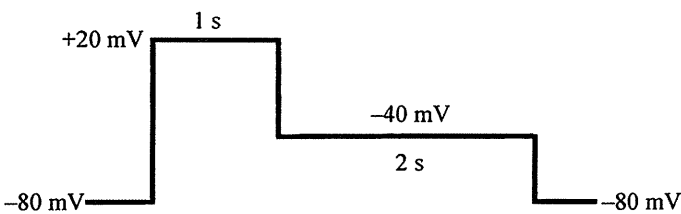
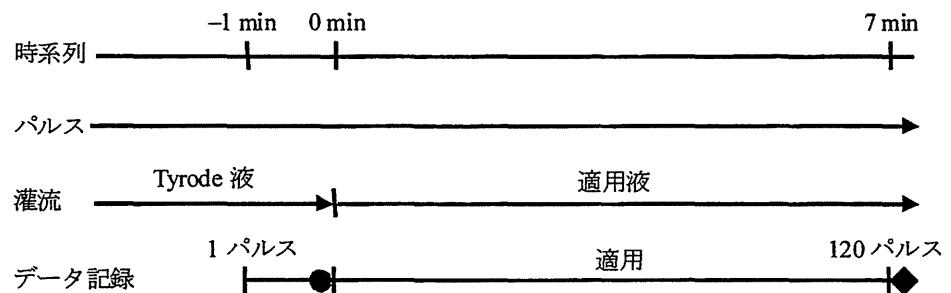


## 6.6.2 カリウム電流測定

- 方法： ホールセルパッチクランプ法を用いて hERG 電流を測定した。
- 溶液組成
- Tyrode 液： NaCl : 137 mmol/L, KCl : 4 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> : 1 mmol/L,  
HEPES : 10 mmol/L, D(+)-グルコース : 10 mmol/L,  
CaCl<sub>2</sub> : 1.8 mmol/L  
(1 mol/L NaOH 溶液を用いて pH 7.40±0.02 に調整)
- 電極内充填液： KCl : 130 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> : 1 mmol/L, MgATP : 5 mmol/L,  
GEDTA : 5 mmol/L, HEPES : 10 mmol/L  
(8 mol/L KOH 溶液を用いて pH 7.20±0.02 に調整)
- 操作方法： 細胞培養ディッシュ内の培地を除去し, Tyrode 液 1 mL で 3 回洗浄後, Tyrode 液 2 mL を加えた. Tyrode 液を灌流速度 2 mL/min で 5 分間灌流した. ガラス管針電極を電極内充填液で満たし, ヘッドステージの電極ホルダーに装着後, 顕微鏡下でマイクロマニピュレータを操作して電極先端を細胞膜に軽く接触させた. 吸引により電極内に陰圧をかけ, パッチクランプシステム (EPC-10 アンプ/Pulse v8.7 ソフトウェア, HEKA 社) による膜抵抗値として 1 GΩ 以上の抵抗を得た. その後, 強い吸引をかけ, 電極直下の細胞膜を破った. 電位固定モード (Mode を whole-cell) にし, 保持電位を -80 mV にセットした. Tyrode 液を灌流速度 2 mL/min で灌流し, パルスを与え, 電流をモニターした.
- パルスの条件： 保持電位： -80 mV  
脱分極パルス (1 秒) : +20 mV  
再分極パルス (2 秒) : -40 mV  
パルス間隔： 4 秒 (脱分極パルスの間隔)
- 
- 記録開始の条件：
- ・膜抵抗値が 0.7 GΩ 以上
  - ・Tail peak current が, 300 pA 以上
- データ記録： 適用前の 15 パルス及び適用後の 110 パルス (合計 125 パルス) によって誘発される電流をパッチクランプシステムを用いて記録した.

