



3-ヒドロキシ-4- [(4-メチル-2-
スルフォフェニル)アゾ] -2-
ナフタレンカルボン酸のカルシウム塩
(DC Red 7)の細菌を用いる
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

桑野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および試験方法	3
試験結果および考察	7
参 考 文 献	9
Tables 1～5	

【要 約】

3-ヒドロキシ-4-[(4-メチル-2-スルフォフェニル)アゾ]-2-ナフタレンカルボン酸のカルシウム塩 (DC Red 7) の変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然変異試験を Ames の標準法およびアゾ還元法によって実施することにより検討した。

Ames の標準法では、検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接法および代謝活性化のいずれも、用量設定試験は 50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、本試験では 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を実施した。

アゾ還元法では、検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100および TA98を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を実施した。

その結果、いずれの試験法においても、用いた検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、3-ヒドロキシ-4-[(4-メチル-2-スルフォフェニル)アゾ]-2-ナフタレンカルボン酸のカルシウム塩 (DC Red 7) は、用いた試験系において変異原性を有しない (陰性) と判定された。

【結 言】

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、アゾ色素である3-ヒドロキシ-4-[(4-メチル-2-スルフォフェニル)アゾ]-2-ナフタレンカルボン酸のカルシウム塩 (DC Red 7) について、細菌を用いる復帰突然変異試験を Ames の標準法⁽¹⁾およびアゾ還元法⁽²⁾により実施した。

この試験は、サルモネラ (ネズミチフス菌) におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異⁽¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異⁽³⁾を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接法と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素 (S9 混液) によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化法とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号) およびOECD化学品試験法ガイドライン: 471, 472 に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施した。

【材料および試験方法】

〔検 定 菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の 4 菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、
から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年 5 月 9 日に
から分与を
受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo 2 (OXOID, ロット番号 : B-1674/1 およ
び B-1674/2) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、約10~12時間往復振とう培
養したものを検定菌液とした。

〔被 験 物 質〕

3-ヒドロキシ-4-[(4-メチル-2-スルフォフェニル)アゾ]-2-ナフタレンカルボン酸のカル
シウム塩 (DC Red 7) (CAS No 5281-04-9、以下P A Nと略) は、分子量 424.45 の赤
色の粒子である。純度約98%のもの (主な不純物として水、塩化ナトリウムおよび塩化カル
シウム・2水和物を含む、ロット番号 :) を
から供与された。

P A Nは、ジメチルスルホキシド (以下DMSOと略 : ロット番号 : TWP 5445 および APQ
5928、和光純薬工業(株)) を用いて 50 mg/ml になるように調製した後、同溶媒で更に公比
2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度換算
は行わなかった。

秦野研究所においてP A Nの DMSO 溶液中での安定性試験を行った。本試験における最
高濃度 (50 mg/ml) および最低濃度 (3 mg/ml) の2濃度について、室温遮光条件下で実
施した。その結果、調製後4時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値
(0時間) の平均に対して、98.1%および99.1%であった。これらの値は、当研究所の基
準を満たしていた (Appendix 1)。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、96.2~99.0%、3.125 mg/ml 溶液は、100~102%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた (Appendix 2)。

以上の結果から、PANは DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF-2 : フリルアマイド	(上野製薬(株))	ロット番号 46,	純度99.9%
SA : アジ化ナトリウム	(和光純薬工業(株))	ロット番号 TWR3330,	純度>90%
9-AA : 9-アミノアクリン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度>98%
2-AA : 2-アミノアントラセン	(和光純薬工業(株))	ロット番号 DSF2950,	純度>90%
TB : トリパブル	(MERCK,	ロット番号 K13595432,	純度記載なし)

AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを、-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9-AA および TBは DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 混液の組成〕

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	イオニン	0.5 mM

* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社製の最少寒天培地 (Ames の標準法の用量設定試験においてはロット番号 : DJ040IH, 1992年9月4日製造、本試験においては、ロット番号 : DJ050JH, 1992年10月12日製造、アゾ還元法においては、ロット番号 : DJ060KH, 1992年11月10日製造) を用いた。なお、培地 1 l あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バクトアガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 混液

1 ml 中下記の成分を含むものとした。

i) Ames の標準法

**			
S9	0.1 ml	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μmol		

** : 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および 5、6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン株、ロット番号 RAA-280、1992年 7 月 24 日製造および RAA-285、1992年 11 月 20 日製造) を -80℃ で凍結保存し、用時に解凍した。PB および BF の投与量は 1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したものである。

ii) アゾ還元法

S9	0.3 ml	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	1000 μmol
グルコース・6リン酸	5 μmol		
FMN	2 μmol		

