2007年1月31日

ピグメントブルー29の
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室　委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

目次

要約 ---------- 1

試験目的 ---------- 1

材料と方法 ---------- 1

1. 被験物質 ---------- 1

2. 陽性対照物質 ---------- 2

3. 検定菌 ---------- 2

4. 試験材料 ---------- 3

5. 被験物質調製液の調製 ---------- 4

6. 試験操作 ---------- 4

7. 結果の表示 ---------- 6

8. 判定 ---------- 6

結果と考察 ---------- 6

1. 用量設定試験 ---------- 6

2. 本試験 ---------- 6

参考文献 ---------- 7

Tables ---------- 8

Figures ---------- 11

要約

ピグメントブルー29の遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 非存在下および存在下で試験を行った。

用量設定試験を 50.0、150、500、1500 および 5000 μg/plate の 5 用量を設定して行ったところ、S9 mix 非存在下および存在下とも、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。変異コロニー数は、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

これらの結果に基づき、すべての検定菌で最高用量を 5000 μg/plate とし、公比 2 で 5 用量(313～5000 μg/plate)を設定して本試験 I および本試験 II を行った。その結果、2 回の本試験ともに、用いたすべての検定菌において S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 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。

以上の結果に基づき、ピグメントブルー29 は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

試験目的

ピグメントブルー29 の遺伝子突然変異誘発性(変異原性)を検討するために、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法[1)]により実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質であるピグメントブルー29[別名(製品名):群青 No. 8000、略称:PB29、英名:C.I. Pigment Blue 29]は、青色粉末で、

から提供を受けた。被験物質の物理化学的性状等をAppendix 1に示す。被験物質は、使用時まで直射日光、高温多湿を避け室温保管した。

被験物質提供者において、実験終了後に返却した被験物質を非 GLP 下で分析した結果、被験物質の組成に変化が認められず、実験期間中安定であったことが確認された(Appendix 2)。なお、被験物質原体の安定性については GLP 下での確認はされていないが、化学的根拠に基づいた資料であることから、実験期間中安定であり、当該試験の信頼性に影響しないと判断した。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれを結果の各 Table 中に示した。

名称	略称	ロット番号(購入日)	製造者	純度
2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	AF-2	CKQ1402 (2001 年 9 月 13 日)	和光純薬工業	99.0%
ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	SA	ELE2329 (2001 年 5 月 15 日)	和光純薬工業	99.2%
9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	9AA	106F06681 (2001 年 5 月 15 日)	Sigma Chem.	97%以上
2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	2AA	DWK5667 (2001 年 9 月 13 日)	和光純薬工業	97.4%

AF-2、9AA および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号:CEK4884、和光純薬工業)に、SA は日局注射用水(製造番号:K4I81、大塚製薬工場)に溶解し、所定の濃度に調製した後、冷凍保存(設定温度:-20℃)し、調製後 6 か月以内に用時に解凍して用いた。

3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、試験には、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌(*Escherichia coli*)WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 の 4 菌株は 1997 年 8 月 7 日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は 1997 年 4 月 9 日に、いずれも日本バイオアッセイ研究センターの より分与された。*S. typhimurium* の 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異[2)]、*E. coli* WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異[3)]を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検定菌は凍結保存(設定温度:-80℃)したものを用いた。各菌株の凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV 感受性、膜変異(*rfa*)、アンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が維持されていることを確認した。

4. 試験材料

1)合成培地

培地は、極東製薬工業製の最少グルコース寒天培地[ロット番号:DZA5BJ01、2004年11月19日製造(用量設定試験、本試験Ⅰ)およびロット番号:DZA62I01、2005年2月18日製造(本試験Ⅱ)]を用いた。なお、培地1Lあたりの組成は以下のとおりで、径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

硫酸マグネシウム・七水和物	0.2	g
クエン酸・一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	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
大洋寒天(清水食品)	15	g

2)トップアガー

以下の水溶液(A)に(B)または(C)を容量比10:1の割合で混合した。

(A)	バクトアガー(Difco Lab.)	0.6 w/v%
	塩化ナトリウム	0.5 w/v%
(B)	*Salmonella typhimurium* 用	
	L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
	D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C)	*Escherichia coli* 用	
	L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3)ラット肝臓から調製したS9

キッコーマンで製造したS9[ロット番号:RAA-514、2004年12月10日製造(用量設定試験、本試験Ⅰ)およびロット番号:RAA-518、2005年3月17日製造(本試験Ⅱ)]を購入して用いた。

