

Appendix 2 分析証明書 (No. P120567-COA8)

P120567-COA8

分析証明書

分析証明書番号 : P120567-COA8
 試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学
 試験番号 : P120567
 表題 : P092 の特性試験及び保存安定性試験
 試験施設 : 三菱化学メディエンス株式会社 熊本研究所
 適用 GLP : 厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」
 (平成 9 年 3 月 26 日, 一部改正 厚生労働省令第 114 号, 平成 20 年 6 月 13 日)
 被験物質 : P092
 コット番号 : E5Z6K
 保管条件 : 冷蔵 (1-10 °C), 遮光, 密封, 窒素封入
 保管場所 : 被験物質保管室 J009 内の薬用冷蔵庫
 入手日 : 2012 年 11 月 02 日
 分析日 : 2013 年 02 月 21 日 (被験物質の使用日)
 試験結果 :

試験項目	判定基準	結果	判定
性状 (色, 形状)	なし (観察結果を報告する)	白色の粉末	—
確認試験 (IR)	なし (測定結果を報告する)	IR 測定結果を図 1 に示した	—
純度 ^{*)}	95.0%以上 (HPLC 面積%)	99.1%	適

<備考>
 *) 繰り返し 3 回測定 of 平均値を結果に記載した。

試験責任者: 2013 年 2 月 27 日

佐藤 保夫



三菱化学メディエンス株式会社
 創薬支援事業本部 試験研究センター
 安全性研究部 安全性 4 グループ

Appendix 2 (続き)

P120567-COA8

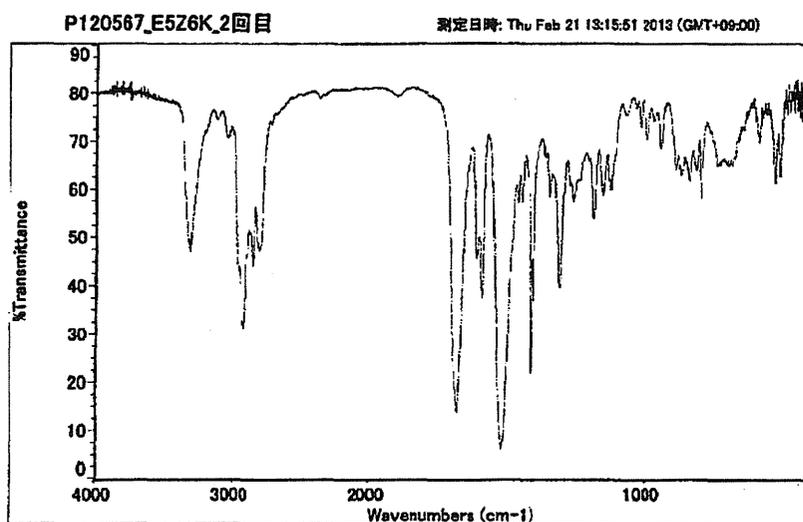


図 1 IR スペクトル(ロット番号: E5Z6K)

Appendix 3 Certificate of Analysis (Certification No.: B120714-001)

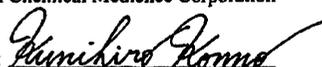
Certification No. B120714-001

Certificate of Analysis

February 8, 2013

Kashima Laboratory

Mitsubishi Chemical Medience Corporation

Chief Analyst: 

Kunihiko Konno

Analyst: Junko Ohnuki

Study No.: B120714
 Test Substance: P092
 Lot No.: 7J7XB
 GLP: MHW, Ordinance No. 21, "Standards for Conduct of Nonclinical Studies on the Safety of Drugs"
 (Dated March 26, 1997; partial revision: Ordinance No. 114, MHLW, dated June 13, 2008)

Description of Analysis: Confirmation of stability of P092 in preparations
 [Vehicle: Dimethyl sulfoxide]
 (Nominal concentration: 0.005 mg/mL and 50 mg/mL)

Analysis: HPLC

Storage Conditions: The preparations were stored at room temperature (18.7°C to 20.1°C) and shielded from light in tight container for 24 hours.

Date of Preparation: November 20, 2012

Date of Analysis: November 20 and 21, 2012

Results: The concentrations of P092 in the preparations are shown in the table below. Results indicated that the preparations were stable under the storage conditions.

Concentration		Date	November 20, 2012	November 21, 2012
			Initial	After 24 hours
0.005 mg/mL	Measured concentration		0.00532	0.00538
			0.00522	0.00539
	Mean		0.00527	0.00539
Ratio to initial concentration (%)			-	102.3
50 mg/mL	Measured concentration		47.4	50.5
			48.2	49.9
	Mean		47.8	50.2
Ratio to initial concentration (%)			-	105.0

Ratio to initial concentration, acceptable range: 90% to 110%

Appendix 4 Certificate of Analysis (Certification No.: B120713-001)

Certification No. B120713-001**Certificate of Analysis**

February 13, 2013

Kashima Laboratory

Mitsubishi Chemical Medicine Corporation

Chief Analyst: 
Kunihiro Konno

Analyst: Kenichi Minato

Study No.: B120713
 Test Substance: P092
 Lot No.: E5Z6K
 GLP: MHW, Ordinance No. 21, "Standards for Conduct of Nonclinical Studies on the Safety of Drugs" (Dated March 26, 1997; partial revision: Ordinance No. 114, MHLW, dated June 13, 2008)

Description of Analysis: Confirmation of concentration of P092 in preparations [Vehicle: Dimethyl sulfoxide] (Nominal concentration: 0.0156 mg/mL and 2 mg/mL)

Analysis: HPLC

Date of Analysis: February 12, 2013

Results: The concentrations of P092 in the preparations are shown in the table below. We confirmed that the obtained data were within the acceptable range.^a

Nominal concentration (mg/mL)	Measured concentration (mg/mL)	Mean (mg/mL)	Ratio to nominal concentration (%)
0.0156	0.0152 0.0153	0.0153	98.1
2	1.96 2.04	2.00	100.0

a: Ratio to nominal concentration, acceptable range: 90% to 110%

Appendix 5 陰性（溶媒）対照値および陽性対照値の適正範囲

1. 陰性対照値

試験菌株	S9	実験数 ¹	復帰変異コロニー数/プレート	
			平均±S.D.	適正範囲 ²
TA100	S9-	79	112 ± 12	88 - 136
	S9+	79	119 ± 13	93 - 145
TA1535	S9-	76	11 ± 2	7 - 15
	S9+	76	12 ± 2	8 - 16
WP2uvrA	S9-	67	32 ± 5	22 - 42
	S9+	67	37 ± 4	29 - 45
TA98	S9-	81	17 ± 3	11 - 23
	S9+	80	24 ± 4	16 - 32
TA1537	S9-	77	11 ± 2	7 - 15
	S9+	75	18 ± 2	14 - 22

2. 陽性対照値

試験菌株	S9	名称および用量 (µg/プレート)		実験数 ¹	復帰変異コロニー数 /プレート	
					平均±S.D.	適正範囲 ³
TA100	S9-	AF-2	0.01	79	760 ± 113	421 - 1520
	S9+	2-AA	1	79	1215 ± 167	714 - 2430
TA1535	S9-	NaN ₃	0.5	76	558 ± 40	438 - 1116
	S9+	2-AA	2	76	249 ± 30	159 - 498
WP2uvrA	S9-	AF-2	0.01	67	278 ± 75	53 - 556
	S9+	2-AA	10	67	1344 ± 145	909 - 2688
TA98	S9-	AF-2	0.1	81	655 ± 46	517 - 1310
	S9+	2-AA	0.5	80	247 ± 28	163 - 494
TA1537	S9-	9-AA	80	77	342 ± 52	186 - 684
	S9+	2-AA	2	75	186 ± 31	93 - 372

1. 2012年1月13日から2012年12月21日までのデータを集計した。
2. 平均±2S.D.
3. 陽性対照値の下限値は平均-3S.D.とし、上限値は平均値の2倍とした。

信 頼 性 保 証 証 明 書

試験委託者 : 岐阜大学
 表 題 : P092 の細菌を用いる復帰突然変異試験
 試験番号 : B120713

本試験は下記の基準に従って実施され、本最終報告書は、試験の方法、結果が正確に記載されていることを保証する。調査の内容、調査日および報告日を以下に示す。

厚生省令第21号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」
 (平成9年3月26日、一部改正 厚生労働省令第114号、平成20年6月13日)

調査内容	調査日	報告日	
		試験責任者	運営管理者
試験計画書			
試験計画書	2013年01月23日	2013年01月23日	2013年01月23日
(再調査)	2013年01月24日	2013年01月24日	2013年01月24日
試験計画書変更書 (1)	2013年02月08日	2013年02月08日	2013年02月08日
試験実施状況			
被験物質溶液の調製	2013年01月30日	2013年01月30日	2013年01月30日
被験物質溶液の濃度分析	2013年02月12日	2013年02月12日	2013年02月12日
プレインキュベーション	2013年02月13日	2013年02月13日	2013年02月13日
コロニーカウント	2013年02月15日	2013年02月15日	2013年02月15日
試験資料・最終報告書			
試験資料・最終報告書草案	2013年03月01日 ~2013年03月04日	2013年03月04日	2013年03月04日
(再調査)	2013年03月07日	2013年03月07日	2013年03月07日
試験資料・最終報告書	2013年03月13日	2013年03月13日	2013年03月13日

2013年 3月 13日
 信頼性保証部門責任者

東川 国男 

東川 国男
 三菱化学メディエンス株式会社
 鹿島研究所

資料2 非臨床試験

14. ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

B120714

本写しは原本と相違ありません
三菱化学メディエンス(株) 鹿島研究所
2013年3月8日
試験責任者 古永勝昭 

最終報告書

P092 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号 : B120714)

三菱化学メディエンス株式会社

1. GLP 陳述書

表 題： P092 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号： B120714

本試験は下記の基準に従って実施したものである。

厚生省令第21号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」
(平成9年3月26日, 一部改正 厚生労働省令第114号, 平成20年6月13日)

試験責任者：

2013年 3月 8日

安永 勝昭



安永 勝昭
三菱化学メディエンス株式会社
創薬支援事業本部 試験研究センター
安全性研究部 安全性3グループ

2. 目次

1. GLP 陳述書	2
2. 目次	3
3. 試験実施概要	6
3.1 表題	6
3.2 試験番号	6
3.3 試験目的	6
3.4 適用ガイドライン	6
3.5 適用 GLP	6
3.6 試験委託者	6
3.7 試験受託者	6
3.8 試験施設	6
3.9 試験責任者	6
3.10 分担責任者	6
3.11 試験従事者	6
3.12 試験日程	7
3.13 保存	7
3.14 保存する資料	7
4. 試験責任者署名	8
5. 要約	9
6. 材料および方法	10
6.1 被験物質	10
6.1.1 名称 (略称)	10
6.1.2 ロット番号	10
6.1.3 純度	10
6.1.4 常温における性状	10
6.1.5 保存条件	10
6.1.6 保管場所	10
6.1.7 提供者	10
6.1.8 取扱上の注意	10
6.1.9 被験物質の安定性確認	10
6.1.10 残余被験物質の処理	10
6.2 対照物質	10
6.2.1 陰性対照物質	10
6.2.2 陽性対照物質	11
6.3 細胞	11
6.3.1 細胞	11
6.3.2 購入元	11
6.3.3 購入日	11
6.3.4 保存	11
6.3.5 特性検査	11
6.3.6 継代数	12
6.3.7 培養条件	12
6.3.8 細胞の選択理由	12
6.4 培地	12
6.4.1 MEM	12

6.4.2	MEM 培地	12
6.5	S9 mix	12
6.5.1	製造元	12
6.5.2	ロット番号	12
6.5.3	製造日	12
6.5.4	入手日	12
6.5.5	S9 の製造方法	13
6.5.6	S9 の蛋白含量	13
6.5.7	S9 mix の組成	13
6.5.8	保存条件	13
6.5.9	使用期限	13
6.6	被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製	13
6.6.1	被験物質溶液の調製	13
6.6.2	陽性対照物質溶液の調製	14
6.7	被験物質溶液の安定性確認	14
6.7.1	実施	14
6.7.2	媒体	14
6.7.3	濃度	14
6.7.4	保存条件および期間	14
6.7.5	判定基準	14
6.7.6	結果	14
6.8	被験物質溶液の濃度確認	15
6.8.1	実施	15
6.8.2	濃度	15
6.8.3	判定基準	15
6.8.4	結果	15
6.9	被験物質溶液の濃度確認方法	15
6.9.1	高速液体クロマトグラフ (HPLC) 装置	15
6.9.2	HPLC 操作条件	15
6.9.3	標準溶液の調製	16
6.9.4	試料溶液の調製	16
6.9.5	濃度の算出	16
6.10	細胞増殖抑制試験	16
6.10.1	処理条件	16
6.10.2	被験物質用量	17
6.10.3	被験物質用量設定理由	17
6.10.4	細胞処理	17
6.10.5	細胞増殖率の測定	17
6.10.6	50%細胞増殖抑制用量の算出	17
6.11	染色体異常試験	17
6.11.1	処理条件	17
6.11.2	被験物質用量	17
6.11.3	陽性対照物質用量	18
6.11.4	陽性対照物質用量の設定理由	18
6.11.5	細胞処理	18
6.11.6	標本作製	18
6.11.7	細胞増殖率の測定	18

6.11.8 観察.....	19
6.11.9 判定基準.....	20
7. 結果.....	21
7.1 細胞増殖抑制試験.....	21
7.2 染色体異常試験.....	21
8. 考察および結論.....	21
9. 参考文献.....	21
10. 特記事項.....	21
10.1 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.....	21
10.2 試験計画書に従わなかったこと.....	22
表 1 細胞増殖抑制試験の結果.....	23
表 2 染色体異常試験の結果 (短時間処理法・-S9 mix).....	24
表 3 染色体異常試験の結果 (短時間処理法・+S9 mix).....	25
表 4 染色体異常試験の結果 (連続処理法).....	26
図 1 P092 処理における細胞毒性 (短時間処理法・-S9 mix).....	27
図 2 P092 処理における細胞毒性 (低用量域, 短時間処理法・-S9 mix).....	27
図 3 P092 処理における細胞毒性 (短時間処理法・+S9 mix).....	28
図 4 P092 処理における細胞毒性 (低用量域, 短時間処理法・+S9 mix).....	28
図 5 P092 処理における細胞毒性 (連続処理法).....	29
図 6 P092 処理における細胞毒性 (低用量域, 連続処理法).....	29
図 7 P092 処理における染色体異常細胞出現頻度 (短時間処理法・-S9 mix).....	30
図 8 P092 処理における染色体異常細胞出現頻度 (短時間処理法・+S9 mix).....	30
図 9 P092 処理における染色体異常細胞出現頻度 (連続処理法).....	31
Appendix 1 分析証明書 (修正版) (No. P120567-COA1-A1).....	32
Appendix 2 分析証明書 (No. P120567-COA5).....	33
Appendix 3 Certificate of Analysis (Certification No. B120714-001).....	34
Appendix 4 Certificate of Analysis (Certification No. B120714-002).....	35
Appendix 5 背景データ.....	36
信頼性保証証明書.....	37

(最終ページ : 37)

3. 試験実施概要

3.1 表題

P092 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3.2 試験番号

B120714

3.3 試験目的

P092 のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

- (1) 医薬品の遺伝毒性試験および解釈に関するガイダンス
(薬食審査発 0920 第 2 号, 平成 24 年 9 月 20 日)
- (2) 医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて
(医薬審第 1604 号, 平成 11 年 11 月 1 日)

3.5 適用 GLP

厚生省令第 21 号 「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」
(平成 9 年 3 月 26 日, 一部改正 厚生労働省令第 114 号, 平成 20 年 6 月 13 日)

3.6 試験委託者

岐阜大学
〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1
委託責任者: 桑田 一夫

3.7 試験受託者

三菱化学メディエンス株式会社
〒108-8559 東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号

3.8 試験施設

三菱化学メディエンス株式会社 鹿島研究所
〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1

3.9 試験責任者

安永 勝昭
三菱化学メディエンス株式会社 創薬支援事業本部 試験研究センター
安全性研究部 安全性 3 グループ

3.10 分担責任者

調剤分析 紺野 邦裕

3.11 試験従事者

細胞播種: 浦山 蘭, 田中 亜矢子
被験物質溶液調製: 石井 奈々, 箕輪 茂徳, 安永 勝昭
細胞処理: 石井 奈々, 浦山 蘭, 箕輪 茂徳, 安永 勝昭
細胞増殖率の測定: 浦山 蘭, 箕輪 茂徳, 堀 一成, 安永 勝昭
標本作製: 浦山 蘭, 堀 一成, 安永 勝昭

予備鏡検： 安永 勝昭
標本観察： 梶原 昭彦
調剤分析： 井口 奈津美, 大貫 順子

3.12 試験日程

試験開始：	2012年11月12日
被験物質溶液の安定性確認：	2012年11月20日～2012年11月21日
細胞増殖抑制試験：	2012年11月18日～2012年11月22日
染色体異常試験：	2012年12月3日～2012年12月27日
試験終了日：	本最終報告書への試験責任者署名日とする

3.13 保存

次項に示す試験関係資料を鹿島研究所の資料保存室に保存する。保存期間は最終報告書作成後10年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。

3.14 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 試験計画書変更書
- (3) 被験物質および対照物質に関する資料
- (4) 細胞に関する資料
- (5) 試験結果に関する資料
- (6) 通信文書等の記録文書
- (7) 標本
- (8) 最終報告書

4. 試験責任者署名

表 題： P092 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号： B120714

試験責任者：

2013 年 3 月 8 日

安永 勝昭



安永 勝昭
三菱化学メディエンス株式会社
創薬支援事業本部 試験研究センター
安全性研究部 安全性3グループ

5. 要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、P092 の *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験は、短時間処理法 S9 mix 非共存下（以下、-S9 mix と略す）、S9 mix 共存下（以下、+S9 mix と略す）および連続処理法 24 時間処理（以下、24 時間処理と略す）で 1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 および 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。その結果、50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は -S9 mix で 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9 mix で 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24 時間処理で 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

細胞増殖抑制試験の結果に基づいて、-S9 mix では 0.25, 0.5, 1, 2, 4 および 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9 mix では 0.5, 1, 2, 4, 8 および 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24 時間処理では 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 および 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定して染色体異常試験を実施した。

細胞増殖率測定結果に基づいて -S9 mix では 0.5, 1 および 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9 mix では 2, 4 および 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24 時間処理では 0.125, 0.25 および 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を選択して標本観察を実施した。標本観察の結果、いずれの処理条件のいずれの用量においても、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度は 5%未満であった。

従って、P092 は、当試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有しないと結論した。

6. 材料および方法

6.1 被験物質

6.1.1 名称 (略称)

P092

6.1.2 ロット番号

7J7XB

6.1.3 純度

97.4%

6.1.4 常温における性状

うすい黄色の結晶性粉末

6.1.5 保存条件

冷蔵 (実測値: 3.8~6.3°C, 許容範囲: 1~10°C), 遮光, 密封, 窒素封入

6.1.6 保管場所

被験物質保管場所 (55) および (42)

6.1.7 提供者

岐阜大学

6.1.8 取扱上の注意

保護具 (ゴム手袋, 眼鏡およびマスク) を着用した。

6.1.9 被験物質の安定性確認

「P092 の特性試験および保存安定性試験」 (試験番号: P120567, 三菱化学メディエンス株式会社熊本研究所) で実施した同一ロットの分析結果を入手し, 試験期間中で安定であることを確認した。その結果, 試験期間中安定であった (Appendix 1, 2)。

6.1.10 残余被験物質の処理

本試験で使用した被験物質の残余は, 実験終了後, 被験物質管理責任者へ移管した。

6.2 対照物質

6.2.1 陰性対照物質

6.2.1.1 名称

ジメチルスルホキシド (以下, DMSO と略す)

6.2.1.2 製造元

純正化学株式会社

6.2.1.3 ロット番号

9J5040

6.2.1.4 規格

高速液体クロマト用

6.2.1.5 純度

100.0%

6.2.1.6 陰性対照物質の選択理由

試験施設で実施した分析法バリデーション試験（試験番号：B120710）において、本被験物質のDMSOを媒体として用いた分析法が確立されていた。これらの結果から、本被験物質の溶媒（陰性対照物質）にはDMSOを選択した。

6.2.2 陽性対照物質**6.2.2.1 名称**

マイトマイシンC（MMCと略す）[S9 mix 非共存下]

ベンゾ[a]ピレン（BPと略す）[S9 mix 共存下]

6.2.2.2 製造元, 他

名称	ロット番号	純度	有効期限	製造元	保存条件
MMC	558AAA	101%	2015年1月	協和発酵キリン株式会社	室温 ^{†1}
BP	090M1400V	96%	2014年9月21日	Sigma-Aldrich Corp.	室温 ^{†2}

†1：実測値：18.7°C to 23.2°C

†2：実測値：15.8°C to 25.4°C

6.2.2.3 陽性対照物質の選択理由

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において広く使用されている。

6.3 細胞**6.3.1 細胞**

CHL/IU（雌チャイニーズハムスター肺由来）

6.3.2 購入元

DSファーマバイオメディカル株式会社

6.3.3 購入日

2010年11月30日

6.3.4 保存

最終10 v/v%の割合でDMSOを添加した培地に細胞を浮遊させ、約1 mLに小分けして、2010年12月7日に凍結した後に液体窒素保存容器に移して保存した。

試験においては、これを試験開始前および試験期間中に解凍、培養して、他試験と共通で使用した。

6.3.5 特性検査

6.3.4項の凍結細胞について、以下の特性を2012年6月7日までに確認した。

染色体モード(2n) : 25

倍加時間 : 15.4時間

マイコプラズマ : 陰性

6.3.6 継代数

購入時：14

凍結時：17

使用時：20～24（解凍後7～20日）

6.3.7 培養条件

容器：プラスチックプレート（直径6 cm および10 cm ; Becton Dickinson and Company）

温度：37°C

CO₂濃度：5%

湿度：加湿条件下

培養器：炭酸ガス細胞培養装置（Thermo Fisher Scientific Inc., 370 型）

6.3.8 細胞の選択理由

染色体数のモードが25本と少なく、染色体が比較的大きいため標本観察が容易である等の利点があり、培養細胞を用いる染色体異常試験で広く使用されている。また、適用ガイドラインにおいて推奨されている。

6.4 培地

MEM および MEM 培地は、事前あるいは試験開始後に購入、調製したものを、他試験と共通で使用した。

6.4.1 MEM

Minimum Essential Medium (MEM) (1×), liquid (Life Technologies Corp., ロット番号：1139891)

またはイーグル MEM 培地「ニッスイ」①（日水製薬株式会社, ロット番号：681206, 681208）

イーグル MEM 培地「ニッスイ」①を用いる場合は下記のように MEM を調製した。

(1) イーグル MEM 培地「ニッスイ」① 8.3 g を精製水 880 mL に溶解した。

(2) オートクレーブ滅菌（121°C, 20 分間）した。

(3) この溶液に、別に滅菌処理した 2.92 w/v% L-グルタミン水溶液 8.8 mL と、10 w/v% 炭酸水素ナトリウム水溶液 11.2 mL を添加した。

6.4.2 MEM 培地

MEM に、非働化（56°C, 30 分間加熱処理）した牛血清（Life Technologies Corp., ロット番号：1140959）を 10 v/v% の割合で添加した。

6.5 S9 mix

6.5.1 製造元

キッコーマン株式会社

6.5.2 ロット番号

CAM-655

6.5.3 製造日

2012 年 9 月 14 日

6.5.4 入手日

2012 年 10 月 12 日

6.5.5 S9の製造方法

フェノバルビタール（1日目 30 mg/kg を1回腹腔内投与，2日目以降 60 mg/kg を1日1回3日間腹腔内投与）と5,6-ベンゾフラボン（フェノバルビタール投与3日目に80 mg/kg を1回腹腔内投与）で酵素誘導した7週齢SD系雄ラット（体重：212～248 g）の肝臓より調製された。

6.5.6 S9の蛋白含量

23.85 mg/mL（細胞処理時の最終蛋白含量：1.19 mg/mL）

6.5.7 S9 mixの組成

コファクターミックス 2.45 mL と，S9 1.05 mL が混合された，凍結 S9 mix を使用した。S9 mix 1 mL 中のコファクター成分は以下の通りである。使用日に必要本数を冷水中で解凍，使用時まで氷中で保存した。

MgCl ₂	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol

6.5.8 保存条件

-80°C 以下（実測値：-80～-74.2°C，許容範囲：-60°C 以下）

6.5.9 使用期限

2013年3月13日（製造日から6ヶ月間）

6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

6.6.1 被験物質溶液の調製

- (1) 被験物質溶液の安定性確認（6.7項）では，500 mg の被験物質を秤量して適量の DMSO を加え，振盪攪拌および超音波処理により溶解させた後に 10 mL とし，50 mg/mL 溶液とする。この溶液の一部を DMSO で段階希釈して，5，0.5，0.05 および 0.005 mg/mL 溶液を調製した。5，0.5 および 0.05 mg/mL 溶液は被験物質溶液の安定性確認には用いなかった。
- (2) 細胞増殖抑制試験（6.10項）では，250 mg の被験物質を秤量して適量の DMSO を加え，振盪攪拌および超音波処理により溶解させた後に 5 mL とし，50 mg/mL 溶液（最終処理用量の 100 倍濃度）とした。この溶液の一部を DMSO で段階希釈して，25，12.5，6.25，3.13，1.56，0.781，0.391 および 0.195 mg/mL 溶液（最終処理用量の 100 倍濃度）を調製した。
- (3) 染色体異常試験（6.11項）では，32 mg の被験物質を秤量して適量の DMSO を加え，振盪攪拌および超音波処理により溶解させた後に 20 mL とし，1.6 mg/mL 溶液（最終処理用量の 100 倍濃度）とした。この溶液の一部を DMSO で段階希釈して，0.8，0.4，0.2，0.1，0.05，0.025，0.0125 および 0.00625 mg/mL 溶液（最終処理用量の 100 倍濃度）を調製した。
- (4) 被験物質の秤量，溶液の希釈および分注を含む全ての操作は室温，黄色灯下（または紫外線をカットした蛍光灯）で行った。
- (5) 被験物質溶液は調製後，細胞増殖抑制試験では速やかに使用した。染色体異常試験では