

200917007A

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  
(H21 - トランス - 一般 - 003) に関する研究  
平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 秀親

平成22(2010)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 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	7
AcPepA の細菌を用いる復帰突然変異試験	41
AcPepA のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	59
AcPepA のラット小核試験	79
AcPepA のhERG細胞を用いたK <sup>+</sup> チャンネルへの影響	95
AcPepA の無麻酔サルを用いた心血管系、呼吸数及び行動に及ぼす影響	109
AcPepA のサルを用いたLDHの検討	145
II. 分担研究報告	
1. アナフィラトキシンC5a阻害ペプチドの抗炎症機序の解析	169
岡田則子	
2. アナフィラトキシン阻害ペプチドの活性分析に関する研究	174
今井優樹	
3. AcPepAの安定性及び代謝物に関する研究	176
前田康博	
III. 研究成果の刊行物・別刷	177

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）  
（総括）研究報告書

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

C5a アナフィラトキシンは、敗血症や多臓器不全等の重篤な病態の要因のひとつである。C5a に対する抗体が盲腸結札穿孔腹膜炎モデルなどで有効性を発揮することが報告されている。我々は、C5a アナフィラトキシンに対して特異的に強い阻害作用を持つ17アミノ酸から成るペプチド PepA を創生した。PepA は分子比 1 : 10 で C5a の活性を抑制した。100%のラットがショック死を起こす動物実験モデルにおいて、PepA の静脈注射で全例を救命できた。PepA のアミノ末端（N 末）のアラニンをアセチル化した AcPepA はさらに強い効果を発揮することが分かった。致死量の LPS（4mg/kg）を投与したカニクイザルに 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札穿孔して起こした致死的急性腹膜炎モデル（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。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ために必要な前臨床安全性試験や実験動物での治療効果の確認を行う。サルでの安全性が確認されたなら、健常人での安全性確認も試みたい。

研究分担者氏名・所属機関名

岡田秀親	福祉村病院長寿医学研究所	先端医療担当副院長
小橋 修	福祉村病院	病院長
奥田研爾	福祉村病院長寿医学研究所	研究所長
戸苺 創	名市大医・新生児学	教授（理事長）
祖父江和哉	名市大院・危機管理医学	教授
岡田則子	名市大院・医学研究科・免疫学	教授
間瀬光人	名市大医・脳神経外科	准教授
多田豊曠	名市大看護・病理形態学	教授
大塚隆信	名市大医・整形外科学	教授
宮原 亮	京大医・呼吸器外科	助教
今井優樹	名市大院・医学研究科・免疫学	講師
川浪憲一	名市大院・医学研究科・情報管理教育センター	助教
黒野幸久	名市大院・薬学研究科・病院薬剤	教授
前田康博	名市大院・薬学研究科・分析化学	講師
竹山廣光	名市大医・外科学	教授

#### 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。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」)。このC5a阻害ペプチドの臨床治療研究を行うため、前臨床安全性試験をカニクイザルでも実施し、急性毒性などの副作用のないことを確認した。さらに慢性毒性試験も実施中である。その結果を基に、各施設のIRB (倫理委員会な

ど)の承認を得たプロトコールで医師主導型臨床治療研究を実施する。

#### B. 研究の方法

1) 前年度に引き続き前臨床安全性試験をスギ生物科学研究所(株)に委託して実施する。急性毒性と慢性毒性のほか、催奇性、発がん性についての解析も実施する。

2) 肺炎などで38℃以上の発熱をした感染患者の血漿を継時的に採取し、血漿中のサイトカイン等の他に、C5a、HMGB1などの推移を測定して、C5aと病態との関連性を解析する。

