

試験番号：AN210063

最 終 報 告 書

試験番号：AN210063

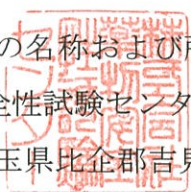
表 題：抗菌・抗ウイルス剤の細菌を用いる復帰突然変異試験

2021年09月06日

試験施設の名称および所在地

株式会社 薬物安全性試験センター・吉見研究所

〒355-0166 埼玉県比企郡吉見町黒岩 25-1



1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	4
2.1	表題	4
2.2	試験番号	4
2.3	試験目的	4
2.4	参考としたガイドライン	4
2.5	試験委託者の名称および所在地	4
2.6	試験施設の名称および所在地	4
2.7	試験責任者の氏名および所属	4
2.8	試験従事者	4
2.9	試験日程	5
2.10	予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのあ る事態および試験計画書に従わなかつたこと	5
2.11	資料の保存	5
2.12	試験責任者の署名	5
3.	要約	6
4.	被験物質および対照物質	7
4.1	被験物質	7
4.2	陰性対照物質	7
4.3	陽性対照物質	7
4.4	陽性対照溶液の調製	8
5.	指標菌株	8
5.1	試験菌株	8
5.2	菌株の識別	9
5.3	指標菌株の選択理由	9
5.4	菌株の保存および解凍	9
5.5	菌株の特性検査	9
5.6	前培養	10
6.	培地および調製試薬	10
6.1	最少グルコース寒天平板培地	10
6.2	ニュートリエントブロス No.2 培養液	11
6.3	トップアガー	11
6.4	0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)	12
6.5	S9 mix の調製方法	12
7.	試験方法	13
7.1	溶媒	13

7.2	溶媒の選択理由	14
7.3	被験液の調製方法	14
7.4	プレート数.....	14
7.5	プレートの識別	14
7.6	試験操作 (プレインキュベーション法).....	14
7.7	試験系の成立条件	15
7.8	判定基準	15
8.	試験結果.....	15
8.1	用量設定試験の観察結果および本試験用量の設定.....	15
8.2	本試験の観察結果	16
9.	考察	16
10.	参考文献.....	16

表

別表 1	試験結果表 (用量設定試験).....	18
別表 2	試験結果表 (本試験).....	19

図

別紙 1	図 1 TA100 における用量反応曲線 (本試験)	20
	図 2 TA1535 における用量反応曲線 (本試験)	20
別紙 2	図 3 WP2 <i>uvrA</i> における用量反応曲線 (本試験).....	21
	図 4 TA98 における用量反応曲線 (本試験)	21
別紙 3	図 5 TA1537 における用量反応曲線 (本試験)	22

背景データ	23
-------------	----

2. 試験実施概要

2.1 表題

抗菌・抗ウイルス剤の細菌を用いる復帰突然変異試験

2.2 試験番号

AN210063

2.3 試験目的

抗菌・抗ウイルス剤の安全性評価の一環として、細菌を用いて遺伝子突然変異誘発能の有無を明らかにすることを目的とした。

2.4 参考としたガイドライン

- ・「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」(薬食審査発0920第2号：平成24年9月20日付厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知)
- ・「労働安全衛生法第57条の4第1項の規定に基づき厚生労働大臣の定める基準」(厚生労働省告示第172号：令和2年4月6日)

2.5 試験委託者の名称および所在地

名称：株式会社姫路鍍金工業所
所在地：兵庫県姫路市北条北河原 978 (〒670-0947)
委託責任者：中筋 隆

2.6 試験施設の名称および所在地

名称：株式会社薬物安全性試験センター・吉見研究所
所在地：埼玉県比企郡吉見町黒岩 25-1 (〒355-0166)

2.7 試験責任者の氏名および所属

株式会社薬物安全性試験センター 第二研究部
小熊 義宏

2.8 試験従事者

用量設定試験

使用菌株の前培養 : 齋藤 はるか
被験液の調製 : 小熊 義宏
試験操作 : 齋藤 はるか, 金子 千枝美, 諏訪 貴美子, 上原 千恵子
コロニーの計数 : 小熊 義宏

本試験

使用菌株の前培養 : 齋藤 はるか
被験液の調製 : 小熊 義宏
試験操作 : 齋藤 はるか, 金子 千枝美, 諏訪 貴美子, 上原 千恵子
コロニーの計数 : 小熊 義宏

2.9 試験日程

試験開始日 : 2021年08月11日
用量設定試験開始日 : 2021年08月12日
用量設定試験終了日 : 2021年08月16日
本試験開始日 : 2021年08月19日
本試験終了日 : 2021年08月23日
試験終了日 : 2021年09月06日

2.10 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事
態および試験計画書に従わなかつたこと

本試験において予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある
事態および試験計画書に従わなかつたことはなかつた。

2.11 資料の保存

試験計画書, 記録文書, 生データおよび報告書類を資料として, 株式会社 薬物安全
性試験センターの資料保存施設に保存する。なお, その期間は最終報告書提出後3年
間とする。期間終了後の保存については, 試験委託者と株式会社 薬物安全性試験セン
ター間で協議し, その処置を決定する。

2.12 試験責任者の署名

小熊 義宏 2021年 9月 6日
株式会社 薬物安全性試験センター

3. 要約

抗菌・抗ウイルス剤の遺伝子突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100, TA1535, TA98, TA1537 および大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合および代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒には注射用水を用いた。

