

Table 4 Cumulative excretion of radioactivity in bile, urine and feces after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 80 mg/kg)

Time (h)	Cumulative excretion of radioactivity (% of dose)			
	Bile	Urine	Feces	Total
0 - 4	5.2 ± 4.5	1.1 ± 0.2	–	–
8	14.5 ± 7.4	2.1 ± 0.4	–	–
24	33.7 ± 7.9	5.8 ± 2.5	12.6 ± 4.0	52.2 ± 6.6
48	43.2 ± 7.3	7.0 ± 3.8	14.9 ± 2.9	65.1 ± 7.1
Cage washing (48 h)				0.5 ± 0.4

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

–: Not determined

Table 5 Cumulative excretion of radioactivity in bile, urine and feces after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 300 mg/kg)

Time (h)	Cumulative excretion of radioactivity (% of dose)			
	Bile	Urine	Feces	Total
0 - 4	2.4 ± 1.2	0.7 ± 0.2	–	–
8	11.4 ± 2.9	1.4 ± 0.4	–	–
24	27.1 ± 7.4	5.5 ± 1.7	15.5 ± 16.2	48.0 ± 21.8
48	41.1 ± 1.5	8.1 ± 3.8	27.2 ± 8.6	76.5 ± 5.8
Cage washing (48 h)				1.2 ± 0.2

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

–: Not determined

Appendix Table 1 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)											
	No. S13				No. S2				No. S3			
	Bile	Urine	Feces	Total	Bile	Urine	Feces	Total	Bile	Urine	Feces	Total
0- 4	4.5	1.8	–	–	4.9	1.2	–	–	2.7	0.5	–	–
8	13.9	2.4	–	–	14.4	1.6	–	–	9.5	0.9	–	–
24	30.2	3.9	2.6	36.6	37.5	3.9	4.7	46.1	29.5	2.3	5.8	37.6
48	40.5	4.3	5.6	50.3	50.6	5.1	6.2	62.0	43.0	3.1	9.6	55.7
Cage washing (48 h)				0.2				0.3				0.2

–: Not determined

Appendix 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: 20 mg/kg)

Time (h)	Cumulative excretion of radioactivity (% of dose)											
	No. S4				No. S5				No. S6			
	Bile	Urine	Feces	Total	Bile	Urine	Feces	Total	Bile	Urine	Feces	Total
0- 4	0.0	1.1	–	–	2.1	1.0	–	–	0.0	0.9	–	–
8	1.3	2.7	–	–	8.7	2.2	–	–	8.0	2.2	–	–
24	16.2	6.9	16.6	39.7	26.9	5.3	0.5	32.6	36.1	4.9	7.9	48.9
48	32.9	9.2	18.6	60.7	43.7	7.3	8.9	59.9	49.0	6.0	11.6	66.5
Cage washing (48 h)				0.3				0.7				0.8

–: Not determined

Appendix 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: 80 mg/kg)

Time (h)	Cumulative excretion of radioactivity (% of dose)											
	No. S7				No. S8				No. S9			
	Bile	Urine	Feces	Total	Bile	Urine	Feces	Total	Bile	Urine	Feces	Total
0- 4	0.3	1.0	–	–	9.1	1.0	–	–	6.1	1.3	–	–
8	6.0	2.2	–	–	17.8	1.7	–	–	19.6	2.5	–	–
24	28.2	8.3	9.9	46.5	30.2	3.4	17.2	50.8	42.8	5.7	10.8	59.4
48	45.4	11.1	13.8	70.3	35.0	3.7	18.2	57.0	49.1	6.3	12.6	68.0
Cage washing (48 h)				0.2				1.0				0.4

–: Not determined

Appendix Table 4 Cumulative excretion of radioactivity in bile, urine and feces after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 300 mg/kg)

