

最 終 報 告 書

ペルフルオロヘプタンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1289

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	9
緒 言	10
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び溶媒	11
1) 被験物質	11
2) 溶媒	11
2. 被験液の調製	12
1) 調製方法	12
3. 対照物質	13
1) 陰性対照	13
2) 陽性対照	13
4. 使用細胞株	14
1) 細胞株	14
2) 細胞の選択理由	14
3) 培養条件	14
4) 細胞の性状検査	14
5. S9mix 及び培養液	15
1) S9 mix	15

	頁
2) 培養液	16
6. 試験方法	16
1) 識別方法	17
2) 用量の設定	17
3) 細胞増殖抑制試験	17
4) 染色体異常試験	18
5) 確認試験	20
6) 標本の観察	20
7) 染色体異常の分類	20
8) 判定基準	21
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験及び確認試験	22
1) 短時間処理法	22
2) 連続処理法	22
2. 染色体異常試験	23
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	23
2) 構造異常	23
3) 数的異常	23
考察	25
参考文献	26

Figures and Tables

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

[Short-term treatment: +S9 mix]

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

[Confirmation test (Short-term treatment: -S9 mix)]

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

[Continuous treatment: 24 hr]

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

[Continuous treatment: 48 hr]

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

[Short-term treatment: +S9 mix]

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

[Short-term treatment: -S9 mix]

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

[Continuous treatment: 24 hr]

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

[Continuous treatment: 48 hr]

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

[Short-term treatment: +S9 mix]

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

[Confirmation test (Short-term treatment: -S9 mix)]

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

[Continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane

[Continuous treatment: 48 hr]

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

[Short-term treatment: +S9 mix]

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

[Short-term treatment: -S9 mix]

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

[Continuous treatment: 24 hr]

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

[Continuous treatment: 48 hr]

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

[Short-term treatment: +S9 mix]

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

[Short-term treatment: -S9 mix]

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

[Continuous treatment: 24 hr]

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

[Continuous treatment: 48 hr]

試験実施概要**1. 試験計画書**

試験番号 : M-1289

試験表題 : ペルフルオロヘプ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 : ペルフルオロヘプタン、perfluoroheptane

別名 : ヘキサデカフルオロヘプタン、hexadecafluoroheptane

受領日 : 2007 年 5 月 10 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

ペルフルオロヘプタンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、ほ乳類培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 4000 µg/mL を最高用量として、細胞増殖抑制試験及び確認試験を実施した。その結果、短時間処理法、連続処理法及び確認試験ともに 4000 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（概略値）は 4000.0 µg/mL 以上と算出された。細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験では、短時間処理法及び連続処理法ともに 4000 µg/mL を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 4 試験用量を設定し染色体異常誘発能の有無を検討した。確認試験では、非代謝活性化について、この判断が正しいものであったことを再確認した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法及び連続処理法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、各処理法の陰性対照群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率は全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、各処理法の陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様の顕著な誘発が認められた。従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、ペルフルオロヘプタンは、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。

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、ペルフルオロヘプタン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。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。

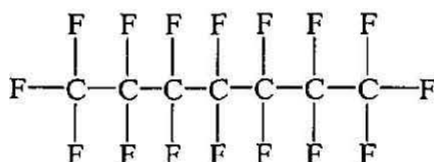
試験材料及び方法

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非 GLP 下での分析に基づくものである (Attached Data 1)。

製造者 :
 名称 : ペルフルオロヘプタン、perfluoroheptane
 別 名 : ヘキサデカフルオロヘプタン、hexadecafluoroheptane
 CAS 番号 : 335-57-9
 構造式又は示性式 :



純 度 : 98.1%
 入 手 量 : 25g
 不 純 物 : 不明
 性 状 : 無色液体
 分 子 量 : 388.05
 比 重 : 1.75
 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℃～23℃)
 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 40 mg/mL で不溶、DMSO、アセトン及びテトラヒドロフランに 400 mg/mL で不溶であり、適切な溶媒が存在しなか

った。類縁物質のペルフルオロオクタン（M-1290 試験）においても、同様に注射用水、DMSO、アセトン及びテトラヒドロフランに不溶で、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ことから、本被験物質においても、溶媒を用いず、比重（1.75）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. 被験液の調製

1) 調製方法

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（1.75）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 4000 $\mu\text{g/mL}$ （10 mM 相当）とし、以下公比 2 で 2000、1000、500.0、250.0、125.0 及び 62.50 $\mu\text{g/mL}$ 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。

4000 $\mu\text{g/mL}$	→	11.429 $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (培養液)
2000 $\mu\text{g/mL}$	→	5.714 $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (培養液)
1000 $\mu\text{g/mL}$	→	2.857 $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (培養液)
500.0 $\mu\text{g/mL}$	→	1.429 $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (培養液)
250.0 $\mu\text{g/mL}$	→	0.714 $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (培養液)
125.0 $\mu\text{g/mL}$	→	0.357 $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (培養液)
62.50 $\mu\text{g/mL}$	→	0.179 $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (培養液)

(2) 染色体異常試験

最高用量を 4000 $\mu\text{g/mL}$ （10 mM 相当）とし、以下公比 2 で 2000、1000 及び 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 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。

4000 $\mu\text{g/mL}$	→	11.429 $\mu\text{L}/5\text{mL}$ (培養液)
-----------------------	---	---------------------------------------

2000 µg/mL	→	5.714 µL/5mL(培養液)
1000 µg/mL	→	2.857 µL/5mL(培養液)
500.0 µg/mL	→	1.429 µL/5mL(培養液)

3. 対照物質

1) 陰性対照

細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験ともに溶媒を用いないため、陰性対照物質は存在しなかった。従って両試験ともに陰性対照群は設けず、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）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 25 継代、染色体異常試験では短時間処理法で 7 継代、連続処理法で 11 継代、確認試験では 19 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、さら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 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	
			ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
			注射用水(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、注射用水に融解、pH 調製、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
3. 確認試験（細胞増殖抑制試験）	短時間処理法	非代謝活性化

