

図 14 純度 (ロット番号: 65E3H (2回目))

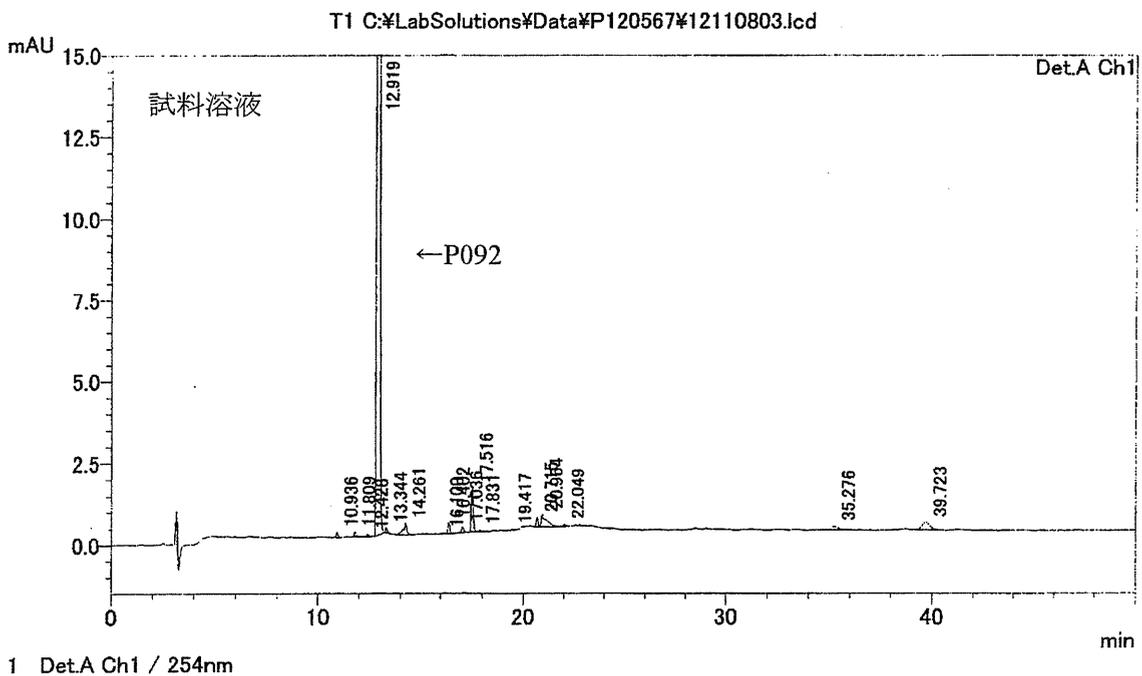
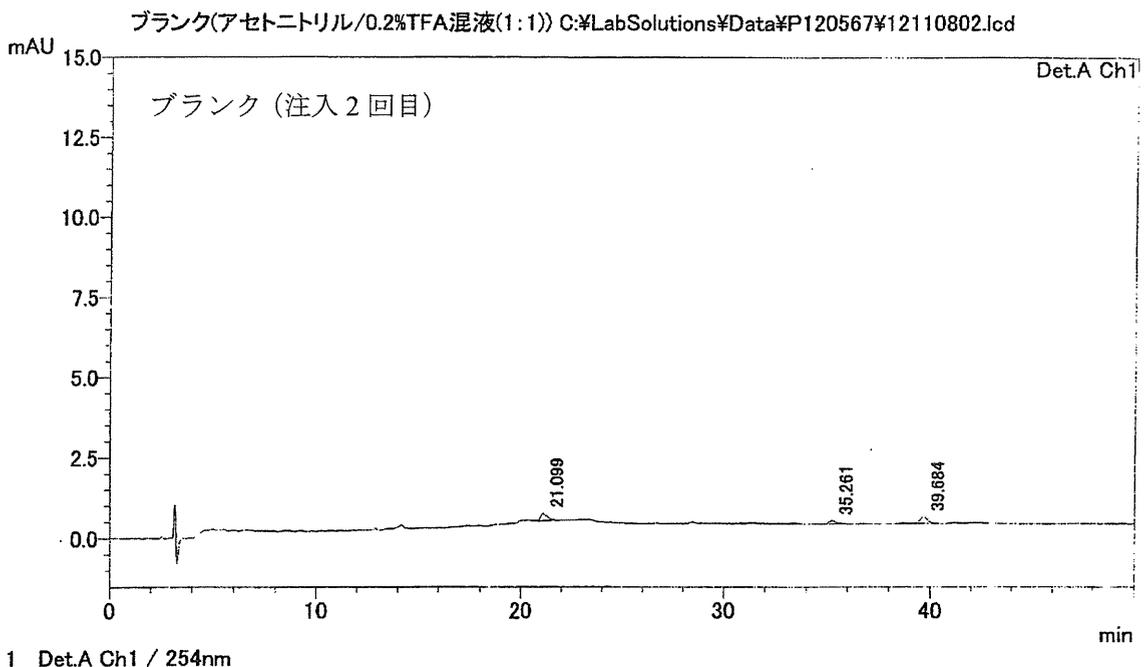


