

厚生省生活衛生局 殿

## 試 験 報 告 書

フタリミドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 7L633)

株式会社三菱化学安全科学研究所

## 目 次

要約	7
材料および方法	8
1. 試験物質	8
2. 細胞	8
3. 培地	9
4. S9 mix	9
5. 試験物質調製液	10
6. 細胞増殖抑制試験	10
7. 染色体異常試験	11
結果	13
考察および結論	14
参考文献	14
表	15
図	19

## 要 約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、フタリミドの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理法の24, 48時間処理で2356, 2540  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法のS9 mix 共存下、非共存下で4524, 991  $\mu\text{g/ml}$ であった。従って、染色体異常試験は、5000  $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、連続処理法の24, 48時間処理および短時間処理法のS9 mix 共存下では、その1/2, 1/4および1/8の4濃度、短時間処理法のS9 mix 非共存下では、その1/2, 1/4, 1/8および1/16の5濃度で実施した。その結果、染色体構造異常細胞の出現頻度は短時間処理法のS9 mix 共存下において5000  $\mu\text{g/ml}$ では10.0%、2500  $\mu\text{g/ml}$ では6.0%であった。その他の処理条件では、染色体構造異常細胞の誘発は観察されなかった。また、数的異常細胞の誘発は全ての処理条件で観察されなかった。

以上の結果から、本試験条件下におけるフタリミドのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した。

## 材料および方法

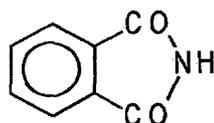
### 1. 試験物質

#### 1.1 被験物質

から提供されたフタリミド(CAS 番号：85-41-6, ロット番号：純度：99.9%)は使用時まで冷暗所に密閉保存した。被験物質は下記の構造式および分子量を有する水に 0.5 g/l (20℃) で溶解の白色粉末である。

被験物質の安定性は、被験物質供給者より安定性を保証する資料を入手し、確認した。

構造式：



分子量：147.13

不純物：なし

#### 1.2 対照物質

##### 1) 陰性対照物質

カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na と略す。ナカライテスク㈱, ロット番号：M5F8130)

##### 2) 陽性対照物質

###### (1) 連続処理法

マイトマイシン C (MMC と略す。協和醗酵工業㈱, ロット番号：139AFK, 含量 104%)

###### (2) 短時間処理法

ベンゾ[a]ピレン (BP と略す。東京化成工業㈱, ロット番号：AX01, 含量 99.5%)

### 2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を使用した。細胞は大日本製薬㈱より 1996 年 11 月 6 日に購入し、細胞懸濁液に対し 10% の割合でジメチルスルホキシド (DMSO と略す) を添加したものを 1 ml に小分けして、液体窒素中で凍結保存した。試験には、これを融解して培養し、その後の継代数が 5 代以内のものを使用した。細胞の培養には、プラスチックシャーレ (直径 6 cm または 10 cm ; Becton

Dickinson and Company) を用い、炭酸ガス細胞培養装置内 (NAPCO 社, 7300 型, 炭酸ガス 5 %, 温度 37 °C, 加湿) で培養した。

### 3. 培地

#### 3.1 イーグル最少培地

イーグル最少培地 (MEM と略す。イーグル MEM 培地「ニッスイ」①, 日水製薬 (株) を添付の処方に従い調製し, オートクレーブ滅菌 (121 °C, 15 分間) を行った。この 1 l に, 別に滅菌処理した 2.92 % L- グルタミン水溶液 10 ml と 10 % 炭酸水素ナトリウム水溶液 12.7 ml を添加した。

#### 3.2 培養液

上記の MEM 900 ml に対して, 非働化 (56 °C, 30 分間加熱処理) した仔牛血清 (GIBCO BRL, ロット番号: 39K0464) を 100 ml 添加した。

### 4. S9 mix

#### 4.1 S9

フェノバルビタール (1 日目 30 mg/kg, 2 日目以降 60 mg/kg を 3 日間 1 日 1 回腹腔内投与) と 5, 6- ベンゾフラボン (3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与) で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9 (キッコーマン (株), ロット番号: RAA-374, 1997 年 12 月 4 日製造) を購入した。購入した S9 は使用時まで -80 °C 以下で保存した。

