

なお、動物番号RP6F01については、瀕死と判定し、採血中に死亡した例であり、血液検査（凝固系検査のみ）及び血液生化学的検査を行った（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）。試験操作については該当項の規定に従った。

瀕死動物:

動物番号 RP6F03, RP6F04

体重を測定後、可能な限り採血し、血液学的検査、血液生化学的検査及びサイトカイン測定を行った。採血後に麻酔下で放血して安楽死させ、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。試験操作については該当項の規定に従った。

8.13 統計解析

投与期間終了時まで得られた各計量値について、各群の平均値及び標準偏差を算出し Bartlett 法による分散の一樣性の検定（有意水準 5%）を行った。分散が一樣の場合は Dunnett 法によって対照群と各被験物質群との間で平均値の検定を行った。一方、分散が一樣でない場合はデータを対数変換し、変換後データで再度 Bartlett 法による分散の一樣性の検定（有意水準 5%）を行った。この時点で分散が一樣になった場合は変換後データで Dunnett 法によって対照群と各被験物質群との間で平均値の差について検定を行った。さらに、この時点でも分散が一樣でない場合は、対照群と各被験物質群との平均順位の違いについて Steel 検定を行った。

左右別で測定した器官重量については、左右の合算値について、統計処理を実施した。

1 群あたりの計量値が 2 例以下の場合は統計解析から除外した。

検定はいずれも両側で、有意水準 5% で対照群との差が認められた場合に有意な変動とし、表中には 5% と 1% に区別して示した。

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

以下の事例があったが、いずれも試験評価に影響を及ぼすものではなかった。

- 1) 207 号及び 208 号飼育室内の湿度について、試験期間中、ケージ及び飼育室の水洗作業によって許容範囲の上限（80.0%）を超えた日が 2 室の合計で 33 日にみられ、それぞれ最高で 89.2% 及び 87.2% まで上昇した。いずれも飼育管理の一環であり、水洗作業終了後 1 時間以内に回復する一時的な変動であることから、試験系に影響しないと判断した。
- 2) 投与期間中の体重測定頻度を投与 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 及び 28 日と規定していたが、動物番号末尾 1, 2 の雄については、投与 11 日の体重測定を失念した。当該動物については投与と給餌が終了した後であったため、摂食と飲水の体重への影響を考慮して、投与 12 日に体重測定を実施した。投与液量については、個別別に投与 8 日から投与 11 日又は投与 12 日の変動幅を測定したところ、体重測定日による大差はなかった（投与 11 日: $-0.5 \text{ mL} \sim 0.7 \text{ mL}$, 投与 12 日: $-0.4 \text{ mL} \sim 0.5 \text{ mL}$ ）。また、投与 8 日と投与 12 日の投与液量の差は 5% 未満と微量であったことから、投与 11 日の体重測定漏れに伴う試験への影響はないと判断した。
- 3) TK 測定において、採取した血液は遠心分離（約 $10,000 \times g$, 1 分, 4°C ）して血漿を得よう規定していたが、実際には投与 1 日の対照群の 38 サンプル（2013 年 9 月 10～13 日採血分）については約 $7700 \times g$, 1 分, 4°C で遠心分離を実施した。TK 測定用血漿が分離でき、測定も実施できたことから、試験への影響はないと判断した。
- 4) 瀕死判定した後に死亡した 1 例（動物番号 RP6F01）において、十分量を採血できなかったため、血液学的検査では凝固系検査のみ実施した。また、残余の血漿については、保存することを規定していなかったが、超低温フリーザーで凍結保存した。瀕死状態にある動

物の血液生化学パラメータの参考値を得ることができたため、試験評価への悪影響はないと判断した。

- 5) 瀕死動物（動物番号 RP6F03, RP6F04）について、血漿試料採取を実施するように規定していたが、実際には血漿試料採取を失念した。これらの例については、血液生化学的検査の予備試料を充てることとした。
- 6) 死亡動物（動物番号 RP6M02）の胸腺について、組織標本の作製を複数回試みたが胸腺組織が含まれておらず、結果として病理組織学的検査が実施できなかった。胸腺が著しく萎縮していたことと、死後変化が重なったためと考えられた。この例の胸腺については肉眼的に小さいことが確認できており、試験評価に影響しないと判断した。

10. 試験関係資料の保存

保存対象:	試験計画書, 最終報告書草案, 最終報告書, 生データその他の記録文書, 被験物質及び下記の標本類 <ul style="list-style-type: none"> - 血液塗抹標本 - 10 vol%中性緩衝ホルマリン液固定器官 - 病理組織標本（パラフィンブロック及びプレパラート） - 電顕ブロック
保存期間:	最終報告書提出後 5 年間。その後の処置については、所定の保存期間終了時までには試験委託者と協議する。
保存場所:	株式会社イナリサーチ本社施設内の資料保存施設

11. 成績

11.1 死亡又は瀕死動物

(Tables 1～2)

300 mg/kg 群の雄 4 例中 1 例（動物番号 RP6M02）及び雌 4 例中 3 例（動物番号 RP6F01, RP6F03, RP6F04）において、投与 16～20 日に死亡又は瀕死が認められた。

死亡/瀕死例は、いずれも灰白色便（通常便, 軟便, 泥状便）や通常色の軟便又は泥状便, 嘔吐/嘔吐物が観察期間中に認められ, 摂餌量は死亡/瀕死の 2 日前までほぼ規定量を摂食していたが, 体重は漸減した。死亡に至る時点又は瀕死と判断した時点の状態は以下のとおりであった。

動物番号 RP6M02: 死亡前日（投与 15 日）に運動性の低下, 及び被験物質様物の嘔吐物がみられ, 投与 16 日の死亡発見時には灰白色水様便が認められていた。

動物番号 RP6F01: 投与 20 日の投与前に排便がなく, 体表温度の低下（体温 34.1℃）及び腹臥位が認められ, 瀕死と判断した。血液検査のために採血を行ったが, 採血途中で死亡した。

動物番号 RP6F03: 投与 19 日に灰白色泥状便, 及び被験物質様物の嘔吐/嘔吐物, 体表温度の低下（体温 36.7 及び 36.2℃）, 口腔粘膜の淡黄色化, 残餌（30/100 g）が認められ, 瀕死と判断した。

動物番号 RP6F04: 投与 19 日に灰白色泥状便, 体表温度の低下（体温 36.8 及び 36.3℃）, 水様便, 残餌（26/100 g）が認められ, 瀕死と判断した。

11.2 一般状態

(Tables 1~2)

300 mg/kg 群の生存例の雄 3 例 (動物番号 RP6M01, RP6M03, RP6M04) 及び雌 1 例 (動物番号 RP6F02) において, 投与期間中, 灰白色便 (通常便, 軟便, 泥状便) が認められた. 灰白色便は早い例で投与 1 日の投与後 6 時間にみられ, 正常便と共に認められる場合と灰白色便のみが認められる場合が散見された. 通常色の泥状便も雄の 3 例で投与期間中に散見された. 雄 1 例 (動物番号 RP6M03) では投与 15 日に排便がみられなかった. 同群の雄の 1 例 (動物番号 RP6M01) で投与 3 日に被験物質様の嘔吐物がみられ, 別の雄の 1 例 (動物番号 RP6M03) では食ひの嘔吐物が投与 22 日に認められた. なお, 被験物質様物質の嘔吐については, 同群の死亡例の雄 1 例 (動物番号 RP6M02) においても投与 1, 3 及び 6 日の投与直後から投与後 1 時間までに認められた.

