6.　材料及び方法

6.1　被験物質

6.1.1　名称

P092

6.1.2　ロット番号

E5Z6K

6.1.3　純度

99.2%（Annex 1 参照）

6.1.4　性状

白色の粉末

6.1.5　提供者

国立大学法人岐阜大学

6.1.6　入手量

約 143 g

6.1.7　保存条件

冷蔵（実測値：4.2°C～6.3°C，許容範囲：1°C～10°C），遮光，密封（窒素封入）

6.1.8　取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋を着用した．

6.1.9　安定性の確認

試験委託者から安定性試験（GLP 適用試験）の結果を入手し，投与期間中の安定性を確認した（Annex 2 参照）．

6.1.10　残余被験物質の処理

全て試験施設の被験物質管理責任者に移管した（9.2 項参照）．

6.2　媒体

6.2.1　名称

0.5 w/v%メチルセルロース水溶液（略称：0.5 w/v% MC）

6.2.2　試薬

メチルセルロース（ロット番号：WER5404，MC と略す，MC400，和光純薬工業株式会社）

日本薬局方注射用水（ロット番号：2C71，略称：注射用水，株式会社大塚製薬工場）

6.2.3　媒体の調製法

(1) 所定量の MC を正確に秤量した．
(2) 調製量より少ない注射用水をビーカーに入れ，ホットマグネチックスターラーを用いて約 80°C に加熱した．加熱した注射用水を攪拌しながら，MC を少量ずつ加えて溶解させた．
(3) 溶解後，室温になるまで冷まし，これをメスシリンダーに移し，適宜注射用水を加えて 0.5 w/v%となるように定容した．
(4) 調製した 0.5 w/v% MC を保存容器に入れ，2 日以内に使用した（使用期限：調製後 14 日間）．

6.2.4　保存条件

冷蔵（実測値：4.3°C～6.0°C，許容範囲：1°C～10°C）

6.3　投与液

6.3.1　調製方法及び頻度

被験物質投与液は，紫外線をカットした蛍光灯下で投与前日に 1 回調製した．媒体（0.5 w/v% MC）を対照群の投与液として使用した．

(1) P092 を正確に秤量した．
(2) 乳鉢及び乳棒を用いて被験物質を破砕し，媒体で洗い流しながらメートルグラスに移した．
(3) この混合液に媒体を加え，50 mg/mL になるように正確にメスアップした．更に 8 mg/mL の投与液を媒体で段階希釈し，15 及び 5 mg/mL の投与液を調製した．
(4) 調製後，投与液は褐色ガラス瓶に入れた．採取及び希釈などにおける操作はマグネチックスターラーで攪拌しながら行った．

6.3.2　保管条件

冷蔵（実測値：4.3°C～5.8°C，許容範囲：1°C～10°C），遮光
投与液は，調製後 1 日以内に使用した．

6.3.3　安定性確認及び均一性確認

試験施設において，6.3.1 項に示した方法と同様の方法で調製し，投与液の安定性及び均一性を確認した．調製直後及び保管終了後に 0.05 及び 100 mg/mL 被験物質投与液の上層，中層及び下層の 3 点からサンプリングし，HPLC 法で濃度分析を行った．分析方法は 6.4 項に示す．なお，0.05 mg/mL 被験物質投与液の調製直後における濃度が許容範囲を外れたことから，再調製を実施した（9.1 項参照）．

＜結果＞

0.05 及び 100 mg/mL 被験物質投与液は，冷蔵・遮光・密封下で調製後 3 及び 9 日間，これに続く室温・遮光・密封下で 24 時間の保存条件で許容範囲を満たし，安定かつ均一であることが確認された（Annex 3 参照）．

＜許容範囲＞

濃度：保存後の測定値（濃度）の平均が調製直後の±10%以内であること．

均一性：保存後の測定値の精度（変動係数，C.V.値）が 10%以下であること．

6.3.4 濃度及び均一性確認

試験施設において，投与に用いた被験物質投与液の濃度及び均一性を確認した．各被験物質投与液の上層，中層及び下層の 3 点からサンプリングし，HPLC 法で濃度分析を行った．分析方法は 6.4 項に示す．