- データ採用の条件： 記録開始後，以下の条件を満たしたデータを採用した。
- ・膜抵抗値が 0.7 GΩ 以上
  - ・適用前の tail peak current が，300 pA 以上
- すべてのデータを採用した。
- 解析項目： Tail peak current
- 解析方法： 電流波形データの基線を 0 pA に補正した場合の tail peak current をパッチクランプシステムを用いて算出した。
- 百分率算出方法： 適用前の 5 パルス（11～15 番目のパルス，●）及び適用後の 5 パルス（121～125 番目のパルス，◆）における tail peak current の平均値を用いて，適用前に対する適用後の tail peak current の百分率を Microsoft Excel（Microsoft Co.）により求めた。



$$\% \text{ of pre-application value} = \frac{\text{適用後の 5 パルスにおける tail peak current の平均値}}{\text{適用前の 5 パルスにおける tail peak current の平均値}} \times 100$$

## 6.7 統計学的手法

結果は平均値で表示する。統計学的検定は実施しなかった。

## 7. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び

試験計画書に従わなかったこと

本試験では，予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

## 8. 結果及び考察

LRX, LRY 及び LRZ の hERG 導入 HEK293 細胞の hERG 電流に対する作用を, tail peak current を指標としてホールセルパッチクランプ法により評価した. (Table 1)

### 8.1 LRX

LRX の 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を適用したときの tail peak current は, 適用前の 91.55%を示し, hERG 電流の抑制はみられなかった.

### 8.2 LRY

LRY の 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を適用したときの tail peak current は, 適用前の 98.70%を示し, hERG 電流の抑制はみられなかった.

### 8.3 LRZ

LRZ の 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を適用したときの tail peak current は, 適用前の 94.95%を示し, hERG 電流の抑制はみられなかった.

以上, 本試験条件下において, LRX, LRY 及び LRZ の 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  は, hERG 導入 HEK293 細胞の hERG 電流に対して影響を与えなかった.

9. 試験責任者，その他の試験に従事した者の氏名

試験責任者： 伴 昌明  
被験物質取扱い責任者： 塩崎 彩  
電流測定： 吉福 智子  
電流解析： 吉福 智子

10. 記録及び資料の保存

記録及び資料は，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

被験物質に関する記録，資料

試験系に関する記録，資料

カリウム電流測定に関する記録（CD-R を含む）

カリウム電流解析記録

最終報告書草案

最終報告書

その他，試験に関する資料

別添 1

Table

1	Effects of LRX, LRY, and LRZ on tail peak currents in hERG transfected HEK293 cells.....	13
---	--	----

**Table 1 Effects of LRX, LRY, and LRZ on tail peak currents in hERG transfected HEK293 cells**

Test articles	File name	Actual value <sup>1)</sup> (pA)		% of pre-application value
		Pre	Post	
LRX 10 µg/mL	366002-1030-01	1216.8	1110.5	91.3
	366002-1030-02	1335.3	1225.5	91.8
	Mean	1276.05	1168.00	91.55
LRY 10 µg/mL	366002-1030-03	2346.6	2242.3	95.6
	366002-1030-04	1756.6	1787.9	101.8
	Mean	2051.60	2015.10	98.70
LRZ 10 µg/mL	366002-1030-05	1805.1	1801.4	99.8
	366002-1030-06	1805.9	1628.0	90.1
	Mean	1805.50	1714.70	94.95

1) Actual value represents the mean of 5 tail peak currents before (pre) and after (post) application.

最終報告書

表題： LRX, LRY 及び LRZ のマウスにおける 2 週間間歇静脈内投与 (計 6 回)  
毒性試験

試験番号： SBL366-003

試験責任者： 出口 芳樹

当該資料は原本を正確に複写した  
ものであり、原本と相違ないことを  
保証いたします。

株式会社新日本科学 安全性研究所

試験責任者 出口 芳樹

日付 2014 年 3 月 4 日

署名

出口 芳樹

2014 年 3 月 4 日

株式会社新日本科学 安全性研究所

本報告書は表紙を含む 129 頁

## 目 次

要 約.....	4
1. 試験目的.....	6
2. 適用規則.....	6
3. 動物福祉.....	6
4. 試験委託者.....	6
5. 試験施設.....	6
6. 試験日程.....	6
7. 材料及び方法.....	7
7.1 被験物質及び対照物質（媒体）.....	7
7.1.1 被験物質-1.....	7
7.1.2 被験物質-2.....	7
7.1.3 被験物質-3.....	7
7.1.4 対照物質.....	8
7.1.5 媒体.....	8
7.2 被験物質調製液.....	8
7.3 被験物質及び対照物質の投与.....	9
7.4 試験系.....	9
7.5 飼育条件.....	9
7.6 動物の識別法.....	10
7.7 検疫馴化.....	10
7.8 動物の群分け.....	11
7.9 試験群構成.....	11
7.10 投与量設定の根拠.....	11
7.11 観察及び検査項目.....	11
7.11.1 一般状態.....	11
7.11.2 体重.....	12
7.11.3 血液生化学的検査.....	12
7.11.4 病理学的検査.....	13
7.11.4.1 剖検.....	13
7.11.4.2 器官重量（絶対及び相対重量）.....	13
7.11.4.3 病理組織学的検査.....	14
7.12 統計学的手法.....	14
8. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び 試験計画書に従わなかったこと.....	14
9. 結果.....	15



