◇◇北川賞受賞論文◇◇

薬物動態に基づく医薬品の安全性評価研究の推進

野口 英世, 徳間 洋二*

Toxicology Support ADME Studies for Safety Evaluation of New Chemical Entity

Hideyo NOGUCHI and Yoji TOKUMA*

ADME/TOX Research Institute, Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo;

**Reserch Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka*

Summary: The objectives of pharmacokinetics and metabolic studies in drug safety evaluation is the drug absorption, the duration of drug exposure and the effects of multiple dose regimen on the pharmacokinetics in test animal species. There are many examples of drug to show little or no toxic event at extremely high dose level, which originate in low absorption or low bioavailability of the drug. A complicating situation can arise when the pharmacokinetic profile of the drug changes during repeated dosing due to such factors as enzyme induction, saturation of metabolism, accumulation of drug in the tissue, and renal excretion process. The toxic effect could also changed their pharmacokinetics during a toxicity testing. It is important to monitor a drug level during the toxicity testing. When toxicity cause depends on toxic metabolites or reactive intermediates, the plasma concentration of unchanged drug are difficult to correlate to the toxic effect. It is indispensable to evaluate the metabolic pathways and metabolic clearance of a drug under similar conditions of toxicity testing. These data may be useful for the interpretation of toxicological finding and their relevance to clinical safety evaluation.

Stereoselective pharmacokinetics and metabolic studies should be evaluated because of differences on the pharmacokinetics and metabolism of each enantiomer. Most of dihydropyridine calcium antagonists have one or more chiral centre, and the pharmacological activity between the enantiomers for these drug is known to be markedly different. The stereoselective pharmacokinetics of these drugs in animals, healthy subjects and patients should evaluated during the development process. Enantiomer-enantiomer interaction, enantiomeric inversion and the stereochemical aspects of pharmacokinetic drug interactions in these drugs should also be studied.

Key words: Toxicokinetics, Toxicity testing, Metabolism studies in human, Stereoselective metabolism, Racemic drugs

はじめに

新規化合物の薬理・毒性試験からヒトにおける安全性および有効性を予測するうえで薬物動態のデータが有用であることは広く知られている。我々は約30年間にわたって新医薬品開発における薬物動態研究を動物からヒトへの安全性の予測と位置付けて取り組んできた。薬物動態研究は生体成分中の微量薬物を定量的に測定することによって成り立つ研究であり、その研究には分析化学の進歩が不可欠であった。当初は放射性同位元素標識薬物を用いたマスバランス試験を中心に研究を進めてきたが、ガスクロマトグラフ/マススペクトロメトリー

(GC/MS) が定量分析に応用可能であることが明らかとなり、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) が定量分析のツールとして実用段階に入った1970年代後半からは毒性試験に用いる動物種の選択や毒性試験投与量の設定に血中薬物濃度を測定し、反復投与毒性試験において血中薬物濃度を測定してきた^{1,2)}。その経験から新薬の安全性を定量的に評価するためにトキシコキネティクスの考え方を導入する必要があることを提言してきた^{3,4)}。

多くの薬物は原薬が薬効・毒性を有しているが、代謝物が作用を有していることもある。なかでも化学構造に不斉原子を有するラセミ薬物はエナンチオマー間で薬効・毒性が異なり、医薬品としての評価方法が複雑にな

第一化学薬品株式会社 薬物動態研究所 〒103-0004 東京都中央区東日本橋 2-8-3

* 藤沢薬品工業株式会社 大阪支店 SAS 担当 〒541-0045 大阪市中央区道修町 3-4-7

る。我々はラセミ薬として開発された1,4-ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬 nilvadipine の立体選択的薬物動態を解明し、動物とヒトの薬物動態学的比較を行うことによって、動物での薬効・毒性評価からヒトでの臨床使用の妥当性を説明するための薬物動態学的評価を確立した^{5,6)}。その過程で肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 試験がヒトにおける *in vivo* での立体選択的代謝の予測に有用であることも示した^{7,8)}。