#### 4.2 S9 mix

S9 mix 10 ml あたり以下の組成で用時調製し, 使用時まで氷中に保存した。

D- グルコース 6- リン酸	14.1 mg
$\beta$ -NADP <sup>+</sup>	33.5 mg
(以上, 用時秤量)	
20 mM HEPES (pH 7.2)	2 ml
50 mM 塩化マグネシウム六水和物	1 ml
330 mM 塩化カリウム	1 ml
精製水	3 ml
(以上, 予め滅菌調製した溶液を添加)	
S9	3 ml

## 5. 試験物質調製液

### 5.1 被験物質溶液

溶媒検討の結果、本被験物質は、局方生理食塩液には50 mg/ml, DMSO には1000 mg/ml, アセトン 500 mg/ml でそれぞれ不溶であった。1% CMC-Na 水溶液には50 mg/ml でほぼ均一に懸濁した。これらの結果から、本被験物質の溶媒は1% CMC-Na 水溶液を用いた。

被験物質を1% CMC-Na 水溶液で所定濃度に用時懸濁した。これを同じ溶媒を用いて希釈し、所定濃度の被験物質溶液を調製した。

### 5.2 陽性対照溶液

MMC は、局方生理食塩液（㈱大塚製薬工場，ロット番号：K7F75）で3  $\mu\text{g/ml}$  に用時調製した。BP は、DMSO（関東化学㈱，ロット番号：810S1814）で4 mg/ml に溶解し、凍結保存したものを室温で融解し使用した。

## 6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の処理濃度を決定するために、細胞増殖抑制試験を実施した。

### 6.1 被験物質濃度

細胞増殖抑制試験に先立ち、連続処理法の24, 48時間処理および短時間処理法のS9 mix 共存下で、5000, 500, 50  $\mu\text{g/ml}$  の3濃度で予備試験を実施した。この試験では、1濃度あたり1枚のシャーレを用い、処理24または48時間後に位相差倒立顕微鏡により細胞の状態を肉眼的に観察した。

その結果、陰性対照群を100%としたときの細胞生存率は、いずれの処理条件においても5000  $\mu\text{g/ml}$  では10~20%，500および50  $\mu\text{g/ml}$  では100%であった。

以上の結果から、細胞増殖抑制試験は、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても5000, 4000, 3000, 2000, 1000および500  $\mu\text{g/ml}$  の6濃度を設定した。

### 6.2 細胞処理

$4 \times 10^3$  個/ml の細胞懸濁液を6 cm シャーレに5 ml 播き、3日間培養した。

シャーレから培養液を除去した後、連続処理法では、被験物質溶液0.5 ml, 培養液4.5 ml を添加し、24または48時間細胞を処理した。

短時間処理法のS9 mix 共存下では、被験物質溶液0.3 ml, S9 mix 0.5 ml, 培養液2.2 ml で、また、S9 mix 非共存下では、被験物質溶液0.3 ml, 培養液2.7 ml で6時

間細胞を処理した後、MEMで3回洗浄し、新しい培養液5 mlでさらに18時間処理した。

陰性対照として、溶媒も各条件で同様に処理した。

各濃度あたり2枚のシャーレを用いた。

### 6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面をCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>フリーのリン酸緩衝液(PBS(-))と略す。ダルベッコPBS「ニッスイ」、日水製薬(株)で洗浄後、メタノールで10分間固定し、3%ギムザ液(1/150 Mリン酸緩衝液、pH 6.8、で希釈)で10分間染色した後、軽く水洗し、乾燥した。染色した各シャーレについて、単層培養細胞密度計(モノセレーター、オリンパス光学工業(株))を用いて細胞増殖率を測定した。

### 6.4 50%細胞増殖抑制濃度(IC<sub>50</sub>)の算出

連続処理法および短時間処理法のそれぞれについて、陰性対照値を100%として生存曲線を作成し、被験物質の50%細胞増殖抑制濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した。なお、IC<sub>50</sub>は、プロビット法により算出した。

## 7. 染色体異常試験

### 7.1 試験物質濃度

細胞増殖抑制試験の結果は図1~2に示すごとく、IC<sub>50</sub>は連続処理法の24、48時間処理で2356、2540 μg/ml、短時間処理法のS9 mix 共存下、非共存下で4524、991 μg/mlであった。

この結果より、連続処理法の24、48時間処理および短時間処理法のS9 mix 共存下では5000 μg/mlを最高用量とし、その1/2、1/4および1/8の4濃度、短時間処理法のS9 mix 非共存下では5000 μg/mlを最高用量とし、1/2、1/4、1/8および1/16の5濃度で染色体異常試験を実施した。

