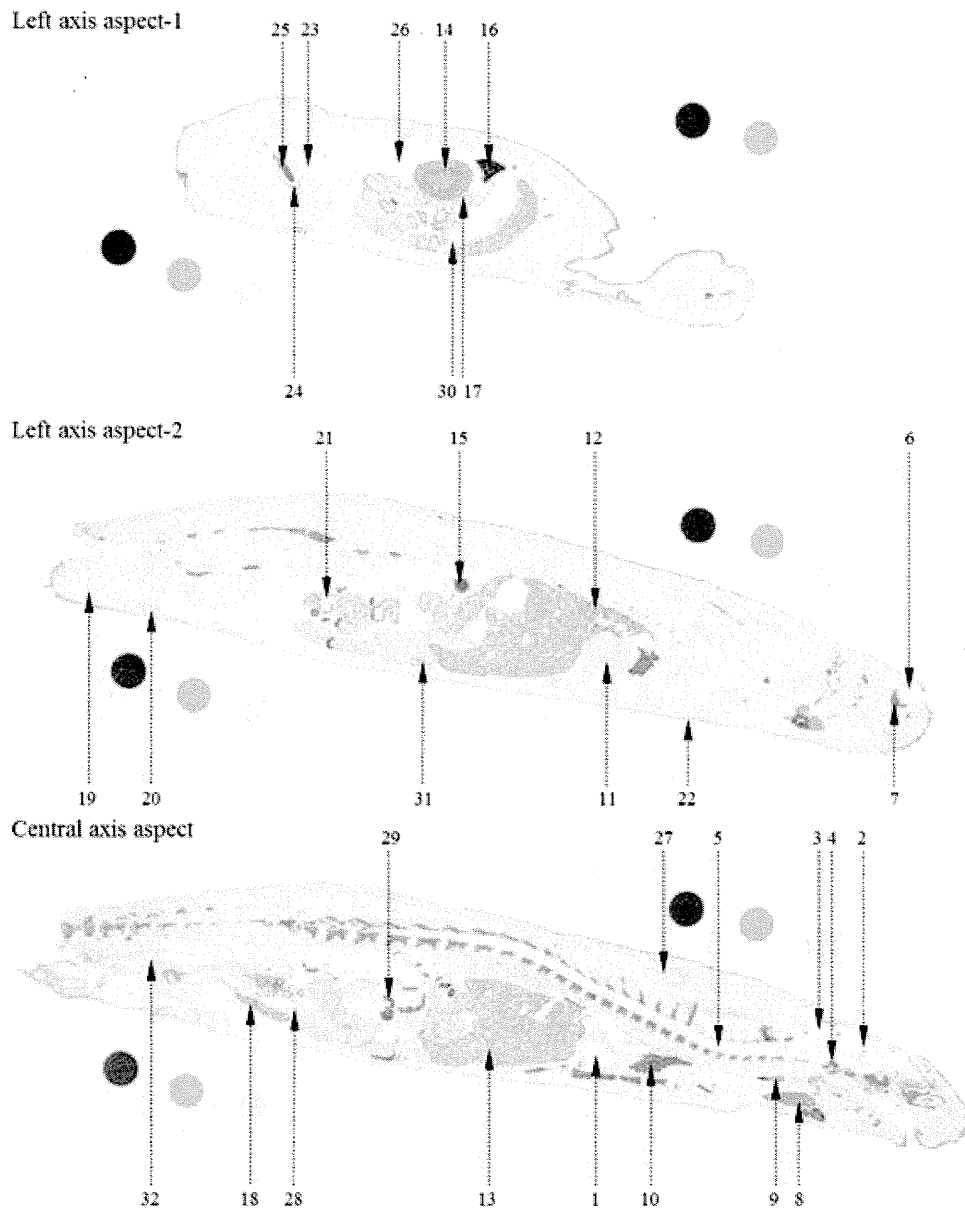


図へ-4 [¹⁴C]P092 マレイン酸塩ラット単回静脈内投与 168 時間後の組織中放射濃度分布



- | | | | |
|----------------------|------------|--------------------|--------------------------|
| 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-5 [14C]P092 マレイン酸塩ラット単回静脈内投与 336 時間後の組織中放射濃度分布

7.4. 血液、血漿、脳及び脳脊髄液中放射能濃度

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩を雄性ラットに 1 mg/kg の用量で単回急速静脈内投与したときの投与後 1、24、168 及び 336 時間における血液、血漿、脳及び脳脊髄液中放射能濃度を表へ-4 に示した。

血液及び血漿中放射能濃度は投与後 1 時間に最高値（それぞれ 74.2 及び 7.1 ng eq./mL）を示し、その後経時的に減少して、血漿中放射能濃度は投与後 168 時間で検出限界値未満（ND）となった。脳中放射能濃度は投与後 1 時間以降徐々に増加して投与後 168 時間に最高値（37.2 ng eq./g）を示した。脳脊髄液中放射能濃度は、いずれの測定時点においても ND であった。投与後 1 及び 24 時間の血液中放射能濃度は血漿中放射能濃度の約 10 倍の値であり、[¹⁴C]P092 の血球成分への高い移行性が示唆された。また、脳中放射能濃度は投与後 168 時間で最高値を示したことから [¹⁴C]P092 及び/又はその代謝物の脳組織への移行は緩徐であることが推察された。

