

目 次

1. 表題.....	4
2. 試験目的.....	4
3. 適用規則.....	4
4. 試験委託者.....	4
5. 試験施設.....	4
6. 試験関係者.....	4
7. 試験日程.....	4
8. 被験物質.....	5
9. 試薬.....	5
10. 測定機器.....	6
11. アミノ酸含量測定法のバリデーション.....	6
11.1 試液及び移動相の調製.....	6
11.1.1 100 mmol/L PITC/アセトニトリルの調製.....	6
11.1.2 1 mol/L トリエチルアミン/アセトニトリルの調製.....	6
11.1.3 6 mol/L 塩酸の調製.....	6
11.1.4 1.2 mol/L 塩酸.....	6
11.1.5 0.02 mol/L 塩酸.....	6
11.1.6 移動相 A の調製.....	6
11.1.7 移動相 B の調製.....	6
11.2 標準溶液の調製.....	7
11.3 特異性用試料溶液の調製.....	7
11.4 試料溶液の調製.....	7
11.5 PTC 誘導体化法.....	7
11.6 測定法.....	8
11.6.1 HPLC 測定条件.....	8
11.6.2 システムの再現性.....	8
11.6.3 測定順序.....	8
11.7 分析法バリデーション.....	9
11.7.1 特異性.....	9
11.7.2 直線性.....	9
11.7.3 真度及び併行精度.....	9
12. 純度測定法のバリデーション.....	10
12.1 移動相の調製.....	10
12.1.1 移動相 A の調製.....	10
12.1.2 移動相 B の調製.....	10

12.1.3	希釈液の調製.....	10
12.2	試料溶液の調製.....	10
12.2.1	直線性確認用試料溶液の調製.....	10
12.2.2	併行精度用試料溶液の調製.....	11
12.2.3	併行精度用標準溶液の調製.....	11
12.3	測定法.....	11
12.3.1	HPLC 測定条件.....	11
12.3.2	システム適合性.....	12
12.4	分析法バリデーション.....	12
12.4.1	特異性.....	12
12.4.2	直線性.....	12
12.4.3	オートサンプラー内の安定性.....	13
12.4.4	定量限界及び検出限界.....	13
12.4.5	併行精度.....	13
13.	酢酸含量測定法のバリデーション.....	13
13.1	移動相の調製.....	13
13.2	標準溶液の調製.....	14
13.3	試料溶液の調製.....	14
13.4	測定法.....	14
13.4.1	HPLC 測定条件.....	14
13.4.2	システムの再現性.....	15
13.5	分析法バリデーション.....	15
13.5.1	特異性.....	15
13.5.2	直線性.....	15
13.5.3	オートサンプラー内の安定性.....	15
13.5.4	併行精度.....	15
14.	測定結果の取扱い.....	16
15.	統計学的手法.....	16
16.	試験成績の報告.....	16
17.	記録及び資料の保存.....	17
18.	試験計画書の変更.....	17
19.	試験計画書の作成及び承認.....	18

1. 表題

AcPepA (MPS-390) の特性確認のためのバリデーション

2. 試験目的

AcPepA (MPS-390) の特性確認を実施するために、アミノ酸含量 (アミノ酸組成比及びペプチド含量)、純度試験及び酢酸含量の測定法の妥当性を確認する。

3. 適用規則

本試験は、適用規則なしとする。

4. 試験委託者

医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所

〒441-8124 愛知県豊橋市野依町宇山中 19-14

TEL : 0532-46-7511

FAX : 0532-46-8940

委託試験責任者 :

岡田秀親

5. 試験施設

株式会社新日本科学 安全性研究所

〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地

TEL : 099-294-2600

FAX : 099-294-3619

6. 試験関係者

試験責任者 :

山田聡美

被験物質取扱い責任者 :

真鍋ひろ子

7. 試験日程

試験開始日 : 2010年12月16日

バリデーション実施日程 : 2010年12月16日~2010年12月24日

最終報告書草案作成日 : 2011年1月14日

最終報告書作成日/試験終了日 : 2011年1月21日

8. 被験物質

(SOP : TSB/002)

名称 : AcPepA (MPS-390)
 提供者 : 医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所
 ロット番号 : 2K09030
 分子量 : 1635.9
 受領日 : 2010年12月9日
 入手日 : 2010年12月17日
 入手量 : 2g
 保存条件 : 冷凍, 遮光
 保存場所 : 被験物質保管所内冷凍室 (許容範囲 : -30~-10°C)
 取扱い : マスク, キャップ, 手袋及び保護眼鏡を着用する.
 残余被験物質 : すべて被験物質管理責任者に移管する.

