



1993年12月7日

ピグメントグリーン7の
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

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品

秦野研



試験委託者：厚生省生活衛生局（1992年10月19日）

試験計画番号：H-92-294

試験系識別番号：CH-789

被験物質名：ピグメントグリーン7

試験項目：染色体異常試験


試験内容：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

試験期間：1992年10月19日～1993年8月30日

資料保管場所：秦野研究所資料保管室

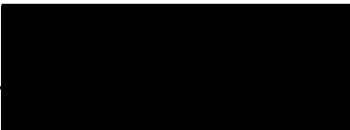
試験施設：財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
（所在地）（神奈川県秦野市落合 729-5）

運営管理者：財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
所長

 93年8月31日



試験責任者 :



1993年8月30日

試験担当主任者 :



1993年8月30日

試験担当者 :



(標本観察、報告書作成)

(標本観察)

(処理、標本観察、データ集計、図表作成)

(培養、処理、標本観察)

(培養)

(化学分析担当責任者)

(化学分析)



陳 述 書

試 験 の 表 題 : ピグメントグリーン7のチャイニーズ・ハムスター培養細胞
を用いる染色体異常試験

試 験 計 画 書 : H-92-294

上記の試験は、「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ガイドライン：473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も
のであります。

1993年8月31日

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所所長（運営管理者）

氏 名



信頼性保証証明

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所信頼性保証部門は、試験計画番号 H-92-294 に関する試験の実施状況について次のとおり査察を行った。

査察日	査察項目	運営管理者および試験責任者への報告日
1992年10月12日	試験計画書点検査	1992年10月12日
1992年12月14日	含量試験・ 被験物質による細胞処理査察	1992年12月14日
1993年 1月11日	標本観察査察	1993年 1月11日
1993年 7月23日	報告書案点検査	1993年 7月23日
1993年 8月30日	最終報告書点検査	1993年 8月30日

この報告書は、試験に使用された方法および手順を正確に記述し、報告結果は、データを正確に反映していることを証明する。

1993年 8月30日

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所 信頼性保証責任者



【目 次】

	頁
要 約 -----	1
緒 言 -----	2
材料および方法 -----	3
1. 使用した細胞 -----	3
2. 培養液の調製 -----	3
3. 培養条件 -----	3
4. 被験物質および陽性対照物質 -----	3
5. 被験物質の調製 -----	4
6. 試験条件 -----	5
7. 細胞増殖抑制試験 -----	5
7.1処理条件 -----	5
7.2標本作製法 -----	6
7.3増殖抑制の指標とその結果 -----	6
8. 本試験の群構成 -----	6
8.1直接法 -----	6
8.2代謝活性化法 -----	7
9. 染色体標本作製法 -----	7
10. 染色体分析 -----	8
11. 記録と判定 -----	9
結果および考察 -----	10
結 論 -----	10
特記事項 -----	11
文 献 -----	11

Tables 1~5, Figure 1, Appendixes 1~2

【要 約】

ピグメントグリーン7の染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL)を用いて検討した。

1. 細胞増殖抑制試験

直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は1.2 mg/mlであった。一方、代謝活性化法では、S9mix存在下および非存在下のいずれの処理濃度群(0.16~5.00 mg/ml)においても50%をこえる増殖抑制作用は認められなかった。

従って、染色体異常試験において、直接法では1.2 mg/ml、代謝活性化法では5.0 mg/mlの処理濃度をそれぞれ高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

2. 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、すべての処理群において、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

また、代謝活性化法におけるS9mix存在下および非存在下のいずれの濃度群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

3. 結論

ピグメントグリーン7は、直接法における24時間(0.3~1.2 mg/ml)および48時間処理(0.3~1.2 mg/ml)の各処理群において、CHL細胞に染色体の構造異常や倍数性細胞を誘発しなかった。

また、代謝活性化法のS9mix存在下(1.3~5.0 mg/ml)および非存在下(1.3~5.0 mg/ml)のいずれの処理条件においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、ピグメントグリーン7は、上記の試験条件下で試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

【緒 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、ピグメントグリーン7の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL）を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

上記の試験は、「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 ガイドライン：473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。

