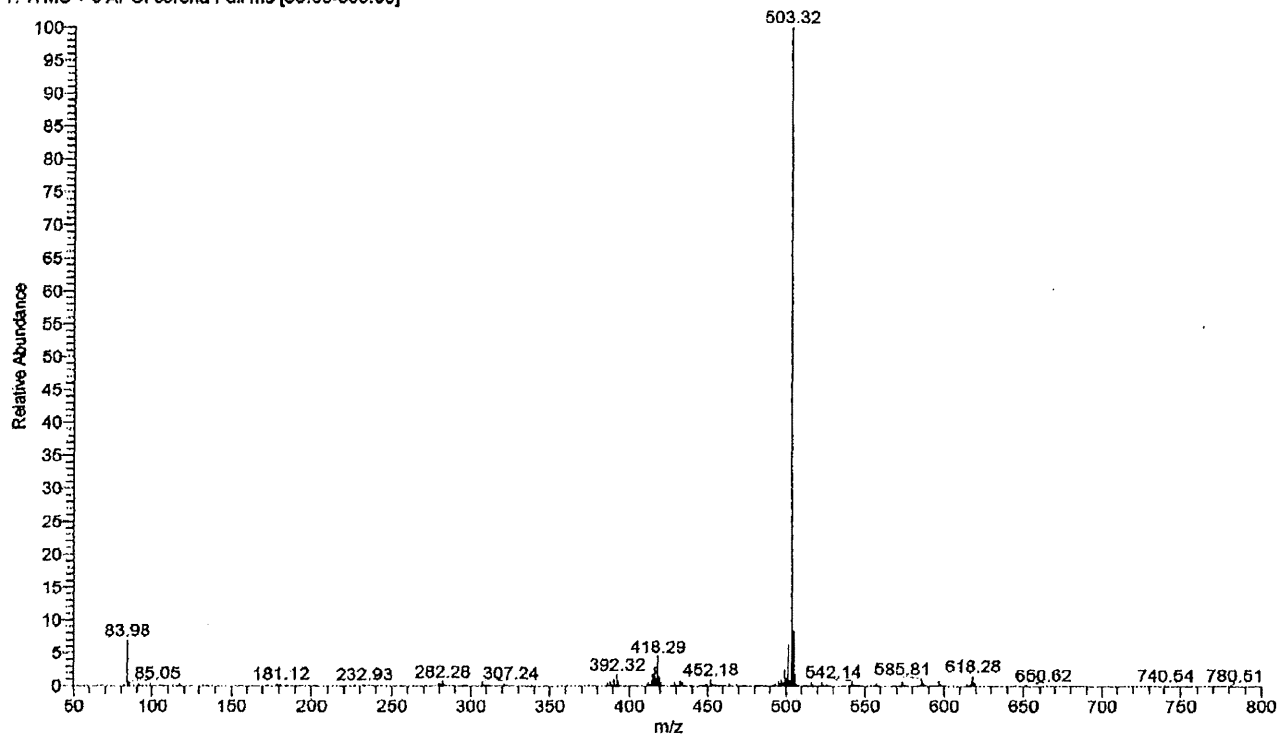
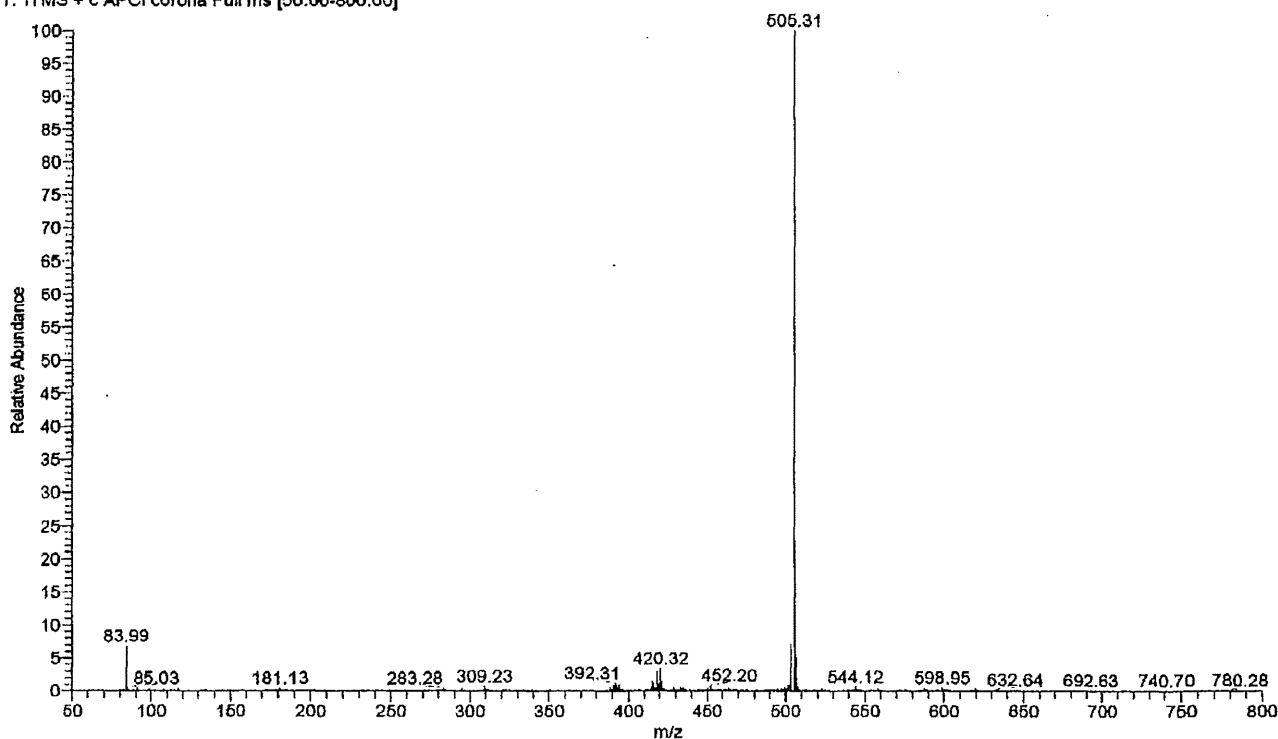


