

1 要約

雄性サルに ^{14}C で標識した TM5509 を 5 mg/kg, 20 mg/kg, 80 mg/kg 及び 300 mg/kg の用量で経口投与した際の胆汁中への排泄について検討し、以下の結果を得た。

1. 胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 5 mg/kg の用量で経口投与した際、投与後 48 時間までの胆汁中排泄率は投与量の 44.7%であり、同時に採取した尿及び糞中には投与後 48 時間までにそれぞれ投与量の 4.2%及び 7.1%が排泄された。投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率は投与量の 56.0%であった。
2. 胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 20 mg/kg の用量で経口投与した際、投与後 48 時間までの胆汁中排泄率は投与量の 41.9%であり、同時に採取した尿及び糞中には投与後 48 時間までにそれぞれ投与量の 7.5%及び 13.0%が排泄された。投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率は投与量の 62.4%であった。
3. 胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 80 mg/kg の用量で経口投与した際、投与後 48 時間までの胆汁中排泄率は投与量の 43.2%であり、同時に採取した尿及び糞中には投与後 48 時間までにそれぞれ投与量の 7.0%及び 14.9%が排泄された。投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率は投与量の 65.1%であった。
4. 胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 300 mg/kg の用量で経口投与した際、投与後 48 時間までの胆汁中排泄率は投与量の 41.1%であり、同時に採取した尿及び糞中には投与後 48 時間までにそれぞれ投与量の 8.1%及び 27.2%が排泄された。投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率は投与量の 76.5%であった。

2 試験目的

^{14}C で標識した TM5509 (以降 ^{14}C -TM5509 と略す) を用いて以下の試験を実施し、サルにおける TM5509 の体内動態を明らかにした。

試験項目

- Exp.1 標識被験物質の純度検定
- Exp.2 胆汁中排泄率の測定

3 試験条件

3.1 標識被験物質

^{14}C -TM5509 は、SMD にて合成して当該試験に使用した。なお、残余の ^{14}C -TM5509 は SMD で保存する。

- Lot No. : CP-3974
- 比放射能 : 6.16 MBq/mg
- 保存形態 : 固体
- 保存条件 : 遮光下, 窒素ガス置換, 冷凍 (設定温度: -80°C , 許容範囲: $-90\sim-70^{\circ}\text{C}$)
- 保存場所 : 第 1 実験棟 102 室, 第 4 実験棟 4314 室超低温フリーザー内
- 入手量 : 333 MBq
- 入手日 : 2012 年 11 月 8 日

3.2 非標識被験物質

TM5509 は試験委託者より提供を受けたものを使用した。なお、残余の TM5509 は試験終了後廃棄する。

- Lot No. : TMC-001
- 保存条件 : 気密容器, 遮光下, 冷蔵 (設定温度: 4°C , 許容範囲: $1\sim-10^{\circ}\text{C}$)
- 保存場所 : 第 1 実験棟 108 室, 第 4 実験棟 4314 室冷蔵庫内
- 入手量 : 5 g 及び 2 g
- 入手日 : 2013 年 9 月 25 日及び 2013 年 10 月 16 日

3.3 試験系

3.3.1 試験動物

動物種	性別	投与時年齢	投与時体重範囲
カニクイサル	雄性	3～5	3.1～4.9 kg
使用数	13		
予備動物 (余剰動物) 数	1		
供給元及び本社所在地	ハムリー株式会社 茨城県古河市尾崎 2638-2		

3.3.2 動物種を選択理由

安全性評価に使用する動物種に合わせた。

3.4 試験系の環境条件

3.4.1 飼育環境条件

飼育室	B 棟飼育室	第3 実験棟試験室
設定温度	20℃～26℃	
設定湿度	35%～75%	
照明	明暗サイクル 12 時間 (6 : 00～18 : 00)	
空調方式	オールフレッシュエアー	
ケージ 収容匹数 及び 収容時期	<B 棟サル飼育室> 680W×670D×770H (mm) のブラケット式飼育ケージ (積水メディカル型, トキワ科学器械) ; 個別収容 <第3 実験棟 4 階試験室> 600W×600D×910H (mm) のサル用ステンレス製代謝ケージ (積水メディカル型, トキワ科学器械) ; 個別収容	

