

最終報告書

ピグメントオレンジ 16 の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：4187 (115-105)

平成 12 年 7 月 13 日

試験委託者

厚生省 生活衛生局

財団法人

食品農医薬品安全性評価センター

目次

1. 要約.....	3
2. 表題.....	4
3. 試験目的.....	4
11. 被験物質.....	6
12. 試験材料および方法.....	8
13. 試験結果.....	18
14. 考察および結論.....	20
15. 参考文献.....	21

Figures		F-1～6
Figure 1	Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain TA100	F-1
Figure 2	Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain TA1535	F-2
Figure 3	Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain WP2 $uvrA$	F-3
Figure 4	Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain TA98	F-4
Figure 5	Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain TA1537	F-5
Figure 6	Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain TA98 (additional test)	F-6

Tables		T-1 ~5
Table 1	Results of the bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 (1st trial) [direct method : -S9]	T-1
Table 2	Results of the bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 (1st trial) [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 (2nd trial) [direct method : -S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 (2nd trial) [activation method : +S9]	T-4
Table 5	Results of the bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 (additional test) [activation method : +S9]	T-5

1. 要約

本試験条件下において、ピグメントオレンジ 16 には遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

ピグメントオレンジ 16 の変異原性について、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535 および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、ピグメントオレンジ 16 処理では 4.88~5000 μg /プレートのいずれの試験用量においても、ラット肝マイクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照に比べ復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。しかしながら、ピグメントオレンジ 16 のアゾ基の還元により生成される o-ジアニシジンについて Ames 試験陽性との報告があることから、アゾ基の還元を促進する代謝活性化系を用い、TA98 のみの追加試験を実施した。

1.17~300 μg /プレートの用量でピグメントオレンジ 16 の処理を実施した結果、復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、直接法および代謝活性化法での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

2. 表題

ピグメントオレンジ 16 の細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討した。

11. 被験物質

11.1. 被験物質名

ピグメントオレンジ 16
(C.I. Pigment Orange 16)

11.2. ロット番号

11.3. 純度

99 wt%以上

11.4. 提供元

11.5. 保管条件

高温, 火気, 多湿, 水漏れ, 直射日光を避け密封, 室温保管

11.6. 別名

ジスアゾオレンジ

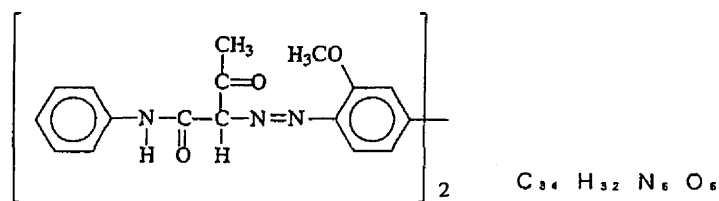
11.7. 化学名

C.I. Pigment Orange 16

11.8. CAS 番号

6505-28-8

11.9. 構造式又は示性式



11.10. 分子量

620.66

11.11. 常温における性状

橙色粉末

11.12. 融点

349°C

11.13. 溶媒に対する溶解度等

水, DMSO, アセトン, メタノール, トルエンに不溶

11.14. 安定性

水, 熱, 光に対して安定

11.15. 取り扱い上の注意

飛散しやすい粉体のため容器の破損に注意し, 適切な保護具を着用して作業するようにした.

11.16. 残余被験物質の処理

被験物質の残余は, 被験物質提供元に返却した.

12. 試験材料および方法

12.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

- | | | | |
|----|---------|-----------------|---------------------|
| a. | ネズミチフス菌 | TA100 | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型) |
| b. | ネズミチフス菌 | TA98 | (ヒスチジン要求性のフレームシフト型) |
| c. | ネズミチフス菌 | TA1535 | (ヒスチジン要求性の塩基対置換型) |
| d. | ネズミチフス菌 | TA1537 | (ヒスチジン要求性のフレームシフト型) |
| e. | 大腸菌 | WP2 <i>uvrA</i> | (トリプトファン要求性の塩基対置換型) |

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受けた。

平成11年6月29日(本試験)および平成11年9月28日(追加試験)に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO:GC用; Merck KGaA; 純度99.7%以上, Lot No. K24605778 830)を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-390AT; 三洋電機メディカシステム株式会社)に保存(-80°C)した。

12.2. 培地の調製

12.2.1. 最少グルコース寒天平板培地（プレート）

テスメディア AN 培地（オリエンタル酵母工業株式会社：平成 11 年 3 月 16 日製造, Lot No. AN180CO【本試験】；平成 11 年 5 月 18 日製造, Lot No. AN280EO【追加試験】）を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 E を含む下記の組成の溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示す。

硫酸マグネシウム・7水塩	0.2	g
クエン酸・1水塩	2	g
リン酸二カリウム・無水塩	10	g
リン酸一アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
精製水	200	mL
<hr/>		
グルコース	20	g
精製水	100	mL
<hr/>		
寒天 (No.1 ; Oxoid Limited ; Lot No. 802436)	15	g
精製水	700	mL

12.2.2. トップアガー（軟寒天）

塩化ナトリウム 0.5% を含む 0.6% 寒天 (Bacto-agar : Difco Laboratories ; Lot No. 120535JD) 水溶液をオートクレーブで滅菌した後、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン（関東化学株式会社；Lot No. 911S1877）－0.5 mmol/L D-ビオチン（関東化学株式会社；Lot No. 811S2086）水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン（関東化学株式会社；Lot No. 608E1385）水溶液を同じく 1 容量加えた。

12.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5% ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No.2 : Oxoid Limited ; Lot No. 028 59365) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した。培養開始までの間冷却ユニット (ECS-1 : 東京理化学器械株式会社) を用いて 4°C に保存し、その後ウォーターバスシェーカー (MM-10 : タイテック株式会社) を用い、37°C で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後直ちに使用した。

ATP フォトメーター (ルミテスター K-100 : キッコーマン株式会社) を用いて計測した生菌数を以下に示した。

試験	試験生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
本試験 1 回目	3.65	3.12	3.82	3.37	2.08
本試験 2 回目	3.34	3.21	3.93	3.24	2.05
追加試験	—	—	—	3.96	—

12.4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のS9 mix (キッコーマン株式会社; Lot No. FSM-400【本試験】, Lot No. FSM-407【追加試験】) を試験に使用した。

12.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を以下に示した。

	本試験	追加試験
a. ロット番号	RAA-400	RAA-407
b. 調製日	平成11年3月25日 (誘導物質投与開始後5日目)	平成11年6月10日
c. 使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系	同左
d. 性/週齢	雄/7週齢	同左
e. 体重	187~232 g	202~239 g
f. 臓器	肝臓	同左
g. 誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	同左
h. 投与量	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目)	
および	60 mg/kg 3回 (2~4日目)	同左
投与回数	BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)	
i. 投与方法	腹腔内投与	同左
j. 蛋白含量	24.20 mg/mL	25.30 mg/mL

