

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第 1 分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンス
に関する研究

医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
研究者 林 譲

研究要旨 医薬品の有効性・安全性を正しく判断するために用いる分析法の正確かつ簡便な評価方法を開発し、その評価方法の実験・解析手順を標準化する。本研究課題の成果の一部は、国内規格（JIS）として既に制定され、国際規格（ISO）としては日本から提案されている。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所食品部 松田りえ子
- (2) 東京薬科大学 楠文代
- (3) 大阪大学 片倉啓雄
- (4) 日本エンバイロケミカルズ 藤本茂
- (5) ホリバ・バイオテクノロジー 奥村弘一
- (6) 北斗電工 福泉敦尚
- (7) 林純薬工業 植田泰輔
- (8) 明治製菓 北原進一
- (9) 第一ラジオアイソトープ研究所 北島昭人
- (10) ヤザワ 矢澤久雄

A. 研究目的

薬局方に記載されている分析法バリデーションは、定量分析法の統計的信頼性を把握するための国際ルールであり、ICH,ISOなどの国際機関の提案に基づいている。分析法の精度または不確かさは、標準偏差（SD）または相対標準偏差（RSD）で表される。少ないくり返し数から求めたSDの信頼性は乏しいが、多くのくり返し数（最低30くらい）からは、正しい標準偏差（95%信頼区間が真値の±20%）が求められることは統計学で分かっ

ている。しかし、多くの分析方法においては、30回のくり返しは実用的とは到底言えない。そこで、正しくかつ簡便に不確かさを求める方法の開発は、レギュラトリーサイエンスの一環として国際的にも強く要求されているが、多くの分析法に適用できる具体的な方法は未だ確立されていない状況にある。

本研究の目的は、不確かさを定量的に予測する一般的方法論を作り、その有用性を実験から証明することにある。本研究で対象とする分析法は、電気化学分析、ラジオアイソトープHPLC、粉末X線回折と免疫化学測定法である。免疫化学測定法の誤差の主な原因は、ピペット誤差であり、その他の上記の方法では、測定装置の出力のバックグラウンドノイズであることが我々の研究から分かっている。本研究では、実サンプルのくり返し測定は行わない代わりに、分析法の不確かさをその因果関係から求める。具体的には、誤差の原因（ピペットの採取容量のRSD、ノイズのSD）の関数として、測定値のRSDを記述する。

化学の原理も測定手順もまったく異なる分析法を本研究では扱う。一見、研究課題としては発散すると思われるかもしれない。しか

し、不確かさをその因果関係から推定するという概念が多く異なる分析法に適用可能であることを、本研究では強く主張したい。

ここで提案する方法から得られる標準偏差は、30回位のくり返し測定から得られる標準偏差と同じ統計的信頼性を持つ。そのため、日常的なシステム適合性試験や分析法バリデーションなどの負荷を軽減できるので、エネルギー、時間、生産コスト等の低減につながる。分析回数を減らすことにより放射性核種の製造量の削減も可能である。不確かさを求める方法の一般化・標準化を ISO, JIS などの国際・国内機関に既に提案されているので、レギュラトリーサイエンスの分野での日本の国際的貢献が期待できる。

B. 研究方法

本研究課題報告書で取り上げる話題は

- 研究成果の標準化
- 電気化学分析
- 粉末 X 線回折
- 免疫化学測定法

である。その他の話題は、次項で挙げる。

電気化学分析、ラジオアイソトープ HPLC、粉末 X 回折の測定誤差の主原因はベースラインノイズであり、FUMI 理論に基づいてノイズを解析することにより測定値の SD と RSD を求めた。FUMI は、Function of Mutual Information の略である。免疫化学測定法の誤差の主原因はピペットの容量誤差 (RSD) であり、誤差の伝播法則により、測定値の精度を求めた。

