

e) 測定試料

血漿 50 μL とメタノール 50 μL を混合した。なお、測定試料を希釈することはなかった。

(12) 前処理用試料の調製 (脳脊髄液)

脳脊髄液中濃度測定用に調製した試料には全て「Cerebrospinal fluid」の「C-」を表示した。

a) C-ブランク試料及び C-ゼロ試料

ブランク髄液 50 μL とメタノール 50 μL を混合した。

C-ブランク試料及び C-ゼロ試料は、検量線作成時に P092 及び IS のピーク溶出位置に妨害ピークの有無を確認のため調製した。

b) 脳脊髄液検量線試料 (C-CStdS)

ブランク髄液 50 μL と各濃度の CStd 50 μL をそれぞれ混合した。

| 調製試料 | 採取溶液 | 採取量 (μL) | ブランク髄液 (μL) | 調製濃度 (ng/mL) |
|-----------|--------|--------------------------|-----------------------------|-----------------|
| C-CStdS-1 | CStd-1 | 50 | 50 | 5.00 |
| C-CStdS-2 | CStd-2 | 50 | 50 | 10.0 |
| C-CStdS-3 | CStd-3 | 50 | 50 | 20.0 |
| C-CStdS-4 | CStd-4 | 50 | 50 | 50.0 |
| C-CStdS-5 | CStd-5 | 50 | 50 | 100 |
| C-CStdS-6 | CStd-6 | 50 | 50 | 200 |
| C-CStdS-7 | CStd-7 | 50 | 50 | 500 |
| C-CStdS-8 | CStd-9 | 50 | 50 | 1000 |

c) C-QC サンプル

(a) 高濃度 C-QC サンプル (P-HQC : 調製濃度 800 ng/mL) として、CStd-8 の 50 μL を n=2 で採取し、それぞれにブランク髄液 50 μL を添加し、混合した。

(b) 中濃度 C-QC サンプル (P-MQC : 調製濃度 50.0 ng/mL) として、CStd-4 の 50 μL を n=2 で採取し、それぞれにブランク髄液 50 μL を添加し、混合した。

(c) 低濃度 C-QC サンプル (P-LQC : 調製濃度 10.0 ng/mL) として、CStd-2 の 50 μL を n=2 で採取し、それぞれにブランク髄液 50 μL を添加し、混合した。

d) システム適合性確認試料

脳脊髄液検量線試料とは別に C-CStdS-4 を別途調製し、C-システム適合性確認試料 (C-SSStd) として使用した。

e) 測定試料

脳脊髄液 50 μL とメタノール 50 μL を混合した。なお、測定試料を希釈することはない。

(13) 前処理手順

以下の手順（フローチャート参照）で前処理を実施し、測定実測試料を調製した。

- a) 前処理用試料に IStd の 20 μ L (P-ブランク試料又は C-ブランク試料にはメタノール 20 μ L) を添加した。
- b) a)にメタノール 400 μ L を添加した。
- c) ミキサーで混合した。
- d) 遠心分離 (15000 \times g、4°C、5分) した。
- e) 上清を採取し、窒素気流下設定 40°C で乾固した。
- f) 血漿を処理して得られた残渣には再溶解溶媒を 100 μ L 添加、脳脊髄液を処理して得られた残渣には再溶解溶媒を 500 μ L 添加し、ミキサーで混合して再溶解させた。
- g) 再溶解液をろ過フィルターに移し、遠心分離 (10000 \times g、4°C、10分間) し測定実測試料とした。

前処理用試料

- ↓ ← IStd 20 μ L
- ↓ (P-ブランク試料又は C-ブランク試料にはメタノール 20 μ L)
- ↓ ← メタノール 400 μ L
- ↓ ミキサーで混合
- ↓ 遠心分離 (15000 \times g、4°C、5分)

上清採取

- ↓ 窒素気流下設定 40°C で乾固

残渣

- ↓ ← 再溶解溶媒：血漿を処理して得られた残渣には 100 μ L、脳脊髄液を処理して得られた残渣には 500 μ L。
- ↓ ミキサーで混合

再溶解液

- ↓ ろ過フィルター、遠心分離 (10000 \times g、4°C、10分)

測定実測試料

(14) LC/MS/MS 条件

a) HPLC 条件

カラム : CAPCELL PAK C18 AQ (2.0 mm I.D. \times 150 mm, 3 μ m, Shiseido Co., Ltd.)

