

個体においても定量下限未満であった。しかしながら、クロマトグラム上にピークは見られていることから、定量下限付近で推移していると推察された。脳脊髄液中の P092 濃度については、多くは定量下限未満であったものの、10 あるいは 25 mg/kg 群の少数例では検出され、薬物の血中から脳脊髄液中への移行が確認された。

以上のことから、P092・マレイン酸塩を静脈内投与する場合、薬物による血管障害が惹起されてしまうことから、低速持続投与は不適と考えられた。

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

CMTPG-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°C～10°C），遮光，密封（窒素封入）

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 投与液

5.3.1 調製方法及び頻度

被験物質投与液は，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（0.2 mg/mL）．
- (3) 0.22 μ m のフィルターでろ過，滅菌した．
- (4) 滅菌済みの器具を用いて，クリーンベンチ下で0.2 mg/mL 濃度液を希釈し，0.08 及び0.008 mg/mL 濃度液を調製した．
- (5) 各濃度液の一部を分取し，pH を測定し，記録した．

5.3.2 保管条件

冷蔵（許容範囲：1°C～10°C），遮光

5.4 試験動物

5.4.1 動物種

ラット（大腿静脈カニューレーション動物を使用した）

5.4.2 系統

CrI:CD(SD)

5.4.3 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。

5.4.4 微生物レベル

SPF

5.4.5 供給源

日本チャールス・リバー株式会社

5.4.6 購入時週齢

8 週齢

5.4.7 購入動物数及び性別

主試験群： 雌雄各 27 匹

TK サテライト群： 雌雄各 18 匹

5.4.8 検疫・馴化

5.4.8.1 検疫

主試験群及び TK サテライト群の動物は同一日に別々に入荷した。検疫期間は動物入荷後 5 日間とした。検疫期間には以下の検査を行い、異常のないことを確認した。

- ・一般状態観察（1 日 1 回）
- ・体重測定（動物入荷時及び検疫終了時）

5.4.8.2 馴化

馴化期間は動物入荷から投与開始前日までとした。検疫期間終了後の馴化期間中に以下の検査を行った。

- ・一般状態観察（1 日 1 回）
- ・体重測定（群分け日）
- ・眼科学的検査（1 回）

5.4.9 投与開始時週齢

9 週齢

5.4.10 投与開始時体重

投与開始日（投与前）に個々の体重が雌雄それぞれ全例の平均体重±20%以内であることを確認した。

5.4.11 群分け

(1) 実施日

投与開始の前日（雄）あるいは投与開始3日前（雌）

主試験群及びTK サテライト群の動物は、同一日に別々に群分けを行った。

(2) 動物選抜

検疫・馴化期間中の検査の結果に基づいて、試験に供する動物を選抜した。

(3) 動物の振り分け

群分け日の体重に基づいて、体重層別化無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ均一になるように動物を振り分けた。主試験群として雌雄各24匹、TK サテライト群として雌雄各15匹を使用した。

5.4.12 動物の識別

個体識別は以下により行った。なお、主試験群とTK サテライト群は、油性ペンの色を変えて区別した。

群分け前： 尾に油性ペンで付した番号（群分け前の動物番号末尾1あるいは2桁）

群分け後： イヤーパンチ

群分け前の動物番号は以下の通りとした。

主試験群： 雄 19001～19027, 雌 59001～59027

TK サテライト群： 雄 29001～29018, 雌 69001～69018

5.4.13 余剰動物の取扱

余剰動物は投与開始日に試験から除外した。除外した動物は、チオペンタールナトリウム（ラボナール[®]、田辺三菱製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた。

5.5 飼育環境

5.5.1 飼育室

ラット・マウス飼育室（4112室、ただし雌の検疫期間のみ2114室を使用した。）

5.5.2 飼育環境

5.5.2.1 温度

許容範囲：19.0℃～25.0℃

5.5.2.2 相対湿度

許容範囲：35.0%～75.0%

5.5.2.3 換気

6～20回/時，オールフレッシュエアー供給

5.5.2.4 照明時間

12時間/日（7:00～19:00）点灯

眼科学的検査の際には消灯した。

5.5.3 飼育器材

5.5.3.1 ケージ

ポリカーボネート製ケージ（TR-PC-200, 265W × 426D × 200H mm, トキワ科学器械株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：雄は投与開始前に1回（群分け日），雌は投与開始前に2回（群わけ日含む）

