

3. 材料及び方法

3.1 被験物質

3.1.1 名称

P092

3.1.2 ロット番号

QV48N

3.1.3 純度

99.1%

3.1.4 性状

白色の粉末

3.1.5 保存条件

冷蔵（許容範囲：1～10°C），遮光，密封（窒素封入）

3.2 媒体

3.2.1 名称

注射用水（株式会社大塚製薬工場）

3.3 投与液

3.3.1 調製方法及び頻度

被験物質投与液は，以下の手順で投与当日に調製した．調製は紫外線をカットした蛍光灯下で行った．

- (1) P092 を正確に秤量した．
- (2) 1N の塩酸を少量ずつ加え，被験物質を溶解させた．
- (3) 続いて，注射用水を加え，所定量に定容した．
- (4) pH を測定し，pH 5 前後であることを確認した．

3.4 試験動物

3.4.1 動物

カニクイザル (*Macaca fascicularis*)

3.4.2 性別

雌雄

3.4.3 購入先

株式会社日本医科学動物資材研究所

3.4.4 仕出国

ベトナム社会主義共和国（生産業者：NAFOVANNY）

3.4.5 投与時年齢

3～4 歳齢

3.4.6 投与時体重

2.5～4.0 kg

3.5 群構成

群	被験物質	投与用量 (mg/kg)	投与液量 (mL/kg)	投与液 濃度 (mg/mL)	動物数（動物番号）	
					雄	雌
1	P092	250	5	50	1 (10101)	1 (50101)

3.6 投与**3.6.1 投与経路**

経口（強制経口投与）

3.6.2 投与経路の選択理由

予定臨床適用経路に準ずる。

3.6.3 投与液量

5 mL/kg とした。

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。

3.6.4 投与回数・期間

1 回

3.6.5 投与方法

ディスポーザブルシリンジ及び経口カテーテルを用いて強制的に胃内に経口投与した。

3.7 採血及び PK 測定試料の採取

全動物から以下の通り採血し、血漿（PK 測定試料）を得た。

(1) 採血時点

投与後 1, 2, 4, 8, 24 時間

(2) 採血方法

採血量： 約 0.5 mL/時点

採血部位： 橈側皮静脈又は伏在静脈

抗凝固剤： ヘパリン（ナトリウム塩）（ヘパリン加注射筒にて採血）

(3) 血漿採取及び保管条件

採取した血液を遠心分離して個体毎に血漿を得た。

遠心条件： 約 10000×g, 3分, 約 4°C

保存条件： 遠心分離後, 直ちにドライアイス保冷

その後, 約-80°C（許容範囲：-60°C 以下）で保存

3.8 脳脊髄液の採取

全動物から以下の通り採取し, 脳脊髄液（測定試料）を得た。

(1) 採取時点

投与後 2~4 時間に 1 回及び投与後 24 時間

(2) 採取及び保管条件

採取量： 約 1 mL

採取部位： 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）の静脈内投与による麻酔下で, 椎間関節穿刺により採取した。

保存条件： 採取した脳脊髄液は, 直ちに採取容器に入れドライアイスで保冷。その後, 約 -80°C（許容範囲：-60°C 以下）で保存。

3.9 血漿中及び脳脊髄液中 P092 濃度の測定

試験計画書の方法に従い, 血漿中及び脳脊髄液中 P092 濃度を測定した。

4. 結果

次ページ以降に血中濃度測定結果を示す。なお, 脳脊髄液中濃度については, いずれのポイントにおいても, 定量限界以下であった。

本試験データ (B130426)

Dose (mg/kg)	Animal No.	Plasma concentration of analyte (ng/mL)					C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-24h} (ng·h/mL)
		1 h	2 h	4 h	8 h	24 h			
250	10101	5.25	BLQ	6.93	BLQ	BLQ	6.93	4	-
	50101	5.97	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	5.97	1	-

BLQ: Below the lower limit of quantification (< 5 ng/mL)

【参考】前回試験データ(サル単回投与試験, B120717)

