

3. 試験実施概要

3.1 表題

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩のラットにおける単回投与後の薬物動態予備試験

3.2 試験番号

B140398

3.3 試験目的

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩をラットに単回静脈内または経口投与して、血液及び血漿中濃度推移並びに組織移行性について予備的に検討する。

3.4 適用ガイドライン

なし

3.5 適用 GLP

なし

3.6 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

3.7 試験受託者

株式会社 L S I メディエンス

〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目 13 番 4 号

3.8 試験施設

3.8.1 名称及び所在地

株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1

3.8.2 試験責任者

牧之段 太志

株式会社 L S I メディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター 分析代謝研究部

TEL：0479-46-5096, FAX：0479-46-3173

E-mail: Makinodan.Futoshi@me.medience.co.jp

3.8.3 主な試験従事者

標識化合物放射化学的純度測定：伊藤 まゆみ
投与液調製：佐藤 智洋
投与液放射能濃度及び純度確認：伊藤 まゆみ, 佐藤 智洋
動物入荷, 検疫, 一般状態観察：大塚 康之, 有田 孝幸
投与：大塚 康之, 有田 孝幸
試料採取, 処理, 放射能測定：大塚 康之, 有田 孝幸, 佐藤 智洋

3.8.4 試験日程

試験開始：2014年5月27日
動物入荷：2014年5月28日
投与：2014年6月3日
実験終了：2014年6月13日
試験終了：本最終報告書への試験責任者署名日とする

3.8.5 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存室に保存する。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。

3.8.6 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) 通信文書等の記録文書
- (6) 最終報告書

3.9 その他

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針(株式会社L S Iメディエンス 試験研究センター)」に基づき、動物実験委員会審査及び試験研究センター長の承認(承認番号:2014-0273)を得た。


4. 試験責任者署名及び捺印

表題： [^{14}C]P092・マレイン酸塩のラットにおける単回投与後の薬物動態予備試験

試験番号： B140398

試験責任者：

2014 年 7 月 8 日

牧之段 太志 

牧之段 太志

株式会社LSIメディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター

分析代謝研究部

5. 要約

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩をラット (Ctrl:CD(SD)) に 1 mg/kg の用量で単回急速静脈内投与, 10 mg/kg の用量で 23 時間持続静脈内投与または 1 mg/kg の用量で単回経口投与したときの血液及び血漿中放射能濃度推移並びに組織移行性について予備的に検討した.

1 mg/kg 急速静脈内投与において血液中放射能濃度は投与後 5 分から投与後 48 時間まで血漿中放射能濃度の 6~11 倍高い値で推移し, [¹⁴C]P092 は血球移行性が高いものと推察された. また, 10 mg/kg/23 h 持続静脈内投与においても血液中放射能濃度は血漿中放射能濃度より 12~16 倍高い値で推移した. 一方, 1 mg/kg 経口投与における血液中放射能濃度は静脈内投与ほど顕著に高い濃度は示さず, 血漿中放射能濃度と同等あるいは 2 倍程度の濃度であった. 以上の結果から, 経口投与後, [¹⁴C]P092・マレイン酸塩は体内に吸収される過程で初回通過効果を受けて, 血球移行性の低い代謝物が生成されていることが推察された.

いずれの投与経路においても, 投与後 48 時間に脳下垂体, 顎下腺, 腸間膜リンパ, 甲状腺, 胸腺, 肺, 肝臓, 副腎, 腎臓, 脾臓及び膵臓で血漿中放射能濃度の 100 倍以上の放射能が認められ, 組織への高い移行性が認められた. また, 大脳及び小脳にも血液中放射能濃度よりも高い放射能が認められていることから, [¹⁴C]P092・マレイン酸塩は中枢神経系にも移行することが示唆された.

6. 材料及び方法

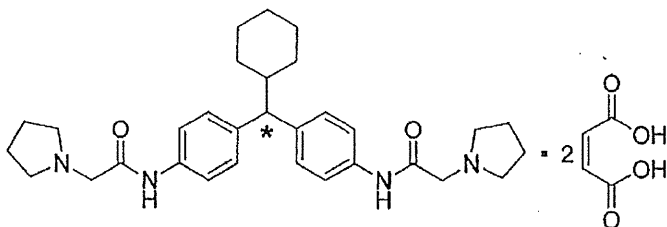
6.1 被験物質

6.1.1 標識化合物

6.1.1.1 名称

[¹⁴C]P092 maleate ([¹⁴C]P092・マレイン酸塩)

