最 終 報 告 書

2-エチルアントラキノンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：4184（ 115－102 ）

平成 12 年 7 月 13 日

試験委託者
厚生省　生活衛生局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目次

1. 要約 3
2. 表題 4
3. 試験目的 4

11. 被験物質 6
12. 試験材料および方法 8
13. 試験結果 15
14. 考察および結論 17
15. 参考文献 18

Figures F-1~5
Figure 1 Dose-survival curves of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment] F-1
Figure 2 Incidence of structural aberrations induced by 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment：-S9] F-2
Figure 3 Incidence of polyploid cells induced by 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment：-S9] F-3
Figure 4 Incidence of structural aberrations induced by 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment：+S9] F-4
Figure 5 Incidence of structural aberrations induced by 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (confirmative examination) [short-term treatment：+S9] F-5

Tables		T-1~4
Table 1	Results of growth inhibition test on 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment : +S9]	T-3
Table 4	Results of the confirmative examination of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment : +S9]	T-4

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において，2-エチルアントラキノンは染色体異常を誘起するものと判断した．

2-エチルアントラキノンの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため，チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った．
あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に，試験用量を設定した．
染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理で 40.0，80.0，160，320 および 640 μg/mL の 5 用量ならびに同+S9 処理では 10 mM 相当の濃度を含む 591，1181 および 2362 μg/mL の 3 用量について顕微鏡観察を実施した．
その結果，2-エチルアントラキノン処理群の場合，-S9 処理で倍数性細胞の出現頻度が試験用量に依存して増加する傾向を示し，陽性反応と判断した．また，+S9 処理では染色体構造異常の僅かな誘発がみられ疑陽性結果が得られたことから，析出の認められない用量を含む 37.5，75.0，150，300 および 600 μg/mL の 5 用量を用いた確認試験を実施した．その結果，被験物質処理群では陽性判定基準の 10%を超えることはなかったが，染色体構造異常の僅かな誘発（疑陽性：±）が認められた．
また，短時間処理法-S9 処理の陽性対照物質マイトマイシン C（MMC）ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド（CP）は，いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した．

2. 表題

2-エチルアントラキノンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討した.

11. 被験物質

11.1. 被験物質名

2-エチルアントラキノン

【2-Alkyl(C=2)anthraquinone】

11.2. ロット番号

11.3. 純度

99.16 wt%

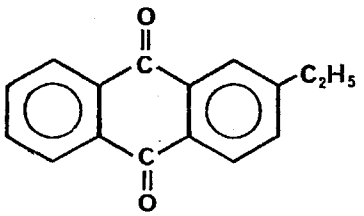
11.4. 保管条件

直射日光が当たらないように保管した.

11.5. CAS 番号

84-51-5

11.6. 構造式又は示性式



11.7. 分子量

236.2

11.8. 不純物の名称および濃度

アントラキノン：0.01%

硫黄分　　：1.4 ppm

塩素分　　：14.3 ppm

11.9. 常温における性状

固体，淡黄色フレーク

11.10. 融点

108～111℃

11.11. 沸点

245℃/20 mmHg

11.12. 溶媒に対する溶解度等

水　　：ほとんど溶けない
DMSO　：可溶
アセトン：可溶

11.13. 安定性

水との反応性　：なし
発火性　　：なし
酸化性　　：なし

11.14. 取り扱い上の注意

吸い込んだり，直接皮膚に触れないよう適切な保護具を着用した.

11.15. 残余被験物質の処理

被験物質の残余は，被験物質提供元に返却した.

12. 試験材料および方法

12.1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから，試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株（CHL 細胞）を選択した．

CHL 細胞は昭和 59 年 11 月 15 日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け，一部についてはジメチルスルホキシド（DMSO：GC 用；Merck KGaA；純度 99.7%以上；Lot No. K23082678 651）を容量比で 10%添加した後，液体窒素中に保存した．試験に際しては凍結細胞を融解し，3～5 日ごとに継代したものを使用した．

なお，細胞増殖抑制試験で継代数 15 の細胞を，染色体異常試験および確認試験ではそれぞれ 13 および 19 の細胞を用いた．

12.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（岩城硝子株式会社；Lot No. 99560002【予備試験および本試験】, I8710【確認試験】）に，メンブランフィルター（孔径 0.45 μm：Featuring Corning and Coastar Products）を用いて濾過除菌した非働化（56℃，30 分）済み仔牛血清（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1019033）を最終濃度で 10%になるよう添加した．調製後の培養液は使用時まで冷暗所（4℃）に保存した．

12.3. 培養条件

CO_2 インキュベーター（Forma および三洋電機メディカシステム株式会社）を用い，CO_2 濃度 5%，37℃の条件で細胞を培養した．

12.4. S9 mix

製造後 6 ヵ月以内の S9 mix（キッコーマン株式会社：Lot No. CAM-397【予備試験および本試験】，CAM-403【確認試験】）を試験に使用した．

