

6.6.2.2 相対湿度

47.1%～63.5% (許容範囲：35.0%～75.0%)

6.6.2.3 換気

6～20回/時, オールフレッシュエアー供給

6.6.2.4 照明時間

12時間/日 (7:00～19:00) 点灯

6.6.3 飼育器材

6.6.3.1 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

交換頻度： 群分け日及び投与開始後 14 日に交換した。

6.6.3.2 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

交換頻度： 群分け日及び投与開始後 14 日に交換した。

6.6.3.3 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。

ただし, 20 時間尿採取中 (6.9.5 項参照) はオートクレーブ滅菌したポリカーボネート製給水瓶 (150 mL, トキワ科学器械株式会社) を使用した。

6.6.3.4 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

交換頻度： 群分け日及び投与開始後 14 日に交換した。

6.6.3.5 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： 群分け日及び投与開始後 7 日, 14 日及び 21 日に交換した。

6.6.3.6 エンリッチメント

動物福祉向上のために、オートクレーブ滅菌した玩具（アルミナボール）を使用した。

6.6.4 収容動物数

1 匹／ケージ

6.6.5 飼料

6.6.5.1 種類

実験動物用固型飼料 (CR-LPF, Lot No. 120918 及び 121012, オリエンタル酵母工業株式会社, 放射線滅菌済み)

6.6.5.2 給餌法

自由摂取

ただし、以下の期間は給餌しなかった。

- ・新鮮尿採取時 (6.9.5 項参照)
- ・計画解剖前日の夕方 (17:00) から解剖までの期間

飼料は群分け日及び投与開始後 7 日、14 日及び 21 日に新しいものと交換した。

6.6.5.3 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。

6.6.6 飲用水

6.6.6.1 種類

5 µm フィルター濾過後、紫外線照射した水道水

6.6.6.2 給水法

自由摂取

ただし、新鮮尿採取中 (6.9.5 項参照) は給水しなかった。

6.6.6.3 分析

株式会社三菱化学アナリティ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。

6.7 群構成

6.7.1 主試験群

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	10 (10101~10110) ^{*2}	10 (50101~50110) ^{*2}
2	P092	5	10	0.5	10 (10201~10210) ^{*2}	10 (50201~50210) ^{*2}
3	P092	20	10	2	10 (10301~10310) ^{*2}	10 (50301~50310) ^{*2}
4	P092	80	10	8	10 (10401~10410) ^{*2}	10 (50401~50410) ^{*2}

*1 : 0.5 w/v% MC を投与

*2 : 投与期間終了の翌日 (第 29 日) に解剖

6.7.2 TK サテライト群

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
5	対照 ^{*1}	0	10	0	3 (20101~20103)	3 (60101~60103)
6	P092	5	10	0.5	3 (20201~20203)	3 (60201~60203)
7	P092	20	10	2	3 (20301~20303)	3 (60301~60303)
8	P092	80	10	8	3 (20401~20403)	3 (60401~60403)

*1 : 0.5 w/v% MC を投与

6.7.3 投与用量及びその設定理由

投与用量は 5, 20 及び 80 mg/kg/day 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 2 週間反復経口投与毒性試験、試験番号 : B120718 の結果に基づいて設定した。雌雄ラットに 20, 80 及び 250 mg/kg/day の用量で投与した結果、一般状態観察において 250 mg/kg/day 群では下痢、軟便、衰弱等がみられ、雄 4 例及び雌 1 例が第 6~10 日に死亡した。80 mg/kg/day 群では体重の増加抑制及び摂餌量の減少又は減少傾向がみられた。20 mg/kg/day 群では被験物質投与による明らかな影響はみられなかった。

以上のことから、80 mg/kg/day は 4 週間の反復投与において毒性を示し、かつ反復投与が可能な用量であると判断し、高用量に設定した。以下、公比約 4 で 20 及び 5 mg/kg/day を設定した。

6.8 投与

6.8.1 投与経路

経口投与

6.8.2 投与経路の選択理由

予定臨床適用経路に準じた。

6.8.3 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。

6.8.4 投与回数・期間

1日1回，週7日，4週間

6.8.5 投与回数の選択理由

毒性試験のガイドラインに従った。

6.8.6 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8:33～12:03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。

6.8.7 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。

6.9 観察・検査項目

主試験群の動物について，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，第1日から第7日を第1週とした。第1週から第4週を投与期間とした。

TK サテライト群の動物については，一般状態観察及び体重測定を主試験群と同様に実施したが，得られたデータは毒性評価から除外した（Appendix 12 及び 13 参照）。

6.9.1 一般状態

全動物の生死，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3回（投与前，投与直後*，投与後約2時間に1回）

