

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 4月 21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 4月 21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	正本文夫

**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）

取り扱い上の注意：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。

### 13.10.2. 骨髓塗抹標本作製方法

炭酸ガスにより安楽死させ、大腿骨を摘出し、骨髓細胞懸濁液を調製した。1 個体あたり 4 枚の塗抹標本を作製し、乾燥させた後、メタノール固定した。0.007%アクリジンオレンジ液を用いて染色した。

### 13.11. 観察及び測定

#### 13.11.1. 生死及び一般状態

投与日の急速投与前、持続投与中、持続投与後約 30 分及び 2 時間、投与後 1 日にそれぞれ 1 回、一般状態の変化及び死亡の有無を観察した。

#### 13.11.2. 体重

投与日及び標本作製日に測定した。

#### 13.11.3. 骨髓塗抹標本観察

蛍光顕微鏡を用いて観察した。成熟赤血球は無蛍光の赤血球、幼若赤血球は橙赤色蛍光、幼若赤血球中の小核は黄緑色蛍光によって識別した。小核は主核の 1/2 以下の大きさとし、微小の小核は含めなかった。

1 個体 2 枚のスライドについて、倍率 1000 倍下で成熟赤血球、幼若赤血球及び小核を有する幼若赤血球を観察し、全赤血球中に占める幼若赤血球の比率（以下、幼若赤血球比率）と幼若赤血球の小核出現率（以下、小核出現率）を求めた。

幼若赤血球比率については、1 スライドあたり 500 個、1 スライドあたり 1000 個の赤血球〔成熟赤血球及び幼若赤血球〕を観察して、下記の計算式から幼若赤血球比率を求めた。

$$\text{幼若赤血球比率 (\%)} = \frac{\text{IE} + \text{MNIE}}{(\text{IE} + \text{MNIE}) + \text{ME}} \times 100$$

小核出現率については、1 スライドあたり 1000 個、1 個体あたり 2000 個の幼若赤血球を観察して小核を有する幼若赤血球数を求め、下記の計算式から小核出現率を求めた。

$$\text{小核出現率 (\%)} = \frac{\text{MNIE}}{\text{IE} + \text{MNIE}} \times 100$$

IE：幼若赤血球（immature erythrocyte）数

MNIE：小核を有する幼若赤血球（micronucleated immature erythrocyte）数



ME：成熟赤血球（mature erythrocyte）数

### 13.12. 試験成立条件

本試験での陰性対照群の小核出現率が背景データの陰性対照変動範囲（0.00～0.45%）内であった時、試験成立として結果を評価した。

### 13.13. 統計学的処理

定量データについてMicrosoft® Excel 2000 Windows版（Version 9）を用いて平均値と標準偏差の算出を行った。統計解析は、Microsoft Windows版 SAS® 9.1.3を用いて行った。

小核出現率は、Kastenbaum and Bowmanの方法により、陰性対照群と被験物質投与群間で比較した。陰性対照群と AcPepA 40 mg/kg 投与群間で有意差が認められたため、Cochran-Armitageの傾向検定を行った。

幼若赤血球比率及び体重は、Dunnett'sの方法により、陰性対照群と被験物質群間で比較した。有意水準は片側5%とした。

## 14. 試験結果

### 14.1. 生死及び一般状態

生死及び一般状態観察の成績を Table 1 に示した。

陰性対照群、AcPepA 40 及び 80 mg/kg 群のいずれの群においても死亡はなく、一般状態にも異常は認められなかった。

### 14.2. 体重

体重の成績を Table 2 に示した。

体重は、AcPepA 40 及び 80 mg/kg 群のいずれの群においても陰性対照群との差は認められなかった。

### 14.3. 骨髄塗抹標本観察

骨髄塗抹標本観察の成績を Table 3 に示した。

陰性対照群の小核出現率は0.11%であった。背景データの変動範囲内であったことから、試験は成立した。

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。1/6例のみでの増加だった。

Cochran-Armitageの傾向検定において用量依存性は認められなかった。

幼若赤血球比率について、AcPepA 40 及び 80 mg/kg 群において、陰性対照群と比較して差は認められなかった。

#### 15. 考察及び結論

AcPepA 40 mg/kg 群において、陰性対照群と比較して小核出現率の有意な増加が認められたが、用量依存性は認められなかった。

40 mg/kg 群の小核出現率の有意な増加について、No. 1201 の小核数が 25 であるのに対して他の 5 匹では陰性対照群に近い値であり、1 個体に限定した増加であった。80 mg/kg 群では増加が認められなかったこと、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ことから<sup>1), 2)</sup>、40 mg/kg 群の小核出現率の増加は偶発的なものと判断した。

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。

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象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) Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards., Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni and R. Tice, *Mutation Research*, 627:78-91, 2007.
- 2) Report of the IWGT working group on strategy/interpretation of regulatory in vivo tests. II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test., Tweats, D. J., D. Blakey, R. H. Heflich, A. Jacobs, S. D. Jacobsen, T. Morita, T. Nohmi, M. R. O'Donovan, Y. F. Sasaki, T. Sofuni and R. Tice, *Mutation Research*, 627:92-105, 2007.

