最終報告書

試験名：モルダントブラック-7 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1350

試験施設
株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所
〒412-0039　静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者
厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室
〒100-8916　東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1. 目次 2
2. 試験実施概要 5
2.1 試験計画書 5
2.2 試験目的 5
2.3 試験委託者 5
2.4 試験受託者 5
2.5 試験実施施設 5
2.6 被験物質 5

4. 要約 8
5. 緒言 10
6. 試験材料及び方法 11
6.1 被験物質及び溶媒 11
6.1.1 被験物質 11
6.1.2 溶媒 11
6.2 被験液の調製 12
6.2.1 調製方法 12
6.2.2 調製頻度 12
6.2.3 安定性 12
6.3 対照物質 12
6.3.1 陰性対照物質 12
6.3.2 陽性対照物質 13
6.4 使用細胞株 13
6.4.1 細胞株 13
6.4.2 細胞の選択理由 14
6.4.3 培養条件 14
6.4.4 細胞の性状検査 14
6.5 S9 mix 及び培養液 14
6.5.1 S9 mix 14
6.5.2 培養液 15

6.6 試験方法[1-5] 15
6.6.1 識別方法 16
6.6.2 用量の設定 16
6.6.3 細胞増殖抑制試験 17
6.6.4 染色体異常試験 18
6.6.5 標本の観察 19
6.6.6 染色体異常の分類 19
6.6.7 判定基準 20
7. 試験結果 21
7.1 細胞増殖抑制試験 21
7.1.1 短時間処理法 21
7.1.2 連続処理法 21
7.2 染色体異常試験 22
7.2.1 短時間処理法 22
8. 考察 24
9. 参考文献 26

Figures and Tables

Fig. 1-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7 [Short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7 [Short-term treatment: –S9 mix]

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment: –S9 mix]

Appendices

Appendix 1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment: +S9 mix]

Appendix 1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment: –S9 mix]

Appendix 1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Continuous treatment: 24 hr]

Appendix 1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Continuous treatment: 48 hr]

Appendix 2-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment: +S9 mix]

Appendix 2-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment: –S9 mix]

Appendix 2-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Continuous treatment: 24 hr]

Appendix 2-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Continuous treatment: 48 hr]

Appendix 3-1 Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment: +S9 mix]

Appendix 3-2 Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment: –S9 mix]

2. 試験実施概要

2.1 試験計画書

試験番号 : M-1350
試験表題 : モルダントブラック-7のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2.2 試験目的

ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

2.3 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室
〒100-8916　東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

2.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町 36-7

2.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所
〒412-0039　静岡県御殿場市かまど 1284

2.6 被験物質

製造者 : 山田化学工業株式会社
名称 : モルダントブラック-7
受領日 : 2008 年 11 月 13 日
保存場所 : 御殿場研究所　被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室　冷蔵庫

4. 要約

モルダントブラック-7の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU細胞株）を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では65.6 μg/mLで、非代謝活性化では131 μg/mLで、更に連続処理法の24時間処理では131 μg/mLで50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では49.2 μg/mL、非代謝活性化では121.4 μg/mL、更に連続処理法の24時間処理では105.2 μg/mLであった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定を参照し、更に各処理における50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を勘案しながら、短時間処理法の代謝活性化では62.5 μg/mLを最高用量として、以下、公比1.25で計5用量を、非代謝活性化及び連続処理法の24時間処理では250 μg/mLを最高用量として、以下、公比2で計5用量を設定し、被験液の調製方法を定めた。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA値）は、短時間処理法の代謝活性化では62.5 μg/mLでは4.5%、50.0 μg/mLでは4.5%、40.0 μg/mLでは3.0%、32.0 μg/mLでは2.5 %及び25.6 μg/mLでは2.0%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、250 μg/mLでは規定数の細胞が観察されずUR（unreliable）と判定した。125 μg/mLでは13.5%、62.5 μg/mLでは9.0%、31.3 μg/mLでは4.0%及び15.6 μg/mLでは1.5%と125 μg/mLで陽性の判定基準である10%以上を、62.5 μg/mLにおいて疑陽性の判定基準である5%以上10%未満を示した。非代謝活性化においては、TA値の増加に用量依存性が認められたことから、陽性と判定した。また、染色体構造異常誘発能の強さを、構造異常が20%出現する推定被験物質濃度（SD_{20}値）を指標として検討したところ、SD_{20}値は0.18 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換（cte）を持つ細胞の出現率の比較値であるTR値[1)]は120であった。なお、短時間処理法で明らかに陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても5%未満であったことから、モルダントブラック-7の染色体数的異常誘発性は陰性と判定した。

全ての処理法において、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、モルダントブラック-7は本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

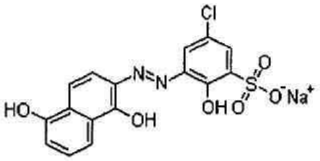
5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室の依頼により、モルダントブラック-7の安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

製造者	:	
名称	:	モルダントブラック-7
英語別称	:	Mordant Black-7
ロット番号	:	
CAS 番号	:	3618-60-8
構造式又は示性式	:	
分子量	:	416.77
純度	:	92.7%
不純物	:	不明不純物 7.3%（うち、塩分として塩素イオン 7100 mg/kg、硫酸イオン 1300 mg/kg）
性状	:	無色～微黄色透明液体
安定性	:	実験終了後に、山田化学工業株式会社において安定性を測定し、実験期間中の安定性を確認した（Attached Data 2）。
入手量	:	25 g
保存方法	:	密閉、冷暗所（実測温度：3～6°C）、吸湿性有りシリカゲルと同梱（防湿）
保存場所	:	御殿場研究所　被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室　冷蔵庫
取り扱い上の注意	:	特に無し
返却	:	実験終了後、被験物質の残余物はすべて山田化学工業株式会社にて廃棄した。

6.1.2 溶媒

名称	:	注射用水
ロット番号	:	9A75N
規　格	:	日本薬局方
製造元	:	株式会社大塚製薬工場
保存方法	:	室温

保存場所　：　御殿場研究所　遺伝毒性試験室
溶媒の選択理由　：　供試前試験において、被験物質の注射用水への溶解性を確認したところ、42.0 mg/mL で良好な懸濁性を示したことから、溶媒として注射用水を用いた。

6.2　被験液の調製

6.2.1　調製方法

1)　細胞増殖抑制試験

被験物質 0.4200 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 42.0 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：4200 μg/mL）を調製した。次いで、42.0 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 7 段階希釈し、21.0、10.5、5.25、2.63、1.31、0.656 及び 0.328 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2)　染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.0500 g を 20 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 2.50 mg/mL 懸濁液（被験液、プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：250 μg/mL）を調製した。次いで 2.50 mg/mL 被験液を公比 2（各濃度の被験液 5.0 mL：溶媒 5.0 mL）で順次 4 段階希釈し、1.25、0.625、0.313 及び 0.156 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。また、2.50 mg/mL 被験液を 4 倍希釈（被験液 10.0 mL：溶媒 30.0 mL）し、0.625 mg/mL 被験液を調製した。更に、0.625 mg/mL 被験液を公比 1.25（各濃度の被験液 20.0 mL：溶媒 5.0 mL）で順次 4 段階希釈し、0.500、0.400、0.320 及び 0.256 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では 0.625、0.500、0.400、0.320 及び 0.256 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では 2.50、1.25、0.625、0.313 及び 0.156 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を用いた。

