

## 13.3.2. 陽性対照物質及び選択理由

次表に示した陽性対照物質及びその濃度についてはいずれも DMSO で調製した。ガイドラインを参考に、背景データがある濃度であることから選定した。

| 菌 株     | 代謝活性化系非存在下 |               | 代謝活性化系存在下 |               |
|---------|------------|---------------|-----------|---------------|
|         | 化学物質名      | 濃度 (µg/plate) | 化学物質名     | 濃度 (µg/plate) |
| TA100   | AF-2       | 0.01          | 2AA       | 1.0           |
| TA1535  | AZI        | 0.5           | 2AA       | 2.0           |
| WP2uvrA | AF-2       | 0.01          | 2AA       | 10.0          |
| TA98    | AF-2       | 0.1           | 2AA       | 0.5           |
| TA1537  | 9AA        | 80.0          | 2AA       | 2.0           |

AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (Lot No. SDJ4376, 和光純薬工業株式会社)

AZI : Sodium azide (Lot No. TSL2436, 和光純薬工業株式会社)

9AA : 9-aminoacridine (Lot No. 2436F, MP Biomedicals, LLC.)

2AA : 2-aminoanthracene (Lot No. DPN4440, 和光純薬工業株式会社)

## 13.4. 使用菌株

以下のネズミチフス菌 4 株及び大腸菌 1 株を用いた。

塩基対置換型の突然変異を検索する菌株

- ① *Salmonella typhimurium* TA100
- ② *Salmonella typhimurium* TA1535
- ③ *Escherichia coli* WP2uvrA

フレームシフト型の突然変異を検索する菌株

- ④ *Salmonella typhimurium* TA98
- ⑤ *Salmonella typhimurium* TA1537

上記菌株①②④及び⑤は 2002 年 2 月 5 日に日本バイオアッセイ研究センターから分与されたもの、③は 2007 年 7 月 12 日に独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門 (NBRC) から購入したものである。これらの菌株は継代培養し、特性を確認したものを使用した。

これらの菌株は、ガイドラインで示された菌株であり、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されているため、選定した。

## 13.5. 最少グルコース寒天平板培地 (プレート)

以下の組成である市販のバイタルメディア AMT-S培地 (Lot No. DZA99501 及び DZAA1601, 極東製薬工業株式会社) を用いた。

|              |          |
|--------------|----------|
| 硫酸マグネシウム・7水塩 | 0.2 g/L  |
| クエン酸・1水塩     | 2.0 g/L  |
| リン酸二カリウム・無水塩 | 10.0 g/L |
| リン酸一アンモニウム   | 1.92 g/L |
| 水酸化ナトリウム     | 0.66 g/L |
| ブドウ糖         | 20.0 g/L |
| 寒天末          | 15.0 g/L |

## 13.6. トップアガー

加温溶解した軟寒天溶液 [Bacto Agar (Becton, Dickinson) : 0.6%, 塩化ナトリウム (関東化学株式会社) : 0.5%] に、ネズミチフス菌用には 0.5 mmol/L ビオチン (和光純薬工業株式会社) 及び 0.5 mmol/L ヒスチジン (関東化学株式会社) 混合溶液を 10mL : 1mL の割合で混合した。同様の手順で、大腸菌用には 0.5 mmol/L トリプトファン (関東化学株式会社) 溶液を混合した。なお、調製後は、45°C で保温して使用した。

## 13.7. S9 mix

## 13.7.1. S9

以下の市販品 S9 (Lot No. 08103108, オリエンタル酵母工業株式会社) を使用した。

|                   |   |
|-------------------|---|
| 使用動物              | ラット : Sprague-Dawley 系  |
| 性/週齢              | 雄/7 週齢  |
| 臓器                | 肝臓  |
| 誘導物質              | Phenobarbital (PB) 及び 5,6-Benzoflavone (BF)                           |
| 投与量<br>及び<br>投与回数 | PB: 30 mg/kg 1回 (1日目)<br>60 mg/kg 3回 (2~4日目)<br>BF: 80 mg/kg 1回 (3日目) |
| 投与方法              | 腹腔内投与   |

## 13.7.2. Cofactor- I

市販品 Cofactor- I (Lot No.999801, オリエンタル酵母株式会社) を注射用水 (株式会社大

塚製薬工場)で溶解し、フィルター滅菌 (0.45  $\mu\text{m}$ ) したものを使用した。

### 13.7.3. S9 mix の調製

用時に、S9 と Cofactor- I を 1 mL : 9 mL の割合で混合した。、S9 mix 中の Cofactor- I の成分濃度を以下に示す。

|                    |                        |
|--------------------|------------------------|
| 塩化マグネシウム           | 8 $\mu\text{mol/mL}$   |
| 塩化カリウム             | 33 $\mu\text{mol/mL}$  |
| グルコース-6-リン酸        | 5 $\mu\text{mol/mL}$   |
| NADPH              | 4 $\mu\text{mol/mL}$   |
| NADH               | 4 $\mu\text{mol/mL}$   |
| リン酸ナトリウム緩衝液, pH7.4 | 100 $\mu\text{mol/mL}$ |

## 13.8. 試験方法

### 13.8.1. 群構成

菌株ごとに、代謝活性化系非存在下と代謝活性化系存在下について実施し、陰性対照及び陽性対照を設けた。

用量設定試験では、5000  $\mu\text{g/plate}$  を最高用量とし、DMSO を用いて、公比 $\sqrt{10}$ の計6用量 (5000, 1580, 500, 158, 50.0, 15.8  $\mu\text{g/plate}$ ) を設けた。