9. 試薬

(SOP : BIO/250)

名称	等級	製造者
アセトニトリル	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
リン酸二水素カリウム	試薬特級	和光純薬工業株式会社
リン酸水素二カリウム	試薬特級	和光純薬工業株式会社
イソチオシアン酸フェニル (PITC)	アミノ酸配列分析用	和光純薬工業株式会社
トリエチルアミン	試薬特級	和光純薬工業株式会社
塩酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
アミノ酸混合標準液, H 型	アミノ酸自動分析用	和光純薬工業株式会社
トリフルオロ酢酸 (TFA)	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
リン酸二水素ナトリウム	試薬特級	和光純薬工業株式会社
リン酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
酢酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
超純水	Milli-Q システムにて精製した水.	

10. 測定機器

名称	型式	製造者	SOP
HPLC システム	島津 10A	株式会社島津製作所	BIO/273
	島津 20A	株式会社島津製作所	BIO/273
検出器	島津 SPD-10A	株式会社島津製作所	BIO/273
	島津 SPD-20A	株式会社島津製作所	BIO/273
データ処理装置	LCsolution	株式会社島津製作所	BIO/273

11. アミノ酸含量測定法のバリデーション

11.1 試液及び移動相の調製

(SOP : BIO/250)

以下の割合で調製する.

11.1.1 100 mmol/L PITC/アセトニトリルの調製

PITC 24 μ L にアセトニトリル 2000 μ L を加える.

11.1.2 1 mol/L トリエチルアミン/アセトニトリルの調製

トリエチルアミン 277 μ L にアセトニトリル 1723 μ L を加える.

11.1.3 6 mol/L 塩酸の調製

塩酸 5 mL に超純水を加えて 10 mL とする.

11.1.4 1.2 mol/L 塩酸

6 mol/L 塩酸 1 mL に超純水を加えて 5 mL とする.

11.1.5 0.02 mol/L 塩酸

1.2 mol/L 塩酸 1 mL に超純水を加えて 60 mL とする.

11.1.6 移動相 A の調製

リン酸二水素カリウム約 1.36 g を秤量し, 超純水で 1000 mL とする (1 液). リン酸水素二カリウム約 1.74 g を秤量し, 超純水で 1000 mL とする (2 液). 1 液に 2 液を加えて pH7.0 に調製する. この液をメンブランフィルター (OMNIPORE, 0.45 μ m ; 日本ミリポア株式会社) で減圧ろ過し, 超音波減圧処理により脱気する.

11.1.7 移動相 B の調製

アセトニトリルを分取し, 超音波減圧処理により脱気する.

11.2 標準溶液の調製

アミノ酸混合標準液（各アミノ酸濃度：2.50 $\mu\text{mol/mL}$ ，混合液 H）[#]を次表に従い，正確に希釈する．11.5 項の方法でこれらの液を PTC 誘導体化する．なお，標準溶液は用時調製とする．

標準溶液	採取液	採取量 (mL)	使用液	添加量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)	測定濃度* ($\mu\text{mol/mL}$)
A-5	混合液 H	0.4	0.02 mol/L 塩酸	0.1	2	0.8
A-4	混合液 H	0.3	0.02 mol/L 塩酸	0.2	1.5	0.6
A-3	混合液 H	0.2	0.02 mol/L 塩酸	0.3	1	0.4
A-2	混合液 H	0.125	0.02 mol/L 塩酸	0.375	0.625	0.25
A-1	混合液 H	0.05	0.02 mol/L 塩酸	0.45	0.25	0.1

*各 PTC-アミノ酸の濃度

アミノ酸混合標準液組成（各アミノ酸濃度：2.50 $\mu\text{mol/mL}$ ）

L-Aspartic Acid (Asp)	L-Threonine (Thr)	L-Serine (Ser)
L-Glutamic Acid (Glu)	L-Proline (Pro)	Glycine (Gly)
L-Alanine (Ala)	L-Cystine (Cys)	L-Valine (Val)
L-Methionine (Met)	L-Isoleucine (Ile)	L-Leucine (Leu)
L-Tyrosine (Tyr)	L-Phenylalanine (Phe)	L-Lysine (Lys)
L-Histidine (His)	L-Arginine (Arg)	

