

定する。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施し、その結果と生物学的妥当性を考慮して試験責任者が総合的に判断する。

18. 結果の表示

(SOP : MUT/008)

復帰変異コロニー数の測定値とその平均値を表示する。さらに、復帰変異コロニー数(平均値)について、用量-反応曲線を図示する。また、プレート上の被験物質の析出及び生育阻害がみられた場合も表示する。

19. 試験成績の報告

本試験の成績について、最終報告書の草案(和文)の電子ファイル(Microsoft Word)を委託者に提出する。最終報告書についてはその写し1部を試験委託者に提出する。

別添 1 被験物質に関する資料

別添 2 表

1) 用量設定試験結果

2) 本試験結果

図

1) 用量設定試験結果(用量-反応曲線)

2) 本試験結果(用量-反応曲線)

添付資料 信頼性保証陳述書

20. 記録及び資料の保存

記録及び資料は、株式会社新日本科学 安全性研究所(住所:〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町2438番地)の以下の保存場所に最終報告書作成後10年間保存する。それ以降の保存については試験委託者と株式会社新日本科学 安全性研究所の間で協議するものとする。

株式会社新日本科学 安全性研究所 データ資料室

試験計画書及び試験計画書変更書

被験物質及び対照物質に関する記録, 資料

試験系に関する記録, 資料

培地調製記録

S9 mix の調製記録

復帰突然変異試験操作記録

コロニーカウント記録

最終報告書草案

最終報告書

その他，試験に関する資料

21. 試験計画書の変更

試験計画内容に変更が生じた場合は，試験計画書変更書を作成し，変更箇所及びその理由を明確にする。

DRAFT

(別添2)

Study No. SBL000-000

22. 試験計画書の作成及び承認

試験計画書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

年 月 日

林 亜耶

試験計画書の承認

運営管理者 株式会社新日本科学 安全性研究所

年 月 日

平井 照正

試験計画書の承認

株式会社新日本科学 安全性研究所より提示された試験計画書を承認します。

試験委託者 国立循環器病研究センター研究所

年 月 日

斯波 真理子

試験計画書

表題： HsPCSK9-1131AM(14)のは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号： SBL000-000

試験責任者： 林 亜耶

Draft

株式会社新日本科学 安全性研究所

2015年1月29日作成

目 次

1. 表題	38
2. 試験目的	38
3. 適用規則	38
4. 試験委託者	38
5. 試験モニター	38
6. 試験施設	38
7. 試験関係者	38
8. 試験日程	39
9. 被験物質及び対照物質	39
9.1 被験物質	39
9.2 媒体（陰性対照物質）	39
9.3 陽性対照物質	40
9.3.1 マイトマイシン C (MMC)	40
9.3.2 シクロホスファミド水和物 (CP)	40
10. 被験物質及び対照物質の調製	40
10.1 被験物質調製液	40
10.2 陰性対照調製液	41
10.3 陽性対照調製液	41
11. 試験系（細胞）	41
12. 培養条件	42
12.1 培養液	42
12.2 培養器	42
13. 代謝活性化系	42
13.1 S9（ラット肝ホモジネート）	42
13.2 S9 mix の調製	43
14. 用量設定試験	43
14.1 群構成及び用量の設定	43
14.2 試験操作	44
14.2.1 前培養	44
14.2.2 被験物質及び対照物質の処理	44
14.2.2.1 短時間処理法	44
14.2.2.2 24 時間連続処理法	45
14.2.3 被験物質による pH の変動及び被験物質の析出	45
14.2.4 細胞増殖率	45
15. 染色体異常試験	46
15.1 群構成及び用量の設定	46
15.2 試験方法	46
15.3 試験操作	46
15.3.1 前培養	46
15.3.2 被験物質及び対照物質の処理	47
15.3.2.1 短時間処理法	47
15.3.2.2 24 時間連続処理法	47
15.3.3 被験物質による pH の変動及び被験物質の析出	47
15.3.4 標本の作製	47

15.3.5	細胞増殖率	48
15.4	染色体異常の観察と分類	48
16.	統計学的手法	49
17.	結果の判定	49
17.1	試験成立	49
17.2	試験結果の判定	50
18.	結果の表示	50
19.	試験成績の報告	50
20.	記録, 資料, 試料及び標本の保存	50
21.	試験計画書の変更	51
22.	試験計画書の作成及び承認	52

