

6. 材料及び方法

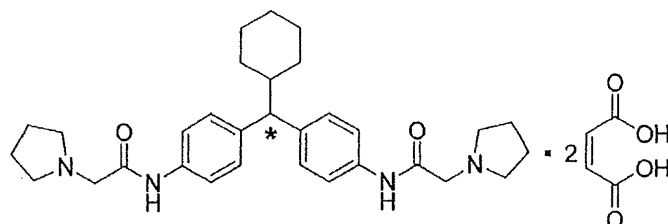
6.1 被験物質

6.1.1 標識化合物

6.1.1.1 名称

[¹⁴C]P092 maleate ([¹⁴C]P092・マレイン酸塩)

6.1.1.2 構造式及び標識位置



* : ¹⁴C 標識位置

6.1.1.3 分子量

736.70 (at this specific activity)

6.1.1.4 ロット番号

K0262-16

6.1.1.5 純度 (含量)

98.2%

6.1.1.6 比放射能

58.4 mCi/mmol (2.933 MBq/mg)

6.1.1.7 放射化学的純度

98.5%

6.1.1.8 性状

White Solid

6.1.1.9 換算係数 (フリー体)

1.493 (分子量比 フリー体 : マレイン酸塩 = 1 : 1.493)

6.1.1.10 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.1.1.11 入手量

1850 MBq

6.1.1.12 保存条件

冷凍（-80°C，許容範囲：-60°C以下），遮光，気密容器

6.1.1.13 取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋着用

6.1.1.14 残余被験物質の処理

残余の被験物質は関連する薬物動態試験（試験番号：B140810，株式会社L S Iメディエンス 鹿島研究所）に移管する。

6.1.2 非標識化合物

6.1.2.1 名称

P092・マレイン酸塩

6.1.2.2 ロット番号

CMTPG-RQ

6.1.2.3 換算係数（フリー体）

1.493

6.1.2.4 性状

白色の粉末

6.1.2.5 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.1.2.6 入手量

約 20 g

6.1.2.7 保存条件

冷蔵（許容範囲：1～10°C），遮光，密封（窒素封入）

6.1.2.8 取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋着用

6.1.2.9 残余被験物質の処理

残余の被験物質は関連する薬物動態試験（試験番号：B140810，株式会社L S I メディエンス 鹿島研究所）に移管する。

6.2 媒体

局方生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）

6.3 投与液

6.3.1 調製方法及び頻度

投与液は，以下の手順で投与当日に1回調製した。調製は紫外線をカットした蛍光灯下で行った。

- (1) [^{14}C]P092・マレイン酸塩及び P092・マレイン酸塩をフリー体換算（1.493 を乗じた）した後，正確に秤量した（いずれも 22.4 mg，フリー体として 15.0 mg）。
- (2) 媒体を 15 mL 加え，スターラーで攪拌しつつ溶解させた（フリー体換算濃度：2.0 mg/mL）。
- (3) 0.22 μm のフィルターでろ過，滅菌した。
- (4) 投与液の一部を分取し，pH を測定した（実測値：pH 3.969）。
- (5) 使用後の投与液は冷蔵（許容範囲：1~10°C）条件下で保管し，試験終了時まで廃棄した。

6.3.2 放射能濃度の測定

投与前及び投与終了後に適量の投与液（ $n = 3$ ）を分取，秤量し，6.8 項において放射能濃度を測定した。放射能濃度の平均値が設定濃度の 90.0~110.0% の範囲内であること並びに測定時の変動係数（CV%）が 5.0% 以内であることを確認した。

6.3.3 放射化学的純度の確認

投与終了後に放射化学的純度を測定した。

投与液の一部（50 μL ）を 570 μL のアセトニトリル/水（1:1, v/v）で希釈したのち，下記の HPLC 分析条件により測定した（ $n = 1$ ）。このサンプルのラジオクロマトグラムと P092・マレイン酸塩標準溶液（0.1 mg/mL）を同条件の HPLC で測定したときの UV クロマトグラムを比較して，[^{14}C]P092・マレイン酸塩の保持時間（Rt）が P092・マレイン酸塩の Rt に相当することを確認した。P092・マレイン酸塩標準溶液は冷蔵（許容範囲：1~10°C）条件下で保管した。HPLC 測定で得られたラジオクロマトグラムにおいて検出された放射能ピークの総和に対する [^{14}C]P092・マレイン酸塩溶出部分の放射能ピークの割合を放射化学的純度として求めた。

