

gPhe-HMRG, HMRGの非臨床安全性試験の実施

業務主任者、担当責任者 石沢 武彰

東京大学医学部附属病院 肝胆膵・人工臓器移植外科 登録研究医

研究要旨：キモトリプシンプローブを構成するgPhe-HMRGと生成物であるHMRGに対し、PMDA薬事戦略相談を経て確定した非臨床安全性試験（ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験、hERG試験細胞を用いたK<sup>+</sup>チャンネルへの影響評価、細菌を用いた復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験）を実施した。上記試験の範囲内では、gPhe-HMRGに関して毒性は認められなかった。HMRGに関する遺伝毒性の可能性については検討を追加して治験計画の策定に反映させる予定である。

A. 研究目的

本研究の最終的な目的は、手術中に膵断端から漏出する膵液を標識するための蛍光プローブを開発することである。研究者らはこれまでに、膵液中の chymotrypsin と反応して蛍光を呈する化合物、glutaryl-phenylalanine hydroxymethyl rhodamine green (gPhe-HMRG)を新たに設計・合成し、これに trypsin を添加した「キモトリプシンプローブ」を患者から採取した体外サンプルに散布することにより、膵液漏の可視化と術後膵液漏のリスク評価が可能であることを示した[1]。

本業務項目の目的は、キモトリプシンプローブを患者腹腔内に散布し、膵断端から漏出する膵液を描出する蛍光イメージング技術に関する治験および臨床試験を計画するにあたり、gPhe-HMRG および生成物たる HMRG の非臨床試験を実施し、安全性を検証することである。

B. 研究方法

gPhe-HMRG 及び HMRG（体腔内で gPhe-HMRG がキモトリプシンと反応して生成される蛍光物質）を用いて、以降に記す①～④の非臨床試験を株式会社シミックバイオリサーチセンター本社（研究所）（所在地：山梨県北杜市小淵沢町 10221）にて実施した。なお、非臨床試験の委託先は競争入札により決定した。また、非臨床試験の実施に先立ち、HPLC による投与液中の被験物質濃度分析法に関して、以下の各バリデーション項目について検討を行い、分析法の妥当性を確認している（分析バリデーション）。

- 1) システム適合性
- 2) 特異性
- 3) 検量線の直線性
- 4) 日内再現性
- 5) 日間再現性
- 6) オートサンプラー内安定性

同様に、投与液中の被験物質の保存安定性についても、非臨床試験に先立って確認を行った（保存安定性試験）。

①ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験

目的：被験物質をラットに単回腹腔内投与し、その毒性を検討する。

実施基準：

gPhe-HMRG：GLP 基準

HMRG：信頼性基準

媒体：0.5 w/v%メチルセルロース水溶液

使用動物：

種：ラット

系統：CrI:CD (SD), SPF

種及び系統の選択理由：本系統のラットは毒性試験に多用されており、かつ当該試験施設における背景データが豊富である。

供給源：日本チャールス・リバー株式会社  
週齢・性別・数：

5 週齢，雌雄，各 22 匹（受入時）

6 週齢，雌雄，各 20 匹（投与時）

受入時体重範囲：

雄 100～160 g，雌 70～130 g

群分け：

・馴化中に異常がないことを確認した動物を用いて、群分け日の体重及び馴化期間中の体重増加量を指標とし、両指標の分布から外れている個体を順に除き、必要数（雌雄各 20 匹）を選抜した。

・群分け日の体重を基に層別無作為抽出法により、1 群当たり雌雄各 5 匹、4 群に振り分け、各群内において動物番号を無作為に付けた。

群構成、gPhe-HMRG：

投与群	投与量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	投与検体濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	投与液量 ( $\text{mL}/\text{kg}$ )	動物数	
				雄	雌
対照 (媒体)	0	0	2.2	5	5
低用量	1	0.5	2.2	5	5
中用量	50	25	2	5	5
高用量	100	50	2	5	5

群構成、HMRG：

投与群	投与量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	投与検体濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	投与液量 ( $\text{mL}/\text{kg}$ )	動物数	
				雄	雌
対照 (媒体)	0	0	2	5	5
低用量	1	0.5	2	5	5
中用量	50	25	2	5	5
高用量	100	50	2	5	5

投与量の設定根拠：

gPhe-HMRG の推定される最大臨床使用量は  $60 \mu\text{g}/\text{ヒト}$  (体重  $60 \text{ kg}$  で換算した場合、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) であることから、推定最大臨床使用量 ( $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) を低用量、その 50 倍の  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  を中用量、100 倍の  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  を高用量に設定した。また、HMRG は gPhe-HMRG の代謝物であることから、gPhe-HMRG の推定最大臨床使用量 ( $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) を HMRG の低用量、その 50 倍の  $50 \mu\text{g}/\text{kg}$  を中用量、100 倍の  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  を高用量に設定した。

投与：

投与経路及び選択理由：腹腔内投与。臨床使用方法として患者体腔内への散布を想定するため。

投与方法及び選択理由：ディスポーザブルシリンジ及び注射針を用いて腹腔内投与する。ラットの腹腔内投与として一般的な方法である。

投与回数及び選択理由：急性毒性を検討するため、1 回投与

投与液量：投与当日の体重から投与液量を算出した。

観察、測定及び検査：

基準日：投与日を投与後 0 日とした。

対象動物：全例を対象とした。

一般状態観察：

投与日は投与前及び投与後 6 時間まで頻回、翌日以降は投与後 14 日まで 1 日 1 回以上、

生死及び一般状態を観察した。

体重測定：

投与日（投与前），投与後 1, 2, 4, 7 及び 14 日に測定した。

病理学的検査（剖検）：

投与後 14 日にイソフルラン（エスカイン® 吸入麻酔液，マイラン製薬株式会社）麻酔下で，腹大動脈から放血安楽死させた後，剖検した。

統計学的処理：

体重について，以下を実施

平均値と標準偏差：Microsoft® EXCEL 2003 Windows版（Version 11）を用いて算出

統計検定：Microsoft Windows版 SAS® 9.1.3 を用いて，対照群と投与群間で検定

Bartlett 法による等分散性の検定（有意水準 5%）

等分散の場合，Dunnett 法による多重比較検定（有意水準両側 5%）

等分散でない場合，Steel 法による多重比較検定（有意水準両側 5%）

なお，一般状態及び剖検所見については統計学的処理を実施しない。

## ②hERG試験細胞を用いたK<sup>+</sup>チャネルへの影響評価

目的：hERG (human ether-a-go-go related gene) 発現 HEK293 細胞を用いて，被験物質の hERG K<sup>+</sup>チャネルに及ぼす影響を検討する。

実施基準：

gPhe-HMRG：GLP 基準

HMRG：信頼性基準

陽性対照物質：

名称：E-4031

分子量：474.44

製造販売元：Sigma-Aldrich Co. LLC.

