

令和6年度（第35回）

日本大学薬学部学術講演会

講演要旨集



2024年10月26日（土）

日本大学薬学部8号館2階821B

日本大学薬学部薬学研究所

日本大学薬学部

日本大学大学院薬学研究科

第 35 回

日本大学薬学部学術講演会

開催日：2024年10月26日(土)

主催：日本大学薬学部薬学研究所

日本大学薬学部

日本大学大学院薬学研究科

〒274-8555 千葉県船橋市習志野台7丁目7番1号

電話 047-465-2111

令和6年度 第35回日本大学薬学部学術講演会

日時：令和6年10月26日(土)9時30分～

開会挨拶 研究担当 宮坂 知宏

8号館2階 821B講義室

区分	分野	開始時刻 1人12分 入替1分	講演番号	講演者氏名	題 目	座 長
学 部	生物学系	9:35	01	薬学部 5年 野島 秀文	ミクログリア細胞株BV-2細胞におけるLipopolysaccharide誘発炎症応答にペントデシルが及ぼす影響	教授 辻 泰弘
大 学 院	生物学系	9:48	02	薬学研究科 博士1年 田中 津宮美	筋萎縮性側索硬化症モデルマウスのアストロサイトの活性化に宮古ビデンス・ピローサエキス末が及ぼす影響	
	生物学系	10:01	03	薬学研究科 博士1年 大久保 朱	ムニンシャシャンボの根から分離されたPenicillium属の未記載種	教授 小菅 康弘
	医療薬学	10:14	04	薬学研究科 博士1年 伊東 萌子	多様な患者背景に適用したバンコマイシン母集団薬物動態解析統合モデルの構築	
共同 研究 助成 金	生物学系	10:27	05	専任講師 徳田 栄一	神経変性疾患のタンパク質病理におけるエンドソームの普遍的役割の解明	
休憩時間 10:39～10:49 (10分間)						
研究 助成 推進 金	生物学系	10:49	06	准教授 和田 平	NASH発症におけるダイオキシン受容体AhRの役割の解明と肝線維化治療への応用	専任講師 鈴木 直人
研究 助成 奨励 金	生物学系	11:02	07	専任講師 木村 元気	疾患モデルマウスを用いたACOにおけるフェロトシスの関与の解明	
一 般	化学系	11:15	08	助教 重松 花梨	金属フルオリドークラウンエーテル錯体を触媒とする加熱や攪拌を伴わないフラバノン合成	

一 般	生物学系	11:28	09	専任講師 田中 融	Tau mRNA と相補的な KANSL1 mRNA の 新奇 3' UTR バリエントの解析	教授 張替 直輝
	医療薬学	11:41	10	助教 黒崎 史大	HPLCを使用したリネゾリド未変化 体および代謝物PNU-142586の同時 測定法の開発	

閉会挨拶・優秀賞授与 研究紀要編集・学術講演会実行委員会委員長 小林 俊亮

講 演 要 旨

ミクログリア細胞株 BV-2 細胞における Lipopolysaccharide 誘発 炎症応答にペンタデシルが及ぼす影響

野島 秀文, 鶴田 こむぎ, 南郷 拓嗣, 宮岸 寛子, 小菅 康弘
日本大薬

【目的】微細藻類 *Aurantiochytrium* が産生する脂質から抽出精製されたペンタデシルは、ペンタデカン酸を高含有する奇数鎖の飽和脂肪酸のみで構成されるトリグリセリドである。これまでに、ペンタデシルには、ヒト臨床試験での肌質改善作用の他、線維芽細胞における小胞体ストレス緩和作用、視神経細胞の保護作用などが報告されているものの、炎症に及ぼす影響については不明な点が多い。そこで、本研究では、マウスミクログリア細胞株である BV-2 細胞を用いて、Lipopolysaccharide (LPS) が誘発する炎症反応にペンタデシルが及ぼす影響を検討した。

【方法】BV-2 細胞は、10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium 中で、37°C、5% CO₂ 条件で培養した。細胞毒性は LIVE/DEAD 法により評価した。各種サイトカインおよびプロスタグランジン合成酵素の mRNA 発現量は、Real-time PCR 法により評価した。ペンタデシルは、株式会社シー・アクトより提供された。

