

博士論文

非標識体化合物を用いたマイクロドース試験
によるヒト薬物動態評価法に関する研究

山根 尚恵

目 次

第1章 序論	1
1. 背景	1
1.1. 医薬品開発とマイクロドース臨床試験	1
1.2. マイクロドース臨床試験を取り巻く政策・環境	2
1.3. 海外の動向	2
1.4. 我が国におけるマイクロドース臨床試験普及の障壁	3
2. 本研究の目的と構成	6
第2章 非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験の実施	7
1. 背景	7
2. ヒト血漿添加調製試料を用いたLC-MS/MSのマイクロドース臨床試験への適用可能性の検討	7
2-1. 目的	7
2-2. 方法	7
3. 非標識体化合物フェキソフェナジン投与のマイクロドース臨床試験の実施	33
3-1. 目的	33
3-2. 方法	33
3-3. 結果	38
3-4. 考察	54
4. マイクロドース臨床試験を利用したヒト代謝物の早期探索	55
4-1. 目的	55
4-2. 方法	55
4-3. 結果	60
4-4. 考察	73
5. カセットマイクロドース臨床試験	75
5-1. 目的	75
5-2. 方法	75
5-3. 結果	84
5-4. 考察	91
第3章 マイクロドース臨床試験導入による費用効果分析	93
1. 背景	93
2. 目的	94
3. 方法	94
4. 結果	107
5. 考察	108

第4章	総括及び今後の展望	112
1.	総括	112
2.	今後の展望	114
Disclosure of conflicts of interest		116
謝 辞		116
文 献		118
Appendices		126
Appendix 1.	マイクロドース臨床試験導入時の費用効果分析のための調査	126
Appendix 2.	マイクロドース臨床試験導入時の費用効果分析のための調査結果	131
Appendix 3.	感度分析結果	132

第1章 序論

1. 背景

1.1. 医薬品開発とマイクロドース臨床試験

医薬品開発には、シーズ探索、リード化合物探索、リード化合物最適化といった医薬品候補化合物の探索段階に続いて、非臨床毒性試験、フェーズ 1～フェーズ 3 までの臨床試験、申請という多くのハードルがある。それ故、開発期間は 10～15 年と長期間になり、開発費用も膨大なものとなっている。一方で、年々開発費用が増加しているにも関わらず、低分子化合物の新薬承認数はむしろ停滞しているのが現状である[1-4]。

日本における 1 品目承認あたりにかかる開発費用（中央値：前臨床試験、フェーズ 1～3 試験及び申請費用を含む）は、166 億円（1990～1999 年、実費）から 245 億円（2000～2008 年、実費）へと 1.5 倍に増加した[1]。開発費用増大の理由は、医薬品の安全性・有効性の確保及びデータの信頼性を得るために、臨床試験の被験者数が 600 名から 1191 名に増加し、特に、費用の最もかかるフェーズ 3 試験における被験者数が 429 名から 888 名に増加していることに起因する。米国においても 1 品目承認あたりにかかる開発費用（平均値：開発、前臨床試験、フェーズ 1～3 試験及び上市費用を含む）は、11 億米ドル（1995～2000 年）から 17 億米ドル（2000～2002 年）へと 1.5 倍に増加しており、中でも臨床試験にかかる費用が、2 倍に増えたことが開発費用全体の増加において一番の要因である[2]。ところが、日本における製薬企業の新有効成分含有医薬品の製造承認数（日本オリジン）は 1996 年から 2005 年の間、10 個以下とほぼ横ばいである[3]。米国食品医薬品庁（Food and Drug Administration, FDA）による New Molecular Entity（NME）承認数は、平均 31 個（1998～2000 年）から平均 21 個（2001～2003 年）へと低下傾向にあり[4]、フェーズ 1 試験を開始する医薬品候補化合物のうち最終的に承認を得るまでに至る成功確率はわずか 11%である[5]。従って、従来の医薬品開発プロセスでは、研究開発費の増加が、必ずしも成功確率の向上に繋がっていないといえる。

臨床開発における候補化合物の開発中止理由は、1991 年では薬物動態/バイオアベイラビリティの原因によるものが、フェーズ 1 試験の中止理由全体の 40%と最も高く、次いで薬効（30%）、毒性（12%）、安全性（10%）であった[6]。しかし、薬物動態の予測精度向上により 2000 年には、薬物動態/バイオアベイラビリティが原因で開発中止となる化合物の割合は 10%に低下し、化合物の薬物動態が原因となる開発中止は減少したかのように一見、見受けられる。一方で、毒性及び薬効で開発中止となる化合物の割合は、むしろ増加傾向であり、20～30%を占めている[6]。しかしながら、毒性や薬効発現を決定づける要因には、薬物の薬効や副作用が発現する標的臓器への移行もまた重要であり、これらのカテゴリーの中にも、依然として広義の薬物動態に関わる要因が関与している可能性は十分に考えられる。

よって、ヒト動態特性に優れている候補化合物をフェーズ 1 試験の前に十分に選別するために、ヒト薬物動態の情報に基づいた候補化合物の選択を可能とする新しい医薬品開発ツール、マイクロドース臨床試験が提唱された。

1.2. マイクロドース臨床試験を取り巻く政策・環境

欧州医薬品庁（European Medicines Evaluation Agency, EMEA：現 Europe Medicines Agency, EMA）は、2003 年 1 月に position paper: Position paper on the nonclinical safety studies to support clinical trials with a single microdose を通知し、マイクロドース臨床試験のコンセプトを提唱した [7]。マイクロドース臨床試験は、ヒトにおいて薬理作用を発現すると推定される投与量の 1/100 を超えない用量または 100 μg のいずれか少ない用量の被験物質を、健康な被験者に単回投与することにより行われる臨床試験として定義されており、医薬品開発のできるだけ早期の段階で直接ヒトにおける動態学的情報を得ることを目的とする。現在のところ、投与薬物の適用範囲は、低分子化合物に限定されている。新規化合物を対象とする通常の臨床試験の前には、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH）M3 ガイドライン [8] が要求している非臨床毒性試験（単回・反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、生殖毒性試験及び一般薬理試験）を実施する必要があるが、マイクロドース臨床試験の実施にあたっては、投与量が薬効用量をはるかに下回ることから、拡張型単回投与毒性試験のみと必要な要件が緩和されており、低コストかつ容易に実施できる点に利点がある [7]。また、薬理作用も毒性も発現しない量を投与するため、マイクロドース臨床試験はヒトに対して安全に実施できる。

マイクロドース臨床試験は、極微量の被験物質を投与する試験であるため、高感度分析が必要である。マイクロドース臨床試験が開始された欧州では、英国のヨーク大学からスピニアウトして設立された Xceleron 社が、加速器質量分析法（Accelerator Mass Spectrometry, AMS）を用いて、被験物質の未変化体や代謝物の薬物動態学的情報の取得を行った [9]。AMS を用いる場合、血漿中薬物を高感度に測定することが可能であるが、放射性同位元素 ^{14}C で標識した被験物質を被験者に投与することが必須である。同じく未変化体や代謝物の薬物動態学的情報の取得ができる測定法に、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS）があるが、これには非標識体を被験物質として投与できることに利点がある。また、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 及び ^{18}F 等のポジトロン放出核種で標識した被験物質を被験者に投与することで被験物質の臓器・組織での定量的な分布画像を経時的に取得する陽電子放射断層撮影法（Positron Emission Tomography, PET）も測定法として挙げられる。

以上のようにマイクロドース臨床試験は、早期にヒト体内動態特性を把握し、臨床開発へ移行させるにふさわしい医薬品候補化合物を選別することで、臨床フェーズにおける開発の成功確率を増大させ、医薬品開発にかかるコストと時間を大幅に削減するものと期待されている。

1.3. 海外の動向

マイクロドース試験に対する問題点として、しばしば取り上げられるのが、極微量の投与によって得られた薬物動態から臨床投与量を投与した時の薬物動態の予測性（線形性）に関する議論である。そこで、欧州では 2005 年に官、製薬企業、そして AMS を用いた測定を行う分析 Contract Research Organization (CRO) の Xceleron 社が共同で、Consortium for Resourcing and Evaluating AMS Microdosing (CREAM) 試験と呼ばれる検証型試験を実施した [10]。本試験で

は、5種の化合物について、マイクロドース時のデータと治療量投与時の薬物動態プロファイルと比較したところ、ZK253（開発化合物）、ミダゾラム及びジアゼパムについては、マイクロドース時のデータから治療量投与時の薬物動態が線形に予測可能であることが立証され、また、AMSがマイクロドース臨床試験での高感度分析に適用できることが実証された。マイクロドース時における薬物濃度は、臨床量投与時よりも低い濃度であり、一般的に、薬物濃度がミカエリス定数よりはるかに小さいとき、代謝反応速度や輸送速度は、薬物濃度に比例する、すなわち薬物動態は線形性であると言える。但し、ワルファリンとエリスロマイシンでは、マイクロドースと治療量投与時では異なる動態特性を示した。ワルファリンの分布容積はマイクロドース時で有意に高く見積もられており、これは臓器内結合の非線形性によるものであると推察されている。また、エリスロマイシンは経口投与後の胃酸による分解のため、マイクロドース条件下においては、血中に到達した薬物量が極めて少なくなってしまうためと考えられている。

米国では2004年にFDAが、クリティカルパス報告書において、候補化合物のヒト薬物動態の予測性と有効性を改善するためには、新しい臨床評価技術が必要であると言及した[11]。FDAは、1996年に認可したスクリーニングフェーズI試験[12]の改良版として2006年1月にExploratory Investigational New Drug (eIND) 試験を通知した[13]。これは、マイクロドース臨床試験のみに限定せず、薬理学的臨床至適用量決定のための初期臨床試験（II型IND試験）や作用機序検討用の臨床試験（III型IND試験）といった薬理作用を検証するための試験も盛り込まれた。米国研究製薬工業協会に加盟している製薬企業16社からの回答によると、ヒト薬物動態予測やPET分子イメージングによる標的臓器におけるPharmacokinetics (PK) 検証を目的として9社がマイクロドース臨床試験を実施したことがあり、2006年度には3試験、2007年度には13試験と実施数が増加していた[14]。ほとんどの試験が測定法にPETを用いたものであった。また、14人の回答者のうち、被験物質の薬物濃度測定のために4人がLC-MS/MSを用い、AMSを用いたのは1人のみであった。II型やIII型IND試験についても、2006年度には8試験、2007年度には19試験と増加傾向にあった。企業がFirst in human試験でのアプローチにより、医薬品開発の効率化をめざしていることが明らかとなった。

1.4. 我が国におけるマイクロドース臨床試験普及の障壁

こうした欧米での動きに対して、日本でのマイクロドース臨床試験の実施例は報告されていなかった。そこで、私は、二つのアンケート調査を実施した。一つ目のアンケートは、医薬品開発におけるマイクロドース試験の実施基盤を整備するための課題を調査することを目標に、国内外の製薬企業に対して実施した（実施時期2008年11月）。マイクロドース臨床試験の実施については、実施の可能性が高いという回答は4例であった。一方で、試験実施の可能性が低いと回答があった（n=18、複数回答）理由のうち、最も多いのが、実施例が少なくマイクロドース試験に関する情報量が少ないため（n=8）と、従来通りの薬効や安全性も確認できるフェーズ1投与量でFirst in human試験を行う方が良いと判断したため（n=8）であった。この結果より、試験の有用性を見いだすための実証研究を率先して行うことで、企業も追隨してマイクロドース試験の導入を検討する可能性が出てくると考えられた。また、日本で試験を実施する場合には、「試験の評価方法」に次いで、「加速器質量分析計でしか測定できないこと（放射性標識体化合物投与時）」が懸念事項として挙げら

れた。しかし、非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験を実施する場合であれば、放射性標識体化合物投与の試験と比較して、被験物質の合成コストが削減でき、被験者の募集や実施施設の確保が容易であると考えられており、また、未変化体の PK データの迅速性に期待していることがわかった。なお、マイクロドース臨床試験の問題点としては、マイクロドース投与量と臨床量投与量との間における未変化体の PK データの非線形の可能性が最も多く挙げられた(n=21)。

次に、二つめのアンケートでは、日本製薬工業協会に属する製薬企業に対して 1 社につき基礎研究部会（動態部門）、基礎研究部会（毒性部門）、臨床開発部門より各 1 名あるいは、日本薬物動態談話会に所属する製薬企業の動態部門に対してアンケート調査を行った（実施時期 2009 年 7 月）。アンケート内容は、AMS と LC-MS/MS の感度の差について企業がどのような認識を持っているのか、マイクロドース臨床試験においてどのような情報を取得したいときに AMS あるいは LC-MS/MS を測定法として選択するのか、国内における放射性標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験の実施可能性についてである。測定法については、LC-MS/MS が AMS と比較して感度不足であると認識されていた（表 1 及び 2）。マイクロドース臨床試験における測定は、血中薬物濃度が pg/mL オーダー以下と低くなるため、高感度分析が必要である。英国で始まったマイクロドース臨床試験は、当時ベンチャー企業であった Xceleron 社が ^{14}C 放射性同位元素で標識した被験物質の生体試料中薬物濃度測定を AMS により行ったことから、一般的に、この方法が用いられている。よって、マイクロドース臨床試験の薬物濃度測定には、AMS の使用が常套手段と思われていた。また、マイクロドース臨床試験で使われるような低濃度域においても、LC-MS/MS が使用可能であることが実証されていないことが試験導入の大きな障壁ともなっていることがわかった。しかし、AMS は、マイクロドース臨床試験に耐える感度があると認識されている反面、国内では放射性標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験を「実施したくない」(n=91) が「実施したい」(n=72) を上回った。主な理由は、放射性標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験は海外で実施できる、及び国内において試験を実施する場合における被験者のアイソトープ投与への抵抗感であった。また、国内で使用可能な AMS は 1 台しかなく、かつ測定費用も高額であることが、マイクロドース臨床試験実施の現実的なハードルとなっているという意見もあった。マイクロドース臨床試験においてどのような情報を取得したいときに AMS あるいは LC-MS/MS を測定法として選択するのかについての回答は、以下のものであった。AMS を選択する場合は、血漿中あるいは尿中代謝物の情報の取得及び代謝物の PK プロファイル取得をしたいとき、LC-MS/MS を選択する場合は、代謝物の情報及び PK プロファイルの取得をしたいときであった。

以上のことから、日本でマイクロドース臨床試験を行うにあたっては、非標識体化合物投与の試験であれば、試験を実施するためのハードルは低く、試験において LC-MS/MS を用いた未変化体の PK データ取得が可能であることを実証することが必要であると考えられた。

また、開発戦略におけるマイクロドース臨床試験導入に際して、マイクロドース臨床試験導入という初期投資に見合った成果、すなわち開発効率の向上が得られるかどうかについての定量的なデータがないことが問題となっていることがわかった（回答 44 人の内、7 人の意見）。

よって、これらの障壁を払拭することが、マイクロドース臨床試験普及の鍵となると考えた。

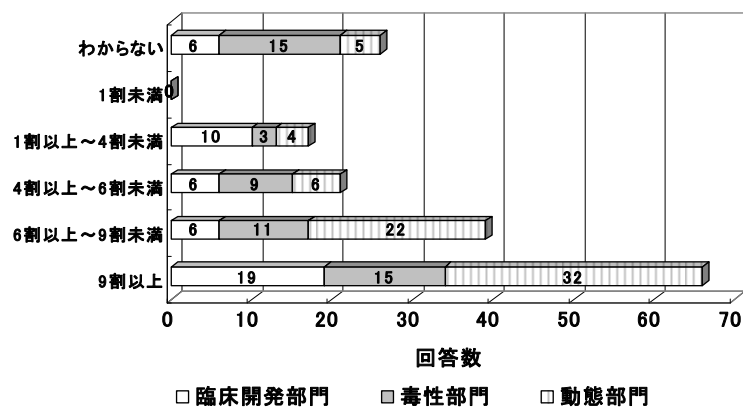


図1 マイクロドース臨床試験における血漿中薬物濃度測定にAMSを用いる場合、上市されている全医薬品(低分子化合物)のうち、血漿中濃度測定が可能であると考えられた医薬品の割合(マイクロドース時のC_{max}の5%の濃度までの定量感度が考えられた医薬品の割合)

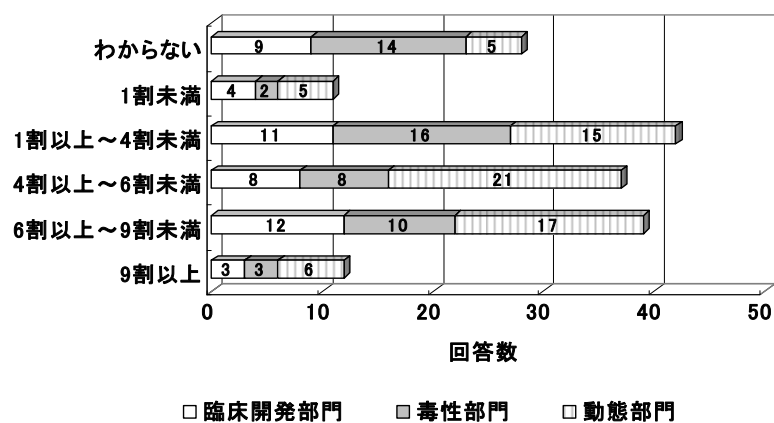


図2 マイクロドース臨床試験における血漿中薬物濃度測定にLC-MS/MSを用いる場合、上市されている全医薬品(低分子化合物)のうち、血漿中濃度測定が可能であると考えられた医薬品の割合(マイクロドース時のC_{max}の5%の濃度までの定量感度が考えられた医薬品の割合)

2. 本研究の目的と構成

マイクロドース臨床試験導入により、臨床開発における成功確率の向上が期待できるにもかかわらず、我が国においてマイクロドース臨床試験は普及していない。そこで、製薬企業に対して行ったアンケート調査の結果から明らかとなった普及の障壁を払拭することで、マイクロドース臨床試験実施のためのハードルを下げることをできると考えた。

アンケートによって抽出された一つ目の障壁は、測定法であった。マイクロドース臨床試験では微量投与であるため、高感度分析が可能な AMS が一般的に用いられているが、AMS はデメリットも多く、一般的には、高感度分析の唯一の方法と考えられていることから使われているに過ぎない。もし、LC-MS/MS が AMS と同様に、マイクロドース臨床試験においても被験物質の薬物動態データが取得できることを実証することができれば、試験実施のためのハードルを下げることはできるはずである。

二つ目の障壁は、医薬品開発戦略におけるマイクロドース臨床試験の意義に関する定量的なエビデンスの不足であった。これについては、マイクロドース臨床試験を導入することによって増加する開発費用が、最終的に得られる成果に見合うのかどうか定量的な評価があれば、企業意思決定に資するデータを提供できるはずである（図 3）。

よって私は医薬品開発におけるマイクロドース臨床試験の有用性を高めることを目的とし、最終的にはマイクロドース臨床試験の普及を目指すことを企図して、本研究を実施することとした。

第 2 章においては、LC-MS/MS の特長を最大限に活用することで、マイクロドース臨床試験における簡便・迅速な薬物濃度測定法を開発し、臨床試験から得られる情報量を高めることを検討した。

第 3 章においては、マイクロドース臨床試験導入の有益さを客観的指標を用いて示すために、マイクロドース試験導入による費用効果分析を実施した。

最後に第 4 章においては、研究を総括し、医薬品開発に本研究が与える影響について述べた。

日本で MD 試験を実施したいが...

- ・加速器質量分析法しか高感度測定ができない？
- ・標識体化合物投与の試験が必要？
- ・開発戦略において試験導入は有益？



図 3 マイクロドース臨床試験普及の障壁として考えられたこと

第2章 非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験の実施

1. 背景

マイクロドース臨床試験における被験物質の薬物濃度測定には、血漿中 fg/mL オーダーまで定量を可能とする加速器質量分析法 (Accelerator Mass Spectrometry, AMS) が一般的に用いられている [9]。しかし、被験物質の ^{14}C 標識体化合物が必須であること、装置の国内台数が 1 台であること、測定費用が高価であることが欠点として挙げられる。一方、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) の最も大きな特長は、非標識体化合物の投与で血中薬物濃度測定ができることである。感度については、数 pg/mL オーダーまで測定したという実績がある [15]。また、国内の分析 Contract Research Organization (CRO) が保有する生体試料中薬物濃度測定のために使用している装置の台数は約 120 台と AMS より遙かに多く、測定費用は 1/3 程度である。また、測定方法にも大きな違いがあり、AMS は、 ^{14}C 核種そのものを測定する方法であることから、その前に親化合物と代謝物とを LC で完全に分離することが不可欠であるため、LC の測定時間が長い。さらに、分離液ごとの試料前処理に 12~15 時間程度かかることから、AMS を用いた測定には、約 30 分/run かかる。LC-MS/MS は、LC により分離後、続いて質量分析装置によって化合物に特徴的なイオンを選択して検出することから特異性の高い測定が可能であるため、親化合物と代謝物のピークの完全分離を必要としない。よって、測定時間は、5 分程度/run である。AMS の測定費用が高価であるのは、LC により予め測定が必要であり、また、試料前処理に手間がかかることが要因であると考えられる。以上のことから、AMS より LC-MS/MS を用いた方が、マイクロドース臨床試験における薬物動態データを、低コストで迅速に取得できると考えた。

しかし、マイクロドース臨床試験に対応するためには、LC-MS/MS では感度不足ではないかという懸念が本研究を実施する前は通説となっていた。

2. ヒト血漿添加調製試料を用いた LC-MS/MS のマイクロドース臨床試験への適用可能性の検討

2-1. 目的

LC-MS/MS がマイクロドース臨床試験での適用に耐えうる感度を有するのか検討することを目的とした。検討に用いる薬物は、薬効や構造に多様性を持たせ、LC-MS/MS で高感度測定ができる化合物を意図的に選択しないようにする必要があると考えた。よって、設定した選択基準を満たした薬物をヒト血漿に添加した調製試料を LC-MS/MS で測定し、各薬物の定量可能な最も低い濃度、すなわち定量下限値を決定した。そして、その定量下限値がマイクロドース臨床試験において解析に十分な薬物動態データを取得するための感度に到達しているかを検証した [16]。

2-2. 方法

(1) 薬物の選択基準

検討に用いる薬物は、以下の 4 つの薬物の選択基準を設け、世界で売上げ上位 47 品目の内、

31 品目を選択した (Uto Brain、News Release、2007) (表 1)。

1) マイクロドース臨床試験に関するガイダンスでは、低分子化合物を投与化合物の適用範囲としているため、高分子化合物 11 品目 (エポエチン α 、ダルベポエチン α 、エタネルセプト、ペグフィルグラスチム、リツキシマブ、インフリキシマブ、トラスツズマブ、ベバシズマブ、アダリムマブ、インスリングルルギン、エノキサパリン注) は除いた。

2) マイクロドース臨床試験のガイダンスでは、投与化合物の適用範囲に配合剤は含まれていないため、配合剤 1 品目 (サルメテロール/フルチカゾン) は除いた。

3) エレクトロスプレーイオン化法によるイオン化に不向きな化合物 2 品目 (オキサリプラチン、アレンドロン酸) については除いた。これらの化合物は、非常に高極性であるため、LC-MS/MS により適切なイオンが得られないが、試料の前処理段階で誘導体化 (オキサリプラチンは、ジエチルジチオカルバメート化 (Meng M. et al., the 54th American Society for Mass Spectrometry Conference、2006)、アレンドロン酸は、メチル化[17]) することにより、LC-MS/MS で測定可能であることが報告されている。

4) 同じ薬効をもつ化合物のうち、売上げ順位 4 番目以降 (プロトンポンプ阻害剤: ラベプラゾール、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬: イルベサルタン) については除いた。

なお、活性代謝物に変換することが知られているクロピドグレル、オセルタミビル及びロサルタンについても、未変化体についての感度のみを検討した。

表 1 2006 年度世界の医薬品売り上げランキング

順	製品名	一般名	薬効	メーカー
1	リビドール	アトルバスタチン	高脂血症	ファイザー/アステラス
2	セレタイド/アドベア	サルメテロール+フルチカゾン	抗喘息薬	グラクソ・スミスクライン
3	ブラビックス	クロビドグレル	抗血小板薬	サノフィ・A/BMS
4	エボジェン/ブロクリット/エスポー	エポエチン α	腎性貧血	アムジェン/J&J/キリン
5	ノルバスク/アムロジピン	ベシル酸アムロジピン	降圧剤	ファイザー/大日本住友 他
6	ネクシアム	エソメプラゾール	抗潰瘍剤	アストラゼネカ
7	リツキシマン/マブセラ	リツキシマブ	非ホジキンリンパ腫	パイオジェン・アイデック/ロシュ
8	エンブレル	エタネルセプト	関節リウマチ/乾癬他	アムジェン/ワイス/武田
9	レミケード	インフリキシマブ	関節リウマチ/クローン病他	J&J (セントコア) /S-P/田辺
10	ジブレキサ	オランザピン	統合失調症薬	イーライリリー
11	ディオパン/ニシス	バルサルタン	降圧剤	ノバルティス/イプセン/シュワルツ
12	リスパダール	リスペリドン	統合失調症薬	J&J
13	タケブロン/プレバシッド	ランソプラゾール	抗潰瘍剤	武田薬品/TAP/アボット 他
14	アラネスブ	ダルベポエチン α	腎性貧血	アムジェン
15	パントゾール/プロトニックス	パントプラゾール	抗潰瘍剤	ニコメッド (アルタナ) /ワイス/ソルベイ
16	エフェクソール/XR	ベンラファキシン	抗うつ剤	ワイス
17	シングレア/キプレス	モンテルカスト	抗喘息/気管支喘息	メルク/キョーリン
18	セクロエル	フマル酸クエチアピン	統合失調症薬	アストラゼネカ/アステラス
19	アクトス	塩酸ビオグリタゾン	2型糖尿病	武田薬品/イーライリリー
20	フォサマック/ボナロン	アレンドロン酸ナトリウム	骨粗鬆症	メルク/帝人ファーマ
21	アバンディア	ロジグリタゾン	糖尿病薬	グラクソ・スミスクライン
22	ハーセプチン	トラスツズマブ	抗がん剤	ジェネンテック/ロシュ/中外
23	ロベノックス	エノキサパリン注	抗血栓薬	サノフィ・アベンティス
24	コザール/ニューロタン	ロサルタンカリウム	降圧剤	メルク
25	レクサプロ/シプラレックス	エシタロプラム	抗うつ剤	ルンドベック/フォレスト/レコルダチ
26	プロブレス/アタカンド	カンデサルタン	降圧剤	武田薬品/アストラゼネカ
27	アンビエン/マイスリー	酒石酸ゾルピデム	睡眠薬	サノフィ・A/アステラス
28	ゾコール/リポバス	シンバスタチン	高脂血症	メルク
29	クラビット/リーバキン/タバニック	レボフロキサシン	合成抗菌剤	第一三共/J&J/サノフィA
30	ニューラスタ	タベグフィルグラスチム	好中球減少症	アムジェン
31	バリエット/アシフェックス	ラベプラゾール	抗潰瘍剤	エーザイ/J&J
32	グリベック	メシル酸イマチニブ	抗がん剤/骨髄性白血病	ノバルティス
33	タミフル	リン酸オセルタミビル	インフルエンザ	ギリアド/ロシュ
34	アリセプト	塩酸ドネペジル	アルツハイマー病	エーザイ/ファイザー
35	アバプロ/アバライド	イルベサルタン	降圧剤	サノフィ・A/BMS
36	アバスチン	ベバシズマブ	抗がん剤/結腸・乳がん	ロシュ/ジェネンテック
37	ジルテック	塩酸セチリジン	抗ヒスタミン剤	UCB/ファイザー/第一三共
38	エロキサチン/エルブラット	オキサリプラチン	抗がん剤/結腸直腸	サノフィ・A/セクルト
39	タキソテル	ドセタキセル	抗がん剤/乳がん他	サノフィ・アベンティス
40	ハルナール/フロアマックス	塩酸タムスロシン	前立腺肥大	アステラス製薬/ベーリンガー・I
41	ウエルブリトンXL	ブプロピオン	抗うつ剤	GSK/バイオベル
42	クレストール	ロスバスタチン	高脂血症	塩野義/アストラゼネカ
43	ランタス	インスリングルラルギン	糖尿病	サノフィ・アベンティス
44	ゾロスト/ジェイゾロスト	塩酸セルトラリン	抗うつ剤	ファイザー
45	ヒューミラ	アダリムマブ	関節リウマチ/乾癬他	アボット・ラボラトリーズ
46	セレブレックス	セレコキシブ	抗炎症剤	ファイザー
47	トバマックス	トピラマート	抗てんかん剤	J&J

Uto Brain、News Release、2007 より改変。本検討に用いた薬物は、灰色の網掛けとした。

(2) 装置

LC システムに、ACQUITY UPLC システム (Waters Corporation, Milford, MA, USA) を、質量分析装置に、ターボエレクトロスプレーイオン源を備えた API5000 システム (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Foster City, CA, USA) を使用した。

(3) 試薬

化合物は、LKT Laboratories, Inc. (Milford, MA, USA)、AvaChem Scientific LLC. (San Antonio, TX, USA)、MP Biomedicals Inc. (Irvine, CA, USA)、Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada) または Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。リン酸オセルタミビルについては、合成された [18, 19]。試薬は、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Kyoto, Japan) から購入した。固相抽出 Solid-phase extraction (SPE) カートリッジ、InertSep Pharma (60 mg/3 mL) 及び InertSep MC-1 (60 mg/3 mL) は、GL Science Inc. (Osaka, Japan) から購入した。SPE 用の Oasis hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB) カートリッジ (30 mg/1 mL) 及び分析カラム ACQUITY UPLC BEH C18 column、ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 column 及び Atlantis HILIC Silica column は、Waters Co. (Milford, MA, USA) から購入した。分析カラム Cadenza CD-C18 column of Imtakt Co. (Kyoto, Japan)、Phenomenex Aqua C18 column and Phenomenex Luna C18(2) column from Phenomenex Inc. (Torrance, CA, USA)、TSK-gel ODS-100V column from TOSOH Co. (Kyoto, Japan) も購入した (表 2)。

(4) 標準原液及び標準溶液の調製

全ての標準原液 (200 µg/mL) は、アセトニトリル、メタノールまたは水を用いて希釈し、検量線用及び精度管理 (Quality Control, QC) サンプル用の標準溶液を調製した。

(5) LC-MS/MS による測定

各化合物の LC 及び MS 条件をスキームに則って検討した (図 1)。各標準溶液を用いて、化合物のイオン化効率を検討後、オクタデシルシリル (Octadecylsilyl, ODS) カラム (逆相カラム) を第一選択として、化合物の保持時間及びピーク形状を確認した。移動相は、アセトニトリルまたはメタノール/0.1%ギ酸または 10 mM ギ酸アンモニウムの組成とし、基本的にアイソクラティックとした (表 2)。ターボイオンスプレーインターフェースは、正イオンモードまたは負イオンモードで使用した (表 3)。定量は、Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法で行った。決定した分析法は、バリデーションし、各化合物の定量下限値の決定に至った。分析データは、Analyst ソフトウェア version 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Foster City, CA, USA) を用いて解析した。

表2 液体クロマトグラフの条件

測定対象物質	分析カラム	移動相	流速 (mL/min)	保持時間 (min)
アムロジピン	C	IV	0.2	1.7
アトルバスタチン	C	IV	0.3	1.3
ブプロピオン	F	I	0.2	3.5
カンデサルタン	F	V	0.2	2.9
セレコキシブ	C	I	0.3	1.6
セチリジン	D	VII	0.3	1.7
エスシタロプラム	E	II	0.15	3.2
クロピドグレル	A	I	0.5	0.9
ドセタキセル	G	VI	0.3	1.2
ドネペジル	B	VIII	0.3	1.0
エソメプラゾール	F	I	0.2	2.4
イマチニブ	F	I	0.2	3.0
ランソプラゾール	F	I	0.2	2.5
レボフロキサシン	H	V	0.2	1.4
ロサルタン	F	IV	0.2	2.6
モンテルカスト	A	IV	0.6	1.0
オセルタミビル	C	IV	0.2	0.95
オランザピン	G	I	0.2	1.8
パントプラゾール	F	I	0.2	2.3
ピオグリタゾン	F	I	0.2	3.4
クエチアピン	F	I	0.2	3.3
リスペリドン	F	I	0.2	2.8
ロシグリタゾン	F	II	0.2	4.0
ロスバスタチン	G	I	0.2	1.8
セルトラリン	G	I	0.2	2.5
シンバスタチン	G	III	0.2	3.6
タムスロシン	F	I	0.2	2.6
トピラマート	C	I	0.3	1.0
バルサルタン	F	IV	0.2	3.2
ベンラファキシン	F	I	0.2	2.8
ゾルピデム	F	I	0.2	2.7

A: ACQUITY UPLC BEH C18 2.1×50 mm, 1.7 μm (Waters)

B: ACQUITY UPLC BEH C18 2.1×100 mm, 1.7 μm (Waters)

C: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 2.1×100 mm, 1.7 μm (Waters)

D: Atlantis HILIC Silica 2×150 mm, 3 μm (Waters)

E: Cadenza CD-C18 2×150 mm, 3 μm (Imtakt)

F: Phenomenex Aqua C18 2×150 mm, 5 μm (Phenomenex)

G: Phenomenex Luna C18(2) 2×100 mm, 2.5 μm (Phenomenex)

H: TSK-gel ODS-100V 2×150 mm, 3 μm (TOSOH)

I: Acetonitrile/10 mM ammonium formate (7:3, v/v)

II: Acetonitrile/10 mM ammonium formate (65:35, v/v)

III: Acetonitrile/10 mM ammonium acetate-acetic acid buffer (pH4.5) (85:15, v/v)

IV: Acetonitrile/0.1% formic acid (7:3, v/v)

V: Acetonitrile/0.1% formic acid (65:35, v/v)

VI: Methanol containing 0.1% formic acid/0.1% formic acid (9:1, v/v)

VII: Methanol/0.1% formic acid (98:2, v/v)

VIII: Methanol/10 mM ammonium acetate (87:13, v/v)

表3 質量分析の条件

測定対象物質	極性	プレカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	コリジョン エネルギー (V)	ネプライザー ガス (psi)	ターボ ガス (psi)	カーテンガス (psi)	コリジョン ガス (単位なし)	イオンスプレー 電圧 (V)	ターボガス 温度 (°C)
アムロジピン	Positive	409.1	238.0	15	50	30	20	5	5000	600
アトルバスタチン	Positive	559.3	440.1	31	40	70	10	7	5000	650
ブプロピオン	Positive	240.1	184.0	17	70	70	20	5	5000	650
カンデサルタン	Positive	441.2	263.1	19	30	70	30	5	5000	550
セレコキシブ	Negative	380.1	316.0	-30	70	70	10	7	-3500	600
セチリジン	Positive	389.2	201.1	25	30	70	10	7	5000	600
エシタロプラム	Positive	325.1	109.0	35	70	70	10	7	5000	600
クロピドグレル	Positive	322.1	211.9	23	70	70	20	6	4000	600
ドセタキセル	Positive	808.4	527.3	11	30	30	20	8	5500	500
ドネペジル	Positive	380.3	91.2	53	30	70	10	10	5000	600
エソメプラゾール	Positive	346.2	198.0	19	70	30	40	5	5000	600
イマチニブ	Positive	494.2	394.1	37	70	70	10	7	4500	600
ランソプラゾール	Positive	370.1	252.0	17	40	70	20	4	5000	600
レボフロキサシン	Positive	362.2	318.3	29	70	50	10	6	5500	600
ロサルタン	Positive	423.2	207.0	33	30	70	10	5	5000	600
モンテルカスト	Positive	586.1	422.1	35	70	70	10	4	4500	500
オセルタミビル	Positive	313.2	166.1	27	50	70	10	4	4500	600
オランザピン	Positive	313.2	256.0	33	70	30	10	5	4500	600
パントプラゾール	Positive	384.1	200.0	19	40	70	20	4	5000	600
ピオグリタゾン	Positive	357.1	134.2	41	70	70	20	6	4000	600
クエチアピン	Positive	384.1	253.1	31	40	70	10	6	4500	600
リスペリドン	Positive	411.2	191.1	39	70	70	20	4	4500	600
ロシグリタゾン	Positive	358.2	135.2	39	60	70	10	9	5000	550
ロスバスタチン	Positive	482.1	258.2	49	70	60	10	7	5500	600
セルトラリン	Positive	306.2	158.9	41	40	70	20	7	4500	600
シンバスタチン	Positive	436.4	199.2	21	70	50	10	4	5500	550
タムスロシン	Positive	409.1	228.1	35	60	70	20	7	4000	600
トピラマート	Negative	337.9	78.0	-40	70	70	20	7	-4000	600
バルサルタン	Positive	436.2	291.2	25	30	70	10	5	4500	500
ベンラファキシン	Positive	278.2	58.1	35	50	70	20	6	5000	600
ゾルピデム	Positive	308.0	235.0	47	50	70	10	7	4000	600

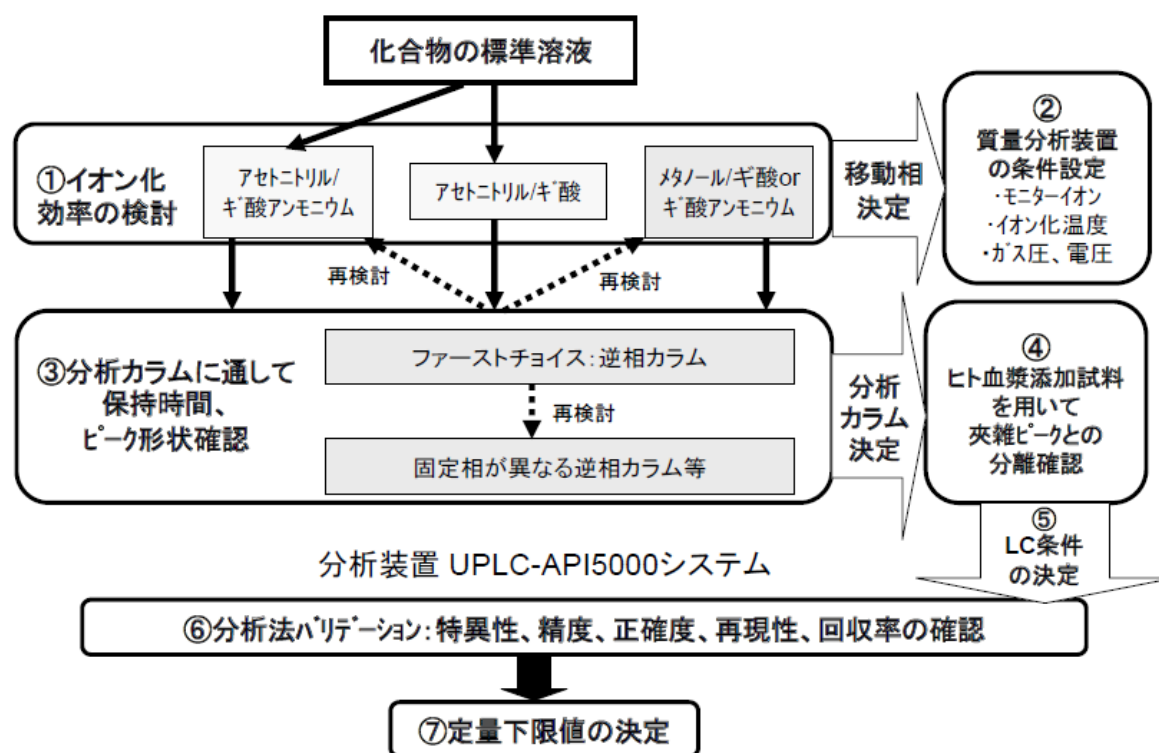


図1 測定条件決定～定量下限値決定までのスキーム

(6) 試料処理法

物性毎に分類した化合物に適した固相抽出法を選択し、各手順の溶媒を検討した（図2）。スルホネート／カチオン交換基をもつ SPE カートリッジ（InertSep MC-1）またはメタクリレートとスチレンジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドンのコポリマーの混合した固定相を持つ SPE カートリッジ（InertSep Pharma）を使用した固相抽出は、以下のように実施した。（表4及び5）。血漿試料 1 mL に、ギ酸 0.1 mL 及び水 1.5 mL を添加後、SPE カートリッジに添加した。夾雑物質を洗浄するために水 3 mL 及び洗浄液 3 mL を SPE カートリッジに添加後、有機溶媒 2 mL で測定対象の化合物を溶出した。セチリジン及びレボフロキサシンについては、血漿試料 0.1 mL を用い、水 0.5 mL を添加後、SPE カートリッジに添加した。水 1 mL 及び洗浄液 1 mL を洗浄溶媒とし、測定対象の化合物は、有機溶媒 1 mL で溶出した。Oasis HLB の SPE カートリッジを使用した場合は、血漿試料に水 0.5 mL を添加後、SPE カートリッジに添加し、洗浄後、有機溶媒で測定対象の化合物を溶出した。窒素ガスにて溶出液を蒸発乾固後、残渣を再溶解液 0.1 mL で溶解した。

固相抽出法で回収率が低いまたは他の問題がある場合は、液液抽出法を採用した（表6）。液液抽出は、以下のように実施した。血漿試料 1 mL に、アセトニトリル 1 mL を添加することにより除タンパクを行い、その上清を別の試験管に採取後、窒素ガスにて上清が約 1 mL になるまで蒸発させた。血漿試料 1 mL を用いて液液抽出を行う際は、夾雑物質のクリーンアップを十分に行うため、抽出前に血漿試料の除タンパクが必要である。それから、上清を酸性またはアルカリ性とし、有機溶媒 4 mL で測定対象の化合物を抽出した。有機溶媒は、窒素ガスにて

蒸発乾固後、残渣を再溶解液 0.1 mL で溶解した。

なお、定量に際し、内標準物質（Internal Standard, IS）法を採用する場合は、各 IS 溶液は試料処理前に血漿試料に添加した。

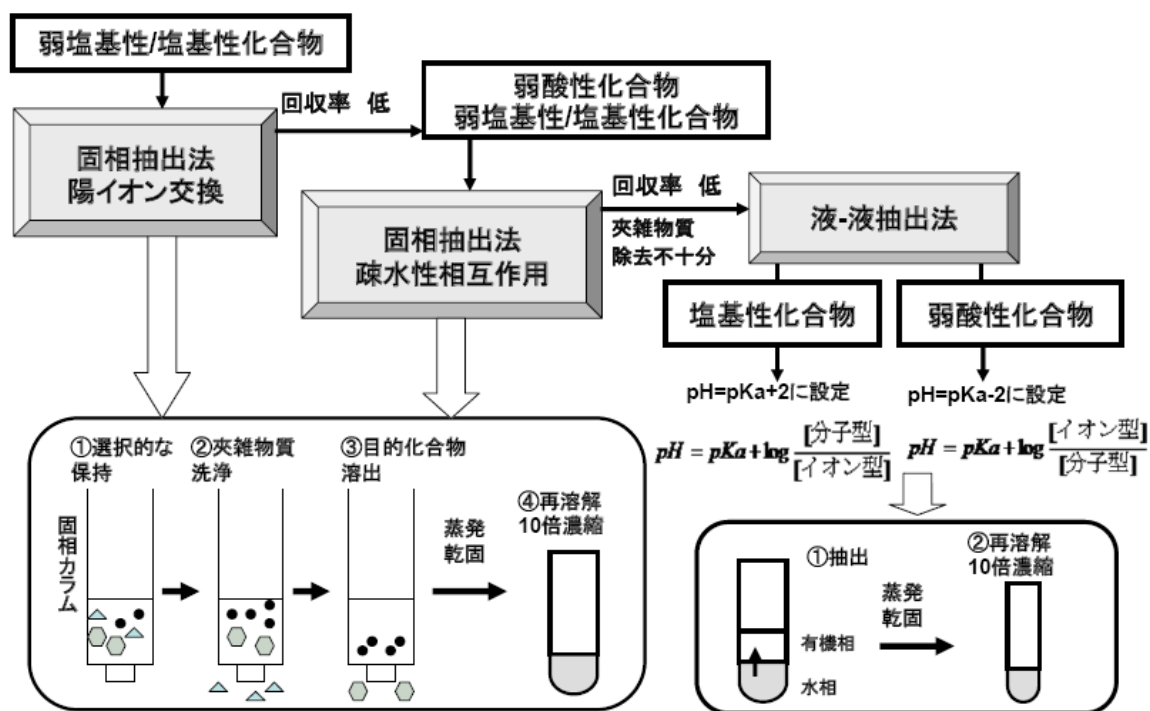


図 2 試料前処理法決定のためのスキーム

表 4 InertSep MC-1 を用いた固相抽出を採用した化合物の試料前処理条件

薬物	薬物の pKa	内標準物質	2 回目の洗浄 溶媒	溶出溶媒	溶解溶媒	回収率 (%)	CV (%)
ブプロピオン	7.9	クエチアピン	メタノール	4%アンモニア含有 アセトニトリル／ メタノール (9:1、v/v)	移動相	94.4	6.6
エスシタロプラム	9.6	タムスロシン				92.1	2.5
クロピドグレル	4.55	イマチニブ				82.5	2.6
イマチニブ	pKa ₁ 8.07、pKa ₂ 3.73 pKa ₃ 2.56、pKa ₄ 1.52	クエチアピン				86.0	1.5
オランザピン	7.37、 4.69	セルトラリン				86.5	1.9
ピオグリタゾン	5.8、 6.4	クエチアピン				85.0	6.8
クエチアピン	3.3、 6.8	イマチニブ				81.2	7.7
リスペリドン	pKa ₁ 8.24、 pKa ₂ 3.11	クエチアピン				97.0	0.7
ロシグリタゾン	6.1、 6.8	クエチアピン				74.4	1.8
セルトラリン	8.9	クエチアピン				75.6	8.2
タムスロシン	8.73、 10.23	クエチアピン				88.0	2.1

表 5 InertSep Pharma または Oasis HLB を用いた固相抽出を採用した化合物の試料前処理条件

薬物	内標準物質	固相カート リッジの種類	2 回目の洗浄溶媒	溶出溶媒	溶解溶媒	回収率 (%)	CV (%)
アトルバスタチン	クロピドグレル	InertSep Pharma	10%メタノール		移動相	82.9	8.7
トピラマート	セレコキシブ					92.3	2.2
ベンラファキシン	-					80.9	3.5
ゾルピデム	-		30%メタノール	メタノール	アセトニトリル／2% アンモニア (7:3、v/v)	100.8	0.1
エソメプラゾール	ゾルピデム					53.5	2.4
ランソプラゾール	ゾルピデム					41.3	6.2
パントプラゾール	ゾルピデム					68.9	0.7
セチリジン	-	Oasis HLB	30% メタノール	酢酸エチル／ メタノール (1:9、v/v)	移動相	65.9	0.6
レボフラキサシン	-					42.0	1.4

表 6 液液抽出を採用した化合物の試料前処理条件

薬物	薬物の pKa	内標準物質	抽出前の添加試薬	抽出溶媒	溶解溶媒	回収率 (%)	CV (%)
カンデサルタン	2.1、4.6	バルサルタン	ギ酸	<i>t</i> -ブチルメチルエーテル	移動相	63.1	0.8
ロサルタン	4.3	カンデサルタン				67.5	0.6
バルサルタン	3.9、4.73	カンデサルタン				65.4	2.3
セレコキシブ	11.1	トピラマート				57.3	3.6
ロスバスタチン	4.6	-				90.4	1.1
シンバスタチン	4.3	-	10 mM 酢酸アンモニウム-酢酸緩衝液 (pH 4.5)		10 mM 酢酸アンモニウム-酢酸緩衝液 (pH 4.5) (5:5、v/v)	61.2	1.8
アムロジピン	8.6	オセルタミビル	アンモニア溶液	<i>t</i> -ブチルメチルエーテル	移動相	82.7	6.6
オセルタミビル	7.75	アムロジピン				56.6	1.8
モンテルカスト	6.5±0.8	-		酢酸エチル		83.8	3.2
ドセタキセル	2.5-4.5	アムロジピン		<i>t</i> -ブチルメチルエーテル	メタノール／アセトニトリル／水 (45:45:10、v/v/v)	82.0	3.0
ドネペジル	8.90	-		3% 2-プロパノール含有ヘキサン	移動相	80.7	2.6