12.4.1. S9 の調製方法

調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質ならびに誘導方法等を以下に示す．

		予備試験および本試験	確認試験
a.	ロット番号	RAA-397	RAA-403
b.	調製日	平成 11 年 2 月 5 日 （誘導物質投与開始後 5 日目）	平成 11 年 4 月 23 日
c.	使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系	同左
d.	性／週齢	雄／7 週齢	同左
e.	体重	192～237 g	189～245 g
f.	臓器	肝臓	同左
g.	誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	同左
h.	投与量 および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1 回（1 日目） 60 mg/kg 3 回（2～4 日目） BF: 80 mg/kg 1 回（3 日目）	同左
i.	投与方法	腹腔内投与	同左
j.	蛋白含量	25.40 mg/mL	24.96 mg/mL

12.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す．

S9	0.3	mL
$MgCl_2$	5	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADP	4	μmol
HEPES 緩衝液	4	μmol

12.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に可溶であり，かつ同溶液中で安定であることから，被験物質を DMSO（Merck KGaA；Lot No. K24605778 830）に懸濁させ調製原液とした．この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に順次希釈（295 μg/mL 以下では溶解）した後，直ちに処理を行った．モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO を被験物質の調製に使用した．

12.6. 対照群

12.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒で試験した.

12.6.2. 陽性対照（短時間処理法-S9 処理）

注射用水（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K8F80）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 247AHK）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後，0.1 μg/mL の用量で試験した.

12.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K8F80）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 8016）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後，12.5 μg/mL の用量で試験した.

12.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

12.7.1. 試験用量

予備的な試験（9.72，32.4，108，360 および 1200 μg/mL の 5 用量：公比 10/3）の結果，-S9 処理の 360 μg/mL で細胞が死滅しており（処理後 6 時間時点での観察）+S9 処理の 1200 μg/mL においても中等度の細胞増殖抑制作用が観察された.

本結果を参考に，細胞増殖抑制試験の用量として下記に示した 7 あるいは 10 用量（公比 5/3）を設定した.

試験	用量数	試験用量 (μg/mL)
短時間処理法-S9 処理	7	23.8 ～ 510
短時間処理法+S9 処理	10	23.8 ～ 2362

12.7.2. 使用ウエル数

1 用量当たり 2 ウエルを用いた.

12.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウエルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F：住友ベークライト株式会社）の各ウエルに培養液を用いて 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，培養液 400 μL を除いた後，使用溶媒（以下溶媒）あるいは被験物質液を 6 μL 加えた．6 時間培養を続けた後，各ウエルの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1020975）を用いて細胞を洗浄した．培養液（500 μL）を新鮮なものに交換し，さらに 18 時間培養を続けた後に細胞生存率（陰性対照に対する比）を求めた．

12.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウエルに 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，培養液 500 μL を除き，S9 mix を 100 μL 添加した後，溶媒あるいは被験物質液を 6 μL 加えた．

以下の操作は 12.7.3. に記載の方法に準じた．

12.7.5. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各プレートから培養液を除き，生理食塩液を用いて細胞を 1 回洗浄した．10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. ACG8912）を加えて約 10 分間細胞を固定した後，0.1%クリスタル･バイオレット（関東化学株式会社；Lot No. 607E4067）水溶液で 10 分間染色した．各プレートを水洗した後，十分乾燥させた．各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を 2.0～2.5 mL 加え，5 分間放置した後，580 nm での吸光度を分光光度計（105-50 型；株式会社 日立製作所）を用いて測定した．陰性対照群での吸光度に対する比（＝細胞生存率）を各用量群について求め，さらにプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した．算出には 23.8～510 μg/mL の 7 点（-S9 処理）を用いた．

なお，細胞生存率の平均値は各ウエルの四捨五入する以前の値から求めた．

12.7.6. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1 および Table 1 に示した.

細胞増殖を 50%抑制する濃度は, 短時間処理法-S9 処理で 161 μg/mL と算出された. 一方, +S9 処理の場合, 弱い細胞増殖抑制作用は認められたが, 最高用量である 2362 μg/mL (10 mM 相当) においても 50%以上の抑制を示すことはなかった.

なお, 被験物質暴露終了時, -S9 処理の 23.8 μg/mL 以上および+S9 処理の 66.1 μg/mL 以上で白色膜状の, -S9 処理の 306 μg/mL 以上および+S9 処理の 184 μg/mL 以上の用量では白色粉末状の, さらに+S9 処理の 306 μg/mL 以上では白色塊状の析出がみられた. 本被験物質は高用量群においては懸濁液での処理であったことから両処理法の 510 μg/mL 以上では培養液中に被験物質が残存していた.

12.8. 染色体異常試験 (本試験)

12.8.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に, 各試験系それぞれ 6 および 5 用量(公比 2 : 下表参照) を本試験の用量に設定した.

試験	試験用量 (μg/mL)					
短時間処理法-S9 処理	20.0	<u>40.0</u>	<u>80.0</u>	<u>160</u>	<u>320</u>	<u>640</u>
短時間処理法+S9 処理	148	295	<u>591</u>	<u>1181</u>	<u>2362</u>	

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した.

