

# 博士論文

創薬の効率化を目的とした早期探索的臨床試験の  
手法とその活用に関する研究

平成 28 年度

富樫 一天



## 目次

略語および略号.....	3
序論.....	5
第 1 章 高感度測定法開発のための前処理法検討ツール（システムティック・アプローチ）の開発.....	8
1. 緒言.....	8
2. 方法.....	8
(1) 試薬.....	8
(2) 標準溶液および添加試料の調製.....	9
(3) 添加試料の前処理法.....	9
(4) 測定条件.....	10
(5) 保持時間の確認.....	10
(6) 回収率およびマトリックス効果の確認.....	11
(7) 主成分分析.....	11
3. 結果および考察.....	11
(1) 保持時間の確認.....	11
(2) 回収率およびマトリックス効果の確認.....	21
(3) 主成分分析によるデータ解析.....	22
4. まとめ.....	24
第 2 章 カセット投与マイクロドーズ臨床試験による候補化合物の評価.....	25
1. 緒言.....	25
2. 方法.....	25
(1) 試薬.....	25
(2) 標準原液および標準溶液の調製.....	26
(3) 添加検量線試料、ゼロ試料および QC 試料の調製.....	27
(4) 主成分分析.....	27
(5) 測定条件.....	27
(6) 前処理条件.....	28
(7) 分析法バリデーション.....	28
(8) マイクロドーズおよび臨床用量における薬物動態試験.....	30

3. 結果および考察 .....	32
(1) 定量下限濃度の設定 .....	32
(2) LC/MS/MS 測定条件の検討 .....	33
(3) 前処理法の検討 .....	34
(4) 分析法バリデーション .....	36
(5) マイクロドーズおよび臨床用量における薬物動態試験 .....	42
4. まとめ .....	51
第3章 マイクロドーズ臨床試験における製剤化検討 .....	52
1. 諸言 .....	52
2. 方法 .....	52
(1) 試薬 .....	52
(2) マイクロドーズ臨床試験用製剤の調製 .....	53
(3) ヒト血漿中濃度測定法 .....	54
(4) マイクロドーズ臨床試験 .....	57
(5) ヒト血漿中濃度測定および薬物動態パラメータの算出 .....	57
3. 結果および考察 .....	58
(1) マイクロドーズ臨床試験用製剤の調製 .....	58
(2) 高感度測定法の確立 .....	60
(3) 分析法バリデーション .....	62
(4) マイクロドーズ臨床試験における薬物の吸収および体内動態 .....	65
4. まとめ .....	70
総括 .....	71
本研究の誌上発表 .....	73
謝辞 .....	74
引用文献 .....	75

## 略語および略号

AMS :	Accelerator mass spectrometry
API :	Active pharmaceutical ingredient
AUC :	Area under the plasma concentration time curve
BA :	Bioavailability
BMI :	Body mass index
C <sub>max</sub> :	Maximum plasma concentration
CL <sub>tot</sub> :	Total clearance
CV :	Coefficient of variation
DE :	Diethyl ether
D/I :	Diethyl ether/Isopropyl alcohol (8:2, v/v)
E1 :	Elution 1
E2 :	Elution 2
EA :	Ethyl acetate
EMA :	European medicines agency
eIND :	Exploratory investigational new drug
GMP :	Good manufacturing practice
HCA :	Hierarchical cluster analysis
ICH :	International conference on harmonization
IRB :	Institutional review board
I.S. :	Internal standard
LC/MS/MS :	Liquid chromatography/tandem mass spectrometry
LLE :	Liquid-liquid extraction
LLOQ :	Lower limit of quantification
MD :	Microdose
ME :	Matrix effect
MRT :	Mean residence time
NA :	Not available
ODS :	Octa decyl silyl
PCA :	Principal component analysis
PP :	Polypropylene
QC :	Quality control
RC :	Recovery
RI :	Radioisotope
RT :	Retention time
SPE :	Solid-phase extraction
SRM :	Selected reaction monitoring

$t_{1/2}$ :	Elimination half-life
ThD :	Therapeutic dose
$T_{\max}$ :	Time to maximum plasma concentration
ULOQ :	Upper limit of quantification
$V_{\text{dss}}$ :	Steady-state volume of distribution

## 序論

通常の医薬品開発過程は、候補化合物を探索するスクリーニング研究の段階から、「選ばれた候補化合物の有効性や安全性などについて動物を使って確認する非臨床試験」と、その後実施される「動物を使って有効性や安全性が確認された候補化合物について、ヒトを対象に実施される有効性や安全性を確認する臨床試験」に大別される。その開発期間は、アイデアの着想から新薬の製造・販売認可が出るまで約 12～15 年といわれている[1]。一品目あたりの医薬品研究開発費は、8～18 億ドルにも上り[2, 3]、そのコストはさらに上昇し続けているともいわれている[4]。その上、候補化合物が臨床第 1 相から承認まで進む確率は、2 割以下と極めて低い[5]。このような現状を改善するには、開発期間を短縮することでコストを削減するとともに、臨床試験における成功確率を上げることが重要である。医薬品の研究開発費には途中で開発中止になったものの費用も含まれるため、成功確率をわずかでも高くすることは、開発費の大幅な削減につながる。

臨床試験における成功確率を上昇させるためには、ヒトにおいて期待される薬効と高い安全性の両方を兼ね揃えた候補化合物を選択する必要がある。ヒトにおける薬効や毒性は、ヒト由来の細胞や組織を用いた *in vitro* 試験や、様々な実験動物を用いた非臨床試験の結果より、アニマルスケールアップ等の手法を用いて予測される[6]。しかし、ヒトと動物での薬物感受性や体内動態の違いから、ヒトでの結果を完全に予測することは極めて困難であり[7]、臨床試験において十分な薬効が得られない、あるいは予測されなかった毒性が発現する 경우가多く報告されている[8-10]。

早期探索的臨床試験は、候補化合物のヒトにおける薬物動態や薬力学に関するデータを開発の早期段階で取得することを目的として実施されるヒト試験である。ヨーロッパ医薬品庁 (European Medicines Agency, EMA) より、この概念が世界で初めて提唱されて[11]以降、医薬品開発の成功確率を向上させるための新たな手法として期待されている[12-14]。新医薬品の探索的臨床試験 (Exploratory Investigational New Drug, eIND) は、ICH (International Conference on Harmonization) において合意が得られており、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス ICH M3 (R2)」としてまとめられている[15]。本ガイダンスでは、eIND 試験を 5 つのタイプに分類している。これらのうち、アプローチ 1 と 2 に該当するものをマイクロドーズ (Microdose, MD) 臨床試験として位置付けており、総投与量が 100  $\mu\text{g}$  以下 (ただし、アプローチ 2 の場合は、1 回での投与量を 100  $\mu\text{g}$  以下として、最大 5 回までの投与を上限としているため、試験における総投与量として 500  $\mu\text{g}$  以下)、かつ、無毒性量の 100 分の 1 以下および薬効量の 100 分の 1 以下よりも低い投与量で実施することが規定されている。このように、MD 臨床試験は十分な安全性が担保しうる投与量域で実施する臨床試験であり、非臨床から臨床へのフェーズ移行における大幅な時間短縮が期待される。

医薬品開発において MD 臨床試験を実施することの一番のメリットは、通常の治療

用量の100分の1以下と超微量の投与量でありながら、新規な化合物のヒトにおける吸収や体内動態等に関する基礎的な情報が得られることにある。さらに、MD臨床試験は、超微量の薬物をヒトに投与する試験であるため、被験者の安全性も十分に担保されており、また臨床試験実施に必要とされる毒性試験は一種類のげっ歯類での試験のみでよいため、通常の臨床試験に比べて迅速かつ安価な実施が可能なことも大きな利点である。しかしながら、MD臨床試験に関しては、未だ以下のような問題点が指摘されている[16]。①MD投与量と臨床投与量間の薬物動態が乖離している。②MD臨床試験にかかるコスト・期間と得られる成果のバランスが不明である。③MD臨床試験に必要とされる候補化合物の選定法およびMD臨床試験の有効な活用法に関する標準的手法が確立されていない。④MD臨床試験で得られる血液などの生体試料中の薬物濃度の測定に必要な迅速かつ超高感度な分析法が十分に確立されていない。

①のMD投与量と臨床投与量間の薬物動態の乖離については、薬物によっては投与量の違いにおいて体内での分布や暴露の状態が異なることが知られている。MD投与量で得られた結果が、臨床投与量時の結果を予測できないのであれば、実施しても意味がないとの指摘である。一方、②および③は今後、我が国においても多くのMD臨床試験が実施され様々な情報が蓄積されることによって、MD臨床試験の実施・活用法に関する一定のコンセンサスが得られるものと推察される。④に関しては、これまでとくに欧米において、加速器質量分析計 (Accelerator Mass Spectrometry, AMS) を用いた超高感度測定の実例が多く報告されてはいるものの[12, 17]、<sup>14</sup>Cを用いた化合物の放射線 (Radio isotope, RI) 標識化が必要であるため測定コストが高く、また我が国では測定の実施が可能な施設は限られている。

現在の医薬品開発における薬物濃度測定において、もっとも汎用性が高く主流となっている分析手法は、液体クロマトグラフィーと質量分析計の組み合わせによる液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (Liquid Chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) であり、いまや薬物動態分野を中心に医薬品開発において欠かせない技術となっている。LC/MS/MS測定はRI標識等の過程が不要であり、AMSに比べてかなり安価に、かつ短期間に測定実施が可能という大きなメリットがある。現在、LC/MS/MS測定装置は国内の医薬品開発を行う多くの施設に設置されており、測定感度の高い上位機種も数100台以上設置されている。しかし、MD臨床試験で得られる生体サンプル中の薬物濃度の測定を可能とする超高感度測定技術の確立は容易ではなく、通常、対象化合物の物理化学的特性に関する多くの情報と、熟練した分析者の豊富な知識と経験が必要不可欠である[18]。

そこで本研究では、医薬品開発の効率化と成功確率の向上を可能とするための支援技術として、MD臨床試験に適用可能なLC/MS/MS高感度測定技術、およびそれを用いた早期探索的臨床試験の実用的な活用法の構築について、以下の検討を行った。

第1章では、MD臨床試験に対応可能な基盤技術の確立を目的として、高感度LC/MS/MS測定法開発における前処理法検討ツール (システムティック・アプローチ) の構築について検討した。医薬品開発の早期段階では、化合物情報が得られない場合

が多い。通常測定法は、化合物ごとに最適化する必要があり、複数化合物について同時に行うことは困難を伴う。そこで効率的かつ迅速に最適な前処理法の初期条件を設定するシステムティックな手法が必要であると考え、これを確立することを試みた[19]。

第2章では、カセット投与 MD 臨床試験による化合物の評価について検討した。MD 臨床試験の活用法として、複数の候補化合物の中からもっとも成功確率の高い化合物を選択する手段に用いることがもっとも適していると推察されるが、その標準的手法はいまだ確立されていない。そこで、モデル化合物として3種のカルシウム拮抗剤 (Nifedipine、Diltiazem および Nicardipine) について、第1章にて構築したシステムティック・アプローチを用いて、同時前処理法並びに高感度測定法を検討した。さらに、カセット投与 MD 臨床試験を実施し、得られたデータから3種のカルシウム拮抗剤について評価した[20]。

第3章では、MD 臨床試験における製剤化について検討した。医薬品開発の成功確率を向上させるためには、開発早期の段階で製剤化による吸収改善を考慮することも重要であると考えられる。製剤化検討が必要な事例として、Erythromycin および Simvastatin の2種をモデル化合物とした。製剤化による吸収改善が検討可能な MD 臨床試験を実施し、有効的な活用法の検討を試みた[21]。

以上のように、本研究において、創薬を効率的に進めるための支援技術として、MD 臨床試験に適用可能な LC/MS/MS 高感度測定技術の開発手順、およびそれを用いた早期探索的臨床試験の実用的な活用法を構築したので、以下に詳述する。

## 第 1 章 高感度測定法開発のための前処理法検討ツール（システムティック・アプローチ）の開発

### 1. 諸言

生体試料中薬物濃度測定法の開発における測定条件や前処理法の最適化は、血漿中のタンパク質や脂質といった夾雑物との分離を目的として、測定対象物に関する物性等の化合物情報を基に検討される。さらに、高感度測定法の検討には、分析担当者の長年の経験と知識が重要となる。生体試料を対象とする分析法の開発についてシステムティックにアプローチする手法については、すでいくつかの報告があり[22]、その検討には化合物の物性情報が用いられることが一般的である。しかしながら、医薬品開発初期の段階においては化合物情報が得られないケースも多く、その場合、トライ・アンド・エラーによる繰り返しの検討プロセスが必要となり、分析法を確立するまでの時間と費用の問題は、医薬品開発におけるボトルネックのひとつとなる可能性がある。

カセット投与試験[23-25]のように複数化合物を同時に投与した場合に得られるサンプルは、可能な限り同時測定法を用いた解析が望ましい。特に試料の前処理法については、サンプル量を節約する意味でも 1 回の処理で複数の対象化合物を同時に抽出可能な方法が求められる。近年、投与された薬物（未変化体）のみならず、その代謝物の体内動態解析を実施することで医薬品の安全性を十分に担保する必要があり[26]、その場合、測定対象物は複数となる。一方、複数同時測定を可能とする手法として、カラムスイッチングを利用したオンライン前処理法があり、いくつか報告されているが[25, 27-33]、オフラインによる前処理の方が濃縮効果も高く汎用性も高いという利点がある。

そこで本研究は、オフラインによる前処理において、①対象化合物の物性情報を必要とせず、②分析者の知識と経験も必要とせず、③簡易的な実験のみで、④複数化合物を含む試料を同時に前処理可能な方法をシステムティックに選定する手法（システムティック・アプローチ）を確立する目的で実施した。

### 2. 方法

#### (1) 試薬

4-Nitrophenol、Salicylic acid (2-hydroxybenzoic acid) (いずれも JIS 特級)、Gliclazide、Diclofenac、Ganciclovir、Midazolam、Reserpine、Propranolol、Verapamil、Clemastine fumarate salt、Diltiazem hydrochloride (いずれも生化学用)、Papaverine hydrochloride (和光 1 級)、Erythromycin (高速液体クロマトグラフ用)、Naloxone (cell biology 用)、ギ酸、酢酸アンモニウム、25%アンモニア水、ジメチルスルホキシド (いずれも特級)、アセトニトリル、メタノール、イソプロピルアルコール、ヘキサン (いずれも高速液体クロマトグラフ用)、ジエチルエーテル、酢酸エチル (いずれも残留農薬・PCB 試験用濃縮 300)、ほう酸塩 pH 標準液 (pH 9.18) およびフタル酸 pH 標

準液 (pH 4.01) (いずれも JCSS) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。Hippuric acid, Gemcitabine および Aripiprazole は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。Tazobactam, Amlodipine および Paroxetine は LKT Laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA) より購入した。Pravastatin sodium および Atorvastatin は Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada) より購入した。Nifedipine、Nicardipine hydrochloride、Labetalol、Buspirone、Escitalopram および Mosapride は SIGMA-ALDRICH (St Louis, MO, USA) より購入した。Procainamide hydrochloride は Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY, USA) より購入した。ヒト血漿 (抗凝固剤: ヘパリンナトリウム) は株式会社ケー・エー・シー (Kyoto, Japan) より購入した。Oasis HLB (30 mg/1 mL)、Oasis MCX (30 mg/1 mL) および Oasis MAX (30 mg/1 mL) は Nihon Waters K.K. (Tokyo, Japan) より購入した。水は Millipore Corp. (Bedford, MA, USA) Milli-Q purification system を用いて調製したものを使用した。

## (2) 標準溶液および添加試料の調製

各化合物について、少量のアセトニトリルまたはジメチルスルホキシドに溶解した後、アセトニトリルまたはアセトニトリル/水 (1:1, v/v) を用いて希釈し、回収率 (Recovery, RC)、品質管理 (Quality control, QC) 試料調製用およびマトリックス効果 (Matrix effect, ME) 確認試料用混合標準溶液 (0.1 および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を調製した。RC QC 試料は 10  $\mu\text{L}$  の混合標準溶液を 0.1 mL のヒト血漿に添加し、10 ng/mL (RC low-QC 試料、QC-L) および 1,000 ng/mL (RC high-QC 試料、QC-H) を調製した。Control RC QC 試料および ME QC 試料は、混合標準溶液の代わりに 10  $\mu\text{L}$  のアセトニトリルをヒト血漿に添加した。

## (3) 添加試料の前処理法

各 RC QC (QC-L および QC-H) 試料およびブランク試料 (0.1 mL、各 3 試料) について、3 つの固相抽出 (Solid-phase extraction, SPE) カートリッジ (Oasis HLB, MCX および MAX) および 6 つの液液抽出 (Liquid-liquid extraction, LLE) 法 (ジエチルエーテル (DE)、ジエチルエーテル/イソプロピルアルコール (8:2, v/v) (D/I) および酢酸エチル (EA)、各抽出溶媒について酸性およびアルカリ条件下) による前処理を実施した。SPE においては、3 つの SPE カラムから 5 つの抽出液を捕集した。使用前に、逆相系カラム Oasis HLB はメタノール 1 mL および水 1 mL を用い、陽イオン交換系カラム Oasis MCX はメタノール 1 mL および水/ギ酸 (100:2, v/v) 1 mL を用い、陰イオン交換系カラム Oasis MAX はメタノール 1 mL および 5%アンモニア水 1 mL を用いて、それぞれコンディショニングした。次に、ヒト血漿試料 (0.1 mL) に対し、Oasis HLB と Oasis MCX の場合は、水/ギ酸 (100:2, v/v) 0.5 mL を添加し、Oasis MAX の場合は、5%アンモニア水 0.5 mL を添加し、混和したものをそれぞれの SPE カートリッジに負荷した。SPE カートリッジの洗浄は、Oasis HLB の場合は、水/メタノール (95:5, v/v) 1 mL、Oasis MCX の場合は、水/ギ酸 (100:2, v/v) 1 mL、

Oasis MAX の場合は、5%アンモニア水 1 mL を用いて実施した。抽出液は、Oasis HLB の場合、メタノール 1 mL、Oasis MCX の場合、メタノール 1 mL (Elution 1, E1) およびメタノール/アンモニア水 (95:5, v/v) 1 mL (Elution 2, E2)、Oasis MAX の場合、メタノール 1 mL (E1) およびメタノール/ギ酸 (100:2, v/v) 1 mL (E2) をそれぞれ Polypropylene (PP) 製チューブに捕集した。LLE は、ヒト血漿試料 (0.1 mL) について、酸性条件の場合は、フタル酸 pH 標準液 (pH 4.01)、アルカリ条件の場合は、ほう酸塩 pH 標準液 (pH 9.18) をそれぞれ 0.5 mL 添加し、混和した溶液に DE、D/I および EA をそれぞれ 3 mL 添加し、10 分振とうした後、10 分間遠心分離 (1,900×g) したもののから抽出溶媒 (上層) のみを別の PP 製チューブに捕集した。それぞれ SPE および LLE において捕集した各抽出液を窒素気流下 40°C で溶媒を留去した。ブランク試料は、抽出溶媒留去前に混合標準溶液を添加し、control RC-QC および ME-QC とした。溶媒留去後の残渣にアセトニトリル/メタノール (1: 1, v/v) 0.2 mL を添加し、攪拌後 0.1 mL 分取したものに水 0.1 mL を添加したものを注入試料とした。混合標準溶液をアセトニトリル/メタノール (1: 1, v/v) で low-および high-QC と同濃度になるまで希釈した溶液を調製し、これを control ME-QC の注入試料とした。それぞれの注入試料を LC/MS/MS で測定した。

#### (4) 測定条件

装置は高速液体クロマトグラフ UPLC システム [ACQUITY] (Waters Corp., Milford, MA, USA) および質量分析計 Xevo TQ MS (Waters Corp.) を用いた。LC 条件は、分析カラムとして BEH C18, 2.1 mm I.D. × 50 mm L., 1.7 μm (Waters Corp.) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相 A は、①保持時間 (Retention time, RT) 確認時には、0.1%ギ酸溶液 (酸性条件)、10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (中性条件)、0.1% アンモニウム溶液 (塩基性条件) を用い、②RC および ME 確認時には、0.1%ギ酸溶液を用いた。移動相 B はアセトニトリルとして、移動相 A と B の混液によるグラジエント分析を実施した。グラジエント条件は、移動相 B の比率が、0~3 min において 2% から 98%、3~3.5 min において 98%、3.5~3.6 min において 98% から 2%、3.6~4.5 min において 2% となるように設定した。流量は 0.7 mL/min とし、注入量は 5 μL とした。MS/MS 条件はインターフェースとしてエレクトロスプレーイオン化法を用い、キャピラリー電圧は 0.5 kV、イオンソース温度は 150°C、デソルベーション温度は 650°C、コーンガス流量は 50 L/Hr、イオン検出モードは MS/MS Selected reaction monitoring (SRM) mode とし、positive または negative ion detection mode を用いた。モニターイオンおよびコリジョンエネルギーは、各化合物における最適値にて測定した。測定データは MassLynx software (version 4.1., Waters Corp.) で解析した。

#### (5) 保持時間の確認

27 種の既知化合物について、異なる 3 つの移動相条件 (酸性、中性およびアルカ

り性)における RT を LC/MS/MS 測定により確認した。得られた 3 つの RT (acidic RT, neutral RT および base RT) およびこれらの計算値 (total RT, acidic/basic RT および basic/neutral RT) を用いて、化合物の分類について検討した。

#### (6) 回収率およびマトリックス効果の確認

回収率 (RC) およびマトリックス効果 (ME) は、前処理の性能を評価するために重要な因子である。5 つの SPE および 6 つの LLE において、それぞれの化合物について、以下の数式から RC および ME を確認した。

- $RC (\%) = \frac{\text{RC-QC のピーク面積の平均値}}{\text{control RC-QC のピーク面積の平均値}} \times 100$
- $ME (\%) = \frac{\text{ME-QC のピーク面積の平均値}}{\text{control ME-QC のピーク面積の平均値}} \times 100$

ピーク面積のばらつき (Coefficient of variation, CV) についても算出し、RC および ME の評価に用いた。いずれの算出についても、Excel 2002 (Microsoft Corp.) を用いた。

#### (7) 主成分分析

得られた RT および RC について、主成分分析 (Principal component analysis, PCA) を実施した。PCA には、Pirouette (Infometrix, Inc., Bothell, WA, USA) を用いた。

### 3. 結果および考察

#### (1) 保持時間の確認

27 種の既知化合物について、異なる 3 つの移動相条件 (酸性、中性およびアルカリ性) における RT を LC/MS/MS 測定により確認した。結果を Table 1 にまとめる。これらの結果と既知化合物の物性情報との照らし合わせにより、化合物は 3 つの Category に分類された。すなわち、i) 酸性条件下の RT をアルカリ条件下の RT で除した値 (acidic/basic RT) が 1.4 以上の場合、その化合物を酸性化合物に近似する化合物と分類し (Category 1)、ii) アルカリ条件下の RT を中性条件下の RT で除した値 (basic/neutral RT) が 1.0 よりも大きい場合、その化合物を塩基性化合物に近似する化合物と分類した (Category 2)。さらに、iii) acidic/basic RT が 1.4 よりも小さい、かつ、basic/neutral RT が 1.0 よりも小さい場合、その化合物は中性か若しくは、両性化合物に近似する化合物と分類した (Category 3)。

Table 1. Summary of appropriate pretreatment and RTs for all compounds.

Compound name	Category	Appropriate LLE method	LLE group	Appropriate SPE method	SPE group	acidic RT	basic RT	neutral RT	total RT	acidic/basic RT	basic/neutral RT
4-Nitrophenol	1	DE (Acidic)	L1	MCX (E1)	S1	1.19	0.43	1.12	2.74	2.77	0.38
Salicylic acid	1	EA (Acidic)	L1	HLB, MCX (E1)	S1	1.17	0.57	0.63	2.37	2.05	0.90
Gliclazide	1	D/I (Acidic)	L1	HLB	S1	1.84	0.97	1.42	4.23	1.90	0.68
Diclofenac	1	D/I (Acidic), EA (Acidic)	L1	HLB	S1	2.06	1.17	1.49	4.72	1.76	0.79
Hippuric acid	1	NA	LNA	HLB	S1	0.81	0.49	0.59	1.89	1.65	0.83
Tazobactam	1	NA	LNA	MCX (E1)	S1	0.60	0.40	0.51	1.51	1.50	0.78
Pravastatin	1	NA	LNA	HLB	S1	1.43	1.00	1.18	3.61	1.43	0.85
Atorvastatin	1	D/I, EA (Acidic)	L1	HLB	S1	2.06	1.47	1.81	5.34	1.40	0.81
Ganciclovir	3	NA	LNA	MCX (E2)	S3	0.38	0.28	0.40	1.06	1.36	0.70
Labetalol	3	EA (Acidic)	L1	NA	SNA	1.05	1.06	1.22	3.33	0.99	0.87
Naloxone	3	EA (Alkaline)	L2	NA	SNA	0.67	1.21	1.30	3.18	0.55	0.93
Gemcitabine	3	NA	LNA	MCX (E2)	S3	0.36	0.46	0.47	1.29	0.78	0.98
Midazolam	3	DE (Alkaline)	L2	MAX (E1), MCX (E2)	S2	1.29	1.77	1.78	4.84	0.73	0.99
Mosapride	2	D/I (Alkaline)	L2	MCX (E2)	S2	1.12	1.94	1.93	4.99	0.58	1.01
Papaverine	2	DE, D/I, EA (Alkaline)	L2	MAX (E1), MCX (E2)	S2	1.11	1.62	1.60	4.33	0.69	1.01
Nicardipine	2	DE (Alkaline), D/I (Acidic, Alkaline)	L2a	HLB	S2	1.34	2.36	2.31	6.01	0.57	1.02
Reserpine	2	D/I, EA (Alkaline)	L2	HLB, MAX (E1)	S2	1.57	2.26	2.20	6.03	0.69	1.03
Aripiprazole	2	D/I (Alkaline)	L2	NA	SNA	1.36	2.41	2.28	6.05	0.56	1.06
Bupirone	2	DE, D/I, EA (Alkaline)	L2	HLB, MAX (E1), MCX (E2)	S2	1.18	1.84	1.66	4.68	0.64	1.11
Amlodipine	2	EA (Acidic)	L1	HLB	S2	1.36	1.92	1.56	4.84	0.71	1.23
Verapamil	2	D/I (Alkaline), EA (Acidic)	L2a	HLB, MAX (E1), MCX (E2)	S2	1.50	2.30	1.82	5.62	0.65	1.26
Clemastine	2	DE (Acidic), D/I (Alkaline), EA (Alkaline)	L2a	HLB	S2	1.73	2.72	1.98	6.43	0.64	1.37
Paroxetine	2	DE (Alkaline), EA (Acidic)	L2a	NA	SNA	1.30	2.04	1.50	4.84	0.64	1.36
Propranolol	2	D/I (Alkaline)	L2	HLB, MAX (E1), MCX (E2)	S2	1.23	1.85	1.36	4.44	0.66	1.36
Erythromycin	2	D/I (Alkaline)	L2	MAX (E1)	S2	1.36	2.10	1.52	4.98	0.65	1.38
Escitalopram	2	DE, D/I (Alkaline)	L2	MCX (E2)	S2	1.22	2.07	1.42	4.71	0.59	1.46
Procainamide	2	D/I (Alkaline)	L2	MAX (E1), MCX (E2)	S3	0.53	1.09	0.61	2.23	0.49	1.79

DE: diethyl ether, D/I: ether / isopropylalcohol (8:2, v/v), EA: ethyl acetate, NA: Not available, Acidic: under acidic condition, Alkaline: under alkaline condition, HLB: Oasis HLB, MAX: Oasis MAX, MCX: Oasis MCX, E1: Elution 1, E2: Elution 2.

Table 2-1. Summary of recoveries for all compounds in category 1 and 3 with LLE.