(7) バリデーションパラメータ

定量下限値を決定するために、以下のバリデーションパラメータを検討した。特異性は、6 個体をプールしたブランク血漿を用いて評価した。ゼロ試料及び 6~8 濃度の検量線用試料から成る検量線を 1 日間測定した。検量線式は最小二乗法（重み $1/y^2$ ）により評価した。検量線の直線性は、相関係数及び各濃度の相対誤差（Relative Error, RE）で評価した。日内再現性は、3 濃度（n=5）の QC サンプルを 1 日間測定した。回収率は、1 濃度（n=3）で評価した。

2-3. 結果

(1) 質量分析装置の分析条件

LC-MS/MS を用いた有機化合物の測定には、化合物のイオン化が必須である。定量の感度は、構造式がもつ官能基のイオン化の程度に依存する（図 3a-e）。イオン化の程度は、有機溶媒の揮発性及び溶液の pH に依存する。よって、移動相には、化合物のイオン化効率を高めることができるアセトニトリルを選択した。移動相の pH 調整のためには、揮発性塩であるギ酸及びギ酸アンモニウムを使用した。

各化合物のアセトニトリル/0.1%ギ酸溶液、及びアセトニトリル/10 mM ギ酸アンモニウム溶液をインフュージョンすることによりマススペクトル及びタンデムマススペクトル測定を行い、スペクトル中で最も高いピーク強度をプレカーサーイオンまたはプロダクトイオンとして選択し、同時にコリジョンエネルギーを最適化した。プロダクトイオンの最も高いピーク強度が得られた時の溶液を一時的な移動相として選択し、ネブライザーガス、ターボガス、カーテンガス、コリジョンガス、イオンスプレー電圧及びターボガス温度を最適化した（表 3）。

(2) 分析カラム及び移動相

各化合物の保持時間及びピーク形状は、一時的な移動相と ODS カラム（ACQUITY UPLC BEH C18 カラム）を用いて確認した。また、化合物のピークと夾雑ピークとの分離は、化合物を添加したヒト血漿試料を用いて確認した。しかし、ODS カラムと移動相が適切でないときには、分析カラムと移動相を再検討した。全ての化合物は、アイソクラティックモードで測定し、保持時間は 4.0 分以内であった（表 2）。アムロジピン、アトルバスタチン及びオセルタミビルを測定する場合、酸性条件下で化合物がイオン化するが、ギ酸を含む移動相を使用することでこれら化合物は ODS カラムの固定相への保持が弱くなった。よって、これらの化合物の固定相への保持を強くするためにカルバメート基を固定相に持つ ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 カラムを選択した。アンギオテンシン II 受容体拮抗薬（サルタン類）と夾雑ピークの分離のためには、極性のエンドキャッピングをもつ Phenomenex Aqua C18 カラムを使用した。ドセタキセルの ODS カラムへの保持を強くするためには、アセトニトリルの代わりにメタノールを使用することが有用であった。親和性で両性化合物であるセチリジンは、ODS カラムに保持しにくいため、親和性相互作用（Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC）シリカカラムを使用した。このカラムの固定相に存在する水層の存在によって、移動相の有機溶媒比率が高いほど化合物の保持が強くなるが、この保持力は、アセトニトリルよりもメタノールを含む移動相において強くなった。

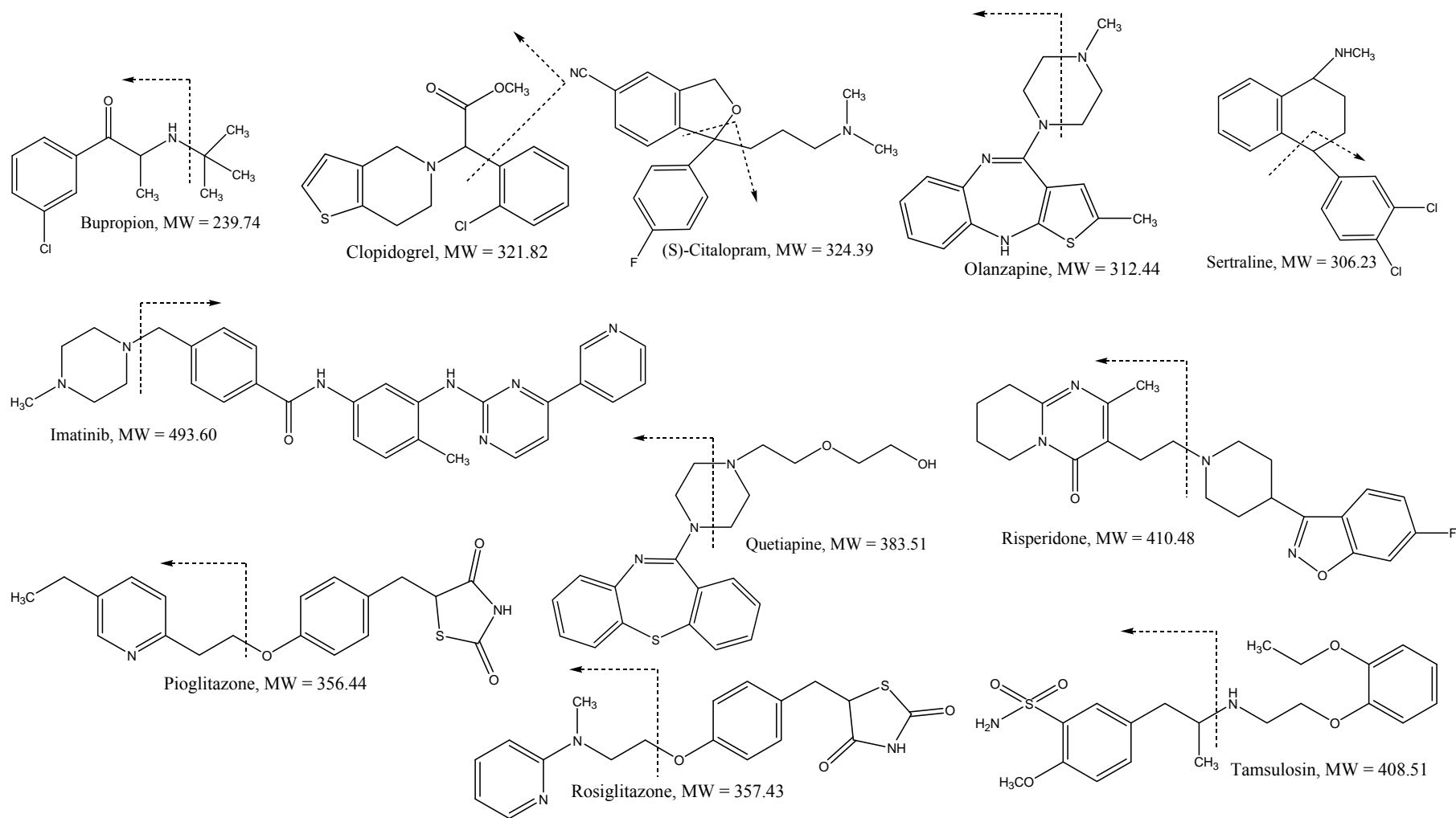


図 3a 試料前処理法別に構造式を区分した。プレカーサーイオンからプロダクトイオンへのフラグメンテーションの位置を点線で示す。

試料前処理法：固相抽出法、使用した固相抽出カートリッジ：InertSep MC-1。

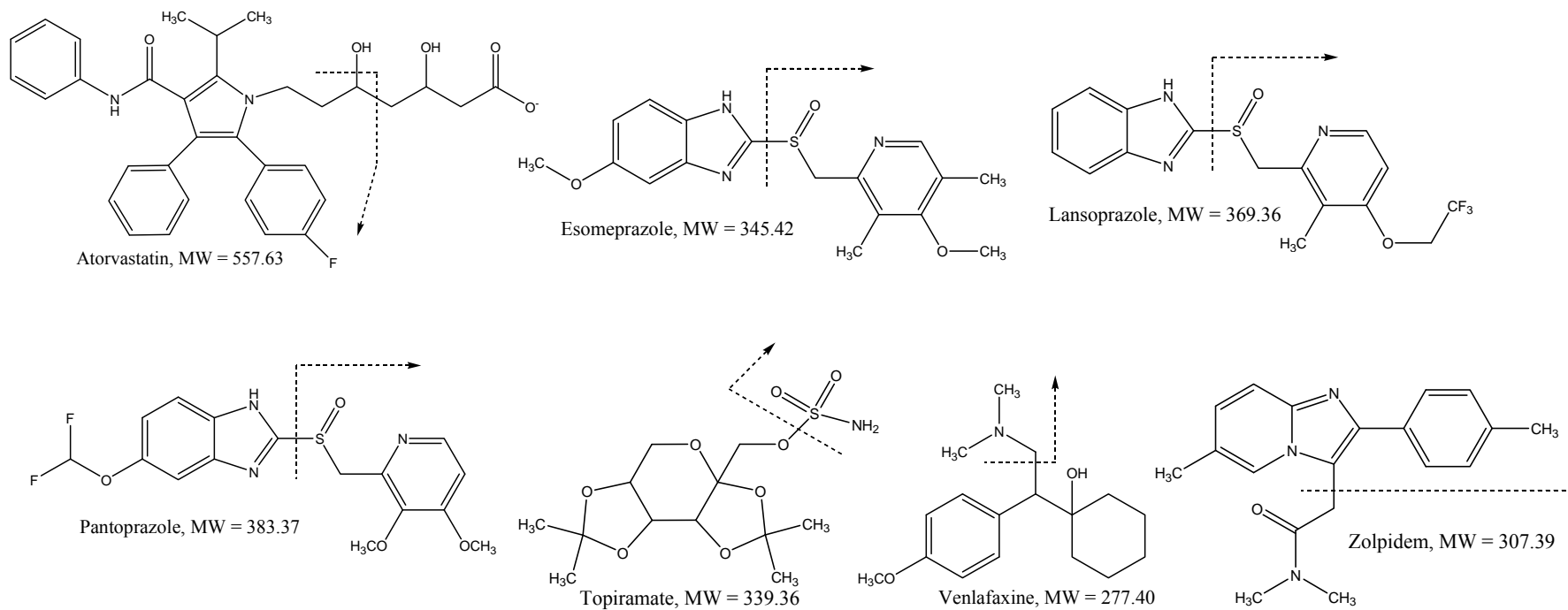


図 3b 試料前処理法別に構造式を区分した。プレカーサーイオンからプロダクトイオンへのフラグメンテーションの位置を点線で示す。

試料前処理法：固相抽出法、使用した固相抽出カートリッジ：InertSep Pharma。

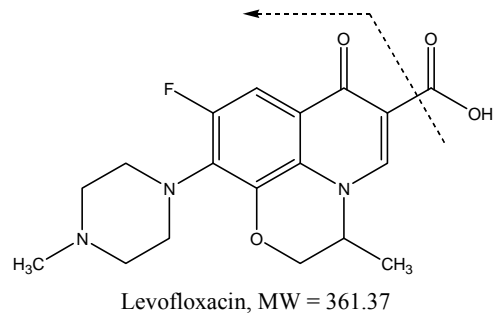
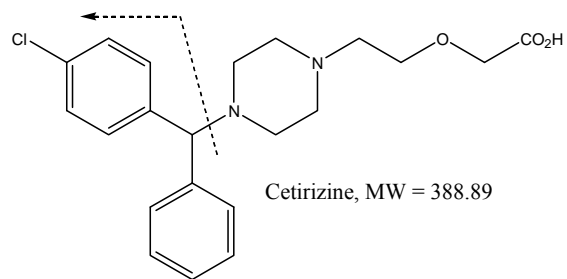


図 3c 試料前処理法別に構造式を区分した。プレカーサーイオンからプロダクトイオンへのフラグメンテーションの位置を点線で示す。
試料前処理法：固相抽出法、使用した固相抽出カートリッジ：Oasis HLB。

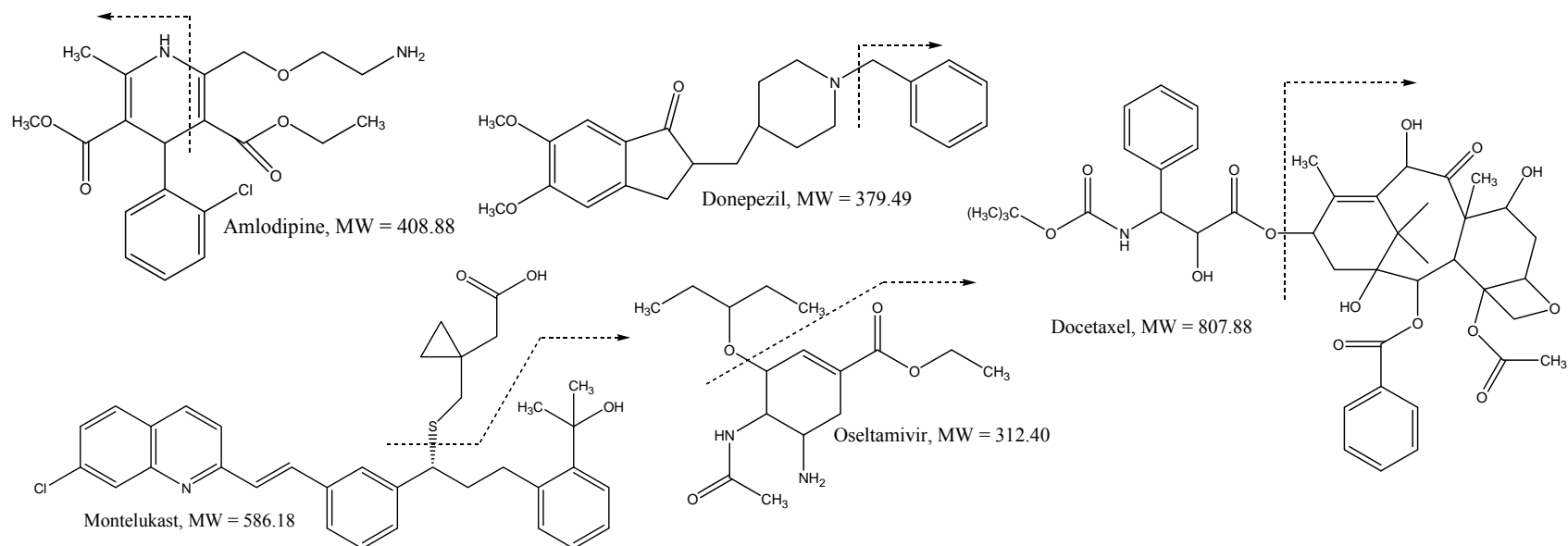


図 3d 試料前処理法別に構造式を区分した。プレカーサーイオンからプロダクトイオンへのフラグメンテーションの位置を点線で示す。
試料前処理法：液液抽出法（アルカリ性条件下にて抽出）。

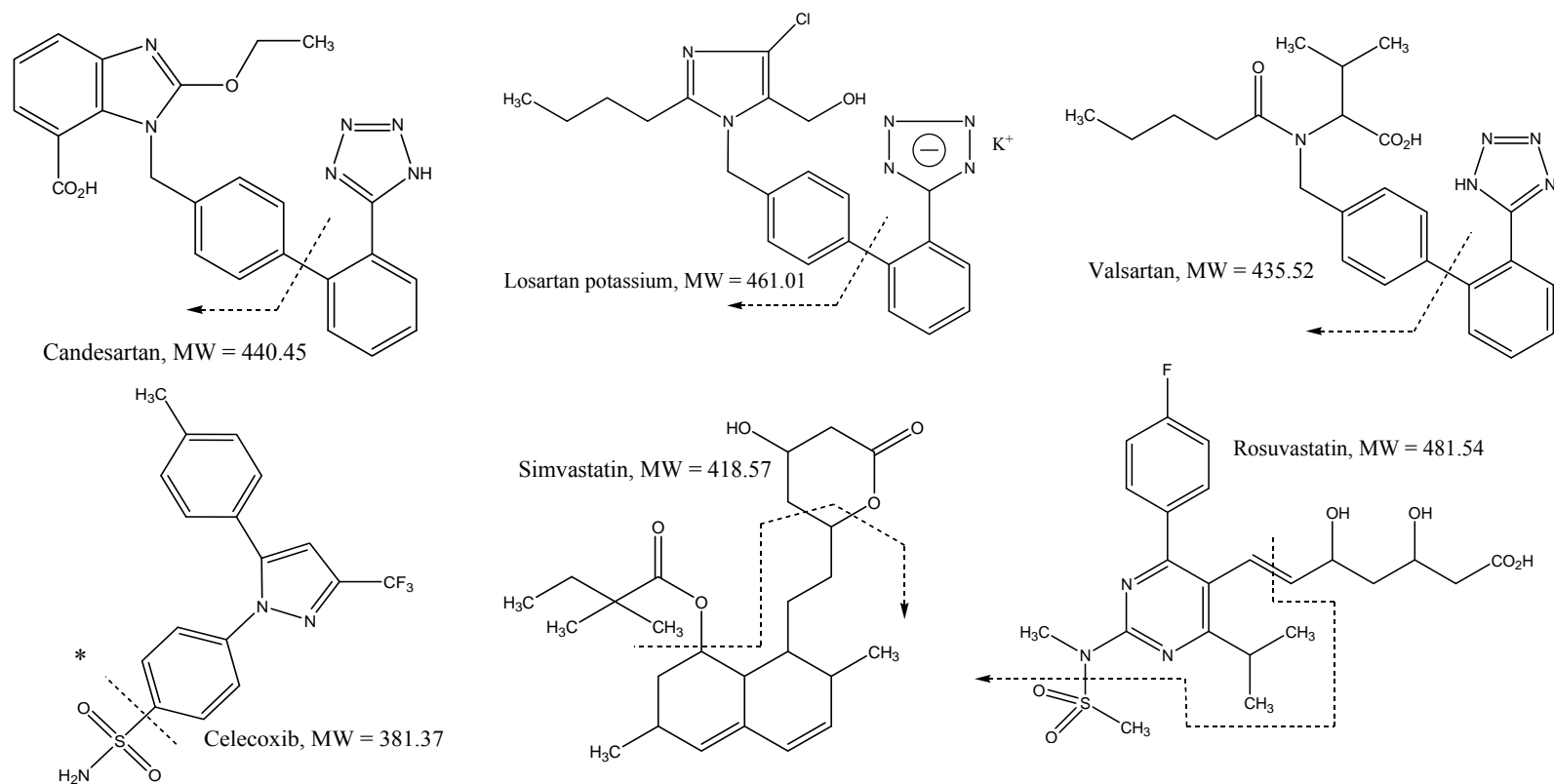


図 3e 試料前処理法別に構造式を区分した。プレカーサーイオンからプロダクトイオンへのフラグメンテーションの位置を点線で示す。
試料前処理法：液液抽出法（酸性条件下にて抽出）。

* プレカーサーイオンからプロダクトイオンへの開裂した時に、SO₂の脱離とNHの転位が同時に起こったと推定。

(3) 試料前処理法

開発した試料処理法及びヒト血漿添加試料からの化合物の回収率は、表 4、5 及び 6 に示す。塩基性及び弱塩基性化合物の場合、化合物中の窒素原子が、SPE カートリッジ InertSep MC-1 の固定相のスルホン酸基に保持されるため、この固相カラムを用いた典型的な前処理法を適用した。SPE カートリッジの固定相への化合物の保持が InertSep MC-1 より強くなる場合には、他の SPE カートリッジである InertSep Pharma や OASIS HLB を使用した。その際の最適な洗浄溶媒は、メタノールと水の割合を検討することで決定した。SPE カートリッジに血漿試料を添加する前には、試料中の化合物をイオン型にするために、血漿試料にギ酸を添加後、SPE カートリッジに添加した。しかし、エソメプラゾール、パントプラゾール及びランソプラゾールのようなベンズイミダゾール誘導体は、酸性条件下において分解するため、血漿試料にギ酸を添加せずに、SPE カートリッジに添加した。さらに、再溶解液には、アンモニア溶液を添加することでアルカリ性とし、化合物の分解を防いだ。

また、基本的に使用する血漿試料は、1 mL としたが、セチリジン及びレボフロキサシンの使用血漿量は 0.1 mL とした。なぜなら、血漿量を 0.1 mL より増加してもそれぞれの定量下限値である 5 pg/mL と 30 pg/mL より低い値を検出することができなかったからである。

固相抽出法で回収率が低いまたは夾雑物質のクリーンアップが不十分な場合は、液-液抽出法を採用した。液液抽出時の試料(水層)の pH は、化合物の pKa を利用し、酸性化合物では pKa-2、塩基性化合物では pKa+2 に調整し、分子型の化合物を有機溶媒で抽出した。ほとんどの化合物の抽出溶媒は、*t*-ブチルメチルエーテル (極性インデックス 2.5 (水=9))、相対密度 0.7、沸点 55°C) を選択した。ドネペジルの抽出においては、抽出中のエマルジョンの形成を防ぐため、2-プロパノールを添加した *n*-ヘキサンを選択した[20]。モンテルカストの抽出においては、回収率が *t*-ブチルメチルエーテルより高くなる酢酸エチル (極性インデックス 4.4) を用いた。シンバスタチンの処理にあたっては、シンバスタチンからシンバスタチン酸への変換を最小にするため、酢酸緩衝液 (pH 4.5) を試料処理及び移動相の調製に使用した[21]。

内標準法を用いて定量する場合、IS は、通常、測定の精度を上げるために測定対象の化合物の安定同位体を用いるが、マイクロドーズ試験実施の段階で医薬品候補品の安定同位体の合成は想定できないことから、測定対象とする化合物と同じ分析条件で測定できる化合物を IS として検討した 31 化合物の中から選択した。

(4) 同時測定及び試料処理

ランソプラゾール及びパントプラゾールを添加した試料は、同時に試料前処理を行い、分析条件、検量線範囲が同じであったため、同時に測定した。検量線は、いずれも 5~5000 pg/mL の範囲で直線性があり、定量下限値は、5 pg/mL に設定できた。

(5) バリデーションパラメータ

選択性は、6 個体からのプールブランク血漿を用いて評価した。定量を妨害するピークは、測定対象物質及び IS の溶出位置になかった。定量下限値は、RE が±20%以内、精度 (Coefficient of Variation, CV) が 20%以内の検量線の最低濃度を設定した。いずれの化合物も検量線の範囲

は 400 倍以上であり良好な直線性を示した。さらに、相関係数は 0.993 以上、検量線各濃度の RE は定量下限値では $\pm 20\%$ 以内、その他の濃度では $\pm 15\%$ 以内であり、判断基準を満たした。ブランク試料において、測定対象の化合物の溶出位置に夾雑ピークが認められた場合は、その化合物の定量下限値のピーク面積値がブランク試料でのピーク面積値の 5 倍以上になるように設定した。日内再現性は、CV が 13.7%以下、RE が $\pm 12.9\%$ 以内であり、判断基準を満たした。回収率の CV は、8.7%以下であり、判断基準の 15%以下を満たした。回収率が 50%未満の化合物もあったが、CV が判断基準を満たしており、定量には影響しなかった。エレクトロスプレーイオン化法を用いた生体試料中薬物濃度においては、通常、試料処理やイオン化の変動を最小にするために内標準法を用いる。しかし、試料前処理において夾雑物質のクリーンアップが十分に行われ、分析条件が最適化されたことにより、回収率の CV の結果が良好であった 8 化合物については、絶対検量線法を採用した。

本研究は、LC-MS/MS がマイクロドース臨床試験に耐えうる感度を有するかどうかを検討するのが目的であることから、一つの標準原液から検量線用標準溶液及び QC サンプル用標準溶液を調製したが、実際の生体試料中薬物濃度測定においては、標準溶液の安定性が確認されていないのであれば、別々の標準原液から調製することが望ましい。取得した 31 化合物の定量下限値を表 7 に、31 化合物中、最も低い定量下限値を示したクロピドグレルの MRM クロマトグラムを図 4 に示す。

(6) マイクロドース臨床試験への適用性

取得した定量下限値が、マイクロドース臨床試験で解析に十分な薬物動態データを取得するための感度に到達しているかを検討した。MD 試験時に想定される C_{max} 値 ($C_{max_{MD}}$) を取得した定量下限値で除したときの比を、図 5 に示す。 $C_{max_{MD}}$ は、MD 投与時と治療量投与時における薬物動態プロファイル ($C_{max_{Clin}}$) の線形性を仮定し治療量投与時の C_{max} 値から比例計算した (表 4)。 $C_{max_{Clin}}$ の情報は、添付文書[22-49]、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics の Appendix[50]または文献[51, 52]から収集した。後発医薬品の生物学的同等性試験のガイドライン[53]において、基本的な薬物動態パラメータである血中濃度曲線下面積 (Area Under the Curve, AUC)、半減期 ($t_{1/2}$)、クリアランス (Clearance, CL)、分布容積 (Volume of Distribution, Vd) を求めるために C_{max} 値の 3 半減期以上 ($1/2^3$ すなわち $1/8$) の濃度を測定することが推奨されていることから、その比の判断基準は、8 とした。結果、ロサルタン以外の全ての化合物は、この判断基準を満たした。さらに、薬物動態データを十分に解析することができるとして、比の判断基準を 32 ($1/2^5$ すなわち $1/32$) と高くしたところ、31 化合物中 24 化合物 (77%) が判断基準を満たした。なお、各化合物の検量線の上限濃度は、推定した $C_{max_{MD}}$ の範囲内であった。

表7 臨床投与及びマイクロドース時における投与量及び Cmax 値並びに各薬物の定量下限値

薬物名	Dose _{Clin} ^a (mg)	Cmax _{Clin} ^b (ng/mL)	Dose _{MD} ^c (μg)	Cmax _{MD} ^d (pg/mL)	定量下限値 (pg/mL)
アムロジピン	5	2.81	50	28	2
アトルバスタチン	5	2.64	50	26	2
ブプロピオン	100	141	100	141	2
カンデサルタン	4 ^e	55.1	40	551	10
セレコキシブ	100	553	100	553	4
セチリジン	10	214.5	100	2145	5
エスシタロプラム	20	21	100	105	0.8
クロピドグレル	75	2.29×10 ³	100	3053	0.08
ドセタキセル	100 ^f	2×10 ³	100	1966	5
ドネペジル	5	9.97	50	98	0.5
エソメプラゾール	20	725×10 ³	100	3627	4
イマチニブ	400	1.64×10 ³	100	438	0.8
ランソプラゾール	15	442.7	100	3533	5
レボフロキサシン	500	8.04×10 ³	100	1608	30
ロサルタン	25	84.5	100	340	50
モンテルカスト	10	526	100	5260	2
オセルタミビル	75	360	100	480	2
オランザピン	5	10.5	50	105	1
パントプラゾール	40	2.5×10 ³	100	6250	5
ピオグリタゾン	30	1.4×10 ³	100	4667	0.2
クエチアピン	25	65.29	100	261	0.4
リスペリドン	1	7.01	10	70	0.2
ロシグリタゾン	2	156	20	1560	0.2
ロスバスタチン	10	7.87	100	79	4
セルトラリン	50	15.1	100	30	2
シンバスタチン	5	5.1	50	51	3
タムスロシン	0.1	3.2	1	32	0.4
トピラマート	50	0.84×10 ³	100	1680	4
バルサルタン	20	0.86×10 ³	100	4300	20
ベンラファキシン	150	150	100	100	4
ゾルピデム	5	76.2	50	762	0.8

^aDose_{Clin}：臨床投与量；^bCmax_{Clin} 臨床投与量後の最大血漿中濃度；^cDose_{MD}：マイクロドース臨床試験における投与量（100 μg または薬理作用を発揮する量の 1/100）；^dCmax_{MD} (pg/mL) = Cmax_{Clin} × Dose_{MD}/Dose_{Clin}；^e カンデサルタンシレキセチルとして；^fOriginal 投与量 60 mg/m²（体表面積は約 1.7m²/body として算出した）

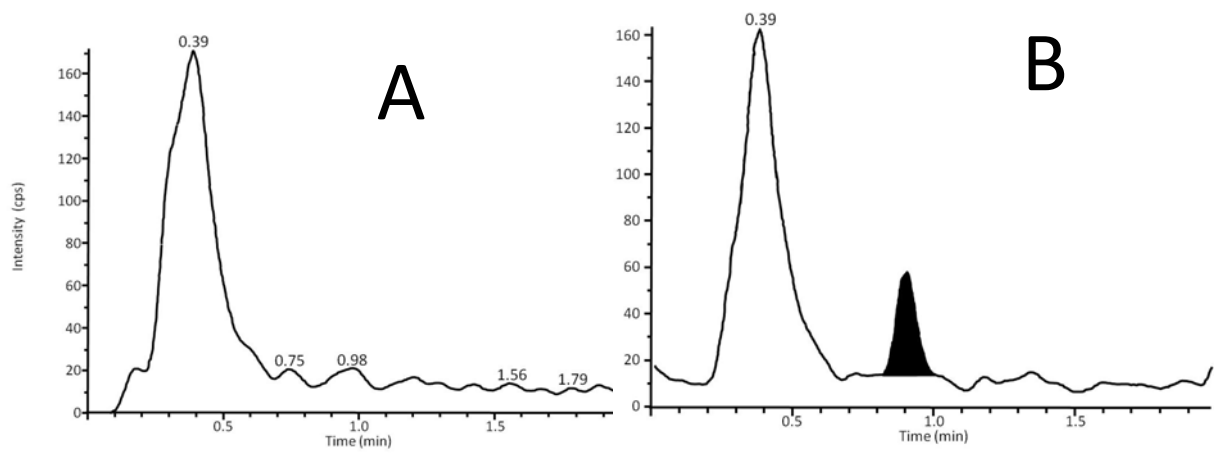


図4 MRM クロマトグラム: ブランク試料 (A) 及びクロピドグレルの定量下限値 (0.08 pg/mL) (B)

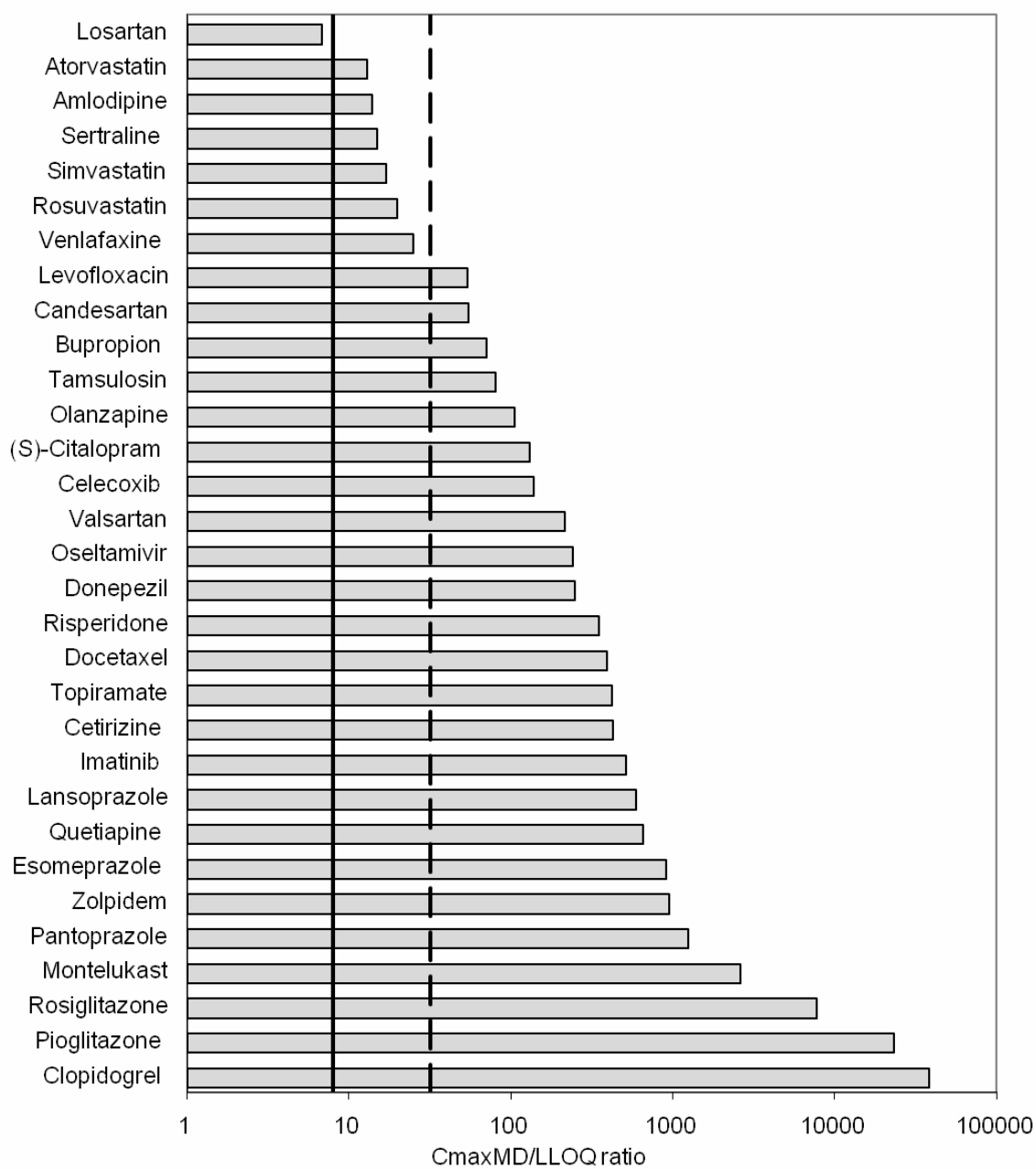


図5 定量下限値に対するマイクロドース時における Cmax 値の割合：8 (2³) (実線)、32 (2⁵) (点線)

2-4. 考察

欧州で実施されたマイクロドース臨床試験 Consortium for Resourcing and Evaluating AMS Microdosing (CREAM study) では、高感度分析が可能な AMS が使用され、ヒト血漿 0.5 mL を使用したときの定量限界値は、300 fg/mL (ZK253 : 開発化合物)、10 pg/mL (ワルファリン、ジアゼパム、ミダゾラムまたはエリスロマイシン) であった[10]。続いて、同じく欧州で実施され、分析法に AMS を用いたマイクロドース試験 European Union Microdose AMS Partnership Programme (EUMAPP) においては、パラセタモール、フェノバルビタール、フェキシフェナジン、プロパフェノン、スマトリプタン及びクラリスロマイシンを各 100 µg 投与したときの C_{maxMD} 値は、それぞれ 1.1、2.6、0.306、0.015、0.1 及び 0.188 ng/mL であった[54]。解析に十分な薬物動態プロファイルを取得するためには、 C_{max} 値の 1/8 の濃度まで測定できる感度を有している分析法が必須であるが、これまでの検証型のマイクロドース臨床試験の実施によって AMS の感度は十分であることが実証されている。

EUMAPP 試験で得られた C_{max} 値や LC-MS/MS の高感度測定の可能性を考慮すると、LC-MS/MS がマイクロドース臨床試験に適用できる感度を有すると考えられた。本研究では、31 化合物それぞれを添加したヒト血漿試料の濃度を LC-MS/MS を用いて測定することにより、0.08~50 pg/mL という低濃度の定量下限値を取得することができた。各薬物の臨床投与量で実測されている最低濃度は、取得した定量下限値と比較すると 1000 倍以上高く、およそ ng/mL オーダーであった (図 6)。LC-MS/MS が有する感度が ng/mL オーダー程度であると思われる点はここに有り、実用的な理由から試料前処理や分析条件の設定が不十分であったと考えられた。本研究において採用した試料前処理は、特別な方法ではなく、固相抽出法や液液抽出法といった一般的に用いられている方法である。また、マイクロドース臨床試験における被験物質の濃度測定法の分析技術として繁用されるために、汎用性が高く、一般的に入手可能な LC-MS/MS で測定ができることを目指した。本研究結果は、従来の LC-MS/MS 感度が単なる先入観であり、LC-MS/MS を用いることによりヒト血漿中 pg/mL オーダーの薬物濃度が検出可能であること、ほとんど全ての化合物の薬物動態プロファイルを取得することが可能であることを示した。

検討した 31 化合物中、ロサルタンのみが MD 試験時に想定される C_{max} 値 (C_{maxMD}) を取得した定量下限値で除したときの比が 8 未満であった。その原因は、ロサルタンの感度が低いために、定量下限値が 50 pg/mL と、他のサルタン類であるカンデサルタン (10 pg/mL)、バルサルタン (20 pg/mL) の定量下限値と比較して高かったことと、酸性条件下で液液抽出する際に、リン脂質のような酸性条件下で分子型となる内因性物質が薬物と同時に抽出されたことで、クロマトグラム上に夾雑ピークが現れたことによりロサルタンのイオン化が抑制されたことにあると考えられた。

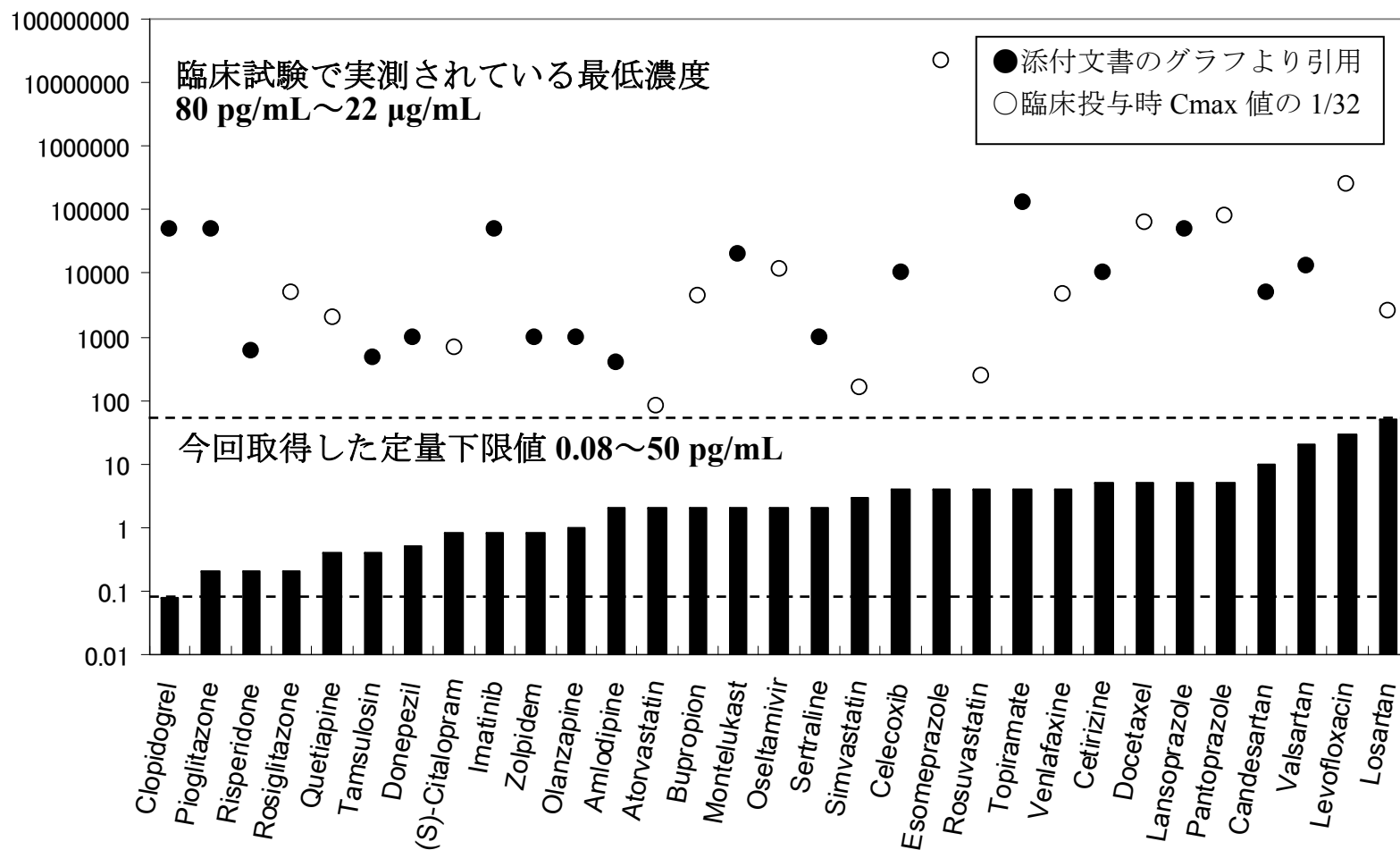


図6 31化合物の定量下限値と臨床試験で実測されている最低濃度との比較[22-52]

本研究において、配合剤と LC-MS/MS でのイオン化に不向きな化合物を研究対象から除外した。配合剤のサルメテロール/フルチカゾン、局所投与後の血漿中濃度が低いため、意図的に研究対象から除外したのではない。サルメテロールの 50 µg 及びプロピオン酸フルチカゾンの 250 µg の吸入剤投与後、サルメテロール及びフルチカゾンの C_{max} 値は、それぞれ 103.7 pg/mL、87.0 pg/mL である（添付文書 Adoair® Diskus®/Aerosol）[55]。もし、臨床投与量の 1/100 量を投与する場合、C_{max} 値の 1/8 は、サルメテロール 0.13 pg/mL、フルチカゾン 0.11 pg/mL となる。クロピドグレル以外の検討した 30 化合物の定量下限値は、これらの濃度より高いため、マイクロドース臨床試験における LC-MS/MS を用いたサルメテロール及びフルチカゾンの血漿中濃度測定は難しいと考えられる。エレクトロスプレーイオン化法によるイオン化に不向きな極性化合物には、誘導体化を行うことで、化合物の極性が下がり、イオン化が可能となる。アレンドロン酸及びオキサリプラチンの誘導体化後の定量下限値は、50 pg/mL（0.1 mL ヒト血清中）[17]、1 ng/mL（0.1 mL ヒト血漿中）と報告されている。また、アレンドロン酸及びオキサリプラチンの C_{maxMD} 値は、それぞれ 92 pg/mL、663 pg/mL と算出された。よって、試料量を 1 mL まで増やすことで、マイクロドース投与後のこれら薬物の薬物動態プロファイルを LC-MS/MS で取得できると考える。イオン化しにくい化合物でも、化合物に適した誘導体化を行うことで、LC-MS/MS がマイクロドース臨床試験に対応しうる感度を有することができる。

マイクロドース臨床試験の測定法として AMS や LC-MS/MS を用いるにはメリットとデメリットがある。AMS で測定するためには、放射性標識体化合物の合成が必須であり、また、臨床試験前に動物データを基に放射性標識体化合物のヒトへの内部被ばくを評価することが必要である。AMS を用いることで、親化合物と同時に既知または未知の代謝物のマスバランスや親化合物及び各代謝物の薬物動態データを取得することができる。但し、AMS での測定の前に、クロマトグラム上において親化合物と各代謝物を完全に分離し、それぞれの溶離液を集めることが必要である。さらに、試料前処理において、各溶離液中に含まれる放射性標識体化合物をグラファイト化することも必要であることから、AMS を用いるデータ取得は、長時間を要する。また、AMS の装置は、国内に 1 台しかないため、将来的に AMS を用いた測定が普及することは考えにくい。一方、LC-MS/MS は、AMS よりデータ取得が迅速であり、かつ化合物に特徴的なプレカーサーイオン及びプロダクトイオンを検出して測定することから、クロマトグラム上の測定対象物質の完全な分離が必要でない。よって、LC-MS/MS は、親化合物及び既知代謝物もしくは他の化合物でも、同時に、かつ迅速に測定できる。しかし、LC-MS/MS を用いて臨床試験試料を測定する前には、分析法をバリデートする必要がある[56]。なお、LC-MS/MS の装置は、国内に普及しており、試料数が増加しても対応可能である。

LC-MS/MS が、マイクロドース臨床試験に対応すべく感度を有することが検証できた。しかし、AMS あるいは LC-MS/MS を用いるかどうかは、マイクロドース臨床試験の目的によって決定することであり、感度で決めることではない。AMS は、未知代謝物の検出、マスバランスデータの取得に最適な方法である。LC-MS/MS は、親化合物や既知代謝物のバイオアベイラビリティや薬物動態パラメータの取得、総クリアランスに対する肝腎クリアランスの寄与を検討するための薬物動態プロファイル取得に有用である。

カセットマイクロドージングは、類似の構造式をもつ複数の候補化合物のスクリーニングに

有用である。本研究では、類似化合物であるランソプラゾール及びパントプラゾールの同時測定に成功した。また、カセットドージングにおける投与化合物は、類似化合物だけでなく物性に類似している化合物であれば同時試料前処理だけでなく、同時測定も可能である。様々な物性をもつ5つの化合物（ブプロピオン、イマチニブ、ピオグリタゾン、リスペリドン及びタムスロシン）は、試料前処理と測定条件が同じであったため、同時試料前処理、同時測定が適用できるだろう。カセットドージングを行う複数の化合物の物性にもよるが、いずれかの化合物の感度低下が許容できる範囲内であれば、カセットマイクロドージングにおいて測定法に LC-MS/MS を用いることで、試料前処理や測定時間の短縮に繋がる。AMS の場合は、クロマトグラフによって各化合物を完全に分離する必要があり、かつ化合物毎に試料前処理や測定を行わなければならないので、LC-MS/MS を用いる場合と比較すると費用も時間もかかる。カセットマイクロドースにおける複数化合物の薬物動態データ取得に、LC-MS/MS は有用であると言える。カセットマイクロドースにおける最大投与量は、100 µg であるため、5 化合物以下の同時投与の場合、1 化合物につき 20 µg 以下となる。その場合、マイクロドース臨床試験において解析に十分な薬物動態プロファイル取得にあたり、MD 試験時に想定される C_{max} 値 ($C_{max_{MD}}$) を取得した定量下限値で除したときの比が 40 以上必要となるが、検討した 31 化合物中 24 化合物 (77%) がその基準を超え、カセットマイクロドース臨床試験での薬物動態データ取得にも LC-MS/MS は、有用であることが検証できた。

3. 非標識体化合物フェキソフェナジン投与のマイクロドース臨床試験の実施

3-1. 目的

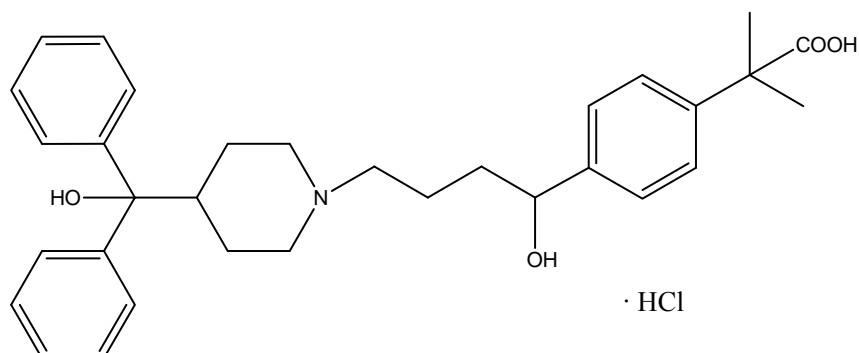
LC-MS/MS で取得したヒト血漿中の 31 化合物の定量下限値を検証することにより、LC-MS/MS は非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験における薬物動態データ取得に十分適用可能な感度を有していると考えられた。そこで、次に健常人を対象として、非標識体化合物フェキソフェナジン投与のマイクロドース臨床試験を行い、実際の試料中の薬物濃度を測定することにより、LC-MS/MS が試験に適用可能であるか実証することを目的とし、マイクロドース時のデータから治療量投与時の薬物動態が予測可能であるかを検討した[57, 58]。

3-2. 方法

(1) 試薬

塩酸フェキソフェナジン及び塩酸テルフェナジンは、Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。アセトニトリル、メタノール (いずれも HPLC グレード)、酢酸アンモニウム及び酢酸は、和光純薬工業株式会社 (Kyoto, Japan) より購入した。固相抽出プレート Oasis HLB (10 mg/well) は、Waters Corporation (Milford, MA, USA) より提供された。フェキソフェナジンと内標準物質 (Internal Standard, IS) の構造式を図 1 に示す。

(A)



(B)

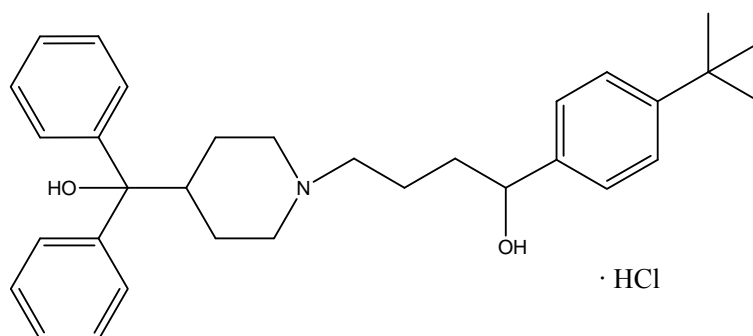


図 1 構造式：塩酸フェキソフェナジン (A) 及び塩酸テルフェナジン (B)

