

株式会社)の静脈内投与による麻酔下で、総頸動脈及び腋窩動静脈から放血して安楽死させた。

5.3.8 予備試験の結果

結果を Appendix 12~16 に示す。

2.5 mg/mL 濃度液では、投与翌日の検査で、貧血様の変化（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低下）、及び ASAT, LDH, CK 及び血清ビリルビンの高値が認められ、強度の溶血が疑われた。一方、1.5 mg/mL 濃度では、同様の傾向は認められるものの、軽度であった。本試験は週 1 回の投与であることを考えると、溶血は起こるものの 1.5 mg/mL 濃度でも繰り返しの投与は可能であると推察された。従って、本試験（4 週間間歇投与試験）の最高用量は、1.5 mg/mL 濃度液を投与した場合の 30 mg/kg とし、以下 10 及び 1 mg/kg を設定した。

5.4 本試験（4 週間間歇静脈内投与試験）

5.4.1 試験デザイン

上述のごとく、用量設定予備試験の結果から、3 用量（1, 10 及び 30 mg/kg）を設定し、週 1 回、4 週間（初回投与日を第 1 日として、第 1, 8, 15, 22 日の計 4 回投与）の間歇投与試験を行った。計画解剖は最終回投与の 1 週間後（第 29 日）に行った。投与は機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（右後肢→右前肢→左前肢→左後肢）を変えた。

5.4.2 群構成

被験物質	投与用量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）	
			雄	雌
Control *	0	0	2 (10101, 10102)	2 (50101, 50102)
P092	1	0.05	2 (10201, 10202)	2 (50201, 50202)
P092	10	0.5	2 (10301, 10302)	2 (50301, 50302)
P092	30	1.5	2 (10401, 10402)	2 (50401, 50402)

* 媒体（生理食塩液）投与

5.4.3 観察・検査項目

日及び週の表記については、初回投与日を第 1 日、第 1~7 日を第 1 週とした。

5.4.3.1 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、投与後）

その他の期間： 1 日 1 回

5.4.3.2 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。

初回投与日（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。

5.4.3.3 摂餌量

動物移管日から剖検前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。

ただし、下記の場合は残餌量測定を給餌日の夕方に行い、1日あたりの摂取量を算出した。

- ・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
- ・計画解剖前日

5.4.3.4 心電図検査

(1) 検査時期

投与開始前に1回、第4週に1回

測定は給餌前に行った。

(2) 検査項目及び検査方法

心電計（α6000AX-D、フクダM・E工業株式会社）を用い、無麻酔下で標準肢誘導（I, II, III）及び増高単極肢誘導（aVR, aVL, aVF）を記録した。

全波形について異常の有無を観察し、第II誘導についてRR間隔、PR間隔、QRS持続時間、QT間隔、心拍数（計算値）、QTc（バゼット法）を測定あるいは算出した。

5.4.3.5 眼科学的検査

(1) 検査時期

投与開始前に1回、第5週に1回

(2) 検査項目及び検査方法

対光反射の検査後、散瞳剤（ミドリンP点眼液、参天製薬株式会社）を点眼し、塩酸ケタミン麻酔下で前眼部、中間透光体及び眼底を観察した。

- ・対光反射：ペンライトを用いて検査
- ・前眼部/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：
 - 双眼倒像検眼鏡（OMEGA 200またはOMEGA 500、Heine Optotechnik）を用いて検査

5.4.3.6 尿検査

(1) 検査時期

投与開始前に1回, 第4週に1回

(2) 検査試料採取

採尿トレーを用いて以下の通り尿を採取した。尿採取時には動物への給水を停止した。

新鮮尿： 検査日の午前中に新鮮尿（最長3時間の蓄積尿）を採取した。

16時間尿： 新鮮尿採取日の夕方（17:00前後）から翌朝（9:00前後, 投与期間は投与前）までの約16時間, 蓄尿した。

(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。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16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*)
ウロビリノーゲン (EU/dL)	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, 室温]
色調	目視法
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, 試験終了時まで廃棄した。その他の残余の尿は検査終了後に廃棄した。

