
C.I.ピグメントレッド 22の哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

最 終 報 告 書

作成日 2002年 4月 5日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目 次

要 約	7
緒 言	8
方 法	8
1. 被験物質, 陽性対照物質および陰性対照物質	8
2. 検体液	9
3. 試験細胞	10
4. 培養液	10
5. S9 mix	10
6. 細胞数の調整および細胞播種	11
7. 細胞増殖抑制試験	11
8. 染色体異常試験	12
9. 標本観察	13
10. 試験の成立条件	14
11. 統計学的方法	14
12. 判定基準	14
試験成績	15
1. 連続処理法	15
2. 短時間処理法	15
考 察	16
文 献	16

Table, Figure,

の目次

Table 1	Cell growth inhibition test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells The continuous treatment method	21
Table 2	Cell growth inhibition test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells The short treatment method	22
Table 3	Chromosomal aberration test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells The continuous treatment method	23
Table 4	Chromosomal aberration test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells The short treatment method	24
Figure 1	Cell growth inhibition test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells	25
Figure 2	Cell growth inhibition test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells	26

要 約

C.I.ピグメントレッド 22の染色体異常誘発性の有無を、哺乳類の培養細胞（CHL/IU細胞）を用い、連続処理法（24および48時間処理）と短時間処理法（6時間処理のS9 mix添加および無添加）で検討した。

1. 染色体異常試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために細胞増殖抑制試験を実施したところ、連続処理法24および48時間処理、短時間処理法のS9 mix添加および無添加とも最高濃度の4300 $\mu\text{g/mL}$ （10 mM）で細胞毒性は認められず、50 %細胞増殖抑制濃度（以下 IC_{50} ）は、いずれの系列も4300 $\mu\text{g/mL}$ 以上であった。
なお、連続処理法および短時間処理法とも、33.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度において培養液が赤色に変色し、268.8 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度において析出物が認められた。
2. 染色体異常試験は、細胞増殖抑制試験において、連続処理法および短時間処理法とも最高濃度の4300 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性は認められなかったが、いずれの系列も268.8 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度において析出物が認められたことから、染色体異常試験の試験濃度は、析出物が認められる濃度が2濃度以上含まれるように37.5, 75, 150, 300および600 $\mu\text{g/mL}$ （公比2, 5段階）に設定して実施した。
試験の結果、連続処理法および短時間処理法とも、染色体異常誘発率は5 %未満の陰性であった。
なお、連続処理法および短時間処理法とも、すべての濃度において培養液が赤色に変色し、300および600 $\mu\text{g/mL}$ において析出物が認められた。
3. 各試験で用いた陽性対照物質は、明らかな陽性結果を示し、陰性対照および陽性対照における染色体異常誘発率は、当試験施設のバックグラウンドデータのほぼ範囲内であった。
4. 陰性対照（無水エタノール）について、無処置対照を設け、細胞に対する無水エタノールの影響を検討した。その結果、無処置対照および陰性対照における生細胞数および染色体異常誘発率は、連続処理法、短時間処理法とも同様な値を示し、細胞に対する無水エタノールの影響は認められなかった。

以上の結果、当試験の条件下において、C.I.ピグメントレッド 22に染色体異常誘発性はないと判定する。

緒 言

C.I.ピグメントレッド 22の安全性に関する非臨床試験の一環として、「OECD化学用品テストガイドライン, 473 In vitro哺乳類動物細胞を用いる染色体異常試験」(1997年7月21日採択) および平成9年10月31日(環保安第287号環境庁企画調整局長, 衛生第127号厚生省生活衛生局長, 平成09・10・31基局第2号通商産業省基礎産業局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正等についての別添「ほ乳類を用いる28日間反復投与毒性試験並びに細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験による変異原性試験」に基づき, C.I.ピグメントレッド 22の哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い, その染色体異常誘発性の有無について検討した。

なお, 当試験は「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」(昭和59年3月31日環保業第39号環境庁企画調整局長, 薬発第229号厚生省薬務局長, 59基局第85号通商産業省基礎産業局長連名通知) およびその改正ならびにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (OECD 化学物質の安全性試験の実施に関する基準) に従って実施した。

方 法

1. 被験物質, 陽性対照物質および陰性対照物質

1.1 被験物質

被験物質のC.I.ピグメントレッド 22 (CAS No.6448959) は, 分子量: 426.42, 水, アセトン, DMSOに不溶で, 水, 熱および光に対して安定な赤色粉末である。当試験には, 厚生労働省 医薬局 審査管理課 化学物質安全対策室から提供されたものを用いた(製造元: ;

