

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験（プロモーション試験）報告書

試験番号 7506

本 文

本文目次

[項目]	[ページ]
1. 要約	1
2. 試験材料	
2-1. 被験物質	2
2-2. 陽性対照	3
2-3. 陰性(溶媒)対照	4
2-4. 使用した細胞	4
3. 試験方法	
3-1. 採用した試験方法	5
3-2. 試験構成	5
3-3. プロモーション試験	5
3-4. 観察	7
3-5. 判定	7
4. 試験成績	
4-1. プロモーション試験	8
5. 結果の判定	9
6. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 及び試験計画書に従わなかったこと	10
7. 参考文献	10
試験結果 表 1～4	11
試験結果 図 1～4	15

1. 要約

硫酸銅(Ⅱ)の Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験(プロモーション試験)を実施し、*in vitro* の発がんプロモーション作用を評価した。

細胞増殖試験は、クリスタルバイオレット(CV)法とセルカウント法で実施した。CV 法による細胞増殖試験は 10 mM(約 1.6 mg/ml)を最高用量とし、公比 2、10 用量段階で実施した。その結果、陰性(溶媒)対照群に対する相対細胞増殖率は 0.020 ~ 0.31 mM の用量で 120%以上、0.63 及び 1.3 mM では 10%未満であった。0.31 mM の用量は、位相差顕微鏡による観察で 20%コンフルエント程度の細胞密度であったが、その相対細胞増殖率は 100%を超えており、CV 法では正確な相対細胞増殖率を測定できない可能性があったため、セルカウント法による細胞増殖試験を実施した。セルカウント法による細胞増殖試験は 0.31 mM に近い 0.32 mM を最高用量とし、公比 2、11 段階に設定した。その結果、相対的細胞数増加(RICC: Relative Increase Cell Count)は、0.020 ~ 0.16 mM で 120%以上であり、細胞増殖の促進作用を示した。0.32 mM の相対的細胞数増加は - 26%と細胞播種時よりも細胞数が減少し、位相差顕微鏡観察の結果とも一致した。以上の結果から、形質転換試験の最高用量は 0.32 mM とし、公比 2 で 7 段階に設定した。

形質転換試験を実施した結果、ウェルあたりの平均形質転換巢数(形質転換率)は 0.040、0.080、0.16 mM で 8.8、10.5、15.8 であり、陰性(溶媒)対照群に対して統計学的に有意な増加を示し、用量依存性も示した。相対的細胞数増加は、0.0050、0.010、0.020、0.040、0.080、0.16、0.32 mM の用量でそれぞれ、98、111、124、144、194、181、0 %であった。

なお、試験成立の判定基準(陰性(溶媒)対照群の形質転換率が 12 個/ウェル未満、陽性対照群の形質転換巢数が有意に高い、被験物質処理群の統計処理対象群が 4 濃度以上)は、全て満たされていた。

形質転換試験(プロモーション試験)において、連続した 3 用量の被験物質処理群で、陰性(溶媒)対照群と比較して形質転換率が統計学的に有意な増加を示した。かつ、試験成立の判定基準は全て満たされており、試験は成立したものと判断した。

以上の結果より、本被験物質の Bhas 42 細胞に対する *in vitro* での発がんプロモーション作用は陽性と判定した。

2. 試験材料

2-1. 被験物質(被験物質番号: 4379)

1) 被験物質の性質

化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	硫酸銅()					
別 名	COPPER(II) SULFATE					
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{O}-\text{S}=\text{O} \\ \\ \text{O}^- \end{array} \quad \text{Cu}^{2+}$					
試験に供した 化学物質の純度	99.3%	試験に供した化学 物質のロット番号			WDK2430	
不純物の名称及び 濃度(含有率)	Cl: 0.003%、Na: 0.1%、K: 0.1%、Pb: 0.05%、Fe: 0.03%					
C A S 番 号	7758-98-7	蒸 気 圧		-		
分 子 量	159.61	分 配 係 数 (1-オクタール/水分配係数)		-		
融 点	200	常 温 に お け る 性 状		灰白色の粉末		
沸 点	650					
安 定 性	水: - 光: - 熱: -					
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の 安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の 安定性
	水	溶解: $3.2 \times 10 \text{ mg/ml}^*$	-	DMSO	懸濁: $3.2 \times 10^2 \text{ mg/ml}^*$	-
	アセトン	-	-	その他()	-	-
供 試 元	富士フイルム和光純薬株式会社					