図 15 純度 (ロット番号 : QV48N (1 回目))

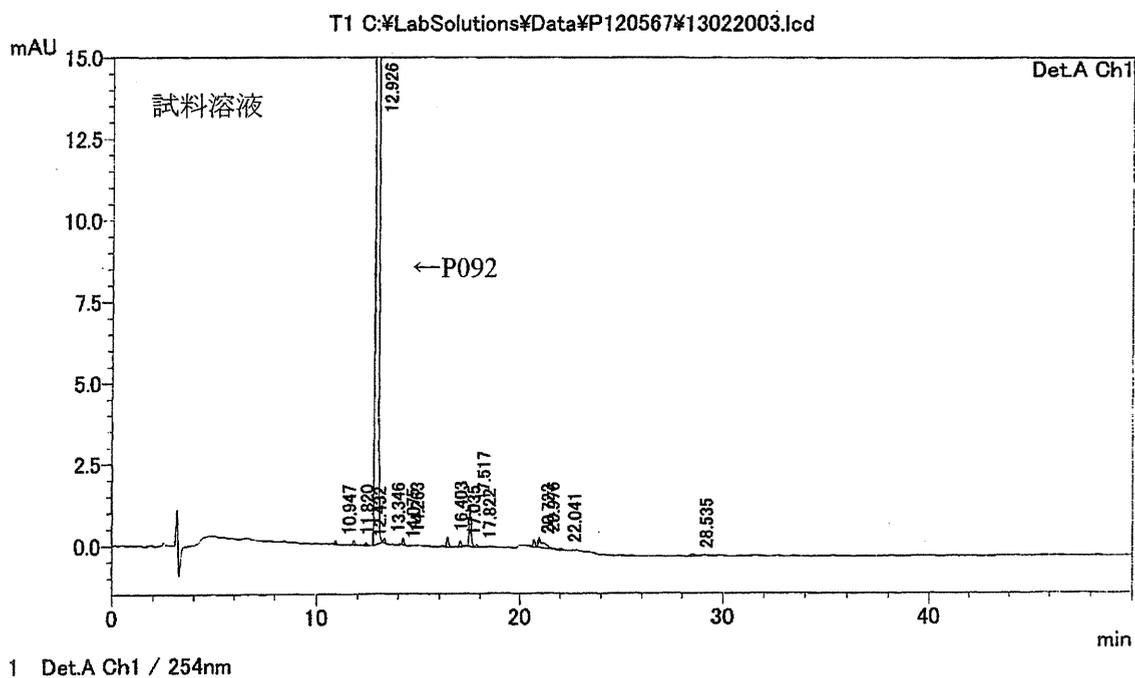
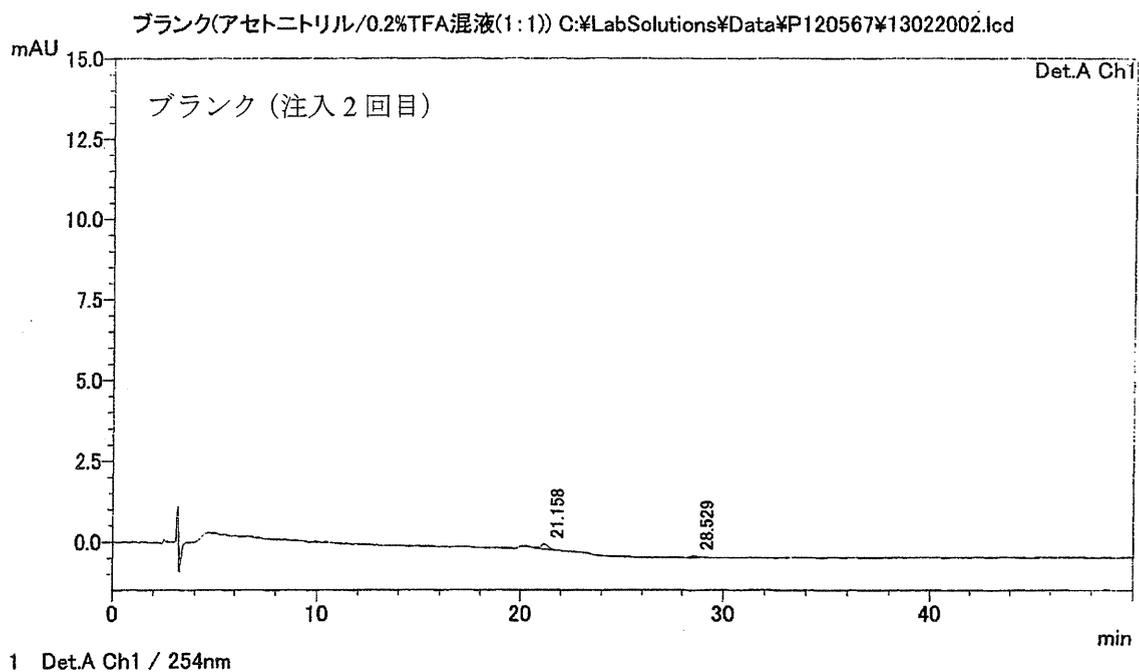