投与開始後は1週間に1回以上

5.5.3.2 給餌器

固型用ステンレス製給餌器（トキワ科学器械株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：ケージ交換時

5.5.3.3 給水瓶

ポリカーボネート製給水瓶（700 mL, トキワ科学器械株式会社）

使用前滅菌：オートクレーブ滅菌

交換頻度：ケージ交換時

5.5.3.4 架台

スチール製架台（トキワ科学器械株式会社）

使用前消毒：消毒薬による清拭

消毒の頻度：1週間に1回以上

5.5.3.5 エンリッチメント

動物福祉向上のために，オートクレーブ滅菌した玩具（アルミナボール）を使用した。

5.5.4 収容動物数

1匹/ケージ

5.5.5 床敷

5.5.5.1 種類

実験動物用床敷（ベータチップ，日本チャールス・リバー株式会社）

使用前滅菌： オートクレーブ滅菌

交換頻度： ケージ交換時

5.5.5.2 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。

5.5.6 飼料

5.5.6.1 種類

実験動物用固型飼料（CR-LPF，オリエンタル酵母工業株式会社，放射線滅菌済み）

5.5.6.2 給餌法

自由摂取

ただし，以下の期間は給餌しなかった。

- ・新鮮尿採取時
- ・計画解剖前日の夕方（17:00）から解剖までの期間

飼料は投与開始前に1回（雄，群分け日）または2回（雌，群分け日を含む），その後は投与開始日から週1回以上の頻度で新しいものと交換した。

5.5.6.3 汚染物質の確認

飼料の供給元から分析結果を入手し，使用したロット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。

5.5.7 飲用水

5.5.7.1 種類

5 μm フィルター濾過後，紫外線照射した水道水

5.5.7.2 給水法

自由摂取

ただし，新鮮尿採取中は給水しなかった。

5.5.7.3 分析

外部施設にて水質検査を定期的（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た。

5.6 投与

5.6.1 投与経路・方法

持続静脈内投与

大腿静脈に挿入されたカテーテルよりシリンジポンプ（テルモ株式会社）及びディスプレイ付きシリンジを用いて、およそ 5.42 mL/kg/h の投与速度で無拘束下で投与した。各個体の投与速度は、投与日の体重を用いて個別に算出した。各投与直前に、生理食塩液でフラッシングを行い、カテーテル内液を排出した。投与終了後、カテーテル内での血液凝固を防ぐため、カテーテル内にヘパリン・グリセリン溶液*を充填させた。

*：グリセリン 6 容量に対しヘパリンナトリウム注射液（1000 単位）4 容量を加えた（最終ヘパリンナトリウム濃度：400 単位/mL）。調製後、フィルター滅菌を行い、冷蔵保存した。

5.6.2 フラッシング

- (1) 注射筒にセプトラムニードルを装着し、ハーネスのキャップを外してセプトラムに接続した。
- (2) シリンジをゆっくり引き、血液が確認されるまでカテーテル内の液を引き出した。
- (3) 血液確認後、生理食塩液を充填させたシリンジを接続し、デッドボリューム分の液をゆっくり注入した。
- (4) ニードルを外し、ハーネスにキャップをかぶせた。

5.6.3 投与経路の選択理由

臨床適用経路に準ずる。

5.6.4 投与方法の選択理由

被験物質を正確に投与できる。

5.6.5 投与回数・期間

週 1 回、4 週間、計 4 回

5.6.6 投与回数・期間の選択理由

毒性試験のガイドラインに従った。

5.6.7 投与用量及びその設定理由

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。動物へ 24 時間持続静脈内投与可能な最高容量（約 130 mL/kg）を考慮すると、24 時間以内で投与可能な最高用量は 25 mg/kg と考えられる。本試験では、この投与可能な最高用量（25 mg/kg）を高用量に設定し、以下 10 及び 1 mg/kg 群を設定した。

5.6.8 投与液量

125 mL/kg

各個体の投与液量は至近日に測定した体重に基づいて算出した。

5.7 群構成

5.7.1 主試験群

被験物質	投与用量 (mg/kg/日)	投与液量 (mL/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号)	
				雄	雌
Control *	0	125	0	6 (10101~10106)	6 (50101~50106)
P092	1	125	0.008	6 (10201~10206)	6 (50201~50206)
P092	10	125	0.08	6 (10301~10306)	6 (50301~50306)
P092	25	125	0.2	6 (10401~10406)	6 (50401~50406)

