

16.3.2. 提出された他の症例記録

該当せず

最終報告書

TM5509 のカニクイザルを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験

試験期間: 2013 年 9 月 4 日～2014 年 3 月 20 日

試験委託者: 東北大学大学院 医学系研究科 附属創生応用医学研究センター
〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1

試験施設: 株式会社イナリサーチ
〒399-4501 長野県伊那市西箕輪 2148 番地 188

試験責任者: 2014 年 3 月 20 日
株式会社イナリサーチ
試験研究センター 試験管理部

佐々木 幹夫

佐々木 幹夫

目次

	ページ
1. 要約.....	4
2. 試験目的.....	4
3. 試験施設.....	4
4. 試験分担責任者.....	4
5. 試験期間.....	5
6. 遵守基準及び参照ガイドライン.....	5
7. 動物愛護.....	5
8. 材料及び方法.....	6
8.1 被験物質.....	6
8.2 対照物質及び媒体.....	6
8.3 投与液.....	7
8.3.1 媒体（対照群への投与液）の調製.....	7
8.3.2 被験物質投与液の調製.....	7
8.3.3 投与液の分析.....	8
8.3.3.1 投与条件下における被験物質の安定性及び均一性.....	8
8.3.3.2 濃度及び均一性の確認.....	8
8.4 試験系.....	8
8.5 飼育条件.....	9
8.6 飼育材料と分析.....	10
8.6.1 飼料.....	10
8.6.2 飲料水.....	10
8.7 個体識別.....	10
8.8 群分け.....	10
8.9 投与量.....	11
8.10 投与量設定理由.....	11
8.11 投与.....	11
8.11.1 投与経路.....	11
8.11.2 投与方法.....	11
8.11.3 投与回数.....	12
8.11.4 投与期間.....	12
8.12 観察及び検査.....	12
8.12.1 一般状態.....	12
8.12.2 体重.....	12
8.12.3 摂餌量.....	13
8.12.4 便潜血検査.....	13
8.12.5 血液学的検査.....	13
8.12.6 血液生化学的検査.....	14
8.12.7 サイトカインの測定.....	15
8.12.8 剖検.....	16
8.12.9 器官重量.....	16
8.12.10 病理組織学的検査.....	16
8.12.11 電子顕微鏡標本の作製.....	18
8.12.12 試料採取.....	18
8.12.13 TK測定.....	19
8.12.14 死亡及び瀕死動物の取扱い.....	19
8.13 統計解析.....	20

9.	試験計画書からの逸脱及び予見することができなかった事態	20
10.	試験関係資料の保存	21
11.	成績	21
11.1	死亡又は瀕死動物	21
11.2	一般状態	22
11.3	体重	22
11.4	摂餌量	22
11.5	便潜血検査	22
11.6	血液学的検査	22
11.7	血液生化学的検査	23
11.8	サイトカイン（インターロイキン6）の測定	24
11.9	剖検	24
11.10	器官重量	24
11.11	病理組織学的検査	25
11.12	TK測定	25
12.	考察	25
13.	結論	27
14.	文献	27

Annexes

Figures 1～6

Tables 1～24

Appendices 1～10

Attachments 1～7

信頼性保証陳述書

1. 要約

TM5509 の 2, 6, 20, 80 及び 300 mg/kg/day を 1 群雌雄各 4 匹のカニクイザルに 4 週間連日経口投与し、その反復投与毒性を調べた。対照群 (雌雄各 4 匹) には 0.5 w/v% カルメロースナトリウム水溶液を同様の方法で投与した。また、被験物質の血中濃度を測定し、全身的暴露について評価した。

20 mg/kg 以下の群では毒性変化は認められなかった。80 mg/kg 群では、雌雄に泥状便、雌に嘔吐が認められた。300 mg/kg 群では、雌雄各 4 例中雄 1 例及び雌 3 例が投与 16~20 日に死亡又は瀕死状態が認められた。投与期間の初期から灰白色の軟便や泥状便、嘔吐がみられ、体重が漸減した。血液学的検査において雌雄にヘマトクリット値の低下がみられ、死亡/瀕死例では、さらに赤血球数及びヘモグロビン濃度の低値傾向、網赤血球の数及び比の高値傾向が認められた。死亡/瀕死例では共通して投与 1 週の血液生化学的検査において総ビリルビンの上昇傾向がみられ、その後の検査では AST など肝臓障害を示す血液パラメータの変動が認められた。インターロイキン 6 の測定では、300 mg/kg 群の死亡/瀕死例において投与 1 週にわずかに高値となる傾向があったが、投与 2 週には減少する例もあった。瀕死時には明らかな高値が認められた。剖検において死亡/瀕死例では胆管閉塞を示唆する胆嚢の拡張 (胆汁増加)、肝外胆管の拡張が認められた。病理組織学的検査において、胆嚢、肝外胆管、ファーター乳頭に至る胆道の炎症、糜爛/潰瘍、細菌感染が認められた。肝臓内の胆管系においても門脈域の炎症、胆管の壊死/再生、門脈域の肝細胞の巣状壊死、肝膿瘍が認められた。その他、被験物質の薬理効果に関連すると考えられる変化として、300 mg/kg 群の雌雄でプロトンポンプ阻害剤の作用時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。また、肝薬物代謝酵素の誘導に関連すると考えられる変化として、80 mg/kg 群の雌及び 300 mg/kg 群の雌雄に肝臓重量の高値が認められた。

