
C.I.ピグメントレッド 22の細菌を用いる復帰突然変異試験

最 終 報 告 書

作成日 2002年 4月 5日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目 次

要 約	7
緒 言	10
方 法	10
1. 被験物質, 陽性対照物質, 媒体対照物質および陰性対照物質	10
2. 検体液	11
3. 試験菌株	12
4. S9 mix	13
5. 培地	13
6. 無菌試験	14
7. 試験方法	14
8. 試験の成立条件	15
9. 統計学的方法	15
10. 判定基準	16
試験成績	17
1. 用量設定試験	17
2. 本試験(I)	17
3. 本試験(II)	18
考 察	19
文 献	20

TableおよびFigureの目次

Table 1	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria (dose-finding test)		25
Table 2-1	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test I)		26
Table 2-2	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test I)		27
Table 3-1	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test II)		28
Table 3-2	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test II)		29
Table 4	Maximum potency of test strains		30
Figure 1-1	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria(dose-finding test : without S9 mix)		31
Figure 1-2	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria(dose-finding test : with S9 mix)		31
Figure 2-1	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria(mutagenicity test I :without S9 mix)		32
Figure 2-2	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria(mutagenicity test I :with S9 mix)		32
Figure 3-1	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria(mutagenicity test II :without S9 mix)		33
Figure 3-2	Reverse mutation test of C.I.Pigment red 22 with bacteria(mutagenicity test II :with S9 mix)		33

要 約

C.I.ピグメントレッド 22の遺伝子突然変異誘発性の有無を，細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した．

試験菌株には*Salmonella typhimurium* のTA100，TA98，TA1535およびTA1537ならびに*Escherichia coli*のWP2uvrAを用いた．試験は，プレーンキュベーション法により，S9 mix無添加と添加の場合について実施した．

1. 本試験(I)および本試験(II)の試験濃度を設定するために用量設定試験を行った．試験濃度は，S9 mix無添加および添加の場合とも，全菌株1.22～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ （公比4，計7濃度）とした．

- 1.1 プレート上の析出物

S9 mix無添加および添加の場合とも，培養開始時および培養終了時において，312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において，赤色の微細な析出物が認められた．また，培地の色が赤く変色し，濃度が高くなるにつれてその色調が濃くなった．

- 1.2 菌の生育阻害

S9 mix無添加および添加の場合とも，いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった．

- 1.3 復帰変異コロニー数

S9 mix無添加の場合，TA100の78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で，TA98の312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で，TA1537の1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で，復帰変異コロニー数が，いずれも媒体対照（無水エタノール）の2倍以上の値を示し，濃度に依存して増加した．S9 mix添加の場合，TA100の1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で，TA98の5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で，TA1537の1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で，復帰変異コロニー数が，いずれも媒体対照の2倍以上の値を示し，濃度に依存して増加した．

2. 用量設定試験の結果に基づき本試験(I)および本試験(II)を行った．試験濃度は，用量反応性が求められ，復帰変異コロニー数が媒体対照値の2倍以下の値になる濃度を考慮して公比2で設定した．すなわち，S9 mix無添加の場合，TA100では19.5～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ （計9濃度），TA98では78.1～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ （計7濃度），TA1535，WP2uvrAおよびTA1537では312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ （計5濃度），S9 mix添加の場合，いずれの菌株とも，312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ （計5濃度）とした．

2.1 プレート上の析出物

S9 mix無添加および添加の場合とも、培養開始時および培養終了時において、312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度（S9 mix無添加のTA100およびTA98では156.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度）において、赤色の微細な析出物が認められた。また、培地の色が赤く変色し、濃度が高くなるにつれてその色調が濃くなった。

2.2 菌の生育阻害

S9 mix無添加および添加の場合とも、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。

2.3 復帰変異コロニー数

S9 mix無添加の場合、TA100の本試験(I)では、78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、本試験(II)では、156.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、TA98の本試験(I)では312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、本試験(II)では625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、TA1537の本試験(I)では1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、本試験(II)では2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、復帰変異コロニー数が、いずれも媒体対照の2倍以上の値を示し、濃度に依存して増加した。

S9 mix添加の場合、TA100の1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、本試験(I)のWP2uvrAの5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で、TA98の本試験(I)では625 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、本試験(II)では1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、TA1537の2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、復帰変異コロニー数が、いずれも媒体対照の2倍以上の値を示し、濃度に依存して増加した。

3. 媒体対照における復帰変異コロニー数は、用量設定試験、本試験(I)および本試験(II)とも陰性対照（注射用水）における値とほぼ同程度であった。
4. 用量設定試験、本試験(I)および本試験(II)で用いた陽性対照物質は明らかな陽性結果を示し、陰性対照および陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。
5. 本試験(I)および本試験(II)の結果には再現性が認められた。
6. 用量設定試験、本試験(I)および本試験(II)において、媒体対照の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現した濃度を対象に、TA100、WP2uvrA、TA98およびTA1537における被験物質1mg当たりの誘発復帰変異コロニー数（比活性値）を算出した。その結果、C.I.ピグメントレッド 22の最大比活性値はS9 mix無添加の場合におけるTA100の78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で1715.7となった。

以上の結果，S9 mix無添加の場合はTA100，TA98およびTA1537において，S9 mix添加の場合はTA100，WP2 $uvrA$ ，TA98およびTA1537において復帰変異コロニー数が濃度に依存して増加したことから，当試験の条件下において，C.I.ピグメントレッド 22は遺伝子突然変異誘発性を有すると判定する。

緒 言

C.I.ピグメントレッド 22の安全性に関する非臨床試験の一環として、「OECD化学品テストガイドライン, 471 細菌を用いる復帰突然変異試験」(1997年7月21日採択)および平成9年10月31日(環保安第287号環境庁企画調整局長, 衛生第127号厚生省生活衛生局長, 平成09.10.31基局第2号通商産業省基礎産業局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正等についての別添「ほ乳類を用いる28日間反復投与毒性試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による変異原性試験」に基づき, C.I.ピグメントレッド 22の細菌を用いる復帰突然変異試験を行い, その遺伝子突然変異誘発性の有無について検討した。

方 法

1. 被験物質, 陽性対照物質, 媒体対照物質および陰性対照物質

1.1 被験物質

被験物質のC.I.ピグメントレッド 22 (CAS No.6448959) は, 分子量: 426.42, 水, アセトン, DMSOに不溶で, 水, 熱および光に対して安定な赤色粉末である。当試験には, 厚生労働省 医薬局 審査管理課 化学物質安全対策室から提供されたものを用いた(製造元:

, ロット番号: , 純度: 99.8 %, 水分: 0.15 %, 水可溶分: 0.05 %)。

入手後は, 試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温の条件下で保管した。なお, 入手した被験物質に細菌の混在が確認されたため,

にてガンマ線滅菌(12.1~14.8 kGy)したものを供試した。

なお, 残余被験物質は, :にすべて返却した。

1.2 陽性対照物質

試験には下記の物質を使用した。

1.2.1 2-アミノアントラセン (2-aminoanthracene, 略名: 2AA)

黄色~黄緑褐色の結晶性の粉末(一級, 単品), 純度: 96.7 %, ロット番号: M6T7067, ナカライテスク株式会社, 購入日: 1997年3月27日, 使用期限: 2002年3月26日(自社規定), 保管条件: 冷所(1~10 °C)。

1.2.2 アジ化ナトリウム (sodium azide, 略名: NaN_3)

白色～ほとんど白色の結晶 (特級, 単品), 純度: 99.7 %, ロット番号: M8K9848, ナカライテスク株式会社, 購入日: 1998年11月19日, 使用期限: 2003年11月18日 (自社規定), 保管条件: 冷所 (1~10 °C) .