短時間処理法+S9 処理において染色体構造異常の出現に関し疑陽性 (±) と判定されたことから, 9.38, 18.8, 37.5, 75.0, 150, 300 および 600 μg/mL (公比 2) の 7 用量を用いた確認試験を実施し, 37.5～600 μg/mL の 5 用量について顕微鏡観察を実施した.

12.8.2. 試験プレート数

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた.

12.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート（細胞培養用シャーレ：住友ベークライト株式会社）に 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 5 mL（4×10^4 細胞）を播種し，3 日間培養した．培養終了後，培養液 2 mL を除いた後，溶媒あるいは被験物質液 30 μL または陽性対照物質溶液 300 μL を加えた．6 時間培養を続けた後，各プレートの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1020975【本試験】，1022866【確認試験】）を用いて細胞を洗浄した．培養液（3 mL）を新鮮なものに交換し，さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した．

12.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，培養液 2.5 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後，溶媒あるいは被験物質液 30 μL または陽性対照物質溶液 300 μL を加えた．以下の操作は 12.8.3. に記載の方法に準じた．

12.8.5. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に最終濃度で 0.2 μg/mL となるようコルセミド溶液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1017694【本試験】，1019640【確認試験】）を添加し，細胞分裂を中期で停止させた．次いで，培養液を遠心管に全量移した後，0.25％トリプシン溶液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1022349【本試験】，1017538【確認試験】）を用いてプレートから細胞を剥離し，遠心管内の培養液に加えた．細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後，37℃に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え，37℃中で 16 分間低張処理を行った．遠心分離により低張液を除いた後，4℃に冷却した固定液（メタノール 3 容：酢酸 1 容）で細胞を固定した．固定液を 3 回交換した後，新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし，脱脂洗浄済みのスライドガラス上に 1～2 滴ずつ滴下した．スライド標本を十分乾燥させ，1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 6.8：Merck KGaA；Lot No. S617674 520【本試験】，TP334974 816【確認試験】）を用いて希釈した 1.2％ギムザ染色液（Merck KGaA；Lot No. 640181939【本試験】，840288308【確認試験】）で 12 分間染色した．スライドを軽く水洗した後，乾燥させた．

12.8.6. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照，各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて，ATP フォトメーター（ルミテスター K-100：キッコーマン株式会社）を用いて細胞増殖に関するデータを採取した．なお，細胞生存率の平均値は各プレートの四捨五入する以前の値から求めた．

12.8.7. 染色体の観察

各プレート当たり 100 個，すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下（×600）で観察し，染色体の形態的変化としてギャップ（gap），染色分体切断（ctb），染色体切断（csb），染色分体交換（cte），染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した．ただし，染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し，染色体切断様の像が認められる場合，その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満，かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した．また，数的異常として 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し，倍数体等の出現数についても計数した．

すべての標本をコード化した後，マスキング法で観察した．

12.9. 結果の解析

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った．

異常細胞の出現頻度が 5%未満を陰性，5%以上 10%未満を疑陽性，10%以上，かつ再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合，陽性と判定した．

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった．

12.10. D_{20} 値の算出法

D_{20}値は分裂中期像の20%になんらかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度（mg/mL）であり，最小二乗法により算出した．

13. 試験結果

13.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 2，3，Table 2 および Appendix 1 に示した.

2-エチルアントラキノン処理群での染色体構造異常出現頻度は陰性対照と同等であった. 倍数性細胞の出現頻度は 40.0 μg/mL で 1.5%, 80.0 μg/mL で 8.0%（±），160 μg/mL で 10.5%（+）を示した．また，試験用量に依存した細胞増殖抑制作用が認められ，320 μg/mL での細胞生存率は 10.1% まで減少し，171 細胞のみ染色体異常の観察が可能であった．最高用量の 640 μg/mL では析出物の一部が浮遊したため，細胞生存率が上昇していた. 一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され，その出現頻度は 47.5%であった.

なお, 被験物質暴露終了時においてすべての用量で白色膜状等の析出物が認められた．また，高用量では懸濁液での処理であったことから白色粉末状の被験物質が残存していた.

13.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 4，Table 3 および Appendix 2 に示した.

2-エチルアントラキノン処理群での染色体構造異常の出現頻度は，591 μg/mL で 6.5%（±），1181 μg/mL で 4.5%，2362 μg/mL で 5.0%（±）を示した．倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照群と同等であった．また，被験物質処理による強い細胞増殖抑制作用は観察されなかった.

一方，陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 73.5%であった.

なお, 被験物質暴露終了時においてすべての用量で白色膜状等の析出物が認められた．また，高用量では懸濁液での処理であったことから白色粉末状の被験物質が残存していた.