陽性対照であるMMC、BPの濃度はそれぞれ、染色体異常誘発性が知られている0.03、20 μg/mlとした。

### 7.2 細胞処理

細胞を6.2と同様に処理した。

陽性対照については、連続処理法では、培養液5 ml、MMC溶液0.05mlで、短時間処理法のS9 mix 共存下では培養液2.5 ml、S9 mix 0.5 ml、BP溶液0.015mlで、

S9 mix 非共存下では培養液 3 ml, BP 溶液 0.015ml で同様に細胞を処理した。

### 7.3 標本作製

処理終了の 2 時間前に, コルセミドを最終濃度が 0.1  $\mu\text{g/ml}$  となるように各シャーレに加え, 分裂中期の細胞を蓄積させた。処理終了後, 細胞表面を PBS (-) で 1 回洗浄し, 0.25% トリプシン処理により細胞を剥離した後, 遠心分離 (1000 rpm, 5 分間; 以下同じ) により細胞を集めた。上清を除去し, これに 0.075 M 塩化カリウム溶液 4 ml を加えて低張処理 (37 $^{\circ}\text{C}$ , 15 分) を行った。次に, 冷却したメタノール・酢酸 (3:1) 混合液 4 ml を加え細胞を固定した後, 遠心分離し, 上清を除去した。さらに, 同固定液 4 ml を加え, 同様の操作を 2 ~ 3 回繰り返した。固定終了後, 少量の固定液で細胞を懸濁し, 濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラス上の 2 箇所水滴下し, 乾燥した。これを 3% ギムザ溶液で 20 分間染色し, 水洗, 乾燥後, 封入して観察標本とした。各シャーレにつき 2 枚の標本作製した。

### 7.4 観察

#### 1) 予備鏡検

標本作製後, 試験の適否確認のため予備鏡検を行った。

その結果, いずれの標本においても 1 枚のシャーレあたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため, 全ての標本を観察対象とした。

陰性対照および陽性対照については, 各々構造異常細胞の出現状態が適切であることを確認した。

#### 2) 分裂指数/分裂活性

予備鏡検時に, シャーレ 1 枚につき 1000 個, 1 濃度 2000 個の細胞中の分裂中期細胞を数え, 分裂指数を求めた。また, これから陰性対照と各処理群の分裂指数の比 (分裂活性) を算出した。

#### 3) 構造異常および数的異常

陰性対照群, 陽性対照群および被験物質処理群について, 構造異常および数的異常を盲検法で観察した。

##### (1) 構造異常

シャーレ 1 枚につき 100 個, 1 濃度 200 個の細胞を調べた。

染色体がよく広がった分裂中期細胞を観察し, 構造異常細胞を数えた。ただし, 構造異常がなく, 染色体数が  $25 \pm 2$  本でない細胞は除外した。異常の分類は以下

のとおりとした<sup>1)</sup>。

ギャップ	(染色分体型および染色体型を含む; gap と略す)
染色分体型切断	(ctb と略す)
染色分体型交換	(cte と略す)
染色体型切断	(csb と略す)
染色体型交換	(二動原体, 環状染色体など; cse と略す)
断片化	(frg と略す)

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分が染色分体の軸上にあり、その幅が染色分体の幅以上で著しく離れておらず、非染色部分の形状が明確なものとし、切断とは区別した。

## (2) 数的異常

シャーレ 1 枚につき 100 個、1 濃度 200 個の分裂中期細胞を調べ、核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

### 7.5 試験結果の判定基準

構造異常を 1 個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし、ギャップのみの異常をもつ細胞を除いた場合 (-gap) と含めた場合 (+gap) で集計した。

被験物質の染色体異常誘発性の判定は、+gap の構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に 5 % 未満を陰性 (-)，いずれか一方または両方が 5 % 以上 10 % 未満を疑陽性 (±)，いずれか一方または両方が 10 % 以上を陽性 (+) とした。

### 7.6 結果のまとめ

染色体構造異常をもつ細胞および数的異常細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度 (%) を表示するとともに、用量依存性について図示した。また、結果が陽性の場合には、D<sub>20</sub> 値 (分裂中期像の 20 % に異常を誘発させるために必要な被験物質濃度, mg/ml) を算出し、代表的な染色体異常像の写真を添付した。

## 結 果

結果を表 1 ~ 4 および図 3 ~ 6 に示す。

短時間処理法の S9 mix 共存下において構造異常の出現頻度が 5000  $\mu\text{g/ml}$  では 10.0 %，2500  $\mu\text{g/ml}$  では 6.0 %，また、その他の処理条件では 5 % 未満であった。また、いずれの処理条件においても被験物質による数的異常細胞の出現頻度は 5 % 未満

