

3. 試験実施概要

3.1 表題

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩をカニクイザルに単回静脈内投与したときの放射能の血中濃度，排泄及び分布

3.2 試験番号

B130899

3.3 試験目的

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩を雄性カニクイザルに単回静脈内投与して，放射能の血液及び血漿中濃度推移，尿及び糞中排泄並びに組織中濃度について検討する。

3.4 適用ガイドライン

非臨床薬物動態試験ガイドラインについて
医薬審第496号，平成10年6月26日

3.5 信頼性基準

申請資料の信頼性の基準

医薬品，医療機器等の品質，有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則 第43条

3.6 信頼性保証部門による調査

試験計画書，試験計画書変更書，試験資料，最終報告書草案及び最終報告書を調査し，信頼性保証証明書を最終報告書に添付した。

3.7 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

3.8 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

3.9 試験施設

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

3.10 試験責任者

中井 弘司

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 分析代謝研究部

TEL : 0479-46-5392, FAX : 0479-46-3173

E-mail : Nakai.Hiroshi@ma.medience.co.jp

3.11 主な試験従事者

標識化合物の純度分析 : 伊藤 まゆみ

動物の飼育管理 : 朝日 啓介, 大塚 康之

投与液調製及び分析 : 佐藤 智洋, 伊藤 まゆみ

投与 : 上田 智哉, 大塚 康之, 有田 孝幸

試料採取及び放射能測定 : 朝日 啓介, 福田 康成, 大塚 康之, 有田 孝幸

3.12 試験日程

試験開始 : 2015年1月16日

動物移管 : 2015年1月19日

投与 : 2015年1月22日

試験終了 : 本最終報告書への試験責任者署名日とする。

3.13 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。

3.14 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 試験計画書変更書
- (3) 被験物質に関する資料
- (4) 使用動物に関する資料
- (5) 試験操作に関する資料
- (6) 試験結果に関する資料
- (7) 通信文書等の記録文書
- (8) 最終報告書

3.15 その他

本試験の実施に際し、「動物実験に関する指針（試験研究センター指針）」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（承認番号：2014-0688）を得た。

4. 試験責任者署名

表題： [^{14}C]P092・マレイン酸塩をカニクイザルに単回静脈内投与したときの放射能の血中濃度，排泄及び分布

試験番号：B130899

試験責任者：

2015年 3月 18日

中井 弘司

中井 弘司

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

分析代謝研究部

5. 要約

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩を雄性カニクイザルに 1 mg/kg (フリー体換算) の用量で単回静脈内投与して、放射能の血液及び血漿中濃度推移、尿及び糞中排泄並びに組織中濃度について検討した。

血液中放射能濃度は投与後 5 分に 511.2 ng eq./mL を示したのち、経時的に低下し、消失半減期 ($t_{1/2}$) は 186.3 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、[¹⁴C]P092 及び/又はその代謝物は血球成分に移行し易いことが推察された。投与後 336 時間までの尿及び糞中への放射能の累積排泄率はそれぞれ 17.2%及び 44.6%であり、サルにおいて静脈内投与された[¹⁴C]P092・マレイン酸塩の主排泄経路は糞中排泄であることが示された。

各組織中放射能濃度の最高値は、小脳、脊髄及び皮膚においては投与後 168 時間、大脳、延髄、眼球、顎下腺、腸間膜リンパ及び精巣においては投与後 336 時間、その他の組織においては投与後 24 時間に認められた。脳脊髄液中の放射能はいずれの測定時点においても検出限界未満 (ND) 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、脾臓及び顎下腺では顕著に高い濃度の放射能が認められ、[¹⁴C]P092 及び/又はその代謝物は組織移行性が高いことが示唆された。また、投与後 168 又は 336 時間に放射能濃度の最高値を示す組織も存在し、[¹⁴C]P092 及び/又はその代謝物組織への移行は比較的緩徐であることが示唆された。一方、投与後 336 時間までの総排泄率は 64.6%に留まり、組織中放射能分布率の合計が投与放射能の 25.11%であったことから、[¹⁴C]P092 及び/又はその代謝物は組織残留性があり、体外への排泄は緩徐であると考えられた。