13.3. 確認試験（短時間処理法+S9 処理）

試験結果を Figure 5，Table 4 および Appendix 3 に示した．

被験物質処理群での染色体構造異常は 37.5 μg/mL で 1.0%，75.0 μg/mL で 3.0%，150 μg/mL で 7.0%（±），300 μg/mL で 7.5%（±）および 600 μg/mL で 6.5%（±）であった．倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照群と同等であった．また，被験物質処理による強い細胞増殖抑制作用は観察されなかった．

一方，陽性対照での染色体構造異常出現頻度は 51.5%であった．

なお，被験物質暴露終了時 75.0 μg/mL 以上の用量で白色膜状等の析出物が認められた．また，高用量では懸濁液での処理であったことから白色粉末状の被験物質が残存していた．

13.4. D_{20} 値算出結果

本染色体異常試験結果から算出した D_{20} 値（mg/mL）は次の通りであった．

試験系	異常の種類	D_{20} 値
短時間処理法-S9 処理	数的異常	0.290

14. 考察および結論

2-エチルアントラキノンの変異原性，すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため，培養細胞（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した．

細胞増殖抑制試験結果を基に，短時間処理法-S9 処理で細胞の増殖が抑制される用量，また，+S9 処理では 10 mM 相当の 2362 μg/mL まで検討した．その結果，2-エチルアントラキノン処理では-S9 処理で倍数性細胞の誘発が認められ，用量依存性もみられることから陽性反応と判断した．また，+S9 処理では染色体構造異常の僅かな誘発が認められ疑陽性と判定されたことから確認試験を実施した．その結果，陽性判定基準の 10%を超えることはなかったが，染色体構造異常の誘発に再現性が認められた．また，変異原性の強さに関する相対的比較値である D_{20} 値は 0.290（mg/mL）と算出され，既知変異原性物質に比較して 2-エチルアントラキノンの変異原性は弱いことを示していた．

本被験物質（2-エチルアントラキノン）の変異原性に関する報告はなかったが，類縁体である Anthraquinone については Ames 試験で陽性 [1]，2-Aminoanthraquinone は染色体異常試験で陽性 [1]，1,4-Diaminoanthraquinone は Ames 試験および染色体異常試験で陽性 [1]，1-Aminoanthraquinone は Ames 試験で陽性 [2]，染色体異常試験で陰性 [2] との報告があった．

一方，陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり，本試験が有効であることを示していた．

以上の試験結果から，本試験条件下において 2-エチルアントラキノンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常（数的異常）誘発性は陽性と判定した．

15. 参考文献

1) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課　監修：労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集，社団法人日本化学物質安全・情報センター，1996.

2) 厚生省生活衛生局企画課生活科学安全対策室　監修：化学物質毒性試験報告，Vol. 3，化学物質点検推進連絡協議会，1996.

Exp. No. 4184 (115-102)