12.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

12.5. 被験物質液の調製

最も懸濁性の良好であった DMSO (Merck KGaA ; Lot No. K24605778 830 【本試験】, K24605778 909 【追加試験】) に本被験物質を懸濁させ調製原液とした。この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO を被験物質の調製に使用した。

12.6. 対照群

12.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒で試験した。

12.6.2. 陽性対照

陽性対照として以下の物質を使用した。各陽性対照物質は DMSO (Lot No. K24605778 830 【本試験】, K24605778 909 【追加試験】) を用いて溶解し、500 あるいは 1000 μL ずつ小分けした後、凍結保存 (-20°C) したものを試験に使用した。

AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド
(和光純薬工業株式会社 ; 純度 98.0~102.0% ; Lot No. PAN0050)

NaN_3 アジ化ナトリウム
(和光純薬工業株式会社 ; 純度 99.0%以上 ; Lot No. TPR1596)

9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩
(Aldrich Chemical Co., Inc. ; 純度 98.0% ; Lot No. AQ08326HN)

2-AA 2-アミノアントラセン
(和光純薬工業株式会社 ; 純度 90.0%以上 ; Lot No. DLH6052)

《直接法》

a.	AF-2	0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	AF-2	0.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	NaN_3	0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	9-AA	80 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	AF-2	0.01 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

《代謝活性化法》

a.	2-AA	1.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	2-AA	0.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	2-AA	2.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	2-AA	2.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	2-AA	10.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i>)

なお、これらの試験用量は労働省安全衛生部化学物質調査課編「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインとGLP」に準じて設定した。

12.6.3. 無菌試験

被験物質液（調製原液）ならびに S9 mix について無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μL あるいは S9 mix 500 μL にトッパアガーをそれぞれ 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。

調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

ピグメントオレンジ 16 調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

12.7. 復帰突然変異試験

12.7.1. 試験用量

1枚のプレートを用いて実施した予備的な試験の結果を以下に示す。

試験用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	S9 Mix	復帰突然変異コロニー数				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
0	-	94	10	23	13	7
19.5	-	89	13	14	14	5
78.1 #	-	89*	10*	18	17*	2*
313 #	-	92*	10*	19	19*	4*
1250 #	-	79 [?]	8 [?]	16 [?]	8 [?]	3 [?]
0	+	95	13	15	26	8
19.5	+	117	13	23	14	14
78.1	+	118*	8*	20	31*	15*
313 #	+	80*	11*	28	21*	6*
1250 #	+	86 [?]	6 [?]	23 [?]	20 [?]	9 [?]

*：菌の生育阻害が認められた。 #：被験物質の析出あるいは残存が認められた。

[?]：被験物質の残存のため、背景菌の観察は不可能であった。

78.1~313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ において直接法、代謝活性化法のサルモネラ菌については試験菌株に対する生育阻害作用が観察されたが、1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ においては被験物質の残存のため、背景菌の観察は不可能であった。また、復帰突然変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。なお、コロニー計数時において、直接法の78.1 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で膜状の析出物が認められた。また、被験物質液の懸濁処理のため、直接法および代謝活性化法では313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で被験物質の残存が認められた。直接法および代謝活性化法の全用量でプレート表面がオレンジ色を呈していた。

本結果を基に、本試験においては以下に示した用量を最高用量とし、それぞれ7~8用量（公比2）を設定した。

用量当たり3枚のプレートを用いた。

試験系	最高用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
直接法	313	313	5000	313	313
代謝活性化法	313	313	5000	313	313

12.7.2. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ L、次いで直接法の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ L、代謝活性化法の場合、S9 mix を 500 μ L 分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液を 100 μ L 加えた後、振盪恒温器 (M-100^N: タイテック株式会社) を用いて 37°C で 20 分間振盪 (プレインキュベーション) した。振盪終了後、トッパガーを 2 mL 添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器を用いて 37°C の条件で 48 時間各プレートを培養した。再現性を確認するため、本試験を独立して 2 回実施した。

12.7.3. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株の生育状態について実体顕微鏡 ($\times 60$) を用いて観察した。さらに被験物質の沈殿状態を肉眼で観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計測した。計測に際しては、コロニーアナライザー (CA-11; システムサイエンス株式会社) を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。なお、直接法ならびに代謝活性化法の 1250 μ g/プレート以上の用量で被験物質の残存によりコロニーアナライザーの使用が不適当と判断されたため、目視でコロニーを計数した。

12.8. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ 2 倍以上の増加を示し、かつ再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

12.9. 復帰突然変異試験（追加試験）

復帰突然変異試験において、陰性結果が得られたため、アゾ結合の還元を促進する代謝活性化系を用いて追加試験を実施した。但し、試験菌株は TA98 のみ使用した。

12.9.1. ハムスター S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 (オリエンタル酵母工業株式会社; Lot No. Ham991004) を試験に使用した。S9 の調製 (調製日: 1999 年 10 月 4 日) には、動物種をハムスター (Slc: Syrian 系) とし、12 週齢の雄の肝臓を用い、酵素誘導はしなかった。なお、蛋白含量は 21.3 mg/mL であった。コファクター (S9 以外の) 溶液をフィルター (孔径 0.2 μm ; Gelman Science 社) 濾過除菌した後、S9 を所定量混合した。ハムスター S9 mix の組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.3 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	20 μmol
G-6-P 脱水素酵素	2.8 unit
NADH	2 μmol
NADP	4 μmol
フラビンモノヌクレオチドナトリウム	2 μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

12.9.2. 試験用量

復帰突然変異試験 (本試験 1 回目, 2 回目) の結果を参考にし、追加試験の用量を設定した。生育阻害が認められる用量を高用量となるように、9 用量 (公比 2) を設定した。用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

12.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間

試験管に使用溶媒あるいは被験物質液 100 μ L, 次いでハムスター S9 mix を 500 μ L 分注した。さらに前培養した試験菌株懸濁液 100 μ L を加えた後, 振盪恒温器 (M-100[®]: タイテック株式会社) を用いて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間プレインキュベーションした。試験菌株の状態をチェックするために, 使用溶媒および陽性対照物質溶液については, さらに 12.7.2.記載の方法に従い処理を実施した。培養終了後, トップアガー 2 mL を添加し, 内容物を混合した。その後, 混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器を用い, 37 $^{\circ}$ C の条件で 48 時間各プレートを培養した。

12.9.4. コロニー数計測

12.7.3.記載の方法に従った。

12.9.5. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数がハムスター S9 mix を用いた陰性対照のほぼ 2 倍以上に増加し, かつ被験物質の用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

13. 試験結果

13.1. 試験結果 (1回目)