HPLC 測定において，シンチレーションカクテルを含む全溶出液を回収し，その一部について 6.8 項において放射能を測定した。この溶出液中の放射能と，注入した試料中の放射能（6.8 項において測定）の値を用いて，次式により HPLC カラムからの放射能の回収率（カラム回収率）を求めた。

$$\text{カラム回収率 (\%)} = \frac{\text{溶出液中放射能濃度 (dpm/g)} \times \text{溶出液全量 (g)}}{\text{注入試料中放射エネルギー (dpm)}} \times 100$$

【HPLC 条件】

ラジオ HPLC システム	L-2000 シリーズ (日立ハイテクノロジーズ) Radiomatic 625TR (PerkinElmer)
分析カラム	Inertsil ODS-2, 5 µm, 4.6mm I.D. × 250 mm (ジールサイエンス)
カラム温度	40°C
移動相	A = 0.2% TFA Water B = Acetonitrile
グラジエント	Time 0 20 50 50.1 60 %B 20 60 60 20 20
Injection volum	10 µL
分析時間	60 分
流速	1.0 mL/min
検出	UV 254 nm 放射能 (液体シンチレーションシステム) セル容量 : 0.5 mL シンチレーションカクテル : Flo-Scint II (PerkinElmer) シンチレータ流速 : 3.0 mL/min 積算時間 : 6 秒

6.4 試験動物

6.4.1 動物種

カニクイザル (*Macaca fascicularis*)

6.4.2 選択の理由

本化合物の薬理及び安全性試験にも使用されており, 試験結果の相互理解と解釈に有益なため。

6.4.3 購入先

日本チャールス・リバー

6.4.4 支出国

中華人民共和国

6.4.5 使用動物数

雄 3 匹

6.4.6 検疫・馴化

6.4.6.1 入荷日

2013年8月6日

6.4.6.2 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。

6.4.7 動物移管日

2014年7月4日

6.4.8 環境馴化

動物移管後、一般状態及び摂餌量を6日間観察して健康状態が良好であることを確認したのち、出生日の早い順に動物番号を付与し、投与に供した。

6.4.9 投与時年齢

4年齢

6.4.10 投与時体重

3.60～4.34 kg

6.4.11 動物の個体識別

動物供給業者による入れ墨番号により個体識別を行った。また、本試験に用いる動物番号との対応表を作成し、管理した。移管後の馴化期間中のケージには、試験番号、移管日、移管時年齢、入れ墨番号、個体番号、ケージ番号、動物種、性別、飼料の種類、馴化期間中である旨を記載したラベルを貼付した。

動物番号付与後のケージには、試験番号、被験物質名、試験の種類、投与経路、用量、食餌条件、入れ墨番号、動物種、性別、動物番号を記載したラベルを貼付した。

6.4.12 瀕死動物の処置

瀕死動物あるいは試験責任者が安楽死を必要と判断した動物はいなかった。

6.5 動物飼育

6.5.1 飼育室

5133室

6.5.2 飼育環境

6.5.2.1 温度

許容範囲：23.0～29.0℃

6.5.2.2 相対湿度

許容範囲：35.0%～75.0%

6.5.2.3 換気

10～30回／時間，オールフレッシュエアー供給

6.5.2.4 照明時間

12時間／日（7:00～19:00）点灯

ただし，投与後10時間の採血の際は点灯した。

6.5.2.5 収容動物数

1匹／ケージ

6.5.3 飼育器材

6.5.3.1 ケージ

ステンレス製代謝ケージ（600W×600D×620H mm，トキワ科学器械）

6.5.3.2 給餌器

ステンレス製給餌器（トキワ科学器械）を使用し，毎日洗浄した。

6.5.3.3 給水瓶

ポリカーボネート製給水瓶（500 mL，トキワ科学器械）を使用し，毎日洗浄した。

6.5.4 飼料

6.5.4.1 種類

サル用固型飼料，CMK-2（日本クレア）

6.5.4.2 給餌法

毎日午前中に，1匹当たり約100gの飼料を給餌し，翌日に残餌を回収，廃棄した。移管日は移管後に給餌した。

6.5.4.3 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。

6.5.5 飲用水

6.5.5.1 種類

5 µm フィルター濾過後、紫外線照射した水道水

6.5.5.2 給水法

自由摂取。新鮮な飲用水に毎日交換した。

6.5.5.3 分析

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。

6.6 投与

6.6.1 投与経路・方法

動物をモンキーチェアー（CL-4535、日本クレア）に保定し、翼付注射針（25G×3/4”、ニプロ）及びディスポーザブルシリンジ（2.5 mL、テルモ）を用いて、2 mL/min の投与速度で伏在静脈内に投与した。