80 mg/kg 群の雌雄の各 4 例中 3 例 (動物番号 RP5M02~RP5M04, RP5F02~RP5F04) において, 通常色の泥状便が投与期間の中期又は末期に各 1 又は 2 回認められた. 同群の雌の 1 例 (動物番号 RP5F01) では投与 1 日の投与直後に被験物質様物の少量の嘔吐が認められた.

その他, 対照群及び 20 mg/kg 以下の被験物質群の雌雄のいずれにも異常は認められなかった. また, 対照群と 2, 20, 80 及び 300 mg/kg 群の雌の 1~3 例に月経が散見され, 異常は認められなかった.

11.3 体重

(Figures 1~2, Tables 3~4, Appendices 1~2)

300 mg/kg 群の生存例のうちの雄 2 例 (動物番号 RP6M03, RP6M04) では投与 1~2 週頃に体重の漸減が認められた.

その他, 対照群を含む各群の雌雄において, 体重推移に異常は認められなかった.

11.4 摂餌量

(Figures 3~4, Tables 5~6, Appendices 3~4)

300 mg/kg 群の生存例及び対照群を含む各群の雌雄において, 摂餌量に異常は認められなかった.

11.5 便潜血検査

(Tables 7~8)

投与期間中, 便性状に変化の認められた動物 (80 mg/kg 群の雄 1 例及び 300 mg/kg 群の雌雄各 4 例全例) について, 投与 8~11 日に便潜血検査を実施した結果, 300 mg/kg 群の雄 1 例 (動物番号 RP6M02) が陽性 (+), 同群の雄 2 例 (動物番号 RP6M01, RP6M03) 及び雌 1 例 (動物番号 RP6F03) が擬陽性 (±) であった. その他の例は陰性 (-) であった.

投与 4 週の検査では, 300 mg/kg 群の生存例のうちの雄 1 例 (動物番号 RP6M03) が擬陽性であり, その他の動物はいずれも陰性であった.

11.6 血液学的検査

(Tables 9~11, Appendices 5~6)

300 mg/kg 群では, 対照群に比べ, 雄で投与 3 週及び雌で投与 2 週にヘマトクリット値の有意な低値, 雌雄で投与 2 週に血小板数の有意な高値, 雌雄ともに投与期間中にプロトロンビン

時間 (PT) 及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の有意な延長又は延長傾向, 雌で投与 2 週に平均赤血球容積の有意な低値がそれぞれ認められた。

投与前値, 対照群の個別値又は試験施設の背景値 (中国産カニクイザル, 2008~2011 年) に比べて低値又は高値がみられ, 用量に応じた変動が認められた個別値として, 300 mg/kg 群の雄 1 例 (動物番号 RP6M01) で投与 1~3 又は 4 週の赤血球数, ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値傾向が認められた。雄の死亡例 (動物番号 RP6M02) の投与 14 日の検査及び雌の瀕死例 (動物番号 RP6F03, RP6F04) の投与 19 日の検査では, 赤血球数, ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値傾向, 網赤血球の数及び比の高値傾向, PT 及び APTT の延長傾向が共通して認められた。採血中に死亡した雌 (動物番号 RP6F01) の投与 20 日の凝固系の検査でも同様に, PT では凝固せず, APTT でも延長傾向が認められた。

その他, 対照群に比べ, 2 mg/kg 群の雄で投与 3 週に好中球の数及び比の有意な低値並びにリンパ球の比の有意な高値が, 6 mg/kg 群の雌で投与 4 週にヘマトクリット値の有意な低値が, 20 mg/kg 群の雌で投与 4 週に好塩基球の数及び比並びにリンパ球の数の有意な高値が, 80 mg/kg 群の雄で投与 4 週に好中球の数の有意な低値, 雌で投与 1 週に平均赤血球色素濃度の有意な高値, 投与 2 及び 3 週に赤血球数並びに投与 1~4 週にヘマトクリット値の有意な低値が, 300 mg/kg 群の雄で投与 2 週に好酸球の数の有意な低値がそれぞれ認められた。しかし, これらはいずれも投与前値と同程度か, 背景値の範囲内又は用量に伴わない変動であることから, 被験物質投与に関連のない偶発的な変動と考えられた。

11.7 血液生化学的検査

(Tables 12~14, Appendices 7~8)

300 mg/kg 群では, 対照群に比べ, 雌雄で投与 1~4 週に総ビリルビンの有意な高値又は高値傾向が認められ, 個別値においても, 死亡/瀕死例を含む雄 3 例及び雌 4 例では, 投与 1 週では投与前値に比べて明らかな高値を示した。雄で投与 1~4 週及び雌で投与 1 週に総胆汁酸の有意な高値又は高値傾向が認められた。また, アルブミンの有意な低値が雄で投与 1~4 週及び雌で投与 1 又は 2 週に認められた。同群の雄では, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性の有意な高値又は高値傾向が投与 1~4 週にみられ, アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性の有意な高値が投与 4 週に認められた。同群の雌では, C 反応性蛋白 (CRP) の高値傾向が投与 1 週, 尿素窒素の有意な高値が投与 2 週, アルブミン・グロブリン比 (A/G) 及びクロールの有意な低値又は低値傾向が投与 1 及び 2 週に認められた。

投与前値, 対照群の個別値又は試験施設の背景値 (中国産カニクイザル, 2008~2011 年) に比べて低値又は高値がみられ, 用量に応じた変動が認められた個別値として, 300 mg/kg 群の雄の死亡例 (動物番号 RP6M02) の投与 14 日の検査では, 投与前値及び対照群の値に比べ, AST, ALT, ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP), γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 及びグルタミン酸脱水素酵素 (GLDH) の活性, 総ビリルビン, 尿素窒素, 中性脂肪, 総胆汁酸の高値傾向, アルブミン, A/G, クロールの低値傾向が認められた。同群の瀕死例 (雌: 動物番号 RP6F03, RP6F04) の投与 19 日の検査では, AST, ALT, LAP, GGT 及び GLDH の活性, 総ビリルビン, 尿素窒素, 総胆汁酸の高値傾向, アルブミン及び A/G の低値傾向が認められた。1 例 (動物番号 RP6F04) でアルカリホスファターゼ活性及び CRP の高値傾向が認められた。採血中に死亡した雌 (動物番号 RP6F01) の投与 20 日のクエン酸ナトリウムを抗凝固剤とした血漿を分析した結果においても, AST, LAP 及び GLDH の活性, 総ビリルビン, 尿素窒素, 総胆汁酸の高値傾向が認められた。

その他, 対照群に比べ, 80 mg/kg 群の雌で投与 1 週に A/G の有意な低値が認められたが, 総蛋白及びアルブミンに有意な変動が認められていない。2, 6 及び 300 mg/kg 群の雌で投与 2 又は 3 週に乳酸デヒドロゲナーゼ活性の有意な高値が認められ, 2, 80 又は 300 mg/kg 群の雌で投与 1~3 週にリン脂質, 20 及び 300 mg/kg 群の雌で投与 1 週にカリウムの有意な低値が散見

された。また、2 mg/kg 群の雄で投与2週に血中カリウムの有意な高値、6 mg/kg 群の雌で投与3週に総胆汁酸の有意な高値、80 mg/kg 群の雄で投与2週に総コレステロールの有意な低値がそれぞれ認められた。しかし、これらはいずれも投与前値と同程度か又は用量に伴わない変動であることから、被験物質投与に関連のない偶発的な変動と考えられた。

11.8 サイトカイン（インターロイキン6）の測定

(Tables 15~16)

300 mg/kg 群では、死亡/瀕死例において、IL-6の個別の投与前値と比べて投与1週にわずかに上昇する傾向がみられたが、投与2週には定量限界未満に低下する例や明らかな高値を示す例など、定期測定においては個体差が認められた。瀕死となった2例（動物番号 RP6F03, RP6F04）の瀕死時のIL-6はいずれもその例の投与前値や対照群の値に比べて明らかな高値が認められた。