6.2.2　調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

6.2.3　安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液の安定性情報とした。その結果、安定性には問題ないことを確認した。

6.3　対照物質

6.3.1　陰性対照物質

溶媒として用いた注射用水を陰性対照物質とした。

6.3.2 陽性対照物質

1) シクロフォスファミドとマイトマイシンCを、代謝活性化系と非代謝活性化系の陽性対照としてそれぞれ用いた。

(1) シクロフォスファミド（以下CPと略記する）

ロット番号	:	SDP4062
製造元	:	和光純薬工業株式会社
純度	:	生化学用（97.0%以上）
保存条件	:	冷蔵、遮光
保存場所	:	御殿場研究所　遺伝毒性試験室　発癌性物質冷蔵保存庫

(2) マイトマイシンC（以下MMCと略記する）

ロット番号	:	525AHA
製造元	:	協和醗酵工業株式会社
力価	:	2 mg（力価）/瓶
保存条件	:	室温、遮光
保存場所	:	御殿場研究所　遺伝毒性試験室　発癌性物質室温保存庫

2) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

(1) 染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化

CP 0.0140 gをγ線滅菌済プラスチック遠沈管（50 mL）に秤取した。これに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号8K83N）を20 mL加えて溶解し、0.70 mg/mL溶液を調製した（培養液4.900 mLに0.100 mLを加えた。この時の最終濃度は14 μg/mL）。

(2) 染色体異常試験 短時間処理法 非代謝活性化

MMCの2 mg充填バイアルに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号8K83N）を注射筒で2 mL加えて溶解した（1 mg/mL）。次に、この溶液を公比20で順次2段階希釈（溶液0.250 mL：生理食塩液4.750 mL）し、0.050及び0.0025 mg/mLの溶液を調製した（培養液4.850 mLに0.0025 mg/mL溶液を0.150 mL加えた。この時の最終濃度は0.075 μg/mL）。

3) 陽性対照物質の選択理由

前述（5-2）の遺伝毒性試験ガイドラインに使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることからCP及びMMCを選択した。

6.4 使用細胞株

6.4.1 細胞株

チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞（CHL/IU 細胞株）を用いた。細胞

は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手（2004年 11月 2日）し、継代数の少ないものを培地にジメチルスルホキシド（DMSO：試薬特級 99.0%以上、和光純薬工業株式会社）を 10vol%添加した液体窒素中で保存し、これを融解し継代培養したものを使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 7 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 11 継代であった。

6.4.2 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、更に種々の化学物質に対して感受性が高く、背景データが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO_2濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で培養した。継代は 1~4 日ごとに行った。

6.4.4 細胞の性状検査

試験に使用する細胞は、凍結保存から解凍し、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等について 2009年 5月 8日 ~ 2009年 5月 14日に定期検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。細胞は、30 継代を越えない範囲で試験に供した。

6.5 S9 mix 及び培養液

6.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9／コファクターC セット、ロット番号 C090213121。オリエンタル酵母工業株式会社）を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	09021312
製造日	:	2009年 2月 13日
種・系統	:	ラット·SD 系
性	:	雄
週齢	:	7 週齢
誘導物質	:	フェノバルビタール(PB)及び 5, 6-ベンゾフラボン(BF)
投与法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量	:	PB 4日間 30+60+60+60 mg/kg body weight
		BF 1日 80 mg/kg body weight
保存方法	:	冷凍（超低温フリーザー）
使用期限	:	2009年 8月 12日（製造後 6 箇月）
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) 補酵素

名称	:	コファクターC
ロット番号	:	C09021211
製造日	:	2009年2月12日
保存方法	:	冷凍（超低温フリーザー）
使用期限	:	2009年8月11日（製造後6箇月）
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

3) S9 mixの組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20 mmol/L HEPES緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40 mmol/L 酸化型ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

6.5.2 培養液

Invitrogen Corporationより購入したMinimum Essential Medium（MEM、GIBCO™、Cat.No. 11095-080）に、Invitrogen Corporationより購入し非働化（56°C, 30分）した牛血清（BS）を10 vol%添加して調製した培養液（BS-MEM）を用いた。調製後のBS-MEMは冷蔵保存した。

1) 牛血清

ロット番号	:	616941
製造元	:	Invitrogen Corporation
保存方法	:	冷凍（–80°C設定の冷凍庫）
保存場所	:	御殿場研究所　遺伝毒性試験室　超低温フリーザー

2) Minimum Essential Medium（MEM）

ロット番号	:	510522、554263
製造元	:	Invitrogen Corporation
保存方法	:	冷蔵
保存場所	:	御殿場研究所　遺伝毒性試験室　冷蔵庫

6.6 試験方法[1-5)]

試験は以下のステージ順に実施した。なお、短時間処理法において明らかな陽性結果が得られたため、連続処理法、確認試験及び追加試験は実施しなかった。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化
		非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理
		48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化
		非代謝活性化

6.6.1 識別方法

1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「–」とし、連続処理法では 24 時間処理を「24–」、48 時間処理を「48–」とした。更にこれに続けて陰性対照（Negative Control）の場合は「NC」を、被験物質用量群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、‥‥の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。また、陽性対照（Positive Control）は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」~「99」までの 2 桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 4200 μg/mL とし、以下公比 2 で希釈した 2100、1050、525、263、131、65.6 及び 32.8 μg/mL の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 65.6 μg/mL で、非代謝活性化では 131 μg/mL で、更に連続処理法の 24 時間処理では 131 μg/mL で 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 49.2 μg/mL、非代謝活性化では 121.4 μg/mL、更に連続処理法の 24 時間処理では 105.2 μg/mL であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定を参照し、更に各処理における 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を勘案しながら、短時間処理法の代謝活性化では 62.5 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.25 で計 5 用量を、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 24 時間処理では 250 μg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で計 5 用量を設定し、被験液の調製方法を定めた。また、連続処理法の 48 時間処理では、最低用量の 32.8 μg/mL において、細胞増殖抑制率が 67%を示し、50%細胞増殖抑制濃度を超えない直前の値が得られず、2 点直線法による 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めることが出来なかっ

た。しかしながら、32.8 μg/mL 以上の用量における細胞増殖抑制率に用量依存性が認められ、外挿した場合に、10～15 μg/mL に 50%細胞増殖抑制濃度が存在すると推測されることから、31.3 μg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で計 5 用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。なお、以下の試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

1) 短時間処理法

(1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。

(2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

(3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液（牛血清含）で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。

(4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした。）。

2) 連続処理法

(1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。

(2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、

倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24 時間処理及び48時間処理ともに陰性対照群については、培養液0.500 mLを取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。

(3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

6.6.4 染色体異常試験

1) 短時間処理法

(1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。

(2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 μg/mL）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 μg/mL）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

(3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液（牛血清含）で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。

(4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 μg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸＝3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。

(5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした。）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

短時間処理法の非代謝活性化において陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

6.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常はさらに以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