5.4.3.7 血液学的検査

(1) 検査時期

投与開始前に1回, 第4週に1回

(2) 検査試料採取

以下の通り採血及び処理を行い、検査試料を得た。

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。

(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)

(4) 残余検査試料の処理

残余の血液及び血漿は、検査終了後に廃棄した。

5.4.3.8 血液生化学的検査**(1) 検査時期**

投与開始前に 1 回, 第 4 週に 1 回

(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 1mL を室温で 30~60 分間静置後、遠心分離 (約 1750×g, 10 分, 約 4°C) して血清を採取した。

血漿採取： 血液約 1 mL をヘパリンナトリウムで抗凝固処理後、遠心分離 (約 1750×g, 10 分, 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)
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及び総蛋白より算出
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)

(4) 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。

5.4.3.9 病理学的検査

5.4.3.9.1 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		器官重量		病理組織検査	
		側性		側性		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	○	-	-	-	○	-

器官・組織	採材 側性	器官重量 側性	病理組織検査 側性
回腸	パイエル板を含む ○ -	- -	○ -
盲腸	○ -	- -	○ -
結腸	○ -	- -	○ -
直腸	○ -	- -	○ -
唾液腺	耳下腺 ○ 両側	- -	○ 片側
	顎下腺 ○ 両側	○ 左右別	○ 片側
	舌下腺 ○ 両側	- -	○ 片側
肝臓/胆嚢	○ -	○ -	○ -
膵臓	○ -	- -	○ -
腎臓	○ 両側	○ 左右別	○ 片側
膀胱	○ -	- -	○ -
精巣	○ 両側	○ 左右別	○ 片側
精巣上皮	○ 両側	- -	○ 片側
精嚢	○ -	○ -	○ -
前立腺	○ -	○ -	○ -
下垂体	○ -	○ -	○ -
甲状腺/上皮小体	○ 両側	○ 左右別	○ 片側
副腎	○ 両側	○ 左右別	○ 片側
大腿骨/骨髄	○ 片側	- -	○ 片側
胸骨/骨髄	○ -	- -	○ -
皮膚/乳腺	○ -	- -	○ -
眼球/視神経	○ 両側	- -	○ 片側
涙腺	○ 両側	- -	○ 片側
脳	○ -	○ -	○ -
脊髄	頸部 ○ -	- -	○ -
	胸部 ○ -	- -	- -
	腰部 ○ -	- -	- -
卵巣	○ 両側	○ 左右別	○ 両側
子宮	○ -	○ -	○ -
膣	○ -	- -	○ -
大動脈	胸部 ○ -	- -	○ -
骨格筋/坐骨神経	大腿部 ○ 片側	- -	○ 片側
投与部位 (4箇所)	○ -	- -	○ -
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

5.4.3.9.2 病理解剖検査

第29日に解剖した。

ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル，共立製薬株式会社）の静脈内投与による麻酔下で，総頸動脈及び腋窩動静脈から放血して安楽死させた後に剖検した。

5.4.3.9.3 器官重量

計画解剖時に5.4.3.9.1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別々に測定し、両側の重量を算出した。また、解剖日の体重に基づいて相対重量（対体重比）を算出した。

5.4.3.9.4 病理組織学的検査

(1) 器官・組織の採材及び保存

計画解剖時に 5.4.3.9.1 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、眼球及び視神経はダビドソン液でそれぞれ固定後、10 vol% リン酸緩衝ホルマリン液で保存した。

(2) 標本作製及び鏡検

採取及び固定した全ての器官・組織を標本作製施設に送付し、定法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本（H.E.標本）を作製した。

【標本作製施設】

株式会社 バイオ病理研究所

〒873-0511 大分県国東市国東町小原 1200-2

TEL : 0978-72-0454, FAX : 0978-72-2320

ホルマリン浸漬標本、パラフィンブロック、ヘマトキシリン・エオジン染色標本、標本作製の記録及び標本の引渡し書類を標本作製施設から入手し、5.4.3.9.1 項に示した器官・組織について、鏡検した。

