

M-1409

最 終 報 告 書

試験名 : Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer のほ乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

試験番号 : M-1409

試験期間 : 2010 年 7 月 30 日-2011 年 6 月 30 日

試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

2. 目次

2.	目次	3
5.	要約	10
6.	緒言	11
7.	試験材料及び方法.....	12
7.1	被験物質及び溶媒	12
7.1.1	被験物質	12
7.1.2	溶媒.....	12
7.2	被験液の調製.....	13
7.2.1	調製方法	13
7.2.2	調製頻度	14
7.2.3	安定性	14
7.2.4	被験液の濃度・均一性確認	14
7.3	対照物質	15
7.3.1	陰性対照	15
7.3.2	陽性対照	15
7.4	使用細胞株.....	16
7.4.1	細胞株.....	16
7.4.2	細胞の選択理由	17

7.4.3	培養条件	17
7.4.4	性状検査	17
7.5	S9 mix 及び培養液の調製	17
7.5.1	S9 mix	17
7.5.2	培養液	18
7.6	試験方法 ¹⁻⁵⁾	19
7.6.1	識別方法	19
7.6.2	用量の設定	19
7.6.3	細胞増殖抑制試験	20
7.6.4	染色体異常試験	21
7.6.5	標本の観察	22
7.6.6	染色体異常の分類	23
7.6.7	判定基準	23
8.	試験結果	24
8.1	細胞増殖抑制試験	24
8.1.1	短時間処理法	24
8.1.2	連続処理法	24
8.2	染色体異常試験	25
8.2.1	短時間処理法	25
8.2.2	連続処理法	26
9.	考察	27
10.	参考文献	28



Fig. 1-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer [Short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer [Short-term treatment: -S9 mix]

M-1409

Fig. 1-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer
[Continuous treatment: 24hr]

Fig. 1-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer
[Continuous treatment: 48hr]

表

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer
[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer
[Short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer
[Continuous treatment: 24hr]

Table 1-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer
[Continuous treatment: 48hr]

5. 要約

Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果を基に、短時間処理法の代謝活性化では 1000 µg/mL、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 48 時間処理では 1250 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 2500 µg/mL を最高用量として、以下公比 1.25 で計 5 用量を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA 値) 及び倍数体の出現率は、いずれの処理方法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer は本試験条件下において、染色体異常は誘発しないと結論した。

M-1409

6. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer の安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。

M-1409

7. 試験材料及び方法

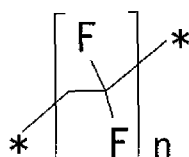
7.1 被験物質及び溶媒

7.1.1 被験物質

名称 : Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer

CAS 番号 : 24937-79-9

構造式又は示性式 :



数平均分子量 (Mn)

: 6,300

重量平均分子量 (Mw)

: 472,000

分散度 (Mw/Mn)

: 75

性状

: 白色粉末

入手量

: 20 g

純度

: 100%

安定性

: 実験終了後に、株式会社ボゾリサーチセンターにおいて安定性測定を実施し、実験期間中安定であったことを確認した (Attached Data 2)。

保存方法

: 冷蔵 (保存期間中の実測温度: 3~7°C)、気密、乾燥、不活性状態 (窒素充填)

保存場所

: 御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫

返却

: 実験終了後、被験物質の残余物は、安定性を確認した後、すべて株式会社ボゾリサーチセンターにて廃棄した。

7.1.2 溶媒

名称 : カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na)

ロット番号 : 0115

規格 : 日本薬局方

製造元	:	丸石製薬株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室
溶媒の選択理由	:	供試前試験の結果、被験物質は注射用水に 50 mg/mL で不溶、ジメチルスルホキシドには 500 mg/mL で溶解不可能であった。そこで、0.5 w/v%CMC-Na 水溶液に 50 mg/mL で懸濁することとした。
調製方法	:	CMC-Na をガラスビン(200 mL)に 1.0000 g 秤取した。これに注射用水(日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: 0C78N) を 200 mL 加えて溶解し、0.5 w/v%CMC-Na 水溶液を調製し、オートクレーブで滅菌後、冷蔵保存し、調製後 1 箇月以内に溶媒として使用した。

7.2 被験液の調製

7.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.5000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理(超音波発生装置、機器 No.2427)を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 50.0 mg/mL 懸濁液(プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度: 5000 µg/mL)を調製した。次いで、50.0 mg/mL 懸濁液を公比 2 (各濃度の被験液 5 mL : 溶媒 5 mL) で順次 7 段階希釈し、25.0、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781 及び 0.391 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験 短時間処理法

被験物質 0.6250 g を 50 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理(超音波発生装置、機器 No.2427)を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 12.5 mg/mL 懸濁液(プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度: 1250 µg/mL)を調製した。次いで、12.5 mg/mL 懸濁液を公比 1.25 (各濃度の被験液 20 mL : 溶媒 5 mL) で順次 5 段階希釈し、10.0、8.00、6.40、5.12 及び 4.10 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。このうち、代謝活性化では 10.0、8.00、6.40、5.12 及び 4.10 mg/mL の 5 濃度の被験液を、非代謝活性化では 12.5、10.0、8.00、6.40 及び 5.12 mg/mL の 5 濃度の被験液を用いた。