; ロット番号: , 純度: 99.8 %, 水分: 0.15 %, 水可溶分: 0.05 %)。

入手後は, 試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温の条件下で保管した。なお, 入手した被験物質に細菌の混在が確認されたため,

にてガンマ線滅菌 (12.1~14.8 kGy) したものを供試した。

なお, 残余被験物質は, ; にすべて返却した。

1.2 陽性対照物質

試験には、マイトマイシンC (以下MMC) とジメチルニトロサミン (以下DMN) を用いた。MMC [商品名：マイトマイシン協和S, 1バイアル中に、日局マイトマイシンC 2 mg (力価) と日局塩化ナトリウム48 mgを含有, ロット番号：307AJC, 使用期限：2004年3月, 協和醗酵工業株式会社] は2000年6月21日に、DMN [純度：99 %以上, ロット番号：DLF7362, 使用期限：2002年6月1日 (自社規定), 和光純薬工業株式会社] は1997年6月2日にいずれも市販品を購入した。購入後は、いずれも使用時まで当試験施設の被験物質保管室の保管庫内に、冷所 (1~10 °C) の条件下で保管した。

1.3 陰性対照物質

被験物質の媒体である無水エタノール (局方品, ロット番号：LF5585, 株式会社ワコーケミカル, 入手日：2000年5月12日, 保管条件：室温) を用いた。

2. 検体液

2.1 被験物質

細胞増殖抑制試験では、被験物質4343 mgを秤量し、無水エタノール10.0 mLに懸濁して最高濃度液 (434.3 mg/mL) を、染色体異常試験では、被験物質606 mgを秤量し、無水エタノール10.0 mLに懸濁して最高濃度液 (60.6 mg/mL) を調製した。以下の濃度液は、最高濃度液から無水エタノールで段階希釈して調製した。調製は用時に行い、使用後の残液は廃棄処分した。なお、当試験における表示濃度は培養液に添加したときの最終濃度であるため、各調製液はあらかじめ表示濃度の101倍の濃度を調製した。

2.2 陽性対照物質

MMCおよびDMNとも、生理食塩液 (局方品, ロット番号：K0J93, 株式会社大塚製薬工場) に溶解して必要濃度 (表示濃度の11倍) を調製した。調製は用時に行い、使用後の残液は廃棄処分した。

	物質名	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	試験濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
連続処理法	MMC	0.55	0.05
短時間処理法	DMN	5500	500
	MMC	1.1	0.1

3. 試験細胞

試験には、2000年11月28日に大日本製薬株式会社ラボラトリープロダクツ部から入手したチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU）を用いた。細胞は液体窒素中に凍結保存（-196 °C）した。試験に際し、凍結保存してある細胞（継代数15回）を融解して増殖させ、染色体数および倍化時間を検査した〔検査日：2001年6月25日～2001年6月29日〕。

試験には、当試験施設の基準に適合した細胞（倍化時間：15～18時間、染色体数：23～27本の染色体を有する細胞が80%以上）を用いた。検査の結果をAttachment 1に示した。

細胞の継代は、培養ビン（Nunc製）を用いて3～4日ごとに行った。以下に各試験における再培養からの継代数を示した。

細胞増殖抑制試験	4回
染色体異常試験（連続処理法）	8回
染色体異常試験（短時間処理法）	9回

なお、実験操作は空調設備を備えた染色体異常試験室（A棟）で行った。

4. 培養液

Eagleの最少必須培養液(Eagle's minimum essential medium, 以下Eagle's MEM)の組成を、Attachment 2に示した。

培養液は、Eagle's MEM粉末（ロット番号：1084659, GIBCO, リストNo.61100-061）と炭酸水素ナトリウムを注射用水に溶解し、1 Nの塩酸でpHを7.0～7.1に調整した。メンブランフィルター（ ϕ 0.22 μ m）で濾過した後、非働化（56 °C, 30分）した仔牛血清（ロット番号：1060198, GIBCO）を最終調製量の10%となるように加えて調製した。なお、調製した培養液は用時に37 °Cに加温して使用した。

5. S9 mix

S9は、Attachment 3の方法により2001年5月11日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの（ロット番号：01051102）を用いた。S9は2001年6月8日に購入し、調製時まで-80 °C設定の冷凍庫（型式：MDF-190AT, 三洋電機株式会社）内に凍結保存した。

