

## 2.8 試験施設

### 2.8.1 名称及び所在地

株式会社L S I メディエンス 鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1

### 2.8.2 試験責任者

大西 康之  
株式会社L S I メディエンス  
創薬支援事業本部 試験研究センター 安全性研究部  
TEL : 0479-46-3461, FAX : 0479-46-7505

### 2.8.3 分担責任者

病理学的検査 : 土谷 稔  
トキシコキネティクス (TK) 測定 : 松元 さなえ

### 2.8.4 試験日程

試験開始 : 2014 年 11 月 5 日

#### 【用量設定予備試験】

動物入荷 : 2014 年 11 月 5 日  
投与 : 2014 年 11 月 12 日  
実験終了 : 2014 年 11 月 13 日

#### 【本試験】

動物入荷 : 2014 年 11 月 12 日  
群分け : 2014 年 11 月 17 日 (雄), 11 月 19 日 (雌)  
投与開始 : 2014 年 11 月 18 日 (雄), 11 月 20 日 (雌)  
TK 採血 (初回投与時) : 2014 年 11 月 18~19 日 (雄),  
2014 年 11 月 20~21 日 (雌)  
TK 採血 (最終回投与時) : 2014 年 12 月 9 日~10 日 (雄),  
2014 年 12 月 11~12 日 (雌)  
投与期間終了時解剖 : 2014 年 12 月 16 日 (雄), 12 月 18 日 (雌)  
試験終了 : 試験責任者署名日

---

TK : トキシコキネティクス

### 2.8.5 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存室に保存する。保存期間は試験終了後 10 年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。なお、コンピュータシステムに格納されたデータについては、株式会社L S I メディエンス 熊本研究所 安全性研究棟 ホストコンピュータ室 (A007) のホストコンピュータ内に保管する。

## 2.8.6 保存する資料

- (1) 試験計画書及び試験計画書変更書
- (2) 被験物質に関する資料
- (3) 使用動物に関する資料
- (4) 試験結果に関する資料
- (5) 標本
- (6) 通信文書等の記録文書
- (7) 最終報告書

## 2.9 試験場所

### 2.9.1 名称及び所在地

株式会社L S I メディエンス 鹿島研究所 静岡分室  
〒411-0902 静岡県駿東郡清水町玉川 23 西川オフィシャルビルディング 201 号室

### 2.9.2 実施項目

病理組織学的検査（鏡検のみ）

### 2.9.3 分担責任者

土谷 稔  
株式会社L S I メディエンス 創薬支援事業本部  
試験研究センター 病理研究部  
TEL / FAX : 055-981-9120

### 2.9.4 試験場所にて発生する資料の保存

試験場所にて発生する資料は、試験施設である鹿島研究所にて2.8.6項に示す資料とともに保存する。保存期間及び保存期間満了後の扱いは2.8.5項に準じる。

## 2.10 その他

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針（株式会社L S I メディエンス 試験研究センター）」に基づき、動物実験委員会審査及び試験研究センター長の承認を得た（承認番号：2014-0586）。

3. 試験責任者署名

表 題： P092・マレイン酸塩のラットにおける4週間間歇静脈内投与毒性試験

試験番号： B140965

試験責任者：

2015 年 3 月 18 日

大西 康之



大西 康之

株式会社LSIメディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター

安全性研究部

#### 4. 要約

P092・マレイン酸塩をラット (CrI: CD (SD), 雌雄各 6 匹/群) に, 0, 0.5, 1 及び 10 mg/kg の用量で, 4 週間間歇静脈内投与 (週 1 回, 尾静脈投与) し, 現れる毒性変化を確認した. 投与速度は 1 mL/kg/分とし, 投与液量は 20 mL/kg とした. 被験物質には溶血性及び血管刺激性があることから, 投与液濃度は, 反復静脈内投与が可能と推察された 0.5 mg/mL を最高濃度とした (用量としては 10 mg/kg). 対照群 (0 mg/kg) には媒体 (生理食塩液) のみを投与した. 投与開始後, 一般状態観察, 体重測定, 摂餌量測定, 及び尿検査を行うとともに, 第 4 回投与 1 週間後に解剖して, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 器官重量測定及び病理学的検査を行った. また, サテライト群 (雌雄各 3 匹/群) を設け, 初回投与時の投与後 5 分, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間, 第 2 回投与前 (初回投与後 7 日), 及び最終回投与の投与前, 投与後 5 分, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間に採血を行って, P092 の血液中濃度を測定した.

