

5. 要約

[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（血漿，尿，糞懸濁液，胆汁，大脳皮質及び視床下部）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 測定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。

主に，血漿では 2 種，尿では 11 種，糞では 6 種，胆汁では 9 種，大脳皮質では 1 種，視床下部では 1 種の放射性ピークが検出された。尿中には未変化体（P092）は検出されなかった。血漿では未変化体（P092）に加え高極性のピークが検出された。大脳皮質及び視床下部では未変化体（P092）のみが検出された。

6. 材料及び方法

6.1 ラット及びサル試料

関連試験より[1]ラット及びサル試料を本試験に移管した。6.5 項ではサル試料を使用した。

6.1.1 移管試料及び分析試料

移管されたサル試料のうち、6.5 項で使用予定の試料を下表に示す。なお、移管されたその他のサル試料及びラット試料については本試験で使用予定がないため、その詳細は試験資料に留めることとした。

投与経路	マトリックス	時点又は区間	動物数	動物番号
IV	血漿	1 h	2	02102, 03103
		4 h	1	03103
		24 h	1	03103
		168 h	1	01101
	尿	0-8, 8-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144 及び 144-168 h	1	01101
	糞懸濁液	0-8, 8-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144 及び 144-168 h	1	01101
	胆汁 (胆嚢内)	1 h	1	02102
		24 h	1	03103
		168 h	1	01101
	大脳皮質 視床下部	1 h	1	02102
		24 h	1	03103
		168 h	1	01101

IV：静脈内投与

下表に示す試料を分析試料として使用した。

分析試料詳細			
マトリックス	時点/区間	プール試料の調製法	検体数
血漿	1 h	各個体から等量ずつ混合して調製した。	1
尿	0-72 h	各区間の採取重量に対する一定比率で混合して調製した。	1
糞	0-72 h	各区間の採取重量に対する一定比率で混合して調製した。	1
胆汁	24 h	--	1

大脳皮質	168 h	--	1
視床下部	168 h	--	1

--: プール試料は調製しなかった。

6.1.2 保管条件

冷凍 (-20°C, 許容範囲: -40~-15°C)

6.1.3 保管場所

分析試料保管場所 (65)

6.1.4 取り扱い上の注意

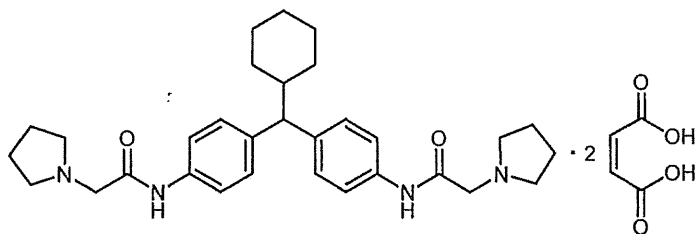
手袋, 保護メガネ及びマスクを着用した。

6.1.5 残余試料の取り扱い

残余試料 (移管試料及び分析試料) の取り扱いは 6.8 項に従った。

6.2 標準物質 (P092・マレイン酸塩)

6.2.1 構造式



6.2.2 ロット番号

CMTPG-RQ

6.2.3 性状

白色の粉末

6.2.4 保管条件

冷蔵 (許容範囲: 1~10°C, 実測値: 3.2~5.1°C), 遮光, 密封 (窒素封入)

6.2.5 保管場所

被験物質保管場所 (29)

6.2.6 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.2.7 取り扱い上の注意

手袋, 保護メガネ及びマスクを着用した。

6.2.8 残余標準物質の取り扱い

試験施設で継続保管する。

6.3 主な試薬

名称	グレード	メーカー
アセトニトリル	試薬特級及びHPLC用	純正化学
炭酸水素アンモニウム	1級	和光純薬工業
ギ酸	特級	純正化学
トリフルオロ酢酸 (TFA)	特級	東京化成工業
Carbo-Sorb E (CO ₂ 吸収剤)	--	PerkinElmer
Clear-sol I	--	ナカライテスク
Hionic-fluor	--	PerkinElmer
Ultima-Flo M	--	PerkinElmer
Permafluor E+	--	PerkinElmer
バイオメリット専用組織溶解液 (組織溶解剤)	--	ナカライテスク