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した。

ピグメントオレンジ 16 処理群の場合、直接法、代謝活性化法のサルモネラ菌の高用量群において試験菌株に対する生育阻害作用が観察されたが、大腸菌の 1250 µg/プレート以上では被験物質の残存のため、背景菌の観察は不可能であった。復帰突然変異コロニー数は、各試験菌株のいずれの用量においても陰性対照と同等の値であり、増加傾向は認められなかった。

一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、陰性対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。

なお、コロニー計数時において、直接法の 9.77 µg/プレート以上および代謝活性化法の 19.5 µg/プレート以上でプレート表面がオレンジ色を呈していた。また、直接法の 39.1 µg/プレート以上で膜状の析出物が認められた。さらに、被験物質液の懸濁処理のため直接法では 156 µg/プレート以上、代謝活性化法では 78.1 µg/プレート以上の用量で被験物質の残存が認められた。

13.2. 試験結果 (2回目)

試験結果を Figure 1~5 および Table 3, 4 に示した。

被験物質処理群の場合、直接法、代謝活性化法ともサルモネラ菌の高用量群で試験菌株に対する生育阻害作用が観察されたが、いずれの菌株においても復帰突然変異コロニー数の増加傾向は認められなかった。なお、大腸菌では 1 回目の試験結果と同じ用量で、背景菌の観察は不可能であった。

一方、陽性対照物質は各試験菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。

なお、コロニー計数時において、直接法の 9.77 µg/プレート以上および代謝活性化法の 19.5 µg/プレート以上でプレート表面がオレンジ色を呈していた。また、直接法の 39.1 µg/プレート以上で膜状の析出物が認められた。さらに、被験物質液の懸濁処理のため直接法では 156 µg/プレート以上、代謝活性化法では 78.1 µg/プレート以上の用量で被験物質の残存が認められた。

以上、2 回繰り返し実施した本試験において、直接法および代謝活性化法の両試験系とも再現性が確認された。

13.3. 試験結果（追加試験）

結果を Figure 6 および Table 5 に示した。

被験物質処理群の場合，最高用量群においてのみ試験菌株（TA98）に対する生育阻害作用が観察された。しかしながら，復帰突然変異コロニー数は，いずれの用量においてもハムスター-S9 mix を用いた陰性対照と同等の値であり，増加傾向は認められなかった。

一方，陽性対照物質はそれぞれの菌株において，陰性対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。

なお，コロニー計数時において，37.5 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上でプレート表面がオレンジ色を呈していた。また，被験物質液の懸濁処理のため 75.0 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で被験物質の残存が認められた。

14. 考察および結論

ピグメントオレンジ 16 の変異原性、すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、微生物（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

最高用量として 5000 μg /プレートまで検討した。その結果、ピグメントオレンジ 16 処理群では直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照と比較し復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

本被験物質（ピグメントオレンジ 16）の変異原性に関する報告はなかったが、本被験物質のアゾ基の切断時に生成される化学物質である *o*-ジアニシジンについては Ames 試験で陽性¹⁾、*in vivo* 染色体異常試験で陽性²⁾との報告があった。従って、アゾ基の還元を促進する代謝活性化系を用い、TA98 のみの追加試験を実施した。その結果、1.17~300 μg /プレートのすべての用量においてハムスター S9 mix を用いた陰性対照と比較し復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、ピグメントオレンジ 16 と類似構造を示す 3,3'-ジクロロベンジジンの誘導体であるピグメントイエロー 12 については、アゾ基の還元を促進する代謝活性化系を用いた Ames 試験で陰性との報告³⁾があった。ピグメントイエロー 12 の特徴は、水やあらゆる有機溶媒に対して不溶であり、ピグメントオレンジ 16 も同様の溶解性を示した。従って、アゾ化合物の不溶性が、アゾ基の還元を妨害になっているものと推察される。また、ピグメントイエロー 12 を経口投与されたラットおよびマウスは、発ガンしなかったとの報告³⁾もあることから、不溶性アゾ化合物は、生体内においても十分なアゾ基の還元が行われないものと思われる。

なお、陰性対照群あるいは陽性対照群でのコロニー数はいずれも当施設での背景データの範囲内であり、本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、本試験条件下においてピグメントオレンジ 16 の微生物に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

15. 参考文献

- 1) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修：労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集，社団法人 日本化学物質安全・情報センター，1996.
- 2) You, Z., Brezzell, M. D., Das, S. K., Espadas-Torre, M. C., Hooberman, B. H., Sinsheimer, J. E. : *Mutat. Res.* 319(1), 19-30, 1993.
- 3) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Peiperl, M. D. and Vaughan, V. L. : *Mutat. Res.* 136, 33-47, 1984.

