

5.3.3 ラットを用いる小核試験

(GLP:試験番号 B130236)

[実験方法および結果]

P092 マレイン酸塩を雄ラット (CrI: CD (SD), 投与時 7 週齢, 5 匹/群) に、0、5、10 及び 20 mg/kg (P092 フリー体として) の用量で、1 回静脈内投与し、末梢血幼若赤血球 (IMEs) における小核誘発を指標として、生体内における染色体異常誘発作用の有無を評価した。投与は拘束下で尾静脈からおよそ 1 mL/kg/min の速度で 20 mL/kg の投与液量を投与した (1 匹あたり 20 分間投与)。また、陽性対照群には CP(cyclophosphamide monohydrate) を 20 mg/kg の用量で 1 回経口投与した。いずれの群も投与後 48 及び 72 時間に鎖骨下静脈から採血し、末梢血小核観察用の標本作製して蛍光顕微鏡下で小核を有する IMEs (MNIMEs) の出現頻度を求めた。

全投与動物について、以下のとおり標本作製した (文献 5,6,7)。

ラットの鎖骨下静脈より血液を約 0.1 mL 採取し、約 0.3 mL の 10 v/v% リン酸緩衝ホルマリンと採取した血液を、血液が凝固しないよう攪拌・混合して室温に保存した。ホルマリン固定血液を観察直前にアクリジン・オレンジ染色液

(500 μ g/mL) と 1:1 で混合して染色し、スライドグラスに伸展した。スライド標本は B 励起の蛍光顕微鏡を用いてブラインド法により観察した。観察は個体毎に全赤血球 [幼若赤血球 (IMEs) 及び成熟赤血球 (MEs)] 1000 個あたりの IMEs の数を数えるとともに、IMEs 2000 個中の小核をもつ細胞 (MNIMEs) の数を数えた。細胞の識別は Hayashi らの方法に従い、赤血球の細胞質が赤色蛍光色のものを IMEs、蛍光を発しないものを MEs として区別した。また、赤血球の細胞質中に黄緑色の蛍光を放つ小体を小核とした。尚標本作成時期は投与後 48 及び 72 時間とし、結果を以下に示した。

投与後 1 時間までの間に 20 mg/kg 群の 2 例で赤色尿が観察された。投与翌日から観察終了まで同群の 2 例に尾の暗赤色化が認められた (表二-17)。その他の動物では異常は認められなかった。また、体重推移を表二-18 に示した。投与後最終測定日まで、いずれの用量群においても陰性対照群と比較して、平均体重に有意な差は認められなかった。小核試験の結果は、24 時間後表二-19 及び 72 時間後表二-20 にそれぞれ示した。IMEs 10000 個 (2000 個 \times 5 匹) あたりの被験物質投与群における MNIMEs 出現数は、投与後 48 時間採血の 5、10 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ 10 個、13 個及び 9 個 (出現率はそれぞれ 0.10 \pm 0.06%, 0.13 \pm 0.08% 及び 0.09 \pm 0.02%)、投与後 72 時間採血群で同様に 9 個、14 個及び

12 個 (出現率はそれぞれ $0.09 \pm 0.07\%$, $0.14 \pm 0.07\%$ 及び $0.12 \pm 0.06\%$) であり、各陰性対照群の 11 個及び 10 個 (出現率: $0.11 \pm 0.04\%$ 及び $0.10 \pm 0.06\%$) と比較して、いずれの群にも統計学的に有意な MNIMEs の増加は認められなかった。また、赤血球 1000 個当たりの IMEs の割合は、投与後 48 時間採血の 5、10 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ $6.9 \pm 0.8\%$ 、 $8.4 \pm 1.0\%$ 及び $7.1 \pm 0.8\%$ 、投与後 72 時間採血の 5、10 及び 20 mg/kg 群でそれぞれ $7.0 \pm 0.6\%$ 、 $8.2 \pm 1.6\%$ 及び $6.9 \pm 0.4\%$ であり、各陰性対照群の $8.3 \pm 1.3\%$ 及び $7.8 \pm 1.2\%$ と比較して、いずれも統計学的に有意な差は認められなかった。

陽性対照物質の CP 投与後 48 及び 72 時間採血群における MNIMEs の出現数は、IMEs 10000 個あたりそれぞれ 182 個及び 44 個 (出現率: $1.82 \pm 0.62\%$ 及び $0.44 \pm 0.27\%$)、IMEs の割合は $4.5 \pm 0.6\%$ 及び $3.9 \pm 1.1\%$ であり、陰性対照群と比較して MNIMEs はいずれも有意な高値を、IMEs の割合はいずれも有意な低値を、それぞれ示した。

P092 マレイン酸塩を雄ラット (CrI: CD (SD), 5 匹/群) に、0、5、10 及び 20 mg/kg の用量で、およそ 1 mL/kg/min の速度で 20 mL/kg の投与液量を 1 回静脈内投与し、末梢血小核試験を実施した。陽性対照群には CP を 20 mg/kg の用量で 1 回経口投与した。いずれの動物も投与後 48 及び 72 時間に採血して標本を作製した。

被験物質の 20 mg/kg 投与後 0~1 時間に、2 例で赤色尿が観察され、投与翌日から観察終了まで同群の 2 例に尾の暗赤色化がみられたが、いずれの群でも体重には有意な変化はみられなかった。

末梢血小核試験の結果、被験物質のいずれの用量、いずれの標本作製時期でも、陰性対照群と比較して有意な MNIMEs の増加は認められなかった。一方、陽性対照群では 48 及び 72 時間採血群ともに有意な MNIMEs の増加が認められた。陰性対照群の各個体における MNIMEs 出現頻度及び IMEs の割合は、それぞれ $0.05 \sim 0.20\%$ 及び $6.0 \sim 10.3\%$ であり、いずれも試験施設の背景値 (Mean $\pm 3SD$, MNIMEs : $0.07 \pm 0.18\%$, IMEs : $9.5 \pm 11.7\%$) の範囲内の値を示した。陰性及び陽性対照群におけるこれらの結果は、本試験の成立基準を満たすものであり、本試験の妥当性を示すものであった。

従って、P092 マレイン酸塩は本試験条件下でラット末梢血小核試験陰性と判定した。

表二-17 P092 マレイン酸塩小核試験におけるラット一般状態

Treatment group	Dose level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	Day 1		Day 2	Day 3	Day 4
			Before dosing	0-1 h after dosing			
Negative control (Physiological saline)	0 i.v. Once	10101	-	-	-	-	-
		10102	-	-	-	-	-
		10103	-	-	-	-	-
		10104	-	-	-	-	-
		10105	-	-	-	-	-
Test substance (P092:maleate)	5 ^{a)} i.v. Once	10201	-	-	-	-	-
		10202	-	-	-	-	-
		10203	-	-	-	-	-
		10204	-	-	-	-	-
		10205	-	-	-	-	-
	10 ^{a)} i.v. Once	10301	-	-	-	-	-
		10302	-	-	-	-	-
		10303	-	-	-	-	-
		10304	-	-	-	-	-
		10305	-	-	-	-	-
	20 ^{a)} i.v. Once	10401	-	-	-	-	-
		10402	-	-	DRT	DRT	DRT
		10403	-	RU	-	-	-
		10404	-	-	-	-	-
		10405	-	RU	DRT	DRT	DRT
Positive control (CP)	20 p.o. Once	10501	-	-	-	-	-
		10502	-	-	-	-	-
		10503	-	-	-	-	-
		10504	-	-	-	-	-
		10505	-	-	-	-	-