S9 mixは、S9以外の各物質を調製混合して溶液とし、これをメンブランフィルター（ ϕ 0.2 μ m）で濾過した後、使用直前にS9を加えて調製した。S9 mixの組成をAttachment 4に示した。

6. 細胞数の調整および細胞播種

培養ビンに0.25 %トリプシン液を加えて細胞を剥離し、遠心分離 [4 °C, 1000 r.p.m., 5分間, 小形冷却遠心器 (型式: 05PR-22型, 日立工機株式会社), 以下同様] により細胞を回収した後, 新鮮な培養液を加えて細胞浮遊液を作製した. この浮遊液中の細胞数を血球計算盤を用いて計測し, 細胞数が 2×10^4 個/5 mLになるように培養液を加えて調整した. 調整した細胞浮遊液5 mLは, 直径60 mmの滅菌シャーレ (CORNING) に播種し, 温度を37 °C, CO₂濃度を5 %に設定した炭酸ガスインキュベーター (型式: BNA-121D, タバイ エスベック株式会社, 以下CO₂インキュベーター) 内で3日間培養したものを試験に用いた.

シャーレは, 細胞増殖抑制試験では1濃度につき1枚を, 染色体異常試験では1濃度につき細胞数の計測用に1枚, 染色体標本作製用に2枚を用いた. また, シャーレには試験番号, 被験物質名または対照物質名, 濃度を記入し, さらに連続処理法の場合は培養時間を, 短時間処理法の場合はS9 mixの有無を記入することにより識別した.

7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験におけるC.I.ピグメントレッド 22の試験濃度を設定するために, 細胞増殖抑制試験を行った. 試験は, 連続処理法の24および48時間処理と短時間処理法のS9 mix添加および無添加の4系列で実施した.

連続処理法では, シャーレに検体液50 μ Lを添加し, CO₂インキュベーター内で24および48時間培養した. 一方, 短時間処理法では, S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後, ここにS9 mix 0.5 mLと検体液30 μ Lを添加した. S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後に, 検体液をS9 mix添加の場合と同様に添加した. いずれのシャーレもCO₂インキュベーター内で6時間培養した後, 新鮮な培養液5.0 mLに取り替え, さらに18時間培養した.

連続処理法および短時間処理法とも, 培養終了後, 各シャーレに0.25 %トリプシン液を約3 mL添加して細胞を剥離し, 遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて, 生細胞数を計測した. 計測は1枚のシャーレ当たり3回行い, その平均を用いて陰性対照群の生細胞数を100 %として各濃度における細胞の生存率を求めた.

試験濃度は, 連続処理法および短時間処理法とも「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)に基づき, 10 mMの4300 μ g/mLを最高濃度とし, 以下公比2により2150, 1075, 537.5, 268.8, 134.4, 67.2, 33.6, 16.8および8.4 μ g/mLの計10濃度を設定し, その他に陰性対照, 無処置対照を設けた.

試験結果をTable 1, 2およびFigure 1, 2に示した.

連続処理法の24および48時間処理における細胞の生存率は、すべての濃度で90%以上を示し、細胞毒性は認められなかった。同じく、短時間処理法のS9 mix添加および無添加における細胞の生存率も、すべての濃度で90%以上を示し、細胞毒性は認められなかった。細胞毒性が認められなかったことからProbit法によるIC₅₀の算出はしなかった。

なお、連続処理法および短時間処理法とも、33.6 µg/mL以上の濃度において培養液が赤色に変色し、268.8 µg/mL以上の濃度において析出物が認められた。

また、陰性対照（無水エタノール）のほか、無処置対照を設け、細胞に対する無水エタノールの影響を検討した。その結果、無処置対照および陰性対照における生細胞数は、連続処理法、短時間処理法とも同様な値を示し、細胞に対する無水エタノールの影響は認められなかった。

8. 染色体異常試験

試験は、連続処理法の24および48時間処理と短時間処理法のS9 mix添加および無添加の4系列で実施した。

8.1 試験濃度および処理群

細胞増殖抑制試験の結果、連続処理法の24および48時間処理、短時間処理法のS9 mix添加および無添加とも、すべての濃度において細胞毒性が認められなかったが、いずれの系列も268.8 µg/mL以上の濃度において析出物が認められたことから、染色体異常試験の試験濃度は、析出物が認められる濃度が2濃度以上含まれるように600 µg/mLを最高濃度とし、以下公比2で300、150、75および37.5 µg/mL（5段階）とした。

