

10. 投与量について次の内容を説明してください。

① 本薬を経口投与する場合について、以下の点を説明してください。

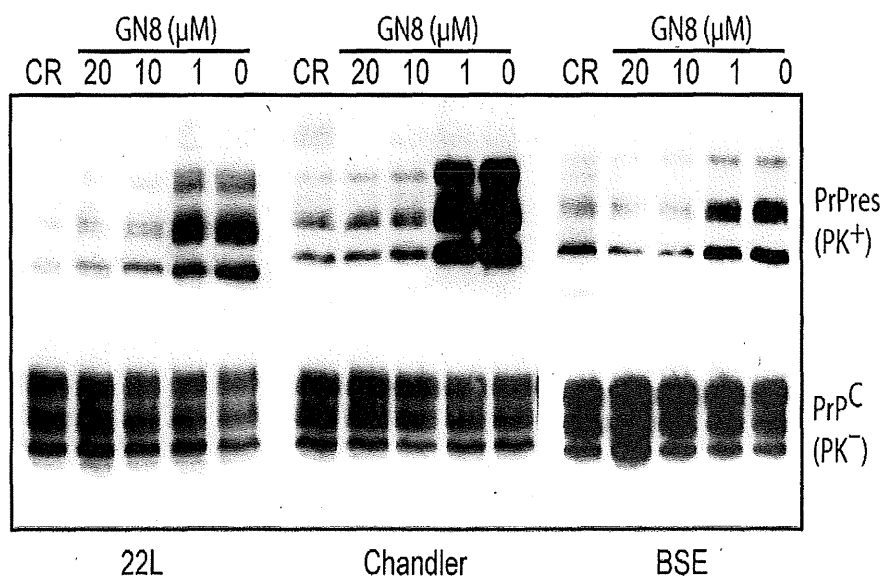
- i) マウスに対する10 mg/kgの腹腔内投与時と、サルに対する経口投与時では異なる薬物動態を示すことが想定されますが、サルに対して10 mg/kgを経口投与することによって有効性が期待できると考えた根拠を説明してください。

回答： ラット経口単回投与群の血漿中濃度 (Cmax) は、250 mg/Kgの用量で、～30 ng/mL (治験薬概要書P14)、サル経口単回投与群では、～15 ng/mL (治験薬概要書P34) となっております。このことは、同じ用量では、げっ歯類と霊長類の間で吸収に、極端な差がないことを示唆しております。

また、ラット4週反復経口投与では、20 mg/Kg/Dayの用量で血中濃度が最低でも～10 ng/mL以上を維持しております (治験薬概要書P25)。マウスの感染実験では、10 mg/Kg/dayの用量で14日間腹腔内投与を行った結果、有意な寿命の延長がみられたことから (治験薬概要書P47)、経口では、～10 mg/kg/day程度で繰り返し投与を行うことにより、延命効果が得られると期待されます。

マウス実験では福岡株を用いておりますが、カニクイザル感染実験においてはBSE株を用いております。しかしながら、今回用いるP092は、GN8類縁体でその作用を強めたものであり、GN8はBSE株においても有効であることより (図1)、カニクイザルにおいても有効であると考えております。

図1 (Kuwata et al., PNAS, 2007)



P092の投与量は、2週間連続投与での無毒性量は、50 mg/Kg未満と考えられる（治験薬概要書P17）ことから、10 mg/kg/dayでの繰り返し経口投与は、許容範囲内ではないか、と考えております。

ii) 10 mg/kgを腹腔内投与した時の血中濃度及び脳脊髄液内濃度の測定が計画されていると説明されていますが（相談事項2）、当該測定によって得られる結果をもとにどのようにサルでの経口投与量を決定する計画であるか説明してください。

回答： マウスの感染実験において、10 mg/Kg/dayで14日間腹腔内投与を行った結果、有意な寿命の延長がみられました（治験薬概要書P47）が、この時の血中濃度、及び脳内濃度が、現時点において不明です。従って、これらを測定し、有効血中濃度、及び有効脳内濃度を直接求めたい、と考えております。これらの値を指標にして、サルの有効経口投与量を推定したいと考えております。

プリオンの福岡株は、ヒトのGSS由来ですが、マウスに適合しているため、他の動物では感染実験ができません。マウスの脳脊髄液は、極めて微量であり、採取とその濃度測定は、極めて困難です。そこで、同じ用量で腹腔内投与した場合の、ラットの血液脳脊髄液の採取とその濃度測定を計画しております。

しかしながら、カニクイザルにおいて、単回、及び反復投与した場合の脳脊髄液内濃度を測定しましたが、ほとんどは検出限界（5 nM）以下で、数匹に数10～数100 nMでの濃度が検出されました。このことから、P092は疎水性が強く、血管内に移行しても、遊離体での存在比率は低く、赤血球や組織に吸着する傾向が強いと考えられました。また、脳脊髄液中には、低濃度でしか存在せず、大部分は脳組織に吸着しているものと考えられました。このことから、今後は、主に血中濃度を指標にしたいと考えます。

② 本薬を静脈内投与する場合について、10月以降に実施を予定している静脈内投与による非臨床試験結果を参考にして投与量を決定すると説明されていますが（相談事項2）、当該非臨床試験においてどのような用量群を設定する予定であるか説明した上で、その結果をもとにどのようにサルでの静脈内投与量を決定する計画であるか説明してください。

回答： カニクイザルを用いて、静脈内投与試験を行いました。その結果、25mg/Kgの単回投与では、24時間後には、検出限界以下になってしまうことが分かりました（表1）。もし血液中に単純に分散すると考えれば、250 µg/mLの濃度で存在する筈ですので、ほとんどは吸着されていることが分かります。この時、脳脊髄液中には、～1 ng/mLの濃度です。このことは、単に水溶液中の濃度を測定しても、組織への分布はわからないことを意味しています。これらに関しては、本年、P092のアイソトープ標識体を用

いて、ADME 試験を行い、脳内分布を確認していきたいと考えております。

一方で、マレイン酸のプリオン産生細胞に対する影響を見てみました (図 2)。プリオン産生細胞 (福岡株) では、大体、0.5 μ M 程度の濃度で、異常プリオンの量が半分になる事がわかります。しかし、0.5 μ M というのは、プレートに加えて、単分散になったと仮定した場合の濃度であり、実際の溶液中の濃度は、細胞やプレートに吸着するため、極めて低いと考えられます。しかし、これら感染性試料は、P3 でのみ使用可能であり、濃度測定そのものは不可能です。