CURACHEM	QC Data of [¹⁴ C]P092 maleate			
MS Chart	R-CODE	C0188	E-NOTE No.	K0262
	DATE	February 21, 2014		

P092 maleate NL: 2.60E5
T: ITMS + c APCI corona Full ms [50.00-800.00]



[¹⁴C]P092 maleate NL: 3.58E5
T: ITMS + c APCI corona Full ms [50.00-800.00]



12. P092 マレイン酸塩の
サルにおける投与用量設定試験及び
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

(株)LSIメディエンス 鹿島研究所

2015年3月18日

試験責任者 大西 康之

最終報告書

P092・マレイン酸塩のサルにおける投与用量設定試験及び
4週間間歇静脈内投与毒性試験

(試験番号：B130235)

株式会社LSIメディエンス

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	8
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	11
5.1	被験物質	11
5.1.1	名称	11
5.1.2	ロット番号	11
5.1.3	換算係数（フリー体）	11
5.1.4	性状	11
5.1.5	提供者	11
5.1.6	保存条件	11
5.2	媒体	11
5.2.1	名称	11
5.3	投与液	11
5.3.1	調製方法及び頻度	11
5.4	試験動物	11
5.4.1	動物種	11
5.4.2	試験系選択の理由	12
5.4.3	購入先	12
5.4.4	仕出国	12
5.4.5	輸入検疫・馴化	12

