

最終報告書

試験名：アゾイック CC5 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1308

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 東京都千代田区霞が関 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	6
2.1	試験計画書	6
2.2	試験目的	6
2.3	試験委託者	6
2.4	試験受託者	6
2.5	試験実施施設	6
2.6	被験物質	6
4.	要約	9
5.	緒言	11
6.	試験材料及び方法	12
6.1	被験物質及び溶媒	12
6.1.1	被験物質	12
6.1.2	溶媒	12
6.2	被験液の調製	13
6.2.1	調製方法	13
6.2.2	調製頻度	13
6.2.3	安定性	13
6.3	対照物質	14
6.3.1	陰性対照	14
6.3.2	陽性対照	14
6.4	使用細胞株	15
6.4.1	細胞株	15
6.4.2	細胞の選択理由	15
6.4.3	培養条件	15
6.4.4	細胞の性状検査	15
6.5	S9 mix 及び培養液	15
6.5.1	S9 mix	15
6.5.2	培養液	16

6.6	試験方法	17
6.6.1	識別方法	17
6.6.2	用量の設定	17
6.6.3	細胞増殖抑制試験	18
6.6.4	染色体異常試験	19
6.6.5	標本の観察	21
6.6.6	染色体異常の分類	21
6.6.7	判定基準	21
7.	試験結果	23
7.1	細胞増殖抑制試験	23
7.1.1	短時間処理法	23
7.1.2	連続処理法	23
7.2	染色体異常試験	24
7.2.1	短時間処理法	24
7.2.2	連続処理法	25
8.	考察	27
9.	参考文献	29

Figures and Tables

Fig. 1-1	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: +S9 mix]
Fig. 1-2	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: -S9 mix]
Fig. 1-3	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 24 hr]
Fig. 1-4	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 48 hr]
Fig. 2-1	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: +S9 mix]
Fig. 2-2	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: -S9 mix]
Fig. 2-3	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 24 hr]
Fig. 2-4	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 48 hr]
Table 1-1	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 1-3	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 24 hr]
Table 1-4	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 48 hr]
Table 2-1	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 2-2	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 2-3	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 24 hr]
Table 2-4	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 48 hr]
Table 3-1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 3-2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 3-3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 24 hr]
Table 3-4	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5 [Continuous treatment: 48 hr]

M-1308

2. 試験実施概要

2.1 試験計画書

試験番号 : M-1308

試験表題 : アゾイック CC5 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 東京都千代田区霞が関 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 : 東京化成工業株式会社

名称 : アゾイック CC5

受領日 : 2008 年 1 月 24 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

アゾイック CC5 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）を用いた染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を、遺伝毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する、3850 $\mu\text{g/mL}$ として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量及び 50%細胞増殖抑制濃度（IC₅₀、概略値）は、それぞれ 241 $\mu\text{g/mL}$ 及び 200.7 $\mu\text{g/mL}$ であった。短時間処理法の非代謝活性化では、50%を超える細胞増殖抑制作用は最高用量においても認められなかった。また、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では、高用量域において被験物質の析出・固着が著しく、正確な細胞密度測定が不可能であったため、当該標本の顕微鏡による観察を実施し、最高用量においても染色体標本観察に十分な細胞が存在することを確認した。これらの結果から、染色体異常試験における最高用量を、短時間処理法の代謝活性化では 241 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 3850 $\mu\text{g/mL}$ とした。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常を有する細胞の総出現率のうち、ギャップを含まない場合（TA 値）は、すべての処理法において陰性と判定された。倍数体の総出現頻度においては、短時間処理法の代謝活性化では、全ての用量で陰性と判定されたが、非代謝活性化では、963 $\mu\text{g/mL}$ 以上において倍数体の総出現頻度に用量依存性の増加が認められ、最高用量の 3850 $\mu\text{g/mL}$ では陽性の判定基準内の増加を示したため陽性と判定された。連続処理法の 24 時間処理では、241 $\mu\text{g/mL}$ においてのみ疑陽性と判定された。連続処理法の 48 時間処理では、全ての用量において倍数体の総出現頻度の増加が認められ、高用量では downturn が認められたものの用量依存性が確認された。短時間処理法の非代謝活性化及び 48 時間処理について、染色体数的異常誘発性の強さの指標値である PD₂₀ 値¹⁾（観察細胞の 20%に数的異常が見られる用量）を求めたが、それぞれ 5.3 mg/mL 及び 0.36 mg/mL であった。以上の結果から、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 48 時間処理で用量依存性を伴った倍数体の総出現頻度の増加が認められたこと、代謝活性化を伴わない方法において、ほぼ被験物質による処理時間の長さに伴って倍数体の総出現頻度が増加していたことから、本被験物質は染色体数的異常を誘発するものと総合的に判断した。

なお、全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。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、アゾイック CC5 は本試験条件下において染色体構造異常は誘発し

M-1308

ないが、染色体数的異常を誘発すると結論した。

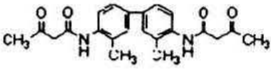
5. 緒言

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、アゾイック
CC5 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	:	アゾイック CC5
英名称	:	Azoic CC5
英名別称	:	Naphthol AS-G N,N'-Bis(acetoacetyl)-3,3'-dimethylbenzidine
ロット番号	:	
CAS 番号	:	91-96-3
化学構造式	:	
分子量	:	380.44
純度	:	97.5 %
融点	:	198.2 °C
性状	:	淡灰色粉末
入手量	:	25 g
安定性	:	試験終了後に東京化成工業株式会社において特性を測定し、その結果を入手して安定性を確認した (Attached Data 2)。
保存方法	:	冷蔵 (保存期間中の実測温度: 3~6°C)、遮光、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
取扱い上の注意	:	特になし
返却	:	被験物質の残余物は、東京化成工業において全て廃棄した。

6.1.2 溶媒

名称	:	注射用水
ロット番号	:	7D74N
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	:	試験開始前に被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を

実施した結果、注射用水では 38.5 mg/mL で、DMSO では 385 mg/mL で不溶であった。しかしながら、注射用水では、超音波処理を施すことで良好な懸濁性が得られたことから、注射用水に被験物質を懸濁させることとした。

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 0.3850 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 38.5 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3850 µg/mL）を調製した。次いで、38.5 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、19.3、9.63、4.81、2.41、1.20、0.602 及び 0.301 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 0.3850 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 38.5 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3850 µg/mL）を調製した。次いで、38.5 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 7 段階希釈し、19.3、9.63、4.81、2.41、1.20、0.602 及び 0.301 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では、2.41 から 0.301 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では、38.5 から 4.81 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。連続処理法では、被験物質 0.3850 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 38.5 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3850 µg/mL）を調製した。次いで、38.5 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 4 段階希釈し、19.3、9.63、4.81 及び 2.41 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理及び 48 時間処理ともに 38.5 から 2.41 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。

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、被験液が安定であることを確認した。

6.3 対照物質

6.3.1 陰性対照

溶媒として用いた注射用水を陰性対照とした。

6.3.2 陽性対照

- 1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロfosファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシン C を用いた。

名称	:	シクロfos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)
保存方法	:	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

名称	:	マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)
ロット番号	:	500AFJ
製造元	:	協和醗酵工業株式会社
力価	:	2mg (力価) / 瓶
保存方法	:	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

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では、CP 0.0140 g を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: K7I92) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度: 14 μ g/mL) を調製した。短時間処理法の非代謝活性化では 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: K7I92) 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 μ g/mL)。

染色体異常試験の連続処理法では、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: K7I92) 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 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 μ g/mL)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 陽性対照物質の選択理由

前記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) 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 2004 年 11 月 2 日に入手した。入手後、ジメチルスルホキシドを 10v/v% 添加した培養液に細胞を懸濁し、液体窒素中で大量に凍結保存した。試験に際しては、その一部を解凍後、再培養を開始し、継代培養を行ったものについて細胞の性状検査 (6.4.4) を定期的実施して、適正であることが確認されたものを試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 17 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 21 継代、染色体異常試験の連続処理法では 4 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、さらに種々の化学物質に対して感受性が高く、バックグラウンド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、CO₂ 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 2007 年 12 月 22 日から 2007 年 12 月 28 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

