

# 最終報告書

C.I. ピグメントイエロー53 の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号：4794 ( 115-136 )

平成13年6月4日

試験委託者  
厚生労働省 医薬局

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
12. 被験物質.....	6
13. 試験材料および方法.....	7
14. 試験結果.....	14
15. 考察および結論.....	15
16. 参考文献.....	16
17. 参考とした資料.....	16

Figures		F-01-10
Figure 1	Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA100	F-01
Figure 2	Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA1535	F-02
Figure 3	Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-03
Figure 4	Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA98	F-04
Figure 5	Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA1537	F-05
Figure 6	Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA100	F-06
Figure 7	Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA1535	F-07
Figure 8	Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain WP2 <i>uvrA</i>	F-08
Figure 9	Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA98	F-09
Figure 10	Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA1537	F-10

Tables		T-1~4
Table 1	Summary data of dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 [non-activation method : -S9]	T-1
Table 2	Summary data of dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 [activation method : +S9]	T-2
Table 3	Results of the bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 [non-activation method : -S9]	T-3
Table 4	Results of the bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 [activation method : +S9]	T-4

## 1. 要約

本試験条件下において、C.I. ピグメントイエロー53 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。

C.I. ピグメントイエロー53 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、C.I. ピグメントイエロー53 処理では 2.29~5000 µg/プレート のいずれの試験用量においても、ラット肝ミクロソーム (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明確な増加は認められなかった。

一方、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下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

C.I. ピグメントイエロー53 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。

## 12. 被験物質

### 12.1. 被験物質名

C.I. ピグメントイエロー53

【C.I. pigment yellow 53】

### 12.2. ロット番号

### 12.3. 純度／含量

100 wt%

### 12.4. 化学分析値

TiO<sub>2</sub> : 81.2%

Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> : 12.22%

NiO : 3.54%

### 12.5. 提供元

### 12.6. 一般名

チタンイエロー

### 12.7. 化学名

チタン, アンチモン, ニッケルの複合酸化物

### 12.8. 構造式又は示性式

(Ti, Sb, Ni) O<sub>2</sub>

### 12.9. 物質の状態

黄色固体

### 12.10. 溶解性

水, アセトン, DMSO に不溶

### 12.11. 残余被験物質の処理

被験物質の一部を保管した後, 残りは被験物質提供元に返却した.

### 12.12. CAS No.

8007189

### 13. 試験材料および方法

#### 13.1. 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 *uvrA* (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日に国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。

平成12年6月20日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 803)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-U71V;三洋電機メディカシステム株式会社)に保存(-80℃)した。

#### 13.2. 培地の調製

##### 13.2.1. 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12年5月25日製造, Lot No. ANI330EP)を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地Eを含む組成の溶液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
グルコース	20	g
寒天 (伊那寒天 BA-30A ; Lot No. 90705)	15	g
精製水	1000	mL

### 13.2.2. トップアガー (軟寒天)

塩化ナトリウム 0.5 w/v% および寒天 (Bacto-agar : Difco Laboratories ; Lot No. 120535JD) 0.6 w/v% を含む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.

### 13.3. 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 w/v% 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  $\mu$ 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速やかに使用した.



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
用量設定試験	3.88	3.56	4.19	2.93	1.85
本試験	3.27	3.17	3.79	3.64	1.68

#### 13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社; Lot No. FSM-427) を試験に使用した。

##### 13.4.1. 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。

ロット番号	RAA-427
調製日	平成 12 年 5 月 26 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	205~246 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF)
投与量および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF: 80 mg/kg 1 回 (3 日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	26.76 mg/mL

## 13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す.

S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	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

## 13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水, DMSO, アセトンに不溶であるが, 水中での分散性が良好であるため, 被験物質を注射用水 (株式会社大塚製薬工場; Lot No. K9G83) に懸濁し, 調製原液とした. この調製原液を使用溶媒を用いて順次希釈した後, 速やかに処理を行った.

## 13.6. 対照群

## 13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒で試験した.

## 13.6.2. 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 909) を用いて溶解し, 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<sub>3</sub> 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. 03024JR)

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)

## 《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》

a.	AF-2	0.01 $\mu\text{g}$ /プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	AF-2	0.1           〃	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	$\text{NaN}_3$	0.5           〃	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	9-AA	80           〃	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	AF-2	0.01       〃	(大腸菌：WP2 <i>uvrA</i> )

## 《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

a.	2-AA	1 $\mu\text{g}$ /プレート	(ネズミチフス菌：TA100)
b.	2-AA	0.5           〃	(ネズミチフス菌：TA98)
c.	2-AA	2           〃	(ネズミチフス菌：TA1535)
d.	2-AA	2           〃	(ネズミチフス菌：TA1537)
e.	2-AA	10           〃	(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。

## 13.6.3. 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  $\mu\text{L}$  あるいは S9 mix 500  $\mu\text{L}$  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。

C.I. ピグメントイエロー53 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。

### 13.7. 用量設定試験 (予備試験)

#### 13.7.1. 試験用量

5000, 1667, 556, 185, 61.7, 20.6, 6.86 および 2.29  $\mu\text{g}$ /プレートの 8 用量 (公比 3) を設定した。

#### 13.7.2. 使用プレート数および識別

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

試験菌株の別, S9 mix の有無および試験用量を明記することにより各プレートを識別した。

#### 13.7.3. 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, 被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100  $\mu\text{L}$ , 次いで代謝活性化系非存在下 (-S9 mix) の場合, 0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500  $\mu\text{L}$ , 代謝活性化系存在下 (+S9 mix) の場合, S9 mix を 500  $\mu\text{L}$  分注した。さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100  $\mu\text{L}$  を加えた後, 振盪恒温器 (M-100<sup>N</sup>: 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, トップアガーを 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。

#### 13.7.4. 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 (背景菌) 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。

**13.8. 復帰突然変異試験****13.8.1. 試験用量**

用量設定試験結果を基に、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6用量（公比2）を設定した。

試験系	最高用量 (µg/プレート)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
代謝活性化系 非存在下	5000	5000	5000	5000	5000
代謝活性化系 存在下	5000	5000	5000	5000	5000

**13.8.2. 使用プレート数および識別**

13.7.2.に準じた。

**13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養時間**

13.7.3.に準じた。

**13.8.4. コロニー数計測**

13.7.4.に準じた。

**13.9. 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。

## 14. 試験結果

### 14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した.

C.I. ピグメントイエロー53 処理での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明確な増加傾向は認められなかった. また, 各試験菌株のいずれの処理群においても, 生育阻害作用は観察されなかった.

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.

### 14.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

コロニー計数時, 被験物質の懸濁処理のため両試験系 1667  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量でプレート表面に被験物質の残存が観察された.

### 14.3. 復帰突然変異試験

試験結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示した.

被験物質処理群の場合, 代謝活性化系非存在下, 代謝活性化系存在下ともいずれの菌株においても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. また, 各試験菌株のいずれの処理群においても, 試験菌株に対する生育阻害作用が観察されなかった.

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.

### 14.4. 被験物質の析出等 (復帰突然変異試験)

コロニー計数時, 被験物質の懸濁処理のため両試験系 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量でプレート表面に被験物質の残存が観察された.