ギャップ(g)	:	染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片がある（非染色部分が染色分体の同軸上にある）ものであって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものと定義した。
染色分体型切断(ctb)	:	切断とは断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものと定義した。
染色分体型交換(cte)	:	四放射状交換など。
染色体型切断(csb)	:	断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものを染色体型切断と定義した。
染色体型交換(cse)	:	二動原体染色体、環状染色体など。
その他(other)	:	断片化(frg)他。

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり倍化した場合を数的異常と定義した。

倍数体　　：　polyploidy（核内倍加体：endoreduplication を含む）

6.6.7　判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準[1]に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率(%)よって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰　性（–）
5% 以上 10% 未満	疑陽性（±）
10% 以上	陽　性（+）

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合（TAG）と含まない場合（TA）とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

7.1.1 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Appendix 1-1 及び Appendix 2-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 1-2 及び Appendix 2-2 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、代謝活性化では 65.6 μg/mL 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 49.2 μg/mL であった。また、非代謝活性化では 131 μg/mL 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 121.4 μg/mL であった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による培養の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、65.6 μg/mL 以上で紫色に、また 32.8 μg/mL の用量では淡紫色に変化が認められた。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、最高用量の 4200 μg/mL の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、525 μg/mL 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、525 μg/mL 以上で被験物質と思われる物質がシャーレ底面に固着していたため、観察不能であった。また、65.6 μg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Appendix 1-3 及び Appendix 2-3 に、48 時間処理の結果を Appendix 1-4 及び Appendix 2-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理法では 131 μg/mL 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 105.2 μg/mL であった。また、48 時間処理法では 32.8 μg/mL 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 32.8 μg/mL 以下であった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による培養の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、65.6 μg/mL 以上で紫色に、また 32.8 μg/mL の用量で淡紫色に変化が認められた。被験物質の添加に伴う析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、最高用量の 4200 μg/mL の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、525 μg/mL 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下

で観察し、陰性対照群と比較すると、24時間処理では、525 μg/mL以上で被験物質と思われる物質がシャーレ底面に固着していたため、観察不能であり、131 μg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。48時間処理では、525 μg/mL以上で被験物質と思われる物質がシャーレ底面に固着していたため観察不能であり、32.8 μg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.2 染色体異常試験

7.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果をAppendix 3-1、Fig. 1-1及びTable 1-1に、非代謝活性化の結果をAppendix 3-2、Fig. 1-2及びTable 1-2に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による培養の色調の観察においては、代謝活性化では、40.0 μg/mL以上で紫色に、25.6 μg/mL以上の用量で淡紫色に変化が認められた。非代謝活性化では、62.5 μg/mL以上で紫色に、15.6 μg/mL以上の用量で淡紫色に変化が認められた。被験物質添加に伴う析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では、50.0 μg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。非代謝活性化では、31.3 μg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率（TA）は、短時間処理法の代謝活性化では62.5 μg/mLでは4.5%、50.0 μg/mLでは4.5%、40.0 μg/mLでは3.0%、32.0 μg/mLでは2.5%及び25.6 μg/mLでは2.0%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、250 μg/mLでは規定数の細胞が観察されずUR（unreliable）と判定した。125 μg/mLでは13.5%、62.5 μg/mLでは9.0%、31.3 μg/mLでは4.0%及び15.6 μg/mLでは1.5%と125 μg/mLで陽性の判定基準である10%以上を、62.5 μg/mLにおいて疑陽性の判定基準である5%以上10%未満を示した。250 μg/mLの用量においては、規定数の細胞が観察されずURと判定したが、陽性の判定基準である10%以上を示した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値（Attached Data 3）と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常（倍数体）の出現率は、代謝活性化では62.5 μg/mLでは0.5%、50.0 μg/mLでは1.5%、40.0 μg/mLでは0.5%、32.0 μg/mLでは0%及び25.6 μg/mLでは1.5%と陰

性の判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、250 μg/mL では規定数の細胞が観察されず UR（unreliable）と判定した。125 μg/mL では 0.5%、62.5 μg/mL では 0%、31.3 μg/mL では 1.0%及び 15.6 μg/mL では 2.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値　　と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

8. 考察

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、短時間処理法の代謝活性化では、陰性の判定基準を示したが、非代謝活性化では、陽性の判定基準である 10%以上の TA 値を示したこと及び TA 値の増加には用量依存性が認められたことから、総合的に陽性と判定した。短時間処理法の非代謝活性化において陽性結果が得られたことから、染色体構造異常誘発能の強さを、構造異常が 20%出現する推定被験物質濃度（SD_{20} 値）を指標として検討したところ、SD_{20} 値は 0.18 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換（cte）を持つ細胞の出現率の比較値である TR 値 [1]は 120 であった。なお、短時間処理法で明らかに陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、モルダントブラック-7 の染色体数的異常誘発性は陰性と判定した。

全ての処理法において、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値（Attached Data 3）と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

多くのアゾ化合物を用いた遺伝毒性試験においては、代謝活性化の条件下で陽性を示すことが報告されている [6]。更に、アゾ化合物の遺伝毒性発現には、アゾ基の還元的開裂反応が重要で、それよって生じる個々の化合物が遺伝毒性に役割を果たしていることが示唆されている。本被験物質も化学構造的にアゾ化合物に属することから、その還元的開裂が重要な役割を果たすと推察され、被験物質自体やその還元的開裂産物に関する遺伝毒性試験の報告を調査したが、見当たらなかった。本被験物質と類似の化学構造を有するアゾ化合物では、Acid Alizarin Violet N の *Salmonella* 菌株を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化の条件下において遺伝毒性 [7]が認められているが、一方、Allura Red AC の染色体異常試験では、非代謝活性化では疑陽性、連続処理法では陽性と報告されており [1]、遺伝毒性の発現が非代謝活性化の条件下で生じている点において、本被験物質の結果と一致している。更に、後者の物質については、*Salmonella* 菌株を用いた復帰突然変異試験及びキイロショウジョウバエ（*Drosophilla melanogaster*）を用いた伴性劣性致死試験においては、陰性と報告されている [8]。また、複数のアゾ化合物を用いたマウス多臓器 DNA 単鎖切断試験（Comet assay）では、本被験物質と同様に、水溶性のスルホン酸ナトリウム基を構造内に有する化合物は、肝臓における DNA 損傷性が低いと報告されている [9]。これらの結果から、アゾ化合物の遺伝毒性の発現機構には、アゾ基の還元反応とは別の要因が存在する可能性も示唆されるが、還元によらないアゾ化合物の遺伝毒性発現機構については不明な点が多く、製造過程に生じた不純物に起因する可能性も示唆されている [6]。本被験物質同様に非

代謝活性化において遺伝毒性が認められる橙色 203 号の復帰突然変異試験において、Combes らは、その遺伝毒性はアゾ基由来ではなく、ニトロ基の存在に起因すると推察している[10]が、本被験物質にはアゾ基を除いて遺伝毒性に直接関与すると考えられる反応基は見当たらない。なお、肝癌を誘発することが知られている 3'-methyl-*N*,*N*-dimethyl-4-aminoazobenzene（3'-Me-DAB）の *Salmonella* 菌株を用いた復帰突然変異試験において、S9 の誘導剤と種差の比較検討を実施しているが、ポリ塩化ビフェニル（PCB）で誘導したラット肝 S9 によって強い遺伝毒性が得られるが[11]、フェノバルビタール誘導では遺伝毒性の誘発が認められなかったと報告している[12]。更に、同化合物に対する遺伝毒性は、ヒト肝 S9 を用いた場合には陰性を示し、遺伝毒性の発現に種差や性差が認められたと報告している[11]ことから、S9 によるアゾ基の還元開裂には種特異性を考慮する必要が示唆される。