(mg/kg)	Animal No.	Plasma concentration of P092 (ng/mL)							C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)
		1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	72 h	120 h		
250 (雄)	10201	5.91	7.29	14.8	12.0	BLQ	BLQ	BLQ	14.8	4
	10202	7.34	10.9	16.7	13.1	7.86	5.84	BLQ	16.7	4
	10203	BLQ	8.18	10.0	5.57	BLQ	BLQ	BLQ	10.0	4
	Mean	BLQ	8.79	13.8	10.2	BLQ	BLQ	BLQ	13.8	4.0
	SD	NC	1.88	3.5	4.1	NC	NC	NC	3.5	0.0
250 (雌)	50201	5.66	6.46	7.81	6.24	BLQ	BLQ	BLQ	7.81	4
	50202	5.02	6.69	13.1	12.0	5.84	BLQ	BLQ	13.1	4
	50203	5.04	10.7	14.7	15.3	10.2	7.46	6.47	15.3	8
	Mean	5.24	7.95	11.9	11.2	5.35	BLQ	BLQ	12.1	5.3
	SD	0.36	2.38	3.6	4.6	5.12	NC	NC	3.8	2.3

【参考】ボゾリサーチのデータ(P092.HCl, 試験番号N-O359, 2010)

(mg/kg)	Animal No.	Plasma concentration of P092 (ng/mL)					C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-24h} (ng·h/mL)
		1 h	2 h	4 h	8 h	24 h			
250	1001	39.50	72.60	71.7	71.9	34.20	72.6	2	1380
	1101	104.00	121.0	83.1	79.6	92.90	121.0	2	2070

2. P092 のカニクイザルを用いた 単回経口投与 PK 試験



最 終 報 告 書

P092 のカニクイザルを用いた単回経口投与 PK 試験

試験番号：N-O458

試験期間：2013年9月3日-2014年1月28日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所
〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松 1308-125

試験委託者

岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科
〒501-1194 岐阜県岐阜市柳戸1番1

試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町36-7

本資料は原本から複写したものに相違ありません。
株式会社 ボゾリサーチセンター
試験責任者：堀江 浩資

1 日付：2014年1月28日

1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	4
2.1	試験番号	4
2.2	試験表題	4
2.3	試験目的	4
2.4	試験委託者	4
2.5	試験受託者	4
2.6	試験実施施設	4
2.7	試験日程	4
2.8	試験責任者	5
2.9	試験担当者	5
2.10	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 る事態及び試験計画書に従わなかつたこと	5
2.11	資料保存	5
2.12	試験責任者の署名又は記名・なつ印	5
3.	緒言	6
4.	試験材料及び方法	7
4.1	被験物質及び媒体	7
4.1.1	被験物質	7
4.1.2	媒体 1	7
4.1.3	媒体 2	7
4.2	被験液の調製	7
4.3	試験動物種の選択理由	8
4.4	試験動物	8
4.5	飼育条件	8
4.6	飼料及び飲料水中の混入物質	9
4.7	動物の識別	9
4.8	群分け（動物番号の決定）	9
4.9	投与経路、投与回数及び観察期間とそれらの選択理由	10
4.10	投与方法及びその選択理由	10
4.11	投与量及び群構成	10
4.12	観察及び検査の方法	10
4.12.1	一般状態の観察	11
4.12.2	体重測定	11
4.13	血漿中及び脳脊髄液中の薬物濃度の測定	11
4.13.1	血漿中薬物濃度測定試料	11

N-O458

4.13.2	脳脊髄液中薬物濃度測定試料	11
4.13.3	血漿中及び脳脊髄液中薬物濃度測定	12
4.14	統計解析	20
5.	試験結果及びまとめ	21
5.1	一般状態観察	21
5.2	体重測定	21
5.3	血漿中薬物濃度の測定	21
5.4	脳脊髄液中薬物濃度の測定	21
5.5	まとめ	21

表

Table 1	死亡状況	22
Table 2	一般状態	23
Table 3	体重測定	24
Table 4	血漿中薬物濃度	25
Table 5	脳脊髄液中薬物濃度	26

