

安定性が確認されている期間内（6.7項参照）に使用した。染色体異常試験に用いた被験物質溶液の保存期間および保存条件は下記のとおり。

保存期間：18時間20分

保存条件：室温（実測値：18.6～20.0℃，許容範囲：10～30℃），遮光，気密

6.6.2 陽性対照物質溶液の調製

6.6.2.1 MMC 溶液の調製

- (1) 2 mg 入りバイアル瓶の MMC を，注射用水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号：K0I76）5 mL に溶解した。
- (2) これを生理食塩液（株式会社大塚製薬工場，ロット番号：K0J70）で段階希釈し，処理用量の 100 倍濃度の溶液（短時間処理法：10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，連続処理法：5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を調製した。
- (3) 上記の各溶液を 2012 年 8 月 17 日（使用期限：2013 年 8 月 16 日）に調製し，約 0.5 mL ずつ分注して，冷凍庫（実測値：-24.7～-20.4℃，許容範囲：-40～-15℃）に保存した。
- (4) このうちの必要本数を，使用当日に解凍して使用した。

6.6.2.2 BP 溶液の調製

- (1) BP 20 mg を秤量し，DMSO（和光純薬工業株式会社，ロット番号：STG0588）20 mL に溶解した（1 mg/mL；処理用量の 100 倍濃度）。
- (2) 上記の溶液を 2012 年 2 月 15 日（使用期限：2013 年 2 月 14 日）に調製し，約 0.2 mL ずつ分注して，冷凍庫（実測値：-24.7～-19.9℃，許容範囲：-40～-15℃）に保存した。
- (3) このうちの必要本数を，使用当日に解凍して使用した。

6.7 被験物質溶液の安定性確認

6.7.1 実施

試験施設にて実施した。

6.7.2 媒体

DMSO

6.7.3 濃度

0.005 および 50 mg/mL

6.7.4 保存条件および期間

室温（実測値：18.7～20.1℃，許容範囲：10～30℃），遮光，気密，24 時間

6.7.5 判定基準

保存後の測定値の平均値（ $n=2$ ）を初期値（調製直後の測定値の平均値）と比較し，その変動幅が $\pm 10\%$ 以内（許容範囲：90%～110%）である場合，安定であると判断した。

6.7.6 結果

いずれの調製液についても，測定値の平均値は初期値の $\pm 10\%$ 以内（102.3%および 105.0%）であった。よって，これらの調製液は室温，遮光，気密の保存条件下で 24 時間安定であると判断した（Appendix 3）。

6.8 被験物質溶液の濃度確認

6.8.1 実施

試験施設にて実施した。

6.8.2 濃度

0.00625 および 1.6 mg/mL

6.8.3 判定基準

測定値の平均値 (n=2) が設定値の±10%以内 (許容範囲: 90%~110%) である場合, 適切に調製されたと判断した。

6.8.4 結果

いずれの調製液についても, 設定値の±10%以内 (102.5%および 106.9%) であった。よって, これらの調製液は適切な濃度に調製されたと判断した (Appendix 4)。

6.9 被験物質溶液の濃度確認方法

被験物質溶液の濃度確認は, 試験施設で実施している分析法バリデーション試験 (試験番号: B120710) で検証された以下の方法に従って実施した。

6.9.1 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 装置

HPLC システム: 2695 Separations Module, Waters Corporation
検出器: 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters Corporation
システムマネージャ: Empower 2 Software, Waters Corporation

6.9.2 HPLC 操作条件

カラム: CAPCELL PAK C18 MG II (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm ID, 株式会社資生堂)
カラム温度: 40°C 付近の一定温度
検出波長: UV 254 nm
移動相: 1%過塩素酸ナトリウム (過塩素酸で pH2.5 に調整した) / アセトニトリル混液 (55 : 45) *
流速: 1 mL/min
注入量: 10 μ L
オートサンプリング温度: 10°C
オートサンプリング洗浄液: メタノール*
測定時間: 10 分

* : 減圧下超音波脱気した。

6.9.3 標準溶液の調製

下表に従い標準溶液 (ST-1~ST-3) を調製した (n=1) .

溶液略号	調製方法		濃度 (µg/mL)
SS	P092, 25 mg	→ 100 mL/メタノール*	250
SS-1	SS, 1 mL	→ 25 mL/メタノール	10
ST-1	SS-1, 1 mL	→ 10 mL/メタノール	1
ST-2	SS-1, 2.5 mL	→ 10 mL/メタノール	2.5
ST-3	SS-1, 3 mL	→ 10 mL/メタノール	3

*: 超音波処理を実施した.

6.9.4 試料溶液の調製

被験物質溶液の安定性確認では, 下表に従い試料溶液を調製した (n=2) .

調製液濃度 (mg/mL)	調製方法	溶液略号	濃度 (µg/mL)	希釈係数
50	被験物質溶液, 1 mL → 100 mL/メタノール*	A	500	20000
	A, 1 mL → 20 mL/メタノール	B	25	
	B, 1 mL → 10 mL/メタノール	C	2.5	
0.005	被験物質溶液, 2.5 mL → 5 mL/メタノール*	D	2.5	2

*超音波処理を実施した.

染色体異常試験では, 下表に従い試料溶液を調製した (n=2) .

調製液濃度 (mg/mL)	調製方法	溶液略号	濃度 (µg/mL)	希釈係数
1.6	被験物質溶液, 1 mL → 40 mL/メタノール*	E	40	800
	E, 1 mL → 20 mL/メタノール	F	2	
0.00625	被験物質溶液, 2.5 mL → 10 mL/メタノール*	G	1.56	4

*超音波処理を実施した.