なお、動物番号 01101 は、投与後 30 分の採血終了までモンキーチェアーに保定し、以降は代謝ケージに戻した。

6.6.2 投与経路の選択理由

予定臨床投与経路準じる。

6.6.3 投与方法の選択理由

カニクイザルに静脈内投与する方法として一般的に用いられており、被験物質を正確に投与できる。

6.6.4 投与回数

単回

6.6.5 投与用量及びその設定理由

1 mg/2.19 MBq/0.5 mL/kg（P092 フリー体換算用量）

[¹⁴C]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（試験番号 B140398、株式会社 L S I メディエンス）における静脈内投与（Bolus）の用量である 1 mg/kg を設定した。

6.6.6 投与液量

投与当日に測定した体重に基づいて算出した。

投与液を採取した投与器材の重量を測定し、投与したのち投与器材重量を測定して、投与前後の重量差から投与実績重量を算出した。

6.7 群構成

試験項目及び群構成を下表に示す。

試験項目	投与経路	用量 (フリー体換算), 投与液量	採取 時点	評価 動物数	動物番号
6.7.1 血液及び血漿中放射能濃度の測定	IV	1 mg/0.5 mL/kg	-	1	01101 ^{*1}
6.7.2 尿及び糞中放射能排泄率の測定					
6.7.3 組織中放射能濃度の測定	IV	1 mg/0.5 mL/kg	1 hr	1	02102 ^{*2}
			24 hr	1	03103 ^{*3}
			168 hr	1	01101 ^{*1}

- : 経時的に試料を採取した。

*1 : 6.7.1 項における最終時点の試料を採取したのち、6.7.3 項において組織中放射能濃度を測定した。

*2 : 動物番号 02102 については、6.7.1 項において投与後 1 時間に血漿を採取した。

*3 : 動物番号 03103 については、6.7.1 項において投与後 1, 4 及び 24 時間に血漿を採取した。

6.7.1 血液及び血漿中放射能濃度の測定

動物番号 01101 においては、投与後、下記の採取時点毎に非麻酔下で橈側皮静脈あるいは大腿静脈から約 0.5mL (投与後 120 時間まで) 又は約 5mL (投与後 168 時間) を採血した。

【採取時点】

投与終了後 5 分, 15 分, 30 分, 1, 2, 4, 8, 10, 24, 48, 72, 120, 168 時間

動物番号 02102 においては、投与後 1 時間に非麻酔下で大腿静脈から約 5 mL を採血した。

血液は採血管 (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, 5mL, テルモ) に採取, 混合した。放射能測定用試料として血液 0.1mL (n=1) をコンバストパッド (PerkinElmer) に分取して 6.8 項において放射能を測定し, 血液中放射能濃度を求めた。残りの血液は遠心分離 (4°C, 3,000 rpm×10 min, CF7D2, 日立工機) し, 血漿を得た。所定量の血漿 0.1mL (n=1) をコンバストパッドに分取して 6.8 項において放射能を測定し, 血漿中放射能濃度を求めた。

動物番号 03103 においては、投与後 1, 4 及び 24 時間に非麻酔下で大腿静脈から 3 mL を採血した。血液は採血管 (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, 5 mL) に採取, 混合した。放射能測定用試料として血液 0.1 mL (n=1) をコンバストパッドに分取して 6.8 項において放射能を測定し, 血液中放射能濃度を求めた。

血液試料の一部をヘマトクリット毛細管 (日電理化硝子) に採取 (n=1) し, 遠心分離 (常温, 12,000rpm×5min, MC-150, トミー精工) してヘマトクリット値を測定した。

残りの血液は遠心分離 (4°C, 3,000 rpm×10 min, CF7D2) し, 血漿を得た。血漿 0.1mL (n=1) をコンバストパッドに分取して 6.8 項において放射能を測定し, 血漿中放射能濃度を求めた。