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)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 4000 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 2000、1000、500.0、250.0、125.0 及び 62.50 $\mu\text{g/mL}$ の計 7 用量を設定した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験で 50%以上の細胞毒性が認められなかったため、最高用量を 4000 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で希釈した 2000、1000 及び 500.0 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量を設定した。

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非処理群及び被験物質用量群を設けた。プ

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物質を加えた。なお、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非処理群及び被験物質用量群を設けた。
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、細胞に異常の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物質を加えた。なお、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非処理群、被験物質用量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 $\mu\text{g/mL}$ ）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物質を加えた。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 $\mu\text{g/mL}$ ）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非処理群、被験物質用量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、細胞に異常の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物質を加えた。なお、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 箇所へ滴下した。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。
- ④ 残る各群 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) 確認試験

細胞増殖抑制試験の短時間処理法・非代謝活性化について、確認試験を実施した。なお、確認試験は全て該当する項目 (細胞増殖抑制試験の短時間処理法について記述した 2. 被験液の調製 1) 調製方法 (1) 細胞増殖抑制試験、3. 対照物質 1) 陰性対照、6. 試験方法 1) 識別方法 (1) 細胞増殖抑制試験、6. 試験方法 2) 用量の設定 (1) 細胞増殖抑制試験、6. 試験方法 3) 細胞増殖抑制試験 等) と同様の方法により実施した。

6) 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。

7) 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数値的異常に大別し、構造異常はさら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また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) 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。

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

8) 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. 細胞増殖抑制試験及び確認試験

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、確認試験の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。なお、短時間処理法における非代謝活性化の結果については、単層培養細胞密度計による細胞密度の測定データに欠落が発見されたことから、細胞増殖抑制作用の再確認のために実施された確認試験の結果を非代謝活性化の結果として採用した。データの欠落は全プレート 16 枚中の 1 枚であったこと、データとして得られた 15 枚のプレートには細胞増殖抑制作用は全く認められなかったこと、細胞増殖抑制試験の短時間処理法と同一の用量設定で実施された細胞増殖抑制試験の連続処理法においても、本被験物質は、細胞増殖抑制作用を全く示さなかったことから、染色体異常試験の短時間処理法・非代謝活性化における用量の設定には問題はなかったものと考えられる。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化及び確認試験ともに最高用量の 4000 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 4000 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

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察したが、代謝活性化及び確認試験ともに、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、代謝活性化及び確認試験ともに培養液交換前の観察において培養液の色調変化は認められなかった。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び確認試験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 4000 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 4000.0 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

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察したが、24 時間処理及び 48

時間処理ともに、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終了時の観察において培養液の色調変化は認められなかった。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

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察したが、短時間処理法及び連続処理法ともに細胞の浮遊・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全ての用量で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 4000 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、2000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、1000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% 及び 500 $\mu\text{g/mL}$ 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、4000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、2000 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、1000 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 500 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% 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 4000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、2000 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、1000 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% 及び 500 $\mu\text{g/mL}$ 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、4000 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、2000 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、1000 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% 及び 500 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。

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全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全て陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値 (Attached Data 2) とほぼ同様に顕著な誘発が認められたことから、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 4000 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、2000 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、1000 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 500 $\mu\text{g/mL}$ 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、4000 µg/mL で 0.5%、2000 µg/mL で 0%、1000 µg/mL で 0.5% 及び 500 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 4000 µg/mL で 0%、2000 µg/mL で 0%、1000 µg/mL で 0% 及び 500 µg/mL で 0% 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、4000 µg/mL で 0.5%、2000 µg/mL で 0%、1000 µg/mL で 0% 及び 500 µg/mL で 0.5% 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全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全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、ペルフルオロヘプタンは、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