6. 材料及び方法

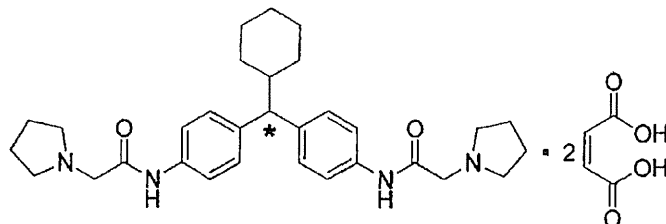
6.1 被験物質

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

K0348-02

6.1.1.5 化学的純度

99.5% (HPLC 法, 2014 年 12 月 26 日測定, Certificate of Analysis, Curachem)

6.1.1.6 比放射能

58.4 mCi/mmol (2.933 MBq/mg, フリー体として 4.288 MBq/mg)

6.1.1.7 放射化学的純度

98.9% (HPLC 法, 2014 年 12 月 26 日測定, Certificate of Analysis, Curachem)

6.1.1.8 性状

エタノール溶液

6.1.1.9 放射能濃度

5 MBq/mL (被験物質濃度 : 1.705 mg/mL, フリー体として 1.166 mg/mL)

6.1.1.10 フリー体換算係数

1.4618 (非標識体での分子量比 フリー体 : マレイン酸塩 = 1 : 1.4618)

6.1.1.11 合成先

Curachem

6.1.1.12 保存条件

冷凍 (-80°C, 許容範囲: -60°C 以下, 実測値: -82.1~-74.8°C), 遮光, 気密容器

6.1.1.13 保管場所

被験物質保管場所 (74)

6.1.1.14 取扱上の注意

保護メガネ, マスク, ゴム手袋を着用した。

6.1.1.15 放射化学的純度の確認

被験物質としての使用前及び使用後に放射化学的純度を測定した。

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩を 20 μL 分取し, 180 μL のアセトニトリル/精製水 (1:1, v/v) で希釈して, 下記 HPLC 分析条件により測定した (各 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, [¹⁴C]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, P092・マレイン酸塩 (0.1 mg) を 1 mL のアセトニトリル/精製水 (1:1, v/v) で溶解させることにより調製し, 冷蔵 (許容範囲: 1~10°C, 実測値: 2.0~5.0°C) 条件下で保存した。

HPLC 測定で得られたラジオクロマトグラムにおける全ピーク面積に対する [¹⁴C]P092・マレイン酸塩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 6.9 項に従い放射能を測定した。この溶出液中の放射能と, 注入した試料中の放射能 (6.9 項において測定) の値を用いて, 次式により HPLC システムからの放射能の回収率 (HPLC 回収率) を求めた。

$$\text{HPLC 回収率 (\%)} = \frac{\text{溶出液中放射能濃度 (dpm/g)} \times \text{溶出液全量 (g)}}{\text{注入試料中放射能 (dpm)}} \times 100$$

【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, 4.6 mm I.D. × 250 mm (ジーエルサイエンス)
カラム温度	40°C

移動相	A =0.2% Trifluoroacetic acid (TFA) Water B =Acetonitrile
グラジエントプログラム	Time (min) 0 20 50 50.1 60 %B 20 60 60 20 20
Injection volume	10 μ L
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) シンチレーションカクテル流速 : 3.0 mL/min 積算時間 : 6 秒

6.1.1.16 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（株式会社LSIメディエンス 鹿島研究所）で使用することとした。

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

KS14001

6.1.2.3 フリー体換算係数

1.4618

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 保存条件

冷蔵（許容範囲：1～10℃，実測値：3.0～4.9℃），遮光，密封（窒素封入）

6.1.2.7 保管場所

被験物質保管場所（59）及び（29）

6.1.2.8 取扱上の注意

保護メガネ、マスク、ゴム手袋を着用した。

6.1.2.9 安定性の確認

「P092・マレイン酸塩の特性試験及び保存安定性試験（試験番号 P140711, 株式会社L S I メディエンス 熊本研究所）」で実施した同一ロットの分析結果を入手し、試験期間中の安定性を確認した。

6.1.2.10 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（株式会社L S I メディエンス 鹿島研究所）で使用することとした。