処理群は、各試験系列ごとに被験物質、無処置対照、陰性対照および陽性対照群を設けた。陽性対照として連続処理法にはMMC（0.05 µg/mL）を、短時間処理法のS9 mix添加にはDMN（500 µg/mL）を、S9 mix無添加にはMMC（0.1 µg/mL）を用いた。また、代謝活性化系の妥当性を保証するために短時間処理法のS9 mix無添加ではDMN（500 µg/mL）も設けた。

8.2 検体液の処理

8.2.1 連続処理法

シャーレに、被験物質および陰性対照物質の場合は50 µLを、陽性対照物質の場合は0.5 mLを添加し、CO₂インキュベーター内で24および48時間培養した後に染色体標本の作製および生細胞数の計測をした。

8.2.2 短時間処理法

S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後に、S9 mix 0.5 mLと被験物質および陰性対照物質の場合は30 µLを、陽性対照物質の場合は0.3 mLを添加した。S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後に、検体液をS9 mix添加の場合と同様に添加した。

いずれのシャーレもCO₂インキュベーター内で6時間培養した後、新鮮な培養液5.0 mLに取り替え、さらに18時間培養してから染色体標本の作製および生細胞数の計測をした。

8.2.3 標本作製

連続処理法および短時間処理法とも、培養終了2時間前に10 µg/mL濃度のコルセミド液を各シャーレに0.1 mL添加して、分裂中期細胞を得た。培養終了後、各シャーレに0.25 %トリプシン液を約3 mL加えて細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後、75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理（37 °C，15分間）をした。低張処理が終了した後、再び遠心分離し、メタノールと酢酸を3:1の割合で混合して氷冷した固定液で脱水固定を行い、同固定液で細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液をスライドガラス上の2カ所に一滴ずつ滴下して細胞を広げ、乾燥後、2 %のGiemsa染色液で約15分間染色した。

スライド標本は1シャーレ当たり3枚作製し、乱数表を用いてコード番号を割り付けた。なお、観察終了後にスライド標本はカバーガラスで封入し、試験番号、被験物質名または対照物質名、濃度、試験法、培養時間（連続処理法）またはS9 mixの有無（短時間処理法）、標本作製日を記入したラベルを貼付した。

8.2.4 細胞数の計測

連続処理法および短時間処理法とも、培養終了後、各シャーレに0.25 %トリプシン液を約3 mL添加して細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて、生細胞数を計測した。計測は1枚のシャーレ当たり3回行い、その平均を用いて陰性対照群の生細胞数を100 %として各濃度における細胞の生存率を求めた。

9. 標本観察

石館の方法¹⁾を参考にして、染色体がよく広がった分裂中期像の細胞を1シャーレ当たり100個、1濃度当たり200個観察した。標本の観察はコード番号順に行い、観察結果と観察濃度との照合は各処理法ごと全標本の観察終了後に行った。なお、観察は短時間処理法から行った。

染色体異常は、数的異常と構造的異常に分類した。数的異常は倍数体 (polyploid) のみを観察対象とし、構造的異常は①染色分体型ギャップ (chromatid gap, 以下ctg)、②染色体型ギャップ (chromosome gap, 以下csg)、③染色分体型切断 (chromatid break, 以下ctb)、④染色体型切断 (chromosome break, 以下csb)、⑤染色分体型交換 (chromatid exchange, 以下cte)、⑥染色体型交換 (chromosome exchange, 以下cse)、⑦断片化 (fragmentation, 以下frg) に分類し、これらの染色体異常を有する細胞を陽性細胞1個として記録した。なお、ギャップと切断の判別は、染色体または染色分体の断片が軸の同一線上にあるものをギャップとし、同一

線上からはずれているものを切断としたが、断片が同一線上にあっても非染色性部分が染色分体幅より大きいものは切断とした。染色体異常の総数は、ギャップを含めた場合と含めない場合とに分けて記録した。

当試験で認められた染色体異常を、型別に代表例について写真撮影した (Photograph 1~6)。

10. 試験の成立条件

陰性対照群において、染色体異常を有する細胞の出現率が5%未満で、陽性対照群においてギャップ以外の染色体異常を有する細胞の出現率が10%以上 [ただし、短時間処理法におけるS9 mix無添加のDMN (500 µg/mL) では異常を有する細胞の出現率は5%未満] を示し、さらに陰性および陽性対照群の染色体異常の出現率が、ほぼ当試験施設のバックグランドデータ (Attachment 5) の範囲内を示し、試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした。