ベースラインノイズとピペットから生じる誤差では、その数学的記述は異なる。しかし、誤差を定式化する際の手続きはまったく同じである。それを研究方法として以下に記す。

具体的な研究方法は次の順番である：

1. 測定値の誤差の原因を見つける；
 2. 誤差原因から、分析値の SD または RSD を記述する数式（不確かさの式）を誘導する；
 3. 誤差原因の大きさ（ピペットの容量誤差の RSD など）を実験から求める；
 4. 3 で求めた数値を基に、不確かさの式を用いて、測定値の RSD を測定対象物質の濃度に対してプロット（精度プロファイル）する；
 5. 4 で求めた精度プロファイルとくり返し実験から求めた RSD と比較する；
- である。

以上が、実サンプルを用いないで、実サンプルのくり返し測定値の精度を予測できる方法論となる。

（倫理面への配慮）

本研究は、イムノアッセイ法、粉末 X 線回折、ラジオアイソトープ HPLC、電気化学検出 HPLC における分析法の開発・評価であり、化学・物理的側面を対象とする。ヒトを含めた生物個体を扱うことはないため、動物愛護上の配慮などを含めた倫理面の問題はなく、倫理面の配慮は必要ないと判断できる。

C. 研究結果

研究成果の標準化

本研究課題の成果の一部は、国内規格 (JIS) として既に制定され、国際規格 (ISO) としては日本から提案され、CD の段階である。

平成 18 年 1 月 20 日付けの官報 (号外第 11 号) に、日本工業規格 K0461 競合免疫測定方法通則が制定されたことが公示された。K0461 の分析法バリデーションの部分は、本研究課題で行った研究の成果 (文献?) が収められている。現在は、JIS 原案 (非競合免

疫測定方法通則)が作成中である。

本研究課題で行った電気化学分析と粉末 X 線回折で扱っている FUMI 理論は主任研究者(林譲)が開発した理論であり, ISO11843-5 として日本から提案されている。現在, CD としての投票が行われており, 2007 年末には ISO の規格として制定される予定である。

電気化学分析

第一に, FIA-ECD のベースラインノイズのパワースペクトルが, FUMI 理論に基づくモデルパワースペクトルで表現でき, ノイズパラメータを算出できることを検討した。FIA-ECD のパワースペクトルは $1/f$ 揺らぎを示すことがわかった。このパワースペクトルにモデルパワースペクトルをシンプレクス最小二乗法でフィッティングさせたところ, 両者は良好に重なり, FIA-ECD のベースラインノイズも FUMI 理論に適応できることが示された。

さらに, FIA-ECD の測定精度予測に FUMI 理論が利用可能であることを確かめるために, 4 種の濃度のアンモニアについてそれぞれ 5 回の繰り返し測定によって求めた RSD と予測 RSD を比較した。実際に繰り返し測定を行って求める RSD を以降, 実測 RSD と呼ぶこととする。従来の方法により, すなわち FUMI 理論を用いない場合, アンモニアの実測 RSD を求めるには同一試料について繰り返し測定が必要であり, フローシグナルを各濃度についてそれぞれ 5 回の繰り返し測定を行って, 20 本のフローシグナルを得る必要がある。

アンモニアのフローシグナルを用いて算出した実測 RSD を図 1 に黒丸 (●) でプロットした。図 1 にプロットした 4 種類の濃度について実測 RSD を求めるには, 1 回の測定が約 1 分間であったので, 20 分間の測定時間を要した。一方, 1 回の測定で得たフローシグ

ナルとベースラインノイズから得た予測 RSD を図 1 に実線で示す。実測 RSD では繰り返し測定を行った濃度の RSD しか求められないが, FUMI 理論では 1 本のベースライン上の連続した 512 ポイントのデジタルデータを用いて確率論によって広い濃度範囲における RSD を予測することができる。このデータポイント数を考慮すると 20 分間かけて繰り返し測定を行っても, その信頼性は $n=5$ の RSD であるのに対し, FUMI 理論によって 1 回の測定 (1 分) で得られる予測 RSD の信頼性は $n=30\sim 50$ の RSD に相当する。予測 RSD と実測 RSD は図 3 に示すようによく一致していた。以上のことから, FIA-ECD の測定精度予測に FUMI 理論が利用でき, 繰り返し測定を行わずに RSD の予測が可能であり, 検出限界も算出できることが分かった。