以上の結果から、モルダントブラック-7 は本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

9. 参考文献

1) 石館基監修 (1987)：＜改訂＞染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー 、東京
2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens, Mutation Res., **48**, 337-354
3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, Mutation Res., **66**, 277-290
4) 石館 基 (1982)：ほ乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), 日本香粧品科学会誌, **6**, 31-43
5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
6) [Danish EPA] Danish Environmental Protection Agency. 1998. Survey of azo-colorants in Denmark: Consumption, use, health and environmental aspects. Ministry of Environment and Energy, Denmark.
7) Brown JP, Dietrich PS. (1983): Mutagenicity of selected sulfonated azo dyes in the Salmonella/microsome assay: use of aerobic and anaerobic activation procedures., Mutation Res., **116**(3-4), 305-15.
8) Lee WR, Abrahamson S, Valencia R, von Halle ES, Würgler FE, Zimmering S. (1983): The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program., Mutation Res., **123**(2):183-279.
9) Tsuda S, Matsusaka N, Madarame H, Ueno S, Susa N, Ishida K, Kawamura N, Sekihashi K, Sasaki Y F. (2000): The comet assay in eight mouse organs: results with 24 azo compounds., Mutation Res., **465**(1-2), 11-26
10) Combes RD, Haveland-Smith RB., (1982): A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes., Mutation Res., **98**(2), 101-248
11) Mori Y, Niwa T, Toyoshi K, Hirano K, Sugiura M. (1983): Mutagenesis in Salmonella after metabolic activation of carcinogenic azo dyes and their isomers by liver S9 from rats, mice and hamsters., Mutation Res., **121**(2), 95-102
12) Mori Y, Niwa T, Toyoshi K. (1983): Mutagenic activation of selected aminoazo compounds by rat liver: evidence for a cytochrome P-448 dependent reaction., Gann., **74**(4), 483-92.

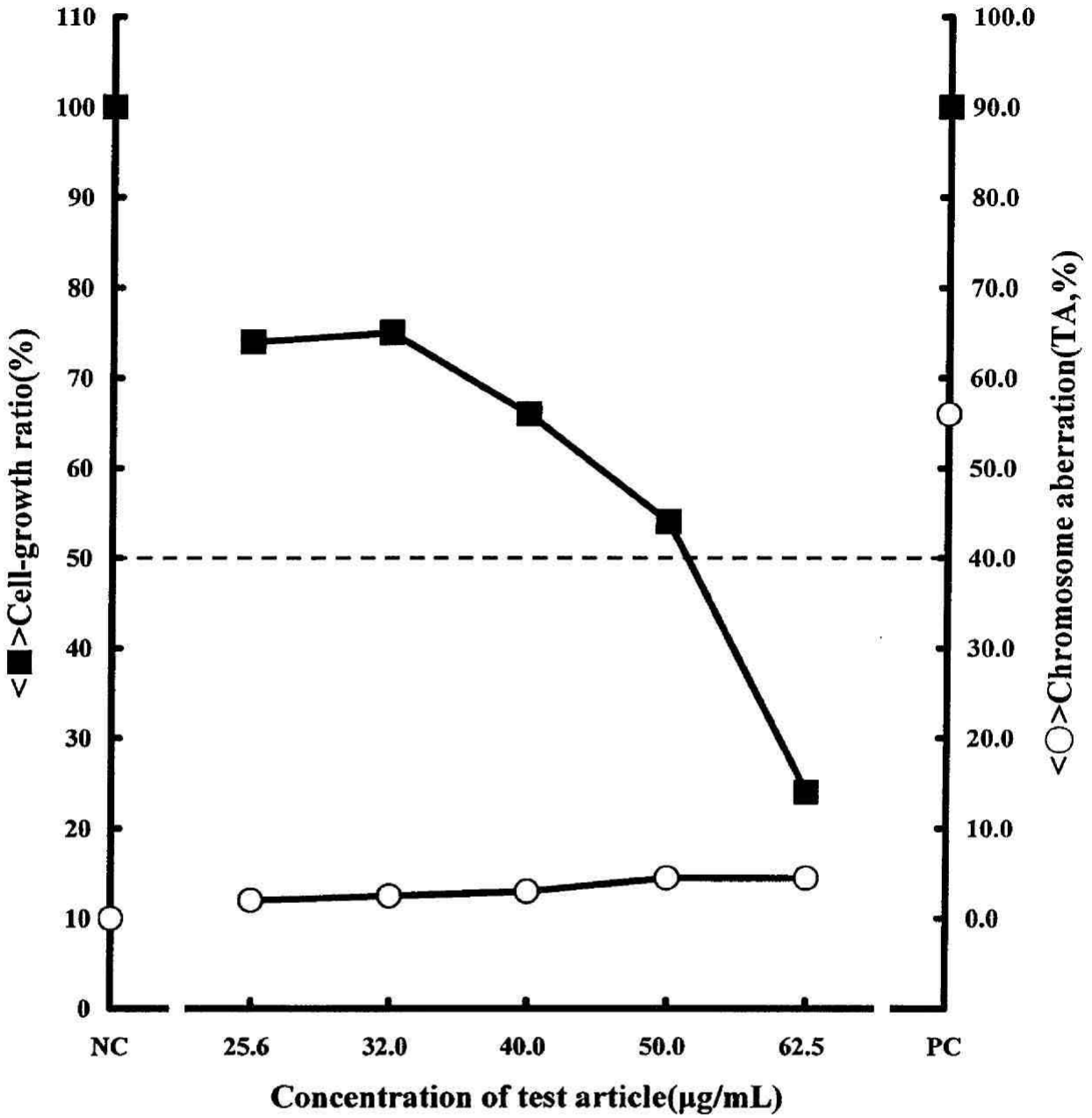


Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)
PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 μg/mL)