TK 測定において、2 mg/kg の用量から全身暴露が認められ、20 mg/kg 以上の投与では用量比よりも低い暴露量であった。4 週間の反復投与によって、20 mg/kg 以上では初回投与よりも低い暴露量となった。全身暴露に性差は認められなかった。

以上のように、80 mg/kg/day の投与において雌雄に泥状便が認められたことから、無毒性量は雌雄共に 20 mg/kg/day と判断した。

2. 試験目的

TM5509 をカニクイザルに 4 週間連日強制経口投与して、その反復投与毒性を調べた。また、被験物質の全身的暴露について評価した。

3. 試験施設

名称: 株式会社イナリサーチ^{a)}

所在地: 長野県伊那市西箕輪 2148 番地 188 (〒399-4501)

^{a)} 病理組織学的検査 (鏡検) は病理東京分室で実施した。

所在地: 東京都千代田区外神田五丁目 2 番 2 号 (〒101-0021)

4. 試験分担責任者

飼育、投薬及び臨床観察: 清水 淳

被験物質調製: 村瀬 昌広

投与液の分析: 鈴木 茜

血液及び便潜血検査: 米山 昭宏

剖検及び器官重量測定: 武井 由弘

病理組織標本作製:

光学顕微鏡標本: 巢山 志保
 電子顕微鏡標本: 武井 由弘
 病理組織学的検査: 小泉 治子
 TK 測定用試料の採取: 小池 和恵
 TK 測定: 植松 敦史

5. 試験期間

試験開始日: 2013年9月4日

本試験への動物入手日(移管日):
 2013年9月5日

投与期間:

性別	動物番号	投与期間
雄	動物番号末尾1及び2	2013年9月10日～10月7日
	動物番号末尾3及び4	2013年9月11日～10月8日
雌	動物番号末尾1及び2	2013年9月12日～10月9日
	動物番号末尾3及び4	2013年9月13日～10月10日

剖検日:

性別	動物番号	剖検日
雄	動物番号末尾1及び2	2013年10月8日
	動物番号末尾3及び4	2013年10月9日
雌	動物番号末尾1及び2	2013年10月10日
	動物番号末尾3及び4	2013年10月11日

試験終了日: 2014年3月20日

6. 遵守基準及び参照ガイドライン

GLP: 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」(1997年3月26日, 一部改正 厚生労働省令第114号 2008年6月13日)

毒性試験ガイドライン: 「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」(1999年4月5日付医薬審第655号)

TK ガイダンス: 「トキシコキネティクス(毒性試験における全身的暴露の評価)に関するガイダンスについて」(1996年7月2日付薬審第443号)

7. 動物愛護

本試験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会(IACUC)による審査を受けた試験計画書に従って適正に実施された。なお、試験施設はAAALAC Internationalにより認証されている(認証番号: 001107)。

8. 材料及び方法

8.1 被験物質

名称:	TM5509
提供元:	試験委託者（ただし、被験物質は製造元から直送）
製造元:	浜理薬品工業株式会社
ロット番号:	TMC-001
特性（Attachment 1）:	
含量:	100.23%
性状:	白色の粉末
成績書:	TM5509 の特性及び安定性試験（試験番号 TK13148）の分析成績書
安定性（Attachment 2）:	投与期間終了後に TM5509 の特性及び安定性試験（試験番号 TK13148）において実施された分析結果を入手し、投与期間中の安定性を確認した。
保存条件:	遮光，気密，冷蔵（許容範囲: 2.0～8.0°C，実測値: 3.1～7.6°C） 実測値は、当施設への入手日～本試験での最終使用日（2013年6月25日～10月9日）について記載した。
保存場所:	被験物質保管室の保冷库
保存用サンプル:	1 g
残余分の処置:	試験委託者に返却した。

8.2 対照物質及び媒体

名称:	カルメロースナトリウム（以下、CMC-Na と略） 日本薬局方注射用水（以下、注射用水と略）
製造元:	
CMC-Na:	丸石製薬株式会社
注射用水:	株式会社大塚製薬工場
ロット番号:	
CMC-Na:	26191
注射用水:	2J91, 2K90
保存条件:	
CMC-Na:	遮光，気密，室温（許容範囲: 1.0～30.0°C，実測値: 16.4～23.1°C）
注射用水:	室温（許容範囲: 1.0～30.0°C，実測値: 16.4～23.1°C） 実測値は、本試験での管理開始日～最終使用日（2013年9月5日～10月2日）について記載した。
保存場所:	被験物質保管室