表へ-4 [¹⁴C]P092 マレイン酸塩ラット単回静脈内投与時の血液、血漿、脳及び脳脊髄液中放射濃度

Tissue	Radioactivity concentration (ng eq./mL or g)		
	1 h	24 h	168 h
Blood	74.2 ± 14.7	30.7 ± 5.5	11.0 ± 2.1
Plasma	7.1 ± 0.4	3.6 ± 0.8	ND
Brain	23.9 ± 2.4	33.1 ± 1.5	37.2 ± 2.2
Cerebrospinal fluid	ND	ND	ND

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

ND: Not detected

7.5. カニクイザルにおける [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 B130899)

[実験方法および結果]

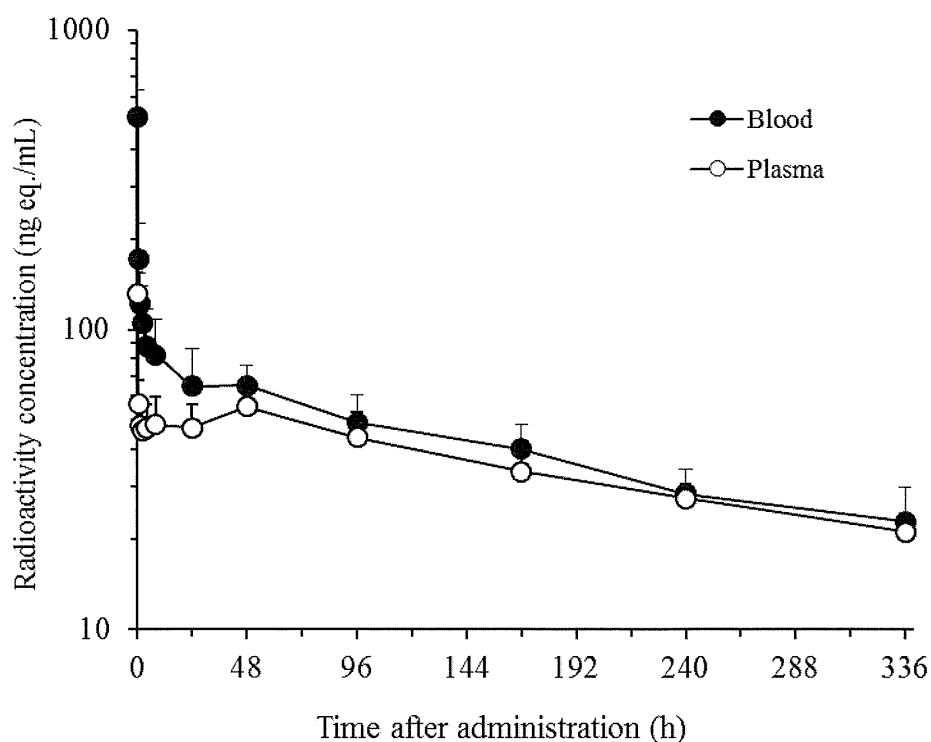
1. 血液・血漿、脳脊髄液及び脳中・尿及び糞中放射濃度

[¹⁴C]P092 マレイン酸塩を雄性サルに 1mg/kg の用量で単回急速静脈内投与したときの血液及び血漿中放射能濃度を表へ-5 及び図へ-6 に示した。また、尿中及び糞中放射能濃度を表へ-6 に示した。血液中放射能濃度は投与後 5 分に

511.2 ng eq./mLを示したのち、投与後 24 時間では 64.8 ng eq./mL、さらに投与後 336 時間では 22.9 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 636.3 ng eq./mL、186.3 h、14409 及び 20683 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 51 mL/h/kg、13697 mL/kg 及び 272.0 h であった。

血漿中放射能濃度は投与後 5 分に 131.5 ng eq./mL を示したのち、投与後 24 時間では 46.9 ng eq./mL、さらに投与後 336 時間では 21.2 ng eq./mL まで低下した。C₀、t_{1/2}、AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 155.6 ng eq./mL、290.2 h、12025 及び 21143 ng eq.·h/mL であり、CL_{total}、V_{dss} 及び MRT_{0-inf} はそれぞれ 49 mL/h/kg、19106 mL/kg 及び 413.0 h であった。

血漿中放射能濃度は血液中放射能濃度と比較して同程度又は低い値で推移し、¹⁴C]P092 マレイン酸塩は血球成分に移行し易いことが推察された。



図へ-6 ¹⁴C]P092 マレイン酸塩カニクイザル単回静脈内投与時の血中放射濃度

表へ-5 [14C]P092 マレイン酸塩カニクイザル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)	
	Blood	Plasma
	Mean ± SD	Mean ± SD
5 min	511.2 ± 116.7	131.5 ± 24.0
30 min	171.9 ± 54.4	56.8 ± 11.1
1 h	121.3 ± 32.8	47.6 ± 10.3
2 h	104.9 ± 34.6	46.1 ± 7.8
4 h	87.7 ± 29.6	46.9 ± 9.5
8 h	82.6 ± 25.8	48.2 ± 11.2
24 h	64.8 ± 21.5	46.9 ± 9.3
48 h	65.1 ± 11.1	55.3 ± 9.8
96 h	48.8 ± 11.7	43.7 ± 9.4
168 h	40.0 ± 8.5	33.7 ± 6.8
240 h	28.3 ± 5.9	27.3 ± 3.4
336 h	22.9 ± 6.9	21.2 ± 3.1
C ₀ (ng eq./mL)	636.3 ± 137.4	155.6 ± 28.1
t _{1/2} (h) ^{a)}	186.3 ± 20.2	290.2 ± 137.4
AUC _{0-t} (ng eq.·h/mL)	14409 ± 3381	12025 ± 1913
AUC _{0-inf} (ng eq.·h/mL)	20683 ± 5614	21143 ± 4886
CL _{total} (mL/h/kg)	51 ± 16	49 ± 11
Vd _{ss} (mL/kg)	13697 ± 3079	19106 ± 5171
MRT _{0-inf} (h)	272.0 ± 30.0	413.0 ± 190.3

