

最 終 報 告 書

テトラフェニルスズのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1286

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	11
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び溶媒	12
1) 被験物質	12
2) 溶媒	12
2. 被験液の調製	13
1) 調製方法	13
2) 調製頻度	14
3) 安定性	14
3. 対照物質	14
1) 陰性対照	14
2) 陽性対照	14
4. 使用細胞株	15
1) 細胞株	15
2) 細胞の選択理由	16
3) 培養条件	16
4) 細胞の性状検査	16
5. S9mix 及び培養液	16
1) S9 mix	16

	頁
2) 培養液	17
6. 試験方法	18
1) 識別方法	18
2) 用量の設定	19
3) 細胞増殖抑制試験	20
4) 染色体異常試験	21
5) 確認試験	22
6) 標本の観察	23
7) 染色体異常の分類	23
8) 判定基準	24
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	25
1) 短時間処理法	25
2) 連続処理法	25
2. 染色体異常試験	26
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	26
2) 構造異常	26
3) 数的異常	26
3. 確認試験	27
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	27
2) 構造異常	27
3) 数的異常	28
考察	29
参考文献	31

Figures and Tables

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

Fig. 1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [short-term treatment: -S9 mix]

Fig. 1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [continuous treatment: 24 hr]

Fig. 1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [continuous treatment: 48 hr]

Fig. 2-1 Results of the chromosome aberration test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [short-term treatment retest: +S9 mix]

Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [short-term treatment retest: -S9 mix]

Fig. 2-3 Results of the Confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [Confirmation test: +S9 mix]

Fig. 2-4 Results of the Confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [Confirmation test: -S9 mix]

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

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

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

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

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [short-term treatment retest: +S9 mix]

Table 2-2 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [short-term treatment retest: -S9 mix]

Table 2-3 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [Confirmation test: +S9 mix]

Table 2-4 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [Confirmation test: -S9 mix]

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

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

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [confirmation test: +S9 mix]

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin [confirmation test: -S9 mix]

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : M-1286
試験表題 : テトラフェニルスズ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

供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
製造者 :
名称 : テトラフェニルスズ、tetraphenyltin
受領日 : 2007 年 3 月 16 日
保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室 室温保存庫及び第 1 研究棟被験物質調製室 室温保存庫

要 約

テトラフェニルスズ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 4300 $\mu\text{g/mL}$ として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 1075 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 134.4 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 67.19 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 33.59 $\mu\text{g/mL}$ で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、被験物質の 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は 1043.4 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 109.8 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 44.0 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 33.59 $\mu\text{g/mL}$ 以下と算出された。これより、染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では 2150 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 5 試験用量を、非代謝活性化では 134.4 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 67.19 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を検討した。なお、連続処理法の 48 時間処理では細胞増殖抑制試験で設定した最低用量の 33.59 $\mu\text{g/mL}$ においても、50%を超えない細胞増殖抑制を示す用量が求められず、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を算出することが出来なかった。しかしながら、33.59 $\mu\text{g/mL}$ における細胞増殖抑制は 56%と、50%に近い値であったため、確実に 50%を超える細胞増殖抑制を示すと推測される 67.19 $\mu\text{g/mL}$ を 48 時間処理の最高用量として、以下公比 2 で希釈した 5 試験用量を設定した。

染色体異常試験の短時間処理法（再試験）の代謝活性化では、2150 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性のため規定数の分裂中期像が観察できなかったが、1075、537.5、268.8 及び 134.4 $\mu\text{g/mL}$ の染色体構造異常の指標であるギャップを含まない総異常細胞の出現頻度（TA 値）は、それぞれ 3.0、0、2.0 及び 2.0%を示し、いずれも 5%未満であったため陰性と判定した。また、短時間処理法（再試験）の非代謝活性化では、134.4 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性のため規定数の分裂中期像が観察できなかったが、67.19、33.59 及び 16.80 $\mu\text{g/mL}$ の染色体構造異常の指標であるギャップを含まない総異常細胞の出現頻度（TA 値）は、それぞれ 2.0、0.5 及び 0%を示し、いずれも 5%未満であったため陰性と判定した。

染色体異常試験の短時間処理法（再試験）の結果、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、最高用量で規定の細胞数を観察出来なかったものの、陽性の判定基準内にある染色体構造異常頻度の増加が認められた。また、最高用量以下の用量では細胞増殖抑制率が 50%以下を示したこ

とから、準拠するガイドラインの規定に照らした場合に、試験は不成立であると考えられた。そこで、毒性試験法ガイドライン及び試験計画書の 12-5-1.項の規定に従って、「出現率の用量依存性又は再現性」を確認するために確認試験（短時間処理法）を実施した。その結果、代謝活性化では 2000 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性のため規定数の分裂中期像が観察できなかったが、1800、1600、1400 及び 1200 $\mu\text{g/mL}$ の染色体構造異常の指標であるギャップを含まない総異常細胞の出現頻度（TA 値）はそれぞれ 52.5、17.5、3.5 及び 2.0% で、1800 及び 1600 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を示したため陽性と判定した。また、非代謝活性化では 120、110、100、90 及び 80 $\mu\text{g/mL}$ の染色体構造異常の指標であるギャップを含まない総異常細胞の出現頻度（TA 値）はそれぞれ 11.0、6.5、0.5、1.0 及び 0.5% で、120 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を、110 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示し、用量依存性が認められたため陽性と判定した。なお、倍数性細胞の出現率はいずれの用量においても 5% 未満であったため、陰性と判定された。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、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、テトラフェニルスズは、本試験条件下において染色体の構造異常誘発能を有するが倍数体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、テトラフェニルスズ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

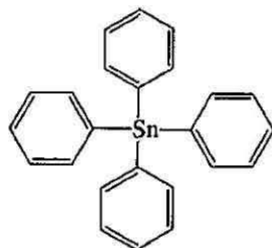
供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

製造者 :

名称 : テトラフェニルスズ、tetraphenyltin

CAS番号 : 595-90-4

構造式又は示性式 :



純度 : 99.0%

入手量 : 15g

性状 : 白色粉末

分子量 : 427.13

ロット番号 :

安定性 : 試験終了後に製造者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 (Attached Data 2)。

保存方法 : 室温 (保存期間中の実測温度 : 15℃～24℃)

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室 室温保存庫及び第1研究棟被験物質調製室 室温保存庫

残余物の取り扱い : 被験物質の残余物は、製造業者がすべて廃棄した。

2) 溶媒

名称 : DMSO

ロット番号 : SDP6175

規 格 : 試薬特級
製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
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 : 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結果、注射用水には 50 mg/mL で不溶、DMSO には 500 mg/mL で懸濁することが確認されたため、DMSO を溶媒として使用した。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.8600 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 430.0 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：4300 µg/mL）を調製した。次いで、430.0 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、215.0、107.5、53.75、26.88、13.44、6.719 及び 3.359 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（再試験）では、被験物質 0.8600 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 430.0 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：4300 µg/mL）を調製した。次いで、430.0 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 8 段階希釈し、215.0、107.5、53.75、26.88、13.44、6.719、3.359 及び 1.680 mg/mL の 9 濃度段階の被験液を調製した。このうち、代謝活性化では 215.0、107.5、53.75、26.88 及び 13.44 mg/mL の 5 濃度を、非代謝活性化では 13.44、6.719、3.359 及び 1.680 mg/mL の 4 濃度を試験に用いた。

(3) 確認試験

確認試験（短時間処理法）では、被験物質 1.0000 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 200.0 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2000 µg/mL）を調製した。次いで、200.0 mg/mL

懸濁液を順次等差で希釈し、

180.0 mg/mL (200 mg/mL 懸濁液 0.90 mL : 溶媒 0.10 mL)

160.0 mg/mL (200 mg/mL 懸濁液 0.80 mL : 溶媒 0.20 mL)

140.0 mg/mL (200 mg/mL 懸濁液 0.70 mL : 溶媒 0.30 mL)

