

PP 製マイクロチューブに P092 標準試料溶液 (WS-4000) を 20  $\mu$ L 分取, 窒素乾固後, ブランク血漿を 20  $\mu$ L 添加, 攪拌した.

<許容基準>

定量値の平均値が, 理論値に対して  $100.0 \pm 15.0\%$  以内であること.

#### 6.6.9 測定実測試料の安定性

Low QC 及び High QC (各濃度  $n=3$ ) より, 測定実測試料を  $n=1$  で調製し, 本安定性試験の試料として使用した.

測定実測試料を  $10^{\circ}\text{C}$  に設定したオートサンプラ内にセットし, 調製直後, 調製直後の測定実測試料の測定開始から 12, 18, 24, 30 及び 36 時間保存後に各時点で 1 回測定した.

調製直後の測定時に作成した検量線を調製直後及び保存後の測定実測試料の定量に用いた.

<許容基準>

残存率 (オートサンプラ内に保存後の測定実測試料から得られた定量値 (平均値) の, 調製直後の定量値 (平均値) に対する割合) が,  $100.0 \pm 15.0\%$  以内であること.

#### 6.6.10 凍結融解安定性

Low stability QC 及び High stability QC (各濃度  $n=3$ ) を調製後, 約  $-80^{\circ}\text{C}$  において 24 時間以上凍結保存後, 各 QC サンプルにつき 3 本を室温に放置して融解した. 完全に融解したことを確認した後, 12 時間以上再凍結した. 本操作を繰り返し, 凍結融解 3 回後に各 QC サンプル (各濃度  $n=3$ ) より,  $n=1$  で測定実測試料を調製, 測定した. 同時に作成した検量線から凍結融解 3 回後の定量値を得た.

<許容基準>

残存率 (凍結融解 3 回後の QC サンプルの定量値 (平均値) の, 理論値に対する割合) が,  $100.0 \pm 15.0\%$  以内であること.

#### 6.6.11 短期室温安定性

Low stability QC 及び High stability QC (各濃度  $n=3$ ) を調製後, そのまま 4 時間放置した (実測値:  $20.1 \sim 22.3^{\circ}\text{C}$ ). 4 時間後, 各 QC サンプル (各濃度  $n=3$ ) より, 測定実測試料を  $n=1$  で調製し, 測定した. 同時に作成した検量線から室温放置 4 時間後の定量値を得た.

<許容基準>

残存率 (室温で 4 時間放置後の QC サンプルの定量値 (平均値) の, 理論値に対する割合) が,  $100.0 \pm 15.0\%$  以内であること.

#### 6.6.12 長期安定性

Low stability QC 及び High stability QC (各濃度  $n=3$ ) を調製後, 約  $-80^{\circ}\text{C}$  において 2 週間, 1 ヶ月間及び 3 ヶ月間凍結保存後, 各 QC サンプルにつき 3 本を室温に放置して融解し, 測定実測試料を  $n=1$  で調製, 測定した. 同時に作成した検量線から凍結保存 2 週間, 1 ヶ月及び 3 ヶ月後の定量値を得た.

<許容基準>

残存率（-80℃における凍結保存2週間、1ヶ月及び3ヶ月後のQCサンプルの定量値（平均値）の、理論値に対する割合）が、 $100.0 \pm 15.0\%$ 以内であること。

## 6.7 データ解析

### 6.7.1 検量線の作成及び定量値の算出

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。

### 6.7.2 定量値

定量単位は“ng/mL”とした。

定量値は有効数字3桁で表示した（有効数字4桁目を四捨五入）。平均値は有効数字3桁（ただし、1000以上の平均値は整数で表示した）で表示し、標準偏差は平均値と小数点以下同桁数で表示した。平均値及び標準偏差はMicrosoft Excel 2003により算出した。

### 6.7.3 ピーク面積

「Analyst」で算出される値を使用し、整数で表示した（小数点第1位を四捨五入）。

### 6.7.4 %表記値

Microsoft Excel 2003で算出し、小数点以下第1位まで表示した（小数点以下第2位を四捨五入）。算出の際、中間で得られる数値は四捨五入しなかった。

## 7. 結果及び考察

### 7.1 分析法バリデーション

#### 7.1.1 特異性

個体別ブランク血漿を雌雄各3個体ずつ用い、個体ごとに調製したブランク試料中には、P092及びISの溶出位置に許容基準を超えて定量に影響を与えるような夾雑ピークは認められなかった (Table 1, Figure 1) .

