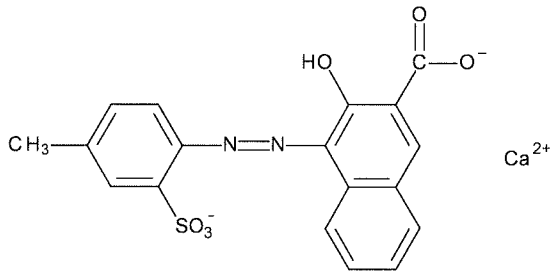


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

### 1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	ピグメントレッド-57-1		
別 名			
構造式又は示性式 (い ずれも不明な場合はそ の製法の概要)			
試験に供した新規 化学物質の純度	88.6%	試験に供した新規 化学物質の Lot No.	N2YBJ
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	5281-04-9	蒸気圧	
分子量	424.44	分配係数	
融 点		常温における性状	固体
沸 点			
安定性	適切な条件下で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	50 mg/mL で不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	DMSO	50 mg/mL で溶解	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン		
	その他		

(備考) 上記被験物質情報は、製造元からの情報による。なお、溶解度及び溶媒中の安定性については、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果である。

## 2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日

## 3. S9 Mix

### (1) S9 の入手方法等

自製・購入の別	1.自製 2. 購入（製造元：株式会社ボゾリサーチセンター）
製造年月日	2019年8月2日製造
購入の場合 Lot No.	S9-190802
保存温度	-70°C 以下

### (2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	PB& 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間及び 投与量 (mg/kg 体重)	PB4日間連続投与: 30+60+60+60(mg/kg 体重) PB投与3日目BF投与: 80(mg/kg 体重)
体重	221.4~250.8 g		

### (3) S9Mix の組成

成分	S9Mix 1mL 中の量	成分	S9Mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 μmol
MgCl <sub>2</sub>	8 μmol	NADH	4 μmol
KCl	33 μmol	Na-リン酸緩衝液	100 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol	その他 ( )	

#### 4. 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度(%)
	DMSO	富士フイルム和光純薬株式会社	KCK3751	試薬特級	100.0%
溶媒選択の理由	<p>本試験で使用する溶媒を選定するため、水、DMSOの50 mg/mLでの溶解性試験を実施した。その結果、水に不溶であったが、DMSOには時間を要したが溶解し、溶媒添加直後に発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。溶媒添加1時間後においても色調変化等の反応性も認められなかったためDMSOを溶媒として選択した。なお、被験液の調製には、モレキュラシーブス 4A 1/16（富士フイルム和光純薬株式会社；Lot No. YLP7563）で脱水したDMSOを使用した。</p>				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="checkbox"/> 溶解	<input type="checkbox"/> 懸濁	<input type="checkbox"/> その他		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	/				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用時調製・室温				
純度換算の有無	<input checked="" type="checkbox"/> 有	<input type="checkbox"/> 無			

#### 5. 前培養の条件

##### (1) 条件

ニュートリエントブロス	名称		製造元	Lot No.
	Nutrient Broth No.2			OXOID LTD.
前培養時間	9時間			
培養容器(形状・容器)	L字管・48mL			
培養液量	10 mL	接種菌量	<i>S.typhimurium</i> 株 20 μL <i>E.coli</i> 株 10 μL	

(2) 前培養終了時の生菌数等

菌株名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	5.10	4.77	7.76	5.48	4.00
	本試験	5.04	4.72	7.70	5.57	4.36
	追加試験	5.10	4.52		5.45	3.95
測定方法		1. O.D.値より換算 2. 段階希釈法 3. その他				

6. 最小グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2019年10月25日製造
購入の場合の Lot No.	DZAKAP02
使用寒天の名称・製造・Lot No.	大洋寒天・SSK セールス株式会社・Lot No. BM-M5-277

7. 試験の方法

(1) 試験方法とその選択理由

採用した試験方法	1. プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他
その他の場合は その選択理由	

(2) 試験条件

組 成	菌懸濁液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液（直接法による場合）	0.5 mL
	S9Mix（代謝活性化法による場合）	0.5 mL
	トップアガー	2.0 mL
プレインキュベーション	温度	37°C
	時間	20 分間
インキュベーション	温度	37°C
	時間（用量設定試験）	48.5 時間
	時間（本試験）	49 時間
	時間（追加試験）	48 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	<input checked="" type="checkbox"/> 1. マニュアル計測 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 機器計測
補正の有無	1 無 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 有（補正の方法 面積補正）

## 9. 試験の結果

(1) 試験の結果は別表による。

(2) 結果の判定

判定	陽性	陰性
<p>判定の理由</p> <p>用量設定試験の結果を別表 1 に、本試験の結果を別表 2、3 に、追加試験の結果を別表 4 に示した。なお、図 1~10 は別表 2、3 より作成した。また、当該試験の参考データとして参照した背景データを Attachment として添付した。</p> <p>用量設定試験、本試験及び追加試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。</p> <p>一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下においてピグメントレッド-57-1 は、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（陰性）と判定した。</p>		

