

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 ($\mu\text{g/mL}$)	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	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	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** $\mu\text{g/mL}$

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.

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	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	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 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{o)}				
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	-	-	-	-	
			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	$\mu\text{g/mL}$			

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.

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 CCS

[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	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	481	85	85	g)	-	+	+
				85		g)	-	+	+
			963	99	85	g)	Whitish pink	+	+
				71		g)	Whitish pink	+	+
		1930	85	92	g)	Whitish pink	+	+	
			99		g)	Whitish pink	+	+	
		3850	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		-	-	-	-	
		Test article	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		-	-	-	-
		241	81	78	-	-	+	+
			81		-	-	+	+
		481	72	69	+	-	+	+
			72		+	-	+	+
		963	81	78	g)	Whitish pink	+	+
			81		g)	Whitish pink	+	+
		1930	81	78	g)	Whitish pink	+	+
			81		g)	Whitish pink	+	+
		3850	81	78	g)	Whitish pink	+	+
			81		g)	Whitish pink	+	+
		PC	90	82	-	-	-	-
			81		-	-	-	-

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.

4. 要約

アゾイック CC5 の 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (0.5 w/v% メチルセルロース水溶液：対照群)、8、40、200 及び 1000 mg/kg/day とし、また、対照群と 1000 mg/kg 投与群の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力、自発運動量及び血液学検査に被験物質投与の影響は認められなかった。

体重では、低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられ、投与期間中の体重増加量にも低値が認められた。

摂餌量では、低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられた。

尿検査では、摂水量の低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の低値が 1000 mg/kg の投与群の雄でみられた。

血液化学検査では、リン脂質の高値が 40 mg/kg 投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、高値傾向が 200 mg/kg 投与群の雄で、総コレステロールの高値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄でみられた。

病理学検査では、肝臓において相対重量の高値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、組織学的に小葉中心性の肝細胞肥大が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられた。

上述したいずれの変化も休薬により、軽減あるいは消失し回復性を示した。

以上の結果、アゾイック CC5 の本試験条件下における無影響量は主として雌雄で体重及び摂餌量の低値と病理学組織学検査における小葉中心性肝細胞肥大、雄で肝臓の相対重量の変化から、雌雄とも 8 mg/kg/day と推定された。

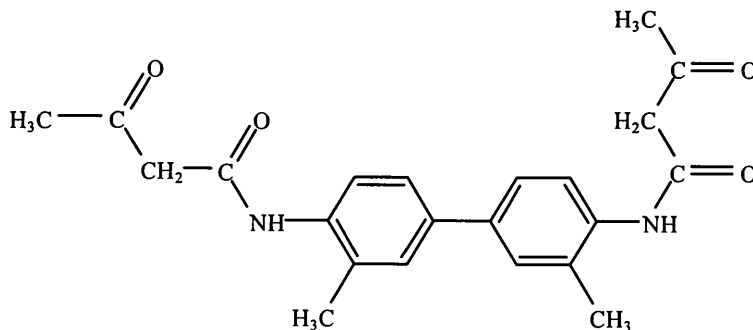
6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質は東京化成工業株式会社より購入した。本試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、試験成績を添付資料1に示した。

名称	:	アゾイック CC5
英名	:	Azoic CC5
別名	:	ナフトール AS-G
化学名	:	N,N'-(3,3'-dimethylbiphenyl-4,4'-ylene)di (acetoacetamide)
官報公示整理番号	:	5-2275
CAS 番号	:	91-96-3
分子量	:	380.44
分子式	:	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄
構造式	:	



ロット番号	:	4EPBE
純度	:	96.9 %
入手量	:	500 g
性状	:	薄い黄色粉末
保存方法	:	冷暗所（冷蔵庫内、実測値 3~8°C）、密栓
安定性	:	投与終了後、被験物質について購入先で安定性の確認を実施し、安定であることが確認された（添付資料2）。
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
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用した。 取扱い場所及び周囲の火気を厳禁し、高温物及び強酸化剤との接触を避けた。
返却	:	被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質の残量は安定性を確認後、すべて廃棄した。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