6.9.5 濃度の算出

- (1) 6.9.3 項で調製した標準溶液 (ST-1~ST-3) および 6.9.4 項で調製した試料溶液を条件設定した HPLC に注入した.
- (2) クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を測定した.
- (3) 標準溶液 (ST-1~ST-3) の濃度および測定したピーク面積から検量線を作成した.
- (4) 検量線, 試料溶液のピーク面積および試料溶液の希釈係数から測定値を求めた.
- (5) 測定値の平均値および対設定値を算出した (Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation) .

6.10 細胞増殖抑制試験

6.10.1 処理条件

-S9 mix : 短時間処理法 (6 時間処理, 18 時間回復) S9 mix 非共存下

+S9 mix : 短時間処理法 (6 時間処理, 18 時間回復) S9 mix 共存下

24 時間処理：連続処理法（24 時間処理）S9 mix 非共存下

6.10.2 被験物質用量

-S9 mix：1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 および 500 $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix：1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 および 500 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理：1.95, 3.91, 7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 および 500 $\mu\text{g/mL}$

6.10.3 被験物質用量設定理由

適用ガイドライン（3.4 項(1)）に規定されている 500 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、6.10.2 項の用量を設定した。

6.10.4 細胞処理

- (1) 4×10^3 個/mL に調整した細胞浮遊液を 6 cm プレートに 5 mL ずつ播き、3 日間前培養した。
- (2) MEM 培地を除去した後、被験物質調製液、S9 mix および MEM 培地を、下記の組成でプレートに添加した。陰性対照群については、DMSO を用いて同様に実施した。各処理条件、処理用量につき 2 枚のプレートを用いた。

処理条件	被験物質溶液 または DMSO	S9 mix	MEM 培地
-S9 mix	0.03 mL	—	3.0 mL
+S9 mix	0.03 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.05 mL	—	5.0 mL

- (3) 短時間処理法では 6 時間、連続処理法では 24 時間細胞を処理した。
- (4) 短時間処理法では 6 時間処理後、MEM で細胞表面を 3 回洗浄し、新たに MEM 培地 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。
- (5) 処理開始時および処理終了時に、被験物質の沈殿等の有無を目視で観察した。

6.10.5 細胞増殖率の測定

- (1) 細胞表面を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} フリーのダルベッコリン酸緩衝液（以下、PBS(-)と略す）で洗浄した。
- (2) 0.25% トリプシン-EDTA で処理（37°C, 5 分）した。
- (3) MEM 培地を加え、ピペッティングにより細胞を剥離した。
- (4) 細胞計数分析装置で細胞を計数した。
- (5) 陰性対照群の測定値（平均）を 100% として、細胞増殖率を算出した。

6.10.6 50%細胞増殖抑制用量の算出

すべての処理条件において 50%細胞増殖抑制用量（ IC_{50} ）を算出した。 IC_{50} は、細胞増殖率が 50%を挟む 2 用量を結ぶ直線式より算出した。

6.11 染色体異常試験

6.11.1 処理条件

-S9 mix, +S9 mix, 24 時間処理

6.11.2 被験物質用量

細胞増殖抑制試験の結果、 IC_{50} は -S9 mix で 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、+S9 mix は 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間処理

で 0.7 µg/mL であった。

以上の結果に基づいて、染色体異常試験は下記の用量を設定した。

-S9 mix : 0.25, 0.5, 1, 2, 4 および 8 µg/mL

+S9 mix : 0.5, 1, 2, 4, 8 および 16 µg/mL

24 時間処理 : 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 および 2 µg/mL

6.11.3 陽性対照物質用量

-S9 mix : MMC, 0.1 µg/mL

+S9 mix : BP, 10 µg/mL

24 時間処理 : MMC, 0.05 µg/mL

6.11.4 陽性対照物質用量の設定理由

上記用量で染色体異常を誘発することが知られている。

6.11.5 細胞処理

6.10.4 項に示した方法で実施した。

陽性対照群については、下記の組成で同様に実施した。

処理条件	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	MEM 培地
-S9 mix	0.03 mL	—	—	3.0 mL
+S9 mix	—	0.03 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.05 mL	—	—	5.0 mL

6.11.6 標本作製

- (1) 処理終了の 2 時間前にコルセミドを最終用量が 0.1 µg/mL となるように各プレートに加え、分裂中期細胞を蓄積した。
- (2) 処理終了後、細胞表面を PBS(-) で洗浄した。
- (3) 0.25% トリプシン-EDTA で処理 (37°C, 5 分) 後、MEM 培地を加え、ピペッティングにより細胞を剥離した。
- (4) 細胞浮遊液を遠心管に回収し、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間; 以下同様) により細胞を集めた。
- (5) 上清を除去後、各遠心管に 0.075 mol/L 塩化カリウム溶液 4 mL を加えて低張処理 (37°C, 15 分) を行った。
- (6) 冷却したエタノール固定液 (エタノール・酢酸混合液 [3 : 1, v/v]) 0.5 mL を加え、混和した後に、遠心分離し、上清を除去した。
- (7) 冷却したエタノール固定液 4 mL を加え、混和した後に、遠心分離し、上清を除去した。
- (8) (7) の操作を再度実施した。
- (9) 適量の冷却したエタノール固定液に細胞を浮遊させた。
- (10) 濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに 2 箇所滴下して乾燥させた。プレートあたり 2 枚の標本作製した。
- (11) 3% ギムザ溶液で 20 分間染色し、水洗、乾燥した。
- (12) カバーガラスおよび封入剤で封入した。

6.11.7 細胞増殖率の測定

- (1) 6.11.6 (3) 項で得られた細胞浮遊液の一部を採取し、細胞計数分析装置を用いて細胞を計

数した。なお、陽性対照群については計測しなかった。

- (2) 陰性対照群の測定値（平均）を 100%として、細胞増殖率を算出した。

6.11.8 観察

6.11.8.1 観察標本の選定

-S9 mix では 2 µg/mL, +S9 mix では 8 µg/mL, 24 時間処理では 0.5 µg/mL の用量で細胞増殖率が 50%付近となった。