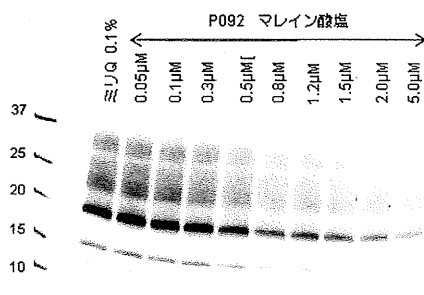
表 1

静脈内投与試験におけるP092血漿中濃度						
1) 25mg/kg (12.5 mg/mL), 100mg/kg (50mg/mL)をボーラス静脈内投与 (投与液量: 2mL/kg)						
<マレイン酸塩静脈内投与>						
Dose (mg/kg)	Animal No.	Plasma concentration of analyte (ng/mL)				
		0.083 h	2 h	4 h	8 h	24 h
25	50201	768	146	73.7	26.6	BLQ
100	50301	247000	-	-	-	-
BLQ: Below the lower limit of quantification (< 5 ng/mL)						
* 100mg/kg投与動物は投与時にショック症状を呈し死亡, 溶血にともなうショックと考えられる						
**25 mg/kg投与動物でも血液は溶血, 血尿も見られる.						
2) 100 mg/kg (12.5 mg/mL液)を0.5mL/分の速度で静脈内投与 (投与液量: 8mL/kg)						
<マレイン酸塩静脈内投与>						
Dose (mg/kg)	Animal No.	Plasma concentration of analyte (ng/mL)				
		0.083 h	2 h	4 h	8 h	24 h
100	50201	2120	983	628	582	86.9
*血尿及び体温低下が見られたが, 瀕死状態にはならず, 回復						

表 2

静脈内投与試験におけるP092脳脊髄液濃度			
1) 25mg/kg (12.5 mg/mL), 100mg/kg (50mg/mL)をボラス静脈内投与 (投与液量: 2mL/1			
<マレイン酸塩静脈内投与>			
Dose (mg/kg)	Animal No.	CSF concentration of analyte (ng/mL)	
		2~4 h	24 h
25	50201	BLQ	BLQ
BLQ: Below the lower limit of quantification (< 5 ng/mL)			
*BLQではあるが, 2-4時間にわずかなピークあり(0.5ng/mL程度)			
2) 100 mg/kg (12.5 mg/mL液を0.5mL/分の速度で静脈内投与, 投与液量: 8mL/kg			
<マレイン酸塩静脈内投与>			
Dose (mg/kg)	Animal No.	CSF concentration of analyte (ng/mL)	
		2~4 h	24 h
100	50201	BLQ	BLQ
BLQ: Below the lower limit of quantification (< 5 ng/mL)			
*BLQではあるが, 2-4及び24時間にわずかなピークあり(1.4ng/mL程度)			

図 2 : 細胞試験における P092 マレイン酸塩の効果



- ・ 5μl/レーン
- ・ 2013.2に新しく起こした細胞使用
- ・ 13/08/09回収分
- ・ Mini-PROTEAN TGXゲル(15%) 使用
(泳動時間20分、180V)
→スマイリング防止のため電圧を200Vから180Vに下げた。

2013/08/15

ミリQ 0.1%	47169128.5	228843653	100
P092マレイン酸塩 0.05 μM	48049320.9	240419636	105.06
P092マレイン酸塩 0.1 μM	44273716.7	211273037	92.32
P092マレイン酸塩 0.3 μM	36743726	196081212	85.68
P092マレイン酸塩 0.5 μM	27869176.6	150339908	65.7
P092マレイン酸塩 0.8 μM	16922191.4	102946458	44.99
P092マレイン酸塩 1.2 μM	14888453.1	92875344.6	40.58
P092マレイン酸塩 1.5 μM	11509275.3	79880166	34.91
P092マレイン酸塩 2.0 μM	8990252.52	61526056.2	26.89
P092マレイン酸塩 5.0 μM	5920105.31	41410146.6	18.1

130815実施

これらの事情を考え合わせると、静脈投与した場合の 25mg/Kg ($\sim 250 \mu\text{g/mL}$) の用量は、細胞実験における $0.5 \mu\text{M}$ の約 1000 倍に相当しますので、0.25 mg/Kg の用量でも、プリオンの量を減少させることは十分可能であると考えられます。脳脊髄液に溶けている量は僅かですが、脳内には確実に移行しています (表 2) ので、必ず何らかの効果はある、と考えられます。

しかし、静脈投与に際しては、急速投与は、溶血がみられることから、次に、投与速度に関して検討を行いました。

P092・マレイン酸塩の溶血性検討実験

実施日：2013 年 8 月 29 日

【方法】：

- 1) サル血液 (ヘパリン血) を採取する。
- 2) P092・マレイン酸塩 (フリー体換算：1.493) の 12.5 mg/mL を生理食塩液を用いて 10mL 調製する (pH3.8)。
- 3) 同様に P092・マレイン酸溶液 (12.5mg/mL) を調製し、pH を 0.1N 水酸化ナトリウム液を用いて調製する (所定量の約半量の生理食塩液で溶解させ、水酸化ナトリウム液を添加し、pH を 6-7 付近にする \rightarrow pH5.96 までにした)。
- 4) 上記の各 P092・マレイン酸溶液を生理食塩液で 2 倍段階希釈を行い、希釈列を用意する (7 段階)。
- 5) サル血液 0.5 mL と P092・マレイン酸塩溶液 0.5 mL を混合し、室温で 30 分間放置する。サル血液と生理食塩液を同率で混合したものを対照として設定する。
- 6) $10000\times\text{g}$, 3 分間 (4°C) で遠心分離し、上清を得る。
- 7) 目視にて溶血程度を確認するとともに、上清中の LDH (ラクトースデヒドロゲナーゼ活性, U/L) を測定して、溶血程度を評価する。