【結果および考察】ペンタデシルを 24 時間処置したところ、LIVE/DEAD 法で染色される Ethidium homodimer-I 陽性死細胞数および Calcein AM 陽性生細胞数には顕著な変化が認められなかった。また、LPS とペンタデシルを併用した細胞においても同様に変化は認められなかった。ペンタデシルは、LPS 処置後 4 時間で誘発された炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-6 および IL-1 β の増加を抑制したが、Tumor necrosis factor- α の増加は抑制しなかった。一方、抗炎症性サイトカインである Transforming growth factor- β や IL-10 の発現レベルには、ペンタデシルは影響を及ぼさなかった。さらに、LPS 曝露は、炎症メディエーターである Prostaglandin E₂ (PGE₂) の合成酵素である Microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) と Cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現も誘導した。ペンタデシルは、この LPS による mPGES-1 の増加を有意に抑制したが、COX-2 の増加に対しては抑制傾向に留まった。以上より、ペンタデシルは、細胞障害を示すことなく一部の炎症性サイトカインおよび PGE₂ 合成酵素の発現抑制を介して抗炎症作用を示すことが示唆された。

【謝辞】本研究の一部は、令和 4・5 年度日本大学学術研究助成金（独創的・先駆的研究）の支援により行われた。

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスのアストロサイトの活性化に 宮古ビデンス・ピローサエキス末が及ぼす影響

田中 津宮美, 鶴田 こむぎ, 南郷 拓嗣, 宮岸 寛子, 小菅 康弘
日本大薬

【目的】筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンが選択的に変性する予後不良な神経変性疾患である。この運動ニューロンの変性には、ミクログリアやアストロサイトの活性化による神経炎症の関与が注目されている。本研究室では、沖縄県宮古島で栽培・加工された宮古ビデンス・ピローサエキス末 (MBP) には、ALS モデルマウス腰髄のミクログリアやアストロサイトの増加を抑制し、生存期間を延長する作用があることを報告している。近年、アストロサイトは、神経障害性の A1 型アストロサイトと神経保護性の A2 型アストロサイトに極性を変化させることが知られている。本研究では、MBP の治療効果解明の一環として、MBP が ALS モデルマウス腰髄におけるアストロサイトの極性変化に及ぼす影響を検討した。

【方法】ALS モデルマウスは、SOD1^{G93A} トランスジェニックマウス (G93A マウス) を用いた。ALS 発症初期 (15 週齢) の G93A マウスに精製水で溶解した MBP (2 g/kg/day) を 7 日間経口投与し、腰髄内の mRNA 発現量を real-time PCR 法により測定した。MBP は、株式会社武蔵野免疫研究所より供与された。

【結果および考察】G93A マウスの腰髄におけるアストロサイトの極性変化について検討したところ、A1 型アストロサイトマーカーである C3 および GBP2 の発現と A2 型アストロサイトマーカーである S100A10 の発現が亢進した。同様に、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) および抗炎症性サイトカイン (TGF- β 、IL-10) の発現も亢進した。これらの結果より、G93A マウス腰髄では、A1 型および A2 型アストロサイトがいずれも増加することが示唆された。そこで、MBP がこれらの発現増加に及ぼす影響を検討したところ、MBP は、C3 の発現を有意に抑制し、GBP2 の発現を抑制する傾向を示したが、S100A10 の発現増加には影響を及ぼさなかった。また、MBP は、炎症性サイトカインの発現増加を顕著に抑制したが、抗炎症性サイトカインの発現増加には影響を及ぼさなかった。以上より、MBP の ALS 治療効果には、神経障害性の A1 型アストロサイトへの極性変化を選択的に制御する作用が関与することが示唆された。

【謝辞】本研究は、令和 4・5 年度日本大学学術研究助成金 (独創的・先駆的研究) の支援により行われた。

ムニンシャシャンボの根から分離された *Penicillium* 属の未記載種

大久保朱、廣瀬大
日本大薬

【目的】

Penicillium 属は 500 種を超える記載種を有する真菌で最も多様性の高い分類群の 1 つである。本属の新種の発見は近年も世界中で相次いでおり、その多様性の全貌は掴めていない。本属は生理活性をもつ新規化合物の探索源として古くから利用されてきたが、新種の発見と同様に新規化合物の報告も現在も後を絶たない。演者らは小笠原諸島に自生するツツジ科のムニンシャシャンボ (*Vaccinium boninense*) の根から本属の *Exilicaulis* 節 *restricta* シリーズに属する未記載種と考えられる複数の菌株の分離に成功した。最近これらの菌株が生理活性を有する新規テルペノイド化合物を産生することが明らかになったため、本研究ではこれらの菌株について分類学的検討を詳細に行い、新種を提案することを目的とした。

