食薬セ研第11-1749号

2001年7月31日

ディスパーズレッド 206の
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を
用いる染色体異常試験

厚生省生活衛生局　委託

財団法人 食品薬品安全センター

秦野研究所

[目　　次]

頁

要　約 ---------- 1

緒　言 ---------- 2

材料と方法 ---------- 2

1.　被験物質 ---------- 2

2.　陽性対照物質 ---------- 3

3.　細胞 ---------- 3

4.　S9 反応液 ---------- 3

5.　細胞増殖抑制試験 ---------- 4

6.　染色体異常試験 ---------- 4

7.　染色体分析 ---------- 5

結果および考察 ---------- 6

参考文献 ---------- 7

Table 1 ---------- 8

Table 2 ---------- 9

Table 3 ---------- 10

Fig. 1 ---------- 11

[要　　約]

ディスパーズレッド206のCHL/IU細胞(チャイニーズ・ハムスター、肺由来)を用いる染色体異常試験を実施した結果、陽性の結果が得られた。

S9 mix非存在下(MEM培地中)および存在下(MEM培地の代わりにS9反応液を使用)で短時間処理(6時間処理後18時間の回復時間)した場合、50%の増殖抑制濃度はそれぞれ3.0 mg/mLおよび4.2 mg/mLとなった。また、連続処理(新鮮培地中で24時間処理)した場合は1.8 mg/mLとなった。

このことから染色体異常試験では、短時間処理群においては、5.0 mg/mLの濃度を最高処理濃度とし、公比2で計5濃度を設定した。また、24時間連続処理群については、50%増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、以下公比2で計5濃度を設定した。

染色体分析の結果、S9 mix存在下で短時間処理した場合、最高処理濃度である5.0 mg/mLの濃度群で、29%の細胞に染色体の構造異常が誘発された。それ以外の処理群では、いずれも染色体の構造異常の誘発は認められなかった。倍数性細胞については、必ずしも明確な濃度依存性は認められないものの、いずれの処理系列においても、低頻度(2%未満)ながら有意な増加を示す群が認められたことから、倍数性細胞を誘発すると判定した。

[緒　　言]

化学物質の遺伝毒性を評価するための短期検索法の一つとして、哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験がある。化学物質によって誘発される染色体異常には、大別して構造異常(ギャップ、切断、交換)と数的異常(倍数性細胞、異数性細胞)があり、前者はDNA傷害、後者は細胞の分裂機構の異常などを反映している。本試験で用いたCHL/IU細胞は、染色体数が少なく、一般的に化学物質に対して染色体異常の検出感度が高いため、染色体異常試験によく用いられる。

変異原物質の細胞内の標的(DNAまたは紡錘糸など)に対する作用は、直接作用する場合と、代謝活性化されて変異原活性が現れる場合に大別される。しかしながら、試験管内の変異原性試験に用いる微生物や培養細胞では、代謝活性化能が無いかあるいはあっても活性が低いことから、一般的にはラットの肝臓から調製した肝ホモジネート9000×g上清(S9)を化学物質の代謝活性化を検出するために用いる。染色体異常試験においては、直接作用を検出するための処理系列として、S9 mix非存在下での短時間処理に加えて連続処理があり、代謝活性化作用をみるための処理系列としてS9 mix存在下での短時間処理がある。

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、ディスパーズレッド206の細胞遺伝学的影響を評価するため、CHL/IU細胞を用いる染色体異常試験を実施した。なお本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成9年10月31日、環保安第287号、衛生第127号、平成09・10・31基局第2号)および「OECD毒性試験ガイドライン：473」に準拠し、「化学物質GLP」(昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号)に基づいて実施した。

[材料と方法]

1.　被験物質

被験物質であるディスパーズレッド206(略称：DR、CAS No. 26630-87-5)の物理化学的性状等をAppendix 1に示した。DRは　　から提供された後、室

温で保管した。

溶解性の予備検討の結果、水、ジメチルスルホキシドおよびアセトンに不溶であることから、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC Na、ロット番号：WTH1105、和光純薬工業）の0.5％水溶液に被験物質を懸濁して試験に用いた。なお、被験物質の純度（39.1 wt％）が低いことから、濃度については純度換算を行った値を記載した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質として用いたマイトマイシン C（MC、ロット番号：263AIC、協和醗酵工業）およびシクロホスファミド（CPA、ロット番号：108H0568、Sigma Chemical）は局方注射用水（ロット番号：K9K79、大塚製薬工場）に溶かし、用時調製して試験に用いた。

