

Japan
Food
Research
Laboratories

試験報告書

第 299080377-005 号

依頼者 アサヒブリテック株式会社

検体 アクアプロ21Rによる生成水

試験項目 培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験

平成 11 年 08 月 19 日 当センターに提出された
上記検体について試験した結果は次のとおりです。

平成 11 年 10 月 29 日

財団法人

日本食品分析センター

東京本部 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒564-0051 大阪府吹田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒460-0011 名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呉服町1番12号
多摩研究所 〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

培養細胞を用いたコロニー形成阻害試験

要 約

アクアプロ21Rによる生成水を検体として、「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン」(平成7年薬機第99号別添)に準拠して、V79細胞を用いてコロニー形成阻害試験(直接曝露法及び培養液混合法)を行った。その結果、直接曝露法では、濃度依存的にコロニー形成を阻害し、その50 %コロニー形成阻害濃度(IC50)は試験-1では約15.1 %, 試験-2では約12.6 %であった。また、培養液混合法でも、濃度依存的にコロニー形成を阻害し、その50 %コロニー形成阻害濃度(IC50)は試験-1では約27.1 %, 試験-2では約19.7 %であった。

依 頼 者

アサヒプリテック株式会社
兵庫県神戸市西区室谷1-6-3 ハイテクパーク内

検 体

アクアプロ21Rによる生成水

試験実施期間

平成11年8月24日～平成11年10月29日

試験実施場所

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
東京都多摩市永山6丁目11番10号

1 試験目的

検体を用いて、「医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン」(平成7年薬機第99号別添)に準拠して、V79細胞を用いたコロニー形成阻害試験を行う。

2 検 体

アクアプロ21Rによる生成水

備考：検体は、依頼者により設置されたアクアプロ21Rを用いて試験実施場所において調製した(設置日：平成11年8月20日)。

3 試験方法

1) 細胞の種類及び培養条件

細胞名	V79	入手先	理化学研究所	
種	チャイニーズ・ハムスター	入手年月日	1998年7月1日	
培養液 (ME10)	イーグルMEM①*	製造元	日水製薬株式会社	
血清 (濃度)	牛胎児血清 (10 vol%)	製造元 (Lot No.)	ICN (94998)	
細胞倍加時間	約14時間	凍結条件	-80℃	
試験に用いた細胞の継代数	直接曝露法：22代目 培養液混合法：19代目	培養条件	容器	プラスチックシャーレ
			温度	37℃
継代間隔	3～4日間		CO ₂ 濃度	5 %
備考	* Eagle's Minimum Essential Medium, 0.06 mg/mLカナマイシン含有			

2) 試験実施時の培養液 (M05), 血清及び培養容器

培養液	MEMアール	製造元		コージン・バイオ株式会社	
		備考		非必須アミノ酸含有, 1 mmol/Lピルビン酸及び0.05 mg/mLカナマイシンを添加。	
血清	牛胎児血清	製造元	ICN	添加濃度	5 vol%
		Lot No.	94998		
培養容器[製造元]		ファルコン組織培養用プラスチックプレート24穴 [ベクトロニック]			

3) 試験に用いた試薬の組成

① 細胞の播種に用いる試薬

リン酸緩衝生理食塩液 [PBS (-)] (1 L)			トリプシン溶液 [PBS (-) 中]	
NaCl	8.0	g	2.5 %トリプシン(1:250)溶液 [コスモ・バイオ株式会社]	0.05
KCl	0.2	g		vol%
Na ₂ HPO ₄	1.15	g	EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	0.02
KH ₂ PO ₄	0.2	g		vol%

② 細胞の固定及び染色に用いる試薬

10 %中性リン酸緩衝ホルマリン溶液 (1 L)			0.1 %メチレンブルー溶液 (1 L)	
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	4.4	g	Methylene blue · 4H ₂ O	1.0 g
Na ₂ HPO ₄	6.5	g		
ホルマリン液	100	mL		