CP: Cyclophosphamide monohydrate

-: No abnormalities, RU: Reddish urine, DRT: Dark reddish in tail

^{a)} As P092 free form

表二- 18 P092 マレイン酸塩小核試験におけるラット体重推移

Treatment group	Dose level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	Body weight (g)		
			Day 1	Day 3	Day 4
Negative control (Physiological saline)	0 i.v. Once	10101	267.0	276.9	287.5
		10102	253.6	266.2	273.8
		10103	252.0	264.2	270.6
		10104	276.1	291.5	298.7
		10105	258.8	273.0	281.7
		Mean ± SD	261.50 ± 10.04	274.36 ± 10.86	282.46 ± 11.24
Test substance (P092-maleate)	5 ^{a)} i.v. Once	10201	247.3	264.0	269.2
		10202	251.4	266.4	273.6
		10203	275.9	282.9	290.4
		10204	258.9	272.7	282.3
		10205	261.4	276.4	284.5
		Mean ± SD	258.98 ± 11.02	272.48 ± 7.63	280.00 ± 8.53
	10 ^{a)} i.v. Once	10301	263.4	278.2	280.9
		10302	251.6	266.3	275.1
		10303	253.5	266.5	273.4
		10304	260.0	275.8	283.5
		10305	270.6	282.9	292.2
		Mean ± SD	259.82 ± 7.69	273.94 ± 7.34	281.02 ± 7.49
	20 ^{a)} i.v. Once	10401	272.5	283.4	290.5
		10402	248.2	248.3	255.5
		10403	259.2	269.9	276.8
		10404	261.4	273.0	279.6
		10405	270.9	273.0	280.4
		Mean ± SD	262.44 ± 9.84	269.52 ± 12.92	276.56 ± 12.86
Positive control (CP)	20 p.o. Once	10501	255.8	264.5	268.6
		10502	269.1	281.2	286.1
		10503	263.4	272.8	282.2
		10504	249.0	267.0	274.0
		10505	272.2	281.0	287.8
		Mean ± SD	261.90 ± 9.54	273.30 ± 7.73	279.74 ± 8.19

CP: Cyclophosphamide monohydrate

^{a)} As P092 free form

表二-19 P092 マレイン酸塩小核試験(48時間)

Treatment group	Dose level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	MNIMEs			IMEs ratio among total erythrocytes	
			Number of IMEs scored	Number	Incidence (%)	Number of erythrocytes scored	IMEs/Erythrocytes (%)
Negative control (Physiological saline)	0 i.v. Once	10101	2000	3	0.15	1000	7.0
		10102	2000	1	0.05	1000	8.2
		10103	2000	2	0.10	1000	7.5
		10104	2000	2	0.10	1000	10.3
		10105	2000	3	0.15	1000	8.7
Total / Mean±SD		10000	11	0.11 ± 0.04		8.3 ± 1.3	
Test substance (P092-maleate)	5 ^{a)} i.v. Once	10201	2000	4	0.20	1000	5.6
		10202	2000	1	0.05	1000	6.8
		10203	2000	1	0.05	1000	7.3
		10204	2000	2	0.10	1000	7.7
		10205	2000	2	0.10	1000	6.9
Total / Mean±SD		10000	10	0.10 ± 0.06		6.9 ± 0.8	
	10 ^{a)} i.v. Once	10301	2000	1	0.05	1000	7.2
		10302	2000	1	0.05	1000	9.9
		10303	2000	3	0.15	1000	8.2
		10304	2000	5	0.25	1000	8.7
		10305	2000	3	0.15	1000	8.0
Total / Mean±SD		10000	13	0.13 ± 0.08		8.4 ± 1.0	
	20 ^{a)} i.v. Once	10401	2000	2	0.10	1000	7.4
		10402	2000	2	0.10	1000	6.5
		10403	2000	2	0.10	1000	8.3
		10404	2000	1	0.05	1000	6.4
		10405	2000	2	0.10	1000	7.0
Total / Mean±SD		10000	9	0.09 ± 0.02		7.1 ± 0.8	
Positive control (CP)	20 p.o. Once	10501	2000	47	2.35	1000	4.1
		10502	2000	17	0.85	1000	4.2
		10503	2000	47	2.35	1000	5.2
		10504	2000	38	1.90	1000	5.1
		10505	2000	33	1.65	1000	3.9
Total / Mean±SD		10000	182 ^{##}	1.82 ± 0.62		4.5 ± 0.6 ^{**}	

IMEs: Immature erythrocytes, MNIMEs: Micronucleated IMEs, CP: Cyclophosphamide monohydrate

^{a)} As P092 free form

^{##} p < 0.01 (Kastenbaum and Bowman's method)

^{**} p < 0.01 (Student's *t*-test)

表二-20 P092 マレイン酸塩小核試験(72 時間)

Treatment group	Dose level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	MNIMEs			IMEs ratio among total erythrocytes	
			Number of IMEs scored	Number	Incidence (%)	Number of erythrocytes scored	IMEs/Erythrocytes (%)
Negative control (Physiological saline)	0 i.v. Once	10101	2000	2	0.10	1000	6.0
		10102	2000	4	0.20	1000	9.1
		10103	2000	1	0.05	1000	7.7
		10104	2000	1	0.05	1000	7.9
		10105	2000	2	0.10	1000	8.5
Total / Mean±SD			10000	10	0.10 ± 0.06		7.8 ± 1.2
Test substance (P092-maleate)	5 ^{a)} i.v. Once	10201	2000	2	0.10	1000	7.1
		10202	2000	4	0.20	1000	7.1
		10203	2000	0	0.00	1000	6.2
		10204	2000	1	0.05	1000	6.8
		10205	2000	2	0.10	1000	7.9
Total / Mean±SD			10000	9	0.09 ± 0.07		7.0 ± 0.6
	10 ^{a)} i.v. Once	10301	2000	1	0.05	1000	7.1
		10302	2000	3	0.15	1000	6.9
		10303	2000	2	0.10	1000	7.8
		10304	2000	4	0.20	1000	8.4
		10305	2000	4	0.20	1000	10.9
Total / Mean±SD			10000	14	0.14 ± 0.07		8.2 ± 1.6
	20 ^{a)} i.v. Once	10401	2000	3	0.15	1000	7.3
		10402	2000	1	0.05	1000	6.5
		10403	2000	2	0.10	1000	7.2
		10404	2000	2	0.10	1000	6.7
		10405	2000	4	0.20	1000	6.6
Total / Mean±SD			10000	12	0.12 ± 0.06		6.9 ± 0.4
Positive control (CP)	20 p.o. Once	10501	2000	1	0.05	1000	5.7
		10502	2000	8	0.40	1000	2.9
		10503	2000	11	0.55	1000	4.3
		10504	2000	16	0.80	1000	3.4
		10505	2000	8	0.40	1000	3.4
Total / Mean±SD			10000	44 ^{##}	0.44 ± 0.27		3.9 ± 1.1 ^{**}