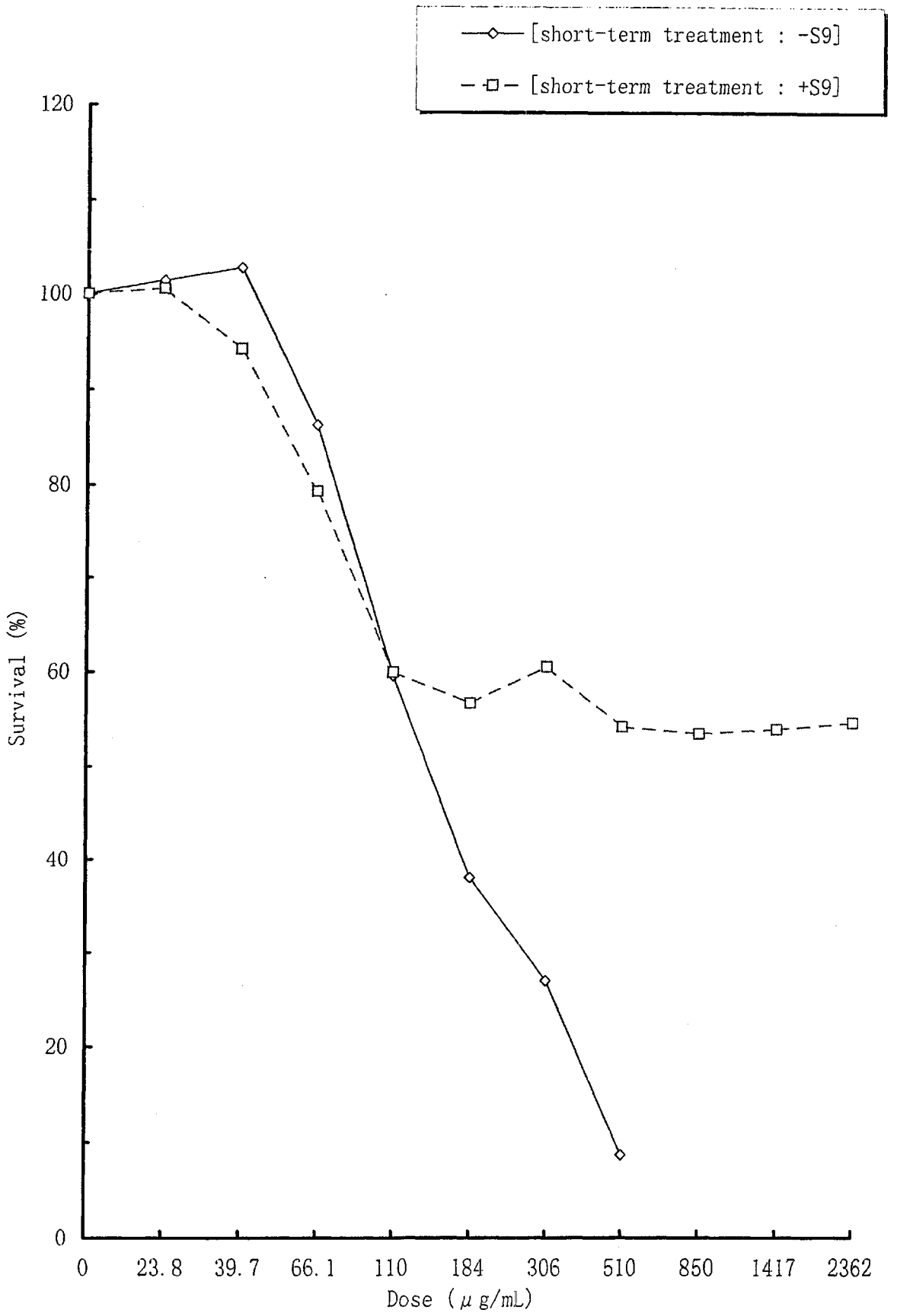


Figure 1. Dose-survival curves of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment]

Exp. No. 4184 (115-102)

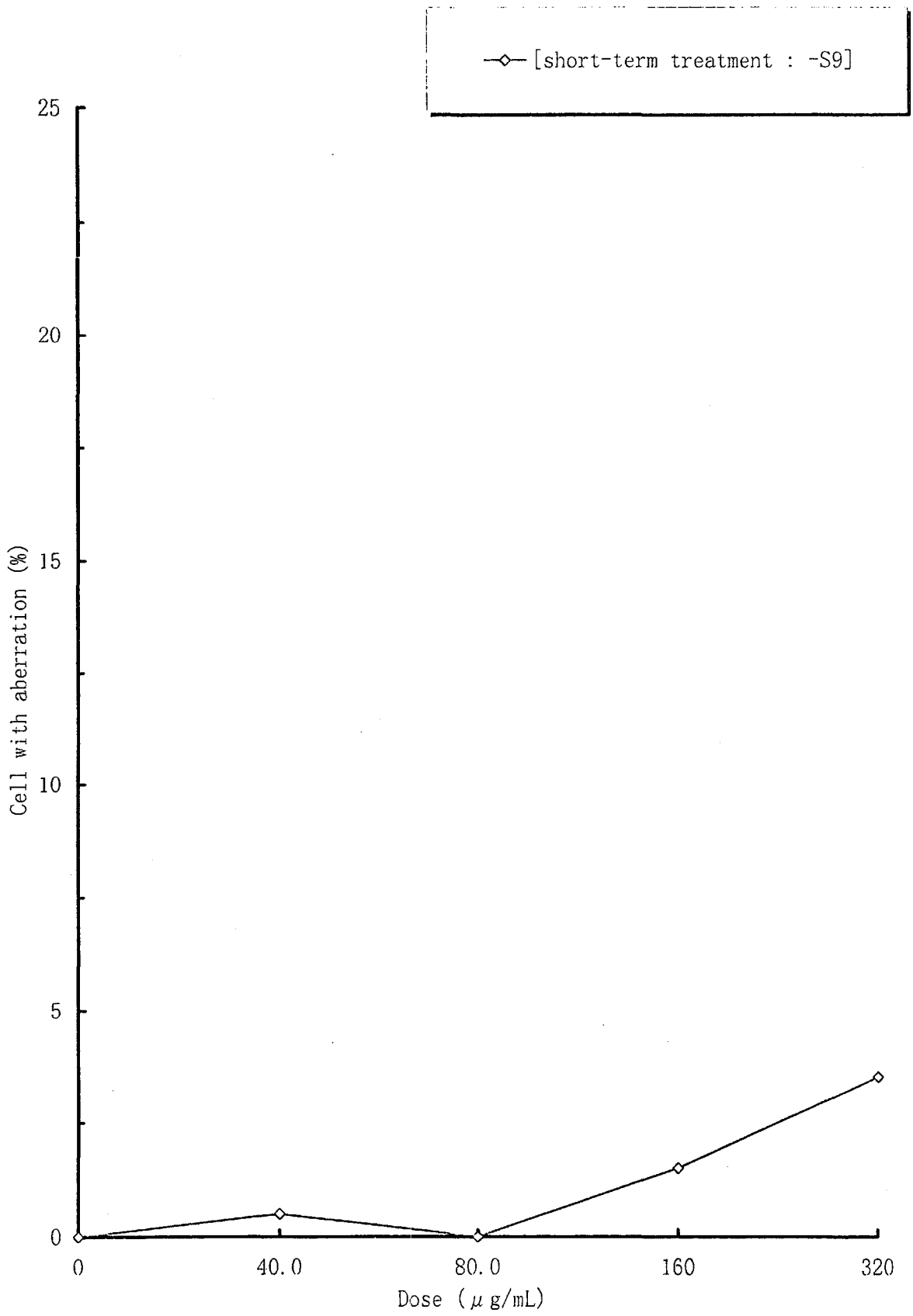


Figure 2. Incidence of structural aberrations induced by 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment:-S9]

