

5.5	溶血性確認.....	9
5.6	統計解析.....	10
6.	結果及び結論.....	10
	Table P092・マレイン酸塩のヒト血液に対する溶血性.....	11

2. 試験実施概要

2.1 表題

P092・マレイン酸塩のヒト血液に対する溶血性試験

2.2 試験番号

B131217

2.3 試験目的

P092・マレイン酸塩をヒトに静脈内投与する場合を想定し、ヒト血液に対する溶血性について検討する。

2.4 適用ガイドライン

なし

2.5 適用 GLP

なし

2.6 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

2.7 試験受託者

三菱化学メディエンス株式会社

〒108-8559 東京都港区芝浦四丁目2番8号

2.8 試験施設

三菱化学メディエンス株式会社 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県神栖市砂山14番地1

2.9 試験責任者

大西 康之

三菱化学メディエンス株式会社

創薬支援事業本部 試験研究センター 安全性研究部

TEL : 0479-46-3461, FAX : 0479-46-7505

2.10 試験日程

試験開始 : 2014年2月19日

実験日： 2014年2月24日
試験終了： 2014年3月7日

2.11 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存施設に保存する。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。

2.12 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 被験物質に関する資料
- (3) 試験結果に関する資料
- (4) 通信記録等の記録文書
- (5) 最終報告書


3. 試験責任者署名

表 題： P092・マレイン酸塩のヒト血液に対する溶血性試験

試験番号： B131217

試験責任者：

2014 年 3 月 7 日

大西 康之 
大西 康之
三菱化学メディエンス株式会社
創薬支援事業本部 試験研究センター
安全性研究部

4. 要約

P092・マレイン酸塩を生理食塩液に 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 及び 1 mg/mL の濃度（フリー体換算濃度）で溶解させ、健常ヒト血液（2 例）と等量混合して、溶血性について検討した。溶血性の評価は、遠心分離後の上清を目視、及び上清中のヘモグロビン濃度と LDH（Lactate Dehydrogenase, 乳酸脱水素酵素）濃度を測定することにより行った。生理食塩液をヒト血液に等量加えたものを比較対照とした。

その結果、目視検査では、P092 調製液濃度 0.5 あるいは 1 mg/mL 液より溶血性が確認された。上清中ヘモグロビン濃度を測定したところ、1 mg/mL 液において高値が認められた。一方、上清中 LDH を測定したところ、0.2 mg/mL 以上の濃度より高値が認められた。LDH 測定値の結果から、0.2 mg/mL 以上の濃度では細胞障害性があることが示唆された。

以上のことから、本試験条件下では、P092・マレイン酸塩の生理食塩溶液は、ヒト血球に対して 0.2 mg/mL 以上の濃度では溶血性を示すが、0.1 mg/mL 以下の濃度では溶血性を示さないと結論した。

5. 材料及び方法

5.1 被験物質

5.1.1 名称

P092・マレイン酸塩

5.1.2 ロット番号

CMPG-RQ

5.1.3 換算係数（フリー体）

1.493

5.1.4 性状

白色の粉末

5.1.5 提供者

国立大学法人岐阜大学

5.1.6 保存条件

冷蔵（許容範囲：1～10°C），遮光，密封（窒素封入）

5.1.7 取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋着用

5.2 媒体

5.2.1 名称

局方生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）

5.3 被験物質溶液

5.3.1 調製方法

被験物質溶液は，以下の手順で使用当日に調製した．調製は紫外線をカットした蛍光灯下で行った．

- (1) P092・マレイン酸塩をフリー体換算した後，正確に秤量した．
- (2) 媒体を加え，スターラーで攪拌しつつ溶解させた（1 mg/mL）．
- (3) 1 mg/mL 濃度液を段階希釈し，0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/mL 濃度液を調製した．
- (4) 各濃度液の一部（約 10 mL）を分取し，pH を測定し記録した．pH は以下のとおりであった．

濃度 (mg/mL)	pH	濃度 (mg/mL)	pH
0.01	5.40	0.2	4.95
0.02	5.44	0.5	4.62
0.05	5.33	1	4.37
0.1	5.19		

5.4 ヒト血液

5.4.1 血液提供者の条件

- (1) 健康な成人男性より採取した末梢血を使用した。実験の当日に採血を行った。
- (2) 血液提供者は、事前に肝炎 (HBV, HCV) および HIV の感染を検査し、陰性と診断され、採血日の 1 週間前から服薬および喫煙していない者とした。

