



最 終 報 告 書

タモキシフェン・クエン酸塩のマウスリンフォーマ TK 試験

試験番号：N-G105

試験期間：2016 年 1 月 29 日-2016 年 3 月 29 日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	4
2.1	試験番号	4
2.2	試験表題	4
2.3	試験目的	4
2.4	試験委託者	4
2.5	試験受託者	4
2.6	試験実施施設	4
2.7	試験日程	4
2.8	試験責任者	4
2.9	試験担当者	4
2.10	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 る事態及び試験計画書に従わなかったこと	5
2.11	資料保存	5
2.12	試験責任者の記名・押印及びその日付	5
3.	要約	6
4.	緒言	7
5.	試験材料	8
5.1	被験物質及び溶媒	8
5.1.1	被験物質	8
5.1.2	溶媒	8
5.2	溶媒の選定根拠	8
5.3	被験液の調製	8
5.3.1	調製方法	9
5.3.2	調製頻度	9
5.4	対照物質	9
5.4.1	陰性対照	9
5.4.2	陽性対照	9
5.5	使用細胞株	10
5.5.1	細胞株	10
5.5.2	細胞株の選択理由	10
5.5.3	培養条件	10
5.6	S9 mix 及び培養液の調製	11
5.6.1	S9 mix	11
5.6.2	培養液	12
5.7	試験方法	12

5.7.1	識別方法.....	12
5.7.2	用量の設定	12
5.7.3	用量設定試験.....	13
5.7.4	遺伝子突然変異試験.....	14
5.7.5	確認試験.....	15
5.7.6	コロニーの形態分類と計数.....	16
5.7.7	試験結果の表示	16
5.7.8	結果の計算	16
5.7.9	結果の判定及び統計学的処理法.....	18
5.7.10	試験成立基準.....	18
6.	試験結果及び考察.....	20
7.	参考文献	21

表

Table 1	Results of the gene mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate [Short-term treatment: -S9 mix]	22
Table 2	Results of the gene mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate [Short-term treatment: +S9 mix]	23

付表

Appendix 1-1	Results from the survival assay of the dose range finding test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate [Short-term treatment: -S9 mix]	24
Appendix 1-2	Results from the survival assay of the dose range finding test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate [Short-term treatment: +S9 mix]	25
Appendix 1-3	Results from the survival assay of the dose range finding test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate [Continuous treatment: 24hr]	26
Appendix 2-1	Results of the gene mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate (Individual Data) [Short-term treatment: -S9 mix]	27
Appendix 2-2	Results of the gene mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate (Individual Data) [Short-term treatment: +S9 mix]	28

N-G105

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

N-G105

2.2 試験表題

タモキシフェン・クエン酸塩のマウスリンフォーマ TK 試験

2.3 試験目的

タモキシフェン・クエン酸塩の安全性に関する非臨床試験の一環として、マウスリンパ腫由来の培養細胞 (L5178Y *tk*^{+/+}-clone 3.7.2C) を用い、チミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標として、タモキシフェン・クエン酸塩の遺伝毒性誘発性を検討した。

2.4 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

2.5 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

2.6 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所

〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

2.7 試験日程

試験開始日	:	2016 年 1 月 29 日
被験物質受領日	:	2015 年 12 月 25 日
実験開始日	:	2016 年 2 月 9 日
実験終了日	:	2016 年 3 月 7 日
試験終了日	:	2016 年 3 月 29 日

2.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部



2.9 試験担当者

被験物質保存責任者

試験担当者

:
:



2.10 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及び試験計画書に従わなかったこと

予見することができなかった試験の信頼性に及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

2.11 資料保存

試験計画書（原本）、記録文書、生データ及び報告書類（最終報告書の原本を含む）は株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書を提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

2.12 試験責任者の記名・押印及びその日付



2016 年 8 月 29 日



株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

3. 要約

タモキシフェン・クエン酸塩の遺伝毒性誘発性を評価するため、マウスリンパ腫由来の培養細胞 (L5178Y *tk*^{+/−}-clone 3.7.2C) を用い、チミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標として、遺伝子突然変異試験を実施した。

本被験物質の細胞毒性を事前に評価するため、TK6 細胞を用いて本被験物質の 100 ~ 6.25 µg/mL の用量で細胞毒性試験が行われた¹⁾。非代謝活性化では 50.0 ~ 25.0 µg/mL、代謝活性化では 100 ~ 50.0 µg/mL の用量に RS が 10 ~ 20% の用量が存在すると予測されたことから、用量設定試験では最高用量を 100 µg/mL とし、以下公比 1.5 で希釈した 66.7、44.4、29.6 及び 19.8 µg/mL の計 5 用量を設定した。その結果、20% RSG を示す理論上の用量は、短時間処理法の非代謝活性化では 38 µg/mL、代謝活性化では 39 µg/mL、連続処理法では 19 µg/mL と算定された。これらの結果に基づき、遺伝子突然変異試験の用量については、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」を参考として、短時間処理法では 40.0 µg/mL を最高用量とし、以下公比 1.2 で希釈した 3.33、2.78、2.31 及び 1.93 µg/mL の計 5 用量を設定した。

遺伝子突然変異試験の結果、被験物質処理群における総遺伝子突然変異頻度 (T-MF) は、代謝活性化系の存在下及び非存在下において、濃度依存性の反応及び陰性対照群における T-MF の有意な増加は認められなかった。