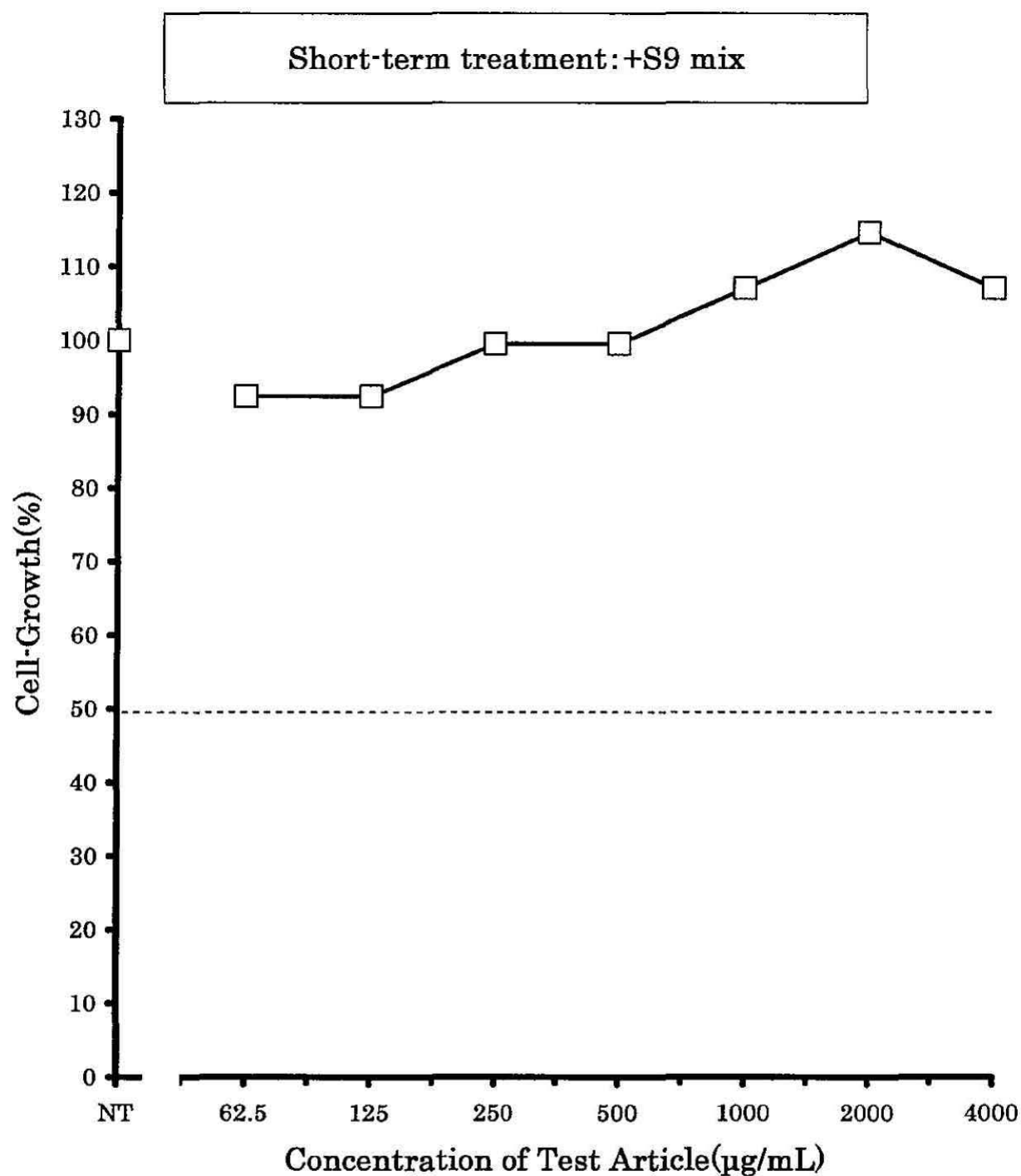


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane

NT: Non Treatment

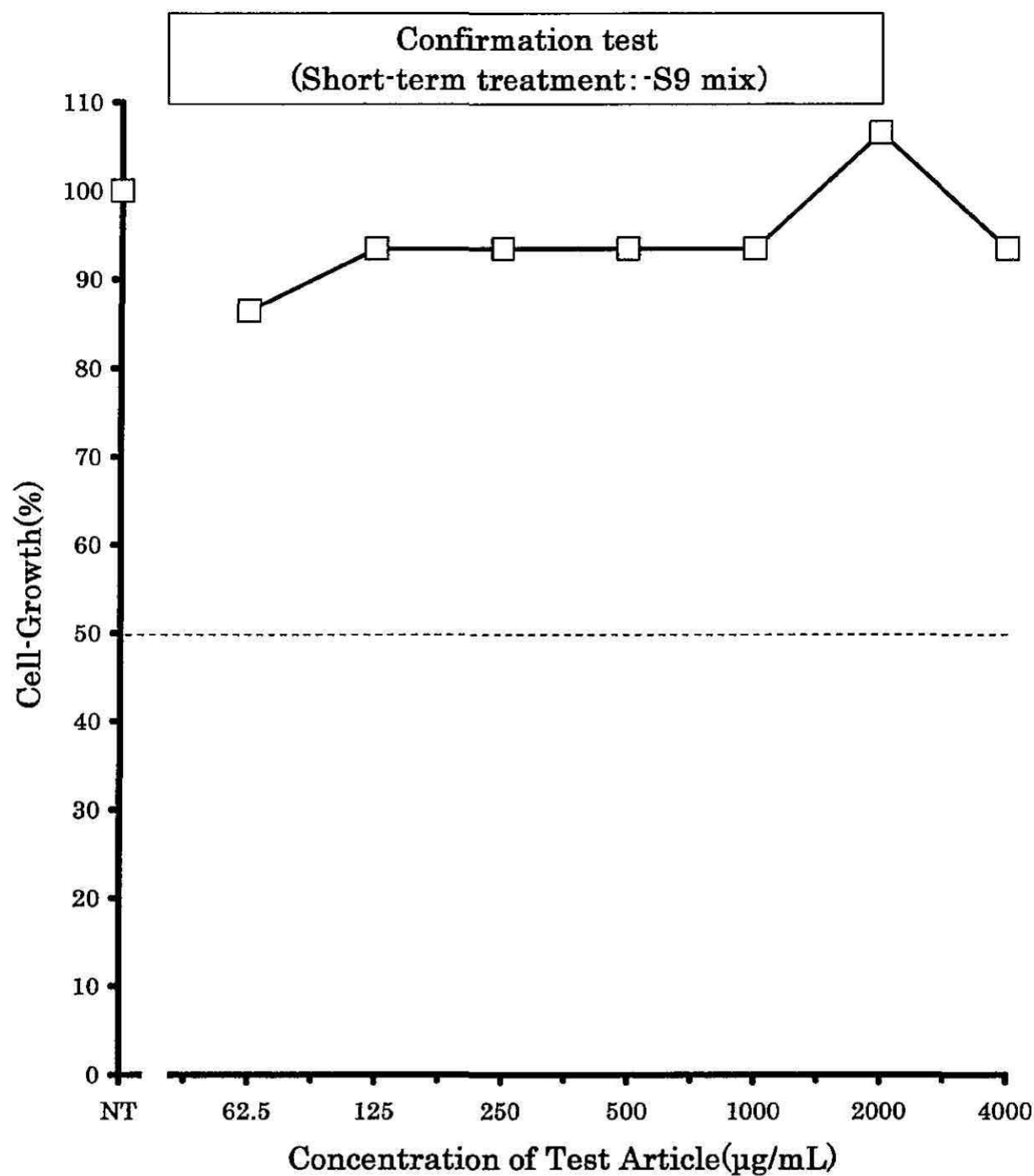


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane

NT: Non Treatment

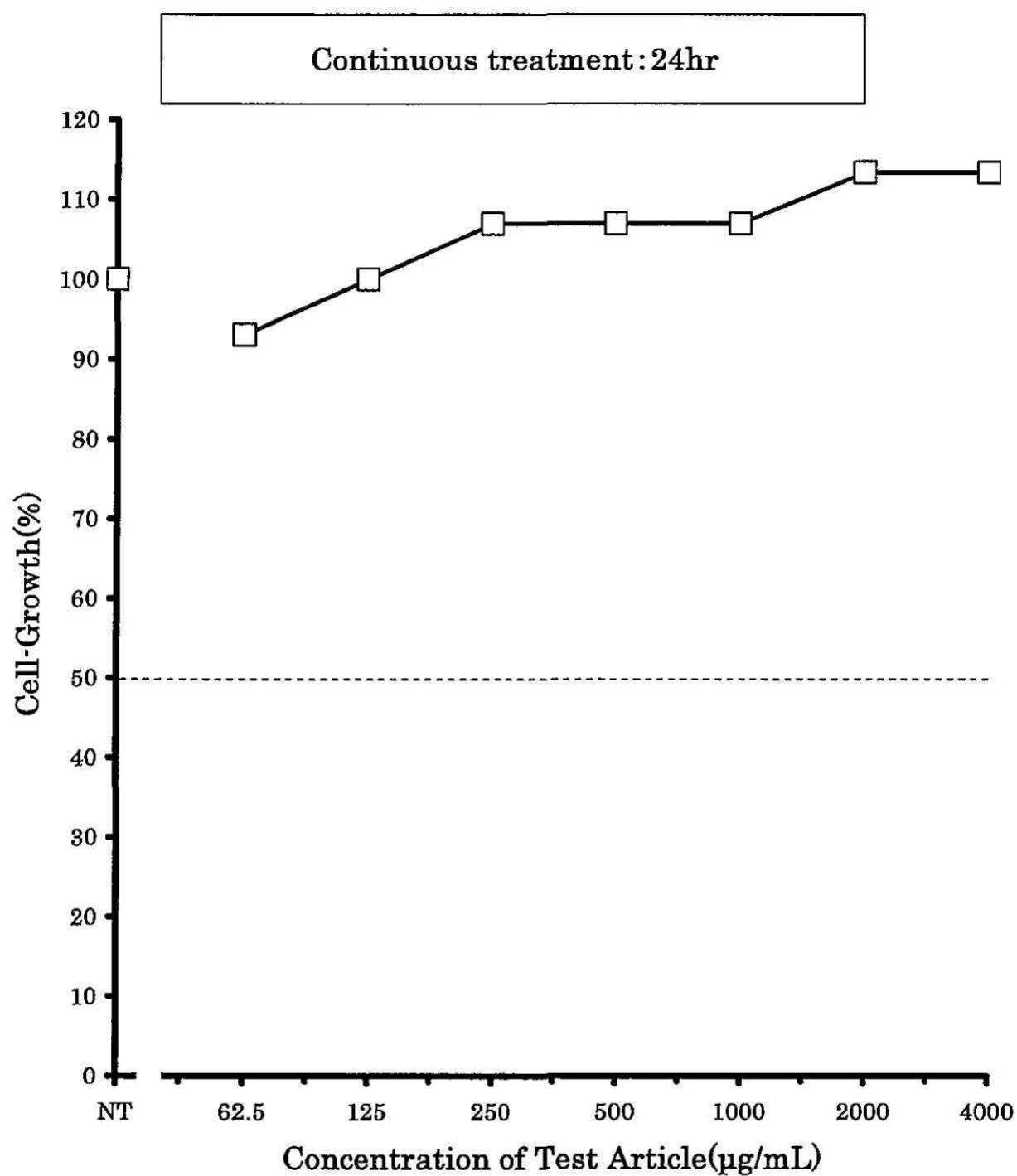


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane

NT: Non Treatment

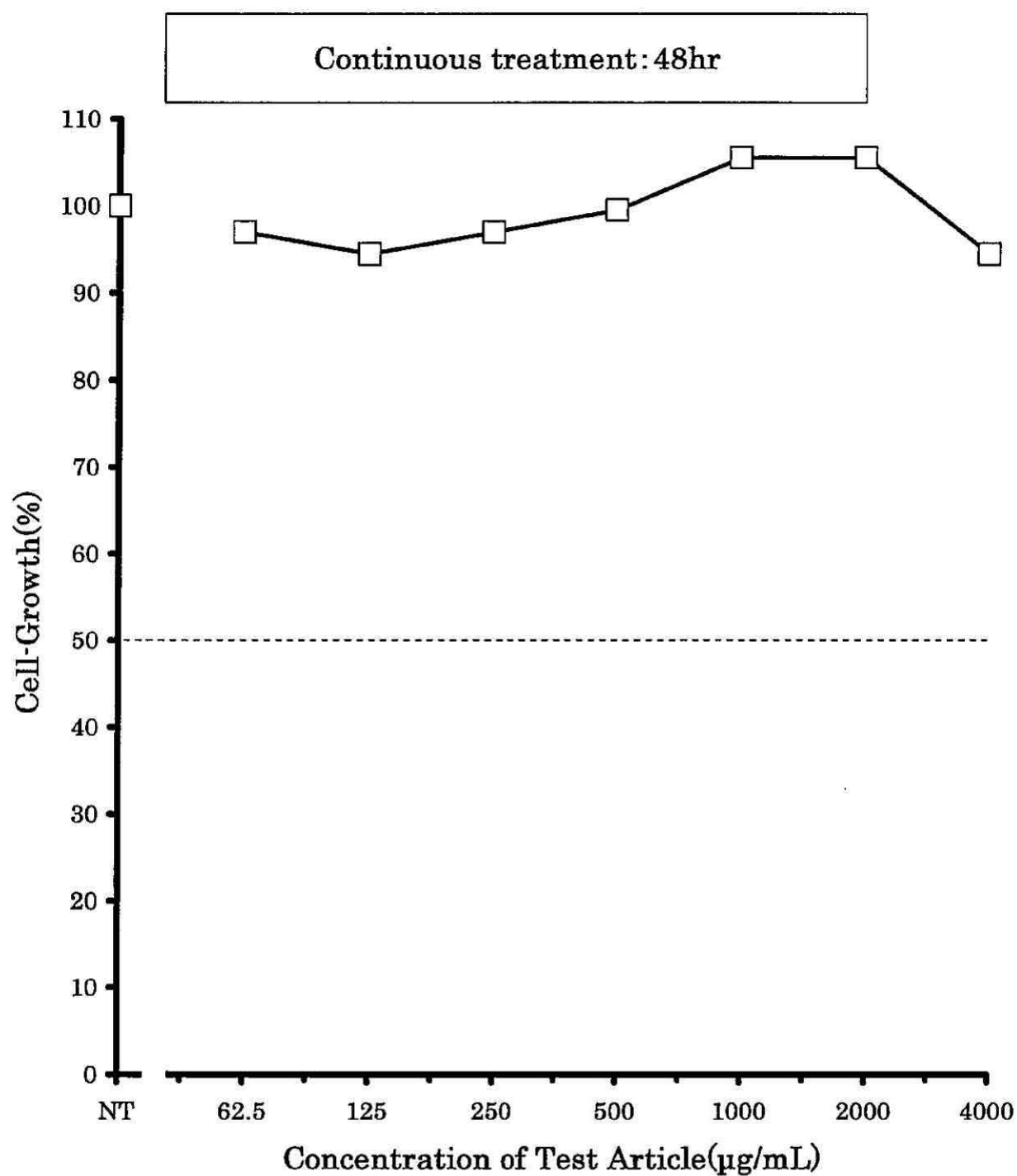


Fig.1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane

NT: Non Treatment

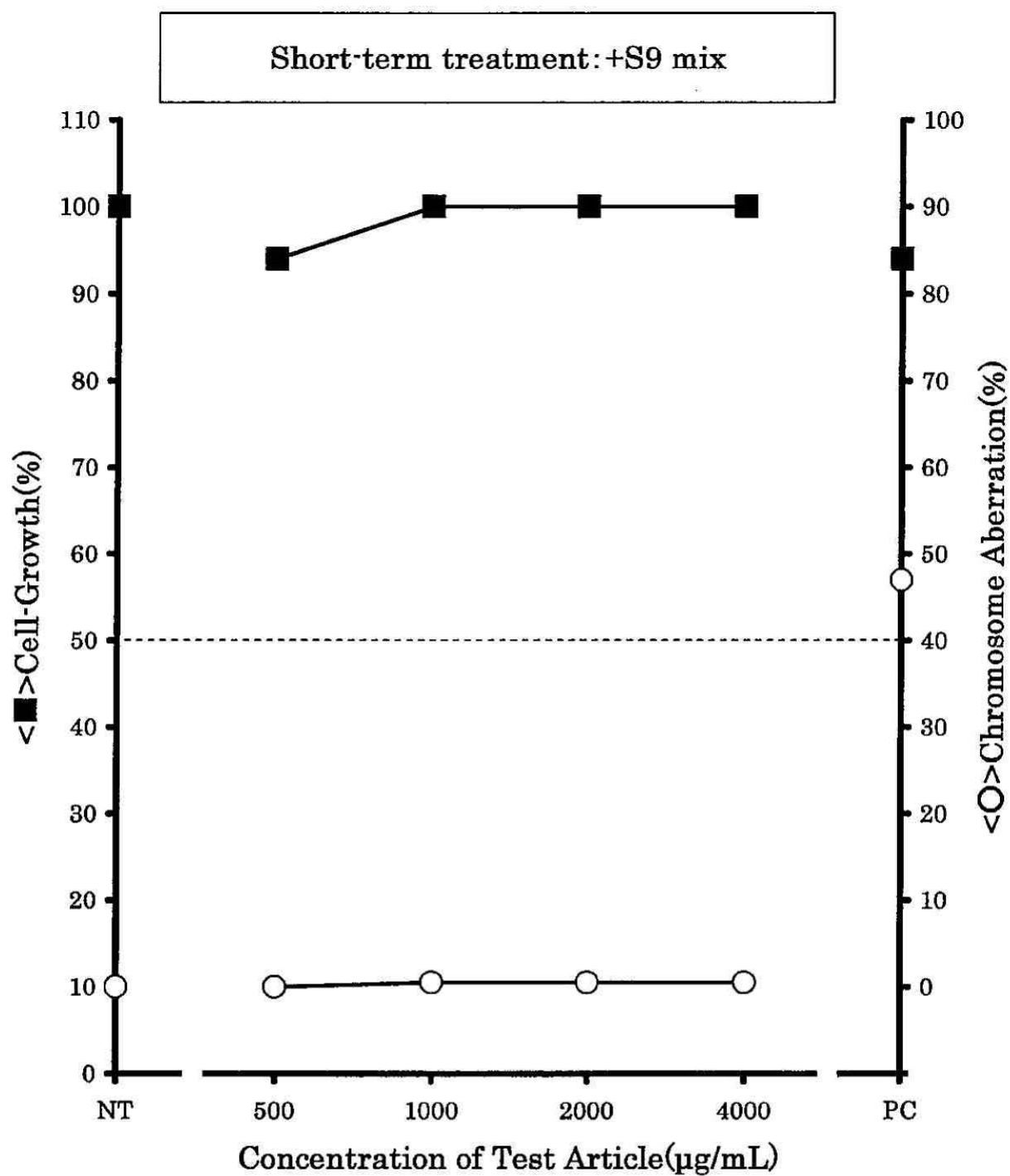


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane

NT: Non treatment

PC: Positive control

