

最終報告書

ピグメントオレンジ 16 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：4188（115-106）

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	16
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 C.I.Pigment Orange 16 [short-term treatment]	F-1
Figure 2	Incidence of structural aberrations induced by C.I.Pigment Orange 16 [short-term treatment : -S9]	F-2
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by C.I.Pigment Orange 16 [short-term treatment : +S9]	F-3
Figure 4	Dose-survival curve of C.I.Pigment Orange 16 [continuous treatment : 24h]	F-4
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by C.I.Pigment Orange 16 [continuous treatment : 24h]	F-5

Tables		T-1~5
Table 1	Results of growth inhibition test on C.I.Pigment Orange 16 [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I.Pigment Orange 16 [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I.Pigment Orange 16 [short-term treatment : +S9]	T-3
Table 4	Results of growth inhibition test on C.I.Pigment Orange 16 [continuous treatment]	T-4
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I.Pigment Orange 16 [continuous treatment : 24h]	T-5

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、ピグメントオレンジ 16 は染色体異常を誘起しないものと判断した。

ピグメントオレンジ 16 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 処理および同+S9 処理では 1250, 2500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のそれぞれ 3 用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、ピグメントオレンジ 16 処理群では染色体異常の誘発は認められず、陰性と判断された。従って、引き続き連続処理法 24 時間処理を実施した。

試験用量は、細胞増殖抑制試験結果を基に設定し、連続処理法 24 時間処理においても 1250, 2500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、短時間処理法と同様に染色体異常の誘発は認められず、陰性と判断された。

また、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに短時間処理法+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

ピグメントオレンジ 16 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

ピグメントオレンジ 16
(C.I.Pigment Orange 16)

11.2. ロット番号

11.3. 純度

99 wt%以上

11.4. 提供元

11.5. 保管条件

高温, 火気, 多湿, 水漏れ, 直射日光を避け密封, 室温保管

11.6. 別名

ジスアゾオレンジ

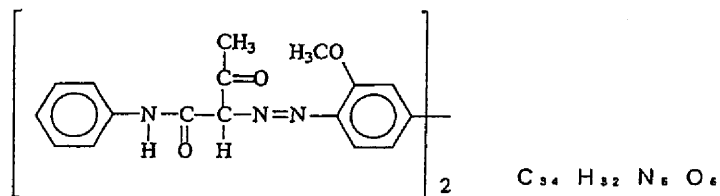
11.7. 化学名

C.I.Pigment Orange 16

11.8. CAS 番号

6505-28-8

11.9. 構造式又は示性式



11.10. 分子量

620.66

11.11. 常温における性状

橙色粉末

11.12. 沸点

349°C

11.13. 溶媒に対する溶解度等

水, DMSO, アセトン, メタノール, トルエンに不溶

11.14. 安定性

水, 熱, 光に対して安定

11.15. 取り扱い上の注意

飛散しやすい粉体のため容器の破損に注意し, 適切な保護具を着用して作業するようにした.

11.16. 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14の細胞を、染色体異常試験では短時間処理法で継代数12および連続処理法で継代数14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】、I8710【本試験】）に、メンブランフィルター（孔径0.45 μm：Featuring Corning and Costar 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

CO₂ 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、CO₂ 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-401）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.

a. ロット番号	RAA-401
b. 調製日	1999年4月9日 (誘導物質投与開始後5日目)
c. 使用動物	ラット: Sprague-Dawley系
d. 性/週齢	雄/7週齢
e. 体重	205~240 g
f. 臓器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF)
h. 投与量	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目),
および	60 mg/kg 3回 (2~4日目)
投与回数	BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	24.20 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

本被験物質を懸濁性良好であった1%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム (1% CMC·Na: 和光純薬工業株式会社; Lot No. WTH1105) 水溶液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した後, 直ちに処理を行った.