別添 A

調製液中の HsPCSK9-1131AM(14)濃度測定方法	総ページ〇枚
--------------------------------	--------

DRAFT

1. 表題

HsPCSK9-1131AM(14)のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験目的

ほ乳類培養細胞を用いて、HsPCSK9-1131AM(14)の染色体異常誘発性の有無を評価する。

3. 適用規則

本試験は、以下の GLP を遵守し、ガイダンスに準拠して実施する。

- ・ 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）
- ・ 「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」（平成 24 年 9 月 20 日薬食審査発 0920 第 2 号厚生労働省医薬食品局審査管理課長）

4. 試験委託者

国立循環器病研究センター

〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5 丁目 7 番 1 号

TEL : 06-6833-5012

委託担当者 :

斯波 真理子

E-mail : mshiba@ncvc.go.jp

5. 試験モニター

大阪大学大学院薬学研究科 附属創薬センター 核酸医薬評価科学プロジェクト

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1 丁目 6 番

TEL : 06-6879-8145

担当者 :

小林 直之

E-mail : t-kobayashi@phs.osaka-u.ac.jp

6. 試験施設

株式会社新日本科学 安全性研究所

〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地

TEL : 099-294-2600

FAX : 099-294-3619

7. 試験関係者

試験責任者 :

林 亜耶

被験物質取扱い責任者 :

後日記載

分析責任者 (被験物質) :

後日記載

統計解析責任者 :

橋口晃一

8. 試験日程

試験開始日： 年 月 日
 実験開始日： 年 月 日
 用量設定試験： 年 月 日～ 年 月 日
 染色体異常試験： 年 月 日～ 年 月 日
 実験終了日： 年 月 日
 最終報告書草案作成日： 年 月 日
 最終報告書作成日／試験終了日： 年 月 日

9. 被験物質及び対照物質

(SOP : TSB/002, TSB/004)

9.1 被験物質

名称： HsPCSK9-1131AM(14)
 提供者： 後日記載
 ロット番号： 後日記載
 特性 (Certificate No.:)
 純度あるいは含量： 後日記載
 物理的性状： 後日記載
 安定性： 後日記載
 受領日： 後日記載 (試験開始前に受領した場合)
 入手日： 後日記載
 入手量： 後日記載
 保存条件： 後日記載
 保存場所： 被験物質保管所内____室 (許容範囲：__～__°C)
 取扱い： マスク, キャップ, 手袋及び保護眼鏡を着用する。
 残余被験物質： すべて試験委託者に返却する。

9.2 媒体 (陰性対照物質)

名称： 後日記載
 製造者： 後日記載
 純度 (あるいは含量)： 後日記載
 保存条件： 後日記載
 保存場所： 後日記載
 選択理由： 被験物質は媒体に__ mg/mL まで溶解し, 媒体中で安定であるため。また, 媒体は, 本試験の媒体として汎用されているため。

9.3 陽性対照物質

選択理由： 染色体異常試験の陽性対照物質として汎用されており、また、試験施設ではこれらの背景データを集積しているため。

9.3.1 マイトマイシン C (MMC)

商品名： マイトマイシン注用 2 mg
製造者： 協和発酵キリン株式会社
力価： 2 mg/瓶
ロット番号： 後日記載

9.3.2 シクロホスファミド一水和物 (CP)

製造者： Sigma-Aldrich Co.
ロット番号： 後日記載
含量： 後日記載

10. 被験物質及び対照物質の調製

(SOP : TSB/004, MUT/004, BIO/023)

10.1 被験物質調製液

調製濃度

用量設定試験： ○, ○及び○ mg/mL
染色体異常試験： 用量設定試験の結果から設定する。

換算係数： なし

事前粉砕： なし

調製方法： 被験物質を秤量し、媒体を加え、スターラー攪拌により被験物質を媒体に溶解させる。その後、媒体でメスアップして最高濃度液を調製する。以下の濃度の調製液は、最高濃度液を媒体により順次希釈して調製する。

安定性 (及び均一性)： ○～○mg/mL 調製液は、(温度)、遮光(有・無)、(容器)条件下で○日間安定(及び均一)であることが確認されている(試験成績書番号○○)。