(3) 参考事項

本被験物質による沈殿は、代謝活性化しない場合の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 2500 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質による菌に対する生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA 株の 313 µg/plate 以上、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* の 2500 µg/plate 以上の用量で認められた。

なお、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株については、生育阻害を示さない用量数が 4 用量以上得られなかったため、本試験と同一用量で追加試験を実施し、再現性の確認をした。

被験液の調製及び試験操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

被験液の調製において、本被験物質の純度が 88.6 wt% であるため、秤量値に換算係数 0.886 とした乗じた換算重量にて最高濃度を調製した。

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: ピグメントレッド-57-1

No. T-3083

試験実施期間		2019年11月26日 より 2019年11月29日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	109 109 ( 109 )	6 6 ( 6 )	20 27 ( 24 )	24 25 ( 25 )	7 7 ( 7 )	
	1.22	95 98 ( 97 )	10 8 ( 9 )	21 26 ( 24 )	18 19 ( 19 )	5 2 ( 4 )	
	4.88	96 97 ( 97 )	10 6 ( 8 )	25 18 ( 22 )	18 18 ( 18 )	5 2 ( 4 )	
	19.5	116 120 ( 118 )	5 2 ( 4 )	24 28 ( 26 )	21 16 ( 19 )	4 3 ( 4 )	
	78.1	104 * 93 * ( 99 )	5 * 5 * ( 5 )	18 30 ( 24 )	26 * 21 * ( 24 )	4 * 2 * ( 3 )	
	313	89 * 85 * ( 87 )	5 * 5 * ( 5 )	32 33 ( 33 )	21 * 18 * ( 20 )	4 * 3 * ( 4 )	
	1250 #	55 * 56 * ( 56 )	2 * 4 * ( 3 )	26 15 ( 21 )	17 * 21 * ( 19 )	2 * 2 * ( 2 )	
	5000 #	50 * 53 * ( 52 )	1 * 2 * ( 2 )	17 * 18 * ( 18 )	10 * 11 * ( 11 )	1 * 0 * ( 1 )	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	126 131 ( 129 )	9 8 ( 9 )	32 35 ( 34 )	32 31 ( 32 )	8 8 ( 8 )
		1.22	126 125 ( 126 )	10 7 ( 9 )	31 38 ( 35 )	27 34 ( 31 )	4 5 ( 5 )
4.88		106 99 ( 103 )	6 8 ( 7 )	38 30 ( 34 )	26 38 ( 32 )	7 9 ( 8 )	
19.5		111 105 ( 108 )	5 4 ( 5 )	27 31 ( 29 )	29 23 ( 26 )	5 5 ( 5 )	
78.1		108 106 ( 107 )	5 9 ( 7 )	27 29 ( 28 )	21 22 ( 22 )	6 8 ( 7 )	
313		98 * 88 * ( 93 )	6 * 4 * ( 5 )	24 31 ( 28 )	21 * 32 * ( 27 )	6 * 8 * ( 7 )	
1250		91 * 86 * ( 89 )	6 * 4 * ( 5 )	32 31 ( 32 )	22 * 23 * ( 23 )	7 * 5 * ( 6 )	
5000 #		55 * 61 * ( 58 )	4 * 3 * ( 4 )	26 * 28 * ( 27 )	16 * 17 * ( 17 )	4 * 2 * ( 3 )	
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	[GR-191]
		用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	746 770 ( 758 )	223 206 ( 215 )	155 152 ( 154 )	462 413 ( 438 )	1863 2045 ( 1954 )	
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
S9Mixを必要とするもの	用量 (μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
	コロニー数/プレート	1163 1177 ( 1170 )	190 198 ( 194 )	623 617 ( 620 )	252 268 ( 260 )	69 93 ( 81 )	

(備考)

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
- SAZ : アジ化ナトリウム
- [GR-191] : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
- 2AA : 2-アミノアントラセン
- B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。  
 # : 被験物質による沈殿が認められたことを示す。  
 ( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