6.1.1.2 構造式及び標識位置



* : ¹⁴C 標識位置

6.1.1.3 分子量

736.70 (at this specific activity)

6.1.1.4 ロット番号

K0262-16

6.1.1.5 純度 (含量)

98.2%

6.1.1.6 比放射能

58.4 mCi/mmol (2.933 MBq/mg)

6.1.1.7 放射化学的純度

98.5%

6.1.1.8 性状

White Solid

6.1.1.9 換算係数 (フリー体)

1.493 (分子量比 フリー体 : マレイン酸塩 = 1 : 1.493)

6.1.1.10 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.1.1.11 入手量

1850 MBq

6.1.1.12 保存条件

冷凍 (-80°C, 許容範囲: -60°C 以下), 遮光, 気密容器

6.1.1.13 取扱上の注意

保護メガネ, マスク, ゴム手袋着用

6.1.1.14 放射化学的純度の確認

投与液調製前に放射化学的純度を測定した。

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩の一部 (0.1 mg) を 830 μL のアセトニトリル/精製水 (1:1, v/v) で希釈したのち, 以下の HPLC 分析条件により測定した (n = 1)。このサンプルのラジオクロマトグラムと P092・マレイン酸塩標準溶液 (0.1 mg/mL) を同条件の HPLC で測定したときの UV クロマトグラムを比較して, [¹⁴C]P092・マレイン酸塩の保持時間 (Rt) が P092・マレイン酸塩の Rt に相当することを確認した。P092・マレイン酸塩標準溶液は冷蔵 (許容範囲: 1~10°C) 条件下で保存した。HPLC 測定で得られたラジオクロマトグラムにおいて検出された放射能ピークの総和に対する [¹⁴C]P092・マレイン酸塩溶出部分の放射能ピークの割合を放射化学的純度として求めた。

HPLC 測定において, シンチレーションカクテルを含む全溶出液を回収し, その一部について 6.8 項において放射能を測定した。この溶出液中の放射能と, 注入した試料中の放射能 (6.8 項において測定) の値を用いて, 次式により HPLC カラムからの放射能の回収率 (カラム回収率) を求めた。

$$\text{カラム回収率 (\%)} = \frac{\text{溶出液中放射能濃度 (dpm/g)} \times \text{溶出液全量 (g)}}{\text{注入試料中放射能量 (dpm)}} \times 100$$

【HPLC 条件】

ラジオ HPLC システム	L-2000 シリーズ (日立ハイテクノロジーズ) Radiomatic 625TR (PerkinElmer)
分析カラム	Inertsil ODS-2, 5 μm, 4.6 mm I.D. × 250 mm (ジューエルサイエンス)
カラム温度	40°C
移動相	A = 0.2% TFA Water B = Acetonitrile
グラジエント	Time (min) 0 20 50 50.1 60 %B 20 60 60 20 20
Injection volume	10 μL
分析時間	60 分

流速	1.0 mL/min
検出	UV 254 nm 放射能（液体シンチレーションシステム） セル容量：0.5 mL シンチレーションカクテル：Flo-Scint II（PerkinElmer） シンチレーションカクテル流速：3.0 mL/min 積算時間：6 秒

6.1.1.15 残余被験物質の処理

残余の被験物質は関連する薬物動態試験（試験番号 B130897，株式会社L S I メディエンス 鹿島研究所）に移管する。

6.1.2 非標識化合物

6.1.2.1 名称

P092・マレイン酸塩

6.1.2.2 ロット番号

CMTPG-RQ

6.1.2.3 換算係数（フリー体）

1.493

6.1.2.4 性状

白色の粉末

6.1.2.5 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.1.2.6 入手量

約 20 g

6.1.2.7 保存条件

冷蔵（許容範囲：1～10°C），遮光，密封（窒素封入）

6.1.2.8 取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋着用

6.1.2.9 残余被験物質の処理

残余の被験物質は関連する薬物動態試験（試験番号 B130897，株式会社L S I メディエンス

鹿島研究所)に移管する。

6.2 媒体

局方生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場)

6.3 投与液

6.3.1 調製方法及び頻度

投与液は、以下の手順で投与当日に1回調製した。調製は紫外線をカットした蛍光灯下で行った。

- (1) [^{14}C]P092・マレイン酸塩をフリー体換算(1.493を乗じた)した後、正確に秤量した(29.9 mg, フリー体として20 mg)。
- (2) 媒体を100 mL加え、スターラーで攪拌しつつ溶解させた(フリー体換算濃度:0.2 mg/mL, Bolus 静脈内及び経口投与液)。
- (3) 0.22 μm のフィルターでろ過、滅菌した。
- (4) 0.2 mg/mL 投与液を60 mL採取し、媒体を90 mL加えて希釈して、0.08 mg/mL (フリー体換算濃度) の投与液を調製した (Infusion 投与液)。
- (5) 各濃度の投与液の一部を分取し、pHを測定した。

