

トコンピュータ室 (A007) のホストコンピュータ内に保管する。

3.14 保存する資料

- (1) 試験計画書及び試験計画書変更書
- (2) 被験物質及び対照物質に関する資料
- (3) 使用動物に関する資料
- (4) 試験結果に関する資料
- (5) 通信文書等の記録文書
- (6) 最終報告書

3.15 その他

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針 (試験研究センター指針)」に基づき、動物実験委員会審査及び試験研究センター長の承認を得た (承認番号: 2014-0680)。

4. 試験責任者署名

表 題： P092・マレイン酸塩のラットを用いる小核試験

試験番号： B130236

試験責任者：

2015年 3月16日

高沢博修

高沢 博修

株式会社LSIメディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター

安全性研究部

5. 要約

P092・マレイン酸塩を雄ラット (Cri: CD (SD), 投与時7週齢, 5匹/群) に, 0, 5, 10及び20 mg/kg (P092 フリー体として) の用量で, 1回静脈内投与し, 末梢血幼若赤血球 (IMEs) における小核誘発を指標として, 生体内における染色体異常誘発作用の有無を評価した. 投与は拘束下で尾静脈からおよそ1 mL/kg/minの速度で20 mL/kgの投与液量を投与した (1匹あたり20分間投与). 陽性対照群にはCPを20 mg/kgの用量で1回経口投与した. いずれの群も投与後48及び72時間に鎖骨下静脈から採血し, 末梢血小核観察用の標本作製して蛍光顕微鏡下で小核を有するIMEs (MNIMEs) の出現頻度を求めた.

P092・マレイン酸塩の20 mg/kg投与後0~1時間に, 2例で赤色尿が観察され, 投与翌日から観察終了まで2例で尾の暗赤色化がみられたが, 他の動物の一般状態に異常は認められず, いずれの群でも陰性対照群と比較して体重には有意な変化はみられなかった.

標本観察の結果, 被験物質のいずれの用量, いずれの標本作製時期でも, 陰性対照群と比較して有意なMNIMEsの増加は認められなかった. 一方, 陽性対照群では48及び72時間採血群ともに有意なMNIMEsの増加が認められた. また, 陰性対照群の各個体におけるMNIMEs出現頻度及びIMEsの割合は, いずれも試験施設の背景値の範囲内の値を示した. 陰性及び陽性対照群におけるこれらの結果は, 小核誘発性を評価する上で本試験の妥当性を示すものであった.

従って, P092・マレイン酸塩は, 本試験条件下でラット末梢血小核試験陰性と判定した.

6. 材料及び方法

6.1 被験物質

6.1.1 名称

P092・マレイン酸塩

6.1.2 ロット番号

KS14001

6.1.3 純度

99.7% (Attachment 1)

6.1.4 換算係数 (フリー体)

1.4618 (マレイン酸塩分子量/フリー体分子量=734.84/502.69)

以下, 投与用量及び濃度はフリー体 P092 としての表示である.

6.1.5 性状

白色の粉末 (Attachment 1)

6.1.6 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.1.7 保存条件

冷蔵 (実測値: 3.4~6.4°C, 許容範囲: 1°C~10°C), 遮光, 気密 (窒素封入)

6.1.8 保管場所

被験物質保管場所 (59) および (42)

6.1.9 取扱上の注意

保護メガネ, マスク, ゴム手袋着用

6.1.10 被験物質の安定性確認

「P092・マレイン酸塩の特性試験及び保存安定性試験」(試験番号: P140711, 株式会社 L S I メディエンス 熊本研究所) で実施した同一ロットの分析結果を入手し, 被験物質が試験期間中安定であることを確認した (Attachment 2).

6.1.11 残余被験物質の処理

被験物質管理責任者に移管した.

