

最 終 報 告 書

C.I.ピグメントイエロー53 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：4795 (115-137)

平成 13 年 6 月 4 日

試験委託者
厚生労働省 医薬局

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
12. 被験物質	7
13. 試験材料および方法	8
14. 試験結果	16
15. 考察および結論	18
16. 参考文献	19
17. 参考とした資料	19

Figures	F-1~5
Figure 1 Dose-survival curves of C.I. Pigment Yellow53 [short-term treatment]	F-1
Figure 2 Dose-survival curve of C.I. Pigment Yellow53 [continuous treatment]	F-2
Figure 3 Incidence of structural aberrations induced by C.I. Pigment Yellow53 [short-term treatment : -S9]	F-3
Figure 4 Incidence of structural aberrations induced by C.I. Pigment Yellow53 [short-term treatment : +S9]	F-4
Figure 5 Incidence of structural aberrations induced by C.I. Pigment Yellow53 [continuous treatment : 24h]	F-5

Tables		T-1~5
Table 1	Results of growth inhibition test on C.I. Pigment Yellow53 [short-term treatment]	T-1
Table 2	Results of growth inhibition test on C.I. Pigment Yellow53 [continuous treatment]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. Pigment Yellow53 [short-term treatment : -S9]	T-3
Table 4	Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. Pigment Yellow53 [short-term treatment : +S9]	T-4
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. Pigment Yellow53 [continuous treatment : 24h]	T-5

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、C.I.ピグメントイエロー53 は染色体異常を誘起しないものと判断した。

C.I.ピグメントイエロー53 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/TU) 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で、懸濁処理の影響から懸濁物の残存が認められた。本試験においてこれが染色体標本上に付着し、染色体の顕微鏡観察に支障を来すことが懸念されたため、19.5 (短時間処理法-S9 処理のみ)、78.1, 313, 1250, 5000 $\mu\text{g/mL}$ の用量を用いた予備検討 (顕微鏡観察可能用量の把握) を実施した。その結果を基に染色体異常試験用量を設定した。短時間処理法-S9 処理で 9.77, 19.5 および 39.1 $\mu\text{g/mL}$, 同+S9 処理で 19.5, 39.1 および 78.1 $\mu\text{g/mL}$, 連続処理法 24 時間処理で 4.88, 9.75 および 19.5 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、C.I.ピグメントイエロー53 処理群の場合、短時間処理法および連続処理法のいずれにおいても染色体異常の明確な誘発は認められなかった。

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であるマイトマイシン 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

C.I.ピグメントイエロー53 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.

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

C.I.ピグメントイエロー53

12.2. ロット番号

12.3. 純度

100 wt%

12.4. 化学分析値

TiO₂ : 81.2%

Sb₂O₃ : 12.22%

NiO : 3.54%

12.5. 提供元

12.6. 一般名

チタンイエロー

12.7. 化学名

チタン, アンチモン, ニッケルの複合酸化物

12.8. 構造式又は示性式

(Ti, Sb, Ni) O₂

12.9. 物質の状態

黄色固体

12.10. 溶解性

水, アセトン, DMSO に不溶

12.11. 残余被験物質の処理

被験物質の一部を保管した後, 残りは被験物質提供元に返却した.

12.12. CAS No.

8007189

13. 試験材料および方法

13.1. 試験細胞株

ほ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/IU 細胞) を選択した。

CHL/IU 細胞は昭和 59 年 11 月 15 日に国立衛生試験所 (現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した細胞を融解した後、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 13 (短時間処理法) および 9 (連続処理法) の細胞を、染色体異常試験では同 16 (短時間処理法) および 13 (連続処理法) の細胞を用いた。

13.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI : 旭テクノグラス株式会社 ; Lot No. 99560003 【短時間処理法】, 99560004 【連続処理法 24 時間処理 : 予備試験】, 99560005 【連続処理法 24 時間処理 : 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°C, 30 分) 済み仔牛血清 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 10690198 【短時間処理法】, 1075354 【連続処理法 24 時間処理 : 予備試験】, 1027934 【連続処理法 24 時間処理 : 本試験】) 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°C) に保存した。

13.3. 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°C の条件で細胞を培養した。

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社 : Lot No. CAM-430) を試験に使用した。

13.4.1. 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．

ロット番号	RAA-430
調製日	平成 12 年 7 月 21 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系
性／週齢	雄／7 週齢
体重	199～231 g
臓器	肝臓
誘導物質投与量 および投与回数	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF) 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)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	28.32 mg/mL

13.4.2. 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 (pH 7.2)	4 μmol

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水，DMSO，アセトンに不溶で，水中での分散性が良好であるため，被験物質を注射用水（株式会社大塚製薬工場；Lot No. K9G83）に懸濁し，調製原液とした．この調製原液を使用溶媒を用いて順次希釈した後，速やかに処理を行った．