5.4.6	移管動物数	12
5.4.7	投与開始前検査	12
5.4.8	投与開始時年齢	13
5.4.9	群分け	13
5.4.10	動物の識別	13
5.4.11	余剰動物の取扱	13
5.1	動物飼育	14
5.1.1	飼育室	14
5.1.2	飼育環境	14
5.1.3	飼育器材	14
5.1.4	収容動物数	14
5.1.5	飼料	15
5.1.6	飲用水	15
5.2	投与	15
5.2.1	投与経路・方法	15
5.2.2	投与経路の選択理由	16
5.2.3	投与方法の選択理由	16
5.2.4	投与液量	16
5.3	用量設定予備試験	16
5.3.1	試験デザイン	16
5.3.2	一般状態観察	16
5.3.3	体重測定	16
5.3.4	摂餌量測定	16
5.3.5	血液学的検査	16
5.3.6	血液生化学的検査	17
5.3.7	実験終了後動物の処置	17
5.3.8	予備試験の結果	18
5.4	本試験（4週間間歇静脈内投与試験）	18
5.4.1	試験デザイン	18
5.4.2	群構成	18
5.4.3	観察・検査項目	18
5.4.4	トキシコキネティクス（TK）測定	24
5.4.5	統計学的解析	30
5.4.6	コンピュータシステムの使用	30
6.	結果	31
6.1	死亡・瀕死	31
6.2	一般状態	31
6.3	体重	31
6.4	摂餌量	31

6.5	心電図検査	31
6.6	眼科学的検査	31
6.7	尿検査	32
6.8	血液学的検査	32
6.9	血液生化学的検査	32
6.10	器官重量	32
6.11	病理解剖検査	32
6.12	病理組織学的検査	33
6.13	トキシコキネティクス (TK) 測定	34
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	Electrocardiography - Summary	53
Table 5	Ophthalmologic Examination - Summary	55
Table 6	Urinalysis - Summary	57
Table 7	Hematology - Summary	83
Table 8	Blood Chemistry - Summary	91
Table 9	Organ Weight - Summary	101
Table 10	Necropsy	109
Table 11	Histopathology	112
Table 12	Blood Concentration of P092	125

List of Appendices

Appendix 1	Clinical Sign	130
Appendix 2	Body Weight	147
Appendix 3	Food Consumption	155
Appendix 4	Electrocardiography	179
Appendix 5	Ophthalmologic Examination	187
Appendix 6	Urinalysis	195
Appendix 7	Hematology	219
Appendix 8	Blood Chemistry	243
Appendix 9	Organ Weight	283
Appendix 10	Pathological Findings	315
Appendix 11	Calibration Standard on Each Analytical Day	323
Appendix 12	Clinical Sign (Preliminary study)	324
Appendix 13	Body Weight (Preliminary study)	328

Appendix 14	Food Consumption (Preliminary study)	329
Appendix 15	Hematology (Preliminary study)	332
Appendix 16	Blood Chemistry (Preliminary study).....	347

最終ページ : 350

2. 試験実施概要

2.1 表題

P092・マレイン酸塩のサルにおける投与用量設定試験及び4週間間歇静脈内投与毒性試験

2.2 試験番号

B130235

2.3 試験目的

P092・マレイン酸塩をサルに4週間間歇静脈内投与する際の適切な用量（濃度）を設定し、引き続き4週間間歇投与を行って、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

株式会社L S I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

2.8 試験施設

2.8.1 名称及び所在地

株式会社L S I 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

2.8.2 試験責任者

大西 康之
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 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 : 山田 直明
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 9 月 19 日
【用量設定予備試験】
動物移管 : 2014 年 9 月 22 日
投与 (1) : 2014 年 9 月 25 日
(2) : 2014 年 9 月 29 日
(3) : 2014 年 10 月 2 日
(4) : 2014 年 10 月 6 日
(5) : 2014 年 10 月 14 日
実験終了 : 2014 年 10 月 22 日

【本試験】

動物移管 : 2014 年 10 月 15 日
群分け : 2014 年 10 月 28 日
投与開始 : 2014 年 10 月 29 日
TK 採血 (初回投与時) : 2014 年 10 月 29~30 日
TK 採血 (最終回投与時) : 2014 年 11 月 19 日~20 日
投与期間終了時解剖 : 2014 年 11 月 26 日
試験終了 : 試験責任者署名日