120.0 mg/mL (200 mg/mL 懸濁液 0.60 mL : 溶媒 0.40 mL)

の総計 5 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では 200.0、180.0、160.0、140.0 及び 120.0 mg/mL の被験液を用いた。非代謝活性化では 200.0 mg/mL 懸濁液より 20.00 mg/mL 懸濁液を調製 (200.0 mg/mL 懸濁液 0.50 mL : 溶媒 4.50 mL) し、更に 12.00 mg/mL (20.00 mg/mL 懸濁液 0.60 mL : 溶媒 0.40 mL) 11.00 mg/mL (20.00 mg/mL 懸濁液 0.55 mL : 溶媒 0.45 mL) 10.00 mg/mL (20.00 mg/mL 懸濁液 0.50 mL : 溶媒 0.50 mL) 9.00 mg/mL (20.00 mg/mL 懸濁液 0.45 mL : 溶媒 0.55 mL) 8.00 mg/mL (20.00 mg/mL 懸濁液 0.40 mL : 溶媒 0.60 mL) の 5 濃度段階の被験液を調製した。試験には、12.00、11.00、10.00、9.00 及び 8.00 mg/mL の被験液を用いた。

2) 調製頻度

使用時に調製した。

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、被験液の安定性情報とした。

3. 対照物質

1) 陰性対照

溶媒として用いる DMSO を陰性対照物質とした。

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

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（再試験）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 μ g/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 μ g/mL）。

確認試験では、染色体異常試験 短時間処理法（再試験）と同様な方法により調製を行った。

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（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 (DMSO: 試薬特級 99.0%以上、和光純薬工業株式会社) を 10vol% 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 11 継代、染色体異常試験では短時間処理法 (再試験) で 19 継代、確認試験で 23 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 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る。

(1) S9

名 称	: S9
ロット番号	: ① 06121510、② 07021612
製 造 日	: ① 2006 年 12 月 15 日、② 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 : ① 2007年6月14日、② 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 : 070209
 製 造 日 : 2007年2月9日
 保存方法 : 冷凍（超低温フリーザー）
 使用期限 : 2007年8月8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、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

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 (被験物質処理後の培養液 交換前に試験を中止した) ^{7E)}	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
3. 染色体異常試験	短時間処理法 (再試験)	代謝活性化 非代謝活性化
4. 確認試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化

注) 組成の異なる培養液 (MEM) を使用したため、試験を中止した。

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「−」とした。更にこれに続けて陰性対照群(Negative Control)の場合「NC」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。

(3) 確認試験

染色体異常試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。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 4300 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 2150、1075、537.5、268.8、134.4、67.19 及び 33.59 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 用量を設定した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 1075 $\mu\text{g/mL}$ で、非代謝活性化では 134.4 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 67.19 $\mu\text{g/mL}$ で、連続処理法の 48 時間処理では 33.59 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 50% を超える細胞増殖抑制が認められた。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は 1043.4 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 109.8 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 44.0 $\mu\text{g/mL}$ であった。これらの結果から染色体異常試験における最高用量を、短時間処理法の代謝活性化では 2150 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 134.4 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 67.19 $\mu\text{g/mL}$ にそれぞれ定めた。なお、連続処理法の 48 時間処理では細胞増殖抑制試験で設定した最低用量の 33.59 $\mu\text{g/mL}$ においても、50%を超えない細胞増殖抑制を示す用量が求められず、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を算出することが出来なかった。しかしながら、33.59 $\mu\text{g/mL}$ における細胞増殖抑制は 56%と、50%に近い値であったため、確実に 50%を超える細胞増殖抑制を示すと推測される 67.19 $\mu\text{g/mL}$ を 48 時間処理の最高用量に定めた。またいずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。なお、短時間処理法において、誤った培養液を用いたことから細胞の増殖が著しく悪く、試験が成立しないと判断したため、短時間処理法と同様な用量設定で再試験を行った。

(3) 確認試験

染色体異常試験の短時間処理法（再試験）の結果、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、最高用量で規定の細胞数についての観察が出来ず UR (unreliable) と判定された。しかしながら、染色体構造異常頻度 (TA) は、代謝活性化では 41.7%、非代謝活性化では 44.8%と、陽性の判定基準を超える高い頻度を示した。また、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、最高用量に次ぐ用量では規定の細胞数についての観察が実施可能であったが、同時に実施された細胞増殖抑制率の測定において、代謝活性化では 50%、非代謝活性化では 29%と、細胞増殖抑制率が低かった。準拠するガイドラインにおいては、「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」と規定されており、細胞増殖抑制率が低い用量での染色体観察では不十分と考えられることから、試験は不成立であると判断された。そこで、毒性試験法ガイドライン及び試験計画書の 12・5・1 項の規定に従って、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制され、規定の細胞数についての染色体観察が出来る用量を最高用量として、「出現率の用量依存性又は再現性」を確認するために確認試験（短時間処理法）を実施することとし、最高用量を短時間処理法（再試験）で染色体構造異常頻度の増加が認められた近傍の用量に定め、間隔を狭めて、代謝活性化では 2000、1800、1600、1400 及び 1200 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量を、非代謝活性化では 120.0、110.0、100.0、90.0 及び 80.0 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量を設定した。更に、これに陰性対照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、陰性対照群を設けた。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、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質処理群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 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、陰性対照の値を 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処理群、陰性対照群を設けた。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 mL）を播種した。培養 3 日後に培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 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 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、陰性対照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、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.933 mL を取り除き、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 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.150 mL を取り除き、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の培養終了約 2 時間前にコルセミド（ジメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、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。

5) 確認試験

(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、陰性対照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、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.933 mL を取り除き、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 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.150 mL を取り除き、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 18 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状態を確認した。次いで、染色体異常試験の短時間処理法と同様にして染色体標本作製した。
- ⑤ 残る 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

標本を作製し、単層培養密度計を用いて細胞密度を測定した。

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、石館らの基準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。

<u>異常細胞の出現率</u>	<u>判定基準</u>
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

細胞増殖抑制は代謝活性化では 1075 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 1043.4 $\mu\text{g/mL}$ であった。また非代謝活性化では 134.4 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 109.8 $\mu\text{g/mL}$ 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、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 134.4 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で、非代謝活性化では 33.59 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、非代謝活性化の 2150 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められたため TOX と判定した。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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 33.59 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で析出が認められた。

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 時間処理では 67.19 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 44.0 $\mu\text{g/mL}$ であった。また 48 時間処理では 33.59 $\mu\text{g/mL}$ においても、50%を超えない細胞増殖抑制を示す用量が求められず、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を算出することが出来なかった。

(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、陰性対照群と比較すると、24 時間処理では 33.59 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、134.4 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められ TOX と判定した。48 時間処理では 33.59

μg/mL以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、67.19 μg/mL以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められ TOX と判定した。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 33.59 μg/mL以上の濃度で析出が認められた。

2. 染色体異常試験

短時間処理法（再試験）の結果を Fig. 2-1、2-2、Table 2-1、2-2、3-1、3-2 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、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 537.5 μg/mL以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。また、非代謝活性化では 33.59 μg/mL以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。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、代謝活性化では 134.4 μg/mL以上で、非代謝活性化では 16.80 μg/mL以上の濃度で析出が認められた。

2) 構造異常

構造異常の出現率（TA）は、代謝活性化では 2150 μg/mLで規定数の細胞が観察されず UR (unreliable) と判定された。また 1075 μg/mLでは 3.0%、537.5 μg/mLで 0%、268.8 μg/mLで 2.0%及び 134.4 μg/mLで 2.0%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。また、非代謝活性化では 134.4 μg/mLで規定数の細胞が観察されず UR と判定された。また 67.19 μg/mLで 2.0%、33.59 μg/mLで 0.5%及び 16.80 μg/mLで 0%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。

