

## 最 終 報 告 書

(9Z,12Z,15Z) -オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の  
Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験 (プロモーション試験)

試験番号 T-G436

試験期間 : 2019 年 11 月 21 日 - 2020 年 1 月 30 日

### 試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所  
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

### 試験委託者

厚生労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質対策課  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 2 号

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

## 2. 目次

1.	試験責任者陳述書	2
2.	目次	3
3.	試験実施概要	5
3.1	試験番号	5
3.2	試験標題	5
3.3	試験目的	5
3.4	試験委託者	5
3.5	試験受託者	5
3.6	試験実施施設	5
3.7	試験日程	5
3.8	試験責任者	5
3.9	試験担当者	5
3.10	予見することができなかつ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つたこと	6
3.11	試験資料保存	6
3.12	試験責任者の署名	7
4.	要約	8
5.	緒言	10
6.	試験材料及び方法	11
6.1	被験物質及び溶媒	11
6.1.1	被験物質	11
6.1.2	溶媒	12
6.1.3	溶媒の選択理由	12
6.2	被験液の調製	12
6.2.1	調製方法	12
6.2.1.1	細胞増殖試験	12
6.2.1.2	形質転換試験	12
6.2.2	調製頻度	13
6.2.3	安定性	13
6.3	対照物質	13
6.3.1	陰性（溶媒）対照	13
6.3.2	陽性対照	13
6.4	細胞株、培養方法及び培養液	14
6.4.1	細胞株	14
6.4.2	培養液及び細胞の培養方法	14
7.	試験方法	15

7.1	識別方法.....	15
7.2	用量の設定.....	15
7.2.1	細胞増殖試験.....	15
7.2.2	形質転換試験.....	15
7.3	細胞増殖試験.....	15
7.3.1	実験操作.....	16
7.3.2	相対細胞増殖率の算出.....	16
7.4	形質転換試験.....	17
7.4.1	実験操作.....	17
7.4.2	形質転換巣（フォーカス）の観察及び計測.....	17
7.5	結果の解析.....	18
7.5.1	統計解析.....	18
7.5.2	数値の取扱い.....	18
7.6	試験成立基準.....	19
7.7	結果の判定.....	19
8.	試験結果及び考察.....	20
8.1	細胞増殖試験.....	20
8.2	形質転換試験.....	20
9.	参考文献.....	22
<b>図</b>		
図 1	(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の Bhas 42 細胞における細胞増殖試験の相対細胞増殖率.....	23
図 2	(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の Bhas 42 細胞における形質転換試験の結果.....	24
<b>表</b>		
表 1	(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の Bhas 42 細胞における細胞増殖試験の相対細胞増殖率.....	25
表 2	(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の Bhas 42 細胞における形質転換試験の相対細胞増殖率.....	26
表 3	(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の Bhas 42 細胞における形質転換試験の結果.....	27
信頼性保証書.....		28

T-G436

### 3. 試験実施概要

#### 3.1 試験番号

T-G436

#### 3.2 試験標題

(9Z,12Z,15Z) -オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験 (プロモーション試験)

#### 3.3 試験目的

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験により、(9Z,12Z,15Z) -オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の *in vitro* での発がんプロモーション作用を検討した。

#### 3.4 試験委託者

厚生労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質対策課  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1 丁目 2 番 2 号

#### 3.5 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

#### 3.6 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所  
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

#### 3.7 試験日程

試験開始日	:	2019 年 11 月 21 日
被験物質受領日	:	2019 年 11 月 19 日
実験開始日	:	2019 年 11 月 21 日
実験終了日	:	2020 年 1 月 6 日
試験終了日	:	2020 年 1 月 30 日

#### 3.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部  
福田 隆之

#### 3.9 試験担当者

被験物質管理責任者： 山崎 英一

試験担当者 : 高部 道仁、中村 真生、比嘉 浩和、林 卓央、西村 諒一

### 3.10 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

本試験において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として、被験物質保存室の冷蔵・冷凍庫 MPR-214FS の温度モニター用 Thermo Recorder TR-71W において記録データの吸い上げ不能が発生したため、2019年12月2日05:00～12月17日07:50の間の温度データが欠失したことが挙げられる。しかし、上記期間における当該冷蔵・冷凍庫温度の日常確認(2回/平常勤務日、Thermo Recorder のモニター表示温度)の記録では、冷蔵庫が3.4～4.8℃、冷凍庫が-29.2～-27.8℃と正常範囲内にあり、またこの期間中に温度異常警報の発報もなかったことから、これらの機器の温度は正常に保たれていたものと考えられる。したがって、試験の信頼性への影響はないものと判断した。

その他、試験計画書に従わなかったことはなかった。

### 3.11 試資料保存

試験計画書(変更書含む)、記録文書、被験物質、生データ及び報告書類(最終報告書の原本を含む)は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に最終報告書提出後10年間保存する。期間終了後の保存については、厚生労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質対策課と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

#### 4. 要約

「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」に従い、Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験により、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の *in vitro* での発がんプロモーション作用を検討した。