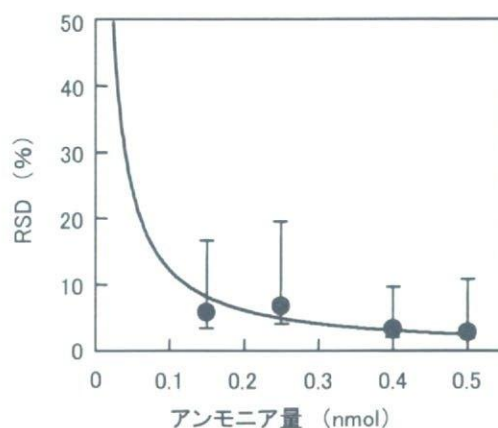


図 1. アンモニアの精度プロファイル
(—) 予測 RSD, (●) 実測 RSD ($n=5$),
(エラーバー) 実測 RSD の 95%信頼区間

本研究では, アンモニアの FIA-ECD 条件の設定に FUMI 理論に基づく検出限界を活用することとした。測定電位を設定するには従来, 図 2 に示すハイドロダイナミックボル

タモグラムを測定し、S/N 比に優れた電位を選択する。しかし、これで選択した電位が精度及び感度に優れている保証はなく、精度を評価するには、同一試料について多数回の繰り返し測定を行う必要がある。一方、FUMI理論は、1回の測定で測定精度と検出限界を算出できるので、ハイドロダイナミックポルタモグラムのデータで測定精度と検出限界について比較することができる。図 2 に示す FUMI 理論に基づき算出した検出限界と測定電位の関係から +0.7 V vs. Ag/AgCl が最も検出限界が優れていることがわかった。

同様に FIA-ECD 条件として流速について検討した結果を表 1 に示す。流速を速くするとピーク高さが高くなり、流速 1.0 ml/min で、検出限界が最も優れていた。しかし、流速をさらに速くすると、ピークの低下が見られ、検出限界は悪くなった。

さらに、ベースラインノイズに影響を与える支持塩濃度について、検出限界を比較した。表 2 の結果から、LiClO₄ 濃度は 0.1 mM を選択した。

以上の条件検討を行い、アンモニアの検出限界を 6.84 pmol まで改善することができた。

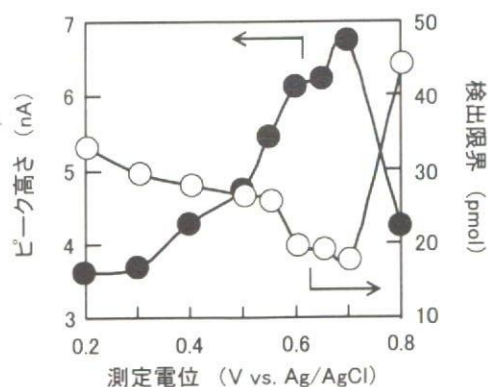


図 2. アンモニアの (●) ハイドロダイナミックポルタモグラムと (○) 検出限界

表 1. アンモニアの検出限界に対する流速の影響

流速 (ml/min)	検出限界 (pmol)
0.5	35.0
0.7	15.2
0.9	13.2
1.0	12.6
1.2	14.0

FIA 条件： キャリアー溶液、3 mM トコフェロールと 10 mM LiClO₄ を含む水・エタノール混液 (1:4, v/v)；測定電位、+0.7 V vs. Ag/AgCl

