

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	大日本製薬株式会社 ラボラトリープロダクツ部
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	2000年 11月 28日
培養液	イーグルのMEM粉末を指定の調製方法に従って溶液とし、メンブランで濾過したもの	製造元	GIBCO
血清の種類と添加量	仔牛 10 %	製造元 (Lot No.)	GIBCO (472959)
細胞周期	16.5 h	凍結条件	-196 °C
継代数	15	容器	プラスチックシャーレ
染色体数 (モード)	25 本	培養条件 温度	37 °C
		C O ₂ 濃度	5 %
備考	—		

3. S 9 mix

(1) S 9の入手方法等 (該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

自製・購入の別	1.自製 (2)購入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2004年 10月 1日製造
購入の場合のLot No.	04100107
保存温度	-80 °C

(2) S 9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット, Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)
性	雄	投与方法	i.p.
週 齢	7 週	投与期間及び投与量	1日目 PB 0.03 g/kg 2,3,4日目 PB 0.06 g/kg 3日目 BF 0.08 g/kg
体重 (匹数)	210.5 ± 8.8 g (63匹)	(g / kg 体重)	

(3) S 9 m i x の組成

成 分	S 9 mix 1mL中の量	成 分	S 9 mix 1mL中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μ mol
MgCl ₂	5 μ mol	Na-リン酸緩衝液	— μ mol
KCl	33 μ mol	その他 (HEPES緩衝液*)	4 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	注射用水	総量を1mLとする.

*pH 7.2

(4) S 9 m i x の処理条件(該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

① プレート法	2. 浮遊細胞法	3. その他 ()
S 9 量 (最終濃度)	5 %	
S 9 蛋白量 (最終濃度)	1.250 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 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと.)

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	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外外部吸収 スペクトル用	100.0 %
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド(DMSO)は, ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で一般的に用いられており, 被験物質が容易に溶解するため.				
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	— 時間 — 分 — °C 細胞増殖抑制試験, 染色体異常試験 (短時間処理法, 連続処理法) とも用時調製				
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 2月 28日から 2005年 3月 1日	2005年 2月 28日から 2005年 3月 1日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	1
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10 ⁴ 個/ 5mL	2.0×10 ⁴ 個/ 5mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 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		1.250 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	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

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 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.00469	97	0.00469	100
0.00938	97	0.00938	96
0.0188	95	0.0188	94
0.0375	80	0.0375	88
0.075	36	0.075	65
0.150	0	0.150	38
0.300 [†]	0	0.300 [†]	16
0.600 [†]	0	0.600 [†]	0
1.200 [†]	0	1.200 [†]	0
2.400 [†]	0	2.400 [†]	0

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

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。

[†]代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合とも、0.300 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（油状）が認められた。

(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 3月 14日から 2005年 3月 15日	2005年 3月 14日から 2005年 3月 15日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	2
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/5mL	2.0×10^4 個/5mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 mix 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		1.250 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表1-1, 1-2による.)

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 2月 28日から 2005年 3月 1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		
0.00469	95		
0.00938	91		
0.0188	68		
0.0375	35		
0.075	0		
0.150	0		
0.300 [†]	0		
0.600 [†]	0		
1.200 [†]	0		
2.400 [†]	0		

[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。
[†]0.300 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（油状）が認められた。