

13. 被験物質及び媒体

13.1. 被験物質

名称：AcPepA

ロット番号：2K08045

供給元：株式会社バイオリジカ (NeoMPS)

性状：凍結乾燥品

含量：97.7%

溶解性：4 mg/mL in saline

入手量：2 g

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)

取扱い上の注意：マスク及び手袋を着用する。

13.2. 媒体

名称：日本薬局方生理食塩液

ロット番号：80513D

製造元：扶桑薬品工業株式会社

保存条件：室温

14. 適用検体の調製方法

被験物質 650.04 mg 及び 325.04 mg を秤量し, 媒体: 灌流液 = 1:9 の溶液 10 mL 及び 5 mL に溶解して高用量群の調製原液を調製した. 高用量群の調製原液を段階希釈し中用量群及び低用量群の調製原液を調製した. 調製原液 500 µL を灌流液で 50 mL にメスアップして適用検体を調製した.

15. 試験系

15.1. 細胞株

hERG (human ether-a-go-go related gene) 導入 HEK-293 細胞 (human embryo kidney 293 cell) を用いた.

15.2. 細胞株選択の理由

本細胞株は、薬物誘発性 QT 延長と関連が深いとされる hERG チャネルを安定的に発現させたもので、hERG 電流測定に汎用されているため。

15.3. 入手先

Cytomix Limited

16. hERG 細胞培養

16.1. 培養液

非働化した牛胎児血清 (FBS, Lot No. 1350820, 有効期限: 2011 年 7 月, Invitrogen Corporation) を 10%, Non essential amino acids (Lot No. 453203, 有効期限: 2009 年 5 月 30 日, Invitrogen Corporation) を 1% 及び Geneticin[®] (Lot No. 473075, 有効期限: 2009 年 11 月 1 日, Invitrogen Corporation) を 400 µg/mL 含む MEM (Lot No. 510522, 有効期限: 2009 年 10 月 30 日, Invitrogen Corporation) を用いた。

16.2. 培養条件

継代培養用の細胞はコラーゲンコートした 60 mm のディッシュ (Lot No. 1140801, 有効期限: 2009 年 10 月, AGC テクノグラス株式会社) で培養した。培養は炭酸ガス培養器 (エスペック株式会社) を使用し、培養期間は 2009 年 3 月 12 日～2009 年 3 月 18 日、培養温度は 37°C (許容範囲: 36～38°C, 実測値 36.9～37.0°C), 5%CO₂ 存在下 (許容範囲: 4.0～6.0%, 実測値 5.0%) で培養した。

16.3. 培養方法

16.3.1. 継代培養

凍結保存された細胞懸濁液を速やかに解凍し、培養液に懸濁した。1000 rpm, 4°C で 2 分間遠心し、上清を除去した。残った細胞を培養液に再懸濁し、60 mm のディッシュに播種し、コンフルエントになるまで炭酸ガス培養器で培養した。コンフルエントになった時点で、トリプシン EDTA (0.25% トリプシン 1 mmol/L EDTA-4Na, Lot No. 443817, 有効期限: 2009 年 10 月 30 日, Invitrogen Corporation) を PBS pH 7.4 (Lot No. 453252, 有効期限: 2010 年 5 月 30 日, Invitrogen Corporation) で 0.05% に希釈した液で、ディッシュから細胞を剥離して培養液で回収及び希釈し、再度 60 mm のディッシュに播種した。継代数は 1 回であった。

16.3.2. 測定用細胞の培養

35 mm のディッシュ (Lot No. 34407010, Corning Incorporated) にコラーゲンコートしたカバーガラス (Lot No. 0630801, 有効期限: 2009 年 9 月, AGC テクノグラス株式会社) を入れ, 継代培養時に回収した細胞を播種して, 測定用の細胞を培養した。