--: グレードなし

水は超純水製造システム (Elix-UV10, Milli-Q Advantage システム, メルク株式会社) で精製したものを精製水として用いた。

6.4 主な機器, システム, 器材

名称	型式又は仕様	メーカー
電子天秤	XS205DU, XP4002S	メトラートレド
遠心分離機	CF7D2, CF15RXII	日立工機
窒素吹き付け式濃縮装置	エバポクイック N-12	三田村理研工業
テフロンホモジナイザー	GTR-1000	東京理化工機
組織溶解装置	バイオメリット	積水メディカル
液体シンチレーションカウンター (LSC)	Tri-Carb 2300TR 及び/又は 3100TR	PerkinElmer
サンプルオキシダイザー	Model 307 型	PerkinElmer

HPLC システム	Prominence (LC-20A) システム	島津製作所
システムマネージャ	LabSolution	島津製作所
	FLO-ONE	PerkinElmer
HPLC 用放射能 検出器 (RID)	Radiomatic 625TR	PerkinElmer

6.5 代謝物分析

6.5.1 標準原液及び標準溶液

各溶液を以下の通り調製，保管し，使用残分は試験終了までに廃棄した。

6.5.1.1 標準原液

- (1) 標準物質 (6.2 項) を 1.0 mg 秤取した (フリー体換算及び純度による補正は実施せず)。
- (2) 1 mL のメタノールに溶解して 1 mg/mL の各標準原液を調製した。
- (3) 調製後，冷蔵 (許容範囲：1～10°C) 保管した。

6.5.1.2 標準溶液 (100 µg/mL)

- (1) 100 µL の標準原液を分取した。
- (2) 900 µL の水／メタノール (1 : 1) を加えて希釈し，100 µg/mL の標準溶液を調製した。
- (3) 調製後，冷蔵 (許容範囲：1～10°C) 保管した。

6.5.1.3 標準溶液 (10 µg/mL)

- (1) 10 µL の標準原液を分取した。
- (2) 990 µL の水／メタノール (1 : 1) を加えて希釈し，10 µg/mL の標準溶液を調製した。
- (3) 調製後，冷蔵 (許容範囲：1～10°C) 保管した。

6.5.2 前処理法

6.1.1 項に示す分析試料を 6.5.2.1～6.5.2.6 項に従って前処理し，HPLC 試料を調製した。

各前処理操作においては，前処理画分の一部を 6.6 項の放射能測定に供し，放射能の回収率を下式に従って算出し確認した。6.6 項に従って抽出残渣中の放射能を測定し，放射能の残渣中残存率を下式より求めた。

$$\text{放射能の回収率* (\%)} = \frac{\text{測定試料中の放射能濃度 (dpm/g)} \times \text{測定試料の全重量 (g)}}{\text{前処理に供した試料中放射能 (dpm)}} \times 100$$

* 抽出率又は HPLC 試料への回収率

$$\text{放射能の残渣中残存率 (\%)} = \frac{\text{残渣中の放射能 (dpm)}}{\text{前処理に供した試料中放射能 (dpm)}} \times 100$$

