最終報告書

硫酸第一鉄・七水塩のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

（試験番号：B010045）

2002 年 2 月 28 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

目次

要約 ····· 5
材料および方法 ····· 6
1. 試験物質 ····· 6
2. 細胞 ····· 7
3. 培地 ····· 7
4. S9 mix ····· 7
5. 試験物質溶液および懸濁液の調製 ····· 8
6. 細胞増殖抑制試験 ····· 9
7. 染色体異常試験（本試験・確認試験） ····· 10
8. 結果のまとめ ····· 12
結果 ····· 13
考察および結論 ····· 14
参考文献 ····· 14

表 1　染色体異常試験の結果（短時間処理法）[本試験] ····· 16
表 2　染色体異常試験の結果（短時間処理法）[確認試験] ····· 17
図 1　硫酸第一鉄・七水塩の細胞毒性（短時間処理法・－S9 mix） ····· 18
図 2　硫酸第一鉄・七水塩の細胞毒性（短時間処理法・＋S9 mix） ····· 18
図 3　硫酸第一鉄・七水塩の細胞毒性（連続処理法・24 時間処理） ····· 19
図 4　硫酸第一鉄・七水塩の構造異常細胞出現頻度 （短時間処理法） ····· 20
図 5　硫酸第一鉄・七水塩の数的異常細胞出現頻度 （短時間処理法） ····· 20

要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い，硫酸第一鉄・七水塩の *in vitro* における染色体異常試験を実施した．

予備試験の結果に基づいて，細胞増殖抑制試験の用量は，短時間処理法の S9 mix 非共存下（以下－S9 mix）および S9 mix 共存下（以下＋S9 mix），ならびに連続処理法の 24 時間処理（以下 24 時間処理）において．500，1000，2000，3000，4000，5000μg/mL を設定した．その結果，被験物質による 50％細胞増殖抑制用量は－S9 mix で 1239μg/mL，＋S9 mix で 560μg/mL，24 時間処理で 1007μg/mL であった．

この結果に基づき，染色体異常試験（本試験）は，－S9 mix で 250，500，1000，1500，2000μg/mL，＋S9 mix で 125，250，500，1000，1500μg/mL を設定した．

本試験の標本観察の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix の 1500μg/mL において 19.0％，＋S9 mix の 500，1000μg/mL において 9.0，72.5％であった．この結果から，用量依存性を検討するために，－S9 mix で 1200，1300，1400，1500，1600μg/mL，＋S9 mix で 600，700，800，900，1000μg/mL を設定して確認試験を実施した．

確認試験の結果，被験物質処理群の全ての用量において，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 10％以上となり，かつ，用量依存性が認められた．

一方，数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの用量においても 5％未満であった．

従って，硫酸第一鉄・七水塩は，本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有すると結論した．

材料および方法

1. 試験物質

1.1 被験物質

から提供された硫酸第一鉄・七水塩を使用時まで室温で，窒素封入して保存し，使用した．被験物質の純度，組成および物理化学的性質は以下の通りである．

<table>
<tr><td>新規化学物質の名称
(IUPAC 命名法による)</td><td colspan="4">硫酸第一鉄・七水塩</td></tr>
<tr><td>別　　名</td><td colspan="4">――――――――――――――――――――</td></tr>
<tr><td>構造式又は示性式
(いずれも不明の場合は，その製法の概要)</td><td colspan="4">$FeSO_4 \cdot 7H_2O$</td></tr>
<tr><td>試験に供した新規化学物質の純度</td><td colspan="2">91.6 wt%</td><td colspan="2">試験に供した新規化学物質の Lot No.</td></tr>
<tr><td>不純物の名称及び濃度</td><td colspan="4">Mg：0.22%，Mn：0.20%，Zn：87 ppm</td></tr>
<tr><td>CAS 番号</td><td colspan="2">7782-63-0</td><td>蒸　気　圧</td><td>－</td></tr>
<tr><td>分　子　量</td><td colspan="2">278.03</td><td>分配係数</td><td>－</td></tr>
<tr><td>融　　点</td><td colspan="2">64℃</td><td rowspan="2">常温における性状</td><td rowspan="2">青緑色結晶</td></tr>
<tr><td>沸　　点</td><td colspan="2">－</td></tr>
<tr><td>安　定　性</td><td colspan="4">空気中で徐々に酸化して表面が黄褐色の硫酸鉄（Ⅲ）となる．</td></tr>
<tr><td rowspan="5">溶媒に対する溶解度等</td><td>溶　媒</td><td colspan="2">溶　解　度</td><td>溶媒中の安定性</td></tr>
<tr><td>水</td><td colspan="2">32.8 g/100g（0℃）で可溶</td><td>－</td></tr>
<tr><td>DMSO</td><td colspan="2">－</td><td>－</td></tr>
<tr><td>ｱｾﾄﾝ</td><td colspan="2">－</td><td>－</td></tr>
<tr><td>その他</td><td colspan="2">－</td><td>－</td></tr>
</table>