形質転換試験の用量を設定するため、「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」に定められた 2790  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した 1395、698、349、174、87.2、43.6 及び 21.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の計 8 用量を設定して細胞増殖試験を行った。その結果、被験物質処理群では 2790  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 87.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量で培養液中に被験物質に起因する析出が認められたため、吸光度測定への影響を考慮し、培養終了後に倒立位相差顕微鏡により詳細に細胞状態を観察した。その結果、陰性（溶媒）対照群 1 と比較して、被験物質処理群の 2790  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と 1395  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量では、細胞密度の明らかな減少が認められた。相対細胞増殖率の測定では、87.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と 43.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 2 用量間で、相対細胞増殖率の急激な減少が認められ、 $\text{IC}_{90}$  及び  $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ 82.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 62.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と算出された。1395  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量では、顕微鏡観察の結果に反し、相対細胞増殖率の低下が認められなかったが、これらの用量では、被験物質がプレート底面に固着したため、クリスタルバイオレットの過剰な染色により、吸光値に影響したものと推察された。以上の結果に基づき、「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」を参考とし、細胞毒性が認められない用量に 2 用量、細胞毒性が認められない用量から増殖が 50% 阻害される用量 ( $\text{IC}_{50}$ ) 間に 2 用量、 $\text{IC}_{50}$  から増殖が 90% 阻害される用量 ( $\text{IC}_{90}$ ) 間に 1 用量が得られるように、最高用量を 80.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし、公差 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で希釈した 70.0、60.0、50.0、40.0、30.0、20.0 及び 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の計 8 用量を設定した。

形質転換試験の結果、被験物質処理群の 50.0 ~ 80.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量では、細胞毒性の影響により、明らかに細胞密度がコンフルエントに達していないことが確認されたため、統計解析の対象から除外した。評価可能な被験物質処理群の 10.0、20.0、30.0 及び 40.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量における形質転換率は、それぞれ 8.5、9.3、7.2 及び 8.7 個/ウェルであり、10.0 ~ 40.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量で陰性（溶媒）対照群 1 の 8.2 個/ウェルに対して統計学的に有意な増加が認められなかった（Dunnett の多重比較検定、 $p > 0.05$ ）ことから、本被験物質には *in vitro* での発がんプロモーション作用はないものと考えられた。

なお、陰性（溶媒）対照群 1 における形質転換率は 8.2 個/ウェルと 12 個/ウェル未満であった。一方、陽性対照群における形質転換率は 26.0 個/ウェルと、陰性（溶媒）対照群 2 の 6.8 個/ウェルと比較して、統計学的に有意な増加を示した（Student の  $t$  検定、 $p < 0.05$ ）。また、細胞増殖試験における各用量の評価可能なウェル数はすべ

T-G436

て3ウェルであり、形質転換試験では各用量の評価可能なウェル数はすべて6ウェルであった。形質転換試験における評価可能な用量は4用量であった。これらの結果より、本試験は適切に実施されたものと判断した。

以上の結果から、本試験条件下において、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸は *in vitro* での発がんプロモーション作用を有さない(陰性)と判定した。

## 5. 緒言

(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の安全性評価の一環として、Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験により、(9Z,12Z,15Z) -オクタデカ-9,12,15-トリエン酸の *in vitro* での発がんプロモーション作用を検討したので、その成績を報告する。

遵守した基準及び採用した試験方法などは以下の通りである。

### 1) GLP

- 「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づき試験施設等が具備すべき基準」  
(昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号)

### 2) 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)
- 「Series on Testing & Assessment No. 231; Guidance Document on the *In Vitro* Bhas 42 Cell Transformation Assay」  
(OECD : 2017 年 7 月 20 日)



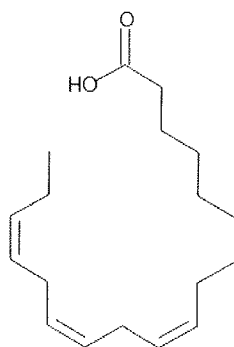
T-G436

## 6. 試験材料及び方法

### 6.1 被験物質及び溶媒

#### 6.1.1 被験物質

名称 : (9Z,12Z,15Z) -オクタデカ-9,12,15-トリエン酸  
製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社  
ロット番号 : APG0739  
CAS 番号 : 463-40-1  
入手量 : 1 g×10 本  
構造式 :



分子量 : 278.433  
外観 : わずかにうすい黄色、澄明の液体  
密度 (20°C) : 0.916 g/mL  
屈折率 n<sub>20/D</sub> : 1.480  
水分 : 0.1%  
含量 (GC) : 99.3%  
融点 : -1.65E+01°C  
引火点 : 113°C  
logP (オクタノール - 水) : 6.46  
水溶性 : 0.124 mg/L  
蒸気圧 : 5.40E-07 mmHg  
保存条件 : 冷凍 (-20°C)、遮光、密閉、不活性ガス封入  
保存場所 : 東京研究所 被験物質保存室  
残量の処置 : 実験終了後の残量はすべて廃棄した。  
取り扱い : 被験物質使用後、窒素ガス充填を行った。

上記被験物質情報は、製造元の COA ならびに公開情報に基づく。

### 6.1.2 溶媒

名称	:	ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide、DMSO)
ロット番号	:	KCN0182
製造元	:	富士フイルム和光純薬株式会社
規格	:	試薬特級
保存条件	:	室温
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室

### 6.1.3 溶媒の選択理由

被験物質情報から、本被験物質の水溶性は 0.124 mg/L と報告されているため、55.8 mg/mL では溶解しないと判断した。このため、その他の溶媒で溶解性試験を実施した結果、本被験物質は DMSO 及びアセトンに 558 mg/mL の濃度で溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかった。したがって、被験物質の溶解性が良好であり、*in vitro* の形質転換試験に広く用いられており、背景データが豊富であることから、溶媒として DMSO を選択した。