表 2. アンモニアの検出限界に対する LiClO₄ 濃度の影響

LiClO ₄ 濃度 (mM)	検出限界 (pmol)
100	29.8
10	11.8
0.1	6.84

FIA 条件： キャリアー溶液、3 mM トコフェロールと LiClO₄ を含む水・エタノール混液 (1:4, v/v)；測定電位、+0.7 V vs. Ag/AgCl；流速、1.0 ml/min

粉末 X 線回折

本研究で用いたマトリクスの構成成分は、乳糖 (66.5%)、コーンスターチ (28.5%)、結晶セルロース (4.0%)、ヒドロキシプロピルセルロース (1.0%) である。マトリクスの粉末 X 線回折パターンを、図 3 に示す。マトリクスの粉末 X 線回折パターンは、混合比率 66.5% を占める乳糖の粉末 X 線回折パターンとほぼ同じものとなっていた。各回折ピークはマトリクスの構成成分に由来するものであり、混合による新たな回折ピークの出現は認められなかった。

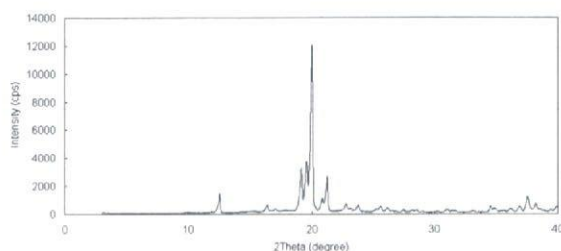


図 3. マトリクスの粉末 X 線回折パターン

マトリクスの粉末 X 線回折パターンにおいて、 $2\theta = 3 \sim 10^\circ$ の範囲に回折ピークが認められなかった。従って主薬成分を選択する場合、この角度範囲に分離度の良い回折ピークを示すものを選択する必要があると考えた。選択に当たっては 20 種以上の薬物に対して粉末 X 線回折測定を実施し、前述の条件を満足するニフェジピン及びプロベネシドを採用する事とした。図 4 にニフェジピンの粉末 X 線回折パターンを示した。 $2\theta = 3 \sim 10^\circ$ に分離度のよい回折ピークを示しており、シミュレーションにおける主薬成分として適していると考えられた。

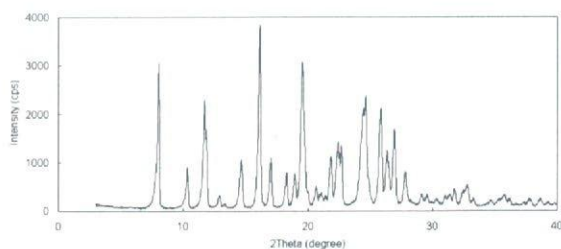


図 4. ニフェジピンの粉末 X 線回折パターン

主薬成分にニフェジピンを用い、重量比が 5%、10% 及び 20% になるようにマトリクスと混合した。各種混合物について 6 回繰り返して粉末 X 線回折測定を行った。図 5 に 20% 混合物の粉末 X 線回折パターンを示した。 $2\theta = 8.1^\circ$ 付近の回折ピークをシグナル解析の対象

ピークとする事とした。

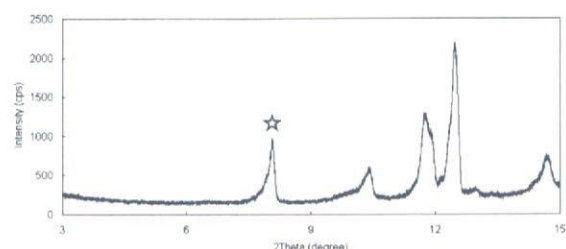


図 5. ニフェジピン 20% 混合物の粉末 X 線回折パターン

図 5 にシグナル解析により得た精度プロファイルを示した。繰り返し測定から得た RSD と FUMI 理論により算出された RSD は近い値を示した。プロベネシドに対しても、同様な結果が得られた。