オリエンタル酵母工業株式会社より購入した S9 と、自家調製を行ったコファクターを用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件及び使用期限と、コファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りである。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	07113009
製造日	:	2007 年 11 月 30 日
種・系統	:	ラット・SD 系

M-1308

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)
 投与方法 : 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 : 2008 年 5 月 29 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
 ロット番号 : 070929
 調製日 : 2007 年 9 月 29 日
 保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)
 使用期限 : 2008 年 3 月 28 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	20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/L 酸化型ニコチンアミド-アデニン	
		ジヌクレオチドリリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、精製水に溶解、pH 調整、ろ過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

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 (bovine serum、BS) を 10 v/v% 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 : 571834
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷凍 (-80℃ 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 : 300142、366167
 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。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
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理

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。ただし、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 3850 µg/mL とし、以下公比 2 で希釈した 1930、963、481、241、120、60.2 及び 30.1 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、241 µg/mL で 50%を

超える細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀、概略値) は 200.7 µg/mL であった。短時間処理法の非代謝活性化では、最高用量の 3850 µg/mL においても 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。また、連続処理法の 24 時間処理では、最高用量の 3850 µg/mL から 963 µg/mL において、48 時間処理では、最高用量の 3850 µg/mL 及び 1930 µg/mL において、被験物質と推測される物質のプレートの底面への固着が著しく認められたため、単層細胞密度測定装置 (機器登録 No.926) による測定は行ったが、IC₅₀ の算出からは除外した。しかしながら、単層細胞密度測定用標本を顕微鏡 (機器 No.2143) によって観察したところ、これらの用量においても、染色体観察用標本の観察に十分と推測される細胞の存在が確認された。これらの結果より、ガイドラインに定められた「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。」及び「50%以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、5mg/mL 又は 10mM (いずれか低い方) を最高用量とする。」との規定から、短時間処理法の代謝活性化では 241 µg/mL、短時間処理法の非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 3850 µg/mL を最高用量とした。また、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の予備試験として実施した。

- 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観察し、細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、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、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、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、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（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 $\mu\text{g/mL}$ ）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 $\mu\text{g/mL}$ ）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観察し、細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.100 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 箇所点滴下した。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、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（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、倍数体の出現率が陽性と判定されたが、染色体構造異常については陰性と判定されたため、連続処理法を実施した。

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理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、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 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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) 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、被験物質処理群については可能な限り析出を除去するために培養液を廃棄し、新しい培養液 5.0 mL を添加した遠沈管に細胞を回収した。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 箇所点滴下した。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 日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- (4) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養の終了時に肉眼で析出の有

無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。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。

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。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とする。

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。 |
| 染色分体型切断(ctb) | : | 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。 |
| 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。 |
| 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(%)に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 Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では、241 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 200.7 $\mu\text{g/mL}$ だった。一方、非代謝活性化では、細胞増殖抑制は認められず、50%細胞増殖抑制濃度は求められなかった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液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 963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化では、全ての用量で析出が認められた。一方、非代謝活性化では、60.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化では、全ての用量で析出が認められた。一方、非代謝活性化では、60.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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 963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では、被験物質と思われる物質が多量に存在していたため観察不能であった。また、代謝活性化では 120 $\mu\text{g/mL}$ 以上、非代謝活性化では、241 $\mu\text{g/mL}$ 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 Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理法及び 48 時間処理法ともに、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度の測定を行ったが、24 時間処理では 241 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48 時間処理では 120 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で、プレート底面に被験物質と思われる物質の固着が認められ、更に 24 時間処理では 963 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48 時間処理では 1930 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では、多量の固着が認められたため、これらの測定値は信頼性に欠けるものと判断した。また、その他の用量では細胞増殖抑制は認められなかったため、50%細胞増殖抑制濃度は求められなかった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液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、963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 60.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上

の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに、60.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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 963 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48 時間処理では 481 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。また、24 時間処理では 241 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48 時間処理では 241 $\mu\text{g/mL}$ 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 Fig. 2-1、Table 2-1 及び Table 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-2、Table 2-2 及び Table 3-2 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培養液の色調の観察においては、代謝活性化では全ての用量で認められなかった。一方、非代謝活性化では 963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、全ての用量で析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で析出が認められた。被験物質用量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 60.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。一方、非代謝活性化では全ての用量で被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の総出現率 (TA) は、代謝活性化では 241 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、120 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%、60.2 $\mu\text{g/mL}$ では 2.5% 及び 30.1 $\mu\text{g/mL}$ では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。また、非代謝活性化においては、3850 $\mu\text{g/mL}$ では 2.5%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 1.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0% 及び 481 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の総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、その総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) 染色体数異常

数異常 (倍数体) の総出現率は、代謝活性化では 241 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、120 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、60.2 $\mu\text{g/mL}$ では 0% 及び 30.1 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。一方、非代謝活性化においては、3850 $\mu\text{g/mL}$ で

は 15.0%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 6.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 6.0% 及び 481 $\mu\text{g/mL}$ では 3.0% と 3850 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上、1930 $\mu\text{g/mL}$ 及び 963 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満、481 $\mu\text{g/mL}$ で陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陽性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の総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) と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

7.2.2 連続処理法

24 時間処理の結果を Fig. 2-3、Table 2-3 及び Table 3-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 2-4、Table 2-4 及び Table 3-4 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培養液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、963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出が認められた。被験物質用量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 時間処理及び 48 時間処理ともに 963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。また、24 時間処理では 241 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48 時間処理では 481 $\mu\text{g/mL}$ 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

染色体構造異常の総出現率 (TA) は、24 時間処理では 3850 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% 及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。また、48 時間処理においては、3850 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 0% 及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の総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、その総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) の総出現率は、24 時間処理では 3850 $\mu\text{g/mL}$ では 4.0%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 4.5% 及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 6.5% と 241 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満であったため、疑陽性と判定した。また、48 時間処理では 3850 $\mu\text{g/mL}$ では 30.5%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 21.0%、963 $\mu\text{g/mL}$

M-1308

では 30.5%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 27.0%及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 18.5%と全ての用量で陽性の判定基準である 10%以上であったため、陽性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の総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、染色体構造異常を有する細胞の総出現率のうちギャップを含まない場合（TA 値）は、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。

一方、倍数体の総出現率においては、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 48 時間処理で用量依存性を伴う増加が、連続処理法の 24 時間処理で最低用量において増加が認められたため、陽性と判定した。陽性と判定した処理法のうち、異常細胞の総出現率に用量依存性が認められた短時間処理法の非代謝活性化及び 48 時間処理について、染色体数的異常誘発性の強さの指標値である PD20 値¹⁾（観察細胞の 20% に数的異常が見られる用量）を求めたが、それぞれ 5.3 mg/mL 及び 0.36 mg/mL であった。

なお、全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の総出現率は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

倍数体細胞の形成機序には、核内倍加、細胞融合、細胞質分裂の阻害等が知られている。本試験においては核内倍加体（endoreduplication）や細胞融合の際に特徴的に認められる細粉化（pulverization）や premature chromosome condensation は全く観察されなかったことから、本試験における倍数体の出現頻度の増加は、これらの機序に起因するものとは考え難い。IARC の分類において Group 1 とされている asbestos は、細胞膜を貫通することによって細胞質分裂を物理的に阻害し、倍数体の出現頻度を増加させると報告⁶⁾をされている。同様に、Vitamine B₂ が不溶性の針状結晶を形成した場合に、倍数体の出現頻度が増加することが Kawaguchi 等⁷⁾によって報告されている。本被験物質も培養液中では析出を生じ、顕微鏡観察において微細な針状結晶が細胞膜周辺に認められ、細胞質内に 2 核、3 核が存在する細胞が散見される（Photo 3 及び 4）ことから、asbestos や Vitamine B₂ と同様に細胞質分裂の物理的阻害が倍数体の出現頻度増加の機序であることが推測される。

