



Study No. AN200107

試験報告書

試験番号：AN200107

表題：HuFufeme(フフファーム)の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験結果報告日

2020年10月07日

フェースサーベイ株式会社



1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	4
2.1	試験表題	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	試験受託者の名称および所在地	4
2.7	試験施設の名称および所在地	4
2.8	試験責任者の氏名および所属	4
2.9	試験従事者	5
2.10	試験日程	5
2.11	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
2.12	資料の保存	5
2.13	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 試験表題

HuFuferme (フフファーム) の細菌を用いる復帰突然変異試験

2.2 試験番号

AN200107

2.3 試験目的

HuFuferme (フフファーム) 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 208 号：平成 28 年 4 月 18 日)

2.5 試験委託者の名称および所在地

名 称 : 株式会社ケーターコミュニケーションズ
所在地 : 東京都千代田区内神田 1-13-1 豊島屋ビル 7 階
(〒101-0047)
委託担当者 : 川野 恵美

2.6 試験受託者の名称および所在地

名 称 : フェースサーベイ株式会社
所在地 : 大阪府大阪市北区南森町 1 丁目 4 番 32 号 (〒530-0054)
受託責任者 : 原 康夫
受託担当者 : 原 あゆみ

2.7 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)
運営管理者 : 高橋 寛人

2.8 試験責任者の氏名および所属

氏 名 : 小熊 義宏
所 属 : 株式会社 薬物安全性試験センター 第二研究部

2.9 試験従事者

用量設定試験

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

本試験

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

2.10 試験日程

試験開始日 : 2020年09月10日
用量設定試験開始日 : 2020年09月10日
用量設定試験終了日 : 2020年09月14日
本試験開始日 : 2020年09月28日
本試験終了日 : 2020年10月01日
試験終了日 : 2020年10月07日

2.11 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 態および試験計画書に従わなかったこと

本試験において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
態および試験計画書に従わなかったことはなかった。

2.12 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。

2.13 試験責任者の署名

小熊 義宏 2020年10月7日

株式会社薬物安全性試験センター

3. 要約

HuFuferme (フフファーム) 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 µg/plate を最高用量として公比 4 で 4 段階希釈した 5000, 1250, 313, 78.1, 19.5 µg/plate の計 5 用量で用量設定試験を実施した。

その結果、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ため、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 µg/plate の計 5 用量で実施した。

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 HuFuferme (フフファーム) 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	HuFuferme (フフファーム)
入手日	2020年09月08日
入手量	100mL×5袋 (①108.321g ②108.966g ③107.968g ④108.586g ⑤107.559g)
ロット番号	IJ18JK13
純度	100%
常温における性状	やや褐色の透明な液体 (比重：1～1.02, pH：9前後)
有効期限	2022年12月13日
保存条件	冷蔵
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(株)薬物安全性試験センターで廃棄する。

上記被験物質情報は、試験委託者から提供された情報による。

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	SAE0315	99.7%	室温，遮光
NaN ₃	JPN7149	99.6%	室温，遮光
ICR-191	690128		室温，遮光
2-AA	CTK0326	96.7%	室温，遮光
B[a]P	ECF5055	99.6%	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)

NaN₃ 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 (富士フイルム和光純薬株式会社 ; CAS No. 613-13-8)
B[a]P	Benzo[a]pyrene (富士フイ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. 富士フイルム和光純薬株式会社, JIS 規格 試薬特級 ; Lot No. KCG0209) に溶解した。ただし, NaN_3 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.K9C88) 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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	陽性対照物質名	処理用量 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)
<i>S. typhimurium</i> TA100	AF-2	0.01	B[a]P	5.0
<i>S. typhimurium</i> TA1535	NaN_3	0.5	2-AA	2.0
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	2-AA	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 6 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 3 月 3 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 (富士フイルム和光純薬株式会社, JIS 規格試薬特級, Lot No. KCG0209) 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	2020年05月26日	2020年05月26日～2020年05月28日
<i>S. typhimurium</i> TA1535	2020年05月26日	2020年05月26日～2020年05月28日
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	2020年05月26日	2020年05月26日～2020年05月28日
<i>S. typhimurium</i> TA98	2020年05月26日	2020年05月26日～2020年05月28日
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2020年05月26日	2020年05月26日～2020年05月28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* は 10 μ L 植菌し、振盪恒温槽 (COOL BATH SHAKER ML-10F 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 に示す。