11. 統計学的方法

染色体異常を有する細胞の出現率は、下記の判定基準に従ったため有意差検定は行わなかった。

12. 判定基準

試験の結果は、数的異常または構造的異常を有する細胞の出現率が5%未満の場合を陰性、5%以上10%未満の場合を疑陽性とした。さらにその出現率が10%以上を示し、濃度の増加に伴って増加した場合を陽性とした。なお、構造的異常の染色体を有する細胞の出現率は、ギャップを含めた場合と含めない場合で算出し、ギャップを含めない場合の出現率により判定した。

試験成績

1. 連続処理法

試験結果をTable 3 (Appendix 1-1~1-2) に示した。

C.I.ピグメントレッド 22処理群の数的異常細胞の出現率は、処理時間にかかわらず、すべての濃度で2.0 %以下であった。同様に、構造的異常細胞の出現率も、処理時間にかかわらず、すべての濃度で1.5 %以下で陰性であった。

細胞生存率は、24および48時間処理とも、すべての濃度で90 %以上を示し、細胞毒性は認められなかった。

検体液添加時と処理終了時に、すべての濃度において培養液が赤色に変色し、300および600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において析出物が認められた。

陰性対照（無水エタノール）の数的異常細胞の出現率は、24および48時間処理とも0 %であった。構造的異常細胞の出現率は、24時間処理では2.0 %，48時間処理では0 %であった。

陽性対照（MMC：0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の数的異常細胞の出現率は、24および48時間処理とも0 %であった。構造的異常細胞の出現率は、24時間処理では48.5 %，48時間処理では73.5 %であった。

陰性対照および陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータのほぼ範囲内であり、試験条件を満たすものであった。

2. 短時間処理法

試験結果をTable 4 (Appendix 2-1~2-2) に示した。

C.I.ピグメントレッド 22処理群の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加の有無にかかわらず、すべての濃度で1.5 %以下であった。同様に、構造的異常細胞の出現率も、S9 mix添加の有無にかかわらず、すべての濃度で1.5 %以下で陰性であった。

細胞生存率は、S9 mix添加の有無にかかわらず、すべての濃度で90 %以上を示し、細胞毒性は認められなかった。

検体液添加時と処理終了時に、すべての濃度において培養液が赤色に変色し、300および600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において析出物が認められた。

陰性対照（無水エタノール）の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では0 %，S9 mix無添加では1.0 %であった。構造的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では0 %，S9 mix無添加では0.5 %であった。

陽性対照（S9 mix添加：DMN；500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，S9 mix無添加：MMC；0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では1.0 %，S9 mix無添加では0.5 %であった。構造的異常細胞の

出現率は、S9 mix添加では57.5 %、S9 mix無添加では61.5 %であった。

陰性対照および陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータのほぼ範囲内であり、試験条件を満たすものであった。

なお、S9 mix無添加のDMN (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) における数的異常細胞の出現率は0 %、構造的異常細胞の出現率は0.5 %と、陰性結果であったことから代謝活性化系の妥当性が保証された。

考 察

C.I.ピグメントレッド 22の染色体異常誘発性の有無を、哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験により検討した。

C.I.ピグメントレッド 22処理群の数的異常細胞の出現率は、いずれの試験系列においても、5 %に満たなかったため、C.I.ピグメントレッド 22は数的異常を誘発しないものと思われる。

同じく、構造的異常細胞の出現率も、いずれの試験系列においても、5 %に満たなかったため、C.I.ピグメントレッド 22は構造的異常を誘発しないものと思われる。

連続処理法および短時間処理法の各試験系において、陰性対照および陽性対照群の異常細胞出現率は、バックグラウンドデータのほぼ範囲内であり、試験の成立条件を満たすものであった。

また、陰性対照（無水エタノール）について、無処置対照を設け、細胞に対する無水エタノールの影響を検討した。その結果、無処置対照および陰性対照における生細胞数および異常細胞出現率は、連続処理法、短時間処理法とも同様な値を示し、細胞に対する無水エタノールの影響は認められなかった。

以上の結果、当試験の条件下において、C.I.ピグメントレッド 22に染色体異常誘発性はないと判定する。

文 献

- 1) 石館 基監修：染色体異常試験データ集（改訂増補），株式会社エル・アイ・シー（東京，1987）

Table 1. Cell growth inhibition test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells
-The continuous treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Treated for 24 hr			Treated for 48 hr		
		No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Non-treatment control	—	65	98	—	147	99	—
Negative control (Absolute ethanol)	—	66	100	—	148	100	—
C.I. Pigment Red 22	8.4	65	98	4300<	152	103	4300<
	16.8	63	95		147	99	
	33.6	67	102		151	102	
	67.2	66	100		150	101	
	134.4	65	98		152	103	
	268.8 [#]	67	102		145	98	
	537.5 [#]	63	95		147	99	
	1075 [#]	66	100		139	94	
	2150 [#]	62	94		142	96	
4300 [#]	62	94	138	93			

a): [C.I. Pigment Red 22 treated group or non-treatment control / negative control] $\times 100$.