いずれの処理法においても陰性対照群におけるコロニー形成率は PE0 及び PE2 ともに 65 ~ 120% を示したことから、使用細胞のコロニー形成能は適切であったと判断された。また、短時間処理法において陰性対照群における T-MF は $50 \sim 170 \times 10^{-6}$ であり、陽性対照群における T-MF の値は 200×10^{-6} 以上かつ陰性対照群の 2 倍以上を示したことから、細胞の既存変異原物質に対する感受性は適切であると判断された。これらの結果から、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、タモキシフェン・クエン酸塩は本試験条件（短時間処理法）下において遺伝毒性誘発性を有しないと結論した。

4. 緒言

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部の依頼により、タモキシフェン・クエン酸塩の安全性評価の一環として、マウスリンパ腫由来の培養細胞（L5178Y *tk*^{+/-}-clone 3.7.2C）を用いた遺伝子突然変異試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の参考とするガイドラインに準拠して実施した。

1) 参考とするガイドラインなど

- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」
(OECD 理事会：2015 年 7 月 28 日)

N-G105

5. 試験材料

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

供給者	:	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
名称	:	タモキシフェン・クエン酸塩
別名（英名）	:	Tamoxifen Citrate
CAS 番号	:	54965-24-1
ロット番号	:	CTG3877
分子式	:	$C_{26}H_{29}NO \cdot C_6H_8O_7$
分子量	:	563.64
性状	:	白色～わずかにうすい褐色、結晶～粉末
溶解性	:	熱エタノールに溶け、水及びアセトンにほとんど溶けない。
融点	:	約 142°C (dec.)
安定性	:	保存条件下にて安定。
保存方法	:	冷蔵・遮光（実測値：4～6°C）
保存場所	:	東京研究所 被験物質保存室
未使用残余被験物質の処理	:	実験終了後の残量はすべて供給者に返却した。

上記被験物質情報は、試験委託者において非 GLP 下で得られた結果による。

5.1.2 溶媒

名称	:	ジメチルスルホキシド ((Dimethyl sulfoxide、DMSO)
規格	:	試薬特級
ロット番号	:	KPL2294
製造元	:	和光純薬工業株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室

5.2 溶媒の選定根拠

先行試験⁴⁾において、溶媒として DMSO が用いられているため。

5.3 被験液の調製

以下の操作は、滅菌済みの器具を用いて、可能な限り無菌的あるいは準無菌的に実施した。なお、本被験液は併行実施する関連試験（試験番号：N-G106）と共有した。

5.3.1 調製方法

1) 用量設定試験

- (1) 被験物質 0.0500 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。
- (2) 溶媒を加えて溶解後、スアップして最高濃度の 10.0 mg/mL 溶液を調製した。
- (3) 10.0 mg/mL 溶液を公比 1.5 (各濃度の被験液 3 mL : 溶媒 1.5 mL) で 4 段階希釈して、6.67、4.44、2.96 及び 1.98 mg/mL の計 5 濃度段階の被験液を調製した。

2) 遺伝子突然変異試験

- (1) 被験物質 0.1000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。
- (2) 溶媒を加えて溶解後、スアップして最高濃度の 10.0 mg/mL 溶液を調製した。
- (3) 10.0 mg/mL 溶液 1.2 mL に溶媒 1.8 mL を加えて 4.00 mg/mL 溶液を調製した。
4.00 mg/mL 溶液を公比 1.2 (各濃度の被験液 2 mL : 溶媒 0.4 mL) で 4 段階希釈して、3.33、2.78、2.31 及び 1.93 mg/mL の計 5 濃度段階の被験液を調製し、これを短時間処理法に用いた。
- (4) 10.0 mg/mL 溶液 0.95 mL に溶媒 4.05 mL を加えて 1.90 mg/mL 溶液を調製した。
1.90 mg/mL 溶液を公比 1.1 (各濃度の被験液 2.5 mL : 溶媒 0.5 mL) で 5 段階希釈して、1.73、1.57、1.43、1.30 及び 1.18 mg/mL の計 6 濃度段階の被験液を調製し、これを連続処理法に用いた。

5.3.2 調製頻度

用時に調製した。

5.4 対照物質

5.4.1 陰性対照

溶媒として使用した DMSO を陰性対照とした。

5.4.2 陽性対照

1) 非代謝活性化系

名称	:	メタンスルホン酸メチル (MMS)
ロット番号	:	AWR0610
製造元	:	株式会社ワコーケミカル
保存方法	:	冷蔵、遮光
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

2) 代謝活性化系

名称	:	シクロフォスファミド (CP)
ロット番号	:	CTN3690
製造元	:	和光純薬工業株式会社
純度	:	生化学用 (97.0%以上)
保存方法	:	冷蔵、遮光

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

3) 陽性対照物質の選択理由

「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」毒性試験ガイドラインに使用が推奨されているため。

4) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

(1) 遺伝子突然変異試験 短時間処理法 非代謝活性化及び連続処理法

MMS を γ 線滅菌済プラスチック遠心管 (50 mL) に 0.0100 g を秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K5E97) を 10 mL 加えて溶解し 1.0 mg/mL 溶液を調製した。次いで、1.0 mg/mL 溶液を 2 倍希釈 (1.0 mg/mL 溶液 5 mL : 生理食塩液 5 mL) し、0.50 mg/mL 溶液を調製した (非代謝活性化では 1.0 mg/mL 溶液、連続処理法では 0.50 mg/mL 溶液を培養液に 1 v/v% 添加した際の最終濃度: 10 μ g/mL 及び 5 μ g/mL)。