媒体（陰性対照物質）：

名称：ジメチルスルホキシド（以下，DMSO）

製造販売元：和光純薬工業株式会社

等級：生化学用

群構成及び適用濃度：

群	適用濃度 (ng/mL)	細胞数	(細胞番号)
1 陰性対照 (DMSO)	0	5	(1101~1105)
2 低濃度	4	5	(1201~1205)
3 中濃度	40	5	(1301~1305)
4 高濃度	400	5	(1401~1405)
5 陽性対照 (E-4031)	50	5	(1501~1505)

適用濃度設定の理由：

gPhe-HMRG のヒトへの投与量は 60 µg である。ヒトの体重を 60 kg，血液量を 4.6 L とした場合，gPhe-HMRG の最大血中濃度は 13 ng/mL と考えられる。この 30 倍の濃度の 400 ng/mL を高濃度に設定し，以下，公比 10 で減じた 40 及び 4 ng/mL をそれぞれ中及び低濃度に設定した。陽性対照の濃度は，hERG 電流の抑制が確実に認められる濃度として 50 ng/mL を設定した。HMRG は gPhe-HMRG の代謝物であることから，gPhe-HMRG と同様の 30 倍の濃度の 400 ng/mL を高濃度に設定し，以下，公比 10 で減じた 40 及び 4 ng/mL をそれぞれ中及び低濃度に設定した。陽性対照の濃度は，hERG 電流の抑制が確実に認められる濃度として 50 ng/mL を設定した。

hERG 電流の測定：

操作方法：ホールセルパッチクランプ法：

測定装置：EPC 8 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH)，電圧固定モード

制御ソフトウェア：pClamp 9 (Axon Instruments, Inc.)

細胞：測定用細胞を接着させたカバーガラス

を 35 mm のディッシュに入れ灌流  
 灌流液温度：26.0 ± 2.0°C  
 灌流速度：120 mL/h  
 ガラス電極：硼珪酸ガラス管を用いてプレーで作製。電極内液を充填し 2~8 MΩ のもの

灌流液及び電極内液組成：

灌流液組成

NaCl	137 mmol/L
KCl	4 mmol/L
CaCl <sub>2</sub>	1.8 mmol/L
MgCl <sub>2</sub>	1 mmol/L
HEPES	10 mmol/L
D(+)- Glucose	10 mmol/L
1 mol/L NaOH で pH 7.4 に調整	

電極内液組成

KCl	130 mmol/L
MgCl <sub>2</sub>	1 mmol/L
EGTA	5 mmol/L
ATP(Mg 塩)	5 mmol/L
HEPES	10 mmol/L
1 mol/L NaOH で pH 7.2 に調整	

パルスプロトコール：

保持電位：-80 mV

脱分極パルス：-40 mV から +20 mV まで  
 20 mV 間隔で 4 ステップ，1.5 秒間

再分極パルス：-50 mV，1.5 秒間

パルスの間隔：15 秒

抑制率の算出：

抑制率(%)=

$$\frac{\text{適用前ピーク値} - \text{適用開始10分後ピーク値}}{\text{適用前のピーク値}} \times 100$$

統計学的処理：

検定対象：抑制率

陰性対照群と被験物質適用群：

Bartlett 法による等分散性の検定を行い、等分散ならば Dunnett の多重比較検定を行う。等分散でない場合は Steel の多重比較検定を行う。有意水準は Bartlett 法では 5%，その他の検定では両側 5% とし，5% 及び 1% を分けて表示する。

陰性対照群と陽性対照群：

F 検定による等分散性の検定を行い、等分散ならば Student の t 検定を行う。等分散でない場合は Aspin-Welch の t 検定を行う。有意水準は F 検定では 5%，その他の検定では両側 5% とし，5% 及び 1% を分けて表示する。

### ③細菌を用いた復帰突然変異試験

目的：被験物質の遺伝子突然変異誘発性を、塩基対置換型変異株の *S. typhimurium* TA100, TA1535, *E. coli* WP2 *uvrA* 及びフレームシフト型変異株の *S. typhimurium* TA98, TA1537 を用いて検討する。

実施基準：信頼性基準

陰性対照物質：

被験物質液の調製に使用した溶媒とした。

陽性対照物質：

細菌を用いる復帰突然変異試験に汎用されている，下記のものを使用した。

名称：

2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide  
 (以下 AF-2 と略す)

供給元：和光純薬工業株式会社

名称：Sodium azide (以下 AZI と略す)

供給元：和光純薬工業株式会社

名称：9-aminoacridine (以下 9AA と略す)

供給元：MP Biomedicals, LLC.

名称：2-aminoanthracene (以下 2AA と略す)

す)

供給元：和光純薬工業株式会社

溶媒：ジメチルスルホキシド（以下 DMSO と略す）

使用菌株：既知変異誘発物質に対して高い感受性を有し、細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されている下記の菌株を使用した。

塩基対置換型変異株；

*S. typhimurium* TA100, TA1535

入手先：日本バイオアッセイ研究センター フレームシフト型変異株；

*S. typhimurium* TA98, TA1537

入手先：日本バイオアッセイ研究センター 塩基対置換型変異株；

*E. coli* WP2 *uvrA*

入手先：独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジー本部，生物遺伝資源部門

群構成：菌株ごとに代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下について実施し、さらに陰性対照，陽性対照を設けた。用量当たりの最少グルコース寒天平板培地は，陰性対照群，被験物質群及び陽性対照群のいずれも3枚とした。なお，同日に他の試験を実施する場合は，陽性対照は共有した。陽性対照の用量は，細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されている，下記の用量とした。

菌 株	代謝活性化非存在下		代謝活性化存在下	
	化学物質名	用量 (µg/plate)	化学物質名	用量 (µg/plate)
TA100	AF-2	0.01	2AA	1.0
TA1535	AZI	0.5	2AA	2.0
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	2AA	10.0
TA98	AF-2	0.1	2AA	0.5
TA1537	9AA	80.0	2AA	2.0

用量段階：試験の最高用量は，50 mg/mL 溶液を DMSO で希釈し 4.8 mL とした際に算出される用量とし，用量段階は以下公比 3 の計 7 用量とした。

菌株と被験物質液の処理：菌株と被験物質液の処理方法は，細菌を用いる復帰突然変異試験の定法として用いられる 37°C，20 分間のブレインキュベーション法とした。

無菌試験：被験物質への雑菌の混入，試験操作時の雑菌の混入がないことを確認するため，最高濃度の被験物質液と S9 mix について無菌試験を実施した。

観察及び復帰突然変異コロニー数の計測：復帰変異コロニー数の計測時に，目視で析出の有無を確認した。また，実体顕微鏡を用いて background lawn の生育を観察し，生育阻害の有無を確認した。析出または生育阻害が認められた場合は，その旨を記録した。復帰変異コロニー数の計測は，*S. typhimurium* TA100 及び陽性対照の復帰変異コロニー数はコロニーアナライザー（CA-11D，システムサイエンス株式会社）を用いて計測し，他は用手法で計測した。また，析出によりコロニーアナライザーによる計測が困難である場合，コロニーの径が小さくコロニーアナライザーでは正確な計測が困難である場合は，用手法で計測した。

試験の成立条件：下記の条件を満たしている場合に，試験は成立とした。

1. 陰性対照群及び陽性対照群のコロニー数の平均値が背景データ（添付資料）の変動範囲内であること。変動範囲を外れる場合にあっては，背景データとの比較から偶発的な要因によるものと考えられること。
2. 陽性対照のコロニー数（平均）が陰性対照値（平均）の2倍以上を示す。
3. 無菌試験の結果，雑菌による汚染が無い。
4. 計測値に欠落がない。

統計学的処理：統計学的処理は行わない。菌株ごとの被験物質の各用量，陰性及び陽性対

照において計測した最少グルコース寒天平板培地ごとの実数値を表示し、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値も併せて表示した。さらに、菌株ごとの被験物質の用量と復帰変異コロニー数の用量反応曲線を図示した。

結果の判定：被験物質液処理の復帰変異コロニー数を陰性対照の復帰変異コロニー数と比較し、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照の平均値の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量反応性が認められた場合に陽性と判定した。

#### ④ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

目的：被験物質の染色体異常誘発性を、雌チャイニーズハムスター肺由来CHL/IU細胞を用いて検討する。

実施基準：信頼性基準

陰性対照物質：被験物質液の調製に使用した溶媒とした。

陽性対照物質：陽性対照は、ほ乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化存在下で汎用されている、下記のものを使用した。

名称：Cyclophosphamide(以下、CPと略す)

供給元：Sigma-Aldrich Inc.