1.2.3 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine hydrochloride, 略名: 9AA)

黄色の粉末 (特級, 単品), 純度: 98.3 %, ロット番号: M8F1294, ナカライテスク株式会社, 購入日: 1998年11月19日, 使用期限: 2003年11月18日 (自社規定), 保管条件: 冷所 (1~10 °C) .

1.2.4 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 略名: AF-2]

黄みの赤色結晶性粉末 (特級, 単品), 純度: 99.1 %, ロット番号: PAE1151, 和光純薬工業株式会社, 購入日: 1999年2月1日, 使用期限: 2004年1月31日 (自社規定), 保管条件: 冷所 (1~10 °C) .

1.3 媒体対照物質

媒体対照物質には, 被験物質の媒体である無水エタノール (局方品, ロット番号: LF5585, 株式会社ワコーケミカル, 入手日: 2000年5月12日, 保管条件: 室温) を用いた.

1.4 陰性対照物質

陰性対照物質には, 注射用水 (局方品, ロット番号: K0J73, 株式会社大塚製薬工場) を用いた.

2. 検体液

2.1 被験物質

用量設定試験, 本試験(I)および本試験(II)とも, 被験物質 500 mgを秤量し, 無水エタノール 5.0 mLに懸濁して最高濃度液 (100 mg/mL) を調製した. 以下の濃度液は, 最高濃度液を無水エタノールで順次希釈して調製した. 調製は用時に行い, 使用後の残液は廃棄処分した.

2.2 陽性対照物質

2AA, 9AAおよびAF-2はジメチルスルホキシド (以下DMSOと略, 紫外外部吸収スペクトル用, ロット番号: 2AAおよび9AAはEP086, AF-2はGR173, 株式会社同仁化学研究所) に, NaN_3 は注射用水 (局方品, ロット番号: K9C77, 株式会社大塚製薬工場) に溶解して, 下記に示す

濃度液を調製した（2AAの調製日：2000年9月25日，9AAおよびNaN₃の調製日：2000年11月27日，AF-2の調製日：2001年4月9日，各調製液の使用期限は調製後1年以内とした）。

各調製液は，チューブ（2 mL容セラムチューブ，住友ベークライト株式会社）に0.5 mLずつ分注し，-80 °C設定の冷凍庫〔型式：MDF-291AT（検体保管庫 No.8），三洋電機株式会社〕内に凍結保管した。

試験の際には各調製液を融解して使用し，使用後の残液は廃棄処分した。

	菌株名	物質名	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g/plate}$)
S9 mix (－)	TA100	AF-2	0.1	0.01
	TA98	AF-2	1	0.1
	WP2uvrA	AF-2	0.1	0.01
	TA1535	NaN ₃	5	0.5
	TA1537	9AA	800	80
S9 mix (＋)	TA100	2AA	10	1
	TA98	2AA	5	0.5
	WP2uvrA	2AA	100	10
	TA1535	2AA	20	2
	TA1537	2AA	20	2

なお，いずれの物質も安定性ならびに媒体中での安定性に関して，現在正確な情報はないことから，これらの陽性対照物質の反応性が，試験施設のバックグラウンドデータのほぼ範囲内にある場合に，生物学的に十分な活性を有していたと判断した。

3. 試験菌株

試験菌株には，国内各GLP準拠毒性試験ガイドラインにおいて規定されており，変異原性物質に対する感受性が高く，細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている *S.typhimurium* のTA100，TA98，TA1535およびTA1537ならびに *E.coli* のWP2uvrAを使用した。TA100およびTA98は1996年10月18日に，TA1535，TA1537およびWP2uvrAは1995年2月25日に，いずれも中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センターから入手した。

菌株の特性として「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインとGLP-」¹⁾に従い，アミノ酸要求性，紫外線感受性，膜変異rfa特性および薬剤耐性因子R-factorプラスミドの有無を検査し（TA100およびTA98の検査日：2000年4月5日～4月7日，2000年4月12日～4月14日，TA1535，TA1537およびWP2uvrAの検査日：1999年11月17日～11月19日，1999年11月30日～12

月2日)，試験施設の基準に適合しているコロニーを選択した。

菌株の保管は、特性検査の結果から選択したコロニーを培養した菌懸濁液0.8 mLに対してDMSOを0.07 mLの割合で加えたものを、チューブ（2 mL容セラムチューブ、住友ベークライト株式会社）に200 μ Lずつ分注し、-80 °C設定の冷凍庫（型式：MDF-190AT、三洋電機株式会社）内に凍結保管した（TA100およびTA98の分注日：2000年4月21日，TA1535，TA1537およびWP2uvrAの分注日：1999年12月29日，使用期限：分注後2年以内）。なお，分注後に実施した菌株の特性検査結果をAttachment 1に示した（検査日：2000年5月9日～2000年5月11日）。

菌の前培養には、OXOID NUTRIENT BROTH No.2（ロット番号：219916，OXOID Ltd.）2.0 gに注射用水80 mLの割合で加えて高圧蒸気滅菌（121 °C，15分）した培養液を使用した。乾熱滅菌（180 °C，1時間，以下同様）したモルトン栓付きのL字管（容量：約40 mL）に先の培養液を10 mL分注し，ここへ融解した菌液を20 μ L接種した。これを往復振盪型式（振盪数：90回／分，振幅：4 cm）の振盪器（型式：M-100^N，タイテック株式会社）を用いて，37 °Cで8時間振盪培養した。培養終了後，菌懸濁液の濁度を測定し，そのO.D.値から生菌数を求めた（Attachment 2）。また，菌懸濁液は使用時まで室温で保管した。

なお，実験操作は空調設備を有したAmes試験室（A棟）において行った。

4. S9 mix

S9は，Attachment 3の条件により2001年5月11日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの（ロット番号：01051102）を使用した。S9は，2001年6月8日に購入し，使用時まで-80 °C設定の冷凍庫（型式：MDF-190AT，三洋電機株式会社）内に凍結保管した。

S9 mixは，S9 mix用のCofactor（商品名：Cofactor- I，ロット番号：999003，オリエンタル酵母工業株式会社）を注射用水で溶解し，メンブランフィルター（ ϕ 0.2 μ m，Nalge）で濾過した後，使用直前にS9を加えて調製した。S9 mixの組成をAttachment 4に示した。