(2) 遺伝子突然変異試験 短時間処理法 代謝活性化

CP を γ 線滅菌済プラスチック遠心管 (50 mL) に 0.0100 g を秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K5E97) を 20 mL 加えて溶解し 0.50 mg/mL 溶液を調製した (培養液に 1 v/v% 添加した際の最終濃度: 5 μ g/mL)。

5.5 使用細胞株

5.5.1 細胞株

マウスリンパ腫由来の培養細胞 (L5178Y tk+/- -clone 3.7.2C) を用いた。

細胞は、独立行政法人 医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから 2013 年 4 月 10 日に入手し、凍結保存した細胞について定期的に細胞の性状検査を実施して、性状が適正である (細胞倍加時間が 9 ~ 12 時間の範囲内、自然突然変異頻度が 200×10^{-6} 未満、既存変異原性物質に対する細胞の感受性に問題がない及び微生物やマイコプラズマによる汚染がない) ことが確認されたものを 30 継代以内で試験に使用した。使用時の細胞継代数は用量設定試験で 4 継代、遺伝子突然変異試験で 8 継代であった。

5.5.2 細胞株の選択理由

「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」に使用が推奨されているため。

5.5.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で 1 ~ 4 日ごとに継代培養を行った。

5.6 S9 mix 及び培養液の調製

5.6.1 S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクターC セット、ロット番号 : C151030081) を混合し、S9 mix を調製した。調製は用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
製造元	:	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	:	15103008
製造日	:	2015 年 10 月 30 日
種・系統	:	ラット・SD 系
週齢・性	:	7 週齢・雄性
誘導物質	:	フェノバルビタール(PB)及び 5,6-ベンゾフラボン(BF)
投与方法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量	:	PB4 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)
使用期限	:	2016 年 4 月 29 日
保存方法	:	冷凍 (-70°C 以下)
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 超低温フリーザ

2) 補酵素

名称	:	コファクターC
製造元	:	オリエンタル酵母工業株式会社
ロット番号	:	C15102808
製造日	:	2015 年 10 月 28 日
保存方法	:	冷凍 (-70°C 以下)
使用期限	:	2016 年 4 月 27 日
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 超低温フリーザ

3) S9 mix の組成 (1 mL 中)

水	:	0.7 mL
S9	:	0.3 mL
MgCl ₂	:	5 µmol/mL
KCl	:	33 µmol/mL
グルコース-6-リン酸	:	5 µmol/mL
酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP)	:	4 µmol/mL
HEPES 緩衝液 (pH7.2)	:	4 µmol/mL

5.6.2 培養液

非働化（56℃、30 分）した馬血清（HS）を、RPMI Medium 1640（GIBCO™ Cat.No.11875）に 0、10 及び 20 v/v% 添加した培養液（それぞれ RPMI-0、RPMI-10 及び RPMI-20 と略記した。）を用いた。調製後の培養液は冷蔵保存した。

1) 馬血清

ロット番号	:	1671318
製造元	:	Life Technologies Corporation
使用期限	:	2019 年 6 月
保存方法	:	冷凍（-20℃ 以下）
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 冷凍庫

2) RPMI Medium 1640

ロット番号	:	1713312
製造元	:	Life Technologies Corporation
使用期限	:	2016 年 8 月
保存方法	:	冷蔵
保存場所	:	東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

5.7 試験方法

試験は以下に示したステージの順に実施した¹⁻³⁾。

1. 用量設定試験	短時間処理法	非代謝活性化 代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理
2. 遺伝子突然変異試験	短時間処理法	非代謝活性化 代謝活性化

5.7.1 識別方法

以下の表示に従い、処理方法及び処理群を明記したラベルで使用器材の識別を行った。

項 目	内 容	表 示
処理方法	短時間処理法 非代謝活性化	-
	短時間処理法 代謝活性化	+
	連続処理法 24 時間処理	24-
処理群	陰性対照群 (Negative Control)	NC (2 系列の場合、NC1、NC2)
	被験物質処理群	高濃度から 1、2、3…N
	陽性対照群 (Positive Control)	PC
同一処理群内での識別		1、2、3…N

5.7.2 用量の設定

1) 用量設定試験

本被験物質の細胞毒性を事前に評価するため、TK6 細胞を用いて本被験物質の 100

～ 6.25 $\mu\text{g/mL}$ の用量で細胞毒性試験が行われた¹⁾。非代謝活性化では 50.0 ～ 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 、代謝活性化では 100 ～ 50.0 $\mu\text{g/mL}$ の用量に RS が 10 ～ 20% の用量が存在すると予測された。本結果に基づき、最高用量を 100 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 1.5 で希釈した 66.7、44.4、29.6 及び 19.8 $\mu\text{g/mL}$ の計 5 用量を設定する。これに加えて陰性対照群を設けた。

2) 遺伝子突然変異試験

用量設定試験の結果に基づき、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」を参考として RSG が 10 ～ 20% を示す用量を選定した。これに加えて陰性対照群、陽性対照群を設けた。

処理方法		用 量 ($\mu\text{g/mL}$)
短時間処理法	非代謝活性化	40.0、33.3、27.8、23.1、19.3
	代謝活性化	40.0、33.3、27.8、23.1、19.3
連続処理法	24 時間処理	19.0、17.3、15.7、14.3、13.0、11.8