調製頻度： 用量設定試験で 1 回、染色体異常試験で 1 回、すべての調製液を一括調製し、安定性が確認されている期間内に使用する。

保存条件： (温度)、遮光(有・無)、(容器)

保存場所： 被験物質保管所内____室(許容範囲：__～__°C)

(用量設定試験及び染色体異常試験で使用する陰性対照物質も同様に保存する。)

濃度(及び均一性)の確認： 染色体異常試験で用いる各希釈系列の最低及び最高濃度の調製液について○○法にて確認する。適合範囲は、目標濃度±10.0%

以内とする。(均一性は変動係数 (CV) が 10.0%以下であるときを適合とする。) 方法の詳細については別添 A に記載する。

10.2 陰性対照調製液

陰性対照物質をそのまま陰性対照調製液とする。

10.3 陽性対照調製液

調製方法：

MMC は 1 瓶 (2 mg) を 5 mL の注射用水 (株式会社大塚製薬工場) に溶解させ (0.4 mg/mL 調製液), これを局方生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場) で希釈する。CP は局方生理食塩液で溶解希釈する。これらをそれぞれ表 1 に示す濃度に調製した後, 凍結保管したものを用时に解凍して使用する。使用後の残液は廃棄する。

調製日：

後日記載

保存条件：

冷凍

保存場所：

培養細胞試験室内フリーザ付薬用保冷庫 冷凍庫 (MPR-213FS, パナソニックヘルスケア株式会社, 許容範囲: -10°C 以下)

表 1 陽性対照調製液の濃度

処理条件	陽性対照物質	調製濃度 (µg/mL)
短時間処理法 (-S9)	MMC	1.5
短時間処理法 (+S9)	CP	100
24 時間連続処理法 (-S9)	MMC	0.5

-S9 : 代謝活性化系の非存在下, +S9 : 代謝活性化系の存在下

11. 試験系 (細胞)

(SOP : DGA/006, MUT/103)

種：

CHL/IU 細胞 (新生チャイニーズ・ハムスター雌肺由来線維芽細胞株) を使用する。

試験には試験施設にて継代培養し, ラベルで識別した後, 超低温フリーザーで凍結保存したものを用时に解凍して使用する。

選択理由：

CHL/IU 細胞は, 染色体数が少なく, 比較的形も大きいため観察が容易で染色体異常試験に汎用されている。また, 種々の化学物質に対して感受性が高いため, 試験施設ではこれらの背景データを集積しているため。

入手先：

DS ファーマバイオメディカル株式会社 ラボラトリープロダクツ部

入手日： 後日記載
 継代数： 入手時○， 保存時○
 保存場所： 変異原性試験室内超低温フリーザー（MDF-392AT， パナソニックヘルスケア株式会社， 許容範囲：-80℃ 以下）
 ロット番号： 後日記載
 特性検査日： 後日記載
 特性検査： 試験に用いるロットの細胞について， 染色体数 25 ± 2 の細胞が 95%以上であること， 倍加時間__時間， マイコプラズマ汚染のないこと及び陰性対照ならびに陽性対照における染色体異常細胞の出現頻度が背景データの範囲内にあることを確認している。

12. 培養条件

(SOP : MUT/007)

12.1 培養液

名称： 10%BCS-MEM
 調製方法（1000 mL の場合）： 9.5 g のイーグル MEM 粉末を 950 mL の蒸留水に溶解させ， 2.2 g の炭酸水素ナトリウムを加え， 1 mol/L 塩酸 (HCl) あるいは水酸化ナトリウム (NaOH) で pH を 6.9~7.0 に調整し， 蒸留水で全量を 1000 mL とする。その後， 孔径 0.22 μm のボルトトップフィルター (Corning Inc.) でろ過滅菌し， 56℃， 30 分間非働化した仔牛血清 (Bovine Calf Serum : BCS) を 10 vol%加える。

製造者

イーグル MEM 粉末： Invitrogen Corporation
 炭酸水素ナトリウム： 和光純薬工業株式会社
 BCS： SAFC Biosciences

12.2 培養器

培養フラスコまたはプラスチックシャーレを用いる。5%CO₂ 存在， 加湿条件下の 37℃ に設定した CO₂ インキュベータ内で培養する。

13. 代謝活性化系

(SOP : MUT/007)