アゾイック CC5 の 0 (0.5 w/v%メチルセルロース水溶液)、100、300 及び 1000 mg/kg/day を 1 群雌雄各 5 匹のラットに 14 日間反復経口投与した結果¹⁾、主な変化として雄では 100 mg/kg 以上の投与群の摂餌量と器官重量、雌では 300 mg/kg 以上の投与群の血液化学検査に変化がみられたものの、被験物質投与との関連性は明らかではなかった。したがって、本試験における投与量は、毒性試験ガイドラインにおける最大投与量である 1000 mg/kg を最高用量とし、公比 5 で除して、200、40 及び 8 mg/kg の 4 用量を設定した。群構成表を次の表 1 に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	8	1.6	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	40	8	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	200	40	5	雄	6	4001~4006	-	-
				雌	6	4101~4106	-	-
最高用量群	1000	200	5	雄	6	5001~5006	6	5007~5012
				雌	6	5101~5106	6	5107~5112

6.11 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りとした。

- 投与 1 日 (day 1 of administration) : 投与開始日
 投与 1 週 (week 1 of administration) : 投与 1 から投与 7 日
 回復 1 日 (day 1 of recovery) : 回復開始日 (投与期間終了の翌日)
 回復 1 週 (week 1 of recovery) : 回復 1 から回復 7 日

6.11.1 一般状態の観察

全個体について投与期間中は毎日 3 回、投与前と投与直後及び約 2 時間後(ただし、休日と詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定を実施する時は投与前と投与直後の 2 回)、回復期間中は毎日 1 回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

6.11.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は、全個体について、投与開始前に 1 回、投与期間中及び回復期間中は毎週 1 回実施した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は、投与 4 週 (雄を投与 25 日、雌を投与 26 日) 及び回復 2 週 (回復 11 日) に行った。なお、

7. 試験結果

7.1 一般状態

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~12 に示した。

1) 投与期間

いずれの動物においても、投与期間を通じて異常は認められなかった。

2) 回復期間

いずれの動物においても、回復期間を通じて異常は認められなかった。

7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 13~84 に示した。

1) 投与期間

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 85~91 に示した。

1) 投与 4 週

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

着地開脚幅の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。

7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 92~98 に示した。

1) 投与 4 週

各被験物質投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

1000 mg/kg 投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 99~105 に示した。

1) 投与 4 週

各被験物質投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移し、有意差は認められなかつ

た。

2) 回復 2 週

測定開始後 0~60 分の測定値の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。

7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 106~112 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 40 mg/kg 投与群の雄で投与 7 から 28 日、雌で投与 24 及び 28 日に、200 及び 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 4 から 28 日に、200 mg/kg 投与群の雌で投与 28 日に、1000 mg/kg 投与群の雌で投与 17 から 28 日に認められた。更に、投与期間中での体重増加量の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄で認められた。なお、8 mg/kg 投与群の雄についても投与期間を通じて低値傾向が認められた。

2) 回復期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で回復 1 から 14 日、雌で回復 1 日に認められた。

7.4 摂餌量

成績を Fig.6、Table 4-1、4-2 及び Appendix 113~119 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄で投与 7 から 28 日に、40 mg/kg 投与群の雌で投与 21 及び 28 日に、200 mg/kg 投与群の雌で投与 7 及び 28 日に、1000 mg/kg 投与群の雌で投与 21 及び 28 日に認められた。

2) 回復期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で回復 7 日に認められた。

7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 120~140 に示した。

1) 投与 4 週

各被験物質投与群の雌雄とも定性的項目で異常は認められなかった。また、摂水量の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の有意な低値が 1000 mg/kg の雄で認められた。

2) 回復 2 週

1000 mg/kg 投与群の雌雄とも定性的項目で異常は認められず、また、尿量、摂水量及び浸透圧でも対照群との間に有意差は認められなかった。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 141~161 に示した。

1) 投与期間終了時

フィブリノーゲン量の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄で、プロトロビン時間の有意な短縮が 40 及び 200 mg/kg 投与群の雄で、ヘモグロビン量とヘマトクリット値の有意な高値と網赤血球率の有意な低値が 200 mg/kg 投与群の雄で認められた。また、白血球百分率で好酸球比率と分画実数で好酸球数の有意な低値が 40 及び 200 mg/kg 投与群の雄で認められた。

2) 回復期間終了時

赤血球数の有意な低値と網赤血球率の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、血小板数の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。また、白血球百分率でリンパ球比率の有意な低値と好中球比率の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、好酸球比率の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雌で、分画実数で好中球数の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 162~175 に示した。