(2) 標準原液及び標準溶液の調製

フェキソフェナジン標準原液 (100 µg/mL) 及びテルフェナジン標準原液 (IS, 100 µg/mL) は、アセトニトリル／水 (7:3, v/v) を用いて調製した。フェキソフェナジン標準溶液及び IS 溶液は、アセトニトリル／水 (7:3, v/v) を用いて以下のように調製した。マイクロドース用の分析法バリデーションのために、0.2、0.4、1、2、4、10 及び 20 ng/mL の検量線用標準溶液、0.2、0.4、2 及び 16 ng/mL の QC サンプル用標準溶液、0.5 ng/mL の IS 溶液を調製した。これらの溶液は、マイクロドース用溶液として扱った。臨床量投与用の分析法バリデーションのために、20、40、100、200、400、1000、2000、4000 及び 10000 ng/mL の検量線用標準溶液、4、20、40、400、800 及び 8000 ng/mL の QC サンプル用標準溶液、10 ng/mL の IS 溶液を調製した。これらの溶液は、臨床量投与用溶液として扱った。これらの標準原液及び標準溶液は、冷蔵 (5°C) 保存した。

(3) 検量線用標準試料溶液、ゼロ試料及び QC サンプルの調製

ヒトブランク血漿 (200 µL) に、0.2、0.4、1、2、4、10 及び 20 ng/mL の標準溶液 (10 µL) を添加し、マイクロドース用の検量線用標準試料溶液 10、20、50、100、200、500 及び 1000 pg/mL を調製した。ゼロ試料は、ヒトブランク血漿 (200 µL) に、アセトニトリル／水 (7:3, v/v) 10 µL を添加して調製した。マイクロドース用の精度及び真度用 (Quality Control, QC) サンプルは 10、20、100 及び 800 pg/mL の濃度の試料を、安定性試験用 QC サンプルは、20、100 及び 800 pg/mL の濃度の試料を調製した。

ヒトブランク血漿 (190 µL) に、1、2、5、10、20、50、100、200 及び 500 ng/mL の標準溶液 (10 µL) を添加し、臨床量投与用の検量線用標準試料溶液 20、40、100、200、400、1000、2000、4000 及び 10000 ng/mL を調製後、この混合溶液を 20 µL を使用した。ゼロ試料は、ヒトブランク血漿 (20 µL) を使用した。臨床量投与用の精度及び真度用 QC サンプルは、1、2、20 及び 400 ng/mL の濃度の試料を、安定性試験用 QC サンプルは、2、20 及び 400 ng/mL の濃度の試料を調製した。

希釈再現性用サンプルは、マイクロドース用で 2000 pg/mL、臨床量投与用で 1000 ng/mL の濃度の試料を調製した。

(4) LC-MS/MS の条件

マイクロドース用及び臨床量投与用試料は、以下の同じ分析条件で測定した。

装置

LC システム : AQUITY UPLC システム (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

質量分析装置 : API 5000 システム (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA, USA)

分析条件

分析カラム :	XBridge C18 (100 mm × 2.1 mm 直径、粒径 3.5 µm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
移動相 :	アセトニトリル／2 mM 酢酸アンモニウム (91:9, v/v)
流速 :	0.6 mL/min

カラム設定温度：	30°C
オートサンプラー温度：	5°C
試料注入量：	1 µL
イオン化法：	エレクトロスプレーイオン化法
極性：	正イオン検出モード
スキャンタイプ：	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
イオンスプレー電圧：	4500 V
ヒーターガス温度：	600°C
マルチプライヤー電圧：	2400 V
ネブライザーガス：	30 psi (約 209 kPa)
ターボガス：	60 psi (約 414 kPa)
カーテンガス (窒素)：	10 psi (約 69 kPa)
コリジョンガス (窒素)：	7
モニターイオン：	

測定対象物質	プレカーサーイオン	プロダクトイオン	コリジョンエネルギー	dwel time
フェキソフェナジン	<i>m/z</i> 502	<i>m/z</i> 466	30 V	500 sec
IS	<i>m/z</i> 472	<i>m/z</i> 436	30 V	500 sec

分析データは、Analyst ソフトウェア version 1.4.1 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA, USA) で解析した。

(5) 試料調製

マイクロチューブにマイクロドースを想定した血漿試料 200 µL を分取し、IS 溶液 (0.5 ng/mL) 20 µL を添加した。10 mmol/L 酢酸アンモニウム-酢酸緩衝液 (pH 4.0) を 400 µL 添加し、その混合溶液を予めメタノール 1 mL、水 1 mL 及び 10 mmol/L 酢酸アンモニウム-酢酸緩衝液 (pH 4.0) 1 mL で活性化させた SPE プレート OASIS HLB に添加した。水 1 mL 及びアセトニトリル／水 (1:9, v/v) 1 mL で洗浄後、アセトニトリル／水 (7:3, v/v) 200 µL で 96-well プレート (350 µL 容量) に溶出した。

マイクロチューブに臨床量投与を想定した血漿試料 20 µL を分取し、IS 溶液 (10 ng/mL) 20 µL を添加した。10 mmol/L 酢酸アンモニウム-酢酸緩衝液 (pH 4.0) を 60 µL 添加し、その混合溶液を予めメタノール 1 mL、水 1 mL 及び 10 mmol/L 酢酸アンモニウム-酢酸緩衝液 (pH 4.0) 1 mL で活性化させた SPE プレート OASIS HLB に添加した。水 300 µL 及びアセトニトリル／水 (1:9, v/v) 300 µL で洗浄後、アセトニトリル／水 (7:3, v/v) 200 µL で 96-well プレート (350 µL 容量) に溶出した。溶出液 20 µL にアセトニトリル／水 (7:3, v/v) 180 µL を添加した。

(6) 分析法バリデーション

分析法バリデーションは、FDA ガイドライン : validation of bioanalytical methods[55]に従って、特異性、真度及び精度を検討した。マイクロドース投与及び臨床量投与を想定した血漿試料のための分析法は、同じバリデーションパラメータを検討した。

1) 特異性

特異性は、6 個体別の血漿を用いて評価した。フェキソフェナジン及び IS のクロマトグラム上の溶出位置に定量を妨害する内因性物質由来のピークがないことを確認した。

2) 検量線

マイクロドース用の検量線は、ゼロ試料及び 7 濃度 (10~1000 pg/mL) の検量線用標準試料溶液から、臨床量投与用の検量線は、ゼロ試料及び 9 濃度 (1~500 ng/mL) の検量線用標準試料溶液から成る。直線性は、最小二乗法 (重み $1/y^2$) により評価した。検量線各濃度の相対誤差 (Relative Error, RE) が定量下限値では $\pm 20\%$ 以内、その他の濃度では $\pm 15\%$ 以内とした。また、検量線用標準試料溶液全濃度の 75%以上 (定量下限値及び検量線最高濃度を含む) がこの基準に適合すること、相関係数 (r) は 0.99 以上とした。

3) 定量下限値

精度 (Coefficient of Variation, CV) が 20%以内及び RE が $\pm 20\%$ である検量線上の最低濃度を定量下限値として設定した。クロマトグラム上のフェキソフェナジンの溶出位置に夾雑ピークが認められる場合は、フェキソフェナジンのレスポンスがブランク試料のレスポンスの 5 倍以上であることとした。

4) 精度及び真度

日内及び日差再現性は、4 濃度 ($n=5$) の QC サンプルの測定を 3 日間行った。判断基準は、CV が定量下限値では 20%以内、その他の濃度では 15%以内とした。平均値の RE は、定量下限値では $\pm 20\%$ 以内、その他の濃度では $\pm 15\%$ 以内とした。

5) 回収率

フェキソフェナジンの回収率は、3 濃度 (マイクロドース用 20、100 及び 800 pg/mL、臨床量投与用 2、20 及び 400 ng/mL) の抽出試料 ($n=3$) のピーク面積値と前処理を行ったブランク試料に標準溶液を添加した試料 ($n=3$) のピーク面積値を比較することで評価した。IS の回収率は、回収率算出用試料 ($n=3$) のピーク面積値と前処理を行ったブランク試料に IS 溶液 (マイクロドース用 50 pg/mL、臨床量投与用 10 ng/mL) を添加した試料 ($n=3$) のピーク面積値を比較することで評価した。

6) 安定性試験

ヒト血漿中及び測定実測試料中フェキソフェナジンの安定性は、3 濃度 ($n=5$) の QC サンプルの測定によって検討した。調製後直ちに測定した QC サンプルは、初期値として用いた。安定性は、初期値の平均を基準とした RE として表示し、平均値の RE が $\pm 15\%$ 以内の場合に安定性があると判断した。

凍結融解用 QC サンプルは、冷凍庫 (-70°C 以下) にて 24 時間以上凍結保存させ、室温にて融解させた。2 及び 3 回目の凍結保存は 12~24 時間とした。この凍結融解を 1、2 及び 3 回繰

り返した後に測定を行った。

短期保存安定性用 QC サンプルは、冷凍庫（-70°C 以下）にて 24 時間以上凍結保存させ、室温にて融解後、4 時間保存した。

長期保存安定性用 QC サンプルは、冷凍庫（-20±5°C または -70°C 以下）にて 30 日間保存した。

実測試料中安定性試験用の QC サンプルを試料前処理したサンプルは、オートサンプラー（設定 5°C）において 24 及び 48 時間保存後に測定した。

7) マトリックス効果

マトリックス効果は、6 個体別の血漿を用いて評価した。ヒトブランク試料に 1 濃度（マイクロドース用 0.4 ng/mL または臨床量投与用 4 ng/mL）の標準溶液を添加して調製した試料 A のピーク面積値と、同濃度の標準溶液をアセトニトリル／水（7:3、v/v）で希釈した試料 B のピーク面積値を比較した。

また、ヒトブランク試料に 1 濃度（マイクロドース用 0.5 ng/mL または臨床量投与用 10 ng/mL）の IS 溶液を添加して調製した試料のピーク面積値と、同濃度の IS 溶液をアセトニトリル／水（7:3、v/v）で希釈した試料のピーク面積値を比較した。マトリックス効果は、試料 A に対する試料 B のピーク面積比を（Matrix Effects, ME）として評価した。

8) 希釈再現性

マイクロドース用 2000 pg/mL または臨床量投与用 1000 ng/mL の QC サンプルは、ヒトブランク血漿で 10 倍希釈後に測定した。精度と真度は、定量値の平均を用いて求めた。CV が 15% 以内、平均値の RE は、±15%以内とした。

9) 標準原液及び標準溶液安定性

フェキシソフェナジン標準原液（100 µg/mL）、IS 標準原液（100 µg/mL、標準溶液（0.2、20 及び 10000 ng/mL）及び IS 溶液（0.5 及び 10 ng/mL）の安定性は、室温で 6 時間後または 5°C で 30 日間保存後、測定（n=3）することによって評価した。安定性は、初期値の平均を基準とした RE として表示し、平均値の RE が±15%以内の場合に安定性があると判断した。

（7）マイクロドース臨床試験

臨床試験は、北里東病院の治験審査委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、北里東病院 治験管理センターにて実施した。試験前には、全ての被験者から、インフォームドコンセントを書面にて得た。

被験者の選択基準は、健康人男性（年齢 20～34 歳、BMI (Body Mass Index) : 18.5～28.5 kg/m²）とした。被験者の健康状態は、薬歴、アルコールと薬物乱用の履歴、身体検査、12 誘導心電図及び臨床検査で評価した。また、梅毒、HIV、B 型肝炎及び C 型肝炎に罹患していない者を対象とした。原則的な除外基準は、試験に影響を与えたり、フェキシソフェナジンの薬物動態に影響を与えたりする医学的あるいは精神的な状態の者、試験前の 7 日以内に、セントジョンズワ

ートを含む薬剤、サプリメント又は食物、処方箋薬や市販薬の使用、グレープフルーツ、オレンジまたはアップルジュースの飲用をした者、フェキソフェナジンのアレルギー歴がある者とした。また、試験前の1ヶ月以内に200 mLを超える、あるいは3ヶ月以内に400 mLを超える献血をした者を除外した。

試験デザインは、単回投与、オープンラベル、ランダム化、2期クロスオーバーとした。8名の被験者には、マイクロドース後に臨床量投与の順序で、あるいは、臨床量投与後にマイクロドースの順序で投与した。投与と投与の間に2週間の休薬期間を設けた。被験者は、それぞれの投与の1日前に施設に参加した。被験者は、絶食条件下、150 mLの水で、マイクロドース量(100 µg)あるいは、臨床量投与量(60 mg)を服用した。Allegra錠(塩酸フェキソフェナジン 60 mg)は、Sanofi-Aventis K.K. (Tokyo, Japan)から購入し、臨床量投与のために使用した。Sigma-Aldrich K.K. (Tokyo, Japan)から購入した塩酸フェキソフェナジンは、マイクロドース用溶液の調製のために使用した。経口のマイクロドース用溶液は、フェキソフェナジン(100 µg)を5 mLの精製水に溶解して調製した。採血ポイントは、投与前、投与0.5、1、2、3、4、6、8及び12時間後であった。

被験者は、投与の少なくとも10時間前と投与5時間後は、絶食した。被験者は、標準的な昼食と夕食を、それぞれ投与5と9時間後に摂取した。被験者は、各投与の10時間前と投与期間中は、アルコール、喫煙、グレープフルーツ、オレンジまたはアップルジュース、カフェインを含む飲食を控えた。セントジョンズワートを含む薬剤は、各投与前の7日間と投与期間中は服用を禁じた(臨床医から服用の指示がない限り)。被験者は、試験参加中、過度な運動を避け、身体検査、ECG (Electrocardiography)、臨床検査によって安全性をモニターされた。

(8) 薬物動態及び統計解析

薬物動態パラメータは、WinNonlin (Pharsight, Mountain View, CA, USA)を用いてノンコンパートメントモデルで算出した。薬物動態パラメータC_{max}値及びT_{max}値は、定量値から得た。血漿濃度時間曲線下面積(AUC_{last})は、台形法で算出した。消失速度定数(*kel*)は、対数変換した血漿中濃度時間曲線の終末相の回帰直線から算出した。終末相の半減期(t_{1/2})は、ln/*kel*として算出した。マイクロドース後と臨床量投与後の薬物動態パラメータにおける有意差は、ANOVAによって評価した。

3-3. 結果

(1) LC/ESI-MS/MS 分析

ハイスループット分析を目的とし、高耐圧のACQUITY UPLC システム及びエチレン架橋型ハイブリッド技術によって合成された粒子を充填したXBridge C18分析カラムを選択した[59, 60]。MRMクロマトグラムにおけるフェキソフェナジンのシャープなピークは、アセトニトリル/2 mM 酢酸アンモニウム(91:9, v/v)と移動相の有機溶媒比率を上げ、また流速を0.6 mL/minに設定することにより得た。保持時間は、フェキソフェナジンで1.0分、ISで2.2分であり、トータルの測定時間は、今までの報告の中で最も短い2.4分だった[61]。

フェキソフェナジンとISのマススペクトル及びタンデムマススペクトル測定は、それぞれ

の標準溶液を用いてインフュージョンによって実施した。マススペクトルにおいてベースピークとして現れたプロトン化分子 $[M + H]^+$ をプレカーサーイオンとして選択した（フェキソフェナジン： m/z 502、IS： m/z 472）。プロダクトイオンは、Analyst ソフトウェアの Quantitative Optimization の機能を利用して、タンデムマススペクトルにおいて最も高いピーク強度を得たイオンを自動的に選択した（図 2、フェキソフェナジン： m/z 466、IS： m/z 436）。いずれのプロダクトイオン $[M - 2H_2O + H]^+$ においてもプレカーサーイオンから 2 つの水分子の脱離によって生成された。続いてイオン源の最適化を Analyst ソフトウェアの Quantitative Optimization の機能を利用して、フローインジェクションにて実施した。自動的に、ネブライザーガス、ターボガス、カーテンガス、コリジョンガス、イオンスプレー電圧及び温度の最適な条件を設定した。ソフトウェアを用いることで分析条件の決定が簡便であった。設定した分析条件下、絶対量 10 fg のフェキソフェナジンの測定を可能とした。

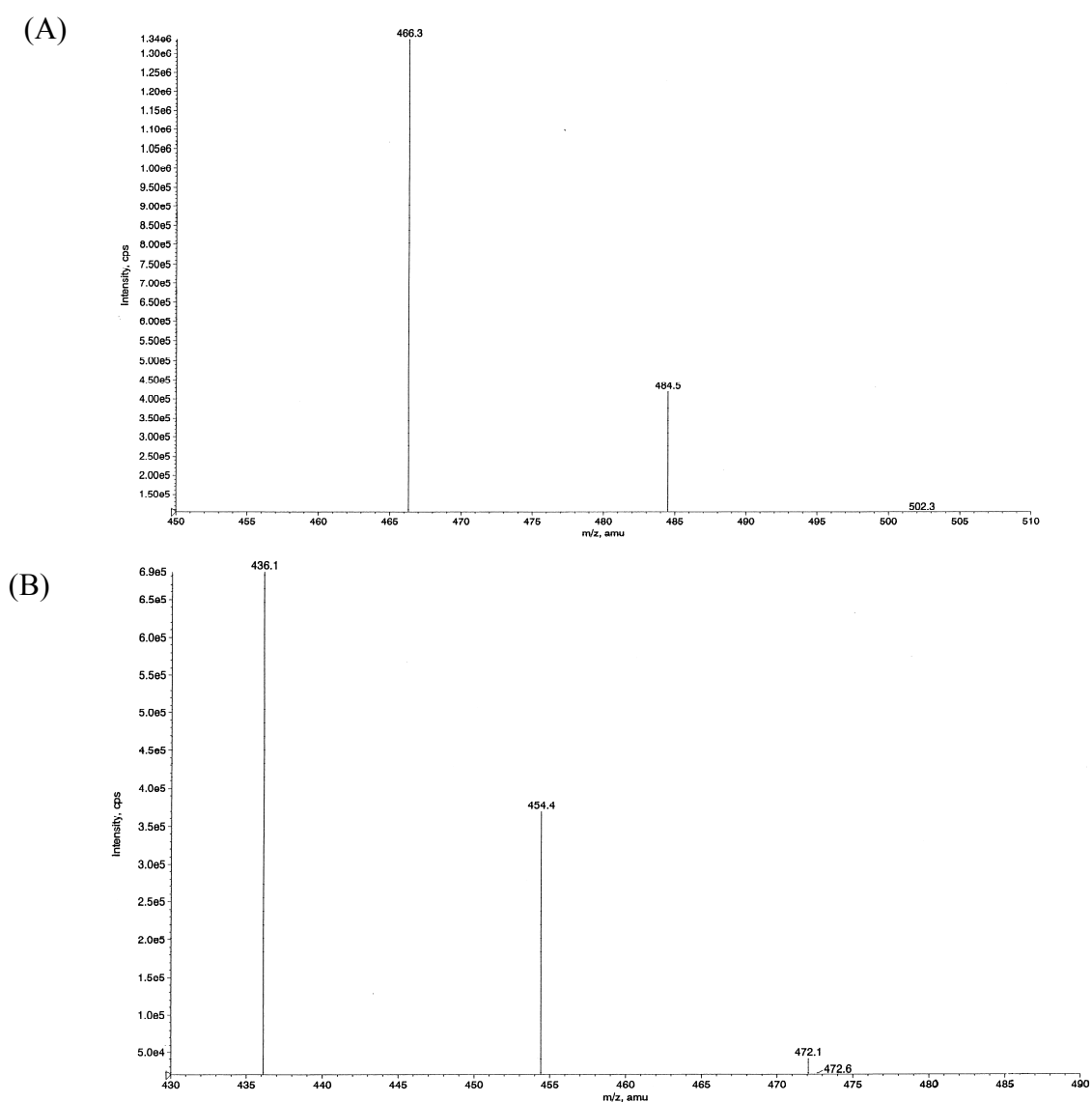


図 2 プロダクトイオン：フェキソフェナジン (A) 及びテルフェナジン (B)

(2) 試料前処理法

96-well プレートを用いた固相抽出法は、ハイスループット開発に適し、簡便性に優れている。Oasis HLB は、ジビニルベンゼンを固定相にもつため、前処理中の固定相乾燥による回収率の低下を防ぐことができ、また、N-ビニルピロリドンポリマーという疎水性相互作用を行う固定相を併せ持つ[62]。さらに、残留シラノール基をもたないため、塩基化合物に対して高い回収率を期待することができる。OASIS HLB を用いたフェキソフェナジンの試料前処理は、洗浄液に水、溶出液にアセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム/ギ酸 (90:10:0.1, v/v/v) を使用し、移動相の組成は、溶出液と同様とした。SPE プレートに添加する際は、先の報告[61]と同様に、フェキソフェナジンをブランク血漿に添加した後に、血漿試料の pH を 4.0 に調整した。洗浄液及び溶出液については、アセトニトリルと水の溶媒比を変えて検討した。洗浄液をアセトニトリル/水 (2:8, v/v) にした場合、フェキソフェナジンが固定相から溶出してしまうため、洗浄液は、アセトニトリル/水 (1:9, v/v) に決定した。溶出液は、フェキソフェナジン及び IS のみを固定相から溶出させるために、溶出液中のアセトニトリルの比率をできる限り低くすることとし、アセトニトリル/水 (7:3, v/v) に設定した。また、測定実測試料中のアセトニトリルの比率は、移動相におけるアセトニトリルの比率より低いため、クロマトグラム上においてフェキソフェナジンと IS のシャープなピーク形状を得ることができた。臨床量投与試料のフェキソフェナジン濃度は、マイクロドース試料よりも 100 倍以上高い。よって、臨床量投与試料の使用血漿量は、20 μ L とし (マイクロドース試料の 1/10)、SPE プレートからの溶出液は、アセトニトリル/水 (7:3, v/v) で 10 倍希釈した。

(3) 分析法バリデーション

1) 特異性

マイクロドース用及び臨床量投与用のヒトブランク血漿の MRM クロマトグラムの一例を図 3A 及び 4A に示す。フェキソフェナジン及び IS の溶出位置に定量を妨害する夾雑ピークは、なかった。他の 5 個体のヒトブランク試料においても同様であった。マイクロドース用及び臨床量投与用のゼロ試料の MRM クロマトグラムの一例を図 3B 及び 4B に示す。フェキソフェナジンの溶出位置に定量を妨害する夾雑ピークは、なかった。

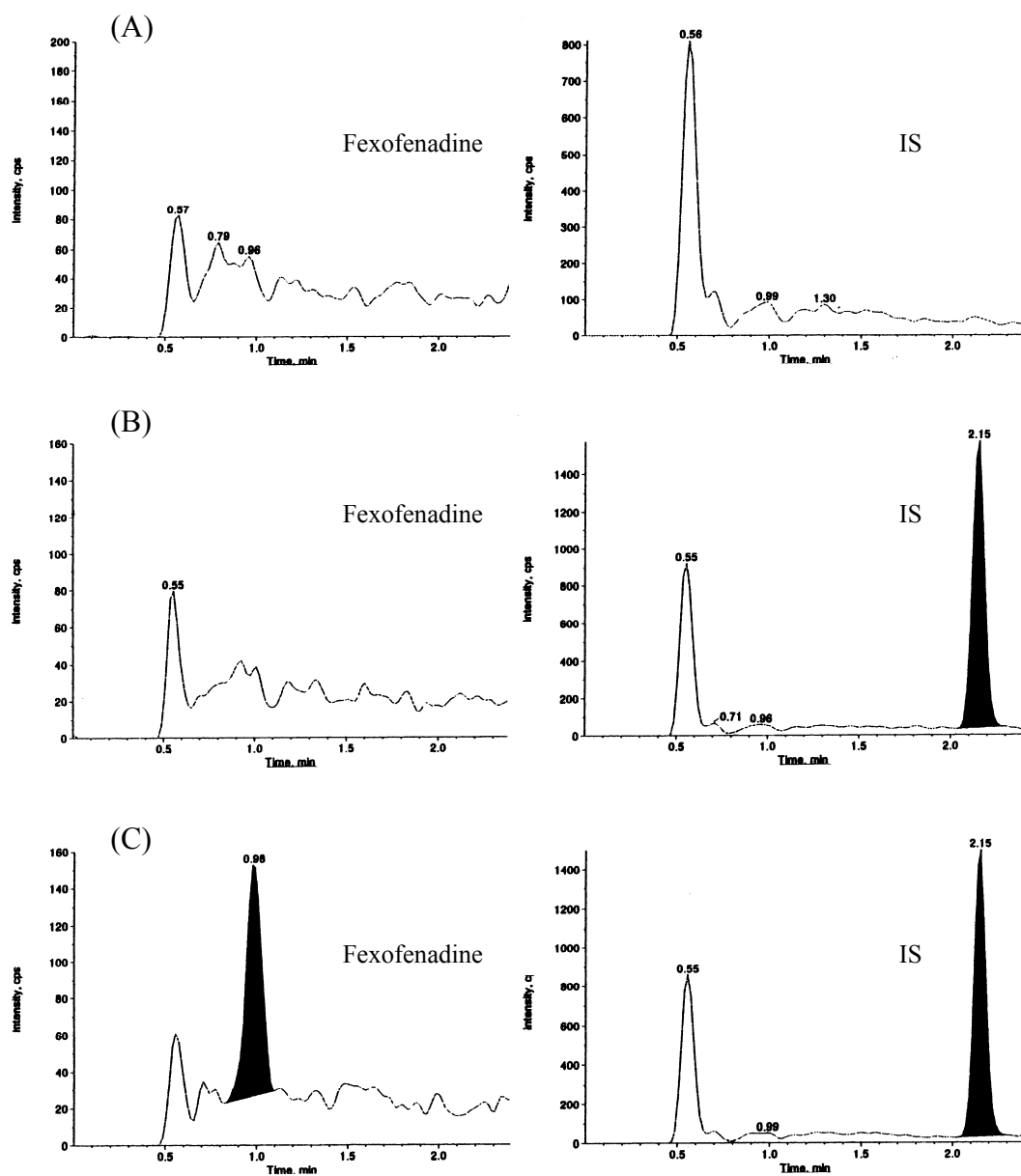


図3 マイクロドースのための検量線のMRMクロマトグラム：ブランク試料 (A)、ゼロ試料 (B) 及び定量下限値における検量線用標準試料溶液 (10 pg/mL) (C)。内標準物質 (IS)：テルフェナジン

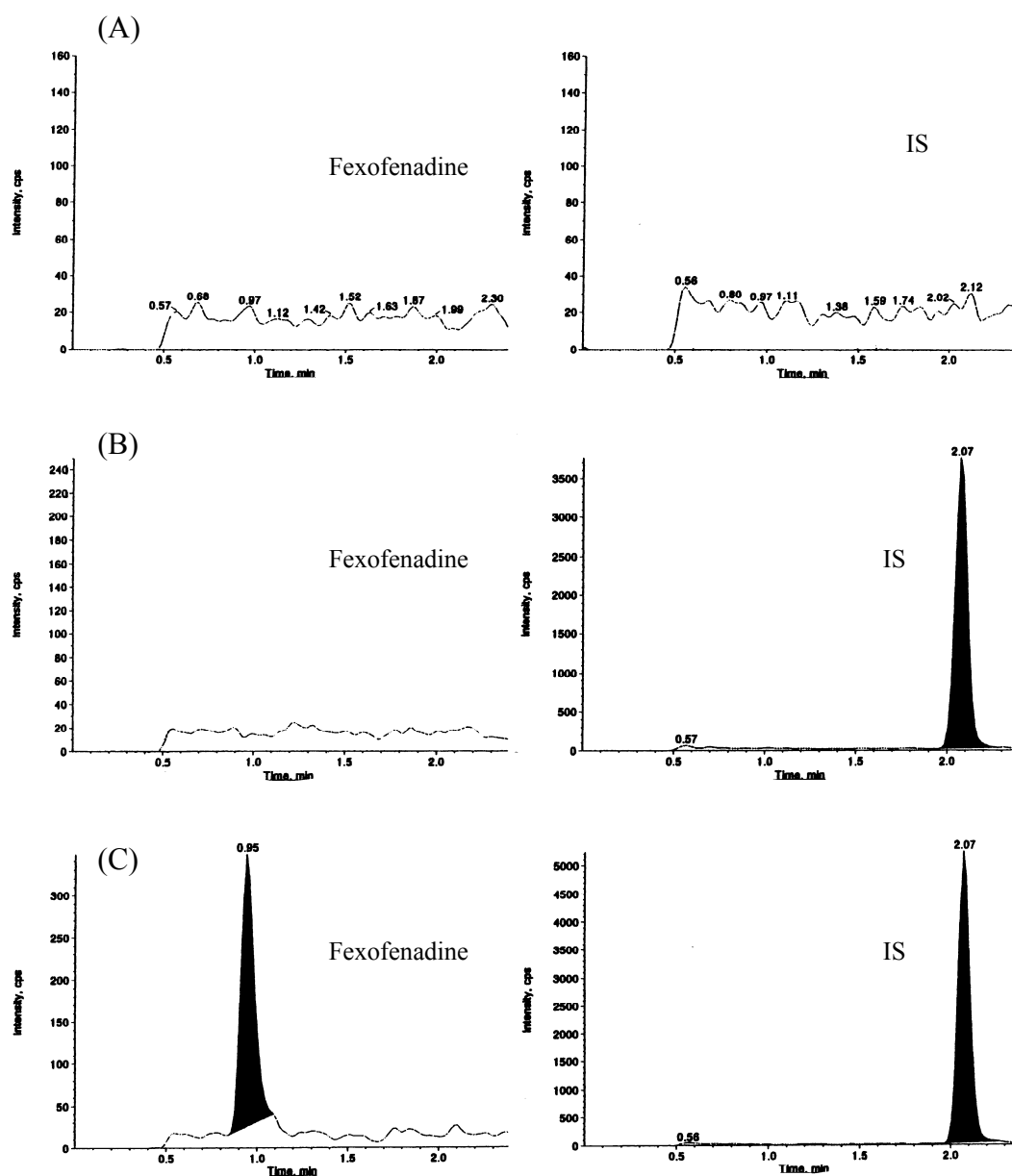


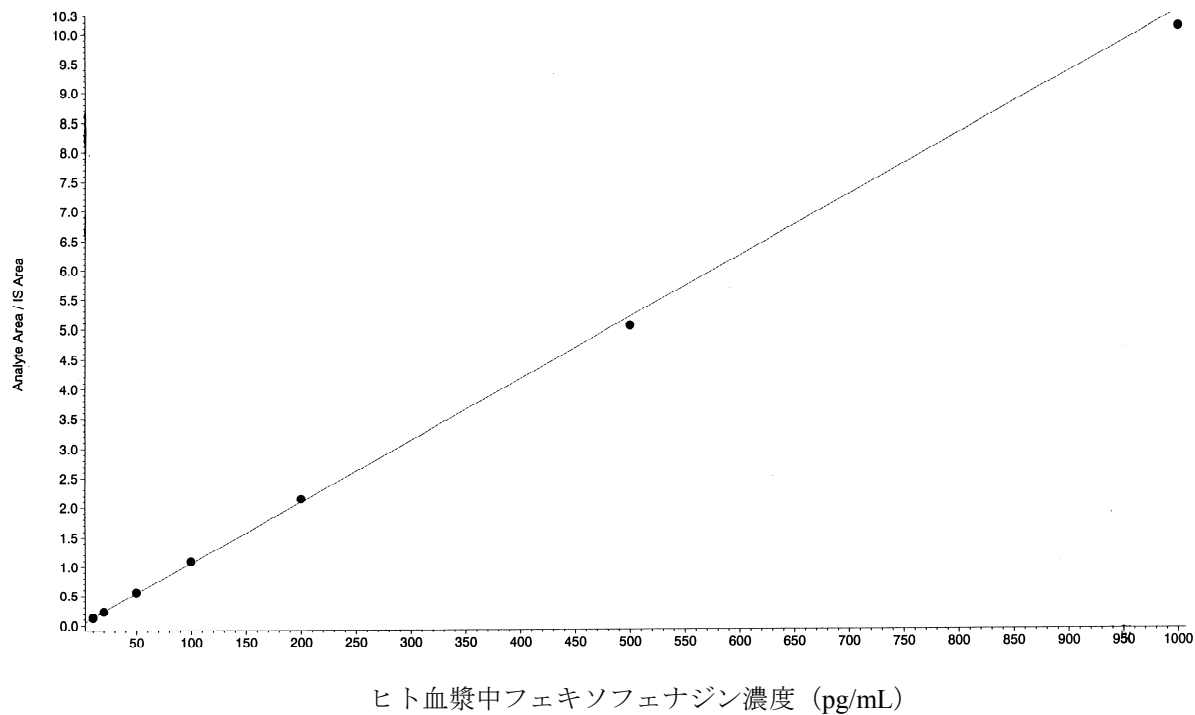
図4 臨床投与のための検量線のMRMクロマトグラム：ブランク試料（A）、ゼロ試料（B）及び定量下限値における検量線用標準試料溶液（1 ng/mL）（C）。内標準物質（IS）：テルフェナジン

2) 検量線

検量線式 $y = ax + b$ は、IS に対するフェキソフェナジンのピーク面積比 (y) とフェキソフェナジンの添加濃度 (x) との関係を用いて最小二乗法 (重み: $1/y^2$) により求めた。マイクロドース用及び臨床量投与用の検量線式は、それぞれ $y = 0.00934(\pm 0.00149)x + 0.0186(\pm 0.0166)$ 、 $y = 0.0661(\pm 0.0104)x - 0.00586(\pm 0.00360)$ であり、いずれも相関係数 (r) が 0.992 以上とそれぞれ 10~1000 pg/mL、1~500 ng/mL の範囲で直線性を得た。マイクロドース用及び臨床量投与用の検量線を図 5 に示す。マイクロドース用及び臨床量投与用の検量線各濃度の平均値、精度及び相対誤差をそれぞれ表 1 及び 2 に示す。マイクロドース用の検量線の CV は、8.5%以下、RE は $\pm 7.5\%$ 以内であった。臨床量投与用の検量線の CV は、10.5%以下、RE は $\pm 9.1\%$ 以内であった。

(A)

■ 060222L.rdb (fexofenadine): "Linear" Regression ("1 / (y * y)" weighting): $y = 0.0104 x + 0.0216$ ($r = 0.9994$)



(B)

■ 060222H.rdb (fexofenadine): "Linear" Regression ("1 / (y * y)" weighting): $y = 0.0647 x + -0.00501$ ($r = 0.9961$)

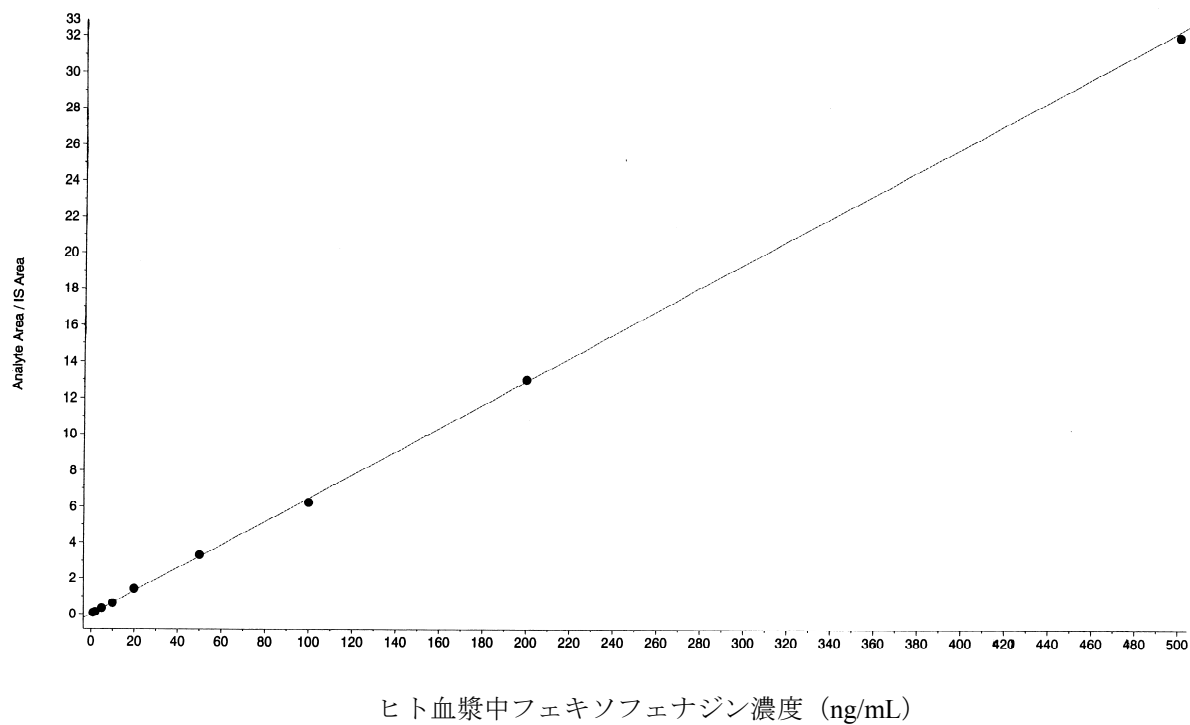


図5 検量線：マイクロドース用 (A) 及び臨床量投与用 (B)

表 1 マイクロドースのための検量線用標準試料溶液各濃度における精度及び真度 (n=3)

濃度 (pg/mL)	逆回帰濃度		
	平均 (pg/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)
10.0	10.4	5.6	4.3
20.0	19.0	5.5	−5.0
50.0	48.4	6.1	−3.3
100	105	8.4	4.5
200	192	8.0	−4.0
500	538	8.5	7.5
1000	1037	8.1	3.7

表 2 臨床量投与のための検量線用標準試料溶液各濃度における精度及び真度 (n=3)

濃度 (ng/mL)	逆回帰濃度		
	平均 (ng/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)
1.00	1.02	3.0	1.7
2.00	1.92	5.2	−4.2
5.00	5.26	1.2	5.2
10.0	10.1	4.2	1.2
20.0	19.5	10.5	−2.3
50.0	54.6	5.2	9.1
100	93.9	2.5	−6.1
200	198	1.8	−1.0
500	515	3.5	2.9

3) 定量下限値

定量下限値は、精度及び真度の判断基準を満たした検量線の最も低い濃度に設定した（マイクロドース用：10 pg/mL、臨床量投与用：1 ng/mL）。マイクロドース用及び臨床量投与用の定量下限値のMRMクロマトグラムを図3C及び4Cに示す。いずれのクロマトグラムにおいてもフェキソフェナジンのピーク形状は良好であった。

4) 精度及び真度

日内及び日差再現性は、4濃度（n=5）のQCサンプルを3日間測定することで評価した（表3）。マイクロドース用の日内再現性は、CVが12.4%以下、REが±3.5%以内であり、日差再現性は、CVが9.4%以下、REが±3.3%以内であった。臨床量投与用の日内再現性は、CVが9.0%以下、REが±8.9%以内であり、日差再現性は、CVが10.3%以下、REが±4.5%以内であった。全ての結果において、判断基準を満たした。

5) 回収率

回収率は、フェキソフェナジン（3 濃度）及び IS（1 濃度）の抽出試料のピーク面積値と、ヒトブランク血漿処理後に、既知濃度の標準溶液を添加した試料のピーク面積値を比較することによって評価した。マイクロドース用の抽出試料の平均回収率は、フェキソフェナジンが $92.5 \pm 6.5\%$ （CV=7.1%）、IS が $73.8 \pm 5.4\%$ （CV=7.3%）であった。臨床量投与用の抽出試料の平均回収率は、フェキソフェナジンが $84.8 \pm 7.5\%$ （CV=8.8%）、IS が $78.1 \pm 7.4\%$ （CV=9.4%）であった。IS の平均回収率は、マイクロドース用及び臨床量投与用のいずれにおいてもフェキソフェナジンの平均回収率より低かったが、CV が 9.4%以下であるため、定量には影響しないと判断した。

6) 安定性試験

マイクロドース用及び臨床量投与用の QC サンプルの安定性結果をそれぞれ表 4 及び 5 に示す。ヒト血漿中フェキソフェナジンは、凍結（ -70°C 以下）融解 3 回の間、または室温で 6 時間安定であった。測定実測試料中（設定温度 5°C ）フェキソフェナジンは、48 時間安定であった。また、ヒト血漿中フェキソフェナジンは、 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ または -70°C 以下で 30 日間安定であった。

7) マトリックス効果

マイクロドース用の ME 値は、フェキソフェナジンが $97.4 \pm 6.1\%$ （CV=6.3%）、IS が $96.3 \pm 4.8\%$ （CV=5.0%）であった。臨床量投与用の ME 値は、フェキソフェナジンが $101.9 \pm 9.2\%$ （CV=9.0%）、IS が $108.0 \pm 11.0\%$ （CV=11.2%）であった。100%以下または 100%を超える ME 値は、それぞれイオンサプレッション、イオンエンハンスメントが起こったことが考えられるが、ME 値の結果より、マイクロドース用及び臨床量投与用のフェキソフェナジン及び IS の定量においては、血漿中の内因性物質による影響はないと言える。

表3 マイクロドース及び臨床投与のためのQCサンプルの日内及び日差再現性

QCサンプル		日内再現性			日差再現性		
マイクロドース用	濃度	定量値			定量値		
	(pg/mL)	平均 (pg/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)	平均 (pg/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)
	10.0	10.4	10.2	3.5	10.1	9.4	1.4
	20.0	20.5	8.3	2.6	19.6	9.2	−2.2
	100	100	12.4	0.0	101	8.4	1.1
	800	779	7.8	−2.7	827	6.4	3.3
臨床量投与用	濃度	定量値			定量値		
	(ng/mL)	平均 (ng/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)	平均 (ng/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)
	1.00	1.00	9.0	0.4	1.00	10.3	0.0
	2.00	1.98	5.4	−1.0	1.91	5.7	−4.5
	20.0	21.8	3.4	8.9	20.4	6.3	2.1
	400	428	3.7	7.1	408	8.6	2.0

表4 マイクロドースのための QC サンプルの安定性試験結果 (n=3)

安定性試験のための パラメータ	ヒト血漿中フェキソフェナジン濃度 (pg/mL)								
	20.0			100			800		
	平均 (pg/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)	平均 (pg/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)	平均 (pg/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)
凍結融解安定性									
1回	18.4	6.3	−8.0	97.7	6.7	−2.3	847	3.2	5.9
2回	20.9	7.1	4.5	98.4	5.6	−1.6	839	7.3	4.9
3回	19.1	4.7	−4.5	110	4.1	10.0	866	1.7	8.3
長期保存安定性 (−20±5°C、30日間)									
	20.5	6.6	2.5	92.1	3.8	−7.9	752	6.0	−6.0
長期保存安定性 (−70°C以下、30日間)									
	20.0	11.9	0.0	96.5	8.8	−3.5	782	7.2	−2.3
短期室温安定性 (4時間)									
	19.2	7.4	−4.0	99.8	4.9	−0.2	860	4.2	7.5
測定実測試料中安定性 (5°C設定オートサンプラー中)									
24時間	18.1	4.4	−9.5	93.2	3.6	−6.8	795	9.5	−0.6
48時間	19.9	2.0	0.5	102	12.9	4.0	817	4.3	2.1

表 5 臨床投与のための QC サンプルの安定性試験結果 (n=3)

安定性試験のための パラメータ	ヒト血漿中フェキソフェナジン濃度 (ng/mL)								
	2.00			20			400		
	平均 (ng/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)	平均 (ng/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)	平均 (ng/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)
凍結融解安定性									
1回	1.80	0.6	−10.0	17.3	0.5	−2.3	363	1.9	−9.3
2回	1.86	7.2	7.0	19.2	13.5	−1.6	365	0.5	−8.8
3回	2.03	3.4	1.5	20.0	4.0	10.0	391	5.0	−2.3
長期保存安定性 (−20±5°C、30日間)									
	2.00	2.8	0.0	17.6	3.3	−12.0	411	4.2	2.8
長期保存安定性 (−70°C以下、30日間)									
	1.92	8.8	−4.0	18.2	2.9	−9.0	384	5.0	−4.0
短期室温安定性 (4時間)									
	1.93	1.6	−3.5	20.3	2.2	1.5	436	2.6	9.0
測定実測試料中安定性 (5°C設定オートサンプラー中)									
24時間	2.01	8.7	0.5	20.3	3.1	1.5	410	3.7	2.5
48時間	1.80	2.2	−10.0	18.7	2.7	−6.5	369	2.5	−7.8

8) 希釈再現性

マイクロドース用の QC サンプル (2000 pg/mL) 及び臨床量投与用の QC サンプル (1000 ng/mL) は、ヒトブランク血漿にて 10 倍希釈後に測定した。CV が 11.2%以下、RE が $\pm 9.3\%$ 以内と判断基準を満たし、いずれの QC サンプルの濃度も、本来の濃度に合致した。

9) 標準原液及び標準溶液安定性

フェキソフェナジン及び IS の RE は、それぞれ $\pm 13.1\%$ 以内、 $\pm 14.4\%$ 以内であった。よって、フェキソフェナジン標準原液 (100 $\mu\text{g/mL}$)、IS 標準原液 (100 $\mu\text{g/mL}$)、標準溶液 (0.2、20 及び 10000 ng/mL) 及び IS 溶液 (0.5 及び 10 ng/mL) は、室温で 6 時間後または 5°C で 30 日間安定であった。

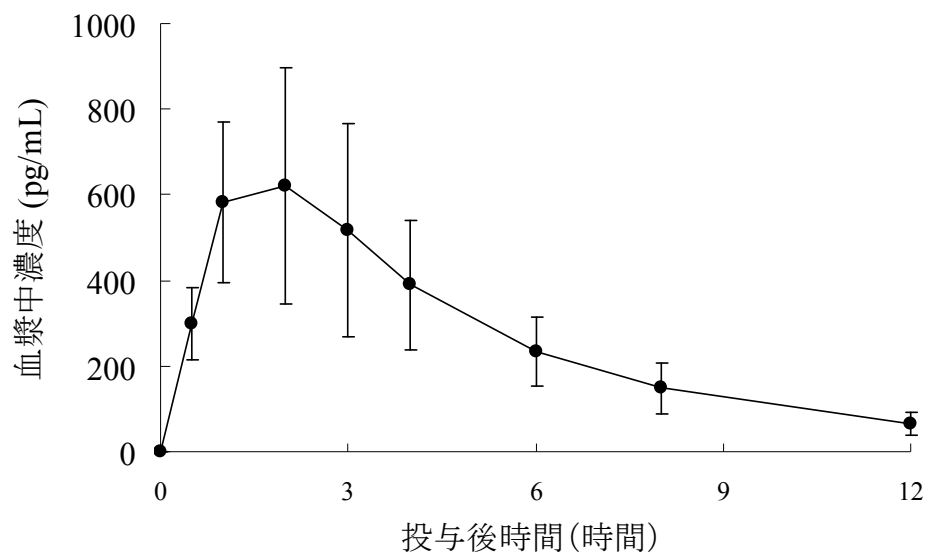
(4) 臨床試験

被験者 8 名の健康人男性の年齢、体重及び BMI の平均 (\pm SD) は、それぞれ 25 ± 4 歳、 64.4 ± 6.9 kg、 21.9 ± 2.2 kg/m²であった。

バリデートされた分析法をマイクロドース後または臨床量投与後の試料測定に用い、外れ値は、除外しなかった。各投与前の血漿中濃度は、先の投与のキャリーオーバーの影響を受けなかった。フェキソフェナジン溶液 100 μg 経口投与後及びフェキソフェナジン錠 60 mg 経口投与後の血漿中濃度の時間推移を図 6A 及び 6B に示す。検量線上限濃度を超えた血漿試料については、希釈測定を実施した。測定の精度管理をするために、各測定において、検量線及び QC サンプルを測定した。LC/ESI-MS/MS を用いることで、マイクロドース後の全ての採血時点における濃度を得ることが可能であった。マイクロドース後の血漿中濃度は、39.1~1082 pg/mL であり、設定した検量線範囲は適切であった。マイクロドース後 12 時間時及び臨床量投与後 0.5 時間時の MRM クロマトグラムを図 7 に示す。得られた薬物動態プロファイルは、薬物動態パラメータを十分に解析できるものであった。臨床量投与後の C_{max} 値の平均値は、275 ng/mL (T_{max} 値 2.0 時間) であり、先に報告されたデータと同様であった[63]。

