

<その他の反応時間>

- (1) 前項の1~4を含む反応液を37°Cで5分間プレインキュベーションした。
- (2) NADPH生成系を添加した(反応開始)。
- (3) 37°Cで所定時間インキュベーション後、氷冷したアセトニトリルを0.5 mL添加した(反応停止)。

7.5.5 分析前処理

- (1) 反応停止後の反応液を遠心分離(4°C, 21,500 ×g [CF15RXII], 10分間)し、上清を採取してHPLC試料とした。
- (2) 残渣の放射能(R₁)を測定した。
- (3) HPLC試料の重量(W₁)を測定後、50 μLを採取、秤量(W₂)し、放射能(R₂)を測定した。
- (4) 以下の式に従い、反応液からHPLC試料への放射能の回収率を算出した(Appendix 3)。

$$\text{反応液から HPLC 試料への放射能の回収率 (\%)} = \frac{R_2 \times W_1 / W_2}{R_2 \times W_1 / W_2 + R_1} \times 100$$

7.5.6 HPLC 測定

HPLC試料をHPLCに50 μL注入し、ラジオクロマトグラムを得た。

P092・マレイン酸塩標準溶液(7.2項)をHPLCに10 μL注入し、UVクロマトグラムにおけるP092(フリー体)の保持時間を確認した。

HPLC試料の残分は冷凍(-80°C, 許容範囲:-60°C以下)で保管した。

【HPLC 条件】

カラム	XBridge BEH C18 Column, 130Å, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm (Waters Corporation)
カラム温度	40°C
移動相	A : 10 mmol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液 B : アセトニトリル
グラジエント	Time (min) 0 5 35 55 60 60.1 70 %B 15 15 40 90 90 15 15
流速	1 mL/min
分析時間	70分
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 : ULTIMA-FLO M シンチレータ流速 : 3.0 mL/min
オートサンプラ設定温度	15°C

オートサンプリング用洗剤	アセトニトリル/水 (1:1, v/v)
--------------	----------------------

反応時間 60 分の試料について、HPLC からの放射能の回収率を測定した。

シンチレーションカクテルを含む全溶出液を回収し、重量 (W_3) を測定した。一部を秤量 (W_4) し、放射能 (R_3) を測定した。以下の式に従い、HPLC からの放射能の回収率を算出した (Appendix 3)。

$$\text{HPLC からの放射能の回収率 (\%)} = \frac{R_3 \times W_3 / W_4}{R_2 \text{ (7.5.5 項)}} \times 100$$

7.5.7 ラジオクロマトグラムの解析

検出対象とする放射性ピークについては以下のように設定、解析を行った。

- (1) 標準溶液を注入して測定したラジオクロマトグラムにおいて、これらの放射能レベルの平均値をバックグラウンド (1BG) とした。
- (2) 分析試料の測定で得られたラジオクロマトグラムから 1BG を減算した。
- (3) 1BG の 5 倍 (5BG) 以上の強度を有するピークを検出対象として積分し、面積百分率 (% Peaks) を求めた。

ピークが検出されなかった場合は N.D. (Not detected) とした。

検出対象とする放射性ピークについて、試験委託者と協議の上、以下のように動物種固有の代謝物番号を付与した。ラット; rM-n, サル; mM-n, ヒト; hM-n (末尾の n: 保持時間の早いピーク順に 1 から付与)。さらに、全動物種に共通の代謝物番号 (M-n) を付与した (末尾の n: 保持時間の早いピーク順に 1 から付与)。ただし、標準物質 P092・マレイン酸塩の保持時間と相対的に一致する放射性ピークは「P092」とした。

7.6 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。

以下に測定試料調製法を示す。

- (1) 被験物質溶液
Clear-sol I を 5 mL 加えて混合した。
- (2) 被験物質溶液の放射化学的純度測定試料
FLO-SCINT II を 5 mL 加えて混合した。