各処理法ともに陰性対照群及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽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。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、代謝活性化では 2150 μg/mLで規定数の細胞が観察されず UR と判定された。また 1075 μg/mLでは 0.5%、537.5 μg/mLで 0%、268.8 μg/mLで 0%及び 134.4 μg/mLで 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。また、非代謝活性化では 134.4 μg/mLで規定数の細胞が観察されず UR と判定された。また 67.19 μg/mLで 0.5%、33.59 μg/mLで 0%及び 16.80 μg/mLで 0%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。

各処理法ともに陰性対照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。

3. 確認試験

短時間処理法の結果を Fig. 2-3、2-4、Table 2-3、2-4、3-3、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、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 1200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。また、非代謝活性化では 80.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。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、代謝活性化では 1200 $\mu\text{g/mL}$ 以上で、非代謝活性化では 80.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で析出が認められた。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では 2000 $\mu\text{g/mL}$ で規定数の細胞が観察されず UR と判定された。また 1800 $\mu\text{g/mL}$ で 52.5%、1600 $\mu\text{g/mL}$ で 17.5%、1400 $\mu\text{g/mL}$ で 3.5% 及び 1200 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0% と 1800 及び 1600 $\mu\text{g/mL}$ においては陽性の判定基準である 10% 以上を示した。また、非代謝活性化では 120 $\mu\text{g/mL}$ で 11.0%、110 $\mu\text{g/mL}$ で 6.5%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% 及び 80 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% と 1800 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を、110 $\mu\text{g/mL}$ においては疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。

陰性対照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 3) 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、非代謝活性化においては試験施設の背景値 (Attached Data 3) 内にあった。しかしながら、代謝活性化においては、試験施設の背景値 (Attached Data 3) の下限値(40%)よりも低い値を示した。代謝活性化において、陽性対照群の値が低くなる要因として、陽性対照物質の秤量、調製及び添加時の誤り、S9mix の調製及び添加時の誤り、細胞の感受性の低下が考えられる。しかしながら、これらの操作においては誤りがなかったことが各記録から確認された。また、非代謝活性化では施設の背景値と同様な染色体構造異常の誘発性が認められたことや、同一条件で同時に実施された他試験においては、下限ではあったが、試験施設の背景値内の値を示した

ことから、細胞の感受性には問題はなかったと考えられる。代謝活性化において、陽性対照物質の染色体構造異常に誘発に最も大きな影響を与える要因は、S9 中に含まれる薬物代謝酵素群の活性である。今回用いたロットの S9 を使用して調製した S9mix は、総じて染色体構造異常の誘発頻度が低いことから、薬物代謝酵素群の活性がやや低かったことが疑われる。今回用いた背景値には、当該ロット以外の S9 を用いて行われた実験で得られた TA 値が含まれており、そのことが、代謝活性化における背景値を高めていることも要因の一つと考えられる。いずれにせよ、本試験において、染色体構造異常の出現率が、試験施設の背景値の下限値を下回った原因は不明で、偶発的な現象であると考えられる。しかしながら、代謝活性化で得られた TA 値は 21.5%と陽性の判定基準である「異常細胞の出現率 (TA 値) 10%以上」は遥かに超えており、更に、本被験物質の染色体構造異常誘発性に関しては、異常細胞の出現率 (TA 値) が 1800 $\mu\text{g/mL}$ で 52.5%、1600 $\mu\text{g/mL}$ で 17.5%と十分に高い値をもって検出していたことから、被験物質の染色体構造異常誘発性を評価する上で、細胞は十分な感受性を有していたと考えられ、問題はなかったものと判断される。

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 2000 $\mu\text{g/mL}$ で規定数の細胞が観察されず UR と判定された。また 1800 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、1600 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、1400 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%及び 1200 $\mu\text{g/mL}$ で 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、非代謝活性化では 120 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、110 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、100 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%、90 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%及び 80 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

陰性対照群における倍数体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 3) 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

染色体異常試験の短時間処理法（再試験）の結果、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、最高用量で規定の細胞数についての観察が出来ず UR (unreliable) と判定された。しかしながら、染色体構造異常頻度 (TA) は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、陽性の判定基準を超える高い頻度を示した。また、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、最高用量に次ぐ用量では規定の細胞数についての観察が実施可能であったが、同時に実施された細胞増殖抑制率の測定において、代謝活性化及び非代謝活性化ともに細胞増殖抑制率が低かった。準拠するガイドラインにおいては、「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」と規定されており、細胞増殖抑制率が低い用量での染色体観察では不十分と考えられることから、試験は不成立であると判断された。そこで、毒性試験法ガイドライン及び試験計画書の 12-5-1.項の規定に従って、「出現率の用量依存性又は再現性」を確認するために確認試験（短時間処理法）を実施した。確認試験の代謝活性化では、1800 及び 1600 mg/mL で TA 値が陽性の判定基準である 10%以上であったため陽性と判定した。また、非代謝活性化では 120 mg/mL で TA 値が陽性の判定基準である 10%以上であったため陽性と、110 mg/mL で TA 値が疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満であったため疑陽性と判定した。更に確認試験の代謝活性化及び非代謝活性化において異常細胞の出現率に用量依存性が認められたため、総合的に陽性と判定した。また、確認試験の代謝活性化における染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の 20%に何らかの異常が見られる用量である D20 値¹⁾は 1.6 mg/mL、単位用量当たりの染色分体交換 (cte) を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値¹⁾は 24 であった。また、非代謝活性化における染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の 20%に何らかの異常が見られる用量である D20 値¹⁾は 0.14 mg/mL、単位用量当たりの染色分体交換 (cte) を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値¹⁾は 79 であった。

Tin (CAS Registry No.7440-31-5) は CHO 細胞において DNA 傷害性を示すことが報告されている⁶⁾。また、塩化スズ (II) (CAS Registry No.7772-99-8) は、CHO 細胞において、姉妹染色分体交換を誘発するが、染色体異常は誘発しないことが報告されている⁷⁾。

なお、陰性対照群における染色体の構造異常を有する細胞及び倍数性細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、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、テトラフェニルスズは、本試験条件下において染色体の構造異常の誘発能は有するが、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
- 6) Richardson ML, Gangolli S, (1994): The Dictionary of Substances and their effects, The Royal Society of Chemistry, 7, 454-456
- 7) Gulati D, Win K, Anderson B, Zeiger E, Shelby M (1989): Chromosome aberration and sister chromatid exchange test in Chinese hamster ovary cells in vitro III: Results with 27 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.* 13, 133-193

