

最終報告書

表 題：ペルフルオロヘキサデカン酸のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR06203

株式会社 化合物安全性研究所

目次

	頁
表紙	1
目次	4
要約	7
緒言	8
材料および方法	8
成績	17
考察	19
参考文献	21

Tables and Figure

Table 1	Effects of perfluorohexadecanoic acid on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR06203)	23
Figure 1	Effects of perfluorohexadecanoic acid on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR06203)	24
Table 2	Effects of perfluorohexadecanoic acid on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR06203)	25
Table 3-1	Results of the chromosomal aberration test of perfluorohexadecanoic acid (6 hours treatment without metabolic activation) (SR06203)	26
Table 3-2	Results of the chromosomal aberration test of perfluorohexadecanoic acid (6 hours treatment with metabolic activation) (SR06203)	27
Table 3-3	Results of the chromosomal aberration test of perfluorohexadecanoic acid (24 hours treatment without metabolic activation) (SR06203)	28

要 約

ペルフルオロヘキサデカン酸の *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて検討した。試験は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の24-0 h処理による場合の3系列で実施した。

予備試験(細胞増殖抑制試験：19.5～5000 µg/mL)の結果、各試験系列で50%を超える細胞増殖抑制が認められた。IC₅₀ 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が454 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が1013 µg/mL および連続処理法の24-0 h処理による場合が377 µg/mLであった。被験物質の析出が、試験液処理開始時では各試験系列の1250 µg/mL以上の用量で、処理終了時では各試験系列の78.1 µg/mL以上の用量あるいは1250 µg/mL以上の用量で観察された。被験物質による培養液pHの低下が、試験液処理開始時において各試験系列の5000 µg/mLの用量で観察された。

本試験(染色体異常試験)は、予備試験の結果に基づき、各試験系列ともIC₅₀ 値より高用量を最高用量とした計6あるいは7用量を設定した。

本試験の結果、染色体の構造異常および数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：78.1～625 µg/mL)、短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：156～1250 µg/mL)および連続処理法の24-0 h処理による場合(評価用量：39.1～117 µg/mL)のいずれの用量においても5%未満であった。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、ペルフルオロヘキサデカン酸は、本試験条件において、ほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

緒 言

ペルフルオロヘキサデカン酸の *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討する目的で、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いる染色体異常試験を実施した。

材料および方法

1. 被験物質

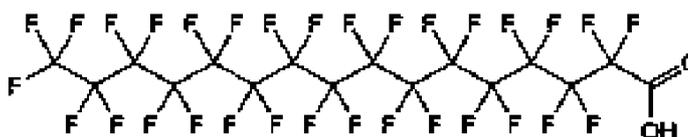
名称 : ペルフルオロヘキサデカン酸

英名 : Perfluorohexadecanoic acid

CAS No. : 67905-19-5

化審法官報公示整理番号 : 2-2658

構造式 :



分子式 : $C_{16}HF_{31}O_2$

分子量 : 814.13

物理化学的性質 : 外観 ; 固体、白色

融点 ; 154~155°C

沸点 ; 211°C/100mm

溶解性 ; 試験施設において、蒸留水、ジメチルスルホキシドおよびアセトンに対する溶解性を確認した。確認内容を、
2. 被験物質の調製(9頁)に記載した。

純度 : 97.3% (Appendix)

不純物の名称およびその濃度 : 不明(データなし)

入手量 : 25 g

安定性	；通常の条件下で安定
保存場所	：検体保存室および変異原性試験室
保存条件	：密閉、冷所(実測範囲；2～9℃)
保存期間	：2008年5月13日(受入)～2008年8月11日(最終使用日)
取扱上の注意	：粉塵除去フィルター付の呼吸保護具、手袋、密閉性の良い安全ゴーグルならびに保護着を着用した。
残余被験物質の処置	：焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

2. 被験物質の調製

試験施設における溶解性確認において、被験物質は蒸留水(日本薬局方注射用水、50 mg/mL の濃度まで検討)に懸濁し反応性はみられなかった。ジメチルスルホキシド(50 mg/mL の濃度まで検討)では反応性はみられなかったが、懸濁溶液に被験物質塊と泡が残り調製不可であった。アセトン(500 mg/mL の濃度まで検討)では、250 mg/mL の濃度で均一な懸濁状態が得られ反応性もみられなかったが、静置による被験物質の沈降が早かった。以上のことから、当該試験の溶媒として日本薬局方注射用水を選択した。

