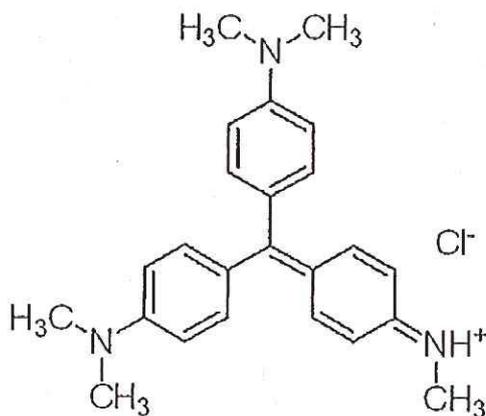


C.I. Basic Violet 1

[CAS No. 8004-87-3]

Molecular formula: $C_{24}H_{28}ClN_3$ Molecular weight: 393.95



ABSTRACT

Chromosomal aberration test was performed using cultured mammalian cells (CHL/IU cells) in order to evaluate whether C.I. basic violet 1 induces chromosomal aberrations. C.I. basic violet 1 induced structural chromosomal aberrations in cultured mammalian cells without metabolic activation (-S9 mix) in the continuous treatment for 24 hour.

SUMMARIZED DATA FROM THE STUDIES

Purity:	Unknown
Type of cell used:	Chinese hamster lung (CHL/IU) cells
Test method:	Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 473
Vehicle:	0.5%CMC-Na
Positive controls:	-S9 mix: Mitomycin C +S9 mix: Benzo[a]pyrene

I certify that this is a true copy, and does not differ from the original.
Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.
Drug Safety Research Laboratories

Study Director

Date

March 16, 2011

Dosage

Short-term treatment:

-S9 mix: 3.75, 7.50, 15, 30, and 60 µg/mL

+S9 mix: 23.7, 35.6, 53.3, 80, 120, and 180 µg/mL

Continuous treatment for 24 hour:

-S9 mix: 3.75, 7.50, 15, 30, and 60 µg/mL

-S9 mix (retest): 3.35, 4.02, 4.82, 5.79, 6.94, 8.33, and 10 µg/mL

S9: Rat liver received a combination of intraperitoneal injections of phenobarbital and 5,6-benzoflavone to induce drug-metabolizing enzymes

Petri dishes/test: 2

Study No.: SBL807-018

GLP compliance: Yes

Test results:

An increase in structural chromosomal aberrations was observed without metabolic activation (-S9 mix) in the continuous treatment for 24 hour.

Lowest concentration producing cytogenetic effects *in vitro*:

Without metabolic activation (continuous treatment for 24 hour): 4.02 µg/mL (clastogenicity)

Genetic effects:

	Clastogenicity			Polyploidy		
	+	?	-	+	?	-
Without metabolic activation:	[*]	[]	[]	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[*]	[]	[]	[]	[*]

**C.I.ベシックバイオレット 1 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
In Vitro Chromosomal Aberration Test of
C.I. Basic Violet 1 in Cultured Chinese Hamster Cells**

要約

C.I.ベシックバイオレット 1 の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU) を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法 S9 mix 非存在下では 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高処理濃度とした 3.75~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で 5 段階、S9 mix 存在下では 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高処理濃度とした 23.7~180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で 6 段階、24 時間連続処理法 S9 mix 非存在下では 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高処理濃度とした 3.75~60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で 5 段階の処理濃度を設定した。短時間処理法では S9 mix 存在下および非存在下で 6 時間処理 (18 時間の回復時間) 後に、連続処理法では S9 mix 非存在下で 24 時間処理後に標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。短時間処理法 S9 mix 非存在下では 3.75, 7.50, 15, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 段階 (公比 2), S9 mix 存在下では 23.7, 35.6, 53.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 段階 (公比 1.5), 連続処理法では 3.75, 7.50, 15, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 段階 (公比 2) について顕微鏡観察を実施した。

その結果、短時間処理法 S9 mix 非存在下および存在下の染色体の構造異常細胞の出現頻度は、顕微鏡観察可能な最高濃度で 6.5% および 7.5% であった。また、連続処理法 S9 mix 非存在下では 7.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 58.0% の出現頻度であった。その上の 15 および 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞毒性により中期分裂像および細胞がみられなかった。

