

### 13.6.3. S9 mix の調製

用時にコファクターと S9 を 7:3 の割合で混合した。S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した。

S9	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol

培養液中の S9 濃度を 5% とした。(培養液中の S9 蛋白量は 1.10 mg/mL であった)

## 13.7. 細胞増殖抑制試験

### 13.7.1. 群構成

染色体異常試験における最高用量を設定するために、細胞増殖抑制試験を行った。

細胞増殖抑制試験の最高用量は、4000 μg/mL とし、 $\sqrt[10]{10}$  で 1260, 400, 126, 40.0, 12.6, 4.00 及び 1.26 μg/mL の計 8 用量を設定した。また、陰性対照群を設けた。

### 13.7.2. 処理法

$4 \times 10^3$  細胞/mL の細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養後、短時間処理法の代謝活性化系非存在下と代謝活性化系存在下並びに連続処理法(代謝活性化系非存在下)により処理した。連続処理法の処理時間は、細胞周期(15.7 時間)の 1.5 倍となる約 24 時間とした。被験物質液による処理は培養液を全量交換することによって行った。1 用量あたり 60 mm プレート 2 枚を用いた。

#### 1) 短時間処理法 代謝活性化系非存在下

培養液を全量抜き取り、被験物質液を 3 mL 添加し、細胞を 6 時間処理培養した後、ダルベッコリン酸緩衝液 (pH 7.1, Invitrogen Corporation, 以下 PBS) で洗い、培養液 5 mL を加え、更に 18 時間回復培養した。

#### 2) 短時間処理法 代謝活性化系存在下

培養液を全量抜き取り、S9 mix 0.5 mL 及び被験物質液を 2.5 mL を加え、細胞を 6 時間処理培養後、PBS で洗い、培養液 5 mL を加え、更に 18 時間回復培養した。

#### 3) 連続処理法

培養液を全量抜き取り、被験物質液を 5 mL 添加し、細胞を 24 時間連続処理培養した。

被験物質添加時及び培養処理終了時に被験物質の析出の有無を確認した。

### 13.7.3. 毒性評価

培養終了後、培養液に生細胞数測定試薬を添加した。培養器内で約3時間呈色反応を行った後、96ウェルプレートに100 µLずつ分注した。マイクロプレートリーダーを用い、吸光度を測定し、ホルマザン量(WST-8)を算出した。用量あたりの平均ホルマザン量より、陰性対照群を100%として被験物質群の細胞増殖率を算出し、細胞増殖率50%を挟む2点間を結ぶ直線から、概略の50%細胞増殖抑制濃度(IC<sub>50</sub>)を求めた。

## 13.8. 染色体異常試験

### 13.8.1. 群構成

細胞増殖抑制試験の結果、IC<sub>50</sub>は、短時間処理法、連続処理法ともに4000 µg/mLを超える用量であった。従って、染色体異常試験の用量は、短時間処理法、連続処理法ともに、最高用量を4000 µg/mLとし、2000、1000及び500 µg/mLの計4用量を設定した。また、陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

### 13.8.2. 処理法

13.7.2.と同じ方法で、3系列の処理培養を行った。1用量あたり60 mmのプレートは4枚を用い、2枚は標本作製に、2枚はサテライト群とし毒性評価に用いた。陽性対照群はプレート2枚とし標本作製のみを用いた。

### 13.8.3. 染色体標本作製

被験物質液処理開始後、約24時間後(正常細胞周期の約1.5周期に相当)に標本作製した。コルセミドを添加し、分裂期の細胞を蓄積した。0.1%EDTA添加1.25%トリプシン処理し、遠心分離(1000 rpm, 5分)により細胞を回収した。次に0.075 mol/L塩化カリウム液を加え、カルノア液で固定し、細胞をスライドガラス上で風乾した。プレート当たり3枚の標本作り、2%ギムザ液(MERCK)(1/15 mol/Lリン酸塩緩衝液pH 6.8, 和光純薬工業株式会社で調製)で染色した。

### 13.8.4. サテライト群の毒性評価

染色体異常試験において毒性を評価するために、1用量あたりプレート2枚をサテライト群とし、細胞増殖抑制試験と同じ方法(13.7.3.)で評価した。

### 13.8.5. 染色体観察の対象群

短時間処理法，連続処理法ともに 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高用量とし，2000 及び 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の連続する 3 用量を観察の対象とした。また，それぞれの陰性対照群及び陽性対照群についても観察対象とした。

