

最終報告書

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：4180（115-098）

平成12年7月13日

試験委託者
厚生省 生活衛生局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目次

1. 要約.....	3
2. 表題.....	4
3. 試験目的.....	4
11. 被験物質.....	6
12. 試験材料および方法.....	8
13. 試験結果.....	15
14. 考察および結論.....	16
15. 参考文献.....	17

Figures	F-1-4
Figure 1 Dose-survival curves of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment]	F-1
Figure 2 Incidence of structural aberrations induced by 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment : -S9]	F-2
Figure 3 Incidence of structural aberrations induced by 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment : +S9]	F-3
Figure 4 Incidence of structural aberrations induced by 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- at the confirmative examination [short-term treatment : -S9]	F-4

Tables		T-1~4
Table 1	Results of growth inhibition test on 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment : +S9]	T-3
Table 4	Results of confirmative examination of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment : -S9]	T-4

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンは染色体異常を誘起するものと判断した。

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果に基づき、試験用量を設定した。染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理で 0.625, 1.25, 2.50 および 5.00 $\mu\text{g/mL}$, +S9 処理で 3, 7.5, 15.0 および 30.0 $\mu\text{g/mL}$ のそれぞれ 4 用量について染色体異常の観察を実施した。

その結果、1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン処理群の場合、+S9 処理では染色体構造異常の明確な増加は観察されなかったが、-S9 処理の高用量群においてのみ染色体構造異常の出現頻度が疑陽性 (±) となった。従って、再現性あるいは用量依存性をみるため-S9 処理について 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50 および 5.00 $\mu\text{g/mL}$ の 8 用量を用いて確認試験を実施した。2.50~5.00 $\mu\text{g/mL}$ の 6 用量について染色体異常の観察を実施した結果、試験用量に依存した染色体構造異常の増加が観察され、陽性反応と判断した。

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

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討した。

11. 被験物質

11.1. 被験物質名

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン

【1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-】

11.2. ロット番号

11.3. 純度

99.2 wt%

11.4. 保管条件

直射日光および高温多湿の場書を避け、密栓して室温保存した。

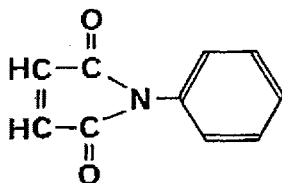
11.5. 別名

N-Phenylmaleimide (PMI)

11.6. CAS 番号

941-69-5

11.7. 構造式又は示性式



11.8. 分子量

173.2

11.9. 不純物の名称及び濃度

2-アニリノ, N-フェニルサクシンイミド 0.5~0.8%

PMI のポリマー 0.03%

11.10. 常温における性状

黄色固体 (フレーク状)

11.11. 融点

88.7°C

11.12. 沸点

142°C/0.8 kPa

11.13. 溶媒に対する溶解度等

水 : 100 ppm 以下

DMSO : 約 50 g/100 mL

アセトン : 約 50 g/100 mL

11.14. 安定性

水に接触すると加水分解する。

11.15. 取り扱い上の注意

吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないよう適切な保護具を着用した。粉塵の発生を極力抑え、取り扱い後は容器を密栓した。

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

は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、試験に用いた細胞の継代数は細胞増殖抑制試験で12、染色体異常試験で14、確認試験で13であった。

12.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（IWAKI:旭テクノガラス株式会社；Lot No. 99560002【予備試験，本試験】，19701【確認試験】）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. 1014735【予備試験，本試験】，1019033【確認試験】）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℃）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

試製造後6ヵ月以内のS9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. CAM-394）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を以下に示す。

a. ロット番号	RAA-394
b. 調製日	1998年12月4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	200～239 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	27.10 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
KCl	33 μmol
MgCl ₂	5 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液	4 μmol

12.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶で，かつ同溶液中で安定であることからモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Lot No. K24605778 803 【予備試験，本試験】，Lot No. K24605778 830 【確認試験】) に溶解し，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希釈した後，速やかに処理を行った。

12.5.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒のみで試験した。

12.5.2. 陽性対照（短時間処理法）

-S9 処理（代謝活性化法によらない場合）の場合、注射用水（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K8F80【本試験】，K8K78【確認試験】）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. 215AHD【本試験】，247AHK【確認試験】）を生理食塩液（株式会社 大塚製薬工場；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。

