



2007年3月23日

ピグメントブルー29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

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

## 目次

|               |   |
|---------------|---|
| 要約            | 1 |
| 試験目的          | 1 |
| 材料と方法         | 2 |
| 1. 被験物質       | 2 |
| 2. 陽性対照物質     | 2 |
| 3. 細胞と培養条件    | 2 |
| 4. S9 反応液の調製  | 2 |
| 5. 被験物質調製液の調製 | 3 |
| 6. 細胞増殖抑制試験   | 3 |
| 7. 染色体異常試験    | 3 |
| 8. 染色体分析      | 5 |
| 試験成績と考察       | 5 |
| 参考文献          | 6 |
| Figure        | 7 |
| Tables        | 8 |

## 要約

ピグメントブルー29のチャイニーズ・ハムスター雌肺由来細胞(CHL/IU細胞)を用いる染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を検討した。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理における最高処理濃度をS9 mix存在下では5.0 mg/mL、S9 mix非存在下では0.60 mg/mLとし、公比2で計4ないし5段階の濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。しかしながら、S9 mix非存在下で短時間処理した場合には、0.60 mg/mLの濃度においても50%を越える増殖抑制作用が得られず、また、濃度設定を変更して実施した再試験では分析可能な3濃度群を得ることができなかった。そこで、S9 mix非存在下の短時間処理では5.0 mg/mLを最高処理濃度とし、また、24時間連続処理では1.0 mg/mLを最高処理濃度として、公比2で計8濃度群を設定して3回目の染色体異常試験を行った。

細胞増殖率および分裂指数の結果をもとに以下の観察対象群を決定し、染色体分析を行った。

S9 mix非存在下の短時間処理:0.078、0.16、0.31 mg/mL

S9 mix存在下の短時間処理:1.3、2.5、5.0 mg/mL

24時間連続処理:0.031、0.063、0.13 mg/mL

その結果、すべての処理条件のいずれの濃度群においても構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、S9 mix非存在下で短時間処理した全群、および24時間連続処理した中濃度群および高濃度群で倍数細胞の統計学的に有意な増加(出現率は2.8~7.6%)が認められた。

なお、肉眼で培養液中における沈殿の有無を確認した結果、処理開始時では0.063 mg/mL以上の濃度群で、処理終了時ではすべての処理群で沈殿が認められた。

以上の結果より、ピグメントブルー29は、本試験条件においてCHL/IU細胞に染色体の構造異常を誘発しないが、倍数性細胞を誘発すると結論した。

## 試験目的

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、ピグメントブルー29の染色体異常誘発作用を評価するため、CHL/IU細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

## 材料と方法

### 1. 被験物質

被験物質であるピグメントブルー29[別名(製品名):群青 No. 8000、略称:PB29、英名:C.I. Pigment Blue 29]は、青色粉末で、

から提供を受けた。被験物質の物理化学的性状等をAppendix 1に示す。被験物質は、使用時まで直射日光、高温多湿を避け室温保管した。

被験物質提供者において、実験終了後に返却した被験物質を非GLP下で分析した結果、被験物質の組成に変化が認められず、実験期間中安定であったことが確認された(Appendix 2)。なお、被験物質原体の安定性についてはGLP下での確認はされていないが、化学的根拠に基づいた資料であることから、実験期間中安定であり、本試験の信頼性に影響しないと判断した。

### 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(MMC、ロット番号:428ACI、協和醗酵工業)およびシクロホスファミド(CP、ロット番号:091K1176、Sigma Chemical)を日局注射用水(ロット番号:K4I81 および K4L72、大塚製薬工場)に溶解し、用時調製して試験に用いた。

### 3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが25本で我が国において染色体異常の検出に常用されている。この細胞をJCRB細胞バンクより入手(1988年2月10日入手、入手時の継代数4)し、継代後、液体窒素(-196℃)中に凍結保存(現在の継代数23)した。その細胞(倍加時間約15時間、マイコプラズマの汚染なし)を、解凍後、継代3代(細胞増殖抑制試験)、6代、2代、6代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:28019903、Cansera International)を10 vol%添加したイーグルMEM培養液(10%CS/MEM)を用い、CO<sub>2</sub>インキュベーター(5%CO<sub>2</sub>、37℃、加湿条件下)内で培養した。イーグルMEM培養液は、製造元(日水製薬)の処方に従ってイーグルMEM培地「ニッスイ」①粉末(日水製薬)、L-グルタミン(日水製薬)およびNaHCO<sub>3</sub>を混合して調製したものをを用いた。