* 媒体 (生理食塩液) 投与

5.7.2 TKサテライト群

被験物質	投与用量 (mg/kg/日)	投与液量 (mL/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号)	
				雄	雌
P092	1	125	0.008	5 (20101~20105)	5 (60101~60105)
P092	10	125	0.08	5 (20201~20205)	5 (60201~60205)
P092	25	125	0.2	5 (20301~20305)	5 (60301~60305)

5.8 観察・検査項目

主試験群の全生存例について下記の項目を検査した。TK サテライト群については、一般状態観察、体重測定並びに瀕死及び死亡動物の剖検及び器官・組織の保存を同様に実施したが、得られたデータは毒性評価からは除外した (Appendix 10 及び 11 参照)。ただし、25 mg/kg 群の雄 1 例 (No. 20304) については、未採血動物であったため、主試験群同様、第 29 日まで継続観察するとともに、体重測定 (第 28 日)、血液学的検査及び血液生化学的検査、器官重量測定、剖検及び組織の採取・保存を行った (Appendix 12, 13 及び 14 参照)。

日及び週の表記については、投与開始日を第 1 日、第 1~7 日を第 1 週とした。第 1~4 週を投与期間とした。

5.8.1 一般状態

投与開始日から解剖日まで毎日観察した。観察頻度を以下に示す。

投与日： 1 日 2 回 (投与前, 投与開始後約 2-4 時間)

その他の期間： 1 日 1 回 (午前中, 動物入荷日は午後)

5.8.2 体重

体重は電子天秤を用いて、次の日程に測定した。投与日は投与前に測定した。

投与期間： 投与開始日（第1日）、第8、15、22及び28日

計画解剖日（第29日）には、器官相対重量（対体重比）算出のために体重を測定した。死亡動物については、解剖前に最終体重を測定した。

5.8.3 摂餌量

飼料の風袋込み重量は電子天秤を用いて、次の日程に従って測定した。

投与期間： 第1～8、8～15、15～22、及び22～27日

各測定日間の重量差からその期間の1日平均摂餌量を算出した。

5.8.4 眼科学的検査

(1) 検査時期

投与開始前： 第-1週（雄：第-2日、雌：第-5日）

投与期間： 第4週（第26日）

(2) 検査項目及び検査方法

照明を暗くした状態で、下記の検査を行った。前眼部、中間透光体および眼底検査は散瞳剤（ミドリリンP®点眼液、参天製薬株式会社）点眼後に行った。

- ・対光反射： 直像検眼鏡（BETA200, Heine Optotechnik）を用いて検査
- ・前眼部及び中間透光体： ポータブルスリットランプ（SL-14 または 15, 興和株式会社）を用いて検査
- ・眼底： 倒像検眼鏡（OMEGA 200, Heine Optotechnik）を用いて検査

5.8.5 尿検査

尿検査は、主試験群全例について実施した。

(1) 検査時期

投与期間： 第4週（第27～28日）

(2) 検査試料採取

代謝ケージ（トキワ科学器械株式会社、オートクレーブ滅菌済み）を用いて以下の通り尿を採取した。

新鮮尿： 検査日の午前中（投与前）に新鮮尿（最長3時間の蓄積尿）を採取した。新鮮尿採取時は動物に飼料及び飲用水を与えなかった。

20時間尿： 新鮮尿採取日の午後（投与後、13:00 前後）から翌朝（9:00 前後）までの約20時間、蓄尿した。20時間尿採取中は動物に飼料及び飲用水を与えた。

(3) 検査項目及び検査方法

検査項目及び検査方法を下表に示す。試験紙法検査及び尿沈渣の観察は新鮮尿を用いて、その他の検査は20時間尿を用いて行った。

項目 (略号, 単位)	方 法
pH	試験紙法 (マルティスティックス*)
蛋白	試験紙法 (マルティスティックス*)
グルコース	試験紙法 (マルティスティックス*)
ケトン体	試験紙法 (マルティスティックス*)
ビリルビン	試験紙法 (マルティスティックス*)
潜血	試験紙法 (マルティスティックス*)
尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検 [遠心分離条件: 約 500×g, 5 分間, 室温]
比重	屈折法
尿量	メスシリンダーで測定
ナトリウム (Na, mmol)	イオン選択電極法
カリウム (K, mmol)	イオン選択電極法
クロール (Cl, mmol)	イオン選択電極法

*: シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社

[測定機器] 試験紙法: クリニテック 500 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社)
比重: ユリコン-JE (株式会社アタゴ)
電解質: TBA-200FR (株式会社東芝)