16.3.3. 試験系の識別方法

ディッシュの底に油性インクペンで試験番号, ディッシュ番号及び培養開始日を記載した。

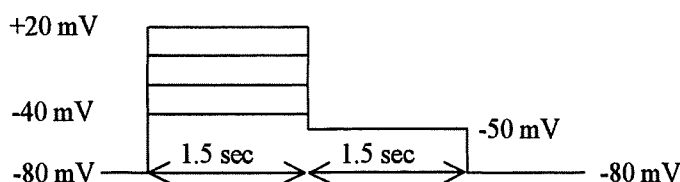
17. hERG 電流の測定

17.1. 操作方法

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, 灌流液 [組成 (mmol/L) : NaCl:137 (Lot No. TSE1146, 和光純薬工業株式会社), KCl:4 (Lot No. LTQ4311, 和光純薬工業株式会社), $MgCl_2$:1 (Lot No. WKH4930, 和光純薬工業株式会社), $CaCl_2$:1.8 (Lot No. SDJ5372, 和光純薬工業株式会社), glucose:10 (Lot No. TSF0726, 和光純薬工業株式会社), HEPES:10 (Lot No. WE032, 株式会社同仁化学研究所), pH:7.4] を灌流した。灌流液の温度は Automatic Temperature Controller (TC-344B, Warner Instrument Corp.) を用いて 25.8~26.2°C に維持し, 灌流速度は Peristaltic Pump (Dynamax[®], Model RP-1, Rainin Instrument Co.Inc.) で 120 mL/h に設定した。ガラス電極は硼珪酸ガラス管 (GC150F-10, Harvard Apparatus) をプラー (P-97, Sutter Instrument) を用い作製した。位相差顕微鏡下でマイクロマンipュレーターを操作し, 電極内液 [組成 (mmol/L) : KCl:130 (Lot No. LTQ4311, 和光純薬工業株式会社), $MgCl_2$:1 (Lot No. WKH4930, 和光純薬工業株式会社), EGTA:5 (Lot No. 078K5430, Sigma-Aldrich Co.), Mg-ATP:5 (Lot No. 054K7013, Sigma-Aldrich Co.), HEPES:10 (Lot No. WE032, 株式会社同仁化学研究所), pH 7.2] を充填したガラス電極 (3.9~7.8 M Ω) を細胞に押し当て, 弱い吸引を電極内にかけることでギガオームシールを形成した。更に吸引して細胞膜を破り, ホールセル状態にした。pClamp 9 ソフトウェア (Axon Instruments) のコントロールにより, EPC 8 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH) を用いて電圧固定モードにより, hERG 電流を測定した。

17.2. パルスプロトコール

保持電位は -80 mV, 脱分極パルスは -40 mV から 20 mV 間隔で +20 mV まで 4 ステップで 1.5 秒間, 再分極パルスは -50 mV で 1.5 秒間とした。パルスの間隔を 15 秒とした。



18. 適用

18.1. 適用方法, 適用回数及び適用時間

+20 mV のパルスで記録された波形におけるテール電流のピーク値が 500 pA 以上の細胞を各適用検体で灌流して適用した。適用は 1 細胞について 1 濃度を 1 回, 10 分間行った。

18.2. 適用方法, 適用回数及び適用時間の選択理由

hERG 電流への影響が確実に判断できる方法として選択した。

18.3. 群構成及び適用濃度

群構成は, 以下の通り 3 群, 各群 5 細胞とした。

群	適用区分	適用濃度 (µg/mL)	細胞数 (細胞番号)
1	AcPepA	6.5	5 (1101~1105)
2	AcPepA	65	5 (1201~1205)
3	AcPepA	650	5 (1301~1305)

18.4. 適用濃度設定の理由

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) におけるトキシコキネティクス測定での最高血中濃度である 6.5 µg/mL を低用量とし, 公比 10 で中用量, 高用量を設定した。

19. 細胞の群分け

測定に使用する細胞の群分けは, 電卓 (EL-510R, シャープ株式会社) の乱数により測定前にランダムに各群に割り振った。

20. 記録及び解析

適用前から適用開始後 10 分間の hERG 電流の波形を連続で記録した。Clampfit 9 (Axon Instruments) を用いて、適用前及び適用開始後 10 分の +20 mV のパルスで記録された波形におけるテール電流のピーク値を解析し、適用前に対する適用後の変化率を算出し、各適用区間の平均値と標準偏差を求めた。