各投与液の平均濃度の対設定濃度は 102.7%～104.8%，変動係数（C.V.値）は，0.6%～1.2%であり，許容範囲を満たした（Annex 4 参照）．

＜許容範囲＞

濃度：測定値（濃度）の平均が設定濃度±10%以内であること．

均一性：測定値の精度（変動係数，C.V.値）が 10%以下であること．

6.4 投与液中の被験物質濃度分析方法

試験施設で実施した分析法バリデーション試験「P092 の投与液濃度確認のための分析法バリデーション」（試験番号：B120710）で検証された以下の方法に従って実施した．

6.4.1 高速液体クロマトグラフ（HPLC）操作条件

カラム：	CAPCELL PAK C18 MG II，5 µm，150 mm×4.6 mm ID, 株式会社資生堂
カラム温度：	40°C
移動相[*1]：	1%過塩素酸ナトリウム（過塩素酸で pH2.5 に調整した）/アセトニトリル混液（55：45）
流速：	1 mL/min
検出波長：	UV 254 nm
注入量：	10 µL
オートサンプラ温度：	10°C
オートサンプラ洗浄液[*1]：	メタノール
測定時間：	10 分

*1：減圧下超音波脱気した．

6.4.2 使用機器

HPLC：	2695 Separations Module, Waters Corporation
検出器：	2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters Corporation

システムマネージャ：Empower 2 software, Waters Corporation

6.4.3 標準溶液の調製

下表に従い標準溶液を調製した．

溶液略号	調製方法			濃度 (μg/mL)
SS	P092，25 mg	→	100 mL／メタノール*1	250
SS-1	SS, 1 mL	→	25 mL／メタノール	10
ST-1	SS-1，1 mL	→	10 mL／メタノール	1
ST-2	SS-1，2.5 mL	→	10 mL／メタノール	2.5
ST-3	SS-1，3 mL	→	10 mL／メタノール	3

*1：超音波処理を実施した．

6.4.4 試料溶液の調製

下表に従い試料溶液を調製した．なお，投与液は撹拌しながら分取した（n=3）．

投与液 (mg/mL)	調製方法				溶液略号	最終濃度 (μg/mL)	最終希釈倍率
0.05	投与液，	1 mL	→	20 mL／メタノール*1	A	2.5	20
5	投与液，	1 mL	→	100 mL／メタノール*1	B	2.5	2000
	B,	1 mL	→	20 mL／メタノール	C		
15	投与液，	1 mL	→	30 mL／メタノール*1	D	2.5	6000
	D,	1 mL	→	20 mL／メタノール	E		
	E,	1 mL	→	10 mL／メタノール	F		
50	投与液，	1 mL	→	100 mL／メタノール*1	G	2.5	20000
	G,	1 mL	→	20 mL／メタノール	H		
	H,	1 mL	→	10 mL／メタノール	I		
100	投与液，	1 mL	→	100 mL／メタノール*1	J	2.5	40000
	J,	1 mL	→	40 mL／メタノール	K		
	K,	1 mL	→	10 mL／メタノール	L		

*1：超音波処理を実施した．

6.4.5 HPLC 測定及び濃度算出

標準溶液（ST-1，ST-2 及び ST-3；6.4.3 項参照）及び試料溶液（A，C，F，I 及び L；6.4.4 項参照）を 6.4.1 項の条件に設定した HPLC に注入し，クロマトグラム上の P092 のピーク面積を測定した．標準溶液の濃度及びそのピーク面積から検量線を作成した．検量線，試料溶液から得られたピーク面積及び希釈倍率から投与液中の P092 濃度（測定値）を算出した．測定値の平均値，対設定値及び変動係数を算出した．検量線の作成，投与液中の P092 濃度（測定値），測定値の平均値，対設定値及び変動係数の計算は Microsoft Excel 2003（Microsoft Corporation）を用いて行った．

6.5 試験動物

6.5.1 動物種

ラット

6.5.2 系統
Crl:CD(SD)

6.5.3 系統選択の理由
げっ歯類を用いた毒性試験に広く使用されており，背景データが豊富である．

6.5.4 微生物レベル
SPF

6.5.5 供給源
日本チャールス・リバー株式会社

6.5.6 購入時週齢
5 週齢

6.5.7 購入動物数及び性別
主試験群：雌雄各 22 匹
TK サテライト群：雌雄各 14 匹
主試験群及び TK サテライト群の動物は同一日に別々に入荷した．