投与量 60 mg で規格化したマイクロドース時 (100 μg) 及び治療量投与時 (60 mg) の血漿中フェキソフェナジン濃度の時間推移プロファイルを図 8 に示す。投与量 60 mg で規格化したマイクロドースの血漿中フェキソフェナジン濃度は、治療量投与のそれよりも高かった。投与量 60 mg で規格化したマイクロドース後の C_{max} 値及び AUC_{last} もまた、同様に高く、C_{max} 値と AUC_{last} の比は、それぞれ 1.3 倍、1.4 倍の差があった。(表 6)。投与量 60 mg で規格化した個人別の C_{max} 値及び AUC_{last} も、治療量投与のそれより高かった (図 9)。薬物動態パラメータは、ANOVA においては有意差が認められなかった。概して、マイクロドース後の薬物動態プロファイルは、治療量投与時のそれと類似しており、マイクロドースのデータから治療量投与時の薬物動態が予測可能であることが示唆された。

(A)



(B)

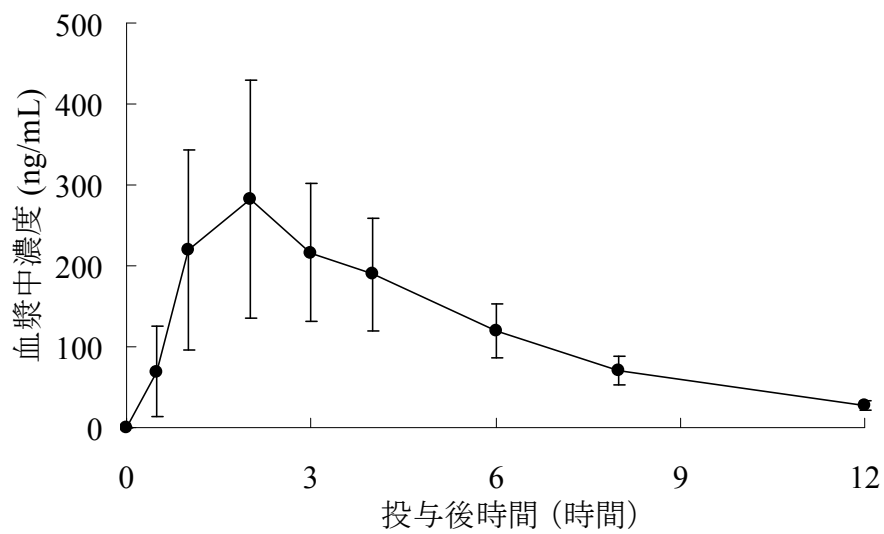


図 6 フェキソフェナジンの血漿中濃度-時間曲線：100 µg 溶液経口投与時 (A) 及び 60 mg 経口投与時 (B)

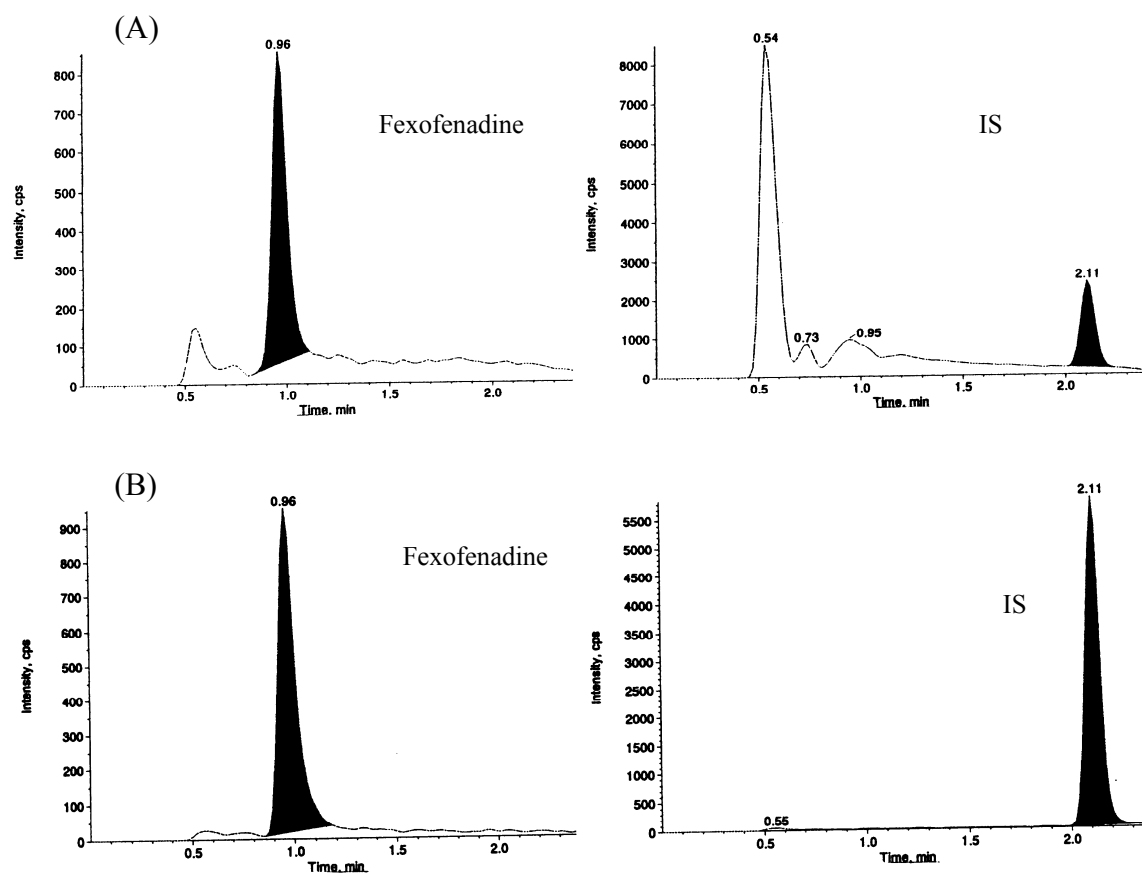


図7 MRM クロマトグラム：マイクロドース後 12 時間時 (39.1 pg/mL) (A) 及び臨床投与後 0.5 時間時 (3.34 ng/mL) (B)

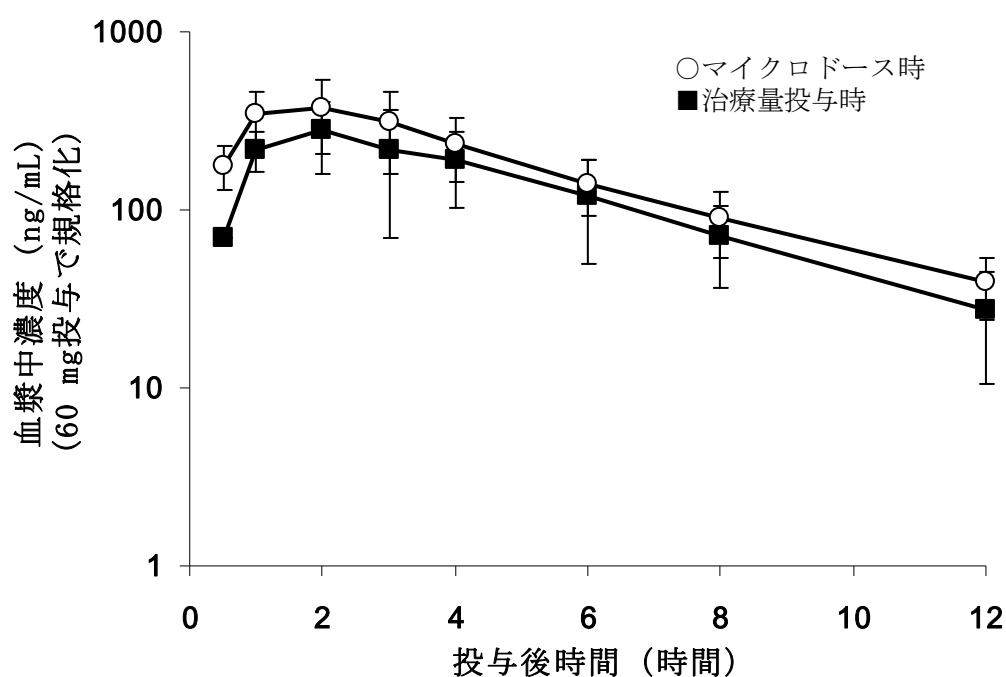


図8 投与量 60 mg で規格化したマイクロドース時 (100 µg) 及び治療量投与时 (60 mg) の血漿中フェキソフェナジン濃度の時間推移プロファイル

表6 マイクロドース後及び治療量投与後のフェキソフェナジンの薬物動態パラメータ (n=8)

	マイクロドース (100 g)	治療量投与 (60 mg)
Cmax (ng/mL)	0.632±0.245 [36.8]	275±145 [47.2] (95%CI: 186, 429)
投与量 60 mg で規格化した Cmax	379±147 (95%CI: 277, 524)	N/A
Tmax (時間)	1.5 (0.5-2.0)	2.0 (1.0-4.0)
AUClast (ng/h/mL)	3.189±1.230 [36.7]	1431±432 [29.0] (95%CI: 1127, 1850)
投与量 60 mg で規格化した AUClast (ng/h/mL)	1914±738 (95%CI: 1395, 2629)	N/A
t1/2 (時間)	3.2±0.4 [13.5]	2.9±0.3 [11.8]

Cmax と AUClast は、幾何平均値±SD [CV%] 及び 95%信頼区間 (Confidence Interval, CI) とした。Tmax は、中央値と範囲で表した。Cmax と AUClast は、投与量で規格化したデータで比較した。マイクロドースと治療量投与間の全てのパラメータは、ANOVA によって顕著な差はなかった。

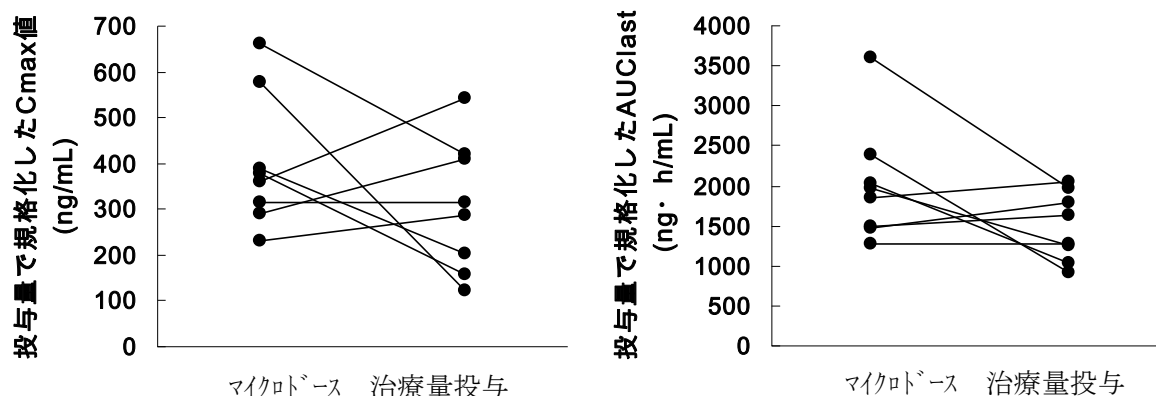


図9 投与量 60 mg で規格化したマイクロドース時 (100 µg) 及び治療量投与時 (60 mg) の Cmax 値及び AUClast の個体別プロット (n=8)

3-4. 考察

本研究は、日本で初めての非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験である。LC-MS/MS を用いた測定においては、一般的に用いられている試料前処理が適用でき、マイクロドース後の全ての採血ポイントの濃度をもれなく、かつ迅速に取得することが可能であった。LC-MS/MS でも実試料中の薬物濃度測定が可能であることを証明した。測定にあたり、IS は、フェキソフェナジンのプロドラッグであるテルフェナジンを使用した。定量の精度及び真度を高くするため、通常の測定では、安定同位体で標識したフェキソフェナジンを IS として用いる。しかし、複数の医薬品候補から開発に値する化合物を選択することを目的としているマイクロドース試験を実施する段階で、合成に費用も時間にかかる安定同位体を IS として使用することは適していない。よって、フェキソフェナジンの類縁物質を選択することが妥当であると判断した。

投与薬物は、マイクロドース時のデータから治療量投与時の薬物動態を予測するにあたり、マイクロドース時と 60mg 投与時の薬物動態に線形性が成立する薬物としてフェキソフェナジンを選択した。その理由としては、フェキソフェナジンの特性として、代謝の寄与率が低い（経口投与量の約 5%のみ代謝）ためである[64]。よって、フェキソフェナジンの薬物動態は CYP3A4 による代謝ではなく、P 糖タンパクを含むトランスポーターに影響を受ける[65-69]。本マイクロドース試験では、投与量 60 mg で規格化したマイクロドース後の Cmax 値及び AUClast は、治療量投与のそれより高かった。その原因としては、マイクロドースは、低投与量のため溶液で投与し、治療量投与は、錠剤で投与したため、投与剤型の違いによる吸収の差が考えられた。なお、60 mg で規格化したマイクロドース後の薬物動態プロファイルは、治療量投与時のそれと類似していたことにより、フェキソフェナジンのマイクロドース後のデータから治療量投与時の薬物動態予測は可能であることが示唆された。

結果、マイクロドース臨床試験における測定法に LC-MS/MS を用いても、未変化体の薬物動態プロファイルは十分に取得でき、非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験の有用性が実証できた。

4. マイクロドース臨床試験を利用したヒト代謝物の早期探索

4-1. 目的

医薬品開発において代謝物を測定することの重要性は、大きく2点ある。薬効の観点からは、特にプロドラッグ体に該当するが、薬理活性を有する代謝物の生成評価とその薬物動態評価に有用である。もう一つは、安全性の観点から、有害事象に関連し得る代謝物の生成、あるいは代謝酵素・トランスポーターの機能を阻害し、基質薬物と薬物相互作用を生じる代謝物の生成がある場合に、代謝物測定が必要となる。従来の医薬品開発であると臨床試験に進まない限り、候補薬物のヒトに特有な代謝物は発見できず、代謝物が発見された場合は、臨床試験開始後に代謝物の毒性試験を実施することになり、開発が遅れる原因となる。実際のところ、医薬品開発における未知代謝物の高感度定量分析には、AMS が用いられているが、 ^{14}C 標識体を投与する必要がある。そこで、私は、非標識体化合物を投与したマイクロドース臨床試験を利用した代謝物測定を考えた。

先の研究において、実際に非標識体化合物フェキソフェナジンを投与したマイクロドース臨床試験で、分析法に LC-MS/MS を用いることにより、解析に十分な薬物動態データを取得することが実証できた[57, 58]。さらに、LC-MS/MS が化合物情報を保持したまま測定が出来るという特長を活かして、マイクロドース臨床試験の適用拡大を図る。ヒト代謝物が複数生成されることが予めわかっているニカルジピンを用い、非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験により、以下の手順で、代謝物の検索及び代謝物の薬物動態データ取得が可能であることを検討した[71]。

- 1) ヒト肝ミクロソームを用いて生成した *in vitro* 代謝物についてフーリエ変換質量分析装置 (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, FTICRMS) を用いて精密質量を測定。同時に、Linear Ion Trap (LIT) -MS により、 MS^2 及び MS^3 測定を行い、代謝物のフラグメンテーション情報の収集。
- 2) LC-MS/MS を用いてヒト血漿中代謝物測定。未変化体は標準物質を用いて定量。

4-2. 方法

(1) 試薬

塩酸ニカルジピン、ニフェジピン、他の試薬は、和光純薬工業株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。D-グルコース-6-リン酸二ナトリウム塩 (D-Glucose-6-Phosphate Disodium Salt, G6P) は、Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオシドリン酸塩 (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADP) 及び 250 U/vial グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, G6PDH) は、オリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) から購入した。塩酸ニカルジピン及びニフェジピンの構造式を図1に示す。

(2) ヒト肝ミクロソーム

プールされた男女混合のヒト肝ミクロソーム (ヒト肝臓の 20 mg/mL ミクロソームタンパク質) は、XenoTech, LLC (Lenexa, KS, USA) から購入した。

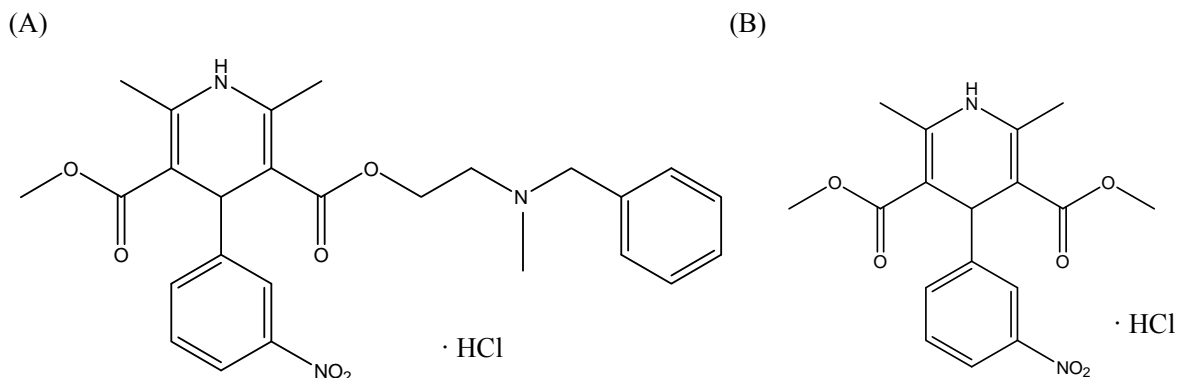


図1 構造式：塩酸ニカルジピン (A) 及び塩酸ニフェジピン (B)

(3) 標準原液及び標準溶液の調製

ニカルジピン標準原液 (100 µg/mL) 及びニフェジピン標準原液 (内標準物質 Internal Standard, IS, 100 µg/mL) は、アセトニトリルを用いて調製し、ニカルジピン標準溶液及び IS 溶液は、アセトニトリルを用いて以下のように調製した。分析法バリデーションのために、0.05、0.25、0.5、1、2.5、5、10 及び 25 ng/mL の検量線用標準溶液及び 0.05、0.15、2 及び 20 ng/mL の Quality Control (QC) サンプル用標準溶液、50 ng/mL の IS 溶液を調製した。これらの標準原液及び標準溶液は、冷蔵 (5°C) 保存した。

(4) 検量線用標準試料溶液、ゼロ試料及び QC サンプルの調製

検量線用標準試料溶液 1、5、10、20、50、100、200 及び 500 pg/mL は、ヒトブランク血漿 1 mL に、標準溶液 20 µL を添加して調製した。ゼロ試料は、ヒトブランク血漿 1 mL に、アセトニトリル 20 µL を添加して調製した。精度及び真度用 QC サンプルは 1、3、40 及び 400 pg/mL の濃度の試料を、安定性試験用 QC サンプルは、3 及び 400 pg/mL の濃度の試料を調製した。

(5) ヒト血漿中ニカルジピン及びその代謝物のための試料前処理法

試験管にマイクロドースを想定した血漿試料 1 mL を分取し、IS 溶液 20 µL を添加した。その試料にアセトニトリル 1 mL を添加し、ボルテックスミキサーにて 30 秒間混和した後、1820×g で 5 分間遠心分離した。上清は、別の試験管に分取し、40°C 加温下窒素ガスにて上清が約 1 mL になるまで蒸発させた。この試料に、28%アンモニア溶液 10 µL 及び t-ブチルエチルエーテル 4 mL を添加し、5 分間振とう後、1820×g で 5 分間遠心分離した。有機相は、別の試験管に分取し、40°C 加温下窒素ガスにて蒸発乾固後、残渣を移動相 100 µL に再溶解した。

(6) 分析法バリデーション

分析法は、validation of bioanalytical methods のための FDA ガイドライン[56]に従って、特異性、真度及び精度を検討した。

特異性は、6 個体別の血漿を前処理することによって評価した。マトリックス効果は、6 個体別の血漿を用いて評価した。検量線は、ゼロ試料及び 8 濃度 (1~500 pg/mL) の検量線用標準試料溶液から構成された。直線性は、最小二乗法 (重み $1/y^2$) により評価した。日内及び日差再現性は、4 濃度 (n=5) の QC サンプルの測定を 3 日間行った。回収率は、3 濃度 (3、40 及び 400 pg/mL、各 n=3) で評価した。ヒト血漿中 (凍結融解、短期保存安定性及び長期保存安定性) 及び測定実測試料中ニカルジピンの安定性は、2 濃度 (n=3) の QC サンプルの測定によって、検討した。

ニカルジピン標準原液 (100 µg/mL)、IS 標準原液 (100 µg/mL)、標準溶液 (0.05 ng/mL) 及び IS 溶液 (50 ng/mL) の安定性は、室温で 6 時間後または 5°C で 67 日間保存後、測定 (n=3) することによって評価した。

(7) 臨床試験

臨床試験は、北里東病院 (Kanagawa, Japan) の治験審査委員会によって承認後、実施された。試験デザインは、ランダム化、クロスオーバーとした。12 名の健康人男性ボランティアからは、インフォームドコンセントを書面にて得た。被験者は、絶食条件下、塩酸ニカルジピン (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kyoto, Japan) を単回投与した。投与量は、マイクロドース 100 µg とした。採血時点は、投与前、投与 0.5、1、1.5、2、3、4、6 及び 8 時間後であった。

(8) in vitro 代謝試験

インキュベーション混合物 (総量 200 µL) は、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中 1 mg/mL ミクロソームのタンパク質、5 mM MgCl₂、NADPH ジェネレーティングシステム (2 mM NADP、10 mM G6P、5 mM MgCl₂、0.7 mU/mL G6PDH) 及び 10 µM の基質を含めた。代謝反応は、37°C で 5 分間のプレインキュベーション後に、NADPH ジェネレーティングシステムの溶液を添加することで開始した。反応混合物は、6%アンモニア溶液 40 µL の添加によって反応を停止するまで 5、10、15、30 及び 60 分間インキュベーションした。混合物に、除タンパクのためにアセトニトリル 240 µL を添加し、1000×g で 5 分間、4°C で遠心分離し、上清を試料として用いた。

(9) ヒト血漿中ニカルジピンの LC-MS/MS を用いた測定装置

LC システム : ACQUITY UPLC システム (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

質量分析装置 : Quattro Premier XE システム (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

分析条件

分析カラム：	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (100 mm × 2.1 mm 直径、粒子径 1.7 μm) (Waters Corporation、Milford、MA、USA)
移動相：	アセトニトリル／5 mM 酢酸アンモニウム (7:3、v/v)
流速：	0.5 mL/min
カラム設定温度：	30°C
試料注入量：	5 μL
イオン化法：	エレクトロスプレーイオン化法
極性：	正イオン検出モード
スキャンタイプ：	Multiple Reaction Monitoring (MRM)
イオン源温度：	150°C
desolvation 温度：	400°C
drying gas flow (窒素)：	800 L/h
cone gas flow：	150 L/h
キャピラリー電圧：	0.8 kV
モニターイオン：	

測定対象物質	プレカーサーイオン	プロダクトイオン	コリジョンエネルギー	コン電圧	dwel time
ニカルジピン	<i>m/z</i> 480	<i>m/z</i> 315	24 eV	35 V	0.1 sec
IS	<i>m/z</i> 347	<i>m/z</i> 315	12 eV	20 V	0.1 sec

分析データは、MassLynx 3.5 ソフトウェア (Waters Corporation, Milford, MA, USA) で解析した。

(10) ヒト肝マイクロソーム中ニカルジピン代謝物の測定

装置

LC システム：ACQUITY UPLC システム (Waters Corporation、Milford、MA、USA)

LTQ FT 及び LIT-FTICR 質量分析装置 (Thermo Fisher Scientific、Bremen、Germany)

分析条件

分析カラム：	Inertsil ODS-3 (100 mm × 2.1 mm 直径、粒子径 3 μm) (GL Sciences、Osaka、Japan)
移動相：	A：5 mM 酢酸アンモニウム、B：アセトニトリル

時間 (分)	A (%)	B (%)
0	90	10
13	5	95
18	5	95
18.1	90	10
25	90	10

流速：	0.2 mL/min
-----	------------

カラム設定温度： 40°C
 注入量： 10 µL
 極性： 正イオン検出モード
 イオン源温度： 275°C
 スプレー電圧： 4.0 kV
 キャピラリー電圧： 15 kV

以下の3つのスキャンを使用した。

- (1) FTICR（分解能 25000）によるフルスキャン測定：スキャンレンジ m/z 150~1500
- (2) data-dependent exclusion MS² measurement：LTQ による MS フルスペクトルにおいて最も強度の高いイオンを測定。その際、MS² スペクトルを得るために用いられたプレカーサーイオンは、12 秒間 dynamic exclusion list に記憶されるため、12 秒間は、同じプレカーサーイオンを測定せずに、他のプレカーサーイオンを測定するように設定された。
- (3) data-dependent MS³ measurement：LTQ による MS² フルスペクトラムにおいて最も強度の高いイオンを測定[72]。MS/MS コリジョンエネルギーは、35%に設定した。

全てのデータは、代謝物探索と代謝物の構造式を分析することが可能な MetWorks 1.0.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で解析した。

(1 1) LC-MS/MS によるヒト血漿中ニカルジピン測定

装置

LC システム：ACQUITY UPLC システム (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

質量分析装置：Quattro Premier XE システム (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

分析条件

分析カラム： Inertsil ODS-3 (100 mm × 2.1 mm 直径、粒子径 3 µm)
 (GL Sciences, Osaka, Japan)
 移動相： A：5 mM 酢酸アンモニウム、B：アセトニトリル

時間 (分)	A (%)	B (%)
0	90	10
13	5	95
18	5	95
18.1	90	10
25	90	10

流速： 0.2 mL/min
 カラム設定温度： 40°C
 注入量： 10 µL
 イオン化法： エレクトロスプレーイオン化法
 極性： 正イオン検出モード

スキャンタイプ :	MRM
イオン源温度 :	150°C
desolvation 温度 :	400°C
drying gas flow (窒素) :	800 L/h
cone gas flow :	150 L/h
キャピラリー電圧 :	0.8 kV
モニターイオン :	M1 (<i>m/z</i> 388→313)、M2 (<i>m/z</i> 390→315)、M3 (<i>m/z</i> 464→313)、M4 (<i>m/z</i> 466→315)、M5 (<i>m/z</i> 478→357)、M6 (<i>m/z</i> 494→357)、M7 (<i>m/z</i> 496→359)、M8 (<i>m/z</i> 514→349)、M9 (<i>m/z</i> 514→349)
コリジョンエネルギー :	24 eV (M1～M9 全て)
コーン電圧 :	35 V (M1～M9 全て)
dwel time :	0.05 sec (M1～M9 全て)

分析データは、MassLynx 3.5 ソフトウェア (Waters Corporation、Milford、MA、USA) で解析した。

4-3. 結果

(1) 分析法バリデーション

ニカルジピン又は IS のクロマトグラム上の溶出位置に夾雑ピークは存在しなかった。他 5 つのヒトブランク試料においても同様であった。ヒトブランク試料、ゼロ試料、マイクロドース用の定量下限値の試料の MRM クロマトグラムを図 2 に示す。定量下限値の試料のニカルジピンの絶対注入量は、1 fg であった。

検量線式 $y = ax + b$ は、IS に対するニカルジピンのピーク面積比 (y) とフェキソフェナジンの添加濃度 (x) との関係を用いて最小二乗法 (重み: $1/y^2$) により求めた。検量線は、1～500 pg/mL の範囲で直線性を得た。検量線式は、 $y = 0.00788(\pm 0.000612)x + 0.00301(\pm 0.000553)$ であった。いずれの検量線の相関係数 (r) も、0.993 を超えた。検量線の精度 (Coefficient of Variation, CV) は、9.8%以下、相対誤差 (Relative Error, RE) は、 $\pm 8.8\%$ 以内であった。

日内及び日差再現性は、4 濃度 ($n=5$) の QC サンプルを 3 日間測定することで評価した。日内再現性は、CV が 14.7%以下、RE が $\pm 6.0\%$ 以内であり、日差再現性は、CV が 14.0%以下、RE が $\pm 5.3\%$ 以内であった。

QC サンプルの安定性結果を表 1 に示す。ヒト血漿中ニカルジピンは、凍結 (-80°C 以下) 融解 3 回の間、または室温で 4 時間安定であった。測定実測試料中 (5°C に設定したオートサンプラー中) ニカルジピンは、48 時間安定であった。また、ヒト血漿中ニカルジピンは、 -20°C または -80°C で 38 日間安定であった。ニカルジピン標準原液 (100 $\mu\text{g/mL}$)、IS 標準原液 (100 $\mu\text{g/mL}$)、標準溶液 (0.2、20 及び 10000 ng/mL) 及び IS 溶液 (0.5 及び 10 ng/mL) は、室温で 6 時間後または 5°C で 67 日間安定であった。

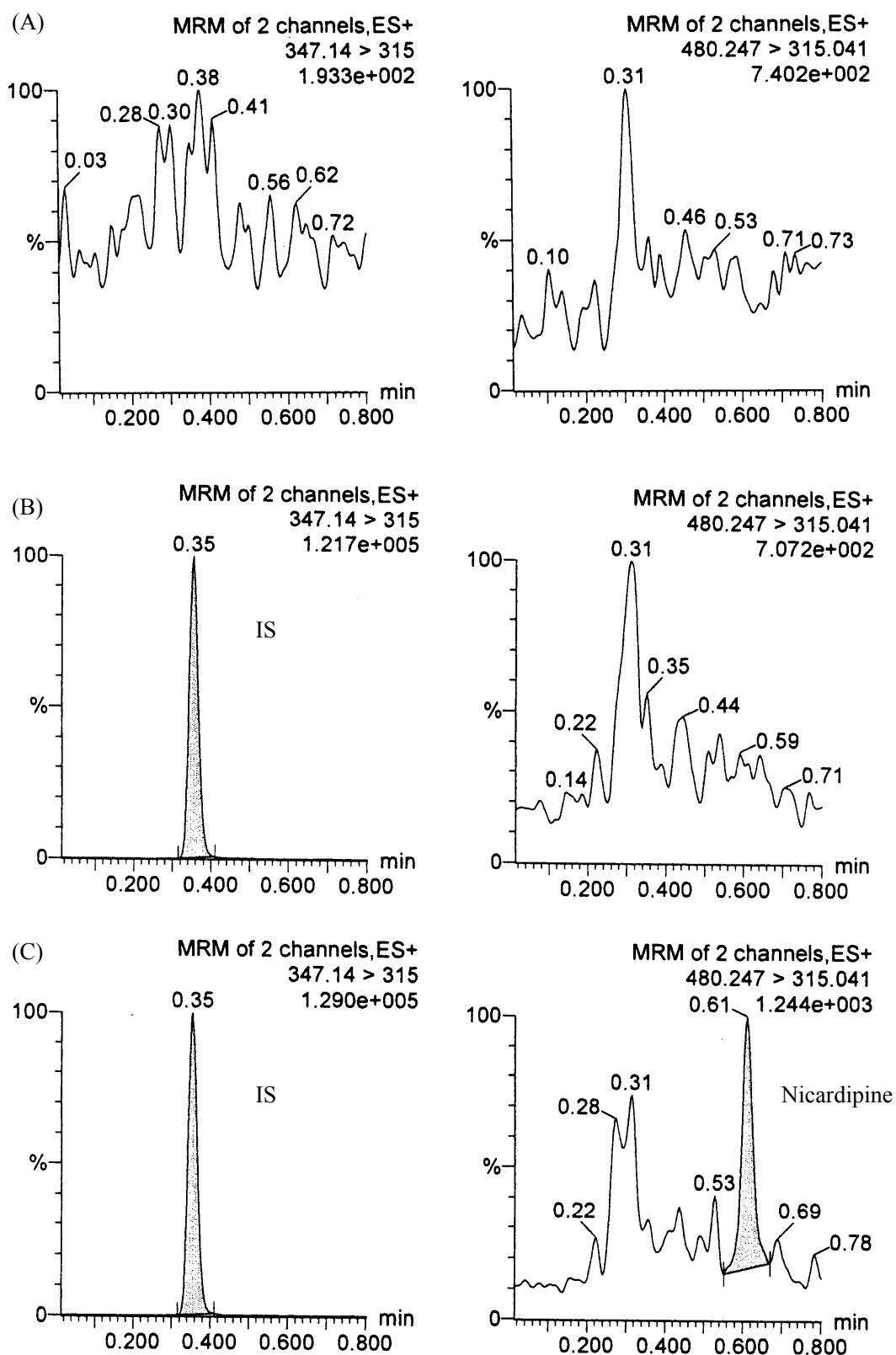


図2 検量線のMRMクロマトグラム：ブランク試料（A）、ゼロ試料（B）及び定量下限値における検量線用標準試料溶液（1 pg/mL）（C）。内標準物質（IS）：ニフェジピン

表 1 QC サンプルの安定性試験結果

安定性試験のための パラメータ	ヒト血漿中ニカルジピン濃度 (pg/mL)					
	3			400		
	平均 (pg/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)	平均 (pg/mL)	変動係数 (%)	相対誤差 (%)
凍結融解安定性						
3回	3.18	6.0	6.0	417	14.4	4.3
長期保存安定性 (−20°C、38日間)	2.60	1.5	−13.3	374	3.2	−6.5
長期保存安定性 (−80°C、38日間)	2.75	2.9	−8.3	378	3.2	−5.5
短期室温安定性 (4時間)	3.06	7.5	2.0	402	9.2	0.5
測定実測試料中安定性 (5°C設定オートサンプラー中)						
24時間	2.93	10.2	−2.3	383	8.6	−4.3
48時間	3.12	1.3	4.0	403	12.7	0.8

(2) 臨床試験

被験者 12 名の健康人男性の年齢、体重及び BMI (Body Mass Index) の平均 (±SD) は、それぞれ 24 ± 4 歳、 64.0 ± 9.6 kg、 21.7 ± 2.9 kg/m² であった。

ヒト血漿中ニカルジピンの測定にあたり、ニカルジピン 100 µg 投与時の血漿中の定量下限値は、以下のように算出した。20 mg 投与の 1 時間後における C_{max} 値 0.032 µg/mL [73] の 1/200 をマイクロドース (100 µg 投与) 投与時の C_{max} 値とし、この推定した値の 1/2⁴ 以下の値、すなわち 1 pg/mL を定量下限値として設定した。高感度測定を達成するために、ACQUITY UPLC システム、Quattro Premier XE 質量分析装置及び ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 分析カラムを選択した [74]。クロマトグラムにおける高分離能は、分析カラムの粒子径に比例する。これらのシステムを用い、分析カラムの効率を良くするためには、カラムの固定相の粒子径は 1.7 µm が最適であった [75]。15000 psi (103500 kPa) までの高耐圧を備えた分析カラムは、0.5 mL/min の高流速が可能であった。また、アセトニトリル/5 mM 酢酸アンモニウム (7:3, v/v) の移動相を使用することにより、クロマトグラム上においてニカルジピンと IS の良好なピーク形状を得ることができた。ピークの保持時間は、ニカルジピンが 0.6 分、IS が 0.35 分であった。

pg/mL オーダーの測定を行うために、少なくとも 1 mL の血漿試料が必要であったが、ヒトから採血する量としては適切な量であった。試料前処理にあたり、当初、固相抽出を試みたところ、クロマトグラム上においてニカルジピンの溶出位置に夾雑ピークが存在した。そこで、洗浄溶媒や溶出溶媒を検討したが、1 pg/mL レベルの定量を行うことが出来なかった。よって、t-ブチルメチルエーテルを用いた液液抽出に変更した。ニカルジピンのタンパク結合率は、98%

～99.5%であり[76]、液液抽出前に血漿中のタンパク質と除去する必要があったため、血漿試料（1 mL）は、予めアセトニトリルで除タンパクした。次に、液液抽出する際は、ニカルジピンと IS の pKa がそれぞれ 8.6 と <1 であるため、試料の pH をアルカリ性とした[77, 78]。結果、クロマトグラム上におけるニカルジピンと IS の溶出位置の夾雑ピークをなくすことができた。LC-MS/MS を用いた高感度測定を行うためには、試料前処理での血漿中内因性物質の除去、化合物のイオン化効率を高めるための最適な移動相の使用、UPLC システムと連結することで高分離を発揮する分析カラムに最適な線形速度の選択、MRM モード測定による特異性の向上を行うことが必要である。IS は、ニカルジピンの類似化合物であるニフェジピンを使用した。一般的に、IS には安定同位体標識化合物を用いるが、マイクロドース臨床試験の実施段階において、その化合物を合成することは実用的でないためである[57]。

バリデートされた分析法をヒト血漿中ニカルジピンの試料測定に用いた。測定の精度管理をするために、各測定において、検量線及び QC サンプルを測定した。マイクロドース後の血漿中濃度は、4.66～278 pg/mL であり、設定した検量線範囲は適切であった。ニカルジピン 100 µg 投与後の血漿中濃度-時間推移を図 3 に示す。マイクロドース 8 時間後の MRM クロマトグラムを図 4 に示す。マイクロドース後の薬物動態データを解析するために、LC-MS/MS を用いてヒト血漿中ニカルジピン濃度が十分に測定できた。

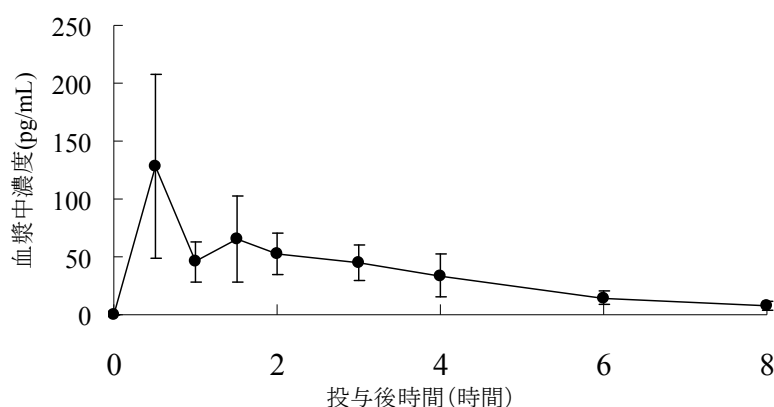


図 3 ニカルジピンの血漿中濃度-時間曲線下面積：100 µg 溶液経口投与時

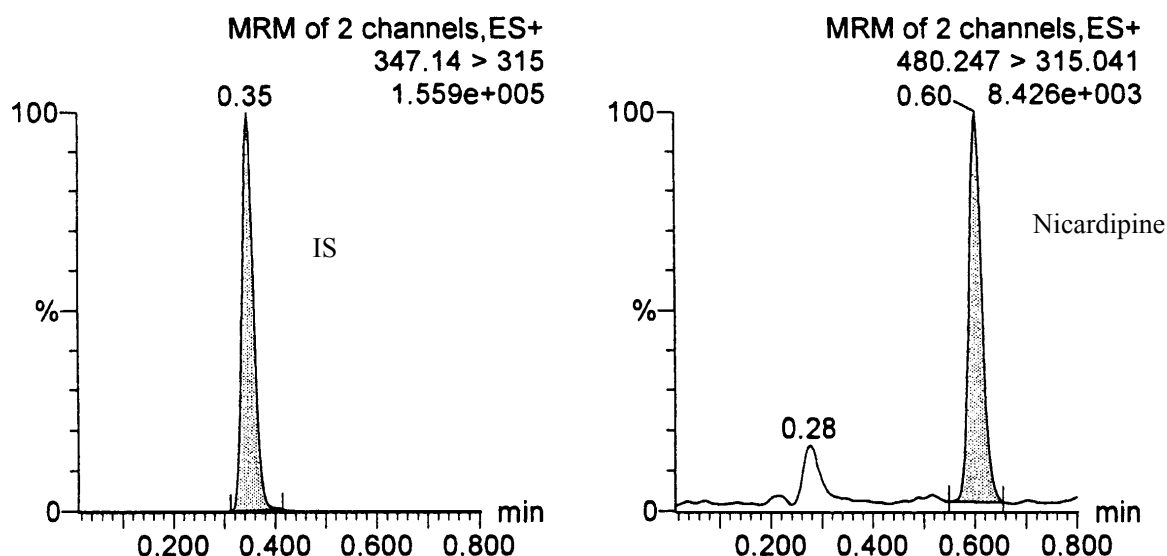


図4 マイクロドース 8 時間後における MRM クロマトグラム：(4.66 pg/mL)

(3) ヒト肝ミクロソーム中ニカルジピン代謝物の測定

最初に、ニカルジピン及びその代謝物のフルスキャン精密質量測定を FTICRMS にて行った。次に、各代謝物の分子式は、計算精密質量と測定精密質量を比較することで MetWorks 1.0.1 を用いて推定した。最後に、代謝反応の部位は、 MS^2 測定又は MS^3 測定のスペクトルを元に推定し、代謝物の構造式を特定した。

9 つの代謝物 (M1-M9) は、ミクロソームに基質を添加した直後とインキュベーション 60 分後の抽出イオンクロマトグラムを比較することによって、推定した (図 5)。代謝物の保持時間は、一般的に代謝物の極性が未変化体より高くなるので、未変化体の保持時間よりも早くなる。しかし、M5 の保持時間は、ニカルジピンの保持時間 (11.36 分) よりも遅かった。逆相クロマトグラフィーの場合、代謝反応における酸化や環化により、そのようなことが起こることがある。表 3 に、ニカルジピン及び各代謝物の保持時間、計算精密質量及び測定精密質量を示す。分子式と代謝反応の種類は、測定精密質量から導き出した。続いて、 MS^2 測定又は MS^3 測定のスペクトルから得た未変化体のフラグメントパターンにより、代謝物の構造式を推定した (図 6)。 m/z 315 及び m/z 359 の MS^2 プロダクトイオンは、*N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチルエステル部分及び *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノ基の脱離によって生成した。 m/z 148 及び m/z 166 の MS^2 プロダクトイオンは、*N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチル基及び *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチルエステル部分を示した。 m/z 226、254、267、269、283、298 の MS^3 プロダクトイオンは、 m/z 315 の MS^2 プロダクトイオンから開裂した。未変化体及び M1-M9 の代謝物の MS^2 及び MS^3 プロダクトイオンは、表 3 にまとめた。

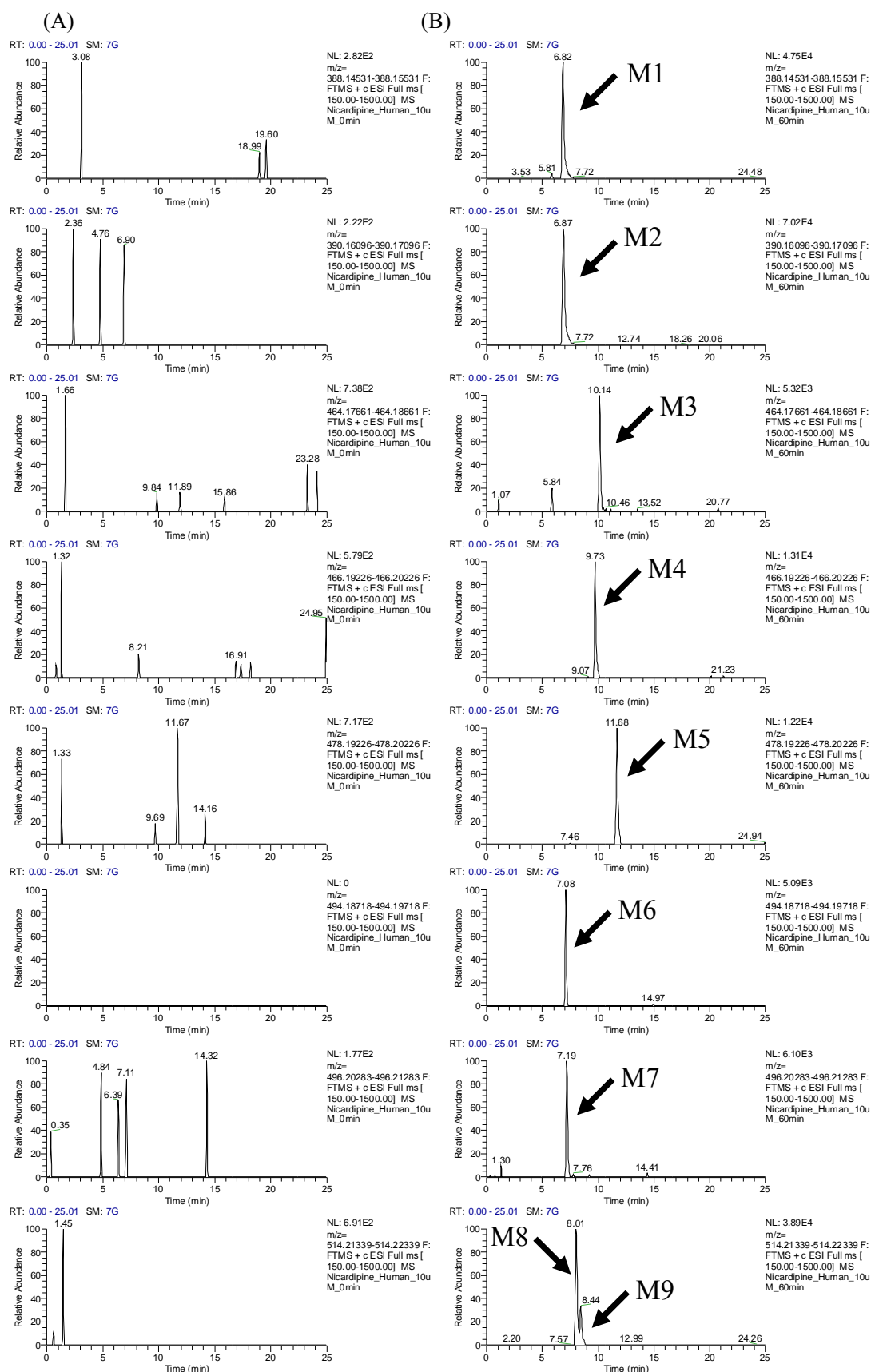


図5 ニカルジピン 10 μ M を含む NADPH 添加ヒト肝ミクロソームをインキュベーション後の抽出イオンクロマトグラム：インキュベーション時間：0 分 (A)、60 分 (B)

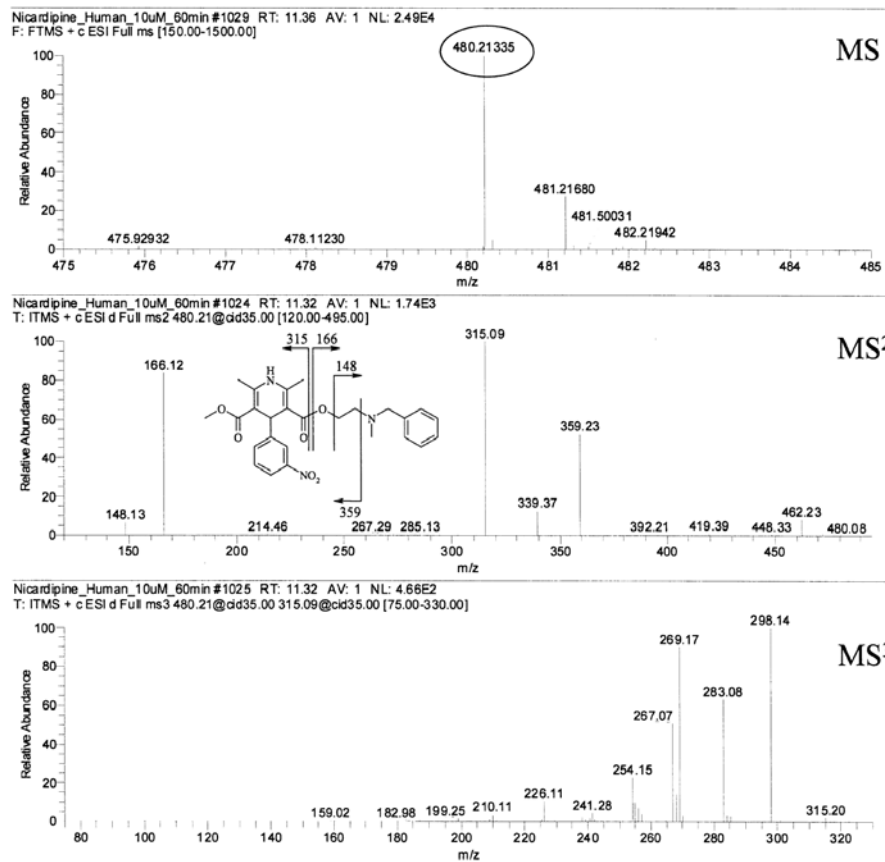


図 6 フルスキャンマススペクトル：ニカルジピンの MS² 及び MS³ 測定

表3 ヒト肝ミクロソーム中推定したニカルジピン代謝物

未変化体 及び 代謝物	分子式	保持時間 (分)	測定精密 質量	計算精密 質量 [M + H] ⁺	質量誤差 (mmas)	MS ² プロダクト イオン (<i>m/z</i>)	MS ³ プロダクト イオン (<i>m/z</i>)
ニカルジピン	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₆	11.36	480.21335	480.21291	0.44	148, 166, 315, 359	226, 254, 267, 269, 283, 298
M1	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₆	6.82	388.15042	388.15031	0.11	313, 331, 357	—
M2	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₆	6.87	390.16595	390.16596	−0.01	315, 359	226, 254, 267, 269, 283, 298
M3	C ₂₅ H ₂₅ N ₃ O ₆	10.14	464.18173	464.18161	0.12	313, 331, 357	—
M4	C ₂₅ H ₂₇ N ₃ O ₆	9.73	466.19754	466.19726	0.28	152, 315, 359	—
M5	C ₂₆ H ₂₇ N ₃ O ₆	11.68	478.19748	478.19726	0.22	148, 313, 357	—
M6	C ₂₆ H ₂₇ N ₃ O ₇	7.08	494.19217	494.19218	−0.01	164, 313, 357	—
M7	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₇	7.19	496.20789	496.20783	0.06	164, 182, 315, 359	—
M8	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₈	8.01	514.21838	514.21839	−0.01	166, 349, 393	217, 247, 290, 331
M9	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₈	8.44	514.21844	514.21839	0.05	166, 349, 393	217, 247, 290, 331