DMSO：ジメチルスルホキシド

1.2 陰性対照物質（被験物質の懸濁溶媒）

局方生理食塩液（以下生食，㈱大塚製薬工場，ロット番号 K0E00）

1.3 陽性対照物質

マイトマイシン C（以下 MMC，協和発酵工業㈱，ロット番号 328AJF，含量 100%）

ベンゾ〔a〕ピレン（以下 BP，東京化成工業㈱，ロット番号 GG01，含量 95.6%）

2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を使用した．この細胞は，染色体数のモードが 25 本と少なく，染色体が比較的大きいため標本観察が容易である等の利点があり，培養細胞を用いる染色体異常試験で広く使用されている．

細胞は 2001 年 2 月 14 日に大日本製薬㈱から購入し，細胞懸濁液に対し最終 10 v/v%の割合で DMSO（関東化学㈱，ロット番号 204G1360）を添加したものを 1 mL に小分けし，液体窒素中で凍結保存した．試験には，これを融解して培養し，融解後 4 週間以内のものを使用した．細胞の培養には，プラスチックプレート（直径 6 cm または 10 cm ; Becton Dickinson and Company）を用い，炭酸ガス細胞培養装置内（炭酸ガス 5%，温度 37℃に設定，加湿，NAPCO 社, 7300 型）で培養した．

3. 培地

3.1 MEM

イーグル MEM 培地「ニッスイ」①（日水製薬㈱，ロット番号 436011，439011）約 8.3 g を精製水 880 mL に溶解し，オートクレーブ滅菌（121℃，15 分間）後，別に滅菌処理した 2.92w/v% L-グルタミン水溶液と 10 w/v%炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ 8.8 mL，11.2 mL 添加した．以下この溶液を MEM とした．

3.2 MEM 培地

MEM 900 mL に，非働化（56℃, 30 分間加熱処理）した仔牛血清（GIBCO BRL，ロット番号 1027934，296130）を 100 mL 添加した．

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール（1 日目に 30 mg/kg を 1 回腹腔内投与，2 日目以降 60 mg/kg を

1日1回3日間腹腔内投与）と5, 6-ベンゾフラボン（3日目に80 mg/kgを1回腹腔内投与）で酵素誘導したSD系雄ラット肝由来S9（キッコーマン㈱，ロット番号RAA-441，2001年3月9日製造）を購入したものを使用した．購入したS9は使用時まで-80℃以下（実測値；－88～－81℃）に設定した超低温冷凍庫で保存した．

4.2 S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で用時調製し，使用時まで氷中に保存した．

S9	0.3 mL
Dグルコース6-リン酸	5 μmol
β-NADP$^+$	4 μmol
HEPES（pH 7.2）	4 μmol
塩化マグネシウム六水和物	5 μmol
塩化カリウム	33 μmol
精製水	残量

5. 試験物質溶液および懸濁液の調製

5.1 被験物質懸濁液の調製

溶媒検討の結果，本被験物質は生食に50 mg/mLでほぼ均一に懸濁し，発熱，発泡，変色などは認められなかった．DMSOおよびアセトンにはそれぞれ約460 mg/mLで不溶であった．1w/v%カルボキシルメチルセルロースナトリウム水溶液には，約46 mg/mLで均一に懸濁しなかった．これらの結果から，本被験物質の溶媒（懸濁媒体）には生食を用いた．

被験物質を純度換算（91.6%）した重量で秤量し，生食を加え，振盪撹拌および超音波処理により懸濁させて 50 mg/mL懸濁液を調製した．これを最高濃度懸濁液とした．細胞毒性により，最高処理用量が5000 μg/mL 未満となった場合は，同様の操作により，最高処理用量の10倍濃度の懸濁液を調製して，これを最高濃度懸濁液とした．

最高濃度懸濁液を生食で段階希釈し，各処理用量の10倍濃度の被験物質懸濁液を調製した．被験物質懸濁液は，用時調製とした．

5.2 陽性対照物質溶液の調製

MMCは，2 mg入りバイヤル瓶の内容物を，注射用水（㈱大塚製薬工場，ロット番号K9I83）5 mLに用時溶解した（400 μg/mL溶液）．これを生食（㈱大塚製薬工場，ロット番号K0E00）で段階希釈し，各処理条件で使用する最終用量の10倍溶液を調製した（短時間処理法：1 μg/mL).

BPは，処理用量の200倍濃度の溶液を調製（DMSO（関東化学㈱，ロット番号207G1673）

に 4 mg/mL で溶解）した．使用時まで凍結保存した．

6. 細胞増殖抑制試験

6.1 被験物質用量

細胞増殖抑制試験に先立ち，－S9 mix および＋S9 mix ならびに 24 時間処理において，50，500，5000 μg/mL で予備試験を実施した．この試験では，1 用量あたり 1 枚のプレートを用いた．位相差倒立顕微鏡でプレートを観察し，陰性対照物質処理プレートの細胞密度を 100％として，被験物質処理プレートの細胞密度を相対的に判断した．

その結果，被験物質処理プレートの細胞密度は下記の通りであった．

処理群＼用量（μg/mL）	50	500	5000
－S9 mix	100％	100％	0％
＋S9 mix	100％	100％	0％
24 時間処理	100％	100％	0％

以上の結果から，細胞増殖抑制試験は下記の用量を設定した．

－S9 mix：500，1000，2000，3000，4000，5000 μg/mL

＋S9 mix：500，1000，2000，3000，4000，5000 μg/mL

24 時間処理：500，1000，2000，3000，4000，5000 μg/mL

6.2 細胞処理

4×10^3 個/mL に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 mL ずつ播き，3 日間前培養した．