であった。本試験の結果から算出した  $D_{20}$  値は 10.5 mg/ml (短時間処理法の S9 mix 共存下) であった。

なお、陽性対照による染色体構造異常細胞の出現頻度は著しく増加した。

## 考 察 お よ び 結 論

フタリミドの染色体異常誘発性を検討するため、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。その結果、染色体構造異常の出現頻度は短時間処理法の S9 mix 共存下において 5000  $\mu\text{g/ml}$  では 10.0 %、2500  $\mu\text{g/ml}$  では 6.0 %、また、その他の処理条件では 5 % 未満であった。数的異常細胞の出現頻度は、連続処理法および短時間処理法のいずれも 5 % 未満であった。

一方、陰性対照および陽性対照では染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は期待通りの値を示し、本試験が技術的に成立していることが示された。

従って、フタリミドの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した。

なお、Agar 法によるマウスリンフォーマ試験において、類似化合物 (phthalimido の開環した物質,  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CONH}_2)_2$ , CAS 番号 : 88-96-0) は、S9 mix 共存下および非共存下の 50  $\mu\text{g/ml}$  (培養液中の溶解限界) で L5178Y (TK $\pm$ ) 細胞に対して遺伝子突然変異を誘発しないと報告されている<sup>2)</sup>。

## 参 考 文 献

- 1) 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会：“化学物質による染色体異常アトラス”  
朝倉書店，東京，1988
- 2) Douglas B. McGregor et al. “Responses of the L5178Y tk $^+$ /tk $^-$  Mouse Lymphoma Cell Forward Mutation Assay : III. 72 Coded Chemicals”, Environmental and Molecular Mutagenesis 12, 85-154, 1988

表1 染色体異常試験結果 (連続処理法)

被験物質名: フクリンD

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	観察的異常細胞数と出現頻度 (%)	判(2)定	染色体構造異常細胞 (1) の出現数と出現頻度 (%)						計	判(2)定	
						ギャップ	ctb	cte	csb	cse	frg			-gap
溶媒	24	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	1 (0.5)	-	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	-
[CMC-Na]	48	0	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	1 (0.5)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
被	24	625 *	100	0	-	1	0	1	0	0	0	1	1	-
			200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	-
験	24	1250 *	100	1	-	1	0	0	0	0	0	1	1	-
			200	1 (0.5)	-	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	-
物	24	2500 *	100	0	-	1	0	1	0	0	0	1	1	-
			200	0 (0.0)	-	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	6 (3.0)	-
質	48	5000 *◇	100	0	-	1	0	0	0	0	0	1	1	-
			200	0 (0.0)	-	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	5 (2.5)	-
質	48	625 *	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
質	48	1250 *	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
質	48	2500 *	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
質	48	5000 *◇	54	0	-	1	0	0	0	0	0	1	1	-
			50	0	-	1	0	0	0	0	0	1	1	-
陽性対照	24	0.03	104	0 (0.0)	-	2 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.9)	2 (1.9)	-
			100	0	-	8	12	2	0	0	0	22	22	-
[MMC]	48	0.03	100	0	-	6	23	2	0	0	29	29	-	
			200	0 (0.0)	-	14 (7.0)	35 (17.5)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	51 (25.5)	51 (25.5)	+
質	48	0.03	100	0	-	7	22	3	1	0	32	32	-	
			200	1 (0.5)	-	14 (7.0)	44 (22.0)	5 (2.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	60 (30.0)	61 (30.5)	+

1) gap: 染色体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色体型交換, cte: 染色体型交換, csb: 染色体型交換, cse: 染色体型交換, frg: 断片化  
 2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(+), 10%以上を陽性(+)とした。  
 CMC-Na: 1%カルボキシルメチルセルロースナトリウム水溶液 MMC: マイトマイシンC  
 ※: 被験物質処理開始時, 培養液中に沈殿した被験物質が認められた。  
 ◇: 被験物質処理開始時, 培養液中に浮遊した被験物質が認められた。

表 2 染色体異常試験結果 (短時間処理法)