3.4.2 検収, 検疫及び順化

購入した動物は, 以下に従い検収, 検疫及び順化を実施した。実施期間中, 動物に異常は認められなかった。

項目	内容	期間
検収 (B 棟試験室)	一般状態の観察及び体重測定	入手当日に実施した。
検疫 (B 棟試験室)	一般状態の観察 (1 日 1 回) 及び 体重測定 (検疫終了日)	検収日の翌日を 1 日目とし, 7 日間以上実施した。 ただし, 試験開始以前に購入 した動物の検疫期間は順化 前の 7 日間とした。
順化 (第3 実験棟試験室)	一般状態の観察 (1 日 1 回)	検疫後 5 日間以上実施した。

なお, 検収, 検疫及び順化の期間を予備飼育期間とした。予備飼育期間は 14 日間以上実施した。

3.4.3 動物及びケージの識別方法

3.4.3.1 動物の識別

胸部に施された入れ墨により、個体番号を識別した。

3.4.3.2 ケージの識別

検収から割り付けまでは管理番号、供給元、動物種、性別、入荷日、入れ墨番号等を記載したカードをケージに付けた。割り付け後は試験名、試験番号、動物番号、群番号、試験項目番号及び入れ墨番号等を記載したカードをケージに付けた。

3.4.4 試験動物の割り付け

第3実験棟試験室搬入時に、一部の動物に脱毛がみられた以外、一般状態に異常は認められなかった。投与当日に体重を測定し、指定体重範囲であることを確認後、動物を割り付けた。割り付けには試験データ処理システム (ADMEDAMS Ver.2.02, 日立ハイテクソリューションズ) を用いた。なお、余剰となった予備動物1匹は動物管理へ返却した。

3.4.5 試験時の症状観察

投与後の症状観察は、1日1回、最終試料採取時まで行った。その結果、300 mg/kg 投与群において、胆汁の色が通常より薄い色であり、同時に採取した糞は全匹とも軟便で、さらに3匹中2匹においては白色便が認められた。300 mg/kg 投与群以外の動物には投与後において異常は認められなかった。

3.4.6 飼料及び水の供給

3.4.6.1 飼料

市販のサル用飼料 (Certified Primate Diet #5048, PMI Nutrition International) を使用し、1日1回、13時頃に約160 gを与えた。飼料ロット毎に栄養学的組成及び微生物による汚染に関するデータと化学物質による汚染に関するデータを納入業者から入手し、それぞれに異常がないことを確認した。

3.4.6.2 水

公営水道水を使用し、B棟では自動給水で行い、第3実験棟では給水瓶で与え、水は毎日交換した。

3.4.7 動物倫理

当試験は動物の取扱い等について、SMDの実験動物委員会の審査を受け、運営責任者の承認を受けて試験を実施した。以下に関連法令を示した。

- 1) 「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年法律第105号, 平成23年8月改正)
- 2) 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日, 環境省告示第88号)
- 3) 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日, 科発第0601005号)
- 4) 日本学術会議が作成した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(平成18年6月)
- 5) 「動物の殺処分方法に関する指針」(平成7年7月4日, 総理府告示第40号)
- 6) その他の法令等

3.5 投与液の調製及び投与方法

3.5.1 投与液調製用媒体

試薬名	規格	Lot No.	製造元	保存条件
カルボキシメチルセルロース ナトリウム (CMC-Na)	化学用	STE4236	和光純薬工業	室温
注射用水	日本薬局方	2J95N 3D84N	大塚製薬工場	室温