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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（16.2, 54.0, 180, 600 および 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 5 用量：公比 10/3）の結果，-S9 処理（処理後 6 時間時点での観察）の 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を除く全用量ならびに+S9 処理の全用量において細胞増殖抑制が認められなかった。また，-S9 処理の 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では，培養液中に浮遊している被験物質の影響により細胞増殖抑制度の判断ができなかった。

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 6 用量（公比 5/3）を設定した。

試験	用量数	試験用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
短時間処理法-S9 処理	6	389 ~ 5000
短時間処理法+S9 処理	6	389 ~ 5000

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 μ L を除いた後、溶媒あるいは被験物質液を 60 μ L 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 μ L）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 μ L を除き、S9 mix を 100 μ L 添加した後、溶媒あるいは被験物質液を 60 μ L 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 2.5 あるいは 3.0 mL 加え、5 分程度放置した後、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。

いずれの処理群においても明確な細胞毒性作用は観察されなかった。

なお、被験物質暴露終了時、被験物質の懸濁液処理のため全用量で被験物質の残存が認められた。

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 4~5 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	313	625	<u>1250</u>	<u>2500</u>	<u>5000</u>
短時間処理法+S9 処理	625	<u>1250</u>	<u>2500</u>	<u>5000</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。

12.8.2. 使用プレート数

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、被験物質液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. 1022866）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、被験物質液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) 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) 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°C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°C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°C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. TP 334974 816) を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. 840288308) 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, 染色体の形態的变化としてギャップ (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. 連続処理法

短時間処理法-S9 ならびに+S9 処理において陰性と判定されたことから、以下に示す代謝活性化によらない条件での連続処理法 24 時間処理を実施した。

12.9.1. 陽性対照（連続処理法 24 時間処理）

注射用水（Lot No. K8K78）5 mL に溶解したマイトマイシン C（Lot No. 247AHK）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で試験した。

12.9.2. 細胞増殖抑制試験（連続処理法 24 時間処理）

予備的な試験（16.2, 54.0, 180, 600 および 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 5 用量：公比 10/3）の結果、全用量において細胞増殖抑制が認められなかった。従って、389~5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 6 用量（公比 5/3）を試験用量として設定した。1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

各ウェルに 8×10^3 細胞を播種し、3 日間培養した。培養終了後、溶媒あるいは被験物質液 100 μL を加えた。さらに 24 時間培養を続けた後、各ウェルから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を洗浄した。10% 中性緩衝ホルマリン液（Lot No. ACG8912）を加えて細胞を固定した後、0.1% クリスタル・バイオレット（Lot No. 607E4067）水溶液で染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。

各ウェルに色素溶出液を 2.0 mL 加えた後、580 nm での吸光度を測定した。なお、細胞生存率の平均値は各ウェルの四捨五入する以前の値から求めた。

12.9.3. 細胞増殖抑制試験結果（連続処理法 24 時間処理）

試験結果を Figure 4 および Table 4 に示した。

いずれの処理群においても明確な細胞毒性作用は観察されなかった。

なお、被験物質暴露終了時、被験物質の懸濁液処理のため全用量で被験物質の残存が認められた。

12.9.4. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

細胞増殖抑制試験結果を基に、625, 1250, 2500 および 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 用量（公比 2）を処理した後、1250～5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量について染色体異常の観察を実施した。1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

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、溶媒、被験物質液または陽性対照物質溶液 500 μL を加え、さらに 24 時間培養を続けた。

染色体標本作製の 2 時間前にコルセミド溶液（Lot No. 1019640）を添加した。次いで、0.25% トリプシン溶液（Lot No. 1017538）を用いて細胞を剥離した。低張処理、固定した後、細胞浮遊液をスライドガラス上に 1～2 滴ずつ滴下した。スライド標本を染色した後、軽く水洗し、乾燥させた。

1 プレート当たり 2～3 枚の染色体標本作製した。

12.8.7. に記載した方法に準じて染色体異常の観察を実施した。

また、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、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。

12.10. 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。

13. 試験結果

13.1. 短時間処理法-S9 処理

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

ピグメントオレンジ 16 処理群での染色体構造異常および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ほぼ同等であった。また、細胞増殖抑制作用も観察されなかった。

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 46.5% であった。

なお、被験物質暴露終了時、被験物質の懸濁液処理のため全用量で被験物質の残存が認められた。

13.2. 短時間処理法+S9 処理

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

ピグメントオレンジ 16 処理群での染色体構造異常および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ほぼ同等であった。また、細胞増殖抑制作用も観察されなかった。

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 61.0% であった。

なお、被験物質暴露終了時、被験物質の懸濁液処理のため全用量で被験物質の残存が認められた。

13.3. 連続処理法 24 時間処理

短時間処理法の結果が陰性であったことから、連続処理法 24 時間処理の試験を追加して実施した。

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

ピグメントオレンジ 16 処理群での染色体構造異常の出現頻度は各群とも 1.0~2.5% であった。倍数性細胞の出現頻度は陰性対照とほぼ同等であった。また、細胞増殖抑制作用も観察されなかった。