### 4. S9反応液の調製

S9(ロット番号:RAA-516、2005年2月4日製造、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、使用時まで超低温槽(-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<sup>+</sup>、オリエンタル酵母工業)およびKClを超純水に溶かし、混合液として超低温槽(-80℃)に保管し、使用時はこれにS9、MgCl<sub>2</sub>およびHEPES(pH 7.2)を加え、S9 mixとした。試験には、10%CS/MEM:S9 mixを22:5の割合で混和したS9反応液(2.7 mL/ディッシュ)を加えて処理

を行った(各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、0.83 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

#### 5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度で水、ジメチルスルホキシドおよびアセトンのいずれの溶媒にも不溶であったことから、懸濁用媒体としてカルボキシメチルセルロースナトリウム(ロット番号:WAP0390、和光純薬工業)の0.5 w/v%水溶液(0.5%CMC Na)を用いた。被験物質を必要量秤量し、媒体を加えて懸濁させ、原液(細胞増殖抑制試験および染色体異常試験ともに50 mg/mL)を用時調製し、それを媒体で段階希釈して種々の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を10 vol%添加して処理を行った。

なお、被験物質調製液の調製時に、均一であること、発熱、発泡および変色のような変化の無いことを目視により確認した。

#### 6. 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細胞に0.25%トリプシンを作用させ、 $4 \times 10^3$ 個/mLの単一細胞浮遊懸濁液を調製し、その5 mL( $2 \times 10^4$ 個)をプラスチックディッシュ(直径6 cm)に播種した。培養開始3日目に、以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。すべての処理条件において、試験法ガイドラインに従い5.0 mg/mLの濃度を最高処理濃度とし、0.16~5.0 mg/mLの濃度範囲(公比2)で処理を行った。各群2枚のディッシュを用いた。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ10%CS/MEMおよびS9反応液と交換(2.7 mL/ディッシュ)した後、媒体(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液(0.3 mL)を各ディッシュに添加し6時間処理した。処理後、リン酸緩衝塩類溶液(PBS、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含む)で細胞を洗浄し、10%CS/MEM(5 mL/ディッシュ)でさらに18時間培養した。また、連続処理する場合には、各ディッシュの培養液を10%CS/MEMと交換(4.5 mL/ディッシュ)した後、媒体(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液(0.5 mL)を各ディッシュに添加し24時間処理した。また、培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた結果、すべての処理群で処理開始時および処理終了時ともに沈殿が認められた。

培養終了後、培養液を捨て、0.02w/v%EDTA含有PBS(Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>不含)をディッシュあたり5 mL加えてピペッティングにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に加えた。その細胞懸濁液0.5 mLをISOTON®II(Beckman Coulter)9 mLに加えたのち、コールターカウンター(Model D、Coulter Electronics)を用いてディッシュあたりの細胞数を測定し、被験物質処理群の陰性(媒体)対照群に対する相対増殖率を求めた。

#### 7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験において、ピグメントブルー29はS9 mix存在下で短時間処理した場合には50%

を越える増殖抑制作用を示さなかった。一方、S9 mix 非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には、低濃度域では増殖率が低下したが、0.63 mg/mL 以上の濃度域では増殖率はあまり変化しなかった (Fig. 1)。増殖率 50%を挟む 2 点の回帰直線式から 50%の増殖抑制濃度を算出した結果、50%の増殖抑制濃度は、S9 mix 非存在下の短時間処理では 0.31 mg/mL および 24 時間連続処理では 0.22 mg/mL と推定された。