以上, 用量設定試験および復帰突然変異試験において, 代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下の両試験系とも再現性が確認された.

## 15. 考察および結論

C.I. ピグメントイエロー53 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  $\mu\text{g}$ /プレートの用量まで検討した。その結果，C.I. ピグメントイエロー53 処理群では代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下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明確な増加は認められなかった。

また，本被験物質 C.I. ピグメントイエロー53 の変異原性に関する報告はなかった。本被験物質の構成物質である酸化アンチモン（Ⅲ）は枯草菌胞子を用いたレック アッセイで陽性<sup>1)</sup>，TA100 および TA98 を用いた Ames 試験では陰性<sup>1)</sup>，V79 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験（SCE）では陽性<sup>1)</sup>との報告があった。酸化アンチモン（Ⅲ）の類縁体である塩化アンチモン（Ⅲ）は V79 細胞を用いた小核試験は陽性<sup>2)</sup>，V79 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験（SCE）では陽性<sup>1)</sup>との報告があった。

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 C.I. ピグメントイエロー53 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。

16. 参考文献

- 1) Kuroda K., Endo G., Okamoto A., Yoo S. Y., Horiguchi S. : *Mutat. Res.*, 264(4) : 163-170, (1991).
- 2) Gebel T. : *Mutat. Res.*, 412(3) : 213-218, (1998).