(4) 残余検査試料の処理

電解質 (Na, K 及び Cl) の検査に用いた尿の残余は、約-80°C (許容範囲: -60°C 以下) のフリーザー内で保存し、試験終了までに廃棄した。その他の残余の尿は検査終了後に廃棄した。

5.8.6 血液学的検査

(1) 検査時期

計画解剖時 (第 29 日)

(2) 検査試料採取

以下の通り採血及び血液処理を行い、検査試料を得た。

採血前絶食: 一晚 (採血前日のおおよそ 17:00~解剖時まで)

採血時麻酔: チオペンタールナトリウム (ラボナール, 田辺三菱製薬株式会社, 腹腔内投与)

採血部位: 後大静脈

採血量: 約 4~5 mL (血液生化学的検査用血液を含む)

EDTA 処理: 血液約 0.8 mL を EDTA-2K で抗凝固処理した。

血漿採取: 血液 0.6 mL を 3.2 w/v %クエン酸三ナトリウム水溶液で抗凝固処理後、遠心分離 (約 12000×g, 3 分間, 約 4°C) して血漿を採取した。

(3) 検査項目及び検査方法

検査項目及び検査方法を下表に示す。PT 及び APTT の測定には血漿を、その他の項目の測定には EDTA 処理血液を用いた。

項目 (略号, 単位)	方法
赤血球数 (RBC, $\times 10^6/\mu\text{L}$)	シーフローDC 検出法
ヘモグロビン濃度 (HGB, g/dL)	SLS-ヘモグロビン法
ヘマトクリット値 (HCT, %)	赤血球パルス波高値検出法
平均赤血球容積 (MCV, fL)	RBC と HCT より算出
平均赤血球色素量 (MCH, pg)	RBC と HGB より算出
平均赤血球色素濃度 (MCHC, g/dL)	HGB と HCT より算出
血小板数 (PLT, $\times 10^3/\mu\text{L}$)	シーフローDC 検出法
網赤血球比 (%)	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法
プロトロンビン時間 (PT, sec) [§]	光散乱検出方式
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT, sec) [§]	光散乱検出方式
白血球数 (WBC, $\times 10^3/\mu\text{L}$)	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法
白血球百分率及び実数 (% , $\times 10^3/\mu\text{L}$)	半導体レーザーを使用したフローサイトメトリー法*

[測定機器] PT 及び APTT : CA-510 (シスメックス株式会社)

その他 : XT-2000iV (シスメックス株式会社)

§ : カテーテル内抗凝固処理にヘパリンを用いていることから、正確な値が得られない可能性が高い。従って、測定は行うものの評価には用いず、参考データとした。

(4) 残余検査試料の処理

残余血液及び血漿は検査終了後に廃棄した。

5.8.7 血液生化学的検査

(1) 検査時期

計画解剖時 (第 29 日)

(2) 検査試料採取

使用血液 : 血液学的検査の項で採取した血液の一部

血清採取 : 血液約 2 ~ 3mL を室温で約 30 ~ 60 分間放置した後、遠心分離 (約 1500×g, 10 分間, 約 4°C) して血清を採取した。

血漿採取 : 血液約 0.6 mL をヘパリンリチウムで抗凝固処理後、遠心分離 (約 12000×g, 3 分間, 約 4°C) して血漿を採取した。

(3) 検査項目及び検査方法

検査項目及び検査方法を下表に示す。LDH 及び CK 測定には血漿を、その他の検査には血清を用いた。

項目 (略号, 単位)	方法
ASAT (GOT, U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
ALAT (GPT, U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)

LDH (U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
γGT (U/L)	L-γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法 (JSCC 改良法)
ALP (U/L)	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (JSCC 改良法)
CK (U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
総ビリルビン (mg/dL)	酵素法 (BOD 法)
尿素窒素 (mg/dL)	酵素-UV 法 (Urease-LEDH 法)
クレアチニン (mg/dL)	酵素法 (Creatininase-POD 法)
グルコース (mg/dL)	酵素法 (HK-G6PDH 法)
総コレステロール (mg/dL)	酵素法 (CO-HMMPS 法)
リン脂質 (mg/dL)	酵素法 (COD-DAOS 法)
トリグリセライド (mg/dL)	酵素法 (GPO-HMMPS 法, グリセリン消去法)
総蛋白 (g/dL)	Biuret 法
蛋白分画 (%及び g/dL)	アガロース電気泳動法
A/G 比	アガロース電気泳動法
カルシウム (mg/dL)	OCPC 法
無機リン (mg/dL)	酵素法 (PNP-XOD-POD 法)
ナトリウム (Na, mmol/L)	イオン選択電極法
カリウム (K, mmol/L)	イオン選択電極法
クロール (Cl, mmol/L)	イオン選択電極法
[測定機器]	蛋白分画及び A/G 比 : Epalyzer 2 (株式会社ヘレナ研究所) その他 : TBA-200FR (株式会社東芝)