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

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

表へ-6 [14C]P092 マレイン酸塩カニクイザル単回静脈内投与時の尿中及び糞中の放射能排泄

Time (h)	Cumulative radioactivity excretion (% of dose)			
	Urine	Feces	Cage washing	Total
0-24	1.7 ± 0.4	0.6 ± 0.7	0.4 ± 0.1	2.6 ± 1.0
-48	4.3 ± 0.6	3.8 ± 1.8	0.8 ± 0.3	8.9 ± 2.3
-72	5.9 ± 0.7	9.8 ± 3.3	1.0 ± 0.3	16.7 ± 3.8
-96	7.7 ± 0.6	15.7 ± 4.9	1.5 ± 0.8	24.9 ± 4.9
-120	9.1 ± 0.6	20.1 ± 7.2	1.9 ± 1.2	31.0 ± 7.0
-168	11.6 ± 0.6	26.7 ± 8.8	2.2 ± 1.2	40.4 ± 8.4
-240	14.3 ± 0.6	36.9 ± 6.6	2.5 ± 1.2	53.7 ± 6.3
-336	17.2 ± 0.7	44.6 ± 6.0	2.8 ± 1.1	64.6 ± 5.4

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

2. 組織中放射濃度の測定

採血終了後、動物はペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル）を 20～30 mg/kg の用量で静脈内投与し、全身麻酔下、頸動脈より放血し、安楽死させたのち下記の組織を摘出した。

—	血液	A	肝臓
—	血漿	A	副腎
A	大脳	A	腎臓
A	小脳	A	脾臓
A	延髄	A	膵臓
C	脊髄	A	精巣
—	脳脊髄液	C	皮膚
B	下垂体	C	骨格筋（大腿筋）
A	眼球	C	骨
A	顎下腺	C	白色脂肪（精巣周辺）
C	腸間膜リンパ	C	褐色脂肪（背部）
A	心臓	—	胆汁（胆嚢内）
A	肺		

組織 A：組織の全量を採取し、その一部を放射能測定に供した組織

組織 B：組織の全量を採取し、その全量を放射能測定に供した組織

組織 C：組織の一部を採取し、その一部を放射能測定に供した組織

脳脊髄液はマイジェクターを用いて採取し、放射能を測定し、脳脊髄液中放射能濃度を求めた。

胆汁は胆嚢から注射針を装着した注射筒を用いて採取し、放射能を測定し、胆汁中放射能濃度を求めた。

組織は生理食塩液で洗浄し、濾紙片により付着水分を除いた。

採取した試料について放射能を測定し、組織中放射能濃度を求めた。

全重量が測定可能な組織（組織 A, B 及び胆汁）については、測定した組織全重量に基づき投与放射能に対する分布率（組織中放射能分布率）を算出した。

血液、骨格筋、皮膚及び白色脂肪については、組織全重量をそれぞれ体重の 6.0%[1]、41.4%[1]、9.4%[1]及び 7.8%[1]として組織中放射能分布率を算出した。

大脳、小脳、脳脊髄液、肝臓及び肺の測定残分は冷凍（ -80°C ）で保存した。

採取した試料は採取当日に組織重量を測定し、放射能測定試料を調製した。

3. 組織中放射濃度の測定

tSIE (transformed Spectral Index of External standard) 法によりクエンチング補正を行う液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 2300TR, PerkinElmer) を用い、放射能を測定した。測定は各バイアル当たり 5 分間、1 回とし、バックグラウンド値は測定試料と同一のシンチレーションカクテルのみ、又はコンバストパッド (PerkinElmer) を燃焼して調製したバックグラウンドバイアルを 5 分間、1 回測定して得られた dpm 値とした。このバックグラウンド値を差し引いてネットのカウント値とした。なお、放射能の検出限界はバックグラウンド値の 2 倍とした。

サンプルオキシダイザー (Model 307 型, PerkinElmer) により燃焼処理を行って放射能を測定した際は、あらかじめ放射能の回収率 ($n = 3$, 許容範囲 90.0% 以上) を測定し、回収率が 100.0% 未満 (97.2%) であったため、得られた測定試料中放射能は回収率で補正した。また、燃焼後にも、同様に放射能の回収率 ($n = 3$) を測定し、回収率が許容範囲であることを確認した。

なお、サンプルオキシダイザーによる燃焼処理は、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を CO_2 吸収剤 (Carbo-Sorb, PerkinElmer : 6 mL として設定) に回収させ、Permafluor E+ (PerkinElmer : 9 mL として設定) に混合することにより行った。

その結果、 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ マレイン酸塩を雄性サルに 1 mg/kg の用量で単回急速静脈