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	2.11×10^9	2.65×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.39×10^9	5.52×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	7.33×10^9	8.46×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	4.60×10^9	4.49×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.33×10^9	3.20×10^9

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. : DZAL8401
- 製造日 : 2020年08月04日

購入日	: 2020年08月21日
保存方法	: 室温保存
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)
製造元	: OXOID LTD.
Lot No.	: 2202237
保存方法	: 室温保存
保存場所	: 微生物試験室

6.3 トップアガー

0.6 wt% Agar および 0.5 wt% NaCl 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.	: 0008968
保存方法	: 室温保存
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.	: ESP6001
保存方法	: 室温保存
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	: 冷蔵保存, 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 : 富士フィルム和光純薬株式会社
- Lot No. : SAN4409
- 保存方法 : 室温保存
- 保存場所 : 微生物試験室
- ⑤ L-トリプトファン
- 製造元 : 富士フィルム和光純薬株式会社
- Lot No. : SAH3396
- 保存方法 : 室温保存
- 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 : 富士フィルム和光純薬株式会社
- Lot No. : PTH1664
- 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
- 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. 1268087) 滅菌する。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. : RAA202005A
- 製造日 : 2020 年 05 月 29 日
- 購入日 : 2020 年 07 月 14 日
- 種・系統 : ラット・SD 系
- 週齢・性 : 7 週齢・雄
- 体重 : 201-241 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. : 999001
製造日 : 2020 年 03 月 07 日
購入日 : 2020 年 08 月 28 日
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 : K9K89
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

本被験物質は水溶液の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 200.0 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を算出した。算出した液量から分取した際の液量を差し引いた 3.800 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。被験液の調製は、紫外線防止環境下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生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 0.250 mL 分取して秤量し、その秤量値 249.2 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を算出した。算出した液量から分取した際の液量を差し引いた 4.734 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。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。被験液の調製は、紫外線防止環境下で使用時に行い、その過程において発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。

7.4 プレート数

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各用量につき 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) を 0.5 mL、代謝活性化する場合は S9 mix を 0.5 mL 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、37°C、80 回/分で 20 分間振盪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、45°Cに保温されているトッペアガーを2.0 mL 加え攪拌後、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 をそれぞれ試験管に取り、これにトッペアガーを2.0 mL 加えた後に最少グルコース寒天平板培地に重層する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ペ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、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と比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、用量反応性および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。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 µg/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プレート上の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。

このため本試験の試験用量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を最高用量として以下公比2で4段階希釈した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プレート上の着色は代謝活性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。実態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HuFuferme(フフファーム)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.

試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称 : HuFuferme (フフファーム)

試験番号 : AN200107

試験実施期間		2020年9月10日 より 2020年9月14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)	151 147 (149)	13 14 (14)	45 42 (44)	26 31 (29)	8 8 (8)
	19.5	147 166 (157)	16 13 (15)	37 37 (37)	22 19 (21)	9 11 (10)
	78.1	160 130 (145)	9 15 (12)	46 38 (42)	23 30 (27)	15 15 (15)
	313	141 157 (149)	11 9 (10)	47 38 (43)	42 34 (38)	8 11 (10)
	1250	146 126 (136)	6 13 (10)	29 42 (36)	37 34 (36)	14 11 (13)
	5000	168 131 (150)	9 15 (12)	39 44 (42)	17 31 (24)	14 13 (14)
	陰性対照(注射用水)	141 146 (144)	14 9 (12)	45 35 (40)	51 33 (42)	14 16 (15)
	19.5	128 128 (128)	14 11 (13)	40 32 (36)	50 39 (45)	12 17 (15)
	78.1	158 135 (147)	8 13 (11)	33 34 (34)	51 49 (50)	14 7 (11)
	313	172 174 (173)	16 8 (12)	34 42 (38)	36 50 (43)	12 14 (13)
	1250	144 165 (155)	16 10 (13)	45 21 (33)	34 50 (42)	10 14 (12)
	5000	149 162 (156)	15 8 (12)	41 37 (39)	41 31 (36)	7 15 (11)
陽性	名称	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量(μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
対照	名称	B[a]P	2-AA	2-AA	B[a]P	B[a]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	525 551 (538)	475 437 (456)	118 126 (122)	587 504 (546)	1215 1180 (1198)
	コロニー数/プレート	1230 1270 (1250)	298 360 (329)	721 730 (726)	363 383 (373)	103 102 (103)

[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[a]P : ベンゾ[a]ピレン

() 内は、2枚のプレートの平均値を示す。

試験結果表(本試験)

