

(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 (%)
	生理食塩液	株式会社 大塚製薬工場	K4E90	—	—
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，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）には生理食塩液を選択した．				
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～20 分 室温 : 細胞増殖抑制試験 10 分～30 分 室温 : 細胞増殖抑制試験-2 および 染色体異常試験（本試験）[同時調製] 5 分 室温 : 染色体異常試験（確認試験）				
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13日から 2005年5月17日	2005年5月13日から 2005年5月17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	2.7 mL／培養器	2.2 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	0.3 mL／培養器	0.3 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	98	125	96
250	86	250	99
500	5	500	19
750	0	750	0
1000	0	1000	0
1250	0	1250	0
1500	0	1500	0

(3) 染色体異常試験（本試験）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 6 月 1 日	2005 年 5 月 20 日から 2005 年 6 月 1 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	2.7 mL／培養器	2.2 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	0.3 mL／培養器	0.3 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（本試験）の結果（別表 1, 3 による.）

(5) 染色体異常試験（確認試験）の条件

		代謝活性化法 による場合
試 験 実 施 期 間		2005 年 6 月 10 日から 2005 年 6 月 16 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	2.2 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	0.3 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
	回 復 時 間	18 h
備考	*：培養開始日を 0 日とした。	

(6) 染色体異常試験（確認試験）の結果（別表 2, 4 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 13 日から 2005 年 5 月 17 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	4.5 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	0.5 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
12.5	102
25	104
50	121
75	110
100	123
125	115
150	110
200	86

(3) 細胞増殖抑制試験-2 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	4.5 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	0.5 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.	

(4) 細胞増殖抑制試験-2 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
100	106
150	95
200	106
250	100
300	76
350	26
400	3
450	1
500	1

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							
短時間処理法 S9 mix 非共存下（－S9 mix）の 400, 450, 500 µg/mL において，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は各々8.5, 16.8, 16.5%を示し，ほぼ用量依存的な増加傾向を伴った異常誘発傾向が認められた．							
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	－S9 mix	6-18 h 処理	0.56 mg/mL		

(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, 15, 150 µg/mL および 1500 µg/mL (約 10 mmol/L) 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 (µg/mL)	15	150	1500
−S9 mix	100%	100%	0%
+S9 mix	100%	100%	0%
24 時間処理	100%	20%	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, 1250, 1500 µg/mL

+S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/mL

24 時間処理 : 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 µg/mL

- 細胞増殖抑制試験の結果, 50%細胞増殖抑制用量 (IC₅₀) は, −S9 mix で 297 µg/mL, +S9 mix で 353 µg/mL であった。一方, 24 時間処理では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかったため, 下記の用量を設定して細胞増殖抑制試験-2 を実施した。

24 時間処理 : 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL

細胞増殖抑制試験-2 の結果, IC₅₀ は 320 µg/mL であった。

- 短時間処理法について, IC₅₀ に基づき, 下記の用量を設定して染色体異常試験 (本試験) を実施した。

−S9 mix : 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL

+S9 mix : 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL

- ・本試験の結果、+S9 mix の 500 $\mu\text{g/mL}$ において、染色体構造異常細胞の出現頻度は 5.5% と疑陽性の範疇 (5%以上 10%未満) であったため、染色体構造異常誘発の再現性を確認するために、下記の用量を設定して確認試験を実施した。
+S9 mix : 400, 450, 500 $\mu\text{g/mL}$
- ・構造異常は、以下の分類¹に従って観察した。
染色体型切断
染色体型交換
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。
- ・確認試験の判定基準は下記の通りとした。
陰性：染色体異常誘発の再現性が認められない場合
陽性：染色体異常誘発の再現性が認められる場合
- ・確認試験の結果、いずれの被験物質用量においても、染色体構造異常細胞の出現頻度は 5%未満を示し、本試験で認められた構造異常誘発の再現性は認められなかった (判定：+S9 mix ; 陰性)。
- ・-S9 mix の 400, 450, 500 $\mu\text{g/mL}$ において染色体構造異常細胞の出現頻度は各々 8.5, 16.8, 16.5%を示し、陽性と判定されたが、これらの用量における細胞増殖率は各々 12, 7, 5% と低値であったことから、強い細胞毒性に副次的に起因して染色体異常が誘発された可能性も示唆された。
- ・本試験および確認試験の標本観察の結果、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。