

6.4.1	動物種.....	14
6.4.2	系統.....	14
6.4.3	系統選択の理由.....	14
6.4.4	微生物レベル.....	14
6.4.5	購入先.....	14
6.4.6	購入時週齢.....	14
6.4.7	購入動物数及び性別.....	14
6.4.8	検疫・馴化.....	15
6.4.9	投与開始時週齢.....	15
6.4.10	投与開始時体重.....	15
6.4.11	群分け.....	15
6.4.12	動物の識別.....	15
6.4.13	余剰動物の取扱.....	16
6.5	飼育環境.....	16
6.5.1	飼育室.....	16
6.5.2	飼育環境.....	16
6.5.3	飼育器材.....	16
6.5.4	収容動物数.....	17
6.5.5	飼料.....	17
6.5.6	飲用水.....	17
6.6	投与.....	18
6.6.1	投与経路.....	18
6.6.2	投与経路の選択理由.....	18
6.6.3	投与方法.....	18
6.6.4	投与方法の選択理由.....	18
6.6.5	投与液量.....	18
6.6.6	投与回数・期間.....	18
6.6.7	投与用量及びその設定理由.....	18
6.7	群構成.....	19
6.8	観察・検査項目.....	19
6.8.1	一般状態.....	19
6.8.2	体重.....	19
6.8.3	摂餌量.....	19
6.8.4	血液学的検査.....	20
6.8.5	血液生化学的検査.....	20
6.8.6	病理学的検査.....	22
6.9	統計学的解析.....	23
6.9.1	毒性試験データ.....	23
6.10	コンピュータシステムの使用.....	24

6.10.1	使用したコンピュータシステム	24
6.10.2	コンピュータシステムのプロトコール番号	24
6.10.3	コンピュータシステムを使用する操作	24
7.	結果	25
7.1	死亡・瀕死	25
7.2	一般状態	25
7.3	体重	25
7.4	摂餌量	25
7.5	血液学的検査	25
7.6	血液生化学的検査	26
7.7	器官重量	26
7.8	病理解剖検査	27
8.	考察	28
9.	特記事項	29
9.1	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	29
9.2	試験計画書に従わなかったこと	29

List of Annexes

Annex 1	分析証明書 (分析証明書番号 : P120567-COA1-A1)	30
Annex 2	分析証明書 (分析証明書番号 : P120567-COA5)	32
Annex 3	Certificate of Analysis (Certification No.: B120716-001)	34

List of Tables

Table 1	Clinical Sign - Summary	35
Table 2	Body Weight - Summary	39
Table 3	Body Weight Gain - Summary	41
Table 4	Food Consumption - Summary	43
Table 5	Hematology - Summary	45
Table 6	Blood Chemistry - Summary	59
Table 7	Organ Weight - Summary	75
Table 8	Relative Organ Weight - Summary	83
Table 9	Necropsy Findings - Summary	91

List of Appendices

Appendix 1	Clinical Sign	94
Appendix 2	Body Weight	102
Appendix 3	Body Weight Gain	110
Appendix 4	Food Consumption	118
Appendix 5	Hematology	126

Appendix 6 Blood Chemistry 150
Appendix 7 Organ Weight 158
Appendix 8 Relative Organ Weight 166
Appendix 9 Pathological Findings..... 174