本試験用量を設定するため、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量として以下公比4で4段階希釈した5000, 1250, 313, 78.1, 19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の計5用量で用量設定試験を実施した。その結果より、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても生育阻害が認められず、被験物質による沈殿も認められなかった。このため本試験は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株についても5000, 2500, 1250, 625, 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の計5用量で実施した。

用量設定試験および本試験ともに本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下において抗菌・抗ウイルス剤は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

4. 被験物質および対照物質

4.1 被験物質

名称	抗菌・抗ウイルス剤
入手日	2021年06月05日
入手量	2.000 g (Ames 試験用として分取, 風袋量込: 10.994 g)
純度	0.88 ppm (有姿で試験実施)
ロット番号	製造日: 2021-05-20
常温における性状	無色透明液体 (比重: 1, pH: 7)
溶解性	水: 50 mg/mL で溶解
溶媒中での安定性	水: 発熱, ガスの発生等の反応性なし
保存条件	室温
使用期限	6ヶ月
保存場所	被験物質調製・保存室
残量の取り扱い	実験終了後の残量は試験委託者に返却する。なお, Ames 試験用に分取した残余被験物質は廃棄する。

上記被験物質情報は試験委託者からの情報による。なお, 溶解性および溶媒中での安定性は, ㈱薬物安全性試験センターで実施した溶解性試験の結果による。

4.2 陰性対照物質

被験物質の調製に用いた注射用水を陰性対照物質とした。

4.3 陽性対照物質

以下の変異原性物質を陽性対照物質とした。

表 1 陽性対照物質

陽性対照物質	Lot No.	純度(%)	保存方法
AF-2	LEQ2400	98.90%	室温, 遮光
NaN ₃	HPK7973	100.5%	室温, 遮光
ICR-191	A792301		室温, 遮光
2-AA	SKQ3204	95.7%	室温, 遮光
B[a]P	KCH6617	99.9%	冷蔵, 遮光

AF-2 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
(富士フィルム和光純薬株式会社; CAS No. 3688-53-7, 和光特級)

NaN ₃	Sodium azide (富士フィルム和光純薬株式会社；CAS No. 26628-22-8, 試薬特級)
ICR-191	2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl (Polysciences, Inc.；CAS No. 17070-45-0)
2-AA	2-Aminoanthracene (富士フィルム和光純薬株式会社；CAS No. 613-13-8)
B[a]P	Benzo[a]pyrene (富士フィルム和光純薬株式会社；CAS No. 50-32-8)

保存場所 被験物質調製・保存室

4.4 陽性対照溶液の調製

陽性対照物質はジメチルスルホキシド (以下 DMSO, 富士フィルム和光純薬株式会社, JIS 規格 試薬特級；Lot No. DLR4647) に溶解した。ただし, NaN₃ については注射用水 (株式会社大塚製薬工場, 日本薬局方；Lot No. K0C79) に溶解した。調製した陽性対照溶液は, 約 1 mL ずつ分注後 -20°C 以下で保存し, 調製後 6 ヶ月以内のものを使用した。なお, 試験実施時に解凍して使用した。それぞれの処理用量を表 2 に示した。

表 2 陽性対照物質調製濃度

使用菌株	代謝活性化しない場合		代謝活性化する場合	
	陽性対照物質名	処理用量 (µg/plate)	陽性対照物質名	処理用量 (µg/plate)
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.01	B[a]P	5.0
<i>S. typhimurium</i> TA1535	NaN ₃	0.5	2AA	2.0
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	2AA	10.0
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	0.1	B[a]P	5.0
<i>S. typhimurium</i> TA1537	ICR-191	1.0	B[a]P	5.0

5. 指標菌株

5.1 試験菌株

S. typhimurium TA1535, TA98, TA1537, *E. coli* WP2 *uvrA* は独立行政法人 製品評価技術基盤機構より 2016 年 06 月 15 日に, *S. typhimurium* TA100 は国立研究開発法人 理化学研究所より 2017 年 03 月 03 日に入手した菌株を継代培養した菌株を使用した。

5.2 菌株の識別

菌株の種類毎に、以下に示す色のマーカー等を使用して識別した。

<i>S. typhimurium</i> TA100	青
<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	茶
<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> TA1537	緑

5.3 指標菌株の選択理由

当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる復帰突然変異試験に最も一般的に使用されている。

表 3 菌株の遺伝的特性

菌株	変異遺伝子	付帯突然変異			検出可能な突然変異型
		DNA 修復	膜変異	R 因子	
<i>S. typhimurium</i> TA100	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	塩基対置換
<i>S. typhimurium</i> TA1535	<i>hisG</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	塩基対置換
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	+	—	塩基対置換
<i>S. typhimurium</i> TA98	<i>hisD</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101	フレームシフト
<i>S. typhimurium</i> TA1537	<i>hisC</i>	<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	—	フレームシフト

5.4 菌株の保存および解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して DMSO (富士フィルム和光純薬株式会社, JIS 規格試薬特級; Lot No. ESJ5373) を 0.7 mL の割合で添加した。これを滅菌チューブに 0.3 mL ずつ分注し、ドライアイス-アセトンで急速凍結した後、 -70°C 以下の超低温フリーザ (MDF-C8V1: パナソニックヘルスケア株式会社) で保存した。なお、使用する際は水温下で解凍し、使用後の残液は廃棄した。