このことから S9 mix 非存在下での短時間処理では 50%の増殖抑制濃度の約 2 倍の濃度を最高処理濃度 (0.60 mg/mL) とし、S9 mix 存在下での短時間処理では試験法ガイドラインに従い 5.0 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で計 4 ないし 5 濃度設定して染色体異常試験を実施した。しかしながら、S9 mix 非存在下で短時間処理した結果、0.60 mg/mL の濃度においても 50%を越える増殖抑制作用が得られず (増殖率:72%)、さらに高い濃度ではより強い増殖抑制作用を示す可能性があることから、試験法ガイドラインに従い、5.0 mg/mL を最高処理濃度として再試験を実施した。しかし、設定した濃度範囲 (0.078~5.0 mg/mL、公比 2) では、分析可能な 3 濃度群が得られなかった。そこで、濃度範囲を再度変更 (0.039~5.0 mg/mL、公比 2) して 3 回目の染色体異常試験を行った。その際、24 時間連続処理による試験も同時に実施した。24 時間連続処理の処理濃度は、50%の増殖抑制濃度の約 4 倍の濃度を最高処理濃度 (1.0 mg/mL) とし、0.0078~1.0 mg/mL の濃度範囲 (公比 2) で処理を行った。

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 (媒体) 対照群と陽性対照群を設けた。各群 2 枚のディッシュを用いた。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、被験物質調製液の代わりに日局注射用水を 10 vol%加え、さらに MMC (20  $\mu$ g/mL) を最終濃度がそれぞれ 0.1  $\mu$ g/mL および 0.05  $\mu$ g/mL となるように添加した。また、S9 mix 存在下の短時間処理では、日局注射用水を 10 vol%加え、さらに CP (1 mg/mL) を最終濃度が 10  $\mu$ g/mL となるように添加した。なお、MMC および CP は上記の濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1  $\mu$ g/mL となるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、0.02 w/v% EDTA 含有 PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ および  $\text{Mg}^{2+}$  不含) をディッシュあたり 5 mL 加えてピペッティングにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。陰性対照群および被験物質処理群については、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON<sup>®</sup>II に加え、コールターカウンターを用いて細胞数の測定を行った。残りの細胞懸濁液については、遠沈 (1000~1500 rpm、約 5 分) し、上清を捨てた後、3 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約 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 6~7 mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作を数回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、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 4~6 枚のスライド標本作製した。なお、20%未満の相対増殖率 (80%を超える増殖抑制) を示す被験物質処理群については、染色体標本作製しないこととした。

作製したスライド標本を 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) で染色後、水道水ですすいで風乾した。

## 8. 染色体分析

染色体分析に先立ち、1枚のディッシュから得られた1枚の標本を用いて、濃度の高い方から分裂指数(500細胞/標本)を分析した。0.5%未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、また、標本あたりの分析可能な分裂中期細胞が少ない場合にはその数を考慮して、分析可能な最高濃度群を決定することとした。なお、S9 mix 非存在下で短時間処理した1.3 mg/mLの一方のディッシュから作製した標本については、428細胞しか分裂指数を分析できなかった。

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の分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1群あたり200個(100細胞/ディッシュ、25細胞/観察者)の分裂中期細胞(染色体数:23~27本)について構造異常の種類と数を、1群あたり800個(400細胞/ディッシュ、100細胞/観察者)の分裂中期細胞について倍数性細胞(染色体数が38本以上)の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く染色体異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行った。染色分体幅より狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

染色体の構造異常(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<sup>2)</sup>( $p < 0.01$ 、片側)により有意差検定を実施した。また、有意差の認められた処理条件については、その用量依存性についてコクラン・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup>( $p < 0.01$ 、片側)を実施することとした。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総合的に行った。

## 試験成績と考察

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理における処理濃度を設定したが、S9 mix 非存在下の短時間処理群では設定した濃度範囲で50%を越える増殖抑制作用が得られなかったこと、および分析可能な3濃度群が得られなかったことから、最終的には公比2で以下の濃度群で実施した染色体異常試験結果を採用した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.039、0.078、0.16、0.31、0.63、1.3、2.5、5.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.63、1.3、2.5、5.0 mg/mL