(3) 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) を分取、秤量し、FLO-SCINT II 又は ULTIMA-FLO M を 5 mL 加えて混合した。

(4) 抽出残渣

組織溶解剤（バイオメリット専用組織溶解液）を 1 mL 加え、組織溶解装置で 30 分間処理したのち、バイアルに移し、HIONIC FLUOR を 15 mL 加えて混合した。

(5) HPLC 試料

ULTIMA-FLO M を 5 mL 加えて混合した。

7.7 試験結果の算出及び表示

放射化学的純度及び放射性ピークの面積百分率 (% Peaks) は FLO-ONE Ver. 3.65 で算出した。

その他の試験結果は Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) で算出した。

試験結果の表示単位、表示桁数は下表の通りとし、表示桁数の 1 桁下で四捨五入して表示した。ただし、放射化学的純度、保持時間及び放射性ピークの面積百分率 (% Peaks) については FLO-ONE Ver. 3.65 で所定の桁数に表示した値とした。

試験結果	表示単位	表示桁数
被験物質溶液中 ^[14C] P092 maleate 濃度	mmol/L	有効数字 3 桁
設定濃度に対する割合	%	小数点以下 1 桁
放射化学的純度	%	小数点以下 1 桁
HPLC からの放射能の回収率	%	小数点以下 1 桁
反応液から HPLC 試料への放射能の回収率	%	小数点以下 1 桁
保持時間	min	小数点以下 1 桁
放射性ピークの面積百分率 (% Peaks)	%	小数点以下 1 桁

7.8 保存試料の取り扱い

冷凍保存した HPLC 試料は、試験終了時までには廃棄した。

8. 結果及び考察

8.1 分析前処理法及び HPLC 条件の検討

[¹⁴C]P092 maleate (5 µmol/L) をヒト肝ミクロソームと 0 及び 60 分間インキュベーション後、分析前処理法及び HPLC 条件を検討した。反応停止及び前処理における抽出溶媒としてアセトニトリルを用いたときの反応液から HPLC 試料への放射能の回収率は 98.4% (0 分) 及び 98.2% (60 分) , HPLC からの放射能の回収率は 102.1% (60 分) であった。メタノールを用いたときの反応液から HPLC 試料への放射能の回収率は 92.4% (0 分) 及び 93.6% (60 分) , HPLC からの放射能の回収率は 97.3% (60 分) であった。HPLC 試料への放射能の回収率はいずれも良好であったが、アセトニトリルのほうが高かった。HPLC からの放射能の回収率はいずれも問題なかった。60 分間インキュベーションしたときのラジオクロマトグラム (Figure 1) には P092 のピークのほか、代謝物ピークが 2 つ検出された。以上の結果から、7.5 項における分析前処理法及び HPLC 条件はそれぞれ 7.5.5 項及び 7.5.6 項に記載の方法とした。

8.2 肝ミクロソームにおける代謝

[¹⁴C]P092 maleate (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。ラジオクロマトグラムを Figure 2~Figure 4 に示す。P092 及び代謝物の割合を Table 1 に示す。

[¹⁴C]P092 maleate 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。

Table 1 Metabolism of [¹⁴C]P092 maleate in liver microsomes

Metabolite No.	tR (min)	% Peaks											
		Rat				Monkey				Human			
		Region	0 min	30 min	60 min	Region	0 min	30 min	60 min	Region	0 min	30 min	60 min
M-1	29.1	-	--	--	--	mM-1	--	--	1.2	-	--	--	--
M-2	33.7-33.8	rM-1	--	--	2.1	mM-2	--	1.6	3.3	-	--	--	--
M-3	34.6	-	--	--	--	mM-3	--	--	1.7	-	--	--	--
M-4	41.7-41.9	rM-2	--	4.0	6.9	mM-4	--	3.2	5.1	-	--	--	--
M-5	42.8	rM-3	--	1.9	3.3	mM-5	--	4.1	6.8	-	--	--	--
M-6	44.7	rM-4	--	--	1.5	-	--	--	--	-	--	--	--
M-7	48.5	-	--	--	--	mM-6	--	--	1.8	-	--	--	--
M-8	51.3	rM-5	--	4.0	4.5	mM-7	--	7.2	8.2	hM-1	--	1.6	2.9
M-9	52.4-52.5	-	--	--	--	-	--	--	--	hM-2	--	1.9	3.2
P092	55.6	P092	100.0	90.1	81.8	P092	100.0	83.9	71.8	P092	100.0	96.4	93.9