溶媒：ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略す)とした。

使用細胞：自然発生の染色体異常発現率が低く、細胞の安定性及び再現性が良く、染色体が比較的大きく数も少なく(染色体数モード25本)、多くの化学物質に対して感受性が高く、ほ乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験に汎用されている下記の細胞を使用した。

細胞：雌チャイニーズハムスター肺由来

CHL/IU細胞

購入先：DSファーマバイオメディカル株式会社

細胞周期：約15時間

マイコプラズマ：陰性

染色体数モード：25本

培養液及び培養細胞：培養液の組成を以下に示す。細胞は60mmプレートを培養容器とし、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%で培養した。

- ・EagleのMEM液体培地 445 mL
- ・ペニシリン(5000 units/mL)及びストレプトマイシン(5000 µg/mL) 5 mL
- ・牛胎児血清、非働済(56°C、30分) 50 mL

群構成：試験は、短時間処理法の代謝活性化非存在下及び代謝活性化存在下、連続処理法24時間処理により実施した。被験物質処理の用量あたりのプレート数は3枚とし、2枚を標本作製に、1枚を細胞増殖率の算出に用いた。対照として、すべての処理条件に陰性対照及び短時間処理法の代謝活性化存在下の陽性対照を設けた。陰性対照のプレート数は被験物質処理と同様とし、陽性対照のプレート数は2枚とし、標本作製に用いた。

用量段階：

gPhe-HMRG：試験の最高用量は500 µg/plateとし、用量段階は以下公比の計5用量とした。

HMRG：試験の最高用量は本被験物質の1 mMに相当する320 µg/plateとし、用量段階は以下公比の計5用量とした。

被験物質処理：4×10<sup>3</sup>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非存在下では培養液を3.0 mLとし、被験物質液0.03 mL添加した。短時間処理法の代謝活性化存在下では、培養液を2.5 mLとし、S9 mix 0.5 mL及び被験物質液0.03 mL添加した。添加後細胞を6時間培養し、6時間後に細胞をダルベッコリン酸

緩衝液（以下PBSと略す）で洗浄した後培養液 5 mLを加え、さらに 18 時間培養して細胞増殖率を算出した。連続処理法 24 時間処理では、培養液を抜き取らず被験物質液を 0.05 mL添加し、24 時間培養した後細胞増殖率を算出した。被験物質の析出の有無は、被験物質添加時及び培養終了時に観察した。

細胞増殖率の算出（ホルマザン法）：培養液を取り除き、連続処理法 24 時間処理の場合はPBSで 2 回洗浄し被験物質を取り除いた。生細胞数測定試薬（株式会社同仁化学研究所）を用時に加えた培養液 2 mLをプレートに添加し、炭酸ガス培養器で約 3 時間呈色反応を行った。呈色反応終了後、プレート 1 枚あたり 96 ウェルプレートの 8 ウェルに 0.1 mLごと分注し、マイクロプレートリーダー（MTP-300 Lab, コロナ電気株式会社、波長 450 nm）で吸光度を測定しホルマザン量を算出した。被験物質処理の細胞増殖率は、陰性対照のホルマザン量を 100%とし、用量あたりのホルマザン量の平均値から算出した。50%以上の増殖抑制が観察された場合は、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>）を算出した。

染色体標本の作製：細胞の回収約 2 時間前に、コルセミドを 0.2 µg/mL の濃度で添加した。約 2 時間後 0.1% EDTA 添加 1.25% トリプシン処理で細胞を回収し、1000 rpm で 5 分間遠心して上清を取り除いた。0.075 mol/L 塩化カリウム液を加えて約 10 分低張処理し、カルノア固定液（メタノール 3：酢酸 1）で固定した。固定した細胞をスライドグラス上に滴下し、エアドライ法により空気乾燥した。プレート当たり 2 枚以上の染色体標本を作製した。乾燥後、2%ギムザ液で 20 分間染色した。

観察対象：染色体の観察対象は、各処理条件のいずれも用量あたり 200 個の分裂中期細胞の観察が可能な、約 50%の細胞増殖抑制が認められる用量を最高用量とした連続する 3 用量以上とした。50%以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、被験物質液処理用量のうち、最高用量から連続する 3 用量以上を観察対象とした。

染色体観察：染色体の観察は、乱数を用いたコード番号を付した盲検法で行った。また、染色体の観察は短時間処理法を先に、次に連続処理法の順で行った。染色体の構造異常は、1 プレートあたり 100 個、1 用量あたり 200 個の良く広がった分裂中期細胞（染色体数：23~27 本）を倍率 1000 倍の顕微鏡下で観察した。数的異常は、倍率 200 倍の顕微鏡下でプレートあたり 200 個、1 用量あたり 400 個を観察した。染色体異常の分類及び型を以下に示す。構造異常を持つ細胞は、ギャップのみを有する細胞を含めた場合（+gap）と、含めない場合（-gap）に区別して集計した。染色体観察結果の評価は、ギャップのみを有する細胞を含めない染色体異常を有する細胞の出現頻度（-gap）により行った。

染色体異常の分類		異常の型
構造異常	染色体分体型異常	染色体分体型切断 (ctb), 染色体分体型交換 (cte)
	染色体型異常	染色体型切断 (csb), 染色体型交換 (cse)
	その他の異常	断片化 (frg), 多数の異常 (mul)
数的異常（モード数が 38 本以		倍数体 (pol), 核内倍加 (end)

試験の成立条件：下記の条件を満たしている場合に、試験は成立とする。

- 1) 陰性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度が、背景データの陰性対照（添付資料）の変動範囲内にある。

- 2) 陽性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度が、背景データの陰性対照の変動範囲内にある。
- 3) 陽性対照の構造異常を有する細胞の出現頻度が、陰性対照と比較して統計学的に有意に増加している。
- 4) 被験物質処理において、分裂中期細胞 200 個を観察した用量が 3 用量以上ある。

統計学的処理：被験物質処理及び陽性対照の構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度について、用量ごとにYatesの補正を伴う $\chi^2$ 検定を使用し、陰性対照との差の有意性を有意水準片側 5%で解析した。被験物質処理については、用量反応性を Cochran-Armitage trend test (有意水準片側 5%, 陰性対照を含む) で解析した。また、構造異常において陽性と判定された場合は、 $D_{20}$ 値及びTR値を算出した。

$D_{20}$  値：20%の細胞に構造異常が出現する濃度 (mg/mL)

$Y = \log X + b$   $Y = aX + b$  (相関係数  $r$  の高い方の式を採用)

$Y =$  染色体異常を有する細胞の出現頻度 (20%),  $X =$  濃度 (mg/mL)

TR 値：1 mg/mLあたりの染色分体型交換異常の出現頻度

結果の評価：構造異常は、構造異常を有する細胞の出現頻度に統計学的に有意な増加が認められ、かつその増加に用量依存性が認められた場合に陽性と判定した。倍数体は、倍数体の出現頻度が陰性対照に対し統計学的に有意に増加した場合に陽性と判定した。

(動物実験倫理)

