

最 終 報 告 書

ペルフルオロオクタンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1290

株式会社 ボゾリサーチセンター

目 次

	頁
目 次	1
試験実施概要	5
要 約	8
緒 言	9
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び溶媒	10
1) 被験物質	10
2) 溶媒	10
2. 被験物質による処理方法	11
1) 細胞増殖抑制試験	11
2) 染色体異常試験	11
3. 対照物質	12
1) 陰性対照	12
2) 陽性対照	12
4. 使用細胞株	13
1) 細胞株	13
2) 細胞の選択理由	13
3) 培養条件	13
4) 細胞の性状検査	13
5. S9mix 及び培養液	14
1) S9 mix	14
2) 培養液	15

	頁
6. 試験方法	15
1) 識別方法	16
2) 用量の設定	16
3) 細胞増殖抑制試験	16
4) 染色体異常試験	17
5) 標本の観察	19
6) 染色体異常の分類	19
7) 判定基準	20
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	21
1) 短時間処理法	21
2) 連続処理法	21
2. 染色体異常試験	22
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	22
2) 構造異常	22
3) 数的異常	22
考察	24
参考文献	25

Figures and Tables

Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells

treated with Perfluorooctane

[Short-term treatment: -S9 mix]

Fig. 1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 24 hr]

Fig. 1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 48 hr]

Fig. 2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Short-term treatment: -S9 mix]

Fig. 2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 24 hr]

Fig. 2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 48 hr]

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese

hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 48 hr]

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 2-2 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Short-term treatment: -S9 mix]

Table 2-3 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 24 hr]

Table 2-4 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 48 hr]

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Short-term treatment: -S9 mix]

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 24 hr]

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

[Continuous treatment: 48 hr]

試験実施概要**1. 試験計画書**

試験番号 : M-1290

試験表題 : ペルフルオロオクタンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験目的 : ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

3. 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

4. 試験受託者 : 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

5. 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

6. 被験物質

製造者 : 和光純薬工業株式会社

名称 : ペルフルオロオクタン、Perfluorooctane

受領日 : 2007 年 3 月 30 日

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

要 約

ペルフルオロオクタン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・ハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 4500 $\mu\text{g/mL}$ として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法及び連続処理法では 4500 $\mu\text{g/mL}$ においても 50%以上の細胞増殖抑制が認められず、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は短時間処理法及び連続処理法ともに 4500.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上と算出された。これより、短時間処理法及び連続処理法ともに 4500 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下公比 2 で各 4 用量を設定し染色体異常誘発能を検討した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに染色体の構造異常及び倍数体の出現率の増加は認められなかった。また、連続処理法においても、24 時間処理及び 48 時間処理ともに染色体の構造異常及び倍数体の出現率の増加は認められなかった。一方、陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。また、非処理群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、更に試験施設の背景値と同様であった。したがって試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、ペルフルオロオktanは、本試験条件下において染色体の構造異常及び倍数体の誘発能は有さないものと判定した。

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、ペルフルオロオクタンの安全性試験の一環として、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。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

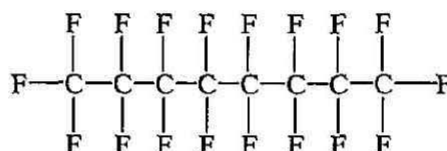
試験材料及び方法

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

被験物質情報は製造者における分析に基づくものである。(Attached Data 1)

製 造 者 :
 名 称 : ペルフルオロオクタン、Perfluorooctane
 CAS 番 号 : 307-34-6
 構造式又は示性式 : C_8F_{18}



純 度 : 99.9%
 不 純 物 : 不明
 入 手 量 : 95g
 性 状 : 無色液体
 分 子 量 : 438.06
 比 重 : 1.766
 ロ ッ ト 番 号 :
 安 定 性 : 試験終了後に東京化成工業株式会社において特性を測定し、その結果を入手して安定性を確認した。
 保 存 方 法 : 室温 (保存期間中の実測温度 : 15℃～25℃)
 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
 残余物の取り扱い : 被験物質の残余物は、東京化成工業株式会社においてすべて廃棄した。

2) 溶媒

溶媒不選択の理由 : 試験開始前に被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を実施したが、注射用水に 50 mg/mL で不溶、DMSO、エタノール、アセトンに 500 mg/mL で不溶、テトラヒドロフランに 450 mg/mL で不溶であり、適切な溶媒が存在しなかった。また、上記の溶

媒及び 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に対する懸濁も不可能で、懸濁方法も存在しなかった。したがって、溶媒を用いず、比重（1.766）から換算した必要液量の被験物質を培養液に直接添加することとした。

2. 被験物質による処理方法

試験開始前に被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を行ったが、適切な溶媒が存在せず、懸濁も不可能であったため、被験物質の調製は行わず、比重（1.766）から換算した必要液量の被験物質を培養液に直接添加することとした。以下に各用量における添加容量を記載した。

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 4500 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で 2250、1125、562.5、281.3、140.6 及び 70.31 µg/mL の 7 用量とした。各用量における被験物質添加容量は、以下の通りとした。なお、被験物質添加容量が微量であることから添加に際しては各プレートからの当該液量の培養液除去は行わなかった。

4500 µg/mL	→	12.741 µL/5mL (培養液)
2250 µg/mL	→	6.370 µL/5mL (培養液)
1125 µg/mL	→	3.185 µL/5mL (培養液)
562.5 µg/mL	→	1.593 µL/5mL (培養液)
281.3 µg/mL	→	0.796 µL/5mL (培養液)
140.6 µg/mL	→	0.398 µL/5mL (培養液)
70.31 µg/mL	→	0.199 µL/5mL (培養液)

2) 染色体異常試験

最高用量を 4500 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で 2250、1125 及び 562.5 µg/mL の 4 用量とした。各用量における被験物質添加容量は、以下の通りとした。なお、被験物質添加容量が微量であることから添加に際しては各プレートからの当該液量の培養液除去は行わなかった。

4500 µg/mL	→	12.741 µL/5mL (培養液)
2250 µg/mL	→	6.370 µL/5mL (培養液)
1125 µg/mL	→	3.185 µL/5mL (培養液)
562.5 µg/mL	→	1.593 µL/5mL (培養液)

3. 対照物質

1) 陰性対照

溶媒を用いないため、陰性対照物質を設けなかった。なお、細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験ともに非処理群を設けた。

2) 陽性対照

- (1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシン C を用いた。

名 称 : シクロフォスファミド (以下 CP と略記する)

ロ ッ ト 番 号 : SDP4062

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

名 称 : マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)

