

の基準を逸脱したことが本試験の信頼性に影響を及ぼすものではないと判断した。

10. 引用文献

- [1] Hamada S, Yamasaki K, Nakanishi S, Omori T, Serikawa T, Hayashi M. Evaluation of the general suitability of the rat for the micronucleus assay: the effect of cyclophosphamide in 14 strains. *Mutat Res* 2001; 495: 127-34.
- [2] Hamada S, Nakajima K, Namiki C, Serikawa T, Hayashi M. Sex differences in the chemical induction of micronuclei in the rat. *Environ Mutagen Res* 2003; 25: 33-7.
- [3] Hamada S, Nakajima K, Serikawa T, Hayashi M. The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay. *Mutagenesis* 2003; 18 (3): 273-5.
- [4] Hayashi M, Sutou S, Shimada H, Sato S, Sasaki YF, Wakata A. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test: The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS. *Mutat Res* 1989; 223: 329-44.
- [5] Kawabata M, Takasawa H, Minowa S, Saitou H, Nakagawa M, Nakajima M, et al. New Method of Specimen Preparation as Cell Suspension for a Micronucleus Test. *Genes and Environ* 2007; 29 (3): 100-6.
- [6] Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M Jr. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res* 1983; 120: 241-7.
- [7] Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 1970; 9: 527-49.

Table 1 Clinical signs

Treatment group	Dose level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	Day 1		Day 2	Day 3	Day 4
			Before dosing	0-1 h after dosing			
Negative control (Physiological saline)	0 i.v. Once	10101	-	-	-	-	-
		10102	-	-	-	-	-
		10103	-	-	-	-	-
		10104	-	-	-	-	-
		10105	-	-	-	-	-
Test substance (P092 maleate)	5 ^{a)} i.v. Once	10201	-	-	-	-	-
		10202	-	-	-	-	-
		10203	-	-	-	-	-
		10204	-	-	-	-	-
		10205	-	-	-	-	-
	10 ^{a)} i.v. Once	10301	-	-	-	-	-
		10302	-	-	-	-	-
		10303	-	-	-	-	-
		10304	-	-	-	-	-
		10305	-	-	-	-	-
	20 ^{a)} i.v. Once	10401	-	-	-	-	-
		10402	-	-	DRT	DRT	DRT
		10403	-	RU	-	-	-
		10404	-	-	-	-	-
		10405	-	RU	DRT	DRT	DRT
Positive control (CP)	20 p.o. Once	10501	-	-	-	-	-
		10502	-	-	-	-	-
		10503	-	-	-	-	-
		10504	-	-	-	-	-
		10505	-	-	-	-	-

CP: Cyclophosphamide monohydrate

-: No abnormalities, RU: Reddish urine, DRT: Dark reddish in tail

^{a)} As P092 free form

Table 2 Body weight changes

Treatment group	Dose level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	Body weight (g)		
			Day 1	Day 3	Day 4
Negative control (Physiological saline)	0 i.v. Once	10101	267.0	276.9	287.5
		10102	253.6	266.2	273.8
		10103	252.0	264.2	270.6
		10104	276.1	291.5	298.7
		10105	258.8	273.0	281.7
		Mean ± SD	261.50 ± 10.04	274.36 ± 10.86	282.46 ± 11.24
Test substance (P092 maleate)	5 ^{a)} i.v. Once	10201	247.3	264.0	269.2
		10202	251.4	266.4	273.6
		10203	275.9	282.9	290.4
		10204	258.9	272.7	282.3
		10205	261.4	276.4	284.5
		Mean ± SD	258.98 ± 11.02	272.48 ± 7.63	280.00 ± 8.53
	10 ^{a)} i.v. Once	10301	263.4	278.2	280.9
		10302	251.6	266.3	275.1
		10303	253.5	266.5	273.4
		10304	260.0	275.8	283.5
		10305	270.6	282.9	292.2
		Mean ± SD	259.82 ± 7.69	273.94 ± 7.34	281.02 ± 7.49
	20 ^{a)} i.v. Once	10401	272.5	283.4	290.5
		10402	248.2	248.3	255.5
		10403	259.2	269.9	276.8
		10404	261.4	273.0	279.6
		10405	270.9	273.0	280.4
		Mean ± SD	262.44 ± 9.84	269.52 ± 12.92	276.56 ± 12.86
Positive control (CP)	20 p.o. Once	10501	255.8	264.5	268.6
		10502	269.1	281.2	286.1
		10503	263.4	272.8	282.2
		10504	249.0	267.0	274.0
		10505	272.2	281.0	287.8
		Mean ± SD	261.90 ± 9.54	273.30 ± 7.73	279.74 ± 8.19