上記試薬を用い、0.5%CMC-Na水溶液を調製した。

3.5.2 投与液の調製及び保存

所定量の¹⁴C-TM5509及び非標識TM5509をメノウ乳鉢上に取り、少量の投与液調製用媒体を加えて十分に磨砕したのち、密栓可能な容器に採取した。メノウ乳鉢上に残存する被験物質を投与液調製用媒体で回収して合した。適時、超音波処理してTM5509として5 mg/3.7 MBq/2 mL, 20 mg/1.85 MBq/2 mL, 80 mg/1.85 MBq/2 mL及び300 mg/1.85 MBq/2 mLの懸濁液を用時調製した。調製後、窒素ガス置換下、遮光下、冷蔵庫内で保存した。また、残余の投与液は試験結果を確認したのち、2014年2月5日に廃棄した。

3.5.3 投与液の品質管理

投与液調製直後に投与液を上、中及び下層から各1検体採取し、それぞれの放射能濃度を測定して得られた値と被験物質採取量及び投与液総量とから、投与液中被験物質の比放射能(実測値)を求め、理論値の±10%以内であることを確認した(実測値は理論値の100.6~101.9%)。さらに、投

与液3検体の放射能濃度を測定した際の変動係数 (C.V.) をもとに均一性について調べ、C.V.が5%以内 (実測値 ; 0.3~0.8%) であることを確認した。

3.5.4 投与経路, 投与方法, 給餌条件

投与経路	投与方法	給餌条件
経口投与 (po)	経口カテーテル付きシリンジを用いて、胃内に投与した。ついで、カテーテル内の洗浄を兼ねて、水道水 10 mL を投与した。	投与前に 16 時間以上絶食を行い、投与後 4 時間の試料採取後に給餌を開始した。なお、水は自由摂取とした。

投与放射能を計算するため、投与前後のシリンジ重量を測定し、投与液重量を求めた。

3.5.5 投与経路の選択理由

本薬物の臨床投与経路に基づき、経口投与を採用した。

3.6 投与量及び投与放射能量

3.6.1 投与経路, 投与量, 投与液量, 投与放射能量, 投与回数

投与経路	投与量	投与液量	投与放射能量	投与回数
po	5 mg/kg	2 mL/kg	約 3.7 MBq/kg (Exp.2)	1 回
	20 mg/kg	2 mL/kg	約 1.85 MBq/kg (Exp.2)	
	80 mg/kg	2 mL/kg	約 1.85 MBq/kg (Exp.2)	
	300 mg/kg	2 mL/kg	約 1.85 MBq/kg (Exp.2)	

3.6.2 投与量の設定理由

放射能量の測定感度を考慮し、投与量及び投与放射能量を設定した。

3.7 主な使用機器及び試薬

3.7.1 機器

機器は SMD で維持管理しているものを使用した。

機器名	仕様	製造元	
高速液体 クロマト グラフィー (HPLC) システム	システムコントローラー	SCL-10Avp	島津製作所
	ポンプ	LC-10ADvp	島津製作所
	UV 検出器	SPD-10Avp	島津製作所
	カラムオーブン	CTO-10ACvp	島津製作所
	マニュアルインジェクタ	7725i	Rheodyne LLC
	放射能連続検出器 (RAD)	625TR	PerkinElmer
液体シンチレーションカウンター (LSC)	2500TR, 3100TR, 1900CA	PerkinElmer	
天秤	AG204DR, PM480DR, XS205DU, MX5, MT5, AT460DR	Mettler-Toledo	
	AD-6205	A & D	
超低温フリーザー	CLN シリーズ	日本フリーザー	
冷凍庫	HF シリーズ	ホシザキ電機	
冷蔵庫	HR シリーズ	ホシザキ電機	
冷凍冷蔵庫	453S2	日立アプライアンス	
蒸留水製造装置	RFD シリーズ	アドバンテック東洋	
超音波洗浄器	VS-150	As One	
	NS-80-1.5U	日本精機製作所	
ポリトロンホモジナイザー	PT45-80	キネマチカ	
マイクロピペット	4910 型	Eppendorf AG	
組織溶解装置	積水メディカル型	平野製作所	