Compound name	Recovery and CV	DE (Acidic)		DE (Alkaline)		D/I (Acidic)		D/I (Alkaline)		EA (Acidic)		EA (Alkaline)	
		QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H
4-Nitrophenol	RC	71.8	89.1	68.6	104.5	59.1	80.1	57.5	93.5	49.5	70.2	62.0	112.0
	CV	18.9	5.2	36.3	12.7	59.2	7.1	17.3	4.0	29.7	5.2	25.6	7.8
Salicylic acid	RC	93.9	82.4	5.9	2.7	0.0	57.2	0.0	141.1	93.8	58.5	1.0	2.1
	CV	31.7	1.8	17.5	9.9	NA	6.1	NA	13.6	28.9	14.1	27.8	10.1
Gliclazide	RC	62.3	75.3	5.2	0.9	58.4	74.1	0.0	9.3	56.6	71.9	0.0	0.0
	CV	6.0	10.4	68.9	29.5	16.9	5.2	NA	18.5	3.9	6.4	NA	NA
Diclofenac	RC	71.1	79.3	22.0	9.8	99.2	72.7	33.4	36.2	75.5	80.9	24.6	22.8
	CV	11.8	19.4	54.7	2.7	11.4	6.5	6.9	8.5	11.7	20.3	31.6	3.7
Hippuric acid	RC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tazobactam	RC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.2	0.0	0.7	0.0	0.0
	CV	NA	NA	NA	NA	NA	10.8	NA	5.1	NA	15.1	NA	NA
Pravastatin	RC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Atorvastatin	RC	60.1	79.8	6.4	6.2	60.5	60.9	46.1	52.8	62.4	61.1	40.2	44.9
	CV	10.9	27.5	47.5	5.6	27.6	3.1	5.5	10.6	13.7	15.7	22.7	10.4
Ganciclovir	RC	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	NA	NA	NA	NA	NA	2.9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Labetalol	RC	15.1	21.2	67.3	38.2	53.6	66.6	25.2	68.1	61.0	66.9	50.6	60.7
	CV	8.7	11.0	55.6	12.3	15.0	4.8	13.7	3.8	24.3	7.8	66.9	14.6
Naloxone	RC	0.0	0.5	0.0	59.1	0.0	0.0	56.8	68.3	0.0	0.0	64.4	69.1
	CV	NA	7.2	NA	45.4	NA	NA	22.0	4.8	NA	NA	15.8	36.5
Gemcitabine	RC	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0	14.9	6.0	14.2	0.5	4.6	2.2	4.7
	CV	NA	NA	NA	NA	28.6	5.6	107.5	8.2	21.9	21.7	86.5	6.0
Midazolam	RC	79.2	95.5	76.4	91.1	0.0	0.0	58.8	94.5	0.0	0.0	43.0	79.3
	CV	32.9	24.7	28.3	10.4	NA	NA	46.8	2.7	NA	NA	38.5	4.7

DE: diethyl ether, D/I: ether / isopropylalcohol (8:2, v/v), EA: ethyl acetate, NA: Not available, Acidic: under acidic condition, Alkaline: under alkaline condition.

Table 2-2. Summary of recoveries for all compounds in category 2 with LLE.

Compound name	Recovery and CV	DE (Acidic)		DE (Alkaline)		D/I (Acidic)		D/I (Alkaline)		EA (Acidic)		EA (Alkaline)	
		QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H
Mosapride	RC	78.2	83.3	0.0	56.9	30.0	72.0	51.0	75.8	32.6	41.2	40.6	48.5
	CV	76.9	17.8	NA	15.7	21.3	6.2	33.7	1.9	11.6	4.7	92.3	7.9
Papaverine	RC	62.0	75.6	75.5	89.4	0.0	0.0	67.5	88.5	0.0	0.0	63.5	94.6
	CV	22.7	11.6	16.8	8.1	NA	NA	20.1	1.2	NA	NA	29.8	6.6
Nicardipine	RC	69.1	79.9	75.9	86.8	90.4	70.2	92.6	84.0	61.1	79.9	120.8	8.4
	CV	19.2	12.2	14.7	2.4	9.6	4.8	30.1	7.9	29.6	7.8	27.0	5.9
Reserpine	RC	82.8	91.5	84.3	93.2	42.8	74.6	94.3	88.9	41.0	69.1	79.8	66.6
	CV	4.7	4.7	33.8	6.7	10.5	5.6	6.9	16.6	8.4	1.7	36.5	12.4
Aripiprazole	RC	79.7	60.0	0.0	82.2	41.4	69.3	112.5	84.5	44.2	44.5	0.0	31.4
	CV	136.3	19.9	NA	12.3	43.8	12.0	40.4	17.6	21.9	18.4	NA	26.2
Buspirone	RC	27.8	47.8	76.8	87.2	0.0	0.0	94.7	91.1	0.0	0.0	81.4	93.9
	CV	57.8	21.7	15.0	20.7	NA	NA	9.4	1.2	NA	NA	33.4	5.9
Amlodipine	RC	0.0	18.0	0.0	76.4	67.6	68.2	8.8	79.9	90.7	75.5	0.0	74.5
	CV	NA	6.7	NA	16.0	76.4	12.7	59.6	12.6	81.3	11.4	NA	16.0
Verapamil	RC	55.4	65.8	111.3	106.3	62.6	73.7	95.2	99.2	73.8	78.6	92.3	79.2
	CV	5.2	1.9	12.3	34.1	1.8	4.3	5.3	3.2	6.6	2.8	42.4	7.0
Clemastine	RC	78.0	82.4	90.3	101.3	0.0	0.0	79.7	94.1	0.0	0.0	80.7	67.5
	CV	8.2	6.2	37.5	14.4	NA	NA	4.7	2.4	NA	NA	30.8	9.8
Paroxetine	RC	49.4	47.8	90.2	65.9	68.9	68.6	59.2	79.3	114.9	78.6	164.1	87.6
	CV	20.2	6.5	5.9	16.9	42.7	8.3	26.6	7.8	16.1	7.7	45.5	6.9
Propranolol	RC	18.8	25.0	109.2	92.5	0.0	0.0	89.6	96.7	0.0	0.0	89.3	78.0
	CV	3.7	9.5	36.7	41.7	NA	NA	7.0	2.9	NA	NA	46.2	7.6
Erythromycin	RC	0.0	0.0	0.0	0.0	60.3	57.0	133.7	123.9	59.1	51.7	0.0	47.2
	CV	NA	NA	NA	NA	10.6	8.8	15.9	3.5	5.6	3.5	NA	11.8
Escitalopram	RC	20.2	16.3	76.3	53.2	31.6	65.9	59.2	83.0	33.6	55.9	33.2	48.0
	CV	38.3	14.2	22.6	11.0	27.0	4.6	22.7	4.3	24.9	5.7	31.4	6.8
Procainamide	RC	0.0	0.0	53.5	40.4	6.4	7.6	66.2	81.0	2.8	2.5	72.8	73.6
	CV	NA	NA	53.1	12.1	7.0	1.9	1.7	6.2	11.4	2.4	48.3	8.0

DE: diethyl ether, D/I: ether / isopropylalcohol (8:2, v/v), EA: ethyl acetate, NA: Not available, Acidic: under acidic condition, Alkaline: under alkaline condition.

Table 2-3. Summary of recoveries for all compounds in category 1 and 3 with SPE.

Compound name	Recovery and CV	HLB		MAX (E1)		MAX (E2)		MCX (E1)		MCX (E2)	
		QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H
4-Nitrophenol	RC	155.3	97.2	0.0	1.5	0.0	0.0	78.6	90.1	9.6	12.6
	CV	6.6	7.4	NA	12.3	NA	NA	37.6	11.0	64.7	19.9
Salicylic acid	RC	127.8	89.4	0.0	3.7	0.0	0.0	89.9	91.8	0.0	9.7
	CV	50.4	5.4	NA	9.4	NA	NA	45.4	19.6	NA	13.9
Gliclazide	RC	89.6	85.2	0.9	0.0	75.5	101.0	0.9	0.0	62.4	83.3
	CV	2.1	6.5	24.3	NA	57.7	28.3	40.2	NA	13.0	4.3
Diclofenac	RC	68.7	78.6	2.3	0.1	122.9	103.1	77.4	40.3	5.4	4.5
	CV	26.5	9.2	69.2	81.0	24.4	14.6	11.0	31.9	81.3	4.1
Hippuric acid	RC	115.5	110.5	0.0	0.6	74.4	101.0	109.1	97.0	0.0	0.0
	CV	7.6	4.6	NA	91.1	42.4	30.1	23.3	45.1	NA	NA
Tazobactam	RC	47.2	70.3	0.0	0.0	0.0	0.0	75.2	69.7	1.4	2.8
	CV	13.6	11.8	NA	NA	NA	NA	9.6	12.6	31.1	3.2
Pravastatin	RC	172.0	161.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	44.8	28.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Atorvastatin	RC	78.6	81.1	0.0	0.0	78.7	115.2	108.2	35.3	0.0	0.8
	CV	18.1	7.7	NA	NA	58.4	8.6	24.7	10.6	NA	25.9
Ganciclovir	RC	0.0	1.7	1.4	2.3	43.6	69.2	0.0	0.0	99.4	86.3
	CV	NA	25.0	143.8	7.7	41.9	20.9	NA	NA	26.7	8.9
Labetalol	RC	97.8	99.3	0.0	0.0	93.3	77.8	1.8	0.0	126.8	85.0
	CV	36.2	10.6	NA	NA	28.5	15.9	28.9	NA	53.9	12.7
Naloxone	RC	85.4	78.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	108.6	81.7
	CV	108.0	9.4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	43.4	7.1
Gemcitabine	RC	0.7	3.7	30.3	36.1	0.3	0.5	0.0	0.0	83.1	90.2
	CV	138.7	19.2	44.7	11.5	27.8	32.8	NA	NA	9.2	15.6
Midazolam	RC	112.8	83.3	75.6	88.0	1.1	1.5	0.0	0.0	90.7	84.5
	CV	18.3	5.2	23.1	17.2	18.4	66.8	NA	NA	28.4	4.2

HLB: Oasis HLB, MAX: Oasis MAX, MCX: Oasis MCX, E1: Elution 1, E2: Elution 2, NA: Not available.

Table 2-4. Summary of recoveries for all compounds in category 2 with SPE.

Compound name	Recovery and CV	HLB		MAX (E1)		MAX (E2)		MCX (E1)		MCX (E2)	
		QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H
Mosapride	RC	101.1	115.5	88.5	47.5	1.8	2.4	0.0	0.0	99.7	77.0
	CV	23.0	23.8	43.7	10.3	72.0	15.4	NA	NA	30.6	5.9
Papaverine	RC	105.1	89.3	92.2	101.7	3.8	5.2	0.5	0.0	92.4	87.8
	CV	33.0	2.1	10.0	10.0	13.5	60.2	29.1	NA	2.6	3.0
Nicardipine	RC	64.4	71.4	41.2	51.2	0.0	2.4	0.0	0.0	163.1	97.6
	CV	40.3	4.2	16.9	19.2	NA	34.3	NA	NA	1.8	12.8
Reserpine	RC	74.0	90.9	87.5	64.9	4.4	1.4	1.0	0.0	101.7	76.8
	CV	20.6	3.6	23.6	33.6	18.6	59.8	41.3	NA	47.6	8.4
Aripiprazole	RC	53.8	96.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	15.1	4.4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Buspirone	RC	128.9	91.2	89.2	103.6	4.3	9.0	0.0	0.0	97.1	89.2
	CV	24.8	2.4	7.8	9.9	2.7	54.5	NA	NA	12.3	6.8
Amlodipine	RC	100.7	101.8	0.0	56.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	54.2	11.1	NA	29.5	NA	13.0	NA	NA	NA	NA
Verapamil	RC	131.2	89.4	89.8	94.2	2.3	0.0	1.1	0.0	84.4	83.2
	CV	28.4	2.1	9.8	7.0	15.7	NA	29.4	NA	13.9	1.6
Clemastine	RC	108.7	84.8	48.8	54.1	0.0	0.0	12.4	0.0	83.7	74.4
	CV	23.4	2.0	11.5	15.8	NA	NA	25.4	NA	18.1	3.4
Paroxetine	RC	73.5	72.1	66.5	55.6	10.6	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	28.4	5.5	13.9	13.6	86.7	23.2	NA	NA	NA	NA
Propranolol	RC	142.0	86.6	97.7	100.4	3.4	0.0	4.6	0.0	90.7	83.5
	CV	32.0	4.3	6.2	13.4	8.4	NA	12.5	NA	15.8	4.3
Erythromycin	RC	36.3	29.0	61.3	81.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3
	CV	33.3	5.5	12.0	11.9	NA	NA	NA	NA	NA	23.1
Escitalopram	RC	108.2	93.1	92.6	77.9	2.8	2.8	0.0	0.0	92.0	83.0
	CV	13.6	3.9	24.4	13.9	34.5	27.1	NA	NA	12.4	7.6
Procainamide	RC	55.6	52.6	81.3	93.8	1.4	0.0	0.5	0.0	93.0	88.6
	CV	41.1	2.5	5.1	5.3	3.1	NA	33.9	NA	18.8	2.7

HLB: Oasis HLB, MAX: Oasis MAX, MCX: Oasis MCX, E1: Elution 1, E2: Elution 2, NA: Not available.

Table 3-1. Summary of matrix effects for all compounds in category 1 and 3 with LLE.

Compound name	Recovery and CV	DE (Acidic)		DE (Alkaline)		D/I (Acidic)		D/I (Alkaline)		EA (Acidic)		EA (Alkaline)	
		QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H
4-Nitrophenol	MF	67.1	82.4	79.0	83.9	66.6	2604.6	0.0	0.0	160.4	92.7	0.0	0.0
	CV	37.6	13.5	75.8	2.3	29.3	4.2	NA	NA	42.1	11.8	NA	NA
Salicylic acid	MF	0.0	0.0	70.0	75.4	52.1	7098.2	0.0	0.0	99.1	83.9	0.0	0.0
	CV	NA	NA	72.8	34.7	16.4	11.1	NA	NA	20.0	2.4	NA	NA
Gliclazide	MF	5621.7	111.3	60.8	108.2	123.7	97.4	123.5	96.9	0.0	0.0	0.0	141.8
	CV	1.3	2.6	16.5	29.7	2.4	7.8	0.5	4.2	NA	NA	NA	21.9
Diclofenac	MF	32.1	16.3	99.2	103.1	107.0	81.5	108.7	100.3	74.7	66.9	100.0	119.1
	CV	21.1	62.7	12.6	5.8	8.4	10.3	10.5	4.7	16.6	6.3	1.0	9.0
Hippuric acid	MF	0.0	0.0	0.0	93.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	NA	NA	NA	11.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Tazobactam	MF	125.0	104.1	99.8	111.5	98.9	104.8	99.8	104.3	114.1	103.7	81.6	110.5
	CV	5.9	1.8	8.0	12.5	5.6	3.0	5.3	1.2	5.5	1.0	15.2	7.3
Pravastatin	MF	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Atorvastatin	MF	51.2	82.0	103.3	92.4	89.0	82.0	102.6	98.9	69.8	81.8	164.4	176.1
	CV	3.7	47.1	8.0	21.9	4.1	10.9	3.3	2.2	14.6	12.4	1.3	11.4
Ganciclovir	MF	107.9	100.7	101.4	114.9	0.0	177.6	0.0	88.2	125.4	110.5	87.2	107.5
	CV	64.2	11.2	5.0	2.4	NA	11.9	NA	68.1	56.7	2.6	43.8	7.9
Labetalol	MF	0.0	339.1	121.0	123.8	0.0	292.7	0.0	122.2	983.5	290.0	124.8	132.8
	CV	NA	2.9	54.7	37.5	NA	7.8	NA	3.0	9.7	2.8	26.2	12.1
Naloxone	MF	0.0	156.2	0.0	193.4	0.0	0.0	355.4	256.1	0.0	0.0	177.6	217.0
	CV	NA	17.7	NA	33.6	NA	NA	49.6	11.7	NA	NA	17.9	10.7
Gemcitabine	MF	135.4	98.8	99.8	116.0	497.6	132.0	134.4	118.2	121.3	105.5	117.2	115.2
	CV	3.3	1.5	16.2	10.9	57.9	8.8	66.5	0.8	4.1	3.6	7.7	8.3
Midazolam	MF	419.0	100.8	217.3	98.4	0.0	0.0	306.3	108.1	0.0	0.0	360.0	124.9
	CV	20.3	4.0	29.7	8.2	NA	NA	16.8	4.2	NA	NA	7.5	1.9

DE: diethyl ether, D/I: ether / isopropylalcohol (8:2, v/v), EA: ethyl acetate, NA: Not available, Acidic: under acidic condition, Alkaline: under alkaline condition.

Table 3-2. Summary of matrix effects for all compounds in category 2 with LLE.

Compound name	Recovery and CV	DE (Acidic)		DE (Alkaline)		D/I (Acidic)		D/I (Alkaline)		EA (Acidic)		EA (Alkaline)	
		QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H
Mosapride	MF	0.0	390.2	0.0	117.7	213.8	229.1	264.6	235.5	625.2	608.7	214.9	147.1
	CV	NA	0.9	NA	3.3	57.1	4.7	15.2	8.2	9.3	4.8	41.9	20.1
Papaverine	MF	320.2	105.2	145.0	96.0	0.0	0.0	232.1	104.0	0.0	0.0	218.8	104.6
	CV	9.6	4.8	10.6	11.3	NA	NA	12.7	4.6	NA	NA	7.2	1.3
Nicardipine	MF	413.5	191.5	188.6	120.7	110.2	123.0	82.8	85.7	330.1	145.3	114.9	69.0
	CV	2.5	19.6	28.3	3.8	18.4	7.1	7.3	6.6	5.0	4.4	18.1	9.1
Reserpine	MF	732.6	145.5	207.7	41.2	245.6	132.5	96.3	71.3	245.6	132.5	104.7	88.8
	CV	6.3	5.3	33.5	17.6	12.4	2.9	55.0	13.8	12.4	2.9	12.5	4.6
Aripiprazole	MF	0.0	0.0	0.0	0.0	81.4	104.3	92.0	113.4	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	NA	NA	NA	NA	28.3	14.3	24.8	3.6	NA	NA	NA	NA
Buspirone	MF	0.0	0.0	95.3	89.4	0.0	0.0	103.4	100.3	0.0	0.0	121.4	99.3
	CV	NA	NA	28.4	21.2	NA	NA	21.2	12.1	NA	NA	13.7	2.4
Amlodipine	MF	0.0	159.3	0.0	122.3	0.0	118.2	0.0	88.2	142.6	123.8	0.0	97.1
	CV	NA	11.8	NA	6.7	NA	11.1	NA	12.9	75.2	2.7	NA	8.3
Verapamil	MF	101.8	113.2	33.1	53.5	129.3	6544.9	71.6	74.8	138.0	108.1	58.8	87.6
	CV	9.2	2.7	72.1	50.2	6.1	8.7	35.1	22.2	2.0	1.5	33.8	2.5
Clemastine	MF	131.6	111.1	40.4	41.7	0.0	0.0	134.8	103.3	0.0	0.0	71.1	89.6
	CV	3.6	3.1	23.4	48.4	NA	NA	30.8	7.9	NA	NA	17.9	4.2
Paroxetine	MF	247.7	162.1	81.3	111.3	108.1	117.8	88.0	94.7	165.8	131.7	63.7	89.3
	CV	42.1	7.2	12.5	21.4	12.2	6.6	24.7	3.0	14.7	4.0	36.3	7.0
Propranolol	MF	0.0	0.0	53.1	68.7	0.0	0.0	101.2	95.5	0.0	0.0	94.1	106.9
	CV	NA	NA	74.7	48.8	NA	NA	33.6	12.5	NA	NA	26.5	2.6
Erythromycin	MF	208.7	307.3	80.7	71.3	0.0	0.0	113.0	139.2	37.9	142.4	174.8	306.0
	CV	6.2	9.1	101.2	58.1	NA	NA	15.9	20.7	0.8	4.6	30.9	7.0
Escitalopram	MF	256.8	164.7	111.9	110.5	129.1	118.3	214.7	135.2	458.9	168.3	159.5	138.6
	CV	32.1	1.2	24.9	38.0	44.0	2.1	5.6	3.0	14.4	2.3	15.7	12.7
Procainamide	MF	152.9	120.0	112.6	126.8	105.7	8615.4	234.6	200.4	69.9	89.0	146.4	146.5
	CV	11.8	4.9	51.7	29.7	8.7	9.0	14.6	2.4	3.2	1.8	13.6	9.3

DE: diethyl ether, D/I: ether / isopropylalcohol (8:2, v/v), EA: ethyl acetate, NA: Not available, Acidic: under acidic condition, Alkaline: under alkaline condition.

Table 3-3. Summary of matrix effects for all compounds in category 1 and 3 with SPE.

Compound name	Recovery and CV	HLB		MAX (E1)		MAX (E2)		MCX (E1)		MCX (E2)	
		QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H
4-Nitrophenol	MF	83.0	100.9	93.9	120.2	66.0	100.6	103.2	110.4	107.8	105.6
	CV	47.3	4.3	30.7	5.9	9.1	3.7	16.1	2.0	16.5	5.5
Salicylic acid	MF	132.4	105.5	60.0	83.4	106.1	107.5	163.3	117.2	212.4	116.1
	CV	21.1	3.9	57.7	15.0	48.0	2.2	17.9	13.5	30.4	6.9
Gliclazide	MF	0.0	146.1	0.0	139.7	0.0	154.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	NA	5.8	NA	5.0	NA	1.4	NA	NA	NA	9.2
Diclofenac	MF	61.9	67.9	25.0	53.2	36.8	40.9	95.0	119.9	110.1	143.9
	CV	28.6	11.6	20.4	15.7	17.6	12.4	12.6	24.0	21.0	17.4
Hippuric acid	MF	0.0	1057.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1527.2	0.0	156.4
	CV	NA	36.8	NA	NA	NA	NA	NA	17.6	NA	23.1
Tazobactam	MF	98.9	106.5	116.4	88.6	102.4	79.3	109.4	104.7	77.4	77.8
	CV	4.5	2.4	11.4	9.0	14.7	0.8	3.8	3.5	4.2	4.1
Pravastatin	MF	122.7	186.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	93.5	23.8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Atorvastatin	MF	179.0	138.3	52.3	98.3	59.1	70.7	87.0	148.8	228.3	285.0
	CV	15.2	12.3	48.8	5.8	0.6	24.8	17.8	26.0	6.5	14.9
Ganciclovir	MF	92.3	105.5	78.6	77.2	41.3	24.1	152.1	107.1	46.3	41.3
	CV	27.2	2.2	13.2	1.1	41.9	4.6	9.8	2.3	20.0	7.8
Labetalol	MF	0.0	306.9	232.1	190.5	742.4	385.5	101.2	105.9	599.4	185.6
	CV	NA	3.3	23.0	3.7	18.2	8.5	49.1	31.6	56.2	14.1
Naloxone	MF	0.0	1404.5	0.0	408.2	0.0	316.8	330.0	339.8	4298.3	753.8
	CV	NA	6.5	NA	11.7	NA	14.5	13.7	31.3	35.1	13.3
Gemcitabine	MF	116.1	108.5	62.5	65.3	25.2	19.2	146.1	101.4	57.4	47.0
	CV	5.1	4.3	19.1	2.7	60.2	5.5	13.8	5.7	9.0	10.0
Midazolam	MF	428.4	132.8	726.6	127.2	173.3	116.3	196.7	113.4	617.1	113.4
	CV	44.5	4.9	15.8	1.6	6.0	2.3	18.6	5.3	15.7	8.4

HLB: Oasis HLB, MAX: Oasis MAX, MCX: Oasis MCX, E1: Elution 1, E2: Elution 2, NA: Not available.

Table 3-4. Summary of matrix effects for all compounds in category 2 with SPE.

Compound name	Recovery and CV	HLB		MAX (E1)		MAX (E2)		MCX (E1)		MCX (E2)	
		QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H	QC-L	QC-H
Mosapride	MF	0.0	703.7	0.0	590.0	0.0	1448.3	0.0	76.6	720.9	599.6
	CV	NA	10.5	NA	8.7	NA	13.7	NA	61.7	11.1	12.7
Papaverine	MF	416.1	117.1	347.7	116.1	201.5	117.3	167.5	96.1	275.7	101.4
	CV	13.4	3.1	7.9	1.9	7.0	1.9	12.9	1.9	6.1	9.7
Nicardipine	MF	289.4	143.8	217.5	243.9	358.2	265.8	38.0	26.0	77.5	44.6
	CV	34.9	11.0	27.1	6.0	23.5	8.4	62.0	44.0	31.1	45.5
Reserpine	MF	150.3	144.3	317.8	92.4	63.4	54.2	107.5	47.0	127.9	39.4
	CV	17.3	6.8	23.0	0.5	29.8	17.6	15.5	31.7	8.3	4.3
Aripiprazole	MF	0.0	764.0	0.0	1277.9	0.0	2469.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	NA	1.1	NA	31.4	NA	8.4	NA	NA	NA	NA
Buspirone	MF	149.1	118.3	183.2	113.9	112.9	116.3	91.1	97.9	118.7	94.0
	CV	15.4	4.2	7.6	1.9	13.5	2.9	22.0	12.7	19.0	15.4
Amlodipine	MF	0.0	142.4	0.0	166.1	0.0	176.9	0.0	32.4	0.0	49.9
	CV	NA	6.6	NA	13.0	NA	4.7	NA	13.2	NA	89.4
Verapamil	MF	113.5	120.2	126.1	121.3	78.7	115.4	24.1	55.7	72.9	95.1
	CV	33.4	2.6	3.6	1.7	27.3	1.3	19.9	3.0	16.7	10.4
Clemastine	MF	137.8	124.3	129.5	121.4	54.2	99.7	13.9	25.4	37.3	57.5
	CV	7.8	4.9	6.2	2.0	42.8	0.8	25.2	49.4	26.5	30.7
Paroxetine	MF	160.9	113.6	212.5	181.2	331.3	200.9	0.0	0.0	0.0	0.0
	CV	44.6	7.6	23.1	5.2	18.9	4.5	NA	NA	NA	NA
Propranolol	MF	123.1	125.1	124.0	124.1	123.5	124.6	36.7	69.3	116.2	113.5
	CV	23.7	4.8	1.8	2.8	3.5	3.2	25.7	25.3	15.1	8.6
Erythromycin	MF	71.8	212.3	602.6	657.8	252.1	426.9	95.3	318.3	419.6	582.8
	CV	55.0	27.1	18.7	0.7	9.8	12.7	15.4	14.6	21.6	9.6
Escitalopram	MF	639.8	267.3	648.4	200.7	1111.6	277.7	117.8	113.5	340.2	145.4
	CV	40.8	0.9	31.8	6.3	18.8	2.9	66.1	45.3	19.7	11.7
Procainamide	MF	290.8	189.2	188.6	176.2	220.9	191.8	160.8	173.2	236.1	185.9
	CV	7.9	1.7	6.4	2.8	8.7	1.8	13.3	7.5	13.7	5.4

HLB: Oasis HLB, MAX: Oasis MAX, MCX: Oasis MCX, E1: Elution 1, E2: Elution 2, NA: Not available.