* 日本バイオアッセイ研究センターの試験による。

2) 保管及び取り扱い

被験物質は、被験物質保管区域で保管した。被験物質の取り扱いについては、黄色灯下で行った。

3) 被験物質の調製

使用溶媒

名称： 超純水（ミリ-Q 水）

製造元： 自家製

溶媒選択の理由

被験物質は、水に対して 3.2×10 mg/ml の用量で溶解し、培養液に対して 5 vol% の添加量で試験に用いることが可能であった。また、被験物質に水を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化が認められなかった。以上のことから水を溶媒として選択した。

被験物質溶液の調製

被験物質を秤量し、滅菌した超純水を添加したものを最高調製溶液とした。これを滅菌超純水で段階希釈して各被験物質溶液を調製した。調製作業については、黄色灯下で行った。被験物質溶液の調製は用時調製とした。

被験物質溶液の処理

必要量の培養液を 50 ml チューブに取り、攪拌しながら被験物質溶液を添加（最終濃度 5 vol%）した（被験物質培養液）。細胞への処理はプレートの培養液を抜き、ただちに被験物質培養液を分注することにより行った。処理作業は、黄色灯下で行った。

純度換算

被験物質の純度が 95% 以上であるため、純度換算は実施しなかった。

2-2 . 陽性対照

1) 陽性対照物質

名称： 12-*O*-テトラデカノイルフォルボール-13-アセテート(TPA)

ロット番号： SLBS0478V

純度： 100%

製造元： Sigma-Aldrich 社

2) 陽性対照物質の選択理由

TPA は Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験にプロモーターとして広く使用されており、日本バイオアッセイ研究センターの背景データも豊富なため。

3) 陽性対照物質溶液の調製、保存について

所定の濃度の DMSO 溶液を調製、分注して、-30 以下で凍結保存し、調製後 2 年以内に用時解凍して用いた。保存凍結溶液は、使用直前に解凍して用いた。

使用溶媒： DMSO(和光純薬工業(株)、Lot No.: AWF1092、純度：100.0%)

最終濃度： 50 ng/ml

2-3 . 陰性(溶媒)対照

陰性(溶媒)対照として、滅菌した超純水を培養液に添加した。培養液への添加液量は、5 vol%とした。

2-4 . 使用した細胞

1) 種類

Bhas 42(マウス全胎児由来 BALB/c 3T3 A31-1-1 に *v-Ha-ras* 遺伝子を導入した細胞)¹⁾

2) 供給源

一般財団法人 食品薬品安全センターより入手(2017 年 3 月 3 日、入手時 17 代)

3) 保存条件

液体窒素中で保存(19 代)

4) 培養条件

ウシ胎児血清(FBS、ロット番号：S11605S1780、Biowest 製)を 5 vol%、ペニシリンを 50 U/ml、ストレプトマイシン 50 µg/ml を含む Dulbecco's modified Eagle's medium/ Ham's F12 (Life Technologies)を培養液(DF5F)として用い、37 °C、5%CO₂ の条件下で培養した。

5) 特性

接触阻止能を維持している。マイコプラズマの汚染は無い。

6) 選択理由

形質転換試験に常用されている²⁻⁵⁾。

7) 使用条件

凍結保存した細胞(19 代)を解凍して、細胞増殖試験では解凍してから継代数 10 代以内の細胞を用いた。形質転換試験では解凍してから継代数 2 代以内の細胞を用いた。

3. 試験方法

3-1. 採用した試験方法

「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」(平成 26 年 7 月 4 日、厚生労働省第 3 回遺伝毒性評価ワーキンググループ合意事項)に準拠して実施した。

3-2. 試験構成

形質転換試験の用量設定のために細胞増殖試験を実施した後に、形質転換試験を実施した。形質転換試験はプロモーション試験のみ実施した。

3-3. プロモーション試験

3-3-1. 用量設定のための細胞増殖試験

細胞増殖試験[クリスタルバイオレット(CV)法、セルカウント法]は、各用量 3 ウェルを用いて実施した。CV 法による細胞増殖試験は、最高用量を 10 mM(約 1.6 mg/ml)として公比 2 で 10 段階、セルカウント法による細胞増殖試験は最高用量を 0.32 mM として公比 2 で 11 段階の用量で実施した。細胞増殖試験の対照として陰性(溶媒)対照を設けた。