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒で試験した。

13.6.2. 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. K9G83）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. 285AIH）を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K9D89）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。試験用量は、0.1 $\mu\text{g/mL}$ とした。

13.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K9G83）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. 9007）を生理食塩液（Lot No. K9D89）を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。試験用量は 12.5 $\mu\text{g/mL}$ とした。

13.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

13.7.1. 試験用量

予備的な試験（24.3, 81.0, 270, 900 および 3000 $\mu\text{g/mL}$ 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 900 $\mu\text{g/mL}$ 以上および +S9 処理の 3000 $\mu\text{g/mL}$ の用量において中等度以上の細胞増殖抑制が認められた。

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 7～9 用量（公比 5/3）を設定した。

試験系	用量数	試験用量 ($\mu\text{g/mL}$)
短時間処理法-S9 処理	10	50.4 ~ 5000
短時間処理法+S9 処理	7	233 ~ 5000

13.7.2. 使用ウェル数および識別

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

試験系および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

13.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（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）の各ウェ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 460 μ L を除いた後、溶媒あるいは被験物質液 60 μ L を加えた。6 時間被験物質に暴露させた後、各ウェ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. 1074505）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 μ L を加え、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。

13.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 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 560 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 60 μ L を加えた。

以下の操作は 13.7.3. に記載の方法に準じた。

13.7.5. 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ウェルから培養液を除き、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. ELQ9435）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. 107D2074）水溶液で 10 分間染色した。各ウェルを水洗した後、乾燥させた。各ウェルに色素溶出液（30% エタノール、1% 酢酸水溶液）を 3.0 mL 加え、5 分間放置した後、分光光度計（105-50 型；株式会社日立製作所）を用いて 580 nm での吸光度を測定した。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ェルの四捨五入する以前の値から求めた。

13.8. 染色体異常試験（本試験）

13.8.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験で、懸濁処理の影響から懸濁物の残存が認められた。本試験においてこれが染色体標本上に付着し、染色体の顕微鏡観察に支障を来すことが懸念されたため、19.5（短時間処理法-S9 処理のみ）、78.1, 313, 1250, 5000 $\mu\text{g/mL}$ の用量を用いた予備検討（顕微鏡観察可能用量の把握）を実施した。その結果、短時間処理法-S9 処理では 19.5 $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理では 78.1 $\mu\text{g/mL}$ において顕微鏡観察が可能であった。この結果を基に、各試験系それぞれ 5~7 用量（公比 2：下表参照）を本試験の用量に設定した。

試験系	試験用量 ($\mu\text{g/mL}$)							
短時間処理法-S9 処理	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1			
短時間処理法+S9 処理	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250	

13.8.2. 使用プレート数および識別

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

試験系および連番を明記することにより各プレートを識別した。

13.8.3. 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 2.3 mL を除いた後、溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。6 時間各物質に暴露させた後、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. 1074505）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

13.8.4. 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 2.8 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後、溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。以下の操作は 13.8.3. に記載の方法に準じた。

13.8.5. 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. 1059548) 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. 1074501) 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. TP392174 927) を用いて希釈した1.2% ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. 040408362) 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.

1 プレート当たり2~3枚の染色体標本作製した.

13.8.6. 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 C-100LU: 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.

13.8.7. 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.

全ての標本をコード化した後, マスキング法で観察した.

13.9. 連続処理法：24 時間処理

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。

13.9.1. 陽性対照（連続処理法 24 時間処理）

注射用水（Lot No. K9G83）5 mL に溶解したマイトマイシン C（Lot No. 285AIIH）を生理食塩液（Lot No. K9D89）を用いて希釈した後、0.05 $\mu\text{g/mL}$ の用量で試験した。

13.9.2. 細胞増殖抑制試験（連続処理法 24 時間処理）

予備的な試験（24.3, 81.0, 270, 900 および 3000 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量：公比 10/3）の結果、900 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において中等度以上の細胞増殖抑制が認められた。

従って、50.4～5000 $\mu\text{g/mL}$ の 10 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 ウエルを用いた。

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 460 μL を除いた後、溶媒あるいは被験物質液 60 μL を加えた。さらに 24 時間被験物質に暴露させた後、各ウエルから培養液を除き、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. ELJ8204）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. 107D2074）水溶液で 10 分間染色した。各ウエルを水洗した後、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 3.0 mL 加え、5 分間放置した後、分光光度計（105-50 型；株式会社日立製作所）を用いて 580 nm での吸光度を測定した。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。