医薬品の安全性評価におけるトキシコキネティクスの役割

医薬品は典型的な毒物とは異なり低毒性化合物であることが多く、新薬開発の過程で行う毒性試験において明らかな毒性が認められないことがある。そのため、非生理的な高投与量での試験を行うことになる。しかし、被験薬の物性によっては投与部位からの吸収が悪かったり、高投与量では吸収が飽和して作用部位での薬物濃度が予想したほど高くないために毒性所見が得られず、投与量と毒性の相関性が悪いことがある。また、初回通過効果を受ける化合物は高投与量で代謝が飽和して作用部位での濃度が予想より高くなり、高投与量で排泄が飽和する薬物では作用部位の薬物濃度が高濃度で持続して思わぬ毒性が現われることがある。Fig. 1 に無作為に抽出した20化合物のラットにおける C_{max} と AUC に対する投与量との関係を示したが、白丸で示した3薬物以外の C_{max} は全て高投与量で飽和した。また、AUC は7化合物が高投与量で飽和する傾向を示したが、点線で示した化合物の様に高投与量での AUC が大

きな値を示すものもある。このように毒性試験の投与量では薬物動態が非線形であることが多いので、あらかじめ単回投与での血漿中濃度を測定して毒性試験に用いる投与量を設定する必要がある¹⁾。

投与量と血漿中薬物濃度の関係は動物種によっても異なることがある。Fig. 2 に示した化合物はスクリーニングとして行った2週間反復毒性試験においてラットでの無毒性量が32 mg/kg、イスでは100 mg/kg であり、毒性に種差があるように見えた。しかし、無毒性投与量での血漿中濃度はラット、イスともに同程度であり、本剤がほとんど代謝を受けないことから、吸収の飽和が動物種の間で異なることによると考えられた。これらの試験はラットは被験薬を0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁して投与し、イスには原末をカプセルに充填して投与したので、血漿中濃度の種差と見える現象は投与剤型の差に依存していることも考えられる。いずれにしても、試験に用いる総ての動物種について毒性試験投与量での薬物動態を検討しておく必要がある³⁾。

ラセミ体で開発された nilvadipine は S(+)-体が薬効に寄与し、R(−)-体は寄与しないが、両者の急性毒性には差が認められなかった。また、本剤はラセミ体として開発されることから毒性試験はラセミ体で評価した。ラットでは rac-nilvadipine は初回通過効果を受けるので経口投与後の nilvadipine の血漿中濃度は低いが、低投与量での吸収は良好であった。しかし、水に対する溶解度が低いために懸濁液や原末をカプセルに充填して経口投与しても血漿中濃度は高くならず、毒性試験に用いる投与形態には種々の工夫が必要があった。そこで各種

Fig. 1 C_{max} (left) and AUC (right) after oral dosing of various new chemical entities in rats

Fig. 2 Plasma concentration of a new chemical entity after oral dosing to male rats (left) and male beagle dog (right)

Fig. 3 Serum concentration of tiaramide during 12 M chronic toxicity study of tiaramide hydrochloride in cynomolgus monkeys

投与形態での血漿中濃度を測定して試験に用いる剤型を選択し、ラットでは被験薬をポリエチレングリコール 400 (PEG400) に溶解または懸濁して投与し、イヌには PEG400 に溶解した溶液をソフトカプセルに充填した製剤、または固体分散体制剤をゼラチンカプセルに充填して投与して毒性試験を行い、がん原性試験では固体分散体制剤を混餌投与するなど、薬物体内負荷量を高くすることに留意しながら開発を進めた。

一般に毒性試験は反復投与で行われるが、薬物を高投与量で反復投与すると酵素誘導によって薬物の血中濃度

が低下したり、自己阻害や代謝物による阻害作用によって血中濃度が上昇して安全性評価を誤ることが危惧される⁴⁾。我々はサルにおける抗炎症薬 tiaramide hydrochloride の 1 年の慢性毒性試験において血清中濃度を測定し、試験中の薬物負荷が安定していることを証明し、無毒性量での血清中濃度をヒトでの血清中濃度と比較して本剤の安全性を評価した²⁾ (Fig. 3)。

これらの経験から開発の初期段階に毒性試験に用いる動物で血漿中濃度を測定し、2 週間投与の予備反復投与毒性試験で血漿中濃度を測定し、投与量と血漿中濃度の

Fig. 4 Metabolic pathways of tiaramide in experimental animals and human

関係や薬効を発現することが期待される血漿中濃度などを考慮して本試験の投与量を設定し、本試験では血漿中濃度をモニターして毒性所見との関係を考察し、無毒性血漿中濃度を推定しながら開発を進めるプログラムを確立した。

Tiaramide の代謝経路は動物種間で量的な差があったので^{9,10)}、長期投与毒性試験では尿中代謝物を測定して試験期間中に代謝経路が変化しなかったことを確認し、原薬とは異なった物性を有する代謝物、DETR (Fig. 4) については試験中の血清中濃度も測定した²⁾。