【材料および方法】

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク (JCRB) から入手 (1988年2月、入手時：継代4代) したチャイニーズ・ハムスター由来の CHL 細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

この CHL 細胞株は、一般的に化学物質に対して検出感度が高いため常用されている。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS: JRH BIOSCIENCES、ロット番号: 1C2073) を10% 添加したイーグル MEM 培養液を用いた。MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末 (日水製薬(株)) 9.4 g を1 l の蒸留水に溶解し、121 °C で15分間、高圧蒸気滅菌したのち、L-グルタミン (滅菌済み、日水製薬(株)) 300 mg と10% NaHCO₃ 溶液 12.5 ml を加えて調製した。2倍濃度の MEM 培養液は、上記の培地 9.4 g を500 ml の蒸留水に溶解し、以下 MEM 培養液と同様に調製した。

3. 培養条件

2×10⁴個の CHL 細胞を、培養液 5 ml を入れたディッシュ (径6 cm、Corning) に播き、37 °C の CO₂ インキュベーター (5% CO₂) 内で培養した。

4. 被験物質および陽性対照物質

[被験物質] ([REDACTED] 資料より)

(名称) ピグメントグリーン7 (別名: フタロシアニングリーン)

(略号) PG7

(CAS No.) 1328-53-6

(ロット番号) [REDACTED]

(分子式) C₃₂H_{0.1}Cl_{15.16}CuN₈

(分子量) 1092~1127

(純度) 99.04%

(性状) 緑色粉末で、水、ジメチルスルホキシドおよびアセトンに不溶、分解点434°Cである。

- (提 供 者) ██████████
(保 存 条 件) 冷暗所
(安 定 性) 有効期限2年
(溶媒中での安定性) 秦野研究所分析化学研究室で実施した溶媒中での安定性試験
では、3.00～50.0 mg/ml の濃度範囲で4時間は安定であった
(Appendix 1) 。

[陽性対照物質]

1) 直接法の試験に用いる物質

- (化 学 名) マイトマイシンC
(略 号) MC
(ロ ッ ト 番 号) 814 ABB
(製 造 者) ██████████
(保 存 条 件) 冷暗所保存

2) 代謝活性化法の試験に用いる物質

- (化 学 名) シクロホスファミド
(略 号) CPA
(ロ ッ ト 番 号) 67F-0155
(製 造 者) Sigma Chemical Co.
(保 存 条 件) 冷暗所保存

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム (ナカライテスク(株)、ロット番号：M9G8053) 水溶液を用いた。原体を溶媒に懸濁して原液 (増殖抑制試験では50 mg/ml、染色体異常試験では12 mg/ml と50 mg/ml) を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の10% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85% 以上) の値であった (Appendix 2) 。

6. 試験条件

直接法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、ディッシュに培養液 4.5 ml と各濃度の被験物質調製液 0.5 ml を加え、24時間および48時間処理した。

代謝活性化法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、MEM 培養液、2倍濃度の MEM 培養液、および S9 mix をそれぞれ 14 : 8 : 5 の割合で混合した溶液 2.7 ml をディッシュに加えた。また、S9 mix 非存在下の処理群においては、MEM 培養液 と 2倍濃度の MEM 培養液をそれぞれ 8 : 1 の割合で混合した溶液 2.7 ml をディッシュに加えた。その後、さらに 0.3 ml の被験物質調製液を加えて6時間処理した。処理終了後、新鮮な培養液に交換し、更に 18時間培養した。S9 mix の調製は下記の組成で行った。

S9*	3
20 mM HEPES (pH 7.2)	2
50 mM MgCl ₂	1
330 mM KCl	1
50 mM G-6-P	1
40 mM NADP	1
蒸留水	1
<hr/>	
合計	10 ml

* S9 : Sprague-Dawley 系ラットにフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンを投与して調製したキッコマン(株)の S9 (ロット番号: RAA-281、1992年8月製造) を購入し、使用時まで -80℃ の超低温槽内に保存した。

7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

7.1 処理条件

直接法では48時間処理群について、また、代謝活性化法では S9 mix 存在下および非存在下の処理群について細胞増殖抑制試験を実施した。処理濃度は、直接法、代謝活性化法ともに培養液中での最終濃度が 0.16 ~ 5.00 mg/ml の範囲の濃度を用いた。ディッシュは 1 濃度について 2枚用いた。

