

4 試験責任者署名

表 題： P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： B141051

試験責任者：

2015年3月17日

藤本透

---

藤本 透  
株式会社LSIメディエンス  
創薬支援事業本部 試験研究センター  
安全性研究部

## 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・マレイン酸塩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。

用量設定試験は 0.5, 1.5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (フリー体として) で実施した。

用量設定試験の結果を基に、本試験は明らかな生育阻害が認められる用量を最高用量として、下記の用量 (フリー体として) を設定した。

本試験 1 回目：

S9 mix 非存在下：

0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 および 25  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA100, TA1535, TA98 および TA1537)  
1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 および 100  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (WP2*uvrA*)

S9 mix 存在下：

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

また、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, TA98 および TA1537 では用量設定試験において強い生育阻害が認められたことから実験の成立条件を満たさなかったため、再現性の確認を目的として下記の用量 (フリー体として) で本試験の 2 回目を実施した。

本試験 2 回目：

S9 mix 非存在下：

0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 および 25  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  (TA100, TA1535, TA98 および TA1537)

いずれの試験においても、S9 mix の有無にかかわらず、すべての試験菌株において、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。

当該試験の陰性 (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・マレイン酸塩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・マレイン酸塩

#### 6.1.2 ロット番号

KS14001

#### 6.1.3 純度

99.7%

#### 6.1.4 換算係数（フリー体）

1.4618

#### 6.1.5 性状

白色の粉末

#### 6.1.6 保存条件

冷蔵（実測値：3.4～6.5℃，許容範囲：1～10℃），遮光，気密（窒素封入）

#### 6.1.7 保管場所

被験物質保管場所（55）および（59）

#### 6.1.8 提供者

国立大学法人岐阜大学

#### 6.1.9 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・マレイン酸塩の特性試験および保存安定性試験」（試験番号：P140711，株式会社L S I メディエンス熊本研究所）で実施した同一ロットの分析結果を入手し，実験期間中の安定性を確認した（Appendix 1 および Appendix 2）。

#### 6.1.10 取扱上の注意

保護具（ゴム手袋，眼鏡およびマスク）着用

#### 6.1.11 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

生理食塩液（生食と略す）

#### 6.2.1.2 製造元

株式会社大塚製薬工場

#### 6.2.1.3 ロット番号

3H71N

#### 6.2.1.4 陰性対照物質の選択理由

試験施設で実施した「サル血漿中及び脳脊髄液中の P092 濃度測定試験（マレイン酸塩静脈内投与試験）」（試験番号：B130598）において，本被験物質が 50 mg/mL で生食に溶解することが確認された．よって，本被験物質の媒体（陰性対照物質）には生食を選択した．

## 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 <sup>†</sup>	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 <sub>3</sub> )	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.	

<sup>†</sup>：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、適用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 16 mL に 1.4 mL のジメチルスルホキシド (DMSO と略す、関東化学株式会社、ロット番号 211U1463) 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

-80°C 以下 (実測値 : -85.4~-82.6°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 $uvrA$	2014 年 10 月 17 日 (141017)	2015 年 10 月 16 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 <sup>(1)</sup>	紫外線感受性 <sup>(2)</sup>	膜変異 <sup>(3)</sup>	薬剤耐性 <sup>(4)</sup>
TA100	$his^-$ (塩基対置換)	$\Delta uvrB$	$rfa$	+ (pKM101)
TA1535	$his^-$ (塩基対置換)	$\Delta uvrB$	$rfa$	-
TA98	$his^-$ (フレームシフト)	$\Delta uvrB$	$rfa$	+ (pKM101)
TA1537	$his^-$ (フレームシフト)	$\Delta uvrB$	$rfa$	-
WP2 $uvrA$	$trp^-$ (塩基対置換)	$\Delta uvrA$	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)  $\Delta uvrA$  および  $\Delta uvrB$  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 2014 年 10 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 $1 \times 10^9$ /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	3.02	4.42	6.56	3.44	2.24
	本試験 1 回目	2.73	4.08	5.87	2.96	1.89
	本試験 2 回目	3.02	4.42	—	3.36	1.94