6.5.2.1 血漿

- (1) 6.6 項に従って試料中放射能を測定し、前処理に供する放射能を求めた。
- (2) 試料 (1 mL, n=1) を採取し、3 倍量の 0.1 % TFA 含有アセトニトリルを添加、攪拌し、超音波処理 (約 3 分) した。
- (3) 遠心分離 (4°C, 3,000 rpm, 10 min, CF7D2) し、上清を採取した。
- (4) 抽出残渣に初回抽出時と同量の 0.1 % TFA 含有アセトニトリルを添加し、攪拌し、超音波処理 (約 3 分) した。
- (5) 2 回の抽出操作で得られた上清を合わせ抽出液とした。
- (6) 抽出液の一部 (n=1) を 6.6 項の放射能測定に供し、放射能の抽出率を求めた。
- (7) 抽出液の残分は室温 (約 25°C) 下、窒素気流により乾固した。
- (8) 残渣に 200 μ L の 1 %ギ酸水 / アセトニトリル (1 : 1) を添加して再溶解させた。
- (9) 再溶解溶液を遠心分離 (4°C, 10,000 rpm, 10 min, CF15RXII) し、得られた上清を HPLC 試料とした。
- (10) HPLC 試料の一部 (n=1) は 6.6 項の放射能測定に供し、放射能の回収率を求めた。
なお、前述の式に従って HPLC 試料中への放射能回収率を算出する際には、抽出率算出のために分取した放射エネルギーを考慮した。

6.5.2.2 尿

- (1) 6.6 項に従って試料中放射能を測定し、前処理に供する放射能を求めた。
- (2) 試料 (1 mL, n=1) を採取、秤量し、2 倍量のアセトニトリルを添加して、攪拌した。
- (3) 遠心分離 (4°C, 3,000 rpm, 10 min, CF7D2) し、上清 (抽出液) を採取した。
- (4) 抽出液の一部 (n=1) を 6.6 項の放射能測定に供し、放射能の抽出率を求めた。
- (5) 抽出液の残分は室温 (約 25°C) 下、窒素気流により乾固した。
- (6) 残渣に 200 μ L の移動相 A / 移動相 B (4 : 1, v/v) を添加して再溶解させた。
- (7) 遠心分離 (4°C, 10,000 rpm, 15 min, CF15RXII) 後の上清を HPLC 試料とした。
- (8) HPLC 試料の一部 (n=1) は 6.6 項の放射能測定に供し、放射能の回収率を求めた。

6.5.2.3 糞懸濁液

- (1) 6.6 項に従って試料中放射能を測定し、前処理に供する放射能を求めた。
- (2) 試料 (1 g, n=1) を採取、秤量し、3 倍量の 0.1 % TFA 含有アセトニトリルを添加、攪拌し、超音波処理 (約 3 分) した。
- (3) 遠心分離 (4°C, 3,000 rpm, 10 min, CF7D2) し、上清を採取した。
- (4) 抽出残渣に初回抽出時と同量の 0.1 % TFA 含有アセトニトリルを添加し、攪拌し、超音波処理 (約 3 分) した。
- (5) 2 回の抽出操作で得られた上清を合わせ抽出液とした。
- (6) 抽出液の一部 (n=1) を 6.6 項の放射能測定に供し、放射能の抽出率を求めた。
- (7) 抽出液の残分は室温 (約 25°C) 下、窒素気流により乾固した。
- (8) 残渣に 200 μ L の 1 %ギ酸水 / アセトニトリル (1 : 1) を添加して再溶解させた。

- (9) 再溶解溶液を遠心分離 (4°C, 10,000 rpm, 10 min, CF15RXII) し, 得られた上清を HPLC 試料とした.
- (10) HPLC 試料の一部 (n=1) は 6.6 項の放射能測定に供し, 放射能の回収率を求めた.
なお, 前述の式に従って HPLC 試料中への放射能回収率を算出する際には, 抽出率算出のために分取した放射エネルギーを考慮した.

6.5.2.4 胆汁

- (1) 6.6 項に従って試料中放射能を測定し, 前処理に供する放射能を求めた.
- (2) 試料 (250 µL, n=1) を採取, 秤量した.
- (3) 遠心分離 (4°C, 10,000 rpm, 15 min, CF15RXII) 後の上清を HPLC 試料とした.
- (4) HPLC 試料の一部 (n=1) は 6.6 項の放射能測定に供し, 放射能の回収率を求めた.