【結果】：

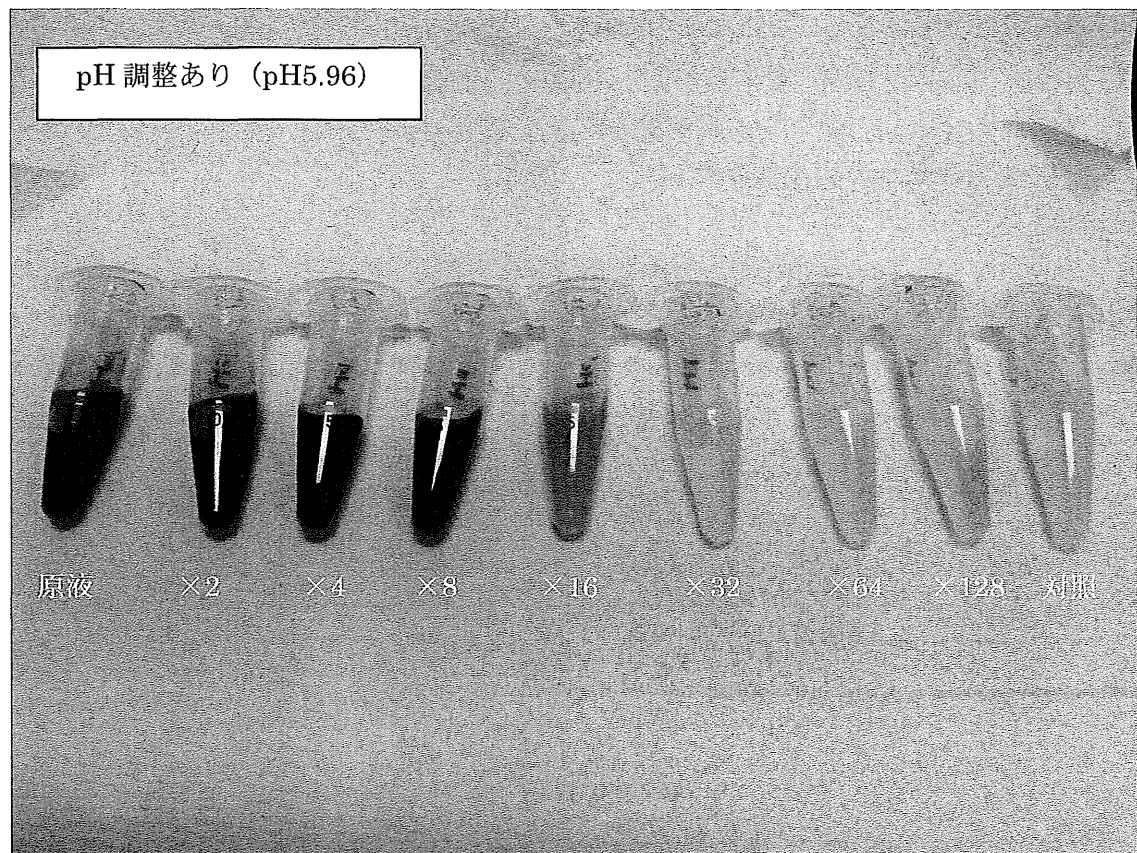
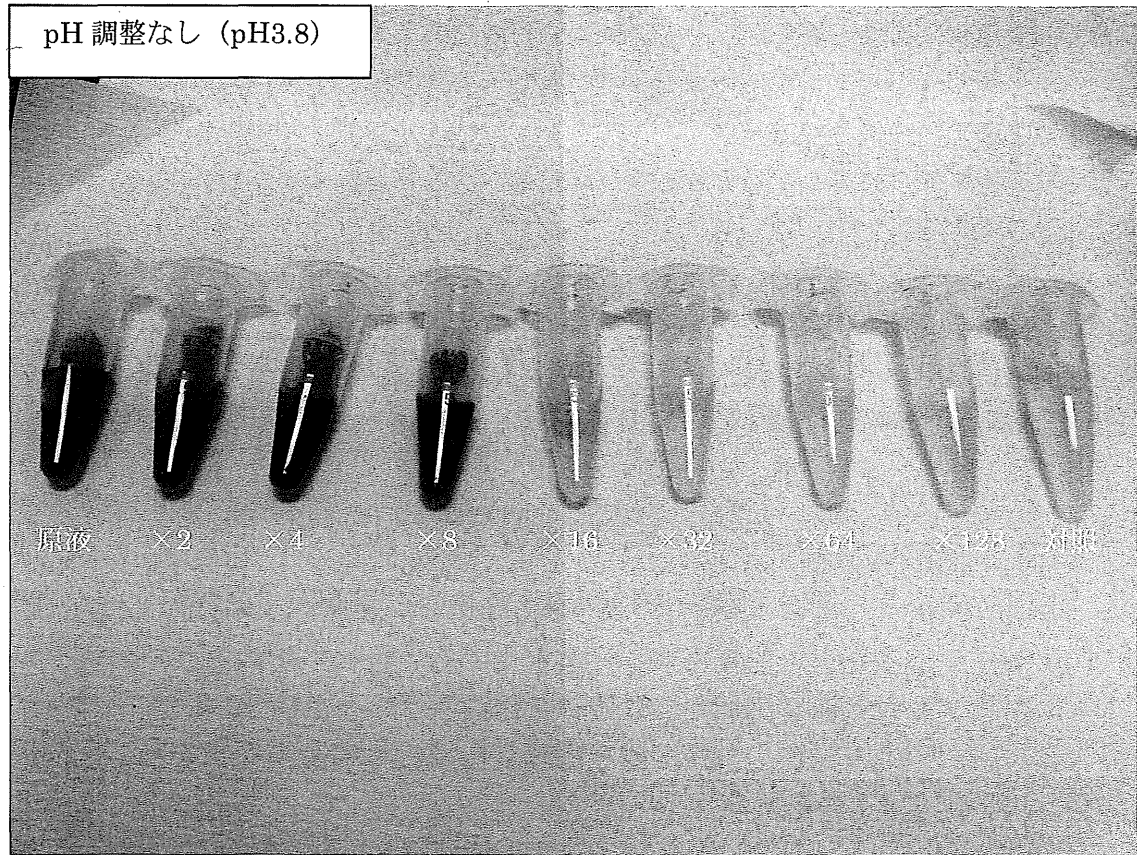
- 1) 目視では、pH を調整した方が溶血度合いは強いと思われた ($\times 16$ 液比較にて、次ページ写真参照)。
- 2) LDH 値は以下のとおりであった。なお、原液 \sim $\times 8$ については溶血度合いが強度であったので、LDH 測定は行わなかった。pH 調整した方が LDH 値は若干高い傾向がみられた。

	$\times 16$	$\times 32$	$\times 64$	$\times 128$	対照
pH調整なし	1108	218	132	125	86
pH調整あり	1464	302	138	128	-

【まとめ】

P092・マレイン酸溶液 (12.5 mg/mL) は、少なくとも $\times 64$ 倍希釈をして投与

することが望ましいと考えられた (0.2 mg/mL).



以上から、0.2 mg/mL 程度まで薄めないで静脈内投与は難しいと思います。サルでは、おそらく0.2 mg/mL 程度まで薄め、10 mg/kg 投与を行うとなると、50 mL/kg の投与液量になり、2 mL/分の投与速度で投与した場合、5 kg の動物で2時間程度投与にかかる計算になります。2時間程度であれば、サルをチェアに保定して静脈内投与は可能です。従いまして、この投与量をサルにおける静脈内投与の最大量としたい、と考えます。

11. プリオン感染サルを用いた薬理試験については、ヒトにおける薬効を推察する上でも重要な試験と考えることから、精神症状及び神経症状の評価については可能な限りバイアスを低減して実施することが望ましいと考えますが、現時点で相談者が検討している内容があれば説明してください。

回答：観察項目については現在、実際に発症しているサルで確認して再構築を行いスコア化を作成中です。特に、神経症状、精神症状、高次脳機能（短期記憶）、運動機能（手の動作時間）の評価系を構築しております。