5. 培地

最少グルコース寒天平板培地は，クリメディアAM-N培地（ロット番号：ANI230DQ，製造日：2001年4月10日，オリエンタル酵母工業株式会社）を使用した。クリメディアAM-N培地の組成をAttachment 5に示した。

トッパアガーは，注射用水にBacto Agar（ロット番号：101793JB，DIFCO）が0.6 %，塩化ナトリウムが0.5 %の割合になるように加えて高圧蒸気滅菌（121 °C，20分，以下同様）した。この水溶液に*S. typhimurium*の場合には0.5 mmol/L L-ヒスチジンと0.5 mmol/L D-ビオチンを混

合した水溶液を、*E.coli*の場合には0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を、それぞれ容量比10:1の割合で加えて調製した。なお、各アミノ酸溶液はフィルターシステム（φ0.22 μm, コーニング）で濾過したものを使用した。

6. 無菌試験

被験物質の最高濃度液およびS9 mixの無菌試験は、用量設定試験、本試験(I)および本試験(II)実施の際に、それぞれ2枚のプレートを用いて実施した。

試験は、被験物質の最高濃度液0.05 mLまたはS9 mix 0.5 mLに、45 °Cに保温したトッパガー2 mLを加えて最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ、プレートを転倒して37 °C設定の恒温器（型式：IA-81, ヤマト科学株式会社）内で約48時間培養した後、コロニーの出現を調べた。被験物質の最高濃度液の無菌試験には、用量設定試験、本試験(I)および本試験(II)とも100 mg/mL濃度液を用いた。

7. 試験方法

7.1 試験操作

試験条件をAttachment 6に示した。

試験は、ブレインキュベーション法により、代謝活性化によらない場合（S9 mix無添加）と代謝活性化による場合（S9 mix添加）で行った。すなわち、乾熱滅菌した試験管（15.5×100 mm, 清浄試験管ラルボ, テルモ株式会社）に、①被験物質検体液、媒体対照液および陰性対照液0.05 mL、陽性対照液0.1mL②高圧蒸気滅菌した0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液（pH7.4）0.5mL（代謝活性化によらない場合）またはS9 mix 0.5 mL（代謝活性化による場合）、③菌懸濁液0.1 mLの順に加え、往復振盪型式の振盪器を用いて37 °Cで20分間インキュベーションした。その後、45 °Cに保温したトッパガーを2 mL加えて混合した後、最少グルコース寒天平板培地上に播き広げ、プレートを転倒して37 °C設定の恒温器内で約48時間培養した。

培養終了後、プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後、復帰変異コロニー数を、陰性対照、媒体対照および被験物質群では目算法により、陽性対照ではコロニーアナライザー（CA-11D エームステストシステム）により計測し、その後、菌の生育阻害の有無を100倍の顕微鏡下で観察した。プレート上での析出物の有無は、培養開始時にも肉眼で観察した。

プレートは、菌株、代謝活性化の有無および濃度の組み合わせごとに用量設定試験では1枚、本試験(I)および本試験(II)では各3枚使用した。また、試験管およびプレートは、菌株ごとに油性インクで色分けすることで識別した。

7.2 用量設定試験

用量設定試験の試験濃度は、「新規化学物質等に係る試験方法について」（平成9年10月31日）に従い、S9 mix無添加および添加の場合とも、いずれの菌株も5000 μ g/plateを最高として、以下公比4で1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88および1.22 μ g/plateの計7濃度を設定した。対照として、全菌株に対し媒体対照、陰性対照および陽性対照を設けた。

7.3 本試験(I)および本試験(II)

用量設定試験の結果から本試験(I)および本試験(II)の試験濃度は、用量反応性が求められ、復帰変異コロニー数が媒体対照値の2倍以下の値になる濃度を考慮して公比2で設定した。

すなわち、S9 mix無添加の場合、TA100では19.5~5000 μ g/plate（計9濃度）、TA98では78.1~5000 μ g/plate（計7濃度）、TA1535, WP2uvrAおよびTA1537では312.5~5000 μ g/plate（計5濃度）、S9 mix添加の場合、いずれの菌株とも、312.5~5000 μ g/plate（計5濃度）とした。対照として、全菌株に対し媒体対照、陰性対照および陽性対照を設けた。

8. 試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入がなく、媒体対照の復帰変異コロニー数が陰性対照の復帰変異コロニー数とほぼ同程度であり、また、陰性対照および陽性対照の復帰変異コロニー数が試験施設のバックグラウンドデータ（Attachment 7）のほぼ範囲内にあり、さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験が成立するものとした。

9. 統計学的方法

復帰変異コロニー数は濃度ごとに平均値と標準偏差を算出した。なお、有意差検定は実施しなかった。

10. 判定基準

試験の結果は、被験物質を処理したプレートにおける復帰変異コロニー数が媒体対照の2倍以上の値を示し、さらに高濃度になるに従って増加した場合を陽性とした。

また、陽性と判定した場合には、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現した濃度を対象に、被験物質1 mg当たりの誘発復帰変異コロニー数を次式により算出し、その最高値を当該被験物質の比活性とした。

$$\text{比活性} = \frac{\left(\begin{array}{c} \text{当該試験濃度におけるプレート} \\ \text{当たりの復帰変異コロニー} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{媒体対照におけるプレート} \\ \text{当たりの復帰変異コロニー数} \end{array} \right)}{\text{当該濃度値 (mg / plate)}}$$

試験成績

1. 用量設定試験

用量設定試験の結果をTable 1およびFigure 1-1～1-2に示した。

被験物質を処理したプレート上の析出物は、S9 mix無添加および添加の場合とも、培養開始時および培養終了時において、312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度において、赤色の微細な析出物が認められた。また、培地の色が赤く変色し、濃度が高くなるにつれてその色調が濃くなった。

被験物質を処理したプレートにおける菌の生育阻害は、S9 mix無添加および添加の場合ともいずれの菌株においても認められなかった。

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加の場合はTA100の78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、TA98の312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、TA1537の1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、いずれも媒体対照（無水エタノール）の2倍以上の値を示し、濃度に依存して増加した。S9 mix添加の場合はTA100の1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、TA98の5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で、TA1537の1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、いずれも媒体対照の2倍以上の値を示し、濃度に依存して増加した。

媒体対照における復帰変異コロニー数は、いずれの菌株も陰性対照における値とほぼ同程度であった。

無菌試験では、被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照および陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

2. 本試験(I)

本試験(I)の結果をTable 2-1～2-2およびFigure 2-1～2-2に示した。

被験物質を処理したプレート上の析出物は、S9 mix無添加および添加の場合とも、培養開始時および培養終了時において、312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度（S9 mix無添加のTA100およびTA98では156.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度）において、赤色の微細な析出物が認められた。また、培地の色が赤く変色し、濃度が高くなるにつれてその色調が濃くなった。

被験物質を処理したプレートにおける菌の生育阻害は、S9 mix無添加および添加の場合ともいずれの菌株においても認められなかった。

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加の場合はTA100の78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、TA98では312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、TA1537では1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度で、いずれも媒体対照の