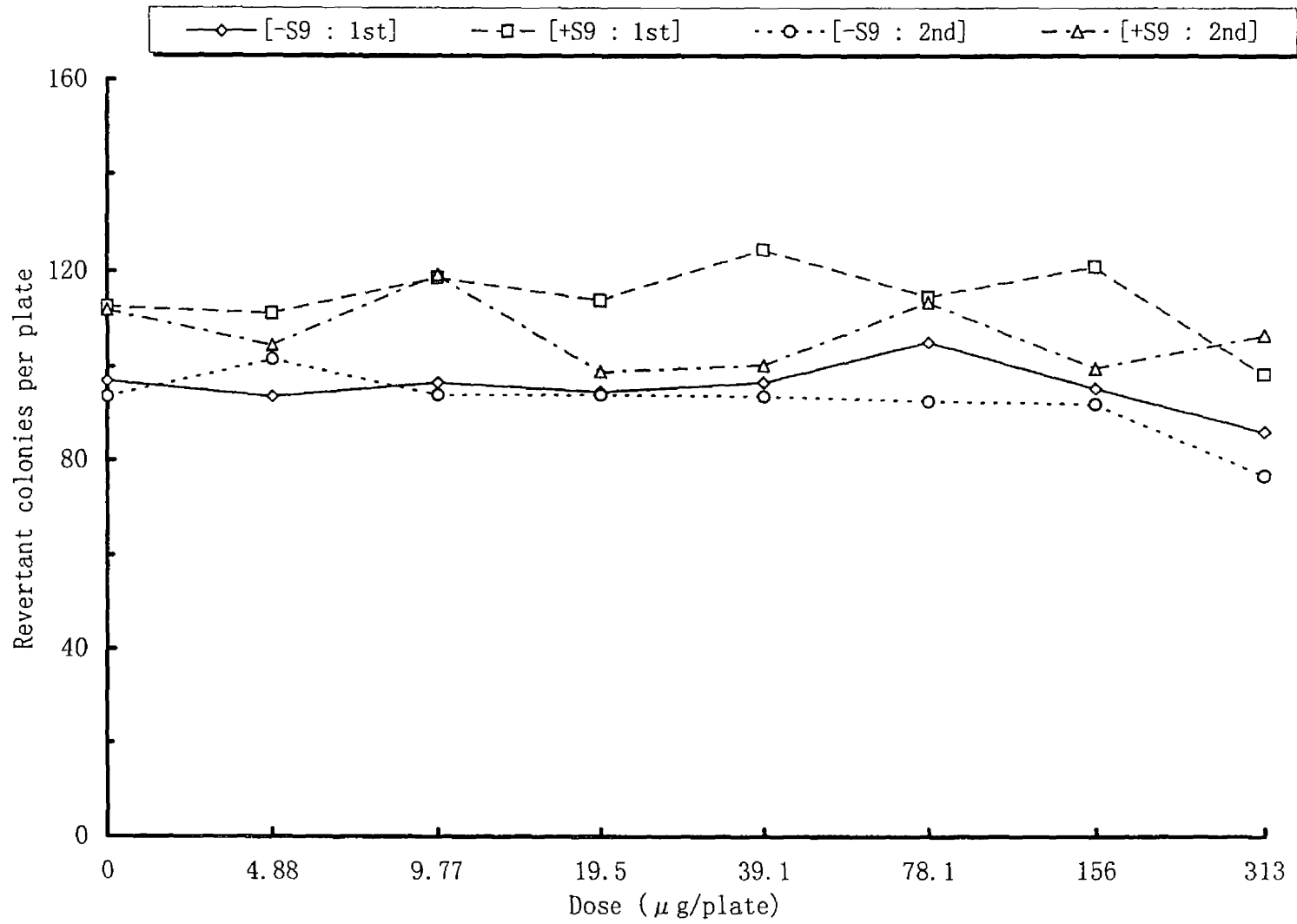


Figure 1. Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain TA100

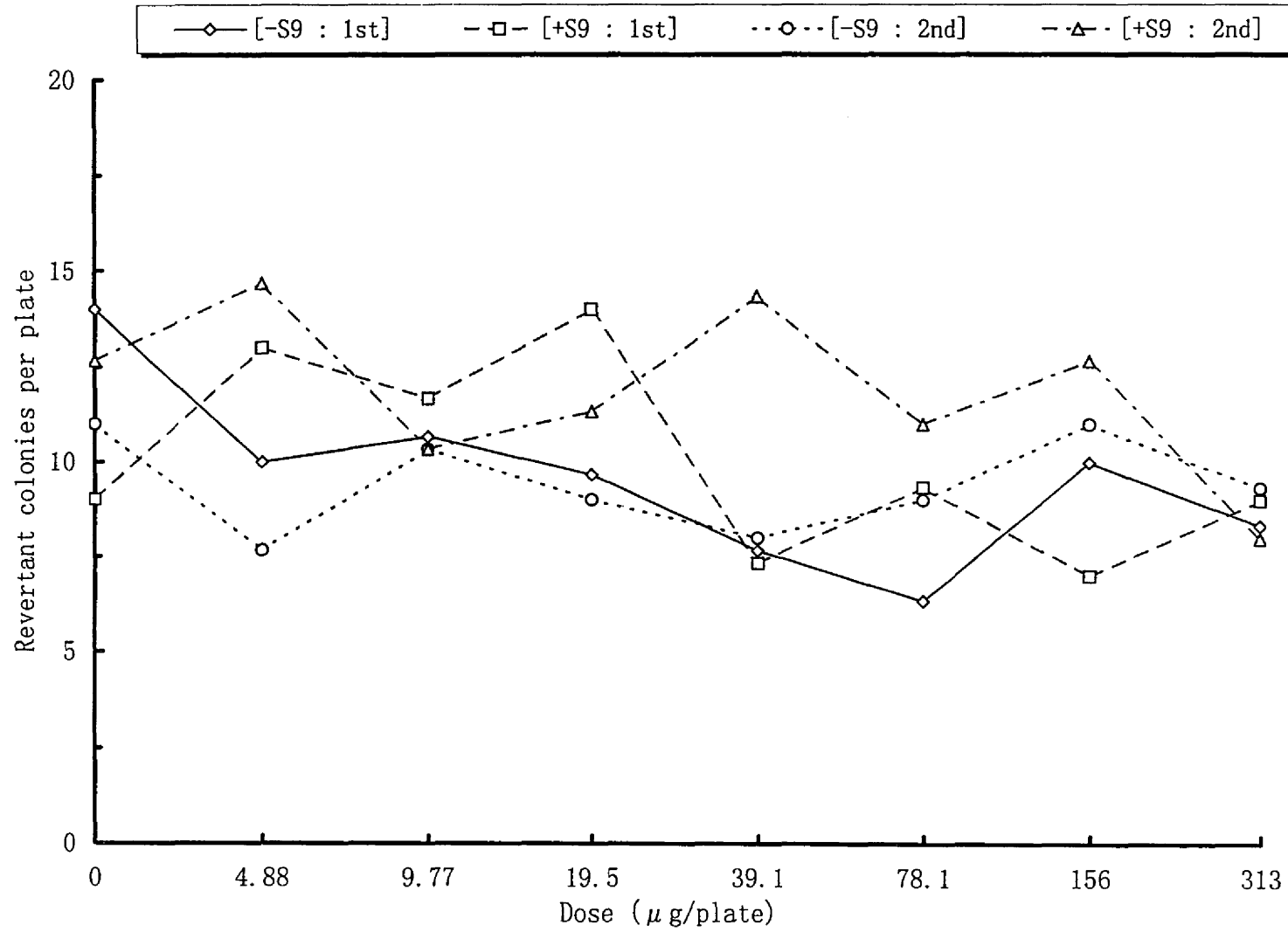


Figure 2. Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain TA1535

F-3

