



受付番号 837-06-T-5256

試験コード番号 K06-1189

最 終 報 告 書

13F-SFA のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2007 年 3 月

化学物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。

財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所

2007 年 3 月 26 日

試験責任者

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
日田事業所

試験委託者 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-SFA のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験コード番号 K06-1189

上記試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11 月 21 日)及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)を適用した。

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2007 年 3 月 26 日

試験責任者

信頼性保証書

財団法人 化学物質評価研究機構
日田事業所

試験委託者: ダイキン工業株式会社

試験の表題: 13F-SFAのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験コード番号: K06-1189

当試験は財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所の信頼性保証部門が監査又は査察を実施しており、監査又は査察を行った日付、試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りである。

監査又は査察対象	監査又は査察実施日	監査又は査察結果報告日
試験計画書	2006年12月8日	2006年12月8日
被験物質の調製	2006年12月11日	2006年12月11日
細胞の処理	2006年12月11日	2006年12月11日
試験計画書再査察	2006年12月14日	2006年12月16日
試験計画書の変更書	2006年12月20日	2006年12月20日
試験計画書の変更書(No.2)	2007年1月12日	2007年1月12日
試験計画書の変更書(No.3)	2007年2月28日	2007年2月28日
試験計画書の変更書(No.4)	2007年3月2日	2007年3月3日
試験計画書の変更書(No.4)再査察	2007年3月8日	2007年3月8日
試験計画書の変更書(No.5)	2007年3月9日	2007年3月9日
試験計画書の変更書(No.6)	2007年3月13日	2007年3月13日
記録類及び最終報告書草案	2007年3月21日	2007年3月21日
記録類及び最終報告書草案再査察	2007年3月23日	2007年3月23日
最終報告書草案(2回目)	2007年3月24日	2007年3月24日
最終報告書草案(2回目)再査察	2007年3月26日	2007年3月26日
最終報告書	2007年3月26日	2007年3月26日

なお、以下の査察対象については施設の査察又は他の試験の査察結果をもとに、試験責任者及び運営管理者に報告を行っている。

査察対象	査察実施日	査察結果報告日
陽性対照物質の調製及び管理	2006年11月24日	2007年3月26日
培地・試薬類の調製	2006年12月6日、7日	2007年3月26日
細胞の前培養	2006年11月27日	2007年3月26日
細胞の回収及び標本作製	2006年12月5日	2007年3月26日

本報告書には、試験で使用した方法、手順が正確に記載されており報告結果は試験の生データを正確に反映している。

2007年3月26日

信頼性保証責任者

目 次

	頁
表 題	3
試験委託者	3
試験施設	3
試験目的	3
試験法	3
適用 GLP	3
試験日程	3
資料の保管場所及び保管期間	4
正本の保管	4
試験責任者その他の試験に従事した者の氏名及び業務分担	4
最終報告書作成者の承認	4
要 約	5
試験材料及び試験方法	
1. 被験物質及び陽性対照物質	6
2. 使用細胞	8
3. 培地及び S9 mix	8
4. 細胞の前培養	9
5. 被験物質液及び陽性対照物質溶液の調製	9
6. 試験の手順	10
7. 結果の判定基準	13
8. 試験の成立条件	13
試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	13
試験成績	
1. 細胞増殖抑制試験	13
2. 染色体異常試験	13
3. 短時間処理法の S9 mix 非存在下における確認試験	15
4. 代表的な写真	15
考察及び結論	15
参考文献	16

表、図及び写真

表 1	13F-SFA の細胞増殖抑制試験結果	17
表 2	13F-SFA の染色体異常試験結果	18
表 3	染色体異常試験の結果 (短時間処理法の S9 mix 非存在下)	19
表 4	染色体異常試験の結果 (短時間処理法の S9 mix 存在下)	20
表 5	染色体異常試験の結果(連続処理法)	21
表 6	13F-SFA の確認試験結果	22
表 7	確認試験の結果 (短時間処理法の S9 mix 非存在下)	23
図 1	13F-SFA の細胞増殖抑制試験結果	24
図 2	13F-SFA の染色体異常試験における細胞増殖率	25
図 3	13F-SFA の短時間処理法における染色体異常試験結果	26
図 4	13F-SFA の連続処理法における染色体異常試験結果	27
図 5	13F-SFA の確認試験における細胞増殖率	28
図 6	13F-SFA の短時間処理法における確認試験結果	29
写真 1	正常細胞	30
写真 2	13F-SFA により誘発された構造異常	30
写真 3	13F-SFA により誘発された構造異常	31

試験コード番号: K06-1189

被験物質コード番号: HR6851

委託者コード番号: D-0060

表 題	13F-SFA のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験										
試験委託者	ダイキン工業株式会社 〒566-8585 大阪府摂津市西一津屋 1-1										
試験施設	財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所 〒877-0061 大分県日田市石井町 3 丁目 822 番地										
試験目的	チャイニーズハムスターの肺線維芽細胞(CHL/IU 細胞)を用いて、被験物質の染色体異常誘発能の有無を検索する。										
試験法	「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成 15 年 11 月 21 日)に定める「Ⅲ 変異原性試験」の「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」に定める試験方法に準拠した。										
適用 GLP	「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11 月 21 日)及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)を適用した。										
試験日程	<table><tr><td>試験開始日</td><td>2006年12月 7日</td></tr><tr><td>実験開始日(細胞増殖抑制試験開始日)</td><td>2006年12月11日</td></tr><tr><td>実験終了日(観察終了日)</td><td>2007年 3月12日</td></tr><tr><td>試験終了日</td><td>2007年 3月26日</td></tr></table>			試験開始日	2006年12月 7日	実験開始日(細胞増殖抑制試験開始日)	2006年12月11日	実験終了日(観察終了日)	2007年 3月12日	試験終了日	2007年 3月26日
試験開始日	2006年12月 7日										
実験開始日(細胞増殖抑制試験開始日)	2006年12月11日										
実験終了日(観察終了日)	2007年 3月12日										
試験終了日	2007年 3月26日										

資料の保管場所及び保管期間

生データ、試験計画書、試験計画書の変更書、試験委託書、被験物質調査票、最終報告書、その他の記録文書、標本は、当機構日田事業所の資料保管室で「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(昭和48年法律第117号)」第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間保管する。通知を受けた日については試験委託者から当機構日田事業所に連絡することとする。保管期限後の処置は試験委託者の承認を得る。ただし保管中に品質が著しく変化する標本などの保管期間は、その品質が評価に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

正本の保管

試験計画書、試験計画書の変更書及び最終報告書の正本は1部とし、当機構日田事業所で保管する。また、試験責任者が正本と相違ないことを証明した写しを試験委託者に送付する。

試験責任者その他の試験に従事した者の氏名及び業務分担

試験責任者:

所 属: 日田事業所 試験第三課

試験に従事した者及び業務分担

(被験物質液の調製、細胞の処理及び標本観察)

(標本観察)

最終報告書作成者の承認

試験責任者:

2007年3月26日

要 約

チャイニーズハムスターの肺線維芽細胞(CHL/IU 細胞)を用い、13F-SFAの染色体異常誘発能の有無を検討した。

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び存在下では 26.6、37.2、52.1、72.9、102、143、200 及び 280 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間連続処理法では 19.0、26.6、37.2、52.1、72.9、102、143 及び 200 $\mu\text{g/mL}$ を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験での被験物質の標本観察用量は、短時間処理法の S9 mix 非存在下では 52.1、72.9 及び 102 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の S9 mix 存在下では 72.9、102 及び 143 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間連続処理法では 37.2、52.1、72.9 及び 102 $\mu\text{g/mL}$ の 3 又は 4 用量とし、染色体の構造異常を持つ細胞及び数的異常細胞の出現頻度を調べた。

標本観察の結果、いずれの処理法においても、数的異常細胞の出現頻度は、観察したすべての被験物質用量で 5%未満であったため、数的異常は陰性と判定した。しかしながら、構造異常を持つ細胞の出現頻度は、24 時間連続処理法では 10%を越え、その出現に用量依存性がみられたため、構造異常は陽性と判定した。

一方、脱水したアセトンを添加した陰性対照では、構造異常を持つ細胞及び数的異常細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であり、マイトマイシン C あるいはシクロホスファミド水和物で処理した陽性対照では、いずれの処理法においても構造異常を持つ細胞の出現頻度が 20%以上を示したため、試験は正常に実施されたと評価した。

以上の結果から、13F-SFA は本試験条件下で数的異常を誘発しないものの、構造異常を誘発するものと考えられた。

試験材料及び試験方法

1. 被験物質及び陽性対照物質

1.1 被験物質(試験委託者提供資料)

1) 名 称

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-トリデカフルオロオクチル=アクリレート

別 名: 13F-SFA

CAS番号: 17527-29-6

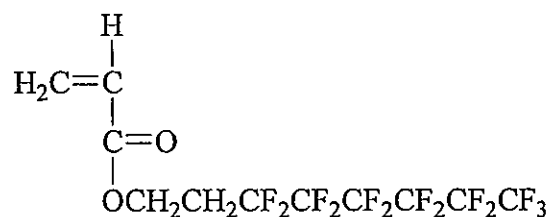
2) ロット番号

6X002

3) 提供源

ダイキン工業株式会社

4) 構造式

(分子式: $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{F}_{13}\text{O}_2$)

5) 純 度

99.7%

6) 不純物の名称及び含有率(濃度)

不明成分 0.3%

7) 物理化学的性状

常温における性状

無色透明液体

分子量

418.15

安定性

—

融 点

—

沸 点

78°C (8 mmHg)

蒸気圧

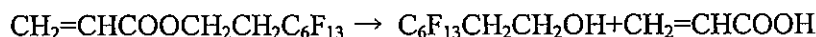
—

分配係数(1-オクタノール/水分配係数)

—

加水分解性

あり



溶解性

—

溶解度

水 不溶

DMSO 50.0 mg/mL 未満
(当機構日田事業所にて脱水 DMSO を用いて測定)