IMEs: Immature erythrocytes, MNIMEs: Micronucleated IMEs, CP: Cyclophosphamide monohydrate

^{a)} As P092 free form

^{##} p < 0.01 (Kastenbaum and Bowman's method)

^{**} p < 0.01 (Student's *t*-test)

6. (ホ) 薬理作用に関する資料

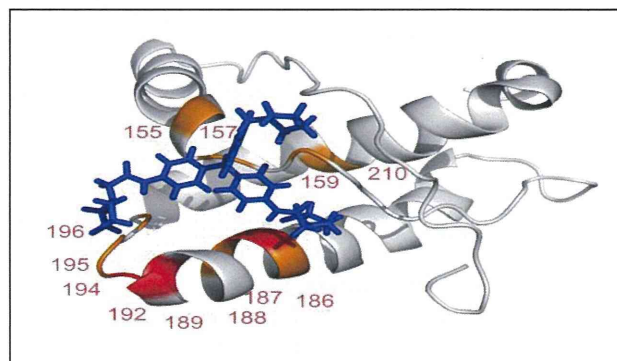
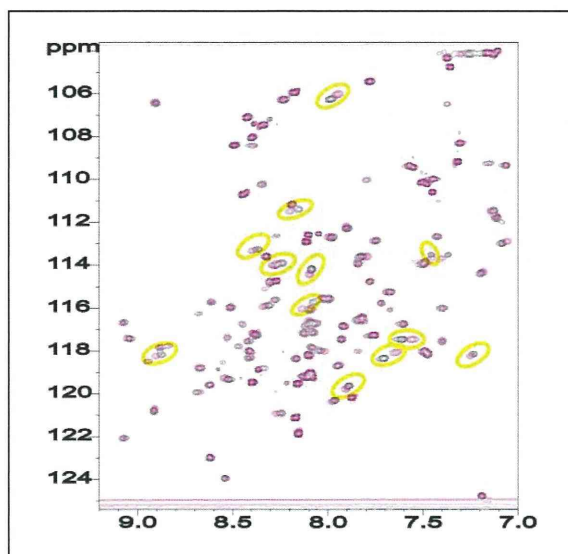
6.1 核磁気共鳴法による結合試験

[実験方法および結果]

^{15}N ラベルしたリコンビナントマウス PrP (121-231) (mPrP (121-231))、及びこれと P092 との混合液に対し、NMR 測定を行い、化学シフトの変化を観測した。1.2 mg/mL の ^{15}N で均一にラベルしたリコンビナント mPrP (121-231) を 30 mM d_3 -acetate 緩衝液 (pH 4.5 で、1 mM NaN_3 、4.5 μM AEBSF、20 μM EDTA、0.4 μM bestatin、0.06 μM pepstatin A、0.06 μM E-64、及び 1 nM DSS を 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O を含む) に溶解した。P092 を混合した場合の最終濃度は 0.5 mM であった。NMR スペクトルは 25.0 °C、Bruker Avance600 を用いて測定した。mPrP の化学シフトは、P092 を混合した場合は、混合しない場合に比べ、残基番号 155、186-189、192、及び 194-196 の化学シフトの変化が見られた (図ホ-1)。この結果から、これらの残基の近傍に P092 が結合しているものと推定され、エネルギー最小化計算より、P092 (青) は、図ホ-2 のようにプリオン蛋白質に結合していることがわかった。

図ホ-1 NMR による P092 とプリオンタンパク質の結合解析

- (1) NMR スペクトル (青：化合物なし、赤：化合物あり) (2) プリオンの立体構造上への化学シフトが変化した残基のマッピング



6.2 表面プラズモン共鳴分析法による結合試験

【実験方法および結果】

Biacore T200を用い、mPrP(121-231)とP092との結合を測定した。PrPは、アミンカップリングを用い、センサーチップに固定した。ランニングバッファーとしては、0.01 M HEPES、pH 7.4、containing 0.15 M NaCl and 0.1% surfactant P20を使用した。その結果、解離定数 (K_D) は、約3.0 μ Mであることが分かった。

6.3 GT+FK 細胞系を用いた試験

【実験方法および結果】

GT+FK 細胞系は 37 °C、5% 二酸化炭素で、ダルベッコ培地に 10%牛胎児血清、50 U/mL のペニシリン G、50 mg/mL の硫酸ストレプトマイシン を加えた培養液で培養した。コンフルエントとなった細胞は、一週間毎に、0.25% トリプシンと 1 mM EDTAを用いて、継代した。細胞の濃度は、 0.5×10^5 cells/mL に調整した。化合物は、10 mMの濃度で、DMSOに溶解した。およそ 3×10^5 の細胞を、6穴プレートに播種し、15 時間後に、培養液を化合物を含む培養液で置換した。対照に使う細胞は、等しい濃度のDMSOを含む培養液を用いた。化合物を加えてから3日後、細胞を150 μ Lのトリトン-DOC溶解液で溶解した。11,200gで遠心した後、上澄み中の蛋白質濃度を吸光度系で測定し、溶解液で1 mg/mLに調整した。

試料は、20 μ g/mLの濃度のプロテイナーゼKで、37 °Cで30分間、加水分解し、反応は3mMの阻害剤（ペファブロック）で停止させた。試料は、21,952 gで45分間、4 °Cで遠心し、沈殿物を試料緩衝液に溶かし、煮沸させたのち、15% ポリアクリルアミドで電気泳動した。その後、ウエスタンブロットを行い、蛋白質をPVDF 膜に転写した。PrP^{Sc}検出のための一次抗体としては、M-20 抗体を使用した。シグナルはSuperSignal液で可視化し、LAS-1000 UV 解析装置でスキャンした。全PrP^{Sc} バンドの濃度を測定し、Multi Gauge（ソフトウェア名）を用いて比較した。PrP^{Sc}が50%に減少する薬剤の有効濃度 (IC_{50}) を、薬剤の添加濃度を変えることにより求めた。

GT+FK細胞系を用いた試験では、P092の IC_{50} は、 $0.46 \pm 0.20 \mu$ Mとこれまでの

GN8類縁体の中でも最も低い値を示した。GN8類縁体はこれまで約200種類を有機合成したが、脳移行しやすい分子量が500程度の分子では、P092の抗プリオン効果が最大である。また、既に発表されている他の抗プリオン化合物と比較しても、最も効果が大きい。また、10 μM での細胞毒性は認められなかった。