N-O458

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

N-O458

2.2 試験表題

P092 のカニクイザルを用いた単回経口投与 PK 試験

2.3 試験目的

P092 をカニクイザルに単回経口投与し、血漿及び脳脊髄液中 P092 濃度を測定した。

2.4 試験委託者

岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科

〒501-1194 岐阜県岐阜市柳戸1番1

委託責任者：桑田 一夫

2.5 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町36-7

2.6 試験実施施設

1) 動物試験

株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所

〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

2) 血漿及び脳脊髄液中薬物濃度測定 (PK 測定)

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284

2.7 試験日程

試験開始日	:	2013年	9月	3日		
被験物質受領日	:	2013年	9月	4日		
動物使用開始日	:	2013年	9月	4日		
馴化期間	:	2013年	9月	4日 ~ 2013年	9月	10日
投与日	:	2013年	9月	11日		
観察終了日	:	2013年	9月	12日		
試験終了日	:	2014年	1月	28日		

2.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所
堀口浩資

2.9 試験担当者

試験主担当者 : 杉本恭平
被験物質保存責任者 : 林崎篤
PK測定責任者 : 赤井弘幸

2.10 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及び試験計画書に従わなかったこと

試験計画書の媒体及び投与液調製の記載箇所にて 1 mol/l Hydrochloric acid の記載が漏れていたが、pH 調整のために使用したものであり、被験液の pH は試験計画書で規定した 5.10 に調整したことから、試験評価上問題ないものと判断した。

脳脊髄液中薬物濃度測定において、検量線上限濃度が試験計画書で基準（逆計算値の相対誤差が±15.0%以内）を逸脱したため再測定を実施した。これは測定感度が血漿に比べて脳脊髄液の方が高くなったため、試験評価上問題ないものと判断した。

2.11 資料保存

試験計画書原本、記録文書、生データ及び報告書類（最終報告書の原本を含む）は、株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に最終報告書提出後 10 年間保存する。なお、10 年経過後は株式会社ボゾリサーチセンターから岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科に連絡し、その後の資料保存については両者間で協議し、その処置を決定する。ただし、長期保存に耐えられない生体試料（血漿）については、試験終了後に廃棄する。

2.12 試験責任者の署名又は記名・なつ印

堀口浩資 2014年 / 月 28 日



株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所

3. 緒言

岐阜大学 大学院連合創薬医療情報研究科からの委託により、P092 をカニクイザルに単回経口投与し、血漿及び脳脊髄液中 P092 濃度を測定した。

本試験において遵守した基準及び準拠したガイドラインなどを以下に示す。なお、本試験は試験施設の動物実験委員会の承認を受けて実施した。

- 「動物の愛護及び管理に関する法律」
(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号)
- 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」
(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)
- 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」
(日本学術会議、平成 18 年 6 月 1 日)

4. 試験材料及び方法

4.1 被験物質及び媒体

4.1.1 被験物質

被験物質 P092 は、以下の情報とともに岐阜大学より提供された。

名称	:	P092
ロット番号	:	P092FR001
受領量	:	約 5.0 g
性状	:	白色粉末
保存方法	:	冷所(冷蔵庫内、許容範囲:1~10°C、実測値:3.8~6.2°C)、遮光(湿気を避けること)
保存場所	:	函南研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室、御殿場研究所 生化学部標準物質保存場所
返却	:	動物試験終了後の残量は全て試験委託者に返却した。

4.1.2 媒体 1

名称	:	注射用水
規格	:	日本薬局方
製造者	:	株式会社大塚製薬工場
製造番号	:	2J82
保存条件	:	室温
保存場所	:	函南研究所 第1研究棟被験物質調製室

4.1.3 媒体 2

名称	0.1 mol/l Hydrochloric acid	1 mol/l Hydrochloric acid
製造者	和光純薬工業株式会社 (容量分析用)	ナカライテスク株式会社
ロット番号	PDK6175	L3K7599
保存条件	室温	
保存場所	函南研究所 第1研究棟被験物質調製室	

4.2 被験液の調製

調製方法	:	4.250 g (秤量許容範囲:4.208~4.292 g) の被験物質を秤量した。最終調製量の約 6 割 (50 mL) の注射用水をガラスビーカーに入れ、スターラーを用いて攪拌しながら、被験物質を徐々に加えた。1mol/l 及び 0.1mol/l Hydrochloric acid を用いて、pH5.10 (許容範囲:pH 4.9~5.1) に調整し溶解させた。溶解後、メスシリンダーに移し、更に注射用水を加えて 85 mL とし
------	---	--