血液中放射能濃度 (C_b)、血漿中放射能濃度 (C_p) 及びヘマトクリット値 (H_t) の測定結果から、次式により放射能の血球移行率 (T) 及び血漿中放射能濃度に対する血液中放射能濃度の比 (R_B 値) を算出した。なお、 T/P 比、 T 及び R_B 値の算出には Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) を用いた。

$$T(\%) = (1 - C_p / C_b \times [100 - H_t] / 100) \times 100$$

$$R_B = C_b / C_p$$

血漿分離後の血球は廃棄した。

6.7.2 尿及び糞中放射能排泄率の測定

動物番号 01101 においては、以下に示す採取区間毎に自然排泄尿及び糞を分別採取した。尿の採取区間毎に、ケージ内面を精製水 (約 500 mL) で洗浄しケージ洗浄液 (精製水) として採取した。最終試料採取後 (投与後 168 時間) においてはケージ洗浄液 (精製水) を回収したのち、さらに約 500 mL のメタノールでケージ内面を洗浄し、ケージ洗浄液 (メタノール) として採取した。採取した尿、糞及びケージ洗浄液を 6.8 項において放射能を測定し、各放射能排泄率を求めた。

最終試料採取後 (投与後 168 時間) の動物は 6.7.3 項に供した。

【採取区間 (採取時点)】

尿：投与後 0～8, 8～24, 24～48, 48～72, 72～96, 96～120, 120～144, 144～168 時間

糞：投与後 0～24, 24～48, 48～72, 72～96, 96～120, 120～144, 144～168 時間

ケージ洗浄液 (精製水)：投与後 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間

ケージ洗浄液 (メタノール)：投与後 168 時間

6.7.3 組織中放射能濃度の測定

6.7.1 項における所定の採血終了後、動物はペントバルビタール (ソムノペンチル, 共立製薬) を約 0.4 mL/kg の用量で静脈内投与し、全身麻酔下、頸動脈より放血し、安楽死させたのち下記組織を摘出した。

【採取試料】

—	血液	A	眼球	A	脾臓
—	血漿	A	顎下腺	A	精巣
	脳の各部位	C	腸間膜リンパ	C	動脈 (腹大動脈)
A	皮質	A	甲状腺	C	皮膚 (下腹部, 毛を刈った)
A	線条体	A	胸腺	C	骨格筋 (大腿筋)
A	海馬	A	心臓	C	骨髄 (大腿骨)

A	視床下部	A	肺	C	白色脂肪 (精巣周辺)
A	小脳	A	肝臓	C	褐色脂肪 (腋窩部 ^{*2})
A	延髄	A	副腎	A	胆嚢
C	脊髄	A	腎臓	A	胆汁 (胆嚢内)
—	脳脊髄液	A	脾臓	B	下垂体
A	胃 ^{*1}	A	小腸 ^{*1}	A	大腸 ^{*1} (盲腸を含む)
A	胃内容物 ^{*1}	A	小腸内容物 ^{*1}	A	大腸内容物 ^{*1} (盲腸内容物を含む)

組織 A：組織の全量を採取し，その一部を放射能測定に供した組織

組織 B：組織の全量を採取し，その全量を放射能測定に供した組織

組織 C：組織の一部を採取し，その一部を放射能測定に供した組織

*1：消化管及び消化管内容物については，投与後 168 時間（動物番号 01101）のみ採取

*2：試験計画書では背部から採取することを設定したが，背部に褐色脂肪が認められなかったため，腋窩部の褐色脂肪を採取した。

血液及び血漿の放射能測定用試料の採取は 6.7.1 項で行い，データを共有した。

脳脊髄液はマイジエクター（27G×1/2”，1 mL，テルモ）を用いて採取し，6.8 項において放射能を測定し，脳脊髄液中放射能濃度を求めた。

組織は生理食塩液で洗浄し，濾紙片により付着水分を除いた。

消化管は切開し，約 40 mL の生理食塩液で内容物を洗い出す操作を 2 回繰り返したのち，濾紙片により付着水分を除き，内容物を洗い出した生理食塩液は 2 回分を合わせた。

