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 *uvrA*	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 *uvrA*	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_2：81.2%

Sb_2O_3：12.22%

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_2

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 のバッ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 μL 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℃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℃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（×10^9／mL）				
	TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	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 ヵ月以内の 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
$MgCl_2$	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

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℃）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. 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	μg／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.	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 *uvrA*)

《代謝活性化系存在下：+S9 mix》

a.	2-AA	1	μg／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 *uvrA*)

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 μL あるいは S9 mix 500 μL にトップアガーをそれぞれ 2 mL 添加し，プレート上に注いだ．37℃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 μg／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 μL，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 μL，代謝活性化系存在下（+S9 mix）の場合，S9 mix を 500 μL 分注した．さらに前培養した試験菌株の懸濁液 100 μL を加えた後，振盪恒温器（M-100^{N}：タイテック株式会社）を用いて 37℃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℃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（×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 *uvrA*	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 μg／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 μg／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 μg／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[1)], TA100 および TA98 を用いた Ames 試験では陰性[1)], V79 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験（SCE）では陽性[1)]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[2)], V79 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験（SCE）では陽性[1)]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).

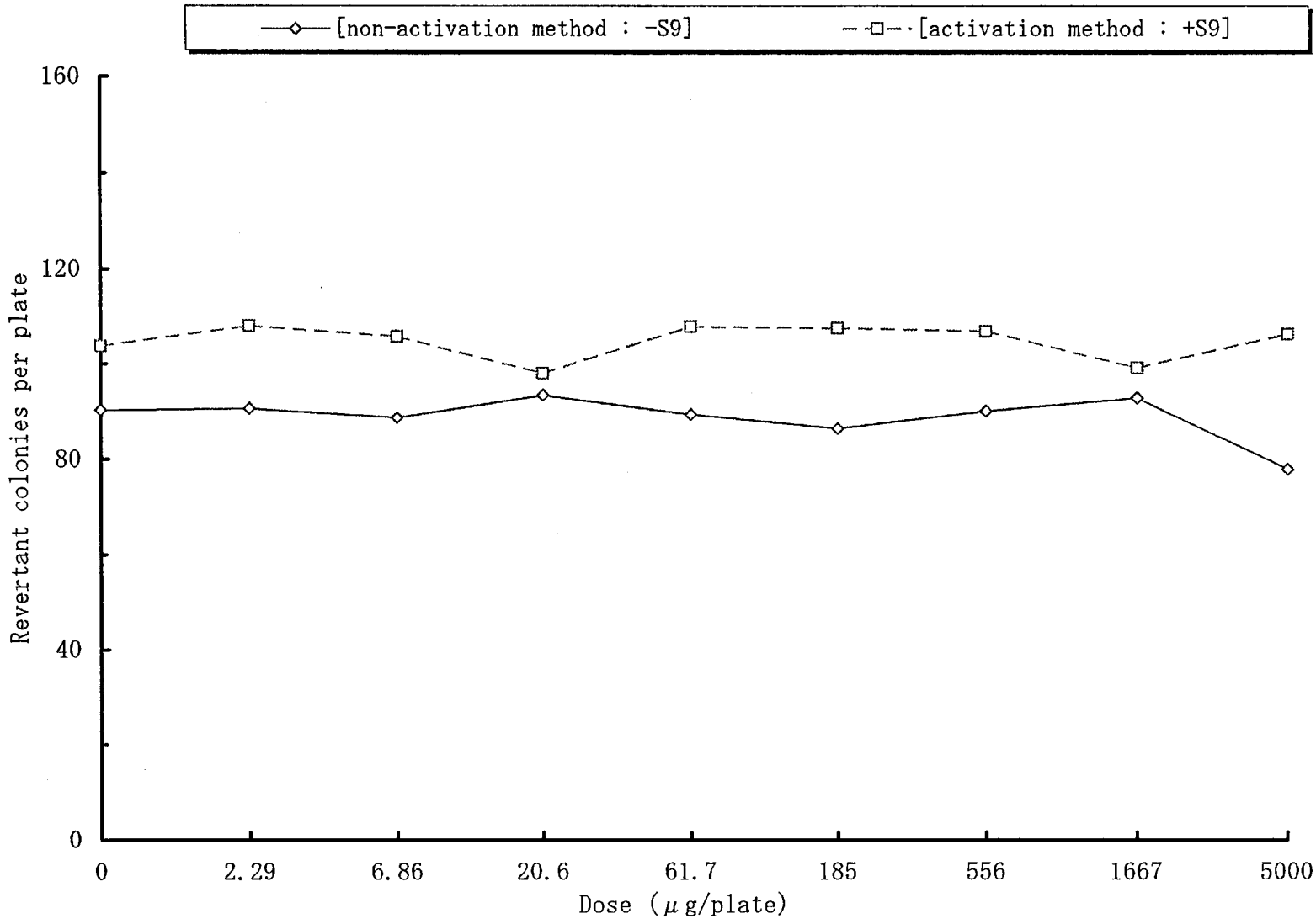

Figure 1. Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA100

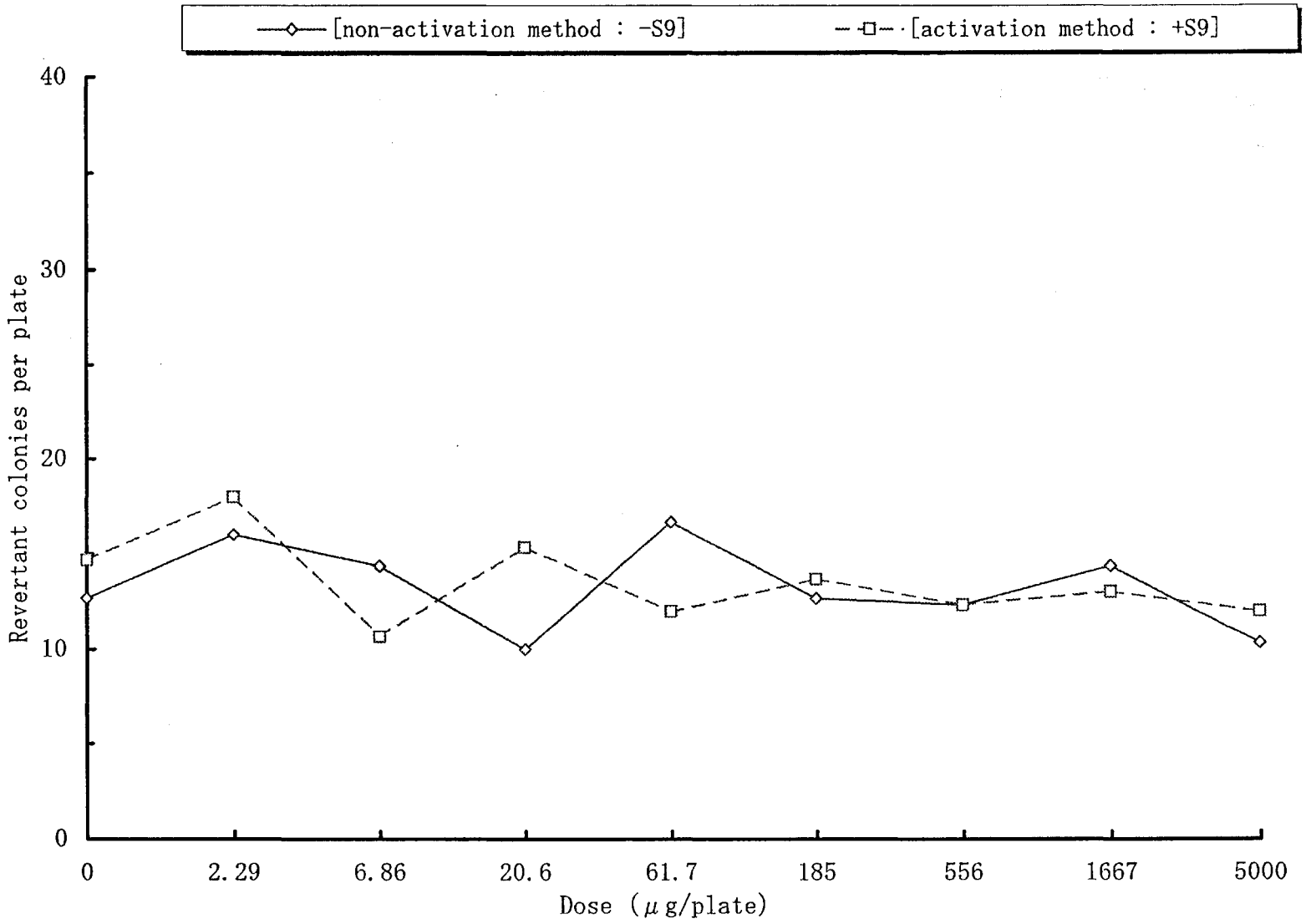

Figure 2. Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA1535

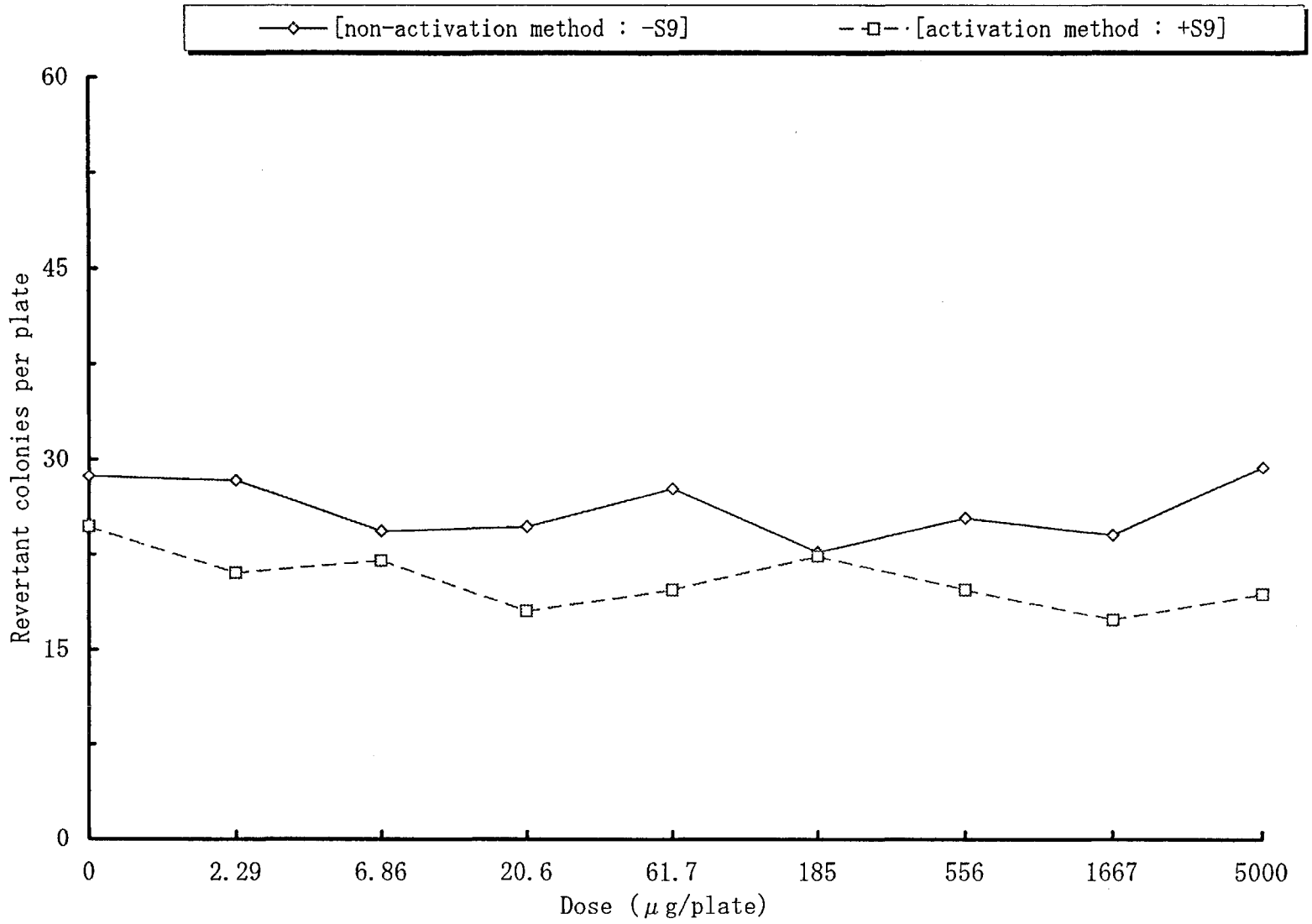

Figure 3. Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain WP2*uvrA*

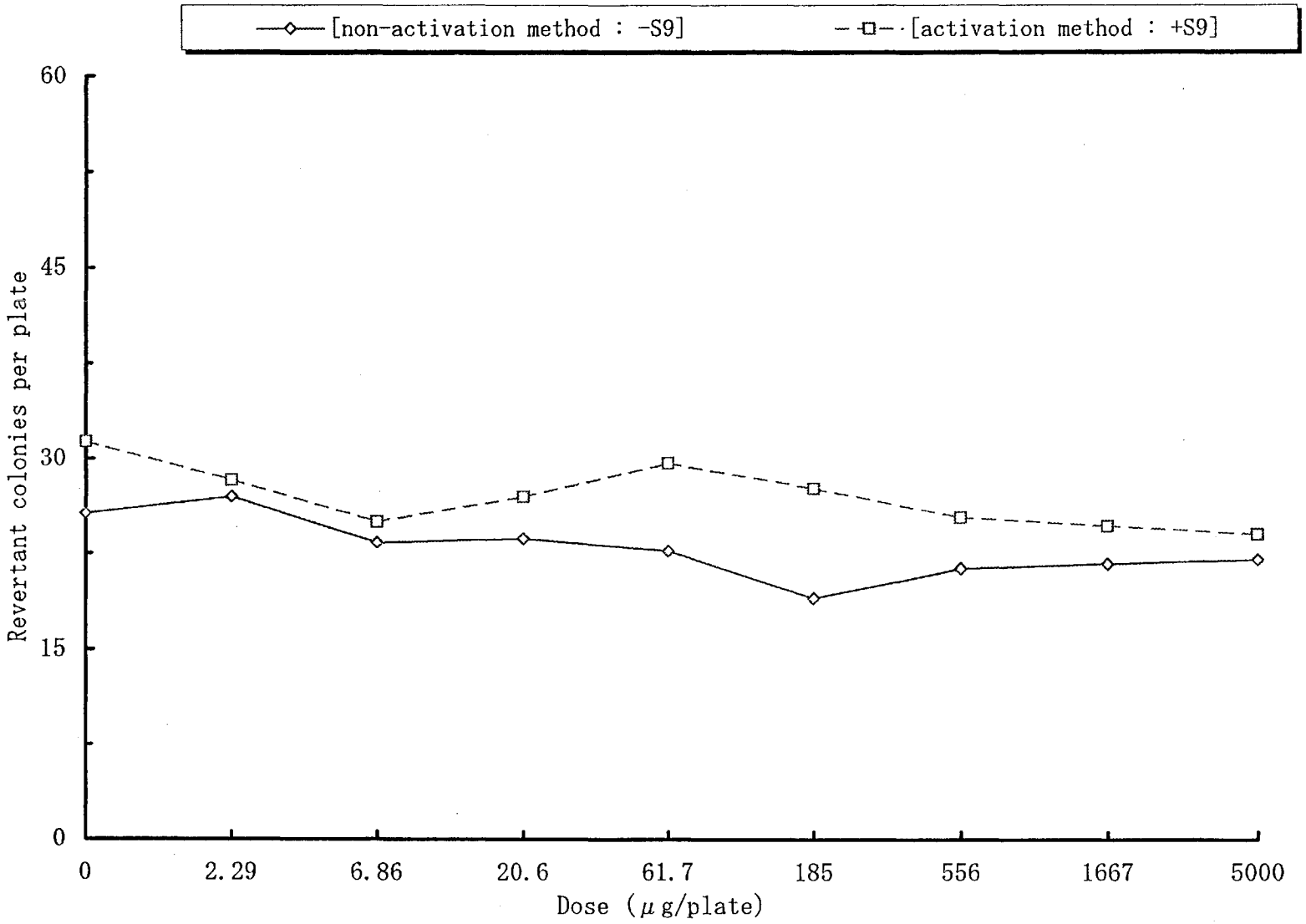