アセトン 418 mg/mL 以上
(当機構日田事業所にて脱水アセトンを用いて測定)

その他 —

8) 保管条件

室温(試験物質保管室、デシケーター2、許容温度範囲: 10～30℃)で遮光保管した。

9) 取扱い上の注意

手袋、マスク、帽子及び白衣を着用した。

1.2 陽性対照物質

1) マイトマイシン C (MMC)

製造元 協和発酵工業株式会社

ロット番号 480AEL

外観 青紫色の粉末

含量 99%

グレード 注射用

2) シクロホスファミド水和物 (CPA)

製造元 和光純薬工業株式会社

ロット番号 PKQ7031

外観 白色結晶～結晶性粉末

含量 99.0%

グレード 生化学用

3) 保管条件

MMC は室温(試験物質保管室、キャビネット 2、許容温度範囲: 10～30℃)で、CPA は冷暗所(試験物質保管室、保冷库 13、許容温度範囲: 1～10℃)で保管した。

4) 取扱い上の注意

手袋、マスク、帽子及び白衣を着用した。

2. 使用細胞

2.1 細胞及び選択理由

チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞(CHO細胞)を用いた。細胞は、財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 2002 年 4 月 17 日に分与された。モード染色体数は 25 本、倍加時間は約 15 時間であり、マイコプラズマの汚染がないこと及び構造異常を持つ細胞あるいは数値異常細胞の自然発生頻度がいずれも 5%未満であることを当機構日田事業所で確認した。

CHO 細胞は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」で染色体異常試験に用いることが推奨されている。

2.2 保 存

10 vol%ジメチルスルホキシド(DMSO)を含む培養液[イーグル MEM 培地(日水製薬株式会社) + 10 vol%の非働化した新生仔牛血清(NBCS、三光純薬株式会社)]に懸濁して液体窒素内に凍結保存した。

2.3 培養条件

細胞は、加湿条件下、温度 37℃、炭酸ガス濃度 5%に設定した炭酸ガス細胞培養装置(MCO-345、三洋電機株式会社及びモデル 530、和研薬株式会社)で培養した。

2.4 継 代

直径 90 mm のディッシュ(ヌンク社)で、週に 2 回継代した。細胞入手後の継代数が、細胞増殖抑制試験では 6 代、染色体異常試験では 9 代、確認試験では 12 代の細胞を用いた。

3. 培地及び S9 mix

3.1 培 地

イーグル MEM 培地(ロット番号: 54860611、日水製薬株式会社)に L-グルタミン(最終濃度: 0.292 g/L)及び炭酸水素ナトリウム(最終濃度: 約 1.85 g/L)を添加し、基礎培地(MEM 培地)を調製した。培養には、MEM 培地に非働化した NBCS(ロット番号: 27020859、三光純薬株式会社)を 10 vol%添加した培地を使用した。

3.2 S9 mix

1) ラット肝 S9

Phenobarbital 及び 5,6-benzoflavone を併用投与した 7 週齢の雄 SD ラット(体重: 215.1±10.7 g)の肝臓より調製した S9 (ロット番号: 06090106、2006 年 9 月 1 日製造、S9 蛋白量: 20.2 mg/mL、オリエンタル酵母工業株式会社)を用いた。S9 は使用直前まで超低温フリーザー(MDF-U481ATR、三洋電機株式会社、許容温度範囲: -80℃以下)にて凍結保存した。製造日より 6 ヶ月以内に使用した。

2) S9 mix の組成

S9 mix 1 mL の組成は、S9 を 0.3 mL、MgCl₂ を 5 µmol、KCl を 33 µmol、グ

ルコース-6-リン酸を 5 μmol 、NADP を 4 μmol 、HEPES (pH 7.2) を 4 μmol とし、
用時に調製した。使用まで氷冷下にて保存した。

4. 細胞の前培養

培養容器には、直径 60 mm のプラスチック製ディッシュ(旭テクノグラス株式会社)を使用した。

5×10^3 cells/mL の細胞懸濁液 5 mL を培養容器に添加し、3 日間培養した。

5. 被験物質液及び陽性対照物質溶液の調製

5.1 被験物質液の調製

1) 使用溶媒

モレキュラシーブス 5A 1/8 (ロット番号 CEQ7072、和光純薬工業株式会社)
で脱水したアセトン (ロット番号 EWJ5080、純度 100.0%、特級、和光純薬工業株式会社)

2) 溶媒選択の理由

被験物質には加水分解性があるとの試験委託者情報から、水への溶解度は確認しなかった。脱水 DMSO には 50.0 mg/mL で不溶で、脱水アセトンには 418 mg/mL で溶解し、脱水アセトンで調製した 418 mg/mL の被験物質液は室温にて調製後 2 時間まで発熱及び色調の変化がみられなかったことから、脱水アセトンを溶媒に選択した。

3) 調製法

被験物質を必要量秤量した後、脱水アセトンを加え攪拌(ラボミキサー)して溶解させ、脱水アセトンを用いて定容し被験物質原液を調製した。被験物質原液を同溶媒で希釈して、培地中の被験物質用量の 100 倍濃度の被験物質液を調製した。なお、調製は黄色灯下にて実施した。また、純度が 95%以上であるため、純度補正せずに調製した。

4) 調製時期

用時に調製した後、黄色灯下、氷中で保存し 1 時間以内に使用した。

5.2 陽性対照物質溶液の調製

1) 調製法及び保存

MMC 及び CPA をそれぞれ蒸留水に溶解させて 0.01 mg/mL 及び 1 mg/mL に調製し、超低温フリーザー(MDF-U481ATR、三洋電機株式会社、許容温度範囲: -80°C 以下)で凍結保存した。

2) 調製時期及び保存期間

使用時に解凍し、1.5 時間以内に使用した。凍結保存液は調製後 6 ヶ月以内に使用した。

6. 試験の手順

6.1 細胞増殖抑制試験

1) 手 順

短時間処理法による場合は、前培養した培地を除き、S9 mix 非存在下では 30 μL の被験物質液又は溶媒と新しい処理用培地 3 mL をよく混合したものを細胞に添加し、S9 mix 存在下では新しい処理用培地 2.5 mL に 30 μL の被験物質液又は溶媒を加え、さらに S9 mix 0.5 mL を加えよく混合したものを細胞に添加した。いずれも 6 時間処理した後培地を除き、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 不含ダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液 2 mL で細胞を 3 回洗浄した後、新たに培地 5 mL を加え 18 時間培養した。

連続処理法による場合は、前培養した培地を除き、50 μL の被験物質液又は溶媒と新しい処理用培地 5 mL をよく混合したものを細胞に添加し、24 時間処理した。

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了 2 時間前に 10 $\mu\text{g/mL}$ のデメコルシン溶液を培養容器当たり 50 μL 加えた。

処理開始、処理終了時及び培養終了時に目視により被験物質の析出の有無及び培地色の変化並びに腐食を観察した。

培養終了後、0.25 w/v% トリプシン 2 mL で細胞を剥離させ細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を 200 μL 採取して 10 mL のセルパック(シスメックス株式会社)で希釈した後、Microcell counter (CDA-500、シスメックス株式会社)で細胞数を計測し、細胞増殖率及び 50%抑制濃度(IC_{50})を求めた。 IC_{50} は、細胞増殖率が 50%未満となる最低用量と、その用量の次に低い用量との細胞増殖率から得られる直線により算出した。

残りの細胞懸濁液を 1000 rpm (185 $\times$ g)で 5 分間遠心して細胞を回収し、0.075 mol/L KCl を 3 mL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間低張処理した。低張処理した細胞に固定液(メタノール: 酢酸=3:1)を約 0.3 mL 加え半固定し、さらに、固定液 3 mL で 2 回取替え、細胞を固定した。その後、固定液で適当な濃度の細胞懸濁液を作り、スライドに滴下した。用量当たり 1 枚の染色体標本作製した。自然乾燥後、1/15 mol/L のリン酸緩衝液(pH6.8)で希釈調製した 2 vol% ギムザ染色液にて約 15 分間染色した。

2) 用量段階

いずれの処理方法とも、ガイドラインに毒性がみられない場合の上限と記載されている 10 mmol/L 相当の 4180 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、公比 2 で希釈した 16.3、32.7、65.3、131、261、523、1050、2090 及び 4180 $\mu\text{g/mL}$ をそれぞれ設定した。用量当たり 2 個の培養容器を用いた。

3) 観察・測定

分裂細胞の有無を調べるとともに、染色体異常試験の用量設定のために参考となる用量では分裂中期細胞を 50 個観察し、染色体異常細胞の出現頻度を求めた。

(1) 構造異常

ギャップを除く構造異常を持つ細胞数を記録した。なお、ギャップは染色分体幅より狭い非染色性部位とした。

(2) 数的異常

3 倍体以上の倍数体を持つ細胞数を記録した。

6.2 染色体異常試験

1) 試験方法

次に示す陽性対照を設置して、細胞増殖抑制試験と同様の手順で実施した。なお、用量当たり 4 枚(培養容器当たり 2 枚)の染色体標本を作製した。

処理法		物質名	処理用量
短時間処理	- S9 mix	MMC	0.1 µg/mL
	+ S9 mix	CPA	6 µg/mL
24 時間連続処理		MMC	0.05 µg/mL

陽性対照は、短時間処理法の S9 mix 非存在下では 0.01 mg/mL の MMC を培養容器当たり 30 µL、S9 mix 存在下では 1 mg/mL の CPA を培養容器当たり 18 µL、連続処理法では 0.01 mg/mL の MMC を培養容器当たり 25 µL 添加した。