5.4.4 トキシコキネティクス（TK）測定

5.4.4.1 採血

全群の全動物から以下の通り採血し、血液（TK 測定試料）を得た。ただし、対照群については同様に採血を行ったが、血液はその場で廃棄した。

(1) 採血時点

初回投与時（第 1 日）： 投与後 5 分, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間

第 2 回投与時： 投与前

最終回投与時（第 22 日）： 投与前並びに投与後 5 分, 1, 2, 4, 8 及び 24 時間

(2) 採血方法

採血量： 約 1 mL/時点

採血部位： 橈側皮静脈あるいは大腿静脈

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、その後、約-80°C（実測値：-88.9～-84.2°C，許容範囲：-60°C 以下）で保存した。

5.4.4.2 血液中 P092 濃度の測定方法

5.4.4.2.1 測定対象標準物質

被験物質（5.1 項）を使用した。

5.4.4.2.2 内標準物質（IS）

名称： Boc-Met-Leu-Phe-OH
 ロット番号： 1052898
 製造元： BACHEM
 安定性の確認： 実施しない。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

5.4.4.2.3 ブランクマトリックス

<血液>

動物種： カニクイザル
 投与歴： なし
 抗凝固剤： ヘパリンナトリウム
 入手先： ハムリー株式会社
 保存条件： 約-20°C（許容範囲：-40~-15°C）

5.4.4.2.4 試薬

試薬類は市販の特級以上の試薬を使用した。

水は超純水製造装置（MILLI-Q Integral 5, メルク株式会社）で精製したものをを用いた。

5.4.4.2.5 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（実測値：4.1～6.2°C，許容範囲：1～10°C）し、使用期限は調製後 97 日間とした。使用時は室温に戻した。

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

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-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
WS-5	5	WS-50	100	900

* : マイクロピペットを使用

5.4.4.2.6 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て IS 試料溶液 (500 ng/mL, ISWS) を調製した。

IS 試料原液及び溶液は褐色ガラス製容器にて冷蔵・遮光保存 (実測値 : 4.1~6.2 $^{\circ}$ C, 許容範囲 : 1~10 $^{\circ}$ C) した。使用時は室温に戻した。

IS 溶液略称	IS 溶液濃度 (ng/mL)	使用 IS 原液 略称	使用量 (mL) ^{*1}	全量 (mL) ^{*2}
ISWS	500	ISSS	0.5	100

*1 : ガラス製ホールピペットを使用

*2 : ガラス製褐色メスフラスコを使用

5.4.4.2.7 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液 20 μ L を分取後、ISWS 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

5.4.4.2.8 血液試料の前処理方法（分析フロー）

操作は氷冷下で実施した。

- (1) PP 製マイクロチューブに血液 20 μL を分取した。
- (2) ISWS（ブランク試料調製時はメタノール）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) ミキサーを用いて攪拌した。
- (5) 遠心分離（20,400 \times g, 1 min, 4 $^{\circ}$ C）した。
- (6) 上清 30 μL を分取した。
- (7) 10 mmol/L ギ酸アンモニウム／メタノール（3:7, v/v）250 μL を添加，攪拌後，次項に従い測定した。

5.4.4.2.9 分析条件

装置

HPLC : ACQUITY Ultra Performance LC (Waters Corporation)
質量分析装置 : API 4000 (AB SCIEX)

HPLC 条件

カラム : InertSustain C18 (2 μm , 2.1 mm I.D. \times 50 mm, GL Science Inc.)
カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C
移動相 A : 10 mmol/L ギ酸アンモニウム
移動相 B : メタノール／28%アンモニア水溶液（1000:1, v/v）

グラジエント条件 :

Time (min)	A (%)	B (%)
Initial	30	70
0.50	10	90
0.51	2	98
1.10	2	98
1.11	30	70
1.20	30	70

流速 : 0.7 mL/min
注入量 : 5 μL
オートサンプラ設定温度 : 4 $^{\circ}$ C
ニードル洗浄溶媒 : メタノール／28%アンモニア水溶液（100:1, v/v）