### 13.8.6. 染色体観察

染色体の構造異常は 1 プレート当たり 100 個，1 用量につき計 200 個の分裂中期細胞（染色体数：23～27 本）を 1000 倍の顕微鏡下で観察した。数的異常は 200 倍の顕微鏡下で 1 プレート当たり 200 個，1 用量につき計 400 個を観察した。

染色体の構造異常については染色分体型切断 (ctb)，染色分体型交換 (cte)，染色体型切断 (csb)，染色体型交換 (cse) 及びその他（断片化 (frg)，多数の異常 (mul)）などを観察した。ギャップ (gap) も観察したが，構造異常の集計は，ギャップのみを持つ細胞を除いた場合 (-gap) と加えた場合 (+gap) とに分けた。試験の評価はギャップのみを持つ細胞を除いた出現頻度 (-gap) とした。

数的異常においては倍数体 (pol) 及び核内倍加 (end) を観察した。倍数体は染色体モード数が 38 本以上のものを倍数体 (pol) と判定した。

### 13.9. 試験系の識別

スライドガラスに試験番号，処理系列，被験物質名，用量，プレート番号及び標本作製日のラベルを貼付した。

### 13.10. 試験成立条件

以下の 1)，2) が成立したので，試験結果の評価を行った。

- 1) 構造異常を持つ分裂中期細胞の出現頻度が，陰性対照群で 5% 未満，陽性対照群で 10% 以上認められること。
- 2) 被験物質処理群において分裂中期細胞を 200 個観察した用量が 3 用量あること。

### 13.11. 結果の判定

観察により，構造異常を有する細胞（ギャップは除く）が 5% 以上の出現頻度を示し， $\chi^2$  検定及び用量依存性検定とともに陰性対照群に対して，統計学的に有意に増加した場合，石館らの判定基準<sup>1)</sup>より疑陽性（5～9%）または陽性（10% 以上）と判定した。

数的異常は，倍数体を有する出現頻度が陰性対照群に対して，統計学的に有意に増加した場合を陽性と判定した。

### 13.12. 統計学的処理

異常細胞の出現頻度についてはMicrosoft® Excel, version 2003を用いて平均値を算出した。

統計解析はMicrosoft® windows版 SAS®9.1.3を用いて実施した。

短時間処理法、連続処理法ともに構造異常を有する細胞が5%未満であったので、統計学的検定は実施しなかった。

倍数体を持つ細胞の出現頻度について、Yatesの補正を伴う $\chi^2$ 検定により、陰性対照群と被験物質処理群の差を有意水準片側5%で解析した。

## 14. 試験結果

### 14.1. 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験の細胞増殖率の結果をFigure 1, Table 1に示した。

IC<sub>50</sub>値は短時間処理法、連続処理法ともに4000 µg/mLを超える値であった。

被験物質の析出はすべての用量で観察されなかった。

### 14.2. 染色体異常試験

細胞増殖率をFigure 2, IC<sub>50</sub>値をTable 2に、染色体異常の観察結果をTable 3, Table 4に示した。

短時間処理法、連続処理法ともに構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群と被験物質処理群はいずれも5%未満であった。倍数体を有する細胞の出現頻度については、陰性対照群に対して、被験物質処理群は差がなかった。

被験物質の析出はすべての用量で観察されなかった。

## 15. 考察及び結論

CHL/IU細胞を用いてAcPepAの細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験を実施した。

短時間処理法、連続処理法ともに構造異常及び数的異常を有する細胞の出現頻度のいずれにおいても増加は認められなかった。

以上の結果、本試験条件下で、AcPepAはCHL/IU細胞に対して染色体異常を誘発しないと判断した。

## 16. 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

該当する事項はなかった。

17. 参考文献

- 1) 石館基 監修；改訂染色体異常試験データ集，エル・アイ・シー社，1987.