--: Not detected

tR: Retention time

[¹⁴C]P092 maleate (5 μmol/L) was incubated with rat, monkey, and human liver microsomes (0.5 mg protein/mL) for 0, 30, and 60 min.

UV-Chromatogram of standard substance

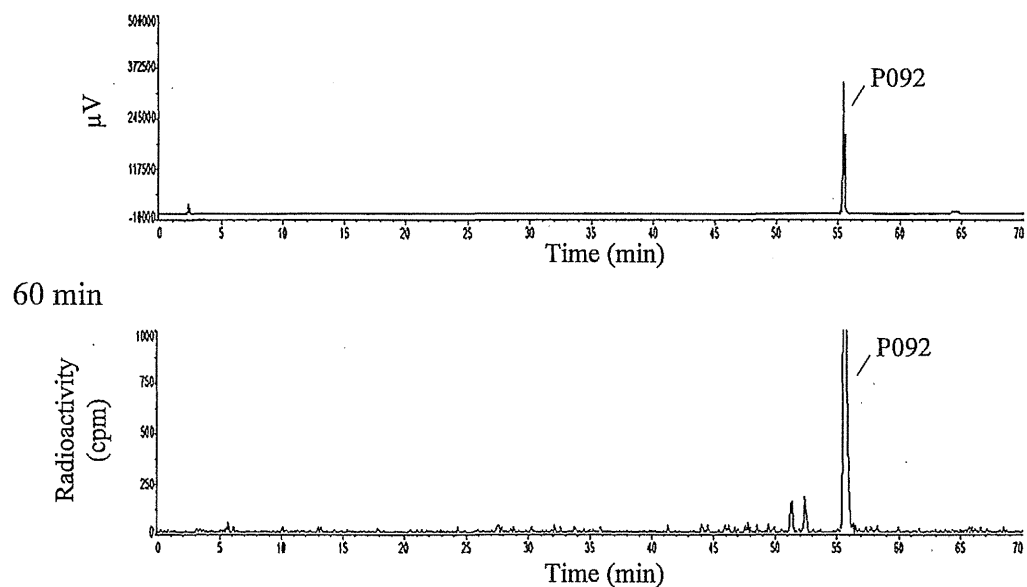


Figure 1 UV chromatogram of standard substance and radiochromatograms of $[^{14}\text{C}]$ P092 and its metabolites in incubation mixtures of $[^{14}\text{C}]$ P092 maleate with human liver microsomes

$[^{14}\text{C}]$ P092 maleate ($5\ \mu\text{mol/L}$) was incubated with human liver microsomes ($0.5\ \text{mg protein/mL}$) for 60 min.