*** : 8 週齢の Syrian Hamster (Std: Syrian) 雄の無誘導肝より作製した S9 (キッコーマン株、ロット番号 930125H、1993年 1 月 25 日製造) を -80℃ で凍結保存し、用時に解凍した。

[試験方法]

(i) Ames の標準法

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトップアガー 2 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (代謝活性化試験においては S9 混液 i) 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに DMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に

示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

(ii) アゾ還元法

プレインキュベーション法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中に検定菌液 0.1 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (代謝活性化法においては S9 混液 ii) 0.5 ml) を混合し、37℃で20分間プレインキュベーションを行ったのち 2 ml のトップアガーを加えて混和し、合成培地平板上に流し固めた。

同時に、被験物質調製液のかわりに溶媒または2種の陽性対照物質溶液を用いて対照試験を行った。その後の操作は Ames の標準法と同じ方法で行った。ただし、用量設定試験は実施しなかった。

[判定基準]

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

【試験結果および考察】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

i) Ames の標準法

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。PANについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比約 3 で、試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法あるいは代謝活性化法のいずれにおいても、抗菌性は認められなかった。また被験物質に由来する、寒天平板上の沈殿物は直接法および代謝活性化法ともに、すべての用量で認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量を直接法、代謝活性化法ともに、すべての検定菌において、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比 2 で、5 用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 2、3 に示した。PANについて、312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお、直接法および代謝活性化法ともに、すべての用量で被験物質に由来する沈殿物が寒天平板上に認められた。

ii) アゾ還元法

結果を Tables 4、5 に示した。PANについて 312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた2種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお、直接法ではすべての用量で、代謝活性化法においては、1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で、被験物質に由来する沈殿物が寒天表面上に認められた。

PANについて実施したすべての試験において、陽性対照群では、いずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、PANは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【参 考 文 献】

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N. : Mutation Research, 113: 173-215 (1983)
- (2) Prival, M.J. and Mitchell, V.D. : Mutation Research, 97:103-116 (1982)
- (3) Green, M.H.L. : in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1984) pp.161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with 3-hydroxy-4-[(4-methyl-2-sulphophenyl) azo]-2-naphthalenecarboxylic acid calcium salt

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg / plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	129	124	123	14	20	14	20	13	17	35	35	39	10	7	6	
		(125 \pm 3.2)			(16 \pm 3.5)			(17 \pm 3.5)			(36 \pm 2.3)			(8 \pm 2.1)			
	50 #	142			16			20			39			6			
	150 #	124			8			20			26			9			
	500 #	120			14			16			23			6			
	1500 #	123			10			11			26			2			
	5000 #	121			9			11			24			6			
S9Mix (+)	0	124	125	129	19	20	18	13	18	19	43	42	48	8	7	13	
		(126 \pm 2.6)			(19 \pm 1.0)			(17 \pm 3.2)			(44 \pm 3.2)			(9 \pm 3.2)			
	50 #	98			16			14			22			15			
	150 #	124			12			7			23			14			
	500 #	84			9			21			26			14			
	1500 #	124			26			19			31			14			
	5000 #	109			9			15			21			4			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	468	437	479	310	281	316	151	126	125	648	669	690	1939	1933	2017	
		(461 \pm 21.8)			(302 \pm 18.7)			(134 \pm 14.7)			(669 \pm 21.0)			(1963 \pm 46.9)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	370	377	394	229	219	203	902	894	910	305	336	340	198	189	226	
		(380 \pm 12.3)			(217 \pm 13.1)			(902 \pm 8.0)			(327 \pm 19.2)			(204 \pm 19.3)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 3-hydroxy-4-[(4-methyl-2-sulfohenyl) azo]-2-naphthalenecarboxylic acid calcium salt