2倍以上の値を示し、濃度に依存して増加した。S9 mix添加の場合はTA100の1250 µg/plate以上の濃度で、WP2uvrAの5000 µg/plateで、TA98の625 µg/plate以上の濃度で、TA1537の2500 µg/plate以上の濃度で、いずれも媒体対照の2倍以上の値を示し、濃度に依存して増加した。

媒体対照における復帰変異コロニー数は、いずれの菌株も陰性対照における値とほぼ同程度であった。

無菌試験では、被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照および陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

3. 本試験(II)

本試験(II)の結果をTable 3-1～3-2およびFigure 3-1～3-2に示した。

被験物質を処理したプレート上の析出物は、S9 mix無添加および添加の場合とも、培養開始時および培養終了時において、312.5 µg/plate以上の濃度（S9 mix無添加のTA100およびTA98では156.3 µg/plate以上の濃度）において、赤色の微細な析出物が認められた。また、培地の色が赤く変色し、濃度が高くなるにつれてその色調が濃くなった。

被験物質を処理したプレートにおける菌の生育阻害は、S9 mix無添加および添加の場合ともいずれの菌株においても認められなかった。

復帰変異コロニー数は、S9 mix無添加の場合はTA100の156.3 µg/plate以上の濃度で、TA98の625 µg/plate以上の濃度で、TA1537の2500 µg/plate以上の濃度で、いずれも媒体対照の2倍以上の値を示し、濃度に依存して増加した。S9 mix添加の場合はTA100の1250 µg/plate以上の濃度で、TA98の1250 µg/plate以上の濃度で、TA1537の2500 µg/plate以上の濃度で、いずれも媒体対照の2倍以上の値を示し、濃度に依存して増加した。

媒体対照における復帰変異コロニー数は、いずれの菌株も陰性対照における値とほぼ同程度であった。

無菌試験では、被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

陽性対照物質は、明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また、陰性対照および陽性対照における復帰変異コロニー数は、試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

用量設定試験、本試験(I)および本試験(II)において、溶媒対照の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現した濃度を対象に、TA100、WP2uvrA、TA98およびTA1537における被験物質1 mg

当たりの誘発復帰変異コロニー数（比活性値）を算出した（Table 4）。その結果，C.I.ピグメントレッド 22の最大比活性値はS9 mix無添加の場合におけるTA100の78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で1715.7となった。

考 察

C.I.ピグメントレッド 22の遺伝子突然変異誘発性の有無を，細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した。

復帰変異コロニー数は，S9 mix無添加の場合はTA100，TA98およびTA1537において，S9 mix添加の場合はTA100，WP2uvrA，TA98およびTA1537において，濃度に依存して増加した。

菌の生育阻害は，S9 mix無添加および添加の場合とも，いずれの菌株においても認められなかった。

被験物質を処理したプレート上の析出物は，培養開始時および培養終了時において312.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度〔本試験(I)および本試験(II)におけるS9 mix無添加のTA100およびTA98では156.3 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の濃度〕において，赤色の微細な析出物が認められ，濃度が高くなるにつれて培地が赤く染まった。

各試験の媒体対照における復帰変異コロニー数は，いずれの菌株も陰性対照における値とほぼ同程度であった。

各試験における無菌試験では，被験物質の最高濃度液およびS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

各試験で用いた陽性対照物質は，明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。また，陰性対照および陽性対照における復帰変異コロニー数は，試験施設のバックグラウンドデータの範囲内にあった。

本試験(I)および本試験(II)に再現性が認められた。

これらのことから，試験は適切に実施されたことが確認された。

以上の結果，S9 mix無添加の場合はTA100，TA98およびTA1537において，S9 mix添加の場合はTA100，WP2uvrA，TA98およびTA1537において復帰変異コロニー数が濃度に依存して増加したことから，当試験の条件下において，C.I.ピグメントレッド 22は遺伝子突然変異誘発性を有すると判定する。

文 献

- 1) 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－，中央労働災害防止協会，平成3年3月

Table 1. Reverse mutation test of C. I. Pigment red 22 with bacteria (dose-finding test)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	109	19	46	19	7
	Vehicle control	99	12	41	28	8
	1.22	119	22	52	26	10
	4.88	121	19	43	28	12
	19.5	135	14	43	22	8
	78.1	233	13	45	43	15
	312.5#	295	18	48	69	14
	1250#	493	14	38	94	17
	5000#	536	13	50	143	20
S9 mix (+)	Negative control	150	19	34	38	14
	Vehicle control	106	17	50	51	14
	1.22	125	25	52	28	12
	4.88	104	13	59	28	18
	19.5	140	27	41	29	12
	78.1	146	19	46	43	27
	312.5#	157	17	37	45	25
	1250#	330	16	54	89	32
	5000#	608	22	86	151	38
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	501	548	123	449	358
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1064	399	1135	436	167

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide; NaN₃: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride; 2AA: 2-Aminoanthracene.

: Red fine precipitations were seen on the surface of agar plate and agar plate gradually became red as the substance concentrations became higher.

Table 2-1. Reverse mutation test of C. I. Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test I)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	80 93 101 (91 $\pm$ 10.6)	4 9 10 (8 $\pm$ 3.2)	37 52 54 (48 $\pm$ 9.3)	19 28 28 (25 $\pm$ 5.2)	13 15 16 (15 $\pm$ 1.5)
	Vehicle control	75 80 87 (81 $\pm$ 6.0)	5 9 11 (8 $\pm$ 3.1)	34 36 39 (36 $\pm$ 2.5)	15 28 40 (28 $\pm$ 12.5)	12 15 18 (15 $\pm$ 3.0)
	19.5	106 124 138 (123 $\pm$ 16.0)				
	39.1	136 147 149 (144 $\pm$ 7.0)				
	78.1	164 177 187 (176 $\pm$ 11.5)			42 49 55 (49 $\pm$ 6.5)	
	156.3#	224 254 292 (257 $\pm$ 34.1)			49 53 62 (55 $\pm$ 6.7)	
	312.5#	318 338 339 (332 $\pm$ 11.8)	8 10 18 (12 $\pm$ 5.3)	34 38 40 (37 $\pm$ 3.1)	65 75 79 (73 $\pm$ 7.2)	14 18 20 (17 $\pm$ 3.1)
	625#	350 415 462 (409 $\pm$ 56.2)	8 10 17 (12 $\pm$ 4.7)	38 39 42 (40 $\pm$ 2.1)	89 95 95 (93 $\pm$ 3.5)	15 18 24 (19 $\pm$ 4.6)
	1250#	515 539 575 (543 $\pm$ 30.2)	7 10 12 (10 $\pm$ 2.5)	37 41 48 (42 $\pm$ 5.6)	103 110 122 (112 $\pm$ 9.6)	30 31 35 (32 $\pm$ 2.6)
	2500#	502 586 588 (559 $\pm$ 49.1)	7 8 11 (9 $\pm$ 2.1)	35 35 42 (37 $\pm$ 4.0)	129 133 147 (136 $\pm$ 9.5)	24 32 37 (31 $\pm$ 6.6)
	5000#	470 478 526 (491 $\pm$ 30.3)	8 9 17 (11 $\pm$ 4.9)	33 41 43 (39 $\pm$ 5.3)	145 154 162 (154 $\pm$ 8.5)	36 38 50 (41 $\pm$ 7.6)
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	526 572 579 (559 $\pm$ 28.8)	534 549 612 (565 $\pm$ 41.4)	139 172 173 (161 $\pm$ 19.3)	405 441 446 (431 $\pm$ 22.4)	174 180 197 (184 $\pm$ 11.9)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

() : Mean $\pm$ S.D.AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.