被験物質名: 771311

処理	SS mix の有無	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	観察的異常細胞の出現率と出現頻度 (%)	染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%)						計	判定				
					ギャップ	ctb	ctf	cte	csb	cse			frg	-gap	+gap	
溶媒	-	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	-
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	4 (2.0)	-
			100	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	-
[CMC-Na]	+	0	100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	-	
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	-	
			100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
被	-	313 *	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-	
			100	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	2	-	
			100	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	2	-	
験	-	625 *	200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	3 (1.5)	-	
			100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-	
物	-	1250 *	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	3 (1.5)	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
質	+	625 *	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	4 (2.0)	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
質	-	1250 *	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	0 (0.0)	3 (1.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	5 (2.5)	-	
			100	0	5	8	2	0	0	0	0	0	9	9	-	
質	+	2500 *	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	0 (0.0)	6 (3.0)	10 (5.0)	10 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (6.0)	12 (6.0)	-	
			100	0	3	8	8	2	0	0	0	0	10	10	-	
質	-	5000 *	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			200	0 (0.0)	4 (2.0)	17 (8.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	20 (10.0)	20 (10.0)	-	
			100	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	-	
陽性対照	-	20	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	-	
			100	0	12	78	0	0	0	0	0	0	78	78	-	
[BP]	+	20	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0	12	73	0	0	0	0	0	0	0	77	78	-
			200	0 (0.0)	24 (12.0)	151 (75.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	155 (77.5)	156 (78.0)	-	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-

1) gap: 染色体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色体型交換, cte: 染色体型交換, csb: 染色体型交換, cse: 染色体型交換, frg: 断片化  
 2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした。  
 S9の用量(5%), 被験物質処理時間(6h), 被験物質処理後の細胞回復時間(1.8h)  
 CMC-Na: 1%カチオン化トリウム水溶液 BP: ベンゾ[a]ピレン  
 ※: 被験物質処理開始時, 培養液中に沈殿した被験物質が認められた。  
 ◇: 被験物質処理開始時, 培養液中に浮遊した被験物質が認められた。

表3 分裂指数 (連続処理法)

処理	処理時間 (h)	処理濃度 ( $\mu$ g/ml)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (CMC-Na)	24	0	2000	157	7.9	100
フタリミド	24	625	2000	137	6.9	87
	24	1250	2000	113	5.7	72
	24	2500	2000	92	4.6	59
	24	5000	2000	62	3.1	39
陽性対照 (MMC)	24	0.03	2000	53	2.7	34
陰性対照 (CMC-Na)	48	0	2000	159	8.0	100
フタリミド	48	625	2000	145	7.3	91
	48	1250	2000	86	4.3	54
	48	2500	2000	49	2.5	31
	48	5000	2000	18	0.9	11
陽性対照 (MMC)	48	0.03	2000	138	6.9	87

CMC-Na : 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

MMC : マイトマイシンC

表4 分裂指数 (短時間処理法)

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ( $\mu$ g/ml)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (CMC-Na)	-	0	2000	161	8.1	100
フタリミド	-	313	2000	132	6.6	82
	-	625	2000	166	8.3	103
	-	1250	2000	86	4.3	53
	-	2500	2000	97	4.9	60
	-	5000	2000	151	7.6	94
陽性対照 (BP)	-	20	2000	132	6.6	82
陰性対照 (CMC-Na)	+	0	2000	167	8.4	100
フタリミド	+	625	2000	170	8.5	102
	+	1250	2000	151	7.6	90
	+	2500	2000	128	6.4	77
	+	5000	2000	143	7.2	86
陽性対照 (BP)	+	20	2000	54	2.7	32

CMC-Na : 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

BP : ベンゾ[a]ピレン

図1 フタリミドの細胞毒性(連続処理法)