TK : トキシコキネティクス

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、株式会社L S Iメディエンス 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) 試験計画書及び試験計画書変更書
- (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（株式会社L S Iメディエンス 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（承認番号：2014-0494）。

3. 試験責任者署名

表 題： P092・マレイン酸塩のサルにおける投与用量設定試験及び4週間間歇静脈内投与
毒性試験

試験番号： B130235

試験責任者：

2015 年 3 月 18 日

大西 康之



大西 康之

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

安全性研究部

4. 要約

P092・マレイン酸塩をカニクイザルに、0, 1, 10 及び 30 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。1 用量群当たり雌雄各 2 例を用いた。投与速度は約 1 mL/kg/分とし、投与液量は 20 mL/kg とした。被験物質には溶血性があることから、予備検討実験を行って投与可能な濃度について検討した。その結果から、投与液濃度は、静脈内投与した場合に軽度の溶血性を示す 1.5 mg/mL を最高濃度とした（用量としては 30 mg/kg）。投与は橈側皮静脈あるいは伏在静脈から行い、投与日毎に投与部位を変えた。投与開始後、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、心電図検査、眼科学的検査、尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査を行うとともに、第 4 回投与 1 週間後に解剖して、器官重量測定及び病理学的検査を行った。また、初回投与時の投与後 5 分、1, 2, 4, 8 及び 24 時間、第 2 回投与前（初回投与後 7 日）、及び最終回投与の投与前、投与後 5 分、1, 2, 4, 8 及び 24 時間に採血を行って、P092 の血液中濃度を測定した。

被験物質投与の影響は、10 mg/kg 以上の用量群で投与部位に認められた。

一般状態観察では、腫脹あるいは発赤が第 2 回あるいは第 3 回投与部位に認められた。病理解剖検査では、各投与部位で血栓、血管周囲の暗色化、血管周囲の硬化が認められ、病理組織学的検査では、出血、血管内膜の増殖、血管周囲の炎症性細胞浸潤、壊死、潰瘍、及び血栓が認められた。血管周囲の炎症性細胞浸潤は、解剖までの時間が長くなる（左後肢→左前肢→右前肢→右後肢の順）と、頻度が低下する傾向が見られたことから、一連の変化は、回復する可逆性のものと考えられた。これらの炎症性変化に対する反応性の変化として、血液生化学的検査では、 γ -グロブリンの高値が 10 mg/kg 群の雄、脾臓重量の高値が 30 mg/kg 群の雄で認められた。

その他、被験物質の溶血性に関連した変化として、一般状態観察では、血尿が 30 mg/kg 群の雌雄、赤血球数、ヘモグロビン濃度の低下及び網赤血球率の高値が 10 mg/kg 群の雄及び 30 mg/kg 群の雌雄、骨髓（大腿骨、胸骨）における造血細胞の増加が 30 mg/kg 群の雌雄、下顎リンパ節における髓外造血が 10 mg/kg 以上の用量群の雄及び 10 mg/kg 群の雌に認められた。1 mg/kg 群では、いずれの個体にも異常は認められなかった。

血液中の P092 濃度推移については、雌雄ともに C_0 及び AUC_{0-24h} は用量増加に伴い増加した。明確な雌雄間差は認められなかった。投与された P092 は投与 7 日後でも血液中から検出され、また反復投与により、血液中濃度は増加する傾向を示したことから、P092 の蓄積性が示唆された。

以上のごとく、P092・マレイン酸塩を静脈内投与した場合、10 mg/kg 以上の用量では投与部位局所（静脈）に炎症性変化が惹起され、また薬物の溶血性に関連した変化が認められた。従って、本試験条件下では、無毒性量は雌雄ともに 1 mg/kg と結論した。また 10 mg/kg では、投与部位血管において血栓が形成されていることから、本試験条件にてより長期間投与を行う場合は、10 mg/kg よりも低用量で実施する必要があると推察された。

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

FA5QJ-QG

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（実測値：3.9～6.3℃，許容範囲：1℃～10℃），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，ロット番号：K3J72，3H71N）

