

## 5.6 投与

### 5.6.1 投与経路・方法

持続静脈内投与

大腿静脈に挿入されたカテーテルよりシリンジポンプ（テルモ株式会社）及びディスプレイシリンジを用いて、およそ 5.42 mL/kg/h の投与速度で無拘束下で投与した。各個体の投与速度は、投与日の体重を用いて個別に算出した。各投与直前に、生理食塩液でフラッシングを行い、カテーテル内液を排出した。投与終了後、カテーテル内での血液凝固を防ぐため、カテーテル内にヘパリン・グリセリン溶液\*を充填させた。

\*：グリセリン 6 容量に対しヘパリンナトリウム注射液（1000 単位）4 容量を加えた（最終ヘパリンナトリウム濃度：400 単位/mL）。調製後、フィルター滅菌を行い、冷蔵保存した。

### 5.6.2 フラッシング

- (1) 注射筒にセプタムニードルを装着し、ハーネスのキャップを外してセプタムに接続した。
- (2) シリンジをゆっくり引き、血液が確認されるまでカテーテル内の液を引き出した。
- (3) 血液確認後、生理食塩液を充填させたシリンジを接続し、デッドボリューム分の液をゆっくり注入した。
- (4) ニードルを外し、ハーネスにキャップをかぶせた。

### 5.6.3 投与経路の選択理由

臨床適用経路に準ずる。

### 5.6.4 投与方法の選択理由

被験物質を正確に投与できる。

### 5.6.5 投与回数・期間

週 1 回，4 週間，計 4 回

### 5.6.6 投与回数・期間の選択理由

毒性試験のガイドラインに従った。

### 5.6.7 投与用量及びその設定理由

被験物質は溶血性を示し、投与可能な最大濃度は 0.2 mg/mL と推定されている。動物へ 24 時間持続静脈内投与可能な最高容量（約 130 mL/kg）を考慮すると、24 時間以内で投与可能な最高用量は 25 mg/kg と考えられる。本試験では、この投与可能な最高用量（25 mg/kg）を高用量に設定し、以下 10 及び 1 mg/kg 群を設定した。

### 5.6.8 投与液量

125 mL/kg

各個体の投与液量は至近日に測定した体重に基づいて算出した。

## 5.7 群構成

### 5.7.1 主試験群

被験物質	投与用量 (mg/kg/日)	投与液量 (mL/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号)	
				雄	雌
Control *	0	125	0	6 (10101~10106)	6 (50101~50106)
P092	1	125	0.008	6 (10201~10206)	6 (50201~50206)
P092	10	125	0.08	6 (10301~10306)	6 (50301~50306)
P092	25	125	0.2	6 (10401~10406)	6 (50401~50406)

\* 媒体 (生理食塩液) 投与

### 5.7.2 TKサテライト群

被験物質	投与用量 (mg/kg/日)	投与液量 (mL/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号)	
				雄	雌
P092	1	125	0.008	5 (20101~20105)	5 (60101~60105)
P092	10	125	0.08	5 (20201~20205)	5 (60201~60205)
P092	25	125	0.2	5 (20301~20305)	5 (60301~60305)

## 5.8 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、体重測定並びに瀕死及び死亡動物の剖検及び器官・組織の保存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 及び 11 参照)。ただし、25 mg/kg 群の雄 1 例 (No. 20304) については、未採血動物であったため、主試験群同様、第 29 日まで継続観察するとともに、体重測定 (第 28 日)、血液学的検査及び血液生化学的検査、器官重量測定、剖検及び組織の採取・保存を行った (Appendix 12, 13 及び 14 参照)。

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。第 1~4 週を投与期間とした。

### 5.8.1 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, 投与開始後約 2-4 時間)

その他の期間： 1 日 1 回 (午前中, 動物入荷日は午後)