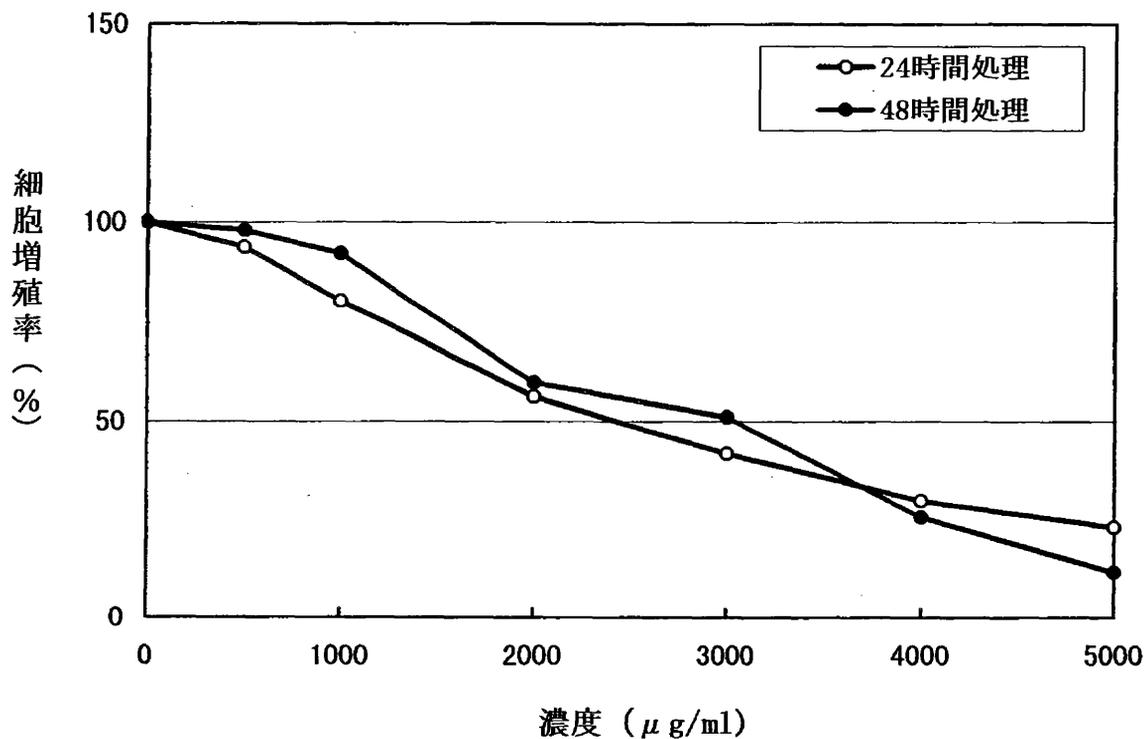
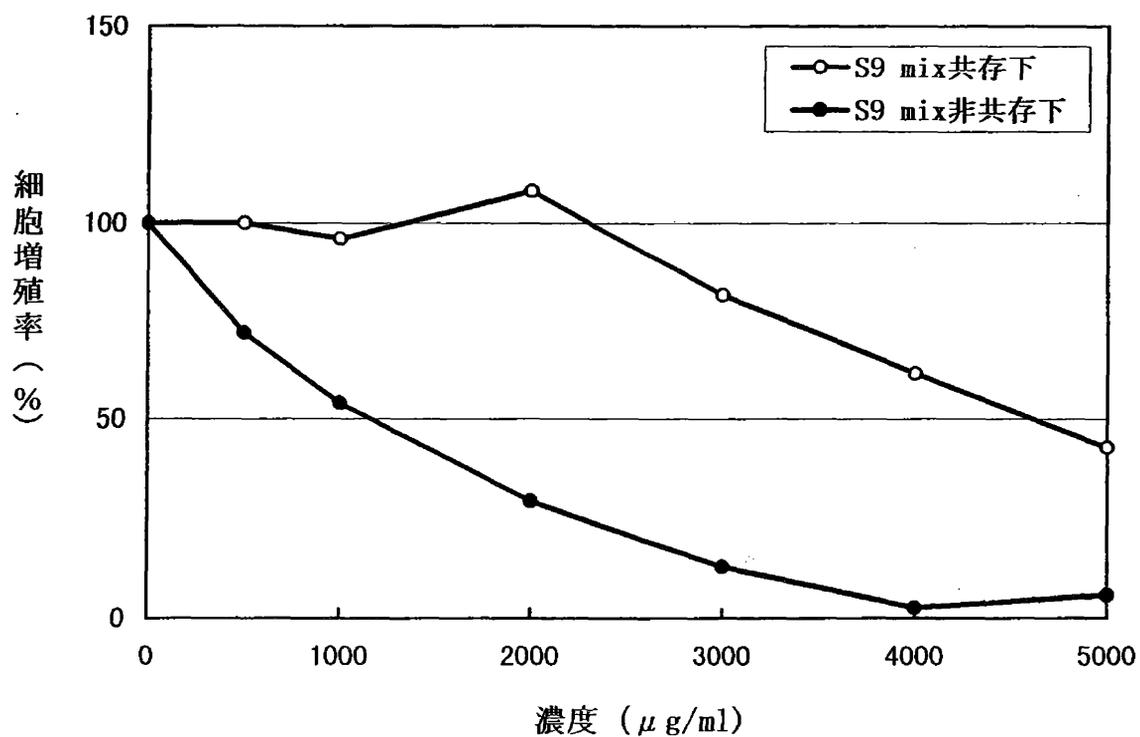
図2 フタリミドの細胞毒性(短時間処理法)  
(6時間処理, 18時間回復)