12.5.3. 陽性対照（短時間処理法）

+S9 処理（代謝活性化法による場合）の場合，注射用水（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。

12.6. 用量設定試験（予備試験）

12.6.1. 試験用量

予備的な試験（8.10，27.0，90.0，300 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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）では 90.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上，+S9 処理では 27.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で強い細胞増殖抑制作用がみられた。

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 10 あるいは 8 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	10	1.01 ~ 100
短時間処理法+S9 処理	8	2.80 ~ 100

12.6.2. 使用ウエル数

1 用量当たり 2 ウエルを用いた。

試験系および試験用量群を明記することにより各ウエルを識別した。

12.6.3. 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 6 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. 1013685）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。

12.6.4. 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 6 μ L 加えた。
以下の操作は 12.6.3. に記載の方法に準じた。

12.6.5. 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 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、さらにプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。なお、算出には 2.80~7.78 μ g/mL の 3 点（短時間処理法-S9 処理），21.6~60.0 μ g/mL の 3 点（同+S9 処理）を用いた。

なお、細胞生存率の平均値は各ウエルの四捨五入する以前の値から求めた。

12.6.6. 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。

50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法-S9 処理で 4.47 $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理で 27.6 $\mu\text{g/mL}$ であった。

なお、被験物質暴露終了時、pH の変動、析出等の特筆すべき変化は、いずれの試験用量においても観察されなかった。

12.7. 本試験（染色体異常試験）

12.7.1. 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 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 ($\mu\text{g/mL}$)					
短時間処理法-S9 処理	0.625	1.25	2.50	5.00	10.0	20.0
短時間処理法+S9 処理	3.75	7.50	15.0	30.0	60.0	

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

短時間処理法-S9 処理において、染色体構造異常に関し 1 用量のみで疑陽性と判定されたことから 1.50, 2.00, 2.50, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50 および 5.00 $\mu\text{g/mL}$ （公差 0.50）の 8 用量を用いた確認試験を実施し、2.50~5.00 $\mu\text{g/mL}$ の 6 用量について染色体異常の観察を実施した。

12.7.2. 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。

12.7.3. 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 2.0 mL（陽性対照群は 2.3 mL）を除いた後、溶媒あるいは被験物質液 30 μL または陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1013685【本試験】、1026396【確認試験】）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。

12.7.4. 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 (陽性対照群は 2.8 mL) を除き、S9 mix を 500 μ L 添加した後、溶媒あるいは被験物質液 30 μ L または陽性対照物質溶液 300 μ L を加えた。以下の操作は 12.7.3. に記載の方法に準じた。

12.7.5. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に、最終濃度 0.2 μ g/mL となるようコルセミド溶液 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1015315 【本試験】, 1019640 【確認試験】) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25% トリプシン溶液 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1017538 【本試験】, 1022349 【確認試験】) を用いてプレートより細胞を剥離し、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細胞浮遊液とし、脱脂洗浄したスライドガラス上に 1~2 滴ずつ滴下した。スライド標本を十分乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8 : Merck KGaA ; Lot No. S617674 520 【本試験】, TP 334974 816 【確認試験】) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. 640181939 【本試験】, 840288308 【確認試験】) で 12 分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

1 プレートあたり 2~3 枚の染色体標本作製した。

12.7.6. 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。

12.7.7. 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.

12.8. 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.

12.9. D_{20} 値ならびに TR 値の算出法

D_{20} 値は分裂中期像の 20% にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であり, 最小二乗法により算出した. TR 値は一定濃度 (mg/mL) あたりの交換型異常 (cte) 出現数を示す比較値であり, 染色分体交換の出現頻度 (%) を被験物質濃度 (mg/mL 換算) で割ることにより算出した.

13. 試験結果

13.1. 短時間処理法-S9 処理

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

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン処理群での染色体構造異常出現頻度は 0.625 $\mu\text{g/mL}$ で 2.5%, 1.25 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 2.50 $\mu\text{g/mL}$ で 9.5% (±) を示した. 倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照と同等であった. また, 試験用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 染色体異常評価群中の高用量である 2.50 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 72.6%, 最高用量の 5.00 $\mu\text{g/mL}$ での生存率は 0.0% であった.

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 46.0% を示した.

