

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.

9.7 個体識別

動物: 動物入荷前 (動物繁殖施設において実施) に, 胸部又は大腿内側に番号 (記号) が入墨されており, 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1~5, 雌は6~10 (主試験用動物)

雄は101~106, 雌は107~112 (TK ブランク血漿用動物)

^{b)} 対照群: 白

低用量群: 青

中用量群: 黄

高用量群: 赤

9.8 群分け

群分け時期: 投与開始4日前

選抜: 主試験用動物については, 群分け前の血液学的検査で好酸球が高値だった雄1例並びに血液生化学的検査でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼが高値だった雌1例を除く雌雄各4例を供試動物として選抜した.

TK ブランク血漿用動物は群分けを実施しなかった.

群分け方法: 主試験用動物は投与前の血液学的検査又は血液生化学的検査結果から雌雄各1例を除外した後, 毒性試験 (Provantis) システムを用いて下記の群に分配した.

群	雄		雌	
	動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	1	EX1M01	1	EX1F01
低用量群	1	EX2M01	1	EX2F01
中用量群	1	EX3M01	1	EX3F01
高用量群	1	EX4M01	1	EX4F01

非供試動物の取扱い:

群分け時の残余動物: 雌雄各1例を投与開始日に試験から除外し, 試験施設の管理とした.

9.9 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	媒体	0	0	2
低用量群	SR-0379	1	0.5	2
中用量群	SR-0379	3	1.5	2
高用量群	SR-0379	10	5	2

TK ブランク血漿用動物には投与を実施しなかった。

9.10 投与量設定理由

ラットにSR-0379を1, 10及び100 mg/kg/dayを皮下投与した際の血漿中濃度推移を検討した結果, 10 mg/kg/day及び100 mg/kg/dayにて血漿中SR-0379濃度を検出できたことから^{2),3)}, 10 mg/kg/dayを最高用量とし, 公比3で除した3 mg/kg/day及び1 mg/kg/dayを設定した。

9.11 投与

9.11.1 投与経路

投与経路: 皮下投与

選択理由: 臨床適用経路は, 創傷部位に経皮投与することを計画している。SR-0379をラットに50 µg/bodyの投与量で単回経皮投与した際, 血漿中SR-0379濃度は定量下限未満であったことから, 経皮投与の代替投与経路として皮下投与を選択した。

9.11.2 投与方法

投与方法: 10 mLの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プレイ製品)を用いて頸背部皮下に投与した。

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。

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。

9.11.3 投与回数

投与回数: 1日1回

投与時刻: 9:00~12:00の間(給餌前)

選択理由: 通常用いられる1日1回とした。

9.11.4 投与期間

投与期間: 1週間(7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1週間を設定した。

9.12 観察及び検査

投与日数は, 投与開始日を投与1日として以降の日を表した。また, 投与1~7日を投与1週として以降の週を表した。さらに, 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た。

9.12.1 一般状態

観察対象:	主試験用動物全例
観察時期:	投与開始前7日から剖検日まで
観察頻度:	投与期間中は1日2回(投与前と投与後1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。

9.12.2 体重

測定対象:	主試験用動物全例
測定時期:	投与開始前7日から剖検前日まで
測定頻度:	
投与開始前:	投与開始前7及び4日
投与期間中:	投与1, 4及び7日
	なお, 投与期間中は投与前, その他の期間は給餌前に測定した。
使用機器:	デジタル台ばかり LDS-150H (株式会社島津製作所)

9.12.3 摂餌量

測定対象:	主試験用動物全例
測定時期:	投与開始前4日から剖検前日まで
測定頻度:	投与開始前4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)

9.12.4 血液学的検査

検査対象:	主試験用動物全例
検査時期:	投与開始前及び投与1週
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:	<ul style="list-style-type: none"> - 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を作製した。

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
平均赤血球色素量	MCH	pg	(HGB/RBC)×10	ADVIA120
平均赤血球色素濃度	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	Diff	%	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	WBC	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

^{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)

9.12.5 血液生化学的検査

- 検査対象: 主試験用動物全例
- 検査時期: 投与開始前及び投与 1 週
- 採血部位: 大腿静脈
- 採血量: 約 3 mL
- 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: 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: 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、病理組織所見確定後に廃棄した。

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
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	OCPC 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