ロ ッ ト 番 号 : 481AEL、485AFC

製 造 元 : 協和醗酵工業株式会社

力 価 : 2mg (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

(2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法では、CP 0.0140 g を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、K6G71) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度 : 14 µg/mL) を調製した。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、K6G71) 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 µg/mL)。

染色体異常試験の連続処理法では、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、K6G71）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 µg/mL）。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

前記（**緒言** 毒性試験法ガイドライン）の毒性試験法ガイドライン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。

4. 使用細胞株

1) 細胞株

チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手（2004 年 11 月 2 日）し、継代数の少ないものを培地にジメチルスルホキシドを 10 vol% 添加した液体窒素中で保存し、これを融解し継代培養したものを使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 23 継代、染色体異常試験では短時間処理法で 5 継代、連続処理法で 9 継代であった。また、元株細胞はマイコプラズマ陰性であることを入手時の情報で確認した。

2) 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、更に種々の化学物質に対して感受性が高く、バックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

3) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37℃、高湿度条件下で培養した。継代は 1～4 日ごとに行った。

4) 細胞の性状検査

試験に使用する細胞は凍結保存から解凍し、30 代を越えない範囲で継代培養を行っているものについて、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等の特性について定期的に検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より購入した S9 と、自家調製を行ったコファクターを用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件及び使用期限とコファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りであった。

(1) S9

名 称	: S9
ロット番号	: 07021612
製 造 日	: 2007 年 2 月 16 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 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	: 2007 年 8 月 15 日 (製造後 6 箇月)
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
ロット番号	: 070405
製 造 日	: 2007 年 4 月 5 日
保 存 方 法	: 冷凍 (超低温フリーザー)
使用期限	: 2007 年 10 月 4 日 (製造後 6 箇月)
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	20mmol/L	HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L	塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L	塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L	グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/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

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、精製水に溶解、pH 調整、ろ過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM, GIBCO™, Cat.No.11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化 (56℃, 30 分) した牛血清 (BS) を 10 vol% 添加して調製した培養液 (BS-MEM) を用いた。調製後の BS-MEM は冷蔵保存した。

(1) 牛血清

ロット番号 : 571834

製造元 : Invitrogen Corporation

保存方法 : 冷凍 (−80℃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 : 1380929、1395329、1403807

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

6. 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。

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

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。更にこれに続けて非処理群(Non Treatment)の場合は「NT」を、被験物質用量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、陽性対照群 (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。

2) 用量の設定

(1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 4500 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で 2250、1125、562.5、281.3、140.6 及び 70.31 $\mu\text{g/mL}$ の計 7 用量を設定した。更に、各処理法ごとに非処理群を設けた。

(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ともに 50%以上の細胞毒性は認められなかった。そこで、最高用量を 4500 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で 2250、1125 及び 562.5 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量を設定した。更に、各処理法ごとに非処理群及び陽性対照群を設けた。

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に予備試験として実施した。

(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被験物質用量群、非処理群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- 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、細胞に異常がないことを倒立位相差顕微鏡で確認してから、代謝活性化では培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き被験物質用量群では各容量の被験液を加えた。また、非処理群では、培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL を加えた。非代謝活性化では培養液を取り除かず、被験物質用量群では各容量の被験液を加えた。また、非処理群については処理を行わなかった。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、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、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計（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、非処理群の値を 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。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質用量群、非処理群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- 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 日後に細胞に異常がないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、培養液を取り除かず、被験物質用量群では各容量の被験液を加えた。また、非処理群については処理を行わなかった。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。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。

4) 染色体異常試験

(1) 短時間処理法

- ① 代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれに被験物質用量群、非処理群及び陽性対照

群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。

- 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、細胞に異常がないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き被験物質用量群では各容量の被験液を加えた。また、非処理群では、培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では培養液を取り除かず、被験物質用量群では各容量の被験液を加えた。なお、非処理群については処理を行わなかった。陽性対照群では培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、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 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のために培養終了約 2 時間前にコルセミド（ジメコルシン溶液、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、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 0.075M 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 箇所点滴下した。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 枚のプレートは、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、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理及び 48 時間処理のそれぞれに被験物質用量群、非処理群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60mm）を用いた。
- 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 日後に細胞に異常がないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、培養液を取り除かず、被験物質用量群では各容量の被験液を加えた。また、非処理群については処理を行

わなかった。また、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。いずれの場合も、その後 24 時間及び 48 時間培養した。

- ③ 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のために培養終了の約 2 時間前にコルセミド（ジメコルシン溶液、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 0.075M 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%ギムザ液約 15 分間染色して染色体標本を作製した。
- ④ 残る 2 枚のプレートは、24 時間及び 48 時間の培養終了後、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。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、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

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。同時に染色体数 46～54 本を持つ細胞を倍数体とし、そ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。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とした。

6) 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数値異常に大別し、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（非染色部分が染色分体の同軸上にある）ものであって、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と定義した。

- 染色分体型切断(ctb) : 切断とは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と定義した。
- 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を染色体型切断と定義した。
- 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) 他。

(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) 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石舘らの基準¹⁾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 (+)

染色体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。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

(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最高用量の 4500 µg/mL においても 50%以上の細胞増殖抑制が認められず、50%細胞増殖抑制濃度は 4500.0 µg/mL 以上であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質用量群の細胞の培養状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、非処理群と比較すると、代謝活性化及び非代謝活性化ともに最高用量の 4500 µg/mL においても細胞の浮遊・形態変化は認められなかった。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに培養液の色調変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに析出は認められなかった。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに最高用量の 4500 µg/mL においても 50%以上の細胞増殖抑制が認められず、50%細胞増殖抑制濃度は 4500.0 µg/mL 以上であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質用量群の細胞の培養状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、非処理群と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに最高用量の 4500 µg/mL においても細胞の浮遊・形態変化は認められなかった。肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに培養液の色調変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに析出は認められなかった。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 2-1、2-2、Table 2-1、2-2、3-1 及び 3-2 に、連続処理法の結果を Fig. 2-3、2-4、Table 2-3、2-4、3-3 及び 3-4 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質用量群の細胞の培養状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、非処理群と比較すると、短時間処理法及び連続処理法ともに最高用量の 4500 µg/mL においても細胞の浮遊・形態変化は認められなかった。肉眼による培養液の色調の観察では、短時間処理法及び連続処理法ともに色調変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、短時間処理法及び連続処理法ともに析出は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では 4500 µg/mL では 0.5%、2250 µg/mL で 1.0%、1125 µg/mL で 0% 及び 562.5 µg/mL で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、非代謝活性化においても、4500 µg/mL では 0%、2250 µg/mL で 0.5%、1125 µg/mL で 1.0% 及び 562.5 µg/mL で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。更に、連続処理法の 24 時間処理では 4500 µg/mL では 0%、2250 µg/mL で 0%、1125 µg/mL で 0% 及び 562.5 µg/mL で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、48 時間処理では、4500 µg/mL では 0.5%、2250 µg/mL で 0.5%、1125 µg/mL で 0% 及び 562.5 µg/mL で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。