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	104	97	111	12	13	20	19	17	29	33	28	19	7	11	4
		(104 \pm 7.0)			(15 \pm 4.4)			(22 \pm 6.4)			(27 \pm 7.1)			(7 \pm 3.5)		
	312.5 #	96	111	85	17	17	15	15	29	13	20	28	26	5	6	3
		(97 \pm 13.1)			(16 \pm 1.2)			(19 \pm 8.7)			(25 \pm 4.2)			(5 \pm 1.5)		
	625 #	107	94	90	17	16	13	22	25	31	29	32	32	5	9	8
		(97 \pm 8.9)			(15 \pm 2.1)			(26 \pm 4.6)			(31 \pm 1.7)			(7 \pm 2.1)		
	1250 #	104	105	86	12	9	7	16	19	8	26	30	30	9	4	9
	(98 \pm 10.7)			(9 \pm 2.5)			(14 \pm 5.7)			(29 \pm 2.3)			(7 \pm 2.9)			
2500 #	102	105	97	12	15	16	21	11	23	21	24	17	3	4	7	
	(101 \pm 4.0)			(14 \pm 2.1)			(18 \pm 6.4)			(21 \pm 3.5)			(5 \pm 2.1)			
5000 #	101	111	120	18	13	13	14	17	16	30	27	17	7	2	1	
	(111 \pm 9.5)			(15 \pm 2.9)			(16 \pm 1.5)			(25 \pm 6.8)			(3 \pm 3.2)			
S9Mix (+)	0	140	111	105	18	21	25	27	22	26	46	50	49	17	8	13
		(119 \pm 18.7)			(21 \pm 3.5)			(25 \pm 2.6)			(48 \pm 2.1)			(13 \pm 4.5)		
	312.5 #	123	150	114	17	11	17	25	22	35	39	34	30	15	17	8
		(129 \pm 18.7)			(15 \pm 3.5)			(27 \pm 6.8)			(34 \pm 4.5)			(13 \pm 4.7)		
	625 #	122	106	117	16	8	7	34	24	18	41	38	39	13	13	16
		(115 \pm 8.2)			(10 \pm 4.9)			(25 \pm 8.1)			(39 \pm 1.5)			(14 \pm 1.7)		
	1250 #	121	117	124	4	5	7	24	17	22	45	44	28	7	13	12
	(121 \pm 3.5)			(5 \pm 1.5)			(21 \pm 3.6)			(39 \pm 9.5)			(11 \pm 3.2)			
2500 #	112	134	120	10	12	11	23	15	28	31	39	41	6	5	6	
	(122 \pm 11.1)			(11 \pm 1.0)			(22 \pm 6.6)			(37 \pm 5.3)			(6 \pm 0.6)			
5000 #	111	91	105	17	15	12	27	29	35	30	27	24	9	8	9	
	(102 \pm 10.3)			(15 \pm 2.5)			(30 \pm 4.2)			(27 \pm 3.0)			(9 \pm 0.6)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	394	415	387	184	148	171	116	164	150	647	707	641	2388	2735	2440
		(399 \pm 14.6)			(168 \pm 18.2)			(143 \pm 24.7)			(665 \pm 36.5)			(2521 \pm 187.1)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	605	483	730	234	211	196	690	560	612	294	225	424	176	227	201
		(606 \pm 123.5)			(214 \pm 19.1)			(621 \pm 65.4)			(314 \pm 101.0)			(201 \pm 25.5)		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 3-hydroxy-4-[(4-methyl-2-sulphophenyl) azo]-2-naphthalenecarboxylic acid calcium salt

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	117	123	117	18	20	18	9	21	17	29	28	40	10	7	6	
		(119 ± 3.5)			(19 ± 1.2)			(16 ± 6.1)			(32 ± 6.7)			(8 ± 2.1)			
	312.5 #	131	112	136	16	13	16	27	29	19	28	30	43	7	11	7	
		(126 ± 12.7)			(15 ± 1.7)			(25 ± 5.3)			(34 ± 8.1)			(8 ± 2.3)			
	625 #	129	101	135	12	14	17	26	28	27	39	26	35	8	9	7	
		(122 ± 18.1)			(14 ± 2.5)			(27 ± 1.0)			(33 ± 6.7)			(8 ± 1.0)			
	1250 #	138	120	114	11	16	12	16	24	19	31	34	36	7	5	5	
	(124 ± 12.5)			(13 ± 2.6)			(20 ± 4.0)			(34 ± 2.5)			(6 ± 1.2)				
2500 #	133	107	109	19	22	16	15	16	20	21	28	35	7	10	6		
	(116 ± 14.5)			(19 ± 3.0)			(17 ± 2.6)			(28 ± 7.0)			(8 ± 2.1)				
5000 #	103	111	112	13	14	11	12	15	21	20	28	26	5	11	7		
	(109 ± 4.9)			(13 ± 1.5)			(16 ± 4.6)			(25 ± 4.2)			(8 ± 3.1)				
S9Mix (+)	0	120	125	136	17	15	11	17	23	18	37	43	57	8	11	11	
		(127 ± 8.2)			(14 ± 3.1)			(19 ± 3.2)			(46 ± 10.3)			(10 ± 1.7)			
	312.5 #	151	168	128	15	12	14	29	20	23	48	53	35	20	17	18	
		(149 ± 20.1)			(14 ± 1.5)			(24 ± 4.6)			(45 ± 9.3)			(18 ± 1.5)			
	625 #	136	147	123	18	11	14	23	22	28	43	60	45	22	16	12	
		(135 ± 12.0)			(14 ± 3.5)			(24 ± 3.2)			(49 ± 9.3)			(17 ± 5.0)			
	1250 #	142	126	154	12	11	11	27	26	23	42	39	40	17	7	18	
	(141 ± 14.0)			(11 ± 0.6)			(25 ± 2.1)			(40 ± 1.5)			(14 ± 6.1)				
2500 #	139	157	117	8	14	11	28	29	16	39	50	44	14	13	10		
	(138 ± 20.0)			(11 ± 3.0)			(24 ± 7.2)			(44 ± 5.5)			(12 ± 2.1)				
5000 #	117	154	129	10	13	12	25	16	19	41	38	36	18	14	15		
	(133 ± 18.9)			(12 ± 1.5)			(20 ± 4.6)			(38 ± 2.5)			(16 ± 2.1)				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2			
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	503	468	501	158	174	149	150	139	146	587	573	692	3169	2909	2930	
		(491 ± 19.7)			(160 ± 12.7)			(145 ± 5.6)			(617 ± 65.0)			(3003 ± 144.4)			
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	686	711	664	326	327	332	532	521	569	331	321	239	191	238	232	
		(687 ± 23.5)			(328 ± 3.2)			(541 ± 25.1)			(297 ± 50.5)			(220 ± 25.6)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay (azo-reduction method I) with 3-hydroxy-4-[(4-methyl-2-sulfohenyl) azo]-2-naphthalenecarboxylic acid calcium salt