なお, 被験物質暴露終了時, pH の変動, 析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

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.

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は, 陰性対照と同等であった. また, 染色体異常評価群では明確な細胞増殖抑制作用は観察されなかったが, 最高用量の 30.0 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 0.0% であった.

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 62.0% であった.

なお, 被験物質暴露終了時, pH の変動, 析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

13.3. 確認試験 (短時間処理法-S9 処理)

本試験において高用量の 1 用量においてのみ疑陽性 (±) と判定されたことから, 用量依存性あるいは再現性をみるため確認試験を実施した.

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

被験物質処理群での染色体構造異常は 2.50 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%, 3.00 $\mu\text{g/mL}$ で 3.0%, 3.50 $\mu\text{g/mL}$ で 4.5%, 4.00 $\mu\text{g/mL}$ で 10.0% (+) および 4.50 $\mu\text{g/mL}$ で 20.5% (+) であった. また, 試験用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 4.50 および 5.00 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率はそれぞれ 23.7 および 5.5% であった.

陽性対照では構造異常細胞が 61.0% 出現した.

14. 考察および結論

1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの変異原性，すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため，培養細胞（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に，短時間処理法-S9 処理ならびに同+S9 処理とも細胞の増殖が著しく抑制される濃度まで検討した。

その結果，1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン処理の+S9 処理では明確な染色体異常の誘発は認められなかった。一方，-S9 処理では高用量の 2.50 $\mu\text{g/mL}$ においてのみ染色体構造異常の誘発が観察された。疑陽性と判定されたが，1 用量のみでの増加であることから再現性あるいは用量依存性を見るために確認試験を実施した。確認試験の結果，染色体構造異常の出現に明確な用量依存性が認められたことから陽性反応と判断した。

変異原性の強さに関する相対的比較値である D_{20} 値は 0.005 (mg/mL) と算出され，既知変異原性物質に比較して1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンの変異原性は中等度であることを示していた。

また，本被験物質（1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン）についてはプレート法による Ames 試験で陰性との報告がある¹⁾。類縁体である N,N'-p-Phenylenedimalcimine，N,N'-o-Phenylenedimalcimid ならびに 1-Phenyl-2-pyrrolidione の変異原性に関する報告はなかった。

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

以上の試験結果から，本試験条件下において1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオンのは乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。

15. 参考文献

- 1) 社内データ（生活科学研究所にて試験実施），1985.