6.5.8 検疫・馴化
6.5.8.1 検疫
検疫期間は動物入荷後 5 日間とした．検疫期間には以下の検査を行い，検疫期間中に一般状態の異常が認められず，体重増加が認められることを確認した．なお，検査方法は 6.9 項に従った．
- 一般状態観察（1 日 1 回）
- 体重測定（動物入荷時及び検疫終了時）

6.5.8.2 馴化
馴化期間は動物入荷から投与前日までとした．検疫期間終了後の馴化期間中に以下の検査を行った．なお，検査方法は 6.9 項に従った．
- 一般状態観察（1 日 1 回）
- 体重測定（群分け日）

6.5.9 投与開始時週齢
6 週齢

6.5.10 投与開始時体重

雄：157.5～173.9 g，雌：129.2～149.3 g

投与日（投与前）に個々の体重が雌雄それぞれ全例の平均体重±20%以内であることを確認した．

6.5.11 群分け

(1) 実施日

投与日の前日

主試験群及び TK サテライト群の動物は，同一日に別々に群分けを行った．

(2) 動物選抜

主試験群及び TK サテライト群は検疫・馴化期間中の検査の結果から，いずれの動物にも異常は認められなかったため，全例を群分けに使用した．

(3) 動物の振り分け

群分け日の体重に基づいて，体重層別化無作為抽出法により各群の平均体重がほぼ均一になるように動物を群分けした．主試験群として雌雄各 20 匹，TK サテライト群として雌雄各 12 匹を使用した．

6.5.12 動物の識別

個体識別は以下により行った．なお，主試験群と TK サテライト群は，油性ペンの色を変えて区別した．

群分け前：尾に油性ペンで付した番号（群分け前の動物番号末尾 1 または 2 桁）

群分け後：尾に油性ペンで付した番号（動物番号末尾 3 桁）

動物のケージには次の情報を記載したラベルを付けた．

群分け前：試験番号，試験種（主試験群又は TK サテライト群），群分け前の動物番号（検疫・馴化期間中の動物番号），動物種，系統及び性別

群分け前の動物番号は以下の通りとした．

主試験群；	雄：#19001～#19022，雌：#59001～#59022
TK サテライト群；	雄：#29001～#29014，雌：#69001～#69014

群分け後：試験番号，試験種（主試験群又は TK サテライト群），群名（用量），動物番号，Cage 番号（主試験群のみ），動物種，系統及び性別

6.5.13 余剰動物の取扱

余剰動物は投与日に試験から除外した．除外した動物は，投与翌日にチオペンタールナトリウム（ラボナール®，田辺三菱製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し，安楽死させた．

6.6 飼育環境

6.6.1 飼育室

ラット・マウス飼育室（2122 室）

6.6.2 飼育環境

6.6.2.1 温度

21.0°C～23.0°C（許容範囲：19.0°C～25.0°C）

6.6.2.2 相対湿度

42.8%～76.0%*（許容範囲：35.0%～75.0%）
*：飼育室作業による湿度上昇（最大 76%，約 1 分間）が，解剖日の午前中に認められた．

6.6.2.3 換気

6～20 回／時，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

6.6.3 飼育器材

6.6.3.1 ケージ

ステンレス製つり下げ型金網ケージ（195W×325D×180H mm，トキワ科学器械株式会社）
使用前滅菌：オートクレーブ滅菌
交換頻度：　群分け日に交換した．

6.6.3.2 給餌器

固型用ステンレス製給餌器（トキワ科学器械株式会社）
使用前滅菌：オートクレーブ滅菌
交換頻度：　群分け日に交換した．

6.6.3.3 給水装置

自動給水装置（トキワ科学器械株式会社）
自動給水配管内の滞留水は 1 日 2 回，オートフラッシュシステムにより排出した．

6.6.3.4 架台

ステンレス製架台（トキワ科学器械株式会社，自動給水装置付）
使用前滅菌：オートクレーブ滅菌
交換頻度：　群分け日に交換した．

6.6.3.5 糞尿トレー

アルミニウム製トレー（トキワ科学器械株式会社）
実験動物用床敷（ベータチップ，日本チャールス・リバー株式会社）を敷いて架台上（ケージの下）に設置した.
使用前滅菌：オートクレーブ滅菌（床敷含む）
交換頻度： 群分け日及び投与後 7 日に交換した.