クリスタルバイオレット(CV)法による細胞増殖試験

細胞は 0.25%トリプシンを用いて剥離した後、細胞濃度 0.7×10^4 個/ml の懸濁液とした。この細胞懸濁液 2 ml (1.4×10^4 個)を 6 ウェルプレートに分注(3 ウェル/群)した。吸光度の補正のためにブランクを設けた。播種 4 日後に培養液を被験物質または溶媒を含む培養液 2ml に交換した。播種 7 日後に 10%ホルマリンで固定し、水洗、乾燥して 0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。乾燥後、2.0 ml の色素抽出液(50%エタノール及び 0.02 N 塩酸を含む)でクリスタルバイオレットを抽出後、その抽出液 0.1 ml を 96 ウェルプレートに移し、550 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。次の式により各処理群での相対細胞増殖率(%)を求めた。

$$X(\%) = (T - B) / (S - B) \times 100$$

X : 被験物質処理群の相対細胞増殖率(%)

S : 陰性(溶媒)対照群の吸光度

T : 被験物質処理群の吸光度

B : ブランクの吸光度(培養液のみを入れたウェル)

セルカウント法による細胞増殖試験

細胞は 0.25%トリプシンを用いて剥離した後、細胞濃度 0.7×10^4 個/ml の懸濁液とした。この細胞懸濁液 2 ml (1.4×10^4 個)を 6 ウェルプレートに分注(無処理 6 ウェル、及び 3 ウェル/群)した。播種 4 日後に培養液を被験物質または溶媒を含む培養液 2ml に交換した。播種 4 日後の無処理の 6 ウェル、播種 7 日後の各群 3 ウェルを一定量のトリプシン溶液で細胞を剥し、単一細胞の懸濁液としたものの一部を用いて、血球計算盤で生細胞数を測定した。次の式により相対的細胞数増加(RICC: Relative Increase Cell Count)、相対的細胞数(RCC: Relative Cell Count)を算出した。

$$\text{RICC}(\%) = \frac{[\text{処理した培養細胞における細胞数の増加(終了時-開始時)}]}{[\text{陰性対照の培養細胞における細胞数の増加(終了時-開始時)}]} \times 100$$

$$\text{RCC}(\%) = \frac{[\text{処理した培養細胞における細胞数(終了時)}]}{[\text{陰性対照の培養細胞における細胞数(終了時)}]} \times 100$$

3-3-2 . 形質転換試験

形質転換試験は、形質転換巢計測用に各用量 6 ウェル、細胞増殖率測定用に 3 ウェルを用いて実施した。用量設定のための細胞増殖試験の結果に基づき、形質転換試験は 0.32 mM を最高用量とし、公比 2、7 段階の用量で実施した。形質転換試験の対照として陰性(溶媒)対照及び陽性対照を設けた。なお、TPA の培地における溶媒(DMSO)濃度は 0.1 vol%とし、TPA に対する溶媒対照群(0.1 vol% DMSO)も設けた。形質転換試験の細胞増殖率測定はセルカウント法で実施した。

実験方法

細胞は 0.25%トリプシンを用いて剥離した後、細胞濃度 0.7×10^4 個/ml の懸濁液とした。この細胞懸濁液 2 ml (1.4×10^4 個)を 6 ウェルプレートに分注し、形質転換巢計測用(6 ウェル/群)及び細胞増殖率測定用(無処理 6 ウェル、及び 3 ウェル/群)とした。播種 4 日後に培養液を被験物質、陽性対照物質または溶媒を含む培養液と交換した。形質転換巢計測用の細胞は、播種 7 日後、播種 11 日後に被験物質、陽性対照物質または溶媒を含む培養液と交換し、播種 14 日後に新鮮培養液に交換した。播種 21 日後にエタノールで固定した後、5 vol%ギムザ液で染色し、各ウェルの形質転換巢を数えた。細胞増殖率測定用の細胞は、3-3-1 のセルカウント法と同様の操作を行った。

3-4. 観察

1) 形質転換巣観察

実体顕微鏡を用いて細胞を観察し、次の基準により形質転換巣であると判定したものについて、その数を数えた。なお、プレートをコード化し、処理条件が判らない状況で観察した。

形質転換巣を構成する細胞数が 100 個以上。

紡錘形をしている(spindle-shaped)。

細胞質が塩基性(濃い紫色)に強く染まっている(basophilic)。

ランダムな配列で互いに交差している(criss-cross)。

積み重なりあっている(piling-up)。

周辺部の単層の細胞へ浸潤している(invasive)。

- の所見が全部揃わなくても、一部著しければ形質転換巣と判定した。

形質転換巣の数は、それぞれのウェルごとに記録した。

2) 結果の表示

相対細胞増殖率(%)

ウェルごとの形質転換巣の数

ウェルあたりの平均形質転換巣の数(形質転換率)

