

非臨床試験総括報告書

Non-GLP

P092 マレイン酸塩の非臨床試験プロファイル
プリオン病に対する低分子シャペロン治療薬の開発

岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

桑田 一夫

版番号 : Ver. 0.0.1

目次

1. 要約	1
1.1 物理的・化学的性質	1
1.2 4週間静脈投与毒性(non-GLP)	1
1.3 [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） ..	1
1.4 [¹⁴ C]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）	2
1.5 P092 マレイン酸塩のカニクイザルにおける単回投与後の P092 濃度試験	2
2. (イ) 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料	3
3. (ロ) 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	5
3.1 原薬の化学構造	5
3.2 物理的及び化学的性質	6
3.3 原薬の性状	6
3.4 原薬の規格及び試験方法	6
4. 安定性試験に関する資料	16
4.1 加速試験	16
4.2 苛酷試験	16
4.3 長期安定性試験	16
5. (ハ) 薬物動態に関する資料	16
5.1 [¹⁴ C]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	16
6. (ニ) 毒性に関する資料	27
6.1 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	27
7. ヒト血液に対する溶血性試験に対する資料	40
8. 参考文献	41

略号一覧

略号	英語表記	日本語表記
A/G	albumin/globulin ratio	アルブミン・グロブリン比
ALAT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
ASAT	aspartate transaminase	アスパラギン酸トランスアミナーゼ
AUC _{0-24h}	area under the blood concentration time curve	血中濃度曲線下面積
BSE	bovine spongiform encephalopathy	牛型海綿状脳症
C _{max}	maximum drug concentration	最高血中濃度
CPME	Cyclopentyl Methyl Ether	シクロペンチルメチルエーテル
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
γ GT	Gamma-glutamyl transferase	γグルタミルトランスフェラーゼ
HPLC	high performance liquid chromatography	高速(高性能)液体クロマトグラフィー
IPE	Isopropylether	イソプロピルエーテル
IR	infrared absorption spectrometry	赤外吸収分析
LDH	lactic acid dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
MCH	mean corpuscular hemoglobin	平均赤血球ヘモグロビン量
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration	平均赤血球ヘモグロビン濃度
MCV	mean corpuscular volume	平均赤血球容積
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴

図表目次

図表 番号	タイトル	ペ ー ジ
図ロ-1	P092 マレイン酸塩の構造	5
表ロ-1	P092 マレイン酸塩の品質・規格（案）	16
図ハ-1	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩の標識位置と比放射能	17
表ハ-1	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩(1mg/kg)のサル静脈内単回投与後における尿中及び糞中の放射活性	18
図ハ-2	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩(1mg/kg)のサル静脈内単回投与後における血液及び血漿中の放射活性推移	19
表ハ-3	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩(1mg/kg)のサル静脈内単回投与後における血液及び血漿中の放射活性パラメーター	19
表ハ-4	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩(1mg/kg)のサル静脈内単回投与後における組織中放射濃度（雄）	21
表ハ-5	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩(1mg/kg)のサル静脈内単回投与後における組織中放射濃度（雌）	22
図ハ-3	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩(1mg/kg)のサル静脈内単回投与後における血漿中放射濃度経時推移	23
表ハ-6	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩(1mg/kg)のサル静脈内単回投与後における血中及び血漿中放射濃度とファルマコキネティックスパラメーター	24
表ハ-7	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩(1mg/kg)のサル静脈内単回投与後における組織中放射濃度	25
表ハ-8	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩をサルに 250mg/kg の用量で単回経口投与後の血液及び脳脊髄液中 P092 濃度	26
表ハ-9	[¹⁴ C]P092 マレイン酸塩をサルに各用量で単回静脈内投与後の血液及び脳脊髄液中 P092 濃度	27
表ニ-1	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後の体重推移	28
表ニ-2	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後の摂餌量推移	29
表ニ-3	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後の血液学的検査	30
表ニ-4	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後の血液生化学的検査	32
表ニ-5	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後の器官重量	34
表ニ-6	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後の病理解剖学的検査所見	36
表ニ-7	初回投与後における血漿中 P092 濃度推移	38
表ニ-8	継続投与（4回）後における血漿中 P092 濃度推移	39
表ニ-9	P092 マレイン酸塩のヒト血液に対する溶血性	41

1. 要約

1.1 物理的・化学的性質

P092 マレイン酸塩（化学名）は、以下の物理的・化学的性質を示す新規化合物である。

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

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

性状：白色結晶

融点：172～177℃（分解）

分子量：734.83

純度：98.2 %以上

1.2 4週間静脈内間歇投与毒性試験

P092 マレイン酸塩をラット（CrI：CD（SD）、雌雄各6匹/群）に、0、1、10及び25 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。投与は大腿静脈に留置したカテーテルを介して行い、無拘束下でおよそ5.42 mL/kg/hの速度で低速持続投与（約23時間）した。投与液量は125 mL/kgとした。対照群（0 mg/kg）には媒体（生理食塩液）のみを投与した。また、サテライト群（雌雄各5匹/群）を設け、初回及び最終回投与時のP092の血漿中濃度の推移を検討するとともに、最終投与（第4回投与）後48時間の採血後に脳脊髄液中の薬物濃度も測定した。

その結果、10 mg/kg群の雄3例、25 mg/kg群の雄4例、雌6例が死亡した。死因はいずれも投与カテーテル先端付近の大静脈からの出血と考えられた。

一般状態観察では、貧血や歩行異常が少数例で認められた。

体重では特筆すべき異常は認められなかった。

1.3. [^{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）

[^{14}C]P092 マレイン酸塩をラット（CrI：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又は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それぞれ予備的に検討した。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、[^{14}C]P092 マレイン酸塩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。

1.4. $[^{14}\text{C}]$ 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)

$[^{14}\text{C}]$ P092 マレイン酸塩を雄性カニクイザルに 1 mg/kg の用量で単回急速静脈内投与したときの放射能の血液及び血漿中濃度推移、尿及び糞中排泄率並びに組織移行性について予備的に検討した。

投与後 168 時間までの尿及び糞中への累積排泄率はそれぞれ 8.6%及び 30.8%であり、サルにおける $[^{14}\text{C}]$ 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 168 時間までの放射能の回収率は、総排泄率 (40.9%) と体内残存放射能 (51.22%) を合わせて、92.1%と算出された。

血液中放射能濃度は投与後 5 分に 632.2 ng eq./mL を示し、投与後 24 時間には 61.4 ng eq./mL まで低下した。投与後 24 時間以降は 199.6 h の消失半減期 ($t_{1/2}$) で緩徐に低下した。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、 $[^{14}\text{C}]$ 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。一方、脳脊髄液中放射能濃度は投与後 1 時間に 2.2 ng eq./g を示したのち、投与後 24 時間以降は検出限界未満となったことから、放射能の移行はわずかであった。

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 (16588.7 ng eq./g、投与後 1 時間)、副腎 (14988.5 ng eq./g、投与後 168 時間) 及び脾臓 (14009.9 ng eq./g、投与後 168 時間) では顕著に高い濃度の放射能が認められ、 $[^{14}\text{C}]$ P092 マレイン酸塩の組織移行性の高いことが示唆された。また、副腎、脾臓、膵臓、脳下垂体等多くの組織において投与後 168 時間に最高濃度を示し、体内残存量 (組織中放射能分布率の合計) は投与放射能の 51.22%であったことから、 $[^{14}\text{C}]$ P092 マレイン酸塩は組織残留性が高く、体外への排泄は非常に緩徐であると考えられた。大脳においては視床下部で比較的高い放射能が認められ、 $[^{14}\text{C}]$ P092 マレイン酸塩の脳内分布には部位特異性のあることが示唆された。

1.5. P092 マレイン酸塩のカニクイザルにおける単回投与後の P092 濃度試験

P092 マレイン酸塩をサルに 250 mg/kg の用量で単回経口投与あるいは 40 μ g/ml、25mg/kg、100mg/kg 急速静脈内投与したときの血液及び脳脊髄液中の P092 濃度について、経口投与では投与後 1、2、4、8 及び 24 時間、静脈内投与

で投与後5分、2、4、8及び24時間ごとにそれぞれ検討した。経口投与では、いずれの時間においても血液及び脳脊髄液中のP092濃度は定量限界以下であった。また、P092マレイン酸塩をサルに40 µg/kg 静脈内投与した動物(No.50101)においては、いずれの採血時点においても血漿中及び脳脊髄液中濃度は定量限界以下であった。

2. (イ) 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料

プリオン病は、ガンやエイズとは比べ、人類で最も悲惨な病気である。初めは数ヵ月にわたる進行性痴呆や視力障害、錯乱、めまい、無感情などの症状がみられ、次第に筋肉のけいれんや運動失調が起こり、最後は廃人となる。若い人が犠牲になるケースも多い。患者の大半は発病から約3～12ヵ月で死亡する¹⁾。現在、治療法は無く、一刻も早い治療薬の開発が求められている。

クロイツフェルト・ヤコブ病や牛海綿状脳症等のプリオン病は、カリフォルニア大学サンフランシスコ校のスタンリー・B・プルシナー教授(1997年ノーベル賞)により発見された病原性タンパク質「プリオン」によって伝播する。プリオンの感染メカニズムは現在世界中で広く研究されているが、いまだ十分な理解は得られていない。プリオン病は、その原因によって三つに分類される。原因不明の孤発性プリオン病、プリオン病蛋白遺伝子の変異によって起こる家族性プリオン病、ヒトまたは動物などのプリオン病から感染したと考えられる感染症プリオン病である¹⁾。プリオン病は約100万人に1人の稀少疾患であり、本邦において、1999年4月より2011年8月までに、クロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランス委員会でプリオン病と認定された症例は1691例であった。それらのうち約80%は孤発性プリオン病であった²⁾。

治療候補物質探索も広く行われているが、ヒトプリオン病モデル細胞を用いた実験では、既発表の化合物の実際の抗プリオン効果は低く、多くは脳内に移行しにくい、又は移行してもすぐに体外に排出されてしまう、などの共通の問題点がある。従って、現時点において、プリオン病に対する確立された治療法はない。

国立大学法人岐阜大学の人獣感染防御研究センターは、ヤコブ病や牛海綿状脳症の原因となる感染性プリオンの生成を抑える新しい化合物であるGN8を世界で初めて発見した。プリオンの論理的創薬では、まずプリオンタンパク質のダイナミクス(運動状態)を、核磁気共鳴(NMR)法を用い原子分解能で決定した。次にこの情報に基づいて、プリオン内で特に大きく揺らいでいるア

ミノ酸残基を突き止め、それが形成するポケットに入り込む物質を、数百万の低分子化合物ライブラリーの中から計算機でスクリーニングし、その結果出力された物質を有機合成した。合成された物質 GN8 は、これらのアミノ酸をつなぎとめることにより、プリオンの構造変化を防いでいることが実験的に証明され、細胞実験や動物治療実験により、その治療効果が確認された³⁾。このような一連の論理的方法により、最終的に GN8 が、抗プリオン物質として同定された。

GN8 及びその類縁体において、構造最適化を進めた結果、GN8 類縁体「P092」の抗プリオン効果が現時点において世界で最も強く (IC₅₀~200nm)、脳内にも確実に移行することが PET イメージングにより確認された⁴⁾(特願 2009-218247)。また、プリオンに感染したマウスに P092 を末梢投与(腹腔内)すると、有意な寿命の延長効果がみられた。さらに、ラット及びカニクイザルを用いた非臨床試験(非 GLP)において、特段の副作用が認められないことが判明した。そこで、P092 を基本の新規抗プリオン病薬として、投与剤型や血中・脳脊髄移行性等を考えながら開発を進めることにした。

現在、P092の開発は、厚生労働省難治性疾患等克服研究事業において、研究課題「プリオン病に対する低分子シャペロン治療薬の開発」(H24難治等(難)一般004)として推進されている。本研究の目的は、医師主導治験への移行を目的とし、抗プリオン物質であるP092の有機合成(治験薬GMP施設)、非臨床安全性試験を実施することにある。

主な非臨床試験項目は、第 I 相試験実施のために必要なラット、イヌ、カニクイザル等を用いた非臨床試験及びカニクイザル感染モデルを用いた非臨床試験である。

これまでに得られたP092フリー体における非臨床試験結果の要約を以下に示した。

薬理作用

P092 は、プリオンタンパク質のホットスポットに結合し、異常型への構造変換を抑制する。これにより、プリオン病の進行が抑えられる。腹腔内投与(9 mg/kg/day)により、プリオン感染マウスの寿命が有意に延長した。

毒性

P092 はラット単回投与試験では 500mg/kg/day までは死亡例を認めず、最少致死量は 500mg/kg/day 以上と推定された。一方、4 週間の反復投与試験で

は、最低投与用量の 5mg/kg/day で摂餌量の減少を伴う体重増加抑制及び消化管の空胞化が認められたことから、無毒性量は、5 mg/kg/day 未満と推定された。

カニクイザルを用いた単回投与試験では、1000mg/kg/day までは死亡例を認めず、最少致死量は 1000mg/kg/day 以上と推定された。2 週間の反復投与試験では、最低投与量の 50mg/kg/day から瀕死を含む、摂餌量の減少を伴う体重増加抑制が認められたため、無毒性量は、50mg/kg/day 未満と推定された。

吸収・分布・代謝・排泄

P092 の投与剤型を検討する中で塩酸塩の単回経口投与試験の結果、P092 塩酸塩の経口吸収は速やかで、30～300 mg/kg の投与量範囲では、ほぼ投与量比で増加し、雌雄ラットにおける P092 の薬物動態は類似するものと推察された。同様の結果が P092 リン酸塩を用いた単回経口投与試験（15～250 mg/kg）でも観察された。P092 塩酸塩を用いた、経口（30、300 mg/kg）又は静脈内投与（125、500mg/kg）での反復投与試験では、P092 の薬物動態はいずれの投与経路においても、反復投与によって大きく変動しないものと推察された。

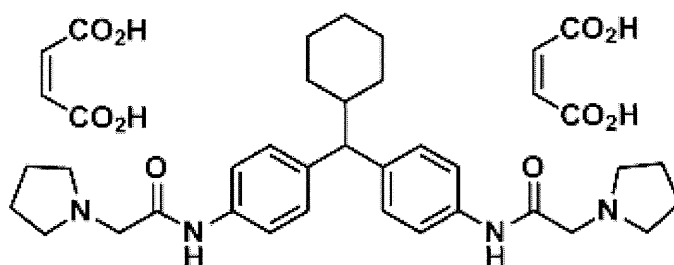
これらの結果をもとに、さらに塩の検討を行い、投与剤型を経口から静脈内投与へ変更し、最終的に P092 マレイン酸塩が臨床への開発候補品として選択された。従って、P092 マレイン酸塩における非臨床試験を追加検討したので、これらのデータを報告する。

尚、P092 フリー体における非臨床試験に対する個々のデータは、P092 治験薬概要書案（平成 25 年度）を参照されたい。

3. (ロ) 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)

3.1. 原薬の化学構造



図ロ-1 P092 マレイン酸塩の構造

3.2. 物理的及び化学的性質

本品は、白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。吸湿性が強い。

3.3. 原薬の性状

化学名：N,N'-((Cyclohexylmethylene)di-4,1-phenylene)bis(2-(1-pyrrolidin)

Acetamide maleat

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

性状：白色の粉末

融点：172～177°C（分解）

分子量：736.70

純度：98.2%以上

3.4. 原薬の規格及び試験方法

(原薬の試験方法)

3.4.1 原薬の規格及び試験方法

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 3 mL に溶かし、試料溶液とする。マレイン酸 105.3 mg に水 5mL を加えて溶かし、さらに水で正確に 10 mL とし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試

料溶液及び標準溶液 5 μ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板に原点にスポットする。次にジエチルエーテル/メタノール/酢酸(100)/水混液 (70 : 20 : 7 : 3) を展開溶媒として約 12 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線 (主波長 254 nm) を照射するとき、試料溶液から得た 2 個のスポットのうち 1 個のスポットは標準溶液から得たスポットと同程度の濃さであり、それらの Rf 値は等しい。

3. pH

本品 1.0g に水 100 mL を加え、70°C の温水中で溶かした後、室温まで冷却した液の pH は 3.5~5.0 である。

4. 純度試験

(1) 溶状

本品 1.0g に水 20 mL を加え、70°C の温水中で溶かすとき、液は無色澄明である。

(2) 塩化物

本品 1.0g に水 10 mL 及び希硝酸 20mL を加えて溶かし、水を加えて 50 mL とする。これを検液とし、試験を行う。比較液は、0.01mol/L 塩酸 0.28 mL に希硝酸 20 mL 及び水を加えて 50 mL とする (0.01%以下)。

(3) 重金属

本品 1.0 g をとり、第 3 法により操作し、試験を行う。比較液には、鉛標準液 2.0 mL を加える (20 ppm 以下)。

(4) 砒素

本品 1.0g をとり、第 3 法により検液を調製し、試験を行う (2 ppm 以下)。

(5) 類縁物質

本品約 0.01g を精密に量り、移動相 A 液/移動相 B 液混液 (1 : 1) を加えて正確に 10 mL とし、試料溶液とする。この液 1mL を正確に量り、移動相 A 液/移動相 B 液混液 (1 : 1) を加えて正確に 100 mL とする。この液 1mL を正確に量り、移動相 A 液/移動相 B 液混液 (1 : 1) を加えて正確に 10mL とし、標準溶液とする。試料溶液、標準溶液、ブランク溶液 [移動相 A 液/移動相 B 液混液 (1 : 1)] につき、5 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液の各々の類縁物質及び標準溶液の P092 のピーク面積を自動積分法により測定する。試料溶液については、ブランク溶液から得たピークに該当するピーク並びに P092 のピークを除外し、それ以外の各々のピーク (類縁物質) の面積を測定する。すべてのピーク面積に

対する各々のピーク面積比を求め、P092 のピーク面積以外のピーク面積比合計は 1%以下かつ各々のピーク面積比は 0.15%以下である。

[試験条件]

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：254 nm）

カラム：GLサイエンス社製 Inertsil ODS-2（4.6 mm i.d.×250 mm、5 μm）

又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相 A：水 1000 mL に L にトリフルオロ酢酸 2mL を加える。

移動相 B：アセトニトリル 1000 mL にトリフルオロ酢酸 2mL を加える。

移動相条件：移動相 A：移動相 B を 80：20 から開始し、20 分の直線グラジエント法で 40：60 にし、その後 30 分間保つ。

流量：約 1.0mL/min（P092 の保持時間は 14-17 分）

面積測定範囲：約 4 分から 50 分（マレイン酸のピークは除外）

（6）残留溶媒

本品約 0.5g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 5 mL とし、試料溶液とする。

①エタノール

エタノール約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10 mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μL につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々のエタノールのピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、エタノールの量は、5000 ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{1}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT：本品の秤量値（g）

a：標準液の希釈倍率（100）

1000000：ppm への換算係数

【試験条件】

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX (0.53mm i.d.×30m、1.00 μm) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度：60℃で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10℃/min で 180℃まで上昇させる。

気化室温度：200℃

検出器温度：220℃

キャリアーガス：ヘリウム

流量：約 40mL/min

スプリット比：1：10

②THF (テトラヒドロフラン)

THF 約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10 mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μL につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々の THF のピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、THF の量は、720 ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{1}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT：本品の秤量値 (g)

a：標準液の希釈倍率 (100)

1000000：ppm への換算係数

【試験条件】

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX (0.53mm i.d.×30m、1.00 μm) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度：60℃で開始し、6分間この温度を維持した後、レート 10℃/min で180℃まで上昇させる。

気化室温度：200℃

検出器温度：220℃

キャリアーガス：ヘリウム

流量：約 40mL/min

スプリット比：1：10

③トルエン

トルエン約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10 mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μL につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々のトルエンのピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、トルエンの量は、890 ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{1}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT：本品の秤量値 (g)

a：標準液の希釈倍率 (100)

1000000：ppm への換算係数

[試験条件]

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX (0.53mm i.d.×30m、1.00 μm) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度：60℃で開始し、6分間この温度を維持した後、レート 10℃/min で180℃まで上昇させる。

気化室温度：200℃

検出器温度：220℃

キャリアーガス：ヘリウム

流量：約 40mL/min

スプリット比：1：10

④ジクロロメタン

ジクロロメタン約 0.1 g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10 mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μ L につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々のジクロロメタンのピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、ジクロロメタンの量は、600 ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{1}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT：本品の秤量値 (g)

a：標準液の希釈倍率 (100)

1000000：ppm への換算係数

【試験条件】

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX (0.53mm i.d.×30m、1.00 μ m) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度：60℃で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10℃/min で 180℃まで上昇させる。

気化室温度：200℃

検出器温度：220℃

キャリアーガス：ヘリウム

流量：約 40 mL/min

スプリット比：1：10

⑤CPME (シクロペンチルメチルエーテル)

CPME 約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確

に 10 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μL につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々の CPME のピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、CPME の量は、5000 ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{1}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT : 本品の秤量値 (g)

a : 標準液の希釈倍率 (100)

1000000 : ppm への換算係数

[試験条件]

検出器 : 水素炎イオン化検出器

カラム : Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX (0.53mm i.d. × 30m、1.00 μm) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度 : 60°C で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10°C/min で 180°C まで上昇させる。

気化室温度 : 200°C

検出器温度 : 220°C

キャリアーガス : ヘリウム

流量 : 約 40 mL/min

スプリット比 : 1 : 10

⑥ 酢酸エチル

酢酸エチル約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10 mL とする。この液 1 mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100 mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μL につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々の酢酸エチルのピーク面積を求め、次式により、溶

媒量を求めるとき、酢酸エチルの量は、5000 ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{1}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT : 本品の秤量値 (g)

a : 標準液の希釈倍率 (100)

1000000 : ppm への換算係数

【試験条件】

検出器 : 水素炎イオン化検出器

カラム : Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX (0.53mm i.d. × 30m、1.00 μm) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度 : 60°C で開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10°C/min で 180°C まで上昇させる。

気化室温度 : 200°C

検出器温度 : 220°C

キャリアーガス : ヘリウム

流量 : 約 40mL/min

スプリット比 : 1 : 10

⑦IPE (イソプロピルエーテル)

IPE 約 0.1g を精密に量り、ジメチルホルムアミドを加えて溶かし、正確に 10mL とする。この液 1mL を正確に量り、ジメチルホルムアミドを加えて正確に 100mL とし、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液各 1 μL につき、次の条件でガスクロマトグラフィー法により試験を行う。各々の IPE のピーク面積を求め、次式により、溶媒量を求めるとき、IPE の量は、5000ppm 以下である。

$$\text{残留溶媒の量 (ppm)} = \text{基準物質の量 (g)} \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{1}{WT} \times \frac{1}{a} \times 1000000$$

WT : 本品の秤量値 (g)

a : 標準液の希釈倍率 (100)

1000000 : ppm への換算係数

[試験条件]

検出器 : 水素炎イオン化検出器

カラム : Agilent 社製キャピラリーカラム DB-WAX (0.53mm i.d.×30m、1.00 μm) 又は、これと同等の性能を有するカラム

カラム温度 : 60°Cで開始し、6 分間この温度を維持した後、レート 10°C/min で180°Cまで上昇させる。

気化室温度 : 200°C

検出器温度 : 220°C

キャリアーガス : ヘリウム

流量 : 約 40mL/min

スプリット比 : 1 : 10

(7) エンドトキシン

本品 0.025g をとり、エンドトキシン試験用水約 8 mL を加え、70°C 温浴槽で加温して溶かし、エンドトキシン試験用水で正確に 10 mL とする。この液 1 mL をとり、エンドトキシン試験用水で全量 10 mL としたものを試料溶液とし、ライセート試薬を用い、ゲル化法によって試験を行う (エンドトキシン 0.5EU/mg 以下)。

5. 水分

本品約 0.1g を精密に量り、水分測定法 (カールフィッシャー法) により試験を行う (10%以下)。

6. 強熱残分

0.1%以下 (1.0g)

7. 定量法

本品を乾燥し、その約 0.25g を精密に量り、0.1mol/L 過塩素酸 20mL を正確に加えて溶かし、酢酸 (100) 50mL を加え、過量の過塩素酸を 0.1mol/酢酸ナトリウム液で滴定する (電位差滴定法)。同様の方法で空試験を行う。

0.1mol/L 過塩素酸 1mL=36.742mg $C_{31}H_{42}N_4O_2 \cdot 2C_4H_4O_4$

8. 微生物試験

(1) 細菌数

微生物限度試験法で試験を行う。ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地を用い、35～40℃で3日間培養する（50個以下/g）。

(2) 真菌数

微生物限度試験法で試験を行う。クロラムフェニコール添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地を用い、20～25℃で5日間培養する（10個以下/g）。

(3) 大腸菌

微生物限度試験法により試験を行う（陰性）。

(表ロ-1) P092 マレイン酸塩の規格(案)

試験項目		規格案
性状	外観	白色の粉末
	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	・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		細菌 50ヶ/g 以下 真菌 10ヶ/g 以下 大腸菌群 陰性

4. 安定性試験に関する資料

4.1. 加速試験

実施中

4.2. 苛酷試験

実施中

4.3 長期安定性試験

実施中

5. (ハ) 薬物動態に関する資料 (株式会社 LSI メディエンス)

5.1. [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