8.3 投与液

8.3.1 媒体（対照群への投与液）の調製

調製方法: 0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液（以下、0.5%CMC-Na）の調製を以下のように実施した。なお、調製量については初回調製時の値を示し、加温の値は全調製の範囲を示した。

- 1) CMC-Na の 12.500 g を秤量した。
- 2) 1750 mL の注射用水をビーカーに入れ、60～70°C（実際は 65～69°C）の水浴中で加温した。
- 3) マグネチックスターラーで攪拌しながら CMC-Na を徐々に加えて分散させた。
- 4) 3) に冷やしておいた注射用水を加えて完全に溶解させた。
- 5) 4) をメスシリンダーに移し、ビーカーを注射用水で洗い、その液もメスシリンダーに加えた。
- 6) さらに、注射用水を加えて、全量を 2500 mL とした。

以降はこの割合に従って調製した。全期間を通しての調製量は、2500～3800 mL であった。

保存条件:

媒体: 遮光、気密、冷蔵（許容範囲: 1.0～8.0°C, 実測値: 2.0～7.0°C）

対照群投与液: 遮光、気密、冷蔵（許容範囲: 1.0～8.0°C, 実測値: 2.0～7.0°C）

なお、調製日を含め 10 日間の使用期限に対し、調製日を含め 9 日以内に使用した。

保存場所:

被験物質調製室の保冷库

8.3.2 被験物質投与液の調製

調製方法: TM5509 の 0.4, 1.2, 4.0, 16 及び 60 mg/mL 液の調製を以下のように実施した。なお、調製量については初回調製時の値を示した。

- 1) TM5509 の所定量（下表参照）を正確に秤量した。

調製濃度 (mg/mL)	0.4	1.2	4.0	16	60
秤量値 (g)	0.1600	0.4800	1.6000	6.4000	24.001

- 2) TM5509 を磁器製乳鉢に移し、磁器製乳棒で磨砕した。
- 3) 粉碎後、0.5%CMC-Na を少量ずつ加えてよく懸濁した。
- 4) 3) の懸濁液を共栓付きメスシリンダーに移した。
- 5) 0.5%CMC-Na で乳鉢及び乳棒を 7～10 回洗い、その液もメスシリンダーに加えた。
- 6) 0.5%CMC-Na を先のメスシリンダーに加えて、正確にいずれも 400 mL とした。
- 7) 共栓をして転倒混和し、所定濃度の調製液とした。

8) 調製液は褐色ガラス瓶に1日分ごと小分けした。

以降はこの割合に従って調製した。全期間を通しての調製量は、0.4, 1.2, 4.0 及び 16 mg/mL 液はいずれも 400~610 mL, 60 mg/mL 液は 370~610 mL であった。

保存条件: 遮光, 気密, 冷蔵 (許容範囲: 1.0~8.0°C, 実測値: 2.0~7.0°C)
 なお, 調製日を含め 8 日間の使用期限に対し, 調製日を含め 8 日以内に使用した。

保存場所: 被験物質調製室の保冷庫

投与後残液の処置: 焼却専用の産業廃棄物容器に廃棄した。

8.3.3 投与液の分析

8.3.3.1 投与条件下における被験物質の安定性及び均一性

実施施設: 株式会社ボゾリサーチセンター

成績書: HPLC による被験液中 TM5509 濃度測定法バリデーション及び安定性・均一性試験 (試験番号: A-2479) の分析成績書 (2012 年 5 月 2 日付)

成績概要 (Attachment 3): TM5509 は, 0.100~200 mg/mL の濃度範囲 (媒体: 0.5%CMC-Na) では, 冷蔵 (1~10°C) で 7 日間, 引き続き, 室温で 24 時間の保存条件において安定かつ均一であることが確認されている。

8.3.3.2 濃度及び均一性の確認

実施施設: 株式会社イナリサーチ

実施時期: 初回及び最終調製時

サンプル: 対照群を除く各濃度の投与液をマグネチックスターラーで攪拌しながら上, 中, 下層から 1 mL ずつ採取した。

分析方法: 濃度及び均一性の確認は HPLC 法で行った。詳細は Attachment 4 に示した。

判定基準:

濃度: 対表示濃度が 90.0~110.0% のとき「適」とした。

均一性: 相対標準偏差 (RSD) が 10.0% 以下を「適」とした。

結果 (Attachment 5):

濃度: 適合 (対表示濃度は 94.2~100.4%)

均一性: 適合 (RSD は 0.2~1.6%)

8.4 試験系

種: カニクイザル

生産所: Hainan Jingang Biotech CO., LTD. (中国)

供給源: 株式会社 GMJ

試験系選択の理由:	非げっ歯類の反復投与毒性試験で使用される種である。また、背景データも豊富であることから選択した。	
性別及び入手匹数:	雄: 25 匹	雌: 25 匹
入手時齢:	雄: 3~4 歳	雌: 2~3 歳
検疫及び馴化:	30 日間以上の法定検疫済（試験施設への搬入日 2013 年 7 月 23 日）で、その後も試験施設の飼育環境に馴化がされた健康な動物を本試験用とした。 予備飼育期間は本試験への動物入手日から投与開始前日までとし、期間中の試験操作は後述の第8.12項「観察及び検査」の規定に従った。	
投与開始時齢:	雄: 3~4 歳	雌: 2~3 歳
使用時体重（投与開始時）:	雄: 2.44~3.76 kg	雌: 2.32~3.23 kg