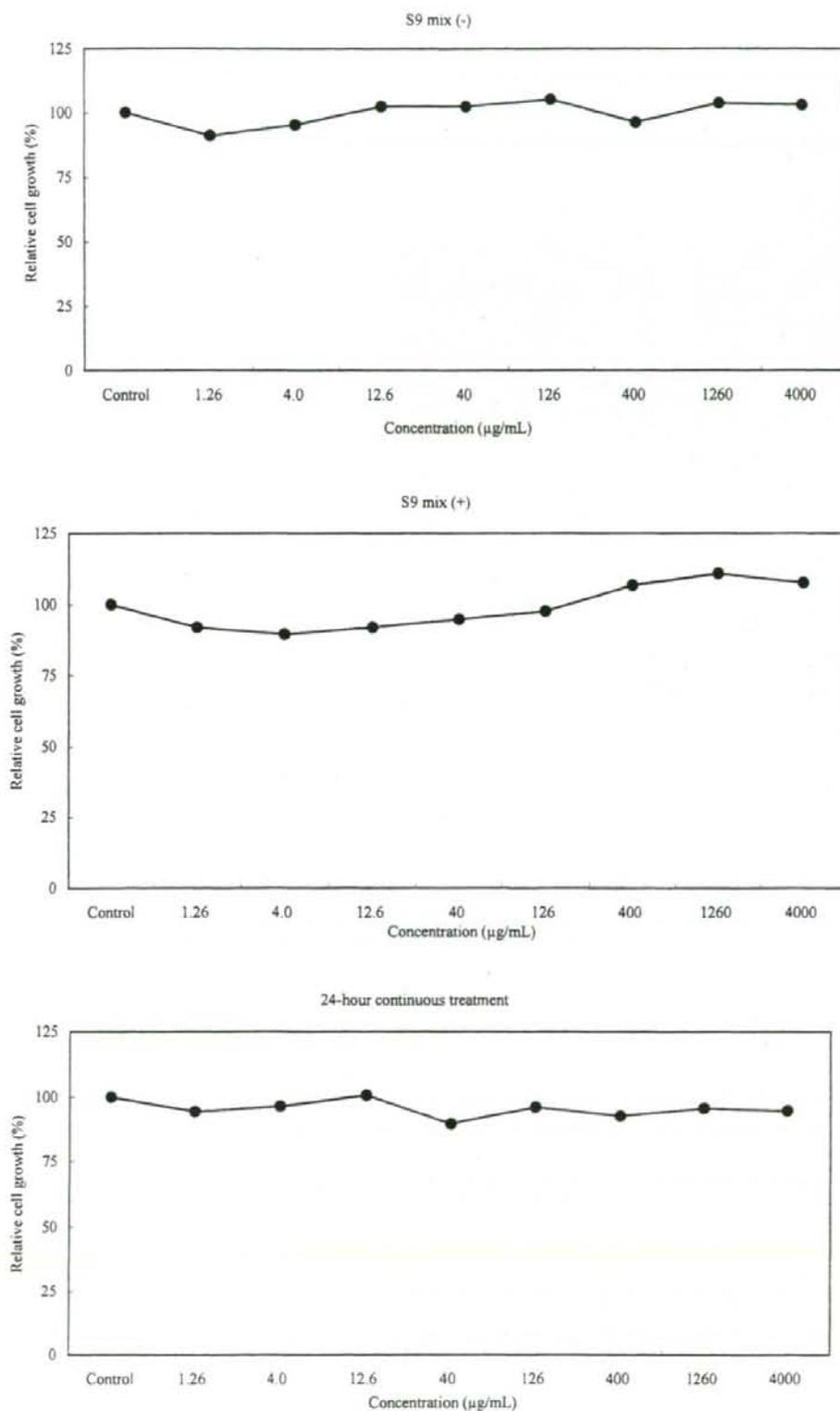


Figure 1 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA

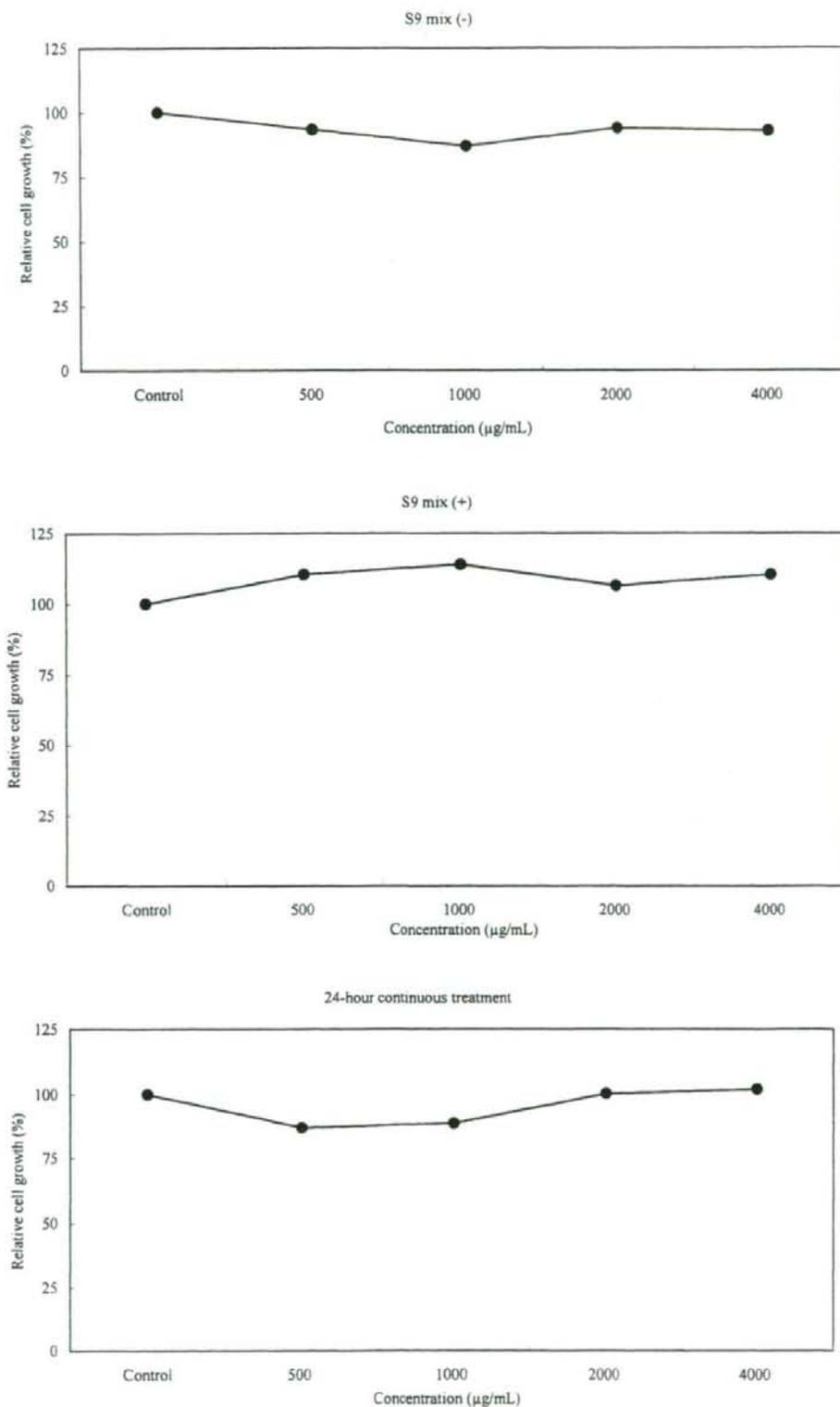


Figure 2 Cell growth inhibition of CHL/TU cells treated with AcPepA in satellite group

Table 1 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9 mix (-)				S9 mix (+)				24-hour continuous treatment			
	WST-8 value	Mean	Relative cell growth (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	WST-8 value	Mean	Relative cell growth (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	WST-8 value	Mean	Relative cell growth (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
0 <sup>1)</sup>	0.175	0.161	100.0	>4000	0.229	0.231	100.0	>4000	0.139	0.149	100.0	>4000
	0.147				0.233				0.159			
1.26	0.142	0.147	91.0		0.213	0.213	92.0		0.135	0.141	94.3	
	0.151				0.212				0.146			
4.0	0.151	0.154	95.3		0.203	0.207	89.6		0.133	0.144	96.3	
	0.156				0.211				0.154			
12.6	0.163	0.165	102.5		0.204	0.213	92.0		0.137	0.150	100.7	
	0.167				0.221				0.163			
40	0.157	0.165	102.5	>4000	0.230	0.219	94.8	>4000	0.134	0.134	89.6	>4000
	0.173				0.208				0.133			
126	0.159	0.170	105.3		0.218	0.226	97.6		0.144	0.143	96.0	
	0.180				0.233				0.142			
400	0.147	0.155	96.3		0.239	0.247	106.7		0.137	0.138	92.6	
	0.163				0.254				0.139			
1260	0.161	0.167	103.7		0.258	0.256	110.8		0.138	0.143	95.6	
	0.173				0.254				0.147			
4000	0.158	0.166	103.1		0.249	0.249	107.6		0.140	0.141	94.6	
	0.174				0.248				0.142			

WST-8: Indication of cell survival

WST-8 value: The amount of WST-8 was converted from a measured value at 450 nm by a microplate-reader, mean of eight wells.

