

(3) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1 mL 中の量	成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.3 mL	β -NADP ⁺	4 μ mol
MgCl ₂	5 μ mol	NADPH	– μ mol
KCl	33 μ mol	HEPES 緩衝液 (pH7.2)	4 μ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 μ mol	精製水	残量

(4) S9 mix の処理条件

① プレート法 2. 細胞浮遊法 3. その他 ()	
S9 量 (最終濃度)	5%
S9 蛋白量 (最終濃度)	1.37 mg/mL
処 理 時 間	6 h
回 復 時 間	18 h
備 考	

4. 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	ジメチルスルホキシド	関東化学株式会社	510F1666	分光分析用	100.0
溶媒選択の理由	溶媒検討の結果, 本被験物質は生理食塩液に 50 mg/mL で溶解しなかったが, ジメチルスルホキシド (以下 DMSO) には 500 mg/mL で溶解し, 溶液に発熱, 発泡, 変色は認められなかった. 従って, 本被験物質の溶媒 (陰性対照物質) には DMSO を用いた.				
被験物質溶液の性状	溶解 懸濁 その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	10 分～30 分 室温 : 細胞増殖抑制試験 10 分～25 分 室温 : 染色体異常試験 (短時間処理法) 10 分 室温 : 染色体異常試験 (連続処理法)				
純度換算の有無	有 無				

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試 験 実 施 期 間		2005 年 5 月 20 日から 2005 年 5 月 24 日	2005 年 5 月 20 日から 2005 年 5 月 24 日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	3.0 mL／培養器	2.5 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個／mL	4×10^3 個／mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.03 mL／培養器	0.03 mL／培養器
	S 9 m i x 添 加 量		0.5 mL／培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5%
	S 9 蛋 白 の 最 終 濃 度		1.37 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤で細胞を計数した。		
備考	* : 培養開始日を 0 日とした。		

(2) 細胞増殖抑制試験の結果

代謝活性化法によらない場合 (6-18 h)		代謝活性化法による場合 (6-18 h)	
用 量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	用 量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100	0 (溶媒)	100
125	93	100	88
250	34	200	87
500	9	300	57
750	4	400	61
1000	2	500	2
1500	0	750	12
2000	0	1000	0

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試 験 実 施 期 間		2005 年 5 月 27 日から 2005 年 6 月 8 日	2005 年 5 月 27 日から 2005 年 6 月 8 日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	3.0 mL／培養器	2.5 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個／mL	4×10^3 個／mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.03 mL／培養器	0.03 mL／培養器
	S 9 m i x 添 加 量		0.5 mL／培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5%
	S 9 蛋 白 の 最 終 濃 度		1.37 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備考	* : 培養開始日を 0 日とした.		

(4) 染色体異常試験の結果 (別表 1, 2 による.)

6. 連続処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		(24-0 h) 処理による 場合
試 験 実 施 期 間		2005 年 5 月 20 日から 2005 年 5 月 24 日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm
	培 養 液 量	5.0 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個／mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.05 mL／培養器
	処 理 時 間	24 h
	回 復 時 間	0 h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤で細胞を計数した。	
備考	* : 培養開始日を 0 日とした。	

(2) 細胞増殖抑制試験の結果

(24-0 h) 処理による場合	
用 量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100
50	97
100	101
200	63
300	0*
400	0
500	0

* : IC50 値は「0.4」として算出した.

(3) 染色体異常試験の条件

		(24-0 h) 処理による 場合
試 験 実 施 期 間		2005 年 6 月 17 日から 2005 年 6 月 28 日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm
	培 養 液 量	5.0 mL／培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個／mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.05 mL／培養器
	処 理 時 間	24 h
	回 復 時 間	0 h
備考	* : 培養開始日を 0 日とした.	

(4) 染色体異常試験の結果 (別表 1, 3 による.)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定	陽 性	陰 性
判定の理由 染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件のいずれの被験物質用量においても 5%未満であった。		

(2) 参考事項

- 細胞増殖抑制試験に先立ち、予備試験を実施した。短時間処理法 S9 mix 非共存下（以下－S9 mix）および S9 mix 共存下（以下＋S9 mix）ならびに連続処理法 24 時間処理（以下 24 時間処理）について、50, 500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を設定し、1 用量あたり 1 枚のプレートを用いて実施した。処理終了後のプレートを位相差倒立顕微鏡で観察し、陰性対照群プレートの細胞密度を 100% として相対的な細胞密度を判断した。その結果、各プレートの細胞密度は以下の通りであった。

処理条件 \ 用量 ($\mu\text{g/mL}$)	50	500	5000
－S9 mix	100%	50%	10%
＋S9 mix	100%	30%	20%
24 時間処理	100%	5%	0%