なお、連続処理法 S9 mix 非存在下では顕微鏡観察可能な濃度が 3 用量得られなかったため、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高処理濃度とした 3.35~

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で 7 段階の処理濃度を設定し、再試験を実施した。顕微鏡観察は 3.35, 4.02, 4.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 段階 (公比 1.2) の処理濃度について実施した。

その結果、染色体の構造異常細胞の出現頻度は濃度依存的に増加し、最高濃度 4.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 25.0% であった。

以上の結果より、本試験条件下では C.I.ベシックバイオレット 1 は、染色体の構造異常を誘発する (陽性) と結論した。

方法

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、試験細胞として新生雌チャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を選択した。平成 21 年 10 月 6 日に DS ファーマバイオメディカルラボラトリープロダクツ部から購入し、その後、継代培養し、細胞凍結保存用試薬を用いて 1×10^6 cells/mL の細胞濃度で凍結し、超低温フリーザーに -70°C 以下で保存した。細胞増殖抑制試験および染色体異常試験ともに凍結細胞を融解し、継代数 18 の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

イーグル MEM 粉末 (Invitrogen) を 950 mL の蒸留水に溶解させ、2.2 g の炭酸水素ナトリウムを加え、1 mol/L 塩酸で pH を 6.9~7.0 の範囲内に調整した後、蒸留水で全量を 1000 mL とした。孔径 0.22 μm のポルトトップフィルター (Corning) でろ過滅菌し、 56°C 、30 分間非働化した仔牛血清 (SAFC Biosciences) を 10 vol% になるように加えた

後、試験に使用した。調製後の培養液は冷蔵保存 (1~15°C) した。

3. 培養条件

CO₂インキュベータ (CDI-325, アステック) を用い、CO₂濃度 5%、37°Cの加湿条件下で細胞を培養した。

4. S9 mix

オリエンタル酵母工業製の製造後6ヵ月以内のS9、G-6-PおよびNADPを用いてS9 mixを作製¹⁾し、試験に使用した。S9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	1 mL 中の量
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
蒸留水	0.3 mL

5. 被験物質

被験物質の C.I.ベシックバイオレット 1 (ロット番号 UXLS D) は純度が不明の暗黄緑色~暗緑色の結晶 (小塊) である。購入した。また、被験物質は使用時まで冷蔵所 (2~8°C) に保存した。実験開始前と実験終了後に、赤外吸収スペクトル法で被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、その結果から実験期間中の安定性を確認した。

6. 被験物質液の調製

被験物質をすり潰し、0.5%CMC-Na を徐々に加え、練り混ぜながら、0.5%CMC-Na に懸濁させた。その後、0.5%CMC-Na でメスアップして最高濃度液とした。最高濃度液は、超音波洗浄器 (US-5, アズワン) を用いて約5分

間超音波処理を行い、被験物質の粒子の大きさを十分小さくし均一に分散させた。以下の濃度の調製液は、最高濃度液を0.5%CMC-Naにより順次希釈して調製した。調製は用時に行い、速やかに処理へ用いた。

7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

直径3.5 cm プラスチックシャーレに細胞を播種し、培養約72時間後に被験物質液を処理した。短時間処理法ではS9 mix 非存在下 (-S9 処理)あるいは存在下 (+S9 処理)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。連続処理法ではS9 mix 非存在下 (-S9 処理)で24時間処理した。

0.25%トリプシンで細胞を剥離し、0.4%トリパンブルーを添加後、血球計算盤を用いて生細胞数を計測した。各濃度について、陰性対照群の生細胞数に対する比、すなわち相対値を求め、細胞増殖率 (%) とした。さらに、最小二乗法を用いて、細胞増殖率が50%となる濃度を算出した。

その結果 (Figure 1), 細胞増殖を50%抑制する濃度は、短時間処理法-S9 処理で29 μg/mL, 短時間処理法+S9 処理で169 μg/mL, 連続処理法-S9 処理で29 μg/mL と算出された。

被験物質処理開始時および終了時ともに、158 μg/mL 以上で被験物質の析出が認められた。また、被験物質処理開始時および終了時ともに、非生理的な処理条件となる培養液のpH変動はなかった。

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では-S9 処理の短時間処理法および連続処理法で60 μg/mL, +S9 処理の短時間処理法で180 μg/mL を最高処理濃度とし、-S9 処理の短時間処理法および連続処理法では以下公比2で5段階、短時間処理法+S9 処理では以下公比1.5で6段階の処理濃度を設定した。また、連続処理法-S9 処理では顕微鏡観察可能な濃度が3用量得られなかったため、