MEM 培地を除去した後，下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加え，連続処理法では 24 時間，短時間処理法では 6 時間細胞を処理した．短時間処理法では 6 時間後，MEM で細胞表面を 1 回洗浄し，新たに MEM 培地 5 mL を加え，さらに 18 時間培養した．陰性対照物質として溶媒を用い，下記条件で同様に処理した．

	被験物質懸濁液 または陰性対照物質	S9 mix	MEM培地
－S9 mix	0.3 mL	—	2.7 mL
＋S9 mix	0.3 mL	0.5 mL	2.2 mL
24 時間処理	0.5 mL	—	4.5 mL

なお，予備試験において，被験物質懸濁液を処理した培養液の黄変（pH 低下）が認められたことから，処理開始時及び処理終了時（短時間処理法では 6 時間処理終了時）に，陰性対照と全処理用量について，細胞処理液を微量採取し，pH を pH メーター（twin pH B-212，㈱堀場製作所）で測定した．

6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+}，Mg^{2+}フリーのリン酸緩衝液（以下 PBS(-)，ダルベッコ PBS「ニッスイ」，日水製薬㈱）で洗浄後，0.25 w/v％トリプシン処理し，培養液を加えて細胞を剥離した後，血球計算盤で細胞を計数した．

6.4 50％細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について，陰性対照値を100％として生存曲線を作成し，被験物質の50％細胞増殖抑制用量（IC_{50}）を算出した．なお，IC_{50}は，細胞増殖率が50％を示す用量を挟む2点を結ぶ直線式より算出した．

7. 染色体異常試験（本試験，確認試験）

染色体異常試験は，まず，短時間処理法のみを実施した．その結果，陽性結果が得られたため，連続処理法の染色体異常試験は実施しなかった．

7.1 被験物質用量および陽性対照物質用量

細胞増殖抑制試験の結果は図1，2に示すごとく，IC_{50}は－S9 mixで1239μg/mL，＋S9 mixで560μg/mLであった．

この結果より，染色体異常試験（本試験）は，下記の用量を設定した．

－S9 mix：250，500，1000，1500，2000μg/mL

＋S9 mix：125，250，500，1000，1500μg/mL

陽性対照物質の用量は，－S9 mix では MMC を 0.1μg/mL，＋S9 mix では BP を 20μg/mL とした．これらは，いずれも染色体異常誘発性が知られている用量である．

7.2 細胞処理

細胞増殖抑制試験と同様に細胞を処理した．

陽性対照については，下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した．

	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	MEM 培地
－S9 mix	0.3 mL	－	－	2.7 mL
＋S9 mix	－	0.015 mL	0.5 mL	2.5 mL

細胞増殖抑制試験と同様に，細胞処理液の pH を測定した．ただし，陽性対照群については pH 測定を実施しなかった．

7.3 標本作製

標本作製の 2 時間前にコルセミドを最終用量が 0.1 μg/mL となるように加え，分裂中期細胞を蓄積した．処理終了後，細胞表面を PBS(-)で洗浄し，0.25 w/v%トリプシン処理にて細胞を剥離した後，遠心管に回収し，遠心分離（1000 rpm，5 分間；以下同様）により細胞を集めた．上清を除去後，各遠心管に 0.075 mol/L 塩化カリウム溶液 4 mL を加えて低張処理（37℃，15 分）を行った．次に，冷却したメタノール・酢酸 (3:1)(v/v)混合液(固定液）0.5 mL を加え細胞を半固定した後，遠心分離し，上清を除去した．さらに，同固定液 4 mL を加え，同様の操作を 2 回繰り返した．その後，適量の固定液で細胞を懸濁させ，濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに 2 箇所滴下して乾燥させた．これを 3 v/v%ギムザ溶液で 20 分間染色し，水洗，乾燥後，封入して染色体標本とした．なお，標本は，各プレートにつき 2 枚作製した．

7.4 細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率の測定を実施した．標本作製時にトリプシン処理にて剥離した細胞の一部を採取し，血球計算盤で細胞を計数した．陽性対照群については実施しなかった．

7.5 観察

(1) 予備鏡検

標本作製後，試験の適否確認のため予備鏡検を行った．その結果，－S9 mix の 2000 μg/mL および＋S9 mix の 1500 μg/mL において，いずれの標本においても，プレート 1 枚あたりの分裂中期細胞は 50 個未満であったため，これらの用量については，観察対象から除外した．また，陰性対照および陽性対照については，構造異常細胞の有無が適切であることを確認した．

(2) 構造異常および数的異常

標本はすべてコード化し，盲検法で観察した．

プレート 1 枚につき 100 個，すなわち 1 用量 200 個の分裂中期細胞を盲検法で観察した．分裂中期細胞は，染色体がよく拡がった細胞を観察した．

構造異常は以下の分類[1]に従って観察した．ただし，動原体数が 25±2 または 35 以上でない細胞は除外した．

染色分体型切断
染色分体型交換
染色体型切断
染色体型交換　　（二動原体，環状染色体など）
断片化

ギャップは染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした．他の異常と区別して記録し，構造異常には含めなかった．