6.5.2.5 大脳皮質

- (1) 6.6 項に従って試料中放射能を測定し, 前処理に供する放射能を求める.
- (2) 大脳皮質の一部 (0.5 g, n=1) を採取, 秤量した.
- (3) 組織重量の約 2 倍量の水を加えてテフロンホモジナイザーによりホモジナイズした.
- (4) ホモジナイズ後の懸濁液に, 懸濁液重量の約 3 倍量のアセトニトリルを加えて攪拌し, 超音波処理 (約 3 分) した.
- (5) 遠心分離 (4°C, 3,000 rpm, 10 min, CF7D2) して上清を採取した.
- (6) 抽出残渣に初回抽出時と同量のアセトニトリルを添加, 攪拌し, 超音波処理 (約 3 分) した.
- (7) 2 回の抽出操作で得られる上清を合わせ抽出液とした.
- (8) 抽出液の一部 (n=1) を 6.6 項の放射能測定に供し, 放射能の抽出率を求めた.
- (9) 抽出液の残分は室温下, 窒素気流により乾固した.
- (10) 残渣に 200 µL の 1% ギ酸水/アセトニトリル (1:1, v/v) を添加して再溶解させた.
- (11) 再溶解溶液を遠心分離 (4°C, 10,000 rpm, 10 min, CF15RXII) し, 得られた上清を HPLC 試料とした.
- (12) HPLC 試料の一部 (n=1) は 6.6 項の放射能測定に供し, 放射能の回収率を求めた.
なお, 前述の式に従って HPLC 試料中への放射能回収率を算出する際には, 抽出率算出のために分取した放射エネルギーを考慮した.

6.5.2.6 視床下部

- (1) 6.6 項に従って試料中放射能を測定し, 前処理に供する放射能を求める.
- (2) 視床下部の一部 (0.5 g, n=1) を採取, 秤量した.
- (3) 組織重量の約 2 倍量の水を加えてテフロンホモジナイザーによりホモジナイズした.
- (4) ホモジナイズ後の懸濁液に, 懸濁液重量の約 3 倍量のアセトニトリルを加えて攪拌し, 超音波処理 (約 3 分) した.
- (5) 遠心分離 (4°C, 3,000 rpm, 10 min, CF7D2) して上清を採取した.

- (6) 抽出残渣に初回抽出時と同量のアセトニトリルを添加，攪拌し，超音波処理（約3分）した。
- (7) 2回の抽出操作で得られる上精を合わせ抽出液とした。
- (8) 抽出液の一部（n=1）を6.6項の放射能測定に供し，放射能の抽出率を求めた。
- (9) 抽出液の残分は室温下，窒素気流により乾固した。
- (10) 残渣に200 μLの1%ギ酸水／アセトニトリル（1:1, v/v）を添加して再溶解させた。
- (11) 再溶解溶液を遠心分離（4°C, 10,000 rpm, 10 min, CF15RXII）し，得られた上清をHPLC試料とした。
- (12) HPLC試料の一部（n=1）は6.6項の放射能測定に供し，放射能の回収率を求めた。
- なお，前述の式に従ってHPLC試料中への放射能回収率を算出する際には，抽出率算出のために分取した放射エネルギーを考慮した。

6.5.3 ラジオ HPLC による分析

6.5.3.1 分析条件

標準溶液（6.5.1.2項）及び6.5.2項で調製したHPLC試料を分析し，ピーク形状やピークの相互分離から代謝物分析に適する下記分析条件を確立した。

ラジオ HPLC 条件

ラジオ HPLC システム	Prominence (LC-20A) システム Radiomatic 625TR		
カラム	XBridge BEH C18 Column, 130Å, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm (Waters)		
カラム温度	40°C		
オートサンプラー温度	4°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 プログラム*	時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
	0.0	85	15
	5.0	85	15
	35.0	60	40
	55.0	10	90
	60.0	10	90
	60.1	85	15
	70.0	85	15
流速	1.0 mL/min		
検出 (UV)	254 nm		

検出 (放射能)	RID の設定 Liquid scintillation system : Radiomatic 625TR セル容量 : 0.5 mL シンチレーションカクテル : Ultima-Flo M (流速 : 3 mL/min)
分析時間	70.0 min

* グラジエントはリニアグラジエントで実施.

