

21.13	血液ガス検査.....	18
21.14	骨髄検査（ミエログラム）.....	19
21.15	病理学的検査.....	19
21.15.1	剖検.....	20
21.15.2	器官重量（絶対及び相対重量）.....	21
21.15.3	病理組織学的検査.....	21
21.16	トキシコキネティクス.....	22
22.	統計学的手法.....	22
23.	文献.....	23
24.	試験成績の報告.....	23
25.	記録，資料，試料及び標本の保存.....	24
26.	試験計画書の変更.....	25
27.	試験計画書の作成及び承認.....	26
別添 A		
	調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度測定方法.....	総ページ 3 枚
別添 B		
	TK 測定計画書.....	総ページ 17 枚

### 1. 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

### 2. 試験目的

AcPepA (MPS-390) をカニクイザルに毎日 1 回 4 週間反復静脈内投与したときの毒性変化を調べるとともに、4 週間の休薬期間を設け、その回復性についても検討する。また、そのときの全体的曝露についても評価する。

### 3. 適用規則

本試験は、以下の GLP を遵守し、ガイドラインに準拠して実施する。

- ・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）
- ・「反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について」（平成 11 年 4 月 5 日医薬審第 655 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知）
- ・「トキシコキネティクス（毒性試験における全体的曝露の評価）に関するガイダンスについて」（平成 8 年 7 月 2 日薬審第 443 号厚生省薬務局審査課長通知）

### 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 IACUC861-006）、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

〒411-8124 愛知県豊橋市野依町山中 19-14

TEL : 0532-46-7501

FAX : 0532-46-8940

委託担当者 :

岡田 秀親

e-mail : hideokada@chojuken.net

### 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

運営管理者 :

洲加本 孝幸

e-mail : sukamoto-takayuki@sntl.co.jp

## 7. 試験場所（トキシコキネティクス測定：TK 測定）

株式会社新日本科学 薬物代謝分析センター

〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 16 番地 1

TEL : 073-483-8881

FAX : 073-483-7377

試験場所管理責任者： 鶴藤 雅裕

e-mail : uto-masahiro@snbl.co.jp

## 8. 試験関係者

試験責任者：

楠元 正吾

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

e-mail : kusumoto-shogo@snbl.co.jp

被験物質取扱い責任者： 真鍋 ひろ子

分析責任者（被験物質）： 山田 聡美

臨床検査責任者： 門倉 豪臣

病理検査責任者： 吉川 剛

統計解析責任者： 橋口 晃一

試験主任者（TK 測定）： 林 善治

株式会社新日本科学 薬物代謝分析センター

〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 16 番地 1

TEL : 073-483-8881

FAX : 073-483-7377

e-mail : hayashi-yoshiharu@snbl.co.jp

## 9. 試験日程

投与開始前日を-1 日目，投与開始日を投与 0 日目，投与期間終了の翌日を休薬 0 日目，投与開始週及び休薬開始週をそれぞれ投与及び休薬 1 週目と起算する。

試験開始日：	2011 年 3 月 7 日	
	(雄)	(雌)
馴化開始日：	2011 年 3 月 8 日	2011 年 3 月 9 日
馴化終了日／群分け日：	2011 年 3 月 28 日	2011 年 3 月 29 日
投与開始日：	2011 年 3 月 29 日	2011 年 3 月 30 日
投与終了日：	2011 年 4 月 25 日	2011 年 4 月 26 日
休薬開始日：	2011 年 4 月 26 日	2011 年 4 月 27 日
休薬終了日：	2011 年 5 月 23 日	2011 年 5 月 24 日

## 剖検日

投与期間終了時：	2011年4月26日	2011年4月27日
休薬期間終了時：	2011年5月24日	2011年5月25日

最終報告書草案作成日： 2011年7月29日

最終報告書作成日／試験終了日：2011年9月16日

## 10. 被験物質及び対照物質（媒体）

（SOP：TSB/002, TSB/004）

## 10.1 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：	投与期間終了後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1日及び2011年3月4日
入手日：	2011年3月8日
入手量：	37 g
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。
保存用被験物質：	約1 g
残余被験物質：	すべて被験物質管理責任者に移管する。

## 10.2 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

## 11. 被験物質調製液

（SOP：TSB/004, BIO/023）

調製濃度：	0.5, 1.5 及び 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 0.5, 1.5 及び 4 mg/mL 溶液をそれぞれ調製する。調製後、ろ過滅菌 (Stericup-GV あるいは Millex-GV, 日本ミリポア株式会社) する。
安定性：	0.5 及び 4 mg/mL 調製液について、投与開始前までに冷蔵、遮光、気密条件下で 2 日間+室温、遮光条件下で 24 時間安定であることを確認する。適合範囲について、安定性は測定直後を 100.0%とした場合、それぞれの測定濃度が 100.0±5.0%以内を適とする。方法の詳細については別添 A に記載する。
調製頻度：	2 日に 1 回以上
保存条件：	冷蔵、遮光、気密
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 0 及び 27 日目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。

## 12. 被験物質及び対照物質の投与

(SOP : GTX/210)

投与経路：	静脈内
投与経路の選択理由：	臨床適用経路に従う。
投与方法：	シリコンチューブをつないだポリウレタンチューブを、シリコンチューブ側より大腿静脈から後大静脈まで挿入し、急速及び持続投与する。チューブの挿入方法については、「18. 静脈内カテーテル留置手術」を参照する。 投与期間終了時剖検日の一般状態観察終了後にポンプを停止させ、速やかに三方活栓を閉める。投与期間終了時剖検例については、剖検時の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, 0.4 mL/kg) の橈側皮静脈内投与後に、背部から出たポリウレタンチューブを結んで切断する。休薬期間終了時剖検例については、塩酸ケタミン (Kamud Drugs Pvt. Ltd., 50 mg/mL) の筋肉内投与 (0.2 mL/kg, 10 mg/kg) による麻酔下で、背部から出たポリウレタンチューブを結んで切断する。同時にジャケットは脱がす。
急速投与：	埋め込んだカテーテル内のデッドボリューム (約 2.5 mL) を考慮し、ディスプレイブル注射筒を用いて投与する。
持続投与：	急速投与終了後、速やかに注射筒を交換し、インフュージョンポンプ (BSP-99M, Braintree Scientific Inc.) を用いて 2.5 mL/kg/hour の速度で 3 時間持続投与する。

投与方法の選択理由： カテーテル留置による静脈内投与は、カニクイザルの静脈内持続投与では通常用いられる方法であり、急速投与から持続投与へ速やかに移行するため、急速静脈内投与でも留置カテーテルを用いることとした。

投与回数及び投与期間： 1日1回、週7日、4週間投与（計28回投与、急速投与と持続投与をあわせて1回投与とする）

投与回数及び投与期間の選択理由：  
医薬品毒性試験法ガイドラインに従う。

#### 投与容量

急速投与： 2.5 mL/kg

持続投与： 7.5 mL/kg

投与液量は、最新の体重を基に個別に算出する。

#### 投与速度

急速投与： 10 mL/kg/min

持続投与： 2.5 mL/kg/hour

投与開始時刻（急速投与）： 09：00～14：00（尿検査日を除く）

### 13. 試験系

種： カニクイザル（purpose-bred）  
 体重（馴化開始時）： 雄 2.5～5.5 kg, 雌 2～5 kg  
 年齢（馴化開始時）： 3～6才  
 原産地： カンボジア  
 入手日： 雄 2011年3月8日, 雌 2011年3月9日  
 入手動物数： 雄 20匹, 雌 20匹 計 40匹  
 使用動物数： 雄 16匹, 雌 16匹 計 32匹  
 供給源： 株式会社新日本科学（予備飼育）  
 〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地  
 動物選択の理由： 毒性試験に用いる非げっ歯類の動物種の一つとしてサル（カニクイザル）が使用されており、株式会社新日本科学はカニクイザルの背景データが豊富であるため。

### 14. 飼育条件

（SOP：GTX/189, GTX/207, GTX/541, HTL/303）

試験区域： 大動物試験区域 II  
 温度： 許容範囲 23～29℃  
 湿度： 許容範囲 35～75%  
 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  
（検査、観察あるいは採血のため上記の照明時間以外に点灯／消灯する場合を除く）
- 飼育ケージ
- 材質： ステンレス
- 大きさ： 680 mm（D）×620 mm（W）×770 mm（H）
- 収容数： 1匹／ケージ
- 飼料： 固型飼料（HF Primate 5K91 12G 5K9J, Purina Mills, LLC）約108 g  
（約12 g × 9個）を1日1回14：30～16：00に与え、翌日の08：30～10：00に残った餌を回収する。投与期間中は投与前に餌の回収を行う。また、眼科的検査及び心電図検査日は検査終了後に餌を与える。静脈内カテーテル留置手術日は手術終了後に餌を与える。動物移動日の給餌は、移動後に行う。全例について血液学的検査及び血液生化学的検査のための採血日の前日、剖検日の前日及び16時間蓄尿採取のためのステンレス製尿受けセット日は17：00前後に残った餌を回収する。使用するロットについてPurina Mills, LLC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し、トリーツ（りんご又はさつまいも）を週2回以上与える。血液学的検査及び血液生化学的検査前日の餌回収後及びこれらの検査日の採血前、心電図測定日及び血圧測定日の測定前及び剖検日については、トリーツは与えない。
- 清掃： 室内及びケージを水で毎日清掃する。また休薬期間中は、動物は4週間に1回以上洗浄・消毒済みの飼育室に設置した洗浄・消毒済みのケージに移動する。
- 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。

## 15. 動物の識別法 (SOP：GTX/502)

- 個体： 馴化期間中は各個体の胸にネスコデルマーク（アルフレッサファーマ株式会社）あるいはアニマルマーカ（室町機械株式会

社)で記入したACN (Acclimation Number)により識別する。静脈内カテーテル留置手術以降はジャケット下部に油性インクで記入したACNにより識別する。群分け以降はジャケット胸部に油性インクで記入した動物番号により識別する。ジャケットの除去以降は、胸にネスコデルマーク (アルフレッサファーマ株式会社) あるいはアニマルマーカ (室町機械株式会社) で記入した動物番号により識別する。

ケージ： 馴化期間中は試験番号，ACN，性別及びバーコード (一般状態観察時の個体識別に使用) を表示したケージカードを使用する。群分け以降は試験番号，群，投与量，性別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。

## 16. 馴化

(SOP : GTX/203)

検疫済みのカニクイザル (雌雄各 20 匹) を入手し，その後，3 週間の馴化期間を設ける。馴化期間中における観察及び検査の頻度ならびに方法の詳細については，「21. 観察及び検査項目」を参照する。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，群分けまでに試験から除外する。

## 17. 動物の群分け

(SOP : GTX/153)

馴化終了日に，群間で体重に偏りが生じないように，体重の層別無作為化 (MiTOX システム，Ver 2.0，三井造船システム技研株式会社) によって群分けする。

群分け時の余剰動物については，初回投与の翌日に試験から除外する。

## 18. 静脈内カテーテル留置手術

(SOP : GTX/199)

-18~-12 日目に，全例 (雌雄各 20 匹) について実施する。メデトミジン水溶液 (ドミトール，Orion Corporation，1 mg/mL) を 0.08 mL/kg，塩酸ケタミン水溶液 (50 mg/mL) を 0.2 mL/kg で筋肉内投与する。麻酔下にて，静脈内持続投与用のポリウレタンチューブを大腿静脈から後大静脈まで挿入する。なお，ポリウレタンチューブの挿入端にはシリコンチューブをつなぐ。チューブの後端を皮下を通して背部から体外に取り出し，ステンレス製テャーサー (Lomir Biomedical Inc.) の中を通して，シーベル (Lomir Biomedical Inc.) に接続し，さらに，シーベルと注射筒をポリウレタンチューブで接続する。動物にはジャケット (Lomir Biomedical Inc.) を着せてテャーサー基部をジャケットに固定する。なお，注射筒先端から留置したカテーテルの先端までのデッドボリュームを埋め込み前に測定しておく。麻酔下でのカテーテル留置操作終了後は，動物が覚醒している場合を除いて，アチパメゾール水溶液 (アンチセダン，Orion



Corporation, 5 mg/mL) を 0.04 mL/kg で筋肉内投与する。術後、術日を含め 3 日間は 1 日 1 回、マイシリンゾル明治 (明治製菓株式会社) を筋肉内に 0.05 mL/kg で投与する。カテーテル留置終了後は、投与時を除き、生理食塩液を 2 mL/hr の投与速度で持続注入する。また、動物の鎮痛処置のため、術日は術前及び術後に 1 回、ブプレノルフィン (商品名: レペタン, 0.005 mg/kg) を筋肉内投与し、以降 2 日間、午前及び午後各 1 回 (投与間隔は 8 時間以上とする)、同様に鎮痛処置を行う。

## 19. 試験群構成

対照群 1 群, 被験物質群 3 群

群	被験物質 及び 対照物質	投与量 (mg/kg/日)		投与容量 (mL/kg/日)		投与液 濃度 (mg/mL)	剖検 時期	動物数 (動物番号)	
		急速	持続	急速	持続			雄	雌
1	生理食塩液	-		10		-	ERC	2 (1, 2)	2 (6, 7)
		-	-	2.5	7.5			EDA 3 (3~5)	3 (8~10)
2	AcPepA	5		10		0.5	EDA	3 (11~13)	3 (14~16)
		1.25	3.75	2.5	7.5				
3	AcPepA	15		10		1.5	EDA	3 (17~19)	3 (20~22)
		3.75	11.25	2.5	7.5				
4	AcPepA	40		10		4	ERC	2 (23, 24)	2 (28, 29)
		10	30	2.5	7.5			EDA 3 (25~27)	3 (30~32)

EDA : 投与期間終了時

ERC : 休薬期間終了時

## 20. 投与量設定の根拠

AcPepA のカニクイザルを用いた 3 日間反復静脈内投与試験<sup>1)</sup> では、急速投与 20 mg/kg/日、持続投与 60 mg/kg/日の投与により被験物質投与に起因すると考えられる毒性学的に意義のある変化はみられなかった。また、本剤の臨床での投与は 1.2 mg/kg/hour の 3 時間持続投与を想定している。従って、臨床想定用量の 10 倍を超える量として 40 mg/kg/日を高用量に設定し、急速投与 10 mg/kg/日、持続投与 30 mg/kg/日とした。また、公比約 3 で減じた急速投与 3.75 mg/kg/日、持続投与 11.25 mg/kg/日 (計 15 mg/kg/日)、ならびに急速投与 1.25 mg/kg/日、持続投与 3.75 mg/kg/日 (計 5 mg/kg/日) を中及び低用量に設定した。

## 21. 観察及び検査項目

### 21.1 一般状態

(SOP : GTX/151, GTX/208)

例数 : 全例

## 観察頻度

馴化期間中： 毎日1回以上  
 投与期間中： 毎日3回（投与前，持続投与開始後約1時間，持続投与終了後約1時間）以上  
 休薬期間中： 毎日1回以上  
 剖検日： 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。

## 21.2 一般症状及び神経行動学的機能観察

(SOP : PHA/091)

例数： 全例  
 観察ポイント  
 投与期間中： 投与1日目に1回（持続投与開始後1～3時間）  
 休薬期間中： 休薬1日目に1回（持続投与開始後1～3時間相当時刻）  
 観察方法： FOB法を用いて，ホームケージ内観察及び操作試験による一般症状及び神経行動学的機能観察を行う。下記に評価項目，観察の方法及び測定の方法を詳述する。評価項目にない症状が発現した場合は，その症状を記録する。

評価項目
姿勢，意識，行動，歩行，手の力と動き，脚の力と動き，眼瞼閉鎖状態，中枢神経系の興奮，嘔吐，流涙，流涎，視覚反応，聴覚反応，筋緊張，触覚反応，眼瞼反射，耳介反射，瞳孔反射，痛覚反応

ホームケージ内観察： ホームケージ内の動物をケージの外から観察する。  
 操作試験： 動物に外的刺激を与え，その反応を観察する。

## 21.3 体重

(SOP : GTX/211)

例数： 全例  
 測定時期  
 馴化期間中： 馴化開始日及び馴化終了日に1回  
 投与期間中： 投与6，13，20及び27日目に1回（投与前）  
 休薬期間中： 休薬6，13，20及び27日目に1回  
 剖検日： 1回（器官重量の相対重量算出のため）  
 測定方法： 電子天秤（HP-40K，株式会社エー・アンド・デイ）で測定する。

## 21.4 摂餌量

(SOP : GTX/213)

例数 :	全例
測定時期	
馴化期間中 :	-7 日目より毎日
投与及び休薬期間中 :	毎日
測定方法 :	給餌個数と残餌個数を記録して、1 日あたりの摂餌量 (g) を算出する。

## 21.5 眼科的検査

(SOP : GTX/248)

例数 :	全例
検査時期	
馴化期間中 :	-20 日目に 1 回
投与期間中 :	投与 23 日目に 1 回 (持続投与終了後)
休薬期間中 :	休薬 23 日目に 1 回
検査方法 :	ペンライトあるいはポータブルスリットランプ (SL-14, 有限会社幸田電子あるいは SL-15, 興和株式会社) を用いて肉眼及び対光反射検査を実施する。散瞳剤 (ミドリン P 点眼液, 参天製薬株式会社) の点眼後に塩酸ケタミン (Kamud Drugs Pvt. Ltd., 50 mg/mL) を筋肉内投与 (0.2 mL/kg, 10 mg/kg) し、麻酔下でポータブルスリットランプ (SL-14, 有限会社幸田電子あるいは SL-15, 興和株式会社) を用いて前眼部及び中間透光体、額帯式双眼倒像検眼鏡 (ID-10, 株式会社トプコンあるいは IO- $\alpha$ Small Pupil, 株式会社ナイツ) を用いて眼底を検査する。
写真撮影 :	眼底に異常が認められた場合は手持ち眼底カメラ (Genesis, 興和株式会社) を用いて写真撮影を行う。馴化期間中は全例について眼底の写真撮影を行う。

## 21.6 心電図検査

(SOP : GTX/531)

例数 :	全例
検査時期	
馴化期間中 :	-3 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間相当時刻)
投与期間中 :	投与 21 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間)
休薬期間中 :	休薬 22 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間相当時刻)

- 検査方法： 無麻酔下で保定用ケージに動物を座位状態にして実施する。心電図 (I, II, III 及び aVR, aVL, aVF) は動物用心電計 (カーディサニーα 6000AX-D あるいはカーディサニーD500, フクダエム・イー工業株式会社) を介して, ECG Processor (SP-2000, 株式会社ソフトロン) で測定し, 第 II 誘導の 8 秒間の連続波形を加算平均させた波形を解析する。
- 評価項目： 心拍数 (beats/min), PR 間隔 (ms), QRS 時間 (ms), QT 間隔 (ms) 及び QTc (Bazett の式)

### 21.7 体温

(SOP : GTX/214)

- 例数： 全例
- 検査時期
- 馴化期間中： -5 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間相当時刻)
- 投与期間中： 投与 21 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間)
- 休薬期間中： 休薬 22 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間相当時刻)
- 検査方法： 無麻酔下でテルモ電子体温計 (C402, テルモ株式会社) を用いて直腸温を測定する。

### 21.8 血圧

(SOP : GTX/197)

- 例数： 全例
- 検査時期
- 馴化期間中： -5 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間相当時刻)
- 投与期間中： 投与 21 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間)
- 休薬期間中： 休薬 22 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間相当時刻)
- 検査方法： 無麻酔下で全自動血圧測定装置 (BP-8800NC, オムロンコーリン株式会社) を用いて, 上腕部から測定する。
- 評価項目： 拡張期血圧及び収縮期血圧 (mmHg)

### 21.9 呼吸数

(SOP : GTX/216)

- 例数： 全例
- 検査時期
- 馴化期間中： -5 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間相当時刻)
- 投与期間中： 投与 21 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間)
- 休薬期間中： 休薬 22 日目に 1 回 (持続投与開始後 1~3 時間相当時刻)

検査方法： 動物を保定し、15秒間の呼吸数を測定する。測定した値を1分間当たりの値に換算し、これを呼吸数とする。

#### 21.10 尿検査

(SOP : GTX/218, HTL/005, HTL/008, HTL/012, HTL/149, HTL/215, HTL/228)

例数： 全例

##### 検査時期

馴化期間中： -7日目に1回  
 投与期間中： 投与26日目に1回  
 休薬期間中： 休薬26日目に1回

採尿方法： 新鮮尿については、投与期間中は投与前、馴化及び休薬期間中は午前中にケージにステンレス製尿受けをセットし、2時間以内の尿を採取する。蓄尿については、17:00前後にステンレス製尿受けをセットし、翌朝までの約16時間の蓄尿を採取する。

検査項目及び方法： 次の表に示す。

##### 新鮮尿による検査

検査項目	単位	測定方法	機種
色調	-	肉眼による	-
pH	-	試験紙法	Clinitek AtlasXL <sup>a)</sup>
ケトン体	-	試験紙法	
ビリルビン	-	試験紙法	
尿潜血	-	試験紙法	
ウロビリノーゲン	-	試験紙法	
蛋白	mg/dL	プロモピロガロールレッド・インジウム錯体法	UM-3410 <sup>b)</sup>
ブドウ糖	mg/dL	GOD 過酸化水素電極法	
尿沈渣 <sup>c)</sup>	-	Sternheimer-Malbin 染色後鏡検	-

a) 全自動尿分析装置 (Sparton Medical Systems)

b) 全自動尿成分定量分析装置 (株式会社アークレイファクトリー)

c) 検査項目：赤血球，白血球，上皮細胞，結晶，細菌，精子（雄のみ），円柱及びその他

##### 蓄尿による検査

検査項目	単位	測定方法	機種
尿量	mL	メスシリンダー使用	-
尿比重	-	尿比重屈折計法	ユリコン-JE <sup>d)</sup>
ナトリウム	mEq/L, mEq <sup>e)</sup>	電極法	PVA-αIII <sup>f)</sup>

検査項目	単位	測定方法	機種
カリウム	mEq/L, mEq <sup>o</sup> )	電極法	PVA-αIII <sup>o</sup> )
塩素	mEq/L, mEq <sup>o</sup> )	電量滴定法	

d) 尿比重屈折計 (株式会社アタゴ)

e) 総排泄量については尿量と濃度から算出し、総排泄量のみを評価に用いる。

f) 全自動電解質分析装置 (株式会社エイアンドティー)

## 21.11 血液学的検査

(SOP : GTX/217, HTL/034, HTL/196, HTL/225)

例数 : 全例 (死亡例は除く)

検査時期

馴化期間中 : -6 日目に 1 回

投与期間中 : 投与 27 日目に 1 回 (投与前)

休薬期間中 : 休薬 27 日目に 1 回

瀕死時 : 剖検前 (可能な限り)

採血量 : 約 2.5 mL

採血方法 : ADVIA120 を用いる測定項目には、大腿静脈より約 1 mL 採血し、EDTA-2K で抗凝固処理した全血を使用する。CA-7000 を用いる測定項目には、大腿静脈より 3.8 w/v%クエン酸ナトリウム溶液を 150 μL 添加した注射筒を用いて約 1.5 mL 採血し、遠心分離 (4°C, 1710×g, 3000 rpm, 15 分間) して得られた血漿を使用する。

血液塗抹標本 : 残余血液を用いて、ライト染色を施した血液塗抹標本を作製し、鏡検は ADVIA120 の測定結果から試験責任者の判断により行う。鏡検を実施しない場合、血液塗抹標本は試験終了までに廃棄する。

検査項目及び方法 : 次の表に示す。

検査項目	単位	測定方法	機種
赤血球	10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120 <sup>a)</sup>
白血球	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	
ヘマトクリット	%	計算式 : (平均赤血球容積×赤血球) / 10	
ヘモグロビン	g/dL	シアンメトヘモグロビン変法	
血小板	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	
平均赤血球容積	fL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	
平均赤血球ヘモグロビン量	pg	計算式 : (ヘモグロビン / 赤血球) × 10	

検査項目	単位	測定方法	機種
平均赤血球ヘモグロ ビン濃度	g/dL	計算式：[ヘモグロビン / (赤血球×平均 赤血球容積)] ×1000	ADVIA120 <sup>a)</sup>
網赤血球	%	RNA 染色法による レーザーフローサイトメトリー法	
白血球分類 <sup>b)</sup>	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> , %	ペルオキシダーゼ染色による フローサイトメトリー法及び 2角度レーザーフローサイトメトリー法	
プロトロンビン時間	s	凝固法	CA-7000 <sup>c)</sup>
活性化部分トロンボ プラスチン時間	s	凝固法	

a) 総合血液学検査装置 (Siemens Healthcare Diagnostics Manufacturing Ltd.)

b) 検査項目：好酸球，好塩基球，好中球，単球，リンパ球及び大型非染色細胞

c) 全自動血液凝固測定装置 (シスメックス株式会社)

## 21.12 血液生化学的検査

(SOP : GTX/217, HTL/175)

例数： 全例 (死亡例は除く)

検査時期

馴化期間中： -6 日目に 1 回  
 投与期間中： 投与 27 日目に 1 回 (投与前)  
 休薬期間中： 休薬 27 日目に 1 回  
 瀕死時： 剖検前 (可能な限り)

採血量： 約 2 mL

採血方法： 大腿静脈から採血し，室温で 20～60 分間静置後，遠心分離 (室  
温，1710×g，3000 rpm，15 分間) して得られた血清を用いる。

検査項目及び方法： 次の表に示す。

検査項目	単位	測定方法	機種
アスパラギン酸アミノトラン スフェラーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	JCA-BM8 <sup>a)</sup>
アラニンアミノトランスフェ ラーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
アルカリフォスファターゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
クレアチンホスホキナーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
乳酸脱水素酵素	IU/L	JSCC 標準化対応	
総ビリルビン	mg/dL	バナジン酸酸化法	

検査項目	単位	測定方法	機種
総蛋白	g/dL	ビウレット法	JCA-BM8 <sup>a)</sup>
アルブミン	g/dL	BCG 法	
グロブリン	g/dL	計算式：総蛋白-アルブミン	-
A/G 比	-	計算式：アルブミン/グロブリン	
総コレステロール	mg/dL	COD-HDAOS 法	JCA-BM8 <sup>a)</sup>
トリグリセリド	mg/dL	GPO-HDAOS 法, グリセリン消去法	
ブドウ糖	mg/dL	ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法	
尿素窒素	mg/dL	ウレアーゼ・GIDH 法	
クレアチニン	mg/dL	クレアチナーゼ・F-DAOS 法	
無機リン	mg/dL	PNP-XDH 法	
カルシウム	mg/dL	MXB 法	
ナトリウム	mEq/L	電極法	
カリウム	mEq/L	電極法	
塩素	mEq/L	電極法	

a) 自動分析装置（日本電子株式会社）

### 21.13 血液ガス検査

(SOP : GTX/217, EQU/024)

例数： 全例（死亡例は除く）

検査時期

馴化期間中： -6 日目に 1 回

投与期間中： 投与 27 日目に 1 回（投与前）

休薬期間中： 休薬 27 日目に 1 回

採血量： 約 0.5 mL

採血方法： 大腿動脈あるいは尾動脈より採血し、ヘパリンリチウム加注射筒（PREZA-PAK II, テルモ株式会社）で抗凝固処理した全血を使用する。

検査方法： 以下の項目について、採血後ただちにポータブル血液分析器（i-STAT 300F, Abbott Point of Care Inc.）を用いて測定する。

検査項目	単位	測定方法	カートリッジ
pH	-	電極法	G3 <sup>+</sup>
酸素分圧	mmHg	電極法	
炭酸ガス分圧	mmHg	電極法	
ヘモグロビン酸素飽和度	%	計算	



## 21.14 骨髓検査 (ミエログラム)

(SOP : HTL/034, HTL/046, HTL/230)

- 例数 : 全例 (死亡例を除く)  
 瀕死例については, 可能な限り実施する.
- 検査時期 : 剖検時
- 採取部位 : 胸骨
- ミエログラム : 骨髓塗抹標本を作製し, メイグリュンワルドとギムザの二重染色を実施する. なお, 血液学的検査の測定結果から考えて, 検査が必要と判断される場合にはミエログラムを検査する.

## 21.15 病理学的検査

病理学的検査器官及び組織一覧表

器官及び組織名	器官重量	固定	病理組織学的検査 (標本作製及び検査)
気管	-	○	○
肺 (気管支を含む)	左	○	○
	右		○
舌	-	○	○
顎下腺	左	○	○
	右	○	○
食道	胸部	-	○
胃	胃体部	-	○
	幽門部	-	○
小腸	十二指腸	-	○
	空腸	-	○
	回腸 <sup>a)</sup>	-	○
大腸	盲腸	-	○
	結腸	-	○
	直腸	-	○
膵臓	-	○	○
肝臓	○ <sup>b)</sup>	○	○
胆嚢	-	○	○
大動脈	胸部	-	○
心臓	○	○	○
腎臓	左	○	○
	右	○	○
膀胱	-	○	○
精巣	左	○	○
	右	○	○
精巣上体	左	○	○
	右	○	○
前立腺	○	○	○
精嚢	左	○	○
	右		-
卵巣	左	○	○
	右	○	○
子宮	○	○	○
膣	-	○	○

器官及び組織名		器官重量	固定	病理組織学的検査 (標本作製及び検査)
脳	大脳 <sup>c)</sup>	○	○	○
	小脳			○
	橋			○
	延髄			○
脊髄	胸部	-	○	○
坐骨神経	左	-	○	○
	右	-	○	-
胸骨/胸骨骨髓		-	○	○
大腿骨/大腿骨骨髓	左	-	○	○
	右	-	○	-
顎下リンパ節	左	-	○	○
	右	-	○	-
腸間膜リンパ節		-	○	○
脾臓		○	○	○
胸腺		○	○	○
下垂体		○	○	○
甲状腺/上皮小体	左	○	○	○
	右	○	○	○
副腎	左	○	○	○
	右	○	○	○
眼球/視神経	左	-	○	○
	右	-	○	○
涙腺	左	-	○	○
	右	-	○	○
骨格筋(腓腹筋)	左	-	○	○
	右	-	○	-
乳腺/皮膚(胸部)	左	-	○	○ <sup>d)</sup>
	右	-	○	-
皮膚(背部) <sup>e)</sup>		-	○	○
投与部位(カテーテル留置部位) <sup>f)</sup>		-	○	○
肉眼的異常部位		-	○	○

○：実施する

-：実施しない

a) パイエル板を含む

b) 胆嚢を含む

c) 頭頂葉，側頭葉，間脳

d) 乳腺は雌のみ

e) 肩甲間部

f) 後大静脈(横断)

## 21.15.1 剖検

(SOP : GTX/125, PAT/053, PAT/094)

例数： 全例

検査時期

死亡例： 発見後速やかに実施する。

瀕死例： 試験責任者の判断により，速やかに実施する。

生存例： 投与あるいは休薬期間終了の翌日

## 検査方法

- 死亡例： 体重を測定後，外表，内部器官及び組織を肉眼的に観察する。
- 瀕死例： 体重を測定後，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, 0.4 mL/kg）の橈側皮静脈内投与により麻酔を行い，放血安楽死させ，外表，内部器官及び組織を肉眼的に観察する。
- 生存例： 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, 0.4 mL/kg）の橈側皮静脈内投与により麻酔を行い，体重を測定後，放血安楽死させ，外表，内部器官及び組織を肉眼的に観察する。

## 21.15.2 器官重量（絶対及び相対重量）

(SOP : PAT/011)

- 例数： 全例
- 測定方法： 病理学的検査器官及び組織一覧表に示す器官について，電子天秤（HR-200, FX-3000N, GF-3000 あるいは HF-3000, 株式会社 エー・アンド・デイ）を用いて測定する。さらに，剖検時の体重から 1 kg あたりの相対重量を算出する。なお，左右個別に測定した器官については，左右の合計値も算出する。

## 21.15.3 病理組織学的検査

(SOP : PAT/032, PAT/070)

- 検査器官及び組織： 病理学的検査器官及び組織一覧表に示す。
- 固定
- 例数： 全例
- 方法： 眼球及び視神経は 3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン混合液，精巣はブアン液，その他の器官及び組織は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定する。
- 標本作製
- 例数： 全例
- 方法： パラフィン包埋及び薄切を行い，HE 染色を施す。脱灰が必要な硬組織については，カルキトックスにて行う。
- 検査
- 例数： 全例
- 方法： 病理組織学的に検査する。

## 21.16 トキシコキネティクス

(SOP : GTX/217, HTL/501)

例数 :	全例 (対照群全例についても測定を実施する)
採血ポイント	
投与開始日 :	急速投与終了直後, 持続投与開始後約 1 時間, 持続投与終了直前, 終了後約 1, 2 及び 4 時間 (6 ポイント)
投与終了日 :	急速投与開始前, 急速投与終了直後, 持続投与開始後約 1 時間, 持続投与終了直前, 終了後約 1, 2 及び 4 時間 (7 ポイント)
採血量 :	約 0.6 mL (各採血ポイント, 血漿量として約 0.2 mL)
採血方法 :	大腿静脈から採血し, EDTA・2K で抗凝固処理を行う。血液は速やかに遠心分離 (4°C, 1710×g, 3000 rpm, 15 分間) し, 得られた血漿は超低温フリーザー (許容範囲 : -70°C 以下) で凍結保存する。
送付方法 :	凍結血漿はドライアイス存在下で試験場所に送付する。
測定対象物質 :	AcPepA
測定対象物質の血漿中での安定性 :	AcPepA はカニクイザルの凍結血漿中 (-70°C 以下) で 15 日間安定であることが「LC/MS/MS によるサル血漿中 AcPepA 中濃度測定法バリデーション (試験番号 : PBC861-001)」で確認されている。
測定 :	測定は試験場所で LC/MS/MS 法を用いて実施する。測定方法の詳細については別添 B に記載する。
パラメータ :	最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ), 最高血漿中濃度到達時間 ( $T_{max}$ ), 血漿中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{0-4h}$ ) を個体別に算出する。なお, 対照群についてはパラメータを算出しない。
残余サンプル :	TK 測定報告書作成までに廃棄する。
TK 測定報告書 :	試験主任者 (TK 測定) が作成した TK 測定報告書の写しを入手する。

## 22. 統計学的手法

(SOP : CPU/105)

各群の馴化期間中及び投与期間中の体重, 摂餌量, 心電図検査, 体温, 血圧, 呼吸数, 尿検査 [定量データ (電解質濃度を除く)], 血液学的検査, 血液生化学的検査, 血液ガス検査, 骨髄検査 (ミエログラム, 実施した場合), 器官重量 (絶対及び相対重量) のデータについては, まず, Bartlett 法により等分散性の検定を行う。その結果, 等分散性が認められた場合は Dunnett 法を用いて, 等分散性が認められなかった場合は Dunnett 型検定 (Miller 検定) を用いて, それぞれ対照群と被験物質各群との間で多重比較を行う。尿検査の評価段階付きのデータについて