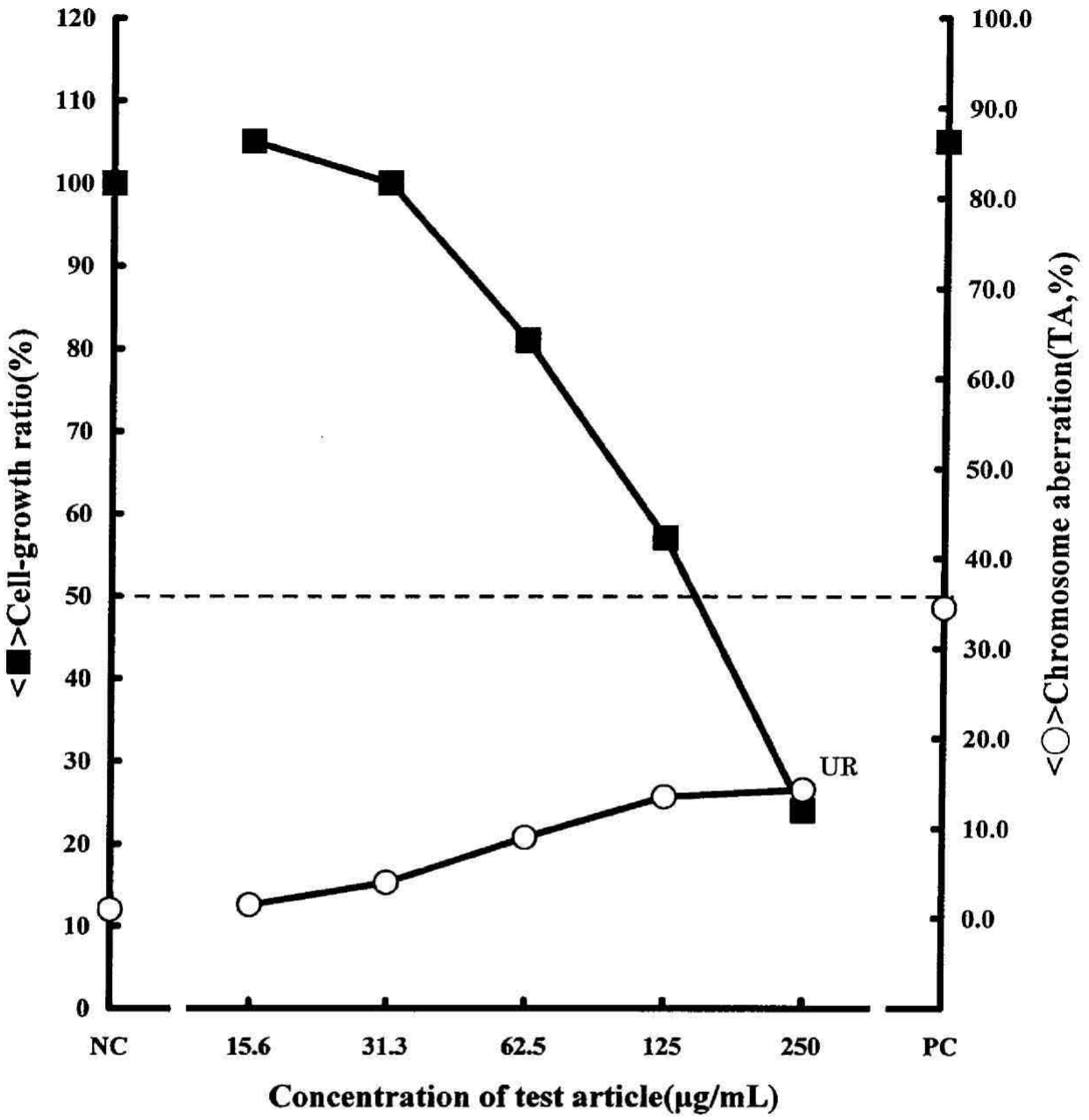


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment:-S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 μg/mL)

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosome could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment:+S9 mix]

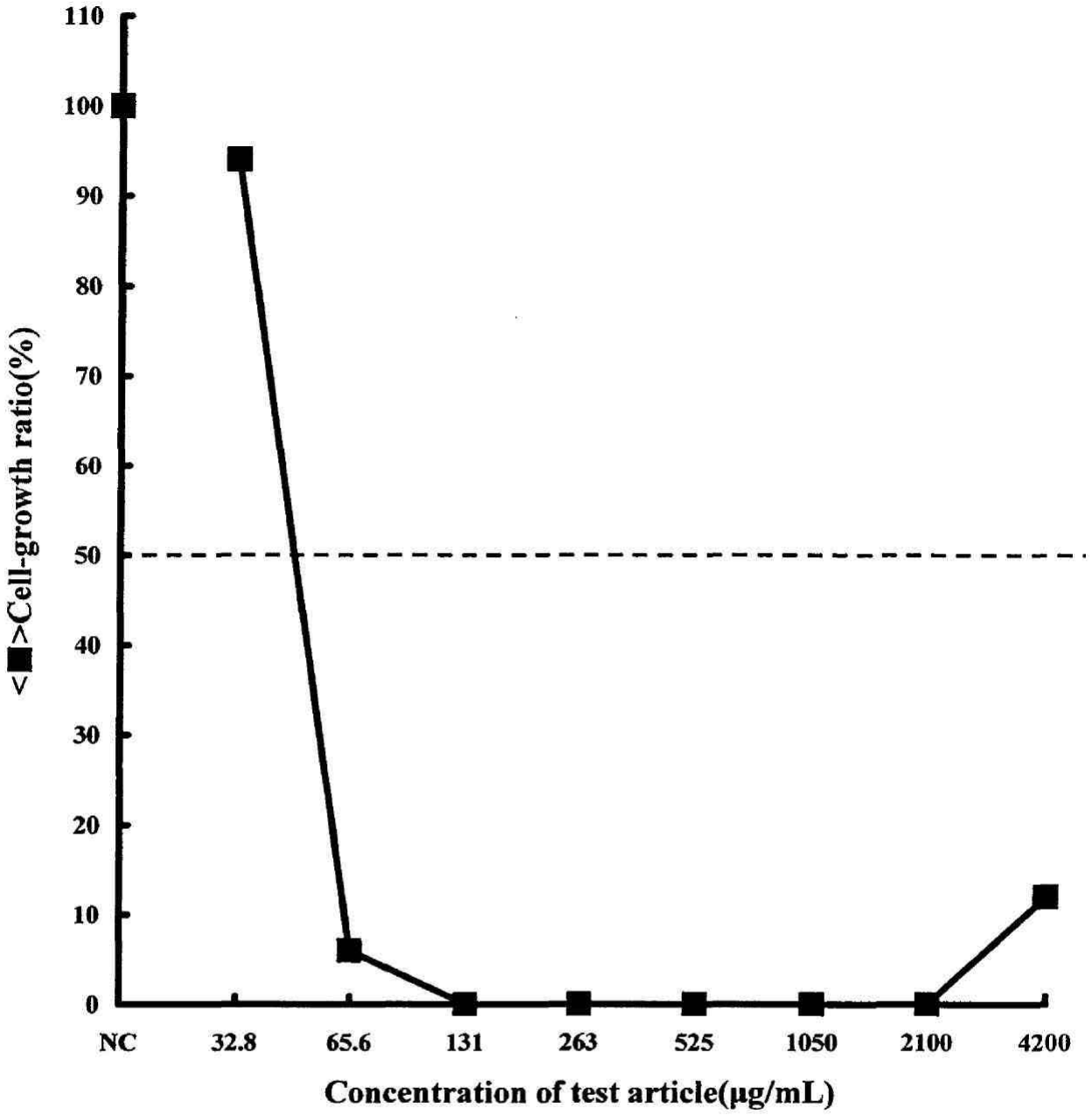
Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge-ment		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge-ment	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0		13-1
		NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-	85-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
			100	2	0	0	0	0	2	0	2		74	100	0	0	0		72-1
		25.6	100	0	2	0	0	0	2	0	2	-	74	100	2	1	3	-	46-1
			200	2(1.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	0(0.0)	4(2.0)		(74)	200	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)		
			100	0	3	0	0	0	3	0	3		83	100	0	0	0		89-1
		32.0	100	1	1	0	0	0	2	1	3	-	66	100	0	0	0	-	62-1
			200	1(0.5)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	1(0.5)	6(3.0)		(75)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
			100	0	2	0	0	0	2	0	2		66	100	0	1	1		58-1
6-18	+	40.0	100	0	4	0	0	0	4	0	4	-	66	100	0	0	0	-	66-1
			200	0(0.0)	6(3.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	6(3.0)	0(0.0)	6(3.0)		(66)	200	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		
			100	0	4	0	0	0	4	0	4		49	100	1	1	2		22-1
		50.0	100	0	5	0	0	0	5	0	5	-	58	100	1	0	1	-	11-1
			200	0(0.0)	9(4.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	9(4.5)	0(0.0)	9(4.5)		(54)	200	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)		
			90	2	0	0	0	1	3	0	3		24	90	1	0	1		94-1
			10	0	0	0	0	0	0	0	0			10	0	0	0		94-2
		62.5	65	2	3	0	0	0	5	0	5	-	24	65	0	0	0	-	33-1
			35	0	1	0	0	0	1	0	1			35	0	0	0		33-2
			200	4(2.0)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	9(4.5)	0(0.0)	9(4.5)		(24)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
			100	2	58	0	0	0	60	2	62		108	100	0	0	0		23-1
		PC	100	1	51	0	0	0	52	0	52	+	91	100	0	0	0	-	28-1
			200	3(1.5)	109(54.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	112(56.0)	2(1.0)	114(57.0)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation
TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.
NC: Negative control (water for injection)
PC: Positive control (cyclophosphamide, 14μg/mL)
Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).
Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge-ment		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge-ment	
6-18	-	NC	100	1	0	0	0	0	1	0	1		100	100	0	0	0		01-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	90	100	0	0	0	-	87-1
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		15.6	100	1	1	0	0	0	2	0	2		100	100	3	2	5		67-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	100	100	0	0	0	-	14-1
			200	2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		(105)	200	3(1.5)	2(1.0)	5(2.5)		
		31.3	100	1	3	0	0	0	4	0	4		100	100	2	0	2		31-1
			100	1	3	0	0	0	4	0	4	-	90	100	0	0	0	-	03-1
			200	2(1.0)	6(3.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(4.0)	0(0.0)	8(4.0)		(100)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		62.5	100	2	7	0	0	1	10	0	10		81	100	0	0	0		38-1
			100	0	8	0	0	0	8	0	8	±	72	100	0	0	0	-	69-1
			200	2(1.0)	15(7.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	18(9.0)	0(0.0)	18(9.0)		(81)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		125	100	3	10	0	0	1	14	0	14		63	100	0	0	0		24-1
			100	2	11	0	0	0	13	0	13	+	45	100	1	0	1	-	90-1
			200	5(2.5)	21(10.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	27(13.5)	0(0.0)	27(13.5)		(57)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		250	1	0	0	0	0	0	0	0	0		27	1	0	0	0		41-1
			8	0	0	0	0	0	0	0	0			8	0	0	0		41-2
			4	0	1	0	0	0	1	0	1	UR	18	4	0	0	0	UR	08-1
			8	1	1	0	0	0	2	0	2			8	0	0	0		08-2
			21	1(4.8)	2(9.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(14.3)	0(0.0)	3(14.3)		(24)	21	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		PC	100	3	30	0	0	0	33	0	33		109	100	0	0	0		43-1
			100	6	30	0	0	0	36	0	36	+	90	100	0	0	0	-	47-1
			200	9(4.5)	60(30.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	69(34.5)	0(0.0)	69(34.5)		(105)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation
TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.
NC: Negative control (water for injection)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.075μg/mL)
Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).
Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.
UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