しかし、その後の代謝物検索において^{11,12)}ヒトでは動物の尿中に存在しない代謝物、TRAO (Fig. 4) が見い出されたために安全性評価は複雑になった¹³⁾。幸いこの代謝物は毒性が弱く、体内からの消失も速やかであったので、ヒトでの安全性を損なうものではないと判断できた。このようにヒト特有の代謝物が存在する場合には動物を用いた毒性試験はヒトでの安全性をカバーできなくなる。これは動物を用いた安全性評価の限界を示すものであり、開発の早い段階で評価に用いる動物での代謝とヒトでの代謝を比較する必要がある。このような代謝物の存在を知るためにはヒトと動物の組織を用いた *in vitro* での代謝試験が有用と思われる。

ラセミ医薬品の開発研究における非臨床評価の目標

初期の 1,4-ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬は nifedipine のように 3,5-位に対称構造のエステルを有する化合物が中心であったが、開発の興味がより活性の強い非対称構造の薬物へと向かい、nitrendipine や nicar-

Fig. 5 Oxidation of nilvadipine to its corresponding pyridine analogue

dipine のように血管拡張作用が強く、作用持続の長い薬物の開発が進められた。したがって新しい 1,4-ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬を開発するためには立体選択的薬物動態の研究とヒトでの薬効・毒性を予測するための薬物動態の種差の研究が必須であった。Nilvadipine は 4 位に不斉炭素有して 2 種のエナンチオマーが存在するが (Fig. 5)、S(+)-体は R(-)-体に比べてイヌの摘出冠動脈弛緩作用が約 160 倍強く、イヌを用いた *in vivo* での冠動脈血流増加作用や冠血管抵抗減少作用も約 200 倍強く、本剤の薬効は S(+)-体に依存すると考えられた。

本剤の開発に着手した 1980 年前後には数多くの 1,4-ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬が開発されていたが、いずれもエナンチオマーを分離した定量法や立体選択的薬物動態は報告されていなかった。Nilvadipine はラセミ体で開発を開始したので毒性学的評価はラセミ体の血漿中濃度を指標として開発を進め、開発初期の薬物動態試験もラセミ体で検討した¹⁴⁻¹⁶⁾。しかし、エナンチオマー間で薬理活性が異なったので、ヒトでの薬効を予測するためのモデル動物を選択するためにはエナンチ

オマーの体内動態を解明する必要があると考えた。

ヒトでは数 ng/ml の血漿中濃度で薬効を発現する nilvadipine の開発では、まず血漿中 nilvadipine の超微量定量分析法を開発することが必須であった。我々は化学イオン化質量分析法において負イオンを検出するキャピラリー GC/MS 法を開発し、1 ml の血漿を用いて 10 pg/ml の nilvadipine を測定するのに成功した¹⁷⁾。この方法は類薬でも注入量あたり 0.5~5 pg の感度を有しており応用範囲の広い方法であった¹⁸⁾。さらに汎用的な方法としてキャピラリー GC 法でも 100 pg/ml の定量分析を可能とし¹⁹⁾、これらの方法を用いてヒトでの薬物動態を明らかにした²⁰⁻²²⁾。ついでキラルな固定相を用いた HPLC 法でエナンチオマーの分離に成功し、分離したエナンチオマーを GC/MS で定量してヒトでは nilvadipine の薬効を担う S(+)-体の血漿中濃度が R(-)-体より高いことを見出した^{23,24)}。これらの研究を契機に開発された新しいキラルカラムを用いた HPLC 法においてエナンチオマーの分離分析も可能となった (Table I)。

Table I Determination of rac-, S(+)-and R(-)-nilvadipine in plasma

Method	Chiral or Achiral	Sensitivity	References
Capillary GC-ECD	Achiral	100 pg/ml	19
Capillary GC/NICI-MS	Achiral	10 pg/ml on column 500 fg at S/N=5	17, 18
Chiral HPLC and off-line capillary GC/NICI-MS	Chiral	25 pg/ml	23
Chiral HPLC	Chiral	1 ng/ml	26

動物にラセミ体として投与した nilvadipine の血漿中濃度をエナンチオマーに分離して測定し、S(+)-体と R(-)-体の濃度が雄性ラットでは S(+)<R(-)、雌性ラットでは S(+)=R(-)、イヌでは S(+)>R(-) と種差があり、ラットでは性差も認められることを明らかにした²⁵⁾ (Table II)。また、体内ではエナンチオマー間の変換が起こらないことも確認した²⁶⁾ (Fig. 6)。