た（調製濃度：50 mg/mL）。投与液の入ったメスシリンダーの口をパラフィルムで覆い、静かに転倒混和後、全量を褐色ガラス瓶に移し、スターラーで攪拌し、投与液とした。調製した液の残量はディスプレイブルシリンジ又はメスシリンダーで記録（1 mL 単位）した。

調製頻度 : 投与日に調製した。
保存方法 : 投与前に調製したため保存は実施しなかった。

4.3 試験動物種の選択理由

カニクイザルは一般的に構造、機能及び代謝がヒトに似ていることなどから得られた試験成績をヒトへ外挿することが容易であると考えられ、更に、経時的に検査を行うことができることから選択した。

4.4 試験動物

動物は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（平成 10 年法律第 114 号）第 54 条、第 55 条及び第 56 条に基づき制定された「指定動物（サル）の輸入検疫要領」に従った検疫を済ませ、当施設で飼育管理されている 4~7 才齢（使用開始時）のカニクイザル（ベトナム産、生産者：NAFOVANNY、繰り返し使用動物で最近の使用日から 1 箇月以上を経過した個体）のうち雌雄各 2 頭を選択し、7 日間の馴化期間を経た後に使用した。

馴化期間の飼育観察 : 体重測定（投与-7 日）、栄養状態、糞便の性状及び摂餌状況などを含む一般状態の観察（1 日 1 回、08:33~09:24）を行った。
供試個体の選択 : 体重や一般状態の観察結果から総合的に判断し、雄は任意の 1 頭及び雌は軟便及び摂餌量の低値を示した 1 頭を残余動物とし、供試可能な雌雄各 1 頭を試験に選択（投与日の体重：雄 4.46 kg、雌 3.96 kg）した。
残余動物の処置 : 観察終了後の試験系は、2013 年 9 月 12 日に塩酸ケタミン注射液（ケタラール筋注用 500 mg：第一三共株式会社、10 mg/kg、ロット番号：GYA0027）による麻酔下で、両腋窩動静脈からの放血により安楽致死させた。

4.5 飼育条件

飼育環境 : 温度 $23 \pm 5^{\circ}\text{C}$ （実測値：21~25 $^{\circ}\text{C}$ ）、相対湿度 $55 \pm 25\%$ （実測値：58~88%*）、換気回数 1 時間 9~15 回、照明 1 日 12 時間（07:00~19:00、投与日の投与 8 時間後の PK 採血時点であった 19:28~19:35 間点灯させた）の動物飼育室（飼育室番号：304 号室）で金属製個別

ケージ (W550×D750×H700 mm: 日本ケージ株式会社) に個別飼育した。

*: 飼育室の清掃や器材洗浄に伴う一時的な相対湿度の上昇が 8 回 (最高 88%, 最長約 3 時間) 認められたが、いずれも短時間の事象で、また、動物の一般状態あるいは摂餌状況に変化がみられなかったことから、試験の信頼性に及ぼすものではないと判断した。

- 飼料 : サル用固形飼料 PS-A (オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号: 130716) 150 g を 1 日 1 回、馴化期間中は 10:21~12:18 の間、投与日は投与 2 時間後以降に給餌し (13:52)、翌日の 08:34~09:24 の間に除餌した。
- 飲料水 : 水道水 (富士見水道組合) を自動給水装置により自由に摂取させた。

4.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用全ロットについて Eurofins Scientific Analytics で分析を行い、また、飲料水については芝浦セムテック株式会社で水道法に準拠する水質検査を定期的に (年 4 回) 行った。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

4.7 動物の識別

- 入墨番号(胸部) : 生産所により付けられていたもので、この番号を個体識別の基本とした。
- 所有番号 : 検疫期間中にアラビア数字 (1、2、3....) によってケージ配列順につけ、馴化期間中は所有番号と入墨番号の照合表を作成した。各ケージに入墨番号、所有番号、性、入荷年月日を明記した所有ラベルを付けた。
- 動物番号 : 群分け後は 1001 及び 1101 の 4 桁の番号を個体番号として設定した。1000 の位は群、100 の位は性及び 10 と 1 の位は個体番号になる。入墨番号と動物番号の照合表を作成、同時に各飼育ケージに各投与日ごとに試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、入墨番号及び投与日を明記したケージラベルを付けた。