本試験では、用量設定試験の結果、復帰変異コロニーの増加及び菌の生育阻害が認められなかったので、5000  $\mu\text{g/plate}$  を最高用量とし、DMSO を用いて、公比2の計5用量 (5000, 2500, 1250, 625, 313  $\mu\text{g/plate}$ ) を設けた。

### 13.8.2. 菌懸濁液の調製

L字型試験管を用いて25 g/Lニュートリエントブロス培養液 (Nutrient Broth No. 2, Oxoid Ltd.) 5 mL に対して菌懸濁液 10  $\mu\text{L}$  (大腸菌は 1/4 希釈後, 10  $\mu\text{L}$ ) の割合で接種後、37°C で8時間振盪培養した。培養後、菌懸濁液の濁度 (OD) を紫外・可視分光光度計を用いて測定し、菌数を算出した。その結果、次表のように菌数が大腸菌の場合は  $2.0 \times 10^9$  個/mL 以上、ネズミチフス菌の場合には  $1.0 \times 10^9$  個/mL 以上であることを確認した。

| 生菌数 ( $\times 10^9$ 個/mL) | TA100 | TA1535 | WP2 <sub>uvrA</sub> | TA98 | TA1537 |
|---------------------------|-------|--------|---------------------|------|--------|
| 用量設定試験                    | 3.29  | 3.28   | 6.30                | 3.02 | 2.19   |
| 本試験                       | 2.64  | 3.28   | 6.35                | 3.12 | 2.45   |

### 13.8.3. 菌株と被験物質液の混合

試験は、ガイドラインに示された方法から、プレインキュベーション法を採用し、黄色灯下で実施した。プレート枚数は、各群（陰性対照、被験物質、陽性対照）2枚とした。

#### 13.8.3.1. 代謝活性化系非存在下

小試験管（ポリプロピレン製）に陰性対照物質液、被験物質液又は陽性対照を0.1 mL入れた後、次いで0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL 及び各菌株の懸濁培養液0.1 mL を入れ、攪拌後、37°C、振盪回数 75 回/分（変動範囲 72～78 回/分）で振盪培養した。20 分後に、トップアガー-2.0 mL を加えて、攪拌後プレート上に均一に重層した。トップアガーを重層固化後、37°C の恒温器内で 48 時間培養した。

#### 13.8.3.2. 代謝活性化系存在下

0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL の代わりに S9 mix 0.5 mL を用いて代謝活性化系非存在下と同様に操作した。

### 13.8.4. 無菌検査

試験系に雑菌の混入がないことを確認するために、最高濃度の被験物質液（50.0 mg/mL）0.1 mL、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL 又は S9 mix 0.5 mL をそれぞれトップアガー-2.0 mL と混合し、プレートに重層後、37°C の恒温器内で 48 時間培養した。

### 13.9. コロニーの計数及び観察

目視で被験物質の析出の有無を確認後、TA100 株及び陽性対照群のプレートはコロニーアナライザーで計数し、その他のプレートは用手法で計数した。生育阻害状況（菌のバックグラウンドの生育）は、実体顕微鏡を用いて観察した。

### 13.10. 試験系の識別方法

各菌株の前培養時には、油性ペンで菌株名を L 字型試験管に記入した。試験時のプレートには試験番号、菌株名、用量、被験物質名、陰性対照物質名又は対照物質名及び S9 mix の存在の有無を表記した。

### 13.11. 試験の成立条件

下記の条件を満たしたので、試験成立とした。

- ① 陰性対照群及び陽性対照群のコロニー数の平均値が背景データ（添付資料）の変動範囲内であり、陽性対照群のコロニー数が陰性対照群の2倍以上であること。
- ② 生育阻害の認められない用量が4用量以上あること。
- ③ 無菌検査の結果、雑菌による汚染が無いこと。

### 13.12. 統計学的処理

各菌における被験物質の各用量、陰性及び陽性対照において計測した復帰変異コロニー数とその平均値を表にした。また、被験物質の用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を作成した。統計学的検定は行わなかった。

### 13.13. 結果の判定

復帰変異コロニー数の平均値が、用量の増加に従って陰性対照値の2倍以上に増加し、かつ試験結果に再現性が認められる場合を陽性とした。

## 14. 試験結果

### 14.1. 用量設定試験

用量設定試験の結果を Figure 1 及び Table 1 に示した。

5菌株いずれの用量においても、復帰変異コロニー数は陰性対照値の2倍未満であった。被験物質の析出及び菌の生育阻害はいずれの用量においても認められなかった。

### 14.2. 本試験

本試験の結果を Figure 2 及び Table 2 に示した。

5菌株いずれの用量においても、復帰変異コロニー数は陰性対照値の2倍未満であった。被験物質の析出及び菌の生育阻害はいずれの用量においても認められなかった。

## 15. 考察及び結論

用量設定試験及び本試験では全菌株において、S9 mixの有無にかかわらず、陰性対照値の2倍を超えるコロニー数は認められなかった。また、被験物質の析出及び菌の生育阻害は認められなかった。

以上の結果より、用量設定試験と本試験の結果に再現性が認められたことから、AcPepAの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

16. 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及び試験計画書に従わなかったこと  
該当する事項はなかった。