11.3 特異性用試料溶液の調製 (AP, n=1)

6 mol/L 塩酸 0.5 mL をバキュームチューブに正確にとり，減圧下 110°C で 20 時間加熱する．放冷後，反応液を減圧留去する．残留物に 0.02 mol/L 塩酸 9 mL を正確に加える．この液をシリンジフィルター（クロマトディスク 13P, 0.45 μm ；ジーエルサイエンス株式会社）でろ過した液（初液 1 mL は廃棄）を 11.5 項の方法で PTC 誘導体化し，特異性用試料溶液とする．

11.4 試料溶液の調製 (n=6)

被験物質を約 50 mg を精密に量り，6 mol/L 塩酸 5 mL を加えて溶かし正確に 5 mL とする．この液 0.5 mL をバキュームチューブに移し，減圧下 110°C で 20 時間加熱する．放冷後，反応液を減圧留去する．残留物に 0.02 mol/L 塩酸 9 mL を正確に加える．この液をシリンジフィルター（クロマトディスク 13P, 0.45 μm ；ジーエルサイエンス株式会社）でろ過した液（初液 1 mL は廃棄）を 11.5 項の方法で PTC 誘導体化し，試料溶液とする．

11.5 PTC 誘導体化法

- 1) 測定試料溶液 200 μL に 100 mmol/L PITC／アセトニトリル 100 μL 及び 1 mol/L トリエチルアミン／アセトニトリル 100 μL を加える．
- 2) 40°C で 20 分間放置する．
- 3) 1.2 mol/L 塩酸 100 μL を加える（PTC-アミノ酸）．

11.6 測定法

11.6.1 HPLC 測定条件

HPLC システム： 島津 20A
 検出器： 紫外吸光光度計（島津 SPD-20A, 測定波長：254 nm, AUX レンジ：2.0 AU/V, レスポンス：0.05 sec, セミマイクロセル）
 カラム： Shim-pack XR-ODS (2.2 μ m, 75 \times 3.0 mm i.d.; 株式会社島津製作所)
 カラム温度： 40°C
 試料温度： 5°C
 移動相 A： 10 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH7.0)
 移動相 B： アセトニトリル
 移動相の送液： 移動相 A 及び移動相 B の混合比を以下のように直線的に変えて濃度勾配制御する。

注入後からの 時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	95	5
0.3	95	5
3.4	60	40
4	60	40
4.01	95	5
10	95	5

流量： 1.2 mL/min
 注入量： 4 μ L
 面積測定範囲： 4 分

11.6.2 システムの再現性

測定の開始時に、標準溶液 A-3 を 6 回測定し、Ser についてピーク面積の相対標準偏差 (RSD) が 5.0%以下であれば適とする。

11.6.3 測定順序

11.6.3.1 直線性の確認

Sys \rightarrow A-1 \rightarrow Sys \rightarrow A-2 \rightarrow Sys (A-3) \rightarrow A-4 \rightarrow Sys \rightarrow A-5 \rightarrow Sys \rightarrow Sys

Sys：システムの再現性 (A-3 を使用)

A-1~A-5 は 2 回ずつ注入する。

11.6.3.2 特異性, 真度及び併行精度の確認

Sys → AP → Sys* → Sys* → T1 → T2 → Sys → T3 → T4 → Sys → T5 → T6 → Sys

Sys : システムの再現性 (A-3 を使用)

Sys* : 標準溶液 (A-3 を使用)

11.7 分析法バリデーション

11.7.1 特異性

特異性用試料溶液 AP を HPLC に 4 μL 注入し, 得られたクロマトグラム上に, Ser, Gly, Ala, Arg, Met, Phe, Leu, 及び Pro の保持時間付近に妨害ピークがないことを確認する。

11.7.2 直線性

標準溶液 (A-1~A-5) を 2 回ずつ測定後, LCsolution を用いて自動積分法により解析し, ピーク面積 (Y) と各アミノ酸の調製濃度 (X) より, 回帰直線 (最小二乗法による一次回帰直線式) をそれぞれ作成する。相関係数 (r), 傾き, Y 切片及び残差プロットをそれぞれ求める。得られた r が 0.99 以上であり, 残差プロットに偏りがないとき, その濃度範囲において直線性が適合基準内であると判定する。