数的異常は動原体数が 35 以上のものとし，核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた．

7.6 試験結果の判定基準

構造異常を 1 個以上もつ細胞を染色体異常細胞として集計した．

被験物質の染色体異常誘発性の判定は，各処理条件において，構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に 5％未満を陰性（－），いずれか一方または両方が 5％以上 10％未満を疑陽性（±），いずれか一方または両方が 10％以上を陽性（＋）とした．

7.7 確認試験

本試験の標本観察の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix の 1500 μg/mL において 19.0％，＋S9 mix の 500，1000 μg/mL において 9.0，72.5％であった．この結果から，用量依存性を検討するために，下記の用量で確認試験を実施した．

－S9 mix：1200，1300，1400，1500，1600 μg/mL

＋S9 mix：600，700，800，900，1000 μg/mL

なお，細胞処理，標本作製，細胞増殖率の測定，観察，試験結果の判定基準は，本試験と同様とした．

8. 結果のまとめ

染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度（％）を表示した．染色体異常は種類別に細胞数を表示した．なお，観察可能な分裂中期細胞がプレートあたり 50 個未満の標本の欄は“TOX”と記載した．また，細胞増殖抑制試験および染色体異常試験結果を図示した．

陽性となった試験条件毎に，D_{20} 値（分裂中期細胞の 20％に異常を誘発させるために必要な用量，mg/mL）を算出した．また，その代表的な染色体異常像の写真を本報告書に添付した．

結果

細胞増殖抑制試験の結果，－S9 mix，＋S9 mix および 24 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制用量はそれぞれ 1239，560，1007 μg/mL であった（図 1～3）．

本試験の予備鏡検の結果，－S9 mix の 2000 μg/mL および＋S9 mix の 1500 μg/mL において，プレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られなかったため，観察の対象から除外し，結果表には“TOX”と記載した（表 1）．

本試験の標本観察の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix の 1500 μg/mL において 19.0%，＋S9 mix の 500，1000 μg/mL において 9.0，72.5%であった（表 1，図 4）．

確認試験の予備鏡検の結果，被験物質処理群の標本において，プレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため，全ての染色体標本について観察対象とした．

確認試験の標本観察の結果，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は，－S9 mix の 1200，1300，1400，1500，1600 μg/mL においてそれぞれ 13.5，17.0，18.5，39.0，52.0%，＋S9 mix の 600，700，800，900，1000 μg/mL において 23.0，44.0，75.0，77.0，85.5%であった（表 2，図 4）．

－S9 mix および＋S9 mix の結果から算出した D_{20} 値は，以下の通りであった．

－S9 mix；2.1 mg/mL（本試験），1.0 mg/mL（確認試験）

＋S9 mix；0.28 mg/mL（本試験），0.32 mg/mL（確認試験）

数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの用量においても 5%未満であった（表 1，2，図 5）．

いずれの処理条件においても，2000 μg/mL 以上の被験物質処理群において，被験物質処理終了時に，培養液中に浮遊する被験物質が認められた．また，3000 μg/mL 以上の処理群において，培養液の黄変が認められた．なお，細胞処理液の pH 測定結果は，添付資料 1,2 に示した．

陰性対照群における染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった（表 1，2，図 4，5）．また，陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 10%以上であった（表 1，2）．

短時間処理法において，陽性結果が得られたため，連続処理法の染色体異常試験は，実施しなかった．

考察および結論

硫酸第一鉄・七水塩の染色体異常誘発性を検討するため，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した.

その結果, 染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は, －S9 mix および＋S9 mix において 10％以上であり，かつ，用量依存性が認められた.

本被験物質懸濁液を培養液に添加した際，一部の用量において，培養液の黄変（pH 低下）が認められた．しかし，構造異常細胞の認められた用量において，細胞処理液の pH の著しい低下は認められなかったことから，本結果は，pH の低下に起因するものではないと判断した.

一方，陰性対照および陽性対照群では染色体異常細胞の出現頻度は期待通りの値を示し，本試験が技術的に成立していることが示された.

従って，硫酸第一鉄・七水塩は，本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有すると結論した.

なお，本物質および類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料 3 にまとめた.

参考文献

1. 日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 第 3 分科会 遺伝毒性ワーキンググループ編「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンティスト社，東京，2000

表 1　染色体異常試験の結果(短時間処理法) [本試験]

