

6.8	統計学的手法.....	13
6.9	試験成立条件.....	13
6.10	試験結果の判定.....	13
6.11	結果の表示.....	13
7.	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	13
8.	結果.....	14
8.1	試験成立条件.....	14
8.2	LRX.....	14
8.2.1	被験物質の析出.....	14
8.2.2	菌株に対する生育阻害.....	14
8.2.3	復帰変異コロニー数.....	14
8.3	LRY.....	14
8.3.1	被験物質の析出.....	14
8.3.2	菌株に対する生育阻害.....	14
8.3.3	復帰変異コロニー数.....	14
8.4	LRZ.....	14
8.4.1	被験物質の析出.....	14
8.4.2	菌株に対する生育阻害.....	15
8.4.3	復帰変異コロニー数.....	15
9.	考察.....	15
10.	参考文献.....	15
11.	試験責任者, その他の試験に従事した研究者全員の氏名及び業務分担	16
12.	記録及び資料の保存.....	16

Table

1	Results of bacterial reverse mutation test	17
2	Results of bacterial reverse mutation test	18
3	Results of bacterial reverse mutation test	19

Figure

1	Results of bacterial reverse mutation test (without metabolic activation)	20
2	Results of bacterial reverse mutation test (with metabolic activation)	20
3	Results of bacterial reverse mutation test (without metabolic activation)	21
4	Results of bacterial reverse mutation test (with metabolic activation)	21
5	Results of bacterial reverse mutation test (without metabolic activation)	22
6	Results of bacterial reverse mutation test (with metabolic activation)	22

要 約

LRX, LRY 及び LRZ のそれぞれの遺伝子突然変異誘発性の有無を評価するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA1535, TA98, TA1537 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA の計 5 菌株を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下のプレインキュベーション法により復帰突然変異試験を実施した。用量は、被験物質原液（濃度 1 mg/mL）をそのまま 0.1 mL 添加した 100 µg/plate を最高用量として、以下公比約 3 で 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1 及び 0.03 µg/plate の計 8 段階の用量を設定した。陰性対照として媒体の生理食塩液を、陽性対照として既知の変異原性物質を用いた。

- 1) 代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。
- 2) 菌株に対する生育阻害は、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても 100 µg/plate までみられなかった。
- 3) 被験物質の析出は、代謝活性化系の有無にかかわらず、被験物質調製液添加時及び 48 時間培養後のプレート上ともに 100 µg/plate まで認められなかった。
- 4) 陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、当施設の背景データの範囲内 (mean±3SD) にあったことから、試験は適切な条件下で実施されたと判断した。

以上の結果から、本試験条件下において、LRX, LRY 及び LRZ はいずれも細菌に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないと結論した。

1. 試験目的

細菌を用いて、LRX, LRY 及び LRZ の遺伝子突然変異誘発性の有無を評価した。

2. 適用規則

本試験は、適用規則なしとしたが、試験は以下のガイダンスを参考にして実施した。

・「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）

3. 試験委託者

独立行政法人理化学研究所

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

TEL : 045-503-7016/7017 FAX : 045-503-7015

4. 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

5. 試験日程

試験開始日 :	2013 年 10 月 11 日
実験開始日 :	2013 年 10 月 15 日
LRX :	2013 年 10 月 15 日～18 日
LRY :	2013 年 10 月 15 日～18 日
LRZ :	2013 年 10 月 21 日～24 日
実験終了日 :	2013 年 10 月 24 日
試験終了日 :	2013 年 11 月 26 日

6. 材料及び方法

6.1 被験物質及び対照物質

6.1.1 被験物質-1

名称 :	LRX
提供者 :	独立行政法人理化学研究所
ロット番号 :	RMJ-MD021
濃度 :	1 mg/mL
受領日 :	2013 年 10 月 7 日
入手日 :	2013 年 10 月 15 日
入手量 :	1.2 mL × 3 本 (3.6 mL)

保存条件： 冷蔵（凍結を避けて保存）
 保存場所： 被験物質保管所内冷蔵室
 [受領日～最終使用日（2013年10月7日～10月16日）：実測値 3.3～5.0°C，許容範囲 2～8°C]
 取扱い： マスク，キャップ，手袋及び保護眼鏡を着用した。
 残余被験物質-1： すべて試験に使用したため残余はなかった。

6.1.2 被験物質-2

名称： LRY
 提供者： 独立行政法人理化学研究所
 ロット番号： RMJ-MD022
 濃度： 1 mg/mL
 受領日： 2013年10月7日
 入手日： 2013年10月15日
 入手量： 1.2 mL × 3本（3.6 mL）
 保存条件： 冷蔵（凍結を避けて保存）
 保存場所： 被験物質保管所内冷蔵室
 [受領日～最終使用日（2013年10月7日～10月16日）：実測値 3.3～5.0°C，許容範囲 2～8°C]
 取扱い： マスク，キャップ，手袋及び保護眼鏡を着用した。
 残余被験物質-2： すべて試験に使用したため残余はなかった。

6.1.3 被験物質-3

名称： LRZ
 提供者： 独立行政法人理化学研究所
 ロット番号： RMJ-MD023
 濃度： 1 mg/mL
 受領日： 2013年10月7日
 入手日： 2013年10月15日
 入手量： 1.2 mL × 3本（3.6 mL）
 保存条件： 冷蔵（凍結を避けて保存）
 保存場所： 被験物質保管所内冷蔵室
 [受領日～最終使用日（2013年10月7日～10月22日）：実測値 3.3～5.0°C，許容範囲 2～8°C]
 取扱い： マスク，キャップ，手袋及び保護眼鏡を着用した。
 残余被験物質-3： すべて試験に使用したため残余はなかった。

6.1.4 媒体 (陰性対照物質)

名称： 生理食塩液
製造者： 株式会社大塚製薬工場
ロット番号： 3F75N
選択理由： 被験物質は生理食塩液に溶解するため。また、細菌を用いる復帰突然変異試験に汎用されているため。

6.1.5 陽性対照物質

選択理由： 細菌を用いる復帰突然変異試験に汎用され、また、当施設ではこれらの背景データを集積しているため。

6.1.5.1 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)