5.7.3 用量設定試験

遺伝子突然変異試験の用量を設定するための予備試験として実施した。遺伝子突然変異試験の最高用量の設定に用いた細胞毒性の指標としては、relative suspension growth (RSG) を用いた。以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済みの器具を用いて、無菌的に実施した。なお、連続処理法は短時間処理法の判定が陰性を示した場合に実施する。

- 1) 短時間処理法の非代謝活性化、代謝活性化及び連続処理法のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。容器はプラスチック製のチューブまたはフラスコを用い、使用個数は各群 1 個用いた。
- 2) 対数増殖期にある細胞を RPMI-10 で約 1×10^6 cells/mL の細胞浮遊液に調製した。
- 3) 下表に従い、被験液処理を行った。

内 容 物	容 量 (mL)		
	非代謝活性化	代謝活性化	連続処理法
細胞浮遊液 (10^6 cells/mL)	6.0	6.0	6.0
RPMI-0	3.4	3.4	
RPMI-10			13.8
S9 mix		0.5	
150 mM KCl	0.5		
被験液又は溶媒	0.1	0.1	0.2

- 4) 肉眼または倒立位相差顕微鏡下で析出の有無及び培養液の色調を観察した。
- 5) 短時間処理法では、容器のキャップをかたく締め、約 37°C で 3 時間振盪培養を行った。連続処理法では、容器のキャップは半開きとし、37°C、5%CO₂ 条件下で 24 時間静置培養を行った。
- 6) 培養終了後に、肉眼または倒立位相差顕微鏡下で析出の有無を観察した。
- 7) 内容物を約 1000 rpm で約 5 分間遠心した後、上清を除去し、約 10 mL の RPMI-0 を加え、細胞を懸濁後、再度遠心した。

- 8) 上清を除去し、RPMI-10 を適量加え細胞濃度を測定した（血球計算盤を用いる場合は、4箇所について計数を行い、平均（四捨五入して整数で表示）を算出した。この時の細胞濃度は「平均 $\times 10^4$ cells/mL」）。
- 9) 得られた細胞濃度から、RPMI-10 で希釈し、浮遊液 A を調製した。このとき、細胞濃度及び調製量の上限は 2×10^5 cells/mL、50 mL とした。
- 10) 9)で調製した各浮遊液 A を 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。
- 11) 約 22~24 時間後に、各細胞濃度を求めた（細胞濃度測定機器を用いた場合の結果の表示方法：ADAM-MC (NanoEn Tek, Inc.)の表示値）。
- 12) RPMI-10 を用いて継代培養した。このとき、細胞濃度及び調製量の上限は 2×10^5 cells/mL、50 mL とした。
- 13) 12)から約 22~24 時間後に、11)と同様に各細胞濃度を求めた（結果の表示方法：ADAM-MC (NanoEn Tek, Inc.)の表示値）。
- 14) 5.7.8 項より、陰性対照群の値を 100%として、被験物質処理群の relative suspension growth (%RSG)を求めた。

5.7.4 遺伝子突然変異試験

以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済みの器具を用いて、無菌的に実施した。

- 1) 短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。容器はプラスチック製のチューブまたはフラスコを用い、使用個数は陰性対照群では 2 個、被験物質処理群及び陽性対照群では 1 個とした。
- 2) 対数増殖期にある細胞を RPMI-10 で約 1×10^6 cells/mL の細胞浮遊液に調製した。
- 3) 下表により、被験液処理を行った。

内 容 物	容 量 (mL)	
	非代謝活性化	代謝活性化
細胞浮遊液 (10^6 cells/mL)	6.0	6.0
RPMI-0	3.4	3.4
RPMI-10		
S9 mix		0.5
150 mM KCl	0.5	
被験液又は溶媒又は 陽性対照物質溶液	0.1	0.1

- 4) 肉眼または倒立位相差顕微鏡下で析出の有無及び培養液の色調を観察した。
- 5) 短時間処理法では、容器のキャップをかたく締め、約 37°C で 3 時間振盪培養を行った。
- 6) 培養終了後に、肉眼で析出の有無を観察した。
- 7) 内容物を遠心（設定：1000 rpm、5 分）した。