13.1 S9 (ラット肝ホモジネート)

製造者： オリエンタル酵母工業株式会社
 ロット番号： 後日記載

製造年月日： _____年__月__日
 使用動物： フェノバルビタール (PB) と 5,6-ベンゾフラボン (BF) を腹腔内投与 (投与期間及び投与量：1日目 PB 30 mg/kg, 2日目 PB 60 mg/kg, 3日目 PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg, 4日目 PB 60 mg/kg, 5日目 S9 調製) し, 薬物代謝酵素系を誘導した雄 SD ラット [7週齢, 体重： $\bar{O} \pm O$ g (Mean \pm SD)]

保存条件： 冷凍
 保存場所： 変異原性試験室内超低温フリーザー (MDF-392AT)
 使用期限： _____年__月__日

13.2 S9 mix の調製

S9 mix 10 mL あたりの調製方法：15.2 mg の G-6-P [D-Glucose 6-phosphate (disodium salt) , オリエンタル酵母工業株式会社] 及び 30.6 mg の NADP [Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, oxidized form (mono sodium salt) , オリエンタル酵母工業株式会社] を 3.0 mL の蒸留水に溶解し, 2.0 mL の 20 mmol/L HEPES 緩衝液, 1.0 mL の 50 mmol/L MgCl₂·6H₂O 及び 1.0 mL の 330 mmol/L KCl を加え補酵素溶液とする。この補酵素溶液を孔径 0.20 μ m のシリンジフィルターでろ過滅菌した後, 3.0 mL の S9 を加え S9 mix とする。S9 mix は用時調製する。なお, S9 mix 1 mL あたりの組成を表 2 に示す。

表 2 S9 mix 1 mL あたりの組成

成分	組成
S9	0.3 mL
塩化マグネシウム	5 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
G-6-P	5 μ mol
NADP	4 μ mol
HEPES 緩衝液	4 μ mol
蒸留水	0.3 mL

14. 用量設定試験

(SOP : MUT/010)

14.1 群構成及び用量の設定

染色体異常試験に用いる被験物質の用量設定のために, 代謝活性化系の存在下及び非存在下での短時間処理法, 代謝活性化系の非存在下での 24 時間連続処理法の各処理条件により用量設定試験を実施する。用量は, 「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて」に従い, 被験物質の最終濃度 500 μ g/mL (あるいは 1 mmol/L) を最高用量として, 以下公比約 3 で $\bar{O}, \bar{O}, \bar{O}, \bar{O}, \bar{O}, \bar{O}$ μ g/mL の \bar{O} 用量を設定する。陰性対照群として媒体処理群を設

ける。各処理群と群番号の対応表を表 3 に示す。なお、低用量群から細胞毒性がみられ、染色体異常試験の用量設定ができない場合は、用量を変更し、再度用量設定試験を実施する。

表 3 各処理群と群番号の対応表

処理条件	用量 (μg/mL)							
	陰性対照	○	○	○	○	○	○	○
短時間処理法 (-S9)	0	1	2	3	4	5	6	7
短時間処理法 (+S9)	10	11	12	13	14	15	16	17
24 時間連続処理法 (-S9)	20	21	22	23	24	25	26	27