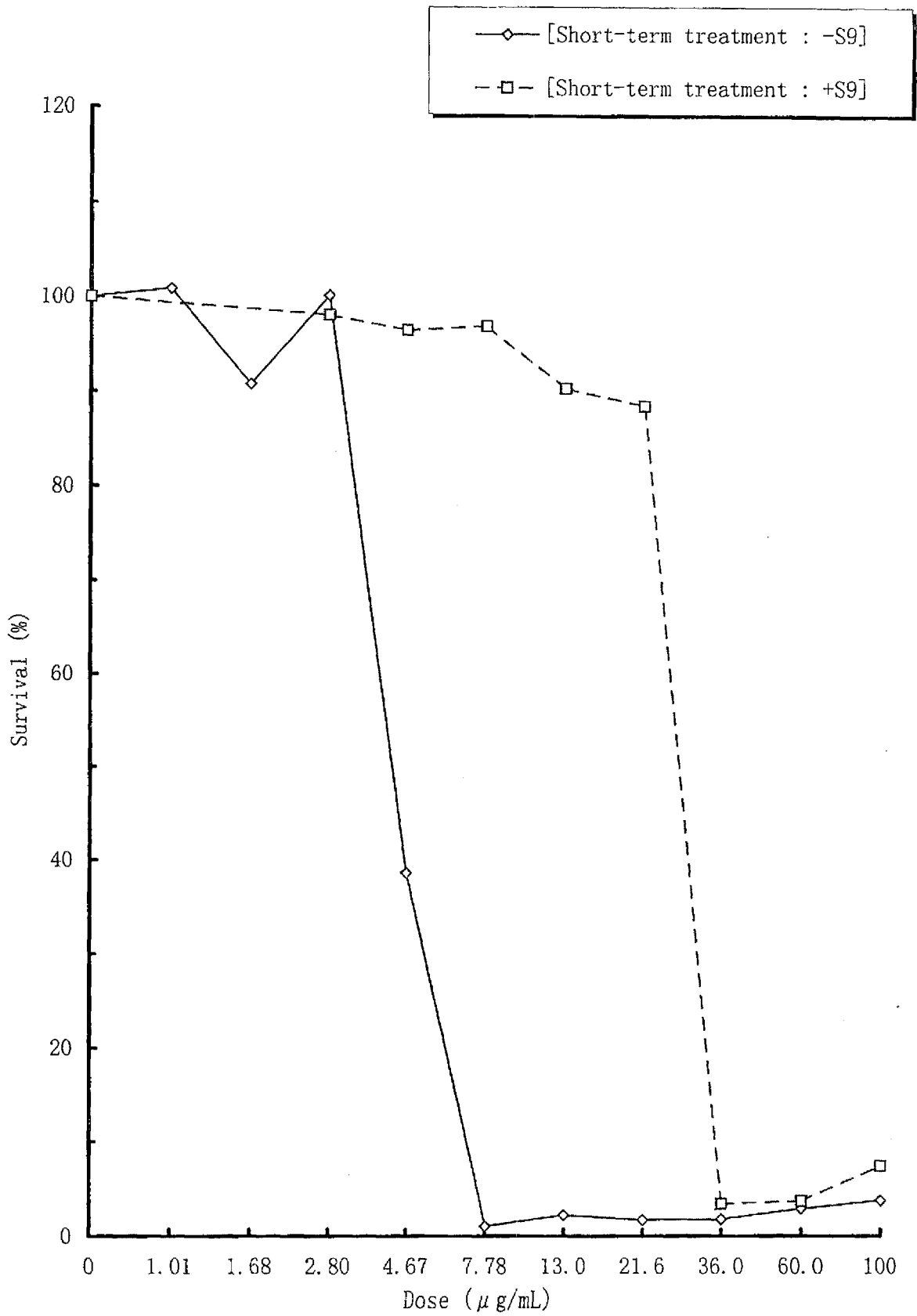


Figure 1. Dose-survival curves of 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment]