## 6.2 被験液の調製

### 6.2.1 調製方法

被験物質と溶媒の混合液を被験液、被験液を添加した培養液を被験物質処理液と定義した。

#### 6.2.1.1 細胞増殖試験

- 1) 被験物質 1.1160 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。
- 2) 溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 558 mg/mL 溶液を調製した。
- 3) 558 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL : 溶媒 1 mL) で 7 段階希釈し、279、140、69.8、34.9、17.4、8.72 及び 4.36 mg/mL の計 8 濃度段階の被験液を調製した。
- 4)  $\gamma$  線滅菌済プラスチック遠沈管に DF5F 培養液 9.95 mL ずつ分注し、そこに 2) 及び 3) で調製した 8 濃度段階の被験液 0.05 mL 添加し、それぞれ攪拌したものを被験物質処理液とした。

#### 6.2.1.2 形質転換試験

- 1) 被験物質 0.0800 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。
- 2) 溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 16.0 mg/mL 溶液を調製した。
- 3) 16.0 mg/mL 溶液の 0.875、0.750、0.625、0.500、0.375、0.250 及び 0.125 mL に対し、溶媒の 0.125、0.250、0.375、0.500、0.625、0.750 及び 0.875 mL を添加し、14.0、12.0、10.0、8.00、6.00、4.00 及び 2.00 mg/mL の計 8 濃度段階の被験液を調製した。

- 4)  $\gamma$ 線滅菌済プラスチック遠沈管に DF5F 培養液 19.9 mL ずつ分注し、そこに 2) 及び 3) で調製した 8 濃度段階の被験液 0.1 mL 添加し、それぞれ攪拌したものを被験物質処理液とした。

### 6.2.2 調製頻度

用時に調製した。形質転換試験では細胞への処理毎に計 3 回調製した。

### 6.2.3 安定性

用時調製のため、安定性確認は実施しなかった。

## 6.3 対照物質

### 6.3.1 陰性（溶媒）対照

被験物質処理群に対する陰性（溶媒）対照を陰性（溶媒）対照 1 とし、溶媒として用いる DMSO の最終濃度が 0.5 vol% となるように DF5F 培養液に添加したものを陰性（溶媒）対照処理液 1 とした。

### 6.3.2 陽性対照

12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) は DMSO (富士フィルム和光純薬株式会社、試薬特級、ロット番号 KCN0182) に溶解し、0.050 mg/mL に調製した (ストック溶液)。調製した陽性対照物質溶液は、約 0.25 mL ずつ分注後 -20°C 以下で保存し、調製後 2 年以内のものを使用した。なお、一度解凍した溶液は再使用しなかった。

#### 1) 物性情報

名称	:	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)
ロット番号	:	SLBX8889
製造元	:	Sigma-Aldrich
規格	:	分子生物学用 (99.0%以上)
保存方法	:	冷凍 (-20°C 以下)
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 冷凍庫

#### 2) 調製方法

- (1) ストック溶液を用時解凍した。
  - (2) DF5F 培養液を用い、ストック溶液 0.02 mL に対し、DF5F 培養液 19.98 mL の割合で陽性対照処理液を調製した (最終濃度: 50 ng/mL)。
  - (3) 陽性対照群に対する陰性（溶媒）対照を陰性（溶媒）対照 2 とし、DMSO 0.02 mL に対し、DF5F 培養液 19.98 mL の割合で処理培養液を調製し、これを陰性（溶媒）対照 2 とした。
  - (4) 残余物は、発がん性廃棄物として廃棄した。
- #### 3) 陽性対照物質の選択理由

「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」に使用が定められているため。

## 6.4 細胞株、培養方法及び培養液

### 6.4.1 細胞株

名称	:	Bhas 42 細胞 (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) <sup>1)</sup>
ロット番号 (購入)	:	053000
入手元	:	独立行政法人 医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク
入手年月日	:	2013 年 11 月 20 日
特性検査	:	マイコプラズマ汚染 ; 陰性 コロニー形成能 ; 1.12 (基準 ; 0.5 以上)
選択理由	:	「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」に使用が定められているため。
供試時の継代数	:	細胞増殖試験では 1 継代、形質転換試験では 1 継代を使用した。

### 6.4.2 培養液及び細胞の培養方法

本試験では、牛胎児血清 (FBS : Fetal Bovine Serum) を 5 vol%、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液を 1 vol% 含む Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12) (DF5F 培養液) を用い、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の条件下で培養した。培養液は、調製後 1 箇月を使用期限として冷蔵保存した。

#### 1) 牛胎児血清 (FBS : Fetal Bovine Serum)

ロット番号	:	184j0e2
製造元	:	Moregate Biotech
保存方法	:	冷凍 (-20°C 以下)
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 冷凍庫

#### 2) Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12)

ロット番号	:	2120374
製造元	:	Thermo Fisher Scientific, Inc.
保存方法	:	冷蔵
保存場所	:	東京研究所 標本作製室 冷蔵庫

#### 3) ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液

ロット番号	:	L9N0177
製造元	:	ナカライテスク株式会社
組成	:	ペニシリン ; 10,000 U/mL ストレプトマイシン ; 10,000 µg/mL
保存方法	:	冷凍 (-20°C 以下)