24 時間連続処理:0.0078、0.016、0.031、0.063、0.13、0.25、0.50、1.0 mg/mL

なお、沈殿の有無を肉眼で観察した結果、0.063 mg/mL 以上の濃度では、処理開始時にも培養液中に沈殿が認められたが、処理終了時には設定したすべての処理群で培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに、観察対象群を以下のように決定し、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.078、0.16、0.31 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理: 1.3、2.5、5.0 mg/mL

24 時間連続処理: 0.031、0.063、0.13 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合には、いずれの処理群においても構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかったが、倍数性細胞は濃度依存的に増加(出現率:3.8~7.6%)し、すべての処理群において統計学的な有意差が認められ、陽性の結果が得られた(Table 1)。

S9 mix 存在下で短時間処理した場合には、いずれの処理群においても構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった(Table 2)。

24 時間連続処理した場合には、いずれの処理群においても構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかったが、倍数性細胞は濃度依存的に増加(出現率:1.3~3.8%)し、中濃度群および高濃度群において統計学的な有意差が認められ、陽性の結果が得られた(Table 3)。

陽性の結果が得られた S9 mix 存在下の短時間処理および 24 時間連続処理の倍数性細胞誘発に関して D20 値<sup>4)</sup>を求めたところ、それぞれ 0.89 mg/mL および 0.71 mg/mL となった。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理において染色体の構造異常を誘発し(Tables 1、3)、CP は短時間処理の S9 mix 存在下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。

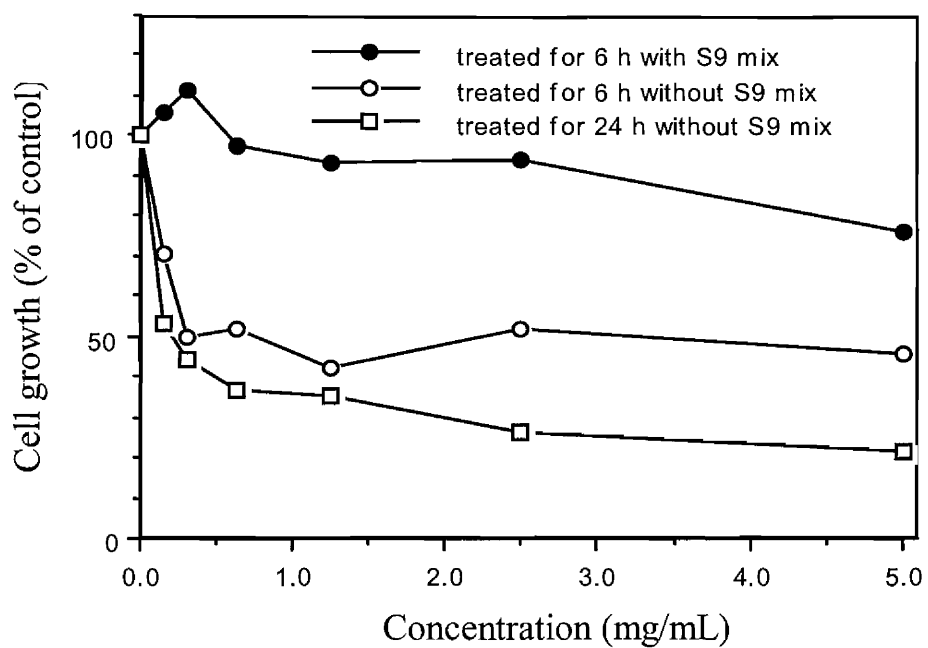
なお、ピグメントブルー29 については、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号:M-04-074)で陰性の結果が得られていることから、染色体の数的異常は誘発するものの、遺伝子変異および染色体の構造的な変異を誘発しないことが示唆された。

以上の結果より、ピグメントブルー29 は本試験条件において CHL/IU 細胞に染色体の構造異常を誘発しないが、倍数性細胞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」, サイエントリスト社, 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:「<改訂> 染色体異常試験データ集」, エル・アイ・シー, 東京(1987)