—：代謝物推定に必要なイオンが存在しなかったため、記載せず

M1：*m/z* 313、*m/z* 331 及び *m/z* 357 の MS²プロダクトイオンは、*N*-メチルアミノエチルエステル部分、*N*-メチルアミノエチル基及び *N*-メチルアミノ基の脱離による。よって、M1 は、側鎖の脱ベンジル化及びジヒドロピリジンからピリジンへの酸化反応を経た代謝物であると推定した。

M2：*m/z* 315 の MS²プロダクトイオンは、*N*-メチルアミノエチルエステル部分の脱離によって生成した。*m/z* 226、254、267、269、283、298 の MS³プロダクトイオンは、*m/z* 315 の MS²プロダクトイオンから開裂した。これは、ニカルジピンの *m/z* 315 の MS²プロダクトイオンが開裂したフラグメントパターンと同様であったため、その構造式は、同じであると考えられた。*m/z* 359 の MS²プロダクトイオンは、*N*-メチルアミノ基の脱離によって生成した。よって、M2 は、側鎖の脱ベンジル化を経た代謝物であると推定した。

M3：*m/z* 313、*m/z* 331 及び *m/z* 357 の MS²プロダクトイオンは、*N*-ベンジルアミノエチルエステル部分、*N*-ベンジルアミノエチル基及び *N*-ベンジルアミノ基の脱離によって生成した。よって、M3 は、*N*-脱メチル及びジヒドロピリジンからピリジンへの酸化反応を経た代謝物であると推定した。

M4：*m/z* 315 及び *m/z* 359 の MS²プロダクトイオンは、*N*-ベンジルアミノエチルエステル部

分、*N*-ベンジルアミノ基の脱離によって生成した。 m/z 152 の MS^2 プロダクトイオンは、*N*-ベンジルアミノエチルエステル部分を示す。よって、M4 は、側鎖の *N*-脱メチルを経た代謝物であると推定した。

M5 : m/z 313 及び m/z 357 の MS^2 プロダクトイオンは、*N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチルエステル部分及び *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノ基を示した。 m/z 148 の MS^2 プロダクトイオンは、*N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチル基を示した。よって、M5 は、ジヒドロピリジンからピリジンへの酸化反応を経た代謝物であると推定した。

M6 : m/z 313 及び m/z 357 の MS^2 プロダクトイオンは、*N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチルエステル部分及び *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノ基を示した。 m/z 164 の MS^2 プロダクトイオンは、窒素または *N*-ベンジル基のベンゼン環への酸素付加によって *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチル基から生成されたと考えられた。M6 は、ジヒドロピリジンからピリジンへの酸化反応及び *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチル基に酸素が付加し、*N*-オキサイド又はフェノールとなった代謝物であると推定した。

M7 : m/z 315 及び m/z 359 の MS^2 プロダクトイオンは、*N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチルエステル部分及び *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノ基を示した。 m/z 164 の MS^2 プロダクトイオンは、窒素または *N*-ベンジル基のベンゼン環への酸素付加によって *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチル基から生成されたと考えられた。 m/z 182 の MS^2 プロダクトイオンは、*N*-アミノ基の窒素または *N*-ベンジル基のベンゼン環への酸素付加による *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチルエステル部分から生成されたと考えられた。M7 は、*N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチル基に酸素が付加し、*N*-オキサイド又はフェノールとなった代謝物であると推定した。

M8 : m/z 349 及び m/z 393 の MS^2 プロダクトイオンは、ジヒドロピリジンの酸化後に、*N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチルエステル部分及び *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノ基の脱離によって生成した。 m/z 349 の MS^2 プロダクトイオンから生成した m/z 217、 m/z 247 及び m/z 290 の MS^3 プロダクトイオンは、ジヒドロピリジンに 2 分子の酸素が付加後、開裂することによって生成したと考えられた。 m/z 331 の MS^3 プロダクトイオンは、 m/z 349 の MS^2 プロダクトイオンからの脱水によって生成したと考えられた。 m/z 166 の MS^2 プロダクトイオンは、*N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチルエステル部分を示した。よって、M8 は、ジヒドロピリジンのジヒドロキシ化によって生成した代謝物であると推定した。

M9 : M9 の MS^2 スペクトルは、M8 と同様であったが、各強度が異なっていた。よって、M9 は、M8 のジアステレオマーと考えられた。

結果、構造式とヒトマイクロソーム中 9 つの代謝物の可能なフラグメンテーション位置を予測した (図 7)。反応時間毎におけるヒトマイクロソーム中 9 つの代謝物のピーク面積値を図 8 に示す。M2、M4、M5 及び M8 への代謝は、速く、M1、M3、M6、M7 及び M9 においては、代謝が緩やかであった。

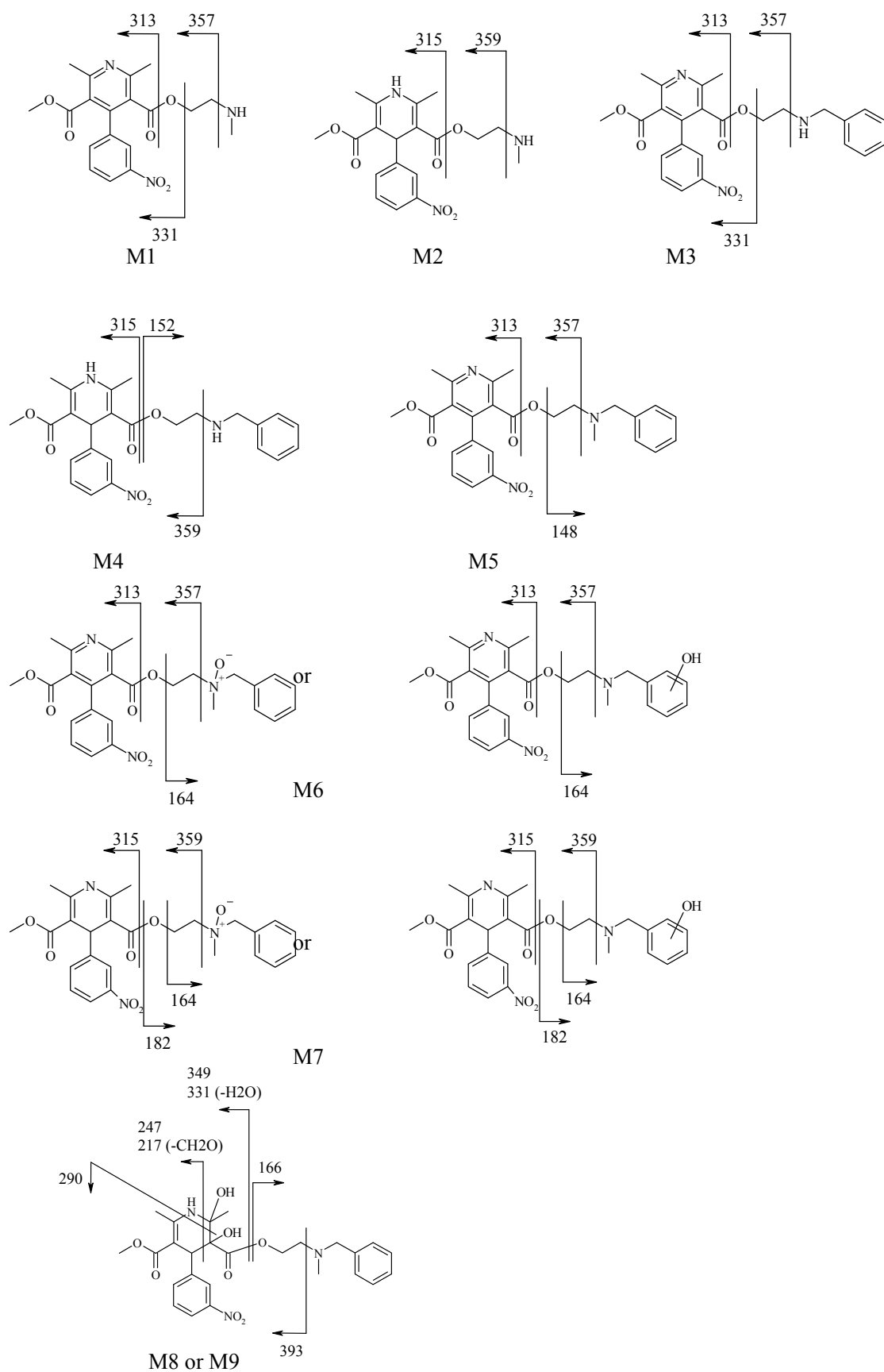


図7 ミクロソーム中ニカルジピン代謝物の推定した構造式及びフラグメンテーション位置

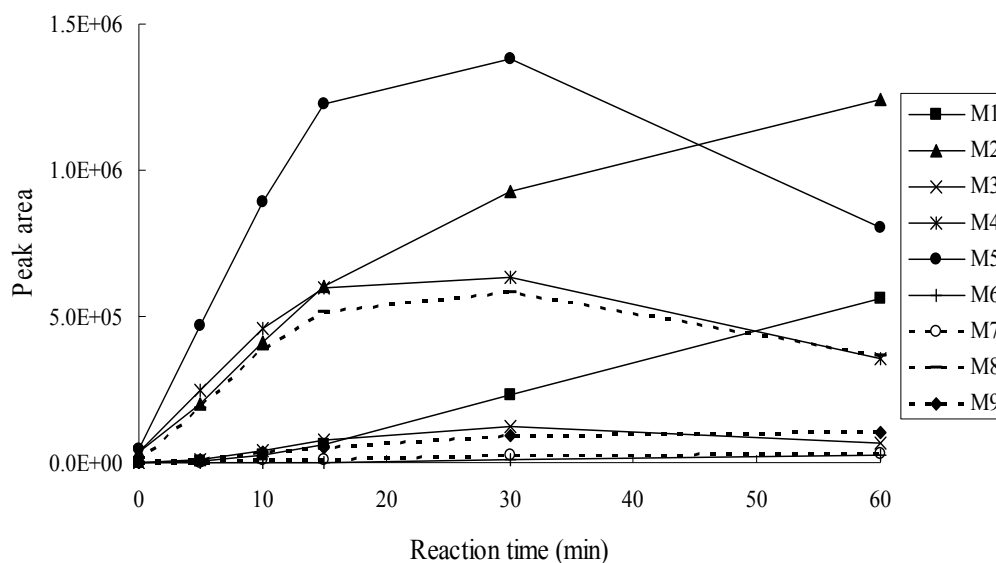


図 8 ヒト肝ミクロソーム中 9 つの代謝物生成の時間推移

(4) ヒト血漿中ニカルジピン代謝物の測定

マイクロドース後 4 名の被験者のヒト血漿中、予測した 9 つの代謝物及び IS を、LC-MS/MS を用いて同時に測定した。9 つの代謝物のマストランジションは、LIT-FTICRMS を用いた測定によって得られたプレカーサーイオンとプロダクトイオン（最も相対強度が高いフラグメントピークから選択）を用いた。液体クロマトグラフ条件は、LIT-FTICRMS 分析と、質量分析の条件は、ニカルジピンの定量測定と同様とした。

ヒト血漿中 M6 及び M7 以外の代謝物の抽出イオンクロマトグラムを図 9 に示す。IS の保持時間は、8.9 分であった。マイクロドース投与後の血漿中、6 つの代謝物（M1、M2、M4、M5、M8 及び M9）が観察された。M3、M6 及び M7 は、血漿中に検出されなかった。図 10A-F に、マイクロドース後の IS のピーク面積値に対する代謝物（M1、M2、M4、M5、M8 及び M9）のピーク面積値の比を示す。

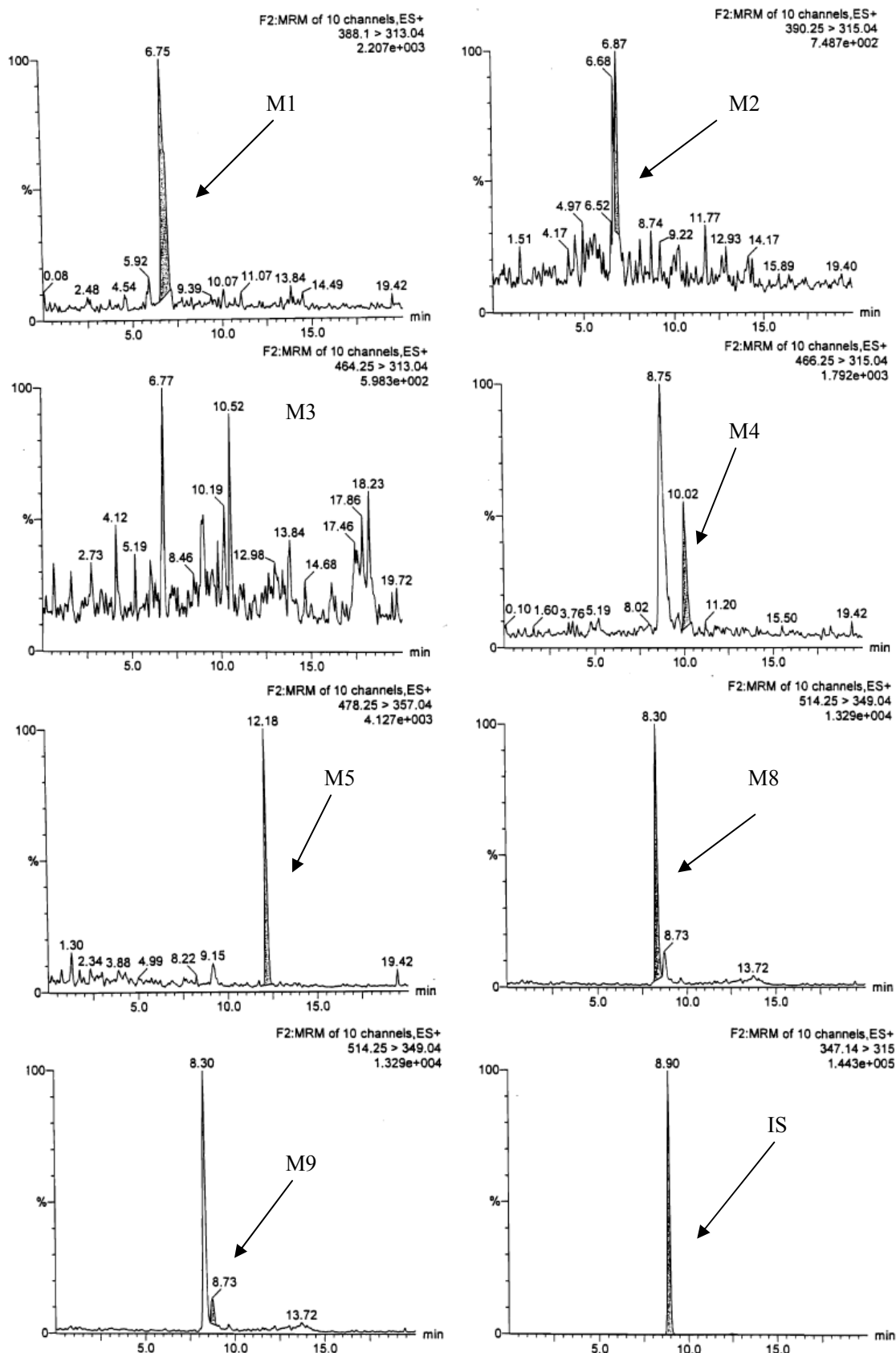


図9 マイクロドース 0.5 時間後におけるヒト血漿中 7 つのニコルジピン代謝物の MRM クロマトグラム

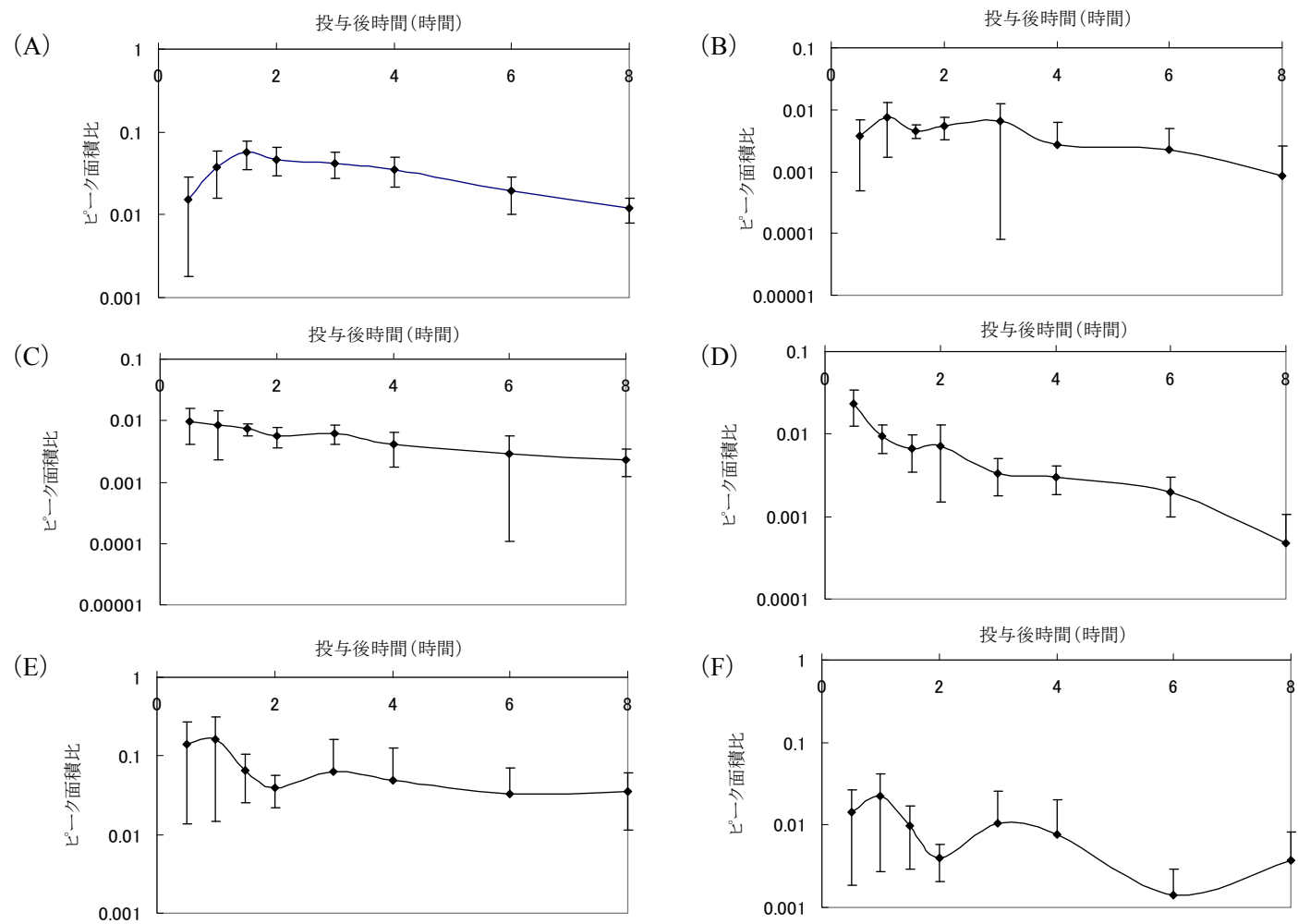


図 10 マイクロドース後の時間対ピーク面積比。M1 (A)、M2 (B)、M4 (C)、M5 (D)、M8 (E)、M9 (F)。(n=4)

4-4. 考察

LC-MS/MS を用いてマイクロドース後の血漿中ニカルジピン濃度を測定することは、ニカルジピンの血漿中濃度時間推移を評価するために十分実用的であった。

動物試験において投与した薬物に由来する代謝物は、放射性標識体でラベル化した候補化合物を用いて網羅的にトレースされるが、ヒトでの代謝物情報は、フェーズ1試験で初めて確認される。動物及びヒトの尿中ニカルジピン代謝物は、 ^{14}C でラベル化したニカルジピンを用いて既に検討されているが[79-81]、本研究では、非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験を実施し、ヒト血漿中代謝物を検索することに挑戦した。

しかし、マイクロドース後のヒト血漿中における代謝物は、装置の感度不足のため、LIT-FTICRMS で検出することができなかった。 MS^3 プロダクトイオンデータを用いて構造を推定するためには、 10^4 以上のイオン強度が必要である[72]。よって、ヒト肝ミクロソームで生成した *in vitro* 代謝物を LIT-FTICRMS にて検索し、LC-MS/MS を用いてヒト血漿中代謝物測定を行うこととした。リニアイオントラップ質量分析装置は、特定のイオンをトラップし、 MS^n 測定により定性分析が可能である。なお、測定にあたっては、data dependent exclusion measurement を採用した。data dependent MS^3 measurement は、化合物の代謝部位あるいは代謝部位でないイオンであるかどうかにかかわらず MS^2 プロダクトイオンの最も強度の高いイオンしか開裂させることができないが、data dependent exclusion measurement であれば、代謝物の構造解析に有用な多くの MS^2 プロダクトイオンから MS^3 フラグメンテーションデータを生成させることができた。

FTICR 質量分析装置は、高い分解能 (LTQ FT の分解能 500000) と高い正確度を有するため、化合物の分子式が決定でき、代謝物検索に有用である[72]。また、MRM モードで測定ができるタンデム質量分析装置は、1 番目と 3 番目の四重極で、化合物のプレカーサーイオンとプロダクトイオンを特定することで、高い特異性と感度を与える。LC-MS/MS を用いた 9 つの代謝物 (M1~M9) 測定の結果、マイクロドース後の血漿中代謝物を一斉に測定することにより、ヒト *in vivo* における 6 つの代謝物の薬物動態プロファイル取得に成功した。通常は、標準物質がある未変化体の血中濃度のみの取得にとどまるところが、*in vitro* 代謝試験で予め代謝物の構造推定を行っておくことで、マイクロドース臨床試験で得られる薬物動態の情報を増すことに貢献するものである。各代謝物の感度は濃度に比例していないため、各ピーク面積比の比較はできないが、取得したヒト代謝物の薬物動態プロファイルの活用法には、FDA から通知された MIST ガイダンスに対応できるところがあると考えている[82]。このガイダンスでは、ヒトと動物では代謝の種差があることから、ヒト特異的あるいはヒトの方が多い代謝物が毒性をもたらす場合があり、その代謝物の毒性試験を行い、ヒト安全性評価をする必要があると言及している。よって、ヒトと動物の薬物動態プロファイルを比較することで、長期毒性試験に用いるため代謝パターンがヒトと似ている動物種の選択やヒト特異的代謝物の存在確認に活用できると考えられた。AMS で測定する場合、化合物の構造情報は取得できないことから、代謝物の有無はクロマトグラム上で検出することができるが、どのような代謝物であるのか推定することはできない。

本研究における投与薬物は、CYP3A4 基質[83]の塩酸ニカルジピン（高血圧、扁桃炎、脳血

管性疾患に効能がある経口血管拡張薬) [84]を選択した。ヒト肝ミクロソーム中の M2 と M5、ヒト血漿中の M5 の存在は、既に報告されている[85, 86]。また、Wagner らはニカルジピンが M5 に初回通過代謝されて、他の代謝経路は、M5 への代謝経路が飽和することによって生じるものであると報告している[87]。M1 と M2、M3 と M4、M6 と M7 のジヒドロピリジンからピリジンへの代謝は、既に報告があるニカルジピンから M5 への初回通過代謝と同じ代謝であった。M2 から M1、M4 から M3 への代謝反応は、ジヒドロピリジン環の酸化によって起こったが、クロマトグラム上において M3 の保持時間は、M4 より遅かった。M2、M4、M5 及び M8 の薬物動態プロファイルは、in vitro 試験における代謝物反応と類似していた。酸化は、CYP2C8、2D6、3A4 によるもので、脱ベンジル化は、CYP2C8、3A4 によるものであり[85]、イヌとラットにおける 8 つの尿の代謝経路、ヒトにおける 6 つの尿の代謝経路、ラット、イヌ、サルでの in vivo と in vitro 試験におけるニカルジピンの代謝は既に報告されていた[80, 88, 89]。

従って、以下の 5 つの代謝経路を推定した。(1) ニカルジピンから M5 への酸化 (2) ニカルジピンから M8 または M9 へのジヒドロピリジンの酸化 (3) ニカルジピンから M2、M5 から M1 への脱ベンジル化 (4) ニカルジピンから M4、M5 から M3 への脱メチル化 (5) ニカルジピンから M7、M5 から M6 への *N*-ベンジル-*N*-メチルアミノエチル基に酸素が付加し、*N*-オキサイド又はフェノールとなった代謝

非臨床毒性試験で既知の代謝物であれば、LC-MS/MS を用いてマイクロドース後の血漿中代謝物の薬物動態プロファイルが取得でき、また、代謝物の標準物質があれば定量も可能である。それには、in vitro 試験や動物実験で検出されている代謝物を予め合成しておくことが必要である。但し、代謝物の極性が未変化体と比較して極端に高くなるときは、試料前処理を変更する必要があるだろう。

本研究により、非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験が、代謝物の構造解析と併用することで、未変化体および代謝物も含めた動態解析を行うことが可能であることを実証した。よって、マイクロドース臨床試験により、臨床開発早期に代謝物に注目した開発をサポートすることができ、これまでにないマイクロドース臨床試験の利用法を開拓したと言える。

5. カセットマイクロドース臨床試験

5-1. 目的

カセットマイクロドース臨床試験のメリットは、臨床開発の初期に複数の化合物の動態データが取得でき、また、単剤を投与する試験と比べて、数少ない被験者で短期間に個人間変動を排した化合物間の体内動態特性の比較が可能であることである。さらに、マイクロドースという極微量の投与における薬物間では相互作用の可能性は極めて低く、仮に予期せぬ血中濃度の上昇があったとしても、低投与量での現象であるため、ヒトにとって安全に試験が実施可能である。

Madan らは、候補品スクリーニングを目的とし、5 種の H_1 受容体拮抗薬：既知薬ジフェンヒドラミン及び開発薬 NBL-1~4 を ^{14}C で標識し、マイクロドース臨床試験にて取得した薬物動態情報により、ヒト動態に優れた NBL-2 を選択した[90]。分析法に AMS を用いたこの試験では、5 つの薬物を別々に投与するため、20 名の被験者を必要とする上、データ取得に多くの時間を要した。そこで、分析法に LC-MS/MS を用いる場合を想定すると、非標識体化合物を同一被験者に 5 物質同時投与でき、かつ、同時前処理、測定が可能となることから、被験者数の削減、データ取得の時間短縮、個人間変動を排した化合物間の薬物動態データ取得が期待できる。

本研究では、非標識体化合物投与のカセットマイクロドース臨床試験において、LC-MS/MS を用いて複数物質の薬物動態情報を一括取得することを目的とし、アトルバスタチンのヒト *in vivo* における肝消失の律速段階を明らかにした[91]。アトルバスタチンは、3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤であり、有機アニオントランスポーターOrganic Anion Transporting Polypeptide (OATP) を介し肝細胞中へ取り込まれた後、細胞内で CYP3A4 による代謝を受ける[92]。このような場合、肝臓における固有クリアランスは細胞内への取り込み過程、細胞内から血液側への排出輸送、代謝と 3 つの過程からなる。特に、細胞内から血液側への排出輸送と代謝のクリアランスの大小関係は、代謝過程が血液からの消失速度に影響を与えるか否かの決定要因となる。

本試験では、アトルバスタチンの肝消失における律速段階を明らかにするため、CYP3A4 阻害剤イトラコナゾール、また OATPs 阻害剤リファンピシンとの薬物間相互作用試験を実施した。OATPs および CYP3A4 阻害を評価するため、OATPs のプローブとしてプラバスタチン、CYP3A4 のプローブとしてミダゾラムを同時投与した。カセット投与により、同一被験者において、OATPs および CYP3A4 阻害をプローブ薬の動態変動から判定し、アトルバスタチンの体内動態変動とに関連づけて解析できる。そのため、プローブ薬ごとに被験者集団を設定する従来の手法と比較して、個人間変動を排した比較が可能である点を特色とする。

5-2. 方法

(1) 試薬

アトルバスタチンカルシウム塩、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン二水和物一ナトリウム塩、2-OH アトルバスタチンラクトン、ミダゾラム、プラバスタチン一ナトリウム塩、RMS-416、リファンピシン、イトラコナゾール、ロスバスタチン、ケトコナゾール及び R-122798 は、東京大学大学院薬学系研究科より提供された。

アセトニトリル、メタノール、2-プロパノール（いずれも HPLC グレード）、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、ギ酸、酢酸、酢酸ナトリウム三水和物、28%アンモニア水は和光純薬工業株式会社（Kyoto, Jpn）より購入した。固相抽出カラム InertSep Pharma は、GL サイエンス（Tokyo, Japan）より、Oasis MAX（1 cc/30 mg）は、Waters Corporation（Milford, MA, USA）より購入した。

（２）標準原液及び標準溶液の調製

アトルバスタチン標準原液（200 µg/mL）、アトルバスタチンラクトン標準原液（200 µg/mL）、2-OH アトルバスタチン標準原液（100 µg/mL）及び 2-OH アトルバスタチンラクトン（60 µg/mL）は、アセトニトリル/水（1:1、v/v）を用いて調製した。ミダゾラム標準原液（200 µg/mL）及びイトラコナゾール標準原液（100 µg/mL）は、メタノールを用いて調製した。プラバスタチン標準原液（100 µg/mL）及び RMS-416 標準原液（100 µg/mL）は、水を用いて調製した。リファンピシン標準原液（100 µg/mL）は、メタノール/水（1:1、v/v）を用いて調製した。プラバスタチン及び RMS-416 標準原液は、冷蔵（5°C）保存、プラバスタチン及び RMS-416 標準原液以外は、冷凍（-20°C）保存した。

ロスバスタチン標準原液（内標準物質 Internal Standard, IS、100 µg/mL）及びケトコナゾール標準原液（IS、100 µg/mL）は、メタノールを用いて調製し、冷凍（-20°C）保存した。R-122798 標準原液（IS、100 µg/mL）は、水を用いて調製し、冷蔵（5°C）保存した。

アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン及び 2-OH アトルバスタチンラクトンの混合標準溶液は、アセトニトリル/水（1:1、v/v）を用いて 0.1、0.5、1、2、5、10 及び 20 ng/mL の検量線用標準溶液及び 0.3、3 及び 16 ng/mL の Quality Control（QC）サンプル用標準溶液を調製した。これらの標準溶液は、用時調製とした。

ミダゾラム標準溶液は、メタノールを用いて 0.5、1、2、5、10 及び 20 ng/mL の検量線用標準溶液及び 1.5、3 及び 16 ng/mL の QC サンプル用標準溶液を調製した。これらの標準溶液は、用時調製とした。

血漿中プラバスタチン及び RMS-416 濃度測定用の混合標準溶液は、水を用いて 0.125、0.25、1.25、5、12.5、50、125 及び 250 ng/mL の検量線用標準溶液及び 0.375、5 及び 200 ng/mL の QC サンプル用標準溶液を調製した。尿中プラバスタチン及び RMS-416 濃度測定用の混合標準溶液は、水を用いて 0.25、0.5、1.25、5、12.5、50、125 及び 250 ng/mL の検量線用標準溶液及び 0.75、7.5 及び 200 ng/mL の QC サンプル用標準溶液を調製した。これらの標準溶液は、冷蔵（5°C）保存した。

リファンピシン標準溶液は、メタノール/水（1:1、v/v）を用いて 100 及び 200 ng/mL、1、2、10 及び 20 µg/mL の検量線用標準溶液及び 9 及び 60 µg/mL の QC サンプル用標準溶液を調製した。これらの標準溶液は、用時調製とした。

イトラコナゾール標準溶液は、メタノールを用いて 100 及び 200 ng/mL、1、2、10 及び 20 µg/mL の検量線用標準溶液及び 9 及び 60 µg/mL の QC サンプル用標準溶液を調製した。これらの標準溶液は、冷凍（-20°C）保存した。

ロスバスタチン溶液（20 ng/mL）及びケトコナゾール溶液（イトラコナゾール測定用 2000

ng/mL、リファンピシン測定用 5000 ng/mL) は、メタノールを用いて調製し、冷凍 (-20°C) 保存した。R-122798 溶液 (血漿中濃度測定用 12.5 ng/mL、尿中濃度測定用 25 ng/mL) は、水を用いて調製し、冷蔵 (5°C) 保存した。

(3) 検量線用標準試料溶液、ゼロ試料及び QC サンプルの調製

アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン、2-OH アトルバスタチンラクトン及びミダゾラム測定用の検量線用標準試料溶液 1、5、10、20、50、100、200 及び 500 pg/mL は、氷冷下、ガラス試験管に分取した緩衝液含有ヒトブランク血漿 1.5 mL に、検量線用標準溶液 10 µL を添加して調製した。ゼロ試料は、氷冷下、ガラス試験管に分取した緩衝液含有ヒトブランク血漿 1.5 mL とした。アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン、2-OH アトルバスタチンラクトン測定用の QC サンプルは、3、30 及び 160 pg/mL の濃度の試料を、ミダゾラム測定用の QC サンプルは、15、30 及び 160 pg/mL の濃度の試料を調製した。

血漿中プラバスタチン及び RMS-416 測定用の検量線用標準試料溶液 5、10、50、200、100、500、2000、5000 及び 10000 pg/mL は、ガラス試験管に分取したヒトブランク血漿 250 µL に、検量線用標準溶液 10 µL を添加して調製した。ゼロ試料は、ガラス試験管に分取したヒトブランク血漿 250 µL とした。QC サンプルは、15、200 及び 8000 pg/mL の濃度の試料を調製した。尿中プラバスタチン及び RMS-416 測定用の検量線用標準試料溶液 10、20、50、200、500、2000、5000 及び 10000 pg/mL は、ガラス試験管に分取したヒトブランク尿 500 µL に、検量線用標準溶液 20 µL を添加して調製した。ゼロ試料は、ガラス試験管に分取したヒトブランク尿 500 µL とした。QC サンプルは、30、300 及び 8000 pg/mL の濃度の試料を調製した。

リファンピシン測定用の検量線用標準試料溶液 0.05、0.1、0.5、1、5、10 及び 50 µg/mL は、マイクロチューブにヒトブランク血漿 20 µL に、標準原液又は各検量線用標準溶液 10 µL を添加して調製した。ゼロ試料は、マイクロチューブに分取したヒトブランク血漿 20 µL とした。QC サンプルは、0.15、1 及び 40 µg/mL の濃度の試料を調製した。

イトラコナゾール測定用の検量線用標準試料溶液 0.05、0.1、0.5、1、5、10 及び 50 µg/mL は、マイクロチューブにヒトブランク血漿 20 µL に、標準原液又は各検量線用標準溶液 10 µL を添加して調製した。ゼロ試料は、マイクロチューブに分取したヒトブランク血漿 20 µL とした。QC サンプルは、15、30 及び 160 pg/mL の濃度の試料を調製した。

(4) LC-MS/MS の条件

1) アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン、2-OH アトルバスタチンラクトン及びミダゾラム測定

装置

LC システム : ACQUITY UPLC システム (Waters Corporation、Milford、MA、USA)

質量分析装置 : API5000 システム (Applied Biosystems Inc.、Carlsbad、CA、USA)

分析条件

分析カラム： ACQUITY UPLC BEH Shield RP18
(150 mm × 2.1 mm 直径、粒子径 1.7 μm)
(Waters Corporation、Milford、MA、USA)

移動相及び流速： A：アセトニトリル、B：0.1%ギ酸

時間 (分)	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
0.0	70	30	0.2
3.5	70	30	0.2
3.6	70	30	0.3
6.5	70	30	0.3

カラム温度： 40°C
試料注入量： 10 μL
イオン化法： エレクトロスプレーイオン化法
極性： 正イオン検出モード
スキャンタイプ： Multiple Reaction Monitoring (MRM)
イオンスプレー電圧： 5500 V
ヒーターガス温度： 450°C
ネブライザーガス： 30 psi (約 207 kPa)
ターボガス： 70 psi (約 483kPa)
カーテンガス (窒素)： 10 psi (約 69kPa)
コリジョンガス (窒素)： 4
モニターイオン及びコリジョンエネルギー：

測定対象物質	プレカーサーイオン	プロダクトイオン	コリジョンエネルギー (V)
アトルバスタチン	<i>m/z</i> 559	<i>m/z</i> 440	31
アトルバスタチンラクトン	<i>m/z</i> 541	<i>m/z</i> 448	27
2-OHアトルバスタチン	<i>m/z</i> 575	<i>m/z</i> 440	33
2-OHアトルバスタチンラクトン	<i>m/z</i> 557	<i>m/z</i> 448	29
ミダゾラム	<i>m/z</i> 326	<i>m/z</i> 291	37
ロスバスタチン (IS)	<i>m/z</i> 482	<i>m/z</i> 258	45

2) プラバスタチン及び RMS-416 測定

装置

LC システム：Prominence UPLC System (Shimadzu Corp.、Kyoto、Japan)

質量分析装置：AB SCIEX QTRAP5500 (Applied Biosystems Inc.、Carlsbad、CA、USA)

分析条件

分析カラム： Inertsil ODS-3 (50 mm × 2.1 mm 直径、粒子径 2 μm)
(GL Sciences、Kyoto、Japan)

移動相及び流速：

A：アセトニトリル

B：アセトニトリル／0.001%酢酸（25:75、v/v）

時間（分）	流速 (mL/min)	A（%）	B（%）
0.0	0.2	0	100
0.5	0.2	0	100
5.0	0.2	55	45
11.0	0.2	55	45
11.1	0.3	0	100
13.0	0.3	0	100

カラム温度：

40°C

試料注入量：

10 µL

イオン化法：

エレクトロスプレーイオン化法

極性：

負イオン検出モード

スキャンタイプ：

MRM

イオンスプレー電圧：

-4500 V

ヒーターガス温度：

650°C

ネブライザーガス：

60 psi（約 414 kPa）

ターボガス：

60 psi（約 414 kPa）

カーテンガス（窒素）：

30 psi（約 207 kPa）

コリジョンガス（窒素）：

7

モニターイオン及びコリジョンエネルギー：

測定対象物質	プレカーサーイオン	プロダクトイオン	コリジョンエネルギー（V）
プラバスタチン	<i>m/z</i> 423	<i>m/z</i> 321	-20
RMS-416	<i>m/z</i> 423	<i>m/z</i> 321	-18
R-122798（IS）	<i>m/z</i> 409	<i>m/z</i> 321	-20

3）リファンピシン測定

装置

LC システム：NANOSPACE SI-2 システム（SHISEIDO、Tokyo、Japan）

質量分析装置：API4000 システム（Applied Biosystems Inc.、Carlsbad、CA、USA）

分析条件

分析カラム：

L-column ODS（50 mm × 2.1 mm 直径、粒子径 5 µm）
（Chemicals Evaluation and Research Institute、Tokyo、Japan）

移動相：

アセトニトリル／10 mmol/L ギ酸アンモニウム（7:3、v/v）

流速：

0.2 mL/min

カラム温度：

25°C

試料注入量：

5 µL

イオン化法： エレクトロスプレーイオン化法
 極性： 正イオン検出モード
 スキャンタイプ： MRM
 イオンスプレー電圧： 4500 V
 ヒーターガス温度： 500°C
 ネブライザーガス： 80 psi (約 551 kPa)
 ターボガス： 50 psi (約 345 kPa)
 カーテングス (窒素)： 20 psi (約 138 kPa)
 コリジョンガス (窒素)： 5
 モニターイオン及びコリジョンエネルギー：

測定対象物質	プレカーサーイオン	プロダクトイオン	コリジョンエネルギー (V)
リファンピシン	<i>m/z</i> 823	<i>m/z</i> 791	23
ケトコナゾール (IS)	<i>m/z</i> 531	<i>m/z</i> 489	45

4) イトラコナゾール測定

装置

LC システム：NANOSPACE SI-2 システム (SHISEIDO、Tokyo、Japan)

質量分析装置：API4000 システム (Applied Biosystems Inc.、Carlsbad、CA、USA)

分析条件

分析カラム： L-column ODS (50 mm × 2.1 mm 直径、粒子径 5 μm)
 (Chemicals Evaluation and Research Institute、Tokyo、Japan)
 移動相： アセトニトリル／10 mmol/L ギ酸アンモニウム (7:3, v/v)
 流速： 0.2 mL/min
 カラム温度： 25°C
 試料注入量： 5 μL
 イオン化法： エレクトロスプレーイオン化法
 極性： 正イオン検出モード
 スキャンタイプ： MRM
 イオンスプレー電圧： 4500 V
 ヒーターガス温度： 500°C
 ネブライザーガス： 80 psi (約 551 kPa)
 ターボガス： 50 psi (約 345 kPa)
 カーテングス (窒素)： 20 psi (約 138 kPa)
 コリジョンガス (窒素)： 5

モニターイオン及びコリジョンエネルギー：

測定対象物質	プレカーサーイオン	プロダクトイオン	コリジョンエネルギー (V)
イトラコナゾール	<i>m/z</i> 705	<i>m/z</i> 392	47
ケトコナゾール (IS)	<i>m/z</i> 531	<i>m/z</i> 489	45

(5) 試料前処理法

1) 血漿中アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン、2-OH アトルバスタチンラクトン及びミダゾラムの測定

試験実施施設にて血漿試料を取得後、直ちにヒト血漿試料量の半分量の 100 mmol/L 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH 5.0) を試料に添加した。ブランク試料 1.5 mL (血漿量：1 mL) に、標準溶液の代わりにメタノール 10 µL 及び IS 溶液の代わりにメタノール 10 µL を添加した。ゼロ試料、QC サンプル及び測定試料 1.5 mL (血漿量：各 1 mL) に、メタノール 10 µL 添加後、IS 溶液 (20 ng/mL) 10 µL を添加した。検量線用標準試料溶液 (血漿量：1 mL) に、IS 溶液 (20 ng/mL) 10 µL を添加した。これらの試料に 100 mmol/L 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 mL を加え、ボルテックスミキサーにて混和した後、予めメタノール 3 mL 及び水 3 mL にて活性化した InertSep Pharma カートリッジ (GL Sciences, Kyoto, Japan) に添加後、毎分 2000 回転 (810×g) で 1 分間遠心分離 (4°C 設定) した。その後、水 3 mL 及び 10 %メタノール 3 mL で洗浄し、メタノール 2 mL で溶出した (各試薬は、添加するまで氷冷下にて保存)。固相抽出カラムは、洗浄液又は溶出液を添加する度に毎分 2000 回転 (810×g) で 2 分間遠心分離 (4°C 設定) した。溶出液は、35°C 加温下窒素ガスにて蒸発乾固し、1 mmol/L 酢酸アンモニウム含有アセトニトリル/水 (40:60, v/v) -酢酸緩衝液 (pH 5.0) 200 µL を加え、ボルテックスミキサーにて 1 分間混和した後、セントリカット超ミニ (W-MO、0.45 µm; Kurabo Industries, Osaka, Japan) により毎分 7000 回転 (4400×g) で 2 分間遠心ろ過 (4°C 設定) した。

2) 血漿中または尿中プラバスタチン及び RMS-416 の定量

ブランク試料 (血漿量：250 µL) に標準溶液の代わりに水 10 µL 及び IS 溶液の代わりに水 20 µL を添加した。ゼロ試料、QC サンプル及び測定試料 (血漿量：各 250 µL) に水 10 µL を添加後、IS 溶液 (12.5 ng/mL) 20 µL を添加した。検量線用標準試料溶液 (血漿量：250 µL) に IS 溶液 (12.5 ng/mL) 20 µL を添加した。これらの試料に水 250 µL を加え、ボルテックスミキサーにて混和した後、予めメタノール 1 mL 及び水 1 mL にて活性化した Oasis MAX (1 cc/30 mg) に添加後、毎分 2000 回転 (810×g) で 1 分間遠心分離した。ブランク試料 (尿量：500 µL) に標準溶液の代わりに水 20 µL 及び IS 溶液の代わりに水 20 µL を添加した。ゼロ試料、QC サンプル及び測定試料 (尿量：500 µL) に水 20 µL を添加後、IS 溶液 (25 ng/mL) 20 µL を添加した。検量線用標準試料溶液 (尿量：500 µL) に IS 溶液 (25 ng/mL) 20 µL を添加した。これらの試料に水 500 µL を加え、ボルテックスミキサーにて混和した後、予めメタノール 1 mL 及び水 1 mL にて活性化した Oasis MAX (1 cc/30 mg) に添加後、毎分 2000 回転 (810×g) で 1 分間遠心分離した。

その後、水 1 mL、1.4 %アンモニア水 1 mL、50 %メタノール 1 mL、メタノール 1 mL 及び

0.1 %酢酸含有 40 %メタノール 1 mL の順で洗浄し、0.1 %酢酸含有メタノール 0.9 mL で 3 回溶出した。固相抽出カラムは、洗浄液又は溶出液を添加する度に毎分 2000 回転 (810×g) で 1 分間遠心分離した。溶出液は、40°C 加温下窒素ガスにて蒸発乾固し、アセトニトリル/水 (25:75、v/v) 100 µL を加え、ボルテックスミキサーにて 1 分間混和した後、Ultrafree-MC (0.22 µm、Millipore、Billerica、MA) により毎分 10000 回転 (9100×g) で 2 分間遠心ろ過 (4°C 設定) した。

3) 血漿中リファンピシン測定

ブランク試料 (血漿量 : 20 µL) に標準溶液の代わりにメタノール/水 (1:1、v/v) 10 µL 及び IS 溶液の代わりにメタノール 20 µL を添加した。ゼロ試料、QC サンプル及び測定試料 (血漿量 : 各 20 µL) にメタノール/水 (1:1、v/v) 10 µL を添加後、IS 溶液 (5000 ng/mL) 20 µL を添加した。検量線用標準試料溶液に IS 溶液 (5000 ng/mL) 20 µL を添加した。それらの試料にアセトニトリル 450 µL を加え、ボルテックスミキサーにて 30 秒間混和した後、毎分 10000 回転 (9100×g) で 3 分間遠心分離 (4°C 設定) した。上清 200 µL をセントリカット超ミニ (W-MO、0.45 µm ; Kurabo Industries、Osaka、Japan) により毎分 7000 回転 (4400×g) で 1 分間遠心ろ過 (4°C 設定) した。ろ液 140 µL に水 60 µL を加え、ボルテックスミキサーにて 10 秒間混和した。

4) 血漿中イトラコナゾール測定

ブランク試料 (血漿量 : 20 µL) に標準溶液の代わりにメタノール 10 µL 及び IS 溶液の代わりにメタノール 20 µL を添加した。ゼロ試料、QC サンプル及び測定試料 (血漿量 : 各 20 µL) にメタノール 10 µL を添加後、IS 溶液 (2000 ng/mL) 20 µL を添加した。検量線用標準試料溶液に IS 溶液 (2000 ng/mL) 20 µL を添加した。それらの試料にアセトニトリル 450 µL を加え、ボルテックスミキサーにて 30 秒間混和した後、毎分 10000 回転 (9100×g) で 3 分間遠心分離 (4°C 設定) した。上清 40 µL を別の 1.5 mL 容ポリプロピレン製マイクロチューブに分取し、アセトニトリル 160 µL を加えて混和した後、その 140 µL を 10 mmol/L 酢酸アンモニウム 60 µL と混和した。