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷凍庫

## 7. 試験方法

形質転換試験の用量設定のための細胞増殖試験を実施し、形質転換試験を行った。なお、形質転換試験はプロモーション試験のみ実施した。

### 7.1 識別方法

使用機材には、試験番号、処理群、コード番号などを記載して識別した。

### 7.2 用量の設定

#### 7.2.1 細胞増殖試験

「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」に従って、最高用量を 2790  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし、以下公比 2 で希釈した 1395、698、349、174、87.2、43.6 及び 21.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の計 8 用量を設定した。これにブランク群及び陰性（溶媒）対照群 1 を設けた。

#### 7.2.2 形質転換試験

細胞増殖試験の結果、被験物質処理群では 2790  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 87.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量で培養液中に被験物質に起因する析出が認められたため、吸光度測定への影響を考慮し、培養終了後に倒立位相差顕微鏡により詳細に細胞状態を観察した。その結果、陰性（溶媒）対照群 1 と比較して、被験物質処理群の 2790  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 1395  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量では、細胞密度の明らかな減少が認められた。相対細胞増殖率の測定では、87.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 43.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 2 用量間で、相対細胞増殖率の急激な減少が認められ、 $\text{IC}_{90}$  及び  $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ 82.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 62.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と算出された。1395  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量では、顕微鏡観察の結果に反し、相対細胞増殖率の低下が認められなかったが、これらの用量では、被験物質がプレート底面に固着したため、クリスタルバイオレットの過剰な染色により、吸光値に影響したものと推察された。以上の結果に基づき、「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」を参考とし、細胞毒性が認められない用量に 2 用量、細胞毒性が認められない用量から増殖が 50% 阻害される用量 ( $\text{IC}_{50}$ ) 間に 2 用量、 $\text{IC}_{50}$  から増殖が 90% 阻害される用量 ( $\text{IC}_{90}$ ) 間に 1 用量が得られるように、最高用量を 80.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし、公差 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で希釈した 70.0、60.0、50.0、40.0、30.0、20.0 及び 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の計 8 用量を設定した。これにブランク群、陰性（溶媒）対照群 1、2 及び陽性対照群を設けた。

### 7.3 細胞増殖試験

形質転換試験の用量を設定するための予備試験として実施した。試験には、ブランク群（培養液のみ）、陰性（溶媒）対照群 1 及び被験物質処理群を設けた。プレートは  $\gamma$  線滅菌済の 6 ウェルプレートを用い、1 群当りのウェル数は 3 ウェルとした。な

お、以下の試験操作のうち、無菌性を必要とする場合は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

### 7.3.1 実験操作

- 1) 継代細胞を 0.25% Trypsin 溶液 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) により剥離させ、DF5F 培養液を用いて、 $0.7 \times 10^4$  cells/mL の細胞懸濁液を調製した。本細胞懸濁液 2 mL ( $1.4 \times 10^4$  cells/ウェル) を 6 ウェルプレートに播種し、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下の炭酸ガス培養器内に入れ、約 4 日間静置した。
- 2) 播種 4 日後、プレートより培養液を除去し、各濃度段階の被験物質処理液及び陰性 (溶媒) 対照処理液 1 の各々 2 mL を、対応する各ウェルに分注した。ブランク群については、細胞が播種されていないウェルに培養液のみ 2 mL を分注した。CO<sub>2</sub> 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下の炭酸ガス培養器内に入れ約 3 日間培養した。
- 3) 播種 7 日後、倒立位相差顕微鏡で観察し、プレート底面に被験物質の固着が認められた用量のみ、プレートより培養液を除去後、約 2 mL の Dulbecco リン酸緩衝液 (D-PBS(-)) を加えて、廃棄した。各ウェルにメチルアルコール約 2 mL を分注し、10 分間以上固定した。固定後、0.1 vol% クリスタルバイオレット染色液 1.5 mL を各ウェルに分注し、室温で 15 分間以上染色した。プレートを水洗し、風乾させた後、色素抽出液 (50 vol% エタノール及び 0.02 mol/L 塩酸) 2 mL を各ウェルに分注し、15 分間以上静置 (色素抽出) した。
- 4) 各抽出液 100  $\mu$ L を 96 ウェルプレートに分取し、540 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (SPECTRAmax PLUS384) で測定した。

### 7.3.2 相対細胞増殖率の算出

次式により、被験物質処理群における相対細胞増殖率 (%) を求めた。なお、計算値の取り扱いは、7.5.2 項に従った。

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

- X : 被験物質処理群の相対細胞増殖率 (%)  
 S : 陰性 (溶媒) 対照群 1 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 (培地のみを入れたウェル)

IC<sub>50</sub> 及び IC<sub>90</sub> 値の算出には、「50% (あるいは 90%) 未満の細胞増殖抑制率を示す用量の中で、最高用量とその細胞増殖抑制率」及び「50% (あるいは 90%) 以上の細胞増殖抑制率を示す用量の中で、最低用量とその細胞増殖抑制率」を値とした、2 点直線法を用いた。

## 7.4 形質転換試験

形質転換試験において、被験物質の細胞毒性を評価するため、並行して細胞増殖試験も実施した。試験には、被験物質処理群、ブランク群（細胞増殖試験のみ）、陰性（溶媒）対照群 1、2 及び陽性対照群を設けた。プレートは  $\gamma$  線滅菌済の 6 ウェルプレートを用い、1 群当りのウェル数は形質転換試験では 6 ウェル、細胞増殖試験では 3 ウェルを用いた。なお、以下の試験操作のうち、無菌性を必要とする場合は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