各処理法ともに非処理群における染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 2) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。陽性対照群における染色体構造異常の出現率は、試験施設の背景値 (Attached Data 2) に比べやや高低が見られたが、染色体構造異常の出現率は陽性の判定基準内にあり、十分に高い出現率を示したことから、試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では 4500 µg/mL では 0%、2250 µg/mL で 0%、1125 µg/mL で 0.5% 及び 562.5 µg/mL で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、非代謝活性化においては、4500 µg/mL では 0%、2250 µg/mL で 0.5%、1125 µg/mL で 0% 及び 562.5 µg/mL で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。更に、連続処理法の 24 時間処理では 4500 µg/mL では 0%、2250 µg/mL で 0%、1125 µg/mL で 0.5% 及び 562.5 µg/mL で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、48

時間処理では、4500 µg/mL では 0%、2250 µg/mL で 0%、1125 µg/mL で 0.5% 及び 562.5 µg/mL で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

各処理法ともに非処理群における倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 2) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

考 察

被験物質は、染色体異常試験において、短時間処理法及び連続処理法ともに染色体の構造異常を有する細胞の出現率は増加せず、倍数性細胞の出現率の増加も認められなかった。

なお、いずれの処理法においても非処理群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率はすべて陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、いずれの処理法においても陽性対照群における染色体構造異常の出現率はすべて陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様に顕著な誘発が認められた。また、2枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、ペルフルオロオクタンは、本試験条件下において染色体の構造異常及び倍数体の誘発能は有さないものと判定した。

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, *Mutation Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation 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), *日本香粧品科学会誌*, **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