#### 7.1.2 検量線

全ての検量線の P092 濃度 (5 ~ 1000 ng/mL) における %RE は -10.6% ~ 12.2% であった。また、同時に測定したブランク試料、ゼロ試料においても P092 及び IS の溶出位置に許容基準を超えて定量に影響を与えるような夾雑ピークは認められず、いずれも許容基準を満たした (Table 2) .

#### 7.1.3 キャリーオーバー

LLOQ, ULOQ 試料に続けて測定したブランク試料中の P092 及び IS の溶出位置には、夾雑ピークは認められず許容基準を満たした (Table 3) .

#### 7.1.4 定量下限

特異性確認時に測定した6個体別 LLOQ 試料から得られた P092 の定量値を用いて算出した %RE 及び %CV は、7.4% 及び 6.9% となり、いずれも許容基準を満たした (Table 4) .

#### 7.1.5 日内再現性

QC サンプル (P092 濃度 : 10, 50 及び 800 ng/mL, 各濃度 n=5) から得られた P092 の定量値を用いて算出した %RE 及び %CV は、-2.1% ~ 9.0% 及び 3.0% ~ 4.3% となり、いずれも許容基準を満たした (Table 5) .

#### 7.1.6 日間再現性

QC サンプル (P092 濃度 : 10, 50 及び 800 ng/mL, 各濃度 n=15) から得られた P092 の定量値を用いて算出した %RE 及び %CV は、-3.6% ~ 10.1% 及び 4.5% ~ 6.2% となり、いずれも許容基準を満たした (Table 6) .

#### 7.1.7 回収率

P092 及び IS について、回収率 (回収率用標準試料溶液中のピーク面積 (平均値) に対する回収率用試料中のピーク面積) の平均値は、P092 濃度が 10 及び 800 ng/mL, 及び IS 濃度が 400 ng/mL (P092 濃度が 10 及び 800 ng/mL の場合それぞれで算出) についてそれぞれ 76.5%, 85.5% 及び 33.7%, 35.7% であった。また、回収率の個々の値を用いて算出した P092 及び IS の回収率の %CV は、それぞれ 3.6%, 5.6% 及び 0.5%, 2.2% であった (Table 7) .

### 7.1.8 希釈妥当性

10倍希釈した4000 ng/mLの添加血漿中P092の測定値に希釈倍率を乗じて得られた定量値(平均値)は、理論値に対して93.6%となり、許容基準を満たした(Table 8)。

従って、10倍の希釈操作は妥当であることが確認された。

### 7.1.9 測定実測試料の安定性

10°Cに設定したオートサンプラ内の測定実測試料を測定して求めたLow QC及びHigh QC中P092の定量値(平均値)は、調製直後の定量値(平均値)に対して12時間保存後にそれぞれ85.0%及び89.7%、18時間保存後にそれぞれ97.3%及び94.8%、24時間保存後にそれぞれ97.6%及び98.2%、30時間保存後にそれぞれ90.9%及び92.9%、36時間保存後にそれぞれ86.7%及び87.8%となり、いずれも許容基準を満たした(Table 9)。

従って、測定実測試料中P092は、オートサンプラ内で36時間保存後も安定であることが確認された。

### 7.1.10 凍結融解安定性

約-80°C及び室温で3回凍結融解後のLow stability QC及びHigh stability QC中P092の定量値(平均値)は、理論値に対してそれぞれ100.6%及び95.3%となり、いずれも許容基準を満たした(Table 10)。

従って、サル血漿中P092は、3回凍結融解後も安定であることが確認された。

### 7.1.11 短期室温安定性

室温で4時間放置後のLow stability QC及びHigh stability QC中P092の定量値(平均値)は、理論値に対してそれぞれ107.0%及び91.3%となり、いずれも許容基準を満たした(Table 11)。