### 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 941971）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 2299369）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 512C5610）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<sup>†</sup>・ヒスチジン<sup>†</sup>混合水溶液

大腸菌： 0.5 mmol/L トリプトファン<sup>†</sup>水溶液

- †: D-ビオチン (和光純薬工業株式会社, ロット番号 STE2866)  
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

ANI420HD

##### 6.4.3.4 製造日

2014年8月21日製造

#### 6.5 S9 mix

##### 6.5.1 S9

###### 6.5.1.1 名称

S9

###### 6.5.1.2 製造元

キッコーマンバイオケミファ株式会社

###### 6.5.1.3 ロット番号

RAA201410A

###### 6.5.1.4 製造日

2014年10月3日製造

###### 6.5.1.5 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 196-254 g)の肝臓より調製された。

###### 6.5.1.6 蛋白含量

23.37 mg/mL

## 6.5.1.7 保存条件

-80°C 以下（実測値：-85.4~-82.6°C，許容範囲：-60°C 以下）

## 6.5.1.8 使用期限

2015 年 4 月 2 日（製造日から 6 ヶ月間）

## 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

999401

## 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

被験物質の秤量に際しては、フリー体換算を実施した（換算係数：1.4618）。

- (1) 用量設定試験では、731 mg の被験物質を秤量して適量の生食を加え、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（フリー体として）とした。この溶液の一部を生食で段階希釈して 15, 5, 1.5, 0.5, 0.15, 0.05, 0.015 および 0.005



mg/mL 溶液（フリー体として）を調製した。

- (2) 本試験では、183 mg の被験物質を秤量して適量の生食を加え、振とう攪拌および超音波処理により溶解させた後に 25 mL とし、5 mg/mL 溶液（フリー体として）とした。この溶液の一部を生食で段階希釈して 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156, 0.00781 および 0.00391 mg/mL 溶液（フリー体として）を調製した。なお、本試験 1 回目では 5 mg/mL 溶液、本試験 2 回目では 5, 1, 0.5 mg/mL 溶液は実験に使用しなかった。
- (3) 被験物質溶液は調製後速やかに使用した。
- (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、紫外線をカットした蛍光灯下（黄色灯下を含む）で行った。

## 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、2014 年 6 月 25 日に調製した保存液を用時融解して試験に使用した。

- (1)  $\text{NaN}_3$  は注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K2L79）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 508H1949）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

-80°C 以下（実測値：-85.4~-82.4°C，許容範囲：-60°C 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	2014 年 6 月 25 日	2015 年 6 月 24 日
$\text{NaN}_3$ 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, WP2 <i>uvrA</i>	0.5, 1.5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500, 5000

†: フリー体として

### 6.7.1.2 本試験

用量設定試験の結果, S9 mix 非存在下では, TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 15 μg/プレート以上, WP2*uvrA* の 50 μg/プレート以上で, S9 mix 存在下ではすべての試験菌株の 50 μg/プレート以上で生育阻害が認められた。また, 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認められる用量を最高用量として, 下記の用量を設定した。

#### 本試験 1 回目

試験菌株	用量 (μg/プレート) †	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
TA100, TA1535, TA98 TA1537	0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25	1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100
WP2 <i>uvrA</i>	1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100	

†: フリー体として

また, S9 mix 非存在下の TA100, TA1535, TA98 および TA1537 では用量設定試験において強い生育阻害が認められたため, 下記の用量を設定して本試験の 2 回目を実施した。

#### 本試験 2 回目

試験菌株	用量 (μg/プレート) †
	S9 mix 非存在下
TA100, TA1535, TA98 TA1537	0.391, 0.781, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25

†: フリー体として

## 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 <sub>3</sub>	0.5	2-AA	2
TA98	AF-2	0.1	2-AA	0.5
TA1537	9-AA	80	2-AA	2
WP2 <i>uvrA</i>	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 復帰突然変異試験

### 6.8.1 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]。

### 6.8.2 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 リン酸ナトリウム緩衝液<sup>†</sup>（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プアガーを 2 mL 加え、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。
- (6) 重層したトップアガーが凝固した後、37°C で 48 時間培養した。