カラム恒温槽設定温度

: 40°C

移動相 A : 0.1%ギ酸水溶液

移動相 B : 0.1%ギ酸含有メタノール

移動相 A、B を 6:4 の割合で HPLC で混合した。

流速 : 0.2 mL/min
 オートサンプラー設定温度 : 10°C
 注入量 : 10 µL
 注入順序 : [血漿中濃度測定]
 P-ブランク試料→P-ゼロ試料→P-CStdS-1~P-CStdS-8
 →P-QC サンプル (各濃度 n=1、3 濃度分の計 3 本) →
 血漿→P-QC サンプル (各濃度 n=1、3 濃度分の計 3 本)
 [脳脊髄液中濃度測定]
 C-ブランク試料→C-ゼロ試料→C-CStdS-1~
 C-CStdS-8→C-QC サンプル (各濃度 n=1、3 濃度分の
 計 3 本) →脳脊髄液→C-QC サンプル (各濃度 n=1、3
 濃度分の計 3 本)

b) MS/MS 条件

イオンソース : ESI
 イオン検出モード : Positive MRM
 カーテングス : 10 (N₂)
 コリジョンガス圧 : 7 (N₂)
 イオンソースガス 1 : 40 (Air)
 イオンソースガス 2 : 90 (Air)
 イオンソース温度 : 500°C
 イオンスプレー電圧 : 5500 V
 モニターイオン及びコリジョンエネルギー :

| モニターイオン | | | コリジョン エネルギー (V) | |
|-----------|------------|----------|-----------------------|----|
| プリカーサーイオン | | プロダクトイオン | | |
| P092 | m/z 252.31 | → | m/z 84.03 | 23 |
| IS | m/z 152.10 | → | m/z 110.02 | 31 |

(15) システム適合性

測定開始時に C-SSStd を 3 回連続注入して、P092 及び IS の保持時間並びにピーク面積比 (P092/IS) の再現性を確認した。

評価基準 : 保持時間及びピーク面積比の相対標準偏差が 5%以下。

(16) 定量計算

定量計算は Analyst 1.5 を用いた。P-CStdS 又は C-CStdS のクロマトグラムから P092 及び IS のピーク面積を求め、検量線濃度 (X) とピーク面積比 (P092/IS) (Y) との関係から最小二乗法 (重み付け: $1/X^2$) により、直線回帰式 ($Y=aX+b$) を作成した。これに血漿又は脳脊髄液から得られたピーク面積比を当てはめ、希釈率 (1) を乗じて血漿中又は脳脊髄液中の P092 の濃度を算出した。定量下限濃度 (LLOQ) は

5 ng/mL とし、クロマトグラム上に P092 のピークが確認されない場合又は P092 濃度が LLOQ 未満の場合は「Below Limit of Quantification (BLQ と略)」とし、「0 ng/mL」として扱った。

(17) パラメータの算出

血漿の採血時点の測定値から、個体毎に最高薬物濃度 (C_{max})、最高薬物濃度到達時間 (T_{max}) 及び濃度時間曲線下面積 (AUC_{0-24h}) を算出した。個体毎の脳脊髄液の採取時点の測定値のみを算出した。

(18) 再測定

脳脊髄液の測定で検量線上限濃度が、基準（逆計算値の相対誤差が±15.0%以内）を逸脱したため、再測定を行った。

これは、脳脊髄液の測定感度が血漿に比べて高く、血漿と同じ条件で処理、測定を行った際、高濃度側で頭打ち傾向を示し、検量線の上限濃度が基準を逸脱した。このため、測定可能な感度を得られるように再溶解溶媒の添加量を 100 μ L から 500 μ L に変更し、測定実測試料をした。

(19) データの採用基準

a) ブランク試料及びゼロ試料の取扱い

CStdS-1 より得られた P092 のピーク面積に対する妨害ピーク面積の割合が 20% 未満とした。また、IS のピーク面積に対する妨害ピーク面積の割合は 5% 未満とした。

b) 検量線の取扱い

相関係数が 0.99 以上で、直線回帰式から求めた逆計算値の相対誤差が定量下限濃度については±20%以内、それ以外の濃度については±15%以内とした。

$$\text{相対誤差 (\%)} = \frac{\text{逆計算値} - \text{調製濃度}}{\text{調製濃度}} \times 100$$

c) QC サンプルの取扱い

QC の測定値の真度が調製濃度に対して 85.0~115.0%の時、基準を満たしたと判断した。

$$\text{真度 (\%)} = \frac{\text{測定濃度}}{\text{調製濃度}} \times 100$$

QC は少なくとも 6 サンプル中 4 サンプルが基準内でなければならない。なお、6 サンプル中 2 サンプル（同じ濃度については除く）は調製濃度に対して±15%を外れていてもよい。