8.5 飼育条件

飼育室:	雄: 207 号飼育室	雌: 208 号飼育室
温度:	許容範囲: 22.0~28.0°C（実測値: 207 号飼育室 24.2~27.2°C, 208 号飼育室 24.7~27.2°C）	
湿度:	許容範囲: 40.0~80.0%（実測値: 207 号飼育室 55.2~89.2%, 208 号飼育室 54.1~87.2%） 第9項「試験計画書からの逸脱及び予見することができなかった事態」参照。	
換気回数:	許容範囲: 15~17 回/時間	
照明時間:	12 時間/日（7 時から 19 時までの人工照明）	
給餌方法:		
給餌量:	100 g/匹/日（ステンレス製給餌器使用）	
給餌時間:	9:00~13:00 の間 ただし、投与期間中は投与後、血液検査採血日は採血後、TK 採血日（投与後 24 時間ポイントの採血日を除く）は投与後 6 時間以降に給餌した。 剖検当日は給餌しなかった。	
残餌:	翌日給餌の際に、残餌量測定後廃棄した。 ただし、血液検査採血の前日は、夕刻（16:00~18:00）に残餌の有無を確認したところ、残餌はなかった。	
給水方法:	自動給水装置から自由に摂取させた。	
ケージへの収容:	ステンレス・高圧メラミン化粧板製ケージ（48W×85D×80H cm, エンリッチメント用のステンレス製遊具付き）に個別に収容した。	
ケージの交換:	ケージ交換は行わず、毎日水洗した。	

8.6 飼育材料と分析

8.6.1 飼料

名称:	PS-A (固型)
供給源:	オリエンタル酵母工業株式会社 (千葉)
ロット番号:	130611, 130716
分析:	
栄養組成及び微生物:	供給源でのロットごとの分析
重金属などの混入物:	第三者機関によるロットごとの分析 (分析機関: Eurofins Scientific 社, ドイツ)
分析結果:	試験評価に影響を及ぼす可能性のある混入物はなかった。

8.6.2 飲料水

種類:	市営上水道水
分析:	伊那市水道局による毎月の分析 (分析機関: 上伊那圏域水道水質管理協議会 水質管理センター) 飼育区域内から採取した水について, 年に 4 回の分析 (分析機関: 一般社団法人 上伊那薬剤師会)
分析結果:	試験評価に影響を及ぼす可能性のある混入物はなかった。

8.7 個体識別

動物:	動物生産所で付された識別タグを入手後に首輪に付けかえ, その番号によって動物を識別した。
ケージ:	ケージカードを用い, 動物入手日に試験番号, 種, 性別, 試験入手時番号 ^{a)} 及び識別番号を表示した。群分け時に試験番号, 種, 性別, 識別番号, 群名 (投与量), 投与開始日, 動物番号及び群別のカラーラベル ^{b)} を新たに表示した。 ^{a)} 雄は 1~25, 雌は 51~75 ^{b)} 対照群: 白 低用量群: 青 低中用量群: 黄 中用量群: 赤 高中用量群: 紫 高用量群: 桃

8.8 群分け

群分け時期:	動物番号末尾 1 及び 2 の雄の投与開始前 1 日
選抜:	群分け前の血液生化学的検査において, 総ビリルビン (BIL) が高値であった雄 1 匹及びアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性が高値であった雌 1 匹を除外し, 雌雄各 24 匹を選抜した。
群分け方法:	コンピュータのプログラム (Provantis システム) を用いて, 群分け日の体重を基に層別にクラス分けし, クラスごとに動物を各群

にランダムに割り付けた。割付後、群内でランダムに動物番号を付与した。

群	雄		雌	
	動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	4	RP1M01～RP1M04	4	RP1F01～RP1F04
低用量群	4	RP2M01～RP2M04	4	RP2F01～RP2F04
低中用量群	4	RP3M01～RP3M04	4	RP3F01～RP3F04
中用量群	4	RP4M01～RP4M04	4	RP4F01～RP4F04
高中用量群	4	RP5M01～RP5M04	4	RP5F01～RP5F04
高用量群	4	RP6M01～RP6M04	4	RP6F01～RP6F04

非供試動物の取扱い:

群分け時の残余動物: 雌雄各 1 匹を雌雄それぞれの動物番号末尾 3 及び 4 の投与開始日に試験から除外し、試験施設の管理とした。

8.9 投与量

群	投与物質名	投与量 (mg/kg/day)	濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg/day)
対照群	0.5%CMC-Na	0	0.0	5
低用量群	TM5509	2	0.4	5
低中用量群	TM5509	6	1.2	5
中用量群	TM5509	20	4.0	5
高中用量群	TM5509	80	16	5
高用量群	TM5509	300	60	5