5.5 菌株の特性検査

凍結保存菌株を用いて、各菌株のアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異 *rfa* 特性、薬剤耐性因子 R-factor プラスミド、生菌数、陰性対照値、陽性対照値、もどり菌の特性を検査し、それぞれの菌株に特有の性質が保持されていることを確認した。

表 4 菌株の保存および特性検査実施日

菌株	凍結保存日	特性検査実施期間
<i>S. typhimurium</i> TA100	2021年06月23日	2021年06月23日～2021年06月25日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2021年06月23日	2021年06月23日～2021年06月25日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2021年06月23日	2021年06月23日～2021年06月25日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2021年06月23日	2021年06月23日～2021年06月25日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2021年06月23日	2021年06月23日～2021年06月25日

5.6 前培養

- ① 滅菌済みL字型試験管 (容量 48 mL) にニュートリエントブロス No.2 培養液を 10 mL 入れ、これに凍結保存菌株を解凍した菌懸濁液を、*S. typhimurium* TA 株は各 20 μ L、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は 10 μ L 植菌し、振盪恒温槽 (COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型, タイテック株式会社) にセットした。なお、使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- ② プログラム制御により前培養開始まで 4°C 水浴中で放置した後、振盪 (100 回/分) しながら 37°C に加温して 10 時間前培養した。
- ③ 前培養終了時に各菌懸濁液の吸光度をデジタル比色計で OD 値を測定し、生菌数が 1×10^9 個/mL 以上あることを確認して試験に使用した。なお、測定した OD 値からの換算生菌数を表 5 に示した。

表 5 換算生菌数 (個/mL)

菌株	用量設定試験	本試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	2.13×10^9	2.30×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.24×10^9	4.62×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	7.20×10^9	7.10×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	4.82×10^9	4.55×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.20×10^9	3.04×10^9

6. 培地および調製試薬

6.1 最少グルコース寒天平板培地

- ① 名称 : バイタルメディア AMT-S 培地
- 製造元 : 極東製薬工業株式会社
- Lot No. : DZAM6P01

製造日	: 2021年06月25日
購入日	: 2021年08月06日
保存方法	: 室温
② 使用寒天	
名称	: 大洋寒天
製造元	: SSKセールス株式会社
Lot No.	: BM-M5-277

6.2 ニュートリエントブロス No.2 培養液

ニュートリエントブロス No.2 を 2.5 wt% となるよう精製水で溶解し、オートクレーブを用いて滅菌処理 (121°C, 20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存し、1 ヶ月以内のものを使用した。

名称	: ニュートリエントブロス No.2 (Nutrient Broth No.2)
Lot No.	: 2202237
製造元	: OXOID LTD.
保存方法	: 室温
保存場所	: 微生物試験室

6.3 トップアガー

0.6 wt% 寒天および 0.5wt% 塩化ナトリウムの割合で調製した軟寒天液をオートクレーブで滅菌処理 (121°C, 20 分) した後、これに 0.5 mmol/L D-ビオチン-L-ヒスチジン-L-トリプトファン溶液を 10 に対して 1 の割合で加えて調製し、*S. typhimurium* TA 株と *E. coli* 株で共通で使用した。調製後は使用時まで室温で保存し、1 ヶ月以内のものを使用した。

- | | |
|-----------|---------------------------------|
| ① 寒天 | |
| 名称 | : Bacto Agar |
| 製造元 | : Becton, Dickinson and Company |
| Lot No. | : 0335092 |
| 保存方法 | : 室温 |
| 保存場所 | : 微生物試験室 |
| ② 塩化ナトリウム | |
| 製造元 | : 富士フイルム和光純薬株式会社 |
| Lot No. | : DLP6649 |
| 保存方法 | : 室温 |
| 保存場所 | : 微生物試験室 |
| ③ D-ビオチン | |
| 製造元 | : 富士フイルム和光純薬株式会社 |
| Lot No. | : PTF1039 |

保存方法 : 冷蔵, 遮光
 保存場所 : 微生物試験室

④ L-ヒスチジン塩酸塩一水和物

製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社
 Lot No. : SKR2378
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 微生物試験室

⑤ L-トリプトファン

製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社
 Lot No. : SKK1808
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 微生物試験室

6.4 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)

りん酸緩衝剤粉末 3 包に対して 2L の精製水を加えて溶解し、オートクレーブを用いて滅菌処理 (121°C, 20 分) を行い、調製した。調製後は使用時まで冷蔵で保存し、1 ヶ月以内のものを使用した。

名称 : りん酸緩衝剤粉末 (1/15 mol/L pH 7.4)
 製造元 : 富士フイルム和光純薬株式会社
 Lot No. : SKJ0441, LER6339
 組成(1 包あたり) : Na_2HPO_4 : 7.6 g, KH_2PO_4 : 1.8 g
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 微生物試験室

6.5 S9 mix の調製方法

Cofactor-I の 1 バイアルに滅菌精製水を 9.0 mL 加え、完全に溶解した後ろ過 (NALGENE 0.45 μm ; Lot No. 1303428) 滅菌した。これに Cofactor-I の 1 バイアルに対して 1.0 mL の S9 を加えて S9 mix とした。調製した S9 mix は使用まで冷蔵で保存し、使用後の残液は廃棄した。