5.4.2 採血人数

2 人

5.4.3 血液の管理

コード番号で管理した (M1 および M2)。

5.4.4 実験終了後の血液の処理

滅菌および不活化処理後、感染性廃棄物として廃棄した。

5.4.5 採血

採血は、医師監督のもと、看護師または臨床検査技師が実施した。

5.4.6 採血場所

医療法人財団 三友会 東部地区共同診療所

5.4.7 採血方法

上腕尺側肘静脈から 1 人あたり約 10 mL の血液を採血管 (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, テルモ株式会社) に採取した。

5.4.8 使用時までの保存条件

室温

5.5 溶血性確認

- (1) コード番号毎に、ヘパリンナトリウム処理済みの血液を 0.9 mL ずつ 8 本に分注した。
- (2) 各被験物質濃度液 (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/mL) 及び生理食塩液をそれぞれ各チューブに 0.9 mL ずつ添加した。

- (3) ウォーターバスインキュベータを用いて、37°C で 30 分間振盪（80 回/分）しながらインキュベートした。
- (4) 遠心分離（20°C, 3000 rpm, 10 分間）し、上清を採取した。
- (5) 得られた上清について、目視による確認、LDH 測定、およびヘモグロビン濃度測定を行った。
- (6) 目視による確認については、以下の表に従い肉眼的に溶血の有無を判定した。

グレード	状態
—	溶血なし
+	弱溶血（淡赤色）
++	溶血（赤色）

- (7) ヘモグロビン濃度測定は、自動血球分析装置（XT-2000iV, シスメックス株式会社）を用いて、SLS-ヘモグロビン法により行った。
- (8) LDH 測定は、自動分析装置（TBA-200FR, 株式会社東芝）を用いて、UV-rate 法（JSCC 改良法）により行った。
- (9) 生理食塩液を添加した場合を対照として、被験物質溶液の溶血度合いを目視による確認、ヘモグロビン濃度及び LDH 測定値から評価した。

5.6 統計解析

統計学的解析は実施しなかった。

6. 結果及び結論

溶血性確認の結果を Table に示す。

目視検査では、P092 調製液濃度 0.5 あるいは 1 mg/mL 液より溶血性が確認された。上清中ヘモグロビン濃度を測定したところ、1 mg/mL 液において高値が認められた。一方、上清中 LDH を測定したところ、0.2 mg/mL 液より高値が認められた。LDH 測定値の結果から、0.2 mg/mL 以上の濃度では細胞障害性があることが示唆された。


以上のことから、本試験条件下では、P092・マレイン酸塩の生理食塩溶液は、ヒト血球に対して 0.2 mg/mL 以上の濃度では溶血性を示すが、0.1 mg/mL 以下の濃度では溶血性を示さないと結論した。

Table P092・マレイン酸塩のヒト血液に対する溶血性

P092・マレイン酸塩 調製液濃度(mg/mL)	コード 番号	測定項目		
		目視*	ヘモグロビン (g/dL)	LDH (U/L)
0	M1	—	0.1	163
	M2	—	0	168
	平均		0.05	165.5
0.01	M1	—	0.1	134
	M2	—	0	130
	平均		0.05	132
0.02	M1	—	0	170
	M2	—	0	153
	平均		0	161.5
0.05	M1	—	0.1	141
	M2	—	0.1	151
	平均		0.1	146
0.1	M1	—	0.1	150
	M2	—	0	151
	平均		0.05	150.5
0.2	M1	—	0.1	416
	M2	—	0	307
	平均		0.05	361.5
0.5	M1	+	0.1	679
	M2	—	0.1	589
	平均		0.1	634
1	M1	++	0.4	1146
	M2	++	0.2	754
	平均		0.3	950

* —:溶血なし, +:弱溶血(赤淡色), ++:溶血(赤色)

10. 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

本写しは原本と相違ありません
三菱化学メディエンス㈱ 鹿島研究所
2014年3月19日
試験責任者 下西 康之 

最終報告書

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)

三菱化学メディエンス株式会社

1. 目次

1. 目次	2
2. 試験実施概要	6
2.1 表題	6
2.2 試験番号	6
2.3 試験目的	6
2.4 適用ガイドライン	6
2.5 適用 GLP	6
2.6 試験委託者	6
2.7 試験受託者	6
2.8 試験施設	7
2.8.1 名称及び所在地	7
2.8.2 試験責任者	7
2.8.3 分担責任者	7
2.8.4 試験日程	7
2.8.5 保存	7
2.8.6 保存する資料	7
2.9 その他	8
3. 試験責任者署名	9
4. 要約	10
5. 材料及び方法	12
5.1 被験物質	12
5.1.1 名称	12
5.1.2 ロット番号	12
5.1.3 換算係数（フリー体）	12
5.1.4 性状	12
5.1.5 提供者	12
5.1.6 保存条件	12
5.2 媒体	12
5.2.1 名称	12
5.3 投与液	12
5.3.1 調製方法及び頻度	12
5.3.2 保管条件	12
5.4 試験動物	13
5.4.1 動物種	13
5.4.2 系統	13
5.4.3 系統選択の理由	13
5.4.4 微生物レベル	13

5.4.5	供給源	13
5.4.6	購入時週齢	13
5.4.7	購入動物数及び性別	13
5.4.8	検疫・馴化	13
5.4.9	投与開始時週齢	13
5.4.10	投与開始時体重	14
5.4.11	群分け	14
5.4.12	動物の識別	14
5.4.13	余剰動物の取扱	14
5.5	飼育環境	14
5.5.1	飼育室	14
5.5.2	飼育環境	14
5.5.3	飼育器材	15
5.5.4	収容動物数	15
5.5.5	床敷	16
5.5.6	飼料	16
5.5.7	飲用水	16
5.6	投与	17
5.6.1	投与経路・方法	17
5.6.2	フラッシング	17
5.6.3	投与経路の選択理由	17
5.6.4	投与方法の選択理由	17
5.6.5	投与回数・期間	17
5.6.6	投与回数・期間の選択理由	17
5.6.7	投与用量及びその設定理由	17
5.6.8	投与液量	17
5.7	群構成	18
5.7.1	主試験群	18
5.7.2	TK サテライト群	18
5.8	観察・検査項目	18
5.8.1	一般状態	18
5.8.2	体重	18
5.8.3	摂餌量	19
5.8.4	眼科学的検査	19
5.8.5	尿検査	19
5.8.6	血液学的検査	20
5.8.7	血液生化学的検査	21
5.8.8	病理学的検査	22
5.9	トキシコキネティクス (TK) 測定及び脳脊髄液中の P092 測定	24

5.9.1	採血	24
5.9.2	脳脊髄液の採取	25
5.9.3	血漿中及び脳脊髄液中 P092 濃度の測定方法	25
5.9.4	残余 TK 測定試料及び脳脊髄液試料の処理	30
5.10	統計学的解析	30
5.11	コンピュータシステムの使用	31
5.11.1	使用するコンピュータシステム	31
5.11.2	コンピュータシステムのプロトコール番号	31
6.	結果	32
6.1	死亡・瀕死	32
6.2	一般状態	32
6.3	体重	32
6.4	摂餌量	32
6.5	眼科学的検査	32
6.6	尿検査	32
6.7	血液学的検査	32
6.8	血液生化学的検査	33
6.9	器官重量	33
6.10	病理解剖検査	33
6.11	トキシコキネティクス (TK) 測定	33
7.	考察	35

List of Tables

Table 1	Clinical Sign - Summary	36
Table 2	Body Weight - Summary	41
Table 3	Food Consumption - Summary	43
Table 4	Ophthalmologic Examination - Summary	45
Table 5	Urinalysis - Summary	47
Table 6	Hematology - Summary	59
Table 7	Blood Chemistry - Summary	63
Table 8	Organ Weight - Summary	69
Table 9	Necropsy - Summary	74
Table 10	Drug Concentration in Plasma and Cerebral Spinal Fluid	77

List of Appendices

Appendix 1	Clinical Sign	83
Appendix 2	Body Weight	108
Appendix 3	Food Consumption	116
Appendix 4	Ophthalmologic Examination	124

Appendix 5	Urinalysis.....	132
Appendix 6	Hematology	146
Appendix 7	Blood Chemistry.....	160
Appendix 8	Organ Weight.....	181
Appendix 9	Necropsy.....	197
Appendix 10	Clinical Sign (TK satellite group)	202
Appendix 11	Body Weight (TK satellite group)	216
Appendix 12	Hematology (TK satellite group).....	222
Appendix 13	Blood Chemistry (TK satellite group).....	224
Appendix 14	Organ Weight (TK satellite group).....	227
Appendix 15	Necropsy (TK satellite group).....	229

最終ページ : 231

2. 試験実施概要

2.1 表題

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

2.2 試験番号

B131138

2.3 試験目的

P092・マレイン酸塩をラットに4週間間歇静脈内投与し、明らかな毒性変化を惹起する用量とその変化の内容、及び毒性変化の認められない用量を求める。また、動物において得られた全身的暴露と用量及び時間経過との関係を検討する。

2.4 適用ガイドライン

医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて（薬審1第24号，平成元年9月11日）

単回及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について（薬新薬第88号，平成5年8月10日）

反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について（医薬審第655号，平成11年4月5日）

トキシコキネティクス（毒性試験における全身的暴露の評価）に関するガイダンスについて（薬審第443号，平成8年7月2日）

2.5 適用GLP

なし

2.6 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

2.7 試験受託者

三菱化学メディエンス株式会社

〒108-8559 東京都港区芝浦四丁目2番8号

2.8 試験施設

2.8.1 名称及び所在地

三菱化学メディエンス株式会社 鹿島研究所
〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1

2.8.2 試験責任者

大西 康之
三菱化学メディエンス株式会社
創薬支援事業本部 試験研究センター 安全性研究部
TEL : 0479-46-3461, FAX : 0479-46-7505

2.8.3 分担責任者

病理学的検査 : 隈部 志野
トキシコキネティクス (TK) 測定 : 松元 さなえ

2.8.4 試験日程

試験開始 :	2014 年 1 月 28 日
動物入荷 :	2014 年 1 月 29 日 (雄) 2014 年 2 月 5 日 (雌)
群分け :	2014 年 2 月 5 日 (雄) 2014 年 2 月 14 日 (雌)
投与開始 :	2014 年 2 月 6 日 (雄) 2014 年 2 月 17 日 (雌)
TK 採血 (初回投与時) :	2014 年 2 月 6~8 日 (雄) 2014 年 2 月 17~19 日 (雌)
TK 採血 (最終回投与時) :	2014 年 2 月 26 日~3 月 1 日 (雄) 2014 年 3 月 9 日~12 日 (雌)
投与期間終了時解剖 :	2014 年 3 月 6 日 (雄) 2014 年 3 月 17 日 (雌)
試験終了 :	2014 年 3 月 19 日

2.8.5 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。なお、コンピュータシステムに格納されたデータについては、三菱化学メディエンス株式会社 熊本研究所 安全性研究棟 ホストコンピュータ室 (A007) のホストコンピュータ内に保管する。

2.8.6 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) 標本
- (6) 通信文書等の記録文書
- (7) 最終報告書

2.9 その他

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針（三菱化学メディエンス株式会社 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を得た。

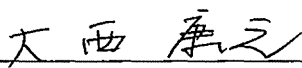

3. 試験責任者署名

表 題： 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

試験責任者：

2014年3月19日


大西 康之 
大西 康之
三菱化学メディエンス株式会社
創薬支援事業本部 試験研究センター
安全性研究部

4. 要約

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.

摂餌量の減少が, 10 及び 25 mg/kg 群の雄で, 第 4 週に認められた.

血液学的検査では, 出血によると思われる貧血傾向及び好中球の増加が, 10 及び 25 mg/kg 群の雄で認められた. 雌においても同様に, ヘマトクリット値の低下が 1 及び 10 mg/kg 群で認められ, 統計学的な有意差はないものの, ヘモグロビン濃度の低値傾向及び好中球の増加傾向もこれらの用量群で認められた.

血液生化学的検査では, ASAT, LDH, γ GT, クレアチンキナーゼ, 総ビリルビン, 尿素窒素, クレアチニンの増加, A/G 比及びアルブミンの低下, α 1, α 2, β グロブリンの増加, 血清ナトリウム及びカリウムの増加, 血清クロールの低下が 10 あるいは 25 mg/kg 群の雄で認められた. 雌においても, 統計学的な有意差は明確ではないものの, ASAT, LDH, γ GT, クレアチンキナーゼ, 総ビリルビンの増加及びアルブミンの低下が 10 mg/kg 群で認められた.

器官重量測定では, 腎臓の実重量及び相対重量の増加が 25 mg/kg 群の雄で認められた. 雌においても, 腎臓の相対重量の増加が 10 mg/kg 群で認められた.

病理解剖検査では, 投与部位 (大静脈) に結節が 1 mg/kg 群の雌及び 10 mg/kg 以上の用量群の雌雄及び認められ, 1 mg/kg 群の雄では白色斑が認められた. その他, 大静脈の血腫, 腹腔内臓器の癒着, 脾臓の腫大が投与群に認められた.

尿検査及び眼科学的検査では, 特筆すべき変化は認められなかった.

初回投与時の血漿中濃度測定では, 10 及び 25 mg/kg 群において投与終了後 5 分をピークに徐々に P092 濃度は低下した. しかしながら, 投与終了後 48 時間であっても定量下限付近の濃度を示す個体が散見された. 1 mg/kg 群ではいずれの測定ポイントにおいても定量下限未満であった. 雄の投与後 5 分の血漿中濃度は雌よりも高値であったが, その後の推移に明確な雌雄差は見られなかった. 最終回投与時では, 血漿中濃度は初回投与時に比して低下し, 定量下限付近の値を示す個体が 10 及び 25 mg/kg 群の雄では散見されたが, 雌ではいずれの