これらの結果を基に、以下に示す用量の標本を観察標本として選択した。

-S9 mix : 0.5, 1 および 2 µg/mL

+S9 mix : 2, 4 および 8 µg/mL

24 時間処理 : 0.125, 0.25 および 0.5 µg/mL

6.11.8.2 予備鏡検

6.8.8.1 項で選択した用量の標本ならびに対照群の標本について、以下の条件を満たしていることを確認した。

予備鏡検は、メタフェーズ自動検索システムを使用した。

- (1) 各プレートから作製した 2 枚の標本で合わせて 100 個以上の分裂中期細胞が得られる。
 (2) 陰性対照群および陽性対照群において、染色体異常を持つ細胞の出現頻度が適切である。

6.11.8.3 観察

6.11.8.3.1 標本のコード化

標本をランダムに並べ替え、情報記載部分をラベルで覆った後に観察した。

6.11.8.3.2 観察対象とした分裂中期細胞の選択基準

- (1) 染色体がよく広がっている。
 (2) 構造異常：染色体数が 25 ± 2 である。
 数的異常：染色体数が 25 ± 2 または 35 以上である。

6.11.8.3.3 観察細胞数

プレートあたり 100 個（用量あたり 200 個）

6.11.8.3.4 構造異常^[1]

- (1) 染色分体型切断
 (2) 染色分体型交換
 (3) 染色体型切断
 (4) 染色体型交換（二動原体、環状染色体など）
 (5) 断片化

6.11.8.3.5 ギャップ

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。

6.11.8.3.6 数的異常

- (1) 動原体数が 35 以上の倍数性細胞
 (2) 核内倍加細胞

6.11.9 判定基準

6.11.9.1 染色体異常細胞

構造異常細胞：染色体構造異常を1個以上持つ細胞

数的異常細胞：染色体数的異常を持つ細胞

6.11.9.2 データ採用基準

観察可能な分裂中期細胞数がプレートあたり100個（用量あたり200個）得られた標本のデータを採用データとした。

6.11.9.3 試験成立基準

以下の基準を満たしている場合に試験成立とした。

- (1) 陰性対照群および陽性対照群ならびに3用量以上の被験物質処理群について、データ採用基準を満たしている。
- (2) 陰性対照群において、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が5%未満である。
- (3) 陽性対照群において、構造異常細胞の出現頻度が10%以上である。

6.11.9.4 判定基準^[2]

陰性：いずれの被験物質処理群においても、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が5%未満である。

疑陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が5%以上10%未満である。

陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が10%以上であり、用量依存的な増加傾向が認められる。

6.11.9.5 統計学的手法

判定に統計学的手法は用いなかった。

7. 結果

7.1 細胞増殖抑制試験 (表 1, 図 1~6)

すべての処理条件において, 250 µg/mL 以上で処理開始時および終了時に被験物質の沈殿が認められた。また, 短時間処理法の 125 µg/mL, 連続処理法の 62.5 および 125 µg/mL で処理終了時に被験物質の沈殿が認められた。

IC₅₀ は, -S9 mix で 2.5 µg/mL, +S9 mix で 7.5 µg/mL, 24 時間処理で 0.7 µg/mL であった。

7.2 染色体異常試験 (表 2~4, 図 1~9)

いずれの処理条件のいずれの用量においても, 処理開始時および終了時に被験物質の沈殿等は認められなかった。

-S9 mix では 2 µg/mL, +S9 mix では 8 µg/mL, 24 時間処理では 0.5 µg/mL の用量で, 細胞増殖率が 50% 付近となった。細胞増殖率測定の結果から, -S9 mix では 0.5, 1 および 2 µg/mL, +S9 mix では 2, 4 および 8 µg/mL, 24 時間処理では 0.125, 0.25 および 0.5 µg/mL の標本を観察用量として選択した。予備鏡検の結果, すべての用量の標本は観察可能であると判断した。標本観察の結果, いずれの処理条件のいずれの用量においても, 構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度は 5% 未満であった。

陰性対照群における構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度は, いずれの処理条件においても 5% 未満であった。また, 陽性対照群における構造異常細胞の出現頻度は, いずれの処理条件においても 10% 以上であった。

8. 考察および結論

P092 の染色体異常誘発性を検討するため, ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

標本観察の結果, 構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度は, いずれの処理条件においても 5% 未満であった。

陰性対照群および陽性対照群では, 染色体異常細胞の出現頻度は期待通りの値を示し, 当該試験が技術的に成立していることが示された (Appendix 5)。

従って, P092 は, 当該試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有しないと結論した。

9. 参考文献

- [1] 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「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンティスト社, 東京, 2000
- [2] 祖父尼俊雄監修「染色体異常試験データ集・改訂 1998 年版」株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1999

10. 特記事項

10.1 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

被験物質溶液の安定性において, 調製後 4 日目の 50 mg/mL 溶液で析出した被験物質と思われる白濁が認められた。被験物質溶液の保存温度 (冷蔵) または, 保存期間 (4 日間) に原因があると考えられ, 2012 年 11 月 19 日の分析を中止した。被験物質溶液の保存温度を室温, 保存期間を 24 時間とし, 被験物質溶液の安定性再実験を 2012 年 11 月 20 日~11 月 21 日に実施した。再実験を実施したため, 試験の信頼性に影響を及ぼさないと判断した。