Figure 4. Dose-finding study with C.I. pigment yellow 53 in strain TA98

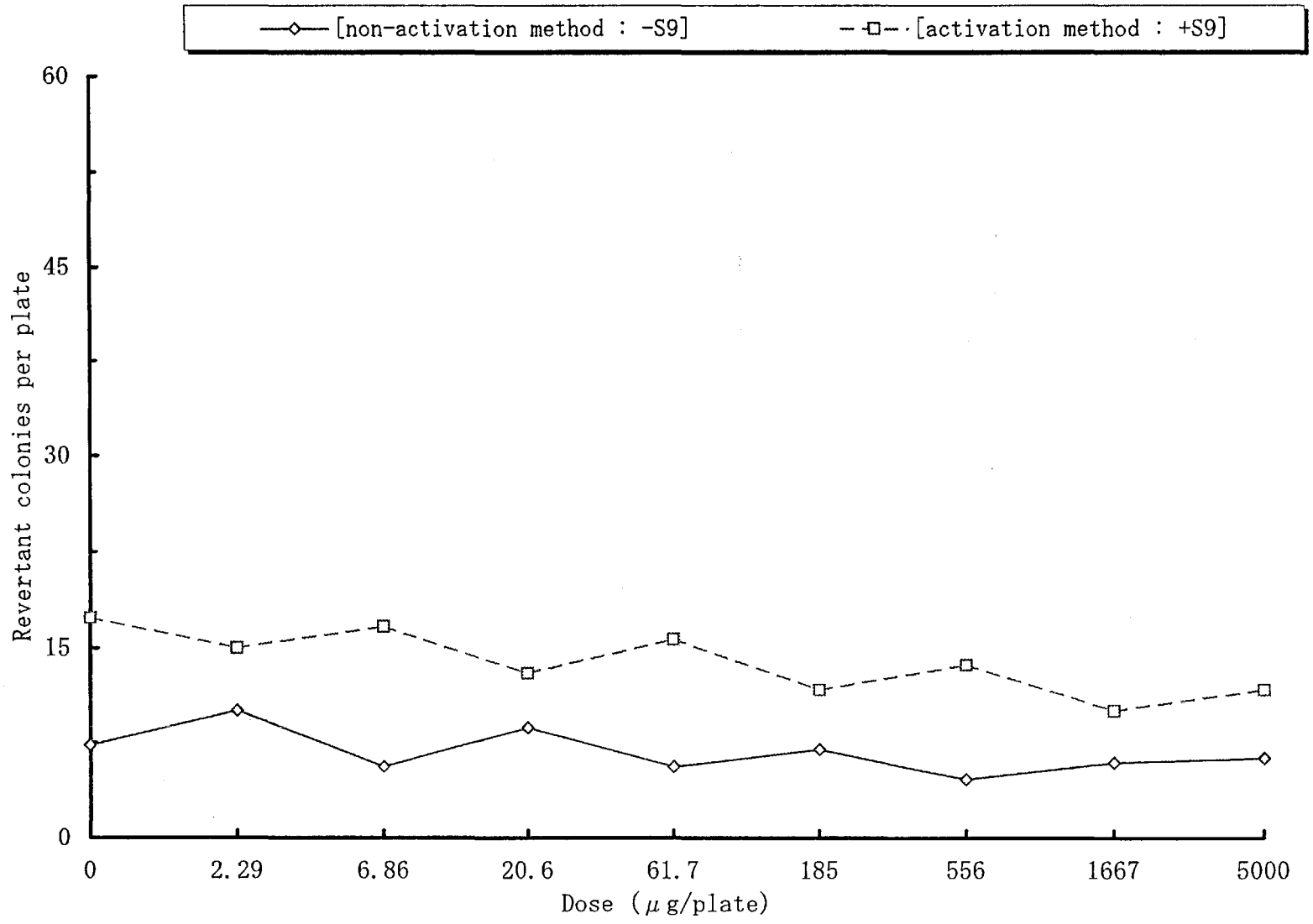

Figure 5. Dose-finding study with of C.I. pigment yellow 53 in strain TA1537

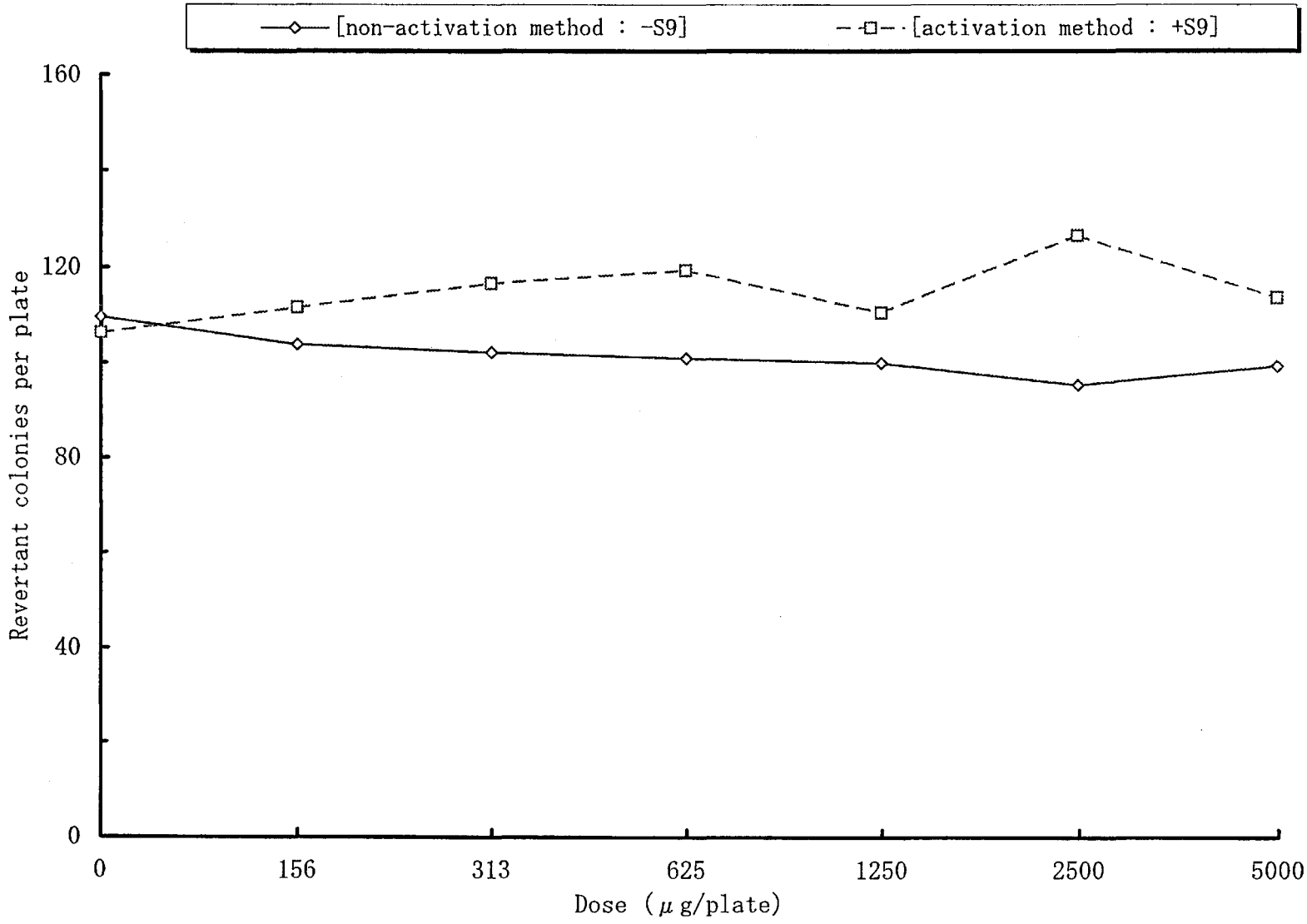

Figure 6. Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA100

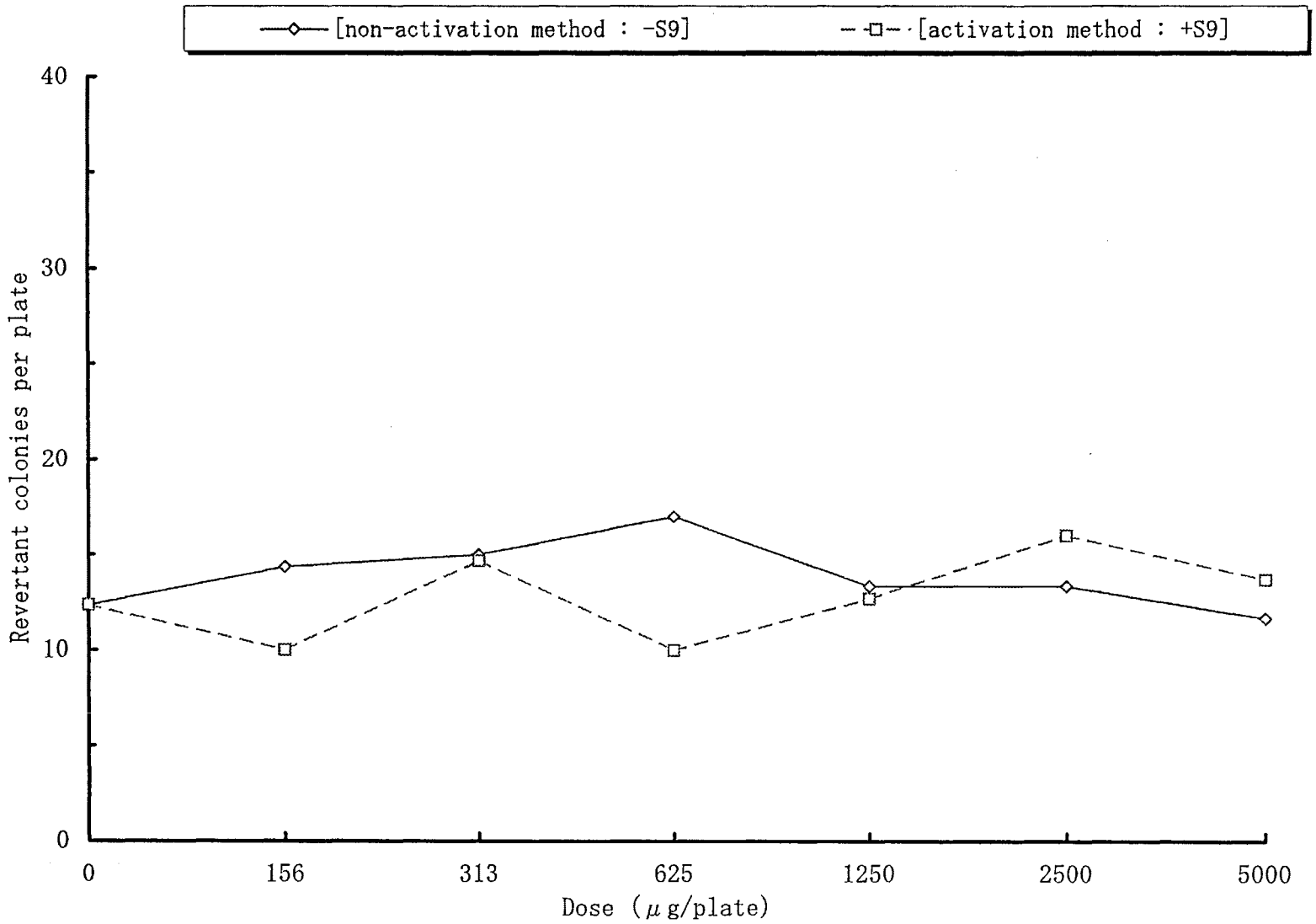

Figure 7. Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA1535

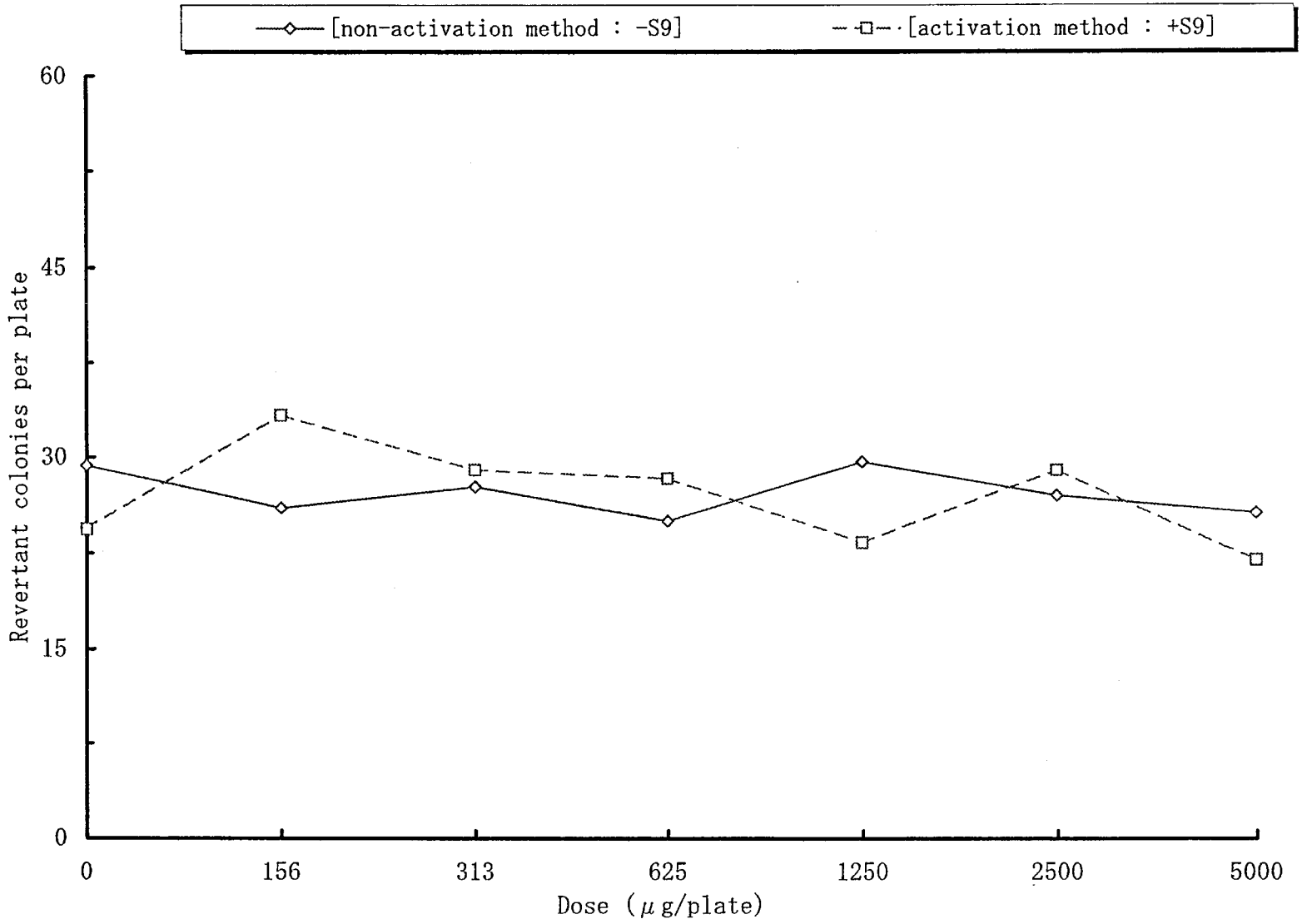

Figure 8. Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain WP2*uvrA*

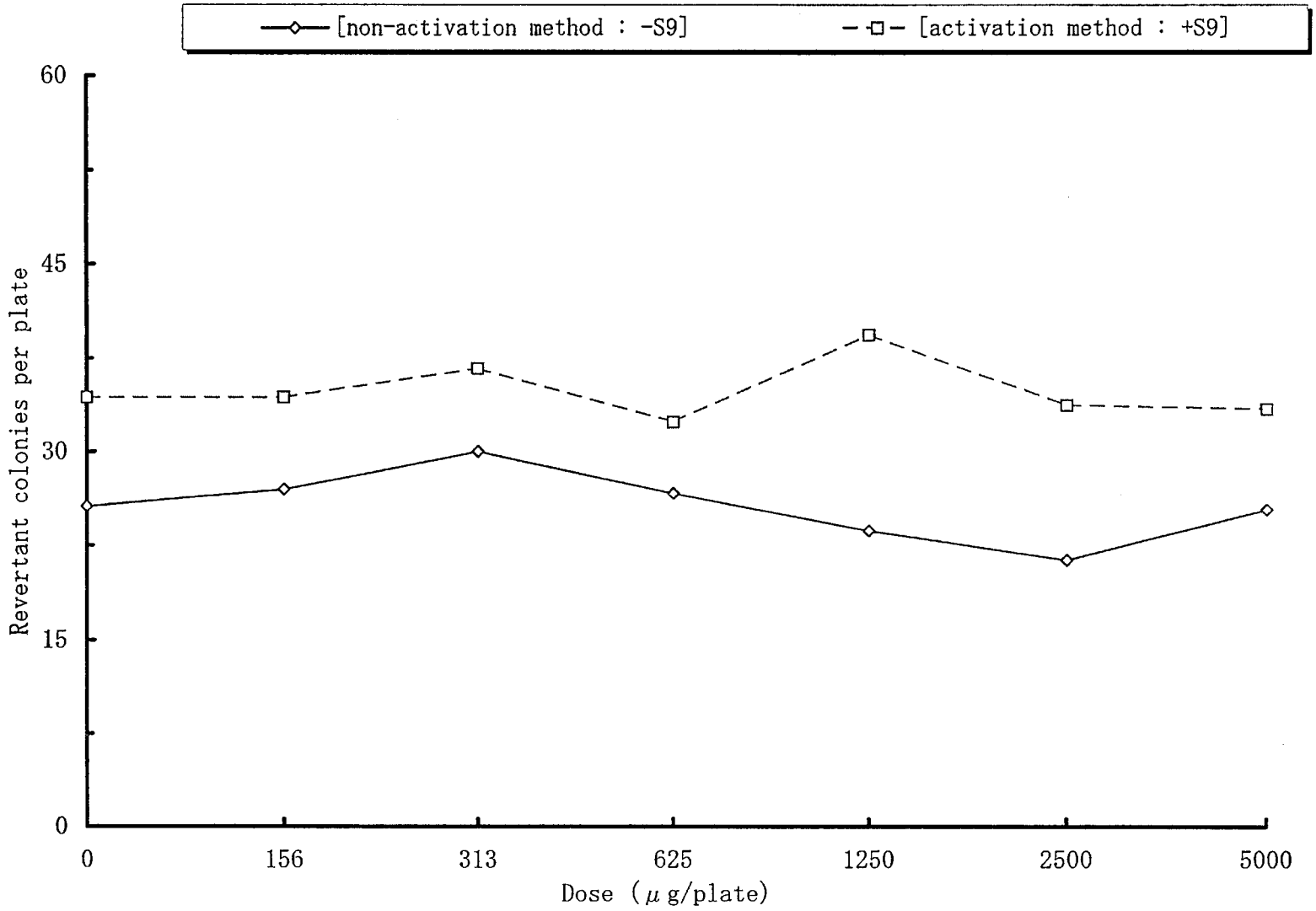

Figure 9. Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA98

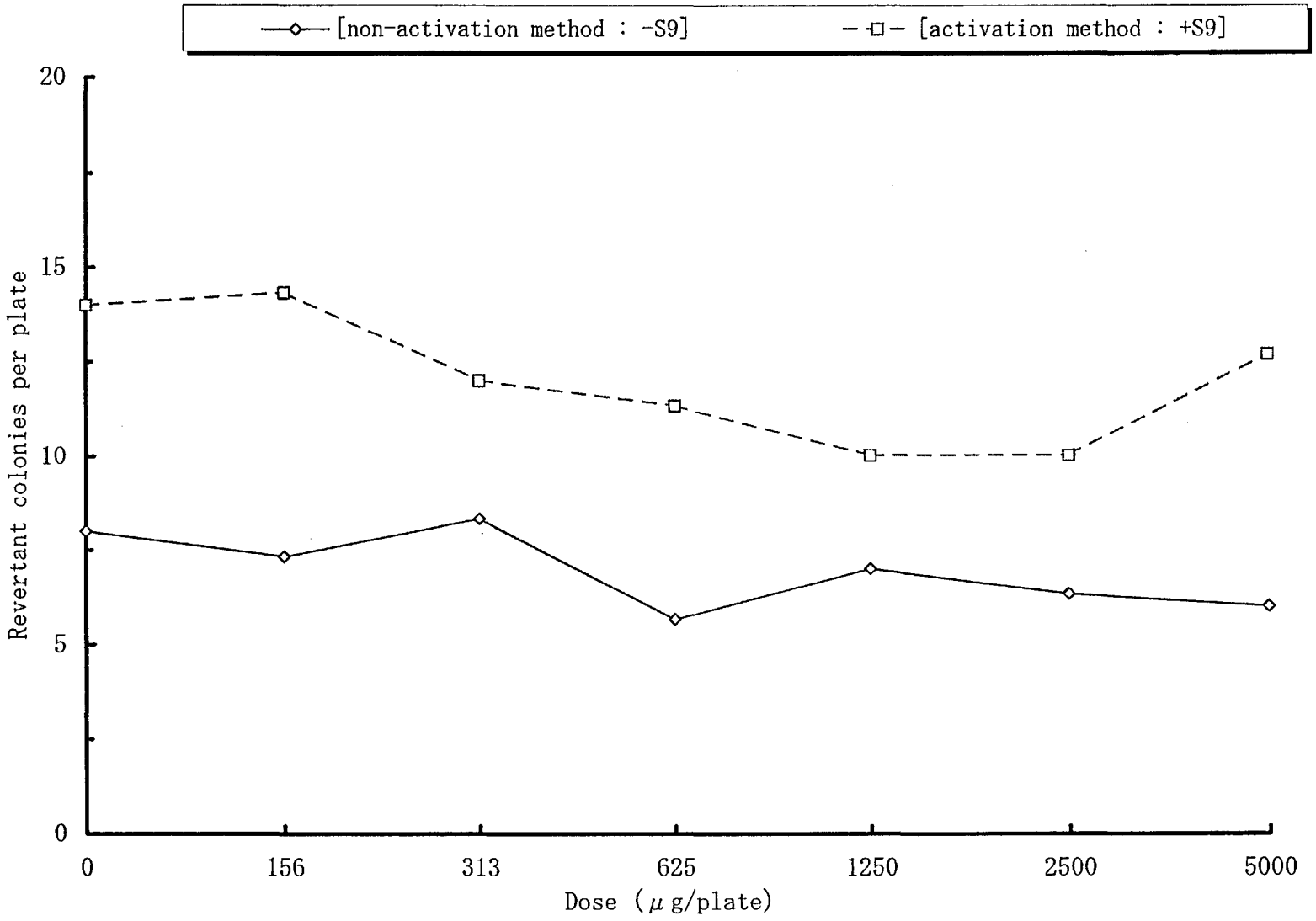