従って、サル血漿中P092は、室温で4時間放置後も安定であることが確認された。

### 7.1.12 長期安定性

約-80°Cにて凍結保存後のLow stability QC及びHigh stability QC中P092の定量値(平均値)は、理論値に対して2週間(14日間)保存後にそれぞれ96.7%及び99.6%、1ヶ月間(32日間)保存後にそれぞれ96.5%及び86.5%、3ヶ月間(96日間)保存後にそれぞれ65.3%及び73.1%となり、1ヶ月間(32日間)保存後までは許容基準を満たした(Table 12)。

従って、サル血漿中P092は、約-80°Cにおいて1ヶ月間(32日間)保存後も安定であることが確認された。

8. 特記事項

8.1 予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態  
なし

8.2 試験計画書に従わなかつたこと  
なし

Table 1 Selectivity

Plasma No.	Sample	P092		IS	
		Peak area	Ratio (%)	Peak area	Ratio (%)
Male No. 1	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	902	--	158259	--
Male No. 2	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	846	--	193952	--
Male No. 3	Blank	0	0.0	2276	1.2
	LLOQ	902	--	194206	--
Female No. 1	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	1016	--	205635	--
Female No. 2	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	968	--	204156	--
Female No. 3	Blank	0	0.0	0	0.0
	LLOQ	1036	--	203719	--

LLOQ: lower limit of quantification

Ratio (%) = (peak area in Blank/peak area in LLOQ) × 100

--: not applicable

Table 2 Calibration curve

Analyte	Date	Calibration curve			Back ground (% of LLOQ)		
		Concentration (ng/mL)		%RE	Sample	Peak area	
		Nominal	Measured			P092	IS
P092	2012/8/23	5	5.61	12.2	Blank	0	0
		10	10.4	4.0		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	18.4	-8.0			
		50	48.4	-3.2	Zero	0	188871
		100	98.6	-1.4		( 0.0 )	--
		200	191	-4.5			
		500	497	-0.6	LLOQ	843	188421
1000	1020	2.0					
P092	2012/8/24	5	5.48	9.6	Blank	0	0
		10	9.98	-0.2		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	19.8	-1.0			
		50	49.5	-1.0	Zero	0	175771
		100	96.2	-3.8		( 0.0 )	--
		200	195	-2.5			
		500	483	-3.4	LLOQ	982	194810
1000	1030	3.0					
P092	2012/8/28	5	5.08	1.6	Blank	0	0
		10	10.4	4.0		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	18.1	-9.5			
		50	49.3	-1.4	Zero	0	186891
		100	102	2.0		( 0.0 )	--
		200	198	-1.0			
		500	540	8.0	LLOQ	889	172064
1000	963	-3.7					
P092	2012/9/6	5	5.22	4.4	Blank	0	0
		10	9.81	-1.9		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	18.2	-9.0			
		50	53.5	7.0	Zero	0	217109
		100	97.3	-2.7		( 0.0 )	--
		200	202	1.0			
		500	511	2.2	LLOQ	900	218687
1000	988	-1.2					
P092	2012/9/24	5	5.45	9.0	Blank	116	0
		10	11.1	11.0		( 10.5 )	( 0.0 )
		20	20.1	0.5			
		50	44.7	-10.6	Zero	0	207832
		100	92.2	-7.8		( 0.0 )	--
		200	196	-2.0			
		500	479	-4.2	LLOQ	1110	226189
1000	1040	4.0					
P092	2012/11/27	5	4.79	-4.2	Blank	0	0
		10	9.52	-4.8		( 0.0 )	( 0.0 )
		20	21.9	9.5			
		50	51.0	2.0	Zero	450	239930
		100	97.3	-2.7		( 9.9 )	--
		200	196	-2.0			
		500	513	2.6	LLOQ	4556	316887
1000	991	-0.9					

RE: relative error, LLOQ: lower limit of quantification

%RE = (measured value - nominal value)/nominal value × 100

The value in parenthesis denotes peak area ratio (%) of back ground peak area to that in LLOQ.

