

## 2. 物理的、化学的及び薬剤学的性質並びに製剤組成

### 2.1 原薬

#### 2.1.1 名称及び化学構造

(1) 一般名（治験成分記号）

ピルビン酸ナトリウム

(2) 分子式・分子量及び化学名

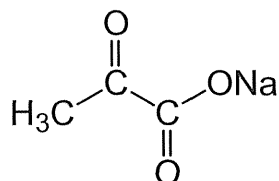
分子式：C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>

分子量：110.04

化学名（日本名） 2-オキソプロパン酸ナトリウム

化学名（英名） Sodium 2-oxopropanoate

構造式：



(3) CAS登録番号

113-24-6

#### 2.1.2 原薬の物理的・化学的性質

(1) 外観（性状）

白色～微黄色の結晶性の粉末

(2) 溶解性

溶解度（20℃、水）：32%

(3) 融点

220-230℃（分解）

(4) pH

pH：約7（本品の水溶液（1→10））

(5) 分配係数・解離定数

いずれも未測定

### 2.1.3 原薬の安定性及び貯法

#### (1) 原薬の安定性

本品をチャック付のポリエチレン袋に入れ、40°C/75%RHに1ヶ月保存したとき、水分を吸収して徐々に分解、着色した。

本品を二重のポリエチレン袋（シリカゲル入り）に入れ、更にこれをアルミラミネート袋に入れて加速試験（40°C/75%RH）で6ヶ月及び長期保存試験（25°C/60%RH）で12ヶ月保存した結果、いずれの試験項目（性状、確認試験、類縁物質、乾燥減量、含量）においても変化は認められず安定であった。なお、長期保存試験は継続中である。

#### (2) 原薬の貯法

遮光した気密容器にて、室温で保管する。

## 2.2 製剤

本剤は、原薬のピルビン酸ナトリウムをそのまま用いる。したがって、製剤に関する情報は、上述の原薬に関する情報と同一である。

### 3. 薬理試験

#### 3.1 効力を裏付ける薬理試験

##### 要約

ピルビン酸は解糖系代謝経路の終末に位置し、ピルビン酸脱水素反応を経てアセチル CoA に転換され、tricarboxylic acid (TCA) サイクルに流入する生体内の内因性活性物質である。主な薬理作用としては、以下が報告されている<sup>1)</sup>。

- 1) 過酸化水素の除去、2) 解糖系の活性化、3) 細胞死の防止、4) PDHC の賦活化、5) アルコールの酸化、6) 尿素の合成 (右図)。

##### 3.1.1 過酸化水素の除去

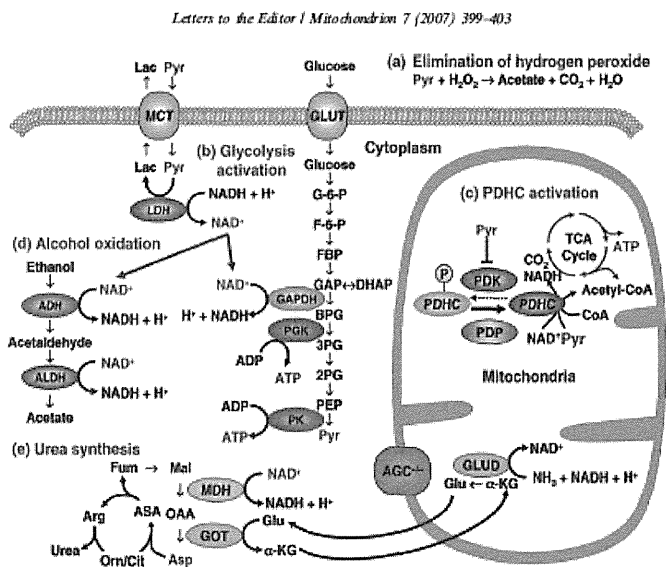
ピルビン酸は非酵素的に過酸化水素と反応し、酢酸・二酸化炭素・水を生成することによって過酸化水素を除去する。参考までに、この抗酸化作用によって、ピルビン酸は臓器移植・体外循環時の心肺保護液や卵子の保存液に使用されている<sup>2)</sup>。

##### 3.1.2 解糖系の活性化

ピルビン酸は、細胞外膜に存在する monocarboxylate transporter (MCT) によって細胞内の乳酸と交換された後、lactate dehydrogenase (LDH) を介することによって、NADH から NAD<sup>+</sup> への変換を促進する<sup>3-4)</sup>。NAD<sup>+</sup> は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の基質であり、glyceraldehyde-3-phosphate を 1,3-bisphosphoglycerate (BPG) に変換する際に必要となる。BPG は、phosphoglycerate kinase (PGK) を介することによってリンを adenosine diphosphate (ADP) に供給し、adenosine triphosphate (ATP) の産生に寄与する。

##### 3.1.3 細胞死の防止

ミトコンドリア DNA を全く欠く ρ ゼロ細胞では、ピルビン酸を培養液中に添加することで、細胞死を防ぎ、細胞増殖を可能にすることが示された。このことは、電子伝達系酵素が完全でないヒトの細胞でもピルビン酸を添加することで、細胞死を抑制することを示しており、電子伝達系酵素が欠損しているミトコンドリア病患者でも細胞死を防ぐ可能性があることを示している<sup>5)</sup>。



### 3.1.4 PDHCの賦活化

ピルビン酸は、pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) の阻害を介してピルビン酸脱水素酵素複合体 pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) を賦活化する。賦活化された PDHC は、TCA サイクルの活性化に寄与する<sup>6)</sup>。

### 3.1.5 アルコールの酸化

ピルビン酸は、NAD<sup>+</sup>を alcohol dehydrogenase (ADH) と acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) に供給することによってエタノールを酸化し、酢酸合成を促進する<sup>1)</sup>。

### 3.1.6 尿素の合成

ピルビン酸は、malate dehydrogenase に NAD<sup>+</sup>を供給することによって、リンゴ酸からオキザロ酢酸への変換を促進する。オキザロ酢酸はアスパラギン酸へと変換されて尿素サイクル内に入り、尿素の合成に関与する<sup>7-8)</sup>。