被験物質の名称 : HuFuferme (フフファーム)

試験番号 : AN200107

試験実施期間		2020年9月28日 より 2020年10月1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)	137 131 (134)	8 11 (10)	32 25 (29)	26 34 (30)	6 5 (6)
	313	149 143 (146)	10 11 (11)	16 17 (17)	32 24 (28)	7 4 (6)
	625	155 159 (157)	11 16 (14)	23 24 (24)	23 21 (22)	5 9 (7)
	1250	122 142 (132)	11 10 (11)	15 18 (17)	17 26 (22)	6 3 (5)
	2500	128 147 (138)	10 11 (11)	27 21 (24)	25 23 (24)	8 6 (7)
	5000	141 115 (128)	11 11 (11)	28 17 (23)	30 20 (25)	3 5 (4)
	+S9 mix	陰性対照 (注射用水)	159 159 (159)	9 15 (12)	23 24 (24)	41 47 (44)
313		158 153 (156)	12 10 (11)	26 33 (30)	35 37 (36)	11 10 (11)
625		174 146 (160)	6 8 (7)	23 29 (26)	27 39 (33)	10 15 (13)
1250		152 177 (165)	7 9 (8)	23 23 (23)	29 21 (25)	8 11 (10)
2500		125 158 (142)	2 8 (5)	19 23 (21)	18 26 (22)	9 10 (10)
5000		164 175 (170)	11 7 (9)	17 30 (24)	33 29 (31)	5 11 (8)
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[a]P	2-AA	2-AA	B[a]P	B[a]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	602 586 (594)	383 367 (375)	93 93 (93)	465 481 (473)	1556 1607 (1582)
	コロニー数/プレート	1018 1143 (1081)	293 275 (284)	451 528 (490)	318 400 (359)	61 65 (63)