6.2 対照物質

6.2.1 陰性対照物質（媒体）

6.2.1.1 名称

生理食塩液（日本薬局方，株式会社大塚製薬工場）

6.2.1.2 保存条件

室温

6.2.1.3 ロット番号及び使用期限

4KG80：2017年7月

4B86N：2019年2月

6.2.2 陽性対照物質

6.2.2.1 名称

Cyclophosphamide monohydrate（以下 CP, Sigma Aldrich）

6.2.2.2 保存条件

冷蔵

6.2.2.3 ロット番号及び使用期限

SLBG4216V, 2016年5月

6.2.2.4 陽性対照物質の選択理由

小核試験において広く使用されているため。

6.3 投与液の調製

投与液の調製は紫外線をカットした蛍光灯下で行った。

6.3.1 被験物質投与液の調製

被験物質投与液は，投与液の安定性分析用及び小核試験投与用に，それぞれ以下の手順で調製した。

- (1) P092・マレイン酸塩をフリー体換算した後，正確に秤量した。各秤量値は次の通りであった。安定性分析用：1.4618 g（50 mg/mL 用）及び 0.2924 g（10 mg/mL 用，9.2 項参照），小核試験用：0.8801 g。
- (2) 媒体を加えて，スターラーで攪拌しつつ溶解させ，メスアップした〔安定性分析用：50 及び 10 mg/mL 用ともに 20 mL，小核試験用：600 mL（1.0 mg/mL）〕。
- (3) 0.22 μm のフィルターでろ過，滅菌した。なお，50 mg/mL の投与液は途中，目視により完全には溶解していないように思われたため，上記の 10 mg/mL 液を調製するに至った

(9.2 項参照). また, 50 mg/mL 溶液は 0.001 mg/mL 溶液の調製には使用せずに(5)以降の操作を行った.

- (4) より低濃度の投与液を調製する場合は, 滅菌済みの器具を用いて, クリーンベンチ内で希釈して調製した. 安定性分析用の 10 mg/mL 液は段階的に希釈して 0.001 mg/mL 液を調製し, 小核試験用の投与液は 1.0 mg/mL の濃度を基にして 0.5 及び 0.25 mg/mL 液を調製した. なお, 0.001 mg/mL の濃度は, 1 回目調製後の分析結果が許容濃度の下限を下回ったため, 再調製した (9.2 項参照).
- (5) 各濃度の溶液の一部を分取して pH を測定し, 記録した. pH 測定結果を下表に示す.
- (6) 安定性分析用の各濃度の投与液は, 褐色ガラス瓶に 2 等分して片方を 6.4 項の安定性分析に使用し, 小核試験用の各濃度の投与液は約 5 mL を採取し, 6.5 項の濃度分析に使用した.
- (7) 安定性分析用のもう片方と, 小核試験用の残りの投与液は褐色ガラス瓶に分取して, 冷蔵 (実測値: 4.3~6.4°C, 許容範囲: 1~10°C), 遮光条件で保管した. 小核試験用の投与液は, 6.4 項で保存安定性が確認された条件下で使用した.

【投与液 pH 測定結果】

安定性分析用		小核試験用	
設定濃度 (mg/mL)	pH 測定値	設定濃度 (mg/mL)	pH 測定値
0.001	6.51/6.57 (再調製)	0.25	4.65
10	3.84	0.5	4.41
50	3.68	1.0	4.25

6.3.2 陽性対照物質投与液の調製

- (1) CP を 0.06 g 秤量し, 注射用水 (日本薬局方) で 30 mL にメスアップした.
- (2) 超音波処理して 2 mg/mL の濃度の溶液を調製した.
- (3) 冷蔵 (実測値: 4.3~6.4°C, 許容範囲: 1~10°C), 遮光条件で保管し, 調製後 5 日以内に使用した.

6.4 被験物質投与液の安定性確認

試験施設において被験物質投与液の安定性を確認した.

- (1) 確認した被験物質投与液の設定濃度
0.001 及び 50 mg/mL.

なお, 10 mg/mL 液については調製直後の濃度分析を実施したが, 下記条件下での保存安定性分析は行わなかった (9.2 項参照).

- (2) 確認した保存条件及び期間

冷蔵 (実測値: 4.3~6.4°C, 許容範囲: 1~10°C), 遮光条件で調製後 8 日間保存後, 室温 (実

測値：18.9～23.4°C，許容範囲：10～30°C)，遮光条件で6時間

(3) 確認方法

調製直後（初期値）は6.3.1項で採取した被験物質投与液について、HPLC法で濃度分析を行った。保存終了後、サンプリングして濃度分析を行った。分析方法は6.6項に示す。

(4) 判定基準及び測定結果

判定基準： 保存後の測定値（濃度）の平均値（n=2）が調製直後の平均濃度（初期値）の100±10%以内であること。

測定結果： 投与液の安定性分析結果を Attachment 3 に示す。上記保存条件及び期間後に測定した結果は、設定濃度 0.001 及び 50 mg/mL とともに基準を満たしたことから、目的の保存安定性が確認された。なお、設定濃度 0.001 mg/mL の投与液の調製直後に測定した値は、対設定値の 90%未満 (0.000842 mg/mL) であった (9.2項参照)。