: Red fine precipitations were seen on the surface of agar plate and agar plate gradually became red as the substance concentrations became higher.

Table 2-2. Reverse mutation test of C. I. Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test I)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	90 118 120 (109 $\pm$ 16.8)	9 11 13 (11 $\pm$ 2.0)	32 40 40 (37 $\pm$ 4.6)	31 33 37 (34 $\pm$ 3.1)	14 23 27 (21 $\pm$ 6.7)
	Vehicle control	97 97 106 (100 $\pm$ 5.2)	7 13 13 (11 $\pm$ 3.5)	36 38 46 (40 $\pm$ 5.3)	37 39 45 (40 $\pm$ 4.2)	12 16 19 (16 $\pm$ 3.5)
	312.5#	128 136 150 (138 $\pm$ 11.1)	7 11 12 (10 $\pm$ 2.6)	43 46 55 (48 $\pm$ 6.2)	57 66 66 (63 $\pm$ 5.2)	20 20 23 (21 $\pm$ 1.7)
	625#	163 179 184 (175 $\pm$ 11.0)	8 10 11 (10 $\pm$ 1.5)	43 45 52 (47 $\pm$ 4.7)	79 92 98 (90 $\pm$ 9.7)	19 20 21 (20 $\pm$ 1.0)
	1250#	319 329 332 (327 $\pm$ 6.8)	6 6 14 (9 $\pm$ 4.6)	54 71 76 (67 $\pm$ 11.5)	74 101 101 (92 $\pm$ 15.6)	18 25 25 (23 $\pm$ 4.0)
	2500#	414 484 507 (468 $\pm$ 48.4)	7 12 14 (11 $\pm$ 3.6)	66 67 67 (67 $\pm$ 0.6)	119 124 126 (123 $\pm$ 3.6)	29 30 40 (33 $\pm$ 6.1)
	5000#	510 522 530 (521 $\pm$ 10.1)	11 13 14 (13 $\pm$ 1.5)	86 92 101 (93 $\pm$ 7.5)	146 151 166 (154 $\pm$ 10.4)	42 43 45 (43 $\pm$ 1.5)
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1097 1172 1242 (1170 $\pm$ 72.5)	337 397 422 (385 $\pm$ 43.7)	1004 1113 1254 (1124 $\pm$ 125.3)	491 505 507 (501 $\pm$ 8.7)	187 191 218 (199 $\pm$ 16.9)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

() : Mean $\pm$ S.D.

2AA: 2-Aminoanthracene.

: Red fine precipitations were seen on the surface of agar plate and agar plate gradually became red as the substance concentrations became higher.

Table 3-1. Reverse mutation test of C. I. Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test II)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	115 120 134 (123 $\pm$ 9.8)	5 11 13 (10 $\pm$ 4.2)	32 47 63 (47 $\pm$ 15.5)	23 31 33 (29 $\pm$ 5.3)	6 7 12 (8 $\pm$ 3.2)
	Vehicle control	109 110 115 (111 $\pm$ 3.2)	5 10 12 (9 $\pm$ 3.6)	34 40 53 (42 $\pm$ 9.7)	37 38 41 (39 $\pm$ 2.1)	5 10 13 (9 $\pm$ 4.0)
	19.5	155 166 191 (171 $\pm$ 18.4)				
	39.1	167 181 181 (176 $\pm$ 8.1)				
	78.1	200 222 233 (218 $\pm$ 16.8)			48 69 73 (63 $\pm$ 13.4)	
	156.3#	247 285 323 (285 $\pm$ 38.0)			41 64 69 (58 $\pm$ 14.9)	
	312.5#	257 305 322 (295 $\pm$ 33.7)	8 10 12 (10 $\pm$ 2.0)	42 47 47 (45 $\pm$ 2.9)	55 58 63 (59 $\pm$ 4.0)	14 15 15 (15 $\pm$ 0.6)
	625#	427 432 448 (436 $\pm$ 11.0)	7 10 17 (11 $\pm$ 5.1)	31 39 44 (38 $\pm$ 6.6)	79 91 105 (92 $\pm$ 13.0)	12 16 17 (15 $\pm$ 2.6)
	1250#	514 516 575 (535 $\pm$ 34.7)	4 15 17 (12 $\pm$ 7.0)	36 42 47 (42 $\pm$ 5.5)	121 127 145 (131 $\pm$ 12.5)	10 15 18 (14 $\pm$ 4.0)
	2500#	478 521 557 (519 $\pm$ 39.6)	6 10 13 (10 $\pm$ 3.5)	37 37 44 (39 $\pm$ 4.0)	145 161 173 (160 $\pm$ 14.0)	16 20 20 (19 $\pm$ 2.3)
	5000#	460 532 618 (537 $\pm$ 79.1)	10 10 12 (11 $\pm$ 1.2)	32 44 64 (47 $\pm$ 16.2)	174 196 198 (189 $\pm$ 13.3)	16 18 19 (18 $\pm$ 1.5)
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	588 609 621 (606 $\pm$ 16.7)	569 595 604 (589 $\pm$ 18.2)	148 168 182 (166 $\pm$ 17.1)	439 443 534 (472 $\pm$ 53.7)	297 302 310 (303 $\pm$ 6.6)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

() : Mean $\pm$ S.D.AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃: Sodium azide; 9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride.

: Red fine precipitations were seen on the surface of agar plate and agar plate gradually became red as the substance concentrations became higher.

Table 3-2. Reverse mutation test of C. I. Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test II)

