

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月9日 より 2009年2月12日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	105 112 (109)	18 12 (15)	27 36 (32)	17 21 (19)	13 14 (14)
	19.5	113 116 (115)	9 7 (8)	44 24 (34)	10 17 (14)	4 5 (5)
	78.1	179 * 140 * (160)	18 * 10 * (14)	28 39 (34)	27 11 (19)	6 * 7 * (7)
	313	148 * 137 * (143)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	50 * 34 * (42)	0 * 0 * (0)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	128 98 (113)	10 13 (12)	30 37 (34)	39 39 (39)
19.5		132 119 (126)	13 7 (10)	47 29 (38)	61 34 (48)	53 51 (52)
78.1		198 * 197 * (198)	7 * 9 * (8)	11 * 15 * (13)	42 * 39 * (41)	78 * 70 * (74)
313		343 * 305 * (324)	16 * 10 * (13)	0 * 0 * (0)	34 * 54 * (44)	13 * 8 * (11)
1250		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	61 * 55 * (58)	0 * 0 * (0)
5000		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要とするもの 用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	522 485 (504)	321 332 (327)	81 88 (85)	419 390 (405)	1781 1617 (1699)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	S9Mixを必要とするもの 用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	975 1022 (999)	283 257 (270)	1249 1140 (1195)	401 434 (418)	117 123 (120)

(備考)

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

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

(別表2)

試験結果表 (本試験1回目:-S9Mix)

被験物質の名称:モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月25日 より 2009年2月28日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537	
S9Mix (一)	陰性対照 (DMSO)	97 89 90 (92 ± 4.4)	22 7 8 (12 ± 8.4)	31 35 39 (35 ± 4.0)	44 25 33 (34 ± 9.5)	20 8 5 (11 ± 7.9)	
	2.44	114 96 97 (102 ± 10.1)	8 10 13 (10 ± 2.5)	NT	NT	6 12 6 (8 ± 3.5)	
	4.88	113 94 91 (99 ± 11.9)	10 10 6 (9 ± 2.3)	NT	NT	13 12 12 (12 ± 0.6)	
	9.77	108 111 118 (112 ± 5.1)	12 8 13 (11 ± 2.6)	21 29 35 (28 ± 7.0)	35 27 28 (30 ± 4.4)	10 5 20 (12 ± 7.6)	
	19.5	106 101 131 (113 ± 16.1)	17 10 13 (13 ± 3.5)	36 37 29 (34 ± 4.4)	21 34 26 (27 ± 6.6)	4 8 12 (8 ± 4.0)	
	39.1	131 148 120 (133 ± 14.1)	8 * 10 * 7 * (8 ± 1.5)	23 30 20 (24 ± 5.1)	33 38 32 (34 ± 3.2)	6 6 5 (6 ± 0.6)	
	78.1	152 * 162 * 175 * (163 ± 11.5)	11 * 8 * 9 * (9 ± 1.5)	34 27 27 (29 ± 4.0)	24 59 28 (37 ± 19.2)	7 * 9 * 13 * (10 ± 3.1)	
	156	NT	NT	14 5 6 (8 ± 4.9)	37 47 43 (42 ± 5.0)	NT	
	313	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	49 * 44 * 45 * (46 ± 2.6)	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要としな いもの	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	SAZ 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1
		コロニー数/プレート	617 625 621 (621 ± 4.0)	342 335 318 (332 ± 12.3)	96 109 96 (100 ± 7.5)	475 485 459 (473 ± 13.1)	1728 1560 1770 (1686 ± 111.1)

(備考)

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

SAZ : アジ化ナトリウム

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

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT: 試験せず。

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

試験結果表 (本試験1回目:+S9Mix)