Time (h)	Cumulative excretion of radioactivity (% of dose)											
	No. S10				No. S11				No. S12			
	Bile	Urine	Feces	Total	Bile	Urine	Feces	Total	Bile	Urine	Feces	Total
0- 4	2.9	0.5	–	–	3.2	0.7	–	–	1.0	0.8	–	–
8	14.6	1.0	–	–	10.5	1.7	–	–	9.1	1.4	–	–
24	35.5	3.6	33.4	72.5	23.7	6.2	11.2	41.1	22.0	6.8	1.8	30.5
48	41.8	3.9	37.1	82.8	39.4	9.1	22.8	71.4	42.1	11.3	21.8	75.3
Cage washing (48 h)				1.4				1.3				1.0

–: Not determined

信頼性保証陳述書

試験表題： ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務
 (^{14}C -TM5509 のサルにおける胆汁中排泄率の測定)

試験番号： AE-7245-G

上記試験は、薬事法施行規則第 43 条「申請資料の信頼性の基準」に基づいて実施され、また、最終報告書は試験の方法が正確に記載され、かつ生データの内容が正確に反映されていることを確認致しました。信頼性保証部門による調査並びにその結果の報告は、下記の日程で実施致しました。

調査項目	調査者	調査実施日	調査結果報告日*
生データ及び図表	朝川 佳奈子	2014 年 1 月 16 日～17 日	2014 年 1 月 17 日
生データ及び図表 (再調査)	朝川 佳奈子	2014 年 1 月 21 日	2014 年 1 月 21 日
生データ及び最終報告書草案 (第 1 回目)	朝川 佳奈子	2014 年 2 月 3 日	2014 年 2 月 3 日
生データ及び最終報告書草案 (第 1 回目：再調査)	朝川 佳奈子	2014 年 2 月 5 日	2014 年 2 月 5 日
生データ及び最終報告書草案 (第 2 回目)	朝川 佳奈子	2014 年 2 月 24 日	2014 年 2 月 24 日
生データ及び最終報告書草案 (第 2 回目：再調査)	朝川 佳奈子	2014 年 2 月 25 日	2014 年 2 月 25 日
最終報告書	朝川 佳奈子	2014 年 2 月 27 日	2014 年 2 月 27 日

*: 運営管理者及び試験責任者への報告日

2014 年 2 月 27 日

積水メディカル株式会社 薬物動態研究所
 信頼性保証部門責任者

片野 取 徳 章

最終報告書

^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務
(^{14}C -TM5509 のサルにおける組織内分布率の測定)

2014年2月27日

積水メディカル株式会社

薬物動態部



試験番号 : AE-7287-G

試験表題 : ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務
(^{14}C -TM5509 のサルにおける組織内分布率の測定)

試験委託者 : 東北大学 大学院医学系研究科
宮田 敏男

委託担当者 : 附属創生応用医学研究センター 分子病態治療学分野
段 孝
所在地 〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1
電話番号 022-717-8158
FAX 番号 022-717-8159

試験実施施設 : 積水メディカル株式会社 薬物動態研究所
所在地 〒319-1182 茨城県那珂郡東海村村松 2117 番地

運営管理者 : 薬物動態研究所 稲葉 厚弘

試験責任者 : 試験研究部 三次 孝一
電話番号 029-282-0232
FAX 番号 029-282-1681

試験従事者 : 薬物動態試験 市毛 一美
同上 三宅 隆行
同上 鈴木 水成
同上 菊地 貴徳
同上 千々和 博之

試験期間 : 試験開始日 2013 年 11 月 28 日
最終報告書提出日 2014 年 2 月 27 日

試験に関する陳述

当試験は積水メディカル株式会社薬物動態研究所 (以後, SMD と略す) にて制定した標準操作手順書に従って実施し, 薬事法施行規則第 43 条「申請資料の信頼性の基準」に従って信頼性を保証されたものに相違ありません。