1) 投与期間終了時

ALT の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌で、ALP の有意な低値が 40 mg/kg 投与群の雌と 1000 mg/kg 投与群の雄で、総コレステロールの有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、リン脂質の有意な高値が 40 mg/kg 投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、高値傾向が 200 mg/kg の投与群の雄で認められた。

2) 回復期間終了時

AST、ALT 及びカリウムの有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 176~203 に示した。

1) 投与期間終了時

最終体重の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄で認められた。

脳	:	絶対重量の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄に、相対重量の有意な高値が 200 mg/kg 投与群の雄と 40 mg/kg 以上の投与群の雌に認められた。
胸腺	:	絶対重量の有意な低値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄に認められた。
心臓	:	相対重量の有意な高値が 200 mg/kg 投与群の雄に認められた。
肝臓	:	相対重量の有意な高値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 200 mg/kg 以上の投与群の雌に認められた。

- 脾臓 : 絶対重量の有意な低値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌に認められた。
- 腎臓 : 絶対重量の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雌に認められた。
- 副腎 : 絶対重量の有意な低値が各被験物質投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌に、相対重量の有意な低値が 40 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 精巣 : 相対重量の有意な高値が 40 及び 200 mg/kg 投与群に認められた。
- 卵巣 : 絶対重量の有意な低値が 200 mg/kg 投与群に認められた。

2) 回復期間終了時

最終体重の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。

- 脳 : 相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 心臓 : 絶対重量の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 脾臓 : 相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 副腎 : 絶対重量の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 精巣 : 相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群に認められた。
- 精巣上体 : 相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群に認められた。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 204~287 に示した。

1) 投与期間終了時

- 腎臓 : 陥凹巣が対照群及び 40 mg/kg 投与群の雌各 1 例に、のう胞が 200 mg/kg 投与群の雄 1 例と 40 及び 1000 mg/kg 投与群の雌各 1 例に認められた。
- 脾臓 : 白色巣が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。
- 精巣 : 小型化が 40 mg/kg 投与群の 1 例に認められた。

2) 回復期間終了時

- 腎臓 : 陥凹巣が 1000 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に、のう胞が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。
- 脾臓 : 白色巣が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。

胃 : 前胃の隆起巣が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に、腺胃の暗赤色巣が対照群の雌 1 例に認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-4 及び Appendix 204~287 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓で認められた。

肝臓 : 軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 40 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例、200 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌全例、1000 mg/kg 投与群の雌 5 例で、軽度な小葉中心性の肝細胞肥大が 200 mg/kg 投与群の雄 3 例、1000 mg/kg 投与群の雄全例と雌 1 例で認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

眼球 : 軽微な網膜異形成が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽微な網膜萎縮が対照群の雄 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。

心臓 : 軽微な限局性の心筋炎が対照群の雌 1 例で認められた。

腎臓 : 軽微な再生尿細管が対照群の雌雄各 3 例、1000 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 1 例で認められた。

肝臓 : 軽微あるいは軽度な門脈周囲の肝細胞の空胞化が対照群の雄 2 例と雌 5 例、8 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌全例、40 mg/kg 投与群の雌 4 例、200 mg/kg 投与群の雌 5 例、1000 mg/kg 投与群の雌 3 例で、軽微な限局性壊死が 40 mg/kg 投与群の雌 1 例で、軽微な微小肉芽腫が対照群の雌雄各 5 例、8 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌全例、40 mg/kg 投与群の雄全例と雌 5 例、200 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌全例、1000 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 5 例で認められた。

肺 : 軽微な肺胞マクロファージの出現が対照群の雌雄各 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。

下垂体 : 軽微な異所性頭蓋咽頭組織が対照群の雄 1 例で認められた。

前立腺 : 軽微な間質性細胞浸潤が 1000 mg/kg 投与群の 2 例で認められた。

脾臓 : 軽微な髓外造血が対照群の雄 1 例と雌 2 例で認められた。また、軽微な線維性被膜が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。

- 甲状腺 : 軽微な異所性胸腺が対照群の雄 1 例で認められた。
 精巣 : 軽度な精子肉芽腫が 40 mg/kg 投与群の 1 例で認められた。

以下に示す所見については、剖検時にみられた肉眼所見に相当すると考えられた。

- 腎臓 : 陥凹巣がみられた対照群及び 40 mg/kg 投与群の雌各 1 例では軽微な線維化が認められた。のう胞がみられた 200 mg/kg 投与群の雄 1 例と 40 及び 1000 mg/kg 投与群の雌各 1 例では軽微なのう胞が認められた。
 脾臓 : 白色巣がみられた 40 mg/kg 投与群の雄 1 例では軽微な線維性被膜が認められた。
 精巣 : 小型化がみられた 40 mg/kg 投与群の 1 例では高度な精細管萎縮が認められた。

2) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓で認められた。

- 肝臓 : 軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 1000 mg/kg 投与群の雄 3 例、軽度な小葉中心性の肝細胞肥大が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- 腎臓 : 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例では軽微な再生尿細管が認められた。
 肝臓 : 軽微な門脈周囲の肝細胞の空胞化が対照群の雌 2 例、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例で、軽微あるいは軽度の微小肉芽腫が対照群の雄 4 例と雌全例、1000 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌全例で認められた。

以下に示す所見については、剖検時にみられた肉眼所見に相当すると考えられた。

- 腎臓 : 陥凹巣がみられた 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例では軽微なのう胞が認められた。陥凹巣とのう胞がみられた 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例では軽微なのう胞と線維化が認められた。
 脾臓 : 白色巣がみられた 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例では軽度な炎症性細胞浸潤が認められた。
 胃 : 前胃の隆起巣がみられた 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例では軽微な異所性胃底腺が認められた。また、腺胃の暗赤色巣がみられた対照群の雌 1 例では軽微な腺胃のびらんが認められた。

8. 考察

アゾイック CC5 の 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Cri:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (0.5 w/v% メチルセルロース水溶液：対照群)、8、40、200 及び 1000 mg/kg/day とし、また、対照群と 1000 mg/kg 投与群の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態、詳細な一般状態の観察及び握力では異常は認められなかった。

機能検査では、回復 2 週に着地開脚幅の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、ごく軽度な変化であり、投与 4 週には認められていないことから偶発性的変化と判断した。

自発運動量では、回復 2 週に測定開始後 0~60 分の測定値の高値が 1000 mg/kg 投与群の雌でみられたが、ごく軽度な変化であり、10 分間隔の測定値に異常は認められていないことから偶発性的変化と判断した。

体重では、投与期間中に低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられ、体重増加量も低値を示し、被験物質投与の影響が疑われた。また、8 mg/kg 投与群の雄で投与期間を通じて低値傾向が認められたが、ごく軽度な変化であった。なお、回復期間中も低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で回復 1 から 14 日、雌で回復 1 日にみられたが、体重増加量は雌雄とも対照群と差がなく回復性が認められた。

摂餌量では、投与期間中に低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられ、被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復期間中も低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で回復 7 日にみられたが回復 14 日には変化がみられていないことから、回復性が認められた。

尿検査では、投与 4 週に摂水量の低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の低値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられ、被験物質投与の影響が疑われた。なお、これらの変化は休薬により、いずれも消失し、回復性が認められた。

血液学検査では、投与期間終了時にフィブリノーゲン量の低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄でみられたがごく軽度な変化であり、投与量との関連性がないことから偶発性と判断した。また、プロトロンビン時間の短縮が 40 及び 200 mg/kg 投与群の雄で、ヘモグロビン量とヘマトクリット値の高値及び網赤血球率の低値が 200 mg/kg 投与群の雄で、更に、白血球百分率及び実数において好酸球の低値が 40 及び 200 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれも軽度であり、最高用量群ではみられていないことから偶発性的変化と判断した。なお、回復期間終了時にも赤血球数の低値と網赤血球率の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、血小板数の高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で、更に白血球百分率においてリンパ球比率の低値と好中球比率の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、好酸球比率の低値が 1000 mg/kg 投与群の雌で、各分画の実数で好中球数の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれの変化もごく軽度であり、投与期間終了時には認められていないことから偶発性的変化と判断した。

血液化学検査では、投与期間終了時にリン脂質の高値が 40 mg/kg 投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、高値傾向が 200 mg/kg 投与群の雄で、総コレステロールの高値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、被験物質投与による肝臓への影響が示唆された。なお、これらの変化は休薬により消失し、回復性が認められた。その他、投与期間終了時に ALT の低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌で、ALP の低値が 40 mg/kg 投与群の雌と 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれもごく軽度であり、障害を示唆するとされる高値ではないことから、重要ではないと判断した。また、回復期間終了時に AST 及び ALT の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれもごく軽度であり、投与期間終了時には認められていないことから、偶発性の変化と判断した。更に、カリウムの高値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、他の電解質には変化がなく、投与期間終了時には認められていないことから偶発性の変化と判断した。