## 試験結果表 (本試験:-S9Mix)

被験物質の名称: ピグメントレッド-57-1

No. T-3083

試験実施期間		2019年12月10日 より 2019年12月13日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	112 111 ( 112 )	7 8 ( 8 )	26 22 ( 24 )	27 29 ( 28 )	7 7 ( 7 )	
	2.44	128 111 ( 120 )	6 8 ( 7 )	NT	25 27 ( 26 )	10 7 ( 9 )	
	4.88	99 98 ( 99 )	6 9 ( 8 )	NT	18 31 ( 25 )	6 8 ( 7 )	
	9.77	100 86 ( 93 )	11 8 ( 10 )	NT	16 19 ( 18 )	4 4 ( 4 )	
	19.5	91 85 ( 88 )	7 11 ( 9 )	NT	21 18 ( 20 )	6 5 ( 6 )	
	39.1	102 * 101 * ( 102 )	10 * 8 * ( 9 )	NT	16 * 22 * ( 19 )	4 * 4 * ( 4 )	
	78.1	101 * 97 * ( 99 )	7 * 8 * ( 8 )	NT	18 * 25 * ( 22 )	6 * 6 * ( 6 )	
	156	NT	NT	21 31 ( 26 )	NT	NT	
	313	NT	NT	26 29 ( 28 )	NT	NT	
	625 #	NT	NT	18 30 ( 24 )	NT	NT	
	1250 #	NT	NT	24 19 ( 22 )	NT	NT	
	2500 #	NT	NT	18 * 16 * ( 17 )	NT	NT	
	5000 #	NT	NT	15 * 16 * ( 16 )	NT	NT	
	陽性対照	名 称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
コロニー数/プレート		722 719 ( 721 )	342 324 ( 333 )	156 123 ( 140 )	407 381 ( 394 )	1504 1391 ( 1448 )	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

\*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

# : 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

NT : 試験せず。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。



(別表3)

## 試験結果表 (本試験:+S9Mix)

被験物質の名称: ピグメントレッド-57-1

No. T-3083

試験実施期間		2019年12月10日 より 2019年12月13日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu$ g/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	125 132 ( 129 )	7 8 ( 8 )	26 31 ( 29 )	36 39 ( 38 )	11 8 ( 10 )	
	9.77	116 105 ( 111 )	6 8 ( 7 )	NT	32 41 ( 37 )	10 11 ( 11 )	
	19.5	110 123 ( 117 )	10 8 ( 9 )	NT	35 27 ( 31 )	8 7 ( 8 )	
	39.1	106 111 ( 109 )	6 11 ( 9 )	NT	21 28 ( 25 )	11 11 ( 11 )	
	78.1	105 111 ( 108 )	8 4 ( 6 )	NT	17 28 ( 23 )	6 11 ( 9 )	
	156	120 100 ( 110 )	10 8 ( 9 )	30 31 ( 31 )	26 26 ( 26 )	7 8 ( 8 )	
	313	120 * 113 * ( 117 )	5 * 7 * ( 6 )	27 35 ( 31 )	23 * 25 * ( 24 )	7 * 9 * ( 8 )	
	625	NT	NT	29 27 ( 28 )	NT	NT	
	1250	NT	NT	31 32 ( 32 )	NT	NT	
	2500 #	NT	NT	31 * 27 * ( 29 )	NT	NT	
	5000 #	NT	NT	27 * 30 * ( 29 )	NT	NT	
	陽性対照	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
		用量 ( $\mu$ g/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	1219 1245 ( 1232 )	257 235 ( 246 )	639 755 ( 697 )	249 255 ( 252 )	81 76 ( 79 )

(備考)

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

2AA : 2-アミノアントラセン

\*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

#: 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

NT: 試験せず。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表4)

## 試験結果表 (追加試験)

被験物質の名称：ピグメントレッド-57-1

No. T-3083

試験実施期間		2019年12月12日 より 2019年12月16日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型		フレームシフト型		
		TA100	TA1535	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	111 129 ( 120 )	9 11 ( 10 )	24 27 ( 26 )	8 10 ( 9 )	
	2.44	124 149 ( 137 )	8 7 ( 8 )	22 25 ( 24 )	9 5 ( 7 )	
	4.88	125 135 ( 130 )	13 13 ( 13 )	36 35 ( 36 )	8 9 ( 9 )	
	9.77	139 159 ( 149 )	14 5 ( 10 )	24 39 ( 32 )	10 13 ( 12 )	
	19.5	128 147 ( 138 )	7 9 ( 8 )	13 27 ( 20 )	7 11 ( 9 )	
	39.1	136 * 139 * ( 138 )	7 * 10 * ( 9 )	18 * 29 * ( 24 )	10 * 9 * ( 10 )	
	78.1	138 * 125 * ( 132 )	11 * 10 * ( 11 )	29 * 34 * ( 32 )	9 * 8 * ( 9 )	
	陽性対照	S9Mixを必要としなもの	名 称	AF-2	SAZ	AF-2
		用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.1	1.0
		コロニー数/プレート	629 597 ( 613 )	255 267 ( 261 )	333 339 ( 336 )	1214 1192 ( 1203 )