#: Red precipitations were noted in the culture fluid in petri plate.

Table 2. Cell growth inhibition test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Treated for 6 hr with S9 mix			Treated for 6 hr without S9 mix		
		No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Non-treatment control	—	66	100	—	63	102	—
Negative control (Absolute ethanol)	—	66	100	—	62	100	—
C.I. Pigment Red 22	8.4	64	97	4300<	62	100	4300<
	16.8	65	98		59	95	
	33.6	65	98		62	100	
	67.2	64	97		63	102	
	134.4	64	97		65	105	
	268.8 [#]	64	97		61	98	
	537.5 [#]	66	100		65	105	
	1075 [#]	62	94		61	98	
	2150 [#]	63	95		63	102	
4300 [#]	61	92	60	97			

a): [C.I. Pigment Red 22 treated group or non-treatment control / negative control] $\times 100$.

#: Red precipitations were noted in the culture fluid in petri plate.

Table 3. Chromosomal aberration test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells
 — The continuous treatment method —

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	No. of polyploid cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Structural aberrations												Survival ratio ^{e)} (%)	
							Types ^{c)} and numbers (cumulative)							No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)		Judgement ^{b)}		
							ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)			
Non-treatment control	—	24	200	1	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	98
Negative control	—	24	200	0	0	—	0	0	3	0	1	0	0	4	4	2.0	2.0	—	100	
C.I. Pigment Red 22	37.5	24	200	0	0	—	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	97	
	75	24	200	2	1.0	—	0	0	2	0	1	0	0	3	3	1.5	1.5	—	102	
	150	24	200	1	0.5	—	0	0	0	0	3	0	0	3	3	1.5	1.5	—	98	
	300 [#]	24	200	2	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97	
	600 [#]	24	200	2	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	98	
Mitomycin C	0.05	24	200	0	0	—	0	0	59	1	60	0	0	97	97	48.5	48.5	+	86	
Non-treatment control	—	48	200	1	0.5	—	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100	
Negative control	—	48	200	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100	
C.I. Pigment Red 22	37.5	48	200	1	0.5	—	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	98	
	75	48	200	4	2.0	—	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	99	
	150	48	200	2	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97	
	300 [#]	48	200	1	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97	
	600 [#]	48	200	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	96	
Mitomycin C	0.05	48	200	0	0	—	0	0	82	0	109	0	2	147	147	73.5	73.5	+	76	

Negative control: Absolute ethanol.

a): $(\text{Polyploid cells} / \text{observed metaphase cells}) \times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; --: negative (less than 5.0%); \pm : equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctg: chromatid gap; csg: chromosome gap; ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): $(\text{Cells with structural chromosome aberration} / \text{observed metaphase cells}) \times 100$.

e): $(\text{C.I. Pigment Red 22 treated group or non-treatment control or positive control} / \text{negative control}) \times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

#: Red precipitations were noted in the culture fluid in petri plate.

Table 4. Chromosomal aberration test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells
— The short treatment method —

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	With(+) or without(-) S9 mix	No. of metaphase examined	No. of polyploid cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Structural aberrations												Survival ratio ^{e)} (%)
							Types ^{c)} and numbers (cumulative)							No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)		Judgement ^{b)}	
							ctg	csg	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Non-treatment control	—	+	200	1	0.5	—	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	106
Negative control	—	+	200	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100
C.I. Pigment Red 22	37.5	+	200	1	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97
	75	+	200	1	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	98
	150	+	200	2	1.0	—	0	0	1	0	2	0	0	2	2	1.0	1.0	—	102
	300 [#]	+	200	1	0.5	—	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	98
	600 [#]	+	200	1	0.5	—	0	0	0	0	2	0	0	2	2	1.0	1.0	—	95
Dimethylnitrosamine	500	+	200	2	1.0	—	0	0	35	0	94	0	0	115	115	57.5	57.5	+	80
Non-treatment control	—	—	200	0	0	—	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	102
Negative control	—	—	200	2	1.0	—	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100
C.I. Pigment Red 22	37.5	—	200	1	0.5	—	0	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	105
	75	—	200	1	0.5	—	0	0	0	0	2	0	0	2	2	1.0	1.0	—	102
	150	—	200	3	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	103
	300 [#]	—	200	3	1.5	—	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	102
	600 [#]	—	200	1	0.5	—	0	0	2	0	2	0	0	3	3	1.5	1.5	—	97
Dimethylnitrosamine	500	—	200	0	0	—	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	106
Mitomycin C	0.1	—	200	1	0.5	—	0	0	72	4	91	0	0	123	123	61.5	61.5	+	83