### 7.4.1 実験操作

- 1) 継代細胞を 0.25% Trypsin 溶液 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) により剥離させ、DF5F 培養液を用いて、 $0.7 \times 10^4$  cells/mL の細胞懸濁液を調製した。本細胞懸濁液 2 mL ( $1.4 \times 10^4$  cells/ウェル) を 6 ウェルプレートに播種し、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下の炭酸ガス培養器内に入れ、約 4 日間静置した。
- 2) 播種 4 日後、プレートより培養液を除去し、各濃度段階の被験物質処理液、陰性（溶媒）対照処理液 1、2 及び陽性対照処理液の各々 2 mL を、各ウェルに分注した。ブランク群については、播種 4 日後のみ細胞が播種されていないウェルに培養液 2 mL を分注した。CO<sub>2</sub> 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下の炭酸ガス培養器内に入れ約 3 日間培養した。播種 7 日後及び播種 11 日後にも同様の操作を行った。
- 3) 形質転換用プレートについては、播種 14 日後、各プレートより培養液を除去し、新鮮な DF5F 培養液 2 mL を各ウェルに分注した。CO<sub>2</sub> 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下の炭酸ガス培養器内に入れて更に約 7 日間培養した。
- 4) 播種 21 日後、プレートより培養液を除去し、メタノール約 1 mL を各ウェルに分注し、10 分間以上固定した。メタノールを除去し、5 vol% ギムザ液を 1.5 mL ずつ分注し、15 分以上染色後、水洗し、風乾した。
- 5) 細胞増殖試験用プレートについては、播種 7 日後、7.3.1 及び 7.3.2 項同様に相対細胞増殖率を算出した。なお、計算式は次式に従った。

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

X : 被験物質処理群または陽性対照群の相対細胞増殖率 (%)

S : 陰性（溶媒）対照群 1 または 2 の吸光度

T : 被験物質処理群または陽性対照群の吸光度

B : ブランクの吸光度（培地のみを入れたウェル）

### 7.4.2 形質転換巣（フォーカス）の観察及び計測

肉眼あるいは実体顕微鏡下で細胞を観察し、次の基準により形質転換巣であると判定したものを計数した。なお、形質転換巣は、下記の形態的特徴のすべてを必要とせず、特に 2) から 6) が明確に観察出来る場合に計数した。なお、観察前にプレートを

コード化し、処理条件が判らない状況下で観察した。観察後、プレートは廃棄した。

- 1) 形質転換巣が 100 細胞以上で構成されているもの。
- 2) 形質転換巣の細胞が紡錘形を示し、周囲の細胞とは明確に異なる細胞形態を示すもの (spindle-shaped)。
- 3) 細胞質が塩基性 (濃い紫色) に強く染まっているもの (basophilic)。
- 4) 形質転換巣の細胞がランダムな配列で互いに交差しているもの (criss-cross)。
- 5) 積み重なりあった細胞の増殖が見られるもの (piling-up)。
- 6) 接触阻害を示すコンフルエント状態の細胞周囲に浸潤 (invasive) しているもの。

## 7.5 結果の解析

### 7.5.1 統計解析

- 1) 試験成立基準  
形質転換率 (平均形質転換巣/ウェル) について、陰性 (溶媒) 対照群 2 と陽性対照群間で Student の  $t$  検定を行った (有意水準 5%、上側確率)。
- 2) 結果の判定
  - (1) 形質転換率について、陰性 (溶媒) 対照群 1 と被験物質処理群間で Dunnett の多重比較検定 (有意水準 5%、片側検定) を行った。被験物質処理群の 50.0 ~ 80.0  $\mu\text{g/mL}$  の用量では細胞毒性の影響により、明らかに細胞密度がコンフルエントに達していないことが確認された。従って、その用量は統計解析の対象から除外し、「TOXIC」と表した。
  - (2) (1)において、5%水準で有意性が認められなかったため、Jonckheere の検定 (有意水準 5%、上側確率) は実施しなかった。

### 7.5.2 数値の取扱い

- 1) 細胞増殖試験
  - (1) 各ウェルの吸光度 (表示: 小数点第 3 位)
  - (2) 用量当たりの平均吸光度 (表示: 小数点第 3 位) 及び標準偏差 (表示: 小数点第 3 位)
  - (3) 相対細胞増殖率 (単位: %、表示: 有効数字 3 桁)
  - (4)  $\text{IC}_{50}$  及び  $\text{IC}_{90}$  値 (単位:  $\mu\text{g/mL}$ 、表示: 有効数字 3 桁)
- 2) 形質転換試験
  - (1) 相対細胞増殖率の測定に関する数値は、細胞増殖試験と同様とした。
  - (2) 各ウェルの形質転換巣の数 (単位: 個、表示: 整数)
  - (3) 用量当たりの形質転換率 (単位: 個/ウェル、表示: 小数点第 1 位) 及び標準偏差 (表示: 小数点第 1 位)