①動物　Sprague-Dawley系ラット、雄:7週齢

②誘導方法　フェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)を、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腹腔内投与した。

③S9調製　5日目に致死させて摘出した肝臓を生理食塩液で灌流したのち、3倍量の0.15 mol/L塩化カリウム溶液を加えてホモジナイズし、9000×gで10分間遠沈して得た上清画分。

④保存条件　ディープフリーザー(設定温度:-80℃)で保存した。製造後6か月以内に使用した。

4) S9 mix の組成および調製

S9 mix 1 mL あたりの組成は以下のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

成　　分	S9 mix 1 mL 中の量	調製濃度
S9	0.1　mL	10　vol%
0.2 mol/L ﾅﾄﾘｳﾑｰﾘﾝ酸緩衝液(pH 7.4)	0.5　mL	100 μmol/mL
Cofactor*	0.38 mL	―――
塩化ｶﾘｳﾑ	―――	33 μmol/mL
ｸﾞﾙｺｰｽ-6-ﾘﾝ酸	―――	5 μmol/mL
NADH	―――	4 μmol/mL
NADPH	―――	4 μmol/mL
0.4 mol/L 塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ溶液	0.02 mL	8 μmol/mL

*：Cofactor は、上記の成分を混合して調製した後、凍結保存（設定温度：-80℃）し、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討を実施した結果、被験物質は 50 mg/mL の濃度で水および DMSO には不溶であるが、超音波処理により水中で良好な懸濁状態が得られた。したがって、試験に際しては、被験物質を日局注射用水（製造番号：K4I81、大塚製薬工場）に超音波処理により懸濁して最高用量の被験物質調製液（50.0 mg/mL）を調製し、以下同溶媒で順次希釈して速やかに試験に用いた。調製濃度を以下に示す。

用量設定試験：　0.500、1.50、5.00、15.0、50.0 mg/mL

本試験 Ⅰ、Ⅱ：　3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 mg/mL

なお、被験物質調製液の調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。また、被験物質調製液は、使用時に均一であることを目視により確認した。

6. 試験操作

1) 試験菌液の作製

凍結保存菌を解凍後、速やかにニュートリエントブロス No. 2（ロット番号：255164、Oxoid）を 12 mL 入れた L 字型試験管に 12 μL（TA100、TA1535 および TA98）あるいは 6 μL（TA1537 および WP2 *uvrA*）接種し、37℃で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。分光光度計（型式：UV-120-02、島津製作所）により 660 nm の吸光度を測定して試験菌液の増殖を確認し、測定値が 2003 年度の背景データの平均値の 90%以上のものを試験に用いた。試験に用いた検定菌の生菌数を段階希釈法により求め、Appendix 3 に示した。

2) 試験法

試験は、プレインキュベーション法により、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下

および哺乳動物(ラット)の薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験するS9 mix存在下で行った。

小試験管中に被験物質調製液0.1 mL、S9 mix非存在下では0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mL、S9 mix存在下ではS9 mix 0.5 mL、試験菌液0.1 mLを混合し、37℃で20分間プレインキュベーションしたのち、トップアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、被験物質調製液の代わりに使用溶媒0.1 mLまたは陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。なお、用量設定試験における陰性および陽性対照の結果については、同時に実施した他試験と共通に用いた。

培養は37℃で48時間行い、発生した変異コロニー数を、コロニーアナライザー(CA-11、システムサイエンス)または目視により計測した。なお、本試験I、IIにおいては培養終了後からコロニー計測までの1日間、合成培地平板を冷蔵(設定温度:4℃)で保管した。被験物質に由来する沈澱の有無は、目視により観察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢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、両対照および各用量につき3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。陰性および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

上記の方法により、用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

3)試験用量

用量設定試験においては、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、最高用量を5000 μg/plateとし、50.0、150、500、1500および5000 μg/plateの5段階の用量を設定した。

本試験においては、用量設定試験で生育阻害が認められなかったことから、最高用量をすべての検定菌について5000 μg/plateとし、313、625、1250、2500および5000 μg/plateの5段階の用量を設定した。

4)無菌試験

最高用量の被験物質調製液0.1 mLおよびS9 mix 0.5 mLを、それぞれ合成培地平板上に滴下して、培養終了時に雑菌の混入の有無を調べた。

5)識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix非存在下は黒、S9 mix存在下は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100は0、TA1535は5、TA98は9、TA1537は7、WP2 *uvrA*はWとした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから1、2、3、・・・と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の右に各々0およびPと記入して識別した。試験の識別は、通し番号(1、2、3、・・・)を設けて菌の識別番号の左に記入した。