MS/MS 条件

Ionization method :	ESI (Electrospray Ionization)
Polarity :	Positive
Scan type :	MRM (Multiple reaction monitoring)
Ion spray voltage (IS) :	5500 V
Heater gas temperature (TEM) :	400°C
Nebulizer gas (GS1) :	Air, 50 psi
Heater gas (GS2) :	Air, 85 psi
Curtain gas flow (CUR) :	N ₂ , 35 psi
Collision gas flow (CAD) :	N ₂ , 4
Entrance potential (EP) :	10 V
Monitor ion :	P092: m/z 252 > 84 IS: m/z 510 > 217

5.4.4.2.10 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， $1/x^2$ の重み付け（x：血液中 P092 濃度）を用いた。P092 の各濃度における真度（%）を算出した。

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

<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%以下であること。

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，真度が ±15.0%（LLOQ では±20.0%）以内であること。

いずれの測定においても，検量線は許容基準を満たした（Appendix 11）。

5.4.4.2.11 TK 測定試料の希釈

血液中 P092 濃度が検量線の最高濃度を超えると予想される場合は，TK 測定試料を予めブランク血液で希釈して測定した。また，定量値が検量線の最高濃度を越えた場合は，TK 測定試料をブランク血液で希釈して再測定した。

5.4.4.2.12 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液 20 μ L を分取後、ISWS 400 μ L を添加し、次表に従い P092 標準試料溶液を 20 μ L 添加した。

略称	血液中濃度 (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
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 検体以上において真度が $\pm 15.0\%$ 以内であること。
いずれの測定においても、許容基準を満たした（Appendix 11）。

5.4.4.2.13 再測定

定量値が検量線の最高濃度を超えた場合は、TK 測定試料をブランク血液で希釈して再測定した。

5.4.4.2.14 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。

項目	表示方法
定量値	MassLynx で算出し、有効数字 4 桁で表示。
平均値	Microsoft Excel 2010 で算出し、定量値と同様に有効数字 4 桁で表示。 ただし、10000 以上の平均値は整数で表示。
標準偏差	Microsoft Excel 2010 で算出し、平均値と小数点同桁数で表示。

5.4.4.2.15 TK パラメータ算出

血液中 P092 濃度推移を薬物動態解析ソフトウェア Phoenix WinNonlin Ver. 6.3（Pharsight Corporation as part of Certara）の Non-compartmental analysis により解析し、下記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		算出方法	
最終報告書での表記	WinNonlin での表記		
C ₀	時間0に外挿した初期血漿中濃度	C0	—
t _{1/2}	消失半減期	HL_Lambda_z	計算に使用する時点は, WinNonlin による自動設定とした.
AUC _{0-24h}	血漿中濃度-時間曲線下面積	AUCall	24 時間までを台形法で算出した.

5.4.4.3 残余 TK 測定試料の処理

測定終了後の残余 TK 測定試料は, 試験終了時まで廃棄した.

5.4.5 統計学的解析

1 用量群あたり 2 例であることから, 統計学的解析は実施しなかった.

5.4.6 コンピュータシステムの使用

5.4.6.1 使用したコンピュータシステム

Provantis システム (INSTEM 社)

5.4.6.2 コンピュータシステムのプロトコール番号

【用量設定予備試験】

B130235A

【本試験】

B130235S (群分け前)

B130235 (群分け以降)

コンピュータプロトコールにはデータ収集範囲, データ収集の日程等を登録した.

6. 結果

6.1 死亡・瀕死

結果を Table 1 及び Appendix 1 に示す。

死亡、瀕死動物は、試験期間を通じて認められなかった。

6.2 一般状態

結果を Table 1 及び Appendix 1 に示す。

10 mg/kg 群の雄 1 例（動物番号：10302）で、第 2 回投与部位（右前肢）に腫脹及び発赤が投与翌日より認められ、同様の変化は第 3 回投与部位（左前肢）にも投与後より認められた。