13.9.3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

細胞増殖抑制試験で、懸濁処理の影響から懸濁物の残存が認められた。本試験においてこれらが染色体標本上に付着し、染色体の顕微鏡観察に支障を来すことが懸念されたため、78.1, 313, 1250, 5000 $\mu\text{g/mL}$ の用量を用いた予備検討（顕微鏡観察可能用量の把握）を実施した。その結果、78.1 $\mu\text{g/mL}$ においても顕微鏡観察が不可能であった。この結果を基に、4.88, 9.75, 19.5, 39.0 および 78.0 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量（公比 2）を処理した後、4.88～19.5 $\mu\text{g/mL}$ 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 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、培養液 2.3 mL を除き、溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液 300 μ L を加えた。さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

染色体標本作製の 2 時間前にコルセミド溶液 (Lot No. 1081687) を添加した。次いで、0.25% トリプシン溶液 (Lot No. 1074501) を用いて細胞を剥離した。低張処理を実施し固定した後、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。

13.8.7. 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 13.8.6. の手順に準じて陰性対照、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。

13.10. 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、かつ再現性が認められた場合に疑陽性、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。

14. 試験結果

14.1. 細胞増殖抑制試験

14.1.1. 短時間処理法

試験結果を Figure 1 および Table 1 に示した.

-S9 処理において用量相関的な細胞毒性作用が認められ, 細胞増殖を 50% 抑制する濃度は, 1843 $\mu\text{g/mL}$ と算出された.

+S9 処理においては明確な細胞毒性作用は観察されなかった.

14.1.2. 連続処理法

試験結果を Figure 2 および Table 2 に示した.

用量相関的な細胞毒性作用が認められ, 細胞増殖を 50% 抑制する濃度は, 509 $\mu\text{g/mL}$ と算出された.

14.1.3. 析出等の観察

被験物質暴露終了時, 懸濁処理のため 84.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において懸濁物の残存が認められた.

14.2. 染色体異常試験

14.2.1. 短時間処理法-S9 処理

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

C.I.ピグメントイエロー53 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同等であった.

また, 被験物質処理群の全ての標本上に懸濁物の残存が認められた.

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 41.0% であった.

14.2.2. 短時間処理法+S9 処理

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

C.I.ピグメントイエロー53 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同等であった.

また, 被験物質処理群の全ての標本上に懸濁物の残存が認められた.

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 56.5% であった.

14.2.3. 連続処理法 24 時間処理

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

C.I.ピグメントイエロー53 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同等であった.

また, 被験物質処理群の全ての標本上に懸濁物の残存が認められた.

陽性対照の MMC 処理群での染色体構造異常出現頻度は 71.5% であった.

14.2.4. 析出等の観察

被験物質暴露終了時, 懸濁処理のため 78.0 µg/mL 以上の用量において懸濁物の残存が認められた.

15. 考察および結論

C.I.ピグメントイエロー53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/IU）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

顕微鏡観察可能用量を把握するための予備検討を基に、短時間処理法-S9処理、+S9処理ならびに連続処理法 24 時間処理とも顕微鏡観察が可能な用量まで検討した。

その結果、C.I.ピグメントイエロー53処理では短時間処理法（-S9 および +S9 処理）ならびに連続処理法（24 時間処理）のいずれの試験系においても明確な染色体異常の誘発は認められなかった。

本被験物質 C.I.ピグメントイエロー53 の変異原性に関する報告はなかった。本被験物質の構成物質である酸化アンチモン（Ⅲ）は枯草菌胞子を用いたレックアッセイで陽性¹⁾、TA100 および TA98 を用いた Ames 試験では陰性¹⁾、V79 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験（SCE）では陽性¹⁾との報告があった。酸化アンチモン（Ⅲ）の類縁体である塩化アンチモン（Ⅲ）は V79 細胞を用いた小核試験は陽性²⁾、V79 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験（SCE）では陽性¹⁾との報告があった。本被験物質の特性により、高用量処理領域での顕微鏡観察が十分できなかったため、陰性結果になった可能性も否定できない。

なお、短時間処理法ならびに連続処理法の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施設での背景データ（Appendix 4）の範囲内であり、本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、本試験条件下において C.I.ピグメントイエロー53 のは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。

16. 参考文献

- 1) Kuroda K., Endo G., Okamoto A., Yoo S. Y., Horiguchi S. : Mutat. Res, 264(4) : 163-170, (1991).
- 2) Gebel T. : Mutat. Res., 412(3) : 213-218, (1998).