最終ページ : 183

3. 試験実施概要

3.1 表題

P092 のラットを用いる 2 週間反復経口投与毒性試験

3.2 試験番号

B120718

3.3 試験目的

P092 をラットに 14 日間反復経口投与し、毒性変化を惹起する用量とその変化の内容を検討する。

3.4 適用ガイドライン

なし

3.5 適用 GLP

なし

3.6 試験委託者

国立大学法人岐阜大学

〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1

委託責任者 桑田 一夫

TEL : 058-230-6143, FAX : 058-230-6144

3.7 試験受託者

三菱化学メディエンス株式会社

〒108-8559 東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号

3.8 試験施設

3.8.1 名称及び所在地

三菱化学メディエンス株式会社 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1

3.8.2 試験責任者

中舘 豊

三菱化学メディエンス株式会社

創薬支援事業本部 試験研究センター 安全性研究部

TEL : 0479-46-7394, FAX : 0479-46-7505

3.8.3 分担責任者

病理学的検査：隈部 志野

3.8.4 主な試験従事者

動物入荷，檢疫及び馴化：	相見 真紀
群分け：	黒崎 智晴
投与液の調製：	鈴木 芙美恵
投与：	草野 理美
一般状態観察：	相見 真紀
体重測定：	相見 真紀
摂餌量測定：	高橋 一彰
採血（血液・血液生化学的検査）：	岩井 淳
血液学的検査：	梶 直子
血液生化学的検査：	作田 直道
麻酔（計画解剖時）：	岩井 淳
剖検：	隈部 志野
器官重量測定：	島田 真己子

3.8.5 試験日程

試験開始：	2012年10月17日
動物入荷：	2012年10月17日
群分け：	2012年10月22日
投与開始：	2012年10月23日
投与期間終了後解剖：	2012年11月2日*，2012年11月6日
試験終了：	本最終報告書への試験責任者署名日とする。

*：250 mg/kg/日群は第11日に解剖した。

3.8.6 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存室に保存する。保存期間は試験終了後10年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。

3.8.7 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 試験計画書変更書 (No. 1)
- (3) 被験物質に関する資料
- (4) 使用動物に関する資料
- (5) 試験結果に関する資料
- (6) 標本
- (7) 通信文書等の記録文書

(8) 最終報告書

3.9 その他

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針（三菱化学メディエンス株式会社 試験研究センター）」に基づき、動物実験委員会審査及び試験研究センター長の承認を得た。

4. 試験責任者署名

表 題：P092 のラットを用いる 2 週間反復経口投与毒性試験

試験番号：B120718

試験責任者：

2013 年 3 月 14 日

中 舘 豊



中舘 豊
三菱化学メディエンス株式会社
創薬支援事業本部 試験研究センター
安全性研究部

5. 要約

P092 をラット (CrI: CD (SD), 雌雄各 5 匹/群) に, 0, 20, 80 及び 250 mg/kg/day の用量で, 2 週間反復経口投与し, 現れる毒性変化を確認した. なお, 対照群 (0 mg/kg/day) には媒体 (0.5 w/v%メチルセルロース水溶液) のみを投与した.

その結果, 死亡が 250 mg/kg/day 群の雄 4 例及び雌 1 例で認められた. 第 6 日に雄 1 例, 第 9 日に雌雄各 1 例, 第 10 日に雄 2 例が死亡した. 死亡例では下痢又は軟便が雄 2 例で第 4 日に, 被毛の汚れ (顔面及び肛門周囲) が雄 1 例で第 4 及び 5 日に, 削瘦が雄 2 例で第 9 日に認められた. さらに死亡例では体重及び摂餌量の減少が雌雄全例で第 4 及び 8 日にみられ, 剖検では盲腸の拡張が雌雄全例, 十二指腸～結腸の拡張が雄 1 例, 腺胃粘膜の暗赤色斑が雄 3 例及び雌 1 例, 脾臓の小型化が雌雄全例, 胸腺の小型化が雄 3 例, 精囊及び前立腺の小型化が雄 2 例で認められた.

計画解剖動物では, 一般状態観察において, 削瘦, 腹部又は胸部の脱毛及びびらんが 250 mg/kg/day 群の雌 2 例で第 9～11 日に認められた.

体重の増加抑制が 80 mg/kg/day 群の雌雄で第 4 日以降に, 体重の減少が 250 mg/kg/day 群の雌雄で第 4 日以降に認められた.

摂餌量の減少又は減少傾向が 80 mg/kg/day 群以上の群の雌雄で第 4 日以降に認められた.