製造者： 和光純薬工業株式会社
規格/等級： 和光特級
ロット番号： STQ3987
含量： 99.7%

6.1.5.2 Sodium azide (NaN_3)

製造者： 和光純薬工業株式会社
規格/等級： 試薬特級
ロット番号： MPG7000
純度： 100.4%

6.1.5.3 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate (9AA)

製造者： Sigma-Aldrich Co.
ロット番号： 07620TD
純度： 99.9%

6.1.5.4 2-Aminoanthracene (2AA)

製造者： 和光純薬工業株式会社
ロット番号： DCK3519
含量： 96.5%

6.2 被験物質及び対照物質の調製

6.2.1 被験物質調製液

調製濃度： 0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 及び 1 mg/mL
換算係数： なし
調製方法： 必要量の被験物質を秤量し、最高濃度液とした。最高濃度液は

シリンジフィルター (DISMIC-13cp, 0.20 µm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.) でろ過滅菌した。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した。

調製頻度： 各被験物質につき 1 回、用時に調製した。

6.2.2 陰性対照調製液

媒体である生理食塩液をそのまま陰性対照調製液とした。

6.2.3 陽性対照調製液

調製方法： NaN_3 は注射用水 (ロット番号 3A90P, 株式会社大塚製薬工場) で、AF-2, 9AA 及び 2AA はジメチルスルホキシド (DMSO, バッチ番号 SHBC6530V, Sigma-Aldrich Co.) に溶解させ、それぞれ次表に示す濃度に希釈調製した後、凍結保存したものを用時に解凍して使用した。使用後の残液は廃棄した。

調製日： 2013 年 9 月 10 日

調製液の保存条件： 冷凍

調製液の保存場所： 微生物操作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)

[調製日～最終使用日 (2013 年 9 月 10 日～10 月 22 日) : 実測値-26.2～-22.5°C, 許容範囲-10°C 以下]

陽性対照調製液の濃度

菌株	代謝活性化系の非存在下		代謝活性化系の存在下	
	陽性対照物質	濃度 (µg/mL)	陽性対照物質	濃度 (µg/mL)
TA100	AF-2	0.1	2AA	10
TA1535	NaN_3	5	2AA	20
WP2uvrA	AF-2	0.2	2AA	100
TA98	AF-2	1	2AA	5
TA1537	9AA	800	2AA	20

6.3 試験系 (菌株)

種： ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA1535, TA98, TA1537 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA の計 5 菌株^{1, 2)} 試験には、当施設にて大量培養し、菌懸濁液 0.8 mL に対し DMSO 0.07 mL を加え、ドライアイス・アセトンで凍結し、ラベルで識別した後、超低温フリーザーで保存したものを用時に解凍して使用した。

選択理由： 「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」に指定されているため。また、当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： 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
 入手日： 2009年6月1日
 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）
 [ロット作製日～最終使用日（2013年7月19日～10月21日）：実測値-84.0～-76.0°C, 許容範囲-70°C以下]
 ロット番号： 20130719
 特性検査日： 2013年8月2日
 特性検査： 試験に用いたロットの菌株について、遺伝的特性（アミノ酸要求性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子及び紫外線感受性）が正常であること、陰性対照ならびに陽性対照における復帰変異コロニー数が背景データの範囲内にあること及び試験と同じ条件で前培養した後の生菌数が 1×10^9 cells/mL 以上であることを確認した。

6.4 代謝活性化系

6.4.1 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： 13061403
 製造年月日： 2013年6月14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：214.9 ± 9.2 g）
 保存場所： 変異原性試験室内超低温フリーザー（MDF-392AT）
 [購入日～最終使用日（2013年8月29日～10月22日）：実測値-83.7～-78.2°C, 許容範囲-70°C以下]
 使用期限： 2013年12月13日

6.4.2 S9 mix の調製

S9 mix 10 mL あたりの調製方法：Cofactor-I（ロット番号999301, オリエンタル酵母工業株式会社）1バイアルに9 mLの蒸留水を加え溶解させた。孔径0.20 μmのシリンジフィルターでろ過滅菌した後、1 mLのS9を加えS9 mixとした。S9 mixは用時調製した。なお、S9 mix 1 mL

あたりの組成を次表に示す。

S9 mix 1 mL あたりの組成

成分	組成
S9	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)	4 μ mol
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)	4 μ mol
リン酸ナトリウム緩衝液, pH7.4	100 μ mol

6.5 培地

6.5.1 前培養液

2.5 w/v%ニュートリエントブロス No. 2 (ロット番号 823402, Oxoid Ltd.) を 10 mL ずつガラス製 L 字管 (容量 30 mL) に分注し, 121°C, 20 分間高圧蒸気滅菌 (オートクレーブ: SX-500, 株式会社トミー精工) 後, 冷蔵しておいたものを用いた。

6.5.2 最少グルコース寒天平板培地

名称: テスメディア AN 培地
 製造者: オリエンタル酵母工業株式会社
 ロット番号: ANI320FC
 製造日: 2013 年 6 月 25 日
 保存条件: 室温
 保存場所: 変異原性試験室内秤量室
 使用期限: 2013 年 12 月 24 日

6.5.3 トップアガー

- 0.6 w/v%バクトアガー・0.5 w/v%塩化ナトリウム水溶液を調製し, 121°C, 20 分間高圧蒸気滅菌 (オートクレーブ: SX-500) し, 軟寒天とした (バクトアガー: ロット番号 2306428, Difco Laboratories, 塩化ナトリウム: ロット番号 PDP0678, 和光純薬工業株式会社)。
- 0.5 mmol/L L-ヒスチジン・0.5 mmol/L D-ビオチン水溶液及び 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を調製し, 孔径 0.22 μ m のボトルトップフィルター (Corning Inc.) でろ過滅菌した (L-ヒスチジン塩酸塩一水和物: ロット番号 WEQ6077, 和光純薬工業株式会社, D-ビオチン: ロット番号 WEG2245, 和光純薬工業株式会社, L-トリプトファン: ロット番号 LAG1847, 和光純薬工業株式会社)。

- 3) 使用する直前に、ネズミチフス菌の場合は 0.5 mmol/L L-ヒスチジン・0.5 mmol/L D-ピオチン水溶液を、大腸菌の場合は 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液を、軟寒天に容量比 1 : 10 の割合で混合させた。
- 4) 調製したトップアガーは、使用するまで約 45°C に温度設定した恒温槽 (EW-100, アズワン株式会社) 中で保温した。