6.5 被験物質投与液の濃度確認

試験施設において小核試験用の投与液の濃度を確認した。

(1) 確認した被験物質投与液の設定濃度

0.25, 0.5 及び 1.0 mg/mL

(2) 確認方法

6.3.1項で採取した各濃度の投与液からサンプリングし(n=2), HPLC法で濃度分析を行った。分析方法は6.6項に示す。

(3) 判定基準及び測定結果

判定基準： 測定値（濃度）の平均値（n=2）が設定値の100±10%以内であること。

測定結果： 投与液の濃度分析結果を以下に示す。いずれの濃度の投与液も上記判定基準を満たした。

設定濃度 (mg/mL)	測定値 (mg/mL)	平均値 (mg/mL)	対設定値 (%)
0.25	0.246	0.247	98.8
	0.248		
0.5	0.497	0.499	99.8
	0.500		
1.0	0.983	0.991	99.1
	0.999		

6.6 投与液中の被験物質濃度分析方法

試験施設で実施した分析法バリデーション試験（試験番号：B141088）で検証された以下の方法に従って実施した。

6.6.1 使用機器

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

6.6.2 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
 移動相 (MP) : 1% 過塩素酸ナトリウム (過塩素酸で pH 2.5 に調整した) / アセ
 トニトリル混液 (55 : 45) *
 流速 : 1 mL/min
 検出波長 : UV 254 nm
 注入量 : 90 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 *
 * 減圧下超音波脱気した。

6.6.3 標準溶液の調製

下表に従い、標準溶液 (ST-1, ST-2 及び ST-3) を正確に調製した。

溶液略号	調製方法	濃度 * (μ g/mL)
SS-1	被験物質, 36.5 mg ** \rightarrow 50 mL / 生理食塩液 ***	500
SS-2	SS-1, 1 mL \rightarrow 50 mL / 生理食塩液	10
ST-1	SS-2, 1 mL \rightarrow 20 mL / 生理食塩液	0.5
ST-2	SS-2, 2 mL \rightarrow 20 mL / 生理食塩液	1
ST-3	SS-2, 4 mL \rightarrow 20 mL / 生理食塩液	2

* P092 フリー体としての濃度

** P092 フリー体として 25 mg.

*** 超音波処理により被験物質を溶解した後、定容とした。

6.6.4 試料溶液の調製

下表に従い試料溶液を調製した (n=2)。

投与液* (mg/mL)	調製方法	溶液 略号	最終濃度* ($\mu\text{g/mL}$)	最終 希釈倍率
0.001	投与液適量	A	1	1
0.25	投与液, 1 mL → 25 mL/生理食塩液 **	B	1	250
	B, 1 mL → 10 mL/生理食塩液	C		
0.5	投与液, 1 mL → 50 mL/生理食塩液 **	D	1	500
	D, 1 mL → 10 mL/生理食塩液	E		
1.0	投与液, 1 mL → 50 mL/生理食塩液 **	F	1	1000
	F, 1 mL → 20 mL/生理食塩液	G		
50	投与液, 1 mL → 50 mL/生理食塩液 **	H	1	50000
	H, 1 mL → 50 mL/生理食塩液	I		
	I, 1 mL → 20 mL/生理食塩液	J		
10 ^s	投与液, 1 mL → 100 mL/生理食塩液 **	K	1	10000
	K, 1 mL → 100 mL/生理食塩液	L		

* P092 フリー体としての濃度

** 超音波照射した後に定容とした。

^s 9.2 項参照。

6.6.5 HPLC 測定及び濃度算出

- (1) 標準溶液 (ST-1, ST-2 及び ST-3 ; 6.6.3 項参照) 及び試料溶液 (A, C, E, G, J 及び L ; 6.6.4 項参照) を 6.6.2 項の条件に設定した HPLC に注入した。
- (2) クロマトグラム上の P092 フリー体のピーク面積を測定した。
- (3) 標準溶液の濃度及びそのピーク面積から検量線を作成した。
- (4) 検量線, 試料溶液から得られたピーク面積及び希釈倍率から投与液中の P092 フリー体濃度 (測定値) を算出した。
- (5) 測定値の平均値, 対設定値及び対初期値 (安定性確認時のみ) を算出した。

検量線の作成及び分析結果の処理には Microsoft Excel 2010 を使用した。

6.7 試験動物

6.7.1 動物種

ラット

6.7.2 系統

CrI:CD (SD)

6.7.3 系統選択の理由

げっ歯類を用いた毒性試験に広く使用されており、ラットを用いる小核試験において、一般的にどの系統を使用しても正当に小核誘発性の評価が可能であることが報告されているため [1]。また試験施設における背景データが豊富であるため。