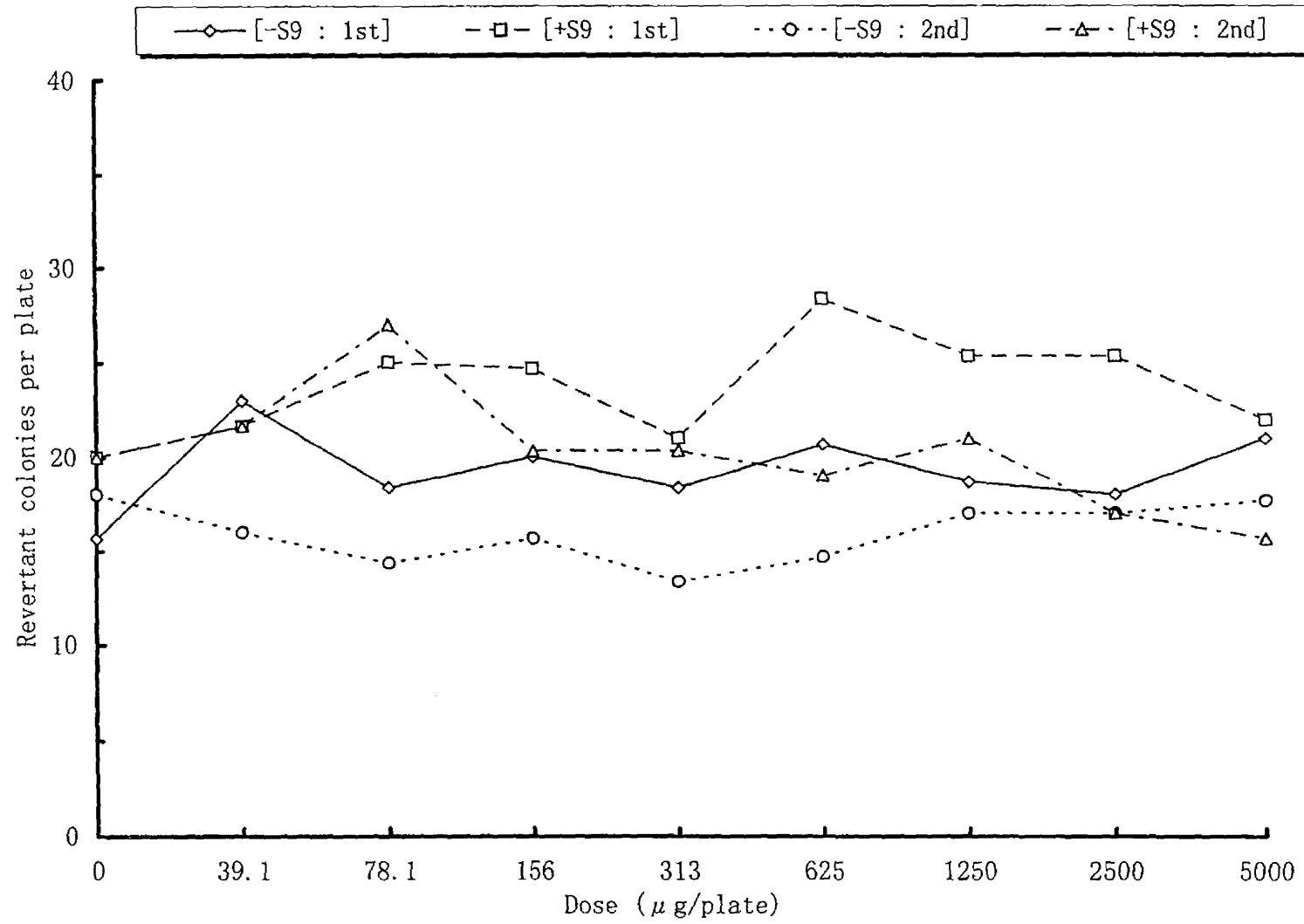


Figure 3. Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain WP2uvrA

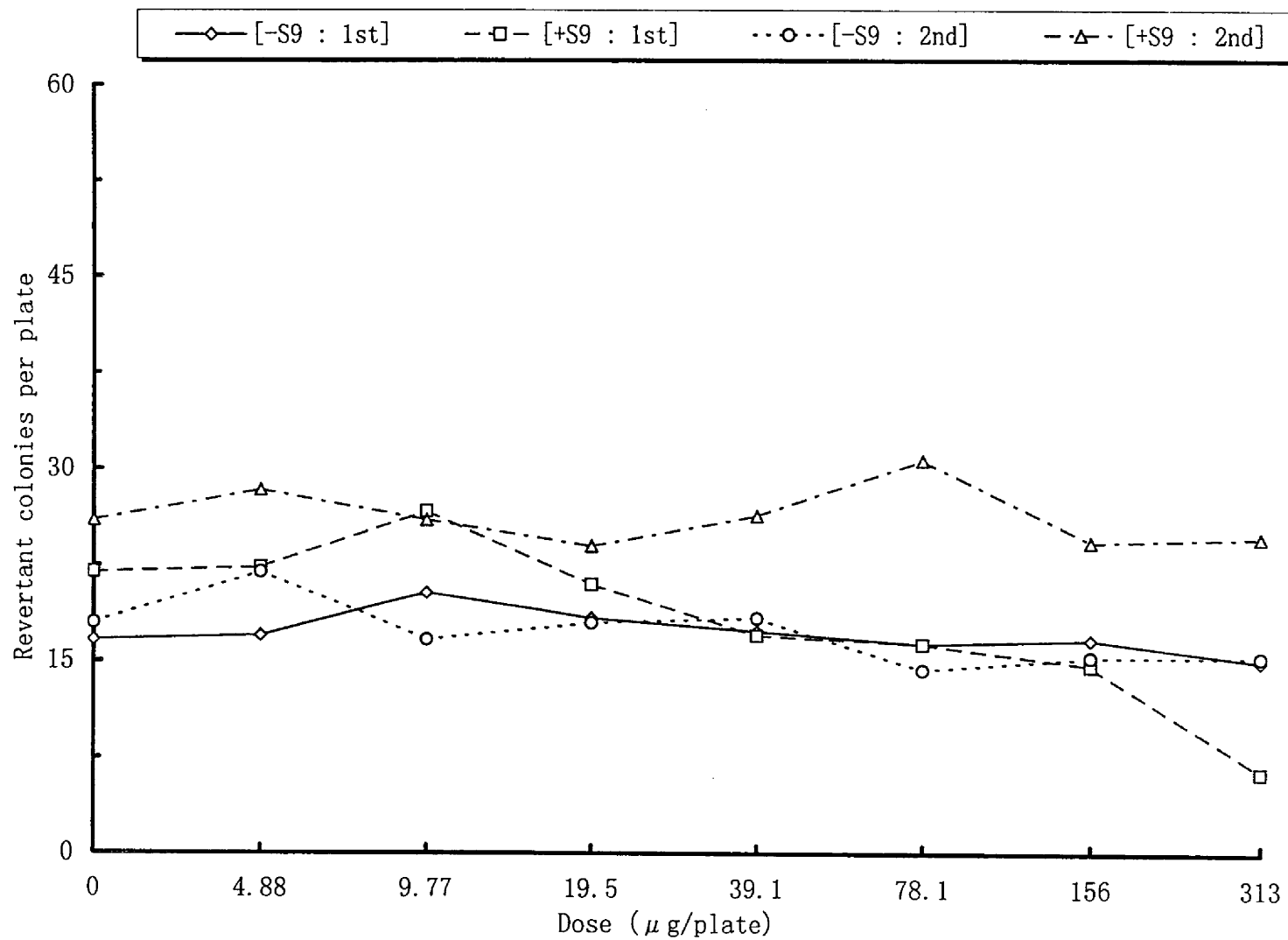


Figure 4. Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain TA98

F-5