10.2 試験計画書に従わなかったこと
なし

表 1 細胞増殖抑制試験の結果

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)		
	短時間処理法		連続処理法
	-S9 mix	+S9 mix	24 時間処理
陰性対照 (DMSO)	100.0	100.0	100.0
1.95	54.2	65.0	13.2
3.91	40.5	71.9	4.7
7.81	15.8	48.2	2.2
15.6	0.9	34.9	1.1
31.3	0.5	5.1	12.2
62.5 P'	0.4	0.4	1.0
125 P'	0.2	0.4	0.8
250 P	0.4	0.6	1.0
500 P	0.3	0.4	1.3

DMSO : ジメチルスルホキシド

P : 250 $\mu\text{g/mL}$ 以上で処理開始時および終了時に被験物質の沈殿が認められた。

P' : 短時間処理法の 125 $\mu\text{g/mL}$, 連続処理法の 62.5 および 125 $\mu\text{g/mL}$ で処理終了時に被験物質の沈殿が認められた。

表 2 染色体異常試験の結果 (短時間処理法・-S9 mix)

被験物質の名称 P092

処理-回復時間(h)	S9 mix	被験物質の用量(μg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップの出現数	細胞増殖率(%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体分体型切断	染色体分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍數体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	-	陰性対照(DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	102.1	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	97.9	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	0.25	観察対象外								75.2	観察対象外			
											90.5				
											82.9				
6-18	-	0.5	100	0	1	0	0	0	1	0	84.9	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	87.4	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	86.2	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	1	100	3	1	1	0	0	4	0	61.0	100	0	0	0
			100	2	0	0	0	0	2	0	65.8	100	0	0	0
			200	5 (2.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	0	63.4	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	2	100	1	0	0	0	0	1	0	52.4	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	43.2	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	47.8	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	4	観察対象外								28.0	観察対象外			
											29.7				
											28.9				
6-18	-	8	観察対象外								7.5	観察対象外			
											7.0				
											7.3				
6-18	-	陽性対照(MMC 0.1)	100	15	16	0	0	0	27	0		100	0	0	0
			100	23	13	1	0	0	32	0		100	0	0	0
			200	38 (19.0)	29 (14.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	59 (29.5)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC

表 3 染色体異常試験の結果 (短時間処理法・+S9 mix)

被験物質の名称 P092

処理-回復 時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (µg/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)				
			観察細胞数	染色体型切断	染色体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化			総異常細胞数(%)	観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	1	0	0	0	1	0	102.6	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	97.4	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.5	観察対象外							105.5	観察対象外				
										103.1	観察対象外				
										104.3	観察対象外				
6-18	+	1	観察対象外							110.6	観察対象外				
										99.1	観察対象外				
										104.9	観察対象外				
6-18	+	2	100	0	0	0	0	0	0	97.1	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	98.5	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	97.8	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	4	100	0	2	0	0	0	2	0	79.6	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	77.3	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	78.5	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	8	100	1	1	0	0	0	2	0	51.0	100	0	0	0
			100	2	0	0	0	0	2	0	41.8	100	0	0	0
			200	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	0	46.4	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	16	観察対象外							36.3	観察対象外				
										34.7	観察対象外				
										35.5	観察対象外				
6-18	+	陽性対照 (BP10)	100	2	8	0	0	0	10	0		100	0	0	0
			100	2	9	0	0	0	11	0		100	0	0	0
			200	4 (2.0)	17 (8.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	21 (10.5)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : ジメチルスルホキシド

BP : ベンゾ [a] ピレン

表 4 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

被験物質の名称 P092

処理-回復 時間(h)	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体型切断	染色分体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	101.2	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	98.8	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	0.0625	観察対象外								81.6	観察対象外			
										95.5				
										88.6				
24-0	0.125	100	2	0	0	0	2	0	87.8	100	0	0	0	
		100	2	0	0	1	0	3	0	88.7	100	0	0	0
		200	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	5 (2.5)	0	88.3	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	0.25	100	3	0	0	0	3	0	68.7	100	0	0	0	
		100	3	0	0	0	3	0	62.2	100	0	0	0	
		200	6 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	0	65.5	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	0.5	100	3	1	0	0	4	0	57.2	100	0	0	0	
		100	1	0	0	0	0	1	0	46.6	100	0	0	0
		200	4 (2.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0	51.9	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	1	観察対象外								9.8	観察対象外			
										14.2				
										12.0				
24-0	2	観察対象外								3.9	観察対象外			
										3.0				
										3.5				
24-0	陽性対照 (MMC 0.05)	100	12	22	0	0	0	29	0		100	0	0	0
		100	15	15	0	0	0	24	0		100	0	0	0
		200	27 (13.5)	37 (18.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	53 (26.5)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC

図1 P092処理における細胞毒性
(短時間処理法・-S9 mix)