With (+) or Without (-) S9 mix	Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	126 126 161 (138 $\pm$ 20.2)	9 11 13 (11 $\pm$ 2.0)	35 49 50 (45 $\pm$ 8.4)	30 30 42 (34 $\pm$ 6.9)	13 13 22 (16 $\pm$ 5.2)
	Vehicle control	129 148 151 (143 $\pm$ 11.9)	6 12 12 (10 $\pm$ 3.5)	32 43 58 (44 $\pm$ 13.1)	34 39 46 (40 $\pm$ 6.0)	12 12 16 (13 $\pm$ 2.3)
	312.5#	146 171 177 (165 $\pm$ 16.4)	10 14 16 (13 $\pm$ 3.1)	42 44 62 (49 $\pm$ 11.0)	48 51 56 (52 $\pm$ 4.0)	12 19 25 (19 $\pm$ 6.5)
	625#	218 224 235 (226 $\pm$ 8.6)	10 10 18 (13 $\pm$ 4.6)	43 46 62 (50 $\pm$ 10.2)	55 70 72 (66 $\pm$ 9.3)	20 21 23 (21 $\pm$ 1.5)
	1250#	331 380 381 (364 $\pm$ 28.6)	6 12 13 (10 $\pm$ 3.8)	45 52 61 (53 $\pm$ 8.0)	88 96 105 (96 $\pm$ 8.5)	20 25 27 (24 $\pm$ 3.6)
	2500#	583 585 598 (589 $\pm$ 8.1)	8 10 14 (11 $\pm$ 3.1)	61 67 87 (72 $\pm$ 13.6)	129 140 162 (144 $\pm$ 16.8)	22 30 36 (29 $\pm$ 7.0)
	5000#	687 702 881 (757 $\pm$ 107.9)	12 13 15 (13 $\pm$ 1.5)	77 79 91 (82 $\pm$ 7.6)	182 200 208 (197 $\pm$ 13.3)	33 41 52 (42 $\pm$ 9.5)
Positive control requiring S9 mix	Name	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1297 1312 1435 (1348 $\pm$ 75.7)	349 350 370 (356 $\pm$ 11.8)	1177 1203 1512 (1297 $\pm$ 186.4)	514 530 547 (530 $\pm$ 16.5)	159 164 168 (164 $\pm$ 4.5)

Negative control: Distilled water.

Vehicle control: Absolute ethanol.

() : Mean $\pm$ S.D.

2AA: 2-Aminoanthracene.

: Red fine precipitations were seen on the surface of agar plate and agar plate gradually became red as the substance concentrations became higher.

Table 4. Maximum potency of test strains

		Maximum potency of test strains (number of colonies/mg)									
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
		Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix	Without S9 mix	With S9 mix
Dose-finding test	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	78.1	1250	— a)	— a)	— a)	— a)	312.5	5000	1250	1250
	Maximum potency	1715.7	179.2	—	—	—	—	131.2	20.0	7.2	14.4
Mutagenicity test (I)	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	78.1	1250	—	—	—	5000	312.5	625	1250	2500
	Maximum potency	1216.4	181.6	—	—	—	10.6	144.0	80.0	13.6	6.8
Mutagenicity test (II)	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	156.3	2500	—	—	—	—	625	1250	2500	2500
	Maximum potency	1113.2	178.4	—	—	—	—	84.8	44.8	4.0	6.4

a): Negative.

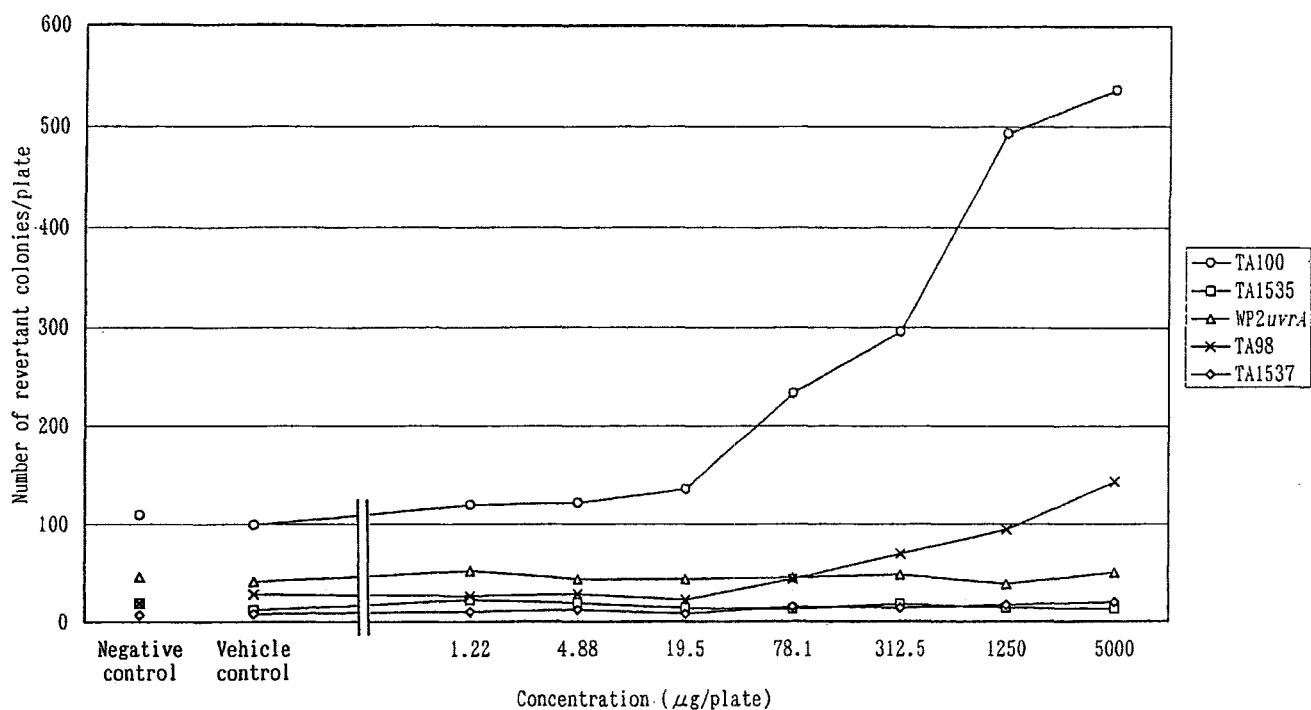


Figure 1-1. Reverse mutation test of C.I. Pigment red 22 with bacteria (dose-finding test: without S9 mix).