被験物質の名称　硫酸第一鉄・七水塩

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量(μg/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%) 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	断片化	総異常細胞数(%)	ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 − 18	−	陰性対照(生食)	100	0	0	0	0	0	0	0	89	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	111	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	250	100	1	0	1	0	0	1	0	160	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	126	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	143	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	500	100	2	0	0	0	0	2	0	133	100	0	0	0
			100	1	0	0	1	0	2	0	125	100	0	0	0
			200	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	4 (2.0)	0	129	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	1000	100	0	1	0	0	0	1	0	79	100	0	0	0
			100	1	0	0	1	0	2	0	84	100	1	0	1
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	82	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	−	1500	100	12	11	7	0	0	23	3	45	100	0	0	0
			100	8	9	2	0	0	15	0	46	100	1	0	1
			200	20 (10.0)	20 (10.0)	9 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	38 (19.0)	3	45	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	−	2000 S	TOX								7	TOX			
											6				
											7				
6 − 18	−	陽性対照(MMC 0.1)	100	17	15	0	0	0	26	1		100	0	0	0
			100	16	19	1	0	0	29	3		100	0	0	0
			200	33 (16.5)	34 (17.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	55 (27.5)	4		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	陰性対照(生食)	100	0	1	0	0	0	1	0	100	100	1	0	1
			100	0	1	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	+	125	100	0	1	0	0	0	1	1	117	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	91	100	1	0	1
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1	104	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	+	250	100	1	1	0	0	0	2	1	80	100	0	0	0
			100	1	3	0	0	0	4	0	80	100	1	0	1
			200	2 (1.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	1	80	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	+	500	100	7	4	0	0	0	10	0	69	100	1	0	1
			100	5	3	1	0	0	8	2	69	100	0	0	0
			200	12 (6.0)	7 (3.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	18 (9.0)	2	69	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	+	1000	100	73	44	4	0	2	84	4	20	100	0	0	0
			100	43	38	2	0	2	61	2	18	100	0	0	0
			200	116 (58.0)	82 (41.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	145 (72.5)	6	19	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	1500	TOX								13	TOX			
											10				
											12				
6 − 18	+	陽性対照(BP 20)	100	36	69	4	0	0	79	4		100	0	0	0
			100	26	59	2	0	0	68	0		100	0	0	0
			200	62 (31.0)	128 (64.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	147 (73.5)	4		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　BP:ベンゾ[a]ピレン　　生食：局方生理食塩液
S:被験物質処理(6時間処理)終了時に，培養液中に浮遊している被験物質が認められた.
TOX:細胞毒性のため，観察可能な分裂中期細胞はプレートあたり50個未満であった.

表 2　染色体異常試験の結果(短時間処理法)［確認試験］

被験物質の名称　硫酸第一鉄・七水塩

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量(μg/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%) 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	断片化	総異常細胞数(%)	ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 − 18	−	陰性対照(生食)	100	0	0	0	0	0	0	0	115	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1	85	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	1200	100	5	10	0	0	0	13	2	61	100	2	0	2
			100	8	10	1	0	1	14	0	51	100	5	0	5
			200	13 (6.5)	20 (10.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	27 (13.5)	2	56	200	7 (3.5)	0 (0.0)	7 (3.5)
6 − 18	−	1300	100	12	13	2	0	0	18	0	41	100	0	0	0
			100	7	5	4	1	0	16	5	34	100	1	0	1
			200	19 (9.5)	18 (9.0)	6 (3.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	34 (17.0)	5	39	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	−	1400	100	10	11	0	0	0	19	3	25	100	3	0	3
			100	10	9	0	0	0	18	2	20	100	1	0	1
			200	20 (10.0)	23 (11.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (18.5)	5	22	200	4 (2.0)	0 (0.0)	4 (2.0)
6 − 18	−	1500	100	21	18	0	0	0	32	1	14	100	3	0	3
			100	36	22	3	0	0	46	2	9	100	2	0	2
			200	60 (30.0)	40 (20.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	78 (39.0)	3	12	200	5 (2.5)	0 (0.0)	5 (2.5)
6 − 18	−	1600	100	36	28	3	0	1	48	1	7	100	2	0	2
			100	45	33	3	0	0	56	3	8	100	0	0	0
			200	81 (40.5)	61 (30.5)	6 (3.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	104 (52.0)	4	8	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6 − 18	−	陽性対照(MMC 0.1)	100	10	13	0	0	0	22	1		100	0	0	0
			100	14	16	2	0	0	28	0		100	0	0	0
			200	24 (12.0)	29 (14.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	50 (25.0)	1		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	陰性対照(生食)	100	0	0	0	1	0	1	0	90	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	110	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6 − 18	+	600	100	14	18	0	0	0	22	1	52	100	0	0	0
			100	11	20	0	1	0	24	3	66	100	0	0	0
			200	25 (12.5)	38 (19.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	46 (23.0)	4	59	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	700	100	30	27	0	0	0	43	2	53	100	1	0	1
			100	29	31	0	0	0	45	2	53	100	0	0	0
			200	59 (29.5)	58 (29.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	88 (44.0)	4	53	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	+	800	100	63	45	6	0	2	79	3	46	100	1	0	1
			100	52	36	7	0	3	71	0	42	100	0	0	0
			200	115 (57.5)	81 (40.5)	13 (6.5)	0 (0.0)	5 (2.5)	150 (75.0)	3	44	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	+	900	100	63	39	11	0	0	76	4	40	100	0	0	0
			100	64	40	2	0	1	78	1	30	100	0	0	0
			200	127 (63.5)	79 (39.5)	13 (6.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	154 (77.0)	5	35	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	1000	100	81	32	10	0	3	91	1	22	100	1	0	1
			100	62	40	0	0	5	80	3	17	100	0	0	0
			200	143 (71.5)	72 (36.0)	10 (5.0)	0 (0.0)	8 (4.0)	171 (85.5)	4	19	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6 − 18	+	陽性対照(BP 20)	100	31	62	0	1	0	73	3		100	0	0	0
			100	26	77	3	0	0	83	0		100	0	0	0
			200	57 (28.5)	139 (69.5)	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	156 (78.0)	3		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　BP:ベンゾ[a]ピレン　　生食：局方生理食塩液

B010045

図１　硫酸第一鉄・七水塩の細胞毒性
(短時間処理法・－S9 mix)