10 µg/mL を最高処理濃度とし、以下公比 1.2 で 7 段階の処理濃度で再試験を実施した。

なお、陰性対照として溶媒処理群を、陽性対照として、-S9 処理の短時間処理法および連続処理法ではマイトマイシン C (MMC: 協和醗酵キリン) をそれぞれ 0.15 µg/mL および 0.05 µg/mL、+S9 処理ではベンゾ[a]ピレン (B[a]P: Sigma-Aldrich) を 20 µg/mL の処理濃度で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径 6 cm のプラスチックシャーレを用い、細胞増殖抑制試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了 2 時間前に、最終濃度で 0.1 µg/mL となるようコルセミド (Invitrogen) を添加した。0.25% トリプシンで細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した。75 mmol/L 塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液 (メタノール 3 容: 酢酸 1 容) で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本作製した後、3.0% ギムザ染色液で 15 分間染色した。

10. 染色体の観察

染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会による分類法²⁾に従って実施した。各シャーレあたり 100 個、すなわち濃度当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、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 (o) の構造異常に分類した。同時に、数的異常として倍数性細胞 (poly) の出現率を求め、核内倍加 (endo) と分けて記録した。

すべての標本をコード化した後、染色体分析を実施した。

11. 結果の解析

ギャップを含めない場合 (-gap) について染色体構造異常の出現頻度を表示した。

染色体異常細胞の出現頻度は、石館らの判定基準³⁾に従い、染色体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%以上を陽性とした。なお、陽性と判定した場合は、分裂中期像の 20%に異常を誘発する濃度である D_{20} 値を最小二乗法により算出した。

12. 細胞増殖抑制制度の測定

染色体標本作製時に各シャーレの剥離した細胞を一部採取し、0.4% トリパンブルーを添加後、血球計算盤を用いて生細胞数を計測した。各濃度について、陰性対照群の生細胞数に対する比すなわち相対値を求め、細胞増殖率 (%) とした。

結果および考察

短時間処理法 S9 mix 非存在下での試験結果を Table 1 に、S9 mix 存在下での試験結果を Table 2 に、連続処理法 S9 mix 非存在下での試験結果を Table 3 に、その再試験の試験結果を Table 4 に示した。

染色体の構造異常細胞の出現頻度は、短時間処理法 S9 mix 非存在下では 3.75 µg/mL で 0.0%、7.50 µg/mL で 0.5%、15 µg/mL で 6.5%、S9 mix 存在下では 23.7 µg/mL で 0.0%、35.6 µg/mL で 0.5%、53.3 µg/mL で 7.5% を示し、S9 mix 非存在下および存在下ともに顕微鏡観察可能な最高濃度でそれぞれ疑陽性と判定した。連続処理法 S9 mix 非存在下では 3.75 µg/mL で 1.0%、7.50 µg/mL で 58.0% を示し、7.50 µg/mL では陽性と判定した。その上の 15 および 30 µg/mL では細胞毒性により中期分裂像および細胞がみられなかった。連続処理法の再試験において、構造異常細胞の出現頻度は 3.35 µg/mL で 1.5%、4.02 µg/mL で 11.0%、4.82 µg/mL で 25.0% を示し、4.02 および 4.82 µg/mL では陽性と判定した。数的異常細胞の出現頻度についてはすべての処理で 0.0%~1.0% であった。すべての処理で濃度の増加とともに細胞増殖率の減少がみられた。一方、陰性対照および陽性対照群の染色体異常細胞の出現頻度は、当施設の背景データの範囲 (Mean ± 3SD) 内にあった。

変異原性の強さに関する相対的比較値であるD₂₀値は構造異常に対して 4.51 µg/mLと算出された。

なお、被験物質処理開始時および終了時ともに、53.3 µg/mL 以上で被験物質の析出が認められた。また、被験物質処理開始時および終了時ともに、非生理的な処理条件となる培養液の pH 変動はなかった。

以上の試験結果から、本試験条件下において、C.I.ベシックバイオレット1のチャイニーズ・ハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。