9.1	死亡数.....	15
9.2	一般状態.....	15
9.3	体重.....	15
9.4	血液生化学的検査.....	15
9.5	剖検所見.....	16
9.6	器官重量.....	16
9.7	病理組織学的検査.....	17
10.	考察.....	18
11.	試験責任者その他の試験に従事した者の氏名.....	19
12.	記録, 資料及び標本の保存.....	19
別添 1	Table.....	20
1	Interim deaths .....	21
2	Clinical signs .....	22
3	Body weight.....	29
4	Blood chemistry.....	35
5	Necropsy .....	42
6	Organ weights (absolute and relative) .....	49
7	Histopathology.....	61
別添 2	Appendix .....	72
1	Interim deaths .....	73
2	Clinical signs .....	75
3	Body weight.....	82
4	Blood chemistry.....	88
5	Necropsy.....	95
6	Organ weights (absolute and relative) .....	104
7	Histopathology.....	120

## 要 約

8週齢のCrj:CD1(ICR)マウス(雌雄各3~5匹/群)にLRX, LRY及びLRZ(原液濃度:1 mg/mL)を0.005, 0.5, 50及び5000 µg/kgの投与量で週3回, 2週間間歇静脈内投与(計6回投与)し, その毒性を予備的に調べた。投与容量は5 mL/kgとし, 投与速度は2 mL/minとした。対照群にはコントロールリポソーム溶液を被験物質と同様の方法で投与した。本試験では, 一般状態観察, 体重測定, 血液生化学的検査, 剖検, 器官重量測定及び病理組織学的検査を実施した。

投与期間中, LRX, LRY及びLRZの5000 µg/kg群のそれぞれ雌1例, 雌雄各3例及び雌1例で投与7日目に死亡がみられた。LRX, LRY及びLRZの50, 0.5及び0.005 µg/kg群では死亡及び瀕死はみられなかった。

一般状態観察では, LRX, LRY及びLRZの5000 µg/kg群のそれぞれ雌, 雌雄及び雌において自発運動の減少がそれぞれ投与4から7日目, 投与7から8日目及び投与9日目にみられた。加えてLRXの5000 µg/kg群の雌で軟便及び下腹部の便による汚れが雌で投与4日目にみられた。LRX, LRY及びLRZの50, 0.5及び0.005 µg/kg群では一般状態に異常はみられなかった。

体重の減少がLRX, LRY及びLRZの5000 µg/kg群の雌雄, LRX及びLRYの50 µg/kg群の雌及びLRZの50 µg/kg群の雄で投与2日目にみられた。LRX, LRY及びLRZの0.5及び0.005 µg/kg群では体重推移に異常はみられなかった。

血液生化学的検査では, LRX及びLRZの5000 µg/kg群の雌雄並びにLRX, LRY及びLRZの50及び0.5 µg/kg群の雌でアスパラギン酸トランスアミナーゼの高値がみられた。LRX, LRY及びLRZの0.005 µg/kg群では異常はみられなかった。

剖検では, LRX, LRY及びLRZの5000 µg/kg群の死亡例では脾臓及び/又はリンパ節(顎下, 鼠径, 腋窩及び/又は腸間膜)の腫大がみられた。生存例では脾臓の腫大がLRX及びLRZの5000 µg/kg群のそれぞれ雄及び雌雄, LRX, LRY及びLRZの50 µg/kg群のそれぞれ雌雄, 雄及び雄, LRX及びLRZの0.5 µg/kg群の雌, LRX及びLRZの0.005 µg/kg群のそれぞれ雌及び雄にみられた。リンパ節(顎下, 鼠径及び/又は腋窩)の腫大がLRX及びLRZの5000 µg/kg群の雄, LRYの50 µg/kg群の雄にみられた。LRYの0.005及び0.5 µg/kg群では肉眼的に異常はみられなかった。