6.6 群構成及び用量の設定

TA100, TA1535, WP2*uvrA*, TA98 及び TA1537 を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下により試験を実施した。被験物質の用量は、100 µg/plate を最高用量として、以下公比約 3 で 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1 及び 0.03 µg/plate の計 8 段階の用量を設定した。陰性対照群として媒体処理群を、陽性対照群として次表に示す群を設けた。

陽性対照群の用量

菌株	代謝活性化系の非存在下		代謝活性化系の存在下	
	陽性対照物質	用量 (µg/plate)	陽性対照物質	用量 (µg/plate)
TA100	AF-2	0.01	2AA	1
TA1535	NaN ₃	0.5	2AA	2
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.02	2AA	10
TA98	AF-2	0.1	2AA	0.5
TA1537	9AA	80	2AA	2

6.7 試験の実施

6.7.1 菌の前培養

- 1) 凍結保存しておいた菌懸濁液をすばやく解凍後、前培養液 10 mL に対して 20 µL の菌懸濁液をマイクロピペットにて接種し、ウォーターバスシェーカー (クールバスシェーカー: ML-10F, タイテック株式会社) を用いて、37°C で 10 時間振盪培養 (往復式, 90 回/分, 振幅 2 cm) した。
- 2) 振盪培養の終わった菌懸濁液について、菌濃度が 1×10^9 cells/mL 以上であることを分光光度計 (U-1800, 株式会社日立製作所, 測定波長 660 nm) を用いて OD 値による換算で確認した。

菌株	生菌数 ($\times 10^9$ cells/mL)	
	LRX 及び LRY	LRZ
TA100	2.10	2.42
TA1535	3.59	2.77
WP2 <i>uvrA</i>	3.83	3.11
TA98	1.81	2.40
TA1537	3.18	2.73

- 3) 前培養した菌懸濁液は使用するまで約 4°C の微生物操作室内フリーザ付薬用保冷庫冷蔵庫 (MPR-213FS, パナソニックヘルスケア株式会社) に保存した。

6.7.2 試験培養

試験はプレインキュベーション法³⁾ で実施した。

- 1) 滅菌済みの小試験管 (13×100 mm) に 0.5 mL の 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH7.4, 代謝活性化系の非存在下) あるいは 0.5 mL の S9 mix (代謝活性化系の存在下) を加えた後, 0.1 mL の前培養した菌懸濁液を加えた。
- 2) 0.1 mL の陰性対照調製液, 被験物質調製液あるいは陽性対照調製液をマイクロピペットで加えた。なお, 被験物質調製液添加時に被験物質の析出の有無を観察した。
- 3) ウォーターバスシェーカー (シェイキングバス: BW201, ヤマト科学株式会社) を用いて, 37°C で 20 分間振盪 (往復式, 120 回/分, 振幅 2 cm) した。
- 4) 保温しておいたトッパアガーを 2 mL を加え, 混合した後, 最少グルコース寒天平板培地上に注ぎ, プレートを動かしながら一様に広げた。
- 5) 水平面上に放置し, トッパアガーが固まった後, プレートを上下転倒してインキュベータ (恒温培養器: TVA660DA, 株式会社東洋製作所) を用いて, 37°C で 48 時間培養した。
- 6) プレートの識別のために, 群番号をプレートに記入した。また, 各群 2 枚のプレートを使用したため, 同じ群のプレートは個別に a, b と識別した。

6.7.3 無菌試験

使用した媒体, 被験物質調製液及び S9 mix への雑菌の混入の有無を確認するため, 0.1 mL の媒体あるいは試験に使用した最高濃度の被験物質調製液, 0.5 mL の S9 mix にトッパアガーを 2 mL 加え, 混合した後, 最少グルコース寒天平板培地上に注ぎ, 試験培養と同様に 48 時間培養した。

6.7.4 生育阻害の分類とコロニー数の測定

- 1) 肉眼及び双眼実体顕微鏡 (×40, SPT-40L, カートン光学株式会社) により菌の生育阻害の有無 (バックグラウンドの菌の生育状態), また肉眼によりプレート上の被験物質の析出の有無を観察した。生育阻害は次のように分類した。

- : プレート上のバックグラウンドの菌の生育が陰性対照群と同程度のもの。
- *: プレート上のバックグラウンドの菌の生育が陰性対照群のそれと比較して明らかに阻害されているもの。
- ** : プレート上のバックグラウンドの菌の生育が被験物質により阻害され, バックグラウンドの菌が死滅し, 肉眼的に微小コロニーを認めるもの。なお, この場合は, 復帰変異コロニー数を「0」とした。

***：プレート上のバックグラウンドの菌の生育が被験物質により強く阻害され、バックグラウンドの菌が死滅し、微小コロニーも認められないもの。

- 2) 陰性対照群及び被験物質群の復帰変異コロニー数は、肉眼により測定した。陽性対照群の復帰変異コロニー数は、コロニーアナライザー (CA-11DS, システムサイエンス株式会社) により測定した。コロニーアナライザーでの計測は、面積補正 (測定値=補正係数×コロニー数) 実施下で、1枚のプレートにつき2回の測定を行い(約90度回転)、その平均値を測定値とした。

6.8 統計学的手法

統計学的検定は実施しなかった。

6.9 試験成立条件

次のすべての条件を満たしている場合に試験成立とした。

- a) 陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数が当施設の背景データ⁴⁾の範囲内 (mean±3SD) にある。
- b) 無菌試験で雑菌汚染が認められない。

6.10 試験結果の判定

いずれかの菌株において、プレートあたりの復帰変異コロニー数 (平均値) が陰性対照の2倍以上に増加し、また、用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加を示した場合に陽性と判定した。復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍未満の場合は陰性と判定した。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した。

6.11 結果の表示

復帰変異コロニー数の測定値とその平均値を表示した。さらに、復帰変異コロニー数 (平均値) について、用量-反応曲線を図示した。

7. 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

本試験では、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はなかった。

8. 結果

8.1 試験成立条件

6.9 項に示す試験成立条件をすべて満たしたことから、試験が適切な条件下で実施されたと判断した。

8.2 LRX

(Table 1, Figure 1 及び 2)