11.7.3 真度及び併行精度

標準溶液 (A-3) を 2 回ずつ測定後, 試料溶液 (濃度 n=6) を 1 回ずつ測定する。LCsolution を用いて自動積分法により解析し, 得られた標準溶液の各アミノ酸のピーク面積と調製濃度から LCsolution により検量線 (一点検量線法) を作成し, 試料溶液中各アミノ酸の濃度を求めて, 被験物質中のアミノ酸組成を求める。

アミノ酸組成比 =

$$\text{試料溶液中アミノ酸濃度 } (\mu\text{mol/mL}) / \text{試料溶液中 Ser 濃度平均値 } (\mu\text{mol/mL})$$

6 回の測定値からアミノ酸組成比を求め, 平均値 (Mean) 及び RSD を算出する。アミノ酸組成比の平均値が下記の範囲以内であるとき, 真度が適合基準内であると判定する。また, RSD が 10.0% 以下であるとき, 併行精度が適合基準内であると判定する。

Ser を 1.00 としたときの組成比 (平均値)

Gly : 2.55~3.45

Ala : 3.40~4.60

Arg : 0.85~1.15

Met : 0.85~1.15

Phe : 0.85~1.15

Leu : 0.85~1.15

Pro : 4.25~5.75

また、次式によりペプチド含量を算出する。

$$\text{ペプチド含量 (\%)} = \frac{\text{試料溶液中 Ser 濃度 } (\mu\text{mol/mL}) \times (9 \times 10 \times 2.5) \times \text{分子量 (1635.9)}}{\text{被験物質採取量 (mg)} \times 10^3} \times 100$$

得られたペプチド含量の Mean 及び RSD を算出する。RSD が 10.0%以下であるとき、併行精度が適合基準内であると判定する。

12. 純度測定法のバリデーション

12.1 移動相の調製

(SOP : BIO/250)

以下の割合で調製する。

12.1.1 移動相 A の調製

超純水 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

12.1.2 移動相 B の調製

アセトニトリル 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

12.1.3 希釈液の調製

酢酸 10 mL に超純水を加え 1000 mL とする。

12.2 試料溶液の調製

12.2.1 直線性確認用試料溶液の調製 (n=1)

被験物質 10 mg を精密に量り、希釈液を加えて溶かし、正確に 20 mL とする。試料溶液 J-10 とする (500 µg/mL)。続いて次表に従い、正確に直線性確認用試料溶液 (J-1~J-9) を調製する。なお、試料溶液は用時調製とする。

直線性確認用 試料溶液	採取液	採取量 (mL)	使用液	調製量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
J-9	J-10	5	希釈液	10	250
J-8	J-10	2	希釈液	10	100
J-7	J-10	1	希釈液	10	50
J-6	J-10	2.5	希釈液	50	25
J-5	J-6	4	希釈液	10	10
J-4	J-6	2	希釈液	10	5
J-3	J-6	1	希釈液	25	1
J-2	J-6	1	希釈液	50	0.5
J-1	J-5	1	希釈液	100	0.1

12.2.2 併行精度用試料溶液の調製 (n=6)

被験物質 10 mg を精密に量り、希釈液を加えて溶かし、正確に 20 mL とする。試料溶液とする (500 $\mu\text{g/mL}$)

12.2.3 併行精度用標準溶液の調製 (n=1)

12.2.2 項で最初に調製した併行精度用試料溶液を 1 mL 正確に量り、希釈液で正確に 100 mL とする (併行精度用標準溶液 : 5 $\mu\text{g/mL}$) .