-S9：代謝活性化系の非存在下， +S9：代謝活性化系の存在下

使用シャーレ数：各群 2 枚，同じ群のシャーレは個別に a, b と識別する。

14.2 試験操作

14.2.1 前培養

- 3) 凍結保存しておいた細胞懸濁液 1 mL を 37°C の温水中ですばやく解凍する。
- 4) 約 9 mL の培養液に細胞懸濁液を加えた後、軽く転倒混和させ、1000 rpm (190×g)、5 分間室温で遠心分離（ユニバーサル冷却遠心機：5800，株式会社久保田製作所）し、上清を除去する。
- 5) 沈渣を残った少量の上清に再懸濁させ、6 mL の培養液を加える。
- 6) この細胞懸濁液を 3 mL の培養液を含む 25 cm² 培養フラスコに 2 mL 加え、約 72 時間培養する。
- 7) 培養終了後、37°C に加温した 0.25 w/v% トリプシン溶液で細胞を剥離し、培養液で 1×10⁴ 個/mL の細胞懸濁液を調製する。
- 8) 1 群あたり 2 枚のプラスチックシャーレ（直径 3.5 cm）に 2 mL ずつ播種し、約 72 時間培養する。各群 2 枚のシャーレを使用するため、同じ群のシャーレは個別に a, b と識別する。また、被験物質処理開始時の細胞数を測定するためのシャーレ [集団倍加：Population doubling (PD) 用] を 2 枚播種し、約 72 時間培養する。各群 2 枚のシャーレを使用するため、同じ群のシャーレは個別に a, b と識別する。
- 9) 被験物質処理開始時、PD 用のシャーレの培養液を遠沈管に移し、37°C に加温した 0.25 w/v% トリプシン溶液で細胞を剥離し、培養液の入っている遠沈管に移し懸濁させる。50 μL の細胞懸濁液に 0.4 w/v% トリパンプルーを 50 μL 加え、血球計算盤を用いて、培養倒立顕微鏡（TMS，株式会社ニコン）下で生細胞数を測定する。

14.2.2 被験物質及び対照物質の処理

14.2.2.1 短時間処理法

- 10) 各シャーレから培養液をすべて除去する。
- 11) 代謝活性化系の非存在下では、予め培養液 ○○ mL に対し、所定濃度の被験物質調

製液あるいは媒体○○ mL の比率で十分に混合したものを準備する [混合液が不均一な懸濁液となる場合は、超音波処理を行い、均一に分散させる。]。これを各シャーレに 1.2 mL 加え、CO₂ インキュベータ内で 6 時間処理する。

- 12) 代謝活性化系の存在下では、予め培養液○○ mL に対し、所定濃度の被験物質調製液あるいは媒体○○ mL の比率で十分に混合したものを準備し [混合液が不均一な懸濁液となる場合は、超音波処理を行い、均一に分散させる。]、さらにこの混合液 1.0 mL に対し、S9 mix (S9 の最終濃度 5%) を 0.2 mL の比率で混合する。これを各シャーレに 1.2 mL 加え、CO₂ インキュベータ内で 6 時間処理する。
- 13) 処理液を捨て、約 2 mL の生理食塩液で 1 回細胞を洗浄する。これに 2 mL の新鮮培養液を加え、さらに 18 時間培養を続ける。
- 14) 培養液を遠沈管に移し、37°C に加温した 0.25 w/v% トリプシン溶液で細胞を剥離し、培養液の入っている遠沈管に移し懸濁させる。
- 15) 50 μL の細胞懸濁液に 0.4 w/v% トリパンプルーを 50 μL 加え、血球計算盤を用いて、培養倒立顕微鏡 (TMS, 株式会社ニコン) 下で生細胞数を測定する。

14.2.2.2 24 時間連続処理法

- 16) 各シャーレから培養液をすべて除去する。
- 17) 13.2.2.1 項 2) と同様の方法で混合液を作製する。これを各シャーレに 2.0 mL 加え、CO₂ インキュベータ内で 24 時間処理する。
- 18) 処理液を遠沈管に移し、37°C に加温した 0.25 w/v% トリプシン溶液で細胞を剥離し、処理液の入っている遠沈管に移し懸濁させる。
- 19) 50 μL の細胞懸濁液に 0.4 w/v% トリパンプルーを 50 μL 加え、血球計算盤を用いて、培養倒立顕微鏡 (TMS) 下で生細胞数を測定する。

14.2.3 被験物質による pH の変動及び被験物質の析出

被験物質調製液添加時に pH の変動の有無を培養液の色調の変化で観察し、培養液の色調の変化が大きく変化した場合、その用量における培養液の pH 及び陰性対照における培養液の pH を pH メーターで測定する。被験物質調製液添加時に培養液の pH を測定した場合は、被験物質処理終了時にも pH を測定する。また、被験物質の析出について、被験物質処理開始時及び終了時に肉眼あるいは培養倒立顕微鏡 (TMS) 下で観察する。

14.2.4 細胞増殖率

以下の式を用い、各群の PD を算出する。

$$PD = [\log (N / X_0)] / \log 2$$

X₀ : 処理開始時の生細胞数 (平均値)

N : 処理後の生細胞数 (平均値)

陰性対照群の PD を 100%とした場合の相対値を求め、細胞増殖率 (%) とする。また、最小二乗法を用いて、細胞増殖率が 50%となる用量を算出する。

15. 染色体異常試験

(SOP : MUT/010)