以上に示したように、ピルビン酸は種々の作用を示すものの、主要な作用は電子伝達系の活性化 (NAD<sup>+</sup>供給への関与) である。NAD<sup>+</sup>は好気性解糖系を賦活化するうえで重要な役割を果たし、NAD<sup>+</sup>が不足すると、ATP が産生されなくなる。このような背景から、NADH/NAD<sup>+</sup>比は細胞内の ATP 産生能を示す指標となる。この NADH/NAD<sup>+</sup>比を反映するのが細胞質では lactate/pyruvate (L/P) 比であり、ミトコンドリア内マトリックスでは  $\beta$ -hydroxybutyrate/acetoactate 比となる。たとえば、L/P 比が 25.6 を超えると、嫌気性解糖系での ATP 合成が完全に停止する<sup>3,4)</sup>。しかし、乳酸値が高い状態でも、ピルビン酸を投与すれば、NAD<sup>+</sup>の供給が可能になり、嫌気性解糖系が賦活化する。理論的には、ピルビン酸 Na を 1 mol (110 g) 投与すると、2 mol (1014 g) の ATP を産生することが可能になる。

ミトコンドリア病に伴う高乳酸血症は、ミトコンドリアの遺伝的異常によって細胞内の好気性解糖系が障害される結果、高乳酸血症を生じるもので、エネルギー不全に基づく臓器不全を来すことが最大の問題である。すなわち、細胞内の乳酸濃度が高くなる結果、NADH から NAD<sup>+</sup>への変換が進まなくなり、ATP の産生不全が生じるのである。ピルビン酸ナトリウムは、NAD<sup>+</sup>を供給することによって好気性解糖系を賦活化し、高乳酸血症によって生じるエネルギー不全を治療しようとするものである。さらに、ミトコンドリア病では呼吸機能に障害が生じる結果、ミトコンドリアからの反応性酸化物の漏出が増加するため、ピルビン酸の過酸化水素除去作用 (抗酸化作用) は高乳酸血症の治療に好ましい影響を及ぼす可能性がある。

### 3.1.7 ミトコンドリア病の細胞モデルを用いた薬理試験

ピルビン酸の有効性は、ミトコンドリア病の細胞モデルである  $\rho^0$  サイブリドを用いた薬理試験で確認されている<sup>9)</sup>。 $\rho^0$  サイブリドは、細胞質内に MELAS や MERRF 型の 100% 変異ミトコンドリアが存在するもので、電子伝達系の酵素活性はほぼ消失している。この細胞モデルにピルビン酸及びウリジンを添加すると、正常のミトコンドリア DNA を有する個体由来の細胞と同程度まで細胞増殖能が改善した。これは、ピルビン酸の添加によって L/P 比が正常化し、解糖系で ATP が合成されたことによって生じたものと考えられる。さらに、MELAS の変異を有する  $\rho^0$  サイブリドを用いた薬理試験でも、エネルギー代謝に及ぼすピルビン酸の有効性が確認されている<sup>10)</sup>。この研究では、DCA 投与時には NADH/NAD<sup>+</sup> 比に変化がみられなかったが、ピルビン酸投与時には NADH/NAD<sup>+</sup> 比が改善し、ATP レベルが増加し、ミトコンドリア病細胞での有効性が認められた。

## 3.2 安全性薬理試験

### 3.2.1 要約

*In vitro* 心血管系試験として human ether-a-go-go-related gene (hERG) 導入 Chinese hamster ovary (CHO) 細胞のカリウム電流 (hERG 電流) に対する影響を調べる安全性薬理試験、ラットにおける呼吸系に対する影響を調べる安全性薬理試験、覚醒下のイヌを用いて心血管系に対する影響を調べる安全性薬理試験を行った。中枢神経系に対する影響についてはラットにおける 4 週間反復投与毒性試験の中で評価を行った。

その結果、呼吸系に対しては 6250 mg/kg の投与で一過性の 1 回換気量の増加が認められたが、その他に特記すべき影響は見られず、臨床的に問題となる影響は認められなかった。

### 3.2.2 安全性薬理試験の成績一覧表

試験項目	動物種等	投与経路及び投与期間	投与量	試験成績
hERG 電流に対する影響	human ether-a-go-go-related gene (hERG) 導入 Chinese hamster ovary (CHO) 細胞	<i>In vitro</i> 、灌流法	0.1、1、10 mmol/L	特記すべき所見は認められなかった。
呼吸系に対する影響	ラット/Crl:CD(SD) (雄 8 匹/群)	経口、単回投与	1000、2500、6250 mg/kg	6250 mg/kg : 1 回換気量の増加
心血管系に対する影響	イヌ/ビーグル (雄 4 匹)	経口、単回投与	1000、2500、6250 mg/kg	特記すべき所見は認められなかった。

### 3.2.3 hERG 導入 CHO 細胞のカリウム電流に対する安全性薬理試験

[SBL743-006]

ピルビン酸ナトリウムの 0 (注射用水)、0.1、1 及び 10 mmol/L を human ether-a-go-go-related gene (hERG) 導入 Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に曝露し、カリウム電流 (hERG 電流) に対する作用を調べた。その結果、特記すべき影響は見られず、臨床的に問題となる影響は認められなかった。

### 3.2.4 ラットの呼吸系に対する安全性薬理試験

[SBL743-005]

ピルビン酸ナトリウムの 0 (注射用水)、1000、2500 及び 6250 mg/kg を SD ラット (CrI:CD (SD)、雄 8 匹/群) に単回経口投与し、呼吸数、1 回換気量及び毎分換気量を Whole Body Plethysmograph 法を用いて測定し、呼吸系に及ぼす影響を調べた。その結果、ピルビン酸ナトリウムの 6250 mg/kg の投与後 4 及び 8 時間に 1 回換気量の増加がみられた。

### 3.2.5 覚醒下イヌの心血管系に対する安全性薬理試験

[SBL743-011]