① S9

名称 : S9
 製造元 : 家田貿易株式会社
 Lot No. : RAA202107A
 製造日 : 2021 年 07 月 09 日
 購入日 : 2021 年 08 月 05 日
 種・系統 : ラット・SD 系
 週齢・性 : 7 週齢・雄
 体重 : 193-243 g

誘導物質 : フェノバルビタール (PB) および 5,6-ベンゾフラボン (BF)
 投与方法 : 腹腔内投与
 投与期間および投与量 : PB 4日間連続投与 : 30+60+60+60 (mg/kg 体重)
 PB 投与 3日目 BF 投与 : 80 (mg/kg 体重)
 保存方法 : 冷凍 (-70°C 以下)
 保存場所 : 微生物試験室内冷凍庫 (超低温フリーザ MDF-C8V1 : パナソニックヘルスケア株式会社)

② 補酵素

名称 : Cofactor-I
 製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社
 Lot No. : 999101
 製造日 : 2021年02月06日
 購入日 : 2021年07月16日, 2021年08月18日
 保存方法 : 冷蔵
 保存場所 : 微生物試験室内冷蔵庫 (冷凍・冷蔵庫 MPR-414F : パナソニックヘルスケア株式会社)

③ S9 mix の組成 (1 mL 中)

水 : 0.9 mL
 S9 : 0.1 mL
 MgCl₂ : 8 μmol/mL
 KCl : 33 μmol/mL
 グルコース-6-リン酸 : 5 μmol/mL
 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 μmol/mL
 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)
 : 4 μmol/mL
 リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)
 : 100 μmol/mL

7. 試験方法

7.1 溶媒

名称 : 注射用水
 製造元 : 株式会社大塚製薬工場
 ロット番号 : K0C79
 規格 : 日本薬局方
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 被験物質調製・保存室

7.2 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に 50 mg/mL で溶解したため注射用水を溶媒とした。

7.3 被験液の調製方法

① 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に電子天秤を用いて被験物質を 0.200 mL 分取して秤量し、その秤量値 199.4 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算した。算出した液量から分取した際の液量を差し引いた 3.788 mL の注射用水を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを以下公比 4 で順次 4 段階希釈し、50, 12.5, 3.13, 0.781, 0.195 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製および試験操作は紫外線防止環境下で行い、その過程において発熱、発泡等の反応性は認められなかった。

② 本試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に電子天秤を用いて被験物質を 0.300 mL 分取して秤量し、その秤量値 301.3 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算した。算出した液量から分取した際の液量を差し引いた 5.726 mL の注射用水を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 2 で順次 4 段階希釈し 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製および試験操作は紫外線防止環境下で行い、その過程において発熱、発泡等の反応性は認められなかった。

7.4 プレート数

用量設定試験、本試験ともに被験物質処理群、陰性対照群および陽性対照群のいずれについても 2 枚のプレートを用いた。

7.5 プレートの識別

最少グルコース寒天平板培地のふたに以下の内容で、各菌株に割り当てた色のマーカーで識別した。試験番号は下 2 桁の番号とし、代謝活性化しない場合は「-」、代謝活性化する場合は「+」とし、これに続けて陰性対照を「SC」、陽性対照を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を各菌の色のマーカーでシャーレのふたに記載し、識別した。

7.6 試験操作 (プレインキュベーション法)

① 滅菌した小試験管に被験液、溶媒または陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の菌懸濁液を 0.1 mL 加え、攪拌した。

- ② 攪拌後、すぐに 37°C で 20 分間振盪 (80 回/分) しながらプレインキュベーションした。
- ③ プレインキュベーション終了後、あらかじめ電子レンジを用いて溶解し、卓上恒温槽で 45°C に保持したトッアガーを小試験管に 2.0 mL 加えて攪拌後、最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- ④ 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL および調製した S9 mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトッアガーを 2.0 mL 加えた後に最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら①～④の一連の操作は、紫外線防止環境下で実施した。
- ⑤ 最少グルコース寒天平板培地に重層したトッアガーが固化したことを確認後、最少グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験、本試験ともに 48 時間培養した。
- ⑥ 培養後、プレート上の被験物質による沈殿および着色を確認した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれも認められなかったため DOT COUNTER (家田貿易株式会社) を用いて計数 (面積補正および数え落とし補正) した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

7.7 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値および陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理値内であり、無菌試験および試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

7.8 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が陰性対照値に対して 2 倍以上となる増加を示し、用量反応性および再現性が認められた場合、あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても陰性対照値に対して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、判定に際して統計学的手法は用いなかった。

8. 試験結果

用量設定試験の結果を別表 1、本試験の結果を別表 2 に示した。なお、図 1~5 は別表 2 より作成した。

8.1 用量設定試験の観察結果および本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量 (5000, 1250, 313, 78.1, 19.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) を用い、用量設定試験を実施した。

その結果、本被験物質によるプレート上の沈殿および着色は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて本被験物

質処理による菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

このため本試験は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株についても5000 µg/plateを最高用量として5000, 2500, 1250, 625, 313 µg/plateの計5用量を設定した。

8.2 本試験の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿および着色は代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。実体顕微鏡を用いて本被験物質処理による菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。

本被験物質処理による復帰変異コロニー数は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上となる増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

9. 考察

用量設定試験および本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、塩基対置換型およびフレームシフト型のいずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下において抗菌・抗ウイルス剤は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

10. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Nat. Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Nat. Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp+ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.