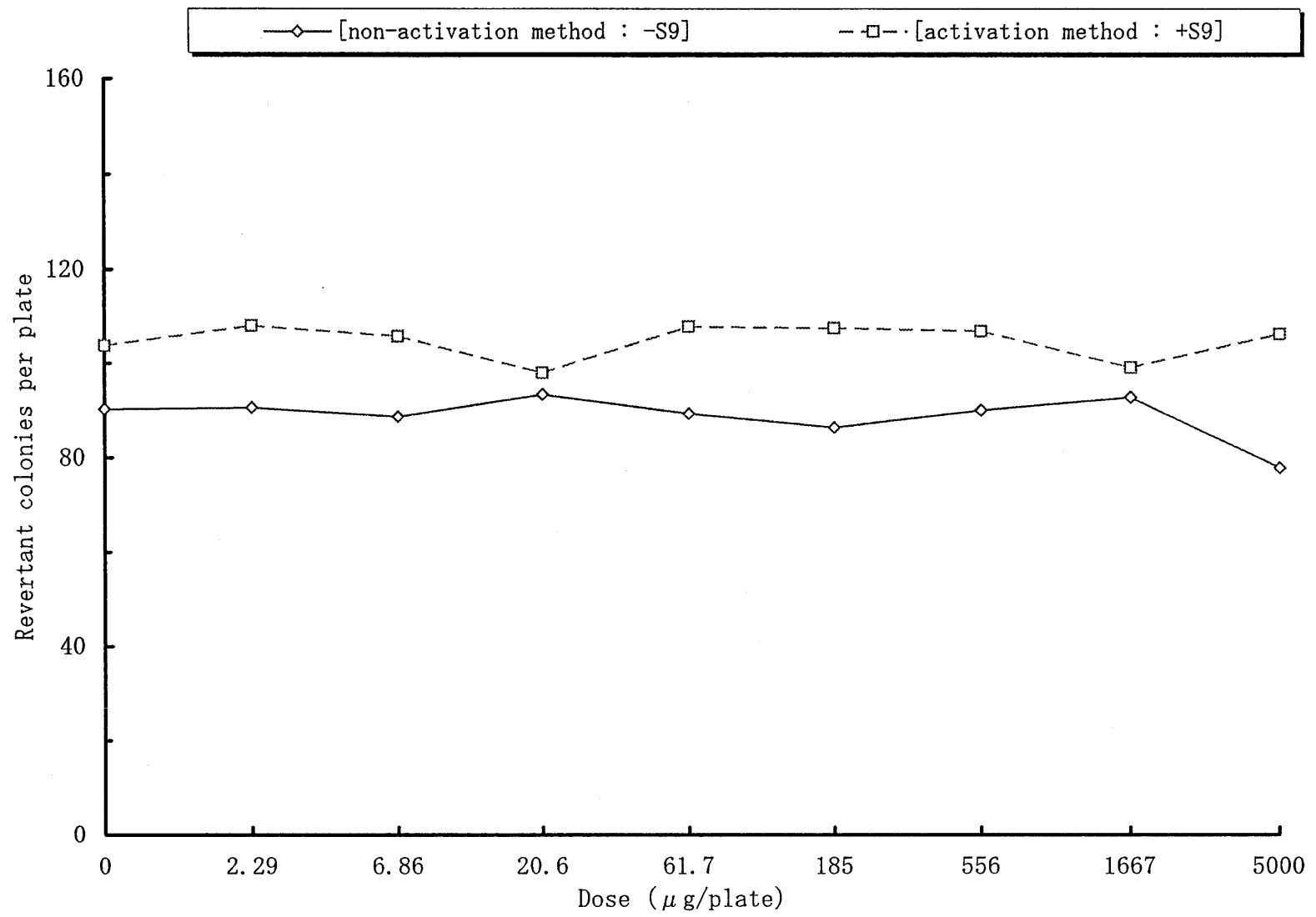


Figure 1. Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA100

F-01

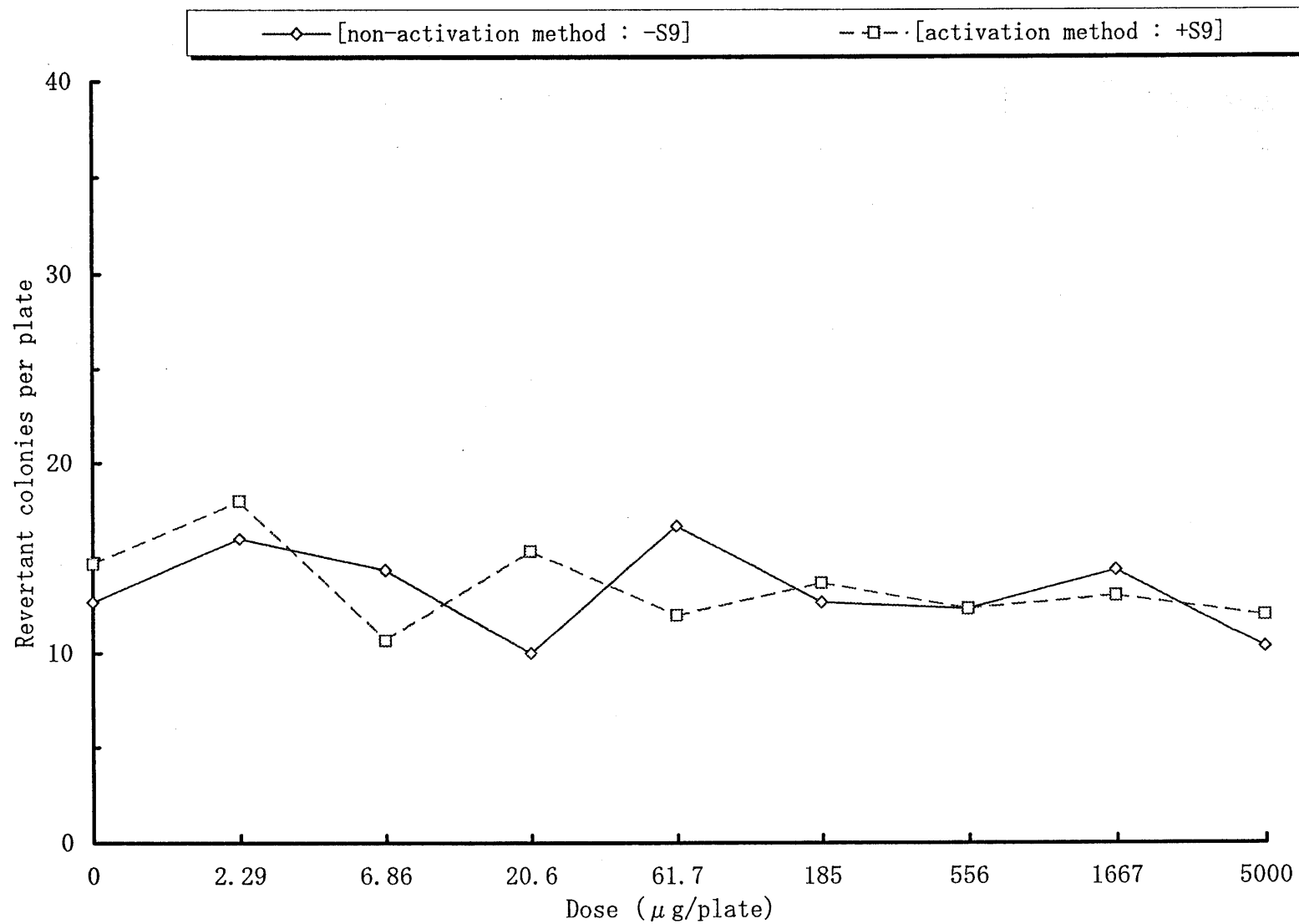


Figure 2. Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA1535

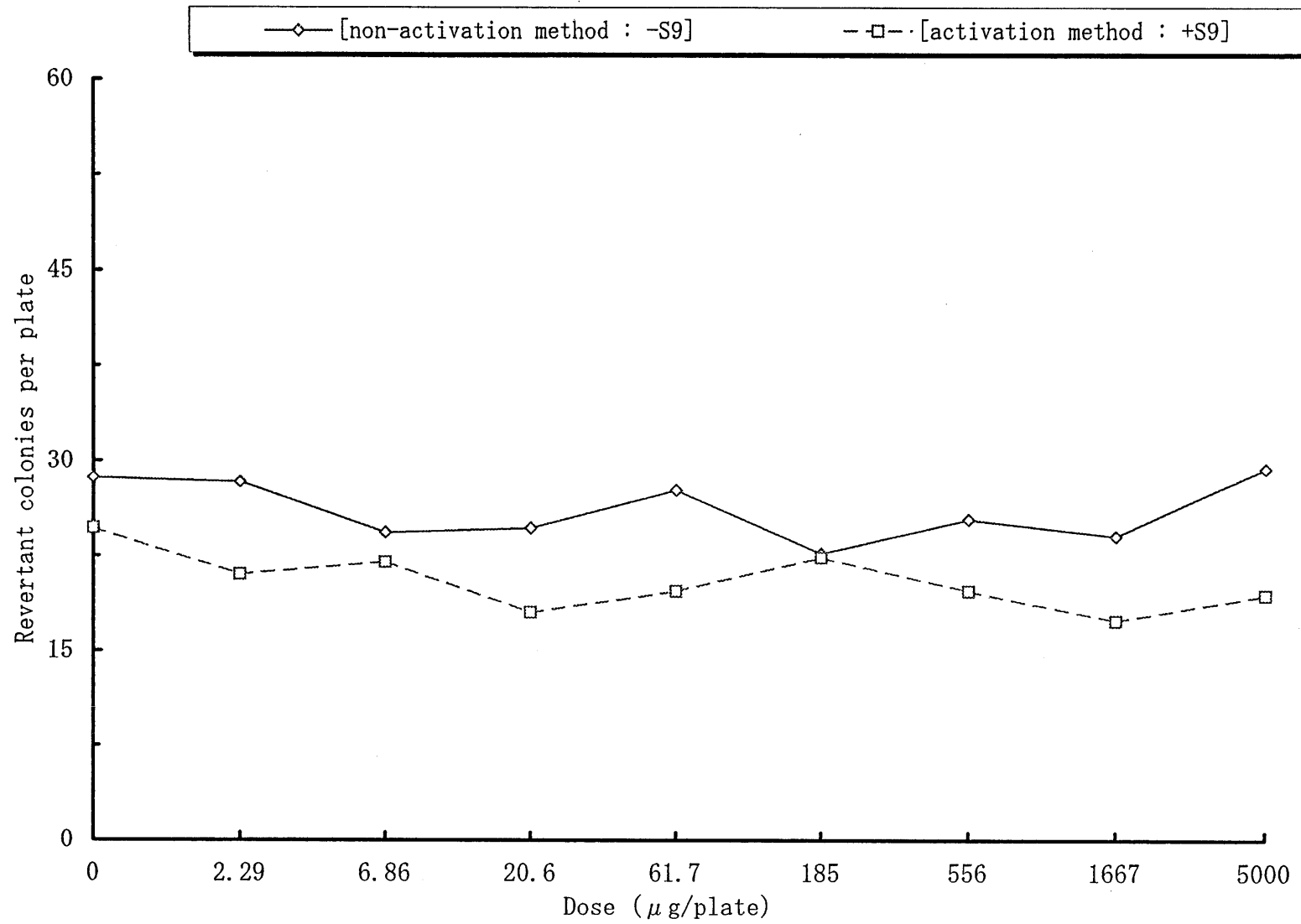


Figure 3. Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain WP2uvrA

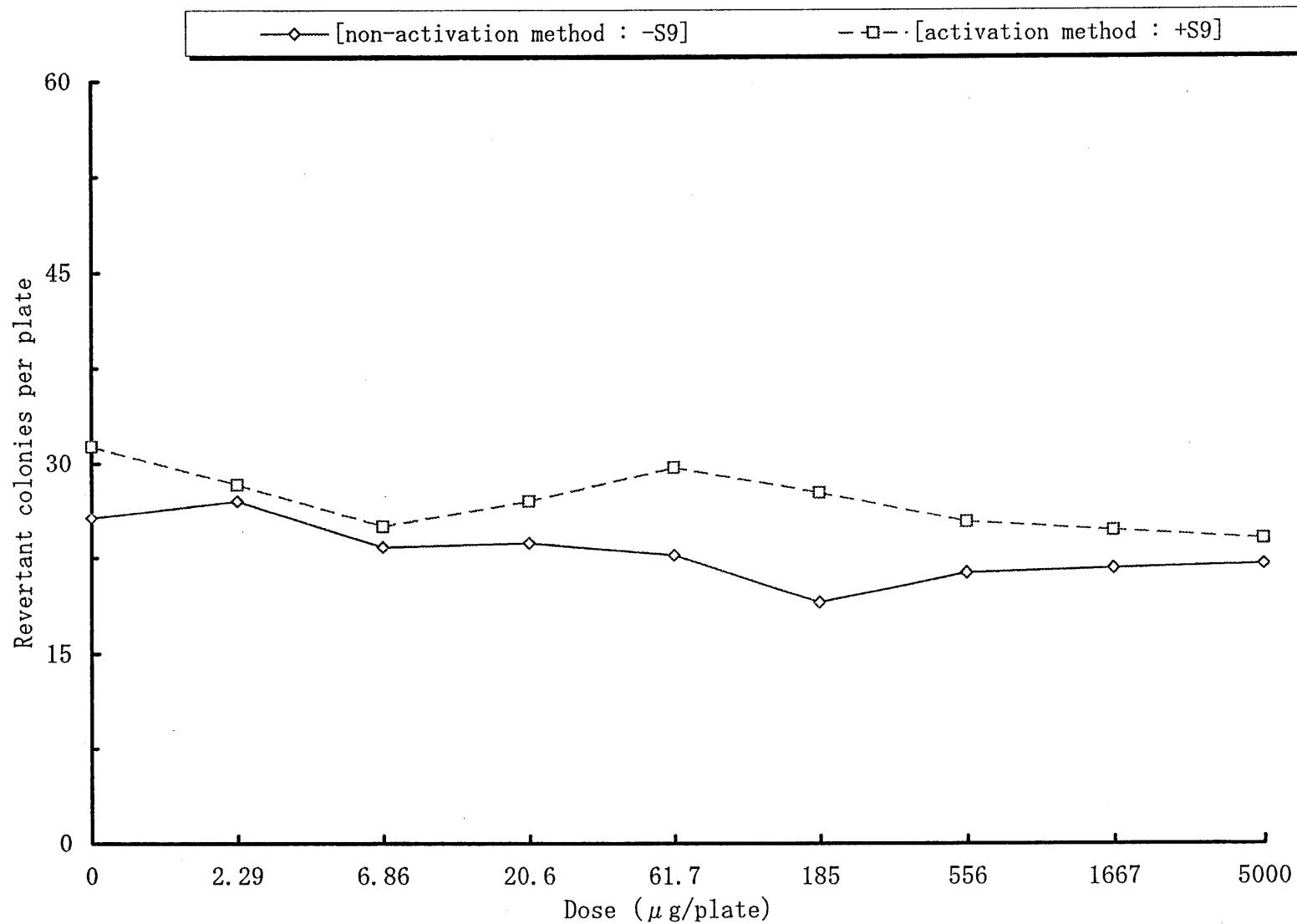


Figure 4. Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA98

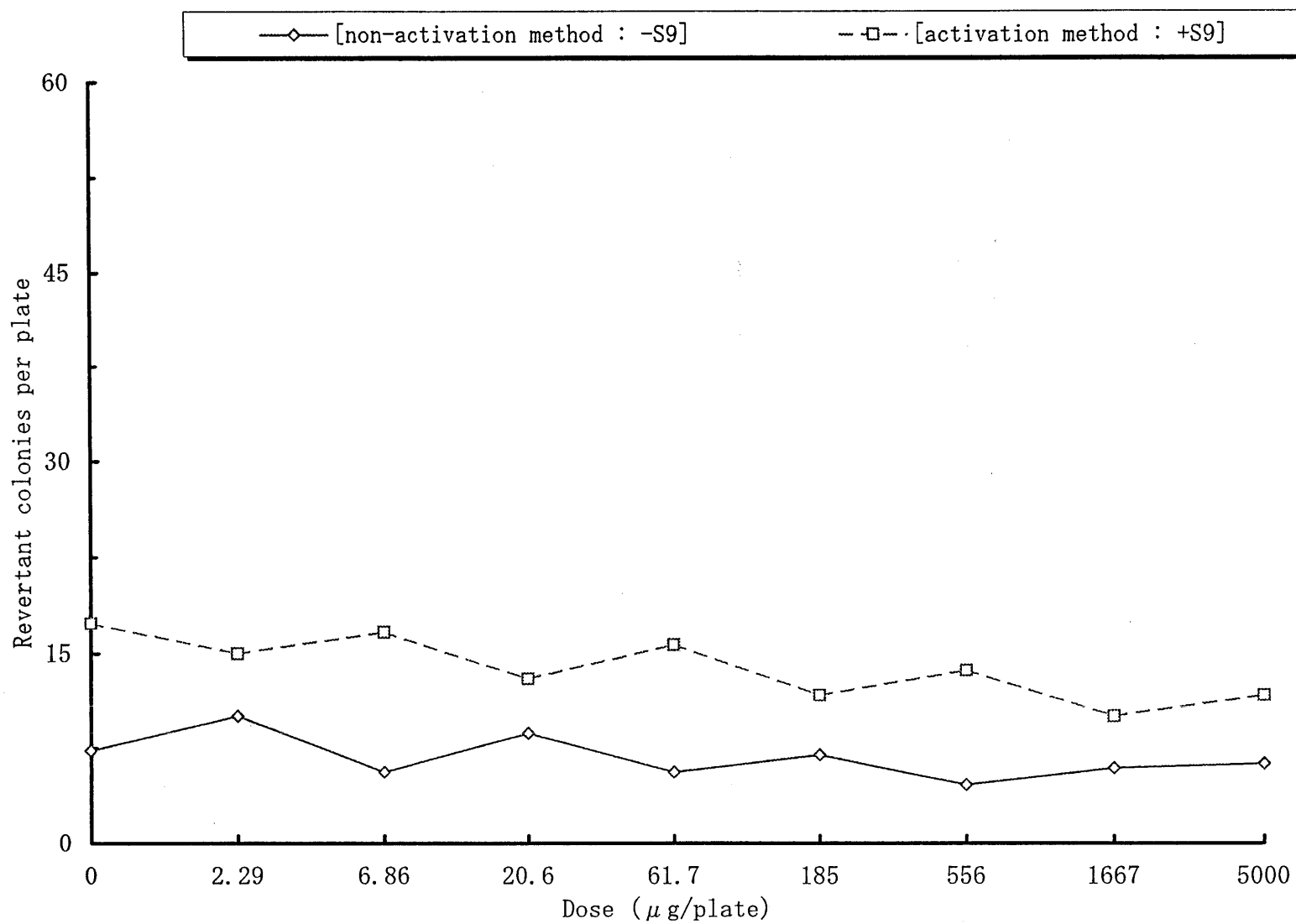