UV-Chromatogram of standard substance

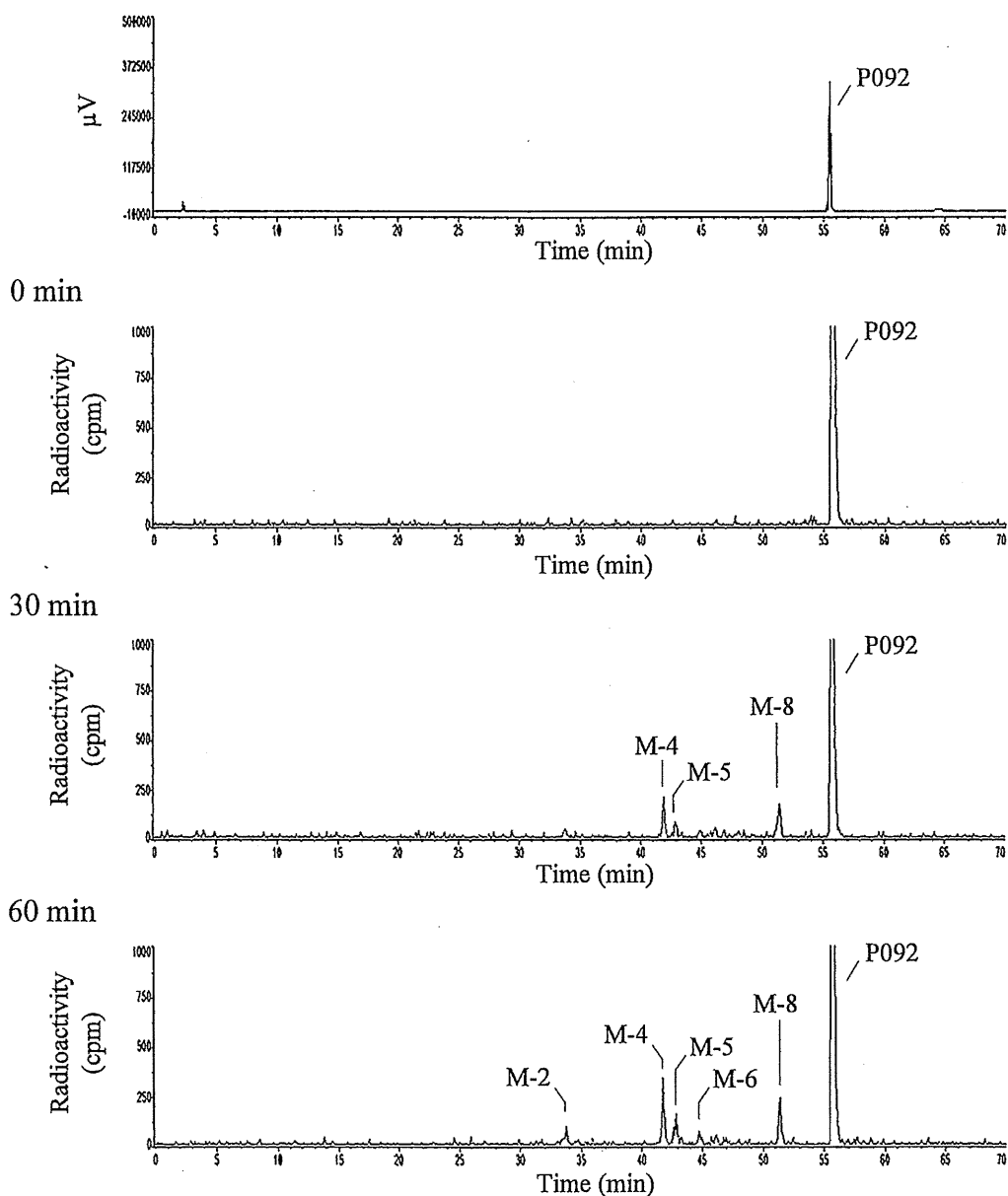


Figure 2 UV chromatogram of standard substance and radiochromatograms of $[^{14}\text{C}]$ P092 and its metabolites in incubation mixtures of $[^{14}\text{C}]$ P092 maleate with rat liver microsomes

$[^{14}\text{C}]$ P092 maleate ($5 \mu\text{mol/L}$) was incubated with rat liver microsomes ($0.5 \text{ mg protein/mL}$) for 0, 30, and 60 min.