4.8 群分け (動物番号の決定)

4.4 に示した手順で動物を選択した後、投与日の前日に動物番号 1001 及び 1101 を振り分けた。

4.9 投与経路、投与回数及び観察期間とそれらの選択理由

毒性試験ガイドラインに準じ、投与経路は臨床適用予定経路である経口投与を選択し、単回投与した。観察期間は被験物質が体内から消失することが予想される投与翌日までとした。

4.10 投与方法及びその選択理由

投与方法は、サルに経口投与する際に通常用いられる方法を選択した。投与容量は5 mL/kg 体重とし、ポリプロピレン製シリンジ（テルモ株式会社）及びカテーテル（サフィード吸引カテーテル、Fr.16 先端開口 2 孔式：テルモ株式会社）を用いて11:30~11:33 の間に単回強制経口投与した（投与直後にカテーテル内の投与液残留を防ぐため、空気でフラッシュした）。個体ごとの投与液量は投与日の体重を基に算出した。

4.11 投与量及び群構成

投与量は250 mg/kg を各動物に経口投与した。

群構成を表1に示した。

表1 群構成表

投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
250	50	5	雄	1	1001
			雌	1	1101

4.12 観察及び検査の方法

投与開始前、投与期間を通じ、表2に示す項目について、それぞれ記載の時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りとした。

投与開始-1日から-7日 : 投与-1週 (Week -1)

投与日 : 投与0日 (Day 0)

投与の翌日 : 投与1日後 (Day 1)

表2 観察及び測定の項目及び実施時期など

項目	実施時期
一般状態観察	投与-1週 : 1回/日 (08:33~09:24) 投与日 : 投与前、投与直後~5分後、投与15、30、60、90及び120分後、投与4及び6時間後の9回/日 投与翌日 (投与1日後) : 投与約24時間後
体重測定	投与-1週 : 週1回 (10:18~10:23) 投与日 : 当日の投与前 (08:53~08:56)

4.12.1 一般状態の観察

全個体について可視粘膜の状態、排泄物の性状及び異常行動の有無を観察した。

4.12.2 体重測定

全個体について測定日に測定した。

4.13 血漿中及び脳脊髄液中の薬物濃度の測定

4.13.1 血漿中薬物濃度測定試料

下記の条件に従って血漿を採取、保存及び分析した。

1) 対象動物及び採血量

全個体、各時点約 0.8 mL (伏在静脈から採血)。

2) 採血日及び採血時点

投与日 : 投与前、投与 30 分後、投与 1、2、4、8 及び 24 時間後

3) 血液試料の処理

血液は採取後、速やかにヘパリンナトリウム入り採血管 (ベノジェクト VP-H052K : テルモ株式会社、ロット番号:130219F) に移し、氷水中に保存後、遠心分離 (約 1600×g、10 分間、4°C 設定 : LX-121、トミー工業株式会社) により血漿 (約 300 µL) をサンプルカップに移した。

4) 血漿試料の保存

得られた血漿は、試験番号、投与量、動物番号、採血年月日及び採血時点を明記したラベルを貼付したポリプロピレン製サンプルカップに入れ、-80°C 設定 (許容温度 : -70°C 以下、実測値 : -79.9~-77.1°C) の冷凍庫に送付時まで凍結保存した。測定施設にはドライアイス凍結下で送付した。なお、測定終了後の血漿は廃棄した。

