

1. 表題

EI236のラットにおける4週間間歇静脈内投与予備毒性試験

2. 試験目的

EI236をラットに週1回4週間間歇静脈内投与したときの毒性変化を予備的に調べる。

3. 適用規則

本試験は、適用規則なしとする。

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IACUC371-003）、当研究所の動物実験規程に従って実施する。なお、試験施設はAAALAC Internationalにより認証されている。

5. 試験委託者

株式会社IHI 基盤技術研究所
〒235-8501 横浜市磯子区新中原町一番地
委託担当者：江口 晴樹

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

7. 試験関係者

試験責任者：岡谷 秀明
被験物質取扱い責任者：塩崎 彩
動物実験担当責任者：伊地知 裕美子
臨床検査責任者：蓑毛 博文
病理検査責任者：藤島 純子
統計解析責任者：橋口 晃一

8. 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、投与開始週を投与1週目と起算する。

9. 被験物質及び対照物質（媒体）

（SOP：TSB/002）

9.1 被験物質

名称：EI236
提供者：横浜市立大学
ロット番号：後日記載
特性
濃度：30 mg/mL（1.5 g/50 mL）
物理的性状：後日記載
安定性：後日記載
受領日：2014年1月17日
入手日：後日記載
入手量：1.5 g/50 mL
保存条件：室温
保存場所：被験物質保管所内常温室（許容範囲：15～25°C）
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：すべて提供者に返却する。

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）

調製濃度：2.5及び12.5 mg/mL
換算係数：なし
調製方法：被験物質の必要量を採取し、媒体を加えて調製量にメスアップし、12.5 mg/mL溶液を調製する。12.5 mg/mL溶液に媒体を加え、2.5 mg/mL溶液を調製する。

調製頻度：用時調製

11. 被験物質及び対照物質の投与

（SOP：GTX/373）

投与経路：静脈内
投与経路の選択理由：臨床適用経路は脳実質内だが、大量曝露時の毒性を評価するために静脈内投与を選択した。
投与方法：ディスポーザブル注射筒及び注射針を用いて尾静脈内に投与する。
投与方法の選択理由：ラットの静脈内投与では通常用いられる方法である。

投与回数及び投与期間：週1回，
4週間投与（計4回投与）

投与回数及び投与期間の選択理由：

4週間間歇投与したときの毒性を確認するため。

投与容量：4 mL/kg/回

投与液量は、最新の体重を基に個別に算出する。

投与速度：1 mL/min

投与時刻：08：30～13：30

12. 試験系

種：ラット

系統：Crl：CD（SD）

体重

繁殖生産者出荷時：

100～160 g

検疫馴化開始時：

90～168 g

週齢

検疫馴化開始時：5週齢

投与開始時：6週齢

入手日：2014年2月4日

入手動物数：雄17匹

使用動物数：雄15匹

繁殖生産者及び所在地：日本チャールス・リバー株式会社

〒529-1633 滋賀県蒲生郡日野町下駒月735

動物選択の理由：毒性試験に汎用される種、系統である。

13. 飼育条件

（SOP：GTX/189，GTX/310，

GTX/541，HTL/303）

飼育室：562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

（観察のため上記の照明時間以外に点灯する場合を除く）

飼育ケージ（平床飼育）

材質：ステンレス

大きさ：300 mm（D）× 170 mm（W）× 180 mm（H）

収容数：1匹/ケージ

飼料：固型飼料（CRF-1，オリエ

ンタル酵母工業株式会社）を自由に与える。ただし、剖検前日（17：00～19：00より）は絶食とする。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、株式会社新日本科学 安全性研究所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により自由に摂取させる。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、株式会社新日本科学 安全性研究所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。

床敷：パルマス μ （株式会社 天然素材探索研究所）を用いる。

清掃及び消毒：床を毎日清掃及び消毒する。

ケージ及び床敷は週1回以上、給餌器及び架台は4週に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、株式会社新日本科学 安全性研究所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：検疫馴化期間中は識別を実施しない。群分け以降は耳パンチ法で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、CAN、性別及びバーコード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、動物番号及びバーコード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: GTX/371)