--: not applicable

Table 3 Carryover

Sample	P092		IS	
	Peak area	Ratio (%)	Peak area	Ratio (%)
LLOQ-1	1081	--	196727	--
ULOQ-1	238833	--	194101	--
Blank-1	0	0.0	0	0.0
LLOQ-2	1035	--	197492	--
ULOQ-2	232491	--	193731	--
Blank-2	0	0.0	0	0.0
LLOQ-3	910	--	201367	--
ULOQ-3	237558	--	193000	--
Blank-3	0	0.0	0	0.0

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

Ratio (%) = (peak area in Blank/peak area in LLOQ) × 100

--: not applicable

Table 4 Lower limit of quantification

Analyte	Concentration (ng/mL)				%RE	%CV
	Nominal	Measured	Mean	SD		
P092	5	6.01	5.37	0.37	7.4	6.9
		4.93				
		5.15				
		5.39				
		5.23				
		5.51				

SD: standard deviation, RE: relative error, CV: coefficient of variance

%RE = (mean value - nominal value)/nominal value × 100

%CV = (standard deviation/mean value) × 100

Table 5 Within-run accuracy and precision

Analyte	Concentration (ng/mL)				%RE	%CV
	Nominal	Measured	Mean	SD		
P092	10	11.2	10.9	0.5	9.0	4.3
		10.7				
		11.0				
		11.4				
		10.2				
	50	47.4	48.9	1.5	-2.1	3.1
		50.2				
		48.9				
		50.7				
		47.5				
	800	771	790	24	-1.2	3.0
		767				
		794				
		794				
		826				

SD: standard deviation, RE: relative error, CV: coefficient of variance

%RE = (mean value - nominal value)/nominal value × 100

%CV = (standard deviation/mean value) × 100

Table 6 Between-run accuracy and precision

Analyte	Concentration (ng/mL)			Mean	SD	%RE	%CV
	Nominal	Run	Measured				
P092	10	1	11.2	11.0	0.7	10.1	6.2
			10.7				
			11.0				
		11.4					
		10.2					
		11.1					
	2	11.5					
		11.8					
		10.6					
	3	3	11.0				
			10.7				
			9.88				
		11.9					
		9.99					
		12.2					
50	2	1	47.4	48.2	2.3	-3.6	4.8
			50.2				
			48.9				
		50.7					
		47.5					
		45.0					
	3	47.4					
		46.5					
		50.6					
	3	3	46.3				
			51.9				
			49.0				
51.1							
45.9							
44.8							
800	2	1	771	824	37	3.0	4.5
			767				
			794				
		794					
		826					
		882					
	3	817					
		856					
		832					
	3	3	867				
			805				
			785				
843							
864							
856							

SD: standard deviation, RE: relative error, CV: coefficient of variance

%RE = (mean value - nominal value)/nominal value × 100

%CV = (standard deviation/mean value) × 100

Table 7 Recovery

Analyte	P092 conc. (ng/mL)	Sample	Peak area	Recovery (%)			%CV
				Individual	Mean	SD	
P092	10	Recovery sample	2094	73.9	76.5	2.8	3.6
			2160	76.2			
			2250	79.4			
		Standard sample	2892				
			2921	--	--	--	--
			2693				
	Mean	2835	--	--	--	--	
	800	Recovery sample	196353	90.7	85.5	4.8	5.6
			175985	81.3			
			182647	84.4			
		Standard sample	221955				
			211474	--	--	--	--
215987							
Mean	216472	--	--	--	--		
IS (400 ng/mL)	10	Recovery sample	174385	33.8	33.7	0.2	0.5
			173119	33.6			
			174863	33.9			
		Standard sample	516544				
			516003	--	--	--	--
			515457				
	Mean	516001	--	--	--	--	
	800	Recovery sample	180194	36.6	35.7	0.8	2.2
			174390	35.4			
			172662	35.1			
		Standard sample	498410				
			495834	--	--	--	--
483270							
Mean	492505	--	--	--	--		

SD: standard deviation, CV: coefficient of variance

Recovery (%) = (peak area of recovery sample/mean peak area of standard sample) × 100