陽性対照の MMC 処理群での染色体構造異常出現頻度は 48.0% であった。

なお、被験物質暴露終了時、被験物質の懸濁液処理のため全用量で被験物質の残存が認められた。

14. 考察および結論

ピグメントオレンジ 16 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 処理および+S9 処理では 5000 µg/mL の用量まで検討した。

その結果、ピグメントオレンジ 16 処理において、-S9 処理および+S9 処理で染色体構造異常の誘発が認められず陰性と判定されたことから連続処理法 24 時間処理を実施した。その結果、染色体構造異常の誘発において陰性対照の背景値をわずかに超える程度の増加が認められたが、陰性の判定基準である 5%未満であった。

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。

本被験物質 (ピグメントオレンジ 16) の変異原性に関する報告はなかったが、本被験物質のアゾ基の切断時に生成される化学物質である *o*-ジアニシジンについては Ames 試験で陽性¹⁾との報告があった。また、マウスの骨髄細胞に対する *in vivo* 染色体異常試験では陽性²⁾であるが、*in vitro* 染色体異常試験では陰性³⁾との報告があった。これらの報告から、染色体異常を誘発する *o*-ジアニシジンの活性化にはラット肝 S9 を用いた代謝経路以外に、他の代謝経路も必要と考えられた。しかしながら、マウスの骨髄細胞に対する *in vivo* 小核試験では、*inconclusive*⁴⁾との報告もあることから、*o*-ジアニシジン活性体自身の染色体異常誘発性はあまり高くないものと思われた。

ピグメントオレンジ 16 は、水やあらゆる有機溶媒に対して不溶であり、アゾ基の還元を促進する代謝活性化系を用いた Ames 試験においても陰性であったことから、この代謝活性化系においても十分なアゾ基の還元が行われず、*o*-ジアニシジンはほとんど生成されなかったと思われる。なお、アゾ化合物の不溶性が、アゾ基還元妨害になっていることを示唆する知見として、不溶性アゾ化合物であるピグメントイエロー 12 (本被験物質と類似構造を示し、3,3'-ジクロロベンジジンの誘導体) の Ames 試験陰性⁵⁾の報告およびラットならびにマウス癌原性試験陰性⁶⁾の報告がある。

以上の試験結果から、本試験条件下においてピグメントオレンジ 16 のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

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) You, Z., Brezzell, M. D., Das, S. K., Espadas-Torre, M. C., Hooberman, B. H., Sinsheimer, J. E. : *Mutat. Res.* 319(1), 19-30, 1993.
- 3) Galloway, S. M., Bloom, A. D., Resnick, M., Margoline, B. H., Nakamura, F., Archer, P. and Zeiger E. : *Environ. Mutagen.* . 7, 1-51, 1985.
- 4) Morita, T., Asano, N., Awogi, T., Sasaki, Y. F., Sato, S., Shimada, H., Sutou, S., Suzuki, T., Wakata, A., Sofuni, T. and Hayashi, M. : *Mutat. Res.* 389, 3-122, 1997.
- 5) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Peiperl, M. D. and Vaughan, V. L. : *Mutat. Res.* 136, 33-47, 1984.