動物は8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。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群分けに用いず、初回投与の翌日に、炭酸ガス吸入法で安楽死させる。

16. 動物の群分け

(SOP: GTX/153)

検疫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、初回投与の翌日に炭酸ガス吸入法で安楽死させる。

17. 試験群構成

対照群 1 群、被験物質群 2 群

群	被験物質及び対照物質	投与量 (mg/kg/回)	投与容量 (mL/kg/回)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号)
					雄
1	生理食塩液	-	4	-	5 (1~5)
2	EI236	10	4	2.5	5 (6~10)
3	EI236	50	4	12.5	5 (11~15)

18. 投与量設定の根拠

委託者にて実施されたマウスの単回予備毒性試験において、LD50は200 mg/kgと判断され、ヌードマウスに50 mg/kgの用量で14日間反復静脈内投与を行っても明らかな状態変化はみられなかった。

このことから、本試験においては反復投与可能な最大用量として50 mg/kgを高用量に設定し、

1/5量の10 mg/kgを低用量に設定した。

19. 観察及び検査項目

19.1 一般状態

(SOP: GTX/151, GTX/374)

例数: 全例

観察頻度

検疫馴化期間中:

毎日1回以上

投与期間中

投与日: 3回以上 (投与前, 投与後約1時間, 投与後約4時間)

非投与日: 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。

19.2 体重

(SOP: GTX/377)

例数: 全例

測定時期

検疫馴化期間中: 検疫馴化開始日及び終了日に1回

投与期間中: 投与0, 7, 14, 21, 27日に1回 (投与日は投与前) 剖検日: 1回 (剖検時の麻酔量算出のため)

測定方法: 電子天秤

(GX-4000, 株式会社エー・アンド・デイ) で測定する。測定時ごとの体重の増加量も求める。

19.3 摂餌量

(SOP: GTX/375)

例数: 全例

測定時期

検疫馴化期間中: 2日目に1回

投与期間中: 投与0, 7, 14, 21日目に1回 (午後)

測定方法: 給餌量を電子天秤

(GX-4000, 株式会社エー・アンド・デイ) で測定し、その翌日に残余量を測定して1日あたりの摂餌量を算出する。

19.4 血液学的検査

(SOP: GTX/381, HTL/034,

HTL/196, HTL/225)

例数: 全例

検査時期：剖検時
瀕死例は可能な限り実施する。
採血量：約 2.5 mL
採血方法：剖検のための麻酔下
で後大静脈腹部から採血する。
ADVIA120を用いる測定項目に約
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，
3.8 w/v%クエン酸ナトリウム溶
液を 150 μ L 添加した注射筒を
用いて約 1.5 mL採血し，遠心分
離（室温，1710 \times g，3000 rpm，
10分間）して得られた血漿を使
用する。
血液塗抹標本：ライト染色を施
した血液塗抹標本を作製する。
検査を実施しない場合は試験終
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 ⁶ /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120 ^{a)}
白血球	10 ³ /μL	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 ³ /μL	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	
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	
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 ^{b)}	10 ³ /μL, %	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 ^{c)}
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
各検査項目については，絶対数及び比率を計測し，絶対数のみを評価に用いる。
- c) 全自動血液凝固測定装置 (シスメックス株式会社)

19.5 血液生化学的検査

(SOP：GTX/381，HTL/182，HTL/253)

例数：全例

検査時期：剖検時

瀕死例は可能な限り実施する。

採血量：約 2 mL 以上

採血方法：血液学的検査のための採血後，腹大動脈から採血し、室温で 20～60 分間静置後、遠心分離（室温， $1710 \times g$ ，3000 rpm，10 分間）して得られた血清，あるいは測定まで超低温フリーザー（許容範囲： $-70^{\circ}C$ 以下）で凍結保存した血清を用いる。