機器の許容温度範囲	
冷蔵庫	1°C~10°C
冷凍庫	-30°C~-10°C
超低温フリーザー	-90°C~-70°C

3.7.2 試薬

蒸留水については自家製蒸留水を使用した。

試薬	規格	Lot No.	供給元	保存条件
アセトニトリル	HPLC 用	507H1752 501H1351	関東化学	室温
ギ酸	特級	404N1151	関東化学	室温
メタノール	HPLC 用	507B1160 509B1167	関東化学	室温
	特級	504B1077 502B1160	関東化学	室温
水酸化ナトリウム	特級	408U6006	関東化学	室温
組織溶解剤 SOLUENE-350	-	24-12451	PerkinElmer	室温
シンチレーター HIONIC-FLUOR	-	55-13051 55-13131	PerkinElmer	室温
シンチレーター FLO-SCINT II	-	82-13161	PerkinElmer	室温

4 試験方法

4.1 標識被験物質の純度検定 (Exp.1)

標識被験物質の放射化学的純度を調べ、安定性について検討した。なお、検討期間中の標識被験物質は遮光下、窒素ガス置換下、超低温フリーザーで保存した。

<検定物質>

^{14}C -TM5509

<検定時期>

使用開始 7 日前

最終使用 1 日後

<測定検体数>

各時点1検体

<放射化学的純度検定方法>

所定の検定時期に ^{14}C -TM5509 に 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液/メタノール (1/1, v/v) を加え、超音波処理を行い十分に溶解したのち、5 μL あたり約 50 万 dpm となるように適量の初期移動相で希釈したのち、HPLC 分析を行い、放射能を RAD で検出した。なお、調製した移動相は当日使用した。

<HPLC分析条件>

カラム	:	YMC-Pack ODS-A, 5 μm , 4.6 mm ID \times 150 mm L (YMC)
移動相	:	A) 0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (v/v, 9/1) B) 0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル溶液 (v/v, 1/9)
グラジエント条件	:	Time (min) 0 35 50 50.1 60 B conc.(%) 30 80 80 30 30
流速	:	0.8 mL/min
カラム温度	:	35 $^{\circ}\text{C}$
検出	:	UV 233 nm, Radioactivity (^{14}C)
分析時間	:	60 min
溶解溶媒	:	0.5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液/メタノール (1/1, v/v)

<放射化学的純度及びカラム回収率算出方法>

HPLC 溶出液中の放射能は RAD を用いて測定したのち、分析時間における全計数値に対する¹⁴C-TM5509 溶出部分の計数値の割合を求め、放射化学的純度を算出した。なお、¹⁴C-TM5509 の溶出位置は少量の溶媒で溶解した非標識 TM5509 を分析した HPLC-UV クロマトグラムにより確認した。また、分析時間内に回収された溶出液中の放射エネルギーを測定し、注入放射エネルギーに対する割合を算出し、カラム回収率 (n=1) を求めた。

4.2 胆汁中排泄率の測定 (Exp.2)

投与数日前に塩酸ケタミン、塩酸キシラジン麻酔下にて総胆管内にチューブを挿入し、胆汁を採取できるよう処置した動物を代謝ケージに収めた。疼痛ケアとして、鎮痛薬 buprenorphine (0.005 mg/kg, i.m.) (レペタン注 0.2 mg/mL, 大塚製薬) を 1 日 2 回で 2 日間の計 3 回投与^{*)}した。手術後の動物の一般状態並びに胆管カニューレの詰まりがないこと等を確認して手術後 2 日以降で投与日を決めた。投与当日に体重を測定し¹⁴C-TM5509 を以下の用量で単回投与し、所定時間における胆汁、尿及び糞を採取し、胆汁、尿及び糞中への放射能排泄率を求めた。

最終試料採取後の第1群 (5 mg/kg投与群)、第2群 (20 mg/kg投与群) 及び第3群 (80 mg/kg投与群) の動物はチアミラールナトリウム1 g/body (イソゾール, 日医工) を静脈内注射し、安楽死させた。

なお、第4群 (300 mg/kg投与群) における動物は投与後48時間の胆汁、尿及び糞採取終了後、塩酸ケタミン (ケタラルール, 第一三共プロファーマ), 塩酸キシラジン (セラクタール, バイエル) 麻酔下、腹大動脈よりヘパリンナトリウム処理した容器に全採血して安楽死させ、AE-7287-Gの試験 (組織内分布率の測定) に供した。なお、採取した血液の一部はAE-7287-Gの試験で放射能を測定した。