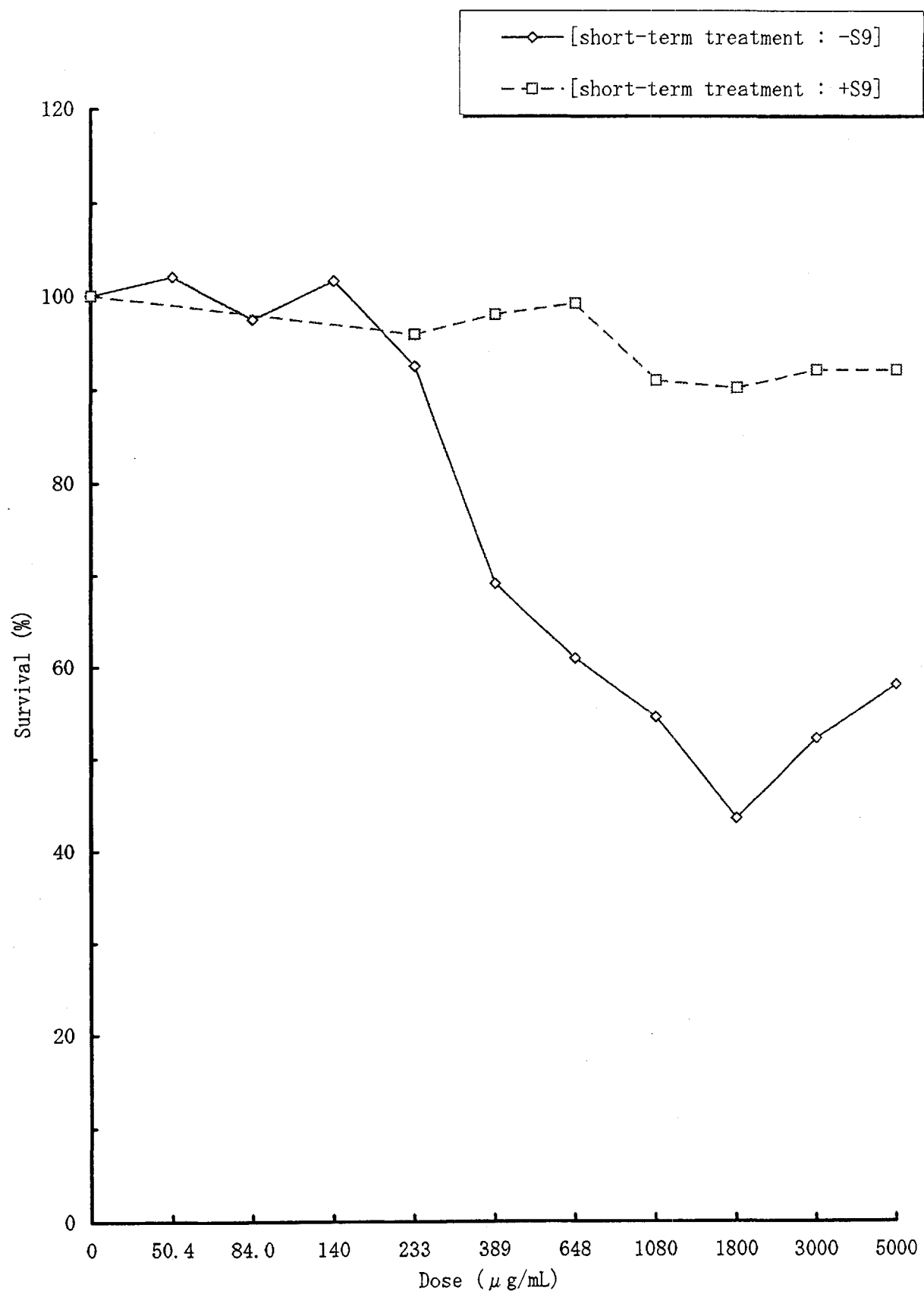


Figure 1. Dose-survival curves of C.I. Pigment Yellow53
[short-term treatment]