### 5.8.2 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．死亡動物については，解剖前に最終体重を測定した．

### 5.8.3 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．

### 5.8.4 眼科学的検査

#### (1) 検査時期

投与開始前： 第-1週（雄：第-2日，雌：第-5日）

投与期間： 第4週（第26日）

#### (2) 検査項目及び検査方法

照明を暗くした状態で，下記の検査を行った．前眼部，中間透光体および眼底検査は散瞳剤（ミドリンP<sup>®</sup>点眼液，参天製薬株式会社）点眼後に行った．

- ・対光反射： 直像検眼鏡（BETA200，Heine Optotechnik）を用いて検査
- ・前眼部及び中間透光体： ポータブルスリットランプ（SL-14または15，興和株式会社）を用いて検査
- ・眼底： 倒像検眼鏡（OMEGA 200，Heine Optotechnik）を用いて検査

### 5.8.5 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（第27～28日）

#### (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
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。

## 5.8.6 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
網赤血球比 (%)	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) <sup>§</sup>	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) <sup>§</sup>	光散乱検出方式
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)

§ : カテーテル内抗凝固処理にヘパリンを用いていることから、正確な値が得られない可能性が高い。従って、測定は行うものの評価には用いず、参考データとした。

#### (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。

### 5.8.7 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)
γGT (U/L)	L-γ-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
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)

#### (5) 残余検査試料の処理

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

### 5.8.8 病理学的検査

#### 5.8.8.1 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
心臓	○ -	○ -
リンパ節		
下顎	○ -	- -
腸間膜	○ -	- -
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	○ -	- -

器官・組織	採材 側性	器官重量 側性
結腸	○ -	- -
直腸	○ -	- -
唾液腺	耳下腺 顎下腺/舌下腺	○ 両側 ○ 両側 ○ 左右合計
肝臓	○ -	○ -
膵臓	○ -	- -
腎臓	○ 両側	○ 左右合計
膀胱	○ -	- -
精巣	○ 両側	○ 左右合計
精巣上体	○ 両側	- -
精嚢	○ -	- -
前立腺	腹葉	○ -
下垂体	○ -	○ -
甲状腺/上皮小体	○ 両側	○ 左右合計
副腎	○ 両側	○ 左右合計
大腿骨/骨髄	○ 片側	- -
胸骨/骨髄	○ -	- -
皮膚/乳腺	○ -	- -
眼球/視神経/ハーダー腺	○ 両側	- -
脳	○ -	○ -
脊髄	頸部 胸部 腰部	○ - ○ - ○ -
卵巣	○ 両側	○ 左右合計
子宮	○ -	- -
膣	○ -	- -
大動脈	胸部	○ -
骨格筋/坐骨神経	大腿部	○ 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

### 5.8.8.2 病理解剖検査

計画解剖動物は第 29 日に解剖した。

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。死亡動物は発見後速やかに剖検した。TK サテライト群の死亡動物についても，主試験群と同様に剖検を実施した。その他の TK サテライト群の動物については，5.9.1 項(4)の手順に従い安楽死させ，カテーテルが閉塞したことにより，投与が継続できなかった 1 例（No. 20203）及びハーネスがかみ切られたことにより投与が継続できなかった 1 例（No. 20302）以外の雄は採血終了後に剖検した。

### 5.8.8.3 器官重量

計画解剖時に 5.8.8.1 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。死亡動物の器官重量は測定しなかった。

### 5.8.8.4 器官・組織の採材及び保存

計画解剖時に 5.8.8.1 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。死亡動物については、いずれの器官・組織も 10 vol%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。

## 5.9 トキシコキネティクス（TK）測定及び脳脊髄液中の P092 測定

### 5.9.1 採血

TK サテライト群の動物から各群雌雄 3 匹ずつ選抜し（動物番号の若い順）、無麻酔下で以下の通り採血して、血漿（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，2，4，8，24，48 時間