3-5. 判定

1) 統計処理対照群

以下に示す基準を満たした群について統計処理を行った。

細胞増殖試験用のプレートでは 2 ウェル以上が測定可能である。

形質転換試験用のプレートでは 5 ウェル以上が計数可能である。

2) 結果の解析

各被験物質処理群と陰性(溶媒)対照群間において Dunnett 検定を行った(有意水準 $\alpha=0.05$ 、片側)。また、陽性対照群と陰性(溶媒)対照群間において Student の t 検定を行った(有意水準 $\alpha=0.05$ 、片側)。

3) 試験成立の判定

以下の基準が全て満たされた場合、結果を評価できる試験が成立したと考えた。

陰性(溶媒)対照群の形質転換率が 12 個/ウェルを越えていない。

陽性対照群の形質転換巣数が有意に高い。

被験物質処理群において以下の条件を含む統計処理対象群が 4 濃度以上ある。ただし、大きくこの条件から外れない限り、処理濃度は適正であったと考える。

- a) 細胞増殖の促進が見られた場合、少なくとも、細胞毒性が認められない濃度に 1 濃度、細胞増殖の促進が認められる濃度に 2 濃度ある。
- b) 細胞増殖の阻害が見られた場合、少なくとも、細胞毒性が認められない濃度に 2 濃度、細胞毒性が認められない濃度から IC_{50} の間に 2 濃度ある。

4) 結果の判定

3)の「試験成立の判定」により試験が成立した場合、被験物質群の統計処理を実施した群において、以下の基準によって結果を判定した。

陰性：形質転換率の統計学的に有意な増加が、全ての群で認められない。

陽性：形質転換率の統計学的に有意な増加が、連続した 2 濃度以上で認められる。

疑陽性：形質転換率の統計学的に有意な増加が、1 濃度または不連続な 2 濃度以上で認められる。

最終的な判定は、統計学的検定、背景データ、形質転換巢の誘発率を考慮し、生物学的な観点からの判断を加味して総合的に評価した⁶⁾。

4. 試験成績

4-1. プロモーション試験

4-1-1. 用量設定のための細胞増殖試験

細胞増殖試験は、クリスタルバイオレット(CV)法とセルカウント法で実施した。CV 法による細胞増殖試験の結果を表 1 と図 1、セルカウント法による細胞増殖試験の結果を表 2 と図 2 に示した。CV 法による細胞増殖試験は 10 mM を最高用量とし、公比 2、10 段階の用量で実施した。その結果、陰性(溶媒)対照群に対する相対細胞増殖率は 0.020 ~ 0.31 mM の用量で 120%以上、0.63 及び 1.3 mM では 10%未満であった。0.31 mM の用量は、位相差顕微鏡による観察で 20%コンフルエント程度の細胞密度であったが、その相対細胞増殖率は 100%を超えており、CV 法では正確な相対細胞増殖率を測定できない可能性があったため、セルカウント法による細胞増殖試験を実施することとした。なお、2.5 ~ 10 mM では被験物質により、一部の細胞が固定されたと推測され、その固定作用は用量依存的に強まった。更に 2.5 ~ 10 mM では被験物質由来の沈殿物が固定細胞に付着して残存し、クリスタルバイオレットを強く吸着し、吸光度が異常な高値になったと推測された。

セルカウント法による細胞増殖試験は、0.31 mM に近い 0.32 mM を最高用量とし、公比 2、11 段階で実施した。その結果、相対的細胞数増加は、0.020 ~ 0.16 mM で 120% 以上であり、細胞増殖の促進作用を示した。0.32 mM の相対的細胞数増加は - 26% と細胞播種時よりも細胞数が減少し、位相差顕微鏡観察の結果とも一致した。以上の結果から、形質転換試験の最高用量は 0.32 mM とし、公比 2 で 7 段階に設定した。

4-1-2 . 形質転換試験

形質転換試験の結果を表 3、4 と図 3 に示した。形質転換試験は 0.32 mM を最高用量とし、公比 2 で 7 段階の用量で実施した。試験の結果、ウェルあたりの平均形質転換巢数(形質転換率)は 0.040、0.080、0.16 mM で 8.8、10.5、15.8 であり、陰性(溶媒)対照群に対して統計学的に有意な増加を示し、用量依存性も示した。なお、0.32 mM の形質転換率は統計学的に有意な減少を示した。相対的細胞数増加は、0.0050、0.010、0.020、0.040、0.080、0.16、0.32 mM の用量でそれぞれ、98、111、124、144、194、181、0 % であった。

なお、試験成立の判定基準(陰性(溶媒)対照群の形質転換率が 12 個 / ウェル未滿、 陽性対照群の形質転換巢数が有意に高い、 被験物質処理群の統計処理対象群が 4 濃度以上) は、全て満たされていた。

