

22. 試験計画書の作成及び承認

試験計画書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

年 月 日

林 亜耶

試験計画書の承認

運営管理者 株式会社新日本科学 安全性研究所

年 月 日

平井 照正

試験計画書の承認

株式会社新日本科学 安全性研究所より提示された試験計画書を承認します。

試験委託者 国立循環器病研究センター研究所

年 月 日

斯波 真理子

試験計画書

表題： HsPCSK9-1131AM(14)のラットにおける13週間間歇皮下投与毒性試験及び13週間回復性試験

試験番号： SBL000-000

試験責任者： 松下 聡紀

株式会社新日本科学 安全性研究所

目 次

1. 表題	56
2. 試験目的	56
3. 適用規則	56
4. 動物福祉	56
5. 試験委託者	56
6. 試験モニター	56
7. 試験施設	56
8. 試験場所（トキシコキネティクス測定：TK 測定）	57
9. 試験関係者	57
10. 試験日程	57
11. 被験物質及び対照物質（媒体）	58
11.1 被験物質	58
11.2 対照物質（媒体）	59
12. 被験物質調製液	59
13. 被験物質及び対照物質の投与	59
14. 試験系	60
15. 飼育条件	60
16. 動物の識別法	61
17. 馴化	61
18. 動物の群分け	62
19. 試験群構成	62
20. 投与量設定の根拠	62
21. 観察及び検査項目	62
21.1 一般状態	62
21.2 一般症状及び行動	63
21.3 体重	63
21.4 摂餌量	64
21.5 眼科的検査	64
21.6 尿検査	65
21.7 血液学的検査	66
21.8 血液生化学的検査	67
21.9 病理学的検査	68
21.9.1 剖検	69
21.9.2 器官重量（絶対及び相対重量）	70
21.9.3 病理組織学的検査	70
21.9.4 凍結臓器サンプルの採取	70
21.10 トキシコキネティクス	71
22. 統計学的手法	71
23. 試験成績の報告	72
24. 記録，資料，試料及び標本の保存	73
25. 試験計画書の変更	74
26. 文献	74
27. 試験計画書の作成及び承認	75

別添 A

調製液中の濃度測定方法.....総ページ〇枚

(別添 4)

Study No. SBL000-000

別添 B

TK 測定計画書 総ページ〇枚

1. 表題

HsPCSK9-1131AM(14)のラットにおける 13 週間間歇皮下投与毒性試験及び 13 週間回復性試験

2. 試験目的

HsPCSK9-1131AM(14)をラットに週 1 回、13 週間 (計 14 回) 間歇皮下投与したときの毒性変化を調べるとともに、13 週間の休薬期間を設け、その回復性についても検討する。安全性薬理試験の中枢系評価項目である Irwin 変法による評価も本毒性試験に組み込んで実施する。また、そのときの全身的曝露についても評価する。

3. 適用規則

本試験は、以下の GLP を遵守し、ガイドラインに準拠して実施する。

- ・ 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」(平成 9 年 3 月 26 日、一部改正 厚生労働省令第 114 号 平成 20 年 6 月 13 日)
- ・ 「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」(平成 11 年 4 月 5 日医薬審第 655 号厚生省医薬安全局審査管理課長通知)
- ・ 「トキシコキネティクス (毒性試験における全身的曝露の評価) に関するガイダンスについて」(平成 8 年 7 月 2 日薬審第 443 号厚生省薬務局審査課長通知)

4. 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 IACUC000-000)、当研究所の動物実験規程に従って実施する。なお、試験施設は AAALAC International により認証されている。

5. 試験委託者

国立循環器病研究センター研究所

〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

TEL : 06-6833-5012

FAX : 06-6835-2533

委託責任者 :

斯波 真理子

E-mail : mshiba@ncvc.go.jp

6. 試験モニター

大阪大学大学院薬学研究科 附属創薬センター 核酸医薬評価科学プロジェクト

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1 丁目 6 番

TEL : 06-6879-8145

委託担当者 :

小林 直之

E-mail : t-kobayashi@phs.osaka-u.ac.jp

7. 試験施設

株式会社新日本科学 安全性研究所 (SNBL DSR)