【方法】

供試菌株は、*V. boninense* の根を 0.005% のエーロゾル OT 水溶液と滅菌精製水で各 3 回洗浄後、0.01% クロラムフェニコールを含むコーンミール寒天培地上に静置、15°C 暗所下で 1–2 週間培養後に分離培養された。β-チューブリン遺伝子、カルモジュリン遺伝子、*RPB2* 遺伝子の部分塩基配列を決定後、最尤法による分子系統解析を行なった。巨視的及び微視的形態観察は Visagie et al. (2014) に従い行った。これらに加え、異なる温度条件下 (5、10、15、20、30、37°C) で培養、1 週間後にコロニー直径を記録することで各菌株の菌糸成長可能な温度域と至適温度を明らかにした。

【結果および考察】

分子系統解析の結果、供試菌株は独立したクレードを形成し *Penicillium cinereoatrum* および *Penicillium heteromorphum* と近縁であることが分かった。形態観察の結果、CZ 培地でのコロニー形態、CREA 培地で酸性物質を産生する点、巨大分生子の有無の点で近縁種とは異なることが分かった。また供試菌株の菌糸成長可能な最低温度が近縁種より 5°C 低い 10°C であった。これらの結果に基づき供試菌株に対し新種 *Penicillium rhizovaccinium* を提案することにした。

多様な患者背景に適用した バンコマイシン母集団薬物動態解析統合モデルの構築

伊東萌子¹, 笠井英史², 青山隆彦¹, 辻泰弘¹

¹日本大薬, ²慶應義塾大

【目的】

バンコマイシン (VCM) は有効薬物血中濃度域が狭く、臨床効果および腎機能の定期的なモニタリングを必要とする。投与設計においては、通常、VCM の投与対象となる患者背景に合致した母集団薬物動態モデルを用いる必要がある。VCM の母集団薬物動態解析報告は、2022 年 9 月時点の PubMed 検索において 274 編、2024 年 6 月では 335 編と、報告数が増え続けている。すなわち、多少異なる背景を有する対象患者に対して、わずかず異なるモデルが多数報告されている状況である。多様な薬物動態モデルが存在するにも関わらず、実臨床においては、対象患者にどのモデルを選択すべきかなどの問題が発生し、1998 年に報告された薬物動態モデルが現在まで使用され続けている。そこで、本研究は、幅広い患者背景に対応する唯一のモデルの構築を目的とし、薬物動態解析の論文情報に基づき仮想患者データを発生させたうえで母集団薬物動態解析を行うことのできる Model-simulated Model-based Meta-analysis method (M³ 法) を開発した。

【方法】

成人のみを対象とし、かつクリアランスの共変量に腎機能を含むパラメトリック母集団薬物動態モデル 20 編をメタアナリシスの対象とした。各論文の患者集団の背景分布に応じて仮想患者を発生させ、投与量および採血時間に基づき VCM 血中濃度を多数回シミュレートし、モデルを構築した。

【結果および考察】

モデル構築の結果、クリアランスの変動要因として、腎機能に加えて、実体重が見いだされた。対象文献の患者背景となった、肥満、高齢者、手術中の患者および敗血症を含む幅広い背景を有する患者の個別の血中濃度予測を 1 つのモデルで行えることが示唆された。今回 M³ 法を用いて構築した母集団薬物動態統合モデルは、現在実臨床で使用されている TDM ソフトウェアを拡張し、多様な背景を有する患者の投与設計が可能になると考えられる。