3) 染色体異常試験 連続処理法

被験物質 1.2500 g を 50 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理(超音波発生装置、機器 No.2427)を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 25.0 mg/mL 懸濁液(プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度: 2500 µg/mL)を調製した。次いで、25.0 mg/mL 懸濁液を公比 1.25 (各濃度の被験液 20 mL : 溶媒 5 mL) で順次 4 段階希釈し、20.0、16.0、12.8 及び 10.2 mg/mL の 5 濃度段

階の被験液を調製した。24 時間処理では 25.0、20.0、16.0、12.8 及び 10.2 mg/mL の 5 濃度の被験液を用いた。また、25.0 mg/mL 懸濁液を公比 2（被験液 15 mL：溶媒 15 mL）で希釈し、12.5 mg/mL 懸濁液を調製し、これを公比 1.25（各濃度の被験液 20 mL：溶媒 5 mL）で順次 4 段階希釈し、10.0、8.00、6.40 及び 5.12 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。48 時間処理では 12.5、10.0、8.00、6.40 及び 5.12 mg/mL の 5 濃度の被験液を用いた。

7.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

7.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液が安定であることを確認した。

7.2.4 被験液の濃度・均一性確認

染色体異常試験の短時間処理法及び連続処理法に用いた最高濃度及び最低濃度の被験液について、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所において重量法により濃度及び均一性の確認を実施した（Attached Data 1）。その結果、表示値に対する濃度及び均一性の割合は、短時間処理法の最高濃度で 101.6%（C.V. 3.1%）、最低濃度で 103.9%（C.V. 1.4%）であった。また、連続処理法では、最高濃度で 102.8%（C.V. 0.4%）、最低濃度で 104.5%（C.V. 0.2%）であり、いずれの場合も濃度許容範囲（表示値に対する割合：100 ± 10%）及び均一性許容範囲（C.V. 10%以内）内であった。分析方法の概略を以下に示す。

1) 測定試料

被験物質	:	Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer
媒体	:	0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液（0.5 w/v%CMC-Na 水溶液）
表示値	:	短時間処理法 12.5 及び 4.10 mg/mL 連続処理法 25.0 及び 5.12 mg/mL

2) 測定手順

〔媒体〕

- (1) 媒体の採取前に、使用する容器の重量（風袋）を測定した。
- (2) 媒体の必要量（10 mg/mL 以上の被験液を対象とする場合は媒体の 1 mL、10 mg/mL 未満の場合は媒体の 3 mL）をそれぞれ n=3 で採取した。
- (3) 遠心濃縮機（設定温度：高温）により乾固した。
- (4) 乾固後、容器が室温になるまで放置し、その後、容器の重量（残渣 + 風袋）を測定した。
- (5) 以下の式により、媒体中の CMC-Na 重量を算出した。なお、媒体採取量ごとに

n=3 で測定した媒体中 CMC-Na 重量を平均し、CMC-Na 重量とした。

$$\text{媒体中 CMC-Na 重量 (g)} = W_v - W_{vt}$$

W_{vt} : 媒体採取前の容器重量 (g)
W_v : 媒体乾固後の容器 (残渣 + 風袋) 重量 (g)

〔測定試料〕

- (1) 測定試料の採取前に、使用する容器の重量 (風袋) を測定した。
- (2) 測定試料を十分に懸濁させた後、マグネチックスターラーで攪拌しながら、必要量 (12.5 及び 25.0 mg/mL 被験液は 1 mL、4.10 及び 5.12 mg/mL 被験液は 3 mL) をそれぞれ n=3 (上層、中層及び下層) で採取した。
- (3) 遠心濃縮機 (設定温度: 高温) により乾固した。
- (4) 乾固後、容器が室温になるまで放置し、その後、容器の重量 (残渣 + 風袋) を測定した。
- (5) 以下の式により、測定試料中被験物質濃度 (mg/mL) を算出した。なお、n=3 で測定した測定試料中被験物質濃度を平均し、被験液濃度とした。

$$\text{測定試料中被験物質重量 (g)} = W_s - W_{st} - W_{cmc}$$

$$\text{測定試料中被験物質濃度 (mg/mL)} = \frac{[\text{測定試料中被験物質重量 (g)}] \times 1000}{\text{測定試料採取量}}$$

W_{st} : 測定試料採取前の容器重量 (g)
W_s : 測定試料の乾固後の容器 (残渣 + 風袋) 重量 (g)
W_{cmc} : 媒体中の CMC-Na 重量 (g)

7.3 対照物質

7.3.1 陰性対照

溶媒として用いた 0.5 w/v% CMC-Na 水溶液を陰性対照とした。

7.3.2 陽性対照

1) 代謝活性化

シクロフォスファミド (CP)

ロット番号 : PEG0397
製造元 : 和光純薬工業株式会社
純度 : 生化学用 (97.0%以上)
保存方法 : 冷蔵、遮光

保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質冷蔵保存庫

2) 非代謝活性化

マイトマイシン C (MMC)

ロット番号 : 542AIA

製造元 : 協和醗酵キリン株式会社

力価 : 2 mg (力価) /瓶

保存方法 : 室温、遮光

保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質室温保存庫

3) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

(1) 染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化

CP 0.0140 g を γ 線滅菌済プラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 : K9L94) を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14 μ g/mL)。

(2) 染色体異常試験 短時間処理法 非代謝活性化

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 : K9L94) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次に、この溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 μ g/mL)。

(3) 染色体異常試験 連続処理法

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 : K9L94) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次に、この溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 μ g/mL)。

4) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験ガイドライン (前述 6.2) に使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

7.4 使用細胞株

7.4.1 細胞株

ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 2009 年 11 月 25 日に入手した、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU、JCRB0030) を用いた。入手後、液体窒素中で凍結保存を行った細胞を再培養し、性状検査 (7.4.4) を実施して、細胞の特性が維持されていることを定期的に確認し、30 継代以内で試験に供した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で 11 継代、染色体異常試験の短時間処理法で 15 継代、

染色体異常試験の連続処理法で19継代であった。

7.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常出現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこと、背景データも多いこと及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられていることから、本細胞株を選択した。

7.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で培養した。

継代は1~4日ごとに行った。

7.4.4 性状検査

プレート上で単層状に増殖すること、細胞倍加時間が15~20時間以内であること、染色体数の平均（モード）が25本であること、マイコプラズマによる汚染がないこと及び染色体異常誘発物質に対する感受性に問題がないことを確認した細胞から、30代を越えない範囲で継代培養を行っているものを用いた。

7.5 S9 mix 及び培養液の調製

7.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9／コファクターC セット、ロット番号：C100312131、オリエンタル酵母工業株式会社）を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	10031213
製造日	:	2010年3月12日
種・系統	:	ラット・SD系
性	:	雄
週齢	:	7週齢
誘導物質	:	フェノバルビタール（PB）及び 5, 6-ベンゾフラボン（BF）
投与方法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量	:	PB 4日間 30+60+60+60 mg/kg body weight BF 1日 80 mg/kg body weight
保存方法	:	冷凍（超低温フリーザー）
使用期限	:	2010年9月11日
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) 補酵素

名称	:	コファクターC
----	---	---------

M-1409

ロット番号 : C10031013
 製造日 : 2010年3月10日
 保存方法 : 冷凍（超低温フリーザー）
 使用期限 : 2010年9月9日
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

3) S9 mix の組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	1.34 mL
		50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40 mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチドリリン酸 (NADP) 水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

7.5.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No. 11095) に、非働化 (56°C, 30分) した牛血清 (bovine serum、BS) を 10 v/v% 添加した培養液 (BS-MEM) を用いた。調製後の培養液は冷蔵保存した。

1) 牛血清

ロット番号 : 731681
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷凍 (-80°C 設定の冷凍庫)
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : 767914、792063
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷蔵
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 冷蔵庫

7.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下に示したステージの順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理

7.6.1 識別方法

1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では 24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性対照 (Negative Control) の場合は「NC」を、被験物質処理群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照 (Positive Control) は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」～「99」までの 2 桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

7.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 5000 µg/mL とし、以下公比 2 で希釈した 2500、1250、625、313、156、78.1 及び 39.1 µg/mL の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法及び連続処理法の 48 時間処理では 1250 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 2500 µg/mL で 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化で 864.4 µg/mL、非代謝活性化で 1093.8 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理で 2215.9 µg/mL、48 時間処理で 1041.7 µg/mL であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定を参照し、更に各処理における 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を勘案しながら、短時間処理法の代謝活性化では 1000 µg/mL、短時間処理法の非代謝活性化では 1250 µg/mL、連続処理法の 24

時間処理では 2500 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 1250 $\mu\text{g/mL}$ をそれぞれ最高用量として、以下、公比 1.25 で計 5 用量を設定することとした。また、これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

7.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。なお、以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡で細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶

媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。

- (3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

7.6.4 染色体異常試験

以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡で細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075 M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- (5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で

18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため 24 時間及び 48 時間の培養終了の 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。
- (4) 染色体標本の作製に際して、陰性対照及び被験物質処理群については、CMC が染色体観察用標本の作製を妨げるため、培養液を廃棄し、新しい培養液 5.0 mL を添加した遠沈管に細胞を回収した。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、1 日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- (5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、24 時間及び 48 時間の培養の終了時に肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

7.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。

7.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

- ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片があるもの（非染色部分が染色分体の同軸上にある）であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの。
- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)など。

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり、倍化した場合を数的異常と定義した。

倍数性 : polyploidy（核内倍加体：endoreduplicationを含む）

7.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準⁹⁾に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率（%）によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5%未満	陰 性 (-)
5%以上 10%未満	疑陽性 (±)
10%以上	陽 性 (+)

構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合（TAG）と含まない場合（TA）とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

8. 試験結果

8.1 細胞増殖抑制試験

8.1.1 短時間処理法

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化及び非代謝活性化ともに 1250 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 50%以上の細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は代謝活性化で 864.4 $\mu\text{g/mL}$ （Appendix 2-1）、非代謝活性化で 1093.8 $\mu\text{g/mL}$ （Appendix 2-2）であった。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による被験物質添加に伴う培養液の色調及び析出の観察において、色調変化は代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で認められなかった（Appendix 2-1 及び 2-2）。一方、析出は代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で認められた（Appendix 2-1 及び 2-2）。

3) 被験物質処理終了時の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で析出が認められ、1250 $\mu\text{g/mL}$ 以上ではプレート底面への固着が認められた（Appendix 2-1 及び 2-2）。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では、1250 $\mu\text{g/mL}$ 以上では析出が多量に存在し観察不能、625 $\mu\text{g/mL}$ では細胞の浮遊・形態変化が認められ、39.1 から 313 $\mu\text{g/mL}$ では異常は認められなかった（Appendix 2-1）。一方、非代謝活性化では、1250 $\mu\text{g/mL}$ 以上では析出が多量に存在し観察不能、78.1 から 625 $\mu\text{g/mL}$ では細胞の浮遊・形態変化が認められ、39.1 $\mu\text{g/mL}$ では異常は認められなかった（Appendix 2-2）。