6.6.3.6 エンリッチメント

動物福祉向上のために，オートクレーブ滅菌した玩具（アルミナボール）を使用した.

6.6.4 収容動物数

1 匹／ケージ

6.6.5 飼料

6.6.5.1 種類

実験動物用固型飼料（CR-LPF, Lot No. 120918 及び 121012, オリエンタル酵母工業株式会社，放射線滅菌済み）

6.6.5.2 給餌法

自由摂取
ただし，以下の期間は給餌しなかった.
・投与前日の夕方（投与の約 18 時間前）から投与後 3 時間までの期間
飼料は群分け日及び投与後 7 日に新しいものと交換した.

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，使用したロット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

6.6.6.3 分析

株式会社三菱化学アナリテックで水質検査を定期的（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た.

6.7 群構成

6.7.1 主試験群

群	被験物質	投与用量 (mg/kg/day)	投与液量 (mL/kg/day)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）	
					雄	雄
1	対照*1	0	10	0	5（10101～10105）*2	5（50101～50105）*2
2	P092	50	10	5	5（10201～10205）*2	5（50201～50205）*2
3	P092	150	10	15	5（10301～10305）*2	5（50301～50305）*2
4	P092	500	10	50	5（10401～10405）*2	5（50401～50405）*2

*1：0.5 w/v% MC を投与

*2：観察期間終了の翌日（第 15 日）に解剖

6.7.2 TK サテライト群

群	被験物質	投与用量 (mg/kg/day)	投与液量 (mL/kg/day)	投与液濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）	
					雄	雌
5	対照*1	0	10	0	3（20101～20103）	3（60101～60103）
6	P092	50	10	5	3（20201～20203）	3（60201～60203）
7	P092	150	10	15	3（20301～20303）	3（60301～60303）
8	P092	500	10	50	3（20401～20403）	3（60401～60403）

*1：0.5 w/v% MC を投与

6.7.3 投与用量及びその設定理由

投与用量は 50，150 及び 500 mg/kg/日とした．加えて媒体のみを投与する対照群を設けた．
被験物質の投与用量は，P092 のラットを用いる単回経口投与予備試験，試験番号：B120965 の結果に基づいて設定した．雌雄ラットに 100，500，1000 及び 2000 mg/kg/日の用量で投与した結果，一般状態観察において 500 mg/kg/日以上の群の雌雄で下痢がみられ，500 mg/kg/日群の雄及び 1000 mg/kg/日以上の群の雌雄では死亡又は状態悪化による瀕死期解剖例が認められた．
以上のことから，500 mg/kg/日は最小致死量付近と判断し，高用量に設定した．以下，公比約 3 で 150 及び 50 mg/kg/日を設定した．

6.8 投与

6.8.1 投与経路

経口投与

6.8.2　投与経路の選択理由
予定臨床適用経路に準じた.

6.8.3　投与液量
10 mL/kg
各個体の投与液量は投与日に測定した体重に基づいて算出した.

6.8.4　投与回数・期間
1回

6.8.5　投与回数の選択理由
毒性試験のガイドラインに従った.

6.8.6　投与方法
ディスポーザブルシリンジ及び経口ゾンデを用い,強制的に胃内に経口投与した.投与は9:51～10:16に行った.なお,投与時には投与液をスターラーで充分に撹拌した.

6.8.7　投与方法の選択理由
ラットに経口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.

6.9　観察・検査項目
主試験群の動物について,下記の項目を検査した.
日と週の表記は,投与日を第1日とした.
TK サテライト群の動物については,一般状態観察及び体重測定を主試験群と同様に実施したが,得られたデータは毒性評価から除外した(Appendix 8 及び 9 参照).