6.2 媒体

6.2.1 名称

生理食塩液（日本薬局方，大塚製薬工場，Lot No. K4G99）

6.3 主な試薬

水は、超純水製造システム（Elix-UV 10, Milli-Q Advantage, メルク）で精製したものを精製水として用いた。試薬は、用途に応じて市販の一級品，試薬特級または同等以上のものを使用した。

6.4 投与液

6.4.1 調製濃度

2 mg/4.288 MBq/mL（フリー体として）

6.4.2 調製方法

投与液は、以下の手順で投与日に調製した。

調製は紫外線をカットした蛍光灯下で行い、可能な限り滅菌あるいは消毒済みの器材を使用した。

- (1) [¹⁴C]P092・マレイン酸塩を 25.7 mL（フリー体として 30.0 mg）分取し、窒素気流下で乾固させた。
- (2) P092・マレイン酸塩を正確に秤量した（43.9 mg，フリー体として 30.0 mg）
- (3) 媒体を 30 mL 加え、スターラーで攪拌しつつ溶解させた。
- (4) 0.22 μm フィルター（MILLEX[®]-GV, メルク(旧社名 Millipore)）でろ過した。
- (5) 投与液の一部（3 mL）を分取し、pH を測定して記録した（実測値：pH 4.282）。
- (6) 使用後の投与液は冷蔵（許容範囲：1～10°C）条件下で保存し、試験終了時まで廃棄した。

6.4.3 放射能濃度の測定

投与前及び投与終了後に 6.9 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%以下であることを確認した。

6.4.4 放射化学的純度の確認

投与前及び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 μ L, 各 n=1) を採取し, 380 μ L のアセトニトリル/精製水 (1:1, v/v) で希釈したのち, 6.1.1.15 項に示す内容に従って放射化学的純度を測定した。

6.5 試験動物

6.5.1 動物種

カニクイザル (*Macaca fascicularis*)

6.5.2 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。

6.5.3 購入先

日本医科学動物資材研究所

6.5.4 仕出国

ベトナム社会主義共和国 (生産業者: NAFOVANNY)

6.5.5 使用動物数

雄 9 匹

6.5.6 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。

または, 指定動物 (サル) の検査場所指定施設であるイブバイオサイエンスにて輸入検疫を終了した動物を購入し, 当試験施設にて検疫, 馴化を 4 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。

6.5.7 動物移管日

2015 年 1 月 19 日

6.5.8 環境馴化

動物を移管後、一般状態及び摂餌量を3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。

6.5.9 投与時年齢

5年齢

6.5.10 投与時体重

動物番号	体重 (kg)	動物番号	体重 (kg)	動物番号	体重 (kg)
01101	3.84	02106	4.22	03111	3.84
01102	3.93	02107	3.77	03112	3.39
01103	4.36	02108	3.67	03113	4.06

6.5.11 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、試験項目、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。

6.5.12 瀕死動物の措置

瀕死動物はいなかった。

6.6 動物飼育

6.6.1 飼育室

5132 及び 5133 室 (9.2 項参照)

6.6.2 飼育環境

6.6.2.1 温度

許容範囲：23.0～29.0℃

実測値：23.8～27.1℃

6.6.2.2 相対湿度

許容範囲：35.0～75.0%

実測値：42.3～71.3%

6.6.2.3 換気

10～30 回/時間、オールフレッシュエアー供給

6.6.2.4 照明時間

12時間/日 (7:00~19:00) 点灯

6.6.2.5 収容動物数

1匹/ケージ

6.6.3 飼育器材

6.6.3.1 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)

6.6.3.2 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.

6.6.3.3 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.

6.6.4 エンリッチメント

動物福祉向上のために, 玩具 (ステンレス製ミラー) を与えた.

6.6.5 飼料

6.6.5.1 種類

サル用固型飼料, CMK-2 (日本クレア)

6.6.5.2 給餌法

毎日午前中に, 1匹当たり約 100 g の飼料を給与し, 翌日に残餌を回収, 廃棄した. 移管日は移管後に給餌した. なお, 絶食は実施しなかった.

6.6.5.3 汚染物質の確認

飼料の供給元から分析結果を入手し, 使用ロット (Lot No. K2084 及び K2094) 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.