本被験物質は化学構造上、benzidine (4,4'-diaminobiphenyl, CAS Registry No.92-87-5) を母核とするが、benzidine は IARC の Group 1 に分類される発癌物質で、強い染色体構造異常の誘発性を有する⁸⁾。また、本被験物質の類縁化合物である 3,3'-dimethylbenzidine は、細菌を用いる復帰突然変異試験⁹⁾及びマウスリンフォーマ TK 試験¹⁰⁾において陽性を示し、CHO 細胞を用いた試験においても姉妹染色分体交換と染色体構造異常を誘発することが報告されている¹¹⁾。しかしながら、本被験物質は

M-1308

官能基であるアミノ基に acetoacetyl が付加されているため、DNA との反応性を失い、染色体構造異常を誘発しなかったものと推測される。

以上の結果から、アゾイック CC5 は本試験条件下において染色体構造異常は誘発しないが、染色体数的異常を誘発すると結論した。

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) Kenne K, S. Ljungquist and Ringertz NR (1986): Effects of asbestos fibers on cell division, cell survival and formation of thioguanine-resistant mutants in Chinese hamster ovary cells, *Br. J. Cancer*, **54**, 107-114
- 7) Kawaguchi I, H Hayashi, M Sato and Shindo Y (1997): Needle crystals of vitamine B2 induce polyploidy in Chinese hamster lung (CHL/IU) cells, *Mutation Res.*, **371**, 1-7
- 8) IARC Monograph Suppl. 6:96-100(1987).
- 9) Zeiger E, B Anderson; S Haworth; T Lawlor and Mortelmans K (1988): Salmonella mutagenicity tests. IV. Results from the testing of 300 chemicals, *Environ Mol. Mutagen* **11** (suppl. 12), 1-158
- 10) Mitchell AD, CJ Rudd and Caspary WJ (1988): Evaluation of the L5178Y mouse lymphoma cell mutagenesis assay: intralaboratory results for sixty-three coded chemicals tested at SRI International, *Environ Mol. Mutagen* **12** (suppl. 13), 37-101
- 11) Galloway SM, MJ Armstrong, C Reuben, S Colman, B Brown, C Cannon, AD Bloom, F Nakamura, M Ahmed, S Duk, J Rimpo, BH Margolin, MA Resnick, B Anderson and Zeiger, E (1987): Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals, *Environ Mol. Mutagen* **10** (suppl. 12), 1-175

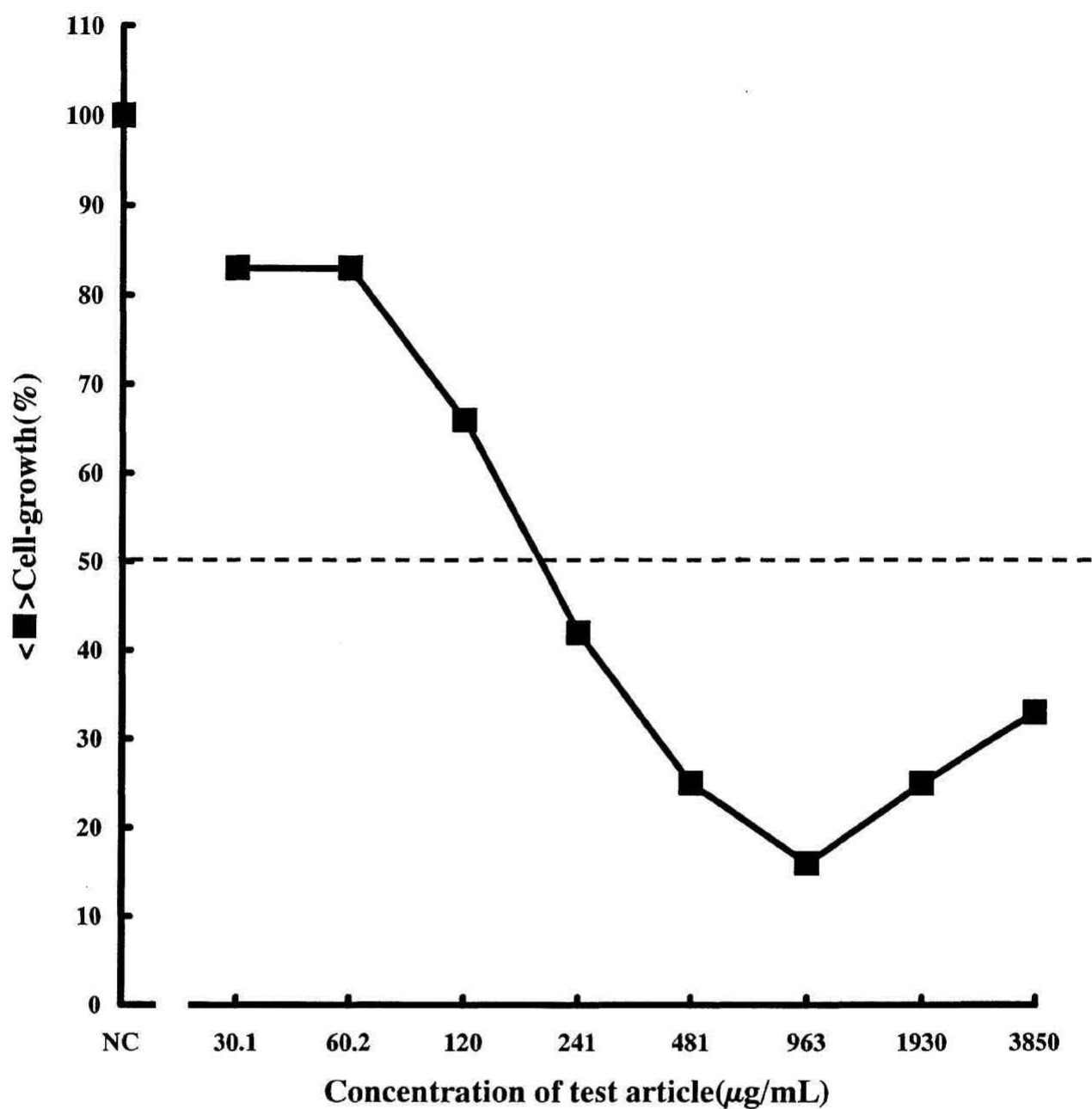


Fig. 1-1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)