胆汁は胆嚢から注射針（テルモ）を装着した注射筒（テルモ）を用いて採取した。

採取した試料について 6.8 項において放射能を測定し，組織（胆嚢中胆汁及び消化管内容物は除く）については組織中放射能濃度を求めた。また，血漿中放射能濃度に対する各組織中放射能濃度の比率（T/P 比）についても算出した。なお，T/P 比の算出には Microsoft Excel 2010 を用いた。

全重量が測定可能な組織（組織 A，B）については，測定した組織全重量に基づき投与放射能に対する分布率（組織中放射能分布率）を算出した。血液，骨格筋，皮膚及び白色脂肪については，組織全重量をそれぞれ体重の 6.0%[1]，41.4%[1]，9.4%[1]及び 7.8%[1]として組織中放射能分布率を算出した。

採取した試料は採取当日に組織重量を測定し，組織摘出後の屍体及び血漿分離後の血球は廃棄した。

6.8 放射能の測定

tSIE (transformed Spectral Index of External standard) 法によりクエンチング補正を行う液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 2300TR, PerkinElmer) を用い，放射能を測定した。測定は各バイアル当たり 5 分間，1 回とし，バックグラウンド値は測定試料と同一のシンチレーションカクテルのみ，又はコンバストパッドを燃焼して調製したバックグラウンドバイア

ルを5分間、1回測定して得られた dpm 値とした。

このバックグラウンド値を差し引いてネットのカウント値とした。なお、放射能の検出限界はバックグラウンド値の2倍とした。

サンプルオキシダイザー (Model 307 型, PerkinElmer) により燃焼処理を行って放射能を測定した際は、あらかじめ放射能の回収率 ($n=3$, 許容範囲 90.0%以上) を測定した。また、各最終燃焼後にも同様に放射能の回収率 ($n=3$) を測定した。なお、サンプルオキシダイザーによる燃焼処理は、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を CO_2 吸収剤 (Carbo-Sorb, PerkinElmer : 6 mL として設定) に回収させ、Permafluor E+ (PerkinElmer : 9 mL として設定) を混合することにより行った。

以下に測定試料調製法を示す。

6.8.1 投与液

一部 (50 μL , $n=3$) を分取し、メタノールで希釈して 50 mL に定容した。希釈液 1 mL をバイアルに分取 (各 $n=1$) し、シンチレーションカクテル (Clear-SolI, ナカライテスク) を 5 mL 加えて混合した。

6.8.2 放射化学的純度測定用試料

一部 (10 μL , $n=1$) をバイアルに分取し、Flo-Scint II を 5 mL 加えて混合した。

6.8.3 HPLC 溶出液 (シンチレーションカクテルを含む)

全重量を測定し、10 mL ($n=1$) をバイアルに分取、秤量し、Flo-Scint II を 5 mL 加えて混合した。

6.8.4 血液及び血漿

サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

6.8.5 尿

全重量を測定したのち、約 0.5 mL ($n=2$) をバイアルに分取、秤量し、Clear-SolI を 10 mL 加えて混合した。

6.8.6 糞

糞重量を測定し、約 4 倍 (v/w) 量の精製水を加えて全重量を測定したのち超高速ホモジナイザー (Polytron, Kinematica) を用いて懸濁液とした。

約 0.5 mL ($n=3$) をコンバストパッドに分取、秤量して、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

6.8.7 ケージ洗浄液

全重量を測定したのち、約 0.5 mL ($n=2$) をバイアルに分取、秤量し、Clear-SolI を 10 mL 加えて混合した。

6.8.8 脳脊髄液

一部 (n=1) をコンバストパッドに分取, 秤量して, サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した.

6.8.9 組織 A

重量を測定し, 組織は解剖用剪刃により, 消化管内容物はミキサーにより, それぞれ粗砕したのち, 一部 (n=1) をコンバストパッドに分取, 秤量して, サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した.

6.8.10 組織 B

コンバストパッドに採取して組織重量を測定したのち, 全量をサンプルオキシダイザーにより燃焼処理した.

6.8.11 組織 C

組織の一部を採取し, 約 0.1 g (n=1) をコンバストパッドに分取, 秤量して, サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した.

6.9 残余試料の取扱い

測定残分の血漿, 尿, 糞及び組織は, 冷凍 (-20°C, 許容範囲: -40~-15°C) 保存した. ケージ洗浄液は試験終了までに廃棄した.