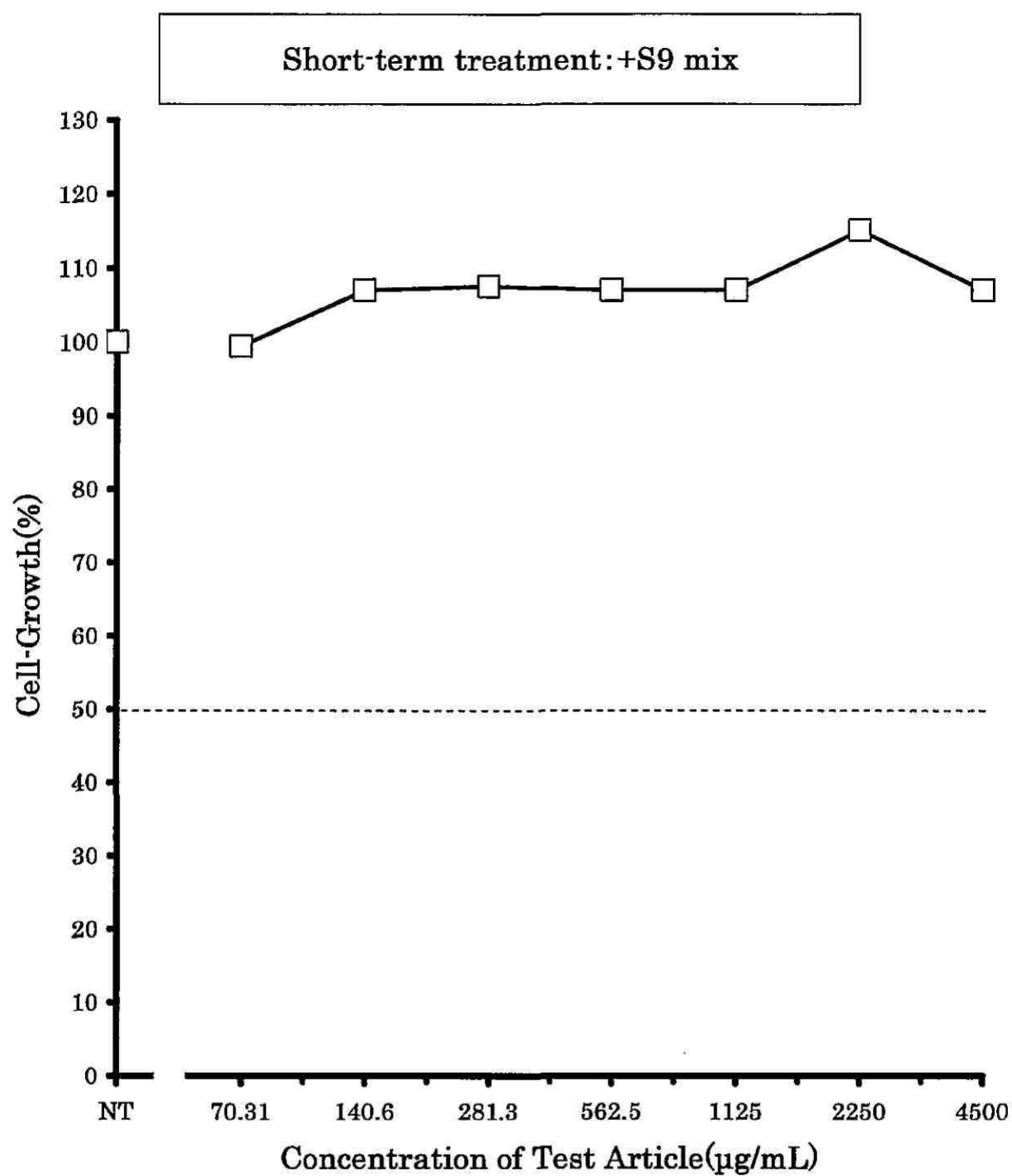


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

NT: Non treatment

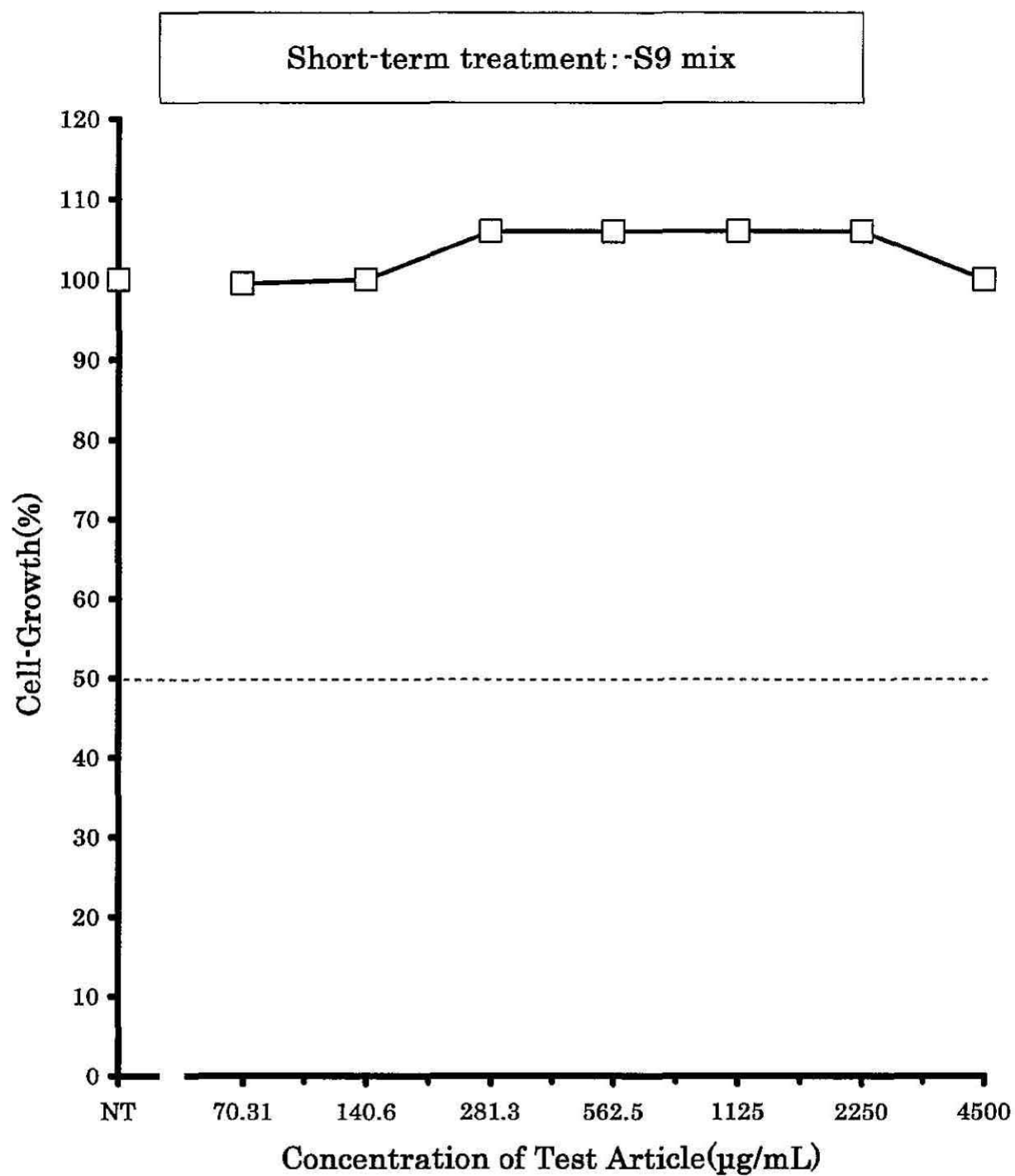


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

NT: Non treatment

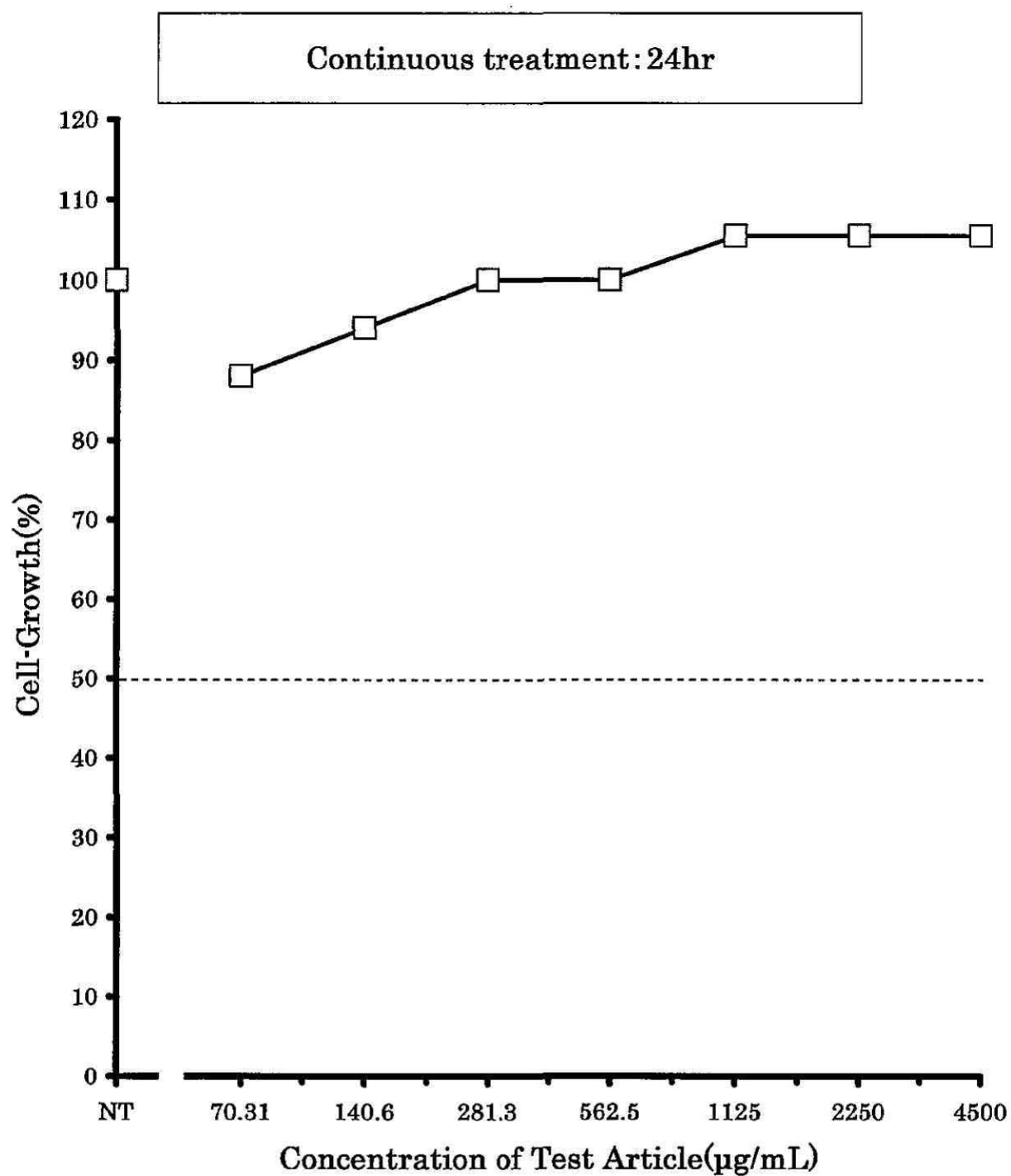


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

NT: Non treatment

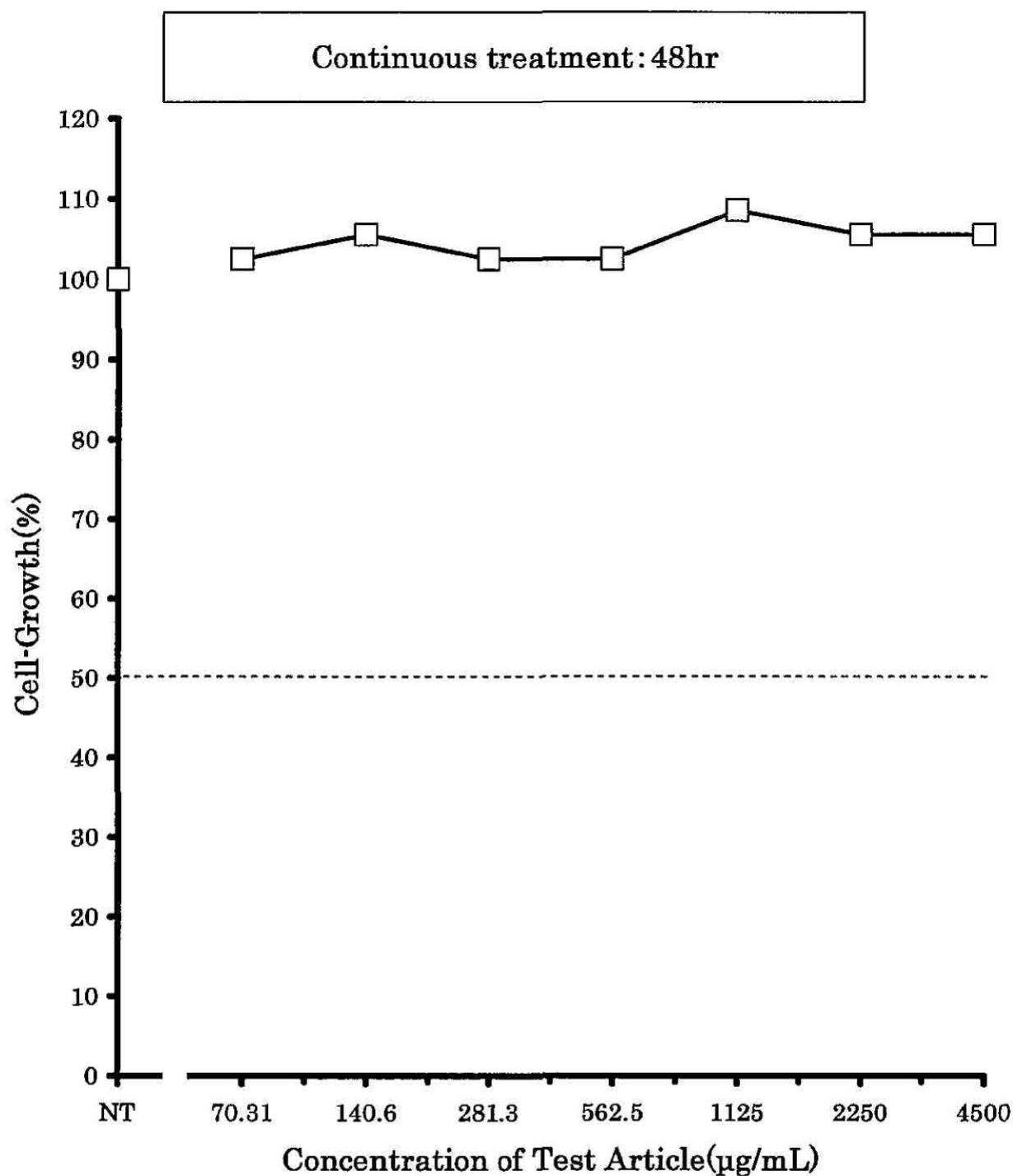


