

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonics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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
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 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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	綱脇祥子 …… 551
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 龍兒 …… 566
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 …… 576

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 郷田泰弘
- (5) 北斗電工 福泉敦尚
- (6) 林純薬工業 植田泰輔
- (7) 明治製菓 北原進
- (8) 第一ラジオアイソトープ研究所 北島昭人
- (9) 西川計測 山上仰

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 $\pm 20\%$ ）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要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はくり返し実験を行わないため、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

本研究課題報告書は次の研究テーマから成り立っている：

- 研究成果の標準化
- 電気化学分析
- ラジオアイソトープ HPLC
- 粉末 X 線回折
- 免疫化学測定法
- 実践ソフトウェアの開発

である。

電気化学分析、ラジオアイソトープ HPLC、粉末 X 線回折の測定誤差の主要原因はベースラインノイズであり、FUMI 理論 (Function of Mutual Information) 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。免疫化学測定法の誤差の主要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。

本報告書では、電気化学分析と実践ソフトウェアの開発について重点的に述べる。

(倫理面への配慮)

本研究は、免疫アッセイ法、粉末 X 線回折、ラジオアイソトープ HPLC、電気化学検出キャピラリー液体クロマトグラフィ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

電気化学分析

CLC-ECD の精度予測に FUMI 理論が利用可能であることを確かめるために、4 種の濃度のバイカレインについてそれぞれ 5 回の繰り返し測定によって求めた実測 RSD と FUMI 理論より求めた予測 RSD を比較した。従来により、バイカレインの実測 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、例えば、図 1 に示すような 0.05, 0.1, 0.23, 0.5 fmol のバイカレインについてそれぞれ 5 回の繰り返し測定を行って、20 本のクロマトグラムを得る必要がある。

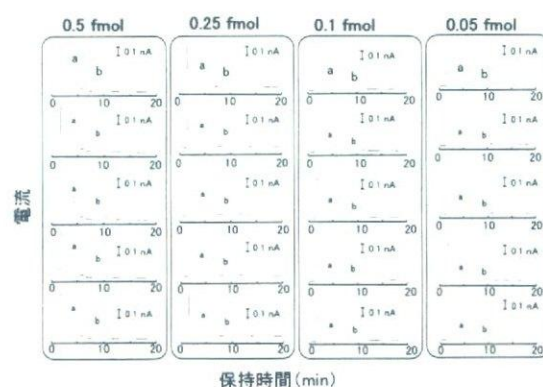


図 1 バイカレインとバイカリンのクロマトグラム

ピーク：a, バイカリン；b, バイカレイン

CLC 条件：移動相、リン酸：水：メタノール (0.5/35/65, v/v/v)；カラム, Inertsil ODS-3 (150 mm x 0.2 mm i.d., 3 μm)；カラム温度, 25℃；測定電位, +0.65 V vs. Ag/AgCl；流速, 1.8 μL/min.

図1のクロマトグラムを用いて算出した実測 RSD を図2に黒丸(●)でプロットした。図2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20分間であったので、7時間の測定時間を要した。1回の測定で得たクロマトグラムから、FUMI理論を用いることで得られる RSD を図2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本のクロマトグラム上の連続した1024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7時間もの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(20分間)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、CLC-ECDの精度予測に 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、