<sup>1)</sup>: Culture medium was used as vehicle.

Table 2 Cell growth inhibition of CHL/IU cells treated with AcPepA in satellite group

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Short term treatment						24-hour continuous treatment					
	S9 mix (-)			S9 mix (+)			S9 mix (-)			S9 mix (+)		
	WST-8 value	Mean cell growth (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	WST-8 value	Mean cell growth (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	WST-8 value	Mean cell growth (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	WST-8 value	Mean cell growth (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
0 <sup>1)</sup>	0.253	0.227	100.0	0.284	0.275	100.0	0.202	0.176	100.0	0.202	0.176	100.0
	0.200			0.265			0.149			0.149		
500	0.217	0.212	93.4	0.307	0.303	110.4	0.152	0.153	86.9	0.152	0.153	86.9
	0.206			0.299			0.153			0.153		
1000	0.200	0.198	87.2	0.323	0.313	113.8	0.146	0.156	88.6	0.146	0.156	>4000
	0.195			0.302			0.165			0.165		
2000	0.218	0.213	94.0	0.300	0.292	106.4	0.175	0.176	100.3	0.175	0.176	100.3
	0.208			0.284			0.177			0.177		
4000	0.218	0.211	92.9	0.311	0.303	110.4	0.184	0.179	102.0	0.184	0.179	102.0
	0.203			0.295			0.174			0.174		

WST-8: Indication of cell survival

WST-8 value: The amount of WST-8 was converted from a measured value at 450 nm by a microplate-reader, mean of eight wells.

<sup>1)</sup>: Culture medium was used as vehicle.

Table 3 Chromosomal aberration of CHL/JU cells treated with AcPepA in short-term treatment

FBM 09-8541

Treatment time	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Relative cell growth (%)	Number of cells showing structural aberrations						Total (%)			Number of cells showing numerical aberrations				Final judgment			
			observed	gap	ctb	csb	cte	cse	others	total	-gap	+gap	observed	pol	end	Total (%)	SA	NA	
6 hr	0 <sup>b</sup>	100	100	0	2	1	0	0	0	0	0	2	2	200	2	0	2	—	—
	100	100	100	0	2	0	0	1	0	1	0	3	200	0	0	0	—	—	
	2000	95.9	Total 200	0	4	1	0	1	0	1	0	5	(2.5)	400	2	0	2	(0.5)	(0.5)
500	95.8	(not observed)																	
6 hr	1000	91.2	100	0	2	0	0	0	0	0	0	2	200	3	0	3	—	—	
	100	100	100	0	2	1	1	0	0	0	0	4	200	0	0	0	—	—	
	2000	95.9	Total 200	0	4	1	1	0	0	0	0	6	(3.0)	400	3	0	3	(0.8)	(0.8)
6 hr	4000	95.2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	200	2	0	2	—	—	
	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	3	0	3	—	—	
	2000	95.9	Total 200	0	0	1	0	0	0	0	0	1	(0.5)	400	5	0	5	(1.3)	(1.3)
6 hr	MMC 0.05	—	100	1	14	2	18	3	0	29	0	29	200	3	0	3	—	—	
	100	100	100	0	14	0	18	0	0	30	0	30	200	5	0	5	—	—	
	2000	95.9	Total 200	1	28	2	36	3	0	59	0	59	(29.5)	400	8	0	8	(2.0)	(2.0)
6 hr	0 <sup>b</sup>	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	3	0	3	—	—	
	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	3	0	3	—	—	
	2000	105.9	Total 200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	400	6	0	6	(1.5)	(1.5)
500	105.9	(not observed)																	
6 hr	1000	110.1	100	0	0	1	0	0	0	0	0	1	200	4	0	4	—	—	
	100	100	100	0	0	0	1	0	0	0	0	1	200	2	0	2	—	—	
	2000	104.1	Total 200	0	0	1	1	0	0	0	0	2	(1.0)	400	6	0	6	(1.5)	(1.5)
6 hr	4000	107.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	1	0	1	—	—	
	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	2	0	2	—	—	
	2000	104.1	Total 200	0	0	1	0	0	0	0	0	1	(0.5)	400	3	0	3	(0.8)	(0.8)
6 hr	CP 5.0	—	100	0	10	1	40	2	0	46	0	46	200	1	0	1	—	—	
	100	100	100	0	9	2	27	1	0	34	0	34	200	2	0	2	—	—	
	2000	105.9	Total 200	0	19	3	67	3	0	80	0	80	(40.0)	400	3	0	3	(0.8)	(0.8)

<sup>b</sup>: Culture medium was used as vehicle.