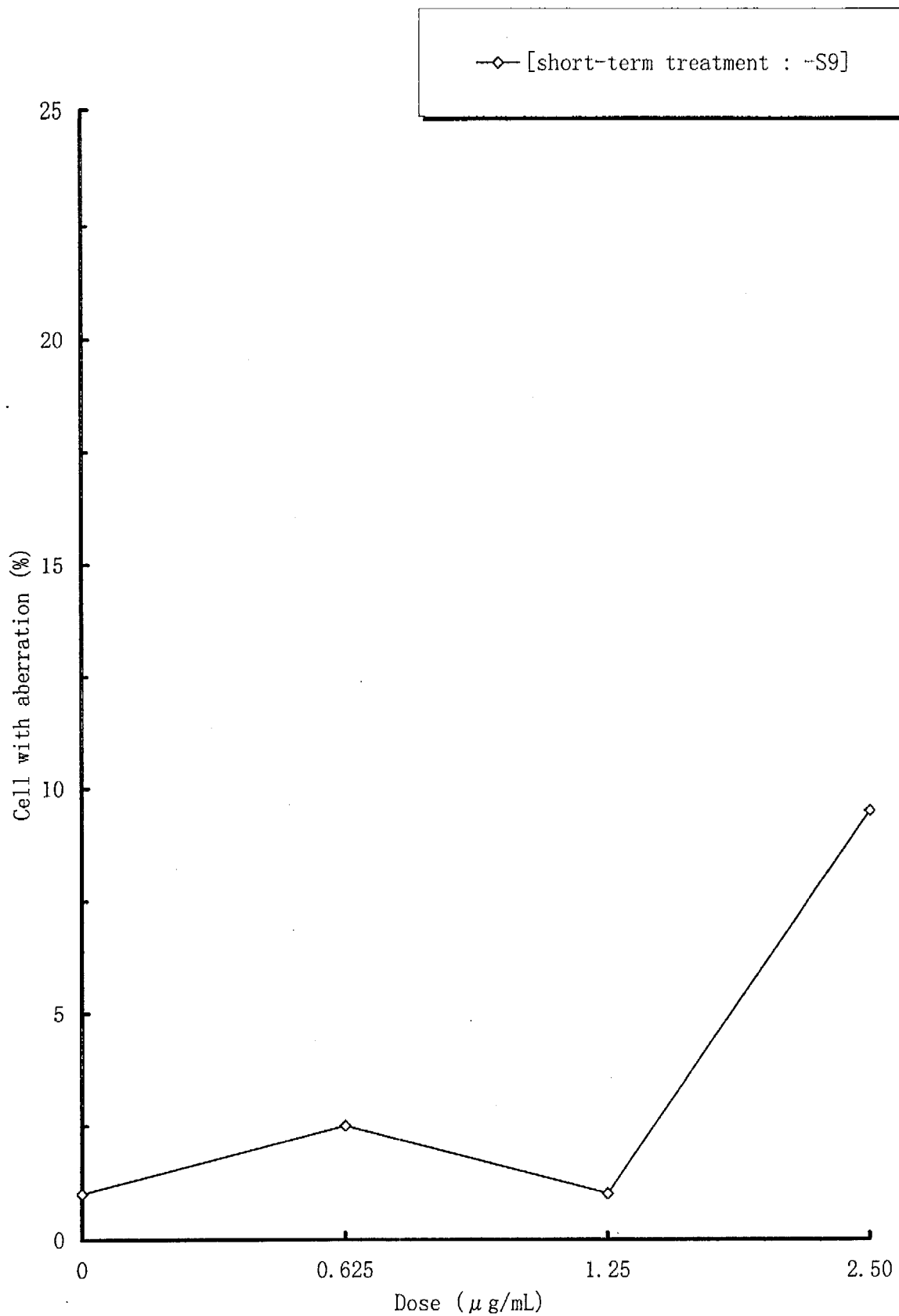


Figure 2. Incidence of structural aberrations induced by 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment:-S9]