[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

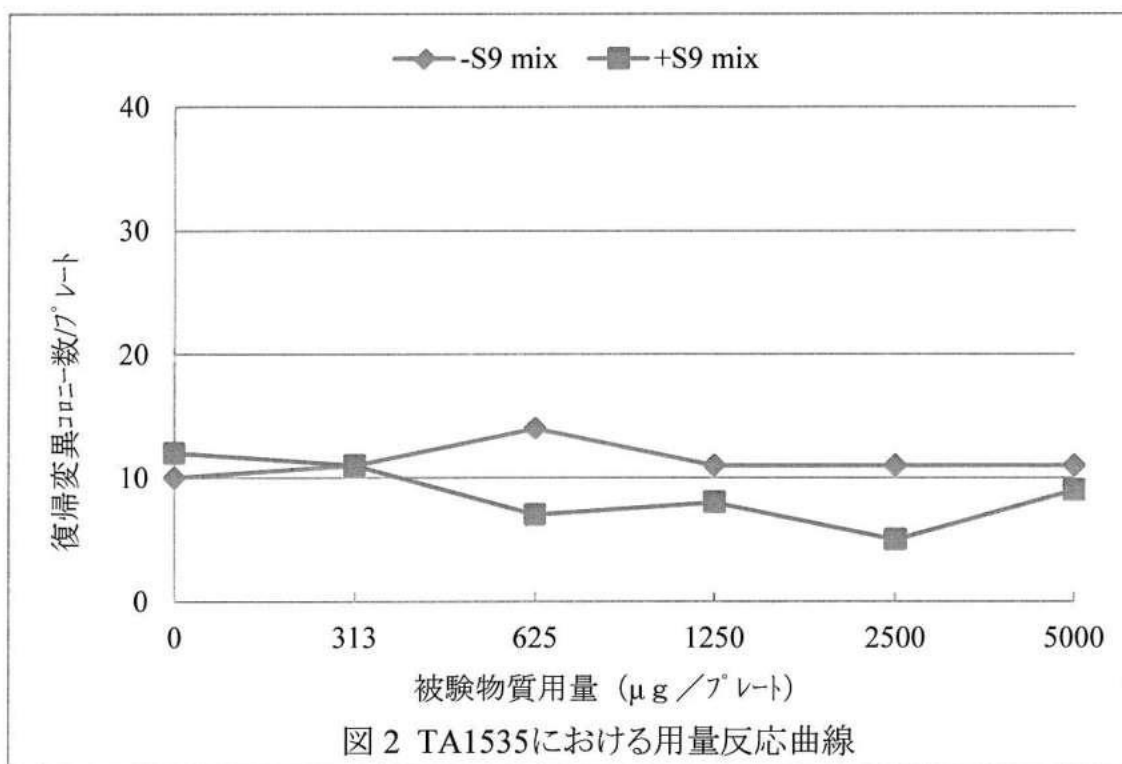
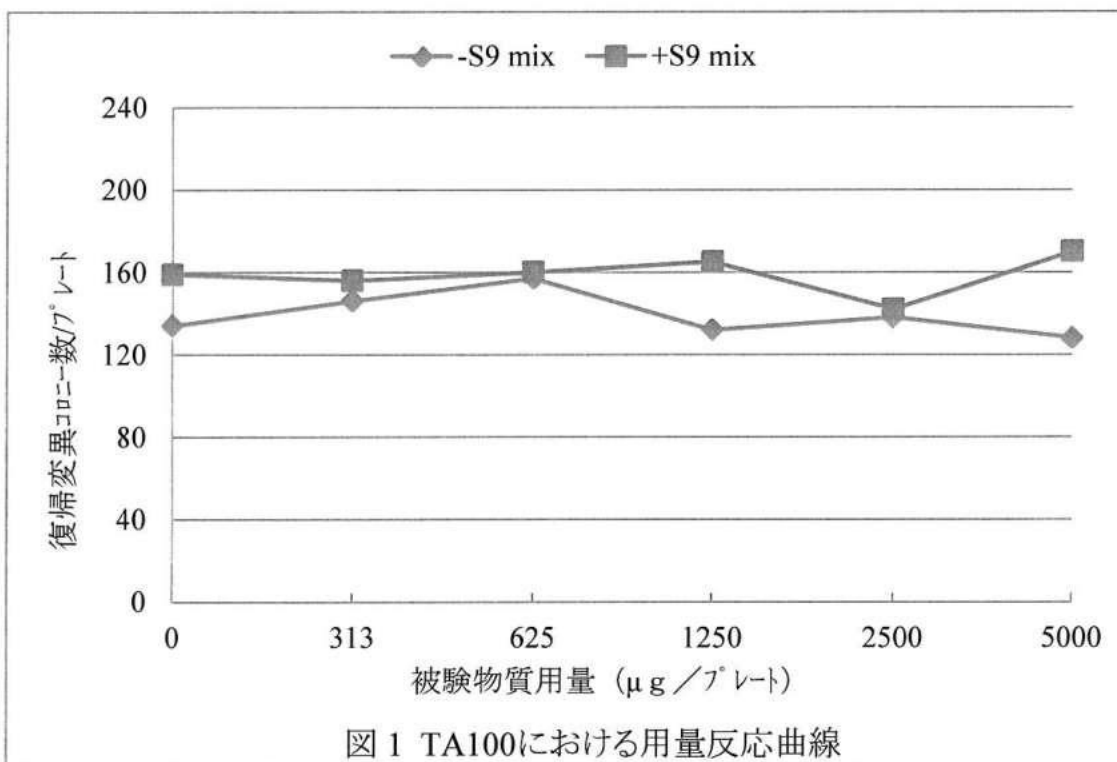
ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2-AA : 2-アミノアントラセン