ピルビン酸ナトリウムの 0 (注射用水)、1000、2500 及び 6250 mg/kg を雄性ビーグル (4 匹) に単回経口投与し、テレメトリー法を用いて、投与後 0.5、1、2、4、8 及び 24 時間の血圧 (収縮期、拡張期及び平均)、心拍数及び心電図パラメータ (PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc) に及ぼす影響を調べた。その結果、特記すべき影響は見られず、臨床的に問題となる影響は認められなかった。

## 3 の文献

1. Tanaka M, Nishigaki Y, Fuku N, Ibi T, Sahashi K, Koga Y. Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion* 2007;7:399-401.
2. Mallet RT, Sun J, Knott EM, Sharma AB, Olivencia-Yurvati AH. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp Biol Med* 2005;230:435-43.
3. Voet, D., Voet, J.G., *Biochemistry*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 1995a pp. 482.
4. Voet, D., Voet, J.G., *Solutions Manual to Accompany Biochemistry*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 1995b. pp. 113-114.
5. King, M.P., Attardi, G., Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989;246:500-503.
6. Bowker-Kinley, M.M., Davis, W.I., Wu, P., Harris, R.A., Popov, K.M.. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 1998;329:191-196.

7. Kobayashi, K., Sinasac, D.S., Iijima, M., Boright, A.P., Begum, L., Lee, J.R., Yasuda, T., Ikeda, S., Hirano, R., Terazono, H., Crackower, M.A., Kondo, I., Tsui, L.C., Scherer, S.W., Saheki, T., 1999. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat. Genet.* 1999;22:159-163.
8. Saheki, T., Kobayashi, K., Iijima, M., Nishi, I., Yasuda, T., Yamaguchi, N., Gao, H.Z., Jalil, M.A., Begum, L., Li, M.X., 2002. Pathogenesis and pathophysiology of citrin (a mitochondrial aspartate glutamate carrier) deficiency. *Metab. Brain Dis.* 2002;17: 335-346.
9. King MP, Koga Y, Davidson M, Schon EA. Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Mol Cell Biol* 1992 Feb;12(2):480-90.
10. Kami K, Fujita Y, Igarashi S, Koike S, Sugawara S, Ikeda S, et al. Metabolomic profiling rationalized pyruvate efficacy in cybrid cells harboring MELAS mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion* 2012;12:644-53

#### 安全性薬理試験の報告書

- [SBL743-005] 沼田 洋輔. ピルビン酸ナトリウムのラットにおける呼吸器系に対する安全性薬理試験. (株)新日本科学の最終報告書 2013年[SBL743-006] 松尾 純子. ピルビン酸ナトリウムの hERG 導入 CHO 細胞のカリウム電流に対する安全性薬理試験. (株)新日本科学の最終報告書 2013年
- [SBL743-011] 軸藺 竜也. ピルビン酸ナトリウムの覚醒下イヌにおける心血管系に対する安全性薬理試験. (株)新日本科学の最終報告書 2013年

## 4. 薬物動態試験

### 要約

ラットにピルビン酸ナトリウムを単回経口投与したときの薬物動態は10~1000 mg/kgの用量で線形性を示した。ピルビン酸ナトリウムは速やかに吸収され、主に炭酸ガスとして呼気中に排泄された。残りのピルビン酸ナトリウムは尿中に未変化体として排泄され、一部は脳及び脊髄を除いた組織内に広く取り込まれた。

ピルビン酸ナトリウムの血漿蛋白への結合率は3.38%以下であった。

ピルビン酸ナトリウムは CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4/5 への阻害作用は見られなかった。

### 4.1 吸収

#### [PBC743-019]

ラットに $[^{14}\text{C}]$ ピルビン酸ナトリウム 10 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中の放射能濃度は速やかに上昇し、投与後 0.667 時間で 2.98  $\mu\text{g eq./mL}$  ( $C_{\text{max}}$ ) となり、その後 41.0 時間の半減期で消失した。AUC $_{0-\infty}$ 及び F はそれぞれ 66.4  $\mu\text{g eq.}\cdot\text{h/mL}$  及び 1.87% であった。

ラットに $[^{14}\text{C}]$ ピルビン酸ナトリウム 1000 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中の放射能濃度は、投与後 1.83 時間で 259  $\mu\text{g eq./mL}$  ( $C_{\text{max}}$ ) となり、その後 47.7 時間の半減期で消失した。AUC $_{0-\infty}$ 及び F はそれぞれ 7050  $\mu\text{g eq.}\cdot\text{h/mL}$  及び 1.99% であった。

ラットに $[^{14}\text{C}]$ ピルビン酸ナトリウム 10 mg/kg を静脈内投与したときの血漿中の放射能濃度は、投与後 0.0833 時間では 2170  $\mu\text{g eq./mL}$  であり、消失半減期は 45.6 時間であった。 $C_0$ 、AUC $_{0-\infty}$ 、CL $_{\text{tot}}$  及び  $V_{\text{dss}}$  はそれぞれ 4280  $\mu\text{g eq./mL}$ 、3550  $\mu\text{g eq.}\cdot\text{h/mL}$ 、2.82 mL/h/kg 及び 124 mL/kg であった。