③ 標準物質

名称		製造元	グレード	ロット
標準物質	Zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC)	東京化成工業株式会社	1級	FBV01
	Zinc dibutyldithiocarbamate (ZDBC)	和光純薬工業株式会社	1級	PDL1635

4) 試験液の調製及び有効塩素濃度の測定

① 直接曝露法

依頼者により設置されたアクアプロ2IRを用いて試験直前に検体を採取し、よう素滴定法により、有効塩素濃度を測定した。

採取した検体と10倍濃度のPBS (-)を9:1の割合で混合したものを調製し、試験原液 (100 %)とした。これをPBS (-)で希釈して0.5, 1, 5, 10, 50及び100 %の計6濃度の検体試験液を調製した。

また、陰性対照試験液としてはPBS (-)を、無処理試験液としてはM05培地を用いた。

② 培養液混合法

依頼者により設置されたアクアプロ2IRを用いて試験直前に検体を採取し、よう素滴定法により、有効塩素濃度を測定した。

採取した検体と2倍濃度のM05培地を等量混合して、試験原液 (50 %)とした。これをM05培地で希釈して12.5, 25及び50 %の計3濃度の検体試験液を調製した。

また、無処理試験液としてはM05培地を用いた。

5) 試験操作法

単層に増殖したV79細胞をトリプシン処理によりはく離し、M05培地を用いて100個/mLの細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液を組織培養用プレートの各ウェルに0.5 mLずつ播種し、37℃の5 %CO₂インキュベーター中で約6時間培養した後、以下の方法で試験を実施した。

① 直接曝露法

培養後、細胞がウェルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各濃度の検体試験液、陰性対照試験液及び無処理試験液を各々4個のウェルに0.5 mLずつ加え、37℃の5 %CO₂インキュベーター中で30分間培養した。培養後、全てのウェルを新しい培養液に交換し、37℃の5 %CO₂インキュベーター中で6日間培養した。培養終了後、各ウェルを10 %中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で30分間固定し、0.1 %メチレンブルー溶液で15分間染色して、細胞数50個以上のコロニーを計数した。

なお、検体については試験を2回繰り返して行い、それぞれ試験-1及び2とした。

② 培養液混合法

培養後、細胞がウェルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各濃度の検体試験液及び無処理試験液を各々4個のウェルに0.5 mLずつ加え、37℃の5 %CO₂インキュベーター中で6日間培養した。培養終了後、各ウェルを10 %中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で30分間固定し、0.1 %メチレンブルー溶液で15分間染色して、細胞数50個以上のコロニーを計数した。

なお、検体については試験を2回繰り返して行い、それぞれ試験-1及び2とした。

4 試験結果及び考察

1) 有効塩素濃度

測定値は32 mg/L(直接曝露法)及び37 mg/L(培養液混合法)であった。

2) コロニー形成阻害試験

試験結果を表-1及び2, 図-1及び2並びに写真-1及び2に示した。

直接曝露法では, 検体試験液は濃度依存的にコロニーの形成を阻害し(写真-1), 陰性対照試験液におけるコロニー形成率を100 %とした時, Van der Waerden法で計算した50 %コロニー形成阻害濃度(IC50)は, 試験-1において約15.1 %, 試験-2において約12.6 %であった。また, 陰性対照試験液におけるコロニー形成率は, 無処理試験液に比べると低下していた。

培養液混合法でも, 検体試験液は濃度依存的にコロニーの形成を阻害し(写真-2), Van der Waerden法で計算した50 %コロニー形成阻害濃度(IC50)は, 試験-1において約27.1 %, 試験-2において約19.7 %であった。

直接曝露法で, 陰性対照試験液は細胞毒性を示さないリン酸緩衝生理食塩液であることから, 陰性対照試験液でのコロニー形成率が無処理試験液に比べて低下した理由として, ①細胞がウエル底面に接着して間もない時期に試験液が交換されたために物理的に細胞がはがれた, ②接着後間もない時期に栄養を含まない塩類溶液に交換されたため, 接着不完全の細胞が浮き上がってしまった, などの要因が考えられた。