2) 用量段階

細胞増殖抑制試験の結果、いずれの処理法においても細胞増殖率が 50%未満となるような細胞毒性はみられたが、高用量域では細胞増殖率の低下抑制がみられ、10 mmol/L 相当の 4180 µg/mL においても標本観察に必要な分裂細胞の出現がみられた。被験物質が析出した用量での現象であるため、培地中の被験物質の分散状態の不良によって、細胞増殖率の低下が抑制されたものと推測された。よって、いずれの処理法においても、染色体異常試験の被験物質の最高用量には、4180 µg/mL ではなく IC₅₀ 値以上の用量を選択した。すなわち、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び存在下では IC₅₀ 値がそれぞれ 85 及び 100 µg/mL と算出されたため、いずれも 280 µg/mL を最高に公比 1.4 とした下記の 8 用量を設定した。24 時間連続処理法では IC₅₀ 値が 60 µg/mL と算出されたため、200 µg/mL を最高に公比 1.4 とした下記の 8 用量を設定した。

処理法		被験物質の設定用量
短時間処理	- S9 mix	26.6、37.2、52.1、72.9、102、143、200 及び 280 µg/mL
	+ S9 mix	26.6、37.2、52.1、72.9、102、143、200 及び 280 µg/mL
24 時間連続処理		19.0、26.6、37.2、52.1、72.9、102、143 及び 200 µg/mL

用量当たり 2 個の培養容器を用いた。

3) 標本観察

(1) 観察用量

対照として設置した陰性対照及び陽性対照の標本は、すべて観察した。

被験物質の観察用量は連続した 3 段階の用量を選択した。以下に選択用量及び理由を示す。

いずれの処理法においても、細胞増殖率が 50%未満となるような細胞毒性がみられたため、被験物質の標本観察する最高用量には、細胞増殖率が 50%未満となる最低用量を選択した。すなわち、短時間処理法の S9 mix 非存在下では、細胞増殖率が 50%未満となる最低用量が 102 $\mu\text{g/mL}$ であったため 52.1、72.9 及び 102 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の S9 mix 存在下では、細胞増殖率が 50%未満となる最低用量が 143 $\mu\text{g/mL}$ であったため 72.9、102 及び 143 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間連続処理法では、細胞増殖率が 50%未満となる最低用量が 72.9 $\mu\text{g/mL}$ であったため 37.2、52.1 及び 72.9 $\mu\text{g/mL}$ を被験物質の標本観察用量とした。

観察用量決定後、観察する標本すべてにランダムに割り付けたスライド番号を付してブラインド法により観察した。

上記用量の標本観察を行った結果、24 時間連続処理法では、標本観察した最高用量の 72.9 $\mu\text{g/mL}$ で構造異常を持つ細胞の出現頻度が 7.5%を示し、誘発が疑われた。72.9 $\mu\text{g/mL}$ より上位の 102 $\mu\text{g/mL}$ でも染色体異常の観察が可能であったため、102 $\mu\text{g/mL}$ の標本を追加観察した。なお、追加観察した標本にはスライド番号を付して観察した。

(2) 構造異常

染色体数(動原体数)が 25 ± 2 本の分裂中期細胞を、用量当たり 200 個(標本当たり 50 個)観察した。構造異常を持つ総細胞数を記録するとともに、構造異常の種類別に細胞数を記録した。なお、ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色部位と定義し、構造異常とは区別して記録した。

(3) 数的異常

分裂中期細胞を用量当たり 200 個(標本当たり 50 個)観察し、染色体を 38 本以上持つ倍数体細胞を記録した。

6.3 確認試験

染色体異常試験において、短時間処理法の S9 mix 非存在下の 72.9 $\mu\text{g/mL}$ で構造異常を持つ細胞の出現頻度が 27.0%を示し、誘発が疑われた。しかし、その出現に用量依存性がみられなかったため、短時間処理法の S9 mix 非存在下による確認試験を実施した。確認試験では、150 $\mu\text{g/mL}$ を最高に公比 1.2 で希釈した 41.9、50.2、60.3、72.3、86.8、104、125 及び 150 $\mu\text{g/mL}$ の 8 用量を設定した。確認試験においても、細胞増殖率が 50%未満となるような細胞毒性がみられたため、被験物質の標本観察用量には、細胞増殖率が 50%未満となる最低用量を最高に連続した 3 用量を選択した。すなわち、細胞増殖率が 50%未満となる最低用量は 86.8 $\mu\text{g/mL}$ であったため、60.3、72.3 及び 86.8 $\mu\text{g/mL}$ を被験物質の標本観察用量とした。なお、確認試験の試験方法及び標本観察方法は、染色体異常試験に準拠した。

7. 結果の判定基準

構造異常又は数的異常を持つ細胞の出現頻度が 10%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられた場合、あるいは 5%以上増加する結果が染色体異常試験と確認試験とで再現性がみられた場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。染色体異常細胞が 5%以上出現した処理法では、 D_{20} 値(細胞の 20%に異常が認められる濃度)を求めた。

8. 試験の成立条件

1) 2 個の培養容器間で異常細胞の出現頻度が著しくばらつかないこと、2) 陰性対照での異常細胞の出現頻度が 5%未満であること、3) 陽性対照での構造異常細胞の出現頻度が 20%以上であることを試験の成立条件とした。

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因は認められなかった。

試験成績

1. 細胞増殖抑制試験(表 1 及び図 1)

IC_{50} 値は、短時間処理法の S9 mix 非存在下では 85 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の S9 mix 存在下では 100 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間連続処理法では 60 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。

処理開始時には、いずれの処理法においても 131 $\mu\text{g/mL}$ 以上、処理終了時には、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び存在下では 131 $\mu\text{g/mL}$ 以上、24 時間連続処理法では 261 $\mu\text{g/mL}$ 以上で被験物質の析出がみられた。培養終了時には、短時間処理法の S9 mix 非存在下で 1050 $\mu\text{g/mL}$ 以上で被験物質の析出がみられた。培地色の変化及び培養容器の腐食はすべての用量でみられなかった。

また、いずれの処理法においても、観察した被験物質用量で数的異常細胞の出現頻度は 5%未満であったものの、構造異常を持つ細胞の最大出現頻度は、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び 24 時間連続処理法において 10.0%、短時間処理法の S9 mix 存在下においては 8.0%を示した。

2. 染色体異常試験

2.1 短時間処理法(表 2、3、4 及び図 2、3)

1) S9 mix 非存在下

(1) 細胞増殖率及び IC_{50} 値

細胞増殖率は 26.6、37.2、52.1、72.9、102、143、200 及び 280 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 106.2、88.8、81.4、60.6、39.3、28.5、29.3 及び 26.1%であり、 IC_{50} 値は 87 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。

(2) 被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食

処理開始時及び処理終了時に、102 $\mu\text{g/mL}$ 以上で被験物質の析出がみられた。培地色の変化及び培養容器の腐食は、すべての用量でみられなかった。

(3) 構造異常を持つ細胞の出現頻度

陰性対照では 1.5%、陽性対照では 47.0%を示した。

被験物質の 52.1、72.9 及び 102 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.5、27.0 及び 3.0%を示し、用量依存性はみられないものの 10%以上の出現がみられた。

(4) 数的異常細胞の出現頻度

全群とも 5.0%未満を示したため、陰性と判定した。

2) S9 mix 存在下

(1) 細胞増殖率及び IC_{50} 値

細胞増殖率は 26.6、37.2、52.1、72.9、102、143、200 及び 280 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 96.5、89.7、92.1、72.6、56.3、28.3、13.5 及び 5.2%であり、 IC_{50} 値は 110 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。

(2) 被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食

処理開始時及び処理終了時に、102 $\mu\text{g/mL}$ 以上で被験物質の析出がみられた。培地色の変化及び培養容器の腐食は、すべての用量でみられなかった。

(3) 構造異常を持つ細胞の出現頻度

陰性対照では 2.5%、陽性対照では 50.0%を示した。

被験物質の 72.9、102 及び 143 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 3.0、4.0 及び 4.0%を示したため、陰性と判定した。

(4) 数的異常細胞の出現頻度

全群とも 5.0%未満を示したため、陰性と判定した。

2.2 24 時間連続処理法(表 2、5 及び図 2、4)

1) 細胞増殖率及び IC_{50} 値

細胞増殖率は 19.0、26.6、37.2、52.1、72.9、102、143 及び 200 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 95.7、79.5、69.2、58.9、41.8、41.5、19.8 及び 14.4%であり、 IC_{50} 値は 63 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。

2) 被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食

処理開始時及び処理終了時に、102 $\mu\text{g/mL}$ 以上で被験物質の析出がみられた。培地色の変化及び培養容器の腐食は、すべての用量でみられなかった。

3) 構造異常を持つ細胞の出現頻度

陰性対照では 1.5%、陽性対照では 75.0%を示した。

被験物質の 37.2、52.1、72.9 及び 102 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.5、3.0、7.5 及び 15.5%を示し、10%を超える出現に用量依存性がみられたため陽性と判定した。

4) 数的異常細胞の出現頻度

全群とも 5.0%未満を示したため、陰性と判定した。

5) D₂₀ 値

構造異常で 0.16 mg/mL と算出された。

3. 短時間処理法の S9 mix 非存在下による確認試験(表 6、7 及び図 5、6)

3.1 細胞増殖率及び IC₅₀ 値

細胞増殖率は 41.9、50.2、60.3、72.3、86.8、104、125 及び 150 µg/mL でそれぞれ 88.3、80.0、80.2、59.5、43.2、42.5、27.6 及び 27.4%であり、IC₅₀ 値は 81 µg/mL と算出された。

3.2 被験物質の析出、培地色の変化及び培養容器の腐食

処理開始時及び処理終了時に、104 µg/mL 以上で被験物質の析出がみられた。培地色の変化及び培養容器の腐食は、すべての用量でみられなかった。

3.3 構造異常を持つ細胞の出現頻度

陰性対照では 0.5%、陽性対照では 59.0%を示した。

被験物質の 60.3、72.3 及び 86.8 µg/mL でそれぞれ 2.5、3.0 及び 2.5%を示したため、陰性と判定した。

3.4 数的異常細胞の出現頻度

全群とも 5.0%未満を示したため、陰性と判定した。

4. 代表的な写真

正常な細胞を写真 1、構造異常を持つ細胞を写真 2 及び 3 に示す。

考察及び結論

いずれの処理法においても、陰性対照で異常細胞の出現頻度が 5%未満であり、陽性対照でギャップ以外の構造異常を持つ細胞の出現頻度が 20%以上であった。また、24 時間連続処理法の 102 µg/mL で異常細胞の出現頻度が 6.0 及び 25.0%とばらつきがみられたが、いずれも 5%以上の出現がみられたため、著しいばらつきではないと判断した。よって、試験は適正に行われたと判断した。