神経変性疾患のタンパク質病理における エンドソームの普遍的役割の解明

徳田 栄一、田中 融
日本大薬

【目的】タンパク質凝集体の細胞間伝播は、様々な神経変性疾患に見られる共通の病理現象である。タンパク質凝集体は伝播の過程で酸性オルガネラ「エンドソーム」に集合し、エンドソームから脱出する。本研究では、ALS または認知症に関連するタンパク質凝集体「SOD1 および TDP-43」に焦点を当て、これら凝集体がエンドソームから脱出する仕組みを解明し、エンドソームから拡大する凝集体の伝播を阻止する手法の基本原理を構築することを目的とした。

【方法】SOD1 および TDP-43 タンパク質は大腸菌発現系で合成し、精製した後、試験管内で凝集させた。これら凝集体を運動神経モデル細胞に添加し、エンドソームの変化を解析した。

【結果および考察】ドラッグデリバリーにおいて、薬物を標的部位に送達させるためには、エンドソームからの脱出が必須となる。このため、薬物送達学の分野では、エンドソーム脱出の基本原理が構築されており、それは塩基性アミノ酸によるエンドソームの H^+ 吸収に基づく。 H^+ 吸収によりエンドソームの H^+ が減少すると、水の大量流入とエンドソーム膜の損傷が起こり、薬物がエンドソームから細胞質へと脱出する。本研究では、上記の H^+ 吸収の理論を凝集体のエンドソーム脱出の仕組みに拡張させた。

SOD1 および TDP-43 凝集体の溶媒表面に露出した塩基性アミノ酸をクロスリンカーで化学修飾し、エンドソームでの H^+ 吸収能が低下した凝集体を作製した。これら凝集体を運動神経モデル細胞に添加したところ、エンドソームの膜損傷マーカー GAL-3 量が低下し、エンドソームから細胞質へと脱出する凝集体が減少した。また、エンドソーム内の H^+ 量を低分子化合物で減少させると、上記と同様の結果が観察された。

以上より、塩基性アミノ酸による H^+ 吸収は、SOD1 と TDP-43 凝集体に共通した脱出機構であることが分かった。

NASH 発症におけるダイオキシン受容体 AhR の役割の解明と 肝線維化治療への応用演題

和田 平
日本大薬

【目的】

我が国では生活習慣病の罹患率の増加と共に、NASH 患者数が急増している。NASH は脂肪肝に脂肪変性や炎症などの要因が加わることで肝星細胞が活性化されることで線維化を伴って発症する。近年、ダイオキシン類の受容体として知られている Aryl hydrocarbon receptor (AhR)が、薬物代謝制御のみならず、脂質代謝制御に関与していることが報告されている。本研究では、NASH 発症における AhR の役割を明らかにするため、肝細胞特異的 AhR 欠損(HKO)マウスを用いて解析した。

【方法】

HKO マウスは、AhR^{flox/flox} マウスに肝細胞特異的 Cre リコンビナーゼを発現させたトランスジェニックマウスを交配して作製した。本実験では、コリン欠乏メチオニン減量超高脂肪食(CDAHFD)を8週間給餌してNASHを誘導した。

【結果および考察】

CDAHFD を負荷した HKO マウスにおける線維化の程度は、AhR^{flox/flox} マウスのそれに比較して軽度であった。そこで HKO マウスにおける NASH 線維化の抑制機序について解析した。肝臓トリグリセリド含量においては両マウス群間に違いは見られなかったが、AhR^{flox/flox} マウスの肝臓で観察された脂肪変性が HKO マウスの肝臓では僅かであった。そこで脂肪変性関連遺伝子の発現量を解析したところ、*Fat Specific Protein27β(Fsp27β)* の NASH 発症に伴う発現誘導が HKO マウスにおいて抑制されていた。また、プロモーター解析により、*Fsp27β* 遺伝子の転写活性は AhR によって制御されていることが示された。以上の結果から、肝細胞 AhR は、NASH 発症における脂肪変性を促進させ、線維化を進展させることが示唆された。

疾患モデルマウスを用いた ACO における フェロトーシスの関与の解明

木村 元気
日本大薬

【目的】

喘息と COPD のオーバーラップ (ACO) は、「慢性の気流閉塞を示し、喘息と COPD のそれぞれの特徴を併せ持つ病態」と定義された疾患である。しかし、その病態形成機序については未知な部分が多い。近年、鉄依存的細胞死であるフェロトーシスが様々な疾患の発症に関与する可能性が示唆されているが、ACO については国内外において報告はない。そこで本研究は、ACO の病態形成機序におけるフェロトーシスの関与を解明することを目的に、申請者が確立した ACO モデルマウスを用いて、フェロトーシスと気道炎症の関連について検討した。