6.9.1　一般状態
全動物の生死,外観,行動及び排泄物等の異常の有無及び程度を観察した.観察頻度及び時刻を以下に示した.
投与日：　　　1日6回(投与前,投与後約30分,1,2,4及び8時間に1回)
投与日以外：　1日1回(午前中,動物入荷日は午後)

6.9.2　体重
全動物について,電子天秤(PB3002-S,メトラー・トレド株式会社)を用いて,以下の日程に測定した.投与日は投与前に測定した.また,各測定日間の体重増加量を算出した.
測定日：投与日(第1日),第2,4,8,11,15日(解剖日)

6.9.3　摂餌量
全動物について,飼料の風袋込み重量を,電子天秤(PB3002-S,メトラー・トレド株式会社)

を用いて，以下の日程に従って測定した．
測定日：第1～4，4～8，8～11，11～15日

各測定日間の重量差からその期間の1日平均摂餌量を算出した．算出した摂餌量は，各測定期間の最終日の摂餌量として表記した．

6.9.4 病理解剖検査

全動物について，第15日にチオペンタールナトリウム（ラボナール®，田辺三菱製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で，腹大動脈を切断・放血して安楽死させた後に剖検した．剖検の結果，異常は認められなかったため，器官・組織の採取及び保存はしなかった．

6.10 トキシコキネティクス（TK）測定

P092投与時の全身的暴露量の用量相関及び経時変化を検討するため，投与日の血漿中P092濃度を測定し，薬物動態パラメータ（C_{max}，T_{max}及び$AUC_{0\text{-}24h}$）を算出した．

6.10.1 採血及びTK測定試料の採取

TKサテライト群の全動物から，無麻酔下で鎖骨下静脈から約0.24 mL／時点を採血し，血漿（TK測定試料）を得た．採血はヘパリン加注射筒（ナトリウム塩）にて実施した．採取した血液は，採血後直ちにポリプロピレン（PP）製チューブに入れて氷冷し，速やかに遠心分離（10000×g，3分間，4°C）して個体毎の血漿を得た．得られた血漿はPP製チューブに入れ，直ちにドライアイスで保冷し，測定まで約−80°C（実測値：−84.4°C～−80.6°C，許容範囲：−60°C以下）のフリーザー内で凍結保存した．

採血時点
投与日（第1日）：　投与後30分，1，2，4，8及び24時間

ただし，対照群は投与後30分及び2時間のみを測定し，それ以外の時間に採取した血液は，その場で廃棄し，測定はしなかった．
総検体数：120検体

6.10.2 採血終了後動物の処理

採血終了後の動物は，最終採血後にチオペンタールナトリウム（ラボナール®，田辺三菱製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し，安楽死させた．剖検は行わなかった．

6.10.3 血漿中P092濃度の測定方法

血漿中P092濃度の測定は，当試験施設で実施した「ラット血漿中P092濃度測定法バリデーション」（試験番号：B120711）における分析法に従って実施した．P092の安定性については，B120711にて以下の項目が確認されている．
また，本試験において調製した標準原液及び溶液類を，同時期に当施設で実施した試験「P092

のラットを用いる 4 週間反復経口投与毒性試験」(試験番号：B120720) においても使用した.

項目	期間又は回数
測定実測試料の安定性（10°C）	36 時間
凍結融解安定性（–80°C）	3 回
短期安定性（室温）	4 時間
長期安定性（–80°C）	33 日間
P092 標準試料原液及び溶液（室温）（200 µg/mL 及び 5 ng/mL）	24 時間
P092 標準試料原液及び溶液（冷蔵）（200 µg/mL 及び 5 ng/mL）	97 日間
IS 試料原液及び溶液（室温）（100 µg/mL 及び 200 ng/mL）	24 時間
IS 試料原液及び溶液（冷蔵）（100 µg/mL 及び 200 ng/mL）	97 日間

6.10.3.1 測定対象標準物質

被験物質（6.1 項）を使用した.

6.10.3.2 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°C～21.9°C，許容範囲：10°C～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
安定性の確認：	実施しなかった．クロマトグラム上において，P092 溶出位置に定量を妨害する夾雑ピークを与えないことを分析日毎に確認した.
取扱上の注意：	保護具（ゴム手袋，眼鏡及びマスク）着用

6.10.3.3 ブランク血漿

動物種：	ラット
系統：	Crl: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°C〜−19.3°C，許容範囲：−40°C〜−15°C）