9.12.6 剖検

剖検対象:	主試験用動物全例
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致死させ, 剖検を行った。

9.12.7 器官重量

測定対象:	主試験用動物全例
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:	「9.12.8 病理組織学的検査」の項の表に記載
特記事項:	剖検日に体重を測定 (使用機器は「9.12.2 体重」の項を参照) し, これを基に器官体重比重量を算出した。 左右別に測定した器官は, 左右の合計値も算出した。

9.12.8 病理組織学的検査

検査対象:	主試験用動物全例
-------	----------

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。

腎臓について過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色標本も作製した。

作製したすべての標本について鏡検を実施した。

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)	○	-	○	
胸骨	○	-	○	
胸骨骨髓		-		
大腿骨	○ 左右	-	○ 左	遠位端関節軟骨, 骨幹部
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	
舌下腺	○ 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	PAS 染色標本 (左) も作製
膀胱	○	-	○	

器官・組織	固定	重量測定	標本作製	
			HE 標本	備考
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	○	○	○	体部, 頸部
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	
眼	○ 左右	-	○ 左右	
視神経	○ 左右	-	○ 左右	
涙腺	○ 左右	-	○ 左	
骨格筋 (大腿二頭筋)	○ 左	-	○ 左	
皮膚 (胸部)	○	-	○	
乳腺 (雌のみ)	○	-	○	
皮膚 (投与部位)	○	-	○	
投与部位 (頸背部皮下)	○	-	○	
剖検で異常の認められた器官・組織	○	-	○	

○: 実施

-: 実施しなかった

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

9.12.9 TK測定

採血対象:

被験物質投与群の全例

対照群の動物についても同様に採血した (採取した血液は被験物質投与群のサンプルと同様に処理及び保存し, 送付した)。

採血時期及び採血時間:

投与 1 日:

投与前, 投与後 2, 5, 15, 30 分, 1 及び 2 時間 (7 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)

採血方法:

2.5 mL ポリプロピレン製の注射筒 (滅菌済ディスポーザブル製品) に抗凝固剤 (1.5%EDTA-2K 水溶液^{a)} 0.1 mL) を入れ, インキュベータで乾固させた. その注射筒及び 23 ゲージの注射針 (滅菌済ディスポーザブル製品) を用いて無麻酔で採血した.

	a) EDTA-2K (株式会社同仁化学研究所) 0.150 g を超純水に溶解し、全量を 10 mL として 1.5%EDTA-2K 水溶液を調製した。
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 10000 ×g, 1 分, 4°C) して血漿を得た。血漿はポリプロピレン製チューブに採取し、分注量の 2 分の 1 量 (0.2 mL) の 9%リン酸 (超純水 18.2 mL とリン酸 1.8 mL を混合して調製) を加え、約 30 秒間攪拌して速やかに凍結保存した。
血漿の保存条件:	凍結 (許容範囲: -95°C~-65°C, 実測値: -85.3°C~-82.5°C, 保存期間: 2014 年 1 月 28 日~1 月 30 日)
血漿の保存場所:	フリーザー室の超低温フリーザー
血漿の送付:	すべての血漿サンプルについてサンプル情報 (試験番号, 動物番号, 採血時期, 採血時間及び日付) を表示し、あらかじめ血中濃度測定施設から送付された保存温度記録用のデータロガーとともに凍結状態 (ドライアイス詰め) で積水メディカル株式会社へ送付した。
血漿送付日:	2014 年 1 月 30 日
測定方法:	積水メディカル株式会社にて LC-MS/MS 法により、各採血ポイントにおける血漿中 SR-0379 濃度を測定した。
算出パラメータ:	積水メディカル株式会社にて各動物の最高薬物濃度 (C_{max} , 実測値), 最高薬物濃度到達時間 (T_{max} , 実測値) 及び濃度時間曲線下面積 (AUC_{0-24h}) を算出した。
報告 (Attachment 1) :	積水メディカル株式会社で作成された TK 測定報告書を入手した。