【方法】

Papain 誘発喘息モデルマウスにタバコ煙を曝露して作製した ACO モデルマウスから肺を摘出した。フェロトーシスについて、肺組織切片を用いた鉄沈着及び肺組織中におけるフェロトーシスマーカーの遺伝子発現変動を指標に評価した。次に、ACO モデルマウスにフェロトーシス阻害薬 liproxstatin-1 を投与して、気道炎症が改善するか検討した。さらに、喘息モデルマウスにフェロトーシス誘導薬 erastin を投与して、フェロトーシスが喘息から ACO 病態を誘導するか検討した。

【結果および考察】

ACO モデルマウスの肺組織において、フェロトーシスマーカーである鉄の沈着、フェロトーシス抑制因子である GPX4 及び FSP1 の遺伝子発現の低下、逆に促進的に作用する NCOA4 の遺伝子発現の上昇が認められた。また、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を用いて、フェロトーシス誘導で重要な酸化ストレスについてグルタチオンを指標に検討した結果、酸化型グルタチオンの上昇、還元型グルタチオンの減少が認められた。そして、ACO モデルマウスに liproxstatin-1 投与した結果、BALF 中の炎症細胞数及び炎症性サイトカイン量が減少し、気道炎症が抑制された。一方、erastin を投与した喘息モデルマウスではフェロトーシス誘導により気道炎症が増悪した。これらの結果から、ACO における病態形成機序の一部にフェロトーシスが関与している可能性が示唆された。

金属フルオリドークラウンエーテル錯体を触媒とする 加熱や攪拌を伴わないフラバノン合成

重松 花梨, 鳥山 正晴, 三浦 基文
日本大薬

【目的】

電力は我々の生活に欠かせないものであるが、その多くは近い将来枯渇すると予想されている石油や石炭などの化石燃料の燃焼によって得られる。また、一般的な有機化学においても反応溶液の攪拌、加熱、冷却などに電力は不可欠である。

本研究のターゲット化合物であるフラバノン類とその誘導体は、抗がん活性、抗菌活性、抗酸化活性、抗肥満活性などの優れた生理活性を有しており、多くの研究者のターゲットとなっている。以前、我々の研究室では CsF 水溶液を触媒とする *oxa-Michael* 反応によって 2'-ヒドロキシカルコンからフラバノン類が合成できることを報告したが、反応溶媒である CH₃CN に基質が不溶であるため、80°Cでの加熱攪拌を必要としていた。そこで、本研究では様々な金属フルオリドークラウンエーテル錯体と、様々な有機物を可溶するジクロロメタンを用い、加熱や攪拌を必要としない、環境に優しい電力消費の少ない反応を模索した。

【方法】

2'-ヒドロキシカルコンのジクロロメタン溶液に、フッ化物塩触媒とサイズの異なる種々のクラウンエーテルを用いて室温で触媒-配位子の組合せ検討を行った。更に触媒-配位子量および基質量の最適化を行った。その後、この結果に基づき、様々な基質に対して室温で攪拌しない条件下での適応を試みた。

【結果および考察】

様々な条件検討を行った結果、クラウンエーテルに 15-Crown 5-ether、触媒に CsF、基質濃度を 0.5 mol/L に設定し、室温で 48 時間攪拌することで、反応が円滑に進行し、フラバノンが効率よく得られる最適条件を見出した。また、この反応は基質によって収率に若干の違いはあるものの、静置条件下でも反応が進行し、収率に大きな変化は及ぼさないことが確認された。さらに、スケールアップにおいても収率に差がほとんど見られなかったことから、この条件はグラムスケールでも適用可能であることが示唆された。

1) M. Miura, K. Shigematsu, M. Toriyama, S. Motohashi, *Tetrahedron Letters*, **2021**, 85, 153480.