6.5.3.2 HPLC 試料の測定

ラジオ HPLC 条件の確定後, 下記の通り HPLC 試料を分析した.

- (1) 標準溶液 (10 μ L) を上記条件のラジオ HPLC に注入し, UV クロマトグラムにおける標準物質の保持時間を確認した.
- (2) 分析試料から調製した HPLC 試料の一部 (100 μ L, n=1) を下記条件のラジオ HPLC に注入した.
- (3) 放射性ピークを RID により測定した.
- (4) 各分析試料の測定において, 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 (n=1) について 6.6 項に従い放射能を測定した. ラジオ HPLC システムに注入した放射能 (HPLC 注入放射能) から次式により HPLC からの放射能の回収率 (カラム回収率, %) を求めた.

$$\text{カラム回収率 (\%)} = \frac{\text{溶出液中の放射能濃度 (dpm/g)} \times \text{全溶出液量 (g)}}{\text{HPLC 注入放射能 (dpm)}} \times 100$$

- (5) 標準溶液 (10 μ L) を再度ラジオ HPLC に注入し, UV クロマトグラムにおける標準物質の保持時間を確認した (標準溶液の測定は, 測定バッチ毎に最初と最後に行い, それぞれ保持時間を確認した).
- (6) 6.5.3.3 項に従い各ピークの面積百分率 (% Peaks) を求めた.

6.5.3.3 代謝物組成の予備的評価 (ラジオクロマトグラムの解析)

各試料中代謝物の組成を予備的に評価するため, 6.5.3.2 項に従って得られたラジオクロマトグラムを以下の通り解析し, 各放射性ピークの面積百分率 (% Peaks) を求めた.

検出対象とする放射性ピークは次のように設定し, 解析を行った. なお, バックグラウンドの確認は測定バッチ毎に行った.

- (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 3 倍 (3BG) 以上の強度を有するピークを検出対象として積分した.

6.6 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 LSC 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により燃焼処理を行って放射能を測定した際は、予め放射能の回収率 (n=3, 許容範囲 90.0%以上) を測定した。試料燃焼前の放射能回収率が 95.4%であったため、得られた測定試料中放射能を回収率により補正した。また、各最終燃焼後にも、同様に放射能の回収率 (n=3) を測定した。

以下に測定試料調製法を示す。

6.6.1 血漿

- (1) 血漿試料 (100 μ L, n=1) をバイアルに分取した。
- (2) 約 1 mL の精製水を加えて希釈した。
- (3) Clear-Sol I を 10 mL 加えて、混合した。

6.6.2 尿及び胆汁

- (1) 試料 (尿 : 100 μ L, 胆汁 : 50 μ L, 各 n=2) をバイアルに分取し、秤量した。
- (2) Clear-Sol I を 10 mL 加えて混合した。

6.6.3 糞懸濁液

- (1) 約 0.5 mL (n=2) をコンバストパッドに分取し、秤量した。
- (2) サンプルオキシダイザーにより燃焼処理し、 $^{14}\text{CO}_2$ を Carbo-Sorb E (6 mL) に回収した。
- (3) Permafluor E+ (9 mL) を混合した。

6.6.4 大脳皮質及び視床下部

- (1) 約 0.1 g (n=1) をバイアルに分取し、秤量した。
- (2) 組織溶解剤 (1 mL) 加えた。
- (3) 組織溶解装置で約 30 分間処理した。
- (4) Hionic-fluor を 15 mL 加えて混合した。

6.6.5 HPLC 溶出液 (シンチレーションカクテルを含む)

- (1) HPLC 溶出液の全重量を測定した。
- (2) 一部 (15 mL, n=1) をバイアルに分取し、秤量した。
- (3) Ultima-Flo M を 5 mL 加えて混合した。