- 8) 上清を除去し、約 10 mL の RPMI-0 を加えて細胞を懸濁した後に、再度遠心した。
- 9) 上清を除去し、RPMI-10 を適量加えて細胞を懸濁した後に、それぞれ細胞濃度を測定した（血球計算盤を用いる場合は、4 箇所について計数を行い、平均（四捨五入して整数で表示）を算出した。この時の細胞濃度は「平均 $\times 10^4$ cells/mL」）
- 10) RPMI-20 を用いて、細胞濃度：8 cells/mL、調製量：25 mL（陰性対照群のみ 50 mL）となるように希釈を行った。
- 11) 96 ウエルプレート 1 枚（陰性対照群のみ 2 枚）に、各 0.2 mL/ウエル分注した (PE0)。
- 12) 96 ウエルプレートは 37°C、5%CO₂ 条件下で 14 日間培養し、その後コロニーを含むウエルの数を記録した。
- 13) RPMI-10 を用いて、9)の残液を継代培養した。このとき、細胞濃度及び調製量の上限は 2×10^5 cells/mL、50 mL とした。
- 14) 13) から約 22~24 時間後に、5.7.3 11)と同様に各細胞濃度を求めた（結果の表示方法：ADAM-MC (NanoEn Tek, Inc.)の表示値）。
- 15) 13)と同様に継代培養を行った。
- 16) 15) から約 22~24 時間後に、5.7.3 11)と同様に各細胞濃度を求めた（結果の表示方法：ADAM-MC (NanoEn Tek, Inc.)の表示値）。
- 17) RPMI-20 を用いて、細胞濃度： 1×10^4 cells/mL、調製量：50 mL（陰性対照群のみ 100 mL）を調製した（細胞浮遊液 A）。
- 18) RPMI-20 を用いて、細胞浮遊液 A を細胞濃度：8 cells/mL、調製量：25 mL（陰性対照群のみ 50 mL）に調製した（細胞浮遊液 B）。
- 19) 各細胞浮遊液 B を、96 ウエルプレート 1 枚（陰性対照群のみ 2 枚）に、各 0.2 mL/ウエル分注した (PE2)。
- 20) 細胞浮遊液 A の残液に trifluorothymidine (TFT)を最終濃度 6 μ g/mL になるように添加した（細胞浮遊液 C）。
- 21) 細胞浮遊液 C を 96 ウエルプレート 2 枚（陰性対照群のみ 4 枚）に、各 0.2 mL/ウエル分注した (MF)。
- 22) 37°C、5%CO₂ 条件下で、PE2 用の 96 ウエルプレートは 12 日間培養し、コロニーを含むウエルの数を記録し、MF 用の 96 ウエルプレートは 12 日間培養し、コロニーを含むウエルの数とコロニーの大きさを記録した。
- 23) 5.7.8 項に従い、PE0、RS0、RSG、RTG、PE2、RS2、MF 及び%SC を算出した。

5.7.5 確認試験

遺伝子突然変異試験の結果において、以下の項目に該当しなかったため、確認試験を実施しなかった。

- 1) 被験物質処理群の中間用量で陽性を示すが、被験液の濃度に伴う遺伝子突然変異頻度の増加が認められない場合。
- 2) 被験物質処理群の最高用量のみで陽性を示す場合。

5.7.6 コロニーの形態分類と計数

コロニーは、下記の基準に従い、まず大きさで分類し、大きさで判断に迷うものについては形態を参照した。

1) 大きさ

Small colony : ウエルの直径の 1/4 未満のもの。

Large colony : ウエルの直径の 1/4 以上のもの。

2) 形態

Small colony : 密度が高く、辺縁がはっきりしているもの。

Large colony : 密度が低く、辺縁がルーズなもの。

5.7.7 試験結果の表示

試験結果は以下のように分類して表示した。すべての計算には Microsoft 社の Excel 2010 を使用し、Excel に設定された計算式によって、有効桁数の設定を行わずに算出した。

plating efficiency (PE)

: 細胞のコロニー形成能（いわゆる平板効率）。被験物質処理群の細胞毒性を求める PE0 及び遺伝子突然変異頻度を求めるための PE2 を算出した。

relative survival (RS)

: 細胞毒性の指標。被験物質処理群の PE0 (PE2) と陰性対照群の PE0 (PE2) との比である RS0 (RS2) を算出した。

relative suspension growth (RSG)

: 被験物質処理群の細胞増殖率。処理終了 1 日後及び 2 日後の積として表した。また、被験物質処理群の RSG と陰性対照群の RSG との比 (%RSG) を算出した。

relative total growth (RTG)

: RSG と RS2 の積として表した。

mutant frequency (MF)

: 突然変異コロニーの出現率（突然変異頻度）。突然変異発現期間後のコロニー形成能 (PE2) も考慮して求めた。

%SC

: Small colony をもたらす遺伝子突然変異頻度の割合。

5.7.8 結果の計算

遺遺伝子突然変異試験における陰性対照群は、2 系列の結果を個別に算出し、その平均値を代表値とした。

1) PE (PE0 及び PE2)

ポアソン分布の式に従い、小数点以下3桁を四捨五入し、小数点以下2桁まで表示した。

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{N}$$

EW	: コロニーを含まないウエルの数
TW	: 総ウエル数
N	: 1.6 (Plating 時のウエル当たりの平均細胞数)

2) RS (RS0 及び RS2)

小数点第1位を四捨五入して整数で表示 (%)した。

$$\%RS = \frac{\text{処理群の PE} \times 100}{\text{陰性対照群の PE}}$$

3) RSG 及び %RSG

小数点第3位を四捨五入して、小数点以下2桁まで表示した。

$$RSG = \frac{\text{処理群の Daily cell growth (Day 1)} \times \text{Daily cell growth (Day 2)}}{\text{陰性対照群の Daily cell growth (Day 1)} \times \text{Daily cell growth (Day 2)}}$$

Daily cell growth は1日当たりの細胞増殖率。
処理終了から1日後及び2日後に求めた。

$$\text{Daily cell growth} = \frac{\text{翌日の細胞濃度}}{\text{調製した細胞濃度}}$$

$$\%RSG = \frac{\text{処理群の RSG} \times 100}{\text{陰性対照群の RSG}}$$

4) RTG

小数点第3位を四捨五入して、小数点以下2桁まで表示した。

$$RTG = RSG \times \%RS2$$

5) MF (T-MF、L-MF 及び S-MF)

突然変異発現期間後のコロニー形成能 (PE2) を考慮して算出し、小数点第3位を四捨五入して、小数点以下2桁まで表示した。なお、MF は $\times 10^{-6}$ で表示した。

(1) T-MF (総遺伝子突然変異頻度)

$$T-MF = \frac{-\ln(EW/TW)}{PE2 \times N}$$

EW	: TW - (A+B+C) ... コロニーを含まないウエルの数
TW	: 総ウエル数
N	: 2000 (Plating 時のウエル当たりの平均細胞数)