試験終了後の残余試料は関連する薬物動態試験 (試験番号: B140810, 株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所) に移管する.

6.10 コンピュータシステムの使用

血液, 血漿及び組織中放射能濃度, 組織中放射能分布率並びに尿, 糞及びケージ洗浄液中放射能排泄率 (回収率) は, 薬物動態試験支援システム ADMESUPPORT Ver. 2.1 (富士通株式会社) を用いて算出した.

当該システムの試験情報には, 群に関する情報, 核種に関する情報, 動物購入に関する情報, 投与に関する情報, 採取項目に関する情報及び測定予定に関する情報を登録した.

血液, 血漿及び組織中放射能濃度は P092 フリー体換算濃度として算出し, 組織中放射能分布率並びに尿, 糞及びケージ洗浄液中放射能排泄率 (回収率) は投与放射能に対する百分率 (% of dose) として算出した.

(1) データのオンライン収集

重量 (g): 投与実績重量, 尿, 糞, ケージ洗浄液, 組織

放射能測定値 (dpm): 血液, 血漿, 尿, 糞, ケージ洗浄液, 組織

(2) データのオフライン収集

容量又は重量: 投与液 (6.3.2 項, g), 血液, 血漿 (mL), 体重 (g)

放射能測定値 (dpm): 投与液 (6.3.2 項)

サンプルオキシダイザー回収率 (%)

6.11 薬物速度論的解析

動物番号 01101 における血液、血漿中放射能濃度推移を薬物動態解析ソフトウェア Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation as part of Certara) の Non-compartmental analysis により解析し、以下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		WinNonlin での表記	算出方法
最終報告書での表記			
C_0	時間 0 に外挿した初期血液、血漿中放射能濃度	C_0	—
$t_{1/2}$	消失半減期	HL_Lambda_z	計算に使用した時点は、血液、血漿中放射能濃度推移の結果を基に設定した (投与後 24~168 時間)。
AUC_{0-t}	血液、血漿中放射能濃度—時間曲線下面積	AUClast	最終測定時点 t までを台形法で算出した。
AUC_{0-inf}	血液、血漿中放射能濃度—時間曲線下面積	AUCINF_obs	—
CL_{total}	全身クリアランス	Cl_obs	—
Vd_{ss}	定常状態の分布容積	Vss_obs	—
MRT_{0-inf}	平均滞留時間	MRTINF_obs	—

— : 対象外

6.12 試験結果の算出及び表示

試験結果の表示単位、表示桁数は以下の通りとし、表示桁数の1桁下で四捨五入して表示した。各試験結果を他の計算に用いる場合は、以下に示す表示桁数とした値を用いた。

試験結果	表示単位	表示桁数
投与液の放射化学的純度 HPLC カラムからの放射能の回収率	%	小数点以下1桁
投与液の放射能濃度	MBq/mL	小数点以下3桁
投与液の放射能濃度測定時の変動係数	%	小数点以下1桁
投与実績容量	mL	小数点以下3桁
血液、血漿中放射能濃度	ng eq./mL	小数点以下1桁
血球移行率	%	小数点以下1桁
R _B 値	--	小数点以下2桁
放射能排泄率及び放射能回収率	% of dose	小数点以下1桁
組織中放射能濃度	ng eq./g	小数点以下1桁
T/P 比	--	小数点以下2桁
組織中放射能分布率	% of dose	小数点以下2桁
C ₀	ng eq./mL	小数点以下1桁
t _{1/2} , MRT _{0-inf}	h	小数点以下1桁
AUC _{0-t} , AUC _{0-inf}	ng eq.·h/mL	整数
CL _{total}	mL/h/kg	整数
Vd _{ss}	mL/kg	整数

7. 結果

7.1 投与液の放射能濃度及び均一性

投与当日の投与前及び投与終了後における投与液の放射能濃度及び均一性の測定結果を Table 1 に示す。

放射能濃度は設定濃度の 90.0～110.0%の範囲内であり、設定通りに調製されたことが確認された。また、放射能濃度測定時の変動係数 (CV) は 5.0%以内であり、均一であることが確認された。