6.6.6 飲用水

6.6.6.1 種類

5 µm フィルター濾過後, 紫外線照射した水道水

6.6.6.2 給水法

自由摂取とし, 新鮮な飲用水に毎日交換した.

6.6.6.3 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ている。

6.7 投与

6.7.1 投与経路

静脈内投与

6.7.2 投与経路の選択理由

予定臨床投与経路に準じる。

6.7.3 投与方法

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) 及びディスプレイ注射筒 (2.5 mL, テルモ) を用いて, [2 mL/min]/kg の投与速度 (約 15 秒/body) で伏在静脈内に投与した。

なお, 動物番号 01101~01103 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。

6.7.4 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。

6.7.5 投与回数

単回投与

6.7.6 投与用量及びその設定理由

1 mg/2.144 MBq/kg (P092 フリー体としての用量)

「¹⁴C]P092・マレイン酸塩のカニクイザルにおける単回投与後の薬物動態予備試験 (試験番号 B130897, 株式会社 L S I メディエンス)」における静脈内投与 (Bolus) と同用量 (1 mg/kg) を設定した。

6.7.7 投与液量

0.5 mL/kg

投与日に測定した体重に基づいて投与液量を算出した。個体の投与実績量は重量法により算出した (投与前後の投与器材の総重量を測定し, 正確な投与量を把握した)。

6.8 試験項目及び試料採取

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 (フリー体として), 投与液量	採取 時点	評価 動物数	動物番号
6.8.1 血液及び血漿中 放射能濃度	IV	1 mg/0.5 mL/kg	-	3	01101-01103
6.8.2 尿及び糞中放射能 排泄			24 h	3	02106-02108
6.8.3 組織中放射能濃度	IV	1 mg/0.5 mL/kg	168 h	3	03111-03113
			336 h	3	01101-01103 ^{*1}

- : 経時的に試料を採取した。

*1 : 6.8.1 項における最終時点の採血終了後, 6.8.3 項に供した。

6.8.1 血液及び血漿中放射能濃度

投与後, 下記の採取時点毎に無麻酔下で, 橈側皮静脈あるいは大腿静脈から約 2 mL (投与後 5 分~240 時間) 又は約 10 mL (投与後 336 時間) を採血した。

【採取時点】^{*1}

投与後 5 分, 30 分, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 240, 336 時間

*1 : 動物番号 01102 の採血時間は上記の時間よりも 2 分早かった (9.2 項参照)。

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, テルモ) に採取, 混合した。放射能測定用試料として血液 100 μ L ($n=1$) をバイアルに分取して 6.9 項において放射能を測定し, 血液中放射能濃度を求めた。

約 0.5 mL (投与後 5 分~240 時間) 又は約 3 mL (投与後 336 時間) の血液を冷凍 (-80°C , 許容範囲: -60°C 以下, 実測値: -91.9°C ~ -86.7°C) 保存した。

残りの血液は遠心分離 (4°C , 3,000 rpm \times 10 min, CF7D2, 日立工機) し, 血漿を得た。血漿 100 μ L ($n=1$) をバイアルに分取して 6.9 項において放射能を測定し, 血漿中放射能濃度を求めた。測定残分の血漿は冷凍 (-80°C , 許容範囲: -60°C 以下, 実測値: -91.9°C ~ -86.7°C) 保存した。

血液及び血漿は可能な限り保冷下で取り扱った。

血漿分離後の血球は廃棄した。

6.8.2 尿及び糞中放射能排泄

投与後, 下記の採取区間毎に, 自然排泄尿及び糞を分別採取した。投与後 30 分までの排泄物は, モンキーチェアーの下に敷いたプラスチック製トレイにより回収した。トレイに付着した尿は少量 (約 30 mL 程度) の精製水でリンスして尿に合わせた。尿及び糞の採取区間 (採取時点) 毎に, ケージ内面を精製水 (約 500 mL) で洗浄し, ケージ洗浄液として採取した。

採取した尿、糞及びケージ洗浄液は 6.9 項において放射能を測定し、各放射能排泄率及び放射能量を求めた。

投与後 168 時間までの尿及び糞については、一部を冷凍（ -80°C ，許容範囲： -60°C 以下，実測値： $-91.9\sim-86.7^{\circ}\text{C}$ ）保存した。