- 5) Dorothy M. Maron, John Katzenellenbogen and Bruce N. Ames: Compatibility of Organic solvents with the Salmonella/Microsome test, *Mutation Res.*, 88, pp.343-350, 1981.
- 6) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, pp.173-215, 1983.
- 7) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶(編):環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 8) 労働省安全衛生部化学物質調査課編:新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 9) 石館基(監修):微生物を用いる変異原性試験データ集(能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

別表 1

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称： 抗菌・抗ウイルス剤

試験番号： AN210063

試験実施期間		2021年8月12日 より 2021年8月16日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/plate)	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 (注射用水)	101 102 (102)	8 13 (11)	16 30 (23)	26 23 (25)	8 3 (6)	
	19.5	90 98 (94)	14 9 (12)	15 14 (15)	12 33 (23)	7 2 (5)	
		78.1	100 86 (93)	9 9 (9)	18 17 (18)	17 20 (19)	6 5 (6)
	313		97 108 (103)	10 10 (10)	12 14 (13)	17 18 (18)	10 9 (10)
		1250	80 68 (74)	14 9 (12)	11 26 (19)	16 14 (15)	6 6 (6)
	5000		108 92 (100)	8 10 (9)	19 14 (17)	13 15 (14)	4 2 (3)
		+S9 mix	陰性対照 (注射用水)	148 98 (123)	9 15 (12)	20 22 (21)	25 29 (27)
	19.5		121 128 (125)	15 15 (15)	25 31 (28)	31 24 (28)	4 3 (4)
			78.1	116 126 (121)	10 6 (8)	26 17 (22)	27 33 (30)
	313			119 116 (118)	9 11 (10)	21 13 (17)	18 33 (26)
			1250	104 106 (105)	8 15 (12)	17 20 (19)	23 23 (23)
	5000			123 124 (124)	10 15 (13)	16 20 (18)	26 16 (21)
陽性対照			名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	用量(μg/plate)		0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
S9 mixを必要としないもの	コロニー数/プレート		471 449 (460)	310 359 (335)	77 64 (71)	403 431 (417)	2425 2973 (2699)
	名称		B[α]P	2-AA	2-AA	B[α]P	B[α]P
S9 mixを必要とするもの	用量(μg/plate)		5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート		881 883 (882)	233 242 (238)	377 427 (402)	353 312 (333)	55 55 (55)

[備考]

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN₃ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2-AA : 2-アミノアントラセン

B[α]P : ベンゾ[α]ピレン

() 内は、2枚のプレートの平均値を示す。

別表 2

試験結果表(本試験)

被験物質の名称： 抗菌・抗ウイルス剤

試験番号： AN210063

試験実施期間		2021年8月19日 より 2021年8月23日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/plate)	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(注射用水)	128 102 (115)	15 14 (15)	20 21 (21)	27 20 (24)	8 6 (7)
	313	109 93 (101)	11 16 (14)	18 20 (19)	19 17 (18)	3 7 (5)
	625	112 94 (103)	18 8 (13)	20 18 (19)	29 18 (24)	3 3 (3)
	1250	106 108 (107)	7 12 (10)	15 22 (19)	25 21 (23)	5 6 (6)
	2500	123 91 (107)	14 14 (14)	19 19 (19)	21 31 (26)	3 5 (4)
	5000	89 95 (92)	7 8 (8)	20 16 (18)	35 23 (29)	5 2 (4)
	+S9 mix	陰性対照(注射用水)	117 125 (121)	10 7 (9)	25 26 (26)	39 19 (29)
313		119 109 (114)	9 10 (10)	24 22 (23)	23 31 (27)	7 3 (5)
625		112 110 (111)	10 6 (8)	24 20 (22)	23 27 (25)	11 5 (8)
1250		97 119 (108)	11 11 (11)	23 23 (23)	26 34 (30)	13 7 (10)
2500		112 134 (123)	14 7 (11)	24 25 (25)	25 38 (32)	11 1 (6)
5000		130 107 (119)	10 10 (10)	20 20 (20)	30 26 (28)	6 5 (6)
陽性		名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2
	用量(μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
対照	名称	B[α]P	2-AA	2-AA	B[α]P	B[α]P
	用量(μg/plate)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
S9 mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	502 512 (507)	502 460 (481)	102 87 (95)	483 483 (483)	1589 1605 (1597)
	コロニー数/プレート	952 1027 (990)	255 232 (244)	468 398 (433)	321 257 (289)	52 60 (56)