一方、ヒトの血漿中濃度は S(+)>R(-) であり^{23,24)} (Fig. 7)、nilvadipine の立体選択的薬物動態はイヌに類似していると考えた。これらの研究から nilvadipine の開発は主としてイヌを用いた薬理試験からヒトでの薬効発現用量を予測して進めた。

さらにヒトではエナンチオマーの濃度比に個人差が少なく、反復投与によっても変化しないことを確認し、立体選択的薬物動態の個人差による薬効の差は少ないと判断した²²⁾ (Table III)。

Nilvadipine 代謝の最初のステップはジヒドロピリジン環が酸化的にピリジン環に代謝される反応であり²⁷⁾ (Fig. 5)、肝ミクロゾームを用いた nilvadipine 代謝における $V_{\max}/K_m$ 値の S(+)/R(-) 比は雄性ラットでは 1.59、雌性ラットでは 1.23、雄性イヌでは 0.69⁸⁾、ヒトでは 0.43~0.54⁷⁾ であり (Table IV)、*in vivo* においてイヌやヒトの血漿中 S(+)-体濃度が高いのは代謝クリアランスを反映したものであると推定した。

この研究は代謝に関与する酵素系が明らかになると、ヒト肝を用いた *in vitro* 試験からヒトの *in vivo* での代謝速度を予測することが可能であることを示したものであり、新医薬品の開発過程において非臨床段階から臨床段階に移行する際にヒト組織を用いた *in vitro* 試験が有用であることを示唆している。

Table II Pharmacokinetic parameters of S(+)-and R(-)-nilvadipine after oral administration of rac-nilvadipine

Species	Dose		$C_{\max}$ (ng/ml)	$t_{\max}$ (h)	AUC (ng·h·ml)	CL_0 (ml/min·kg)	$t_{1/2}$ (h)
Man	6 mg	S(+)-Nilvadipine	4.11±1.41	1.0±0.0	11.8±2.3	75.5±12.2	4.21±0.53
		R(-)-Nilvadipine	1.52±0.53	1.0±0.0	3.95±0.87	229±36	3.58±0.21
		S(+)/R(-) ratio	2.78±0.28	1.0±0.0	3.07±0.30	0.34±0.04	1.16±0.09
Dog	1 mg/kg	S(+)-Nilvadipine	102±23	0.5±0.0	392±50	22.1±2.3	6.46±1.01
		R(-)-Nilvadipine	34.6±9.1	0.5±0.0	105±16	84.8±12.1	7.44±0.87
		S(+)/R(-) ratio	3.13±0.32	1.0±0.0	3.83±0.35	0.27±0.03	0.85±0.05
Male rat	10 mg/kg	S(+)-Nilvadipine	14.1	0.5	24.8	3360	—
		R(-)-Nilvadipine	23.6	0.25	41.8	1990	—
		S(+)/R(-) ratio	0.60	2.0	0.59	1.69	—
Female rat	10 mg/kg	S(+)-Nilvadipine	144	0.25	264	316	2.78
		R(-)-Nilvadipine	159	0.25	276	302	2.87
		S(+)/R(-) ratio	0.91	1.0	0.96	1.05	0.97

Values are means±S.E. (n=4)

—: not determined

Fig. 6 Plasma concentration of S(+)- and R(-)-nilvadipine after oral dose of *rac*-, S(+)- and R(-)-nilvadipine to male beagle dogs (n=6)

Fig. 7 Plasma concentration of S(+)- and R(-)-nilvadipine in three healthy subjects given a 4 mg oral dose of *rac*-nilvadipine

Table III Plasma concentration of S(+)- and R(-)-nilvadipine at the time to reach the maximum concentration of *rac*-nilvadipine in six subjects after single or multiple oral doses

Subject	After single dose			After the last dose of multiple doses		
	S(+)-Nilvadipine (ng/ml)	R(-)-Nilvadipine (ng/ml)	S/R Ratio	S(+)-Nilvadipine (ng/ml)	R(-)-Nilvadipine (ng/ml)	S/R Ratio
1	1.09	0.573	1.90	1.39	0.723	1.92
2	1.01	0.324	3.12	2.18	0.793	2.75
3	1.39	0.455	3.04	2.86	1.02	2.80
4	3.40	1.95	1.74	2.52	1.20	2.10
5	2.94	1.42	2.07	2.54	0.907	2.80
6	1.33	0.376	3.54	2.57	0.827	3.11
Mean±SD	1.86 1.03	0.850 0.674	2.57 0.76	2.34 0.51	0.912 0.174	2.58 0.46

