

# 試験報告書

依頼者 日本ナノテック株式会社

一般財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木町52番1号



検体 アリテラスIC

表題 微生物を用いる変異原性試験

2020 年 08 月 11 日当センターに提出された上記検体について試験した結果をご報告いたします。

## 微生物を用いる変異原性試験

### 要 約

アリテラスICの遺伝子突然変異誘発性を調べる目的で、労働省告示第77号(昭和63年9月1日)に従い、*Escherichia coli* WP2uvrA及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて復帰突然変異試験を実施した。

検体について、313~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で試験を行った。その結果、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下における検体の遺伝子突然変異誘発性は、陰性と結論した。

## 1 依頼者

日本ナノテック株式会社

## 2 検体

アリテラスIC

## 3 試験実施施設

一般財団法人日本食品分析センター 千歳研究所  
北海道千歳市文京2丁目3番

## 4 試験責任者

一般財団法人日本食品分析センター 千歳研究所  
安全性試験部 生物科学課  
中村 鉄平

## 5 試験期間

2020年08月11日～2020年09月17日

## 6 試験目的

検体の遺伝子突然変異誘発性を調べる目的で、労働省告示第77号(昭和63年9月1日)に従い、*Escherichia coli* WP2uvrA及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて復帰突然変異試験を行う。

また、「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)の別添「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」に基づき、試験の繰り返しは不要とする。

## 7 試験方法

### 1) 試験液の調製及び試験用量

検体を秤取りし注射用水を加えた後、超音波処理を行い試験原液を調製した。

注射用水を用いて試験原液を適宜希釈し、試験液を調製した。注射用水を陰性対照とした。

試験用量を以下に示した。

#### 試験用量

5000, 2500, 1250, 625及び313  $\mu\text{g}$ /プレート

### 2) 陽性対照物質及び陽性対照物質を溶解する溶媒

#### ① 陽性対照物質と用量

S9(-)			S9(+)		
菌株	陽性対照物質	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	菌株	陽性対照物質	用量 ( $\mu\text{g}$ /プレート)
TA100	AF-2	0.01	TA100	2-AA	1
TA98	AF-2	0.1	TA98	2-AA	0.5
TA1535	$\text{NaN}_3$	0.5	TA1535	2-AA	2
TA1537	9-AA	80	TA1537	2-AA	2
WP2uvrA	AF-2	0.01	WP2uvrA	2-AA	10

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

$\text{NaN}_3$  : Sodium azide

9-AA : 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate

2-AA : 2-Aminoanthracene

#### ② 陽性対照物質及び陽性対照物質を溶解する溶媒

	物質名	製造元	溶媒名
陽性対照	AF-2	富士フィルム和光純薬株式会社	DMSO
	$\text{NaN}_3$	富士フィルム和光純薬株式会社	注射用水
	9-AA	東京化成工業株式会社	DMSO
	2-AA	富士フィルム和光純薬株式会社	DMSO
溶媒	DMSO	株式会社 同仁化学研究所	—
	注射用水	株式会社 大塚製薬工場	—

陽性対照物質溶液の保存 : 分注保存 (保存温度  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

DMSO : ジメチルスルホキシド

## 3) 使用菌株

## ① 入手先

菌株	入手先	
TA100	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センター
TA98	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センター
TA1535	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センター
TA1537	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センター
WP2uvrA	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センター

## ② 保存方法

保存方法	分注凍結	保存液組成	菌培養液	0.8 mL
保存温度	-80 °C		DMSO	0.07 mL

## 4) 菌の前培養

菌分注凍結保存液を解凍し、ニュートリエントブロス培地 (OXOID, Nutrient broth No. 2) を 15 mL 分注したバツフル付三角フラスコに接種した。菌を接種したバツフル付三角フラスコは旋回を始めるまで冷蔵し、その後、37 °C で 10 時間旋回培養した。菌培養液は吸光度を測定し、生菌数が  $1 \times 10^9$  /mL 以上であることを確認した。

振とう培養装置の型式及び製造元	バイオシェーカー BR-40LF タイテック株式会社
振とう方法 (振とう方式・振とう数)	旋回式・100回/分
培養容器(形状・容量・栓)	バツフル付三角フラスコ・100 mL・シリコン栓

## 5) S9及びS9mix

## ① S9の製造元, 保存方法

製造元	家田貿易株式会社	保存温度	-80 °C
-----	----------	------	--------

## ② S9の調製方法

使用動物の種・系統及び性別	ラット・SD系 雄	投与方法	腹腔内投与
誘導物質の名称	フェノバルビタール (PB) 5, 6-ベンゾフラボン (5, 6-BF)		
投与期間及び投与量 (mg/kg体重)	1日目: PB 30 mg/kg, 2日目: PB 60 mg/kg 3日目: PB 60 mg/kg + 5, 6-BF 80 mg/kg 4日目: PB 60 mg/kg, 5日目: S9調製		



## ③ S9mixの組成

成分	S9mix(1.0 mL)中の量	成分	S9mix(1.0 mL)中の量
S9	0.1 mL	NADH	4 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu$ mol	NADPH	4 $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol	Na-リン酸緩衝液 (pH7.4)	100 $\mu$ mol
G-6-P	5 $\mu$ mol		