9.12.10 TKブランク血漿の採取

採血対象:	TK ブランク血漿用動物の全例
採血時期:	2014 年 1 月 24 日
採血部位:	大腿静脈
採血量:	各動物約 10 mL (対象動物から得られた血漿の総量として 40 mL 以上)
採血方法:	ポリプロピレン製チューブに、EDTA-2K (株式会社同仁化学研究所) の 15 mg を計り取った。無麻酔状態で、無処置の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プレイ製品) を用いて採血した後、血液は直ちに EDTA-2K 入りチューブに移した。
血液の処理:	採取した血液を入れたポリプロピレン製チューブは、直ちに氷水中に保存し、採血後 30 分以内に遠心分離 (10000 ×g, 1 分, 4°C) して血漿を得た。血漿は全量を混和させた後、ポリプロピレン製チューブ 4 本に小分けし、速やかに凍結保存した。
血漿の保存条件:	凍結 (許容範囲: -95°C~-65°C, 実測値: -85.8°C~-82.5°C, 保存期間: 2014 年 1 月 24 日~1 月 30 日)
血漿の保存場所:	フリーザー室の超低温フリーザー

血漿の送付: サンプル情報（試験番号, TK ブランク血漿である旨）を表示し, TK 測定用サンプルとともに凍結状態（ドライアイス詰め）で血中濃度測定施設へ送付した.

血漿送付日: 2014 年 1 月 30 日

採血後の動物の処理: 採血終了後は速やかに動物管理責任者に移管した.

9.13 統計解析

1 群の例数が 1 例であることから, 統計解析は実施しなかった.

10. 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, 試験評価に影響を及ぼすものではなかった.

- 1) 雌動物の入手時齢については, 試験計画書の記載を主試験用動物にあわせ 3 歳としたが, TK ブランク血漿用動物の雌 1 例が 4 歳であった. TK ブランク血漿用動物はブランク血漿を採取するのみであり, 4 歳のサルと 3 歳のサルで生理学的に意義のある変化があると考えられないことから, 試験に対する影響はないと判断した.
- 2) TK ブランク血漿用動物には試験計画書に規定した餌の他に, 毎日バナナ 1/4 本程度を与えた. これはエンリッチメントのためであったが, 供与されていたものは食品で量もわずかであり, また, 供与に際し皮を除外して与えているため, 得られた血漿に TK ブランク血漿としての品質に影響を与える夾雑物は含まれないと判断した. 以上のことから, 本件に対する対処の必要性はなく, 試験に与える影響もないと判断した.

11. 試験関係資料の保存

保存対象: 試験計画書, 中間報告書及び最終報告書, 生データ, その他の記録文書及び下記の標本類

- 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）

保存期間: 最終報告書提出後 10 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

12. 成績及び考察

12.1 死亡

(Tables 1~2)

雌雄とも死亡は認められなかった.

12.2 一般状態

(Tables 1~2)

雌雄とも 10 mg/kg/day 群では投与 6 日から, 3 mg/kg/day 群では投与 7 日から, 投与部位の肥厚が認められた.

12.3 体重

(Figures 1~2, Tables 3~4)

雌雄いずれも体重推移に、被験物質投与の影響は認められなかった。

12.4 摂餌量

(Tables 5~6)

雌雄とも全例で投与期間中毎日、給餌した全量 (100 g/例/日) を摂餌した。

12.5 血液学的検査

(Tables 7~9)

血液学的検査結果に被験物質投与の影響は認められなかった。

雄では 1 mg/kg/day 以上の群で網赤血球数に、1 mg/kg/day 群で網赤血球比率にそれぞれ高値がみられたが、3 mg/kg/day 以上の群の網赤血球比率は背景値の範囲内であった。

雄の網赤血球の変化は、低用量群である 1 mg/kg/day 群で最も強く発現し、用量に依存した変化ではなかった。また、この変化は雌では認められず、網赤血球数、網赤血球比率とも雌雄を通じて雌の対照群の測定値が最も高値を示した。雌雄いずれも網赤血球数、網赤血球比率の高値を引き起こすと考えられる赤血球系の項目には変化がみられず、髄外造血の好発部位である肝臓や脾臓に髄外造血像は認められなかった。骨髄にも病理組織学的変化はみられなかった。以上のことから、雄にみられた網赤血球数及び網赤血球比率の変化は偶発変化であると判断した。雌には血液学的検査結果に異常は認められなかった。

12.6 血液生化学的検査

(Tables 10~12)