図 16 純度 (ロット番号 : QV48N (2 回目))

信 頼 性 保 証 証 明 書

試験委託者 : 国立大学法人岐阜大学
 表 題 : P092の特性試験及び保存安定性試験
 試験番号 : P120567

本試験は下記の基準に従って実施され、本最終報告書は、試験の方法、結果が正確に記載されていることを保証する。調査の内容、調査日および報告日を以下に示す。

厚生省令第21号 「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」
 (平成9年3月26日、一部改正 厚生労働省令第114号、平成20年6月13日)

調 査 内 容	調 査 日	報 告 日	
		試験責任者	運営管理者
試験計画書			
試験計画書	2012年09月21日	2012年09月21日	2012年09月21日
試験計画書変更書 (1)	2012年11月05日	2012年11月05日	2012年11月05日
試験計画書変更書 (2)	2012年11月09日	2012年11月09日	2012年11月09日
(再調査)	2012年11月13日	2012年11月13日	2012年11月13日
試験計画書変更書 (3)	2012年11月09日	2012年11月09日	2012年11月09日
試験計画書変更書 (4)	2012年11月14日	2012年11月14日	2012年11月14日
試験計画書変更書 (5)	2013年02月12日	2013年02月12日	2013年02月12日
試験実施状況			
性状、確認試験、純度	2012年09月24日	2012年09月24日	2012年09月24日
試験資料・最終報告書			
試験資料・最終報告書草案	2013年03月04日	2013年03月05日	2013年03月05日
	~2013年03月05日		
(再調査)	2013年03月07日	2013年03月07日	2013年03月07日
試験資料・最終報告書	2013年03月14日	2013年03月14日	2013年03月14日

2013 年 3 月 14 日
 信頼性保証部門責任者

溝口重光 

溝口 重光
 三菱化学メディエンス株式会社
 熊本研究所

資料2 非臨床試験

3. P092 の投与液濃度確認のための分析法

バリデーション

本写しは原本と相違ありません

Analytical Method Validation

三菱化学メディエンス(株) 鹿島研究所

2012年11月14日

試験責任者 紺野邦裕印

2012年11月13日

三菱化学メディエンス株式会社

鹿島研究所

試験責任者: 紺野邦裕



紺野 邦裕

分析担当者: 湊 健一

試験番号: B120710
 被験物質: P092
 ロット番号: 7J7XB
 試験委託者: 岐阜大学
 表題: P092の投与液濃度確認のための分析法バリデーション
 分析法: HPLC法
 実施日: 2012年10月31日
 目的: 投与液(媒体: 0.5%MC及びジメチルスルホキシド(以下, DMSO))中P092濃度を測定するための分析法の妥当性を検証した。
 試験結果: 特異性確認のクロマトグラム上, 被験物質の溶出位置に妨害ピークは認められず, 直線性, 再現性及び回収率は許容基準を満たした。従って, HPLC法を用いた本分析法は十分に信頼できると判断した。