検査項目及び方法：次の表に示す。

アスパラギン酸トランスアミナーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	JCA-BM6070 ^{a)}
アラニントランスアミナーゼ	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	
クレアチンキナーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
検査項目	単位	測定方法	機種
総ビリルビン	mg/dL	バナジン酸酸化法	
総蛋白	g/dL	ビウレット法	
アルブミン	g/dL	計算式： 総蛋白×アルブ	-

ン		ミン比率/100	
グロブリン	g/dL	計算式：総蛋白- アルブミン	
総コレステロール	mg/dL	COD・HMMPS 法	JCA-BM6070 ^{a)}
トリグリセリド	mg/dL	GPO・HMMPS 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	クレアチニナーゼ ・HMMPS 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	
蛋白分画 ^{b)}	%	電気泳動法	AES320 ^{c)}

a) 自動分析装置（日本電子株式会社）

b) 検査項目：アルブミン比率， α_1 -グロブ

- リン比率, α_2 -グロブリン比率, β -グロ
ブリン比率, γ -グロブリン比率, A/G 比
- c) 自動電気泳動分析装置 (ベックマン・
コールター株式会社)

19.6 病理学的検査

19.6.1 剖検

(SOP: GTX/125, PAT/053, PAT/095)

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: 4回目投与7日後

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。

瀕死例及び生存例: 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(6.48 mg/mL, 5 mL/kg)の腹腔内投与により麻酔を行い、検査のための血液を採取した後、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。

19.6.2 病理組織学的検査

(SOP: PAT/032, PAT/070)

検査器官: 肝臓, 腎臓(左右), 心臓, 肺(左右), 脾臓, 脳(大脳, 小脳, 橋, 延髄), 投与部位(尾), 肉眼的異常部位
固定

例数: 全例

方法: 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。

検査

例数: 全例

方法: 病理組織学的に検査する。

20. 統計学的手法

(SOP: CPU/105)

各群の体重、摂餌量、血液学的検査(白血球分類の比率を除く)、血液生化学的検査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。これらの統計解析にはMUSCOT統計解析ソフトウェア(ユックムス株式会社)を使用し、有意水準はBartlett法は5%、その他の検定は両側5%とする。一般状態、剖検、病理組織学的検査のデータについては検定を実施しない。

21. 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 表

- 1) 死亡数 (死亡がみられた場合)
- 2) 一般状態
- 3) 体重
- 4) 摂餌量
- 5) 血液学的検査
- 6) 血液生化学的検査
- 7) 剖検所見
- 8) 病理組織学的検査所見

別添 2 付表

- 1) 死亡数 (死亡がみられた場合)
- 2) 一般状態
- 3) 体重
- 4) 摂餌量
- 5) 血液学的検査
- 6) 血液生化学的検査
- 7) 剖検所見
- 8) 病理組織学的検査所見

22. 記録、資料及び標本の保存

試験施設で発生する記録、資料及び標本は、株式会社新日本科学 安全性研究所 (住所: 〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地) の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

被験物質及び対照物質に関する記録、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

摂餌量測定記録

血液学的検査記録

血液生化学的検査記録

剖検記録

病理組織学的検査記録

統計に関する記録

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

血液塗抹標本 (鏡検した場合)

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

23. 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。

20) EI236 のラットにおける単回脳内投与毒性予備試験

1. 表題

EI236 のラットにおける単回脳内投与毒性予備試験

2. 試験目的

ラットに EI236 を単回脳内投与したときの毒性変化を予備的に検討する。

3. 適用規則

本試験は、GLP 非適用とする。

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、当研究所の動物実験規程に従って実施する。なお、試験施設は AAALAC International により認証されている。

5. 試験委託者

株式会社 IHI 基盤技術研究所
〒235-8501 横浜市磯子区新中原町一番地
委託担当者：江口 晴樹

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
運営管理者：平井 照正

7. 試験関係者

試験責任者：岡谷 秀明
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 2438 番地

8. 試験日程

投与前日を-1 日目、投与日を 0 日目と起算する。観察期間は投与後 2 週間とする。

9. 被験物質及び対照物質

(SOP : TSB/002, TSB/004)

9.1 被験物質

名称：EI236
提供者：横浜市立大学
特性

濃度：30 mg/mL (1.5 g/50 mL)