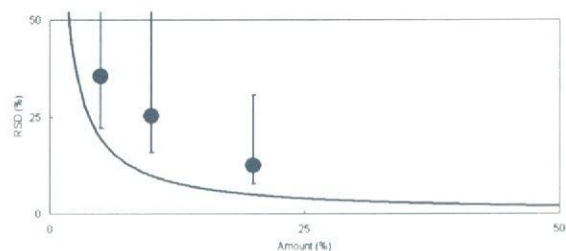


図 6. 精度プロファイル (ニフェジピン)
● は実測した RSD(%), 実線は FUMI 理論により算出された RSD(%)

免疫化学測定法

ポリスチレンプレートに抗体を能動吸着させた場合の密度は最大で $1 \sim 5 \text{ pmol/cm}^2$ であり、吸着による変性のため、吸着させた抗体の抗原結合部位のうち、有効に機能する部位の割合は、ポリクローナル抗体の場合 5~20% 程度、モノクローナル抗体の場合は 1~3% 程度であるとされている^{2, 3)}。96 穴マイクロタイタープレートに 100 μL の溶液を入れて反

応させる場合、固液界面積は約 1 cm^2 であるから、固相の有効結合サイト濃度 C_2 は 10^9 M とした。第一抗体は、固相に固定した第二抗体に対して過剰に加えて反応させるので、その初期濃度 C_1 は C_2 と同じ 10^9 M とした。抗原濃度 A は、 $10^{-11} \sim 10^{-6} \text{ M}$ の範囲で検討した。標識抗原濃度 E は、第一抗体濃度より小さくすると抗原と競合しなくなるので、第一抗体濃度よりも大きい範囲、即ち、 $10^9 \sim 10^7 \text{ M}$ の範囲で検討した。一般に、二つの分子の会合速度定数は、何れか小さい方の分子の拡散速度に支配され、分子の拡散速度はみかけの分子径に反比例する (Stokes-Einstein の法則)。抗体が標準的なサイズの球状タンパク質 (直径 $3 \sim 6 \text{ nm}$) と反応する時の会合速度定数は $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、平均的には $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であることが知られているので、固相化された第二抗体に対する第一抗体の会合速度定数 k_{on1} 、遊離の第一抗体に対する標識抗原の会合速度定数 k_{on1E} は共に $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ に設定した。競合 ELISA の対象となる抗原の分子量は $10^2 \sim 10^3$ であり、その分子径は 1 nm 前後であることから、遊離の第一抗体、および、固相化された第二抗体と第一抗体の複合体に対する抗原の会合速度定数 (k_{onA}) は $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ とした。酵素標識抗原の分子サイズは標識に用いる酵素の分子サイズとほぼ同じであるから、遊離の第一抗体、および、固相化された第二抗体-第一抗体複合体に対する酵素標識抗原の会合速度定数 k_{onE} は $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ に設定した。第一抗体と酵素標識抗体の複合体は、同一分子量の球状タンパク質に比べてみかけの分子径が大きくなるので、固相化された第二抗体に対する会合速度定数は $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ に設定した。抗原抗体複合体の解離は一次反応であるから、複合体の初期濃度を X_0 、 t 秒後の複合体濃度を X とすれば、 $X/X_0 = \exp(-k_{off}t)$ の関係がある。 $k_{off} = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 以上であれば、10 分間 (600 s) の

洗浄によって複合体濃度は $1/2$ 以下に減少してしまい、実用に耐えない。そこで、10 分間の洗浄後も 95% の複合体が残るよう $k_{off} = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ に設定した。なおここでは、三者複合体から、二次抗体、抗原、あるいは標識抗原が解離する速度は、それぞれが一次抗体から解離する速度と同じであると仮定した。

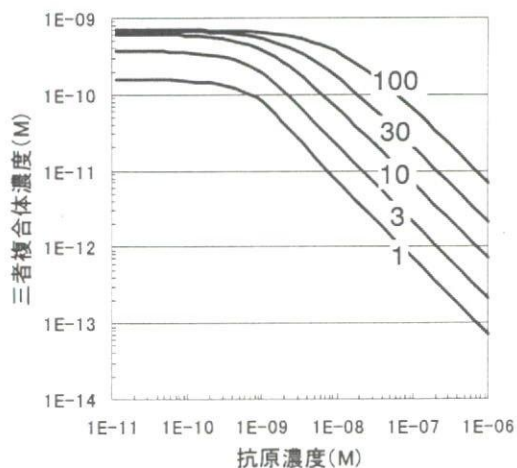


図 7. 三者複合体濃度のシミュレーション
 数字は標識抗原濃度 (nM)

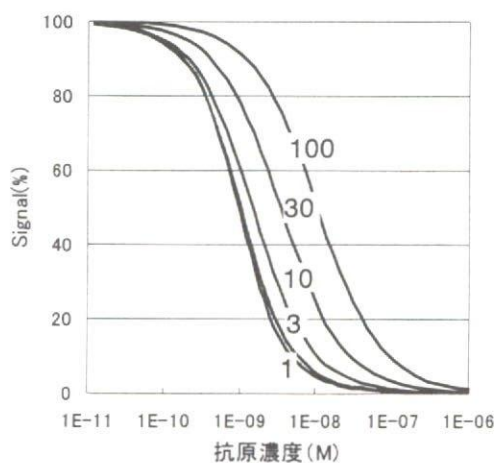


図 8. 検量線のシミュレーション

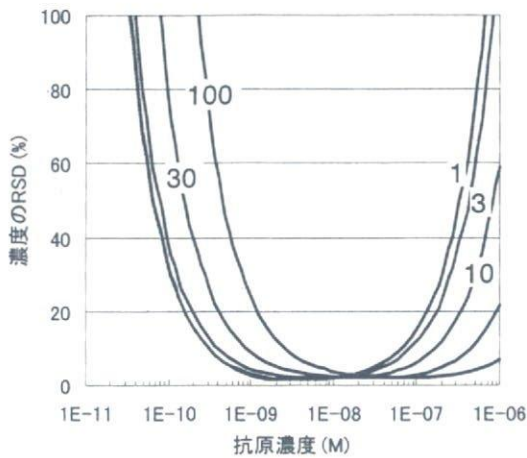


図 9. 精度プロファイルのシミュレーション

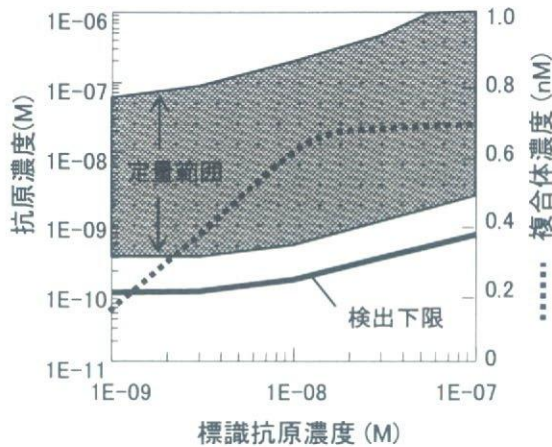


図 10. 標識抗原濃度が測定レンジと複合体濃度に及ぼす影響

標識抗原濃度を 1, 3, 10, 30, 100 nM として 60 分反応させた場合の抗原濃度と三者複合体濃度の関係を図 7 に、検量線を図 8 に、精度プロファイルを図 9 に示す。また、標識抗原濃度が定量上限、定量下限、検出限界、三者複合体濃度 (ELISA の吸光度に比例) に及ぼす影響を図 10 にまとめた。標識抗原濃度の上昇に伴って三者複合体濃度は上昇するが、 10^{-8} M で頭打ちとなる。これに対して、測定上下限、検出限界は標識抗原濃度が 10^{-8} M ま

での範囲では穏やかに高濃度側シフトするが、 10^{-8} を超えると急激に高濃度側シフトする。従ってこの場合、十分に呈色させ、かつ、測定感度が低下しないようにするためには、標識抗原濃度は 10^{-8} M 付近に設定する必要がある。

その他の研究

本研究課題においては、上記の方法以外に、ラジオアイソトープ HPLC の精度推定があるが、スペースの関係上割愛する。なお、粉末 X 線回折のベースラインノイズの理論的取り扱い、クロマトグラフィーの精度推定における FUMI 理論の統計的信頼性、FUMI 理論計算ソフトの作成、ELISA キットの精度推定のソフト作成などがあるが、これらも割愛する。

D. 考察

電気化学分析

検出限界を求める方法には、多数回の繰り返し測定による方法と S/N 比で求める方法があるが、前者は長時間の実験時間を要してしまい、後者は信頼性に乏しいという欠点がある。また、いずれの方法も検出限界を求めた条件が、精度および感度に優れた条件でない時、新たな条件を検討した後に、再び検出限界を求める必要があるため、非常に能率が悪い。本研究で、FIA-ECD の測定精度予測に FUMI 理論が適応できることが明らかとなったので、これを利用することで繰り返し測定を行わずに、信頼性の高い検出限界を算出できることがわかった。この検出限界を用いて、トコフェロールの電解酸化を利用したアンモニアの FIA-ECD の測定条件の最適化を、短時間に実施することを可能とした。

FUMI 理論を利用した FIA-ECD の最適化方法は、実験時間の短縮、試薬及び廃液量の軽減ができるので、グリーンケミストリーの

観点からも有用であると考えられる。

粉末 X 線回折

前年度の研究によって確認された、一成分系を用いた場合と同様、試料に多成分系であるマトリクスを使用した場合においても、解析範囲を限定する事によって FUMI 理論によるノイズ解析が可能であると考えられた。差し引き処理によって抽出されたパターンは一成分系の場合と同様にホワイトノイズによって近似できると考えられ、粉末 X 線回折測定ノイズは、試料には依存しないと考えられた。

製剤を想定した混合粉体を用いて FUMI 理論による解析を行ったところ、繰り返し測定から得られる分析精度の推定結果と同等の値が得られた。従って、製剤中の結晶成分の分析精度推定に FUMI 理論を適用する事が可能であると考えられた。

免疫化学測定法

第二抗体固相化法の動力学モデルを元に、検量線のシミュレーターを構築した。標準的なパラメーターを設定し、標識抗原濃度が精度プロファイルに及ぼす影響をシミュレーションしたところ、図 10 に示すように、酵素反応によって十分に呈色し、かつ、測定感度が低下しないような酵素標識抗原濃度は非常に狭い範囲にあることがわかった。これは、経験的に知られている事実と一致しており、シミュレーターの有用性を示すことができた。

このシミュレーターを用いれば、どのような動特性を持つ抗体を用いればどのような精度プロファイルになるかを予測することができる。これは、ELISA キットを組む際に多数の候補抗体がある場合、それぞれの抗体について最適な ELISA 条件を求めずとも、まとめてみかけの解離および会合速度定数を測定すれば、最も適した抗体を選定し、かつ、最適な測定条件を設計できることを意味している。

更に、ファージ抗体ライブラリーを用いれば、適当な動特性を持つ抗体をポジティブスクリーニングすることも可能であることから、本シミュレーターは新規な競合 ELISA の開発に有用であると考えられる。

E. 結論

分析法の誤差の因果関係から、分析法の不確かさを（精度）を求める方法論を提案し、異なった分析法に適用した。取り上げた分析法は、電気化学分析、ラジオアイソトープ HPLC、粉末 X 回折、ELISA 法である。実験結果から、これらの分析法の精度・検出限界は、実サンプルのくり返し測定なしに、正確かつ簡便に知ることができると結論できた。