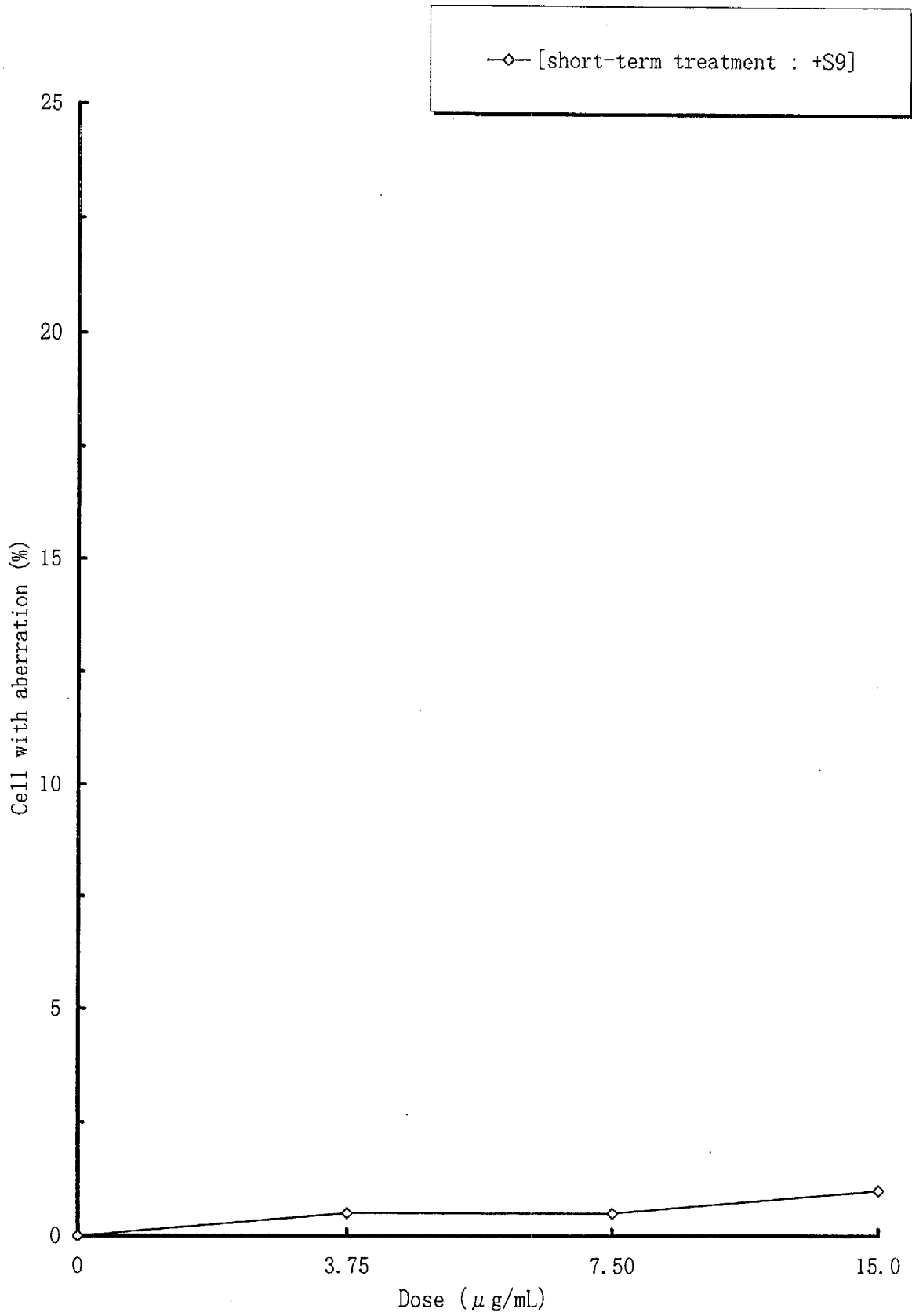


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl- [short-term treatment:+S9]