8.1.2 連続処理法

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理では 2500 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 1250 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 50%以上の細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、24 時間処理で 2215.9 $\mu\text{g/mL}$ （Appendix 2-3）、48 時間処理で 1041.7 $\mu\text{g/mL}$ （Appendix 2-4）であった。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による被験物質添加に伴う培養液の色調及び析出の観察において、色調変化は 24 時間処理及び 48 時間処理ともにすべての用量で認められなかった（Appendix 2-3 及び 2-4）。一方、析出は 24 時間処理及び 48 時間処理ともにすべての用量で認められた（Appendix 2-3 及び 2-4）。

3) 被験物質処理終了時の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともにすべての用量で析出が認められ、1250 $\mu\text{g/mL}$ 以上ではプレート底面への固着が認められた（Appendix 2-3 及び 2-4）。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較

すると、24 時間処理では、1250 $\mu\text{g/mL}$ 以上では析出が多量に存在し観察不能、625 $\mu\text{g/mL}$ では細胞の浮遊・形態変化が認められ、39.1 から 313 $\mu\text{g/mL}$ では異常は認められなかった (Appendix 2-3)。一方、48 時間処理では、1250 $\mu\text{g/mL}$ 以上では析出が多量に存在し観察不能、313 及び 625 $\mu\text{g/mL}$ では細胞の浮遊・形態変化が認められ、39.1 から 156 $\mu\text{g/mL}$ では異常は認められなかった (Appendix 2-4)。

8.2 染色体異常試験

8.2.1 短時間処理法

1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による被験物質添加に伴う培養液の色調及び析出の観察において、色調変化は代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で認められなかった (Appendix 3-1 及び 3-2)。一方、析出は代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で認められた (Appendix 3-1 及び 3-2)。

2) 被験物質処理終了時の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で析出が認められ、更に非代謝活性化では 1250 $\mu\text{g/mL}$ でプレート底面への固着が認められた (Appendix 3-1 及び Appendix 3-2)。

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では、800 及び 1000 $\mu\text{g/mL}$ では細胞の浮遊・形態変化が認められ、410 から 640 $\mu\text{g/mL}$ では異常は認められなかった (Appendix 3-1)。一方、非代謝活性化では、1250 $\mu\text{g/mL}$ では析出が多量に存在し観察不能、1000 $\mu\text{g/mL}$ では細胞の浮遊・形態変化が認められ、512 から 800 $\mu\text{g/mL}$ では異常は認められなかった (Appendix 3-2)。

3) 染色体構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では 1000、800、640、512 及び 410 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 1.5、0.5、0.5、0 及び 2.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった (Table 1-1)。一方、非代謝活性化では 1250、1000、800、640 及び 512 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 1.5、0.5、1.0、0.5 及び 1.0%と陰性の判定基準である 5%未満であった (Table 1-2)。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった (Table 1-1 及び Table 1-2)。なお、陰性対照群においては、染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

8.2.2 連続処理法

1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による被験物質添加に伴う培養液の色調及び析出の観察において、色調変化は 24 時間処理及び 48 時間処理ともにすべての用量で認められなかった (Appendix 3-3 及び 3-4)。一方、析出は 24 時間処理及び 48 時間処理ともにすべての用量で認められた (Appendix 3-3 及び 3-4)。

2) 被験物質処理終了時の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともにすべての用量で析出が認められ、24 時間処理では 1280 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48 時間処理ではすべての用量でプレート底面への固着が認められた (Appendix 3-3 及び 3-4)。

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理では、1600 $\mu\text{g/mL}$ 以上では析出が多量に存在し観察不能、1280 $\mu\text{g/mL}$ では細胞の浮遊・形態変化が認められ、1020 $\mu\text{g/mL}$ では異常は認められなかった (Appendix 3-3)。一方、48 時間処理では、1000 $\mu\text{g/mL}$ 以上では析出が多量に存在し観察不能、512 から 800 $\mu\text{g/mL}$ では異常は認められなかった (Appendix 3-4)。

3) 染色体構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、24 時間処理では 2500、2000、1600、1280 及び 1020 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0、1.5、0.5、0.5 及び 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった (Table 1-3)。一方、48 時間処理では 1250、1000、800、512 及び 410 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 1.5、0、0、0 及び 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった (Table 1-4)。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、24 時間処理では 2500、2000、1600、1280 及び 1020 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.5、0、0、0.5 及び 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった (Table 1-3)。一方、48 時間処理では 1250、1000、800、512 及び 410 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 1.0、0.5、0.5、0 及び 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった (Table 1-4)。

なお、陰性対照群においては、染色体数異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

9. 考察

Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA 値) 及び倍数体の出現率は、いずれの処理方法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。

すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

なお、本被験物質の単量体 (モノマー) である 1,1-difluoroethene (CAS No. 75-38-7) は、細菌 (TA100) を用いる復帰突然変異試験⁶⁾では弱い陽性と報告されている。

以上の結果から、Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer は本試験条件下において、染色体異常は誘発しないと結論した。