保存条件：室温

保存場所：被験物質保管所内常温室

(許容範囲：15~25°C)

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：すべて試験委託者に返却する。

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)

調製濃度：30 及び 6 mg/mL

換算係数：なし

調製方法：高用量群は被験物質をそのまま投与に用いる。低用量群は、被験物質の必要量を採取し、媒体を加えて調製量にメスアップし、6 mg/mL 溶液を調製する。調製は無菌条件下で行う。

調製頻度：用時調製とする。

11.被験物質及び対照物質の投与

(SOP : GTX/373)

投与経路 : 脳実質内

投与経路の選択理由 :

臨床適用経路に準じる.

投与方法 : 投与操作開始直前に痛み緩和のためにカルプロフェン (リマダイル注射液, 50 mg/mL, ファイザー株式会社, 5 mg/kg) を皮下投与 (0.1 mL/kg) する. その後, 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 (6.48 mg/mL, 5 mL/kg) の静脈内投与による麻酔下にて脳定位装置でラット頭部を固定後, 頭皮を正中切開し歯科用ドリルで頭蓋に穴を開け, König and Klippel の脳図譜に従い右側の脳実質 (A : -4.5 mm, L : 2.5 mm, H : 6.5 mm) 内にステンレス管を刺入する. 1.0 mm 戻して固定し, ステンレス管, ポリエチレンチューブ及びマイクロシリンジを接続し, 動物実験用シリンジポンプ (CFV-3200, 日本光電工業株式会社) を用いて被験物質を投与する. 注入後 10 分間ステンレス管をその場に留置する. 投与操作終了後, ボーンワックスで頭蓋の穴を塞いだ後, 頭皮の切開部を縫合する.

投与方法の選択理由 : 脳実質内の一定部位に投与するため.

投与回数 : 1 回 (単回投与)

投与回数の選択理由 :

臨床適用経路に準じる. (CRF-1,

投与容量 : 20 µL/body

11. 試験系

種 : ラット

系統 : CrI : CD (SD)

体重

繁殖生産者出荷時 : 140 ~ 220 g

検疫馴化開始時 : 126 ~ 231 g

週齢

検疫馴化開始時 : 6 週齢

投与時 : 7 週齢

入手動物数 : 雄 17 匹

使用動物数 : 雄 15 匹

繁殖生産者及び所在地 : 日本チャールス・リバー株式会社

〒529-1633 滋賀県蒲生郡日野町下駒月 735

動物選択の理由 : 毒性試験に用いるげっ歯類の動物種の一つとしてラットを使用しており, 株式会社新日本科学はラットの背景データが豊富であるため. 予備的な毒性評価のため, 雄を用いることとした.

13.飼育条件

(SOP : GTX/189, GTX/310, GTX/541, HTL/303)

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

(観察のため上記の照明時間以外に点灯する場合は除く)

飼育ケージ (平床飼育)

材質 : ステンレス

大きさ : 300 mm (D) × 170 mm (W) × 180 mm (H)

収容数 : 1 匹/ケージ

オリエンタル酵母工業株式会社) を自由に与える. ただし, 剖検前日 (17 : 00 前後より) は絶食とする.

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.

環境エンリッチメント :

おもちゃを常時供与する.

床敷 : パルマス µ (株式会社 天然素材探索研究所) を用いる.

清掃及び消毒 : 床を毎日清掃及び消毒する.

ケージ及び床敷は週 1 回以上，給餌器及び架台は 4 週に 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．

動物の識別法

（SOP：GTX/502）

個体：検疫馴化期間中は識別を実施しない．
群分け以降は耳パンチ法で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，ACN，性別及びバーコード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，動物番号及びバーコード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：GTX/371）

動物の入手後，7 日間の検疫馴化を行い，投与日程に従い 1～4 日間馴化を続ける．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．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，全例への投与が終了した翌日に，炭酸ガス吸入法で安楽死させる．

16.動物の群分け

（SOP：GTX/153）

検疫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，全例への投与が終了した翌日に炭酸ガス吸入法で安楽死させる．