Figure 10. Bacterial reversion test of C.I. pigment yellow 53 in strain TA1537

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

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	88 96 87 [90 ± 5]	12 14 12 [13 ± 1]	30 24 32 [29 ± 4]	26 28 23 [26 ± 3]	8 5 9 [7 ± 2]
	2.29	91 97 84 [91 ± 7]	17 16 15 [16 ± 1]	24 29 32 [28 ± 4]	24 33 24 [27 ± 5]	10 10 10 [10 ± 0]
	6.86	83 98 85 [89 ± 8]	15 12 16 [14 ± 2]	30 20 23 [24 ± 5]	26 21 23 [23 ± 3]	6 6 5 [6 ± 1]
	20.6	102 85 93 [93 ± 9]	10 9 11 [10 ± 1]	27 25 22 [25 ± 3]	21 25 25 [24 ± 2]	9 6 11 [9 ± 3]
	61.7	85 84 99 [89 ± 8]	14 19 17 [17 ± 3]	32 31 20 [28 ± 7]	19 27 22 [23 ± 4]	9 3 5 [6 ± 3]
	185	88 85 86 [86 ± 2]	14 10 14 [13 ± 2]	24 22 22 [23 ± 1]	17 21 19 [19 ± 2]	9 3 9 [7 ± 3]
	556	93 82 95 [90 ± 7]	12 11 14 [12 ± 2]	23 29 24 [25 ± 3]	23 19 22 [21 ± 2]	6 3 5 [5 ± 2]
	1667 +	89 90 99 [93 ± 6]	12 18 13 [14 ± 3]	17 24 31 [24 ± 7]	24 18 23 [22 ± 3]	8 4 6 [6 ± 2]
	5000 +	82 73 78 [78 ± 5]	9 12 10 [10 ± 2]	34 23 31 [29 ± 6]	17 24 25 [22 ± 4]	5 8 6 [6 ± 2]
Positive control		441 457 413 [a)] [437 ± 22]	460 475 437 [b)] [457 ± 19]	146 155 157 [a)] [153 ± 6]	671 665 688 [c)] [675 ± 12]	534 501 543 [d)] [526 ± 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 μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.1 μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μg/plate