(別添 4)

Study No. SBL000-000

〒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

運営管理者 :

平井 照正

e-mail : hirai-terumasa@snbl.co.jp

8. 試験場所 (トキシコキネティクス測定 : TK 測定)

株式会社新日本科学 薬物代謝分析センター

〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 16 番地 1

TEL : 073-483-8881

FAX : 073-483-7377

試験場所管理責任者 :

鵜藤 雅裕

e-mail : uto-masahiro@snbl.co.jp

9. 試験関係者

試験責任者 :

松下 聡紀

被験物質取扱い責任者 :

後日記載

分析責任者

被験物質分析 :

後日記載

動物実験担当責任者 :

後日記載

臨床検査責任者 :

後日記載

剖検責任者 :

後日記載

病理検査責任者 :

後日記載

統計解析責任者 :

橋口 晃一

試験主任者 (TK 測定) :

後日記載

株式会社新日本科学 薬物代謝分析センター

〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 16 番地 1

TEL : 073-483-8881

FAX : 073-483-7377

e-mail : xxx-xxx@snbl.co.jp

10. 試験日程

投与開始前日を-1 日目, 1 回目投与日を投与 0 日目, 14 回目投与日の翌日を休薬 0 日目,
投与開始週及び休薬開始週をそれぞれ投与及び休薬 1 週目と起算する。

試験開始日 :

年 月 日

検疫馴化開始日 :

年 月 日

検疫終了日 :

年 月 日

(雄)

(雌)

馴化終了日/群分け日 :

年 月 日

年 月 日

(別添 4)

Study No. SBL000-000

1 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
2 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
3 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
4 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
5 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
6 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
7 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
8 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
9 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
10 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
11 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
12 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
13 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
14 回目投与日 :	年 月 日	年 月 日
休薬開始日 :	年 月 日	年 月 日
休薬終了日 :	年 月 日	年 月 日
剖検日		
投与期間終了時 :	年 月 日	年 月 日
休薬期間終了時 :	年 月 日	年 月 日
最終報告書草案作成日 :	年 月 日	
最終報告書作成日 / 試験終了日 :	年 月 日	

11. 被験物質及び対照物質 (媒体)

(SOP : TSB/002, TSB/004, BIO/023)

11.1 被験物質

名称 :	HsPCSK9-1131AM(14)
提供者 :	後日記載
ロット番号 :	後日記載
特性	
含量 :	後日記載
物理的性状 :	後日記載
安定性 :	後日記載
入手日 :	年 月 日
入手量 :	後日記載
保存条件 :	後日記載
保存場所 :	被験物質保管所内 _____ 室 (許容範囲 : __ ~ __ °C)

取扱い： マスク、キャップ、手袋及び保護眼鏡を着用する。
 保存用被験物質： 後日記載
 残余被験物質： すべて試験委託者に返却する。

11.2 対照物質（媒体）

名称： 後日記載
 調製方法： 後日記載
 保存条件： 被験物質調製液と同じ保存条件
 保存場所： 被験物質調製液と同じ保存場所
 濃度確認： 投与 1 及び 14 回目に使用する媒体について____法にて確認する。適合基準は、被験物質のピークが認められないこととする。方法の詳細については別添 A に記載する。

12. 被験物質調製液

(SOP : TSB/004, BIO/023)

調製濃度： 後日記載
 換算係数： 後日記載
 調製方法： 後日記載
 安定性： 後日記載
 調製頻度： 安定性の確認された範囲内で調製及び使用する。
 保存条件： 後日記載
 保存場所： 被験物質保管所内____室（許容範囲：__～__℃）
 濃度確認： 投与 1 及び 14 回目に使用する調製液について____法にて確認する。適合範囲は、目標濃度±10.0%以内とする。方法の詳細については別添 A に記載する。

13. 被験物質及び対照物質の投与

(SOP : GTX/373)

投与経路： 背部皮下
 投与経路の選択理由： 臨床適用経路に従う。
 投与方法： ディスポーザブル注射筒及び注射針を用いて背部皮下に投与する。
 投与方法の選択理由： ラットの皮下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： 週 1 回、13 週間投与（計 14 回投与）
 投与回数及び投与期間の選択理由： 医薬品毒性試験法ガイドラインに従う。
 投与容量： 後日記載