実測値: 0.2 mg/mL 投与液 pH 4.68, 0.08 mg/mL 投与液 pH 4.68

6.3.2 放射能濃度の測定

投与前及び投与終了後に適量の投与液 ($n = 3$) を分取、秤量し、6.8項において放射能濃度を測定した。放射能濃度の平均値が設定濃度の90.0~110.0%の範囲内であること並びに測定時の変動係数 (CV%) が5.0%以内であることを確認した。

6.3.3 放射化学的純度の確認

投与終了後に放射化学的純度を測定した。

投与液の一部を必要に応じてアセトニトリル/精製水 (1:1, v/v) で希釈したのち、6.1.1.14項に示す内容に従って放射化学的純度を測定した ($n = 1$)。

6.3.4 保存条件

冷蔵 (許容範囲: 1~10°C), 遮光

6.4 試験動物

6.4.1 動物種

ラット

6.4.2 系統

CrI:CD(SD)

6.4.3 系統選択の理由

げっ歯類を用いた毒性試験に広く使用されており、背景データが豊富である。

6.4.4 微生物レベル

SPF

6.4.5 購入先

日本チャールス・リバー株式会社

6.4.6 購入時週齢

8 週齢

6.4.7 購入動物数及び性別

無処置動物：雄 5 匹

大腿静脈カニューレーション動物：雄 3 匹

6.4.8 検疫・馴化

入荷後、無処置動物は 1 ケージ当たり 2 または 3 匹、大腿静脈カニューレーション動物は個別に収容した。動物個体毎に一般状態を 5 日間以上毎日観察して健康状態が良好であることを確認した。動物入荷日及び検疫終了日に体重測定を実施して、検疫終了時の体重が入荷時より増加し、順調に発育していることを確認した。検疫終了後も投与日（投与直前）まで毎日一般状態を観察し、馴化を継続した。

6.4.9 投与時週齢

8 週齢

6.4.10 投与開始時体重

無処置動物及び大腿静脈カニューレーション動物毎に、検疫終了時の動物の体重範囲は平均体重 $\pm 20\%$ 以内であることを確認した。

6.4.11 群分け

投与日に群分けを行った。検疫、馴化期間中の一般状態並びに入荷及び検疫終了時の体重測定の結果より、全動物が健康であることを確認し、動物仮番号順（動物入荷時に付与した番号）に動物番号を付与した。

6.4.12 動物の個体識別

6.4.12.1 検疫、馴化期間中

動物は尾に油性ペンで動物仮番号をマーキングして個体識別した。

ケージには試験番号、入荷日、入荷時週齢、動物仮番号、ケージ番号、動物種、系統、性別、

飼料の種類、検疫・馴化期間中である旨を記載したケージラベルを貼付した。

6.4.12.2 群分け後

動物は尾に油性ペンで動物番号の下2桁をマーキングして個体識別した。

ケージには試験番号、被験物質名、試験の種類、投与経路、用量、食餌条件、動物種、系統、性別、動物番号を記載したケージラベルを貼付した。

6.4.13 余剰動物及び瀕死動物の措置

余剰動物は投与日に試験系から除外した。除外した動物は投与日の翌日に炭酸ガス吸入により安楽死させ、廃棄した。瀕死動物あるいは試験責任者が安楽死を必要と判断した動物はいなかった。

6.5 動物飼育

6.5.1 飼育室

検疫及び馴化：5173 室

馴化及び投与後：5118 室

6.5.2 飼育環境

6.5.2.1 温度

許容範囲：19.0～25.0°C

6.5.2.2 相対湿度

許容範囲：35.0%～75.0%

6.5.2.3 換気

5173 室：6～20 回／時間，オールフレッシュエア供給

なお、換気回数が基準を超えたため、排気口に最も隣接した飼育ケージの排気に近い外側の気流速度が 0.18 m/sec 以下であることを確認した。

5118 室：10～30 回／時間，オールフレッシュエア供給

6.5.2.4 照明時間

12 時間／日（7:00～19:00）点灯

6.5.3 飼育器材

6.5.3.1 ケージ

オートクレーブ滅菌済ポリカーボネート製ケージ（265W×426D×200H mm，トキワ科学器械）を使用し、投与時に交換した。また、投与後は洗浄済（非滅菌）のポリカーボネート製ケージを使用し、投与後 24 時間に交換した。