被験物質を精秤し、日本薬局方注射用水(ロット番号 7C95、株式会社大塚製薬工場)を用いて懸濁ならびに希釈し、所定の濃度に調製した。

予備試験では 50 mg/mL 調製液を調製し、50 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391 および 0.195 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では 12.5 mg/mL 調製液を調製し、12.5 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 6.25、3.13、1.56、0.781 および 0.391 mg/mL 調製液を調製した。また、12.5 mg/mL 調製液より 10.42、8.33、4.69、2.35 および 1.17 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、予備試験および本試験ともに調製後 1.2 時間以内に使用した。

調製はクリーンベンチ内で行い、調製に際しては粉塵除去フィルター付の呼吸保護具、手袋、密閉性の良い安全ゴーグルならびに保護着を着用した。残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体である日本薬局方注射用水(ロット番号 7C95、株式会社大塚製薬工場)を原液のまま使用した。

陰性対照物質は、プレート内の液に対し 10 vol% の割合で添加した。

4. 陽性対照物質

代謝活性化によらない場合の陽性対照物質として、マイトマイシン C(ロット番号 448ADJ、使用期限 2008 年 10 月、協和醗酵工業株式会社)を使用した。マイトマイシン C は、購入後室温で保存し、日本薬局方注射用水(ロット番号 7C95、株式会社大塚製薬工場)を用いて 5 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製した。購入したマイトマイシン C は、1 瓶中に日局マイトマイシン C を 2 mg(力価)含有しており、調製の際には 1 mg(力価)を 1 mg として換算した。

代謝活性化による場合の陽性対照物質として、ベンゾ[a]ピレン[ロット番号 KLM1182、使用期限 2009 年 8 月(購入より 5 年)、和光純薬工業株式会社]を使用した。ベンゾ[a]ピレンは、購入後冷所(2~8°C設定)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 TA026、株式会社同仁化学研究所)を用いて 1 mg/mL の濃度に調製した。なお、購入したベンゾ[a]ピレンの含量は 101.0%であった。

陽性対照物質の各調製液は-20°C以下で分注凍結保存し、調製後 12 ヶ月以内に試験に使用した(使用期限は調製後 1 年)。保存調製液は解凍後 0.6 時間以内に使用した。

陽性対照物質は、それぞれプレート内の液に対し 1 vol%の割合で添加した。

5. 試験系

試験系として、2005 年 5 月 17 日に大日本製薬株式会社より継代数 14 で入手した CHL/IU を使用した。CHL/IU は、雌性の新生チャイニーズハムスターの肺に由来し、染色体数(モード)は 25 本(2n=22)、倍加時間の測定値は 13.3 時間である。本細胞は、増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮して選択した。また、供試細胞と同時に凍結保存した細胞を用いて蛍光染色法によりマイコプラズマチェックを行い、陰性であることを確認した。

細胞の保存に際しては、10 vol%ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて 1×10^6 cells/mL 細胞浮遊液を調製し、1 mL ずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後、液体窒素内に保存した。解凍後は、75 cm^2 培養フラスコを用いて 5.0%CO₂、37.0°Cに設定した CO₂ インキュベーター(MCO-175、三洋電機株式会社)内で培養し、3 または 4 日毎に継代を行った。試験では、継代数 17(予備試験)あるいは 19(本試験)の細胞を使用した。

6. 培地

イーグル MEM 培地を以下の割合で混合し調製した。

イーグル MEM 培地(Code 05902、ロット番号 574709、日本製薬株式会社)9.4 g を日本薬局方注射用水(ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場)に溶解し、さらにフェノールレッド(ロット番号 PKF3307、和光純薬工業株式会社)6 mg を加え、全量を 1 L とした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの炭酸水素ナトリウム(試薬特級、

ロット番号 905X1946、関東化学株式会社) 溶液で pH7.2~7.4 に調整し、ろ過除菌した L-グルタミン溶液(試薬特級、L-グルタミン:ロット番号 LTP5417、和光純薬工業株式会社)を 0.292 g/L となるように添加した。さらに牛胎児血清(ロット番号 1361699、GIBCO)を最終調製量の 10%になるように加えた。なお、牛胎児血清は 56℃で 30 分間非働化した後に使用した。

7. S9 mix

S9 mix はキッコーマン株式会社より購入し(ロット番号 CAM-572、2008 年 2 月 22 日製造)、-80℃以下で凍結保存したものを、製造日より 6 ヶ月以内(使用期限:製造後 6 ヶ月)に使用した。