Negative control: Absolute ethanol.

a): $(\text{Polyploid cells} / \text{observed metaphase cells}) \times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%); \pm : equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctg: chromatid gap; csg: chromosome gap; ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): $(\text{Cells with structural chromosome aberration} / \text{observed metaphase cells}) \times 100$.

e): $(\text{C.I. Pigment Red 22 treated group or non-treatment control or positive control} / \text{negative control}) \times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

#: Red precipitations were noted in the culture fluid in petri plate.

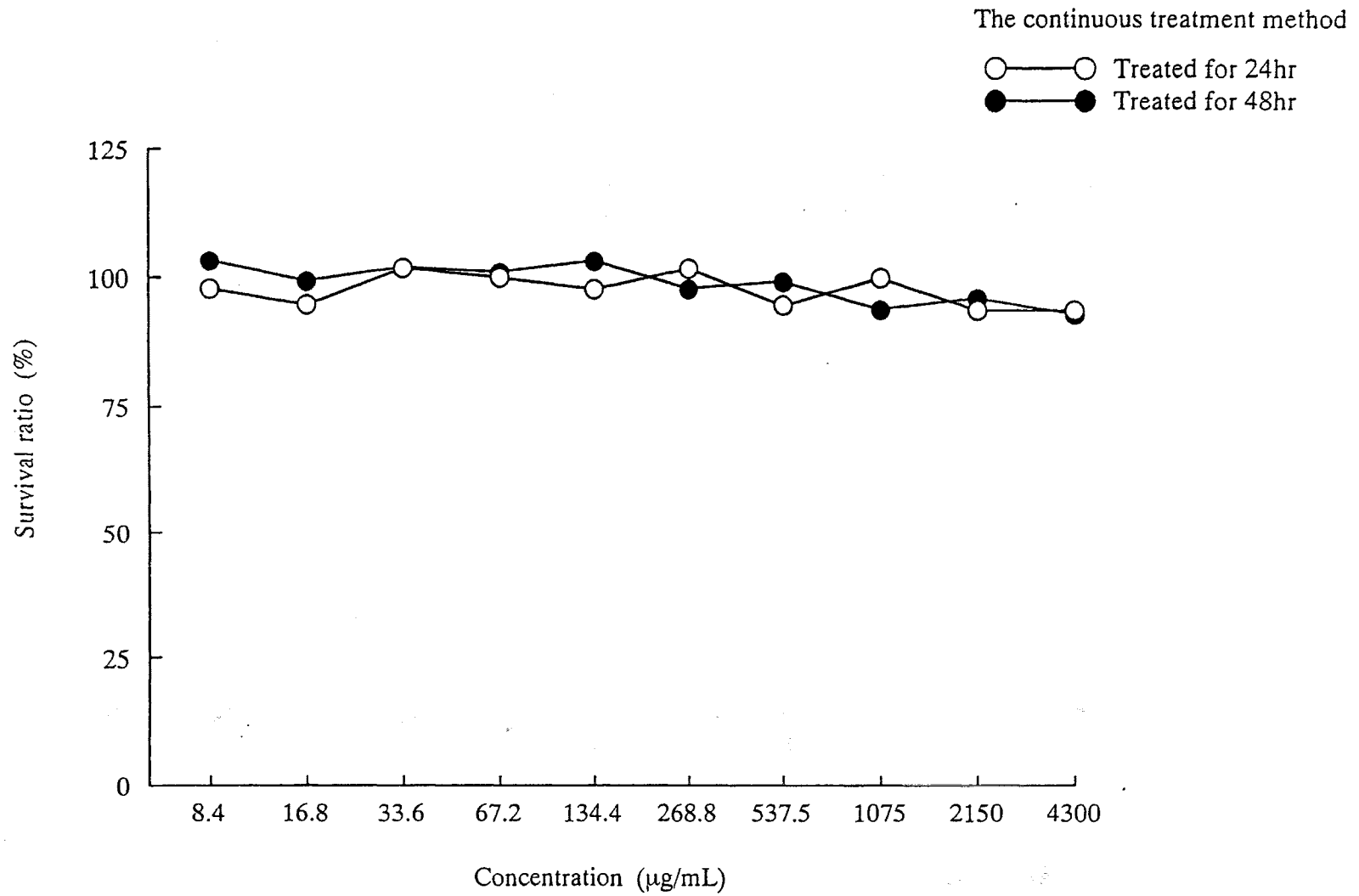


Figure 1. Cell growth inhibition test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells.