15.1 群構成及び用量の設定

用量設定試験の結果から、染色体異常試験の用量を以下の記載に従って設定する。陰性対照群として媒体処理群を、陽性対照群として MMC 処理群（代謝活性化系の非存在下）及び CP 処理群（代謝活性化系の存在下）を設ける。

- a) 細胞毒性がみられた場合、細胞増殖を 50%以上抑制する用量を最高用量とし、最高用量から原則として公比 $\sqrt{10}$ 以下、または公差で 3 段階以上を設定する。なお、被験物質処理終了時に析出が認められ、析出濃度域で用量相関性のある細胞毒性がみられた場合は、析出が認められた用量を 2 段階以上含めて設定する。これらの場合の最低用量は、細胞毒性がみられない用量を設定する。
- b) 細胞毒性がみられなかった場合、用量設定試験で用いた最高用量を最高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ 以下で 3 段階以上を設定する。
- c) 被験物質処理終了時に析出が認められ、析出濃度域でも細胞毒性がみられなかった場合は、用量設定試験で用いた最高用量、あるいは析出が認められる最低用量を最高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ 以下で 3 段階以上を設定する。

15.2 試験方法

試験は、短時間処理法及び 24 時間連続処理法で行う。短時間処理法として、代謝活性化系の存在下及び非存在下について、被験物質及び対照物質で 6 時間処理し、処理開始より 24 時間（約 1.5 細胞周期）後に染色体標本を作製する。また、24 時間連続処理法として、24 時間（約 1.5 細胞周期）にわたり被験物質及び対照物質で処理し、染色体標本を作製する。短時間処理法及び 24 時間連続処理法のどの処理条件においても、細胞増殖の指標として、標本作製時に生細胞数を測定する。

15.3 試験操作

15.3.1 前培養

14.2.1 項と同様の方法で行い、1 群あたり 2 枚のプラスチックシャーレ（直径 6 cm）に 5 mL ずつ細胞を播種する。また、被験物質処理開始時の細胞数を測定するためのシャーレ（PD 用）も同様に 2 枚作成する。各群 2 枚のシャーレを使用するため、同じ群のシャーレは個別に a, b と識別する。

被験物質処理開始時、PD 用のシャーレを用い、13.2.1 7) 項と同様の方法で生細胞数を測定する。

15.3.2 被験物質及び対照物質の処理

15.3.2.1 短時間処理法

- 20) 各シャーレから培養液をすべて除去する。
- 21) 陰性対照群及び被験物質群の代謝活性化系の非存在下では、予め培養液〇〇 mL に対し、所定濃度の被験物質調製液あるいは媒体〇〇 mL の比率で十分に混合したものを準備する [混合液が不均一な懸濁液となる場合は、超音波処理を行い、均一に分散させる。]。これを各シャーレに 3.0 mL 加え、CO₂ インキュベータ内で 6 時間処理する。
- 22) 陰性対照群及び被験物質群の代謝活性化系の存在下では、予め培養液〇〇 mL に対し、所定濃度の被験物質調製液あるいは媒体〇〇 mL の比率で十分に混合したものを準備し [混合液が不均一な懸濁液となる場合は、超音波処理を行い、均一に分散させる。]、さらにこの混合液 1.0 mL に対し、S9 mix (S9 の最終濃度 5%) を 0.2 mL の比率で混合する。これを各シャーレに 3.0 mL 加え、CO₂ インキュベータ内で 6 時間処理する。
- 23) 陽性対照群については、代謝活性化系の非存在下では、2.7 mL の培養液を加え、陽性対照調製液を 0.3 mL (MMC の最終濃度 0.15 µg/mL) 加える。代謝活性化系の存在下では、2.2 mL の培養液と 0.5 mL の S9 mix、そして陽性対照調製液を 0.3 mL (CP の最終濃度 10 µg/mL) 加える。これらを各シャーレに 3.0 mL 加え、CO₂ インキュベータ内で 6 時間処理する。
- 24) 処理液を捨て、約 5 mL の生理食塩液で 1 回細胞を洗浄する。これに 5 mL の新鮮培養液を加え、さらに 18 時間培養を続ける。
- 25) 培養終了の 2 時間前に 10 µg/mL のコルセミドを 0.05 mL (最終濃度 0.1 µg/mL) 加える。