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	136 113 85 (111 ± 25.5)			14 23 14 (17 ± 5.2)		
	312.5 #	94 91 89 (91 ± 2.5)			16 8 19 (14 ± 5.7)		
	625 #	94 93 91 (93 ± 1.5)			21 18 20 (20 ± 1.5)		
	1250 #	77 96 98 (90 ± 11.6)			17 15 10 (14 ± 3.6)		
	2500 #	100 77 91 (89 ± 11.6)			12 16 14 (14 ± 2.0)		
	5000 #	88 93 109 (97 ± 11.0)			21 13 13 (16 ± 4.6)		
S9Mix (+)	0	114 150 151 (138 ± 21.1)			47 44 39 (43 ± 4.0)		
	312.5	119 119 130 (123 ± 6.4)			37 24 22 (28 ± 8.1)		
	625	136 121 122 (126 ± 8.4)			21 24 35 (27 ± 7.4)		
	1250 #	125 143 132 (133 ± 9.1)			23 30 24 (26 ± 3.8)		
	2500 #	123 127 127 (126 ± 2.3)			28 27 26 (27 ± 1.0)		
	5000 #	120 143 153 (139 ± 16.9)			22 26 25 (24 ± 2.1)		
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	TB	2AA	2AA	TB	2AA	
	Dose (µg /plate)	960.8	2	10	960.8	2	
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	442 458 467 (456 ± 12.7)			473 472 435 (460 ± 21.7)		
	Number of colonies / plate	598 700 746 (681 ± 75.7)			497 553 400 (483 ± 77.4)		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

TB : Trypan blue

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 5. Results of bacterial reverse mutation assay (azo-reduction method II) with 3-hydroxy-4-[(4-methyl-2-sulfo-phenyl) azo]-2-naphthalenecarboxylic acid calcium salt

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)						
		Base - pair substitution type			Frameshift type			
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		
S9Mix (-)	0	104 120 113 (112 ± 8.0)			16 17 28 (20 ± 6.7)			
	312.5 #	99 108 109 (105 ± 5.5)			13 13 19 (15 ± 3.5)			
	625 #	126 84 104 (105 ± 21.0)			19 19 21 (20 ± 1.2)			
	1250 #	95 117 122 (111 ± 14.4)			19 20 15 (18 ± 2.6)			
	2500 #	99 86 95 (93 ± 6.7)			19 19 19 (19 ± 0.0)			
	5000 #	101 90 104 (98 ± 7.4)			19 14 8 (14 ± 5.5)			
S9Mix (+)	0	134 152 112 (133 ± 20.0)			40 51 35 (42 ± 8.2)			
	312.5	146 140 138 (141 ± 4.2)			32 35 35 (34 ± 1.7)			
	625	166 174 154 (165 ± 10.1)			32 40 35 (36 ± 4.0)			
	1250 #	184 165 177 (175 ± 9.6)			34 36 36 (35 ± 1.2)			
	2500 #	137 132 142 (137 ± 5.0)			27 29 31 (29 ± 2.0)			
	5000 #	163 167 137 (156 ± 16.3)			32 30 28 (30 ± 2.0)			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA		
	Dose (µg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	TB	2AA	2AA	TB	2AA		
	Dose (µg /plate)	960.8	2	10	960.8	2		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	422 428 381 (410 ± 25.6)			498 481 476 (485 ± 11.5)			
	Number of colonies / plate	592 763 605 (653 ± 95.2)			374 271 298 (314 ± 53.4)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

TB : Trypan blue

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.