本研究課題の成果の一部は、国内規格（JIS）として既に制定され、国際規格（ISO）としては日本から提案されている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Hayashi, R. Matsuda, K. Ito, W. Nishimura, K. Imai and M. Maeda: Detection limit estimated from slope of calibration curve: An application to competitive ELISA, *Anal. Sci.*, **21** (2005) 167-169.
- 2) 林 譲, 松田りえ子, 伊藤克敏, 今井一洋, 前田昌子: 競合 ELISA 法の検出限界を B/B_0 曲線から求める方法, *YAKUGAKU ZASSHI*, **125** (2005) 323-325.
- 3) A. Kotani, Y. Hayashi, R. Matsuda and F. Kusu, Baseline noise in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, Noise and Fluctuations: 18th International Conference on Noise and Fluctuations,

Edited by T. Gonzalez, J. Mateos and D. Pardo, American Institute of Physics, 2005

- 4) A. Kotani, F. Kusu, R. Matsuda and Y. Hayashi, Expression of uncertainty in measurement and its application to liquid chromatography with electrochemical detection, Trends in Chromatography, in press
- 5) 松田りえ子, 植田泰輔, 岩上 猛, 木村良夫, 林 謙, システム適合性試験の不適合システムの検出力に関する考察, 医薬品研究, 36 (2005) 433-436
- 6) 林 謙, 実験科学とその方法 第 5 章 自然科学における評価と判断, 予測, 放送大学教育振興会, 印刷中.

2. 学会発表

- 1) 林 謙, 松田りえ子: 誤差が独立でない場合の検量線の信頼区間の求め方, 日本薬学会第 125 年会, 2005 年 3 月 29~31 日, 千葉
- 2) 小谷 明, 小島智史, 林 謙, 松田りえ子, 福泉敦尚, 植田泰輔, 木村良夫, 楠 文代: 電気化学検出キャピラリーLC におけるバイカレインとバイカリンの測定条件の FUMI 理論に基づく最適化. 第 66 回分析化学討論会, 2005 年 5 月 14~15 日, 北見
- 3) A. Kotani, Y. Hayashi, R. Matsuda, F. Kusu.: Baseline noise in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, 18th International Conference on Noise and Fluctuations (ICNF 2005), 2005 年 9 月 19~23 日, Salamanca, Spain.
- 4) A. Kotani, Y. Hayashi, R. Matsuda, F. Kusu.: Optimization strategy of high-performance liquid chromatography with electrochemical detection based on the FUMI theory, The 56th Annual Meeting of

the International Society of Electrochemistry (ISE 2005), 2005 年 9 月 25~30 日, 釜山, 韓国

- 5) 小谷 明, 小島智史, 林 謙, 松田りえ子, 楠 文代: FUMI 理論を活用したアトモレベルのバイカリン・バイカレインの電気化学検出キャピラリーLC の最適化. 日本薬学会第 126 年会, 2006 年 3 月 28~30 日, 仙台
- 6) 片倉啓雄, 崔 東煥, 仁宮一章, 塩谷捨明, 林 謙, 松田りえ子, "競合 ELISA 法のシミュレーションと精度の予測" 免疫化学測定法研究会学術集会, 2005 年 7 月 1 日, 産総研・つくばセンター
- 7) 崔 東煥, 片倉啓雄, 仁宮一章, 松田りえ子, 林 謙, 塩谷捨明, "競合 ELISA 法のシミュレーションと精度の予測", 日本生物工学会大会, 2005 年 11 月 17 日, つくば国際会議場
- 8) 崔 東煥, 片倉啓雄, 仁宮一章, 塩谷捨明, 林 謙, 松田りえ子"競合 ELISA の精度に及ぼす抗体の動特性の影響", 日本化学工学会, 2006 年 3 月 29 日, 東京工業大学
- 9) 佐藤博泰, 岩木和夫, 北島昭人, 南澤孝夫, 頭島武, 豊岡利正, 松田りえ子, 林謙: FUMI 理論による精度推定の信頼性について. 日本薬学会第 126 年会, 2006 年 3 月 28~30 日, 仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社