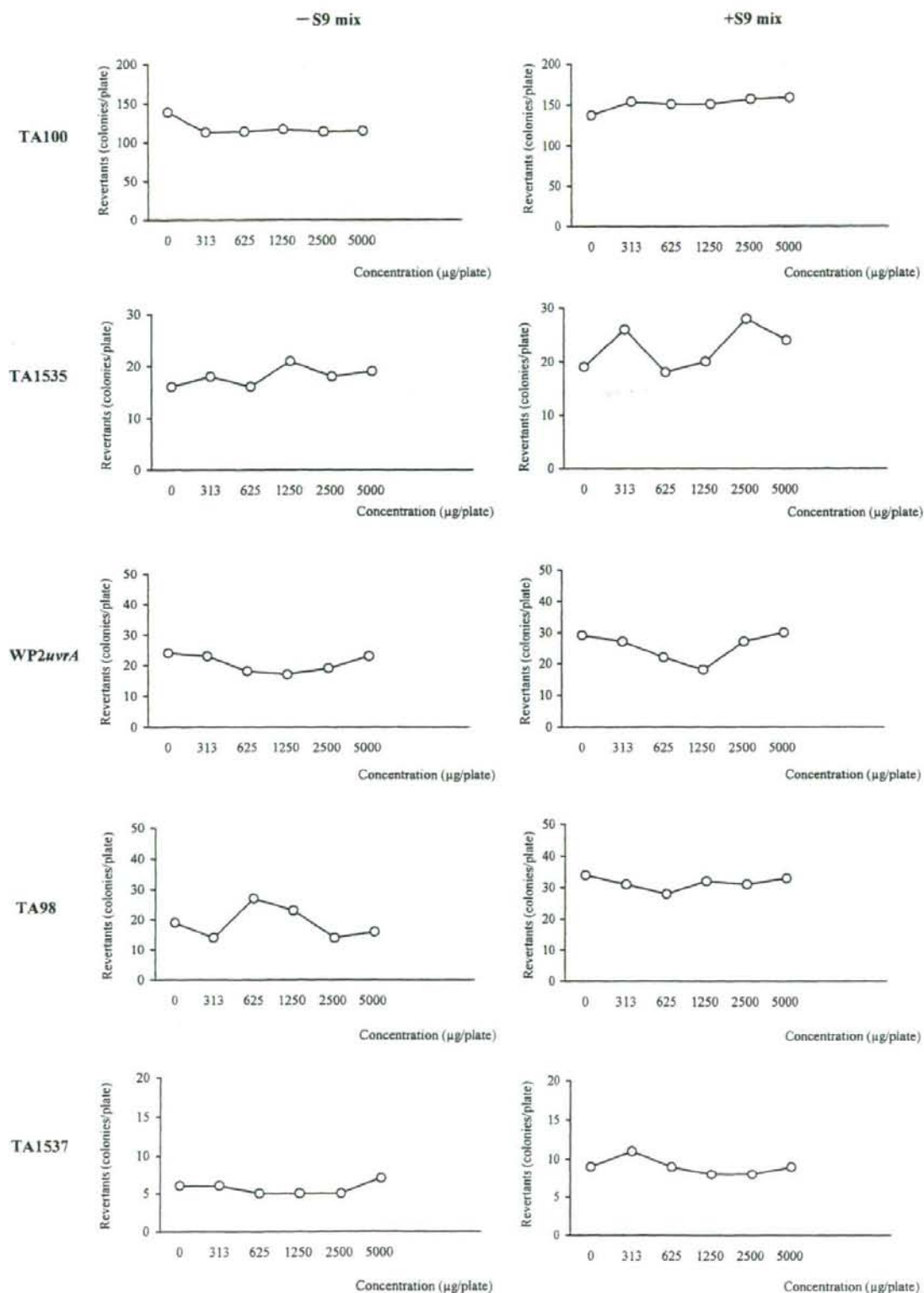


Figure 2 Dose-response Curves of Bacterial Reverse Mutation Test of AcPepA in Main study