なお、システム適合性、ブランク試料及びゼロ試料、検量線、QC サンプルについては評価基準を満たしており、測定値の信頼性は保障されている。

(20) 数値の取扱い

数値の取扱いは以下の表に従った。

| 項目 | 単位 | 使用ソフト | 表示桁数 | 平均値 (Mean) | 標準偏差 (SD) | |
|----------------------|---------|-------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------|--|
| 秤量値 | g | | 天秤の読取り桁数 (小数点以下第4位) 天秤: AE240 | | | |
| 調製濃度 | μg/mL | | 四捨五入により 有効数字3桁 | | | |
| | ng/mL | | | | | |
| 保持時間 ^{a)} | min | Analyst 1.5 | 小数点以下第2位 | | | |
| ピーク面積 | counts | | 整数 | | | |
| ピーク面積比 ^{a)} | | | 有効数字3桁 | 平均値の 有効桁数に 合わせた | | |
| 検量線 | 傾き | | 有効数字3桁 | | | |
| | Y切片 | | 有効数字3桁 | | | |
| | 相関係数 | | 小数点以下第4位 | | | |
| | 逆計算値 | | ng/mL | 有効数字3桁 | | |
| | 相対誤差 | | % | 小数点以下第1位 | | |
| 測定濃度 ^{a)} | ng/mL | | 有効数字3桁 | | | |
| 相対標準偏差(%RSD) | % | | | 四捨五入により 小数点以下第1位 | | |
| 妨害ピーク面積の割合 | | | | | | |
| 真度 | | | | | | |
| C _{max} | ng/mL | | 有効数字3桁 | | | |
| T _{max} | h | | C _{max} を示した時間を 表示 | | | |
| AUC _{0-24h} | ng·h/mL | | 有効数字3桁 | | | |

a) 個々の数値の算出のみ「Analyst1.5」を使用した。

4.14 統計解析

動物数が少ないため、統計解析は実施しなかった。

5. 試験結果及びまとめ

5.1 一般状態観察

死亡状況を Table 1、一般状態観察の結果を Table 2 に示す。

投与日の観察期間中、死亡及び瀕死期屠殺動物はなかった。

流涎（軽度）が投与直後に雌雄、嘔吐（投与液）が投与 15 分後に雌雄で見られた。その他の時点で異常所見は見られなかった。

5.2 体重測定

体重の結果を Table 3 に示す。

投与日の体重は 4.46 又は 3.96 kg であった。

5.3 血漿中薬物濃度の測定

血漿中薬物濃度測定の結果を Table 4 に示す。

AUC_{0-24h} は、雄では 39.4 ng·h/mL、雌では 127 ng·h/mL、C_{max} は、雄では 15.0 ng/mL、雌では 13.4 ng/mL、T_{max} は、雄では 0.5 h、雌では 2.0 h であった。

5.4 脳脊髄液中薬物濃度の測定

脳脊髄液中薬物濃度測定の結果を Table 5 に示す。

投与 2-4 時間後及び 24 時間後ともに両例とも定量下限（5 ng/mL）以下の値であった。

5.5 まとめ

以上の結果、P092 を 250 mg/kg の投与量で雌雄各 1 例に単回経口投与した結果、両例ともに投与後に嘔吐を発現し、血漿中の P092 濃度測定で曝露は確認されたものの、脳脊髄液中の P092 濃度は定量下限以下であった。

Table 1

A pharmacokinetics study of P092 by single oral administration in cynomolgus monkeys

N-0458

Item : Mortality

| Dose level (mg/kg) | sex | Animal number | After administration | | | | | | | | | | Mortality | |
|-----------------------|--------|------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|----|----|-------|-----------|-----|
| | | | Day 0 | | | | | | | | | Day 1 | | |
| | | | pre | ~5min | 15min | 30min | 60min | 90min | 120min | 4h | 6h | 24h | | |
| 250 | Male | 1001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/1 |
| | Female | 1101 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/1 |

Table 2

A pharmacokinetics study of P092 by single oral administration in cynomolgus monkeys