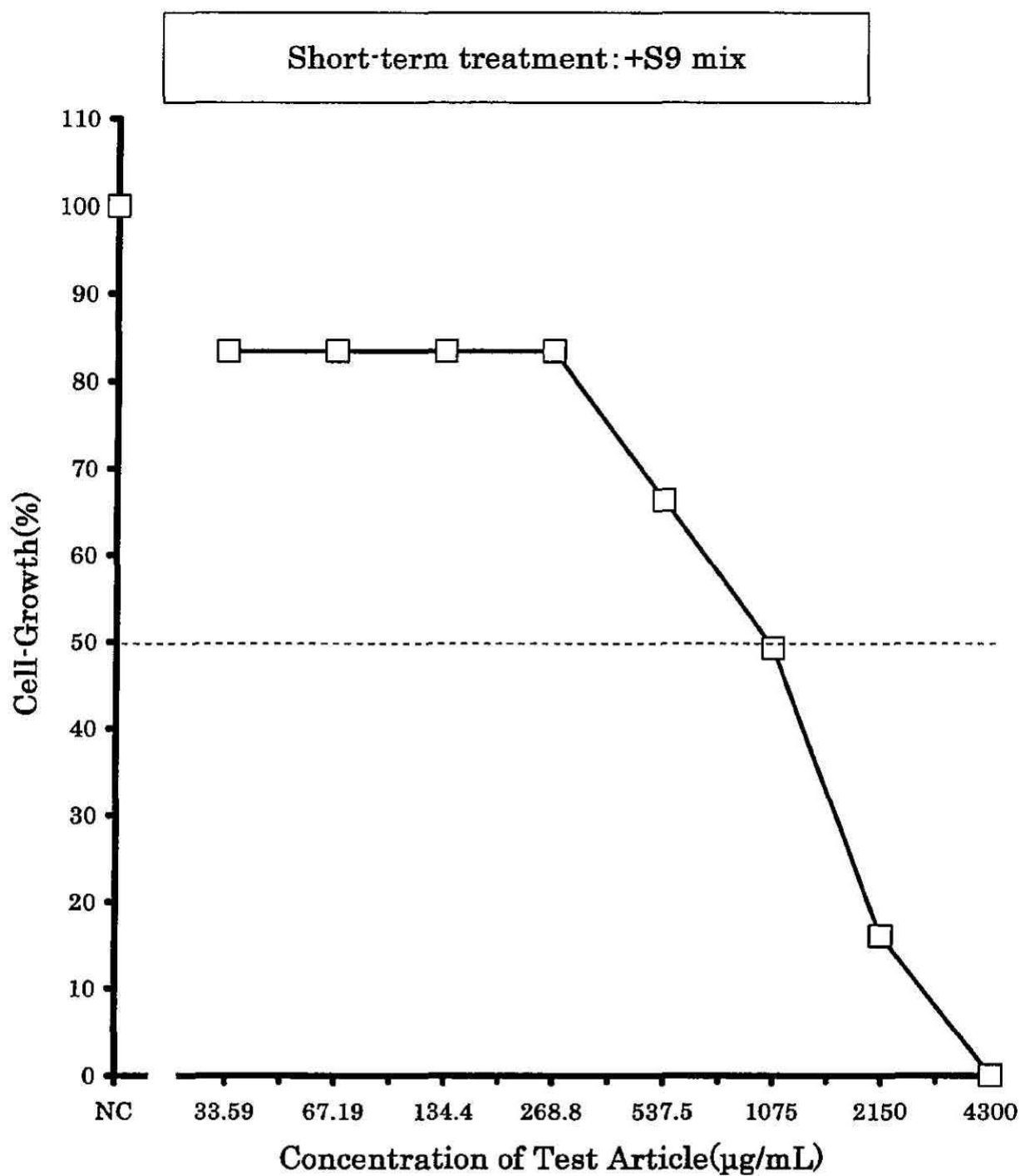


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin

NC: Negative control

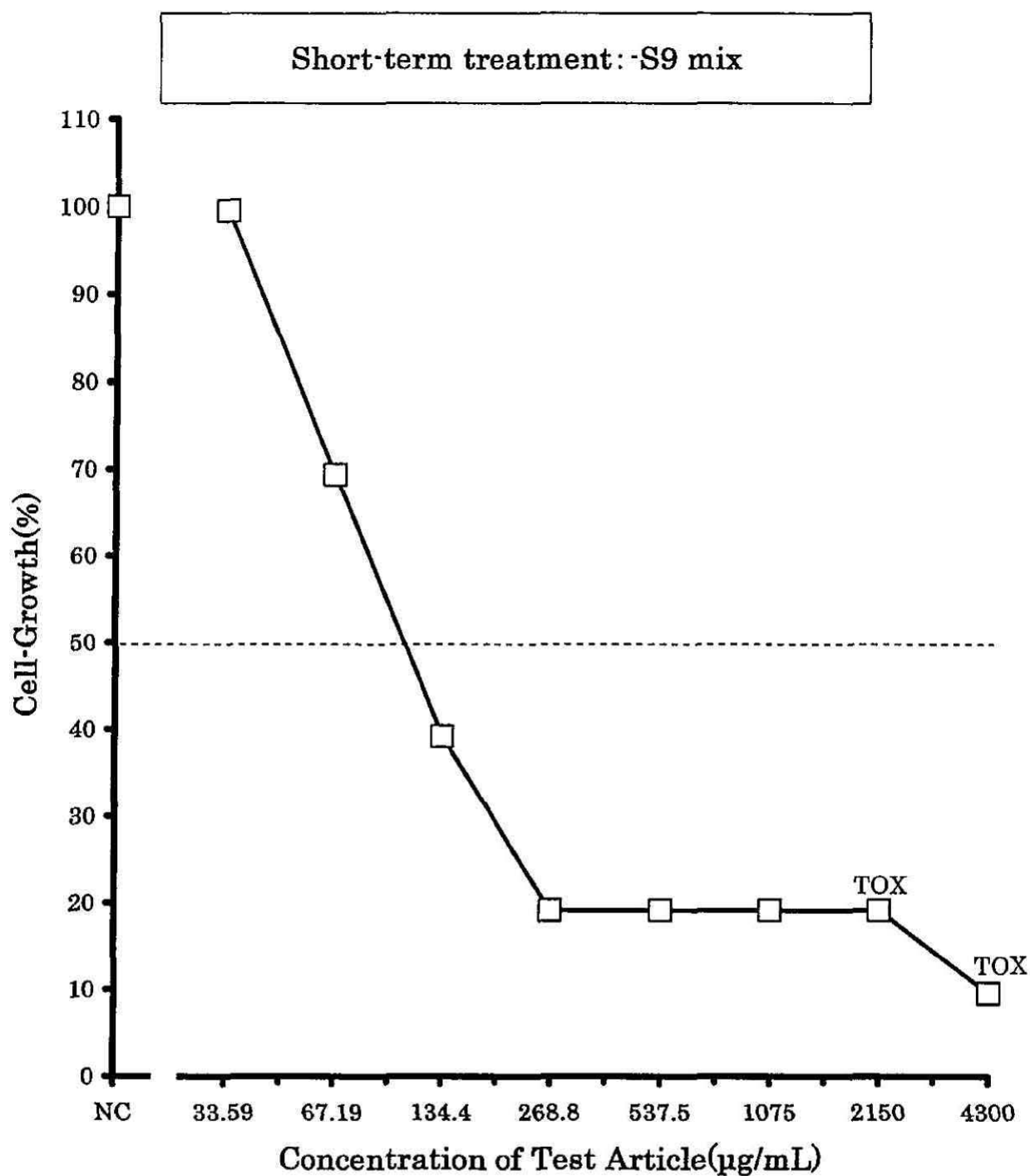


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin

NC: Negative control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

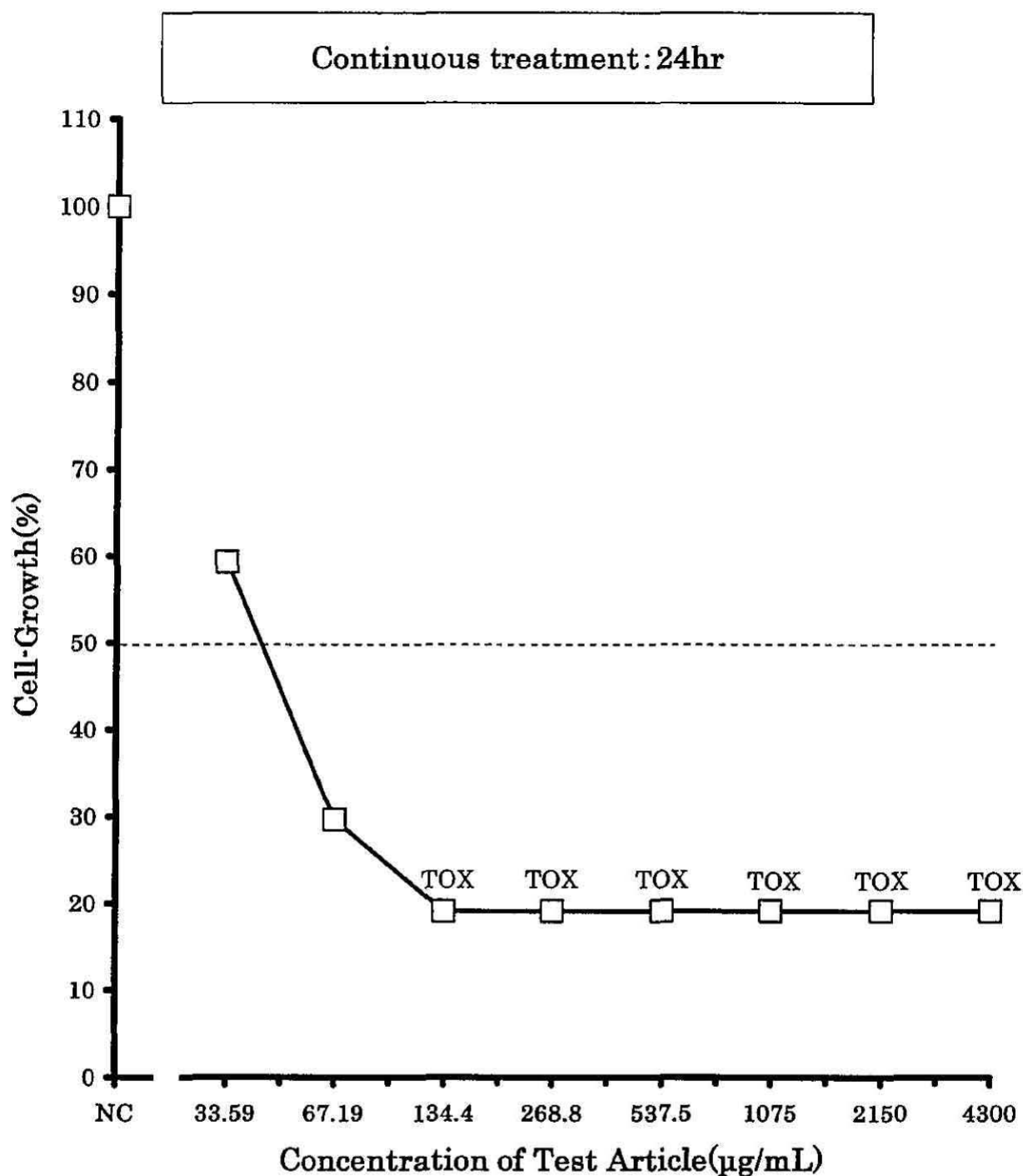