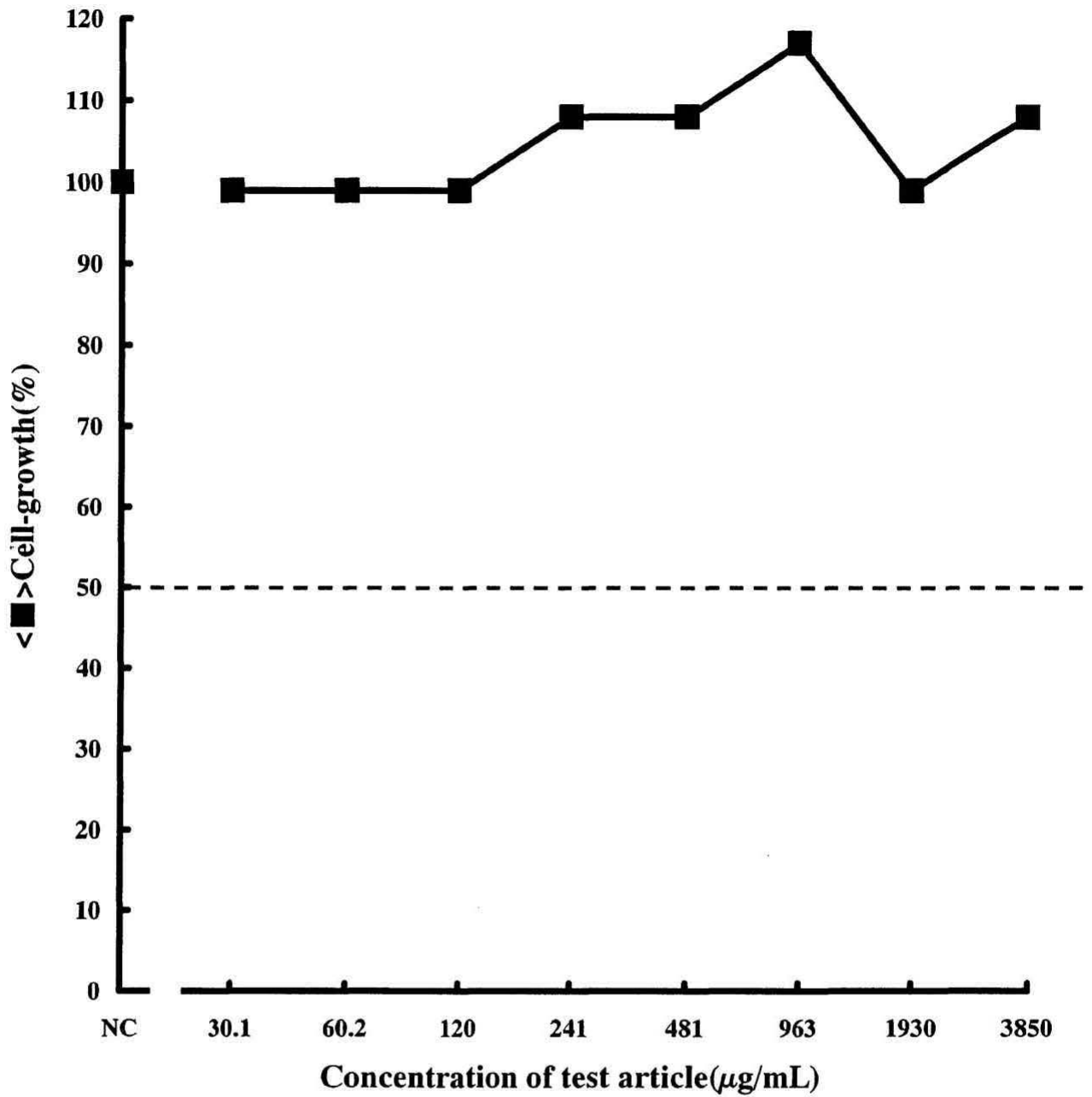


Fig. 1-2

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5

[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)

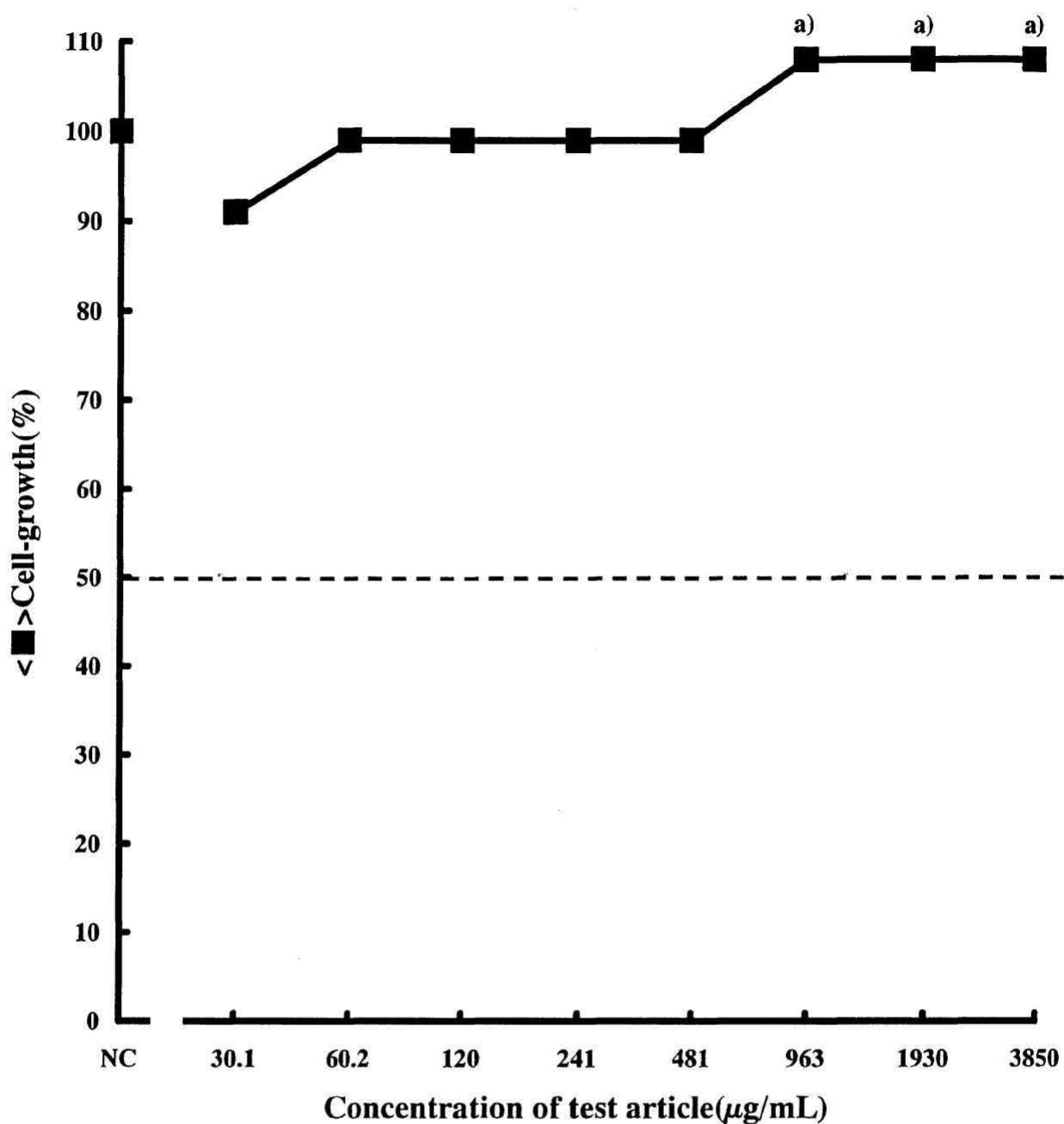


Fig. 1-3

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azotic CC5

[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(water for injection)

a) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

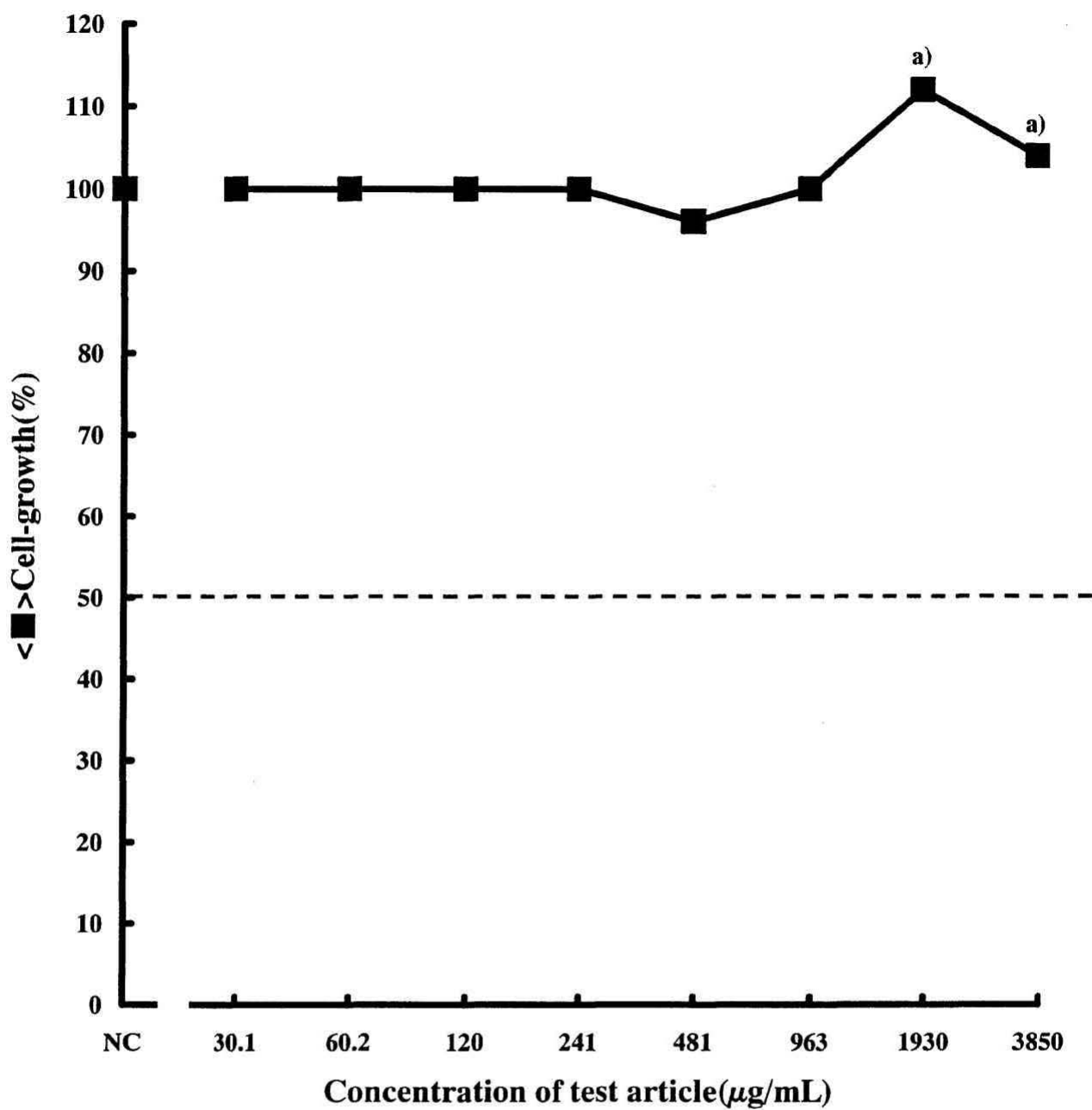


Fig. 1-4

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(water for injection)

a) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

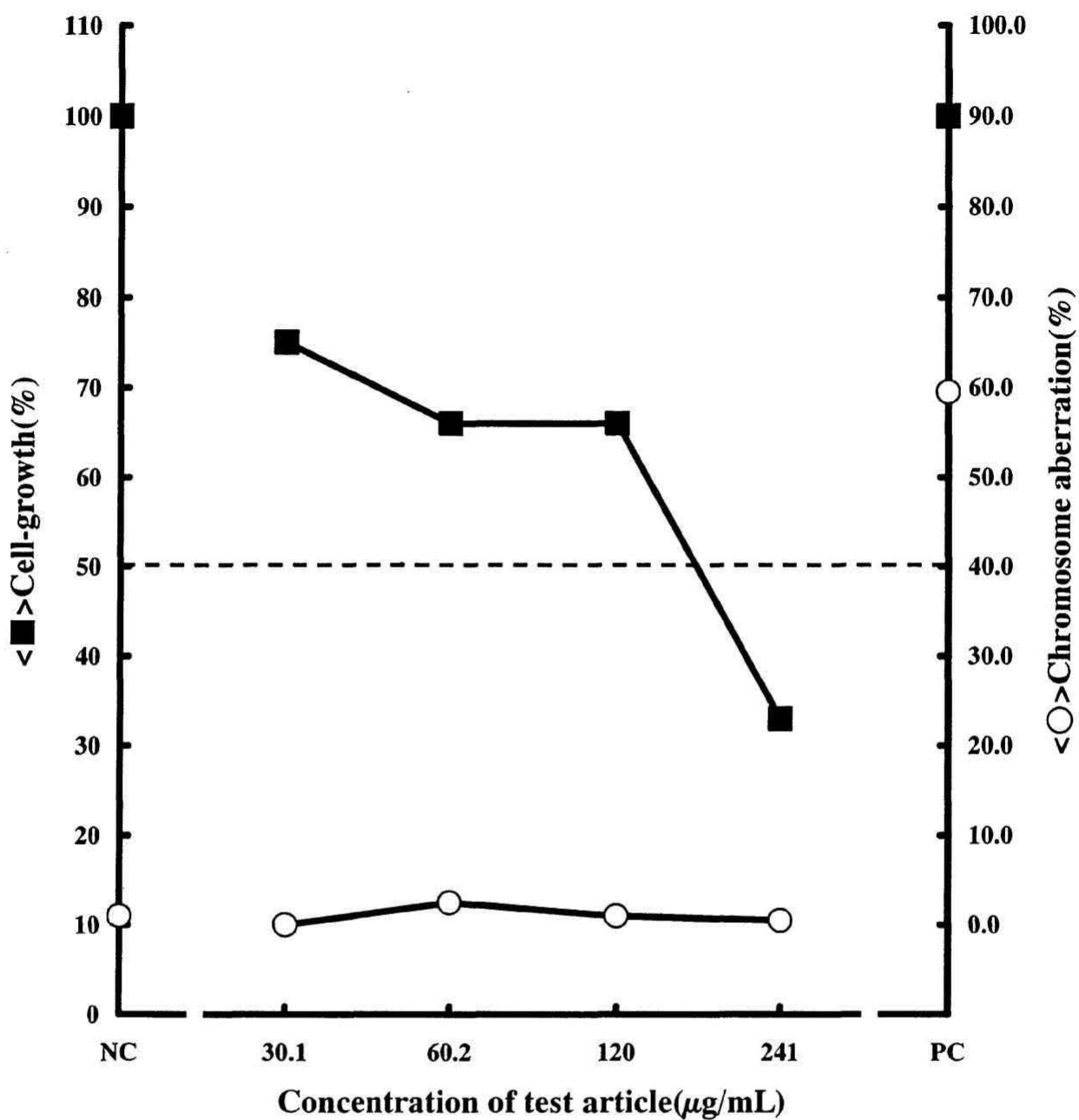


Fig. 2-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)