7.2 標本作製法

培養終了後、培養液を捨てたのち、PBS (Ca⁺⁺、Mg⁺⁺を含む) で洗い。10%ホルマリン溶液を加えて細胞がディッシュに付着した状態で固定した。固定後、0.1%クリスタルバイオレットで染色した。

7.3 増殖抑制の指標とその結果

被験物質のCHL細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計 (Monocellater、オリンパス光学工業(株)) を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、PG7の約50%の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、直接法では1.2 mg/mlとなった。一方、代謝活性化法ではS9mix存在下および非存在下のいずれの処理濃度群 (0.16~5.00 mg/ml) においても50%をこえる増殖抑制作用は認められなかった (Table 1、2、3および Fig.1)。

8. 本試験の群構成

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、直接法では1.2 mg/ml、代謝活性化法のS9mix存在下およびS9mix非存在下では5.0 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたMCおよびCPAは、注射用水 (大塚製薬工場(株)、ロット番号:K1G70) に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8.1 直接法

直接法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群を含め下記の11群を設け、各群2枚のディッシュを用いた。

群	濃度 (mg/ml)	処理時間 (hours)
1) 無処理対照	—	—
2) 溶媒対照	0	24
3) PG7	0.3	24
4) PG7	0.6	24
5) PG7	1.2	24
6) 陽性対照 (MC)	0.00005	24
7) 溶媒対照	0	48
8) PG7	0.3	48
9) PG7	0.6	48
10) PG7	1.2	48
11) 陽性対照 (MC)	0.00005	48

8.2 代謝活性化法

代謝活性化法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群として S9mix を加えない群を含め、下記の 11群を設け、各群 2枚のディッシュを用いた。

群	濃度 (mg/ml)	S9mixの有無	処理時間 (hours)
1) 無処理対照	—	—	—
2) 溶媒対照	0	—	6-(18)
3) PG7	1.3	—	6-(18)
4) PG7	2.5	—	6-(18)
5) PG7	5.0	—	6-(18)
6) 陽性対照 (CPA)	0.005	—	6-(18)
7) 溶媒対照	0	+	6-(18)
8) PG7	1.3	+	6-(18)
9) PG7	2.5	+	6-(18)
10) PG7	5.0	+	6-(18)
11) 陽性対照 (CPA)	0.005	+	6-(18)

9. 染色体標本作製法

- 1) 培養終了の 2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ になるように培養液に加え、培養終了後、各群の細胞をリン酸緩衝液 (Ca^{++} 、 Mg^{++} を含まない) で洗い、

0.25% トリプシン溶液を用いてはがし、10 ml の遠沈管に集めた。

- 2) 1,000~1,200 rpm で5分間遠沈し、上清を捨てたのち、沈殿した細胞に3 ml の0.075 M KCl 水溶液を加えることにより約30分間低張処理を行った。
- 3) 低張処理後、低張液の上層にカルノア液（氷酢酸：メタノール = 1：3 v/v）約6 ml を加え、下方から静かにピペッティングしながら混和して固定し、その後1,000~1,200 rpm で5分間遠沈した。
- 4) 遠沈後上清を除き、再び新鮮なカルノア液を加えて細胞をピペッティングにより再浮遊させ、1,000~1,200 rpm で5分間遠沈した。この操作を数回繰り返した。
- 5) 遠沈して得た白色の細胞塊に、0.2~0.5 ml のカルノア液を加え、十分に懸濁させた。
- 6) 細胞浮遊液の少量を、あらかじめ洗浄しておいたスライドグラス上に滴下し、そのまま風乾した。
- 7) スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。
- 8) スライドグラスのフロスト部分に鉛筆で、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。
- 9) 乾燥したスライドは、ギムザ原液（Merck）4.5 ml を M/15 リン酸緩衝液（pH 6.8）150 ml に希釈した染色液で約8分間染色後、蒸留水で軽くすすいで風乾した。
- 10) 染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、複数の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。よく広がり、かつ染色体が散逸していない分裂中期像を探し、異常を有する細胞については、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で記録用紙に記録した。

