

BMS アンケート(2004年6月)からの質問集(各班での討論用資料とする)

菌株の管理等について

1. 菌株の特性検査の膜変異チェックにおいて、当施設の場合、最近ではクリスタルバイオレットの阻止円が小さくなり問題になっている。使用しているテスメディア AN 培地の寒天の影響らしいことはご教示いただいているが、クリスタルバイオレットの阻止円は 10 mm 程度でも良いのか？
2. 菌株の維持・管理については菌株を継代するたびに正常範囲内にあるロットの選択に苦労している。陰性対照値、陽性対照値、戻り菌数、*rfa* 阻止帯の大きさ等、Ames 試験の原点に戻ると大変難しい事と実感している。これらの管理はどのように行っているのか？
3. 菌株の性質チェックについて GLP で実施することが可能かどうか当社で話題になっている。先日、厚生労働省医薬食品局審査管理課より、安全性薬理試験やTK試験の実施等を踏まえた GLP チェックリストの見直し案が提示され、その中に菌株管理の項目があったのが発端になっている。現時点では非GLPで実施し、当然 QAU のチェックも受けていないが、他社ではどうしているか？またどのように考えているか？
4. 試験のやり方、試薬など特に変えてはいないのに、溶媒対照値や陽性対照値が高くなる、あるいは低くなる、といった現象が発生することがある。(1回の試験だけではなく、ある期間にまたがって)このような経験があるか？また何が原因か？どのような対策をとればよいのか？
5. TA98 の試験を年間 30～40 試験実施しており、溶媒対照値はほぼ 20～30 の間で収まっている。しかし、その内何試験か突発的に 10 程度、逆に 40～50 程度になる試験がある(4倍の差)。多い場合は、小さなコロニーが出てきて数値を押し上げている。実施手順は全く同じで、同じ菌液を分注凍結保存した菌株を培養して用い、時期的な特異性もなさそうである(背景データを経時的に整理はしていないが、、、)。他社ではこのようなことはないのかなど、何か情報があれば教えて欲しい。また、他に何が理由として挙げられるのか？
6. 菌株の前培養開始までの保存時間は 7 時間～9 時間未満ぐらいだが、前培養開始までの保存時間によって生菌数に影響あるのか？
7. TA100 について、復帰変異コロニー数の平均が低い。他のラボはどのように管理しているのか？
8. 菌株の継代はどのようにしているのか？
(シングルコロニーの拾い方、増殖曲線のとり方、濁度と生菌数の検量線の作成方法)
9. 大腸菌について、WP2 *uvrA* か WP2 *uvrA*/pKM101 のどちらを使用しているか？
あるいはそれ以外？

試験材料について

1. S9 のロットによって活性が違うが、他のラボでは活性の良いロットを選んで、まとめてストックしているのか？

2. 滅菌蒸留水、DMSO、アセトン以外の溶媒でどのような溶媒を使用しているのか？

3. THF、DMF、95%エタノールまた、界面活性剤はどの程度使用できるのか？

生育阻害、沈殿について

1. ポリマーの試験をすることがあり、ポリマーの場合に生育阻害でなく、低濃度で菌が凝集していかに、生育阻害があるように見えることがあり、高濃度で被験物質が析出してくると、溶媒対照と比べて差は認められないような現象がある。他のラボではどのようにしているのか？

2. 静菌作用については、どのようにしているのか？

3. 生育阻害が強くなく、低濃度から高濃度まで、だらだら認められている場合の設定濃度は？

その他

1. 使用後のシャーレ、試験管はどのように廃棄しているのか？

2. 医薬品の開発における復帰突然変異試験の位置付けに関する情報。

3. 遺伝子組換えの拡散防止省令によると、サルモネラ菌は P2 との規定があり、Ames 試験は P2 環境下で実施しなければならない。個人的に Ames 試験菌株は毒性が不活化されていることなどを考えると P2 規定は厳しいと思うのだが、他の先生方の意見を聞いてみたい。

4. 現在、一人で試験を実施しているので(染色体異常試験も一人で実施しているのでやりくりが少々大変)、同じ様な境遇の方がいたら、試験実施にあたって、注意している点や効率的な進め方等の話を聞きたい。

5. 労働省による精度管理事業のデータを見てみると、機関間による差がかなり見られる。
前培養条件なども各々機関で全く違うが、コントラクトラボなどの例外はあるにしても他機関の実状は互いに分からない事が多いはずである。そのため、有志で各々の実験風景、菌株の保存状態の写真とともに背景データを紹介して、機関毎に比較し、何が原因で差が出ているのか、自分の所の問題を探す意味でも議論する。

6. Ames 試験に用いられる標準菌株について、各株の具体的な変異原物質の検出特性等についての話が聞きたい。
例えば、実際に TA1537 のみで陽性になる変異原物質はどの程度あり、どのような物質が多いのか、など具体的な話が聞きたい。

7. 被験物質中に遊離のアミノ酸(ヒスチジン、トリプトファン)が含まれている場合、変異原性とは別に復帰変異コロニー数の増加が認められる。このような場合、どのように試験を進めたら良いか？