<術後ケア>

*) : 1 回目投与 ; 手術終了直後, 2 回目投与 ; 1 回目投与から約 6 時間後,

3 回目投与 ; 手術後翌日午前 10 時頃

<試験群及び試験条件>

試験群	投与経路	食餌条件	投与量	投与放射エネルギー	測定試料	使用動物数
第 1 群	po	絶食	5 mg/kg	約 3.7 MBq/kg	胆汁, 尿, 糞, ケージ洗浄液	1 群 3 匹 (計 3 匹)
第 2 群	po	絶食	20 mg/kg	約 1.85 MBq/kg	胆汁, 尿, 糞, ケージ洗浄液	1 群 3 匹 (計 3 匹)
第 3 群	po	絶食	80 mg/kg	約 1.85 MBq/kg	胆汁, 尿, 糞, ケージ洗浄液	1 群 3 匹 (計 3 匹)
第 4 群	po	絶食	300 mg/kg	約 1.85 MBq/kg	胆汁, 尿, 糞, ケージ洗浄液	1 群 3 匹 (計 3 匹)

<採取時間>

胆汁：投与後 0～4, 4～8, 8～24, 24～48 時間

尿：投与後 0～4, 4～8, 8～24, 24～48 時間

糞：投与後 0～24, 24～48 時間

ケージ洗浄液：投与後 48 時間

<放射能測定方法>

胆汁：採取時間毎に採取した胆汁は蒸留水を用いて 1 mL 単位で希釈後、その 0.1 mL を放射能測定用バイアルに採取し (n=1)、シンチレーター-HIONIC-FLUOR を 10 mL 加え、LSC を用いて放射能の計測を行い、得られた値より胆汁中排泄率を算出した。

尿：採取時間毎に少量の蒸留水でケージを洗浄し、1 mL 単位で希釈後、その 0.5 mL を放射能測定用バイアルに採取し (n=1)、シンチレーター-HIONIC-FLUOR を 10 mL 加え、LSC を用いて放射能の計測を行い、得られた値より尿中排泄率を算出した。

糞：採取時間毎に回収した糞に蒸留水を加え 300 mL または 500 mL にした後、ポリトロンホモジナイザーを用いて攪拌均質化した。その 0.5 mL を放射能測定用バイアルに採取し (n=1)、組織溶解剤 SOLUENE-350 を 2 mL 加えて加温振とうして溶解後、シンチレーター-HIONIC-FLUOR を 10 mL 加え、LSC を用いて放射能の計測を行い、得られた値より糞中排泄率を算出した。

ケージ洗浄液：最終時点の試料採取終了後、ケージを水道水で洗浄し、得られた洗浄液は水道水で 10 L とした。攪拌均質化して、その 0.5 mL を放射能測定用バイアルに採取後 (n=1)、シンチレーター HIONIC-FLUOR 10 mL を加え、LSC を用いて放射能の計測を行い、得られた値より放射能のケージ残存率を算出した。

なお、全群の各時点における残余の胆汁試料は、全量を代謝物分析用試料として超低温フリーザー内で凍結保存し、「¹⁴C-TM5509 の薬物動態試験業務 (¹⁴C-TM5509 のサルにおける胆汁中代謝物分析試験) (AE-7246-G)」に供した。

5 試料及びデータの取扱い

5.1 試料の識別及び保存

5.1.1 試料の識別

得られた試料は、容器に試験番号、動物番号、採取時間、試料名、群番号及び試験項目番号等を記入したラベルを貼付して識別した。

5.1.2 試料の保存

生体試料 (尿及び糞ホモジネート) は冷蔵庫内で、動物屍体は冷凍庫内で保存した。放射能測定用バイアルについては、室温で保存した。なお、生体試料、動物屍体 (300 mg/kg 投与群は除く) 及び放射能測定用バイアルは、2014年2月5日に廃棄した。