(5) 残余検査試料の処理

残余の血清及び血漿は、約-80℃（許容範囲：-60℃以下）のフリーザー内で保存し、試験終了までに廃棄した。

5.8.8 病理学的検査

5.8.8.1 検査対象器官・組織

下表に従い、採材及び検査を行った。

器官・組織	採材 側性	器官重量 側性
心臓	○ -	○ -
リンパ節	○ -	- -
下顎 腸間膜	○ -	- -
胸腺	○ -	○ -
脾臓	○ -	○ -
気管	○ -	- -
肺/気管支	○ -	○ -
舌	○ -	- -
食道	○ -	- -
胃	○ -	- -
十二指腸	○ -	- -
空腸	○ -	- -
回腸	○ -	- -
盲腸	○ -	- -
	パイエル板を含む	- -

器官・組織	採材 側性	器官重量 側性
結腸	○ -	- -
直腸	○ -	- -
唾液腺	耳下腺 顎下腺/舌下腺	○ 両側 ○ 両側
肝臓	○ -	○ -
膵臓	○ -	- -
腎臓	○ 両側	○ 左右合計
膀胱	○ -	- -
精巣	○ 両側	○ 左右合計
精巣上体	○ 両側	- -
精嚢	○ -	- -
前立腺	腹葉	○ -
下垂体	○ -	○ -
甲状腺/上皮小体	○ 両側	○ 左右合計
副腎	○ 両側	○ 左右合計
大腿骨/骨髄	○ 片側	- -
胸骨/骨髄	○ -	- -
皮膚/乳腺	○ -	- -
眼球/視神経/ハーダー腺	○ 両側	- -
脳	○ -	○ -
脊髄	頸部 胸部 腰部	○ - ○ - ○ -
卵巣	○ 両側	○ 左右合計
子宮	○ -	- -
膣	○ -	- -
大動脈	胸部	○ -
骨格筋/坐骨神経	大腿部	○ 片側
投与部位	○ -	- -
その他肉眼的異常のみられた器官/組織	○ -	- -

○：採材，検査対象； -：検査対象外または側性の区別なし

5.8.8.2 病理解剖検査

計画解剖動物は第 29 日に解剖した。

チオペンタールナトリウム（ラボナール，田辺三菱製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で，腹大動脈を切断・放血して安楽死させた後に剖検した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。TK サテライト群の死亡動物についても，主試験群と同様に剖検を実施した。その他の TK サテライト群の動物については，5.9.1 項(4)の手順に従い安楽死させ，カテーテルが閉塞したことにより，投与が継続できなかった 1 例（No. 20203）及びハーネスがかみ切られたことにより投与が継続できなかった 1 例（No. 20302）以外の雄は採血終了後に剖検した。

5.8.8.3 器官重量

計画解剖時に 5.8.8.1 項に示した器官・組織の重量を測定した。

両側性の器官については左右まとめて測定した。下垂体及び甲状腺/上皮小体はホルマリン固定後に測定した。また、解剖日の最終体重に基づいて相対重量（対体重比）を算出した。死亡動物の器官重量は測定しなかった。

5.8.8.4 器官・組織の採材及び保存

計画解剖時に 5.8.8.1 項に示した器官・組織を採取した。採取した器官・組織を 10 vol%リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣はブアン液で、眼球、ハーダー腺及び視神経はダビドソン液で固定後、10 vol%リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。死亡動物については、いずれの器官・組織も 10 vol%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。