【備考】

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN₃ : アジ化ナトリウム

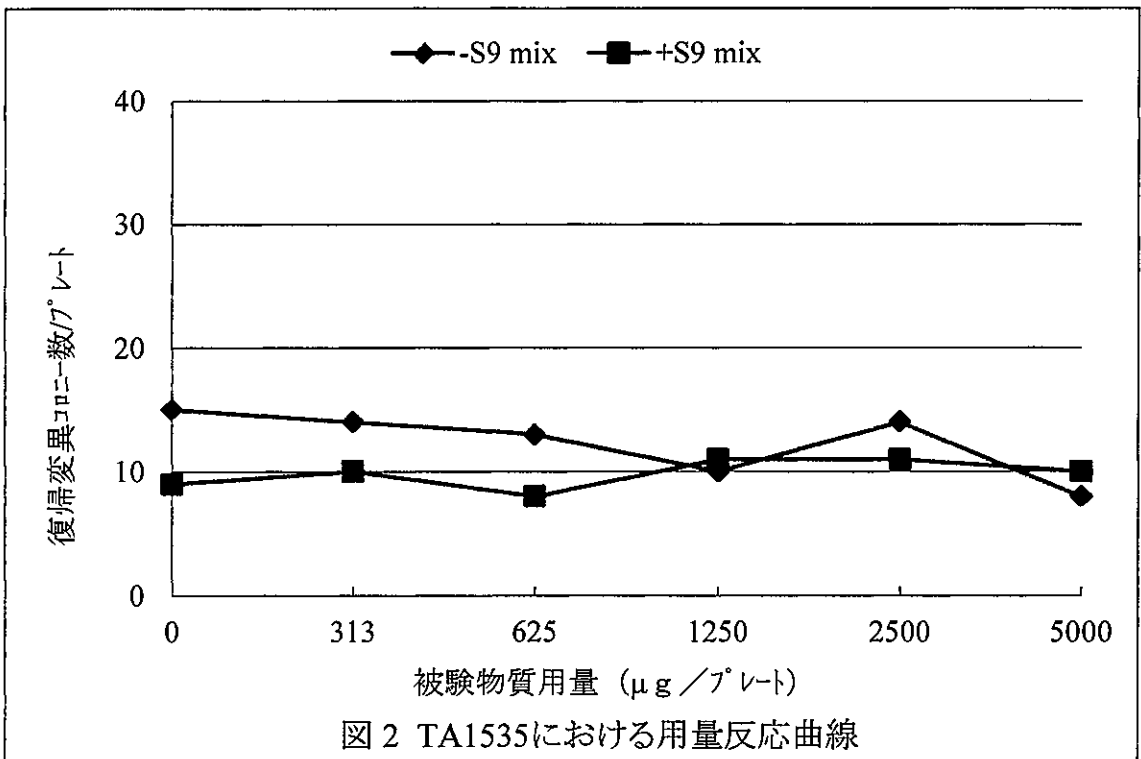
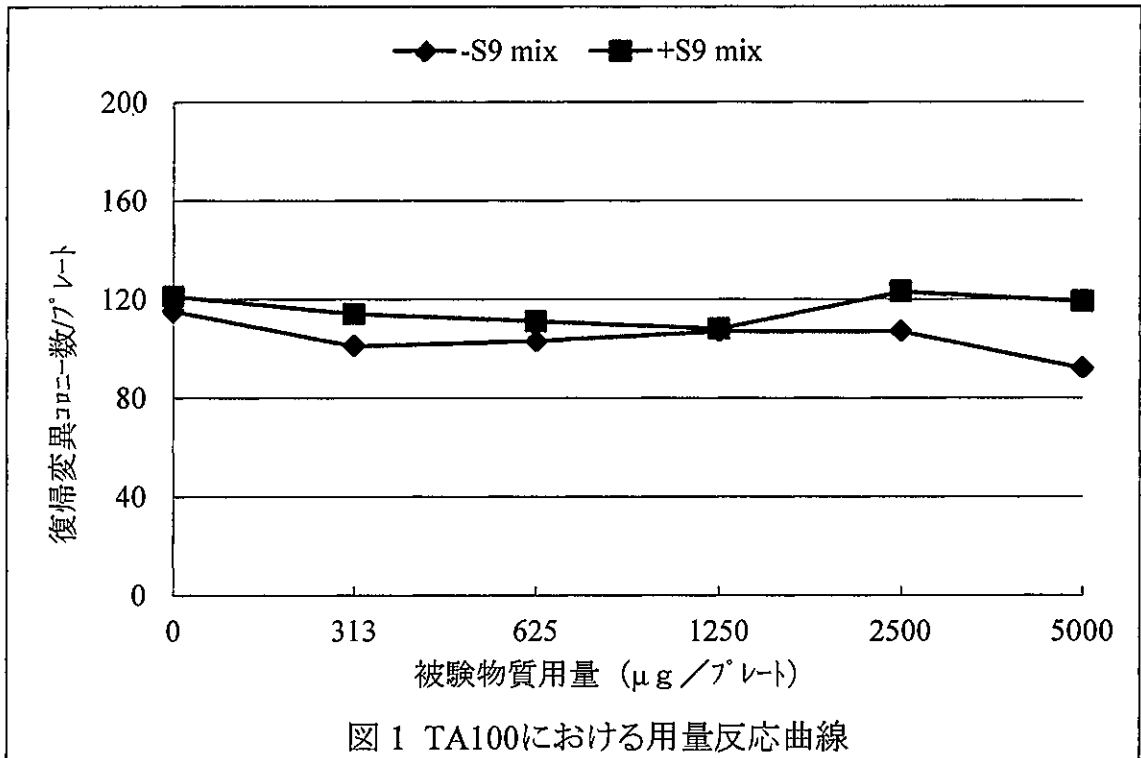
ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2-AA : 2-アミノアントラセン