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

\* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

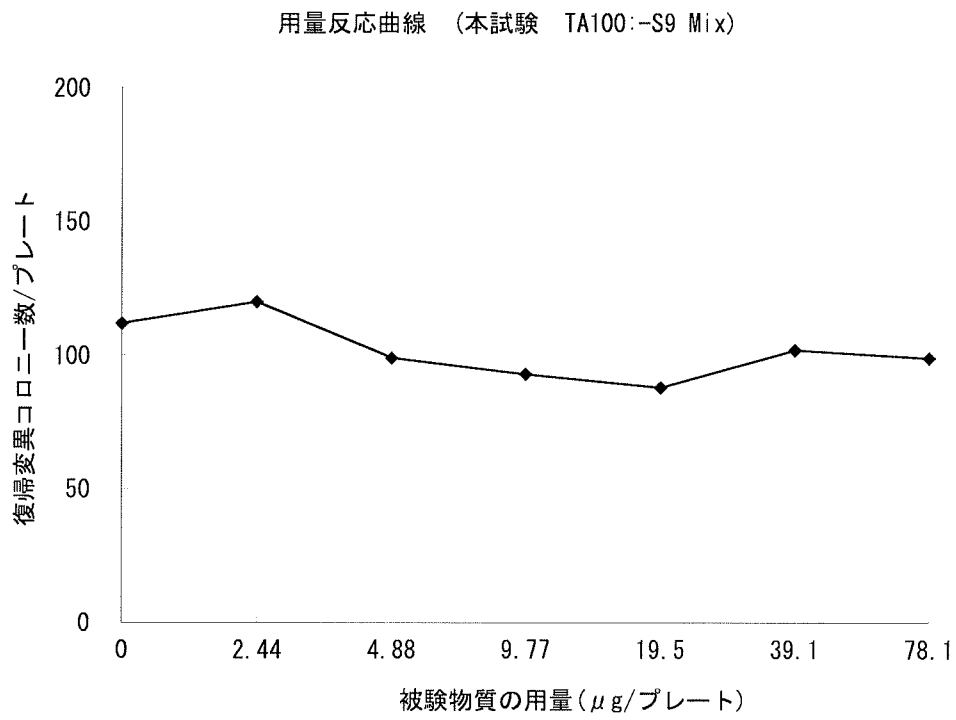
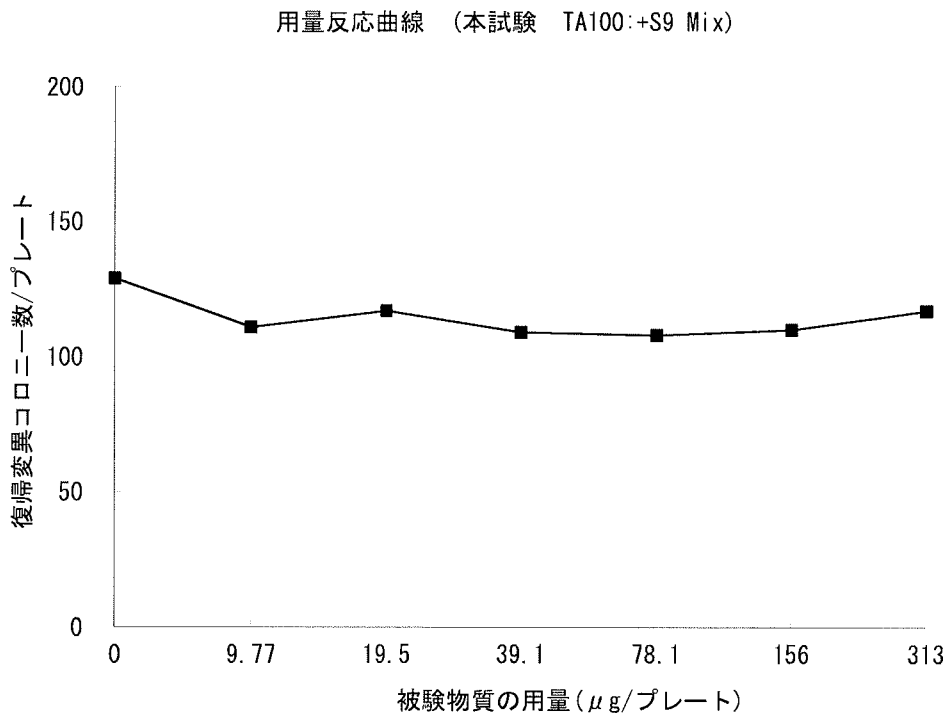


図 2



T-3083

図 3

用量反応曲線 (本試験 TA1535:-S9 Mix)

