

3. 試験実施概要

3.1 表題

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩をラットに単回静脈内投与したときの放射能の血中濃度，排泄及び分布

3.2 試験番号

B130898

3.3 試験目的

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩を雄性ラットに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する。

3.4 適用ガイドライン

非臨床薬物動態試験ガイドラインについて
医薬審第496号，平成10年6月26日

3.5 信頼性基準

申請資料の信頼性の基準
医薬品，医療機器等の品質，有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則 第43条

3.6 信頼性保証部門による調査

試験計画書，試験計画書変更書，試験資料，最終報告書草案及び最終報告書を調査し，信頼性保証証明書を最終報告書に添付した。

3.7 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

3.8 試験受託者

株式会社LSI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

3.9 試験施設

株式会社LSI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

3.10 試験責任者

中井 弘司

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 : 0479-46-5392, FAX : 0479-46-3173

E-mail : Nakai.Hiroshi@ma.medience.co.jp

3.11 主な試験従事者

動物入荷, 検疫及び飼育管理 :

三十尾 知奈, 上田 智哉, 大塚 康之, 有田 孝幸

投与液調製及び分析 : 佐藤 智洋, 伊藤 まゆみ

投与 : 大塚 康之, 上田 智哉

試料採取及び放射能測定 : 朝日 啓介, 大塚 康之, 有田 孝幸, 三十尾 知奈,
福田 康成, 佐藤 智洋

3.12 試験日程

試験開始 : 2015年1月16日

動物入荷 : 2015年1月21日

投与 : 2015年1月27日

試験終了 : 本最終報告書への試験責任者署名日とする。

3.13 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。

3.14 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 試験計画書変更書
- (3) 被験物質及び標準物質に関する資料
- (4) 使用動物に関する資料
- (5) 試験操作に関する資料
- (6) 試験結果に関する資料
- (7) 通信文書等の記録文書
- (8) 最終報告書

3.15 その他

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針（試験研究センター指針）」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：2015-0008）を得た。

4. 試験責任者署名

表題： [^{14}C]P092・マレイン酸塩をラットに単回静脈内投与したときの放射能の血中濃度、
排泄及び分布

試験番号：B130898

試験責任者：

2015年 3月 18日

中井 弘司

中井 弘司
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・マレイン酸塩を雄性ラットに 1 mg/kg (フリー体換算) 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 [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。

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, いずれの時点においても, 大部分の組織に放射能が検出され, 特に甲状腺, 心臓, 肺, 腎臓, 副腎及び脾臓では定量上限以上 (AUQ, >3928.2 ng eq./g) の放射能濃度が認められた。多くの組織において放射能濃度は投与後 1 又は 24 時間で最高値を示したが, 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。以上の結果から, [¹⁴C]P092 及び/又はその代謝物の組織移行性は高いことが示唆された。

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, [¹⁴C]P092 及び/又はその代謝物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 [¹⁴C]P092 及び/又はその代謝物の脳組織への移行は比較的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検出限界未満 (ND) であった。

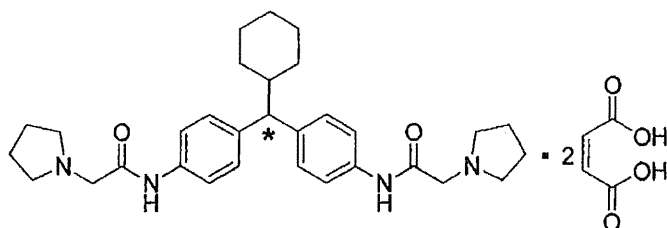
6. 材料及び方法

6.1 被験物質

6.1.1 名称

[¹⁴C]P092 maleate ([¹⁴C]P092・マレイン酸塩)

6.1.2 構造式及び標識位置



* : ¹⁴C 標識位置

6.1.3 分子量

736.70 (at this specific activity)

6.1.4 ロット番号

K0348-02

6.1.5 化学的純度

99.5% (HPLC 法, 2014 年 12 月 26 日測定, Certificate of Analysis, Curachem)