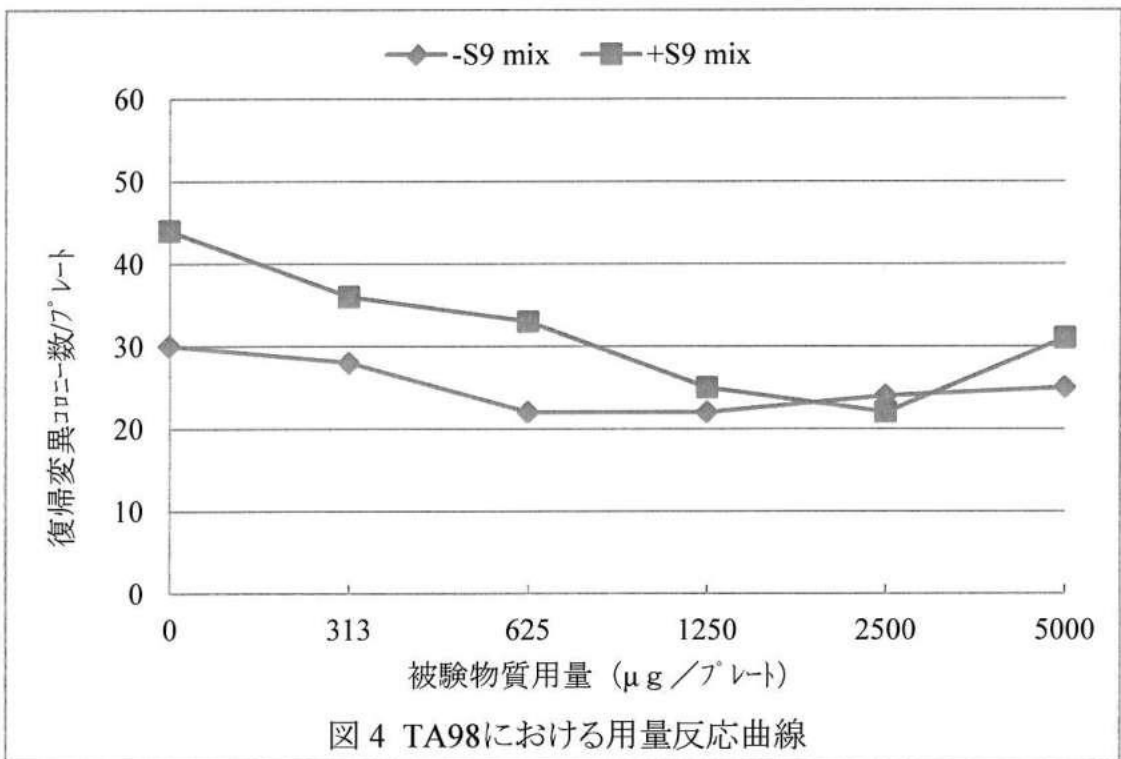
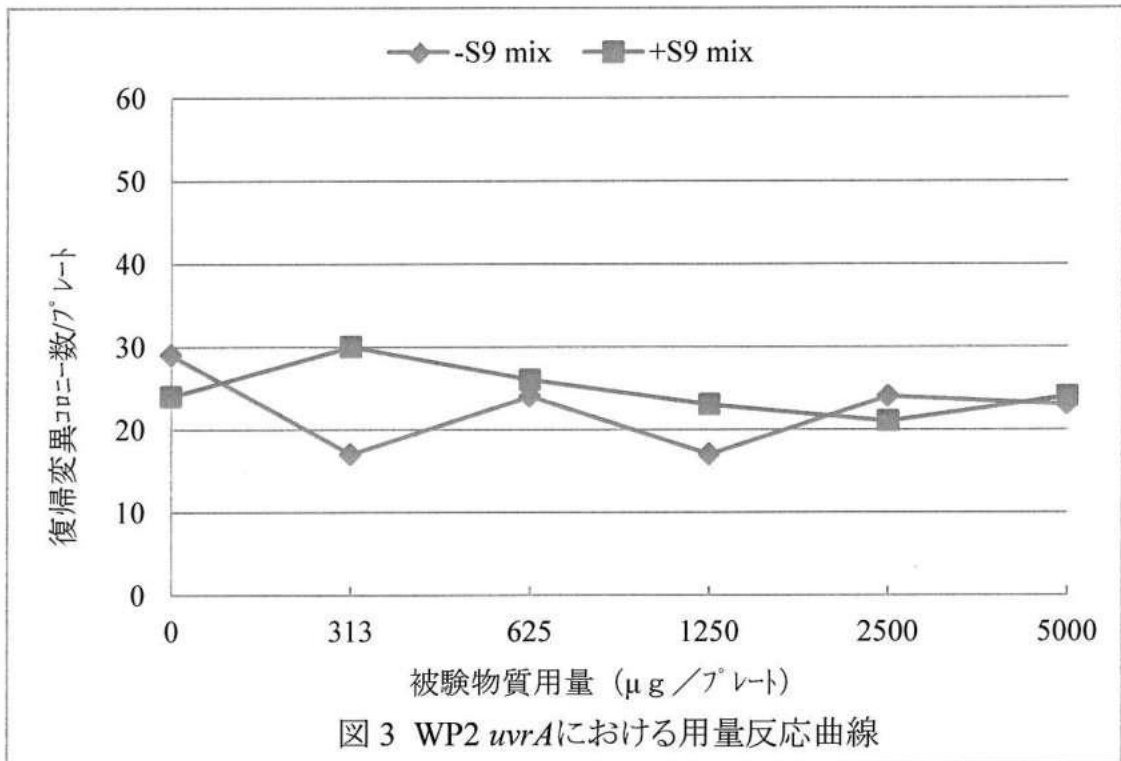
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