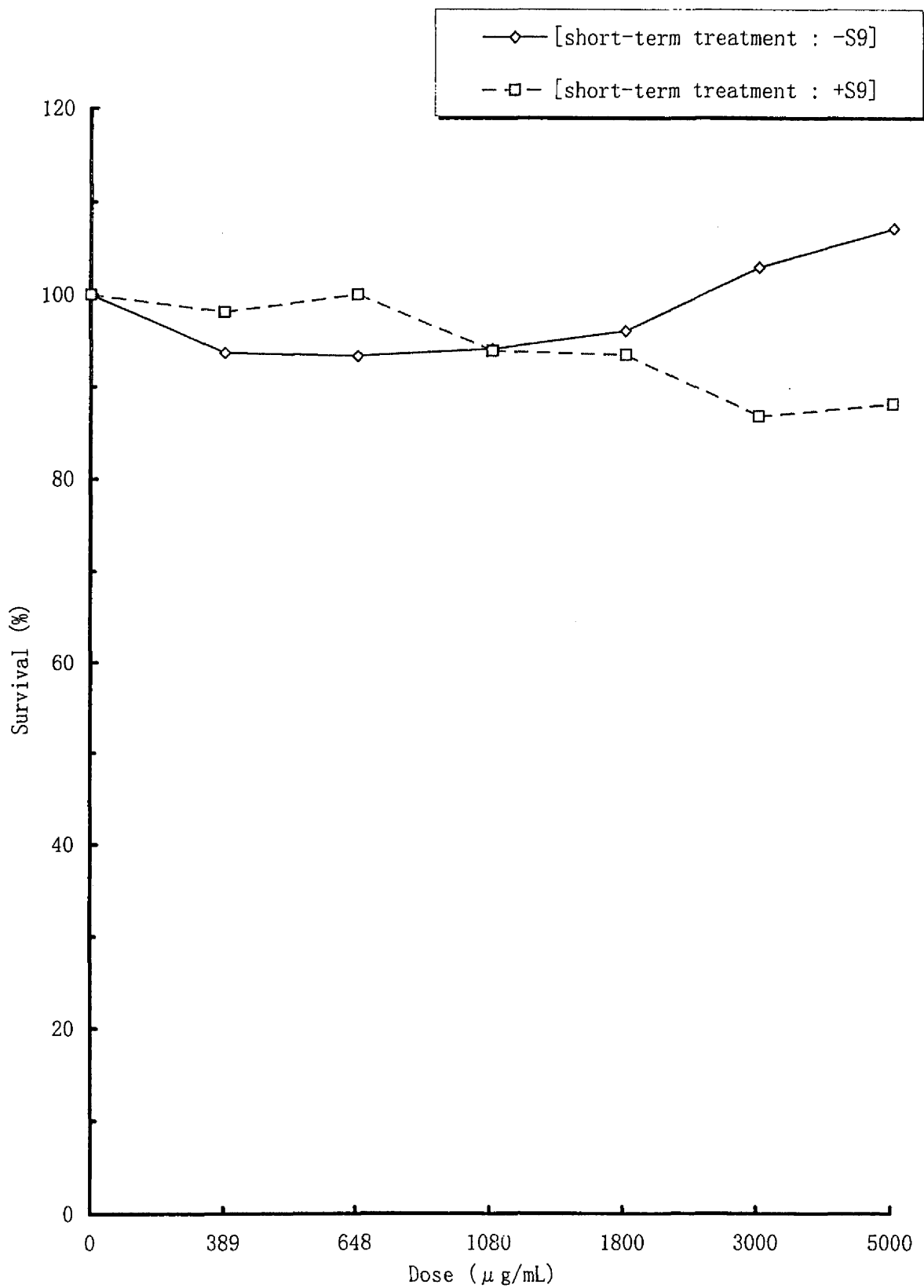


Figure 1. Dose-survival curves of C.I. Pigment Orange 16 [short-term treatment]