7. 結果の表示

結果の表示は、各々の平板における変異コロニー数の実測値とその平均値および標準偏差を示した。また、平均値を用いて用量-反応曲線を作成した。

8. 判定

結果の判定に統計学的手法は用いないこととした。

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix非存在下あるいはS9 mix存在下において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、本試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する(陽性)と判定することとした。

結果と考察

1. 用量設定試験

用量設定試験の結果、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった(Table 1)。被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、用いたいずれの用量においても認められなかった。

変異コロニー数は、用いたいずれの検定菌においても、S9 mixの有無にかかわらず、陰性対照値の2倍以上となる増加は認められなかった。

2. 本試験

用量設定試験の結果に基づき、すべての検定菌で最高用量を5000 μg/plateとし、公比2で5用量(313～5000 μg/plate)を設定して2回の本試験(本試験Iおよび本試験II)を行った(Tables 2、3 および Figures 1、2)。その結果、2回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈澱は、S9 mix 非存在下および存在下ともに、用いたいずれの用量においても認められなかった。

変異コロニー数は、2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる増加は認められなかった。

すべての試験において、用いた最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データ(Appendix 4)の変動範囲内(平均値±3×標準偏差)であったことから、本試験系の有効性が確認された。

なお、ピグメントブルー29 については、併行して実施しているチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験(試験番号:G-04-064)では陽性の結果が得られている。

以上の結果に基づき、ピグメントブルー29 は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない(陰性)と判定した。

参考文献

1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K. H., Garner, R. C. eds., Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285

2) Maron, D. M., Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215 (1983)

3) Green, M. H. L.: Mutagen testing using Trp^+ reversion in *Escherichia coli*. In "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds., Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187

Table 1 Cytotoxicity of C.I. Pigment Blue 29 in bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	138	138	134	11	10	16	28	31	21	22	23	19	5	9	5
		(	137 ±	2)	(	12 ±	3)	(	27 ±	5)	(	21 ±	2)	(	6 ±	2)
	50.0	141			10			22			18			4		
	150	149			16			14			14			6		
	500	154			12			22			19			7		
	1500	115			14			18			25			5		
	5000	121			8			20			19			6		
S9 mix (+)	0	135	156	142	11	17	8	26	24	21	20	27	30	12	6	5
		(	144 ±	11)	(	12 ±	5)	(	24 ±	3)	(	26 ±	5)	(	8 ±	4)
	50.0	158			12			21			28			9		
	150	146			5			25			15			8		
	500	161			7			22			24			9		
	1500	141			11			22			25			10		
	5000	139			9			26			20			5		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF-2			SA			AF-2			AF-2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	533	470	461	547	614	602	102	115	118	391	468	441	410	319	383
		(	488 ±	39)	(	588 ±	36)	(	112 ±	9)	(	433 ±	39)	(	371 ±	47)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	862	868	855	412	349	351	863	880	845	340	373	346	179	151	159
		(	862 ±	7)	(	371 ±	36)	(	863 ±	18)	(	353 ±	18)	(	163 ±	14)

Negative control, Water for injection JP

The purity of the test substance was 98.50%.

This substance contained not more than 0.01% free sulphur as impurity.