4.13.2 脳脊髄液中薬物濃度測定試料

全個体について (背部の頸部を毛刈り・剃毛実施)、血漿中薬物濃度測定用採血時点の投与 2 から 4 時間後の間 (1001 : 投与 2 時間 19 分、1101 : 投与 2 時間 9 分) 及び投与 24 時間後 (1001 : 投与 24 時間 7 分、1101 : 投与 24 時間 6 分) の採血後に塩酸ケタミン注射液 (ケタラール筋注用 500 mg : 第一三共株式会社、10 mg/kg、ロット番号 : GYA0027) を筋肉内に注射して不動化し、後頭下穿刺により椎間腔より脊柱管に注射針を刺入し、脳脊髄液をゆっくり採取した (約 0.5 mL)。採取した脳脊髄液は、遠心分離 (約 1600×g、10 分間、4°C 設定 : LX-121、トミー工業株式会社) して上清を、試験番号、投与用量、動物番号、採血年月日、採血時点、試料名 (脳脊髄液) を明記したラベルを貼付したサンプルカップに分注し、-80°C 設定の冷凍庫 (許容温度 : -70°C 以下、実測値 : -79.9°C~-77.1°C) で凍結保存した。測定施設にはドライアイス凍結下で送付した。なお、測定終了後の脳脊髄液は廃棄した。

4.13.3 血漿中及び脳脊髄液中薬物濃度測定

1) 測定施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

2) 分析方法

LC/MS/MS 法

(1) 測定試料

-80°C の冷凍庫（許容値：-70°C 以下、実測値：-90~-86°C）で保存した。

(2) 測定対象物質

P092

(3) 標準物質

名称	:	P092
供給者	:	岐阜大学
ロット番号	:	P092FR001
保存方法	:	冷所（冷蔵庫内、許容値：1~10°C、実測値：4~8°C）、 遮光（保存容器を入れた袋にシリカゲルを入れること で湿気を避けた）
保存場所	:	函南研究所 被験物質保存室及び御殿場研究所 生化学部標準物質保存場所
使用後の取扱い	:	測定終了後の残量は、試験委託者に返却した。

(4) 内標準物質 (IS)

名称	:	p-アセトアミドフェノール
メーカー	:	和光純薬工業株式会社
規格	:	和光一級
ロット番号	:	WEF3764
使用期限	:	2015年9月9日
保存方法	:	室温（実測値：19~21°C）
保存場所	:	御殿場研究所 生化学部標準物質保存場所

(5) マトリックス

a) ブランク血漿

株式会社ボゾリサーチセンターの所有動物から採取したブランク血漿を使用した。

動物種	:	カニクイザル
抗凝固剤	:	ヘパリンナトリウム
形態	:	雌雄プールブランク血漿
遠心条件	:	約 1600×g、10分、4°C
保存場所	:	-80°C の冷凍庫（許容値：-70°C 以下、実測値： -90~-84°C）

b) ブランク髄液

ブランク髄液として、生理食塩液を使用した。

N-O458

名称 : 生理食塩液
 製造者 : 株式会社大塚製薬工場
 製造番号 : K3C75

(6) 試薬

試薬名	等級	メーカー
メタノール	HPLC 用	Thermo Fisher Scientific, Inc.
ぎ酸	試薬特級	和光純薬工業株式会社
精製水	Milli-Q 水製造システム	

(7) 使用機器

a) LC/MS/MS システム

機器名及び型式	メーカー
HPLC 2690 セパレーションモジュール	Waters Corporation
MS/MS API4000 データ処理 Analyst 1.5	AB SCIEX

b) 天秤

機器名及び型式	メーカー
分析用上皿電子天秤 AE240	Mettler-Toledo AG

c) その他

機器名及び型式	メーカー
ミキサー G-560	Scientific Industries, Inc.
微量高速冷却遠心機 MRX-150 MX-300	トミー工業株式会社
エバポレーションヘッド付ドライサーモユニット DTU-2B	タイテック株式会社
Milli-Q 水製造システム Milli-Q Advantage A10	Millipore Corporation

(8) 器材

機器名及び型式	メーカー
ろ過フィルター セントリカット超ミニ W-MO(0.45 μm)	倉敷紡績株式会社

(9) 試液の調製

a) 0.1%ぎ酸溶液

試薬 : ぎ酸
 精製水
 調製方法 : ぎ酸を 1 mL 採取し、精製水で 1000 mL とした。
 使用期限 : 調製後 1 箇月以内 (調製後 5 日以内に使用)