Figure 5. Dose-finding study with of C.I. pigment yellow 53 in strain TA1537

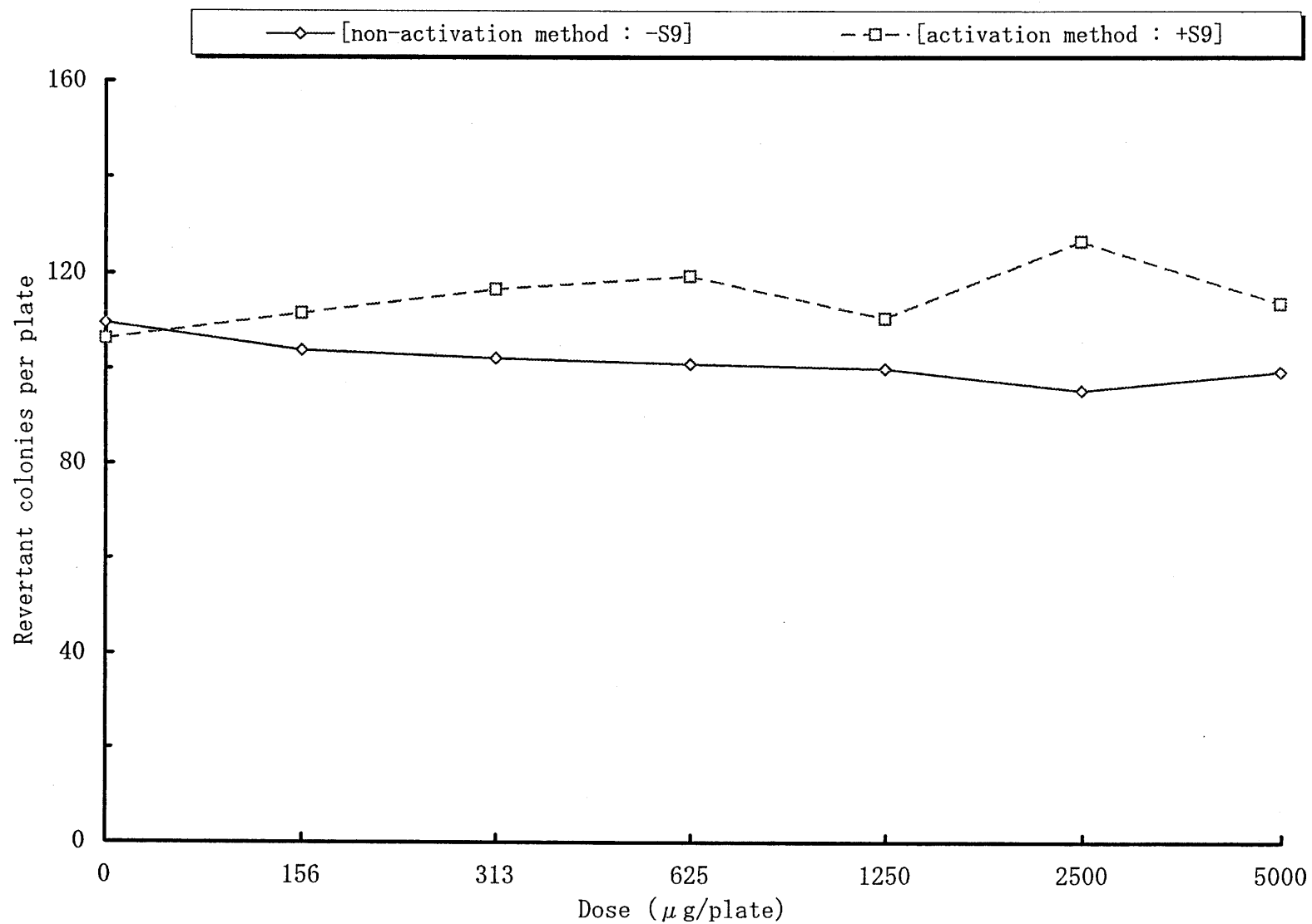


Figure 6. Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA100

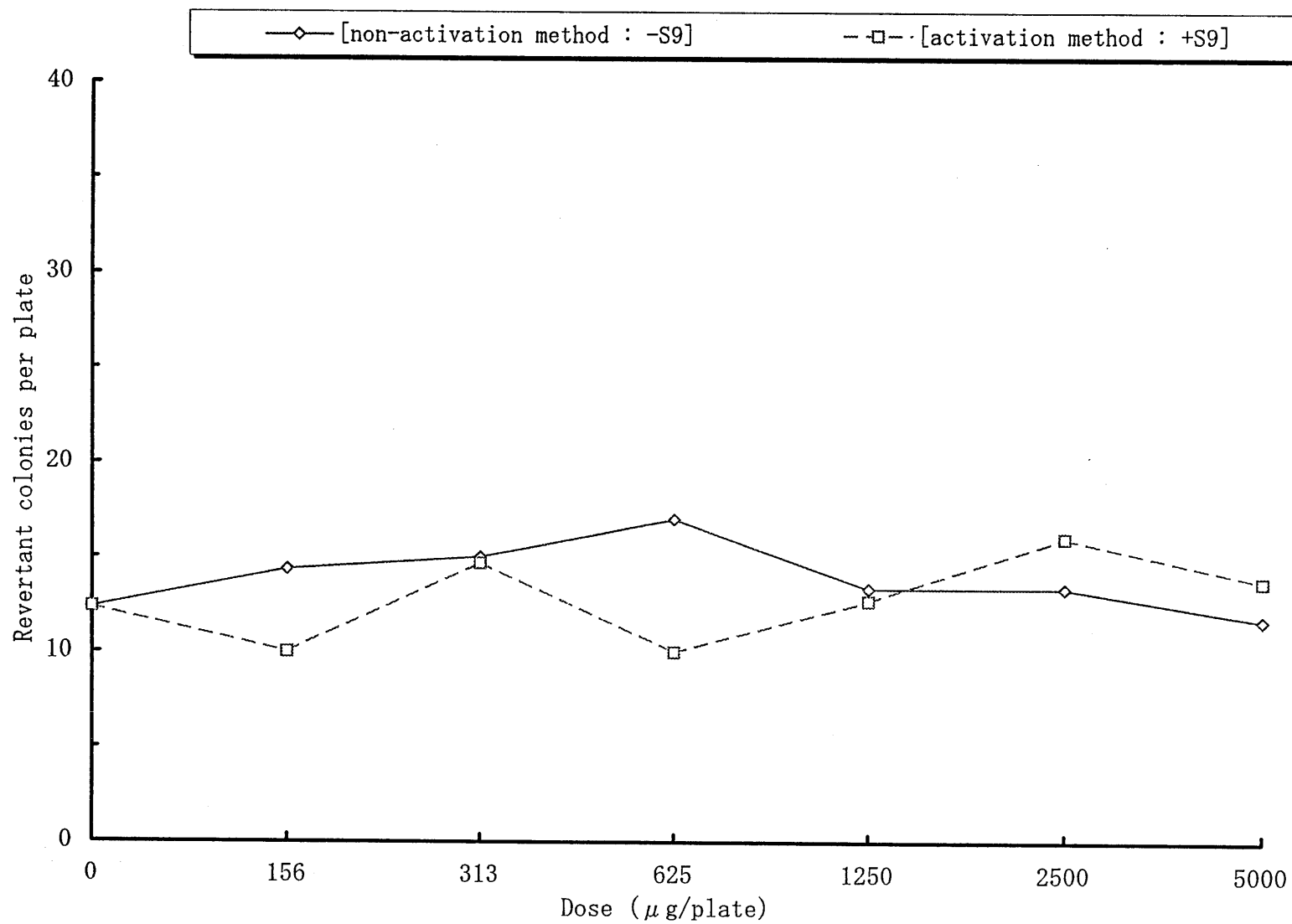


Figure 7. Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA1535

F-07

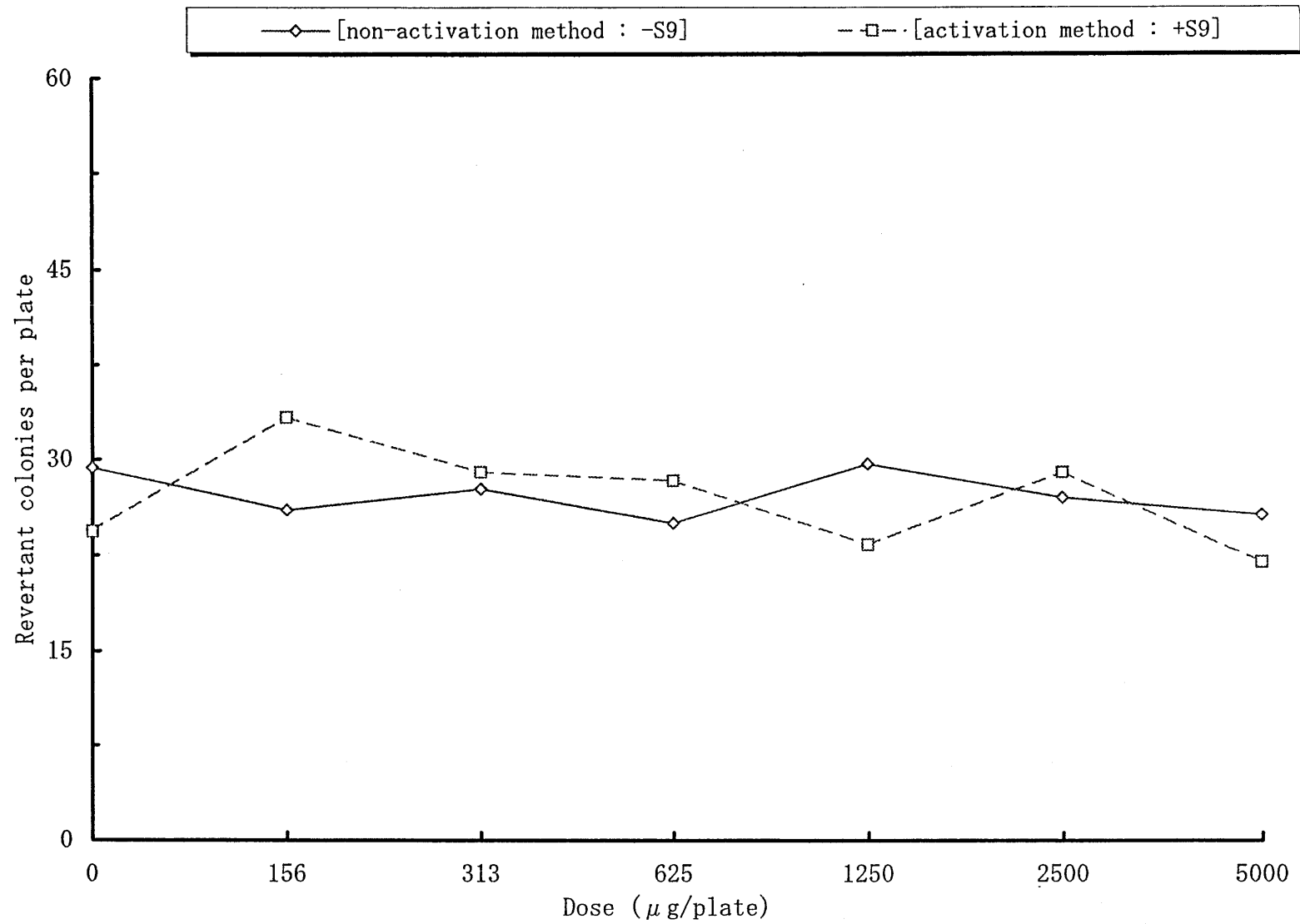


Figure 8. Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain WP2uvrA



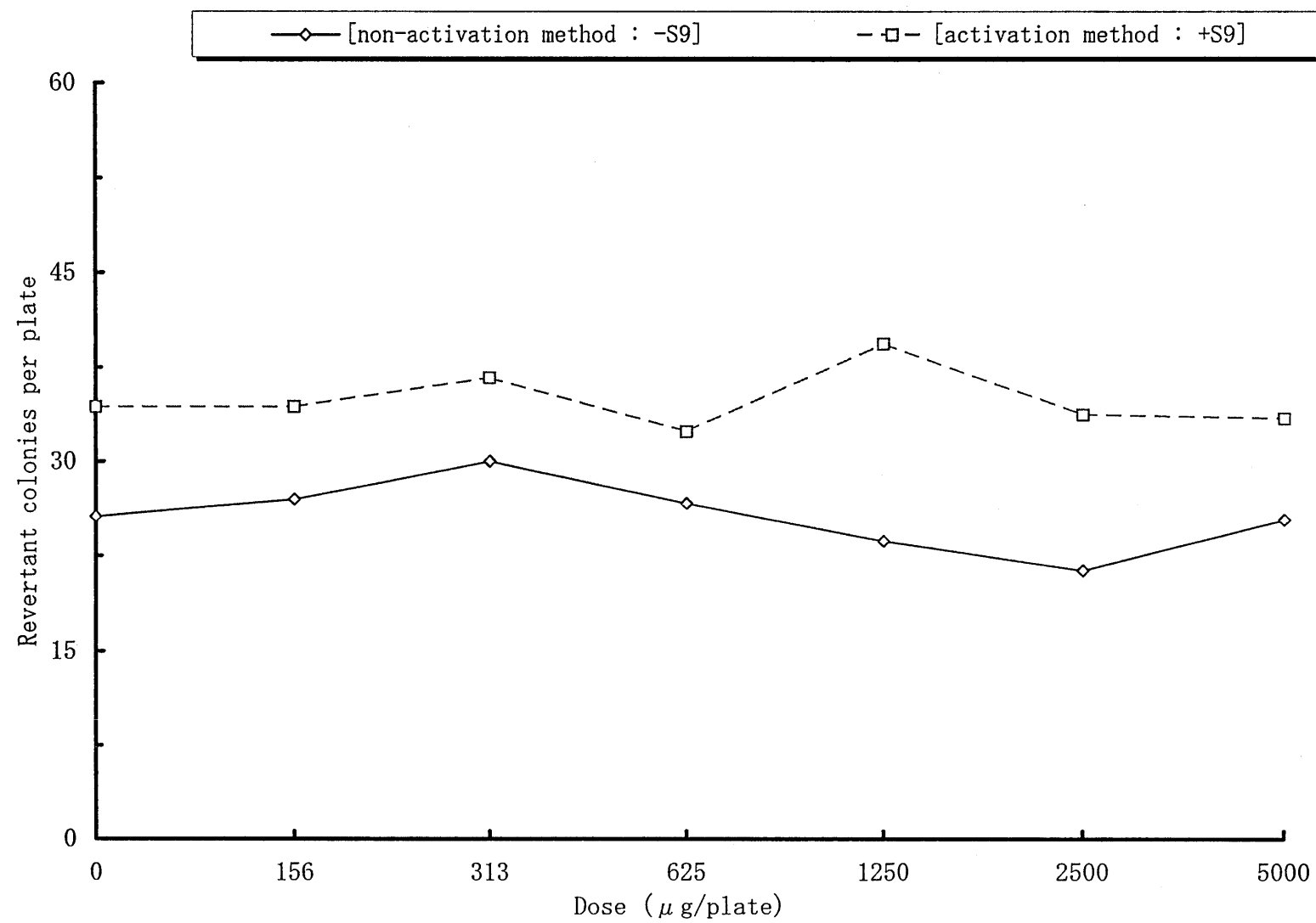


Figure 9. Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA98