最終回（第 4 回）投与時： 投与前日並びに投与後 5 分，2，4，8 及び 24，48 時間

総検体数： 234 検体

#### (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た。

#### (3) 血漿採取及び保存条件

採取した血液を遠心分離して個体毎に血漿を得た。遠心分離は採血後速やかに行った。

遠心条件： 約 10000×g，3 分間，約 4°C

保存容器： ポリプロピレン製チューブ

保存条件： 遠心分離後、直ちにドライアイス保冷し、その後約 -80°C（許容範囲： -60°C 以下）で保存

#### (4) 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、脳脊髄液の採取を行った後、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。



### 5.9.2 脳脊髄液の採取

最終回投与後 48 時間の採血後に TK サテライト群の全生存動物から麻酔下でマイJECTターを用いて脳脊髄液を得た。採取した脳脊髄液は採取容器に入れて直ちにドライアイスで保冷し、その後約-80°C（許容範囲：-60°C 以下）で保存した。

総検体数：30 検体

### 5.9.3 血漿中及び脳脊髄液中 P092 濃度の測定方法

血漿中及び脳脊髄液中 P092 濃度の測定は、当試験施設で実施した「ラット血漿中 P092 濃度測定法バリデーション」（試験番号：B120711）における分析法に従って実施した。P092 の安定性については、B120711 にて以下の項目が確認されている。

項目	期間又は回数
測定実測試料の安定性（10°C）	36 時間
凍結融解安定性（-80°C）	3 回
短期安定性（室温）	4 時間
長期安定性（-80°C）	33 日間
P092 標準試料原液及び溶液（室温） （200 µg/mL 及び 5 ng/mL）	24 時間
P092 標準試料原液及び溶液（冷蔵） （200 µg/mL 及び 5 ng/mL）	97 日間
IS 試料原液及び溶液（室温） （100 µg/mL 及び 200 ng/mL）	24 時間
IS 試料原液及び溶液（冷蔵） （100 µg/mL 及び 200 ng/mL）	97 日間

#### 5.9.3.1 測定対象標準物質

被験物質を使用した。

#### 5.9.3.2 内標準物質（IS）

名称：	p-アセトアミドフェノール
ロット番号：	WEQ6871
分子量：	151.16
保存条件：	室温（許容範囲：10～30°C），遮光
保管場所：	被験物質保管場所（41）
製造元：	和光純薬工業株式会社
安定性の確認：	実施しなかった。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

### 5.9.3.3 ブランクマトリックス

<血漿>

動物種： ラット  
 系統： Cri:CD (SD)  
 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）

<脳脊髄液>

脳脊髄液は希少マトリックスであるため，その代替マトリックスとして生理食塩液を使用した。

### 5.9.3.4 試薬

試薬類は市販の特級又は HPLC 用の試薬を使用した。

水は超純水製造装置（Elix-UV10, MILLI-Q Gradient-A10）で精製したものをを用いた。

### 5.9.3.5 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（許容範囲：1~10°C）し，使用期限は調製後 97 日間とした。

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

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 ( $\mu$ L)*	メタノール 添加量( $\mu$ L)*
WS-5	5	WS-50	100	900

\* : マイクロピペットを使用

### 5.9.3.6 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  $\mu$ g/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 IS 試料溶液 (200 ng/mL, ISWS) を調製した。

IS 試料原液及び溶液は PP 製容器にて冷蔵・遮光保存 (許容範囲: 1~10°C) し、使用期限は調製後 97 日間とした。

IS 試料溶液 略称	IS 試料溶液濃度	使用 IS 試料溶液 略称	使用量 ( $\mu$ L)*	メタノール添加量 ( $\mu$ L)*
ISWS-1	5 $\mu$ g/mL	ISSS	50	950
ISWS	200 ng/mL	ISWS-1	40	960

\* : マイクロピペットを使用

### 5.9.3.7 検量線用標準試料溶液の調製

PP 製マイクロチューブにブランク血漿 (血漿中濃度測定時) または生理食塩液 (脳脊髄液中濃度測定時) 20  $\mu$ L を分取後、水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400  $\mu$ L を添加し、ブランク試料、ゼロ試料についてはメタノールを 20  $\mu$ L、検量線用標準試料溶液 (C1~C8) については、次表に従い P092 標準試料溶液を 20  $\mu$ L 添加した。