【採取区間（採取時点）】

尿、糞：投与後 0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-168, 168-240, 240-336 時間

ケージ洗浄液：投与後 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 336 時間

6.8.3 組織中放射能濃度

動物番号 01101-01103 については、6.8.1 項における投与後 336 時間の採血終了後、本項に供し、投与後 336 時間の血液及び血漿中放射能濃度の測定結果を共有した。

動物番号 02106-02108 及び 03111-03113 においては、所定の採取時点に無麻酔下で大腿静脈から約 10 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）に採取，混合した。放射能測定用試料として血液 100 μL ($n=1$) をバイアルに分取して 6.9 項において放射能を測定し、血液中放射能濃度を求めた。約 3 mL の血液を冷凍（ -80°C ，許容範囲： -60°C 以下，実測値： $-91.9\sim-86.7^{\circ}\text{C}$ ）保存した。

残りの血液は遠心分離（ 4°C ，3,000 rpm \times 10 min，CF7D2）し、血漿を得た。血漿 100 μL ($n=1$) をバイアルに分取して 6.9 項において放射能を測定し、血漿中放射能濃度を求めた。測定残分の血漿は冷凍（ -80°C ，許容範囲： -60°C 以下，実測値： $-91.9\sim-86.7^{\circ}\text{C}$ ）保存した。なお、血液及び血漿は可能な限り保冷下で取り扱った。

血漿分離後の血球は廃棄した。

採血終了後、動物はペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル）を 25~27 mg/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	肝臓
—	血漿	A	副腎
A	大脳	A	腎臓
A	小脳	A	脾臓
A	延髄	A	膵臓
C	脊髄	A	精巣
—	脳脊髄液	C	皮膚
B	下垂体	C	骨格筋（大腿筋）
A	眼球	C	骨
A	顎下腺	C	白色脂肪（精巣周辺）
C	腸間膜リンパ	C	褐色脂肪（背部）
A	心臓	—	胆汁（胆嚢内）
A	肺		

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

脳脊髄液はマイジェクター（27G×1/2”，1 mL，テルモ）を用いて採取し、6.9 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。

胆汁は胆嚢から注射針（21G×1 1/2”，テルモ）を装着した注射筒（5 mL，テルモ）を用いて採取し、6.9 項において放射能を測定し、胆汁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。

採取した試料について 6.9 項において放射能を測定し、組織中放射能濃度を求めた。

全重量が測定可能な組織（組織 A、B 及び胆汁）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。

大脳、小脳、脳脊髄液、肝臓及び肺の測定残分は冷凍（-80°C，許容範囲：-60°C 以下，実測値：-91.9~-86.7°C）保存した。

採取した試料は採取当日に組織重量を測定し、放射能測定試料を調製した。

組織摘出後の屍体及び血漿分離後の血球は廃棄した。

6.9 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（PerkinElmer）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、回収率が 100.0%未満（97.2%）であったため、得られた測定試料中放射能は回収率で補正した。また、燃焼後にも、同様に放射能の回収率（n=3）を測定し、回収率が許容範囲であることを確認した。

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）に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。

6.9.1 投与液

一部（50 μL ，n=3）を分取、秤量し、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-Sol I, ナカライテスク) を 5 mL 加えて混合した。

6.9.2 放射化学的純度測定用試料

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

6.9.3 HPLC 溶出液

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。

6.9.4 血液

組織溶解剤 (バイオメリット専用組織溶解液, ナカライテスク) を 1 mL 加え、組織溶解装置 (バイオメリット, 積水メディカル) で約 30 分間処理したのち、シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor, PerkinElmer) を 15 mL 加えて混合した。