15.3.2.2 24 時間連続処理法

- 26) 各シャーレから培養液をすべて除去する。
- 27) 陰性対照群及び被験物質群については、15.3.2.1 項 2) と同様の方法で混合液を作製する。これを各シャーレに 5.0 mL 加え、CO₂ インキュベータ内で 24 時間処理する。
- 28) 陽性対照群については、4.5 mL の培養液を加え、陽性対照調製液を 0.5 mL (MMC の最終濃度 0.05 µg/mL) 加え、CO₂ インキュベータ内で 24 時間処理する。
- 29) 処理終了の 2 時間前に 10 µg/mL のコルセミドを 0.05 mL (最終濃度 0.1 µg/mL) 加える。

15.3.3 被験物質による pH の変動及び被験物質の析出

14.2.3 項と同様の方法で行う。

15.3.4 標本の作製

- 30) 培養終了後、各シャーレの培養／処理液を遠沈管に移す。
- 31) 各シャーレの細胞を 0.25 w/v%トリプシン溶液 (37°C) により剥離し、培養／処理液の入っている遠沈管に移し懸濁させる。
- 32) すべての遠沈管から 50 μ L の細胞懸濁液を採取し、これに 0.4 w/v%トリパンプルーを 50 μ L 加え、血球計算盤を用いて、培養倒立顕微鏡 (TMS) 下で生細胞数を測定する。
- 33) 残りの細胞懸濁液を 1000 rpm (209 \times g) , 5 分間室温で遠心分離 (卓上多本架遠心機 : KS-8300, 株式会社久保田製作所) し、上清を除去する。
- 34) 沈査を残った少量の上清に再懸濁させ、約 5 mL の 0.075 mol/L KCl (37°C) 溶液を加え 37°C で 30 分間低張処理する。
- 35) 冷却した (約 4°C) カルノア固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1 の混合液) を 0.5 mL 加え半固定する。
- 36) 1000 rpm (209 \times g) , 5 分間室温で遠心分離 (卓上多本架遠心機 : KS-8300) し、上清を除去する。
- 37) 新たに約 4 mL のカルノア固定液を加え懸濁させ、1000 rpm (209 \times g) , 5 分間室温で遠心分離 (卓上多本架遠心機 ; KS-8300) し、上清を除去する。
- 38) 8) の操作を 3 回以上行った後、カルノア固定液で適当な濃度の細胞浮遊液を作製し、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に 2 滴ずつ滴下する。スライド標本は 1 シャーレあたり 1 枚以上作製する。
- 39) スライド標本を空気乾燥させた後、3.0 vol%ギムザ (メルク株式会社) 染色液 (pH6.8) で 15 分間染色し、水洗後に空気乾燥させる。

15.3.5 細胞増殖率

14.2.4 項と同様の方法で細胞増殖率 (%) を算出する。

15.4 染色体異常の観察と分類

観察用量としては、細胞増殖率が 50%付近となる用量を最高用量とする 3 用量以上を選択する。なお、細胞増殖率が 50%未満となる用量がない場合には、染色体異常試験の最高用量を観察用量の最高用量とする 3 用量以上を選択する。

スライド標本はコード化し、観察は盲検法で行う。コード化に用いる乱数表は、短時間処理法と 24 時間連続処理法に分けて作成する。まず、倍率 200 倍程度でスライド標本上の染色体のよく拡がった中期分裂像を捜し、次に最終倍率 600 倍で細胞の構造異常及び数的異常を調べる。各用量について 1 シャーレあたり 100 個、合計で 200 個について観察する。なお、構造異常の観察対象細胞は、染色体数 25 ± 2 の細胞とする。ただし、短時間処理法で構造異常細胞の出現数が増加し、結果が陽性となった場合には、24 時間連続処理法の標本観察は行わない。

染色体異常は次の様に分類する。

構造異常

染色分体切断 (chromatid break : ctb)

染色分体交換 (chromatid exchange : cte)

染色体切断 (chromosome break : csb)

染色体交換 (chromosome exchange : cse)

その他 (others : o)

数的異常

倍数体 (polyploid : poly)

核内倍加 (endoreduplication : endo)