6.1.6 比放射能

58.4 mCi/mmol (2.933 MBq/mg, フリー体として 4.288 MBq/mg)

6.1.7 放射化学的純度

98.9% (HPLC 法, 2014 年 12 月 26 日測定, Certificate of Analysis, Curachem)

6.1.8 性状

エタノール溶液

6.1.9 放射能濃度

5 MBq/mL (被験物質濃度 : 1.705 mg/mL, フリー体として 1.166 mg/mL)

6.1.10 フリー体換算係数

1.4618 (非標識体での分子量比 フリー体 : マレイン酸塩 = 1 : 1.4618)

6.1.11 合成先

Curachem

6.1.12 保存条件

冷凍 (-80°C, 許容範囲: -60°C 以下, 実測値: -82.1~-74.8°C), 遮光, 気密容器

6.1.13 保管場所

被験物質保管場所 (74)

6.1.14 取扱上の注意

保護メガネ, マスク, ゴム手袋を着用した。

6.1.15 放射化学的純度の確認

被験物質としての使用前及び使用後に, 放射化学的純度が 95.0%以上であることを確認した。

【放射化学的純度】

使用前: 99.0%

使用後: 99.1%

なお, 放射化学的純度は, 「 $[^{14}\text{C}]$ P092・マレイン酸塩をカニクイザルに単回静脈内投与したときの放射能の血中濃度, 排泄及び分布 (試験番号 B130899, 株式会社 L S I メディエンス)」において, ラジオ HPLC 法により測定した結果を共用した。

6.1.16 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 (株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所) で使用することとした。

6.2 標準物質

6.2.1 名称

P092・マレイン酸塩

6.2.2 ロット番号

KS14001

6.2.3 フリー体換算係数

1.4618

6.2.4 性状

白色の粉末

6.2.5 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.2.6 保存条件

冷蔵（許容範囲：1～10°C，実測値：3.0～4.9°C），遮光，密封（窒素封入）

6.2.7 保管場所

被験物質保管場所（59）及び（29）

6.2.8 取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋を着用した。

6.2.9 残余標準物質の処理

残余の標準物質は，関連する薬物動態試験（株式会社LSIメディエンス 鹿島研究所）で使用することとした。

6.2.10 特記事項

本試験では本標準物質は直接使用せず，P092・マレイン酸塩標準溶液（別試験で調製）として使用した（6.1.15 項参照）。

6.3 媒体

6.3.1 名称

生理食塩液（日本薬局方，大塚製薬工場，Lot No. K4G99）

6.4 主な試薬

水は，超純水製造システム（Elix-UV 10，Milli-Q Advantage，メルク）で精製したものを精製水として用いた。試薬は，用途に応じて市販の一級品，試薬特級または同等以上のものを使用した。

6.5 投与液

6.5.1 調製濃度

0.2 mg/0.858 MBq/mL（フリー体として）

6.5.2 調製方法及び頻度

投与液は，以下の手順で投与当日に調製した。

調製は紫外線をカットした蛍光灯下で行い，可能な限り滅菌あるいは消毒済みの器材を使用した。

- (1) [^{14}C]P092・マレイン酸塩を 6.5 mL（フリー体換算で 7.6 mg）分取し，窒素気流下で乾固させた。

- (2) 媒体を 38 mL 加え, スターラーで攪拌しつつ溶解させた.
- (3) 0.22 μm フィルター (MILLEX[®]-GV, メルク(旧社名 Millipore)) でろ過した.
- (4) 投与液の一部 (2 mL) を分取し, pH を測定して記録した (実測値: pH 4.694).
- (5) 使用後の投与液は冷蔵 (許容範囲: 1~10°C) 条件下で保存し, 試験終了時まで廃棄した.

6.5.3 放射能濃度の測定

投与前及び投与終了後に 6.10 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%以下であることを確認した.

6.5.4 放射化学的純度の確認

投与前及び投与終了後に放射化学的純度を測定した.