S9 mix は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製した S9 1.05 mL に、コファクターミックス 2.45 mL を加え、次表の組成に調製されたものである。

S9 mix 1 mL 中の組成		
S9	(キッコーマン株式会社製 RAA-572、S9 中蛋白含量 24.86 mg/mL)	0.3 mL
MgCl ₂	(和光純薬工業株式会社 SDN0075)	5 μmol /0.1 mL
KCl	(和光純薬工業株式会社 WKQ3733)	33 μmol /0.1 mL
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 118703)	5 μmol /0.1 mL
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 045714)	4 μmol /0.1 mL
HEPES 緩衝液	(株式会社同仁化学研究所 PE026)	4 μmol /0.2 mL
蒸留水		0.1 mL

8. 試験方法

(1) 予備試験(細胞増殖抑制試験)

1) 試験群

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列について実施した。

被験物質の最高用量を 5000 μg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 9 用量(5000、2500、1250、625、313、156、78.1、39.1 および 19.5 μg/mL)の試験群を設定した。更に、試験系列毎に陰性対照群を設定した。

各群につき 2 枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

直径 60 mm の培養プレートに、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 0.4×10^4 cells/mL、短時間処理法の代謝活性

化による場合では 0.6×10^4 cells/mL の細胞浮遊液をそれぞれ 5 mL ずつ播種し、5.0% CO_2 、37.0°C に設定した CO_2 インキュベーター内で培養した。

3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 2.7 mL に対して試験液を 300 μL の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、S9 mix 0.5 mL および培養液 2.2 mL の混和液に対し試験液を 300 μL の割合で試験チューブ内で混合し (S9 の最終濃度約 5 vol%)、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

5) 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 4.5 mL に対して試験液を 500 μL の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 5 mL をプレートに添加した。更に、24 時間培養した。

6) 被験物質の析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、被験物質による培養液 pH への影響は無いものと判断した。培養液色の変化が認められた場合には、pH 試験紙 (東洋濾紙株式会社) で培養液の pH を確認した。

8) 細胞増殖率の測定および 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) の算出

培養終了後、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、10%ホルマリンで約 10~15 分間固定した後、0.1 w/v% クリスタルバイオレットで約 10~15 分間の染色を行った。染色後、水道水を入れた水槽内でプレートを洗浄して風乾させた。対照群のプレートを 100% として、各プレートの細胞増殖率を単層培養細胞密度測定装置 (MONOCELLATER II、東洋測器株式会社) で測定した。細胞増殖率が 50% 以下まで低下した場合には、用量を対数化した回帰計算により 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) を算出した。

(2) 本試験

1) 試験群

予備試験の結果、各試験系列で 50%を超える細胞増殖抑制がみられたことから、各試験系列とも IC_{50} 値より高用量を最高用量とした計 6 あるいは 7 用量を設定した。

陽性対照群を除く各群には被験物質の細胞増殖への影響を確認するためのサテライト群 2 枚を加えた 4 枚のプレートを使用し、陽性対照群では 2 枚のプレートを使用した。各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

8. 試験方法、(1)予備試験、2)細胞の播種と同様の方法で実施した。

3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

8. 試験方法、(1)予備試験、3)短時間処理法の代謝活性化によらない場合と同様の方法で実施した。

4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

8. 試験方法、(1)予備試験、4)短時間処理法の代謝活性化による場合と同様の方法で実施した。

5) 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

8. 試験方法、(1)予備試験、5)連続処理法の 24-0 h 処理による場合と同様の方法で実施した。

6) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、6)被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、7)被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認と同様の方法で実施した。

8) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1)予備試験、8)細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) の算出と同様の方法で実施した。 IC_{50} は算出しなかった。

9) 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前に、各プレートに最終濃度 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のコルセミド(ロット番号 414710、GIBCO)を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを 0.02% EDTA-0.25%トリプシン(0.5M EDTA:ロット番号 1390894、GIBCO、2.5%トリプシン:ロット番号 366711、GIBCO)で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を同上の遠沈管に回収して 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清

を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム（ロット番号 810X1990、関東化学株式会社）を加え、穏やかにピペティングを繰り返しながら常温で 30 分間放置し細胞を膨満化させた。氷冷したカルノア固定液（メタノール：酢酸=3：1、メタノール：ロット番号 906W1125、関東化学株式会社、酢酸：ロット番号 TSN6991、和光純薬工業株式会社）を加えて細胞を固定した後、1000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を 3 回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、一夜以上自然乾燥させた。各プレートより、2 枚の染色体標本を作製した。