5.2 放射能の測定方法

5.2.1 放射能の測定

5.2.1.1 LSC

各試料中の放射能はLSCを用いて2分間測定した。なお、計数効率の補正は外部標準線源法により行った。また、検出限界はバックグラウンド値の2倍とした。

測定検体数はn=1とした。

5.2.1.2 RAD

HPLC 溶出液中の放射能は、RADを用いて測定した。HPLC 溶出液にシンチレーターFLO-SCINT IIを移動相の3倍の流速で送液しながら混合し、RADを用いて6秒積算で放射能 (cpm) の計測を行った。また、検出限界はバックグラウンド値の2倍とした。測定検体数はn=1とした。

5.2.2 バックグラウンド値の設定

5.2.2.1 LSC

バックグラウンドは以下の通り測定した。

^{14}C -TM5509の純度検定におけるカラム回収率を求める際は、初期移動相を測定した。

投与液中の放射能を測定する際は、メタノールを測定した。

生体試料中の放射能を測定する際は、薬物投与前の動物より採取した生体試料 (Exp.2; 胆汁, 尿, 糞) を測定した。ケージ洗浄液の放射能を測定する際は水道水を測定した。なお、測定検体数はn=1とし、各試料の調製はExp.2の試験条件に従って行った。

5.2.2.2 RAD

非標識被験物質を HPLC 分析した際の検出値の平均を用いた。

5.3 データ処理

5.3.1 試験成績の表示

5.3.1.1 放射化学的純度及び回収率

各試料中の放射能の計測値より次式に基づき、HPLC 分析では RAD 内蔵の計算処理システム (FLO-ONE) を用いて、放射化学的純度 (%) を算出した。また、HPLC 分析におけるカラム回収率 (%) は次式に基づき、Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft) を用いて算出した。放射化学的純度及びカラム回収率は、それぞれ 1 例とし、小数点第 2 位で四捨五入し、小数点以下 1 桁で表示した。

$$\text{放射化学的純度 (\%)} = \frac{S}{T} \times 100$$

$$\text{カラム回収率 (\%)} = \frac{R}{I} \times 100$$

T : 分析時間における全計数値

S : ^{14}C -TM5509 に相当するピークの計数値

I : HPLC への注入放射エネルギー

R : HPLC より分析時間内に回収された放射エネルギー

5.3.1.2 投与液

投与液の比放射能の C.V. は以下の次式に基づき、試験データ処理システムを用いて算出し、小数点以下 1 桁で表示した。

$$\text{C.V. (\%)} = \frac{\text{投与液中放射能濃度の標準偏差 (SD)}}{\text{投与液中放射能濃度の平均}} \times 100$$

5.3.1.3 排泄率及び残存率

各試料中の放射能の計測値より次式に基づき、試験データ処理システム又は Microsoft Office Excel 2003 を用いて排泄率及び残存率を算出し、3 例の平均値 \pm SD で表示した。排泄率及び残存率はそれぞれ投与放射エネルギーに対する割合 (% of dose) に換算後、小数点第 2 位で四捨五入し、小数点以下 1 桁で表示した。

$$\text{排泄率, 残存率 (\%)} = \frac{D \times T}{A \times S} \times 100$$

D : 測定試料中の放射エネルギー (dpm) T : 測定試料の総量 (mL)

S : 測定試料の採取量 (mL) A : 投与放射エネルギー (dpm)

5.3.2 統計学的解析

当試験では統計学的解析は実施しなかった。

6 再試験及び再測定

5 mg/kg 投与群において、他の 2 匹と比べて No.S1 の胆汁排泄率が低く、胆汁排泄量も少なかった。この原因として胆管カニューレの詰まりが考えられたため、No.S1 のデータは不採用とし、予備動物 (1 匹) に新たに胆汁採取処置を施したのち投与し、そのデータを採用した。

放射能測定試料の再サンプリングあるいは放射能測定用バイアルの再測定は発生しなかった。

また、5 mg/kg、20 mg/kg 及び 80 mg/kg 投与群において、投与後 48 時間までの総排泄率が低かったため、300 mg/kg 投与群を用いた追加試験 (主要組織の分布率測定) を別途試験計画書 (AE-7287-G) を作成し、実施することになった。