図3 フタリミドの構造異常細胞出現頻度  
(連続処理法)

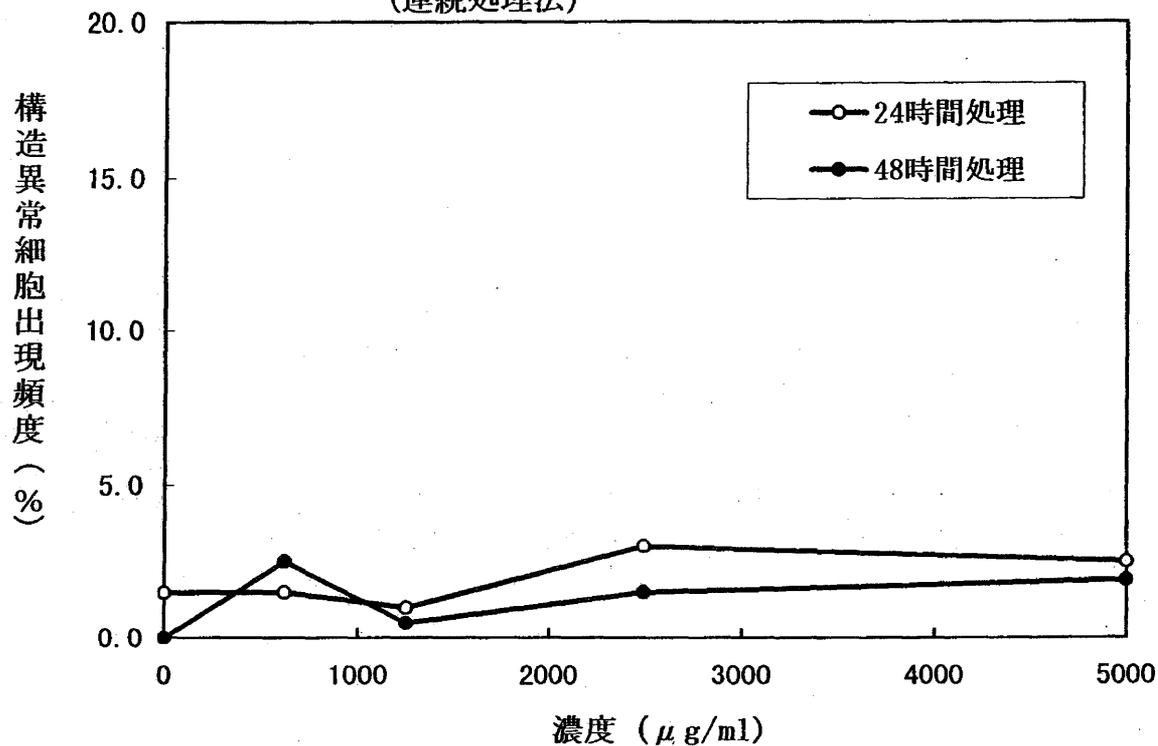


図4 フタリミドの構造異常細胞出現頻度  
(短時間処理法)