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin

NC: Negative control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

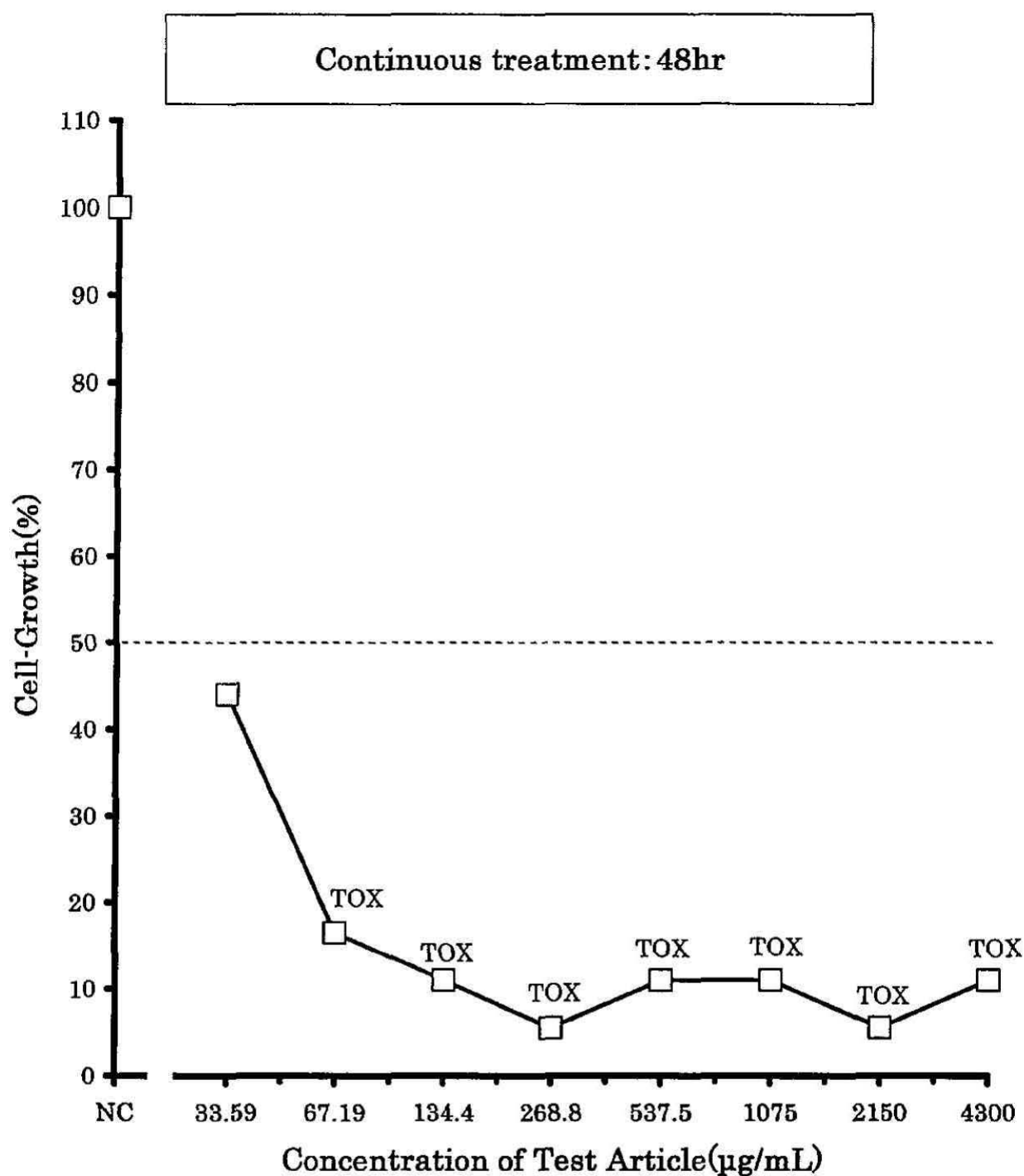


Fig.1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin

NC: Negative control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