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．
- (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高濃度液を希釈した．
- (5) 各濃度液の一部を分取し，pH を測定し，記録した（pH 4.13～5.11）．

5.4 試験動物

5.4.1 動物種

カニクイザル (*Macaca fascicularis*)

5.4.2 試験系選択の理由

サル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。

5.4.3 購入先

【用量設定予備試験】

株式会社日本医科学動物資材研究所

【本試験】

日本チャールス・リバー株式会社

5.4.4 仕出国

【用量設定予備試験】

ベトナム社会主義共和国（生産業者：NAFOVANNY）

【本試験】

中華人民共和国（生産業者：GUANGXI WEIMEI BIO-TECH CO., LTD）

5.4.5 輸入検疫・馴化

指定動物（サル）の検査場所指定施設である当試験施設で、30日間以上の輸入検疫期間を含めて検疫・馴化を6週間以上行い、健康状態が良好であることを確認した動物を本試験へ移管した。

5.4.6 移管動物数

【用量設定予備試験】

雄1頭（投薬歴あり）

【本試験】

雌雄各10頭

5.4.7 投与開始前検査

【用量設定予備試験】

動物移管日から初回投与前日まで、一般状態を1日1回、毎日観察するとともに、摂餌量を毎日測定した。また動物移管日に体重を測定した。

【本試験】

動物移管から群分けまでに、以下の検査を実施した。観察及び検査方法は、5.4.3項に従った。

- ・一般状態観察（1日1回）
- ・体重測定（動物移管日、動物移管後7日、群分け日）
- ・摂餌量測定（毎日）

- ・心電図検査（1回）
- ・眼科学的検査（1回）
- ・尿検査（1回）
- ・血液学的検査（1回）
- ・血液生化学的検査（1回）

5.4.8 投与開始時年齢

【用量設定予備試験】

7歳齢

【本試験】

雌雄：4～5歳齢

5.4.9 群分け

【本試験】

(1) 実施日

初回投与日の前日

(2) 動物選抜

投与開始前の検査の結果に基づいて、健康状態が良好であり、毒性評価上問題のないことが確認された動物を選抜した。

(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。雌雄各8匹を本試験に使用した。

5.4.10 動物の識別

個体識別は入れ墨番号（動物生産施設の個体番号）により行った。また、試験に用いる動物番号との対応表を作成して個体管理を行った。

【用量設定予備試験】

動物番号は、29001とした。

【本試験】

群分け前の動物番号は以下の通りとした。

雄 19001～19010, 雌 59001～59010

5.4.11 余剰動物の取扱

余剰動物は投与開始日に試験系から除外し、飼育管理責任者に移管した。

5.1 動物飼育

5.1.1 飼育室

サル飼育室（13152室）

5.1.2 飼育環境

5.1.2.1 温度

24.4～27.2℃（許容範囲：23.0～29.0℃）

5.1.2.2 相対湿度

45.8～76.8%（許容範囲：35.0～75.0%）

ただし、洗浄等の飼育室内作業に伴う一時的な逸脱についてはこの限りではない。

5.1.2.3 換気

10～30回／時、オールフレッシュエアー供給

5.1.2.4 照明時間

12時間／日（7:00～19:00）

5.1.3 飼育器材

5.1.3.1 ケージ

ステンレス製ケージ（680W×608/658D×770H mm，トキワ科学器械株式会社）を使用し，毎日水洗した。

5.1.3.2 給餌器

ステンレス製給餌器（トキワ科学器械株式会社）を使用し，毎日水洗した。

5.1.3.3 給水装置

自動給水装置（トキワ科学器械株式会社）

5.1.3.4 架台

ステンレス製水洗式架台（2段，トキワ科学器械株式会社）を使用し，毎日水洗した。

5.1.3.5 エンリッチメント

動物福祉向上のために，金属製玩具等を使用した。エンリッチメントは毎日水洗した。

5.1.4 収容動物数

1頭／ケージ

5.1.5 飼料

5.1.5.1 種類

サル用固型飼料, CMK-2 (日本クレア株式会社, ロット番号: K2064, K2084)