6.5.3.2 スノコ

投与後は、洗浄済（非滅菌）のステンレス製スノコ（225W×385D×30H mm, トキワ科学器械）を使用し、ケージ交換時に交換した。

6.5.3.3 給餌器

オートクレーブ滅菌済ステンレス製給餌器（トキワ科学器械）を使用し、週1回以上の頻度で交換した。

6.5.3.4 給水瓶

オートクレーブ滅菌済ポリカーボネート製給水瓶（700 mL, トキワ科学器械）を使用し、週1回以上の頻度で交換した。

6.5.3.5 架台

ベンザルコニウム系特殊洗浄剤（マイクロカット, エコラボ）の希釈液で消毒した架台（トキワ科学器械）を使用した。

6.5.4 床敷

6.5.4.1 種類

オートクレーブ滅菌済実験動物用床敷（ベータチップ, 日本チャールス・リバー）を使用した。ただし、投与後は使用しなかった。

6.5.4.2 汚染物質の確認

床敷の供給元から分析結果を入手し、残留農薬等の汚染物質濃度が、試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.5.5 エンリッチメント

動物福祉向上のために、検疫、馴化期間中にオートクレーブ滅菌した玩具を与えた。

6.5.6 飼料

6.5.6.1 種類

実験動物用固型飼料（CR-LPF, オリエンタル酵母工業, 放射線滅菌済み）

6.5.6.2 給餌法

自由摂取とし、追加が必要な場合は補充した。

飼料は群分け日とその後は投与日から1週間に1回以上の頻度で新しいものと交換した。

6.5.6.3 汚染物質の確認

飼料の供給元から分析結果を入手し、使用したロットの残留農薬等の汚染物質濃度が、試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.5.7 飲用水

6.5.7.1 種類

5 µm フィルター濾過後，紫外線照射した水道水

6.5.7.2 給水法

自由摂取とし，給水瓶交換時及び追加が必要な場合に新鮮な飲用水に交換した。

6.5.7.3 分析

外部施設にて水質検査を定期的（2回／年）に実施し，その分析値が試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

6.6 投与

6.6.1 静脈内投与（Bolus）

6.6.1.1 方法

翼付注射針（25G×3/4，ニプロ）及びディスポーザブル注射筒（2.5 mL，テルモ）を用いて，1 mL/min の投与速度で尾静脈内に投与した。

6.6.1.2 投与液量

5 mL/kg

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。

6.6.2 持続静脈内投与（23h infusion）

6.6.2.1 方法

大腿静脈に挿入されたカテーテルよりシリンジポンプ（TE-312，テルモ）及びディスポーザブル注射筒（50 mL，テルモ）を用いて，5.43 mL/kg/h の投与速度で投与した。各個体の投与速度は投与日の体重を用いて算出した。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。

6.6.2.2 投与液量

125 mL/kg

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。

6.6.3 経口投与

6.6.3.1 方法

経口ゾンデ（フチガミ器械）をディスポーザブル注射筒（2.5 mL，テルモ）に装着し，投与液量及び投与器材のデッドボリューム分の投与液を投与器材に充填し，強制経口投与した。

6.6.3.2 投与液量

5 mL/kg

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。

6.6.4 投与回数

単回

6.6.5 投与用量及びその設定理由

6.6.5.1 静脈内投与 (Bolus)

1 mg/4.379 MBq/5 mL/kg (P092 フリー体換算用量)

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。P092・マレイン酸塩のラットにおける 4 週間間歇静脈内投与毒性試験 (試験番号 B131138, 株式会社 L S I メディエンス) における最低用量である 1 mg/kg を設定した。

6.6.5.2 持続静脈内投与 (23h infusion)

10 mg/43.79 MBq/125 mL/kg (P092 フリー体換算用量), 5.43 mL/kg/h×23 h

上記のラット毒性試験 (試験番号 B131138) における中間用量の 10 mg/kg を設定した。

6.6.5.3 経口投与

1 mg/4.379 MBq/5 mL/kg (P092 フリー体換算用量)

静脈内投与 (Bolus) との体内動態を比較するために同用量 (1 mg/kg) を設定した。

6.7 群構成

試験項目及び群構成を下表に示す。

試験項目	投与経路	用量 (フリー体換算), 投与液量	採取時点	評価動物数	動物番号
6.7.1 血液及び血漿中放射能濃度の測定	IV Bolus	1 mg/5 mL/kg	-	2	01101-01102
	IV Infusion	10 mg /125 mL/kg	-	2	02211-02212
	PO	1 mg/5 mL/kg	-	2	03321-03322
6.7.2 組織中放射能濃度の測定	IV Bolus	1 mg/5 mL/kg	48 h	1	01101
	IV Infusion	10 mg /125 mL/kg	48 h	1	02211
	PO	1 mg/5 mL/kg	48 h	1	03321