精神症状については、サルのベースの反応が個体によって異なるため（発症前でも、アイソレーターに移動してから自閉症行動が発現するなど）相対的な評価が必要になるかと思えます。また、麻酔下で皮質脳波測定を行っています。スクレイピープリオン接種リスザルではPSDが認められましたが、現在発症が進行している個体では振幅低下の傾向が認められるかもしれません。

12. 投与期間に関連して、対照群が全麻痺状態になった時点で全群を安楽死させる旨記載されていること（平成25年度 共同利用施設利用研究計画書：年次計画）について、全麻痺等一定の基準を満たした動物を安楽殺することは受入可能と考えるものの、本薬の予後改善効果を十分に評価するためには、全麻痺等一定の基準を満たしていない動物については可能な限り投薬・観察を継続し、生存期間の延長についても評価すべきと考えますが、これについて相談者の見解を説明してください。

回答：投与群で発症、病態の進行を抑えることができるのであれば、安楽死は病態のステージで一定して行い（麻痺、振戦が進行し、自力での摂食が困難となった時）長期観察の方が有用な情報を得ることができるかと思えます。例えば、自力で摂食できなくなった時点で安楽死という同じエンドポイントを持たせることで、生存期間を評価できると思えます。動物愛護の観点からもエンドポイントの設定が必須であり、死ぬまで観察することは、認められておりませんので、よろしく願います。

<投与経路について>

13. サル血漿・脳脊髄液中濃度測定（6～7月、8月：フリー体（経口）、P092塩（経口）、P092塩（注射））が計画されていますが、当該試験結果が既に得られていれば、提示してください。

回答：

フリー体（経口） 治験薬概要書P31～33参照

P092塩（経口）

Table Plasma Concentration of P092

試験番号: B130595

<マレイン酸塩経口投与>

Dose (mg/kg)	Animal No.	Plasma concentration of analyte (ng/mL)				
		1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
250	10101	8.27	7.23	8.72	BLQ	BLQ
	50101	9.10	12.6	11.7	6.39	BLQ
	Mean	8.69	9.92	10.2	BLQ	BLQ

BLQ: Below the lower limit of quantification (<5 ng/mL)

P092塩（注射）

経口

Table Plasma Concentration of P092

試験番号: B130596

<コハク酸塩経口投与>

Dose (mg/kg)	Animal No.	Plasma concentration of analyte (ng/mL)				
		1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
250	10101	17.8	16.3	25.3	9.17	5.45
	50101	9.44	14.0	25.8	7.22	BLQ
	Mean	13.6	15.2	25.6	8.20	BLQ

BLQ: Below the lower limit of quantification (<5 ng/mL)

フリー体、塩の経口投与、同用量の塩の注射では、血中濃度は、それほど大きく変化しません。血中濃度は、単純に分散した場合の濃度（2.5 mg/ml）に比べると極めて低い値となっています。これらのことを総合的に考え合わせると、経口投与でも、大部分は吸収され血液中に移行しているが、そのほとんどが、血管壁や赤血球に吸着し、血漿中に出て来ないものと判断されます。

14. 現状の静注用製剤はpHが3程度とされており、血管外漏出が生じた際に局所刺激性の発現が懸念されますが、より静脈内投与に適した製剤の検討状況について説明してください。この結果、

回答：現在は、静脈内投与による製剤の検討は実施致しておりませんが、現行の注射液の投与について安全性を考慮して、希釈した注射液を調製し長時間の点滴静注による慎重な投与を考えています。従いまして、仮に点滴静注時に血管外露出が生じた場合、通常の静脈注射による投与よりも血管外漏出量は少なく、薄めた注射液のため局所刺激は低いものと推察されます。

また、静脈内投与における本剤の局所刺激について、動物を用いた毒性試験等において局所刺激性を観察・評価することで、必要により製剤の局所刺激性を考慮した検討を考えることになると思います。

以上

プリオン感染サル治療試験 (案)

2013/09/04

被験動物

カニクイザル (Cynomolgus macaque) 3 匹

性別：オス

年齢：1~2 歳 (プリオン接種時)

グループ分け

- 1 群 コントロール群 3 匹
- 2 群 発症早期 P092 投与群 3 匹

プリオンの接種方法

BSE 感染サルの脳乳剤 (BSE/JP6, classical type)、1 代継代
10%脳乳剤/PBS (w/v)、200 ul

接種方法：右側頭骨にドリルで穴を開け、視床下部に注射する。

治療薬候補物質

プラシーボ ブドウ糖液

P092 (コハク酸塩 or マレイン酸塩)

治療薬候補物質の投与方法

投与開始時期 (発症早期)

- 1 群 プラシーボ投与
- 2 群 P092 投与

投与量 (経口の場合、10 mg/Kg/day、静脈注射の場合、10 mg/Kg/week を想定)

投与間隔 毎日一回経口投与、或いは毎週一回点滴静注

投与方法 (経口の場合、リングに塗布 或いは 2 時間かけて点滴静注)

治療効果の検証方法

毎周一回、経過観察、ビデオ撮影・記録

3 ヶ月に一度、脳脊髄液採取

死亡時に病理検査

実験スケジュール

	2013												2014												2015		
	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3					
予定潜伏期	*prion 接種																										
プラシーボ投与																									?		
発症後早期投与																									?		
血液、脳脊髄液採取	○				○			○			○			○			○			○							
症状観察、ビデオ撮影	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○					

主要観察項目、及び検査項目

精神症状

抑うつ状態	有、無、不明
自傷行為	有、無、不明
食欲不振	有、無、不明
あくび	有、無、不明
驚愕反応	有、無、不明
不穏 (特に夜間に落ち着きなくそわそわするか)	有、無、不明

神経症状

運動失調 (転びやすい)	有、無、不明
振戦 (手足が震える)	有、無、不明
ミオクローヌス (四肢のびくつき)	有、無、不明
運動麻痺	有、無、不明
四肢筋強剛 (体のこわばり)	有、無、不明
姿勢反射障害 (転びやすい)	有、無、不明
動作緩慢 (動きがにぶいか、すくみ足がある)	有、無、不明
痙性歩行 (突っ張るような歩き方)	有、無、不明
筋力低下	有、無、不明
歩行不能	有、無、不明

認知機能障害、意識障害

記憶力障害	有、無、不明
意識障害	有、無、不明

無動性無言

無言、体は動かさないが目は動いている	*動けなくなったら安楽殺
無言、体は動かさない、目も動かない	

脳脊髄液

14-3-3 蛋白質	増加
タウ蛋白質	増加
PMCA	←試料は研究所外に持ち出せるが、量が取れない (髄液 500ul 程度)
PrPSc (QUIC)	←QUIC でサルの試料を測定できるか? サンプル量が確保できるか。