また, 当最終報告書は当施設において得られた試験結果に基づいて作成されたものに相違ありません。

試験責任者

積水メディカル株式会社 薬物動態研究所

三 次 孝 一 2014 年 2 月 27 日

目次

	頁
試験に関する陳述.....	3
1 試験目的	5
2 主な使用機器及び試薬	5
2.1 機器	5
2.2 試薬	5
3 試験方法	6
3.1 組織内分布率の測定 (Exp.1).....	6
4 試料及びデータの取扱い	7
4.1 試料の識別及び保存	7
5 統計学的解析	8
6 再測定	8
7 予見することが出来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、 試験計画書に従わなかった事項及び試験計画書の変更.....	8
8 試験結果及び考察	8
8.1 組織内分布率 (Table 1)	8
9 参考資料	9
10 資料保存	9
11 TABLES	10
Table 1 Percentage distribution of radioactivity in tissues (48 h) after a single oral administration of ¹⁴ C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 300 mg/kg).....	11
Appendix Table 1 Percentage distribution of radioactivity in tissues (48 h) after a single oral administration of ¹⁴ C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 300 mg/kg).....	12

1 試験目的

「 ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務 (^{14}C -TM5509 のサルにおける胆汁中排泄率の測定) (AE-7245-G)¹⁾」(以後、 ^{14}C -TM5509 のサル胆汁中排泄率の測定と略す)において、投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中総排泄率が最高で 7 割台であることから、Exp.2 の第 4 群 (300 mg/kg) の動物を用いて、投与後 48 時間における主要組織の分布率を求めた。

2 主な使用機器及び試薬

2.1 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
天秤	PM480DR, AT460DR, XS205DU	Mettler-Toledo
	AD-6205	A & D
冷凍庫	HF シリーズ	ホシザキ電機
蒸留水製造装置	RFD シリーズ	アドバンテック東洋
ポリトロンホモジナイザー	PT1200, 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
液体シンチレーションカウンター (LSC)	2500TR	PerkinElmer

機器の許容温度範囲	
冷凍庫	-30°C~-10°C

2.2 試薬

蒸留水については特に指定がない場合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
塩化ナトリウム	特級	V1R6937	ナカライテスク	室温
過酸化ベンゾイル	化学用	M0G4523	ナカライテスク	冷蔵
ベンゼン	特級	310U1422	関東化学	室温
生理食塩液	日本薬局方	1B80N	大塚製薬工場	室温
組織溶解剤 SOLUENE-350	-	24-12451	PerkinElmer	室温
シンチレーター HIONIC-FLUOR	-	55-13131	PerkinElmer	室温

3 試験方法

3.1 組織内分布率の測定 (Exp.1)

^{14}C -TM5509 のサル胆汁中排泄率の測定¹⁾において、投与後 48 時間に全採血により安楽死させた第 4 群 (300 mg/kg) の動物 (n=3) より以下の組織を摘出し、組織内分布率を求めた。

<測定組織>

No.	組織名	No.	組織名
1	血液 ^{注)}	5	皮膚
2	肝臓	6	白色脂肪
3	腎臓	7	腸内容物
4	骨格筋		

注)¹⁾ ^{14}C -TM5509 のサル胆汁中排泄率の測定¹⁾ で得られた血液を測定した。

なお、血液、骨格筋、皮膚及び白色脂肪については、全量をそれぞれ解剖時体重の 6.0¹⁾、50.0²⁾、9.4¹⁾及び 7.8%¹⁾として計算した。

- 1) Lutz RJ, Dedrick RL, Tuey D, Sipes IG, Anderson MW, Matthews HB. Comparison of the pharmacokinetics of several polychlorinated biphenyls in mouse, rat, dog, and monkey by means of a physiological pharmacokinetic model. Drug Metab Dispos. 1984;12(5):527-35.
- 2) Leonard E. Gerlowski and Rakesh K.Jain, Journal of Pharmaceutical Sciences, 983;72(10):1103-1127.