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可能性のある事態及び試験計画書に従わなかった事項

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可能性のある事態は発生しなかった。

試験計画書に従わなかった事項は、以下の 3 点が発生したが、試験成績に影響はないと判断した。

- 1) 試験計画書では動物の投与時年齢は 3~4 歳であったが、一部 5 歳に達した動物を用いた。
- 2) ^{14}C -TM5509 の純度検定におけるカラム回収率を求める際のバックグラウンド値は試験計画書に記載がなかったため、初期移動相を測定しその値を用いた。
- 3) 試験計画書では試験データ処理システムを用いて排泄率及び残存率を算出することとなっていたが、一部、Microsoft Office Excel 2003 を用いて算出した。

なお、試験計画書の変更を行い、以下の試験計画書変更書を発行した。

2013 年 10 月 1 日付試験計画書変更書 (No.1)

2013 年 10 月 17 日付試験計画書変更書 (No.2)

2013 年 11 月 28 日付試験計画書変更書 (No.3)

2014 年 2 月 25 日付試験計画書変更書 (No.4)

8 試験結果

8.1 Exp.1 標識被験物質の純度 (Table 1)

^{14}C -TM5509 の使用前及び使用終了後の放射化学的純度は、それぞれ 98.9%及び 99.1%であった。カラム回収率は 95.9%以上であった。

8.2 Exp.2 胆汁中排泄率

8.2.1 5 mg/kg投与群 (Table 2)

胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 5 mg/kg の用量で経口投与した際、胆汁中には投与後 4 時間までに投与量の 4.0%、8 時間までに 12.6%、24 時間までに 32.4%、48 時間までに 44.7% が排泄された。同時に採取した尿及び糞中には投与後 48 時間までにそれぞれ投与量の 4.2%及び 7.1%が排泄された。投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率は投与量の 56.0%であった。また、投与後 48 時間のケージ洗浄液中には投与量の 0.2%が認められた。

8.2.2 20 mg/kg投与群 (Table 3)

胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 20 mg/kg の用量で経口投与した際、胆汁中には投与後 4 時間までに投与量の 0.7%、8 時間までに 6.0%、24 時間までに 26.4%、48 時間までに 41.9%が排泄された。同時に採取した尿及び糞中には投与後 48 時間までにそれぞれ投与量の 7.5%及び 13.0%が排泄された。投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率は投与量の 62.4%であった。また、投与後 48 時間のケージ洗浄液中には投与量の 0.6%が認められた。

8.2.3 80 mg/kg投与群 (Table 4)

胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 80 mg/kg の用量で経口投与した際、胆汁中には投与後 4 時間までに投与量の 5.2%、8 時間までに 14.5%、24 時間までに 33.7%、48 時間までに 43.2%が排泄された。同時に採取した尿及び糞中には投与後 48 時間までにそれぞれ投与量の 7.0%及び 14.9%が排泄された。投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率は投与量の 65.1%であった。また、投与後 48 時間のケージ洗浄液中には投与量の 0.5%が認められた。

8.2.4 300 mg/kg投与群 (Table 5)

胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 300 mg/kg の用量で経口投与した際、胆汁中には投与後 4 時間までに投与量の 2.4%、8 時間までに 11.4%、24 時間までに 27.1%、48 時間までに 41.1%が排泄された。同時に採取した尿及び糞中には投与後 48 時間までにそれぞれ投与量の 8.1%及び 27.2%が排泄された。投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率は投与量の 76.5%であった。また、投与後 48 時間のケージ洗浄液中には投与量の 1.2%が認められた。

9 考察

胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 5 mg/kg の用量で経口投与した際、放射能は緩慢に排泄され、投与後 48 時間までの胆汁中排泄率は投与量の 44.7%、尿中排泄率は 4.7%、糞中排泄率は 7.1% であり、投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率は 56.0% であった。投与後 48 時間までに体外へ排泄された放射能 (投与量の 56.0%) の約 8 割が胆汁中へ排泄され、本薬物は胆汁排泄型と考えられた。また、投与後 48 時間においては投与量の 40% 強が体内に残存していることを考慮すると、TM5509 を 5 mg/kg で経口投与した際の消化管吸収率は良好であり、投与量の約 90% と推察された。