6.7.4 性

雄

6.7.5 性の選択理由

雄は雌よりも遺伝毒性物質に対する感受性が高く [2]、雌雄間で毒性や代謝または曝露の相違が明確な場合や薬剤が特定の性にのみ用いる場合を除き、通常雄のみにより評価することが適用ガイドラインにおいても認められているため。

6.7.6 微生物レベル

SPF

6.7.7 購入先

日本チャールス・リバー株式会社 厚木生産所

6.7.8 購入時週齢

6 週齢

6.7.9 購入動物数

28 匹

6.7.10 検疫・馴化

6.7.10.1 検疫

検疫期間は動物入荷後 5 日間とした。検疫期間には以下の検査を行い、異常のないことを確認した。なお、検査方法は 6.11 項に従った。

- ・一般状態観察 (1 日 1 回)
- ・体重測定 (動物入荷時及び検疫終了時)

6.7.10.2 馴化

馴化期間は動物入荷から投与前日までとし、検疫期間終了日と投与前日は同日であった。

6.7.11 投与前週齢

7 週齢

6.7.12 投与時週齢選択理由

小核誘発性の評価に適切な感度をもつ週齢であることが報告されており[3]、適用ガイドラインにおいても若い成熟げっ歯類の使用が推奨されているため。

6.7.13 投与時体重

投与時の体重範囲は、247.3～276.1 g であり (Table 2)、全例の平均体重 (260.93 g) \pm 20%以内であった。

6.7.14 群分け

(1) 実施日

投与の前日 (検疫終了日: 2015 年 1 月 19 日)

(2) 動物選抜

検疫・馴化期間中の検査 (6.7.10 項) の結果に基づき、いずれの動物にも異常が認められなかったため、試験に供する動物として全動物を群分け対象として選抜した。

(3) 動物の振り分け

群分け日の体重に基づいて、体重層別化無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ均一になるように動物を振り分け、25 匹を試験に使用した。

6.7.15 動物の個体識別

個体識別は以下により行った。

群分け前: 尾に青色油性ペンで付した番号 (群分け前の動物番号末尾 1 あるいは 2 桁)

群分け前の動物番号は以下の通りとした。

19001～19028

群分け後: 尾に赤色油性ペンで付した番号 (群分け後の動物番号末尾 3 桁, 6.10 項)

実験期間中、各ケージには識別ラベルを付した。

6.7.16 余剰動物の取扱

余剰動物は投与開始日に試験系から除外した。除外した動物 (3 匹) は、チオペンタールナトリウム (ラボナール, ロット番号: V003, 田辺三菱製薬株式会社) の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた。

6.8 動物飼育

6.8.1 飼育室

ラット・マウス飼育室 (4131 室, 4132 室*)

* パーティションを取り外し、1 部屋として使用した。

6.8.2 飼育環境

6.8.2.1 温度

実測値：21.6°C～23.2°C，許容範囲：19.0°C～25.0°C

6.8.2.2 相対湿度

実測値：50.5%～62.3%，許容範囲：35.0%～75.0%

6.8.2.3 換気

6～20回/時，オールフレッシュエアー供給に設定し，年2回問題ないことを確認した。

6.8.2.4 照明時間

12時間/日（7:00～19:00）点灯

6.8.3 飼育器材

6.8.3.1 ケージ

ポリカーボネート製ケージ（TR-PC-200，257W×387D×197H mm，トキワ科学器械株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：1回（群分け日）

6.8.3.2 給餌器

固型用ステンレス製給餌器（トキワ科学器械株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：1回（群分け日）

6.8.3.3 給水瓶

ポリカーボネート製給水瓶（700 mL，トキワ科学器械株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：1回（群分け日）

6.8.3.4 架台

ステンレス製架台（トキワ科学器械株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：1回（群分け日）

6.8.3.5 エンリッチメント

動物福祉向上のために，玩具（アルミナボール）を匹数分ケージ内に入れた。

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：1回（群分け日）

6.8.4 収容動物数

1 ケージあたり 2～3 匹

6.8.5 床敷

6.8.5.1 種類

実験動物用床敷（ベータチップ，日本チャールス・リバー株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：1 回（群分け日）

6.8.5.2 汚染物質の確認

床敷の供給元から分析結果を入手し，残留農薬等の汚染物質濃度が，試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.8.6 飼料