略称	血漿または脳 脊髄液中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
C1 (LLOQ)	5	WS-5
C2	10	WS-10
C3	20	WS-20
C4	50	WS-50
C5	100	WS-100
C6	200	WS-200
C7	500	WS-500
C8 (ULOQ)	1000	WS-1000

LLOQ: lower limit of quantification

ULOQ: upper limit of quantification

### 5.9.3.8 血漿試料及び脳脊髄液試料の前処理方法（分析フロー）

- (1) PP 製マイクロチューブに血漿または脳脊髄液（生理食塩液）20  $\mu\text{L}$  を分取した。
- (2) 水／ギ酸（1000:1, v/v）400  $\mu\text{L}$  を添加した。
- (3) メタノール 20  $\mu\text{L}$  を添加した。  
（検量線用標準試料溶液調製時は P092 標準試料溶液）
- (4) ISWS（ブランク試料調製時はメタノール）40  $\mu\text{L}$  を添加した。
- (5) ミキサーを用いて攪拌した。
- (6) 全量を Oasis HLB  $\mu\text{Elution plate}$ （30  $\mu\text{m}$ , Waters Corporation）にアプライした（プレートは、あらかじめメタノール 200  $\mu\text{L}$  及び水／ギ酸（1000:1, v/v）200  $\mu\text{L}$  でコンディショニングしておいた）。
- (7) 水／ギ酸（1000:1, v/v）200  $\mu\text{L}$  で洗浄した。
- (8) メタノール 70  $\mu\text{L}$  で溶出した。
- (9) 水／ギ酸（1000:1, v/v）140  $\mu\text{L}$  を添加，攪拌後，次項に従い測定した。

### 5.9.3.9 分析条件

#### 5.9.3.9.1 装置

HPLC 装置：	1100 (Agilent Technologies)
オートサンプラ：	SIL-20AC (Shimadzu Corporation)
質量分析装置：	API 4000 (AB SCIEX)
もしくは	
送液ポンプ：	LC-20AD (Shimadzu Corporation)
脱気装置：	DGU-20A3 (Shimadzu Corporation)
カラムオーブン：	CTO-20AC (Shimadzu Corporation)
オートサンプラ：	SIL-20AC・HT (Shimadzu Corporation)
質量分析装置：	API 4000 (AB SCIEX)

#### 5.9.3.9.2 HPLC 条件

カラム：	XBridge C18, 3.5 $\mu\text{m}$ , 3.0 mm I.D. $\times$ 50 mm (Waters Corporation)
カラム温度：	50°C
移動相 A：	水／ギ酸（1000:1, v/v）
移動相 B：	メタノール／ギ酸（1000:1, v/v） 移動相 A, B を 4:6 の割合で HPLC で混合した。
流速：	0.25 mL/min
注入量：	10 $\mu\text{L}$
オートサンプラ設定温度：	10°C
ニードル洗浄溶媒：	メタノール

#### 5.9.3.9.3 MS/MS 条件

Ionization method：	ESI (Electrospray Ionization, Turbo Ion Spray)
--------------------	--

Polarity :	Positive
Scan type :	MRM (Multiple reaction monitoring)
Ion spray voltage (IS) :	5500 V
Heater gas temperature (TEM) :	500°C
Nebulizer gas (GS1) :	Air, 50 psi
Heater gas (GS2) :	Air, 85 psi
Curtain gas flow (CUR) :	N <sub>2</sub> , 18 psi
Collision gas flow (CAD) :	N <sub>2</sub> , 4
Entrance potential (EP) :	10 V
Monitor ion :	P092: <i>m/z</i> 252 > 84 IS: <i>m/z</i> 152 > 110

### 5.9.3.10 検量線

ブランク試料, ゼロ試料及び 8 濃度の検量線用標準試料溶液を n=1 で調製し, それぞれから測定実測試料を n=1 で調製, 測定した.