6.10.3.4　試薬

試薬類は市販の特級又は 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）で精製したものを用いた．

6.10.3.5　P092 標準試料溶液の調製

P092 を 10.0 mg 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：3.9°C〜6.0°C，許容範囲：1°C〜10°C）し，調製後 8 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 (µL)*	メタノール添加量(µL)*
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

6.10.3.6　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 µg/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．
IS 試料原液及び溶液は PP 製容器にて冷蔵・遮光保存（実測値：3.9°C〜6.0°C，許容範囲：1°C〜10°C）し，調製後 8 日以内に使用した．

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 (µL)*	メタノール添加量 (µL)*
ISWS-1	5 µg/mL	ISSS	50	950
ISWS	200 ng/mL	ISWS-1	40	960

*：マイクロピペットを使用

6.10.3.7　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 µL を分取後，水／ギ酸（1000:1，v/v）400 µL 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 µL，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 µL 添加した．

略称	血漿中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
C1 (LLOQ)	5	WS-5
C2	10	WS-10
C3	20	WS-20
C4	50	WS-50
C5	100	WS-100
C6	200	WS-200
C7	500	WS-500
C8 (ULOQ)	1000	WS-1000

LLOQ: lower limit of quantification
ULOQ: upper limit of quantification

6.10.3.8　血漿試料の前処理方法（分析フロー）

(1) PP 製マイクロチューブに血漿 20 µL を分取した．
(2) 水／ギ酸（1000:1，v/v）400 µL を添加した．
(3) メタノール 20 µL を添加した．
　（検量線用標準試料溶液調製時は P092 標準試料溶液）
(4) ISWS（ブランク試料調製時はメタノール）40 µL を添加した．
(5) ミキサーを用いて攪拌した．
(6) 全量を Oasis HLB µElution plate（30 µm，Waters Corporation）にアプライした（プレートは，あらかじめメタノール 200 µL 及び水／ギ酸（1000:1，v/v）200 µL でコンディショニングした）．
(7) 水／ギ酸（1000:1，v/v）200 µL で洗浄した．
(8) メタノール 70 µL で溶出した．
(9) 水／ギ酸（1000:1，v/v）140 µL を添加，攪拌後，次項に従い測定した．

6.10.3.9 分析条件

6.10.3.9.1 装置

HPLC 装置：	1100 (Agilent Technologies)
オートサンプラ：	SIL-20AC (Shimadzu Corporation)
質量分析装置：	API 4000 (AB SCIEX)

6.10.3.9.2 HPLC 条件

カラム：	XBridge C18, 3.5 µm, 3.0 mm I.D. × 50 mm（Waters Corporation）
カラム温度：	50°C
移動相 A：	水／ギ酸（1000:1，v/v）
移動相 B：	メタノール／ギ酸（1000:1，v/v） 移動相 A，B を 4:6 の割合で HPLC で混合した．
流速：	0.25 mL/min
注入量：	10 µL
オートサンプラ設定温度：	10°C
ニードル洗浄溶媒：	メタノール

6.10.3.9.3 MS/MS 条件

Ionization method：	ESI (Electrospray Ionization, Turbo Ion Spray)
Polarity：	Positive
Scan type：	MRM (Multiple reaction monitoring)
Ion spray voltage (IS)：	5500 V
Heater gas temperature (TEM)：	500°C
Nebulizer gas (GS1)：	Air, 50 psi
Heater gas (GS2)：	Air, 85 psi
Curtain gas flow (CUR)：	N_2, 18 psi
Collision gas flow (CAD)：	N_2, 4
Entrance potential (EP)：	10 V
Monitor ion：	P092: *m/z* 252 > 84 IS: *m/z* 152 > 110

6.10.3.10 検量線

ブランク試料，ゼロ試料及び 8 濃度の検量線用標準試料溶液を n=1 で調製し，それぞれから測定実測試料を n=1 で調製，測定した．
ブランク試料，ゼロ試料の 2 検体は，LC-MS/MS 測定のバックグランド確認のために測定した．
検量線用標準試料溶液につき，P092 の IS に対するピーク面積比を，添加濃度に対し一次回帰して得られる直線を検量線とした．検量線には，1/x の重み付け（x：血漿中 P092 濃度）を用いた．P092 の各濃度における真度（%RE）を算出した．