6.6.6 抽出液及び HPLC 試料

- (1) 全重量を測定した。
- (2) 下表の通り、一部 (n=1) をバイアルに分取し、秤量した。

(3) Ultima-Flo M を 5 mL 加えて混合した。

試料	分取量 (μL)	
	抽出液	HPLC 試料
血漿	500	50
尿	100	10
糞懸濁液	500	50
胆汁	--	10
大脳皮質	500	50
視床下部	500	50

-- : 該当なし

6.6.7 抽出残渣

- (1) 残渣に Soluene-350 を 1 mL 加えて溶解させた。
- (2) 2-プロパノールを 1 mL 加えて、攪拌し混合した。
- (3) Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

6.7 試験結果の算出及び表示

6.7.1 代謝物番号の付与

6.5.3.3 項に従って検出対象とした放射性ピークについて、下表の通り代謝物番号 (M-No.) を付与した。ただし、標準物質 P092・マレイン酸塩 (6.2 項) 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。

マトリックス	M-No.付与の規定	M-No.*
血漿	面積百分率 (% Peaks) が 3.0%以上の放射性ピーク	mPM-n
尿	面積百分率 (% Peaks) が 3.0% (排泄率換算で 0.1%) 以上の放射性ピーク	mUM-n
糞	面積百分率 (% Peaks) が 4.3% (排泄率換算で 0.5%) 以上の放射性ピーク	mFM-n
胆汁	面積百分率 (% Peaks) が 3.0%以上の放射性ピーク	mBM-n
大脳皮質	面積百分率 (% Peaks) が 3.0%以上の放射性ピーク	mCOM-n
視床下部	面積百分率 (% Peaks) が 5.0%以上の放射性ピーク	mHTM-n

* 溶出時間の早いピーク順に 1 から付与。

6.7.2 代謝物組成の予備的評価

6.5.3.3 項で求めた各放射性ピーク的面積百分率 (% Peaks) は、ラジオクロマトグラム解析ソフトウェア FLO-ONE により算出した。

その他の値の算出には、Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) を用いた。

各試料中代謝物の組成を予備的に評価するため、M-No.が付与された放射性ピークの定量値を、関連試験[1]のデータに基づき下式(a)～(e)に従って算出した。

(a) 組成比 (% in analysis sample)

$$= \text{面積百分率 (\% Peaks)} \times \text{HPLC 試料への回収率}^* \times 1/100$$

(b) 未変化体及び代謝物の血漿中及び脳組織中濃度

(P092 フリー体換算濃度, ng eq./mL or g)

$$= \text{血漿中及び脳組織中濃度[1]} \times \text{組成比} \times 1/100$$

(c) 未変化体及び代謝物の尿中排泄率 (% of dose) = 尿中排泄率[1] × 組成比 × 1/100

(d) 未変化体及び代謝物の糞中排泄率 (% of dose) = 糞中排泄率[1] × 組成比 × 1/100

(e) 胆汁における未変化体及び代謝物の分布率 (% of dose)

$$= \text{胆汁への分布率[1]} \times \text{組成比} \times 1/100$$

M-No.が付与されない放射性ピークの定量値はまとめて「Others」として表示した。Othersの面積百分率は、M-No.が付与された放射性ピーク（P092を含む）の合算値を100%から差し引いて算出した。Othersの組成比、血漿中及び脳組織中濃度並びに排泄率・分布率は上式(a)～(e)に従って算出した。

6.7.3 表示単位及び表示桁数

試験結果の表示単位及び表示桁数は下表の通りとした。試験結果は表示桁数の1桁下で四捨五入して表示した。ただし、放射性ピークの面積百分率(% Peaks)及び保持時間については使用するソフトウェアで所定の桁数で表示した値とした。

試験結果	表示単位	表示桁数
放射能の回収率（抽出率及び HPLC 試料への回収率） カラム回収率	%	小数点以下1桁
代謝物定量値（面積百分率, % Peaks）	%	小数点以下1桁
代謝物定量値（組成比）	% in analysis sample	小数点以下1桁
代謝物定量値（血漿中及び脳組織中濃度）	ng eq./mL or g	小数点以下1桁
代謝物定量値（排泄率及び分布率）	% of dose	小数点以下1桁
保持時間	min	小数点以下1桁