以上のことから, 本試験条件下において, 検体には濃度依存的な細胞毒性が認められた。

なお, 標準物質を用いてコロニー形成阻害試験を行った結果を表-3及び4並びに図-3及び4にそれぞれ示した。

表-1 検体のコロニー形成阻害試験の結果(直接曝露法)

濃度 (%)	コロニー数/ウェル				平均	コロニー形成率 (%) (無処理=100)	IC50 (%)
試験-1	0.5	44	39	48	40	42.8	97.7
	1	45	38	38	45	41.5	94.7
	5	38	55	49	51	48.3	110.3
	10	31	33	28	35	31.8	72.6
	50	0	0	0	0	0.0	0.0
	100	0	0	0	0	0.0	0.0
試験-2	0.5	48	35	43	49	43.8	100.0
	1	44	38	35	36	38.3	87.4
	5	33	36	36	46	37.8	86.3
	10	34	40	28	32	33.5	76.5
	50	0	0	0	0	0.0	0.0
	100	0	0	0	0	0.0	0.0
陰性対照 無処理		45	39	42	49	43.8	100.0
		50	47	49	59	51.3	-

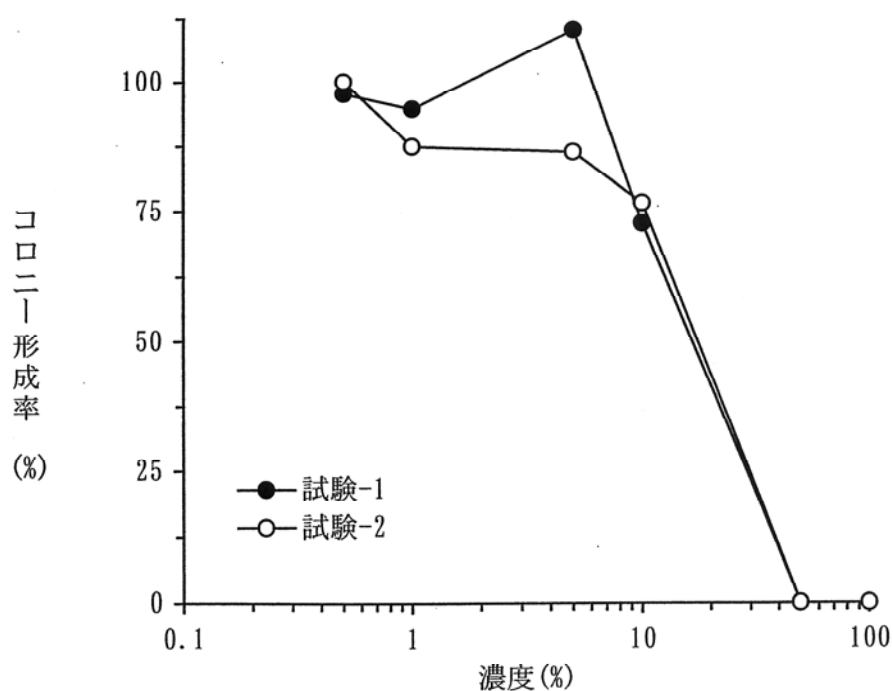


図-1 検体の用量反応

表-2 検体のコロニー形成阻害試験の結果(培養液混合法)

濃度 (%)	コロニー数/ウェル				平均	コロニー形成率 (%) (空抽出=100)	IC50 (%)
試験-1	12.5	56	54	45	48	50.8	100.6
	25	42	23	31	28	31.0	61.4
	50	0	0	0	0	0.0	0.0
試験-2	12.5	38	45	41	54	44.5	88.1
	25	10	15	9	21	13.8	27.3
	50	0	0	0	0	0.0	0.0
無処理		45	53	53	51	50.5	100.0

