

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。

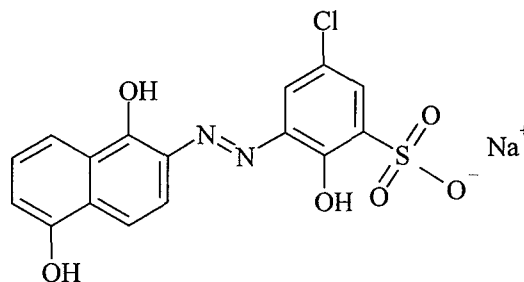
以上の試験結果より、本試験条件下において、モルダント ブラック-7は、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。

## 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  $\mu$ L、*E. coli* 株では 10  $\mu$ 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	$4.48 \times 10^9$	$5.35 \times 10^9$	$5.59 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1535	$4.91 \times 10^9$	$4.89 \times 10^9$	$4.98 \times 10^9$
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	$8.14 \times 10^9$	$8.09 \times 10^9$	$8.13 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA98	$5.66 \times 10^9$	$5.55 \times 10^9$	$5.68 \times 10^9$
<i>S. typhimurium</i> TA1537	$3.09 \times 10^9$	$3.10 \times 10^9$	$3.01 \times 10^9$

## 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 313  $\mu$ 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.



(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	WP2uvrA	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
	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 <sub>uvrA</sub>	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 <sub>uvrA</sub>	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<sup>1)</sup>は 120 であった。なお、短時間処理法で明らかに陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

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

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



M-1350

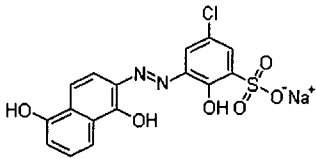
以上の結果から、モルダントブラック-7は本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

## 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 $2 \times 10^4$ 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 $2 \times 10^4$ 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 $\gamma$ 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  $2 \times 10^4$  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<sup>1)</sup>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