$$真度（\%RE）= \frac{定量値 - 理論値}{理論値} \times 100$$

<許容基準>
ブランク及びゼロ試料における P092 及び IS の溶出位置に夾雑ピークが検出されていないこと．検出された場合，夾雑ピークのピーク面積が，LLOQ サンプルの P092 及び IS のピーク面積に対してそれぞれ 20.0 及び 5.0%未満であること．
検量線用標準試料溶液の 8 濃度中，定量下限及び上限を含む 6 濃度以上において，%RE が ±15.0%（LLOQ では±20.0%）以内であること．
LLOQ 及び ULOQ 以外の濃度について，%RE が±15.0%を満たさない場合は，当該濃度を除いて再度検量線を作成する．ただし，6 濃度以上の検量線用標準試料溶液が含まれることとする．なお，重み付けを変更してはならない．

検量線はすべて許容基準を満たした（Appendix 6 参照）．

6.10.3.11 TK 測定試料の希釈

本試験では，希釈は実施しなかった．

6.10.3.12 TK 測定時の精度管理

PP 製マイクロチューブにブランク血漿 20 µL を分取後，水／ギ酸（1000:1，v/v）400 µL を添加し，次表に従い P092 標準試料溶液を 20 µL 添加した．

略称	血漿中濃度 (ng/mL)	P092 標準試料溶液略称
Low QC	10	WS-10
Middle QC	50	WS-50
High QC	800	WS-800

次に示す順に各濃度 2 本（計 6 本）の QC サンプルを測定した．

1. 検量線
2. QC サンプル（Low, Middle 及び High, n=1）
3. TK 測定試料
4. QC サンプル（Low, Middle 及び High, n=1）

<許容基準>
6 検体中 4 検体かつ 1 濃度 1 検体以上において%RE が±15.0%以内であることとする．

QC サンプルはすべて許容基準を満たした（Appendix 6 参照）．

6.10.3.13 再注入

本試験では，再注入は実施しなかった．

6.10.3.14 再測定

本試験では，再測定は実施しなかった．

6.10.3.15 試料測定時の再現性確認（Incurred Sample Reanalysis; ISR）

TK 測定試料を再測定し，測定再現性を確認した．
データ採用確定後，被験物質投与群の P092 の T_{max} 付近における TK 測定試料 12 検体及び消失相付近における TK 測定試料 12 検体の合計 24 検体を選択し，n=1 で血漿中 P092 濃度を測定した．
再測定の結果は以下の式に基づき初回定量値との差（相対誤差）を算出した．

相対誤差＝100×（再測定定量値－初回定量値）／［(再測定定量値＋初回定量値）／2]

許容基準は 24 検体中 16 検体以上の相対誤差が±20.0%以内とした．

24 検体中 21 検体の相対誤差が±20.0%以内であり，許容基準を満たした．詳細は Appendix 7 に示す．

6.10.3.16 データ解析

検量線の作成及び定量値の算出は，LC-MS/MS 装置付属の解析ソフトウェア「Analyst」（Ver. 1.4.2，AB SCIEX）を用いて行った．
定量値の単位は "ng/mL" として次表に従った．
定量下限未満の定量値は BLQ（Below the lower limit of quantification）と表示し，平均値及び標準偏差算出時は 0 として扱った．同一時点の過半数の定量値が BLQ の場合は，平均値は BLQ と表示し，標準偏差は NC（Not calculated）と表示した．平均値が定量下限未満の場合は，BLQ と表示し，標準偏差は NC と表示した．

項目	表示方法
定量値	Analyst で算出し，有効数字 3 桁で表示した．
平均値	Microsoft Excel 2003 で算出し，定量値と同様に有効数字 3 桁で表示した．
標準偏差	Microsoft Excel 2003 で算出し，平均値と小数点以下同桁数で表示した．
%表記値	Microsoft Excel 2003 で算出し，小数点以下第 1 位まで表示した．

6.10.4 薬物動態パラメータの算出

被験物質投与群について，血漿中濃度推移から薬物動態パラメータ (C_{max}，T_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$) を個体別に算出した．投与 0 時間の血漿中濃度は，0 ng/mL とした．C_{max}，T_{max} は実測値より求め，$AUC_{0\text{-}24h}$ は，薬物動態解析プログラム Phoenix WinNonlin 6.2（Pharsight Corporation）を用いて，台形法で算出した．

各パラメータの平均値及び標準偏差の算出には Microsoft Excel 2003 を用いた.