6.9.5 血漿

約 1 mL の精製水を加えて希釈したのち、Clear-sol I を 10 mL 加えて混合した。

6.9.6 尿

全重量を測定したのち、0.1~1 mL ($n=2$) をバイアルに分取、秤量し、Clear-sol I を 10 mL 加えて混合した。

6.9.7 ケージ洗浄液

全重量を測定したのち、約 1 mL ($n=2$) をバイアルに分取、秤量し、Clear-Sol I を 10 mL 加えて混合した。

6.9.8 糞

餌片等の混入物を除去し、糞重量を測定した。約 4 倍 (v/w) 量の精製水を加えて全重量を測定し、超高速ホモジナイザー (ポリトロン PT3100, Kinematica) を用いて懸濁液とした。約 0.5 mL ($n=2$) をコンバストパッドに分取、秤量し、サンプルオキシダイザーにより燃焼処理した。

6.9.9 脳脊髄液

一部 ($n=1$) をバイアルに分取、秤量して、Clear-sol I を 10 mL 加えて混合した。

6.9.10 胆汁

全重量を測定したのち、一部 ($n=1$) をバイアルに分取、秤量して、Clear-sol I を 10 mL 加えて混合した。

6.9.11 組織 A

組織全重量を測定した。解剖用剪刀により粗砕したのち、約 0.1 g (n = 1) をバイアルに分取、秤量した。組織溶解剤を 1 mL 加え、組織溶解装置で約 30 分間処理したのち、Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

6.9.12 組織 B

バイアルに分取、秤量した。組織溶解剤を 1 mL 加え、組織溶解装置で約 30 分間処理したのち、Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

6.9.13 組織 C

組織の一部を採取した。解剖用剪刀により粗砕したのち、約 0.1 g (n = 1) をバイアルに分取、秤量した。組織溶解剤を 1 mL 加え、組織溶解装置で約 30 分間処理したのち、Hionic-Fluor を 15 mL 加えて混合した。

6.10 残余試料の取扱い

冷凍 (-80°C, 許容範囲: -60°C 以下) 保存した測定残分試料 (以下) は、代謝物分析の候補試料として、2015 年 3 月 11 日に関連する薬物動態試験 (試験番号: B150130, 株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所) に移管した。

血液: 約 0.5 又は約 3 mL

血漿: 残分全量

投与後 168 時間までの尿及び糞懸濁液: 約 30 mL

大脳, 小脳, 脳脊髄液, 肝臓, 肺: 残分全量

その他の測定残分試料については冷凍 (-20°C, 許容範囲: -40~-15°C) 保存し、試験終了までに廃棄した。

6.11 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, 尿及び糞中放射能排泄率, ケージ洗浄液中放射能並びに組織中放射能分布率は, 薬物動態試験支援システム ADMESUPPORT Ver. 2.1 (富士通) 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等を登録した。

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, 尿及び糞中放射能排泄率, ケージ洗浄液中放射能並びに組織中放射能分布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：投与時体重 (g)，解剖時体重 (g)，投与液 (6.4.3 項, g)，血液 (mL)，
血漿 (mL)

放射能測定値 (dpm)：投与液 (6.4.3 項)

サンプルオキシダイザー放射能回収率 (%)

また、6.8.3 項における投与後 336 時間の血液及び血漿中放射能濃度は、6.8.1 項の同時点におけるデータをオフライン入力して測定結果を共用した。

6.12 薬物速度論的解析

血液及び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。

なお、動物番号 01102 については、採血が試験計画書で設定した時間よりも 2 分早く実施されていたため、投与後 1 時間までは実際の採血時点 (3 分, 28 分, 58 分) を用いて、薬物動態パラメータを算出した (9.2 項参照)。

【薬物動態パラメータ及び算出方法】

薬物動態パラメータ		
最終報告書での表記		WinNonlin での表記
C_0	時間 0 に外挿した初期血液、血漿中放射能濃度	C_0
$t_{1/2}$	消失半減期	HL_Lambda_z
AUC_{0-t}	血液、血漿中放射能濃度－時間曲線下面積	AUClast
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

$t_{1/2}$ の計算に使用した時点は、血液及び血漿中放射能濃度推移の結果を基に設定した。
具体的には、WinNonlin で自動設定された区間をそのまま採用した。

6.13 試験結果の算出及び表示

個体別値は Appendix に表示した。平均値及び標準偏差 (Mean \pm SD) は、Microsoft Excel 2010 (Microsoft) により算出し、Appendix に表示した。個体別値 3 例中 3 例が検出限界値未満の場合には平均値を算出せず、ND (Not detected) と表示した。