7.2 投与液中¹⁴C]P092 maleate の放射化学的純度

投与終了後における投与液中¹⁴C]P092 maleate の放射化学的純度の測定結果を Table 2 に示す。HPLC への注入放射能はほぼ完全に回収されており、かつ放射化学的純度が 95.0%以上であったことから、投与液中¹⁴C]P092 maleate は投与終了まで安定であったことが確認された。

7.3 血液及び血漿中放射能濃度

¹⁴C]P092 maleate を雄性サルに 1 mg/kg の用量で単回急速静脈内投与したときの血液及び血漿中放射能濃度を Table 3 及び Figure 1 に示し、薬物動態パラメータを Table 3 に示す。

また、投与後 1, 4 及び 24 時間における放射能の血球移行率 (T) 及び血漿中放射能濃度に対する血液中放射能濃度の比 (R_B 値) を Table 4 に示す。

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 時間以降の血液中放射能濃度は 199.6 h の消失半減期 (t_{1/2}) で低下した。C₀, AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 915.5 ng eq./mL, 9280 及び 19908 ng eq.・h/mL であり、CL_{total}, Vd_{ss} 及び MRT_{0-inf} はそれぞれ 50 mL/h/kg, 13811 mL/kg 及び 274.9 h であった。

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た。C₀, t_{1/2}, AUC_{0-t} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 440.9 ng eq./mL, 223.3 h, 7785 及び 19030 ng eq.・h/mL であり、CL_{total}, Vd_{ss} 及び MRT_{0-inf} はそれぞれ 53 mL/h/kg, 16780 mL/kg 及び 319.3 h であった。

投与後 1, 4 及び 24 時間において、放射能の血球移行率はそれぞれ 66.7%, 69.8%及び 52.6% であり、R_B 値はそれぞれ 1.68, 1.99 及び 1.35 であった。

7.4 組織中放射能濃度

¹⁴C]P092 maleate を雄性サルに 1 mg/kg の用量で単回急速静脈内投与したときの組織中放射能濃度及び組織中放射能分布率をそれぞれ Table 5 及び Table 6 に示す。

投与後 1 時間において、最も高い放射能濃度を示した組織は肺 (16588.7 ng eq./g) で、血漿中放射能濃度に対する比率 (T/P 比) は 183.91 であった。次いで、腎臓 (10277.2 ng eq./g), 肝臓 (7905.0 ng eq./g), 心臓 (7868.9 ng eq./g), 褐色脂肪 (7547.1 ng eq./g) 及び副腎 (7381.2 ng eq./g) で放射能濃度が高く、T/P 比はそれぞれ 113.94, 87.64, 87.24, 83.67 及び 81.83 であった。脳内では視床下部 (303.6 ng eq./g) に比較的高い放射能が認められ、T/P 比は 3.37 であった。他の脳部位, 延髄, 脊髄及び脳脊髄液における T/P 比は 1.00 未満であった。最も高い放射能分布率を示した組織は骨格筋 (60.89%) であり、次いで肝臓 (13.35%), 肺

(8.08%) 及び白色脂肪 (6.08%) であった。

投与後 24 時間においては、胆汁 (胆嚢内) 中に最も高い放射能濃度 (14772.6 ng eq./g) が認められ、T/P 比は 317.01 であった。胆汁を除いた組織の中では肺に最も高い放射能濃度 (12499.3 ng eq./g) が認められ、T/P 比は 268.23 であった。次いで、脾臓 (10878.9 ng eq./g)、副腎 (10530.4 ng eq./g)、褐色脂肪 (9652.2 ng eq./g) 及び胸腺 (7492.9 ng eq./g) で放射能濃度が高く、T/P 比はそれぞれ 233.45, 225.97, 207.13 及び 160.79 であった。脳内では視床下部 (119.9 ng eq./g) に比較的高い放射能が認められ、T/P 比は 2.57 であった。他の脳部位、延髄及び脊髄における T/P 比は 0.74~1.61 であった。脳脊髄液中の放射能は検出限界未満 (ND) であった。最も高い放射能分布率を示した組織は骨格筋 (61.98%) であり、次いで肝臓 (9.93%)、肺 (5.35%) 及び腎臓 (2.29%) であった。