病理学検査では、投与期間終了時に肝臓において相対重量の高値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、組織学的検査に小葉中心性の肝細胞肥大が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられ、被験物質投与の影響が示唆された。なお、回復期間終了時でも肝臓において組織学検査に小葉中心性の肝細胞肥大が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたものの、休薬により程度及び頻度は軽減し、回復性が認められた。また、投与期間終了時に胸腺において絶対重量の低値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄で認められた。なお、回復期間終了時には異常はなく回復性が認められた。その他、器官重量では投与あるいは回復期間終了時に絶対重量の低値が脳、心臓、脾臓、腎臓及び卵巣に、相対重量の高値が脳、心臓、脾臓、精巣及び精巣上体にみられたが、これらの変化はいずれも体重の増加が抑制されたことに伴った 2 次的変化と考えられた。副腎については投与期間終了時に絶対重量の低値が各被験物質投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、相対重量の低値が 40 mg/kg 投与群の雄で、また、回復期間終了時に絶対重量の低値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれもごく軽度であり、通常みられる程度の変化であることから偶発性の変化と判断した。更に、剖検では、投与あるいは回復期間終了時に腎臓の限局性の陥凹巣及びのう胞、脾臓の限局性の白色巣、精巣の小型化、前胃の限局性の隆起巣及び腺胃の暗赤色巣がみられたが、いずれの変化もその出現状況などから偶発性の変化と判断した。

以上の結果、アゾイック CC5 の本試験条件下における無影響量は、主として雌雄で体重及び摂餌量の低値と病理学組織検査における小葉中心性肝細胞肥大、雄で肝臓の相対重量の変化から、雌雄とも 8 mg/kg/day と推定された。なお、いずれの変化も休薬による回復性が認められた。

3. 要約

モルダント ブラック-7の復帰突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド(以下、DMSO と略す)を用いた。

試験は、19.5~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537、*E. coli* WP2 *uvrA* については2.44~78.1 µg/plate の範囲の6用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* については9.77~313 µg/plate の範囲の6用量で実施した。なお、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100 については、生育阻害を示した高用量での変異原性を確認するため、2.44~313 µg/plate の範囲の8用量で実施した。

1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。また、本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化しない場合の39.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の78.1 µg/plate 以上で認められた。

2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の39.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の78.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の313 µg/plate 以上で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

2回の本試験ともに、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。また、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 においても用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、*S. typhimurium* TA98 の用量設定試験及び本試験2回目では陰性対照値の2倍以上に増加した。なお、復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍を超え、再現性が認められた菌株について比活性値を求めたところ、最大で2459 (Rev/mg)となり、本被験物質の変異原性は非常に強いものと判断された。

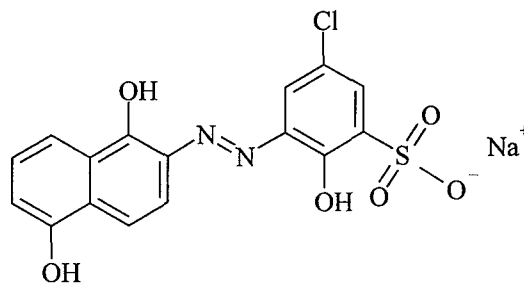
以上の試験結果より、本試験条件下において、モルダント ブラック-7は、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。

5. 被験物質及び被験液の調製

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

製造元	:	山田化学工業株式会社
名称	:	モルダント ブラック-7
ロット番号	:	08001
CAS番号	:	3618-60-8
構造式	:	



純度	:	92.7%(HPLC)
不純物の名称及び濃度	:	不明不純物 7.3% (うち、塩分として塩素イオン 7100mg/kg、硫酸イオン 1300mg/kg)
分子量	:	416.77
融点	:	情報提供なし
沸点	:	情報提供なし
蒸気圧	:	情報提供なし
分配係数	:	情報提供なし
常温における性状	:	黒色粉末
安定性	:	本試験終了後に残余となった被験物質を製造元において分析した結果、純度に大きな変動はなく、安定であることが確認された(別添1)。
溶解性	:	水；不溶 DMSO；50mg/mL以上
保存条件	:	室温
保存温度	:	保存期間(東京研究所 2008.11.13~2009.3.3；14.9~28.6℃)
返却	:	試験終了後の残量はすべて製造元へ返却した。