†： リン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）  
リン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）

### 6.8.3 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。

### 6.8.4 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。

#### 6.8.5 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

#### 6.8.6 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（コロニー計測システム，家田貿易株式会社）。

#### 6.8.7 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 にトップアガー 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) 重層したトップ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。

#### 6.8.8 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) 生育障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。

#### 6.8.9 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。

#### 6.8.10 再現性の確認

試験結果の再現性は用量設定試験および本試験 1 回目で確認した。なお、TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の S9 mix 非存在下では用量設定試験において強い生育阻害が認められ、生育阻害の認められない用量が 4 用量以上得られなかったため、2 回の本試験で再現性を確認した。

### 7 結果

#### 7.1 用量設定試験

用量設定試験の結果を Table 1 に示す。S9 mix の有無にかかわらず、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 非存在下では、TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 15  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、WP2*uvrA* の 50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、S9 mix 存在下ではすべての試験菌株の 50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で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  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  において、プレート上に沈殿が認められた。

#### 7.2 本試験 1 回目

本試験 1 回目の結果を Table 2 に示す。S9 mix の有無にかかわらず、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 非存在下では、TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 12.5  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上、WP2*uvrA* の 25  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で、S9 mix 存在下ではすべての試験菌株の 50  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で生育阻害が認められた。なお、S9 mix の有無にかかわらず、プレート上に沈殿は認められなかった。

#### 7.3 本試験 2 回目

本試験 2 回目の結果を Table 3 に示す。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。TA100, TA1535, TA98 および TA1537 の 12.5  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上で生育阻害が認められた。なお、プレート上に沈殿は認められなかった。

#### 7.4 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

用量設定試験および 2 回の本試験を 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  あるいは菌の生育阻害が認め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あるいは 2 回の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 3）。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（S9 mix 非存在下の WP2uvrA および S9 mix 存在下のすべての試験菌株）および2回の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、本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から、P092・マレイン酸塩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*<sup>+</sup> 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

Table 1 P092・マレイン酸塩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	125 124 ( 125 )	11 8 ( 10 )	30 35 ( 33 )	20 16 ( 18 )	18 15 ( 17 )
	0.5	103 111 ( 107 )	11 15 ( 13 )	40 32 ( 36 )	17 21 ( 19 )	15 20 ( 18 )
	1.5	106 117 ( 112 )	7 12 ( 10 )	35 33 ( 34 )	22 18 ( 20 )	21 18 ( 20 )
	5	117 116 ( 117 )	12 9 ( 11 )	32 33 ( 33 )	20 13 ( 17 )	15 18 ( 17 )
	15	97 * 95 * ( 96 )	8 * 4 * ( 6 )	30 26 ( 28 )	15 * 12 * ( 14 )	11 * 12 * ( 12 )
	50	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	31 * 25 * ( 28 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )
	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	113 144 ( 129 )	7 12 ( 10 )	30 38 ( 34 )	20 27 ( 24 )	21 18 ( 20 )
	0.5	141 127 ( 134 )	9 11 ( 10 )	34 35 ( 35 )	25 23 ( 24 )	25 18 ( 22 )
	1.5	149 124 ( 137 )	11 13 ( 12 )	38 33 ( 36 )	21 25 ( 23 )	20 20 ( 20 )
	5	125 145 ( 135 )	13 11 ( 12 )	33 31 ( 32 )	27 25 ( 26 )	17 20 ( 19 )
	15	137 138 ( 138 )	13 11 ( 12 )	35 33 ( 34 )	22 27 ( 25 )	18 15 ( 17 )
	50	89 * 104 * ( 97 )	2 * 7 * ( 5 )	26 * 18 * ( 22 )	16 * 20 * ( 18 )	6 * 13 * ( 10 )
	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 <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
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
		1023 1036 ( 1030 )	253 258 ( 256 )	1098 1130 ( 1114 )	263 283 ( 273 )	161 190 ( 176 )

備考： \*：菌の生育阻害が認められた。  
 †：沈殿物が認められた。  
 #：フリー体として  
 陰性対照：生理食塩液 (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, NaN<sub>3</sub>：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