染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

11. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの Exact probability test 法により、溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群の有意差検定を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が 5% 未満を陰性、5% 以上 10% 未満を疑陽性、10% 以上を陽性とした。

【結果および考察】

直接法による染色体分析の結果を Table 4 に示した。

PG7を加えて24時間および48時間処理した各濃度群で、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 5 に示した。

PG7を加えてS9mix存在下および非存在下で6時間処理した各濃度群で、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびS9mix存在下でのCPA処理群では染色分体交換(cte)や染色分体切断(ctb)などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

【結 論】

ピグメントグリーン7は、直接法における24時間(0.3~1.2 mg/ml)および48時間処理(0.3~1.2 mg/ml)の各処理群において、CHL細胞に染色体の構造異常や倍数性細胞を誘発しなかった。

また、代謝活性化法のS9mix存在下(1.3~5.0 mg/ml)および非存在下(1.3~5.0 mg/ml)のいずれの処理条件においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、PG7は、上記の試験条件下で試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

【特記事項】

本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

【文 献】

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店 1988
- 2) 石館 基 監修：〈改訂〉染色体異常試験データ集、エル・アイ・シー社、1987

Table 1 Inhibition of cell growth treated with pigment green 7 (PG7) for 48 hours by direct method in CHL cells

Concentration of PG7 (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0.00	100 ,	100	100.0
0.16	78 ,	80	79.0
0.31	80 ,	73	76.5
0.63	73 ,	69	71.0
1.25	49 ,	49	49.0
2.50	29 ,	25	27.0
5.00	12 ,	9	10.5

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 2 Inhibition of cell growth treated with pigment green 7 (PG7) for 6 hours with S9 mix by metabolic activation method in CHL cells

Concentration of PG7 (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0.00	100,	100	100.0
0.16	114,	116	115.0
0.31	107,	116	111.5
0.63	100,	100	100.0
1.25	92,	108	100.0
2.50	113,	116	114.5
5.00	114,	133	123.5

Cell growth was measured by MonocellaterTM (OLYMPUS)

Table 3 Inhibition of cell growth treated with pigment green 7 (PG7) for 6 hours without S9 mix by metabolic activation method in CHL cells

Concentration of PG7 (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0.00	100,	100	100.0
0.16	100,	111	105.5
0.31	94,	105	99.5
0.63	84,	117	100.5
1.25	94,	103	98.5
2.50	84,	105	94.5
5.00	80,	77	78.5

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 4 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with pigment green 7 (PG7)** by direct method

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	1	1	0	6	0	1	0	9	1	5 (2.5)	4 (2.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	2	1	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
PG7	0.3	24	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00	—	—
PG7	0.6	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00	—	—
PG7	1.2	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00	—	—
MC	0.00005	24	200	9	52	73	2	1	5	0	142	1	89*(44.5)	84*(42.0)	0.25	+	—
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
PG7	0.3	48	200	0	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	—	—
PG7	0.6	48	200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	—	—
PG7	1.2	48	200	1	0	0	2	0	3	0	6	1	3 (1.5)	2 (1.0)	0.00	—	—
MC	0.00005	48	200	3	31	101	15	5	5	20	180	23	96*(48.0)	94*(47.0)	0.63	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 99.04%.

Table 5 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with Pigment green 7 (PG7)** by metabolic activation method

Group	Concent- ration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾		
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾		total	TAG (%)		TA (%)	SA	NA
Control				200	1	0	1	2	0	0	0	4	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	-	6 - (18)	200	0	0	0	1	0	1	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
PG7	1.3	-	6 - (18)	200	1	0	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00	-	-
PG7	2.5	-	6 - (18)	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13	-	-
PG7	5.0	-	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-
CPA	0.005	-	6 - (18)	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00	-	-
Solvent ¹⁾	0	+	6 - (18)	200	3	0	0	0	1	0	10	14	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.13		
PG7	1.3	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-
PG7	2.5	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-
PG7	5.0	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	-	-
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	8	114	308	0	3	8	260	701	0	165 *(82.5)	165 *(82.5)	0.13	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 99.04%.