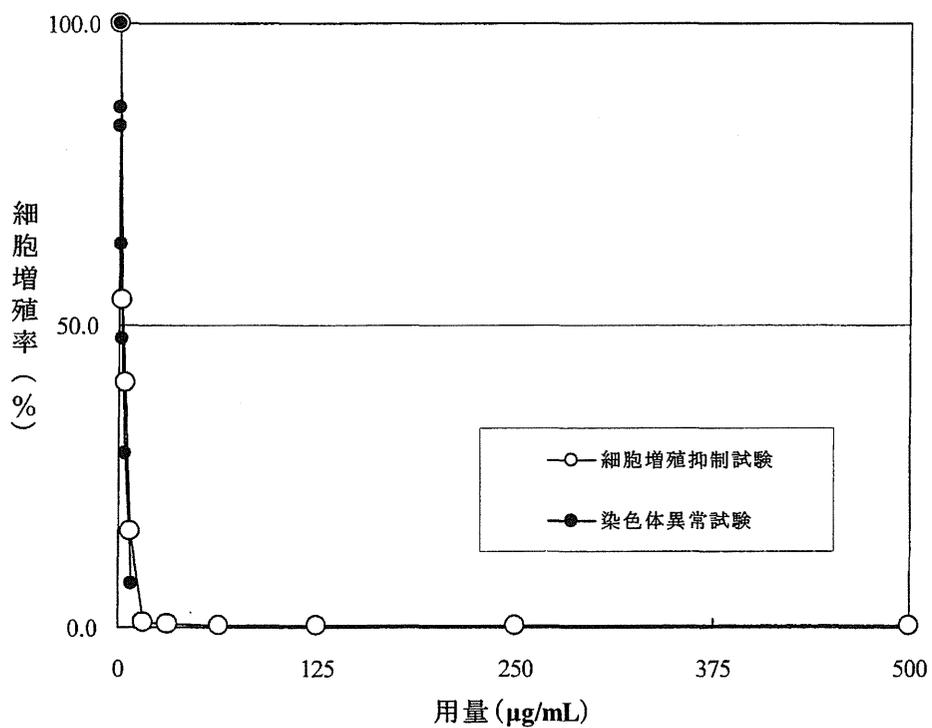


図2 P092処理における細胞毒性
(低用量域, 短時間処理法・-S9 mix)

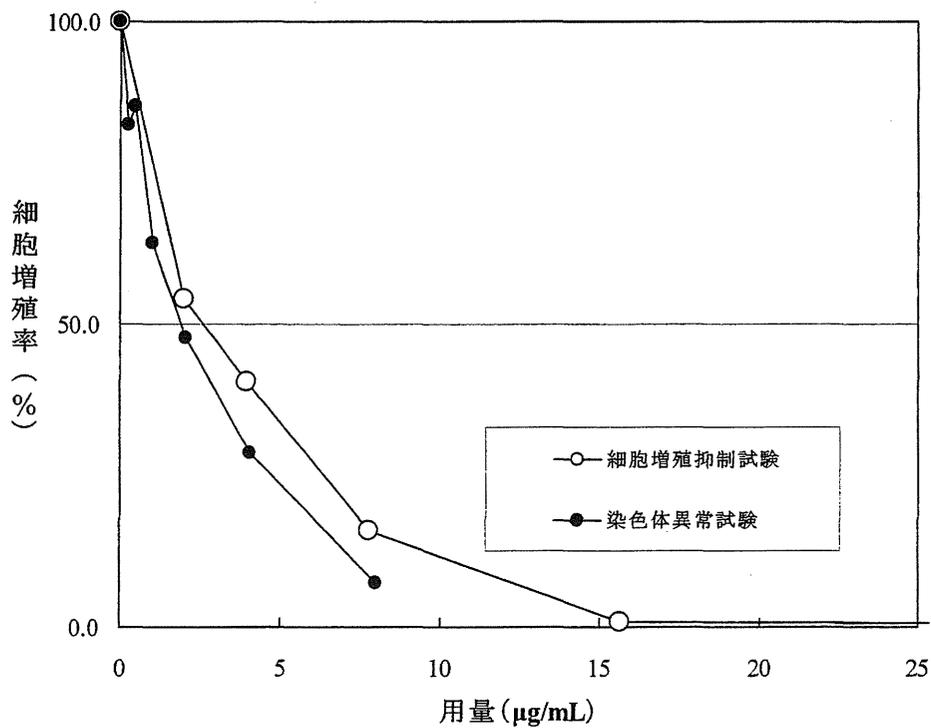


図3 P092処理における細胞毒性
(短時間処理法・+S9 mix)

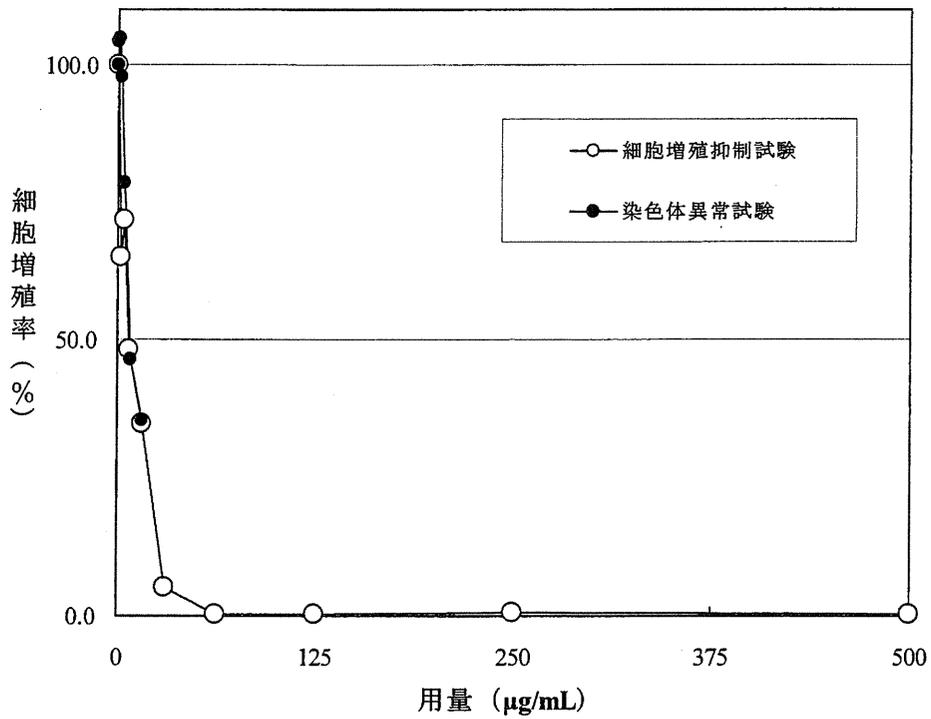


図4 P092処理における細胞毒性
(低用量域, 短時間処理法・+S9 mix)