N-O458

Item : Clinical signs

| Dose level (mg/kg) | sex | Animal number | Pre-administration period | | | | | | |
|-----------------------|--------|------------------|---------------------------|----|----|----|----|----|----|
| | | | Day | | | | | | |
| | | | -7 | -6 | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 |
| 250 | Male | 1001 | - | - | - | - | - | - | - |
| | Female | 1101 | - | - | - | - | - | - | - |

| Dose level (mg/kg) | sex | Animal number | After administration | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------|------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|----|-----|
| | | | Day 0 | | | | | | | Day 1 | | |
| | | | pre | ~5min | 15min | 30min | 60min | 90min | 120min | 4h | 6h | 24h |
| 250 | Male | 1001 | - | A | B# | - | - | - | - | - | - | - |
| | Female | 1101 | - | A | B## | - | - | - | - | - | - | - |

- : No abnormality #:approximately 15 mL ##:approximately 10 mL
 A : Salivation (slight, immediatery after dosing)
 B : Vomiting (dosing solution-like material)

Table 3

A pharmacokinetics study of P092 by single oral administration in cynomolgus monkeys

N-0458

Item : Body weight (kg)

| Dose level (mg/kg) | Animal | | | |
|-----------------------|--------|--------|------|-------|
| | sex | number | -1W | Day 0 |
| 250 | Male | 1001 | 4.36 | 4.46 |
| | Female | 1101 | 3.93 | 3.96 |

Table 4 A pharmacokinetics study of P092 by single oral administration in cynomolgus monkeys
Plasma concentration of P092 (single administration)

| Sex | Dose (mg/kg) | Animal No. | Plasma concentration (ng/mL) | | | | | | | T _{max} (h) | C _{max} (ng/mL) | AUC _{0-24h} (ng•h/mL) |
|--------|-----------------|---------------|------------------------------|------|------|------|------|------|-----|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | | | Pre | 0.5h | 1h | 2h | 4h | 8h | 24h | | | |
| Male | 250 | 1001 | BLQ | 15.0 | 7.29 | 6.66 | 5.48 | BLQ | BLQ | 0.5 | 15.0 | 39.4 |
| Female | 250 | 1101 | BLQ | 10.8 | 6.57 | 13.4 | 11.0 | 6.35 | BLQ | 2.0 | 13.4 | 127 |

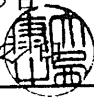
BLQ : Below limit of quantification (<5 ng/mL)

Table 5 A pharmacokinetics study of P092 by single oral administration in cynomolgus monkeys
Cerebrospinal fluid concentration of P092 (single administration)

| Sex | Dose (mg/kg) | Animal No. | Cerebrospinal fluid concentration (ng/mL) | |
|--------|-----------------|---------------|---|-----|
| | | | 2-4h | 24h |
| Male | 250 | 1001 | BLQ | BLQ |
| Female | 250 | 1101 | BLQ | BLQ |

BLQ : Below limit of quantification (<5 ng/mL)

3. サル血漿中及び脳脊髄液中の
P092 濃度測定試験
(マレイン酸塩経口投与試験)

| |
|--|
| 本写しは原本と相違ありません |
| 三菱化学メディエンス(株) 鹿島研究所 2013年9月26日 |
| 試験責任者 大西 康  |

最終報告書

サル血漿中及び脳脊髄液中の P092 濃度測定試験 (マレイン酸塩経口投与試験)

(試験番号 : B130595)

三菱化学メディエンス株式会社

1. 試験実施概要

1.1 表題

サル血漿中及び脳脊髄液中の P092 濃度測定試験（マレイン酸塩経口投与試験）

1.2 試験番号

B130595

1.3 試験目的

P092・マレイン酸塩をカニクイザルに単回経口投与し、血漿中及び脳脊髄液中の濃度推移を確認する。

1.4 適用ガイドライン

なし

1.5 適用 GLP

なし

1.6 試験委託者

国立大学法人岐阜大学

〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1

委託責任者 桑田 一夫

TEL : 058-230-6143, FAX : 058-230-6144

1.7 試験受託者

三菱化学メディエンス株式会社

〒108-8559 東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号

1.8 試験施設

三菱化学メディエンス株式会社 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1

1.9 試験責任者

大西 康之

三菱化学メディエンス株式会社

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

1.10 試験日程

試験開始： 2013 年 7 月 12 日

動物移管： 2013年7月12日
投与： 2013年7月17日
試験終了： 2013年9月26日

1.11 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存施設に保存する。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。

1.12 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (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) 通信記録等の記録文書
- (6) 最終報告書