投与後 168 時間において、最も高い放射能濃度を示した組織は副腎 (14988.5 ng eq./g) で、T/P 比は 429.47 であった。次いで、脾臓 (14009.9 ng eq./g)、肺 (12687.8 ng eq./g)、褐色脂肪 (9032.1 ng eq./g) 及び膵臓 (7198.1 ng eq./g) で放射能濃度が高く、T/P 比はそれぞれ 401.43, 363.55, 258.80 及び 206.25 であった。脳内では視床下部 (246.8 ng eq./g) に比較的高い放射能が認められ、T/P 比は 7.07 であった。他の脳部位、延髄及び脊髄における T/P 比は 2.50~5.53 であった。脳脊髄液中の放射能は ND であった。最も高い放射能分布率を示した組織は骨格筋 (22.10%) であり、次いで肝臓 (5.48%)、肺 (4.43%) 及び小腸 (3.31%) であり、全ての組織及び消化管内容物を合わせた放射能の分布率は 51.22% であった。

7.5 尿及び糞中放射能排泄率

[¹⁴C]P092 maleate を雄性サルに 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尿及び糞中累積排泄率を Table 7 に示す。

投与後 24 時間までの尿及び糞中にはそれぞれ投与放射能の 1.5% 及び 3.2% が排泄された。投与後 168 時間までの尿及び糞中にはそれぞれ投与放射能の 8.6% 及び 30.8% が排泄され、ケージ洗浄液を含めた放射能の総排泄率は 40.9% であった。

8. 考察

[¹⁴C]P092 maleate 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 [¹⁴C]P092 maleate 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 分から 24 時間までは比較的速やかに低下し，それ以降の消失は緩徐であった。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， [¹⁴C]P092 maleate は血球成分に移行し易いことが推察された。一方，脳脊髄液中への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，副腎及び脾臓では顕著に高い濃度の放射能が認められ， [¹⁴C]P092 maleate は組織移行性が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， [¹⁴C]P092 maleate 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， [¹⁴C]P092 maleate の脳内分布には部位特異性のあることが示唆された。

9. 参考資料

- [1] R. J. Lutz, et. al., Drug Metab. Disp., 12, 529 (1984)

Table 1 Radioactivity concentration of [¹⁴C]P092 maleate in dosing formulation

Nominal concentration*	Date of preparation	Date of measurement	Radioactivity concentration			% of nominal concentration
			Individual value (MBq/mL)	Mean ± S.D. (MBq/mL)	C.V. (%)	
2 mg/4.38 MBq/mL	July 10, 2014	July 10, 2014 (On the day of preparation)	4.218	4.289	1.6	97.9
			4.356	±		
			4.294	0.069		
		July 10, 2014 (After administration)	4.421	4.370	1.6	99.8
			4.399	±		
			4.291	0.070		

*: As free form

Table 2 Radiochemical purity of [¹⁴C]P092 maleate in dosing formulation

Nominal concentration*	Date of preparation	Date of measurement	Sample	Detection	Retention time (min)	Radiochemical purity (%)	Recovery from HPLC system (%)
2 mg/4.38 MBq/mL	July 10, 2014	July 10, 2014 (After administration)	P092 maleate	UV ^{a)}	14.3	--	--
			[¹⁴ C]P092 maleate	RI ^{b)}	14.4	95.1	101.6

*: As free form

a) Absorbance (UV 254 nm)

b) Radioactivity

--: Not applicable

Table 3 Radioactivity concentrations and pharmacokinetic parameters in blood and plasma after single intravenous bolus administration of [^{14}C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg

Time/Parameter	Radioactivity concentration (ng eq./mL)	
	Blood	Plasma
5 min	632.2	320.0
15 min	300.1	167.9
30 min	217.7	134.4
1 h	190.3	113.4
2 h	143.8	99.3
4 h	122.2	77.3
8 h	107.2	68.7
10 h	96.9	58.9
24 h	61.4	52.8
48 h	56.5	48.4
72 h	47.5	48.3
120 h	43.3	36.6
168 h	36.9	34.9
C_0 (ng eq./mL)	915.5	440.9
$t_{1/2}$ (h) ^{a)}	199.6	223.3
AUC_{0-t} (ng eq.·h/mL)	9280	7785
AUC_{0-inf} (ng eq.·h/mL)	19908	19030
CL_{total} (mL/h/kg)	50	53
Vd_{ss} (mL/kg)	13811	16780
MRT_{0-inf} (h)	274.9	319.3

a) The $t_{1/2}$ was calculated using the concentrations from 24 h to 168 h.