## (2) 回収率およびマトリックス効果の確認

27種の既知化合物について、LLEおよびSPEにおける最適な前処理法をTable 1にまとめる。最適な前処理法を決定するために、5つのSPEと6つのLLE条件から得られたRCおよびMEについて検証した。なお、本研究は各化合物と最適な前処理法との関係を調べることを目的とするため、検討に用いた前処理法は、一般的なものを採用した。得られたRCおよびMEをTable 2-1~3-4にまとめる。

生体試料中薬物濃度測定に関する各ガイドラインでは、LC/MS等のクロマトグラフィー分析によるバリデーションで実施される各項目における真度（定量値と理論値との一致の程度）および精度（繰り返し分析して得られる定量値間の一致のばらつきの程度）について、15~20%の振れ幅を許容している[34-36]。ガイドラインではRCに対する明確な基準はないが、目的とする測定感度が満たされるのであれば80%程度あれば十分といえる。本研究では内標準物質（Internal standard, I.S.）による補正をしないピーク面積値による評価であるため、RCのばらつきを考慮し、各化合物における最適な前処理法の判定については、次の基準を設定した。QC-LおよびHのRCが60%を超えているか、または60%に近い値が得られている場合、その条件が最適な前処理法であると判定した。CVが40%を超える条件は選択から外した。ただし、低濃度における吸着の影響を考慮し、一部の化合物はQC-LのみCVが40%を超えたものについても採用した。MEが60%以上かつ300%以下であった場合、その条件を最適な前処理法であると判定した。ただし、一部の化合物はQC-Lにおいてこの基準を外れた場合も採用とした。Diclofenacは、LLEのDE（酸性条件下）、SPEのOasis MAX (E2)においても高いRCが得られたが、これらのMEは最適と選択したLLEのD/IおよびEA（いずれも酸性条件下）およびSPEのOasis HLBでMEが60%以上であったのに比べて、約20~40%と低かった。Labetalolは、SPEのOasis MAX (E2)において高いRCが得られたが、MEは約400%と著しく高く、これは測定対象物質がイオン化の際に生体試料中の夾雑物によるエンハンス効果を受けたことによると推察される。同様に、Naloxone、Mosapride、Erythromycin、EscitalopramおよびProcainamideにおいてもエンハンス効果が観察された。この結果は、適切な前処理法を選択する際には、RCだけでなくMEについても評価することの重要性を示唆している。Nicardipineは、LLEのDEおよびD/Iにおいて、酸性およびアルカリ条件の両方で抽出可能であった。RCは69.1~92.6%であり、最終的にはMEの結果を考慮し、DE（アルカリ条件下）およびD/I（酸性条件およびアルカリ条件下）を最適な前処理として選択した。Nicardipineは、両性化合物のため、酸性およびアルカリ性条件下の両方で抽出可能であったと推察される。ReserpineはLLEのすべての条件で抽出可能であり、RCは41.0~94.3%の範囲であった。Reserpineはメルクインデックスでは弱塩基性化合物に分類されているが、フェノール性水酸基とカルボキシル基を有しているため、酸性・アルカリ性の両条件で抽出が可能であったと推察される。

Category 1の化合物は、LLEでは酸性条件下で抽出でき、SPEでは逆相系カート

リッジの Oasis HLB および陽イオン交換カートリッジの中性（メタノール）抽出条件である Oasis MCX (E1) で抽出可能であった。Category 2 の化合物は、主に LLE のアルカリ条件で抽出可能であったが、Nicardipine、Amlodipine、Verapamil、Clemastine および Paroxetine は、酸性条件下でも抽出可能であり、他に SPE の陽イオン交換カートリッジ Oasis MCX (E2)、Oasis HLB および陰イオンカートリッジの中性抽出条件である Oasis MAX (E1) において抽出可能な化合物もあった。Category 3 の化合物は、SPE の陽イオン交換カートリッジ Oasis MCX (E2) や陰イオンカートリッジの中性抽出条件である Oasis MAX (E1) において抽出可能であり、一部の化合物は、LLE の酸性やアルカリ条件で抽出可能であった。

### (3) 主成分分析によるデータ解析

27 種の既知化合物について得られた 3 つの RT (acidic RT, neutral RT および base RT) およびこれらの計算値 (total RT, acidic/basic RT および basic/neutral RT) および 5 つの SPE と 6 つの LLE 条件から得られた RC (QC-H のみ) を用いて、主成分分析 (PCA) によるデータ解析を実施した。PCA のスコアデータおよびローディングプロットを Fig. 1 に示す。PCA は複数の条件から得られたデータについて関連する因子に対する分類を可能とする多変量解析の一手法であり、得られたスコアデータのプロットから視覚的に類似性や違いを導き出せるため、バイオマーカーやメタボロミクス、生理活性物質および植物中の薬物について得られた LC/MS データ等の解析によく用いられている[37-40]。前処理法の最適化に統計的手法を用いた一例として、尿中の利尿薬および  $\beta$  拮抗薬 34 種について、SPE データについてクラスター分析 (Hierarchical cluster analysis, HCA) を用いて分類した報告がある[41]。

PCA 解析により、各化合物における最適な LLE および SPE について検討した結果、それぞれいくつかのクラスに分類されることが認められた。LLE は、主に、酸性条件下で抽出可能な化合物群 (L1)、アルカリ性条件下で抽出可能な化合物群 (L2) および LLE 不可の化合物群 (LNA) の 3 つに分類でき (Fig. 1A)、SPE は、Oasis HLB および Oasis MCX (E1) で抽出可能な化合物群 (S1)、Oasis HLB、Oasis MAX (E1) および Oasis MCX (E2) で抽出可能な化合物群 (S2)、Oasis MCX (E2) で抽出可能な化合物群 (S3) および SPE 不可の化合物群 (SNA) の 4 つに分類されることが認められた (Fig. 1B)。さらに、PCA のローディングデータ (Fig. 1C) から、acidic/base RT が MAX (E2) および MCX (E1) の RC とクラスターを形成しており、近似性を示していることが認められた。同様に、basic/neutral RT は MAX (E1) および MCX (E2) の RC とクラスターを形成していた。HLB の RC は MAX と MCX のちょうど中間にプロットされていることが認められた。acidic RT および basic RT は、それぞれ LLE の酸性条件およびアルカリ条件下における各溶媒の RC とクラスターを形成していた。

これらの結果は、RT が各化合物の性質に基づいた最適な前処理法のインデックスとして機能することを示唆しており、さらに、複数化合物の前処理を同時に最適

化可能であることが示唆された。

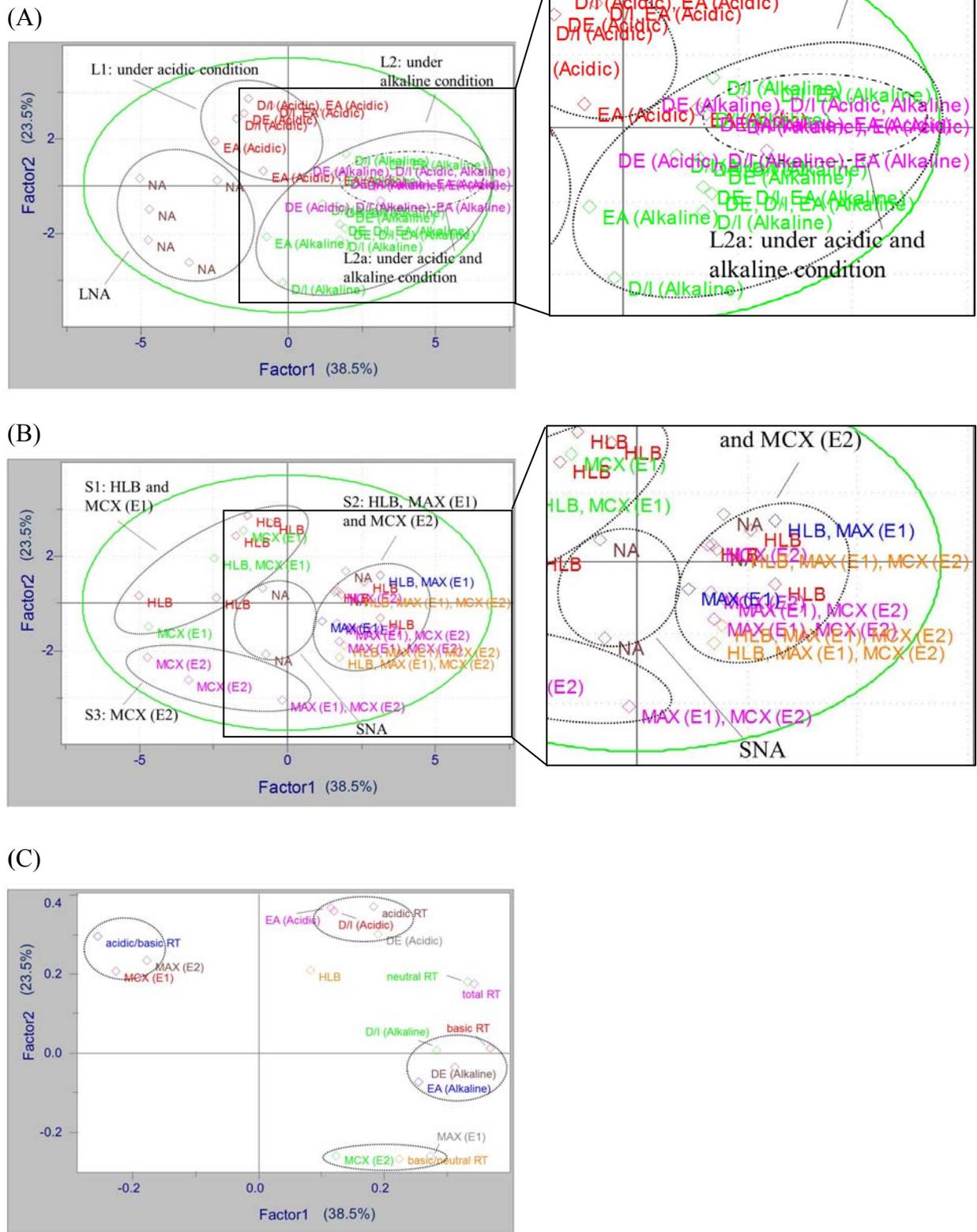


Fig. 1. PCA scores of all compounds for appropriate pretreatment with LLE (A), SPE (B) and loading data (C) for RTs, RT variations and RCs in QC-high.

#### 4. まとめ

高感度測定法開発のための前処理法検討ツールとして、システマティック・アプローチを確立した。本ツールでは、新たに前処理法を検討したい化合物の3つの保持時間を取得するだけで、あらかじめ既知化合物について解析した PCA モデルを用いたシミュレーションによって、新たな化合物に最適な前処理法の初期条件を導き出すことが可能と推察される。検討方法の詳細を次章に示す。

本研究において開発した前処理法検討ツールは、化合物の物性情報や熟練分析担当者の知識などを必要とせず、複数化合物の前処理法検討を同時に効率的かつ迅速に行うことを可能とするため、MD 臨床試験のみならず、LC/MS による高感度測定法の開発に広く応用可能と推察される。

## 第2章 カセット投与マイクロドーズ臨床試験による候補化合物の評価

### 1. 緒言

MD 臨床試験の活用法として、複数の候補化合物の中からもっとも成功確率の高い化合物を選択する際の手段とすることがもっとも適していると考えられる。候補化合物について、ヒト体内動態を比較することが、その選択を可能とする。しかしながら、その標準的手法はいまだ確立されていない。本章では、経口投与後の生物学的利用率（バイオアベイラビリティ：Bioavailability, BA）が 10～50%と比較的低いことで知られるカルシウム拮抗薬のうち[42, 43]、Nifedipine、Nicardipine および Diltiazem をモデル化合物として、3 剤同時投与（カセット投与）MD 臨床試験を実施することで、候補化合物の効率的な選択法としてのカセット投与 MD 臨床試験の有用性に関する検討を行った。まず、カセット投与 MD 臨床試験に必要な高感度測定法を構築するため、第1章において開発したシステムティック・アプローチを用いることで、前処理法を効率的に検討した。次に、実際の MD 臨床試験において得られた各薬物の体内動態に関する解析を試みた。

### 2. 方法

#### (1) 試薬

Nifedipine および Nicardipine 塩酸塩は SIGMA-ALDRICH より購入した。Diltiazem 塩酸塩、Midazolam および Verapamil 塩酸塩は和光純薬工業株式会社より購入した。アセトニトリル、ヘキサン（いずれも高速液体クロマトグラフ用）、酢酸アンモニウム（試薬特級）、ジエチルエーテル（残留農薬・PCB 試験用濃縮 300）およびほう酸塩 pH 標準液（pH 9.18）（JCSS）は和光純薬工業株式会社より購入した。添加検量線試料、ゼロ試料および QC 試料の調製に用いるヒト血漿（抗凝固剤：ヘパリンナトリウム）は株式会社ケー・エー・シーより購入した。濾過フィルターセントリカット超ミニ（0.45  $\mu\text{m}$ , W-MR 型）は倉敷紡績株式会社（Osaka, Japan）より購入した。Nifedipine、Nicardipine、Diltiazem、Midazolam（Nifedipine 測定用 I.S.; I.S.-1）および Verapamil（Nicardipine および Diltiazem 測定用 I.S.; I.S.-2）の構造式を Fig. 2 に示す。

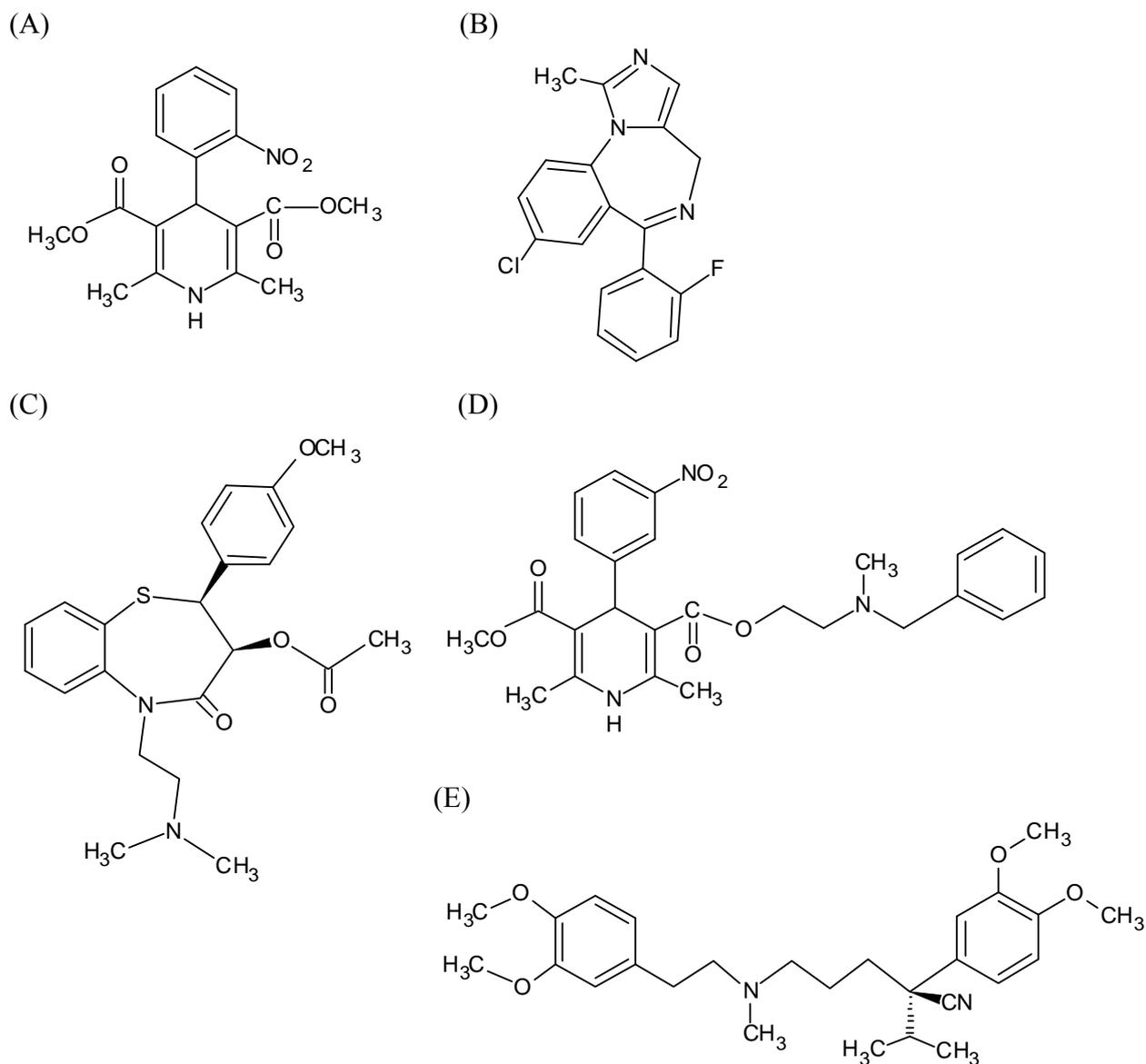


Fig. 2. Structures of nifedipine (A), midazolam, (B), diltiazem (C), nicardipine (D), and verapamil (E).

## (2) 標準原液および標準溶液の調製

Nifedipine 5 mg、塩酸 Nicardipine 5.38 mg (Nicardipine として 5 mg) および塩酸 Diltiazem 5.44 mg (Diltiazem として 5 mg) をそれぞれ正確に量り、少量のアセトニトリルで溶解後、アセトニトリルで 20 mL とした (各 250  $\mu\text{g/mL}$ 、各標準原液)。各標準原液を用いてアセトニトリル/水 (1:1, v/v) で希釈し、0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10 および 15  $\text{ng/mL}$  の検量線試料用混合標準溶液を調製し、それとは別に、0.06、0.3、0.6、1.5、6 および 48  $\text{ng/mL}$  の QC 試料用混合標準溶液を調製した。Midazolam および Verapamil 塩酸塩をそれぞれ 5 mg 正確に量り、少量のアセトニトリルで溶解後、アセトニトリルで 20 mL とした (各 250  $\mu\text{g/mL}$ 、I.S.-1

原液および I.S.-2 原液)。各 I.S.原液を用いてアセトニトリル／水 (1:1, v/v) で希釈し、5 ng/mL の混合 I.S.溶液を調製した。

### (3) 添加検量線試料、ゼロ試料および QC 試料の調製

添加検量線試料はガラス製試験管にヒト血漿 0.5 mL を分取し、各濃度の検量線試料用混合標準溶液 10  $\mu$ L を添加し、十分に混和して 0.2、0.5、1、2、5、10、20、100、200 および 300 pg/mL の濃度となるように調製した。ただし、ブランク試料およびゼロ試料 (I.S.のみ添加する試料) は標準溶液に代えてアセトニトリル／水 (1:1, v/v) 10  $\mu$ L を添加して調製し、一次回帰式算出には使用しなかった。添加検量線試料は測定ごとに調製して使用した。なお、各化合物の検量線範囲は、Diltiazem で 0.2～200 pg/mL、Nicardipine で 1～200 pg/mL、Nifedipine で 2～300 pg/mL とした。QC 試料は、PP 製チューブにヒト血漿 3 mL を分取し、各濃度の QC 試料用混合標準溶液 10  $\mu$ L を添加し、十分に混和して 0.2、1、2、5、20、160、200、240 および 300 pg/mL の濃度となるように調製した。QC 試料は必要に応じて -20°C 設定の冷凍庫にて保存した。

### (4) 主成分分析

PCA は Pirouette (Infometrix, Inc.) を用いて実施した。

### (5) 測定条件

すべての臨床試験において得られた検体は次の条件にて測定した。

Nifedipine の測定装置は、高速液体クロマトグラフ UFLC システム [prominence] (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) および質量分析計 API5000 (AB SCIEX, Foster City, CA, USA) を用いた。LC 条件は、トラップカラムとして、CAPCELL PAK C18 UG 120, 2.0 mm I.D.×10 mm L., 5  $\mu$ m (Shiseido Co., Ltd. Tokyo, Japan) を用い、カラム温度は室温、移動相 A として、アセトニトリル／10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (3:7, v/v)、流量は 0.2 mL/min とした。分析カラムは、Shim-pack XR-ODS, 3.0 mm I.D×75 mm L., 2.2  $\mu$ m (Shimadzu Corp.) を用い、カラム温度は 40°C、移動相 B として、アセトニトリル／10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (7:3, v/v)、流量は 0.2 mL/min とした。カラムスイッチングバルブを用いて、1.0～3.2 分においてトラップカラムと分析カラムを連結させるように設定した。注入量は 15  $\mu$ L とし、オートサンプラー温度は 4°C とした。MS/MS 条件はインターフェースとして Turbo Ionspray (エレクトロスプレーイオン化法) を用い、イオンスプレー電圧は 5,000 V、ヒーターガス温度は 500°C、ヒーターガスは 80 psi (空気)、ネブライザーガスは 70 psi (空気)、カーテンガス流量は 20 psi (窒素)、コリジョンガス圧は設定値 6 (窒素) とした。イオン検出モードは MS/MS (SRM mode) positive ion detection mode として、モニターイオンおよびコリジョンエネルギーは、Nifedipine で  $m/z$  347.2  $\rightarrow$   $m/z$  254.4 および 27 V、I.S.-1 で  $m/z$  326.1  $\rightarrow$   $m/z$  291.3 および 38 V とした。測定データは、Analyst ver.1.4.2 (AB

SCIEX) で解析した。

Nicardipine および Diltiazem の測定装置は、高速液体クロマトグラフ UFLC XR システム [prominence] (Shimadzu Corp.) および質量分析計 TSQ Vantage (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) を用いた。LC 条件は、分析カラムとして、Shim-pack XR-ODS, 3.0 mm I.D×75 mm L., 2.2 μm (Shimadzu Corp.) を用い、カラム温度は 40°C、移動相 A は 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、移動相 B はアセトニトリルとして、A と B の比率が 30 : 70 となるよう設定した。流量は 0.3 mL/min とし、バルブ設定にて 1.8 分から 5.99 分までを質量分析計へ導入した。注入量は 10 μL、オートサンプラー温度は 4°C とした。MS/MS 条件は、インターフェースとして H-ESI (エレクトロスプレーイオン化法) を用い、Spray Voltage は 1,000 V、Vaporizer Temperature は 450°C、Sheath Gas Pressure は 40 psi (窒素)、Aux Gas Pressure は 10 psi (窒素)、Capillary Temperature は 220°C、Collision Pressure は 1.0 mTorr (アルゴン)、イオン検出モードは MS/MS (SRM mode) positive ion detection mode として、モニターイオンおよびコリジョンエネルギーは、Nicardipine で  $m/z$  480.1 →  $m/z$  315.0 および 23 V、Diltiazem で  $m/z$  415.1 →  $m/z$  178.0 および 25 V、I.S.-2 で  $m/z$  455.2 →  $m/z$  165.0 および 28 V とした。測定データは、Lcquan Manual ver2.5 (Thermo Fisher Scientific Inc.) で解析した。

#### (6) 前処理条件

ヒト血漿 0.5 mL 中 Nifedipine、Nicardipine、Diltiazem、I.S.-1 および I.S.-2 をほう酸塩 pH 標準液 (pH 9.18) 1 mL 添加によるアルカリ性条件下、ジエチルエーテル/ヘキサン (3:1, v/v) 5 mL で抽出した後、蒸発乾固 (窒素気流下、40°C) したものを溶解液 0.2 mL で再溶解し、濾過フィルターセントリカット超ミニ (0.45 μm, W-MR 型) による遠心濾過したものを注入試料とした。

#### (7) 分析法バリデーション

分析法バリデーションは次の項目について検討し、実施内容および判定基準については、本研究実施当時のガイダンスに従った[44]。

選択性については、独立した 6 個体から採取したヒト血漿を用いて検討した。ブランク試料のクロマトグラムにおいて、Nifedipine、Nicardipine、Diltiazem、I.S.-1 および I.S.-2 の保持時間に存在する妨害ピークがないことを確認した。

直線性および定量範囲については、各添加検量線 (Diltiazem は 0.2~200 pg/mL、Nicardipine は 1~200 pg/mL、Nifedipine は 2~300 pg/mL) の定量範囲において、得られたクロマトグラムよりピーク面積比を算出し、回帰式および相関係数 (Nifedipine は  $r$ 、Diltiazem および Nicardipine は  $r^2$ ) を求めることで評価した。判定基準は、相関係数 ( $r$  または  $r^2$ ) が 0.9900 以上であること、並びに算出した回帰式に添加検量線の各ポイントのピーク面積比を代入して得られる定量値の真度が、定量下限濃度 (Lower Limit of quantification, LLOQ) で ±20.0% 以内、定量上限濃度

(Upper limit of quantification, ULOQ) およびその他の濃度で $\pm 15.0\%$ 以内であることとし、LLOQ および ULOQ を含む 75%以上のポイントが基準を満たすこととした。

同時再現性（日内変動）については、7種類の QC 試料（0.2、1、2、5、20、200 および 300 pg/mL）において各濃度 5 試料の測定を行った。添加検量線を用いて定量値を算出し、精度および真度を求めた。判定基準は、各 LLOQ で精度が 20.0%以下および真度が $\pm 20.0\%$ 以内、その他の濃度で精度が 15.0%以下および真度が $\pm 15.0\%$ 以内であることとした。

日差再現性（日間変動）については、7種類の QC 試料（0.2、1、2、5、20、200 および 300 pg/mL）において各濃度 1 試料を 5 日間の測定を行った。添加検量線を用いて定量値を算出し、精度および真度を求めた。判定基準は、LLOQ で精度が 20.0%以下および真度が $\pm 20.0\%$ 以内、その他の濃度で精度が 15.0%以下および真度が $\pm 15.0\%$ 以内であることとした。

希釈妥当性については、10、100、1,000 および 10,000 倍に希釈した希釈妥当性用 QC 試料（1、10 および 100 ng/mL）について各希釈倍率につき 3 試料の測定を行った。添加検量線を用いて定量値を算出し、精度および真度を求めた。判定基準は、精度が 15.0%以下および真度が $\pm 15.0\%$ 以内であるとき、希釈妥当性を保証するものとした。

安定性試験については、ヒト血漿中および前処理後の測定試料中 Nifedipine、Nicardipine および Diltiazem の安定性を確認するため、5種類の QC 試料（1、2、5、160 および 240 pg/mL）において各濃度 3 試料の測定を行った。添加検量線を用いて定量値を算出し、真度を求めた。判定基準は、真度が $\pm 15.0\%$ 以内であるとき、安定であるとした。室温保存安定性は、調製直後および $-20^{\circ}\text{C}$ 設定の冷凍庫で保存し、室温で融解した後、室温で 24 時間保存した QC 試料について測定を行った。凍結保存安定性は、調製直後および $-20^{\circ}\text{C}$ 設定の冷凍庫で一定期間（1 ヶ月間および 2 ヶ月間）保存した QC 試料について測定を行った。凍結融解操作の安定性は、調製直後および凍結融解操作を 3 回繰り返した QC 試料について測定を行った。前処理後の測定試料の安定性は、前処理直後および  $4^{\circ}\text{C}$ 設定のオートサンプラー内で一定期間（Nifedipine および Nicardipine ; 24 時間、48 時間および 72 時間、Diltiazem ; 24 時間および 36 時間）保存後に測定を行った。前処理直後に測定した添加検量線を用いて定量値を算出し、真度を求めた。標準溶液および I.S.溶液の安定性は、標準原液（250  $\mu\text{g/mL}$ ）および混合標準溶液（2,500 ng/mL）について、それぞれアセトニトリル/水（1:1, v/v）で 10 ng/mL に希釈し、調製直後および $-20^{\circ}\text{C}$ 設定の冷凍庫で 1 ヶ月および 2 ヶ月間保存したものをそれぞれ 3 試料の測定を行った。混合標準溶液（90 ng/mL、15 ng/mL、0.1 ng/mL、0.05 ng/mL および 0.01 ng/mL）について、標準原液（250  $\mu\text{g/mL}$ ）から新たに希釈した同濃度の混合標準溶液を対照試料として、 $4^{\circ}\text{C}$ 設定の冷蔵庫で 24 時間、 $-20^{\circ}\text{C}$ 設定の冷凍庫で 1 週間および 2 週間、室温で 24 時間保存したものをそれぞれ 3 試料の測定を行った。I.S.溶液（5 ng/mL）について、調製直後および $-20^{\circ}\text{C}$ 設定の冷凍庫で 1 ヶ月および 2 ヶ月間保存したものをそれぞれ

3 試料の測定を行った。得られたクロマトグラムより、ピーク面積比（Nifedipine のピーク面積値/I.S.-1 のピーク面積値、Nicardipine または Diltiazem のピーク面積値/I.S.-2 のピーク面積値）を求め、調製直後または対照試料に対する変化率を算出した。判定基準は、変化率が±15.0%以内であるとき安定であるとした。

#### (8) マイクロドーズおよび臨床用量における薬物動態試験

臨床試験は臨床研究に関する倫理指針[45]およびヘルシンキ宣言[46]を遵守し、大分大学医学部附属病院総合臨床研究センターのクリニカルトリアルユニットおよび管理棟で行った。本試験の試験実施内容に関して同付属病院に設置された治験審査委員会（Institutional review board, IRB）に試験計画書を提出し、承認された後に試験を実施した。被験者は 20 歳以上 40 歳未満の健康な男性とし、体格指数（Body mass index, BMI）が 18.0 以上 30.0 以下（ $\text{体格指数} = \text{体重 (kg)} \div [\text{身長 (m)}]^2$ ）とした。除外規定として、循環器系疾患、肝疾患、腎疾患、消化器疾患、血液疾患を持つ、またはその既往を持つ者、薬物依存あるいは薬物アレルギーを持つ、またはその既往を有する者、試験結果に影響を及ぼす可能性のある薬物を現在服用している者、診察、問診（既往歴、献血歴、喫煙歴、治験参加歴、等の聴取）、身体所見（身長、体重、血圧、）心電図検査、および血液検査（赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、白血球数、血小板数、白血球分画）、生化学検査（総ビリルビン、AST (GOT)、ALT (GPT)、 $\gamma$ -GTP、ALP、LDH、CK、尿酸、BUN、クレアチニン、総蛋白、アルブミン、総コレステロール、中性脂肪、Na、K、Cl)、尿検査（蛋白、糖、潜血、ウロビリノーゲン、ケトン体）、感染症検査（B 型肝炎検査、C 型肝炎検査、HIV 検査、梅毒検査）で、試験担当医師が試験参加に不相当であると判断した者、医薬品またはセントジョーンズワートを含む健康食品を試験薬剤の投与前 7 日間以内に服用した者、グレープフルーツジュースを含む果実ジュースを試験薬剤の投与前 7 日間以内に飲用した者、セントジョーンズワートを含む健康食品を常用している者、3 ヶ月以内に治験に参加された者で試験担当者が本試験の対象として不相当と判断した者、1 ヶ月以内に 200 mL 以上、過去 3 ヶ月以内に 400 mL 以上の献血をした者、梅毒血清反応、HIV 抗原・抗体、HBs 抗原、HCV 抗体が陽性である者、並びにその他、試験担当者が本試験に参加することが不相当であると判断した者は、臨床試験の対象に含めなかった。

健康成人に対し、3 剤のカルシウム拮抗薬（Nifedipine、Nicardipine および Diltiazem）を MD の単回投与（3 種同時投与：カセットドーズによる経口（p.o.）および静脈内（i.v.）投与および臨床用量（Therapeutic dose, ThD）の投与（経口）を行った。Diltiazem の MD では、ヘルベッサ<sup>®</sup>注射薬 10 mg（Mitsubishi Tanabe Pharma Co. Osaka, Japan）を希釈した溶液から 30  $\mu\text{g}$  を経口投与（200 mL の水とともに内服）または静脈内投与し、ThD ではヘルベッサ<sup>®</sup>注射薬 30 mg（Mitsubishi Tanabe Pharma Co.）を生理食塩水またはブドウ糖注射液 5 mL に溶解し、200 mL の水とともに内服した。Nicardipine の MD では、ペルジピン<sup>®</sup>注射液 2 mg（Astellas Pharma Inc. Tokyo, Japan）

から希釈した 30 µg を経口投与または静脈内投与し、ThD ではペルジピン®注射薬 40 mg (Astellas Pharma Inc.) を 200 mL の水とともに内服した。Nifedipine の MD では、アダラート® 5 mg/50 mL pro infusione (Bayer AG, Leverkusen, Germany) を希釈した溶液から 40 µg を経口投与または静脈投与し、ThD ではアダラート®カプセル 10 mg (Bayer AG) を 1 個内服した。採血時間は、MD の静脈内投与においては、投与直前、投与後 10、20、30、45、60、120、180、240 および 360 分とし、MD および ThD の経口投与においては、投与直前、投与後 15、30、60、90、120、180、240、360 および 480 分とした。MD カセット投与臨床試験および ThD の経口投与試験ともに各期間のウォッシュアウトは 3 日以上とした。MD カセット投与臨床試験（経口投与および静脈内投与）は、対象薬物である Nifedipine (40 µg)、Nicardipine 塩酸塩 (30 µg)、Diltiazem 塩酸塩 (30 µg) について、MD レベルでの経口投与および静脈内投与カセット投与をクロスオーバー試験により行った。本試験ではスクリーニングを行い、適格性が確認された 8 名の被験者を対象とし、4 名ずつの 2 群に分けて投与した。ThD の経口投与試験は対象薬物である Nifedipine (10 mg)、Diltiazem (30 mg)、Nicardipine (40 mg) について、MD カセット投与試験を行った被験者について、それぞれの薬物を ThD で、以下の順に経口投与を行った。

ヒト血漿中濃度測定の商品管理は、次の基準に従った。感度確認は Diltiazem および Nicardipine は添加検量線試料の 1 pg/mL を、Nifedipine は 2 pg/mL を検体測定開始前に注入し、各測定成分の保持時間に問題がないこと、ピーク形状および機器の感度が良好に得られていることにより行った。添加検量線の直線性は、添加検量線の相関係数 (Nifedipine は  $r$ 、Diltiazem および Nicardipine は  $r^2$ ) が 0.9900 以上であること、並びに算出した回帰式に添加検量線の各ポイントのピーク面積比を代入して得られた定量値の真度が LLOQ で  $\pm 20.0\%$  以内、ULOQ で  $\pm 15.0\%$  以内、およびその他の濃度で Nifedipine および Nicardipine は 6 ポイント中 4 ポイント以上、Diltiazem は 8 ポイント中 6 ポイント以上が  $\pm 15.0\%$  以内であることとした (LLOQ および ULOQ を含む 75% 以上のポイントが基準を満たすこととした)。真度が上記の基準値を外れた濃度ポイント (LLOQ および ULOQ を除く) が 2 ポイント以内であった場合は、それらを除いた濃度ポイントを使用して再度、回帰式を算出した。再計算した回帰式が上記基準を満たさない場合は添加検量線を不採用とし、同時に測定した検体の測定結果は採用せず、再測定した。QC 試料は、各濃度について 2 試料ずつ前処理を行った。検体の注入開始前と注入終了後に各濃度 1 試料ずつに分けて測定し、各濃度の少なくとも 1 試料を含む合計 4 試料の真度が、 $\pm 15.0\%$  以内であることを基準とした。基準を満たさなかった場合は測定が適正に行われなかったと判断し、再測定を実施することとした。薬物動態パラメータは WinNonlin Professional V 6.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) を用いて算出した。BA は、MD または ThD における経口投与時の血中濃度-時間曲線下面積 (Area under the plasma concentration time curve, AUC)  $AUC_{p.o.}$  および MD における  $AUC_{i.v.}$  (静脈投与時の AUC) を用い、次の式に従って、Excel 2002 (Microsoft Corp.) を用いて算出し

た。

$$\bullet \text{ BA (\%)} = \text{AUC}_{\text{p.o.}} / \text{AUC}_{\text{i.v.}} \times 100$$

### 3. 結果および考察

#### (1) 定量下限濃度の設定

3種のカルシウム拮抗薬について、各化合物のインタビューフォーム[47-49]より、ThDにおける最高血中濃度 ( $C_{\text{max}}$ ) を基に、MDの予想  $C_{\text{max}}$  を算出した。各化合物の数値を以下の Table 4 にまとめる。

Table 4. The estimated lower limit of quantification (LLOQ) for three Ca-channel blockers.

