

試験報告書

依頼者 きりしまフラワー株式会社 様

検 体 本報告書中

表 題 供与検体によるがん細胞 (A549 細胞) の増殖抑制効果の評価

当社が拝受致しました上記検体の試験結果をご報告いたします。

試験機関：株式会社プロテクティア

試験機関責任者：田中伸幸

試験報告日：2022 年 4 月 xx 日

1-1. 依頼者

きりしまフラワー株式会社 様

1-2. 試験機関及び住所

試験機関：株式会社プロテクティア

試験場所：大阪府茨木市美徳ヶ丘 8-1 インキュベーション棟 1213

試験責任者：田中伸幸（株式会社プロテクティア）

1-3. 試験実施日

がん細胞 A549 細胞に対する増殖抑制試験 2022 年 3 月 14 日-22 日

1-4. 使用試験体

- ・試験検体 特別高濃度ミネラル水 音無
- ・試験対照 ダルベッコ改変リン酸緩衝液 (D-PBS (-))

1-5. 試験概要

上記検体のがん細胞 A549 細胞に対する増殖抑制能を評価する。

1-6. 試験対象菌株・細胞・ウイルス株

がん細胞 A549 (ヒト肺腺がん由来)

JCRB0076

1-7. 試験方法

[増殖抑制試験]

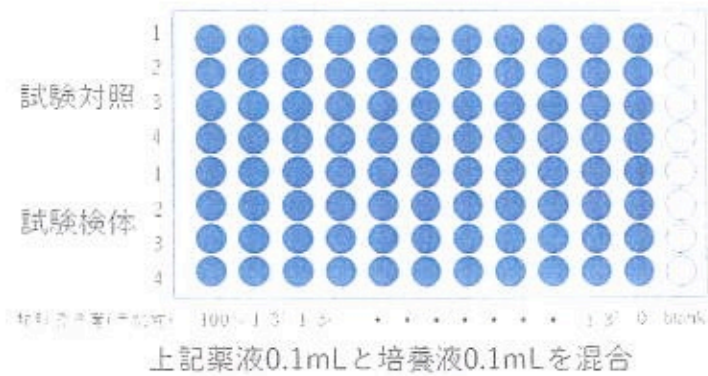
80-90% コンフルエントの 549 細胞をトリプシン処理によって懸濁液を作成し、10%ウシ血清含有イーグル培地を用いて 2×10^4 cells/mL に調製した。96 ウェルプレートに上記細胞溶液を 0.1 mL/ウェルずつ播種し、温度 37℃、5% 炭酸ガス雰囲気下で 24 時間静置培養を行った。倒立型顕微鏡を用いて細胞の接着を確認したのち、増殖抑制試験に移行した。

試験検体および試験対照は 10%ウシ血清含有イーグル培地を用いて 1/3 倍段階希釈を行い、10 系列の段階希釈系列を作成し、試験液とした。上述した 96 ウェル細胞シートに試験液を 0.1 mL/ウェルずつ添加し、プレートをよく攪拌した後、温度 37℃、5% 炭酸ガス雰囲気下で 7 日間静置培養を行った。無添加列が 80-90%コンフルエントまで増殖しているのを確認した後、上清培地を取り除き、MTS アッセイを行った。MTS アッセイ試薬は Promega 社 CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay を用い、FluoroBrite DMEM を用いて希釈したものを用い、37℃ 5%炭酸ガス雰囲気下で 30 分間呈色後、プレートリーダーを用いて Abs490 を測定し、細胞生存能力 (Cell Viability) を算

出した。

Cell Viability (%) = (検体添加系列の Abs490 / 検体無添加系列の Abs 490) x 100
 ※活発な細胞は MTS 試薬が還元され呈色されるが、細胞数が少ない、増殖が起きないなど不良な細胞は還元性が低下するため、呈色が小さくなる。この差を用いて細胞の生存性 (Cell Viability) を評価できる。

[試験濃度]