6.8.6.1 種類

実験動物用固型飼料（CR-LPF，オリエンタル酵母工業株式会社，放射線滅菌済み，ロット番号：141118）

6.8.6.2 給餌法

自由摂取

群分け日に新しいものと交換した。

6.8.6.3 汚染物質の確認

飼料の供給元から分析結果を入手し，使用したロットの残留農薬等の汚染物質濃度が，試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.8.7 飲用水

6.8.7.1 種類

5 μm フィルター濾過後，紫外線照射した水道水

6.8.7.2 給水法

自由摂取

群分け時にケージ，給水瓶とともに交換した。

6.8.7.3 分析

一般財団法人茨城県薬剤師会検査センターで水質検査を定期的（2 回／年）に実施し，その分析値が試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.9 投与

6.9.1 投与経路・方法

陰性対照物質及び被験物質は静脈内投与とし、尾静脈よりシリンジポンプ（TE-312, テルモ株式会社）、30 mL ディスポーザルシリンジ及び注射針を用いて、およそ 1 mL/kg/min の投与速度で投与した。各個体の投与速度は、投与日の体重を用いて個別に算出した。

陽性対照物質は経口投与とし、3 mL ディスポーザブル注射筒にラット用胃ゾンデを装着したものを使用して投与した。

6.9.2 投与経路の選択理由

被験物質の臨床適用経路に準じた。

陽性対照物質は小核試験の評価に一般的に使用されている [4]。

6.9.3 投与方法の選択理由

被験物質及び対照物質を正確に投与できる。

6.9.4 投与用量及びその設定理由

試験施設で実施したラットの 4 週間間歇静脈内投与毒性試験（試験番号 B140965）の用量設定予備試験において、被験物質の 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 及び 2.5 mg/mL の濃度の投与液を 1 回静脈内投与した結果、2.5 mg/mL の濃度では血液検査及び生化学検査において変化が認められた。また、0.8 mg/mL 以上の濃度では尾のうっ血によると思われる暗赤色化が確認され、1.0 mg/mL 以上の濃度では尾の暗赤色化が顕著で、1.5 mg/mL 以上の濃度では脱落する懸念が考えられた。本試験では末梢血中の幼若赤血球を検査対象とすること及び動物福祉の観点から 1.0 mg/mL の濃度を最高濃度として設定するのが妥当と判断した。したがって、1 回静脈内投与で許容される最大投与液量である 20 mL/kg を乗じた 20 mg/kg を最高用量として設定し、以下公比 2 で漸減して 10 及び 5 mg/kg の計 3 用量を設定した。また、媒体のみを投与する陰性対照群及び CP の 20 mg/kg を投与する陽性対照群を設定した。

6.9.5 投与液量

陰性対照物質及び被験物質： 20 mL/kg

陽性対照物質： 10 mL/kg

各個体の投与液量は投与日に測定した体重に基づいて算出した。

6.10 群構成

処理群	投与用量 (mg/kg)	投与液 濃度 (mg/mL)	投与 液量 (mL/kg)	投与 経路	標本作製 時期	動物数 (動物番号)
陰性対照群 (生理食塩液)	0	0				5 (10101~10105)
被験物質群 (P092・マレイ ン酸塩)	5 *	0.25 *	20	i.v.	投与後 48 及び 72 時間	5 (10201~10205)
	10 *	0.5 *				5 (10301~10305)
	20 *	1.0 *				5 (10401~10405)
陽性対照群 (CP)	20	2	10	p.o.		5 (10501~10505)

* P092 フリー体としての用量または濃度

6.11 観察・検査項目

全投与動物について下記の項目を検査した。

6.11.1 一般状態

投与前及び投与直後から約 1 時間間歇的に、ならびに投与翌日及び各標本作製日の採血前に観察した。

6.11.2 体重

体重は電子天秤を用いて、投与日の投与前及び各標本作製日の採血前に測定した。

6.11.3 小核試験

6.11.3.1 標本作製時期

投与後 48 及び 72 時間とした。

6.11.3.2 標本作製時期選択理由

適用ガイドラインで認められているため。

6.11.3.3 標本作製方法

全投与動物について、以下のとおり標本作製した [5]。

- (1) ラットの鎖骨下静脈より血液を約 0.1 mL 採取した。
- (2) 約 0.3 mL の 10 v/v%リン酸緩衝ホルマリンと採取した血液を、血液が凝固しないよう攪拌・混合して室温に保存した。
- (3) ホルマリン固定血液を観察直前にアクリジン・オレンジ染色液 (500 µg/mL) と 1:1 で混合して染色し、スライドグラスに伸展した。