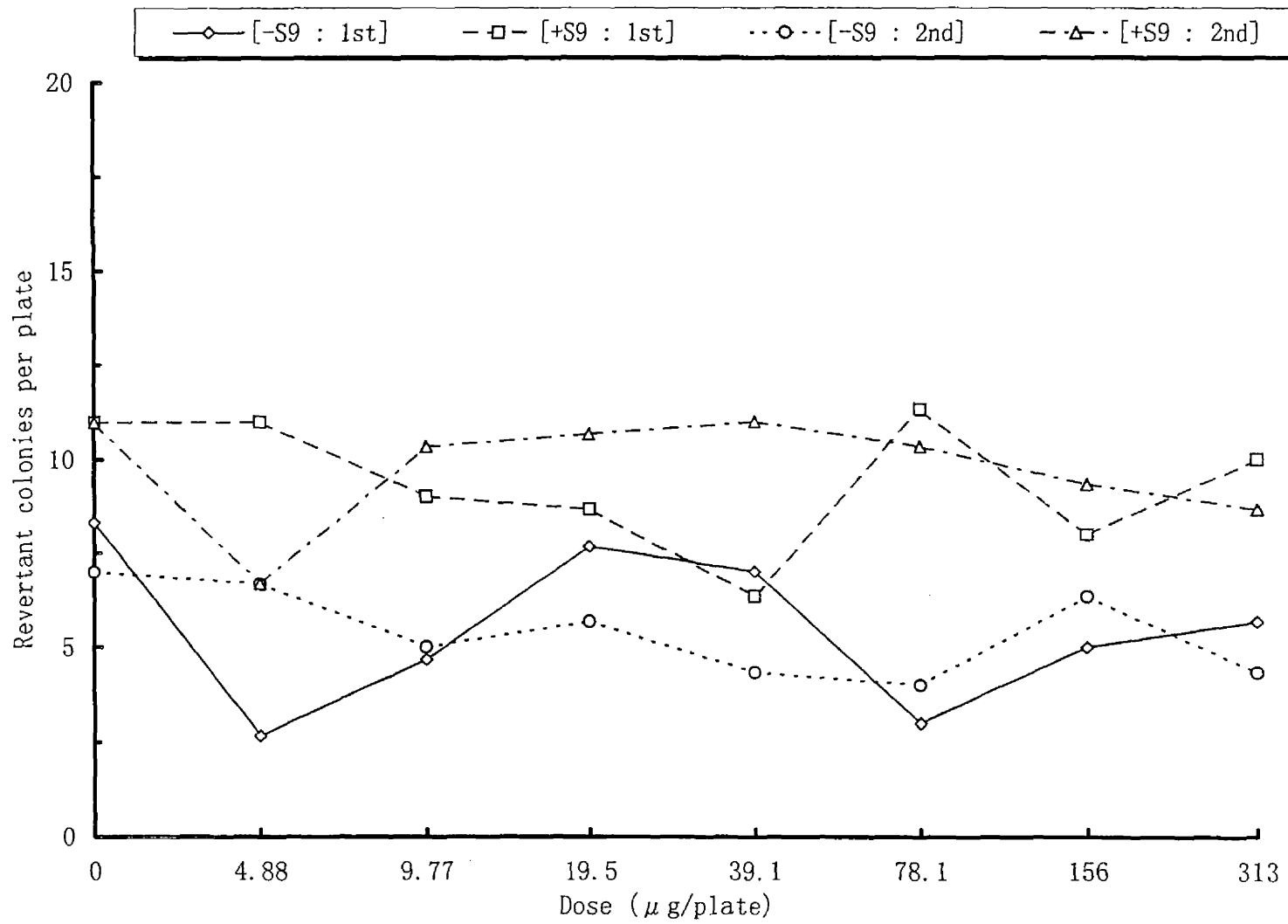


Figure 5. Bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 in strain TA1537

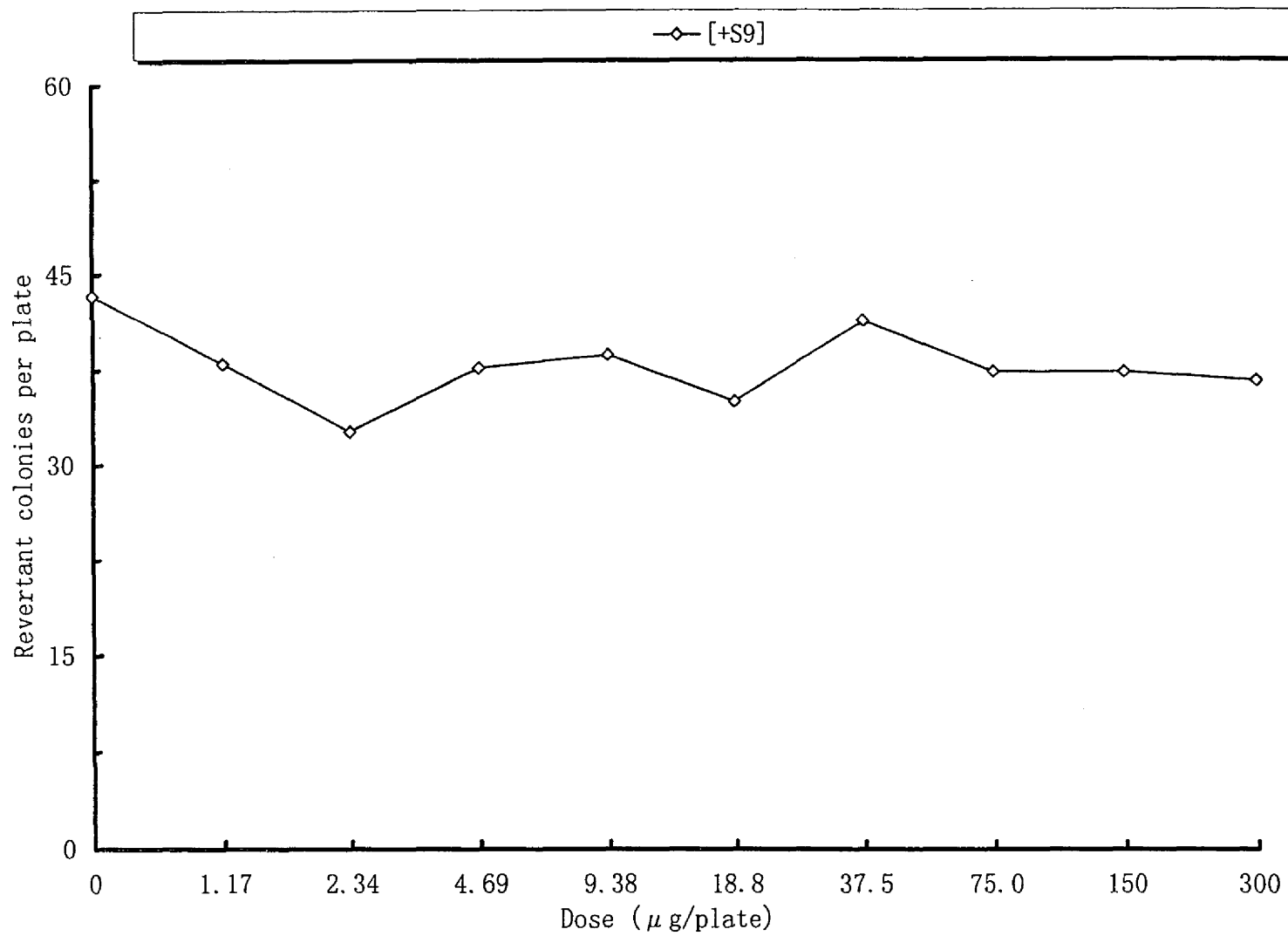


Figure 6. Bacterial reversion test of C. I. Pigment Orange 16 in strain TA98 (additional test)