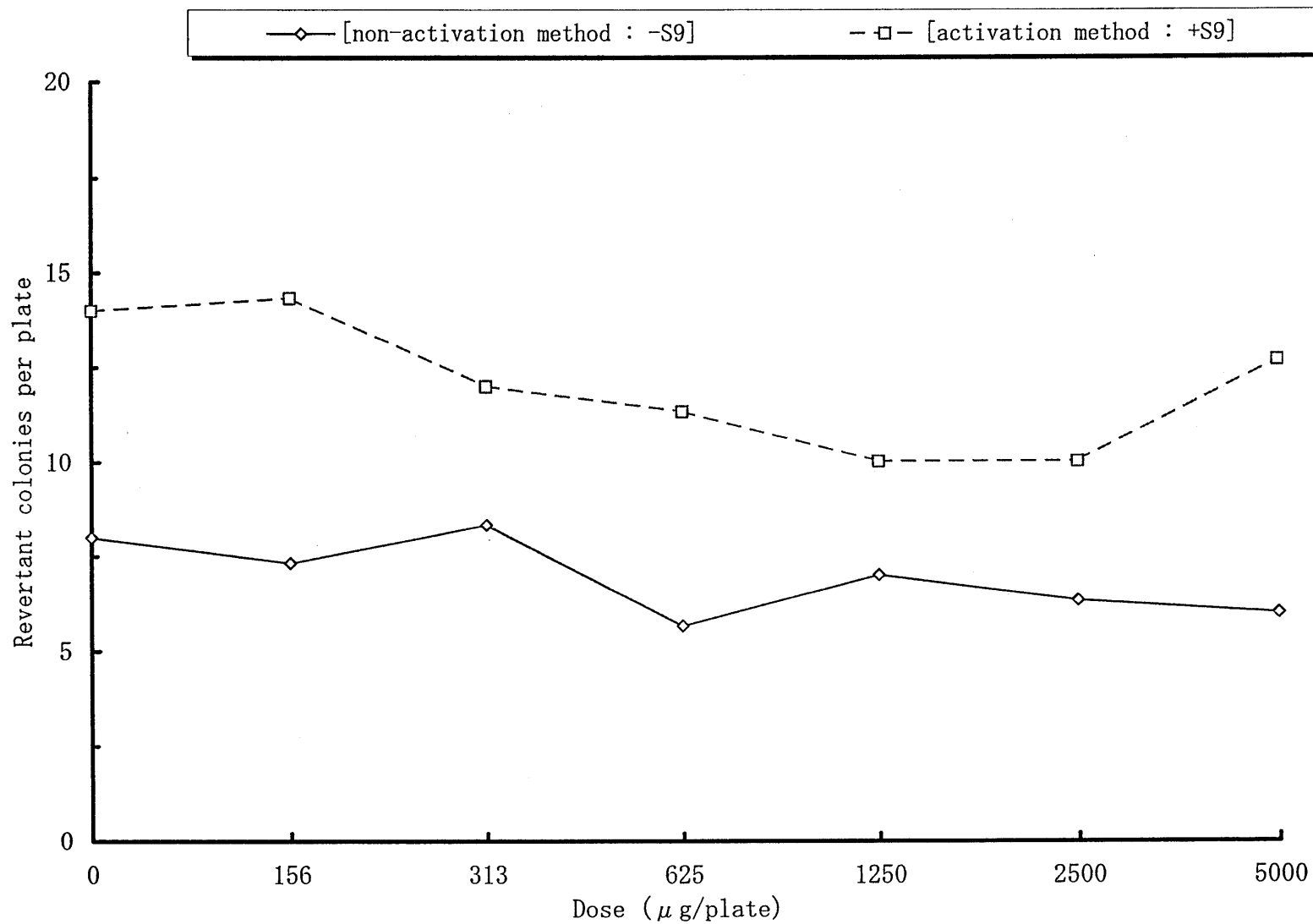


Figure 10. Bacterial reversion test of C. I. pigment yellow 53 in strain TA1537

Table 1. Summary data of dose-finding study with C.I. pigment yellow 53  
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	88	96	87	12	14	12	30	24	32	26	28	23	8	5	9
		[ 90 $\pm$	5]	[ 13 $\pm$	1]	[ 29 $\pm$	4]	[ 26 $\pm$	3]	[ 7 $\pm$	2]					
	2.29	91	97	84	17	16	15	24	29	32	24	33	24	10	10	10
		[ 91 $\pm$	7]	[ 16 $\pm$	1]	[ 28 $\pm$	4]	[ 27 $\pm$	5]	[ 10 $\pm$	0]					
	6.86	83	98	85	15	12	16	30	20	23	26	21	23	6	6	5