Table 2 P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験結果表（本試験1回目）

代謝活性化系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート) #	復帰突然変異数 (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 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照	125 121 ( 123 )	12 9 ( 11 )	25 33 ( 29 )	18 23 ( 21 )	11 17 ( 14 )	
	0.391	121 130 ( 126 )	11 15 ( 13 )	/	21 21 ( 21 )	12 15 ( 14 )	
	0.781	111 107 ( 109 )	13 11 ( 12 )		18 16 ( 17 )	15 18 ( 17 )	
	1.56	109 110 ( 110 )	15 7 ( 11 )	32 27 ( 30 )	18 17 ( 18 )	16 15 ( 16 )	
	3.13	114 107 ( 111 )	8 8 ( 8 )	33 28 ( 31 )	18 13 ( 16 )	17 13 ( 15 )	
	6.25	112 111 ( 112 )	8 9 ( 9 )	31 27 ( 29 )	16 16 ( 16 )	18 16 ( 17 )	
	12.5	100 * 82 * ( 91 )	3 * 6 * ( 5 )	34 25 ( 30 )	13 * 11 * ( 12 )	9 * 8 * ( 9 )	
	25	68 * 75 * ( 72 )	1 * 7 * ( 4 )	23 * 25 * ( 24 )	12 * 16 * ( 14 )	9 * 3 * ( 6 )	
	50	/	/	16 * 21 * ( 19 )	/	/	
	100			22 * 21 * ( 22 )			
S9 mix (+)	陰性対照	111 126 ( 119 )	12 16 ( 14 )	38 35 ( 37 )	22 25 ( 24 )	20 23 ( 22 )	
	1.56	117 125 ( 121 )	8 20 ( 14 )	37 38 ( 38 )	30 25 ( 28 )	22 17 ( 20 )	
	3.13	125 124 ( 125 )	16 12 ( 14 )	31 33 ( 32 )	22 27 ( 25 )	23 20 ( 22 )	
	6.25	119 141 ( 130 )	17 15 ( 16 )	40 37 ( 39 )	26 28 ( 27 )	20 22 ( 21 )	
	12.5	141 142 ( 142 )	13 9 ( 11 )	39 37 ( 38 )	31 30 ( 31 )	21 18 ( 20 )	
	25	138 142 ( 140 )	16 15 ( 16 )	37 33 ( 35 )	28 27 ( 28 )	21 20 ( 21 )	
	50	88 * 92 * ( 90 )	2 * 7 * ( 5 )	26 * 22 * ( 24 )	26 * 21 * ( 24 )	11 * 12 * ( 12 )	
	100	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	21 * 12 * ( 17 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	
	陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	1	2	10	0.5	2	
	(コロニー数/プレート)	857 894 ( 876 )	271 245 ( 258 )	894 978 ( 936 )	238 225 ( 232 )	145 162 ( 154 )	

備考： \*：菌の生育阻害が認められた。  
#：フリー体として  
陰性対照：生理食塩液 (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，NaN<sub>3</sub>：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



Table 3 P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験結果表（本試験2回目）

代謝活性化系の有無	被験物質用量 ( $\mu\text{g}$ /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	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	106	11	18	11
		105 ( 106 )	9 ( 10 )	17 ( 18 )	15 ( 13 )
	0.391	97	6	20	15
		124 ( 111 )	8 ( 7 )	16 ( 18 )	21 ( 18 )
	0.781	117	7	20	17
		109 ( 113 )	12 ( 10 )	21 ( 21 )	16 ( 17 )
	1.56	96	11	13	11
		120 ( 108 )	9 ( 10 )	18 ( 16 )	17 ( 14 )
	3.13	120	8	17	16
		109 ( 115 )	7 ( 8 )	17 ( 17 )	9 ( 13 )
	6.25	88	8	22	12
		112 ( 100 )	8 ( 8 )	21 ( 22 )	13 ( 13 )
	12.5	88 *	2 *	11 *	13 *
		73 * ( 81 )	2 * ( 2 )	22 * ( 17 )	4 * ( 9 )
25	76 *	6 *	18 *	13 *	
	48 * ( 62 )	6 * ( 6 )	16 * ( 17 )	13 * ( 13 )	
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	$\text{NaN}_3$	AF-2	9-AA
	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	0.01	0.5	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	562 550 ( 556 )	490 489 ( 490 )	633 561 ( 597 )	457 373 ( 415 )