投与期間以外：1日1回（午前中）

*：80 mg/kg/day 群の雄2例及び雌1例において，投与直後（雄：第24日，雌：第22日）に流涎がみられたことから，雄の第25日，雌の第23日からの投与直後の観察を追加した。

6.9.2 体重

全動物について、電子天秤（BX-3200H，島津製作所株式会社又は PB3002-S，メトラー・トレド株式会社）を用いて、以下の日程に測定した。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、15、18、22、25日及び最終投与日（第28日）

計画解剖日（第29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。

6.9.3 摂餌量

全動物について、飼料の風袋込み重量を、電子天秤（BX-3200H，島津製作所株式会社又は PB3002-S，メトラー・トレド株式会社）を用いて、以下の日程に従って測定した。

測定期間：第1～4、4～8、8～11、11～15、15～18、18～22、23～25、25～28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。ただし、採尿期間（第22～23日）の摂餌量は算出しなかった。

6.9.4 眼科学的検査

全動物について、投与開始前期間の第-1週（雄：第-1日，雌：第-3日）及び投与期間の第4週（雄：第24日，雌：第27日）に実施した。直像検眼鏡（BETA200，Heine Optotechnik）を用いて対光反射を検査し、ポータブルスリットランプ（SL-15，興和株式会社）を用いて前眼部及び中間透光体を、双眼倒像検眼鏡（OMEGA 200，Heine Optotechnik）を用いて眼底を検査した。前眼部，中間透光体及び眼底検査は、散瞳剤（ミドリンP点眼液，参天製薬株式会社）を点眼後に行った。

6.9.5 尿検査

各群5例（動物番号の小さい順）について、第4週（第22日～23日）に下表に示す項目について実施した。試験紙法検査及び尿沈渣の観察は新鮮尿を用いて、その他の検査は20時間尿を用いて行った。尿は代謝ケージを用いて以下の通り採取した。

新鮮尿： 第22日の午前中（投与前，7:10）に新鮮尿（最長3時間の蓄積尿）を採取した。
新鮮尿採取時には動物に餌水を与えなかった。

20時間尿： 第22日の午後（投与後，13:00頃）から翌朝（9:00頃）までの約20時間，蓄尿した。20時間尿採取中は動物に餌水を与えた。

電解質（Na，K及びCl）の検査に用いた尿の残余は，約-80°C（許容範囲：-60°C以下）のフリーザー内で保存し，試験終了時まで廃棄した。その他の残余の尿は検査終了後に廃棄した。

項目(略号;単位)	方法
(1) pH	試験紙法(マルティスティックス*)
(2) 蛋白	試験紙法(マルティスティックス*)

項目(略号;単位)	方法
(3) グルコース	試験紙法 (マルティスティックス*)
(4) ケトン体	試験紙法 (マルティスティックス*)
(5) ビリルビン	試験紙法 (マルティスティックス*)
(6) 潜血	試験紙法 (マルティスティックス*)
(7) 尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検 [遠心分離条件: 約 500×g, 5分, 室温] 検査項目: 結晶, 円柱, 上皮細胞, 白血球, 赤血球
(8) 比重	屈折法
(9) 色調	目視
(10) 尿量 (mL)	メスシリンダーで測定
(11) ナトリウム (Na; mmol/L, mmol)	イオン選択電極法
(12) カリウム (K; mmol/L, mmol)	イオン選択電極法
(13) クロール (Cl; mmol/L, mmol)	電量滴定法

*: シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社

[測定機器] 試験紙法: クリニテック 500 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社)

比重: ユリコン-JE (株式会社アタゴ)

電解質: PVA-α III (株式会社エイアンドティー)

下記の動物のカリウムについては、測定値が測定上限を超えたため、精製水にて希釈後の再測定値を採用した。

対照群の雄 5 例, 雌 3 例 (#10101~#10105, #50101, #50102, #50105), 5 mg/kg/day 群の雄 4 例, 雌 4 例 (#10201~#10204, #50201, #50203~#50205), 20 mg/kg/day 群の雄 4 例, 雌 2 例 (#10301~#10304, #50301, #50303), 80 mg/kg/day 群の雄 2 例 (#10401, #10403)

6.9.6 血液学的検査

計画解剖時 (第 29 日) に、全例を前日より 16 時間以上 (採血前日のおおよそ 17:00~解剖時まで) 絶食し、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、後大静脈より採血し、下表に示す項目について検査を行った。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。また、全例について Wright 染色塗抹標本を作製した。残余血液及び血漿は検査終了後に廃棄した。

採血量: 約 4~5 mL

血液生化学的検査用血液 (6.9.7 項参照) 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。

項目(略称;単位)	方法
(1) 赤血球数 (RBC; ×10 ⁶ /μL)	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)	(1), (3)より算出
(5) 平均赤血球血色素量 (MCH; pg)	(1), (2)より算出