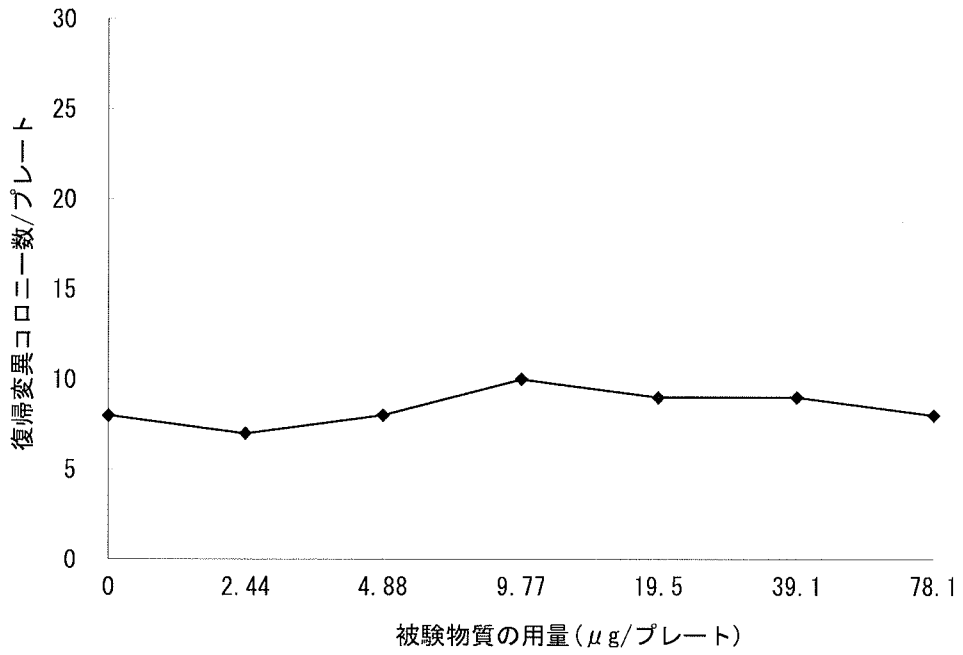


図 4

用量反応曲線 (本試験 TA1535:+S9 Mix)