- Nifedipine		
Therapeutic dose	Dose: 10 mg	$C_{\text{max}}$ : 26 ng/mL *
Micodose	Dose: 0.03 mg	$C_{\text{max}}$ (Estimated): 0.078 ng/mL
Estimated LLOQ with	1/100 <sup>th</sup> of $C_{\text{max}}$ :	0.8 pg/mL
Microdose	1/50 <sup>th</sup> of $C_{\text{max}}$ :	1.5 pg/mL
- Nicardipine		
Therapeutic dose	Dose: 30 mg	$C_{\text{max}}$ : 91 ng/mL *
Micodose	Dose: 0.03 mg	$C_{\text{max}}$ (Estimated): 0.091 ng/mL
Estimated LLOQ with	1/100 <sup>th</sup> of $C_{\text{max}}$ :	0.9 pg/mL
Microdose	1/50 <sup>th</sup> of $C_{\text{max}}$ :	1.8 pg/mL
- Diltiazem		
Therapeutic dose	Dose: 60 mg	$C_{\text{max}}$ : 59 ng/mL *
Micodose	Dose: 0.03 mg	$C_{\text{max}}$ (Estimated): 0.03 ng/mL
Estimated LLOQ with	1/100 <sup>th</sup> of $C_{\text{max}}$ :	0.3 pg/mL
Microdose	1/50 <sup>th</sup> of $C_{\text{max}}$ :	0.6 pg/mL

\* The data were referred to interview forms.

薬物動態パラメータを十分に得るためには、3半減期までの定量値が得られるようなLLOQの設定が望ましい[50]。よって、MDにおける各化合物の予想  $C_{\text{max}}$  から、100分の1と50分の1を目標LLOQとして検討することとし、いずれの化合物についても目標LLOQは、1 pg/mL前後と設定した。しかしながら、NicardipineはThDにおける10~40 mgにおいて、BAが6.5~30.3%と非線形を示す傾向がみられているため[48, 51]、またその他の化合物についても非線形であることを考慮に入れ、各

化合物について可能な限りの高感度化を検討した。

## (2) LC/MS/MS 測定条件の検討

3つのカルシウム拮抗薬はいずれも、質量分析計においてポジティブモードのイオン化にて検出可能であるが、Diltiazem と Nifedipine は  $pK_a$  がそれぞれ 7.7 [49] と 7.2 [48] の塩基性化合物である。一方、Nifedipine は中性に近い性質を持つ化合物である。いずれもイオン検出モードは SRM を選択し、Q1 においては各化合物の分子イオンを、Q3 においては各化合物においてもっとも感度よく検出されるプロダクトイオンをそれぞれ選択した。イオン検出モードにおける各パラメータ値についても、化合物ごとに最適化した。

LC 条件は、いずれの化合物についても ODS で十分保持が可能であることを確認し、生体試料中の夾雑物の影響を避けるために十分な分離が得られるよう検討した。結果、Diltiazem および Nifedipine の分離は、Shim-pack XR-ODS, 3.0 mm I.D×75 mm L., 2.2  $\mu\text{m}$  (Shimadzu Corp.) を用い、移動相に 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液/アセトニトリル (30:70, v/v) を採用した。Nifedipine は同様の LC 条件においてヒト血漿由来と思われる夾雑物ピークの影響が認められたため、保持が大きくなるように移動相の組成を変更する検討を行ったが、完全な分離はできなかつたため、カラムスイッチング法を採用した。Nifedipine 測定のカラムスイッチングシステムを Fig. 3 に示す。

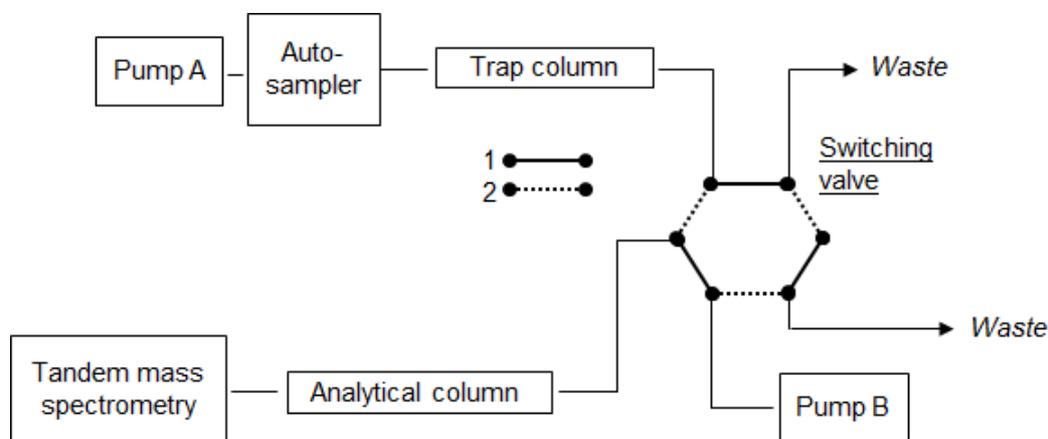


Fig. 3. Schematic representation of column switching (heart-cut) for measurement of nifedipine.

採用したカラムスイッチング法はハートカットと呼ばれる方式であり[52-54]、トラップカラムから溶出された目的成分のみを分析カラムに流すことで、夾雑物との分離を可能にする。トラップカラムと分析カラムの移動相組成の溶媒比率に差をつけることでピーク形状をシャープにさせる効果があり、クロマトグラムの S/N 比が向上し、結果として測定感度の上昇が期待される。検討の結果、トラップカラムに

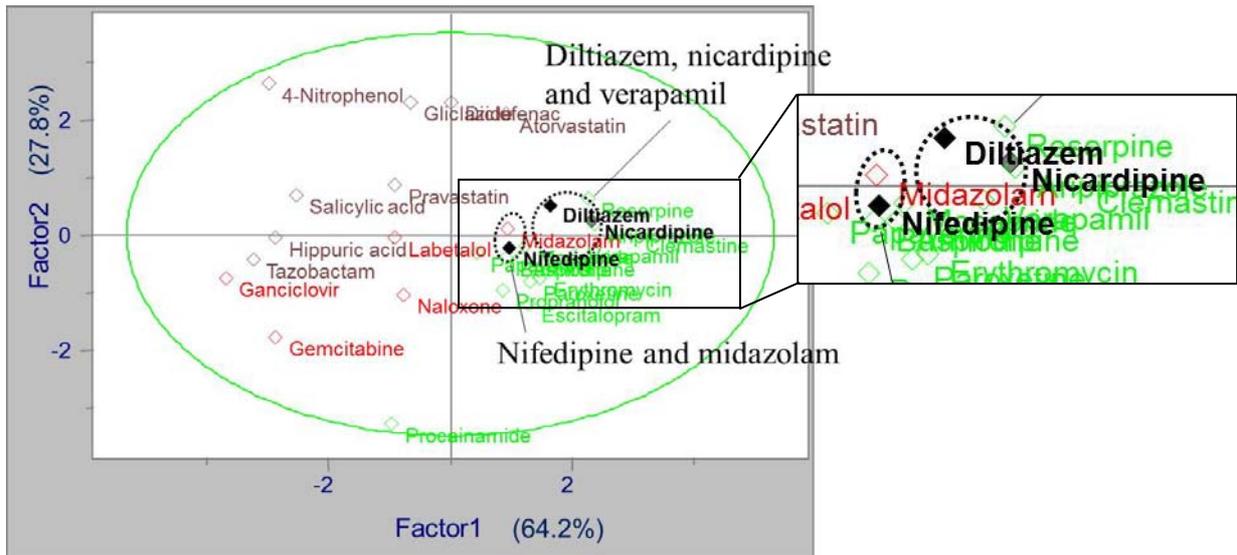
は CAPCELL PAK C18 UG 120, 2.0 mm I.D.×10 mm L., 5 μm (Shiseido Co., Ltd.) を用い、移動相はアセトニトリル/10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (3:7, v/v) とし、分析カラムには Shim-pack XR-ODS, 3.0 mm I.D.×75 mm L., 2.2 μm (Shimadzu Corp.) を用い、移動相はアセトニトリル/10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (7:3, v/v) を採用することで、分析時間 8 分というスループット性にも優れた分析法を確立した。一般的な臨床試験は測定するサンプル数が多いことから、分析時間の延長は臨床試験にかかる期間に影響し、開発期間の遅延にもつながる。そのため、分析法を開発する際に分析時間を考慮することはたいへん重要である。昨今の技術革新によって、高压対応の LC システムおよび LC カラムが開発されており、従来のセミマイクロ LC と比べ、流速を数倍高く設定した使用が可能なたため、測定スループットの向上にも大きく貢献している[55]。本研究を実施した当時 (2009 年)、高压対応の LC でカラムスイッチングが可能なシステムは開発されていなかったため、本研究では通常のセミマイクロカラムによる分析法を採用した。

### (3) 前処理法の検討

カルシウム拮抗薬 3 種のうち、Nicardipine は 1 章におけるシステムティック・アプローチ[19]において、エーテルによる LLE が有効であることが確認されていた。そこで、Nifedipine および Diltiazem について、酸性、中性および塩基性条件下の 3 つの保持時間を観察し、1 章において実施した PCA と同じモデルを用い、Nifedipine および Diltiazem が PCA スコア上でどこにプロットされるかを解析した。結果、得られた PCA スコアプロットを Fig. 4 に示す。PCA スコア上において、Diltiazem は Nicardipine の近くにプロットされたが、Nifedipine はわずかに離れた位置にプロットされ、それぞれの化合物の物性情報と合致すると思われる結果が得られた。前処理分類上、カルシウム拮抗薬 3 種は、LLE においてアルカリ抽出可能なカテゴリーに位置することが認められた。SPE では、3 種のカルシウム拮抗薬は同一カテゴリーではなかった。PCA スコアにおいて、Diltiazem および Nicardipine の近くにプロットされている化合物の中から、I.S.は Verapamil を採択した。同様に、Nifedipine の I.S.は Midazolam を採択した。このように、各化合物の保持時間が与える PCA プロットにより、測定対象物の最適な前処理法と同一条件で抽出可能な I.S.を探索することが可能であることが示唆された。検討の結果、3 種のカルシウム拮抗薬および 2 つの I.S.は、すべてジエチルエーテルにて抽出可能であることが明らかとなった。さらに選択性を上げるために、ジエチルエーテルにヘキサンを加え、ジエチルエーテル/ヘキサン (3:1, v/v) を抽出溶媒に決定した。

以上のように、3 種のカルシウム拮抗薬の LC/MS 測定および前処理法について検討した。結果、Nifedipine で 2 pg/mL、Nicardipine で 1 pg/mL、Diltiazem で 0.2 pg/mL を LLOQ とする超高感度測定法が確立された。

(A)



(B)

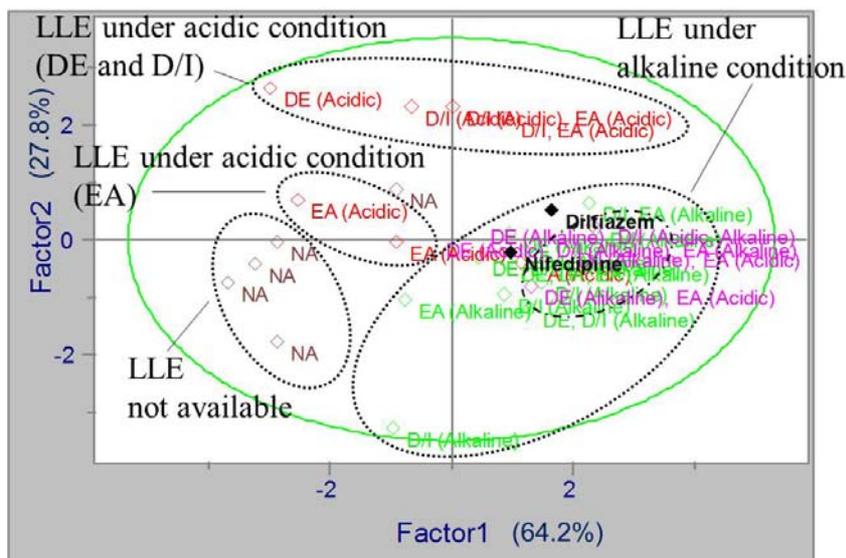
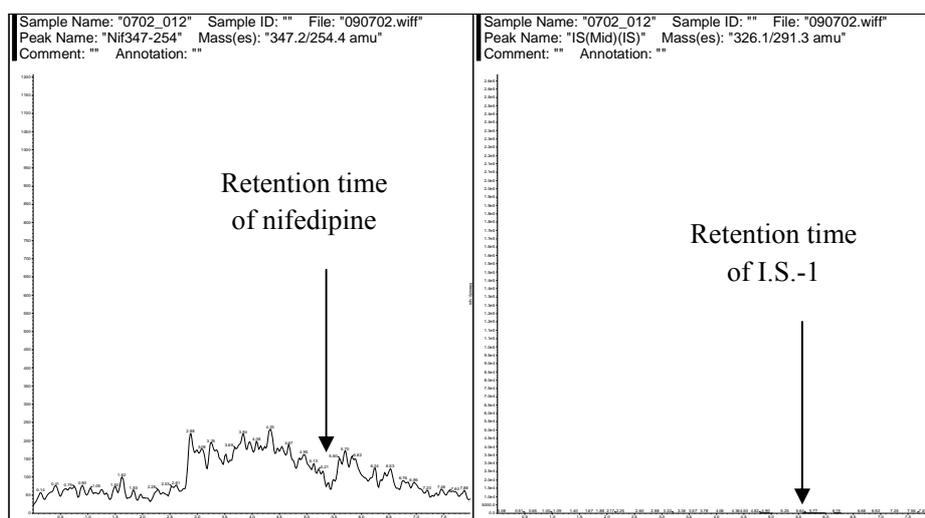


Fig. 4. PCA scores for prediction for nifedipine and diltiazem by RTs and RT variations; Compound name (A) and Pretreatment (B).

#### (4) 分析法バリデーション

Nifedipine、Nicardipine、Diltiazem、I.S.-1 および I.S.-2 の選択性において得られたクロマトグラムの一例を Fig. 5-1 および 5-2 に示す。6 個体のヒト血漿について、いずれの化合物においても、溶出位置に定量を妨害する夾雑ピークはなかった。

(A)



(B)

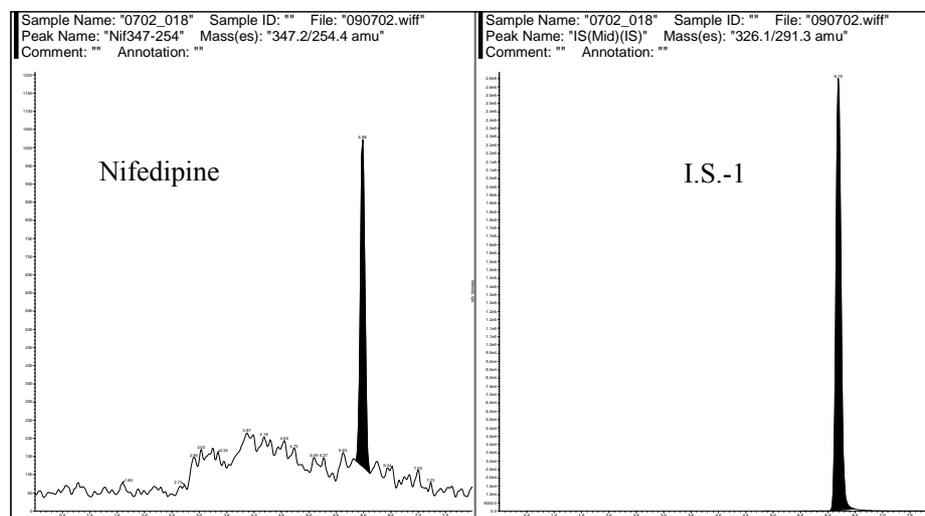
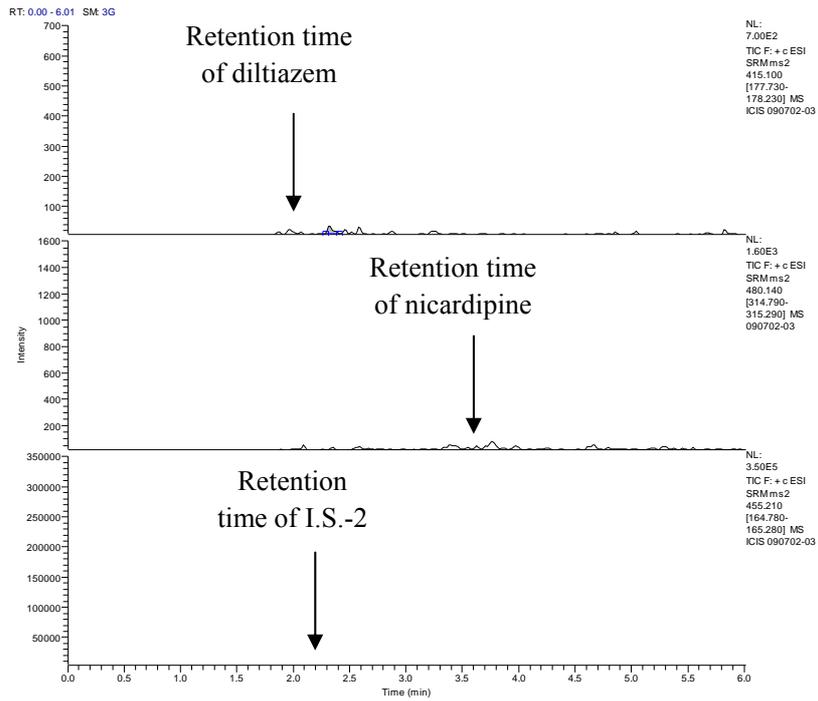


Fig. 5-1. SRM chromatograms of nifedipine and I.S.-1 (midazolam) for selectivity in blank human plasma (A) and LLOQ samples (2 pg/mL) (B).

(A)



(B)

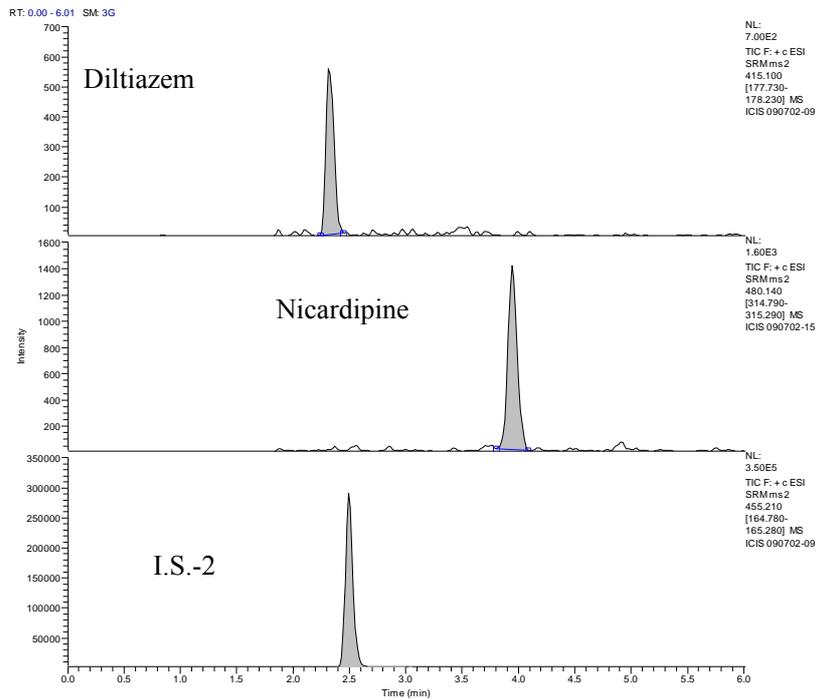


Fig. 5-2. SRM chromatograms of diltiazem, nicardipine and I.S.-2 (verapamil) for selectivity in blank human plasma (A) and LLOQ samples (diltiazem: 0.2 pg/mL, nicardipine: 1 pg/mL) (B).

添加検量線の直線性および定量範囲について、得られた結果を Table 5 に示す。添加検量線試料の測定で得られたピーク面積比 (Nifedipine のピーク面積値 / I.S.-1 のピーク面積値、Nicardipine または Diltiazem のピーク面積値 / I.S.-2 のピーク面積値) を Y、添加濃度を X とし、最小二乗法により一次回帰式 ( $Y = aX + b$ , 重み ; Nifedipine および Diltiazem  $1/X^2$ , Nicardipine  $1/X$ ) を算出した。その他の添加試料についてもピーク面積比を求め、上記の回帰式に代入して定量値を算出した。Nifedipine、Nicardipine、Diltiazem の相関係数はいずれも 0.9900 以上であり、算出した回帰式に各ポイントのピーク面積比を代入して得られた Nifedipine、Nicardipine、Diltiazem の定量値の真度は、各 LLOQ で  $\pm 20.0\%$  以内、各 ULOQ で  $\pm 15.0\%$  以内およびその他の濃度で  $\pm 15.0\%$  以内であった。これらの結果はいずれも判定基準を満たすものであり、Nifedipine は 2 ~ 300 pg/mL、Nicardipine は 1 ~ 200 pg/mL、Diltiazem は 0.2 ~ 200 pg/mL の定量範囲で良好な直線性を示すと判定した。

Table 5. The standard curve for three Ca-channel blockers.

- Nifedipine		- Nicardipine		- Diltiazem	
Nominal conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Nominal conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Nominal conc. (pg/mL)	Accuracy (%)
2.000	0.0	1.000	7.7	0.2000	-0.2
5.000	-2.4	2.000	-0.8	0.5000	1.0
10.00	2.0	5.000	-1.3	1.000	1.0
20.00	-0.4	10.00	-6.5	2.000	-2.3
50.00	8.0	20.00	0.2	5.000	-1.0
100.0	-8.2	50.00	5.3	10.00	-4.4
200.0	4.0	100.0	-7.0	20.00	-2.3
300.0	-3.1	200.0	2.5	50.00	2.9
				100.0	-4.4
				200.0	9.6

同時再現性 (日内変動) および日差再現性 (日間変動) について、得られた結果を Table 6 に示す。いずれの化合物についても判定基準を満たすものであり、ヒト血漿中の Nifedipine、Nicardipine および Diltiazem の濃度を良好な再現性で測定可能であると判定した。希釈妥当性における Nifedipine の精度は 0.3 ~ 2.3%、真度は -2.8 ~ -0.3%、Nicardipine の精度は 3.0 ~ 7.6%、真度は -5.3 ~ 2.6%、Diltiazem の精度は 0.4 ~ 7.3%、真度は -5.5 ~ -1.3% であった。これらの結果から、いずれの化合物についても、10 倍、100 倍、1,000 倍および 10,000 倍に希釈したときの精度および真度は判定基準を満たすものであり、ヒト血漿による 10,000 倍までの希釈定量の妥当性が保

証された。

安定性試験について、得られた結果を Table 7 に示す。いずれの安定性試験においても、結果は判定基準を満たすものであり、ヒト血漿中の Nifedipine、Nicardipine および Diltiazem は、室温保存で 24 時間は安定であり、 $-20^{\circ}\text{C}$ における凍結保存でも 2 ヶ月間 (62 日間) は安定であり、 $-20^{\circ}\text{C}$ において凍結保存した後、凍結融解操作を 3 回繰り返しても安定であると判定した。前処理後の注入試料中において Nifedipine および Nicardipine は、 $4^{\circ}\text{C}$ 設定のオートサンプラー内で 72 時間、Diltiazem は同様に 36 時間安定であると判定した。標準溶液および I.S.溶液の安定性における Nifedipine、Nicardipine および Diltiazem の変化率は、室温 24 時間保存後で $-14.7\sim-8.9\%$ 、 $-14.9\sim-8.1\%$ および $-7.6\sim-3.5\%$ 、冷蔵 24 時間保存後で $-8.4\sim-7.3\%$ 、 $-8.8\sim-3.2\%$ および $-9.1\sim-0.1\%$ であった。 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存 1 週間 (9 日間) 保存後で $1.4\sim-8.6\%$ 、 $-6.9\sim-10.2\%$ および $-10.0\sim-7.5\%$ 、2 週間 (14 日間) 保存後で $-5.3\sim-11.7\%$ 、 $-12.8\sim-13.9\%$ および $-6.4\sim-9.8\%$ 、1 ヶ月間 (38 日間) 保存後で $-4.6\sim-4.2\%$ 、 $-6.3\sim-0.8\%$ および $10.8\sim-12.5\%$ 、2 ヶ月間 (67 日間) 保存後で $-4.9\sim-0.6\%$ 、 $-6.9\sim-3.2\%$ および $-8.9\sim-6.4\%$ であった。I.S.-1 および I.S.-2 の変化率は、 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存において 1 ヶ月間 (37 日間) 保存後で $4.6\%$ および $0.2\%$ 、2 ヶ月間 (66 日間) 保存後で $-2.0\%$ および $6.2\%$ であった。いずれの結果についても、判定基準を満たすものであり、Nifedipine、Nicardipine および Diltiazem 標準溶液は室温および冷蔵保存条件で 24 時間、 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存条件で 2 ヶ月間 (67 日間) 安定であり、I.S.溶液においても $-20^{\circ}\text{C}$ 保存条件で 2 ヶ月間 (66 日間) 安定であると判定した。

Table 6. Intra- and inter-day reproducibility of three Ca-channel blockers.