8.2.1 被験物質の析出

被験物質の析出は、代謝活性化系の有無にかかわらず、被験物質調製液添加時及び 48 時間培養後のプレート上ともに 100 µg/plate まで認められなかった。

8.2.2 菌株に対する生育阻害

菌株に対する生育阻害は、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても 100 µg/plate までみられなかった。

8.2.3 復帰変異コロニー数

代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。

8.3 LRY

(Table 2, Figure 3 及び 4)

8.3.1 被験物質の析出

被験物質の析出は、代謝活性化系の有無にかかわらず、被験物質調製液添加時及び 48 時間培養後のプレート上ともに 100 µg/plate まで認められなかった。

8.3.2 菌株に対する生育阻害

菌株に対する生育阻害は、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても 100 µg/plate までみられなかった。

8.3.3 復帰変異コロニー数

代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。

8.4 LRZ

(Table 3, Figure 5 及び 6)

8.4.1 被験物質の析出

被験物質の析出は、代謝活性化系の有無にかかわらず、被験物質調製液添加時及び 48 時間培養後のプレート上ともに 100 µg/plate まで認められなかった。

8.4.2 菌株に対する生育阻害

菌株に対する生育阻害は、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても 100 µg/plate までみられなかった。

8.4.3 復帰変異コロニー数

代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加はみられなかった。

9. 考察

LRX, LRY 及び LRZ のそれぞれの遺伝子突然変異誘発性の有無を評価するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA1535, TA98, TA1537 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2*uvrA* の計 5 菌株を用いて、代謝活性化系の存在下及び非存在下のプレインキュベーション法により復帰突然変異試験を実施した。用量は、被験物質原液（濃度 1 mg/mL）をそのまま 0.1 mL 添加した 100 µg/plate を最高用量として、以下公比約 3 で 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1 及び 0.03 µg/plate の計 8 段階の用量を設定した。陰性対照として媒体の生理食塩液を、陽性対照として既知の変異原性物質を用いた。

LRX, LRY 及び LRZ はそれぞれ、代謝活性化系の有無にかかわらず、いずれの菌株においても、陰性対照の 2 倍以上に復帰変異コロニー数を増加させなかった。したがって、LRX, LRY 及び LRZ の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性はいずれも陰性であると判断した。

陰性対照及び陽性対照における復帰変異コロニー数は、当施設の背景データの範囲内 (mean±3SD) にあったことから、試験は適切な条件下で実施されたと判断した。

以上の結果から、本試験条件下において、LRX, LRY 及び LRZ はいずれも細菌に対して遺伝子突然変異誘発性を示さないと結論した。

10. 参考文献

- 1) Maron DM and Ames BN. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Research 1983; 113: 173-215.
- 2) Green MHL, Muriel WJ. Mutagen testing using TRP+ reversion in *Escherichia coli*. Mutation Research 1976; 38: 3-32.
- 3) Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, *et al.* Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Research 1994; 312: 217-233.
- 4) Control Background Data - Bacterial reverse mutation test (pre-incubation method), 2013, In-house data of SNBL DSR.

11. 試験責任者、その他の試験に従事した研究者全員の氏名及び業務分担

試験責任者： 林 亜耶

被験物質取扱い責任者： 塩崎 彩

被験物質及び対照物質の調製： 上別府 聡

復帰突然変異試験： 伊地知 美咲，上別府 聡，高橋 久仁子

12. 記録及び資料の保存

記録及び資料は、以下の保存場所に最終報告書作成後 10 年間保存する。

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

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

Results of bacterial reverse mutation test

Test article-1: LRX

Metabolic activation	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate					
		Base pair substitution mutations			Frameshift mutations		
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
Without	Negative control Physiological saline	102 , 110 (106)	12 , 13 (13)	24 , 28 (26)	23 , 24 (24)	9 , 6 (8)	
	0.03	106 , 118 (112)	12 , 10 (11)	26 , 24 (25)	29 , 21 (25)	6 , 9 (8)	
	0.1	116 , 115 (116)	12 , 11 (12)	29 , 28 (29)	24 , 19 (22)	8 , 11 (10)	
	0.3	100 , 110 (105)	12 , 14 (13)	31 , 27 (29)	24 , 19 (22)	11 , 8 (10)	
	1	115 , 119 (117)	11 , 14 (13)	29 , 30 (30)	21 , 28 (25)	7 , 9 (8)	
	3	108 , 110 (109)	11 , 12 (12)	28 , 29 (29)	17 , 24 (21)	6 , 5 (6)	
	10	111 , 116 (114)	14 , 10 (12)	24 , 28 (26)	26 , 22 (24)	7 , 8 (8)	
	30	111 , 110 (111)	9 , 10 (10)	27 , 28 (28)	20 , 19 (20)	10 , 6 (8)	
	100	107 , 111 (109)	8 , 11 (10)	26 , 29 (28)	25 , 22 (24)	9 , 5 (7)	
With	Negative control Physiological saline	117 , 123 (120)	13 , 12 (13)	24 , 26 (25)	29 , 28 (29)	11 , 8 (10)	
	0.03	120 , 124 (122)	11 , 14 (13)	30 , 27 (29)	28 , 22 (25)	9 , 11 (10)	
	0.1	128 , 117 (123)	13 , 14 (14)	31 , 31 (31)	19 , 20 (20)	6 , 9 (8)	
	0.3	119 , 125 (122)	11 , 10 (11)	23 , 28 (26)	22 , 26 (24)	9 , 13 (11)	
	1	115 , 117 (116)	11 , 15 (13)	20 , 28 (24)	24 , 26 (25)	12 , 10 (11)	
	3	118 , 110 (114)	13 , 9 (11)	30 , 25 (28)	22 , 23 (23)	8 , 11 (10)	
	10	105 , 107 (106)	10 , 12 (11)	29 , 33 (31)	21 , 27 (24)	11 , 7 (9)	
	30	102 , 105 (104)	15 , 14 (15)	30 , 29 (30)	21 , 24 (23)	11 , 8 (10)	
	100	128 , 129 (129)	9 , 8 (9)	29 , 34 (32)	22 , 24 (23)	12 , 9 (11)	
PC	Without	Article	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
		Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.02	0.1	80
		Colonies/plate	522 , 539 (531)	403 , 436 (420)	676 , 662 (669)	439 , 454 (447)	433 , 464 (449)
	With	Article	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
		Colonies/plate	551 , 548 (550)	195 , 186 (191)	363 , 364 (364)	325 , 304 (315)	190 , 223 (207)