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

5.9.1 採血

TK サテライト群の動物から各群雌雄 3 匹ずつ選抜し（動物番号の若い順）、無麻酔下で以下の通り採血して、血漿（TK 測定試料）を得た。

(1) 採血時点

初回（第 1 回）投与時： 投与後（投与終了後）5 分, 2, 4, 8, 24, 48 時間

最終回（第 4 回）投与時： 投与前日並びに投与後 5 分, 2, 4, 8 及び 24, 48 時間

総検体数： 234 検体

(2) 採血方法

採血量： 約 0.24 mL/時点

採血部位： 鎖骨下静脈

抗凝固剤： ヘパリン（ナトリウム塩）（ヘパリン加注射筒にて採血）

採取容器： ポリプロピレン製チューブ

採取した血液は、採血後直ちに採取容器に入れて氷冷した。

(3) 血漿採取及び保存条件

採取した血液を遠心分離して個体毎に血漿を得た。遠心分離は採血後速やかに行なった。

遠心条件： 約 10000×g, 3 分間, 約 4°C

保存容器： ポリプロピレン製チューブ

保存条件： 遠心分離後、直ちにドライアイス保冷し、その後約-80°C（許容範囲：-60°C 以下）で保存

(4) 採血終了後動物の処理

採血終了後の動物は、第 29 日にチオペンタールナトリウム（ラボナール、田辺三菱製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で、脳脊髄液の採取を行った後、腹大動脈を切断・放血して安楽死させた。剖検は行わなかった。

5.9.2 脳脊髄液の採取

最終回投与後 48 時間の採血後に TK サテライト群の全生存動物から麻酔下でマイジェクターを用いて脳脊髄液を得た。採取した脳脊髄液は採取容器に入れて直ちにドライアイスで保冷し、その後約-80°C（許容範囲：-60°C 以下）で保存した。

総検体数：30 検体

5.9.3 血漿中及び脳脊髄液中 P092 濃度の測定方法

血漿中及び脳脊髄液中 P092 濃度の測定は、当試験施設で実施した「ラット血漿中 P092 濃度測定法バリデーション」（試験番号：B120711）における分析法に従って実施した。P092 の安定性については、B120711 にて以下の項目が確認されている。

項目	期間又は回数
測定実測試料の安定性（10°C）	36 時間
凍結融解安定性（-80°C）	3 回
短期安定性（室温）	4 時間
長期安定性（-80°C）	33 日間
P092 標準試料原液及び溶液（室温） （200 µg/mL 及び 5 ng/mL）	24 時間
P092 標準試料原液及び溶液（冷蔵） （200 µg/mL 及び 5 ng/mL）	97 日間
IS 試料原液及び溶液（室温） （100 µg/mL 及び 200 ng/mL）	24 時間
IS 試料原液及び溶液（冷蔵） （100 µg/mL 及び 200 ng/mL）	97 日間

5.9.3.1 測定対象標準物質

被験物質を使用した。

5.9.3.2 内標準物質 (IS)

名称： p-アセトアミドフェノール
ロット番号： WEQ6871
分子量： 151.16
保存条件： 室温（許容範囲：10～30°C），遮光
保管場所： 被験物質保管場所（41）
製造元： 和光純薬工業株式会社
安定性の確認： 実施しなかった。クロマトグラム上において、P092 溶出位置に定量を妨害する夾雑ピークを与えないことを分析日毎に確認した。

取扱上の注意： 保護具（ゴム手袋，眼鏡及びマスク）着用

5.9.3.3 ブランクマトリックス

<血漿>

動物種： ラット
 系統： Ctrl:CD (SD)
 投与歴： なし
 抗凝固剤： ヘパリンナトリウム
 入手先： 日本チャールス・リバー株式会社
 保存条件： 約-20°C（許容範囲：-40~-15°C）

<脳脊髄液>

脳脊髄液は希少マトリックスであるため，その代替マトリックスとして生理食塩液を使用した。

5.9.3.4 試薬

試薬類は市販の特級又は HPLC 用の試薬を使用した。

水は超純水製造装置（Elix-UV10, MILLI-Q Gradient-A10）で精製したものをを用いた。

5.9.3.5 P092 標準試料溶液の調製

P092・マレイン酸塩を 14.9 mg（フリー体換算値）正確に量り，メタノールに溶解し，全量を 50 mL とした（200 µg/mL）（ガラス製メスフラスコを使用）。溶解の際，超音波処理を実施した。この溶液を P092 標準試料原液（SS）とし，次表に従ってメタノールで順次希釈し，以下の標準試料溶液を調製した。

P092 標準試料原液及び溶液はポリプロピレン（PP）製容器にて冷蔵・遮光保存（許容範囲：1~10°C）し，使用期限は調製後 97 日間とした。

標準試料溶液 略称	標準試料溶液濃度 (ng/mL)	使用標準試料溶液 略称	使用量 (µL)*	メタノール 添加量(µL)*
WS-40000	40000	SS	200	800
WS-4000	4000	WS-40000	100	900
WS-1000	1000	WS-4000	250	750
WS-800	800	WS-4000	200	800
WS-500	500	WS-1000	500	500
WS-200	200	WS-1000	200	800
WS-100	100	WS-500	200	800
WS-50	50	WS-500	100	900
WS-20	20	WS-200	100	900
WS-10	10	WS-100	100	900