**Figure 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with C. I. pigment blue 29**  
 Precipitation was observed at all dosage groups at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with C.I. pigment blue29 (PB29)\*\* for 6 h without S9 mix

| Group                  | Concentration (mg/mL) | S 9 mix | Time of exposure (h) | Concurrent <sup>2)</sup> cell growth (%) | Mitotic <sup>3)</sup> index (%) | Number of cells analyzed                           | Number of structural aberrations |     |     |     |     |                   |       | Others <sup>5)</sup> | Number of cells with aberrations |              | Number <sup>6)</sup> of polyploid cells (%) | Trend test <sup>7)</sup> |     |  |
|------------------------|-----------------------|---------|----------------------|--|---------------------------------|--|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|----------------------------------|--------------|---|--------------------------|-----|--|
|                        |                       |         |                      |  |                                 |  | gap                              | ctb | cte | csb | cse | mul <sup>4)</sup> | total |                      | +gap (%)                         | -gap (%)     |   | -gap                     | POL |  |
| Negative <sup>1)</sup> | 0                     | -       | 6 - (18)             | 100                                      | —                               | 100  | 1                                | 0   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 1     | 0                    | 1 ( 1.0 )                        | 0 ( 0.0 )    | 1 ( 0.3 )                                   |                          |     |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100  | 1                                | 1   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 2     | 0                    | 2 ( 2.0 )                        | 1 ( 1.0 )    | 4 ( 1.0 )                                   |                          |     |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200  | 2                                | 1   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 3     | 0                    | 3 ( 1.5 )                        | 1 ( 0.5 )    | 5 ( 0.6 )                                   |                          |     |  |
| PB29                   | 0.039 <sup>pe</sup>   | -       | 6 - (18)             | 90                                       | —                               | not observed                                       |                                  |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |              |   |                          |     |  |
| PB29                   | 0.078 <sup>pbe</sup>  | -       | 6 - (18)             | 84                                       | —                               | 100  | 1                                | 1   | 0   | 0   | 1   | 0                 | 3     | 0                    | 3 ( 3.0 )                        | 2 ( 2.0 )    | 8 ( 2.0 )                                   |                          |     |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100  | 0                                | 1   | 1   | 1   | 0   | 0                 | 3     | 0                    | 3 ( 3.0 )                        | 3 ( 3.0 )    | 22 ( 5.5 )                                  |                          |     |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200  | 1                                | 2   | 1   | 1   | 1   | 0                 | 6     | 0                    | 6 ( 3.0 )                        | 5 ( 2.5 )    | 30 *( 3.8 )                                 |                          |     |  |