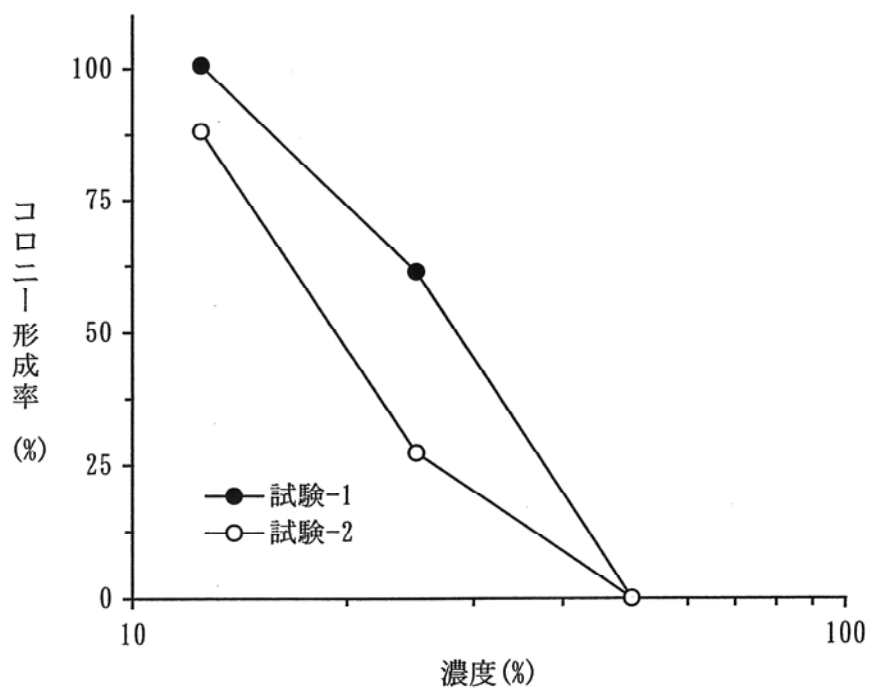


図-2 検体の用量反応

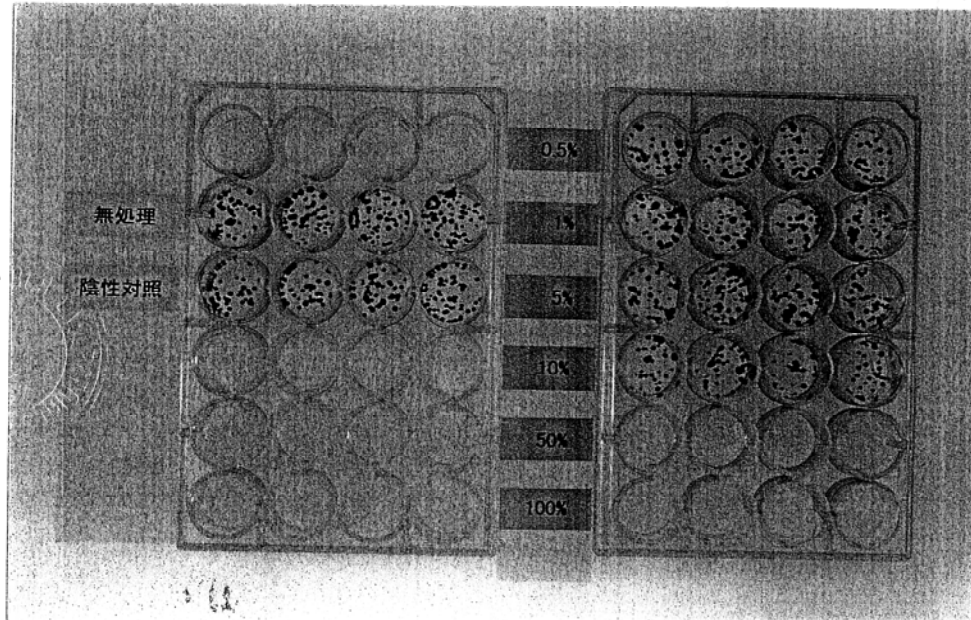


写真-1 コロニーの肉眼像(直接曝露法)