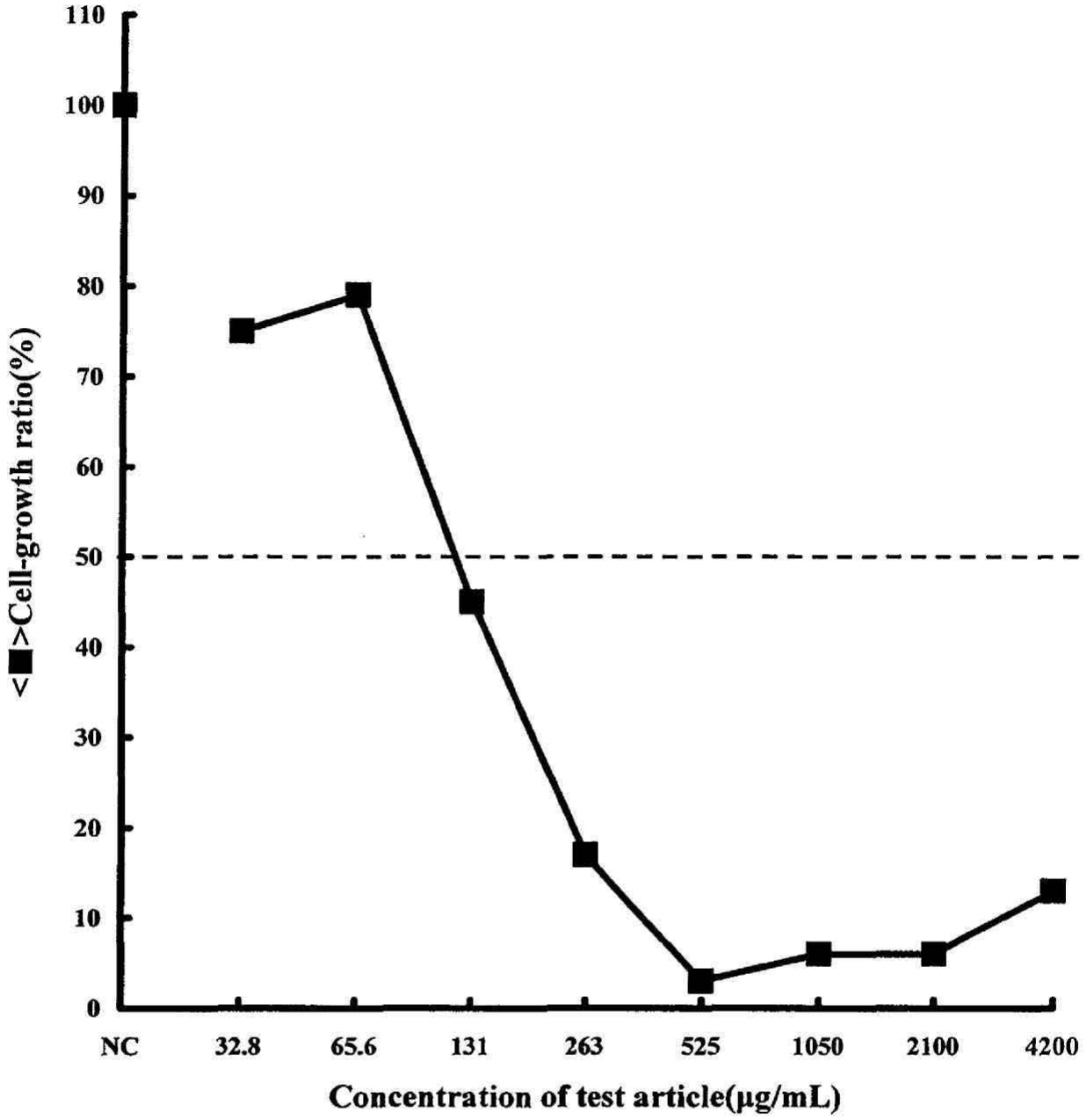


Appendix 1-1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment : +S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)