- : 経時的に試料を採取した。

6.7.1 血液及び血漿中放射能濃度の測定

無処置動物は、投与後にスノコを敷いたポリカーボネート製ケージに個別別に収容した。

大腿静脈カニューレ動物は、イソフルラン吸入麻酔下で首輪を装着し、覚醒したのち投与した。投与後の動物は、フリームービング装置（ツムラ）にセットし、ガラス製代謝ケージ（メタボリカ MC-ST 型，スギヤマゲン）に個体別に収容した。

下記の採取時点毎に無麻酔下で鎖骨下静脈からヘパリンナトリウム処理した注射針及びビシリンジを用いて、それぞれ約 0.25 mL（投与後 8 時間まで）または約 0.45 mL（投与後 24 時間以降）を採血し、マイクロテストチューブに移した。血液 0.05 mL（投与後 8 時間まで）または 0.1 mL（投与後 24 時間以降）をコンバストパッドに分取（各 n=1）し、6.8 項において放射能を測定して血液中放射能濃度を求めた。血液の残部は遠心分離（4°C, 12,000 rpm×5 min, CF15D2, 日立工機）し、血漿を採取した。得られた血漿 0.05 mL（投与後 8 時間まで）または 0.1 mL（投与後 24 時間以降）をコンバストパッドに分取（各 n=1）し、6.8 項において放射能を測定して血漿中放射能濃度を求めた。

最終採血終了後の動物は炭酸ガス吸入により安楽死させ、廃棄した。

分取残分の血漿及び血漿分離後の血球は廃棄した。

【採取時点】

投与終了後 5 分, 2, 4, 8, 24, 48 時間

6.7.2 組織中放射能濃度の測定

6.7.1 項で用いたラットから各投与経路 1 匹をそれぞれ用いた。投与後 48 時間に各群のラットをイソフルラン吸入麻酔下で開腹し、後大静脈から可能な限り採血したのち腹大動脈を切断放血して安楽死させ、下記の組織を摘出した。

【採取試料】

—	血液	B	胸腺	B	脾臓
—	血漿	B	心臓	B	精巣
B	大脳	B	肺	D	腸間膜リンパ
B	小脳	A	肝臓	C	骨格筋（大腿筋）
B	脳下垂体	B	腎臓	C	骨（大腿骨）
B	顎下腺	B	副腎	C	白色脂肪（精巣周辺）
B	甲状腺	B	脾臓	—	脳脊髄液

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

組織 D：組織の一部を採取し、その全量を放射能測定に供した組織

血液は、採血管（ベノジェクトⅡ真空採血管，ヘパリンナトリウム処理済み，10 mL，テルモ）に採取，混合し，血液試料とした。血液試料 1 mL をコンバストパッドに分取（n=1）し，6.8 項において放射能を測定して血液中放射能濃度を求めた。また，血液試料の一部を毛

細管に採取 (n=1) し、遠心分離 (12,000 rpm×5 min, HC-12A, トミー精工) してヘマトクリット値を測定した。血液試料残部は遠心分離 (4°C, 3000 rpm×10 min, CF7D2, 日立工機) して、その上清を血漿試料とした。血漿試料 1 mL をコンバストパッドに分取 (n=1) し、6.8 項において放射能を測定して血漿中放射能濃度を求めた。

脳脊髄液はマイジェクター (テルモ) を用いて採取し、6.8 項において放射能を測定して脳脊髄液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、6.8 項において放射能を測定して組織中放射能濃度を求めた。

また、血漿中放射能濃度に対する各組織中放射能濃度の比率 (T/P 比) を算出した。血液中放射能濃度 (C_b)、血漿中放射能濃度 (C_p) 及びヘマトクリット値 (H_t) の測定結果から、次式により放射能の血球移行率 (T) 及び血漿中放射能濃度に対する血液中放射能濃度の比 (R_B 値) を算出した。なお、T/P 比、T 及び R_B 値の算出には Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) を用いた。

$$T(\%) = (1 - C_p / C_b \times (100 - H_t) / 100) \times 100$$

$$R_B = C_b / C_p$$

採取した試料は採取当日に組織重量を測定し、組織摘出後の屍体及び血漿分離後の血球は廃棄した。

6.8 放射能の測定

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、また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) を測定した。また、最終燃焼後にも同様に放射能の回収率 (n=3) を測定した。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) を混合することにより行った。