(6) 分析法バリデーション

分析法は、特異性、真度及び精度を検討した。

特異性は、6 個体別のマトリックスを前処理することによって評価した。アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン、2-OH アトルバスタチンラクトンの検量線は、ゼロ試料及び 7 濃度 (1~200 pg/mL) の検量線用標準試料溶液から、ミダゾラムの検量線は、ゼロ試料及び 6 濃度 (5~200 pg/mL) の検量線用標準試料溶液から構成された。プラバスタチン及び RMS-416 の検量線は、マトリックスが血漿の時は、ゼロ試料及び 8 濃度 (5~10000 pg/mL) の検量線用標準試料溶液から、マトリックスが尿の時は、ゼロ試料及び 8 濃度 (10~10000 pg/mL) の検量線用標準試料溶液から構成された。リファンピシン及びイトラコナゾールの検量線は、ゼロ試料及び 7 濃度 (0.05~50 µg/mL) の検量線用標準試料溶液から構成され

た。検量線の直線性は、最小二乗法（重み $1/y^2$ ）により 1 日間評価した。日内再現性は、4 濃度（ $n=5$ ）の QC サンプルの測定を 3 日間行った。回収率は、3 濃度（ $n=3$ ）で評価した。ヒトマトリックス中（凍結融解、短期保存安定性及び長期保存安定性）及び測定実測試料中安定性は、2 濃度（ $n=3$ ）の QC サンプルの測定によって、検討した。

各標準原液は、室温で 4 時間後あるいは -20°C で 64 日間保存後、測定（ $n=3$ ）することによって評価した。

（7）被験者

8 名の健常人日本人男性ボランティアは、リクルートされ、本臨床試験のために登録された。被験者の選択基準は、年齢 20～40 歳、体重 50～100 kg であった。試験開始 1 ヶ月前から、被験者候補の薬歴を取得し、それから生理化学的検査、心電図、血液検査、尿検査を行った。被験者 1 名は、上気道炎のため II 期の間に試験参加を中断し、他 1 名の被験者は、病気のため III 期に参加できなかった。よって、II 期及び III 期の被験者数は、7 名と 6 名であった。

（8）試験デザイン

試験計画書は、東京大学薬学部と北里大学東病院 治験管理センターの倫理委員会で承認された。試験は、UMIN 臨床試験登録（<http://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm>（UMIN000002477））に登録した。全ての参加者から、3 期クロスオーバー試験に参加するためのインフォームドコンセントを書面にて取得した。各期の間には、1 週間のウォッシュアウト期間を設けた。各期において、被験者は、薬剤を服用する前日から入院した。経口の薬物溶液は、以下のように調製された。(1) 注射溶媒の 1000 mL に 2.5 mg のアトルバスタチンを溶解 (2) 注射溶媒の 1500 mL に 10 mg のミダゾラムを溶解 (3) 注射溶媒の 500 mL に 2.5 mg のプラバスタチンを溶解。注射溶媒は、大塚製薬、(Tokyo, Japan) より得た。薬物溶液の最終濃度は、アトルバスタチン $2.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、ミダゾラム $6.6\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、プラバスタチン $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ であった。I 期の前日夜から絶食後、被験者にアトルバスタチン、ミダゾラム、プラバスタチンをそれぞれ $33\text{ }\mu\text{g}$ ずつカクテルした溶液（アトルバスタチン溶液 13.2 mL 、ミダゾラム溶液 5 mL 、プラバスタチン溶液 6.6 mL ）を水 150 mL で投与した。II 期では、リファンピシン 600 mg （Rifadin カプセル 4 錠 150 mg ）をカクテル溶液と同時に経口投与した。III 期では、イトラコナゾール 200 mg は、カクテル溶液投与 1 時間前に Itrizole 1% 溶液を 1 時間かけて静脈投与した。採血（各 7 mL ）は、投与前と投与 0.5、1、1.5、2、4、6、8 及び 10 時間後に行った。尿試料は、投与前、投与 0～6 時間、6～12 時間、12～24 時間の間隔で採取した。血漿は、10 分間 4°C で遠心分離し、全ての試料は、試料処理に供するまで -80°C で保存した。被験者は、試験参加 7 日前から試験終了までグレープフルーツ、オレンジまたはアップルジュースは飲用しなかった。また、試験参加 2 週間前から試験終了までセントジョンズワートを含むサプリメントまたはいかなる薬剤も服用しなかった。さらに、試験参加中は、アルコールまたはカフェインを含む飲料の飲用、喫煙を禁じた。試験の間、標準的な食事が予定通りに被験者に供給された。参加者の安全を確保するため、各期の最後に、生理化学的検査、心電図、血液検査及び尿検査を行った。心電図は、各期の投与 1、2、4 及び 8 時間後に行った。また、III 期のカクテル溶液投与の 0.5 と 2 時間前にイトラコ

ナゾールの薬理学的作用をモニターするために心電図をとった。

5-3. 結果

(1) 分析法バリデーション

各化合物又は各 IS のクロマトグラム上の溶出位置に夾雑ピークは存在しなかった。

全ての検量線式 $y = ax + b$ は、IS に対する被験物質のピーク面積比 (y) と被験物質の添加濃度 (x) との関係を用いて最小二乗法 (重み: $1/y^2$) により求めた。アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン、2-OH アトルバスタチンラクトンの検量線式は、1~200 pg/mL、ミダゾラムの検量線式は、5~200 pg/m の範囲で直線性を得た。プラバスタチン及び RMS-416 の検量線式は、5~10000 pg/mL (血漿)、10~10000 pg/mL (尿) の範囲で直線性を得た。リファンピシンまたはイトラコナゾールの検量線は、0.05~50 µg/mL の範囲で直線性を得た。いずれの検量線においても、相関係数 (r) は、0.995 を超え、RE は、±14.5% 以内であった。

日内再現性は、4 濃度 (n=5) の QC サンプルを 1 日間測定することで評価し、定量下限値では精度 (Coefficient of Variation, CV) が 15.5% 以下、RE が ±19.0% 以内であり、定量下限値以外の濃度では、CV が 11.9% 以下、RE が ±12.3% 以内であった。

ヒト血漿中アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン、2-OH アトルバスタチンラクトン及びミダゾラムは、凍結 (-70°C 以下) 融解 3 回の間、または氷冷下で 4 時間安定であった。測定実測試料中 (5°C に設定したオートサンプラー中) アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチンは、50 時間、2-OH アトルバスタチンラクトン及びミダゾラムは、26 時間安定であった。また、ヒト血漿中アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン、2-OH アトルバスタチンラクトン及びミダゾラムは、-70°C で 30 日間安定であった。

ヒト血漿中または尿中プラバスタチン及び RMS-416 は、凍結 (-70°C 以下) 融解 3 回の間、または室温で 6 時間安定であった。測定実測試料中 (5°C に設定したオートサンプラー中) プラバスタチン及び RMS-416 は、48 時間安定であった。また、ヒト血漿中または尿中プラバスタチン及び RMS-416 は、それぞれ -70°C で 24 日間、-70°C で 34 日間安定であった。

ヒト血漿中リファンピシンまたはイトラコナゾールは、凍結 (-70°C 以下) 融解 3 回の間、または室温で 6 時間安定であった。測定実測試料中 (5°C に設定したオートサンプラー中) リファンピシンまたはイトラコナゾールは、48 時間安定であった。また、ヒト血漿中リファンピシンまたはイトラコナゾールは、それぞれ -70°C で 22 日間、-70°C で 39 日間安定であった。

アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン及びミダゾラム標準原液 (200 µg/mL)、ロスバスタチン標準原液 (100 µg/mL)、アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン標準溶液 (0.1 ng/mL)、ミダゾラム標準溶液 (0.5 ng/mL) 及びロスバスタチン溶液 (20 ng/mL) は、室温で 4 時間、安定であった。アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン及びミダゾラム標準原液 (200 µg/mL)、2-OH アトルバスタチンラクトン標準原液 (60 µg/mL)、2-OH アトルバスタチン及びロスバスタチン標準原液 (100 µg/mL) は、-20°C で 64 日間、安定であった。

プラバスタチン、RMS-416 及び R-122798 標準原液 (100 µg/mL)、プラバスタチン及び RMS-416

標準溶液 (0.125 及び 250 ng/mL)、R-122798 溶液 (12.5 ng/mL) は、室温で 6 時間、5°C で 63 日間、安定であった。

リファンピシン標準原液 (100 µg/mL) は、室温で 6 時間、-20°C で 22 日間、リファンピシン標準原液 (100 ng/mL) は、室温で 6 時間、安定であった。

イトラコナゾール標準原液 (100 µg/mL)、ケトコナゾール標準原液 (100 µg/mL)、イトラコナゾール標準溶液 (100 ng/mL)、ケトコナゾール標準溶液 (2000 ng/mL) は、室温で 6 時間、-20°C で 39 日間、安定であった。

(2) 薬物濃度測定

バリデートされた分析法を試料測定に用いた。測定の精度管理をするために、各測定において、検量線及び QC サンプルを測定した。LC-MS/MS を用いた薬物濃度測定において、未変化体のアトルバスタチンだけでなく、アトルバスタチンラクトン、ならびにそれぞれの 2-OH 体、そしてミダゾラムの 5 物質について固相抽出で同時に試料処理し、また、簡易な測定条件で同時測定が可能であった (図 2)。アトルバスタチンは、血漿中においてラクトン体と inter conversion があるため、マトリックスを氷冷及び酸性条件下にする必要がある[93]。よって、本測定では、治験施設で血漿を分離後、直ちに血漿量の半分量の 100 mmol/L 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液 (pH 5.0) を添加した。

プラバスタチンと代謝物の RMS-416 は、水溶性物質のためアトルバスタチンと物性が異なった。また、プラバスタチンと RMS-416 は異性体の関係にあり、クロマトグラム上でピークを完全分離する必要があったことから[94]、アトルバスタチン類とは同時に処理や測定ができなかったが、一般的な前処理法である固相抽出法を採用することができた (図 3)。よって、マイクロドース条件下でも、簡易で迅速に複数化合物の同時測定が可能であった。リファンピシン及びイトラコナゾールについては、臨床量投与であるため、試料前処理法における最も簡易な方法、除タンパク法を採用した。

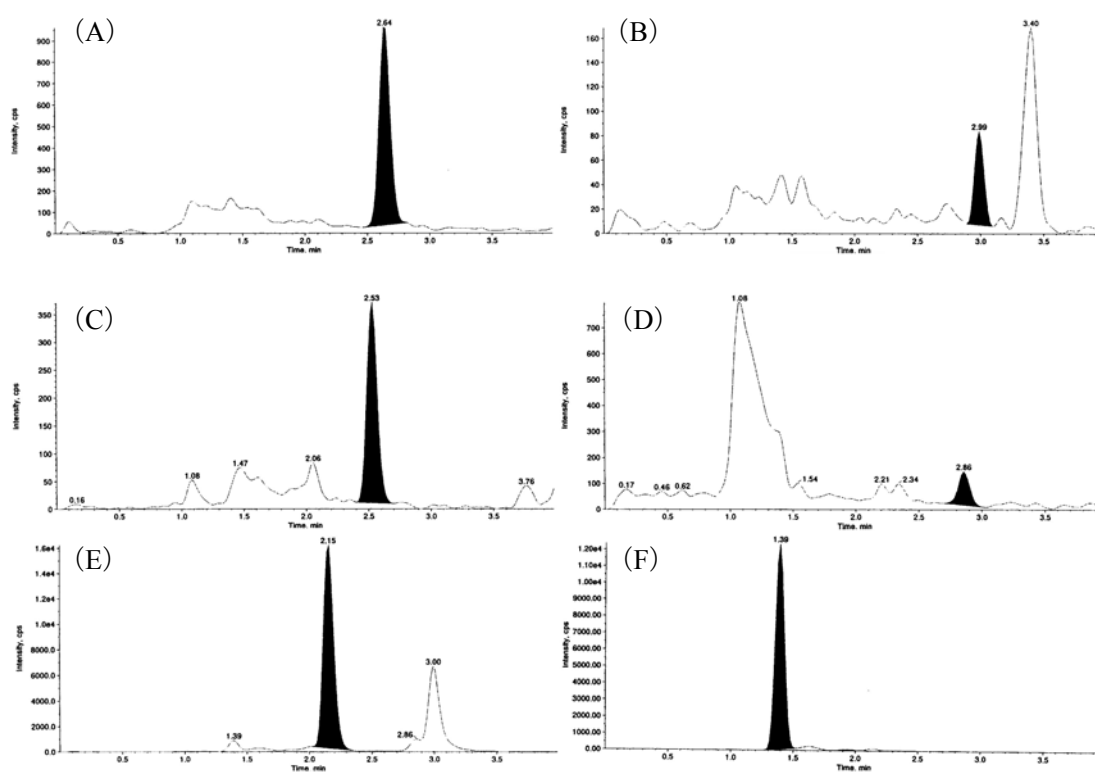


図2 I期、被験者番号 No.2、投与 1.5 時間後における MRM クロマトグラム：アトルバスタチン (A)、アトルバスタチンラクトン (B)、2-OH アトルバスタチン (C)、2-OH アトルバスタチンラクトン (D)、内標準物質：ロスバスタチン (E)、ミダゾラム (F)

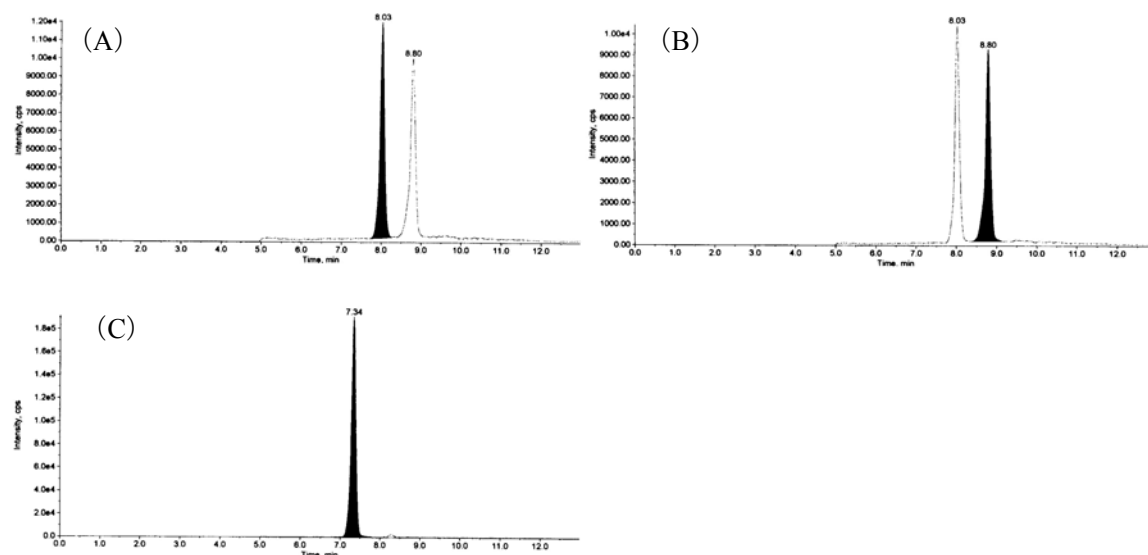


図3 I期、被験者番号 No.2、投与 1.5 時間後における MRM クロマトグラム：プラバスタチン (A)、RMS-416 (B)、内標準物質：R-122798 (C)

尿中プラバスタチン及び RMS-416 濃度測定においては、マトリックスが血漿の時よりもクロマトグラムにおけるベースラインが高く、血漿中濃度測定時と同じ定量下限値 5 pg/mL を設定するのが困難であったため、マトリックス量を 500 µL に増やし、定量下限値を 10 pg/mL に設定した。よって、全ての蓄尿時間において濃度測定が可能であった。全ての薬物において、全ポイントの濃度を測定することができ、LC-MS/MS によりカセット投与した未変化体及び代謝物の薬物動態データの一括取得が可能であった。

(2) 臨床試験

8 名の健常人ボランティアは、本臨床試験の参加のために登録された。I 期、II 期及び III 期に、それぞれ 8、7、6 名の被験者が参加した。被験者の年齢は、21～32 歳であり、Body Mass Index は、18.2～26.1 kg/m² であった。試験が原因による有害事象や症状は、いかなる被験者にも観察されなかった。アトルバスタチンの投与量は、コントロール群が 20.8 µg、リファンピシン併用時が 19.8 µg、イトラコナゾール併用時が 17.8 µg であった。プラバスタチンの投与量は、コントロール群が 32.7 µg、リファンピシン併用時が 34.3 µg、イトラコナゾール併用時が 43.9 µg であった。ミダゾラムの投与量は、コントロール群が 30.4 µg、リファンピシン併用時が 28.7 µg、イトラコナゾール併用時が 31.4 µg であった。

1) リファンピシンあるいはイトラコナゾール併用時におけるプラバスタチンの薬物動態への影響

リファンピシンあるいはイトラコナゾール併用時におけるプラバスタチン (OATPs プローブ薬) の薬物動態は、これらの薬物を併用していない時のその薬物動態と比較した (図 4)。リファンピシンと併用時において、プラバスタチンの血漿中濃度は著しく増加し、イトラコナゾール併用時においては、顕著に増加しなかった。投与量で規格化したプラバスタチンの血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC₀₋₈) は、リファンピシン併用時に顕著に増加した (4.6 倍) (表 1)。投与量で規格化したプラバスタチンの AUC₀₋₈ は、イトラコナゾール併用時に顕著に増加しなかった。プラバスタチンの腎クリアランスは、いずれの薬物を併用しても変化はなかった (表 1)。

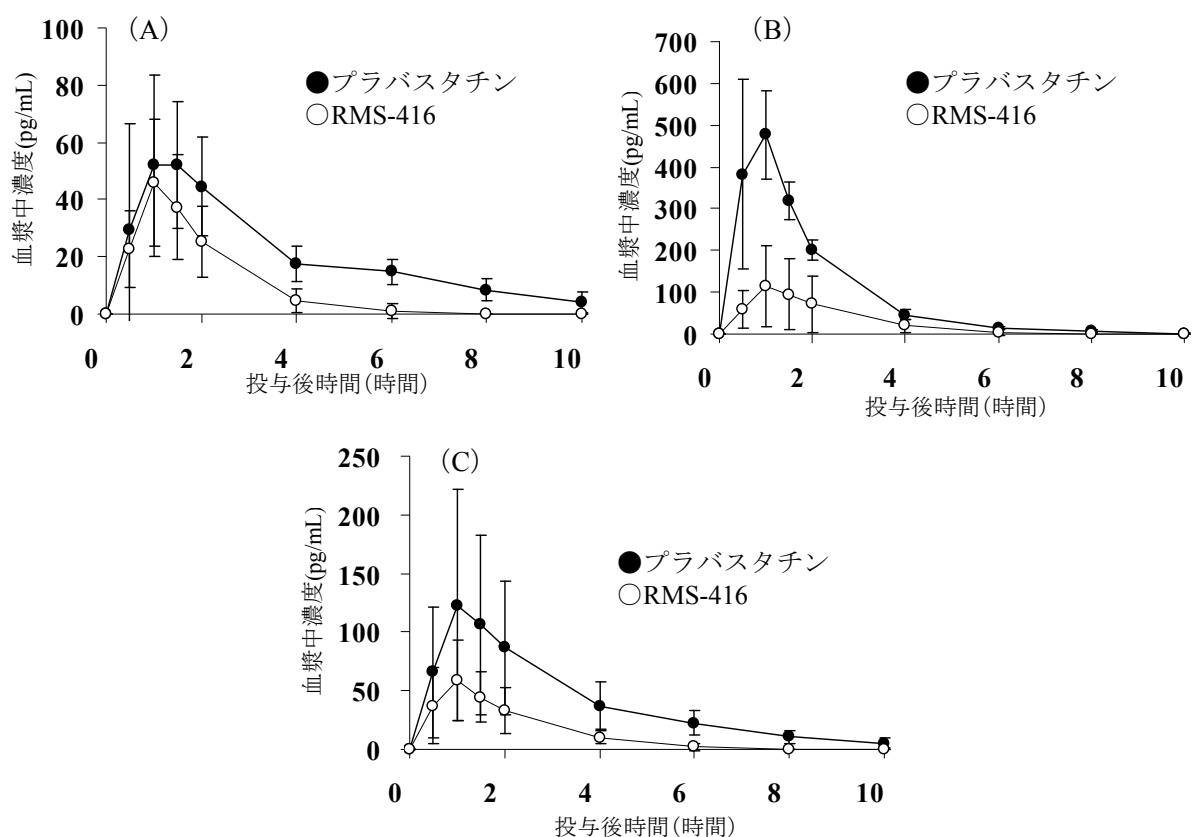


図4 プラバスタチン及びRMS-416の血漿中濃度推移。I期コントロール (A)、II期リファンピシン併用時 (B)、III期イトラコナゾール併用時 (C)。各ポイントは、平均値±SDを示す。

2) リファンピシンあるいはイトラコナゾール併用時におけるミダゾラムの薬物動態への影響

リファンピシンあるいはイトラコナゾール併用時におけるミダゾラム (CYP3A4プロブ薬) の薬物動態は、これらの薬物を併用していない時のその薬物動態と比較した。イトラコナゾールと併用時において、ミダゾラムの血漿中濃度は増加し、リファンピシン併用では影響がなかった (図 5)。投与量で規格化したミダゾラムの血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC_{0-10}) は、全ての被験者で増加し、併用しない時と比較して 1.7 倍増加した。投与量で規格化したミダゾラムの AUC_{0-10} は、リファンピシン併用時には変化がなかった (表 1)。

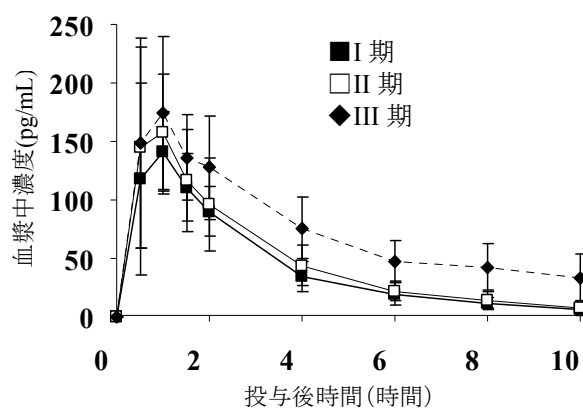


図5 ミダゾラムの血漿中濃度推移。各ポイントは、平均値±SDを示す。

3) リファンピシンあるいはイトラコナゾール併用時におけるアトルバスタチン及び 2-OH アトルバスタチンの薬物動態への影響

リファンピシンと併用時において、アトルバスタチン及び 2-OH アトルバスタチンの血漿中濃度は増加した。イトラコナゾール併用時においては、アトルバスタチンの血漿中濃度に変化はなかったが、2-OH アトルバスタチン血漿中濃度は低下した (図 6)。投与量で規格化したアトルバスタチンの血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC_{0-10}) は、リファンピシン併用時に顕著に増加した (12 倍) が、投与量で規格化したアトルバスタチンの AUC_{0-10} は、イトラコナゾール併用時に変化はなかった (表 1)。

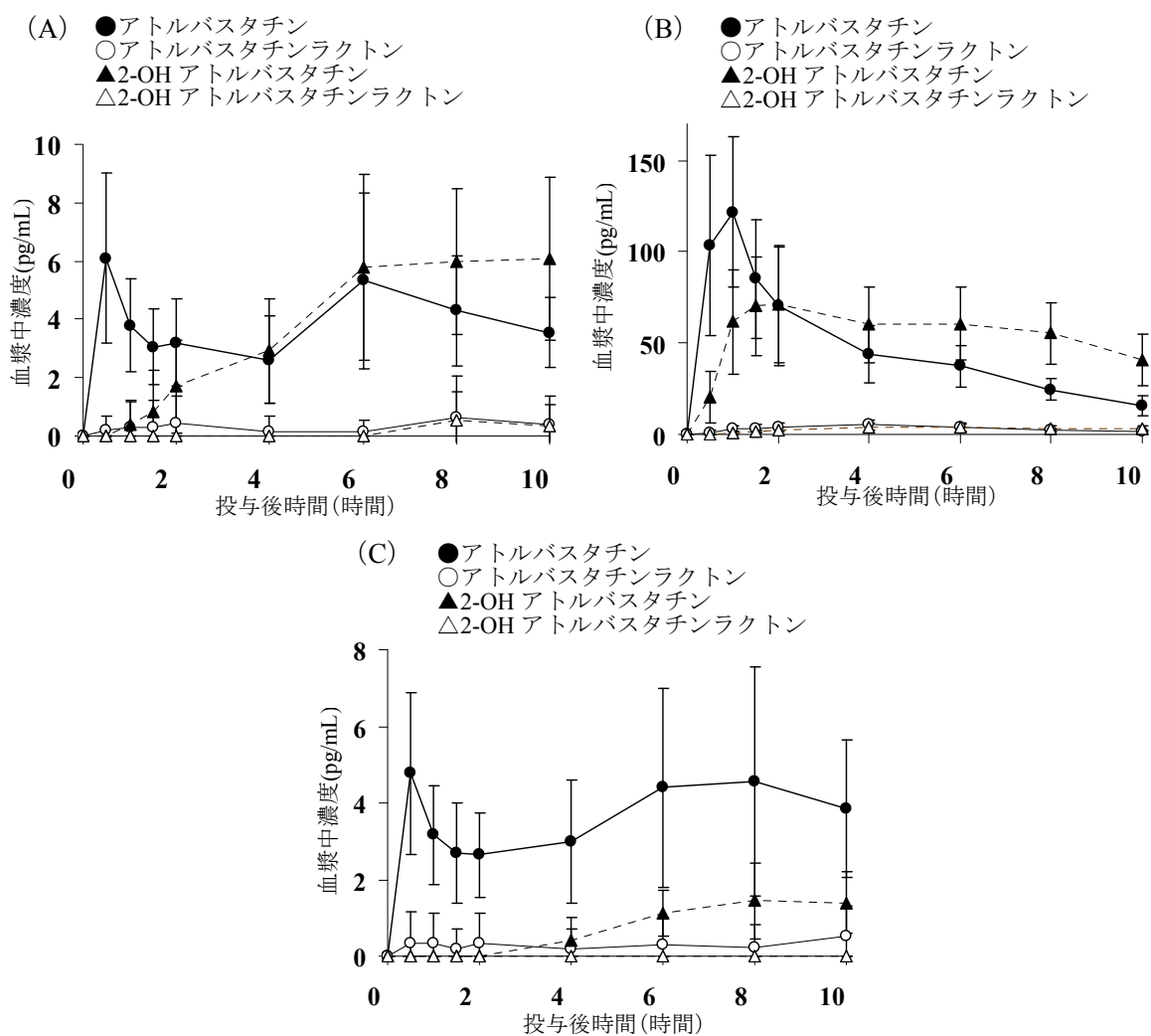


図6 アトルバスタチン、アトルバスタチンラクトン、2-OH アトルバスタチン、2-OH アトルバスタチンラクトンの血漿中濃度推移。I期コントロール(A)、II期リファンピシン併用時(B)、III期イトラコナゾール併用時 (C)。各ポイントは、平均値±SDを示す。

4) リファンピシン及びイトラコナゾールの薬物動態

リファンピシンの C_{max} 値は、投与1時間後において $18.6 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$ (平均値±SD) であり、消失相での半減期は4.2時間であった (図7A)。イトラコナゾールを1時間静注し、30分経過後の血漿中濃度は、 $1.21 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ (平均値±SD) であり、消失相での半減期は4.6時間であった (図7B)。

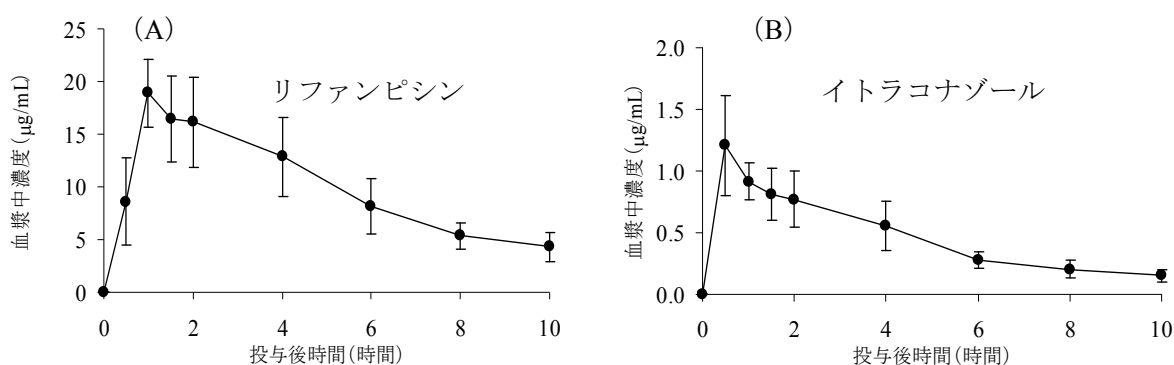


図7 リファンピシン及びイトラコナゾールの血漿中濃度推移

表1 リファンピシンまたはイトラコナゾール併用時におけるアトルバスタチン、プラバスタチン及びミダゾラムの投与量で規格化した AUC 値並びにプラバスタチンの腎クリアランス

	コントロール	+リファンピシン	+イトラコナゾール
アトルバスタチン			
AUC ₀₋₁₀ /dose (pg・h/mL/µg)	1.85±0.84	22.2±6.8**	2.02±1.08
プラバスタチン			
AUC ₀₋₈ /dose (pg・h/mL/µg)	5.97±2.42	27.7±5.2**	8.79±5.79
CL _{rp} (L/h)	21.7±5.1	18.4±1.7	20.7±8.6
ミダゾラム			
AUC ₀₋₁₀ /dose (pg・h/mL/µg)	14.3±4.0	16.4±5.9	24.1±8.8*

平均値±SD

AUC_{0-t}/dose：投与量で規格化した投与0～t時間後の血漿濃度時間曲線下面積

CL_{rp}：血漿中濃度に関与する腎クリアランス

*P<0.05, **P<0.01 対コントロール群

5-4. 考察

本研究にて実施したカセットマイクロドース臨床試験は、CYP3A4 及び OATPs の基質であるアトルバスタチンに、OATPs プローブのプラバスタチン、CYP3A4 プローブのミダゾラムの3剤を同時投与し、さらに、選択的阻害剤である OATPs 阻害剤のリファンピシンあるいはCYP3A4 阻害剤のイトラコナゾールを併用させた試験である。測定法に LC-MS/MS を用いることにより、カセットマイクロドースした未変化体のみならず代謝物の薬物動態データを一括取得することが可能であり、阻害剤投与時における各化合物の動態変動を検出することができた。

リファンピシン及びイトラコナゾールの血漿中濃度測定の結果、各阻害剤は、OATPs あるいはCYP3A4を阻害するのに十分な濃度であった。イトラコナゾール併用時のミダゾラムのAUCは、I期と比較して1.7倍増加したが、イトラコナゾールを経口投与でミダゾラムと併用したときのAUCは10倍以上増加したと報告があった[95, 96]。本研究において、イトラコナゾール

を静脈投与した理由は、肝臓での薬物のクリアランスにおける肝臓の CYP3A4 の役割を評価したかったからである。イトラコナゾールを経口投与するときは、小腸の CYP3A4 による代謝も関与する。一方、イトラコナゾール併用時プラバスタチンの AUC は顕著に増加していないことから、OATP に阻害はほとんど生じていないことを支持するものである。本試験とは異なり、イトラコナゾールを経口投与で投与した場合、アトルバスタチンの AUC は 2.5~3.4 倍増加した[97, 98]。アトルバスタチンの小腸アベイラビリティは 0.24[99]であり、イトラコナゾールを経口投与した際のアトルバスタチンの AUC 増加は、小腸の CYP3A4 や排出トランスポーターが阻害された結果、アトルバスタチンの小腸アベイラビリティが増加したものと考えられる。本試験では、2-OH アトルバスタチンの血漿中濃度が顕著に減少していることから、肝代謝過程が十分阻害されているにも関わらず、アトルバスタチンの血中動態に影響しなかったすなわち、アトルバスタチンの肝消失において、代謝過程は律速過程ではないことが示唆される。

リファンピシンとの併用時においては、アトルバスタチンとプラバスタチンの両方の AUC は増加したが、ミダゾラムは変化がなかった。リファンピシンは、肝 OATP を阻害したため、アトルバスタチンと 2-OH アトルバスタチンの血漿中濃度が明らかに増加した。これは、2-OH アトルバスタチンもまた OATP の基質であることを示唆した先の研究と一致した[100]。すなわち、アトルバスタチンの肝消失の第一段階である肝取り込み過程は OATPs を介して行われていることをヒト in vivo で証明することができた。

また、このカセットマイクロドース臨床試験におけるアトルバスタチンの AUC 増加の程度は、治療量投与時の薬物間相互作用の予測に応用できる。マイクロドース臨床試験の本来のコンセプトは、ヒト臨床試験前に、候補化合物の臨床の薬物動態の予測のためのツールである。しかし、このカセットマイクロドース臨床試験により、開発薬のクリアランスを決定づけるトランスポーター分子種をヒト in vivo で明らかにすることができた。なお、このアプローチを採用するのであれば、あらゆる分子のプローブ基質と阻害剤をヒトで特定し、バリデートする必要がある。

本研究により、カセットマイクロドース臨床試験による薬物動態データの一括取得のために、LC-MS/MS は十分実用的な性能を有していることが実証できた。そして、開発薬にプローブ薬物やプローブ阻害薬を併用したカセットマイクロドース臨床試験において、開発薬の薬物動態の変動を検討することで、開発薬のクリアランスがどの分子の機能によって決定づけられているのかをヒト in vivo で直接明らかにすることが可能であり、これまでにないマイクロドース臨床試験の利用法を開拓したと言える。

第3章 マイクロドース臨床試験導入による費用効果分析

1. 背景

医薬品開発には、不確実性をもつ要因が多い。よって、医薬品開発者は、医薬品として有望な薬物を開発中止にする、あるいは医薬品として不適な薬物について開発を進めてしまうリスクに直面している。医薬品候補化合物の多くは、臨床開発において、その化合物の安全性、有効性、薬物動態学的/バイオアベイラビリティや毒性が原因で開発中止となっている[101]。医薬品開発では、候補化合物は、通常、バックアップ化合物と併行して開発されており、いずれの化合物の開発を進めるかの go/no-go の決定は優先順位によって決定される。開発が進むにつれてコストがかかるため、開発の早期段階で決定することが重要である[102-104]。これらの意思決定プロセスを難しくさせる要因は、特にヒトデータがまだ確認されていない開発早期段階では、判断材料が限られているためである。

R&D の生産性については、多くの報告がある。後期のフェーズ試験に多くの費用がかかるため、臨床開発を合理的にすすめるには、臨床開発の早期にあるいは臨床開発前に、薬物の選択を最適化することや不確実な要因を明確化することが必要であると考えられている。ヒトの薬物動態特性の探索は、このパラダイムの中で重要な役割を果たしている。

マイクロドース試験は、臨床投与量の 1/100 あるいは 100 µg を超えない量を投与する臨床試験であり、医薬品開発早期における薬物選択の最適化を図ることができると期待されている。医薬品開発早期にヒトデータを用いて理論的な意思決定を高めることを目的として、探索的早期段階臨床試験（マイクロドース臨床試験を含む）が、欧州医薬品庁（European Medicines Evaluation Agency, EMEA、現 Europe Medicines Agency, EMA）が 2004 年に「position paper」[7]を通知した時には、既に普及しており[105]、医薬品開発におけるオプションとしてマイクロドース臨床試験が認可されていた。2006 年に、米国食品医薬品庁（Food and Drug Administration, FDA）より「Guidance for industry, investigators, and reviewers: Exploratory Investigational New Drug (eIND) studies」[13]が通知され、マイクロドース臨床試験は、3 つのタイプの eIND 試験の一つとして取りあげられた。日本では、厚生労働省から 2008 年に「マイクロドース臨床試験の実施に関するガイダンス」が通知された[106]。このガイダンスにおいて、3 つの分析方法、Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)、Accelerator Mass Spectrometry (AMS) 及び Positron Emission Tomography (PET) が高感度薬物濃度測定法として明記された。これらの分析方法がもつ特長は様々である。親化合物の薬物動態データは、LC-MS/MS により得ることができる。我々は、LC-MS/MS によって、31 化合物それぞれをヒト血漿に添加した試料を測定したときに、0.08~50 pg/mL の範囲内の定量下限値を得た[16]。これは、31 化合物のうちの 30 化合物の定量下限値が、各薬物のマイクロドース試験時に想定される C_{max} 値の 1/8 よりも低い値であるという結果であった。よって、LC-MS/MS が、非標識体化合物の測定法としてマイクロドース臨床試験に適用でき、また、カセットドージング後の複数化合物の薬物動態プロファイルの同時取得に有用であることを検証した。AMS は、予めクロマトグラムを使用することによって、親化合物と代謝物の薬物動態データが取得可能である。AMS は、マイクロドース臨床試験に十分適用できる感度を有することが既に報告されているが[10, 54]、放

放射性標識体化合物の使用が必須である。一方、臓器分布や受容体占有率を得る場合は、PET を用いる。PET-マイクロドース試験により、治療量投与時における組織濃度の時間推移プロファイルを予測することができる。受容体占有率は、組織濃度と *in vitro* 試験から得られた標的タンパク (受容体) により定量的予測が可能である。これは、候補化合物濃度の時間推移により、十分に薬理的な効果をもった候補医薬品を選択することが可能であり、同時に、安全性の高い候補医薬品の選択が期待できる。いずれの測定方法においてもマイクロドース臨床試験における目的は、ヒト薬物動態プロファイルを得ることにより、フェーズ 1 試験の前に医薬品として有望な候補化合物の選択をサポートすることである。

マイクロドース臨床試験は、バイオアベイラビリティデータが取得できるだけでなく、代謝酵素やトランスポーターに特異的な阻害剤併用の有無の条件下、開発薬とプローブ基質のカセットマイクロドージングを実施することで開発薬のクリアランス経路を決定することができる。また、代謝酵素やトランスポーターの薬理遺伝的な影響をプローブ基質のカセットマイクロドージングを実施することで予測できる。我々は、今までにマイクロドース臨床試験に関する妥当性を報告し、マイクロドースのデータと *in vitro* 試験のデータを合わせることで、マイクロドース臨床試験が、医薬品開発早期における有益なデータを提供できる可能性があることを理論的に検証した [16, 57, 71, 91, 107-109]。医薬品開発において、スクリーニング通過後に非臨床毒性試験に進む化合物をマイクロドース臨床試験によって理論的に選択された候補化合物は、従来型の医薬品開発において経験則や *in vitro* データにより選択された化合物よりも承認に至る確率が高くなることが期待される。

2. 目的

革新的なマイクロドース臨床試験のアプローチは、理論上のものとなっており、多くの医薬品開発者が、マイクロドース臨床試験の費用や効果に関する定量的なデータや実験データが欠けているために開発戦略にマイクロドース臨床試験を導入することに対して躊躇していると考えられた。実際に、マイクロドース臨床試験の費用と効果、すなわち 3 つの分析方法を用いたマイクロドース臨床試験を実施することで医薬品候補化合物の成功確率がどれくらい改善するのかのデータが欠如している。

それ故に、本研究は、医薬品開発における意思決定プロセスをサポートするために、我々は費用効果分析を行い、医薬品開発における不確実性を仮定のモデルに考慮することにより、マイクロドース臨床試験を従来の医薬品開発に導入する際の定量的な評価を行うことを目的とする。

3. 方法

日本において、従来型の医薬品開発にマイクロドース臨床試験を導入したときの費用対効果を以下のように評価した。

1. 費用効果分析のためにモデルを構築し、非臨床毒性試験に入った 1 候補化合物あたりの期待コスト及び非臨床毒性試験から承認までの各フェーズ間の移行確率を推定した。「効果」は、承認化合物数として定義した。コストとフェーズ間の移行確率は、4 つの開発戦略そ

れぞれで算出した。「戦略」は、非臨床毒性試験から承認までの連続したプロセスとして定義した。4つの戦略は、マイクロドースなしの従来型戦略と3つの分析方法（LC-MS/MS、AMS、PET）がそれぞれ含まれる3つの戦略から構成させた。

2. コホート分析において、仮定した様々な医薬品開発シナリオにおける承認化合物1個増加あたりの費用、増分費用効果比（Incremental Cost-Effectiveness Ratio, ICER）を算出した。シナリオは、100個の医薬品候補化合物から成る医薬品開発のパイプラインを想定した。これらの仮定したシナリオは、従来型戦略と3つのマイクロドース導入型戦略（MD 導入型戦略）から構成された。

医薬品開発者が開発のパイプラインにマイクロドース臨床試験を導入する場合、全ての医薬品候補化合物にマイクロドース臨床試験の実施を適用するのではなく、化合物の特性によって導入するか否か、あるいは、従来型戦略のまま開発を行うのかを考える必要がある。それから、実際のプロセスをモデルに反映させるために、コホート分析を行った。各医薬品候補化合物が4つの戦略の一つに割り当てるとして、MD 導入型シナリオにおける全体の費用効果を従来型シナリオ（全ての医薬品候補化合物は、マイクロドース臨床試験を行わずに開発される）と比較した。また、我々は、他のMD 導入型シナリオ（100個の医薬品候補化合物が異なったパターンで4つの戦略により選択されて開発される）も仮定した。

マイクロドース臨床試験の費用対効果を評価するためには、各戦略における費用効果比（全体にかかったコストを承認化合物数で割る）の比較ではなく、増分費用が増分した承認化合物数に見合うのかどうかを評価しなければならない。例えば、従来型開発にMD 試験を導入した4つのシチュエーションがある場合、これらの費用効果比（破線の傾き）は、全て同じであるが、実際、それぞれの評価は同じではなく、従来型開発と比較するとそれぞれのシチュエーションは異なる。よって、費用効果比では、MD 試験導入による正しい評価ができない（図1）。よって、マイクロドース臨床試験導入の費用対効果は、承認化合物1個増加あたりの費用であるICERで評価した（図2）。

一般的に、経済評価は、使用するモデルと仮説に依存し、本研究も例外ではない。よって、本研究では、コストと移行確率改善のパラメータに仮定をおくことについて、十分に注意した。混乱を避けるために、日本における医薬品開発の状況を仮定した。また、仮定の頑健性を確認するためにパラメータを変動させた。

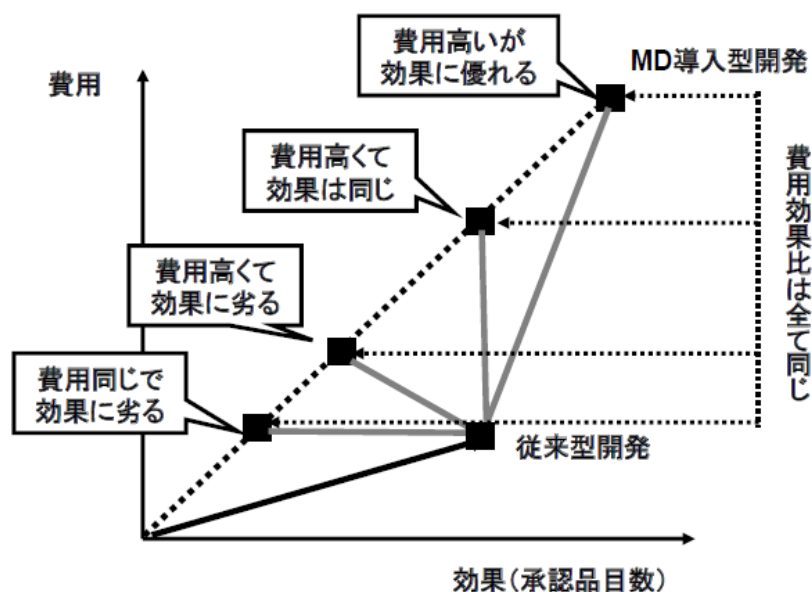


図 1 従来型開発にマイクロドース（MD）試験を導入したときの 4 つのシチュエーションにおける効果に対する費用の比較：従来型開発における費用効果比（実線黒色）、MD 導入型開発における費用効果比（破線）、MD 導入型開発における増分費用効果比（実線灰色）

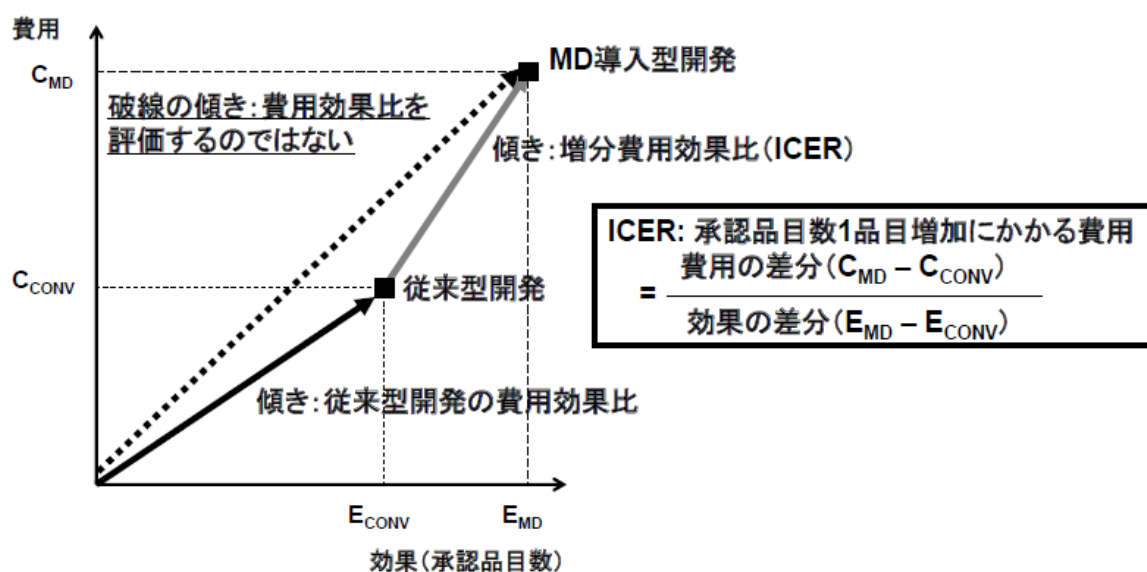


図 2 従来型開発にマイクロドース（MD）試験を導入したときの費用対効果を承認化合物 1 品目増加にかかる費用（増分費用効果比、ICER）で評価する理由：従来型開発における費用効果比（実線黒色）、MD 導入型開発における費用効果比（破線）、MD 導入型開発における ICER（実線灰色）

1) 費用効果分析のためのモデル構築

TreeAge Pro 2011 Suite ソフトウェア (TreeAge Software Inc., Williamstown, Massachusetts, USA) を使用して、判断樹モデルを構築した (図 3)。

本研究では、各候補化合物がスクリーニングを通過した後から非臨床毒性試験またはマイクロドース試験に移行するプロセスに注目した。よって、従来型戦略における判断樹モデルは、開始を非臨床毒性試験とし、終了を承認または各フェーズでの失敗とした。MD 導入型戦略における判断樹モデルは、開始をマイクロドース試験とし、終了を承認または各フェーズでの失敗とした。3 つの MD 導入型戦略間において、移行確率とコストが異なるため、それらの判断樹モデルは、戦略毎に構築した。