<試料採取及び調製方法>

1) 血液

100 μL を放射能測定用バイアルに採取し、組織溶解剤 SOLUENE-350 (PerkinElmer) 2 mL を加えて溶解後、過酸化ベンゾイル飽和のベンゼン溶液 0.4 mL を加えて脱色した。

2) 肝臓

全量を秤量後、全量の約 2 倍量の生理食塩液を加えて再び重量を測定し、ホモジネートを調製した。調製後のホモジネート 0.5 mL をバイアルに採取し、その重量を測定したのち、組織溶解剤 SOLUENE-350 を 2 mL 加えて加温・溶解した。

3) 腎臓

全量を秤量後、ポリ容器に採取し、細かく碎片化した。その後、全量の約 2 倍量の生理食塩液を加えて再び重量を測定し、ホモジネートを調製した。調製後のホモジネート 0.5 mL をバイアルに採取し、その重量を測定したのち、組織溶解剤 SOLUENE-350 を 2 mL 加えて加温・溶解した。

4) 骨格筋, 皮膚, 白色脂肪

それぞれ 150 mg 前後をバイアルに採取し, 組織溶解剤 SOLUENE-350 を 2 mL 加えて加温・溶解した。なお, 骨格筋は大腿部より, 皮膚は背部より, 白色脂肪は腎臓周辺部より採取した。

5) 腸内容物

十二指腸から直腸までの内容物を採取し, 蒸留水を加え 1000 mL とした。攪拌均質化後, その 0.5 mL をバイアルに採取し, 組織溶解剤 SOLUENE-350 を 2 mL 加えて加温・溶解した。

<放射能の測定>

調製後の各試料にはそれぞれシンチレーター HIONIC-FLUOR (PerkinElmer) 10 mL を加え, LSC を用いて 2 分間放射能の計測を行い, 得られた値より組織内分布率を算出した。バックグラウンド値は蒸留水を測定し, その値を用いた。なお, 検出限界はバックグラウンド値の 2 倍とした。

<分布率算出方法>

各試料中の放射能計測値より, Microsoft Office Excel 2003 を用いて分布率を算出し, 3 例の平均値 ± 標準偏差 (SD) で表示した。分布率は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 3 位で四捨五入し, 小数点以下 2 桁で表示した。

$$\text{分布率 (\%)} = \frac{D \times T}{A \times S} \times 100$$

D : 測定試料中の放射エネルギー (dpm)

T : 測定試料の総量 (g or mL)

A : 投与放射エネルギー (dpm)

S : 測定試料の採取量 (g or mL)

4 試料及びデータの取扱い

4.1 試料の識別及び保存

4.1.1 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直接記入するか, ラベルを貼付して識別した。

4.1.2 試料の保存

残余の生体試料及び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, 屍体及び放射能測定用バイアルは, 試験結果確定後に廃棄処分した。

5 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 再測定

放射能測定試料の再サンプリング及び放射能測定用バイアルの再測定は、発生しなかった。

7 予見することが出来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、試験計画書に従わなかった事項及び試験計画書の変更

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、試験計画書に従わなかった事項は発生しなかった。

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。

2014年2月20日付試験計画書変更書 (No.1)

2014年2月25日付試験計画書変更書 (No.2)

8 試験結果及び考察

8.1 組織内分布率 (Table 1)

^{14}C -TM5509 のサル胆汁中排泄率の測定ⁱ⁾において、胆管カニューレした雄性サルに ^{14}C -TM5509 を 300 mg/kgの用量で経口投与して投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞を採取後安楽死させ、採取した組織の放射能を測定し、組織内分布率及び腸内容物中残存率を求めた。

その結果、投与後 48 時間における肝臓に投与量の 3.46%、骨格筋に 2.64%、血液に 1.76%、皮膚に 1.41%、白色脂肪に 0.80%、腎臓に 0.04%が認められ、これら主要組織の分布率の合計は 10.12%であった。また、腸内容物中には投与量の 5.11%が認められた。

^{14}C -TM5509 のサル胆汁中排泄率の測定ⁱ⁾において、300 mg/kg投与群の投与後 48 時間までの胆汁中には投与量の 41.1%、尿中に 8.1%、糞中に 27.2%が排泄され、この時点のケージ洗浄液中に 1.2%が認められ、これらの合計は 77.7%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 77.7%）に、主要組織及び腸内容物中に認められた放射能の合計（投与量の 15.23%）を加味すると、総回収率は投与量の約 93%であった。また、「 ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務 (^{14}C -TM5509 のサルにおける胆汁中代謝物分析試験) (AE-7246-G)ⁱⁱ⁾」の代謝物分析において、80 mg/kg投与群の投与後 48 時間における肝臓からの放射能回収率は低値であり、抽出画分中には TM5509 の他、主代謝物としてジヒドロジオール体、酸化体のグルクロン酸抱合体、水酸化体の硫酸抱合体の存在が確認された。胆汁中においてはこれらの代謝物の他に、肝臓中では少なかった TM5509 のアシルグルクロン酸抱合体も主代謝物として認められた。これらの代謝物分析結果をふ