Table 1. Results of the bacterial reversion test of C. I. Pigment Orange 16 (1st trial)
[direct method : -S9]

Exp. No. 4187 (115-105)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 $uvrA$			TA98			TA1537		
Test substance	0	100	95	96	17	12	13	15	16	16	18	15	17	9	4	12
		[97 \pm 3]		[14 \pm 3]		[16 \pm 1]		[17 \pm 2]		[8 \pm 4]						
	4.88	90	94	97	8	9	13				13	17	21	2	3	3
		[94 \pm 4]		[10 \pm 3]				[17 \pm 4]		[3 \pm 1]						
	9.77	104	86	100	10	13	9				23	17	21	4	3	7
		[97 \pm 9]		[11 \pm 2]				[20 \pm 3]		[5 \pm 2]						
	19.5	92	90	102	8	9	12				20	19	16	10	8	5
		[95 \pm 6]		[10 \pm 2]				[18 \pm 2]		[8 \pm 3]						
	39.1 #	100	97	93	7	6	10	24	25	20	20	16	16	5	10	6
		[97 \pm 4]		[8 \pm 2]				[23 \pm 3]		[17 \pm 2]		[7 \pm 3]				
78.1 #	96 *	106 *	114 *	9 *	6 *	4 *	19	15	21	15 *	17 *	17 *	3 *	3 *	3 *	
	[105 \pm 9]		[6 \pm 3]				[18 \pm 3]		[16 \pm 1]		[3 \pm 0]					
156 #	94 *	101 *	91 *	7 *	9 *	14 *	21	21	18	15 *	15 *	20 *	5 *	4 *	6 *	
	[95 \pm 5]		[10 \pm 4]				[20 \pm 2]		[17 \pm 3]		[5 \pm 1]					
313 #	94 *	82 *	82 *	7 *	10 *	8 *	23	17	15	13 *	16 *	16 *	6 *	7 *	4 *	
	[86 \pm 7]		[8 \pm 2]				[18 \pm 4]		[15 \pm 2]		[6 \pm 2]					
625 #							17	21	24							
							[21 \pm 4]									
1250 #							21 !	16 !	19 !							
							[19 \pm 3]									
2500 #							18 !	21 !	15 !							
							[18 \pm 3]									
5000 #							22 !	22 !	19 !							
							[21 \pm 2]									
Positive control		443	461	432 a)	406	405	431 b)	116	109	125 a)	606	591	581 c)	394	407	370 d)
		[445 \pm 15]		[414 \pm 15]		[117 \pm 8]		[593 \pm 13]		[390 \pm 19]						

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate
c): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate
* : Growth inhibition was observed # : Test substance was shown at the end of exposure period
! : Condition of the background lawn could not be examined because of the precipitation

T-1

Table 2. Results of the bacterial reversion test of C.I.Pigment Orange 16 (1st trial)
[activation method : +S9]

Exp. No. 4187 (115-105)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	107	121	110	9	9	9	20	23	17	24	22	20	12	13	8
		[113 \pm 7]		[9 \pm 0]		[20 \pm 3]		[22 \pm 2]		[11 \pm 3]						
	4.88	112	103	119	13	16	10				25	23	19	10	13	10
		[111 \pm 8]		[13 \pm 3]				[22 \pm 3]		[11 \pm 2]						
	9.77	112	121	123	9	12	14				26	24	30	9	12	6
		[119 \pm 6]		[12 \pm 3]				[27 \pm 3]		[9 \pm 3]						
	19.5	103	118	121	16	16	10				22	22	19	11	9	6
		[114 \pm 10]		[14 \pm 3]				[21 \pm 2]		[9 \pm 3]						
	39.1	129	117	128	4	9	9	21	24	20	15	16	20	11	3	5
		[125 \pm 7]		[7 \pm 3]		[22 \pm 2]		[17 \pm 3]		[6 \pm 4]						
78.1 #	112 *	111 *	121 *	13	6	9	29	22	24	18 *	16 *	15 *	12 *	10 *	12 *	
	[115 \pm 6]		[9 \pm 4]		[25 \pm 4]		[16 \pm 2]		[11 \pm 1]							
156 #	114 *	118 *	131 *	8 *	5 *	8 *	21	28	25	14 *	17 *	13 *	6 *	10 *	8 *	
	[121 \pm 9]		[7 \pm 2]		[25 \pm 4]		[15 \pm 2]		[8 \pm 2]							
313 #	101 *	97 *	97 *	11 *	8 *	8 *	24	18	21	6 *	6 *	7 *	12 *	8 *	10 *	
	[98 \pm 2]		[9 \pm 2]		[21 \pm 3]		[6 \pm 1]		[10 \pm 2]							
625 #							27	27	31							
							[28 \pm 2]									
1250 #							30 !	23 !	23 !							
							[25 \pm 4]									
2500 #							25 !	24 !	27 !							
							[25 \pm 2]									
5000 #							25 !	22 !	19 !							
							[22 \pm 3]									
Positive control		1020	1042	1018 a)	358	377	372 b)	844	862	869 c)	413	424	413 d)	165	170	165 b)
		[1027 \pm 13]			[369 \pm 10]			[858 \pm 13]			[417 \pm 6]		[167 \pm 3]			

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed # : Test substance was shown at the end of exposure period

! : Condition of the background lawn could not be examined because of the precipitation

T-2

Table 3. Results of the bacterial reversion test of C. I. Pigment Orange 16 (2nd trial)
[direct method : -S9]