I. 濃度測定法のバリデーション結果

項目	許容基準	結果
特異性	妨害ピークが確認された場合, ST-2の被験物質ピーク面積の5%以下であること。	0.5%MC及びDMSOについて妨害ピークは認められなかった。(Figure 1, 2)
直線性	相関係数 (r) ≥ 0.995	r = 0.9999
再現性	C.V. $\leq 5\%$	1.5% (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=3) 0.9% (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=3) 0.6% (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=3)
回収率	対理論値: 100 \pm 10%以内	媒体1: 0.5%MC 100.7% (0.01 mg/mL, n=3) 100.7% (100 mg/mL, n=3) 媒体2: DMSO 104.1% (0.005 mg/mL, n=3) 101.0% (100 mg/mL, n=3)

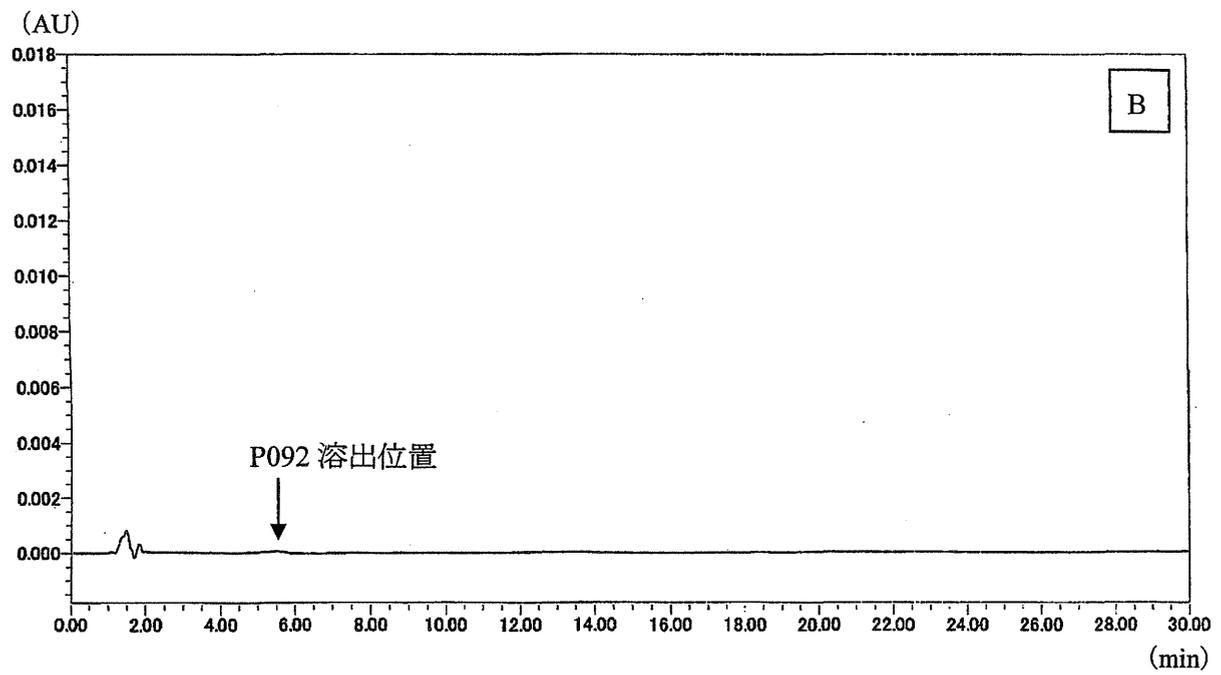
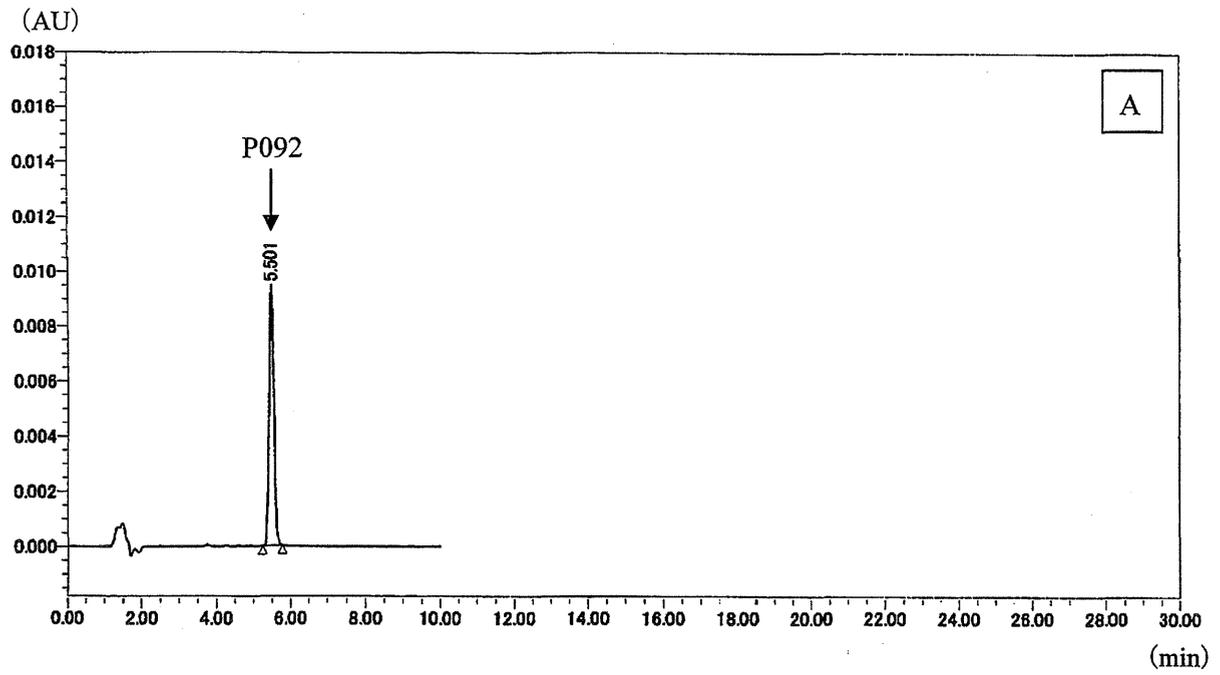