10. 参考文献

- 1) 石館基監修 (1987) : <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, 48, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M and Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutat. Res.*, 66, 277-290
- 4) 石館 基 (1982) : 哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), 日本化粧品科学会誌, 6, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
- 6) Bartsch H., Malaveille C, Montesano R and Tomatis L (1979): Mutagenic and alkylating metabolites of haloethylenes, chlorobutadienes and dichlorobutenes produced by rodent or human liver tissues. Evidence for oxirane formation by P450-linked microsomal mono-oxygenases, *Arch. Toxicol.*, 41, 249-277

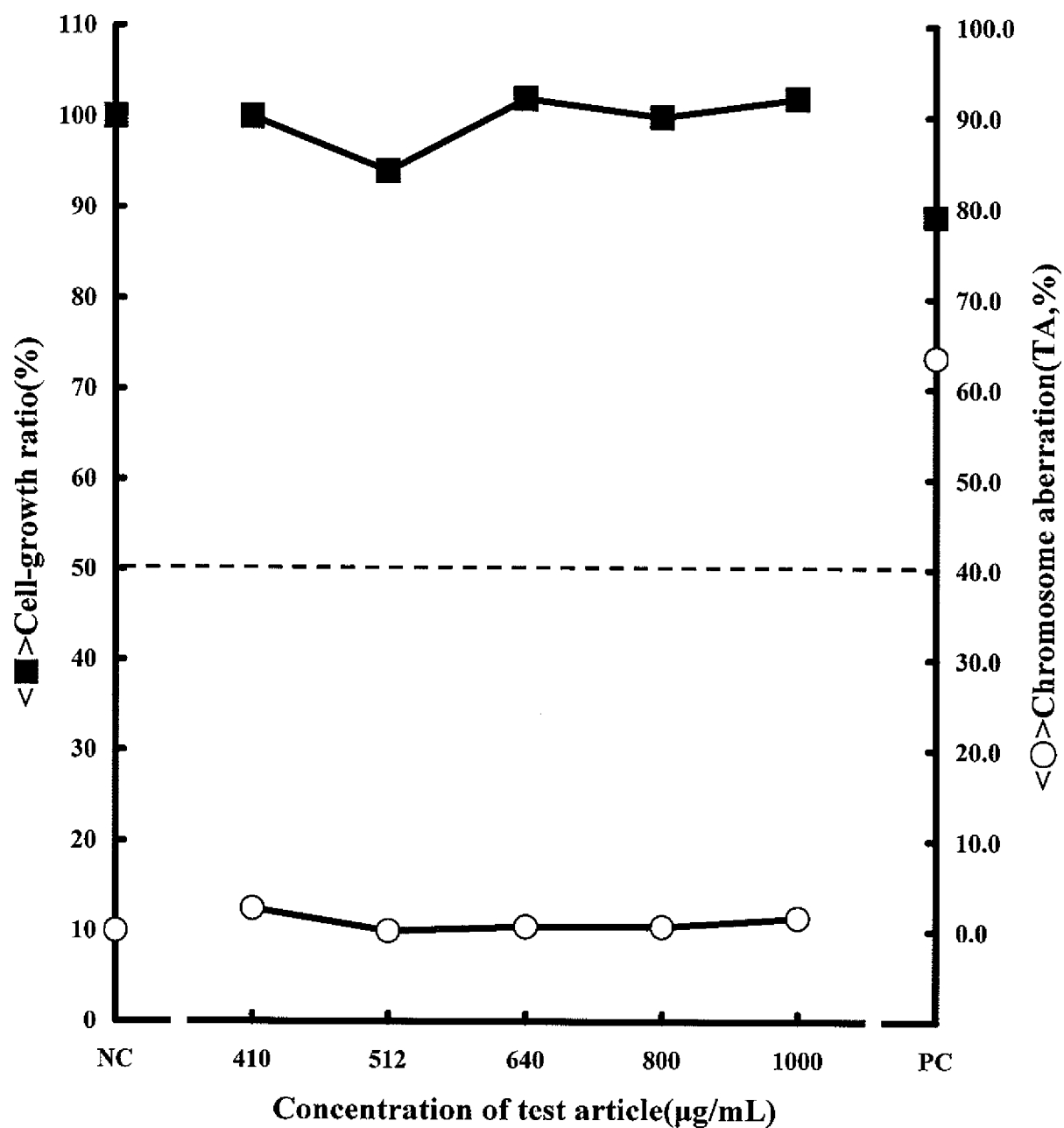


Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene, 1,1-difluoro-, homopolymer
[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

PC: Positive Control (cyclophosphamide : 14 µg/mL)