(別添 4)

Study No. SBL000-000

投与液量は、最新の体重を基に個別に算出する。

投与時刻： 08：30～13：30

14. 試験系

種： ラット
系統： CrI:CD(SD)

体重

繁殖生産者出荷時： 雄__ ～ __g, 雌__ ～ __g

検疫馴化開始時： 雄__ ～ __g, 雌__ ～ __g

週齢

検疫馴化開始時： ○週齢

投与開始時： ○週齢

入手日： 年 月 日

入手動物数

毒性試験群： 雄 44 匹, 雌 44 匹 計 88 匹

サテライト群： 雄 13 匹, 雌 13 匹 計 26 匹

使用動物数

毒性試験群： 雄 40 匹, 雌 40 匹 計 80 匹

サテライト群： 雄 12 匹, 雌 12 匹 計 24 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： 毒性試験に用いるげっ歯類の動物種の一つとしてラットが使用されており、株式会社新日本科学はラットの背景データが豊富にあるため。

15. 飼育条件

(SOP : GTX/189, GTX/310, GTX/541, HTL/303)

飼育室： ○○号室

温度： 許容範囲 19～25℃

湿度： 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

(検査, 観察あるいは採血のため上記の照明時間以外に点灯/消灯する場合を除く)

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, オリエンタル酵母工業株式会社) を自由に与える。ただし, 4 時間以内の新鮮尿採取時及び剖検前日 (17:00~19:00 より) は絶食とする。使用する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する。
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る。ただし, 4 時間以内の新鮮尿及び 16 時間蓄尿採取時には給水瓶を使用する。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する。
環境エンリッチメント :	おもちゃを常時供与する。
床敷 :	パルマス μ (株式会社 天然素材探索研究所) を用いる。
清掃及び消毒 :	床を毎日清掃及び消毒する。 ケージ及び床敷は週 1 回以上, 給餌器及び架台は 4 週に 1 回以上, オートクレーブ滅菌処理 (121°C, 30 分間) 済みのものと交換する。
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する。

16. 動物の識別法

(SOP : GTX/502)

個体 :	検疫馴化期間中は色素塗布法 (ハイマッキー, ゼブラ株式会社) で ACN (Acclimation Number) により識別する。群分け以降は耳パンチ法で動物番号により識別する。
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する。群分け以降は試験番号, 群, 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する。

17. 馴化

(SOP : GTX/371)

動物は検疫馴化開始日に毒性試験群 (雄 44 匹, 雌 44 匹) 及びサテライト群 (雄 13 匹, 雌 13 匹) に無作為に振り分ける。その後, 7 日間の検疫馴化を行い, 雌についてはさらに 1 日間馴化する。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, 「20. 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については群分けに用いず, 1 回目投与日の翌日に, 炭酸ガス吸入法で安楽死させる。

18. 動物の群分け

(SOP : GTX/153)

検疫馴化終了日に毒性試験群及びサテライト群の動物については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（安全性試験システム MiTOX システム、三井造船システム技研株式会社）によって群分けする。

群分け時の余剰動物については、1 回目投与日の翌日に炭酸ガス吸入法で安楽死させる。

19. 試験群構成

毒性試験群：対照群 1 群，被験物質群 2 群

群	被験物質及び 対照物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	剖検時 期	動物数（動物番号）	
						雄	雌
1	対照物質	-	後日記載	-	ERC EDA	5 (1~52) 10 (6~15)	5 (15~20) 10 (21~30)
2	HsPCSK9-1131AM(14)	後日記載	後日記載	後日記載	EDA	10 (31~40)	10 (41~50)
3	HsPCSK9-1131AM(14)	後日記載	後日記載	後日記載	ERC EDA	5 (51~55) 10 (56~56)	5 (66~70) 10 (71~80)