各スライドは、2%ギムザ液（ギムザ液：ロット番号 LE158、和光純薬工業株式会社、インスタントリン酸緩衝液（pH7.2）：ロット番号 E639、株式会社 三菱化学ヤトロン）で 20 分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤（マリノール、ロット番号 0700901、武藤化学薬品株式会社）で封入した。

10) 染色体標本の観察

標本観察の前に各用量の各プレートにつき 1 枚の標本を選択してブラインド化した。なお、連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 78.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量の 1 プレートおよび 117 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量の 2 プレートでは、分裂中期細胞数が少なかったため各プレートにつき 2 枚の標本を選択した。

観察用量として、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では細胞増殖率が 50%未満で標本の観察が可能な最高用量を高用量とする 6 用量を選択し、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では観察可能な最高用量を高用量とする 3 用量を選択した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では 78.1、156、235、313、469 および 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 6 用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では 156、313、625、833、1042 および 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 6 用量を、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 39.1、78.1 および 117 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量を選択した。

総合倍率 600 倍の顕微鏡（BX51TF、オリンパス株式会社）で、1 枚あたり 100 個の分裂中期像を観察し、以下の分類に従って染色体異常の判定を行った。なお、連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 78.1 および 117 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では、観察可能な分裂中期細胞数を観察した。構造異常については 25 ± 2 本の染色体をもつものを観察対象とした。

①構造異常(structural aberration)

・染色体分体切断(ctb: chromatid break)

染色体分体のはっきりした不連続部分(切断部分)で、不連続部分が染色体分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色体分体の長軸線上から外れている場合に染色体分体切断として判定した。

- ・染色分体交換(cte: chromatid exchange)

染色分体の 2 ヶ所以上の切断部位が相互に交換(結合反応)しているものを染色分体交換として判定した。
- ・染色体切断(csb: chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色分体切断に準じた。
- ・染色体交換(cse: chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。
- ・その他(others)

その他の構造異常として、断片化(fragmentation)がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

②ギャップ(gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分(染色性が全くみられない部分)で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

③数的異常(numerical aberration)

- ・倍数体(poly: polyploid)

染色体数(25±2)が倍加し、三倍体、四倍体等になったものを倍数体として判定した。
- ・その他(others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加(end: endoreduplication)と判定し、倍数体とは区別し計数した。

11) 観察結果の集計方法

プレート毎に以下の細胞出現数を求め、試験群毎にその合計値を算出した。更に、構造異常(1個の細胞に複数の構造異常がある場合にも、構造異常を有する細胞数は1として計数)および数的異常を有する細胞の total について、それぞれ出現率(%)を求めた。出現率(%)は、観察した細胞数(分裂中期像の数)に対する出現数の百分率で算出した。

①構造異常について

- ・ctb: 染色分体切断をもつ細胞数
- ・cte: 染色分体交換をもつ細胞数

- ・ csb: 染色体切断をもつ細胞数
- ・ cse: 染色体交換をもつ細胞数
- ・ others: その他の構造異常をもつ細胞数
- ・ total: 何らかの構造異常をもつ細胞数

②ギャップについて

- ・ gap: ギャップをもつ細胞数

③数的異常について

- ・ poly: 倍数体の細胞数
- ・ others: その他の数的異常をもつ細胞数
- ・ total: 何らかの数的異常をもつ細胞数

9. 試験結果の評価

構造異常または数的異常の total の出現率(%)が10%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは5%以上増加する結果について確認試験により再現性がみられる場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

なお、いずれの試験系列にも異常細胞の5%以上の出現はみられなかったことから、D₂₀値(細胞の20%に異常が認められる濃度)は算出しなかった。

成 績

1. 予備試験

細胞増殖率の結果を Table 1 および Figure 1 に、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 1 に示す。

各試験系列で 50% を超える細胞増殖抑制が認められた。IC₅₀ 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 454 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が 1013 µg/mL および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 377 µg/mL であった。

被験物質の析出が、試験液処理開始時では各試験系列の 1250 µg/mL 以上の用量で、処理終了時では短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 1250 µg/mL 以上の用量ならびに短時間処理法の代謝活性化による場合の 78.1 µg/mL 以上の用量で観察された。