MMC: Mitomycin C, CP:Cyclophosphamide

ctb: chromatid break, csb: chromosome break, cte: chromosome exchange, cse: chromosome exchange, others: multiple aberration, pol: polyploids, end: endoreduplication

SA: structural aberration, NA: numerical aberration

No significant difference was found between the negative control and AcPepA treated groups by  $\chi^2$  test (numerical aberration)

Table 4 Chromosomal aberration of CHL/IU cells treated with AcPepA in continuous treatment

Treatment time	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Relative cell growth (%)	Number of cells showing structural aberrations							Total (%)			Number of cells showing numerical aberrations			Final judgment			
			observed	gap	ctb	csb	cte	cse	others	total	-gap	+gap	observed	pol	end	Total (%)	SA	N/A	
24 hr	0 <sup>b</sup>	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	1	0	1			
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	1	0	1			
			Total 200	0	2	0	0	0	0	0	2	(1.0)	(1.0)	400	2	0	2	(0.5)	
	500	83.4	(not observed)																
24 hr	1000	81.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	0			
			100	0	0	0	1	0	0	0	1		200	4	0	4			
			Total 200	0	0	0	1	0	0	1	(0.5)	(0.5)	400	4	0	4	(1.0)		
	2000	91.1	100	0	0	0	1	0	0	1		200	3	0	3				
		100	0	0	1	0	2	0	3		200	0	0	0					
		Total 200	0	0	1	1	2	0	4	(2.0)	(2.0)	400	3	0	3	(0.8)			
24 hr	4000	94.0	100	0	0	0	1	0	0	1		200	2	0	2				
			100	0	0	0	0	0	0	0		200	0	1	1				
			Total 200	0	0	0	1	0	0	1	(0.5)	(0.5)	400	2	1	3	(0.8)		
	MMC 0.05	-	100	1	20	1	27	2	0	37		200	1	0	1				
		100	0	14	0	19	0	2	29		200	0	0	0					
		Total 200	1	34	1	46	2	2	66	(33.0)	(33.0)	400	1	0	1	(0.3)			

<sup>b</sup>: Culture medium was used as vehicle.

MMC: Mitomycin C,

ctb: chromatid break, csb: chromosome break, cte: chromatid exchange, cse: chromosome exchange, others: multiple aberration, pol: polyploids, end: endoreduplication

SA: structural aberration, N/A: numerical aberration

No significant difference was found between the negative control and AcPepA treated groups by  $\chi^2$  test (numerical aberration)

DRAFT

FBM 09-8542

## 最終報告書

(第1稿)

試験表題：AcPepA のラット小核試験

試験番号：FBM 09-8542

スギ生物科学研究所株式会社

試験責任者署名：

川口 恵未

年 月 日

本報告書は表紙を含む16枚

## 目次

	(頁)
1. 試験表題 .....	4
2. 試験番号 .....	4
3. 試験目的 .....	4
4. 試験施設 .....	4
5. 試験委託者 .....	4
6. 試験実施期間 .....	4
7. 試験責任者 .....	5
8. 担当責任者 .....	5
9. 試験の基準及びガイドライン .....	5
10. 動物倫理 .....	5
11. 試験関係資料の保存 .....	5
12. 要約 .....	6
13. 試験材料及び方法 .....	7
13.1. 被験物質 .....	7
13.2. 投与液 .....	7
13.3. 陰性対照物質 .....	7
13.4. 使用動物及び飼育環境 .....	7
13.5. 個体及びケージの識別方法 .....	8
13.6. 群分け .....	8
13.7. 群構成及び投与量 .....	9
13.8. 投与量の設定理由 .....	9
13.9. 被験物質及び媒体の投与 .....	9
13.10. 骨髓塗抹標本作製 .....	9
13.11. 観察及び測定 .....	10
13.12. 試験成立条件 .....	11
13.13. 統計学的処理 .....	11
14. 試験結果 .....	11
14.1. 生死及び一般状態 .....	11
14.2. 体重 .....	11
14.3. 骨髓塗抹標本観察 .....	11
15. 考察及び結論 .....	12

16. 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及び 試験計画書に従わなかつたこと.....	12
17. 参考文献.....	12