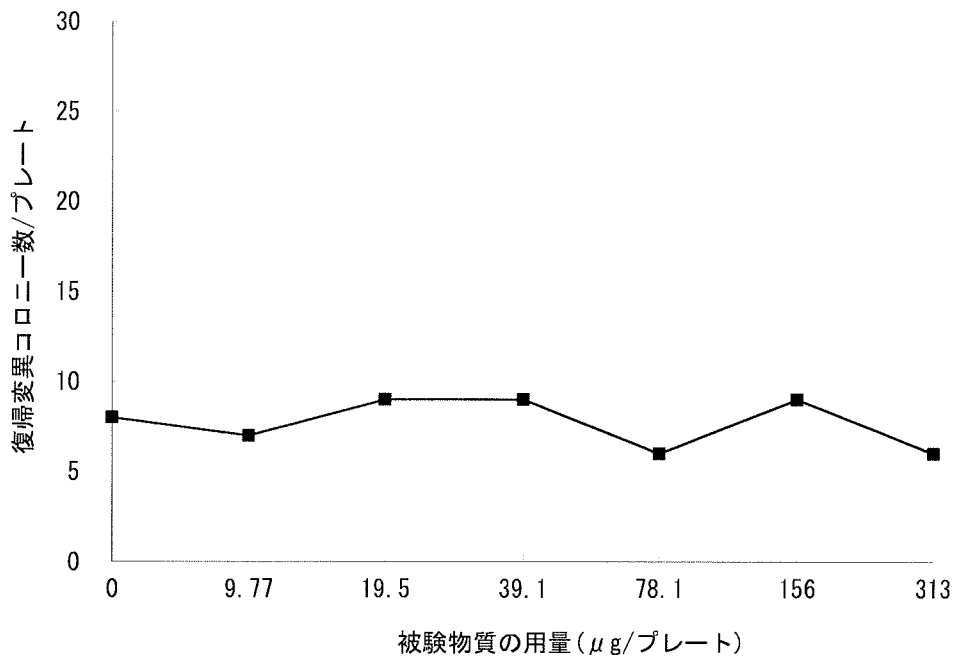


図 9

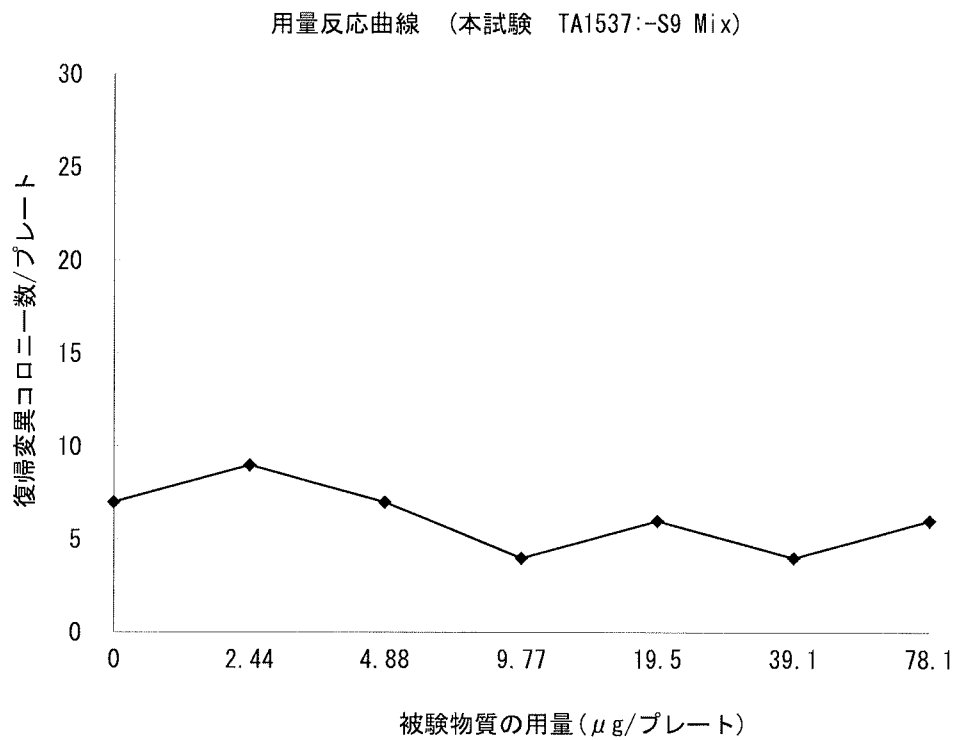


図 10

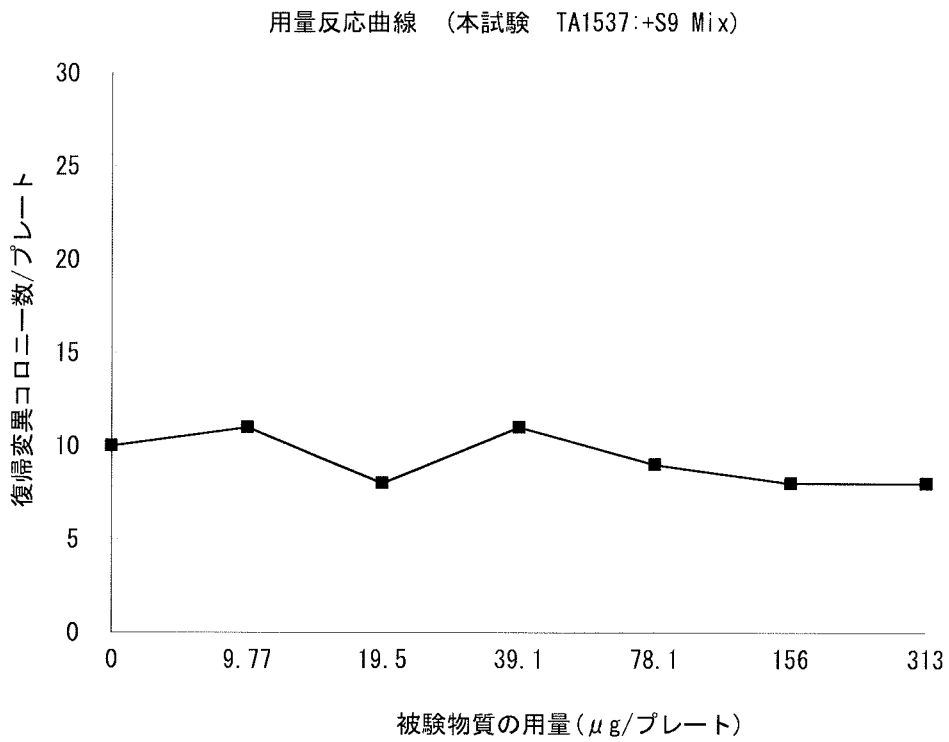


図 7

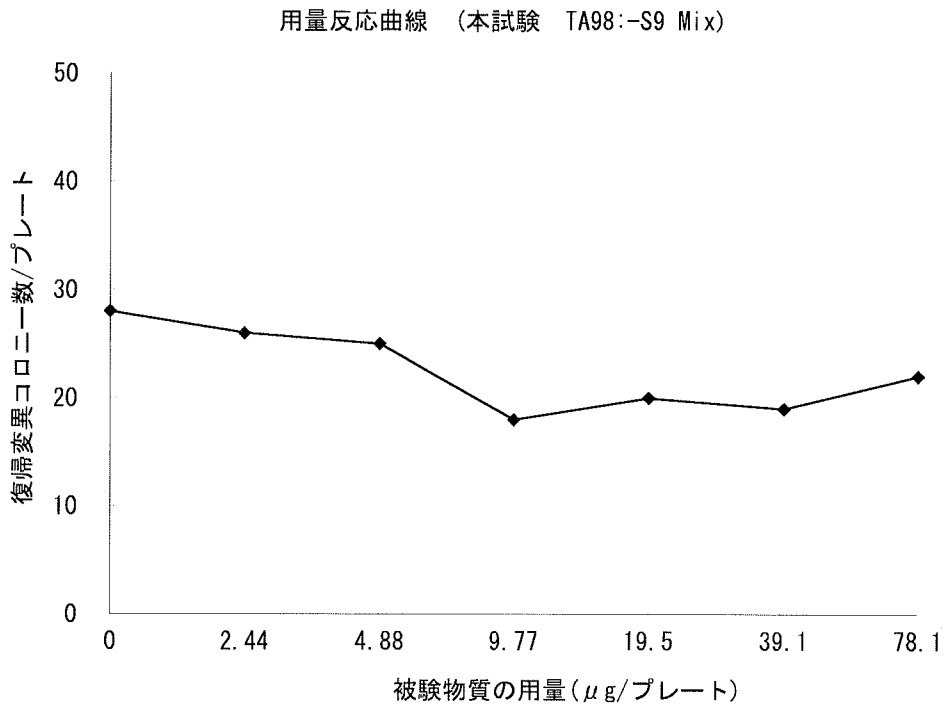


図 8

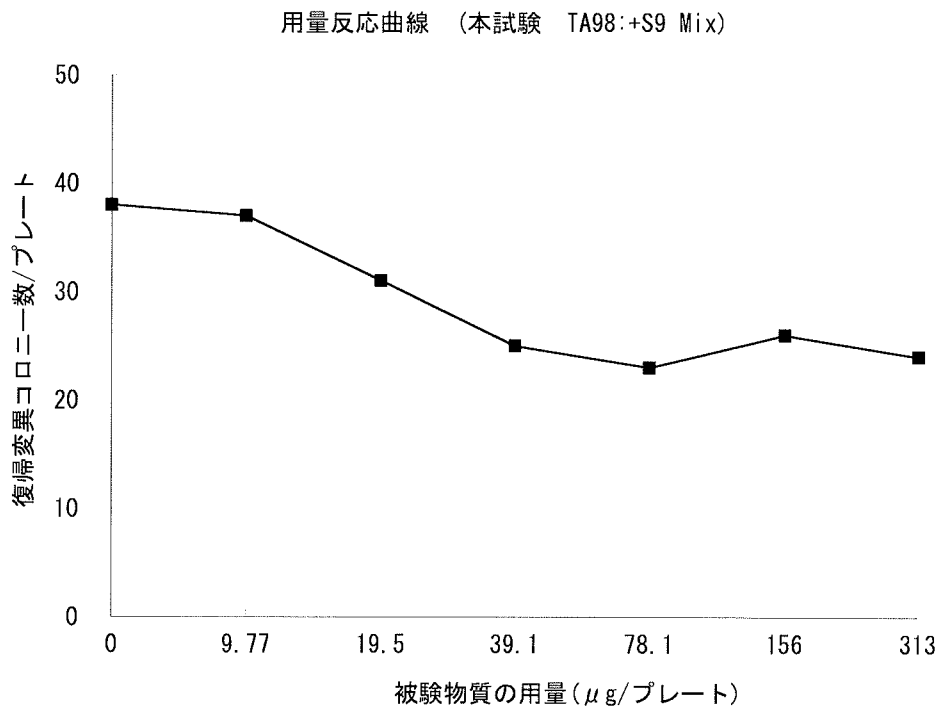


図 5

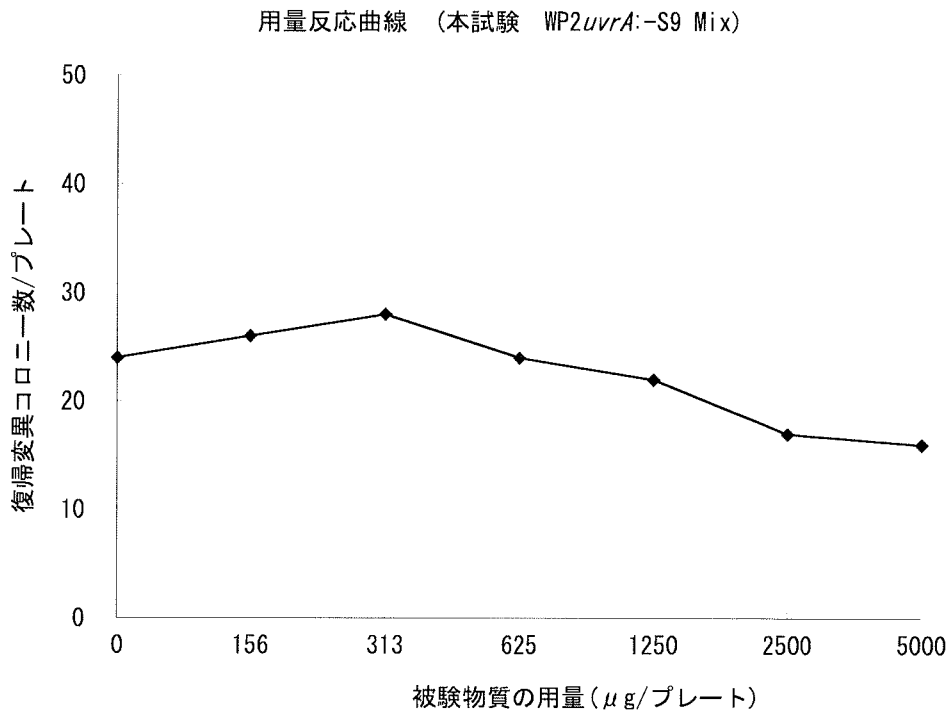
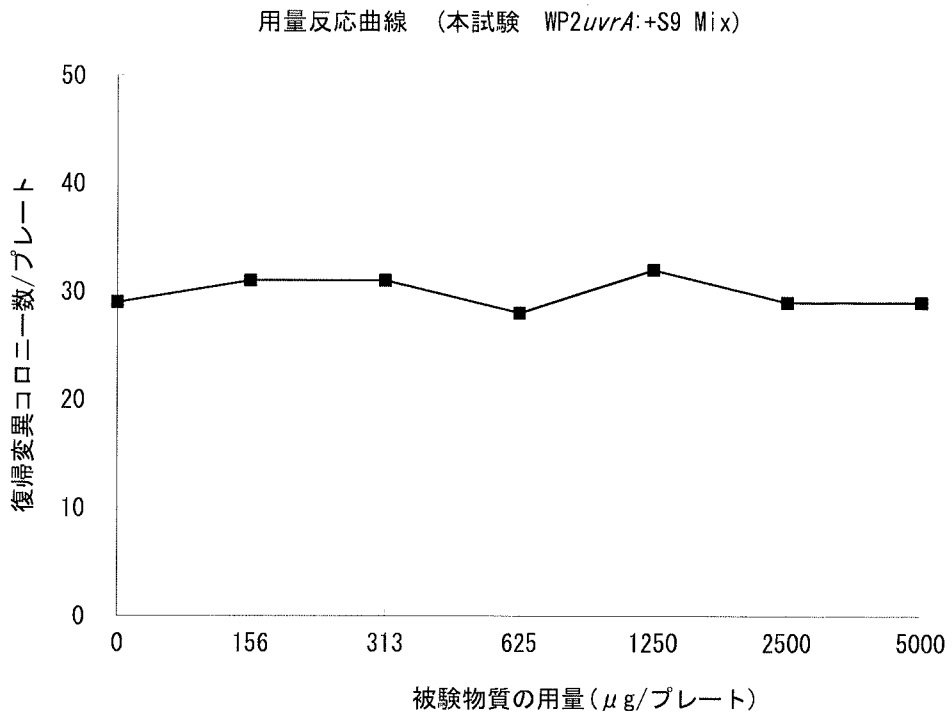


図 6



## Background Data

Test Category : Bacterial reverse mutation test (Preincubation Method)

CODE No. : 190924

Period : From September 20, 2019 to September 24, 2019

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	107	13	69	146	20