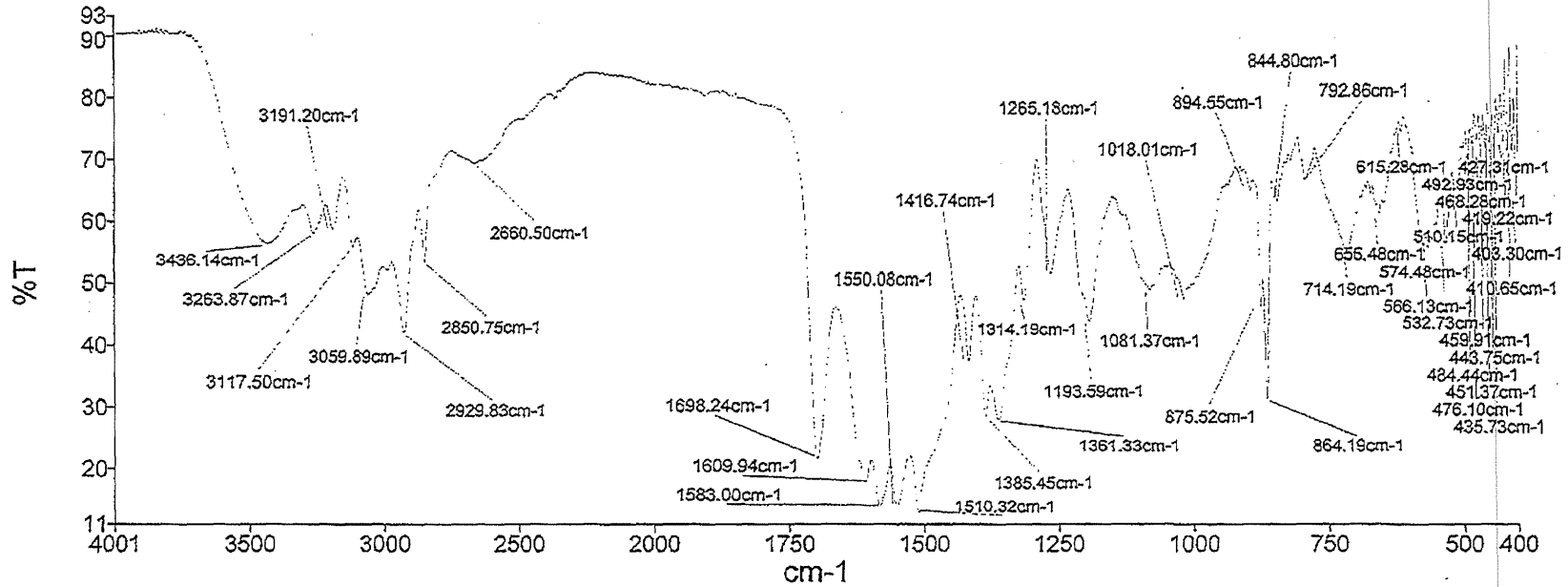
ADL 他

食欲不振	有、無	*食事不能時は安楽殺
------	-----	------------

P092 マレイン酸塩チャート

測定者
日付

Administrator
2013年7月17日 14:51



- 1928 -

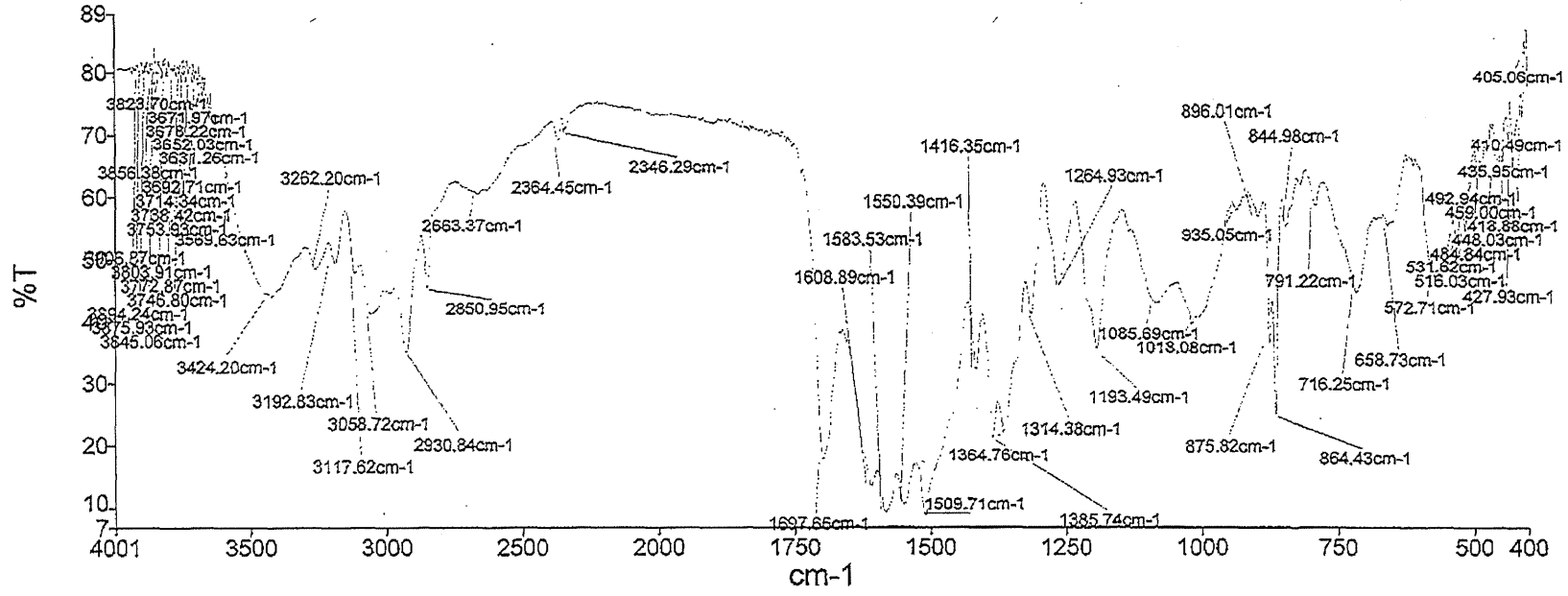
サンプル名	記述
検体・11448097-2-0週間2013年7月17日	

P092 マリン酸塩
0.週間保存品

SD 確認
千葉 央彦
2013/7/17



測定者 Administrator
日付 2013年7月26日 11:23



サンプル名	記述
検体-11448097-2-2週間2013年7月25日	