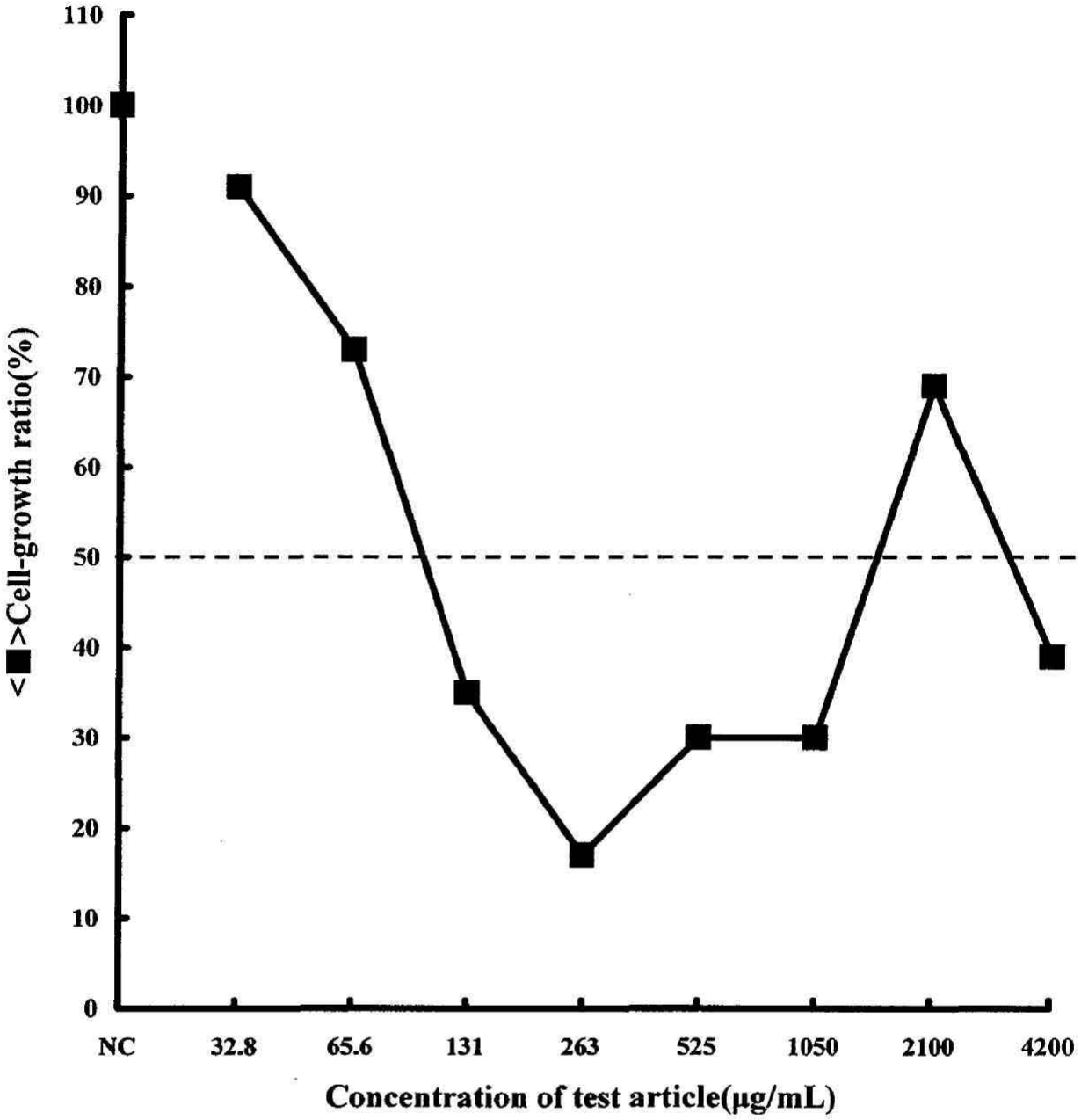


Appendix 1-2

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)