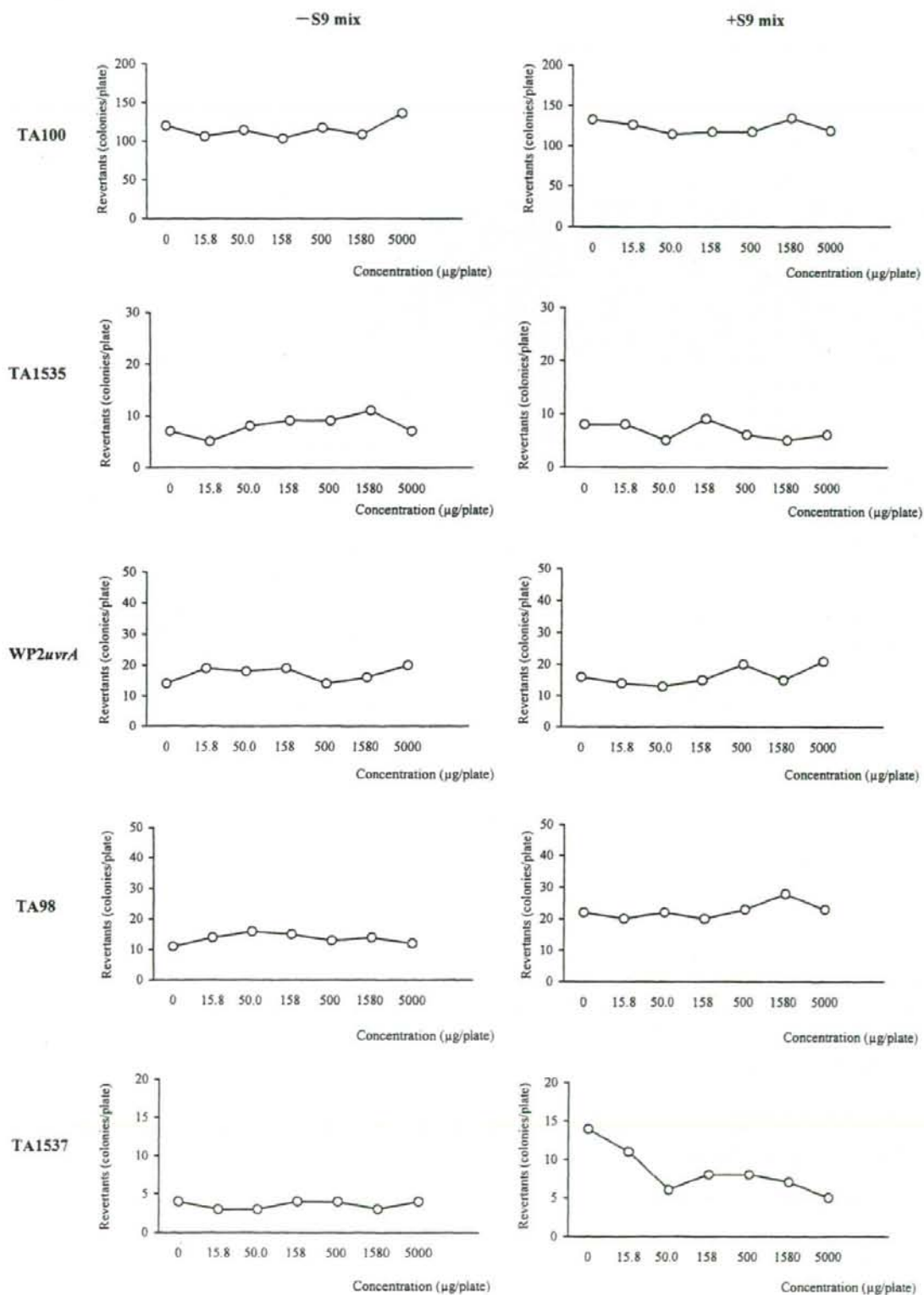


Figure 1 Dose-response Curves of Bacterial Reverse Mutation Test of AcPepA in Dose-finding study



Table 1 Results of the Bacterial Reverse Mutation Test of AcPepA in Dose-finding study

Study period: 2009.2.17-2.19

Metabolic activation : - S9 mix

| Concentration<br>( $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) | Revertants (colonies/plate)                     |           |           |       |                     |       |                  |       |           |      |
|---|---|-----------|-----------|-------|---------------------|-------|------------------|-------|-----------|------|
|   | Base-pair substitution type                     |           |           |       |                     |       | Flame shift type |       |           |      |
|   | TA100   |           | TA1535    |       | WP2 <sub>uvrA</sub> |       | TA98             |       | TA1537    |      |
|   | count   | mean      | count     | mean  | count               | mean  | count            | mean  | count     | mean |
| Negative control<br>(DMSO)                      | 120   | (120)     | 6         | ( 7)  | 13                  | ( 14) | 14               | ( 11) | 2         | ( 4) |
|   | 120   |           | 8         |       | 14                  |       | 8                |       | 5         |      |
| 15.8  | 100   | (106)     | 4         | ( 5)  | 15                  | ( 19) | 11               | ( 14) | 3         | ( 3) |
|   | 111   |           | 6         |       | 22                  |       | 16               |       | 3         |      |
| 50.0  | 114   | (114)     | 5         | ( 8)  | 17                  | ( 18) | 12               | ( 16) | 1         | ( 3) |
|   | 113   |           | 11        |       | 18                  |       | 19               |       | 5         |      |
| 158   | 108   | (103)     | 6         | ( 9)  | 14                  | ( 19) | 14               | ( 15) | 2         | ( 4) |
|   | 97  |           | 11        |       | 24                  |       | 16               |       | 6         |      |
| 500   | 102   | (117)     | 7         | ( 9)  | 16                  | ( 14) | 13               | ( 13) | 3         | ( 4) |
|   | 132   |           | 10        |       | 11                  |       | 12               |       | 5         |      |
| 1580  | 111   | (108)     | 10        | ( 11) | 19                  | ( 16) | 10               | ( 14) | 3         | ( 3) |
|   | 105   |           | 11        |       | 13                  |       | 17               |       | 3         |      |
| 5000  | 128   | (136)     | 5         | ( 7)  | 19                  | ( 20) | 11               | ( 12) | 3         | ( 4) |
|   | 143   |           | 8         |       | 21                  |       | 13               |       | 4         |      |
|   | Mutagen   | AF-2      | AZI       |       | AF-2                |       | AF-2             |       | 9AA       |      |
| Positive control                                | Concentration<br>( $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) | 0.01      | 0.5       |       | 0.01                |       | 0.1              |       | 80.0      |      |
|   | Colonies/plate                                  | 660 (666) | 425 (432) |       | 150 (153)           |       | 567 (591)        |       | 252 (199) |      |
|   |   | 672       | 438       |       | 156                 |       | 615              |       | 146       |      |

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine.