12.3 測定法

12.3.1 HPLC 測定条件

HPLC システム : 島津 10A

検出器 : 紫外吸光光度計 (島津 SPD-10A, 測定波長 : 215 nm, AUX レンジ : 2.0 AU/V)

カラム : Vydac C18 (5 μm , 250 \times 4.6 mm i.d. ; Grace Vydac)

カラム温度 : 40°C

試料温度 : 5°C

移動相 A : 0.1%TFA 水溶液

移動相 B : 0.1%TFA アセトニトリル溶液

移動相の送液 : 移動相 A 及び移動相 B の混合比を以下のように直線的に変えて濃度勾配制御する。

注入後からの 時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	85	15
30	55	45
30.01	85	15
40	85	15

流量 : 1.0 mL/min

注入量 : 20 μ L

面積測定範囲 : 30 分

12.3.2 システム適合性

測定時に下記項目を確認する。

12.3.2.1 システムの性能

システムの再現性の 1 回目で得られた MPS-370 のピークについて、シンメトリー係数が 2.0 以下、理論段数が 2000 段以上であれば適とする。

12.3.2.2 システムの再現性

直線性確認用試料溶液 J-4 又は併行精度用標準溶液を上記の条件で 6 回繰り返して測定し、MPS-370 のピーク面積の RSD が 2.0%以下であれば適とする。

12.4 分析法バリデーション

(SOP : BIO/067)

12.4.1 特異性

希釈液を HPLC に 20 μ L 注入する。得られたクロマトグラム上の MPS-370 の保持時間付近に妨害ピークがないことを確認する。

12.4.2 直線性

直線性確認用試料溶液 (J-1~J-10) を 2 回ずつ測定後、LCsolution を用いて自動積分法により解析し、直線性確認用試料溶液 (J-1~J-5) 及び直線性確認用試料溶液 (J-6~J-10) で得られたピーク面積 (Y) と MPS-370 の調製濃度 (X) より、それぞれ回帰直線 (最小二乗法による一次回帰直線式) を作成する。相関係数 (r) , 傾き, Y 切片及び残差プロットを求める。得られた r が 0.99 以上であり、直線性確認用試料溶液 (J-1~J-5) と直線性確認用試料溶液 (J-6~J-10) の傾きの比が 0.8~1.2 の範囲のとき、その濃度範囲において直線性が適合基準内であると判定する。

12.4.3 オートサンプラー内の安定性

直線性確認用試料溶液 J-5 及び併行精度用試料溶液をオートサンプラー（設定温度；5° C）内に保存し，システムの再現性確認及び約 24 時間（24～26 時間）後に 2 回測定する．システムの再現性確認後に測定されたピーク面積の平均値を 100.0%とし，約 24 時間後のピーク面積の平均値が 100.0±10.0%以内であるとき，測定試料がオートサンプラー内で 24 時間安定であると判定する．

12.4.4 定量限界及び検出限界

直線性確認用試料溶液（J-1～J-5）を 2 回ずつ測定後，Excel の回帰分析を用いて MPS-370 ピーク面積（Y）と濃度（X）より，回帰直線（最小二乗法による一次回帰直線式）を作成する．回帰直線の残差の標準偏差（ σ ）と回帰直線の傾き（S）から次式により定量限界（QL）及び検出限界（DL）を求める．

$$QL = 10\sigma / S$$

$$DL = 3.3\sigma / S$$

12.4.5 併行精度

希釈液（ブランク）を 1 回測定後，併行精度用標準溶液（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及び併行精度用試料溶液（2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を 1 回ずつ交互に測定する（各 $n=6$ ）．各々の相対保持時間及びピーク面積を LCsolution を用いて自動積分法により求め，各組み合わせごとに次式により個々の類縁物質量を算出する．なお，該当ブランクピーク及び 12.4.4 項で得られた定量限界以下のピークは計算から除く．

$$\text{被験物質中の個々の類縁物質の量 (\%)} = A_T / A_S$$

A_T ：試料溶液から得られた個々の類縁物質のピーク面積

A_S ：標準溶液から得られた MPS-370 のピーク面積

$$\text{類縁物質の総量 (\%)} = \text{個々の類縁物質の量の合計 (\%)}$$

$$\text{純度 (\%)} = 100 - \text{類縁物質の総量 (\%)}$$

得られた純度の平均値（Mean）及び相対標準偏差（RSD）を算出する．RSD が 10.0%以下であるとき，併行精度が適合基準内であると判定する．

$$RSD (\%) = SD / \text{Mean} \times 100$$

13. 酢酸含量測定法のバリデーション

13.1 移動相の調製

（SOP：BIO/250）

リン酸二水素ナトリウム 2.40 g を超純水約 800 mL に溶解する．この液にリン酸を加えて，pH

を 2.8 に調整し、超純水で 1000 mL とし、超音波減圧処理により脱気する。

13.2 標準溶液の調製 (n=1)