Compound Name	Intra-day reproducibility (n=5)				Inter-day reproducibility (n=5)		
	Nominal conc. (pg/mL)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Nifedipine	2.000	2.063	5.5	3.2	1.889	5.2	-5.5
	5.000	4.769	3.6	-4.6	4.671	7.2	-6.6
	20.00	20.26	3.4	1.3	19.44	6.0	-2.8
	300.0	304.0	3.3	1.3	292.4	3.7	-2.5
Nicardipine	1.000	0.9171	3.9	-8.3	0.9931	15.0	-0.7
	2.000	2.101	4.3	5.0	2.005	7.0	0.3
	20.00	20.81	2.8	4.0	20.05	3.2	0.2
	200.0	207.2	5.2	3.6	188.7	8.2	-5.7
Diltiazem	0.2000	0.1915	8.4	-4.3	0.1942	8.3	-2.9
	1.000	0.9751	4.3	-2.5	0.9154	10.8	-8.5
	20.00	20.53	4.2	2.6	19.26	3.0	-3.7
	200.0	200.6	3.6	0.3	188.3	3.4	-5.8

Table 7. Stability tests for three Ca-channel blockers.

Nifedipine	Room temp. in plasma for 24 hr		Storage at -20°C for 2 months (62 days)		Freeze–thaw (3 times)		Stability at 4°C in injection sample for 72 hr	
	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)
5.000	4.794	-4.1	4.641	-7.2	4.672	-6.6	5.113	2.3
240.0	247.9	3.3	220.0	-8.3	235.3	-2.0	260.2	8.4

Nicardipin	Room temp. in plasma for 24 hr		Storage at -20°C for 2 months (62 days)		Freeze–thaw (3 times)		Stability at 4°C in injection sample for 72 hr	
	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)
2.000	1.745	-12.8	1.821	-8.9	2.188	9.4	1.751	-12.4
160.0	150.2	-6.1	148.6	-7.1	159.5	-0.3	149.6	-6.5

Diltiazem	Room temp. in plasma for 24 hr		Storage at -20°C for 2 months (62 days)		Freeze–thaw (3 times)		Stability at 4°C in injection sample for 36 hr	
	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Accuracy (%)
1.000	0.8624	-13.8	0.8514	-14.9	0.8712	-12.9	0.9690	-3.1
160.0	147.1	-8.0	140.8	-12.0	152.3	-4.8	145.6	-9.0

#### (5) マイクロドーズおよび臨床用量における薬物動態試験

被験者 8 名の健常人男性について、それぞれ I～V 期の臨床試験を実施し、カルシウム拮抗薬 3 種のカセット投与および投与後の採血を実施した。すべての被験者について有害事象等はなく、ヒト血漿検体を得た。被験者の年齢は 21～32 歳であり、BMI 値は 18.2～26.1 kg/m<sup>2</sup> であった。各化合物の正確な投与量は、投与液の濃度測定を実施し補正することで算出した。補正後の投与量は、MD の経口投与において Nifedipine で 40.3 μg、Nicardipine で 28.5 μg および Diltiazem で 26.4 μg であり、静脈投与において Nifedipine で 43.0 μg、Nicardipine で 25.8 μg および Diltiazem で 28.4 μg であった。すべてのヒト血漿検体について、本研究にて確立された測定法を用いて検体測定を実施した。添加検量線濃度範囲を超えることが予測された検体は、予めヒト血漿で希釈した後、前処理および測定を行った。希釈過多により添加検量線濃度範囲から外れた場合や、妨害ピークの影響により測定値が得られなかった場合および品質管理基準を外れた場合は、対象となる検体について再測定を実施した。再測定を実施した検体は、添加検量線濃度範囲の定量値が得られていること、並びに品質管理基準が満たされていることを確認し、再測定値を採用した。すべての検体について、バリデーション試験にて安定性が保証される条件内（-20℃保存下 62 日以内および凍結融解 3 回以内）で前処理および測定を行い、定量値を得た。クロマトグラムの一例を Fig. 6-1 および 6-2 に示す。得られた定量値から薬物動態パラメータを算出した。薬物動態パラメータの算出には、投与後の補正時間を用いた。

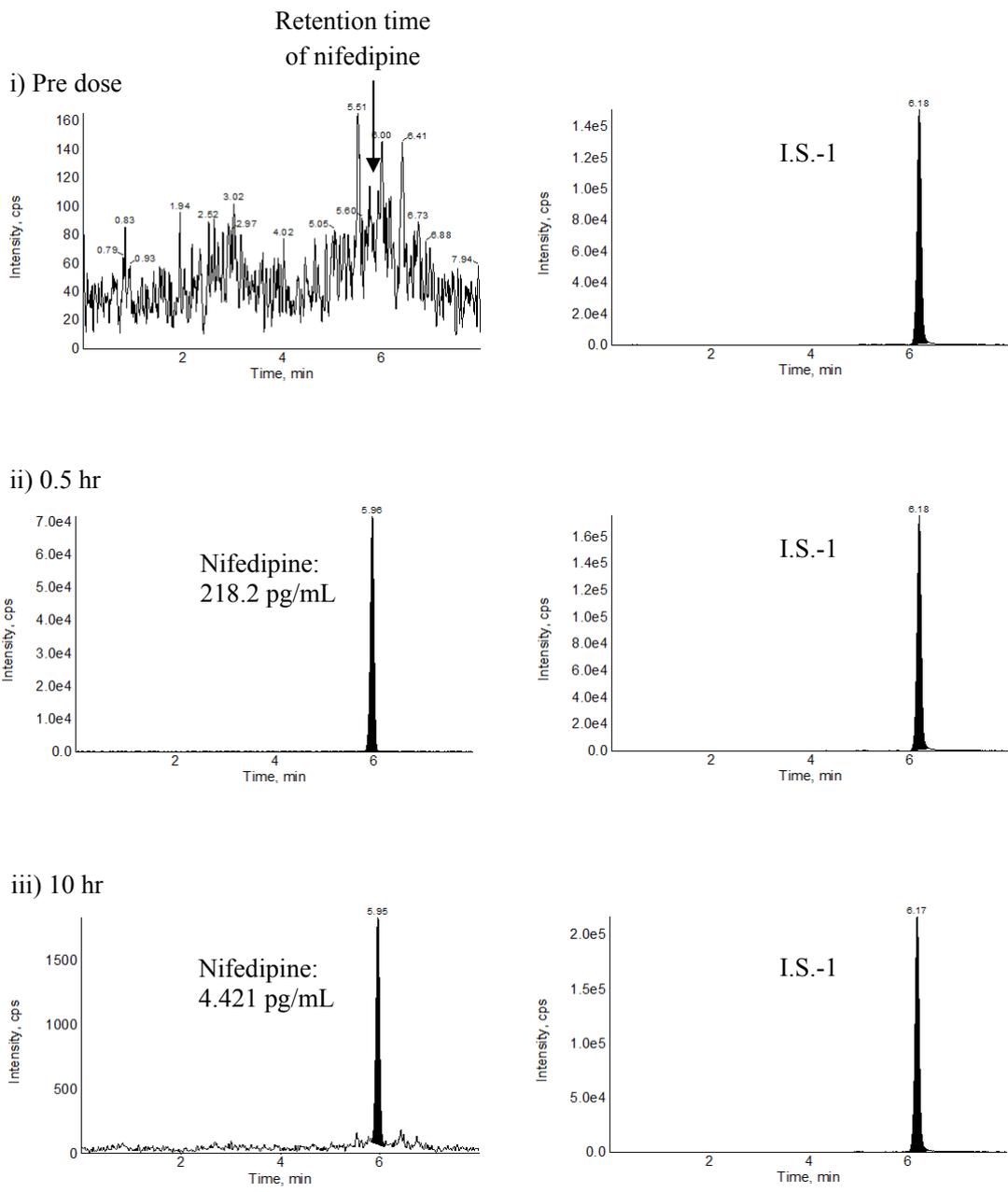
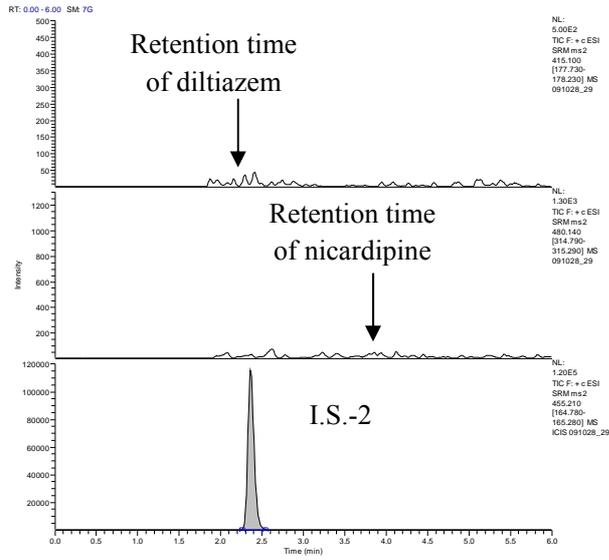
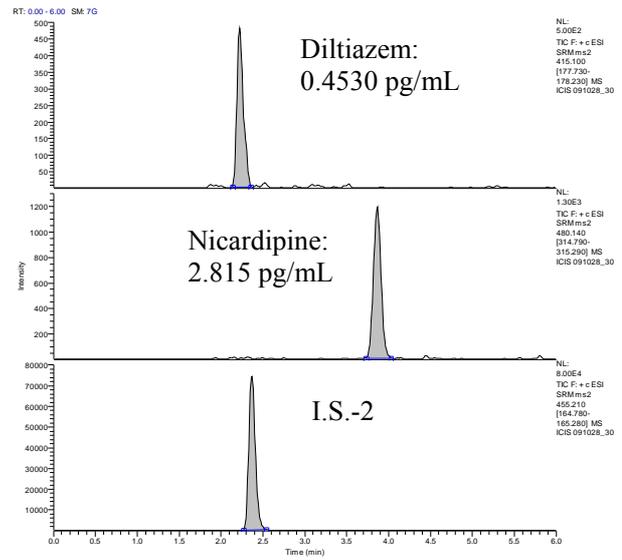


Fig. 6-1. SRM chromatograms of nifedipine and I.S.-1 (midazolam) for subject (No. 2) in the microdose clinical study (p.o.) (pre dose, 0.5 hr and 10 hr after microdosing).

i) Pre dose



ii) 0.25 hr



iii) 1.5 hr

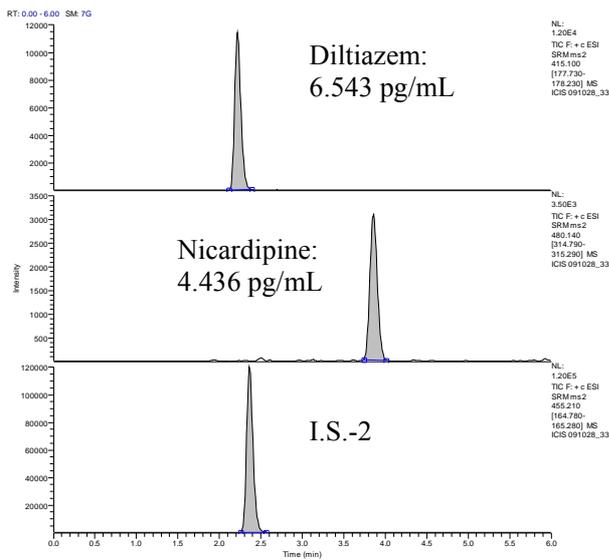
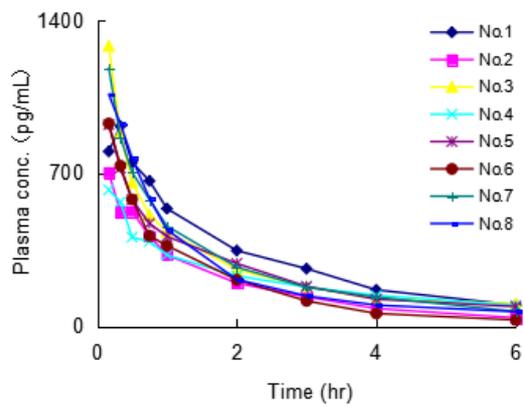


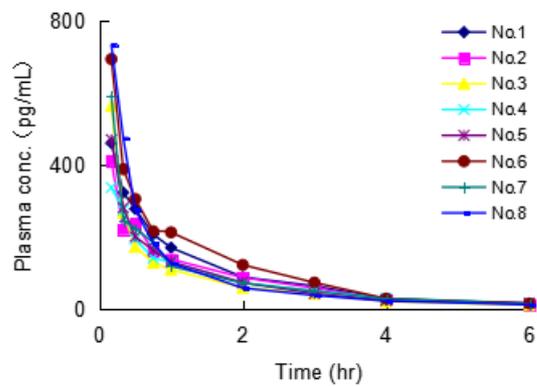
Fig. 6-2. SRM chromatograms of nicardipine, diltiazem, and I.S.-2 (verapamil) for subject (No.3) in the microdose clinical study (p.o.) (pre dose, 0.25 hr and 1.5 hr after microdosing).

各薬物を MD で静脈内投与した後の各被験者における血漿中濃度推移を Fig. 7 に示す。それぞれの血漿濃度推移から算出した動態パラメータの平均値を Table 8 にまとめた。いずれの薬物においても、静脈内投与後の血漿中濃度推移の個体間変動は比較的小さく、MD レベルの投与量においても、ヒトにおけるクリアランスや分布容積等の基本的な動態パラメータが算出可能であることが確認された。本研究で用いた薬物間で動態パラメータを比較すると、全身クリアランス ( $CL_{tot}$ ) は Nifedipine が最も小さく、Nicardipine、Diltiazem の順に大きかった。Diltiazem は他の薬物に比べて分布容積が大きかった。

(A) Nifedipine



(B) Nicardipine



(C) Diltiazem

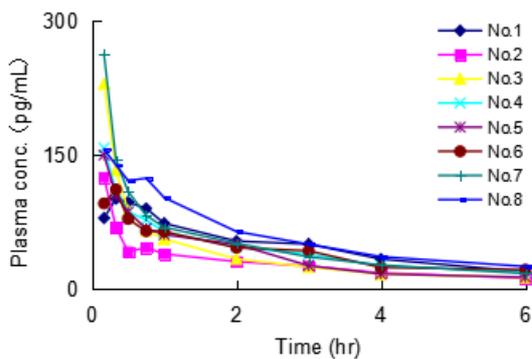


Fig. 7. Plasma concentration profiles of three Ca-channel blockers after i.v. injection in the microdose clinical study.

Table 8. Pharmacokinetic parameters of three Ca-channel blockers after i.v. injection in the microdose studies.

	Nifedipine	Nicardipine	Diltiazem
CL <sub>tot</sub> (L/h)	26.7 ± 6.5	51.5 ± 5.5	91.9 ± 22.0
V <sub>dss</sub> (L)	60.1 ± 13.9	81.3 ± 18.7	299.6 ± 78.8
t <sub>1/2</sub> (h)	2.1 ± 0.6	1.4 ± 0.2	2.6 ± 0.4

Values are expressed as the mean ± SD of 8 subjects.

次に、MD および ThD で経口投与した後の各薬物の血漿中濃度推移を Fig. 8-1～8-3 に示す。Table 9 には血中濃度推移から算出した各薬物静脈および経口投与後の平均体内滞留時間 (MRT<sub>i.v.</sub>, MRT<sub>po.</sub>) を、Table 10 にはそれぞれの薬物の血中暴露を比較するため、血漿中濃度の AUC を投与量で規格化した値、および静脈内投与時の AUC の比として算出した BA をまとめた。経口投与後の血漿中濃度推移を比較すると、Nifedipine の最高血中濃度到達時間 (T<sub>max</sub>) はいずれの投与量でも投与後 1 時間付近とほぼ同じであったのに対し、Nicardipine と Diltiazem の T<sub>max</sub> は、MD と ThD において大きな違いが見られた。Nifedipine は腸管膜での透過性が高く、いずれの投与量においても速やかに吸収されたため、両者による差は少なかったと推察される。一方、Nicardipine と Diltiazem は ThD 投与後の T<sub>max</sub> が投与後 1 時間付近であったのに対し、MD においては濃度推移がブロードであり、T<sub>max</sub> に遅れの傾向が見られた。とくに Nicardipine においては、明確な濃度ピークが認められず、C<sub>max</sub> が得られなかった被験者もあった。この現象は Table 9 において、経口投与後の MRT<sub>po.</sub> の違いとしても認められた。MRT とは薬物分子が平均してどのくらいの時間体内に存在していたかを表すパラメータであり、静脈投与後の MRT<sub>i.v.</sub> は体内からの消失に要した時間を、経口投与後の MRT<sub>po.</sub> は吸収に要した時間と体内からの消失に要した時間の和を表す。すなわち、Table 9 において Nicardipine と Diltiazem の MRT<sub>po.</sub> は、ThD において MD よりも大きく、この差が吸収に要した時間の違いを反映している。MD において、Nicardipine と Diltiazem の吸収に遅れが観察された原因は、明確には特定できないものの、小腸における CYP3A4 の活性の部位差に起因する現象と考えることが出来る。ヒト小腸では CYP3A4 による代謝活性は上部で高く、下部にいくにしたがって低くなることが報告されている[56]。Diltiazem、Nicardipine は CYP3A4 によって、小腸において初回通過代謝を受けることが知られており、MD では、小腸上部で吸収された薬物のほとんどが代謝された結果、主として小腸下部において吸収されたものが全身循環に入ったため、血中濃度推移に遅れが観察されたものと推察される。一方、ThD では、小腸上部で大量に吸収された薬物によって CYP3A4 が飽和され、Diltiazem、Nicardipine とも全身循環血中に速やかに移行したと推察される。

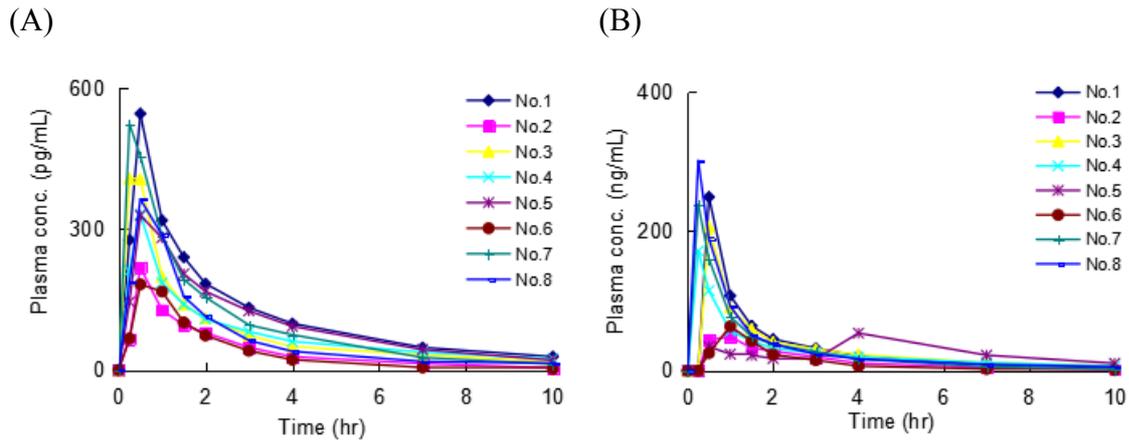


Fig. 8-1. Plasma concentration profiles of nifedipine after p.o. administration in the microdose (A) and therapeutic dose (B) clinical studies.

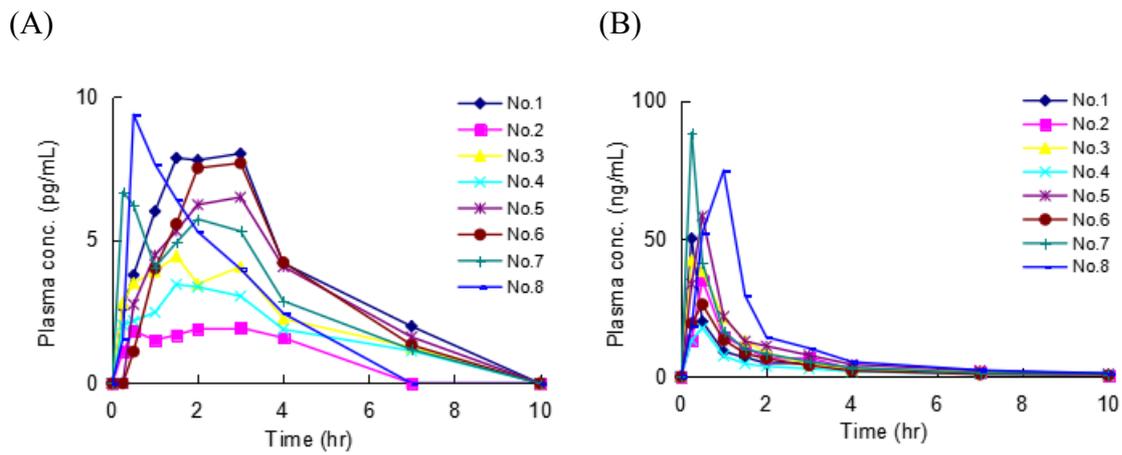


Fig. 8-2. Plasma concentration profiles of nicardipine after p.o. administration in the microdose (A) and therapeutic dose (B) clinical studies.

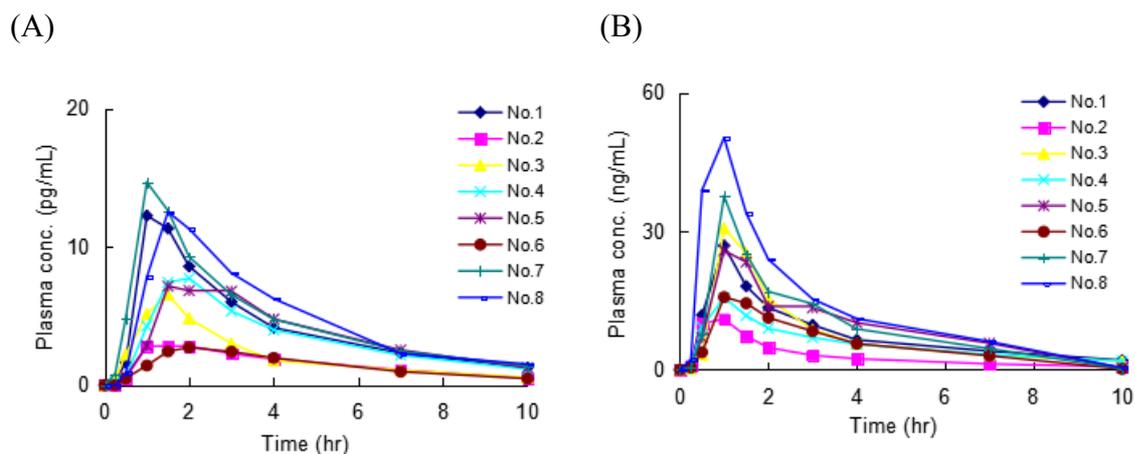


Fig. 8-3. Plasma concentration profiles of diltiazem after p.o. administration in the microdose (A) and therapeutic dose (B) clinical studies.

Table 9. Mean residence time (MRT) of three Ca-channel blockers in the microdose (i.v. and p.o.) and therapeutic dose (p.o.) clinical studies.

	Nifedipine	Nicardipine	Diltiazem
Microdose (MD)			
MRT <sub>i.v.</sub>	2.69 ± 0.76	1.56 ± 0.20	3.22 ± 0.50
MRT <sub>p.o.</sub>	3.49 ± 0.98 <sup>1)</sup>	4.40 ± 1.27 <sup>***2)</sup>	5.09 ± 0.38 <sup>***2)</sup>
Therapeutic dose (ThD)			
MRT <sub>p.o.</sub>	3.35 ± 1.14	2.52 ± 0.28	3.85 ± 0.89

Values are expressed as the mean ± SD of 8 subjects.

1) Not significantly different from the ThD study.

2) \*\*\* p<0.005, significantly different from the ThD study.

Table 10. Dose normalized AUC and bioavailability of three Ca-channel blockers after p.o. administration in the microdose and therapeutic dose clinical studies.

	Nifedipine	Nicardipine	Diltiazem
Microdose (MD)			
AUC <sub>p.o.</sub> /dose (hr*ng/L/μg)	21.3 ± 8.0 <sup>*1)</sup>	0.98 ± 0.26 <sup>**1)</sup>	1.38 ± 0.59 <sup>**1)</sup>
Bioavailability (%)	52.6 ± 11.6	4.97 ± 1.19	11.9 ± 4.0
Therapeutic dose (ThD)			
AUC <sub>p.o.</sub> /dose (hr*ng/L/μg)	27.6 ± 9.4	2.20 ± 0.95	2.64 ± 0.99
Bioavailability (%) <sup>2)</sup>	(68.7 ± 15.1)	(11.3 ± 4.8)	(22.9 ± 6.7)

Values are expressed as the mean ± SD of 8 subjects.

1) \* p<0.05, \*\* p<0.005, significantly different from the ThD study.

2) Bioavailability in the ThD study was calculated using the AUC<sub>I.V.</sub> values at MD IV study.

Table 10 において、MD で経口投与した場合の BA は Nifedipine が 52.6% と 3 剤中もっとも高い値を示し、Diltiazem は 11.9%、Nicardipine は 4.97% ともっとも低い値を示した。これらの結果をすでに報告されている ThD での BA データと比較すると、Nifedipine においては、50% (40~77%) [42, 57] とほぼ同等の値であることが確認された。一方、Diltiazem においては、平均値で 42% (24~72%) [58]、Nicardipine では、10~40 mg 投与について 6.5~30.3% との報告があり [48, 51]、Nicardipine および Diltiazem について、今回 MD から得られた BA はこれら ThD と比べ、かなり低い値を示していることが確認された。さらに、本研究にて得られた ThD での結果 (AUC<sub>p.o.</sub>) について、MD 静脈投与時の AUC<sub>I.V.</sub> を用いて BA を算出した結果、同様に Nicardipine および Diltiazem において、ThD 時の BA が MD 時に比べて約 2 倍程度高くなることが明らかとなった。以上の結果は、Nicardipine および Diltiazem では、経口投与後の吸収率が投与量に依存して高くなることを示唆しており、両薬物の吸収過程に正の非線形を示す過程が存在しているものと推察された。

本研究において MD および ThD から得られた経口投与時 AUC (AUC<sub>p.o.</sub>) を投与量補正した値とそれぞれの BA について、すべての被験者での値を比較したグラフを Fig. 9 に示す。二つの投与量間での差は Nifedipine がもっとも小さく、MD に比べて ThD での AUC は 1.3 倍であった。これに対し、Nicardipine は 2.2 倍、Diltiazem は 1.9 倍の差が認められ、すべての被験者で非線形性が確認された。

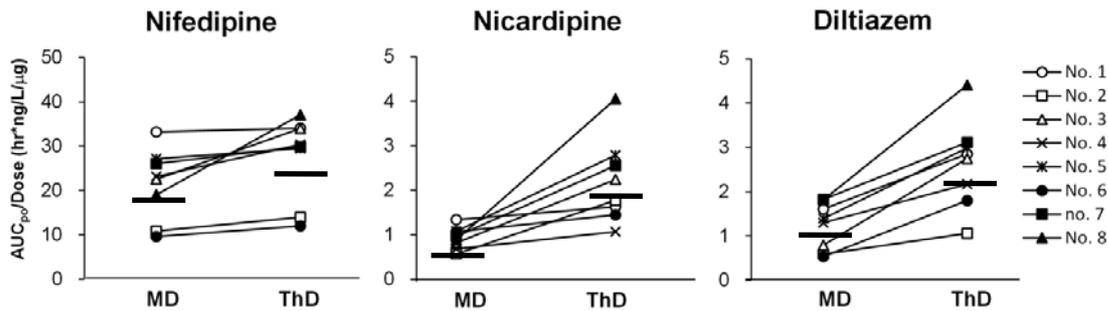


Fig. 9. Dose-dependency in systemic exposure of three Ca-channel blockers after oral administration in the microdose and therapeutic dose clinical studies.