Fig.1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

NT: Non treatment

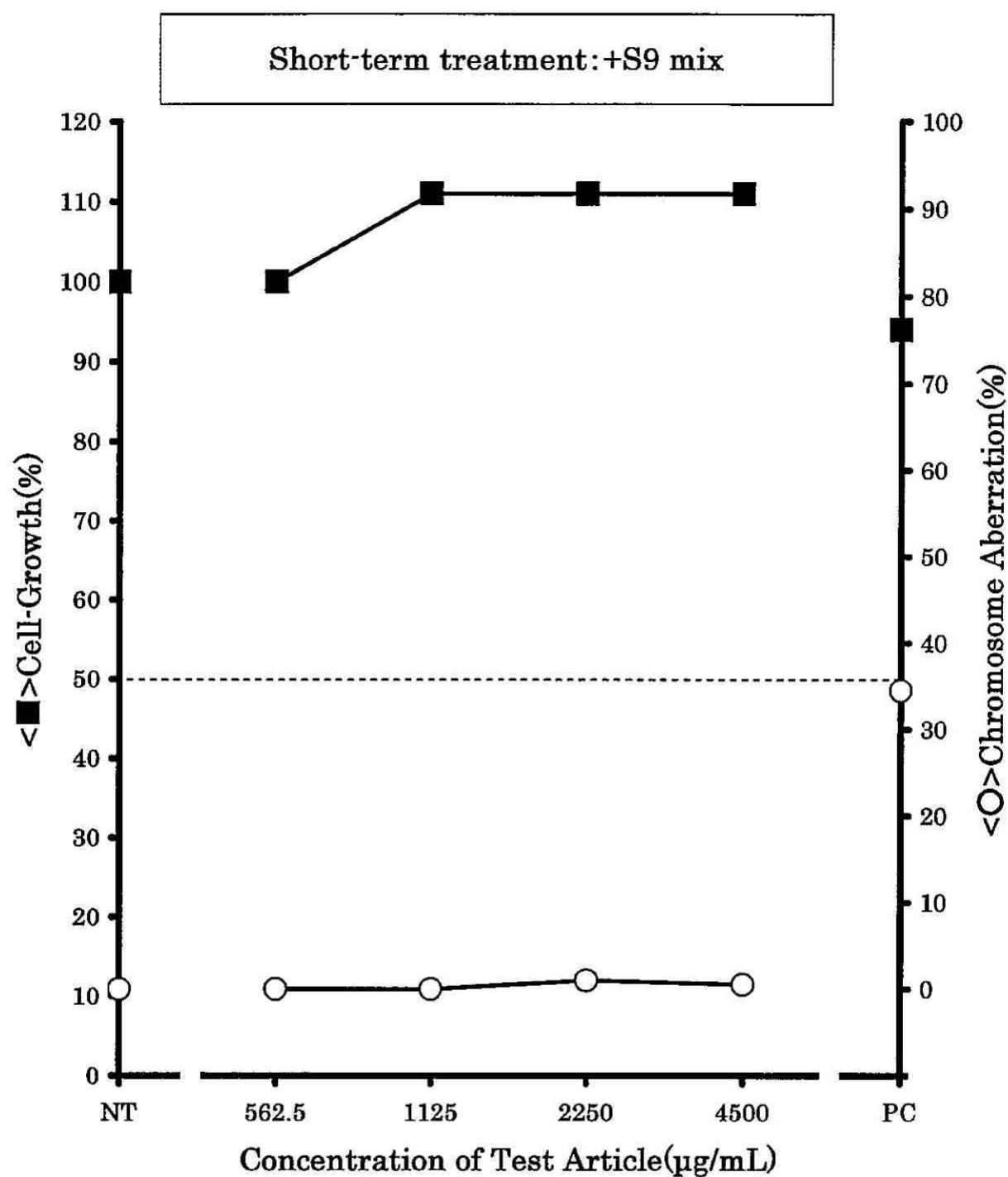


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

NT: Non treatment

PC: Positive control

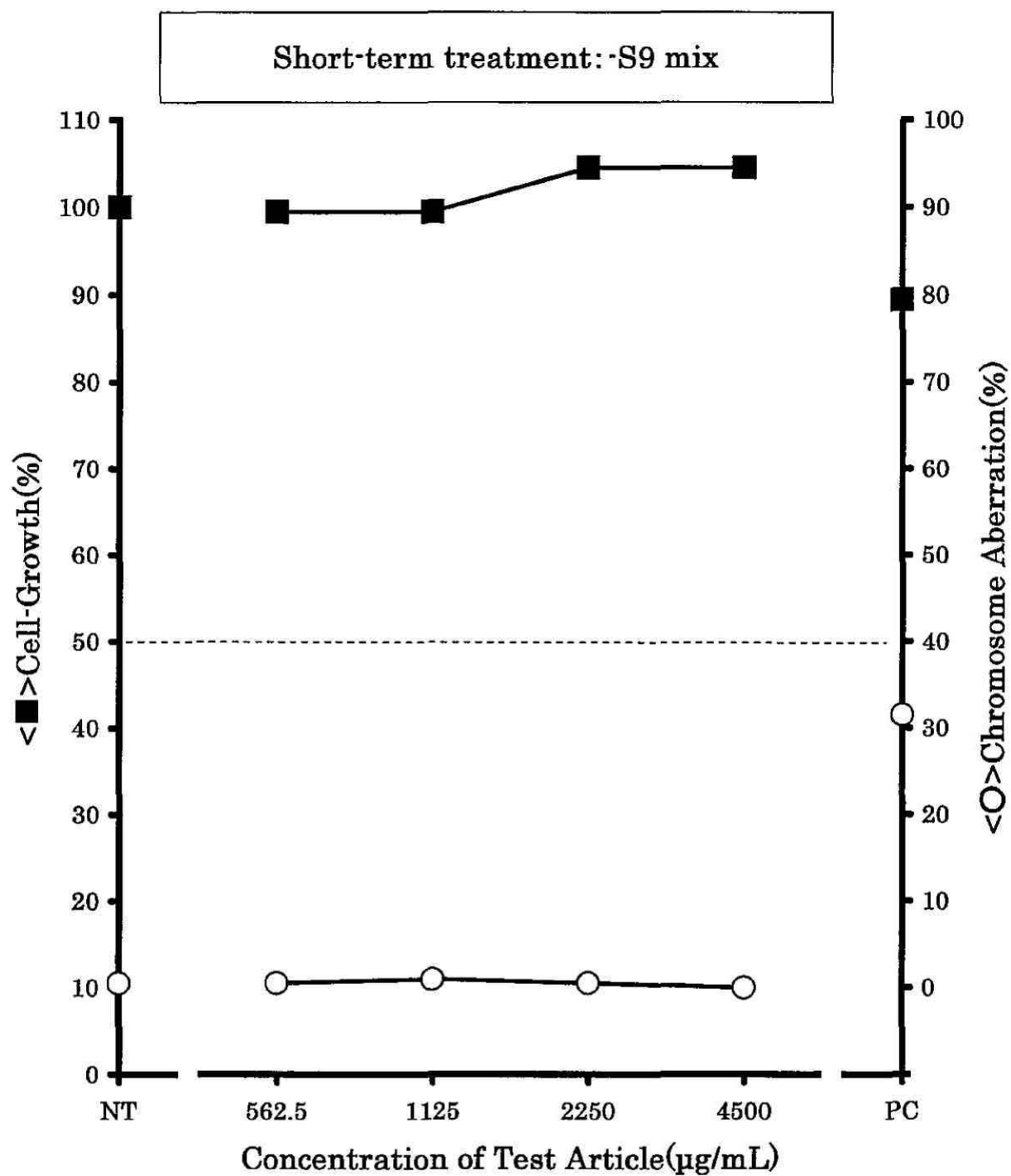


Fig.2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

NT: Non treatment

PC: Positive control