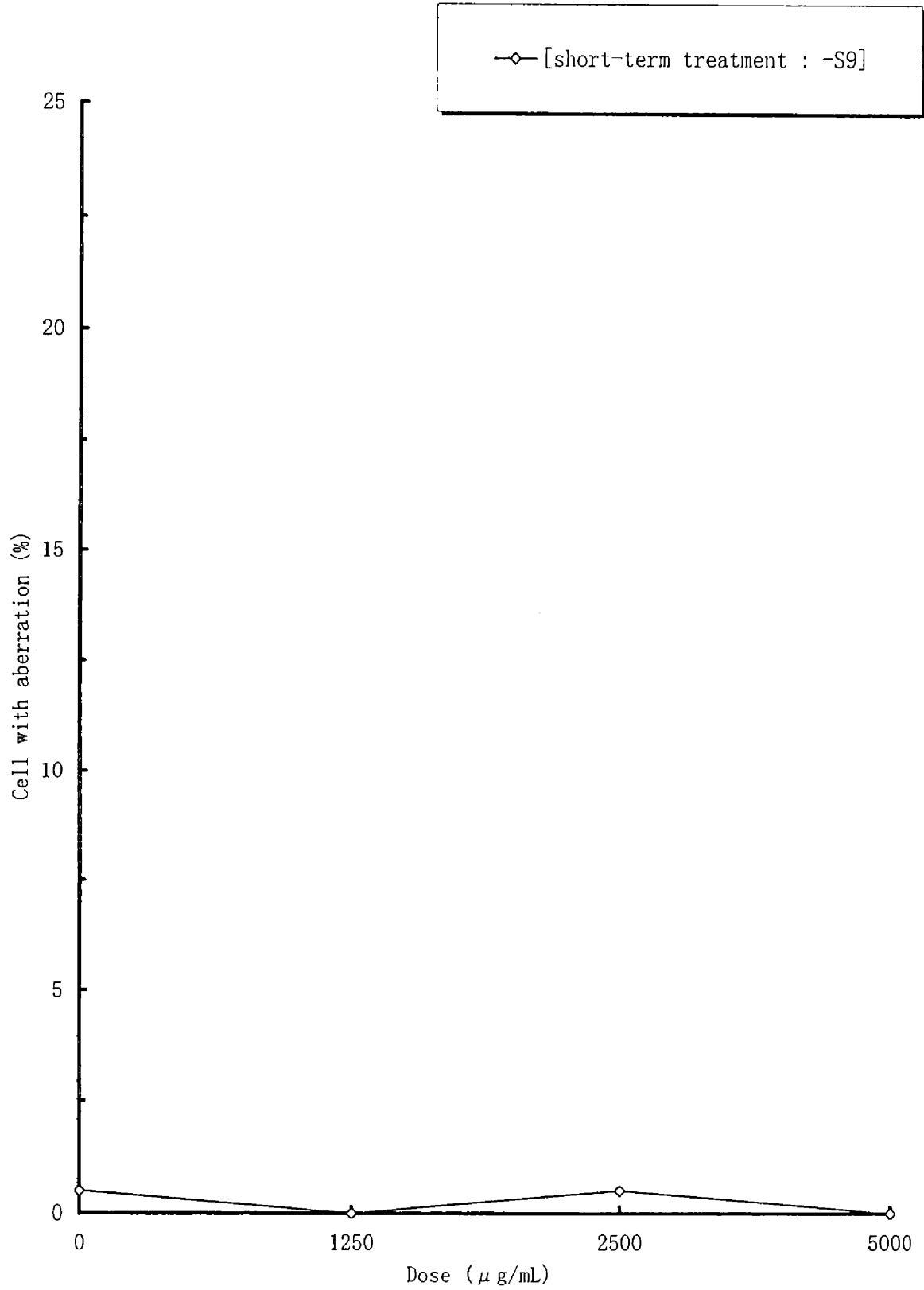


Figure 2. Incidence of structural aberrations induced by C.I. Pigment Orange 16 [short-term treatment:-S9]