| PB29                   | 0.16 <sup>pbe</sup>   | -       | 6 - (18)             | 65                                       | —                               | 100  | 2                                | 0   | 1   | 0   | 0   | 0                 | 3     | 0                    | 3 ( 3.0 )                        | 1 ( 1.0 )    | 15 ( 3.8 )                                  |                          |     |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100  | 0                                | 4   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 4     | 0                    | 4 ( 4.0 )                        | 4 ( 4.0 )    | 23 ( 5.8 )                                  |                          |     |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200  | 2                                | 4   | 1   | 0   | 0   | 0                 | 7     | 0                    | 7 ( 3.5 )                        | 5 ( 2.5 )    | 38 *( 4.8 )                                 |                          |     |  |
| PB29                   | 0.31 <sup>pbe</sup>   | -       | 6 - (18)             | 56                                       | 2.8, 2.8                        | 100  | 2                                | 3   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 5     | 0                    | 5 ( 5.0 )                        | 3 ( 3.0 )    | 30 ( 7.5 )                                  | NA                       | +   |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100  | 2                                | 1   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 3     | 0                    | 2 ( 2.0 )                        | 1 ( 1.0 )    | 31 ( 7.8 )                                  |                          |     |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200  | 4                                | 4   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 8     | 0                    | 7 ( 3.5 )                        | 4 ( 2.0 )    | 61 *( 7.6 )                                 |                          |     |  |
| PB29                   | 0.63 <sup>pbe</sup>   | -       | 6 - (18)             | 57                                       | 1.4, 0.4                        | not observed due to the small number of metaphases |                                  |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |              |   |                          |     |  |
| PB29                   | 1.3 <sup>pbe</sup>    | -       | 6 - (18)             | 61                                       | 0.6, 0.2 <sup>8)</sup>          | not observed due to the small number of metaphases |                                  |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |              |   |                          |     |  |
| PB29                   | 2.5 <sup>pbe</sup>    | -       | 6 - (18)             | 61                                       | 0.8, 0.2                        | not observed due to the small number of metaphases |                                  |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |              |   |                          |     |  |
| PB29                   | 5.0 <sup>pbe</sup>    | -       | 6 - (18)             | 54                                       | 1.2, 1.6                        | not observed due to the small number of metaphases |                                  |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |              |   |                          |     |  |
| MMC                    | 0.1 µg/mL             | -       | 6 - (18)             | —  | —                               | 100  | 1                                | 19  | 21  | 2   | 1   | 0                 | 44    | 0                    | 34 ( 34.0 )                      | 33 ( 33.0 )  | 0 ( 0.0 )                                   |                          |     |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100  | 2                                | 16  | 27  | 3   | 0   | 0                 | 48    | 0                    | 41 ( 41.0 )                      | 39 ( 39.0 )  | 1 ( 0.3 )                                   |                          |     |  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200  | 3                                | 35  | 48  | 5   | 1   | 0                 | 92    | 0                    | 75 ( 37.5 )                      | 72 *( 36.0 ) | 1 ( 0.1 )                                   |                          |     |  |