EDA：投与期間終了時

ERC：休薬期間終了時

サテライト群：対照群 1 群，被験物質群 2 群

群	被験物質及び 対照物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）	
					雄	雌
4	対照物質	-	後日記載	-	4 (69~72)	4 (73~76)
5	HsPCSK9-1131AM(14)	後日記載	後日記載	後日記載	4 (77~80)	4 (81~84)
6	HsPCSK9-1131AM(14)	後日記載	後日記載	後日記載	4 (85~88)	4 (89~92)

20. 投与量設定の根拠

4 週間反復投与毒性試験の結果から設定する。

21. 観察及び検査項目

サテライト群については、一般状態観察、体重測定及びトキシコキネティクスのみ実施し、最終報告書にはトキシコキネティクスのみを反映させる。

21.1 一般状態

(SOP : GTX/151, GTX/374)

例数： 全例

観察頻度

毒性試験群

検疫馴化期間中： 毎日 1 回以上
 投与期間中
 投与日： 2 回以上（投与前，投与終了後約 1 時間）
 非投与日： 毎日 1 回以上
 休薬期間中： 毎日 1 回以上
 剖検日： 1 回
 サテライト群： 毎日 1 回以上（投与期間中は投与前）
 観察方法： 生死の確認とあわせて一般状態観察を行う。

21.2 一般症状及び行動

(SOP : PHA/001)

例数： 毒性試験群各群雌雄各 6 例（動物番号の小さい方から実施する）
 観察ポイント： 投与 13 週目に 1 回（投与前）
 観察方法： 一般症状及び行動は Irwin 法¹⁾の変法に従って観察する。観察項目は以下に示す。評価項目にない症状が発現した場合は、その症状を記録する。

観察項目
姿勢，自発運動，眼瞼閉鎖状態，眼球突出，呼吸，振戦， 攣縮，痙攣，立毛，発声，排尿/脱糞，驚き反応，いらだち， 皮膚色，体温下降，瞳孔径，流涙，流涎，腹筋緊張度， 四肢筋緊張度，覚醒状態，よろめき歩行，異常歩行， 四肢の位置，挙尾反応，視覚による位置認識，触覚反応， カタレプシー，握力，耳介反射，角膜反射，受動性， 同側屈筋反射，正向反射，痛覚反応

21.3 体重

(SOP : GTX/377)

例数： 全例

測定時期

毒性試験群

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： 各投与日に実施（投与前）
 休薬期間中： 1 週間に 1 回
 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）
 サテライト群
 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： 各投与日に実施（投与前）
測定方法： 電子天秤（GX-4000，株式会社エー・アンド・デイ）で測定する。毒性試験群については測定時ごとの体重の増加量も求める。

21.4 摂餌量

(SOP : GTX/375)

例数： 毒性試験群全例
測定時期
検疫馴化期間中： -2日目に1回
投与期間中： 各投与日に実施（午後）
休薬期間中： 1週間に1回
測定方法： 給餌量を電子天秤（GX-4000，株式会社エー・アンド・デイ）で測定し，その翌日に残余量を測定して1日あたりの摂餌量を算出する。

21.5 眼科的検査

(SOP : GTX/248)

例数：
検疫馴化期間中： 毒性試験群全例
投与及び休薬期間中： 毒性試験群全例
ただし，額带式双眼倒像検眼鏡を用いた検査は，毒性試験群各群雌雄各5例（動物番号の小さい方から実施する）
検査時期
検疫馴化期間中： 1回
投与期間中： 投与13週目に1回
休薬期間中： 休薬13週目に1回
検査方法： ペンライトあるいはポータブルスリットランプ（SL-15，興和株式会社）を用いて肉眼及び対光反射検査を実施する。散瞳剤（ミドリンP点眼液，参天製薬株式会社）の点眼後にポータブルスリットランプ（SL-15，興和株式会社）を用いて前眼部及び中間透光体，額带式双眼倒像検眼鏡（ID-10，株式会社トプコンあるいはIO- α Small Pupil，株式会社ナイツ）を用いて眼底を検査する。
写真撮影： 眼底に異常が認められた場合は手持ち眼底カメラ（GENESIS-Df，興和株式会社）を用いて写真撮影を行う。