5 . 結果の判定

形質転換試験(プロモーション試験)において、連続した 3 用量の被験物質処理群で、陰性(溶媒)対照群と比較して形質転換率が統計学的に有意な増加を示した。かつ、試験成立の判定基準は全て満たされており、試験は成立したものと判断した。

以上の結果より、本被験物質の Bhas 42 細胞に対する *in vitro* での発がんプロモーション作用は陽性と判定した。判定が陽性となったため、陰性(溶媒)対照群、陽性対照群、被験物質処理群のプレートの中から代表的なウェルを選び、それらの写真を図 4 に示した。

6. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態は発生しなかった。なお、クリスタルバイオレット法による細胞増殖試験の結果、正しい相対細胞増殖率を評価できなかったため、2回目の細胞増殖試験及び形質転換試験では、セルカウント法を用いて相対的細胞数増加(RICC)を算出して細胞増殖の指標とし、セルカウント法の記載を報告書に追加した。

7. 参考文献

- 1) Sasaki, K. et al.: Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, Jpn. J. Cancer Res. 79 (1988) 921-930.
- 2) Ohmori, K. et al.: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, Mutat. Res. 557 (2004) 191-202.
- 3) Ohmori, K. et al.: An inter-laboratory collaborative study by the non-genotoxic carcinogen study group in Japan, on a cell transformation assay for tumor promoters using Bhas 42 cells, Altern. Lab. Animal 33 (2005) 619-639.
- 4) Sakai, A. et al.: A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity, Mutat. Res. 702 (2010) 100-122.
- 5) Sakai, A. et al.: An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity, Mutat. Res. 725 (2011) 57-77.
- 6) OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2016 Guidance document on the in vitro Bhas 42 cell transformation assay. Series on Testing and Assessment No. 231, 08 Jan-2016. Available at [https://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO\(2016\)1.pdf](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO(2016)1.pdf) [accessed 26 Sep. 2018].

表1 硫酸銅(Ⅱ)の細胞増殖試験(クリスタルバイオレット法)結果

用量 (mM)	吸光度 (OD ₅₅₀)						相対細胞増殖率 ^{b)} (% of control)
	Well 1	Well 2	Well 3	平均値	SD	-ブランク ^{a)}	
ブランク	0.055	0.054	0.052	0.054	0.002	0.000	-
0 (5% 超純水)	0.455	0.433	0.445	0.444	0.011	0.390	100
0.020	0.554	0.573	0.592	0.573	0.019	0.519	133
0.039	0.608	0.620	0.616	0.615	0.006	0.561	144
0.078	0.751	0.748	0.722	0.740	0.016	0.686	176
0.16	0.851	0.824	0.818	0.831	0.018	0.777	199
0.31	0.567	0.550	0.595	0.571	0.023	0.517	133[*]
0.63	0.068	0.068	0.065	0.067	0.002	0.013	3.3
1.3	0.090	0.091	0.092	0.091	0.001	0.037	9.5
2.5	0.238	0.235	0.228	0.234	0.005	0.180	46[†]
5.0	0.908	0.859	0.925	0.897	0.034	0.843	216[†]
10	2.066	2.321	2.999	2.462	0.482	2.408	617[†]

a) 各群の吸光度の平均からブランクの吸光度の平均を引いた

b) それぞれの陰性(溶媒)対照群の吸光度に対する各処理群の吸光度のパーセンテージを示した

* 位相差顕微鏡観察で20%コンフルエント程度の細胞密度を示し、強い細胞毒性が認められた

† 細胞は死滅したが、被験物質の作用により一部細胞が細胞固定されてwell内に残存し、その細胞上に堆積した
被験物質由来の沈殿物がクリスタルバイオレットを吸着して異常に高い吸光度を示したと推測された