CP: Cyclophosphamide monohydrate

^{a)} As P092 free form

Table 3-1 Results of the micronucleus test (48 h after dosing)

Treatment group	Dose level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	MNIMEs			IMEs ratio among total erythrocytes	
			Number of IMEs scored	Number	Incidence (%)	Number of erythrocytes scored	IMEs/Erythrocytes (%)
Negative control (Physiological saline)	0	10101	2000	3	0.15	1000	7.0
		10102	2000	1	0.05	1000	8.2
	Once	10103	2000	2	0.10	1000	7.5
		10104	2000	2	0.10	1000	10.3
		10105	2000	3	0.15	1000	8.7
Total / Mean±SD			10000	11	0.11 ± 0.04		8.3 ± 1.3
Test substance (P092-maleate)	5 ^{a)}	10201	2000	4	0.20	1000	5.6
		10202	2000	1	0.05	1000	6.8
	Once	10203	2000	1	0.05	1000	7.3
		10204	2000	2	0.10	1000	7.7
		10205	2000	2	0.10	1000	6.9
		Total / Mean±SD			10000	10	0.10 ± 0.06
10 ^{a)}	i.v.	10301	2000	1	0.05	1000	7.2
		10302	2000	1	0.05	1000	9.9
	Once	10303	2000	3	0.15	1000	8.2
		10304	2000	5	0.25	1000	8.7
		10305	2000	3	0.15	1000	8.0
Total / Mean±SD			10000	13	0.13 ± 0.08		8.4 ± 1.0
20 ^{a)}	i.v.	10401	2000	2	0.10	1000	7.4
		10402	2000	2	0.10	1000	6.5
	Once	10403	2000	2	0.10	1000	8.3
		10404	2000	1	0.05	1000	6.4
		10405	2000	2	0.10	1000	7.0
Total / Mean±SD			10000	9	0.09 ± 0.02		7.1 ± 0.8
Positive control (CP)	20	10501	2000	47	2.35	1000	4.1
		10502	2000	17	0.85	1000	4.2
	Once	10503	2000	47	2.35	1000	5.2
		10504	2000	38	1.90	1000	5.1
		10505	2000	33	1.65	1000	3.9
Total / Mean±SD			10000	182 ^{##}	1.82 ± 0.62		4.5 ± 0.6 ^{**}

IMEs: Immature erythrocytes, MNIMEs: Micronucleated IMEs, CP: Cyclophosphamide monohydrate

^{a)} As P092 free form

^{##} p < 0.01 (Kastenbaum and Bowman's method)

^{**} p < 0.01 (Student's *t*-test)

Table 3-2 Results of the micronucleus test (72 h after dosing)

Treatment group	Dose level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	MNIMEs			IMEs ratio among total erythrocytes	
			Number of IMEs scored	Number	Incidence (%)	Number of erythrocytes scored	IMEs/Erythrocytes (%)
Negative control (Physiological saline)	0 i.v. Once	10101	2000	2	0.10	1000	6.0
		10102	2000	4	0.20	1000	9.1
		10103	2000	1	0.05	1000	7.7
		10104	2000	1	0.05	1000	7.9
		10105	2000	2	0.10	1000	8.5
Total / Mean±SD			10000	10	0.10 ± 0.06	7.8 ± 1.2	
Test substance (P092-maleate)	5 ^{a)} i.v. Once	10201	2000	2	0.10	1000	7.1
		10202	2000	4	0.20	1000	7.1
		10203	2000	0	0.00	1000	6.2
		10204	2000	1	0.05	1000	6.8
		10205	2000	2	0.10	1000	7.9
Total / Mean±SD			10000	9	0.09 ± 0.07	7.0 ± 0.6	
	10 ^{a)} i.v. Once	10301	2000	1	0.05	1000	7.1
		10302	2000	3	0.15	1000	6.9
		10303	2000	2	0.10	1000	7.8
		10304	2000	4	0.20	1000	8.4
		10305	2000	4	0.20	1000	10.9
Total / Mean±SD			10000	14	0.14 ± 0.07	8.2 ± 1.6	
	20 ^{a)} i.v. Once	10401	2000	3	0.15	1000	7.3
		10402	2000	1	0.05	1000	6.5
		10403	2000	2	0.10	1000	7.2
		10404	2000	2	0.10	1000	6.7
		10405	2000	4	0.20	1000	6.6
Total / Mean±SD			10000	12	0.12 ± 0.06	6.9 ± 0.4	
Positive control (CP)	20 p.o. Once	10501	2000	1	0.05	1000	5.7
		10502	2000	8	0.40	1000	2.9
		10503	2000	11	0.55	1000	4.3
		10504	2000	16	0.80	1000	3.4
		10505	2000	8	0.40	1000	3.4
Total / Mean±SD			10000	44 ^{##}	0.44 ± 0.27	3.9 ± 1.1 ^{**}	