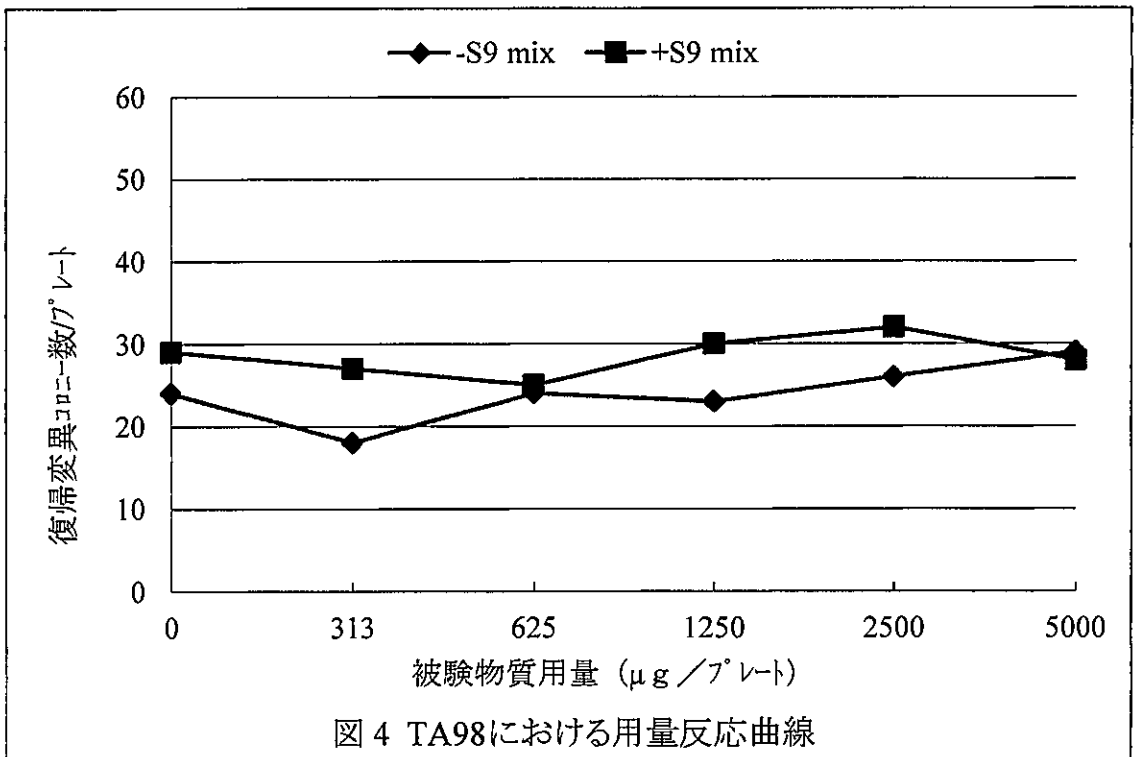
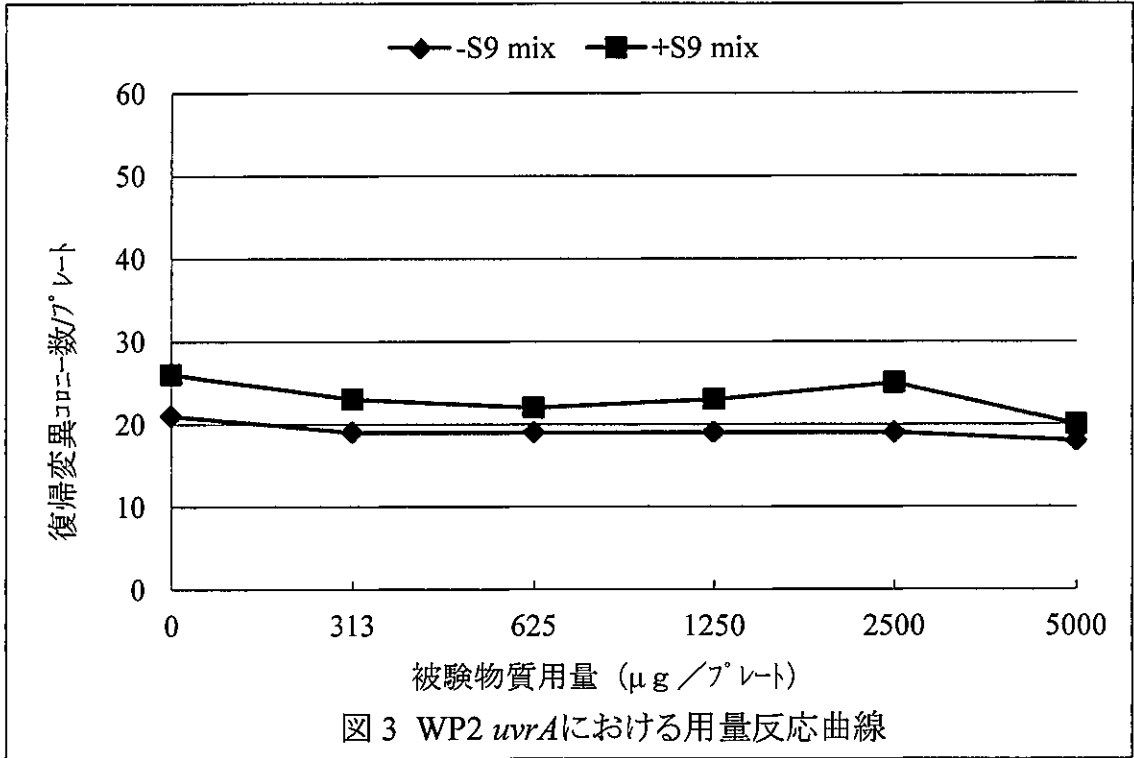
B[α]P : ベンゾ[α]ピレン