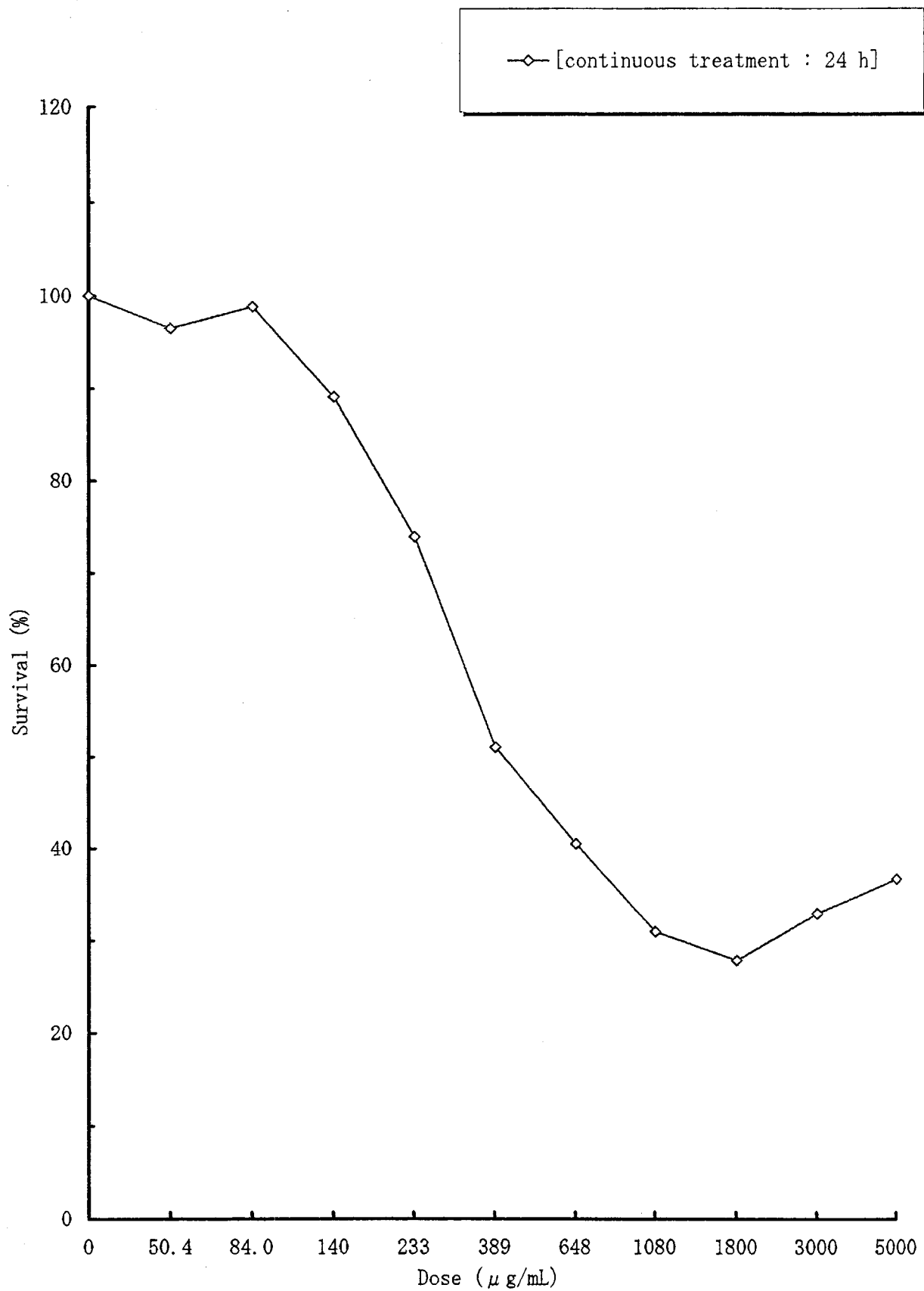


Figure 2. Dose-survival curves of C.I. Pigment Yellow53
[continuous treatment]