IMEs: Immature erythrocytes, MNIMEs: Micronucleated IMEs, CP: Cyclophosphamide monohydrate

^{a)} As P092 free form

^{##} p < 0.01 (Kastenbaum and Bowman's method)

^{**} p < 0.01 (Student's *t*-test)

Appendix 1 Historical control data of rat peripheral blood micronucleus tests in the test facility (Male)

Treatment group	No. of animals	Incidence of MNIMEs (%)		IMEs ratio among total erythrocytes (%)	
		Mean \pm SD * (Mean \pm 3SD)	Maximum and minimum individual values	Mean \pm SD * (Mean \pm 3SD)	Maximum and minimum individual values
Negative control	35	0.07 \pm 0.06 (0.07 \pm 0.18)	Max: 0.30 Min: 0.00	9.5 \pm 3.9 (9.5 \pm 11.7)	Max: 15.6 Min: 2.6

IMEs: Immature erythrocytes, MNIMEs: Micronucleated IMEs

* Calculated from individual data

分析証明書

分析証明書番号 : P140711-COA1
 試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学
 試験番号 : P140711
 表題 : P092・マレイン酸塩の特性試験及び保存安定性試験
 試験施設 : 株式会社LSIメディエンス 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・マレイン酸塩
 ロット番号 : KS14001
 保管条件 : 冷蔵 (1~10°C), 遮光, 気密, 窒素封入
 保管場所 : 被験物質保管室 J009 内の薬用冷蔵庫
 分析日 : 2014年12月24日及び2014年12月25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)	白色の粉末	—
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%)	99.7%	適
<備考>			
*1 繰り返し3回測定の平均値を結果に記載した。			