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; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Carboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test (p<0.01, one-side). 8) Four hundred and twenty-eight cells were analyzed.

\*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

\*\* , PB29 is composed of SiO<sub>2</sub> (39.60%), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (23.68%), Na<sub>2</sub>O (22.69%), S (12.10%) and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.43%).

pe, Precipitation was observed at the end of the treatment in the medium by the naked eye.

pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with C.I. pigment blue 29 (PB29)\*\* for 6 h with S9 mix

| Group                  | Concentration (mg/mL) | S 9 mix | Time of exposure (h) | Concurrent <sup>2)</sup> cell growth (%) | Mitotic <sup>3)</sup> index (%) | Number of cells analyzed | Number of structural aberrations |     |     |     |     |                   |       | Others <sup>5)</sup> | Number of cells with aberrations |              | Number <sup>6)</sup> of polyploid cells (%) | Trend test <sup>7)</sup> |     |
|------------------------|-----------------------|---------|----------------------|--|---------------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|----------------------------------|--------------|---|--------------------------|-----|
|                        |                       |         |                      |  |                                 |                          | gap                              | ctb | cte | csb | cse | mul <sup>4)</sup> | total |                      | +gap (%)                         | -gap (%)     |   | -gap                     | POL |
| Negative <sup>1)</sup> | 0                     | +       | 6 - (18)             | 100                                      | —                               | 100                      | 0                                | 1   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 1     | 0                    | 1 ( 1.0 )                        | 1 ( 1.0 )    | 1 ( 0.3 )                                   |                          |     |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100                      | 0                                | 0   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 0     | 0 ( 0.0 )            | 0 ( 0.0 )                        | 1 ( 0.3 )    |   |                          |     |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200                      | 0                                | 1   | 0   | 0   | 0   | 1                 | 0     | 1 ( 0.5 )            | 1 ( 0.5 )                        | 2 ( 0.3 )    |   |                          |     |
| PB29                   | 0.63 <sup>Pbc</sup>   | +       | 6 - (18)             | 92                                       | —                               | not observed             |                                  |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |              |   |                          |     |
| PB29                   | 1.3 <sup>Pbc</sup>    | +       | 6 - (18)             | 94                                       | —                               | 100                      | 0                                | 1   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 1     | 0                    | 1 ( 1.0 )                        | 1 ( 1.0 )    | 1 ( 0.3 )                                   |                          |     |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100                      | 0                                | 0   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 0     | 0 ( 0.0 )            | 0 ( 0.0 )                        | 1 ( 0.3 )    |   |                          |     |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200                      | 0                                | 1   | 0   | 0   | 0   | 1                 | 0     | 1 ( 0.5 )            | 1 ( 0.5 )                        | 2 ( 0.3 )    |   |                          |     |
| PB29                   | 2.5 <sup>Pbc</sup>    | +       | 6 - (18)             | 78                                       | —                               | 100                      | 2                                | 1   | 0   | 1   | 0   | 0                 | 4     | 0                    | 4 ( 4.0 )                        | 2 ( 2.0 )    | 3 ( 0.8 )                                   |                          |     |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100                      | 1                                | 0   | 0   | 0   | 0   | 1                 | 0     | 1 ( 1.0 )            | 0 ( 0.0 )                        | 2 ( 0.5 )    |   |                          |     |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200                      | 3                                | 1   | 0   | 1   | 0   | 5                 | 0     | 5 ( 2.5 )            | 2 ( 1.0 )                        | 5 ( 0.6 )    |   |                          |     |
| PB29                   | 5.0 <sup>Pbc</sup>    | +       | 6 - (18)             | 76                                       | 5.8, 6.2                        | 100                      | 1                                | 2   | 2   | 1   | 0   | 0                 | 6     | 0                    | 5 ( 5.0 )                        | 4 ( 4.0 )    | 1 ( 0.3 )                                   | NA                       | NA  |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100                      | 0                                | 0   | 1   | 3   | 0   | 0                 | 4     | 0                    | 3 ( 3.0 )                        | 3 ( 3.0 )    | 0 ( 0.0 )                                   |                          |     |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200                      | 1                                | 2   | 3   | 4   | 0   | 10                | 0     | 8 ( 4.0 )            | 7 ( 3.5 )                        | 1 ( 0.1 )    |   |                          |     |
| CP                     | 10 µg/mL              | +       | 6 - (18)             | —  | —                               | 100                      | 0                                | 19  | 54  | 2   | 0   | 0                 | 75    | 0                    | 54 ( 54.0 )                      | 54 ( 54.0 )  | 0 ( 0.0 )                                   |                          |     |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 100                      | 1                                | 13  | 26  | 2   | 0   | 0                 | 42    | 0                    | 36 ( 36.0 )                      | 36 ( 36.0 )  | 0 ( 0.0 )                                   |                          |     |
|                        |                       |         |                      |  |                                 | 200                      | 1                                | 32  | 80  | 4   | 0   | 0                 | 117   | 0                    | 90 ( 45.0 )                      | 90 *( 45.0 ) | 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; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Carboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test (p<0.01, one-side).

\*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

\*\*, PB29 is composed of SiO<sub>2</sub> (39.60%), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (23.68%), Na<sub>2</sub>O (22.69%), S (12.10%) and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.43%).

pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with C.I. pigment blue 29 (PB29)\*\* for 24 h without S9 mix