6.8 残余試料の取り扱い

残余試料（移管試料、分析試料及び HPLC 試料残分）は冷凍（-20℃、許容範囲：-40～-15℃）保管し、試験終了までに廃棄した。

7. 参考資料

[1] 最終報告書

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩のカニクイザルにおける単回投与後の薬物動態予備試験（試験番号：B130897），株式会社L S Iメディエンス

8. 結果及び考察

8.1 前処理回収率及びラジオ HPLC 測定でのカラム回収率

各試料の前処理回収率を Table 1 に示す.

血漿 (投与後 1 時間) を前処理したとき, 抽出率は 75.2%, HPLC 試料への回収率は 68.8% であった.

尿 (投与後 0-72 時間) を前処理したとき, 抽出率は 96.4%, HPLC 試料への回収率は 95.9% であった.

糞懸濁液 (投与後 0-72 時間) を前処理したとき, 抽出率は 90.5%, HPLC 試料への回収率は 76.3% であった.

胆汁 (投与後 24 時間) を前処理したとき, HPLC 試料への回収率は 92.4% であった.

大脳皮質 (投与後 168 時間) を前処理したとき, 抽出率は 75.7%, HPLC 試料への回収率は 56.0% であった.

視床下部 (投与後 168 時間) を前処理したとき, 抽出率は 74.3%, HPLC 試料への回収率は 56.4% であった.

また, これら試料をラジオ HPLC で測定したときのカラム回収率は血漿 (投与後 1 時間) で 101.4%, 尿 (投与後 0-72 時間) で 97.0%, 糞懸濁液 (投与後 0-72 時間) で 96.1%, 胆汁 (投与後 24 時間) で 102.0%, 大脳皮質 (投与後 168 時間) で 96.0%, 視床下部 (投与後 168 時間) で 96.5% であった.

8.2 代謝物組成の予備的評価

血漿, 尿, 糞, 胆汁, 大脳皮質及び視床下部試料における代謝物の定量結果を Table 2~Table 7 及び Appendix 1~Appendix 6 に示す. また各試料におけるラジオクロマトグラムを Figure 1 及び Figure 2 に示す.

なお, P092・マレイン酸塩標準物質との保持時間の比較から, 血漿での mPM-2, 糞での mFM-6, 胆汁での rBM-9, 大脳皮質での mCOM-1, 視床下部での mHTM-1 を P092 と同定した. 尿中には P092 は検出されなかった. 検出されたその他の放射性ピークは unknown とした (Table 8).

8.2.1 血漿

血漿では主に 2 種 (mPM-1 及び mPM-2) の放射性ピークが検出された (Table 2, Appendix 1 及び Figure 1). mPM-1 (unknown) の組成比は 5.4% (4.9 ng eq./mL), mPM-2 (P092) の組成比は 2.5% (2.3 ng eq./mL) であった.

8.2.2 尿

尿では主に 11 種 (mUM-1~mUM-11) の放射性ピークが検出された (Table 3, Appendix 2 及び Figure 1). P092 は検出されなかった. これらのピークのうち, mUM-4 (unknown) の組成比が 10.3% (0.5% of dose) と最も大きかった.

8.2.3 糞

糞では主に6種 (mFM-1~mFM-6) の放射性ピークが検出された (Table 4, Appendix 3 及び Figure 1) . これらのピークのうち, mFM-1 (unknown) の組成比が 35.5% (5.5% of dose) と最も大きかった. 未変化体 (mFM-6, P092) の組成比は 4.1% (0.6% of dose) であった.

8.2.4 胆汁

胆汁では主に9種 (mBM-1~mBM-9) の放射性ピークが検出された (Table 5, Appendix 4 及び Figure 2) . これらのピークのうち, mBM-2 (unknown) の組成比が 13.7% (0.1% of dose) と最も大きかった. 未変化体 (mBM-9, P092) の組成比は 5.5% (0.0% of dose) であった.