なお、試験に使用した動物は、最終標本作製日の採血終了後に、6.7.16 項に従って安楽死させた。

6.11.3.4 標本観察

スライド標本は B 励起の蛍光顕微鏡を用いてブラインド法により観察した。観察は個体毎に全赤血球 [幼若赤血球 (IMEs) 及び成熟赤血球 (MEs)] 1000 個あたりの IMEs の数を数えるとともに、IMEs 2000 個中の小核をもつ細胞 (MNIMEs) の数を数えた。細胞の識別は Hayashi ら [6] の方法に従い、赤血球の細胞質が赤色蛍光色のものを IMEs、蛍光を発しないものを MEs として区別した。また、赤血球の細胞質中に黄緑色の蛍光を放つ小体を小核とした。

6.12 統計学的解析

以下の統計学的解析を実施した。なお、いずれも投与後 48 時間採血群と 72 時間採血群を別々に処理した。

6.12.1 小核をもつ幼若赤血球の出現数

- (1) Kastenbaum と Bowman の統計学的方法 [7] を用いて、被験物質群 (有意水準: 片側 5%) 及び陽性対照群 (有意水準: 片側 5% 及び 1%) の MNIMEs 出現数の合計について、陰性対照群と比較した。
- (2) 被験物質のいずれの群でも有意差がみられなかったため、Cochran-Armitage 検定は行われなかった。

6.12.2 赤血球中の幼若赤血球の割合及び動物体重

IMEs の割合及び各標本作製日に測定した動物の体重について、以下の通り有意差検定を実施した。解析には解析ソフトウェア EXSUS (Ver. 7.7.1, 株式会社 CAC エクシケア) を用いた。

- (1) Bartlett 検定により、陽性対照群を除いた各群間の等分散性を検定した (有意水準: 5%)。
- (2) Bartlett 検定の結果、等分散の場合は以下の(3)及び(4)の処理を行った。
- (3) Williams 検定により陰性対照群と各被験物質群との間で有意差検定を行った (有意水準: 両側 5%)。
- (4) Williams 検定で有意でなかったため、Dunnett 検定を用いて陰性対照群と各被験物質群との平均値の差の検定を行った (有意水準: 両側 5% 及び 1%)。
- (5) Bartlett 検定の結果、不等分散の場合は以下の(6)及び(7)の処理を行った。
- (6) Shirley-Williams 検定により陰性対照群と各被験物質群との間で有意差検定を行った (有意水準: 両側 5%)。
- (7) Shirley-Williams 検定で有意でなかったため、Steel 検定を用いて陰性対照群と各被験物質群との間の平均順位差の検定を行った (有意水準: 両側 5% 及び 1%)。

- (8) 陽性対照群については、F 検定により陰性対照群との間の等分散性の検定を行い（有意水準：5%）、いずれのパラメータも等分散であったため、Student の t-検定により平均値の差の検定を行った（有意水準：両側 5%及び 1%）。

6.13 試験の成立基準

以下の基準を満たすとき、本試験は適切に実施されたと判断した。

- (1) 陰性対照群における各個体の MNIMEs 出現頻度が試験施設の背景値（平均値 $\pm 3SD$ ）の範囲内にあること。
- (2) 陽性対照群における MNIMEs 出現数の合計が陰性対照群と比較して統計学的に有意に高いこと。

6.14 試験結果の評価

MNIMEs の有意な増加が認められ、その増加に用量反応性が認められた場合を陽性と判定することとした。

6.15 コンピュータシステムの使用

6.15.1 使用したコンピュータシステム

Provantis システム（INSTEM 社）

6.15.2 コンピュータシステムのプロトコール番号

B130236S （群分け前）

B130236 （群分け以降）

コンピュータプロトコールにはデータ収集範囲、データ収集の日程等を登録した。

7. 結果

7.1 一般状態

結果を Table 1 に示す.

投与後 1 時間までの間に 20 mg/kg 群の 2 例で赤色尿が観察された. 投与翌日から観察終了まで同群の 2 例に尾の暗赤色化が認められた. その他の動物では異常は認められなかった.

7.2 体重

結果を Table 2 に示す.

投与後最終測定日まで, いずれの用量群においても陰性対照群と比較して, 平均体重に有意な差は認められなかった.

7.3 小核試験

結果を Table 3-1 及び Table 3-2 に示す.