文献

- 1) Sofuni T, Matsuoka A: Metabolic activation method in the chromosomal aberration test. *Environmental. Mutagen Res*, 5: 4-6 (1983).
- 2) Sofuni T: Production Mechanism, Classification, and Criteria of Chromosomal Aberrations. *In* "The Atlas of Chromosomal Aberration on Chemical Compounds", first ed., Environmental Mutagen Society of Japan, Mammalian Mutagenicity Study Group (ed.), Asakura Shoten, Tokyo (1988) pp. 16-35.
- 3) Hayashi M, Matsuoka A: Test Method Outline. *In* "Data Book of Chromosomal Aberration Test In Vitro", revised ed., Sofuni T (ed.), Life-science Information Center, Tokyo (1999) pp. 15-23.

連絡先

試験責任者 :

試験担当者 :

(株) 新日本科学 安全性研究所

〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438

Tel 099-294-2600 Fax 099-294-3619

Correspondence

Authors:

Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

Drug Safety Research Labs. (SNBL DSR)

2438 Miyanoura, Kagoshima 891-1394, Japan

Tel +81-99-294-2600 Fax +81-99-294-3619

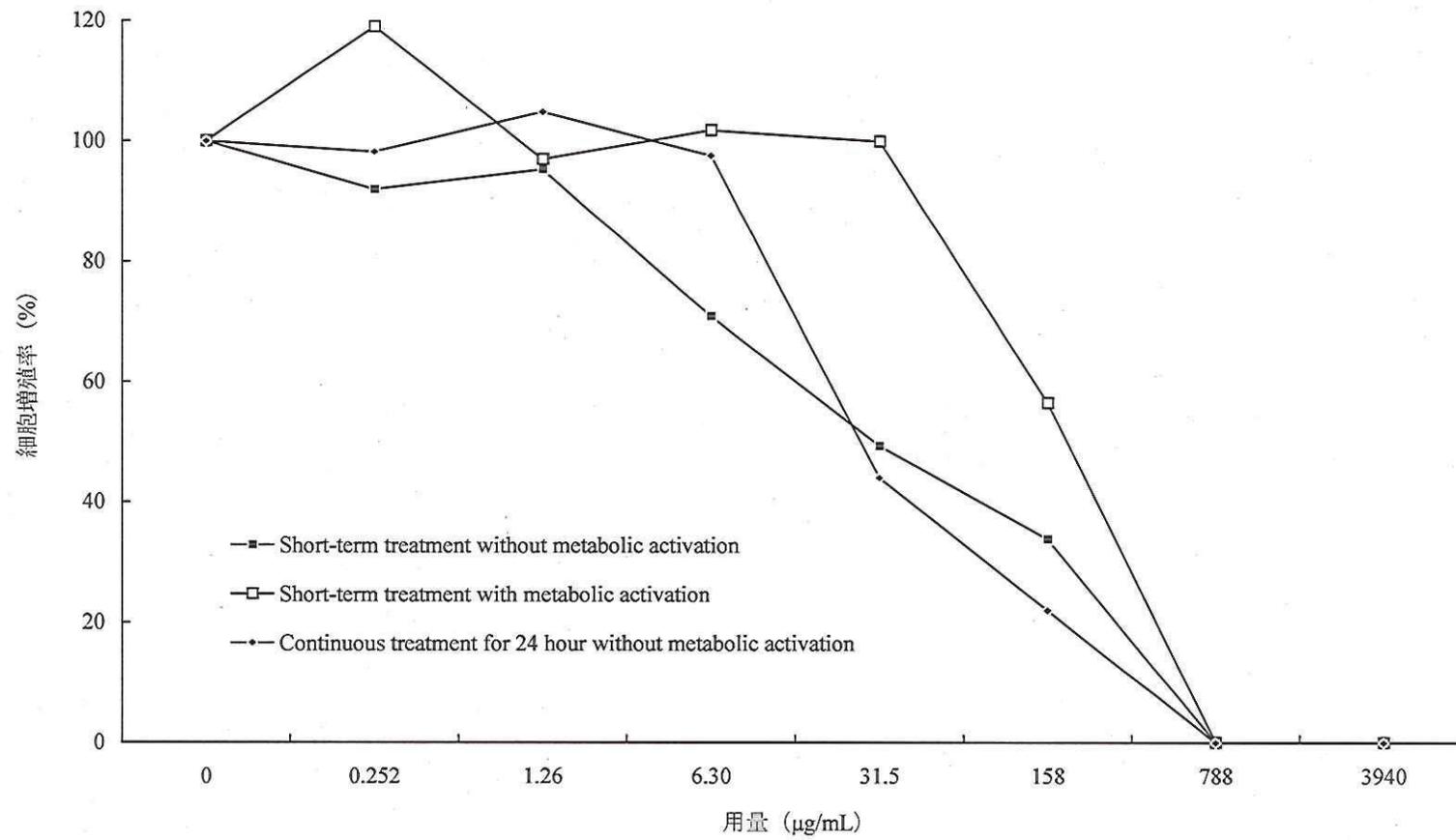


Figure 1 Growth inhibition of CHL cells treated with C.I. basic violet 1

Table 1 Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. basic violet 1
(short-term treatment without metabolic activation)

処理時間 (h)	S9 mix	用量 (µg/mL)	染色体構造異常の細胞数							判定	ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%) #	染色体数的異常の細胞数				判定
			観察 細胞数	染色体 切断	染色体 交換	染色体 切断	染色体 交換	その他	総異常数 (出現頻度%)				観察 細胞数	倍数体	核内 倍加	総異常数 (出現頻度%)	