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

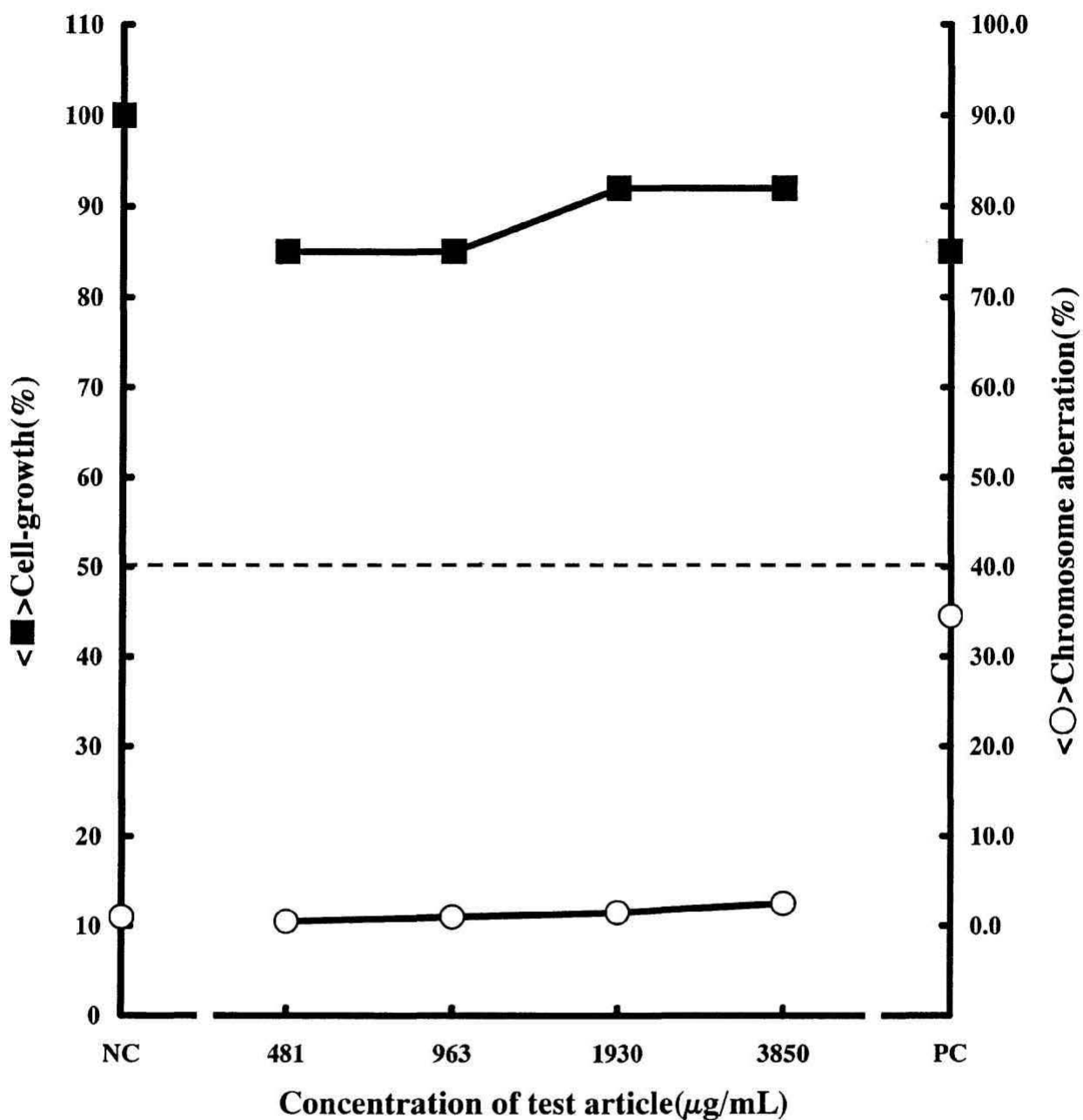


Fig. 2-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5

[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 $\mu\text{g/mL}$)

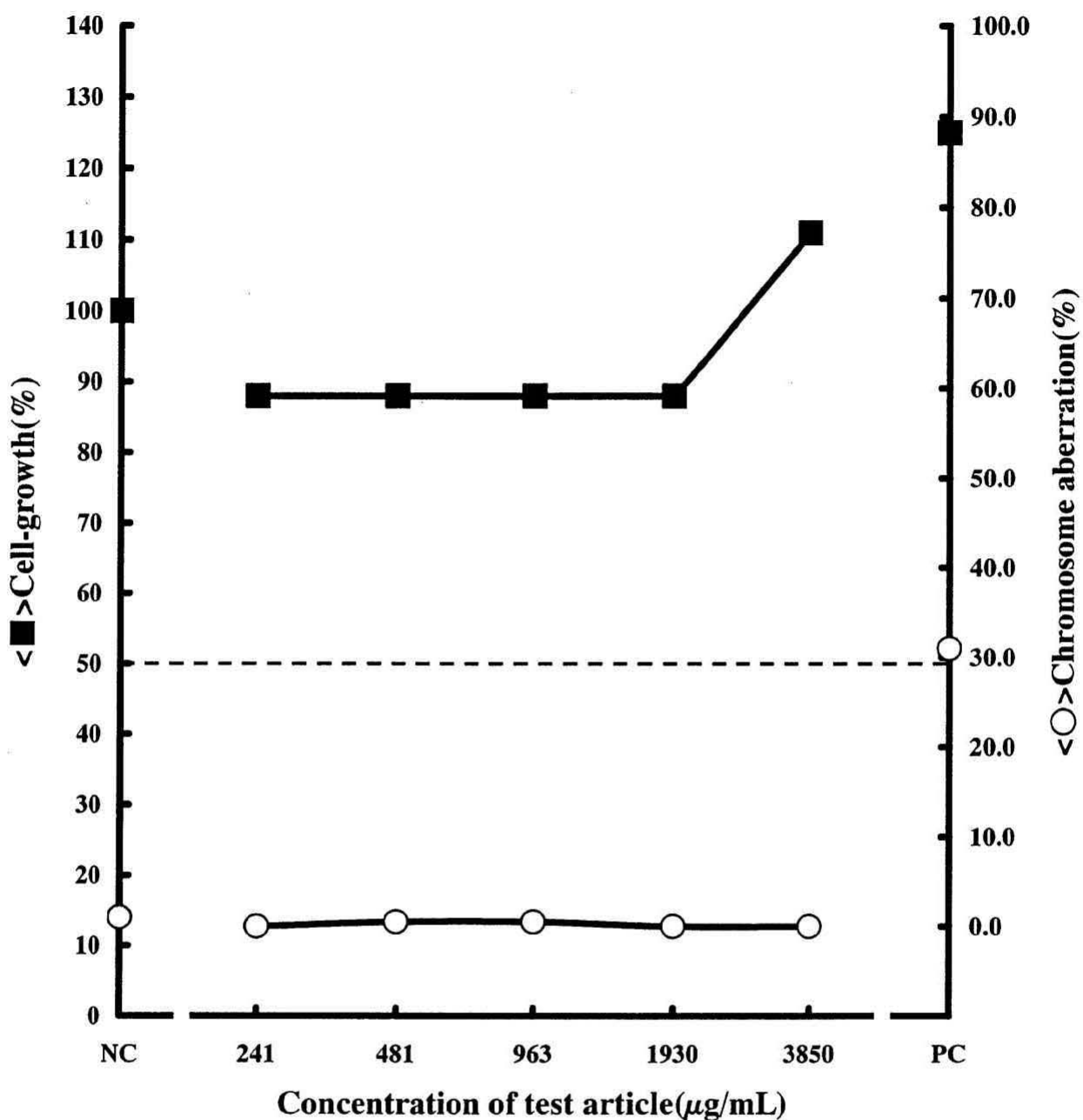


Fig. 2-3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azotic CC5
 [Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.05 $\mu\text{g/mL}$)