30 mg/kg 群の雄 1 例（動物番号：10402）では、腫脹が第 3 回投与部位（左前肢）に投与翌日より認められた。

また血尿が、30 mg/kg 群の雌雄各 1 例（動物番号：10401, 50402）で初回投与日の投与後に、雌 1 例（動物番号：50401）では、第 3 回投与日の投与後に認められた。

6.3 体重

結果を Table 2 及び Appendix 2 に示す。

投与期間を通して、いずれの用量群においても対照群と同等に推移した。

6.4 摂餌量

結果を Table 3 及び Appendix 3 に示す。

投与期間を通して、いずれの用量群においても被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

6.5 心電図検査

結果を Table 4 及び Appendix 4 に示す。

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

6.6 眼科学的検査

結果を Table 5 及び Appendix 5 に示す。

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

Table 5 及び Appendix 5 に示した変化は、投与開始前から認められているものであり、サルではしばしば認められる変化であることから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

6.7 尿検査

結果を Table 6 及び Appendix 6 に示す。

いずれの検査項目においても、被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

6.8 血液学的検査

結果を Table 7 及び Appendix 7 に示す。

第4週検査において、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、10mg/kg 群の雄及び30 mg/kg 群の雌雄で認められた。またヘマトクリット値の低下が30 mg/kg 群の雌雄で認められた。

6.9 血液生化学的検査

結果を Table 8 及び Appendix 8 に示す。

第4週検査において、 γ -グロブリンの高値が10 mg/kg 群の雄1例（動物番号：10302）で認められた。

6.10 器官重量

結果を Table 9 及び Appendix 9 に示す。

脾臓重量の高値が、30 mg/kg 群の雄1例（動物番号：10401）で認められた。

6.11 病理解剖検査

結果を Table 10 及び Appendix 10 に示す。

10 及び 30 mg/kg 群で投与部位に変化が認められた。

右後肢投与部位： 血管周囲の暗赤色化が10 mg/kg 群の雌1例、血栓が30 mg/kg 群の雌1例に認められた。

右前肢投与部位： 血栓が10 及び 30 mg/kg 群の雌各1例に認められた。

左前肢投与部位： 血管周囲の硬化が10 mg/kg 群の雄1例、血栓が10 mg/kg 群の雌2例、30 mg/kg 群の雌雄各1例、血管周囲の結節が30 mg/kg 群の雄1例に認められた。

左後肢投与部位： 血栓が10 mg/kg 群の雄2例、30 mg/kg 群の雌1例、暗赤色化が30 mg/kg 群の雌1例に認められた。

なお、10 及び 30 mg/kg 群の雄各1例（動物番号：10302、10401）に脾臓の腫大が認められたが、病理組織学的検査において異常所見は認められなかったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。このほか認められた変化は、カニクイザルでは非特異的に発現する変化であり、被験物質とは関連のない変化と判断した。

6.12 病理組織学的検査

結果を Table 11 及び Appendix 10 に示す。

10 及び 30 mg/kg 群で投与部位に変化が認められた。

右後肢投与部位： 出血が 30 mg/kg 群の雄，10 mg/kg 以上の用量群の雌に認められた。血管内膜の増殖が 10 mg/kg 以上の用量群の雄，30 mg/kg 群の雌に認められた。血管周囲の炎症性細胞浸潤が 30 mg/kg 群の雄で認められた。

右前肢投与部位： 出血が 30 mg/kg 群の雌に認められた。血管内膜の増殖が 30 mg/kg 群の雄，10 mg/kg 以上の用量群の雌に認められた。血管周囲の炎症性細胞浸潤が 10 mg/kg 以上の用量群の雄で認められた。

左前肢投与部位： 壊死が 10 mg/kg 以上の用量群の雄に認められた。いずれの動物も，壊死は血管壁および血管周囲結合組織に認められた（グレード2または4）。潰瘍が 10 mg/kg 群の雄に認められた。出血が 10 mg/kg 以上の用量群の雄，10 mg/kg 群の雌に認められた。血栓が 10 mg/kg 群の雌に認められた。血管内膜の増殖が 30 mg/kg 群の雄，10 mg/kg 以上の用量群の雌に認められた。血管周囲の炎症性細胞浸潤が 10 mg/kg 以上の用量群の雌雄で認められた。