項目 (略称; 単位)	方法
(6) 平均赤血球血色素濃度 (MCHC; g/dL)	(2), (3)より算出
(7) 網赤血球比 (%) 及び実数 ($\times 10^9/L$)	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 ($\times 10^3/\mu L$)	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 ($\times 10^3/\mu L$)	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 ($\times 10^3/\mu L$)	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)

80 mg/kg/day 群の雌 1 例 (#50401) の血小板数については、測定値が測定上限を超えたため、セルパック (II) にて希釈後の再測定値を採用した。

6.9.7 血液生化学的検査

計画解剖時 (第 29 日) に採取した血液 (6.9.6 項参照) の一部 (約 2 mL) を室温で約 30~60 分間放置後、遠心分離 (1500×g, 10 分間, 4°C) し、得られた血清を用いて下表の項目を測定した。LDH 及び CK の測定には、血液 (6.9.6 項参照) の一部 (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) して得られた血漿を用いた。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、試験終了時まで廃棄した。

項目 (略称; 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

項目 (略称; 単位)	方法
(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(14)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、(14)及び(21)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

6.9.8 病理学的検査

6.9.8.1 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)	病理組織標本作製 (側性)
(1) 心臓	○ -	○ -	○ -
(2) リンパ節	○ -	- -	○ -
	下顎	- -	○ -
	腸間膜	- -	○ -
(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	○ -	- -	○ -
	パイエル板を含む	- -	○ -
(13) 盲腸	○ -	- -	○ -
(14) 結腸	○ -	- -	○ -
(15) 直腸	○ -	- -	○ -
(16) 唾液腺	○ 両側	- -	○ 左側
	耳下腺	- -	○ 左側
	顎下腺/舌下腺	○ 左右合計	○ 左側
(17) 肝臓	○ -	○ -	○ -
(18) 膵臓	○ -	- -	○ -
(19) 腎臓	○ 両側	○ 左右合計	○ 左側
(20) 膀胱	○ -	- -	○ -
(21) 精巣	○ 両側	○ 左右合計	○ 左側
(22) 精巣上体	○ 両側	○ 左右合計	○ 左側
(23) 精囊	○ -	- -	○ -
(24) 前立腺	○ -	○ -	○ -
	腹葉	- -	○ -
(25) 下垂体	○ -	○ -	○ -
(26) 甲状腺/上皮小体	○ 両側	○ 左右合計	○ 片側
(27) 副腎	○ 両側	○ 左右合計	○ 左側
(28) 大腿骨 (膝関節を含む) / 大腿骨骨髓	○ 左側	- -	○ 左側
(29) 胸骨/胸骨骨髓	○ -	- -	○ -
(30) 皮膚/乳腺	○ 両側	- -	○ 左側
(31) 眼球/視神経/ハーダー腺	○ 両側	- -	○ 左側
(32) 脳	○ -	○ -	○ -

器官・組織	採材 (側性)	器官重量 (側性)	病理組織標本作製 (側性)
(33) 脊髄	○ -	- -	○ -
(34) 卵巣	○ 両側	○ 左右合計	○ 左側
(35) 子宮	○ -	○ -	○ -
(36) 膈	○ -	- -	○ -
(37) 大動脈 胸部	○ -	- -	○ -
(38) 骨格筋/坐骨神経 大腿部	○ 左側	- -	○ 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

6.9.8.2 病理解剖検査

計画解剖動物は（第 29 日）に解剖した。

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，血液学的検査及び血液生化学的検査のための採血後に腹大動脈を切断・放血して安楽死させた後に剖検した。

6.9.8.3 器官重量

計画解剖時に 6.9.8.1 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。甲状腺及び下垂体はホルマリン固定後に測定した。また，解剖日の体重に基づいて相対重量（対体重比）を算出した。

6.9.8.4 病理組織学的検査

計画解剖時に 6.9.8.1 項に示した器官・組織を採取した。採取した器官・組織を 10vol%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，10vol%リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。

対照群及び高用量群の雌雄全例の検査対象器官・組織（6.9.8.1 項参照）と全動物の肉眼的異常がみられた器官・組織について，定法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し，鏡検した。

検査の結果，80 mg/kg/day 群で被験物質の影響と思われる変化が，雌雄の十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，肝臓，腎臓，肺，脾臓，腸間膜リンパ節，下顎リンパ節，大腿骨髄，胸骨髄，胸腺，並びに雌の胃で認められたため，5 及び 20 mg/kg/day 群の当該器官・組織について追加検査を実施した。さらに対照群及び 80 mg/kg/day 群の雄各 2 例（#10101，#10102，#10401，#10402）の空腸，肝臓，腎臓については，空胞化の内容物を確認するため，ナイル青染色及びルクソール・ファスト・ブルー染色を実施し鏡検した。

6.10 トキシコキネティクス（TK）測定

P092 投与時の全身的暴露量の用量相関及び反復投与による経時変化を検討するため，初回及び最終回投与時の血漿中 P092 濃度を測定し，薬物動態パラメータ（ C_{max} ， T_{max} 及び AUC_{0-24h} ）を算出した。

6.10.1 採血及び TK 測定試料の採取

TK サテライト群の全動物から、無麻酔下で鎖骨下静脈から約 0.24 mL/時点を採血し、血漿 (TK 測定試料) を得た。採血はヘパリン加注射筒 (ナトリウム塩) にて実施した。採取した血液は、採血後直ちにポリプロピレン (PP) 製チューブに入れて氷冷し、速やかに遠心分離 (10000×g, 3 分間, 4°C) して個体毎の血漿を得た。得られた血漿は PP 製チューブに入れ、直ちにドライアイスで保冷し、測定まで約 -80°C (実測値: -84.4°C ~ -80.4°C, 許容範囲: -60°C 以下) のフリーザー内で凍結保存した。

採血時点

初回 (第 1 日) 投与時: 投与後 30 分, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間

最終回 (第 28 日) 投与時: 投与前並びに投与後 30 分, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間

ただし、対照群は投与後 30 分及び 2 時間のみを測定し、それ以外の時間に採取した血液は、その場で廃棄し、測定はしなかった。

総検体数: 258 検体

6.10.2 採血終了後動物の処理

採血終了後の動物は、最終採血後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。剖検は行わなかった。

6.10.3 血漿中 P092 濃度の測定方法

血漿中 P092 濃度の測定は、当試験施設で実施した「ラット血漿中 P092 濃度測定法バリデーション」(試験番号: B120711) における分析法に従って実施した。P092 の安定性については、B120711 にて以下の項目が確認されている。

また、同時期に当施設で実施した試験「P092 のラットを用いる単回経口投与毒性試験」(試験番号: B120716) において調製した標準原液及び溶液類を、本試験においても使用した。

項目	期間又は回数
測定実測試料の安定性 (10°C)	36 時間
凍結融解安定性 (-80°C)	3 回
短期安定性 (室温)	4 時間
長期安定性 (-80°C)	33 日間
P092 標準試料原液及び溶液 (室温) (200 µg/mL 及び 5 ng/mL)	24 時間
P092 標準試料原液及び溶液 (冷蔵) (200 µg/mL 及び 5 ng/mL)	97 日間

項目	期間又は回数
IS 試料原液及び溶液 (室温) (100 µg/mL 及び 200 ng/mL)	24 時間
IS 試料原液及び溶液 (冷蔵) (100 µg/mL 及び 200 ng/mL)	97 日間

6.10.3.1 測定対象標準物質

被験物質 (6.1 項) を使用した。

6.10.3.2 内標準物質 (IS)

名称： p-アセトアミドフェノール
ロット番号： WEQ6871
分子量： 151.16
保存条件： 室温 (実測値：17.5°C~21.9°C, 許容範囲：10°C~30°C), 遮光
保管場所： 被験物質保管場所 (41)
製造元： 和光純薬工業株式会社
安定性の確認： 実施しなかった。クロマトグラム上において、P092 溶出位置に定量を妨害する夾雑ピークを与えないことを分析日毎に確認した。
取扱上の注意： 保護具 (ゴム手袋, 眼鏡及びマスク) 着用

6.10.3.3 ブランク血漿

動物種： ラット
系統： Cri:CD(SD)
投与歴： なし
抗凝固剤： ヘパリンナトリウム
入手先： 日本チャールス・リバー株式会社
保存条件： 約-20°C (実測値：-29.3°C~-19.3°C, 許容範囲：-40°C~-15°C)

6.10.3.4 試薬

試薬類は市販の特級又は HPLC 用の試薬を使用した。

水は超純水製造装置 (Elix-UV10, MILLI-Q Gradient-A10) で精製したものをを用いた。

6.10.3.5 P092 標準試料溶液の調製

P092 を 10.0 mg 正確に量り, メタノールに溶解し, 全量を 50 mL とした (200 µg/mL) (ガラス製メスフラスコを使用)。溶解の際, 超音波処理を実施した。この溶液を P092 標準試料原液 (SS) とし, 次表に従ってメタノールで順次希釈し, 以下の標準試料溶液を調製した。P092 標準試料原液及び溶液はポリプロピレン (PP) 製容器にて冷蔵・遮光保存 (実測値：3.9°C~6.3°C, 許容範囲：1°C~10°C) し, 調製後 43 日以内に使用した。

標準試料溶液 略称	標準試料溶液濃度 (ng/mL)	使用標準試料溶液 略称	使用量 (μ L)*	メタノール 添加量(μ L)*
WS-40000	40000	SS	200	800
WS-4000	4000	WS-40000	100	900
WS-1000	1000	WS-4000	250	750
WS-800	800	WS-4000	200	800
WS-500	500	WS-1000	500	500
WS-200	200	WS-1000	200	800
WS-100	100	WS-500	200	800
WS-50	50	WS-500	100	900
WS-20	20	WS-200	100	900
WS-10	10	WS-100	100	900
WS-5	5	WS-50	100	900

* : マイクロピペットを使用

6.10.3.6 IS 試料溶液の調製

IS を 5 mg 正確に量り、メタノールに溶解、全量を 50 mL として IS 試料原液 (100 μ g/mL) を調製した (ガラス製メスフラスコを使用)。この溶液を IS 試料原液 (ISSS) とし、次表に従ってメタノールで希釈し IS 試料溶液 (200 ng/mL, ISWS) を調製した。

IS 試料原液及び溶液は PP 製容器にて冷蔵・遮光保存 (実測値 : 3.9°C~6.3°C, 許容範囲 : 1°C~10°C) し、調製後 43 日以内に使用した。

IS 試料溶液 略称	IS 試料溶液濃度	使用 IS 試料溶液 略称	使用量 (μ L)*	メタノール添加量 (μ L)*
ISWS-1	5 μ g/mL	ISSS	50	950
ISWS	200 ng/mL	ISWS-1	40	960

* : マイクロピペットを使用

6.10.3.7 検量線用標準試料溶液の調製

PP 製マイクロチューブにブランク血漿 20 μ L を分取後、水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400 μ L を添加し、ブランク試料、ゼロ試料についてはメタノールを 20 μ L、検量線用標準試料溶液 (C1~C8) については、次表に従い P092 標準試料溶液を 20 μ L 添加した。

略称	血漿中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
C1 (LLOQ)	5	WS-5
C2	10	WS-10
C3	20	WS-20

略称	血漿中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
C4	50	WS-50
C5	100	WS-100
C6	200	WS-200
C7	500	WS-500
C8 (ULOQ)	1000	WS-1000

LLOQ: lower limit of quantification

ULOQ: upper limit of quantification

6.10.3.8 血漿試料の前処理方法（分析フロー）

- (1) PP 製マイクロチューブに血漿 20 μ L を分取した。
- (2) 水／ギ酸（1000:1, v/v）400 μ L を添加した。
- (3) メタノール 20 μ L を添加した。
（検量線用標準試料溶液調製時は P092 標準試料溶液）
- (4) ISWS（ブランク試料調製時はメタノール）40 μ L を添加した。
- (5) ミキサーを用いて攪拌した。
- (6) 全量を Oasis HLB μ Elution plate（30 μ m, Waters Corporation）にアプライした（プレートは、あらかじめメタノール 200 μ L 及び水／ギ酸（1000:1, v/v）200 μ L でコンディショニングした）。
- (7) 水／ギ酸（1000:1, v/v）200 μ L で洗浄した。
- (8) メタノール 70 μ L で溶出した。
- (9) 水／ギ酸（1000:1, v/v）140 μ L を添加，攪拌後，次項に従い測定した。

6.10.3.9 分析条件

6.10.3.9.1 装置

HPLC 装置： 1100 (Agilent Technologies)
 オートサンプラ： SIL-20AC (Shimadzu Corporation)
 質量分析装置： API 4000 (AB SCIEX)

6.10.3.9.2 HPLC 条件

カラム： XBridge C18, 3.5 μ m, 3.0 mm I.D. \times 50 mm (Waters Corporation)
 カラム温度： 50°C
 移動相 A： 水／ギ酸（1000:1, v/v）
 移動相 B： メタノール／ギ酸（1000:1, v/v）
 移動相 A, B を 4:6 の割合で HPLC で混合した。
 流速： 0.25 mL/min
 注入量： 10 μ L
 オートサンプラ設定温度： 10°C

ニードル洗浄溶媒： メタノール

6.10.3.9.3 MS/MS 条件

Ionization method :	ESI (Electrospray Ionization, Turbo Ion Spray)
Polarity :	Positive
Scan type :	MRM (Multiple reaction monitoring)
Ion spray voltage (IS) :	5500 V
Heater gas temperature (TEM) :	500°C
Nebulizer gas (GS1) :	Air, 50 psi
Heater gas (GS2) :	Air, 85 psi
Curtain gas flow (CUR) :	N ₂ , 18 psi
Collision gas flow (CAD) :	N ₂ , 4
Entrance potential (EP) :	10 V
Monitor ion :	P092: m/z 252 > 84 IS: m/z 152 > 110

6.10.3.10 検量線

ブランク試料, ゼロ試料及び 8 濃度の検量線用標準試料溶液を n=1 で調製し, それぞれから測定実測試料を n=1 で調製, 測定した.

ブランク試料, ゼロ試料の 2 検体は, LC-MS/MS 測定のバックグラウンド確認のために測定した.

検量線用標準試料溶液につき, P092 の IS に対するピーク面積比を, 添加濃度に対し一次回帰して得られる直線を検量線とした. 検量線には, 1/x の重み付け (x : 血漿中 P092 濃度) を用いた. P092 の各濃度における真度 (%RE) を算出した.

$$\text{真度 (\%RE)} = \frac{\text{定量値} - \text{理論値}}{\text{理論値}} \times 100$$

<許容基準>

ブランク及びゼロ試料における P092 及び IS の溶出位置に夾雑ピークが検出されていないこと. 検出された場合, 夾雑ピークのピーク面積が, LLOQ サンプルの P092 及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%未満であること.

検量線用標準試料溶液の 8 濃度中, 定量下限及び上限を含む 6 濃度以上において, %RE が ±15.0% (LLOQ では±20.0%) 以内であること.

LLOQ 及び ULOQ 以外の濃度について, %RE が±15.0%を満たさない場合は, 当該濃度を除いて再度検量線を作成する. ただし, 6 濃度以上の検量線用標準試料溶液が含まれることとする. なお, 重み付けを変更してはならない.

検量線はすべて許容基準を満たした (Appendix 11 参照).

6.10.3.11 TK 測定試料の希釈

本試験では、希釈は実施しなかった。

6.10.3.12 TK 測定時の精度管理

PP 製マイクロチューブにブランク血漿 20 μ L を分取後、水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400 μ L を添加し、次表に従い P092 標準試料溶液を 20 μ L 添加した。

略称	血漿中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
Low QC	10	WS-10
Middle QC	50	WS-50
High QC	800	WS-800

次に示す順に各濃度 2 本 (計 6 本) の QC サンプルを測定した。

1. 検量線
2. QC サンプル (Low, Middle 及び High, n=1)
3. TK 測定試料
4. QC サンプル (Low, Middle 及び High, n=1)

<許容基準>

6 検体中 4 検体かつ 1 濃度 1 検体以上において %RE が $\pm 15.0\%$ 以内であることとする。

QC サンプルはすべて許容基準を満たした (Appendix 11 参照)。

6.10.3.13 再注入

本試験では、再注入は実施しなかった。

6.10.3.14 再測定

本試験では、再測定は実施しなかった。

6.10.3.15 データ解析

検量線の作成及び定量値の算出は、LC-MS/MS 装置付属の解析ソフトウェア「Analyst」(Ver. 1.4.2, AB SCIEX) を用いて行った。

定量値の単位は“ng/mL”として次表に従った。

定量下限未満の定量値は BLQ (Below the lower limit of quantification) と表示し、平均値及び標準偏差算出時は 0 として扱った。同一時点の過半数の定量値が BLQ の場合は、平均値は BLQ と表示し、標準偏差は NC (Not calculated) と表示した。平均値が定量下限未満の場合は、BLQ と表示し、標準偏差は NC と表示した。

項目	表示方法
定量値	Analyst で算出し、有効数字 3 桁で表示した。
平均値	Microsoft Excel 2003 で算出し、定量値と同様に有効数字 3 桁で表示した。
標準偏差	Microsoft Excel 2003 で算出し、平均値と小数点以下同桁数で表示した。
%表記値	Microsoft Excel 2003 で算出し、小数点以下第 1 位まで表示した。

6.10.4 薬物動態パラメータの算出

被験物質投与群について、血漿中濃度推移から薬物動態パラメータ (C_{max} , T_{max} 及び AUC_{0-24h}) を個体別に算出した。初回投与時の投与 0 時間の血漿中濃度は、0 ng/mL とし、最終回投与時の投与 0 時間の血漿中濃度は、投与前の定量値を使用した。 C_{max} , T_{max} は実測値より求め、 AUC_{0-24h} は、薬物動態解析プログラム Phoenix WinNonlin 6.2 (Pharsight Corporation) を用いて、台形法で算出した。

各パラメータの平均値及び標準偏差の算出には Microsoft Excel 2003 を用いた。

6.10.5 残余 TK 測定試料の処理

測定終了後の残余 TK 測定試料は、試験終了時までには廃棄した。

6.11 統計学的解析

主試験群から得られた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支援システム (Provantis, INSTEM 社) を用いた。

計量データは、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。

計数データは、Dunnett 型の多重比較検定 (有意水準: 1% 及び 5%, 両側検定) によって対照群との比較を行った。

統計学的解析の対象項目を以下に示した。TK サテライト群で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
- ・ 尿検査結果 (比重, 尿量, 電解質)
- ・ 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

計数データ：

- ・尿検査結果（試験紙検査，尿沈渣），9.2 項参照

6.12 コンピュータシステムの使用

以下に示すデータの収集・集計には安全性試験支援システム（Provantis, INSTEM 社）を使用した。当該システムのコンピュータプロトコールにはデータ収集範囲，データ収集の日程等を登録した。コンピュータシステムのプロトコール番号として群分け前には B120720S，群分け以降には B120720 を用いた。

(1) 群分け，投与液量算出

(2) オンラインデータ収集及びデータ集計：

- ・一般状態
- ・体重及び体重増加量
- ・摂餌量
- ・尿検査（試験紙検査，尿量，比重，電解質）
- ・血液学的検査
- ・血液生化学的検査
- ・器官重量及び器官相対重量
- ・病理組織学的検査

(3) オフライン収集及びデータ集計：

- ・一般状態（雄：第 24 日，雌：第 22 日の 80 mg/kg/day 群の投与直後，雄：第 25 日～28 日，雌：第 23 日～28 日の全例の投与直後）
- ・尿検査（尿沈渣）
- ・眼科学的検査
- ・病理解剖検査

7. 結果

7.1 死亡・瀕死

結果を Table 1 及び Appendix 1 に示す。

死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。

7.2 一般状態

結果を Table 1 及び Appendix 1 に示す。

投与直後の流涎が 80 mg/kg/day 群の雄 2 例及び雌 4 例において認められた。雄が第 24 日～第 28 日に、雌が第 22 日～第 28 日に一過性ないし継続して認められた。流涎は投与後約 2 時間の観察では消失していた。

7.3 体重

結果を Table 2, 3 及び Appendix 2, 3 に示す。

投与期間を通して体重増加量の低値又は低値傾向が 5 mg/kg/day 群の雌, 20 mg/kg/day 以上の群の雌雄で認められた。体重の低値又は低値傾向が 5 mg/kg/day 群の雌及び 20 mg/kg/day 群の雌雄で第 18 日～第 28 日に、80 mg/kg/day 群の雄で第 4 日～第 28 日に、雌で第 11 日～第 28 日に認められた。

7.4 摂餌量

結果を Table 4 及び Appendix 4 に示す。

摂餌量の減少又は減少傾向が、5 mg/kg/day 群の雌で第 15 日～28 日に、20 mg/kg/day 群の雌で第 11 日～第 28 日に、80 mg/kg/day 群の雌雄で第 4 日～第 28 日に認められた。

7.5 眼科学的検査

結果を Table 5 及び Appendix 5 に示す。

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

Table 5 及び Appendix 5 に示した変化は、いずれも投与開始前から認められていることから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

7.6 尿検査

結果を Table 6 及び Appendix 6 に示す。

尿量の増加傾向、尿比重、尿電解質 (Na, K, Cl) の濃度及び排泄量の減少又は減少傾向が 80 mg/kg/day 群の雌雄に認められた。K 排泄量の減少については、5 及び 20 mg/kg/day 群の雌にも認められた。

この他、80 mg/kg/day 群の雄で有意な尿蛋白及び結晶出現率の低下がみられたが、いずれも低下であることから、毒性学的意義は低いと考えられた。

なお、20 mg/kg/day 群の雄において、尿 Cl 排泄量の有意な増加が認められたが、用量相関性が認められないことから偶発的なものと判断した。

7.7 血液学的検査

結果を Table 7 及び Appendix 7 に示す。

血小板数の増加が 20 mg/kg/day 以上の群の雌雄で認められた。また、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、MCV 及び MCH の減少が 80 mg/kg/day 群の雌雄で認められた。ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の減少は、20 mg/kg/day 群の雄でも認められた。さらに白血球数の増加に伴う好中球数、好中球比率、リンパ球数及び単球数の増加、並びに好酸球比率及びリンパ球比率の減少又は減少傾向が 80 mg/kg/day 群の雌雄で認められた。好中球数の増加は、20 mg/kg/day 群の雌でも認められた。好塩基球比率及び好塩基球数の増加が 80 mg/kg/day 群の雌で認められた。

この他、20 mg/kg/day 群の雄において、網状赤血球数及び網状赤血球比率の有意な減少が認められたが、用量相関性が認められないことから偶発的なものと判断した。

なお、80 mg/kg/day 群の雄で PT 及び APTT の短縮が認められたが、短縮であることから毒性学的意義は低いと考えられた。

7.8 血液生化学的検査

結果を Table 8 及び Appendix 8 に示す。

総蛋白、A/G 比、アルブミン比率及びアルブミン濃度の減少、 α_2 -グロブリン比率及び α_2 -グロブリン濃度、 β -グロブリン比率及び β -グロブリン濃度の増加又は増加傾向が 20 mg/kg/day 以上の群の雌雄で、グルコースの減少が 20 mg/kg/day 以上の群の雌で、総コレステロール及びリン脂質の減少が 20 mg/kg/day 群の雌及び 80 mg/kg/day 群の雌雄で認められた。また、尿素窒素の増加が 80 mg/kg/day 群の雌雄で、トリグリセライドの増加が 80 mg/kg/day 群の雌で認められた。

この他、80 mg/kg/day 群の雄で有意な ALP、カルシウム、 α_1 -グロブリン濃度の減少及び有意なカリウムの増加、5 及び 80 mg/kg/day 群の雌で有意な CK の減少、5 mg/kg/day 以上の群の雄で有意な無機リンの増加、80 mg/kg/day 群の雌で有意なナトリウム及び α_1 -グロブリン比率の増加がみられたが、いずれも試験施設の背景データ (ALP: 雄 343~815 U/L, カルシウム: 雄 9.6~10.8 mg/dL, α_1 -グロブリン濃度: 雄 0.9~1.7 g/dL, カリウム: 雄 3.8~5.0 mmol/L, CK: 雌 69~237 U/L, 無機リン: 雄 7.9~10.3 mg/dL, ナトリウム: 雌 142~150 mmol/L, α_1 -グロブリン比率: 雌 12.3~20.3%) 付近の軽微な変化であった。これらの変化については、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

なお、5 mg/kg/day 群の雌で有意な無機リンの減少が認められたが、用量相関性が認められないことから偶発的なものと判断した。

さらに、ALAT の減少が 20 及び 80 mg/kg/day 群の雄で認められたが、減少であることから毒性学的意義は低いと考えられた。

7.9 器官重量

結果を Table 9 及び Appendix 9 に示す。

肝臓の実重量及び相対重量の増加又は増加傾向が 80 mg/kg/day 群の雌雄で認められた。

この他、心臓の実重量の有意な減少が 5 mg/kg/day 以上の群の雌で、肺の相対重量の有意な増加が 20 mg/kg/day 以上の群の雌雄で、脳の相対重量の有意な増加が 20 mg/kg/day 群の雌及び 80 mg/kg/day 群の雌雄で、胸腺の実重量の有意な減少が 20 mg/kg/day 群の雄で、精巣上体の相対重量の有意な増加が 20 mg/kg/day 以上の群の雄で、唾液腺の実重量の有意な減少、腎臓の相対重量の有意な増加が 80 mg/kg/day 群の雌雄で、肺の実重量の有意な増加、前立腺の実重量の有意な減少、心臓の実重量及び相対重量の有意な減少が 80 mg/kg/day 群の雄で、脾臓、副腎及び卵巣の相対重量の有意な増加、胸腺の実重量の有意な減少が 80 mg/kg/day 群の雌で認められた。しかし、いずれも試験施設の背景データ（肺の相対重量：雄 0.329～0.433%，雌 0.413～0.545%，脳の相対重量：雄 0.482～0.658%，雌 0.709～1.009%，胸腺の実重量：雄 321.1～708.3 mg，精巣上体の相対重量：雄 0.195～0.311%，唾液腺の実重量：雄 0.495～0.771 g，雌 0.325～0.501 g，心臓の実重量：雄 0.992～1.556 g，雌 0.657～0.985 g，腎臓の相対重量：雄 0.630～0.834%，雌 0.653～0.861%，肺の実重量：雄 1.145～1.557 g，前立腺の実重量：雄 0.346～0.718 g，心臓の相対重量：雄 0.292～0.428%，脾臓の相対重量：雌 0.157～0.265%，副腎の相対重量：雌 22.06～38.26×10⁻³%，卵巣の相対重量：雌 30.07～53.67×10⁻³%，胸腺の実重量：雌 246.2～631.8 mg）付近の軽微な変化であった。これらの変化については、体重の低値によるものと考えられ、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

7.10 病理解剖検査

結果を Table 10 及び Appendix 10 に示す。

被験物質に起因すると思われる変化が、80 mg/kg/day 群の雌雄の小腸（十二指腸，空腸，回腸），同群の雌の肝臓及び腸間膜リンパ節に認められた。その発現状況を文中表 1 に示す。