

Appendix 2 (続き)

P140711-COA2

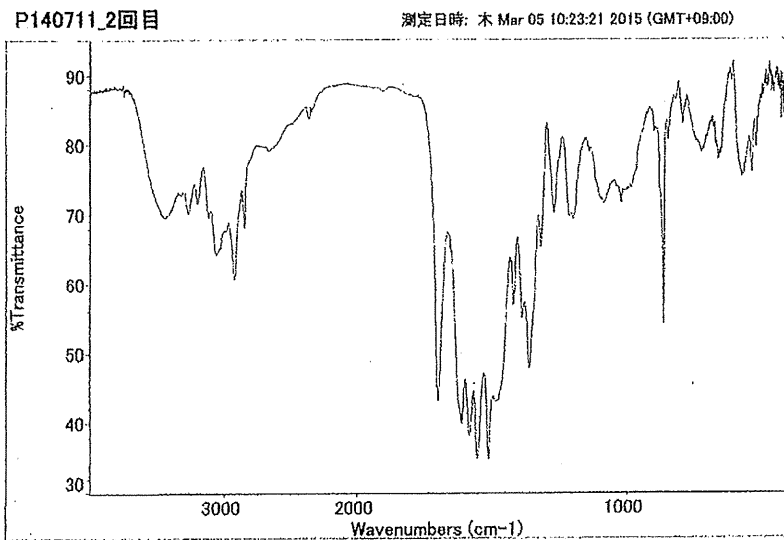


図 1 IR スペクトル

## Appendix 3 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 <sup>1</sup>	復帰変異コロニー数/プレート	
			平均±S.D.	適正範囲 <sup>2</sup>
TA100	S9-	105	113 ± 11	91 - 135
	S9+	104	122 ± 12	98 - 146
TA1535	S9-	96	10 ± 2	6 - 14
	S9+	95	11 ± 2	7 - 15
WP2 <sup>uvrA</sup>	S9-	86	36 ± 6	24 - 48
	S9+	86	39 ± 5	29 - 49
TA98	S9-	104	19 ± 3	13 - 25
	S9+	103	25 ± 3	19 - 31
TA1537	S9-	97	13 ± 3	7 - 19
	S9+	97	19 ± 3	13 - 25

## 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 <sup>1</sup>	復帰変異コロニー数 /プレート	
					平均±S.D.	適正範囲 <sup>3</sup>
TA100	S9-	AF-2	0.01	105	515 ± 78	281 - 1030
	S9+	2-AA	1	104	852 ± 127	471 - 1704
TA1535	S9-	NaN <sub>3</sub>	0.5	96	502 ± 46	364 - 1004
	S9+	2-AA	2	95	241 ± 23	172 - 482
WP2 <sup>uvrA</sup>	S9-	AF-2	0.01	86	169 ± 20	109 - 338
	S9+	2-AA	10	86	1106 ± 100	806 - 2212
TA98	S9-	AF-2	0.1	104	608 ± 68	404 - 1216
	S9+	2-AA	0.5	103	217 ± 25	142 - 434
TA1537	S9-	9-AA	80	97	413 ± 91	140 - 826
	S9+	2-AA	2	97	156 ± 20	96 - 312

1. 2014年1月17日から2014年12月18日までのデータを集計した。
2. 平均±2S.D.
3. 陽性対照値の下限值は平均-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 : 国立大学法人岐阜大学  
 表 題 : P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験  
 試験番号 : B141051

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 (再調査)	2015年01月07日	2015年01月07日	2015年01月07日
試験計画書変更書 (1)	2015年01月09日	2015年01月09日	2015年01月09日
試験計画書変更書 (1)	2015年01月23日	2015年01月23日	2015年01月23日
試験実施状況			
被験物質溶液の調製	2015年01月14日	2015年01月14日	2015年01月14日
ブレインキューベーション	2015年01月27日	2015年01月27日	2015年01月27日
コロニーカウント	2015年01月29日	2015年01月29日	2015年01月29日
試験資料・最終報告書			
試験資料・最終報告書草案	2015年02月19日 ~2015年02月20日	2015年02月20日	2015年02月20日
試験資料・最終報告書	2015年03月17日	2015年03月17日	2015年03月17日

2015年 3 月 17 日  
 信頼性保証部門責任者

東川国男

東川 国男  
 株式会社LSIメディエンス  
 鹿島研究所

21. P092 マレイン酸塩の哺乳類培養  
細胞を用いる染色体異常試験

本写しは原本と相違ありません

株式会社LSIメディエンス 鹿島研究所

2015年3月17日

試験責任者 安永 勝昭

## 最終報告書

P092・マレイン酸塩のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：B141052)

株式会社LSIメディエンス

## 1. GLP 陳述書

表 題： P092・マレイン酸塩のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試 験 番 号： B141052

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：

2015年 3月 17日 安永 勝昭

安永 勝昭

株式会社LSIメディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター

安全性研究部

## 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 試験従事者 .....	6
3.11 試験日程 .....	7
3.12 保存 .....	7
3.13 保存する資料 .....	7
4. 試験責任者署名 .....	8
5. 要約 .....	9
6. 材料及び方法 .....	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 分子量 .....	10
6.1.5 換算係数 (フリー体) .....	10
6.1.6 性状 .....	10
6.1.7 保存条件 .....	10
6.1.8 保管場所 .....	10
6.1.9 提供者 .....	10
6.1.10 取扱上の注意 .....	10
6.1.11 被験物質の安定性確認 .....	10
6.1.12 残余被験物質の処理 .....	10
6.2 対照物質 .....	11
6.2.1 陰性対照物質 .....	11
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.....	12
6.3.4	保存.....	12
6.3.5	特性検査.....	12
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.....	13
6.5	S9 mix.....	13
6.5.1	製造元.....	13
6.5.2	S9 の製造方法.....	13
6.5.3	S9 mix の組成.....	13
6.5.4	ロット番号.....	13
6.5.5	製造日.....	13
6.5.6	入手日.....	13
6.5.7	S9 の蛋白含量.....	14
6.5.8	保存条件.....	14
6.5.9	使用期限.....	14
6.6	被験物質溶液及び陽性対照物質溶液の調製.....	14
6.6.1	被験物質溶液の調製.....	14
6.6.2	陽性対照物質溶液の調製.....	14
6.7	細胞増殖抑制試験.....	15
6.7.1	処理条件.....	15
6.7.2	被験物質用量.....	15
6.7.3	被験物質用量設定理由.....	15
6.7.4	細胞処理.....	15
6.7.5	細胞増殖率の測定.....	16
6.7.6	50%細胞増殖抑制用量の算出.....	16
6.8	染色体異常試験.....	16
6.8.1	処理条件.....	16
6.8.2	被験物質用量.....	16
6.8.3	陽性対照物質用量.....	16
6.8.4	陽性対照物質用量の設定理由.....	16
6.8.5	細胞処理.....	16
6.8.6	標本作製.....	17
6.8.7	細胞増殖率の測定.....	17
6.8.8	観察.....	17



6.8.9 判定基準.....	18
7. 結果.....	20
7.1 細胞増殖抑制試験.....	20
7.2 染色体異常試験.....	20
8. 考察及び結論.....	20
9. 参考文献.....	20
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.....	21
表 1 細胞増殖抑制試験の結果.....	22
表 2 染色体異常試験の結果（短時間処理法・-S9 mix）.....	23
表 3 染色体異常試験の結果（短時間処理法・+S9 mix）.....	24
表 4 染色体異常試験の結果（連続処理法）.....	25
図 1 P092・マレイン酸塩処理における細胞毒性（短時間処理法・-S9 mix）.....	26
図 2 P092・マレイン酸塩処理における細胞毒性（短時間処理法・-S9 mix, 低用量域）.....	26
図 3 P092・マレイン酸塩処理における細胞毒性（短時間処理法・+S9 mix）.....	27
図 4 P092・マレイン酸塩処理における細胞毒性（短時間処理法・+S9 mix, 低用量域）.....	27
図 5 P092・マレイン酸塩処理における細胞毒性（連続処理法）.....	28
図 6 P092・マレイン酸塩処理における細胞毒性（連続処理法, 低用量域）.....	28
図 7 P092・マレイン酸塩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） .....	29
図 8 P092・マレイン酸塩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） .....	29
図 9 P092・マレイン酸塩処理における染色体異常細胞出現頻度（連続処理法）.....	30
Appendix 1 分析証明書（No. P140711-COA1）.....	31
Appendix 2 分析証明書（No. P140711-COA2）.....	33
Appendix 3 背景データ.....	35
信頼性保証証明書.....	36

(最終ページ : 36)

### 3. 試験実施概要

#### 3.1 表題

P092・マレイン酸塩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

B141052

#### 3.3 試験目的

P092・マレイン酸塩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及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

国立大学法人 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

株式会社 L S I メディエンス  
〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目 13 番 4 号

#### 3.8 試験施設

株式会社 L S I メディエンス 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  
株式会社 L S I メディエンス 創薬支援事業本部 試験研究センター 安全性研究部

#### 3.10 試験従事者

細胞播種： 石井 奈々, 田中 亜矢子  
被験物質溶液調製： 石井 奈々, 梶原 昭彦, 箕輪 茂徳

細胞処理： 石井 奈々, 岡崎 静, 梶原 昭彦, 箕輪 茂徳  
細胞増殖率の測定： 石井 奈々, 岡崎 静, 梶原 昭彦, 川端 正義, 箕輪 茂徳,  
安永 勝昭  
標本作製： 石井 奈々, 岡崎 静, 梶原 昭彦, 箕輪 茂徳, 安永 勝昭  
予備鏡検： 石井 奈々  
標本観察： 箕輪 茂徳

### 3.11 試験日程

試験開始： 2015年1月7日  
細胞増殖抑制試験： 2015年1月10日～2015年1月14日  
染色体異常試験： 2015年1月23日～2015年2月9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

### 3.12 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。

### 3.13 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 試験計画書変更書
- (3) 被験物質及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・マレイン酸塩のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号： B141052

試験責任者：

2015年 3月 17日

安永 勝昭

---

安永 勝昭  
株式会社LSIメディエンス  
創薬支援事業本部 試験研究センター  
安全性研究部

## 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・マレイン酸塩の *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）及び連続処理法 24 時間処理（以下、24 時間処理と略す）で 0.244, 0.488, 0.977, 1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 125 及び 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （フリー体として）を設定した。

その結果、50%細胞増殖抑制用量（ $\text{IC}_{50}$ ）は、-S9 mix で 1.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9 mix で 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24 時間処理で 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

細胞増殖抑制試験の結果に基づいて、-S9 mix では 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 及び 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9 mix では 0.5, 1, 2, 4, 6, 7, 8 及び 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24 時間処理では 0.0156, 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 及び 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 0.25, 0.5 及び 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9 mix では 2, 4 及び 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24 時間処理では 0.125, 0.25 及び 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、構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度は 5%未満であった。

従って、P092・マレイン酸塩は、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. 材料及び方法

### 6.1 被験物質

#### 6.1.1 名称 (略称)

P092・マレイン酸塩

#### 6.1.2 ロット番号

KS14001

#### 6.1.3 純度

99.7%

#### 6.1.4 分子量

734.84 (マレイン酸塩)

502.69 (フリー体)

#### 6.1.5 換算係数 (フリー体)

1.4618 (734.84/502.69)

#### 6.1.6 性状

白色の粉末

#### 6.1.7 保存条件

冷蔵 (実測値 : 3.4~6.5°C, 許容範囲 : 1~10°C), 遮光, 気密 (窒素封入)

#### 6.1.8 保管場所

被験物質保管場所 (55) 及び (59)

#### 6.1.9 提供者

国立大学法人 岐阜大学

#### 6.1.10 取扱上の注意

保護具 (ゴム手袋, 眼鏡及びマスク) を着用した。

#### 6.1.11 被験物質の安定性確認

「P092・マレイン酸塩の特性試験及び保存安定性試験」 (試験番号 : P140711, 株式会社 L S I メディエンス熊本研究所) 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)。

#### 6.1.12 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

生理食塩液（以下，生食と略す）

#### 6.2.1.2 製造元

株式会社大塚製薬工場

#### 6.2.1.3 ロット番号

K3I88

#### 6.2.1.4 陰性対照物質の選択理由

試験施設で実施した「サル血漿中及び脳脊髄液中の P092 濃度測定試験（マレイン酸塩静脈内投与試験）」（試験番号：B130598）において，本被験物質が 50 mg/mL で生食に溶解することが確認された。これらの結果から，本被験物質の溶媒（陰性対照物質）には生食を選択した。

## 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	567ABB	106%	2016年2月	協和発酵キリン株式会社	室温 †1
BP	SLBC6864V	97%	2016年4月19日	Sigma-Aldrich Corp.	室温 †2

†1：実測値：18.2℃ ～21.6℃

†2：実測値：18.2℃ ～22.4℃

### 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

2013年6月4日

### 6.3.4 保存

最終 10 v/v%の割合でジメチルスルホキシド（以下、DMSO と略す）を添加した培地に細胞を浮遊させ、約 1 mL に小分けして、2013年6月11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、これを試験開始前及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 2014年9月11日までに確認した。

染色体モード (2n) : 25

倍加時間 : 14.7 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 : 19~23 (解凍後 5~18 日)

### 6.3.7 培養条件

容器 : プラスチックプレート (直径 6 cm または 10 cm ; Corning Inc.)

温度 : 37°C

CO<sub>2</sub> 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 及び 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 : 1557664, 1613103) 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 : 707404)



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：1517948）を10 v/v%の割合で添加した。

### 6.5 S9 mix

#### 6.5.1 製造元

キッコーマンバイオケミファ株式会社

#### 6.5.2 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：188～236 g）の肝臓より調製された。

#### 6.5.3 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 1mL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し, 使用時まで氷中で保存した。

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

#### 6.5.4 ロット番号

CAM201409A

#### 6.5.5 製造日

2014年9月5日

#### 6.5.6 入手日

2014年9月26日

### 6.5.7 S9の蛋白含量

23.77 mg/mL (細胞処理時の最終蛋白含量 : 1.19 mg/mL)

### 6.5.8 保存条件

-80°C 以下 (実測値 : -80~-75.0°C, 許容範囲 : -60°C 以下)

### 6.5.9 使用期限

2015年3月4日 (製造日から6ヶ月間)

## 6.6 被験物質溶液及び陽性対照物質溶液の調製

### 6.6.1 被験物質溶液の調製

被験物質の秤量に際しては、フリー体換算 (換算係数 : 1.4618) を行った。

- (1) 細胞増殖抑制試験 (6.7 項) では、365 mg の被験物質を秤量して適量の生食を加え、振盪攪拌及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 (フリー体として、最終処理用量の 100 倍濃度) とした。この溶液の一部を生食で段階希釈して、12.5, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488 及び 0.0244 mg/mL 溶液 (フリー体として、最終処理用量の 100 倍濃度) を調製した。
- (2) 染色体異常試験 (6.8 項) では、47 mg の被験物質を秤量して適量の生食を加え、振盪攪拌及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 (フリー体として、最終処理用量の 100 倍濃度) とした。この溶液の一部を生食で段階希釈して、0.8, 0.7, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.00313 及び 0.00156 mg/mL 溶液 (フリー体として、最終処理用量の 100 倍濃度) を調製した。
- (3) 被験物質の秤量、溶液の希釈及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。
- (4) 被験物質溶液は調製後、速やかに使用した。

### 6.6.2 陽性対照物質溶液の調製

#### 6.6.2.1 MMC 溶液の調製

- (1) 2 mg 入りバイアル瓶の MMC を、注射用水 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号: K2L86) 5 mL に溶解した。
- (2) これを生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号: 2J82N) で段階希釈し、処理用量の 100 倍濃度の溶液 (短時間処理法 : 10 µg/mL, 連続処理法 : 5 µg/mL) を調製した。
- (3) 上記の各溶液を 2014 年 5 月 8 日 (使用期限 : 2015 年 5 月 7 日) に調製し、約 0.5 mL ずつ分注して、冷凍庫 (実測値 : -25.7~-22.3°C, 許容範囲 : -40~-15°C) に保存した。
- (4) このうちの必要本数を、使用当日に解凍して使用した。

#### 6.6.2.2 BP 溶液の調製

- (1) BP 30 mg を秤量し、DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 : AWH6229) 20 mL

に溶解した (1.5 mg/mL ; 処理用量の 100 倍濃度) .

- (2) 上記の溶液を 2014 年 5 月 8 日 (使用期限 : 2015 年 5 月 7 日) に調製し, 約 0.5 mL ずつ分注して, 冷凍庫 (実測値 : -25.7~-22.3°C, 許容範囲 : -40~-15°C) に保存した.
- (3) このうちの必要本数を, 使用当日に解凍して使用した.