内投与したときの投与後 24、168 及び 336 時間における組織中放射能濃度及び組織中放射能分布率をそれぞれ表へ-7 及び表へ-8 に示した。各組織中放射能濃度の最高値は、小脳、脊髄及び皮膚においては投与後 168 時間、大脳、延髄、眼球、顎下腺、腸間膜リンパ及び精巣においては投与後 336 時間、その他の組織においては投与後 24 時間に認められた。脳脊髄液中の放射能はいずれの測定時点においても検出限界未満 (ND) であった。

投与後 24 時間においては、肺に最も高い放射能濃度 (15664.4 ng eq./g) が認められ、KP 値 (組織/血漿中濃度比) は 349.65 であった。次いで、脾臓 (13960.8 ng eq./g, KP 値 311.63)、副腎 (10985.2 ng eq./g, KP 値 245.21)、胆汁 (10938.4 ng eq./g, KP 値 244.16)、腎臓 (8359.0 ng eq./g, KP 値 186.58) 及び肝臓 (8098.3 ng eq./g, KP 値 180.77) で高い放射能濃度が認められた。大脳中放射能濃度は 101.2 ng eq./g (KP 値 2.26) であり、小脳、延髄及び脊髄における KP 値は 0.72 ~ 2.19 であった。最も高い放射能分布率を示した組織は骨格筋 (52.00%) であり、次いで肝臓 (15.66%)、肺 (7.71%) 及び白色脂肪 (4.63%) であった。

投与後 168 時間においては、脾臓に最も高い放射能濃度 (11204.3 ng eq./g) が認められ、KP 値は 291.78 であった。次いで、肺 (10419.4 ng eq./g, KP 値 271.34)、副腎 (7429.8 ng eq./g, KP 値 193.48)、胆汁 (6720.8 ng eq./g, KP 値 175.02) 及び腸間膜リンパ (6308.9 ng eq./g, KP 値 164.29) で高い放射能濃度が認められた。大脳中放射能濃度は 147.6 ng eq./g (KP 値 3.84) であり、小脳、延髄及び脊髄における KP 値は 1.90 ~ 2.84 であった。最も高い放射能分布率を示した組織は骨格筋 (20.20%) であり、次いで、肝臓 (6.90%)、肺 (4.80%) 及び白色脂肪 (3.75%) であった。

投与後 336 時間においては、副腎に最も高い放射能濃度 (8575.9 ng eq./g) が認められ、KP 値は 404.52 であった。次いで、脾臓 (7560.8 ng eq./g, KP 値 356.64)、腸間膜リンパ (7248.4 ng eq./g, KP 値 341.91)、肺 (4958.7 ng eq./g, KP 値 233.90) 及び顎下腺 (3967.2 ng eq./g, KP 値 187.13) で高い放射能濃度が認められた。大脳中放射能濃度は 148.8 ng eq./g (KP 値 7.02) であり、小脳、延髄及び脊髄における KP 値は 3.34 ~ 7.72 であった。最も高い放射能分布率を示した組織は骨格筋 (9.12%) であり、次いで、肝臓 (4.42%)、皮膚 (2.93%) 及び白色脂肪 (2.52%) であった。

組織中放射能濃度は大部分の組織において血漿よりも高く、特に肺、副腎、脾臓及び顎下腺では顕著に高い濃度の放射能が認められ、 $[^{14}\text{C}]$ P092 マレイン酸塩及び/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、多くの組織において投与後 168 又は 336 時間に最高濃度を示し、組織への移行は緩徐であ

ることが示唆された。

一方、投与後 336 時間までの総排泄率は 64.6%に留まり、組織中放射能分布率の合計が投与放射能の 25.11%であったことから、^[14C]P092 マレイン酸塩及び/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-7 ^[14C]P092 マレイン酸塩カニクイザル単回静脈内投与時の組織中放射濃度