被験物質による培養液 pH への影響では、pH の低下が各試験系列とも試験液処理開始時の 5000 µg/mL の用量で観察された。

2. 本試験

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 2 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 3-1~3-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50% を超える細胞増殖抑制が、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の 469 µg/mL 以上の用量、短時間処理法の代謝活性化による場合の 1250 µg/mL の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 313 µg/mL 以上の用量で認められた。

被験物質の析出が、試験液処理開始時では短時間処理法の代謝活性化による場合の 1250 µg/mL の用量で、処理終了時では短時間処理法の代謝活性化による場合の 156 µg/mL 以上の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 625 µg/mL の用量で観察された。

被験物質による培養液 pH への影響は、いずれの試験系列にも観察されなかった。

染色体の構造異常および数異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：78.1~625 µg/mL)、短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：

156～1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)および連続処理法の 24-0 h 処理による場合(評価用量：39.1～117 $\mu\text{g}/\text{mL}$)のいずれの用量においても5%未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が30.0%、短時間処理法の代謝活性化による場合が39.5%および連続処理法の24-0 h 処理による場合が51.0%であった。

考 察

ペルフルオロヘキサデカン酸の *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて検討した。

予備試験(細胞増殖抑制試験)の結果に基づき、本試験(染色体異常試験)用量として、各試験系列とも IC₅₀ 値より高用量を最高用量とする計 6 あるいは 7 用量を設定した。

本試験の結果、染色体の構造異常ならびに数的異常の出現率は各試験系列のいずれの用量も 5%未満であり、結果は陰性であった。なお、評価最高用量は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では 50%以上の細胞増殖抑制がみられた用量であったが、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では細胞増殖抑制が 50%未満の評価可能な最高用量となった。しかし、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、評価最高用量と 50%以上の細胞増殖抑制がみられた用量との間は公比 1.33 あるいは 1.51 と小さな用量比で設定しており、評価可能な用量範囲における染色体異常誘発性は適切に評価されたものと考えられた。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、ペルフルオロヘキサデカン酸は、本試験条件において、ほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

当試験施設では当該試験の被験物質を含め 5 種類のペルフルオロカルボン酸(PFA)の染色体異常試験を実施しており、各被験物質の染色体異常誘発性と細胞毒性作用についての比較が可能である。試験対象とした PFA の炭素鎖は 10、11、13、15 および 17 で、それぞれペルフルオロウンデカン酸[CF₃(CF₂)₈CF₂COOH、試験番号：SR06173]、ペルフルオロドデカン酸[CF₃(CF₂)₉CF₂COOH、試験番号：SR06199]、ペルフルオロテトラデカン酸[CF₃(CF₂)₁₁CF₂COOH、試験番号：SR06201]、ペルフルオロヘキサデカン酸[CF₃(CF₂)₁₃CF₂COOH、試験番号：SR06203]およびペルフルオロオクタデカン酸[CF₃(CF₂)₁₅CF₂COOH、試験番号：SR06175]である。

各被験物質の細胞増殖抑制作用の IC₅₀ 値(予備試験結果)と染色体異常誘発性の結果を次頁の表に示す。

被験物質名	分子量	IC ₅₀ (μg/ml.) [染色体異常試験結果]		
		短時間処理(-)	短時間処理(+)	連続処理(24h)
ペルフルオロウンデカン酸	564.09	206 [構造+, 数的+]	235 [構造+, 数的+]	124 [-]
ペルフルオロドデカン酸	614.10	242 [-]	277 [構造+, 数的+]	87.1 [-]
ペルフルオロテトラデカン酸	714.11	175 [-]	592 [-]	69.7 [-]
ペルフルオロヘキサデカン酸	814.13	454 [-]	1013 [-]	377 [-]
ペルフルオロオクタデカン酸*	914.15	3316 [-]	5000 < [数的±]	2800 [-]