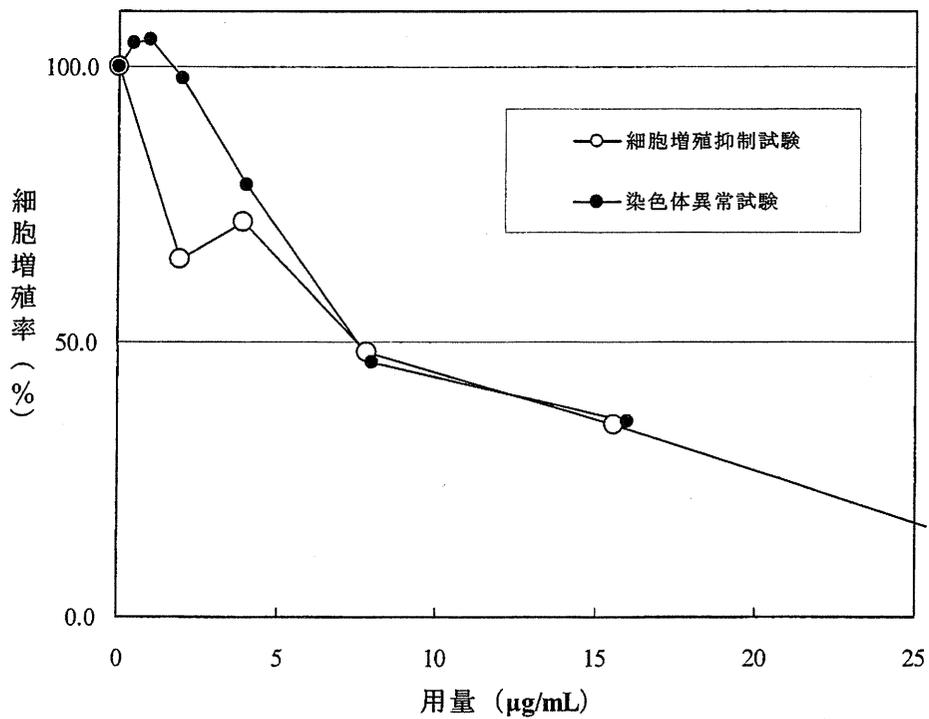


図5 P092処理における細胞毒性
(連続処理法)

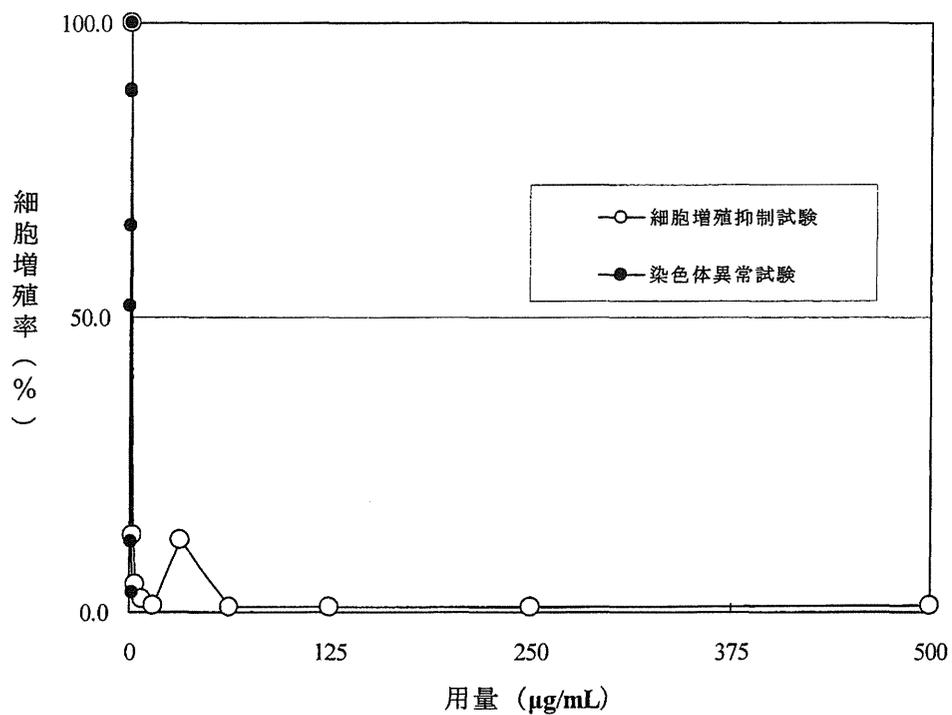


図6 P092処理における細胞毒性
(低用量域, 連続処理法)