表2 硫酸銅(Ⅱ)の細胞増殖試験(セルカウント法)結果

	細胞浮遊 液量(ml)	画数 (* / 9)	カウント1	カウント2	細胞数 (個/ml)	細胞数 (個/培養器)	細胞数の平均値 (個/培養器)				
処理前	1.5	9	100	113	236667	355000	359167				
	1.5	9	102	106	231111	346667					
	1.5	9	98	109	230000	345000					
	1.5	9	114	105	243333	365000					
	1.5	9	119	110	254444	381667					
	1.5	9	104	113	241111	361667					
用量 (mM)	細胞浮遊 液量(ml)	画数 (* / 9)	カウント1	カウント2	細胞数 (個/ml)	細胞数 (個/培養器)	細胞数の平均値 (個/培養器)	増加量 (個/器)	増加量の平均値 (個/培養器)		
0 (処理後)	2.5	9	122	112	260000	650000	670370	290833	311203		
	2.5	9	126	113	265556	663889		304722			
	2.5	9	131	120	278889	697222		338055			
用量 (mM)	細胞浮遊 液量(ml)	画数 (* / 9)	カウント1	カウント2	細胞数 (個/ml)	細胞数 (個/培養器)	RCC(%)	増加量 (個/器)	RICC(%)	RICCの 平均値(%)	
0.00031	2.5	9	116	111	252222	630556	94	271389	87	97	
	2.5	9	127	120	274444	686111	102	326944	105		
	2.5	9	119	121	266667	666667	99	307500	99		
0.00063	2.5	9	120	124	271111	677778	101	318611	102	97	
	2.5	9	118	113	256667	641667	96	282500	91		
	2.5	9	126	114	266667	666667	99	307500	99		
0.0013	2.5	9	128	120	275556	688889	103	329722	106	101	
	2.5	9	109	116	250000	625000	93	265833	85		
	2.5	9	132	124	284444	711111	106	351944	113		
0.0025	2.5	9	114	128	268889	672222	100	313055	101	95	
	2.5	9	120	115	261111	652778	97	293611	94		
	2.5	9	114	116	255556	638889	95	279722	90		
0.0050	2.5	9	123	128	278889	697222	104	338055	109	107	
	2.5	9	126	120	273333	683333	102	324166	104		
	2.5	9	130	121	278889	697222	104	338055	109		
0.010	2.5	9	110	109	243333	608333	91	249166	80	117	
	2.5	9	134	148	313333	783333	117	424166	136		
	2.5	9	140	140	311111	777778	116	418611	135		
0.020	2.5	9	149	135	315556	788889	118	429722	138	138	
	2.5	9	148	143	323333	808333	121	449166	144		
	2.5	9	142	134	306667	766667	114	407500	131		
0.040	2.5	9	139	130	298889	747222	111	388055	125	136	
	2.5	9	144	138	313333	783333	117	424166	136		
	2.5	9	151	143	326667	816667	122	457500	147		
0.080	2.5	9	151	160	345556	863889	129	504722	162	155	
	2.5	9	159	151	344444	861111	128	501944	161		
	2.5	9	146	141	318889	797222	119	438055	141		
0.16	2.5	9	173	177	388889	972222	145	613055	197	188	
	2.5	9	159	164	358889	897222	134	538055	173		
	2.5	9	173	172	383333	958333	143	599166	193		
0.32	2.5	9	49	37	95556	238889	36	-120278	-39	-26	
	2.5	9	57	58	127778	319444	48	-39723	-13		
	2.5	9	44	57	112222	280556	42	-78611	-25		

相対的細胞数増加 (RICC: Relative Increase Cell Count)

相対的細胞数(RCC: Relative Cell Count)

$$\text{RICC}(\%) = \frac{[\text{処理した培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時)}]}{[\text{陰性(溶媒)対照培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時)}]} \times 100$$

$$\text{RCC}(\%) = \frac{[\text{処理した培養細胞における細胞数 (終了時)}]}{[\text{陰性(溶媒)対照培養細胞における細胞数 (終了時)}]} \times 100$$