%CV = (standard deviation/mean value) × 100

--: not applicable

Table 8 Dilution suitability

Analyte	Dilution	Concentration (ng/mL)			Dilution suitability (%)
		Nominal	Measured	Mean	
P092	10	4000	3970	3743	93.6
			3640		
			3620		

Dilution suitability (%) = (mean value/nominal value) × 100

Table 9 Post-preparative stability

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual rate (%)	
	Nominal	Storage period	Measured		
P092	10	Just after preparation (Initial)	11.2 10.7 11.0	11.0	--
		12 h	9.53 9.27 9.18	9.33	85.0
		18 h	10.4 11.1 10.5	10.7	97.3
		24 h	11.1 10.3 10.7	10.7	97.6
		30 h	10.3 9.50 10.1	9.97	90.9
		36 h	9.77 9.19 9.57	9.51	86.7
		Just after preparation (Initial)	771 767 794	777	--
		12 h	701 667 724	697	89.7
		18 h	731 716 764	737	94.8
		24 h	747 755 788	763	98.2
		30 h	716 708 743	722	92.9
		36 h	679 666 703	683	87.8

Residual rate (%) = mean value after storage/mean initial value × 100

--: not applicable

Table 10 Freeze and thaw stability

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual rate (%)	
	Nominal	Cycle	Measured		
P092	10	3 cycles	10.4	10.1	100.6
			10.5		
			9.29		
	800	3 cycles	748	762	95.3
			773		
			765		

Residual rate (%) = mean value after freeze and thaw cycles/nominal value × 100

Table 11 Short-term stability at room temperature

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual rate (%)	
	Nominal	Storage period	Measured		
P092	10	4 h	10.6	10.7	107.0
			11.0		
			10.5		
	800	4 h	738	731	91.3
			733		
			721		

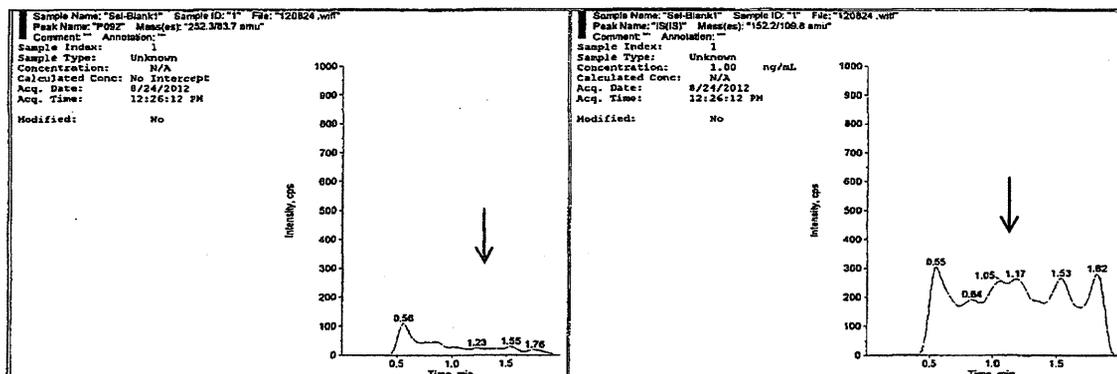
Residual rate (%) = mean value after storage/nominal value × 100

Table 12 Long-term stability

Analyte	Concentration (ng/mL)			Residual rate (%)			
	Nominal	Storage period	Measured				
P092	10	14 days	10.4	9.67	96.7		
			9.62				
			8.99				
		32 days	8.55	9.65	96.5		
			9.49				
			10.9				
	96 days	7.73	6.53	65.3			
		6.77					
		5.10					
		14 days			897	797	99.6
					754		
					739		
32 days	688	692	86.5				
	694						
	695						
96 days	452	585	73.1				
	654						
	649						

Residual rate (%) = mean value after storage/nominal value × 100

(1) Blank sample



(3) LLOQ sample (5 ng/mL)

