

Appendix 4-1 Respiratory rate in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Parameter	Test substance	Dose (mg/kg)		Animal No.	Time after the start of infusion (min)					Time after the end of infusion (h)				
		rapid (2min)	infusion (3h)		pre	10	40	70	180	2	4	8	18	
Respiratory rate (breaths/min)	Control (Saline)	0	0	1	28	26	28	26	30	26	26	26	24	
				2	26	32	34	26	34	26	26	28	26	
				3	30	32	32	32	24	34	30	26		
		AcPepA	5	15	1	32	32	32	26	28	28	26	28	26
					2	28	28	30	30	30	24	34	26	
					3	28	26	26	28	26	26	24	24	
		20	60	1	36	32	34	32	36	30	30	28	28	
				2	28	36	36	34	38	30	30	24	26	
				3	38	36	42	36	38	40	34	42	34	

Appendix 4-2 Statistical analyses of time-sequential analysis of variance on respiratory rate
using the SAS[®] MIXED procedure

Effect	NDF	DDF	F value	<i>p</i> value
Dose	2	4	3.99	0.1115
Time	7	42	6.15	0.0001
Dose × Time	14	42	0.76	0.7073

NDF: Numerator degrees of freedom.

DDF: Denominator degrees of freedom.

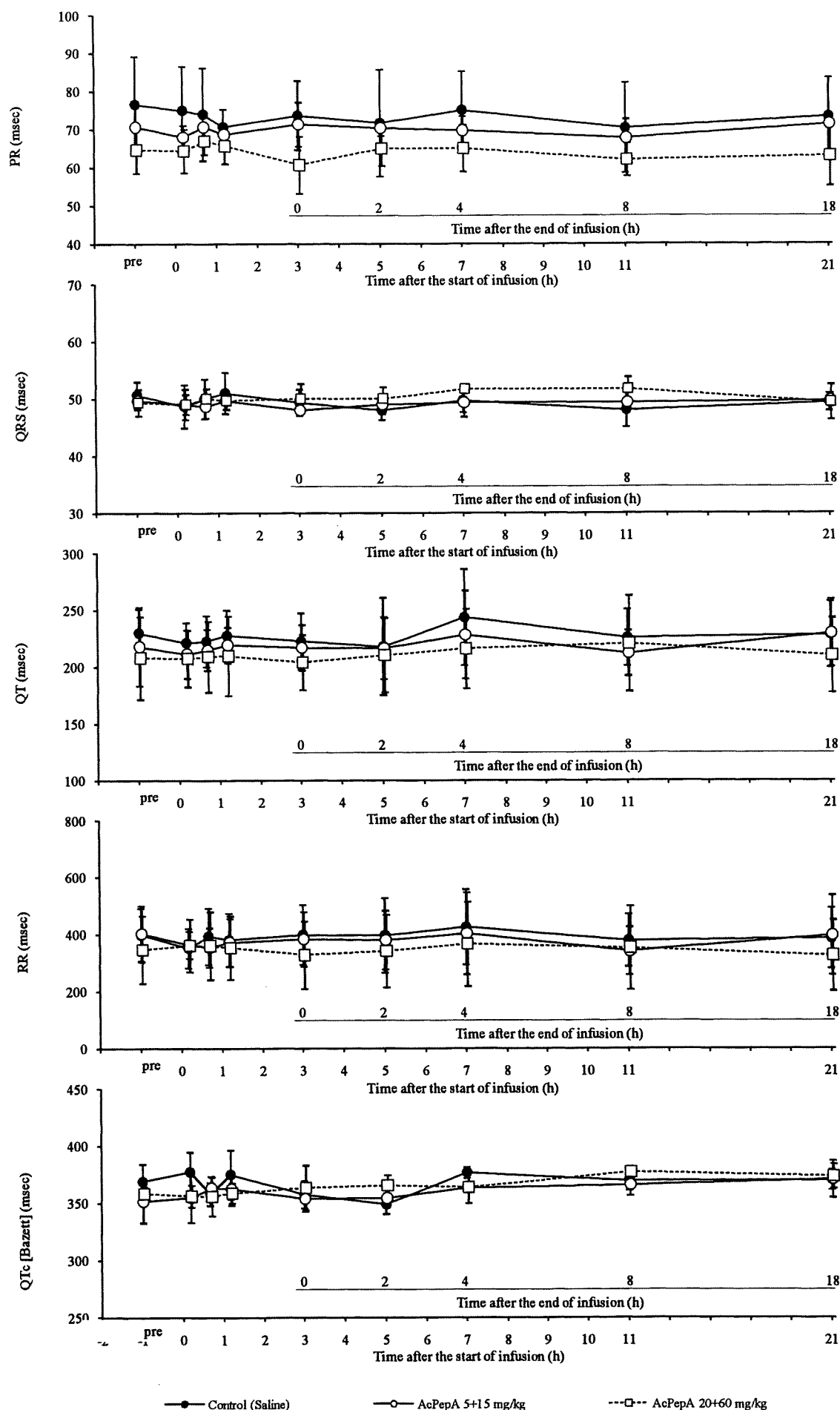


Fig 1 Electrocardiography in conscious monkeys treated intravenously with AcPepA

Data are the mean \pm standard deviations of 3 animals.

No significant difference was found among each group.

最終報告書

試験表題：AcPepA のサルを用いた LDH の検討

試験番号：10K0066N

スギ生物科学研究所株式会社

試験責任者署名：

清水 茂 一

____年 ____月 ____日

本報告書は表紙を含む 23 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. GLP.....	5