表3 硫酸銅(Ⅱ)の形質転換試験(細胞増殖率:セルカウント法)結果

	細胞浮遊 液量(ml)	画数 (* /9)	カウント1	カウント2	細胞数 (個/ml)	細胞数 (個/培養器)	細胞数の平均値 (個/培養器)				
処理前	1.5	9	117	122	265556	398333	371389				
	1.5	9	113	117	255556	383333					
	1.5	9	101	98	221111	331667					
	1.5	9	102	99	223333	335000					
	1.5	9	116	110	251111	376667					
	1.5	9	120	122	268889	403333					
用量 (mM)	細胞浮遊 液量(ml)	画数 (* /9)	カウント1	カウント2	細胞数 (個/ml)	細胞数 (個/培養器)	細胞数の平均値 (個/培養器)	増加量 (個/器)	増加量の平均値 (個/培養器)		
0 (処理後)	2.5	9	114	121	261111	652778	632407	281389	261018		
	2.5	9	103	113	240000	600000		228611			
	2.5	9	120	112	257778	644444		273055			
用量 (mM)	細胞浮遊 液量(ml)	画数 (* /9)	カウント1	カウント2	細胞数 (個/ml)	細胞数 (個/培養器)	RCC(%)	増加量 (個/器)	RICC(%)	RICCの 平均値(%)	
0.0050	2.5	9	109	113	246667	616667	98	245278	94	98	
	2.5	9	121	111	257778	644444	102	273055	105		
	2.5	9	110	114	248889	622222	98	250833	96		
0.010	2.5	9	124	120	271111	677778	107	306389	117	111	
	2.5	9	116	118	260000	650000	103	278611	107		
	2.5	9	121	115	262222	655556	104	284167	109		
0.020	2.5	9	119	121	266667	666667	105	295278	113	124	
	2.5	9	128	124	280000	700000	111	328611	126		
	2.5	9	125	134	287778	719444	114	348055	133		
0.040	2.5	9	132	139	301111	752778	119	381389	146	144	
	2.5	9	142	135	307778	769444	122	398055	153		
	2.5	9	128	132	288889	722222	114	350833	134		
0.080	2.5	9	149	150	332222	830556	131	459167	176	194	
	2.5	9	162	154	351111	877778	139	506389	194		
	2.5	9	171	163	371111	927778	147	556389	213		
0.16	2.5	9	149	152	334444	836111	132	464722	178	181	
	2.5	9	168	158	362222	905556	143	534167	205		
	2.5	9	138	145	314444	786111	124	414722	159		
0.32	2.5	9	75	60	150000	375000	59	3611	1	0	
	2.5	9	73	68	156667	391667	62	20278	8		
	2.5	9	59	66	138889	347222	55	-24167	-9		
用量 (mM)	細胞浮遊 液量(ml)	画数 (* /9)	カウント1	カウント2	細胞数 (個/ml)	細胞数 (個/培養器)	細胞数の平均値 (個/培養器)	増加量 (個/器)	増加量の平均値 (個/培養器)		
DMSO (処理後)	2.5	9	104	113	241111	602778	609259	231389	237870		
	2.5	9	110	117	252222	630556		259167			
	2.5	9	105	109	237778	594444		223055			
用量 (mM)	細胞浮遊 液量(ml)	画数 (* /9)	カウント1	カウント2	細胞数 (個/ml)	細胞数 (個/培養器)	RCC(%)	増加量 (個/器)	RICC(%)	RICCの 平均値(%)	
PC	2.5	9	174	183	396667	991667	163	620278	261	244	
	2.5	9	179	168	385556	963889	158	592500	249		
	2.5	9	161	164	361111	902778	148	531389	223		

相対的細胞数増加 (RICC: Relative Increase Cell Count)

相対的細胞数(RCC: Relative Cell Count)

$$RICC(\%) = \frac{[\text{処理した培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時)}]}{[\text{陰性(溶媒)対照培養細胞における細胞数の増加 (終了時 - 開始時)}]} \times 100$$

$$RCC(\%) = \frac{[\text{処理した培養細胞における細胞数 (終了時)}]}{[\text{陰性(溶媒)対照培養細胞における細胞数 (終了時)}]} \times 100$$

表4 硫酸銅(Ⅱ)の形質転換試験結果

用量 (mM)	形質転換巢数								相対的細胞数 増加 (RICC) ^{b)}
	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6	平均値 ^{a)}	SD	
0 (5% 超純水)	4	5	4	5	6	3	4.5	1.0	100
0.0050	3	4	5	4	2	7	4.2	1.7	98
0.010	5	3	2	5	3	7	4.2	1.8	111
0.020	6	5	4	5	7	8	5.8	1.5	124
0.040	8	7	7	14	7	10	8.8*	2.8	144
0.080	14	16	9	9	9	6	10.5*	3.7	194
0.16	16	13	18	12	21	15	15.8*	3.3	181
0.32	0	0	0	0	0	0	0*	0.0	0
0 (0.5% DMSO)	6	3	7	6	4	5	5.2	1.5	100
TPA (50 ng/ml)	20	17	18	18	18	19	18.3#	1.0	244