以下に測定試料調製法を示す。

6.8.1 放射化学的純度測定用試料

一部 (10 μL , n=1) をバイアルに分取し、Flo-Scint II を 5 mL 加えて混合した。

6.8.2 HPLC 溶出液 (シンチレーションカクテルを含む)

全重量を測定し、10 mL (n=1) をバイアルに分取し、秤量し、Flo-Scint II を 5 mL 加えて混合

した。

6.8.3 投与液

一部 (50 μ L, n=3) を分取し, メタノールで希釈して 20 または 10 mL に定容した。希釈液 1 mL をバイアルに分取 (各 n=1) し, シンチレーションカクテル (Clear-Sol I, ナカライテスク) を 5 mL 加えて混合した。

6.8.4 血液及び血漿

サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

6.8.5 脳脊髄液

一部 (n=1) をコンバストパッドに分取, 秤量して, サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

6.8.6 組織 A

組織重量を測定し, 解剖用剪刀により粗砕したのち, 一部 (約 0.5 g, n=1) をコンバストパッドに分取, 秤量して, サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

6.8.7 組織 B

コンバストパッドに採取して組織重量を測定したのち, 全量をサンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

6.8.8 組織 C

組織の一部を採取した。白色脂肪については約 0.1 g (n=1) を, 他の組織については約 0.3 g (n=1) をコンバストパッドに分取, 秤量して, サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。また, 燃焼不良の際の予備試料として, それぞれ採取試料をコンバストパッドに分取, 秤量した (使用せず)。

6.8.9 組織 D

組織の一部をコンバストパッドに分取, 秤量して, サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

6.9 残余試料の取扱い

測定残分の試料は冷凍 (-20°C, 許容範囲: -40~-15°C) 保存したのち, 関連する薬物動態試験 (試験番号 B130897, 株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所) に移管する。

6.10 コンピュータシステムの使用

血液, 血漿及び組織中放射能濃度は, 薬物動態試験支援システム ADMESUPPORT Ver. 2.1 (富士通株式会社) を用いて算出した。当該システムの試験情報には, 群に関する情報, 核種に

関する情報、動物購入に関する情報、投与に関する情報、採取項目に関する情報及び測定予定に関する情報を登録した。

血液、血漿及び組織中放射能濃度は P092 フリー体換算濃度として算出した。

(1) データのオンライン収集

重量 (g) : 体重, 投与実績重量, 組織, 脳脊髄液

放射能測定値 (dpm) : 血液, 血漿, 組織, 脳脊髄液

(2) データのオフライン収集

容量 (mL) : 投与液, 血液, 血漿

放射能測定値 (dpm) : 投与液, 組織

サンプルオキシダイザー回収率 (%)

6.11 薬物速度論的解析

血液及び血漿中放射能濃度推移を薬物動態解析ソフトウェア Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation as part of Certara) の Non-compartmental analysis により解析し、以下の薬物動態パラメータを算出した。

【薬物動態パラメータ及び算出方法】

薬物動態パラメータ		WinNonlin での表記	PO	IV	算出方法
最終報告書での表記					
C_{max}	最高血液, 血漿中放射能濃度	Cmax	○	—	実測値から求めた。
t_{max}	最高血液, 血漿中放射能濃度到達時間	Tmax	○	—	実測値から求めた。
C_0	時間 0 に外挿した初期血漿中放射能濃度	C0	—	○	Bolus において算出
$t_{1/2}$	消失半減期	HL_Lambda_z	○	○	計算に使用した時点は、血液、血漿中放射能濃度推移の結果を基に設定した (投与後 4~48 時間)。
AUC_{0-t}	血液、血漿中放射能濃度-時間曲線下面積	AUClast	○	○	最終測定時点 t までを台形法で算出した。
AUC_{0-inf}	血液、血漿中放射能濃度-時間曲線下面積	AUCINF_obs	○	○	—
CL_{total}	全身クリアランス	Cl_obs	—	○	—
CL_{total}/F	見かけの全身クリアランス	Cl_F_obs	○	—	—

○ : 該当する投与経路, — : 対象外

薬物動態パラメータ			PO	IV	算出方法
最終報告書での表記		WinNonlin での表記			
Vd _{ss}	定常状態の分布容積	Vss_obs	—	○	—
Vd _z /F	見かけの終末相の分布容積	Vz_F_obs	○	—	—
MRT _{0-inf}	平均滞留時間	MRTINF_obs	○	○	—
Fa	吸収率	—	○	—	Microsoft Excel 2010 により、経口投与時の AUC _{0-inf} /Dose を静脈内投与時 (Bolus) の AUC _{0-inf} (平均値)/Dose で除することにより求めた。