6.4 マウス感染モデルを用いた試験

【実験方法および結果】

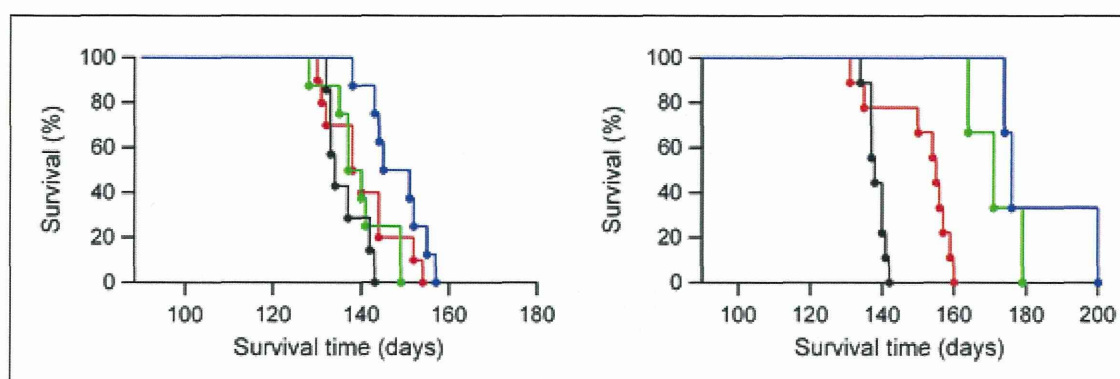
福岡株に感染したマウスの脳乳液を1%に希釈し、その20 μL を4週齢の雄DDYマウスの右側頭葉に注入した。投与前日に、化合物を5%グルコースに溶解した。化合物を溶解した溶液は、pHが、1.9~2.4と低いため、0.1 N NaOHで、pH 5に調整した。化合物の濃度は100 mMとした。福岡株感染マウスの脳乳液を注入してから4週後、2つの浸透圧ポンプに化合物、または5%グルコースを満たし、マウスの腹腔内に挿入した。このようにして、マウスには、脳乳液注入後、17.9 $\mu\text{mol/kg/day}$ の用量で脳乳液注入後28-56日の間にP092を含む化合物を投与した。全てのマウスに関して、毎日注意深く、その神経症状を観察し、また潜伏期や生存期間をモニターした。投与後、それぞれのポンプにおける薬液の残量を測定し、薬液の半分以上が残存していた場合は、解析から除外した。生存曲線は、カプラン・マイヤー法により、SigmaStatを用いて解析した。

プリオンと化合物を同時に投与した場合は、化合物は1%の福岡株に感染したマウスの脳乳液に20 mMの濃度で混合した。化合物を含む福岡株感染脳乳液は、同様に浸透圧ポンプを用いてマウスに注入した。この時のP092の用量は25 $\mu\text{mol/kg}$ であった。どちらの実験においても、プリオン病に関連しない原因で死亡したケースは、解析に含めなかった。実験動物の取り扱いについては、動物の苦痛を最小限に留めるために、岐阜大学における動物実験規定に従い、岐阜大学動物実験委員会の承認を得た上で実施した。

図ホ・2：マウス感染モデルにおける P092 腹腔内投与の効果（生存曲線）

左図：感染後 4 週において、P092 を投与した群（青）、投与しない群（黒）、化合物 A を投与した群（赤）、化合物 B を投与した群（緑）

右図：感染と同時に P092 を投与した群（青）、投与しない群（黒）、化合物 A を投与した群（赤）、化合物 B を投与した群（緑）



上記の実験結果に対し、カプラン・マイヤー法を適用すると、表ホ・1 の結果となる。

表ホ・1 マウス感染モデルにおける P092 腹腔内投与の効果（平均生存時間）

Treatment	n	Dose	Duration (d.p.i.)	Survival time (d.p.i., mean ± SD)	
5% glucose	7		29-57	136.3 ± 4.5	
Compound A	10	17.9 μmol/kg/day	27-55	140.3 ± 8.3	N.S.
Compound B	8	17.9 μmol/kg/day	28-56	139.5 ± 7.1	N.S.
P092	8	17.9 μmol/kg/day	27-55	148.1 ± 6.6	**

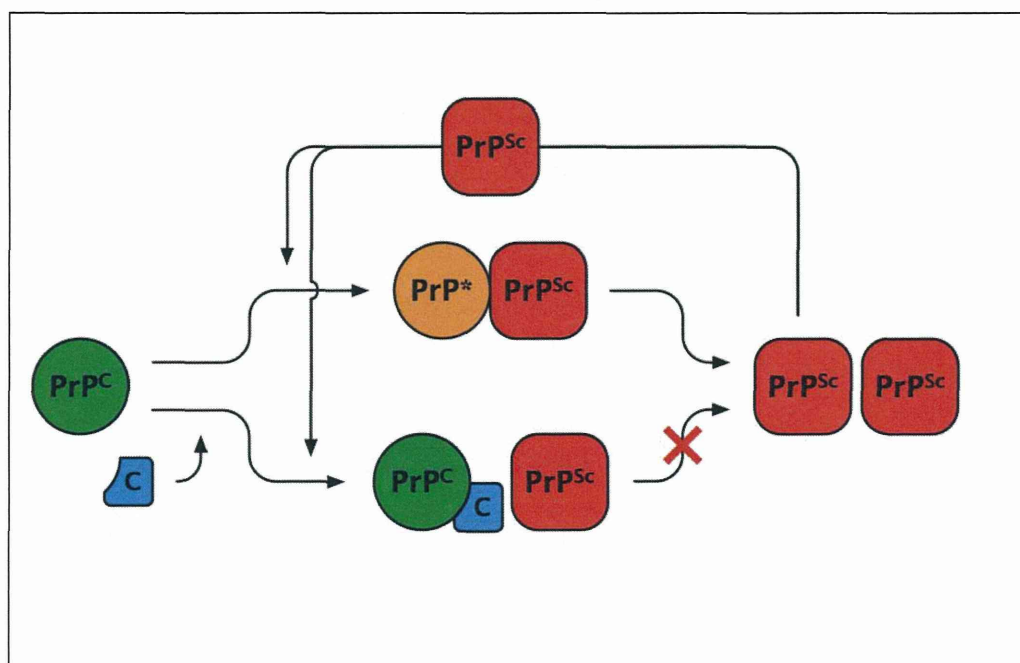
この結果から、P092 の投与により、福岡株感染マウスの寿命が有意に延長することがわかった。また、この場合の有効末梢投与量は、9.0 mg/kg/day であることがわかる。

d.p.i.; days post-inoculation, N.S.; not significant, **; P < 0.001.