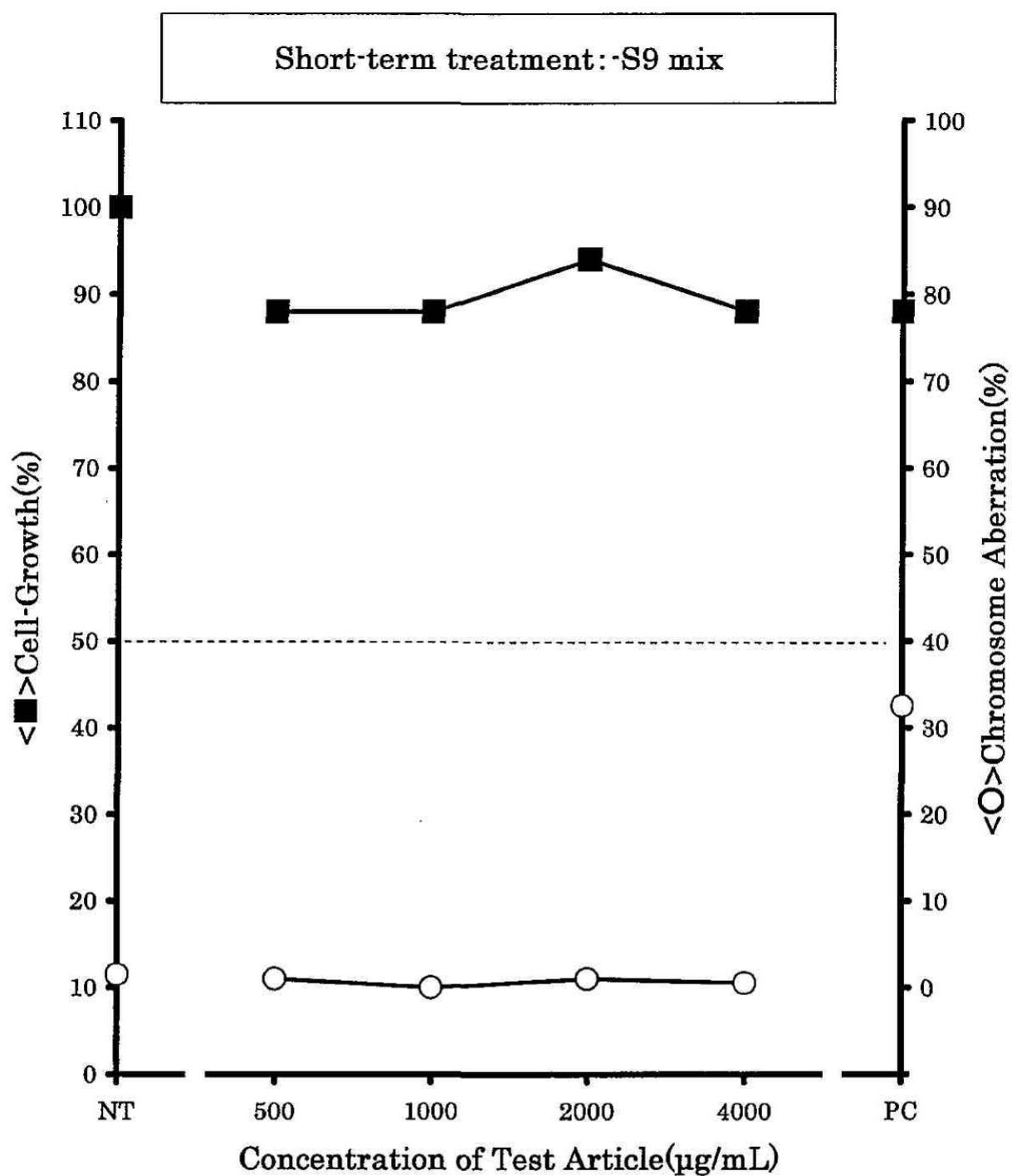


Fig.2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane

NT: Non treatment

PC: Positive control

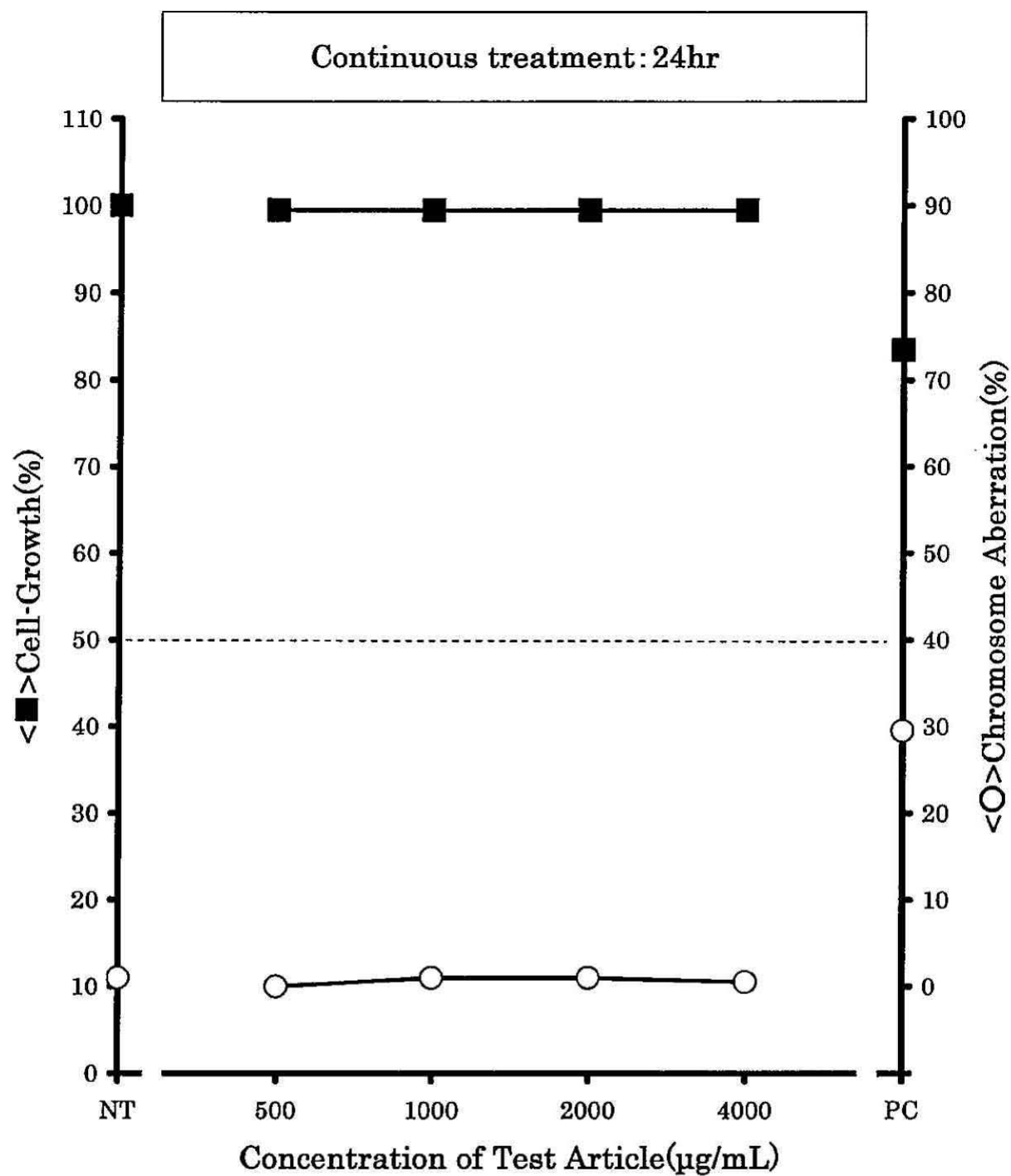


Fig.2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane

NT: Non treatment

PC: Positive control

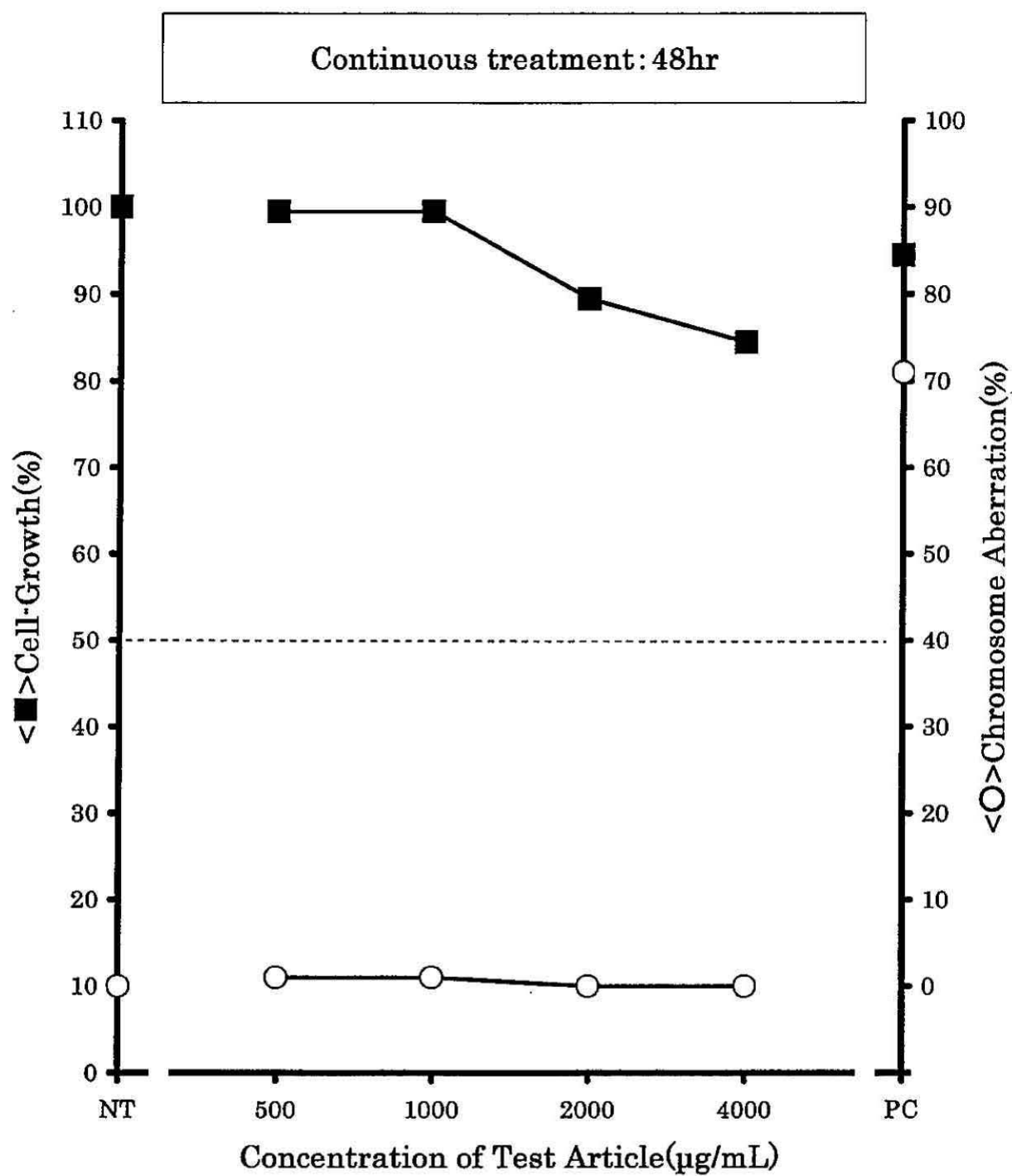


Fig.2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane

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 Perfluoroheptane
[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 ^{f)}
+	6-18	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		62.5	99	92	—	—	—
			85		—	—	—
		125	85	92	—	—	—
			99		—	—	—
		250	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		500	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		1000	114	107	—	—	—
			99		—	—	—
		2000	114	115	—	—	—
			114		—	—	—
		4000	99	107	—	—	—
			114		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition: above					4000.0	µg/mL	