試験責任者: 2015年 / 月 / 日

古賀 善幸

古賀 善幸
 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

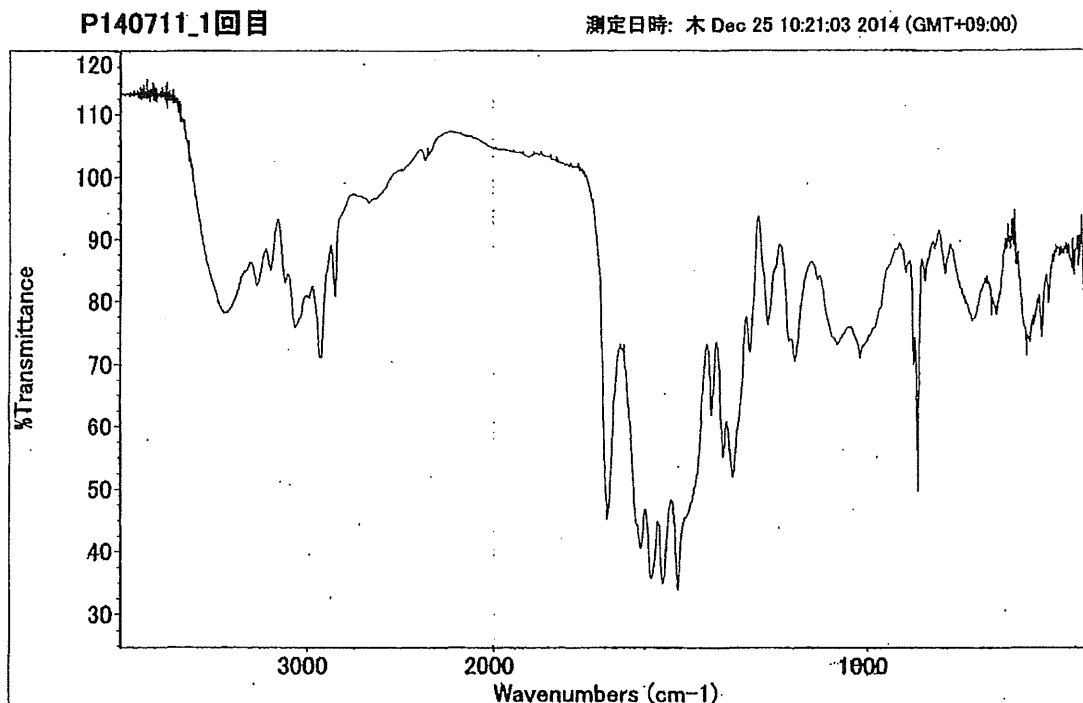


図 1 IR スペクトル

分析証明書

分析証明書番号 : P140711-COA2
 試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学
 試験番号 : P140711
 表題 : P092・マレイン酸塩の特性試験及び保存安定性試験
 試験施設 : 株式会社L S I メディエンス 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・マレイン酸塩
 ロット番号 : KS14001
 保管条件 : 冷蔵 (1~10°C), 遮光, 気密, 窒素封入
 保管場所 : 被験物質保管室 J009 内の薬用冷蔵庫
 分析日 : 2015 年 3 月 5 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)	白色の粉末	—
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%)	99.7%	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: 2015 年 3 月 9 日

古賀 善幸

古賀 善幸
 株式会社L S I 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

P140711_2回目

測定日時: 木 Mar 05 10:23:21 2015 (GMT+09:00)

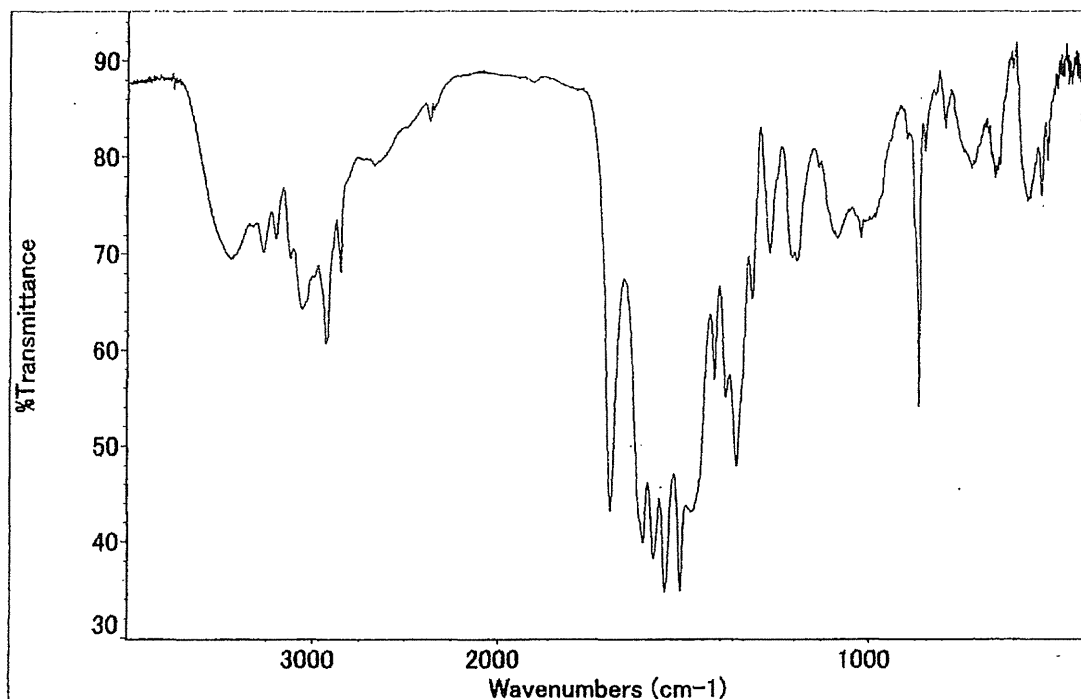


図 1 IR スペクトル

証明書番号：B130236-001

分析証明書

2015年1月27日

株式会社LSIメディエンス 鹿島研究所

分担責任者：紺野 邦裕

紺野 邦裕

分析担当者：神谷 歩

西山 彩

試験番号： B130236
 被験物質： P092・マレイン酸塩
 ロット番号： KS14001
 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）