Table IV Kinetic parameters for oxidation reaction of S(+)- and R(-)-nilvadipine to its pyridine analogue by liver microsomes

Species		$V_{\max}$ (nmol/mg protein · min)	K_m (μ M)	$V_{\max}/K_m$ (ml/mg protein · min)	S/R ratio for $V_{\max}/K_m$
Man (A, B, C)	S(+)-Nilvadipine	0.927, 0.423, 4.71	19.6, 40.6, 32.7	0.0473, 0.0104, 0.144	0.49 ± 0.30
	R(-)-Nilvadipine	0.996, 0.392, 4.46	10.5, 16.1, 16.8	0.0949, 0.0243, 0.265	(0.50, 0.43, 0.54)
Dog	S(+)-Nilvadipine	3.02 ± 0.15	21.9 ± 1.3	0.139 ± 0.012	0.69 ± 0.2
	R(-)-Nilvadipine	2.45 ± 0.15	12.2 ± 0.1	0.201 ± 0.012	
Male rat	S(+)-Nilvadipine	7.48 ± 0.29	11.2 ± 0.2	0.668 ± 0.021	1.59 ± 0.12
	R(-)-Nilvadipine	3.37 ± 0.04	8.06 ± 0.72	0.426 ± 0.041	
Female rat	S(+)-Nilvadipine	0.392 ± 0.017	2.99 ± 0.16	0.131 ± 0.003	1.23 ± 0.10
	R(-)-Nilvadipine	0.222 ± 0.020	2.10 ± 0.28	0.108 ± 0.009	

Values are individual for mean for mean or means ± S.E. for dogs and rats (n=3)

おわりに

我々は早くから医薬品の安全性評価におけるトキシコキネティクスの重要性を認識して新医薬品の開発を進め、その重要性を具体的に提言して新医薬品の評価に組み入れるのに成功した。さらに、トキシコキネティクスを単に毒性試験における薬物負荷の説明に終わらせるのではなく、ヒトと動物の薬物動態を詳細に比較することによって代謝物も含めた総合的な安全性評価を進めることができることを示してきた。また、ラセミ薬の開発においては高精度/高感度のエナンチオマー分離定量法を開発し、エナンチオマーの体内動態を解明してラセミ薬の評価法を確立し、薬物動態試験が医薬品の薬効評価のみならず、安全性評価においても重要な役割を演じなければならないことを示した。