10. 動物実験倫理.....	5
11. 試験関係資料の保存.....	5
12. 要約.....	6
13. 試験材料及び方法.....	7
13.1. 被験物質及び投与検体.....	7
13.2. 使用動物及び飼育環境.....	7
13.3. 群分け.....	8
13.4. 投与区分.....	9
13.5. 投与量の設定理由.....	9
13.6. 投与.....	9
13.7. 観察, 測定及び検査.....	10
13.8. データの統計学的処理.....	11
14. 試験結果.....	11
14.1. 一般状態.....	11
14.2. 体重.....	11
14.3. 血液生化学的検査.....	11
14.4. 病理学的検査.....	12
15. 考察及び結論.....	13

Fig. 1 Blood chemistry (mean of 2 animals)

Fig. 2 Blood chemistry - %Change to pre-dosing value (mean of 2 animals)

Table 1	Clinical signs
Table 2	Body weights
Table 3	Blood chemistry
Table 4	Blood chemistry - %Change to pre-dosing value
Table 5	Gross pathological findings
Table 6	Histopathological findings

1. 試験表題

AcPepA のサルを用いた LDH の検討

2. 試験番号

10K0066N

3. 試験目的

AcPepA を静脈内投与した際の LDH への影響及び毒性を検討する目的で、サルに単回静脈内投与し、経時的に LDH を測定した。同時にその他の血液生化学的検査及び肝臓、心臓及び骨格筋（大腿筋）の病理学的検査も行った。

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

〒411-8124 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

試験期間	2010年2月1日	～	2010年4月5日
試験開始日	2010年2月1日		
馴化開始日	2010年2月1日		
投与日	2010年2月4日		
剖検日	2010年2月5日		
試験終了日	2010年4月5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
血液生化学的検査	塚原みゆき
病理学的検査	小林吉彦
統計学的処理	正木文夫

9. GLP

本試験は非 GLP とした。

10. 動物実験倫理

当試験施設の動物実験承認規定に基づいて実施した (承認番号 2010-12) .

11. 試験関係資料の保存

保存場所 : 当試験施設 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 : 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.