その結果, 死亡及び瀕死動物は発現せず, 一般状態観察でも, 一過性の投与部位の暗赤色化が 10 mg/kg の少数例で認められたのみであった. 体重, 摂餌量, 尿検査, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 器官重量及び病理解剖検査では, いずれの用量群にも被験物質投与の影響は認められなかった.

病理組織学的検査では, 10 mg/kg 群の雌雄で胆管上皮の軽微な空胞化, 及び脾臓の濾胞辺縁帯のマクロファージの軽微な空胞化が認められた. また投与部位血管 (尾静脈) では, 血管内膜の増殖及び血管周囲の炎症性細胞浸潤が 10 mg/kg 群の雌雄全例で認められ, 被験物質投与液の刺激性が示唆された. 10 mg/kg 群の雌 1 例では, 尾静脈に軽度の血栓も認められた.

初回投与時の血液中濃度測定では, 雌雄ともに  $C_0$  及び  $AUC_{0-24h}$  は用量増加に伴い増加した.  $t_{1/2}$  は, 0.5 及び 1 mg/kg 群では 20.2~27.1 時間, 10 mg/kg 群では 40.9~57.5 時間であり, 10 mg/kg 群では延長する傾向がみられた.  $C_0$  及び  $AUC_{0-24h}$  ともに, 雄の方が雌よりも高値を示していた. 投与された P092 は投与 7 日後でも血液中から検出され, また反復投与により, 10 mg/kg 群では血液中濃度は増加する傾向を示した. 同群の  $t_{1/2}$  は反復投与により延長する傾向がみられたことから, P092 の蓄積性が示唆された.

以上のごとく, P092・マレイン酸塩を静脈内投与した場合, 10 mg/kg では投与部位局所 (静脈) に炎症性変化が惹起されるが, 全身性の重篤な変化は認められなかった. 本試験条件下では, 無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg と結論した. また本試験条件にてより長期間投与を行う場合は, 10 mg/kg よりも低用量で実施する必要があると推察された.

## 5. 材料及び方法

### 5.1 被験物質

#### 5.1.1 名称

P092・マレイン酸塩

#### 5.1.2 ロット番号

FA5QJ-QG

#### 5.1.3 換算係数（フリー体）

1.493

#### 5.1.4 性状

白色の粉末

#### 5.1.5 提供者

国立大学法人岐阜大学

#### 5.1.6 保存条件

冷蔵（実測値：3.9～6.3℃，許容範囲：1℃～10℃），遮光，密封（窒素封入）

## 5.2 媒体

### 5.2.1 名称

局方生理食塩液（株式会社大塚製薬工場，ロット番号：4G9P，K4G80）

## 5.3 投与液

### 5.3.1 調製方法及び頻度

被験物質投与液は，以下の手順で投与当日に調製した．調製は紫外線をカットした蛍光灯下で行った．

- (1) P092・マレイン酸塩をフリー体換算した後，正確に秤量した．
- (2) 媒体を加え，スターラーで攪拌しつつ溶解させた．
- (3) 0.22 $\mu$ m のフィルターでろ過，滅菌した．
- (4) 滅菌済みの器具を用いて，クリーンベンチ下で高濃度液を希釈した．
- (5) 各濃度液の一部を分取し，pH を測定し，記録した（pH 4.37～5.45）．

## 5.4 試験動物

### 5.4.1 動物種

ラット

#### 5.4.2 系統

CrI:CD(SD)

#### 5.4.3 系統選択の理由

げっ歯類を用いた毒性試験に広く使用されており、背景データが豊富である。

#### 5.4.4 微生物レベル

SPF

#### 5.4.5 供給源

日本チャールス・リバー株式会社

#### 5.4.6 購入時週齢

5 週齢

#### 5.4.7 購入動物数及び性別

【用量設定予備試験】

雌 6 匹

【本試験】

主試験群： 雌雄各 29 匹

TK サテライト群： 雌雄各 11 匹

#### 5.4.8 検疫・馴化

##### 5.4.8.1 検疫

【用量設定予備試験】

検疫期間は動物入荷後 5 日間とした。検疫期間には以下の検査を行い、異常のないことを確認した。なお、検査方法は 5.10 項に従った。

- ・一般状態観察（1 日 1 回）
- ・体重測定（動物入荷時及び検疫終了時）

【本試験】

主試験群及び TK サテライト群の動物は同一日に別々に入荷した。検疫期間は動物入荷後 5 日間とした。検疫期間には以下の検査を行い、異常のないことを確認した。なお、検査方法は 5.10 項に従った。