## 7.6 試験成立基準

以下のすべての項目を満たしたため、試験は適切に実施されていたと判断した。

- 1) 細胞増殖試験
  - (1) 各用量の評価可能なウェル数が 2 ウェル以上であること。
- 2) 形質転換試験
  - (1) 各用量の評価可能なウェル数が 5 ウェル以上であること。
  - (2) 評価可能な用量数が 4 用量以上であること。
  - (3) 陰性（溶媒）対照群の形質転換率が 12 個/ウェル未満であること。
  - (4) 陽性対照群の形質転換率が、陰性（溶媒）対照群 2 と比較して統計学的に有意な増加を示すこと。

## 7.7 結果の判定

結果の判定は下記の基準によるが、生物学的妥当性を勘案して総合的に評価した。

- 1) 陰性  
被験物質処理群の形質転換率が陰性（溶媒）対照群 1 と比較して統計学的有意差が認められない場合。
- 2) 陽性  
被験物質処理群の形質転換率が陰性（溶媒）対照群 1 と比較して、統計学的に有意に増加し、かつ、その作用に濃度依存性が認められる場合。

## 8. 試験結果及び考察

### 8.1 細胞増殖試験

結果を図 1 及び表 1 に示した。

形質転換試験の用量を設定するため、「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」に定められた 2790 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した 1395、698、349、174、87.2、43.6 及び 21.8 µg/mL の計 8 用量を設定して細胞増殖試験を行った。被験物質処理群では 2790 µg/mL から 87.2 µg/mL の用量で培養液中に被験物質に起因する析出が認められたため、吸光度測定への影響を考慮し、培養終了後に倒立位相差顕微鏡により詳細に細胞状態を観察した。その結果、陰性（溶媒）対照群 1 と比較して、被験物質処理群の 2790 µg/mL と 1395 µg/mL の用量では、細胞密度の明らかな減少が認められた。相対細胞増殖率の測定では、87.2 µg/mL と 43.6 µg/mL の 2 用量間で、相対細胞増殖率の急激な減少が認められ、IC<sub>90</sub> 及び IC<sub>50</sub> はそれぞれ 82.9 µg/mL 及び 62.3 µg/mL と算出された。1395 µg/mL 以上の用量では、顕微鏡観察の結果に反し、相対細胞増殖率の低下が認められなかったが、これらの用量では、被験物質がプレート底面に固着したため、クリスタルバイオレットの過剰な染色により、吸光値に影響したものと推察された。以上の結果に基づき、「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」を参考とし、細胞毒性が認められない用量に 2 用量、細胞毒性が認められない用量から増殖が 50% 阻害される用量 (IC<sub>50</sub>) 間に 2 用量、IC<sub>50</sub> から増殖が 90% 阻害される用量 (IC<sub>90</sub>) 間に 1 用量が得られるように、最高用量を 80.0 µg/mL とし、公差 10 µg/mL で希釈した 70.0、60.0、50.0、40.0、30.0、20.0 及び 10.0 µg/mL の計 8 用量を設定した。

### 8.2 形質転換試験

結果を図 2 及び表 2 ならびに表 3 に示した。

形質転換試験の結果、被験物質処理群の 50.0 ~ 80.0 µg/mL の用量では、明らかに細胞密度がコンフルエントに達していないことが確認されたため、統計解析の対象から除外した。評価可能な被験物質処理群の 10.0、20.0、30.0 及び 40.0 µg/mL の用量における形質転換率は、それぞれ 8.5、9.3、7.2 及び 8.7 個/ウェルであり、10.0 ~ 40.0 µg/mL の用量において、陰性（溶媒）対照群 1 の 8.2 個/ウェルに対して統計学的に有意な増加が認められなかった（Dunnett の多重比較検定、 $p > 0.05$ ）ことから、本被験物質には *in vitro* での発がんプロモーション作用はないものと考えられた。

なお、陰性（溶媒）対照群 1 における形質転換率は 8.2 個/ウェルと 12 個/ウェル未満であった。一方、陽性対照群における形質転換率は 26.0 個/ウェルと、陰性（溶媒）対照群 2 の 6.8 個/ウェルと比較して、統計学的に有意な増加を示した（Student の *t* 検定、 $p < 0.05$ ）。また、細胞増殖試験における各用量の評価可能なウェル数はすべて 3 ウェルであり、形質転換試験では各用量の評価可能なウェル数はすべて 6 ウェル

T-G436

であった。形質転換試験における評価可能な用量は4用量であった。これらの結果より、本試験は適切に実施されたものと判断した。

以上の結果から、本試験条件下において、(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸は *in vitro* での発がんプロモーション作用を有さない(陰性)と判定した。