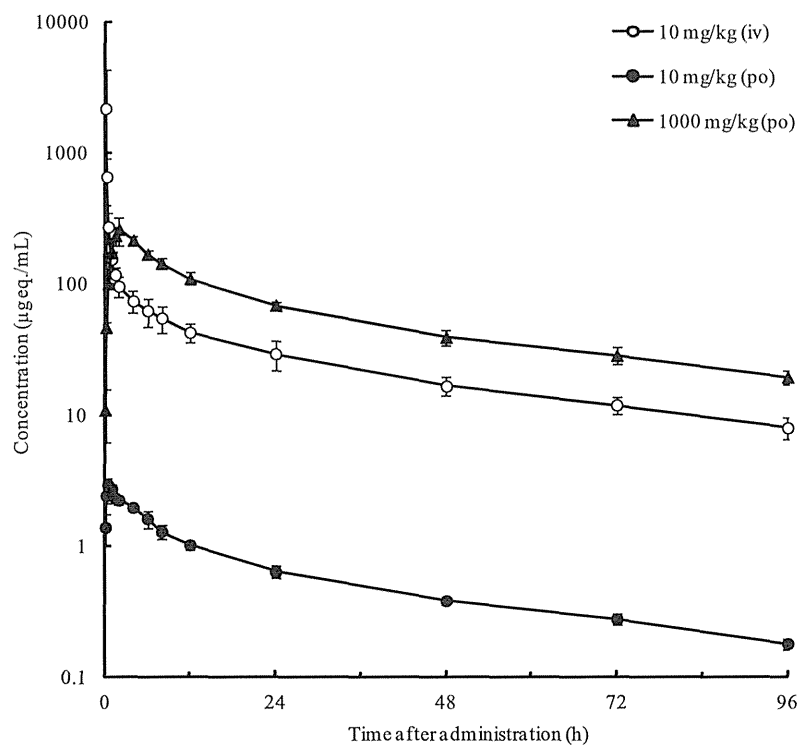


図 4-1 雄性ラットに $^{14}\text{C}$ ピルビン酸ナトリウム 10 及び 1000 mg/kg を経口投与並びに 10 mg/kg を静脈内投与したときの血漿中放射濃度推移  
 平均値 $\pm$ SD (n=3)

## 4.2 分布

### [PBC743-019]

ラットに $^{14}\text{C}$ ピルビン酸ナトリウム 1000mg/kg を経口投与したとき、投与後 1 時間で胃内容物、小腸内容物及び膀胱内尿に特に高濃度の放射能が認められ、腎臓髄質、膵臓、肝臓、腎臓皮質、脾臓、骨髄及び顎下線にも高い放射能濃度が認められた。投与後 4 及び 8 時間では大腸内容物に特に高い放射能が認められ、小腸内容物、顎下線、膵臓、骨髄、肝臓及び腎臓にも高い放射能が認められた。投与後 24 時間では主に大腸内容物、小腸内容物、肝臓、骨髄及び腎臓に放射能が分布し、投与後 48 時間では主に肝臓及び骨髄に放射能が分布した。その他の組織については、血液中の放射能濃度と同程度の分布であったが、脳及び脊髄には放射能はほとんど検出されなかった。

### [PBC743-016]

$^{14}\text{C}$ ピルビン酸ナトリウムを 2、20 及び 200  $\mu\text{g/mL}$  の濃度となるようにヒト、ラット及びイヌ血漿に添加したときの蛋白結合率は、それぞれ 1.20~3.17%、2.22~3.38%及び 2.20~3.04%であった。

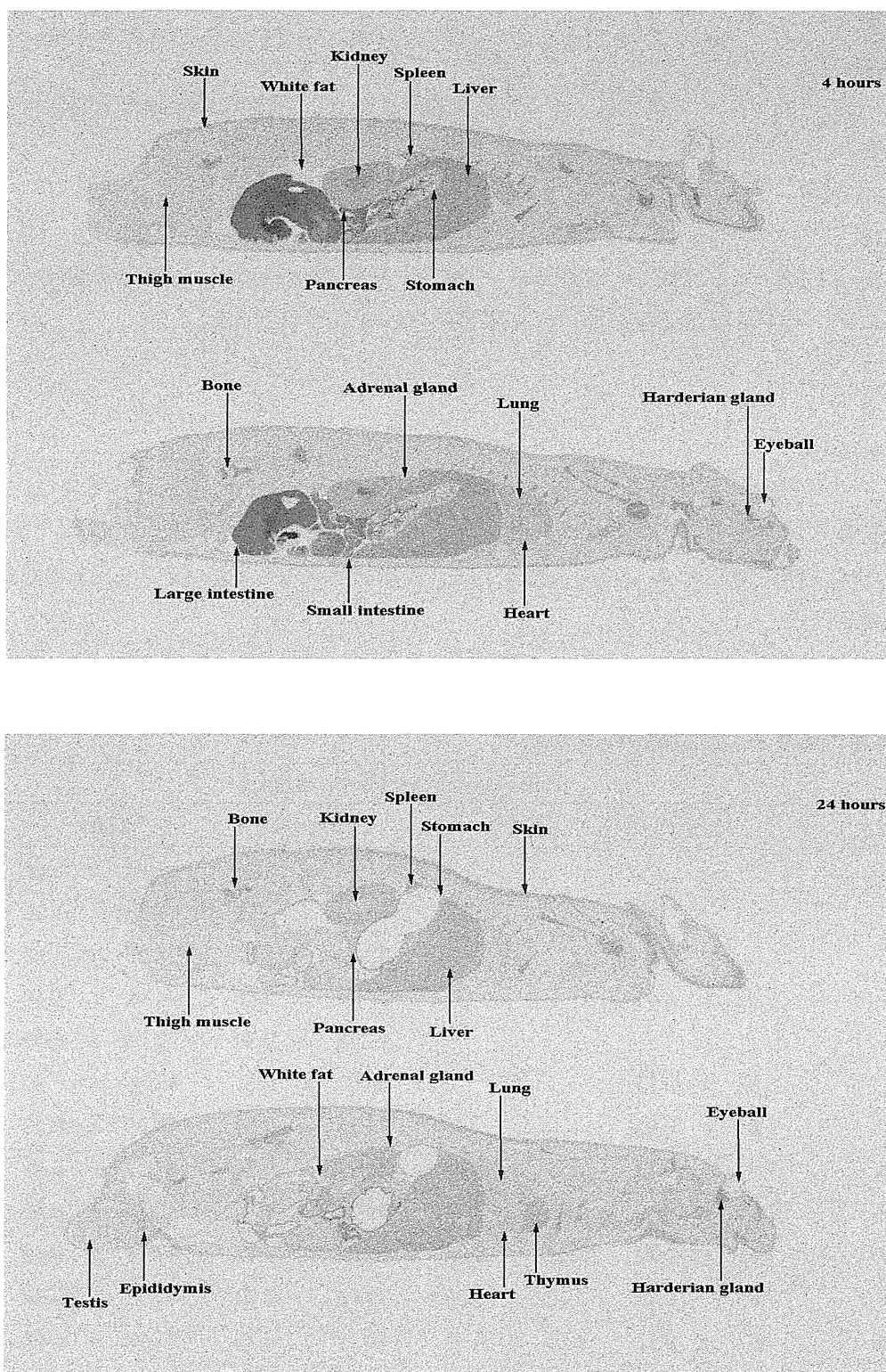


図 4-2 雄性ラットに $[^{14}\text{C}]$ ピルビン酸ナトリウム 1000 mg/kg を単回経口投与したときの投与後 4 及び 24 時間目のオートラジオグラム