被験物質の名称:モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月25日 より 2009年2月28日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	91 91 104 (95 ± 7.5)	10 11 11 (11 ± 0.6)	33 33 32 (33 ± 0.6)	47 48 44 (46 ± 2.1)	18 10 22 (17 ± 6.1)	
	2.44	126 114 103 (114 ± 11.5)	7 5 2 (5 ± 2.5)	31 41 34 (35 ± 5.1)	45 36 51 (44 ± 7.5)	22 16 16 (18 ± 3.5)	
	4.88	93 112 120 (108 ± 13.9)	6 5 2 (4 ± 2.1)	27 41 37 (35 ± 7.2)	44 41 42 (42 ± 1.5)	22 17 18 (19 ± 2.6)	
	9.77	99 109 117 (108 ± 9.0)	7 15 7 (10 ± 4.6)	41 31 28 (33 ± 6.8)	55 37 45 (46 ± 9.0)	37 25 33 (32 ± 6.1)	
	19.5	99 102 132 (111 ± 18.2)	7 9 8 (8 ± 1.0)	31 28 33 (31 ± 2.5)	48 49 33 (43 ± 9.0)	48 51 51 (50 ± 1.7)	
	39.1	118 162 126 (135 ± 23.4)	7 8 8 (8 ± 0.6)	26 28 31 (28 ± 2.5)	45 54 42 (47 ± 6.2)	75 74 73 (74 ± 1.0)	
	78.1	197 * 221 * 167 * (195 ± 27.1)	9 * 16 * 10 * (12 ± 3.8)	19 * 18 * 13 * (17 ± 3.2)	65 * 66 * 61 * (64 ± 2.6)	72 * 55 * 59 * (62 ± 8.9)	
	156	272 * 216 * 241 * (243 ± 28.1)	NT	NT	NT	NT	
	313	329 * 332 * 278 * (313 ± 30.3)	NT	NT	NT	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称 用量(μg/プレート)	B[a]P 5.0	2AA 2.0	2AA 10.0	B[a]P 5.0
		コロニー数/プレート	977 1032 938 (982 ± 47.2)	285 253 278 (272 ± 16.8)	1045 992 1151 (1063 ± 81.0)	322 378 373 (358 ± 31.0)	119 109 102 (110 ± 8.5)

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン
B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

*:被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT:試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

試験結果表 (本試験2回目:-S9Mix)

被験物質の名称:モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年3月2日 より 2009年3月5日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	69 82 83 (78 ± 7.8)	15 8 8 (10 ± 4.0)	31 27 32 (30 ± 2.6)	18 17 20 (18 ± 1.5)	8 9 5 (7 ± 2.1)	
	2.44	85 110 93 (96 ± 12.8)	8 8 6 (7 ± 1.2)	NT	NT	7 5 11 (8 ± 3.1)	
	4.88	106 108 116 (110 ± 5.3)	8 13 10 (10 ± 2.5)	NT	NT	3 2 4 (3 ± 1.0)	
	9.77	99 95 77 (90 ± 11.7)	5 16 10 (10 ± 5.5)	34 32 37 (34 ± 2.5)	31 26 19 (25 ± 6.0)	5 1 5 (4 ± 2.3)	
	19.5	79 93 94 (89 ± 8.4)	7 11 11 (10 ± 2.3)	42 31 33 (35 ± 5.9)	20 15 21 (19 ± 3.2)	2 5 4 (4 ± 1.5)	
	39.1	96 111 131 (113 ± 17.6)	8 * 12 * 11 * (10 ± 2.1)	33 34 23 (30 ± 6.1)	16 19 19 (18 ± 1.7)	8 3 8 (6 ± 2.9)	
	78.1	124 * 155 * 176 * (152 ± 26.2)	11 * 7 * 7 * (8 ± 2.3)	39 33 35 (36 ± 3.1)	28 23 24 (25 ± 2.6)	7 * 5 * 9 * (7 ± 2.0)	
	156	NT	NT	8 19 12 (13 ± 5.6)	21 35 24 (27 ± 7.4)	NT	
	313	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	36 * 45 * 44 * (42 ± 4.9)	NT	
	陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	S9Mixを必要としなもの	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニー数/プレート	546 632 627 (602 ± 48.3)	321 322 350 (331 ± 16.5)	126 110 116 (117 ± 8.1)	439 459 448 (449 ± 10.0)	1439 1388 1196 (1341 ± 128.1)

(備考)

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

SAZ :アジ化ナトリウム

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

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT: 試験せず。

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

試験結果表 (本試験2回目:+S9Mix)