- ・一般状態観察（1 日 1 回）
- ・体重測定（動物入荷時及び検疫終了時）

#### 5.4.8.2 馴化

##### 【用量設定予備試験】

馴化期間は動物入荷から投与前日までとした。検疫期間終了後の馴化期間中に以下の検査を行った。なお、検査方法は5.10項に従った。

- ・一般状態観察（1日1回）

##### 【本試験】

馴化期間は動物入荷から投与開始前日までとした。検疫期間終了後の馴化期間中に以下の検査を行った。なお、検査方法は5.10項に従った。

- ・一般状態観察（1日1回）
- ・体重測定（群分け日）

#### 5.4.9 投与開始時週齢

6週齢

#### 5.4.10 投与開始時体重

##### 【用量設定予備試験】

規定しなかった。

##### 【本試験】

投与開始時の体重範囲は、雌雄それぞれ全例の平均体重±20%以内とした。

#### 5.4.11 動物選抜及び群分け

##### 【用量設定予備試験】

(1) 実施日

投与当日

(2) 動物選抜

検疫・馴化期間中の検査の結果、異常動物は認められなかったことから、動物番号の若い順に5匹選抜した。

(3) 動物の振り分け

低用量から動物番号の若い順に各用量に振り分けた。

##### 【本試験】

(1) 実施日

投与開始の前日

主試験群及びTK サテライト群の動物は、同一日に別々に群分けを行った。

(2) 動物選抜

検疫・馴化期間中の検査の結果に基づいて、試験に供する動物を選抜した。

### (3) 動物の振り分け

群分け日の体重に基づいて、体重層別化無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ均一になるように動物を振り分けた。主試験群として雌雄各 24 匹，TK サテライト群として雌雄各 9 匹を使用した。

#### 5.4.12 動物の識別

##### 【用量設定予備試験】

個体識別は尾に油性ペンで付した番号（動物番号末尾 1 桁）により行った。

動物番号：79001～79006

##### 【本試験】

個体識別は以下により行った。なお、主試験群と TK サテライト群は、油性ペンの色を変えて区別した。

群分け前：尾に油性ペンで付した番号（群分け前の動物番号末尾 1 あるいは 2 桁）

群分け後：イヤープンチ

群分け前の動物番号は以下の通りとする。

主試験群：                  雄 19001～19029，雌 59001～59029

TK サテライト群：          雄 29001～29011，雌 69001～69011

#### 5.4.13 余剰動物の取扱

余剰動物は投与開始日に試験から除外した。除外した動物は、チオペンタールナトリウム（ラボナル<sup>®</sup>，田辺三菱製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し，安楽死させた。

### 5.5 飼育環境

#### 5.5.1 飼育室

ラット・マウス飼育室（予備試験：4125 及び 2121 室，本試験：4156 室）

#### 5.5.2 飼育環境

##### 5.5.2.1 温度

実測値：21.2～24.3℃，許容範囲：19.0℃～25.0℃

##### 5.5.2.2 相対湿度

実測値：45.6～65.1%，許容範囲：35.0%～75.0%

##### 5.5.2.3 換気

6～20 回／時，オールフレッシュエア供給



#### 5.5.2.4 照明時間

12 時間／日 (7:00～19:00) 点灯

#### 5.5.3 飼育器材

##### 5.5.3.1 ケージ

ステンレス製つり下げ型金網ケージ (173W×295D×180H mm, トキワ科学器械株式会社)

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：

【用量設定予備試験】：投与日

【本試験】：群分け日, 投与開始後は2週間に1回以上

##### 5.5.3.2 給餌器

固型用ステンレス製給餌器 (トキワ科学器械株式会社)

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度： ケージ交換時

##### 5.5.3.3 給水装置

自動給水装置 (トキワ科学器械株式会社)

なお, 本試験における 20 時間尿採取中はオートクレーブ滅菌したポリカーボネート製給水瓶 (トキワ科学器械株式会社) を使用した。

自動給水配管内の滞留水は1日2回, オートフラッシュシステムにより排出した。

##### 5.5.3.4 架台

ステンレス製架台 (トキワ科学器械株式会社, 自動給水装置付)

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度： ケージ交換時

##### 5.5.3.5 糞尿トレイ

アルミニウム製トレイ (トキワ科学器械株式会社)

実験動物用床敷 (ベータチップ, 日本チャールス・リバー株式会社) を敷いて架台上 (ケージの下) に設置した。

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌 (床敷含む)

交換頻度：

【用量設定予備試験】：投与日

【本試験】： 群分け日, その後は投与開始日から週1回以上

##### 5.5.3.6 エンリッチメント

動物福祉向上のために, オートクレーブ滅菌した玩具 (アルミナボール) を使用した。

使用前滅菌： オートクレーブ滅菌

交換頻度： ケージ交換時

#### 5.5.4 収容動物数

1匹/ケージ

#### 5.5.5 飼料

##### 5.5.5.1 種類

実験動物用固型飼料（CR-LPF，ロット番号：140521，140619，オリエンタル酵母工業株式会社，放射線滅菌済み）

##### 5.5.5.2 給餌法

自由摂取

ただし，本試験における以下の期間は給餌しなかった。

- ・新鮮尿採取時
- ・計画解剖前日の夕方（17:00）から解剖までの期間

飼料は群分け日とその後は投与開始日から1週間に1回以上の頻度で新しいものと交換した。

##### 5.5.5.3 汚染物質の確認

飼料の供給元から分析結果を入手し，使用したロットの残留農薬等の汚染物質濃度が，試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

#### 5.5.6 飲用水

##### 5.5.6.1 種類

5 μm フィルター濾過後，紫外線照射した水道水

##### 5.5.6.2 給水法

自由摂取

ただし，新鮮尿採取中は給水しなかった。

##### 5.5.6.3 分析

外部施設にて水質検査を定期的（2回/年）に実施し，その分析値が試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

#### 5.6 投与

##### 5.6.1 投与経路・方法

静脈内投与

尾静脈よりシリンジポンプ（テルモ株式会社），ディスポーザルシリンジ及び注射針を用いて，およそ1 mL/kg/分の投与速度で投与した。

### 5.6.2 投与経路の選択理由

臨床適用経路に準じた。

### 5.6.3 投与方法の選択理由

被験物質を正確に投与できる。

### 5.6.4 投与液量

20 mL/kg

各個体の投与液量は投与日に測定した体重に基づいて算出した。

## 5.7 用量設定予備試験

### 5.7.1 試験デザイン

本被験物質は溶血性及び血管刺激性があることから、投与液濃度には限界がある。投与可能な最大濃度を求めるため、0.5, 0.8, 1, 1.5 及び 2.5 mg/mL の濃度液を各 1 匹に投与した。

### 5.7.2 一般状態観察

投与日は 1 日 3 回（投与前及び投与後に 2 回）、その他は 1 日 1 回、毎日観察した。

### 5.7.3 体重測定

体重は電子天秤を用いて、投与日（投与前）及び投与翌日に測定した。

### 5.7.4 血液学的検査

投与の翌日に、以下のとおり採血を行い、血液学的検査及び血液生化学的検査（次項）を行った。

採血部位： 後大静脈

採血量： 約 3 mL（血液生化学的検査用血液を含む）

EDTA 処理： 血液約 0.8 mL を EDTA-2K で抗凝固処理した。

血漿採取： 血液 0.6 mL を 3.2 w/v %クエン酸三ナトリウム水溶液で抗凝固処理後、遠心分離（約 12000×g, 3 分, 約 4°C）して血漿を採取した。

検査項目及び検査方法：

検査項目及び検査方法を下表に示す。PT 及び APTT の測定には血漿を、その他の項目の測定には EDTA 処理血液を用いた。

項目（略号, 単位）	方法
赤血球数 (RBC, $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	シーフローDC 検出法
ヘモグロビン濃度 (HGB, g/dL)	SLS-ヘモグロビン法
ヘマトクリット値 (HCT, %)	赤血球パルス波高値検出法
平均赤血球容積 (MCV, fL)	RBC と HCT より算出
平均赤血球血色素量 (MCH, pg)	RBC と HGB より算出
平均赤血球血色素濃度 (MCHC, g/dL)	HGB と HCT より算出

血小板数 (PLT, $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	シーフローDC 検出法
網赤血球率 (% , $\times 10^9/\text{L}$ )	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法
プロトロンビン時間 (PT, sec)	光散乱検出方式
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT, sec)	光散乱検出方式
白血球数 ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法
白血球百分率及び実数 (% , $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法*

[測定機器] PT 及び APTT : CA-510 (シスメックス株式会社)  
 その他 : XT-2000iV (シスメックス株式会社)

残余検査試料の処理 :

残余の血液は、検査終了後に廃棄した。残余血漿は、約-80°C (許容範囲 : -60°C 以下) のフリーザー内で保存し、試験終了までに廃棄した。

### 5.7.5 血液生化学的検査

前項で採取した血液を用いて、以下の項目について検査した。

血漿採取 : 前項で採取した血液の残りをヘパリンナトリウムで抗凝固処理後、遠心分離 (約 1500×g, 10 分, 約 4°C) して血漿を採取した。

検査項目及び検査方法 :

項目 (略号, 単位)	方法
ASAT (GOT, U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
ALAT (GPT, U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
LDH (U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
CK (U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
総ビリルビン (mg/dL)	酵素法 (BOD 法)