本研究で用いた 3 種のカルシウム拮抗薬は、主に代謝によって体内から消失し、チトクローム P450 の CYP3A4 が主代謝酵素である。Nicardipine および Diltiazem において、経口投与後の体内動態に正の非線形性が得られた主な原因としては、以下の 2 点が推察される。①ThD において、肝代謝の飽和による全身クリアランスが低下した、②小腸または肝における初回通過代謝の飽和により、BA が上昇した。Nicardipine は、ThD の範囲内でも経口投与後の吸収に非線形性が認められることが報告されている[48, 51]。ThD における  $CL_{tot}$  は、1 kg 当たり 8~9 mL/min との報告があり[51]、これを 60 kg に換算すると約 30 L/h となり、本研究の静脈投与 (MD) において得られた  $CL_{tot}$  の方が 1.7 倍高い値であった。Diltiazem についても、その  $CL_{tot}$  は、1 kg 当たり  $11.5 \pm 0.7$  mL/min [59] および  $1.28 \pm 0.48$  L/h [58] との報告があり、それぞれ 60 kg に換算すると、約 42 および 77 L/h であった。これら報告値の違いは、日本人と欧米人の人種間による CYP 活性の違いが影響していると推察されるが、本試験での MD 静脈投与において得られた値は、それよりもさらに 1.2 倍程度高い値であった。したがって、Nicardipine、Diltiazem とともに MD での代謝クリアランスが ThD 投与時に比べて高く、AUC が小さくなった可能性が示唆される。一方、経口投与後の BA は、Nicardipine で MD に比べて ThD で 2.2 倍、Diltiazem では 1.9 倍と、全身クリアランスの差よりも大きな違いを示したことから、吸収過程における非線形性の可能性も推察される。その原因としては、ThD では消化管内の薬物濃度が MD に比べて顕著に高くなるため、主として小腸における初回通過代謝が飽和したことによって、全身循環血中への吸収量が投与量依存的に上昇した可能性が挙げられる。

以上、今回実施した MD 臨床試験において、3 つのモデル化合物のうち Nifedipine は経口投与後もっとも高い BA を示し、血中濃度の時間推移および BA の個人間変動も小さかった。したがって、Nifedipine は経口剤としてもっともよい動態特性を持った化合物であると判断することが妥当と推察される。今回の検討では、ThD での試験も実施したためその比較から投与量に依存した非線形動態等に関してもより多くの考察をすることが可能であった。しかしながら、実際の医薬品開発過程で

実施される MD 臨床試験では、得られる結果は MD のみでの動態特性であるため、限られたデータからいかにベストな候補化合物を選択するかが重要となる。その場合、各化合物について、代謝活性や膜透過性などを *in vitro* で測定し、それらデータとの組み合わせによる総合的な判断が必要であると推察される。

#### 4. まとめ

本研究では、前処理法を効率的に検討するためのシステマティック・アプローチによって、MD カセット投与臨床試験の測定を可能とする超高感度・超高精度測定法を確立した。モデル化合物として、3 種のカルシウム拮抗薬 (Nifedipine, Nicardipine および Diltiazem) の溶液投与による MD カセット投与臨床試験を実施し、確立した測定法により血中濃度を得た。得られた定量値からの薬物動態パラメータを算出し、各化合物について評価した。よって、本研究は、MD カセット投与臨床試験において、複数化合物の同時評価についての可能性を示唆するとともに、その化合物評価手法、並びに有用性について明らかにした。

### 第3章 マイクロドーズ臨床試験における製剤化検討

#### 1. 諸言

通常の MD 臨床試験では、医薬品の製剤化検討は考慮しないため、溶液による投与が一般的である[20, 60, 61]。投与量も微量であることから、溶媒への溶解性は問題になり難い。しかしながら、溶液による経口投与を実施する際、胃酸に対して不安定な薬物の場合には、投与後の吸収性や体内動態を観察することは困難となる。徐放製剤化によって血中濃度を長時間維持することで、より有効な臨床応用の可能性がある場合には、その効果をなるべく早い段階で確認する方法論が必要となる。そこで、本章においては、MD 臨床試験における製剤化の効果を検討する手法の構築を試みた。モデル化合物として Erythromycin および Simvastatin を選択した。Erythromycin は胃酸で容易に分解されるため[62]、市販のシロップ剤や顆粒剤では、エステル体のプロドラッグとして投与することで吸収率を上げる工夫が施されている。一方、Simvastatin は徐放剤化することで吸収をコントロールし、AUC を増大させた報告がある[63]。

本研究においては、MD の Erythromycin の腸溶性製剤および Simvastatin の徐放性製剤の MD 製剤をそれぞれ調製し、溶液投与および MD 製剤の MD 臨床試験を実施し、それぞれの製剤化による効果について検討した。

#### 2. 方法

##### (1) 試薬

Erythromycin および Simvastatin の Good Manufacturing Practice (GMP) 原末は沢井製薬株式会社 (Osaka, Japan)、東和薬品株式会社 (Osaka, Japan) よりそれぞれ入手した。リン酸水素カルシウム (日本薬局方) は、太平化学産業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。バレイショデンプン (日本薬局方) は小堺製薬株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。乳糖水和物 (日本薬局方外医薬品規格) は DFE Pharma (Goch, Germany) より購入した。アラビアゴム末 (日本薬局方) は三星製薬株式会社 (Nara, Japan) より購入した。寒梅粉 (医薬品添加物規格) は株式会社麻生圓兵衛商店 (Toyama, Japan) より購入した。クエン酸トリエチル (日本薬局方) は森村商事株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。タルク (日本薬局方) は松村産業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。オイドラギット L30D-55、オイドラギット L100 およびオイドラギット S100 は Evonik Industries AG (Essen, Germany) より購入した。溶出試験第1液 (JP1) および溶出試験第2液 (JP2) はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) より購入した。

LC/MS/MS 測定用の Simvastatin および Erythromycin A (以下、Erythromycin) は和光純薬工業株式会社より購入した。LC/MS/MS 測定時の I. S.として、Lovastatin は Toronto Research Chemicals Inc.、Erythromycin B は U.S.P. Reference Standards を購入した。アセトニトリル、酢酸エチルおよび *t*-ブチルメチルエーテル (いずれも高速液体クロマトグラフ用)、酢酸アンモニウム (試薬特級)、0.1 mol/L 水酸化ナトリ

ウム溶液（容量分析用）、フタル酸塩 pH 標準液（pH 4.01）（JCSS）および 40%メチルアミン溶液は和光純薬工業株式会社より購入した。添加検量線試料、ゼロ試料および QC 試料の調製に用いるヒト血漿（抗凝固剤：ヘパリンナトリウム）は株式会社ケー・イー・シーより購入した。濾過フィルター Ultra free-MC (0.22 μm) は Millipore Corp.より購入した。

Simvastatin、Erythromycin A、Lovastatin（Simvastatin 測定用 I.S., I.S.-1）および Erythromycin B（Erythromycin 測定用 I.S., I.S.-2）の構造式を Fig. 10 に示す。

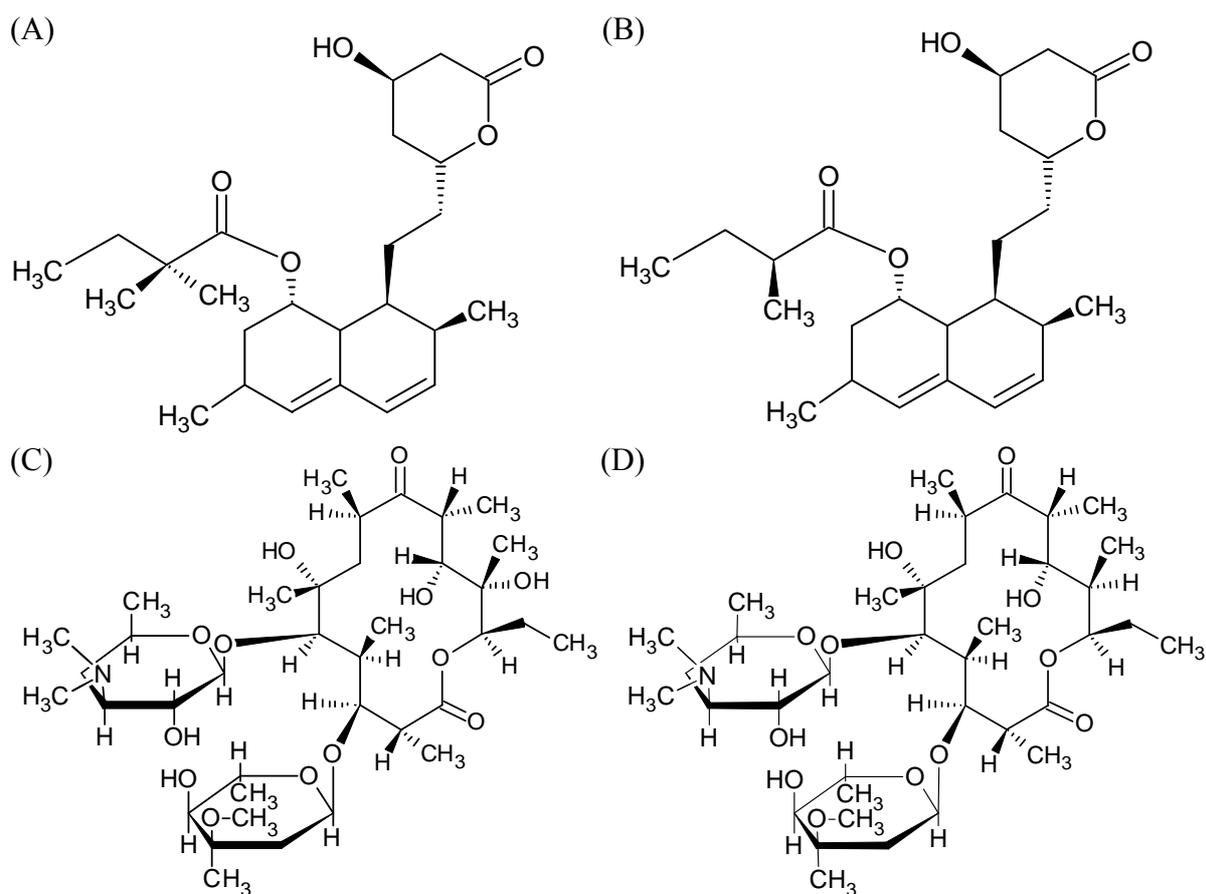


Fig. 10. Structures of simvastatin (A), lovastatin, (B), erythromycin A (C) and erythromycin B (D).

## (2) マイクロドーズ臨床試験用製剤の調製

Erythromycin および Simvastatin の GMP 原末は沢井製薬株式会社、東和薬品株式会社より入手したものを扱い、株式会社廣貫堂（Toyama, Japan）にて GMP 基準を遵守し MD 臨床試験用製剤（MD 製剤）を調製した。MD 製剤の賦形剤として、リン酸水素カルシウム、バレイショデンプンおよび乳糖水和物を用い、結合剤として、アラビアゴム末および寒梅粉を用いた。有効成分を賦形剤および結合剤の寒梅粉を用いて倍散し、それらを混合した後、精製水に溶解した結合剤のアラビアゴム末と

練合したものを製丸機によって製丸した。この製丸を乾燥した後に、それぞれのコーティングを施したものを MD 製剤とした。製剤の表面コーティング剤には、メタクリル酸コポリマーのオイドラギットを採用した。Erythromycin 腸溶剤には、pH 5.5 以上で溶解するオイドラギット L30D-55 を用いた。一方、Simvastatin 徐放剤には、pH 6 以上で溶解するオイドラギット L10 と pH 7 以上で溶解するオイドラギット S100 の二種を混合し、pH 6.5 以上で溶解する製剤を調製した。

含量均一性試験は、製丸した MD 製剤 30 個のうちから無作為に取り出した 10 個について、含量を定量した。判定は、第十五改正日本薬局方の含量均一性試験の判定式（式 1）に基づいて実施した。

$$\text{判定値} = |M - X| + ks \quad (\text{式 1})$$

判定係数  $k$  は、本研究実施当時、第十五改正日本薬局方にて規定されていた 2.2 ( $n=10$ ) とし、含有率 ( $M$ ) は 100% として、実際の含有率の平均値 ( $X$ ) および標準偏差 ( $s$ ) から判定値を算出した。判定値が 15% を超えないときに適合とした。

溶出試験は、溶出試験機 NTR-6200A（富山産業株式会社、Osaka, Japan）を用い、第十五改正日本薬局方の回転バスケット法に準拠して実施した。溶出試験第 1 液（JP1）および溶出試験第 2 液（JP2）を用い、回転数は、100 回転/分、温度は  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  とした。保存 24 時間後の MD 製剤 10 個を 1 つのベッセル内に投入し、経時的（5、10、15、30、45、60、90 および 120 分後）に溶出液を 2 mL 採取し、測定試料とし、LC-UV（Shimadzu Corp）にて測定した。

### (3) ヒト血漿中濃度測定法

Simvastatin および Erythromycin 5 mg をそれぞれ正確に量り、少量のアセトニトリルで溶解後、アセトニトリルで 20 mL とした（各 100  $\mu\text{g/mL}$ 、各標準原液）。各標準原液を用いて 50%アセトニトリル溶液で希釈し、0.1、0.125、0.25、0.5、1、1.5、5、10、25、40、45 および 50  $\text{ng/mL}$  の検量線試料用混合標準溶液を調製し、それとは別に、3、150 および 240  $\text{ng/mL}$  の QC 試料用混合標準溶液を調製した。Lovastatin および Erythromycin B をそれぞれ 2 mg 正確に量り、少量のアセトニトリルで溶解後、アセトニトリルで 20 mL とした（各 100  $\mu\text{g/mL}$ 、I.S.-1 原液および I.S.-2 原液）。各 I.S.原液を用いて 50%アセトニトリル溶液で希釈し、50  $\text{ng/mL}$  の混合 I.S.溶液を調製した。添加検量線試料はガラス製試験管にヒト血漿 0.5 mL を分取し、各濃度の検量線試料用混合標準溶液 10  $\mu\text{L}$  を添加し、十分に混和して 2、2.5、5、10、20、30、100、500、800、900 および 1,000  $\text{pg/mL}$  の濃度となるように調製した。ただし、ブランク試料およびゼロ試料は標準溶液に代えて 50%アセトニトリル溶液 10  $\mu\text{L}$  を添加して調製し、一次回帰式算出には使用しなかった。添加検量線試料は測定ごとに調製して使用した。QC 試料は PP 製チューブにヒト血漿 3 mL を分取し、各濃度の QC 試料用混合標準溶液 10  $\mu\text{L}$  を添加し、十分に混和して 2、2.5、10、30、500、

800 および 1,000 pg/mL の濃度となるように調製した。QC 試料は必要に応じて-80°C 設定の冷凍庫にて保存した。

MD 臨床試験から得られた投与後の血漿試料は、次の条件にて測定した。Simvastatin の測定装置は、高速液体クロマトグラフ UFLC システム [prominence] (Shimadzu Corp.) および質量分析計 API5000 (AB SCIEX) を用いた。LC 条件は、トラップカラムとして、Synergi 4u POLAR-RP 80A, 2.0 mm I.D.×50 mm L., 4 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) を用い、カラム温度は 40°C、移動相 A は、アセトニトリル/10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (6:4, v/v)、流量は 0.25 mL/min とした。分析カラムとして、SUMIPAX ODS Z-CLUE, 2.0 mm I.D.×50 mm L., 3 μm (株式会社住化分析センター, Osaka, Japan) を用い、カラム温度は 40°C、移動相 B は、アセトニトリル / (10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 / 40%メチルアミン (100:0.1, v/v)) (7:3, v/v)、流量は 0.2 mL/min とした。カラムスイッチングバルブを用いて、1.4~2.2 分においてトラップカラムと分析カラムを連結させるように設定した。注入量は 15 μL、オートサンプラー温度は 10°C とした。MS/MS 条件は、インターフェースとして、Turbo Ionspray (エレクトロスプレーイオン化法) を用い、イオンスプレー電圧は 5,000 V、ヒーターガス温度は 600°C、ヒーターガスは 80 psi (空気)、ネブライザーガスは 50 psi (空気)、カーテンガス流量は 40 psi (窒素)、コリジョンガス圧は設定値 5 (窒素) とし、イオン検出モードは MS/MS (SRM mode) positive ion detection mode として、モニターイオンおよびコリジョンエネルギーは、Simvastatin で  $m/z$  450.3 →  $m/z$  199.2 および 24 V、I.S.-1 で  $m/z$  436.3 →  $m/z$  199.2 および 23 V とした。Erythromycin の測定装置は、高速液体クロマトグラフ UFLC システム [prominence] (Shimadzu Corp.) および質量分析計 API5000 (AB SCIEX) を用いた。LC 条件は、分析カラムとして、Synergi 4u POLAR-RP 80A, 2.0 mm I.D.×50 mm L., 4 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) を用い、カラム温度は 40°C、移動相はアセトニトリル/10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (6:4, v/v)、流量は 0.2 mL/min、注入量は 10 μL、オートサンプラー温度は 10°C とした。MS/MS 条件はインターフェースとして、Turbo Ionspray (エレクトロスプレーイオン化法) を用い、イオンスプレー電圧は 5,000 V、ヒーターガス温度は 400°C、ヒーターガスは 80 psi (空気)、ネブライザーガスは 40 psi (空気)、カーテンガス流量は 40 psi (窒素)、コリジョンガス圧は設定値 5 (窒素) とし、イオン検出モードは MS/MS (SRM mode) positive ion detection mode として、モニターイオンおよびコリジョンエネルギーは Erythromycin で  $m/z$  734.5 →  $m/z$  158.3 および 43 V、I.S.-2 で  $m/z$  718.5 →  $m/z$  158.2 および 43 V とした。いずれも測定データは Analyst ver.1.4.2 (AB SCIEX) で解析した。

ヒト血漿の前処理は次の方法で行った。ヒト血漿 0.5 mL 中 Simvastatin および I.S.-1 は、フタル酸塩 pH 標準液 (pH 4.01) 1 mL 添加による酸性条件下、*t*-ブチルメチルエーテル 5 mL で抽出した後、蒸発乾固 (窒素気流下、25°C) したものを溶解液 0.2 mL で再溶解し、濾過フィルター Ultra free-MC (0.22 μm) による遠心濾過したものを注入試料とした。ヒト血漿 0.5 mL 中 Erythromycin および I.S.-2 はフタル酸

塩 pH 標準液 (pH 4.01) 1 mL 添加による酸性条件下、*t*-ブチルメチルエーテル 5 mL 抽出後の水層に 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 0.5 mL を添加によるアルカリ性条件下、酢酸エチル 7 mL で抽出した後、蒸発乾固 (窒素気流下、25°C) したものを溶解液 0.2 mL で再溶解し、濾過フィルターによる遠心濾過したものを注入試料とした。

分析法バリデーションは、次の項目について検討し、実施内容および判定基準については、本研究実施当時のガイダンスに従った[44]。

選択性については、独立した 6 個体から採取したヒト血漿を用いて検討し、ブランク試料のクロマトグラムにおいて Simvastatin、Erythromycin、I.S.-1 および I.S.-2 の保持時間に存在する妨害ピークがないことを確認した。

直線性および定量範囲については、各添加検量線 (Simvastatin および Erythromycin が 2~1,000 pg/mL) の定量範囲において、得られたクロマトグラムよりピーク面積比 (Simvastatin のピーク面積値/I.S.-1 のピーク面積値、Erythromycin のピーク面積値/I.S.-2 のピーク面積値) を算出し、回帰式および相関係数 (r) を求めることで評価した。判定基準は相関係数 (r) が 0.9900 以上であること、並びに算出した回帰式に添加検量線の各ポイントのピーク面積比を代入して得られる定量値の真度が、LLOQ で $\pm 20.0\%$ 以内、ULOQ およびその他の濃度で $\pm 15.0\%$ 以内であることとし、LLOQ および ULOQ を含む 75%以上のポイントが基準を満たすこととした。

同時再現性 (日内変動) および日差再現性 (日間変動) については、4 種類の QC 試料 (日内の場合 ; 2、10、500 および 1,000 pg/mL、日間の場合 ; Simvastatin : 2.5、10、500 および 1,000 pg/mL、Erythromycin : 10、30、500 および 1,000 pg/mL) において各濃度 5 試料の測定を行った。日間変動は操作日を変えて 3 回繰り返した。判定基準は各 LLOQ で精度が 20.0%以下および真度が $\pm 20.0\%$ 以内、その他の濃度で精度が 15.0%以下および真度が $\pm 15.0\%$ 以内であることとした。

希釈妥当性は、10 および 100 倍に希釈した希釈妥当性用 QC 試料 (5 ng/mL) について、前処理および測定を行った。添加検量線を用いて定量値を算出し、精度および真度を求めた。判定基準は精度が 15.0%以下および真度が $\pm 15.0\%$ 以内であるとき、希釈妥当性を保証するものとした。

安定性試験については、ヒト血漿中凍結融解操作の安定性は、室温保存 (Simvastatin : 1 時間および 2 時間、Erythromycin : 1 時間、2 時間および 24 時間、Simvastatin および Erythromycin : 室温で 1 時間保存してから冷蔵庫で 24 時間)、凍結保存安定性 (Simvastatin : -20°C 保存で 2 週間および 1 ヶ月間、-80°C 保存で 2 週間、1 ヶ月間および 2 ヶ月間、Erythromycin : -20°C および 80°C 保存で 2 週間および 3 週間)、凍結融解操作の安定性 (3 回) を実施し、前処理後の測定試料中 Simvastatin および Erythromycin の安定性は、10°C 設定のオートサンプラー内で 24 時間、48 時間および 72 時間保存後について実施した。各項目について、2 種類の QC 試料 (Simvastatin : 10 および 800 pg/mL、Erythromycin : 30 および 800 pg/mL) において各濃度 3 試料の測定を行い、判定基準は真度が $\pm 15.0\%$ 以内であるとき、安定である

とした。標準溶液および I.S.溶液の安定性は、標準原液 (100 µg/mL) および混合標準溶液 (0.125 および 0.5 ng/mL) は、室温で 24 時間、4°C 設定の冷蔵庫で 1 ヶ月および 2 ヶ月間および -80°C 設定の冷凍庫で Simvastatin は 1 ヶ月および 2 ヶ月間、Erythromycin は 1 ヶ月において実施し、混合 I.S.溶液 (50 ng/mL) は、室温で 24 時間、4°C 設定の冷蔵庫で 1 ヶ月および 2 ヶ月間および -80°C 設定の冷凍庫で 1 ヶ月および 2 ヶ月間において実施した。得られたクロマトグラムからピーク面積比を求め、調製直後に対する変化率を算出し、変化率が±15.0%以内であるとき、安定であるとした。

#### (4) マイクロドーズ臨床試験

MD 臨床試験は臨床研究に関する倫理指針[45]およびヘルシンキ宣言[46]を遵守し、大分大学医学部附属病院総合臨床研究センターにおいて実施した。本試験の試験実施内容に関して同付属病院に設置された IRB に試験計画書を提出し、承認された後に試験を実施した。被験者は 20 歳以上の健康な男性とし、BMI が 17.0 以上 30.0 未満とした。除外規定として、継続的な治療を必要とする疾患を有する者、肝機能障害、腎機能障害、精神疾患のある者、この試験の参加に不適当なスクリーニング検査成績を示した者、試験薬投与前 1 週間以内に発熱を呈した者、薬物に対する過敏症または特異体質を有する者、試験薬投与前 1 週間以内に医薬品を服用した者、試験薬投与前 1 週間以内にグレープフルーツを含有する果実ジュースを服用した者、試験薬投与前 1 週間以内にセントジョーンズワートを含有する健康食品を服用した者、試験薬投与前 1 週間以内に喫煙した者、試験薬投与前 4 ヶ月以内に治験に参加した者、または、3 ヶ月以内の承認薬の臨床試験へ参加した者、試験薬投与前 3 ヶ月以内に 400 mL を超える全血献血、1 ヶ月以内に 200 mL を超える全血献血、2 週間以内に成分献血を行った者、試験担当医師が被験者として不適当と判断した者は、臨床試験の対象に含めなかった。試験薬投与前 28 日以内にスクリーニング検査を行い、被験者の適格性を判定し、Erythromycin 投与群 8 名、Simvastatin 投与群 8 名の計 16 名を決定した。16 名の被験者をそれぞれ Erythromycin 投与群、Simvastatin 投与群に無作為に割り付けた。なお、Washout 期間は 1 週間以上間隔をあけることとした。健康成人に対し、Erythromycin あるいは Simvastatin をそれぞれ 100 µg 含有する溶液または MD 臨床試験用製剤 (MD 製剤) を水 200mL とともに経口的に投与した。採血時間は、溶液投与においては、投与直前、投与後 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12 および 24 時間とし、MD 製剤においては、投与直前、投与後 0.5、1、2、3、4、6、8、12、24 および 48 時間とした。

#### (5) ヒト血漿中濃度測定および薬物動態パラメータの算出

ヒト血漿中濃度測定は、次の品質管理の基準に従った。感度確認はそれぞれの添加検量線試料の 2 pg/mL を検体測定開始前に注入し、各測定成分の保持時間に問題がないこと、ピーク形状および機器の感度が良好に得られていることを確認した。

添加検量線の直線性は、添加検量線の相関係数 (r) が 0.9900 以上であること並びに各添加濃度の真度において、11 ポイント中 9 ポイント以上が、LLOQ で $\pm 20.0\%$ 以内、その他の濃度で $\pm 15.0\%$ 以内であることとした (添加検量線試料の 75%以上のポイントが基準を満たすこととした)。真度が上記の基準値を外れた濃度ポイント (LLOQ および ULOQ を除く) が 2 ポイント以内であった場合は、それらを除いた濃度ポイントを使用して再度、回帰式を算出した。再計算した回帰式が上記基準を満たさない場合は添加検量線を不採用とし、同時に測定した検体の測定結果は採用せず、再測定を実施した。QC 試料は各濃度について 2 試料ずつ前処理を行った。検体の注入開始前と注入終了後に各濃度 1 試料ずつに分けて測定し、各濃度の少なくとも 1 試料を含む合計 4 試料の真度が、 $\pm 15.0\%$ 以内であることを基準とした。基準を満たさなかった場合は測定が適正に行われなかったと判断し、再測定を実施することとした。薬物動態パラメータは WinNonlin Professional V 6.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, California) を用いて算出した。

### 3. 結果および考察

#### (1) マイクロドーズ臨床試験用製剤の調製

本研究では、Erythromycin の腸溶性製剤および Simvastatin の徐放性製剤につき、MD 製剤を調製した。製剤設計において、一定以上の大きさを有する腸溶剤や徐放剤は胃内滞留時間の違いによって血中濃度パターンに大きなばらつきが生じる可能性があるため、今回の試験で用いる製剤は、溶液とともに幽門部を通過可能な 1 粒 1~2 mm 程度の丸剤とした。シングルユニット製剤では、放出の遅れ、胃内への滞留、吸着などの問題によってデータにずれが生じる可能性があるため、丸剤一粒中に有効成分の含量が約 10  $\mu\text{g}$  となるように調製し、1 回の投与を 10 粒とすることで投与量 100  $\mu\text{g}$  が担保されるマルチユニット製剤を設計した。調製した Simvastatin 徐放性製剤を Fig. 11 に示す。

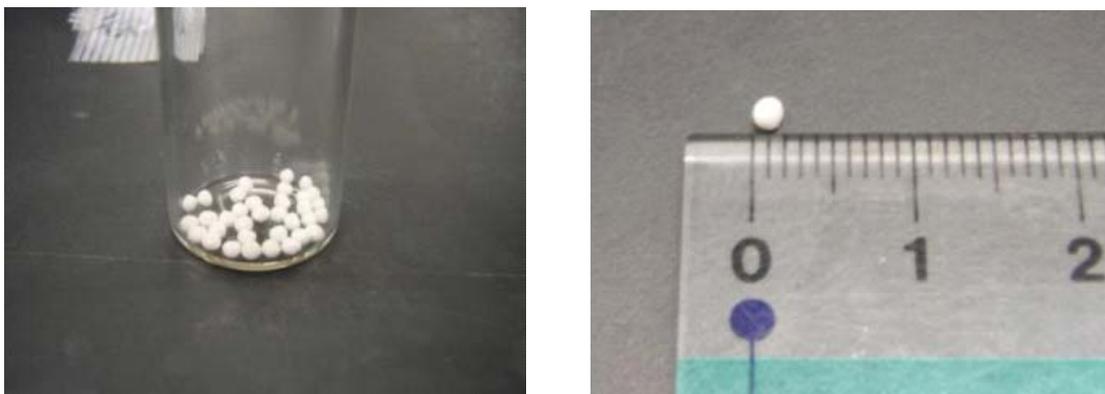


Fig. 11. Sustained release pills of simvastatin.

Erythromycin および Simvastatin の MD 製剤について、日本薬局方に準じて含量均

一性試験を実施した。Erythromycin 腸溶剤の含量は、 $10.25 \pm 0.63 \mu\text{g}$ 、判定値は 13.08 であり、Simvastatin の徐放剤の含量は、 $10.75 \pm 0.48 \mu\text{g}$ 、判定値は 13.88 であった。これらの結果は、いずれも判定基準内であり、含量均一性試験は適合と判定した。

2 種類の MD 製剤について、日本薬局方に準じて溶出試験を実施した。結果を Fig. 12 に示す。

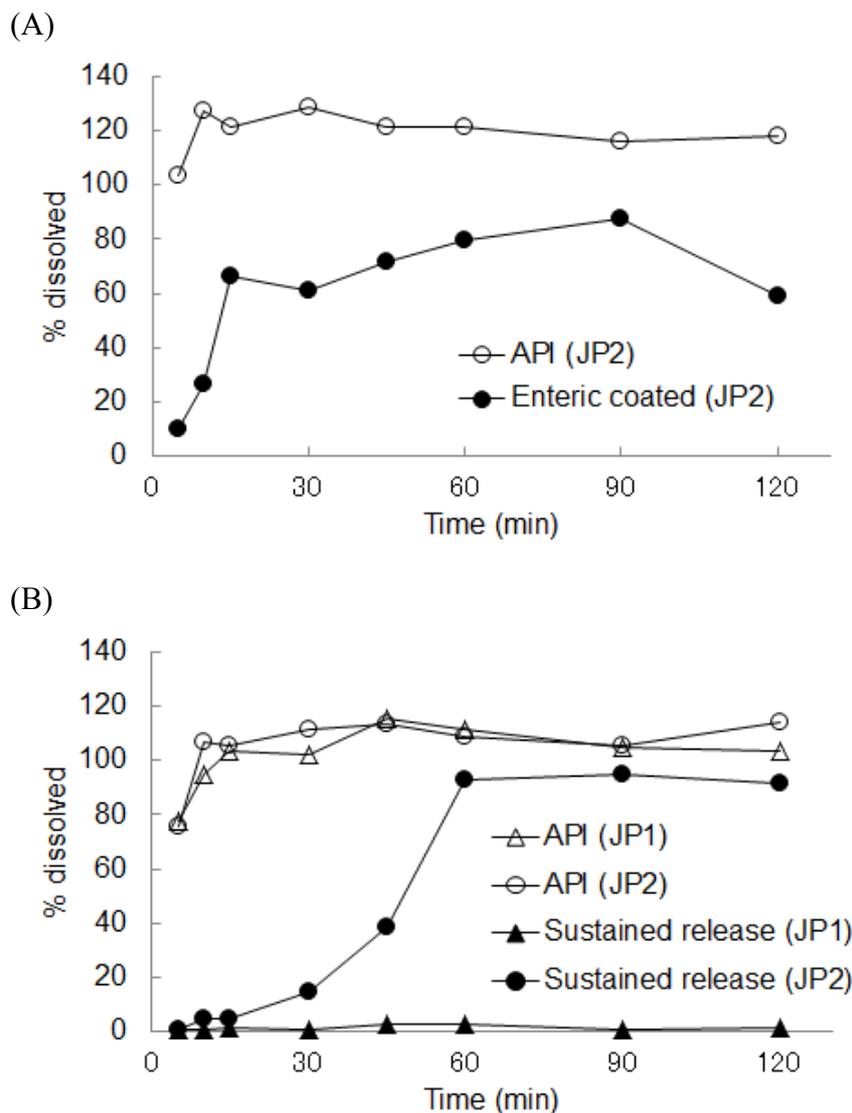


Fig. 12. Dissolution profiles of erythromycin (A) and simvastatin (B) from API (Active pharmaceutical ingredient) and each formulation (erythromycin: enteric coated, simvastatin: sustained release).