染色体間交換 (三放射状, 四放射状) 及び染色体内交換 (環状染色分体) は染色分体交換に, 二動原体と環状染色体は染色体交換に含める. 中期分裂像中に多数のギャップ (chromatid gap and chromosome gap : gap) あるいは切断がみられる場合, 断片化 (fragmentation : frg) として, また, 中期分裂像中に 10 個以上の切断や交換がみられた場合, 多種多様な異常 (multiple aberration : mul) としてその他 (o) に分類する. 構築上の変性 (ill-defined chromosome aberration) や細粉化 (pulverization) あるいは C-分裂 (C-mitosis) などが標本中に多数みられる場合, 異常細胞に含めないで別に分類する. ギャップは, 染色分体幅よりも狭い非染色部位とし, 染色分体幅以上の非染色部位は切断として分類する.

1 個の細胞に 1 あるいはそれ以上の異常がみられた場合, それぞれ 1 個の異常細胞として計測する. ギャップは他の異常と区別して記録するが, 構造異常には含めない.

数的異常については, 38 本以上の染色体数を有するものを倍数体とし, 核内倍加と分けて記録する.

16. 統計学的手法

(SOP : CPU/105, CPU/124)

染色体異常細胞の出現数について, 陰性対照群と被験物質各群との間で Fisher 直接確率検定 (Bonferroni 補正) を行う. 染色体異常細胞の出現数に有意な増加が認められた場合は, 用量反応性について Cochran-Armitage の傾向検定を行う. これらの検定には SAS ソフトウェア (SAS for Windows, Release 9.2, SAS Institute Inc.) を使用し, 有意水準は片側 5%とする.

17. 結果の判定

(SOP : MUT/010)

17.1 試験成立

次のすべての条件を満たしている場合に試験成立とする.

- a) 陰性対照及び陽性対照の染色体異常細胞の出現頻度が試験施設の背景データの範囲内 (Mean \pm 3SD) にある.
- b) 染色体異常試験において観察可能な用量が 3 段階以上ある.

17.2 試験結果の判定

いずれかの処理条件において、陰性対照群と比較し、被験物質群で染色体異常細胞の出現数に有意な増加がみられ、用量依存性が認められた場合に陽性と判定し、それ以外の場合は陰性と判定する。明確に陽性あるいは陰性と結論づけられない場合には、適切な実験条件で確認試験を実施し、その結果と生物学的妥当性を考慮して試験責任者が総合的に判断する。

18. 結果の表示

(SOP : MUT/010)

染色体構造異常及び数的異常細胞の出現数及び頻度 (%) ならびに構造異常の種類別に細胞数をシャーレごとに表示する。さらに各群の平均値を表示し、用量-反応曲線を図示する。また、PD から求めた細胞増殖率を表示し、被験物質の析出が認められた場合は、その用量も明記する。

19. 試験成績の報告

本試験の成績について、最終報告書の草案（和文）の電子ファイル（Microsoft Word）を委託者に提出する。最終報告書についてはその写し1部を試験委託者に提出する。

別添 1	被験物質に関する資料
別添 2	表
	3) 用量設定試験結果
	4) 染色体異常試験結果
	図
	5) 用量設定試験結果（用量-反応曲線）
	6) 染色体異常試験結果（用量-反応曲線）
添付資料	信頼性保証陳述書

20. 記録、資料、試料及び標本の保存

記録、資料及び標本は、株式会社新日本科学 安全性研究所（住所：〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地）の以下の保存場所に最終報告書作成後 10 年間保存する。それ以降の保存については試験委託者と株式会社新日本科学 安全性研究所の間で協議するものとする。

株式会社新日本科学 安全性研究所 データ資料室

試験計画書及び試験計画書変更書

被験物質及び対照物質に関する記録、資料

試験系に関する記録, 資料
培養液調製記録
S9 mix の調製記録
用量設定試験操作記録
培養液 pH 測定記録 (必要に応じて)
染色体異常試験操作記録
生細胞数測定記録
染色体スライド標本観察記録
統計処理に関する記録
最終報告書草案
最終報告書
その他, 試験に関する資料

株式会社新日本科学 安全性研究所 器官保管室
スライド標本

21. 試験計画書の変更

試験計画内容に変更が生じた場合は, 試験計画書変更書を作成し, 変更箇所及びその理由を明確にする.