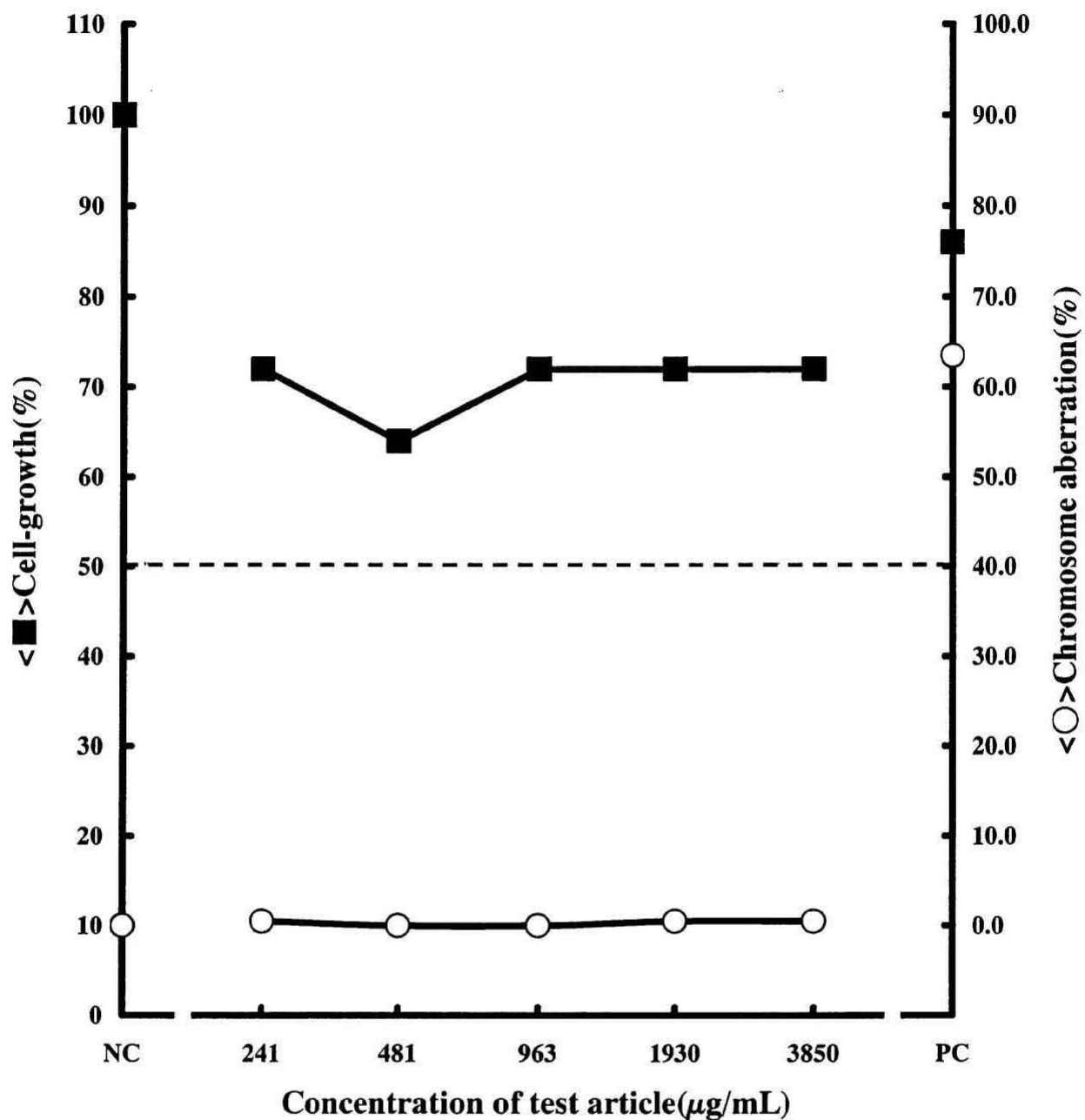


Fig. 2-4

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
 [Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.05 μg/mL)

Table 1-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[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) 2)		
+	6-18	Test article	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
					100		-	-	-	-
			30.1	83	83	-	-	+	+	
				83		-	-	+	+	
			60.2	83	83	-	-	+	+	
				83		-	-	+	+	
			120	66	66	+	-	+	+	
				66		+	-	+	+	
			241	33	42	+	-	+	+	
				50		+	-	+	+	
			481	16	25	++	-	+	+	
				33		++	-	+	+	
			963	16	16	g)	Whitish pink	+	+	
				16		g)	Whitish pink	+	+	
			1930	16	25	g)	Whitish pink	+	+	
				33		g)	Whitish pink	+	+	
			3850	33	33	g)	Whitish pink	+	+	
				33		g)	Whitish pink	+	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition :						200.7 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 their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

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.

Table 1-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5

[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) 2)	
-	6-18	Test article	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			30.1	99	99	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			60.2	99	99	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			120	99	99	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			241	116	108	+	-	+	+
				99		+	-	+	+
			481	116	108	++	-	+	+
				99		++	-	+	+
			963	116	117	g)	Whitish pink	+	+
				116		g)	Whitish pink	+	+
			1930	99	99	g)	Whitish pink	+	+
				99		g)	Whitish pink	+	+
			3850	99	108	g)	Whitish pink	+	+
				116		g)	Whitish pink	+	+

Concentration of 50% cell-growth inhibition : above 3850.0 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 their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

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.

Table 1-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment : 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		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)	2)	
-	24-0	Test article	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			30.1	83	91	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			60.2	99	99	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			120	99	99	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			241	99	99	+	-	+	+
				99		+	-	+	+
			481	99	99	++	-	+	+
				99		++	-	+	+
			963	116	108 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+
				99		g)	Whitish pink	+	+
			1930	116	108 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+
				99		g)	Whitish pink	+	+
			3850	116	108 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+
				99		g)	Whitish pink	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : above						481.0	$\mu\text{g/mL}$		

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 their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

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.

h) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 1-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)	Concentration (μg/mL)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-
		30.1		100	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-
		60.2		100	100	-	-	+	+
				100		-	-	+	+
		120		100	100	-	-	+	+
				100		-	-	+	+
		241		100	100	+	-	+	+
				100		+	-	+	+
		481		100	96	g)	-	+	+
				91		g)	-	+	+
		963		100	100	g)	Whitish pink	+	+
				100		g)	Whitish pink	+	+
		1930		116	112 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+
				108		g)	Whitish pink	+	+
		3850		108	104 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+
				100		g)	Whitish pink	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : above 963.0 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 their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

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.

h) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 2-1

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		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)	2)
+	6-18	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-
		Test article	30.1	83	75	-	-	+	+
				66		-	-	+	+
			60.2	66	66	+	-	+	+
				66		+	-	+	+
			120	66	66	+	-	+	+
				66		+	-	+	+
			241	33	33	++	-	+	+
				33		++	-	+	+
		PC		100	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 $\mu\text{g/mL}$)

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 their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

Table 2-2

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Short-term treatment : -S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{e)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)
-	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
			99		-	-	-	-
		Test article	85	85	g)	-	+	+
			85		g)	-	+	+
			99	85	g)	Whitish pink	+	+
			71		g)	Whitish pink	+	+
			85	92	g)	Whitish pink	+	+
			99		g)	Whitish pink	+	+
			99	92	g)	Whitish pink	+	+
			85		g)	Whitish pink	+	+
		PC	85	85	-	-	-	-
			85		-	-	-	-

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 $\mu\text{g/mL}$)

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 their shape was normal.

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.

Table 2-3

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	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)	2)
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
			125		-	-	-	-
		241	99	88	+	-	+	+
			99		+	-	+	+
		481	99	88	++	-	+	+
			99		++	-	+	+
		963	99	88	g)	Whitish pink	+	+
			99		g)	Whitish pink	+	+
		1930	99	88	g)	Whitish pink	+	+
			99		g)	Whitish pink	+	+
		3850	125	111	g)	Whitish pink	+	+
			125		g)	Whitish pink	+	+
		PC	125	111	-	-	-	-
			125		-	-	-	-

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.05 $\mu\text{g/mL}$)

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 their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates and crystals

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

Table 2-4

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	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)	2)
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
			109		-	-	-	-
		Test article	81	78	-	-	+	+
			81		-	-	+	+
			72	69	+	-	+	+
			72		+	-	+	+
			81	78	g)	Whitish pink	+	+
			81		g)	Whitish pink	+	+
			81	78	g)	Whitish pink	+	+
			81		g)	Whitish pink	+	+
			81	78	g)	Whitish pink	+	+
			81		g)	Whitish pink	+	+
			90	82	-	-	-	-
			81		-	-	-	-
		PC						

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.05 $\mu\text{g/mL}$)

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 their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates and crystals

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

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Short-term treatment: +S9 mix]

S9 mix	Time (h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	0.0	—	1	1	1	0	0	0	1.0	1.5	—	30-1 33-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		30.1	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	34-1 47-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		60.2	200	0.0	—	1	2	3	0	0	0	2.5	3.0	—	28-1 18-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(2)	(2)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)		
		120	200	0.5	—	0	0	0	1	1	0	1.0	1.0	—	69-1 94-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		241	200	0.0	—	1	1	0	0	0	0	0.5	1.0	—	54-1 62-1
			(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	—	1	19	106	2	0	0	59.5	60.0	+	98-1 58-1
			(100)	(0)		(0)	(11)	(50)	(1)	(0)	(0)	(57)	(57)		
			(100)	(0)		(1)	(8)	(56)	(1)	(0)	(0)	(62)	(63)		

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, 14 μ g/mL)