被験物質の名称: モルダント ブラック7

No. T-0310

試験実施期間		2009年3月2日 より 2009年3月5日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	106	11	35	40	6
		116	7	35	33	7
		114 (112 ± 5.3)	10 (9 ± 2.1)	23 (31 ± 6.9)	48 (40 ± 7.5)	8 (7 ± 1.0)
	2.44	116	10	28	34	8
		98	12	27	35	15
		106 (107 ± 9.0)	8 (10 ± 2.0)	39 (31 ± 6.7)	37 (35 ± 1.5)	12 (12 ± 3.5)
	4.88	99	9	41	36	25
		114	5	32	31	19
		125 (113 ± 13.1)	3 (6 ± 3.1)	25 (33 ± 8.0)	38 (35 ± 3.6)	14 (19 ± 5.5)
	9.77	113	5	32	29	18
		115	11	29	34	21
		115 (114 ± 1.2)	9 (8 ± 3.1)	35 (32 ± 3.0)	44 (36 ± 7.6)	33 (24 ± 7.9)
19.5	107	5	30	53	36	
	113	13	25	44	38	
	107 (109 ± 3.5)	8 (9 ± 4.0)	37 (31 ± 6.0)	50 (49 ± 4.6)	44 (39 ± 4.2)	
39.1	137	15	28	47	59	
	125	5	28	46	63	
	120 (127 ± 8.7)	6 (9 ± 5.5)	26 (27 ± 1.2)	50 (48 ± 2.1)	77 (66 ± 9.5)	
78.1	167 *	10 *	15 *	36 *	54 *	
	198 *	13 *	15 *	48 *	58 *	
	165 * (177 ± 18.5)	5 * (9 ± 4.0)	13 * (14 ± 1.2)	45 * (43 ± 6.2)	77 * (63 ± 12.3)	
156	243 *					
	212 *					
	246 * (234 ± 18.8)	NT	NT	NT	NT	
313	313 *					
	347 *					
	332 * (331 ± 17.0)	NT	NT	NT	NT	
陽性対照	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	S9Mixを必要とするもの 用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1067	289	1097	347	139
	1094	276	1029	423	120	
	1088 (1083 ± 14.2)	271 (279 ± 9.3)	1063 (1063 ± 34.0)	406 (392 ± 39.9)	128 (129 ± 9.5)	

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT: 試験せず。

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表6)

用量設定試験における比活性値表

被験物質の名称: モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月9日 より 2009年2月12日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)					
	19.5					
	78.1					
	313				73	
	1250					
	5000					
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)					
	19.5					2256
	78.1					845
	313	674				
	1250					
	5000					

(備考)

比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示した値のみ記載した。

比活性=被験物質1mgあたりの復帰変異コロニー数

下記の計算式により算出する。

比活性=(当該用量のコロニー数-陰性対照のコロニー数)×1000/当該用量(μg/plate)

(別表7)

本試験1回目における比活性値表

被験物質の名称:モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月25日 より 2009年2月28日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)					
	2.44					
	4.88					
	9.77					
	19.5					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)					
	2.44					
	4.88					
	9.77					
	19.5					1692
	39.1					1458
	78.1	1280				576
	156	949				
	313	696				

(備考)

比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示した値のみ記載した。

比活性=被験物質1mgあたりの復帰変異コロニー数

下記の計算式により算出する。

比活性=(当該用量のコロニー数-陰性対照のコロニー数)×1000/当該用量(μg/plate)

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 $\mu\text{g/mL}$ で、非代謝活性化では 131 $\mu\text{g/mL}$ で、更に連続処理法の 24 時間処理では 131 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 121.4 $\mu\text{g/mL}$ 、更に連続処理法の 24 時間処理では 105.2 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ では 4.5%、50.0 $\mu\text{g/mL}$ では 4.5%、40.0 $\mu\text{g/mL}$ では 3.0%、32.0 $\mu\text{g/mL}$ では 2.5 % 及び 25.6 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の細胞が観察されず UR (unreliable) と判定した。125 $\mu\text{g/mL}$ では 13.5%、62.5 $\mu\text{g/mL}$ では 9.0%、31.3 $\mu\text{g/mL}$ では 4.0% 及び 15.6 $\mu\text{g/mL}$ では 1.5% と 125 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 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。

M-1350

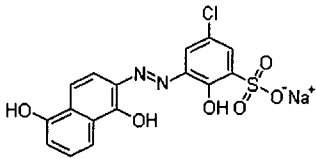
以上の結果から、モルダントブラック-7は本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

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

被験物質モルダントブラック-7は山田化学工業株式会社より提供された。被験物質情報 (Attached Data 1) は、山田化学工業株式会社における非 GLP 下での分析に基づくものである。

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
英語別称	:	Mordant Black-7
ロット番号	:	08001
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

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、以下公比 2 で希釈した 2100、1050、525、263、131、65.6 及び 32.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、非代謝活性化では 131 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、更に連続処理法の 24 時間処理では 131 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 121.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、更に連続処理法の 24 時間処理では 105.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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つ

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、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。

M-1350

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 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

M-1350

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 (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（SD₂₀ 値）を指標として検討したところ、SD₂₀ 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、それに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。

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	UR	27	1	0	0	0	UR	41-1
			8	0	0	0	0	0	0	0	0	UR	8	8	0	0	0	UR	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	UR	18	8	0	0	0	UR	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)	UR	(24)	21	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	UR	08-2
		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 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)	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.

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)	2)	
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			91		-	-	-	-	
		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.

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)	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