UV-Chromatogram of standard substance

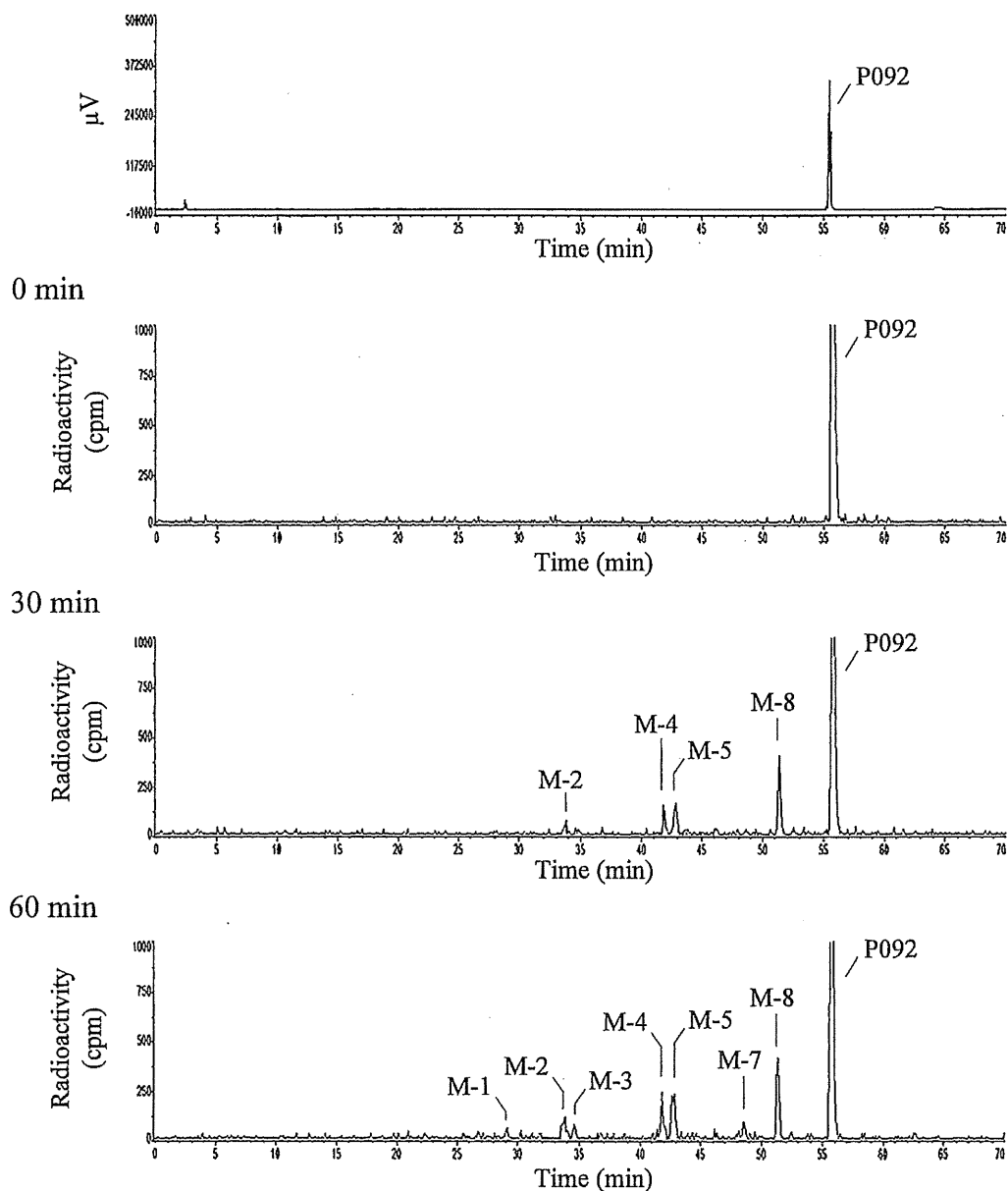


Figure 3 UV chromatogram of standard substance and radiochromatograms of $[^{14}\text{C}]$ P092 and its metabolites in incubation mixtures of $[^{14}\text{C}]$ P092 maleate with monkey liver microsomes

$[^{14}\text{C}]$ P092 maleate ($5\ \mu\text{mol/L}$) was incubated with monkey liver microsomes ($0.5\ \text{mg protein/mL}$) for 0, 30, and 60 min.