*：生細胞数に基づく値ではなく他試験と同様に比色法による値を採用した。

細胞増殖抑制作用は、代謝活性化系の非存在下において、被験物質の炭素鎖と細胞増殖抑制作用の強さに一定の傾向が認められた。炭素鎖 13 のペルフルオロテトラデカン酸の細胞増殖抑制作用が最も強く、炭素鎖 13 未満では炭素鎖の延長に伴い細胞増殖抑制作用が強くなる傾向が、逆に炭素鎖が 13 を超える場合には炭素鎖の延長により細胞増殖抑制作用は弱くなる傾向が認められた。同様の結果が、ヒト結腸癌細胞(HCT116)を用いた炭素鎖 6～18 の PFA の細胞毒性の構造活性相関の検討において報告¹⁾されており、ペルフルオロテトラデカン酸で最も強い細胞増殖抑制作用が認められている。PFA の細胞毒性のメカニズムは明確にされていないが、炭素鎖 7～10 の PFA が Gap-junction 依存性細胞間情報伝達を阻害し、その作用が炭素鎖に依存すること²⁾、ペルフルオロテトラデカン酸の細胞毒性作用には直接のおよび物理的な膜変異メカニズムが推察されるとともに³⁾、ペルフルオロテトラデカン酸は内因性の細胞死(アポトーシス)を誘発させることが報告^{1),3)}されている。

当試験施設における染色体異常誘発性の検討において、陽性結果が炭素鎖 10 および 11 のペルフルオロウンデカン酸およびペルフルオロドデカン酸で認められた。いずれも細胞毒性が明確にみられた用量での結果であり、また、当試験施設で実施した復帰突然変異試験では陰性結果が得られており、これらの被験物質は特別注意すべき変異原性を有するものではないと考えられる。PFA の遺伝毒性に関する報告は、ほとんどが炭素鎖 8 のペルフルオクタン酸についてのものである。ヒト肝癌細胞(HepG2)を用いて活性酸素(ROS)の産生確認とコメットアッセイを行った報告⁴⁾では、ペルフルオクタン酸の処理により ROS の増加はみられるものの DNA 損傷性は認められず遺伝毒性は確認されておらず、また、ペルフルオクタン酸については遺伝毒性陰性結果が多いとの解説がなされている。

参考文献

- 1) Konrad Kleszczyński, Pawel Gardziclewski, Ewa Mulkiewicz, Piotr Stepnowski and Andrzej C. Skladanowski: Analysis of structure-cytotoxicity *in vitro* relationship (SAR) for perfluorinated carboxylic acids. *Toxicology in Vitro* 21, 1206-1211 (2007)
- 2) Wenyuc Hu, Paul D. Jones, Brad L. Upham, James E Trosko, Christopher Lau and John P. Giesy: Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication by Perfluorinated Compounds in Rat Liver and Dolphin Kidney Epithelial Cell Lines *in vitro* and Sprague-Dawley Rats *in Vivo*. *TOXICOLOGICAL SCIENCE* 68, 429-436 (2002)
- 3) Konrad Kleszczyński, Piotr Stepnowski and Andrzej C. Skladanowski: Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids II. Disruption of mitochondrial bioenergetics. *Toxicology and Applied Pharmacology* 235, 182-190 (2009)
- 4) Kirsten Thorup Eriksen, Ole Raaschou-Nielsen, Mette Sorensen, Martin Roursgaard, Steffen Loft and Peter Moller: Genotoxic potential of the perfluorinated chemicals PFOA, PFOS, PFBS, PFNA, and PFHxA in human HepG2 cells. *Mutation Research* 700, 39-43 (2010)

Table 1 Effects of perfluorohexadecanoic acid on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR06203)

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Perfluorohexadecanoic acid	19.5	108 , 96 (102.0)	98 , 96 (97.0)	97 , 101 (99.0)
	39.1	104 , 101 (102.5)	98 , 95 (96.5)	94 , 103 (98.5)
	78.1	100 , 99 (99.5)	92 ⁺ , 91 ⁺ (91.5)	88 , 92 (90.0)
	156	89 , 88 (88.5)	87 ⁺ , 86 ⁺ (86.5)	62 , 71 (66.5)
	313	56 , 58 (57.0)	83 ⁺ , 81 ⁺ (82.0)	48 , 55 (51.5)
	625	45 , 37 (41.0)	71 ⁺ , 75 ⁺ (73.0)	43 ⁻ , 40 ⁺ (41.5)
	1250	43 [#] , 47 [#] (45.0)	39 [#] , 41 [#] (40.0)	36 [#] , 39 [#] (37.5)
	2500	38 [#] , 36 [#] (37.0)	31 [#] , 37 [#] (34.0)	39 [#] , 45 [#] (42.0)
	5000	50 ^{# *} , 47 ^{# *} (48.5)	41 ^{# *} , 41 ^{# *} (41.0)	44 ^{# *} , 46 ^{# *} (45.0)
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		454	1013	377