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

Test substance	Dose (mg/kg)				Animal No.	Time after infusion dosing				
	Total	Rapid (2min)	+	Infusion (1h)		Pre	During	30min	2h	1day
Negative control (Saline)	0	0	+	0	1101	-	-	-	-	-
					1102	-	-	-	-	-
					1103	-	-	-	-	-
					1104	-	-	-	-	-
					1105	-	-	-	-	-
					1106	-	-	-	-	-
AcPepA	40	10	+	30	1201	-	-	-	-	-
					1202	-	-	-	-	-
					1203	-	-	-	-	-
					1204	-	-	-	-	-
					1205	-	-	-	-	-
					1206	-	-	-	-	-
AcPepA	80	20	+	60	1301	-	-	-	-	-
					1302	-	-	-	-	-
					1303	-	-	-	-	-
					1304	-	-	-	-	-
					1305	-	-	-	-	-
					1306	-	-	-	-	-

Pre: Pre rapid dosing, During: During infusion dosing.

-: No abnormalities.

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

Test substance	Dose (mg/kg)			Animal No.	Dosing day	Specimen preparation day	
	Total	Rapid (2min)	+ Infusion (1h)				
Negative control (Saline)	0	0	+	0	1101	289	293
					1102	312	311
					1103	299	309
					1104	311	314
					1105	303	305
					1106	295	304
					Mean	302	306
SD	9	7					
AcPepA	40	10	+	30	1201	306	315
					1202	301	302
					1203	296	294
					1204	322	331
					1205	297	305
					1206	294	290
					Mean	303	306
SD	10	15					
AcPepA	80	20	+	60	1301	297	300
					1302	320	313
					1303	298	304
					1304	293	290
					1305	306	302
					1306	309	313
					Mean	304	304
SD	10	9					

Unit: g.

Table 3 Results of micronucleus test of AcPepA in rats

## The incidence of micronuclei (%)

Preparation time (h)	Test substance	Dose (mg/kg)				No. of animals	MNIE/2000IE						Total	Mean $\pm$ SD (%)
		Total	Rapid (2min)	+	Infusion (1h)		individual data of							
						1	2	3	4	5	6			
24	Negative control (Saline)	0	0	+	0	6	1	1	2	3	3	3	13	0.11 $\pm$ 0.05
	AcPepA	40	10	+	30	6	25	7	8	2	1	1	44	0.37 $\pm$ 0.46 **
		80	20	+	60	6	1	3	5	5	4	2	20	0.17 $\pm$ 0.08

## The frequency (%) of polychromatic erythrocytes to the total erythrocytes

Preparation time (h)	Test substance	Dose (mg/kg)				No. of animals	IE/1000(IE+ME)						Mean $\pm$ SD (%)	
		Rapid (2min)	+	Infusion (1h)	individual data of									
						1	2	3	4	5	6			
24	Negative control (Saline)	0	0	+	0	6	416	498	530	512	490	540		49.8 $\pm$ 4.4
	AcPepA	40	10	+	30	6	411	575	474	466	520	408		47.6 $\pm$ 6.4
		80	20	+	60	6	443	527	453	413	493	500		47.2 $\pm$ 4.2

IE: Immature Erythrocyte, MNIE: Micronucleated Immature Erythrocyte, ME: Mature Erythrocyte.

\*\*  $p < 0.01$ : Significant difference from the negative control by Kastenbaum and Bowman method.

## 添付資料 1

## ラット小核試験背景データ

施設：スギ生物科学研究所株式会社

動物：ラット(SD), SPF 性：雄, 週齢：8週齢, 1群 5～6匹

標本作成：陰性対照物質又は陽性対照物質の投与後 24時間

観察数：幼若赤血球；2000個/匹, 赤血球；1000個/匹

実験期間：2007～2008年3月

作成：2008年3月

2007～2008年に行われた小核試験における小核を有する幼若性赤血球の出現頻度(表1), 及び全赤血球に占める幼若赤血球の割合(表2)について, 平均(Mean)及び標準偏差(SD)を算出し, 適切な範囲を設定した.