標準試料溶液 略称	標準試料溶液濃度 (ng/mL)	使用標準試料溶液 略称	使用量 (μ L)*	メタノール 添加量(μ L)*
WS-5	5	WS-50	100	900

* : マイクロピペットを使用

5.9.3.6 IS 試料溶液の調製

IS を 5 mg 正確に量り、メタノールに溶解、全量を 50 mL として IS 試料原液 (100 μ g/mL) を調製した (ガラス製メスフラスコを使用)。この溶液を IS 試料原液 (ISSS) とし、次表に従ってメタノールで希釈し IS 試料溶液 (200 ng/mL, ISWS) を調製した。

IS 試料原液及び溶液は PP 製容器にて冷蔵・遮光保存 (許容範囲 : 1~10°C) し、使用期限は調製後 97 日間とした。

IS 試料溶液 略称	IS 試料溶液濃度	使用 IS 試料溶液 略称	使用量 (μ L)*	メタノール添加量 (μ L)*
ISWS-1	5 μ g/mL	ISSS	50	950
ISWS	200 ng/mL	ISWS-1	40	960

* : マイクロピペットを使用

5.9.3.7 検量線用標準試料溶液の調製

PP 製マイクロチューブにブランク血漿 (血漿中濃度測定時) または生理食塩液 (脳脊髄液中濃度測定時) 20 μ L を分取後、水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400 μ L を添加し、ブランク試料、ゼロ試料についてはメタノールを 20 μ L、検量線用標準試料溶液 (C1~C8) については、次表に従い P092 標準試料溶液を 20 μ L 添加した。

略称	血漿または脳 脊髄液中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
C1 (LLOQ)	5	WS-5
C2	10	WS-10
C3	20	WS-20
C4	50	WS-50
C5	100	WS-100
C6	200	WS-200
C7	500	WS-500
C8 (ULOQ)	1000	WS-1000

LLOQ: lower limit of quantification

ULOQ: upper limit of quantification

5.9.3.8 血漿試料及び脳脊髄液試料の前処理方法（分析フロー）

- (1) PP 製マイクロチューブに血漿または脳脊髄液（生理食塩液）20 μL を分取した。
- (2) 水／ギ酸（1000:1, v/v）400 μL を添加した。
- (3) メタノール 20 μL を添加した。
（検量線用標準試料溶液調製時は P092 標準試料溶液）
- (4) ISWS（ブランク試料調製時はメタノール）40 μL を添加した。
- (5) ミキサーを用いて攪拌した。
- (6) 全量を Oasis HLB $\mu\text{Elution plate}$ （30 μm , Waters Corporation）にアプライした（プレートは、あらかじめメタノール 200 μL 及び水／ギ酸（1000:1, v/v）200 μL でコンディショニングしておいた）。
- (7) 水／ギ酸（1000:1, v/v）200 μL で洗浄した。
- (8) メタノール 70 μL で溶出した。
- (9) 水／ギ酸（1000:1, v/v）140 μL を添加，攪拌後，次項に従い測定した。

5.9.3.9 分析条件

5.9.3.9.1 装置

HPLC 装置： 1100 (Agilent Technologies)
 オートサンプラ： SIL-20AC (Shimadzu Corporation)
 質量分析装置： API 4000 (AB SCIEX)

もしくは

送液ポンプ： LC-20AD (Shimadzu Corporation)
 脱気装置： DGU-20A3 (Shimadzu Corporation)
 カラムオープン： CTO-20AC (Shimadzu Corporation)
 オートサンプラ： SIL-20AC・HT (Shimadzu Corporation)
 質量分析装置： API 4000 (AB SCIEX)

5.9.3.9.2 HPLC 条件

カラム： XBridge C18, 3.5 μm , 3.0 mm I.D. \times 50 mm (Waters Corporation)
 カラム温度： 50°C
 移動相 A： 水／ギ酸（1000:1, v/v）
 移動相 B： メタノール／ギ酸（1000:1, v/v）
 移動相 A, B を 4:6 の割合で HPLC で混合した。
 流速： 0.25 mL/min
 注入量： 10 μL
 オートサンプラ設定温度： 10°C
 ニードル洗浄溶媒： メタノール