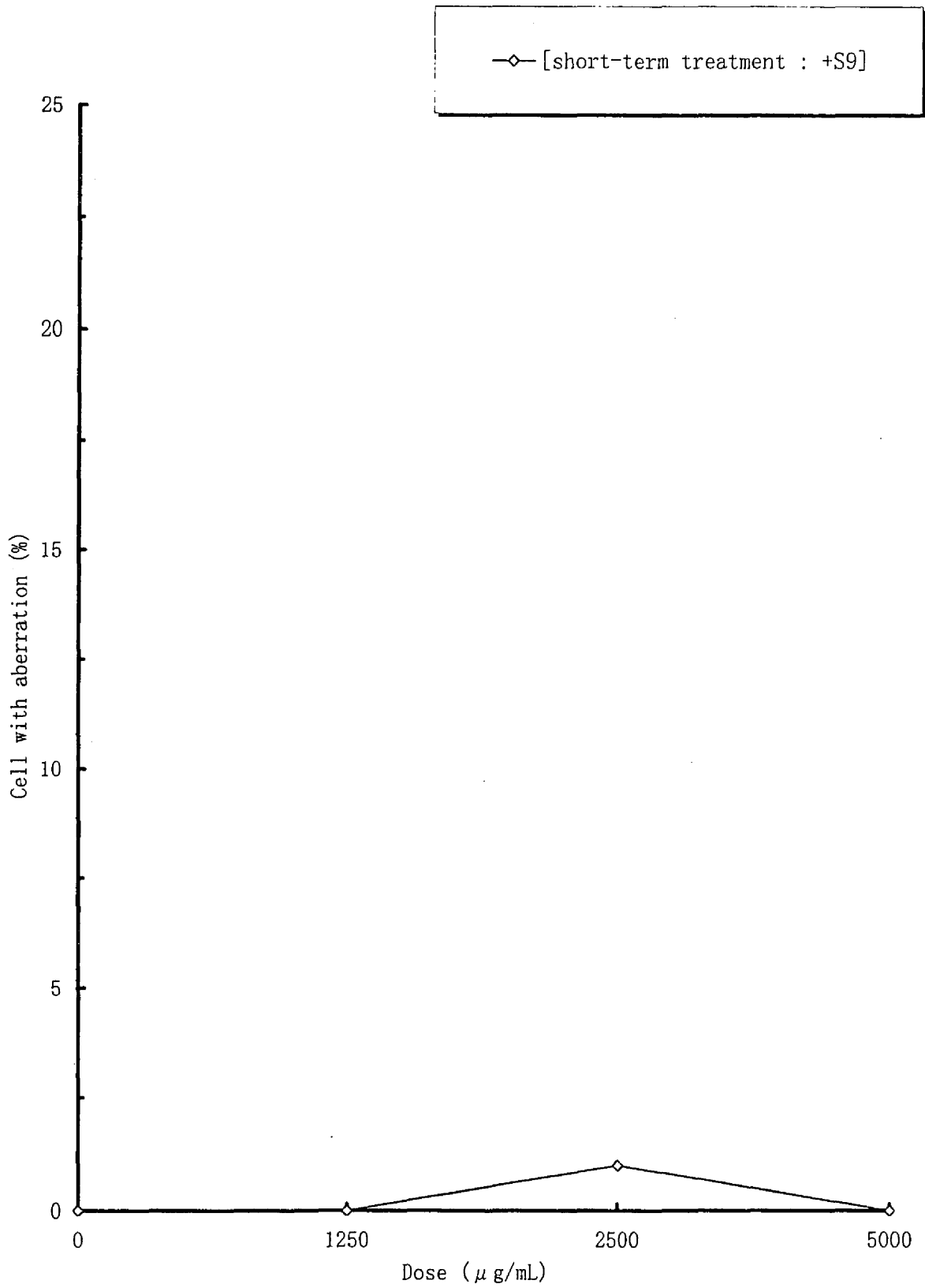


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by C.I. Pigment Orange 16 [short-term treatment: +S9]