Tissue	Radioactivity concentration, ng eq./mL or g (K _p)					
	24 h		168 h		336 h	
Blood	73.9 ± 16.5	(1.65)	35.6 ± 9.6	(0.93)	22.9 ± 6.9	(1.08)
Plasma	44.8 ± 18.3	(1.00)	38.4 ± 15.5	(1.00)	21.2 ± 3.1	(1.00)
Cerebrum	101.2 ± 52.9	(2.26)	147.6 ± 22.8	(3.84)	148.8 ± 59.9	(7.02)
Cerebellum	98.1 ± 37.2	(2.19)	108.9 ± 14.4	(2.84)	80.8 ± 31.7	(3.81)
Medullaoblongata	66.2 ± 20.2	(1.48)	106.8 ± 6.7	(2.78)	163.6 ± 93.9	(7.72)
Cerebrospinal fluid	ND	(NC)	ND	(NC)	ND	(NC)
Spinal cord	32.2 ± 9.5	(0.72)	73.1 ± 6.8	(1.90)	70.8 ± 33.5	(3.34)
Pituitary	4195.4 ± 1019.0	(93.65)	4157.5 ± 683.2	(108.27)	3261.7 ± 529.6	(153.85)
Eyeball	256.5 ± 251.5	(5.73)	308.2 ± 42.9	(8.03)	792.4 ± 167.9	(37.38)
Submaxillary gland	2225.1 ± 856.5	(49.67)	3960.7 ± 1067.7	(103.14)	3967.2 ± 1003.8	(187.13)
Mesenteric lymph nodes	2703.7 ± 829.8	(60.35)	6308.9 ± 1643.7	(164.29)	7248.4 ± 1116.8	(341.91)
Heart	5284.5 ± 1680.6	(117.96)	2499.7 ± 359.7	(65.10)	1692.1 ± 265.4	(79.82)
Lung	15664.4 ± 1199.3	(349.65)	10419.4 ± 1568.3	(271.34)	4958.7 ± 2851.4	(233.90)
Liver	8098.3 ± 1599.7	(180.77)	3910.6 ± 552.0	(101.84)	2661.2 ± 550.1	(125.53)
Adrenal	10985.2 ± 2331.8	(245.21)	7429.8 ± 1018.8	(193.48)	8575.9 ± 1592.2	(404.52)
Kidney	8359.0 ± 1330.9	(186.58)	3962.3 ± 390.6	(103.18)	2617.8 ± 737.4	(123.48)
Spleen	13960.8 ± 1454.7	(311.63)	11204.3 ± 1859.7	(291.78)	7560.8 ± 682.4	(356.64)
Pancreas	5288.7 ± 622.4	(118.05)	4480.1 ± 2711.7	(116.67)	3018.2 ± 945.5	(142.37)
Testis	356.5 ± 198.6	(7.96)	497.2 ± 29.7	(12.95)	741.7 ± 60.3	(34.99)
Skin	264.9 ± 63.9	(5.91)	359.5 ± 38.2	(9.36)	311.9 ± 114.4	(14.71)
Skeletal muscle	1220.9 ± 279.8	(27.25)	472.2 ± 94.7	(12.30)	219.6 ± 85.2	(10.36)
Bone	62.9 ± 10.1	(1.40)	23.9 ± 2.1	(0.62)	18.7 ± 2.5	(0.88)
White adipose tissue	569.0 ± 58.1	(12.70)	465.3 ± 48.4	(12.12)	317.8 ± 79.8	(14.99)
Brown adipose tissue	4737.8 ± 2604.3	(105.75)	2595.0 ± 705.7	(67.58)	1586.1 ± 220.1	(74.82)
Bile	10938.4 ± 8358.7	(244.16)	6720.8 ± 3127.3	(175.02)	3165.8 ± 587.4	(149.33)

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

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

ND: Not detected

NC: Not calculated

表へ-8 [14C]P092 マレイン酸塩カニクイザル単回静脈内投与時の
組織中放射能分布率

Tissue	Radioactivity distribution (% of dose)		
	24 h	168 h	336 h
Blood ^{a)}	0.46 ± 0.08	0.22 ± 0.06	0.14 ± 0.04
Cerebrum	0.15 ± 0.07	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.05
Cerebellum	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Medullaoblongata	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01
Pituitary	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01
Eyeball	0.05 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.14 ± 0.02
Submaxillary gland	0.12 ± 0.05	0.32 ± 0.16	0.24 ± 0.03
Heart	1.66 ± 0.35	0.79 ± 0.15	0.57 ± 0.05
Lung	7.71 ± 1.82	4.80 ± 1.22	2.26 ± 1.01
Liver	15.66 ± 4.56	6.90 ± 2.10	4.42 ± 0.23
Adrenal	0.16 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.04
Kidney	2.94 ± 0.28	1.36 ± 0.26	0.94 ± 0.24
Spleen	1.75 ± 0.71	0.85 ± 0.08	0.62 ± 0.15
Pancreas	0.79 ± 0.13	0.72 ± 0.33	0.48 ± 0.19
Testis	0.11 ± 0.02	0.34 ± 0.11	0.24 ± 0.10
Skin ^{a)}	2.58 ± 0.56	3.49 ± 0.35	2.93 ± 0.89
Skeletal muscle ^{a)}	52.00 ± 8.79	20.20 ± 4.09	9.12 ± 3.28
White adipose tissue ^{a)}	4.63 ± 0.73	3.75 ± 0.39	2.52 ± 0.75
Bile	0.52 ± 0.38	0.23 ± 0.07	0.13 ± 0.04
Total	91.31	44.42	25.11

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

a) The whole weights of the blood, skeletal muscle, skin, and white adipose tissue were calculated as 6.0%, 41.4%, 9.4%, and 7.8% of body weight, respectively.

8. 参考文献

- 1) クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル（改訂版） 厚生労働省特定疾患対策研究事業 厚生労働省遅発性ウイルス感染調査研究班 平成 14 年 1 月 24 日
- 2) プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）平成 23 年度総括研究報告書
- 3) Kuwata K, et al. Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. PNAS 2007;104(29):11921-11926
- 4) Kimura T, et al. Synthesis of GN8 derivatives and evaluation of their anti-prion activity in TSE-infected cells. Bioorganic & medicinal chemistry letters 2011;21(5):1502-1507
- 5) Kawabata M, Takasawa H, Minowa S, Saitou H, Nakagawa M, Nakajima M, et al. New Method of Specimen Preparation as Cell Suspension for a Micronucleus Test. Genes and Environ 2007; 29 (3): 100-6.
- 6) Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M Jr. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. Mutat Res 1983; 120: 241-7.
- 7) Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res 1970; 9: 527-49.