[測定機器] TBA-200FR (株式会社東芝)

残余検査試料の処理 :

残余血漿は、約-80°C (許容範囲 : -60°C 以下) のフリーザー内で保存し、試験終了までに廃棄した。

### 5.7.6 実験終了後動物の処置

投与翌日に、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) の腹腔内投与による麻酔下で、採血後、腹大動脈を切斷、放血して安楽死させた。

### 5.7.7 予備試験の結果

結果を Appendix 13~16 に示す。

2.5 mg/mL 濃度液では、投与翌日の検査で、貧血様の変化 (赤血球数, ヘモグロビン濃度, ヘマトクリット値の低下), 血小板, 白血球数の減少, 及び ASAT の高値が認められ, 強度の溶血が疑われた。投与部位である尾の外観については, 0.8 mg/mL 以上の濃度液では暗色化が認められ, 繰り返しの投与は困難であると考えられた。従って, 本試験 (4 週間間歇投与試験) の最高用量は, 0.5 mg/mL 濃度液を投与した場合の 10 mg/kg とし, 以下 1 及び 0.5 mg/kg

を設定した。

## 5.8 本試験（4週間間歇静脈内投与試験）

### 5.8.1 試験デザイン

上述のごとく、用量設定予備試験の結果から、3用量（0.5, 1及び10 mg/kg）を設定し、週1回、4週間（初回投与日を第1日として、第1, 8, 15, 22日の計4回投与）の間歇投与試験を行った。計画解剖は最終回投与の1週間後（第29日）に行った。

## 5.9 群構成

### 5.9.1 主試験群

被験物質	投与用量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）	
			雄	雌
Control *	0	0	6 (10101~10106)	6 (50101~50106)
P092	0.5	0.025	6 (10201~10206)	6 (50201~50206)
P092	1	0.05	6 (10301~10306)	6 (50301~50306)
P092	10	0.5	6 (10401~10406)	6 (50401~50406)

\* 媒体（生理食塩液）投与

### 5.9.2 TKサテライト群

被験物質	投与用量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）	
			雄	雌
P092	0.5	0.025	3 (20101~20103)	3 (60101~60103)
P092	1	0.05	3 (20201~20203)	3 (60201~60203)
P092	10	0.5	3 (20301~20303)	3 (60301~60303)

## 5.10 観察・検査項目

主試験群の全生存例について下記の項目を検査した。TK サテライト群については、一般状態観察及び体重測定を同様に実施したが、得られたデータは毒性評価からは除外した（Appendix 10, 11）。

日及び週の表記については、投与開始日を第1日、第1~7日を第1週とした。

### 5.10.1 一般状態

投与開始日から解剖日まで毎日観察した。観察頻度を以下に示す。

投与日： 1日2回（投与前、投与後）

その他の期間：1日1回（午前中、動物入荷日は午後）

### 5.10.2 体重

体重は電子天秤を用いて、次の日程に測定した。投与日は投与前に測定した。

投与期間： 投与開始日（第1日）、第8、15、22及び28日

計画解剖日（第29日）には、器官相対重量（対体重比）算出のために体重を測定した。

### 5.10.3 摂餌量

飼料の風袋込み重量は電子天秤を用いて、次の日程に従って測定した。

投与期間： 第1～8、8～15、15～22、及び22～27日

各測定日間の重量差からその期間の1日平均摂餌量を算出した。

### 5.10.4 尿検査

尿検査は、主試験群全例について実施した。

#### (1) 検査時期

投与期間： 第4週

#### (2) 検査試料採取

代謝ケージ（トキワ科学器械株式会社、オートクレーブ滅菌済み）を用いて以下の通り尿を採取した。

新鮮尿： 検査日の午前中（投与前）に新鮮尿（最長3時間の蓄積尿）を採取した。新鮮尿採取時は動物に飼料及び飲用水を与えなかった。

20時間尿： 新鮮尿採取日の午後（投与後、13:00前後）から翌朝（9:00前後）までの約20時間、蓄尿した。20時間尿採取中は動物に飼料及び飲用水を与えた。

#### (3) 検査項目及び検査方法

検査項目及び検査方法を下表に示す。試験紙法検査及び尿沈渣の観察は新鮮尿を用いて、その他の検査は20時間尿を用いて行った。

項目（略号、単位）	方法
pH	試験紙法（マルティスティックス*）
蛋白	試験紙法（マルティスティックス*）
グルコース	試験紙法（マルティスティックス*）
ケトン体	試験紙法（マルティスティックス*）
ビリルビン	試験紙法（マルティスティックス*）
潜血	試験紙法（マルティスティックス*）
尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検 [遠心分離条件：約 500×g, 5 分間, 室温]
比重	屈折法
尿量	メスシリンダーで測定
ナトリウム (Na, mmol)	イオン選択電極法