T-G436

## 9. 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: 921-930 (1988)

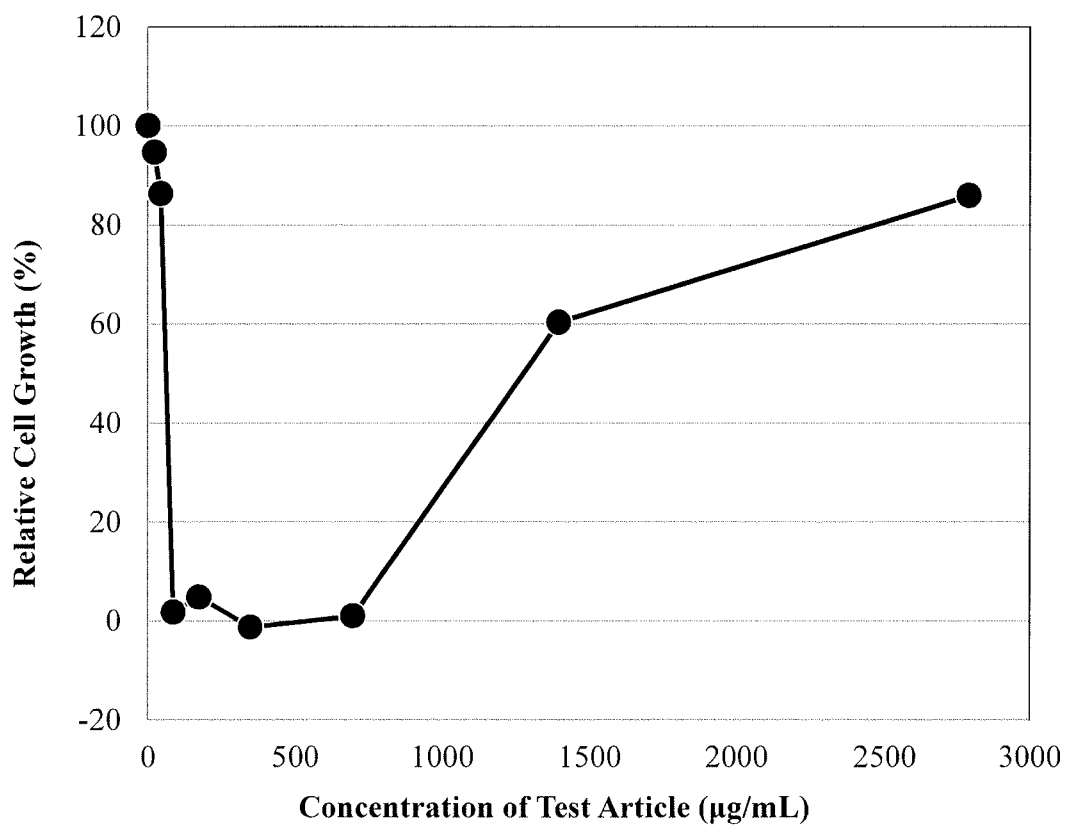


図1 (9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸のBhas 42 細胞における細胞増殖試験の相対細胞増殖率

