

6. 連続処理法による試験

(短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること.)

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24 — 0 h) 処理による場合		(— h) 処理による場合	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100		
0.00625	98		
0.0125	97		
0.025	94		
0.050 [†]	92		
0.100 [†]	92		
0.200 [†]	90		
0.400 [†]	84		
0.800 [†]	56		
1.600 [†]	29		
3.200 [†]	8		

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。

[†]0.050 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（白色の微細及び油膜状の析出物）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2005年 5月 12日から 2005年 5月 13日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果（別表2-1による.）

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと.)		陽性				陰性	
判定の理由							
本被験物質は、短時間処理法（代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合）及び連続処理法（24時間処理）とも構造異常・数的異常の出現率は5%未満で、用量に伴う増加も認められなかった。							
なお、本試験で用いた陽性対照物質は明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、背景データの範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験が適切に実施されたことが確認された。							
また、染色体異常試験と同時に行った各処理濃度における生細胞数の測定結果は、用量設定試験として実施した細胞増殖抑制試験の結果を再現し、染色体異常試験が適切な濃度で実施されたことを確認した。							
以上の結果より、本被験物質は陰性と判断した。							
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法		—	h処理	—	mg/mL
				—	h処理	—	mg/mL
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法		—	h処理	—	mg/mL
				—	h処理	—	mg/mL

〔備考〕 D₂₀値は分裂中期像20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判定した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

[用量設定理由]

染色体異常試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために細胞増殖抑制試験を実施した。細胞増殖抑制試験の試験濃度は「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成15年11月21日）に基づき、10mM相当の3.200 mg/mLを最高濃度として、以下公比2で計10濃度を設定した。すなわち、0.00625, 0.0125, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.400, 0.800, 1.600及び3.200 mg/mLとした。

細胞増殖抑制試験の結果から、Probit法で求めた被験物質の50 %細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では1.8649 mg/mL、代謝活性化による場合では2.0209 mg/mLであった。一方、連続処理法(24時間処理)では0.8366 mg/mLであった。このことから、染色体異常試験の試験濃度は、 IC_{50} 及び細胞の生存率を指標に、細胞増殖を50 %以上抑制する濃度を最高濃度とし、公比2により5段階設定した。すなわち、短時間処理法（代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合）では、0.150, 0.300, 0.600, 1.200及び2.400 mg/mLとした。連続処理法(24時間処理)では、0.075, 0.150, 0.300, 0.600及び1.200 mg/mLとした。

[被験物質の析出]

被験物質の析出は、短時間処理法及び連続処理法とも、細胞増殖抑制試験では0.050 mg/mL以上の濃度において認められ、染色体異常試験ではすべての濃度において認められた。

[染色体異常の観察及び結果判定の方法]

1シャーレあたり100個、1濃度あたり200個の分裂中期像を観察した。染色体の異常については、数的異常として倍数体及び核内倍化を記録した。また、構造的異常として染色分体切断、染色分体交換、染色体切断、染色体交換及びその他に分類し、これらの異常を1つでも有する細胞を陽性細胞1個として記録した。

結果の判定は、石館の方法を用いて行った。

[備考]「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。