6.5 作用機序

P092 は、プリオンタンパク質 (PrP^C) のホットスポットに特異的に結合し、PrP^{Sc} との相互作用を阻害し、立体構造を安定化すると考えられる。このような作用を有する分子を我々は、メディカルシャペロンと呼んでいる。すなわち、P092 はメディカルシャペロンとして強い活性を持ち、プリオンタンパク質の異常構造への変換を抑制する。P092 を腹腔内投与することにより、脳内に移行し、プリオン病の進行が抑制される。

図ホ-3 P092 (メディカルシャペロン) の作用機序 (c : P092, PrP^C : 正常プリオン、PrP^{Sc} : 異常プリオン、PrP* : 活性型プリオン)



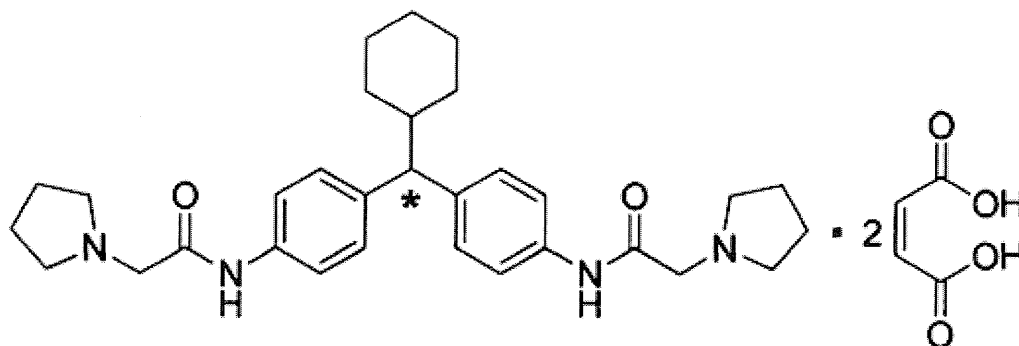
安全性薬理：平成 27 年度実施予定

その他の薬理試験：BSE 感染カニクイサルに対する発症前投与及び発症後投与の影響
(独立行政法人医薬基盤研にて平成 27 年度実施中)

7. (へ) 吸収・分布・代謝・排泄に関する資料

7.1. 被験物質および構造と標識位置

[¹⁴C]P092 maleate ([¹⁴C]P092 マレイン酸塩 : Lot.K0348-02)



* : ¹⁴C 標識位置

7.2. 放射能濃度および放射化学的純度

5 MBq/mL (被験物質濃度 : 1.705 mg/mL, フリー体として 1.166 mg/mL : Curachem 社) であり、放射化学的純度は 98.9%(HPLC 法)であった。

7.3. ラットにおける [¹⁴C]P092 マレイン塩酸塩の単回静脈内投与後の血中動態、排泄及び分布

(non-GLP:試験番号 B130898)

【実験方法および結果】

1. 血液・血漿、脳脊髄液及び脳中・尿・糞及び呼気中放射濃度

雄性ラット (CrI:CD (SD)) に [¹⁴C]P092 マレイン酸塩を 1mg/5ml/kg を単回静脈内投与したときの血液・血漿、脳脊髄液及び脳中を、さらに尿・糞及び呼気中放射濃度を継時的に測定し、それぞれ表へ-1～表へ-2 及び図へ-1 に示した。血液中放射能濃度は投与後 5 分に 298.3 ng eq./mL を示したのち、投与後 24 時間では 37.4 ng eq./mL、さらに投与後 336 時間では 3.8 ng eq./mL まで低下した。時間 0 に外挿した初期血液中放射能濃度 (C₀)、消失半減期 (t_{1/2}) 及び血液中放射能濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf}) はそれぞれ 366.3 ng eq./mL, 91.9 h, 5697 及び 6212 ng eq.・h/mL であり、全身クリアランス (CL_{total})、定常状態の分布容積 (V_{dss}) 及び平均滞留時間 (MRT_{0-inf}) はそれぞれ 169 mL/h/kg、20922 mL/kg 及び 126.1 h であった (表へ-1、図へ-1)。

また、投与後 24 時間までの尿及び糞中にはそれぞれ投与放射能の 2.5%及び 11.5%が排泄され、投与後 336 時間までの尿及び糞中にはそれぞれ投与放射能の 12.3%及び 85.2%が排泄された。

投与後 336 時間までのケージ洗浄液を含めた放射能の総排泄率は 99.6%であり、屠体中放射能量（投与放射能の 15.6%）を加えた放射能の総回収率は 115.2%であった。なお、放射能の呼気中排泄は認められなかった。

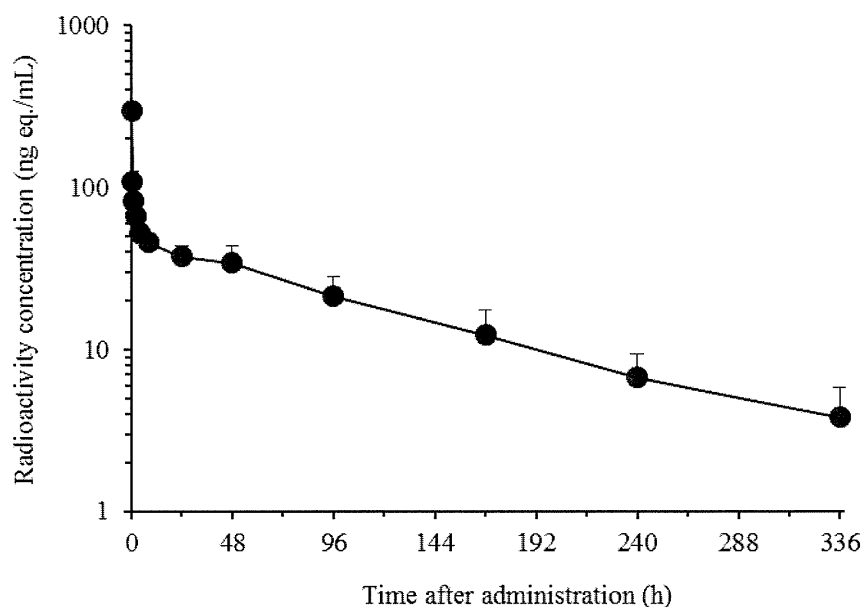
静脈内投与された放射能の大部分は糞中に排泄され、ラットにおける¹⁴C]P092 マレイン酸塩の主排泄経路は糞中排泄であることが示された。また、投与後 336 時間においても体内に投与放射能の 15.6%が残存しており、¹⁴C]P092 及び/又はその代謝物には組織残留性があり、体外への排泄は緩徐であると考えられた（表へ-2）。

表へ-1 [14C]P092 マレイン酸塩ラット単回静脈内投与時の血中放射濃度とファルマコキネテックス

Time/Parameter	Radioactivity concentration (ng eq./mL)
	Mean ± SD
5 min	298.3 ± 26.3
30 min	108.0 ± 17.2
1 h	82.5 ± 14.6
2 h	66.3 ± 13.2
4 h	52.1 ± 6.5
8 h	45.6 ± 5.1
24 h	37.4 ± 6.5
48 h	34.1 ± 9.4
96 h	21.3 ± 6.8
168 h	12.3 ± 5.2
240 h	6.7 ± 2.6
336 h	3.8 ± 2.0
C ₀ (ng eq./mL)	366.3 ± 41.2
t _{1/2} (h) ^{a)}	91.9 ± 9.1
AUC _{0-t} (ng eq.·h/mL)	5697 ± 1513
AUC _{0-inf} (ng eq.·h/mL)	6212 ± 1794
CL _{total} (mL/h/kg)	169 ± 42
Vd _{ss} (mL/kg)	20922 ± 4642
MRT _{0-inf} (h)	126.1 ± 22.4

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

a) The t_{1/2} was automatically calculated by WinNonlin.