### 4.3 代謝

#### [PBC743-019]

ラットに $^{14}\text{C}$ ピルビン酸ナトリウムを経口投与すると、約 80%が炭酸ガスとして呼気中に排泄され、さらに約 8%が未変化体として尿中に排泄された。

#### [PBC743-017]

ヒト肝ミクロソームにピルビン酸ナトリウムを添加して CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4/5 の指標酵素活性への影響を調べたが、いずれの分子種においても阻害作用は見られなかった。

### 4.4 排泄

#### [PBC743-019]

ラットに $^{14}\text{C}$ ピルビン酸ナトリウム 1000 mg/kg を経口投与したときの投与後 24 時間までの放射能の尿、糞及び呼気中への排泄率はそれぞれ 7.41%、1.55%及び 78.31%であった。投与後 168 時間までには 90.26%の放射能が尿、糞及び呼気中に排泄され、5.12%の放射能が体内に残存した。

表 4-1 雄性ラットに $^{14}\text{C}$ ピルビン酸ナトリウム 1000 mg/kg を経口投与したときの尿、糞及び呼気中への放射能の排泄率

Time (h)	Cumulative excretion (% of dose)			
	Urine	Feces	Expired air	Total
-0.5	-	-	1.83 ± 0.50	1.83 ± 0.50
-1	-	-	8.93 ± 1.10	8.93 ± 1.10
-2	-	-	28.15 ± 3.92	28.15 ± 3.92
-4	4.62 ± 0.31	-	60.29 ± 5.86	64.91 ± 6.10
-6	-	-	73.48 ± 0.39	73.48 ± 0.39
-8	6.03 ± 0.87	-	76.03 ± 0.51	82.06 ± 0.57
-12	6.87 ± 0.25	-	77.28 ± 0.69	84.15 ± 0.52
-24	7.41 ± 0.13	1.55 ± 0.38	78.31 ± 0.78	87.27 ± 0.49
-48	7.55 ± 0.13	2.03 ± 0.09	79.21 ± 0.74	88.79 ± 0.62
-72	7.61 ± 0.12	2.07 ± 0.09	79.68 ± 0.72	89.36 ± 0.60
-96	7.65 ± 0.12	2.10 ± 0.09	79.98 ± 0.73	89.73 ± 0.60
-120	7.67 ± 0.12	2.11 ± 0.09	80.19 ± 0.72	89.98 ± 0.60
-144	7.69 ± 0.12	2.11 ± 0.09	80.33 ± 0.72	90.14 ± 0.59
-168	7.71 ± 0.12	2.11 ± 0.09	80.44 ± 0.73	90.26 ± 0.60
Carcass	5.12 ± 0.31			95.38 ± 0.29

#### 4 の文献

[PBC743-016] 中村 稚加.  $^{14}\text{C}$ -ピルビン酸ナトリウムのラット、イヌ及びヒト血漿蛋白結合 (*in vitro*). (株)新日本科学. 最終報告書. 2014 年

[PBC743-017] 中村 稚加. ピルビン酸ナトリウムのヒト肝ミクロソームを用いた CYP 阻害試験. (株)新日本科学. 最終報告書. 2014 年

[PBC743-019] 後藤 瞳.  $^{14}\text{C}$  標識ピルビン酸ナトリウムのラットにおける吸収・分布・排泄試験. (株)新日本科学. 最終報告書. 2014 年

## 5. 毒性試験

### 5.1 要約

#### 単回投与毒性試験

SD ラット [CrI:CD(SD)] 及びイヌ (ビーグル) において、ピルビン酸ナトリウムの急性毒性を評価した結果、いずれの動物種においても死亡はみられず、一般状態の変化もみられなかった。このことから、ラット及びイヌにおける概略の致死量は 6250 mg/kg を上回る量と判断した。

#### 反復投与毒性試験

SD ラット [CrI:CD(SD)] にピルビン酸ナトリウムの 0 (注射用水)、1000、2500 及び 6250 mg/kg/日を 2、4 または 13 週間反復経口投与した試験では、一般状態、一般症状及び行動、眼検査及び血液学的検査ではピルビン酸ナトリウム投与の影響と考えられる所見はいずれの群にもみられなかった。体重、摂餌量、尿検査、血液生化学的検査及び器官重量において種々の変化が散見されたが、被験物質の大量投与または被験物質投与により引き起こされた飲水量及び尿量の増加に伴い発生した二次的変化であると判断した。剖検及び病理組織学的検査において胃局所の変化がみられたが、被験物質の刺激性による変化または刺激に対する反応性の変化であると考えられた。この変化は投与期間の延長によって、わずかながら増強する傾向がみられた。いずれの検査においても全身性の変化はみられなかった。また、投与期間中にみられた変化は、4 週間の休薬により回復するか回復傾向がみられた。

イヌにピルビン酸ナトリウムの 0 (注射用水)、1000、2500 及び 6250 mg/kg/日を 2 または 4 週間反復経口投与した試験では、一般状態、体重、摂餌量、眼検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査及び器官重量では、ピルビン酸ナトリウム投与の影響と考えられる所見はいずれの群にもみられなかった。尿検査及び血液生化学的検査では、被験物質投与各群でナトリウムの高値が散見されたが、ナトリウム塩である被験物質の大量投与による変化であると考えられ、毒性学的な意義は少ないと判断した。剖検及び病理組織学的検査では、胃または十二指腸、空腸、回腸での変化がみられたが、被験物質の刺激性による変化あるいは刺激に対する反応性の変化であると考えられた。また、投与期間中にみられた変化は、4 週間の休薬により回復すると考えられた。