・上記の試験は IACUC (Institutional Animal

Care and Use Committee, 動物実験委員会) によって承認を受けた。また、本試験は AAALAC International (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 国際実験動物管理評価認定協会) の認証を取得した施設で実施した (認証番号：001182)。

### C. 研究結果

#### ①ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験

gPhe-HMRG：

一般状態観察：観察期間中、全例で異常はみられなかった。

体重測定：対照群及び各被験物質投与群の間で差はみられなかった。

病理学的検査 (剖検)：全例で肉眼的異常はみられなかった。

HMRG：

一般状態観察：観察期間中、全例で異常はみられなかった。

体重測定：対照群及び各被験物質投与群の間で差はみられなかった。

病理学的検査 (剖検)：全例で肉眼的異常はみられなかった。

#### ②hERG試験細胞を用いたK<sup>+</sup>チャンネルへの影響評価

gPhe-HMRG：

hERG 電流の抑制率は、4, 40, 400 ng/mL のいずれの濃度においても陰性対照群と比べて有意な差は認められなかった。

HMRG：

hERG 電流の抑制率は、4 ng/mL の濃度で陰性対照群と比べて有意な差は認められなかったが、40, 400 ng/mL の濃度では有意差が認められた。

#### ③細菌を用いた復帰突然変異試験



gPhe-HMRG :

試験は0.0143~10.4  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で実施した。いずれの菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった(表 1,2, 図 1)。

HMRG :

試験は3.81~2774  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で実施した。代謝活性化存在下のS. typhimurium TA100, 98, TA1537において復帰変異コロニー数が用量反応的に増加し、S. typhimurium TA98, TA1537では陰性対照の2倍以上の増加を示した(表 3,4, 図 2)。

#### ④ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

gPhe-HMRG :

染色体の観察は、短時間処理法では125~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法24時間処理では62.5~00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で実施した。いずれの処理条件においても、染色体の構造異常を有する細胞、数的異常の増加は認められなかった(表 5~7, 図 3)。

HMRG :

染色体の観察は、短時間処理法では20.0~80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法24時間処理では20.0及び40.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で実施した。短時間処理法の代謝活性化非存在下において、染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度が6.0%に増加し、陰性対照と比較して統計学的な有意性及び用量反応性も認められた(表 8~10, 図 4)。

#### D. 考察

今回の研究では、キモトリプシンプローブを構成するgPhe-HMRGと生成物であるHMRGに対し、PMDA薬事戦略相談を経て確定した非臨床安全性試験のうち①ラットを

用いた単回腹腔内投与毒性試験、②hERG試験細胞を用いた $\text{K}^+$ チャネルへの影響評価、③細菌を用いた復帰突然変異試験、④ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験を実施した。①、②ではgPhe-HMRGとHMRGのいずれにも毒性は観察されなかった。遺伝毒性試験(③、④)では、HMRGについて用量反応性の復帰変異コロニー増加および染色体構造異常出現率の上昇を認めた。本プローブの投与方法が微量

(gPhe-HMRGとして最大で約57.8 $\mu\text{g}$ )を腹腔内に散布し、投与後は十分量の生理食塩水で洗浄できるものであることを考慮すると、臨床使用に際する遺伝毒性のリスクは極めて低いと予想されるが、腹腔内組織に残留するHMRGを測定するなどの追加検討を行う予定である。今後は、今回の試験期間中に実施に至らなかった試験項目、すなわち、非げっ歯類を用いた心血管系及び呼吸器系に対する安全性薬理試験(テレメトリー検査)と反復投与毒性試験を実施して本プローブの安全性を検証し、治験計画の策定につなげたい。

#### E. 結論

キモトリプシンプローブを構成する

gPhe-HMRGと生成物であるHMRGに対し、ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験、hERG試験細胞を用いた $\text{K}^+$ チャネルへの影響評価、細菌を用いた復帰突然変異試験、およびほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験を実施した。上記試験の範囲内では、gPhe-HMRGに関して毒性は認められなかった。HMRGに関する遺伝毒性の可能性については検討を追加して治験計画の策定に反映させる予定である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得: 高感度膵液漏迅速検出法  
(特願 2012-123478) について PCT 移行  
中。
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

(参考文献)

1. Yamashita S, Ishizawa T, Urano Y, et al. Visualization of the leakage of pancreatic juice using a chymotrypsin-activated fluorescent probe. Br J Surg 2013;100:1220-1228.

表 1 細菌を用いた復帰突然変異試験 (gPhe-HMRG) ①

Study period		from March 24, 2015 to March 27, 2015										
S9 mix	Compound	Dose (µg/plate)	Revertants per plate (mean number of revertants per dose)									
			Base-pair substitution type			Flameshift mutation type						
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537					
S9 mix (-)	Negative control	—	145	(131)	10	( 9)	15	( 18)	14	( 19)	7	( 7)
			130	[14.0]	9	[ 1.5]	19	[ 3.1]	22	[ 4.4]	8	[ 1.0]
			117		7		21		21		6	
	gPhe-HMRG	0.0143	149	(145)	6	( 5)	16	( 16)	24	( 20)	8	( 6)
			147	[ 5.3]	5	[ 0.6]	18	[ 2.0]	19	[ 3.2]	7	[ 2.6]
		0.0429	139		5		14		18		3	
			126	(122)	9	( 8)	17	( 17)	25	( 22)	6	( 7)
			113	[ 7.5]	3	[ 4.2]	20	[ 2.5]	17	[ 4.6]	4	[ 3.1]
			126		11		15		25		10	
	0.129	134	(131)	5	( 6)	19	( 18)	20	( 20)	4	( 6)	
		132	[ 3.1]	5	[ 1.2]	17	[ 1.2]	20	[ 0.6]	6	[ 2.5]	
		128		7		19		19		9		
	0.386	129	(133)	4	( 5)	21	( 18)	26	( 22)	7	( 6)	
		141	[ 7.2]	6	[ 1.2]	21	[ 4.6]	20	[ 3.5]	6	[ 0.6]	
		128		6		13		20		6		
		95	(115)	7	( 6)	20	( 19)	23	( 21)	11	( 8)	
	1.16	113	[21.1]	7	[ 1.2]	17	[ 2.1]	17	[ 3.5]	7	[ 2.6]	
		137		5		21		23		6		
		114	(115)	5	( 8)	15	( 17)	19	( 19)	5	( 6)	
	3.47	121	[ 5.6]	10	[ 2.5]	16	[ 2.1]	21	[ 1.5]	7	[ 1.2]	
110			8		19		18		7			
134		(122)	4	( 4)	10	( 14)	25	( 18)	9	( 7)		
117		[10.8]	4	[ 0.6]	15	[ 4.0]	13	[ 6.2]	6	[ 1.7]		
10.4	114		3		18		16		6			
	749	(712)	—		93	( 95)	—		—			
	711	[36.5]	—		88	[ 8.2]	—		—			
AF-2	676		—		104		—		—			
	—		—		—		433	(481)	—			
	0.1		—		—		493	[43.3]	—			
AZI	—		—		—		517		—			
	0.5		—	392	(404)	—	—		—			
	—		—	496	[86.6]	—	—		—			
9AA	80.0		—	324		—	—		—			
	—		—	—	—	—	—		486	(499)		
	—		—	—	—	—	—		455	[51]		
		—	—	—	—	—		555				

Negative control: Dimethylsulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine

[ ]: Standard deviation

表 2 細菌を用いた復帰突然変異試験 (gPhe-HMRG) ②

Study period		from March 24, 2015 to March 27, 2015								
S9 mix	Compound	Dose (µg/plate)	Revertants per plate (mean number of revertants per dose)							
			Base-pair substitution type			Frameshift mutation type				
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537			
S9 mix (+)	Negative control	—	126 (139)	7 (9)	22 (20)	35 (25)	14 (10)			
			140 [12.1]	9 [2.5]	22 [4.0]	21 [8.4]	8 [3.2]			
			150	12	15	20	9			
	0.0143	147 (143)	6 (5)	16 (17)	36 (28)	8 (6)				
		150 [9.1]	6 [1.2]	16 [1.7]	28 [8.0]	5 [1.5]				
		133	4	19	20	6				
	0.0429	119 (127)	5 (7)	20 (18)	23 (26)	6 (7)				
		133 [7.4]	5 [3.5]	16 [2.0]	25 [3.6]	5 [3.2]				
		130	11	18	30	11				
	0.129	119 (126)	7 (8)	23 (19)	20 (21)	9 (9)				
		140 [12.1]	7 [1.2]	17 [3.2]	21 [1.0]	6 [2.5]				
		119	9	18	22	11				
	gPhe-HMRG	0.386	154 (143)	11 (9)	22 (19)	30 (27)	9 (8)			
			146 [12.2]	9 [2.0]	17 [2.9]	26 [3.1]	10 [2.1]			
			130	7	17	24	6			
	1.16	135 (129)	4 (7)	23 (21)	26 (31)	6 (8)				
		136 [11.8]	10 [3.1]	19 [2.1]	29 [6.2]	7 [2.6]				
		115	6	20	38	11				
	3.47	111 (126)	5 (6)	15 (15)	28 (25)	8 (7)				
		127 [15.0]	6 [0.6]	18 [3.5]	29 [6.7]	6 [1.0]				
141		6	11	17	7					
10.4	130 (132)	4 (5)	14 (17)	26 (25)	5 (6)					
	126 [6.7]	6 [1.2]	21 [3.6]	25 [1.5]	6 [1.5]					
	139	6	16	23	8					
0.5	—	—	—	367 (377)	—					
	—	—	—	387 [10.0]	—					
	—	—	—	377	—					
1.0	981 (1008)	—	—	—	—					
	998 [33.2]	—	—	—	—					
	1045	—	—	—	—					
2AA	2.0	—	341 (355)	—	—	274 (244)				
		—	383 [24.5]	—	—	241 [29.1]				
		—	340	—	—	216				
10.0	—	—	715 (753)	—	—					
	—	—	823 [60.7]	—	—					
	—	—	721	—	—					

Negative control: Dimethylsulfoxide

2AA: 2-Aminoanthracene

[ ]: Standard deviation

表 3 細菌を用いた復帰突然変異試験 (HMRG) ①

Study period		from March 24, 2015 to March 27, 2015										
S9 mix	Compound	Dose (µg/plate)	Revertants per plate (mean number of revertants per dose)									
			Base-pair substitution type						Flameshift mutation type			
			TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
Negative control	—	132	(138)	12	( 8)	22	( 20)	24	( 22)	9	( 7)	
		148	[ 8.5]	6	[ 3.2]	17	[ 2.6]	24	[ 3.5]	5	[ 2.1]	
HMRG	3.81	135		7		21		18		6		
		145	(146)	11	( 10)	19	( 20)	24	( 22)	3	( 6)	
		135	[11.5]	10	[ 0.6]	19	[ 1.7]	23	[ 2.1]	6	[ 3.0]	
	11.4	158		10		22		20		9		
		141	(140)	7	( 12)	22	( 19)	18	( 21)	7	( 6)	
		153	[13.5]	16	[ 4.5]	17	[ 2.6]	16	[ 6.4]	5	[ 1.0]	
	34.2	126		12		18		28		6		
		143	(136)	11	( 9)	23	( 21)	16	( 19)	9	( 9)	
		143	[11.5]	9	[ 2.0]	22	[ 3.2]	20	[ 2.6]	11	[ 2.5]	
	103	123		7		17		21		6		
		150	(152)	11	( 13)	17	( 18)	30	( 29)	12	( 9)	
		163	[10.6]	13	[ 1.5]	19	[ 1.2]	34	[ 5.6]	5	[ 3.8]	
308	142		14		17		23		11			
	147	(146)	10*	( 10)	17	( 22)	36	( 32)	8*	( 7)		
	145	[ 1.0]	11*	[ 1.5]	25	[ 4.6]	30	[ 3.8]	5*	[ 1.5]		
S9 mix (-)	146		8*		25		29		7*			
	925	0*	( 0)	0*	( 0)	13*	( 10)	0*	( 0)	0*	( 0)	
	0*	[ 0.0]	0*	[ 0.0]	4*	[ 5.2]	0*	[ 0.0]	0*	[ 0.0]		
	0*		0*		13*		0*		0*			
	2774	0*	( 0)	0*	( 0)	13*	( 9)	0*	( 0)	0*	( 0)	
	0*	[ 0.0]	0*	[ 0.0]	5*	[ 4.0]	0*	[ 0.0]	0*	[ 0.0]		
AF-2	0.01	749	(712)	—	—	93	( 95)	—	—	—	—	
	711	[36.5]	—	—	88	[ 8.2]	—	—	—	—	—	
	676		—	—	104		—	—	—	—	—	
0.1	—	—	—	—	—	—	—	433	(481)	—	—	
	—	—	—	—	—	—	—	493	[43.3]	—	—	
	—	—	—	—	—	—	—	517		—	—	
AZI	0.5	—	—	392	(404)	—	—	—	—	—	—	
	—	—	—	496	[86.6]	—	—	—	—	—	—	
	—	—	—	324		—	—	—	—	—	—	
9AA	80.0	—	—	—	—	—	—	—	—	486	(499)	
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	455	[51]	
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	555		

Negative control: Dimethylsulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, AZI: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine

[ ]: Standard deviation

\*: Growth-inhibition.

表 4 細菌を用いた復帰突然変異試験 (HMRG) ②

Study period		from March 24, 2015 to March 27, 2015					
S9 mix	Compound	Dose (µg/plate)	Revertants per plate (mean number of revertants per dose)				
			Base-pair substitution type			Flameshift mutation type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	—	142 (148)	7 (8)	28 (22)	30 (24)	12 (10)
			149 [ 5.1]	6 [ 2.1]	18 [ 5.5]	22 [ 5.3]	9 [ 2.1]
			152	10	19	20	8
	3.81	157 (153)	6 (10)	16 (19)	23 (30)	10 (8)	
		146 [ 6.4]	12 [ 3.2]	20 [ 2.6]	34 [ 6.4]	9 [ 2.1]	
		157	11	21	34	6	
	11.4	153 (150)	8 (8)	17 (20)	34 (33)	7 (8)	
		144 [ 4.9]	11 [ 2.5]	19 [ 3.1]	29 [ 3.2]	14 [ 5.1]	
		152	6	23	35	4	
	34.2	164 (157)	10 (10)	21 (19)	46 (45)	6 (8)	
		143 [12.1]	9 [ 1.0]	20 [ 3.2]	49 [ 4.6]	8 [ 2.5]	
		164	11	15	40	11	
	HMRG 103	189 (174)	9 (8)	27 (22)	113 (109)	15 (17)	
		167 [13.0]	10 [ 2.1]	21 [ 5.0]	107 [ 3.8]	15 [ 2.9]	
		166	6	17	106	20	
308	184 (192)	8 * (7)	17 (17)	332 (291)	34 * (27)		
	183 [14.7]	3 * [ 4.0]	18 [ 1.0]	260 [37.0]	22 * [ 6.4]		
	209	11 *	16	281	24 *		
925	0 * (0)	0 * (0)	15 * (17)	285 * (273)	22 * (19)		
	0 * [ 0.0]	0 * [ 0.0]	20 * [ 2.9]	256 * [15.3]	18 * [ 2.3]		
	0 *	0 *	15 *	279 *	18 *		
2774	0 * (0)	0 * (0)	15 * (17)	290 * (318)	21 * (15)		
	0 * [ 0.0]	0 * [ 0.0]	20 * [ 2.9]	290 * [47.9]	16 * [ 6.6]		
	0 *	0 *	15 *	373 *	8 *		
0.5	—	—	—	367 (377)	—		
	—	—	—	387 [10.0]	—		
	—	—	—	377	—		
1.0	981 (1008)	—	—	—	—		
	998 [33.2]	—	—	—	—		
	1045	—	—	—	—		
2AA 2.0	—	341 (355)	—	—	274 (244)		
	—	383 [24.5]	—	—	241 [29.1]		
	—	340	—	—	216		
10.0	—	—	715 (753)	—	—		
	—	—	823 [60.7]	—	—		
	—	—	721	—	—		