Metabolic activation : +S9 mix

| Concentration<br>( $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) | Revertants (colonies/plate)                     |           |           |      |                     |       |                  |       |           |       |
|---|---|-----------|-----------|------|---------------------|-------|------------------|-------|-----------|-------|
|   | Base-pair substitution type                     |           |           |      |                     |       | Flame shift type |       |           |       |
|   | TA100   |           | TA1535    |      | WP2 <sub>uvrA</sub> |       | TA98             |       | TA1537    |       |
|   | count   | mean      | count     | mean | count               | mean  | count            | mean  | count     | mean  |
| Negative control<br>(DMSO)                      | 158   | (133)     | 6         | ( 8) | 13                  | ( 16) | 18               | ( 22) | 13        | ( 14) |
|   | 107   |           | 9         |      | 19                  |       | 26               |       | 15        |       |
| 15.8  | 142   | (126)     | 7         | ( 8) | 10                  | ( 14) | 19               | ( 20) | 10        | ( 11) |
|   | 109   |           | 9         |      | 18                  |       | 21               |       | 11        |       |
| 50.0  | 133   | (114)     | 3         | ( 5) | 16                  | ( 13) | 21               | ( 22) | 5         | ( 6)  |
|   | 95  |           | 6         |      | 10                  |       | 23               |       | 6         |       |
| 158   | 115   | (117)     | 8         | ( 9) | 17                  | ( 15) | 19               | ( 20) | 6         | ( 8)  |
|   | 119   |           | 10        |      | 13                  |       | 21               |       | 9         |       |
| 500   | 115   | (117)     | 6         | ( 6) | 21                  | ( 20) | 22               | ( 23) | 4         | ( 8)  |
|   | 119   |           | 6         |      | 18                  |       | 24               |       | 12        |       |
| 1580  | 109   | (134)     | 3         | ( 5) | 12                  | ( 15) | 26               | ( 28) | 5         | ( 7)  |
|   | 159   |           | 6         |      | 18                  |       | 29               |       | 8         |       |
| 5000  | 107   | (118)     | 5         | ( 6) | 20                  | ( 21) | 22               | ( 23) | 4         | ( 5)  |
|   | 129   |           | 6         |      | 21                  |       | 24               |       | 6         |       |
|   | Mutagen   | 2AA       | 2AA       |      | 2AA                 |       | 2AA              |       | 2AA       |       |
| Positive control                                | Concentration<br>( $\mu\text{g}/\text{plate}$ ) | 1.0       | 2.0       |      | 10.0                |       | 0.50             |       | 2.0       |       |
|   | Colonies/plate                                  | 991 (953) | 219 (239) |      | 563 (607)           |       | 280 (261)        |       | 239 (201) |       |
|   |   | 915       | 258       |      | 651                 |       | 242              |       | 163       |       |

2AA: 2-Aminoanthracene.

Table 2 Results of the Bacterial Reverse Mutation Test of AcPepA in Main study

Study period: 2009.2.25-2.27

Metabolic activation : -S9 mix

| Concentration<br>(µg/plate)                     | Revertants (colonies/plate) |       |        |       |         |       |                  |       |        |       |
|---|-----------------------------|-------|--------|-------|---------|-------|------------------|-------|--------|-------|
|   | Base-pair substitution type |       |        |       |         |       | Flame shift type |       |        |       |
|   | TA100                       |       | TA1535 |       | WP2uvrA |       | TA98             |       | TA1537 |       |
|   | count                       | mean  | count  | mean  | count   | mean  | count            | mean  | count  | mean  |
| Negative control<br>(DMSO)                      | 129                         | (139) | 13     | (16)  | 20      | (24)  | 15               | (19)  | 4      | (6)   |
|   | 149                         |       | 19     |       | 27      |       | 23               |       | 8      |       |
| 313   | 121                         | (113) | 13     | (18)  | 22      | (23)  | 13               | (14)  | 5      | (6)   |
|   | 104                         |       | 22     |       | 23      |       | 14               |       | 7      |       |
| 625   | 115                         | (114) | 15     | (16)  | 15      | (18)  | 25               | (27)  | 4      | (5)   |
|   | 112                         |       | 17     |       | 20      |       | 29               |       | 6      |       |
| 1250  | 121                         | (117) | 20     | (21)  | 14      | (17)  | 23               | (23)  | 5      | (5)   |
|   | 112                         |       | 22     |       | 20      |       | 23               |       | 5      |       |
| 2500  | 119                         | (114) | 18     | (18)  | 16      | (19)  | 12               | (14)  | 3      | (5)   |
|   | 109                         |       | 18     |       | 21      |       | 15               |       | 7      |       |
| 5000  | 94                          | (115) | 18     | (19)  | 20      | (23)  | 13               | (16)  | 4      | (7)   |
|   | 135                         |       | 20     |       | 25      |       | 19               |       | 9      |       |
| Mutagen   | AF-2                        |       | AZI    |       | AF-2    |       | AF-2             |       | 9AA    |       |
| Positive control<br>Concentration<br>(µg/plate) | 0.01                        |       | 0.5    |       | 0.01    |       | 0.1              |       | 80.0   |       |
| Colonies/plate                                  | 673                         | (654) | 376    | (367) | 180     | (179) | 558              | (546) | 172    | (175) |
|   | 634                         |       | 358    |       | 177     |       | 533              |       | 177    |       |

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine.

Metabolic activation : +S9 mix

| Concentration<br>(µg/plate)                     | Revertants (colonies/plate) |       |        |       |         |       |                  |       |        |       |
|---|-----------------------------|-------|--------|-------|---------|-------|------------------|-------|--------|-------|
|   | Base-pair substitution type |       |        |       |         |       | Flame shift type |       |        |       |
|   | TA100                       |       | TA1535 |       | WP2uvrA |       | TA98             |       | TA1537 |       |
|   | count                       | mean  | count  | mean  | count   | mean  | count            | mean  | count  | mean  |
| Negative control<br>(DMSO)                      | 135                         | (137) | 18     | (19)  | 25      | (29)  | 30               | (34)  | 8      | (9)   |
|   | 139                         |       | 20     |       | 33      |       | 38               |       | 10     |       |
| 313   | 164                         | (154) | 21     | (26)  | 25      | (27)  | 30               | (31)  | 7      | (11)  |
|   | 143                         |       | 31     |       | 29      |       | 31               |       | 14     |       |
| 625   | 139                         | (151) | 15     | (18)  | 12      | (22)  | 25               | (28)  | 8      | (9)   |
|   | 162                         |       | 20     |       | 31      |       | 31               |       | 9      |       |
| 1250  | 124                         | (151) | 18     | (20)  | 14      | (18)  | 30               | (32)  | 6      | (8)   |
|   | 177                         |       | 21     |       | 22      |       | 34               |       | 10     |       |
| 2500  | 160                         | (157) | 25     | (28)  | 22      | (27)  | 29               | (31)  | 7      | (8)   |
|   | 154                         |       | 31     |       | 31      |       | 32               |       | 8      |       |
| 5000  | 146                         | (159) | 20     | (24)  | 28      | (30)  | 33               | (33)  | 5      | (9)   |
|   | 171                         |       | 27     |       | 32      |       | 33               |       | 13     |       |
| Mutagen   | 2AA                         |       | 2AA    |       | 2AA     |       | 2AA              |       | 2AA    |       |
| Positive control<br>Concentration<br>(µg/plate) | 1.0                         |       | 2.0    |       | 10.0    |       | 0.50             |       | 2.0    |       |
| Colonies/plate                                  | 927                         | (953) | 261    | (252) | 639     | (638) | 354              | (336) | 256    | (233) |
|   | 979                         |       | 243    |       | 636     |       | 318              |       | 210    |       |

2AA: 2-Aminoanthracene.

## 添付資料

陰性対照値及び陽性対照値の背景データから算出した基準値

## 陰性対照値

| 菌株名                 | S9 mix | 背景データ |     |      | 変動範囲   |
|---------------------|--------|-------|-----|------|--------|
|                     |        | 試験数   | 平均値 | 標準偏差 |        |
| TA100               | -      | 118   | 113 | 14   | 71~155 |
|                     | +      | 118   | 122 | 17   | 71~173 |
| TA98                | -      | 117   | 20  | 5    | 5~35   |
|                     | +      | 116   | 28  | 6    | 10~46  |
| TA1535              | -      | 103   | 10  | 2    | 4~16   |
|                     | +      | 100   | 10  | 3    | 1~19   |
| TA1537              | -      | 101   | 6   | 2    | 1~12   |
|                     | +      | 98    | 11  | 3    | 2~20   |
| WP2 <sub>uvrA</sub> | -      | 100   | 23  | 6    | 5~41   |
|                     | +      | 97    | 25  | 5    | 10~40  |

2006年4月~2008年3月に行った試験の陰性対照値について、平均(M)及び標準偏差(SD)を算出し、それぞれの菌株について適切な範囲(M±3SD)を設定した。

## 陽性対照値

| 菌株名                 | 陽性対照物質(用量)         | S9 mix | 背景データ |     |      | 変動範囲     |
|---------------------|--------------------|--------|-------|-----|------|----------|
|                     |                    |        | 試験数   | 平均値 | 標準偏差 |          |
| TA100               | AF-2 0.01 µg/plate | -      | 118   | 501 | 72   | 285~717  |
|                     | 2AA 1.0 µg/plate   | +      | 114   | 748 | 142  | 322~1174 |
| TA98                | AF-2 0.1 µg/plate  | -      | 117   | 514 | 67   | 313~715  |
|                     | 2AA 0.5 µg/plate   | +      | 115   | 273 | 51   | 120~426  |
| TA1535              | AZI 0.5 µg/plate   | -      | 104   | 448 | 117  | 97~799   |
|                     | 2AA 2.0 µg/plate   | +      | 99    | 227 | 57   | 56~398   |
| TA1537              | 9AA 80.0 µg/plate  | -      | 96    | 305 | 94   | 23~587   |
|                     | 2AA 2.0 µg/plate   | +      | 97    | 153 | 39   | 36~270   |
| WP2 <sub>uvrA</sub> | AF-2 0.01 µg/plate | -      | 100   | 152 | 29   | 65~239   |
|                     | 2AA 10.0 µg/plate  | +      | 97    | 698 | 124  | 326~1070 |

2006年4月~2008年3月に行った試験の陽性対照値について、平均(M)及び標準偏差(SD)を算出し、それぞれの菌株について適切な範囲(M±3SD)を設定した。

DRAFT

FBM 09-8541

## 最終報告書

(第1稿)