8.10 投与量設定理由

先に実施されたTM5509のカニクイザルを用いた4週間反復経口投与毒性試験(20, 80及び300 mg/kg/day)¹⁾において、TM5509の300 mg/kg/dayを投与した雌雄各4例中2又は3例で投与10日以降に瀕死又は死亡が認められた。また、80 mg/kg/day以上の用量で雌雄に軟便又は嘔吐が認められた。先の試験での毒性発現用量において再現性を確認するため、同一用量の20, 80及び300 mg/kg/dayをそれぞれ中用量、高中用量及び高用量に設定した。また、先の試験での無毒性量(20 mg/kg/day)以下の薬効発現量(0.3 mg/kg p.o.以上)における投与用量と血中濃度の線形性を確認するため、中用量から公比約3で減量した6及び2 mg/kg/dayをそれぞれ低中用量及び低用量とした。

8.11 投与

8.11.1 投与経路

投与経路: 経口

選択理由: 臨床適用経路と同一経路を選択した。

8.11.2 投与方法

投与方法: 20 mLのポリプロピレン製注射筒及び胃カテーテル(No. 9A, 株式会社イズモヘルス)を用い、強制経口投与した。被験物質投与液

はマグネチックスターラーで攪拌しながら注射筒に充填した。なお、投与液を完全に投与するため、投与後に約 4 mL の水道水でフラッシングした。

投与液量算出基準: 個体ごとに、各投与日に最も近い測定日の体重を基準とした（表示単位: 0.1 mL）。

選択理由: サルに対する投与方法として一般的であり、かつ、適切である。

8.11.3 投与回数

投与回数: 1 日 1 回

投与時刻: 8:00～12:00 の間（給餌前）

選択理由: 通常用いられる 1 日 1 回とした。

8.11.4 投与期間

投与期間: 4 週間（28 日間）

選択理由: 短期の反復投与毒性を調べるために投与期間 4 週間を設定した。

8.12 観察及び検査

投与の日数は、投与開始日を投与 1 日として以降の日を表し、投与 1～7 日を投与 1 週として以降の週を表した。また、投与開始日の前日を投与開始前 1 日として以前の日を表し、投与開始前 1～7 日を投与開始前 1 週とした。

8.12.1 一般状態

観察対象: 全例

観察時期: 投与開始前から剖検日まで

観察頻度: 投与期間中は 1 日 3 回（投与前と投与後 1 及び 4 時間）、その他の期間は 1 日 1 回（午前）

観察方法: ケージの外からの個体別観察を行い、異常が疑われた場合はケージから動物を取り出して観察を行った。

記録事項: 上記観察時以外にも異常がみられた個体の所見を記録した。

8.12.2 体重

測定対象: 全例

測定時期: 投与開始前から剖検前日まで

測定頻度:

投与開始前: 投与開始前 4 又は 5 日

投与期間中: 投与 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 及び 28 日

ただし、動物番号末尾 1 及び 2 の雄については投与 11 日に測定すべきところを投与 12 日に測定した（第 9 項「試験計画書からの逸脱及び予見することができなかつた事態」参照）。

なお、投与期間中は投与前、その他の期間は給餌前（午前）に測定した。

使用機器: デジタル台ばかり LDS-150H (株式会社島津製作所)

8.12.3 摂餌量

測定対象: 全例

測定時期: 投与開始前から剖検前日まで

測定頻度: 投与開始前 4 又は 5 日に給餌量, その後毎日残餌及び給餌量, 剖検日に残餌量を測定した.

1 日あたりの摂餌量を算出し, それぞれ給餌量測定日の摂餌量とした.

使用機器: 台ばかり TANITA1345 (株式会社タニタ)

8.12.4 便潜血検査

検査対象: 全例

検査時期: 投与開始前 1 週及び投与 4 週
また, 9 例 (動物番号 RP5M02, RP6M01~RP6M04 及び RP6F01~RP6F04) については, 便の性状及び色調に異常が認められたため追加で検査を実施した.

検査方法: 採取した糞便について, テトラメチルベンジジン法を用いた便潜血反応検査試験紙 EZ Detect (Biomerica, Inc.) を使用して発色の状態を観察した.

8.12.5 血液学的検査

検査対象: 全例

検査時期: 投与開始前 1 週, 投与 1, 2, 3 及び 4 週の投与前 (午前)

採血部位: 大腿静脈

採血量: 凝固の検査に 0.9 mL
その他の検査に約 1 mL

使用機器:

- 総合血液学検査装置 ADVIA120 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社, 以下 ADVIA120)
- 全自動血液凝固測定装置 CA-510 (シスメックス株式会社, 以下 CA-510)

採血方法: 無麻酔で, ポリプロピレン製注射筒及び 22 ゲージの注射針 (いずれも滅菌済ディスポーザブル製品) を用いて採血した.

血液の処理:

ADVIA120: 抗凝固剤 EDTA-2K 入りの採血管に約 1 mL 分注した.