21.6 尿検査

(SOP : GTX/378, HTL/005, HTL/008, HTL/012, HTL/120, HTL/227, HTL/253)

例数 : 毒性試験群各群雌雄各 5 例 (動物番号の小さい方から実施する)

検査時期

投与期間中 : 投与 13 週目に 1 回

休薬期間中 : 休薬 13 週目に 1 回

採尿方法 : 午前中に代謝ケージを用いて 4 時間以内の尿を採取して新鮮尿による検査を行う。また, 代謝ケージを用いて 17 : 00 前後から翌朝までの 16 時間蓄尿を採取して蓄尿による検査を行う。採尿日に JCA-BM6070 を用いる測定が出来ない場合は, 超低温フリーザー (許容範囲 : -70°C 以下) で凍結後に測定を実施する。

検査項目及び方法 : 次の表に示す。

新鮮尿による検査

検査項目	単位	測定方法	機種
色調	-	肉眼による	-
pH	-	試験紙法	Clinitek 500 ^{a)}
蛋白	-	試験紙法	
ブドウ糖	-	試験紙法	
ケトン体	-	試験紙法	
ビリルビン	-	試験紙法	
尿潜血	-	試験紙法	
ウロビリノーゲン	-	試験紙法	
尿沈渣 ^{b)}	-	Sternheimer-Malbin 染色後鏡検	-

c) 自動尿分析器 (Kimball Electronics Wales Ltd.)

d) 検査項目 : 赤血球, 白血球, 上皮細胞, 結晶, 細菌, 精子 (雄のみ), 円柱及びその他

蓄尿による検査

検査項目	単位	測定方法	機種
尿量	mL	メスシリンダー使用	-
尿比重	-	尿比重屈折計法	ユリコン-JE ^{c)}
ナトリウム	mEq/L, mEq ^{d)}	電極法	JCA-BM6070 ^{e)}
カリウム	mEq/L, mEq ^{d)}	電極法	
塩素	mEq/L, mEq ^{d)}	電極法	

e) 尿比重屈折計 (株式会社アタゴ)

f) 総排泄量については尿量と濃度から算出し, 総排泄量のみを評価に用いる。

g) 自動分析装置 (日本電子株式会社)

21.7 血液学的検査

(SOP : GTX/381, HTL/034, HTL/196, HTL/225)

例数 : 毒性試験群全例

検査時期 : 各剖検時

瀕死例は可能な限り実施する。

採血量 : 約 2.5 mL

採血方法 : 剖検のための麻酔下で後大静脈腹部から採血する。ADVIA120を用いる測定項目に約 1 mL 採血し, EDTA-2K で抗凝固処理した全血を使用する。CA-7000 を用いる測定項目には, 3.8 w/v% クエン酸ナトリウム溶液を 150 μ L 添加した注射筒を用いて約 1.5 mL 採血し, 遠心分離 (室温, 1710 \times g, 3000 rpm, 10 分間) して得られた血漿を使用する。

血液塗抹標本 : ライト染色を施した血液塗抹標本を作製する。検査を実施しない場合は試験終了までに廃棄する。

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
赤血球	10 ⁶ / μ L	2角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120 ^{a)}
白血球	10 ³ / μ L	2角度レーザーフローサイトメトリー法	
ヘマトクリット	%	計算式 : (平均赤血球容積 \times 赤血球) / 10	
ヘモグロビン	g/dL	シアンメトヘモグロビン変法	
血小板	10 ³ / μ L	2角度レーザーフローサイトメトリー法	
平均赤血球容積	fL	2角度レーザーフローサイトメトリー法	
平均赤血球ヘモグロビン量	pg	計算式 : (ヘモグロビン / 赤血球) \times 10	
平均赤血球ヘモグロビン濃度	g/dL	計算式 : [ヘモグロビン / (赤血球 \times 平均赤血球容積)] \times 1000	
網赤血球	%	RNA 染色法による レーザーフローサイトメトリー法	
白血球分類 ^{b)}	10 ³ / μ L, %	ペルオキシダーゼ染色による フローサイトメトリー法及び 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	s	凝固法	CA-7000 ^{c)}
活性化部分トロンボプラスチン時間	s	凝固法	