TK パラメータでは、ラット及びイヌにおいて  $C_{max}$  及び  $AUC_{0-24h}$  は雌雄共に投与量の増加に伴い増加する傾向がみられたが、用量比より小さな増加であり、雌雄差はみられなかった。また、 $T_{max}$  では用量及び雌雄差による明らかな変化はみられなかった。また、いずれのパラメータにも反復投与による蓄積の傾向はみられなかった。

### 塩化ナトリウムの反復投与毒性試験（GLP 非適用）

ナトリウム換算でピルビン酸ナトリウム（6250 mg/kg/日）と同量の塩化ナトリウム（3375 mg/kg/日）をラットに 13 週間反復経口投与した試験（SBL743-031 の試験内で実施）では、呼吸音の異常、自発運動の減少、赤色鼻汁痕がみられ、投与 35 日目から死亡が発現した。3375 mg/kg/日での投与継続は困難と判断し、投与 7 週目より 2700 mg/kg/日に用量を下げて投与を継続した。体重、摂餌量、尿検査、血液学的検査及び血液生化学的検査における種々の変化及び剖検、病理組織学的検査における腎臓の変化が散見されたが、塩化ナトリウムの大量投与または塩化ナトリウム投与により引き起こされた飲水量及び尿量の増加に伴い発生した二次的变化であると判断した。剖検及び病理組織学的検査において、胃局所の変化がみられたが、被験物質の刺激性による変化あるいは刺激に対する反応性の変化であると考えられた。

### 幼若動物を用いた毒性試験

幼若の SD ラット [CrI:CD(SD)] にピルビン酸ナトリウムの 0（注射用水）、1000、2000 及び 4000 mg/kg/日を生後 4 日から 7 週間反復経口投与した試験では、4000 mg/kg/日群で投与開始翌々日（生後 6 日）までにほとんどの動物の死亡が確認された。2000 及び 1000 mg/kg/日群では一般状態、一般分化、機能発達、生殖器の形態分化、血液学的検査及び骨長ではピルビン酸ナトリウム投与の影響はみられなかった。体重、摂餌量、血液生化学的検査及び器官重量において種々の変化が散見されたが、被験物質の大量投与または被験物質投与により引き起こされた飲水量及び尿量の増加に伴い発生した二次的变化であると判断した。剖検及び病理組織学的検査において、胃局所の変化がみられたが、被験物質の刺激性による変化あるいは刺激に対する反応性の変化であると考えられた。いずれの検査においても全身性の変化はみられなかった。また、投与期間中にみられた変化は、4 週間の休薬により回復するか回復傾向がみられた。

TK パラメータでは、 $C_{max}$  において生後 4 日の雌雄で用量比以上の増加がみられたが、生後 4 日の  $AUC_{0-24h}$  ならびに生後 52 日の  $C_{max}$  及び  $AUC_{0-24h}$  では投与量による明確な差はみられなかった。また、雌雄による差はみられず、7 週間反復経口投与による蓄積の傾向はみられなかった。 $T_{max}$  には用量差及び雌雄差はみられなかった。

### 生殖毒性試験

妊娠 SD ラット [CrI:CD(SD)] にピルビン酸ナトリウムの 0（注射用水）、1000、2500 及び 6250 mg/kg/日を胚の着床から胎児硬口蓋の閉鎖までの期間（妊娠 6 日から 17 日）経口投与した試験では、6250 mg/kg/日群で投与期間中に摂餌量の減少がみられたが、一般状態、体重、体重増加量、剖検ではピルビン酸ナトリウム投与の影響はみられなかった。2500 及

び 1000 mg/kg/日群では母動物のいずれの検査でもピルビン酸ナトリウム投与の影響はみられなかった。また、いずれの群においても胎児の生存性、性別、胎児体重、胎盤重量、外表、内臓、骨格に影響はみられなかった。

TK パラメータでは、 $C_{max}$  及び  $AUC_{0-24h}$  は、投与量の増加に伴う変化はみられず、反復投与の影響もほぼみられなかった。

ウサギ (NZW) において、ピルビン酸ナトリウムの母動物及び胚・胎児発生への影響を評価した結果 (GLP 非適用試験)、6250 mg/kg では母動物の死亡がみられた。4000 及び 2500 mg/kg では摂餌量の減少がみられ、4000 mg/kg の 1/4 例で流産が確認された。1000 mg/kg では母動物に影響はみられなかった。胎児では 4000、2500 及び 1000 mg/kg で生存性、性別、胎児体重、外表、内臓、骨格に影響はみられなかった。

### 遺伝毒性試験

*In vitro* の CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験、ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験で検討し、ピルビン酸ナトリウムの遺伝子突然変異誘発性及び染色体異常誘発性は認められなかった。

### 結論

以上から、ラット及びイヌにおける反復投与試験では被験物質の刺激性による胃局所での変化が 1000 mg/kg/日群からみられたため、無毒性量は 1000 mg/kg/日を下回る用量となったが、全身毒性は 6250 mg/kg/日群でもみられなかった。また、投与期間中にみられた変化はいずれも休薬により回復するまたは回復傾向がみられるものであった。

また、ラットにおける塩化ナトリウムの反復投与試験ではこれらの症状と同様の変化が散見され、程度は塩化ナトリウム投与時のほうが強い傾向がみられた。このことから、ピルビン酸ナトリウムでみられた変化については、ピルビン酸ナトリウムに特有な毒性ではなく、ナトリウムの大量投与によって引き起こされた変化であると考えられた。

幼若ラットでは 4000 mg/kg/日群で投与開始後すぐに死亡がみられたが、2000 及び 1000 mg/kg/日群でみられた変化は成獣ラットでみられたものと同様であり、全身毒性はみられなかった。また 2000 mg/kg/日群でも生後発達への影響は認められなかった。4000 mg/kg/日群の死亡は、胃内に乳汁しか存在しない状態でナトリウムが大量投与されたために起こった変化であり、乳児期に特異的な変化と考えられた。

ラットにおける胚・胎児発生に関する試験では、6250 mg/kg/日群で母動物の摂餌量の減少がみられたが、その他、母動物及び胚・胎児発生への影響は認められなかった。ピルビン酸ナトリウムの遺伝子突然変異誘発性及び染色体異常誘発性は認められなかった。