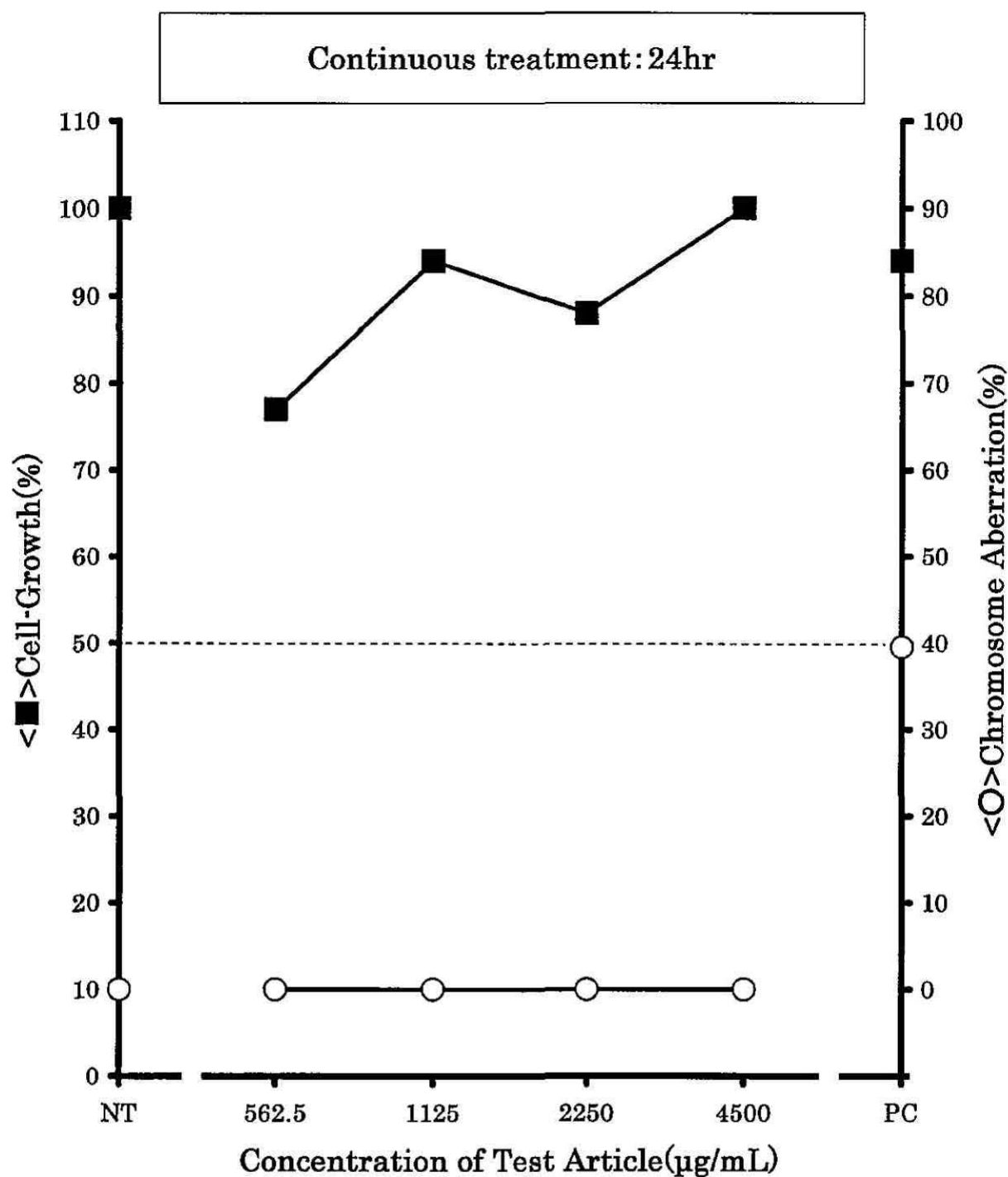


Fig.2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

NT: Non treatment

PC: Positive control

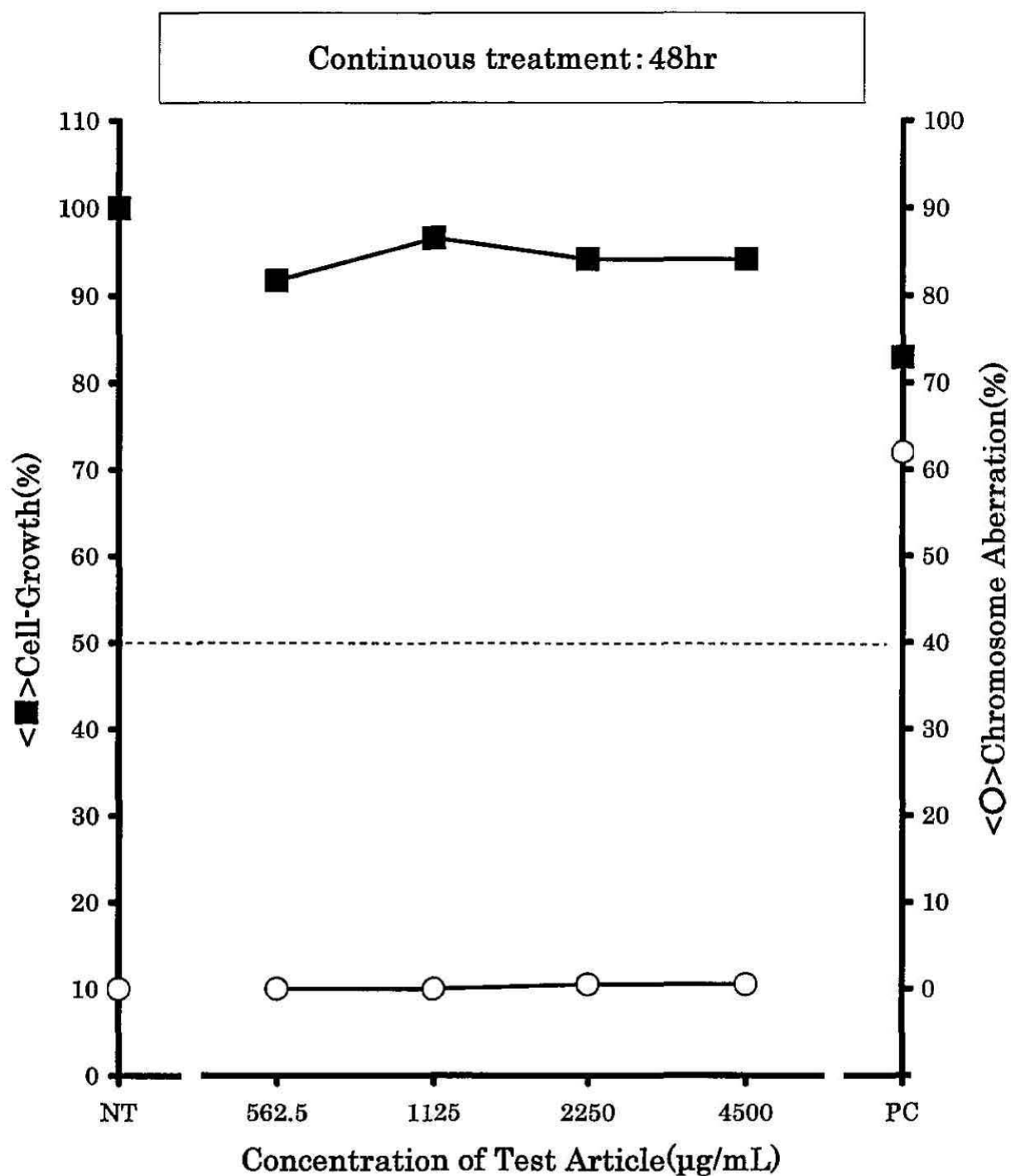


Fig.2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane

NT: Non treatment

PC: Positive control

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{d)}
+	6-18	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			85		—	—	—
		70.31	99	99	—	—	—
			85		—	—	—
		140.6	99	107	—	—	—
			99		—	—	—
		281.3	114	108	—	—	—
			85		—	—	—
		562.5	99	107	—	—	—
			99		—	—	—
		1125	99	107	—	—	—
			99		—	—	—
		2250	114	115	—	—	—
			99		—	—	—
		4500	99	107	—	—	—
			99		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition: above					4500.0	µg/mL	