謝 辞：本研究は藤沢薬品工業株式会社研究開発部門において長年にわたって行った研究の一部であり、研究にご協力頂いた多数の方々に深謝いたします。

文 献

- Noguchi, H.: Toxicokinetics as part of the safety evaluation of new pharmaceuticals under development, *J. Toxicol. Sci.*, **16**, (suppl. II): 103-106 (1991).
- 野口英世：毒性試験における薬物動態，薬物動態，**7**: 376-381 (1992).
- 野口英世：トキシコキネティクスの毒性評価への応用，中毒研究，**6**: 221-226 (1993).
- 野口英世：薬物動態とトキシコキネティクス，ファルマシア，**30**: 619-621 (1994).
- 野口英世：ラセミ薬物の体内動態と薬効・毒性とのかかわり，原 昭二，古賀憲司，首藤紘一（編）：モレキュラー・キラリティ，化学増刊，**123**: 133-138 (1993).
- Tokuma, Y., Noguchi, H.: Stereoselective pharmacokinetics of dihydropyridine calcium antagonists, *J. Chromatog. A*, **694**: 181-193 (1995).
- Niwa, T., Tokuma, Y., Nakagawa, K., Noguchi, H., Yamazoe, Y., Kato, R.: Stereoselective oxidation and plasma protein binding of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in man, *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, **60**: 161-172 (1988).
- Niwa, T., Tokuma, Y., Nakagawa, K., Noguchi, H.: Stereoselective oxidation of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in rat and dog liver, *Drug Metab. Disp.*, **17**: 64-68 (1989).
- Noguchi, H., Okui, M., Noda, K., Kato, R.: Disposition and metabolic fate of tiaramide hydrochloride, a new anti-inflammatory agent, in the rat, *Xenobiotica*, **7**: 491-503 (1977).
- Noguchi, H., Okui, M., Noda, K., Sugiura, M., Tanaka, Y., Kato, R.: Species differences in metabolism of tiaramide hydrochloride, a new anti-inflammatory agent, *Xenobiotica*, **7**: 505-516 (1977).
- Lockley, W. J. S., Mead, B., Plumb, A. P., Smith, D. A., Iwasaki, K., Suzuki, A., Tada, K., Noguchi, H.: Sex differences in the conjugation of tiaramide by CR/CD and JCL/SD strains of albino rat, *Biochem. Pharmacol.*, **31**: 2433-2435 (1982).
- Iwasaki, K., Shiraga, T., Noda, K., Tada, K., Noguchi, H.: Terminal N-sulphoconjugation of an alicyclic amine (piperazine), identified as a new metabolite of tiaramide in mouse and rat, *Xenobiotica*, **13**: 273-278 (1983).
- Noguchi, H., Tada, K., Iwasaki, K.: Urinary metabolite profile of tiaramide in man and in some animal species, *Xenobiotica*, **12**: 211-220 (1982).
- Tokuma, Y., Fujiwara, T., Noguchi, H.: Absorption distribution and excretion of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in rats and dogs, *Xenobiotica*, **17**: 1341-1349 (1987).
- Terashita, S., Tokuma, Y., Fujiwara, T., Shiokawa, Y., Okumura, K., Noguchi, H.: Metabolism of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in rats and dogs, *Xenobiotica*, **17**: 1415-1425 (1987).
- Tokuma, Y., Sekiguchi, M., Niwa, T., Noguchi, H.: Pharmacokinetics of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in mice, rats, rabbits and dogs, *Xenobiotica*, **18**: 21-28 (1988).
- Tokuma, Y., Fujiwara, T., Noguchi, H.: Determination of nilvadipine in human plasma by capillary column gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, **345**: 51-58 (1985).
- Tokuma, Y., Fujiwara, T., Noguchi, H.: Combined capillary column gas chromatography/electron capture negative

- ion chemical ionization mass spectrometry of dihydropyridine calcium antagonists, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **13**: 251-255 (1986).
- 19) Tokuma, Y., Fujiwara, T., Sekiguchi, M., Noguchi, H.: Determination of nilvadipine in plasma and urine by capillary column gas chromatography with electron-capture detection, *J. Chromatogr.*, **415**: 156-162 (1987).
- 20) Terakawa, M., Tokuma, Y., Shishido, A., Noguchi, H.: Pharmacokinetics of nilvadipine in healthy volunteers, *J. Clin. Pharmacol.*, **27**: 111-117 (1987).
- 21) Terakawa, M., Tokuma, Y., Shishido, A., Yasuda, K., Noguchi, H.: Effect of two different meals on bioavailability of nilvadipine in healthy volunteers, *J. Clin. Pharmacol.*, **27**: 293-296 (1987).
- 22) Terakawa, M., Tokuma, Y., Kuwahara, N., Shishido, A., Noguchi, H.: Multiple-dose pharmacokinetics of nilvadipine in healthy volunteers, *J. Clin. Pharmacol.*, **28**: 350-355 (1988).
- 23) Tokuma, Y., Fujiwara, T., Noguchi, H.: Determination of (+)- and (-)-nilvadipine in human plasma using chiral stationary-phase liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, and a preliminary pharmacokinetic study in humans, *J. Pharm. Sci.*, **76**: 310-313 (1987).
- 24) Tokuma, Y., Fujiwara, T., Noguchi, H.: Plasma levels of (+)- and (-)-nilvadipine after oral dosing with racemic ($\pm$)-nilvadipine in man, *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, **57**: 229-237 (1987).
- 25) Tokuma, Y., Fujiwara, T., Niwa, T., Hashimoto, T., Noguchi, H.: Stereoselective disposition of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, in the rat and dog, *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, **63**: 249-262 (1989).
- 26) 中川喜久子, 丹羽俊朗, 橋本知子, 戸塚善三郎, 徳間洋二, 野口英世: 薬物動態, **3**: 594 (1988).
- 27) Niwa, T., Tokuma, Y., Noguchi, H.: Oxidation of nilvadipine, a new dihydropyridine calcium antagonist, to corresponding pyridine by rat liver microsomes, *Xenobiotica*, **18**: 217-224 (1988).