染色体異常試験の結果、いずれの処理法においても、数的異常細胞の出現頻度は、観察したすべての被験物質用量で 5%未満であったため、数的異常は陰性と判定した。

しかしながら、構造異常を持つ細胞の出現頻度は、短時間処理法の S9 mix 存在下では観察したすべての被験物質用量で 5%未満であったが、24 時間連続処理法では 10%を越え、その出現に用量依存性がみられたため、構造異常は陽性と判定した。

なお、24 時間連続処理法で構造異常が増加した用量では、培養容器間で細胞の出現頻度にばらつきがみられた。構造異常を持つ細胞が 10%以上出現した培養容器での細胞増殖率は約 30%程度であり、5%程度が出現した培養容器での細胞増殖率は約 50%であった。よって、構造異常を持つ細胞の出現頻度のばらつきは、細胞増殖率に起因するものと考えられた。また、細胞増殖率のばらつきは、培地中に被験物質の析出がみられ

ている濃度であることから、培地中での分散状態のわずかな違いによって生じたものと判断した。

また、短時間処理法の S9 mix 非存在下においては、染色体異常試験で構造異常を持つ細胞の出現頻度が 72.9 $\mu\text{g/mL}$ で 27.0%を示したが、確認試験では 60.3、72.3 及び 86.8 $\mu\text{g/mL}$ でいずれも 5%未満であった。染色体異常試験でみられた構造異常を持つ細胞の出現頻度の増加には用量依存性はみられなかったため、染色体異常試験でみられた構造異常の増加は偶発的なものと判断し、短時間処理法の S9 mix 非存在下では構造異常は陰性と判定した。さらに、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び存在下では、細胞増殖抑制試験において構造異常を持つ細胞の出現頻度が 5%以上を示す用量がみられた。しかし、細胞増殖抑制試験では観察細胞数が用量当たり 50 細胞と少なく、5%以上の出現頻度を示した用量では細胞増殖率が 30%未満であるか、あるいは培地中の被験物質の分散状態が不良であった用量での増加であったため、評価に用いるには不適切な条件での増加傾向と判断した。

以上の結果から、本試験条件下では、13F-SFA は数的異常を誘発しないものの、構造異常を誘発するものと考えられた。

参考文献

1. 染色体異常試験データ集(改訂 1998 年版)(1999)祖父尼俊雄監修. 株式会社 エル・アイ・シー.
2. 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編(1988)化学物質による染色体異常アトラス. 朝倉書店.

表 1 13F-SFAの細胞増殖抑制試験結果

物質	用 量 (μg/mL)	処理-回復 時間(h)	S9 mix	細胞増殖率 (%)	培地中の被験物質の 析出 ^{a)}			異常細胞の出現頻度 (%) ^{b)}	
					処理 開始時	処理 終了時	培養 終了時	構造異常	数的異常
脱水アセトン	0	6-18	-	100	-	-	-	0.0	0.0
13F-SFA	16.3	6-18	-	100.5	-	-	-	n.o.	n.o.
	32.7	6-18	-	90.0	-	-	-	n.o.	n.o.
	65.3	6-18	-	61.6	-	-	-	0.0	0.0
	131	6-18	-	23.2	+	+	-	6.0	0.0
	261	6-18	-	28.2	+	+	-	10.0	0.0
	523	6-18	-	23.2	+	+	-	few meta	
	1050	6-18	-	31.9	+	+	+	4.0	0.0
	2090	6-18	-	38.8	+	+	+	4.0	0.0
	4180	6-18	-	36.9	+	+	+	2.0	0.0
IC ₅₀ : 85 μg/mL									
脱水アセトン	0	6-18	+	100	-	-	-	0.0	0.0
13F-SFA	16.3	6-18	+	106.7	-	-	-	n.o.	n.o.
	32.7	6-18	+	106.4	-	-	-	n.o.	n.o.
	65.3	6-18	+	88.8	-	-	-	0.0	0.0
	131	6-18	+	21.9	+	+	-	6.0	0.0
	261	6-18	+	5.1	+	+	-	few meta	
	523	6-18	+	17.8	+	+	-	8.0	2.0
	1050	6-18	+	35.1	+	+	-	2.0	2.0
	2090	6-18	+	54.4	+	+	-	6.0	2.0
	4180	6-18	+	46.0	+	+	-	8.0	0.0
IC ₅₀ : 100 μg/mL									
脱水アセトン	0	24-0	-	100	-	-	/	0.0	0.0
13F-SFA	16.3	24-0	-	84.2	-	-		n.o.	n.o.
	32.7	24-0	-	68.3	-	-		0.0	0.0
	65.3	24-0	-	46.3	-	-		4.0	2.0
	131	24-0	-	15.2	+	-		few meta	
	261	24-0	-	9.7	+	+		no meta	
	523	24-0	-	11.0	+	+		no meta	
	1050	24-0	-	11.1	+	+		no meta	
	2090	24-0	-	16.4	+	+		8.0	0.0
4180	24-0	-	14.9	+	+	10.0		0.0	
IC ₅₀ : 60 μg/mL									

アセトンはモレキュラシーブス5A 1/8で脱水した。

n.o.: 観察せず、few meta: 分裂細胞の出現頻度が極めて少ない、no meta: 分裂細胞の出現無し

a) 被験物質の析出は、有りを+、無しを-とした。

b) 用量当たり50個の分裂細胞を観察し、染色体異常細胞の出現頻度を求めた。

注) ガイドラインに毒性のみられない場合の上限と記載されている10 mmol/L相当の4180 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量に公比2で希釈した上記用量を設定した。

表 2 13F-SFAの染色体異常試験結果

物質	用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	処理-回復 時間(h)	S9 mix	細胞増殖率 (%)	培地中の被験物質の 析出 ^{a)}			異常細胞の出現頻度 (%) ^{b)}	
					処理 開始時	処理 終了時	培養 終了時	構造異常	数的異常
脱水アセトン	0	6-18	-	100	-	-	-	1.5	1.0
13F-SFA	26.6	6-18	-	106.2	-	-	-	n.o.	n.o.
	37.2	6-18	-	88.8	-	-	-	n.o.	n.o.
	52.1	6-18	-	81.4	-	-	-	0.5	0.0
	72.9	6-18	-	60.6	-	-	-	27.0	0.5
	102	6-18	-	39.3	+	+	-	3.0	0.0
	143	6-18	-	28.5	+	+	-	n.o.	n.o.
	200	6-18	-	29.3	+	+	-	n.o.	n.o.
	280	6-18	-	26.1	+	+	-	n.o.	n.o.
MMC	0.1	6-18	-	ND	-	-	-	47.0	1.5
IC ₅₀ : 87 $\mu\text{g/mL}$									
脱水アセトン	0	6-18	+	100	-	-	-	2.5	1.0
13F-SFA	26.6	6-18	+	96.5	-	-	-	n.o.	n.o.
	37.2	6-18	+	89.7	-	-	-	n.o.	n.o.
	52.1	6-18	+	92.1	-	-	-	n.o.	n.o.
	72.9	6-18	+	72.6	-	-	-	3.0	1.5
	102	6-18	+	56.3	+	+	-	4.0	1.0
	143	6-18	+	28.3	+	+	-	4.0	1.5
	200	6-18	+	13.5	+	+	-	few meta	
	280	6-18	+	5.2	+	+	-	no meta	
CPA	6	6-18	+	ND	-	-	-	50.0	1.0
IC ₅₀ : 110 $\mu\text{g/mL}$									
脱水アセトン	0	24-0	-	100	-	-		1.5	0.0
13F-SFA	19.0	24-0	-	95.7	-	-		n.o.	n.o.
	26.6	24-0	-	79.5	-	-		n.o.	n.o.
	37.2	24-0	-	69.2	-	-		0.5	0.0
	52.1	24-0	-	58.9	-	-		3.0	0.0
	72.9	24-0	-	41.8	-	-		7.5	1.5
	102	24-0	-	41.5	+	+		15.5	0.5
	143	24-0	-	19.8	+	+		few meta	
	200	24-0	-	14.4	+	+		no meta	
MMC	0.05	24-0	-	ND	-	-		75.0	1.0
IC ₅₀ : 63 $\mu\text{g/mL}$							D ₂₀ : 0.16 mg/mL -		

アセトンはモレキュラシーブス5A 1/8で脱水した。

MMC: マイトマイシンC、CPA: シクロホスファミド水和物

ND: 測定せず

n.o.: 観察せず、few meta: 分裂細胞の出現頻度が極めて少ない、no meta: 分裂細胞の出現無し

a) 被験物質の析出は、有りを+、無しを-とした。

b) 用量当たり200個の分裂細胞を観察し、染色体異常細胞の出現頻度を求めた。

表 3 染色体異常試験の結果(短時間処理法のS9 mix非存在下)