N-O458

b) 0.1%ギ酸含有メタノール溶液

- 試薬 : ギ酸
メタノール
- 調製方法 : ギ酸を 1 mL 採取し、メタノールで 1000 mL とした。
- 使用期限 : 調製後 1 箇月以内 (調製後 5 日以内に使用)

c) 再溶解溶媒

- 試薬 : 0.1%ギ酸溶液
0.1%ギ酸含有メタノール溶液
- 調製方法 : 0.1%ギ酸溶液 30 mL と 0.1%ギ酸含有メタノール溶液 20 mL を混合した。
- 使用期限 : 調製後 1 箇月以内 (調製後 5 日以内に使用)

(10) 標準溶液類の調製

a) 標準原液

- 標準物質 : P092
- 秤取量 : 0.0100 g
- 溶媒 : メタノール
- 定容量 : 100 mL
- 調製濃度 : 100 µg/mL
- 使用期限 : 用時調製

b) 検量線用標準溶液 (CStd)

以下の表に示すように、検量線用標準溶液 (以下 CStd と略) を n=1 で用時調製した。

調製試料	採取溶液	採取量 (mL)	定容量 (mL)	調製濃度 (ng/mL)
CStd-10	標準原液	1	10	10000
CStd-9	CStd-10	1	10	1000
CStd-8	CStd-10	0.8	10	800
CStd-7	CStd-10	1	20	500
CStd-6	CStd-9	2	10	200
CStd-5	CStd-9	1	10	100
CStd-4	CStd-7	1	10	50.0
CStd-3	CStd-6	1	10	20.0
CStd-2	CStd-5	1	10	10.0
CStd-1	CStd-4	1	10	5.00

希釈溶媒 : メタノール

c) 内標準原液

- 内標準物質 : p-アセトアミドフェノール
- 秤取量 : 0.0100 g
- 溶媒 : メタノール
- 定容量 : 100 mL
- 調製濃度 : 100 µg/mL

使用期限 : 用時調製

d) 内標準溶液 (IStd)

以下の表に示すように、IStd を用時調製した。

調製試料	採取試料	採取量 (mL)	定容量 (mL)	調製濃度 (ng/mL)
内標準原液希釈液	内標準原液	1	10	10000
IStd	内標準原液希釈液	1	100	100

希釈溶媒：メタノール

(11) 前処理用試料の調製 (血漿)

血漿中濃度測定用に調製した試料には全て「Plasma」の「P-」を表示した。

a) P-ブランク試料及び P-ゼロ試料

ブランク血漿 50 μ L とメタノール 50 μ L を混合した。

P-ブランク試料及び P-ゼロ試料は、検量線作成時に P092 及び IS のピーク溶出位置に妨害ピークの有無を確認のため調製した。

b) 血漿用検量線試料 (P-CStdS)

ブランク血漿 50 μ L と各濃度の CStd 50 μ L をそれぞれ混合した。

調製試料	採取溶液	採取量 (μ L)	ブランク血漿 (μ L)	調製濃度 (ng/mL)
P-CStdS-1	CStd-1	50	50	5.00
P-CStdS-2	CStd-2	50	50	10.0
P-CStdS-3	CStd-3	50	50	20.0
P-CStdS-4	CStd-4	50	50	50.0
P-CStdS-5	CStd-5	50	50	100
P-CStdS-6	CStd-6	50	50	200
P-CStdS-7	CStd-7	50	50	500
P-CStdS-8	CStd-9	50	50	1000

c) P-QC サンプル

(a) 高濃度 P-QC サンプル (P-HQC : 調製濃度 800 ng/mL) として、CStd-8 の 50 μ L を n=2 で採取し、それぞれにブランク血漿 50 μ L を添加し、混合した。

(b) 中濃度 P-QC サンプル (P-MQC : 調製濃度 50.0 ng/mL) として、CStd-4 の 50 μ L を n=2 で採取し、それぞれにブランク血漿 50 μ L を添加し、混合した。

(c) 低濃度 P-QC サンプル (P-LQC : 調製濃度 10.0 ng/mL) として、CStd-2 の 50 μ L を n=2 で採取し、それぞれにブランク血漿 50 μ L を添加し、混合した。

d) システム適合性確認試料

血漿用検量線試料とは別に P-CStdS-4 を別途調製し、P-システム適合性確認試料 (P-SSStd) として使用した。