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

[#] : Precipitation at the beginning and end of treatment

⁺ : Precipitation at the end of treatment

^{*} : Decrease of pH in culture medium at the beginning of treatment

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

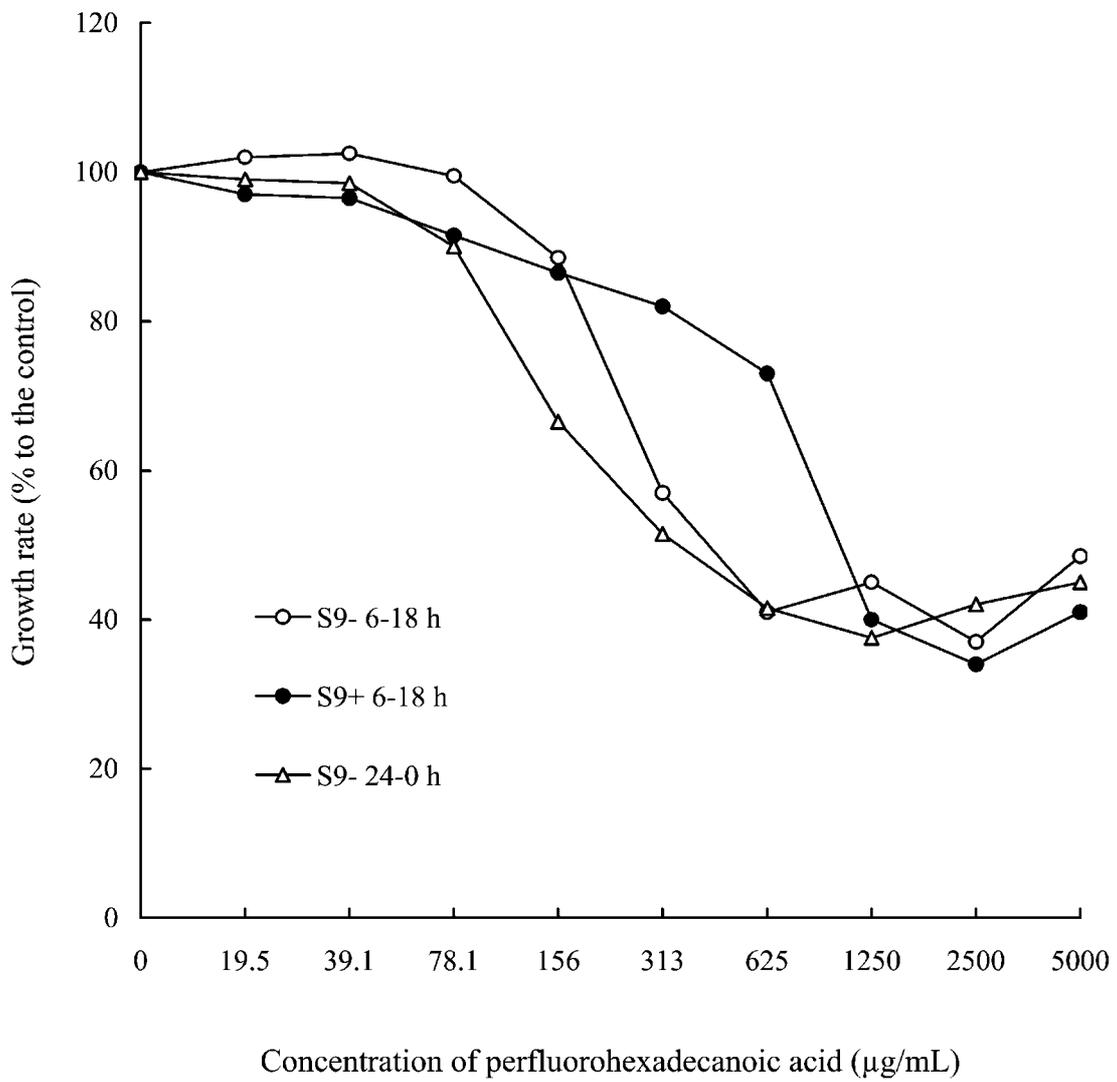


Figure 1 Effects of perfluorohexadecanoic acid on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR06203)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of perfluorohexadecanoic acid on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR06203)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Perfluorohexadecanoic acid	39.1	-	-	101 , 92 (96.5)
	78.1	98 , 89 (93.5)	-	87 , 81 (84.0)
	117	-	-	72 , 64 (68.0)
	156	82 , 82 (82.0)	81 ⁺ , 82 ⁺ (81.5)	71 , 67 (69.0)
	235	70 , 67 (68.5)	-	52 , 50 (51.0)
	313	54 , 55 (54.5)	82 ⁺ , 79 ⁺ (80.5)	47 , 43 (45.0)
	469	44 , 34 (39.0)	-	-
	625	45 , 41 (43.0)	70 ⁺ , 71 ⁺ (70.5)	39 ⁻ , 38 ⁺ (38.5)
	833	-	73 ⁺ , 73 ⁺ (73.0)	-
	1042	-	60 ⁺ , 64 ⁺ (62.0)	-
1250	-	42 [#] , 39 [#] (40.5)	-	