Exp. No. 4187 (115-105)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	93	96	92	8	11	14	21	17	16	19	18	17	4	9	8
		[94 \pm 2]		[11 \pm 3]		[18 \pm 3]		[18 \pm 1]		[7 \pm 3]						
	4.88	93	112	100	7	7	9				23	20	23	9	5	6
		[102 \pm 10]		[8 \pm 1]				[22 \pm 2]		[7 \pm 2]						
	9.77	90	102	90	10	7	14				12	20	18	5	5	5
		[94 \pm 7]		[10 \pm 4]				[17 \pm 4]		[5 \pm 0]						
	19.5	94	93	95	9	8	10				15	19	20	4	5	8
		[94 \pm 1]		[9 \pm 1]				[18 \pm 3]		[6 \pm 2]						
	39.1 #	92	103	86	9	10	5	17	14	17	18	18	19	4	4	5
		[94 \pm 9]		[8 \pm 3]				[16 \pm 2]		[18 \pm 1]		[4 \pm 1]				
78.1 #	91 *	91 *	96 *	9 *	12 *	6 *	13	14	16	12 *	16 *	15 *	3 *	5 *	4 *	
	[93 \pm 3]		[9 \pm 3]				[14 \pm 2]		[14 \pm 2]		[4 \pm 1]					
156 #	94 *	83 *	99 *	10 *	13 *	10 *	14	14	19	13 *	20 *	13 *	8 *	6 *	5 *	
	[92 \pm 8]		[11 \pm 2]				[16 \pm 3]		[15 \pm 4]		[6 \pm 2]					
313 #	84 *	75 *	71 *	5 *	13 *	10 *	9	15	16	18 *	15 *	13 *	4 *	6 *	3 *	
	[77 \pm 7]		[9 \pm 4]				[13 \pm 4]		[15 \pm 3]		[4 \pm 2]					
625 #							17	13	14							
							[15 \pm 2]									
1250 #							14 !	18 !	19 !							
							[17 \pm 3]									
2500 #							19 !	17 !	15 !							
							[17 \pm 2]									
5000 #							15 !	17 !	21 !							
							[18 \pm 3]									
Positive control		497	502	485 a)	383	417	409 b)	140	152	139 a)	614	591	627 c)	371	385	412 d)
		[495 \pm 9]			[403 \pm 18]			[144 \pm 7]			[611 \pm 18]			[389 \pm 21]		

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μ g/plate

c): AF-2, 0.1 μ g/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed # : Test substance was shown at the end of exposure period

! : Condition of the background lawn could not be examined because of the precipitation

Table 4. Results of the bacterial reversion test of C.I.Pigment Orange 16 (2nd trial)
[activation method : +S9]

Exp. No. 4187 (115-105)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	101	114	121	15	10	13	18	22	20	30	21	27	9	13	11
		[112 \pm 10]			[13 \pm 3]			[20 \pm 2]			[26 \pm 5]			[11 \pm 2]		
	4.88	106	104	104	17	14	13				33	26	26	10	5	5
		[105 \pm 1]			[15 \pm 2]						[28 \pm 4]			[7 \pm 3]		
	9.77	117	127	114	8	11	12				26	26	26	9	12	10
		[119 \pm 7]			[10 \pm 2]						[26 \pm 0]			[10 \pm 2]		
	19.5	97	96	104	8	13	13				27	24	21	13	10	9
		[99 \pm 4]			[11 \pm 3]						[24 \pm 3]			[11 \pm 2]		
	39.1	99	97	105	13	13	17	20	21	24	25	31	23	11	8	14
		[100 \pm 4]			[14 \pm 2]			[22 \pm 2]			[26 \pm 4]			[11 \pm 3]		
	78.1 #	114	107	120	7 *	13 *	13 *	29	24	28	34 *	32 *	26 *	12 *	12 *	7 *
		[114 \pm 7]			[11 \pm 3]			[27 \pm 3]			[31 \pm 4]			[10 \pm 3]		
	156 #	96 *	98 *	105 *	9 *	17 *	12 *	19	21	21	28 *	22 *	23 *	8 *	10 *	10 *
		[100 \pm 5]			[13 \pm 4]			[20 \pm 1]			[24 \pm 3]			[9 \pm 1]		
	313 #	109 *	105 *	106 *	8 *	9 *	7 *	23	19	19	24 *	25 *	25 *	10 *	7 *	9 *
		[107 \pm 2]			[8 \pm 1]			[20 \pm 2]			[25 \pm 1]			[9 \pm 2]		
	625 #							16	22	19						
								[19 \pm 3]								
	1250 #							22 !	23 !	18 !						
								[21 \pm 3]								
	2500 #							13 !	18 !	20 !						
								[17 \pm 4]								
	5000 #							20 !	13 !	14 !						
								[16 \pm 4]								
Positive control		890	924	904 a)	345	316	335 b)	878	855	856 c)	502	496	512 d)	165	159	162 b)
		[906 \pm 17]			[332 \pm 15]			[863 \pm 13]			[503 \pm 8]			[162 \pm 3]		

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μ g/plate b) : 2-AA, 2 μ g/plate c) : 2-AA, 10 μ g/plate d) : 2-AA, 0.5 μ g/plate
 * : Growth inhibition was observed # : Test substance was shown at the end of exposure period
 ! : Condition of the background lawn could not be examined because of the precipitation

7-1

Table 5. Results of the bacterial reversion test of C.I. Pigment Orange 16 (additional test)
[activation method : +S9 (Hamster S9)]

Exp. No. 4187 (115-105)

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]		
		TA98		
Test substance	0	43 [43 \pm 2]	45 [45 \pm 2]	42 [42 \pm 2]
	1. 17	36 [38 \pm 2]	38 [38 \pm 2]	40 [40 \pm 2]
	2. 34	33 [33 \pm 2]	31 [31 \pm 2]	34 [34 \pm 2]
	4. 69	40 [38 \pm 4]	40 [40 \pm 4]	33 [33 \pm 4]
	9. 38	42 [39 \pm 4]	35 [35 \pm 4]	39 [39 \pm 4]
	18. 8	36 [35 \pm 1]	34 [34 \pm 1]	35 [35 \pm 1]
	37. 5	42 [41 \pm 1]	40 [40 \pm 1]	42 [42 \pm 1]
	75. 0 #	38 [37 \pm 3]	40 [40 \pm 3]	34 [34 \pm 3]
	150 #	34 [37 \pm 3]	40 [40 \pm 3]	38 [38 \pm 3]
	300 #	37 * [37 \pm 2]	38 * [38 \pm 2]	35 * [35 \pm 2]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μ g/plateb): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 0.5 μ g/plate

* : Growth inhibition was observed

: Test substance was shown at the end of exposure period

Compound	Dose (μ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S. D.]		
		TA98		
<Direct method> Test substance	0	16 [16 \pm 3]	18 [18 \pm 3]	13 [13 \pm 3]
Positive control		620 [614 \pm 15]	597 [597 \pm 15]	625 a) [625 \pm 15]
<Activation method : Rat S9> Test substance	0	25 [28 \pm 3]	29 [29 \pm 3]	30 [30 \pm 3]
Positive control		401 [386 \pm 15]	371 [371 \pm 15]	386 b) [386 \pm 15]