Figure 1 クロマトグラム例
A: ST-2 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
B: SF1 (媒体 1 : 0.5%MC)

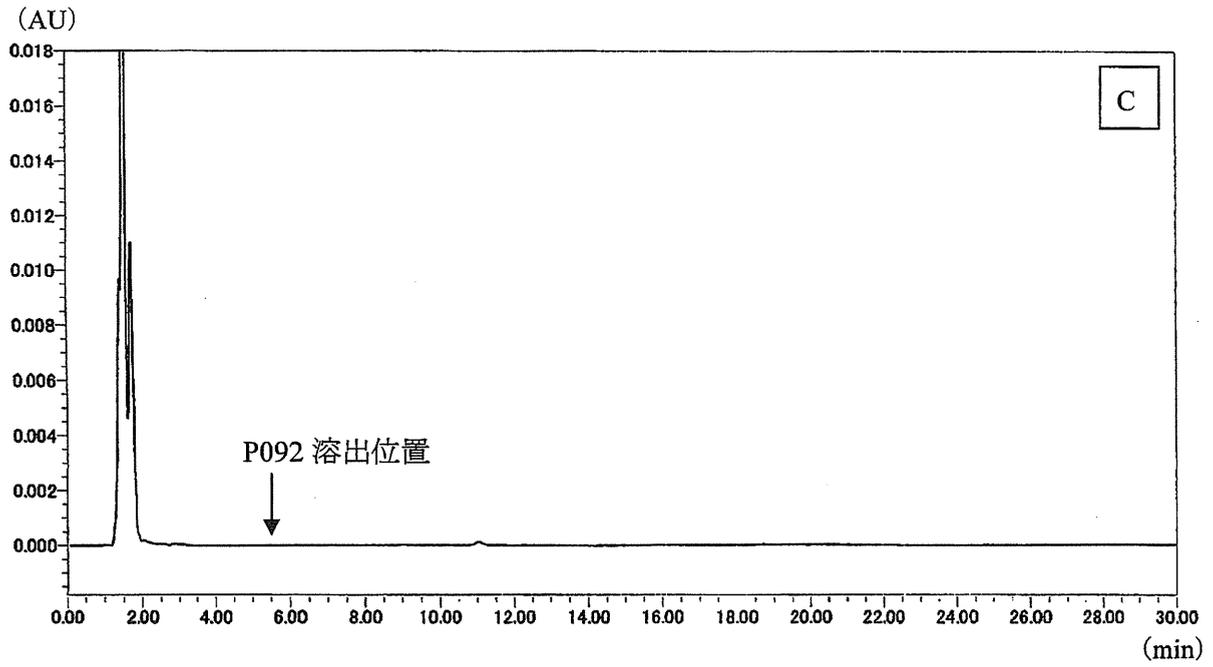


Figure 2 クロマトグラム例
C: SF2 (媒体 2 : DMSO)