		[ 89 $\pm$	8]	[ 14 $\pm$	2]	[ 24 $\pm$	5]	[ 23 $\pm$	3]	[ 6 $\pm$	1]					
	20.6	102	85	93	10	9	11	27	25	22	21	25	25	9	6	11
		[ 93 $\pm$	9]	[ 10 $\pm$	1]	[ 25 $\pm$	3]	[ 24 $\pm$	2]	[ 9 $\pm$	3]					
	61.7	85	84	99	14	19	17	32	31	20	19	27	22	9	3	5
	[ 89 $\pm$	8]	[ 17 $\pm$	3]	[ 28 $\pm$	7]	[ 23 $\pm$	4]	[ 6 $\pm$	3]						
185	88	85	86	14	10	14	24	22	22	17	21	19	9	3	9	
	[ 86 $\pm$	2]	[ 13 $\pm$	2]	[ 23 $\pm$	1]	[ 19 $\pm$	2]	[ 7 $\pm$	3]						
556	93	82	95	12	11	14	23	29	24	23	19	22	6	3	5	
	[ 90 $\pm$	7]	[ 12 $\pm$	2]	[ 25 $\pm$	3]	[ 21 $\pm$	2]	[ 5 $\pm$	2]						
1667 +	89	90	99	12	18	13	17	24	31	24	18	23	8	4	6	
	[ 93 $\pm$	6]	[ 14 $\pm$	3]	[ 24 $\pm$	7]	[ 22 $\pm$	3]	[ 6 $\pm$	2]						
5000 +	82	73	78	9	12	10	34	23	31	17	24	25	5	8	6	
	[ 78 $\pm$	5]	[ 10 $\pm$	2]	[ 29 $\pm$	6]	[ 22 $\pm$	4]	[ 6 $\pm$	2]						
Positive control		441	457	413 <sup>a)</sup>	460	475	437 <sup>b)</sup>	146	155	157 <sup>a)</sup>	671	665	688 <sup>b)</sup>	534	501	543 <sup>d)</sup>
		[437 $\pm$	22]	[457 $\pm$	19]	[153 $\pm$	6]	[675 $\pm$	12]	[526 $\pm$	22]					