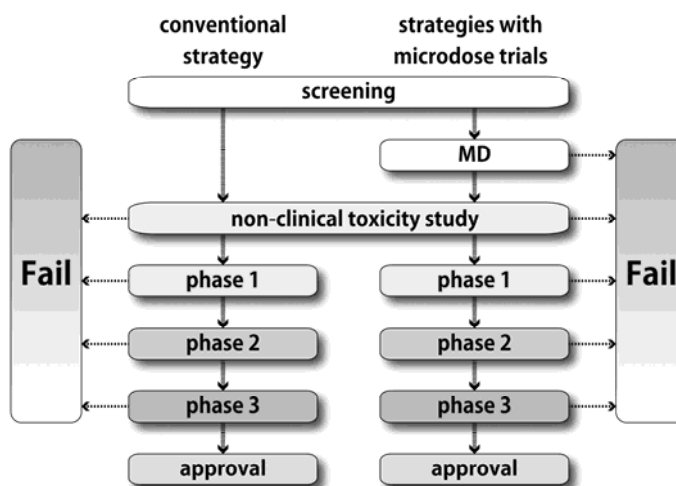


図 3 医薬品開発のためのモデル

各フェーズのコスト及び各フェーズ間の移行確率は、判断樹モデルのそれぞれに適用した。日本におけるコスト及び移行確率のデータは文献より、または、LC-MS/MS、AMS、PET を用いた測定を受託している機関：分析 Contract Research Organization (CRO) や臨床医からの回答 (表 1 及び 2) 及び薬物動態を専門とする研究者や製薬企業の医薬品開発者 (表 3) からの回答により得た。文献データは、内部費用 (人件費) と外部費用 (外部委託費) を含む。3 つのマイクロドース臨床試験のコストは、それぞれの機関から得た。

本研究におけるマイクロドース臨床試験の基本的なコンセプトは、非臨床毒性試験以降のフェーズで開発中止となる化合物を減らすために、非臨床毒性試験に移行するのに相応しい候補医薬品を試験によって選択することである。従来型戦略では、スクリーニング通過後に非臨床毒性試験に移行する候補化合物を、経験則に基づいて選択しているが、マイクロドース臨床試験のデータに基づいて化合物が選択できれば、従来型戦略における選択と比較すると非臨床毒性試験以降のフェーズにおける成功確率が高くなる可能性がある (図 4)。スクリーニング通過後から非臨床毒性試験の間の移行確率は、以下のように仮定した。ベースケースにおいては、スクリーニングを通過した 3 つの候補化合物の内、1 つが非臨床毒性試験に進むと仮定し、非臨床毒性試験までの移行確率は、4 つ全ての戦略において 0.333 とした。すなわち、3 つの MD

導入型戦略では、3つの候補医薬品の内の1つが、マイクロドース臨床試験で化合物の特性を評価することによって選択され、非臨床毒性試験にフェーズに進む。一方、従来型戦略では、3つの候補医薬品の内の1つが、感覚的や経験的に選択される。この移行確率 ($0.333=1/3$) は、感度分析において 0.2 (1/5) から 0.5 (1/2) の幅で変動させた。よって、非臨床毒性試験から承認までの移行確率は、構築したモデルにおいてマイクロドース臨床試験を導入した戦略において高くなる。

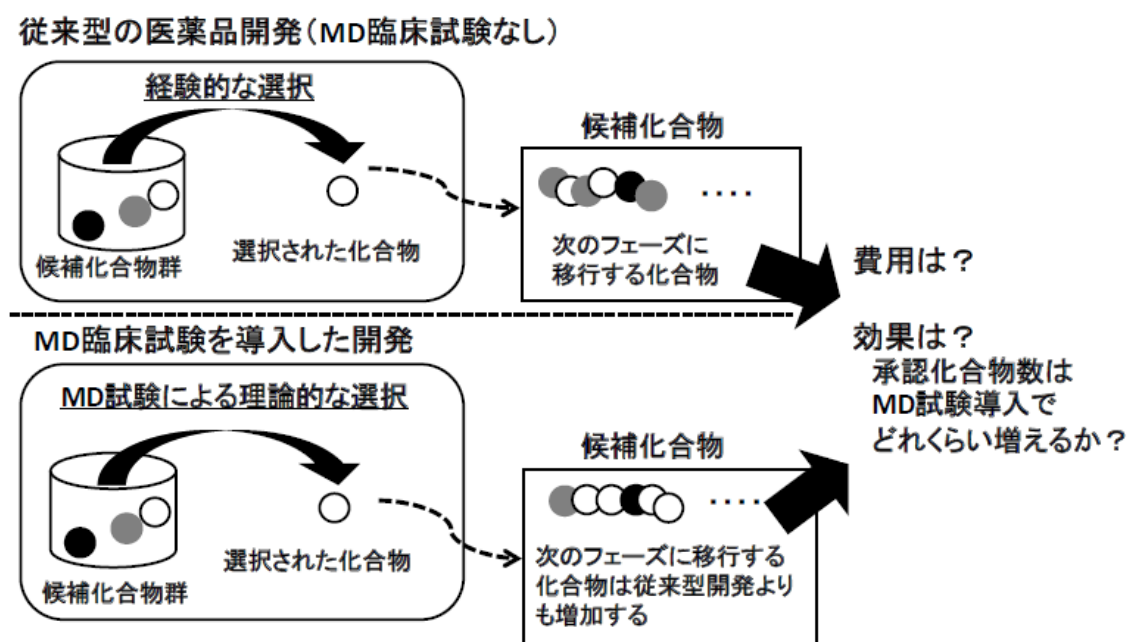


図4 化合物の選択における MD 試験の役割の考え方

4つの戦略における非臨床毒性試験からフェーズ3試験までの各フェーズ間には、異なる移行確率を適用した。被験物質測定法に LC-MS/MS、AMS または PET を用いるマイクロドース臨床試験のそれぞれの特長を考慮すると、各マイクロドース臨床試験で候補化合物を選択することにより、安全性、有効性、薬物動態/バイオアベイラビリティ、毒性が原因で開発中止となっている化合物を減らすことができると仮定した。これらの開発中止理由別に、移行確率が改善されると考えた根拠を、以下に説明する。

安全性：前臨床毒性試験からフェーズ1試験に移行する間においては、動物やヒト試料、または細胞を用いた前臨床毒性試験の結果に、マイクロドース臨床試験から得られる薬物分布データを追加することで、臨床試験におけるヒトでの安全性に関わる事象が起こる可能性が予測できると考えた。臨床試験のフェーズ間においては、マイクロドース臨床試験によって、臨床試験で安全性が問題となることが予測できる ADME データが提供できると考えた。

有効性：マイクロドース臨床試験は、開発段階の各フェーズにおいて、標的臓器における薬物分布を推定することが可能であると考えた。

薬物動態/バイオアベイラビリティ：全てのフェーズにおいて、マイクロドース臨床試験は、

ヒト薬物動態を取得することが可能であると考えた。

毒性：全てのフェーズにおいて、マイクロドース臨床試験により、毒性を予測するためのヒト薬物動態の ADME データを取得することが可能であると考えた。毒性による開発中止は、薬物動態にも一部起因していると考えた。

表 3 に、各戦略における非臨床毒性試験からフェーズ 3 試験までの移行確率を示す。従来型戦略では、文献から引用した各値の点推定値をベースラインとし、その値の 95%信頼区間を各移行確率の最小値と最大値に設定した。改善度合いを乗じた各 MD 導入型戦略の移行確率は、主観を避け、可能な限り客観的になるように算出した。その方法は、マイクロドース臨床試験について専門知識をもった研究者に、マイクロドース臨床試験を実施することで、従来型開発と比較して、開発中止の割合がどれくらい改善するのか、すなわち改善度合いについてアンケート調査を行った (Appendix 1)。アンケートでは、3 つの MD 導入型戦略での 3 つの移行フェーズにおける 4 つの理由で開発中止となっている化合物 (36 のシチュエーション) について、改善される最大の割合とその可能性値について質問した (Appendix 2)。調査の回答率は、100% (8/8) であった。非臨床毒性試験から承認までの移行確率は、4 つの各戦略において算出した (表 2)。

2) コホート分析

マイクロドース臨床試験を導入したときの全体の費用対効果を推定するために、100 個の候補化合物が 4 つの戦略下で開発される 9 つのシナリオを想定したコホート分析を実施した。シナリオ I、II 及び III では、100 個全ての候補化合物が、それぞれ MD-LC-MSMS、MD-AMS 及び MD-PET によって選択されるとした。ベースケースの MD 導入型戦略 (シナリオ IV) においては、70 個の候補化合物が従来型戦略で選択され、10 個の候補化合物が 3 つの MD 導入型戦略で選択されるとした (計 30 個)。シナリオ V 及び VI では、従来型戦略で選択される化合物数は 70 個と固定し、3 つの MD 導入型戦略で選択される化合物数を変動させた。シナリオ VII、VIII 及び IX では、従来型戦略で選択される化合物数は 50 個と固定し、3 つの MD 導入型戦略で選択される化合物数を変動させた。シナリオ V~IX は、感度分析を行うために構築した。

シナリオ I~IX では、承認品目数を 1 個増加させるためにかかる費用、増分効果比 ICER は、従来型シナリオ (100 個全ての候補化合物が従来型戦略で開発される) に対して算出した。シナリオ I~IV では、フェーズ 2 とフェーズ 3 に移行するのに成功した化合物 1 個増加させるためにかかる費用 ICER も算出した。ICER を用いた費用対効果を評価するために、閾値、すなわち最大許容である ICER を設定する必要があるが [110]、承認品目数を 1 個増加させるためにかかる費用については、データがなく閾値の明確な基準がない。よって、本研究では、閾値を従来型シナリオの平均費用効果比、すなわち承認品目数 1 個増加させるためにかかる費用 244 億円 (3 億 500 万米ドル、USD1=JPY80) (43 億 7600 万円/0.179)、フェーズ 3 に移行する化合物を 1 個増加させるためにかかる費用 154 億円 (34 億 4600 万円/0.224)、フェーズ 2 に移行する化合物を 1 個増加させるためにかかる費用 38 億円 (22 億 300 万円/0.583) に設定した [1] (表 4 及び 5)。

3) 感度分析

スクリーニング通過後から非臨床毒性試験への移行確率の感度分析は、0.2 (1/5) から 0.5 (1/2) の幅で変動させた。3 つの MD 導入型戦略における改善率及び従来型戦略の移行確率の範囲を変動させることにより一次元感度分析を行った。MD-LC-MS/MS は、類似の化学構造をもった医薬品候補化合物を同時に投与するカセットドージングが可能である。よって、カセットドージングにおける MD-LC-MSMS の感度分析は、1 化合物を投与するマイクロドース臨床試験にかかる費用を同時に投与する化合物数で除することによって行った。2~5 化合物同時投与のカセットドージングにおける 1 化合物あたりの MD-LC/MS/MS の費用は、それぞれ 89.5 億円、63.3 億円、48.8 億円、40.0 億円であった。

シナリオ I~IV の確率感度分析は、各パラメータに特定の分布を適用することで、モンテカルロシミュレーション (10000 回) を行った。確率感度分析は、各フェーズの費用 (正規分布、ベースラインの±25%) と非臨床毒性試験からフェーズ 3 までの各フェーズ間の移行確率を変動させた。従来型戦略の移行確率に、 β 分布を、3 つの MD 導入型戦略の改善率に、三角分布を適用した。

表 1 医薬品開発のための費用（百万円）

フェーズ	単位費用	戦略 ^a				引用文献
		従来型	MD-LC-MS/MS	MD-AMS	MD-PET	
MD 試験						パーソナルコミュニケーション ^b
LC-MS/MS	17.0 ^c	—	25.5 ^f	—	—	
AMS	53.0 ^d	—	—	61.5 ^f	—	
PET	76.0 ^e	—	—	—	84.5 ^f	
非臨床毒性試験	1310.6	1310.6	1310.6	1310.6	1310.6	Yagi et al. (2010)[1]
フェーズ 1	1086.0	1086.0	1086.0	1086.0	1086.0	
フェーズ 2	2110.1	2110.1	2110.1	2110.1	2110.1	
フェーズ 3	3823.4	3823.4	3823.4	3823.4	3823.4	
申請	349.2	349.2	349.2	349.2	349.2	
総費用		8679.3	8704.8	8740.8	8763.8	

^a戦略は、非臨床毒性試験から承認までの医薬品開発プロセスとして定義した。

^b LC-MS/MS、AMS または PET を用いた分析を行う医薬品開発業務受託機関の匿名の者または臨床開発早期及び探索的臨床試験を専門とする臨床医

^cMD 臨床試験、分析法バリデーション、LC-MS/MS を用いた試料分析に関わる費用を含む

^dMD 臨床試験、¹⁴C 放射性標識体化合物の合成、内部被ばく試験、AMS を用いた試料分析に関わる費用を含む

^eMD 臨床試験、PET プローブの合成、内部被ばく試験、PET を用いた試料分析に関わる費用を含む

^f 単位費用には、拡張型単回投与毒性試験（850 万円）を加算した。

表 2 移行確率（ベースケース分析）

	スクリーニ ング通過後 から 非臨床毒性 試験	スクリーニ ング通過後 から MD 試験	MD 試験 から 非臨床毒性 試験	非臨床毒性 試験 から フェーズ 1	フェーズ 1 から フェーズ 2	フェーズ 2 から フェーズ 3	フェーズ 3 から 申請	申請 から 承認	非臨床毒性試験 から 承認までの 累積移行確率
戦略 ^a									
従来型	0.333	—	—	0.801	0.728	0.385	0.800	1.000	0.179
MD-LC-MS/MS	—	1.000	0.333	0.825 ^b	0.757 ^b	0.415 ^b	0.800	1.000	0.208
MD-AMS	—	1.000	0.333	0.834 ^b	0.770 ^b	0.426 ^b	0.800	1.000	0.219
MD-PET	—	1.000	0.333	0.827 ^b	0.771 ^b	0.463 ^b	0.800	1.000	0.236
データ元	仮定	仮定	仮定	Yagi et al. (2010) [1] Suter et al. (2004) [101]			Yagi et al. (2010) [1]		

^a戦略は、非臨床毒性試験から承認までの医薬品開発プロセスとして定義した。

^b安全性、有効性、薬物動態/バイオアベイラビリティ、毒性による中止が改善されると仮定した。（表 3 を参照）

表3 各戦略における移行確率の範囲及び分布（方法及び表2を参照）

A：従来型開発における移行確率 ^a （文献値）									
	非臨床毒性試験からフェーズ1			フェーズ1からフェーズ2			フェーズ2からフェーズ3		
	最小	ベースライン	最大	最小	ベースライン	最大	最小	ベースライン	最大
	0.739	0.801	0.864	0.650	0.728	0.806	0.285	0.385	0.485
B：各フェーズでのMD導入型の測定法を用いた時の開発中止理由別における改善比 ^b （専門家の意見に基づく）									
	非臨床毒性試験からフェーズ1			フェーズ1からフェーズ2			フェーズ2からフェーズ3		
	最小	ベースライン	最大	最小	ベースライン	最大	最小	ベースライン	最大
MD-LC-MS/MS ^c									
安全性	1.000000	1.000037	1.000161	1.001042	1.008339	1.026060	1.000000	1.012843	1.038529
有効性	1.000139	1.001113	1.002922	1.000654	1.007192	1.018962	1.000000	1.041532	1.124597
薬物動態/ハ イアベ イラビ リティ	1.008795	1.015537	1.020814	1.000557	1.018371	1.032845	1.000000	1.004984	1.011501
毒性	1.001096	1.012052	1.026295	1.000000	1.000777	1.004274	1.000000	1.000383	1.001917
MD-AMS									
安全性	1.000012	1.000161	1.000410	1.001042	1.016679	1.044824	1.000000	1.021405	1.059935
有効性	1.000139	1.001252	1.003200	1.000654	1.007192	1.021577	1.000000	1.049839	1.157823
薬物動態/ハ イアベ イラビ リティ	1.011726	1.016417	1.020814	1.003340	1.023938	1.036186	1.000000	1.004984	1.013418
毒性	1.001096	1.020817	1.043825	1.001166	1.003109	1.011657	1.000000	1.000767	1.005751
MD-PET									
安全性	1.000012	1.000273	1.000596	1.008339	1.015636	1.041697	1.000000	1.029967	1.059935
有効性	1.000278	1.004452	1.008069	1.005231	1.016346	1.032692	1.000000	1.157823	1.323953
薬物動態/ハ イアベ イラビ リティ	1.001173	1.009088	1.014072	1.002227	1.012247	1.024495	1.000000	1.003067	1.009968
毒性	1.001096	1.016434	1.038347	1.000777	1.003497	1.011657	1.000000	1.001917	1.007668

^a戦略は、非臨床毒性試験から承認までの医薬品開発プロセスとして定義した。

^b従来型戦略と比較した改善

^c例えば、MD-LC-MS/MS 戦略における非臨床毒性試験からフェーズ 1 試験への移行確率は、以下のように算出した。従来型戦略における移行確率は、0.801 であるため、中止割合は 0.199 となる (Yagi et al. [1])。非臨床毒性試験で開発中止となる候補化合物の内の 0.5%は、安全性が原因である (Suter et al. [101])。専門家の意見より、MD-LC-MS/MS 戦略において、この 0.5%が最小で 0%、最頻で 3%、最大で 13%改善されるとされた。このデータを基にすると、安全性における改善度合い IRcs は以下のように算出された。

$$\text{IRcs (minimum)} = (0.801 + 0.199 \times 0.005 \times 0) / 0.801 = 1.000000$$

$$\text{IRcs (likeliest)} = (0.801 + 0.199 \times 0.005 \times 0.03) / 0.801 = 1.000037$$

$$\text{IRcs (maximum)} = (0.801 + 0.199 \times 0.005 \times 0.13) / 0.801 = 1.000161$$

三角分布を採用した。IRcs の期待値は、これら 3 つの IRcs 値の平均値 1.000066 に該当する。同様に、有効性 (IRef)、薬物動態/バイオアベイラビリティ (IRpk) 及び毒性 (IRtox) による改善度合いの期待値は、それぞれ 1.001391、1.015049、1.013147 と算出された。これらの値は、移行確率のベースラインを算出するために使用された。0.825 (0.801 × IRcs × IRef × IRpk × IRtox) (表 2)。

表4 コホート分析における1品目承認化合物増加のための総費用、承認化合物数、増分費用効果比（ICER）（単位：10億円）

シナリオ ^a	(A) 各4戦略で開発される 非臨床毒性試験を開始する 候補化合物数 (C：従来型、 L：MD-LC-MS/MS、 A：MD-AMS、P：MD-PET)	(B) 非臨床毒性試験 を開始する1候補 化合物あたりの 期待コスト	(C) 非臨床毒性試験 から承認までの 累積移行確率	(D) 総コスト： [(B)×100]	(E) 従来型からの 増分費用	(F) 効果 (承認化合物 数)： [(C)×100]	(G) 従来型からの 増分効果	ICER ^b (E)/(G)
従来型	100(C)	4.38	0.179	437.6	-	17.95	-	-
I	100(L)	4.71	0.208	471.4	33.8	20.77	2.82	12.0
II	100(A)	4.93	0.219	492.7	55.1	21.88	3.93	14.0
III	100(P)	5.07	0.236	506.9	69.3	23.63	5.68	12.2
IV (ベースケース MD導入型 シナリオ)	70(C), 10(L), 10(A), 10(P)	4.54	0.192	453.4	15.8	19.19	1.24	12.7
V	70(C),12.5(L), 12.5(A),5(P)	4.52	0.191	452.2	14.6	19.08	1.13	12.9
VI	70(C),7.5 (L),7.5 (A),15(P)	4.55	0.193	454.7	17.1	19.31	1.36	12.6
VII	52(C),16 (L),16 (A),16(P)	4.63	0.199	462.9	25.3	19.94	1.99	12.7
VIII	52(C),20 (L),20 (A),8(P)	4.61	0.198	460.9	23.3	19.75	1.81	12.9
IX	52(C),12 (L),12 (A),24(P)	4.65	0.201	464.9	27.3	20.12	2.17	12.6

^aシナリオは、100候補化合物から成る医薬品開発パイプラインを想定した。^b閾値は、244億円とした。

表5 コホート分析におけるフェーズ3試験またはフェーズ2試験に移行する化合物1品目増加のための総費用、承認化合物数、増分費用効果比(ICER) (単位: 10億円)

シナリオ ^a	(A) 各4戦略で開発される 非臨床毒性試験を開始する 候補化合物数 (C: 従来型、 L: MD-LC-MS/MS、 A: MD-AMS、P: MD-PET)	(B) 非臨床毒性試験 を開始する1候補 化合物あたりの 期待コスト	(C) 非臨床毒性試験 から承認までの 累積移行確率	(D) 総コスト: [(B)×100]	(E) 従来型からの 増分費用	(F) 効果 (承認化合物 数): [(C)×100]	(G) 従来型からの 増分効果	ICER ^b (E)/(G)
フェーズ3試験に移行する薬物								
従来型	100(C)	3.45	0.224	344.6	-	22.44	-	-
I	100(L)	3.64	0.260	363.8	19.2	25.96	3.53	5.4
II	100(A)	3.79	0.274	379.4	34.7	27.35	4.92	7.1
III	100(P)	3.85	0.295	384.6	39.9	29.53	7.10	5.6
IV (ベースケース MD導入型 シナリオ)	70(C), 10(L), 10(A), 10(P)	3.54	0.240	354.0	9.3	23.99	1.55	6.0
フェーズ2試験に移行する薬物								
従来型	100(C)	2.20	0.583	220.3	-	58.33	-	-
I	100(L)	2.31	0.625	230.6	10.4	62.49	4.16	2.5
II	100(A)	2.42	0.642	242.5	22.2	64.22	5.89	3.8
III	100(P)	2.49	0.638	248.7	28.4	63.75	5.42	5.2
IV (ベースケース MD導入型 シナリオ)	70(C), 10(L), 10(A), 10(P)	2.26	0.599	226.4	6.1	59.88	1.55	3.9

^aシナリオは、100候補化合物から成る医薬品開発パイプラインを想定した。

^b閾値は、フェーズ3試験に移行する1候補化合物あたり154億円、フェーズ2試験に移行する1候補化合物あたり38億円とした。

4. 結果

1) 4つの戦略における費用対効果

MD 導入型戦略の費用及び効果は、いずれも増加した（表 1 及び 2）。3 つの MD 導入型戦略の総費用は、MD-LC-MS/MS、MD-AMS、MD-PET の順で増加した。効果、すなわち非臨床毒性試験から承認までの累積移行確率は、従来型戦略で 0.179、MD-LC-MS/MS で 0.208、MD-AMS で 0.219、MD-PET で 0.236 であった（表 2）。

非臨床毒性試験に移行した 1 候補化合物あたりの期待費用は、従来型戦略で 43.8 億円であった。3 つの MD 導入型戦略における費用は、MD-LC-MS/MS (47.1 億円)、MD-AMS (49.3 億円)、MD-PET (50.7 億円) の順で増加した。一方、3 つの MD 導入型戦略における 1 承認化合物あたりの期待費用は、従来型戦略の期待費用 243.8 億円も低く、MD-LC-MS/MS (227.0 億円)、MD-AMS (225.2 億円)、MD-PET (214.6 億円) の順で減少した。

2) コホート分析

ほとんどのシナリオにおいて、ICER は閾値をかなり下回った。ベースケースシナリオ（シナリオ IV）では、従来型戦略と比較して費用が 158 億円、承認化合物の数が 1.24 個増加した（表 4）。よって、従来型シナリオと比較したときの承認化合物 1 個増加あたりの ICER は、127 億円と閾値（244 億円）をかなり下回った。シナリオ V 及びシナリオ VII の ICER は、それぞれ 129 億円及び 126 億円であり、かなり閾値を下回った。全体の費用及び承認化合物の数はシナリオ毎で異なったが、シナリオ IV と VII、シナリオ V と VIII、シナリオ VI と IX の ICER は同じであった。

LC-MS/MS を用いたシナリオ I の ICER は、各閾値を全て下回った。AMS を用いたシナリオ II 及び PET を用いたシナリオ III については、承認化合物 1 個増加あたりの ICER 及びフェーズ 3 へ移行する化合物 1 個増加あたりの ICER は閾値を下回ったが、フェーズ 2 へ移行する化合物 1 個増加あたりの ICER は閾値を超えた（表 5）。

3) 感度分析

スクリーニング通過後から非臨床毒性試験への移行確率を変動させた時の ICER は、154 億円（移行確率 0.2=1/5 の時）、112 億円（移行確率 0.5=1/2 の時）であり、いずれも閾値をかなり下回った。移行確率の一次元感度分析の結果は、トルネードダイアグラムに示す（Appendix 3、図 1）。変動させるパラメータの中で、改善率が ICER に最も影響を及ぼした。MD-PET におけるフェーズ 2 からフェーズ 3 間のフェーズにおける有効性に対する改善率（1~1.323953）は、3 つの MD 導入型戦略において最も ICER に影響を及ぼした。MD-AMS 及び MD-LC-MS/MS におけるフェーズ 2 からフェーズ 3 へ間のフェーズにおける有効性に対する改善率（1~1.157823、1~1.124597）もまた ICER に影響を及ぼした。他の改善率は、ICER にほとんど影響を及ぼさなかった。

カセットドージングにおける MD-LC-MS/MS の費用は、46.89 億円（2 化合物同時投与時）、46.80 億円（3 化合物同時投与時）、46.76 億円（4 化合物同時投与時）、46.73 億円（5 化合物同時投与時）であった（Appendix 3、図 2）。

シナリオ IV における確率感度分析の結果を、ICER scattered plot で Appendix 3、図 3A に示す。モンテカルロシミュレーションの結果を基にすると、MD 導入型シナリオは、244 億円を閾値に設定した時に 100%の確率で費用効果に優れると言える。シナリオ IV における許容曲線を Appendix 3、図 3B に示す。シナリオ I～III における 3 つの MD 導入型戦略の確率感度分析の結果は、ICER scattered plot で Appendix 3、図 4A～C に示す。これらの結果より、MD 導入型シナリオは、244 億円を閾値に設定した時に MD-LC-MS/MS、MD-AMS、MD-PET のいずれもにおいて、ほぼ 100%の確率で費用効果に優れると言える。

5. 考察

マイクロドース臨床試験を実施することにより、医薬品開発の早期段階において候補化合物として不適な化合物を検出し、医薬品として最適な化合物を効率的に選択することができる。マイクロドース臨床試験の導入によって増加する開発費用に、効果が見合うのかどうか疑問視されているが、我々が構築した条件下において、マイクロドース臨床試験の導入は、費用対効果に優れると言えた。本研究は、初めて医薬品開発にマイクロドース臨床試験を導入した際の費用と効果を定量的に予測し、報告したものである。MD 導入型戦略の標準的なモデルがないため、モデルに費用と効果のパラメータを入力するにあたり、文献から引用できる限られたデータを基にした。よって、仮定をおいた条件におけるデータの取扱いには不確実性を伴うため、適用したモデルと仮定を十分に検討した。

モデルは、まず、費用最小化分析を検討したが、本分析では、マイクロドース臨床試験の役割が、医薬品候補として適さない化合物の開発を中止することであり、開発中止となる化合物全体の確率は変わらないことが前提となる。我々は、マイクロドース臨床試験のデータを基に候補化合物を選択することは、従来の開発で開発中止としていた化合物を開発に進める場合も想定でき、承認化合物数が増加すると考えた。よって、マイクロドース臨床試験の導入によって費用と効果の両方が変動する費用効果分析を採用し、費用と効果（成功確率）を評価した。次に、費用と移行確率のパラメータにおいて仮定をおいた。医薬品開発プロセスは、日本における臨床開発を想定し、従来の医薬品開発における臨床試験の費用を、製薬企業への調査に基づいて得られた国内自社開発品目に関わる費用により引用した。マイクロドース臨床試験の費用は、分析施設からの回答を得て、平均値を使用した。医薬品開発における開発中止理由とその割合に関して、日本での情報はなかったため、代わりに US のデータ (Suter et al. [101]) を採用した。測定法に LC-MS/MS、AMS あるいは PET を用いるマイクロドース臨床試験によって得られるデータは、測定法毎に特長があり、各試験によって選択される候補化合物の安全性、有効性、薬物動態、毒性が原因で開発中止となる化合物数が減少すると仮定した。

モデルの重要な点は、マイクロドース臨床試験による移行確率の改善率、すなわち、どの理由で開発中止となっている化合物を、どのマイクロドース導入型戦略でどれくらい減少させることが可能かということである。改善率算出にあたっては、主観や直感を避け、36 のシチュエーションにおいて移行確率の改善率の「最大の割合」と「その可能性」を得るために、薬物動態の専門家に対してアンケート調査を行った。これは、実際の医薬品開発に携わる企業の方からの意見を収集するための客観的な情報となる。MD 導入型戦略において移行確率の改善率の

確率分布には、三角分布を適用した。「最大の割合」と「その可能性」を乗じた値の平均値と最小値をそれぞれ最頻値、最低の値として使用し、「最大の割合」の平均値は、最大値として使用した。

スクリーニング通過後から非臨床毒性試験への移行確率は、経験的な証拠が存在しないが、0.333 と仮定した。しかし、この移行確率を 0.2 から 0.5 に変動させたときの ICER が、閾値をかなり下回ることを考慮すると（0.2：154 億円、0.5：112 億円）、この仮定は、全体の結果に対して無視できるパラメータであると言える。

医薬品開発は、パラダイムシフトに直面しており、医薬品開発従事者が今までの開発戦略よりも多くの選択肢を持つようになっている。FDA によって通知された eIND 試験は、マイクロドース臨床試験のみではなく、薬理作用を検証する他 2 つの試験についても言及している。医薬品開発戦略は、新しいイノベーションとファーマコメトリクスのようなアプローチに沿って変わりがちである[102]。1990 年から 2000 年にかけて、臨床開発において、薬物動態/バイオアベイラビリティが原因で開発中止となった化合物数が減少している[6]。ここ 10 年のデータはないが、in silico ADME 予測法や in vitro-in vivo 外挿法が大きな進化を遂げていることに起因する[111-114]。市販後の医薬品の安全性を強化するため、薬物間相互作用の情報や肝腎の機能障害、小児及び高齢者における薬物動態変動の情報は、より要求が強くなっている。マイクロドース臨床試験は、将来、理論的な情報を提供し、医薬品開発に貢献することが考えられる[115]。製薬企業間では、候補医薬品の数も特性も異なるため、構築したモデルは、製薬企業によって戦略ごとに改変することができる。なお、費用効果分析は、費用の増分を効果の増分で除した比で評価するため、化合物の絶対数には影響しない。本研究では、100 個の候補医薬品から成る医薬品開発パイプラインを想定した 9 つのシナリオについてマイクロドース臨床試験を導入したときの費用対効果を評価した。仮に、ある企業の候補化合物数が年間 10 個であり、7 個が従来型開発で選択され、3 つの MD 導入型戦略それぞれで 1 個が選択される（ベースケースの MD 導入型開発のシナリオにて選択）場合、ICER（承認品目数 1 個増加にあたりかかる追加費用）は、以下のように、全体の費用の差分を承認品目数の差分で除することで算出される。

全体の費用 = 1 候補品目の期待コスト × 候補化合物数

従来型開発の場合：437.6 億円、10 候補化合物の場合：453.4 億円

承認品目数 = 累積移行確率 × 候補化合物数

従来型開発の場合：1.795、10 候補化合物の場合：1.919

ICER = (437.6 億円 - 453.4 億円) / (1.919 - 1.795) = 127 億円

10 候補化合物がマイクロドース臨床試験によって選択されたときの ICER 127 億円は、100 候補化合物と同じ結果である。全体の費用と承認品目の総数は、候補品目数で変動する。よって、全体の費用の差分と承認品目の総数の差分もまた候補化合物数で変動する。しかし、ICER は、候補化合物数には影響しない。

費用と移行確率は、薬物の特性や製薬企業によって様々である。本研究では、1 承認品目にかかる費用は、244 億円であったが、米国における報告では 5 億～20 億米ドルと報告されている[2, 102, 116, 117]。この相違の原因としては、本研究で用いた内部費用と外部費用を含む開

発費用が、非臨床毒性試験前の R&D 費用を含まず、かつ、国内のみのデータであるためである。

移行確率は、医薬品として不適な特性をもつ化合物が単に開発中止になるだけではない。多くの候補医薬品をもつ企業の場合、医薬品として不適でない場合の化合物でも、開発を優先している化合物のせいで開発中止とするときもある。企業が臨床開発において候補化合物をライセンスアウトする場合、早期段階で付加価値をつけるためにマイクロドース臨床試験は有用なツールである。そのような場合、製薬企業は、より早いフェーズに注目しており、フェーズ 2 試験又はフェーズ 3 試験に移行する 1 化合物あたりの費用の情報は、承認に至る 1 化合物あたりの費用の情報よりも有益である。フェーズ 3 試験に移行する化合物 1 個増加するための ICER は閾値よりかなり低く、マイクロドース臨床試験の効果がより出ていることがわかった。フェーズ 2 試験に移行する化合物 1 個増加するための ICER の結果より、MD-AMS と MD-PET 戦略は、費用対効果がなかったが、後のフェーズ試験に移行することで費用対効果が出てきた。これは、これらの戦略の効果が、マイクロドース臨床試験の費用に見合うのに時間がかかることを意味した。

フェーズ 3 試験の費用は、膨大であるため、費用対効果を評価する際に、マイクロドースの戦略の効果がマスクされてしまう。その上、製薬企業は、proof of concept が確認された時あるいはフェーズ 2 試験の後に、候補化合物をライセンスインやライセンスアウトを考えるかもしれない。MD-PET 戦略又はベースケースの MD 導入型シナリオにおけるフェーズ 2 試験に移行する化合物 1 個増加するための ICER 以外は、閾値をかなり下回った。いずれの戦略においても、フェーズ 3 試験に移行する化合物 1 個増加するための ICER は閾値を下回り、費用対効果に優れることがわかった（表 5）。

MD-LC-MS/MS のマイクロドース臨床試験の費用は、放射性標識体化合物を必要としないため、MD-AMS や MD-PET よりも低い。さらに、カセットドースで 1 候補化合物あたりの費用は、もっと安くなる。カセットドースの他のメリットは、個人間変動を排した薬物動態情報が取得できる点である。しかし、MD-LC-MS/MS は、代謝物の検索や検出ができない。一方、非臨床毒性試験で取得できないヒト代謝物は AMS で検索することができる。PET を用いたマイクロドース臨床試験は、組織分布と受容体結合データの取得に適している。

本研究には、いくつかの限界がある。全ての条件は、国内データを採用しているが、例外がある。移行確率の改善率の算出にあたっては、国内データを用いることができず、4 つの理由で開発中止となった化合物の割合は、海外データを用いた[101]。このモデルの一般化には、いくつかの欠点がある。開発化合物は、海外開発におけるデータを用いずに国内のみで開発することはないので、構築したモデルは、現実の医薬品開発プロセスを反映していない。現在、ほとんどの薬物は、多くの地域で同時に開発されている。企業は、世界での新薬承認を目指して、国際共同治験を実施している。また、同効薬の候補化合物は、一つの化合物だけではなく、バックアップ化合物を含めた候補化合物群があり、これらは同時に開発が進められている。そのようなケースの場合、各フェーズの費用と移行確率は、変動する。また、マイクロドース臨床試験を実施するにあたり、実施に必要な期間だけでなく、機会費用を考慮していない。モデル構築にあたっては、各企業の状況に応じた様々な改良に対応することのできる定量的なモデル

ルを提供することを目指した。また、主観的な仮定をおかず、客観的なデータをモデルに用いた。

構築したモデルに、実際のデータが存在しない機会費用と開発期間のデータを入力することは、費用効果分析の評価が曖昧で、主観的なものとなる。もしマイクロドース臨床試験により、従来型開発よりも早くに医薬品として不適な候補化合物の開発中止の判断ができるのであれば、機会費用は減少し、より金銭的に期間の資源を他のことに適用するだろう。ただ、このモデルを企業自身の状況の下に解釈することを医薬品開発従事者に託す。

本研究では、マイクロドース臨床試験を導入しない従来型開発と比較して3つのMD導入型戦略（MD-LC-MS/MS、MD-AMS、MD-PET）の費用対効果を評価した。3つのMD導入型戦略及び従来型戦略で100候補化合物が選択されると仮定した様々な6つのシナリオにおいて、承認品目1個増加のためのICERは、126億円～129億円であり、閾値（244億円）より低かった。結果、マイクロドース臨床試験を医薬品開発に導入することは費用対効果に優れると判断できた。

第4章 総括及び今後の展望

1. 総括

本研究は、汎用性の高い液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS）がマイクロドース臨床試験に要求される感度の水準を満たすことを明らかにするとともに、マイクロドース臨床試験導入のメリットを定量化することで、医薬品開発へのマイクロドース臨床試験の導入が現状のインフラでも十分可能であることを示した。マイクロドース臨床試験における LC-MS/MS を用いた高感度の血漿中薬物濃度測定が成功したのは、装置の性能だけに依存せず、物性毎に分類した各化合物に適した試料前処理法を開発し、構築したスキームに則った LC 及び MS 条件の最適化によるものである。日本では、2008 年 6 月 3 日に「マイクロドース臨床試験を実施するためのガイダンス」（薬食審査発第 0603001 号）[106]が通知され、被験物質測定法の一つとして LC-MS/MS が明記された。欧米当局から通知された法令[7, 13]には、測定法としての LC-MS/MS の記載がないことから、本研究成果の影響によるものであると考えられる。

本研究の将来に向けた有用性は、各企業が合理的にマイクロドース臨床試験の導入あるいは非導入の意思決定ができるデータを供給できたことにある。但し、本研究の限界が二つ挙げられる。一つ目は、本研究における評価対象はマイクロドース臨床試験において投与対象としている低分子化合物だけであることから LC-MS/MS が測定できない高分子化合物、LC-MS/MS においてイオン化が不向きな化合物については、研究結果に外挿することはできないことである。二つ目は、本研究によりマイクロドース臨床試験導入のメリットが定量的に示されたものの、この結果のみをもって導入の可否を一律に判断できるものではなく、あくまで意思決定の一助になるデータであることである。

研究を開始するまでは、マイクロドース臨床試験の測定法といえば加速器質量分析法（Accelerator Mass Spectrometry, AMS）という先入観があり、LC-MS/MS では試験に対応できる感度を有していないと認識されていた。しかしながら、本研究において、LC-MS/MS の適用可能性を検証し、さらに、実際にマイクロドース臨床試験における薬物濃度測定を行うことで、技術的な有用性を初めて実証した。それに伴い、未変化体の薬物濃度測定のみならず、LC-MS/MS の特長を最大限に活かすことで、新たな創薬研究における非標識体化合物を投与するマイクロドース臨床試験の活用法が提案できた（図 1）。化合物情報を保持したまま測定することを活用したニカルジピン投与のマイクロドース臨床試験では、*in vitro* 代謝試験で予め代謝物の構造推定を行っておくことで、マイクロドース臨床試験で得られる薬物動態（代謝物の薬物動態プロファイル）の情報を増やせることがわかった。さらに、もう一つの LC-MS/MS の特長である複数物質同時測定を応用したカセットマイクロドース臨床試験により、未変化体及び代謝物の薬物動態プロファイルの一斉取得を可能とした。創薬スクリーニングを目的とした同種同効薬のカセットマイクロドース臨床試験のみならず、プローブ薬物やプローブ阻害薬併用時におけるカセットマイクロドース臨床試験により、候補薬物の薬物動態データを取得することで、候補薬物のクリアランスがどの分子の機能によって決定づけられているのかをヒト *in vivo* で直接明らかにし、今までにないカセットマイクロドース臨床試験の利用法を開拓した。

マイクロドース臨床試験は、ビックファーマのように多くの開発候補品をもつ企業が、候補品のスクリーニング目的で用いる試験であると認識され、日本の製薬企業には用いられていなかった。しかしながら本研究により、非標識体化合物を使ったマイクロドース臨床試験の活用幅を広げることができたため、候補化合物数が相対的に少ない日本企業でもマイクロドース臨床試験を導入しようとする。例えば、先行している開発化合物とバックアップ化合物の「カセット投与によるそれらの動態比較」、また、「選択的阻害剤の併用時における候補薬物の薬物動態データ取得によって、薬物相互作用の標的となる分子や阻害の程度の予測、基質薬物の律速段階を決定づける代謝酵素やトランスポーター分子種の推定」が考えられる。非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験は、創薬に間違いなく貢献するものである。

本研究は、NEDO 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発「マイクロドース臨床試験を活用した革新的創薬技術の開発」（研究開発責任者：杉山雄一先生、実施時期：2008 年 10 月～2011 年 3 月）での非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験において、LC-MS/MS を用いて高感度にかつ簡便で迅速な薬物濃度測定法を開発し、LC-MS/MS が実用的な性能を有していることを実証するとともに、非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験が、医薬品開発における有用なツールとなり得るための活用法を見いだした。このプロジェクトにおいて、非標識体化合物投与のカセットマイクロドース臨床試験を世界で初めて行い、LC-MS/MS による非標識体化合物の微量定量に成功した。

我々が構築した条件下において、マイクロドース臨床試験を医薬品開発に導入することは、費用対効果に優れており、臨床開発の成功確率向上に寄与しようと考えられた（図 1）。マイクロドース臨床試験導入による効果は、フェーズ 2 試験からフェーズ 3 試験に移行する際に顕著に出ることがわかった。MD-AMS と MD-PET 戦略では、マイクロドース臨床試験実施の費用が MD-LC-MS/MS 戦略より多くかかるため、フェーズ 2 試験までは、マイクロドース臨床試験導入による費用対効果がない結果が得られた。本研究により、医薬品開発にマイクロドース臨床試験を導入した際の開発費用と効果（承認化合物数の増加）を定量的に予測できた。しかし、マイクロドース臨床試験導入による臨床開発期間の短縮は、予測できるものではなかった。ただし、マイクロドース臨床試験で選択された候補化合物は、ヒトの薬物動態情報が取得できていることから、もとなる投与量の設定や臨床投与時の動態予測が従来の開発より精度高くでき、臨床開発の加速化に寄与しようとする。たとえ、マイクロドース臨床試験で候補化合物が選択できない結果だったとしても、企業としてその化合物類のヒト *in vivo* データを蓄積することができ、後の開発に役立てることができる。一つの成功化合物のみに着目すると、マイクロドース臨床試験を実施する分、トータルの開発が遅延するが、開発全体でみた場合、成功確率が向上し、臨床開発の加速化に繋がると考えられる。なお、開発遅延のデメリットは、単独には評価出来ず、開発遅延のデメリットと開発成功化合物増加のメリットの双方を評価することが必要である（図 1）。

本研究により、非標識体化合物を用いたマイクロドース試験におけるヒト薬物動態評価法として LC-MS/MS を用いることで、医薬品開発段階で以下のような薬物動態を評価することを可能とした。

- 1) 候補薬物のマイクロドース試験：未変化体の薬物動態データ取得による臨床量投与時

- の候補薬物の体内動態の予測。
- 2) *in vitro* 代謝試験における候補薬物の代謝物の構造推定と併用したマイクロドース試験：未変化体及び代謝物を含めた動態解析により、代謝物に注目した開発が可能。代謝物の薬物動態プロファイルと動物データとの比較による毒性試験のための動物種の選択。代謝物の標準物質が合成されている場合は、未変化体と代謝物の定量的なデータ同時取得が可能。
 - 3) 複数候補薬物のカセットマイクロドース試験：複数化合物の薬物動態データの同時取得による臨床量投与時の体内動態の予測から候補薬物の選択。
 - 4) 阻害剤（臨床投与量）の併用時における候補薬物及び各分子に選択的な基質薬物群のカセットマイクロドース試験：選択的阻害剤存在下、候補薬物の薬物動態データの変動を比較することにより、候補薬物のクリアランスを決定づける代謝酵素やトランスポーター分子種の推定。また、薬物相互作用の標的となる分子や阻害の程度の予測。



**MD試験は医薬品開発において有用である
なぜなら・・・**

- ・液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法は技術的に適用可能である
- ・非標識体化合物投与試験の活用法がある
- ・開発戦略における試験導入はメリットがある

図1 本研究により明らかとなった医薬品開発におけるマイクロドース臨床試験の有用性

2. 今後の展望

我々の研究成果を受けて、国内外における創薬研究に非標識体化合物投与のマイクロドース臨床試験は活用されている。

メルクは、5種のHIV-1インテグラーゼ阻害剤のスクリーニングのために、5剤カセットマイクロドース試験を実施した[118]。高感度分析が可能なAMSが、マイクロドース臨床試験に用いられる一般的に普及している測定法であると認識していたが、我々の研究を受けてLC-MS/MSによる高感度測定に着手している。ラルテグラビルが1 pg/mL、他4物質が2 pg/mLの定量下限値を得ることができ、ラルテグラビルがマイクロドース時と臨床量投与時の薬物動態に線形性があることを実証した。

グラクソ・スミスクラインは、プロスタノイド（EP₁）受容体拮抗薬の評価のために、経口及び静脈投与のマイクロドース臨床試験を実施した。本拮抗薬について、ヒト*in vivo*の薬物動態と3種の動物*in vivo*データを基にアロメトリックスケーリングで実験動物データから外挿したヒト薬物動態とが、一致しないという結果を得たことにより、早期開発段階におけるヒト*in*

vivo の薬物動態評価の重要性を述べている[119]。

ロシュは、マイクロドース臨床試験のための候補品目+2 種の代謝物の同時測定のための LC-MS/MS メソッドの開発を報告した[120]。

国内では、理化学研究所が、新規乳癌治療薬の開発を目的としたアロマターゼ阻害剤（セトロゾール、TMD-322）の体内動態の解析のため、既存のアロマターゼ阻害剤（アナストロゾール）を含めた3 剤カセットマイクロドース試験を世界初のマイクロドース臨床試験として実施した。ヒトでの3 種の薬物の薬物動態を比較することで、候補化合物の優位性を検証した[121]。小野薬品は、企業による国内初の新薬候補化合物を投与したマイクロドース臨床試験を実施し、創薬における効率化を高め、成功確率向上を目指している[122]。

また、アカデミアでは、マイクロドース投与した新薬候補化合物と薬物トランスポーターの指標となる内因性物質の同時測定を行うことにより、統合的に薬物間相互作用を解析する試みもなされている。さらに、ベンチャー企業などが開発した化合物やアカデミア発創薬の付加価値をつけるためにも、簡便に実施でき、ヒト薬物動態の情報が取得できるマイクロドース臨床試験が活用されていくと考える。

近年のマイクロドース試験の動向としては、「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」（薬食審査発第 0219 第 4 号、平成 22 年 2 月 19 日）[123]において、早期探索的臨床試験の位置づけの中で、2 つの異なったマイクロドース臨床試験のアプローチが示されている。このガイダンスは、2009 年の日米 EU 医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH）M3 ガイドライン[8]を受けて、通知された。第 1 のアプローチでは、総投与量が $100\ \mu\text{g}$ 以下を単回投与あるいは分割投与であるが、第 2 のアプローチでは、1 回あたりの最高用量が $100\ \mu\text{g}$ 以下で投与回数が 5 回以下の反復投与（総投与量が $500\ \mu\text{g}$ 以下）が可能となった。

本研究の成果は、マイクロドース臨床試験で得られる情報を広げ、医薬品開発の成功確率向上に貢献するものと期待している。

Disclosure of conflicts of interest

筆者は、株式会社 J C L バイオアッセイの社員である。

本研究の一部は、NEDO 基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発「マイクロドース臨床試験を活用した革新的創薬技術の開発」（研究開発責任者：杉山 雄一先生）におけるものである。

第3章におけるマイクロドース臨床試験導入による費用効果分析において行ったアンケート調査における回答者は、製薬企業、大学、医薬品開発受託機関、臨床施設に属するマイクロドース臨床試験に関する専門知識を有する研究者である。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、熱心なご指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室 楠原 洋之教授に心より感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり多くのご支援とご指導を賜りました東京大学名誉教授 杉山 雄一先生（現 理化学研究所）、東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室 前田 和哉講師、東京大学大学院薬学系研究科 医薬品評価科学講座 草間 真紀子講師、戸塚 善三郎教授（元 株式会社 J C L バイオアッセイ；現 大阪大学大学院薬学研究科）、横浜薬科大学 池田 敏彦教授、東京大学大学院薬学系研究科 医薬政策学講座 五十嵐 中特任助教に謹んで感謝いたします。

また本論のまとめに際し、ご高閲をいただきました東京大学大学院薬学系研究科 加藤 大特任准教授、大澤 匡範講師、草間 真紀子講師、前田 和哉講師に謹んで感謝いたします。

フェキシフェナジン投与及びニカルジピン投与の臨床試験の実施に際しては、北里大学東病院 治験管理センター 熊谷 雄治先生、北里大学東病院 治験管理センター兼ブリストル・マイヤーズ株式会社 薬事統括部 山崎 晃氏に、御協力及び御支援をいただきました。さらに、熊谷 雄治先生には、3 剤カセットマイクロドース臨床試験の実施に際しても御協力及び御支援をいただきました。ここに感謝の意を表します。

第2章の「ヒト血漿添加調製試料を用いた LC-MS/MS のマイクロドース臨床試験への適用可能性の検討」におきまして、リン酸オセルタミビルをご提供していただきました東京大学名誉教授 柴崎 正勝先生（元 東京大学大学院薬学系研究科 有機合成化学教室）、金井 求教授（東京大学大学院薬学系研究科 有機合成化学教室）、山次 建三先生（元 東京大学大学院薬学系研究科 有機合成化学教室）に深く感謝いたします。その他の標準物質購入にあたりご支援いただきました谷本 敏子教授（武庫川女子大学薬学部 薬品物理化学研究室）に深く感謝いたします。

3 剤カセットマイクロドース臨床試験におけるデータ解析に際して、東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室 吉田 健太氏に御尽力いただきましたことに感謝申し上げます。

ニカルジピン投与の臨床試験における測定に際しては、株式会社 J C L バイオアッセイ 高見 知徳氏に、また、3 剤カセットマイクロドース臨床試験における測定に関しては、株式会

社 J C L バイオアッセイ 春山 祐介、東 夕貴、古川 倫子、土井 美由起、の各氏に、御協力
いただき、心より感謝申し上げます。

文 献

- 1 Yagi T, Okubo M, Ono S. Duration and cost of drug development. (in Japanese): OPIR Views and Action. 2010; 29: 1–9.
- 2 Gilbert J, Henske P, Singh A. Rebuilding Big Pharma's Business Model. In Vivo, the Business & Medicine Report. 2003; 21: 73–82.
- 3 「製薬産業の将来像」 (in Japanese): OPIR 産業レポート、May 2007.
- 4 Jim K. Fresh from the biotech pipeline—2013. Nature Biotech. 2014; 32: 121–124.
- 5 Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? Nat Rev Drug Discov. 2004; 3(8): 711–715.
- 6 Frank R, Hargreaves R. Clinical biomarkers in drug discovery and development. Nat Rev Drug Discov. 2003; 2: 566–580.
- 7 European Medicines Evaluation Agency (EMA). European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Position paper on the nonclinical safety studies to support clinical trials with a single microdose. CPMP/SWP2599/0.; 28 January 2003.
- 8 US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), M3 (R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. January 2010.
- 9 Lappin G, Garner R.C. Big physics, small doses: the use of AMS and PET in human microdosing of development drugs. Nat Rev Drug Discov. 2003; 7: 233–240.
- 10 Lappin G, Kuhn W, Jochemsen R, Kneer J, Chaudhary A, Oosterhuis B, Drijfhout WJ, Rowland M, Garner R.C. Use of microdosing to predict pharmacokinetics at the therapeutic dose: experience with 5 drugs. Clin Pharmacol Ther. 2006; 80: 203–215.
- 11 US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Innovation or stagnation, Challenge opportunity on the critical path to new medical products. March 2004.
- 12 Single-dose acute toxicity testing for pharmaceuticals; Revised Guidance, Availability, Notice. Federal Register. 1996 Aug. 26: 43933–5.
- 13 US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry, investigators, and reviewers exploratory IND studies. January 2006.
- 14 Adel H Karara, Timi Edeki, James McLeod, Alfred P Tonelli, John A. Wagner. PhRMA Survey on the Conduct of First-in-Human Clinical Trials Under Exploratory Investigational New Drug Applications. J Clin Pharmacol. 2010; 50: 380–391.
- 15 Mayahara H, Yamane N, Kikuchi Y. Screening phase I trials in the EU and US (in Japanese). Jpn J Clin Pharmacol Ther. 2005; 36: 7–18.