資料 2 非臨床試験

4. ラット血漿中 P092 濃度測定法 バリデーション

B120711

本写しは原本と相違ありません
三菱化学メディエンス株式会社 鹿島研究所
2013年1月30日
試験責任者 松元さゆえ 

最終報告書

ラット血漿中 P092 濃度測定法バリデーション

(試験番号：B120711)

三菱化学メディエンス株式会社

1. 陳述書

表 題： ラット血漿中 P092 濃度測定法バリデーション

試験番号： B120711

本試験は下記の基準に従って実施され、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

「申請資料の信頼性の基準」

(薬事法施行規則第 43 条, 平成 16 年 7 月 9 日)

試験責任者：

2013 年 1 月 29 日 松元 さなえ 

松元 さなえ

三菱化学メディエンス株式会社

創薬支援事業本部 試験研究センター

分析代謝研究部 薬物分析 1 グループ

2.	目次	
1.	陳述書	2
2.	目次	3
3.	試験実施概要	6
3.1	表題	6
3.2	試験番号	6
3.3	試験目的	6
3.4	適用ガイドライン	6
3.5	信頼性基準	6
3.6	信頼性保証部門による調査	6
3.7	試験委託者	6
3.8	試験受託者	6
3.9	試験施設	6
3.10	試験責任者	6
3.11	試験従事者	7
3.12	試験日程	7
3.13	保存	7
3.14	保存する資料	7
4.	試験責任者署名	8
5.	要約	9
6.	材料及び方法	10
6.1	測定対象標準物質	10
6.2	内標準物質 (IS)	10
6.3	試薬	10
6.4	ブランク血漿	10
6.5	ラット血漿中 P092 濃度測定法	10
6.5.1	P092 標準試料溶液の調製	10
6.5.2	IS 試料溶液の調製	11
6.5.3	検量線用標準試料溶液の調製	11
6.5.4	バリデーション QC サンプルの調製	12
6.5.5	安定性確認用 QC サンプルの調製	12
6.5.6	前処理操作方法	12
6.5.7	分析条件	13
6.6	分析法バリデーション	13
6.6.1	特異性	13
6.6.2	検量線	14
6.6.3	キャリーオーバー	14
6.6.4	定量下限	14
6.6.5	日内再現性	15

6.6.6	日間再現性	15
6.6.7	回収率	15
6.6.8	希釈妥当性	15
6.6.9	測定実測試料の安定性	16
6.6.10	凍結融解安定性	16
6.6.11	短期室温安定性	16
6.6.12	長期安定性	16
6.6.13	標準試料溶液及び IS 試料溶液の安定性	17
6.7	データ解析	18
6.7.1	検量線の作成及び定量値の算出	18
6.7.2	定量値	18
6.7.3	ピーク面積	18
6.7.4	%表記値	18
7.	結果及び考察	19
7.1	分析法バリデーション	19
7.1.1	特異性	19
7.1.2	検量線	19
7.1.3	キャリアオーバー	19
7.1.4	定量下限	19
7.1.5	日内再現性	19
7.1.6	日間再現性	19
7.1.7	回収率	19
7.1.8	希釈妥当性	20
7.1.9	測定実測試料の安定性	20
7.1.10	凍結融解安定性	20
7.1.11	短期室温安定性	20
7.1.12	長期安定性	20
7.1.13	標準試料溶液及び IS 試料溶液の安定性	20
8.	特記事項	22
8.1	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態	22
8.2	試験計画書に従わなかったこと	22

Tables and Figure

Table 1	Selectivity	23
Table 2	Calibration curve	24
Table 3	Carryover	25
Table 4	Lower limit of quantification	25
Table 5	Within-run accuracy and precision	26
Table 6	Between-run accuracy and precision	27

Table 7	Recovery	28
Table 8	Dilution suitability	28
Table 9	Post-preparative stability	29
Table 10	Freeze and thaw stability	30
Table 11	Short-term stability at room temperature	30
Table 12	Long-term stability	31
Table 13	Standard and IS solutions stability at room temperature	32
Table 14	Standard and IS solutions stability in a refrigerator	33
Figure 1	Typical chromatograms of selectivity	36
信頼性保証証明書		37