ブランク試料, ゼロ試料の 2 検体は, LC-MS/MS 測定のバックグラウンド確認のために測定した.

検量線用標準試料溶液につき, P092 の IS に対するピーク面積比を, 添加濃度に対し一次回帰して得られる直線を検量線とした. 検量線には, 1/x の重み付け (x: 血漿または脳脊髄液中 P092 濃度) を用いた. P092 の各濃度における真度 (%RE) を算出した.

$$\text{真度 (\%RE)} = \frac{\text{定量値} - \text{理論値}}{\text{理論値}} \times 100$$

#### <許容基準>

ブランク及びゼロ試料における P092 及び IS の溶出位置に夾雑ピークが検出されていないこと. 検出された場合, 夾雑ピークのピーク面積が, LLOQ サンプルの P092 及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%未満であること.

検量線用標準試料溶液の 8 濃度中, 定量下限及び上限を含む 6 濃度以上において, %RE が ±15.0% (LLOQ では±20.0%) 以内であること.

### 5.9.3.11 TK 測定時の精度管理

PP 製マイクロチューブにブランク血漿 (血漿中濃度測定時) または生理食塩液 (脳脊髄液中濃度測定時) 20 µL を分取後, 水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400 µL を添加し, 次表に従い P092 標準試料溶液を 20 µL 添加した.

略称	血漿または脳脊髄液中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
Low QC	10	WS-10

Middle QC	50	WS-50
High QC	800	WS-800

次に示す順に各濃度 2 本（計 6 本）の QC サンプルを測定した。

1. 検量線
2. QC サンプル（Low, Middle 及び High, n=1）
3. TK 測定試料及び脳脊髄液試料
4. QC サンプル（Low, Middle 及び High, n=1）

<許容基準>

6 検体中 4 検体かつ 1 濃度 1 検体以上において%RE が±15.0%以内であること。

#### 5.9.3.12 再測定.

雌の初回投与時検体の測定時に、測定終了時の QC サンプルが許容基準を満たさなかったため、再測定を実施した。再測定で得られたデータを採用した。

#### 5.9.3.13 データ解析

検量線の作成及び定量値の算出は、LC-MS/MS 装置付属の解析ソフトウェア「Analyst」(Ver. 1.4.2, AB SCIEX) を用いて行った。

定量値の単位は“ng/mL”として次表に従った。

定量下限未満の定量値は BLQ (Below the lower limit of quantification) と表示し、平均値及び標準偏差算出時は 0 として扱った。同一時点の過半数の定量値が BLQ の場合は、平均値は BLQ と表示し、標準偏差は NC (Not calculated) と表示した。平均値が定量下限未満の場合は、BLQ と表示し、標準偏差は NC と表示した。

項目	表示方法
定量値	MassLynx で算出し、有効数字 3 桁で表示した。
平均値	Microsoft Excel 2003 または Microsoft Excel 2010 で算出し、定量値と同様に有効数字 3 桁で表示した。 ただし、1000 以上の平均値は整数で表示した。
標準偏差	Microsoft Excel 2003 または Microsoft Excel 2010 で算出し、平均値と小数点以下同桁数で表示した。

#### 5.9.4 残余 TK 測定試料及び脳脊髄液試料の処理

測定終了後の残余 TK 測定試料及び脳脊髄液試料は、試験終了時まで廃棄した。

#### 5.10 統計学的解析

主試験群から得られたデータについて以下の統計学的解析を実施した。解析には Provantis システム (INSTEM 社) を用いた。

## (1) 解析方法

計量データ：

Bartlett 法による等分散の検定（有意水準：1%）を行い、分散が等しい場合は Dunnett 法、分散が等しくない場合は Dunnett 型の多重比較検定（有意水準：各 1%及び 5%，両側検定）によって対照群との平均値の差の検定を行った。死亡動物の死亡発見時体重データについては、統計学的解析の対象から除外した。

