

最終報告書

Twendee 4 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験期間: 2007年6月27日～2007年8月30日

試験委託者: ブロックフィールドメディカル株式会社
〒540-0033 大阪府中央区石町1丁目1番11天満橋
ニュースカイハイツ 504号

試験施設: 株式会社イナリサーチ
〒399-4501 長野県伊那市西箕輪 2148 番地 188

試験責任者: 2007年8月30日
株式会社イナリサーチ
試験研究センター 試験管理部

鈴木洋

鈴木洋

本件は正本と相違ありません。

2007年8月30日

株式会社イナリサーチ

試験責任者 鈴木洋

目次

	ページ
1. 要約	3
2. 試験目的	3
3. 試験分担責任者	3
4. 試験期間	3
5. 遵守する基準及び準拠するガイドライン	3
6. 材料及び方法	3
6.1 被験物質	3
6.2 対照物質	4
6.2.1 陰性対照物質 (媒体)	4
6.2.2 陽性対照物質	4
6.3 添加液	4
6.3.1 被験物質液の調製	4
6.3.2 陽性対照物質液の調製	5
6.3.3 被験物質液の分析 (濃度確認)	5
6.4 使用細胞種及び培養条件	5
6.4.1 使用細胞種	5
6.4.2 培養条件	6
6.5 試験方法	6
6.5.1 細胞培養液	6
6.5.2 薬物代謝活性化酵素系 (S9 mix)	6
6.5.3 濃度設定試験	7
6.5.4 染色体異常試験	7
6.5.5 添加量の設定	8
6.5.6 染色体標本の作製	9
6.5.7 染色体標本の観察	9
6.5.8 結果の表示及び判定	9
7. 試験計画書からの逸脱及び予見することができなかった事態	10
8. 試験関係資料の保存	10
9. 成績	10
9.1 濃度設定試験	10
9.2 染色体異常試験	10
10. 考察及び結論	11
11. 文献	11

添付資料

総括表: Table 1~3

個別表: Appendix 1~3

1. 要約

Twendee 4 のほ乳類培養細胞への染色体異常誘発性について評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU 細胞) を用いて試験を行った。

Twendee 4 の用量は、薬物代謝活性化酵素系 (S9 mix) 非存在下 (以下、直接法と略) 6 時間処理では 62.5, 125, 250, 500, 750 及び 1000 µg/mL の 6 用量, 直接法 24 時間処理では 31.3, 62.5, 125, 250, 500 及び 750 µg/mL の 6 用量, S9 mix 存在下 (以下、代謝活性化法と略) 6 時間処理では、62.5, 125, 250, 500, 1000 及び 2000 µg/mL の 6 用量で実施した。

その結果、いずれの処理法でも、染色体構造異常及び倍数性異常出現率はいずれも 5% 未満であり、陰性と判定された。

以上の結果から、本試験条件下では、Twendee 4 は CHL/IU 細胞に対して染色体異常誘発性はないと判定された。

2. 試験目的

Twendee 4 の染色体異常誘発性についてほ乳類培養細胞を用いて検討した。

3. 試験分担責任者

被験物質液調製: 飯野好美
染色体異常試験: 今村匡志

4. 試験期間

試験開始日: 2007年 6月 27日
濃度設定試験:
細胞播種日: 2007年 7月 2日
被験物質液添加日: 2007年 7月 5日
シャーレの固定, 染色日: 2007年 7月 6日
染色体異常試験 (直接法及び代謝活性化法):
細胞播種日: 2007年 7月 9日
被験物質液添加日: 2007年 7月 12日
標本作製日: 2007年 7月 13日
標本観察期間: 2007年 7月 23日～7月 30日
試験終了日: 2007年 8月 30日

5. 遵守する基準及び準拠するガイドライン

基準: 「申請資料の信頼性の基準」(薬事法施行規則第 43 条)
ガイドライン: 「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」(1999 年 11 月 1 日付医薬審第 1604 号)

6. 材料及び方法

6.1 被験物質

名称, 略称又はコード番号: Twendee 4

陰性: 異常細胞の出現頻度が 5%未満である。

疑陽性: 異常細胞の出現頻度が 5%以上 10%未満である。

陽性: 異常細胞の出現頻度が 10%以上である。

各処理群についての判定は、個々の用量の判定後、用量依存性などを考慮して判定した。当該処理群を陽性と判定する場合、いずれかの被験物質処理群において異常細胞の出現率が 10%以上であり、用量依存的な増加傾向が認められる場合とした。