最終項 : 37 ページ

3. 試験実施概要

3.1 表題

ラット血漿中 P092 濃度測定法バリデーション

3.2 試験番号

B120711

3.3 試験目的

ラット血漿中 P092 濃度を定量するための分析法の妥当性を検証する。

3.4 適用ガイドライン

Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation

(Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, FDA, dated May 2001)

3.5 信頼性基準

「申請資料の信頼性の基準」

(薬事法施行規則第 43 条, 平成 16 年 7 月 9 日)

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

岐阜大学

岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1 (〒501-1193)

試験委託責任者: 桑田 一夫

3.8 試験受託者

三菱化学メディエンス株式会社

東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号 (〒108-8559)

3.9 試験施設

三菱化学メディエンス株式会社 鹿島研究所

茨城県神栖市砂山 14 番地 1 (〒314-0255)

3.10 試験責任者

松元 さなえ

三菱化学メディエンス株式会社 創薬支援事業本部

試験研究センター 分析代謝研究部 薬物分析 1 グループ

TEL : 0479-46-4024, FAX : 0479-46-3173

E-mail : Matsumoto.Sanae@mm.medience.co.jp

3.11 試験従事者

明石 百恵

3.12 試験日程

試験開始	2012年8月10日
実験開始	2012年8月14日
実験終了	2012年11月27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) 試験計画書及び試験計画書変更書
- (2) 測定対象標準物質及び内標準物質に関する資料
- (3) 試験結果に関する資料
- (4) 通信文書等の記録文書
- (5) 最終報告書

4. 試験責任者署名

表 題： ラット血漿中 P092 濃度測定法バリデーション

試験番号： B120711

試験責任者：

2013年1月29日

松元 さなえ



松元 さなえ

三菱化学メディエンス株式会社

創薬支援事業本部 試験研究センター

分析代謝研究部 薬物分析1グループ

5. 要約

LC-MS/MS を用いたラット血漿中 P092 濃度測定のための分析法を確立し、バリデーションを実施した。

本法では、試料としてラット血漿 20 μ L を、内標準物質として p-アセトアミドフェノールを用い、前処理方法には OASIS HLB μ Elution 96-well plate を用いる固相抽出法を適用した。測定は、逆相系 HPLC、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) 及びマルチリアクションモニタリング法 (MRM) により実施した。

本法における P092 の特異性について、雌雄各 3 個体から得られたラットブランク血漿中において、クロマトグラム上、P092 及び内標準物質のピークを妨害する成分は認められなかった。血漿中 P092 濃度算出のための検量線には、 $1/x$ (x : 血漿中 P092 濃度) の重み付き直線回帰式を採用し、濃度範囲 5~1000 ng/mL で良好な直線性を示した。定量上限からのキャリーオーバーは、P092 及び内標準物質のいずれも許容基準を満たした。

定量下限濃度 (5 ng/mL) の添加血漿試料を用いて再現性を確認した結果、真度と精度の許容基準を満たした。また、10、50 及び 800 ng/mL の添加血漿試料を用いて日内及び日間再現性を検討した結果、いずれの濃度においても真度と精度の許容基準を満たした。

10 及び 800 ng/mL の添加血漿試料を用いて得られた P092 の回収率はそれぞれ 83.0% 及び 87.6%、内標準物質の回収率はそれぞれ 35.2% 及び 34.6% (P092 濃度が 10 及び 800 ng/mL の場合それぞれで算出) であった。希釈妥当性においても 10 倍希釈において許容基準を満たした。

血漿試料を前処理した後の測定試料溶液中の P092 は、オートサンブラ中 (設定温度: 10°C) で 36 時間安定であった。ラット血漿中の P092 は凍結・融解を 3 回まで繰り返しても安定であり、また、室温では 4 時間、約 -80°C での凍結保存では 1 ヶ月間 (33 日間) 安定であることが確認された。

P092 標準試料原液 (200 μ g/mL)、P092 標準試料溶液 (5 ng/mL)、IS 試料原液 (100 μ g/mL) 及び IS 試料溶液 (200 ng/mL) は、室温では 24 時間安定であり、冷蔵保存では 3 ヶ月間 (97 日間) 安定であることが確認された。

以上の結果より、本法はラット血漿中 P092 濃度測定のための分析法として適用できるものと判断した。

6. 材料及び方法

6.1 測定対象標準物質

名称：	P092
ロット番号：	20120711
純度：	95.8%
補正係数：	0.958
	補正係数 = (純度/100)
保存条件：	室温（実測値：17.5～21.9°C，許容範囲：10～30°C）
保管場所：	被験物質保管場所（41）
提供者：	岐阜大学
安定性の確認：	安定性に関する資料を入手し，確認した。
取り扱い上の注意：	保護具（ゴム手袋，眼鏡及びマスク）着用
残余標準物質の処置：	被験物質管理責任者へ移管した。