分析内容： 被験物質投与液の安定性確認
 分析方法： HPLC法
 保存条件： 冷蔵（許容範囲：1～10℃），遮光条件で調製後8日間保存後，室温（許容範囲：10～30℃），遮光条件で6時間

調製日： 2015年1月8日
 分析日： 2015年1月8日及び16日
 分析結果： 被験物質投与液のP092濃度（単位：mg/mL）を以下の表に示す。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%以内であったことから，被験物質投与液の保存安定性が確認された。

設定値		分析日	
		2015年1月8日	2015年1月16日
		調製直後	冷蔵8日間 + 室温6時間後
0.001*	測定値	0.000842 0.000842	0.000865 0.000864
	平均値	0.000842	0.000865
対初期値		-	102.7%
50	測定値	47.7 46.6	50.1 50.0
	平均値	47.2	50.1
対初期値		-	106.1%

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。

* 調製直後の測定値は対設定値の90%未満であった。

信 頼 性 保 証 証 明 書

試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学
 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

本試験は下記の基準に従って実施され、本最終報告書は、試験の方法、結果が正確に記載されていることを保証する。調査の内容、調査日および報告日を以下に示す。

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)

調 査 内 容	調 査 日	報 告 日	
		試験責任者	運営管理者
試験計画書			
試験計画書	2015年01月07日	2015年01月08日	2015年01月08日
(再調査)	2015年01月13日	2015年01月13日	2015年01月13日
コンピュータプロトコール	2015年01月19日	2015年01月19日	2015年01月19日
試験計画書変更書 (1)	2015年02月16日	2015年02月16日	2015年02月16日
試験実施状況			
動物入荷, 体重測定	2015年01月14日	2015年01月14日	2015年01月14日
群分け	2015年01月19日	2015年01月19日	2015年01月19日
被験物質投与液の調製, 濃度分析	2015年01月19日	2015年01月19日	2015年01月19日
投与, 一般状態観察	2015年01月20日	2015年01月20日	2015年01月20日
標本作製	2015年01月22日	2015年01月22日	2015年01月22日
標本観察	2015年01月28日	2015年01月28日	2015年01月28日
試験資料・最終報告書			
試験資料・最終報告書草案	2015年02月20日 ～2015年02月24日	2015年02月24日	2015年02月24日
(再調査)	2015年02月25日	2015年02月25日	2015年02月25日
試験資料・最終報告書	2015年03月16日	2015年03月16日	2015年03月16日

2015年 3 月 16 日
 信頼性保証部門責任者

東川 国男

東川 国男
 株式会社L S I メディエンス
 鹿島研究所

22. P092 マレイン酸塩の細菌を用いる
復帰突然変異試験

本写しは原本と相違ありません
㈱LSIメディエンス 鹿島研究所
2015年3月17日
試験責任者 藤本透

最終報告書

P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験

(試験番号：B141051)

株式会社LSIメディエンス

1 GLP 陳述書

表 題： P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号： B141051

本試験は下記の基準に従い実施したものである。

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)

試験責任者：

2015年3月17日

藤本透

藤本 透

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

2 目次

1	GLP 陳述書	2
2	目次	3
3	試験実施概要	6
3.1	表題	6
3.2	試験番号	6
3.3	試験目的	6
3.4	適用ガイドライン	6
3.5	適用 GLP	6
3.6	試験委託者	6
3.7	試験受託者	6
3.8	試験施設	6
3.9	試験責任者	6
3.10	試験従事者	7
3.11	試験日程	7
3.12	保存	7
3.13	保存する資料	7
4	試験責任者署名	8
5	要約	9
6	材料および方法	10
6.1	被験物質	10
6.1.1	名称	10
6.1.2	ロット番号	10
6.1.3	純度	10
6.1.4	換算係数（フリー体）	10
6.1.5	性状	10
6.1.6	保存条件	10
6.1.7	保管場所	10
6.1.8	提供者	10
6.1.9	安定性の確認	10
6.1.10	取扱上の注意	10
6.1.11	残余被験物質の処理	10
6.2	対照物質	11
6.2.1	陰性対照物質	11
6.2.2	陽性対照物質	11
6.3	試験菌株	11
6.3.1	試験菌株	11