○：該当する投与経路，—：対象外

6.12 試験結果の算出及び表示

試験結果の表示単位，表示桁数は以下の通りとし，表示桁数の1桁下で四捨五入して表示した。各試験結果を他の計算に用いる場合は，以下に示す表示桁数とした値を用いた。

試験結果	表示単位	表示桁数
原体及び投与液の放射化学的純度 HPLC カラムからの放射能の回収率	%	小数点以下1桁
投与液の放射能濃度	MBq/mL	小数点以下3桁
投与液の放射能濃度測定時の変動係数	%	小数点以下1桁
血液及び血漿中放射能濃度	ng eq./mL	小数点以下1桁
血球移行率	%	小数点以下1桁
R _B 値	--	小数点以下2桁
組織中放射能濃度	ng eq./g	小数点以下1桁
T/P 比	--	小数点以下2桁
C ₀ , C _{max}	ng eq./mL	小数点以下1桁
t _{max} , t _{1/2} , MRT _{0-inf}	h	小数点以下1桁
AUC _{0-t} , AUC _{0-inf}	ng eq.·h/mL	整数
CL _{total} , CL _{total} /F	mL/h/kg	整数
Vd _{ss} , Vd _z /F	mL/kg	整数
Fa	%	小数点以下1桁

血液及び血漿中放射能濃度に ND (Not detected) を含む場合，以下のように取り扱った。

(1) 2 例中 1 例が ND の場合，ND は 0 として取り扱い，2 例の平均値を算出した。

(2) 2 例中 2 例ともに ND の場合，平均値は ND として表示した。

また，組織中放射能濃度が ND の場合，T/P 比は NC とした。

7. 結果

7.1 [¹⁴C]P092 maleate の放射化学的純度

投与液調製前の[¹⁴C]P092 maleate の放射化学的純度の測定結果を Table 1 に示す。

[¹⁴C]P092 maleate の放射化学的純度は 95.6%であり、HPLC カラムからの回収率は 101.3%であった。

7.2 投与液の放射能濃度及び均一性

投与当日の投与前及び投与終了後における各投与液の放射能濃度及び均一性の測定結果を Table 2 に示す。

いずれの投与液においても、投与液の放射能濃度は設定濃度の 90.0～110.0%の範囲内であり、設定通りに調製されたことが確認された。また、放射能濃度測定時の変動係数 (CV) はいずれも 5.0%以内であり、均一であることが確認された。

7.3 投与液中[¹⁴C]P092 maleate の放射化学的純度

投与終了後における投与液中[¹⁴C]P092 maleate の放射化学的純度の測定結果を Table 3 に示す。いずれの投与液においても、HPLC への注入放射能はほぼ完全に回収されており、かつ放射化学的純度が 95.0%以上であったことから、投与液中[¹⁴C]P092 maleate は投与終了まで安定であったことが確認された。

7.4 血液及び血漿中放射能濃度

[¹⁴C]P092 maleate を単回投与したときの血液及び血漿中放射能濃度を Table 4 及び Figure 1 に示す。また、薬物動態パラメータを Table 4 に示す。

7.4.1 急速静脈内投与 (Bolus)

1 mg/kg の用量で急速静脈内投与したとき、[¹⁴C]P092 maleate の血液中放射能濃度は投与後 5 分に 312.7 ng eq./mL を示し、投与後 4 時間には 57.6 ng eq./mL まで低下した。投与後 4 時間以降の血液中放射能濃度は 98.8 h の消失半減期 ($t_{1/2}$) で低下した。 C_0 、 AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 331.1 ng eq./mL、2424 及び 7956 ng eq.·h/mL であり、 CL_{total} 、 $V_{d_{ss}}$ 及び MRT_{0-inf} はそれぞれ 128 mL/h/kg、17445 mL/kg 及び 138.4 時間であった。

血漿中放射能濃度は、血液中放射能濃度と比較して低い値 (血液中放射能濃度の 9.2%～16.7%) で推移した。 C_0 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 56.3 ng eq./mL、46.1 h、268 及び 514 ng eq.·h/mL であり、 CL_{total} 、 $V_{d_{ss}}$ 及び MRT_{0-inf} はそれぞれ 1947 mL/h/kg、125155 mL/kg 及び 64.4 h であった。

7.4.2 持続静脈内投与 (23h infusion)