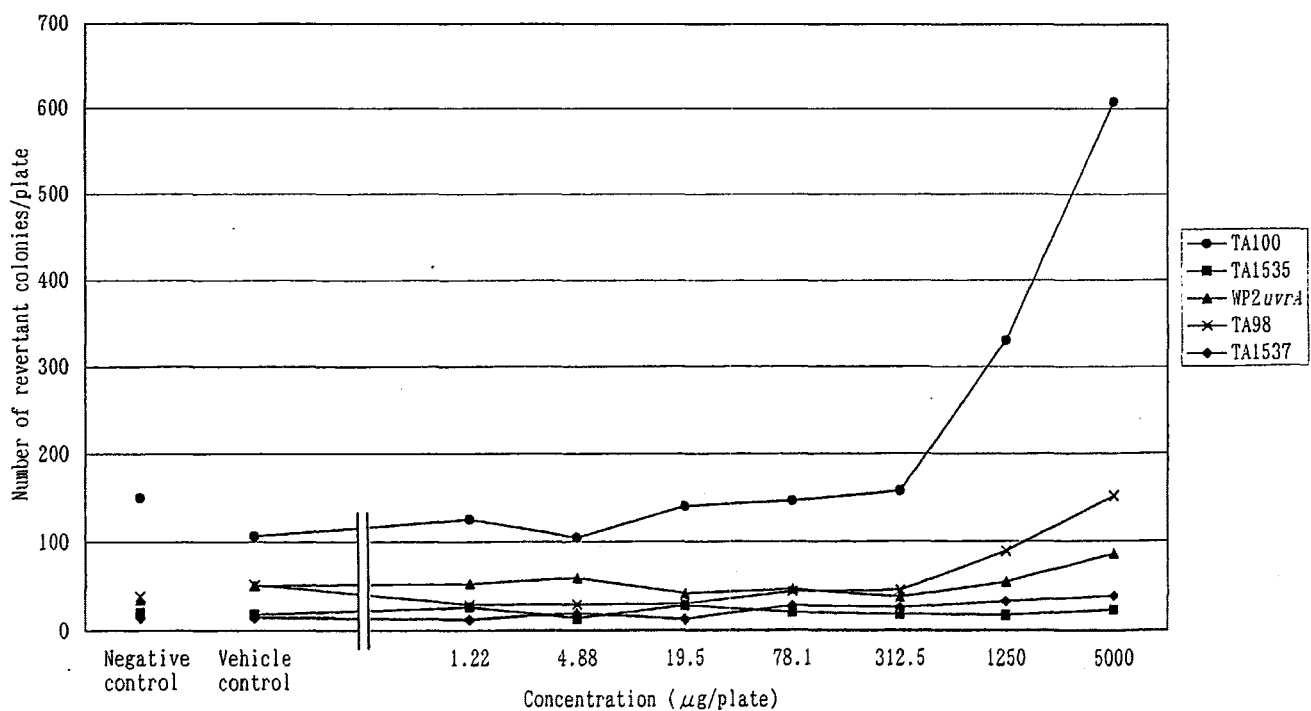


Figure 1-2. Reverse mutation test of C.I. Pigment red 22 with bacteria (dose-finding test: with S9 mix).

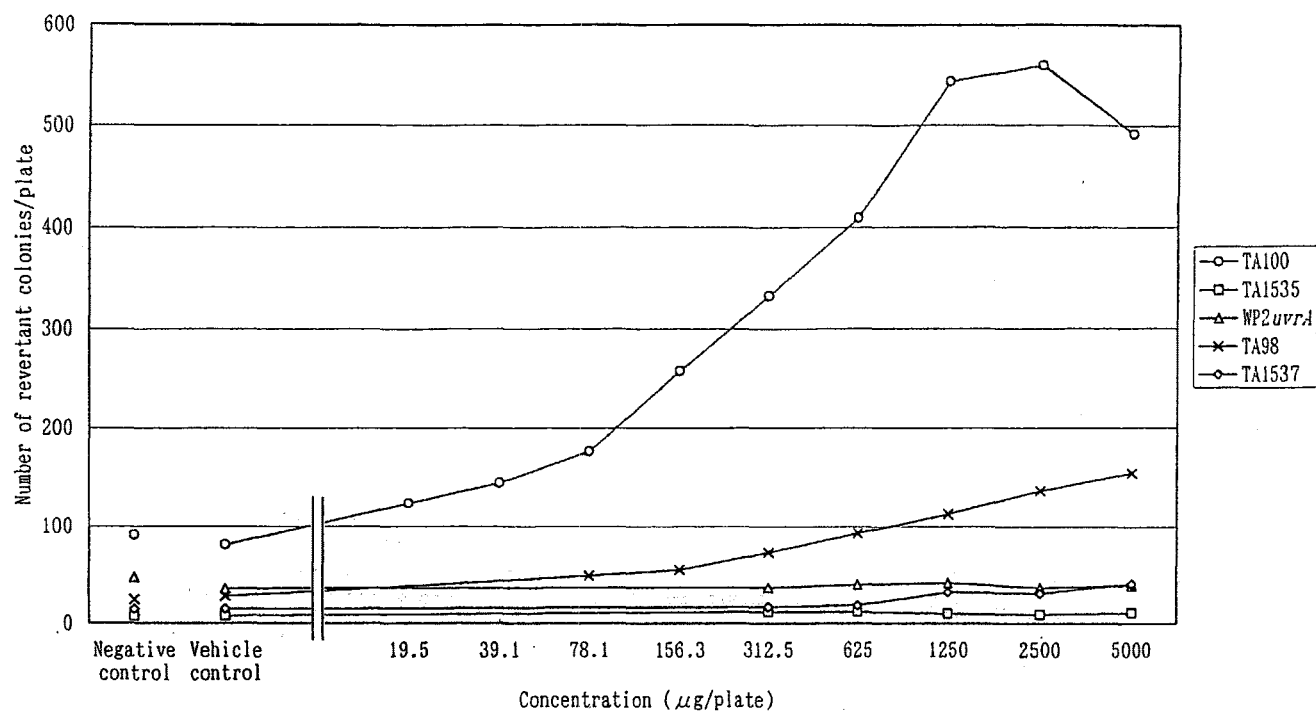


Figure 2-1. Reverse mutation test of C. I. Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test I: without S9 mix).

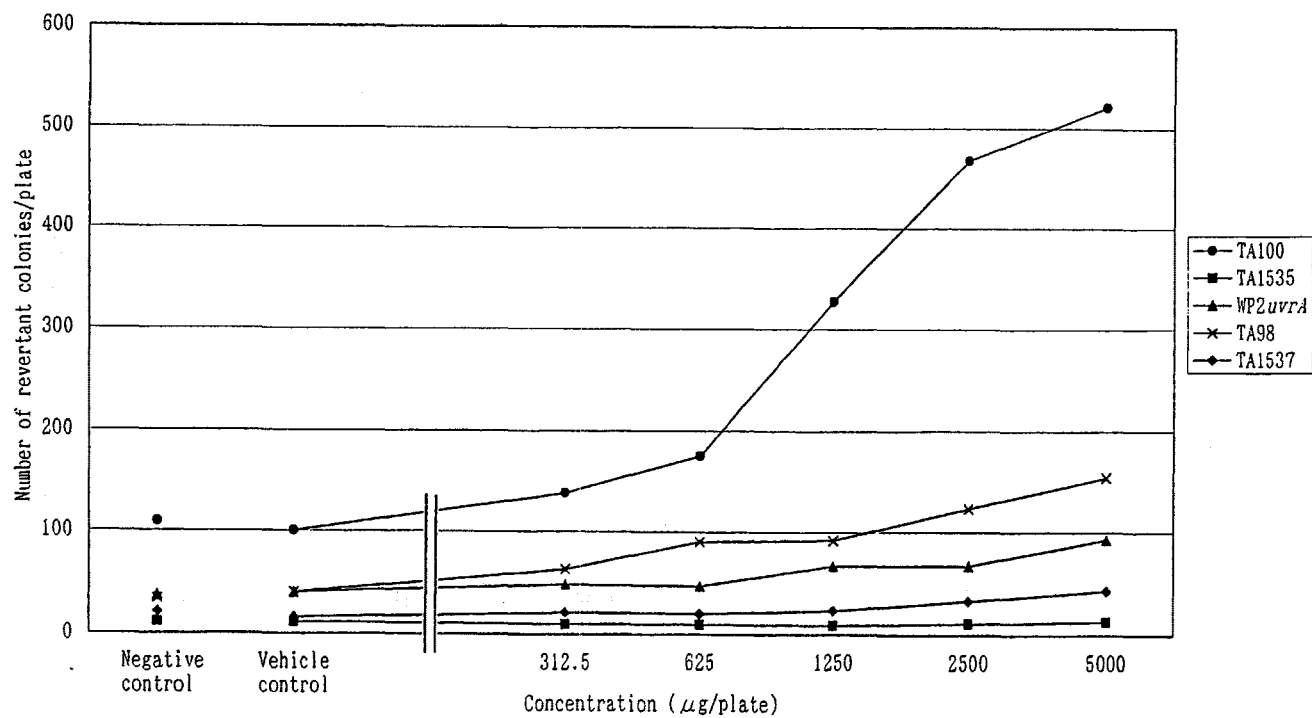


Figure 2-2. Reverse mutation test of C. I. Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test I: with S9 mix).