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

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	97 112 102 [104 ± 8]	13 13 18 [15 ± 3]	26 25 23 [25 ± 2]	31 36 27 [31 ± 5]	18 15 19 [17 ± 2]
	2.29	100 114 110 [108 ± 7]	16 22 16 [18 ± 3]	22 16 25 [21 ± 5]	23 28 34 [28 ± 6]	15 13 17 [15 ± 2]
	6.86	106 105 106 [106 ± 1]	9 14 9 [11 ± 3]	20 23 23 [22 ± 2]	27 20 28 [25 ± 4]	15 20 15 [17 ± 3]
	20.6	85 102 107 [98 ± 12]	13 18 15 [15 ± 3]	21 17 16 [18 ± 3]	26 26 29 [27 ± 2]	15 14 10 [13 ± 3]
	61.7	115 102 106 [108 ± 7]	11 16 9 [12 ± 4]	24 16 19 [20 ± 4]	24 32 33 [30 ± 5]	14 15 18 [16 ± 2]
	185	116 107 99 [107 ± 9]	10 17 14 [14 ± 4]	17 25 25 [22 ± 5]	25 35 23 [28 ± 6]	13 9 13 [12 ± 2]
	556	108 113 99 [107 ± 7]	12 17 8 [12 ± 5]	23 18 18 [20 ± 3]	31 20 25 [25 ± 6]	17 9 15 [14 ± 4]
	1667 +	89 102 106 [99 ± 9]	8 18 13 [13 ± 5]	17 19 16 [17 ± 2]	23 31 20 [25 ± 6]	9 14 7 [10 ± 4]
	5000 +	107 105 106 [106 ± 1]	13 10 13 [12 ± 2]	15 19 24 [19 ± 5]	19 25 28 [24 ± 5]	9 12 14 [12 ± 3]
Positive control		696 633 652 a) [660 ± 32]	311 310 288 b) [303 ± 13]	844 899 864 c) [869 ± 28]	380 410 385 d) [392 ± 16]	155 183 154 b) [164 ± 16]

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μg/plate b) : 2-AA, 2 μg/plate c) : 2-AA, 10 μg/plate d) : 2-AA, 0.5 μg/plate

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

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	116 106 107 [110 ± 6]	16 10 11 [12 ± 3]	30 26 32 [29 ± 3]	23 29 25 [26 ± 3]	9 7 8 [8 ± 1]
	156	104 103 105 [104 ± 1]	17 12 14 [14 ± 3]	21 30 27 [26 ± 5]	22 28 31 [27 ± 5]	6 10 6 [7 ± 2]
	313	103 103 101 [102 ± 1]	16 14 15 [15 ± 1]	24 30 29 [28 ± 3]	32 29 29 [30 ± 2]	5 11 9 [8 ± 3]
	625	98 100 105 [101 ± 4]	16 17 18 [17 ± 1]	23 28 24 [25 ± 3]	33 23 24 [27 ± 6]	7 5 5 [6 ± 1]
	1250	103 94 103 [100 ± 5]	15 11 14 [13 ± 2]	23 29 37 [30 ± 7]	22 29 20 [24 ± 5]	7 6 8 [7 ± 1]
	2500 +	98 98 90 [95 ± 5]	10 16 14 [13 ± 3]	24 34 23 [27 ± 6]	24 21 19 [21 ± 3]	8 4 7 [6 ± 2]
	5000 +	103 88 107 [99 ± 10]	15 9 11 [12 ± 3]	20 30 27 [26 ± 5]	26 24 26 [25 ± 1]	4 9 5 [6 ± 3]
Positive control		388 395 405 [a)] [396 ± 9]	476 470 474 [b)] [473 ± 3]	143 126 136 [a)] [135 ± 9]	615 562 583 [c)] [587 ± 27]	493 427 450 [d)] [457 ± 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 μg/plate b): NaN_3; Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.1 μg/plate d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 μg/plate

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

Compound	Dose (μg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2*uvrA*	TA98	TA1537
Test substance	0	115 102 102 [106 ± 8]	15 11 11 [12 ± 2]	26 26 21 [24 ± 3]	38 29 36 [34 ± 5]	14 13 15 [14 ± 1]
	156	112 118 105 [112 ± 7]	14 7 9 [10 ± 4]	33 35 32 [33 ± 2]	37 33 33 [34 ± 2]	18 13 12 [14 ± 3]
	313	118 114 118 [117 ± 2]	14 14 16 [15 ± 1]	31 28 28 [29 ± 2]	30 37 43 [37 ± 7]	11 14 11 [12 ± 2]
	625	118 112 128 [119 ± 8]	9 9 12 [10 ± 2]	28 24 33 [28 ± 5]	31 34 32 [32 ± 2]	12 10 12 [11 ± 1]
	1250	106 114 112 [111 ± 4]	9 12 17 [13 ± 4]	23 22 25 [23 ± 2]	43 33 42 [39 ± 6]	7 11 12 [10 ± 3]
	2500 +	129 129 122 [127 ± 4]	18 14 16 [16 ± 2]	29 25 33 [29 ± 4]	29 32 40 [34 ± 6]	8 13 9 [10 ± 3]
	5000 +	124 110 107 [114 ± 9]	12 15 14 [14 ± 2]	21 21 24 [22 ± 2]	35 33 32 [33 ± 2]	13 12 13 [13 ± 1]
Positive control		942 879 845 a) [889 ± 49]	334 313 308 b) [318 ± 14]	843 854 836 c) [844 ± 9]	408 432 430 d) [423 ± 13]	182 188 197 b) [189 ± 8]

+ : Visible precipitation was shown at the end of exposure period
a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1μg/plate b) : 2-AA, 2μg/plate c) : 2-AA, 10μg/plate d) : 2-AA, 0.5μg/plate