IMEs 10000 個 (2000 個×5 匹) あたりの被験物質投与群における MNIMEs 出現数は, 投与後 48 時間採血の 5, 10 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ 10 個, 13 個及び 9 個 (出現率はそれぞれ $0.10 \pm 0.06\%$, $0.13 \pm 0.08\%$ 及び $0.09 \pm 0.02\%$), 投与後 72 時間採血群で同様に 9 個, 14 個及び 12 個 (出現率はそれぞれ $0.09 \pm 0.07\%$, $0.14 \pm 0.07\%$ 及び $0.12 \pm 0.06\%$) であり, 各陰性対照群の 11 個及び 10 個 (出現率: $0.11 \pm 0.04\%$ 及び $0.10 \pm 0.06\%$) と比較して, いずれの群にも統計学的に有意な MNIMEs の増加は認められなかった. また, 赤血球 1000 個当たりの IMEs の割合は, 投与後 48 時間採血の 5, 10 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ $6.9 \pm 0.8\%$, $8.4 \pm 1.0\%$ 及び $7.1 \pm 0.8\%$, 投与後 72 時間採血の 5, 10 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ $7.0 \pm 0.6\%$, $8.2 \pm 1.6\%$ 及び $6.9 \pm 0.4\%$ であり, 各陰性対照群の $8.3 \pm 1.3\%$ 及び $7.8 \pm 1.2\%$ と比較して, いずれも統計学的に有意な差は認められなかった.

陽性対照物質の CP 投与後 48 及び 72 時間採血群における MNIMEs の出現数は, IMEs 10000 個あたりそれぞれ 182 個及び 44 個 (出現率: $1.82 \pm 0.62\%$ 及び $0.44 \pm 0.27\%$), IMEs の割合は $4.5 \pm 0.6\%$ 及び $3.9 \pm 1.1\%$ であり, 陰性対照群と比較して MNIMEs はいずれも有意な高値を, IMEs の割合はいずれも有意な低値を, それぞれ示した.

8. 考察

P092・マレイン酸塩を雄ラット (CrI: CD (SD), 5 匹/群) に, 0, 5, 10 及び 20 mg/kg の用量で, およそ 1 mL/kg/min の速度で 20 mL/kg の投与液量を 1 回静脈内投与し, 末梢血小核試験を実施した. 陽性対照群には CP を 20 mg/kg の用量で 1 回経口投与した. いずれの動物も投与後 48 及び 72 時間に採血して標本を作製した.

被験物質の 20 mg/kg 投与後 0~1 時間に, 2 例で赤色尿が観察され, 投与翌日から観察終了まで同群の 2 例に尾の暗赤色化がみられたが (Table 1), いずれの群でも体重には有意な変化はみられなかった (Table 2).

末梢血小核試験の結果, 被験物質のいずれの用量, いずれの標本作製時期でも, 陰性対照群と比較して有意な MNIMes の増加は認められなかった (Table 3-1, Table 3-2). 一方, 陽性対照群では 48 及び 72 時間採血群ともに有意な MNIMes の増加が認められた (Table 3-1, Table 3-2). 陰性対照群の各個体における MNIMes 出現頻度及び IMes の割合は, それぞれ 0.05~0.20%及び 6.0~10.3%であり, いずれも試験施設の背景値 (Appendix 1, Mean \pm 3SD, MNIMes : 0.07 \pm 0.18%, IMes : 9.5 \pm 11.7%) の範囲内の値を示した. 陰性及び陽性対照群におけるこれらの結果は, 本試験の成立基準を満たすものであり (6.13 項参照), また, 本試験の妥当性を示すものであった.

従って, P092・マレイン酸塩は, 本試験条件下でラット末梢血小核試験陰性と判定した.

なお, 被験物質投与液の保存安定性確認のために, 設定値 0.001 mg/mL 溶液を調製した際, 設定値との誤差が比較的大きくなる結果となった (初回調製及び再調製の結果はそれぞれ設定値の 84.2%及び 81.0%, 6.4 項及び 9.2 項参照). ほぼ同じ操作で当該溶液を 2 回調製した結果がほぼ同等であり, また, 当該溶液を調製する際の各希釈操作において 4%程度の誤差が生じていたと仮定すると, 上記の測定結果は理論値とほぼ一致することから, 上述の設定値との誤差が生じた原因として, 本試験で使用した 10 mg/mL 溶液 (9.2 項参照) をもとにして, 設定値 0.001 mg/mL 溶液を希釈調製する際の操作誤差による可能性が示唆された. これらのことは, 保存安定性確認の初期分析において, 被験物質を直接秤量して調製した 50 及び 10 mg/mL の溶液の結果が対設定値の 94.4%及び 96.8%と, 既に 100%からの誤差が 3~6%程度生じていたことから可能性が高いと考えられた. 従って, 被験物質投与液の 0.001 mg/mL 付近の低濃度を希釈調製する際には, より慎重に希釈操作を行う必要があると考えられ, あるいは本試験で使用した 10 mg/mL よりもさらに低濃度を基にして, 希釈倍率や希釈段階を減らすように調製するのが望ましいと考えられた.