17.試験群構成

対照群 1 群，被験物質群 2 群

群	被験物質及び 対照物質	投与量 (mg/body)	投与容量 (μ L/body)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数
					(動物番号)
1	対照物質	-	20	-	5 (1~5)
2	EI236	0.12	20	6	5 (6~10)
3	EI236	0.6	20	30	5 (11~15)

18. 観察及び検査項目

18.1 一般状態

(SOP : GTX/151, GTX/374)

例数 : 全例

観察頻度

検疫馴化期間中 : 毎日 1 回以上

投与日 :

一般症状及び行動観察を行うので実施しない。

観察期間中 :

毎日 1 回以上 (投与翌日は実施しない)

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。

18.2 一般症状及び行動観察

(SOP : PHA/001)

例数 : 全例

観察ポイント :

投与前, 投与終了後約 4 及び 24 時間

観察方法 :

Irwin 法¹⁾の変法を用いて一般症状及び行動観察を行う。方法はホームケージ内観察, 手持ち観察, オープンフィールド観察及び操作試験によって各項目を評価する。

下記に評価項目及び観察の方法を詳述する。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。

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。

評価項目
姿勢, 自発運動, 眼瞼閉鎖状態, 眼球突出, 呼吸, 振戦, 攣縮, 痙攣, 立毛, 発声, 排尿/脱糞

手持ち観察 :

動物に手を近づけたときの反応及びハンドリングに対する反応を観察し, 同時に臨床症状も観察する。

評価項目
驚き反応, 眼瞼閉鎖状態, いらだち, 皮膚色, 体温下降, 瞳孔径, 流涙, 流涎, 腹筋緊張度, 四肢筋緊張度

オープンフィールド観察 :

800 mm (D) × 300 mm (W) × 150 mm (H) のオープンフィールドの中央に動物を置き観察する。

評価項目
覚醒状態, 自発運動, 発声, よろめき歩行, 異常歩行, 四肢の位置, 挙尾反応, 排尿/脱糞

操作試験 :

刺激に対する反応を観察する。

評価項目
視覚による位置認識, 触覚反応, カタレプシー, 握力, 耳介反射, 角膜反射, 受動性, 同側屈筋反射, 正向反射, 痛覚反応

18.3 体重

(SOP : GTX/377)

例数 : 全例

測定時期

検疫馴化期間中 : 検疫馴化開始日, 検疫終

了日及び馴化終了日に1回

投与日：投与前に1回

観察期間中：

投与2, 6, 9, 13日目に1回

剖検日：

1回（器官重量の相対重量及び剖検時の
麻酔量算出のため）

測定方法：

電子天秤（GX-4000, 株式会社エー・ア
ンド・デイ）で測定する。測定時ごとの
体重の増加量も求める。

19.4 摂餌量

（SOP：GTX/375）

例数：全例

測定時期

検疫馴化期間中：-2日目に1回

観察期間中：

投与1, 5, 8, 12日目に1回

測定方法：

給餌量を電子天秤（GX-4000, 株式会社エ
ー・アンド・デイ）で測定し、その翌日に
残余量を測定して1日あたりの摂餌量を
算出する。

18.5 剖検

（SOP：GTX/125, PAT/053, PAT/095）

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：観察期間終了の翌日

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。

瀕死例及び生存例：

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（6.48
mg/mL, 5 mL/kg）の腹腔内投与により麻酔
を行い、検査のための血液を採取した後、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。

固定

対象臓器：

脳（大脳、小脳、橋、延髄）及び肉眼的
異常部位

方法：

10%中性緩衝ホルマリン液で固定する。

18.6 病理組織学的検査

（SOP：PAT/032, PAT/070）

例数：全例

検査器官：

脳（投与部位2カ所、大脳、小脳、橋、
延髄）

固定方法：

標本作製方法：

パラフィン包埋及び薄切を行い、HE染色
を施す。

検査：病理組織学的に検査する。

19. 統計学的手法

（SOP：CPU/105）

各群の体重及び摂餌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。これらの検定及び計算
にはMUSCOT統計解析ソフトウェア（ユック
ムス株式会社）を使用し、有意水準はBartlett
法は5%、その他の検定は両側5%とする。一
般状態、剖検、病理組織学的検査のデータに
ついては検定を実施しない。