- h) 総合血液学検査装置 (Siemens Healthcare Diagnostics Manufacturing Ltd.)
 i) 検査項目：好酸球，好塩基球，好中球，単球，リンパ球及び大型非染色細胞
 各検査項目については，絶対数及び比率を計測し，絶対数のみを評価に用いる。
 j) 全自動血液凝固測定装置 (シスメックス株式会社)

21.8 血液生化学的検査

(SOP : GTX/381, HTL/182, HTL/253)

- 例数： 毒性試験群全例
 検査時期： 剖検時
 瀕死例は可能な限り実施する。
 採血量： 約 2 mL 以上
 採血方法： 血液学的検査のための採血後，腹大動脈から採血し，室温で 20～60 分間静置後，遠心分離 (室温，1710×g，3000 rpm，10 分間) して得られた血清，あるいは測定まで超低温フリーザー (許容範囲：-70°C 以下) で凍結保存した血清を用いる。
 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 ^{a)}
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	
クレアチンキナーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
総ビリルビン	mg/dL	バナジン酸酸化法	
総蛋白	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	-
グロブリン	g/dL	計算式：総蛋白-アルブミン	
総コレステロール	mg/dL	COD・HMMPS 法	JCA-BM6070 ^{a)}
トリグリセリド	mg/dL	GPO・HMMPS 法，グリセリン消去法	
ブドウ糖	mg/dL	ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法	
尿素窒素	mg/dL	ウレアーゼ・GIDH 法	
クレアチニン	mg/dL	クレアチニナーゼ・HMMPS 法	
無機リン	mg/dL	PNP・XDH 法	
カルシウム	mg/dL	MXB 法	
ナトリウム	mEq/L	電極法	

検査項目	単位	測定方法	機種
カリウム	mEq/L	電極法	
塩素	mEq/L	電極法	
蛋白分画 ^{b)}	%	電気泳動法	AES320 ^{c)}

k) 自動分析装置 (日本電子株式会社)

l) 検査項目: アルブミン比率, α_1 -グロブリン比率, α_2 -グロブリン比率, β -グロブリン比率, γ -グロブリン比率, A/G 比

m) 自動電気泳動分析装置 (ベックマン・コールター株式会社)

21.9 病理学的検査

病理学的検査器官及び組織一覧表

器官及び組織名	器官重量	固定	病理組織学的検査 (標本作製及び検査)
気管	-	○	○
肺 (気管支を含む)	左	○	○
	右		○
舌	-	○	○
顎下腺/単孔舌下腺	左	○	○
	右	○	○
食道	胸部	-	○
胃	前胃	-	○
	腺胃	-	○
小腸	十二指腸	-	○
	空腸	-	○
	回腸	-	○
パイエル板 (回腸)	-		○
大腸	盲腸	-	○
	結腸	-	○
	直腸	-	○
脾臓	-	○	○
肝臓	○	○	○
大動脈	胸部	-	○
心臓	○	○	○
腎臓	左	○	○
	右	○	○
膀胱	-	○	○
精巣	左	○	○
	右	○	○
精巣上部	左	○	○
	右	○	○
前立腺	○	○	○
精嚢	左	○	○
	右		-
卵巣	左	○	○
	右	○	○
子宮	左	○	○
	右		-

器官及び組織名	器官重量	固定	病理組織学的検査 (標本作製及び検査)	
腔	-	○	○	
脳	大脳	○	○	
	小脳			
	橋			
	延髄			
脊髄	胸部	-	○	○
坐骨神経	左	-	○	○
	右	-	○	-
胸骨／胸骨骨髓	-	○	○	
大腿骨／大腿骨骨髓	左	-	○	○
	右	-	○	-
顎下リンパ節	左	-	○	○
	右	-	○	-
腸間膜リンパ節	-	○	○	
脾臓	○	○	○	
胸腺	○	○	○	
下垂体	○	○	○	
甲状腺／上皮小体	左	○	○	○
	右	○	○	○
副腎	左	○	○	○
	右	○	○	○
眼球／視神経	左	-	○	○
	右	-	○	○
涙腺	左	-	○	○
	右	-	○	○
ハーダー腺	左	-	○	○
	右	-	○	○
骨格筋（大腿四頭筋）	左	-	○	○
	右	-	○	-
乳腺／皮膚（腹部）	左	-	○	○ ^{a)}
	右	-	○	-
皮膚（背部） ^{b)}	-	○	○	
投与部位（背部皮下）	-	○	○	
肉眼的異常部位	-	○	○	

