

14.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に不溶で DMSO に易溶であり、DMSO と混合後、4 時間以内では発熱、発色、発煙等の変化がなかった。したがって、溶媒にはモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (GC 用、純度 99.9%、Lot No. K31758278, Merck) を使用し、調製後は 4 時間以内に処理を行った。

細胞増殖抑制試験では、使用直前に被験物質 1172 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 3 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (234.4 mg/mL 溶液) を準備した。1 mL の DMSO に対し、この 234.4 mg/mL 調製原液を 1 mL 加えることにより、117.2 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、58.6, 29.3, 14.7, 7.33, 3.66, 1.83, 0.916 および 0.458 mg/mL 溶液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に被験物質 85 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (8.50 mg/mL 溶液) を準備した。この調製原液を以下に示す手順で、DMSO を用いて順次希釈し、各被験物質液を調製した。

被験物質液調製手順 (染色体異常試験)

| 設定濃度 (mg/mL) | 被験物質液 採取元 (mg/mL) | 採取量 (mL) | DMSO (mL) |
|-----------------|-------------------------|-------------|--------------|
| 7.50 | 8.50 | 3.0 | 0.4 |
| 6.50 | 7.50 | 2.6 | 0.4 |
| 5.50 | 6.50 | 2.2 | 0.4 |
| 4.50 | 5.50 | 1.8 | 0.4 |
| 3.50 | 4.50 | 1.4 | 0.4 |
| 2.50 | 3.50 | 1.0 | 0.4 |
| 1.50 | 2.50 | 0.6 | 0.4 |
| 0.50 | 1.50 | 0.2 | 0.4 |

追加試験では、使用直前に被験物質 75 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (7.50 mg/mL 溶液) を準備した。この調製原液を次に示す手順で、DMSO を用いて順次希釈し、各被験物質液を調製した。

被験物質液調製手順 (追加試験)

| 設定濃度 (mg/mL) | 被験物質液 採取元 (mg/mL) | 採取量 (mL) | DMSO (mL) |
|-----------------|-------------------------|-------------|--------------|
| 6.50 | 7.50 | 2.6 | 0.4 |
| 5.50 | 6.50 | 2.2 | 0.4 |
| 4.50 | 5.50 | 1.8 | 0.4 |
| 3.50 | 4.50 | 1.4 | 0.4 |
| 2.50 | 3.50 | 1.0 | 0.4 |
| 1.50 | 2.50 | 0.6 | 0.4 |
| 0.50 | 1.50 | 0.2 | 0.4 |

確認試験では、使用直前に被験物質 65 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (6.50 mg/mL 溶液) を準備した。この調製原液を以下に示す手順で、DMSO を用いて順次希釈し、各被験物質液を調製した。

被験物質液調製手順 (確認試験)

| 設定濃度 (mg/mL) | 被験物質液 採取元 (mg/mL) | 採取量 (mL) | DMSO (mL) |
|-----------------|-------------------------|-------------|--------------|
| 5.50 | 6.50 | 2.2 | 0.4 |
| 4.50 | 5.50 | 1.8 | 0.4 |
| 3.50 | 4.50 | 1.4 | 0.4 |
| 2.50 | 3.50 | 1.0 | 0.4 |
| 1.50 | 2.50 | 0.6 | 0.4 |
| 0.50 | 1.50 | 0.2 | 0.4 |

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K3G77, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC, Lot No. 415ACF, 協和醗酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. 4C87N, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

用量は、短時間処理法で 0.1 µg/mL、連続処理法で 0.05 µg/mL とした。

14.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K3G77 【確認試験以外】, K4D88 【確認試験】) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP: Lot No. 4028, 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. 4C87N) を用いて希釈し, 1 mL ずつ分注した後, 凍結保存したものを試験に用いた.

用量は 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした.

14.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 10 mM 相当の 2344 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量とし, 以下 1172, 586, 293, 147, 73.3, 36.6, 18.3, 9.16 および 4.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 10 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした.

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた.

油性インクを用いて, 試験番号, 処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した.

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート (細胞培養用マルチプレート 12F, 住友ベークライト) の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った. 6 時間培養を続けた後, 各ウェルの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 064K2309, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した. 新鮮な培養液 500 μL を加え, さらに 18 時間培養を続けた.

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った.

その後の操作は 14.7.3. に記載した方法に準じた.

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行い, さらに 24 時間培養を続けた.

14.7.6. 処理量一覧

| | 陰性対照あるいは被験物質 | | |
|---------|--------------|-------------|--------------|
| | 培養液 | S9 mix | 溶媒/ 被験物質液 |
| -S9 処理 | 600 μ L | - | 6 μ L |
| +S9 処理 | 500 μ L | 100 μ L | 6 μ L |
| 24 時間処理 | 600 μ L | - | 6 μ L |

14.7.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウエルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用，Lot No. KLH9734，和光純薬工業）を加えて10分間細胞を固定した。次いで、0.1%クリスタル・バイオレット（Lot No. K31134240，Merck）水溶液で10分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を3 mL 加え、5分間放置した。各ウエルの溶出液を96ウエルのプレート（アッセイプレート，IWAKI）に各々300 μ L 分注し、マイクロプレートリーダー（モデル450，BIO・RAD）を用いて570 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求めた。

さらに、全ての処理法において細胞増殖抑制が認められたため、プロビット法を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には4.58~73.3 μ g/mL の5点（-S9 処理），18.3~73.3 μ g/mL の3点（+S9 処理）および9.16~73.3 μ g/mL の4点（24時間処理）を用いた。