被験物質名: 13F-SFA

S9 mix			用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)										ギャップ の出現数 (出現頻度%)	細胞 増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)				
処理時間 (h)				観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体体切断	染色体体交換	その他	総異常細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体体切断			染色体体交換	その他	観察細胞数	倍数体	その他
6 - 18	-	陰性対照 (Acetone) 0	100	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	100	1	0	0	1
			100	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	100	1	0	0	1
			200	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
			0													103.6	0			
6 - 18	-	26.6	0												108.7	0				
			0												(106.2)	0				
			0												94.7	0				
			0												82.8	0				
6 - 18	-	37.2	0											(88.8)	0					
			100	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	79.4	100	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83.3	100	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(81.4)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 - 18	-	72.9	100	17	14	0	0	0	24	0	0	0	1	64.6	100	0	0	0	0	
			100	20	21	0	0	0	30	0	0	0	0	56.6	100	1	0	0	1	
			200	37 (18.5)	35 (17.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	54 (27.0)	0 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(60.6)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)
			100	3	0	0	0	0	3	1	45.6	100	0	0	0	0	0	0	0	0
6 - 18	-	102 †	100	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	33.0	100	0	0	0	0	
			200	5 (2.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	1 (0.5)	(39.3)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
			0												29.6	0				
			0												27.4	0				
6 - 18	-	143 †	0										(28.5)	0						
			0												32.8	0				
			0												25.7	0				
			0											(29.3)	0					
6 - 18	-	200 †	0											22.1	0					
			0												30.1	0				
			0												(26.1)	0				
			0												0					
6 - 18	-	陽性対照 (MMC) 0.1	100	21	45	0	0	0	51	0	0	0	0		100	3	0	0	3	
			100	15	38	1	1	0	43	2		100	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	36 (18.0)	83 (41.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	94 (47.0)	2 (1.0)		200	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)

処理時間は処理時間-回復時間を表す。
異常細胞数は各群のプレートごとのデータを1及び2行目、その合計を3行目に表す。
細胞増殖率は各被験物質群のプレートごとの数値を1及び2行目、その平均を3行目に表す。
アセトンはモレキュレーションス5A1/8で脱水した。

MMC: マイトマイシンC

†: 処理開始時及び処理終了時に被験物質の折出がみられた。

26.6、37.2、143、200及び280 μ g/mLの標本は観察しなかった。

表 4 染色体異常試験の結果 (短時間処理法のS9 mix存在下)

被験物質名: 13F-SFA

処理時間 (h)	S9 mix	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)										細胞 増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			観察細胞数		染色体分体切斷	染色体分体交換	染色体切斷	染色体交換	その他	総異常細胞数	ギャップ の出現数 (出現頻度%)	観察細胞数		倍数体	その他	総異常細胞数																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
			100	200	4	1	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				0 (0.0)	0 (0.0)	4	1	5 (2.5)	0 (0.0)	100	200	1	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
6 - 18	+	陰性対照 (Acetone) 0	0	0											97.1	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
			0	0											0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
			0	0											0	0					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

処理時間は処理時間・回復時間を表す。

異常細胞数は各群のプレートごとデータの1及び2行目、その合計を3行目に表す。

細胞増殖率は各被験物質群のプレートごとの数値を1及び2行目、その平均を3行目に表す。

アセトンはモレキュラシープス5A1/8で脱水した。

CPA: シクロホスファミド・水和物

†: 処理開始時及び処理終了時に被験物質の析出がみられた。

few metaphases: 分裂細胞の出現が極めて少ない

no metaphases: 分裂細胞の出現がみられない

26.6, 37.2, 52.1, 200及び280 $\mu\text{g/mL}$ の標本は観察しなかった。

表 5 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

K06-1189

被験物質名: 13F-SFA

処理時間 (h)	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)										細胞 増殖率 (%)	染色体数異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体分体交換	染色体分体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数	ギヤップ の出現数 (出現頻度%)	観察細胞数		倍數体	その他	総異常細胞数	
24 - 0	陰性対照 (Acetone) 0	100	1	0	0	1	0	0	2	0	100	100	0	0	0	
		100	1	0	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0	
		200	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
		0										0				
24 - 0	19.0	0									96.2	0				
		0									95.1	0				
		0									(95.7)	0				
		0									80.6	0				
24 - 0	26.6	0									78.3	0				
		0									(79.5)	0				
		100	1	0	0	0	0	0	1	1	70.5	100	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	67.9	100	0	0	0	
24 - 0	37.2	200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	(69.2)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	57.4	100	0	0	0	
		100	5	1	0	0	0	0	6	0	60.3	100	0	0	0	
		200	5 (2.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	(58.9)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
24 - 0	52.1	100	3	6	1	1	0	0	10	0	32.5	100	0	0	0	
		100	3	1	1	1	0	0	5	0	51.1	100	3	0	3	
		200	6 (3.0)	7 (3.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	15 (7.5)	0 (0.0)	(41.8)	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	
		100	4	2	0	0	0	0	6	2	53.0	100	1	0	1	
24 - 0	102 †	100	20	6	0	0	0	0	25	1	30.0	100	0	0	0	
		200	24 (12.0)	8 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	31 (15.5)	3 (1.5)	(41.5)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	
		0									19.6	0				
		0									20.0	0				
24 - 0	143 †	0									(19.8)	0				
		0									13.7	0				
		0									15.0	0				
		0									(14.4)	0				
24 - 0	200 †	0														
		100	43	65	0	1	0	0	78	3		100	1	0	1	
		100	42	57	0	0	0	0	72	1		100	1	0	1	
		200	85 (42.5)	122 (61.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	150 (75.0)	4 (2.0)		200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	
24 - 0	陽性対照 (MMC) 0.05	100	43	65	0	1	0	0	78	3		100	1	0	1	
		100	42	57	0	0	0	0	72	1		100	1	0	1	
		200	85 (42.5)	122 (61.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	150 (75.0)	4 (2.0)		200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	
		0														

処理時間は処理時間-回復時間を表す。

異常細胞数は各群のプレートットごとのデータを1及び2行目、その合計を3行目に表す。

細胞増殖率は各被験物質群のプレートットごとの数値を1及び2行目、その平均を3行目に表す。

アセトンはモレキュラースプスA1/8で脱水した。

MMC: マイトマイシンC

†: 処理開始時及び処理終了時に被験物質の析出がみられた。

few metaphases: 分裂細胞の出現が極めて少ない

no metaphases: 分裂細胞の出現がみられない

19.0、26.6、143及び200 $\mu\text{g/mL}$ の標本は観察しなかった。

表 6 13F-SFAの確認試験結果

物質	用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	処理-回復 時間(h)	S9 mix	細胞増殖率 (%)	培地中の被験物質の 析出 ^{a)}			異常細胞の出現頻度 (%) ^{b)}	
					処理 開始時	処理 終了時	培養 終了時	構造異常	数的異常
脱水アセトン	0	6-18	-	100	-	-	-	0.5	0.0
13F-SFA	41.9	6-18	-	88.3	-	-	-	n.o.	n.o.
	50.2	6-18	-	80.0	-	-	-	n.o.	n.o.
	60.3	6-18	-	80.2	-	-	-	2.5	0.0
	72.3	6-18	-	59.5	-	-	-	3.0	0.0
	86.8	6-18	-	43.2	-	-	-	2.5	0.5
	104	6-18	-	42.5	+	+	-	n.o.	n.o.
	125	6-18	-	27.6	+	+	-	n.o.	n.o.
	150	6-18	-	27.4	+	+	-	n.o.	n.o.
MMC	0.1	6-18	-	ND	-	-	-	59.0	0.5
IC ₅₀ : 81 $\mu\text{g/mL}$									

アセトンはモレキュラシーブス5A 1/8で脱水した。

MMC: マイトマイシンC

ND: 測定せず、n.o.: 観察せず

a) 被験物質の析出は、有りを+、無しを-とした。

b) 用量当たり200個の分裂細胞を観察し、染色体異常細胞の出現頻度を求めた。

表 7 確認試験の結果 (短時間処理法のS9 mix非存在下)

被験物質名: 13F-SFA

処理時間 (h)	S9 mix	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)										ギャップ の出現数 (出現頻度%)	細胞 増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)					
			染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)												観察細胞数	観察細胞数	倍率	倍率	その他	総異常細胞数
			観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体分体切断	染色体分体交換	その他	総異常細胞数	観察細胞数								
6-18	-	陰性対照 (Acetone) 0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	100	0	0	0	0	0	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
			0											0						
6-18	-	41.9	0											0						
			0											0						
			0											0						
			0											0						
6-18	-	50.2	0											0						
			0											0						
			0											0						
			0											0						
6-18	-	60.3	100	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	100	0	0	0	0	0	
			100	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	100	0	0	0	0	0	
			200	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
			100	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	100	0	0	0	0	0	
6-18	-	72.3	100	3	1	0	0	0	0	4	0	0	62.8	100	0	0	0	0	0	
			200	5 (2.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
			100	1	2	0	0	0	0	3	1	0	45.0	100	1	0	0	1	1	
			100	1	0	0	0	1	0	2	0	0	41.3	100	0	0	0	0	0	
6-18	-	86.8	200	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	1 (0.5)	(43.2)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)		
			0										45.6	0						
			0										39.4	0						
			0										(42.5)	0						
6-18	-	125†	0										26.5	0						
			0										28.7	0						
			0										(27.6)	0						
			0										23.8	0						
6-18	-	150†	0										31.0	0						
			0										(27.4)	0						
			0																	
			0																	
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.1	100	26	56	0	0	0	0	64	0		100	1	0	0	1	1		
			100	31	42	0	0	0	0	54	2		100	0	0	0	0	0		
			200	57 (28.5)	98 (49.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	118 (59.0)	2 (1.0)		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)		
			0																	