Erythromycin は、JP1 (pH 1.2) 中では分解してしまうため、今回の検討では JP2 (pH6.8) を用いた溶出性についてのみ確認を行った。Fig. 12 (A)に示すように、腸溶性製剤では原薬に比べて JP2 中での溶出に若干の遅れが観察されたものの、その後速やかに溶出し、15 分で約 70%、2 時間までに約 90%の薬物の溶出が認められ

た。なお、JP1 中では溶出した Erythromycin が酸性下で速やかに分解することから、溶出試験における濃度推移は示していないが、実際に同じ条件で溶出試験を行い、速放錠では JP1 中で製剤が崩壊したのに対して、腸溶錠では製剤の性状には変化が認められないことを目視によって確認した。一方、Simvastatin の徐放剤では、JP1 中では溶出が認められず、JP2 中では 15 分程度の lag-time ののち、60 分でほぼ 100% が溶出することが確認された (Fig. 12 (B))。以上の結果より、今回調製した製剤は、それぞれ当初の目的であった腸溶性と徐放性の機能を有していると判断した。

以上、含量均一性試験および溶出試験の結果によって、MD 臨床試験を実施するにあたり十分な品質を保証する MD 製剤が調製されたことが示された。

## (2) 高感度測定法の確立

Simvastatin および Erythromycin の目標 LLOQ は、それぞれのインタビューフォームから、MD における  $C_{max}$  を予想し、Simvastatin で 5 pg/mL、Erythromycin で 20 pg/mL と設定した。Erythromycin の pKa は 6.9 [64]であり、ジメチルアミンを有する塩基性化合物である。一方、Simvastatin は解離基を持たない中性化合物である[65]。それぞれの化合物について LC における保持条件を検討したところ、Simvastatin は ODS カラム (SUMIPAX ODS Z-CLUE) における保持が良好であったのに対し、Erythromycin は極性が高いため、ODS では十分な保持が得られなかった。検討の結果、Erythromycin はフェニル系カラムの Synergi 4u POLAR-RP において、移動相に アセトニトリル/10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (6:4, v/v) を用いることで良好な保持が得られることが確認された。一方、Simvastatin は同条件において十分な保持が得られなかった。また Simvastatin は、同移動相条件では MS シグナル強度が弱く、目標 LLOQ に到達可能な感度が得られないこと、さらに生体試料由来による夾雑物ピークの影響を受けて選択性にも問題があることが確認された。そこで、Simvastatin のようなシクロヘキサンジオール構造を有する化合物は、ナトリウムやアルキルアミンと付加イオンを形成し、通常検出される分子イオンよりも高感度に検出されるという報告[66]を参考にし、さらなる検討を実施した。結果、移動相にメチルアミンを添加することで、Simvastatin のメチルアミン付加イオンをモニターしたところ、MS 感度が約 10 倍向上し、目標 LLOQ に到達可能であること、並びに生体試料由来の夾雑物ピークの影響も受けないことが認められた。しかしながら、メチルアミンを添加した移動相条件は、Erythromycin の感度を低下させることも明らかとなった。それぞれの化合物において、最適な保持が得られるカラムおよび十分な感度が得られる移動相条件が異なることから、これら 2 化合物を一つの測定系で同時測定することは困難と考えられる。しかし、カラムスイッチング法の応用によって、異なる 2 つの測定系の共存が可能となった。確立したカラムスイッチのシステムを Fig. 13 に示す。

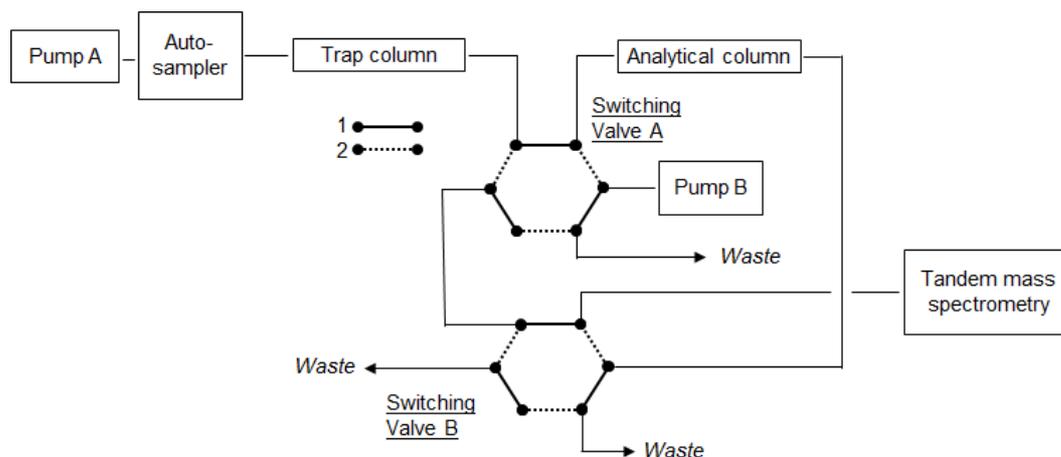


Fig. 13. Schematic representation of column switching (heart-cut) for measurement of simvastatin and erythromycin.

Erythromycin および I.S.-2 を十分に保持可能なフェニル系カラム (Synergi 4u POLAR-RP) をトラップカラムとして使用し、Erythromycin および I.S.-2 の溶出前である 1.4~2.2 分に溶出する Simvastatin および I.S.-1 を ODS カラム (SUMIPAX ODS Z-CLUE) へカラムスイッチさせた。フェニル系カラムは、Erythromycin および I.S.-2 の分析カラムであるとともに、Simvastatin および I.S.-1 のトラップカラムとして用いた。ODS カラムは Simvastatin および I.S.-1 の分析カラムとして使い、カラムスイッチを用いることでメチルアミンを添加した移動相が ODS カラムのみに流れるように設定した。このように、カラムスイッチングを用いることで、2 つの測定系を 1 つのシステムに統合させる測定上の工夫は、測定時間の短縮並びに装置のリソースを縮小し、実際のサンプル測定において大幅な効率化につながる可能性がある。

ヒト血漿中 Simvastatin および I.S.-1 (Lovastatin) は *t*-ブチルメチルエーテルによって抽出可能であることがすでに報告されている[67]。一方、Erythromycin はアルカリ性条件下による酢酸エチルで抽出可能との報告がある[68]。本報告によると、酢酸エチル抽出前にヘキサン抽出にて脂質類を除去している。Simvastatin および I.S.-1 はアルカリ性条件下においてシクロヘキサジオールが加水分解によって開環し、プロドラッグである不活性体 (ラクトン体) から活性体 (オープンアシド体) へと変化してしまうことから、不活性体と活性体とを混同して測定しないためにも、前処理過程においてこのような分解を抑える必要がある。第 1 章の検討において、Erythromycin は LLE の場合、アルカリ条件下で抽出可能であり、SPE の場合、陰イオン系カラムの中性条件下で抽出可能であることを確認済みであった。一方、Simvastatin は酸性条件下で LLE 可能であり、Erythromycin とは同じカテゴリーに含まれない。そこで、それぞれの初期条件に基づいて、両化合物について最適化した結果、ヒト血漿中の Simvastatin および I.S.-1 はフタル酸塩 pH 標準液 (pH 4.01) に

よる弱酸性下で t-ブチルメチルエーテルにより効率的に抽出され、かつ Simvastatin の目標 LLOQ が検出されることを確認した。同時にこのときの抽出液中に Erythromycin および I.S.-2 が検出されていないことを確認し、さらに、抽出後の水層残液に 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加したアルカリ性条件下における Erythromycin および I.S.-2 の抽出を検討したところ、Erythromycin および I.S.-2 は効率よく抽出され、選択性にも問題なく Erythromycin の目標 LLOQ の検出も可能であることが認められたため、最終的にこの前処理法を採用した。

以上のように、Erythromycin および Simvastatin について、LC/MS/MS 測定および前処理法について検討した結果、Erythromycin および Simvastatin について 2 pg/mL を LLOQ とする高感度測定法が確立された。

### (3) 分析法バリデーション

Simvastatin、Erythromycin、I.S.-1 および I.S.-2 の選択性において得られたクロマトグラムの一例を Fig. 14-1 および 14-2 に示す。6 個体のヒト血漿について、いずれの化合物においても、溶出位置に定量を妨害する夾雑ピークはなかった。

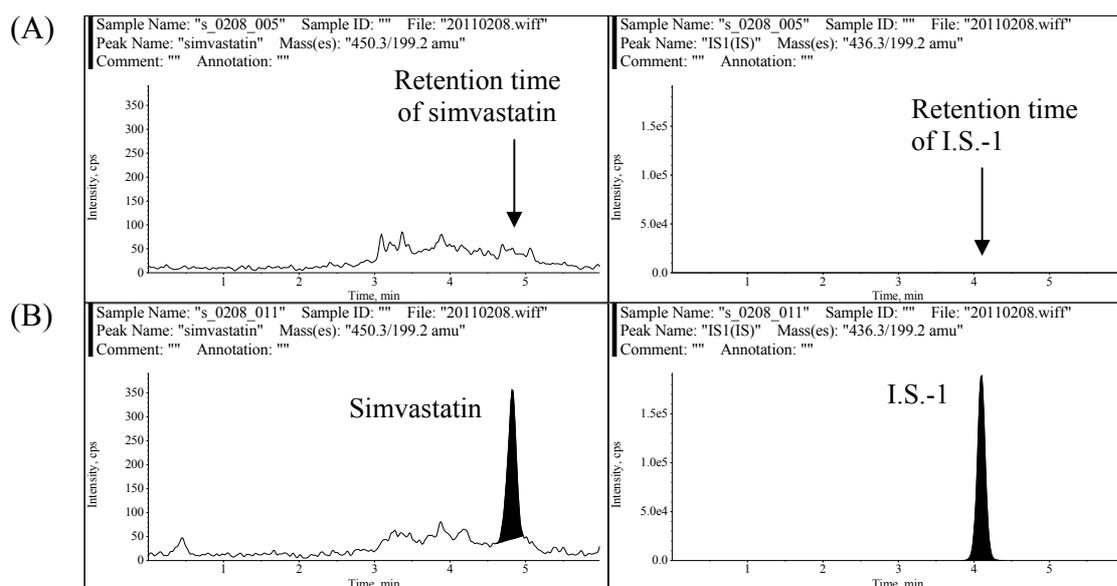


Fig. 14-1. SRM chromatograms of simvastatin and I.S.-1 (lovastatin) for selectivity in blank human plasma (A) and LLOQ samples (simvastatin: 2 pg/mL) (B).

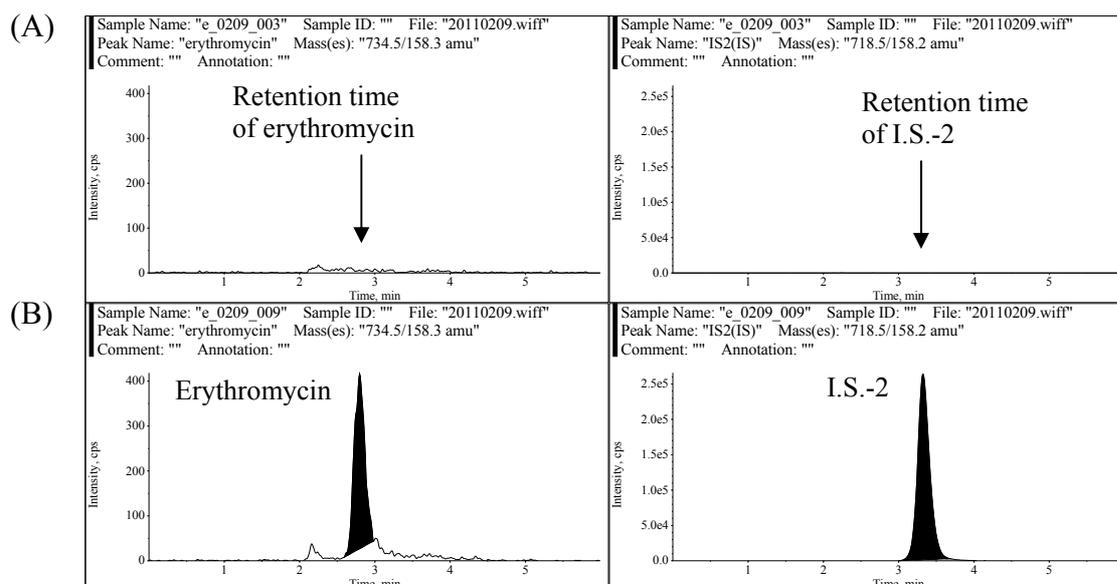


Fig. 14-2 SRM chromatograms of erythromycin and I.S.-2 (erythromycin B) for selectivity in blank human plasma (A) and LLOQ samples (erythromycin: 2 pg/mL) (B).

添加検量線の直線性について確認した結果、相関係数はいずれも 0.9900 以上であり、算出した回帰式に各ポイントのピーク面積比を代入して得られる各化合物の定量値の真度は、各 LLOQ で $\pm 20.0\%$ 以内、各 ULOQ で $\pm 15.0\%$ 以内およびその他の濃度で $\pm 15.0\%$ 以内であった。これらの結果はいずれも判定基準を満たすものであり、Simvastatin および Erythromycin について、2~1,000 pg/mL の定量範囲で良好な直線性を示すと判定した。同時再現性（日内変動）および日差再現性（日間変動）について、得られた結果を Table 11 および 12 に示す。いずれの化合物についても判定基準を満たすものであり、ヒト血漿中の Simvastatin および Erythromycin の濃度を良好な再現性で測定可能であると判定した。

Table 11. Intra-day reproducibility of simvastatin and erythromycin.

Compound	Nominal conc. (pg/mL)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Simvastatin	2.000	1.961	4.9	-2.0
	10.00	10.03	2.2	0.3
	500.0	453.6	0.7	-9.3
	1000	882.8	1.7	-11.7
Erythromycin	2.000	1.761	10.1	-12.0
	10.00	9.826	1.2	-1.7
	500.0	480.5	0.3	-3.9
	1000	972.9	0.6	-2.7

Table 12. Inter-day reproducibility of simvastatin and erythromycin.

Compound	Nominal conc. (pg/mL)	Mean calculated conc. (pg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Simvastatin	2.500	2.240	8.7	-10.4
	10.00	9.659	3.1	-3.4
	500.0	465.7	2.8	-6.9
	1000	920.5	3.0	-8.0
Erythromycin	10.00	9.366	8.8	-6.3
	30.00	28.99	2.8	-3.4
	500.0	508.4	4.3	1.7
	1000	987.0	5.8	-1.3

希釈妥当性について確認した結果、いずれの化合物についても、10 倍および 100 倍に希釈したときの精度および真度は判定基準を満たすものであり、ヒト血漿による 100 倍までの希釈定量の妥当性が保証された。安定性試験について確認した結果、いずれの安定性試験においても、結果は判定基準を満たすものであり、ヒト血漿中の室温保存で、Simvastatin は少なくとも 2 時間、Erythromycin は少なくとも 24 時間安定であり、Simvastatin および Erythromycin は、室温で 1 時間保存してから冷蔵庫で 24 時間保存しても安定であった。血漿中の凍結保存においても、 $-20^{\circ}\text{C}$  で Simvastatin は少なくとも 1 ヶ月間 (30 日間) は安定であり、Erythromycin は少なくとも 3 週間 (21 日間) 安定であり、 $-80^{\circ}\text{C}$  でも Simvastatin は少なくとも 2 ヶ月間 (55 日間) は安定であり、Erythromycin は少なくとも 3 週間 (21 日間) 安定であった。

ヒト血漿中 Simvastatin および Erythromycin は、 $-80^{\circ}\text{C}$ において凍結保存した後、凍結融解操作を 3 回繰り返しても安定であった。前処理後の注入試料中において Simvastatin および Erythromycin は、 $10^{\circ}\text{C}$ 設定のオートサンプラー内で少なくとも 72 時間は安定であると判定した。標準溶液および I.S.溶液の安定性について確認した結果、いずれの結果についても、判定基準を満たすものであり、Simvastatin および Erythromycin の標準原液は室温保存条件で少なくとも 24 時間、冷凍 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存条件で少なくとも 2 ヶ月間 (65 日間)、 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷凍保存条件下で少なくとも 2 ヶ月間 (70 日間)、混合標準溶液は室温保存条件下で少なくとも 24 時間、冷蔵保存条件下で少なくとも 2 ヶ月間 (65 日間)、 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷凍保存条件下で少なくとも 1 ヶ月間 (36 日間) は安定であると判定した。混合 I.S.溶液は、室温保存条件下で少なくとも 24 時間、冷蔵保存条件下で少なくとも 2 ヶ月間 (65 日間)、 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷凍保存条件下で少なくとも 2 ヶ月間 (70 日間) は安定であると判定した。

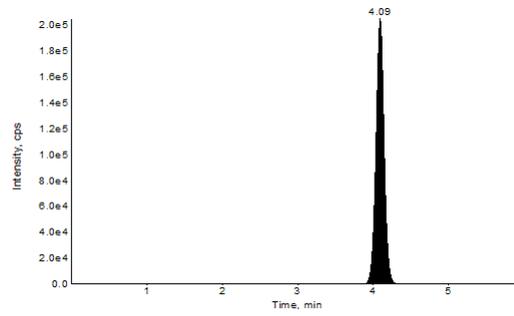
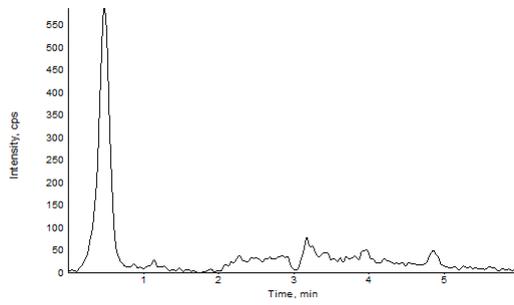
#### (4) マイクロドーズ臨床試験における薬物の吸収および体内動態

各投与群につき、8 名の被験者 (健常成人男性) について、それぞれ I 期および II 期の臨床試験を実施した。投与後のすべての被験者において、有害事象等はなく、血中濃度測定のための採血も問題なく実施し、ヒト血漿検体を得た。被験者の年齢は、21~32 歳であり、BMI 値は、 $18.2\sim 26.1\text{ kg/m}^2$ であった。すべてのヒト血漿検体について、バリデーション試験にて安定性が保証される条件内 ( $-80^{\circ}\text{C}$ 保存下 Erythromycin は 21 日間、Simvastatin は 55 日間以内および凍結融解 3 回以内) で前処理および各薬物の濃度の測定を行った。品質管理基準を外れた場合、対象となる検体について再測定を実施した。再測定を実施した検体は、品質管理基準が満たされていることを確認し、再測定値を採用した。クロマトグラムの一例を Fig. 15-1 および 15-2 に示す。得られた定量値から薬物動態パラメータを算出した。

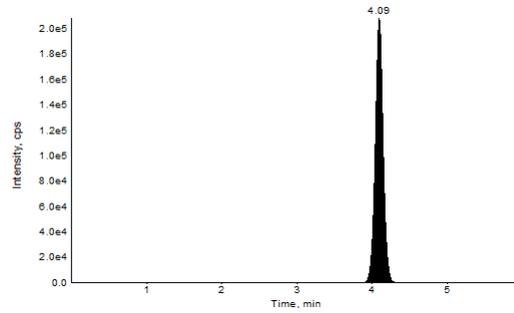
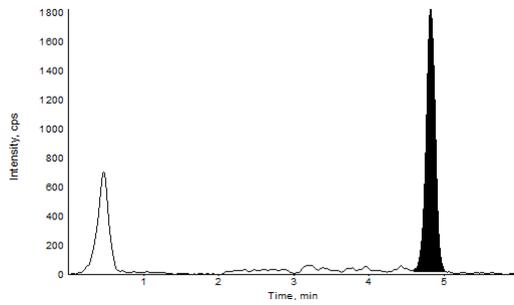
(A)

(B)

Pre dose



4 hr (11.70 pg/mL)



6 hr (2.118 pg/mL)

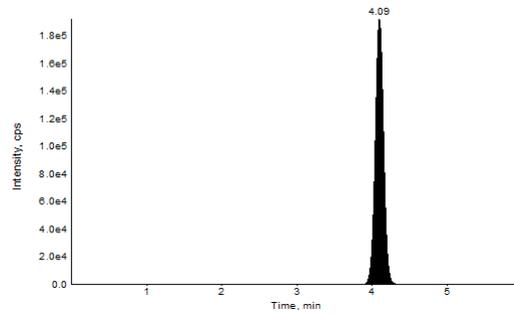
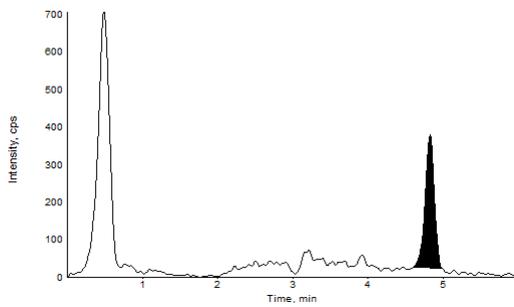


Fig. 15-1. SRM chromatograms of simvastatin (A) and I.S.-1 (lovastatin) (B) for a subject (No.10) in the microdose clinical studies (pre dose, 4 hr and 6 hr after microdosing).

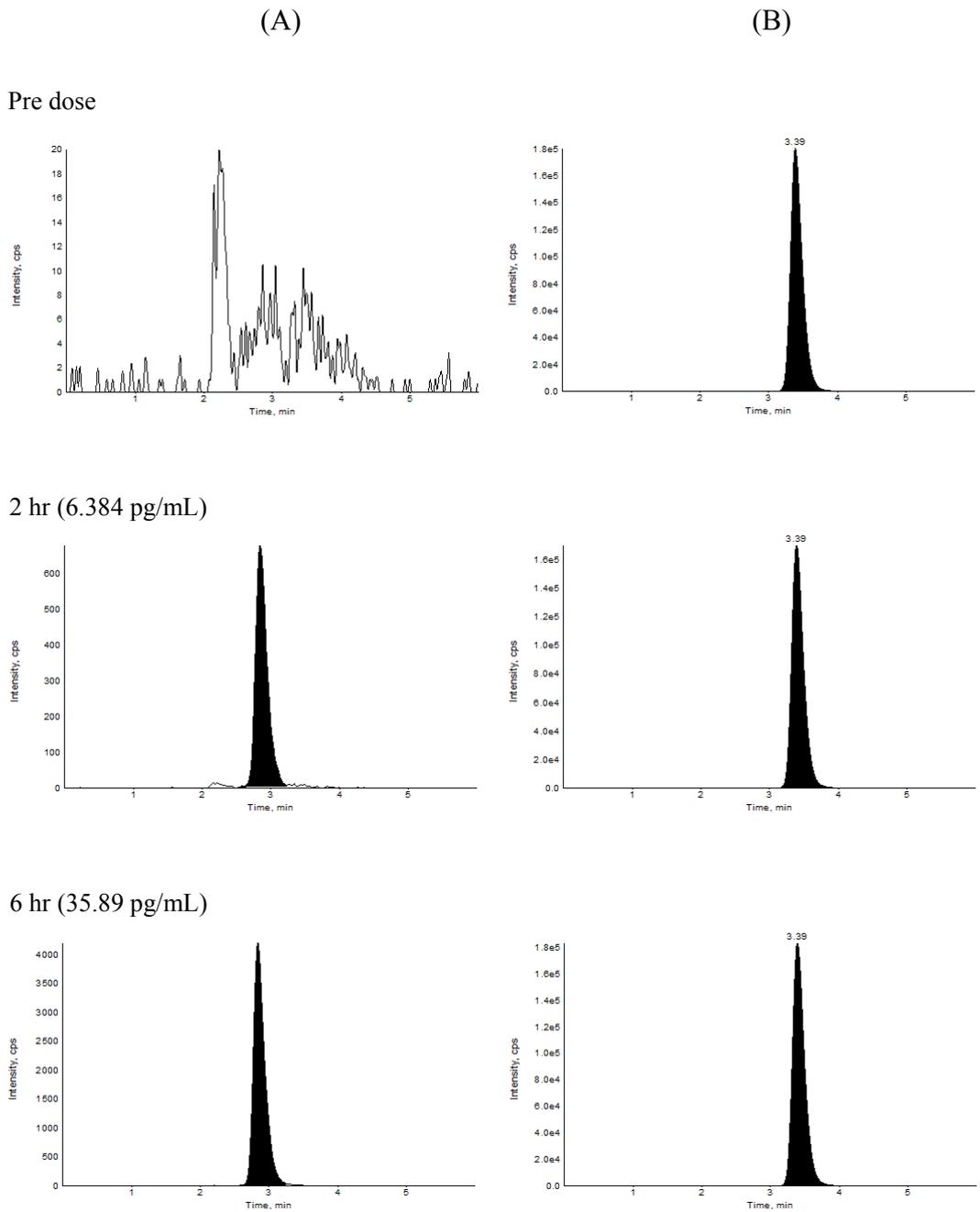


Fig. 15-2. SRM chromatograms of erythromycin (A) and I.S.-1 (erythromycin B) (B) for a subject (No. 2) in the microdose clinical studies (pre dose, 2 hr and 6 hr after microdosing).

Erythromycin を溶液および腸溶剤として経口投与した後の血漿中濃度推移（8例の平均値）を Fig. 16 に示す。個々の被験者の血漿中薬物濃度推移より算出した薬物動態パラメータの平均値を Table 13 に示す。

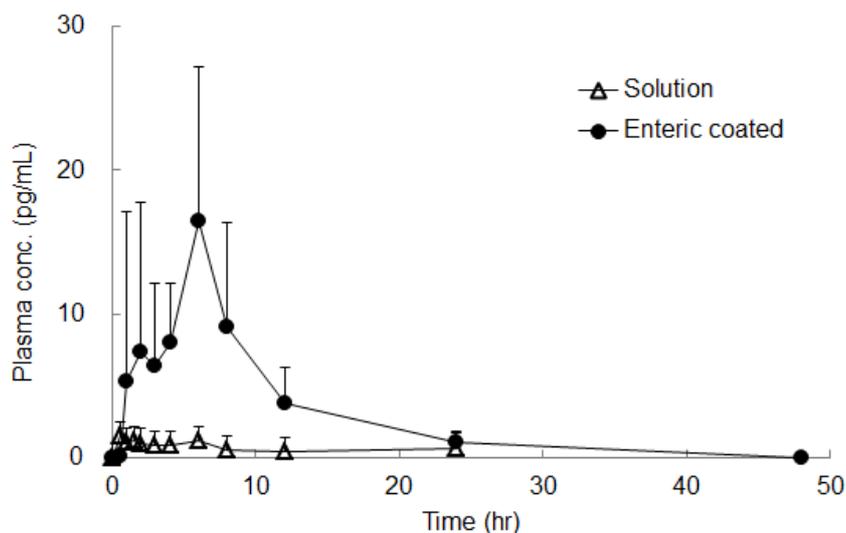


Fig. 16. Plasma concentration profiles (mean  $\pm$  SD) in human plasma after administration of solution and enteric coated pills for erythromycin.

Table 13. Pharmacokinetic parameters of solutions and enteric coated pills for erythromycin.

	Solution		Enteric coated	
$C_{max}$ (pg/mL)	2.7	$\pm$ 3.7	17.1**	$\pm$ 11.6
$T_{max}$ (hr)	2.2	$\pm$ 1.8	4.9	$\pm$ 2.1
$AUC_{0-t}$ (pg*hr/mL)	11.9	$\pm$ 16.4	138.9**	$\pm$ 94.2

Values are expressed as the mean  $\pm$  SD of 8 subjects.