血漿中放射能濃度 (平均値) に対する各組織中放射能濃度 (平均値) の比率 (K_p 値) を Microsoft Excel 2010 により算出した。組織中放射能濃度が ND の場合には、 K_p 値は算出せず、NC (Not calculated) と表示した。

Table には Appendix に示した Mean \pm SD を表示し、Figure は Table に示した値に基づいて

Microsoft Excel 2010 により作成した。

試験結果の表示単位，表示桁数は以下の通りとした。試験結果は表示桁数の 1 桁下で四捨五入して表示した。標準偏差は平均値と同じ桁までを表示した。

試験結果	表示単位	表示桁数
標識化合物及び投与液の放射化学的純度	%	小数点以下 1 桁
HPLC 回収率		
投与液の放射能濃度	MBq/mL	小数点以下 3 桁
投与液中放射能濃度の対設定濃度比	%	小数点以下 1 桁
CV		
血液及び血漿中放射能濃度	ng eq./mL	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
K _p 値	--	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
排泄率	% of dose	小数点以下 1 桁
ケージ洗浄液中放射能量		
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. 結果及び考察

7.1 標識化合物の放射化学的純度

被験物質としての使用前及び使用後における $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ ・マレイン酸塩の放射化学的純度の測定結果を Appendix 1 に示す。

いずれの測定時点においても放射化学的純度は 95.0%以上であり、かつ HPLC への注入放射能はほぼ完全に回収されたことから、 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ ・マレイン酸塩は被験物質としての試用期間中、放射化学的に安定であったことが確認された。

7.2 投与液の放射能濃度及び均一性

投与当日（投与液調製日）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 Appendix 2 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。

7.3 投与液中 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ ・マレイン酸塩の放射化学的純度

投与当日（投与液調製日）の投与前及び投与終了後における投与液中 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ ・マレイン酸塩の放射化学的純度の測定結果を Appendix 3 に示す。

投与前及び投与終了後のいずれにおいても放射化学的純度は 95.0%以上であり、かつ HPLC への注入放射能はほぼ完全に回収されたことから、投与液中 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ ・マレイン酸塩は投与終了まで放射化学的に安定であったことが確認された。

7.4 血液及び血漿中放射能濃度

$[^{14}\text{C}]\text{P092}$ ・マレイン酸塩を雄性サルに 1mg/kg（フリー体換算）の用量で単回静脈内投与したときの血液及び血漿中放射能濃度を Table 1 及び Figure 1 に示し、薬物動態パラメータを Table 1 に示す。また、これらの個体別値を Appendix 4 及び Appendix 5 に示す。

血液中放射能濃度は投与後 5 分に 511.2 ng eq./mL を示したのち、投与後 24 時間では 64.8 ng eq./mL、さらに投与後 336 時間では 22.9 ng eq./mL まで低下した。時間 0 に外挿した初期血液中放射能濃度 (C_0)、消失半減期 ($t_{1/2}$) 及び血液中放射能濃度－時間曲線下面積 (AUC_{0-t} 及び $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$) はそれぞれ 622.5 ng eq./mL、186.3 h、14405 及び 20679 ng eq.·h/mL であり、全身クリアランス (CL_{total})、定常状態の分布容積 (Vd_{ss}) 及び平均滞留時間 ($\text{MRT}_{0-\text{inf}}$) はそれぞれ 51 mL/h/kg、13702 mL/kg 及び 272.1 h であった。

血漿中放射能濃度は投与後 5 分に 131.5 ng eq./mL を示したのち、投与後 24 時間では 46.9 ng eq./mL、さらに投与後 336 時間では 21.2 ng eq./mL まで低下した。 C_0 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 及び $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ はそれぞれ 151.7 ng eq./mL、290.2 h、12024 及び 21142 ng eq.·h/mL であり、 CL_{total} 、 Vd_{ss} 及び $\text{MRT}_{0-\text{inf}}$ はそれぞれ 49 mL/h/kg、19108 mL/kg 及び 413.1 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、 $[^{14}\text{C}]\text{P092}$ 及び/又はその代謝物は血球成分に移行し易いことが推察された。