20. 記録, 資料及び標本の保存

試験施設で発生する記録, 資料及び標本は, 株式会社新日本科学 安全性研究所 (住所: 〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町2438番地) の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

摂餌量測定記録

剖検記録

病理組織学的検査記録

統計に関する記録

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

血液塗抹標本 (鏡検した場合)

ホルマリン固定標本 (真空パック)

21. 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.

22. 文献

1) Irwin S. Comprehensive observational

assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacol (Berl.)* 1968; 13: 222-57.

研究分担者

藤内 祝 横浜市立大学・教授

A. 研究目的

現在の口腔癌の治療における大きな問題点としては、①領域再発や後発転移をきたした患者に対する根治的治療が困難であること、②腫瘍の進展度や患者の全身状態、手術拒否など様々な理由により、手術不適合患者の予後が極めて不良であること、③治療後の著しい審美的および機能的障害などがあげられる。これらの問題点を解決するためには化学療法、放射線療法、手術を主体とした従来の方法に加え、新たな治療法の開発が必要である。我々は、口腔癌N3頸部リンパ節転移を有する患者に対し、動注化学放射線治療と温熱療法(Thermochemoradiotherapy)を併用し、その治療効果を報告してきた(Mitsudo K et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012)。この併用療法により、患者の5年生存率ならびに局所制御率が向上し良好な成績(図1)

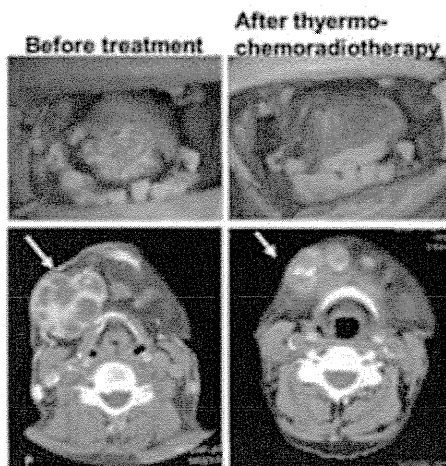


図1

を治めているが、しかし依然として同時化学放射線治療による粘膜障害、骨髄毒性、口腔乾燥症などの合併症が存在している。そこで我々は、現在多くの領域で注目され、研究・開発が進められている分子標的薬に着目した。これまでの抗癌剤による化学療法や放射線療法は、癌細胞のみならず正常細胞までもダメージを与えてしまう副作用が存在して

いたが、この分子標的治療は癌細胞に特異的に発現する分子をターゲットとするため、副作用を最小限に抑えることが可能となる。近年、我々はインターロイキン 13 (IL-13) と緑膿菌外毒素 (PE) の2つのたんぱく質を遺伝子組み換え技術により融合させた分子標的薬である IL13-PE38(以下 IL13-PE)を開発し、その標的効果について研究を行ってきた。

IL-13の受容体の一つである IL-13R・2は悪性脳腫瘍、特に神経膠芽腫に高発現することが報告されているが、ほとんどの正常組織には認められない。最近我々は口腔扁平上皮癌においても、この IL-13R・2が高発現していることを見出し報告している(Kioi M et al, Int J Cancer, 2009)。IL13-PEは、IL-13R・2を高発現する癌細胞に高い親和性で結合し、細胞内に取り込まれた後、たんぱく合成を阻害することで細胞死を引き起こす。正常細胞は IL-13R・2受容体を発現していないため IL13-PEは結合せず細胞毒性は見られない。