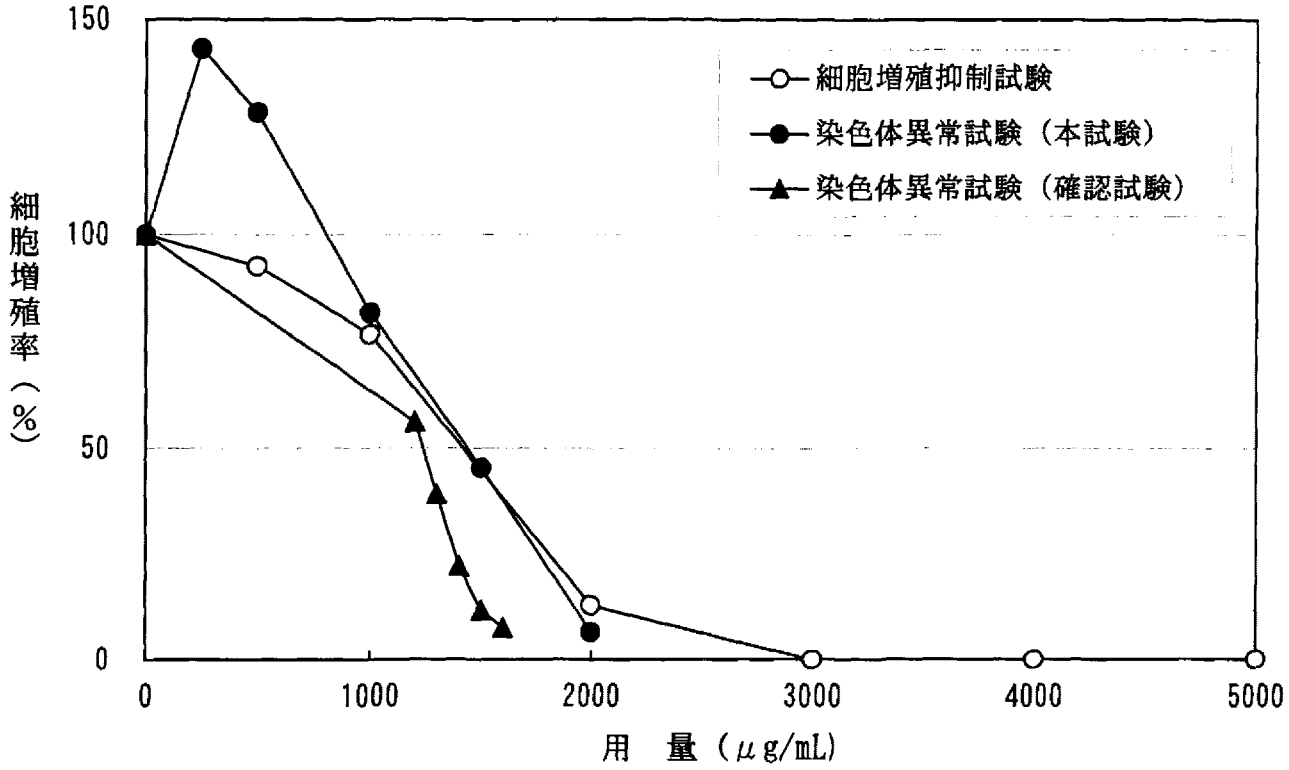

図２　硫酸第一鉄・七水塩の細胞毒性
(短時間処理法・＋S9 mix)