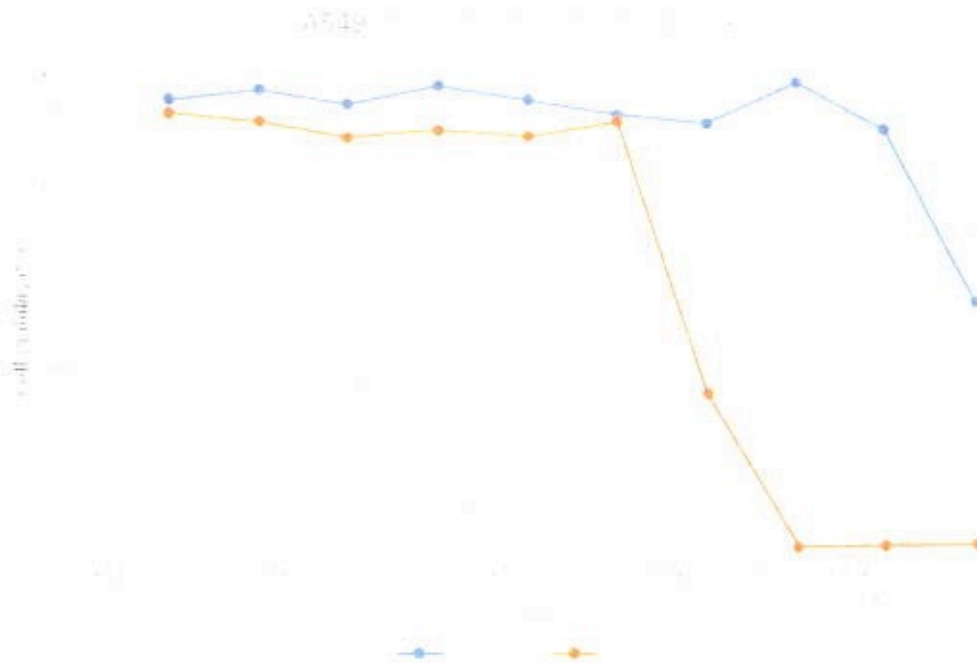


初発濃度：試験検体および試験対照濃度 50% (0.5 g/mL)

最終濃度：試験検体および試験対照濃度 0.0025% (2.5×10^{-5} g/mL)

I-8. 試験結果

[がん細胞 A549 細胞に対する音無の増殖抑制効果試験結果]



濃度 (%)	50.0000%	16.6667%	5.5556%	1.852%	0.617%	0.206%	0.069%	0.023%	0.008%	0.003%	-
濃度 Ig/mL	0.500000	0.166667	0.055556	0.018519	0.006173	0.002058	0.000686	0.000229	0.000076	0.000025	-
抗験対照	55%	94%	105%	95%	97%	101%	104%	100%	103%	101%	100%
試験検体	0%	0%	0%	34%	96%	93%	94%	92%	96%	98%	100%

[測定データ]

Abs490	濃度 (%)											
	Blank	50.0000	16.6667	5.5556	1.8519	0.6173	0.2058	0.0686	0.0229	0.0076	0.0025	0.0000
抗験対照	0.0425	0.231	1.350	1.842	1.626	1.729	1.752	1.705	1.635	1.690	1.703	1.502
	0.0425	0.780	1.616	1.579	1.484	1.427	1.498	1.553	1.595	1.561	1.527	1.518
	0.0432	1.205	1.387	1.430	1.486	1.481	1.526	1.596	1.520	1.494	1.514	1.526
	0.0438	1.225	1.420	1.514	1.267	1.347	1.411	1.519	1.379	1.565	1.443	1.597
試験検体	0.0423	0.050	0.046	0.043	0.345	1.384	1.450	1.468	1.385	1.491	1.650	1.611
	0.0434	0.050	0.047	0.044	0.325	1.536	1.540	1.495	1.405	1.557	1.555	1.653
	0.0435	0.049	0.049	0.044	0.744	1.634	1.452	1.625	1.617	1.605	1.691	1.600
	0.0437	0.047	0.049	0.044	0.935	1.679	1.585	1.625	1.595	1.570	1.608	1.629

各系列 4 回の測定結果の平均を元に平均値を算出し、Blank からの差分を元に CellViability を算出した。

I-9: 考察及び結論

供与試験検体のがん細胞増殖抑制効果を評価した。がん細胞は肺腺がん由来の A549 細胞を用い、増殖抑制効果は細胞生存性評価手法として多用される MTT (MTS) アッセイによる CellViability 測定を用いた。供与試験検体：音無はリン酸緩衝液と比べて有意にがん細胞増殖抑制効果を示し、1.8% 溶液以上で顕著な増殖抑制効果を示した。

以上