CA-510: 抗凝固剤として 3.2 w/v%クエン酸ナトリウム液 0.1 mL を入れた採血管に, 抗凝固剤とあわせて 1.0 mL になるように分注し, 遠心分離 (1600 ×g, 10 分, 4°C) して血漿を採取した.

標本作製: 全例について, May-Grunwald-Giemsa 染色法による血液塗抹標本作製した.

検査項目:

項目	略語	単位	測定方法	使用機種
赤血球数	RBC	10 ⁶ /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
ヘモグロビン濃度	HGB	g/dL	シアンメトヘモグロビン変法	ADVIA120
ヘマトクリット値	HCT	%	(MCV×RBC)/10	ADVIA120
平均赤血球容積	MCV	fL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
平均赤血球血色素量	MCH	pg	(HGB/RBC)×10	ADVIA120
平均赤血球血色素濃度	MCHC	g/dL	[HGB/(RBC×MCV)]×1000	ADVIA120
網赤血球 百分率	Retic	%	RNA 染色によるレーザーフローサイト	ADVIA120
網赤血球 絶対数		10 ⁹ /L	メトリー法	
血小板数	PLT	10 ³ /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
白血球数	WBC	10 ³ /μL	2 角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
白血球分類 ^{a)} 百分率	-	%	ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメト	ADVIA120
白血球分類 ^{a)} 絶対数		10 ³ /μL	リー法+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	PT	s	光散乱検出方式	CA-510
活性化部分トロンボ プラスチン時間	APTT	s	光散乱検出方式	CA-510
フィブリノーゲン量	Fib	mg/mL	光散乱検出方式 (トロンビン時間法)	CA-510

^{a)} 好中球 (Neut), リンパ球 (Lymph), 単球 (Mono), 好酸球 (Eos), 好塩基球 (Baso), 大型非染色球 (LUC)

8.12.6 血液生化学的検査

検査対象:	全例
検査時期:	投与開始前1週, 投与1, 2, 3及び4週の投与前(午前)
採血部位:	大腿静脈
採血量:	約5 mL (サイトカイン測定用血液約1.5 mLを含む)
使用機器:	7180形自動分析装置(株式会社日立ハイテクノロジーズ)
採血方法:	第8.12.5項「血液学的検査」の血液学的検査用試料のための採血時に、同時に採取した。
血液の処理:	ヘパリンナトリウム入りの採血管に分注し、遠心分離(1600×g, 10分, 4°C)して血漿を採取した。
試料の保存:	試料の一部は予備試料として-65°C以下で凍結保存し、動物番号RP6F03及びRP6F04の予備試料を除き、最終報告書草案提出後に廃棄した。
特記事項:	動物番号RP6F01の瀕死判定後死亡した投与20日の血液凝固系検査後の残余血漿(抗凝固剤:クエン酸ナトリウム)を用いて、以下の項目を検査した。 AST, ALT, ALP, GGT, GLDH, LAP, GLU, BIL, UN, CRE, CHO, TG, TP, T-BA, CRP

検査項目:

項目	略語	単位	測定方法
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	AST	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
アラニンアミノトランスフェラーゼ	ALT	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
アルカリホスファターゼ	ALP	U/L	日本臨床化学会標準化対応法

項目	略語	単位	測定方法
乳酸デヒドロゲナーゼ	LD	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
クレアチンキナーゼ	CK	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
γ-グルタミルトランスフェラーゼ	GGT	U/L	日本臨床化学会標準化対応法
グルタミン酸脱水素酵素	GLDH	U/L	ドイツ臨床化学会勧告法
ロイシンアミノペプチダーゼ	LAP	U/L	L-ロイシン-p-ニトロアニリド基質法
グルコース	GLU	mg/dL	酵素法 (Gluc-DH 法)
総ビリルビン	BIL	mg/dL	酵素法 (BOD 法)
尿素窒素	UN	mg/dL	酵素法 (ウレアーゼ-LEDH 法)
クレアチニン	CRE	mg/dL	酵素法
総コレステロール	CHO	mg/dL	酵素法 (コレステロール酸化酵素法)
中性脂肪	TG	mg/dL	酵素法 (GK-GPO・遊離グリセロール消去法)
リン脂質	PL	mg/dL	酵素法 (コリン酸化酵素法)
無機リン	IP	mg/dL	酵素法 (マルトースホスホリラーゼ法)
カルシウム	CA	mg/dL	OCP法
ナトリウム	NA	mEq/L	イオン選択電極法
カリウム	K	mEq/L	イオン選択電極法
クロール	CL	mEq/L	イオン選択電極法
総蛋白	TP	g/dL	ビウレット法
アルブミン	ALB	g/dL	BCG 法
アルブミン・グロブリン比	A/G	-	計算処理
総胆汁酸	T-BA	μmol/L	酵素サイクリング法
C反応性蛋白	CRP	mg/dL	ラテックス免疫比濁法