温熱療法とは血管系の温度調節機構の違いを利用して、癌の局所を42-43℃に加温することによって、正常組織に影響を与えずに癌細胞のみを死滅させようとする局所療法の一つで、一般的に放射線や化学療法の補助療法として用いられている。その歴史は古く、現在は保険治療として臨床応用されているが、深部の温度調節など手技に熟練を要することや煩雑さなどからあまり普及していないのが現状である。また生物学的効果に関してはいまだ解明されていない部分も多い。我々は現在までに、口腔癌に対する温熱療法について研究および臨床応用を行ってきたが、ごく最近の知見で、加温により癌細胞の IL-13R・2の発現レベルが上昇し、IL13-PEの抗腫瘍効果の増強が観察された。(図2)。

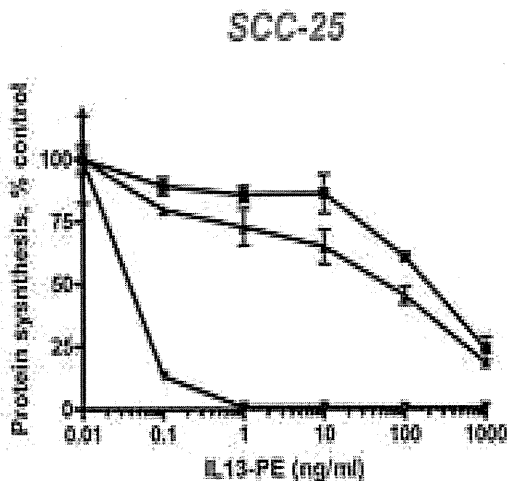
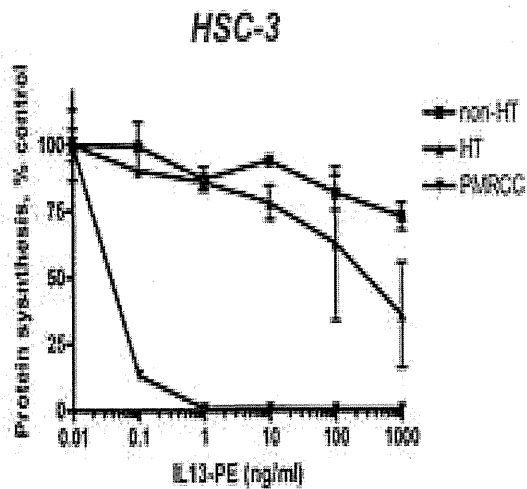


図 2

つまり、温熱療法に IL13-PE を用いた分子標的療法を組み合わせることにより、従来から知られている温熱療法の効果（血流上昇に起因する癌細胞へのドラッグデリバリーを高める作用）だけでなく、標的分子の発現上昇を図ることで IL13-PE に対する癌細胞の感受性を高める効果も期待できる。これまでに温熱療法により標的治療薬の標的分子の発現上昇を認めた報告はなく、非常に画期的な方法であるのと同時に、それぞれ副作用が少ないことから早期の臨床応用が期待できる。これ

は口腔癌に対する従来の治療法のデメリットを極力回避し、低侵襲かつより安全で、患者の QOL 向上が期待される新たな治療法の確立となり得る。

B. 研究方法

温熱療法と IL13-PE の併用療法による腫瘍抑制効果のメカニズムについての検討を Cell apoptosis assay を用いて検討を行った。ヒト扁平上皮癌細胞株は SCC25, OSC-19, HSC-3 ならびにマウス由来の SCC-7 を用いた。

細胞をチャンバースライドにて培養後、下記グループに分けてトリートする。その後、TUNEL Apoptosis Detection Kit (Millipore) を用いてアポトーシスの誘導について検討する。

《グループ》コントロール、ii) 温熱療法のみ、iii) IL13-PE のみ、iv) 温熱療法+IL13-PE
動物実験では、ヒト扁平上皮癌細胞移植ヌードマウスにおける温熱療法と IL13-PE の併用療法による腫瘍抑制効果を検討した。In vivo における温熱療法は造影剤リゾビスト (SPI0: Superparamagnetic iron oxide) を i. t. injection した後、交流磁場をかけることで腫瘍のみを特異的に加温可能とさせる手技をこれまでに樹立させた (図 3)。