5.1.5.2 給餌法

制限給餌 (100 g/日, 1回)

投与期間は投与後, その他の期間は 13:00 までに給餌し, 翌朝 (投与日は投与前) に残存している飼料を回収, 廃棄した。ただし, 以下の場合には例外とした。なお, 計画解剖日には給餌しなかった。

13:00 以降に給餌されることがある場合:

- ・ 眼科学的検査日 (十分に麻酔から覚醒したことを確認後に給餌)
- ・ 心電図検査日 (全動物の検査終了後に給餌)

給餌日の夕方 (17:00 前後) に残存している飼料を回収, 廃棄する場合:

- ・ 尿検査の 16 時間尿採取開始日
- ・ 血液学的検査及び血液生化学的検査の前日
- ・ 計画解剖の前日

5.1.5.3 汚染物質の確認

飼料の供給元から分析結果を入手し, 使用する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。

5.1.6 飲用水

5.1.6.1 種類

5 µm フィルター濾過後, 紫外線照射した水道水

5.1.6.2 給水法

自由摂取

ただし, 尿検査のための採尿中は給水を停止した。

5.1.6.3 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。

5.2 投与

5.2.1 投与経路・方法

静脈内投与

シリンジポンプ (テルモ株式会社) 及びディスポーザルシリンジを用いて, およそ 1 mL/kg/分の投与速度で投与した。

5.2.2 投与経路の選択理由

臨床適用経路に準じた。

5.2.3 投与方法の選択理由

被験物質を正確に投与できる。

5.2.4 投与液量

20 mL/kg

各個体の投与液量は投与日に測定した体重に基づいて算出した。

5.3 用量設定予備試験

5.3.1 試験デザイン

本被験物質は溶血性があることから、投与液濃度には限界がある。投与可能な最高濃度を求めるため、1匹のサルに漸増静脈内投与を行った。投与液濃度は順次、0.5, 0.8, 1, 1.5 及び 2.5 mg/mL と漸増させた。各投与は3~8日おきに行った。投与は橈側皮静脈あるいは伏在静脈から行い、投与日毎に投与部位（左右の前肢、後肢）を順に変えた。

5.3.2 一般状態観察

投与日は1日3回（投与前及び投与後に2回）、その他は1日1回、最終投与後8日まで毎日観察した。

5.3.3 体重測定

体重は電子天秤を用いて、各投与日（投与前）に測定した。

5.3.4 摂餌量測定

最終投与後8日まで毎日測定した。給餌の翌朝に残存している飼料の個数を目測して重量換算し、1日あたりの摂取量を算出した。

5.3.5 血液学的検査

各投与日の投与前及び投与翌日に、以下のとおり採血を行い、血液学的検査及び血液生化学的検査（次項）を行った。

採血部位： 大腿静脈

採血量： 約4 mL（血液生化学的検査用血液を含む）

EDTA処理： 血液約1 mLをEDTA-2Kで抗凝固処理した。

血漿採取： 血液1 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, 約4°C）して血漿を採取した。

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
網赤血球率 (%)	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 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	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)

残余検査試料の処理：

残余の血液は、検査終了後に廃棄した。残余血漿は、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。

5.3.6 血液生化学的検査

前項で採取した血液を用いて、以下の項目について検査した。

血漿採取： 血液約 2 mL をヘパリンナトリウムで抗凝固処理後、遠心分離 (約 1750 \times g, 10 分, 約 4°C) して血漿を採取した。

検査項目及び検査方法：

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)
CK (U/L)	UV-rate 法 (JSCC 改良法)
総ビリルビン (mg/dL)	酵素法 (BOD 法)

[測定機器] TBA-200FR (株式会社東芝)

残余検査試料の処理：

残余血漿は、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。

5.3.7 実験終了後動物の処置

最終回投与の翌日の採血後に、ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル, 共立製薬