その他、20 mg/kg 群の雄では、投与4週に対照群と比較して有意な高値が認められたが、その個別値の範囲は同群の投与前値の程度であり、80 mg/kg 群では同様な変動は認められていないことから、偶発的な変動と考えられた。

なお、2及び80 mg/kg 群の雌各1例（動物番号 RP2F04 及び RP5F01）では、対照群や同群の他の例の投与前の個別値に比べて投与前から著しい高値を示していたが、一般状態、血液検査などに共通する異常はなかった。

11.9 剖検

(Tables 17~18)

4週間生存例の投与期間終了時剖検では、300 mg/kg 群の雄1例（動物番号 RP6M03）で肝外胆管の拡張及び肝臓の外側左葉に淡褐色結節が認められた。

300 mg/kg 群の死亡例（動物番号 RP6M02, RP6F01）及び瀕死例（動物番号 RP6F03, RP6F04）の剖検では、全例で肝外胆管の拡張及び雌雄各1例の死亡例及び雌1例（動物番号 RP6F03）の瀕死例では胆嚢で9~15 mLの胆汁が貯留し拡張していた。雌では3例とも胆嚢に暗赤色物の貯留が認められた。すべての例で胸腺が小さく、死亡した雄の例では副腎が暗褐色を呈して大きかった。死亡例の雌では小腸の内容物が暗赤色を呈しており、死亡例の雌雄ともに大腸の内容物が赤褐色であった。死亡例の雌では直腸粘膜に暗赤色巣が散在していた。瀕死例の雌では膝関節の滑膜に暗赤色巣が認められた。

その他の変化として対照群から300 mg/kg 群に至るまで胸腺の小さい例が散見され、その頻度は80 mg/kg 群の雌及び300 mg/kg 群で高かった。6 mg/kg 群の雄1例（動物番号 RP3M01）で胃体部粘膜に暗赤色巣が散在しており、対照群の雌1例（動物番号 RP1F01）で片側の卵巣に嚢胞が確認された。

11.10 器官重量

(Tables 19~20, Appendices 9~10)

肝臓重量では、300 mg/kg 群の雄で実重量が高値傾向、体重比重量が対照群に比べて有意な高値を示した。80及び300 mg/kg 群の雌で実重量及び体重比重量が高値傾向を示した。

胸腺重量では、300 mg/kg 群の雌雄及び80 mg/kg 群の雌で実重量及び体重比重量が低値傾向を示した。

肺重量では、体重比重量が80 mg/kg 群の雄及び20 mg/kg 群の雌で有意な高値を示したが、用量に関連がみられず、偶発的な変動であった。

11.11 病理組織学的検査

(Tables 21~22)

300 mg/kg 群の 4 週間生存例の雄 1 例 (動物番号 RP6M03) で胆嚢の炎症細胞浸潤, 肝外胆管の炎症細胞浸潤, 出血及び糜爛/潰瘍がみられ, 十二指腸ファーター乳頭においても同様の変化が観察された. さらに, ファーター乳頭では細菌叢 (グラム陽性又は陰性菌) が確認された. 同例では肝臓に膿瘍が確認されたが, 膿瘍には細菌叢はみられなかった. 肝臓ではさらに門脈域の炎症細胞浸潤, 胆管の壊死/再生, 門脈域の多巣状性肝細胞壊死もみられた. 同群のその他の 4 週間生存例 (動物番号 RP6M01, RP6M04, RP6F02) も含め, 肝臓には肝細胞肥大及び細胆管の増生が軽度から中等度に認められた.

死亡例 (動物番号 RP6M02, RP6F01) 及び瀕死例 (動物番号 RP6F03, RP6F04) では, 肝外胆管又は胆嚢に炎症細胞浸潤, 出血, 浮腫, 糜爛/潰瘍が認められ, 死亡例の雌雄及び瀕死例の 1 例 (動物番号 RP6F04) で細菌叢 (グラム陽性又は陰性菌) が認められた. 十二指腸のファーター乳頭にも炎症細胞浸潤, 糜爛/潰瘍又は出血が認められ, 細菌叢 (グラム陽性又は陰性菌) がみられた. 肝臓においては門脈域の炎症細胞浸潤, 胆管の壊死・再生, 門脈域の肝細胞壊死が多巣状性にみられ, 死亡例の雄では胆管に細菌叢 (グラム陽性又は陰性菌) も観察された. 瀕死例では細胆管の増生も確認された. その他に, 死亡例の雄では副腎皮質のうっ血及び肥大, 死亡例及び瀕死例の雌では胸腺の萎縮, 死亡例の雌では回腸及び結腸粘膜の炎症細胞浸潤, 瀕死例の雌では滑膜の出血がみられた. 死亡例では死後変化により, 所見が確認できない器官もあった.

80 mg/kg 以下の群のいずれにも, 異常は認められなかった.

11.12 TK測定

(Figures 5~6, Tables 23~24)

投与 1 日では, 2, 6, 20, 80 及び 300 mg/kg (用量比 1:3:10:40:150) において, 群平均の C_{max} は, 雄で 20.5, 74.6, 145, 211 及び 264 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1.0:3.6:7.0:10.3:12.9), 雌で 29.6, 81.6, 161, 206 及び 253 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1.0:2.8:5.4:7.0:8.5) であり, 群平均の AUC_{0-24h} は, 雄で 322, 1070, 2250, 3270 及び 4410 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ (1.0:3.3:7.0:10.2:13.7), 雌で 437, 1090, 2510, 3400 及び 4480 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ (1.0:2.5:5.7:7.8:10.3) であった. T_{max} は, 雄が 4.0~6.5 h, 雌が 4.0~8.0 h であり, 用量の増加に伴い T_{max} が遅れる傾向が認められた.

投与 28 日では, 2, 6, 20, 80 及び 300 mg/kg (用量比 1:3:10:40:150) において, 群平均又は個別の C_{max} は, 雄で 30.8, 77.2, 121, 124 及び 153 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1.0:2.5:3.9:4.0:5.0), 雌で 37.6, 77.7, 118, 148 及び 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1.0:2.1:3.1:3.9:4.0) であり, 群平均又は個別の AUC_{0-24h} は, 雄で 481, 1140, 1970, 1890 及び 2840 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ (1.0:2.4:4.1:3.9:5.9), 雌で 587, 1040, 1820, 2330 及び 2630 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ (1.0:1.8:3.1:4.0:4.5) であった. T_{max} は, 雄が 4.0~6.7 h, 雌が 3.8~8 h (個別値) であり, 投与 1 日と同様に用量の増加に伴い T_{max} が遅れる傾向が認められた.

対照群では投与 1 及び 28 日のいずれの TK 測定用試料にも, 被験物質のピークは認められなかった.

12. 考察

TM5509 の 80 及び 300 mg/kg/day の投与によって, 毒性変化として以下の所見が認められた.

80 mg/kg 群では, 一般状態で雌雄に泥状便及び雌に嘔吐が認められた.