左後肢投与部位： 壊死が 30 mg/kg 群の雌雄に認められた。このうち，雄に認められた壊死は血管内膜に限局し（グレード1），雌に認められた壊死は血管周囲結合組織にも広がっていた（グレード2）。出血が 10 mg/kg 以上の用量群の雄，30 mg/kg 群の雌に認められた。血栓が 10 mg/kg 群の雄，30 mg/kg 群の雌に認められた。血管内膜の増殖が 10 mg/kg 以上の用量群の雄，10 mg/kg 群の雌に認められた。血管周囲の炎症性細胞浸潤が 10 mg/kg 以上の用量群の雌雄で認められた。

以下にまとめ表を記す。（ ）内は雄：雌の発現例数を示す。

所見	右後肢				右前肢				左前肢				左後肢			
	mg/kg:				0	1	10	30	0	1	10	30	0	1	10	30
出血	—	—	0:1	1:1	—	—	—	0:1	—	—	1:2	2:0	—	—	2:0	1:2
血管内膜の増殖	—	—	1:0	1:1	—	—	0:1	1:1	—	—	0:1	1:2	—	—	1:1	1:0
炎症性細胞浸潤 (血管周囲)	—	—	—	1:0	—	—	1:0	1:0	—	—	1:2	2:1	—	—	1:1	1:2
壊死 (血管壁, 周囲組織)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:0	1:0	—	—	—	1:1
潰瘍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:0	—	—	—	—	—
血栓	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0:1	0:0	—	—	1:0	0:1

投与部位以外の変化として、骨髄（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髄外造血が 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。

以上のほかに、種々の組織変化が対照群を含む各群で認められた。しかし、それらはカニクイザルでは非特異的に発現する変化であること、その発現状況に明らかな群間差が認められないことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。病理解剖検査において、10 及び 30 mg/kg 群の雄各 1 例（動物番号：10302, 10401）で脾臓の腫大がみられたが、これら脾臓に組織学的異常は認められなかった。

6.13 トキシコキネティクス（TK）測定

結果を Table 12 及び Appendix 11 に示す。

初回投与時の血液中薬物濃度測定では、雌雄ともに C_0 及び AUC_{0-24h} は用量増加に伴い増加した。 $t_{1/2}$ は、9.2～17.8 時間であり、用量間に明確な差はみられなかった。明確な雌雄間差は認められなかった。

投与後 7 日（第 2 回投与前、第 8 日）でも血液中より P092 は検出され、代謝、排泄には時間がかかるものと考えられた。

最終回投与時では、初回投与時と比べて C_0 及び AUC_{0-24h} ともに増加し、また $t_{1/2}$ は延長する傾向がみられたことから、P092 の蓄積性が示唆された。

7. 考察

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。

被験物質の影響は、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、血栓、血管周囲の暗色化、血管周囲の硬化が認められた。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 10mg/kg 群の雄及び 30 mg/kg 群の雌雄、ヘマトクリット値の低下が 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 は投与後 7 日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。

Key Page

Code	Description
BD	Before dosing
T10	After dosing

Table 1

Clinical Sign - Summary

B130235

Group	Sex	Clinical Sign	Day numbers relative to Start Date																				
			1 BD	1 T10	2 Day	3 Day	4 Day	5 Day	6 Day	7 Day	8 BD	8 T10	9 Day	10 Day	11 Day	12 Day	13 Day	14 Day	15 BD	15 T10	16 Day	17 Day	18 Day
1	m	ANIMALS ALIVE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		ANIMALS NORMAL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	m	ANIMALS ALIVE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		ANIMALS NORMAL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	m	ANIMALS ALIVE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		ANIMALS NORMAL	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Erythema	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Swelling	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	m	ANIMALS ALIVE	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
		ANIMALS NORMAL	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
	Swelling	1	1	1	1
	Hematuria	.	1	1	.	.	.

- 893 -

Group 1 - 0 mg/kg Group 2 - 1 mg/kg Group 3 - 10 mg/kg Group 4 - 30 mg/kg