

本件は正本と相違ありません。
2007年10月24日
株式会社イナリサーチ
試験責任者 鈴木洋

試験番号: BV07352

最終報告書

Twendee 4α の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験期間: 2007年9月4日～2007年10月24日

試験委託者: ブル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10月24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

目次

	ページ
1. 要約	4
2. 試験目的	4
3. 試験分担責任者	4
4. 試験期間	4
5. 遵守する基準及び準拠するガイドライン	5
6. 材料及び方法	5
6.1 被験物質	5
6.2 対照物質	5
6.2.1 陰性対照物質 (媒体).....	5
6.2.2 陽性対照物質	5
6.3 添加液	6
6.3.1 被験物質液の調製	6
6.3.2 被験物質液の分析 (濃度確認).....	7
6.4 指標菌株	7
6.5 培地	7
6.5.1 指標菌株の前培養培地 (液体栄養培地).....	7
6.5.2 最少グルコース寒天平板培地	8
6.5.3 重層用培地	8
6.6 薬物代謝活性化酵素系 (S9 mix)	8
6.7 試験方法	9
6.7.1 前培養	9
6.7.2 復帰突然変異試験	9
6.7.3 無菌試験	9
6.8 添加量の設定	9
6.8.1 濃度設定試験	9
6.8.2 本試験	10
6.8.3 確認試験	10
6.9 観察及び測定方法	10
6.10 統計解析	11
6.11 結果の表示及び判定	11
6.11.1 結果の表示	11
6.11.2 結果の判定	11
6.12 試験成立の基準	11
6.13 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.....	11
6.14 試験関係資料の保存	11
7. 成績	12
7.1 濃度設定試験	12
7.2 本試験	12

7.3	確認試験	12
7.4	無菌試験	12
8.	考察及び結論	13
9.	文献	13

添付資料

総括表: Table 1~4

1. 要約

この試験は、ブルックフィールドメディカル株式会社からの委託により実施された。Twendee 4α の遺伝子突然変異誘発性について細菌を用いて検討した。

塩基対置換型の遺伝子突然変異を検出する *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 及び *Escherichia coli* WP2uvrA の 3 菌株と、フレームシフト型の遺伝子突然変異を検出する *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA1537 の 2 菌株を使用し、プレインキュベーション法により試験を実施した。濃度設定試験及び本試験とも代謝活性化系存在下 (以下、代謝活性化法と略) 及び非存在下 (以下、直接法と略) の条件にて実施した。

Twendee 4α の用量は、濃度設定試験では、直接法及び代謝活性化法とも公比 3 で 7~5000 µg/plate の 7 用量, 本試験及び確認試験では、直接法及び代謝活性化法とも公比 2 で 156.3 ~5000 µg/plate の 6 用量で実施した。

濃度設定試験では、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株にも 2 倍以上の増加は認められなかった。本試験においては、直接法の TA1537, 代謝活性化法の TA1535 及び WP2uvrA で陰性対照群復帰変異コロニー数の用量依存性をほとんど伴わない 2 倍以上の増加がみられたが、その他の菌株では 2 倍以上の増加は認められなかった。再現性が得られなかった菌株について確認試験を実施した結果、いずれも 2 倍以上の増加は認められなかった。

以上の結果から、本実験条件下では、用いた 5 菌株に対して Twendee 4α に遺伝子突然変異誘発作用はないものと判定された。

2. 試験目的

Twendee 4α の遺伝子突然変異誘発性について細菌を用いて検討した。

3. 試験分担責任者

被験物質液調製: 飯野好美
復帰突然変異試験: 今村匡志

4. 試験期間

試験開始日: 2007年 9月 4日

濃度設定試験:

前培養: 2007年 9月 4日

被験物質液添加日: 2007年 9月 5日

プレート観察日: 2007年 9月 7日

本試験:

前培養: 2007年 9月 18日

被験物質液添加日: 2007年 9月 19日

プレート観察日: 2007年 9月 21日

確認試験:

前培養: 2007年 10月 2日

被験物質液添加日: 2007年 10月 3日

プレート観察日: 2007年 10月 5日

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

7. 成績

7.1 濃度設定試験

(Table 1)

直接法及び代謝活性化法とも、すべての菌株で陰性対照群復帰変異コロニー数の 2 倍以上の増加はみられなかった。また、いずれの菌株においても被験物質の析出及び菌の生育阻害はみられなかった。

陽性対照群では、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株においても陽性反応を示した。濃度設定試験の結果から、本試験を 6.8.2 項に記載した用量で実施した。

7.2 本試験

(Table 2)

直接法、代謝活性化法とも、いずれの菌株にも被験物質の析出及び菌の生育阻害はみられなかった。直接法では、TA1537 の 312.5 及び 2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で陰性対照群復帰変異コロニー数の 2 倍以上の増加がみられたが、用量依存性のない変動であった。その他 4 菌株では 2 倍以上の増加はみられなかった。代謝活性化法では、TA1535 の 156.3, 312.5, 1250, 2500 及び 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で陰性対照群復帰変異コロニー数の 2 倍以上の増加がみられたが、用量依存性のない変動であった。また、WP2*uvrA* の 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で 2 倍以上の増加がみられた。その他 3 菌株では、2 倍以上の増加はみられなかった。

陽性対照群では、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株においても陽性反応を示した。

以上のように、直接法の TA1537 並びに代謝活性化法の TA1535 及び WP2*uvrA* について濃度設定試験と本試験の結果に再現性が認められなかったため、確認試験を 6.8.3 項に記載した用量で実施した。

7.3 確認試験

(Table 3)

直接法の TA1537 並びに代謝活性化法の TA1535 及び WP2*uvrA* のいずれにおいても、陰性対照群復帰変異コロニー数の 2 倍以上の増加はみられなかった。また、いずれの菌株においても被験物質の析出及び菌の生育阻害はみられなかった。

陽性対照群では、いずれの菌株においても陽性反応を示した。

7.4 無菌試験

濃度設定試験、本試験及び確認試験とも、陰性対照物質溶液、被験物質液、0.1 mol/L ナリソリン酸緩衝液 (pH 7.4) 及び S9mix のいずれにおいても、コロニーの生育は認められなかった。

8. 考察及び結論

濃度設定試験及び本試験とも、陰性対照群の復帰変異コロニー数は、当試験実施施設の背景値(2007年5月～2007年8月, Table 4)の平均値 \pm 3S.D.の範囲内であった。被験物質群の評価できる用量は4用量以上であった。濃度設定試験, 本試験及び確認試験とも陽性対照群では、すべての菌株で陽性反応が認められた。また、無菌試験では雑菌の混入は認められなかった。以上の結果から、試験は成立し、かつ、成績は評価できるものと考えられた。

本試験において、直接法の TA1537 及び代謝活性化法の TA1535 で用量依存性のない陰性対照群復帰変異コロニー数の2倍以上の増加、代謝活性化法の WP2*uvrA* の最高用量で2倍以上の増加がみられたが、濃度設定試験ではいずれも陰性であり再現性が得られなかったため、確認試験を実施した。その結果、いずれの菌株も2倍以上の増加は認められなかった。本試験において用量依存性をほとんど伴わない2倍以上の増加がみられたのは、本試験時の陰性対照群の復帰変異コロニー数がやや低値(直接法 TA1537: 6, 代謝活性化法 TA1535: 5, 代謝活性化法 WP2*uvrA*: 11)であったためと考えられた。

以上の結果から、本実験条件下では、用いた5菌株に対して Twendee 4 α に遺伝子突然変異誘発作用はないものと判定された。

9. 文献

- 1) 株式会社イナリサーチ 社内資料。
- 2) 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.