この結果に基づき、細胞増殖抑制試験の用量は下記を設定した。

- －S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/mL}$
 ＋S9 mix : 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 $\mu\text{g/mL}$
 24 時間処理 : 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$
- 細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は、－S9 mix で 202 $\mu\text{g/mL}$ 、＋S9 mix で 406 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間処理で 205 $\mu\text{g/mL}$ であった。
 IC_{50} を参考に、染色体異常試験は下記の用量を設定した。
 - －S9 mix : 100, 150, 200, 250, 300, 350 $\mu\text{g/mL}$
 - ＋S9 mix : 200, 300, 400, 450, 500 $\mu\text{g/mL}$
 - 24 時間処理 : 150, 175, 200, 225, 250, 275 $\mu\text{g/mL}$
- 染色体異常試験の予備鏡検の結果、＋S9 mix の 500 $\mu\text{g/mL}$ では、いずれのプレートにおいても 50 個以上の分裂中期細胞が得られなかったため、これらのプレートから作製した標本は観察の対象から除外した。
- 構造異常は、以下の分類¹に従って観察した。
 - 染色分体型切断
 - 染色分体型交換
 - 染色体型切断
 - 染色体型交換 (二動原体、環状染色体など)
 - 断片化

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。

- ・ 数的異常は、動原体数が 35 以上の倍数体細胞（核内倍加細胞を含む）とした。
- ・ 染色体異常細胞は、下記の定義で集計した。
 - 構造異常細胞：染色体構造異常を 1 個以上持つ細胞
 - 数的異常細胞：染色体数的異常を持つ細胞
- ・ 被験物質の染色体異常誘発性の判定基準は下記の通りとした。
 - 陰性：いずれの被験物質処理群においても、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が 5%未満である。
 - 疑陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が 5%以上 10%未満である。
 - 陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が 10%以上であり、用量依存的な増加傾向が認められる。
- ・ 統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。
- ・ 標本観察の結果、陰性対照群における染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件においても 5%未満であった。一方、陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件においても 10%以上であった。これらによって当試験は技術的に成立していることが示された。
- ・ 染色体異常試験において、1 枚のプレートあたり 500 個、すなわち各用量あたり 1000 個の細胞について、分裂中期細胞を数え、下式により分裂指数 (%) を算出した。

$$\text{分裂指数 (\%)} = \text{分裂中期細胞数} / \text{観察細胞数} \times 100$$
 またこれをもとに、各処理用量について、陰性対照値を 100%として下式により相対分裂指数 (%) を算出した。

$$\text{相対分裂指数 (\%)} = \text{被験物質処理群の分裂指数} / \text{陰性対照群の分裂指数} \times 100$$
- ・ 分裂指数測定の結果、細胞増殖率を指標とした場合に比べて顕著な分裂抑制が認められなかったことから、被験物質の細胞周期に対する著しい影響は無いものと考えられた (別表 1)。
- ・ 陽性対照物質に関する情報は以下の通りである。
 - マイトマイシン C (協和発酵工業株式会社, ロット番号 435ADB, 含量 99%)
 - ベンゾ[a]ピレン (東京化成工業株式会社, ロット番号 GG01, 含量 95.6%)
- ・ 参考文献
 1. 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第 3 分科会・遺伝毒性ワーキンググループ編「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンティスト社, 東京, 2000
 2. 祖父尼俊雄監修「染色体異常試験データ集・改訂 1998 年版」株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1999

別表 1 分裂指数測定結果

処理	処理-回復 時間 (h)	S9 mix の有無	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	相対分裂指数 (%)
陰性対照 (DMSO)	6-18	—	0	1000	71	7.1	100
クロロシクロ ヘキサン	6-18	—	100	1000	60	6.0	85
	6-18	—	150	1000	69	6.9	97
	6-18	—	200	1000	51	5.1	72
	6-18	—	250	1000	48	4.8	68
	6-18	—	300	1000	56	5.6	79
	6-18	—	350	1000	39	3.9	55
陰性対照 (DMSO)	6-18	+	0	1000	115	11.5	100
クロロシクロ ヘキサン	6-18	+	200	1000	95	9.5	83
	6-18	+	300	1000	76	7.6	66
	6-18	+	400	1000	53	5.3	46
	6-18	+	450	1000	29	2.9	25
	6-18	+	500	1000	5	0.5	4
陰性対照 (DMSO)	24-0	—	0	1000	46	4.6	100
クロロシクロ ヘキサン	24-0	—	150	1000	49	4.9	107
	24-0	—	175	1000	45	4.5	98
	24-0	—	200	1000	51	5.1	111
	24-0	—	225	1000	48	4.8	104
	24-0	—	250	1000	41	4.1	89
	24-0	—	275	1000	16	1.6	35

DMSO : ジメチルスルホキシド