300 mg/kg 群では, 投与 16~20 日に死亡又は瀕死状態が認められた. 投与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ヘマトクリット値の低

下がみられ、死亡/瀕死例では、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（投与6又は7日）の血液生化学的検査において総ビリルビンの高値がみられ、その後の検査において、AST, ALT, LAP, GGT, GLDH, 尿素窒素, 中性脂肪, 総胆汁酸などの肝臓機能に関連する血液生化学パラメータの変動が認められた。IL-6では、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。瀕死時のIL-6には明らかな高値が認められた。剖検において死亡/瀕死例では特に胆嚢の拡張（胆汁貯留量の増加）、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細胞浸潤及び糜爛/潰瘍が認められ、特に死亡及び瀕死例では細菌叢がみられる例もあった。肝臓内の胆管系においても炎症細胞浸潤及び胆管の壊死/再生が明らかであり、これら胆道系の変化を受けた門脈域の肝細胞の巣状壊死が多数みられる例も確認された。死亡例の雄では胆管の壊死がみられた部位に細菌叢がみられた。生存例の雄1例では肝膿瘍があり、これには細菌叢はみられなかったが、投与期間中の細菌感染の可能性を示唆する変化であった。

以上のうち、300 mg/kg 群で認められた毒性変化の多くが、胆道系の障害とそれに伴う胆汁排出障害に関連するものと考えられた。

死亡/瀕死例において暗赤色の胆汁が認められたが、被験物質の胆汁排泄によるか、胆汁の滞留によるかは明らかではなかった。通常、胆汁は胆道系に障害を起こさないが、被験物質投与が胆汁の組成や性状を変化させ、胆道系の上皮に対して刺激を与えた可能性が考えられた。また、剖検でみられた胆嚢及び肝外胆管の拡張は、胆汁の排出障害を示唆するものであり、血中の総ビリルビンの上昇は胆汁の排出障害の結果と考えられた。また、血中の総ビリルビンが高値である段階では、胆汁排出障害に伴い胆汁が肝臓内に逆流しており、胆汁の肝細胞へ影響が門脈域の巣状壊死として現れたと考えられた。この時期に肝機能に関連する血液生化学パラメータが上昇したと考えられた。さらに、胆道内の損傷部位に細菌叢が認められており、腸内細菌の上行性感染が示唆された。なお、死亡/瀕死例に発熱や白血球数の増加が認められなかったことから、肝・胆道の感染は軽度であったと考えられた。

300 mg/kg 群で認められた灰白色の軟便や泥状便は、胆汁が十分に排出されなかったことによる性状の変化と考えられた。

当試験の検査項目において、胆汁排出の障害に直接関連し、投与初期から変動するパラメータは、総ビリルビンであることを確認した。また、300 mg/kg 群でみられた灰白色便は、胆汁の減少に伴う色調の変化の可能性があり、投与初期から胆汁排出障害を示唆する臨床症状と考えられた。なお、IL-6については、動物の状態を早期から予想することができる安定した指標とはならないと考えられた。

300 mg/kg 群のアルブミンの低値及びこれに伴う A/G は、継続する灰白色の軟便及び泥状便により栄養摂取の不良に伴うものと考えられた。また、80 及び 300 mg/kg 群で胸腺の矮小がみられたが、300 mg/kg 群の死亡/瀕死例では胸腺の矮小と共に副腎が大きい個体があり、ストレスに伴う変化の可能性が考えられた。これらは被験物質投与の二次的影響と考えられることから、毒性学的意義のない変化と判断した。300 mg/kg 群の PT 及び APTT の延長は、TM5509 が PAI-1 阻害作用を有することから、被験物質の薬理作用に基づく影響と考えられることから、毒性学的意義のない変化と判断した。80 mg/kg 群の雌及び 300 mg/kg 群の雌雄の肝臓重量に増加がみられ、300 mg/kg 群の雌雄では肝細胞肥大が認められたが、これらの肝臓の変化は、28 日間の反復投与によって 20 mg/kg 以上の群で TK パラメータが低値を示していることから、肝薬物代謝酵素の誘導による適応性変化と考えられた。

TM5509 の全身曝露については、投与1日では、すべての被験物質群で用量の増加に伴い C_{max} 及び AUC_{0-24h} は増加し、2 及び 6 mg/kg では用量比に近い増加がみられたが、20 mg/kg 以上では用量比よりも低かった。投与28日では、2, 6 及び 20 mg/kg では用量の増加に伴って C_{max} 及び AUC_{0-24h} は増加し、2 及び 6 mg/kg では用量比に近い増加がみられたが、20 mg/kg 以上では、雄の 20 mg/kg と 80 mg/kg との間、雌の 80 mg/kg と 300 mg/kg の生存例の個別値との間がほぼ同等の値であった。28 日間の反復投与の結果、雌雄共に 2 及び 6 mg/kg では投与1日に比

べてほぼ同等の値であったが、20 mg/kg 以上では低値を示した。また、雌雄共に TK パラメータの値や用量間の関係はほぼ同等であり、性差はないと考えられた。

13. 結論

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。その結果、80 mg/kg/day の用量において、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 であると判断した。

なお、300 mg/kg/day の反復投与における死亡/瀕死に関連する胆道系の障害の推定については、投与初期のビリルビンの上昇及び便性状の変化が指標となると考えられた。

14. 文献

- 1) 堀口 浩資. 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. 株式会社ボゾリサーチセンター最終報告書; 2013. 試験番号 B-7235. 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.

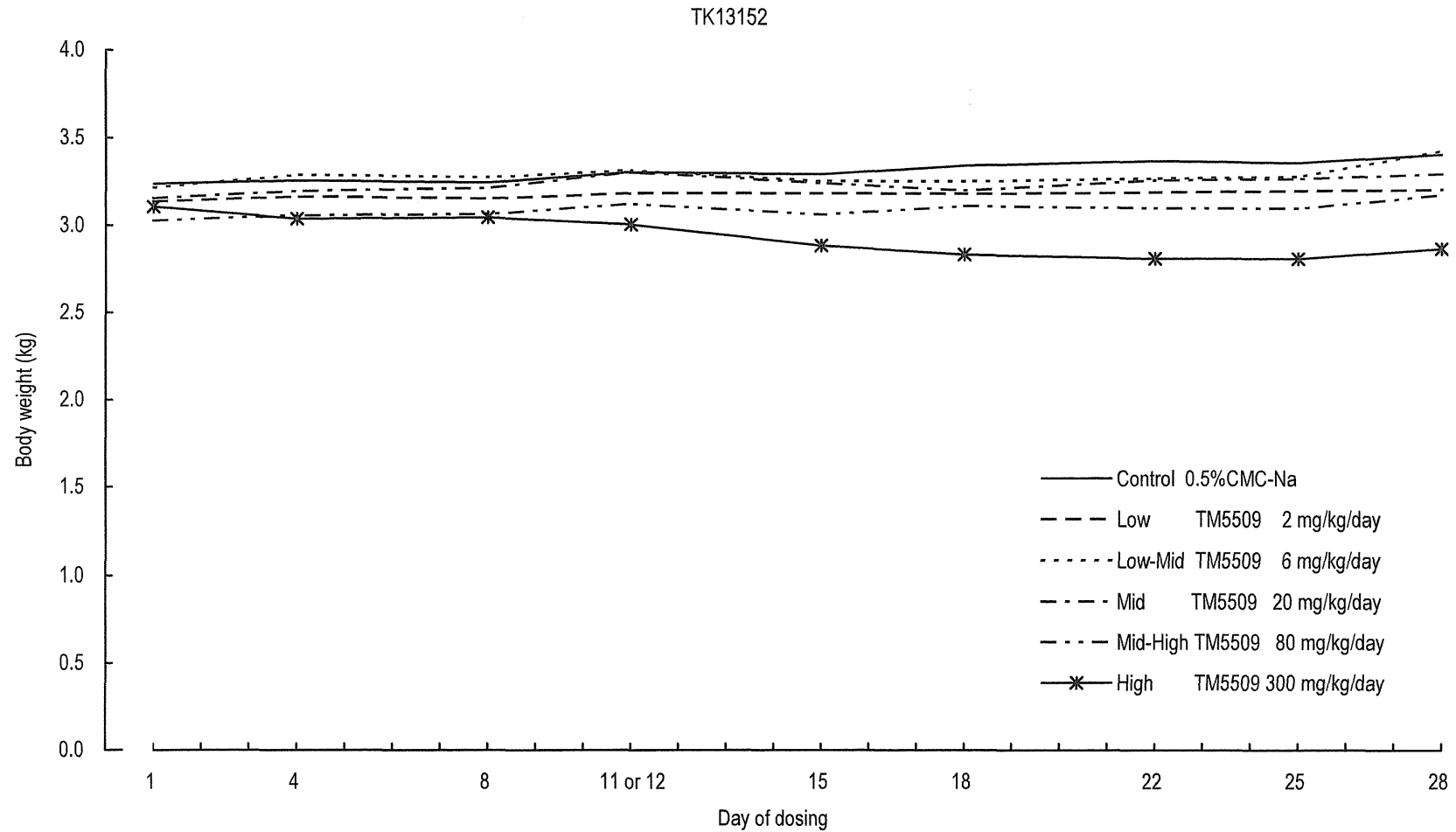


Fig. 1 A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys
Body weight (males)