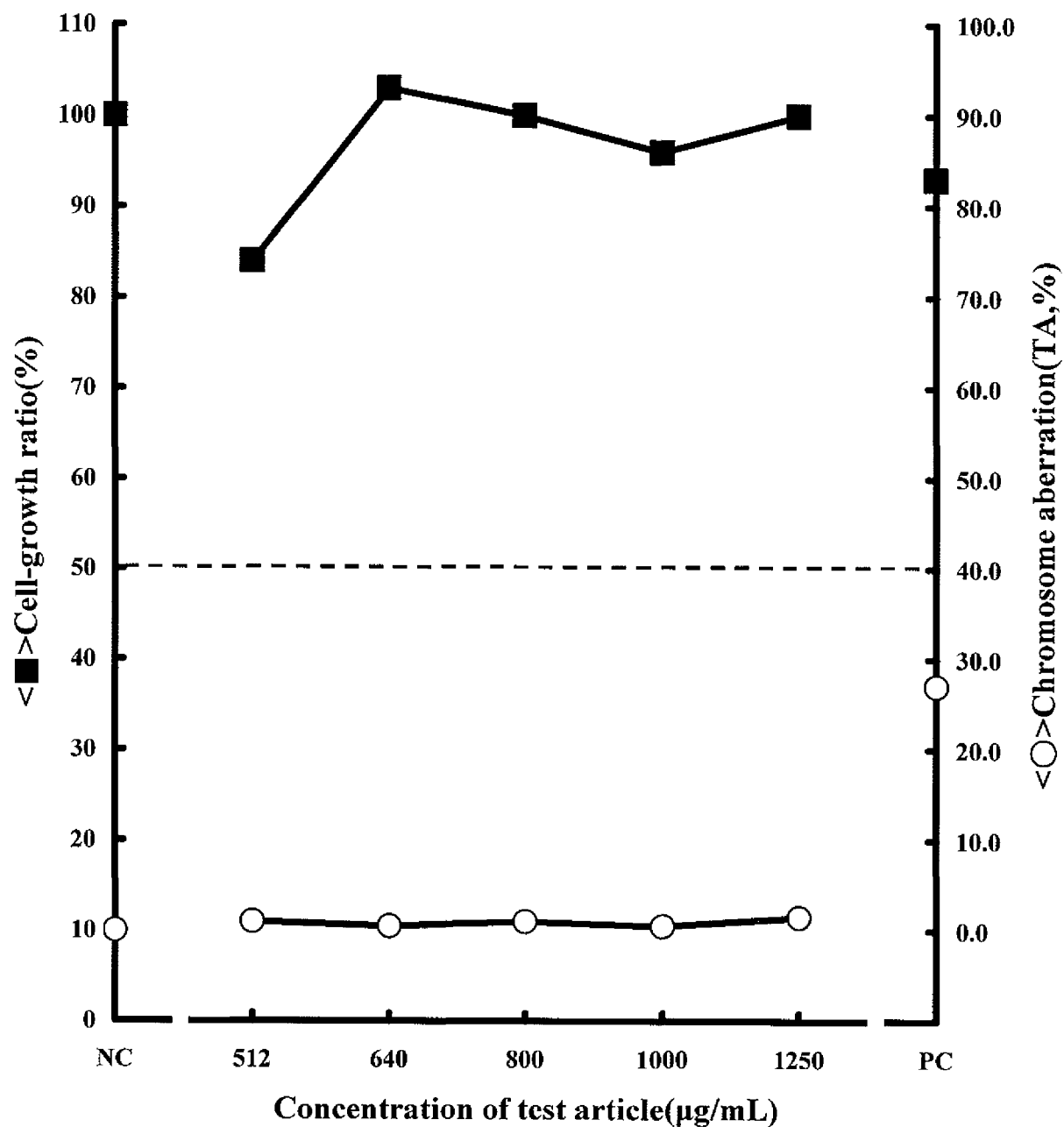


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with
Ethene, 1,1-difluoro-, homopolymer
[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

PC: Positive Control (mitomycin C : 0.075 µg/mL)