a) 結果の解析として、被験物質処理群ではDunnett検定、陽性対照のTPA処理群ではStudentのt検定を実施した

Dunnett検定($\alpha=0.05$ 、片側)：陰性(溶媒)対照群に対して有意差を示した場合、平均値の右上に*を付した

Studentのt検定($\alpha=0.05$ 、片側)：陰性(溶媒)対照群に対して有意差を示した場合、平均値の右上に#を付した

b) 相対的細胞数増加 (RICC: Relative Increase Cell Count) を示した

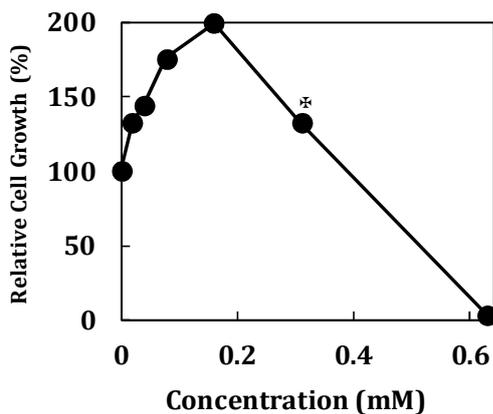


図1 硫酸銅(Ⅱ)のBhas 42細胞における細胞増殖試験(1回目: CV法)の結果

※ 0.31 mMは、位相差顕微鏡下で20%コンフルエント程度の細胞密度であり、強い細胞毒性を示した

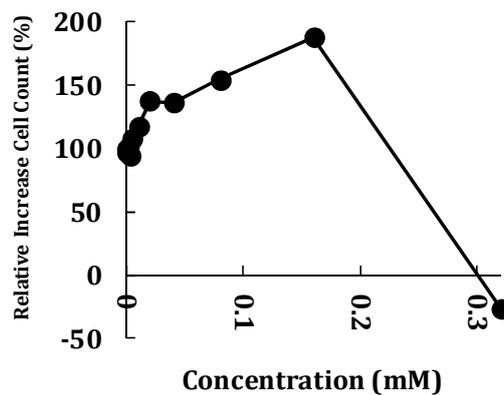


図2 硫酸銅(Ⅱ)のBhas 42細胞における細胞増殖試験(2回目: セルカウント法)の結果

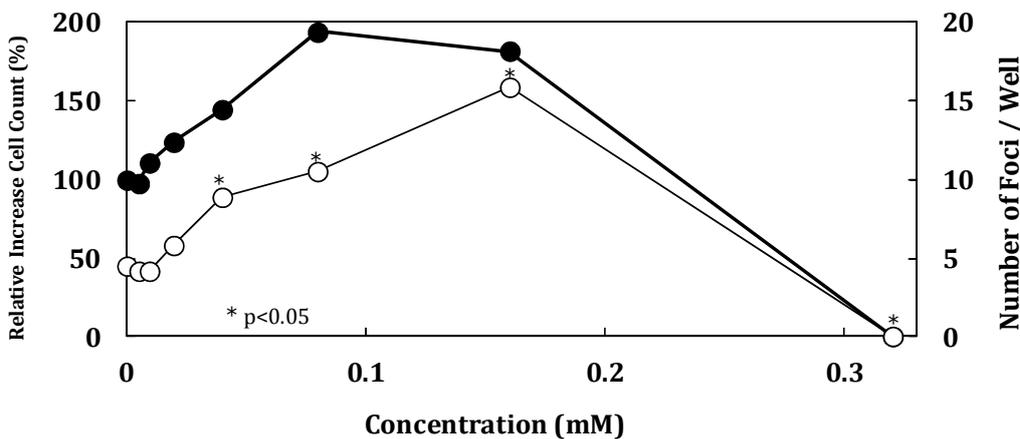


図3 硫酸銅(Ⅱ)のBhas 42細胞における形質転換試験の結果

注) 細胞増殖率測定はセルカウント法で実施した

● : 相対細胞増殖率(%), ○ : 形質転換巢数/ウェル

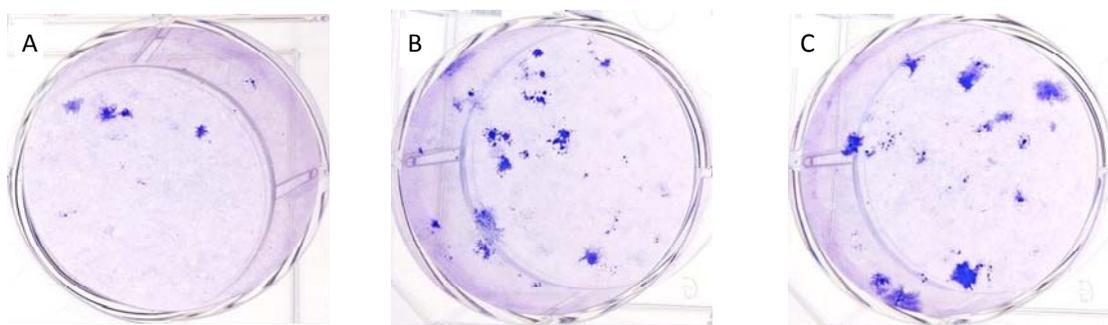


図4 ギムザ染色したBhas 42細胞の代表的ウェル

A: 陰性(溶媒)対照群、B: 陽性対照群、C: 0.16 mM 硫酸銅(Ⅱ)