Table 1 Clinical signs in the micronucleus test of AcPepA in rats

Table 2 Body weights in the micronucleus test of AcPepA in rats

Table 3 Results of micronucleus test of AcPepA in rats

添付資料 1 ラット小核試験背景データ

## 1. 試験表題

AcPepA のラット小核試験

## 2. 試験番号

FBM 09-8542

## 3. 試験目的

AcPepA の安全性評価の一環として、本被験物質のラット骨髄における小核誘発性を検討した。

## 4. 試験施設

スギ生物科学研究所株式会社

〒408-0044 山梨県北杜市小淵沢町 10221 番地

TEL 0551-36-2455 FAX 0551-36-3895

## 5. 試験委託者

医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所

〒441-8124 愛知県豊橋市野依町山中 19-14

TEL 0532-46-7501 FAX 0532-46-8940

委託担当者：岡田秀親

## 6. 試験実施期間

試験期間	2009年 2月 13日	～	2009年 00月 00日
試験開始日	2009年 2月 13日		
動物受入日	2009年 2月 16日		
群分け日	2009年 2月 23日		
投与検体調製日	2009年 2月 23日		
投与日	2009年 2月 23日		
骨髄塗抹標本作製日	2009年 2月 24日		
骨髄標本観察開始日	2009年 3月 2日		
試験終了日	2009年 00月 00日		

## 7. 試験責任者

川口 恵未

スギ生物科学研究所株式会社 毒性試験部

## 8. 担当責任者

検疫, 馴化	清 基城
飼育, 投与, 観察, 測定	山中妙子
骨髄標本作製	川口恵未
骨髄標本観察	川口恵未
被験物質の管理	高橋善康
統計学的処理	正木文夫

## 9. 試験の基準及びガイドライン

本試験は GLP 非適用とした。

参考ガイドライン：厚生労働省の「遺伝毒性試験ガイドライン」（平成 11 年 11 月 1 日医薬審第 1604 号）

## 10. 動物倫理

本試験は、スギ生物科学研究所株式会社の動物実験承認規定（承認番号 2009-018）に基づき実施した。

## 11. 試験関係資料の保存

保存場所：スギ生物科学研究所株式会社 資料保存施設

保存資料：最終報告書（原本），試験計画書（原本），被験物質及び動物等に関する記録，生データ，標本，試験操作記録，その他記録文書

保存期間：本試験終了後 5 年間保存。その後の措置については試験委託者と協議の上決定する。

## 12. 要約

AcPepA を雄 8 週齢 SD ラットに、2 分間急速投与に引き続き 1 時間持続投与し、骨髄における小核誘発性を検討した。

AcPepA 40 及び 80 mg/kg の 2 用量を設定した。急速投与後 24 時間に骨髄塗抹標本を作製した。1 個体あたり 2000 個の幼若赤血球における小核の有無を観察し、小核を有した幼若赤血球の出現率を求めた。また、1 個体あたり 1000 個の全赤血球に対する幼若赤血球比率を求めた。

一般状態及び体重について、陰性対照群、AcPepA の各投与群のいずれの群においても異常は認められなかった。

幼若赤血球比率について、AcPepA の各投与群において、陰性対照群と比較して有意な差は認められなかった。

小核出現率について、AcPepA 80 mg/kg 群では陰性対照群と比較して増加は認められなかったが、40 mg/kg 群で統計学的に有意な増加が認められた。ただし、1 個体に限られた増加であり、かつ、小核の増加はストレス、体温変化、赤血球生成障害及び環境の変化等によっても生じるという報告もあるため、偶発的な増加と判断した。

以上のことから、本試験条件下において、AcPepA には小核誘発性はないと判定した。

### 13. 試験材料及び方法

#### 13.1. 被験物質

名称：AcPepA

ロット番号：2K08045

受領日：2009年1月30日

供給源：株式会社バイオロジカ（NeoMPS）

性状：凍結乾燥品（GMP製造品）白色粉末

含量：97.7%

溶解性：生理食塩液に4 mg/mL

保存条件：冷凍（-20°C以下），遮光，気密

保存場所：研究本館 検体調製室 メディカルフリーザー（設定温度：-30°C，許容範囲：  
-40～-20°C，実測温度：-32～-28°C，2009年2月13日～2009年2月23日）

取扱い上の注意：マスク及び手袋を着用した。

残余被験物質の管理：実験終了後，被験物質管理責任者に移管した。

#### 13.2. 投与液

##### 13.2.1. 媒体

日本薬局方生理食塩液（扶桑薬品工業株式会社，Lot No. 80513D，以下，生理食塩液とする）を選択した。

##### 13.2.2. 投与液の調製

被験物質を生理食塩液に溶解した後，2及び4 mg/mL液を調製し，フィルター（MILLEX GV 0.22 µm，日本ミリポア株式会社）でろ過したものを投与液とした。