処理時間は処理時間-回復時間を表す。

異常細胞数は各群のプレートごとのデータを1及び2行目、その合計を3行目に表す。

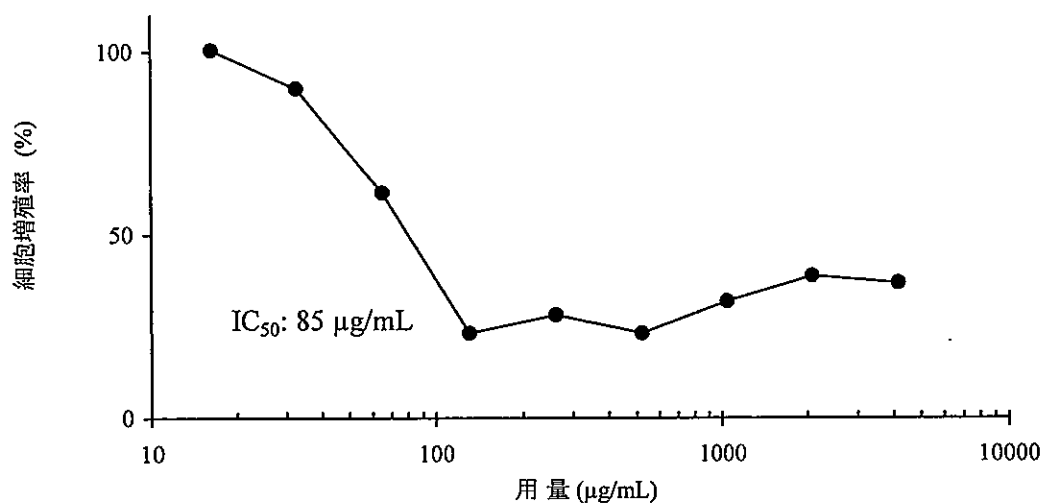
細胞増殖率は各被験物質群のプレートごとの数値を1及び2行目、その平均を3行目に表す。

アセトンはモレキュラーブラスA1/8で脱水した。

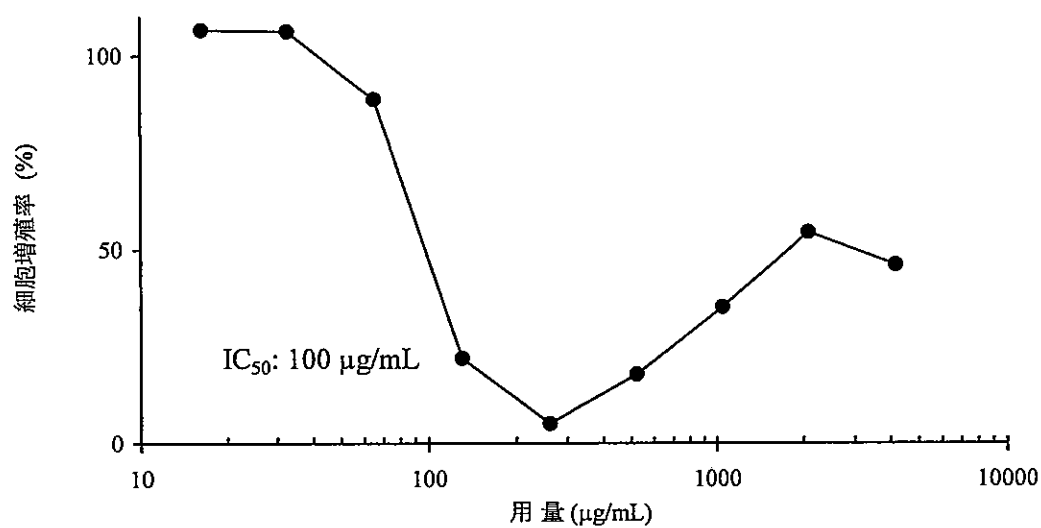
MMC: マイトマイシンC

†: 処理開始時及び処理終了時に被験物質の折出がみられた。

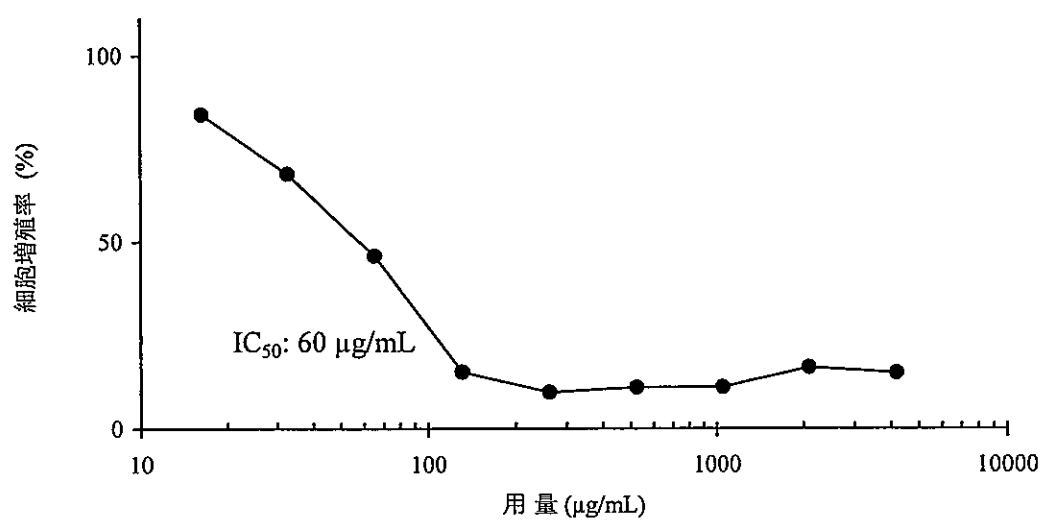
41.9、50.2、104、125及び150 $\mu\text{g/mL}$ の標本は観察しなかった。