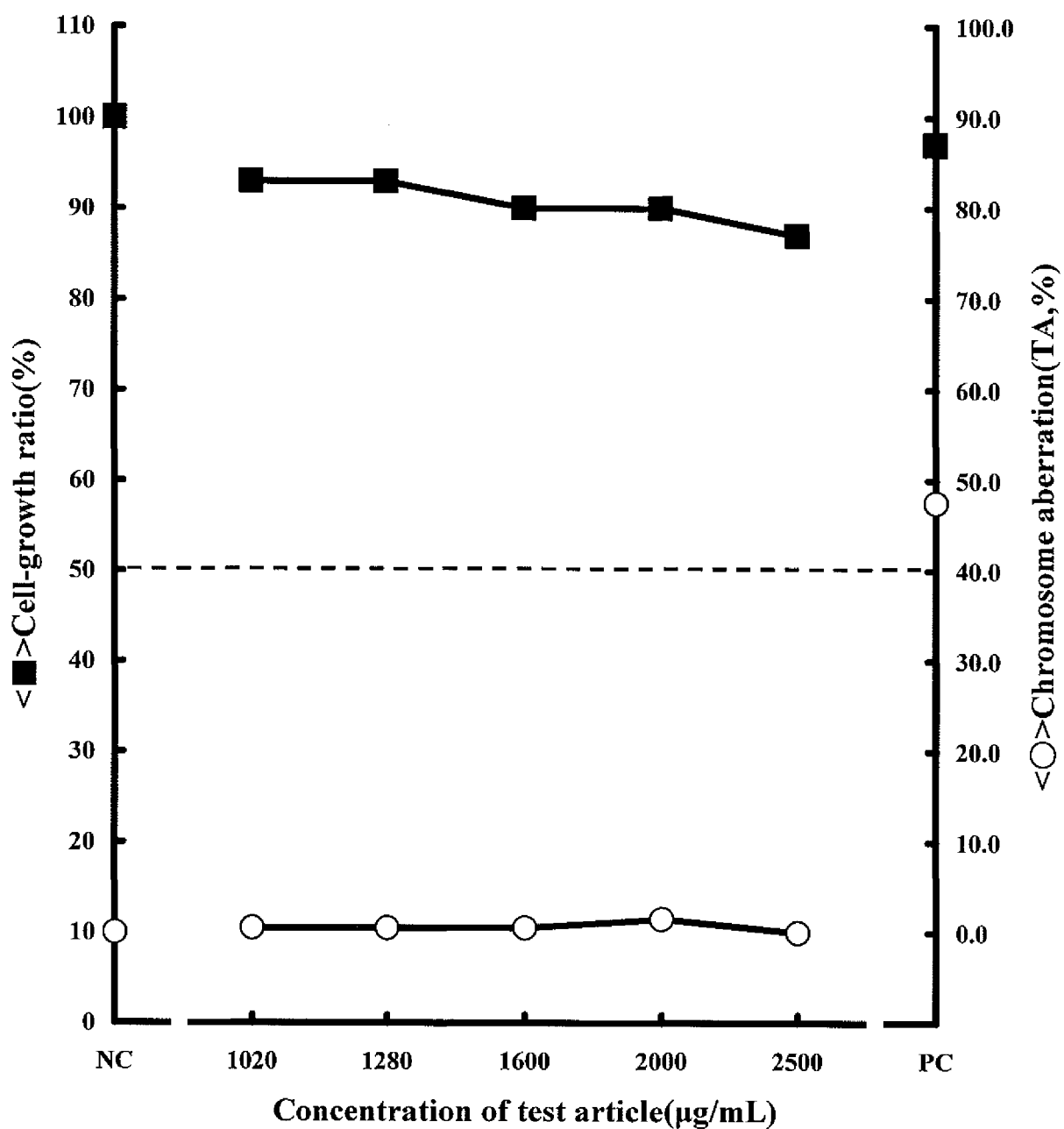


Fig. 1-3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene, 1,1-difluoro-,homopolymer
[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

PC: Positive Control (mitomycin C : 0.050 μg/mL)

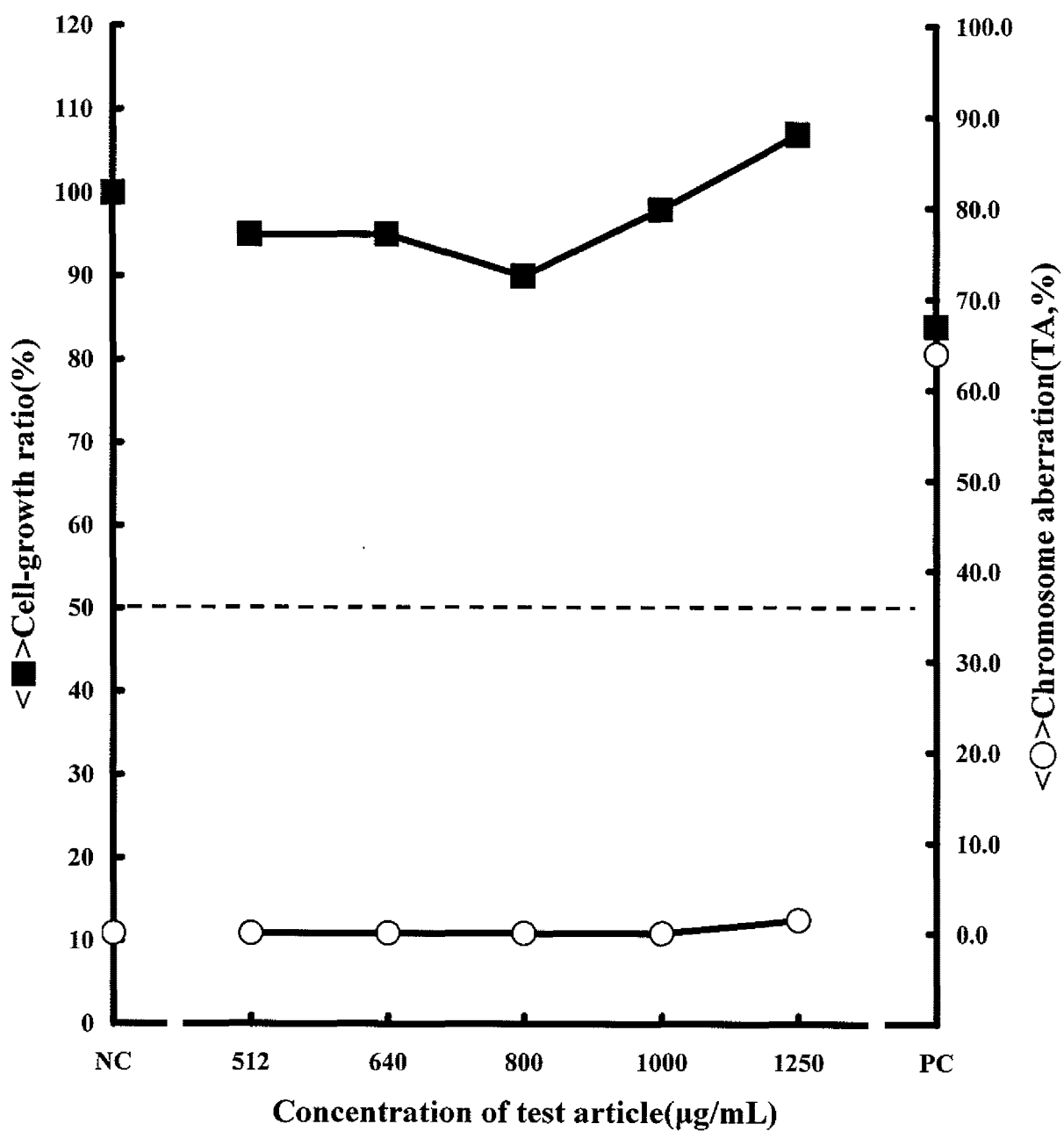


Fig. 1-4

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-,homopolymer
[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