器官重量では, LRX, LRY及びLRZの5000 µg/kg群の死亡例で脾臓及び肝臓重量の高値がみられた。生存例では脾臓重量の高値がLRX, LRY及びLRZの5000及び50 µg/kgの雌雄, LRX, LRY及びLRZの0.5 µg/kg群のそれぞれ雄, 雌及び雌雄, LRX及びLRZの0.005 µg/kg群のそれぞれ雌雄及び雄でみられた。肝臓重量の高値がLRX及びLRZの5000 µg/kg群のそれぞれ雌及び雌雄でみられた。LRYの0.005 µg/kg群では異常はみられなかった。

病理組織学的検査では、LRX, LRY 及び LRZ の死亡例では肝臓の門脈周囲性の炎症性細胞浸潤、脾臓の赤脾髄の泡沫細胞及び白脾髄のリンパ球増加がみられた。加えて、LRX 及び LRY の死亡例では顎下リンパ節の泡沫細胞、LRY 及び LRZ の死亡例では脾臓の髄外造血、LRY の死亡例では肝臓の小肉芽腫、LRZ の死亡例では肝臓の髄外造血がみられた。生存例では肝臓において門脈周囲性の炎症性細胞浸潤が LRX 及び LRZ の 5000 及び 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雌雄、LRY の 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雄に、小肉芽腫が LRX, LRY 及び LRZ の 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雌雄、LRX 及び LRY の 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群のそれぞれ雌及び雄に、類洞クッパー細胞の腫大が LRX 及び LRZ の 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群のそれぞれ雄及び雌雄にみられた。リンパ節（顎下、鼠径及び／又は腋窩）においてリンパ洞の泡沫細胞が LRY の 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雄、LRZ の 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雄にみられた。脾臓において赤脾髄の泡沫細胞が LRX, LRY 及び LRZ の 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群のそれぞれ雄、雄及び雌雄、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雌に、白脾髄のリンパ球増加が LRX, LRY 及び LRZ の 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群のそれぞれ雄、雄及び雌雄、LRX 及び LRZ の 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群のそれぞれ雌雄及び雄、LRX 及び LRZ の 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雌、LRZ の 0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雄に、髄外造血が LRZ の 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群の雌にみられた。LRY の 0.5 及び 0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では組織学的に異常はみられなかった。

以上のように、本試験条件下において、LRX, LRY 及び LRZ のマウスにおける週 3 回、2 週間間歇静脈内投与での無毒性量は、LRX では雌雄ともに 0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  未満、LRY では雄は 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、雌は 0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、LRZ では雄は 0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  未満、雌は 0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と結論した。

## 1. 試験目的

LRX, LRY 及び LRZ をマウスに週 3 回, 2 週間 (計 6 回) 間歇静脈内投与したときの毒性変化を調べた。

## 2. 適用規則

本試験は, 適用規則なしとした。

## 3. 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 IACUC366-003), 当研究所の動物実験規程に従って実施した。なお, 試験施設は AAALAC International により認証されている。

## 4. 試験委託者

独立行政法人理化学研究所

統合生命医科学研究センター

〒 230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

TEL : 045-503-7016/7017 FAX : 045-503-7015

## 5. 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

TEL : 099-294-2600 FAX : 099-294-3619

## 6. 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 週目と起算した。

試験開始日 : 2013 年 10 月 7 日

検疫馴化開始日 : 2013 年 10 月 8 日

検疫終了日 : 2013 年 10 月 15 日

(雄)

(雌)