7. 試験計画書からの逸脱及び予見することができなかった事態

試験実施期間中、該当する事例はなかった。

8. 試験関係資料の保存

保存対象:	試験計画書 (試験計画変更書含む)、最終報告書草案、最終報告書、生データ、細胞密度測定用標本、染色体標本及び試験に関連する文書
保存期間:	最終報告書提出後 5 年間。その後の処置については、所定の保存期間終了時まで試験委託者と協議する。
保存場所:	株式会社イナリサーチ 大萱分室 (長野県伊那市西箕輪 8047 番地) における所定保管庫

9. 成績

9.1 濃度設定試験

(Table 1)

直接法 6 及び 24 時間処理では 625 µg/mL 以上、代謝活性化法では 625~2500 µg/mL の用量で細胞増殖率は 50%以下であった。また、被験物質の析出がいずれの処理法とも 2500 及び 5000 µg/mL の添加時にみられた。

以上の結果から、染色体異常試験では直接法及び代謝活性化法とも、6.5.5.2項に示す用量を設定した。

9.2 染色体異常試験

(Table 2, Appendix 1~3)

直接法 6 時間処理では、1000 µg/mL、代謝活性化法では 1000 及び 2000 µg/mL で添加時に被験物質の析出がみられたが、いずれの処理法でもすべての用量で観察可能であった。直接法 6 時間処理では、構造異常出現率 (-gap) は 3.0%以下、倍数性異常出現率は 1.5%以下といずれも 5%未満であり、陰性であった。直接法 24 時間処理では、構造異常出現率 (-gap) は 1.5%以下、倍数性異常出現率は 2.0%以下で陰性であった。代謝活性化法では、構造異常出現率 (-gap) は 2.5%以下、倍数性異常出現率は 1.5%以下で陰性であった。

一方、各処理で用いた陽性対照物質 (MMC, B[a]P) の判定において、構造異常出現率はいずれも 10%以上であり、陽性と判定された。

10. 考察及び結論

陰性対照群における構造異常 (-gap) 及び倍数性異常細胞の当試験施設の背景値 (Table 3) と比較を行った。その結果、当試験の陰性対照群の-gap (%) 及び倍数性異常 (%) はいずれも背景値の $\pm 3S.D.$ の範囲内であった。被験物質群では、いずれも3用量以上の染色体分析が可能であった。直接法6時間処理では750及び1000 $\mu\text{g/mL}$ 、直接法24時間処理では500及び750 $\mu\text{g/mL}$ 、代謝活性化法では2000 $\mu\text{g/mL}$ で50%以下の細胞増殖率であった。また、陽性対照群の染色体異常出現率は10%以上であった。したがって、本試験は成立し、かつ、成績は評価できるものと判断された。

観察の結果、構造異常及び倍数性異常の出現率に関して、すべての処理群で構造異常出現率(-gap)は3.0%以下、倍数性異常出現率は2.0%以下と5%未満であり、直接法及び代謝活性化法6時間処理並びに直接法24時間処理とも、陰性と判定された。Twendee 4はL-cysteineを含有している。L-cysteineのCHL細胞を用いる染色体異常試験で直接法24及び48時間処理の2000 $\mu\text{g/mL}$ で10-20%の構造異常の誘発が見られている²⁾。今回の試験では代謝活性化法6時間処理2000 $\mu\text{g/mL}$ で2.5%と陰性の結果であった。処理時間などを考慮すれば代謝活性化法の陰性結果は妥当な結果と考えられた。

以上の結果から、本試験条件下では、CHL/IU細胞に対してTwendee 4に染色体異常誘発性はないと判定された。

11. 文献

- 1) 三宅幸雄, 森田 健, 若田明裕, 朝波省吾, 島田弘康. 日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 第3分科会 遺伝毒性ワーキンググループ編集. : 医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A. 東京: 株式会社サイエンティスト社; 2000.
- 2) 祖父尼俊雄監修: 染色体異常試験データ集 改訂1998年版 東京: 株式会社 エル・アイ・シー, 1999.