胆管カニューレ処置した雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 20 mg/kg, 80 mg/kg 及び 300 mg/kg の用量で経口投与した際、投与後 48 時間までの胆汁中排泄率はそれぞれ投与量の 41.9%、43.2% 及び 41.1% であり、いずれの投与量群とも 5 mg/kg 投与群の胆汁中排泄率 (投与量の 44.7%) と相違が認められなかった。従って、TM5509 を 5 mg/kg, 20 mg/kg, 80 mg/kg 及び 300 mg/kg の用量で経口投与した際の投与後 48 時間までの胆汁中排泄率に用量依存性は認められず、いずれの投与量群とも投与量の 40% 強が胆汁中へ排泄されることが明らかとなった。また、20 mg/kg, 80 mg/kg 及び 300 mg/kg 投与群の投与後 48 時間までの尿中排泄率 (20 mg/kg が投与量の 7.5%、80 mg/kg が 7.0%、300 mg/kg が 8.1%) 及び投与後 48 時間の胆汁、尿及び糞中総排泄率 (20 mg/kg が投与量の 62.4%、80 mg/kg が 65.1%、300 mg/kg が 76.5%) から求めた体内残存率 (20 mg/kg が投与量の約 38%、80 mg/kg が約 35%、300 mg/kg が約 24%) を考慮すると、20 mg/kg, 80 mg/kg 及び 300 mg/kg の消化管吸収率は概ね投与量の 80% 前後と推察された。

10 資料保存

試験に関する試験記録文書、試験計画書 (正本 1 部)、試験計画書変更書 (正本 1 部)、逸脱記録 (正本 1 部)、交信記録、試験成績に関する記録 (生データ) 及び最終報告書 (正本 1 部) については、SMD が定める資料保存施設にて試験終了後 10 年間保存する。その後の処置については、試験委託者と協議する。

以 上

11 TABLES

Table 1 Radiochemical Purity of ^{14}C -TM5509

Lot No.	Assay date	Radiochemical purity ²⁾ (%)
CP-3974 ¹⁾	2013.10.1	98.9 (100.5)
	2013.11.27	99.1 (95.9)

Storage condition: setting temperature: -80°C

Figures in parentheses are expressed as column recovery (%).

1): Received on 8 November 2012 (specific radioactivity: 6.16 MBq/mg as ^{14}C -TM5509)

2): Determined by HPLC

Table 2 Cumulative excretion of radioactivity in bile, urine and feces after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 5 mg/kg)

Time (h)	Cumulative excretion of radioactivity (% of dose)			
	Bile	Urine	Feces	Total
0 - 4	4.0 ± 1.2	1.2 ± 0.7	–	–
8	12.6 ± 2.7	1.6 ± 0.8	–	–
24	32.4 ± 4.4	3.4 ± 0.9	4.4 ± 1.6	40.1 ± 5.2
48	44.7 ± 5.3	4.2 ± 1.0	7.1 ± 2.2	56.0 ± 5.9
Cage washing (48 h)				0.2 ± 0.1

Data are expressed as the mean values ± SD of three animals.

–: Not determined

Table 3 Cumulative excretion of radioactivity in bile, urine and feces after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 20 mg/kg)

Time (h)	Cumulative excretion of radioactivity (% of dose)			
	Bile	Urine	Feces	Total
0 - 4	0.7 ± 1.2	1.0 ± 0.1	–	–
8	6.0 ± 4.1	2.4 ± 0.3	–	–
24	26.4 ± 10.0	5.7 ± 1.1	8.3 ± 8.1	40.4 ± 8.2
48	41.9 ± 8.2	7.5 ± 1.6	13.0 ± 5.0	62.4 ± 3.6
Cage washing (48 h)				0.6 ± 0.3

Data are expressed as the mean values ± SD of three animals.

–: Not determined