3. 細胞

CHL/IU 細胞（JCRB 細胞バンクより入手）は、仔牛血清（ロット番号：28110754、Cansera International）を 10 vol％含むイーグル MEM 培地（日水製薬）を用い、CO_2 インキュベーター（5％ CO_2、37℃）内で培養した。また、解凍後継代 10代以内で試験に用いた（親株の継代数は、1988年 2月に入手した時点で 4代、現在は 21代）。

4. S9 反応液

S9（ロット番号：RAA-417 および RAA-423、1999年12月製造および 2000年 3月製造、キッコーマン）は、フェノバルビタールと 5, 6-ベンゾフラボンを投与した 7週齢の雄 Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時までディープフリーザー（−80℃）に保管した。グルコース-6-リン酸（G-6-P、Sigma Chemical）、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（β-$NADP^+$、オリエンタル酵母工業）および KCl を蒸留水に溶かし、混合液としてディープフリーザー（−80℃）に保管し、使用時はこれに S9、$MgCl_2$ および HEPES buffer（pH 7.2）を加え、S9 mix とした。S9 mix 存在下で短時間処理する場合、S9 mix、2倍濃度 MEM 培地（血清不含で、S9 mix と被験物質調製液の添加量の合計と等量）および MEM 培地（血清不含）を混和して S9 反応液（被験物質調製液を 10 vol％で添加したときの各成分の最終濃度：5 vol％ S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-$NADP^+$、0.83 mmol/L $MgCl_2$、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L

HEPES) とした。一方、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合は、S9 反応液の代わりに MEM 培地に 2倍濃度 MEM 培地 (被験物質調製液の添加量と等量) を混合したものを使用した。

5. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖におよぼす影響を調べた。CHL/IU 細胞を 0.25％トリプシンを用いてはがした後、4×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (2×10^4個) をプラスチックディッシュ (直径 6 cm) に播種して 3日間培養した。

S9 mix 存在下で短時間処理する場合、S9 反応液 2.7 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 0.3 mL ずつ添加し 6時間処理した。リン酸緩衝塩類溶液 (Ca^{2+} および Mg^{2+} を含む) で洗浄後、新鮮培地に交換し、さらに 18時間培養した。一方、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合、S9 反応液の代わりに MEM 培地を用いた以外の操作は、S9 mix 存在下の処理と同様に行った。また、連続処理においては、新鮮培地 4.5 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 0.5 mL ずつ添加し 24時間処理した。全ての処理系列において、0.16 ～ 5.0 mg/mL の濃度範囲 (公比 2) で処理した。

培養終了後、10 vol％ホルマリン溶液で固定し、0.1％クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計 (Monocellater ™、オリンパス光学工業) を用い、陰性 (0.5%CMC Na) 対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。1濃度あたり 2枚のディッシュを用いた。

6. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験において、DR は S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合および 24時間連続処理した場合、CHL/IU 細胞の増殖を抑制した (Fig. 1)。50％の増殖抑制濃度は、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合、それぞれ 3.0 mg/mL および 4.2 mg/mL となり、連続処理した場合は 1.8 mg/mL となった。

このことから染色体異常試験において、短時間処理群では 5.0 mg/mL を最高処理濃度とし、連続処理群では50％増殖抑制濃度の約 2倍の濃度 (3.5 mg/mL) を最高処理濃度とし、以下公比 2 で計 5濃度を設定して試験を実施した。また、染色体異常試験においては

1濃度あたり 4枚のディッシュ（ただし、無処理対照群および陽性対照群では 2枚）を用い、そのうちの 2枚より染色体標本を作製し、別の 2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。すべての処理系列で被験物質処理群、陰性（0.5%CMC Na）対照群と陽性対照群を設けた。また、無処理対照群も設けた。陽性対照群については、S9 mix 非存在下の短時間処理および連続処理では、 MC（原液濃度：20 μg/mL）を最終濃度がそれぞれ 0.1 μg/mL および 0.05 μg/mL となるように添加した。S9 mix 存在下の短時間処理では、 CPA（原液濃度：1 mg/mL）を最終濃度が 5 μg/mL となるように添加した。