## (2) 対象項目

統計学的解析の対象項目を以下に示す。TK サテライト群で得られたデータについては統計学的解析を実施しなかった。

- ・ 体重
- ・ 摂餌量
- ・ 尿検査結果（比重，尿量，電解質）
- ・ 血液学的検査結果
- ・ 血液生化学的検査結果
- ・ 器官重量

## 5.11 コンピュータシステムの使用

### 5.11.1 使用するコンピュータシステム

Provantis システム（INSTEM 社）

### 5.11.2 コンピュータシステムのプロトコール番号

B131138S（群分け前）

B131138（群分け以降）

コンピュータプロトコールにはデータ収集範囲，データ収集の日程等を登録した。

## 6. 結果

### 6.1 死亡・瀕死

結果を Table 1 及び Appendix 1 に示す。

10 mg/kg 群の雄 3 例, 25 mg/kg 群の雄 4 例, 雌 6 例が死亡した。死因はいずれも投与カテーテル先端付近の大静脈からの出血と考えられた。

### 6.2 一般状態

結果を Table 1 及び Appendix 1 に示す。

10 mg/kg 群の雄 1 例に貧血及び歩行異常が, 25 mg/kg 群の雌 1 例に貧血が認められた。その他の死亡動物及び生存動物では異常は認められなかった。

### 6.3 体重

結果を Table 2 及び Appendix 2 に示す。

投与期間を通して, いずれの用量群においても対照群と比べて平均体重の有意な差は認められなかった。

### 6.4 摂餌量

結果を Table 3 及び Appendix 3 に示す。

摂餌量の減少が, 10 及び 25 mg/kg 群の雄で, 第 4 週に認められた。その他, 対照群と比べて有意な差は認められなかった。

### 6.5 眼科学的検査

結果を Table 4 及び Appendix 4 に示す。

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

Table 4 及び Appendix 4 に示した変化は, いずれも投与開始前から認められていることから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

### 6.6 尿検査

結果を Table 5 及び Appendix 5 に示す。

いずれの検査項目においても, 被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

### 6.7 血液学的検査

結果を Table 6 及び Appendix 6 に示す。



出血によると思われる貧血傾向（赤血球数，ヘモグロビン濃度，ヘマトクリット値の低下，網赤血球数の増加），及び好中球の増加が，10及び25 mg/kg 群の雄で認められた．雌においても同様に，ヘマトクリット値の低下が1及び10 mg/kg 群で認められ，統計学的な有意差はないものの，ヘモグロビン濃度の低値傾向，網赤血球数の増加傾向，及び好中球の増加傾向もこれらの用量群で認められた．

## 6.8 血液生化学的検査

結果を Table 7 及び Appendix 7 に示す．

ASAT, LDH,  $\gamma$ GT, クレアチンキナーゼ, 総ビリルビン, 尿素窒素, クレアチニンの増加, A/G 比及びアルブミンの低下,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$  グロブリンの増加, 血清ナトリウム及びカリウムの増加, 血清クロールの低下が 10 あるいは 25 mg/kg 群の雄で認められた．雌においても, 統計学的な有意差は明確ではないものの, ASAT, LDH,  $\gamma$ GT, クレアチンキナーゼ, 総ビリルビンの増加及びアルブミンの低下が 10 mg/kg 群で認められた．

## 6.9 器官重量

結果を Table 8 及び Appendix 8 に示す．

腎臓の実重量及び相対重量の増加が 25 mg/kg 群の雄で認められた．雌においても, 腎臓の相対重量の増加が 10 mg/kg 群で認められた．

## 6.10 病理解剖検査

結果を Table 9 及び Appendix 9 に示す．

病理解剖検査では, 投与部位（大静脈）に結節が 1 gm/kg 群の雌及び 10 mg/kg 以上の用量群の雌雄及び認められ, 1 mg/kg 群の雄では白色斑が認められた．その他, 大静脈の血腫, 腹腔内臓器の癒着, 脾臓の腫大が投与群に認められた．