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	565	87	302	827	20
	+	Solvent control	121	11	87	154	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	977	90	708	1247	20
TA1535	-	Solvent control	10	4	1	20	20
		Positive control SAZ (0.5 µg/plate)	305	44	174	437	20
	+	Solvent control	10	3	1	20	20
		Positive control 2AA (2.0 µg/plate)	231	28	146	316	20
WP2 <sub>uvrA</sub>	-	Solvent control	29	7	9	49	20
		Positive control AF-2 (0.01 µg/plate)	101	21	38	164	20
	+	Solvent control	30	7	9	52	20
		Positive control 2AA (10.0 µg/plate)	611	84	358	864	20
TA98	-	Solvent control	26	5	11	42	20
		Positive control AF-2 (0.1 µg/plate)	399	32	304	495	20
	+	Solvent control	37	7	16	57	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	282	22	218	347	20
TA1537	-	Solvent control	7	4	1	18	20
		Positive control ICR-191 (1.0 µg/plate)	1406	267	605	2208	20
	+	Solvent control	10	3	2	18	20
		Positive control B[a]P (5.0 µg/plate)	83	12	47	119	20

(Notice)

Solvent controls Water, Dimethyl sulfoxide(DMSO)

Positive controls AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SAZ : Sodium azide

ICR-191 : 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-Aminoanthracene

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation