

4. 試験責任者署名

表 題： P092 の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： B120713

試験責任者：

2013 年 3 月 13 日

藤 本 透



藤本 透

三菱化学メディエンス株式会社

創薬支援事業本部 試験研究センター

安全性研究部 安全性3グループ

5. 要約

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2*uvrA* の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験で P092 の変異原性を調べた。試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した。

用量設定試験を 0.5, 1.5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で実施した結果, S9 mix 非存在下および存在下の TA100, TA1535, WP2*uvrA* および TA1537, S9 mix 非存在下の TA98 の 50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で菌の生育阻害が認められた。また, S9 mix 存在下の TA98 の 150 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で菌の生育阻害が認められた。なお, S9 mix 非存在下の 500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上, S9 mix 存在下の 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ でプレート上に沈殿が認められた。S9 mix の有無にかかわらず, いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。

以上の結果を基に, 本試験では明らかな生育阻害が得られる用量を最高用量として下記の用量を設定した。

S9 mix 非存在下および存在下:

1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ (全ての試験菌株)

本試験の結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。S9 mix 非存在下の TA100 および TA1537 の 25 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上, TA1535, WP2*uvrA* および TA98 の 50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で菌の生育阻害が認められた。また, S9 mix 存在下では, TA100, TA1535, WP2*uvrA* および TA1537 の 50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上, TA98 の 100 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で菌の生育阻害が認められた。なお, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿は認められなかった。

本試験の陰性 (溶媒) 対照値および陽性対照値は, 試験施設の適正範囲内であった。また, 陽性対照物質により誘発された復帰変異コロニー数は, S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍を超えて増加し, 明らかな陽性結果を示した。

以上の結果から, P092 は本試験条件下において変異原性を有さない (陰性) と結論した。

6. 材料および方法

6.1 被験物質

6.1.1 名称

P092

6.1.2 ロット番号

E5Z6K

6.1.3 純度／含量

99.2%

6.1.4 性状

白色の粉末

6.1.5 保存条件

冷蔵（実測値：3.3～6.3℃，許容範囲：1～10℃），遮光，密封，窒素封入

6.1.6 保管場所

被験物質保管場所（55）

（受領してから試験責任者に移管するまでは，被験物質保管場所（59）および（42）に保管した。）

6.1.7 提供者

岐阜大学

6.1.8 安定性の確認

被験物質の最終処理日までの安定性を保証するための分析は，「P092 の特性試験および保存安定性試験」（試験番号：P120567，三菱化学メディエンス株式会社熊本研究所）で実施した同一ロットの分析結果を入手し，そのデータを最終報告書に添付した（Appendix 1 および Appendix 2）。

6.1.9 残余被験物質の処理

被験物質の残余は，実験終了後に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

ジメチルスルホキシド（DMSO と略す）

6.2.1.2 製造元

純正化学株式会社

6.2.1.3 ロット番号

9J5040

6.2.1.4 規格

高速液体クロマト用

6.2.1.5 純度

100.0%

6.2.1.6 陰性対照物質の選択理由

試験施設で実施した分析法バリデーション試験（試験番号：B120710）において、本被験物質の DMSO を媒体として用いた分析法が確立された。これらの結果から、本被験物質の溶媒（陰性対照物質）には DMSO を選択した。

6.2.2 陽性対照物質

6.2.2.1 名称, 製造元等

名称 (略称)	ロット番号	含量 (純度)	使用期限†	製造元	保存条件
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)	STQ3987	99.7%	2016年4月20日	和光純薬工業株式会社	室温
アジ化ナトリウム (NaN ₃)	HLE7967	99.7%			
2-アミノアントラセン (2-AA)	EPM0250	96.3%			
9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物 (9-AA)	07620TD	99.9%	2016年4月17日	Sigma-Aldrich Co.	

†: 入手から5年

6.2.2.2 陽性対照物質の選択理由

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用されている。

6.3 試験菌株

6.3.1 試験菌株

試験菌株[1], [2]	入手先 (入手日)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537	カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授 (1983 年 5 月 27 日)
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	東京大学医科学研究所松島教授 (1985 年 10 月 14 日)

6.3.2 試験菌株の選択理由

細菌を用いる復帰突然変異試験において広く使用され、医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインにおいて推奨されている。

6.3.3 試験菌株の保存

6.3.3.1 組成

液体完全培地中にて 37°C で 8 時間前培養を行った菌懸濁液 24 mL に 2.1 mL の DMSO (関東化学株式会社, ロット番号 204U1524) を混合した。

6.3.3.2 保存方法

分注凍結 (分注量 : 0.2 mL)

6.3.3.3 保存条件

超低温冷凍庫 (日本フリーザー株式会社, CL-322, 実測値 : -83~-80°C, 許容範囲 : -60°C 以下)

6.3.3.4 保存日および使用期限

試験菌株	保存日 (ロット番号)	使用期限
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2 <u>uvrA</u>	2012 年 4 月 18 日 (120418)	2013 年 4 月 17 日

6.3.4 試験菌株の遺伝的特性

6.3.4.1 遺伝的特性

試験菌株	アミノ酸要求性 ⁽¹⁾	紫外線感受性 ⁽²⁾	膜変異 ⁽³⁾	薬剤耐性 ⁽⁴⁾
TA100	<i>his</i> ⁻ (塩基対置換)	Δ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1535	<i>his</i> ⁻ (塩基対置換)	Δ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	-
TA98	<i>his</i> ⁻ (フレームシフト)	Δ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	+ (pKM101)
TA1537	<i>his</i> ⁻ (フレームシフト)	Δ <i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	-
WP2 <u>uvrA</u>	<i>trp</i> ⁻ (塩基対置換)	Δ <i>uvrA</i>	Wild type	-

(1) *his*⁻ はヒスチジン要求性, *trp*⁻ はトリプトファン要求性を示す。

(2) Δ *uvrA* および Δ *uvrB* は DNA 修復遺伝子の欠失を示し, 紫外線感受性を示す。

(3) *rfa* は細胞壁のリポ多糖類の欠失を示し, クリスタルバイオレット感受性を示す。

(4) + (pKM101) は薬剤耐性因子を保持していることを示し, アンピシリン耐性を示す。

6.3.4.2 遺伝的特性の確認

試験菌株の遺伝的特性を 2012 年 4 月 20 日に確認した。試験には上記 (6.3.4.1 項) の特性を備えた菌株を用いた。

6.3.5 菌懸濁液

6.3.5.1 培養

培養温度 : 37°C (培養開始までは 10°C に保冷)

培養時間：8 時間

培養方法：往復振とう（振とう回数：90 回／分）

培養容器：L 字管（容量 22 mL）

培養液：液体完全培地（10 mL）

菌株および接種量：保存菌株を融解し，0.02 mL 接種

6.3.5.2 菌懸濁液の菌濃度

培養終了後，濁度計（コロナ電気，UT-11）を用いて濁度を測定し，濁度からの換算により生菌数を算出した．菌懸濁液は菌濃度が 1×10^9 /mL 以上であることを確認した後，試験に使用した．菌懸濁液は用時調製し，調製後は室温で保存した．

各菌懸濁液の生菌数を以下に示す．

試験菌株		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
生菌数 ($\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	3.47	4.46	7.30	3.07	2.45
	本試験	3.35	4.38	7.38	3.04	2.51

6.4 培地

6.4.1 液体完全培地の調製

Oxoid Nutrient Broth No.2（Oxoid 社，ロット番号 635187）7.5 g に精製水 300 mL を加えて溶解した．これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌し，冷蔵保存した．

6.4.2 トップアガーの調製

6.4.2.1 軟寒天の調製

Bacto-agar（Becton, Dickinson and Company，ロット番号 9131119）1.8 g および塩化ナトリウム（関東化学株式会社，ロット番号 403P5604）1.5 g に精製水 300 mL を加え，これを 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌して，室温で保存した．

6.4.2.2 トップアガーの調製

軟寒天を電子レンジで加熱して液化し，以下に示す水溶液をそれぞれ使用直前に 1/10 量添加した．トップアガーは用時調製し，調製後は約 45°C に保温した．

ネズミチフス菌： 0.5 mmol/L ビオチン[†]・ヒスチジン[†]混合水溶液

大腸菌： 0.5 mmol/L トリプトファン[†]水溶液

†： D-ビオチン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 CDG0311）

L-ヒスチジン塩酸塩一水和物（和光純薬工業株式会社，ロット番号 STG0578）

L-トリプトファン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 STL1355）

6.4.3 最少グルコース寒天平板培地

6.4.3.1 名称

テスメディア AN 培地

6.4.3.2 製造元

オリエンタル酵母工業株式会社

6.4.3.3 ロット番号

ANI630JB

6.4.3.4 製造日および入手日

2012年10月23日製造

2012年11月22日入手

6.4.3.5 使用期限

2013年4月22日

6.5 S9 mix

6.5.1 S9

6.5.1.1 製造元

キッコーマン株式会社

6.5.1.2 ロット番号

RAA-655

6.5.1.3 製造日および入手日

2012年9月14日製造

2012年9月28日入手

6.5.1.4 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 212-248 g) の肝臓より調製された。

6.5.1.5 蛋白含量

23.83 mg/mL

6.5.1.6 保存条件

超低温冷凍庫 (日本フリーザー株式会社, CL-322, 実測値: -83~-81°C, 許容範囲: -60°C)

以下)

6.5.1.7 使用期限

2013年3月13日（製造日から6ヵ月間）

6.5.2 Cofactor mix

6.5.2.1 名称

Cofactor-I

6.5.2.2 製造元

オリエンタル酵母工業株式会社

6.5.2.3 ロット番号

999202

6.5.2.4 調製

Cofactor-I 1本に滅菌精製水 9 mL の割合で加えて溶解し、メンブレンフィルター（孔径：0.45 μm ）でろ過して Cofactor mix とした。Cofactor mix は用時調製した。

6.5.3 S9 mix

Cofactor mix 9 mL に対して、S9 を 1 mL の割合で加え S9 mix とした。S9 mix は用時調製し、使用時まで氷槽中に保存した。

S9 mix 1 mL あたりの組成を以下の表に示す。

S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

6.6.1 被験物質溶液の調製

6.6.1.1 調製

- (1) 用量設定試験では、500 mg の被験物質を秤量して適量の DMSO を加え、振とう攪拌および超音波処理により溶解させた後に 10 mL とし、50 mg/mL 溶液とした。この溶液の一部を DMSO で段階希釈して 15, 5, 1.5, 0.5, 0.15, 0.05, 0.015 および 0.005 mg/mL 溶液を調製した。
- (2) 本試験では、100 mg の被験物質を秤量して適量の DMSO を加え、振とう攪拌および超音波処理により溶解させた後に 50 mL とし、2 mg/mL 溶液とした。この溶液の一部を

DMSO で段階希釈して 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313 および 0.0156 mg/mL 溶液を調製した。

- (3) 用量設定試験では被験物質溶液は調製後速やかに使用した。本試験では調製後、安定性が確認されている期間内（6.8 項参照）に使用した。
- (4) 被験物質の秤量，溶液の希釈，分注および被験物質処理を含む全ての操作は室温，黄色灯下（紫外線をカットした照明下）で行った。

6.6.1.2 保存条件

用量設定試験： 調製後速やかに使用したため保管しなかった

本試験： 室温（実測値：18.7～20.3℃，許容範囲：10～30℃），遮光，気密で 18 時間 40 分

6.6.2 陽性対照物質溶液

6.6.2.1 陽性対照物質溶液の調製

陽性対照物質溶液は，2012 年 3 月 22 日に調製した保存液を用時融解して試験に使用した。

- (1) NaN_3 は注射用水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号 K1D73）に，AF-2, 9-AA および 2-AA は DMSO（関東化学株式会社，ロット番号 204U1524）に溶解した。
- (2) これを同じ溶媒で希釈して所定濃度の陽性対照物質溶液とした。

6.6.2.2 保存方法

分注凍結（分注量：0.5 mL）

6.6.2.3 保存条件

超低温冷凍庫（日本フリーザー株式会社，CL-322，実測値：-83～-80℃，許容範囲：-60℃以下）

6.6.2.4 調製濃度および使用期限

名称および濃度 (μg/mL)	調製日	使用期限
AF-2 0.1, 1	2012 年 3 月 22 日	2013 年 3 月 21 日
NaN_3 5		
9-AA 800		
2-AA 5, 10, 20, 100		

6.6.2.5 陽性対照値の確認

凍結保存した陽性対照物質溶液について，プレインキュベーション法で試験を実施し，陽性対照値が当該年度の適正範囲内であることを確認している。

6.7 被験物質用量および陽性対照物質用量

6.7.1 被験物質用量

6.7.1.1 用量設定試験

ガイドラインに従い 5000 µg/プレート を最高用量とし、以下の用量を設定した。

試験菌株	用量 (µg/プレート)	
	S9 mix 非存在下および存在下	
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2uvrA	0.5, 1.5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000	

6.7.1.2 本試験

用量設定試験の結果、S9 mix 非存在下および存在下の TA100, TA1535, WP2uvrA および TA1537, S9 mix 非存在下の TA98 の 50 µg/プレート 以上で菌の生育阻害が認められた。また、S9 mix 存在下の TA98 の 150 µg/プレート 以上で菌の生育阻害が認められた。なお、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった。

以上の結果を基に、本試験では明らかな生育阻害が得られる用量を最高用量として、下記の用量を設定した。

試験菌株	用量 (µg/プレート)	
	S9 mix 非存在下および存在下	
TA100, TA1535, TA98 TA1537, WP2uvrA	1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200	

6.7.2 陽性対照物質用量

6.7.2.1 名称および用量

試験菌株	名称および用量 (µg/プレート)			
	S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
TA100	AF-2	0.01	2-AA	1
TA1535	NaN ₃	0.5	2-AA	2
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA1537	9-AA	80	2-AA	2
WP2uvrA	AF-2	0.01	2-AA	10

6.7.2.2 陽性対照物質用量の選択理由

これらの用量は、各試験菌株に対して陽性を示すことが知られている。

6.8 被験物質溶液の安定性確認

6.8.1 実施

試験施設で実施する「P092 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」（試験番号: B120714, 使用した被験物質のロット番号: 7J7XB）において確認された（Appendix 3）。

なお、当該試験で用いた被験物質のロット番号（E5Z6K）は、上記試験に用いたロット番号と異なるが、いずれも純度規格値に適合していることから、P092 としての同一性が確認可能である。従って、ロット番号（E5Z6K）の被験物質溶液の安定性は、ロット番号（7J7XB）

を使用可能であると判断した。

6.8.2 媒体

DMSO

6.8.3 濃度

0.005 および 50 mg/mL

6.8.4 期間および条件

室温（実測値：18.7～20.1℃，許容範囲：10～30℃），遮光，気密，24 時間

6.9 被験物質溶液の濃度確認

6.9.1 実施

試験施設にて実施した。

6.9.2 濃度

本試験に用いた同一希釈列の最高および最低濃度について確認した。

6.9.3 判定基準

測定値の平均値（ $n=2$ ）が設定値の±10%以内（許容範囲：90%～110%）である場合，適切に調製されたと判断した。

6.9.4 判定

最高および最低濃度の測定値の平均値（ $n=2$ ）を以下に示す（設定値に対する%）。測定値はいずれも許容範囲内（許容範囲：90%～110%）であった（Appendix 4）。

本試験：98.1% (0.0156 mg/mL) および 100.0% (2 mg/mL)

従って，これらの被験物質溶液は適切に調製されたと判断した。

6.10 被験物質溶液の濃度確認方法

被験物質溶液の濃度確認は，試験施設で実施した分析法バリデーション試験（試験番号：B120710）で評価された方法に従い実施した。

6.10.1 高速液体クロマトグラフ（HPLC）装置

HPLC システム： 2695 Separations Module, Waters Corporation

検出器： 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters Corporation

システムマネージャ： Empower 2 Software, Waters Corporation

6.10.2 HPLC 操作条件

カラム： CAPCELL PAK C18 MG II (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm ID, 株式会社

資生堂)

カラム温度： 40°C

検出波長： UV 254 nm

移動相： 1%過塩素酸ナトリウム（過塩素酸で pH2.5 に調整する）/アセトニトリル混液（55：45）†

流速： 1 mL/min

注入量： 10 µL

オートサンプリング温度： 10°C

オートサンプリング洗浄液： メタノール†

測定時間： 10 分

†：減圧下超音波脱気した。

6.10.3 標準溶液の調製

下表に従い標準溶液（ST-1, ST-2 および ST-3）を調製した（n = 1）。

溶液略号	調製方法		濃度 (µg/mL)
SS	P092, 約 25 mg	→ 100 mL/メタノール†	250
SS-1	SS, 1 mL	→ 25 mL/メタノール	10
ST-1	SS-1, 1 mL	→ 10 mL/メタノール	1
ST-2	SS-1, 2.5 mL	→ 10 mL/メタノール	2.5
ST-3	SS-1, 3 mL	→ 10 mL/メタノール	3

†: 超音波処理を実施した。

6.10.4 試料溶液の調製

下表に従い本試験の濃度確認における試料溶液を調製した（n = 2）。

被験物質溶液の濃度 (mg/mL)	調製方法		試料溶液の濃度 (µg/mL)
0.0156	被験物質溶液 1 mL → 10 mL/メタノール†		1.56
2	(1)	被験物質溶液 1 mL → 40 mL/メタノール†	2.5
	(2)	(1) 1 mL → 20 mL/メタノール	

†：超音波処理を実施した。

6.10.5 濃度の算出

- (1) 6.10.3 項で調製した標準溶液（ST-1～ST-3）および 6.10.4 項で調製した試料溶液を条件設定した HPLC に注入した。
- (2) クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を測定した。
- (3) 標準溶液（ST-1～ST-3）の濃度および測定したピーク面積から検量線を作成した。
- (4) 検量線、試料溶液のピーク面積および試料溶液の希釈係数から測定値を求めた。
- (5) 測定値の平均値および対設定値を算出した (Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation)。

6.11 復帰突然変異試験

6.11.1 試験法の選択

試験はプレインキュベーション法を用いて、S9 mix 非存在下および存在下で実施した[3].

6.11.2 プレインキュベーション法

- (1) 各用量につき、滅菌した試験管に被験物質溶液、陰性（溶媒）対照物質または陽性対照物質溶液を 0.1 mL 添加した。
- (2) S9 mix 非存在下の場合、0.1 mol/L ナトリウムーりん酸緩衝液[†] (pH 7.4) を 0.5 mL 加えて混和し、さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた。
- (3) S9 mix 存在下の場合、S9 mix を 0.5 mL 加えて混和し、さらに菌懸濁液を 0.1 mL 加えた。
- (4) この混合液を 37°C で 20 分間緩やかに振とう（振とう回数：90 回/分）してインキュベーションした（プレインキュベーション）。
- (5) プレインキュベーション後、この混合液に融解したトッパアガーを 2 mL 加え、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。
- (6) 重層したトッパアガーが凝固した後、37°C で 48 時間培養した。

†： りん酸水素二ナトリウム（和光純薬工業株式会社，ロット番号 TLK3421）

りん酸二水素ナトリウム二水和物（和光純薬工業株式会社，ロット番号 WEJ6554）

6.11.3 観察

沈殿物：48 時間培養後に目視で観察した。

菌の生育阻害：48 時間培養後に実体顕微鏡（Nikon, SMZ-10）で観察した。

6.11.4 コロニー計測

プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンター（システムサイエンス株式会社，CA-11）で計測した。機器計測に際しては面積補正および数え落とし補正を行った。

6.11.5 プレート数

用量設定試験： 2 プレート/用量

本試験： 2 プレート/用量

6.11.6 結果の集計

陰性（溶媒）対照，陽性対照および被験物質の各処理について，計測したコロニー数の平均値を算出した。平均値は小数点以下を四捨五入して表示した（Excel 2003, Microsoft Corporation）。

6.11.7 無菌試験

最高用量の被験物質溶液および S9 mix それぞれにつき 1 枚のプレートを使用し，試験毎に実施した。

- (1) 最高用量の被験物質溶液 0.1 mL または S9 mix 0.5 mL にトッパアガー 2 mL を加えて混和した。
- (2) それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に重層した。
- (3) 重層したトッパアガーが凝固した後、37°C で 48 時間培養し、雑菌の混入について目視で確認した。

6.11.8 実験の成立基準

下記の条件をすべて満たしている場合に成立とした。

- (1) 陰性（溶媒）対照値（平均値）および陽性対照値（平均値）が試験施設における背景データの適正範囲内にあること。
- (2) 陽性対照値（平均値）が、対応する試験菌株の陰性（溶媒）対照値と比較して明らかに 2 倍を超えて増加していること。
- (3) 生育阻害の認められない用量が 4 用量以上あり、かつ評価可能な用量が 5 用量以上あること。
- (4) 無菌試験の結果、雑菌による汚染が無いこと。
- (5) 試験プレートが汚染あるいは他の不測の事態によって計測不能になり、失われていないこと。

6.11.9 試験結果の判定

いずれかの試験菌株で、S9 mix の有無にかかわらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数（平均値）が陰性（溶媒）対照値（平均値）の 2 倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する（陽性）と判定した。その他の場合は陰性と判定した。試験結果の評価には統計学的検定を実施しなかった。

6.11.10 再現性の確認

結果の再現性は用量設定試験および本試験を実施することにより確認した。

7. 結果

7.1 用量設定試験

用量設定試験の結果を表 1 に示す。S9 mix 非存在下および存在下の TA100, TA1535, WP2uvrA および TA1537, S9 mix 非存在下の TA98 の 50 µg/プレート以上で菌の生育阻害が認められた。また、S9 mix 存在下の TA98 の 150 µg/プレート以上で菌の生育阻害が認められた。なお、S9 mix 非存在下の 500 µg/プレート以上、S9 mix 存在下の 5000 µg/プレートでプレート上に沈殿が認められた。S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった。

7.2 本試験

本試験の結果を表 2 に示す。S9 mix 非存在下の TA100 および TA1537 の 25 µg/プレート以

上、TA1535, WP2uvrA および TA98 の 50 µg/プレート以上で菌の生育阻害が認められた。また、S9 mix 存在下では、TA100, TA1535, WP2uvrA および TA1537 の 50 µg/プレート以上、TA98 の 100 µg/プレート以上で菌の生育阻害が認められた。なお、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿は認められなかった。S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であった。

7.3 無菌試験

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、最高用量の被験物質溶液および S9 mix には菌、カビの混入は認められなかった。

8. 考察および結論

用量設定試験の結果を基に、本試験を生育阻害が得られる用量を最高用量として実施した結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の 2 倍未満であり、用量設定試験および本試験で再現性が確認された。

用量設定試験および本試験の陰性（溶媒）対照値および陽性対照値は、試験施設の適正範囲内であった（Appendix 5）。また、陽性対照物質により誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性（溶媒）対照値の 2 倍を超えて増加し、明らかな陽性結果を示した。さらに、用量設定試験および本試験のいずれにおいても生育阻害の認められない用量が 4 用量以上あり、かつ評価可能な用量が 5 用量以上得られた。従って、用量設定試験および本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から、P092 は本試験条件下において変異原性を有さない（陰性）と結論した。

9. 参考文献

- [1] Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.
- [2] Green MHL, Muriel WJ. Mutagen testing using *Trp*⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1976; 38: 3-32.
- [3] 労働省安全衛生部化学物質調査課編（1991）：安衛法における変異原性試験，中央労働災害防止協会，東京

10. 特記事項

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
なし

10.2 試験計画書に従わなかったこと
なし

表 1 P092 の細菌を用いる復帰突然変異試験結果表 (用量設定試験)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照	125 134 (130)	8 12 (10)	44 38 (41)	21 18 (20)	16 11 (14)	
	0.5	127 125 (126)	13 14 (14)	41 35 (38)	23 24 (24)	16 14 (15)	
		1.5	133 101 (117)	13 11 (12)	42 47 (45)	16 15 (16)	13 17 (15)
	5		132 138 (135)	14 11 (13)	41 44 (43)	16 19 (18)	16 15 (16)
		15	132 141 (137)	14 13 (14)	42 46 (44)	21 20 (21)	18 15 (17)
	50		43 * 40 * (42)	17 * 14 * (16)	30 * 37 * (34)	15 * 13 * (14)	15 * 13 * (14)
		150	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	500 †		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
		1500 †	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000 †		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
		S9 mix (+)	陰性対照	122 136 (129)	9 10 (10)	42 44 (43)	18 24 (21)
	0.5		132 120 (126)	9 11 (10)	48 42 (45)	22 32 (27)	19 17 (18)
1.5			117 132 (125)	12 9 (11)	44 47 (46)	25 28 (27)	21 18 (20)
	5		112 126 (119)	11 9 (10)	47 50 (49)	26 19 (23)	18 17 (18)
15			147 144 (146)	15 13 (14)	52 44 (48)	21 23 (22)	17 23 (20)
	50		119 * 105 * (112)	10 * 6 * (8)	42 * 38 * (40)	26 25 (26)	13 * 15 * (14)
150			0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	500		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
1500			0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000 †		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
陽性対照 S9 mix (-)			名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	用量 (μg/プレート)		0.01	0.5	0.01	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	1279 1103 (1191)	598 608 (603)	458 476 (467)	608 664 (636)	409 394 (402)	
	陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
用量 (μg/プレート)		1	2	10	0.5	2	
	(コロニー数/プレート)	1512 1616 (1564)	239 223 (231)	1685 1460 (1573)	238 242 (240)	200 222 (211)	

(備考) *: 菌の生育阻害が認められた。

†: 沈殿物が認められた。

陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

(平均値)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN₃: ナジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2 P092 の細菌を用いる復帰突然変異試験結果表 (本試験)

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg /プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	109 124 (117)	13 10 (12)	35 38 (37)	19 22 (21)	14 10 (12)
	1.56	118 137 (128)	15 12 (14)	33 32 (33)	16 19 (18)	12 15 (14)
		3.13	118 99 (109)	11 16 (14)	41 35 (38)	19 17 (18)
	6.25		127 119 (123)	15 12 (14)	40 35 (38)	23 20 (22)
		12.5	125 132 (129)	17 23 (20)	38 34 (36)	15 17 (16)
	25		109 * 108 * (109)	19 13 (16)	31 40 (36)	16 15 (16)
		50	38 * 37 * (38)	18 * 10 * (14)	27 * 24 * (26)	16 * 15 * (16)
	100		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
		200	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9 mix (+)		陰性対照	100 114 (107)	14 8 (11)	41 35 (38)
1.56		112 119 (116)	10 9 (10)	44 33 (39)	22 26 (24)	19 18 (19)
		3.13	110 113 (112)	13 13 (13)	38 41 (40)	34 28 (31)
6.25			101 114 (108)	16 16 (16)	41 31 (36)	28 30 (29)
		12.5	131 133 (132)	16 17 (17)	46 41 (44)	26 31 (29)
25			114 104 (109)	15 13 (14)	37 34 (36)	30 28 (29)
		50	100 * 98 * (99)	8 * 7 * (8)	34 * 32 * (33)	29 28 (29)
100			0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
		200	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
陽性対照 S9 mix (-)			名称	AF-2	NaN ₃	AF-2
	用量 (μg /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	460 486 (473)	609 623 (616)	400 374 (387)	582 586 (584)	449 456 (453)
	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
陽性対照 S9 mix (+)	用量 (μg /プレート)	1	2	10	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	1191 1173 (1182)	235 236 (236)	1618 1456 (1537)	287 226 (257)	176 183 (180)

(備考)

*: 菌の生育阻害が認められた。

陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

(平均値)

AF-2: 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド, NaN₃: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩一水和物, 2-AA: 2-アミノアントラセン

Appendix 1 分析証明書 (No. P120567-COA2)

P120567-COA2

分析証明書

分析証明書番号 : P120567-COA2
 試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学
 試験番号 : P120567
 表題 : P092 の特性試験及び保存安定性試験
 試験施設 : 三菱化学メディエンス株式会社 熊本研究所
 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)
 被験物質 : P092
 ロット番号 : E5Z6K
 保管条件 : 冷蔵 (1-10 °C), 遮光, 密封, 窒素封入
 保管場所 : 被験物質保管室 J009 内の薬用冷蔵庫
 入手日 : 2012 年 11 月 02 日
 分析日 : 2012 年 11 月 06 日 (被験物質の使用日)
 試験結果 :

試験項目	判定基準	結果	判定
性状 (色, 形状)	なし (観察結果を報告する)	白色の粉末	—
確認試験 (IR)	なし (測定結果を報告する)	IR 測定結果を図 1 に示した	—
純度 ¹⁾	95.0%以上 (HPLC 面積%)	99.2%	適

<備考>
¹⁾ 繰り返し 3 回測定 of 平均値を結果に記載した。

試験責任者: 2012 年 11 月 13 日

佐藤 保夫

三菱化学メディエンス株式会社
 創薬支援事業本部 試験研究センター
 安全性研究部 安全性 4 グループ



Appendix 1 (続き)

P120567-COA2

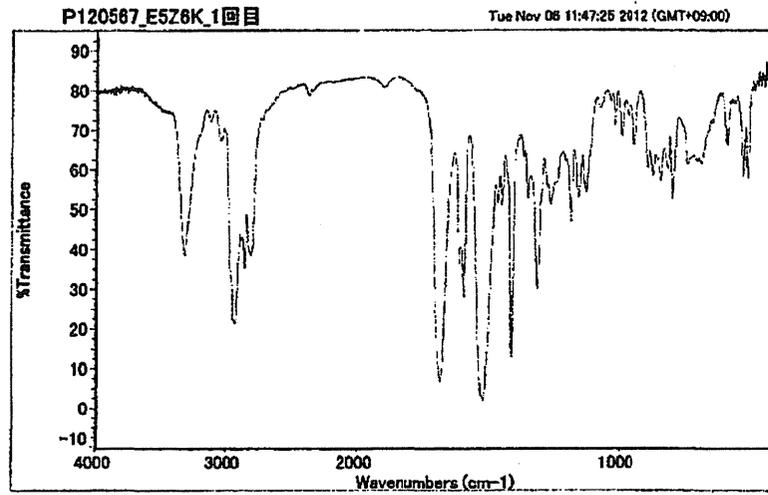


図 1 IR スペクトル(ロット番号 : E5Z6K)