9. 添付資料

表 1 物理化学的性質ならびに規格および試験法等に関する資料

表 2 薬理作用に関する資料—効力を裏付ける試験

表 3 急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、催奇形性その他の毒性に関する資料

表 4 吸収・分布・代謝及び排泄に関する資料

表-1 物理化学的性質並びに規格および試験法等に関する資料

原薬の化学構造		原薬の性状
		<p>本品は、白色から微黄色の結晶性の粉末である。メタノールにやや溶けやすく、水及びエタノール(99.5%)に溶けにくい。</p> <p>分子量：734.83 示性式：C₃₁H₄₂N₄O₂・2C₄H₄O₄</p>
<p>化学名：N,N'-[(Cyclohexylmethylene)di-4,1-phenylene]bis[2-(1-pyrrolidinyl)acetamide]Dimaleate</p> <p>P092 マレイン酸塩</p>		<p>原薬の貯法と安定性</p> <p>冷蔵保存</p>
<p>原薬の安定性 冷蔵で保存。安定性は下記の条件にて実施継続あるいは実施段階にある。 貯法及び使用期限は治験薬の包装資材に表示する。</p> <p>安定性試験項目と条件 長期安定性試験(5℃, 25℃/60%RH)：0, 3, 6, 9, 12, 18, 24及び36ヶ月 加速試験(40℃±2℃/75%±5%RH)：0, 1, 3および6ヶ月 過酷試験</p>		
1)長期安定性試験	治験薬概要書(ハ)安定性試験に関する資料(東京化成工業株式会社)を参照	
2)加速試験	実施予定	
3. 原薬の規格(暫定規格案を下記に示す)		
試験項目		規格案
性状	外観	白色から微黄色の結晶性の粉末
	溶解性	メタノールにやや溶けやすい。エタノール(99.5)及び水に溶けにくい。
確認試験	IR	標準品のスペクトルと同一波数のところに同様の強度の吸収を認める
	マレイン酸定性(TLC)	試料溶液から得られたスポットのうち一つは標準溶液のスポットとRf値及び濃さが同等
pH		3.5~5.0
純度試験	溶状	無色澄明
	塩化物	0.01%以下
	重金属	20ppm以下
	砒素	2ppm以下
	類縁物質(HPLC)	1%以下(個々の不純物 0.15%以下)
	残留溶媒	<ul style="list-style-type: none"> ・エタノール 5000ppm以下 ・THF 720ppm以下 ・トルエン 890ppm以下 ・ジクロロメタン 600ppm以下 ・CPME 5000ppm以下 ・酢酸エチル 5000ppm以下 ・IPE 5000ppm以下
	エンドトキシン	0.5EU/mg以下
水分		10%以下
強熱残分		0.1%以下
定量(非水滴定)		98~102%
微生物試験		<p>細菌 50ヶ/g 以下</p> <p>真菌 10ヶ/g 以下</p> <p>大腸菌群 陰性</p>

表-2 薬理作用に関する資料

効力を裏付ける試験(P092塩酸塩)

試験名	試験方法			試験結果
	実験モデル	細胞/動物	実験方法 および投与方法	
1. 核磁気共鳴法による結合試験	In vitro	-	15NラベルしたリコンピナントマウスPrP(rmPrP)(121-231)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。	0.5mM rmPrP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。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。
2. 表面プラズモン共鳴分析法による結合試験	In vitro	-	Biacore T200を用い、rmPrP(121-231)とP092との結合を測定した。	- 解離定数(KD)は、約3.0・Mであることが分かった。
3. GT+FK細胞系を用いた試験	In vitro	マウス神経系細胞由来細胞株GT1	GT1細胞に感染性プリオン福岡株(FK)を添加し、薬剤存在下で培養し、変異性プリオンタンパク質PrP ^{Sc} をウエスタンブロットで定量し、化合物のプリオン変性抑制効果を検討した。	P092のIC50は、0.46 ± 0.20 μMであった。
4. マウス感染モデルを用いた試験	In vivo	マウス	福岡株感染マウスの脳乳液を用いたプリオン感染モデルマウスに、感染時同時又は感染後4週間から浸透圧ポンプを用いて薬物を腹腔内に連続投与して感染による死亡抑制効果を検討した。	感染4週間後投与:17.9 μmol/kg/day 感染時同時投与:25 μmol/kg/day 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。