血液生化学的検査の結果、雌雄とも 10 mg/kg/day 群で CK 活性に高値傾向が認められたが、背景値の範囲内であり毒性変化とは考えられなかった。

雄では 3 及び 10 mg/kg/day 群で LD 活性に高値が認められたが、対照群との間に著明な差はなかった。10 mg/kg/day 群では CK 活性に高値傾向がみられたが、カニクイザルの背景値の範囲内の変化であることから、被験物質投与による毒性変化とは判断されなかった。総ビリルビン濃度は 10 mg/kg/day 群で高値を示したが、測定値は投与開始前の 1 mg/kg/day 群においても認められる程度の値であることから、偶発的な測定値と判断した。

雌では 3 mg/kg/day 群の LD 活性が高値を示したが、10 mg/kg/day 群ではみられず、用量に依存しない変化であった。10 mg/kg/day 群では CK 活性に高値傾向がみられたが、カニクイザルの背景値の範囲内の変化であった。

12.7 剖検

(Tables 13~14)

雌雄とも 3 mg/kg/day 以上の群で投与部皮下と筋肉の癒着が認められた。雄の対照群及び雌雄の被験物質投与群では暗赤色巣が認められたが、その面積は雄の対照群では極めて小範囲であり、雌雄の 1 mg/kg/day 群では小範囲で、3 mg/kg/day 以上の群ではほぼ一律に認められた。

12.8 器官重量

(Tables 15~16)

雌雄とも器官重量に被験物質投与の影響は認められなかった。

雄の1及び3 mg/kg/day 群の甲状腺重量及び雌の1 mg/kg/day 群の副腎重量に高値がそれぞれ実重量、体重比重量ともに認められたが、いずれも10 mg/kg/day 群では認められず、用量に依存しない変化であった。

12.9 病理組織学的検査

(Tables 17~18)

投与部位以外の器官・組織には被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。投与部位では雌雄とも1 mg/kg/day 以上の群で出血が認められた。投与部位ではこのほか、炎症細胞の浸潤、筋線維の変性・壊死及び血管炎がみられ、雄の1 mg/kg/day 以上の群、雌の3 mg/kg/day 以上の群ではさらに浮腫が、投与量の増加につれ、フィブリンの沈着や結合組織の増殖も認められた。

被験物質であるSR-0379は、その主たる薬理作用が血管新生作用及び線維芽細胞増殖・遊走作用であることから^{4),5)}、本試験の病理組織学的検査で認められた炎症細胞の浸潤、筋線維の変性・壊死及び血管炎、浮腫、フィブリンの沈着や結合組織の増殖、剖検で認められた筋肉の癒着、一般状態の観察でみられた投与部位の肥厚はいずれも、本薬の薬理作用に起因するものであると推察される。

本被験物質のラット2週間反復皮下投与毒性試験(非GLP)においても、本試験での所見に類似した変化(投与部位での浮腫、炎症性細胞浸潤及び結合組織増殖)が認められたが、これらの所見はSR-0379の薬理作用により、発現したものと考えられている。

一方、投与部皮下の出血は、病理組織学検査において雄では対照群を含めた全群、雌でも1 mg/kg/day 以上の群で認められ、雄の3 mg/kg/day 以上の群、雌でも10 mg/kg/day 群での変化は中等度~強度であった。このうち、対照群にみられた出血は軽度であり、その他の炎症性変化はみられないことから、出血は投与操作によるものと考えられた。剖検ではこの所見に相当する皮下の暗赤色巣が雄の対照群及び雌雄の被験物質投与群で認められたが、その面積は雄の対照群では極めて小範囲であり、雌雄の1 mg/kg/day 群では小範囲で、3 mg/kg/day 以上の群ではほぼ一律に認められた。これらの変化には臨床使用においては起こらない注射針の穿刺といった、反復的な投与部位への物理的刺激に伴う変化が加味されている可能性が考えられるものの、被験物質の投与部位局所に対する作用である可能性が考えられる。