短時間処理・- S9 mix

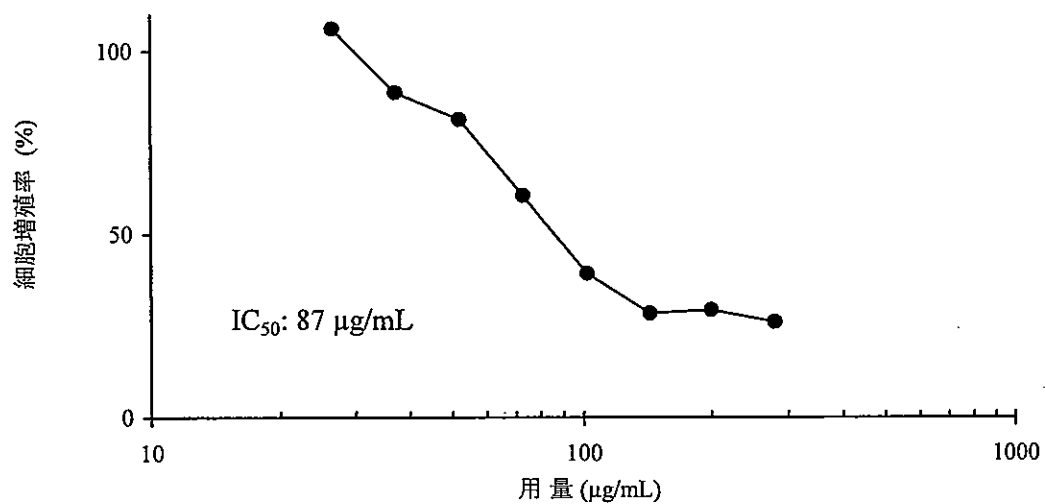


短時間処理・+ S9 mix

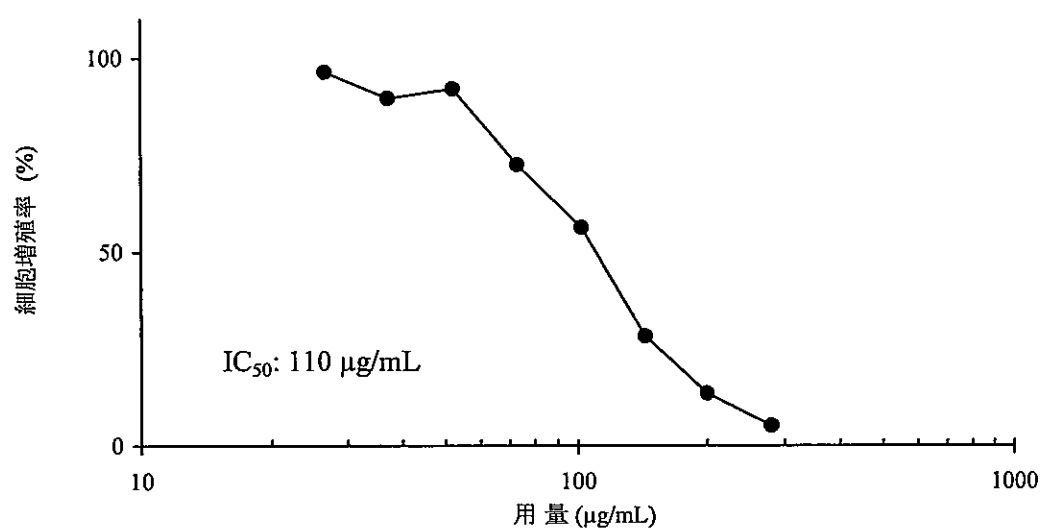


24時間連続処理

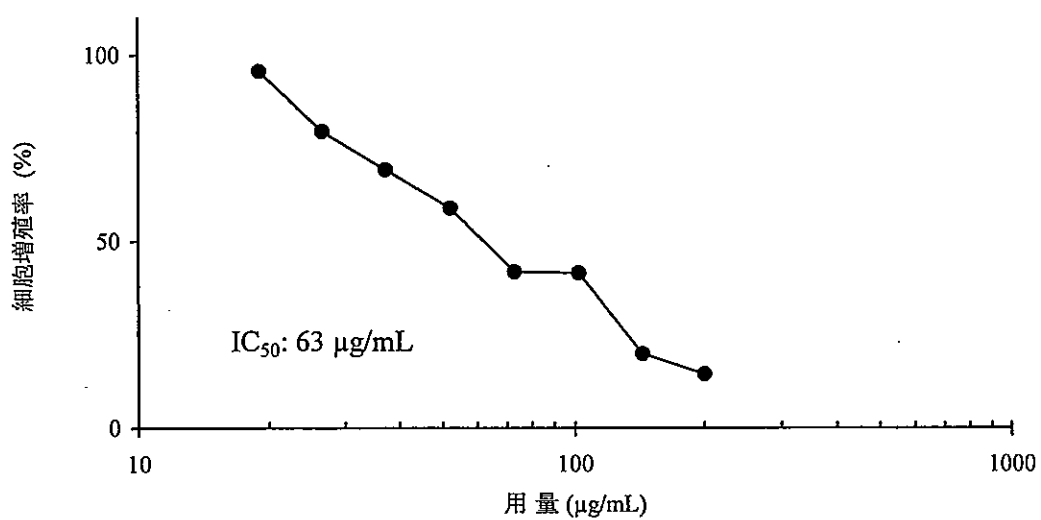
図1 13F-SFAの細胞増殖抑制試験結果



短時間処理・- S9 mix



短時間処理・+ S9 mix



24時間連続処理

図2 13F-SFAの染色体異常試験における細胞増殖率

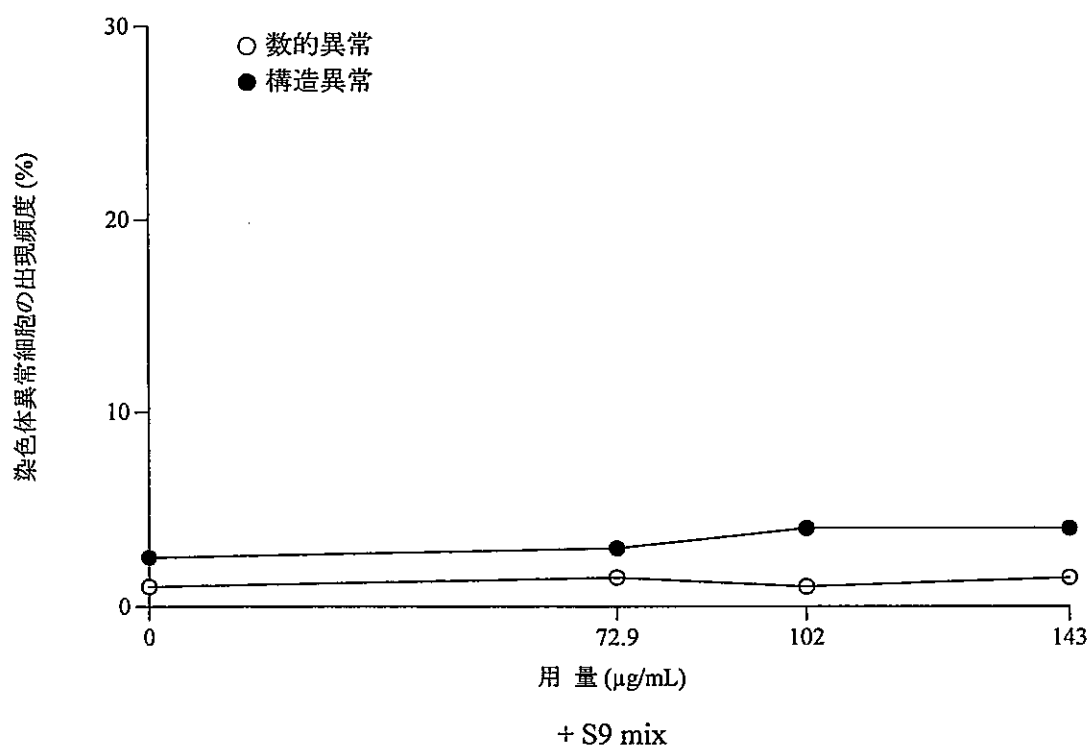
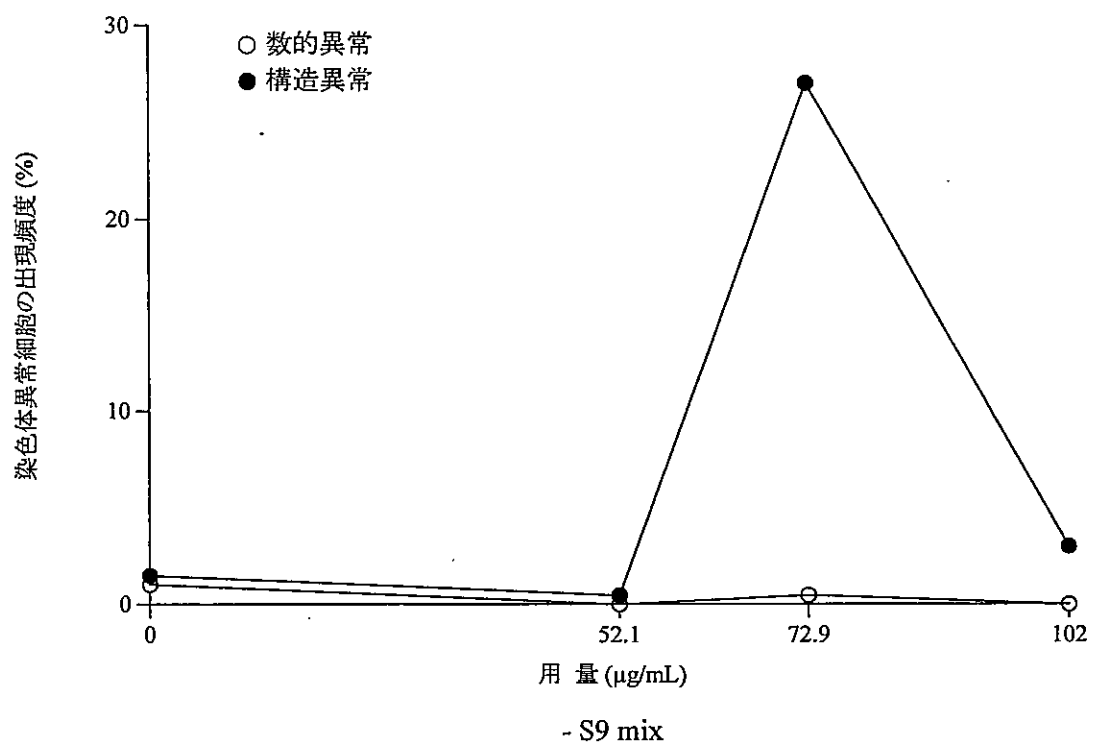