Tau mRNA と相補的な KANSL1 mRNA の新奇 3' UTR バリエーションの解析

田中 融, 大橋 祥世, 小林 俊亮
日本大薬

【目的】

Tau は軸索のマーカータンパク質として知られているが、アルツハイマー病では過剰にリン酸化された Tau が樹状突起に蓄積し凝集体が形成され、神経細胞死が引き起こされる。我々はこれまでに、正常な神経細胞を用いた解析で、Tau mRNA が樹状突起へ輸送され、神経刺激に応じて局所的な翻訳活性化と過剰リン酸化が起こることを報告しており、アルツハイマー病の発症に樹状突起内 Tau mRNA の翻訳が深く関わっていることが示唆される。Tau の樹状突起発現機構の解析を進めていく過程で、偶然にも Tau mRNA に相補的な新奇長鎖 RNA が Tau mRNA と同様に樹状突起に分布しているのが見いだされた。本研究ではこの未知の RNA を明らかにし、Tau mRNA の翻訳活性への影響を解析した。

【方法】

RNA の配列は RT-PCR, 5'-RACE, 3'-RACE を用いて解析した。Tau mRNA の翻訳に対する新奇長鎖 RNA の影響は、この RNA を発現するベクターを構築後、Tau mRNA 発現ベクターと共に神経系株化細胞 NG108-15 に遺伝子導入し、発現してくる Tau タンパク質および Tau mRNA の量をウエスタンブロットおよび RT-PCR でそれぞれ解析した。

【結果および考察】

Tau mRNA と相補的な新奇長鎖 RNA の配列を解析したところ、驚いたことに Tau 遺伝子の近傍に存在する KANSL1 遺伝子の新奇 3'-UTR バリエーションで、Tau mRNA の 3'-UTR のほとんど全体と相補的な領域を持っていることが分かった。これを tKANSL1 mRNA と呼ぶことにした。遺伝子導入実験から、興味深いことに tKANSL1 mRNA により Tau mRNA の翻訳が増加することが分かった。このことから tKANSL1 mRNA は、樹状突起内において相補的な領域を介して Tau mRNA の翻訳に影響を与え、Tau タンパク質の樹状突起内蓄積・凝集に関わっている可能性がある。

HPLC を使用したリネゾリド未変化体および代謝物 PNU-142586 の同時測定法の開発

黒崎 史大, 及川 直毅, 青山 隆彦, 内山 武人, 辻 泰弘
日本大薬

【目的】

リネゾリド (LZD) はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 感染症治療薬として使用される一方、重篤な血小板減少を引き起こすことが知られている。近年、LZD の主要代謝物である PNU-142586 と PNU-142300 が血小板減少に関与していることが示唆されているが、これらの血中濃度を汎用高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量した例はなく、主要代謝物の体内動態と血小板減少の関連性は明らかではない。本研究では汎用 HPLC を用い、LZD と PNU-142586 を同時定量可能な分析法を開発することを目的とした。

【方法】

LZD 未変化体および PNU-142586 の標準品を添加し、内標準物質としてテジゾリドを加えた試料溶液を用いた。移動相の組成は 60%リン酸緩衝液/40%メタノールに固定し、分析カラムには一般的な C₁₈ カラムを使用した。以上の条件のもと、移動相への添加剤および添加剤濃度を検討した。続いて緩衝液の濃度を 0.5, 5, 50 mM で変化させ各化合物の保持時間の推移を調査した。正確度および精度は、LZD 未変化体と PNU-142586 とともに 0.1-50 µg/mL の濃度範囲で検証した。

【結果および考察】

カチオン性イオンペア試薬である塩化テトラブチルアンモニウム (TBAC) を添加することで PNU-142586 の保持時間が延長され、LZD 未変化体および夾雑物と分離することが判明した。一方で緩衝液の濃度が高くなると PNU-142586 の保持時間は短くなった。これらの結果から、PNU-142586 と TBAC がイオン対を形成することが明らかとなり、また PNU-142586 の分離分析が達成可能であることがわかった。TBAC を 10 mM 添加し、緩衝液の濃度を 0.5 mM とした移動相を使用して LZD 未変化体および PNU-142586 の測定正確度および精度を 3 回繰り返し検証した結果、正確度は 0.5-50 µg/mL の範囲でそれぞれ 92-113%, 99-118%、定量限界である 0.1 µg/mL ではそれぞれ 136%, 152% であった。精度についても良好であり、堅牢性の高い分析法であることが示された。以上から、本分析法で LZD 未変化体および PNU-142586 を HPLC で同時定量可能であることが示された。