14.8. 染色体異常試験，追加試験および確認試験

14.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験の結果、全ての処理法において細胞毒性が認められ、50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ71.0（短時間処理法-S9 処理），34.3（短時間処理法+S9 処理）および52.0 μ g/mL（連続処理法24時間処理）と算出された。したがって、染色体異常試験では、細胞の増殖を50%以上抑制すると推定される用量，すなわち，-S9 処理で85.0 μ g/mL，+S9 処理で45.0 μ g/mL，24時間処理で65.0 μ g/mL をそれぞれ最高用量とし、次に示す5~6用量を設定した。

| 処理法 | 用量 (µg/mL) | | | | | | | | |
|---------|------------|------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|
| -S9 処理 | — | — | — | <u>35.0</u> | 45.0 | <u>55.0</u> | 65.0 | <u>75.0</u> | 85.0 |
| +S9 処理 | 5.00 | 15.0 | 25.0 | 35.0 | 45.0 | — | — | — | — |
| 24 時間処理 | — | — | 25.0 | 35.0 | 45.0 | 55.0 | 65.0 | — | — |

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

染色体異常試験の短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理において、全ての用量で相対細胞増殖率が 50%以上を示し、細胞の増殖を 50%以上抑制する用量が得られなかった。したがって、+S9 処理および 24 時間処理について追加試験を実施した。追加試験では、以下に示す 6 用量を設定した。

| 処理法 | 用量 (µg/mL) | | | | | | | | |
|---------|------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------------|---|
| +S9 処理 | 5.00 | 15.0 | <u>25.0</u> | <u>35.0</u> | <u>45.0</u> | <u>55.0</u> | — | — | — |
| 24 時間処理 | — | — | 25.0 | <u>35.0</u> | 45.0 | <u>55.0</u> | 65.0 | <u>75.0</u> | — |

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

追加試験の短時間処理法+S9 処理において、明確に陽性であると判断ができなかったため、+S9 処理について確認試験を実施した。確認試験では、以下に示す 7 用量を設定した。

| 処理法 | 用量 (µg/mL) | | | | | | | |
|--------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|---|
| +S9 処理 | 5.00 | <u>15.0</u> | <u>25.0</u> | <u>35.0</u> | <u>45.0</u> | <u>55.0</u> | 65.0 | — |

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ, 住友ベークライト) に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し, 3 日間培養した。培養終了後, 14.8.6. に記載する割合で溶媒, 被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後, 各プレートの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 094K2331, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え, さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は 14.8.3. に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.6. 処理量一覧

| | 陰性対照あるいは被験物質 | | | 陽性対照 | | |
|---------|--------------|--------|--------------|--------|--------|-------------|
| | 培養液 | S9 mix | 溶媒/ 被験物質液 | 培養液 | S9 mix | 陽性対照 物質液 |
| -S9 処理 | 3.0 mL | - | 0.03 mL | 2.7 mL | - | 0.3 mL |
| +S9 処理 | 2.5 mL | 0.5 mL | 0.03 mL | 2.2 mL | 0.5 mL | 0.3 mL |
| 24 時間処理 | 3.0 mL | - | 0.03 mL | 2.7 mL | - | 0.3 mL |

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に、最終濃度で $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1252976, Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25% トリプシン溶液 (Lot No. 1233304 【染色体異常試験】、1263419 【追加試験および確認試験】、Invitrogen) を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、 37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、 37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 2 回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を 1 枚作製した。その後、染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を 1 滴滴下し、染色体標本を 2 枚作製した。スライド標本を十分に乾燥させ、 $1/100 \text{ mol/L}$ ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8, Lot No. TP601474, Merck) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (Lot No. OB408561 【染色体異常試験】、OB318388 【追加試験および確認試験】、Merck) で 12 分間染色した。ス

ライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に、陰性対照群、各被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、ATP フォトメーター（ルミテスターC-100LU、キッコーマン）を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理した細胞液を 50 μ L 添加し、攪拌してから約 20 分間静置した。測定用チューブにこの混合液を 100 μ L 分注し、ATP 測定用試薬キット（ルシフェール 250：キッコーマン）の発光試薬を 100 μ L 添加した後、相対発光量（Relative Light Unit：RLU）を測定した。陰性対照群における RLU に対する比（＝細胞生存率）を各用量群について求め、細胞増殖抑制度とした。

14.8.10. 評価対象

観察用量としては、14.8.9.における相対細胞増殖率が陰性対照群の 50%未満になる最も低い用量を最高用量とした。なお、+S9 処理および連続処理法については追加試験において作成した標本から評価対象を選択し、+S9 処理では高用量の細胞毒性領域での染色体異常誘発性を確認するため、連続する 4 用量を評価対象（観察用量）とした。さらに、確認試験では再現性を確認する事から、追加試験で観察した最高用量から連続する 5 用量を評価対象（観察用量）とした。-S9 処理および連続処理法においては連続する 3 用量では用量間隔が狭いため、間隔を空けて 3 用量を評価対象（観察用量）とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。ただし、短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理の標本は、追加試験において作成した標本を採用した。また、確認試験の標本についてもコード化し、観察した。

各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下（ $\times 600$ ）で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ（gap）、染色分体切断（ctb）、染色分体切断（csb）、染色分体交換（cte）、染色分体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも 5%未満であること。陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること。以上の条件を満たした場合に試