表-3 急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、催奇形性その他の毒性に関する資料

試験項目名	被験物質等	試験系	投与方法	試験結果	実施状況	備考
反復投与毒性試験 (non-GLP 試験)	P092 マレイン酸塩	ラット (Ctrl:CD(SD))	4 週間間歇静脈内投与 (週 1 回)	P092 マレイン酸塩をラット (Ctrl: CD (SD), 雌雄各 6 匹/群) に, 0, 0.5, 1 及び 10 mg/kg の用量で, 4 週間間歇静脈内投与 (週 1 回, 尾静脈投与) し, 現れる毒性変化を確認した。10 mg/kg では投与部位局所 (静脈) に炎症性変化が惹起されるが, 全身性の重篤な変化は認められなかった。 初回投与時の血液中濃度測定では, 投与された P092 は投与 7 日後でも血液中から検出され, また反復投与により, 10 mg/kg 群では血液中濃度は増加する傾向を示した。同群の $t_{1/2}$ は反復投与により延長する傾向がみられたことから, P092 の蓄積性が示唆された。 本試験条件下では, ラットにおける無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg と結論した。	終了	詳細については最終報告書参照 試験番号 B130235 (本試験)
		カニクイザル (Macaca Fascicularis)	4 週間間歇静脈内投与 (週 1 回)	P092 マレイン酸塩をカニクイザルに, 0, 1, 10 及び 30 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。1 用量群当たり雌雄各 2 例を用いた。投与は橈側皮静脈あるいは伏在静脈から行い, 投与日毎に投与部位を変えた。P092 マレイン酸塩をカニクイザルに静脈内投与した場合, 10 mg/kg 以上の用量では投与部位局所 (静脈) に炎症性変化が惹起され, また薬物の溶血性に関連した変化が認められた。一般状態観察では, 血尿が 30 mg/kg 群の雌雄, 赤血球数, ヘモグロビン濃度の低下及び網赤血球率の高値が 10mg/kg 群の雄及び 30 mg/kg 群の雌雄, 骨髓 (大腿骨, 胸骨) における造血細胞の増加が 30 mg/kg 群の雌雄, 下顎リンパ節における髓外造血が 10 mg/kg 以上の用量群の雄及び 10 mg/kg 群の雌に認められた。1 mg/kg 群では, いずれの個体にも異常は認められなかった。血液中の P092 濃度推移については, 投与された P092 は投与 7 日後でも血液中から検出され, また反復投与により, 血液中濃度は増加する傾向を示したことから, P092 の蓄積性が示唆された。 本試験条件下では, カニクイザルにおける無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg と結論した。	終了	詳細については最終報告書参照 試験番号 B140965 (本試験)
反復投与毒性試験 (GLP 試験)	P092 マレイン酸塩	ラット (Ctrl:CD(SD))	12 週間間歇静脈内投与 (週 1 回)		H27 年実施予定	
		カニクイザル (Macaca Fascicularis)	36 週間間歇静脈内投与 (週 1 回)		H27 年実施予定	
変異原生試験 (GLP 試験)	P092 マレイン酸塩	細菌を用いる復帰当然	5 菌株 (TA100,TA1535,TA98,	陰性	終了	詳細については

		変異	TA1537 及び大腸菌株 WP2uvrA) S9 Mix 存在下、非存在 下			最終報告書 参照 試験番号 B141051 (本試験)
		哺乳類培養 細胞を用い る染色体異 常試験	CHL/IU を用いた細胞 増殖抑制試験 短時間処理及び連続 処理 S9 Mix 存在下、非存在 下	陰性	終了	詳細につい ては 最終報告書 参照 試験番号 B141052 (本試験)
		小核試験(ラ ット)	ラット 0.5, 10 及び 20 mg/kg 1 回静脈内投与後 48,72 時間	陰性	終了	詳細につい ては 最終報告書 参照 試験番号 B130236 (本試験)
安全性薬理試験 (循環器) (non-GLP 試験)	P092 マレイ ン酸塩	カニクイザ ル (Macaca Fascicularis)	4 週間間歇静脈内投与 (週 1 回) 心電図検査は、投与前 及び 4 週目の計 2 回心 電図計を用い無麻酔 下実施	投与に起因する変化は認められなかった。	H27 年実 施予定	詳細につい ては下記参 照。 サル反復毒 性試験番号 B140965 (本試験)

表- 4 吸収・分布・代謝及び排泄に関する試験の一覧

試験項目	被験物質	試験系	投与方法	試験結果	備考
[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩をラットに単回静脈内投与した時の放射能血中濃度、排泄及び分布	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩	雄性ラット	単回静脈内投与 5 MBq/mL (被験物質濃度 : 1.705 mg/mL, フリー体として 1.166 mg/mL)	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩を雄性ラットに 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与して、放射能の血液中濃度推移、尿、糞及び呼気中排泄並びに組織中濃度について検討した。 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、経時的に低下し、消失半減期 ($t_{1/2}$) は 91.9 h であった。投与後 336 時間までの尿及び糞中への放射能の累積排泄率はそれぞれ 12.3% 及び 85.2% であり、放射能の呼気中排泄は認められず、ラットにおいて静脈内投与された [¹⁴ C]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、[¹⁴ C]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。組織中放射能濃度を定量的全身オートラジオグラフィ (QWBA) で検討した結果、いずれの時点のラジオ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。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、[¹⁴ C]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 C]P092 及び/又はその代謝物の組織残留性が示唆された。投与後 1、24 及び 168 時間における血液、血漿、脳及び脳脊髄液中放射能濃度を測定した結果、投与後 1 及び 24 時間の血液中放射能濃度は血漿中放射能濃度の約 10 倍の値であり、[¹⁴ C]P092 の血球成分への高い移行性が示唆された。脳中放射能濃度は投与後 168 時間で最高値を示したことから [¹⁴ C]P092 及び/又はその代謝物の脳組織への移行は緩徐であることが推察された。なお、脳脊髄液中放射能濃度は、いずれの測定時点においても ND であった。	詳細については、最終報告書参照 試験番号 B130898
	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩	雄性カニクイザル (<i>Macaca fascicularis</i>)	単回静脈内投与 5 MBq/mL (被験物質濃度 : 1.705 mg/mL, フリー体として 1.166 mg/mL)	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩を雄性カニクイザルに 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与して、放射能の血液及び血漿中濃度推移、尿及び糞中排泄並びに組織中濃度について検討した。血液中放射能濃度は投与後 5 分に 511.2 ng eq./mL を示したのち、経時的に低下し、消失半減期 ($t_{1/2}$) は 186.3 h であった。血漿中放射能濃度は血液中放射能濃度と比較して同程度又は低い値で推移し、[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩は血球成分に移行し易いことが推察された。投与後 336 時間までの尿及び糞中への放射能の累積排泄率はそれぞれ 17.2% 及び 44.6% であり、サルにおいて静脈内投与された [¹⁴ C]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。各組織中放射能濃度の最高値は、小脳、脊髄及び	詳細については、最終報告書参照 試験番号 B130899