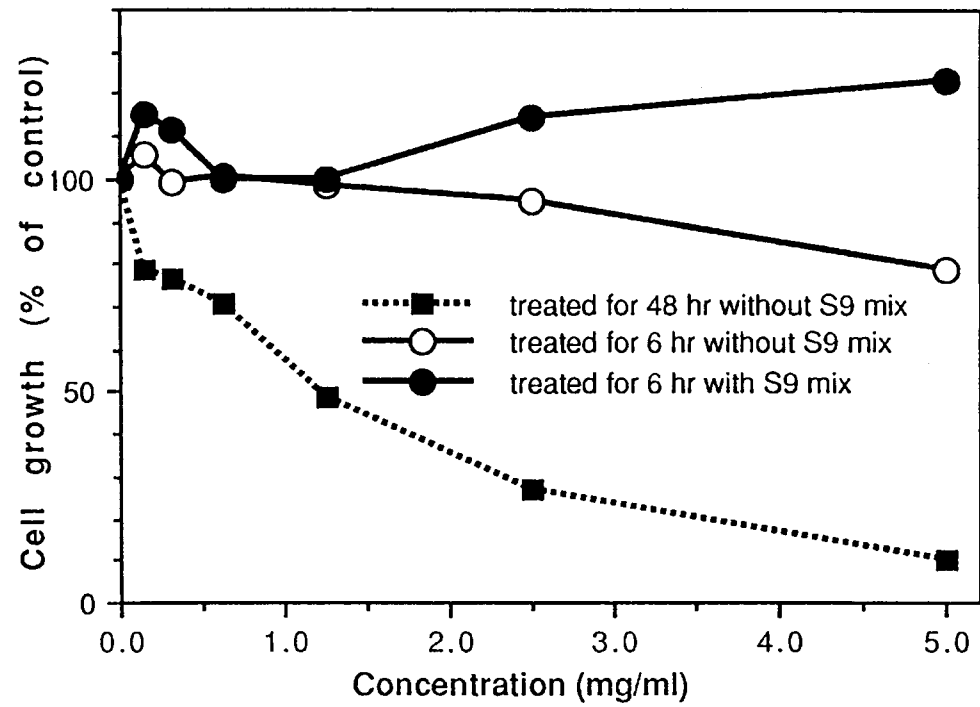


Fig.1 Inhibition of cell growth treated with pigment green 7 in CHL cells

Stability of the test article in the preparation

Test article : pigment green 7

Carrier : 0.5% CMC Na

Date of preparation: Feb. 10, 1993

Date of determination

A : Feb. 10, 1993

B : Feb. 10, 1993

Condition for storage : ambient temp.

Indicated formulation (mg/ml)	A (0 hr)			B (4 hr)		
	Sample No.	Found-1 (mg/ml)	Content (%) ^{a)}	Sample No.	Found-2 (mg/ml)	Content (%) ^{b)}
3.00	1	3.162	105	7	3.125	98.9
"	2	3.164	105	8	3.082	97.6
"	3	3.152	105	9	3.086	97.7
	mean	3.159	105	mean		98.1
50.0	4	50.29	101	10	50.65	101
"	5	50.19	100	11	50.34	100
"	6	50.34	101	12	49.64	98.7
	mean	50.27	101	mean		99.9

a) : Found-1/Indicated Formulation × 100

b) : Found-2/mean Found-1 × 100

Investigator

Director, Chemistry Dept.

Appendix 2

Content and uniformity of the test article in the preparation

Test article : pigment green 7

████████████████████

Date of preparation : Dec. 14, 1992

Carrier : 0.5% CMC Na

Date of determination : Dec. 14, 1992

Sample No.	Indicated Formulation (A) (mg/ml)	Found (B) (mg/ml)	B/A × 100 (%)	Mean (%)
1	12.0	11.23	93.6	94.6
2	"	11.43	95.3	
3	"	11.37	94.8	
4	3.00	2.910	97.0	99.7
5	"	3.036	101	
6	"	3.020	101	
7	50.0	46.56	93.1	93.5
8	"	46.89	93.8	
9	"	46.80	93.6	
10	12.5	12.58	101	101
11	"	12.63	101	
12	"	12.62	101	

Investigator

████████████████████

Director, Chemistry Dept.

████████████████████