項目 (略号, 単位)	方 法
カリウム (K, mmol)	イオン選択電極法
クロール (Cl, mmol)	イオン選択電極法

\* : シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社

[測定機器] 試験紙法 : クリニテック 500 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社)  
 比重 : ユリコン-JE (株式会社アタゴ)  
 電解質 : TBA-200FR (株式会社東芝)

#### (4) 残余検査試料の処理

電解質 (Na, K 及び Cl) の検査に用いた尿の残余は, 約-80°C (許容範囲 : -60°C 以下) のフリーザー内で保存し, 試験終了までに廃棄した. その他の残余の尿は検査終了後に廃棄した.

### 5.10.5 血液学的検査

#### (1) 検査時期

計画解剖時 (第 29 日)

#### (2) 検査試料採取

以下の通り採血及び血液処理を行い, 検査試料を得た.

採血前絶食 : 一晩 (採血前日のおおよそ 17:00~解剖時まで)

採血時麻酔 : 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, 腹腔内投与)

採血部位 : 後大静脈

採血量 : 約 4~5 mL (血液生化学的検査用血液を含む)

EDTA 処理 : 血液約 0.8 mL を EDTA-2K で抗凝固処理した.

血漿採取 : 血液 0.6 mL を 3.2 w/v %クエン酸三ナトリウム水溶液で抗凝固処理後, 遠心分離 (約 12000×g, 3 分間, 約 4°C) して血漿を採取した.

#### (3) 検査項目及び検査方法

検査項目及び検査方法を下表に示す. PT 及び APTT の測定には血漿を, その他の項目の測定には EDTA 処理血液を用いた.

項目 (略号, 単位)	方法
赤血球数 (RBC, $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	シーフローDC 検出法
ヘモグロビン濃度 (HGB, g/dL)	SLS-ヘモグロビン法
ヘマトクリット値 (HCT, %)	赤血球パルス波高値検出法
平均赤血球容積 (MCV, fL)	RBC と HCT より算出
平均赤血球色素量 (MCH, pg)	RBC と HGB より算出
平均赤血球色素濃度 (MCHC, g/dL)	HGB と HCT より算出
血小板数 (PLT, $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	シーフローDC 検出法
網赤血球率 (%)	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法
プロトロンビン時間 (PT, sec)	光散乱検出方式
活性化部分トロンボプラスチン時間	光散乱検出方式

(APTT, sec)	
白血球数 (WBC, $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法
白血球百分率及び実数 (% , $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法*
[測定機器]	PT 及び APTT : CA-510 (シスメックス株式会社)
	その他 : XT-2000iV (シスメックス株式会社)

## (4) 残余検査試料の処理

残余血液及び血漿は検査終了後に廃棄した。

**5.10.6 血液生化学的検査**

## (1) 検査時期

計画解剖時 (第 29 日)

## (2) 検査試料採取

使用血液 : 血液学的検査の項で採取した血液の一部

血清採取 : 血液約 2~3mL を室温で約 30~60 分間放置した後, 遠心分離 (約 1500×g, 10 分間, 約 4°C) して血清を採取した。

血漿採取 : 血液約 0.6 mL をヘパリンリチウムで抗凝固処理後, 遠心分離 (約 12000×g, 3 分間, 約 4°C) して血漿を採取した。

## (3) 検査項目及び検査方法

検査項目及び検査方法を下表に示す。LDH 及び CK 測定には血漿を, その他の検査には血清を用いた。

項目 (略号, 単位)	方法
ASAT (GOT, U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
ALAT (GPT, U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
LDH (U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
$\gamma$ GT (U/L)	L- $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法 (JSCC 改良法)
ALP (U/L)	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (JSCC 改良法)
CK (U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
総ビリルビン (mg/dL)	酵素法 (BOD 法)
尿素窒素 (mg/dL)	酵素-UV 法 (Urease-LEDH 法)
クレアチニン (mg/dL)	酵素法 (Creatininase-POD 法)
グルコース (mg/dL)	酵素法 (HK-G6PDH 法)
総コレステロール (mg/dL)	酵素法 (CO-HMMPS 法)
リン脂質 (mg/dL)	酵素法 (COD-DAOS 法)
トリグリセライド (mg/dL)	酵素法 (GPO-HMMPS 法, グリセリン消去法)
総蛋白 (g/dL)	Biuret 法
蛋白分画 (%及び g/dL)	アガロース電気泳動法及び総蛋白より算出
A/G 比	アガロース電気泳動法
カルシウム (mg/dL)	OCPC 法
無機リン (mg/dL)	酵素法 (PNP-XOD-POD 法)
ナトリウム (Na, mmol/L)	イオン選択電極法