6.3.2	試験菌株の選択理由	12
6.3.3	試験菌株の保存	12
6.3.4	試験菌株の遺伝的特性	12
6.3.5	菌懸濁液	13
6.4	培地	13
6.4.1	液体完全培地の調製	13
6.4.2	トップアガールの調製	13
6.4.3	最少グルコース寒天平板培地	14
6.5	S9 mix	14
6.5.1	S9	14
6.5.2	Cofactor mix	15
6.5.3	S9 mix	15
6.6	被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製	15
6.6.1	被験物質溶液の調製	15
6.6.2	陽性対照物質溶液	16
6.7	被験物質用量および陽性対照物質用量	16
6.7.1	被験物質用量	16
6.7.2	陽性対照物質用量	18
6.8	復帰突然変異試験	18
6.8.1	試験法の選択	18
6.8.2	プレインキュベーション法	18
6.8.3	観察	18
6.8.4	コロニー計測	18
6.8.5	プレート数	19
6.8.6	結果の集計	19
6.8.7	無菌試験	19
6.8.8	実験の成立基準	19
6.8.9	試験結果の判定	19
6.8.10	再現性の確認	20
7	結果	20
7.1	用量設定試験	20
7.2	本試験 1 回目	20
7.3	本試験 2 回目	20
7.4	無菌試験	20
8	考察および結論	20
9	参考文献	21
10	特記事項	21
10.1	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	21

10.2	試験計画書に従わなかったこと	21
Table 1	P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験結果表（用量設定試験） ...	22
Table 2	P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験結果表（本試験 1 回目） ...	23
Table 3	P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験結果表（本試験 2 回目） ...	24
Appendix 1	分析証明書（No. P140711-COA1）.....	25
Appendix 2	分析証明書（No. P140711-COA2）.....	27
Appendix 3	陰性（溶媒）対照値および陽性対照値の適正範囲	29
	信頼性保証証明書.....	30

（最終ページ：30）

3 試験実施概要

3.1 表題

P092・マレイン酸塩の細菌を用いる復帰突然変異試験

3.2 試験番号

B141051

3.3 試験目的

ネズミチフス菌株および大腸菌株を用いる復帰突然変異試験を実施し，P092・マレイン酸塩の変異原性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

- (1) 医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス
(薬食審査発 0920 第 2 号，平成 24 年 9 月 20 日)
- (2) 医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて
(医薬審第 1604 号，平成 11 年 11 月 1 日)

3.5 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)

3.6 試験委託者

国立大学法人岐阜大学
〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1
委託責任者：桑田 一夫

3.7 試験受託者

株式会社 L S I メディエンス
〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目 13 番 4 号

3.8 試験施設

株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所
〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1

3.9 試験責任者

藤本 透
株式会社 L S I 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

3.10 試験従事者

液体完全培地の調製：	清水 優子
軟寒天の調製：	清水 優子
被験物質溶液の調製：	藤本 透, 清水 優子
試験菌株の前培養：	清水 優子
菌懸濁液の濁度測定：	藤本 透, 清水 優子, 榎本 佳明
トップアガールの調製：	藤本 透, 清水 優子
S9 mix の調製：	藤本 透, 清水 優子
プレインキュベーション：	藤本 透, 清水 優子, 榎本 佳明
プレートの観察：	藤本 透, 清水 優子
コロニーカウント：	藤本 透, 清水 優子

3.11 試験日程

試験開始日：	2015年1月7日
用量設定試験：	2015年1月13日～2015年1月16日
本試験1回目：	2015年1月26日～2015年1月29日
本試験2回目：	2015年2月2日～2015年2月5日
試験終了日：	本最終報告書への試験責任者署名日とする

3.12 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存室に保存する。保存期間は最終報告書作成後10年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。

3.13 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 試験計画書変更書
- (3) 被験物質および対照物質に関する資料
- (4) 試験菌株に関する資料
- (5) 試験結果に関する資料
- (6) 通信文書等の記録文書
- (7) 最終報告書