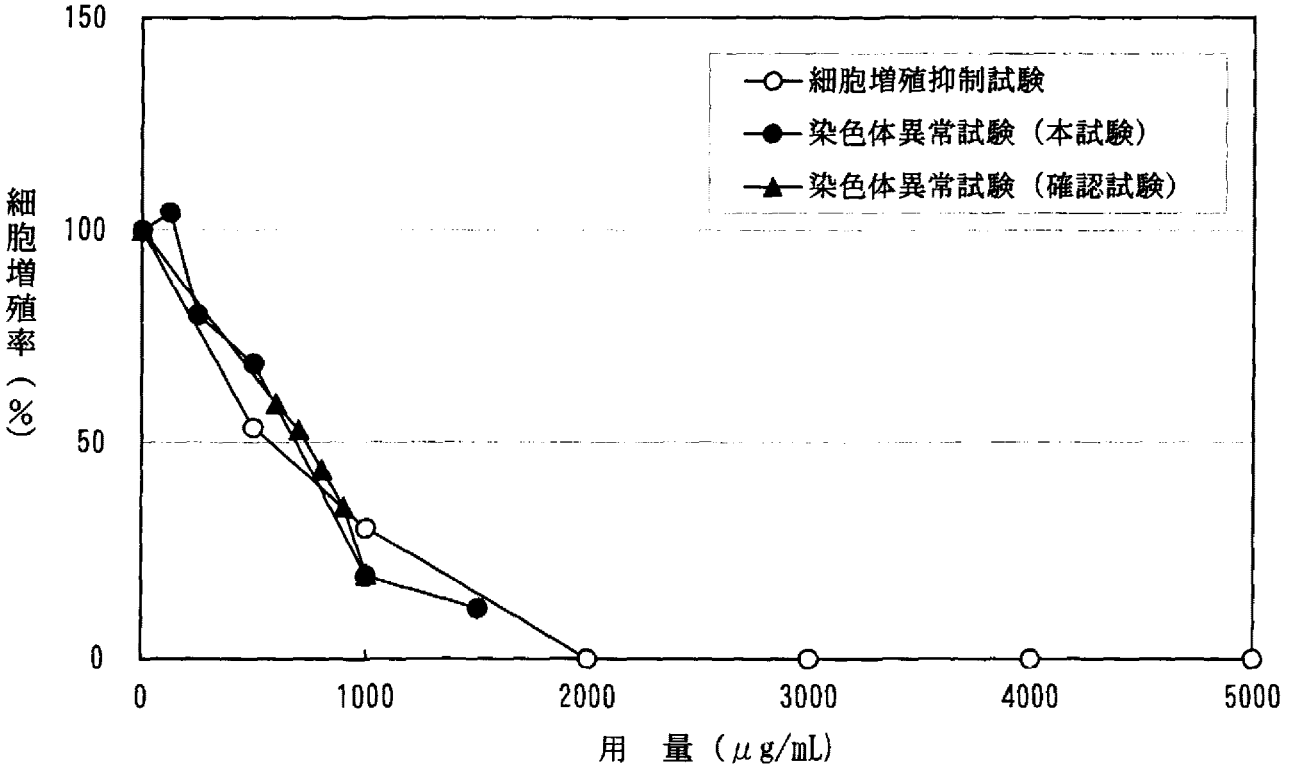

図３　硫酸第一鉄・七水塩の細胞毒性
(連続処理法・24時間処理)