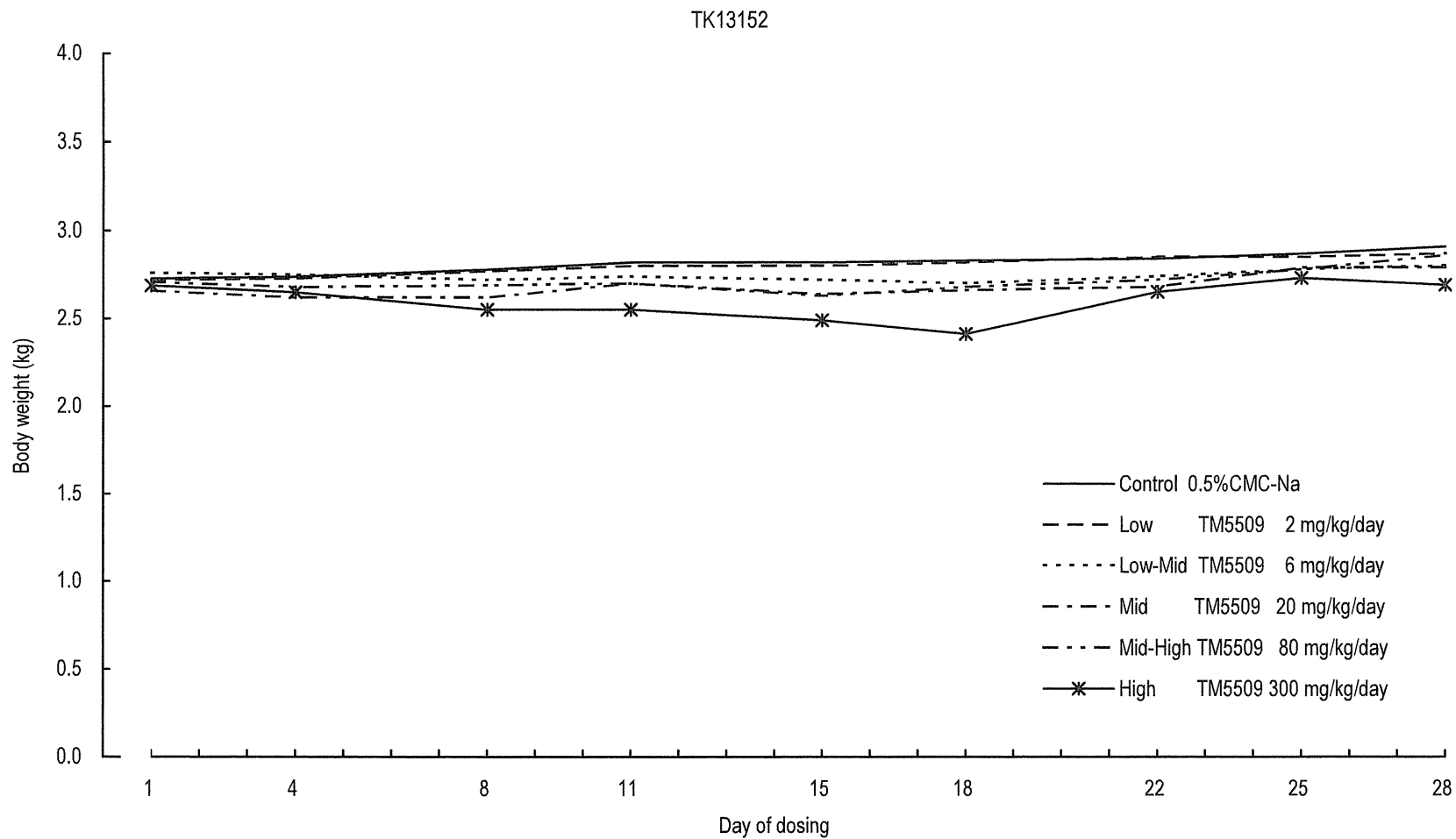


Fig. 2 A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys
Body weight (females)