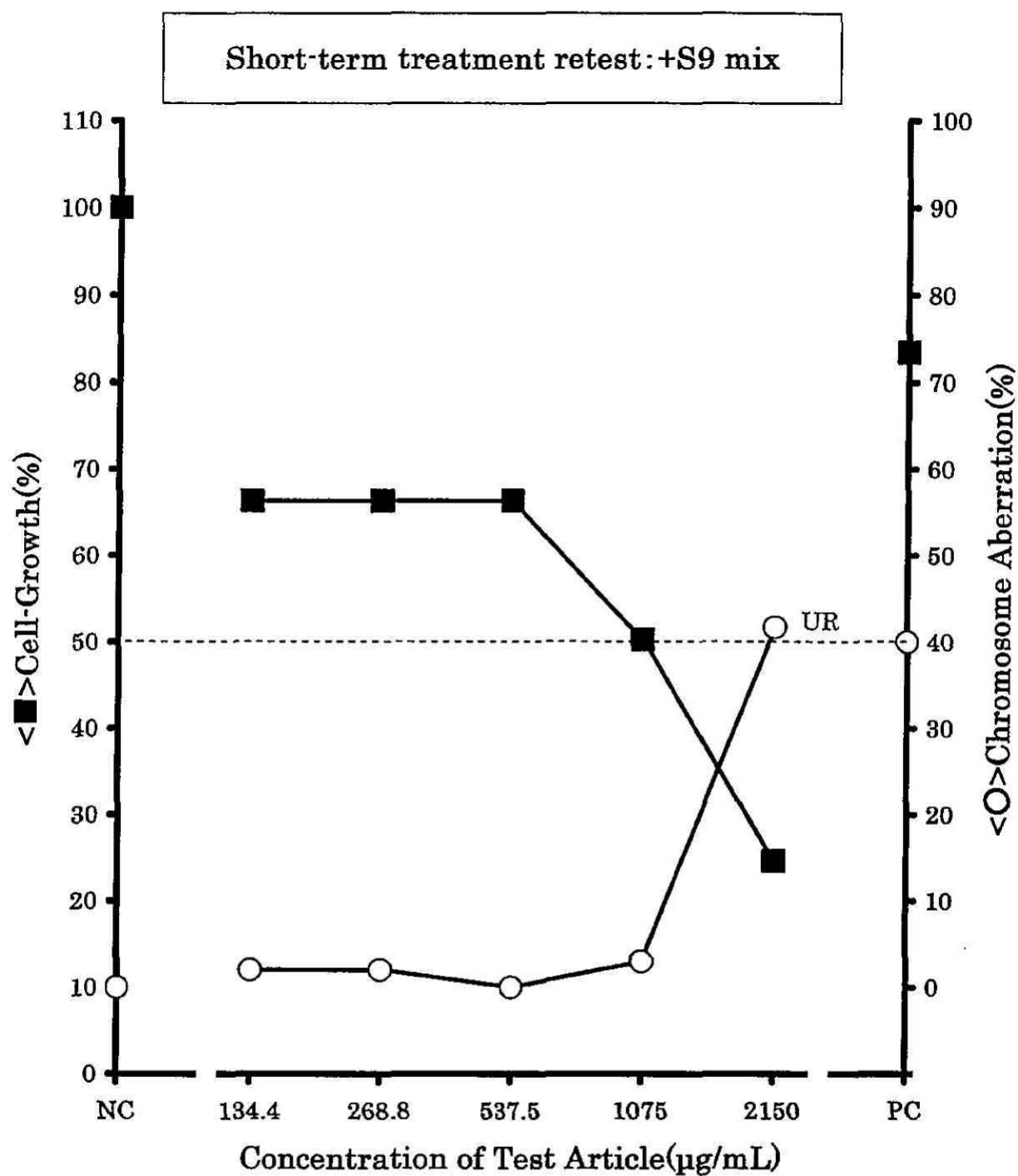


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin

NC: Negative control PC: Positive control

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

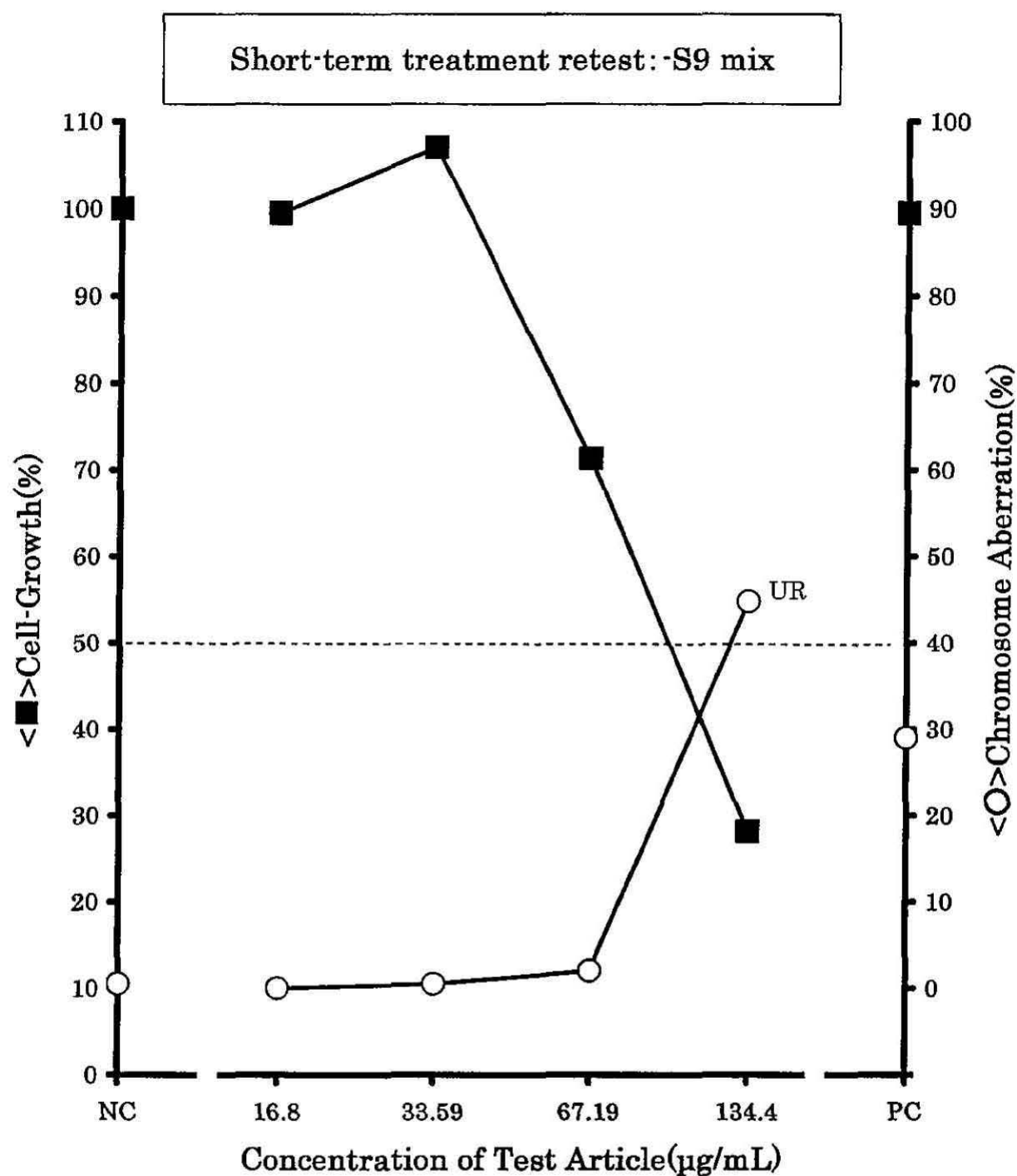


Fig.2-2 Results of the chromosome aberration test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin

NC: Negative control PC: Positive control

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

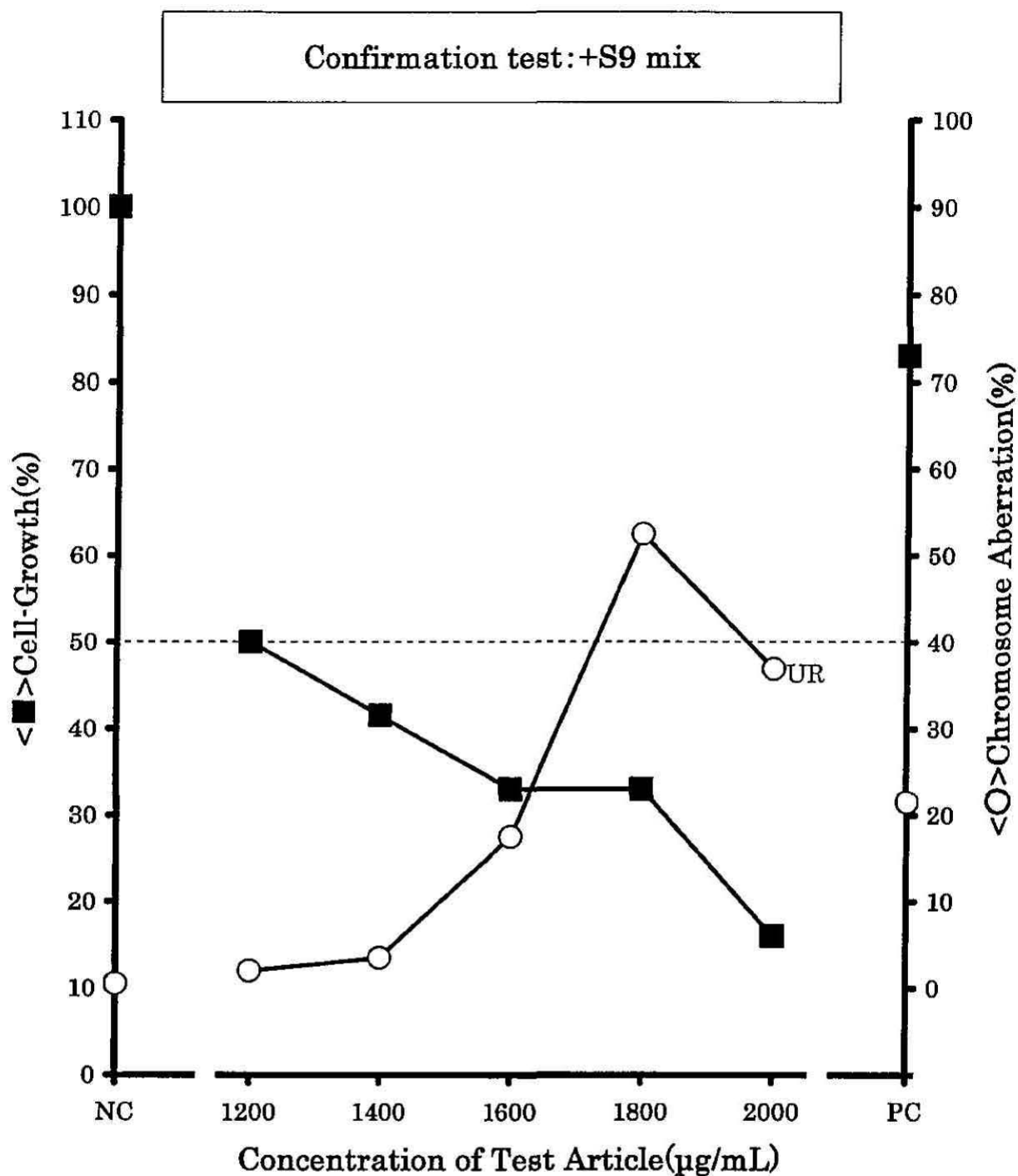


Fig.2-3 Results of the Confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin

NC: Negative control PC: Positive control

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

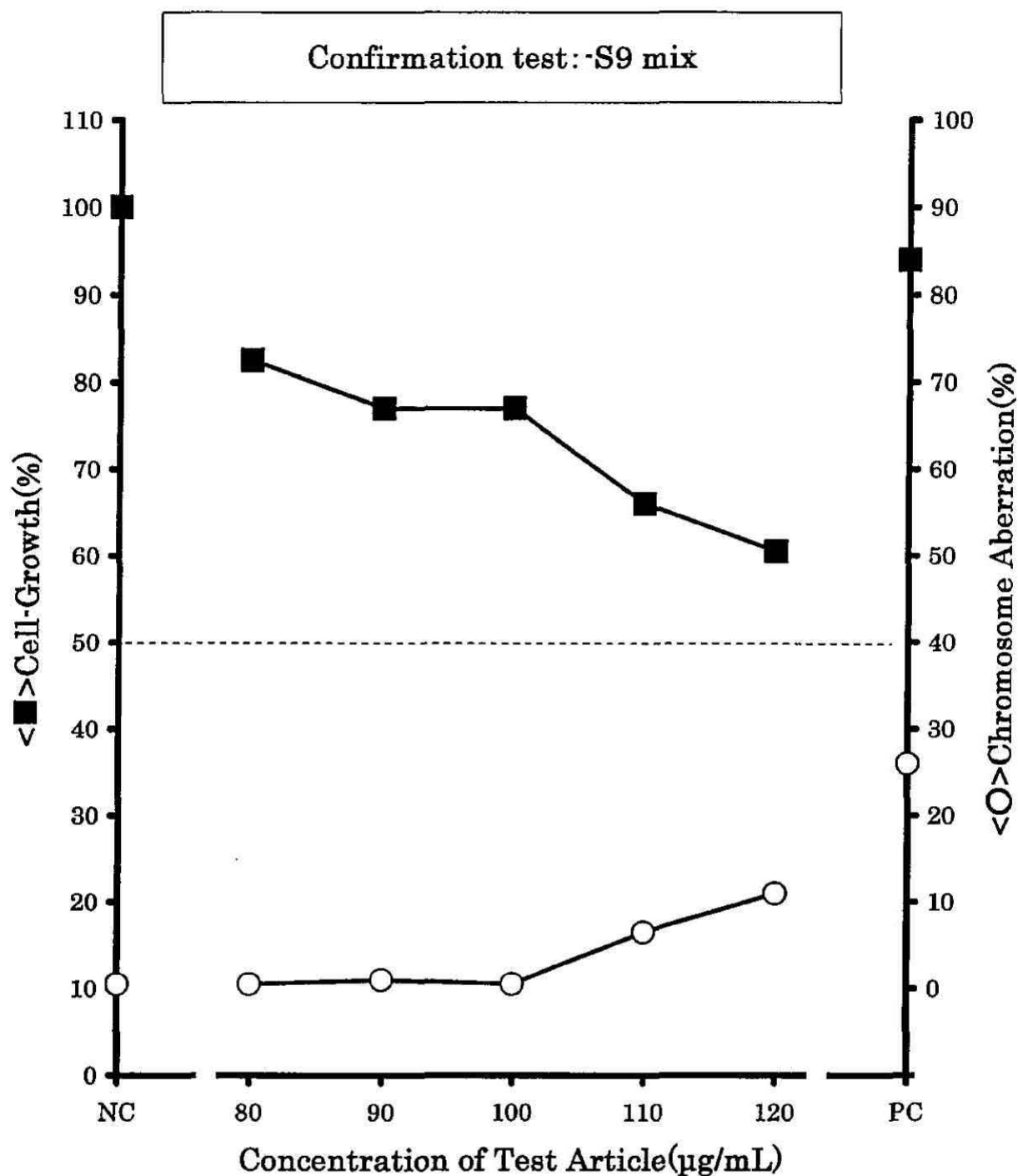


Fig.2-4 Results of the Confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin

NC: Negative control PC: Positive control

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[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(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			99		—	—	—	
		Test article	33.59	83	83	—	—	+
				83		—	—	+
			67.19	83	83	—	—	+
				83		—	—	+
			134.4	83	83	+	—	+
				83		+	—	+
			268.8	83	83	++	—	+
				83		++	—	+
			537.5	66	66	++	—	+
				66		++	—	+
			1075	49	49	+++	—	+
				49		+++	—	+
			2150	16	16	+++	—	+
				16		+++	—	+
			4300	0	0	+++	—	+
				0		+++	—	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					1043.4	µg/mL		

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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.

 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

 ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

 +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

 + : Presence of precipitates

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[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(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		33.59	99	99	++	—	+
			99		++	—	+
		67.19	79	69	++	—	+
			59		++	—	+
		134.4	39	39	+++	—	+
			39		+++	—	+
		268.8	19	19	+++	—	+
			19		+++	—	+
		537.5	19	19	+++	—	+
			19		+++	—	+
		1075	19	19	+++	—	+
			19		+++	—	+
		2150	19	19	TOX	—	+
			19		TOX	—	+
		4300	0	10	TOX	—	+
			19		TOX	—	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					109.8	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

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 Tetraphenyltin
[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(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			99		—	—	—	
		Test article	33.59	59	59	++	—	+
				59		++	—	+
			67.19	19	30	+++	—	+
				40		+++	—	+
			134.4	19	19	TOX	—	+
				19		TOX	—	+
			268.8	19	19	TOX	—	+
				19		TOX	—	+
			537.5	19	19	TOX	—	+
				19		TOX	—	+
			1075	19	19	TOX	—	+
				19		TOX	—	+
			2150	19	19	TOX	—	+
				19		TOX	—	+
			4300	19	19	TOX	—	+
				19		TOX	—	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					44.0	µg/mL		

