

2008/70/A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

アナフィラトキシン阻害ペプチドの実用化推進研究
(H20-トランス-一般-003)に関する研究
平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 秀親

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
アナフィラトキシン阻害ペプチドの実用化推進に関する研究	1
岡田秀親	
(資料)	
前臨床安全性試験結果報告書	
AcPepAのラットを用いた3日間反復静脈内投与による用量設定試験	6
AcPepAのサルを用いた3日間反復静脈内投与による用量設定試験	60
AcPepAの細菌を用いる復帰突然変異試験	92
AcPepAのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	110
AcPepAのラット小核試験	130
AcPepAのhERG細胞を用いたK ⁺ チャネルへの影響	146
臨床試験情報登録(社団法人日本医師会治験促進センター)	160
II. 分担研究報告	
1. AcPepAの定量法開発およびToxico-Kineticsに関する研究	176
前田康博	
2. モルモットHVJ肺炎モデルでの治療実験に関する研究	178
岡田則子	
3. サル局所脳虚血後再灌流モデルにおけるアナフィラトキシン 阻害ペプチドの効果に関する研究	181
間瀬光人	
4. ブタ新生児敗血症モデルでのAcPepA治療効果に関する研究	182
戸莉創	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	183
IV. 研究成果の刊行物・別刷	184

アナフィラトキシン阻害ペプチドの実用化推進に関する研究

研究代表者 岡田 秀親 （医）さわらび会福祉村病院 先端医療担当副院長

研究要旨

致死量の LPS (4mg/kg) を投与したカニクイザルにエンドトキシンショック病態が起こり始めた 30 分目から AcPepA を静脈内持続投与する治療で 7 頭のサル全てを救命することができた。また、ブタ新生児の回盲部を結紮穿孔して起こした致死性急性腹膜炎モデル (CLP モデル) でも救命効果を認めることができた。サイトカインの動態を解析し、C5a を阻害することにより、HMGB1 の放出を抑えサイトカインストームの悪循環が防がれることが分かった。このような救命効果は抗酸化剤、酵素阻害剤、ヘパリン、ステロイド等の現有治療剤では達成することができない。従って、重篤な敗血症患者の救命に AcPepA が有用であると考え、医師主導型トランスレーショナルリサーチでそれを立証する。

A. 研究の目的

我々は蛋白質ペプチド鎖内に、相互にアンチセンスペプチドとして対応する配列が常に存在することを発見し、アンチセンスホモロジーボックス (AHB) と命名した (Nature Med. 1: 894, 1995)。AHB 部分のペプチド断片で蛋白質の機能を阻害できることも立証した (Peptides, 19: 211, 1998; J. Immunol., 157: 4591, 1996; Microbiol. Immunol., 44: 205, 2000)。

その知見を基に任意のペプチド鎖に対する相補性ペプチドを自動設計するプログラムを考案し、それを活用して C5a アナフィラトキシン (特願 2003-44850; 特許第 4106691 号) を特異的に阻害するペプチドを創生できた。

C5a アナフィラトキシンを阻害する相補性ペプチドである PepAI は分子比 1:10 でも

C5a の活性を抑制した。さらに、ラットがショック死を起こす実験モデルにおいて、PepA の静脈注射で全例を救命できた (J. Immunol. 172: 6382, 2004)。

PepA の N 末アミノ酸をアセチル化した AcPepA はさらに強力な効果を発揮する。致死量の LPS 投与でエンドトキシンショック病態のカニクイザルに AcPepA を投与することで救命できることも分かった。したがって、重篤な敗血症患者の救命に AcPepA が有用であると考えて、新たに特許を申請した (特願 2008-288523 「SIRS 患者を救命するためのペプチド組成物」)。

ペプチド剤は蛋白分解酵素の作用を受けて速やかに分解されるので、救命時に大量に投与しても蓄積毒性などの副作用リスクが少ないと考えられる。そこで、この C5a 阻害ペプチドの救命効果を臨床治療実験で明らかにすることを目的とする。20 年度では、サルとラット

を用いて急性毒性試験を実施中である。その結果を基に、21度以降には各施設の倫理委員会などの承認をえたプロトコールでトランスレーショナルリサーチを実施する。また、C5aが要因となる脳梗塞での虚血再血流障害に対する予防効果についてもサルでの脳梗塞モデル実験で確認できている。

B. 研究の方法

カニクイザルにLPSを投与して惹起した敗血症病態モデルでAcPepAに顕著な救命治療効果が認められた。病態が更に進行した状況下での治療効果を検討し、治療効果を発揮できる限界を明確にする。cGMP規格AcPepAを作成し毒性試験などで安全使用量を明らかにする。それらの前臨床試験データに基づき、患者への治療実験を各施設の倫理委員会の承認と指導の下に第2年度に開始することを目指す。cGMP規格の製剤は株式会社バイオロジカ社に合成を委託する。

【平成20年度】

- 1) PepA は 17 個のアミノ酸 (ASGAPAPGPAGPLRPMF) からなるペプチドであるが、N末アミノ酸をアセチル化したAcPepAを基本とする (Microbiol. Imm. 51:439, 2007)。更に化学修飾を施したり、一部のアミノ酸を置換するなどの処理により、蛋白分解酵素などに対する耐性を付与したり、C5aに対する阻害活性を高めるなどの改良も試みる。C5aの活性は、好中球のCaインフラックスやエラスターゼ放出などを指標に解析する(今井優樹、

岡田則子)。

- 2) ^{14}C 等の放射性同位元素を含むアミノ酸を用いて、AcPepAを合成し、血清に加えて反応させたときや、ラットやモルモットの静脈内に投与したときのペプチドの半減期などを解析する。また、体内での分布状況の解析も放射能を指標として行う(今井優樹、岡田則子)。
- 3) ブタ新生児での盲腸結紮穿孔腹膜炎(CPL)の致死的病態に対するAcPepAの治療効果を評価する。この場合、抗生物質やステロイド剤などとの併用効果も解析する(戸苅創、岡田則子)。
- 4) 全身麻酔下において、カニクイザルに致死量(4mg/kg)のエンドトキシン(LPS)の静脈内投与を行い、炎症病態が種々の段階に進行してからAcPepAの投与を開始し、治療効果を発揮できる病態の限界を評価する(岡田秀親、寺尾恵治)。
- 5) 動物倫理委員会で承認されれば、カニクイザルで盲腸結紮穿孔法により腹膜炎を惹起させたときのAcPepAによる治療効果を評価する。さらに、抗生物質やステロイド剤を点滴輸液で投与するなどの治療とAcPepAなどの投与が相乗効果を発揮することにより、救命治療が可能であることを明らかにしたい(寺尾恵治)。
- 6) ブタ及びカニクイザルで消化管や脳における虚血再還流によって惹起させる臓器炎症障害に対するAcPepAの発症予防効果について評

価する（大塚隆信、祖父江和哉、間瀬光人）。

- 7) AcPepAをマウスに種々の量を投与して急性毒性の有無を検討する。また、連日投与を続けて慢性毒性や催奇性の有無などの検討を行い、安全使用基準を定める。マウスにおける安全投与限界量を明らかにしたうえで、サルでの安全投与量の確認を行う。必要に応じ、安全性試験受託専門業者（株式会社バイオメディックス社：スギ生物科学研究所株式会社）に前臨床安全性試験を委託する。

C. 研究結果

C5aアナフィラトキシンを阻害する相補性ペプチドであるPepAは分子比1:10でもC5aの活性を抑制した。さらに、ラットがショック死を起こす実験モデルにおいて、PepAの静脈注射で全例を救命できた（J. Immunol. 172: 6382, 2004）。PepAのN末アミノ酸をアセチル化したAcPepAはさらに強力な効果を発揮する。致死量のLPS投与でエンドトキシンショック病態のカニクイザルにAcPepAを投与することで救命できることも分かった。

カニクイザルに致死量のLPSを投与した後で、AcPepAの持続継続投与を3時間続けるとカニクイザルを救命できるが、その際の血中のサイトカイン動態の解析を実施した結果、サイトカインストーム状態を示し種々のサイトカインの上昇などが認められたが、AcPepAの投与で救命できるサルではHMGB1の上昇が抑制させているこ

とが分かった（岡田秀親）。

さらに、ブタ新生児での盲腸結紮穿孔腹膜炎（CPL）の致死的病態に対するAcPepAの治療効果を解析した。CLP手術後30分から2mg/kg/hrでAcPepAを持続投与すると、無治療対象は9.5時間で死亡したのに対し18時間以上生存することが分かった。その際、血漿中HMGB1の上昇は抑えられていた（戸苅創、岡田秀親、岡田則子）。したがって、重篤な敗血症患者の救命にAcPepAが有用であると考えて、新たに特許を申請した。（特願2008-288523「SIRS患者を救命するためのペプチド組成物」）

AcPepAをラットの静脈内に投与したときのペプチドの分解経過をLC/MS/MSによって分析する方法を考案した。その方法を用い、ラット生体内の半減期が2分であることが明らかとなった（前田康博）。また、C5aが要因となる脳梗塞での虚血再灌流障害に対する予防効果について評価するために、カニクイザルの脳梗塞モデル実験系を作成した（間瀬光人、岡田秀親）。

来年度以降に医師主導型臨床研究を開始するために、前臨床安全性試験としてカニクイザルとラットを用いて急性毒性試験をスギ生物科学研究所株式会社（前・株式会社富士バイオメディックス）に依頼して行い、治療投与予定量の10倍量（20mg/kg）の投与でも異常所見は現れず、安全性が確認できた。試験管内安全性試験としては変異原性試験、細胞機能障害試験なども実施したが、異常所見は検出されなかった。さらに、反復毒性試験などもスギ生物科学研究所株式会社に依頼して実施中である。平成21年5月末には結果の報告を

受ける予定である。その結果を基に、21度以降には各施設の倫理委員会などの承認をえたプロトコールでトランスレーショナルリサーチを実施する計画である。前臨床安全性試験の進行状況は以下の如くである。

完了した安全性試験：

AcPepA のサルを用いた 3 日間反復静脈内投与による用量設定試験

→ 急性毒性は認められなかった。

AcPepA のラットを用いた 3 日間反復静脈内投与による用量設定試験

→ 急性毒性は認められなかった。

無麻酔サルを用いた心血管系、呼吸系及び行動に及ぼす影響

→ 異常所見は現れなかった。

目下実施中の前臨床試験：

* AcPepA のラット小核試験

* AcPepA のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

* AcPepA の細菌を用いる復帰突然変異試験

* ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

* hERG 細胞を用いた K⁺チャネルへの影響

長期観察を要する今後の安全性試験：

* 催奇性試験

* 発がん性試験

D. 考察

カニクイザル及びブタ新生児のゼブシスショックモデルを用いた実験動物で治療効果を立証することができた。更に急

性毒性試験などで安全性を確かめることができた。試験管内安全性試験としては変異原性試験、細胞機能障害試験なども実施したが、異常所見は検出されなかった。さらに、反復毒性試験などもスギ生物科学研究所株式会社に依頼して実施中であり、平成 1 年 5 月には結果が出揃い安全性が確認できる予定である。その知見をもとに福祉村病院の I R B（倫理委員会及び治験委員会）に健常人での安全性臨床試験（第 I 相安全性臨床試験）の実施申請を行い、臨床試験を実施する予定である。安全性臨床試験で安全性の確認を得た段階で、重篤な感染症患者に対して、患者（又は家族）が実験治療を書面です承して希望する場合には、I R B（倫理委員会及び治験委員会）に臨床治療試験（第 I 相臨床治療研究）の実施手順などのプロトコールを提出し、I R B の指導と承認のもとにトランスレーショナルリサーチとして AcPepA の投与を試みる。第一段階としては福祉村病院（岡田秀親、小橋修、奥田研爾）および名古屋市立大学病院（祖父江和哉、戸苅創）において薬剤耐性菌により敗血症（ゼブシス）病態で重篤な患者に対して家族の書面による了解のもとに AcPepA を点滴静注液に添加して効果と副作用の有無の解析を行う。AcPepA は従来の治療法に追加する形で点滴静注を行うが、その際、種々のモニターを活用して治療効果の情報を収集しながら患者の救命に当たる。ペプチド剤は cGMP レベルの製剤を株式会社バイオロジカ社に委託合成したものを使用する。治療効果の評価は C R P 値の改善、高体温の鎮静化、心拍数の正常化、血圧

の正常化などをモニター解析1週間以上継続するとともに、4週間ごの生存率を解析する。患者での明確な救命効果を確認できれば、大手製薬企業に大規模臨床治験の実施について協力を求めて、薬剤としての承認申請を目指す。

ゼブシス患者の救命薬として、米国では Activated Protein C (ACP) が Xigsis として FDA 承認薬とされているが、脳出血などの出血亢進副作用が大きな障害となっている。AcPepA が実用化されれば、米国で年間30万人の死亡者を出しているゼブシスの救命薬として大きな貢献をすることができるだろう。

E. 結論

カニクイザル及びブタ新生児のゼブシスショックモデルを用いた実験動物で治療効果を立証することができた。急性毒性試験などで安全性を確かめることができた。試験管内安全性試験としては変異原性試験、細胞機能障害試験なども実施したが、異常所見は検出されなかった。さらに、反復毒性試験なども、平成1年5月には結果が出揃い安全性が確認できる予定である。その知見をもとに福祉村病院のIRB（倫理委員会及び治験委員会）に健常人での安全性臨床試験（第I相安全性臨床試験）の実施申請を行い、臨床試験を実施する予定である。引き続き、医師主導型臨床治療研究に於いて患者での明確な救命効果を確認できれば、大手製薬企業に大規模臨床治験の実施について協力を求めて、薬剤としての承認申請を目指すことができる。

F. 健康危険情報

前臨床安全性試験の全ての項目に於いて健康危険をもたらす副作用は認めていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Okada,H., Ono,F., Terao,K., Okada,A., Asai,S., Campbell,W., Mizue,Y., Suzuki,K., Okada,N. C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS. *Mol. Immunol.* 45: 4113 (2008)

2. 学会発表

XXII International Complement

Workshop (Basel, Sept. 28 –Oct. 2, 2008)

C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS.:

Okada,H., Ono,F., Terao,K., Okada,A., Asai,S., Campbell,W., Mizue,Y., Suzuki,K., and Okada,N.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許第4106691号「アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド」

特許権者：岡田秀親、岡田則子

発明者：岡田秀親、岡田則子、藤田恵美子

特許申請（特願2008-288523「SIRS患者を救命するためのペプチド組成物」平成20年11月11日出願）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

最終報告書

本写しは原本と相違ありません

スギ生物科学研究所株式会社

2009年4月6日

試験責任者 國枝正幹 印

試験表題: AcPepA のラットを用いた3日間反復静脈内投与による用量設定試験

試験番号: FBM 08-2522

スギ生物科学研究所株式会社

試験責任者署名:

國枝 正幹 (印)

國枝正幹

2009年4月6日

本報告書は表紙を含む54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	5
8. 担当責任者	5
9. 業務分担及び試験従事者の氏名	5
10. GLP 及びガイドライン	5
11. 信頼性保証	6
12. 動物倫理	6
13. 試験関係資料の保存	6
14. 要約	7
15. 試験材料及び方法	8
15.1. 被験物質及び投与検体	8
15.2. 使用動物及び飼育環境	8
15.3. 個体及びケージの識別方法	10
15.4. 群分け	10
15.5. 群構成及び投与量	10
15.6. 投与量の設定理由	11
15.7. 投与	11
15.8. 観察、測定及び検査	11
15.9. 統計学的処理	15
16. 試験結果	16
16.1. 一般状態	16
16.2. 体重測定	16
16.3. 摂餌量測定	16
16.4. 血液学的検査	16
16.5. 血液生化学的検査	16
16.6. 病理学的検査	16

16.7. トキシコキネティクス (TK)	17
17. 考察及び結論	17
18. 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及び 試験計画書に従わなかったこと	18

Fig. 1 Body weights of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Fig. 2 Food consumption of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 1 Clinical signs of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 2 Body weights of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 3 Food consumption of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 4 Hematology in rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 5 Blood chemistry in rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 6 Gross pathological findings in rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 7-1 Organ weights of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 7-2 Relative organ weights of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 8 Histopathological findings in rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Table 9 Plasma concentration of AcPepA in rats after intravenous administration of AcPepA

Appendix 1-1, 1-2 Clinical signs during quarantine period

Appendix 1-3, 1-4 Body weights during quarantine period

Appendix 2-1, 2-2 Clinical signs of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Appendix 2-3 Clinical signs of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days - TK group

Appendix 3-1 Body weights of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Appendix 3-2 Body weights of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days - TK group

Appendix 4 Food consumption of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Appendix 5-1 - 5-3 Hematology in rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Appendix 6-1 - 6-3 Blood chemistry in rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Appendix 7-1 - 7-3 Organ weights of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Appendix 7-4 - 7-6 Relative organ weights of rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

Appendix 8 Histopathological findings in rats treated intravenously with AcPepA for 3 days

1. 試験表題

AcPepA のラットを用いた 3 日間反復静脈内投与による用量設定試験

2. 試験番号

FBM 08-2522

3. 試験目的

AcPepA をラットに静脈内投与した際の毒性を検索し、2 週間反復投与毒性試験の用量を設定する目的で、ラットに 3 日間静脈内投与し、その毒性について検討した。同時に経時的なトキシコキネティクス (TK) 測定による血中濃度推移の評価も行った。

4. 試験施設

スギ生物科学研究所株式会社

(旧：株式会社富士バイオメディックス 小淵沢総合研究所)

〒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

岡田秀親

6. 試験実施期間

試験期間	2008 年 12 月 8 日 ～ 2009 年 4 月 6 日
試験開始日	2008 年 12 月 8 日
動物受入日	2008 年 12 月 8 日
群分け日	2008 年 12 月 12 日
毒性群投与日	2008 年 12 月 15 日～17 日
毒性群剖検日	2008 年 12 月 18 日
TK 測定群投与及び採血日	2008 年 12 月 19 日
試験終了日	2009 年 4 月 6 日

7. 試験責任者

國枝正幹

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

石原 勝

飼育, 投与, 観察, 測定

高尾修治

血液学的検査

諸角芳友

血液生化学的検査

塚原みゆき

病理学的検査

江田 景

統計学的処理

正木文夫

9. 業務分担及び試験従事者の氏名

検疫, 馴化

高尾修治, 赤根弘敏, 國枝正幹

投与, 一般状態観察, 測定

高尾修治, 赤根弘敏, 國枝正幹, 久保寺慧,

小松弘幸, 末岡綾乃

採血, 分離 (TK)

高尾修治, 坂口靖江, 千原愛美, 河原田奈美,

宮下良平

採血, 分離

國枝正幹, 諸角芳友, 塚原みゆき

血液学的検査

諸角芳友, 塚原みゆき, 葛岡 律

血液生化学的検査

塚原みゆき

剖検

江田 景, 楫野恵美子, 蛭間正巳, 小林吉彦,

石原 勝, 赤根弘敏, 高尾修治, 小林立弥,

杉山 賢

病理組織標本作製

江田 景

病理組織学的検査

江田 景

統計学的処理

正木文夫

被験物質の管理

高橋善康

投与検体の調製

國枝正幹, 高尾修治

10. GLP 及びガイドライン

本試験は非 GLP とした。

11. 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）を添付する。

12. 動物倫理

本試験は、当施設の動物実験承認規定に基づいて実施する（承認番号：2008-170）。

13. 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：試験計画書（原本）、最終報告書（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年間保存する。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。

14. 要約

AcPepA の3日間反復静脈内投与による毒性及び全身への暴露を評価し、2週間反復投与毒性試験の用量を設定する目的で、6週齢のCD(SD)ラットを用いて AcPepA 推定臨床投与量の10倍で、物理的投与可能量である80 mg/kg 群(20 mg/kg の急速投与及び60 mg/kg の1時間持続投与)、5倍である40 mg/kg 群(10 mg/kg の急速投与及び30 mg/kg の1時間持続投与)及び対照群(生理食塩液)の計3群、1群雌雄各7匹を設定し、3日間の反復静脈内投与を行った。一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査を行い、剖検して病理組織学的検査を実施した。さらにTK測定を行った。

その結果、死亡例はなく、諸検査においても、被験物質に関連する変化はみられなかった。

TKでは、持続投与終了直後、投与による暴露が確認されたが、投与終了後30分以降の血中濃度はいずれの時点においても検出限界以下で、投与終了後は速やかな血中濃度の減少が認められた。

以上の結果、本試験の条件下では3日間反復投与毒性はないものと判断された。

15. 試験材料及び方法

15.1. 被験物質及び投与検体

15.1.1. 被験物質

名称：AcPepA

ロット番号：2K08045

供給元：株式会社バイオロジカ（NeoMPS）

性状：凍結乾燥品 (in compliance with Good Manufacturing Practices)

含量：97.7%

溶解性：4 mg/mL in saline

保存条件：冷凍（-20℃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℃、許容範囲：-40℃～-20℃）（実測値：-32℃～-28℃、保存期間：2008年12月5日～12月19日）

取扱い上の注意：マスク及び手袋を着用した。

15.1.2. 媒体

日本薬局方生理食塩液（Lot No. 80513D、扶桑薬品工業株式会社、以下、生理食塩液と記載する）

15.1.3. 投与検体

15.1.3.1. 投与検体の調製

用量群毎に被験物質の必要量を電子天秤で正確に量り取り、それぞれ生理食塩液に溶解し、既定量にメスアップして2及び4 mg/mL液を調製した。調製後、調製液をフィルター（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検体とした。投与検体は用時調製とした。

15.1.3.2. 残余投与検体の処理

焼却処分した。

15.2. 使用動物及び飼育環境

15.2.1. 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，2008年12月8日

週齢・性別・数：発注時；5週齢，雌雄各39匹

投与開始時；毒性群 6週齢，雌雄各21匹

TK測定群 6週齢，雌雄各8匹

体重範囲：雄116～142 g，雌82～107 g（受入れ時）

雄183～215 g，雌133～155 g（毒性群投与開始時）

雄223～251 g，雌156～178 g（TK群投与日）

検疫，馴化：受入時に外観（被毛，眼，耳鼻，口腔，尾及び四肢），行動観察の検査を行い，異常は認められなかったため，5日間の検疫（馴化を兼ねる）を行った．検疫期間中，一般状態の観察を1日1回，体重測定を受入日及び検疫終了日に行い，検疫終了日に動物の健康状態を判定した．また，検疫終了日に群分けを行った．検疫期間中の動物の症状観察及び体重測定において，動物の健康状態に異常は認められなかった（Appendix 1-1～1-4）．

15.2.2. 飼育環境

動物室：バリアシステム飼育室（第1動物実験棟，D-3室）

ケージ：自動洗浄式ラックに取り付けた金網床式金属製ケージ（W15×D30×H17 cm）で個別飼育した．

温度：22℃（許容範囲19～25℃）（実測値：2008年12月8日～19日20.5～25.1℃）

相対湿度：50%（許容範囲30～70%）（実測値：2008年12月8日～19日44.3～62.0%）

換気回数：10～15回／時

照明時間：7～19時

床清掃：毎日，床面を清掃し，ハイアミン液（第一三共株式会社）100倍液で清拭消毒した．

飼料：オートクレーブ滅菌した固型飼料CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社，Lot No. 080904）．給餌器に入れ，自由摂取させた．

飲料水：紫外線照射した公共水道水，給水装置により自由摂取させた．

汚染物質の分析：飼料の汚染物質の分析は全使用ロットについて供給者から Eurofins Scientific 社に依頼し，その結果を入手した．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，実施した．その結果，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）及び水質基準に適合している事を確認した．

15.3. 個体及びケージの識別方法

個体識別：受入日に背側尾根部に油性インクで記入した個体番号を用いて識別した。

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、投与量、動物番号及び個体番号を記したカラーラベルを付けた。

15.4. 群分け

群分けは、検疫終了日に実施した。検疫期間中（馴化期間を含む）に異常の認められない動物について、FujiBiomedix Laboratory System を用いて検疫期間中の体重変動及び検疫終了日の体重を指標とし、両指標の分布から外れている個体を除き、雌雄各 29 匹を残した。残した動物について、検疫終了日の体重を基に層別無作為に毒性群の 1 群雌雄各 7 匹 3 群、TK 測定群の 1 群雌雄各 4 匹 2 群に振り分け、各群内において動物番号を付けた。群分け後、投与日までは一般状態観察を 1 日 1 回実施した。余剰動物は群分け終了後、試験系から除外した。

15.5. 群構成及び投与量

以下のとおり 5 群とした。

毒性群

投与区分	投与量(mg/kg)		投与液濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）	
	急速投与	持続投与		雄	雌
1 対照（媒体）	0	0	0	7 (1101-1107)	7 (2101-2107)
2 AcPepA	10	30	2	7 (1201-1207)	7 (2201-2207)
3 AcPepA	20	60	4	7 (1301-1307)	7 (2301-2307)
総計				21	21

投与液量：急速投与；5 mL/kg，持続投与；15 mL/kg

TK 測定群

投与区分	投与量(mg/kg)		投与液濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号)	
	急速投与	持続投与		雄	雌
4 AcPepA	10	30	2	4*(1401-1404)	4*(2401-2404)
5 AcPepA	20	60	4	4*(1501-1504)	4*(2501-2504)
総計				8	8

* : TK 測定群動物のうち1例 (番号末尾 : 04) は予備動物として投与した。

15.6. 投与量の設定理由

AcPepA の臨床での投与は、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。本試験では、臨床投与方法に準じて 2 分間で物理的に急速静脈内投与可能な最大用量である 20 mg/kg (臨床投与量の 10 倍) を投与し、その後の 3 時間持続投与についても臨床投与量の 10 倍である 60 mg/kg を投与した (ラットを 3 時間保定器に入れ、持続投与することは困難であるため 1 時間とした)。したがって、1 日あたりの投与量は 80 mg/kg/day であった。低用量にはその 1/2 量の 40 mg/kg を設定した。

15.7. 投与

投与経路及び理由：ヒトにおける適用経路に準じて、静脈内投与とした。

投与方法及び理由：ラットの静脈内投与として一般的な尾静脈投与とした。ディスプレイ・ブールシリンジに接続した翼状針を静脈内に刺入し投与した。

投与期間、投与回数及び理由：2 週間反復投与試験の投与量設定に必要な情報が得られる投与期間として 3 日間の反復投与とし、1 日 1 回投与した。

投与時間：ヒトの投与時間を想定して、2 分間急速静脈内投与した後、1 時間持続投与した。

投与液量：急速投与では 5 mL/kg、持続投与は 15 mL/kg とし、最近時の体重から算出した。

投与速度：急速投与はそのまま投与した。持続投与はハーバードデジタルインフュージョンポンプ (Model-11, Model-11 E Econoflo, HARVARD APPARATUS) を用いて、投与速度を設定した。

15.8. 観察、測定及び検査

投与開始日を投与第 1 日とした。

15.8.1. 一般状態

全例について、1日3回（投与前、投与中、投与直後～約1時間後）、生死及び一般状態を観察した。なお、剖検日は1回、TK測定群については1日1回実施した。

15.8.2. 体重

毒性群全例について、投与開始日（投与前）、投与第2、3日及び剖検日に電子天秤（ザルトリウス株式会社）を用いて測定した。ただし、剖検日の体重は絶食のため、体重評価から除いた。

TK測定群全例については、投与日（投与前）に実施した。

15.8.3. 摂餌量

毒性群全例について、投与開始前1回、投与第1～2日及び2～3日の1日間の摂取量を、電子天秤（ザルトリウス株式会社）を用いて測定した。

15.8.4. 血液学的検査

毒性群全例について、剖検時に、イソフルラン麻酔下で腹大動脈から採血し、以下の項目を検査した。

測定はEDTA-2K加血液を用いた。ただし、プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の測定には3.2%クエン酸Na添加血漿を用いた。

白血球分画については、Wright染色塗抹標本の作製も行った。

項目と方法

No.	測定項目	単位	測定方法
1	赤血球数 (RBC)	$10^4/\mu\text{L}$	シーセルフローDC検出法
2	白血球数 (WBC)	$10^2/\mu\text{L}$	フローサイトメトリー法
3	ヘマトクリット値 (Ht)	%	赤血球パルス波高値検出法
4	ヘモグロビン量 (Hb)	g/dL	SLS-ヘモグロビン法
5	平均赤血球血色素量 (MCH)	pg	計算
6	平均赤血球容積 (MCV)	fL	計算
7	平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	g/dL	計算
8	網状赤血球数 (Ret)	%, $10^4/\mu\text{L}$	フローサイトメトリー法
9	血小板数 (Plt)	$10^4/\mu\text{L}$	シーセルフローDC検出法
10	プロトロンビン時間 (PT)	sec	光散乱検出方式

11	活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	sec	光散乱検出方式
12	白血球分画	%, $10^3/\mu\text{L}$	フローサイトメトリー法

白血球分画：リンパ球 (Lym), 好中球 (Neut), 単球 (Mono), 好塩基球 (Baso), 好酸球 (Eosi)
測定機器

No. 1~9, 12: 多項目自動血球分析装置 (XT-2000iV, シスメックス株式会社)

No. 10, 11: 全自動血液凝固測定装置 (CA-1500, シスメックス株式会社)

15.8.5. 血液生化学的検査

毒性群全例について、血液学的検査用採血に続いて腹大動脈から同様に採取した血液を用いた。測定は採取した血液を1時間室温放置後、3000 rpm, 4°C, 15分間遠心して得られた血清を用いた。ただし、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及び乳酸脱水素酵素の測定にはヘパリンナトリウム (ノボ・ヘパリン注 10,000, 持田製薬株式会社) 加血漿を用いた。

項目と方法

No.	測定項目	単位	測定方法
1	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	IU/L	酵素レート法 (ヘンリー法)
2	アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	IU/L	酵素レート法 (ヘンリー法)
3	アルカリホスファターゼ (ALP)	IU/L	2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール酵素法
4	乳酸脱水素酵素 (LDH)	IU/L	酵素レート法
5	γ-グルタミルトランスアミナーゼ (γ-GTP)	IU/L	酵素レート法 (Szasz 法)
6	グルコース (Glu.)	mg/dL	ヘキシキナーゼ法
7	総コレステロール (T.Cho.)	mg/dL	コレステロール酸化酵素法
8	トリグリセリド (TG)	mg/dL	酵素法
9	リン脂質 (PL)	mg/dL	酵素法
10	総タンパク (TP)	g/dL	ビュレット法
11	アルブミン (Alb.)	g/dL	BCG 法
12	アルブミン/グロブリン比 (A/G 比)		計算
13	尿素窒素 (BUN)	mg/dL	酵素法
14	クレアチニン (Crea.)	mg/dL	Jaffé 法
15	総ビリルビン (T.Bil.)	mg/dL	ジブゾノ法
16	ナトリウム (Na)	mEq/L	電極法
17	カリウム (K)	mEq/L	電極法
18	クロール (Cl)	mEq/L	電極法