酢酸を 1.0 g 精密に量り、超純水を加えて正確に 10 mL とする (100 mg/mL)。この液 1 mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 100 mL とし、標準原液 R とする (1000 µg/mL)。続いて次表に従い、正確に標準溶液 (R-1~R-5) を調製する。標準溶液は、シリンジフィルター (クロマトディスク 13P, 0.45 µm; ジーエルサイエンス株式会社) でろ過し (初液 0.5 mL は廃棄)、用時調製とする。

標準溶液名	採取液	採取量 (mL)	使用液	調製量 (mL)	調製濃度* (µg/mL)
R-5	標準原液 R	15	移動相	20	750
R-4	標準原液 R	10	移動相	20	500
R-3	標準原液 R	5	移動相	20	250
R-2	標準原液 R	2.5	移動相	20	125
R-1	標準原液 R	1	移動相	40	25

* 酢酸濃度として

13.3 試料溶液の調製 (n=6)

被験物質を約 10 mg (5~15 mg) に量り取り、移動相を 2 mL 添加し、試料溶液とする。試料溶液は、シリンジフィルター (クロマトディスク 13P, 0.45 µm; ジーエルサイエンス株式会社) でろ過し (初液 0.5 mL は廃棄)、用時調製とする。

13.4 測定法

13.4.1 HPLC 測定条件

HPLC システム： 島津 10A
 検出器： 紫外吸光光度計 (島津 SPD-10A, 測定波長：220 nm, AUX レンジ：2.0 AU/V)
 カラム： YMC-Pack ODS-AQ (5 µm, 150 × 4.6 mm i.d.; 株式会社ワイエムシイ)
 カラム温度 30°C
 試料温度： 20°C
 移動相： 20 mmol/L H₃PO₄-NaH₂PO₄ (pH2.8)
 流量： 0.7 mL/min
 注入量： 50 µL
 測定時間： 10 分

13.4.2 システムの再現性

測定時に確認する。標準溶液 R-3（調製濃度：250 µg/mL）を上記の条件で6回繰り返して測定し、酢酸のピーク面積のRSDが2.0%以下であれば適とする。

13.5 分析法バリデーション

13.5.1 特異性

移動相をHPLCに50 µL注入する。得られたクロマトグラム上の酢酸の保持時間付近に妨害ピークがないことを確認する。

13.5.2 直線性

標準溶液（R-1～R-5）を2回ずつ測定後、LCsolutionを用いて自動積分法により解析し、ピーク面積（Y）と酢酸の調製濃度（X）より、回帰直線（最小二乗法による一次回帰直線式）を作成する。相関係数（r）、傾き、Y切片及び残差プロットを求める。得られたrが0.99以上であり、残差プロットに偏りが無いとき、その濃度範囲において直線性が適合基準内であると判定する。

13.5.3 オートサンプラー内の安定性

標準溶液 R-3（調製濃度：250 µg/mL）をオートサンプラー（設定温度；20°C）内に保存し、約24時間（24～26時間）後に2回測定する。システムの再現性で測定されたピーク面積の平均値を100.0%とし、約24時間後の平均値が100.0±10.0%以内であるとき、標準溶液がオートサンプラー内で24時間安定であると判定する。また、試料溶液（最初に調製した1本）をオートサンプラー（設定温度；20°C）内に保存し、システムの再現性確認後及びその約24時間（24～26時間）後に2回測定する。システムの再現性確認後に測定されたピーク面積の平均値を100.0%とし、約24時間後の平均値が100.0±10.0%以内であるとき、試料溶液がオートサンプラー内で24時間安定であると判定する。

13.5.4 併行精度

標準溶液（R-1～R-5）を2回ずつ測定後、試料溶液（濃度 n=6）を1回ずつ測定する。LCsolutionを用いて自動積分法により解析し、標準溶液のピーク面積（Y）と酢酸の調製濃度（X）より、回帰直線（最小二乗法による一次回帰直線式）を作成する。傾き、Y切片を求め、次式により酢酸含量（% Acetate）を算出する。

$$\mu\text{g Acetate} = (\text{試料溶液のピーク面積} - Y \text{ 切片}) / \text{傾き} \times 2$$

$$\% \text{ Acetate} = \mu\text{g Acetate} / \text{被験物質秤量値} (\mu\text{g})$$

% Acetate をそれぞれ求め、平均値（Mean）及びRSDを算出する。RSDが10.0%以下であるとき、併行精度が適合基準内であると判定する。

$$\text{RSD} (\%) = \text{標準偏差} (\text{SD}) / \text{Mean} \times 100$$

14. 測定結果の取扱い

ピーク面積，検量線情報（検量線の傾き，切片，相関係数等），相対保持時間，理論段数及びシステムの再現性は，データ処理装置から出力された値を用いる。その後の計算には，表計算ソフト Excel を用いる。算出される数値の表示桁数は以下のとおりとし，数値の丸め方は必要桁の1桁小さい桁で四捨五入する。