				<p>皮膚においては投与後 168 時間, 大脳, 延髄, 眼球, 顎下腺, 腸間膜リンパ及び精巣においては投与後 336 時間, その他の組織においては投与後 24 時間に認められた。脳脊髄液中の放射能はいずれの測定時点においても検出限界未満 (ND) であった。組織中放射能濃度は大部分の組織において血漿よりも高く, 特に, 肺, 副腎, 脾臓及び顎下腺では顕著に高い濃度の放射能が認められ, [¹⁴C]P092 マレイン酸塩及び/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, 多くの組織において投与後 168 又は 336 時間に最高濃度を示し, 組織への移行は緩徐であることが示唆された。一方, 投与後 336 時間までの総排泄率は 64.6%に留まり, 組織中放射能分布率の合計が投与放射能の 25.11%であったことから, [¹⁴C]P092 マレイン酸塩及び/又はその代謝物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。</p>	
[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩の In Vitro 代謝予備試験	[¹⁴ C]P092・マレイン酸塩	肝ミクロソーム ラット Sprague Dawley:(SD) 雄 R1000(lot1310214), カニクイザル雄 P2000(Lot1210334), ヒト男女混合 H0620(lot 1110473)	5 MBq/mL (被験物質濃度: 1.705 mg/mL)	<p>ラット, サル及びヒトの肝ミクロソームにおける [¹⁴C]P092 マレイン酸の代謝を予備的に検討した。 [¹⁴C]P092 マレイン酸 (5 μmol/L) をラット, サル及びヒト肝ミクロソームと NADPH 存在下で 0, 30 及び 60 分間インキュベーションした。</p> <p>[¹⁴C]P092 マレイン酸の肝ミクロソームの代謝プロファイルには種差が認められ, ラジオクロマトグラム上には全部で 9 種の代謝物ピーク (M-1~M-9) が検出された。ラットでは 5 種 (M-2, M-4~M-6, M-8), サルでは 7 種 (M-1~M-5, M-7, M-8), ヒトでは 2 種 (M-8, M-9) のピークが検出され, 主要なピークはラットでは M-4 (6.9%) 及び M-8 (4.5%), サルでは M-8 (8.2%), M-5 (6.8%) 及び M-4 (5.1%), ヒトでは M-9 (3.2%) 及び M-8 (2.9%) であった (括弧内は 60 分間インキュベーションしたときのピーク面積百分率 (% Peaks))。種特異的なピークはラットで 1 種 (M-6), サルで 3 種 (M-1, M-3, M-7), ヒトで 1 種 (M-9) 検出された。60 分間インキュベーション後の P092 のピーク面積百分率 (% Peaks) はラットが 81.8%, サルが 71.8%, ヒトが 93.9%であり, 肝ミクロソームにおける P092 の代謝速度はサル, ラット, ヒトの順であった。</p>	<p>詳細については、最終報告書参照 試験番号 B141137</p>

ND:検出限界未満

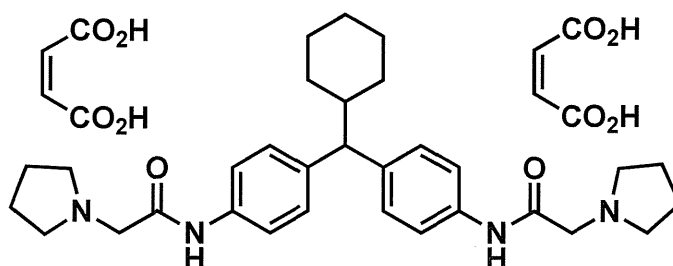
資料 2

開発候補物の製造・製品の規格、
製造工程（GMP）記録一式、
GMP 準拠製造施設、及び安定性試験

1. 規格

1. 物理的・化学的性質ならびに規格及び試験法に関する資料
(積水メディカル株式会社)

1. P092・2 マレイン酸塩



化学名 : N,N'-[(Cyclohexylmethylene)di-4,1-phenylene]bis[2-(1-pyrrolidinyl)acetamide]Dimaleate

$C_{31}H_{42}N_4O_2 \cdot 2C_4H_4O_4$: 734.84

本品を乾燥したものは定量するとき、P092・2 マレイン酸塩($C_{31}H_{42}N_4O_2 \cdot 2C_4H_4O_4$)98～102%を含む。

1.1.1. 原薬の規格および試験方法

本試験方法は、別に規定するもののほか、日本薬局方一般試験法を準用するものとする。

1. 性状

本品は、白色の結晶性の粉末である。

本品は、メタノールにやや溶けやすく、水及びエタノール(99.5)に溶けにくい。

本品は、吸湿性が強い。

2. 確認試験

(1) 本品を乾燥し、赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法による試験を行い、本品のスペクトルと本品の参照スペクトルを比較するとき、両者のスペクトルは同一波数のところに同様の強度の吸収を認める。

(2) 本品 0.10g をメタノール 3mL に溶かし、試料溶液とする。マレイン酸 105.3mg に水 5mL を加えて溶かし、さらに水で正確に 10mL とし、標準溶液とする。これらの液につき、