血液学的検査において, 80 mg/kg/day 以上の群の雌雄で血小板数の増加又は増加傾向が認められた. 250 mg/kg/day 群の雌雄で網状赤血球比率及び網状赤血数の減少が認められ, 250 mg/kg/day 群の雌では赤血球数, ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少, PT 及び APTT の延長が認められた. さらに, 80 mg/kg/day 群の雄及び 250 mg/kg/day 群の雌雄では, 白血球数 (好中球数及び好中球比率) 及び単球数の増加, 並びに好酸球比率, リンパ球数及びリンパ球比率の減少が認められた.

血液生化学的検査において, 80 mg/kg/day 以上の群の雌雄で尿素窒素, α_2 -グロブリン比率及び濃度, β -グロブリン比率及び濃度の増加又は増加傾向, アルブミン, アルブミン比率及び A/G 比の減少が認められた. さらに 80 mg/kg/day 以上の群の雌では, 総コレステロール及びリン脂質の減少が認められた. また, 250 mg/kg/day 群の雌雄で ASAT, LDH 及びグルコースの増加, 総蛋白, カルシウム及び無機リンの減少が認められ, 250 mg/kg/day 群の雌では, ALAT, γ GT, ALP, CK, トリグリセライド及びカリウムの増加が認められた.

器官重量測定において, 80 mg/kg/day 以上の群の雌雄で肝臓の相対重量の増加が認められた. 80 mg/kg/day 群の雌及び 250 mg/kg/day 群の雌雄で副腎の相対重量の増加が認められた. さらに 80 mg/kg/day 群の雄及び 250 mg/kg/day 群の雌雄で脾臓の実重量及び相対重量の減少が認められた. また, 250 mg/kg/day 群の雌雄で胸腺, 唾液腺の実重量及び相対重量の減少が認められ, 250 mg/kg/day 群の雌では, 卵巣及び子宮の実重量及び相対重量の減少が認められた.

剖検において, 250 mg/kg/day 群の雌 1 例で消化管 (胃～結腸) の拡張, 雌雄のほぼ全例で胸腺及び脾臓の小型化, 雄 1 例で精囊及び前立腺の小型化, 雌 2 例で皮膚のびらんとその周囲

の脱毛が認められた。

以上の結果から、摂餌量の低下を伴う体重増加抑制、肝臓の相対重量の増加が 80 mg/kg/day 群で認められたことから、本実験条件下での P092 の無毒性量は、雌雄とも 20 mg/kg/day であると考えられる。

6. 材料及び方法

6.1 被験物質

6.1.1 名称

P092

6.1.2 ロット番号

7J7XB (Annex 1, 2)

6.1.3 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.1.4 保存条件

冷蔵（実測値：3.8°C～6.2°C，許容範囲：1°C～10°C），遮光，密封（窒素封入）

6.1.5 取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋を着用した。

6.1.6 残余被験物質の処理

全て試験施設の被験物質管理責任者に移管した（9.2 項参照）。

6.2 媒体

6.2.1 名称

0.5 w/v%メチルセルロース水溶液（略称：0.5 w/v% MC）

6.2.2 試薬

メチルセルロース（ロット番号：WER5404，MC と略す，MC400，和光純薬工業株式会社）

日本薬局方注射用水（ロット番号：1F99，2C71，略称：注射用水，株式会社大塚製薬工場）

6.2.3 媒体の調製法

- (1) 所定量の MC を正確に秤量した。
- (2) 調製量より少ない注射用水をビーカーに入れ，ホットマグネチックスターラーを用いて約 80°C に加熱した。加熱した注射用水を攪拌しながら，MC を少量ずつ加えて溶解させた。
- (3) 溶解後，室温になるまで冷まし，これをメスシリンダーに移し，適宜注射用水を加えて 0.5 w/v% となるように定容した。
- (4) 調製した 0.5 w/v% MC を保存容器に入れ，7 日以内に使用した（使用期限：調製後 14 日間）。