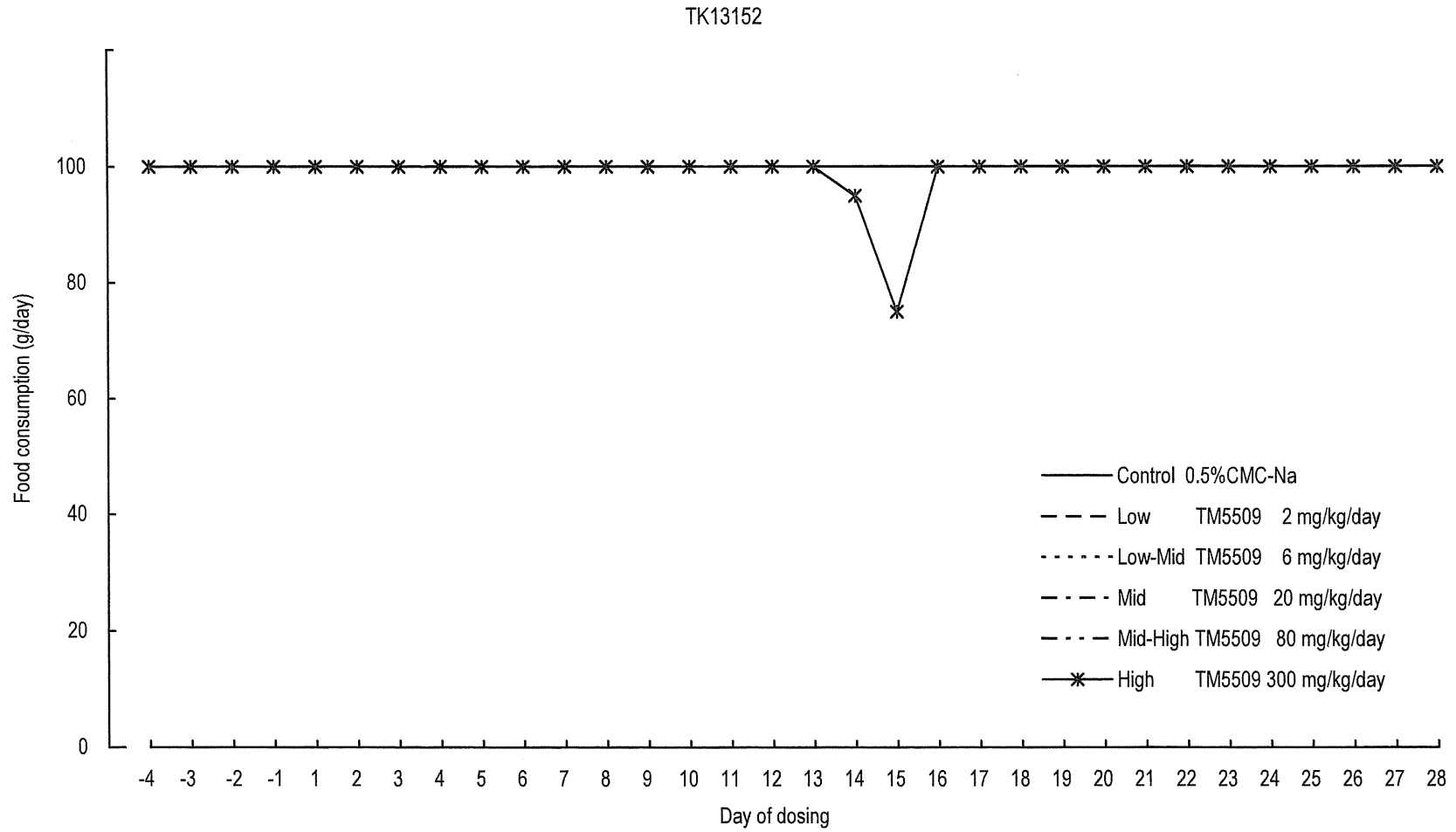


Fig. 3 A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys
Food consumption (males)

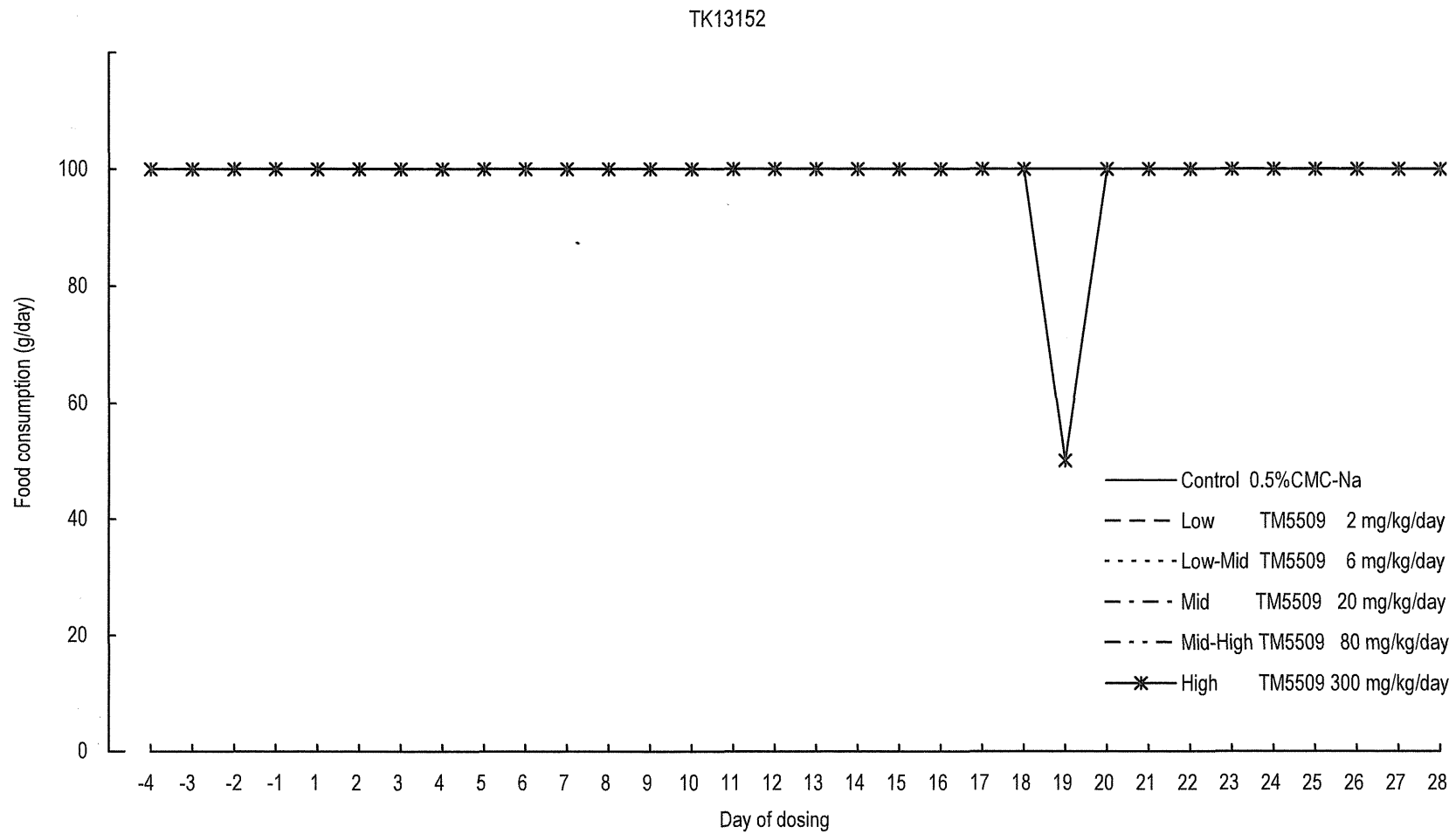


Fig. 4 A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys
Food consumption (females)