\*\*  $p < 0.005$ , significantly different from the solution.

溶液として投与した場合、Erythromycin は胃酸によって分解されたため、すべての被験者において血漿中濃度は極めて低い結果となった。一方、腸溶剤とした場合、各被験者の  $C_{max}$  値は 7.2 ~ 35.9 pg/mL と個体間差は大きかったものの、溶液投与に比べて明らかに高い血漿中濃度推移を示した。このとき、薬物の血漿中暴露の指標となる AUC は、腸溶剤投与によって溶液投与の 10 倍以上に上昇した。これらの結果は、通常の溶液投与による MD 臨床試験では、Erythromycin のように胃内の低 pH 条件下で容易に分解される薬物の経口吸収性を低く評価してしまう危険性を示唆している。一方、腸溶剤等の MD 臨床試験用の製剤を調製することにより、消化管等で不安定な化合物についてもヒト吸収性を評価することが可能であることを明らかとした。

今回の MD 臨床試験で得られた Erythromycin 腸溶剤投与後の結果を ThD でのヒト試験結果[69]と比較すると、 $T_{max}$  は本試験結果 ( $4.9 \pm 2.1$  hr) と ThD での結果 ( $3.8 \pm 0.6$  hr) がほぼ同等であった。一方、AUC 値を投与量 (MD 臨床試験 100  $\mu$ g、ThD

試験 400 mg) で補正した AUC/Dose 値を算出したところ、今回の MD 臨床試験での AUC/Dose 値は ThD での値の約 1/8 と小さく、経口投与後の血中暴露が低かったことが示された。本研究では、その原因は明らかとなっていないが、Erythromycin は排泄型のトランスポーターである P-糖タンパク質の良好な基質であることから[70]、MD 臨床試験のような極めて低投与量では、小腸に発現する P-糖タンパク質によって消化管内に効率的に汲み出された結果、経口投与後の吸収率が低くなる可能性が示唆された。

Simvastatin を溶液あるいは徐放性製剤として経口投与した後の血漿中濃度推移(8例の平均値)を Fig. 17 に示す。個々の被験者の血漿中薬物濃度推移より算出した薬物動態パラメータの平均値を Table 14 に示す。Simvastatin 経口投与後の  $T_{max}$  は溶液投与で 0.5~1.5 時間、徐放剤投与で 3~6 時間となり、今回調製した MD 製剤が、通常の徐放剤と同様に薬物の吸収を有意に遅延させることが示された。このとき、溶液と徐放剤投与群の AUC にはほとんど差が認められなかったことから、Simvastatin は、消化管下部での放出を目的とした徐放化製剤において、溶液投与と同じ吸収率が得られることが明らかとなった。この結果は、Simvastatin は徐放剤とすることでその吸収率を低下させることなく、血中濃度の持続化を図ることが可能であることを示すものである。薬物によっては、消化管下部での薬物の膜透過性が上部に比べて低く、徐放化によって吸収率自体が低下するため、徐放剤による血中濃度のコントロールが困難な場合がある[71-73]。したがって、将来的に徐放剤化が可能か否かを開発の早い段階で確認することは、経口剤開発の戦略的にも重要な項目であり、本研究結果は、MD 臨床試験によってその確認が可能であることを示した点で意義深いと推察される。

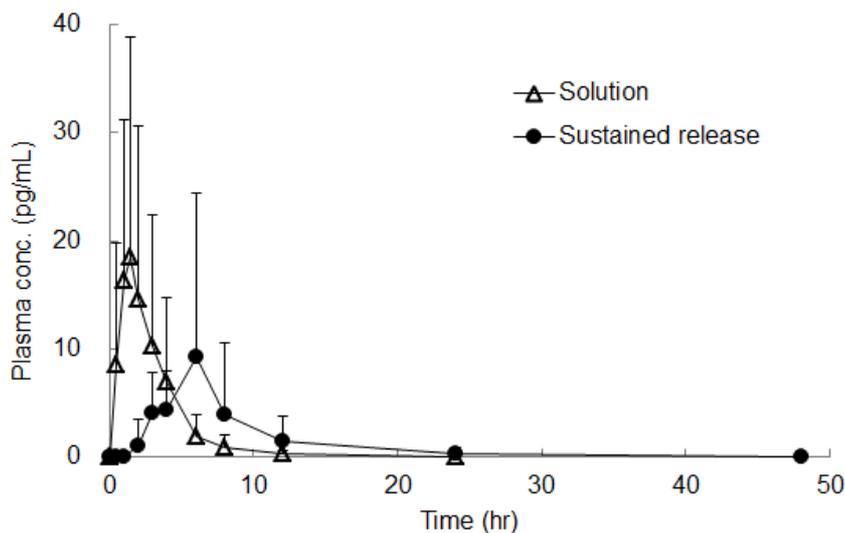


Fig. 17. Plasma concentration profiles (mean  $\pm$  SD) in human plasma after administration of solution and sustained release pills for simvastatin.

Table 14. Pharmacokinetic parameters of solutions and sustained release pills for simvastatin.

	Solution			Sustained release		
$C_{\max}$ (pg/mL)	24.4	±	18.0	12.9	±	13.5
$T_{\max}$ (hr)	1.0	±	0.5	4.4 <sup>**</sup>	±	1.4
AUC <sub>0-t</sub> (pg *hr/mL)	61.6	±	57.7	57.3	±	75.4

Values are expressed as the mean ± SD of 8 subjects.

<sup>\*\*</sup>  $p < 0.001$ , significantly different from the solution.

Simvastatin の速放錠および徐放剤を ThD でヒトに投与した Tubic-Grozdanis らの報告[63]によると、速放錠投与後の  $T_{\max}$  は 2.1 hr、徐放剤では 6.3 hr であり、本研究の結果とほぼ同様であることが認められた。一方、彼らは Simvastatin を徐放化した場合、速放錠に比べて血中 AUC が有意に上昇することを見出し、その理由として Simvastatin の初回通過代謝にかかわる CYP3A4 活性において消化管内での部位差が原因であると推論している[56]。すなわち、Simvastatin を徐放化することによって、CYP3A4 が多く発現している小腸上部よりも発現の少ない小腸下部から主として吸収されたため、速放錠に比べて初回通過代謝を受ける割合が減少し、血中への吸収率が增大することを報告している。しかしながら、本研究では徐放剤投与後の AUC は溶液投与時とほぼ同等であり、吸収率の改善効果は認められなかった。その原因として、本研究での投与は MD であったため、たとえ CYP3A4 の発現が小さい小腸下部から Simvastatin が吸収されたとしても、小腸細胞内で効率的に代謝を受けた可能性が推察される。ThD と MD での代謝効率の違いに関しては、Erythromycin のようなトランスポーターによる輸送効率の違いとともに、今後さらなる検討が必要であると推察される。

#### 4. まとめ

本研究では、Erythromycin および Simvastatin をモデル化合物として選択し、MD 臨床試験用の腸溶剤および徐放剤を調製した。健常人による MD 臨床試験を実施した結果、両薬物ともに製剤化の効果を検証することが可能であることを明らかとした。すなわち、開発の早期段階で MD 臨床試験による製剤化の効果を確認しておくことによって、製剤化による吸収改善や血中濃度推移の最適化の可能性を念頭においた、候補化合物の選択あるいはその経口剤としての開発戦略を考えることが可能になるものと期待される。

## 総括

本研究は、創薬を効率的に進めるための支援技術として、早期探索的臨床試験に適用可能な LC/MS/MS 高感度測定技術、およびそれを用いた早期探索的臨床試験の実用的な活用法を例示した。MD 臨床試験において、カセット投与による化合物評価および製剤化検討を実際に可能としたのは、生体試料中薬物の高感度測定法開発のための前処理法検討ツールとして構築したシステムティック・アプローチを用いて超高感度測定法を確立したことによる。早期探索的臨床試験が実施される医薬品開発の初期段階では、物性等の化合物情報が少ないことが多く、高感度測定法の開発には、熟練した分析者の知識を駆使しながら、測定する化合物ごとに最適化する必要がある。さらに、複数化合物の同時測定法を開発する際、とくに前処理法の検討は、分析熟練者であっても困難を極めることが多い。そのため、化合物情報も熟練分析者の知識も必要とせず、簡単な実験によって、同時に複数化合物の前処理法を最適化可能とするシステムティック・アプローチは、高感度測定法の開発にかかる時間とコストを大幅に削減し、医薬品開発の期間と費用の削減にも寄与することが期待される。

早期探索的臨床試験は、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（薬食審査発 0219 第 4 号、平成 22 年 2 月 19 日）として通知され、その積極的な活用によって、新規医薬品の開発成功率の向上が期待されている。中でも超微量投与で実施される MD 試験実施の実現には、投与後の血中や組織中の薬物濃度を正確に測定するための高感度測定法に関する基盤技術が必須となる。

本研究において開発されたシステムティック・アプローチは、MD 臨床試験においてカセット投与を実施する際のツールとして、複数化合物の前処理法を同時に検討可能なように設計しており、モデル化合物としてカルシウム拮抗薬 3 剤（Nifedipine、Diltiazem および Nicardipine）を用いたカセット投与 MD 臨床試験を実施するための高感度測定法の開発にそれを活用した。確立された高感度測定法は、カセット投与による MD 臨床試験における化合物評価をするに十分な測定感度を有しており、3 剤のうち、Nifedipine がヒトにおいてもっとも良好な吸収率を示すことが明らかとなった。このように、本研究は、カセット投与 MD 臨床試験において、化合物評価および選定が可能であることを明らかにするとともに、MD 臨床試験の有効な活用方法を例示した。さらに、製剤化検討が必要な事例として、Erythromycin および Simvastatin の 2 種をモデル化合物として選択した。胃酸に不安定な薬物であることが知られている Erythromycin は腸溶剤を、徐放製剤化によって薬効が持続し、より有効な臨床応用の可能性のある Simvastatin は徐放剤を調製し、それぞれの MD 臨床試験を実施した。得られた結果から、Erythromycin および Simvastatin のいずれについても MD 臨床試験において徐放化による製剤化の効果を検証することが可能であることを明らかにした。

本研究において、MD 臨床試験の実施を可能とするための基盤技術として、高感度

測定を確立する手法から MD 臨床試験における化合物の評価方法および製剤化検討の成果を例示することで、MD 臨床試験は非常に有用であり、かつ、いかに実用性に富む技術であるかを明らかにした。

世界で初めて EMA より早期探索的臨床試験の概念が提唱されて十年以上もの月日が流れた現在、MD 臨床試験は単にヒトへ微量薬物を投与して薬物動態情報を得るという当初の目的よりも多くの情報を得ようとする技術へと変化し続けている。本研究は、今後の MD 臨床試験の新たな可能性を示すとともに、より効果的な試験の実施を支援する技術を例示した。

以上、本研究で得られた成果は、医薬品開発をより効率的かつ迅速に行う上で早期探索的臨床試験の有用性を明らかにするとともに、開発期間の短縮および研究費の削減にも大きく寄与するものと期待される。

本研究の誌上発表

1. S. Yamashita, M. Kataoka, Y. Suzaki, H. Imai, T. Morimoto, K. Ohashi, A. Inano, K. Togashi, K. Mutaguchi, Y. Sugiyama, An assessment of the oral bioavailability of three Ca-channel blockers using a cassette-microdose study: A new strategy for streamlining oral drug development. *J. Pharm. Sci.* **104(9)** 3154-3161 (2015).
2. K. Togashi, K. Mutaguchi, S. Komuro, M. Kataoka, H. Yamazaki, S. Yamashita, Systematic approach to optimize a pretreatment method for ultrasensitive LC/MS/MS analysis of multiple target compounds in biological samples. *J. Sep. Sci.* **39(16)** 3212-3220 (2016).
3. 富樫一天, 牟田口国則, 小室勢津子, 片岡誠, 山崎浩史, 山下伸二, 杉山雄一, マイクロドーズ臨床試験における製剤化検討. *薬剤学*, **77(3)** 177-185 (2017).

## 謝辞

本研究の終わりに鑑み、本論文審査の主査としてご指導、ご鞭撻を賜りました昭和薬科大学 水谷 颯洋 教授、副査としてご指導とご鞭撻を賜りました昭和薬科大学 渡邊 泰男 教授および昭和薬科大学 石井 功 教授に心から厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行において、懇切なるご指導とご教示を頂きました摂南大学 山下 伸二 教授に心から厚く御礼申し上げます。同時に、終始御懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました昭和薬科大学 山崎 浩史 教授に心から深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり多くのご支援とご指導をいただきました株式会社住化分析センター 医薬事業部 医薬事業部長 金丸 博 博士および株式会社住化分析センター 医薬事業部 副事業部長 小室 勢津子 博士に深く感謝申し上げます。

本研究に関するマイクロドーズ臨床試験の実施に際しては、理化学研究所 杉山 雄一 先生(東京大学名誉教授)、大分大学 医学部 臨床薬理学講座 大橋 京一 教授、医療法人医心会みえ記念病院 副院長 森本 卓哉 先生(元 大分大学 医学部 臨床薬理学講座)、大分大学 医学部 医療倫理学講座 今井 浩光 教授(元 大分大学 医学部 臨床薬理学講座)、武田薬品工業株式会社 メディカルアフェアーズ部 臨床研究推進グループ 須崎 友紀 博士(元 大分大学 医学部 臨床薬理学講座)、摂南大学 薬学部 片岡 誠 博士に、ご協力およびご支援をいただきました。深く感謝申し上げます。

本論文を纏めるにあたり、ご指導およびご協力をいただきました昭和薬科大学 清水 万紀子 博士に謹んで御礼申し上げます。

さらに、本研究を実施するにあたり数々のご協力およびご支援をいただきました株式会社住化分析センター テクニカルソリューション本部 大阪ラボラトリー バイオアナリシスグループ 牟田口 国則 氏および同グループの諸氏に深く御礼申し上げます。

最後に、本論文作成に際し、研究に専心できる環境を整えてくれた妻 亜紀子、心の支えになってくれた子どもたちと友人に心から感謝を伝えたいと思います。

## 引用文献

1. 医薬品開発の期間と費用－アンケートによる実態調査－医薬産業政策研究所リサーチペーパー・シリーズ No.59 (2013 年 7 月)
2. J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski, The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.* **22(2)**, 151-185 (2003).
3. S. M. Paul, D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, A. L. Schacht, How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* **9(3)** 203-214 (2010).
4. J. W. Scannell, A. Blanckley, H. Boldon, B. Warrington, Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat Rev Drug Discov.* **11(3)** 191-200 (2012).
5. J. A. DiMasi, L. Feldman, A. Seckler, A. Wilson, Trends in risks associated with new drug development: Success rates for investigational drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* **87(3)** 272-277 (2010).
6. H. Tang, M. Mayersohn, A novel model for prediction of human drug clearance by allometric scaling. *Drug Metab. Dispos.* **33(9)** 1297-1303 (2005).
7. G. M. Grass, P. J. Sinko, Physiologically-based pharmacokinetic simulation modelling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54(3)** 433-451 (2002).
8. R. Kaur, P. Sidhu, S. Singh, What failed BIA 10-2474 phase I clinical trial? Global speculations and recommendations for future phase I trials. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **7(3)** 120-126 (2016).
9. G. Suntharalingam, M. R. Perry, S. Ward, S. J. Brett, A. Castello-Cortes, M. D. Brunner, N. Panoskaltsis, Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* **355(10)** 1018-1028 (2006).
10. J. Lazarou, B. H. Pomeranz, P. N. Corey, Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* **279(5)** 1200-1205 (1998).
11. EMEA Committee for Medical Products for Human Use, Position Paper on Non-clinical

Safety Studies to Support Clinical Trials with a Single Microdose. 2004  
CPMP/SWP/2599/02/Rev 1.

12. G. Lappin, W. Kuhnz, R. Jochemsen, J. Kneer, A. Chaudhary, B. Oosterhuis, W. J. Drijfhout, M. Rowland, R. C. Garner, Use of microdosing to predict pharmacokinetics at the therapeutic dose: Experience with 5 drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80(3)** 203–215 (2006).
13. G. Lappin, R.C. Garner, The utility of microdosing over the past 5 years. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4(12)** 1499–1506 (2008).
14. Y. Sugiyama, S. Yamashita, Impact of microdosing clinical study—Why necessary and how useful? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63(7)** 494–502 (2011).
15. 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」厚生労働省医薬食品局審査管理課長、(薬食審査発 0219 第 4 号、平成 22 年 2 月 19 日)
16. Y. Sugiyama, C. Kurihara, H. Mayahara, T. Suhara, T. Ikeda, K. Itoh, T. Yano, S. Miura, S. Nishimura, M. Otsuka, S. Ono, Y. Ohno, Basis for the conduct of microdose clinical trials in Japan: A proposal toward formulation of guidelines. *Clin. Eval.* **33(3)** 649-677 (2006).
17. European Microdosing AMS Partnership Program (EUMAPP), Outcomes from EUMAPP – A Study comparing in vitro, in silico, microdose and pharmacological dose pharmacokinetics, <http://www.eumapp.com/>, 2008.
18. K. Togashi, K. Mutaguchi, T. Yamaguchi, S. Komuro, S. Yamashita, Highly sensitive quantification using liquid chromatography-tandem mass spectrometry for a microdose analysis in clinical trial. *Chromatography* **34(3)** 141-149 (2013).
19. K. Togashi, K. Mutaguchi, S. Komuro, M. Kataoka, H. Yamazaki, S. Yamashita, Systematic approach to optimize a pretreatment method for ultrasensitive LC/MS/MS analysis of multiple target compounds in biological samples. *J. Sep. Sci.* **39(16)** 3212-3220 (2016).
20. S. Yamashita, M. Kataoka, Y. Suzaki, H. Imai, T. Morimoto, K. Ohashi, A. Inano, K. Togashi, K. Mutaguchi, Y. Sugiyama, An assessment of the oral bioavailability of three

- Ca-channel blockers using a cassette-microdose study: A new strategy for streamlining oral drug development. *J. Pharm. Sci.* **104(9)** 3154-3161 (2015).
21. 富樫一天, 牟田口国則, 小室勢津子, 片岡誠, 山崎浩史, 山下伸二, 杉山雄一, マイクロドーズ臨床試験における製剤化検討. *薬剤学*, **77(3)** 177-185 (2017).
  22. M. Meng, L. Wang, T. Voelker, S. Reuschel, K. van Horne, P. Bennett, A systematic approach for developing a robust LC-MS/MS method for bioanalysis. *Bioanalysis* **5(1)** 91-115 (2013).
  23. N. F. Smith, F. I. Raynaud, P. Workman, The application of cassette dosing for pharmacokinetic screening in small- molecule cancer drug discovery. *Mol. Cancer Ther.* **6(2)** 428-440 (2007).
  24. R. Nagilla, M. Nord, J. J. McAtee, L. J. Jolivet, Cassette dosing for pharmacokinetic screening in drug discovery: comparison of clearance, volume of distribution, half-life, mean residence time, and oral bioavailability obtained by cassette and discrete dosing in rats. *J. Pharm. Sci.* **100(9)** 3862-3874 (2011).
  25. T. Ohkawa, Y. Ishida, E. Kanaoka, K. Takahashi, H. Okabe, T. Matsumoto, S. Nakamoto, J. Tamada, M. Koike, T. Yoshikawa, A new generic column switching system for quantitation in cassette dosing using LC/MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31(6)** 1089-1099 (2003).
  26. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for industry: Safety testing of drug metabolites. February 2008.
  27. J. Komaba, Y. Masuda, Y. Hashimoto, S. Nago, M. Takamoto, K. Shibakawa, S. Nakade, Y. Miyata, Ultra sensitive determination of limaprost, a prostaglandin E1 analogue, in human plasma using on-line two-dimensional reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **852(1-2)** 590-597 (2007).
  28. J. Komaba, D. Matsuda, K. Shibakawa, S. Nakade, Y. Hashimoto, Y. Miyata, M. Ogawa, Development and validation of an on-line two-dimensional reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> and 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F<sub>2α</sub> levels in human plasma. *Biomed. Chromatogr.* **23(3)** 315-323 (2009).

29. F. Li, J. P. Zulkoski, J. Ding, W. Brown, T. Addison, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry sensitivity enhancement via online sample dilution and trapping: applications in microdosing and dried blood spot (DBS) bioanalysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24(17)** 2575-2583 (2010).
30. T. Koal, M. Deters, B. Casetta, V. Kaever, Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **805(2)** 215-222 (2004).
31. H. Zeng, Y. Deng, J. T. Wu, Fast analysis using monolithic columns coupled with high-flow on-line extraction and electrospray mass spectrometric detection for the direct and simultaneous quantitation of multiple components in plasma. *J. Chromatogr. B* **788(2)** 331-337 (2003).
32. R. N. Xu, L. Fan, M. J. Rieser, T. A. El-Shourbagy, Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44(2)** 342-355 (2007).
33. P. Simon, M. Lafontaine, P. Delsaut, Y. Morele, T. Nicot, Trace determination of urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene by automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **748(2)** 337-348 (2000).
34. 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」について (平成 25 年 7 月 11 日 薬食審査発 0711 第 1 号)
35. EMA Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) . Guideline on Bioanalytical Method Validation. 2011  
EMA/CHMP/EWP/192217/2009
36. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation: Draft Guidance. September 2013.
37. H. Idborg-Björkman, P. O. Edlund, O. M. Kvalheim, I. Schuppe-Koistinen, S. P. Jacobsson, Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionization-MS

- and two-way data analysis. *Anal. Chem.* **75(18)** 4784-4792 (2003).
38. T. Cajka, M. Vaclavikova, Z. Dzuman, L. Vaclavik, J. Ovesna, J. Hajslova, Rapid LC-MS-based metabolomics method to study the *Fusarium* infection of barley. *J. Sep. Sci.* **37(8)** 912-919 (2014).
  39. P. Chandra, R. Pandey, M. Srivastva, B. Kumar, Quality control assessment of polyherbal formulation based on a quantitative determination multimarker approach by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry using polarity switching combined with multivariate analysis. *J. Sep. Sci.* **38** 3183-3191 (2015).
  40. H.-D. Cho, U. Kim, J. H. Suh, H. Y. Eom, J. Kim, S. G. Lee, Y. S. Choi, S. B. Han, Classification of the medicinal plants of the genus *Atractylodes* using highperformance liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometry detection combined with multivariate statistical analysis. *J. Sep. Sci.* **39(7)** 1286-1294 (2016).
  41. I. Marchi, S. Rudaz, J. L. Veuthey, Sample preparation development and matrix effects evaluation for multianalyte determination in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49(2)** 459-467 (2009).
  42. H. Echizen, M. Eichelbaum, Clinical pharmacokinetics of verapamil, nifedipine and diltiazem. *Clin. Pharmacokinet.* **11(6)** 425-449 (1986).
  43. D. J. Graham, R. J. Dow, D. J. Hall, O. F. Alexander, E. J. Mroszczak, D. Freedman, The metabolism and pharmacokinetics of nicardipine hydrochloride in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **20(Suppl 1)** 23S-28S (1985).
  44. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation. May 2001.
  45. 臨床研究に関する倫理指針(平成 15 年 7 月 30 日、平成 20 年 7 月 31 日全部改正、厚生労働省)
  46. ヘルシンキ宣言 (1964 年 6 月採択、2013 年 10 月フォルタレザ総会 (ブラジル) で修正、世界医師会)
  47. バイエル薬品株式会社、Adalat<sup>®</sup> L-10, Adalat<sup>®</sup> L-20、医薬品インタビューフォー

ム、2010年12月改訂（改訂第1版）。

48. アステラス製薬株式会社、Perdipine<sup>®</sup> Tablets 10 mg・20 mg, Powder 10%、医薬品インタビューフォーム、2007年5月（改訂第9版）。
49. 田辺三菱製薬株式会社、HERBESSER<sup>®</sup> Tablets 30・Tablets 60、医薬品インタビューフォーム、2016年2月改訂（第11版）。
50. 「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」厚生労働省医薬食品局審査管理課長、（薬食審査発0229第10号、平成24年2月29日）
51. S. Higuchi, Y. Shiobara, Comparative pharmacokinetics of nifedipine hydrochloride, a new vasodilator, in various species. *Xenobiotica* **10(6)** 447-454 (1980).
52. E. M. Sheldon, Development of a LC–LC–MS complete heart-cut approach for the characterization of pharmaceutical compounds using standard instrumentation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31(6)** 1153–1166 (2003).
53. T. Matsui, K. Tamaya, T. Kawasaki, Y. Osajima, Determination of angiotensin metabolites in human plasma by fluorimetric high-performance liquid chromatography using a heart-cut column-switching technique. *J. Chromatogr. B* **729(1-2)** 89–95 (1999).
54. S. R. Villaseñor, Matrix elimination in ion chromatography by “heart-cut” column-switching techniques. *J. Chromatogr. A* **602(1-2)** 155-161 (1992).
55. M. I. Churchwell, N. C. Twaddle, L. R. Meeker, D. R. Doerge, Improving LC–MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC–ES/MS/MS to HPLC–ES/MS/MS. *J. Chromatogr. B* **825(2)** 134–143 (2005).
56. M. Thörn, N. Finnström, S. Lundgren, A. Rane, L. Lööf, Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **60(1)** 54-60 (2005).
57. K. D. Raemsch, J. Sommer, Pharmacokinetics and metabolism of nifedipine. *Hypertension* **5(4 Pt 2)** II18-24 (1983).
58. P. Hermann, S. D. Rodger, G. Remones, J. P. Thenot, D. R. London, P. L. Morselli, Pharmacokinetics of diltiazem after intravenous and oral administration. *Eur. J. Clin.*

- Pharmacol.* **24(3)** 349-352 (1983).
59. H. R. Ochs, M. Knüchel, Pharmacokinetics and absolute bioavailability of diltiazem in humans. *Klin Wochenschr.* **62(7)** 303-306 (1984).
60. N. Yamane, Z. Tozuka, Y. Sugiyama, T. Tanimoto, A. Yamazaki, Y. Kumagai, Microdose clinical trial: Quantitative determination of fexofenadine in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **858(1-2)** 118-128 (2007).
61. K. Maeda, Y. Ikeda, T. Fujita, K. Yoshida, Y. Azuma, Y. Haruyama, N. Yamane, Y. Kumagai, Y. Sugiyama, Identification of the rate-determining process in the hepatic clearance of atorvastatin in a clinical cassette microdosing study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **90(4)** 575-81 (2011).
62. B. G. Boggiano, M. Gleeson, Gastric acid inactivation of erythromycin stearate in solid dosage forms. *J. Pharm. Sci.* **65(4)** 497-502 (1976).
63. M. Tubic-Grozdanis, J. M. Hilfinger, G. L. Amidon, J. S. Kim, P. Kijek, P. Staubach, P. Langguth, Pharmacokinetics of the CYP 3A substrate simvastatin following administration of delayed versus immediate release oral dosage forms. *Pharm. Res.* **25(7)** 1591-1600 (2008).
64. アボット・ジャパン株式会社、Erythrocin<sup>®</sup>、医薬品インタビューフォーム、2010年8月改訂（改訂第3版）。
65. MSD株式会社、LIPOVAS<sup>®</sup> Tablet5, 10, 20、医薬品インタビューフォーム、2015年8月改訂（改訂第23版）。
66. K. Teshima, T. Yoneyama, T. Kondo, Studies on 1-alkylamine adduct formation in electrospray ionization mass spectrometry for quantitative analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47(4-5)** 962-966 (2008).

67. C. Apostolou, C. Kousoulos, Y. Dotsikas, G-S. Soumelas, F. Kolocouri, A. Ziaka, Y. L. Loukas, An improved and fully validated LC–MS/MS method for the simultaneous quantification of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46(4)** 771–779 (2008).
68. S. Bajic, D. R. Doerge, L. Lu, E. B. Hansen Jr., Analysis of erythromycin by liquid chromatography/mass spectrometry using involatile mobile phases with a novel atmospheric pressure ionization source. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14(3)** 156–160 (2000).
69. 沢井製薬株式会社、エリスロマイシン錠 200 mg 「サワイ」、医薬品インタビューフォーム、2015年6月改訂（第7版）。
70. R. B. Kirn, C. Wandel, B. Leake, M. Cvetkovic, M. F. Fromm, P. J. Dempsey, M. M. Roden, F. Belas, A. K. Chaudhary, D. M. Roden, A. J. J. Wood, G. R. Wilkinson, Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-Glycoprotein. *Pharm. Res.* **16(3)** 408–414 (1999).
71. Y. Masaoka, Y. Tanaka, M. Kataoka, S. Sakuma, S. Yamashita, Site of drug absorption after oral administration: Assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *Euro. J. Pharm. Sci.* **29(3-4)** 240–250 (2006).
72. O. I. Corrigan, The biopharmaceutic drug classification and drugs administered in extended release (ER) formulations. *Adv. Exp. Med. Biol.* **423** 111–128 (1997).
73. R. Menon, E. Cefali, I. Wilding, H. Wray, A. Connor, The assessment of human regional drug absorption of free acid and sodium salt forms of acipimox, in healthy volunteers, to direct modified release formulation strategy. *Biopharm. Drug Dispos.* **30(9)** 508–516 (2009).