6.2.4 保存条件

冷蔵（実測値：3.9～6.2°C，許容範囲：1～10°C）

6.3 投与液

6.3.1 調製方法及び頻度

被験物質投与液は，紫外線をカットした蛍光灯下で用時調製した（Annex 3）．媒体（0.5 w/v% MC）を対照群の投与液として使用した．

- (1) P092 を正確に秤量した．
- (2) 乳鉢及び乳棒を用いて被験物質を破碎し，媒体で洗い流しながらメートルグラスに移した．
- (3) この混合液に媒体を加え，25 mg/mL になるように正確にメスアップした．更に 25 mg/mL の投与液を媒体で段階希釈し，8 及び 2 mg/mL の投与液を調製した．
- (4) 調製後，投与液は褐色ガラス瓶に入れた．採取及び希釈などにおける操作はマグネチックスターラーで攪拌しながら行った．

6.4 試験動物

6.4.1 動物種

ラット

6.4.2 系統

Cri:CD(SD)

6.4.3 系統選択の理由

げっ歯類を用いた毒性試験に広く使用されており，背景データが豊富である．

6.4.4 微生物レベル

SPF

6.4.5 購入先

日本チャールス・リバー株式会社

6.4.6 購入時週齢

5 週齢

6.4.7 購入動物数及び性別

雌雄各 22 匹

6.4.8 検疫・馴化

6.4.8.1 検疫

検疫期間は動物入荷後 5 日間とした。検疫期間には以下の検査を行い、検疫期間中に一般状態の異常が認められず、体重増加が認められることを確認した。なお、検査方法は 6.8 項に従った。

- ・一般状態観察（1 日 1 回）
- ・体重測定（動物入荷時及び検疫終了時）

6.4.8.2 馴化

馴化期間は動物入荷から投与開始前日までとした。検疫期間終了後の馴化期間中に以下の検査を行った。なお、検査方法は 6.8 項に従った。

- ・一般状態観察（1 日 1 回）
- ・体重測定（群分け日）

6.4.9 投与開始時週齢

6 週齢

6.4.10 投与開始時体重

雄：164～189 g，雌：143～169 g

投与開始日（投与前）に個々の体重が雌雄それぞれ全例の平均体重±20%以内であることを確認した。

6.4.11 群分け

(1) 実施日

投与開始の前日

(2) 動物選抜

検疫・馴化期間中の検査の結果から、試験に供する動物として全例を選抜した。

(3) 動物の振り分け

群分け日の体重に基づいて、体重層別化無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ均一になるように動物を群分けした。雌雄各 20 匹を使用した。

6.4.12 動物の識別

個体識別は以下により行った。

群分け前：尾に油性ペンで付した番号（群分け前の動物番号末尾 1 または 2 桁）

群分け後：イヤーパーチ

動物のケージには次の情報を記載したラベルを付けた。

群分け前：試験番号，群分け前の動物番号（検疫番号），動物種，系統及び性別

群分け前の動物番号は以下の通りとした。

雄：19001～19022，雌：59001～59022

群分け後：試験番号，群名（用量），動物番号，動物種，系統及び性別

6.4.13 余剰動物の取扱

余剰動物は投与開始日に試験から除外した。除外した動物は，投与開始後6日にチオペンタールナトリウム（ラボナール[®]，田辺三菱製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し，安楽死させた。

6.5 飼育環境

6.5.1 飼育室

ラット・マウス飼育室（4154室）

6.5.2 飼育環境

6.5.2.1 温度

20.4°C～21.8°C（許容範囲：19.0°C～25.0°C）

6.5.2.2 相対湿度

48.3～65.1%（許容範囲：35.0～75.0%）

6.5.2.3 換気

6～20回／時，オールフレッシュエアー供給

6.5.2.4 照明時間

12時間／日（7:00～19:00）点灯

6.5.3 飼育器材

6.5.3.1 ケージ

ステンレス製つり下げ型金網ケージ（195W×325D×180H mm，トキワ科学器械株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

群分け日に1回交換した。

6.5.3.2 給餌器

固型用ステンレス製給餌器（トキワ科学器械株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

群分け日に1回交換した。

6.5.3.3 給水装置

自動給水装置（トキワ科学器械株式会社）

自動給水配管内の滞留水は1日2回，オートフラッシュシステムにより排出した。

6.5.3.4 架台

ステンレス製架台（トキワ科学器械株式会社，自動給水装置付）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

群分け日に1回交換した。

6.5.3.5 糞尿トレイ

アルミニウム製トレイ（トキワ科学器械株式会社）

実験動物用床敷（ベータチップ，日本チャールス・リバー株式会社）を敷いて架台上（ケージの下）に設置した。

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌（床敷含む）

交換頻度：群分け日，その後は投与開始日から週1回の頻度で交換した。

6.5.3.6 エンリッチメント

動物福祉向上のために，玩具（アルミナボール）を使用した。

6.5.4 収容動物数

1匹/ケージ

6.5.5 飼料

6.5.5.1 種類

実験動物用固型飼料（CR-LPF，Lot No. 120918，オリエンタル酵母工業株式会社，放射線滅菌済み）

6.5.5.2 給餌法

自由摂取

ただし，以下の期間は給餌しなかった。

- ・計画解剖前日の夕方（17:00）から解剖までの期間

飼料は群分け日とその後は投与開始日から1週間に1回の頻度で新しいものと交換した。

6.5.5.3 汚染物質の確認

飼料の供給元から分析結果を入手し，使用したロットの残留農薬等の汚染物質濃度が，試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.5.6 飲用水

6.5.6.1 種類

5 μm フィルター濾過後，紫外線照射した水道水

6.5.6.2 給水法

自由摂取

6.5.6.3 分析

株式会社三菱化学アナリテックで水質検査を定期的（2回/年）に実施し、その分析値が試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.6 投与

6.6.1 投与経路

経口投与

6.6.2 投与経路の選択理由

予定臨床適用経路に準ずる。

6.6.3 投与方法

ディスポーザブルシリンジ及び経口ゾンデを用い、強制的に胃内に経口投与した。投与は10:07～11:56に行った。なお、投与時には投与液をスターラーで十分に攪拌した。

6.6.4 投与方法の選択理由

ラットに経口投与する方法として一般的に用いられており、被験物質を正確に投与できる。

6.6.5 投与液量

10 mL/kg

各個体の投与液量は至近日に測定した体重に基づいて算出した。

6.6.6 投与回数・期間

1日1回、週7日、2週間（ただし、250 mg/kg/日群は10日間とした。）

6.6.7 投与用量及びその設定理由

投与用量は20, 80及び250 mg/kg/日とした。加えて媒体のみを投与する対照群を設けた。被験物質の投与用量は、P092のラットを用いる単回経口投与予備試験（B120965）の結果に基づいて設定した。雌雄ラットに100, 500, 1000及び2000 mg/kgの用量で単回投与した結果、500 mg/kg群の雄及び1000 mg/kg以上の群の雌雄で死亡又は状態悪化が認められた。一般状態観察において500 mg/kg以上の群で下痢がみられた。100 mg/kg群の雌雄では一般状態観察に異常は認められなかった。したがって、500 mg/kg以上の用量での14日間反復投与は困難である可能性が高いと考えた。

以上のことから、500 mg/kgと100 mg/kgの中間付近の用量が反復投与する際の高用量として適切であると判断し、高用量を250 mg/kg/日とし、公比約4で80及び20 mg/kg/日を設定した。

6.7 群構成

群	被験物質	投与用量 (mg/kg/day)	投与液量 (mL/kg/day)	投与液 濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号)	
					雄	雌
1	対照*1	0	10	0	5 (10101~10105) *2	5 (50101~50105) *2
2	P092	20	10	2	5 (10201~10205) *2	5 (50201~50205) *2
3	P092	80	10	8	5 (10301~10305) *2	5 (50301~50305) *2
4	P092	250	10	25	5 (10401~10405) *2	5 (50401~50405) *2

*1 : 0.5 w/v% MC を投与

*2 : 投与期間終了の翌日 (第 15 日) に解剖 (ただし, 250 mg/kg/日群の生存動物は第 11 日に解剖した.)

6.8 観察・検査項目

全生存例について下記の項目を検査した。

日と週の表記は、投与開始前日を第-1日、投与開始日を第1日、第1日から第7日を第1週とした。第1週から第2週を投与期間とした。

6.8.1 一般状態

全生存動物の生死、外観、行動及び排泄物等の異常の有無及び程度を観察した。観察頻度及び時刻を以下に示した。

投与期間： 1日2回 (投与前、投与後約2時間)

投与期間以外：1日1回 (午前中)

6.8.2 体重

体重は電子天秤 (EB-3200S, 島津製作所株式会社) を用いて、次の日程に測定した。投与日は投与前に測定した。また、各測定日間の体重増加量を算出した。

測定日：投与開始日 (第1日)、第4、8、11日及び最終投与日 (第14日)

計画解剖日 (第11、15日) には、器官相対重量 (対体重比) 算出のために最終体重を測定した。死亡動物は、解剖前に体重を測定した。

6.8.3 摂餌量

飼料の風袋込み重量を、電子天秤 (EB-3200S, 島津製作所株式会社) を用いて、次の日程に従って測定した。

測定期間：第1~4、4~8、8~11、及び11~14日

各測定日間の重量差からその期間の1日平均摂餌量を算出した。算出した摂餌量は、各測定期間の最終日の摂餌量として表記した。

6.8.4 血液学的検査

(1) 検査時期

計画解剖時（第 11, 15 日）

(2) 検査試料採取

以下の通り採血及び血液処理を行い、検査試料を得た。

採血前絶食：一晩（採血前日の 17:00～解剖時まで）、ただし、第 11 日解剖動物は絶食しなかった。

採血時麻酔：チオペンタールナトリウム（ラボナール[®]、田辺三菱製薬株式会社、腹腔内投与）

採血部位：後大静脈

採血量：約 4～5 mL（血液生化学的検査用血液を含む）

EDTA 処理：血液約 0.8 mL を EDTA-2K で抗凝固処理した。

血漿採取：血液 0.6 mL を 3.2 w/v %クエン酸三ナトリウム水溶液で抗凝固処理後、遠心分離（12000×g, 3 分間, 4°C）して血漿を採取した。

(3) 検査項目及び検査方法

検査項目及び検査方法を下表に示した。PT 及び APTT の測定には血漿を、その他の項目の測定には EDTA 処理血液を用いた。

項目（略号, 単位）	方法
(1) 赤血球数 (RBC, $\times 10^6/\mu\text{L}$)	シーフローDC 検出法
(2) ヘモグロビン濃度 (HGB, g/dL)	SLS-ヘモグロビン法
(3) ヘマトクリット値 (HCT, %)	赤血球パルス波高値検出法
(4) 平均赤血球容積 (MCV, fL)	RBC と HCT より算出
(5) 平均赤血球色素量 (MCH, pg)	RBC と HGB より算出
(6) 平均赤血球色素濃度 (MCHC, g/dL)	HGB と HCT より算出
(7) 網赤血球比 (%) 及び実数 ($\times 10^9/\text{L}$)	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法
(8) 血小板数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	シーフローDC 検出法
(9) プロトロンビン時間 (PT, sec)	光散乱検出方式
(10) 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
(11) 白血球数 (WBC, $\times 10^3/\mu\text{L}$)	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法
(12) 白血球百分率及び実数 (% , $\times 10^3/\mu\text{L}$)	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法

[測定機器] PT 及び APTT：CA-510（シスメックス株式会社）

その他：XT-2000iV（シスメックス株式会社）

全生存例について Wright 染色塗抹標本を作製した。ただし、雌 3 例（No. 50401, 50404 及び 50405）については、MICROX HEG-50 及び HEG-50VF を用いて目視で測定を実施した。

(4) 残余検査試料の処理

残余血液及び血漿は検査終了後に廃棄した。

6.8.5 血液生化学的検査

(1) 検査時期

計画解剖時（第 11, 15 日）

(2) 検査試料採取

使用血液： 血液学的検査の項で採取した血液の一部

血清採取： 血液約 2 mL を室温で約 30～60 分間放置した後、遠心分離 (1500×g, 10 分, 4°C) して血清を採取した。

血漿採取： 血液約 1 mL を凝固阻止剤ヘパリン(リチウム塩; Microtainer[®]; Becton, Dickinson and Company) で処理し、遠心分離 (12000×g, 3 分間, 4°C) して血漿を採取した。

(3) 検査項目及び検査方法

検査項目及び検査方法を下表に示した。LDH 及び CK の測定には血漿を、その他の項目の測定には血清を用いた。

項目 (略号, 単位)	方法
(1) ASAT (GOT, U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
(2) ALAT (GPT, U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
(3) LDH (U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
(4) γ GT (U/L)	L- γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法 (JSCC 改良法)
(5) ALP (U/L)	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (JSCC 改良法)
(6) CK (U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
(7) 総ビリルビン (mg/dL)	酵素法 (BOD 法)
(8) 尿素窒素 (mg/dL)	酵素-UV 法 (Urease-LEDH 法)
(9) クレアチニン (mg/dL)	酵素法 (Creatininase-POD 法)
(10) グルコース (mg/dL)	酵素法 (HK-G6PDH 法)
(11) 総コレステロール (mg/dL)	酵素法 (CO-HMMPS 法)
(12) リン脂質 (mg/dL)	酵素法 (COD-DAOS 法)
(13) トリグリセライド (mg/dL)	酵素法 (GPO-HMMPS 法, グリセリン消去法)
(14) 総蛋白 (g/dL)	Biuret 法
(15) カルシウム (mg/dL)	OCPC 法
(16) 無機リン (mg/dL)	酵素法 (PNP-XOD-POD 法)
(17) ナトリウム (Na, mmol/L)	イオン選択電極法
(18) カリウム (K, mmol/L)	イオン選択電極法
(19) クロール (Cl, mmol/L)	イオン選択電極法
(20) グロブリン分画 (% , g/dL)	アガロース電気泳動法及び総蛋白より算出
(21) A/G 比	アガロース電気泳動法
(22) アルブミン (% , g/dL)	アガロース電気泳動法, 総蛋白及び A/G 比より算出

[測定機器] グロブリン分画, A/G 比及びアルブミン: Epalyzer 2, 株式会社ヘレナ研究所
その他: TBA-200FR (株式会社東芝)

雌 1 例 (No. 50401) の ASAT が測定上限を超えたため、生理食塩水で希釈後の再測定値を採用した。

(4) 残余検査試料の処理

残余の検査試料 (血清及び血漿) は、約 -80°C (許容範囲: -60°C 以下) のフリーザー内で保存し、試験終了までに廃棄した。

6.8.6 病理学的検査

6.8.6.1 検査対象器官・組織

下表に従い、採材及び検査を行った。

器官・組織	採材 (側性)	器官重量 (側性)
(1) 心臓	○ -	○ -
(2) リンパ節	○ -	- -
	○ -	- -
(3) 胸腺	○ -	○ -
(4) 脾臓	○ -	○ -
(5) 気管	○ -	- -
(6) 肺/気管支	○ -	○ -
(7) 舌	○ -	- -
(8) 食道	○ -	- -
(9) 胃	○ -	- -
(10) 十二指腸	○ -	- -
(11) 空腸	○ -	- -
(12) 回腸	○ -	- -
	○ -	- -
(13) 盲腸	○ -	- -
(14) 結腸	○ -	- -
(15) 直腸	○ -	- -
(16) 唾液腺	○ 両側	- -
	○ 両側	○ 左右合計
(17) 肝臓	○ -	○ -
(18) 膵臓	○ -	- -
(19) 腎臓	○ 両側	○ 左右合計
(20) 膀胱	○ -	- -
(21) 精巣	○ 両側	○ 左右合計
(22) 精巣上部	○ 両側	○ 左右合計
(23) 精嚢	○ -	- -
(24) 前立腺	○ -	○ -
(25) 下垂体	○ -	○ -
(26) 甲状腺/上皮小体	○ 両側	○ 左右合計
(27) 副腎	○ 両側	○ 左右合計
(28) 大腿骨 (膝関節を含む) / 大腿骨骨髓	○ 左側	- -
(29) 胸骨/胸骨骨髓	○ -	- -
(30) 皮膚/乳腺	○ 両側	- -
(31) 眼球/視神経/ハーダー腺	○ 両側	- -
(32) 脳	○ -	○ -
(33) 脊髄	○ -	- -
(34) 卵巣	○ 両側	○ 左右合計
(35) 子宮	○ -	○ -
(36) 膣	○ -	- -
(37) 大動脈	○ -	- -
(38) 骨格筋/坐骨神経	○ 左側	- -
(39) その他肉眼的異常のみられた器官/組織	○ -	- -

○：採材，検査対象； -：検査対象外又は側性の区別なし

6.8.6.2 病理解剖検査

計画解剖動物は第 11, 15 日に, チオペンタールナトリウム (ラボナール, 田辺三菱製薬株式会社) の腹腔内投与による麻酔下で, 腹大動脈を切断・放血して安楽死させた後に剖検した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

6.8.6.3 器官重量

計画解剖時に 6.8.6.1 項に示した器官・組織の重量を電子天秤 (AW120, 株式会社島津製作所) を用いて測定した。

両側性の器官については左右まとめて測定した。下垂体及び甲状腺はホルマリン固定後に測定した。また, 解剖日の最終体重に基づいて相対重量 (対体重比) を算出した。

なお, 死亡動物の器官重量は, 測定しなかった。

6.8.6.4 器官・組織の採材及び保存

6.8.6.1 項に示した器官・組織を採取した。採取した器官・組織を 10 vol%リン酸緩衝ホルマリン液で固定し, 保存した。ただし, 精巣はブアン液で, 眼球, ハーダー腺及び視神経はダビドソン液で固定後, 10 vol%リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。死亡動物についても解剖時に器官・組織を採取, 固定, 保存した。ただし, 死亡動物については, いずれの器官・組織も 10vol%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。

6.9 統計学的解析

6.9.1 毒性試験データ

データについて以下の統計学的解析を実施した。解析には安全性試験システム (MiTOX, 三井造船システム技研株式会社) を用いた。

(1) 解析方法

Bartlett 法による等分散の検定 (有意水準: 1%) を行い, 分散が等しい場合は Dunnett 法, 分散が等しくない場合は Dunnett 型の多重比較検定 (有意水準: 各 1%及び 5%, 両側検定) によって対照群との平均値の差の検定を行った。

(2) 対象項目

統計学的解析の対象項目を以下に示した。死亡動物の解剖時に得られたデータについては統計学的解析を実施しなかった。

計量データ:

- ・ 体重
- ・ 体重増加量
- ・ 摂餌量
- ・ 血液学的検査結果
- ・ 血液生化学的検査結果
- ・ 器官重量
- ・ 器官相対重量