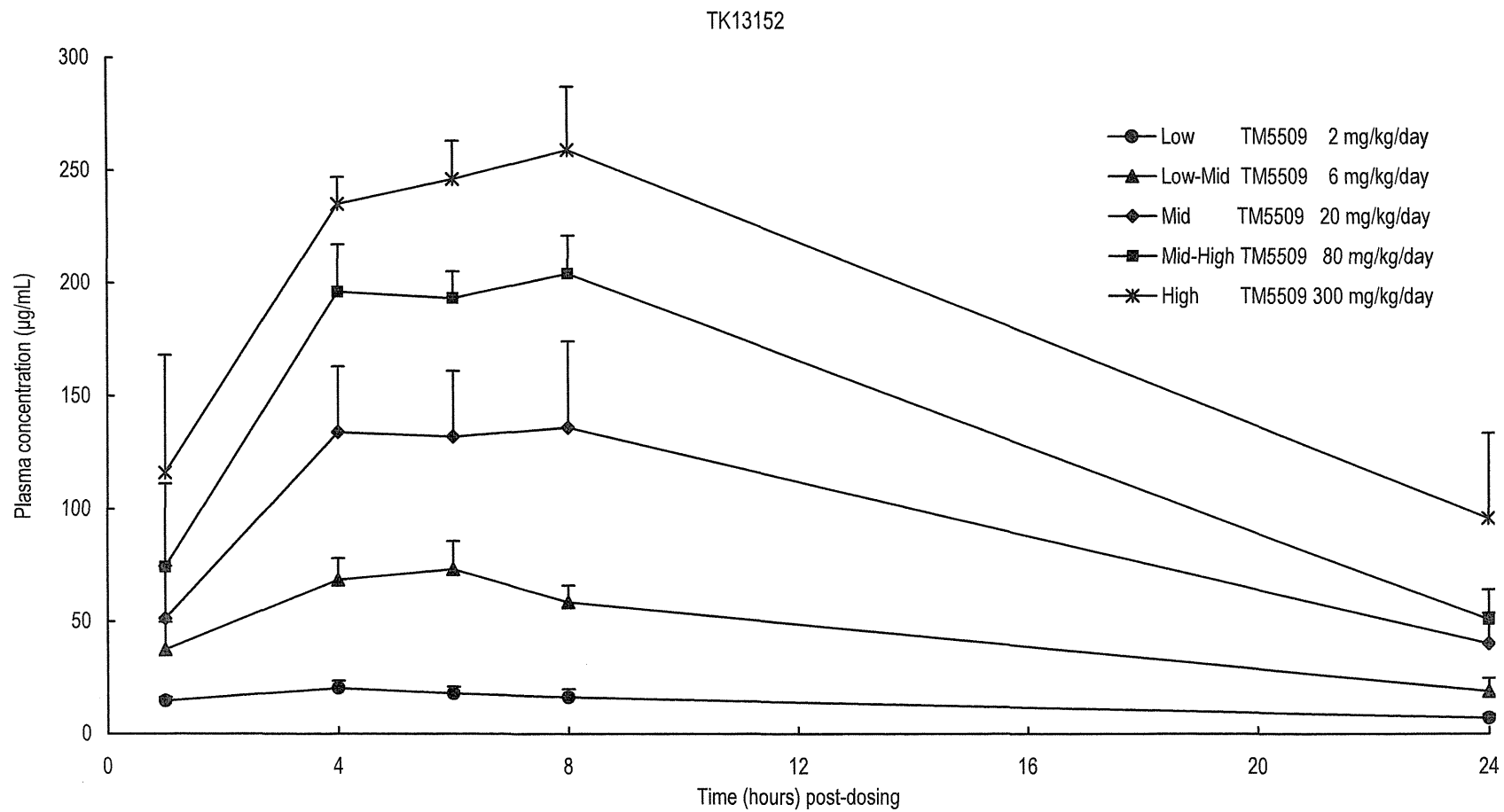


Fig. 5-1 A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys
Plasma concentrations of TM5509 (males) - Day 1 -

Each value represents Mean + S.D.

TK13152

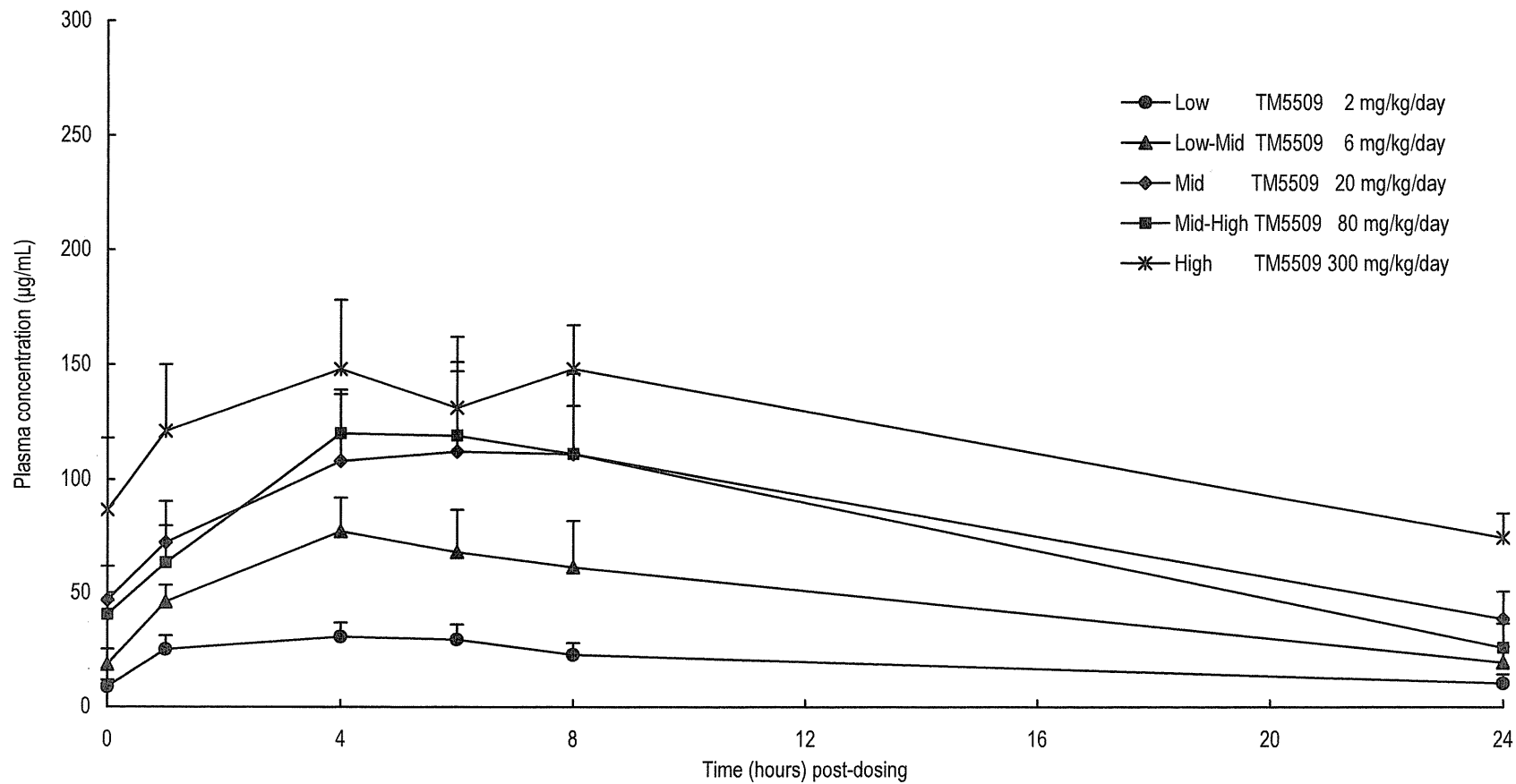


Fig. 5-2 A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys
Plasma concentrations of TM5509 (males) - Day 28 -

Each value represents Mean + S.D.