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time (h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	6-18	NC	200	0.0	-	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	-	40-1 02-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		481	200	3.0	-	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	-	09-1 52-1
			(100)	(4)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(2)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
-	6-18	963	200	6.0	$\pm$	0	0	2	0	0	0	1.0	1.0	-	96-1 37-1
			(100)	(5)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(7)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1930	200	6.5	$\pm$	0	2	0	0	1	0	1.5	1.5	-	17-1 61-1
			(100)	(7)		(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(6)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
-	6-18	3850	200	15.0	+	1	2	1	2	0	0	2.5	3.0	-	86-1 67-1
			(100)	(11)		(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(2)	(3)		
			(100)	(19)		(0)	(1)	(1)	(1)	(0)	(0)	(3)	(3)		
-	6-18	PC	200	0.0	-	0	12	60	1	0	0	34.5	34.5	+	95-1 66-1
			(100)	(0)		(0)	(7)	(28)	(0)	(0)	(0)	(34)	(34)		
-	6-18	PC	(100)	(0)	-	(0)	(5)	(32)	(1)	(0)	(0)	(35)	(35)	+	95-1 66-1

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, 0.075 μ g/mL)

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	24-0	NC	200	0.5	—	0	1	0	0	1	0	1.0	1.0	—	29-1 92-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
		241	200	6.5	±	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	93-1 64-1
			(100)	(7)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(6)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		481	200	4.5	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	01-1 12-1
			(100)	(3)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(6)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		963	200	3.5	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	27-1 88-1
			(100)	(4)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(3)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1930	200	3.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	83-1 48-1
			(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(5)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		3850	200	4.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	06-1 44-1
			(100)	(3)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(5)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	—	0	6	57	0	0	0	31.0	31.0	+	42-1 11-1
			(100)	(0)		(0)	(4)	(26)	(0)	(0)	(0)	(30)	(30)		
			(100)	(0)		(0)	(2)	(31)	(0)	(0)	(0)	(32)	(32)		

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, 0.050 μ g/mL)

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time (h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	48-0	NC	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	60-1 04-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		241	200	18.5	+	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	15-1 51-1
			(100)	(19)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(18)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		481	200	27.0	+	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	76-1 05-1
			(100)	(32)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		963	200	30.5	+	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	74-1 85-1
			(100)	(35)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(26)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1930	200	21.0	+	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	91-1 72-1
			(100)	(16)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		3850	200	30.5	+	1	1	0	0	0	0	0.5	1.0	—	80-1 84-1
			(100)	(27)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(34)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		PC	200	0.0	—	0	19	117	1	2	0	63.5	63.5	+	82-1 19-1
			(100)	(0)		(0)	(9)	(59)	(1)	(2)	(0)	(66)	(66)		
			(100)	(0)		(0)	(10)	(58)	(0)	(0)	(0)	(61)	(61)		

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, 0.050 μ g/mL)

別表1-1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称 アゾイック CC5

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数（出現頻度%）							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度%）			
			観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	そ の 他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	そ の 他	総異常細胞数 (%)
6-18	-	陰性対照 (注射用 水)	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	99	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	0.481	100	0	0	0	0	0	0	0	85	100	4	0	4
			100	0	1	0	0	0	1	0	85	100	2	0	2
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(85)	200	6 (3.0)	0 (0.0)	6 (3.0)
6-18	-	0.963	100	0	1	0	0	0	1	0	99	100	5	0	5
			100	0	1	0	0	0	1	0	71	100	7	0	7
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(85)	200	12 (6.0)	0 (0.0)	12 (6.0)
6-18	-	1.93	100	2	0	0	0	0	2	0	85	100	7	0	7
			100	0	0	0	1	0	1	0	99	100	6	0	6
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	(92)	200	13 (6.5)	0 (0.0)	13 (6.5)
6-18	-	3.85	100	1	0	1	0	0	2	1	99	100	11	0	11
			100	1	1	1	0	0	3	0	85	100	19	0	19
			200	2 (1.0)	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	1 (0.5)	(92)	200	30 (15.0)	0 (0.0)	30 (15.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC)	100	7	28	0	0	0	34	0	85	100	0	0	0
			100	5	32	1	0	0	35	0	85	100	0	0	0
			200	12 (6.0)	60 (30.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	69 (34.5)	0 (0.0)	(85)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC: マイトマイシン C

別表1-2 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称 アゾイック CC5

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	そ の 他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	そ の 他	総異常細胞数 (%)
6-18	+	陰性対照 (注射用 水)	100	0	1	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	1	100	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.0301	100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	66	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(75)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	0.0602	100	0	1	0	0	0	1	1	66	100	0	0	0
			100	2	2	0	0	0	4	0	66	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	1 (0.5)	(66)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.120	100	0	0	0	1	0	1	0	66	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	66	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(66)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	0.241	100	1	0	0	0	0	1	1	33	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	33	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	(33)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陽性対照 (CP)	100	11	50	1	0	0	57	0	100	100	0	0	0
			100	8	56	1	0	0	62	1	100	100	0	0	0
			200	19 (9.5)	106 (53.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	119 (59.5)	1 (0.5)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

CP: シクロフォスファミド

別表2-1 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称 アゾイック CC5

処理時間 (h)	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	そ の 他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	そ の 他	総異常細胞数 (%)
24-0	陰性対照 (注射用 水)	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
		100	0	0	0	1	0	1	0	125	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(100)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24-0	0.241	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	7	0	7
		100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	6	0	6
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(88)	200	13 (6.5)	0 (0.0)	13 (6.5)
24-0	0.481	100	0	1	0	0	0	1	0	99	100	3	0	3
		100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	6	0	6
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(88)	200	9 (4.5)	0 (0.0)	9 (4.5)
24-0	0.963	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	4	0	4
		100	1	0	0	0	0	1	0	99	100	3	0	3
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(88)	200	7 (3.5)	0 (0.0)	7 (3.5)
24-0	1.93	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	5	0	5
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(88)	200	7 (3.5)	0 (0.0)	7 (3.5)
24-0	3.85	100	0	0	0	0	0	0	0	125	100	3	0	3
		100	0	0	0	0	0	0	0	125	100	5	0	5
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(111)	200	8 (4.0)	0 (0.0)	8 (4.0)
24-0	陽性対照 (MMC)	100	4	26	0	0	0	30	0	125	100	0	0	0
		100	2	31	0	0	0	32	0	125	100	0	0	0
		200	6 (3.0)	57 (28.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	62 (31.0)	0 (0.0)	(111)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC: マイトマイシン C

別表2-2 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称 アゾイック CC5

処理時間（h）	被験物質 の用量 （mg/ml）	染色体構造異常の細胞数（出現頻度％）							ギャップ の出現数	細胞増殖率 （％）	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度％）			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	そ の 他	総異常数（％）			観察細胞数	倍 数 体	そ の 他	総異常細胞数 （％）
48-0	陰性対照 （注射用 水）	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	109	100	1	0	1
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(100)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
48-0	0.241	100	1	0	0	0	0	1	0	81	100	19	0	19
		100	0	0	0	0	0	0	0	81	100	18	0	18
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(78)	200	37 (18.5)	0 (0.0)	37 (18.5)
48-0	0.481	100	0	0	0	0	0	0	0	72	100	32	0	32
		100	0	0	0	0	0	0	1	72	100	22	0	22
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	(69)	200	54 (27.0)	0 (0.0)	54 (27.0)
48-0	0.963	100	0	0	0	0	0	0	0	81	100	35	0	35
		100	0	0	0	0	0	0	0	81	100	26	0	26
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(78)	200	61 (30.5)	0 (0.0)	61 (30.5)
48-0	1.93	100	0	0	0	0	0	0	0	81	100	16	0	16
		100	1	0	0	0	0	1	0	81	100	26	0	26
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(78)	200	42 (21.0)	0 (0.0)	42 (21.0)
48-0	3.85	100	0	0	0	0	0	0	0	81	100	27	0	27
		100	1	0	0	0	0	1	1	81	100	34	0	34
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	(78)	200	61 (30.5)	0 (0.0)	61 (30.5)
48-0	陽性対照 (MMC)	100	9	59	1	2	0	66	0	90	100	0	0	0
		100	10	58	0	0	0	61	0	81	100	0	0	0
		200	19 (9.5)	117 (58.5)	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	127 (63.5)	0 (0.0)	(82)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC: マイトマイシン C