NT : Non Treatment

- a) The plate in the non treatment group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the non treatment value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
- e) — : No changes of color
- f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Short-term treatment:-S9 mix]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}	
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}
—	6-18	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		70.31	112	100	—	—	—
			87		—	—	—
		140.6	100	100	—	—	—
			100		—	—	—
		281.3	112	106	—	—	—
			100		—	—	—
		562.5	112	106	—	—	—
			100		—	—	—
		1125	112	106	—	—	—
			100		—	—	—
		2250	112	106	—	—	—
			100		—	—	—
		4500	100	100	—	—	—
			100		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition : above					4500.0	µg/mL	

NT : Non Treatment

- a) The plate in the non treatment group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the non treatment value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
- e) — : No changes of color
- f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	24	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		70.31	88	88	—	—	—
			88		—	—	—
		140.6	100	94	—	—	—
			88		—	—	—
		281.3	100	100	—	—	—
			100		—	—	—
		562.5	100	100	—	—	—
			100		—	—	—
		1125	111	106	—	—	—
			100		—	—	—
		2250	100	106	—	—	—
			111		—	—	—
		4500	111	106	—	—	—
			100		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition: above					4500.0	µg/mL	

NT : Non Treatment

- a) The plate in the non treatment group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the non treatment value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
- e) — : No changes of color
- f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{d)}
—	48	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		70.31	105	103	—	—	—
			99		—	—	—
		140.6	105	106	—	—	—
			105		—	—	—
		281.3	105	103	—	—	—
			99		—	—	—
		562.5	105	103	—	—	—
			99		—	—	—
		1125	111	109	—	—	—
			105		—	—	—
		2250	105	106	—	—	—
			105		—	—	—
		4500	105	106	—	—	—
			105		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition : above					4500.0	µg/mL	

NT : Non Treatment

- a) The plate in the non treatment group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the non treatment value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
- e) — : No changes of color
- f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
+	6-18	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		562.5	100	100	—	—	—
			100		—	—	—
		1125	111	111	—	—	—
			111		—	—	—
		2250	111	111	—	—	—
			111		—	—	—
		4500	111	111	—	—	—
			111		—	—	—
		PC	100	94	—	—	—
			88		—	—	—

NT : Non Treatment

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

a) The plate in the non treatment group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the non treatment value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-2 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Short-term treatment:-S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	6-18	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		562.5	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		1125	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		2250	109	105	—	—	—
			99		—	—	—
		4500	99	105	—	—	—
			109		—	—	—
		PC	89	89	—	—	—
			89		—	—	—

NT : Non Treatment

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

a) The plate in the non treatment group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the non treatment value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-3 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	24	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		Test article	66	77	—	—	—
			88		—	—	—
			100	94	—	—	—
			88		—	—	—
			88	88	—	—	—
			88		—	—	—
			100	100	—	—	—
			100		—	—	—
		PC	88	94	—	—	—
			100		—	—	—

NT : Non Treatment

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/mL)

a) The plate in the non treatment group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the non treatment value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-4 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	48	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			105		—	—	—
		Test article	94	92	—	—	—
			94		—	—	—
			99	97	—	—	—
			99		—	—	—
			94	94	—	—	—
			99		—	—	—
			94	94	—	—	—
			99		—	—	—
		PC	82	83	—	—	—
			88		—	—	—

NT : Non Treatment

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/mL)

a) The plate in the non treatment group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the non treatment value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Short-term treatment: +S9 mix]

S9 mix	Time (h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NT	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	46-1 89-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		4500	200	0.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	55-1 11-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
+	6-18	2250	200	0.0	—	1	1	1	0	0	0	1.0	1.5	—	52-1 98-1
			(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1125	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	70-1 69-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
+	6-18	562.5	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	95-1 44-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	—	0	7	63	0	0	0	34.5	34.5	+	42-1 54-1
			(100)	(0)		(0)	(4)	(33)	(0)	(0)	(0)	(36)	(36)		
			(100)	(0)		(0)	(3)	(30)	(0)	(0)	(0)	(33)	(33)		

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.

NT: Non treatment

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	6-18	NT	200	0.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	66-1 78-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		4500	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	22-1 93-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
—	6-18	2250	200	0.5	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	40-1 86-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1125	200	0.0	—	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	—	38-1 16-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
—	6-18	562.5	200	0.0	—	0	0	0	0	1	0	0.5	0.5	—	74-1 43-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	—	1	15	52	0	0	0	31.5	32.0	+	90-1 12-1
			(100)	(0)		(0)	(6)	(29)	(0)	(0)	(0)	(33)	(33)		
			(100)	(0)		(1)	(9)	(23)	(0)	(0)	(0)	(30)	(31)		

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.

NT: Non treatment

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

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	24-0	NT	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	82-1 73-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		4500	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	27-1 57-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
—	24-0	2250	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	19-1 13-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1125	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	07-1 76-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
—	24-0	562.5	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	63-1 15-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	—	0	12	74	0	0	0	39.5	39.5	+	51-1 88-1
			(100)	(0)		(0)	(6)	(37)	(0)	(0)	(0)	(40)	(40)		
			(100)	(0)		(0)	(6)	(37)	(0)	(0)	(0)	(39)	(39)		

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.

NT: Non treatment

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluorooctane
[Continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	48-0	NT	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	53-1 29-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		4500	200	0.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	77-1 50-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
—	48-0	2250	200	0.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	60-1 01-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1125	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	31-1 04-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
—	48-0	562.5	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	25-1 33-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	—	0	16	121	0	4	0	62.0	62.0	+	02-1 09-1
			(100)	(0)		(0)	(8)	(63)	(0)	(2)	(0)	(64)	(64)		
			(100)	(0)		(0)	(8)	(58)	(0)	(2)	(0)	(60)	(60)		

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.

NT: Non treatment

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)