Negative control: Dimethylsulfoxide

2AA: 2-Aminoanthracene

[ ]: Standard deviation

\*: Growth-inhibition.

表5 gPhe-HMRGの染色体異常試験(細胞増殖率)

短時間処理法								連続処理法24時間処理			
S9 mix (-)				S9 mix (+)							
濃度 (μg/mL)	ホルマザン 測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (μg/mL)	濃度 (μg/mL)	ホルマザン 測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (μg/mL)	濃度 (μg/mL)	ホルマザン 測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (μg/mL)
陰性対照	0.861	100	---	陰性対照	0.651	100	---	陰性対照	0.968	100	403
31.3	0.848	98.5		31.3	0.651	100		31.3	0.904	93.4	
62.5	0.802	93.1		62.5	0.633	97.2		62.5	0.930	96.1	
125	0.858	99.7		125	0.667	102		125	0.916	94.6	
250	0.840	97.6		250	0.799	123		250	0.807	83.4	
500	0.771	89.5		500	0.688	106		500	0.338	34.9	

陰性対照: Dimethylsulfoxide

表6 gPhe-HMRGの染色体異常試験(短時間処理法)

処理時間 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	構造異常を持つ細胞数							合計(%)		数的異常を持つ細胞数						
		観察数	gap	ctb	csb	cte	csc	others	合計	- gap	+ gap	観察数	pol	end	合計 (%)		
6時間 S9 mix (-)	陰性対照	100	100	1	0	1	0	0	0	1			200	1	0	1	
		Total	200	0	0	0	0	0	0	0			200	1	0	1	
	125	99.7	100	0	2	0	0	0	0	2	(0.5)	(1.0)	400	2	0	2	(0.5)
		Total	200	0	2	0	0	0	0	2	(1.0)	(1.0)	400	1	0	1	(0.3)
	250	97.6	100	0	1	0	2	0	0	2			200	0	0	0	
			Total	200	0	1	1	2	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	0	0	0
500	89.5	100	0	1	0	0	1	0	2			200	3	0	3		
		Total	200	2	1	0	1	0	0	1	(1.5)	(2.5)	400	4	0	4	(1.0)
6時間 S9 mix (+)	陰性対照	100	100	0	0	0	1	0	0	1			200	0	0	0	
		Total	200	0	2	0	1	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	1	0	1	(0.3)
	125	102	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
			Total	200	2	1	0	0	0	0	1	(1.0)	(2.0)	400	0	0	0
	250	123	100	1	2	0	0	0	0	2			200	1	0	1	
			Total	200	2	3	0	0	0	0	3	(1.5)	(2.5)	400	4	0	4
500	106	100	0	0	0	0	0	0	0			200	1	0	1		
		Total	200	0	1	0	1	0	0	1	(0.5)	(0.5)	400	3	0	3	(0.8)
CP	5.0	---	100	1	13	0	36	0	0	41			200	1	0	1	
Total	200	0	15	2	34	0	0	0	41	(41.0)	(41.5) †	400	1	0	1	(0.3)	

陰性対照: Dimethylsulfoxide

CP: Cyclophosphamide

ctb: 染色分体型切断, csb: 染色体型切断, cte: 染色分体型交換, csc: 染色体型交換, pol: 倍数体, end: 核内倍加

†: p < 0.05

表7 gPhe-HMRGの染色体異常試験(連続処理法24時間処理)

処理時間 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	構造異常を持つ細胞数							合計(%)		数的異常を持つ細胞数						
		観察数	gap	ctb	csb	cte	csc	others	合計	- gap	+ gap	観察数	pol	end	合計 (%)		
24時間	陰性対照	100	100	0	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0	
		Total	200	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	(0.0)	400	0	0	0	(0.0)
	62.5	96.1	100	0	2	0	0	0	0	2			200	0	0	0	
			Total	200	0	2	0	0	0	0	2	(1.0)	(1.0)	400	0	0	0
	125	94.6	100	0	1	0	1	0	0	1			200	0	0	0	
			Total	200	0	1	0	2	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	0	0	0
250	83.4	100	1	1	0	1	0	0	2			200	0	0	0		
		Total	200	1	3	0	1	0	0	4	(2.0)	(2.5)	400	0	0	0	(0.0)
500	34.9	100	0	1	0	0	0	0	1			200	3	0	3		
		Total	200	1	2	0	0	0	0	2	(1.0)	(1.5)	400	3	0	3	(0.8)

陰性対照: Dimethylsulfoxide

ctb: 染色分体型切断, csb: 染色体型切断, cte: 染色分体型交換, csc: 染色体型交換, pol: 倍数体, end: 核内倍加

表 8 HMRGの染色体異常試験(細胞増殖率)

短時間処理法												連続処理法24時間処理			
S9 mix (-)				S9 mix (+)											
濃度 (μg/mL)	ホルマザン 測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (μg/mL)	濃度 (μg/mL)	ホルマザン 測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (μg/mL)	濃度 (μg/mL)	ホルマザン 測定値	細胞増殖率 (%)	IC50 (μg/mL)				
陰性対照	0.961	100	64.0	陰性対照	0.682	100	115	陰性対照	0.997	100	32.4				
20.0	1.039	108		20.0	0.633	92.8		20.0	0.848	85.1					
40.0	0.962	100		40.0	0.699	102		40.0	0.346	34.7					
80.0	0.252	26.2		80.0	0.679	100		80.0	0.031	3.1					
160	0.028	2.9		160	0.035	5.1		160	0.026	2.6					
320 #	0.027	2.8		320 #	0.024	3.5		320	0.026	2.6					

陰性対照: Dimethylsulfoxide

#: 折出

表 9 HMRGの染色体異常試験(短時間処理法)

処理時間 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	構造異常を持つ細胞数								合計 (%)	数的異常を持つ細胞数					
		観察数	gap	ctb	csb	ctc	csc	others	-gap		+gap	観察数	pol	end	合計 (%)	
6時間 S9 mix (-)	陰性対照 100	100	0	1	1	0	0	0	0	2			200	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0
		Total 200	0	1	1	0	0	0	0	2	(1.0)	(1.0)	400	0	0	0
	20.0 108	100	0	1	0	0	0	0	0	1			200	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0
		Total 200	0	2	0	0	0	0	0	1	(0.5)	(0.5)	400	0	0	0
40.0 100	100	0	1	0	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
	100	0	1	1	1	0	0	0	2			200	0	0	0	
	Total 200	0	2	1	1	0	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	0	0	0	(0.0)
80.0 26.2	100	0	2	0	5	0	0	7				200	2	0	2	
	100	0	2	0	4	0	0	5				200	0	0	0	
	Total 200	0	4	0	9	0	0	12	(6.0)	(6.0) †		400	2	0	2	(0.5)
6時間 S9 mix (+)	陰性対照 100	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
		100	0	1	1	1	0	0	3			200	1	0	1	
		Total 200	0	2	1	1	0	0	4	(2.0)	(2.0)	400	1	0	1	(0.3)
	20.0 92.8	100	0	3	0	0	0	0	3			200	1	0	1	
		100	0	0	0	1	1	0	2			200	1	0	1	
		Total 200	0	3	0	1	1	0	5	(2.5)	(2.5)	400	2	0	2	(0.5)
40.0 102	100	0	0	0	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
	100	0	0	0	1	0	0	1			200	1	0	1		
	Total 200	0	0	0	1	0	0	1	(0.5)	(0.5)	400	1	0	1	(0.3)	
80.0 100	100	0	0	0	0	0	0	0	0			200	0	0	0	
	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0		
	Total 200	0	1	0	0	0	0	1	(0.5)	(0.5)	400	0	0	0	(0.0)	
CP 5.0	---	100	1	13	0	36	0	41				200	1	0	1	
	---	100	0	15	2	34	0	41				200	0	0	0	
Total	---	200	1	28	2	70	0	82	(41.0)	(41.5) †		400	1	0	1	(0.3)

陰性対照: Dimethylsulfoxide

CP: Cyclophosphamide

ctb: 染色体分体型切断, csb: 染色体型切断, ctc: 染色体分体型交換, csc: 染色体型交換, pol: 倍数体, end: 核内倍加

†: p < 0.05

表 10 HMRGの染色体異常試験(連続処理法24時間処理)

処理時間 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	構造異常を持つ細胞数								合計 (%)	数的異常を持つ細胞数				
		観察数	gap	ctb	csb	ctc	csc	others	-gap		+gap	観察数	pol	end	合計 (%)
24時間	陰性対照 100	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0
		100	0	1	0	1	0	0	2			200	1	0	1
		Total 200	0	2	0	1	0	0	3	(1.5)	(1.5)	400	1	0	1
20.0 85.1	100	0	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
	100	1	1	0	0	0	0	1			200	0	0	0	
	Total 200	1	2	0	0	0	0	2	(1.0)	(1.5)	400	0	0	0	(0.0)
40.0 34.7	100	1	3	0	1	0	0	4			200	0	0	0	
	100	0	0	0	1	0	0	1			200	1	0	1	
	Total 200	1	3	0	2	0	0	5	(2.5)	(3.0)	400	1	0	1	(0.3)
80.0 3.1		Tox (no cell)													

陰性対照: Dimethylsulfoxide

ctb: 染色体分体型切断, csb: 染色体型切断, ctc: 染色体分体型交換, csc: 染色体型交換, pol: 倍数体, end: 核内倍加



図1

細菌を用いた復帰突然変異試験の用量反応曲線 (gPhe-HMRG)

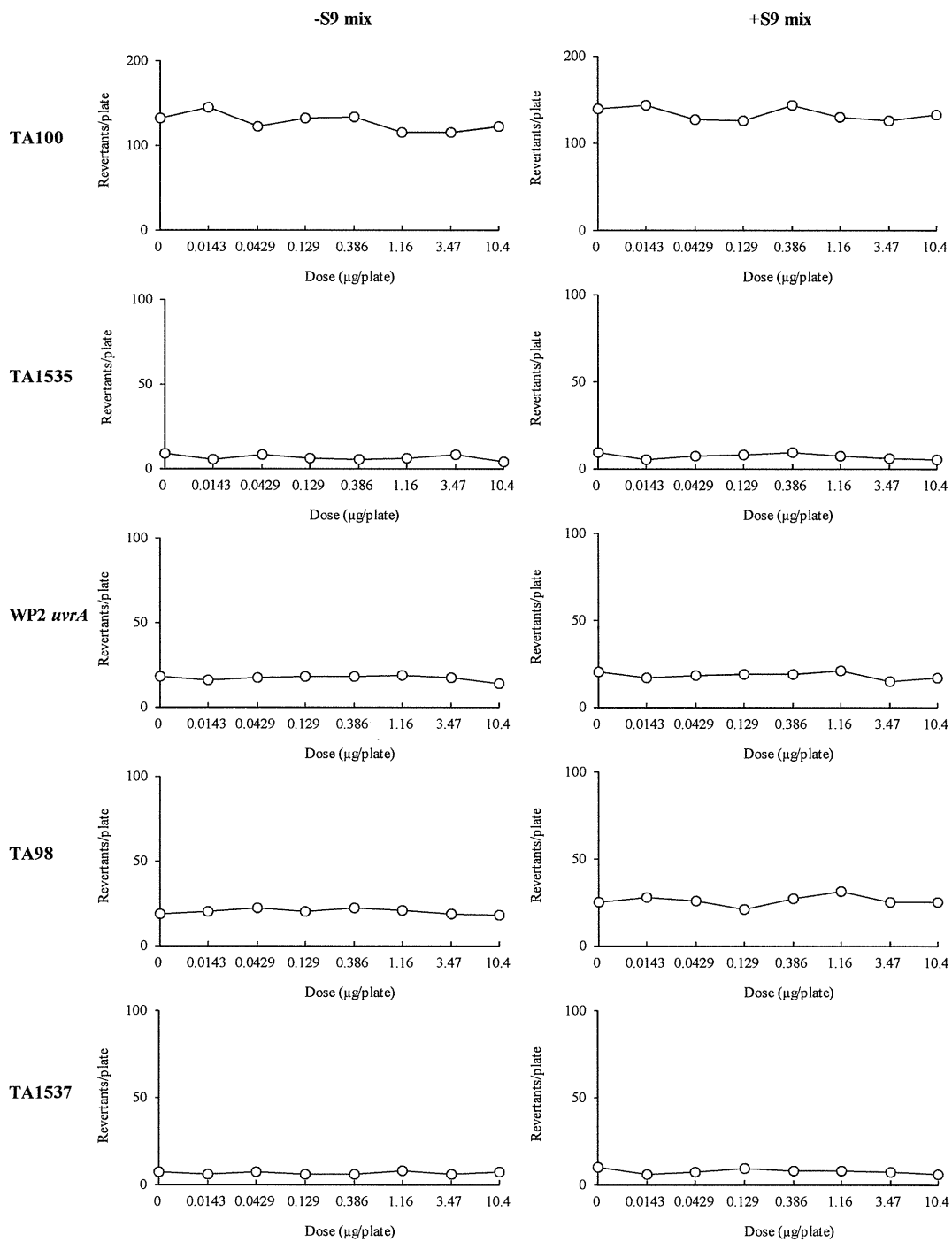


図2

細菌を用いた復帰突然変異試験の用量反応曲線 (HMRG)