馴化終了日/群分け日 : 2013 年 10 月 15 日

2013 年 10 月 16 日

1 回目投与日 : 2013 年 10 月 16 日

2013 年 10 月 17 日

2 回目投与日 : 2013 年 10 月 18 日

2013 年 10 月 19 日

3 回目投与日 : 2013 年 10 月 20 日

2013 年 10 月 21 日

4 回目投与日 : 2013 年 10 月 23 日

2013 年 10 月 24 日

5 回目投与日 : 2013 年 10 月 25 日

2013 年 10 月 26 日

6 回目投与日/投与期間終了日 : 2013 年 10 月 27 日

2013 年 10 月 28 日

剖検日 : 2013 年 10 月 28 日

2013 年 10 月 29 日

試験終了日： 2014年3月4日

## 7. 材料及び方法

### 7.1 被験物質及び対照物質 (媒体)

#### 7.1.1 被験物質-1

名称： LRX  
提供者： 独立行政法人理化学研究所  
ロット番号： RMJ-MD021  
濃度： 1 mg/mL  
入手日： 2013年10月7日  
入手量： 1.2 mL × 26本 (31.2 mL)  
保存条件： 冷蔵 (凍結を避けて保存)  
保存場所： 被験物質保管所内冷蔵室  
[入手日～返却日：2013年10月7日～2013年12月10日,  
実測値：2.4～5.0°C, 許容範囲：2～8°C]  
取扱い： マスク, キャップ, 手袋及び保護眼鏡を着用した。  
残余被験物質-1： 未開封のみ, すべて試験委託者に返却した。

#### 7.1.2 被験物質-2

名称： LRY  
提供者： 独立行政法人理化学研究所  
ロット番号： RMJ-MD022  
濃度： 1 mg/mL  
入手日： 2013年10月7日  
入手量： 1.2 mL × 26本 (31.2 mL)  
保存条件： 冷蔵 (凍結を避けて保存)  
保存場所： 被験物質保管所内冷蔵室  
[入手日～返却日：2013年10月7日～2013年12月10日,  
実測値：2.4～5.0°C, 許容範囲：2～8°C]  
取扱い： マスク, キャップ, 手袋及び保護眼鏡を着用した。  
残余被験物質-2： 未開封のみ, すべて試験委託者に返却した。

#### 7.1.3 被験物質-3

名称： LRZ  
提供者： 独立行政法人理化学研究所  
ロット番号： RMJ-MD023  
濃度： 1 mg/mL

入手日： 2013年10月7日  
 入手量： 1.2 mL × 26本 (31.2 mL)  
 保存条件： 冷蔵 (凍結を避けて保存)  
 保存場所： 被験物質保管所内冷蔵室  
 [入手日～返却日：2013年10月7日～2013年12月10日,  
 実測値：2.4～5.0°C, 許容範囲：2～8°C]  
 取扱い： マスク, キャップ, 手袋及び保護眼鏡を着用した。  
 残余被験物質-3： 未開封のみ, すべて試験委託者に返却した。

#### 7.1.4 対照物質

名称： コントロールリポソーム (CL) 溶液  
 提供者： 独立行政法人理化学研究所  
 ロット番号： RMJ-MD024  
 入手日： 2013年10月7日  
 入手量： 1.2 mL × 28本 (33.6 mL)  
 保存条件： 冷蔵 (凍結を避けて保存)  
 保存場所： 被験物質保管所内冷蔵室  
 [入手日～返却日：2013年10月7日～2013年12月10日,  
 実測値：2.4～5.0°C, 許容範囲：2～8°C]  
 残余対照物質： 未開封のみ, すべて試験委託者に返却した。

#### 7.1.5 媒体

名称： 生理食塩液  
 製造者： 株式会社大塚製薬工場  
 ロット番号： K3D94, K3G78, K3G80

#### 7.2 被験物質調製液

調製濃度： 0.001, 0.1, 10 及び 1000 µg/mL  
 調製方法： 1000 µg/mL は, 被験物質をそのまま使用した。  
 0.001, 0.1 及び 10 µg/mL は, 被験物質を採取し, 生理食塩液で  
 段階希釈して調製した。被験物質及び調製液は, ボルテックス  
 ミキサーを用いて低速でよく混和した。調製はクリーンベンチ  
 を用いて無菌的に行った。  
 調製頻度： 用時調製

## 7.3 被験物質及び対照物質の投与

投与経路： 静脈内  
 投与経路の選択理由： 臨床適用経路に従った。  
 投与方法： 動物を保定器に固定し、ディスプレイ注射筒及び注射針を用いて尾静脈内に投与した。被験物質調製液は、転倒混和した後に採取した。  
 投与方法の選択理由： マウス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： 1日1回、週3日、2週間投与（計6回投与）  
 投与回数及び投与期間の選択理由： 週3日、2週間（計6回投与）間歇静脈内投与したときの毒性変化を調べるため。  
 投与容量： 5 mL/kg  
 投与液量は、最新の体重を基に個別に算出した。  
 投与速度： 2 mL/min  
 投与時刻： 09：51～11：43