Remarks

1. () : Mean of 2 plates

2. PC : Positive controls

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃: Sodium azide

9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

2AA: 2-Aminoanthracene

Table 2

Study No. SBL366-001

Results of bacterial reverse mutation test

Test article-2: LRY

Metabolic activation	Dose (µg/plate)	Number of revertant colonies/plate					
		Base pair substitution mutations			Frameshift mutations		
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537	
Without	Negative control	118, 109	12, 14	29, 27	25, 21	8, 7	
	Physiological saline	(114)	(13)	(28)	(23)	(8)	
	0.03	120, 113	14, 15	26, 24	17, 23	9, 8	
		(117)	(15)	(25)	(20)	(9)	
	0.1	114, 109	13, 11	30, 29	21, 26	6, 5	
		(112)	(12)	(30)	(24)	(6)	
	0.3	106, 103	12, 14	29, 25	27, 25	8, 5	
		(105)	(13)	(27)	(26)	(7)	
	1	111, 117	15, 12	29, 26	21, 25	7, 10	
		(114)	(14)	(28)	(23)	(9)	
3	103, 110	12, 14	28, 29	16, 18	7, 6		
	(107)	(13)	(29)	(17)	(7)		
10	118, 111	13, 10	24, 27	17, 18	7, 5		
	(115)	(12)	(26)	(18)	(6)		
30	104, 110	11, 10	24, 27	21, 21	5, 8		
	(107)	(11)	(26)	(21)	(7)		
100	120, 119	14, 15	24, 26	19, 16	8, 6		
	(120)	(15)	(25)	(18)	(7)		
With	Negative control	120, 113	10, 12	29, 31	26, 22	6, 10	
	Physiological saline	(117)	(11)	(30)	(24)	(8)	
	0.03	116, 128	12, 12	31, 29	22, 20	9, 10	
		(122)	(12)	(30)	(21)	(10)	
	0.1	117, 123	14, 11	26, 25	24, 26	8, 6	
		(120)	(13)	(26)	(25)	(7)	
	0.3	127, 121	13, 15	28, 28	21, 26	7, 7	
		(124)	(14)	(28)	(24)	(7)	
	1	126, 122	12, 14	24, 28	24, 24	7, 7	
		(124)	(13)	(26)	(24)	(7)	
3	117, 121	11, 10	28, 28	24, 23	11, 8		
	(119)	(11)	(28)	(24)	(10)		
10	122, 129	10, 12	25, 23	24, 21	12, 10		
	(126)	(11)	(24)	(23)	(11)		
30	113, 123	9, 7	23, 25	23, 21	7, 7		
	(118)	(8)	(24)	(22)	(7)		
100	112, 120	12, 13	25, 29	29, 23	10, 8		
	(116)	(13)	(27)	(26)	(9)		
PC	Without	Article	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
		Dose (µg/plate)	0.01	0.5	0.02	0.1	80
		Colonies/plate	472, 502	453, 425	549, 589	454, 452	568, 517
		(487)	(439)	(569)	(453)	(543)	
	With	Article	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		Dose (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
Colonies/plate		520, 550	194, 215	316, 278	353, 366	183, 165	
	(535)	(205)	(297)	(360)	(174)		

Remarks

1. () : Mean of 2 plates

2. PC : Positive controls

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃: Sodium azide

9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

2AA: 2-Aminoanthracene

Results of bacterial reverse mutation test

Test article-3: LRZ

Metabolic activation	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate					
		Base pair substitution mutations			Frameshift mutations		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
Without	Negative control Physiological saline	102 , 106 (104)	8 , 6 (7)	24 , 22 (23)	22 , 24 (23)	8 , 8 (8)	
	0.03	97 , 104 (101)	11 , 7 (9)	20 , 29 (25)	27 , 29 (28)	7 , 12 (10)	
	0.1	96 , 102 (99)	10 , 9 (10)	19 , 22 (21)	27 , 24 (26)	6 , 7 (7)	
	0.3	104 , 102 (103)	8 , 9 (9)	25 , 21 (23)	22 , 23 (23)	6 , 7 (7)	
	1	109 , 118 (114)	9 , 8 (9)	21 , 29 (25)	24 , 24 (24)	7 , 7 (7)	
	3	110 , 117 (114)	9 , 7 (8)	27 , 21 (24)	29 , 25 (27)	8 , 8 (8)	
	10	106 , 118 (112)	11 , 7 (9)	24 , 29 (27)	24 , 23 (24)	11 , 11 (11)	
	30	110 , 118 (114)	9 , 6 (8)	21 , 22 (22)	28 , 25 (27)	7 , 11 (9)	
	100	121 , 114 (118)	10 , 6 (8)	26 , 22 (24)	28 , 30 (29)	6 , 5 (6)	
With	Negative control Physiological saline	118 , 127 (123)	10 , 7 (9)	20 , 23 (22)	24 , 26 (25)	8 , 9 (9)	
	0.03	119 , 127 (123)	7 , 10 (9)	19 , 25 (22)	25 , 24 (25)	6 , 6 (6)	
	0.1	125 , 123 (124)	6 , 5 (6)	24 , 22 (23)	25 , 23 (24)	9 , 10 (10)	
	0.3	127 , 122 (125)	11 , 6 (9)	16 , 17 (17)	22 , 29 (26)	12 , 8 (10)	
	1	133 , 134 (134)	9 , 6 (8)	19 , 24 (22)	28 , 30 (29)	11 , 11 (11)	
	3	127 , 114 (121)	7 , 7 (7)	20 , 22 (21)	23 , 23 (23)	9 , 5 (7)	
	10	125 , 115 (120)	12 , 9 (11)	17 , 22 (20)	24 , 20 (22)	7 , 7 (7)	
	30	114 , 120 (117)	8 , 7 (8)	19 , 18 (19)	20 , 24 (22)	8 , 8 (8)	
	100	130 , 113 (122)	7 , 6 (7)	21 , 21 (21)	23 , 20 (22)	12 , 14 (13)	
PC	Without	Article	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
		Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.02	0.1	80
		Colonies/plate	533 , 507 (520)	340 , 341 (341)	783 , 778 (781)	498 , 525 (512)	405 , 442 (424)
	With	Article	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
		Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
		Colonies/plate	548 , 511 (530)	158 , 190 (174)	372 , 392 (382)	329 , 319 (324)	133 , 168 (151)