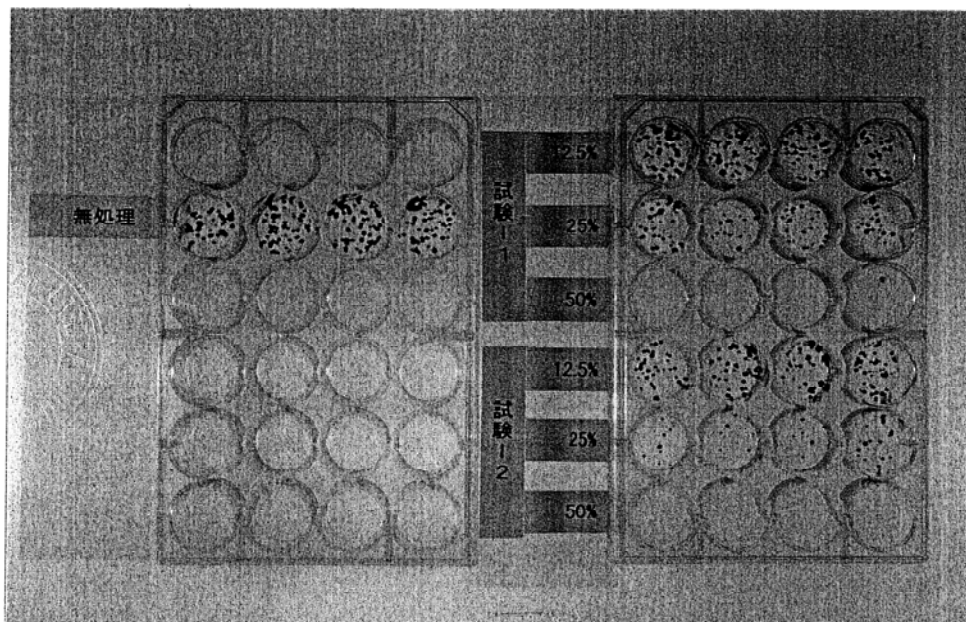


写真-2 コロニーの肉眼像(培養液混合法)

表-3 標準物質を用いたコロニー形成阻害試験の結果(22代目)

濃度 (μg/mL)	コロニー数/ウエル			平均	コロニー形成率 (%) (無処理=100)	IC50 (μg/mL)
ZDEC	0.005	46	52	39	45.7	93.8
	0.01	30	33	25	29.3	60.2
	0.02	0	0	0	0.0	0.0
ZDBC	1	38	48	42	42.7	87.7
	2	11	17	14	14.0	28.7
	5	0	0	0	0.0	0.0
無処理		47	48	51	48.7	100.0