6.2 内標準物質（IS）

名称：	p-アセトアミドフェノール
ロット番号：	WEQ6871
分子量：	151.16
保存条件：	室温（実測値：17.5～21.9°C，許容範囲：10～30°C），遮光
保管場所：	被験物質保管場所（41）
製造元：	和光純薬工業株式会社
取り扱い上の注意：	保護具（ゴム手袋，眼鏡及びマスク）着用

6.3 試薬

特級もしくは HPLC 用の試薬を使用した。水は超純水製造装置（Elix-UV10, MILLI-Q Gradient-A10, メルク株式会社）で精製したものをを用いた。

6.4 ブランク血漿

動物種：	ラット
系統：	Cri:CD(SD)
投与歴：	なし
抗凝固剤：	ヘパリンナトリウム
入手先：	日本チャールス・リバー株式会社
保存条件：	約-20°C（実測値：-29.3～-19.3°C，許容範囲：-40～-15°C）

6.5 ラット血漿中 P092 濃度測定法

本試験において調製した移動相，試薬類，P092 標準試料原液及び溶液，IS 試料原液及び溶液を，同時期に当施設で実施した試験「サル血漿中 P092 濃度測定法バリデーション」（試験番号：B120712）においても使用した。

6.5.1 P092 標準試料溶液の調製

P092 を 10.4 mg (10.0/0.958 [補正係数]=10.4) 正確に量り，メタノールに溶解し，全量を 50 mL とした (200 µg/mL) (ガラス製メスフラスコを使用)。溶解の際，超音波処理を実施した。この溶液を P092 標準試料原液 (SS) とし，次表に従ってメタノールで順次希釈し，以

下の標準試料溶液を調製した。

P092 標準試料原液及び溶液はポリプロピレン (PP) 製容器にて冷蔵・遮光保存 (実測値 : 3.6 ~ 6.6°C, 許容範囲 : 1 ~ 10°C) した。標準試料溶液中安定性確認のためのもの以外については, 調製後 1 日以内に使用した。

標準試料溶液 略称	標準試料溶液濃度 (ng/mL)	使用標準試料溶液 略称	使用量 (μ L)*	メタノール添 加量(μ L)*
WS-40000	40000	SS	200	800
WS-4000	4000	WS-40000	100	900
WS-1000	1000	WS-4000	250	750
WS-800	800	WS-4000	200	800
WS-500	500	WS-1000	500	500
WS-200	200	WS-1000	200	800
WS-100	100	WS-500	200	800
WS-50	50	WS-500	100	900
WS-20	20	WS-200	100	900
WS-10	10	WS-100	100	900
WS-5	5	WS-50	100	900

* : マイクロピペットを使用

6.5.2 IS 試料溶液の調製

IS を 5 mg 正確に量り, メタノールに溶解, 全量を 50 mL として IS 試料原液 (100 μ g/mL) を調製した (ガラス製メスフラスコを使用)。この溶液を IS 試料原液 (ISSS) とし, 次表に従ってメタノールで希釈し IS 試料溶液 (200 ng/mL, ISWS) を調製した。

ISSS 及び ISWS は PP 製容器にて冷蔵・遮光保存 (実測値 : 3.6 ~ 6.6°C, 許容範囲 : 1 ~ 10°C) した。IS 試料溶液中安定性確認のためのもの以外については, ISSS は調製後 1 日以内に使用し, ISWS は用時調製とした。

IS 試料溶液 略称	IS 試料溶液濃度	使用 IS 試料溶液 略称	使用量 (μ L)*	メタノール添加量 (μ L)*
ISWS-1	5 μ g/mL	ISSS	50	950
ISWS	200 ng/mL	ISWS-1	40	960

* : マイクロピペットを使用

6.5.3 検量線用標準試料溶液の調製

PP 製マイクロチューブにブランク血漿 20 μ L を分取後, 水/ギ酸 (1000:1, v/v) 400 μ L を添加し, ブランク試料, ゼロ試料についてはメタノールを 20 μ L, 検量線用標準試料溶液 (C1 ~ C8) については, 次表に従い P092 標準試料溶液を 20 μ L 添加した。