| Group                  | Concentration (mg/mL) | Time of exposure (h) | Concurrent <sup>2)</sup> cell growth (%) | Mitotic <sup>3)</sup> index (%) | Number of cells analyzed | Number of structural aberrations                   |     |     |     |     |                   |       | Others <sup>5)</sup> | Number of cells with aberrations |             | Number <sup>6)</sup> of polyploid cells (%) | Trend test <sup>7)</sup> |     |  |
|------------------------|-----------------------|----------------------|--|---------------------------------|--------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|----------------------------------|-------------|---|--------------------------|-----|--|
|                        |                       |                      |  |                                 |                          | gap  | ctb | cte | csb | cse | mul <sup>4)</sup> | total |                      | +gap (%)                         | -gap (%)    |   | -gap                     | POL |  |
| Negative <sup>1)</sup> | 0                     | 24                   | 100                                      | —                               | 100                      | 1  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 1     | 0                    | 1 ( 1.0 )                        | 0 ( 0.0 )   | 2 ( 0.5 )                                   |                          |     |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 100                      | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 0     | 0 ( 0.0 )            | 0 ( 0.0 )                        | 1 ( 0.3 )   |   |                          |     |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 200                      | 1  | 0   | 0   | 0   | 0   | 1                 | 0     | 1 ( 0.5 )            | 0 ( 0.0 )                        | 3 ( 0.4 )   |   |                          |     |  |
| PB29                   | 0.0078 <sup>pe</sup>  | 24                   | 93                                       | —                               |                          | not observed                                       |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |             |   |                          |     |  |
| PB29                   | 0.016 <sup>pe</sup>   | 24                   | 92                                       | —                               |                          | not observed                                       |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |             |   |                          |     |  |
| PB29                   | 0.031 <sup>pe</sup>   | 24                   | 92                                       | —                               | 100                      | 0  | 1   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 1     | 0                    | 1 ( 1.0 )                        | 1 ( 1.0 )   | 3 ( 0.8 )                                   |                          |     |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 100                      | 1  | 0   | 0   | 0   | 0   | 1                 | 0     | 1 ( 1.0 )            | 0 ( 0.0 )                        | 7 ( 1.8 )   |   |                          |     |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 200                      | 1  | 1   | 0   | 0   | 0   | 2                 | 0     | 2 ( 1.0 )            | 1 ( 0.5 )                        | 10 ( 1.3 )  |   |                          |     |  |
| PB29                   | 0.063 <sup>pbe</sup>  | 24                   | 78                                       | —                               | 100                      | 2  | 1   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 3     | 0                    | 3 ( 3.0 )                        | 1 ( 1.0 )   | 14 ( 3.5 )                                  | NA                       | +   |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 100                      | 2  | 1   | 0   | 0   | 0   | 3                 | 0     | 2 ( 2.0 )            | 1 ( 1.0 )                        | 8 ( 2.0 )   |   |                          |     |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 200                      | 4  | 2   | 0   | 0   | 0   | 6                 | 0     | 5 ( 2.5 )            | 2 ( 1.0 )                        | 22 *( 2.8 ) |   |                          |     |  |
| PB29                   | 0.13 <sup>pbe</sup>   | 24                   | 69                                       | 5.0, 4.6                        | 100                      | 7  | 1   | 0   | 0   | 0   | 0                 | 8     | 0                    | 6 ( 6.0 )                        | 1 ( 1.0 )   | 11 ( 2.8 )                                  |                          |     |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 100                      | 1  | 0   | 0   | 0   | 0   | 1                 | 0     | 1 ( 1.0 )            | 0 ( 0.0 )                        | 19 ( 4.8 )  |   |                          |     |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 200                      | 8  | 1   | 0   | 0   | 0   | 9                 | 0     | 7 ( 3.5 )            | 1 ( 0.5 )                        | 30 *( 3.8 ) |   |                          |     |  |
| PB29                   | 0.25 <sup>pbe</sup>   | 24                   | 70                                       | 2.0, 1.2                        |                          | not observed due to the small number of metaphases |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |             |   |                          |     |  |
| PB29                   | 0.50 <sup>pbe</sup>   | 24                   | 70                                       | 1.4, 0.6                        |                          | not observed due to the small number of metaphases |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |             |   |                          |     |  |
| PB29                   | 1.0 <sup>pbe</sup>    | 24                   | 78                                       | 0.4, 0.6                        |                          | not observed due to the small number of metaphases |     |     |     |     |                   |       |                      |                                  |             |   |                          |     |  |
| MMC                    | 0.05 µg/mL            | 24                   | —  | —                               | 100                      | 1  | 17  | 41  | 0   | 0   | 0                 | 59    | 0                    | 42 ( 42.0 )                      | 42 ( 42.0 ) | 0 ( 0.0 )                                   |                          |     |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 100                      | 0  | 21  | 32  | 0   | 0   | 53                | 0     | 45 ( 45.0 )          | 45 ( 45.0 )                      | 1 ( 0.3 )   |   |                          |     |  |
|                        |                       |                      |  |                                 | 200                      | 1  | 38  | 73  | 0   | 0   | 112               | 0     | 87 ( 43.5 )          | 87 *( 43.5 )                     | 1 ( 0.1 )   |   |                          |     |  |

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; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Carboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test (p<0.01, one-side).

\*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

\*\*, PB29 is composed of SiO<sub>2</sub> (39.60%), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (23.68%), Na<sub>2</sub>O (22.69%), S (12.10%) and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.43%).

pe, Precipitation was observed at the end of the treatment in the medium by the naked eye.

pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.