表1 小核を有する幼若赤血球の出現頻度

	動物数	平均値 (%)	標準偏差	*変動範囲 (%)	Min(%)	Max(%)
陰性対照群	65	0.15	0.1	0.00～0.35	0	0.4
陽性対照(CP 20mg/kg)	34	2.93	1.18	0.57～5.29	1.1	6.10

\*変動範囲 (%) の算出：Mean ± 2SD

表2 全赤血球に占める幼若赤血球の割合

	動物数	平均値 (%)	標準偏差	*変動範囲 (%)	Min(%)	Max(%)
陰性対照群	65	52.1	4.79	42.5～61.7	41.0	63.4
陽性対照(CP 20mg/kg)	34	34.8	8.22	26.6～43.1	18.6	52.9

\*変動範囲 (%) の算出：Mean ± 2SD

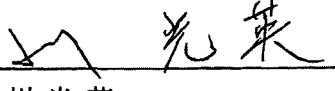

## 最終報告書

試験表題：AcPepA の hERG 細胞を用いた K<sup>+</sup>チャンネルへの影響

試験番号：FBM 09-9544

スギ生物科学研究所株式会社  
(旧社名：株式会社富士バイオメディックス)

試験責任者署名：

  
小川光英 

2009年 6月 15日

本最終報告書は表紙を含む 14 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 .....	4
8. 担当責任者 .....	5
9. GLP及びガイドライン .....	5
10. 信頼性保証 .....	5
11. 試験関係資料の保存 .....	5
12. 要約 .....	6
13. 被験物質及び媒体 .....	7
13.1. 被験物質 .....	7
13.2. 媒体 .....	7
14. 適用検体の調製方法 .....	7
15. 試験系 .....	7
15.1. 細胞株 .....	7
15.2. 細胞株選択の理由 .....	8
15.3. 入手先 .....	8
16. hERG細胞培養 .....	8
16.1. 培養液 .....	8
16.2. 培養条件 .....	8
16.3. 培養方法 .....	8
17. hERG電流の測定 .....	9
17.1. 操作方法 .....	9
17.2. パルスプロトコール .....	9
18. 適用 .....	10
18.1. 適用方法, 適用回数及び適用時間 .....	10
18.2. 適用方法, 適用回数及び適用時間の選択理由 .....	10
18.3. 群構成及び適用濃度 .....	10



18.4. 適用濃度設定の理由 .....	10
19. 細胞の群分け .....	10
20. 記録及び解析 .....	11
21. 試験結果 .....	11
22. 考察及び結論 .....	11

Table 1 Effects of AcPepA on Tail peak currents in hERG transfected HEK-293 cells.

Appendix 1 Effects of AcPepA on Tail peak currents in hERG transfected HEK-293 cells.

1. **試験表題**  
AcPepA の hERG 細胞を用いた K<sup>+</sup>チャンネルへの影響
2. **試験番号**  
FBM 09-9544
3. **試験目的**  
hERG (human ether-a-go-go) 遺伝子を導入し、カリウムイオンチャンネルを安定発現させた HEK-293 細胞における、AcPepA の hERG 電流に及ぼす影響を検討した。
4. **試験施設**  
スギ生物科学研究所株式会社 (旧社名：株式会社富士バイオメディックス)  
〒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  
〒411-8126 愛知県豊橋市野依町山中 19-14  
TEL 0532-46-7501 FAX 0532-46-8940  
試験委託担当者：岡田秀親
6. **試験実施期間**

試験期間	2009年3月11日	～	2009年6月15日
試験開始日	2009年3月11日		
細胞培養開始日	2009年3月12日		
hERG 電流測定開始日	2009年3月17日		
試験終了日	2009年6月15日		
7. **試験責任者**  
小川光英  
スギ生物科学研究所株式会社 薬理試験部

**8. 担当責任者**

hERG 電流測定                      高橋善康

**9. GLP 及びガイドライン**

本試験は GLP 非適用試験として実施した。

**10. 信頼性保証**

スギ生物科学研究所株式会社の信頼性保証部門が最終報告書に記載したデータと生データの整合性について確認し、最終報告書に確認証明（信頼性保証部門報告）を添付した。

**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），被験物質及び試験系に関する記録，生データ，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 の  $K^+$ チャンネルに及ぼす影響を検討するために、AcPepA の 6.5, 65 及び 650  $\mu\text{g/mL}$  を、hERG チャンネルを安定発現させた HEK-293 細胞に適用し、パッチクランプ法を用いて hERG 電流を測定した。

その結果、被験物質適用群の hERG 電流の変化率は 6.5  $\mu\text{g/mL}$  適用群で -1.8%, 65  $\mu\text{g/mL}$  適用群で -3.1%, 650  $\mu\text{g/mL}$  適用群で -3.5%であり、いずれの群においても hERG 電流に対する抑制は認められなかった。

以上の結果から、AcPepA は 650  $\mu\text{g/mL}$  以下の濃度において、hERG チャンネルを安定発現させた HEK-293 細胞における  $K^+$ チャンネルに影響しないものと考えられた。