- 16 Yamane N, Tozuka Z, Kusama M, Maeda K, Ikeda T, Sugiyama Y. Clinical relevance of liquid chromatography tandem mass spectrometry as an analytical method in microdose clinical studies. *Pharm Res*, 2011; 28: 1953–1972.
- 17 Zhu LS, Lapko VN, Lee JW, Basir YJ, Kafonekm C, Olsen R, Briscoe C. A general approach for the quantitative analysis of biophosphonates in human serum and urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrum*. 2006; 20: 3421–3426.
- 18 Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB, Tai CY, Laver WG, Stevens RC. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc*. 1997; 119: 681–690.
- 19 Yamatsugu K, Kamijo S, Suto Y, Kanai M, Shibasaki M. A concise synthesis of Tamiflu: third generation route via the Diels-Alder reaction and the Curtius rearrangement. *Tetrahedron Lett*. 2007; 48: 1403–1406.
- 20 Lu Y, Wen H, Li W, Chi Y, Zhang Z. Determination of donepezil hydrochloride (E2020) in plasma by liquid chromatography–mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies in healthy, young, chinese subjects. *J Chromatogr Sci*. 2004; 42: 234–237.
- 21 Yang AY, Sun L, Musson DG, Zhao JJ. Application of a novel ultra-low elution volume 96-well solid-phase extraction method to the LC/MS/MS determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J Pharm Biomed*. 2005; 38: 521–527.
- 22 Package insert for Plavix tablets 75 mg, Sanofi-Aventis Pharmaceuticals Inc., May 2006.
- 23 Package insert for ACTOS tablets 30 mg, Takeda Pharmaceutical Company Limited, December 1999.
- 24 Package insert for RISPERDAL tablets 1 mg, Janssen Pharmaceuticals, Inc., June 1996.
- 25 Label information for AVANDIA tablets 2 mg, GlaxoSmithKline Inc., 2007.
- 26 Package insert for Seroquel tablets 25 mg, Astellas Pharmaceuticals Inc., February 2001
- 27 Package insert for Harnal tablets 0.1 mg, Astellas Pharmaceuticals Inc., June 2005
- 28 Package insert for Aricept tablets 5 mg, Eisai Company Limited. November 1999
- 29 http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2002/21-323.pdf_Lexapro_BioPharmr.pdf. Clinical pharmacology and biopharmaceutics reviews for Lexapro tablets, Forest Laboratories, Inc., March 2001.
- 30 Package insert for Glivec tablets 100 mg, Novartis Pharma K.K., June 2005.
- 31 Package insert for Myslee tablets 5 mg, Astellas Pharmaceuticals Inc., December 2000.
- 32 Package insert for Zyprexa tablets 5 mg, Eli Lilly Japan K.K., June 2001.
- 33 Package insert for Norvasc tablets 5 mg, Pfizer Company Limited. December 1993.
- 34 Package insert for Lipitor tablets 5 mg, Pfizer Company Limited. May 2000.

- 35 Package insert for KIPRES tablets 10 mg, Kyorin Pharmaceutical Company Limited, August 2001.
- 36 Package insert for TAMIFLU capsules 75 mg, Chugai Pharmaceutical Company Limited, February 2001.
- 37 Package insert for JZOLOFT tablets 50 mg, Pfizer Company Limited. July 2006.
- 38 Package insert for CEREBREX tablets 100 mg, Pfizer Company Limited, February 1999.
- 39 Label information for NEXIM delayed-release capsules 20 mg, AstraZeneca K.K., 2006.
- 40 Package insert for CRESTOR tablets 10 mg, AstraZeneca K.K., April 2005.
- 41 Package insert for TOPAMAX tablets 50 mg, Johnson & Johnson K.K.,
- 42 Label information for Effexor XR capsules 150 mg, Wyeth Pharmaceuticals Inc., August 2007.
- 43 Package insert for Zyrtec tablets 10 mg, UCB Co. Ltd., September 1998.
- 44 Package insert for TAXOTERE 20 mg for I.V. Infusion, Sanofi-Aventis Pharmaceuticals Inc., June 1997.
- 45 Package insert for Takepron capsules 15 mg, Takeda Pharmaceutical Company Limited., December 1992.
- 46 Label information for PROTONIX delayed-release tablets 40 mg, Wyeth Pharmaceuticals Inc., November 2007.
- 47 Package insert for BLOPRESS tablets 4 mg, Takeda Pharmaceutical Company Limited., June 1999.
- 48 Package insert for DIOVAN tablets 20 mg, Novartis Pharma K.K., November 2000.
- 49 Package insert for CRAVIT tablets 500 mg, Dai-ichi Sankyo Pharmaceutical Company Limited., July 2009.
- 50 Posner J, Bye A, Dean K, Peck AW, Whiteman PD. The disposition of bupropion and its metabolites in healthy male volunteers after single and multiple doses. *Eur J Clin Pharmacol.* 1985; 29: 97–103.
- 51 Ohtawa M, Uchiyama N, Saito Y, Suzuki A, Tanno C, Nakaya N, Goto Y. Phase I study of MK-733, an inhibitor of HMG-CoA reductase II: pharmacokinetics of MK-733 in healthy subjects after single and multiple oral administration. *J Clin Ther Med.* 1989; 5(6): 1123–1140.
- 52 Nakashima M, Kanamaru M, Uematsu T, Takayama K, Kamei K. Phase I study of MK-954, a new angiotensin II receptor antagonist - results of single oral administration - *Jap J Clin Pharmacol. Ther.* 1995; 26: 671–684.
- 53 Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), Japan. Guidelines for Bioequivalence Studies of Generic Products (Pharmaceutical and Food Safety Bureau Notification No.1124004). 2006.
- 54 Lappin G, Shishikura Y, Jochemsen R, Weaver RJ, Gesson C, Houston JB, Oosterhuis B, Bjerrum OJ, Grynkiewicz G, Alder J, Rowland M, Garner RC. European union microdose AMS partnership programme (EUMAPP). Comparative pharmacokinetics between a microdose and therapeutic dose for clarithromycin, sumatriptan, propafenone, paracetamol (acetaminophen), and phenobarbital in human volunteers. *Eur J Pharm Sci.* 2011; 43: 141–150.

- 55 Package insert for Adair Diskus/Aerosol, GlaxoSmithKline Inc., June 2007.
- 56 US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry, bioanalytical method validation.; May 2001
- 57 Yamane N, Tozuka Z, Sugiyama Y, Tanimoto T, Yamazaki A, Kumagai Y. Microdose clinical trial: quantitative determination of fexofenadine in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2007; 858: 118–128.
- 58 Yamazaki A, Kumagai Y, Yamane N, Tozuka Z, Sugiyama Y, Fujita T, Yokota S, Maeda M, Microdose study of a P-glycoprotein substrate, fexofenadine, using a non-radioisotope-labelled drug and LC/MS/MS, *J Clin Pharm Ther*, 2010; 35: 169–175.
- 59 Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR, Doerge DR. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B*. 2005; 825: 134–143.
- 60 Ikegaya S, Sasaki S, Sorimachi S. A new milestone in chromatography, ethylene-bridge hybrids [BEH] technology. (*in Japanese*): *Chromatography*. 2005; 26: 53–55.
- 61 Fu I, Woolf EJ, Matuszewski BK, Determination of fexofenadine in human plasma using 96-well solid phase extraction and HPLC with tandem mass spectrometric detection. *J Pharm BioMed Anal*. 2004; 35: 837–46
- 62 Mallet CR, Lu Z, Fisk R, Mazzeo JR, Neue UD. Performance of an ultra-low elution-volume 96-well plate: drug discovery and development applications. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003; 17: 163–170.
- 63 Package insert for Allegra tablet 60 mg, Sanofi-Aventis Pharmaceuticals Inc., January 2006.
- 64 Lippert C, Ling J, Brown P, et al. Mass balance and pharmacokinetics of MDL 16, 455 in healthy male volunteers [abstract]. *Pharm Res* 1995; 12 Suppl. 9: S390
- 65 Yasui-Furukori N, Uno T, Sugawara K, Tateishi T. Different effects of three transporting inhibitors, verapamil, cimetidine, and probenecid, on fexofenadine pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2005; 77: 17–23.
- 66 Simpson K, Jarvis B. Fexofenadine: a review of its use in the management of seasonal allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria. *Drugs*. 2000; 59: 301–321.
- 67 Hamman MA, Bruce MA, Haehner-Daniels BD, Hall SD. The effect of rifampin administration on the disposition of fexofenadine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2001; 69: 114–121.
- 68 Wang Z, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ, Hall SD. Effect of St John's wort on the pharmacokinetics of fexofenadine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2002; 71: 414–420.
- 69 Dresser GK, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ, Kim RB. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2002; 71: 11–20.

- 70 Petri N, Tannergren C, Rungstad D, Lennernas H. Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model. *Pharmaceutical Research*. 2004; 21: 1398–1404.
- 71 Yamane N, Takami T, Tozuka Z, Sugiyama Y, Yamazaki A, Kumagai Y. Microdose clinical trial: quantitative determination of nicardipine and prediction of metabolites in human plasma. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009; 24: 391–406.
- 72 Tozuka Z, Kaneko H, Shiraga T, Beppu M, Niwa T, Kawamura A, Kagayama A. New SRM data dependent exclusion (MS)ⁿ measurement for structural determination of drug metabolites using LC/ESI/Ion trap MS. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2003; 18: 390–403.
- 73 Package insert for Nicodel LA20, Bayel Inc., July 2007.
- 74 Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR, Doerge DR. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparison of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B*. 2005; 825: 134–143.
- 75 Lurie IS. High-performance liquid chromatography of seized drugs at elevated pressure with 1.7 μ m hybrid C18 stationary phase columns. *J Chromatogr A*. 2005; 1100: 168–175.
- 76 Urien S, Albengres E, Comte A, Kiechel JR, Tillement JP. Plasma protein binding and erythrocyte partitioning of nicardipine in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1985; 7: 891–898.
- 77 Sorasuchart W, Wardrop J, Ayres JW. Extraction and quantification of nicardipine in. *Drug Dev Ind Pharm.*, 1999; 25: 1093–85.
- 78 Zendelovska D, Simeska S, Sibinovska O, Kostova E, Milosevska K, Jakovski K, Jovanovska E, Kikerkov I, Trojcanec J, Zafirov D. Development of an HPLC method for the determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction. *J Chromatogr B*. 2006; 839: 85–88.
- 79 Higuchi S, Shiobata Y. Comparative pharmacokinetics of nicardipine hydrochloride, a new vasodilator, in various species. *Xenobotica*. 1980; 10: 447–454.
- 80 Graham DJM, Dow RJ, Hall DJ, Alexander OF, Mroszczak EJ, Freedman D. The metabolism and pharmacokinetics of nicardipine hydrochloride in man. *Br J clin Pharmacol*. 1985; 20: 23S–28S.
- 81 Rush WR, Alexander O, Hall DJ, Cairncross L, Dow RJ, Graham DJM. The metabolism of nicardipine hydrochloride in healthy male volunteers. *Xenobotica*. 1986; 16: 341–349.
- 82 Guidance for Industry: Safety Testing of Drug Metabolites, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), February 2008.
- 83 Terai M, Takenaka T, Maeno H. Inhibition of calcium influx in rabbit aorta by nicardipine hydrochloride (YC-93). *Biochem Pharmacol*. 1981; 30: 375–378.
- 84 Guengerich FP, Brian WR, Iwasaki M, Sari M-A, Baarnhielm C, Berntsson P. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P-450 IIIA4. *J Med Chem*. 1991; 34: 1838–1844.
- 85 Nakamura K, Ariyoshi N, Iwatsubo T, Fukunaga Y, Higuchi S, Itoh K, Shimada N, Nagashima K, Yokoi T, Yamamoto K, Hiriuchi R, Kamataki T. Inhibitory effects of nicardipine to cytochrome P450 (CYP) in human liver microsomes. *Biol Pharm Bull*, 2005; 28: 882–885.

- 86 Higuchi S, Shiobata Y, Sado T. Determination of a new cerebral vasodilator 2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylic acid 3-[2-(N-benzyl-N-methylamino)]-ethyl ester 5-methyl ester hydrochloride (YC-93) in plasma by electron capture gas chromatography. *J Chromatogr.* 1975; 110: 301–307.
- 87 Wagner JG, Ling TL, Mrosczak EJ, Freeman D, Wu A, Huang B, Massey IJ, Roe RR. Single intravenous dose and steady-state oral dose pharmacokinetics of nicardipine in healthy subjects. *Biopharm Drug Dispos.* 1987; 8: 133–148.
- 88 Higuchi S, Sasaki H, Shiobara Y, Sado T. Absorption, excretion and metabolism of a new dihydropyridine diester cerebral vasodilator in rats and dogs. *Xenobiotica.* 1977; 7: 469–479.
- 89 Higuchi S, Shiobata, Y. Metabolic fate of nicardipine hydrochloride, a new vasodilator, by various species in vitro. *Xenobiotica.* 1980; 10: 889–896.
- 90 Madan A, O'Brien Z, Wen J, O'Brien C, Farber RH, Beaton G, Crowe P, Oosterhuis B, Garner RC, Lappin G, Bozigian HP, A pharmacokinetic evaluation of five H(1) antagonists after an oral and intravenous microdose to human subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2009; 67: 288–298.
- 91 Maeda K, Ikeda Y, Fujita T, Yoshida K, Azuma Y, Haruyama Y, Yamane N, Kumagai Y, Sugiyama Y. Identification of the Rate-Determining Process in the Hepatic Clearance of Atorvastatin in a Clinical Cassette Microdosing Study. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 90: 575–581.
- 92 Watanabe T. *et al.* Investigation of the rate-determining process in the hepatic elimination of HMG-CoA reductase inhibitors in rats and humans. *Drug Metab Dispos.* 2010; 38: 215–222.
- 93 Liu D, Jiang J, Zhou H, Hu P. Quantitative determination of atorvastatin and para-hydroxy atorvastatin in human plasma by LC-MS-MS. *J Chromatogr Sci.* 2008; 46: 862–866.
- 94 Kawabata K, Samata N, Urasaki Y. Quantitative determination of pravastatin and R-416, its main metabolite in human plasma, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2004; 816: 73–79.
- 95 Backman JT, Kivisto KT, Olkkola KT, Neuvonen PJ. The area under the plasma concentration-time curve for oral midazolam is 400-fold larger during treatment with itraconazole than with rifampicin. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998; 54: 53–58.
- 96 Olkkola KT, Backman JT, Neuvonen PJ. Midazolam should be avoided in patients receiving the systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin Pharmacol Ther.* 1994; 55: 481–485.
- 97 Mazzu AL, Lasseter KC, Shamblen EC, Agarwal V, Lettieri J, Sundaresen P. Itraconazole alters the pharmacokinetics of atorvastatin to a greater extent than either cerivastatin or pravastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 2000; 68: 391–400.
- 98 Kantola T, Kivisto KT, Neuvonen PJ. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 1998; 64: 58–65.
- 99 Lennernas H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42: 1141–1160.

- 100 Lau YY, Okochi H, Huang Y, Benet LZ. Multiple transporters affect the disposition of atorvastatin and its two active hydroxy metabolites: application of in vitro and ex situ systems. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 316: 762–771.
- 101 Suter L, Babiss LE, Wheeldon EB. Toxicogenomics in predictive Toxicology in drug development. *Chem Biol*. 2004; 11: 161–171.
- 102 Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov*, 2010; 9: 203–214.
- 103 Cohen CM. A path to improved pharmaceutical productivity. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2: 751–753.
- 104 DiMasi J A. The value of improving the productivity of the drug development process: faster times and better decisions. *Pharmacoeconomics*. 2002; 20: Suppl 3: 1–10.
- 105 Combes RD, Berridge T, Connelly J, Eve MD, Garner RC, Toon S, Wilcox, P. Early microdose drug studies in human volunteers can minimise animal testing: Proceedings of a workshop organised by Volunteers in Research and Testing. *Eur J Pharm Sci*, 2003; 19: 1–11.
- 106 Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), Japan. Guidance on microdose clinical trial (Pharmaceutical and Food Safety Bureau Notification No. 0603001).; 2008.
- 107 Maeda K, Sugiyama Y. Novel strategies for microdose studies using non-radiolabeled compounds. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2011; 63: 532–538.
- 108 Tozuka Z, Kusuhara H, Nozawa K, Hamane Y, Ikushima I, Ikeda T, Sugiyama Y. Microdose study of ¹⁴C-acetaminophen with accelerator mass spectrometry to examine pharmacokinetics of parent drug and metabolites in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2010; 88: 824–830.
- 109 Maeda K, Takano J, Ikeda Y, Fujita, Oyama Y, Nozawa K, Kumagai Y, Sugiyama Y. Nonlinear Pharmacokinetics of Oral Quinidine and Verapamil in Healthy Subjects: A Clinical Microdosing Study. *Clin Pharmacol Ther*. 2011; 90: 263–270.
- 110 Drummond MF, Sculpher MJ, Torrance GW, O'Brien BJ, Stoddart GL. Critical assessment of clinical evaluation. *Methods for the Economic Evaluation of Health Care Programmes*. 3 ed. New York, Oxford University Press, 2005, pp. 27–54.
- 111 Lipinski C. Chris Lipinski discusses life and chemistry after the Rule of Five. *Drug Discov Today*. 2003; 8: 12–16.
- 112 Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, Shah VP, Lesko LJ, Chen M-L, Lee VHL, Hussain AS. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res*. 2002; 19: 921–925.
- 113 Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res*. 2005; 22: 11–23.

- 114 Kusama M, Toshimoto K, Maeda K, Hirai Y, Imai S, Chiba K, Akiyama Y, Sugiyama Y. In silico classification of major clearance pathways of drugs with their physiochemical parameters. *Drug Metab Dispos.* 2010; 38: 1362–1370.
- 115 Sugiyama Y, Yamashita S. Impact of microdosing clinical study -- Why necessary and how useful? *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63: 494–502.
- 116 DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ.* 2003; 22: 151–185.
- 117 Adams CP, Brantner VV. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Aff (Millwood).* 2006; 25: 420–428.
- 118 Sun L, Li H, Willson K, Breidinger S, Rizk ML, Wenning L, Woolf EJ. Ultrasensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometric methodologies for quantification of five HIV-1 integrase inhibitors in plasma for a microdose clinical trial. *Anal Chem.* 2012; 84: 8614–8621.
- 119 Ostenfeld T, Beaumont C, Bullman J, Beaumont M, Jeffrey P. Human microdose evaluation of the novel EP1 receptor antagonist GSK269984A. *Br J Clin Pharmacol.* 2012; 74: 1033–1044.
- 120 Heinig K, Wirz T, Bucheli F, Monin V, Gloge A. Sensitive determination of a pharmaceutical compound and its metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54: 742–749.
- 121 Watanebe Y. Molecular imaging-based early-phase and exploratory clinical research. *YAKUGAKU ZASSHI* (in Japanese): 2013; 132: 187–195.
- 122 http://www.ono.co.jp/jpnw/PDF/n12_1004.pdf. Press release, Ono Pharmaceutical Company, October 4, 2012.
- 123 Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), Japan. Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals (Pharmaceutical and Food Safety Bureau Notification No. 0219).; 2010.

Appendices

Appendix 1. マイクロドース臨床試験導入時の費用効果分析のための調査

アンケートご協力をお願い

マイクロドース臨床試験導入時の費用効果分析のための調査

現在私たちは、医薬品開発にマイクロドース臨床試験を導入することのメリット（成功化合物数の増加）が、導入がもたらすコスト増加に見合っているか否かを評価する費用効果分析を実施しています。

分析の際には、従来型の戦略で開発中止になった化合物が、マイクロドース臨床試験の導入でどの程度中止とならずにすむのかの評価が必要になります。そこで今回、用いる測定手法別、開発中止理由別、フェーズ別にその改善度合いをご回答いただくことで、その度合いをマイクロドース臨床試験導入時の費用効果分析に引用することを目的とした調査を企画致しました。

なお、アンケートの結果につきましては、本研究の目的以外には使用いたしません。

用いる測定手法については、「マイクロドース臨床試験の実施に関するガイダンス」において挙げられている LC-MS/MS, AMS, PET を対象とします。LC-MS/MS を用いることで被験物質のヒトにおける薬物動態、AMS を用いることで薬物動態及び代謝物プロファイル、PET を用いることで被験物質の臓器・組織への分布の情報が得られます。

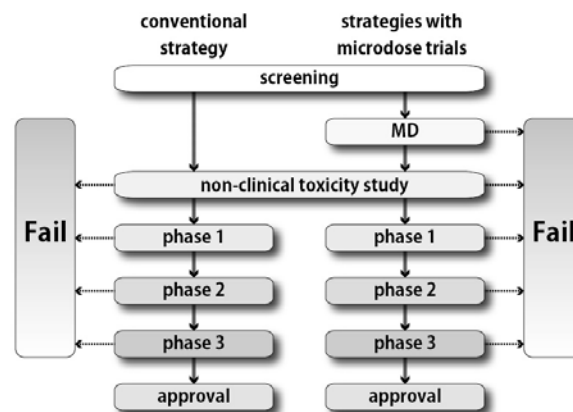
以下に、各フェーズごとの開発中止化合物数を中止理由別に分け、割合を付記した表を添付致しました。11 の理由に分けられていますが、今回は Clinical safety、Efficacy、PK/bioavailability、Toxicology の 4 つの理由のみご回答ください。

Table Survey of reasons for failure of compounds in Development						
	Preclinicalで失敗してPhase IIにいけなかった化合物		Phase Iで失敗してPhase IIにいけなかった化合物		Phase IIで失敗してPhase IIIにいけなかった化合物	
Reason	プロジェクト数に対する割合	数	プロジェクト数に対する割合	数	プロジェクト数に対する割合	数
Clinical safety	0.5%	1	27.9% (*1)	43	13.4% (*1)	17
Efficacy	5.6%	11	17.5%	27	52.0%	66
Formulation	5.1%	10	5.8%	9	1.6%	2
Market potential	6.2%	12	3.9%	6	7.9%	10
PK/bioavailability	11.8%	23	14.9%	23	2.4%	3
Strategic	14.4%	28	12.3%	19	13.4%	17
Resources	1.5%	3	1.3%	2	0.8%	1
Toxicology	44.1%	86	10.4% (*2)	16	2.4% (*2)	3
Cost of goods	1.5%	3	1.3%	2	0.0%	0
Unknown	7.2%	14	1.3%	2	4.7%	6
Other	2.1%	4	3.2%	5	1.6%	2
Number of projects	195		154		127	
Suter, L., Babiss, L.E., and Wheeldon, E.B., Chemistry & Biology, Vol.11, 161-171 (2004).						

*1: 臨床試験において **Clinical safety** が原因で開発中止となった化合物数の、全失敗化合物に対する割合。

*2: 臨床試験開始以降に行われた非臨床毒性試験において **Toxicity** が原因で開発中止となった割合を開発ステージごとに分けて示している。

なお、従来型の医薬品開発戦略及びマイクロドース試験導入型戦略のスキームを右記に示します。
マイクロドース試験は、非臨床毒性試験の前に実施することとします。



ご回答していただく際の考え方

a), b) の 2 つについてご回答下さい。

<例: 手法=MD-LC-MS/MS, 中止理由=PK/bioavailability, 開発フェーズ=Phase I で失敗して Phase II にいけなかった場合の考え方>

Suterらの文献(1 ページ目の表)によれば、「Phase IからPhase II」で開発中止になる化合物数は154 個。そのうち、PK/bioavailability に起因するものは 14.9%で、 $154 \times 0.149 = 23$ 個が該当します。

この 23 個の化合物に関し、以下の 3 つの状況を仮定します。

- 1) 23 個のうち 5 個は、MD 試験を実施しても救出不可能。残り 18 個は MD を入れれば確実に救出できたはず。
- 2) 23 個のうち 5 個は、MD 試験を実施しても救出不可能。残り 18 個は MD を入れれば 50%程度の確率で救え
たかもしれない。
- 3) 23 個のうち 5 個は、MD 試験を実施しても救出不可能。残り 18 個については MD で救出できた可能性がわ
ずかながら (10%) ある。

a) については、以下のようにお考えください。

手法に LC-MS/MS を用いることで、「MD 試験で救える可能性が 1%でもあれば、『可能性あり』として、算入。MD 試験ではどうあがいても救えないもののみ、除外」します。

上の 3 つの例では、5 個は無理ですが、残り 18 個については救える可能性が「ゼロではない」ので、カウントされます。ですから、3 つとも $18/23 = 80\%$ になります。

b) については、以下のようにお考えください。

a) でカウントされた、MD 臨床試験で救える可能性が 1%でもある化合物について、「救える可能性がいくらか？」をお考えください。

可能性がゼロではない 18 個のうち、1) では 100%、2)では 50%、3) では 10%の救出確率を見込んでいます。b)には、この $100\% \cdot 50\% \cdot 10\%$ の値をそのまま記入して下さい。

設問

3つのフェーズ(非臨床毒性試験で失敗して Phase I にいけなかった段階、Phase I で失敗して Phase II にいけなかった段階、Phase II で失敗して Phase III にいけなかった段階)において、各理由で開発中止となっている化合物がマイクロドーズ臨床試験を実施することで、どの程度救えることができ、また、その救出成功率はどれくらいだと考えられますか。用いる測定手法別、開発中止理由別、フェーズ別に、感覚的なご意見で構いませんので、各欄に 0%から 100%(10%刻みで)をご記入ください。

a):MD 試験で救える可能性が少しでもある化合物の、該当箇所での全失敗化合物に対する割合

b):a)にカウントされた化合物を、救出できる確率

1. LC-MS/MS を測定手法に用いた場合

各欄に 0%から 100%(10%刻みで)をご記入ください。

開発中止理由		前臨床毒性試験で失敗して Phase I にいけなかった段階	Phase I で失敗して Phase II にいけなかった段階	Phase II で失敗して Phase III にいけなかった段階
Clinical safety	a	% (*1)	% (*2)	% (*2)
	b	% (*1)	% (*2)	% (*2)
Efficacy (*4)	a	%	%	%
	b	%	%	%
PK/bioavailability	a	%	%	%
	b	%	%	%
Toxicology (*4)	a	%	% (*3)	% (*3)
	b	%	% (*3)	% (*3)

*1: 前臨床毒性試験において動物や人のオルガネラ、細胞などを使う実験をし、ヒトでの安全性について疑いを持った場合、先行品のヒトにおける副作用があきらかになり、同様の疑いが生じた場合などを想定

*2: 臨床試験において Clinical safety が原因で開発中止となったもの

*3: 結果を得るのに時間がかかる非臨床毒性試験（遺伝毒性試験など）の結果が、臨床試験開始以降に得られ、Toxicity が原因で開発中止となったもの

*4: これらの理由で開発中止となった化合物は、PK 要因も一定割合含まれる可能性があるとしてお考えください。(非標識体化合物投与の MD 試験において得られた PK の情報によって、これらの理由で開発中止となる化合物を救える場合もあり得ると想定)

2. AMS を測定手法に用いた場合

各欄に 0%から 100% (10%刻みで) をご記入ください。

開発中止理由		前臨床毒性試験で失敗して Phase I にいけなかった段階	Phase I で失敗して Phase II にいけなかった段階	Phase II で失敗して Phase III にいけなかった段階
Clinical safety	a	% (*1)	% (*2)	% (*2)
	b	% (*1)	% (*2)	% (*2)
Efficacy (*4)	a	%	%	%
	b	%	%	%
PK/bioavailability	a	%	%	%
	b	%	%	%
Toxicology (*4)	a	%	% (*3)	% (*3)
	b	%	% (*3)	% (*3)

*1: 前臨床毒性試験において動物や人のオルガネラ、細胞などを使う実験をし、ヒトでの安全性について疑いを持った場合、先行品のヒトにおける副作用があきらかになり、同様の疑いが生じた場合などを想定

*2: 臨床試験において **Clinical safety** が原因で開発中止となったもの

*3: 結果を得るのに時間がかかる非臨床毒性試験（遺伝毒性試験など）の結果が、臨床試験開始以降に得られ、**Toxicity** が原因で開発中止となったもの

*4: これらの理由で開発中止となった化合物は、PK 要因も一定割合含まれる可能性があるとしてお考えください。（標識体化合物投与の MD 試験において得られた PK の情報によって、これらの理由で開発中止となる化合物を救える場合もあり得ると想定）

3. PET を測定手法に用いた場合

各欄に 0%から 100% (10%刻みで) をご記入ください。

開発中止理由		前臨床毒性試験で失敗して Phase I にいけなかった段階	Phase I で失敗して Phase II にいけなかった段階	Phase II で失敗して Phase III にいけなかった段階
Clinical safety	a	% (*1)	% (*2)	% (*2)
	b	% (*1)	% (*2)	% (*2)
Efficacy	a	%	%	%
	b	%	%	%
PK/bioavailability	a	%	%	%
	b	%	%	%
Toxicology	a	%	% (*3)	% (*3)
	b	%	% (*3)	% (*3)

*1: 前臨床毒性試験において動物や人のオルガネラ、細胞などを使う実験をし、ヒトでの安全性について疑いを持った場合、先行品のヒトにおける副作用があきらかになり、同様の疑いが生じた場合などを想定

*2: 臨床試験において **Clinical safety** が原因で開発中止となったもの

*3: 結果を得るのに時間がかかる非臨床毒性試験（遺伝毒性試験など）の結果が、臨床試験開始以降に得られ、**Toxicity** が原因で開発中止となったもの

ご回答者氏名 _____

以上、御協力ありがとうございました

Appendix 2. マイクロドース臨床試験導入時の費用効果分析のための調査結果

表 マイクロドース臨床試験による移行確率改善についての調査結果 (n=8)。データは、開発中止理由別、フェーズ別、測定法別に MD 導入型戦略において期待できる改善率を示す。

開発中止理由		前臨床毒性試験 から			フェーズ 1 から			フェーズ 2 から		
		フェーズ 1			フェーズ 2			フェーズ 3		
LCMSMS										
安全性	a ^{*1}	13	±	7	25	±	13	18	±	24
	b ^{*2}	20	±	18	26	±	16	15	±	19
	axb	3	±	3	8	±	7	6	±	8
有効性	a ^{*1}	21	±	8	29	±	22	15	±	21
	b ^{*2}	35	±	19	33	±	16	15	±	19
	axb	8	±	6	11	±	12	5	±	7
薬物動態/バイオアベイラビリティ	a ^{*1}	71	±	11	59	±	27	30	±	29
	b ^{*2}	74	±	19	51	±	28	26	±	29
	axb	53	±	17	33	±	22	13	±	17
毒性	a ^{*1}	24	±	20	11	±	6	5	±	5
	b ^{*2}	29	±	25	11	±	8	5	±	5
	axb	11	±	19	2	±	2	1	±	1
AMS										
安全性	a ^{*1}	33	±	17	423	±	20	28	±	23
	b ^{*2}	35	±	18	36	±	21	3	±	27
	axb	13	±	9	16	±	10	10	±	9
有効性	a ^{*1}	23	±	7	33	±	22	19	±	22
	b ^{*2}	36	±	20	31	±	15	18	±	18
	axb	9	±	6	11	±	10	6	±	8
薬物動態/バイオアベイラビリティ	a ^{*1}	71	±	11	65	±	24	35	±	28
	b ^{*2}	79	±	16	61	±	24	26	±	28
	axb	56	±	14	43	±	25	13	±	16
毒性	a ^{*1}	40	±	23	30	±	14	15	±	14
	b ^{*2}	40	±	21	28	±	14	10	±	11
	axb	19	±	20	8	±	6	2	±	3
PET										
安全性	a ^{*1}	48	±	19	40	±	20	28	±	23
	b ^{*2}	41	±	15	39	±	11	36	±	31
	axb	22	±	11	15	±	8	14	±	17
有効性	a ^{*1}	58	±	21	50	±	19	39	±	22
	b ^{*2}	51	±	21	50	±	17	45	±	33
	axb	32	±	18	25	±	12	19	±	13
薬物動態/バイオアベイラビリティ	a ^{*1}	48	±	25	44	±	22	26	±	21
	b ^{*2}	61	±	30	53	±	26	36	±	31
	axb	31	±	23	22	±	11	8	±	6
毒性	a ^{*1}	35	±	15	30	±	18	20	±	15
	b ^{*2}	40	±	19	29	±	16	19	±	16
	axb	15	±	10	9	±	6	5	±	4

^{*1} MD臨床試験によって得られたデータを元に候補化合物を選択することで開発中止となった化合物を救うことができる最大値 (%)

^{*2} MD臨床試験による改善の可能性の値 (%)

Appendix 3. 感度分析結果

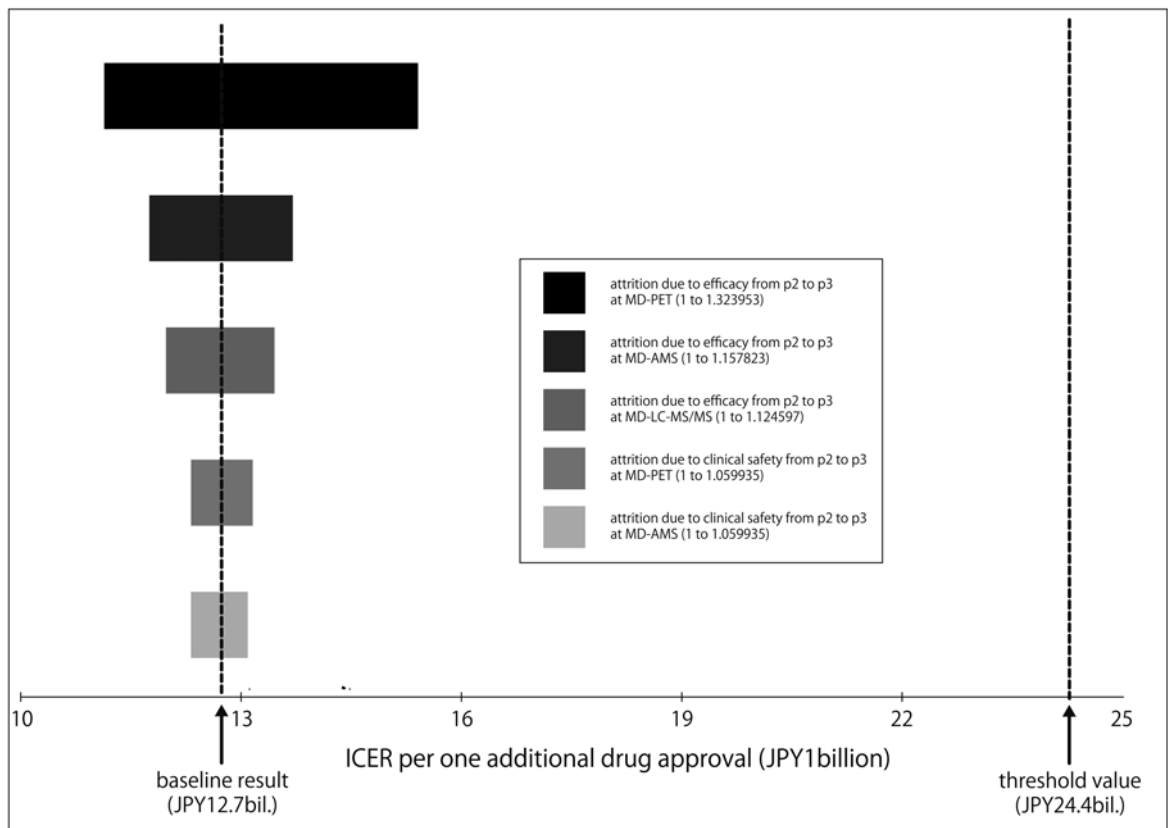


図 1 ICER に影響を及ぼす移行確率における改善率を変動させたときの一次元感度分析の結果をトルネードダイアグラムに示す（シナリオ IV）。他の改善率は、ICER にほとんど影響がなかった。

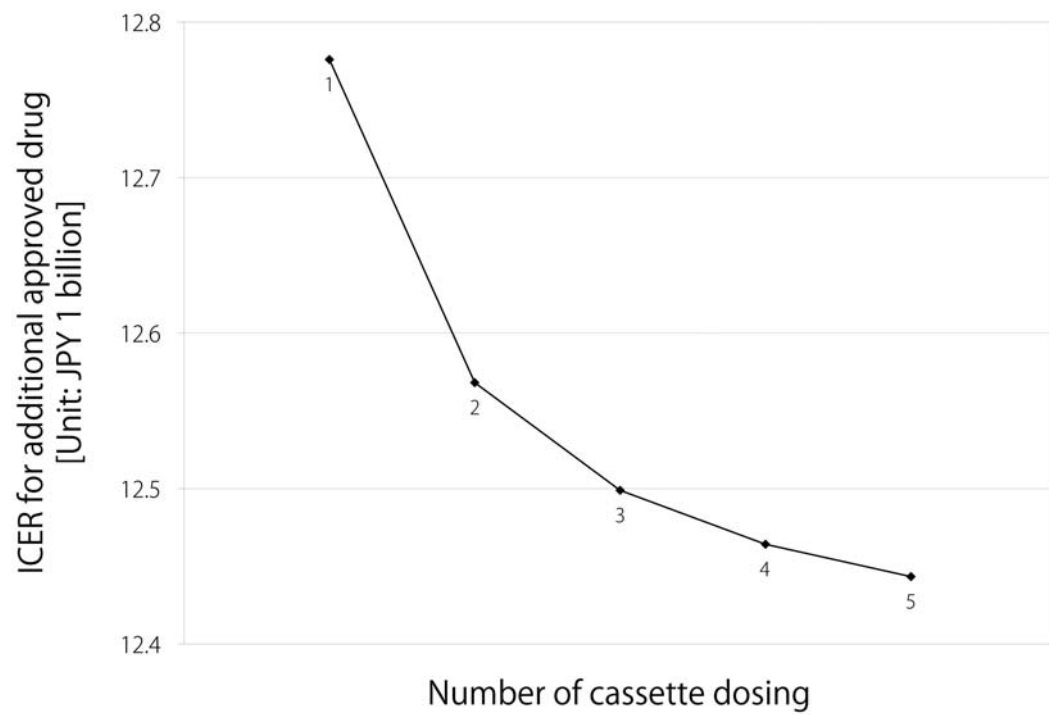


図2 MD-LC-MS/MS のカセットドージングにおける候補化合物数による感度分析

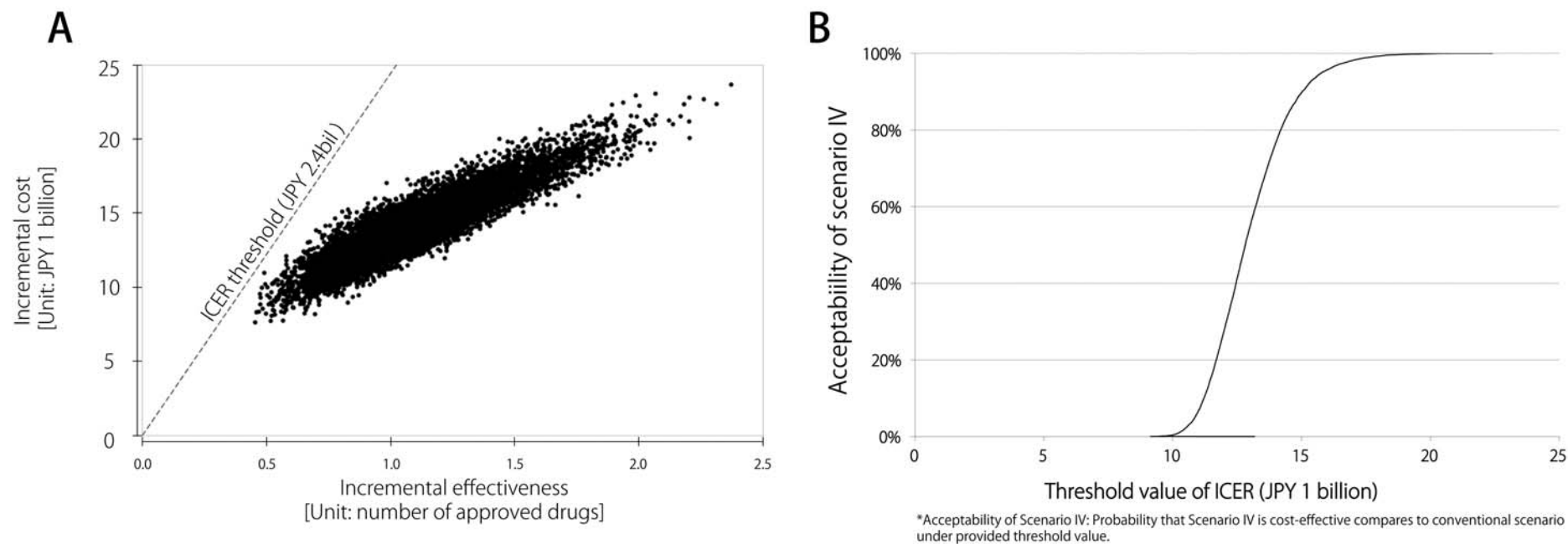


図3 シナリオ IV における確率感度分析からの費用と効果の Scattered plot (A) 及び費用対効果のための許容曲線 (B)

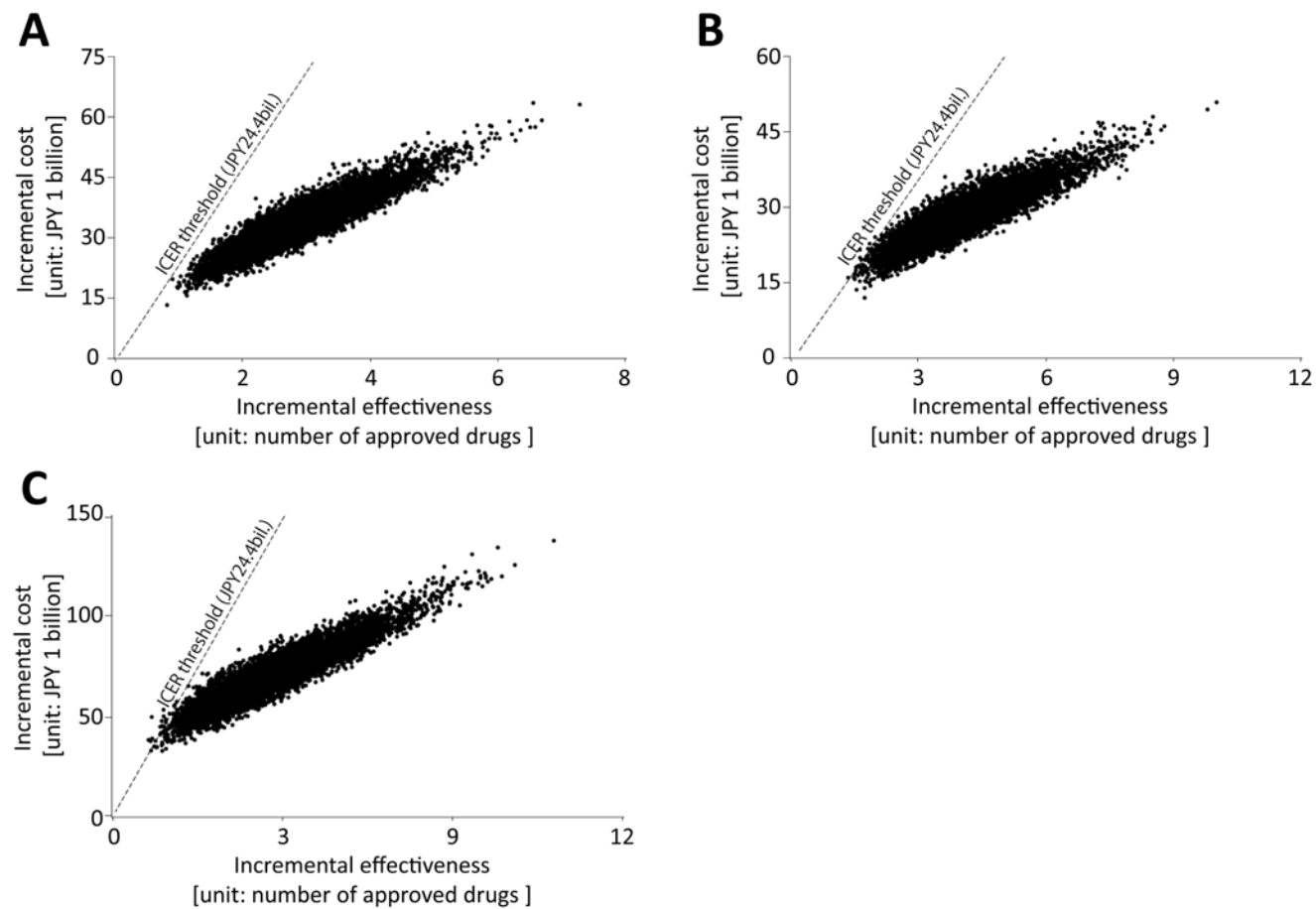


図4 MD-LC-MS/MS (シナリオI、A)、MD-AMS (シナリオII、B)、MD-PET (シナリオIII、C) における確率感度分析からの費用と効果の差分の Scattered plot