## 6.7 細胞増殖抑制試験

### 6.7.1 処理条件

-S9 mix : 短時間処理法 (6 時間処理, 18 時間回復) S9 mix 非共存下

+S9 mix : 短時間処理法 (6 時間処理, 18 時間回復) S9 mix 共存下

24 時間処理 : 連続処理法 (24 時間処理) S9 mix 非共存下

### 6.7.2 被験物質用量

-S9 mix : 0.244, 0.488, 0.977, 1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 125 及び 500 µg/mL  
(フリー体として)

+S9 mix : 0.244, 0.488, 0.977, 1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 125 及び 500 µg/mL  
(フリー体として)

24 時間処理 : 0.244, 0.488, 0.977, 1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 125 及び 500 µg/mL  
(フリー体として)

### 6.7.3 被験物質用量設定理由

適用ガイドライン (3.4 項(1)) に規定されている 500 µg/mL を最高用量とし, 6.7.2 項の用量を設定した.

### 6.7.4 細胞処理

- (1)  $4 \times 10^3$  個/mL に調整した細胞浮遊液を 6 cm プレートに 5 mL ずつ播き, 3 日間前培養した.
- (2) MEM 培地を除去した後, 被験物質溶液, S9 mix 及び MEM 培地を, 下記の組成でプレートに添加した. 陰性対照群については, 生食を用いて同様に実施した. 各処理条件, 処理用量につき 2 枚のプレートを用いた.

処理条件	被験物質溶液 または生食	S9 mix	MEM 培地
-S9 mix	0.03 mL	—	3.0 mL
+S9 mix	0.03 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.05 mL	—	5.0 mL

- (3) 短時間処理法では 6 時間, 連続処理法では 24 時間細胞を処理した.
- (4) 短時間処理法では 6 時間処理後, MEM で細胞表面を 3 回洗浄し, 新たに MEM 培地 5 mL を加え, さらに 18 時間培養した.
- (5) 処理開始時及び処理終了時に, 被験物質の沈殿等の有無を目視で観察した.

### 6.7.5 細胞増殖率の測定

- (1) 細胞表面をリン酸緩衝液（以下、PBS(-)と略す）で洗浄した。
- (2) 0.25 %トリプシン-EDTA を加えて処理（37°C, 5分）した。
- (3) MEM 培地を加え、細胞を剥離した。
- (4) 細胞計数分析装置で細胞を計数した。
- (5) 陰性対照群の測定値（平均）を 100%として、細胞増殖率を算出した。

### 6.7.6 50%細胞増殖抑制用量の算出

すべての処理条件において 50%細胞増殖抑制用量（IC<sub>50</sub>）を算出した。IC<sub>50</sub> は、細胞増殖率が 50%を挟む 2 用量を結ぶ直線式より算出した。

## 6.8 染色体異常試験

### 6.8.1 処理条件

-S9 mix, +S9 mix, 24 時間処理

### 6.8.2 被験物質用量

細胞増殖抑制試験の結果、それぞれの IC<sub>50</sub> は、-S9 mix で 1.3 µg/mL, +S9 mix で 6.6 µg/mL, 24 時間処理で 0.5 µg/mL となった。

以上の結果に基づいて、染色体異常試験は下記の用量を設定した。

-S9 mix : 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 及び 8 µg/mL (フリー体として)

+S9 mix : 0.5, 1, 2, 4, 6, 7, 8 及び 16 µg/mL (フリー体として)

24 時間処理 : 0.0156, 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 及び 2 µg/mL (フリー体として)

### 6.8.3 陽性対照物質用量

-S9 mix : MMC, 0.1 µg/mL

+S9 mix : BP, 15 µg/mL

24 時間処理 : MMC, 0.05 µg/mL

### 6.8.4 陽性対照物質用量の設定理由

上記用量で染色体異常を誘発することが知られている。

### 6.8.5 細胞処理

6.7.4 項に示した方法で実施した。

陽性対照群については、下記の組成で同様に実施した。

処理条件	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	MEM 培地
-S9 mix	0.03 mL	—	—	3.0 mL
+S9 mix	—	0.03 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.05 mL	—	—	5.0 mL