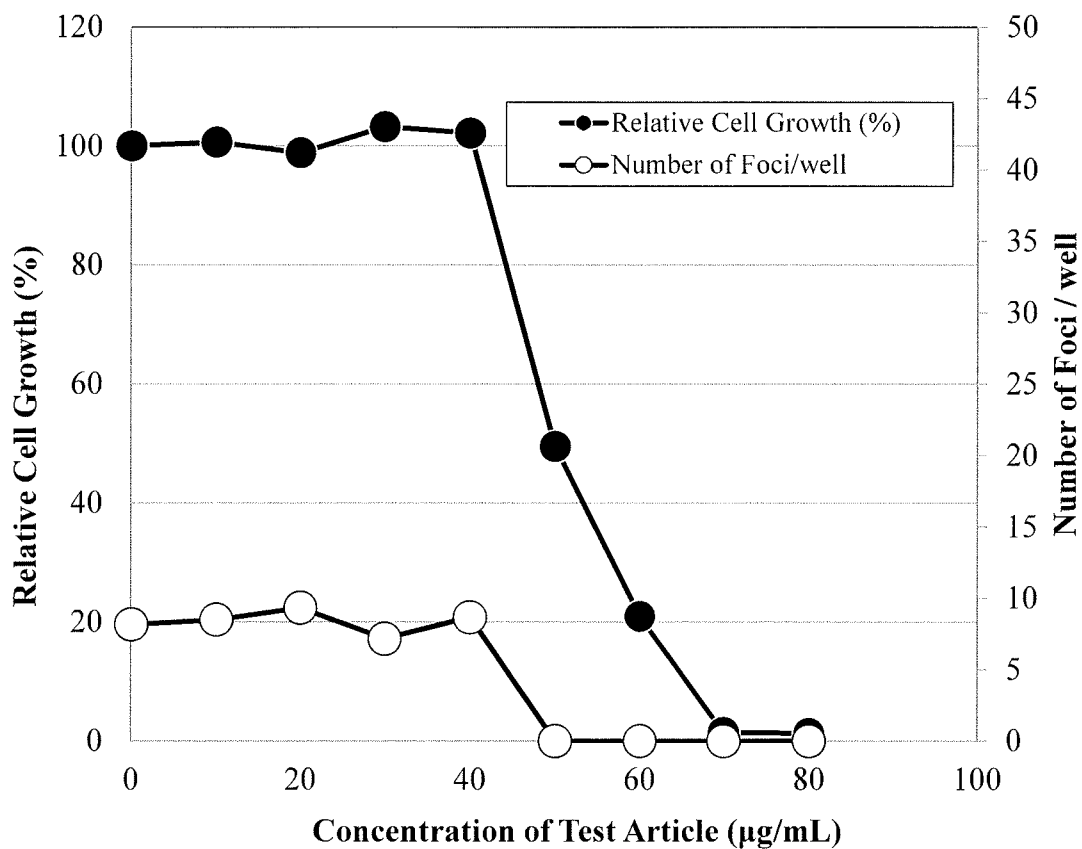


図2 (9Z,12Z,15Z) -オクタデカ-9,12,15-トリエン酸のBhas 42 細胞における形質転換試験の結果

表1 (9Z,12Z,15Z) -オクタデカ-9,12,15-トリエン酸のBhas 42 細胞における細胞増殖試験の相対細胞増殖率

物質名	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	ウェル当たりの吸光度 (540 nm)					相対細胞 <sup>a)</sup> 増殖率 (%)
		1	2	3	平均値	標準偏差	
ブランク群	-	0.090	0.092	0.094	0.092	0.002	-
陰性(溶媒)対照群 <sup>b)</sup>	0.5 vol%	0.523	0.561	0.553	0.546	0.020	100
被験物質処理群	21.8	0.532	0.515	0.517	0.521	0.009	94.6
	43.6	0.489	0.488	0.473	0.483	0.009	86.3
	87.2 <sup>#</sup>	0.099	0.100	0.101	0.100	0.001	1.76
	174 <sup>#</sup>	0.111	0.114	0.116	0.114	0.003	4.78
	349 <sup>#</sup>	0.082	0.083	0.093	0.086	0.006	-1.32
	698 <sup>#</sup>	0.097	0.095	0.097	0.096	0.001	0.955
	1395 <sup>##</sup>	0.306	0.363	0.428	0.366	0.061	60.3
	2790 <sup>###</sup>	0.495	0.480	0.470	0.482	0.013	85.9

a) 各用量における平均吸光度から、ブランク群の平均吸光度を減じた値に対して、陰性(溶媒)対照群の値を100%とした場合の相対値を示す。

b) 陰性(溶媒)対照群: 0.5 vol% dimethyl sulfoxide (DMSO)

# 培養液中に析出有り。

## プレート底面に被験物質の固着有り。

表2 (9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸のBhas 42 細胞における形質転換試験の相対細胞増殖率

物質名	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	ウェル当たりの吸光度 (540 nm)					相対細胞 <sup>d)</sup> 増殖率 (%)
		1	2	3	平均値	標準偏差	
ブランク群	-	0.084	0.091	0.085	0.087	0.004	-
陰性(溶媒)対照群1 <sup>b)</sup>	0.5 vol%	0.508	0.485	0.497	0.497	0.012	100
被験物質処理群	10.0	0.500	0.493	0.505	0.499	0.006	101
	20.0	0.488	0.498	0.490	0.492	0.005	98.9
	30.0	0.508	0.502	0.520	0.510	0.009	103
	40.0	0.487	0.526	0.504	0.506	0.020	102
	50.0	0.290	0.298	0.281	0.290	0.009	49.5
	60.0	0.160	0.173	0.185	0.173	0.013	21.0
	70.0	0.098	0.081	0.099	0.093	0.010	1.46
	80.0 <sup>#</sup>	0.080	0.097	0.099	0.092	0.010	1.30
陰性(溶媒)対照群2 <sup>c)</sup>	0.1 vol%	0.542	0.539	0.527	0.536	0.008	100
陽性対照群 (TPA)	50 ng/mL	0.817	0.847	0.820	0.828	0.017	165

a) 各用量における平均吸光度から、ブランク群の平均吸光度を減じた値に対して、陰性(溶媒)対照群の値を100%とした場合の相対値を示す。

b) 陰性(溶媒)対照群1: 0.5 vol% dimethyl sulfoxide (DMSO), c) 陰性(溶媒)対照群2: 0.1 vol% DMSO

TPA: 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

# 培養液中に析出有り。



表3 (9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸のBhas 42 細胞における形質転換試験の結果

物質名	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	形質転換巣/ウェル								相対細胞 <sup>a)</sup> 増殖率 (%)
		1	2	3	4	5	6	平均値 <sup>b)</sup>	標準偏差	
陰性(溶媒)対照群1 <sup>c)</sup>	0.5 vol%	5	7	10	9	9	9	8.2	1.8	100
被験物質処理群	10.0	5	6	8	12	10	10	8.5	2.7	101
	20.0	8	9	6	11	13	9	9.3	2.4	98.9
	30.0	7	9	5	8	8	6	7.2	1.5	103
	40.0	12	7	8	6	7	12	8.7	2.7	102
	50.0	0	0	0	0	0	0	0.0 <sup>TOXIC</sup>	0.0	49.5
	60.0	0	0	0	0	0	0	0.0 <sup>TOXIC</sup>	0.0	21.0
	70.0	0	0	0	0	0	0	0.0 <sup>TOXIC</sup>	0.0	1.46
	80.0 <sup>#</sup>	0	0	0	0	0	0	0.0 <sup>TOXIC</sup>	0.0	1.30
陰性(溶媒)対照群2 <sup>d)</sup>	0.1 vol%	9	6	7	8	6	5	6.8	1.5	100
陽性対照群 (TPA)	50 ng/mL	31	22	30	21	25	27	26.0 <sup>†</sup>	4.1	165

a) 各用量における平均吸光度から、ブランク群の平均吸光度を減じた値に対して、陰性(溶媒)対照群の値を100%とした場合の相対値を示す。

b) 形質転換率(個/ウェル)を示す。

c) 陰性(溶媒)対照群1: 0.5 vol% dimethyl sulfoxide (DMSO), d) 陰性(溶媒)対照群2: 0.1 vol% DMSO

TPA: 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

# 培養液中に析出有り。

†  $p < 0.05$  (Student's t検定)

TOXIC: 細胞毒性作用が強すぎ、細胞がconfluentにならなかったため評価対象外とした。