図3 13F-SFAの短時間処理法における染色体異常試験結果

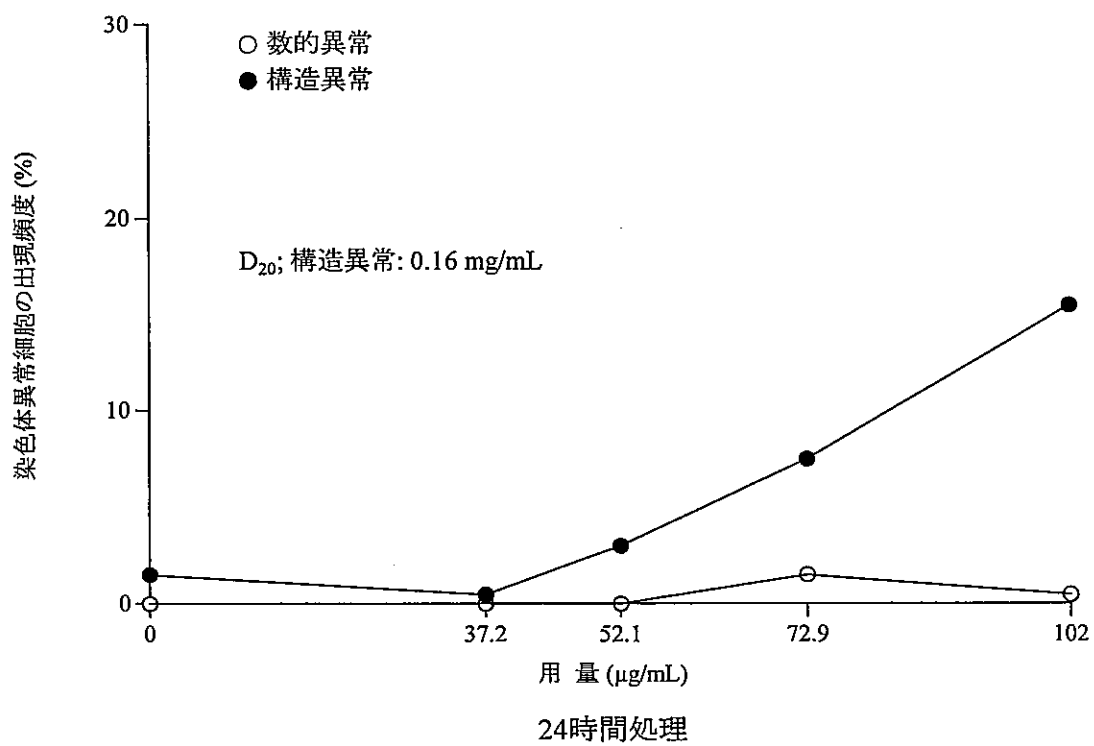


図4 13F-SFAの連続処理法における染色体異常試験結果

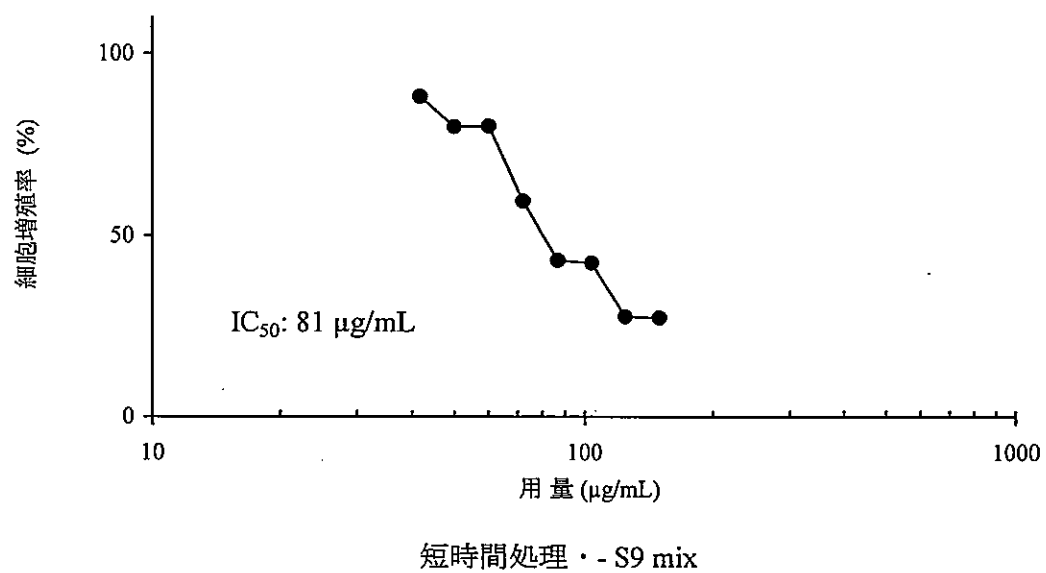


図 5 13F-SFAの確認試験における細胞増殖率

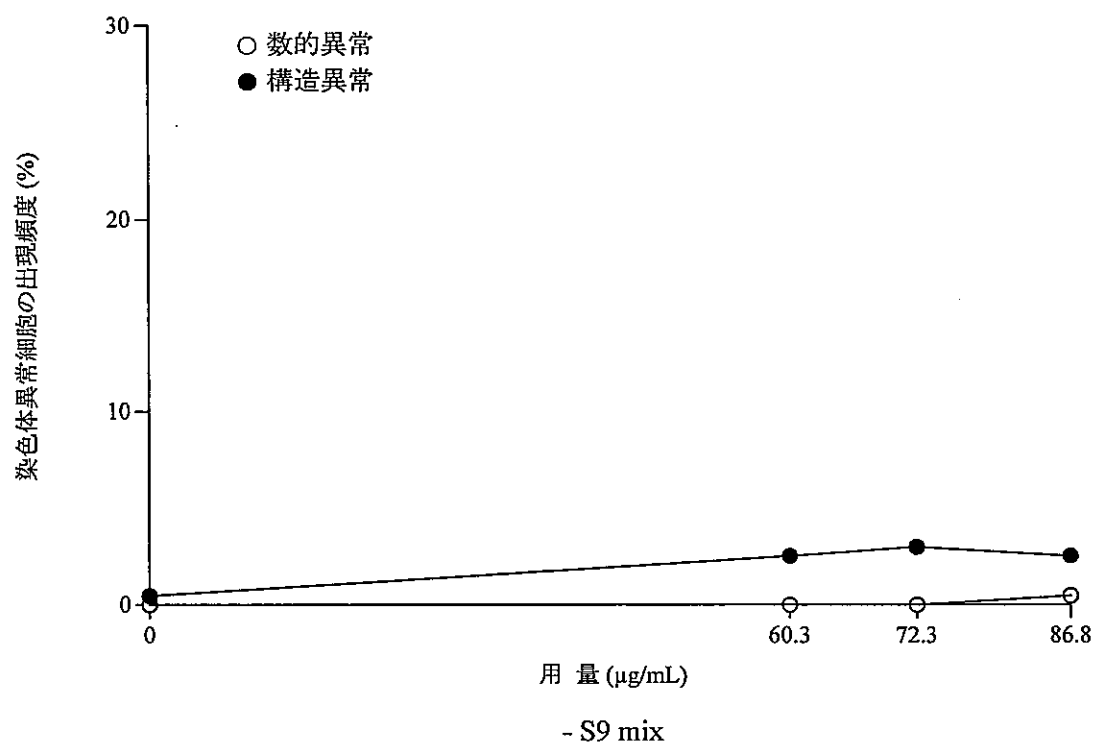


図 6 13F-SFAの短時間処理法における確認試験結果

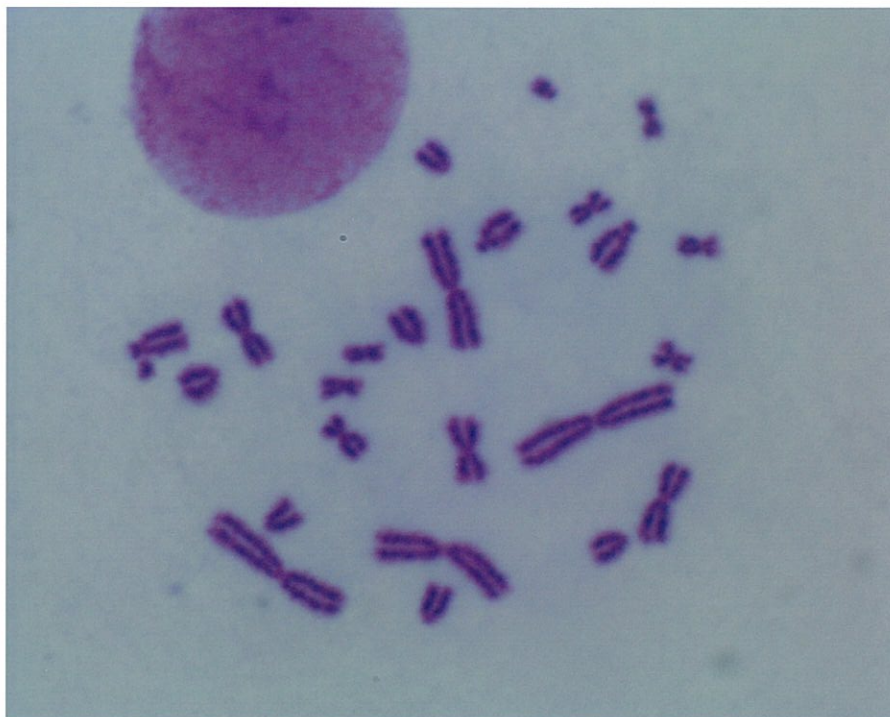


写真 1 正常細胞
24 時間連続処理法 陰性対照

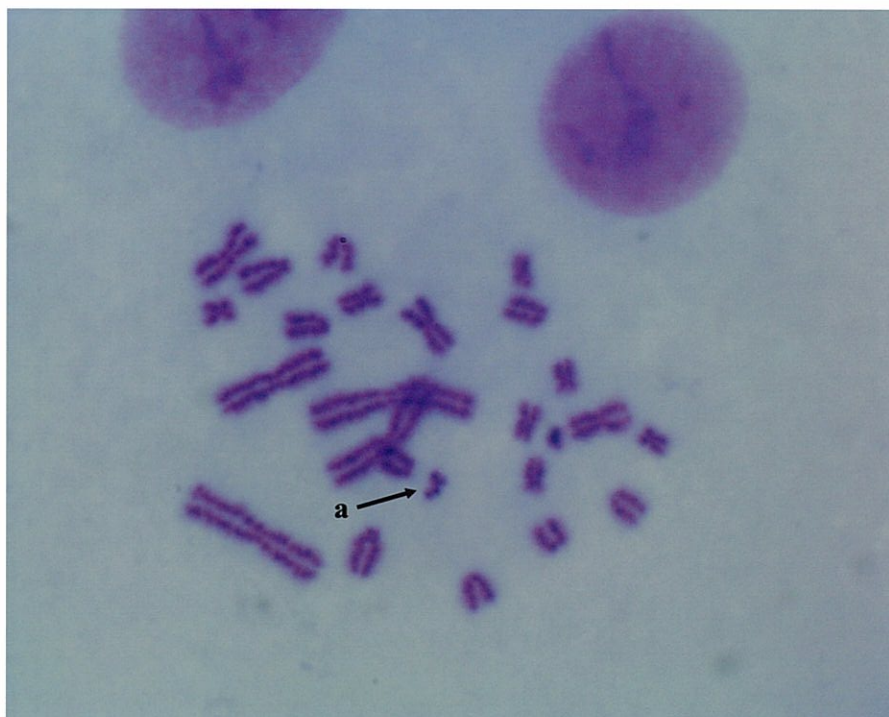


写真 2 13F-SFA により誘発された構造異常
24 時間連続処理法 102 $\mu\text{g/mL}$
a: 染色分体切断

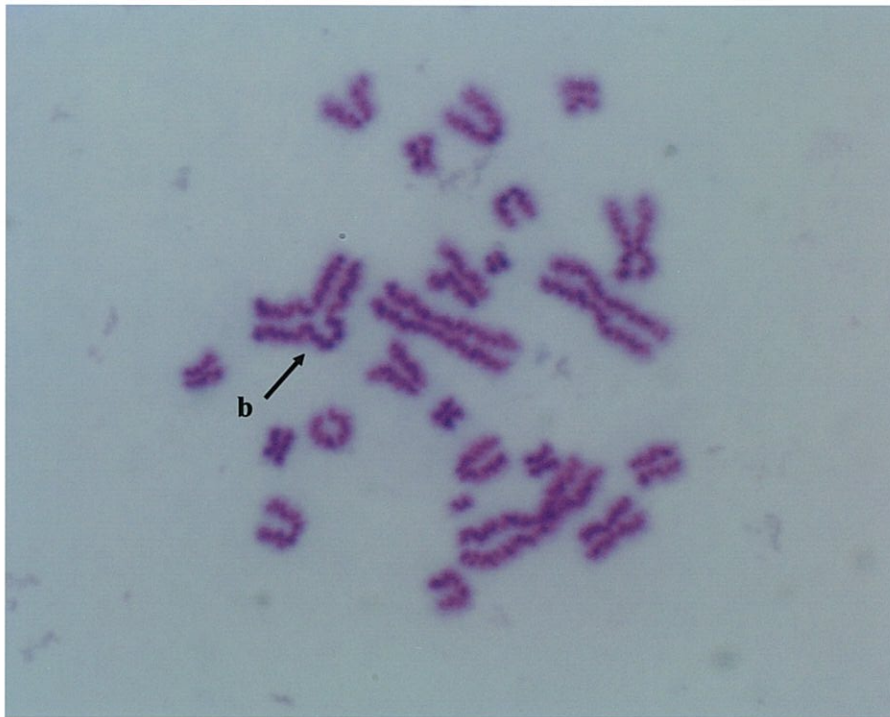


写真3 13F-SFAにより誘発された構造異常
24時間連続処理法 72.9 $\mu\text{g/mL}$
b: 染色分体交換