3) 前臨床安全性試験で安全性の確証がとれた段階で、正常人での安全性試験を実施するための実験計画を作成し福祉村病院及び名古屋市立大学病院のIRB (臨床試験審査委員会)に臨床研究実施の申請を行う。臨床治験登録 (社団法人日本医師会治験促進センター)はPhase I試験ID「JMA-IIA00027」で登録した (平成21年4月6日登録)。催奇性や発がん性のデータがそろっていない段階では、正常人被験者は50歳以上に限定して実施計画を立てる予定である。投与量の基準としては、カニクイザル及びブタ新生児で救命効果が確認されている2mg/kgとする。最初は、ボラスの1回投与とし、副作用などの所見を認めないことを確認したうえで、2mg/kg/hrの3時間継続投与試験を行う。

4) 健常人での安全性を確認できた段階で、SIRS (ゼプシス) 患者での臨床治療

研究計画を福祉村病院および名古屋市立大学病院のIRBに提出し計画の承認を求める。

- 5) 重篤な感染症患者に対して、患者（又は家族）が臨床実験治療を書面です承して希望する場合には、IRB（倫理委員会・臨床試験審査委員会）の承認を得た上でトランスレーショナルリサーチとしてC5a阻害ペプチドであるAcPepAの投与を試みる。患者は50歳以上に限定して実施する。第一段階としては福祉村病院（小橋修、奥田研爾）および名古屋市立大学病院（祖父江和哉、戸苺創）において薬剤耐性菌により敗血症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詳細な解析を行う。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)バイオロジカ社に委託合成したものを使用する。

（倫理面への配慮）

- 1) 各研究者が所属する研究機関に設置されている「動物実験委員会」又は「動物倫理委員会」でのプロトコルの承認を前提とし、あわせて全体計画に対して「医薬基盤研究所・動物実験委員会」の承認を得た後に動物実験を開始する。
- 2) 個体レベルでの実験プロトコルの作成にあたっては、法律第105号「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守するとともに、「医薬基盤研究所・サル類を用い

る実験指針」の精神に則り、苦痛軽減の具体策を詳細に記述する。

- 3) トランスレーショナルリサーチ（臨床研究）の実施に当たっては、インフォームドコンセントの方法も含めた実験治療計画書を作成し、夫々の実施施設である福祉村病院倫理委員会及び名古屋市立大学大学院医学研究科の倫理委員会でトランスレーショナルリサーチの承認を受ける。

### C. 研究結果

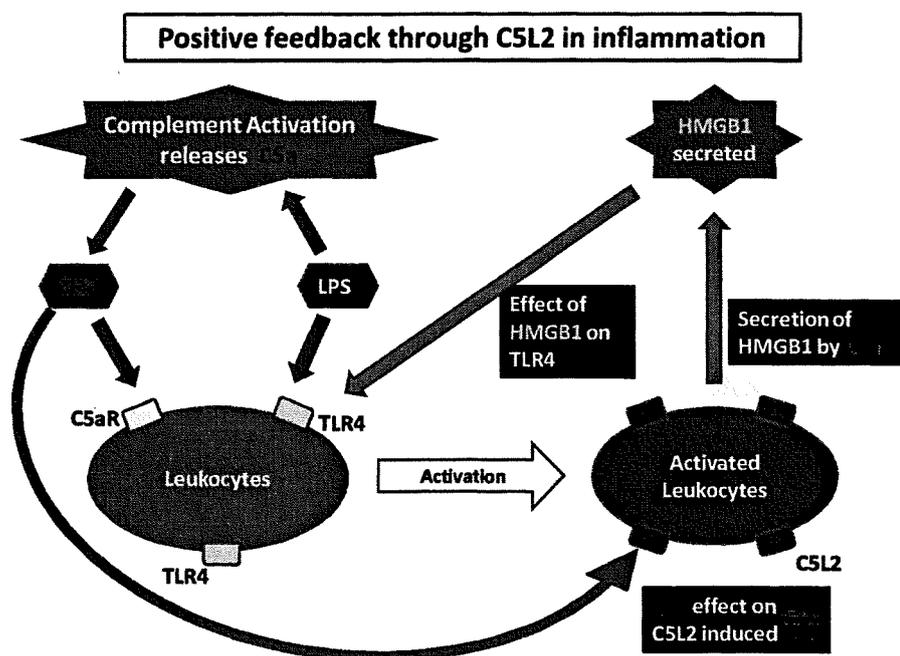
致死量のLPS（4mg/kg）を投与したカニクイザルにAcPepAを静脈内持続投与して治療したカニクイザルの血漿を解析したところ、AcPepAの投与でHMGB1の上昇が抑えられていることが分かった。また、ブタ新生児の回盲部を結紮穿孔して起こした致死的急性腹膜炎モデル（CLPモデル）でも救命効果を認めることができた（9時間で死亡するブタ新生児CLPモデルでcGMP-AcPepAの投与で24時間延命できた）が、この場合にもAcPepAの投与でHMGB1の上昇が抑えられていることが分かった。その他のサイトカインの動態を解析した結果、C5aを阻害することにより、HMGB1の放出を抑えサイトカインストームの悪循環を防ぐことが分かった。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。C5aは従来から知られていたC5a receptor（C5aR）の他に新たに発見されたC5a第二レセプターであるC5L2にも反応し、この刺激が炎症細胞にHMGB1を放出させていると考えられた。

サル及びラットでの前臨床安全性試験

で有害事象は検出されなかったので、福祉村病院倫理委員会の承認を得て健常人での安全性試験を実施した。健常人6名に付いて、インフォームドコンセントを充分行ったうえで、20 mg/kg AcPepAを生理食塩水に溶解（120 mg/180 ml）して、これを2時間かけて点滴静注を行った。心電図、血圧計、SpO2、呼吸数などを継続的にモニターすると共に、採血を時間ごとに行い、生化学的検査及び血球検査

等も実施した。LDHの上昇を若干認めた場合もあったが、それ以外には有害事象を認めなかった。詳細に解析したところミオグロビンの上昇を若干認めた場合もあったので、カニクイザルにAcPepAを投与してLDHやミオグロビンなどの解析を行うと共に、病理組織学的解析も実施しなおした。その結果、筋繊維に若干の炎症細胞の反応が認められたので、今後留意すべきポイントと考えられた。

【Fig. 1. C5a阻害ペプチドがサイトカインストームによるSIRS発症を抑制する機序：白血球が活性化されるとC5L2が発現誘導され、C5aの作用で放出されたHMGB1がTLR4を再刺激してサイトカインストームの増悪フィードバック反応を起こす。C5a阻害がこの反応を遮断する】



#### D. 考察

C5a アナフィラトキシン阻害ペプチドであるAcPepAの投与により、致死的炎症病態（ゼブシス）にあるカニクイザルやCLP処置ブタ新生児敗血症の病態を抑制できるメカニズムにはHMGB1の放出抑制が重要であることが分かった。当初

は、C5aを抑制することにより、C5aが白血球などの炎症細胞を刺激する作用をC5a阻害ペプチドのAcPepAが抑えることにより過度な炎症を防ぐと考えていたが、TNF-alphaなどの放出は殆ど抑制しない点が不可解であった。サイトカインなどの解析の結果、HMGB1の上昇が

AcPepA の投与で抑えられることが、LPS 投与カニクイザルでも CLP 処置ブタ新生児でも認められたので、C5a が C5aR に反応するのを AcPepA が抑制することよりも、C5a 第二レセプターである C5L2 に反応して、HMGB1 を放出させる作用を抑えることが重要であると考えに至った (Fig. 1 参照)。

白血球に LPS や C5a が作用すると白血球が活性化されて、C5a 第二レセプターの C5L2 を発現するようにさせる。白血球の C5L2 に C5a が反応すると HMGB1 を放出するので、その放出された HMGB1 が別の白血球の TLR4 に作用して白血球は TLR4 に LPS が作用したと同様に活性化され、更に C5L2 の発現を促進することになる。この循環が炎症増悪をもたらすサイトカインストームであるので、AcPepA が C5a を阻害することにより、この増悪循環を断ち切り、ゼプシスの様な過剰炎症反応病態を抑制して治療効果をあげると考えてよい。

健常人への AcPepA 投与では、LDH の若干の上昇を認める所見も見られたが、カニクイザルで AcPepA の大量投与 (15mg/kg) を行って検討したが、組織の間などの所見は認められなかった。今後の検討に於いては、LDH とミオグロビンなどの指標も注意深く解析する必要があると考えられる。

## E. 結論

炎症細胞膜上に炎症時に発現誘導される C5L2 (C5a 第二レセプター) に C5a が反応すると HMGB1 の放出を起こさせ、炎症反応の増悪循環が起こる。この C5a

の作用を AcPepA が抑制することにより HMGB1 の放出が抑制され、炎症増悪が防がれてゼプシス病態の治療に役立つと考えられる。

## F. 健康危険情報

健常人に 180 ml の生理食塩水によるかいした 120 mg AcPepA を 2 時間かけて点滴静注すると、軽度の LDH 上昇を認めることがあったが、それ以外には注目すべき有害事象は認められなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okada, H., et al. An inhibitory peptide of C5a anaphylatoxin rescues monkeys from lethal endotoxin shock by suppressing HMGB1 release. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 投稿中(2010)
- 2) 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)
- 3) Farkas, I., Varju, P., Szabo, E., Hrabovszky, E., Okada, N., Okada, H., Liposits Z. Estrogen enhances expression of the complement C5a receptor and the C5a-agonist evoked calcium influx in hormone secreting neurons of the hypothalamus. **Neurochemistry Int.** 52:846-856 (2008)
- 4) Okada, N., Okada, H., et al. Increased inhibitory capacity of an anti-C5a complementary peptide following acetylation of N-terminal alanine. **Microbiol. Immunol.**, 51, 439-443 (2007)
- 5) Imai, M., Baranyi L, Okada, N., Okada, H. Inhibition of HIV-1 infection by synthetic peptides derived CCR5 fragments. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 353, 851-856 (2007)
- 6) Fujita, E., Okada, H., Okada, N., et al. Inactivation of C5a anaphylatoxin by a

peptide which is complementary to a region of C5a. **J. Immunol.** 172: 6382 -6388 (2004)

- 7) Farkas, I., Okada, N., Okada, H. et al. Complement C5a receptor-mediated signalling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. **J. Immunol.** 170: 5764-5771 (2003)

## 2. 学会発表

戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中西渉、岡田則子、岡田秀親、里見進 「C5aを標的とした補体因子ペプチド AcPepA導入による移植後早期膵島障害の抑制」第56回補体シンポジウム 講演集 46:45-46 (2009)

岡田秀親 「アナフィラトキシン阻害ペプチドに付いての臨床研究と臨床治験」第56回補体シンポジウム 講演集 46:47 (2009)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 「アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド」発明者：岡田秀親・岡田有武、出願日：2005年3月30日、特願2005-97238、出願人：株式会社蛋白質科学研究所
- 2) 「トロンボモジュリンを不活性化するペプチド」発明者：岡田秀親、岡田則子、出願日：2003年2月28日、特願2003-10226、出願人：岡田秀親、岡田則子
- 5) 「HIV-1感染抑制作用を有するアンセンスペプチド」発明者：岡田秀親、岡田則子、今井優樹、出願日：2000年9月13日、特願2000-277747、公開日：2002年3月27日、特開2002-88099、出願人：科学技術振興事業団 号（平成18年9月6日）特許権者：〈独〉科学技術振興機構、

- 6) 「エンドセリン活性抑制剤」特許第3923615（平成19年3月2日）特許権者：岡田秀親；国際特許 PCT/JP94/01658

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 最終報告書

試験表題：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

試験番号：FBM 08-6523

スギ生物科学研究所株式会社

試験責任者署名：

  
清水 茂一

2009 年 2 月 25 日

本報告書は表紙を含む 32 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.....	5
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.....	8
15.2. 媒体.....	8
15.3. 投与検体.....	8
15.4. 使用動物及び飼育環境.....	8
15.5. 個体及びケージの識別方法.....	10
15.6. 投与区分.....	10
15.7. 投与量の設定理由.....	10
15.8. 投与.....	10
15.9. 観察, 測定及び検査.....	11
15.10. トキシコキネティクス (TK).....	14
15.11. データ統計学的処理.....	14
16. 試験結果.....	14
16.1. 一般状態.....	14
16.2. 体重.....	15
16.3. 摂餌量.....	15
16.4. 血液学的検査.....	15

16.5.	血液生化学的検査 .....	15
16.6.	病理学的検査 .....	15
16.7.	TK .....	16
17.	考察及び結論 .....	16
18.	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及び 試験計画書に従わなかつたこと .....	17
Table 1	Clinical signs of monkeys treated intravenously with AcPepA for 3 days	
Table 2	Body weights of monkeys treated intravenously with AcPepA for 3 days	
Table 3	Food consumption of monkeys treated intravenously with AcPepA for 3 days	
Table 4	Hematology in monkeys treated intravenously with AcPepA for 3 days	
Table 5	Blood chemistry in monkeys treated intravenously with AcPepA for 3 days	
Table 6	Gross pathological findings in monkeys treated intravenously with AcPepA for 3 days	
Table 7	Organ weights of monkeys treated intravenously with AcPepA for 3 days	
Table 8	Histopathological findings in monkeys treated intravenously with AcPepA for 3 days	
Table 9	Plasma concentration of AcPepA in intravenous administration of monkeys	
Appendix 1	Clinical signs during acclimation	
Appendix 2	Body weights during acclimation	
Appendix 3	Food consumption during acclimation	
Appendix 4	Hematology	
Appendix 5	Blood chemistry	

1. 試験表題

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

2. 試験番号

FBM08-6523

3. 試験目的

AcPepA をサル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、サルに 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

(旧施設名：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

〒411-8124 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 1 日	～	2009 年 2 月 25 日
試験開始日	2008 年 12 月 1 日		
馴化開始日	2008 年 12 月 1 日		
投与開始日	2008 年 12 月 8 日		
剖検日	2008 年 12 月 11 日		
試験終了日	2009 年 2 月 25 日		

**7. 試験責任者**

清水茂一  
スギ生物科学研究所株式会社 毒性試験部

**8. 担当責任者**

馴化, 飼育, 投与, 観察, 測定	中根史行
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	小林吉彦

**9. 業務分担及び試験従事者の氏名**

馴化	中根史行, 高橋友安, 星合清隆, 杉山 賢, 清 基城, 國枝正幹, 相良聡美
飼育, 投与, 観察, 測定	中根史行, 國枝正幹, 清 基城, 高橋友安, 清水茂一, 相良聡美
採血, 分離 (TK)	中根史行, 高橋友安, 清 基城, 杉山 賢, 河原田奈美
採血, 分離 (血液検査)	高橋友安, 國枝正幹, 諸角芳友, 赤羽且行, 葛岡 律
血液学的検査	鈴木修三, 赤羽且行, 葛岡 律
血液生化学的検査	塚原みゆき, 葛岡 律
剖検	清水茂一, 江田 景, 小林吉彦, 楯 美樹
器官重量測定	楯野恵美子
病理組織標本作製	江田 景, 楯野恵美子, 小林吉彦
病理組織学的検査	小林吉彦
被験物質の管理	高橋善康
投与検体の調製	中根史行

**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した（承認番号 2008-167）。

**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：最終報告書（原本），試験計画書（原本），試験計画書変更書（原本），被験物質及び動物に関する記録，生データ，標本，試験操作記録，その他の記録文書

保存期間：本試験終了後 5 年間保存し，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、4年齢の雄カニクイザル3匹を用いて臨床用量の10倍である20 mg/kgを2分間で急速静注し、その後60 mg/kgを3時間持続静注した。投与期間中、一般状態の観察及び体重並びに摂餌量の測定を行った。最終投与の翌日に血液学的検査及び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。また、投与開始日に経時的に採血を行い、トキシコキネティクス (TK) 測定を行った。

その結果、死亡例はなく、一般状態、体重及び摂餌量に投与期間を通して全例に異常は認められず、AcPepAによる急性毒性はみられなかった。血液生化学的検査でAST、LDH及びCKの軽度の上昇が認められたが、比較的軽度の変動で投与手技による変動と考えられた。剖検で1例の胸腺に小型が認められ、組織学的検査で胸腺にリンパ球の減少がみられたが、他のすべての器官・組織に病理学的変化は認められなかった。投与部位の組織学的検査では、3例ともに血管周囲の出血及び炎症性細胞浸潤、2例に静脈の壊死が認められたが、いずれも投与に起因する変化でAcPepAによる局所刺激性はみられなかった。

TKでは、急速静注直後の血中濃度は43.0 µg/mL、持続静注開始後1時間では1.62 µg/mL及び3時間では1.27 µg/mLで投与による暴露が確認された。投与終了後の血中濃度はいずれの時点においても検出限界下で、投与後の速やかな血中濃度の減少が認められた。

以上により、本試験の条件下では急性毒性及び3日間反復投与毒性のいずれも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

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°C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°C，許容範囲：-40 ~ -20°C)

保存期間及び保存温度：2008年12月5日～10日，-32～-28°C

取扱い上の注意：マスク及び手袋を着用した。

### 15.2. 媒体

日本薬局方生理食塩液 (ロット番号：71111D，扶桑薬品工業株式会社，以下，生理食塩液と記載する)

### 15.3. 投与検体

#### 15.3.1. 調製方法

電子天秤 (ME235S，ザルトリウス株式会社) で被験物質を 1200 mg 秤量し，媒体 (生理食塩液) に溶解後，メスフラスコで 300 mL にメスアップして 4 mg/mL の溶液を調製した。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。

#### 15.3.2. 残余投与検体の処理

焼却処分した。

### 15.4. 使用動物及び飼育環境

#### 15.4.1. 使用動物

動物種及び品種：サル，Cynomolgus Monkey (カニクイザル)

動物選択の理由：本動物種及び品種は医薬品毒性試験に汎用されており，バックグラウンドデータが豊富にあり，実験動物として安定供給されているため。

輸入：株式会社ケアリー

販売：株式会社日本医科学動物資材研究所

生産国：ベトナム

年齢・性別・数：4 年齢（試験開始時），雄，4 匹

体重範囲：3.66～3.85 kg（馴化最終日）

検疫：株式会社ケアリーにて実施した検査（外観，行動並びに B-ウイルス，赤痢菌，サルモネラ，TB 及び消化管寄生虫の検査）により健康であることが確認された動物を当施設に搬入した。搬入後，2 週間の検疫期間中，B-ウイルス及び赤痢菌検査並びに一般状態観察を行い，健康であることを確認した。

選別：検疫を終了したスギ生物科学研究所株式会社の所有動物 5 匹から試験開始前に採血し，血液学的検査及び血液生化学的検査を行って，異常の認められない動物 4 匹を選別した。なお，その結果は投与開始前のデータとして採用した。

馴化：試験開始後，投与開始前日まで第 3 動物実験棟 S2-8 室で馴化飼育を行った。この間，一般状態の観察を毎日，体重及び摂餌量を馴化最終日に 1 回測定した。同時に，モンキーチェアに対する馴化を行った。

#### 15.4.2. 飼育環境

動物室：第 3 動物実験棟，S2-8 室

ケージ：ステンレス製ケージ（W65×D70×H78 cm）で個別飼育した。

温度：22.2～25.6°C（設定：23°C，許容範囲：20～28°C）

湿度：31.0～77.3%（設定：50%，許容範囲：30～80%）

換気回数：10～15 回／時

照明時間：6～18 時（ただし，TK 採血日は作業終了まで点灯した）

清掃：毎日，飼育ケージ及び飼育室の床を酸化水散布にて消毒した後，水洗した。

飼料：1 匹 1 日当たり固型飼料 PS（ロット番号：080922，オリエンタル酵母工業株式会社）70 g を午前中（投与中は投与直後）に与えた。なお，血液学的検査及び血液生化学的検査の採血及び剖検の前日は夕刻（16 時以降）に残餌を取り除いた。剖検日の給餌は行わなかった。

飲料水：公共水道水を自由摂取させた。

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。得られた結果は，当施設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

していることを確認した。

#### 15.5. 個体及びケージの識別方法

個体識別：入荷時，大腿部外側に入墨した通し番号（個体番号）で識別した。

ケージの識別：馴化期間中は試験番号，性別及び個体番号を記したラベルを，投与期間中は試験番号，性別，投与量，動物番号及び個体番号を記載したラベルを付けて識別した。

#### 15.6. 投与区分

以下のとおり 1 群とした。

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
① AcPepA	20	60	4	3 (111-113)

\*動物 4 匹のうち 1 匹は待機動物としたが，3 匹に異常がなかったため投与を行わず，スギ生物科学研究所株式会社の所有動物とした。

#### 15.7. 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。したがって，1 日あたりの投与量は 80 mg/kg/day であった。

#### 15.8. 投与

投与経路及び理由：臨床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：サルの静脈内投与として一般的な伏在静脈投与とした。留置針を静脈内に刺入し，インジェクションプラグを装着した。ディスプレイブルシリンジに接続した翼静針をインジェクションプラグに刺入し投与した。投与はモンキーチェアに動物を保定して行った。

投与回数，期間及び理由：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：臨床の投与時間に準じて，2 分間急速静脈内投与した後，3 時間持続投与した。

投与液量：急速投与は 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 E Econoflo, HARVARD APPARATUS) を用いて, 投与速度を設定した。

## 15.9. 観察, 測定及び検査

投与開始日を投与第 1 日とした。

### 15.9.1. 一般状態

全例について, 馴化期間中は 1 日 1 回 (午前), 投与期間中は 1 日 3 回 (投与前, 投与中, 投与終了直後～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 回実施した。

### 15.9.2. 体重

全例について, 馴化最終日及び投与期間中は毎日及び剖検日に測定した。

### 15.9.3. 摂餌量

全例について, 馴化最終日及び投与期間中は毎日残量を測定し, 前日の給餌量 (70 g) から 1 日当たりの摂餌量を算出した。なお, 血液学・血液生化学的検査の採血日及び剖検日の前日は, 絶食時に残量を測定した。

### 15.9.4. 血液学的検査及び血液生化学的検査

全例について, 剖検日の剖検前に, 無麻酔下でモンキーチェアに固定して大腿静脈から採血し, 以下の項目を検査した。検査前日は夕刻 (16 時以降) に残餌を取り除いた。

#### 15.9.4.1. 血液学的検査

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 加血漿を用いた。なお, 白血球分画については, Wright 染色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)	$10^4/\mu\text{L}$	シースフロー 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)	$10^4/\mu\text{L}$	シースフロー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	%, $10^2/\mu\text{L}$	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)

#### 15.9.4.2. 血液生化学的検査

測定は採取した血液を1時間室温放置後、3000 rpm, 4°C, 15分間遠心分離して得られる血清を用いた。ただし、乳酸脱水素酵素の測定にはヘパリン Na 加血漿を用いた。タンパク分画は総タンパク、アルブミン、A/G 比等の関連検査項目に被験物質投与によると思われる影響が認められなかったため実施しなかった。

##### 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	クレアチンキナーゼ (CK)	IU/L	酵素レート法 (Rosalki 法)
7	グルコース (Glu.)	mg/dL	ヘキソキナーゼ法
8	総コレステロール (T.Cho.)	mg/dL	コレステロール酸化酵素法
9	トリグリセリド (TG)	mg/dL	酵素法
10	リン脂質 (PL)	mg/dL	酵素法