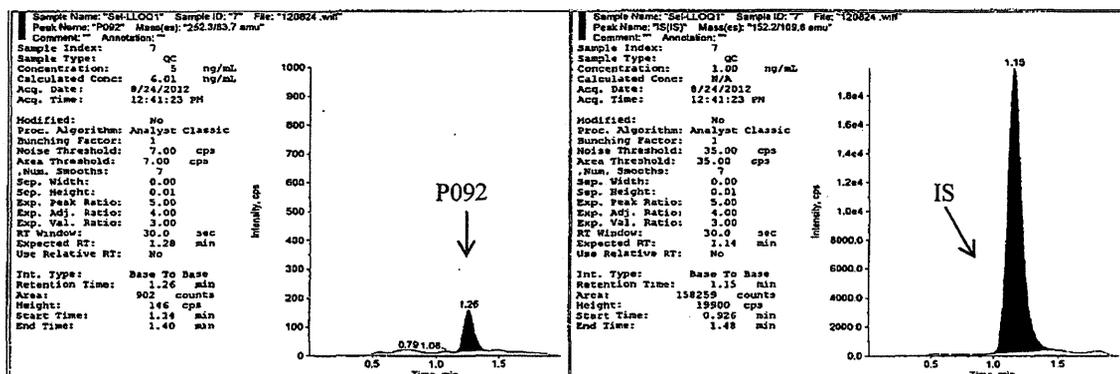


Figure 1 Typical chromatograms of selectivity

## 信 頼 性 保 証 証 明 書

試験委託者：岐阜大学

表 題：サル血漿中P092濃度測定法バリデーション

試験番号：B120712

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。

「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)

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 (再調査)	2012年08月13日	2012年08月13日	2012年08月13日
試験計画書変更書 (1)	2012年08月14日	2012年08月14日	2012年08月14日
試験計画書変更書 (2)	2012年08月14日	2012年08月14日	2012年08月14日
(再調査)	2012年08月21日	2012年08月21日	2012年08月21日
(再調査)	2012年08月21日	2012年08月21日	2012年08月21日
試験資料・最終報告書			
試験資料・最終報告書草案	2013年01月07日 ~2013年01月10日	2013年01月10日	2013年01月10日
(再調査)	2013年01月16日	2013年01月16日	2013年01月16日
試験資料・最終報告書	2013年01月29日	2013年01月29日	2013年01月29日

2013年1月29日  
信頼性保証部門責任者

東川 国男 

東川 国男  
三菱化学メディエンス株式会社  
鹿島研究所

## 資料2 非臨床試験

10. 「カニクイザルを用いる単回経口投与毒性試験」  
のための予備試験

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) 鹿島研究所

2013年2月14日

試験責任者 中野豊



## 最終報告書

P092 のカニクイザルを用いる単回経口投与予備試験

(試験番号 : B121072)

三菱化学メディエンス株式会社

1. 陳述書

表題：P092 のカニクイザルを用いる単回経口投与予備試験

試験番号：B121072

本試験は、試験計画書及び標準操作手順書に従って実施したものである。

試験責任者：

2019 年 3 月 14 日

中館 豊



中館 豊  
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  
安全性研究部

## 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 適用 GLP .....	6
3.6 試験委託者 .....	6
3.7 試験受託者 .....	6
3.8 試験施設 .....	6
3.8.1 名称及び所在地 .....	6
3.8.2 試験責任者 .....	6
3.8.3 主な試験従事者 .....	7
3.8.4 試験日程 .....	7
3.8.5 保存 .....	7
3.8.6 保存する資料 .....	7
3.9 その他 .....	7
4. 試験責任者署名 .....	8
5. 要約 .....	9
6. 材料及び方法 .....	10
6.1 被験物質 .....	10
6.1.1 名称 .....	10
6.1.2 ロット番号 .....	10
6.1.3 提供者 .....	10
6.1.4 保存条件 .....	10
6.1.5 取扱上の注意 .....	10
6.1.6 残余被験物質の処理 .....	10
6.2 媒体 .....	10
6.2.1 名称 .....	10
6.2.2 試薬 .....	10
6.2.3 媒体の調製法 .....	10
6.2.4 保存条件 .....	11
6.3 投与液 .....	11
6.3.1 調製方法及び頻度 .....	11
6.4 試験動物 .....	11
6.4.1 動物種 .....	11