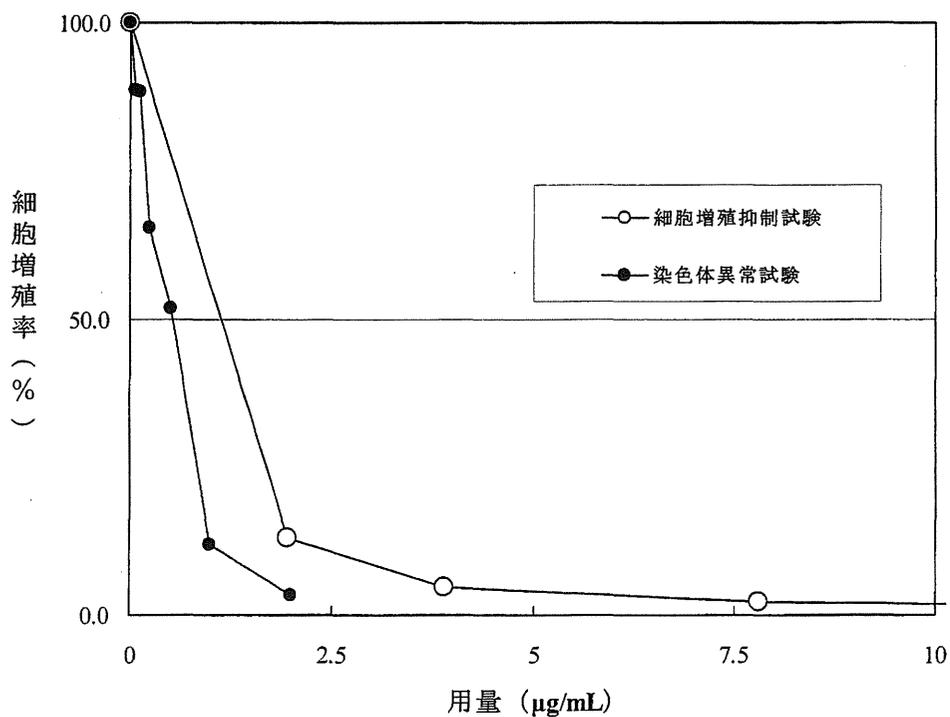


図7 P092処理における染色体異常細胞出現頻度
(短時間処理法・-S9 mix)

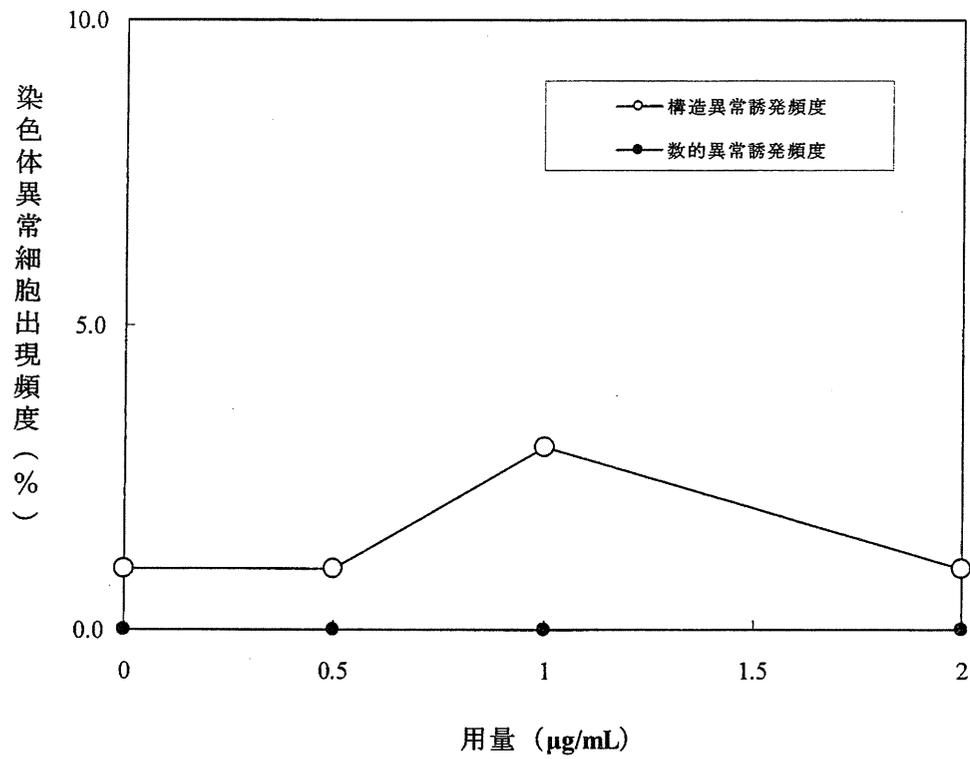


図8 P092処理における染色体異常細胞出現頻度
(短時間処理法・+S9 mix)