8.2.5 大脳皮質

大脳皮質では主に未変化体 (mCOM-1, P092) のみが検出され, その組成比は 27.6% (45.8 ng eq./g [0.1 nmol/g]) であった (Table 6, Appendix 5 及び Figure 2) .

8.2.6 視床下部

視床下部では主に未変化体 (mHTM-1, P092) のみが検出され, その組成比は 38.9% (96.0 ng eq./g [0.2 nmol/g]) であった (Table 7, Appendix 6 及び Figure 2) .

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
なし

Table 1 Recovery of radioactivity in sample pretreatment and radio-HPLC measurement

Analysis sample	Time point or time period	Recovery of radioactivity, %			
		Extract ^a	Residue ^b	HPLC sample ^c	HPLC column ^d
Plasma	1 h	75.2	28.5	68.8	101.4
Urine	0-72 h	96.4	--	95.9	97.0
Feces	0-72 h	90.5	3.7	76.3	96.1
Bile	24 h	--	--	92.4	102.0
Cerebral cortex	168 h	75.7	27.2	56.0	96.0
Hypothalamus	168 h	74.3	26.9	56.4	96.5

a: Recovery of radioactivity from analysis sample to extract

b: Residual radioactivity in extraction residue

c: Recovery of radioactivity from analysis sample to HPLC sample

d: Recovery of radioactivity from HPLC column

--: Not determined

Table 2 **Composition ratio and radioactivity concentration of P092 and its metabolites in plasma at 1 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg**

Metabolite No.	Retention time (min)	Component	% in analysis sample (<i>ng eq./mL</i>)
mPM-1	3.4	Unknown	5.4 (4.9)
mPM-2	54.0	P092	2.5 (2.3)
Others	--	--	60.9 (54.9)
Unextracted	--	--	31.2 (28.1)
Total radioactivity concentration			(90.2)

Composition ratio = % in analysis sample

Radioactivity concentration = ng eq./mL

--: Not applicable

Table 3 Composition ratio and radioactivity excretion of P092 and its metabolites in urine at 0-72 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg

Metabolite No.	Retention time (min)	Component	% in analysis sample	
			(%) <i>of dose</i>)
mUM-1	3.3	Unknown	(8.6 0.4)
mUM-2	16.3	Unknown	(9.8 0.4)
mUM-3	18.9	Unknown	(3.6 0.2)
mUM-4	21.7	Unknown	(10.3 0.5)
mUM-5	23.2	Unknown	(7.3 0.3)
mUM-6	26.1	Unknown	(5.1 0.2)
mUM-7	31.0	Unknown	(2.7 0.1)
mUM-8	33.0	Unknown	(5.8 0.3)
mUM-9	33.8	Unknown	(3.1 0.1)
mUM-10	40.9	Unknown	(4.7 0.2)
mUM-11	41.9	Unknown	(4.0 0.2)
Others	--	--	(31.0 1.4)
Unextracted	--	--	(4.1 0.2)
Total radioactivity excretion			(4.5)

Composition ratio = % in analysis sample

Radioactivity excretion = % of dose

--: Not applicable

Table 4 **Composition ratio and radioactivity excretion of P092 and its metabolites in feces at 0-72 h after single intravenous bolus administration of [¹⁴C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg**

Metabolite No.	Retention time (min)	Component	% in analysis sample	
			(%) <i>of dose</i>)
mFM-1	3.1	Unknown	(35.5 5.5)
mFM-2	21.0	Unknown	(4.9 0.8)
mFM-3	29.7	Unknown	(4.3 0.7)
mFM-4	31.6	Unknown	(3.5 0.5)
mFM-5	40.0	Unknown	(3.7 0.6)
mFM-6	54.1	P092	(4.1 0.6)
Others	--	--	(20.3 3.1)
Unextracted	--	--	(23.7 3.6)
Total radioactivity excretion			(15.4)

Composition ratio = % in analysis sample

Radioactivity excretion = % of dose

--: Not applicable