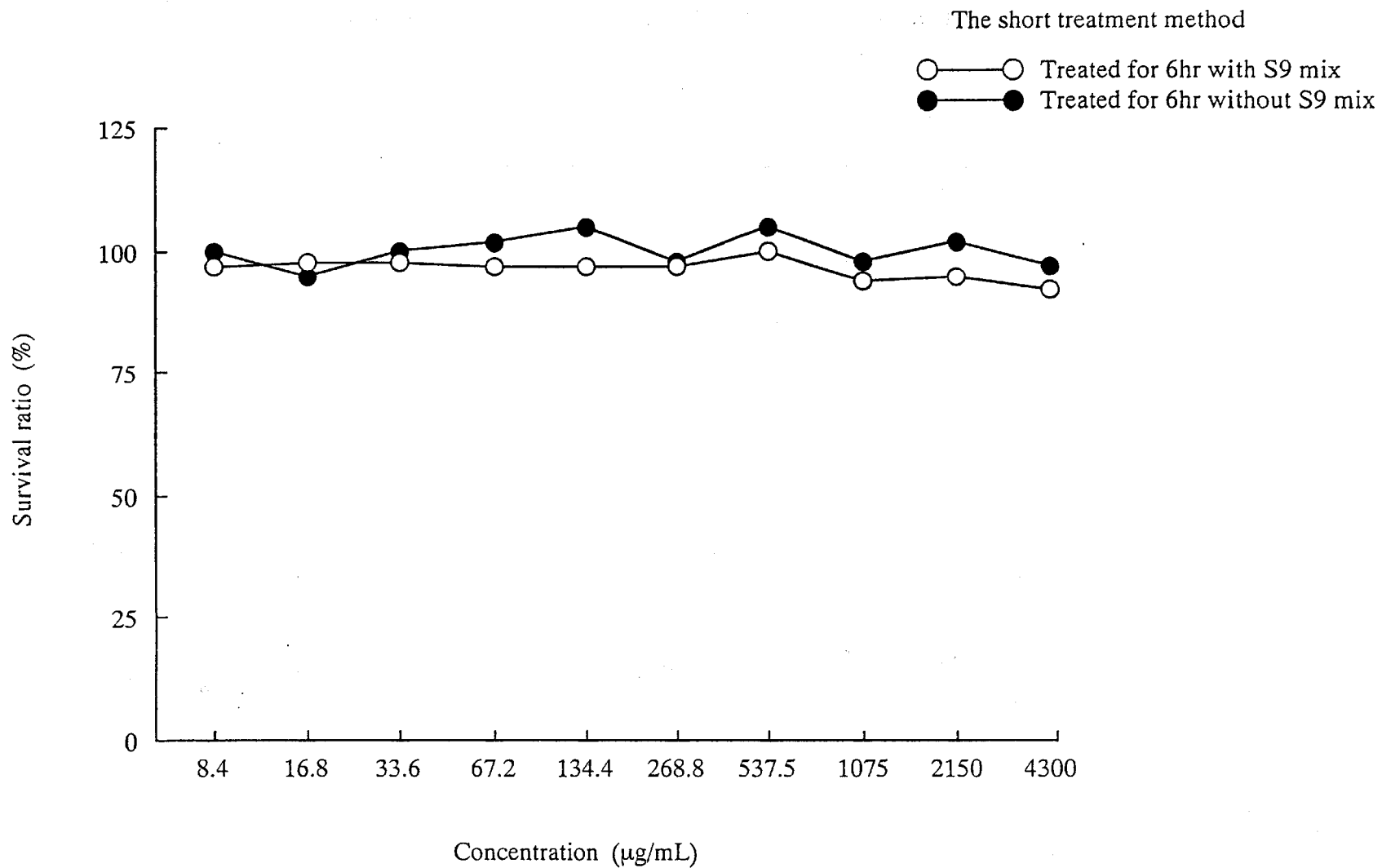


Figure 2. Cell growth inhibition test of C.I. Pigment Red 22 with cultured CHL cells.