12. 要約

AcPepA を静脈内投与した際の LDH への影響及び毒性を検討する目的で、AcPepA の 2, 10 及び 30 mg/kg を雄のカニクイザルに単回静脈内投与した。投与日から投与翌日に一般状態観察、体重測定、血液生化学的検査を行い、剖検して病理学的検査を行った。

血液生化学的検査では、投与後 1 から 4 時間に、全用量群で AST, ALT, LDH, CK 及び Mb の上昇が認められた。投与後 4 から 8 時間に最も高値を示し、特に CK 及び Mb では著しい上昇がみられた。これらの変化は 2 mg/kg 群で最も顕著であった。

病理組織学的検査で左右心室心筋に変性あるいは壊死及び単核細胞浸潤が認められた。肝臓及び大腿筋には投与による変化はみられなかった。

一般状態、体重及び剖検では AcPepA に起因する異常は認められなかった。

以上の結果から、AcPepA の単回静脈内投与で心臓に器質的变化を生じると考えられ、本試験の条件下では 2 mg/kg で最も顕著と判断された。

13. 試験材料及び方法

13.1. 被験物質及び投与検体

13.1.1. 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°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：-32~-28°C)

13.1.2. 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)

13.1.3. 投与検体

13.1.3.1. 投与検体の調製

必要量の被験物質を電子天秤で量り取り，媒体 (生理食塩液) で溶解し，規定濃度の溶液を調製した。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。

13.1.4. 残余投与検体の処理

焼却処分した。

13.2. 使用動物及び飼育環境

13.2.1. 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。

年齢・性別・数：4~5 年齢 (試験開始時)，雄，6 匹

体重範囲：3.29～4.80 kg（馴化最終日）

検疫：供給元にて実施した検査（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 6 匹を選別した。

馴化：試験開始後，投与開始前日まで第3動物実験棟 S3-1 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。

13.2.2. 飼育環境

動物室：第3動物実験棟，S3-1 室

ケージ：ステンレス製ケージ（W65×D70×H78 cm）で個別飼育。

温度：温度 23°C（許容範囲：20～28°C，実測値：22.9～23.3°C）

湿度：湿度 50%（許容範囲：30～80%，実測値：39.1～58.1%）

換気回数：10～15 回/時

照明時間：6～18 時（ただし，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。

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）80 g を午前中（投与中は投与終了後）に与えた。投与前日の夕刻（16 時以降）に残餌を取り除き，投与後 4 時間の採血終了後に給餌した。剖検日の給餌は行わなかった。

飲料水：公共水道水 自由摂取

汚染物質の分析：以下のデータについて，当試験施設で定めた飼料中の汚染物質の最大許容濃度（許容基準値）及び水質基準への適合を確認

飼料：飼料供給者から，全使用ロットの分析結果を入手

飲料水：株式会社山梨県環境科学検査センターに，6 か月ごとに採取した飲料水について分析依頼

13.3. 群分け

対象動物：全例

検査項目：一般状態，体重

実施日：馴化終了日（群分け日）

方法：群分け日の体重を基に各群の平均体重が均一になるよう、動物を以下の試験群に無作為に割り付けた。群分け後、各動物に動物番号を付けた。

13.4. 投与区分

以下のとおり3群とした。

群 No.	投与群	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号) 雄
1	AcPepA（低用量）	2	0.267	2 (111, 112)
2	AcPepA（中用量）	10	1.33	2 (121, 122)
3	AcPepA（高用量）	30	4	2 (131, 132)
			総計	6

投与液量：7.5 mL/kg とし、投与日の体重から算出した。

13.5. 投与量の設定理由

AcPepA の標準投与量である 2 mg/kg を低用量に設定し、その 5 倍量の 10 mg/kg を中用量、15 倍量の 30 mg/kg を高用量に設定した。

13.6. 投与

投与経路：静脈内投与

投与経路の選択理由：予定臨床適用経路である静脈内投与とした。

投与方法：橈側皮静脈あるいは伏在静脈投与に留置針を刺入し、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。

投与方法の選択理由：サル静脈内投与として一般的な方法のため。

投与回数及び理由：1回投与による影響を確認するため単回投与とした。

投与時間：臨床の投与時間に準じて、2時間持続投与した。

投与速度：ハーバードデジタルインフュージョンポンプ（Model-11 E Econoflo, Model-22, HARVARD APPARATUS）を用いて、投与速度を設定した。

13.7. 観察, 測定及び検査

13.7.1. 一般状態

頻度：馴化期間中は1日1回（午前），投与日は1日3回（投与前，投与中，投与終了直後～約1時間後）及び剖検日は1回.

方法：生死及び一般状態

13.7.2. 体重

頻度：投与日及び剖検日

方法：電子天秤を用いた.

13.7.3. 血液生化学的検査

頻度：投与開始前，投与開始後1，2，4，8，20及び24時間

採血方法：無麻酔下で大腿静脈あるいは前腕橈側皮静脈から採血し，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．

測定試料：血清（乳酸脱水素酵素測定及びクレアチンキナーゼはヘパリンNa加血漿）

分離方法：血清；採取した血液を1時間室温放置後，3000rpm，4°C，15分間遠心分離．ヘパリンNa加血漿；採取した血液は遠心時まで氷中保存．3000rpm，4°C，15分間遠心分離．

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）	U/L	JSCC標準化対応法
2	アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）	U/L	JSCC標準化対応法
3	アルカリホスファターゼ（ALP）	U/L	JSCC標準化対応法
4	乳酸脱水素酵素（LDH）	U/L	JSCC標準化対応法
5	γ-グルタミルトランスアピチダーゼ（γ-GTP）	U/L	JSCC標準化対応法
6	クレアチンキナーゼ（CK）	U/L	JSCC標準化対応法
7	ミオグロビン（Mb）	ng/mL	ラテックス比濁法
8	カリウム（K）	mEq/L	電極法

測定機器

No. 1～8：自動分析装置（JCA-BM6010，日本電子株式会社）

13.7.4. 病理学的検査

13.7.4.1. 剖検

方法：投与翌日に約 25 mg/kg のペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル[®]，シェリング・プラウ アニマルヘルス社）による麻酔下で，腋窩動脈から放血安楽死させて剖検した。

13.7.4.2. 病理組織学的検査

検査器官：肝臓，心臓及び大腿筋

方法：10%中性緩衝ホルマリン液で固定し，包埋，薄切の後，ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色を施して鏡検した。

13.8. データの統計学的処理

定量データについて Microsoft[®] EXCEL 2000 Windows 版（Version 9）を用いて平均値の算出を行った。

14. 試験結果

14.1. 一般状態

一般状態の観察結果を Table 1 に示した。

投与日の観察では，全例に異常は認められなかった。投与翌日では 2 mg/kg 群の 1 例（No. 111）に餌の吐物が認められた。

14.2. 体重

体重推移を Table 2 に示した。

各測定日の体重推移に，明らかな変動は認められなかった。

14.3. 血液生化学的検査

血液生化学的検査の成績を Fig. 1, 2, Table 3, 4 に示した。

14.3.1. AST

投与後 1 あるいは 2 時間から AST の上昇が認められ，投与後 4 あるいは 8 時間で最も高値を示した。投与前値を 100%とした変動率は，投与後 8 時間で 2 mg/kg 群が 353%，10 mg/kg 群が 171%及び 30 mg/kg 群が 198%で，2 mg/kg 群が最も高値を示した。

14.3.2. ALT

投与後1～4時間でALTの上昇が認められ、投与後24時間で最も高値を示した。投与前値を100%とした変動率は、投与後24時間で2 mg/kg 群が148%、10 mg/kg 群が131%及び30 mg/kg 群が125%で、2 mg/kg 群で最も高値を示した。

14.3.3. LDH

投与後1～2時間にLDHの上昇が認められ、投与後8時間で最も高値を示した。投与前値を100%とした変動率は、投与後8時間で2 mg/kg 群が357%、10 mg/kg 群が269%及び30 mg/kg 群が158%で、2 mg/kg 群で最も高値を示した。

14.3.4. CK

投与後1あるいは4時間にCKの上昇が認められ、投与後8時間で最も高値を示した。投与前値を100%とした変動率は、投与後8時間で2 mg/kg 群が9532%、10 mg/kg 群が2058%及び30 mg/kg 群が670%で、2 mg/kg 群で最も高値を示した。

14.3.5. Mb

投与後1時間にミオグロビンの上昇が認められ、投与後4時間で最も高値を示した。投与前値を100%とした変動では、投与後4時間で2 mg/kg 群が1169%、10 mg/kg 群が432%及び30 mg/kg 群が677%で、2 mg/kg 群で最も高値を示した。

14.3.6. ALP, γ -GTP, カリウム

いずれの投与群においても、投与後24時間までのすべての測定時点において、AcPepA投与による変動は認められなかった。

14.4. 病理学的検査

14.4.1. 剖検

剖検所見をTable 5に示した。

全例の投与部位皮下に暗赤色斑が認められた以外に、全身の器官・組織に肉眼的異常はみられなかった。

14.4.2. 病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 6 に示した。

心臓：30 mg/kg 群の 1 例 (No. 132) を除く全例 (5 例) の左心室及び 2 mg/kg 群の 1 例 (No. 111) の右心室に軽微な心筋の変性あるいは壊死が認められた。全群の各 1 例 (No. 111, 121, 131) の左心室, 2 及び 10 mg/kg 群の各 1 例 (No. 111, 121) の右心室にそれぞれ軽微な単核細胞浸潤が認められた。

肝臓：2 及び 10 mg/kg 群の各 1 例 (No. 112, 121) に類洞内空胞細胞の増加, 2 及び 30 mg/kg 群の各 1 例 (No. 111, 131) にクッパー細胞の褐色色素沈着, 30 mg/kg 群の 1 例 (No. 132) の類洞に好中球の増加及び微小肉芽腫 (マクロファージ主体) がいずれも軽微に認められた。

大腿筋：明らかな変化は認められなかった。

15. 考察及び結論

AcPepA の 2, 10 及び 30 mg/kg をサルに単回静脈内投与し, 血液生化学的検査及び心臓, 肝臓, 大腿筋の病理学的検査を行い, 毒性を検討した。

血液生化学的検査において, 投与後 1 から 4 時間に, AST, ALT, LDH, CK 及び Mb の上昇が認められた。これらは経時的に増加し, ALT 以外では投与後 4 から 8 時間で最も高値を示した。投与前値を 100% とした変動率は, 2 mg/kg 群のクレアチニンキナーゼで 9532%, ミオグロビンで 1169% 及び LDH で 357% と顕著な上昇が認められた。病理組織学的検査で, 左右心室心筋に軽微の変性あるいは壊死が認められ, 大腿筋には変化は認められなかったことから, AcPepA 投与により心筋に器質的变化を生じ, 血液生化学的検査のパラメータが上昇したと考えられた。これらの変化は 2 mg/kg 群で最も顕著に認められ, 10 及び 30 mg/kg 群ではより軽度であった。

全投与群で AST, ALT 及び LDH の上昇が認められたが ALP には変動はなく, 肝臓の組織学的検査でも投与に関連した変化がみられなかったことから, 肝臓への影響は明らかでなかった。

以上の結果から, AcPepA の単回静脈内投与で心臓に器質的变化を生じると考えられ, 本試験の条件下では 2 mg/kg で最も顕著な変化が惹起されると判断された。

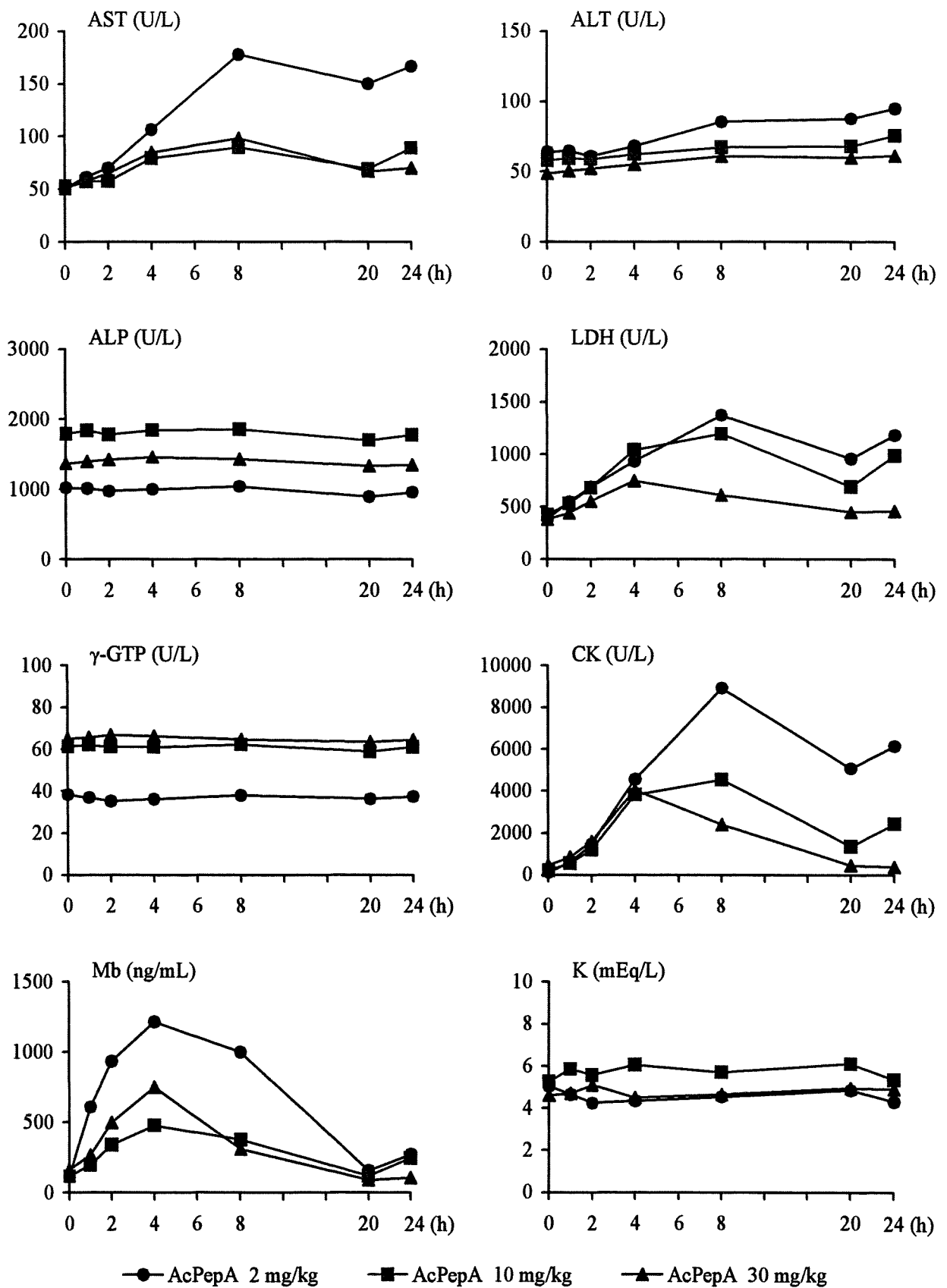


Fig 1 Blood chemistry (mean of 2 animals)

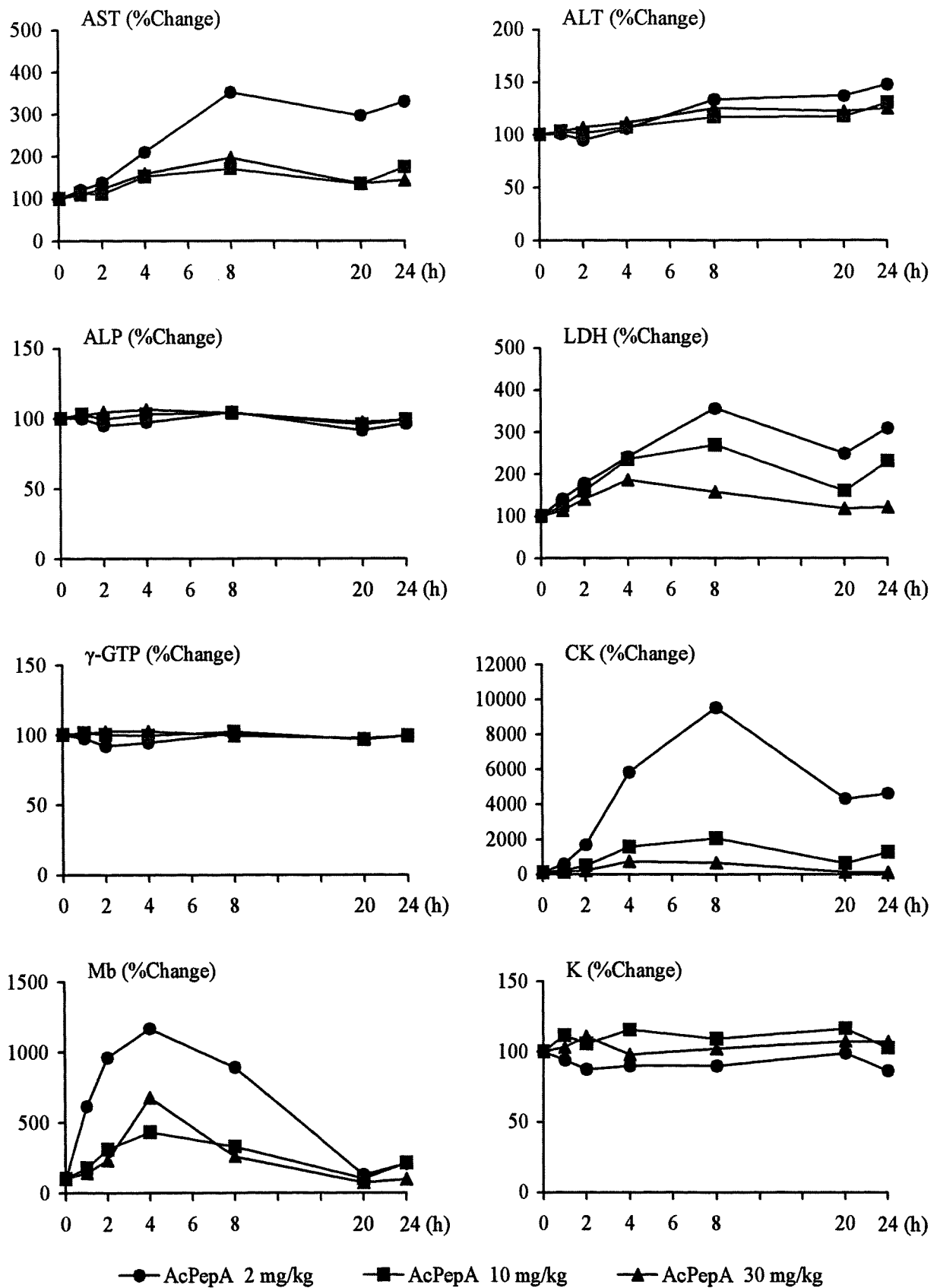


Fig 2 Blood chemistry - %Change to pre-dosing value (mean of 2 animals)

Table 1 Clinical signs

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	Time after dosing (day)						
			-3	-2	-1	0 (Dosing day)		1	
						pre	dosing	0 to 1h	
AcPepA	2	111	-	-	-	-	-	-	Vf+
		112	-	-	-	-	-	-	-
	10	121	-	-	-	-	-	-	-
		122	-	Fs+	Fs+	-	-	-	-
	30	131	-	-	-	-	-	-	-
		132	-	-	-	-	-	-	-

Time after dosing pre: pre-dosing at dosing day, dosing: during dosage, 0 to 1h: just after to 1 hour after dosing.

Table 2 Body weights

Test substance	Dose (mg/kg)	Animal No.	Grouping day	Dosing day	Necropsy day
AcPepA	2	111	4.80	4.78	4.81
		112	3.29	3.26	3.30
		Mean	4.05	4.02	4.06
	10	121	3.69	3.70	3.74
		122	3.42	3.39	3.41
		Mean	3.56	3.55	3.58
	30	131	3.63	3.60	3.71
		132	3.50	3.49	3.48
		Mean	3.57	3.55	3.60