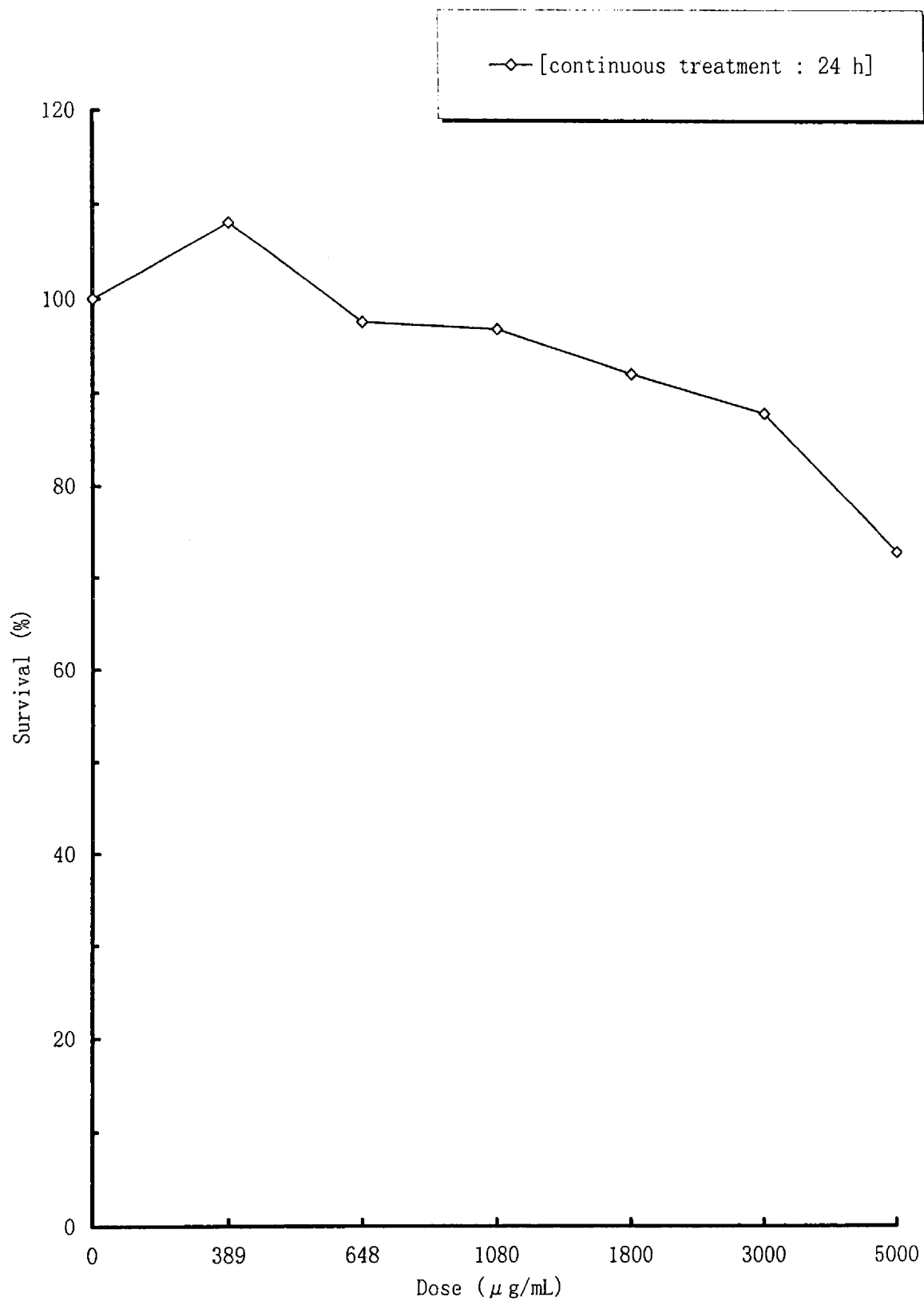


Figure 4. Dose-survival curve of C.I. Pigment Orange 16 [continuous treatment:24 h]