8.12.7 サイトカインの測定

検査対象:	全例
検査項目:	インターロイキン6 (IL-6)
検査時期:	投与開始前1週, 投与1, 2, 3及び4週の投与前 (午前)
使用機器:	マイクロプレートリーダーSH-1100R Lab (コロナ電気株式会社)
採血:	第8.12.6項「血液生化学的検査」の血液生化学的検査用試料と同時に約1.5 mL採取した。
血液の処理:	凝固促進フィルム入りポリエステル樹脂チューブに無処理血液約1.5 mLを入れ, 室温で30~60分間静置した後, 遠心分離(1600 ×g, 10分, 4°C)して血清を採取した。
試料の保存:	採取から測定まで-65°C以下で凍結保存した。血清の一部は予備試料として同様に保存し, 後述するやり直し測定*に使用した。測定後残余分を再び凍結保存した。残余試料については, 最終報告書草案提出後に廃棄した。
検査方法:	ELISA 法*. 詳細は Attachment 6 に示した。 測定値が検量線の下限值 (2 pg/mL) 未満の場合は「<2 (pg/mL)」と表記し, 解析には値を「0」として集計した。

* Attachment 6 に示す測定法の前に BioVendor Laboratorni medicina 社製の ELISA Kit を使用して測定を行ったが, すべての試料の

測定値が定量下限未満となった。この測定は、より適合性の高いELISA Kitを用いて測定をやり直したものである。

8.12.8 剖検

剖検対象: 全例
 剖検時期: 投与期間終了時（最終投与の翌日）
 剖検方法: 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）の静注で麻酔し，腋窩部及び大腿部の動静脈を切断して放血して安楽死させ，剖検を行った。

8.12.9 器官重量

測定対象: 全例（瀕死/死亡例を除く）
 測定時期: 剖検時
 使用機器: 電子天秤 UX620H（株式会社島津製作所）
 測定器官: 次項「病理組織学的検査」の表に記載
 特記事項: 剖検日に体重を測定（使用機器は第8.12.2項「体重」参照）し，これを基に器官体重比重量を算出した。

8.12.10 病理組織学的検査

検査対象: 全例
 固定: 剖検時に下表に示すすべての器官・組織を個体識別部位とともに固定した。固定液は10 vol%中性緩衝ホルマリン液を使用した。ただし，精巣，眼及び視神経はあらかじめ以下の固定液に浸漬した後に10 vol%中性緩衝ホルマリン液に固定した。
 精巣: FSA (Formalin-sucrose-acetic acid) 液
 眼及び視神経: リン酸緩衝1%ホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド液
 標本作製及び鏡検: 下表に示す器官・組織について，常法に従ってヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本作製した。肝臓，胆嚢及び十二指腸の標本について鏡検した。また，瀕死/死亡例の剖検で異常の認められた器官・組織，並びに生存例で剖検時に異常が認められた胆管についても鏡検した。なお，高用量群の全例及び対照群の雌雄各1例（動物番号 RP1M02, RP1F01）の肝臓，胆嚢及び十二指腸並びに高用量群の一部の動物（動物番号 RP6M02, RP6M03, RP6F01, RP6F03, RP6F04）の胆管について，グラム染色標本作製して，鏡検した。

対象器官・組織:

器官・組織	固定	重量測定	標本作製	
			HE 標本	備考
心臓	○	○	○	左室乳頭筋，右室壁，冠状動脈と大動脈弁を含む部位
大動脈（胸部）	○	—	○	

器官・組織	固定	重量測定	標本作製	
			HE 標本	備考
胸骨	○	-	○	
胸骨骨髓		-		
大腿骨	○ 左右	-	○ 左	遠位端関節軟骨を含む部位
大腿骨骨髓	○ 右	-	○ 右	
胸腺	○	○	○	
脾臓	○	○	○	
顎下リンパ節	○	-	○	
腸間膜リンパ節	○	-	○	
気管	○	-	○	
気管支	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	左前葉, 右後葉
肺				
舌	○	-	○	
顎下腺	○ 左右	○ 左右合計	○ 左	
耳下腺	○ 左右	-	○ 左	
食道	○	-	○	
胃	○	-	○	噴門部, 胃体部, 幽門部
十二指腸	○	-	○*	
空腸	○	-	○	
回腸	○	-	○	
パイエル板				
盲腸	○	-	○	
結腸	○	-	○	
直腸	○	-	○	
肝臓	○	○ 胆汁を除去した 胆嚢を含む	○*	外側左葉, 胆嚢を含む内側右葉
胆嚢			○*	
膵臓	○	○	○	
腎臓	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	
膀胱	○	-	○	
下垂体	○	○	○	
甲状腺	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	
上皮小体			○ 左	
副腎	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	
精巣	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	
精巣上体	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	
前立腺	○	○	○	
精嚢	○	○	○	
卵巣	○ 左右	○ 左右別	○ 左右	
子宮	○	○	○	
膣	○	-	○	
脳	○	○	○	大脳 [前頭葉, 頭頂葉 (基底核及び海馬を含む), 後頭葉], 小脳, 橋, 延髄
脊髄 (胸部)	○	-	○	
坐骨神経	○ 左	-	○ 左	

