

1. 表題

AcPepA (MPS-390) のウサギにおける血管周囲刺激性試験

2. 試験目的

AcPepA (MPS-390) の血管周囲局所刺激性について、ウサギの耳介を用いて検討する。

3. 適用規則

本試験は、以下の GLP を遵守して実施する。

・ 厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成 9 年 3 月 26 日、一部改正 厚生労働省令第 114 号 平成 20 年 6 月 13 日）

4. 動物福祉

本試験は、株式会社新日本科学 安全性研究所の動物実験委員会により承認されており（承認番号 IACUC861-004）、当研究所の動物実験規程に従って実施する。

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字山中 19-14

TEL : 0532-46-7511 FAX : 0532-46-8940

委託担当者 : 岡田 秀親

6. 試験施設

株式会社新日本科学 安全性研究所

〒 891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地

TEL : 099-294-2600 FAX : 099-294-3619

7. 試験関係者

試験責任者 : 山下 祐介

被験物質取扱い責任者 : 真鍋 ひろ子

分析責任者 : 山田 聡美

病理検査責任者 : 吉川 剛

8. 試験日程

投与日を 0 日目と起算する。

試験開始日 : 2011 年 3 月 28 日

検疫馴化開始日 : 2011 年 3 月 29 日

検疫馴化終了日／選抜日 : 2011 年 4 月 4 日

投与日： 2011年4月5日
観察終了日／標本採取日： 2011年4月8日
最終報告書草案作成日： 2011年5月31日
最終報告書作成日／試験終了日： 2011年6月28日

9. 被験物質及び対照物質（媒体）

（SOP：TSB/002）

9.1 被験物質

名称： AcPepA（MPS-390）
提供者： 医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所
ロット番号： 2K09030
特性（CERTIFICATE OF ANALYSIS, Certificate No.: 861003-1）
性状： 白色の粉末
ペプチド含量（HPLC）： 77.9%
純度（HPLC）： 96.9%
安定性： 実験期間中の被験物質の安定性について、本試験で使用したロットと同一ロット、同一保存条件下で保存した被験物質を用いて測定した結果を入手し、確認する。
受領日： 2011年3月14日
入手日： 2011年4月1日
入手量： 1g
保存条件： 冷凍、遮光
保存場所： 被験物質保管所内冷凍室（許容範囲：-30~-10℃）
取扱い： マスク、キャップ、手袋及び保護眼鏡を着用する。
残余被験物質： すべて被験物質管理責任者に移管する。

9.2 対照物質（媒体）

名称： 生理食塩液
製造者： 株式会社大塚製薬工場

10. 被験物質調製液

（SOP：TSB/004, BIO/023）

調製濃度： 4 mg/mL
換算係数： なし
調製方法： 被験物質を秤量し、生理食塩液に溶解して4 mg/mL溶液を調製する。調製後、ろ過滅菌（Millex-GV, 日本ミリポア株式会社）する。

安定性： 0.5～4 mg/mL 調製液は、冷蔵、遮光、密封条件下で2日間+室温、遮光条件下で24時間安定であることが確認されている (CERTIFICATE OF ANALYSIS, Certificate No.: 861006-1)。

調製頻度： 安定性の確認されている範囲で調製する。

保存条件： 冷蔵、遮光、密封

保存場所： 被験物質保管所内冷蔵室 (許容範囲：2～8°C)

濃度の確認： 投与に使用する調製液について HPLC 法にて確認する。適合範囲は、目標濃度±5.0%以内とする。方法の詳細については別添 A に記載する。

11. 被験物質及び対照物質の投与

(SOP : STE/118, STE/205)

投与経路： 皮下

投与方法： 投与前日までに左右耳介の投与部位周辺を電気バリカンで刈毛する。ディスポーザブル注射筒及び注射針を用いて、耳介の血管 (耳介後静脈) 周囲皮下に投与し、投与後、油性インクで投与部位にあたる範囲に印をつける。

投与回数： 1回

投与経路、投与方法及び投与回数の選択理由： 被験物質の臨床投与経路として静脈内投与が予定されているため、被験物質が静脈外に漏洩した場合の安全性を確認するため。

投与容量： 0.2 mL/site

投与時刻： 09 : 00～13 : 00

12. 試験系

種： ウサギ

系統： Kbt : JW

性： 雄

体重

繁殖生産者出荷時： 2.5～3.5 kg

検疫馴化開始時： 2.3～3.5 kg

月齢 (検疫馴化開始時)： 3～4 ヶ月齢

入手日： 2011年3月29日

入手動物数： 4匹

使用動物数： 3匹

繁殖生産者及び所在地： 株式会社バイオテック
〒841-0071 佐賀県鳥栖市原古賀町 976-11

動物選択の理由： 局所刺激性試験において頻繁に使用されている動物種であるため。

13. 飼育条件

(SOP : GTX/189, GTX/541, STE/202, HTL/303)

飼育室： 530 号室

温度： 許容範囲 19～25°C

湿度： 許容範囲 30～70%

換気回数： 15 回/時間

照明： 1 日 12 時間 (07 : 00～19 : 00 点灯) の人工照明

飼育ケージ

材質： ステンレス製あるいはアルミニウム製

大きさ： 630 mm (D) × 500 mm (W) × 360 mm (H)

収容数： 1 匹/ケージ

飼料： 固型飼料 (LRC4, オリエンタル酵母工業株式会社) 約 120 g を 1 日 1 回与える。使用するロットについてオリエンタル酵母工業株式会社より分析結果を入手し、SOP の基準値の範囲内であることを確認する。

飲水： 水道法水質基準に適合した水を自動給水装置を用いて自由に摂取させる。社団法人鹿児島県薬剤師会試験センターで年 4 回実施する検査の結果を入手し、SOP の基準値の範囲内であることを確認する。

環境エンリッチメント： おもちゃを常時供与する。

清掃及び消毒： 床を毎日清掃及び消毒する。
架台及びケージは、Cage and Rack Washer (Basil 4600, ステリス株式会社) で洗浄済みのものを使用する。
給餌器は週 1 回以上、オートクレーブ滅菌処理 (121°C, 30 分間) 済みのものと交換する。

落下細菌検査： 株式会社新日本科学 安全性研究所で年 4 回実施する落下細菌検査の結果を入手し、SOP の基準値の範囲内であることを確認する。

14. 動物の識別法

(SOP : GTX/502)

個体： 検疫馴化期間中は、各個体の左耳介内側に油性インクで記入した ACN (Acclimation Number) により識別する。選抜以降は、

右耳介内側に油性インクで記入した動物番号により識別する。
 ケージ： 検疫馴化期間中は試験番号及び ACN を表示したケージカード
 を使用する。選抜以降は試験番号、群及び動物番号を表示した
 カラーケージカードを使用する。

15. 検疫馴化

(SOP : STE/201)

7日間の検疫馴化を行う。検疫馴化期間中の観察及び検査の頻度並びに方法の詳細については、「19. 観察及び検査項目」を参照する。また、検疫馴化期間中に、投与時に使用する首枷保定器に馴れさせるため、約5分間の保定訓練を2日間実施する。耳介後静脈の走行性の良い動物を選んで試験に使用し、検疫馴化期間中に被験物質の評価に適さないと判断した動物については、投与の翌日に、ペントバルビタールナトリウム(東京化成工業株式会社)水溶液(64.8 mg/mL, 4 mL/body)を耳介静脈内投与し、安楽死させる。

16. 動物の選抜

(SOP : GTX/153)

検疫馴化終了日に、無作為に3匹を選抜し動物番号を割り当てる(MiTOX システム, Ver 2.0, 三井造船システム技研株式会社)。

選抜時の余剰動物については、投与の翌日に試験から除外する。

17. 試験群構成

群	被験物質及び対照物質		動物数 (動物番号)
	左耳	右耳	
1	4 mg/mL AcPepA (MPS-390)	生理食塩液	3 (1~3)

18. 投与濃度の設定の根拠

AcPepA の溶解性は、生理食塩液で4 mg/mL であるため、本試験では4 mg/mL を設定した。

19. 観察及び検査項目

19.1 一般状態

(SOP : GTX/151, RPS/031)

例数： 全例

観察頻度

検疫馴化期間中： 毎日1回以上

観察期間中： 毎日1回(投与日は投与前)以上

標本採取日： 1回

観察方法： 生死の確認とあわせて一般状態観察を行う。

19.2 体重

(SOP : STE/215)

例数 : 全例

測定時期

検疫馴化期間中 : 検疫馴化開始日及び検疫馴化終了日に1回

投与日 : 1回 (投与前)

標本採取日 : 1回 (標本採取時の麻酔量算出のため)

測定方法 : 電子天秤 (GP-20K, 株式会社エー・アンド・デイ) で測定する。

19.3 肉眼的観察

(SOP : STE/118)

例数 : 全例

観察時期 : 投与前, 投与後 1, 4, 8, 24, 48 及び 72 時間

観察方法 : 投与部位について以下の判定基準¹⁾に基づき判定評価する。また, 紅斑, 痂皮及び浮腫の形成が確認された時点で, それぞれについて長径及び短径を測定する。

A 紅斑及び痂皮の形成	評点
紅斑なし	0
非常に軽度な紅斑 (かろうじて識別できる)	1
はっきりした紅斑	2
中等度ないし高度紅斑	3
高度紅斑 (beet redness) からわずかな痂皮の形成 (深部損傷) まで	4

B 浮腫の形成	評点
浮腫なし	0
非常に軽度な浮腫 (かろうじて識別できる)	1
軽度浮腫 (はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる)	2
中等度浮腫 (約 1 mm の膨隆)	3
高度浮腫 (1 mm 以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり)	4

写真撮影 : 投与前は全例について, 各観察時は代表例 1 例以上の左右の投与部位について写真撮影を行う。

19.4 病理組織学的検査

(SOP : STE/118, PAT/032, PAT/053)

- 例数 : 全例
- 標本採取時期 : 投与後 72 時間の肉眼的観察終了後
- 標本採取方法 : 投与後 72 時間の肉眼的観察が終了した後、ペントバルビタールナトリウム（東京化成工業株式会社）水溶液（64.8 mg/mL, 0.7 mL/kg）の耳介後静脈内（標本作製部位よりも心臓側）投与による麻酔下で放血安楽死させ、投与部位を含むようにして耳介を摘出する。
- 固定方法 : 10%中性緩衝ホルマリン液で固定する。
- 標本作製方法 : 投与部位について、肉眼的に障害がみられる場合はその変化のうち最も著しい部分を含むように、肉眼的に障害がみられない場合は投与部位の中心部分から、互いに垂直な 2 ヶ所（左耳 : a, b, 右耳 : c, d）を切り出し、パラフィン包埋、薄切を行い、HE 染色を施す。切り出し部位については、別添 B に記載する。
- 検査方法 : 出血、浮腫、細胞浸潤、変性、壊死及び線維化などについて病理組織学的検査判定基準²⁾（別添 C）に基づき判定評価する。判定は 2 ヶ所のうち重篤な方の判定を採用する。
- 写真撮影 : 代表例 1 例以上について行う。

20. 統計学的手法

統計学的検定は実施しない。

21. 文献

- 1) Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther 1944; 82: 377-390.
- 2) 三上博輝, 徳本 純, 井上明文, 三浦智士, 呉晃一郎 : ヒトフィブリン糊 (ティシール) のウサギにおける局所刺激性及び局所傷害性試験, 応用薬理, 28, 337-355, 1984

22. 試験成績の報告

本試験の成績について、最終報告書の草案を試験委託者に 1 部提出する。最終報告書（和文）についてはその写し 1 部を試験委託者に提出する。

別添 1 被験物質に関する資料
被験物質の特性
被験物質の安定性

調製液の安定性
調製液の濃度測定

別添 2 表
1) 肉眼的観察
2) 病理組織学的検査

添付資料 信頼性保証陳述書

23. 記録, 資料及び標本の保存

記録, 資料及び標本は, 以下の保存場所に最終報告書作成後 10 年間保存する.

株式会社新日本科学 安全性研究所 データ資料室

試験計画書及び試験計画書変更書

試験スケジュール

被験物質及び対照物質 (媒体) に関する記録, 資料

試験系に関する記録, 資料

飼育条件に関する記録, 資料

検疫馴化記録

投与記録

一般状態観察記録

体重測定記録

肉眼的観察記録

肉眼的観察写真 (陰画を含む)

病理組織学的検査記録

病理標本作製記録

組織写真 (陰画を含む)

最終報告書草案

最終報告書

その他, 試験に関する資料

株式会社新日本科学 安全性研究所 器官保管室

ホルマリン固定標本 (真空パック)

パラフィン包埋標本

組織標本


24. 試験計画書の変更

試験計画内容に変更が生じた場合は、試験計画書変更書を作成し、変更箇所及びその理由を明確にする。

25. 試験計画書の作成及び承認

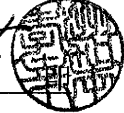
試験計画書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

山下 祐介 2011年3月28日

山下 祐介

試験計画書の承認

運営管理者 株式会社新日本科学 安全性研究所

洲加本 孝幸 2011年3月28日

洲加本 孝幸

試験計画書の承認

株式会社新日本科学 安全性研究所より提示された試験計画書を承認致します。

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

岡田 秀親 2011年4月12日

岡田 秀親

別添 A

調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定方法 総ページ 3 枚

調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定方法
(SOP : BIO/023)

本試験に用いる測定法は株式会社新日本科学 安全性研究所でバリデーションを実施した^り。

1. 標準物質

被験物質を標準物質として使用する。

2. 試薬

(SOP : BIO/250)

名称	等級	製造者
アセトニトリル	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
トリフルオロ酢酸 (TFA)	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
超純水	Milli-Q システムにて精製した水。	

3. 測定機器

名称	型式	製造者	SOP
HPLC システム	島津 10A	株式会社島津製作所	BIO/273
検出器	島津 SPD-10A	株式会社島津製作所	BIO/273
データ処理装置	LCsolution	株式会社島津製作所	BIO/273

4. 移動相の調製

(SOP : BIO/250)

以下の割合で調製する。

4.1 移動相 A の調製

超純水 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

4.2 移動相 B の調製

アセトニトリル 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

5. 標準溶液の調製 (n=1)

次表に従い、正確に標準溶液を調製する。

標準溶液名	採取物	採取量	使用液	調製量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
S	被験物質	10 mg	超純水	40	250
STD	S	2 mL	超純水	50	10

6. 試料溶液の調製 (n=2)

調製液をよく転倒混和した後、次表に従い正確に採取し、超純水を用いて正確に試料溶液を調製する。

試料溶液	採取液 (生理食塩液調製液)	採取量 (mL)	使用液	調製量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
T1	4 mg/mL 調製液	1	超純水	40	100 [t1]
	t1	1	超純水	10	10

[] 内は、調製途中の溶液名。

7. 測定法

7.1 HPLC 測定条件

検出器： 紫外吸光光度計 (測定波長：215 nm, AUX レンジ：2.0 AU/V)
 カラム： YMC-Pack Pro C18 RS (5 μm , 150 \times 4.6 mm i.d.; 株式会社ワイエムシィ)
 カラム温度： 40°C
 試料温度： 5°C
 移動相 A： 0.1%TFA 水溶液
 移動相 B： 0.1%TFA アセトニトリル溶液
 移動相の送液： 移動相 A 及び移動相 B の混合比を以下のように直線的に変えて濃度勾配制御する。

注入後からの 時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0 \rightarrow 5	70 \rightarrow 50	30 \rightarrow 50
5.01 \rightarrow 10	20	80
10 \rightarrow 20	70	30

流量： 1.0 mL/min
 注入量： 20 μL
 面積測定範囲： 5 分

7.2 システムの再現性

測定の開始時に、標準溶液 STD (調製濃度：10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 6 回繰り返して測定し、AcPepA (MPS-390) のピーク面積の相対標準偏差 (RSD) が 2.0%以下であれば適とする。

8. 調製液濃度の算出

標準溶液 STD を 2 回測定後、試料溶液 T1 を 1 回測定する。得られた標準溶液のピーク面積と調製濃度から LCsolution により検量線 (一点検量線法) を作成し、試料溶液中の AcPepA (MPS-390) 濃度を求め、次式により調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度及び含有率を算出

する。

調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度 (mg/mL)

$$= \text{試料溶液中の AcPepA (MPS-390) 濃度 } (\mu\text{g/mL}) \times \text{希釈倍率} \times 10^{-3}$$

含有率 (%) = 調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度 (mg/mL) / 目標濃度 (mg/mL) × 100

9. 測定結果の取扱い

ピーク面積, 試料溶液濃度及びシステムの再現性は, データ処理装置から出力された値を用いる。その後の計算には, 表計算ソフト Excel を用いる。算出される数値の表示桁数は以下のとおりとする。

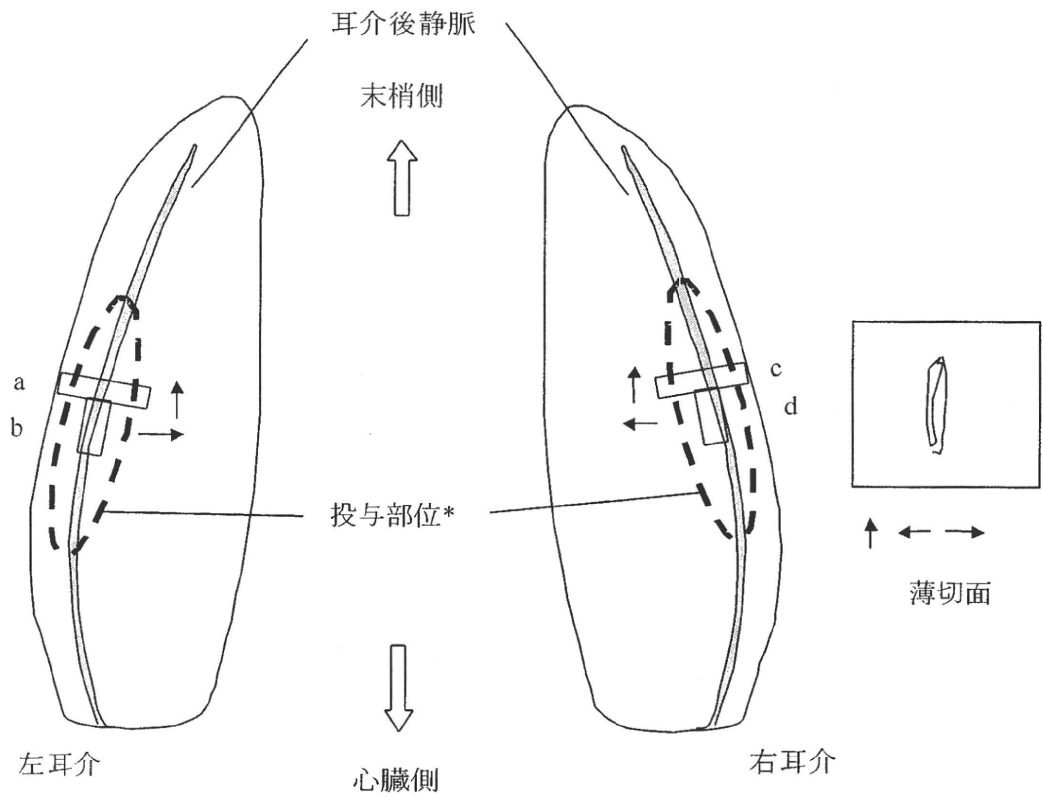
ピーク面積 :	小数点以下 1 桁
濃度値 :	有効数字 5 桁
Mean :	計算前の数値と同じ桁数
百分率表示値 :	小数点以下 1 桁

10. 参考文献

- 1) 山田聡美 : 調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定法バリデーション試験. 株式会社新日本科学 安全性研究所, 試験番号 SBL861-005, 最終報告書, 2011 年

別添 B

切り出し図.....総ページ 1 枚



* 投与部位については、肉眼的に障害がみられる場合はその変化のうち最も著しい部分を含むように、肉眼的に障害がみられない場合は投与部位の中心部分から、互いに垂直な2カ所を切り出す。

切り出し図

別添 C

病理組織学的検査判定基準..... 総ページ 1 枚

病理組織学的検査判定基準

所見		評点
1. 出血	出血なし	0
	ごく軽度の出血	1
	軽度の出血	2
	中等度の出血	3
	強い出血	4
2. 浮腫	浮腫なし	0
	ごく軽度の浮腫	1
	軽度の浮腫	2
	中等度の浮腫	3
	強い浮腫	4
3. 細胞浸潤	細胞浸潤なし	0
	ごく軽度の細胞浸潤	1
	軽度の細胞浸潤	2
	中等度の細胞浸潤	3
	強い細胞浸潤	4
4. 変性	変性なし	0
	ごく軽度の変性	1
	軽度の変性	2
	中等度の変性	3
	強い変性	4
5. 壊死	壊死なし	0
	ごく軽度の壊死	1
	軽度の壊死	2
	中等度の壊死	3
	強い壊死	4
6. 線維化	線維化なし	0
	ごく軽度の線維化	1
	軽度の線維化	2
	中等度の線維化	3
	強い線維化	4

試験計画書

表題： AcPepA (MPS-390) のカニクイザルにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験
及び 4 週間回復性試験

試験番号： SBL861-006

試験責任者： 楠元 正吾

株式会社新日本科学 安全性研究所

目 次

1. 表題.....	4
2. 試験目的.....	4
3. 適用規則.....	4
4. 動物福祉.....	4
5. 試験委託者.....	4
6. 試験施設.....	4
7. 試験場所（トキシコキネティクス測定：TK 測定）.....	5
8. 試験関係者.....	5
9. 試験日程.....	5
10. 被験物質及び対照物質（媒体）.....	6
10.1 被験物質.....	6
10.2 対照物質（媒体）.....	6
11. 被験物質調製液.....	6
12. 被験物質及び対照物質の投与.....	7
13. 試験系.....	8
14. 飼育条件.....	8
15. 動物の識別法.....	9
16. 馴化.....	10
17. 動物の群分け.....	10
18. 静脈内カテーテル留置手術.....	10
19. 試験群構成.....	11
20. 投与量設定の根拠.....	11
21. 観察及び検査項目.....	11
21.1 一般状態.....	11
21.2 一般症状及び神経行動学的機能観察.....	12
21.3 体重.....	12
21.4 摂餌量.....	13
21.5 眼科的検査.....	13
21.6 心電図検査.....	13
21.7 体温.....	14
21.8 血圧.....	14
21.9 呼吸数.....	14
21.10 尿検査.....	15
21.11 血液学的検査.....	16
21.12 血液生化学的検査.....	17