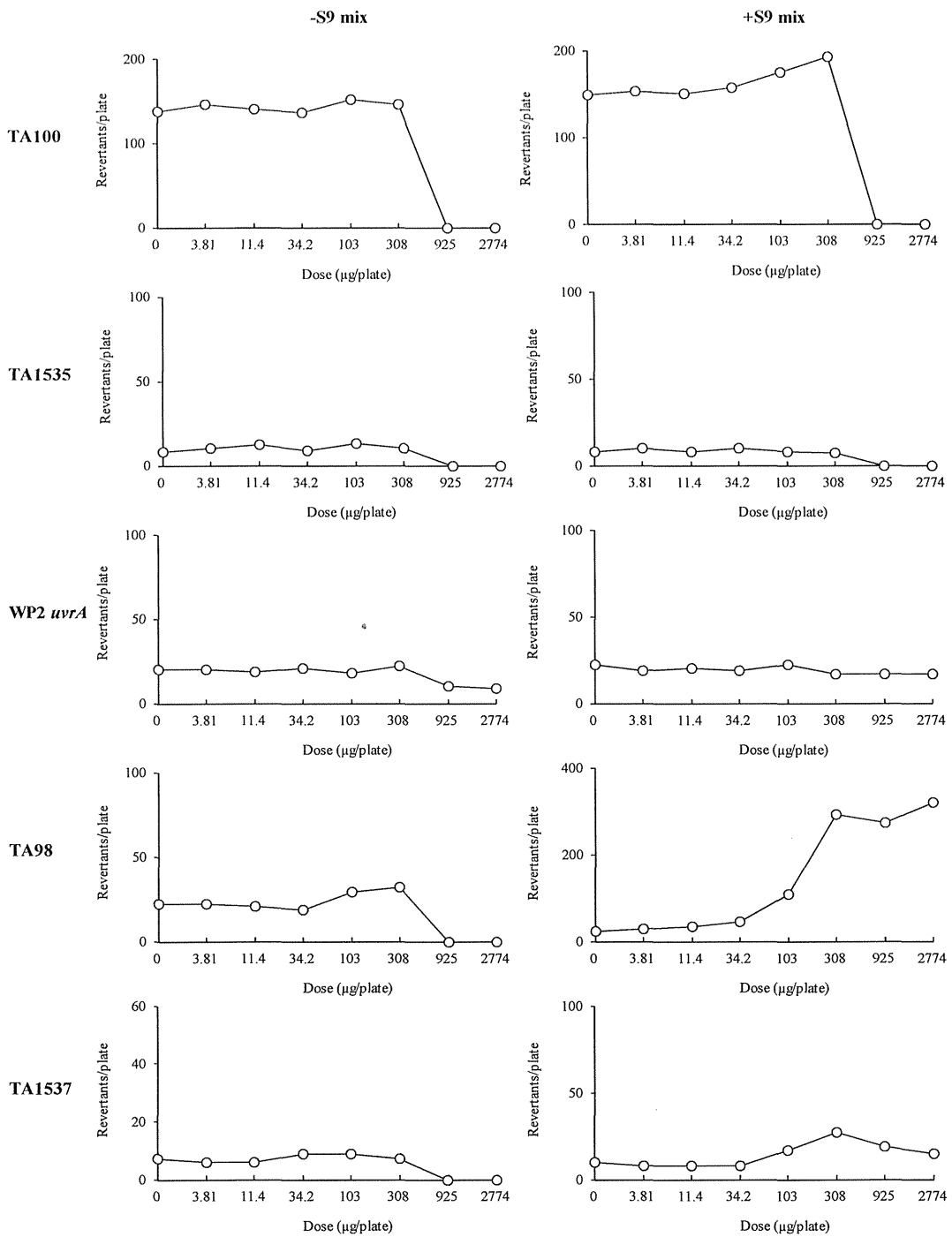


図3 gPhe-HMRG の染色体異常試験

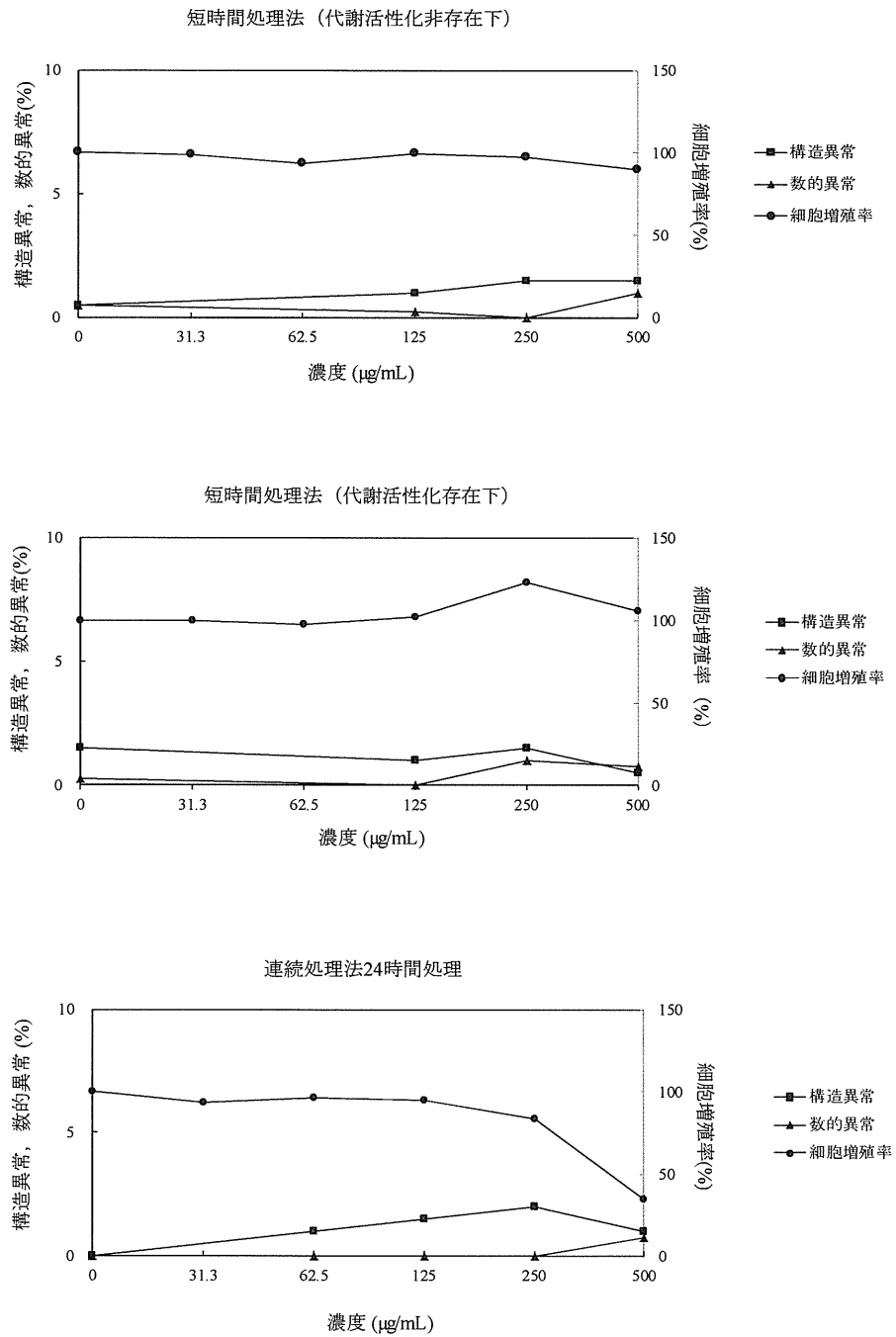


図4 HMRGの染色体異常試験