(2) L-MF (Large colony の遺伝子突然変異頻度)

$$L-MF = \frac{-\ln(EW/TW)}{PE2 \times N}$$

EW	: TW - (A+C)・・・コロニーを含まないウエルの数
TW	: 総ウエル数
N	: 2000 (Plating 時のウエル当たりの平均細胞数)

(3) S-MF (Small colony の遺伝子突然変異頻度)

$$S-MF = \frac{-\ln(EW/TW)}{PE2 \times N}$$

EW	: TW - (B+C)・・・コロニーを含まないウエルの数
TW	: 総ウエル数
N	: 2000 (Plating 時のウエル当たりの平均細胞数)

6) %SC

小数点第 1 位を四捨五入して整数で表示 (%)した。

$$\%SC = \frac{S-MF \times 100}{T-MF}$$

5.7.9 結果の判定及び統計学的処理法

判定は「総遺伝子突然変異頻度 (T-MF)」の値を用いて行い、以下に基準を示す。

GEF とは総合的評価ファクター (Global Evaluation Factor) を示し、マイクロウェル法の場合は 126×10^{-6} となる。

総遺伝子突然変異頻度 (T-MF)	判定
(1) $X < \text{GEF} + \text{同時陰性対照群の T-MF}$ を示す場合 (2) 明確な用量依存性が見られない場合	陰性 (-)
(1) $X < \text{GEF} + \text{同時陰性対照群の T-MF}$ または $\text{GEF} + \text{同時陰性対照群の T-MF} \leq X$ を示す場合 (2) 明確な用量依存性が見られない場合	疑陽性 (±)
(1) $\text{GEF} + \text{同時陰性対照群の T-MF} \leq X$ を示す用量が 1 用量以上ある場合 (2) 用量依存的に増加する場合	陽性 (+)

注 1) X は判定対象となる T-MF を表す。

注 2) MF は PE2 を考慮し算出しているため、90%以上の細胞毒性が認められる用量で陽性判定が得られた場合は、結果の解釈に注意を要する。

なお、統計解析は実施しなかった。

5.7.10 試験成立基準

以下に示した内容を満たした場合において、被験物質の遺伝子突然変異誘発性を正しく評価できたものとした。

- 1) 非代謝活性化及び代謝活性化のいずれかで陽性結果が得られていない限り、2つの条件すべてで試験を実施していること。
- 2) 評価可能な用量が 4 用量以上であること。
- 3) 陰性対照群における T-MF が Duplicate culture 間で同等であり、それぞれ 50 ~ 170

N-G105

$\times 10^{-6}$ であること。

- 4) 陰性対照群における PE0 及び PE2 が 65～120%であること。
- 5) 陽性対照群における T-MF が 200×10^{-6} 以上、かつ陰性対照群の 2 倍以上を示すこと。

6. 試験結果及び考察

結果を Table 1 ~ 2、Appendix 1-1~1-3 及び Appendix 2-1 ~ 2-2 に示した。

本被験物質の細胞毒性を事前に評価するため、TK6 細胞を用いて本被験物質の 100 ~ 6.25 µg/mL の用量で細胞毒性試験が行われた¹⁾。非代謝活性化では 50.0 ~ 25.0 µg/mL、代謝活性化では 100 ~ 50.0 µg/mL の用量に RS が 10 ~ 20%の用量が存在すると予測されたことから、用量設定試験では最高用量を 100 µg/mL とし、以下公比 1.5 で希釈した 66.7、44.4、29.6 及び 19.8 µg/mL の計 5 用量を設定した。その結果、20%RSG を示す理論上の用量は、短時間処理法の非代謝活性化では 38 µg/mL、代謝活性化では 39 µg/mL、連続処理法では 19 µg/mL と算定された。これらの結果に基づき、遺伝子突然変異試験の用量については、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」を参考として、短時間処理法では 40.0 µg/mL を最高用量とし、以下公比 1.2 で希釈した 3.33、2.78、2.31 及び 1.93 µg/mL の計 5 用量を設定した。

遺伝子突然変異試験の結果、被験物質処理群における総遺伝子突然変異頻度 (T-MF) は、短時間処理法の非代謝活性化では濃度依存性の反応及び T-MF の増加が認められなかったが、代謝活性化では濃度依存性の反応が認められた。しかしながら、その増加は同時陰性対照群と GEF (総合的評価ファクター、Global Evaluation Factor) を合わせた値を超えていなかったため陰性と判定した。本被験物質の遺伝子突然変異誘発性の判定には、今後更なる長期暴露による評価が必要と考えられる。

いずれの処理法においても陰性対照群におけるコロニー形成率は PE0 及び PE2 ともに 65 ~ 120%を示したことから、使用細胞のコロニー形成能は適切であったと判断された。また、短時間処理法において陰性対照群における T-MF は $50 \sim 170 \times 10^{-6}$ であり、陽性対照群における T-MF の値は 200×10^{-6} 以上かつ陰性対照群の 2 倍以上を示したことから、細胞の既存変異原物質に対する感受性は適切であると判断された。これらの結果から、試験は適切に実施されたと考えられた。

なお、タモキシフェン・クエン酸塩は、ヒト P-450 遺伝子を導入した MCL-5 細胞において染色体異常の誘発性が報告されている⁵⁾。同様に、5 種類のヒト P-450 遺伝子及びエポキシド加水分解酵素を導入した MCL-5 細胞を用いる *in vitro* 小核試験において陽性が報告されている⁶⁾。