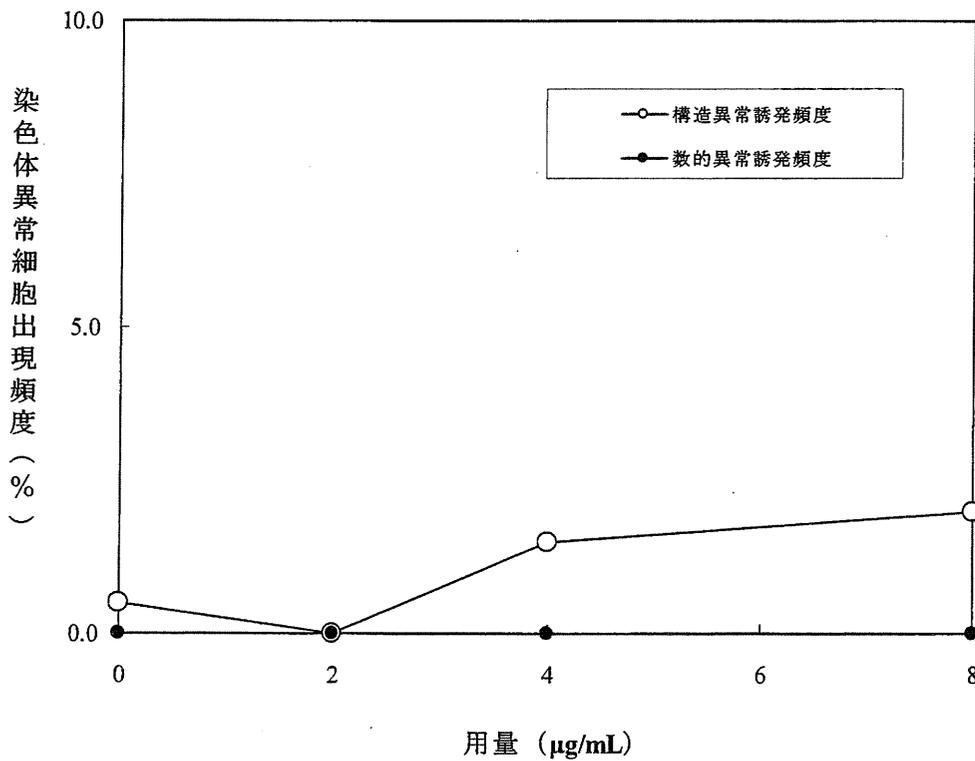
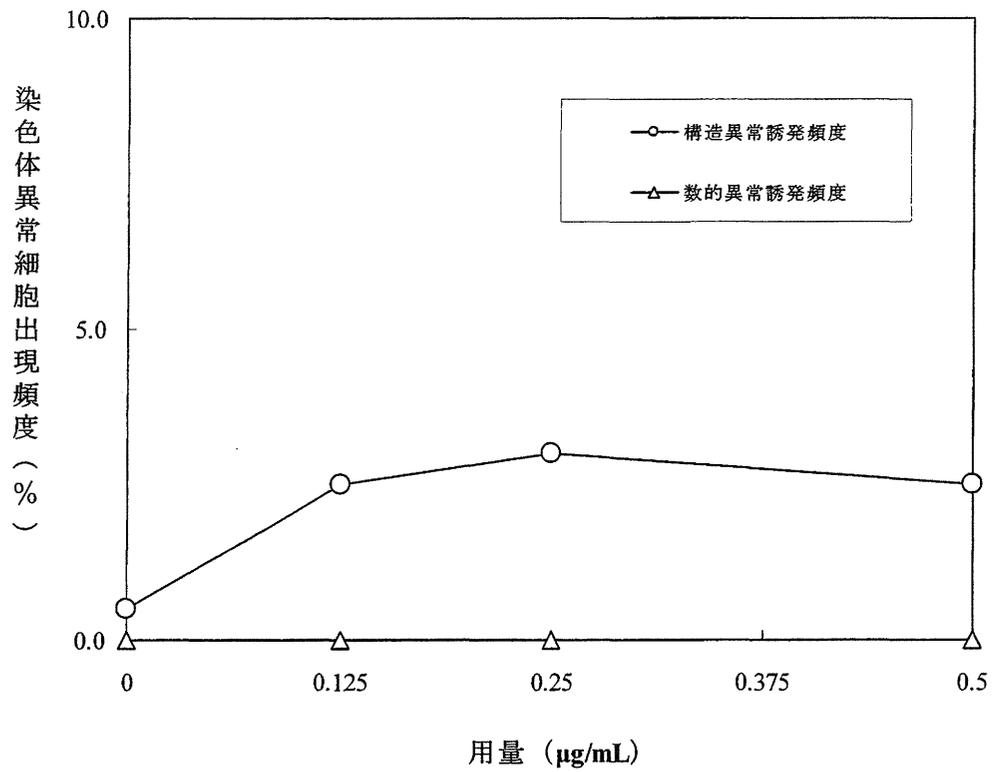


図9 P092処理における染色体異常細胞出現頻度
(連続処理法)



Appendix 1 分析証明書（修正版）（No. P120567-COA1-A1）

P120567-COA1-A1

分析証明書（修正版）

分析証明書番号 : P120567-COA1-A1
 試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学
 試験番号 : P120567
 表題 : P092 の特性試験及び保存安定性試験
 試験施設 : 三菱化学メディエンス株式会社 熊本研究所
 適用 GLP : 厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
 に関する省令」
 (平成 9 年 3 月 26 日, 一部改正 厚生労働省令第 114 号, 平成 20 年 6
 月 13 日)
 被験物質 : P092
 ロット番号 : 7J7XB
 保管条件 : 冷蔵 (1-10 °C), 遮光, 密封, 窒素封入
 保管場所 : 被験物質保管室 J009 内の薬用冷蔵庫
 入手日 : 2012 年 09 月 03 日
 分析日 : 2012 年 09 月 24 日 (被験物質の使用日)
 試験結果 :

試験項目	判定基準	結果	判定
性状 (色, 形状)	なし (観察結果を報告する)	うすい黄色の結晶性粉末	—
確認試験 (IR)	なし (測定結果を報告する)	IR 測定結果を図 1 に示した	—
純度 ^{*1}	95.0%以上 (HPLC 面積%)	97.4%	適

<備考>
*1 繰り返し 3 回測定 of 平均値を結果に記載した。

試験責任者: 2012年 11月13日

佐藤 保夫

三菱化学メディエンス株式会社
 創薬支援事業本部 試験研究センター
 安全性研究部 安全性 4 グループ



Appendix 2 分析証明書 (No. P120567-COA5)

P120567-COA5

分析証明書

分析証明書番号 : P120567-COA5
 試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学
 試験番号 : P120567
 表題 : P092 の特性試験及び保存安定性試験
 試験施設 : 三菱化学メディエンス株式会社 熊本研究所
 適用 GLP : 厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」
 (平成 9 年 3 月 26 日, 一部改正 厚生労働省令第 114 号, 平成 20 年 6 月 13 日)
 被験物質 : P092
 ロット番号 : 7J7XB
 保管条件 : 冷蔵 (1-10 °C), 遮光, 密封, 窒素封入
 保管場所 : 被験物質保管室 J009 内の薬用冷蔵庫
 入手日 : 2012 年 09 月 03 日
 分析日 : 2013 年 02 月 05 日 (被験物質の使用日)
 試験結果 :

試験項目	判定基準	結果	判定
性状 (色, 形状)	なし (観察結果を報告する)	うすい黄色の結晶性粉末	—
確認試験 (IR)	なし (測定結果を報告する)	IR 測定結果を図 1 に示した	—
純度 ^{*1}	95.0%以上 (HPLC 面積%)	97.1%	適
<備考> *1 繰り返し 3 回測定 of 平均値を結果に記載した。			

試験責任者: 2013 年 2 月 12 日

佐藤 保夫
 三菱化学メディエンス株式会社
 創薬支援事業本部 試験研究センター
 安全性研究部 安全性 4 グループ