## 7.4 試験系

種： マウス  
 系統： Crlj:CD1 (ICR)  
 体重  
 検疫馴化開始時： 雄 31.2 ～ 36.5 g, 雌 21.4 ～ 26.9 g  
 群分け時： 雄 36.0 ～ 40.2 g, 雌 24.2 ～ 30.3 g  
 週齢  
 検疫馴化開始時： 雄 7 週齢, 雌 6.5 週齢  
 投与開始時： 8 週齢  
 入手日： 2013 年 10 月 8 日  
 入手動物数： 雄 55 匹, 雌 55 匹 計 110 匹  
 使用動物数： 雄 50 匹, 雌 50 匹 計 100 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： 類薬である  $\alpha$ -GalCer の試験で使用した系統であるため。

## 7.5 飼育条件

飼育室： 563 号室  
 温度： 実測値 21.0～22.8°C, 許容範囲 19～25°C  
 湿度： 実測値 46～57%, 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
- 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，ロット番号130802，オリエンタル酵母工業株式会社）を自由に与えた。ただし、剖検前日（17：00前後より）は絶食とした。使用した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した。
- 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た。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した。
- 環境エンリッチメント： おもちゃの供与は行わなかった。
- 床敷： パルマス $\mu$ （株式会社 天然素材探索研究所）を用いた。
- 清掃及び消毒： 床を毎日清掃及び消毒した。  
ケージ及び床敷は週1回、オートクレーブ滅菌処理（121℃、30分間）済みのものと交換した。給餌器及び架台は、オートクレーブ滅菌処理（121℃、30分間）済みのものを使用し、交換は行わなかった。
- 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した。

## 7.6 動物の識別法

- 個体： 検疫馴化期間中は識別を実施しなかった。群分け以降は耳パンチ法で動物番号により識別した。
- 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した。群分け以降は試験番号，群，被験物質名，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した。

## 7.7 検疫馴化

検疫馴化開始日に雄55匹，雌55匹を入手し，8日間の検疫馴化を行い，さらに雌については1日間馴化した。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，「7.11 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



動物はいなかった。

## 7.8 動物の群分け

検疫馴化終了日に動物をそれぞれ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) によって群分けした。

群分け時の余剰動物 (雌雄各 5 匹) 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た。

## 7.9 試験群構成

対照群 1 群, LRX 群 4 群, LRY 群 4 群, LRZ 群 4 群

群	被験物質及び 対照物質	投与量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	投与容量 ( $\text{mL}/\text{kg}$ )	投与液濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	動物数 (動物番号)	
					雄	雌
1	対照物質 (CL 溶液)	-	5	-	5 (1~5)	5 (6~10)
2	LRX	0.005	5	0.001	3 (11~13)	3 (14~16)
3	LRX	0.5	5	0.1	4 (17~20)	4 (21~24)
4	LRX	50	5	10	4 (25~28)	4 (29~32)
5	LRX	5000	5	1000	4 (33~36)	4 (37~40)
6	LRY	0.005	5	0.001	3 (41~43)	3 (44~46)
7	LRY	0.5	5	0.1	4 (47~50)	4 (51~54)
8	LRY	50	5	10	4 (55~58)	4 (59~62)
9	LRY	5000	5	1000	4 (63~66)	4 (67~70)
10	LRZ	0.005	5	0.001	3 (71~73)	3 (74~76)
11	LRZ	0.5	5	0.1	4 (77~80)	4 (81~84)
12	LRZ	50	5	10	4 (85~88)	4 (89~92)
13	LRZ	5000	5	1000	4 (93~96)	4 (97~100)

## 7.10 投与量設定の根拠

LRX, LRY, LRZ の最大溶解量は 1 mg/mL であることから、投与可能な最大用量である 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を最高用量として設定し、以下、公比 100 で 50, 0.5 及び 0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を設定した。