器官・組織	固定	重量測定	標本作製	
			HE 標本	備考
眼	〇左右	-	〇左右	
視神経	〇左右	-	〇左右	
涙腺	〇左右	-	〇左	
骨格筋 (大腿二頭筋)	〇左	-	〇左	
皮膚 (胸部)	〇	-	〇	
乳腺 (雌のみ)	〇	-	〇	
剖検で異常の認められた器官・組織	〇	-	〇	

〇: 実施

-: 実施しなかった

*: 鏡検を実施

左右: 左右を対象

左: 左右いずれか一方を対象, 原則は左とした

右: 左右いずれか一方を対象, 原則は右とした

8.12.11 電子顕微鏡標本の作製

実施時期: 剖検時

対象動物: 対照群の全例及び高用量群の死亡例を除く雌雄各3例

方法: 肝臓 (外側左葉) について, グルタルアルデヒド・四酸化オスミウムの二重固定後, エポキシ樹脂包埋してブロックを作製した。

8.12.12 試料採取

血漿:

対象動物: 全例 (死亡例を除く)

採取時期: 剖検日の最終体重測定後から麻酔実施前

採取方法: 大腿静脈から 22 ゲージの注射針を装着したポリプロピレン製シリンジ (いずれも滅菌済ディスポーザブル製品) を用いて血液を 5 mL 採取した。

処理方法: ヘパリンナトリウム入りの採血管に分注し, 遠心分離 (1600 ×g, 10 分, 4°C) して血漿を採取した。サンプルチューブに移し保存した。

特記事項: 動物番号 RP6F03 及び RP6F04 については, 血液生化学的検査の予備試料をこの試料に充てた。

胆汁:

対象動物: 全例 (瀕死/死亡例含む)

採取時期: 剖検時

採取方法: 18 ゲージの注射針を装着したポリプロピレン製シリンジ (いずれも滅菌済ディスポーザブル製品) を用いて胆嚢から採取した (0.4 ~ 2 mL) 。

処理方法: 採取後, サンプルチューブに入れて, 液体窒素で直ちに凍結した。

肝薬物代謝酵素測定用試料:

対象動物: 全例 (瀕死/死亡例を除く)

採取時期:	剖検時
採取方法:	肉眼的異常部位を除く摘出した肝臓の一部（尾状葉の約 8 g）を採取した。なお、全例で規定量に満たなかったため、右葉からも採取した。
処理方法:	採取後、サンプルチューブに入れて、液体窒素で直ちに凍結した。
共通事項:	
保存条件:	凍結（許容範囲: -50°C ～ -20°C ）
保存場所:	第 2 フリーザー室のメディカルフリーザー
送付:	ドライアイスとともに梱包し、試験委託者宛に冷凍便で送付した。

8.12.13 TK測定

採血対象:	対照群及び被験物質群の生存例全例
採血時期及び採血時間:	
投与 1 日:	投与後 1, 4, 6, 8 及び 24 時間（5 ポイント）
投与 28 日:	投与前, 投与後 1, 4, 6, 8 及び 24 時間（6 ポイント）
採血部位:	大腿静脈
採血量:	1 ポイントあたり約 1 mL（血漿量として 0.4 mL 以上）
採血方法:	無麻酔で、ヘパリンナトリウムで処理したポリプロピレン製注射筒及び 23 ゲージの注射針（いずれも滅菌済ディスポーザブル製品）を用いて採血した。
血液の処理:	採取した血液はポリプロピレン製チューブに入れ、直ちに氷水中に保存し、採血後 30 分以内に遠心分離（約 $10,000 \times g$, 1 分, 4°C ）して血漿を得た。ただし、投与 1 日の対照群の一部のサンプルは約 $7700 \times g$, 1 分, 4°C で遠心分離した（第 9 項「試験計画書からの逸脱及び予見することができなかった事態」参照）。血漿はポリプロピレン製チューブに採取し、速やかに凍結保存した。
血漿の保存条件:	
投与 1 日:	冷凍（許容範囲: -95°C ～ -65°C , 実測値: -86.3°C ～ -81.4°C , 保存期間: 2013 年 9 月 10 日～9 月 19 日）
投与 28 日:	冷凍（許容範囲: -50°C ～ -20°C , 実測値: -33.9°C ～ -30.6°C , 保存期間: 2013 年 10 月 7 日～10 月 15 日）
血漿の保存場所:	フリーザー室の超低温フリーザー又はメディカルフリーザー
測定方法:	LC-MS/MS 法により、各採血ポイントにおける血漿中 TM5509 濃度を測定した。詳細は Attachment 7 に示した。
測定後の残余血漿の処置:	当該試験から除外し、試験番号 TK14050 の管理とした。

8.12.14 死亡及び瀕死動物の取扱い

死亡動物:	動物番号 RP6M02, RP6F01 発見後速やかに体重を測定し、剖検を行った。また、胆汁を採取し、器官・組織を固定して病理組織学的検査を行った。
-------	---