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

Table 2 Mutagenicity of C.I. Pigment Blue 29 in bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	99	115	100	7	9	9	22	21	18	18	12	17	6	7	6
		(105 ± 9)			(8 ± 1)			(20 ± 2)			(16 ± 3)			(6 ± 1)		
	313	94	115	131	15	7	10	16	22	29	21	22	26	6	8	10
		(113 ± 19)			(11 ± 4)			(22 ± 7)			(23 ± 3)			(8 ± 2)		
	625	89	130	94	6	8	9	23	29	20	24	22	18	6	3	3
		(104 ± 22)			(8 ± 2)			(24 ± 5)			(21 ± 3)			(4 ± 2)		
	1250	132	139	120	8	6	2	19	30	15	24	17	25	5	5	6
		(130 ± 10)			(5 ± 3)			(21 ± 8)			(22 ± 4)			(5 ± 1)		
	2500	92	77	93	6	3	6	30	23	28	13	19	21	7	8	5
		(87 ± 9)			(5 ± 2)			(27 ± 4)			(18 ± 4)			(7 ± 2)		
	5000	86	96	97	7	12	4	20	22	30	14	18	19	3	8	10
		(93 ± 6)			(8 ± 4)			(24 ± 5)			(17 ± 3)			(7 ± 4)		
S9 mix (+)	0	100	102	100	10	12	8	22	25	26	26	35	30	7	14	9
		(101 ± 1)			(10 ± 2)			(24 ± 2)			(30 ± 5)			(10 ± 4)		
	313	108	103	116	9	6	12	32	32	33	33	29	32	9	10	12
		(109 ± 7)			(9 ± 3)			(32 ± 1)			(31 ± 2)			(10 ± 2)		
	625	130	106	120	5	7	7	33	36	16	31	27	35	15	9	13
		(119 ± 12)			(6 ± 1)			(28 ± 11)			(31 ± 4)			(12 ± 3)		
	1250	120	107	104	6	11	8	35	30	30	25	22	30	8	17	10
		(110 ± 9)			(8 ± 3)			(32 ± 3)			(26 ± 4)			(12 ± 5)		
	2500	111	140	110	13	5	7	28	30	35	24	21	28	12	6	14
		(120 ± 17)			(8 ± 4)			(31 ± 4)			(24 ± 4)			(11 ± 4)		
	5000	107	109	84	6	11	9	34	33	36	28	21	28	12	4	5
		(100 ± 14)			(9 ± 3)			(34 ± 2)			(26 ± 4)			(7 ± 4)		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF-2			SA			AF-2			AF-2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	392	437	448	366	484	445	106	88	103	394	464	495	351	303	235
		(426 ± 30)			(432 ± 60)			(99 ± 10)			(451 ± 52)			(296 ± 58)		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	669	746	791	299	361	323	841	781	756	358	334	338	172	181	153
		(735 ± 62)			(328 ± 31)			(793 ± 44)			(343 ± 13)			(169 ± 14)		

Negative control, Water for injection JP

The purity of the test substance was 98.50%.

This substance contained not more than 0.01% free sulphur as impurity.

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

Table 3 Mutagenicity of C.I. Pigment Blue 29 in bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/ plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 *uvrA*			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	101	97	102	11	10	11	29	24	28	21	24	21	6	7	7
		(100 ±		3)	(11 ±		1)	(27 ±		3)	(22 ±		2)	(7 ±		1)
	313	106	109	112	14	10	10	33	18	37	10	20	23	4	8	7
		(109 ±		3)	(11 ±		2)	(29 ±		10)	(18 ±		7)	(6 ±		2)
	625	101	107	117	10	11	10	31	35	30	17	26	26	5	10	12
		(108 ±		8)	(10 ±		1)	(32 ±		3)	(23 ±		5)	(9 ±		4)
	1250	101	113	96	9	10	8	24	29	23	19	24	22	7	5	11
		(103 ±		9)	(9 ±		1)	(25 ±		3)	(22 ±		3)	(8 ±		3)
	2500	92	89	119	9	8	8	29	32	34	18	27	18	9	4	10
		(100 ±		17)	(8 ±		1)	(32 ±		3)	(21 ±		5)	(8 ±		3)
	5000	113	98	119	8	10	11	28	27	29	14	15	28	5	8	11
		(110 ±		11)	(10 ±		2)	(28 ±		1)	(19 ±		8)	(8 ±		3)
S9 mix (+)	0	112	108	126	8	14	12	41	31	31	16	21	18	11	18	17
		(115 ±		9)	(11 ±		3)	(34 ±		6)	(18 ±		3)	(15 ±		4)
	313	101	98	105	11	12	9	40	31	39	29	23	23	9	14	8
		(101 ±		4)	(11 ±		2)	(37 ±		5)	(25 ±		3)	(10 ±		3)
	625	97	117	119	9	11	10	37	26	31	27	26	30	15	6	15
		(111 ±		12)	(10 ±		1)	(31 ±		6)	(28 ±		2)	(12 ±		5)
	1250	122	103	101	11	17	6	33	31	36	21	29	18	12	5	13
		(109 ±		12)	(11 ±		6)	(33 ±		3)	(23 ±		6)	(10 ±		4)
	2500	102	96	129	8	14	9	36	30	31	31	22	13	13	10	9
		(109 ±		18)	(10 ±		3)	(32 ±		3)	(22 ±		9)	(11 ±		2)
	5000	114	109	123	12	11	13	38	35	42	28	30	25	13	8	6
		(115 ±		7)	(12 ±		1)	(38 ±		4)	(28 ±		3)	(9 ±		4)
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF-2			SA			AF-2			AF-2			9AA		
	Dose (μg / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	414	428	501	439	417	467	98	123	126	313	392	411	220	212	179
		(448 ±		47)	(441 ±		25)	(116 ±		15)	(372 ±		52)	(204 ±		22)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg / plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	714	834	877	302	329	363	706	703	659	380	333	436	169	205	233
		(808 ±		84)	(331 ±		31)	(689 ±		26)	(383 ±		52)	(202 ±		32)