6-18	-	陰性対照 0.5 w/v% CMC-Na	100	0	0	0	0	0	0	/	0	100	100	1	0	1	/
			100	0	0	0	0	0	0				100	0	0	0	
			200	0	0	0	0	0	0 (0.0)				200	1	0	1 (0.5)	
6-18	-	3.75	100	0	0	0	0	0	陰性	0	94.4	100	0	0	0	陰性	
			100	0	0	0	0	0				100	1	0	1		
			200	0	0	0	0	0				0 (0.0)	200	1	0		1 (0.5)
6-18	-	7.50	100	0	0	0	0	0	陰性	0	100.8	100	0	0	0	陰性	
			100	1	0	0	0	0				1	100	0	0		0
			200	1	0	0	0	0				1 (0.5)	200	0	0		0 (0.0)
6-18	-	15	100	0	5	0	0	0	疑陽性	0	64.5	100	0	0	0	陰性	
			100	0	7	0	1	0				8	100	1	0		1
			200	0	12	0	1	0				13 (6.5)	200	1	0		1 (0.5)
6-18	-	30	TOX	-	-	-	-	-	/	-	1.6	TOX	-	-	-	/	
			TOX	-	-	-	-	-				TOX	-	-	-		
			TOX	-	-	-	-	-				- (-)	TOX	-	-		- (-)
6-18	-	60	NT	-	-	-	-	-	/	-	0.0	NT	-	-	-	/	
			NT	-	-	-	-	-				NT	-	-	-		
			NT	-	-	-	-	-				- (-)	NT	-	-		- (-)
6-18	-	陽性対照 MMC 0.15	100	5	17	0	0	0	/	0	80.6	100	0	0	0	/	
			100	5	23	0	0	0				24	100	0	0		0
			200	10	40	0	0	0				45 (22.5)	200	0	0		0 (0.0)

各群のシャーレごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。ギャップには染色体型と染色体型の両方を含める。

処理時間：処理時間一回復時間 -S9 mix：代謝活性化によらない場合 CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 MMC：マイトマイシンC

#：陰性対照群の生細胞数（平均値）を100%とした場合の各用量の相対値 TOX：細胞毒性により細胞がみられなかった。 NT：Not tested

判定：石館らの判定基準（陰性：5%未満 疑陽性：5%以上10%未満 陽性：10%以上）

被験物質の析出は、被験物質処理開始時及び終了時ともに53.3 µg/mLで認められた。

Table 2 Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. basic violet 1
(short-term treatment with metabolic activation)