() 内は、2枚のプレートの平均値を示す。

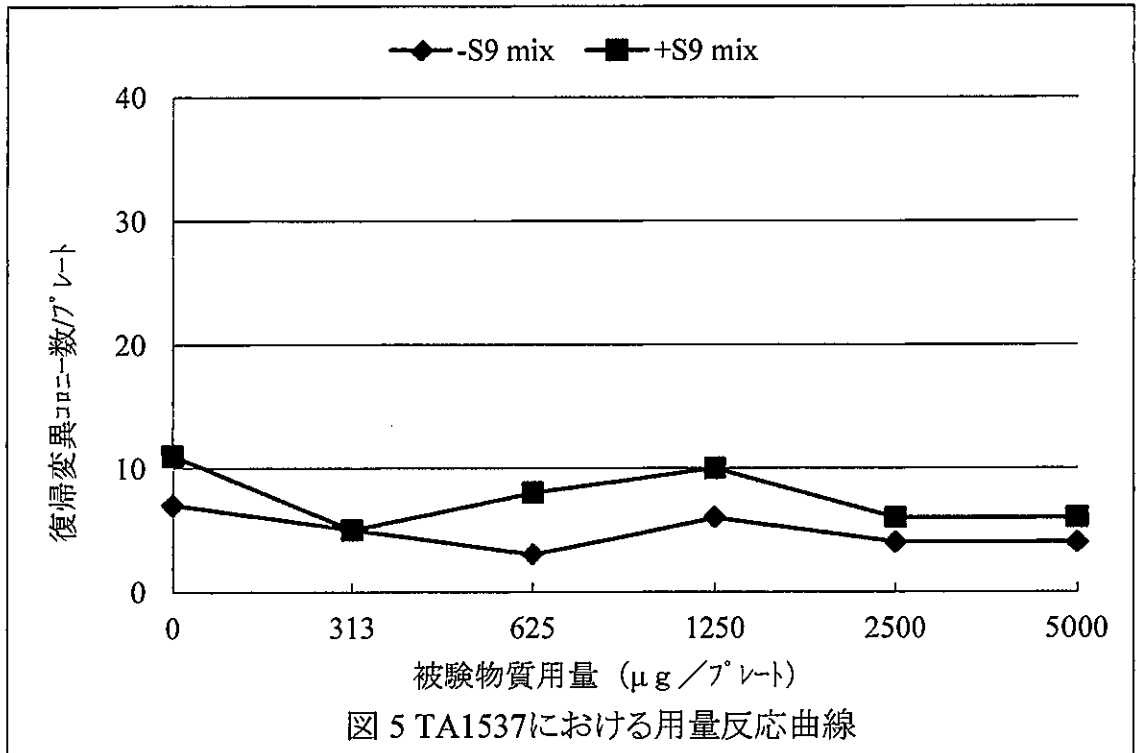
用量反応曲線(本試験)



用量反応曲線(本試験)



用量反応曲線(本試験)



**Background Data of the reverse mutation tests in bacteria
at the Yoshimi Laboratories of Drug Safety Testing Center Co., Ltd.**

CODE No.: 210603

Period: From March 5, 2021 to May 14, 2021

(Preincubation Method)

Tester Strains	S9 mix (-) or (+)	Classification	Management ranges		Mean	Management ranges		number of plates
			-3SD	-2SD		+2SD	+3SD	
TA100	-	Solvent control	67	85	119	154	171	218
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	362	412	511	611	660	208
	+	Solvent control	67	85	122	158	177	218
		Positive control B[α]P(5.0µg/plate)	766	851	1023	1194	1280	208
TA1535	-	Solvent control	2	6	13	19	23	218
		Positive control NaN ₃ (0.5µg/plate)	263	313	414	515	566	208
	+	Solvent control	2	5	11	17	20	218
		Positive control 2-AA(2.0µg/plate)	202	231	291	350	380	208
WP2uvrA	-	Solvent control	9	16	29	43	50	218
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	47	63	97	130	147	208
	+	Solvent control	13	19	33	46	53	218
		Positive control 2-AA(10.0µg/plate)	248	325	479	632	709	208
TA98	-	Solvent control	7	12	22	32	37	218
		Positive control AF-2(0.1µg/plate)	371	403	467	531	563	208
	+	Solvent control	14	20	33	45	51	218
		Positive control B[α]P(5.0µg/plate)	230	259	318	377	406	208
TA1537	-	Solvent control	1	2	8	13	16	218
		Positive control ICR-191(1.0µg/plate)	1200	1506	2119	2731	3037	208
	+	Solvent control	1	3	11	18	22	218
		Positive control B[α]P(5.0µg/plate)	33	43	62	82	91	208

(Notice)

Minimal Glucose Agar Plate Medium : Vital Media AMT-S medium

Solvent controls Water, Dimethylsulfoxide(DMSO), Acetone, *N,N*-dimethylformamide(DMF) and 1,4-Dioxane

Positive controls AF-2 :2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN₃ :Sodium azide

ICR-191 :2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[α]P :Benzo[α]pyrene

2-AA :2-aminoanthracene

S9 mix (-) :without metabolic activation

(+) :with metabolic activation