死亡動物では, 投与部位である大静脈に血腫や結節が見られ, 各種臓器との癒着も認められた．死因は, 大静脈からの出血であると考えられた．

## 6.11 トキシコキネティクス (TK) 測定

結果を Table 10 に示す．

初回投与時の血漿中濃度測定では, 10 及び 25 mg/kg 群において投与終了後 5 分をピークに徐々に P092 濃度は低下した．しかしながら, 投与終了後 48 時間であっても定量下限付近の濃度を示す個体が散見された．1 mg/kg 群ではいずれの測定ポイントにおいても定量下限未満であった．雄の投与後 5 分の血漿中濃度は雌よりも高値であったが, その後の推移に明確な雌雄差は見られなかった．最終回投与時では, 血漿中濃度は初回投与時に比して低下し, 定量下限付近の値を示す個体が 10 及び 25 mg/kg 群の雄では散見されたが, 雌ではいずれの

個体においても定量下限未満であった。しかしながら、クロマトグラム上にピークは見られていることから、定量下限付近で推移していると推察された。脳脊髄液中の P092 濃度については、1あるいは10 mg/kg 群の少数例で検出されたが、多くは定量下限未満であった。

## 7. 考察

P092・マレイン酸塩をラット (Ctrl: CD (SD), 雌雄各 6 匹/群) に, 0, 1, 10 及び 25 mg/kg の用量で, 4 週間間歇静脈内投与 (週 1 回) し, 現れる毒性変化を確認した. 投与は大静脈に留置したカテーテルを介して行い, 無拘束下でおよそ 5.42 mL/kg/h の速度で低速持続投与 (約 23 時間投与) した.

その結果, 10 mg/kg 群の雄 3 例, 25 mg/kg 群の雄 4 例, 雌 6 例が死亡した. 死因はいずれも投与カテーテル先端付近の大静脈からの出血と考えられた. 出血部位は, カテーテルの先端部分であり, また対照群ではそのような変化は見られなかったことから, おそらく被験物質の影響で血管が脆弱化したためと考えられた. 1 mg/kg 群においても, 血管 (大静脈) の結節が認められたことから, 0.008 mg/mL の濃度でも持続投与することにより, 血管の障害を引き起こすと推察された. 従って, P092・マレイン酸塩を静脈内投与する場合, 低速持続投与は適当ではないと考えられる.

その他, 血液生化学的検査では, 尿素窒素及びクレアチニンの増加が認められ, また腎臓重量の増加も見られたことから, 被験物質の腎臓への影響が懸念された.

血漿中の薬物濃度推移については, 10 及び 25 mg/kg 群において投与終了後 5 分をピークに徐々に P092 濃度は低下した. しかしながら, 投与終了後 48 時間であっても定量下限付近の濃度を示す個体が散見され, 比較的長期間にわたり, 薬物が定量下限付近の濃度で血漿中に維持されると考えられた. 最終回投与時は, 初回投与時より血漿中濃度は低下していた. 詳細は明らかではないが, 血管障害性や出血などが見られていること, 血清アルブミンは低下していることから, 血中に投与された薬物は血管外に漏出してしまっている可能性も考えられる.

脳脊髄液中の P092 濃度については, 多くは定量下限未満であったものの, 10 あるいは 25 mg/kg 群の少数例では検出され, 薬物の血中から脳脊髄液中への移行が確認された. 脳脊髄液中の薬物濃度に, 血漿中濃度との相関性は見られず, 脳脊髄液中濃度の高低の要因については不明であった.

以上のことから, P092・マレイン酸塩を静脈内投与する場合, 薬物による血管障害が惹起されてしまうことから, 低速持続投与は不適と考えられた.

Table 1

Clinical Sign - Summary

B131138

---

Key Page

Code	Description
BD	Before dosing
T10	2-4 hours after dosing