Remarks

1. () : Mean of 2 plates

2. PC : Positive controls

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃: Sodium azide

9AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

2AA: 2-Aminoanthracene

Test article-1: LRX

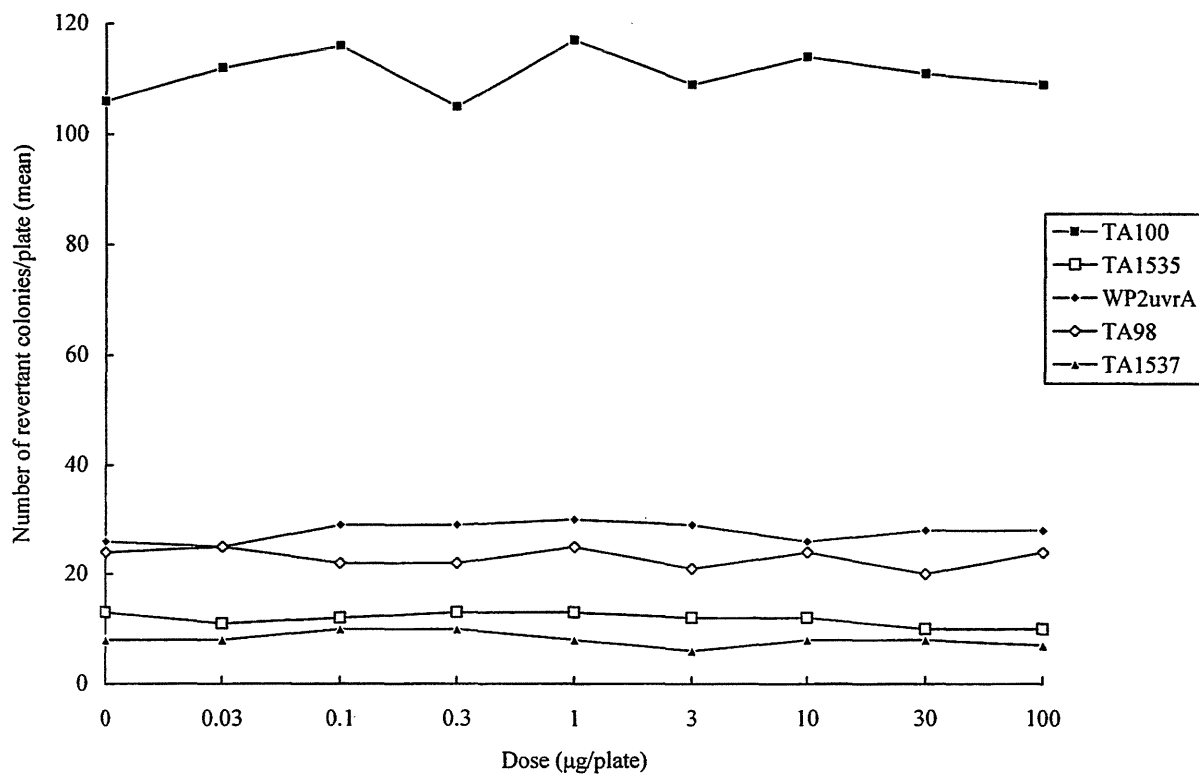


Figure 1 Results of bacterial reverse mutation test (without metabolic activation)

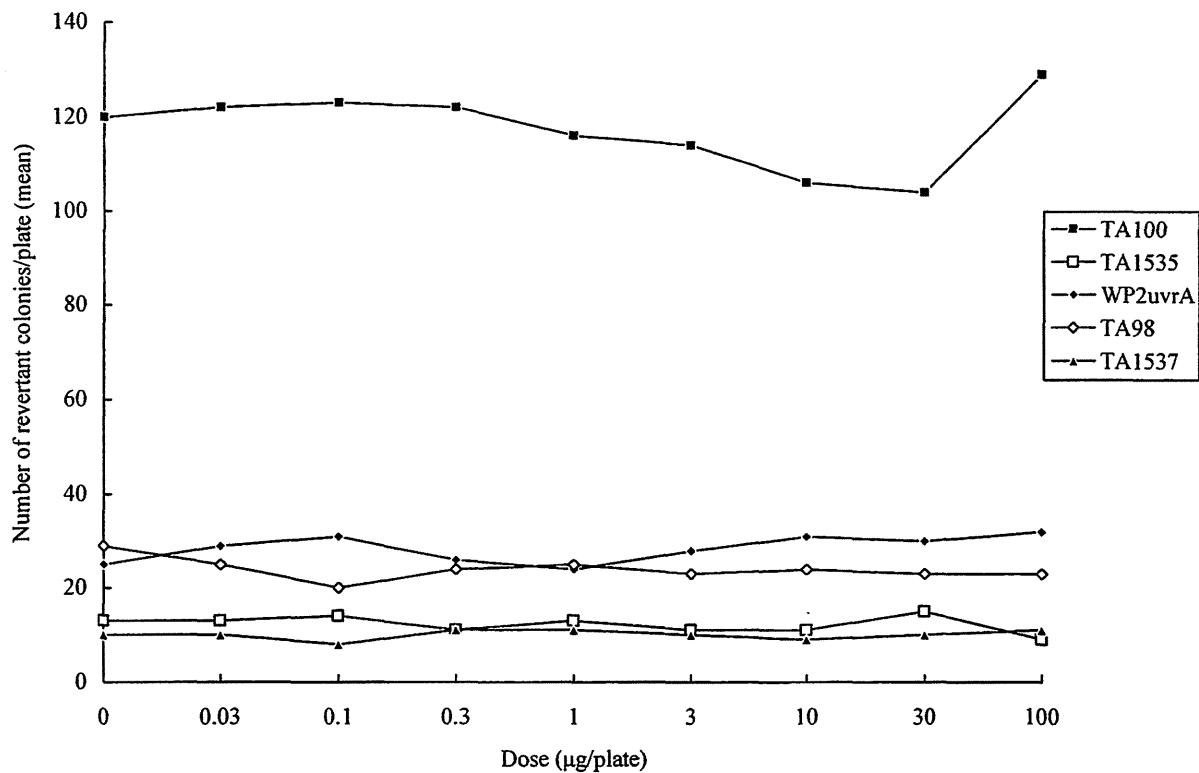


Figure 2 Results of bacterial reverse mutation test (with metabolic activation)