試験施設で実施した「P092・マレイン酸塩のラットにおける 4 週間間歇静脈内投与毒性試験」(試験番号: B140965) において, 当該試験の高用量である 10 mg/kg (本試験の中用量) を本試験と同条件で投与したトキシコキネティクス測定 (雄, n=3, 初回投与) では, 投与 0 時間の血漿中濃度 (C_0) は 796.7 ng/mL, 投与後 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24h}) は 6667 ng·h/mL と算出された. これらのことから, 本試験における陰性結果は, 上述の毒性試験と同等以上の被験物質による暴露条件下で得られたものと考えられた.

9. 特記事項

9.1 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なし

9.2 試験計画書に従わなかったこと

被験物質投与液の安定性確認に関する投与液調製から初期値濃度分析作業に至るまで、下記(1)～(4)の試験計画書に従わなかったこと及び標準操作手順書からの逸脱が発生した。

- (1) 被験物質の 50 mg/mL 溶液を調製した際、完全には溶解していないように見えたため、試験計画書に記載していない 10 mg/mL 溶液を念のため調製し、これら 2 濃度の溶液の濃度分析を実施した。その結果、50 及び 10 mg/mL 溶液の対設定値はそれぞれ 94.4%及び 96.8%であった。ともに標準操作手順書の基準を満たしたことから、保存安定性の確認には 50 mg/mL 溶液を使用し、10 mg/mL 溶液は使用しなかった。これら 2 濃度の分析結果が基準を満たしたことから、及び 10 mg/mL 溶液を保存安定性の確認に使用しなかったことから、試験計画書に記載のない 10 mg/mL を調製して濃度分析を実施したこと自体は、試験に悪影響を及ぼすものではないと判断した。
- (2) 試験計画書に従えば、保存安定性用に 50 mg/mL 溶液を基にして調製すべき 0.001 mg/mL の溶液を、上述の 10 mg/mL 溶液を 10～50 倍希釈による 3 段階希釈法により調製して濃度分析を実施した。調製直後の 50 mg/mL の投与液の濃度に懸念があったことによる対処であり、また、目的とする濃度が調製されていれば問題なしと考えたため、これらの試験計画書に従わなかった作業は、試験に影響を及ぼすものではない。
- (3) 0.001 mg/mL 溶液の初期値濃度分析結果は対設定値の 84.2%であり、試験施設の標準操作手順書の基準（初期値は設定値の $100 \pm 10\%$ 以内）から逸脱した。
- (4) (3)の結果から、(2)において 10 mg/mL 溶液から 0.001 mg/mL 溶液を調製する際の希釈操作に問題があった可能性を懸念し、再度 10 mg/mL 溶液をもとにして 10 倍希釈の 4 段階希釈法により 0.001 mg/mL を調製して濃度分析を行った。その結果、対設定値の 81.0%であり、標準操作手順書の基準を再度逸脱した。

(3)及び(4)の逸脱について、10 mg/mL 溶液から 0.001 mg/mL 溶液を調製する際の、各希釈段階の操作に 4%程度の誤差が生じていたと仮定すると、得られた 84.2%及び 81.0%の値は理論値とほぼ一致することから、これら標準操作手順書の基準から逸脱した値が得られた原因は、10 mg/mL 溶液から 0.001 mg/mL 溶液を希釈調製する際の操作誤差による可能性が示唆された。

設定濃度 0.001 mg/mL 溶液を再調製・再分析した結果が、初回調製した溶液の測定結果とほぼ同等であったことから、初回調製した溶液（設定値 0.001 mg/mL, 実測値 0.000842 mg/mL）及びその測定濃度を採用して、保存安定性の確認に使用した。その結果、設定値 0.001 mg/mL 溶液は 50 mg/mL 溶液とともに、目的とする条件下での保存安定性が確認されたことから（6.4 項参照）、0.001～50 mg/mL の被験物質投与液を保存安定性が確認された条件下で使用する場合には問題ないと考えられ、設定値 0.001 mg/mL 溶液の調製直後の測定値が標準操作手順書