皮下投与は経皮投与に比較して、吸収における大きな障壁となる角質細胞層の透過を必要としないこと、被験物質が組織内に投与されることから、表皮表面からの流失や拭い去りなどにより曝露量が減少する可能性がないこと、皮下の毛細血管に被験物質が吸収されてから先は、皮下と経皮で等しい経路をたどることから、経皮投与よりも被験物質を確実に多量に吸収させ、被験物質の分布、代謝及び排泄について評価し得る成績を得ることができる代替法として、経皮投与による全身曝露による影響を評価するのに最適な経路と考えられる。一方、経皮投与の代替法としての皮下投与には、注射針の穿刺による反復かつ強い刺激と皮下織血管の損傷、血管への吸収以外に投与部位から排除される可能性がないことによる投与物質の皮下への滞留や周辺組織細胞への直接的な取り込みによる影響等、投与部位局所への影響を評価するには障害となる課題が多く、臨床使用時における投与部位局所の変化の推定に寄与する部分は少ないと考えられる。したがって、本試験の目的は被験物質による全身曝露後の毒性を評価することであり、投与経路である経皮投与を行った場合の、被験物質による投与部位局所に対する刺激性及び腐食性等については、皮膚刺激性試験等により別途検討することが必要である。

投与部位以外の器官・組織では雌の3及び10 mg/kg/day 群で胸腺の萎縮が軽度のみみられ

たが、雌のみにみられ、雄では胸腺の萎縮はみられなかったこと、しばしばカニクイザルにみられる程度の変化であることから、偶発的な変化で被験物質投与の影響とは考えられなかった。

このほかの器官・組織にも所見が散見されたが、いずれも自然発生的にしばしば認められる所見であり、被験物質投与による影響ではなかった。

12.10 TK測定

(Attachment 1)

血漿中 SR-0379

投与量 (mg/kg/day)		1		3		10	
性		雄	雌	雄	雌	雄	雌
C _{max} (ng/mL)	投与 1 日	18.4	22.8	161	59.4	418	480
T _{max} (min)	投与 1 日	15	5.0	15	5.0	5.0	5.0
AUC _{0-24h} (ng·h/mL)	投与 1 日	NC	NC	59.3	NC	117	181

NC: Not Calculated

投与量は各用量で3倍及び3.3倍に増加し、低用量と高用量では10倍の比率であるのに対し、各用量間のC_{max}は雄では8.8倍、2.6倍、雌では2.6倍、8.1倍の高値を示し、雌雄とも低用量に比較して高用量では約20倍の高値を示した。

13. 結論

以上の結果、雌雄とも一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査結果に、被験物質投与によると考えられる薬理作用以外の全身性の毒性反応は認められなかったことから、SR-0379の1週間反復皮下投与時の全身に対する最大無毒性量 (NOAEL) は、雌雄とも10 mg/kg/dayと考えられる。

投与部位では、雌雄とも1 mg/kg/day以上の投与群において剖検で暗赤色巣がみられ、病理組織学的検査で出血がみられたことから、SR-0379の1週間反復投与時の投与部位局所における最大無毒性量 (NOAEL) は1 mg/kg/dayを下回ると考えられる。ただし、剖検において認められた暗赤色巣の範囲は雌雄とも1 mg/kg/day群では3 mg/kg/day以上の群よりも小さく、病理組織学検査において認められた出血の程度も雌雄とも1 mg/kg/day群では軽度であったことから、1 mg/kg/day群における影響は明らかに3 mg/kg/day以上の群よりも軽度であった。

14. 文献

- 1) 北野 隆行. SR-0379の0.9%生理食塩水中の分析法バリデーション及び安定性試験. 株式会社JCLバイオアッセイ最終報告書; 2013. 試験番号: JCL12095351. 試験委託者 大阪大学大学院.
- 2) 小松 弘幸. SR-0379をラットに単回皮下投与及び単回静脈内投与した時の血漿中濃度推移. 株式会社シミックバイオリサーチセンター最終報告書. 2014. 試験番号: 13K6752R. 試験委託者 国立大学法人大阪大学大学院連合小児発達学研究科 健康発達医学寄付講座.
- 3) 佐野 友一. SR-0379をラットに皮下投与及び静脈内投与したときの血漿中濃度推移-血漿中濃度測定-. 積水メディカル株式会社最終報告書. 2014. 試験番号: AL-5866-G. 試験委託者 大阪大学大学院.
- 4) Nishikawa T, Nakagami H, Maeda A, Morishita R, Miyazaki N, Ogawa T, *et al.* Development of a novel antimicrobial peptide, AG-30, with angiogenic properties. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 535-46

- 5) Nakagami H, Nishikawa T, Tamura N, Maeda A, Hibino H, Mochizuki M, *et al.* Modification of a novel angiogenic peptide, AG30, for the development of novel therapeutic agents. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 1629-39