Negative control, Water for injection JP

The purity of the test substance was 98.50%.

This substance contained not more than 0.01% free sulphur as impurity.

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

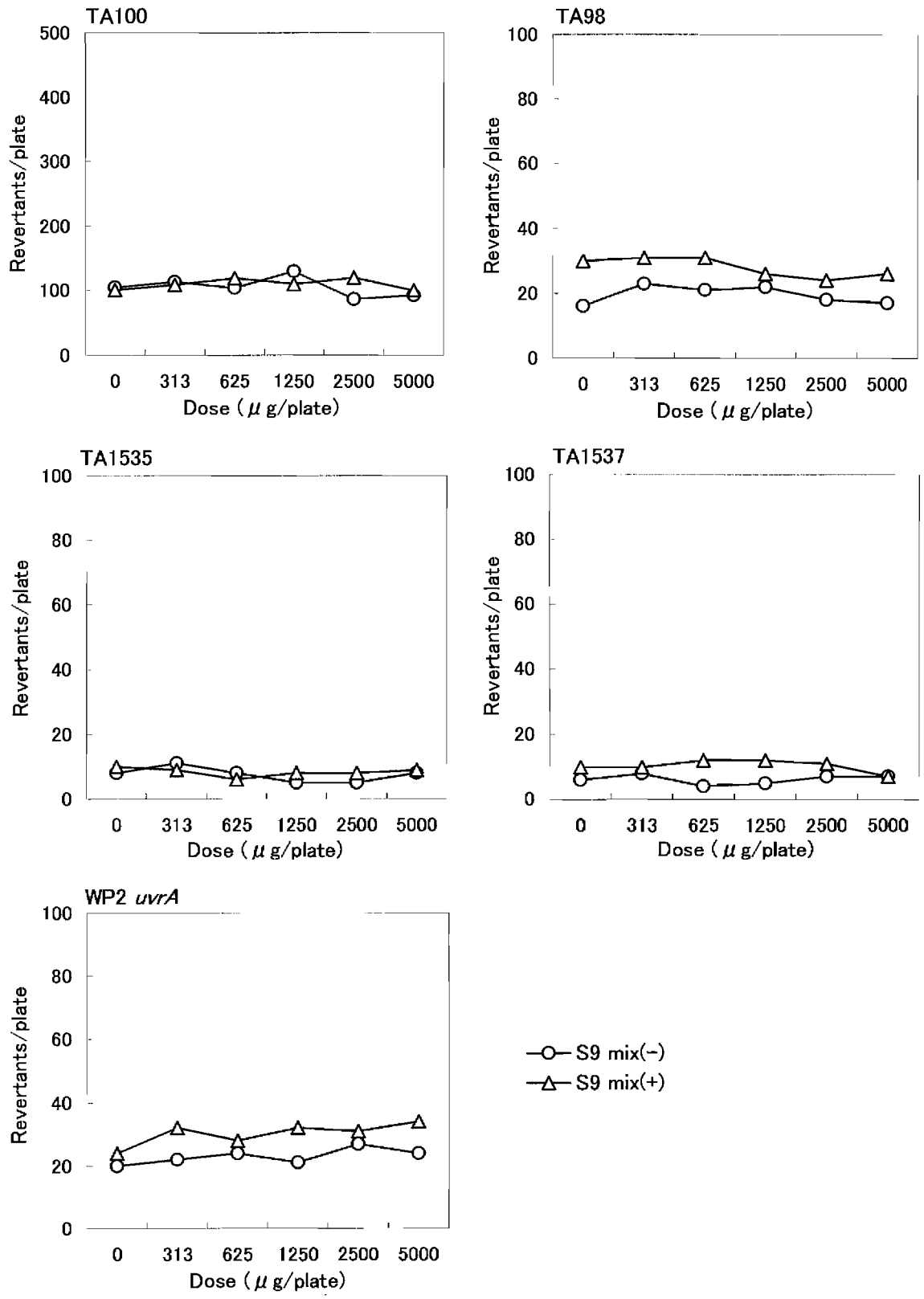

Figure 1 Dose response curves in mutagenicity test (I) of C.I. Pigment Blue 29 in bacteria