NT : Non Treatment

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control 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 Perfluoroheptane
[Confirmation test (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 ^{f)}
—	6-18	Test article	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
				114		—	—	—
			62.5	100	86	—	—	—
				85		—	—	—
			125	100	93	—	—	—
				100		—	—	—
			250	100	93	—	—	—
				100		—	—	—
			500	100	93	—	—	—
				100		—	—	—
			1000	100	93	—	—	—
				100		—	—	—
			2000	114	107	—	—	—
				114		—	—	—
			4000	100	93	—	—	—
				100		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition: above						4000.0	µg/mL	

NT : Non Treatment

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control 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 Perfluoroheptane
[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	Test article	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
				87		—	—	—
			62.5	87	93	—	—	—
				87		—	—	—
			125	87	100	—	—	—
				100		—	—	—
			250	100	107	—	—	—
				100		—	—	—
			500	100	107	—	—	—
				100		—	—	—
			1000	100	107	—	—	—
				100		—	—	—
			2000	100	113	—	—	—
				112		—	—	—
			4000	100	113	—	—	—
				112		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition: above 4000.0 µg/mL								

NT : Non Treatment

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control 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 Perfluoroheptane
[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 ^{f)}
—	48	0(NT)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		62.5	99	97	—	—	—
			94		—	—	—
		125	94	94	—	—	—
			94		—	—	—
		250	99	97	—	—	—
			94		—	—	—
		500	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		1000	105	106	—	—	—
			105		—	—	—
		2000	105	106	—	—	—
			105		—	—	—
		4000	94	94	—	—	—
			94		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition: above					4000.0	µg/mL	

NT : Non Treatment

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control 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 Perfluoroheptane
[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		—	—	—
		500	100	94	—	—	—
			88		—	—	—
		1000	100	100	—	—	—
			100		—	—	—
		2000	100	100	—	—	—
			100		—	—	—
		4000	100	100	—	—	—
			100		—	—	—
		PC	100	94	—	—	—
			88		—	—	—

NT : Non Treatment

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control 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 Perfluoroheptane
[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		—	—	—
		500.0	88	88	—	—	—
			88		—	—	—
		1000	88	88	—	—	—
			88		—	—	—
		2000	100	94	—	—	—
			88		—	—	—
		4000	88	88	—	—	—
			88		—	—	—
		PC	88	88	—	—	—
			88		—	—	—

NT : Non Treatment

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control 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 Perfluoroheptane
[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	—	—	—
			99		—	—	—
		500.0	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		1000	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		2000	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		4000	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		PC	83	83	—	—	—
			83		—	—	—

NT : Non Treatment

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control 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 Perfluoroheptane
[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	—	—	—
			99		—	—	—
		500.0	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
			99		—	—	—
			99		—	—	—
		1000	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		2000	89	89	—	—	—
			89		—	—	—
		4000	89	84	—	—	—
			79		—	—	—
		PC	89	94	—	—	—
			99		—	—	—

NT : Non Treatment

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control 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 Perfluoroheptane
[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	—	10-1 05-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		4000	200	0.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	87-1 12-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		2000	200	0.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	52-1 11-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1000	200	0.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	42-1 92-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		500	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	08-1 76-1
			(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	19	83	0	0	0	47.0	47.0	+	72-1 50-1
			(100)	(0)		(0)	(11)	(37)	(0)	(0)	(0)	(44)	(44)		
			(100)	(0)		(0)	(8)	(46)	(0)	(0)	(0)	(50)	(50)		

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 Perfluoroheptane
[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	2	0	0	0	1.5	1.5	—	06-1 88-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		4000	200	0.5	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	39-1 66-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		2000	200	0.0	—	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	—	38-1 81-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1000	200	0.5	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	24-1 46-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		500	200	0.0	—	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	—	16-1 19-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	—	1	10	57	0	0	0	32.5	33.0	+	14-1 91-1
			(100)	(0)		(1)	(4)	(29)	(0)	(0)	(0)	(33)	(34)		
			(100)	(0)		(0)	(6)	(28)	(0)	(0)	(0)	(32)	(32)		

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 Perfluoroheptane
[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	0.0	—	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	—	82-1 73-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		4000	200	0.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	27-1 43-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		2000	200	0.0	—	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	—	57-1 13-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1000	200	0.0	—	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	—	07-1 63-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		500	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	15-1 51-1
			(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	14	49	0	1	0	29.5	29.5	+	53-1 29-1
			(100)	(0)		(0)	(6)	(25)	(0)	(0)	(0)	(28)	(28)		
			(100)	(0)		(0)	(8)	(24)	(0)	(1)	(0)	(31)	(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, 0.05 μ g/mL)

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Perfluoroheptane
[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	—	77-1 55-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		4000	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	60-1 01-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		2000	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	44-1 31-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1000	200	0.0	—	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	—	04-1 25-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		500	200	0.5	—	1	2	0	0	0	0	1.0	1.5	—	95-1 33-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		PC	200	0.0	—	0	39	128	0	1	0	71.0	71.0	+	02-1 09-1
			(100)	(0)		(0)	(22)	(59)	(0)	(1)	(0)	(69)	(69)		
			(100)	(0)		(0)	(17)	(69)	(0)	(0)	(0)	(73)	(73)		

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)