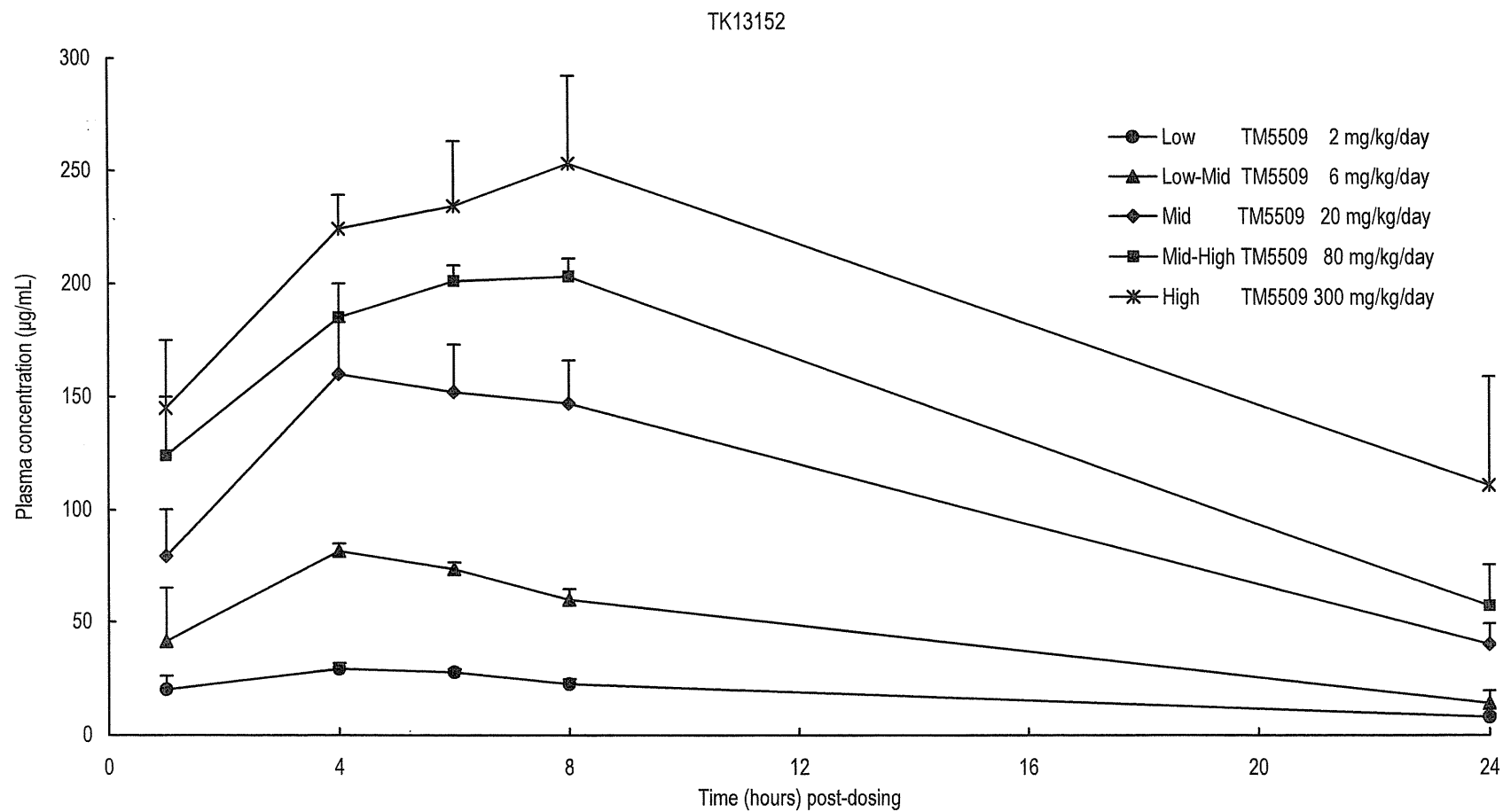


Fig. 6-1 A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys
Plasma concentrations of TM5509 (females) - Day 1 -

Each value represents Mean + S.D.

TK13152

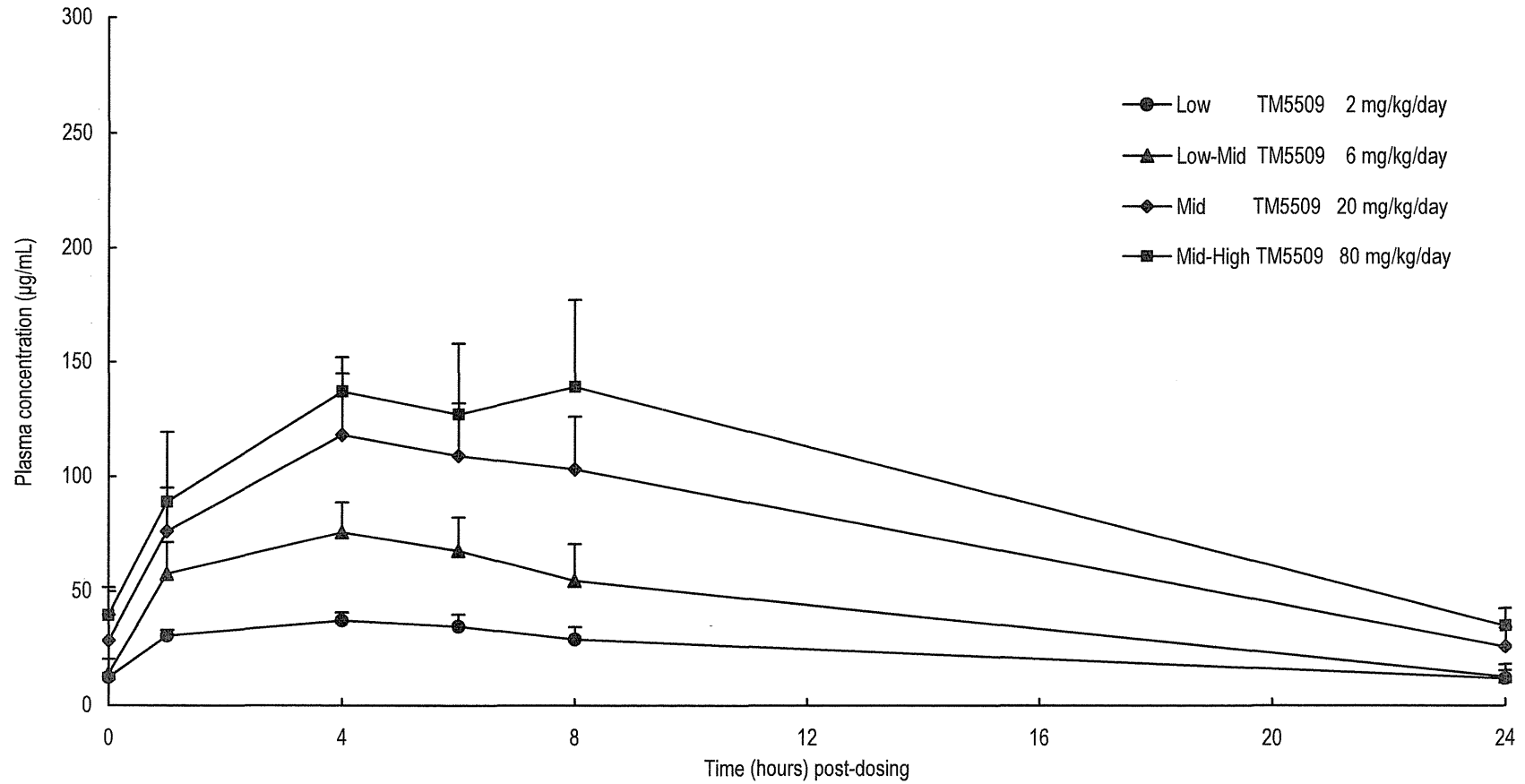


Fig. 6-2 A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys
Plasma concentrations of TM5509 (females) - Day 28 -

Each value represents Mean + S.D.

A 4-Week Oral Dose Toxicity Study of TM5509 in Cynomolgus Monkeys

Table 1 Clinical observations (males)

Sex: Male

Group	Animal No.	Findings	Day of dosing																													
			-6or-5to-1			1			2			3			4			5			6			7			8			9		
			am	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h	Pre	1h 4h					
High TM5509 300 mg/kg/day	RP6M02	Vomiting (test article-like substances): Small quantity			A ^{a)}																											
		Large quantity								A ^{c)}																						
		Grayish white muddy stools (normal feces: absent)																														
		Grayish white loose stools (normal feces: absent)																														
		(normal feces: present)																														
		Grayish white stools (normal feces: present)																														
		Muddy stools (normal feces: absent)																														
		(normal feces: present)																														
		Decrease in movement																														
		Vomitus (undigested feed)																														
		(test article-like substances)																														
		Found dead																														
		Grayish white watery stools (normal feces: absent)																														
		Lateral position																														
RP6M03	Grayish white loose stools (normal feces: present)																															
	Grayish white stools (normal feces: present)																															
	Grayish white muddy stools (normal feces: absent)																															
	(normal feces: present)																															
	Muddy stools (normal feces: absent)																															
	(normal feces: present)																															
RP6M04	Grayish white muddy stools (normal feces: absent)																															
	(normal feces: present)																															
	Muddy stools (normal feces: present)																															
	(normal feces: absent)																															
Grayish white stools (normal feces: present)																																

General Footnote: Pre: Pre-dosing 1h and 4h: 1 and 4 hours post-dosing A: Appearance of signs Blank spaces indicate "no abnormalities".
^{a)} Immediately after dosing ^{b)} 6 hours post-dosing ^{c)} 1 minute post-dosing ^{d)} 57 minutes post-dosing