以上の結果から、タモキシフェン・クエン酸塩は本試験条件 (短時間処理法) 下において遺伝毒性誘発性を有しないと結論した。

7. 参考文献

- 1) 鵜飼 明子 (2014 年) : TK6 細胞の遺伝毒性試験 (TK6 assay) のための薬剤濃度検定、国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第三室
- 2) 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 (2000) : 遺伝毒性試験 Q&A、pp.48-61、サイエンティスト社、東京
- 3) Robinson, W.D., Green, M.H.L., Cole, J. Healy, M.J.R., Garner, R.C. and Datehouse, D.: Statistical evaluation of bacterial/mammalian fluctuation tests. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data; ed. D. J. Kirkland. Cambridge University Press, Cambridge, pp.102-140
- 4) Clive, D., Johnson, O., Spector, J., Batson, A. and Brown, M.: Validation and characterization of the L5178Y/TK^{+/−} mouse lymphoma mutagen assay system, Mutation Res., 59, 61-108 (1979)
- 5) Styles JA, Davies A, Davies R, White IN, Smith LL.(1997): Clastogenic and aneugenic effects of tamoxifen and some of its analogues in hepatocytes from dosed rats and in human lymphoblastoid cells transfected with human P450 cDNAs (MCL-5 cells), Carcinogenesis, 18, 303-313
- 6) Crofton-Sleigh C, Doherty A, Ellard S, Parry EM, Venitt S. (1993): Micronucleus assays using cytochalasin-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydrolase., Mutagenesis., 8, 363-72

Table 1

N-G105

Results of the mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate

[Short-term treatment : -S9 mix]

Treatment and Concentration (µg/mL)			Survival assay		Viability assay				Mutation assay			%SC ^{b)}
			Plating efficiency (PE0)	Relative survival (RS0 : %)	Plating efficiency (PE2)	Relative survival (RS2 : %)	Relative survival growth (RSG, %RSG)	Relative total growth (RTG : %)	Mutant frequency (×10 ⁻⁶)			
									L-MF	S-MF	T-MF	
NC	0	-1	0.95	100	0.94	100	1.00 (100.00)	100.00	66.64	49.57	123.15	40
		-2	0.87	100	1.03	100	1.00 (100.00)	100.00	52.03	40.90	97.78	42
		average	0.91	100	0.98	100	1.00 (100.00)	100.00	59.34	45.23	110.46	41
Test article		19.3	0.98	108	0.89	91	0.75 (74.53)	67.77	42.39	23.83	68.14	35
		23.1	0.98	108	0.95	97	0.53 (53.46)	51.70	25.27	39.85	67.16	59
		27.8	0.52	57	0.92	94	0.56 (55.86)	52.37	53.45	32.04	88.91	36
		33.3	0.53	59	1.48	151	0.03 (3.12)	4.69	14.38	106.75	126.63	84
		40.0	N/A									
PC			1.12	123	0.67	64	0.58 (57.85)	36.87	91.17	242.00	371.08	65

NC: Negative Control (DMSO) , PC: Positive Control (methylmethanesulfonate ; 10 µg/mL)

a) These values showed as a relative survival against the negative control value.

b) These values are ratios of the mutant frequency that brings small colony.

All calculations were carried out using Excel 2010

Table 2

N-G105

Results of the mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate

[Short-term treatment : +S9 mix]

Treatment and Concentration (µg/mL)			Survival assay		Viability assay				Mutation assay			%SC ^{b)}
			Plating efficiency (PE0)	Relative survival (RS0 : %)	Plating efficiency (PE2)	Relative survival (RS2 : %)	Relative survival growth (RSG, %RSG)	Relative total growth (RTG : %)	Mutant frequency (×10 ⁻⁶)			
									L-MF	S-MF	T-MF	
NC	0	-1	1.33	100	1.08	100	1.00 (100.00)	100.00	50.83	20.93	74.26	28
		-2	0.89	100	1.01	100	1.00 (100.00)	100.00	54.32	23.71	80.87	29
		average	1.11	100	1.05	100	1.00 (100.00)	100.00	52.58	22.32	77.56	29
Test article		19.3	1.08	98	0.92	88	0.89 (88.64)	77.94	41.11	29.04	72.51	40
		23.1	0.79	71	1.20	115	0.79 (79.11)	90.90	43.30	10.96	55.49	20
		27.8	0.49	44	0.79	76	0.59 (59.04)	44.70	30.28	33.73	65.72	51
		33.3	0.33	29	1.85	176	0.17 (17.41)	30.71	39.39	46.00	93.36	49
		40.0	0.21	19	1.01	97	0.01 (0.77)	0.74	0.00	145.51	145.51	100
PC			0.21	19	0.36	34	0.41 (40.75)	13.99	185.67	630.52	920.98	68

NC: Negative Control (DMSO), PC: Positive Control (cyclophosphamide ; 5 µg/mL)

a) These values showed as a relative survival against the negative control value.

b) These values are ratios of the mutant frequency that brings small colony.