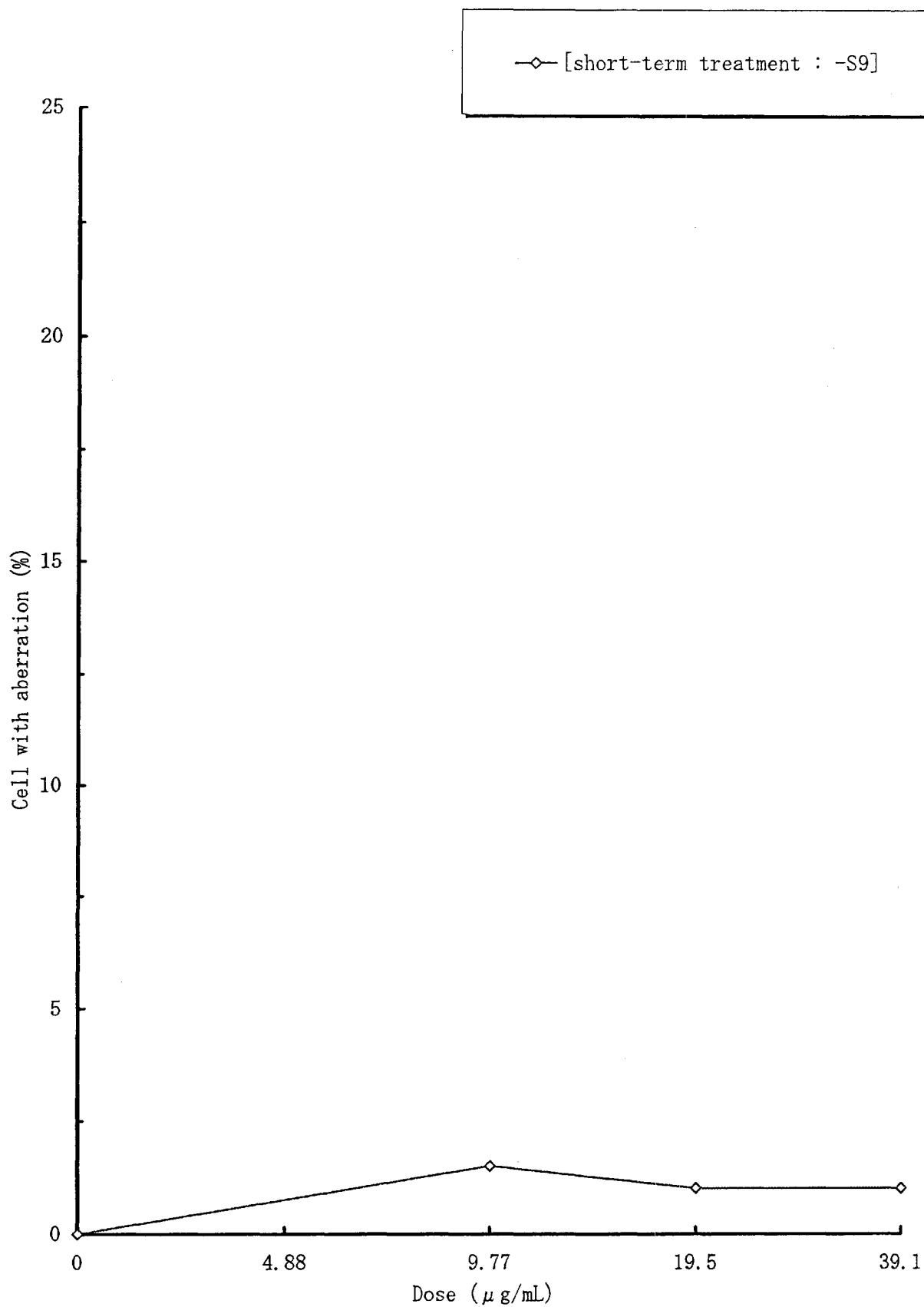


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by C.I. Pigment Yellow53 [short-term treatment:-S9]