試験表題：AcPepA のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：FBM 09-8541

スギ生物科学研究所株式会社

試験責任者署名：

\_\_\_\_\_  
佐藤福弘

\_\_\_\_\_  
年 月 日

本報告書は表紙を含む 20 枚

## 目 次

|   | (頁) |
|---|-----|
| 1. 試験表題 .....   | 4   |
| 2. 試験番号 .....   | 4   |
| 3. 試験目的 .....   | 4   |
| 4. 試験施設 .....   | 4   |
| 5. 試験委託者 .....  | 4   |
| 6. 試験実施期間.....  | 4   |
| 7. 試験責任者 .....  | 5   |
| 8. 担当責任者 .....  | 5   |
| 9. 業務分担及び試験従事者の氏名 .....   | 5   |
| 10. GLP 及びガイドライン .....  | 5   |
| 11. 試験関係資料の保存 .....   | 5   |
| 12. 要約 .....  | 6   |
| 13. 試験材料及び方法 .....  | 7   |
| 13.1. 被験物質 .....  | 7   |
| 13.2. 被験物質液 .....   | 7   |
| 13.3. 陰性対照物質 .....  | 8   |
| 13.4. 陽性対照物質 .....  | 8   |
| 13.5. 試験細胞 .....  | 8   |
| 13.6. S9 mix .....  | 9   |
| 13.7. 細胞増殖抑制試験 .....  | 10  |
| 13.8. 染色体異常試験 .....   | 11  |
| 13.9. 試験系の識別 .....  | 12  |
| 13.10. 試験成立条件 .....   | 12  |
| 13.11. 結果の判定 .....  | 12  |
| 13.12. 統計学的処理 .....   | 13  |
| 14. 試験結果 .....  | 13  |
| 14.1. 細胞増殖抑制試験 .....  | 13  |
| 14.2. 染色体異常試験 .....   | 13  |
| 15. 考察及び結論 .....  | 13  |
| 16. 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及び試験<br>計画書に従わなかったこと ..... | 13  |

## 17. 参考文献 ..... 14

Figure 1 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA

Figure 2 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA in satellite group

Table 1 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA

Table 2 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA in satellite group

Table 3 Chromosomal aberration of CHL/IU cells treated with AcPepA in short-term treatment

Table 4 Chromosomal aberration of CHL/IU cells treated with AcPepA in continuous treatment

## 1. 試験表題

AcPepA のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

## 2. 試験番号

FBM 09-8541

## 3. 試験目的

AcPepA の安全性評価の一環として、ほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討した。

## 4. 試験施設

スギ生物科学研究所株式会社

(旧：株式会社富士バイオメディックス 小淵沢総合研究所)

〒408-0044 山梨県北杜市小淵沢町 10221 番地

TEL 0551-36-2455 FAX 0551-36-3895

## 5. 試験委託者

医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所

〒411-8124 愛知県豊橋市野依町山中 19-14

TEL 0532-46-7501 FAX 0532-46-8940

委託担当者：岡田秀親

## 6. 試験実施期間

試験期間 2009年2月4日 ～ 2009年 月 日

試験開始日 2009年2月4日

## 細胞増殖抑制試験

細胞播種日 2009年2月9日

被験物質処理 2009年2月12日

毒性評価日 2009年2月13日

## 染色体異常試験

細胞播種日 2009年2月23日

被験物質処理日 2009年2月26日

標本作製日 2009年2月27日

試験終了日 2009年 月 日

7. 試験責任者

佐藤 福弘  
 スギ生物科学研究所株式会社 毒性試験部

8. 担当責任者

|          |      |
|----------|------|
| 培養, 標本作製 | 山中妙子 |
| 染色体観察    | 山中妙子 |
| 毒性評価     | 山中妙子 |
| 統計学的処理   | 正木文夫 |

9. 業務分担及び試験従事者の氏名

|          |                  |
|----------|------------------|
| 培養, 標本作製 | 佐藤福弘, 山中妙子, 川口恵未 |
| 毒性評価     | 佐藤福弘, 山中妙子       |
| 染色体観察    | 佐藤福弘, 山中妙子, 川口恵未 |
| 被験物質の調製  | 佐藤福弘, 山中妙子       |
| 統計学的処理   | 正木文夫             |
| 被験物質の管理  | 高橋善康             |

10. GLP 及びガイドライン

本試験は GLP 非適用とした。

参考ガイドライン：厚生労働省の「遺伝毒性試験ガイドライン」(平成 11 年 11 月 1 日医薬審第 1604 号)

11. 試験関係資料の保存

保存場所：スギ生物科学研究所株式会社 資料保存施設

保存資料：最終報告書 (原本), 試験計画書 (原本), 被験物質及び細胞等に関する記録, 生データ, 試験操作記録, 標本, その他記録文書

保存期間：本試験終了後 5 年間保存。その後の措置については試験委託者と協議の上決定する。



## 12. 要約

チャイニーズハムスター雌肺由来の細胞 CHL/IU を用いて、短時間処理法の代謝活性化系非存在下、代謝活性化系存在下並びに連続処理法の 3 処理法により、AcPepA の細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験を行った。

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、染色体異常試験の群構成を、短時間処理法、連続処理法ともに最高用量を 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし、2000、1000 及び 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 4 用量とした。さらに、それぞれに陰性及び陽性対照群を設けた。

標本観察対象用量は、短時間処理法、連続処理法ともに 4000、2000 及び 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。