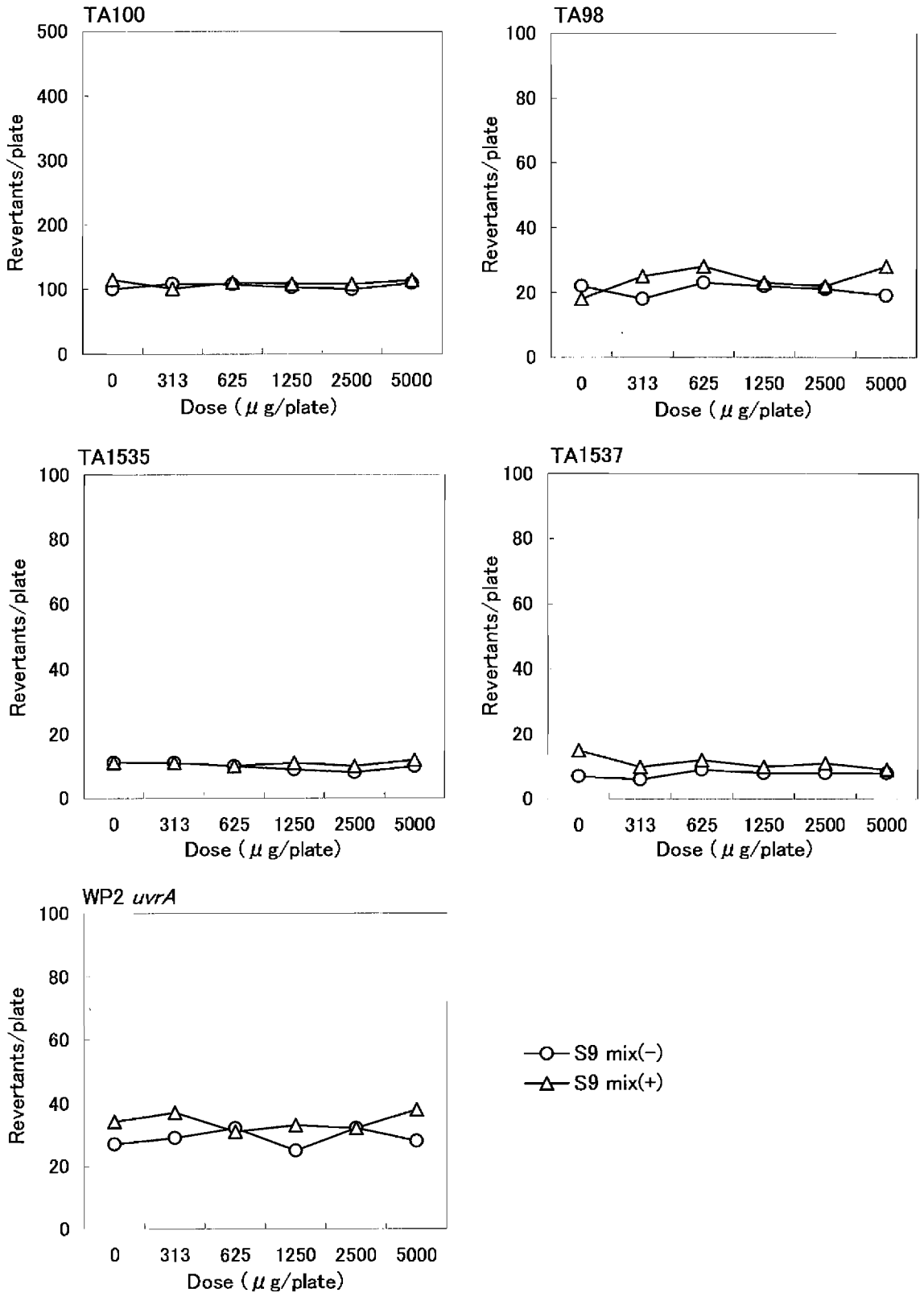

Figure 2 Dose response curves in mutagenicity test (II) of C.I. Pigment Blue 29 in bacteria