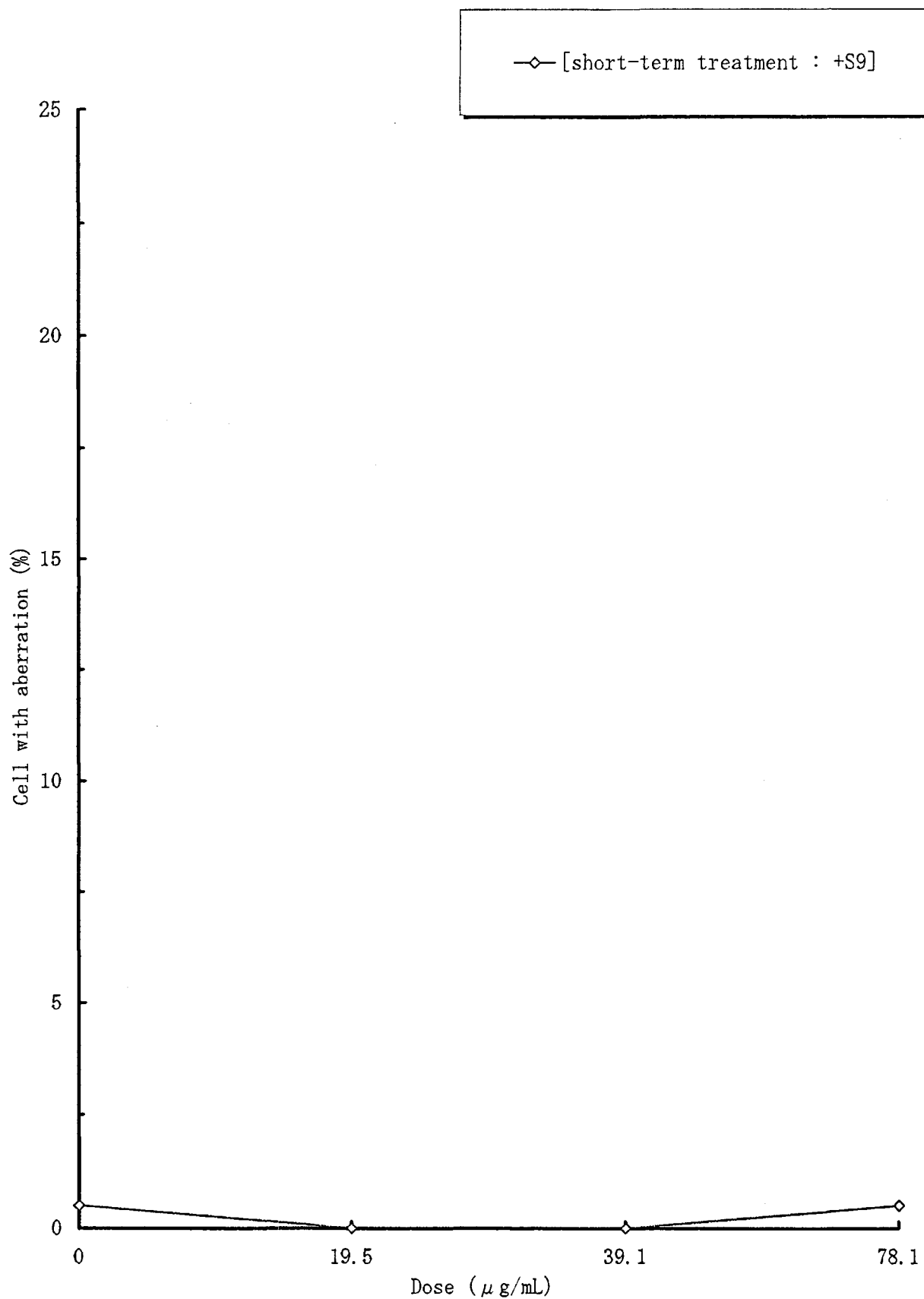


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by
C.I. Pigment Yellow53 [short-term treatment: +S9]

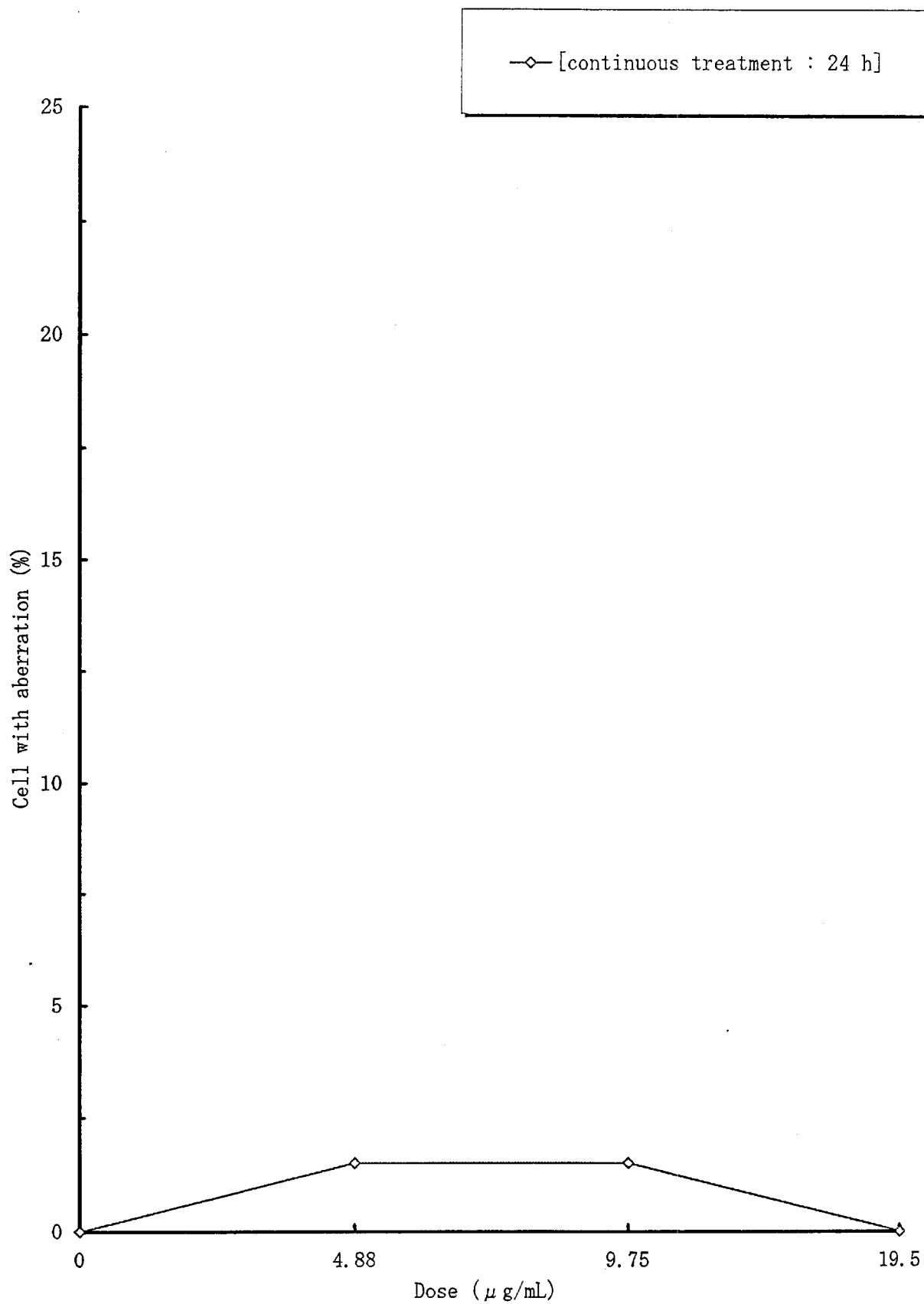


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by C.I. Pigment Yellow53 [continuous treatment:24 h]