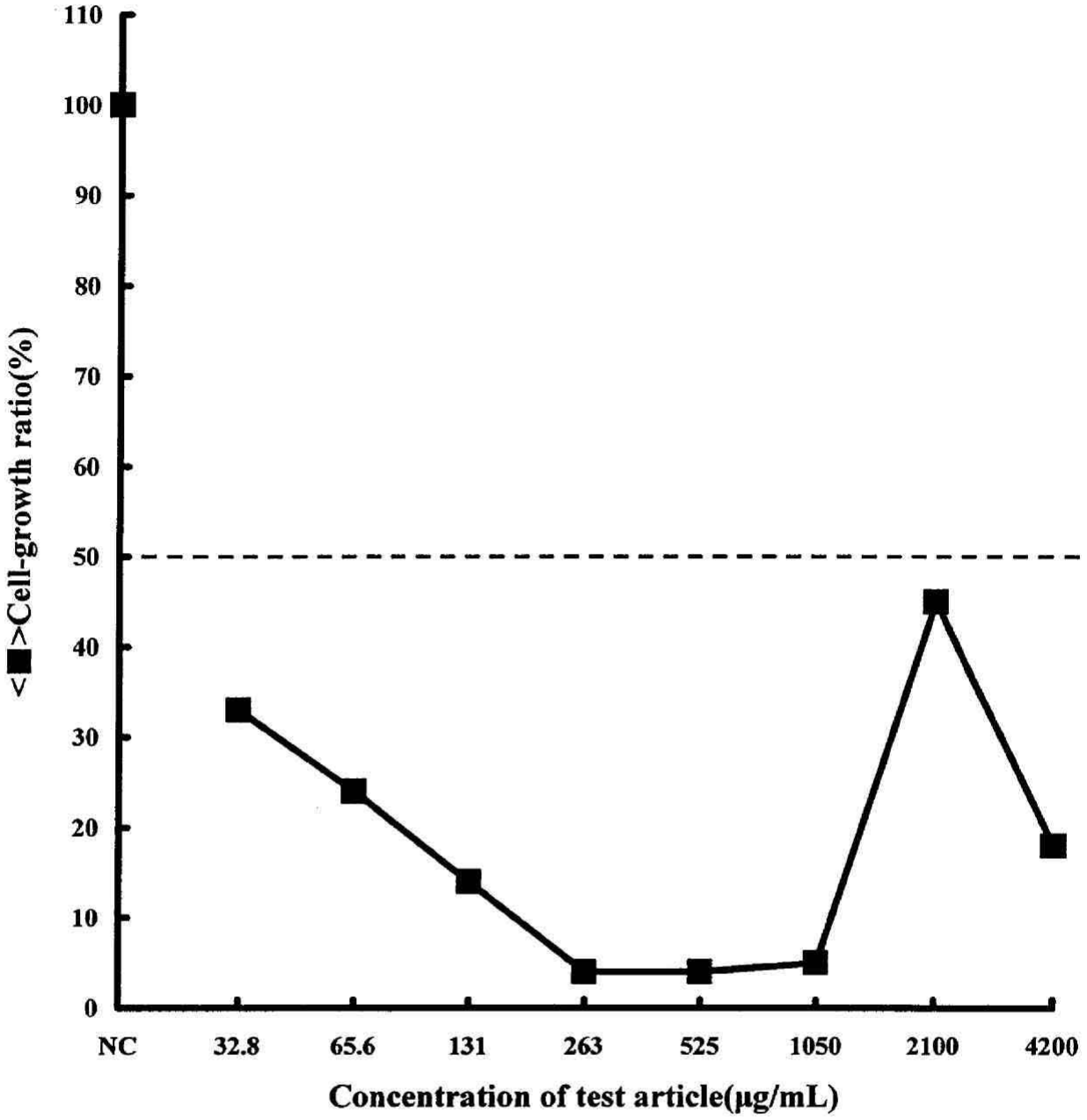


Appendix 1-3

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Continuous treatment:24hr]

NC: Negative Control(water for injection)



Appendix 1-4

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Continuous treatment : 48hr]

NC: Negative Control(water for injection)

Appendix 2-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Cell-growth ratio		Observation[c]			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%)[b]	Condition of cells[d]	Color of medium[e]	Precipitates/Crystals[f] 1)	Precipitates/Crystals[f] 2)
+	6-18	0 (NC)		100 [a]	100	-	-	-	-
				128		-	-	-	-
		Test article	32.8	114	94	-	Light-purple	-	-
				100		-	Light-purple	-	-
			65.6	0	6	++	Purple	-	-
				14		++	Purple	-	-
			131	0	0	+++	Purple	-	-
				0		+++	Purple	-	-
			263	0	0	+++	Purple	-	-
				0		+++	Purple	-	-
			525	0	0	g)	Purple	-	+
				0		g)	Purple	-	+
			1050	0	0	g)	Purple	-	+
				0		g)	Purple	-	+
			2100	0	0	g)	Purple	-	+
				0		g)	Purple	-	+
			4200	14	12	g)	Purple	+	+
				14		g)	Purple	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **49.2** μg/mL									

NC: Negative Control(water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions.Precipitates/crystals were observed [1]immediately after addition of the test suspensions and [2]at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: -S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Cell-growth ratio		Observation[c]			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%)[b]	Condition of cells[d]	Color of medium[e]	Precipitates/Crystals[f] 1)	Precipitates/Crystals[f] 2)
-	6-18	0 (NC)		100 [a]	100	-	-	-	-
				93		-	-	-	-
		Test article	32.8	66	75	-	Light-purple	-	-
				79		-	Light-purple	-	-
			65.6	79	79	+	Purple	-	-
				73		+	Purple	-	-
			131	46	45	++	Purple	-	-
				40		++	Purple	-	-
			263	13	17	++	Purple	-	-
				20		++	Purple	-	-
			525	0	3	g)	Purple	-	+
				6		g)	Purple	-	+
			1050	6	6	g)	Purple	-	+
				6		g)	Purple	-	+
			2100	6	6	g)	Purple	-	+
				6		g)	Purple	-	+
			4200	13	13	g)	Purple	+	+
				13		g)	Purple	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **121.4** μg/mL									

NC: Negative Control(water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions.Precipitates/crystals were observed [1]immediately after addition of the test suspensions and [2]at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Cell-growth ratio		Observation[c)]			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%)[b)]	Condition of cells[d)]	Color of medium[e)]	Precipitates/Crystals[f)] 1)	Precipitates/Crystals[f)] 2)
-	24-0	0 (NC)		100 [a)]	100	-	-	-	-
				91		-	-	-	-
		Test article	32.8	91	91	-	Light-purple	-	-
				83		-	Light-purple	-	-
			65.6	74	73	-	Purple	-	-
				66		-	Purple	-	-
			131	33	35	++	Purple	-	-
				33		++	Purple	-	-
			263	16	17	+++	Purple	-	-
				16		+++	Purple	-	-
			525	16	30	g)	Purple	-	+
				41		g)	Purple	-	+
			1050	33	30	g)	Purple	-	+
				24		g)	Purple	-	+
			2100	66	69	g)	Purple	-	+
				66		g)	Purple	-	+
			4200	33	39	g)	Purple	+	+
				41		g)	Purple	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **105.2** μg/mL									

NC: Negative Control(water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions.Precipitates/crystals were observed [1)]immediately after addition of the test suspensions and [2)]at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

\+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 2-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Cell-growth ratio		Observation[c]			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%)[b]	Condition of cells[d]	Color of medium[e]	Precipitates/Crystals[f] 1)	Precipitates/Crystals[f] 2)
-	48-0	0 (NC)		100 [a]	100	-	-	-	-
				96		-	-	-	-
		Test article	32.8	32	33	++	Light-purple	-	-
				32		++	Light-purple	-	-
			65.6	24	24	++	Purple	-	-
				24		++	Purple	-	-
			131	17	14	++	Purple	-	-
				10		++	Purple	-	-
			263	0	4	+++	Purple	-	-
				7		+++	Purple	-	-
			525	7	4	g)	Purple	-	+
				0		g)	Purple	-	+
			1050	3	5	g)	Purple	-	+
				7		g)	Purple	-	+
			2100	46	45	g)	Purple	-	+
				42		g)	Purple	-	+
			4200	21	18	g)	Purple	+	+
				14		g)	Purple	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : below **32.8** μg/mL									

NC: Negative Control(water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions.Precipitates/crystals were observed [1]immediately after addition of the test suspensions and [2]at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

\+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 3-1

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Observation[a)]			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells[b)]	Color of medium[c)]	Precipitates/Crystals[d)]	
						1)	2)
+	6-18	0 (NC)		-	-	-	-
				-	-	-	-
		Test article	25.6	-	Light-purple	-	-
				-	Light-purple	-	-
			32.0	-	Light-purple	-	-
				-	Light-purple	-	-
			40.0	-	Purple	-	-
				-	Purple	-	-
			50.0	+	Purple	-	-
				+	Purple	-	-
			62.5	++	Purple	-	-
				++	Purple	-	-
		PC		-	-	-	-
				-	-	-	-

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 μg/mL)

a) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions.Precipitates/crystals were observed [1)]immediately after addition of the test solutions and [2)]at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates/crystals

Appendix 3-2

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Observation[a)]			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells[b)]	Color of medium[c)]	Precipitates/Crystals[d)]	
						1)	2)
-	6-18	0 (NC)		-	-	-	-
				-	-	-	-
		Test article	15.6	-	Light-purple	-	-
				-	Light-purple	-	-
			31.3	+	Light-purple	-	-
				+	Light-purple	-	-
			62.5	+	Purple	-	-
				+	Purple	-	-
			125	+	Purple	-	-
				+	Purple	-	-
			250	++	Purple	-	-
				++	Purple	-	-
		PC		-	-	-	-
				-	-	-	-

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 μg/mL)

a) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions.Precipitates/crystals were observed [1)]immediately after addition of the test solutions and [2)]at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates/crystals