5.9.3.9.3 MS/MS 条件

Ionization method： ESI (Electrospray Ionization, Turbo Ion Spray)

Polarity :	Positive
Scan type :	MRM (Multiple reaction monitoring)
Ion spray voltage (IS) :	5500 V
Heater gas temperature (TEM) :	500°C
Nebulizer gas (GS1) :	Air, 50 psi
Heater gas (GS2) :	Air, 85 psi
Curtain gas flow (CUR) :	N ₂ , 18 psi
Collision gas flow (CAD) :	N ₂ , 4
Entrance potential (EP) :	10 V
Monitor ion :	P092: <i>m/z</i> 252 > 84 IS: <i>m/z</i> 152 > 110

5.9.3.10 検量線

ブランク試料，ゼロ試料及び8濃度の検量線用標準試料溶液を n=1 で調製し，それぞれから測定実測試料を n=1 で調製，測定した。

ブランク試料，ゼロ試料の2検体は，LC-MS/MS 測定のバックグラウンド確認のために測定した。

検量線用標準試料溶液につき，P092 の IS に対するピーク面積比を，添加濃度に対し一次回帰して得られる直線を検量線とした。検量線には，1/x の重み付け（x：血漿または脳脊髄液中 P092 濃度）を用いた。P092 の各濃度における真度（%RE）を算出した。

$$\text{真度 (\%RE)} = \frac{\text{定量値} - \text{理論値}}{\text{理論値}} \times 100$$

<許容基準>

ブランク及びゼロ試料における P092 及び IS の溶出位置に夾雑ピークが検出されていないこと。検出された場合，夾雑ピークのピーク面積が，LLOQ サンプルの P092 及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%未満であること。

検量線用標準試料溶液の 8 濃度中，定量下限及び上限を含む 6 濃度以上において，%RE が ±15.0%（LLOQ では±20.0%）以内であること。

5.9.3.11 TK 測定時の精度管理

PP 製マイクロチューブにブランク血漿（血漿中濃度測定時）または生理食塩液（脳脊髄液中濃度測定時）20 µL を分取後，水／ギ酸（1000:1，v/v）400 µL を添加し，次表に従い P092 標準試料溶液を 20 µL 添加した。

略称	血漿または脳脊髄液中濃度 (ng/mL)	P092 標準試 料溶液略称
Low QC	10	WS-10

Middle QC	50	WS-50
High QC	800	WS-800

次に示す順に各濃度 2 本（計 6 本）の QC サンプルを測定した。

1. 検量線
2. QC サンプル (Low, Middle 及び High, n=1)
3. TK 測定試料及び脳脊髄液試料
4. QC サンプル (Low, Middle 及び High, n=1)

<許容基準>

6 検体中 4 検体かつ 1 濃度 1 検体以上において %RE が ±15.0% 以内であること。

5.9.3.12 再測定.

雌の初回投与時検体の測定時に、測定終了時の QC サンプルが許容基準を満たさなかったため、再測定を実施した。再測定で得られたデータを採用した。

5.9.3.13 データ解析

検量線の作成及び定量値の算出は、LC-MS/MS 装置付属の解析ソフトウェア「Analyst」(Ver. 1.4.2, AB SCIEX) を用いて行った。

定量値の単位は“ng/mL”として次表に従った。

定量下限未満の定量値は BLQ (Below the lower limit of quantification) と表示し、平均値及び標準偏差算出時は 0 として扱った。同一時点の過半数の定量値が BLQ の場合は、平均値は BLQ と表示し、標準偏差は NC (Not calculated) と表示した。平均値が定量下限未満の場合は、BLQ と表示し、標準偏差は NC と表示した。

項目	表示方法
定量値	MassLynx で算出し、有効数字 3 桁で表示した。
平均値	Microsoft Excel 2003 または Microsoft Excel 2010 で算出し、定量値と同様に有効数字 3 桁で表示した。 ただし、1000 以上の平均値は整数で表示した。
標準偏差	Microsoft Excel 2003 または Microsoft Excel 2010 で算出し、平均値と小数点以下同桁数で表示した。

5.9.4 残余 TK 測定試料及び脳脊髄液試料の処理

測定終了後の残余 TK 測定試料及び脳脊髄液試料は、試験終了時まで廃棄した。

5.10 統計学的解析

主試験群から得られたデータについて以下の統計学的解析を実施した。解析には Provantis システム (INSTEM 社) を用いた。