PC: Positive Control (mitomycin C : 0.050 µg/mL)

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene, 1,1-difluoro-, homopolymer
[Short-term treatment: +S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge-ment
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	21-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	105	100	0	1	1	-	39-1
			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(0.0)	(100)	200	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		
		410	100	1	0	0	0	0	1	1	2	-	105	100	0	0	0	-	81-1
			100	0	2	0	2	0	4	0	4	-	99	100	0	0	0	-	09-1
			200	1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	5(2.5)	1(0.5)	6(3.0)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
		512	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-	33-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	94	100	0	0	0	-	30-1
			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)	(94)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
		640	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	105	100	0	0	0	-	49-1
			100	0	0	0	1	0	1	1	2	-	105	100	0	0	0	-	50-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)	(102)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
		800	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	105	100	0	0	0	-	52-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	99	100	0	0	0	-	92-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
		1000	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	111	100	0	0	0	-	80-1
			100	1	1	0	0	0	2	0	2	-	99	100	0	0	0	-	65-1
			200	1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	(102)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
		PC	100	4	61	0	0	0	62	0	62	-	94	100	0	0	0	-	56-1
			100	7	60	0	0	0	65	0	65	+	88	100	0	0	0	-	62-1
			200	11(5.5)	121(60.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	127(63.5)	0(0.0)	127(63.5)	(89)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene,1,1-difluoro-, homopolymer
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge- ment
6-18	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	48-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	113	100	0	0	0	-	51-1
			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(0.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		512	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	93	100	0	0	0	-	53-1
			100	2	0	0	0	0	2	0	2	-	86	100	0	0	0	-	35-1
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-	(84)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		640	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	113	100	0	0	0	-	66-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	106	100	0	0	0	-	08-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(103)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		800	100	1	0	0	0	0	1	1	2	-	106	100	0	0	0	-	73-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	106	100	0	0	0	-	87-1
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		1000	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	99	100	0	0	0	-	32-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	106	100	0	0	0	-	63-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(96)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		1250	100	1	1	0	0	0	2	1	3	-	99	100	0	0	0	-	94-1
			100	0	1	0	0	0	1	1	2	-	113	100	0	0	0	-	68-1
			200	1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	2(1.0)	5(2.5)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		PC	100	4	23	0	0	0	27	0	27	+	99	100	1	0	1	-	10-1
			100	3	24	0	0	0	27	0	27	+	99	100	0	0	0	-	90-1
			200	7(3.5)	47(23.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	54(27.0)	0(0.0)	54(27.0)	+	(93)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene, 1,1-difluoro-, homopolymer
[Continuous treatment: 24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge-ment
24-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	34-1
			100	0	0	0	0	0	0	1	1	-	106	100	0	0	0	-	47-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		1020	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-	28-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	93	100	0	0	0	-	18-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(93)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		1280	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	99	100	1	0	1	-	69-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	93	100	0	0	0	-	54-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(93)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-
		1600	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	93	100	0	0	0	-	98-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	93	100	0	0	0	-	58-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(90)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		2000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	93	100	0	0	0	-	40-1
			100	0	3	0	0	0	3	0	3	-	93	100	0	0	0	-	02-1
			200	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	-	(90)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		2500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	93	100	0	0	0	-	96-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	87	100	1	0	1	-	37-1
			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(0.0)	-	(87)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-
		PC	100	2	48	0	0	0	48	0	48	+	93	100	0	0	0	-	17-1
			100	2	46	0	0	0	47	0	47	+	106	100	0	0	0	-	61-1
			200	4(2.0)	94(47.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	95(47.5)	0(0.0)	95(47.5)	+	(97)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Ethene, 1,1-difluoro-, homopolymer
[Continuous treatment: 48hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.	
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)
48-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	86-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	97	100	0	0	0	67-1
			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(0.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		512	100	0	0	0	0	0	0	1	1	-	97	100	0	0	0	95-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	91	100	0	0	0	29-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	-	(95)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		640	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	97	100	0	0	0	79-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	91	100	0	0	0	71-1
			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(0.0)	-	(95)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
		800	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	93	100	1	0	1	91-1
			100	0	0	0	0	0	0	1	1	-	85	100	0	0	0	11-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	-	(90)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
		1000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	1	0	1	36-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	95	100	0	0	0	82-1
			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(0.0)	-	(98)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)
		1250	100	0	2	0	0	0	2	0	2	-	108	100	1	0	1	24-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	102	100	1	0	1	76-1
			200	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	-	(107)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)
		PC	100	5	63	0	2	0	64	0	64	+	85	100	0	0	0	70-1
			100	4	62	0	0	0	64	0	64	+	80	100	0	0	0	31-1
			200	9(4.5)	125(62.5)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	128(64.0)	0(0.0)	128(64.0)	+	(84)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 $\mu\text{g/mL}$)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.