Test article-2: LRY

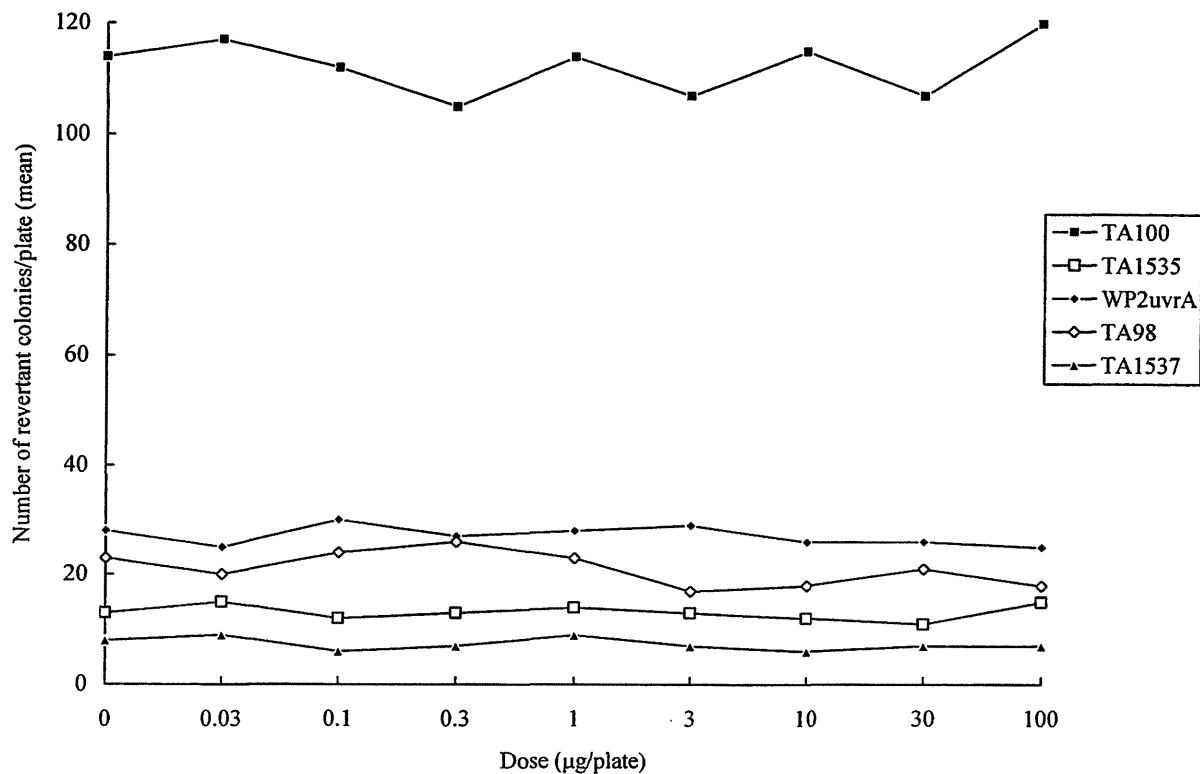


Figure 3 Results of bacterial reverse mutation test (without metabolic activation)

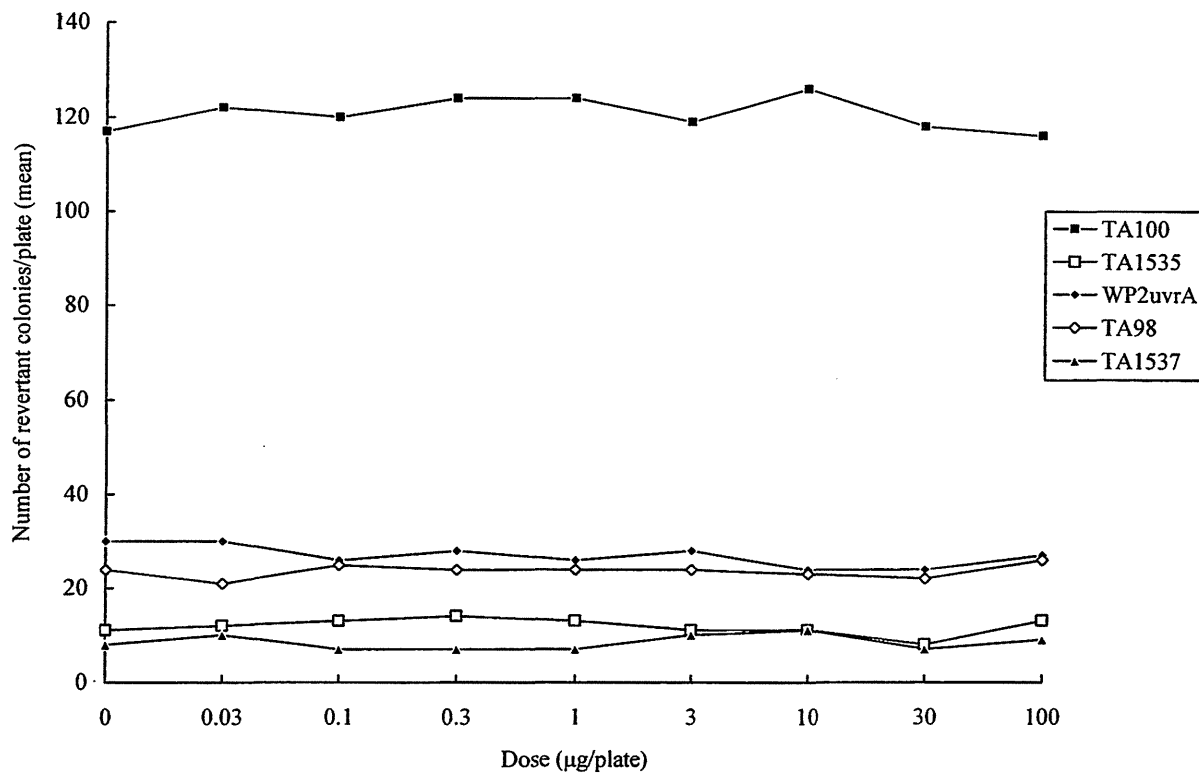


Figure 4 Results of bacterial reverse mutation test (with metabolic activation)