染色体標本作製用のディッシュについては、培養終了の 2時間前に、コルセミドを 最終濃度が 0.1 μg/mL となるように添加した。培養終了後、培地を除き、0.02％ EDTA を含むリン酸緩衝塩類溶液（Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない）を加えて細胞をはがし、15 mL の遠沈管に集め、遠沈した（1000 ～ 1500 rpm、5分）。上清を捨てた後、沈殿した細胞に 0.075 mol/L KCl 水溶液 3 mL を加え、30分間低張処理を行った。低張処理後、固定液（メタノール：氷酢酸 = 3：1 v/v）を 6 mL 加え遠沈した後、上清を除き、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。固定液の交換を数回行った後、少量の固定液で細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス（あらかじめフロスト部分に試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入）上に滴下し、そのまま風乾した。1ディッシュあたり 6枚のスライド標本を作製した。

3 vol％ギムザ液（pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製）でスライド標本を染色後、蒸留水ですすいで風乾した。試験計画番号、試験系識別番号および標本作製の日付を明示したスライドケースに、スライド標本をコード番号順に入れて保存した。

7. 染色体分析

染色体分析に先立って、各処理系列の相対増殖率および分裂指数を調べ、20％以上の相対増殖率で、かつ 2ディッシュともに 0.5％以上の分裂指数の場合を観察可能と判断した。また、染色体の構造異常については、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会（JEMS・MMS）[1] による分類法に基づいて分類した。ただし、ギャップについては、染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。染色体分析においては、染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を観察した。各群

ごとに、観察細胞数、染色体型および染色分体型の構造異常の種類と数、倍数性細胞の数を記録用紙に記入した。ディッシュ1枚から得られたスライド標本4枚を、4人の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化して分析した。構造異常は1群200個(ディッシュあたり100個)、倍数性細胞は1群800個(ディッシュあたり400個)の分裂中期細胞を分析した。

構造異常(ギャップを除く)を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性(溶媒)対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法[2] ($p < 0.01$)により有意差検定を実施した。また、コクラン・アーミテッジの傾向性検定[3] ($p < 0.01$)により用量依存性の有無を検討した。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

[結果および考察]

染色体分析に先立ち、細胞増殖率および分裂指数の測定を行った結果(Table 1～3)、染色体分析が可能な最高濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では、それぞれ2.5 mg/mLおよび5.0 mg/mLとなった。また、連続処理では1.8 mg/mLとなった。従って、染色体分析に際してはそれらの濃度を含め以下3濃度群を観察対象とした。

染色体分析の結果、DRは、S9 mix 存在下で短時間処理した高濃度群(5.0 mg/mL)でのみ染色体の構造異常を誘発した(Table 2)。一方、S9 mix 非存在下で短時間処理および連続処理した場合には、いずれの処理群においても染色体の構造異常の有意な増加は認められなかった(Table 1、3)。倍数性細胞については、短時間処理した2.5 mg/mLの濃度群で有意な増加が認められた(Table 1、2)。また、24時間連続処理した低濃度群(0.44 mg/mL)で倍数性細胞の有意な増加が認められた(Table 3)。これらの処理群における倍数性細胞の出現頻度は、いずれも低頻度(2%未満)であり、濃度依存性も必ずしも明確ではなかったが、3つの異なるすべての条件下で有意差が認められたことから、再現性のある結果と判断し、弱いながらも最終的には陽性と判定した。

染色体の構造異常の誘発が認められたS9 mix 存在下の短時間処理群について、D_{20}値[4]を求めたところ、4.3 mg/mLとなった。倍数性細胞については、いずれも最高濃度の10倍ないし最低濃度の10分の1以下の値となり、D_{20}値はいずれも対象外となった。

本試験で構造異常陽性の結果が得られたS9 mix存在下の最高濃度群では、強い増殖抑制作用(26.5%の増殖率)を示し、細胞毒性による構造異常誘発の可能性も示唆されるが、当該試験と併行して実施した細菌を用いる復帰突然変異試験において陽性の結果が得られている[5]ことから、被験物質の直接的な作用により構造異常が誘発されたと考えられる。

陽性対照物質として用いたMCは、S9 mix非存在下で短時間処理および24時間連続処理した場合において染色体の構造異常を誘発し(Table 1、3)、CPAはS9 mix存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発した(Table 2)。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

以上の結果より、ディスパーズレッド206は、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

[参考文献]

1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：「化学物質による染色体異常アトラス」，朝倉書店，東京(1988)

2) 吉村　功　編：「毒性・薬効データの統計解析、事例研究によるアプローチ」，サイエンティスト社，東京(1987)

3) 吉村　功，大橋靖夫　編集：「毒性試験講座14、毒性試験データの統計解析」，地人書館，東京(1992)