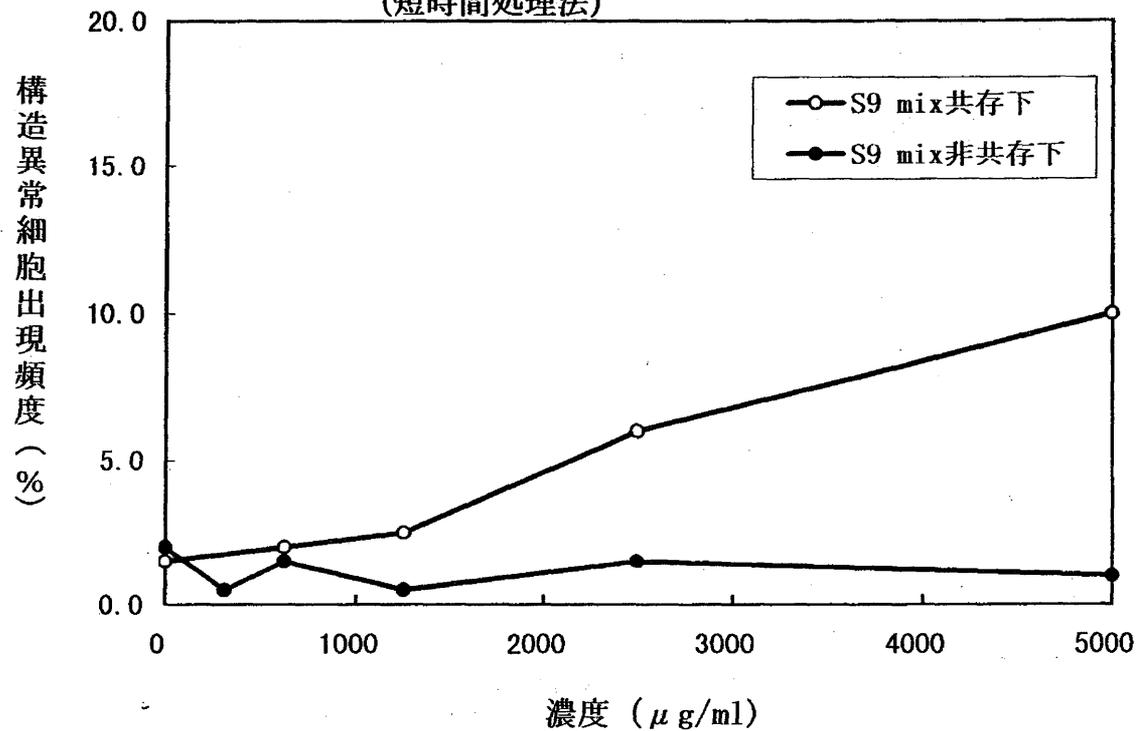


図5 フタリミドの数的異常細胞出現頻度  
(連続処理法)

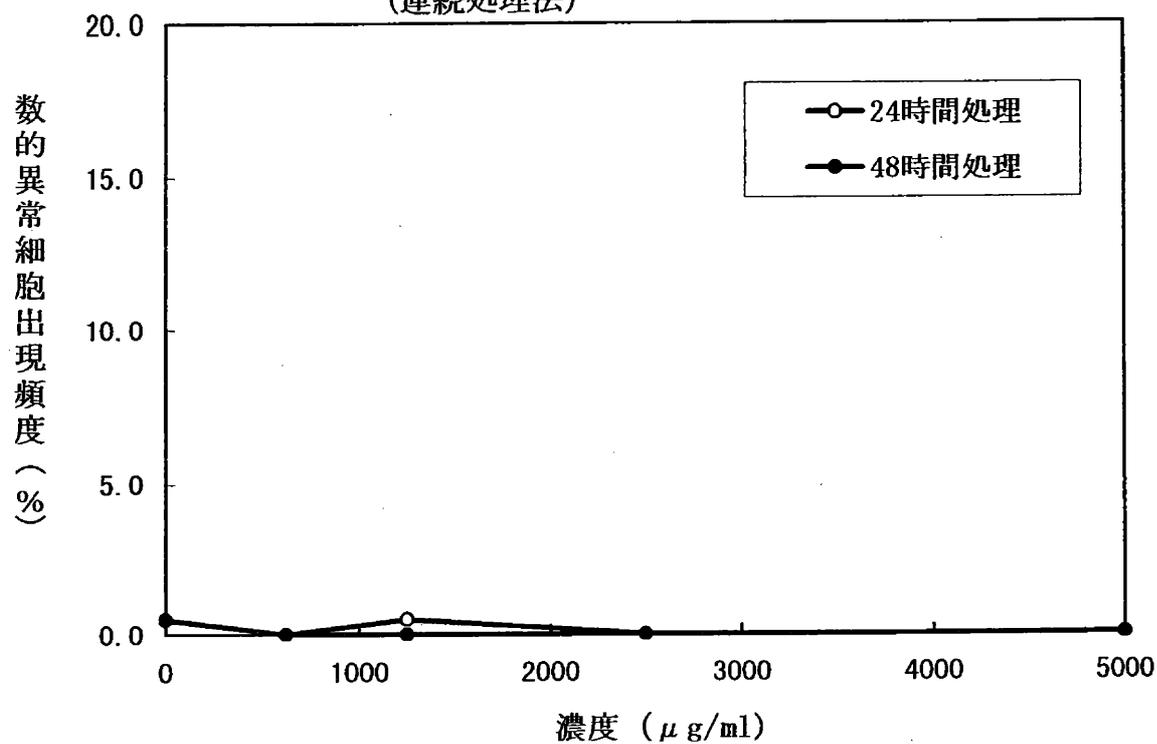


図6 フタリミドの数的異常細胞出現頻度  
(短時間処理法)