図 3

この手法をもとに温熱療法と IL13-PE の併用療法を施行した。治療後の腫瘍の大きさ、マウスの生存率を Time course で計測する。また IL-13R の発現程度、アポトーシスの誘導などを免疫染色、RT-PCR などで検討した。

C. 研究結果

IL-13R の発現レベルが低く、IL13-PE の抗腫瘍効果が低い癌においても、温熱療法を併用することにより IL-13R の発現が上昇し、IL13-PE の親和性が高まることにより抗腫瘍効果の増強を示した。また、マウスの皮下腫瘍モデルにおいても温熱療法や IL13-PE の単独療法に比べて併用することで抗腫瘍効果の増強を示した。

D. 考察

これまでに、IL-13R・2 をターゲットにした DNA ワクチンおよび IL13-PE の併用療法にて、マウスモデルで癌の増殖を抑制する結果を報告してきた (Nakashima H et al, J Immunol, 2011)。

その中で IL13-PE が免疫抑制を起こすある種の細胞群を枯渇することで腫瘍免疫を活性化作用を有することを見出した。温熱療法は樹状細胞などの免疫を賦活する作用を有することが示唆されており、IL13-PE との併用により、標的受容体の発現誘導による抗腫瘍効果に加えて、免疫賦活作用による抗腫瘍効果も期待される (図 4)。

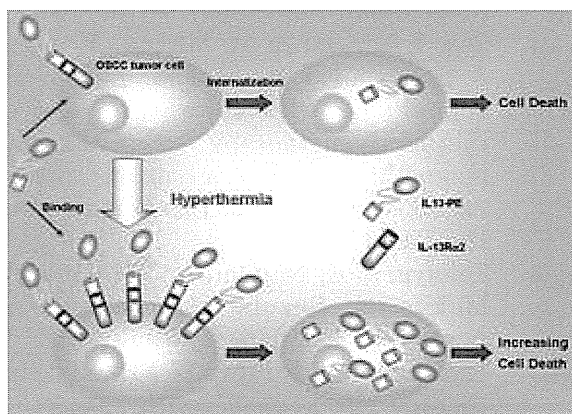


図 4

口腔癌のみならず、癌研究全体においても温熱療法と分子標的薬を併用した研究は少なく、まだ不明な点も多い。このことから本研究において温熱療法および分子標的治療の抗腫瘍効果に加えて、免疫活性を含め、そのメ

カニズムを解明することは従来の抗癌剤に比較して、より効果的で、より副作用が少ない治療法の確立が非常に期待され、極めて意義深いものである。IL-13R の発現レベルが低く、IL13-PE の抗腫瘍効果が低い癌においても、温熱療法を併用することにより IL-13R の発現が上昇し、IL13-PE の親和性が高まることにより抗腫瘍効果の増強が期待される。本研究ではすでに臨床応用されている温熱療法を用いる事で標的分子の誘導を行うことから、より安全性が高く、臨床応用への可能性はより高いと思われる。また、温熱療法自身にも抗腫瘍効果があり分子標的薬と併用することで相乗効果も期待できる。さらに本研究により、温熱効果で誘導される新たな標的分子の候補をスクリーニングすることも可能で、将来的な研究の発展を望むことができる。本研究により分子標的薬を用いた口腔癌研究の向上に大きく貢献するだけでなく、他領域の癌への応用も考えられ、学術的観点からも大変意義深いと思われる。

E. 結語

温熱療法に IL13-PE を用いた分子標的療法を組み合わせることにより、従来から知られている温熱療法の効果 (血流上昇に起因する癌細胞へのドラッグデリバリーを高める作用) だけでなく、標的分子の発現上昇を図ることで IL13-PE に対する癌細胞の感受性を高める効果も期待できる。これまでに温熱療法により標的治療薬の標的分子の発現上昇を認めた報告はなく、非常に画期的な方法であると同時に、それぞれ副作用が少ないことから早期の臨床応用が期待できる。これは口腔癌に対する従来の治療法のデメリットを極力回避し、低侵襲かつより安全で、患者の QOL 向上が期待される新たな治療法の確立となり得る。

F. 健康危機情報

特記すべきこと無し。