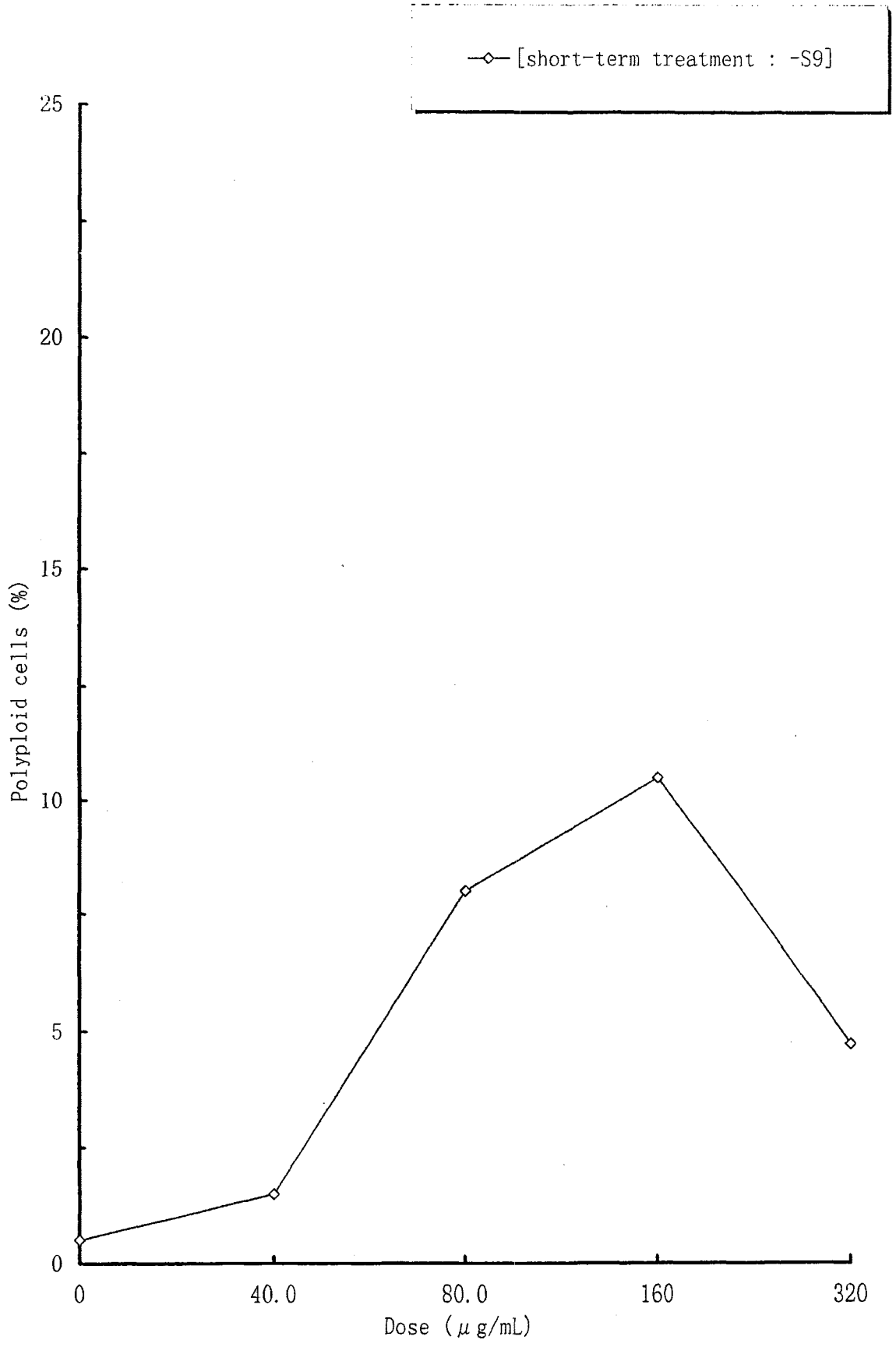


Figure 3. Incidence of polyploid cells induced by 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment:-S9]

Exp. No. 4184 (115-102)