備考： \* : 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)

# : フリー体として

陰性対照 : 生理食塩液

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド,  $\text{NaN}_3$  : 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

## Appendix 1 分析証明書 (No. P140711-COA1)

P140711-COA1

## 分析証明書

分析証明書番号 : P140711-COA1  
 試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学  
 試験番号 : P140711  
 表題 : P092・マレイン酸塩の特性試験及び保存安定性試験  
 試験施設 : 株式会社L S I メディエンス 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・マレイン酸塩  
 ロット番号 : KS14001  
 保管条件 : 冷蔵 (1~10℃), 遮光, 気密, 窒素封入  
 保管場所 : 被験物質保管室 J009 内の薬用冷蔵庫  
 分析日 : 2014 年 12 月 24 日及び 2014 年 12 月 25 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 <sup>*1</sup>	95.0%以上 (HPLC 面積%)	99.7%	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: 2015 年 / 月 / 日

古賀 善幸

古賀 善幸  
 株式会社L S I メディエンス  
 創薬支援事業本部 試験研究センター  
 安全性研究部

Appendix 1 (続き)

P140711-COA1

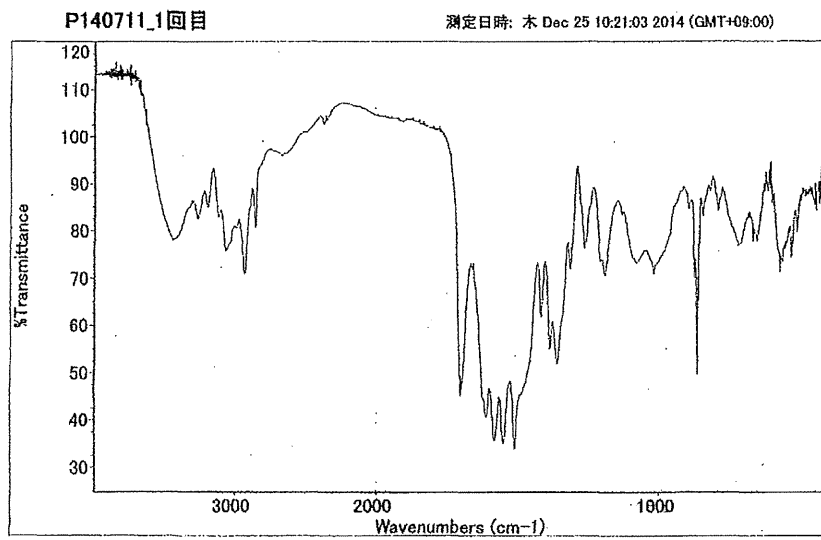


図 1 IR スペクトル

## Appendix 2 分析証明書 (No. P140711-COA2)

P140711-COA2

## 分析証明書

分析証明書番号 : P140711-COA2  
 試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学  
 試験番号 : P140711  
 表題 : P092・マレイン酸塩の特性試験及び保存安定性試験  
 試験施設 : 株式会社L S Iメディエンス 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・マレイン酸塩  
 ロット番号 : KS14001  
 保管条件 : 冷蔵 (1~10°C), 遮光, 気密, 窒素封入  
 保管場所 : 被験物質保管室 J009 内の薬用冷蔵庫  
 分析日 : 2015年3月5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 (視察結果を報告する)	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 <sup>*1</sup>	95.0%以上 (HPLC 面積%)	99.7%	適
<備考>			
*1 繰り返し3回測定の平均値を結果に記載した。			

試験責任者: 2015年3月9日

古賀 善幸

古賀 善幸  
 株式会社L S Iメディエンス  
 創薬支援事業本部 試験研究センター  
 安全性研究部