UV-Chromatogram of standard substance

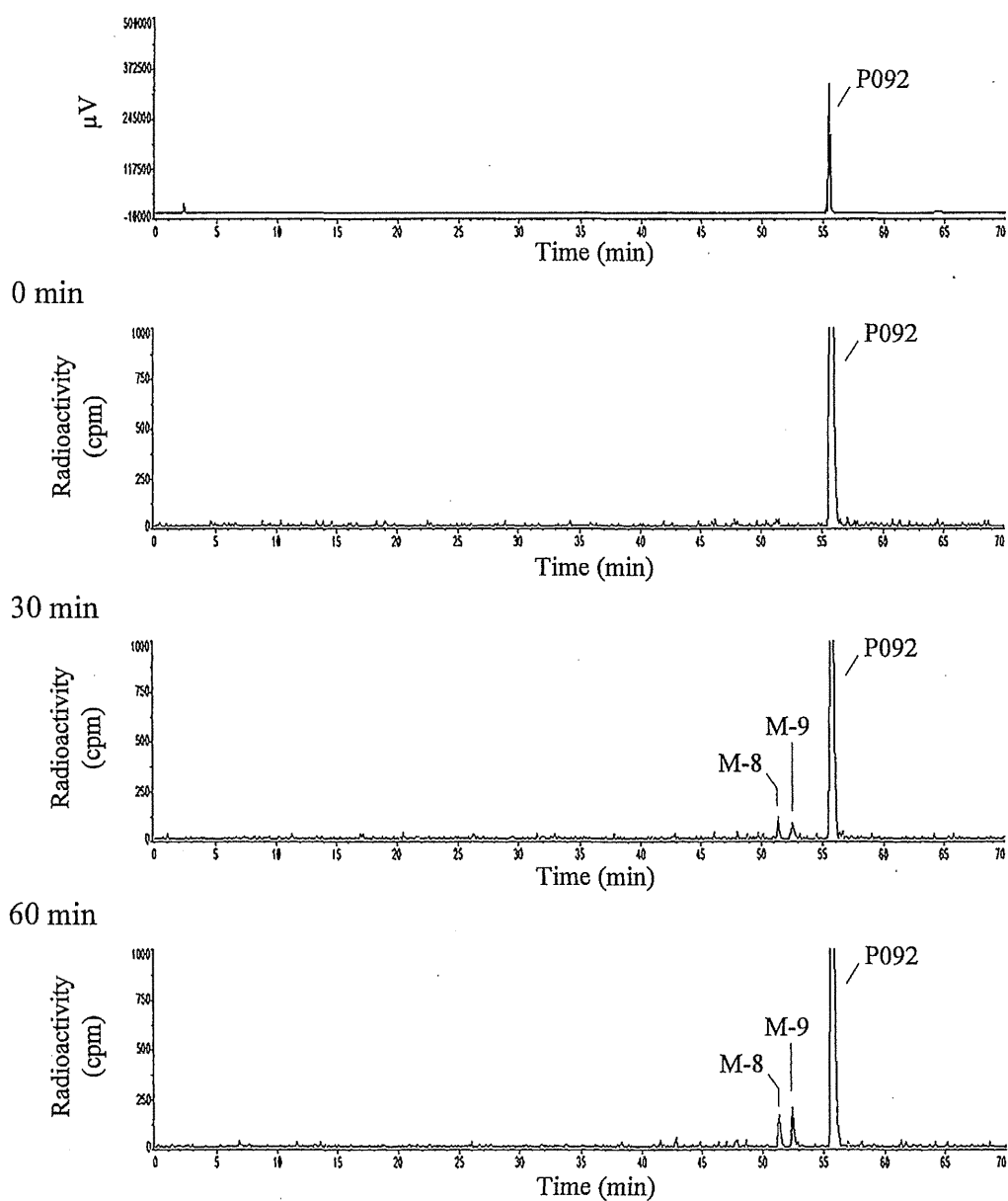


Figure 4 UV chromatogram of standard substance and radiochromatograms of [^{14}C]P092 and its metabolites in incubation mixtures of [^{14}C]P092 maleate with human liver microsomes

[^{14}C]P092 maleate (5 $\mu\text{mol/L}$) was incubated with human liver microsomes (0.5 mg protein/mL) for 0, 30, and 60 min.