All calculations were carried out using Excel 2010

Results from the survival assay of the dose range finding test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate

[Short-term treatment: -S9 mix]

RSG & %RSG					
Treatment and Concentration (µg/mL)		Relative suspension growth (RSG)	%RSG ^{a) b)}	Observation ^{c)}	
				Color of medium ^{d)}	Precipitates/Crystals ^{e)}
					1) 2)
0 (NC)		1.00	100.00	-	- -
Test article	13.2	0.70	70.42	-	- -
	19.8	f)	f)	-	- -
	29.6	f)	f)	-	- -
	44.4	f)	f)	-	- -
	66.7	f)	f)	-	- -
	100	f)	f)	-	- -

NC : Negative Control (DMSO)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
b) These values showed as a relative survival ratio against the negative control value.
c) Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test suspensions and ²⁾ at the end of treatment.
d) - : No changes of color
e) - : Absence of precipitates/crystals
f) %RSG at 100 ~ 19.8 µg/mL did not calculate, because cell death was observed in these doses.

All calculations were carried out using Excel 2010

Results from the survival assay of the dose range finding test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate

[Short-term treatment: +S9 mix]

RSG & %RSG					
Treatment and Concentration (µg/mL)		Relative suspension growth (RSG)	%RSG ^{a) b)}	Observation ^{c)}	
				Color of medium ^{d)}	Precipitates/Crystals ^{e)}
					1) 2)
0 (NC)		1.00	100.00	-	- -
Test article	13.2	0.68	67.55	-	- -
	19.8	f)	f)	-	- -
	29.6	f)	f)	-	- -
	44.4	f)	f)	-	- -
	66.7	f)	f)	-	- -
	100	f)	f)	-	- -

NC : Negative Control (DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) These values showed as a relative survival ratio against the negative control value.

c) Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test suspensions and ²⁾ at the end of treatment.

d) - : Absence of precipitates/crystals

e) %R : Absence of precipitates/crystals

f) %RSG at 100 ~ 19.8 µg/mL did not calculate, because cell death was observed in these doses.

All calculations were carried out using Excel 2010

Results from the survival assay of the dose range finding test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate

[Continuous treatment: 24 hr]

RSG & %RSG					
Treatment and Concentration (µg/mL)		Relative suspension growth (RSG)	%RSG ^{a) b)}	Observation ^{c)}	
				Color of medium ^{d)}	Precipitates/Crystals ^{e)}
					1) 2)
0 (NC)		1.00	100.00	-	- -
Test article	13.2	1.23	122.79	-	- -
	19.8	f)	f)	-	- -
	29.6	f)	f)	-	- -
	44.4	f)	f)	-	- -
	66.7	f)	f)	-	- -
	100	f)	f)	-	- -

NC : Negative Control (DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) These values showed as a relative survival ratio against the negative control value.

c) Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test suspensions and ²⁾ at the end of treatment.

d) - : Absence of precipitates/crystals

e) %R : Absence of precipitates/crystals

f) %RSG at 100 ~ 19.8 µg/mL did not calculate, because cell death was observed in these doses.

All calculations were carried out using Excel 2010

Results of the mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate (Individual Data)

[Short-term treatment : -S9 mix]

Treatment and Concentration (µg/mL)		Observation ^{a)}			Survival assay		Viability assay		Mutation assay			
		Color of ^{b)} medium	Precipitates ^{c)}		Wells observed	Number of colonies	Wells observed	Number of colonies	Wells observed	Number of colonies		
			1)	2)						Large colony	Small colony	L and S colonies
NC	0	-1	-	-	192	150	192	149	384	45	34	0
		-2	-	-	192	144	192	155	384	39	31	0
Test article	19.3	-	-	-	96	76	96	73	192	14	8	0
	23.1	-	-	-	96	76	96	75	192	9	14	0
	27.8	-	-	-	96	54	96	74	192	18	11	0
	33.3	-	-	-	96	55	96	87	192	8	52	0
	40.0	-	-	-	96	96	96	96	192	0	0	0
PC		-	-	-	96	96	96	96	192	22	53	0

NC: Negative Control (DMSO) , PC: Positive Control (methylmethanesulfonate ; 10 µg/mL)

a) Color of medium was observed immediately after addition of the test extract suspensions. Precipitates were observed ¹⁾ immediately after addition of the test extract suspensions and ²⁾ at the end of treatment.

b) - : No change of color

c) - : Absence of precipitates

Results of the mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Tamoxifen Citrate (Individual Data)

[Short-term treatment : +S9 mix]

Treatment and Concentration (µg/mL)			Observation ^{a)}			Survival assay		Viability assay		Mutation assay			
			Color of ^{b)} medium	Precipitates ^{c)}		Wells observed	Number of colonies	Wells observed	Number of colonies	Wells observed	Number of colonies		
				1)	2)						Large colony	Small colony	L and S colonies
NC	0	-1	-	-	-	192	169	192	158	384	40	17	0
		-2	-	-	-	192	146	192	154	384	40	18	0
Test article	19.3		-	-	-	96	79	96	74	192	14	10	0
	23.1		-	-	-	96	69	96	82	192	19	5	0
	27.8		-	-	-	96	52	96	69	192	9	10	0
	33.3		-	-	-	96	39	96	91	192	26	30	0
	40.0		-	-	-	96	27	96	77	192	0	49	0
PC			-	-	-	96	27	96	42	192	23	69	1

NC: Negative Control (DMSO) , PC: Positive Control (cyclophosphamide ; 5 µg/mL)

- a) Color of medium was observed immediately after addition of the test extract suspensions. Precipitates were observed ¹⁾ immediately after addition of the test extract suspensions and ²⁾ at the end of treatment.
 b) - : No change of color
 c) - : Absence of precipitates