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu$ g/plate      b) : NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu$ g/plate

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

Table 2. Summary data of dose-finding study with C.I. pigment yellow 53  
[activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	97	112	102	13	13	18	26	25	23	31	36	27	18	15	19
		[104 $\pm$	8]	[15 $\pm$	3]	[25 $\pm$	2]	[31 $\pm$	5]	[17 $\pm$	2]					
	2.29	100	114	110	16	22	16	22	16	25	23	28	34	15	13	17
		[108 $\pm$	7]	[18 $\pm$	3]	[21 $\pm$	5]	[28 $\pm$	6]	[15 $\pm$	2]					
	6.86	106	105	106	9	14	9	20	23	23	27	20	28	15	20	15
		[106 $\pm$	1]	[11 $\pm$	3]	[22 $\pm$	2]	[25 $\pm$	4]	[17 $\pm$	3]					
	20.6	85	102	107	13	18	15	21	17	16	26	26	29	15	14	10
		[98 $\pm$	12]	[15 $\pm$	3]	[18 $\pm$	3]	[27 $\pm$	2]	[13 $\pm$	3]					
	61.7	115	102	106	11	16	9	24	16	19	24	32	33	14	15	18
	[108 $\pm$	7]	[12 $\pm$	4]	[20 $\pm$	4]	[30 $\pm$	5]	[16 $\pm$	2]						
185	116	107	99	10	17	14	17	25	25	25	35	23	13	9	13	
	[107 $\pm$	9]	[14 $\pm$	4]	[22 $\pm$	5]	[28 $\pm$	6]	[12 $\pm$	2]						
556	108	113	99	12	17	8	23	18	18	31	20	25	17	9	15	
	[107 $\pm$	7]	[12 $\pm$	5]	[20 $\pm$	3]	[25 $\pm$	6]	[14 $\pm$	4]						
1667 +	89	102	106	8	18	13	17	19	16	23	31	20	9	14	7	
	[99 $\pm$	9]	[13 $\pm$	5]	[17 $\pm$	2]	[25 $\pm$	6]	[10 $\pm$	4]						
5000 +	107	105	106	13	10	13	15	19	24	19	25	28	9	12	14	
	[106 $\pm$	1]	[12 $\pm$	2]	[19 $\pm$	5]	[24 $\pm$	5]	[12 $\pm$	3]						
Positive control		696	633	652 <sup>a)</sup>	311	310	288 <sup>b)</sup>	844	899	864 <sup>c)</sup>	380	410	385 <sup>d)</sup>	155	183	154 <sup>b)</sup>
		[660 $\pm$	32]	[303 $\pm$	13]	[869 $\pm$	28]	[392 $\pm$	16]	[164 $\pm$	16]					

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

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

Table 3. Results of the bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53  
[non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	116	106	107	16	10	11	30	26	32	23	29	25	9	7	8
		[110 $\pm$		6]	[12 $\pm$		3]	[29 $\pm$		3]	[26 $\pm$		3]	[8 $\pm$		1]
	156	104	103	105	17	12	14	21	30	27	22	28	31	6	10	6
		[104 $\pm$		1]	[14 $\pm$		3]	[26 $\pm$		5]	[27 $\pm$		5]	[7 $\pm$		2]
	313	103	103	101	16	14	15	24	30	29	32	29	29	5	11	9
		[102 $\pm$		1]	[15 $\pm$		1]	[28 $\pm$		3]	[30 $\pm$		2]	[8 $\pm$		3]
	625	98	100	105	16	17	18	23	28	24	33	23	24	7	5	5
	[101 $\pm$		4]	[17 $\pm$		1]	[25 $\pm$		3]	[27 $\pm$		6]	[6 $\pm$		1]	
1250	103	94	103	15	11	14	23	29	37	22	29	20	7	6	8	
	[100 $\pm$		5]	[13 $\pm$		2]	[30 $\pm$		7]	[24 $\pm$		5]	[7 $\pm$		1]	
2500 +	98	98	90	10	16	14	24	34	23	24	21	19	8	4	7	
	[95 $\pm$		5]	[13 $\pm$		3]	[27 $\pm$		6]	[21 $\pm$		3]	[6 $\pm$		2]	
5000 +	103	88	107	15	9	11	20	30	27	26	24	26	4	9	5	
	[99 $\pm$		10]	[12 $\pm$		3]	[26 $\pm$		5]	[25 $\pm$		1]	[6 $\pm$		3]	
Positive control		388	395	405 <sup>a)</sup>	476	470	474 <sup>b)</sup>	143	126	136 <sup>a)</sup>	615	562	583 <sup>c)</sup>	493	427	450 <sup>d)</sup>
		[396 $\pm$		9]	[473 $\pm$		3]	[135 $\pm$		9]	[587 $\pm$		27]	[457 $\pm$		34]

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b) : NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) : AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d) : 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of C. I. pigment yellow 53  
[activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/plate)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	115	102	102	15	11	11	26	26	21	38	29	36	14	13	15
		[106 $\pm$	8]	[12 $\pm$	2]	[24 $\pm$	3]	[34 $\pm$	5]	[14 $\pm$	1]					
	156	112	118	105	14	7	9	33	35	32	37	33	33	18	13	12
		[112 $\pm$	7]	[10 $\pm$	4]	[33 $\pm$	2]	[34 $\pm$	2]	[14 $\pm$	3]					
	313	118	114	118	14	14	16	31	28	28	30	37	43	11	14	11
		[117 $\pm$	2]	[15 $\pm$	1]	[29 $\pm$	2]	[37 $\pm$	7]	[12 $\pm$	2]					
	625	118	112	128	9	9	12	28	24	33	31	34	32	12	10	12
	[119 $\pm$	8]	[10 $\pm$	2]	[28 $\pm$	5]	[32 $\pm$	2]	[11 $\pm$	1]						
1250	106	114	112	9	12	17	23	22	25	43	33	42	7	11	12	
	[111 $\pm$	4]	[13 $\pm$	4]	[23 $\pm$	2]	[39 $\pm$	6]	[10 $\pm$	3]						
2500 +	129	129	122	18	14	16	29	25	33	29	32	40	8	13	9	
	[127 $\pm$	4]	[16 $\pm$	2]	[29 $\pm$	4]	[34 $\pm$	6]	[10 $\pm$	3]						
5000 +	124	110	107	12	15	14	21	21	24	35	33	32	13	12	13	
	[114 $\pm$	9]	[14 $\pm$	2]	[22 $\pm$	2]	[33 $\pm$	2]	[13 $\pm$	1]						
Positive control		942	879	845 <sup>a)</sup>	334	313	308 <sup>b)</sup>	843	854	836 <sup>c)</sup>	408	432	430 <sup>d)</sup>	182	188	197 <sup>b)</sup>
		[889 $\pm$	49]	[318 $\pm$	14]	[844 $\pm$	9]	[423 $\pm$	13]	[189 $\pm$	8]					

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

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