21. 試験結果

測定結果を Table 1 及び Appendix 1 に示した。

被験物質適用群の hERG 電流の変化率は 6.5 µg/mL 適用群で -1.8%、65 µg/mL 適用群で -3.1%、650 µg/mL 適用群で -3.5%であった。

22. 考察及び結論

AcPepA の 6.5 µg/mL、65 µg/mL 及び 650 µg/mL を hERG 導入 HEK-293 細胞に適用し、パッチクランプ法を用いて AcPepA の K⁺チャンネルに及ぼす影響を検討した。

その結果、AcPepA による hERG 電流の変化率は、弊社における陰性対照群成立基準である 10%以内であり、AcPepA による hERG 電流の抑制は認められなかった。

以上の結果から、AcPepA は 650 µg/mL 以下の濃度において、hERG チャンネルを安定発現させた HEK-293 細胞における K⁺チャンネルに影響しないものと考えられた。

Table 1 Effects of AcPepA on Tail peak currents in hERG transfected HEK-293 cells.

Test substance Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	AcPepA		
	6.5	65	650
Changes from pre-application (%)	-1.8 \pm 2.2	-3.1 \pm 1.7	-3.5 \pm 2.2

Values are the mean \pm standard deviation for 5 cells.

Appendix 1 Effects of AcPepA on Tail peak currents in hERG transfected HEK-293 cells.

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell No.	Current amplitude (pA)		Changes from Pre-application (%)
			Pre-application	Post-application	
AcPepA	6.5	1101	1015.3	1005.6	-1.0
		1102	1822.5	1839.0	0.9
		1103	712.6	676.3	-5.1
		1104	1673.6	1630.2	-2.6
		1105	674.7	665.3	-1.4
		Mean	1179.7	1163.3	-1.8
		SD	537.9	544.2	2.2
	65	1201	1072.7	1048.6	-2.2
		1202	832.2	795.9	-4.4
		1203	1376.6	1360.2	-1.2
		1204	994.6	941.5	-5.3
		1205	1979.1	1931.8	-2.4
		Mean	1251.0	1215.6	-3.1
		SD	452.4	450.8	1.7
	650	1301	1351.6	1267.4	-6.2
		1302	969.5	961.0	-0.9
		1303	740.7	707.7	-4.5
		1304	625.0	614.9	-1.6
		1305	1093.4	1045.8	-4.4
		Mean	956.0	919.4	-3.5
		SD	287.9	262.8	2.2

Changes from pre-application (%) = (Post-application - Pre-application) / Pre-application \times 100.

信頼性保証部門陳述書

試験表題：AcPepA の h ERG 細胞を用いた K+チャンネルへの影響

試験番号：FBM 09-9544

報告書に記載された内容と生データとの整合性について、以下の調査を実施した。
その結果、最終報告書には生データが正確に反映されていることを確認した。

調査日および報告日は下記のとおりです。

項目	調査日	試験責任者への 報告日	運営管理者への 報告日
報告書第1稿・生データ	2009年3月23日	2009年3月23日	2009年3月23日
最終報告書	2009年6月15日	2009年6月15日	2009年6月15日

信頼性保証部門責任者

樋口 史郎 

2009年6月15日

最終報告書草案

試験表題：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

試験番号：FBM 09-6543

スギ生物科学研究所株式会社

試験責任者署名：

永山幸利

年 月 日

本報告書は表紙を含む 34 枚

目次

	(頁)
1. 試験表題	5
2. 試験番号	5
3. 試験目的	5
4. 試験施設	5
5. 試験委託者	5
6. 試験実施期間	5
7. 試験責任者	6
8. 担当責任者	6
9. 業務分担及び試験従事者の氏名	6
10. GLP 及びガイドライン	6
11. 信頼性保証	6
12. 動物倫理	7
13. 試験関係資料の保存	7
14. 要約	8
15. 試験材料及び方法	9
15.1. 被験物質及び投与検体	9
15.1.1. 被験物質	9
15.1.2. 媒体	9
15.1.3. 投与検体	9
15.2. 使用動物及び飼育環境	9
15.2.1. 使用動物	9
15.2.2. 飼育環境	10
15.3. 動物選別	10
15.4. 投与群及び投与量	11
15.5. 投与量の設定理由	11
15.6. 投与	11
15.7. 一般状態	12
15.8. 行動観察	12
15.9. 体重	12
15.10. 長時間心電図検査	12
15.10.1. 測定時期及び方法	12

15.10.2. 解析	13
15.11. 血圧及び心拍数の計測	13
15.11.1. 送信器埋込手術	13
15.11.2. 測定時期.....	13
15.11.3. データの取得及び処理.....	13
15.11.4. 呼吸数の計測.....	14
15.11.5. 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. 行動観察	15
16.3. 体重	15
16.4. 長時間心電図検査.....	15
16.5. 血圧及び心拍数.....	15
16.6. 呼吸数	15
17. 考察及び結論	16
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.....	16
18.1. 血圧, 心拍数, 呼吸数及び心電図のデータ取得時間の逸脱.....	16

Fig. 1 Electrocardiography in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Fig. 2 Blood pressure and heart rate in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Fig. 3 Respiratory rate in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Table 1 Clinical signs in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Table 2 Post-dose behavior in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Table 3 Body weights on the day of dosing in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Table 4-1 Electrocardiography in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Table 4-2 Cardiac arrhythmias in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Table 5 Blood pressure and heart rate in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Table 6 Respiratory rate in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

- Appendix 1-1 Clinical signs during quarantine and acclimation periods
- Appendix 1-2 Body weight during quarantine and acclimation periods
- Appendix 2-1 Electrocardiography in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA
- Appendix 2-2 Statistical analyses of time-sequential analysis of variance on electrocardiography using the SAS[®] MIXED procedure
- Appendix 3-1 Blood pressure and heart rate in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA
- Appendix 3-2 Statistical analyses of time-sequential analysis of variance on blood pressure and heart rate using the SAS[®] MIXED procedure
- Appendix 4-1 Respiratory rate in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA
- Appendix 4-2 Statistical analyses of time-sequential analysis of variance on respiratory rate using the SAS[®] MIXED procedure

1. 試験表題

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

2. 試験番号

FBM 09-6543

3. 試験目的

AcPepA を無麻酔サルに静脈内投与した際の心血管系，呼吸数及び行動に及ぼす影響を検討した。

4. 試験施設

スギ生物科学研究所株式会社
〒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
〒411-8126 愛知県豊橋市野依町山中 19-14
TEL 0532-46-7501 FAX 0532-46-8940
試験委託担当者：岡田秀親

6. 試験実施期間

試験開始日	2009年4月1日
動物受入日（馴化飼育開始日）	2009年4月1日
送信器埋込日	2009年4月15日
選別日（馴化飼育終了日）	2009年5月11日
第1回投与日	2009年5月13日
第2回投与日	2009年5月20日
第3回投与日	2009年5月27日
試験終了日	2009年 月 日

7. 試験責任者

永山幸利
スギ生物科学研究所株式会社 薬理試験部

8. 担当責任者

検疫	蛭間正巳
馴化, 飼育, 投与, 観察, 測定	斉藤裕之
送信器埋め込み	園真志
長時間心電図検査	永山幸利
血圧, 心拍数及び呼吸数測定	星合清隆
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	斉藤裕之, 清基城, 園真志, 永山幸利, 杉山賢, 中根史行, 石塚進, 星合清隆, 高橋友安
飼育, 投与, 観察, 体重測定	斉藤裕之, 杉山 賢, 國枝正幹, 相良聡美, 中根史行, 永山幸利, 清基城, 園真志, 久保寺慧, 石塚進, 小川光英, 高橋友安, 小林立弥
送信器埋め込み	園真志, 斉藤裕之, 永山幸利, 楯美樹, 中根史行, 相良聡美
長時間心電図検査	斉藤裕之, 永山幸利, 伊藤さゆり, 久保寺慧, 高橋友安, 相良聡美
血圧, 心拍数及び呼吸数測定	斉藤裕之
統計学的処理	正木文夫
被験物質の調製	斉藤裕之, 永山幸利
被験物質の管理	高橋善康

10. GLP 及びガイドライン

本試験は GLP 非適用とした。

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

した。

12. 動物倫理

本試験は、スギ生物科学研究所株式会社の動物実験承認規定に基づいて実施した（承認番号：2009-034）。

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），被験物質及び動物に関する記録，生データ，その他記録文書

保存期間：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

本試験は AcPepA の心血管系，呼吸器系及び行動に及ぼす影響を検討する目的で，無麻酔雄性カニクイザルに対照（生理食塩液），20 及び 80 mg/kg をインフュージョンシステム（2.5 mL/kg/min の速度で 2 分間の急速投与後，5 mL/kg/min の速度で 3 時間持続投与）を用いて単回静脈内投与し，長時間心電図，不整脈解析，血圧，心拍数及び呼吸数の測定を行った。また，投与開始 1 時間前から投与終了後 6 時間までの動物の行動を詳細に観察した。

その結果，AcPepA の 20 及び 80 mg/kg で心電図，血圧，心拍数，呼吸数及び動物の行動に変化は認められなかった。

以上より，AcPepA を 80 mg/kg 投与しても，本試験条件において心血管系，呼吸器系及び行動への影響は無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

含量：97.7%

溶解性：4 mg/mL 生理食塩液

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, 実測値：後日記載)

取り扱い上の注意：白衣, マスク及び手袋を着用する。

残余被験物質の処理：残余被験物質はすべて試験委託者に返却した(返却日後日記載)。

15.1.2. 媒体

日本薬局方生理食塩液 (扶桑薬品工業株式会社, 以下, 生理食塩液と記載)

15.1.3. 投与検体

15.1.3.1. 投与検体の調製

被験物質を媒体(生理食塩液)で溶解し, 低及び高用量投与日にそれぞれ1及び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。

15.2. 使用動物及び飼育環境

15.2.1. 使用動物

種及び系統：サル, *Cynomolgus Monkey* (カニクイザル)

輸入・販売：ハムリー株式会社

生産国：中国

性別・数・年齢：雄, 4匹, 3年齢 (受入時)

体重範囲：2.95～3.20 kg (受入時) , 2.89～3.26 kg (投与時)

受入前検査：供給源にて実施した検査 (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。

受入後検疫：受入後，2週間の検疫を実施した。検疫期間中に B-ウイルス及び赤痢菌検査，一般状態観察並びに体重測定を行い，健康であることを確認した。

馴化：動物受入後，選別日まで第3動物実験棟 S2-2 室で馴化飼育を行った。この間，一般状態の観察を毎日，体重を週1回測定した。送信器埋め込み2週間後から投与終了翌日までケージ内に配備したインフュージョン投与用テータ付ジャケットを着用させた。

15.2.2. 飼育環境

動物室：第3動物実験棟，S2-2 室

ケージ：ステンレス製ケージ（W65×D70×H78 cm）で個別飼育。

温度・相対湿度：実測値 22.8～28.6°C（設定温度 23°C，許容範囲：20～28°C），実測値 34.6～69.7%（設定湿度：50%，許容範囲：30～80%）（期間：2009年4月1日～5月28日）

換気回数：10～15回/時

照明時間：6～18時

飼料：1匹1日当たり固型飼料 PS（オリエンタル酵母工業株式会社）70 g を原則として午前中に給餌した。ただし，投与翌日は投与終了後 18 時間の測定終了後に給餌した。また，送信器埋め込み日は 18:48～18:50 に給餌した。

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全使用ロットについて供給者から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山梨県環境科学検査センターに依頼した。得られた結果は，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ことを確認した。

15.3. 動物選別

2009年5月7日～8日（選別の3-4日前）に，テレメトリーシステム（DATA SCIENCES INTERNATIONAL, INC.）を用いて，血圧（収縮期；SBP 及び拡張期；DBP），心拍数の取得状況を確認した。その結果，全例で血圧の取得状況及び日内変動に異常は認められなかったが，T.No. 04711 で血圧差が小さい（約 10 mmHg）ことが確認されたことから，本例を除く3匹を選別し，各動物に動物番号（1～3）を付けた。

その他，送信器の埋め込み手術の予後，一般状態及び体重測定により，異常が認めら

れないことから不測の事態が生じた場合に動物入れ替えを検討できるよう待機動物とし、最終投与終了後に試験系から除外した。

15.4. 投与群及び投与量

動物 3 匹を用いた。以下のとおり各動物に生理食塩液、低用量、高用量の順に投与した。各投与では、2 分間で 0, 5 又は 20 mg/kg を急速投与した後、引き続いて 3 時間で 0, 15, 60 mg/kg を持続投与した。

なお、各投与は 6 日間の間隔を置いて実施した。

投与群	投与量 (mg/kg)			1 日用量 (mg/kg/day)	投与液濃度 (mg/mL)
	急速投与+持続投与				
1) 対照 (生理食塩液)	0	+	0	0	0
2) AcPepA 低用量	5	+	15	20	1
3) AcPepA 高用量	20	+	60	80	4

投与液量：5 mL/kg (急速投与)，15 mL/kg (持続投与)

15.5. 投与量の設定理由

AcPepA は臨床において、2 mg/kg を 2-3 分間で急速静注した後、6 mg/kg を 3 時間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 5 mL/kg に相当する 20 mg/kg (臨床予想投与量の 10 倍) を投与し、引き続いて臨床予想投与量の 10 倍である 60 mg/kg を 3 時間持続的に投与した。従って、高用量の 1 日あたりの投与量は 80 mg/kg/day となる。低用量は、高用量の 1/4 量である 20 mg/kg として設定した。

15.6. 投与

投与経路：静脈内投与。ヒトにおける臨床適用経路に準じた。

投与方法：遠隔操作によるインフュージョン投与方法。

本試験では、心血管系のパラメータを評価するため、動物飼育室外から遠隔で静脈内投与を実施可能にするインフュージョンシステム (90 cm catheter, LOMIR BIOMEDICAL INC.) を用いた。動物には事前 (テレメトリー送信器の埋込手術時) に投与用カテーテルとして慢性実験動物用脈管アクセスポート (GPVAC-3.5H, アクセステクノロジー社) を埋め込み、カテーテルはテレメトリー送信器のカテーテ

ルと反対側の大腿静脈内，ポートは背部皮下に留置した．アクセスポートは，週 1 回以上ヘパリン生理食塩液（ヘパリン約 20 単位/mL；ノボヘパリン注 1 万単位，持田製薬株式会社）約 5 mL を注入し，内部での血液凝固を予防した．

投与回数：単回投与（急速投与に引き続き 3 時間持続投与）．

投与時間：ヒト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．

投与流量：急速投与は 5 mL/kg，持続投与は 15 mL/kg とし，投与日の体重から算出した．

投与速度：急速投与は 2.5 mL/kg/min で，ボラス投与した．持続投与は 5 mL/kg/hr で，輸液ポンプ（FP-1200，株式会社ニプロ）を用いて投与した．

投与開始時刻：13:04～13:09 の間

15.7. 一般状態

全例について，馴化期間中及び投与期間中は 1 日 1 回（午前），一般状態を観察した．

15.8. 行動観察

全例について各投与日の投与開始 1 時間前から持続投与終了後 6 時間まで，ビデオカメラを用いた行動観察装置（ソニーブロードバンドソリューション株式会社）を用いて動物室外からケージ内の動物の行動を観察した．カメラの映像は録画後，後日詳細に観察した．

15.9. 体重

全例について，動物受入日，検疫最終日，送信器埋込日，馴化期間中（週 1 回），選別日及び各投与日（投与動物のみ）に体重測定した．

15.10. 長時間心電図検査

15.10.1. 測定時期及び方法

全例について，馴化期間中 1 回，投与の際は，投与前日（午前中）から投与翌日（投与終了後 18 時間以降）まで無麻酔・通常飼育下で長時間心電図を記録した．ホルター心電計（QR2100 型，フクダエム・イー工業株式会社）をジャケットのポケットに入れ，M-X 誘導（胸骨柄部：－，剣状軟骨部：＋）と R-L 誘導（胸郭右：－，胸郭左：＋）により，心電図をスモールメモリーカード（MC-S32，フクダエム・イー工業株式会社）に記録した．