2. 試験責任者署名

表 題：サル血漿中及び脳脊髄液中の P092 濃度測定試験（マレイン酸塩経口投与試験）

試験番号：B130595

試験責任者：

2013 年 9 月 26 日

大西 康之



大西 康之

三菱化学メディエンス株式会社

創薬支援事業本部 試験研究センター

安全性研究部

3. 材料及び方法

3.1 被験物質

3.1.1 名称

P092・マレイン酸塩

3.1.2 ロット番号

W6ANM-JT

3.1.3 保存条件

冷蔵（許容範囲：1～10°C），遮光，密封（窒素封入）

3.2 媒体

3.2.1 名称

注射用生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）

3.3 投与液

3.3.1 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・マレイン酸塩を正確に秤量した．
- (2) 生理食塩液を少量ずつ加え，被験物質を溶解させた．
- (3) 続いて，生理食塩液を加え，所定量に定容した．
- (4) pHを測定し，記録した（pH 3.79）．

3.4 試験動物

3.4.1 動物

カニクイザル (*Macaca fascicularis*)

3.4.2 性別

雌雄

3.4.3 購入先

株式会社日本医科学動物資材研究所

3.4.4 仕出国

ベトナム社会主義共和国（生産業者：NAFOVANNY）

3.4.5 投与時年齢

3～5 歳齢

3.4.6 投与時体重

3～4 kg

3.5 群構成

| 群 | 被験物質 | 投与用量 (mg/kg) | 投与液量 (mL/kg) | 投与液 濃度 (mg/mL) | 動物数 (動物番号) | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|------------|-----------|
| | | | | | 雄 | 雌 |
| 1 | P092・マレ イン酸塩 | 250 | 5 | 50 | 1 (10101) | 1 (50101) |

3.6 投与**3.6.1 投与経路**

経口 (強制経口投与)

3.6.2 投与液量

5 mL/kg とした。

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。

3.6.3 投与回数・期間

1 回

3.6.4 投与方法

ディスポーザブルシリリング及び経口カテーテルを用いて強制的に胃内に経口投与した。

3.7 採血及び PK 測定試料の採取

全動物から以下の通り採血し、血漿 (PK 測定試料) を得た。

(1) 採血時点

投与後 1, 2, 4, 8, 24 時間

(2) 採血方法

採血量： 約 0.5 mL/時点

採血部位： 橈側皮静脈又は伏在静脈

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)

(3) 血漿採取及び保管条件

採取した血液を遠心分離して個体毎に血漿を得た。

遠心条件： 約 10000×g, 3 分, 約 4°C

保存条件： 遠心分離後、直ちにドライアイス保冷

その後、約 -80°C （許容範囲： -60°C 以下）で保存

3.8 脳脊髄液の採取

全動物から以下の通り採取し、脳脊髄液（測定試料）を得た。

(1) 採取時点

投与後 2～4 時間に 1 回及び投与後 24 時間

(2) 採取及び保管条件

採取量： 約 1 mL

採取部位： 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）の静脈内投与による麻酔下で，椎間関節穿刺により採取した。

保存条件： 採取した脳脊髄液は，直ちに採取容器に入れドライアイスで保冷．その後，約 -80°C （許容範囲： -60°C 以下）で保存。

3.9 血漿中及び脳脊髄液中 P092 濃度の測定

サル血漿中及び脳脊髄液中の P092 濃度測定試験（試験番号：B130426）の方法に従い，薬物濃度を測定した。

4. 結果

次ページ以降に血中濃度測定結果を示す．なお，脳脊髄液中濃度については，いずれのポイントにおいても，定量限界以下であった。

Table 1 Plasma Concentration of P092

| Dose (mg/kg) | Animal No. | Plasma concentration of analyte (ng/mL) | | | | |
|-----------------|---------------|---|------|------|------|------|
| | | 1 h | 2 h | 4 h | 8 h | 24 h |
| 250 | 10101 | 8.27 | 7.23 | 8.72 | BLQ | BLQ |
| | 50101 | 9.10 | 12.6 | 11.7 | 6.39 | BLQ |
| | Mean | 8.69 | 9.92 | 10.2 | BLQ | BLQ |

BLQ: Below the lower limit of quantification (< 5 ng/mL)

Table 2 Cerebrospinal fluid concentration of P092

| Dose (mg/kg) | Animal No. | CSF concentration of analyte (ng/mL) | |
|-----------------|---------------|--------------------------------------|------|
| | | 2~4 h | 24 h |
| 250 | 10101 | BLQ | BLQ |
| | 50101 | BLQ | BLQ |

BLQ: Below the lower limit of quantification (< 5 ng/mL)