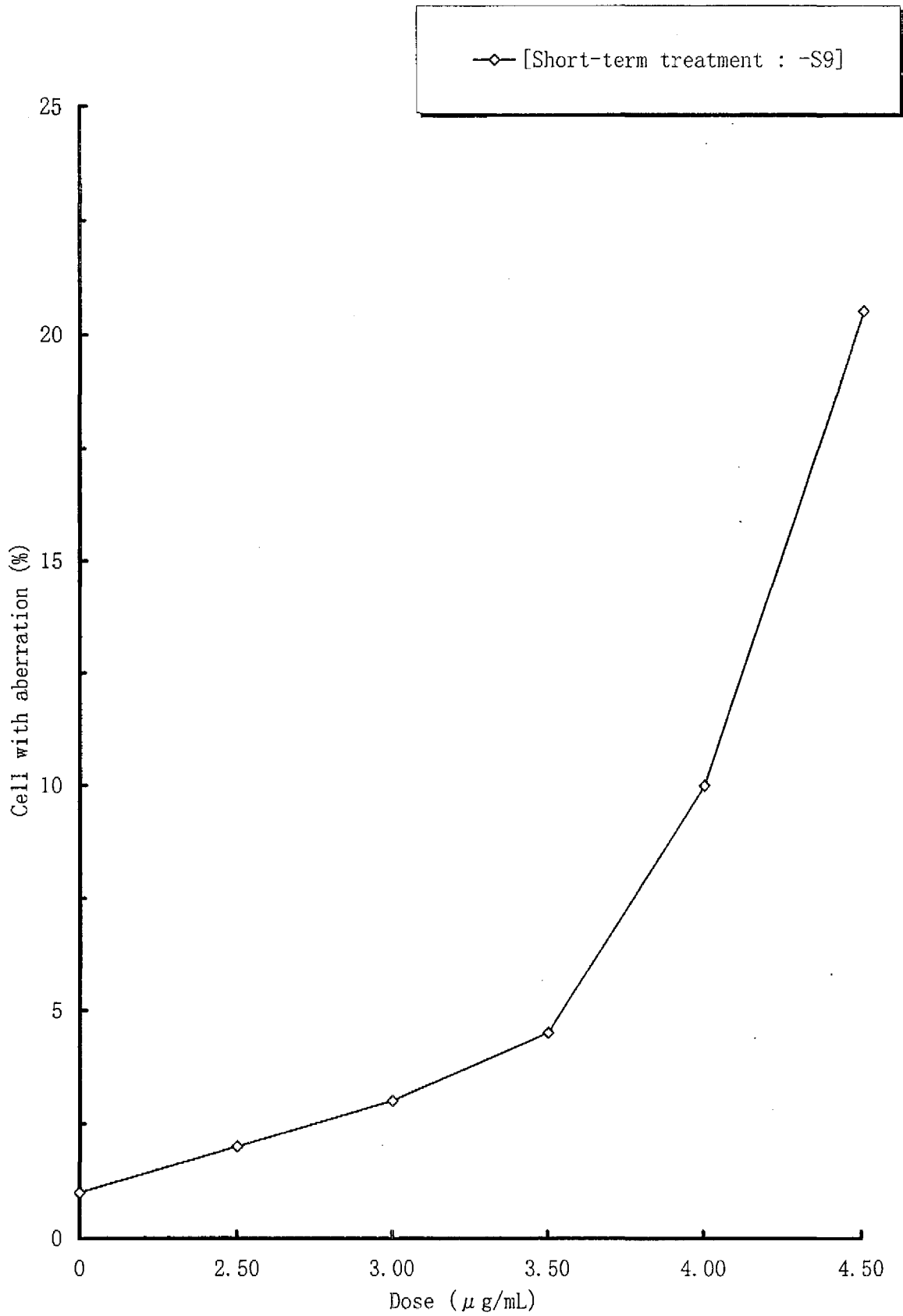


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- at the confirmative examination [short-term treatment:-S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl- [short-term treatment]

Exp. No. 4180 (115-098)

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]		Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	1.01	100.8 100.9	[100.9]	Test substance	2.80	98.0 98.2	[98.1]
	1.68	90.8 90.8	[90.8]		4.67	96.4 96.6	[96.5]
	2.80	100.3 100.0	[100.2]		7.78	96.9 97.0	[97.0]
	4.67	38.8 38.5	[38.7]		13.0	90.4 90.3	[90.4]
	7.78	1.1 1.0	[1.1]		21.6	88.3 88.7	[88.5]
	13.0	2.2 2.2	[2.2]		36.0	3.4 3.4	[3.4]
	21.6	1.8 1.6	[1.7]		60.0	3.7 3.7	[3.7]
	36.0	1.8 1.8	[1.8]		100	7.4 7.5	[7.5]
	60.0	2.9 2.9	[2.9]				
	100	3.8 3.8	[3.8]				

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— 4.47 (μ g/mL)[short-term treatment : +S9] - - - - - 27.6 (μ g/mL)

a): Negative control

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 4180 (115-098)

Compound	Dose (μ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	100.0	200	0	1	2	0	0	0	1.0 -	1.0 -	-
Test substance	0.625	97.6	200	0	2	3	0	0	0	2.5 -	0.5 -	-
	1.25	88.9	200	1	1	1	0	0	0	1.0 -	2.5 -	-
	2.50	72.6	200	3	11	12	0	0	0	9.5 \pm	1.0 -	\pm
	5.00	0.0	Toxic									
MMC b)	0.1	69.8	200	6	39	74	0	0	0	46.0 +	0.0 -	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1H-Pyrrole-2,5-dione, 1-phenyl-
[short-term treatment : +S9]

Exp. No. 4180 (115-098)

Compound	Dose (μ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	-
Test substance	3.75	98.0	200	0	1	0	0	0	0	0.5 -	0.0 -	-
	7.50	95.8	200	0	0	1	0	0	0	0.5 -	0.0 -	-
	15.0	90.0	200	0	0	2	0	0	0	1.0 -	0.0 -	-
	30.0	0.0	Toxic									
CP b)	12.5	70.5	200	2	30	119	0	0	0	62.0 +	0.0 -	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Negative control
b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 4. Results of the confirmative examination of 1H-Pyrrole-2,5-dione,1-phenyl-
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 4180 (115-098)

Compound	Dose (μ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	100.0	200	0	1	0	1	0	0	1.0 -	0.0 -	-
Test substance	2.50	99.2	200	0	3	1	0	0	0	2.0 -	0.5 -	-
	3.00	90.4	200	1	3	2	0	1	0	3.0 -	0.0 -	-
	3.50	73.0	200	0	4	4	0	0	1	4.5 -	1.5 -	-
	4.00	59.0	200	1	10	11	0	0	1	10.0 +	2.5 -	+
	4.50	23.7	200	4	25	25	2	0	0	20.5 +	2.0 -	+
	5.00	5.5	Toxic									
MMC b)	0.1	62.9	200	13	51	115	0	0	0	61.0 +	0.0 -	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)