() 内は、2枚のプレートの平均値を示す。

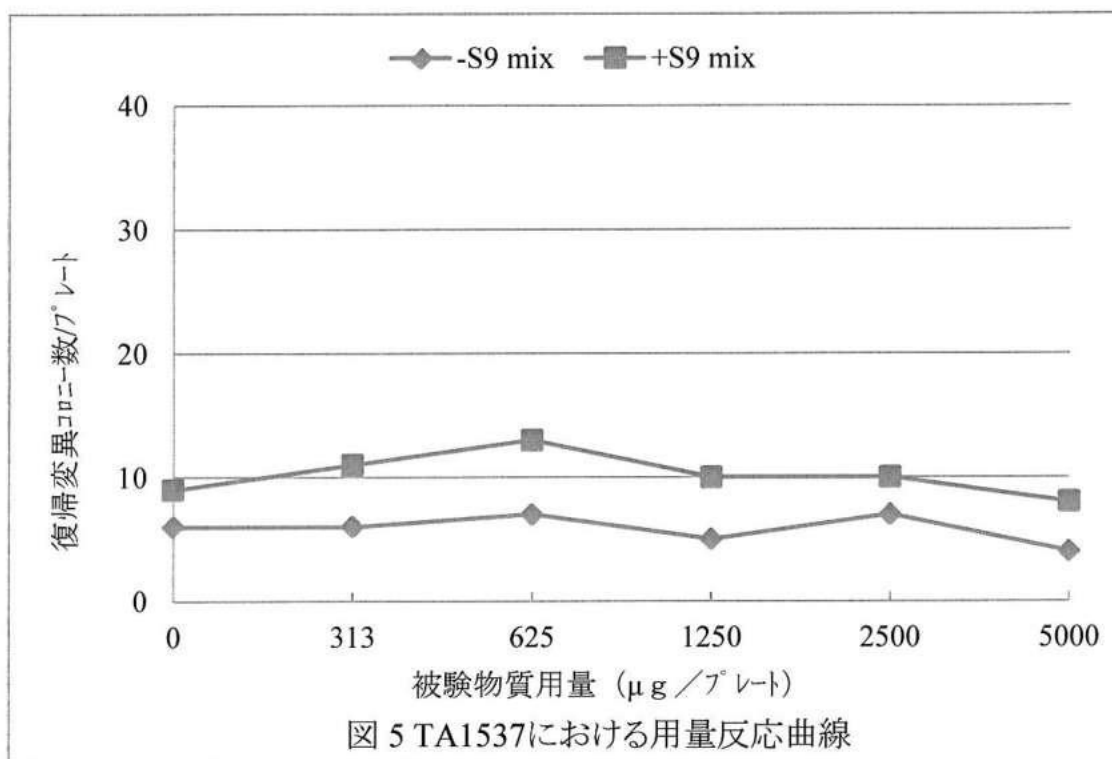
用量反応曲線(本試験)



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.:200914

Period:From June 1, 2020 to September 11, 2020

(Preincubation Method)

Tester Strains	S9 mix (-) or (+)	Classification	Management ranges		Mean	Management ranges		number of plates
			-3SD	-2SD		+2SD	+3SD	
TA100	-	Solvent control	74	92	128	165	183	234
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	413	455	540	624	666	228
	+	Solvent control	78	97	137	176	196	234
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	817	927	1146	1365	1475	228
TA1535	-	Solvent control	2	5	11	18	21	234
		Positive control NaN ₃ (0.5µg/plate)	277	331	438	546	599	228
	+	Solvent control	1	4	11	18	21	234
		Positive control 2-AA(2.0µg/plate)	214	256	340	424	466	228
WP2uvrA	-	Solvent control	6	12	24	36	42	234
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	56	72	102	133	148	228
	+	Solvent control	7	14	27	40	47	234
		Positive control 2-AA(10.0µg/plate)	320	409	587	766	855	228
TA98	-	Solvent control	4	11	24	38	45	234
		Positive control AF-2(0.1µg/plate)	430	464	532	600	634	228
	+	Solvent control	14	22	37	52	59	234
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	248	288	369	449	490	228
TA1537	-	Solvent control	1	1	7	13	16	234
		Positive control ICR-191(1.0µg/plate)	291	630	1310	1989	2329	228
	+	Solvent control	1	3	11	19	23	234
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	28	42	70	99	113	228

(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[a]P :Benzo[a]pyrene

2-AA :2-aminoanthracene

S9 mix (-) :without metabolic activation

(+) :with metabolic activation