投与液 (100 μL , 各 $n=1$) を採取し, 70 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 (各 $n=1$). 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. なお, P092・マレイン酸塩標準溶液は, 「[¹⁴C]P092・マレイン酸塩をカニクイザルに単回静脈内投与したときの放射能の血中濃度, 排泄及び分布 (試験番号 B130899, 株式会社 L S I メディエンス)」で調製し, 冷蔵 (許容範囲: 1~10°C, 実測値: 2.0~5.0°C) 条件下で保存したものを使用した.

HPLC 測定で得られたラジオクロマトグラムにおける全ピーク面積に対する [¹⁴C]P092・マレイン酸塩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 6.10 項に従い放射能を測定した. この溶出液中の放射能と, 注入した試料中の放射能 (6.10 項において測定) の値を用いて, 次式により HPLC システムからの放射能の回収率 (HPLC 回収率) を求めた.

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

【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) Radiomatic 625TR (PerkinElmer)
分析カラム	Inertsil ODS-2, 5 μm , 4.6 mm I.D. \times 250 mm (ジーエルサイエンス)
カラム温度	40°C
移動相	A = 0.2% Trifluoroacetic acid (TFA) Water B = Acetonitrile

グラジエントプログラム	Time (min) 0 20 50 50.1 60 %B 20 60 60 20 20
Injection volume	10 μ L
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

6.6 試験動物

6.6.1 動物種

ラット

6.6.2 系統

Crl:CD (SD)

6.6.3 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。

6.6.4 微生物レベル

SPF

6.6.5 購入先

日本チャールス・リバー

6.6.6 購入時週齢

8 週齢

6.6.7 購入動物数

雄 23 匹

6.6.8 検疫・馴化

入荷後、動物仮番号を付与し、1 ケージ当たり 2~3 匹で収容した。

動物個体毎に一般状態を 5 日間、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。

6.6.9 投与時週齢

9 週齢

6.6.10 検疫終了時体重

検疫終了時の動物の体重範囲は平均体重 $\pm 20\%$ 以内であり，全例を群分けに供した。

6.6.11 群分け

投与日に群分けした。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，健康な動物を選択した。

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。

6.6.12 動物の個体識別

6.6.12.1 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。

6.6.12.2 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，試験項目，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。

6.6.13 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，当日中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。

6.7 動物飼育

6.7.1 飼育室

検疫及び馴化：5173 室

馴化及び投与後：5118 室

6.7.2 飼育環境

6.7.2.1 温度

許容範囲：19.0～25.0°C

実測値：21.0～23.6°C

6.7.2.2 相対湿度

許容範囲：35.0～75.0%

実測値：42.8～59.5%

6.7.2.3 換気

5173室：6～20回/時間，オールフレッシュエアー供給

5118室：10～30回/時間，オールフレッシュエアー供給

6.7.2.4 照明時間

12時間/日（7:00～19:00）点灯

6.7.3 飼育器材

6.7.3.1 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（内寸：257W×387D×197H mm，トキワ科学器械）を使用し，週1回交換した。

6.9.1，6.9.3 及び 6.9.4 項の投与後は，洗浄済（非滅菌）のポリカーボネート製ケージを使用し，週1回交換した。6.9.2 項の投与後は，ガラス製代謝ケージ（メタボリカ MC-CO₂ 型，直径 195×185H mm，スギヤマゲン）に個体別に收容し，飼育した。

6.7.3.2 スノコ

6.9.1，6.9.3 及び 6.9.4 項の投与後は，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。

6.7.3.3 給餌器

オートクレーブ滅菌済固型用ステンレス製給餌器（トキワ科学器械）を使用し，週1回交換した。

6.7.3.4 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回交換した。

6.7.3.5 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。

6.7.3.6 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用具を与えた。

6.7.4 床敷

6.7.4.1 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。

6.7.4.2 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。

6.7.5 飼料

6.7.5.1 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）

6.7.5.2 給餌法

自由摂取とする。追加が必要な場合は補充し，給餌器交換時には交換した。なお，絶食は実施しなかった。

6.7.5.3 汚染物質の確認

飼料の供給元から分析結果を入手し，使用ロット（Lot No. 141118）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。

6.7.6 飲用水

6.7.6.1 種類

5 μm フィルター濾過後，紫外線照射した水道水

6.7.6.2 給水法

自由摂取とする。

飲用水は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。

6.7.6.3 分析

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ている。

6.8 投与

6.8.1 投与経路

静脈内投与

6.8.2 投与経路の選択理由

予定臨床投与経路に準じる。

6.8.3 投与方法

27G×1/2'の注射針(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。

6.8.4 投与方法の選択理由

ラットに静脈内投与する方法として一般的に用いられており, 被験物質を正確に投与できる。

6.8.5 投与回数

単回投与

6.8.6 投与用量及びその設定理由

1 mg/4.288 MBq/kg (P092 フリー体としての用量)

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LSIメディエンス, 旧社名 三菱化学メディエンス株式会社)」における最低用量である1 mg/kgを設定した。

6.8.7 投与液量

5 mL/kg

投与日に測定した体重に基づいて投与液量を算出した。個体の投与実績量は重量法により算出した(投与前後の投与器材の総重量を測定し, 正確な投与量を把握した)。

6.9 試験項目及び試料採取

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 (フリー体として), 投与液量	採取 時点	評価 動物数	動物番号
6.9.1 血液中放射能濃度	IV	1 mg/5 mL/kg	-	3	01101-01103
6.9.2 尿, 糞及び呼気中放射能排泄	IV	1 mg/5 mL/kg	-	3	02104-02106
6.9.3 ラジオグラフィー(QWBA)	IV	1 mg/5 mL/kg	1 h	1	03111
			24 h	1	04123
			168 h	1	05125
			336 h	1	06127
6.9.4 血液, 血漿, 脳脊髄液及び脳中放射能濃度	IV	1 mg/5 mL/kg	1 h	3	07131-07133
			24 h	3	08136-08138
			168 h	3	09141-09143

- : 経時的に試料を採取した。

6.9.1 血液中放射能濃度

投与後，ラットはポリカーボネート製ケージにスノコを敷き，3匹まとめて収容した。

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注射筒を用いて，約 0.15 mL を採血し，マイクロテストチューブに移した。血液 50 μ L をバイアルに分取（各 n = 1）して 6.10 項において放射能を測定し，血液中放射能濃度を求めた。

測定残分の血液は冷凍（ -80°C ，許容範囲： -60°C 以下，実測値： $-77.0\sim-72.0^{\circ}\text{C}$ ）保存した。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。

【採取時点】

投与後 5, 30 分, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 240, 336 時間

6.9.2 尿，糞及び呼気中放射能排泄

投与後，ラットはガラス製代謝ケージ（メタボリカ MC-CO₂ 型）に個体毎に収容した。

以下に示す採取区間毎に自然排泄尿，糞及び呼気を分別採取した。尿の採取区間毎に，ケージ内面を精製水（約 50 mL）で洗浄しケージ洗浄液として採取した。呼気の捕集はケージ内に約 250 mL/分の流速で給気し，24 時間毎の排気を 2-メトキシエタノール/2-アミノエタノール（2/1, v/v）混液 200 mL を充填した 1 本のインピンジャーに導くことにより行い，この 24 時間毎の呼気捕集液 4 日分（投与後 0-96 時間）又は 3 日分（投与後 96-168 時間）をプールした。採取した尿，糞，呼気及びケージ洗浄液は 6.10 項において放射能を測定し，各放射能排泄率及び放射エネルギーを求めた。

最終試料採取後（投与後 336 時間）の動物は炭酸ガス吸入により安楽死させたのち，6.10 項において放射能を測定し，放射能残存率を求めた。

投与後 168 時間までの尿及び糞については，一部を冷凍（ -80°C ，許容範囲： -60°C 以下，実測値： $-77.0\sim-72.0^{\circ}\text{C}$ ）保存した。

【採取区間（採取時点）】

尿，糞：投与後 0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144, 144-168, 168-240, 240-336 時間

呼気：投与後 0-96, 96-168 時間

ケージ洗浄液：投与後 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 240, 336 時間

屠体：投与後 336 時間

6.9.3 定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）

6.9.3.1 ブランク血液の購入

ラットのプール血液を日本チャールス・リバーから購入した。試験施設への血液の輸送はドライアイスによる凍結下で行い，使用時まで冷凍（ -20°C ，許容範囲： $-40\sim-15^{\circ}\text{C}$ ，実測値： $-25.2\sim-22.4^{\circ}\text{C}$ ）保存した。採血条件を以下に示す。

系統： Crl:CD (SD)

性別： 雄

投与歴： なし
抗凝固剤： ヘパリンナトリウム

6.9.3.2 [¹⁴C]P092 標準溶液の調製

0.4 mL の [¹⁴C]P092・マレイン酸塩に、アセトニトリル/精製水 (1:1, v/v) を 0.6 mL 加えて希釈し、2000 kBq/mL の標準溶液を調製した。さらに、アセトニトリル/精製水 (1:1, v/v) で希釈して 4, 20 及び 200 kBq/mL の標準溶液を調製した。各標準溶液は検量線血液試料の調製 (6.9.3.3 項) の当日に調製した。調製した標準溶液は 6.10 項において放射能を測定した。残余の標準溶液は冷蔵 (許容範囲：1~10°C) 保存し、試験終了までに廃棄した。

6.9.3.3 検量線血液試料の調製

室温下、ブランク血液の約 40 mL (約 40 g) (n=4) に 4, 20, 200 及び 2000 kBq/mL の標準溶液をそれぞれ 0.4 mL 加えて混合し、約 0.04, 0.2, 2.0 及び 20 kBq/g の検量線血液試料を調製した。これらの検量線血液試料の一部 (200 µL) は 6.10 項において放射能を測定し、投与液の比放射能 (6.5.1 項, 放射能濃度は実測値を使用) から P092 フリー体換算濃度 (ng eq./g) を求めた。

放射能測定後の検量線血液試料は、各濃度約 4 mL ずつチューブ (テストチューブ, Polypropylene 製, アシスト) 8 本に小分けし、冷凍 (-20°C, 許容範囲：-40~-15°C, 実測値：-25.2~-22.6°C) 保存した。

残余のブランク血液は廃棄した。

6.9.3.4 ラジオルミノグラムの作製

投与後、ラットはポリカーボネート製ケージにスノコを敷き、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た。その際、6.9.3.3 項で調製した各濃度の検量線血液試料 4 濃度 1 組を凍結屠体の上下左右の対角部位 (2 部位) に 1 組ずつ配置して同時に包埋した。

大型滑走式凍結マイクロトーム (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 48 時間露光した。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 : 50 µm, latitude: 4), 個体当たり 3 又は 4 切片のラジオルミノグラムを作製した。

6.9.3.5 組織中放射能濃度の算出

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。

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) を算出した。

解析組織は下記の組織とし、各個体(各時点)の切片より各1組織を選択して評価に供した。血液及び組織中放射能濃度は、P092フリー体換算濃度 (ng eq./g) として算出した。

【解析組織】

血液、大脳、小脳、下垂体、脊髄、眼球、ハーダー氏腺、顎下腺、甲状腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、睪臓、前立腺、精巣、精巣上体、精囊、皮膚、骨格筋、大腿骨、骨髓(大腿部)、白色脂肪、褐色脂肪、膀胱、腸間膜リンパ節、胃、小腸、大腸

6.9.4 血液、血漿、脳脊髄液及び脳中放射能濃度

投与後、ラットはポリカーボネート製ケージにスノコを敷き、採取時点毎に収容した。

所定の採取時点に各群のラットをイソフルラン吸入麻酔下で開腹し、後大静脈から注射筒及び注射針を用いて採血したのち、腹大動脈を切断放血して安楽死させ、脳脊髄液及び脳を摘出した。

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、混和した。放射能測定用試料として血液100 µL (n=1) をバイアルに分取して6.10項において放射能を測定し、血液中放射能濃度を求めた。

約2 mLの血液を冷凍(-80°C、許容範囲:-60°C以下、実測値:-77.0~-72.0°C) 保存し、残りの血液は遠心分離(4°C、3,000 rpm × 10 min、CF7D2、日立工機)し、血漿を得た。血漿100 µL (n=1) をバイアルに分取して6.10項において放射能を測定し、血漿中放射能濃度を求めた。

血漿の測定残分及び血漿分離後の血球は冷凍(-80°C、許容範囲:-60°C以下、実測値:-77.0~-72.0°C) 保存した。

脳脊髄液はマイジクター(27G×1/2", 1 mL、テルモ)を用いて採取し、6.10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。

脳は生理食塩液で洗浄し、濾紙片により付着水分を除き、6.10項において放射能を測定し、脳中放射能濃度を求めた。

脳及び脳脊髄液の測定残分は冷凍(-80°C、許容範囲:-60°C以下、実測値:-77.0~-72.0°C) 保存した。

組織摘出後の屍体は廃棄した。

6.10 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、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%及び 96.8%) であったため、得られた測定試料中放射能はそれぞれの燃焼処理時の回収率で補正した。また、各燃焼後にも、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。

以下に測定試料調製法を示す。

6.10.1 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。

6.10.2 HPLC 溶出液

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

6.10.3 投与液

一部 (50 μL , $n=3$) を分取、秤量し、メタノールで希釈して、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。

6.10.4 血液

組織溶解剤 (バイオメリット専用組織溶解液, ナカライテスク) を 1 mL 加え、組織溶解装置 (バイオメリット, 積水メディカル) で約 30 分間処理したのち、シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor, PerkinElmer) を 15 mL 加えて混合した。

6.10.5 尿

全重量を測定したのち、0.1~1 mL ($n=2$) をバイアルに分取、秤量し、Clear-sol I を 10 mL

加えて混合した。

6.10.6 ケージ洗浄液

全重量を測定したのち、約 1 mL (n=2) をバイアルに分取、秤量し、Clear-sol I を 10 mL 加えて混合した。

6.10.7 糞

餌片等の混入物を除去し、糞重量を測定した。約 9 倍 (v/w) 量の精製水を加えて全重量を測定し、超高速ホモジナイザー (ポリトロン PT3100, Kinematica) を用いて懸濁液とした。約 0.5 mL (n=2) をコンバストパッドに分取、秤量し、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

6.10.8 呼気捕集液

全重量を測定したのち、約 1 mL (n=2) をバイアルに分取、秤量し、メタノールを 3 mL、Clear-Sol I を 10 mL 加えて混合した。

6.10.9 屠体

2 mol/L 水酸化カリウム水溶液 400 mL を加え、加熱、攪拌により溶解した。放冷後、溶解液の全重量を測定し、超高速ホモジナイザーにより均質化した。約 0.5 mL (n=2) をバイアルに分取、秤量し、Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

6.10.10 [¹⁴C]P092 標準溶液

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

6.10.11 検量線血液試料

検量線血液試料 200 μL (各 n=1) を分取、秤量し、組織溶解剤を 1 mL 加えた。組織溶解装置で約 30 分間処理したのち、Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

6.10.12 血漿

約 1 mL の精製水を加えて希釈したのち、Clear-sol I を 5 mL 加えて混合した。

6.10.13 脳脊髄液

一部 (n=1) をバイアルに分取、秤量し、Clear-sol I を 10 mL 加えて混合した。

6.10.14 脳

組織全重量を測定した。解剖用剪刀により粗砕したのち、約 0.1 g (n=1) をバイアルに分取、秤量した。組織溶解剤を 1 mL 加え、組織溶解装置で約 30 分間処理したのち、Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

6.11 残余試料の取扱い

冷凍（-80°C，許容範囲：-60°C以下）保存した測定残分試料（以下）は，代謝物分析の候補試料として，2015年3月12日に関連する薬物動態試験（試験番号：B150130，株式会社L S Iメディエンス 鹿島研究所）に移管した。

血液：測定残分（6.9.1項），約2 mL（6.9.4項）

血漿，血球，脳及び脳脊髄液：残分全量

投与後168時間までの尿：約15 mL

投与後168時間までの糞懸濁液：約30 mL

その他の測定残分試料及び露光終了後の切片は，冷凍（-20°C，許容範囲：-40～-15°C）保存し，試験終了までに廃棄した。

6.12 コンピュータシステムの使用

血液，血漿，脳及び脳脊髄液中放射能濃度，尿，糞及び呼気中放射能排泄率並びにケージ洗浄液及び屠体中放射能量は，薬物動態試験支援システム ADMESUPPORT Ver. 2.1（富士通）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等を登録した。

血液，血漿，脳及び脳脊髄液中放射能濃度は P092 フリー体換算濃度として算出した。尿，糞及び呼気中放射能排泄率並びにケージ洗浄液及び屠体中放射能量は，投与放射能に対する百分率（% of dose）として算出した。

(1) データのオンライン収集

重量（g）：投与時体重，投与実績重量，解剖時体重，尿，糞，呼気捕集液，ケージ洗浄液，屠体，脳，脳脊髄液

放射能測定値（dpm）：尿，糞，呼気捕集液，ケージ洗浄液，屠体，血液，血漿，脳，脳脊髄液

(2) データのオフライン収集

容量又は重量：投与液（6.5.3項，g），血液（mL），血漿（mL）

放射能測定値（dpm）：投与液（6.5.3項）

サンプルオキシダイザー放射能回収率（%）

6.13 薬物速度論的解析

6.9.1項の血液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，次頁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		
最終報告書での表記		WinNonlin での表記
C ₀	時間 0 に外挿した初期血液中放射能濃度	C0
t _{1/2}	消失半減期	HL_Lambda_z
AUC _{0-t}	血液中放射能濃度－時間曲線下面積	AUClast
AUC _{0-inf}	血液中放射能濃度－時間曲線下面積	AUCINF_obs
CL _{total}	全身クリアランス	Cl_obs
Vd _{ss}	定常状態の分布容積	Vss_obs
MRT _{0-inf}	平均滞留時間	MRTINF_obs

t_{1/2} の計算に使用した時点は、血液中放射能濃度推移の結果を基に設定した。

具体的には、WinNonlin で自動設定された区間をそのまま採用した。

6.14 試験結果の算出及び表示

6.9.1, 6.9.2 及び 6.9.4 項の個体別値は Appendix に表示した。平均値及び標準偏差 (Mean ± SD) は、薬物動態試験支援システム又は Microsoft Excel 2010 (Microsoft) により算出し、Appendix に表示した。

個体別値 3 例中 2 例以上が検出限界値未満の値の場合は、平均値を算出せず、ND (Not detected) と表示した。

6.9.3 項の各ラジオルミノグラムにおける血液及び組織中放射能濃度は Appendix に表示した。全身ラジオルミノグラム及び切片の画像はそれぞれ Figure 及び Appendix に表示した。ラジオルミノグラムには、目視で放射能分布が確認できる代表的な組織又は特定可能な組織について、該当する組織名を表示した。

各組織中放射能濃度の算出に際し、PSL 値が検量線最高濃度を超えた場合は、定量上限以上とし、AUQ (Above the Upper limit of Quantification) と表示した。PSL 値が定量下限未満の場合には BLQ (Below the Lower limit of Quantification) と表示した。目視で確認及び特定できない組織は NA (Not applicable) と表示した。各ラジオルミノグラム (3 又は 4 切片) における血液及び各組織中放射能濃度の平均値 (NA は含めず) を Microsoft Excel 2010 により算出し Appendix に表示した。ただし、NA 及び AUQ 又は BLQ のみの組織については、平均値は算出せず、AUQ 又は BLQ と表示した。

血液中放射能濃度に対する各組織中放射能濃度の比率 (K_B 値) を Microsoft Excel 2010 により算出し、Table に表示した。組織中放射能濃度が AUQ 又は BLQ の場合には、K_B 値は算出せず、NC (Not calculated) と表示した。

Table には Appendix に示した Mean ± SD (6.9.3 項については個別値) を表示し、Figure (血液中放射能濃度) は Table に示した値に基づいて Microsoft Excel 2010 により作成した。

試験結果の表示単位、表示桁数は次頁の表の通りとした。試験結果は表示桁数の 1 桁下で四捨五入して表示した。標準偏差は平均値と同じ桁までを表示した。