## 6) 最少グルコース寒天平板培地

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
備考：直径90 mmの滅菌平板1枚当たり30 mLを分注して固化させたもの			
組成(培地1 L当たり)			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g	クエン酸·H <sub>2</sub> O	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.92 g
NaOH	0.66 g	グルコース	20 g
寒天	15 g		

## 7) トップアガー

ソフトアガーにアミノ酸溶液を1/10容量加え調製した。

## ① ソフトアガー

Bacto agar (DIFCO)	0.6 %
NaCl	0.5 %

## ② アミノ酸溶液

L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

## 8) 試験操作法

代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合について、プレインキュベーション法により試験を行った。

試験液0.1 mL, 注射用水(陰性対照)0.1 mL又は陽性対照物質溶液0.1 mLを試験管に入れた。これに、代謝活性化法によらない場合は0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液(pH7.4) 0.5 mLを、代謝活性化法による場合はS9mix 0.5 mLを混合し、更に菌培養液0.1 mLを加えて、37 °Cの振とう恒温水槽中で約20分間振とう(プレインキュベーション)した。次いでトップアガー2 mLを加えて混合し、最少グルコース寒天平板培地上に一様に広げ固化させた。37 °Cの恒温器中で48時間培養し、復帰突然変異により出現したコロニーを計数した。

## 9) 統計処理

実施しなかった。

## 10) 判定基準

コロニー数の平均値が、陰性対照と比較して試験区で2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性が認められた場合に陽性と判定する。

なお、試験区のコロニー数の平均値が、陰性対照と比較して2倍未満の場合には、復帰変異コロニー数の増加は認められないものとする。

## 8 試験結果

試験結果を表-1に示した。検体は、陰性対照に比べ復帰変異コロニー数を増加させなかった。菌の生育阻害及び検体の析出、沈殿は、いずれの試験用量においても認められなかった。陽性対照では、著明な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

## 9 結 論

検体について、*Escherichia coli* WP2uvrA及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて復帰突然変異試験を実施した。その結果、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上のことから、本試験条件下における検体の遺伝子突然変異誘発性は、陰性と結論した。

## 10 参考文献

- Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. : Cancer Lett., 1, 91-96 (1975).
- Maron, D. M. and Ames, B. N. : Mutat. Res., 113, 173-215 (1983).
- 労働省告示第77号 (昭和63年9月1日).

表-1 試験結果表

検体の名称：アリテラスIC(Keskin)

代謝活性化系の有無	検体の用量 ( $\mu\text{g}$ /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	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9mix (-)	陰性対照	79	11	23	26	2	
		84 ( 77)	5 ( 7)	19 ( 19)	15 ( 19)	1 ( 2)	
		67	6	15	15	2	
	313	87	11	14	23	3	
		99 ( 93)	7 ( 8)	18 ( 18)	22 ( 21)	4 ( 3)	
		93	6	22	19	1	
	625	88	13	12	15	3	
		95 ( 90)	6 ( 10)	22 ( 16)	18 ( 18)	1 ( 2)	
		87	11	15	20	2	
	1250	85	9	19	15	3	
		63 ( 77)	10 ( 10)	19 ( 19)	18 ( 18)	4 ( 3)	
		84	10	20	20	2	
	2500	77	10	14	15	2	
		88 ( 84)	12 ( 10)	19 ( 17)	20 ( 18)	1 ( 2)	
		87	7	17	18	2	
	5000	93	5	15	20	0	
		82 ( 82)	9 ( 6)	11 ( 16)	25 ( 19)	5 ( 2)	
		70	5	23	13	1	
	S9mix (+)	陰性対照	108	9	18	30	7
			109 ( 97)	7 ( 10)	15 ( 20)	30 ( 30)	13 ( 9)
			75	15	27	29	6
313		82	10	28	30	12	
		66 ( 78)	4 ( 8)	18 ( 24)	29 ( 33)	11 ( 10)	
		86	10	26	39	6	
625		84	5	26	31	7	
		96 ( 90)	3 ( 5)	14 ( 20)	35 ( 32)	10 ( 8)	
		90	7	21	31	6	
1250		83	13	19	30	4	
		91 ( 89)	9 ( 11)	12 ( 15)	26 ( 26)	1 ( 5)	
		94	11	14	23	11	
2500		87	10	17	35	3	
		106 ( 103)	7 ( 8)	13 ( 17)	38 ( 35)	11 ( 6)	
		116	6	22	31	3	
5000		96	11	23	26	11	
		118 ( 99)	10 ( 10)	21 ( 21)	37 ( 31)	9 ( 10)	
		83	9	20	31	9	
陽性対照		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
		コロニー数	307	340	109	476	346
	/プレート	285 ( 299) 305	376 ( 363) 372	110 ( 100) 80	464 ( 448) 404	222 ( 337) 443	
陰性対照	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	488	196	294	363	111	
	/プレート	523 ( 516) 538	174 ( 187) 190	336 ( 317) 321	355 ( 363) 370	110 ( 115) 124	

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 NaN<sub>3</sub>: Sodium azide  
 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride monohydrate  
 2-AA: 2-Aminoanthracene

括弧内は各プレートのコロニー数の平均値を示す。  
 陰性対照: 試験液の調製に用いた溶媒

以上