Appendix 1 Concentration of [¹⁴C]P092 maleate in test substance solution

Date of preparation	Nominal concentration (mmol/L)	Measured concentration (mmol/L)	% of nominal
January 16, 2015	0.5	0.518	103.6

Appendix 2 Radiochemical purity of [¹⁴C]P092 maleate in test substance solution

Assay date	Radiochemical purity (%)	Recovery of radioactivity from HPLC system (%)
January 16, 2015 ^{*1}	99.3	104.3
January 30, 2015 ^{*2}	99.4	100.7

*1 Date of preparation

*2 After completion of use

Appendix 3 Recovery of radioactivity

Species	Time (min)	Recovery of radioactivity (%)	
		HPLC sample	HPLC system
Rat	0	98.5	--
	30	98.1	--
	60	98.1	104.6
Monkey	0	98.6	--
	30	98.5	--
	60	97.8	98.4
Human	0	98.6	--
	30	97.6	--
	60	98.5	98.7

--: Not applicable

14. $[^{14}\text{C}]$ P092 マレイン酸塩の
代謝物組成分析予備試験

本写しは原本と相違ありません
株式会社LSIメディエンス 鹿島研究所
2015年3月18日
試験責任者 伊藤 威 彦

最終報告書

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩の代謝物組成分析予備試験

(試験番号：B140810)

株式会社LSIメディエンス

1. 陳述書

表 題： $[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩の代謝物組成分析予備試験

試験番号： B140810

本最終報告書は試験結果を正しく反映したものである。

試験責任者：

2015年 3月 18日

笠神 威雄

笠神 威雄

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 薬物動態グループ

2. 目次

1. 陳述書.....	2
2. 目次.....	3
3. 試験実施概要.....	7
3.1 表題.....	7
3.2 試験番号.....	7
3.3 試験目的.....	7
3.4 適用ガイドライン.....	7
3.5 適用 GLP.....	7
3.6 試験委託者.....	7
3.7 試験受託者.....	7
3.8 試験施設.....	7
3.8.1 名称及び所在地.....	7
3.8.2 試験責任者.....	7
3.9 試験従事者.....	8
3.10 最終報告書.....	8
3.11 保存.....	8
3.12 保存する資料.....	8
4. 試験責任者署名.....	9
5. 要約.....	10
6. 材料及び方法.....	11
6.1 ラット及びサル試料.....	11
6.1.1 移管試料及び分析試料.....	11
6.1.2 保管条件.....	12
6.1.3 保管場所.....	12
6.1.4 取り扱い上の注意.....	12
6.1.5 残余試料の取り扱い.....	12
6.2 標準物質 (P092・マレイン酸塩).....	12
6.2.1 構造式.....	12
6.2.2 ロット番号.....	12
6.2.3 性状.....	12
6.2.4 保管条件.....	12
6.2.5 保管場所.....	12
6.2.6 提供者.....	13
6.2.7 取り扱い上の注意.....	13