まえると、投与後 48 時間の体内には TM5509 の他に、主として肝臓中で確認された代謝物が残存しているものと推察される。

9 参考資料

- i) 三次孝一, ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務 (^{14}C -TM5509 のサルにおける胆汁中排泄率の測定), 最終報告書, 積水メディカル株式会社 薬物動態研究所, 2014 年, AE-7245-G
- ii) 野沢耕平, ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務 (^{14}C -TM5509 のサルにおける胆汁中代謝物分析試験), 試験計画書, 積水メディカル株式会社 薬物動態研究所, 2013 年, AE-7246-G, 実施中

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), 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 Percentage distribution of radioactivity in tissues (48 h) after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 300 mg/kg)

Tissue	Radioactivity content (% of dose)
Blood	1.76 ± 0.51
Liver	3.46 ± 1.27
Kidney	0.04 ± 0.01
Skeletal muscle	2.64 ± 1.02
Skin	1.41 ± 0.29
Fat	0.80 ± 0.06
Total	10.12 ± 3.04
Intestinal contents (48 h)	5.11 ± 3.81

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

Blood, skeletal muscle, skin, and fat were assumed to be 6.0%, 50.0%, 9.4%, and 7.8% of body weight, respectively.

Excretion of radioactivity in the bile, urine, and feces were 41.1%, 8.1%, and 27.2% of the dose up to 48 h. Cage washing was 1.2% of the dose. (AE-7245-G)

Appendix Table 1 Percentage distribution of radioactivity in tissues (48 h) after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 300 mg/kg)

Tissue	Radioactivity content (% of dose)		
	No. S10	No. S11	No. S12
Blood	1.18	1.94	2.16
Liver	2.02	3.94	4.42
Kidney	0.03	0.05	0.05
Skeletal muscle	1.48	3.06	3.39
Skin	1.10	1.67	1.46
Fat	0.82	0.85	0.73
Total	6.63	11.51	12.21
Intestinal contents (48 h)	0.92	6.02	8.38

Blood, skeletal muscle, skin, and fat were assumed to be 6.0%, 50.0%, 9.4%, and 7.8% of body weight, respectively.

信頼性保証陳述書

試験表題： ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務
 (^{14}C -TM5509 のサルにおける組織内分布率の測定)
 試験番号： AE-7287-G

上記試験は、薬事法施行規則第 43 条「申請資料の信頼性の基準」に基づいて実施され、また、最終報告書は試験の方法が正確に記載され、かつ生データの内容が正確に反映されていることを確認致しました。信頼性保証部門による調査並びにその結果の報告は、下記の日程で実施致しました。

調査項目	調査者	調査実施日	調査結果報告日*
生データ及び図表	海野 絵理奈	2014 年 1 月 20 日	2014 年 1 月 20 日
生データ及び図表 (再調査)	海野 絵理奈	2014 年 1 月 20 日	2014 年 1 月 20 日
生データ及び最終報告書草案 (第 1 回目)	磯崎 光江	2014 年 1 月 30 日	2014 年 1 月 30 日
生データ及び最終報告書草案 (第 1 回目：再調査)	磯崎 光江	2014 年 1 月 31 日	2014 年 1 月 31 日
生データ及び最終報告書草案 (第 2 回目)	片野坂 徳章	2014 年 2 月 24 日～25 日	2014 年 2 月 25 日
最終報告書	柴田 洋子	2014 年 2 月 27 日	2014 年 2 月 27 日

*: 運営管理者及び試験責任者への報告日

2014 年 2 月 27 日

積水メディカル株式会社 薬物動態研究所

信頼性保証部門責任者

片野坂 徳章