カリウム (K, mmol/L)	イオン選択電極法
クロール (Cl, mmol/L)	イオン選択電極法
[測定機器] 蛋白分画及び A/G 比 : Epalyzer 2 (株式会社ヘレナ研究所)	
その他 : TBA-200FR (株式会社東芝)	

#### (4) 残余検査試料の処理

残余の血清及び血漿は、約-80°C（許容範囲：-60°C 以下）のフリーザー内で保存し、試験終了までに廃棄した。

### 5.10.7 病理学的検査

#### 5.10.7.1 検査対象器官・組織

下表に従い、採材及び検査を行った。

器官・組織	採材 側性	器官重量 側性	病理組織検査 側性
心臓	○ -	○ -	○ -
リンパ節	下顎	- -	○ -
	腸間膜	- -	○ -
	鼠径	- -	○ 片側
胸腺	○ -	○ -	○ -
脾臓	○ -	○ -	○ -
気管	○ -	- -	○ -
肺/気管支	○ -	○ -	○ -
舌	○ -	- -	○ -
食道	○ -	- -	○ -
胃	○ -	- -	○ -
十二指腸	○ -	- -	○ -
空腸	○ -	- -	○ -
回腸	パイエル板を含む ○ -	- -	○ -
盲腸	○ -	- -	○ -
結腸	○ -	- -	○ -
直腸	○ -	- -	○ -
唾液腺	耳下腺	- -	○ 片側
	顎下腺/舌下腺	○ 左右合計	○ 片側
肝臓	○ -	○ -	○ -
膵臓	○ -	- -	○ -
腎臓	○ 両側	○ 左右合計	○ 片側
膀胱	○ -	- -	○ -
精巣	○ 両側	○ 左右合計	○ 片側
精巣上体	○ 両側	- -	○ 片側
精囊	○ -	- -	○ -
前立腺	腹葉 ○ -	○ -	○ -
下垂体	○ -	○ -	○ -
甲状腺/上皮小体	○ 両側	○ 左右合計	○ 片側
副腎	○ 両側	○ 左右合計	○ 片側
大腿骨/骨髄	○ 片側	- -	○ 片側
胸骨/骨髄	○ -	- -	○ -
皮膚/乳腺	○ -	- -	○ -

器官・組織	採材 側性	器官重量 側性	病理組織検査 側性
眼球/視神経/ハーダー腺	○ 両側	- -	○ 片側
脳	○ -	○ -	○ -
脊髄	頸部	- -	○ -
	胸部	- -	- -
	腰部	- -	- -
卵巣	○ 両側	○ 左右合計	○ 両側
子宮	○ -	- -	○ -
膣	○ -	- -	○ -
大動脈	胸部	○ -	○ -
骨格筋/坐骨神経	大腿部	○ 片側	○ 片側
投与部位	○ -	- -	○ -
その他肉眼的異常のみられた器官/組織	○ -	- -	○ -

○：採材，検査対象；-：検査対象外または側性の区別なし

### 5.10.7.2 病理解剖検査

計画解剖動物は第 29 日に解剖した。

主試験群の全例について、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）の腹腔内投与による麻酔下で、腹大動脈を切断・放血して安楽死させた後に剖検した。

### 5.10.7.3 器官重量

計画解剖時に 5.10.7.1 項に示した器官・組織の重量を測定した。

両側性の器官については左右まとめて測定した。下垂体及び甲状腺/上皮小体はホルマリン固定後に測定した。また、解剖日の最終体重に基づいて相対重量（対体重比）を算出した。

### 5.10.7.4 病理組織学的検査

#### (1) 器官・組織の採材及び保存

全動物について、5.10.7.1 項に示した器官・組織を採取した。採取した器官・組織を 10 vol% リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣はブアン液で、眼球、ハーダー腺及び視神経はダビドソン液で固定後、10 vol% リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。

#### (2) 標本作製及び鏡検

投与期間終了時に採取した雌雄全例の器官・組織、並びに対照群を含む全動物の肉眼的異常部位のみられた器官・組織について、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本作製した。なお、標本作製は以下の施設において実施した。