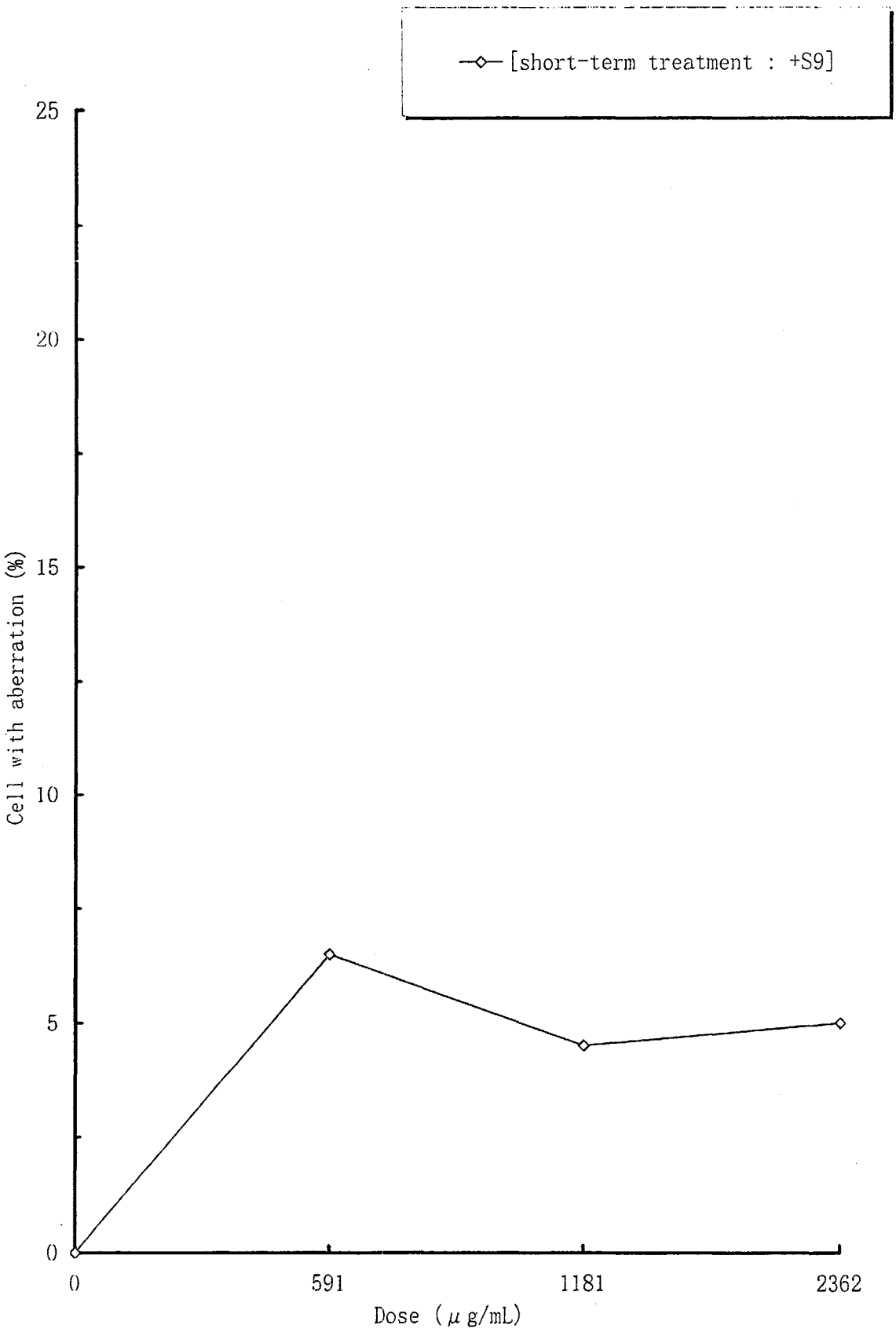


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment:+S9]