Test article-3: LRZ

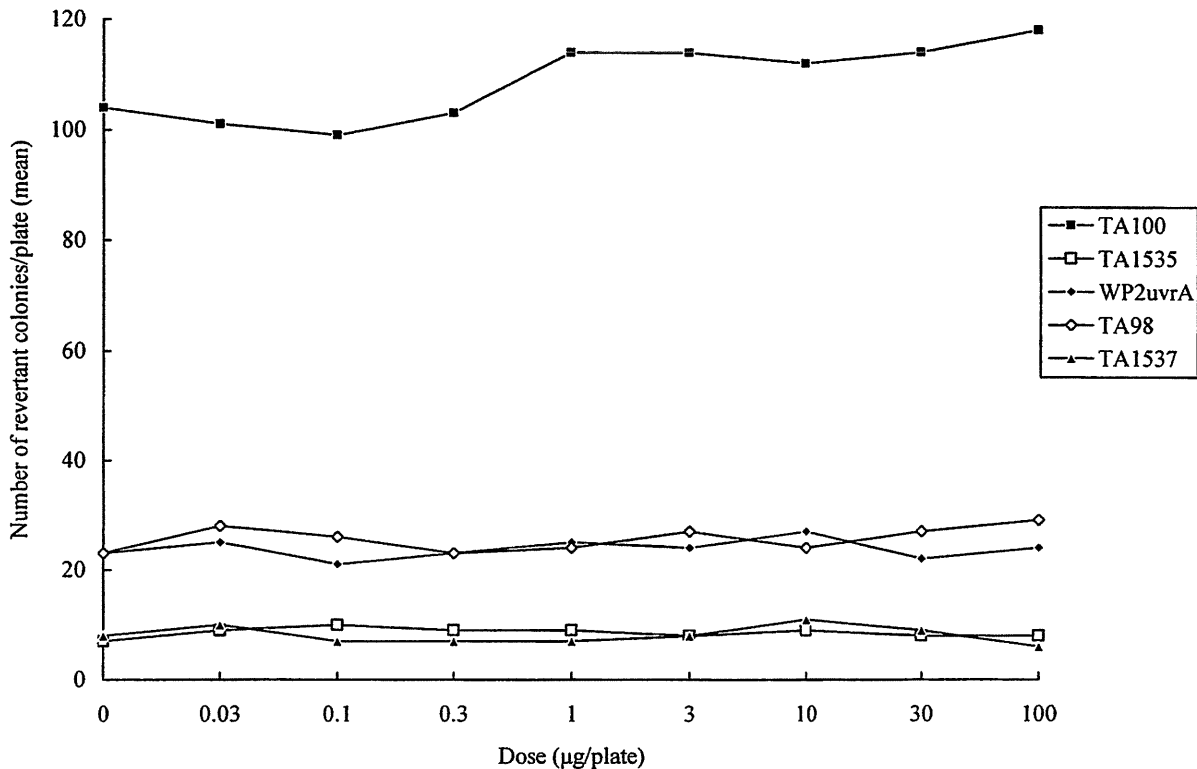


Figure 5 Results of bacterial reverse mutation test (without metabolic activation)

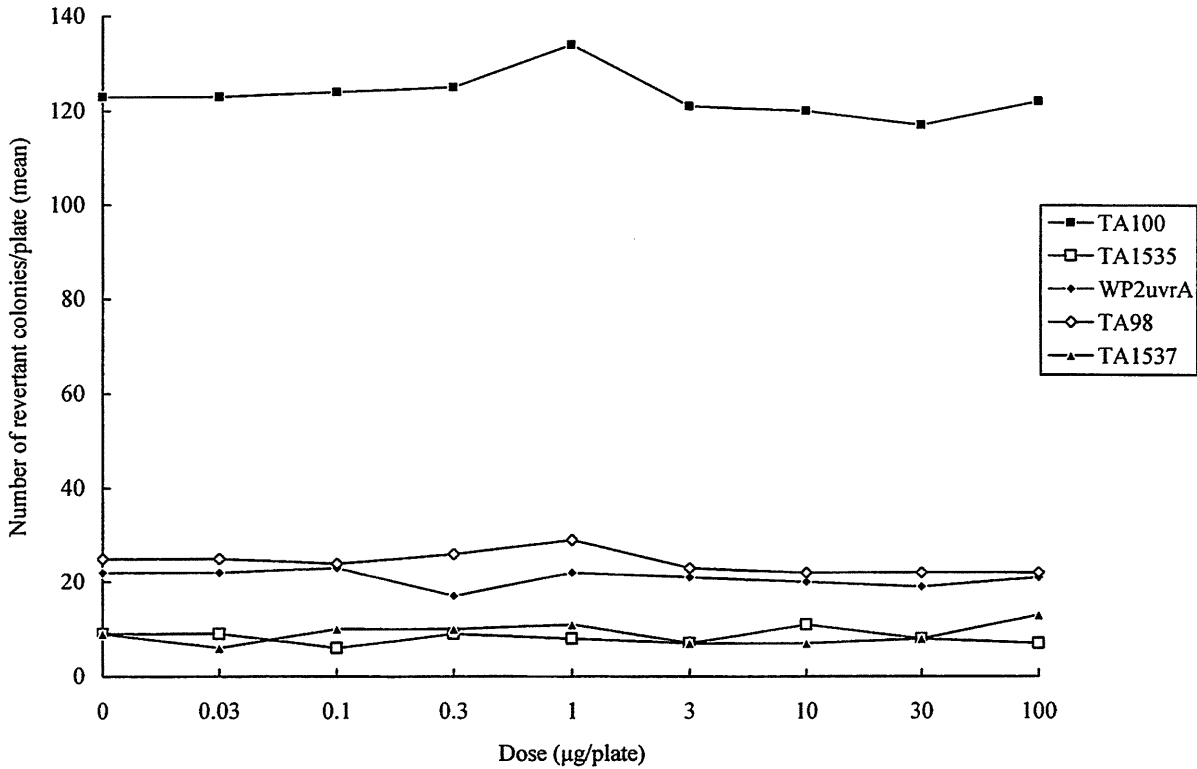


Figure 6 Results of bacterial reverse mutation test (with metabolic activation)