その結果、短時間処理法、連続処理法ともに、構造異常及び数的異常の増加は認められなかった。

以上の結果、AcPepA は CHL/IU 細胞の染色体に対して染色体異常を誘発しないと結論した。

### 13. 試験材料及び方法

#### 13.1. 被験物質

名称：AcPepA

ロット番号：2K08045

受領日：2009年1月30日

供給元：株式会社バイオロジカ（NeoMPS）

性状：凍結乾燥品（in compliance with Good Manufacturing Practices）白色粉末

含量：97.7%（100%として使用した）

分子量：1635.9

溶解性：4 mg/mL in saline

保存条件：冷凍（-20°C以下）、遮光、気密

保存場所：研究本館 検体調製室 メディカルフリーザー（設定温度：-30°C，許容範囲：  
-40～-20°C）

実測温度（-32～-28°C，2009年1月30日～2009年2月26日）

取扱い上の注意：マスク及び手袋を着用した。

残余被験物質の管理：実験終了後，被験物質管理責任者に移管した。

#### 13.2. 被験物質液

##### 13.2.1. 媒体

培養液を用いた。

##### 13.2.2. 被験物質液の調製

被験物質は用時調製とし，溶解性が4 mg/mL in saline より処理用量の1倍濃度を調製した。（13.7.1.，13.8.1. 群構成参照）

細胞増殖抑制試験では，被験物質160.11 mgを秤量し，媒体を加えて4 mg/mL液を調製した。公比 $\sqrt{10}$ で希釈し，4，1.26，0.400，0.126，0.040，0.0126，0.004及び0.00126 mg/mLの計8段階の濃度液を調製した。

染色体異常試験では400.19 mgを秤量し媒体を加えて，4 mg/mL液を調製した。公比2で希釈し短時間処理法，連続処理法で計4段階の濃度液（4，2，1及び0.5 mg/mL）を調製した。

## 13.2.2.1. 残余被験物質液の処理

焼却処分した。

## 13.3. 陰性対照物質

媒体を用いた。

## 13.4. 陽性対照物質

## 13.4.1. 代謝活性化系非存在下

名称：Mitomycin C（以下、MMC と略す）

製造発売元：Sigma-Aldrich Inc.

ロット番号：075K1923

## 13.4.2. 代謝活性化系存在下

名称：Cyclophosphamide（以下、CP と略す）

製造発売元：Sigma-Aldrich Inc.

ロット番号：076K1050

## 13.4.3. 陽性対照物質の選択理由及び調製

既知の染色体異常誘発物質であり、陽性対照に広く利用されているため選択した。処理濃度は細胞に対して陽性反応を示す濃度とした。陽性対照物質は下表の通りとし、生理食塩液に溶解し、超低温槽（-80℃）に凍結保存したものを用時に解凍して培養液にその 1/100 容量を添加した。

| 処理方法              | 陽性対照物質 | 最終処理濃度（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ） |
|-------------------|--------|-----------------------------------|
| 短時間処理法 代謝活性化系非存在下 | MMC    | 0.05                              |
| 短時間処理法 代謝活性化系存在下  | CP     | 5.0                               |
| 連続処理法 代謝活性化系非存在下  | MMC    | 0.05                              |

## 13.5. 試験細胞

## 13.5.1. 使用細胞株及び選択理由

本細胞株チャイニーズハムスター雌肺由来の CHL/IU 細胞（継代数 14）は、大日本住友製薬株式会社から 2006 年 11 月 21 日に購入し、継代数 20 の細胞を試験に使用した。細胞周期は約 15.7 時間、マイコプラズマ陰性及び染色体数モード 25 本のものを使用し

た。本細胞株は、遺伝毒性試験ガイドラインで推奨されているため使用した。

### 13.5.2. 培養液及び培養条件

Eagle の MEM の液体培地 (Invitrogen Corporation) にペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (Invitrogen Corporation, 50 mg/L) を 1% 及び仔牛血清 (Lot No. 683862, Invitrogen Corporation) を 10% の割合で添加したものを培養液とした。培養容器は 60 mm プレートを用いて、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% で培養した。

## 13.6. S9 mix

### 13.6.1. S9

製造後 6 ヶ月以内の S9 (Lot No. 08103108, オリエンタル酵母工業株式会社) を試験に使用した。S9 の調製方法 (製品説明書) を以下に示す。

|                   |   |
|-------------------|---|
| 使用動物              | ラット：Sprague-Dawley 系  |
| 性/週齢              | 雄/7 週齢  |
| 臓器                | 肝臓  |
| 誘導物質              | Phenobarbital (PB) 及び 5,6-Benzoflavone (BF)                                 |
| 投与量<br>及び<br>投与回数 | PB: 30 mg/kg 1 回 (1 日目)<br>60 mg/kg 3 回 (2~4 日目)<br>BF: 80 mg/kg 1 回 (3 日目) |
| 投与方法              | 腹腔内投与   |

### 13.6.2. コファクターの調製

以下の割合で調製し、氷冷下で保存した。

|                              |      |
|------------------------------|------|
| 20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.2) | 2 mL |
| 50 mmol/L MgCl <sub>2</sub>  | 1 mL |
| 330 mmol/L KCl               | 1 mL |
| 50 mmol/L G-6-P              | 1 mL |
| 40 mmol/L NADP               | 1 mL |
| 注射用水                         | 1 mL |