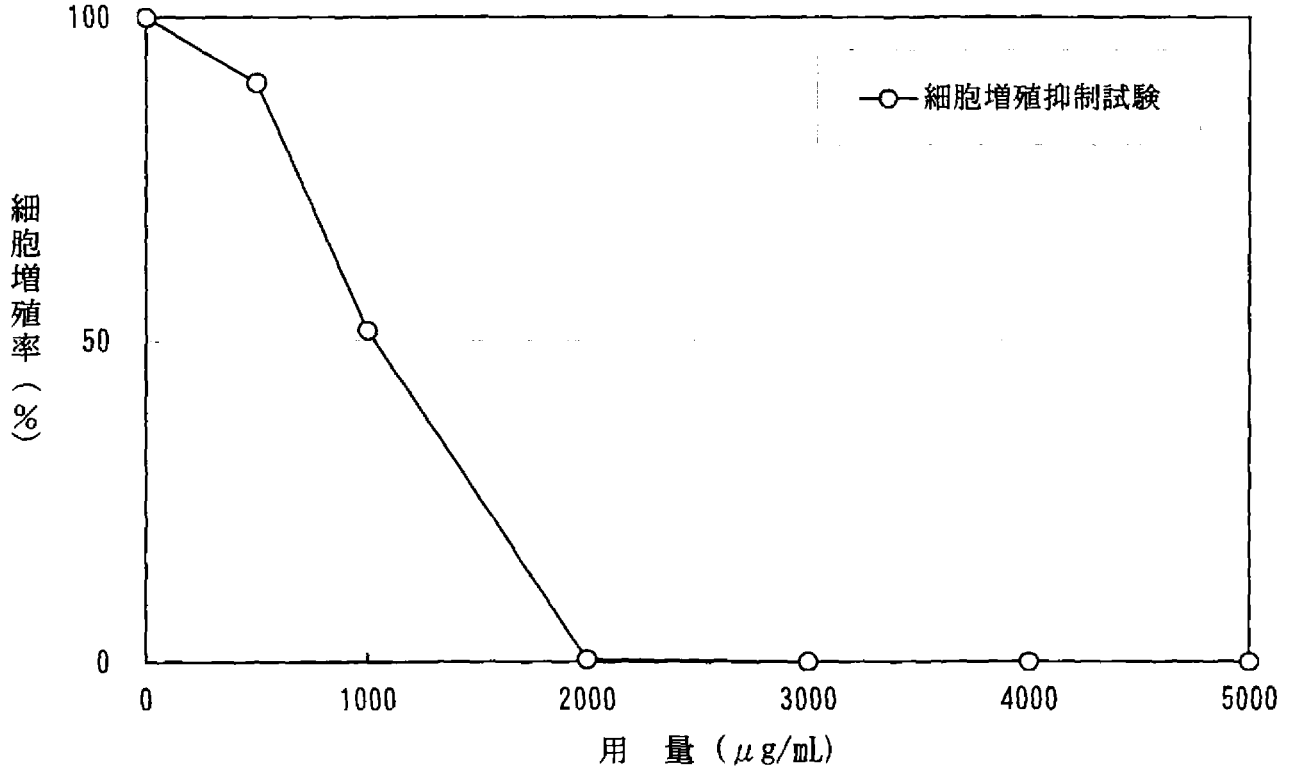

図４　硫酸第一鉄・七水塩の構造異常細胞出現頻度
（短時間処理法）

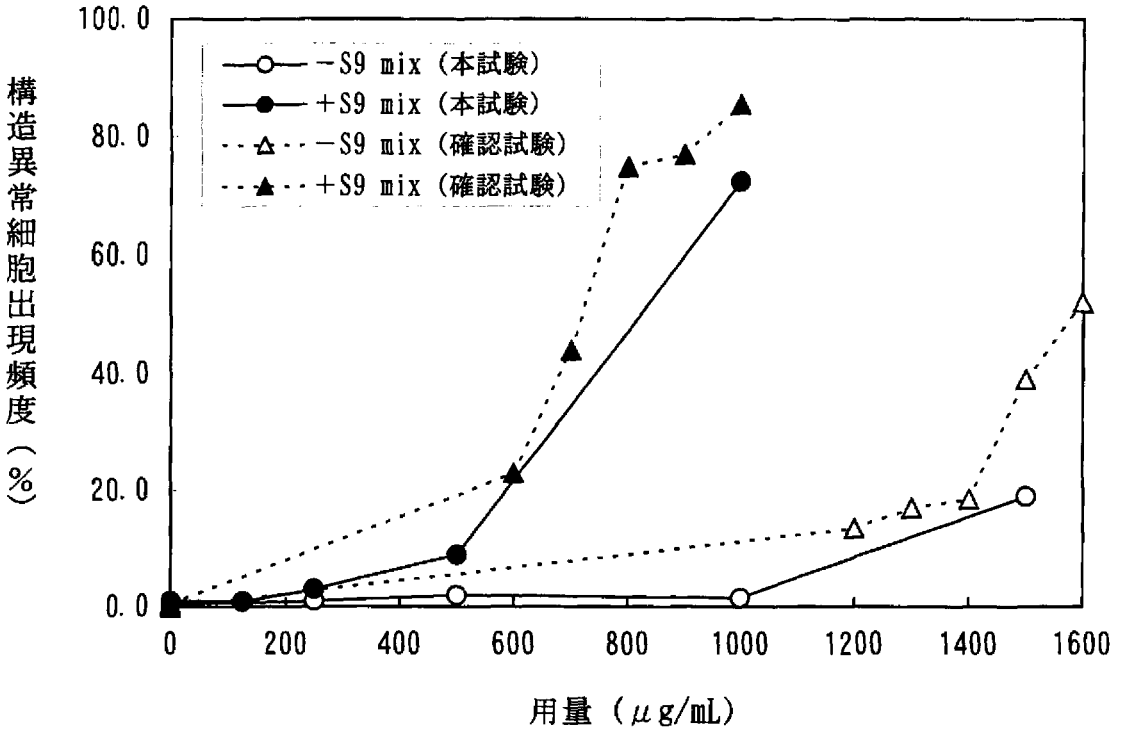
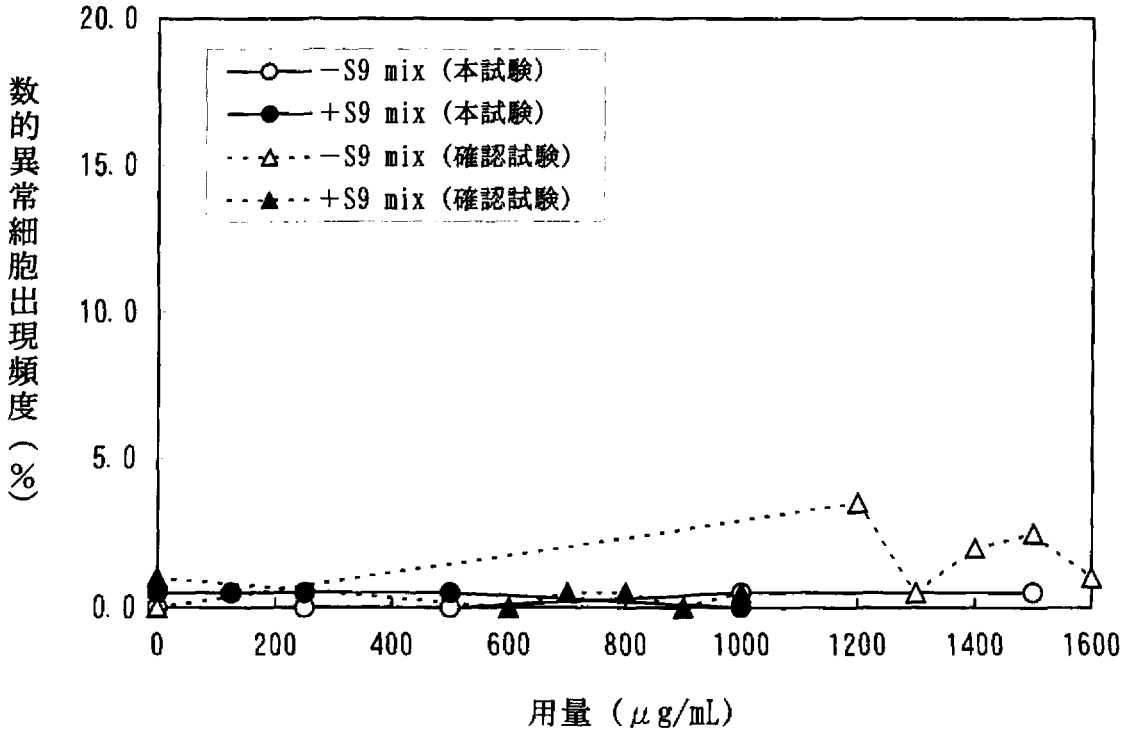
図５　硫酸第一鉄・七水塩の数的異常細胞出現頻度
（短時間処理法）