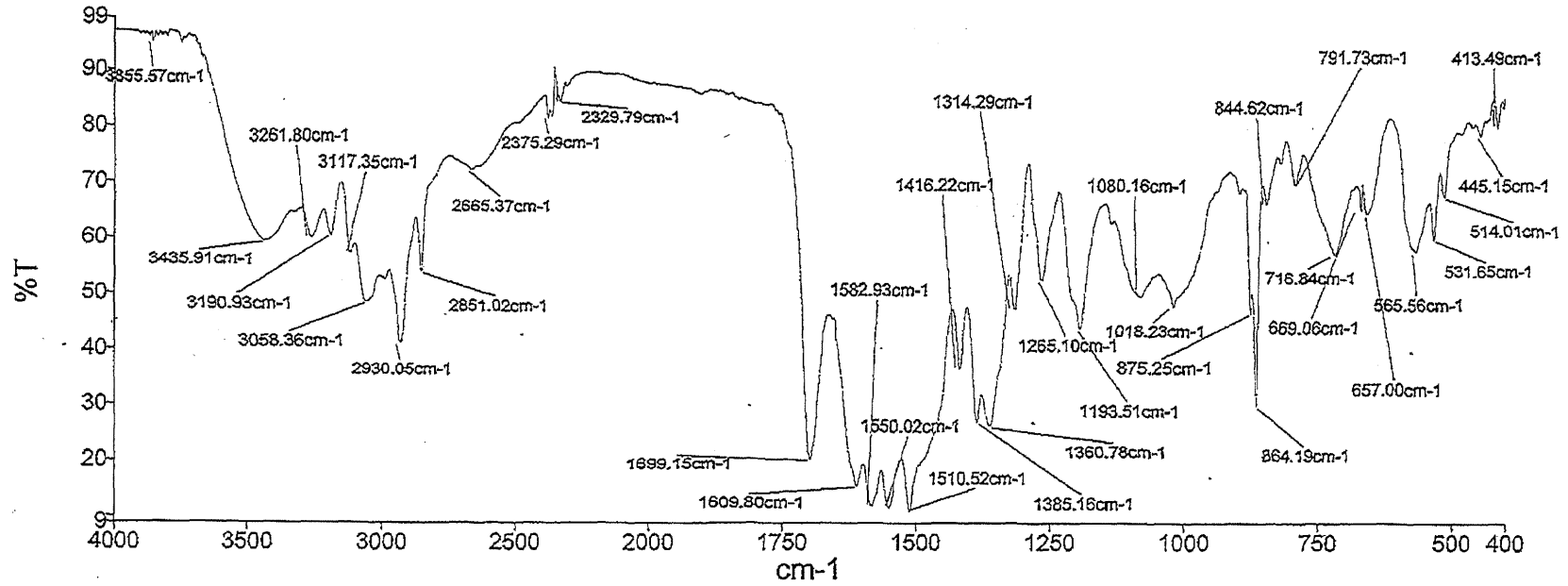
P092 マリン酸塩
2週間保存品



- 1929 -

測定者
日付

Administrator
2013年8月8日 15:03



サンプル名	記述
検体・11448097-2-4週間 2013年8月8日 ✓	

P092 2L>酸塩
4週間

QC: 2013.8.12

浦本 ちき

SD確認
20B.28
千葉忠彦



11448097-2
 VGMX-0w
 MMSO-d6 /TMS 0.03%
 SW
 OP/ijima

Sample Name:

Data Collected on:
 Agilent-VXR-inova500
 Archive directory:

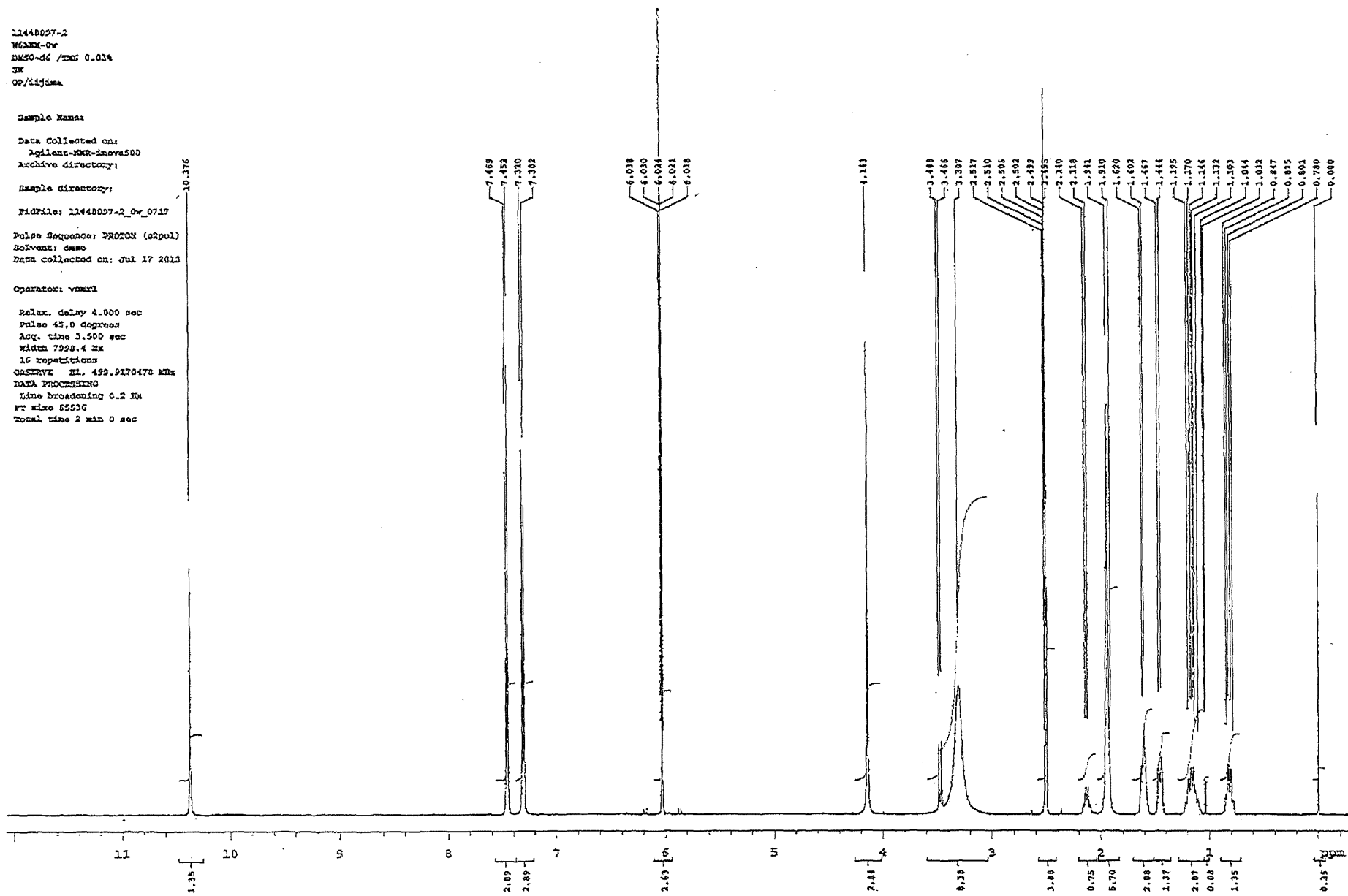
Sample directory:

File: 11448097-2_0w_0717

Pulse Sequence: PROTON (g2pul)
 Solvent: dmsc
 Data collected on: Jul 17 2013

Operator: vmar1

Relax. delay 4.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 3.500 sec
 Width 7998.4 Hz
 16 repetitions
 OBSERVE III, 499.9170478 MHz
 DATA PROCESSING
 Line Broadening 0.2 Hz
 F2 size 65536
 Total time 2 min 0 sec



P092 2kx酸塩 OW

11448097-2
W500K-DW
DMSO-d6 /TMS 0.03%
JW
OP/Iijima

Sample Name:

Data Collected on:
Agilent-NMR-inova500
Archive directory:

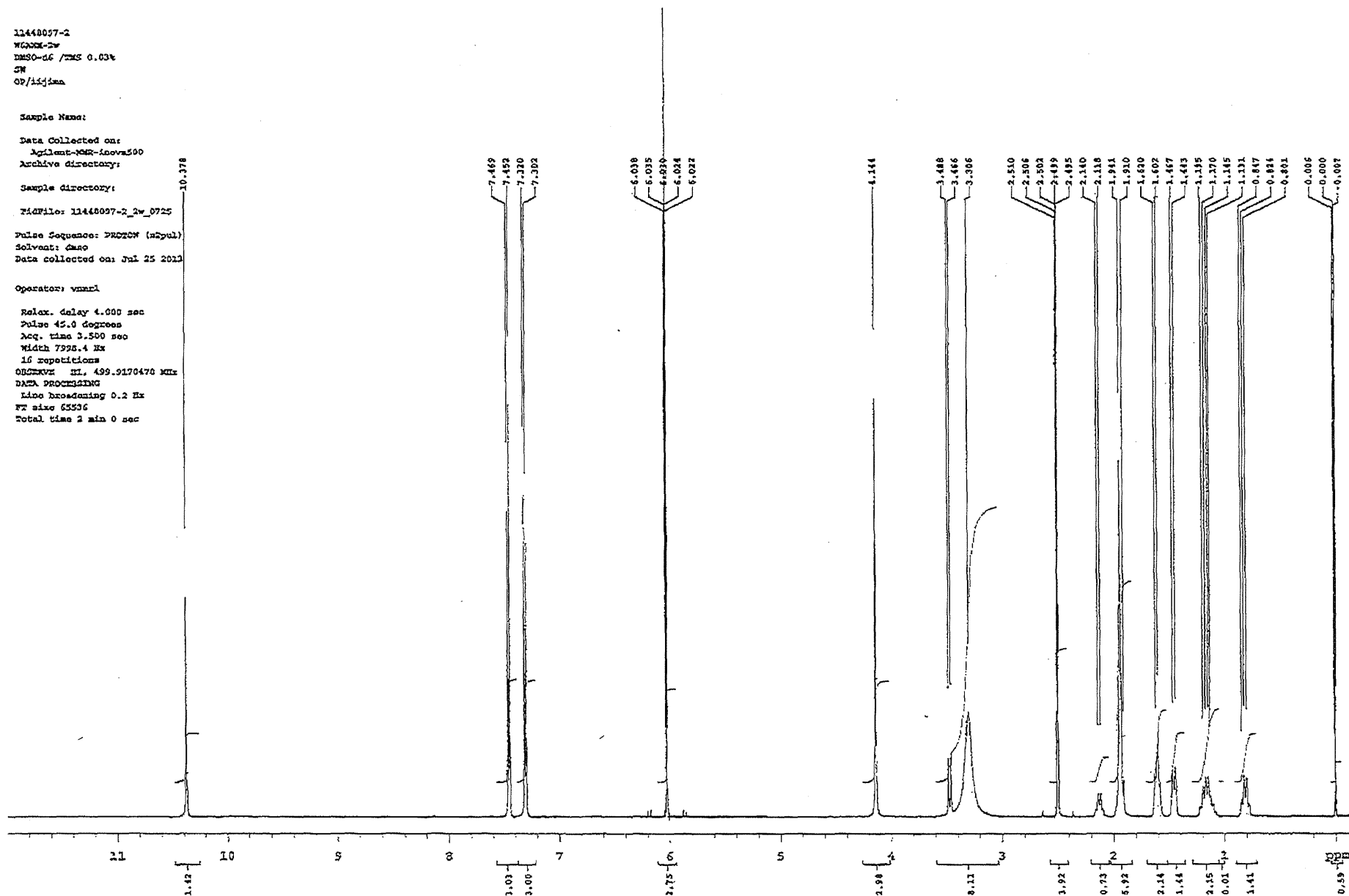
Sample directory:

File: 11448097-2_2w_0725

Pulse Sequence: PROTON (n2pul)
Solvent: dms
Data collected on: Jul 25 2012

Operator: vnm1

Relax. delay 4.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.500 sec
Width 7998.4 Hz
16 repetitions
OBSERVE CH: 499.9170470 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 65536
Total time 2 min 0 sec



P092 2w 酸塩 2w

1144097-2
WATERS-4w
BRAND-26 / TMS 0.03%
SW
OP/ijima

11445097-2
Sample Name: W6ANH-4

Data Collected on:
Agilent-NMR-Inova500
Archive directory:

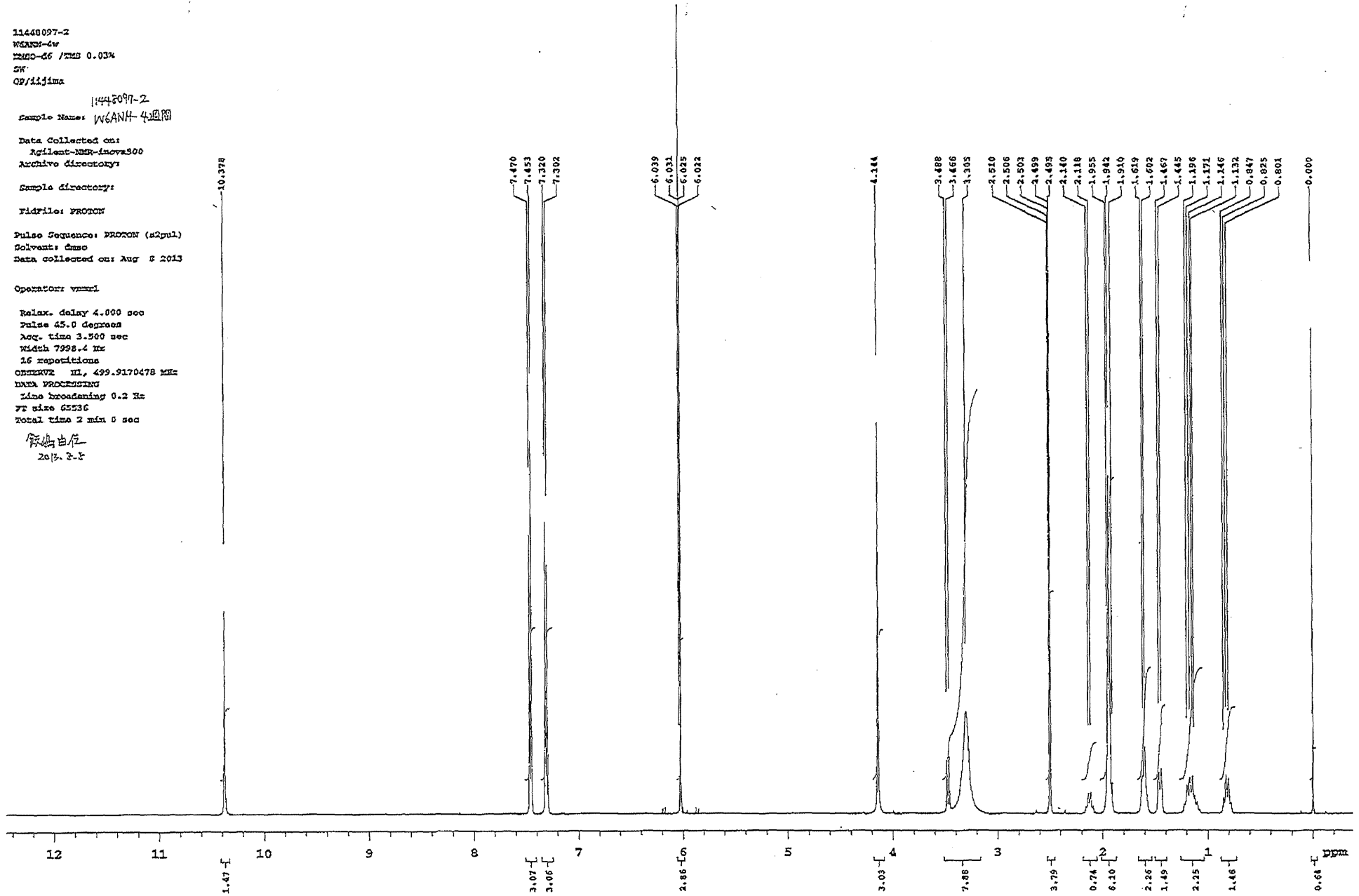
Sample directory:
Fidfile: PRORON

Pulse Sequence: PRORON (a2pul)
Solvent: CHMS
Data collected on: Aug 8 2013

Operator: ymm1

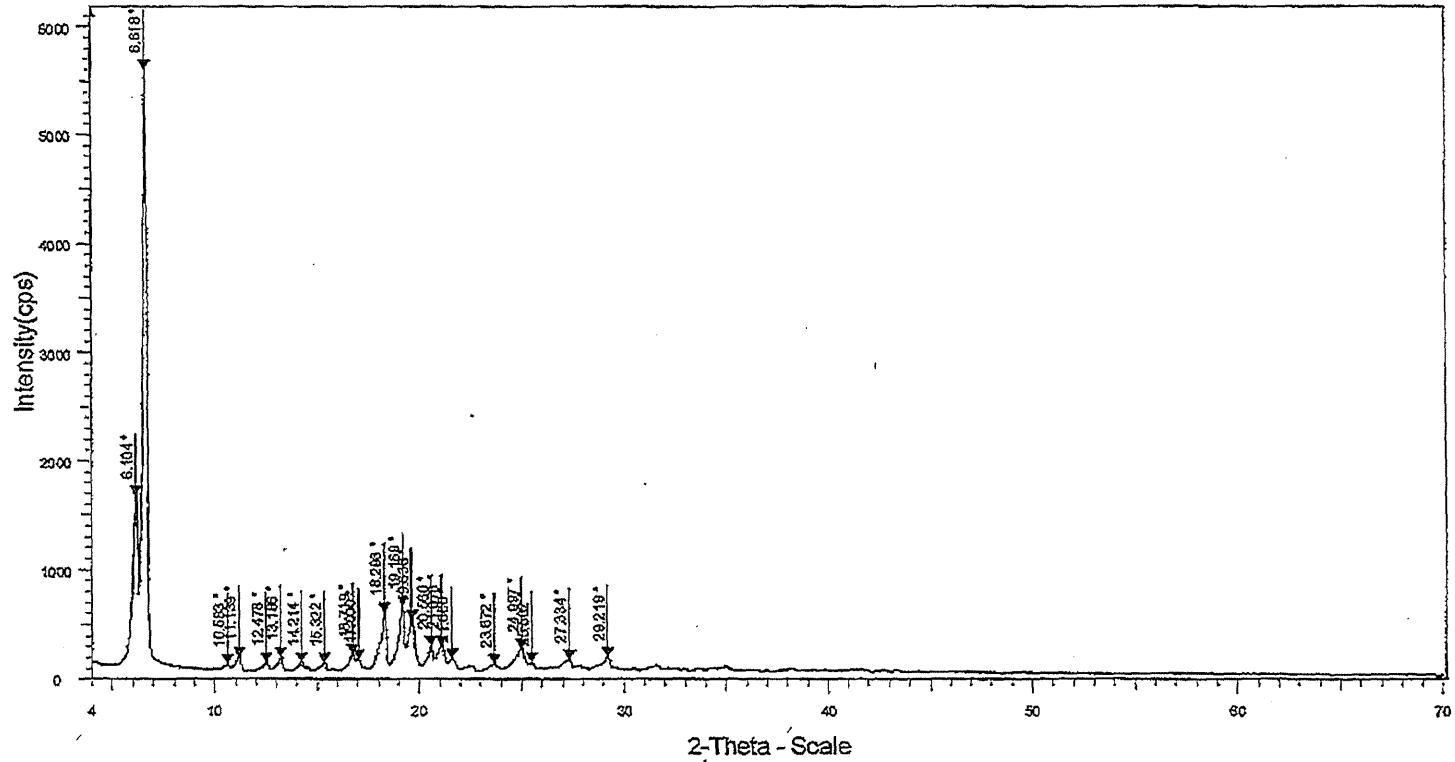
Relax. delay 4.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.500 sec
Width 7998.4 Hz
16 repetitions
CROSSPULP II, 499.9170478 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.2 Hz
FT size 65536
Total time 2 min 0 sec

分析由左
2013.8.8



D-90 0.1% 丙烷 4w

試験番号: 11448097-2



File: Malonic.raw - Type: Locked Coupled - Start: 4.000 ° - End: 70.134 ° - Step: 0.021 ° - Stop time: 115.2 s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 13 s - 2-Theta: 4.000 ° - Theta: 2.000 ° - Chi: 0.00 ° - Phi: 0.

W6ANM-0 週間

2013.7.12 石川 雅夫