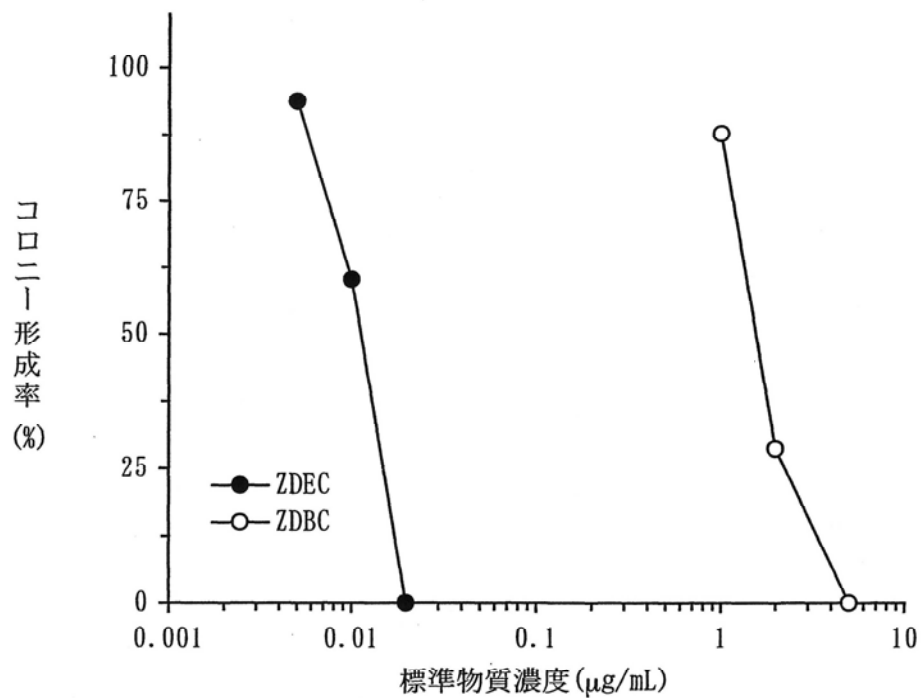


図-3 標準物質の用量反応

表-4 標準物質を用いたコロニー形成阻害試験の結果(19代目)

濃度 (μg/mL)	コロニー数/ウエル			平均	コロニー形成率 (%) (無処理=100)	IC50 (μg/mL)
ZDEC	0.005	49	58	49	52.0	103.4
	0.01	32	33	36	33.7	67.0
	0.02	0	0	0	0.0	0.0
ZDBC	1	44	49	47	46.7	92.8
	2	19	12	17	16.0	31.8
	5	0	0	0	0.0	0.0
無処理		42	51	58	50.3	100.0

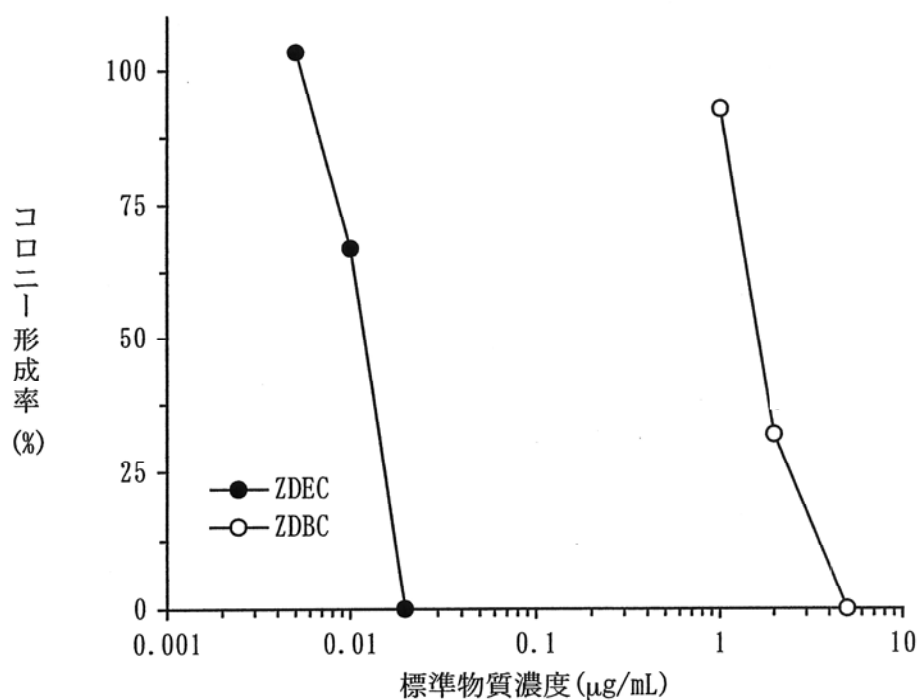


図-4 標準物質の用量反応

以 上