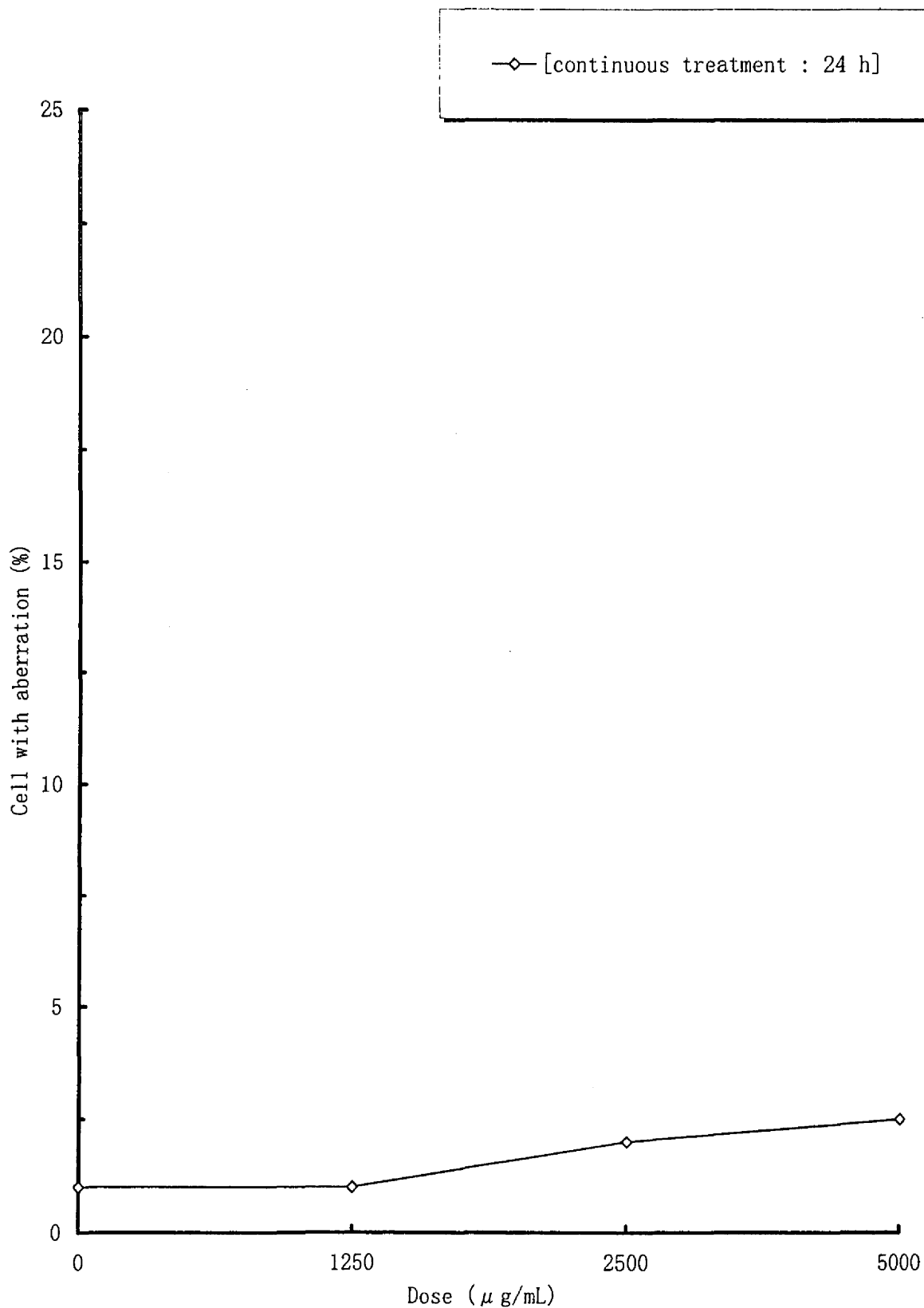


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by C.I. Pigment Orange 16 [continuous treatment: 24h]

Table 1. Results of growth inhibition test on C.I. Pigment Orange 16 [short-term treatment]

Exp. No. 4188 (115-106)

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]
1% CMC-Na a)	0	100.0 100.0	[100.0]	1% CMC-Na a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	389 d)	91.6	[93.6]	Test substance	389 d)	96.2	[98.1]
		95.6				99.9	
	648 d)	90.1	[93.2]		648 d)	97.3	[99.9]
		96.3				102.5	
	1080 d)	93.9	[94.0]		1080 d)	94.1	[93.8]
		94.1				93.4	
	1800 d)	96.9	[95.9]		1800 d)	92.2	[93.4]
		94.8				94.5	
	3000 d)	106.0	[102.9]		3000 d)	86.5	[86.7]
		99.7				86.9	
	5000 d)	108.5	[107.1]		5000 d)	87.7	[88.0]
		105.6				88.3	

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— Not inhibited

[short-term treatment : +S9] ——— Not inhibited

a) : Negative control

d) : Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with C. I. Pigment Orange 16
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 4188 (115-106)

Compound	Dose (μ g/mL)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Cell Survival (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
1% CMC-Na a)	0	200	2	0	0	0	1	0	100.0	0.5 -	0.0 -	-
Test substance	1250 d)	200	2	0	0	0	0	0	102.1	0.0 -	0.5 -	-
	2500 d)	200	1	1	0	0	0	0	102.7	0.5 -	0.0 -	-
	5000 d)	200	3	0	0	0	0	0	89.1	0.0 -	0.0 -	-
MMC b)	0.1	200	17	36	69	0	0	0	75.4	46.5 +	0.5 -	+

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 shown at the end of exposure period

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with C. I. Pigment Orange 16
[short-term treatment : +S9]

Exp. No. 4188 (115-106)

Compound	Dose (μ g/mL)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Cell Survival (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
1% CMC-Na a)	0	200	1	0	0	0	0	0	100.0	0.0 -	0.0 -	-
Test substance	1250 d)	200	0	0	0	0	0	0	104.3	0.0 --	1.0 -	-
	2500 d)	200	0	1	1	0	0	0	96.6	1.0 -	0.0 -	-
	5000 d)	200	0	0	0	0	0	0	87.0	0.0 -	0.0 -	-
CP b)	12.5	200	20	21	115	1	1	0	76.8	61.0 +	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 shown at the end of exposure period

Table 4. Results of growth inhibition test on C.I.Pigment Orange 16 [continuous treatment]

Exp. No. 4188 (115-106)

[continuous treatment : 24 h]				[continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]
1% CMC-Na a)	0	100.0 100.0	[100.0]				
Test substance	389 d)	106.7 109.5	[108.1]				
	648 d)	96.8 98.4	[97.6]				
	1080 d)	97.9 95.8	[96.9]				
	1800 d)	92.4 91.6	[92.0]				
	3000 d)	81.9 93.8	[87.9]				
	5000 d)	71.9 73.8	[72.9]				

50% Growth inhibition dose was as follows:
 [continuous treatment : 24 h] ——— Not inhibited

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

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. Pigment Orange 16
[continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 4188 (115-106)

Compound	Dose (μ g/ml)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Cell Survival (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
1% CMC·Na a)	0	200	2	2	1	0	0	0	100.0	1.0 -	0.0 -	-
Test substance	1250 d)	200	2	0	0	1	1	0	88.7	1.0 -	0.5 -	-
	2500 d)	200	1	4	0	0	0	0	83.9	2.0 -	0.5 -	-
	5000 d)	200	2	4	1	0	0	0	32.8	2.5 -	1.0 -	-
MMC b)	0.05	200	9	43	72	1	0	0	71.3	48.0 +	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 shown at the end of exposure period