処理時間 (h)	S9 mix	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数							判定	ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%) #	染色体数的異常の細胞数				判定
			観察 細胞数	染色分体 切断	染色分体 交換	染色体 切断	染色体 交換	その他	総異常数 (出現頻度%)				観察 細胞数	倍数体	核内 倍加	総異常数 (出現頻度%)	
6-18	+	陰性対照 0.5 w/v% CMC-Na	100	0	0	0	0	0	0	/	0	100	100	0	0	0	/
			100	1	0	0	0	0	1		0		100	1	0	1	
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)		0		200	1	0	1 (0.5)	
6-18	+	23.7	100	0	0	0	0	0	0	陰性	0	77.8	100	0	0	0	陰性
			100	0	0	0	0	0	0		0		100	0	0	0	
			200	0	0	0	0	0	0 (0.0)		0		200	0	0	0 (0.0)	
6-18	+	35.6	100	0	1	0	0	0	1	陰性	0	56.7	100	1	0	1	陰性
			100	0	0	0	0	0	0		0		100	0	0	0	
			200	0	1	0	0	0	1 (0.5)		0		200	1	0	1 (0.5)	
6-18	+	53.3	100	7	1	0	0	0	8	疑陽性	1	30.6	100	1	0	1	陰性
			100	5	3	0	0	0	7		1		100	1	0	1	
			200	12	4	0	0	0	15 (7.5)		2		200	2	0	2 (1.0)	
6-18	+	80	NT	-	-	-	-	-	-	/	-	0.0	NT	-	-	-	/
			-	-	-	-	-	-	-		-		-	-	-		
			-	-	-	-	-	-	- (-)		-		-	-	- (-)		
6-18	+	120	NT	-	-	-	-	-	-	/	-	0.0	NT	-	-	-	/
			-	-	-	-	-	-	-		-		-	-			
			-	-	-	-	-	-	- (-)		-		-	-	- (-)		
6-18	+	180	NT	-	-	-	-	-	-	/	-	0.0	NT	-	-	-	/
			-	-	-	-	-	-	-		-		-	-			
			-	-	-	-	-	-	- (-)		-		-	-	- (-)		
6-18	+	陽性対照 B[a]P 20	100	3	25	0	0	0	26	/	0	72.2	100	0	0	0	/
			100	2	25	0	0	0	25		0		100	1	0	1	
			200	5	50	0	0	0	51 (25.5)		0		200	1	0	1 (0.5)	

各群のシャーレごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。ギャップには染色分体型と染色体型の両方を含める。
 処理時間：処理時間一回復時間 +S9 mix：代謝活性化による場合 CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 B[a]P：ベンゾ[a]ピレン
 #：陰性対照群の生細胞数（平均値）を100%とした場合の各用量の相対値 TOX：細胞毒性により細胞がみられなかった。 NT：Not tested
 判定：石館らの判定基準（陰性：5%未満 疑陽性：5%以上10%未満 陽性：10%以上）

被験物質の析出は、被験物質処理開始時及び終了時ともに53.3 $\mu\text{g/mL}$ で認められた。

Table 3 Chromosome aberration test on CHL cells treated with C.I. basic violet 1
(continuous treatment for 24 hour without metabolic activation)

処理時間 (h)	用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	染色体構造異常の細胞数							判定	ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%) #	染色体数的異常の細胞数				判定
		観察 細胞数	染色体 切断	染色体 交換	染色体 切断	染色体 交換	その他	総異常数 (出現頻度%)				観察 細胞数	倍数体	核内 倍加	総異常数 (出現頻度%)	
24-0	陰性対照 0.5 w/v% CMC-Na	100	0	0	0	0	0	0	/	0	100	100	0	0	0	/
		100	0	0	0	0	0	0		0		100	0	0	0	
		200	0	0	0	0	0	0 (0.0)		0		200	0	0	0 (0.0)	
24-0	3.75	100	0	0	0	0	0	0	陰性	0	77.3	100	0	0	0	陰性
		100	2	0	0	0	0	2		0		100	0	0	0	
		200	2	0	0	0	0	2 (1.0)		0		200	0	0	0 (0.0)	
24-0	7.50	100	19	42	0	0	6	56	陽性	1	66.4	100	0	0	0	陰性
		100	29	45	0	0	5	60		0		100	0	0	0	
		200	48	87	0	0	11	116 (58.0)		1		200	0	0	0 (0.0)	
24-0	15	TOX	-	-	-	-	-	-	/	-	57.0	TOX	-	-	-	/
			-	-	-	-	-	-		-			-	-	-	
			-	-	-	-	-	-		- (-)			-	-	-	
24-0	30	TOX	-	-	-	-	-	-	/	-	0.0	TOX	-	-	-	/
			-	-	-	-	-	-		-			-	-	-	
			-	-	-	-	-	-		- (-)			-	-	-	
24-0	60	NT	-	-	-	-	-	-	/	-	0.0	NT	-	-	-	/
			-	-	-	-	-	-		-			-	-	-	
			-	-	-	-	-	-		- (-)			-	-	-	
24-0	陽性対照 MMC 0.05	100	5	11	0	0	0	15	/	0	73.4	100	0	0	0	/
		100	10	15	0	0	0	24		1		100	0	0	0	
		200	15	26	0	0	0	39 (19.5)		1		200	0	0	0 (0.0)	