○：実施する

-：実施しない

a) 乳腺は雌のみ

b) 肩甲間部

21.9.1 剖検

(SOP : GTX/125, PAT/053, PAT/095)

例数： 毒性試験群全例

検査時期

死亡例： 発見後速やかに実施する。

瀕死例： 試験責任者の判断により，速やかに実施する。

生存例： 投与あるいは休薬期間終了の翌日

検査方法

(別添 4)

Study No. SBL000-000

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する。
瀕死例及び生存例： 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する。

21.9.2 器官重量（絶対及び相対重量）

（SOP：PAT/011）

例数： 毒性試験群全例
測定方法： 病理学的検査器官及び組織一覧表に示す器官について，電子天秤（HR-200，株式会社エー・アンド・デイ）を用いて測定する。さらに，剖検時の体重から 100 g あたりの相対重量を算出する。左右個別に測定した器官については，左右の合計値も算出する。

21.9.3 病理組織学的検査

（SOP：PAT/032，PAT/070）

検査器官及び組織： 病理学的検査器官及び組織一覧表に示す。

固定

例数： 毒性試験群全例
方法： 眼球及び視神経は 3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン混合液，精巣は Formalin-Sucrose-Acetic acid（FSA）液，その他の器官及び組織は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定する。気管，胸骨及び大腿骨はカルキトックス（和光純薬工業株式会社）で脱灰を行う。

標本作製

例数： 毒性試験群の対照群及び高用量群全例の全ての器官及び組織
方法： 切り出し後，パラフィン包埋及び薄切を行い，HE 染色を施す。

検査

例数： 毒性試験群の対照群及び高用量群全例の全ての器官及び組織
方法： 病理組織学的に検査する。

21.9.4 凍結臓器サンプルの採取

（SOP：PAT/054）

器官及び組織： 肝臓，腎臓
例数： 毒性試験群全例（死亡例は除く）
採取頻度： 各剖検時
瀕死例については，可能な限り採取する。

採取方法： 各臓器の重量を測定後、肝臓、腎臓のそれぞれ一部（約__g）を採取する。採取した臓器は、直ちに液体窒素で凍結させ、超低温フリーザー（許容範囲：-70°C 以下）で保存する。凍結肝臓サンプルは、試験終了までに試験から除外し、委託者に送付する。

21.10 トキシコキネティクス

(SOP : GTX/381, HTL/501, HTL/513)

例数： サテライト群全例

採血ポイント

1 回目投与日： 6 時点

14 回目投与日： 7 時点

採血量： 後日記載

採血方法： 大腿静脈からヘパリンナトリウム加注射筒を用いて採血する。血液は速やかに氷冷した後、遠心分離（4°C, 1700×g, 5 分間）し、得られた血漿は超低温フリーザー（許容範囲：-70°C 以下）で凍結保存する。

サテライト群の動物は最終の採血終了後に炭酸ガス吸入法で安楽死させる。

測定対象物質： 後日記載

測定対象物質の血漿中での安定性：

後日記載

測定： 後日記載

パラメータ： 最高血漿中濃度 (C_{max}) , 最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) , 血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-h}) を個体別に算出する。なお、対照群についてはパラメータを算出しない。

残余サンプル： 試験終了までに廃棄する。

TK 測定報告書： 試験主任者 (TK 測定) が作成した TK 測定報告書の写しを入手する。

22. 統計学的手法

(SOP : CPU/105)

各毒性試験群の体重、摂餌量、尿検査 [定量データ (電解質濃度を除く)] , 血液学的検査 (白血球分類の比率を除く) , 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う。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、それぞれ対照群と被験物質各群との間で多重比較を行う。尿検査の評価段階付きのデ