図へ-1 $[^{14}\text{C}]$ P092 マレイン酸塩ラット単回静脈内投与時の血中放射濃度

表へ-2 $[^{14}\text{C}]$ P092 マレイン酸塩ラット単回静脈内投与時の尿中、糞中及び呼気中の放射能排泄

Time (h)	Cumulative radioactivity excretion (% of dose)				
	Urine	Feces	Expired air	Cage washing	Total
0-24	2.5 ± 0.9	11.5 ± 4.1	--	0.2 ± 0.1	14.3 ± 4.9
-48	4.7 ± 1.4	29.8 ± 5.0	--	0.6 ± 0.0	35.1 ± 6.4
-72	6.5 ± 1.9	43.2 ± 6.6	--	0.8 ± 0.1	50.4 ± 8.5
-96	7.9 ± 2.2	52.8 ± 6.8	ND	0.9 ± 0.1	61.6 ± 9.0
-120	8.9 ± 2.4	59.5 ± 6.4	--	1.0 ± 0.1	69.4 ± 8.8
-144	9.8 ± 2.7	65.0 ± 5.8	--	1.1 ± 0.2	76.0 ± 8.4
-168	10.5 ± 2.8	69.3 ± 5.5	ND	1.2 ± 0.2	81.0 ± 8.2
-240	11.7 ± 3.1	78.4 ± 3.4	--	1.4 ± 0.3	91.6 ± 6.2
-336	12.3 ± 3.3	85.2 ± 1.6	--	2.0 ± 0.7	99.6 ± 4.2
Residues in carcass at 336 h					15.6 ± 4.3
Total recovery					115.2 ± 0.3

Data are expressed as the mean ± S.D. of three animals.

ND: Not detected

--: Not determined

2. 定量的全身オートラジオグラフィ

(Quantitative Whole-body Autoradiography: QWBA)

[¹⁴C]P092 マレイン酸塩を 1mg/kg 単回静脈内投与後、ポリカーボネート製ケージにスノコを敷き、ラットを個体毎に収容した。

所定の採取時点に、ラットを炭酸ガス吸入により安楽死させた。電気バリカン等で全身を剪毛したのち、約 4% (w/v) カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 水溶液を全身に塗布し、ドライアイス/アセトン浴中で凍結させた。凍結屠体を約 4% (w/v) CMC-Na 水溶液中に包埋した凍結ブロックを作製して包埋する。

大型滑走式凍結ミクロトーム (CM3600, Leica Microsystems) を用いて、全身凍結切片 (厚さ: 設定値 30 μm) を粘着テープ (tesa4129, テサテープ) 上に採取した。

採取した凍結切片を凍結乾燥し、表面をダイアホイル膜 (厚さ 4 μm, 三菱樹脂) で覆ったのち、イメージングプレート (IP, BAS-MS2040, 20×40 cm, 富士フイルム) に密着させて露光させた。IP 上の放射線像をフルオロ・イメージアナライザー (Typhoon FLA 7000, GE Healthcare) により読み取り (laser: 650 nm, filter: [IP], PMT: 900, pixel size : 25 又は 50 μm, latitude: 4), 個体当たり 3 切片以上のラジオルミノグラムを作製後、組織中放射能濃度の算出 (KSOP/SYS/4015, 4020) はラジオルミノグラムを QWBA 画像解析ソフト (SeeScan Ver. 2.1.2.19, LabLogic Systems) により解析し、同一切片上のバックグラウンド (検量線血液試料及び組織試料が存在しない場所) の PSL (Photo Stimulated Luminescence) 値で補正した検量線血液及び組織の単位面積当たりの放射能濃度 (PSL_B 及び PSL_T, (PSL-BG)/mm²) を求めた。また、PSL_B を検量線血液試料中放射能濃度 (ng eq./g) に対して一次回帰 (重み付け: 1/Y) し、4 濃度の検量線 (原点を含めない) を作成した。

直線性の許容基準は、相関係数 (r) が 0.99 以上であること、更に PSL_B から back calculate して求めた露光時間毎の検量線血液試料の各放射能濃度 (ng eq./g) において、全 IP の平均濃度の相対誤差 (RE) 及び全 IP 間の変動係数 (CV 値) を算出し、それぞれが±20%以内 (検量線最低濃度では±30%以内) であることを確認した。なお、r が規定範囲外となった場合は当該 IP 又は切片のみを不採用とし、更に CV 値が規定範囲外となった場合は RE が大きな IP 又は切片のみを不採用とし、再露光又は当該切片の隣接切片を用いて露光を行うこととした。また、過露光した組織については、露光時間を変えて再露光し、当該組織のみを解析した。

得られた PSL_T について、同一切片上の検量線により組織中放射能濃度 (C_{T(QWBA)}, ng eq./g) を算出する。結果は、図へ-2, 3,4,5 及び表へ-3 に示した。

いずれの時点のラジオルミノグラムにおいても大部分の組織に放射能が検出され、特に脾臓で高い放射能が認められた。各組織の放射能濃度は、多くの組織においては投与後 1 又は 24 時間に最高値を示したが、下垂体では投与後 168 時間、大脳、ハーダー氏腺及び胸腺では投与後 336 時間で最高値を示した。

表へ-3 より投与後 1 時間においては、胸腺、心臓、肺及び脾臓で放射能濃度は定量上限以上 (Above the upper limit of quantification: AUQ, >3928.2ng eq./g) であった。次いで副腎 (3599.1 ng eq./g, K_B 値 17.93)、腎臓 (3206.0 ng eq./g, K_B 値 15.97)、腸間膜リンパ (3133.3 ng eq./g, K_B 値 15.61) 及び下垂体 (2050.7 ng eq./g, K_B 値 10.22) で高い放射能濃度が認められた。その他の組織においては K_B 値が 10 未満であり、大脳中放射能濃度は 17.0 ng eq./g (K_B 値 0.08) であった。

投与後 24 時間においては、脾臓、副腎及び腎臓で放射能濃度は AUQ であった。次いで腸間膜リンパ (3302.5 ng eq./g, K_B 値 56.74)、胸腺 (3236.4 ng eq./g, K_B 値 55.61)、肺 (2955.2 ng eq./g, K_B 値 50.78)、下垂体 (2675.5 ng eq./g, K_B 値 45.97) 及び顎下腺 (2541.2 ng eq./g, K_B 値 43.66) で高い放射能濃度が認められた。その他の組織においては K_B 値が 40 未満であり、大脳中放射能濃度は 13.4 ng eq./g (K_B 値 0.23) であった。

投与後 168 時間においては、脾臓で放射能濃度は AUQ であった。次いで下垂体 (3405.2 ng eq./g, K_B 値 228.54)、副腎 (3352.6 ng eq./g, K_B 値 225.01)、腸間膜リンパ (2342.1 ng eq./g, K_B 値 157.19) 及び胸腺 (1541.2 ng eq./g, K_B 値 103.44) で高い放射能濃度が認められた。その他の組織においては K_B 値が 100 未満であり、大脳中放射能濃度は 18.3 ng eq./g (K_B 値 1.23) であった。