表 5-1 毒性試験の成績一覧

試験項目	動物種/例数等	投与経路及び投与期間	投与量 (mg/kg/日)	試験成績
単回投与毒性試験 (反復投与毒性試験の初回投与日の結果から評価)				
ラット	SD ラット/ (雌雄各 10 例/群)	経口、 単回	1000、2500、6250 mg/kg/日	概略致死量：>6250 mg/kg ピルビン酸ナトリウム投与に起因する死亡は認められなかった。
イヌ	ビーグル/(雌雄各 3 例/群)	経口、 単回	1000、2500、6250 mg/kg/日	概略致死量：>6250 mg/kg ピルビン酸ナトリウム投与に起因する死亡は認められなかった。
反復投与毒性試験				
ラット	SD ラット/ (雌雄各 5 例/群)	経口、 2 週間 GLP 非適用	1000、2500、6250 mg/kg/日	無毒性量：1000 mg/kg/日未満
ラット	SD ラット/ (雌雄各 10 例/群)	経口、 4 週間	1000、2500、6250 mg/kg/日	無毒性量：1000 mg/kg/日未満
ラット	SD ラット/ (雌雄各 10 例/群)	経口、 13 週間	1000、2500、6250 mg/kg/日	無毒性量：1000 mg/kg/日未満
イヌ	ビーグル/(雌雄各 1 例/群)	経口、 2 週間	1000、2500、6250 mg/kg/日	無毒性量：6250 mg/kg/日
イヌ	ビーグル/(雌雄各 3 例/群)	経口、 4 週間	1000、2500、6250 mg/kg/日	無毒性量：1000 mg/kg/日
塩化ナトリウムの反復投与毒性試験 (GLP 非適用)				
ラット	SD ラット/ (雄 10 例/群)	経口、 13 週間	3375 mg/kg/日 ⇒2700 mg/kg/日 (ナトリウム換算でピルビン酸ナトリウムの 6250 mg/kg/日に相当⇒5000mg/kg/日に相当)	無毒性量：6250 mg/kg/日未満
幼若動物を用いた毒性試験				



試験項目	動物種/例数等	投与経路及び投与期間	投与量 (mg/kg/日)	試験成績
ラット	SD ラット/ (雌雄各 12 例/群)	経口、 生後 4 日から 7 週間	1000、2000、4000 mg/kg/日	無毒性量：1000 mg/kg/日未満
生殖毒性試験（予備試験は GLP 非適用）				
ラット 胚・胎 児試験	SD ラット/ (雌各 19~20 例/群)	経口、 妊娠 6~17 日	1000、2500、6250 mg/kg/日	母動物の一般毒性学的無毒性量： 2500 mg/kg/日 母動物の生殖機能に対する無毒性量： 6250 mg/kg/日 胚・胎児発生に対する無毒性量： 6250 mg/kg/日
ウサギ 胚・胎 児予備 試験	NZW ウサギ/ (雌各 2~6 例/群)	経口、 妊娠 6~18 日	1000、2500、4000、 6250 mg/kg/日	母動物の一般毒性学的無毒性量： 1000 mg/kg/日 母動物の生殖機能に対する無毒性量： 2500 mg/kg/日 胚・胎児発生に対する無毒性量： 4000 mg/kg/日
遺伝毒性				
復帰突 然変異 試験	ネズミチフス 菌 (TA98、 TA100、 TA1535、 TA1537) 及び 大腸菌 (WP2uvrA)	<i>In vitro</i>	本試験*1： 78.1、156、313、 625、1250、2500 及び 5000 µg/plate	ピルビン酸ナトリウムは、細菌に 対して遺伝子突然変異誘発性を示 さなかった。
染色体 異常試 験	チャイニー ズ・ハムスタ ー雌肺由来細 胞 (CHL/IU 細 胞)	<i>In vitro</i>	短時間処理法*1 及 び 24 時間連続処 理法：125、250 及 び 500 µg/mL	ピルビン酸ナトリウムは、CHL/IU 細胞に対して染色体異常誘発性を 示さなかった。

\*1：代謝活性化系の存在下及び非存在下

## 5.2 単回投与毒性試験

ラット及びイヌについて、反復投与毒性試験での初回投与で評価を行った。

ピルビン酸ナトリウムの 0 (対照群)、1000、2500 及び 6250 mg/kg/日を SD ラット (CrI:CD (SD)、雌雄各 10 匹/群) 及びイヌ (ビーグル) に単回投与した結果、いずれの動物にも死亡はみられず、イヌで投与直後に嘔吐がみられた以外に一般状態の変化もみられなかった。

以上から、単回経口投与時の概略の致死量はラット及びイヌで 6250 mg/kg を超える量であると結論した。

### 5.3 反復投与毒性試験

#### 5.3.1 ラットを用いた 2 週間反復経口投与予備毒性試験

[SBL743-003、GLP 非適用]

##### [目的]

ピルビン酸ナトリウムをラットに毎日 1 回 2 週間反復経口投与したときの毒性変化を予備的に調べる。また、単回投与時の全身的曝露についても評価する。

##### [方法]

ピルビン酸ナトリウムの 0 (対照群)、1000、2500 及び 6250 mg/kg/日を SD ラット (Cri:CD (SD)、雌雄各 5 匹/群) に 2 週間反復経口投与し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定、尿検査を行うとともに、投与終了後に血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を行った。なお、対照群には注射用水を被験物質群と同様の方法で投与した。

また、単回投与時の全身的曝露評価のため、6250 mg/kg 群にサテライト群を設けた (雌雄各 2 匹)。

##### [成績]

試験成績の概要を表 5-2 に示した。いずれの群にも投与期間中の死亡はなく、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、剖検及び器官重量測定ではピルビン酸ナトリウム投与の影響と考えられる所見はみられなかった。

尿検査及び血液生化学的検査では、被験物質投与各群で電解質の変動が散見されたが、被験物質の大量投与または被験物質投与により引き起こされた飲水量及び尿量の増加に伴い発生した二次的な変化であると考えられ、毒性学的な意義はないと判断した。