<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	茶
<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> TA1537	緑

2) 濃度の識別

代謝活性化しない場合は「-」、代謝活性化する場合は「+」とし、これに続けて陰性対照(Solvent Control)を「SC」、陽性対照(Positive Control)を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を各菌の色のマーカーで記載し、識別した。

6.4.2 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10mL を入れた滅菌済み L 字型試験管に凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を *S. typhimurium* 株では各 20 μ L、*E. coli* 株では 10 μ L 接種した。使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 2) 各試験菌株を接種した L 字型試験管を振盪恒温槽 (COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社) にセットし、プログラム制御により前培養開始まで 4°C の水浴中に放置(6 時間 30 分)した後、37°C に上昇後 9 時間前培養した。
- 3) 前培養終了時に培養液の吸光度をデジタル比色計 (Mini photo 518R、タイテック株式会社) で測定した。なお、培養液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表 3 に示した。

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌 株	菌 数(cells/mL)		
	用量設定試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	4.48×10^9	5.35×10^9	5.59×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	4.91×10^9	4.89×10^9	4.98×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.14×10^9	8.09×10^9	8.13×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	5.66×10^9	5.55×10^9	5.68×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.09×10^9	3.10×10^9	3.01×10^9

6.4.3 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量 (19.5、78.1、313、1250、5000 μ g/plate) を用い、用量設定試験を実施した。なお、用量設定試験の結果を別表 1 に示した。

用量設定試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の 78.1 μ g/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 313 μ g/plate 以上で認められた。なお、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98

及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。また、本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化の有無にかかわらず 78.1 µg/plate 以上で認められた。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537、*E. coli* WP2 *uvrA* については 78.1 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* については 313 µg/plate をそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。また、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100 については、生育阻害を示した高用量での変異原性を確認するため、313 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 7 段階希釈した計 8 用量を設定した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

6.4.4 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では 2 枚、2 回の本試験では 3 枚のプレートを用いた。

6.4.5 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪しながらプレインキュベーションし、これに 45°C に保温されているトップアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~3) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験では 48.5 時間、本試験 1 回目では 49 時間、本試験 2 回目では 48.5 時間培養した。
- 5) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、代謝活性化しない場合の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 78.1 µg/plate 以上で着色が認められたものの、機器計測に影響がなかったため、自動コロニーカウンタ (コロニーアナライザー CA-11D systems、システムサイエンス株式会社) を用いて計

数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

6.5 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して2倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の2倍以上となる増加を示し、2回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

7. 試験結果

試験の結果を別表1～5及び図1～10に示した。また、比活性値を別表6～8に示した。なお、図は別表2、3より作成した。

7.1 培養終了後の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。また、本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化しない場合の39.1 µg/plate以上、代謝活性化した場合の78.1 µg/plate以上で認められた。なお、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA1535の39.1 µg/plate以上、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA100、TA1537及び代謝活性化した場合のすべての菌株の78.1 µg/plate以上、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA*の313 µg/plate以上で認められた。

7.2 復帰変異コロニー数

2回の本試験ともに、代謝活性化した場合の*S. typhimurium* TA100、TA1537において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。また、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA100、TA98においても用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、*S. typhimurium* TA98の用量設定試験及び本試験2回目では陰性対照値の2倍以上に増加した。

7.3 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、本試験2回目の代謝活性化しない場合の*E. coli* WP2 *uvrA*の陽性対照値を除き、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理限界(平均値±3SD：別添2)内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。なお、本試験2回目の代謝活性化しない場合の*E. coli* WP2 *uvrA*の陽性対照値につい

ても、管理限界をわずかに超える程度(117:39~104)であり、使用した試薬及び試験操作に問題はないことから、判定には影響しないと判断した。

8. 考察

2回の本試験ともに、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。また、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 においても用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、*S. typhimurium* TA98 の用量設定試験及び本試験2回目では陰性対照値の2倍以上に増加した。なお、復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍を超え、再現性が認められた菌株について比活性値を求めたところ、最大で2459 (Rev/mg)となり、本被験物質の変異原性は非常に強いものと判断された。

以上の試験結果より、本試験条件下において、モルダント ブラック-7は、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有する(陽性)と判定した。

9. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp+ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶(編): 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基(監修): 微生物を用いる変異原性試験データ集(能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.