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

[#] : Precipitation at the beginning and end of treatment

⁺ : Precipitation at the end of treatment

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

- : Blank

Table 3-1 Results of the chromosomal aberration test of perfluorohexadecanoic acid (6 hours treatment without metabolic activation) (SR06203)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	-	Control ^b	—	100.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-
					100	2	0	0	0	0	2	0	1	0	1	
					200	3	0	0	0	3 (1.5)	0	2	0	2 (1.0)		
		Perfluorohexa- decanoic acid	78.1	93.5	100	1	2	0	0	0	3	0	1	0	1	-
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0		
					200	2	2	0	0	0	4 (2.0)	0	1	0	1 (0.5)	
			156	82.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0		
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)	
		235	68.5	100	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0		
				100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
				200	3	0	0	0	0	3 (1.5)	0	1	0	1 (0.5)		
		313	54.5	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1		
				100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2		
				200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	3	0	3 (1.5)		
		469	39.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1		
				100	2	0	0	0	0	2	0	3	0	3		
				200	3	0	0	0	0	3 (1.5)	0	4	0	4 (2.0)		
		625	43.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1		
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
				200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)		
Mitomycin C	0.1	/	100	9	18	0	0	0	27	0	0	0	0	+		
			100	3	30	0	1	0	33	0	0	0	0			
			200	12	48	0	1	0	60 (30.0)	0	0	0	0 (0.0)			

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Water for injection (Japanese pharmacopocia)

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

Table 3-2 Results of the chromosomal aberration test of perfluorohexadecanoic acid (6 hours treatment with metabolic activation) (SR06203)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	+	Control ^b	—	100.0	100	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	-
					100	0	1	0	0	0	1	0	1	2		
					200	1	1	1	0	0	2 (1.0)	0	1	2 (1.0)		
		Perfluorohexa- decanoic acid	156	81.5	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	1 (0.5)		
			313	80.5	100	2	0	0	0	0	2	0	1	0	1	
					100	1	0	0	0	0	1	0	3	0	3	
					200	3	0	0	0	0	3 (1.5)	0	4	4 (2.0)		
			625	70.5	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	1 (0.5)		
		833	73.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
				100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1		
				200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	2	2 (1.0)			
		1042	62.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
				100	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0		
				200	3	0	0	0	0	3 (1.5)	0	1	1 (0.5)			
		1250	40.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
				100	3	0	0	0	0	3	0	2	0	2		
				200	3	0	0	0	0	3 (1.5)	0	2	3 (1.5)			
Benzo[a]pyrene	10	/	100	8	29	0	0	0	36	0	0	0	0	+		
			100	11	34	1	1	0	43	0	0	0				
			200	19	63	1	1	0	79 (39.5)	0	0	0 (0.0)				

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of perfluorohexadecanoic acid (24 hours treatment without metabolic activation) (SR06203)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
24-0	-	Control ^b	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					200	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)		
		Perfluorohexadecanoic acid	39.1	96.5	100	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	-
					100	2	1	0	0	0	2	0	1	0	1		
					200	4	1	0	0	0	4 (2.0)	0	1	0	1 (0.5)		
			78.1	84.0	100	2	0	0	0	0	2	0	2	0	2		
					83	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
					82	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
			117	68.0	265	3	0	0	0	0	3 (1.1)	0	3	0	3 (1.1)		
					41	2	0	0	0	0	2	0	1	0	1		
					64	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1		
		156	69.0	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
				84	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
				289	5	0	0	0	0	5 (1.7)	0	2	0	2 (0.7)			
		235	51.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		313	45.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		625	38.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Mitomycin C	0.05	/	100	12	47	0	0	0	0	56	0	0	0	0	+		
			100	6	42	0	1	0	46	0	2	0	2				
			200	18	89	0	1	0	102 (51.0)	0	2	0	2 (1.0)				

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank