

5. 要約

P092 をカニクイザル（雌雄各 3 頭/群）に、0, 50, 150 及び 500/250 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。また、反復投与後の P092 の脳脊髄液中濃度を測定した。その他に P092 をカニクイザル（雌 3 匹）に 500 mg/kg/day の用量で単回投与し、P092 の脳脊髄液中濃度の推移を検討した。

その結果、死亡又は瀕死が 50 mg/kg/day 群の雌 1 例、150 mg/kg/day 群の雄 3 例及び雌 1 例、500/250 mg/kg/day 群の雄 1 例及び雌 2 例で認められた。一般状態では嘔吐、軟便又は下痢（水様下痢を含む）、無便、自発運動の低下及び横臥、摂餌量の減少を伴う体重の減少がみられ、死亡又は瀕死状態となった。血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン濃度又はヘマトクリット値の増加が認められた。また、MCV の減少、血小板数の増加、APTT の延長が認められた。さらに白血球数の増加、リンパ球比率の減少も認められた。血液生化学的検査では、ASAT 又は ALAT の増加、LDH、尿素窒素及びクレアチニンの増加、ナトリウム及びクロールの減少が認められた。また、CK の上昇、無機リン及びカリウムの増加が 50 mg/kg/day 群の雌及び 500/250 mg/kg/day 群の雌で認められた。500/250 mg/kg/day 群の雌 1 例（#50402）では、グルコース、総コレステロール、リン脂質、トリグリセライドの増加、総蛋白、 α_1 -、 α_2 -及び β -グロブリン濃度の増加、A/G 比の減少が認められた。胸腺の実重量及び相対重量の減少、副腎の実重量及び相対重量の増加が 150 mg/kg/day の雄で認められた。剖検では胃粘膜、結腸及び直腸粘膜の暗赤色斑、胸腺の小型化、副腎の腫大が認められた。全身性的変化として、脱水が認められた。

生存動物では、一般状態観察において、嘔吐、軟便又は下痢（水様下痢を含む）、無便が 50 mg/kg/day 以上の群の雌雄で認められた。

摂餌量の減少を伴う体重の減少又は減少傾向が 50 mg/kg/day 以上の群の雌雄で認められた。

血液学的検査では、赤血球数、ヘモグロビン濃度又はヘマトクリット値の増加、MCV の減少が 500/250 mg/kg/day 群の雌雄で認められた。血小板数の増加が 50 及び 150 mg/kg/day の雌雄及び 500/250 mg/kg/day 群の雄で認められた。APTT の延長が 500/250 mg/kg/day 群の雄で認められた。さらに白血球数の増加（好中球数及び好中球比率の増加）、リンパ球比率の減少が 50 mg/kg/day の雌、500/250 mg/kg/day 群の雄で認められた。

血液生化学的検査では、ASAT 又は ALAT 増加、LDH の増加が 50 mg/kg/day 以上の群の雌で、CK の上昇が 50 mg/kg/day 以上の群の雌で、尿素窒素及びクレアチニンの増加が 50 及び 150 mg/kg/day 群の雌、500/250 mg/kg/day 群の雌雄で、トリグリセライドの増加が 500/250 mg/kg/day 群の雄で、無機リン及びカリウムの増加が 500/250 mg/kg/day 群の雄で、ナトリウム、クロールの減少が 50 mg/kg/day 群の雌雄、150 mg/kg/day 群の雄雌、500/250 mg/kg/day 群の雌雄で認められた。

器官重量では、肝臓の実重量及び相対重量の増加、胸腺の実重量及び相対重量の減少が 50 及び 150 mg/kg/day 群の雌、500/250 mg/kg/day 群の雌雄で認められた。副腎の実重量及び相

対重量の増加が 500/250 mg/kg/day 群の雄で認められた。

病理解剖検査では、副腎の腫大が 50 mg/kg/day 群の雌 2 例、150 mg/kg/day 群の雌 1 例及び 500/250 mg/kg/day 群の雄 2 例で、胸腺の小型化が 50 mg/kg/day 群の雌 2 例で認められた。

脳脊髄液中薬物濃度測定では、150 mg/kg/day の雌雄各 1 例 (#10301, #50303) がそれぞれ 59.1 ng/mL 及び 199 ng/mL, 500/250 mg/kg/day の雄 1 例 (#10403) が 209 ng/mL であった。その他の動物は全例が定量下限未満 (<5 ng/mL) であった。また、単回投与後の投与後約 1, 4 及び 24 時間の脳脊髄液中薬物濃度は、全時点が定量下限未満 (<5 ng/mL) であった。

以上の結果から、本実験条件下での P092 の無毒性量は、雌雄とも 50 mg/kg/day 未満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

65E3H 及び QV48N

6.1.3 純度

65E3H : 99.1% (Annex 1 参照)

QV48N : 99.1% (Annex 2 参照)

6.1.4 性状

白色の粉末

6.1.5 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.1.6 保存条件

冷蔵 (実測値 : 3.2°C~6.3°C, 許容範囲 : 1°C~10°C), 遮光, 密封 (窒素封入)

6.1.7 取扱上の注意

保護メガネ, マスク, ゴム手袋を着用した。

6.1.8 安定性の確認

試験委託者から安定性試験 (GLP 適用試験) の結果を入手し, 投与期間中の安定性を確認した (Annex 3, 4 参照)。

6.1.9 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 及び WEK5883, 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 : 2E85, 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、8 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：4.2°C～6.2°C，許容範囲：1°C～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 5 日～7 日に 1 回の頻度で調製した。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スシリンダーあるいはメートルグラスに移した。
- (3) この混合液に媒体を加え、100 又は 50 mg/mL になるように正確にメスアップした。更に 100 又は 50 mg/mL の投与液を媒体で段階希釈し、50 又は 30 及び 10 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。

6.3.2 保管条件

冷蔵（実測値：4.3°C～6.2°C，許容範囲：1°C～10°C），遮光，密封
投与液は、調製後 6 日以内に使用した。

6.3.3 安定性確認及び均一性確認

試験施設で実施した「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、0.05 及び 100 mg/mL 被験物質投与液が冷蔵・遮光・密封下で調製後 9 日間、これに続く室温・遮光・密封下で 24 時間安定かつ均一であることが確認されている（Annex 5 参照）。

6.4 試験動物

6.4.1 動物種

サル

6.4.2 種

カニクイザル (*Macaca fascicularis*)

6.4.3 性別

雌雄

6.4.4 系統選択の理由

非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。

6.4.5 購入先

株式会社日本医科学動物資材研究所

6.4.6 仕出国

ベトナム社会主義共和国（生産業者：NAFOVANNY）

6.4.7 入荷日

雄：2012年5月10日

雌：2012年5月9日

6.4.8 入荷時年齢

雌雄とも3～4歳齢

6.4.9 輸入検疫・馴化

指定動物（サル）の検査場所指定施設である当試験施設で，30日間以上の輸入検疫期間を含めて検疫・馴化を6週間以上行い，健康状態が良好であることを確認した動物を本試験へ移管した。

6.4.10 移管動物数

反復投与：雌雄各14頭

単回投与：雌3頭

6.4.11 投与前検査

動物移管後，投与前検査として以下の検査を群分けまでに実施した。観察及び検査方法は，6.8項に従った。単回投与動物の投与開始前検査については，一般状態観察（毎日），体重測定（動物移管日）のみを実施した。

- ・ 一般状態観察（毎日）
- ・ 体重測定〔動物移管日，動物移管後7日，群分け日〕
- ・ 摂餌量測定（毎日）
- ・ 眼科学的検査（1回）
- ・ 尿検査（1回）
- ・ 血液学的検査（1回）
- ・ 血液生化学的検査（1回）

6.4.12 投与時年齢

雄： 4～5 歳齡

雌： 4 歳齡

6.4.13 投与開始時体重

反復投与

雄： 2.8～3.8 kg

雌： 2.6～3.6 kg

単回投与

雌： 2.6～2.9 kg

6.4.14 群分け

(1) 実施日

反復投与動物：雌雄とも投与開始の3日前

単回投与動物：投与前日

(2) 動物選抜

投与前検査の検査の結果から，毒性評価に適さないと考えられた雌雄各2例(#19006, #19013, #59011, #59012)を除外し，その他の動物（雌雄各12例）を群分けに使用した。

除外動物番号	除外理由
#19006	リンパ球数の高値
#19013	摂餌量の低値
#59011	低体重
#59012	白血球数の高値

(3) 動物の振り分け

反復投与動物については，動物選抜後，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12頭を使用した。単回投与動物については，移管動物をそのまま振り分けた。

6.4.15 動物の識別

個体識別は入れ墨番号（動物生産施設の個体番号）により行った。また、個体管理は、入れ墨番号、試験施設の個体番号、ケージ番号及び本試験での動物番号の対応表を用いて行った。

動物のケージには以下の情報を記載したラベルを付けた。

群分け前：試験番号，ケージ番号，群分け前の動物番号（反復投与動物の検疫番号；雄：19001～19014，雌：59001～59014，単回投与動物の検疫番号；雌：69001～69003），入れ墨番号，性別及び試験施設の個体番号

群分け後：試験番号，ケージ番号，被験物質名，投与用量，動物番号（6.6項参照），入れ墨番号，性別及び試験施設の個体番号

6.4.16 余剰動物の取扱

余剰動物は投与日に試験から除外した。

6.5 飼育環境

6.5.1 飼育室

サル飼育室（13156室）

6.5.2 飼育環境

6.5.2.1 温度

24.9°C～26.3°C（許容範囲：23.0°C～29.0°C）

6.5.2.2 相対湿度

41.0%～68.7%（許容範囲：35.0%～75.0%）

6.5.2.3 換気

10～30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

なお，TK採血のため，19:00以降に照明を点灯した（最大：58分間）。

6.5.3 飼育器材

6.5.3.1 ケージ

ステンレス製ケージ（680W×608/658D×770H mm，トキワ科学器械株式会社）

ケージは毎日水洗した。

6.5.3.2 給餌器

ステンレス製給餌器（トキワ科学器械株式会社）

給餌器は毎日水洗した。

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）

6.5.3.4 架台

ステンレス製水洗式架台（2段，トキワ科学器械株式会社）

架台は毎日水洗した。

6.5.3.5 エンリッチメント

動物福祉向上のために，コングを使用した。

6.5.4 収容動物数

1頭/ケージ

6.5.5 飼料

6.5.5.1 種類

サル用固型飼料，CMK-2（CR-LPF，Lot No. K2092 及び K2102，日本クレア株式会社）

6.5.5.2 給餌法

制限給餌（100 g/日，1日1回給餌）

投与期間中は投与後約2時間の一般状態観察後に，その他の期間は10:00～15:00に給餌し，翌朝に残存している飼料を回収，廃棄した。ただし，ただし，以下の場合には例外とした。なお，計画解剖日には給餌しなかった。単回投与動物については，投与後4時間の脳脊髄液採取後に給餌した。

15:00以降に給餌されることがある場合：

- ・眼科学的検査日（十分に麻酔から覚醒したことを確認後に給餌）

給餌日の夕方（17:00前後）に残存している飼料を回収，廃棄する場合：

- ・尿検査の16時間尿採取開始日
- ・血液学的検査及び血液生化学的検査の前日
- ・計画解剖日の前日

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

ただし，尿検査のための採尿中は給水を停止した。

6.5.6.3 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。

6.6 群構成

反復投与試験

群	被験物質	投与用量 (mg/kg/日)	投与液量 (mL/kg/日)	投与液 濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）	
					雄	雌
1	対照 ^{*1}	0	5	0	3 (10101~10103) ^{*2}	3 (50101~50103) ^{*2}
2	P092	50	5	10	3 (10201~10203) ^{*2}	3 (50201~50203) ^{*2}
3	P092	150	5	30	3 (10301~10303) ^{*2}	3 (50301~50303) ^{*2}
4	P092	500/250 ^{*3}	5	100/50 ^{*3}	3 (10401~10403) ^{*2}	3 (50401~50403) ^{*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，500/250 mg/kg/日群の生存動物は第11日に解剖した。）

*3：第5日から投与用量を250 mg/kgに変更した。

単回投与試験

群	被験物質	投与用量 (mg/kg/日)	投与液量 (mL/kg/日)	投与液 濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）
					雌
5	P092	500	5	100	3 (60101~60103) ^{*1}

*1：投与の翌日に解剖（脳採取のみ）

6.6.1 投与用量及びその設定理由

投与用量は50，150及び500/250 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のカニクイザルを用いる単回経口投与予備試験（B121072）の結果に基づいて設定した。雌雄カニクイザルに100，250及び500 mg/kgの用量で単回投与した結果，一般状態観察において100 mg/kg以上の群で吐物（泡状物又は投与液）が投与後30

分～投与後 6 時間に、100 mg/kg 以上の群の雄及び 500 mg/kg 群の雌で下痢又は軟便が投与後 6 時間～第 3 日にみられた。しかし、重篤な症状はいずれの用量でも認められず、体重にも影響は認められなかった。

以上のことから、2 週間継続して投与が可能と考えられる 500 mg/kg/日を高用量に設定し、公比約 3 で 150 及び 50 mg/kg/日を設定した。

投与の結果、第 1 日から第 4 日に高用量の 500 mg/kg/日群において、吐物、下痢又は軟便、体重及び摂餌量の減少がみられた。500 mg/kg/日群は反復投与によってさらなる状態悪化が想定されることから、第 5 日から投与用量を 250 mg/kg に変更した。

単回投与試験については、P092 のカニクイザルを用いる単回経口投与毒性試験（試験番号：B120717）の血漿中薬物濃度測定の結果から、500 mg/kg/日を設定した。

6.7 投与

6.7.1 投与経路

経口（強制経口投与）

6.7.2 投与経路の選択理由

予定臨床適用経路に準じた。

6.7.3 投与液量

5 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。

6.7.4 投与回数

反復投与：1 日 1 回、週 7 日、2 週間（ただし、500/250 mg/kg/日群は 10 日間とした。）

単回投与：1 回

6.7.5 投与方法

ディスポーザブルシリンジ及び経口カテーテルを用いて強制的に胃内に経口投与した。被験物質投与後に飲用水を 5 mL 追送した。投与は反復投与が 8:17～12:49、単回投与が 12:00～12:30 に行った。なお、投与に際しては、投与液をマグネチックスターラーで攪拌しながら分取した。

6.8 観察・検査項目

全動物について、下記の項目を検査した。なお、群分け後の余剰動物についても投与開始日まで同様に検査を実施した。単回投与動物については、一般状態観察、体重測定、TK 測定試料の採取及び脳脊髄液中の薬物濃度測定のみを実施した。

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。動物移管日から投与開始前日までを投与開始前期間、第 1 週から第 2 週を投与期間とした。単回投与の日と週の表記は、投与日を第 1 日とした。

6.8.1 一般状態

動物移管日から解剖日まで毎日、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時間に1回）

投与期間以外：1日1回（午前中）

単回投与動物の投与日の観察は、投与前並びに投与後約1,4及び24時間の採血前に行った。

6.8.2 体重

電子天秤（LDS-150H，島津製作所株式会社）を用いて、以下の日程で給餌前（投与期間は投与前）に測定した。

測定日：動物移管日，動物移管後7日，群分け日，第-35，-28，-21，-14，-7日，初回投与日（第1日），第4，8，11及び最終投与日（第14日）

計画解剖日（第15日）には、器官相対重量（対体重比）算出のために体重を測定した。

瀕死動物及び死亡動物が認められた場合は、解剖前に体重を測定した。

単回投与動物については、動物移管日，群分け日，投与日（第1日）に測定した。

6.8.3 摂餌量

動物移管日から剖検前日まで毎日測定した。給餌（6.5.5.2項参照）の翌朝に残餌量（個数）を目測した。給餌量と残餌量（個数からグラム換算）から1日あたりの摂取量を算出した。ただし、下記の場合は残餌量測定を給餌日の夕方に行い、1日あたりの摂取量を算出した。

- ・尿検査の16時間尿採取開始日
- ・血液学的検査及び血液生化学的検査の前日
- ・計画解剖日の前日

算出した摂餌量を残餌量測定日（給餌日の夕方に回収した場合は翌日）の摂餌量として表記した。

6.8.4 眼科学的検査

投与開始前期間（第-45日）に実施した。ペンライトを用いて対光反射を検査後、塩酸ケタミン麻酔下で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。

6.8.5 尿検査

投与開始前期間（第-48～-47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16時間尿を用いて行った。尿は採尿トレーを

用いて以下の通り尿を用いて以下の通り採取した。尿採取時には動物への給水を停止した。

新鮮尿： 検査日の午前中（投与期間は投与前）に新鮮尿（最長 3 時間の蓄積尿）を採取した。

16 時間尿： 新鮮尿採取日の夕方（17:00 前後）から翌朝（9:00 前後，投与期間は投与前）までの約 16 時間，蓄尿した。

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（略号又は別称；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*）
(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) ウロビリノーゲン（EU/dL）	試験紙法（マルティスティックス*）
(8) 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]
(9) 比重	屈折法
(10) 色調	目視
(11) 尿量（mL）	メスシリンダーで測定
(12) ナトリウム（Na; mmol/L, mmol）	イオン選択電極法
(13) カリウム（K; mmol/L, mmol）	イオン選択電極法
(14) 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）

6.8.6 血液学的検査

投与開始前期間（第-46，-4 日）及び投与期間（第 11 日*，第 14 日）の午前中（投与期間は投与前，その他の期間は給餌前）に，前日より 16 時間以上絶食し，大腿静脈より採血し，下表に示す項目について検査を行った。以下の瀕死動物についても採血し，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，計画解剖動物及び下記瀕死動物について 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。

*：#10401，#10402，#50403 のみ

瀕死動物

採血日	動物番号
第 5 日	#50402
第 10 日	#50201

採血量： 約 4 mL

血液生化学的検査用血液（6.8.7 項参照）を含む

EDTA 処理： 血液約 1 mL を EDTA-2K で抗凝固処理した。

血漿採取： 血液 1 mL を 3.2 w/v %クエン酸三ナトリウム水溶液（111 μ L）で抗凝固処理後、遠心分離（12000 \times g, 3 分, 4 $^{\circ}$ C）して血漿を採取した。

項目 (略称; 単位)	方法
(1) 赤血球数 (RBC; $\times 10^6/\mu$ 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) 平均赤血球血色素量 (MCH; pg)	RBC と HGB より算出
(6) 平均赤血球血色素濃度 (MCHC; g/dL)	HGB と HCT より算出
(7) 網赤血球比 (%) 及び実数 ($\times 10^9/L$)	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)

*： 第 11 日の 500/250 mg/kg/day 群の雄 1 例 (#10401) の白血球百分率及び実数において、白血球スクアタグラム異常がみられ、測定できなかった。本例については、Wright 染色塗抹標本を MICROX HEG-50 及び HEG-50VF (オムロン株式会社) を用いて目視により測定した。

第 5 日の 500 mg/kg/day 群の雌 1 例 (#50402) の RBC 及び HCT 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。

6.8.7 血液生化学的検査

投与開始前期間（第-46, -4 日）及び投与期間（第 11 日, 第 14 日）の午前中（投与期間は投与前, その他の期間は給餌前）に、血液学的検査と同時に採取した血液（6.8.6 項参照）の一部（約 1 mL）を室温で約 30~60 分間放置後、遠心分離（約 1750 \times g, 10 分, 約 4 $^{\circ}$ 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（6.8.6 項参照）の一部（約 0.6 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（約 12000 \times g, 3 分, 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C（許容範囲：-60 $^{\circ}$ 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
(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

下記の動物については、測定値が測定上限を超えたため、生理食塩液にて希釈後の再測定値を採用した。

採血日	動物番号	再測定項目
第 5 日	#50402	無機リン
第 10 日	#50201	CK

6.8.8 病理学的検査

6.8.8.1 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		器官重量	
		側性		側性
(1) 心臓	○	-	○	-
(2) リンパ節	下顎	○	-	-
	腸間膜	○	-	-
(3) 胸腺	○	-	○	-

器官・組織	採材 側性	器官重量 側性
(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	パイエル板含 ○ -	- -
(13) 盲腸	○ -	- -
(14) 結腸	○ -	- -
(15) 直腸	○ -	- -
(16) 唾液腺	耳下 ○ 両側	- -
	顎下 ○ 両側	○ 左右別
	舌下 ○ 両側	- -
(17) 肝臓/胆嚢	○ -	○ -
(18) 膵臓	○ -	○ -
(19) 腎臓	○ 両側	○ 左右別
(20) 膀胱	○ -	- -
(21) 精巣	○ 両側	○ 左右別
(22) 精巣上体	○ 両側	○ 左右別
(23) 精嚢	○ -	○ -
(24) 前立腺	○ -	○ -
(25) 下垂体	○ -	○ -
(26) 甲状腺/上皮小体	○ 両側	○ 左右別
(27) 副腎	○ 両側	○ 左右別
(28) 大腿骨 (膝関節を含む) /大腿骨骨髓	○ 片側	- -
(29) 胸骨/骨髓	○ -	- -
(30) 皮膚/乳腺	○ 両側	- -
(31) 眼球/視神経	○ 両側	- -
(32) 涙腺	○ 両側	- -
(33) 脳	○ -	○ -
(34) 脊髄	頸部 ○ -	- -
	胸部 ○ -	- -
	腰部 ○ -	- -
(35) 卵巣	○ 両側	○ 左右別
(36) 子宮	○ -	○ -
(37) 膣	○ -	- -
(38) 大動脈	胸部 ○ -	- -
(39) 骨格筋/坐骨神経	大腿部 ○ 片側	- -
(40) その他肉眼的異常の器官/組織	○ -	- -

○：採材，検査対象； -：検査対象外または側性の区別なし

6.8.8.2 病理解剖検査

計画解剖動物は第 11, 15 日に解剖した。

ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル，共立製薬株式会社）又は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）の静脈内投与による麻酔下で，総頸動脈及び腋窩動静脈から放血して安楽死させた後に剖検した。

瀕死動物についても同様に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。

6.8.8.3 器官重量

計画解剖時に 6.8.8.1 項に示した器官・組織の重量を電子天秤（PAE260，メトラー・トレド株式会社）を用いて測定した。両側性の器官については左右別々に測定した。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。瀕死動物についても解剖時に同様に器官重量を測定した。死亡動物の器官重量は測定しなかった。

6.8.9 脳脊髄液中の薬物濃度測定

P092 の投与期間終了時の脳脊髄液中濃度を測定した。

6.8.9.1 採取及び測定試料の採取

反復投与の瀕死動物を含む生存動物は，ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル，共立製薬株式会社）の静脈内投与による麻酔下で，死亡動物も解剖前に脳脊髄液（測定試料）を椎間関節穿刺により約 1 mL 採取した。採取した脳脊髄液は，直ちにポリプロピレン（PP）製チューブに入れドライアイスで保冷し，測定まで約 -80°C （許容範囲： -60°C 以下）のフリーザー内で凍結保存した。単回投与動物は，投与後約 1, 4 及び 24 時間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）の静脈内投与による麻酔下で，同様に採取し，凍結保存した。反復投与の総検体数は 24 検体，単回投与の総検体数は 9 検体であった。

6.8.9.2 測定対象標準物質

被験物質（6.1 項）を使用した。

6.8.9.3 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：実測値： 15.3°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

6.8.9.4 ブランク脳脊髄液

動物種： カニクイザル
 投与歴： 休薬3ヶ月以上
 入手先： 当試験施設で飼育中の動物より採取
 保存条件： 約-20°C（実測値：-29.2°C~-22.4°C，許容範囲：-40°C~-15°C）

6.8.9.5 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。

6.8.9.6 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：4.2°C ~6.0°C，許容範囲：1°C~10°C）し，調製後1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 (µL)*	メタノール 添加量(µL)*
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した。

6.8.9.7 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 µg/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：4.2°C～6.0°C，許容範囲：1°C～10°C）し，調製後 1 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 (μL)*	メタノール添加量 (μL)*
ISWS-1	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	ISSS	50	950
ISWS	200 ng/mL	ISWS-1	40	960

*：マイクロピペットを使用した。

6.8.9.8 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脳脊髄液 20 μL を分取後，水／ギ酸（1000:1，v/v）400 μL 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 μL ，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 μL 添加した。

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

6.8.9.9 脳脊髄液試料の前処理方法（分析フロー）

- (1) PP 製マイクロチューブに脳脊髄液 20 μL を分取した。
- (2) 水／ギ酸（1000:1，v/v）400 μL を添加した。
- (3) メタノール 20 μL 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 μL を添加した。
- (5) ミキサーを用いて攪拌した。
- (6) 全量を Oasis HLB $\mu\text{Elution plate}$ （30 μm ，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 μL 及び水／ギ酸（1000:1，v/v）200 μL でコンディショニングした）。
- (7) 水／ギ酸（1000:1，v/v）200 μL で洗浄した。
- (8) メタノール 70 μL 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.

6.8.9.10 分析条件

<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)

<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 で混合する.
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

<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

6.8.9.11 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 ：脳脊髄液中 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 $\pm 15.0\%$ （LLOQ では $\pm 20.0\%$ ）以内であること。

LLOQ 及び ULOQ 以外の濃度について、%RE が $\pm 15.0\%$ 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 10 参照）。

6.8.9.12 薬物濃度測定試料の希釈

本試験では、希釈は実施しなかった。

6.8.9.13 薬物濃度測定時の精度管理

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

略称	脳脊髄液中濃度 (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. 測定試料
4. QC サンプル（Low, Middle 及び High, n=1）

<許容基準>