##### 13.2.3. 残余投与液の処理

焼却処分した。

#### 13.3. 陰性対照物質

媒体を用いた。

#### 13.4. 使用動物及び飼育環境

##### 13.4.1. 使用動物

種及び系統：ラット，Cri:CD (SD)，SPF

種及び系統の選択理由：本系統のラットは小核試験に多用されており、かつ当試験施設における背景データが豊富であることから選択した。

供給源及び受入日：日本チャールス・リバー株式会社，2009年2月16日

週齢・性別・数：7週齢，雄20匹（受入時）

8週齢，雄18匹（投与時）

体重範囲：219～243 g（受入時）

：289～322 g（投与時）

検疫・馴化：5日間の検疫（馴化を兼ねる）を実施した。

#### 13.4.2. 飼育環境

動物室：バリアシステム飼育室（第1動物実験棟，A-2室）

ケージ：金網床式金属製ケージ（W15×D30×H17 cm）で個別飼育した。

温度：22°C（許容範囲19～25°C）（実測値；2009年2月16日～2月24日，20.6～23.9°C）

相対湿度：50%（許容範囲30～70%）（実測値；2009年2月16日～2月24日，43.5～67.5%）

換気回数：10～15回/時

照明時間：7～19時

飼料：固型飼料CRF-1（Lot No. 081002，オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取。

飲料水：公共水道水を自由摂取。

汚染物質の分析：飼料の汚染物質の分析は使用ロットについて、床敷の汚染物質の分析は定期的な測定を供給者から入手した。飲料水の水質分析は6か月ごとに採取した試料について株式会社メデカジャパン・ラボラトリーに依頼した。結果、スギ生物科学研究所株式会社で定めた飼料における汚染物質の最大許容濃度（許容基準値）及び水質基準の範囲内であった。

#### 13.5. 個体及びケージの識別方法

個体識別：受入日に油性インクで個体番号を記入。

ケージの識別：受入から群分けまでは試験番号及び個体番号を記したラベルを、群分け以降は試験番号、投与区分、個体番号及び動物番号を記したラベルを付けた。

#### 13.6. 群分け

群分けは、馴化最終日（投与日）に実施した。FujiBiomedix Laboratory Systemを用いて、体重増加量を指標として18匹を選別し、層別無作為に3群に振り分けた。余剰動物は群

分け終了時に試験系から除外した。

### 13.7. 群構成及び投与量

以下の3群を設定した。

群 No.	投与区分	投与量 (mg/kg)		投与液濃度 (mg/mL)	動物数	動物番号
		総投与	(急速投与 + 持続投与)			
1	陰性対照 (媒体)	0	(0 + 0)	0	6	1101~1106
2	AcPepA (低用量)	40	(10 + 30)	2	6	1201~1206
3	AcPepA (高用量)	80	(20 + 60)	4	6	1301~1306
計					18	

投与液量：急速投与；5 mL/kg，持続投与；15 mL/kg

### 13.8. 投与量の設定理由

AcPepA の臨床は、2 mg/kg を 2-3 分間で急速静注した後、6 mg/kg を 3 時間で持続投与することを想定している。これは 8 mg/kg/day となる。本試験では、臨床用量の 10 倍量の 80 mg/kg/day を設定し、2 分間急速投与で 20 mg/kg を、その後 1 時間持続投与で 60 mg/kg を投与した。なお、いずれも投与可能最大量であり、また、ラットを 3 時間保定器に拘束し投与することは技術的に困難と判断し、1 時間持続投与とした。低用量にはその 1/2 量の 40 mg/kg を設定した。

### 13.9. 被験物質及び媒体の投与

投与経路及び理由：臨床経路に準じて、尾静脈への静脈内投与とした。

投与方法：翼状針を用いて、静脈内投与した。なお、持続投与ではハーバードデジタルインフュージョンポンプ (Model-11 E Econoflo, Model-22, HARVARD APPARATUS) を用いた。

投与回数及び理由：遺伝毒性試験ガイドラインに基づき、1 回とした。

### 13.10. 骨髄塗抹標本作製

#### 13.10.1. 骨髄塗抹標本作製時期

急速投与 24 時間後に作製した。