Table 1. Results of growth inhibition test on C.I. Pigment Yellow53 [short-term treatment]

Exp. No. 4795 (115-137)

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]
D.W. a)	0	100.0 100.0	[100.0]	D.W. a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	50.4	101.8 102.2	[102.0]	Test substance	233 b)	95.7 95.9	[95.8]
	84.0 b)	101.1 93.7	[97.4]		389 b)	100.2 95.7	[97.9]
	140 b)	101.7 101.3	[101.5]		648 b)	100.5 97.6	[99.1]
	233 b)	92.0 92.7	[92.4]		1080 b)	91.1 90.5	[90.8]
	389 b)	69.9 68.1	[69.0]		1800 b)	88.7 91.4	[90.1]
	648 b)	56.9 64.8	[60.9]		3000 b)	90.7 93.3	[92.0]
	1080 b)	54.7 54.2	[54.5]		5000 b)	91.1 92.8	[92.0]
	1800 b)	43.4 43.6	[43.5]				
	3000 b)	55.7 48.6	[52.2]				
	5000 b)	59.6 56.4	[58.0]				

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— 1843 (μ g/mL)

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

a): Negative control

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

Table 2. Results of growth inhibition test on C. I. Pigment Yellow53 [continuous treatment]

Exp. No. 4795 (115-137)

[continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]
D.W. a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	50.4	95.7 97.2	[96.4]
	84.0 b)	100.3 97.1	[98.7]
	140 b)	87.1 90.8	[89.0]
	233 b)	73.3 74.4	[73.8]
	389 b)	51.4 50.4	[51.0]
	648 b)	40.7 40.2	[40.4]
	1080 b)	29.8 32.0	[30.9]
	1800 b)	31.2 24.4	[27.8]
	3000 b)	35.5 30.4	[32.9]
	5000 b)	37.6 35.7	[36.6]

50% Growth inhibition dose was as follows:
 [continuous treatment : 24 h] ——— 509 (μ g/mL)

a): Negative control

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

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. Pigment Yellow53
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 4795 (115-137)

Compound	Dose (μ g/mL)	Time of exposure (h)	Cell survival (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of polyploid cells analyzed	Number of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
D.W. a)	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0) —	200	0 (0.0) —	—
	9.77	6	83.6	200	0	1	2	0	0	0	3 (1.5) —	200	4 (2.0) —	—
	19.5	6	81.7	200	0	1	1	0	0	0	2 (1.0) —	200	2 (1.0) —	—
	39.1	6	80.4	200	1	1	1	0	0	0	2 (1.0) —	200	3 (1.5) —	—
	78.1 c)	6	91.4	N.O. d)										
MMC b)	0.1	6	98.4	200	5	36	66	0	0	0	82 (41.0) +	200	2 (1.0) —	+

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

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

d): Not observed

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. Pigment Yellow53
[short-term treatment : +S9]

Exp. No. 4795 (115-137)

Compound	Dose (μ g/mL)	Time of exposure (h)	Cell survival (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of polyploid cells analyzed	Number of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
D.W. a)	0	6	100.0	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5) -	200	0 (0.0) -	-
Test substance	19.5	6	89.3	200	2	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	200	0 (0.0) -	-
	39.1	6	91.6	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0) -	200	1 (0.5) -	-
	78.1 c)	6	100.6	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5) -	200	1 (0.5) -	-
	156 c)	6	90.6	N.O. d)										
	313 c)	6	93.4	N.O.										
	625 c)	6	100.8	N.O.										
	1250 c)	6	107.6	N.O.										
CP b)	12.5	6	91.2	200	7	34	110	0	0	0	113 (56.5) +	200	1 (0.5) -	+

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

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

d): Not observed

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. Pigment Yellow53
[continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 4795 (115-137)

Compound	Dose (μ g/mL)	Time of exposure (h)	Cell survival (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of polyploid cells analyzed	Number of polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
D.W. a)	0	24	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0) —	200	1 (0.5) —	—	—
Test substance	4.88	24	98.4	200	1	1	2	0	0	0	3 (1.5) —	200	0 (0.0) —	—	—
	9.75	24	115.1	200	0	1	2	0	0	0	3 (1.5) —	200	2 (1.0) —	—	—
	19.5	24	112.9	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0) —	200	0 (0.0) —	—	—
	39.0	24	106.2	N.O. d)											
	78.0 c)	24	93.9	N.O.											
MMC b)	0.05	24	87.6	200	14	68	139	0	0	0	143 (71.5) +	200	2 (1.0) —	+	+

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

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

d): Not observed