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

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 Tetraphenyltin
[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(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			100		—	—	—	
		Test article	33.59	44	44	++	—	+
				44		++	—	+
			67.19	22	17	TOX	—	+
				11		TOX	—	+
			134.4	11	11	TOX	—	+
				11		TOX	—	+
			268.8	11	6	TOX	—	+
				0		TOX	—	+
			537.5	11	11	TOX	—	+
				11		TOX	—	+
			1075	11	11	TOX	—	+
				11		TOX	—	+
			2150	11	6	TOX	—	+
				0		TOX	—	+
			4300	11	11	TOX	—	+
				11		TOX	—	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition: below					33.59	µg/mL		

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[Short-term treatment retest: +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(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		134.4	66	66	—	—	+
			66		—	—	+
		268.8	66	66	—	—	+
			66		—	—	+
		537.5	66	66	+	—	+
			66		+	—	+
		1075	50	50	++	—	+
			50		++	—	+
		2150	33	25	+++	—	+
			16		+++	—	+
		PC	83	83	—	—	—
			83		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

Table 2-2 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[Short-term treatment retest: -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(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		16.80	99	99	—	—	+
			99		—	—	+
		33.59	99	107	+	—	+
			114		+	—	+
		67.19	85	71	++	—	+
			57		++	—	+
		134.4	28	28	+++	—	+
			28		+++	—	+
		PC	99	99	—	—	—
			99		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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

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

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

+

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+

Table 2-3 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[Confirmation test: +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(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		1200	50	50	++	—	+
			50		++	—	+
		1400	50	42	++	—	+
			33		++	—	+
		1600	33	33	++	—	+
			33		++	—	+
		1800	33	33	+++	—	+
			33		+++	—	+
		2000	16	16	+++	—	+
			16		+++	—	+
		PC	83	83	—	—	—
			83		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+

Table 2-4 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[Confirmation test:-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 ^{a)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{d)}
—	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		80.0	88	83	++	—	+
			77		++	—	+
			77	77	++	—	+
			77		++	—	+
		100.0	77	77	++	—	+
			77		++	—	+
		110.0	66	66	+++	—	+
			66		+++	—	+
		120.0	66	61	+++	—	+
			55		+++	—	+
		PC	100	94	—	—	—
			88		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[Short-term treatment retest: +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	NC	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	37-1 96-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		2150	48	0.0	UR	0	15	11	0	0	1	41.7	41.7	UR	73-1 73-2 10-1 10-2
			(8)	(0)		(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
			(14)	(0)		(0)	(3)	(4)	(0)	(0)	(1)	(6)	(6)		
			(10)	(0)		(0)	(5)	(3)	(0)	(0)	(0)	(6)	(6)		
			(16)	(0)		(0)	(4)	(4)	(0)	(0)	(0)	(5)	(5)		
		1075	200	0.5	—	2	3	4	0	0	0	3.0	4.0	—	34-1 32-1
			(100)	(1)		(1)	(2)	(2)	(0)	(0)	(0)	(3)	(4)		
			(100)	(0)		(1)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(3)	(4)		
		537.5	200	0.0	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	74-1 86-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		268.8	200	0.0	—	0	4	0	0	0	0	2.0	2.0	—	92-1 22-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(4)	(0)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)		
		134.4	200	0.5	—	0	2	2	0	0	0	2.0	2.0	—	05-1 49-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		PC	200	0.0	—	1	16	66	0	1	0	40.0	40.5	+	81-1 78-1
			(100)	(0)		(1)	(7)	(35)	(0)	(0)	(0)	(42)	(43)		
			(100)	(0)		(0)	(9)	(31)	(0)	(1)	(0)	(38)	(38)		

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 (DMSO)

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

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[Short-term treatment retest:--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	NC	200	0.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	30-1 08-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		134.4	58	0.0	UR	0	21	17	0	0	0	44.8	44.8	UR	66-1 66-2 64-1 64-2
			(11)	(0)		(0)	(2)	(3)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)		
			(16)	(0)		(0)	(7)	(6)	(0)	(0)	(0)	(9)	(9)		
			(16)	(0)		(0)	(6)	(5)	(0)	(0)	(0)	(6)	(6)		
			(15)	(0)		(0)	(6)	(3)	(0)	(0)	(0)	(7)	(7)		
		67.19	200	0.5	—	0	2	2	0	0	0	2.0	2.0	—	51-1 01-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
		33.59	200	0.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	39-1 29-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		16.80	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	65-1 07-1
			(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	11	48	0	0	0	29.0	29.0	+	87-1 95-1
			(100)	(0)		(0)	(6)	(25)	(0)	(0)	(0)	(31)	(31)		
			(100)	(0)		(0)	(5)	(23)	(0)	(0)	(0)	(27)	(27)		

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 (DMSO)

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

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[Confirmation test: +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	NC	200	0.0	—	1	1	0	0	0	0	0.5	1.0	—	083-1 055-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		2000	65	0.0	UR	0	17	19	0	0	1	36.9	36.9	UR	080-1 080-2 085-1 085-2
			(13)	(0)		(0)	(5)	(6)	(0)	(0)	(0)	(7)	(7)		
			(19)	(0)		(0)	(4)	(4)	(0)	(0)	(0)	(5)	(5)		
			(20)	(0)		(0)	(6)	(7)	(0)	(0)	(0)	(8)	(8)		
			(13)	(0)		(0)	(2)	(2)	(0)	(0)	(1)	(4)	(4)		
		1800	200	0.0	—	0	54	88	0	0	2	52.5	52.5	+	105-1 105-2 099-1 099-2
			(74)	(0)		(0)	(24)	(36)	(0)	(0)	(0)	(42)	(42)		
			(26)	(0)		(0)	(2)	(10)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)		
			(79)	(0)		(0)	(25)	(38)	(0)	(0)	(1)	(47)	(47)		
			(21)	(0)		(0)	(3)	(4)	(0)	(0)	(1)	(6)	(6)		
		1600	200	0.0	—	1	7	28	0	0	2	17.5	18.0	+	106-1 027-1
			(100)	(0)		(0)	(4)	(13)	(0)	(0)	(2)	(19)	(19)		
			(100)	(0)		(1)	(3)	(15)	(0)	(0)	(0)	(16)	(17)		
		1400	200	0.5	—	0	1	6	0	0	0	3.5	3.5	—	070-1 045-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(4)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)		
		1200	200	0.0	—	0	0	4	0	0	0	2.0	2.0	—	057-1 091-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(4)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	—	0	9	37	0	0	0	21.5	21.5	+	016-1 009-1
			(100)	(0)		(0)	(4)	(22)	(0)	(0)	(0)	(24)	(24)		
			(100)	(0)		(0)	(5)	(15)	(0)	(0)	(0)	(19)	(19)		

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 (DMSO)

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

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Tetraphenyltin
[Confirmation test:-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	NC	200	0.5	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	033-1 102-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		120	200	1.0	—	2	5	19	0	0	0	11.0	12.0	+	021-1 103-1
			(100)	(1)		(2)	(1)	(9)	(0)	(0)	(0)	(10)	(12)		
			(100)	(1)		(0)	(4)	(10)	(0)	(0)	(0)	(12)	(12)		
		110	200	0.0	—	0	2	11	0	0	0	6.5	6.5	±	017-1 059-1
			(100)	(0)		(0)	(2)	(2)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(9)	(0)	(0)	(0)	(9)	(9)		
		100	200	2.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	024-1 071-1
			(100)	(2)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		90	200	1.0	—	0	0	2	0	0	0	1.0	1.0	—	100-1 067-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		80	200	2.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	104-1 101-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(3)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	—	0	9	45	0	0	0	26.0	26.0	+	040-1 043-1
			(100)	(0)		(0)	(4)	(24)	(0)	(0)	(0)	(27)	(27)		
			(100)	(0)		(0)	(5)	(21)	(0)	(0)	(0)	(25)	(25)		

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 (DMSO)

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