6.2.8	残余標準物質の取り扱い	13
6.3	主な試薬	13
6.4	主な機器, システム, 器材	13
6.5	代謝物分析	14
6.5.1	標準原液及び標準溶液	14
6.5.2	前処理法	14
6.5.3	ラジオ HPLC による分析	17
6.6	放射能の測定	18
6.6.1	血漿	19
6.6.2	尿及び胆汁	19
6.6.3	糞懸濁液	19
6.6.4	大脳皮質及び視床下部	19
6.6.5	HPLC 溶出液 (シンチレーションカクテルを含む)	19
6.6.6	抽出液及び HPLC 試料	19
6.6.7	抽出残渣	20
6.7	試験結果の算出及び表示	20
6.7.1	代謝物番号の付与	20
6.7.2	代謝物組成の予備的評価	20
6.7.3	表示単位及び表示桁数	21
6.8	残余試料の取り扱い	21
7.	参考資料	22
8.	結果及び考察	23
8.1	前処理回収率及びラジオ HPLC 測定でのカラム回収率	23
8.2	代謝物組成の予備的評価	23
8.2.1	血漿	23
8.2.2	尿	23
8.2.3	糞	24
8.2.4	胆汁	24
8.2.5	大脳皮質	24
8.2.6	視床下部	24
9.	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態	25
Tables		
Table 1	Recovery of radioactivity in sample pretreatment and radio-HPLC measurement	26
Table 2	Composition ratio and radioactivity concentration of P092 and its metabolites in plasma at 1 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg	27

Table 3	Composition ratio and radioactivity excretion of P092 and its metabolites in urine at 0-72 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg	28
Table 4	Composition ratio and radioactivity excretion of P092 and its metabolites in feces at 0-72 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg	29
Table 5	Composition ratio and radioactivity distribution of P092 and its metabolites in bile at 24 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg.....	30
Table 6	Composition ratio and radioactivity concentration of P092 and its metabolites in cerebral cortex at 168 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg.....	31
Table 7	Composition ratio and radioactivity concentration of P092 and its metabolites in hypothalamus at 168 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg.....	32
Table 8	Comparison of retention times of radioactive components detected in plasma, urine, feces, bile, cerebral cortex, and hypothalamus after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg.....	33
Figures		
Figure 1	UV chromatogram of P092 maleate standard substance and radiochromatograms of plasma, urine, and feces after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg.....	34
Figure 2	UV chromatogram of P092 maleate standard substance and radiochromatograms of bile, cerebral cortex, and hypothalamus after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg.....	35
Appendices		
Appendix 1	Peak area percentage and composition ratio of P092 and its metabolites in plasma at 1 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg.....	36
Appendix 2	Peak area percentage and composition ratio of P092 and its metabolites in urine at 0-72 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg	37

Appendix 3	Peak area percentage and composition ratio of P092 and its metabolites in feces at 0-72 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg	38
Appendix 4	Peak area percentage and composition ratio of P092 and its metabolites in bile at 24 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg	39
Appendix 5	Peak area percentage and composition ratio of P092 and its metabolites in cerebral cortex at 168 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg	40
Appendix 6	Peak area percentage and composition ratio of P092 and its metabolites in hypothalamus at 168 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴ C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg	41

最終ページ : 41

3. 試験実施概要

3.1 表題

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩の代謝物組成分析予備試験

3.2 試験番号

B140810

3.3 試験目的

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩の代謝プロファイルを評価するため、サルに単回静脈内投与したときの試料を用いて前処理法及びラジオ HPLC 条件を検討した。またラジオ HPLC で検出された放射性ピーク (P092 及びその代謝物) の組成を予備的に評価した。

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
委託担当者：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

笠神 威雄
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 薬物動態グループ
TEL: 0479-46-5392, FAX: 0479-46-7656
E-mail: kasagami.takeo@mp.medience.co.jp

3.9 試験従事者

代謝物分析：工藤 広史，向後 克哉，笠神 威雄

3.10 最終報告書

全ての試験成績をもとに最終報告書（和文）を作成し，以下を試験委託者に提出する。

- (1) 最終報告書写し（1部）
- (2) 電子媒体（最終報告書のスキャンPDFを保管したCD-R）

3.11 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。

3.12 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 標準物質に関する資料
- (3) 分析試料に関する資料
- (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

4. 試験責任者署名

表 題： $[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩の代謝物組成分析予備試験

試験番号： B140810

試験責任者：

2015年3月18日

笠神 威雄

笠神 威雄

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 薬物動態グループ