10 mg/kg の用量で持続静脈内投与したとき、[¹⁴C]P092 maleate の血液中放射能濃度は投与終了後 5 分に 897.8 ng eq./mL を示し、投与後 4 時間には 477.4 ng eq./mL まで低下した。投与後 4 時間以降の血液中放射能濃度は 99.3 h の $t_{1/2}$ で低下した。 AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 19527 及び 69626 ng eq.·h/mL であり、 CL_{total} 、 $V_{d_{ss}}$ 及び MRT_{0-inf} はそれぞれ 145 mL/h/kg、19037 mL/kg 及び 132.1 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低い値(血液中放射能濃度の 6.3%~8.3%)で推移した。 $t_{1/2}$, AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 62.2 h, 1500 及び 3562 ng eq.·h/mL であり, CL_{total} , V_{dss} 及び MRT_{0-inf} はそれぞれ 2845 mL/h/kg, 214311 mL/kg 及び 77.6 h であった。

7.4.3 経口投与

1 mg/kg の用量で経口投与したとき、血液中放射能は投与後 4.0 時間 (t_{max}) に最高濃度 (C_{max}) である 39.5 ng eq./mL に達し、その後 18.7 h の $t_{1/2}$ で低下した。 AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 706 及び 896 ng eq.·h/mL であり, CL_{total}/F , V_{d_z}/F 及び MRT_{0-inf} はそれぞれ 1120 mL/h/kg, 30263 mL/kg 及び 30.3 h であった。また、吸収率 (F_a) は 11.3% であった。

血漿中放射能は投与後 4.0 時間 (t_{max}) に C_{max} である 33.8 ng eq./mL に達し、その後 12.9 時間の $t_{1/2}$ で低下した。 AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 472 及び 527 ng eq.·h/mL であり, CL_{total}/F , V_{d_z}/F 及び MRT_{0-inf} はそれぞれ 1969 mL/h/kg, 36594 mL/kg 及び 20.6 h であった。また、 F_a は 102.5% であった。

7.5 組織中放射能濃度

[^{14}C]P092 maleate を単回投与したときの投与後 48 時間における組織中放射能濃度を Table 5 に、血球移行率 (T) 及び血漿中放射能濃度に対する血液中放射能濃度の比 (R_B) を Table 6 に示す。

7.5.1 急速静脈内投与 (Bolus)

急速静脈内投与後 48 時間における血液及び血漿中放射能濃度はそれぞれ 39.7 及び 3.9 ng eq./mL であり, T 及び R_B はそれぞれ 93.7% 及び 10.18 であった。

脳脊髄液を除く全ての採取組織において血漿中放射能濃度よりも高い放射能が認められた。最も高い放射能濃度を示した組織は副腎 (13870.9 ng eq./g) で、血漿中放射能濃度に対する比率 (T/P 比) は 3556.64 であった。次いで、脾臓 (13562.1 ng eq./g), 肺 (8426.7 ng eq./g), 腸間膜リンパ (5855.8 ng eq./g) 及び脳下垂体 (4317.8 ng eq./g) で放射能濃度が高く, T/P 比はそれぞれ 3477.46, 2160.69, 1501.49 及び 1107.13 であった。大脳及び小脳では血漿中放射能濃度のそれぞれ 18.54 及び 4.95 倍に相当する 72.3 及び 19.3 ng eq./g の放射能が認められた。脳脊髄液は検出限界未満 (ND) であった。

7.5.2 持続静脈内投与 (23h infusion)

持続静脈内投与終了後 48 時間における血液及び血漿中放射能濃度はそれぞれ 407.9 及び 20.9 ng eq./mL であり, T 及び R_B はそれぞれ 96.5% 及び 19.52 であった。

脳脊髄液を除く全ての採取組織において血漿中放射能濃度よりも高い放射能が認められた。最も高い放射能濃度を示した組織は脾臓 (201967.0 ng eq./g) で, T/P 比は 9663.49 であった。次いで、肺 (161436.4 ng eq./g), 副腎 (95579.5 ng eq./g), 腸間膜リンパ (69303.2 ng eq./g), 腎臓 (62073.2 ng eq./g) 及び脳下垂体 (52196.9 ng eq./g) で放射能濃度が高く, T/P 比はそれぞれ 7724.23, 4573.18, 3315.94, 2970.01 及び 2497.46 であった。大脳及び小脳では血漿中放射能濃度のそれぞれ 13.98 及び 14.15 倍に相当する 292.1 及び 295.7 ng eq./g の放射能が認められた。脳脊髄液は 1.6 ng eq./g であり, T/P 比は 0.08 であった。