4) 石館　基　監修：「<改定>染色体異常試験データ集」，エル・アイ・シー，東京(1987)

5)　　：「ディスパーズレッド206の細菌を用いる復帰突然変異試験」，食薬セ研第11-1746号(2001)

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with Disperse Red 206 (DR)** for 6 h without S9 mix

Group	Concen-[2] tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent[3] cell growth (%)	Mitotic[4] index (%)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations gap	ctb	cte	csb	cse	mul[5]	total	Others[6]	Total no. of cells with aberrations TAG (%)	TA (%)	No. of[7] polyploid cells (%)	Trend test[8] TA	POL
Non-treatment				—	—	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
						100	3	0	1	0	0	0	4	0	4 (4.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						200	4	0	1	0	0	0	5	0	5 (2.5)	1 (0.5)	2 (0.3)		
Negative[1]	0	−	6 - (18)	100.0	—	100	1	0	0	5	0	0	6	0	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
						200	2	1	0	5	0	0	8	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0 (0.0)		
DR	0.31	−	6 - (18)	96.0	—	not observed													
DR	0.63	−	6 - (18)	92.0	—	100	0	2	0	8	0	0	10	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)		
						200	0	2	0	8	0	0	10	0	2 (1.0)	2 (1.0)	2 (0.3)		
DR	1.3	−	6 - (18)	79.0	—	100	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	2 (0.5)		
						100	0	0	0	4	0	0	4	0	1 (1.0)	1 (1.0)	4 (1.0)		
						200	0	3	0	4	0	0	7	0	4 (2.0)	4 (2.0)	6 (0.8)	−	+
DR	2.5	−	6 - (18)	62.0	2.8, 2.2	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	8 (2.0)		
						100	0	0	1	0	0	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
						200	1	1	1	0	0	0	3	1	3 (1.5)	2 (1.0)	10* (1.3)		
DR	5.0	−		28.5	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
MC	0.1 μg/mL	−	6 - (18)	—	—	100	0	30	65	3	0	0	98	0	55 (55.0)	55 (55.0)	0 (0.0)		
						100	4	25	68	0	2	0	99	0	51 (51.0)	51 (51.0)	0 (0.0)		
						200	4	55	133	3	2	0	197	0	106 (53.0)	106 *(53.0)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; TAG, total no. of cells with aberrations including gaps; TA, total no. of cells with aberrations excluding gaps; MC, mitomycin C.

1) Carboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) was used as vehicle and added 10 vol% per dish. 2) Concentration of DR was converted by concerning the purity. 3) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 4) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 5) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 6) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 7) Eight hundred cells were analysed in each group. 8) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$.

*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 39.1 wt%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with Disperse Red 206 (DR)** for 6 h with S9 mix

Group	Concen-[2] tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent[3] cell growth (%)	Mitotic[4] index (%)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[6]	Total no. of cells with aberrations		No. of[7] polyploid cells (%)	Trend test[8]	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul[5]	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL
Negative[1]	0	+	6 - (18)	100.0	—	100	1	2	0	0	0	0	3	1	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						200	1	2	0	0	0	0	3	1	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)		
DR	0.31	+	6 - (18)	82.5	—	not observed													
DR	0.63	+	6 - (18)	82.5	—	not observed													
DR	1.3	+	6 - (18)	76.0	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.8)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)		
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.6)		
DR	2.5	+	6 - (18)	71.5	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (1.8)		
						100	0	1	1	1	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	8 (2.0)		
						200	0	1	1	1	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	15* (1.9)	+	—
DR	5.0	+	6 - (18)	26.5	1.6, 2.2	100	2	12	35	1	2	10	62	0	28 (28.0)	28 (28.0)	1 (0.3)		
						100	1	17	21	1	0	0	40	1	31 (31.0)	30 (30.0)	2 (0.5)		
						200	3	29	56	2	2	10	102	1	59 (29.5)	58 *(29.0)	3 (0.4)		
CPA	5 μg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	0	7	12	0	1	0	20	0	20 (20.0)	20 (20.0)	0 (0.0)		
						100	2	12	19	0	0	0	33	2	24 (24.0)	23 (23.0)	0 (0.0)		
						200	2	19	31	0	1	0	53	2	44 (22.0)	43 *(21.5)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; TAG, total no. of cells with aberrations including gaps; TA, total no. of cells with aberrations excluding gaps; CPA, cyclophosphamide.

1) Carboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) was used as vehicle and added 10 vol% per dish. 2) Concentration of DR was converted by concerning the purity. 3) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 4) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 5) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 6) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 7) Eight hundred cells were analysed in each group. 8) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$.

*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 39.1 wt%.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with Disperse Red 206 (DR)** without S9 mix

Group	Concen-[2] tration (mg/mL)	Time of exposure (h)	Concurrent[3] cell growth (%)	Mitotic[4] index (%)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[6]	No. of cells with aberrations		No. of[7] polyploid cells (%)	Trend test[8]	
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul[5]	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL
Negative[1]	0	24	100.0	—	100	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
					100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
					200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)		
DR	0.22	24	84.5	—	not observed													
DR	0.44	24	78.0	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (1.8)		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.3)		
					200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	12* (1.5)		
DR	0.88	24	66.5	—	100	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
					100	0	0	0	0	1	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
					200	0	0	0	0	2	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	2 (0.3)	—	—
DR	1.8	24	51.0	2.0, 2.0	100	0	2	0	0	0	0	2	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
					200	0	2	0	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)		
DR	3.5	24	35.0	0.0, 0.0	not observed due to small number of metaphases													
MC	0.05 μg/mL	24	—	—	100	4	22	66	2	0	10	104	0	48 (48.0)	46 (46.0)	0 (0.0)		
					100	1	15	45	0	1	0	62	0	42 (42.0)	41 (41.0)	0 (0.0)		
					200	5	37	111	2	1	10	166	0	90 (45.0)	87 *(43.5)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; TAG, total no. of cells with aberrations including gaps; TA, total no. of cells with aberrations excluding gaps; MC, mitomycin C.

1) Carboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) was used as vehicle and added 10 vol% per dish. 2) Concentration of DR was converted by concerning the purity. 3) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 4) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 5) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 6) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 7) Eight hundred cells were analysed in each group. 8) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$.

*, Significantly different from the negative control at $p<0.01$ by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 39.1 wt%.

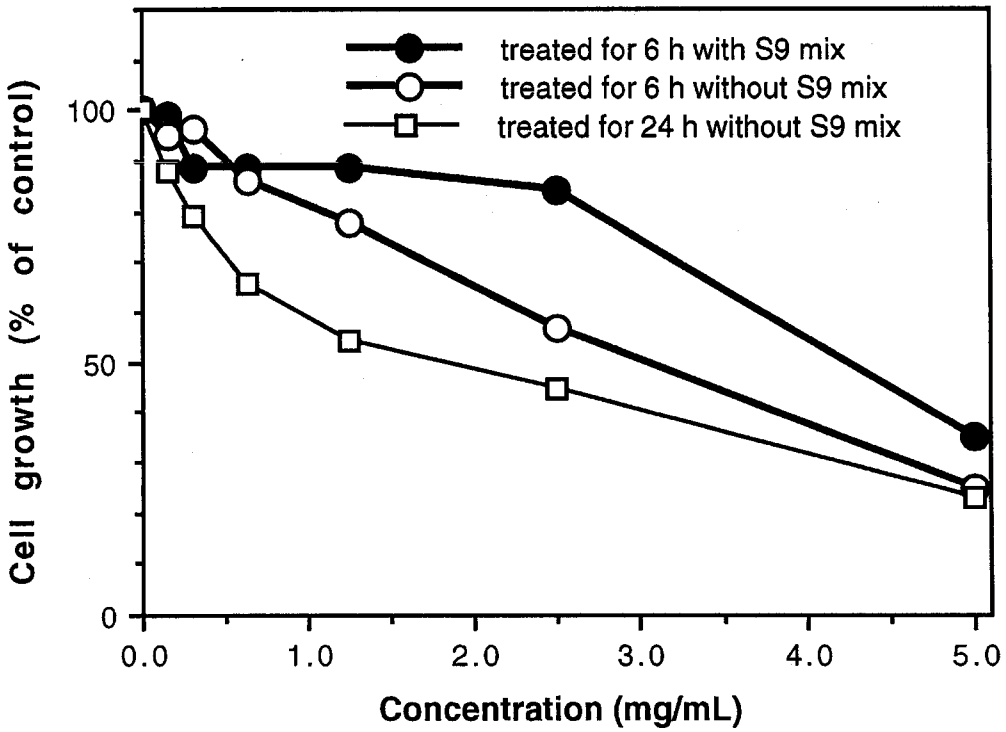

Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with Disperse Red 206

Precipitates were observed at all doses.