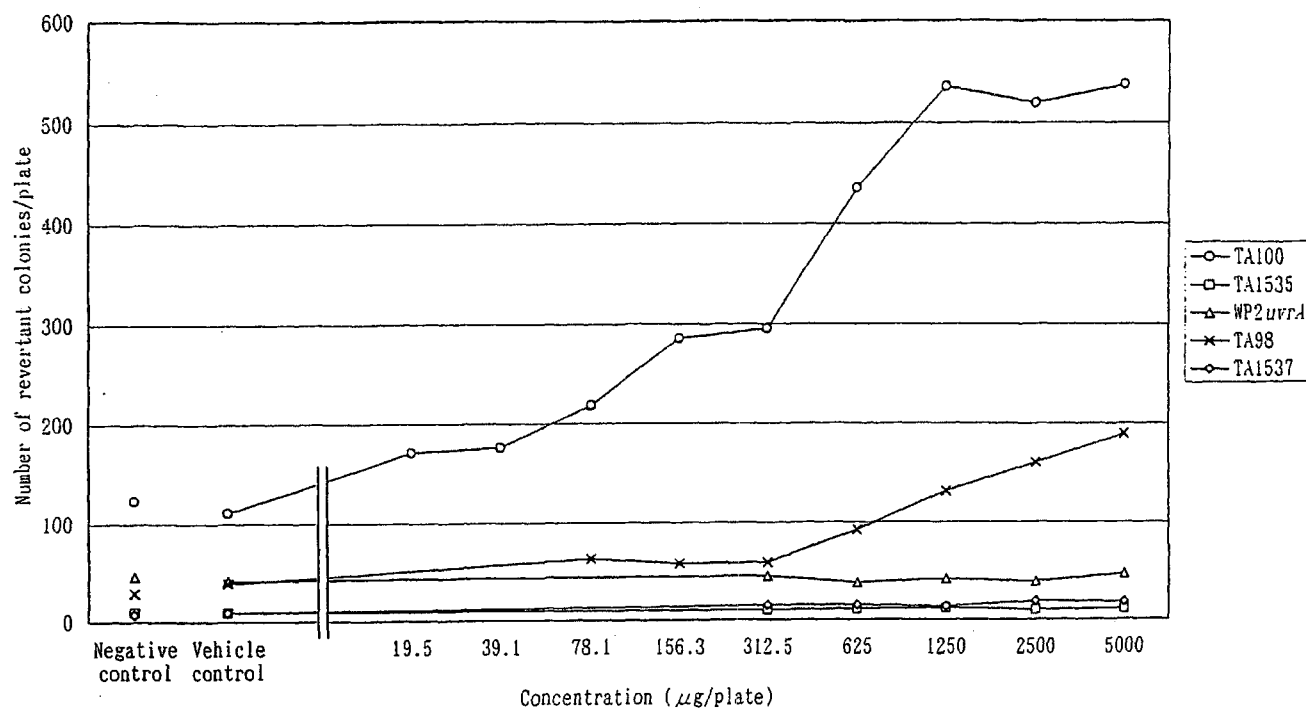


Figure 3-1. Reverse mutation test of C. I. Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test II: without S9 mix).

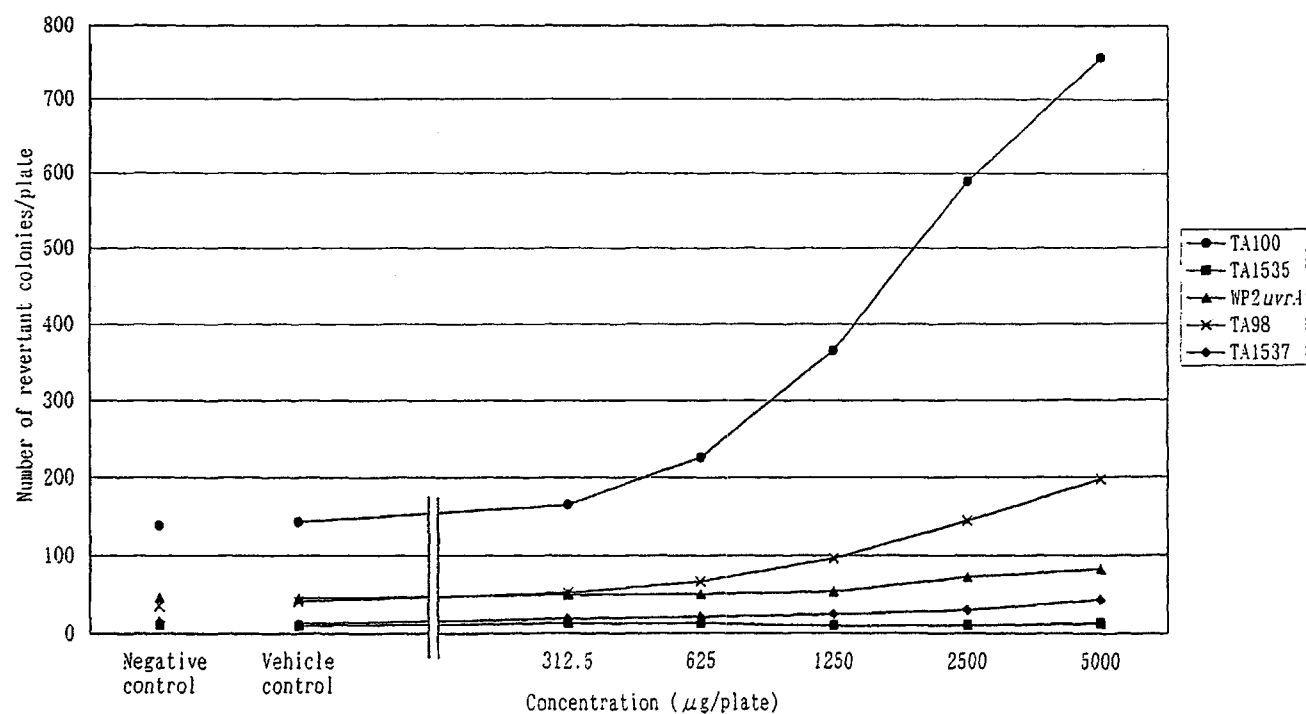


Figure 3-2. Reverse mutation test of C. I. Pigment red 22 with bacteria (mutagenicity test II: with S9 mix).