血液生化学的検査では、グロブリン濃度の低値を伴う総蛋白の低値が 2500 及び 6250 mg/kg/日群でみられたが、摂餌量に差はなく、肝臓及び免疫系の異常を示す変化はみられておらず、変動幅もわずかであることから、毒性学的な意義は少ないと判断した。

病理組織学的検査では、被験物質投与各群で前胃の境界縁において扁平上皮の過形成、腺胃の球状白血球の浸潤 (粘膜表面～頸部) 及び表面上皮細胞及び副細胞数の増加がみられた。以上の前胃及び腺胃における組織学的変化は、胃粘膜に対する刺激による変化あるいは刺激に対する反応性の変化であると考えられた。

TK では、投与 0 日目の 6250 mg/kg 群の  $C_{max}$  は雄で 34.4  $\mu\text{g/mL}$ 、雌で 29.3  $\mu\text{g/mL}$ 、 $AUC_{0-24h}$  は雄で 659  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 、雌で 475  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 、 $T_{max}$  は雄で 6.0 h、雌で 3.0 h であった。6250 mg/kg

群の C<sub>max</sub>、AUC<sub>0-24h</sub> 及び T<sub>max</sub> に雌雄差はみられなかった。

[結論]

ピルビン酸ナトリウムをラットに2週間反復経口投与したとき、1000 mg/kg/日群から胃局所の変化がみられたものの、いずれの群においても全身性の変化はみられなかった。

表 5-2 ラット2週間反復経口投与毒性試験の成績

項目		SD系ラット [CrI:CD (SD)], 投与開始時6週齢、雌雄			
動物種(系統)、週齢、性別		SD系ラット [CrI:CD (SD)], 投与開始時6週齢、雌雄			
投与方法		1日1回、2週間、経口投与、10 mL/kg			
投与量 (mg/kg/日)		0* <sup>1</sup>	1000	2500	6250
動物数 (雄/雌)		5/5	5/5	5/5	5/5
トキシコキネテイクス* <sup>2</sup> (0日)	AUC <sub>0-24h</sub> (µg·h/mL)	NA	NA	NA	659/475
	C <sub>max</sub> (µg/mL)	NA	NA	NA	34.4/29.3
	T <sub>max</sub> (h)	NA	NA	NA	6.0/3.0
死亡動物		0/0	0/0	0/0	0/0
一般状態		-	-	-	-
体重		-	-	-	-
体重増加量		-	-	-	-
摂餌量測定		-	-	-	-
尿検査		-	-	雄：ナトリウム↑	
		-	-	雌雄：塩素↓ 雄：カリウム↓ 雌：ナトリウム↑	
		-	-	雌雄：尿量↑ 雄：尿比重↓ 雌：カリウム↓	
血液学的検査		-	-	-	-
血液生化学的検査		-	-	雄：総蛋白↓ グロブリン↓	
		-	-	雌雄：カルシウム↓ カリウム↓ 雄：ナトリウム↓ 塩素↓ 雌：総蛋白↓ グロブリン↓	
剖検		-	-	-	-
器官重量		-	-	-	-
病理組織学的検査		-	-	雌雄：前胃 境界線の扁平上皮過形成 腺胃 球状白血球の浸潤(粘膜表面～頸部) 表面上皮細胞/副細胞数の増加	

\*1：注射用水、 \*2：各ポイント雌雄各2例

-：特記すべき所見なし、 ↓↑：有意な変化 (p<0.05 または p<0.01)、 NA：Not applicable

### 5.3.2 ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性及び 4 週間回復性試験

#### [SBL743-009]

##### [目的]

ピルビン酸ナトリウムをラットに毎日 1 回 4 週間反復経口投与したときの毒性変化を調べるとともに、4 週間の休薬期間を設け、その回復性についても検討する。また、そのときの全身的曝露についても評価する。

##### [方法]

ピルビン酸ナトリウムの 0 (対照群)、1000、2500 及び 6250 mg/kg/日を SD ラット (CrI:CD (SD)、雌雄各 10 匹/群) に 4 週間反復経口投与し、一般状態観察、一般症状及び行動 (初回投与日のみ)、体重測定、摂餌量測定、眼科的検査、尿検査を行うとともに、投与終了後に血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量測定及び病理組織学的検査を行った。また、投与終了後 4 週間の休薬期間を設け、上記と同じ検査を行ない回復性について検討した。さらに、全身的曝露評価のため、ピルビン酸ナトリウム投与群及び対照群にサテライト群をそれぞれ設けた (雌雄各 3 匹/群)。なお、対照群には注射用水を被験物質群と同様の方法で投与した。

##### [成績]

試験成績の概要を表 5-3 に示した。いずれの群にも投与期間中の死亡はなく、一般状態、一般症状及び行動、眼検査及び血液学的検査ではピルビン酸ナトリウム投与の影響と考えられる所見はみられなかった。

体重及び摂餌量では、試験期間中に低値が散見されたが、一過性で軽度な変化であること、被験物質投与により引き起こされた飲水量の増大に伴い、摂餌量が減少したために発生したと考えられることから、毒性学的な意義は少ないと判断した。

尿検査及び血液生化学的検査では、被験物質投与各群で電解質の変動が散見されたが、被験物質の大量投与または被験物質投与により引き起こされた飲水量及び尿量の増加に伴い発生した二次的変化であると考えられ、毒性学的な意義はないと判断した。

血液生化学的検査では、グロブリン濃度の低値を伴う総蛋白の低値が 2500 及び 6250 mg/kg/日群でみられたが、肝臓及び免疫系の異常を示す変化はみられておらず、変動幅もわずかであることから、毒性学的な意義は少ないと判断した。

器官重量では、2500 及び 6250 mg/kg/日群の雌雄で腎臓重量の高値がみられたが、基質的变化を伴わない軽度な変化であり、尿量の増加に伴い発生した二次的変化であると考えられ、毒性学的な意義はないと判断した。

剖検では、6250 mg/kg/日群の 1 例で腺胃の赤色巣がみられ、病理組織学的検査では、被験物質投与各群で前胃の境界縁に扁平上皮の過形成及び空胞変性、腺胃の好酸性細胞浸潤