投与後 336 時間においては、脾臓で最も高い放射能濃度 (3122.5 ng eq./g) が認められ、K_B 値は 312.25 であった。次いで副腎 (2257.4 ng eq./g, K_B 値 225.74)、下垂体 (1646.0 ng eq./g, K_B 値 164.60)、胸腺 (1631.5 ng eq./g, K_B 値 163.15)、骨髄 (1387.8 ng eq./g, K_B 値 138.78)、ハーダー氏腺 (1357.9 ng eq./g, K_B 値 137.59) 及び腸間膜リンパ (1132.5 ng eq./g, K_B 値 113.25) で高い放射能濃度が認められた。その他の組織においては K_B 値が 100 未満であり、大脳中放射能濃度は 21.0 ng eq./g (K_B 値 2.10) であった。

放射能濃度は大部分の組織において血液よりも高く、特に肺、副腎及び脾臓では顕著に高い濃度の放射能が認められ、^[14C]P092 及び/又はその代謝物は組織移行性が高いことが示唆された。また、投与後 336 時間においても多くの組織

の放射能濃度が認められ、 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ 及び/又はその代謝物の組織残留性が示唆された。

表へ-3 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ マレイン酸塩ラット単回静脈内投与時の組織中放射濃度

Tissue	Radioactivity concentration (ng eq./g)			
	1 h	24 h	168 h	336 h
Blood	200.7 (1.00)	58.2 (1.00)	14.9 (1.00)	10.0 (1.00)
Cerebrum	17.0 (0.08)	13.4 (0.23)	18.3 (1.23)	21.0 (2.10)
Cerebellum	15.2 (0.08)	12.7 (0.22)	10.0 (0.67)	BLQ (NC)
Pituitary	2050.7 (10.22)	2675.5 (45.97)	3405.2 (228.54)	1646.0 (164.60)
Spinal cord	20.6 (0.10)	17.5 (0.30)	15.0 (1.01)	17.3 (1.73)
Eyeball	81.3 (0.41)	115.6 (1.99)	38.5 (2.58)	26.3 (2.63)
Harderian gland	486.6 (2.42)	632.0 (10.86)	1026.5 (68.89)	1375.9 (137.59)
Submaxillary gland	1374.1 (6.85)	2541.2 (43.66)	1060.4 (71.17)	791.6 (79.16)
Thyroid	AUQ (NC)	3236.4 (55.61)	875.6 (58.77)	646.9 (64.69)
Thymus	668.2 (3.33)	1149.8 (19.76)	1541.2 (103.44)	1631.5 (163.15)
Heart	AUQ (NC)	968.0 (16.63)	140.5 (9.43)	82.4 (8.24)
Lung	AUQ (NC)	2955.2 (50.78)	716.9 (48.11)	426.0 (42.60)
Liver	2260.6 (11.26)	1980.6 (34.03)	387.1 (25.98)	250.5 (25.05)
Kidney	3206.0 (15.97)	AUQ (NC)	724.8 (48.64)	435.8 (43.58)
Adrenal	3599.1 (17.93)	AUQ (NC)	3352.6 (225.01)	2257.4 (225.74)
Spleen	AUQ (NC)	AUQ (NC)	AUQ (NC)	3122.5 (312.25)
Pancreas	1781.7 (8.88)	2022.7 (34.75)	278.3 (18.68)	151.3 (15.13)
Prostate	517.7 (2.58)	882.7 (15.17)	462.1 (31.01)	391.8 (39.18)
Testis	20.2 (0.10)	31.4 (0.54)	30.2 (2.03)	30.8 (3.08)
Epididymis	115.9 (0.58)	125.0 (2.15)	65.5 (4.40)	66.9 (6.69)
Seminal vesicle	10.4 (0.05)	28.7 (0.49)	25.7 (1.72)	12.3 (1.23)
Skin	179.2 (0.89)	262.0 (4.50)	217.2 (14.58)	161.7 (16.17)
Skeletal muscle	1993.4 (9.93)	554.4 (9.53)	67.5 (4.53)	41.8 (4.18)
Bone (femur)	150.8 (0.75)	112.1 (1.93)	17.8 (1.19)	32.2 (3.22)
Bone marrow (femur)	1454.3 (7.25)	2268.9 (38.98)	1377.5 (92.45)	1387.8 (138.78)
White adipose tissue	86.5 (0.43)	90.5 (1.55)	20.1 (1.35)	10.4 (1.04)
Brown adipose tissue	288.7 (1.44)	1257.4 (21.60)	243.9 (16.37)	80.1 (8.01)
Bladder	207.0 (1.03)	424.5 (7.29)	138.0 (9.26)	50.3 (5.03)
Mesenteric lymph node	3133.3 (15.61)	3302.5 (56.74)	2342.1 (157.19)	1132.5 (113.25)
Stomach	1158.8 (5.77)	1022.9 (17.58)	183.5 (12.32)	117.2 (11.72)
Small intestine	713.6 (3.56)	1588.2 (27.29)	309.8 (20.79)	171.2 (17.12)
Large intestine	578.3 (2.88)	996.0 (17.11)	223.2 (14.98)	84.7 (8.47)

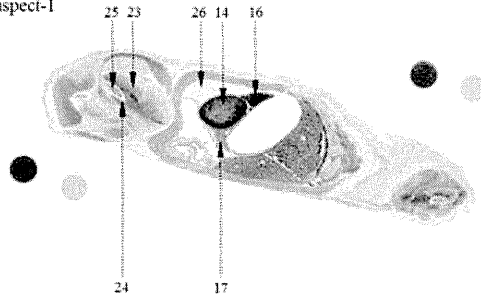
Values in parentheses are expressed as the ratio of tissue concentration to blood concentration (K_p).

AUQ: Above the upper limit of quantification (> 3928.2 ng eq./g)

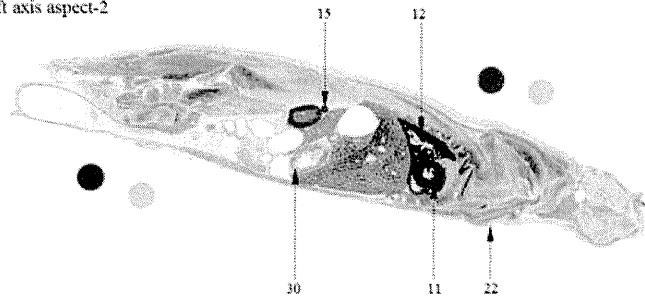
BLQ: Below the lower limit of quantification (< 7.5 ng eq./g)