6.10.5 残余 TK 測定試料の処理

測定終了後の残余 TK 測定試料は,試験終了時までに廃棄した.

6.11 統計学的解析

主試験群から得られたデータについて以下の統計学的解析を実施した.解析には安全性試験支援システム(Provantis, INSTEM 社)を用いた.

計量データは,Bartlett 法による等分散の検定(有意水準:1%)を行い,分散が等しい場合は Dunnett 法,分散が等しくない場合は Dunnett 型の多重比較検定(有意水準:各 1%及び 5%,両側検定)によって対照群との平均値の差の検定を行った.

統計学的解析の対象項目を以下に示した.TK サテライト群で得られたデータについては統計学的解析を実施しなかった.

計量データ:
・体重
・体重増加量
・摂餌量

6.12 コンピュータシステムの使用

以下に示すデータの収集・集計には安全性試験支援システム(Provantis, INSTEM 社)を使用した.当該システムのコンピュータプロトコールにはデータ収集範囲,データ収集の日程等を登録した.コンピュータシステムのプロトコール番号として群分け前には B120716S,群分け以降には B120716 を用いた.

(1) 群分け,投与液量算出
(2) オンラインデータ収集及びデータ集計:
・一般状態
・体重及び体重増加量
・摂餌量
(3) オフライン収集及びデータ集計:
・一般状態(投与日の投与後観察)
・病理解剖検査

7. 結果

7.1 死亡・瀕死

結果を Table 1 及び Appendix 1 に示す.

死亡あるいは瀕死動物は認められなかった.

7.2 一般状態

結果を Table 1 及び Appendix 1 に示す.

下痢が 50 mg/kg/day 以上の群の雌雄において認められた. 下痢は 50 mg/kg/day 群の雄 2 例及び雌 1 例で投与後約 8 時間に, 150 mg/kg/day 群の雌雄各 4 例で投与後約 4 時間～第 2 日に, 500 mg/kg/day 群の雌雄全例で投与後約 2 時間～第 3 日に一過性ないし継続して認められた.

7.3 体重

結果を Table 2, 3, Appendix 2 及び 3 に示す.

体重及び体重増加量の低値又は低値傾向が 50 及び 150 mg/kg/day 群の雄で第 2 日に, 500 mg/kg/day 群の雄で第 2 日～第 4 日に, 雌で第 2 日及び第 4 日に認められた. 500 mg/kg/day 群の雄では, 第 8 日にも体重の低値が認められた.

なお, 第 4 日に 150 mg/kg/day 群の雄で, 第 8 日に 500 mg/kg/day 群の雌雄で有意な体重増加量の高値が認められたが, 一過性の変化であり, 回復状態と考えられることから毒性学的意義は低いと判断した.

また, 第 15 日に 150 mg/kg/day 群の雌で有意な体重増加量の低値が認められたが, 500 mg/kg/day 群ではみられない変化であることから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した.

7.4 摂餌量

結果を Table 4 及び Appendix 4 に示す.

摂餌量の減少が, 500 mg/kg/day 群の雌雄で第 4 日に認められた.

7.5 病理解剖検査

結果を Table 5 及び Appendix 5 に示す.

被験物質投与に起因すると思われる変化は, 認められなかった.

7.6　トキシコキネティクス（TK）測定

結果を Figure 1，2，Table 6，Appendix 6 及び 7 に示す.
P092 を 50，150，及び 500 mg/kg の用量で単回投与後の C_{max} 及び T_{max} は，雄においてそれぞれ 25.1 ng/mL 及び 3.0 h，36.6 ng/mL 及び 2.0 h，73.4 ng/mL 及び 8.8 h，雌においてそれぞれ 22.9 ng/mL 及び 2.0 h，29.1 ng/mL 及び 1.0 h，33.6 ng/mL 及び 1.3 h であった.
$AUC_{0\text{-}24h}$ は雄においてそれぞれ 161，349，及び 451 ng·h/mL，雌においてそれぞれ 126，182，及び 326 ng·h/mL であった.

平均血漿中濃度，C_{max}，及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量の増加に伴い増加した．また，明らかな性差はなかった.