## 7.11 観察及び検査項目

### 7.11.1 一般状態

例数： 全例

観察頻度

検疫馴化期間中： 毎日 1 回

投与期間中  
 投与日： 4回（投与前，投与直後，投与後約1時間，投与後約4時間）  
 非投与日： 毎日1回  
 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った。

#### 7.11.2 体重

例数： 全例  
 測定時期  
 検疫馴化期間中： 検疫馴化開始日（雌雄），検疫終了日（雌）及び馴化終了日（雌雄）に1回  
 投与期間中： 投与0，2，7及び11日目に1回（投与前）  
 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）で測定した。

#### 7.11.3 血液生化学的検査

例数： 全例（死亡例は除く）  
 検査時期： 剖検時  
 採血量： 採取できる最大量  
 採血方法： 剖検のための麻酔下で，ヘパリンナトリウム加注射器を用いて，後大静脈腹部から可能な限り採血した。血液は速やかに遠心分離（4℃，1710×g，3000 rpm，10分間，ユニバーサル冷却遠心機5800，5910及び5922，株式会社久保田製作所）して得られた血漿を使用した。残余サンプルは，冷凍室（許容範囲：-30～-15℃）あるいは超低温フリーザー（許容範囲：-70℃以下）に保存し，ドライアイス存在下で試験委託者に送付した。保存期間及び温度は以下に示す。

##### 【冷凍室】

保存期間（初回採取日～保存場所移動日）：

2013年10月28日～2013年10月31日

実測値：-24.9～-20.2℃

##### 【超低温フリーザー】

保存期間（保存場所移動日～送付日）：

2013年10月31日～2013年11月5日

実測値：-83.8～-79.8℃

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
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 <sup>a)</sup>
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	
総ビリルビン	mg/dL	バナジン酸酸化法	
総タンパク	g/dL	ビウレット法	
アルブミン	g/dL	計算式： 総蛋白×アルブミン比率/100	AES320 <sup>b)</sup>
グルコース	mg/dL	ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法	JCA-BM6070 <sup>a)</sup>
リン脂質	mg/dL	コリンオキシダーゼ・DAOS 法	
総コレステロール	mg/dL	COD・HMMPS 法	
トリグリセリド	mg/dL	GPO・HMMPS 法, グリセリン消去法	

a) 自動分析装置（日本電子株式会社）

b) 自動電気泳動分析装置（ベックマン・コールター株式会社）にてアルブミン比率を測定

#### 7.11.4 病理学的検査

##### 7.11.4.1 剖検

例数： 全例

検査時期

死亡例： 発見後速やかに実施した。

生存例： 最終投与日（6回目投与日）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した。

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した。

##### 7.11.4.2 器官重量（絶対及び相対重量）

例数： 全例

器官： 肝臓及び脾臓

測定方法： 電子天秤（HR-200, 株式会社エー・アンド・デイ）を用いて測定した。さらに、剖検時の体重から 100 g あたりの相対重量を

算出した。

#### 7.11.4.3 病理組織学的検査

検査器官： 肝臓及び肉眼的異常部位  
肉眼的異常部位として脾臓，顎下リンパ節（左右），腋窩リンパ節（左右），腸間膜リンパ節及び鼠径リンパ節（左右）の病理組織学的検査を実施した。

#### 例数

肝臓： 対照群及び各被験物質の 0.5, 50 及び 5000 µg/kg 群全例

肉眼的異常部位： 全例

比較対照として，以下に記載した対照群の動物の組織について病理組織学的検査を実施した。

Animal No. 2 及び 4：脾臓，顎下リンパ節（左右），腋窩リンパ節（左右）及び鼠径リンパ節（左右）

Animal No. 6 及び 7：脾臓（固定のみ実施），顎下リンパ節（左右）及び腸間膜リンパ節

固定方法： 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

標本作製方法： パラフィン包埋及び薄切を行い，HE 染色を施した。

検査方法： 病理組織学的に検査した。

#### 7.12 統計学的手法

各群の体重，血液生化学的検査，器官重量（絶対及び相対重量）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った。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，それぞれ対照群と各被験物質各群との間で多重比較を行った（1 群 vs 2～5 群，1 群 vs 6～9 群，1 群 vs 10～13 群）。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%とした。一般状態，剖検及び病理組織学的検査のデータについては検定を実施しなかった。

#### 8. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

本試験では，予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。