ピーク面積：	小数点以下1桁
相関係数：	小数点以下6桁
傾き，Y切片：	有効数値5桁
理論段数：	整数
相対保持時間：	小数点以下3桁
個々の類縁物質の量：	小数点以下3桁
類縁物質の総量：	小数点以下2桁
純度：	小数点以下1桁
酢酸含量：	小数点以下1桁
RSD：	小数点以下1桁

15. 統計学的手法

統計学的検定は実施しない。

16. 試験成績の報告

本試験の成績について，最終報告書の草案（和文）を試験委託者に1部提出する。最終報告書（和文）についてはその写し1部を試験委託者に提出する。

別添1

図

- (1) 特異性（アミノ酸含量，純度及び酢酸含量）
- (2) 直線性（アミノ酸含量，純度及び酢酸含量）

表

- (1) 直線性（アミノ酸含量，純度及び酢酸含量）
- (2) オートサンプラー内の安定性（アミノ酸含量，純度及び酢酸含量）
- (3) 定量限界及び検出限界（純度及び酢酸含量）
- (4) 真度及び併行精度（アミノ酸含量）
- (5) 併行精度（純度及び酢酸含量）

17. 記録及び資料の保存

記録及び資料は、以下の保存場所に最終報告書作成後 10 年間保存する。

株式会社新日本科学 安全性研究所 データ資料室

試験計画書及び試験計画書変更書

試験スケジュール

被験物質に関する記録, 資料

測定に関するチャート及び記録

最終報告書草案

最終報告書

その他, 試験に関する資料

18. 試験計画書の変更

試験計画内容に変更が生じた場合は、試験計画書変更書を作成し、変更箇所及びその理由を明確にする。

19. 試験計画書の作成及び承認

試験計画書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

山田 聡美 印 2010年12月16日
山田 聡美

試験計画書の承認

運営管理者 株式会社新日本科学 安全性研究所

洲加本 孝幸 印 2010年12月17日
洲加本 孝幸

試験計画書の承認

株式会社新日本科学 安全性研究所より提示された試験計画書を承認致します。

試験委託者 医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所

岡田 秀親 印 2010年12月21日
岡田 秀親

試験計画書

表題： AcPepA (MPS-390) のウサギにおける血管周囲刺激性試験

試験番号： SBL861-004

試験責任者： 山下 祐介

株式会社新日本科学 安全性研究所

目 次

1. 表題.....	4
2. 試験目的.....	4
3. 適用規則.....	4
4. 動物福祉.....	4
5. 試験委託者.....	4
6. 試験施設.....	4
7. 試験関係者.....	4
8. 試験日程.....	4
9. 被験物質及び対照物質（媒体）.....	5
9.1 被験物質.....	5
9.2 対照物質（媒体）.....	5
10. 被験物質調製液.....	5
11. 被験物質及び対照物質の投与.....	6
12. 試験系.....	6
13. 飼育条件.....	7
14. 動物の識別法.....	7
15. 検疫馴化.....	8
16. 動物の選抜.....	8
17. 試験群構成.....	8
18. 投与濃度の設定の根拠.....	8
19. 観察及び検査項目.....	8
19.1 一般状態.....	8
19.2 体重.....	9
19.3 肉眼的観察.....	9
19.4 病理組織学的検査.....	10
20. 統計学的手法.....	10
21. 文献.....	10
22. 試験成績の報告.....	10
23. 記録、資料及び標本の保存.....	11
24. 試験計画書の変更.....	12
25. 試験計画書の作成及び承認.....	13
別添 A	
調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度測定方法.....	総ページ 3 枚
別添 B	
切り出し図.....	総ページ 1 枚

別添 C

病理組織学的検査判定基準総ページ 1 枚