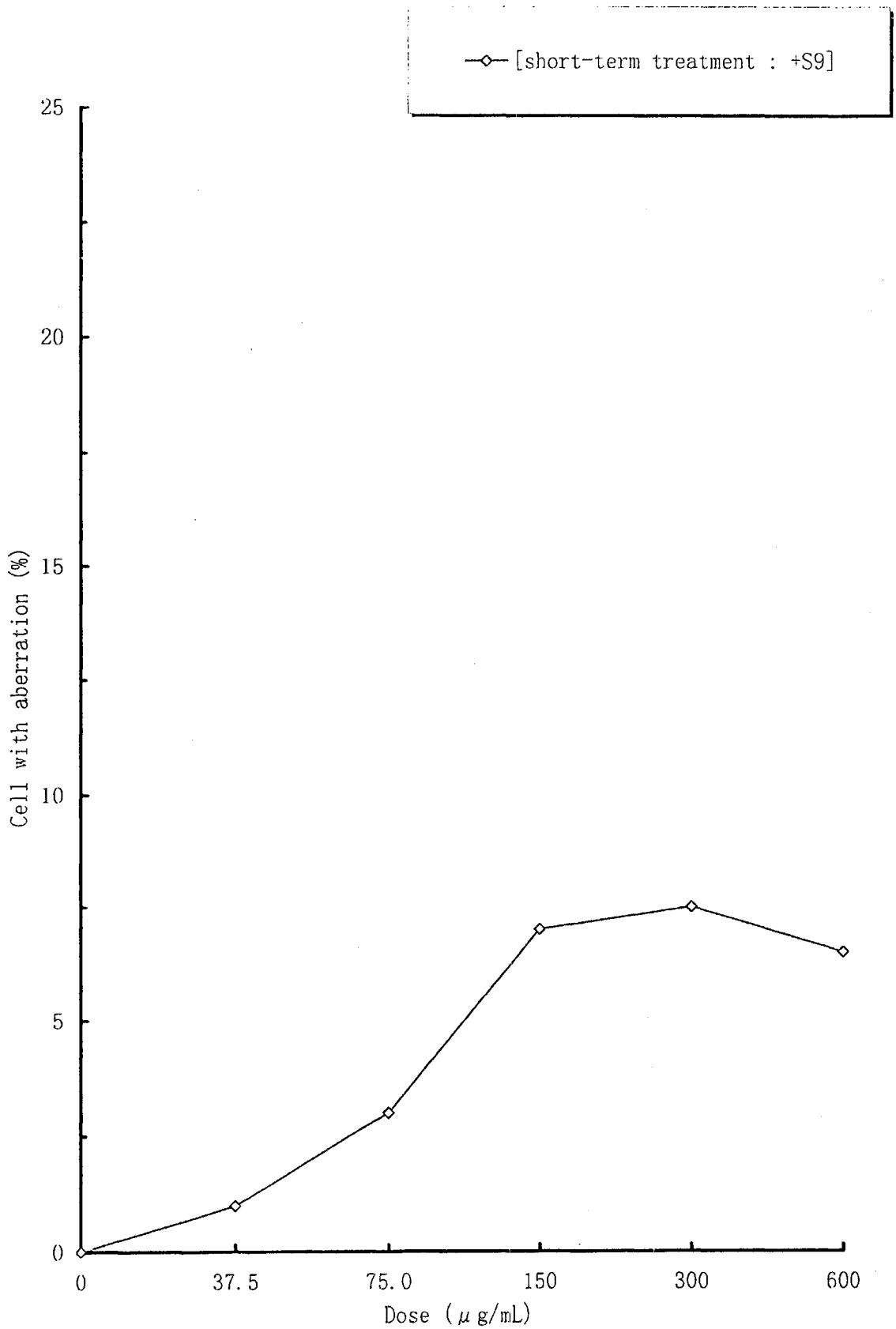


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by 2-Alkyl(C=2)anthraquinone (confirmative examination) [short-term treatment:+S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment] Exp. No. 4184 (115-102)

[short-term treatment : -S9]

Compound	Dose (μg/mL)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	23.8 d)	101.4 101.5	[101.5]
	39.7 d)	102.6 103.0	[102.8]
	66.1 d)	87.4 85.3	[86.4]
	110 d)	62.3 56.9	[59.6]
	184 d)	35.6 40.5	[38.1]
	306 d)	25.0 29.1	[27.1]
	510 d)	9.3 8.1	[8.7]

[short-term treatment : +S9]

Compound	Dose (μg/mL)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	23.8	101.4 99.7	[100.6]
	39.7	93.5 95.0	[94.3]
	66.1 d)	82.3 76.3	[79.3]
	110 d)	61.5 58.5	[60.0]
	184 d)	55.6 57.9	[56.8]
	306 d)	59.9 61.2	[60.6]
	510 d)	53.9 54.6	[54.3]
	850 d)	53.9 53.3	[53.6]
	1417 d)	54.0 54.0	[54.0]
	2362 d)	54.7 54.7	[54.7]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[short-term treatment : -S9] ——— 161.14 (μg/mL)
[short-term treatment : +S9] ——— Not inhibited

a) : Negative control
d) : Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment : -S9]

Exp. No. 4184 (115-102)

Compound	Dose (μg/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	0.5 −	−
Test substance	40.0 d)	126.6	200	0	0	1	0	0	0	0.5 −	1.5 −	−
	80.0 d)	96.3	200	2	0	0	0	0	0	0.0 −	8.0 ±	±(P)
	160 d)	54.2	200	0	0	3	0	0	0	1.5 −	10.5 +	+(P)
	320 d)	10.1	171	2	1	5	0	0	1	3.5 −	4.7 −	−
	640 d)	47.4	NE									
MMC b)	0.1	79.9	200	10	31	81	0	2	0	47.5 +	0.0 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a) : Negative control
b) : Positive control (Mitomycin C)
d) : Visible precipitation was occurred at the end of exposure period
NE : Not examined
(P): Only polyploid cells were induced

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment : +S9]

Exp. No. 4184 (115-102)

Compound	Dose (μg/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	0.0 −	−
Test substance	591 d)	66.2	200	2	2	9	0	2	0	6.5 ±	2.5 −	±
	1181 d)	61.8	200	1	1	8	1	0	0	4.5 −	2.0 −	−
	2362 d)	67.7	200	4	2	8	0	0	0	5.0 ±	2.0 −	±
CP b)	12.5	62.5	200	11	37	144	1	0	0	73.5 +	0.0 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Negative control
b): Positive control (Cyclophosphamide)
d): Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

Table 4. Results of the confirmative examination of 2-Alkyl(C=2)anthraquinone [short-term treatment : +S9]

Exp. No. 4184 (115-102)

Compound	Dose (μg/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	0.5 −	−
Test substance	37.5	79.2	200	0	0	2	0	0	0	1.0 −	2.0 −	−
	75.0 d)	81.5	200	0	2	5	0	0	0	3.0 −	2.5 −	−
	150 d)	65.2	200	0	7	8	0	0	0	7.0 ±	2.0 −	±
	300 d)	60.1	200	2	5	11	0	1	0	7.5 ±	1.5 −	±
	600 d)	50.4	200	1	1	12	0	0	0	6.5 ±	3.5 −	±
CP b)	12.5	107.7	200	5	16	95	0	0	0	51.5 +	0.0 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Negative control
b): Positive control (Cyclophosphamide)
d): Visible precipitation was occurred at the end of exposure period