#### 【標本作製施設】

株式会社 バイオ病理研究所

〒873-0511 大分県国東市国東町小原 1200-2

TEL：0978-72-0454，FAX：0978-72-2320

ホルマリン浸漬標本，パラフィンブロック，ヘマトキシリン・エオジン染色標本，標本作製

の記録及び標本の引渡し書類を標本作製施設から入手し、まず対照群と高用量群の器官・組織について鏡検した。鏡検の結果、高用量群の雌雄の肝臓、脾臓及び投与部位で被験物質投与の影響が疑われたため、他の用量群の当該器官・組織も検査した。鏡検は試験場所にて実施した。

## 5.11 トキシコキネティクス (TK) 測定

### 5.11.1 採血

TK サテライト群の動物から無麻酔下で以下の通り採血して、血液 (TK 測定試料) を得た。

#### (1) 採血時点

初回 (第 1 回) 投与時: 投与後 (投与終了後) 5 分, 1, 2, 4, 8, 24 時間

第 2 回投与時: 投与前

最終回 (第 4 回) 投与時: 投与前並びに投与後 5 分, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間

#### (2) 採血方法

採血量: 約 0.24 mL/時点

採血部位: 鎖骨下静脈

抗凝固剤: ヘパリン (ナトリウム塩) (ヘパリン加注射筒にて採血)

採取容器: ポリプロピレン製チューブ

採取した血液は、採血後直ちに採取容器に入れて氷冷し、その後約 $-80^{\circ}\text{C}$  (実測値:  $-84.2\sim-86.4^{\circ}\text{C}$ , 許容範囲:  $-60^{\circ}\text{C}$  以下) で保存した。

#### (3) 採血終了後動物の処理

採血終了後の動物は、第 29 日に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) の腹腔内投与による麻酔下で、腹大動脈を切断・放血して安楽死させた。剖検は行わなかった。

## 5.11.2 血液中 P092 濃度の測定方法

### 5.11.2.1 測定対象標準物質

被験物質 (5.1 項) を使用した。

### 5.11.2.2 内標準物質 (IS)

名称: Boc-Met-Leu-Phe-OH

ロット番号: 1052898

製造元: BACHEM

安定性の確認: 実施しない。クロマトグラム上において、P092 溶出位置に定量を妨害する夾雑ピークを与えないことを分析日毎に確認した。

取扱上の注意: 保護具 (ゴム手袋, 眼鏡及びマスク) 着用

### 5.11.2.3 ブランクマトリックス

<血液>

動物種：	CrI:CD (SD)ラット
投与歴：	なし
抗凝固剤：	ヘパリンナトリウム
入手先：	日本チャールス・リバー株式会社
保存条件：	約-20°C（許容範囲：-40~-15°C）

#### 5.11.2.4 試薬

試薬類は市販の特級以上の試薬を使用した。

水は超純水製造装置（MILLI-Q Integral 5, メルク株式会社）で精製したものをを用いた。

#### 5.11.2.5 P092 標準試料溶液の調製

P092・マレイン酸塩を 14.9 mg（フリー体換算値）正確に量り、メタノールに溶解し、全量を 50 mL とした（200 µg/mL）（ガラス製メスフラスコを使用）。溶解の際、超音波処理を実施した。この溶液を P092 標準試料原液（SS）とし、次表に従ってメタノールで順次希釈し、以下の標準試料溶液を調製した。

P092 標準試料原液及び溶液はポリプロピレン（PP）製容器にて冷蔵・遮光保存（実測値：4.1～6.2°C，許容範囲：1～10°C）し、使用期限は調製後 97 日間とした。使用時は室温に戻した。

標準試料溶液 略称	標準試料溶液濃度 (ng/mL)	使用標準試料溶液 略称	使用量 (µL)*	メタノール 添加量(µL)*
WS-40000	40000	SS	200	800
WS-4000	4000	WS-40000	100	900
WS-1000	1000	WS-4000	250	750
WS-800	800	WS-4000	200	800
WS-500	500	WS-1000	500	500
WS-200	200	WS-1000	200	800
WS-100	100	WS-500	200	800
WS-50	50	WS-500	100	900
WS-20	20	WS-200	100	900
WS-10	10	WS-100	100	900
WS-5	5	WS-50	100	900

\*：マイクロピペットを使用

#### 5.11.2.6 IS試料溶液の調製

IS を 5 mg 正確に量り、メタノールに溶解、全量を 50 mL として IS 試料原液（100 µg/mL）を調製した（ガラス製メスフラスコを使用）。この溶液を IS 試料原液（ISSS）とし、次表に従ってメタノールで希釈して IS 試料溶液（500 ng/mL, ISWS）を調製した。

IS 試料原液及び溶液は褐色ガラス製容器にて冷蔵・遮光保存（実測値：4.1～6.2°C，許容範囲：1～10°C）した。使用時は室温に戻した。