各群のシャーレごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。ギャップには染色体型と染色体型の両方を含める。

処理時間：処理時間一回復時間 CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 MMC：マイトマイシンC

#：陰性対照群の生細胞数（平均値）を100%とした場合の各用量の相対値 TOX：細胞毒性により細胞がみられなかった。 NT：Not tested

判定：石館らの判定基準（陰性：5%未満 疑陽性：5%以上10%未満 陽性：10%以上）

被験物質の析出は、被験物質処理開始時及び終了時ともに53.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で認められた。

Table 4 Chromosome aberration retest on CHL cells treated with C.I. basic violet 1
(continuous treatment for 24 hour without metabolic activation)

処理時間 (h)	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数							判定	ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%) #	染色体数的異常の細胞数				判定
		観察 細胞数	染色分体 切断	染色分体 交換	染色体 切断	染色体 交換	その他	総異常数 (出現頻度%)				観察 細胞数	倍数体	核内 倍加	総異常数 (出現頻度%)	
24-0	陰性対照 0.5 w/v% CMC-Na	100	0	0	0	0	0	0	/	0	100	100	0	0	0	/
		100	0	0	0	0	0	0				100	0	0	0	
		200	0	0	0	0	0	0 (0.0)				200	0	0	0 (0.0)	
24-0	3.35	100	0	1	0	0	0	1	陰性	0	65.1	100	0	0	0	陰性
		100	0	2	0	0	0	2				100	0	0	0	
		200	0	3	0	0	0	3 (1.5)				200	0	0	0 (0.0)	
24-0	4.02	100	3	12	0	0	0	12	陽性	0	54.8	100	0	0	0	陰性
		100	2	8	0	0	0	10				100	0	0	0	
		200	5	20	0	0	0	22 (11.0)				200	0	0	0 (0.0)	
24-0	4.82	100	7	26	0	0	0	28	陽性	1	40.5	100	0	0	0	陰性
		100	2	22	0	0	0	22				100	2	0	2	
		200	9	48	0	0	0	50 (25.0)				200	2	0	2 (1.0)	
24-0	5.79	NT	-	-	-	-	-	-	/	-	38.1	NT	-	-	-	/
		NT	-	-	-	-	-	-				NT	-	-	-	
		NT	-	-	-	-	-	- (-)				NT	-	-	- (-)	
24-0	6.94	NT	-	-	-	-	-	-	/	-	37.3	NT	-	-	-	/
		NT	-	-	-	-	-	-				NT	-	-	-	
		NT	-	-	-	-	-	- (-)				NT	-	-	- (-)	
24-0	8.33	NT	-	-	-	-	-	-	/	-	31.0	NT	-	-	-	/
		NT	-	-	-	-	-	-				NT	-	-	-	
		NT	-	-	-	-	-	- (-)				NT	-	-	- (-)	
24-0	10	NT	-	-	-	-	-	-	/	-	16.7	NT	-	-	-	/
		NT	-	-	-	-	-	-				NT	-	-	-	
		NT	-	-	-	-	-	- (-)				NT	-	-	- (-)	
24-0	陽性対照 MMC 0.05	100	2	15	0	0	0	17	/	0	70.6	100	0	0	0	/
		100	6	16	0	0	0	21				100	1	0	1	
		200	8	31	0	0	0	38 (19.0)				200	1	0	1 (0.5)	

各群のシャーレごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。ギャップには染色分体型と染色体型の両方を含める。

処理時間：処理時間-回復時間 CMC-Na：カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液 MMC：マイトマイシンC

#：陰性対照群の生細胞数（平均値）を100%とした場合の各用量の相対値 NT：Not tested

判定：石館らの判定基準（陰性：5%未満 疑陽性：5%以上10%未満 陽性：10%以上）

被験物質の析出は、被験物質処理開始時及び終了時ともに10 $\mu\text{g/mL}$ まで認められなかった。