NC: Not calculated

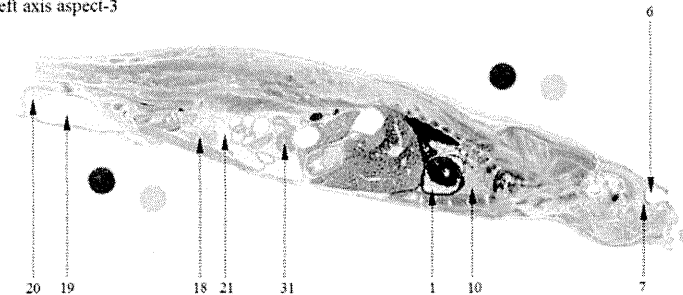
Left axis aspect-1



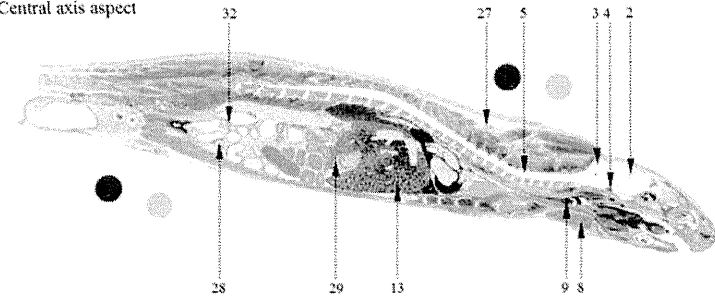
Left axis aspect-2



Left axis aspect-3



Central axis aspect

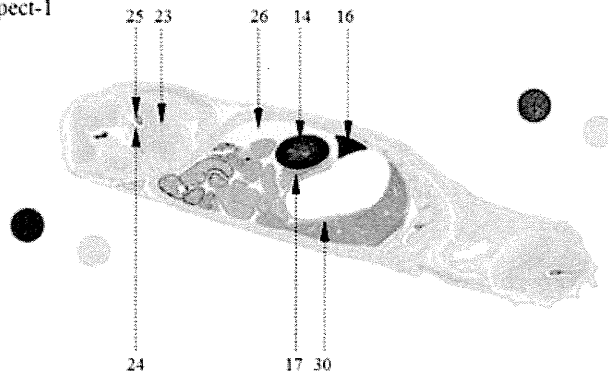


- | | | | |
|----------------------|------------|--------------------|--------------------------|
| 1 Blood | 9 Thyroid | 17 Pancreas | 25 Bone marrow(femur) |
| 2 Cerebrum | 10 Thymus | 18 Prostate | 26 White adipose tissue |
| 3 Cerebellum | 11 Heart | 19 Testis | 27 Brown adipose tissue |
| 4 Pituitary | 12 Lung | 20 Epididymis | 28 Bladder |
| 5 Spinal cord | 13 Liver | 21 Seminal vesicle | 29 Mesenteric lymph node |
| 6 Eyeball | 14 Kidney | 22 Skin | 30 Stomach |
| 7 Harderian gland | 15 Adrenal | 23 Skeletal muscle | 31 Small intestine |
| 8 Submaxillary gland | 16 Spleen | 24 Bone(femur) | 32 Large intestine |

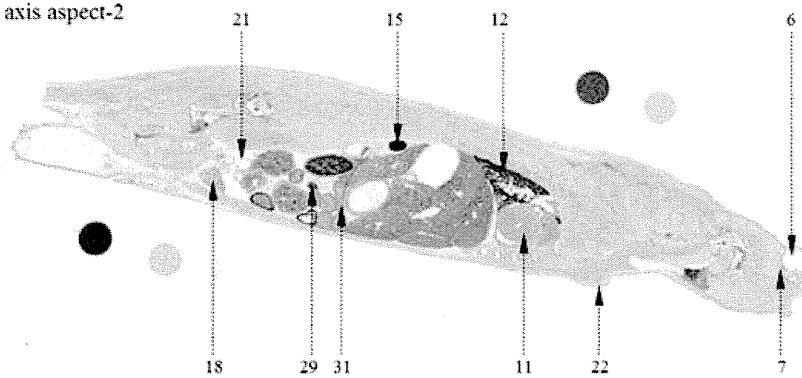
- | | | | |
|----------------------|------------|--------------------|--------------------------|
| 1 Blood | 9 Thyroid | 17 Pancreas | 25 Bone marrow(femur) |
| 2 Cerebrum | 10 Thymus | 18 Prostate | 26 White adipose tissue |
| 3 Cerebellum | 11 Heart | 19 Testis | 27 Brown adipose tissue |
| 4 Pituitary | 12 Lung | 20 Epididymis | 28 Bladder |
| 5 Spinal cord | 13 Liver | 21 Seminal vesicle | 29 Mesenteric lymph node |
| 6 Eyeball | 14 Kidney | 22 Skin | 30 Stomach |
| 7 Harderian gland | 15 Adrenal | 23 Skeletal muscle | 31 Small intestine |
| 8 Submaxillary gland | 16 Spleen | 24 Bone(femur) | 32 Large intestine |

図へ-2 [14C]P092 マレイン酸塩ラット単回静脈内投与 1 時間後の組織中放射濃度分布

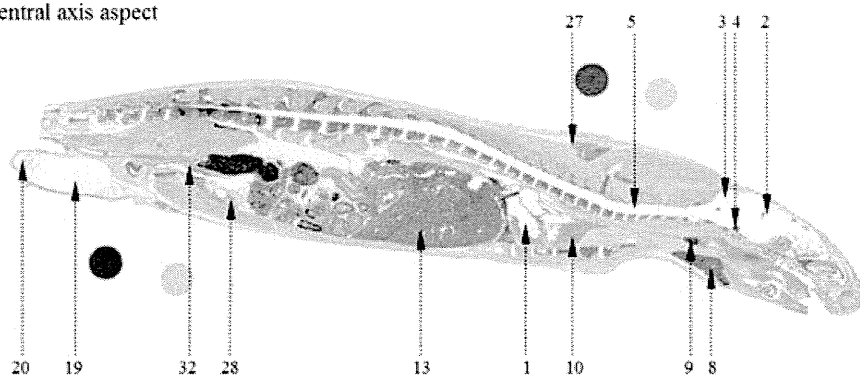
Left axis aspect-1



Left axis aspect-2



Central axis aspect



- | | | | |
|----------------------|------------|--------------------|--------------------------|
| 1 Blood | 9 Thyroid | 17 Pancreas | 25 Bone marrow(femur) |
| 2 Cerebrum | 10 Thymus | 18 Prostate | 26 White adipose tissue |
| 3 Cerebellum | 11 Heart | 19 Testis | 27 Brown adipose tissue |
| 4 Pituitary | 12 Lung | 20 Epididymis | 28 Bladder |
| 5 Spinal cord | 13 Liver | 21 Seminal vesicle | 29 Mesenteric lymph node |
| 6 Eyeball | 14 Kidney | 22 Skin | 30 Stomach |
| 7 Harderian gland | 15 Adrenal | 23 Skeletal muscle | 31 Small intestine |
| 8 Submaxillary gland | 16 Spleen | 24 Bone(femur) | 32 Large intestine |

図へ-3 [^{14}C]P092 マレイン酸塩ラット単回静脈内投与 24 時間後の組織中放射濃度分布