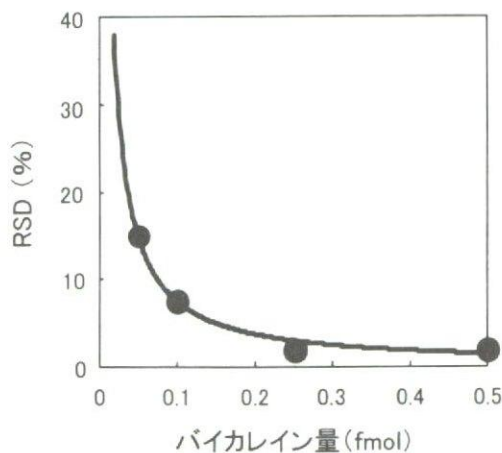


図2 エピカテキンの精度の濃度プロフィール

(●) 図1のクロマトグラムから算出した実測 RSD, (—) 0.1 fmolのエピカテキンのクロマトグラムから算出した予測 RSD

情報量 ϕ と分析効率 θ に基づく CLC 条件の最適化が行えることが示された。

次に、情報量 ϕ と分析効率 θ を用いて、CLC-ECD条件の最適化を行った。

まず、バイカリンとバイカレインの測定電位について検討を行った。CLC-ECDの測定電位+500 ~ +800 mVの間でバイカリン、バイカレインを測定したヒドロダイナミックボルタモグラムを図3Aに示した。+900 mVで、最も高い電流値が得られたが、この電位ではノイズが大きくクロマトグラムの再現性が乏しい。図3Bでは情報量 ϕ と分析効率 θ を算出し、その関係を ϕ - θ プロットとして表した。バイカリンの場合、+500 mVから+650 mVまではバイカリンのピークが高くなるため情報量が大きくなり、情報量 ϕ も分析効率 θ も増加し、+650 mVで情報量 ϕ と分析効率 θ ともに最大となった。+650 mVより、電位を正側にすると、ピークは高くなるが、それに加えてノイズも大きくなるので、予測 RSD は悪くなり、情報量 ϕ と分析効率 θ は低下した。同様にバイカレインでは、情報量 ϕ 、分析効率 θ は+900 mVの時に最大となった。従って、バイカリンを精度良く定量するときは、+650 mV、バイカレインを精度良く定量するときは、+900 mVに設定すればよいことが分かった。今までヒドロダイナミックボルタモグラムで経験的に測定電位を設定していたが、この方法では、選択した電位が測定精度よい条件とは限らない。しかし、予測 RSD に基づく情報量 ϕ と分析効率 θ を用いることで、測定精度のよい測定電位の設定を容易に行うことができた。

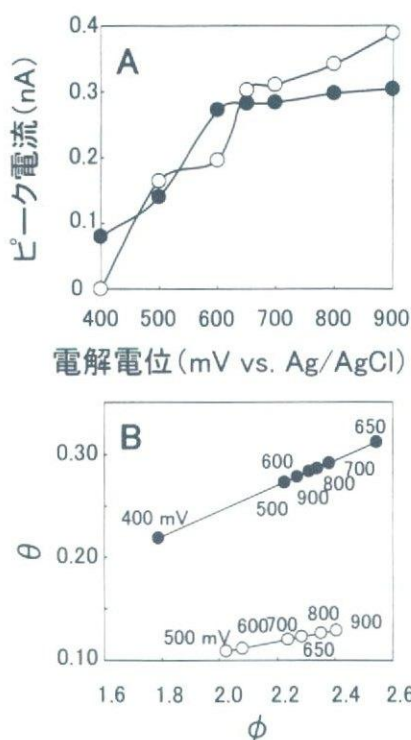


図3 バイカリンとバイカレインの(A)ハイドロダイナミックボルタモグラム及び(B) ϕ - θ プロット

(●) バイカリン, (○) バイカレイン
(B) 図中の数値は, 電解電位を示す。

実践ソフトウェアの開発

本ソフトウェア(FUMI理論に関する機能)は, Agilent社製のクロマトグラフ用オペレーティングソフトウェアをプラットフォームとする解析支援ツールソフトウェア「LC/GC Powered」の一機能として開発されたものであり, 単一クロマトグラムからの精度推定に基づいて検出限界 (LOD, 3.3σ) および定量下限 (LOQ, 10σ) を算出するものである。また, これに加えて HPLC ポンプ由来ノイズ (脈流) の確認機能も有している。

LC/GC Powered は, ユーザーがオペレーティングソフトウェアと同様の使用感が得られるように, FUMI理論に関する機能も含めて, 通常メニューから動作するように設計

されている。アドオン型である本ソフトウェアでは, 対象となるクロマトグラムをデータ変換することなく, オペレーティングソフトウェアから直接処理計算することが可能である。図4に本ソフトウェア (およびオペレーティングソフトウェア) のメニュー画面を示す。以下に両機能の内容について述べる。

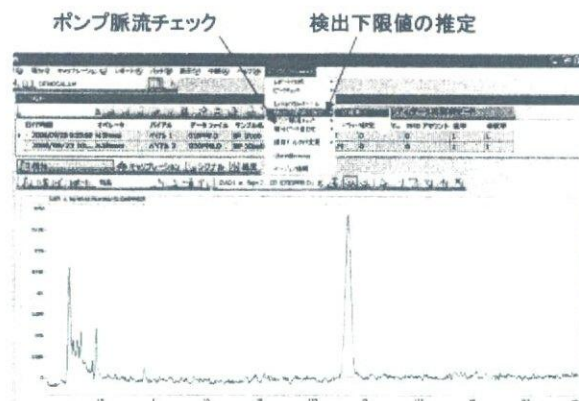


図4 ソフトウェアメニュー画面

1. LOD/LOQ 計算機能

FUMI理論によるクロマトグラフィー測定精度の一般的な算出手順は以下の通りである。

- ①クロマトグラムベースラインノイズを用いてパワースペクトルを作成する。
- ②FUMIの理論曲線をパワースペクトルにフィッティングさせて, ノイズパラメータ (ホワイトノイズの標準偏差, マルコフ過程の標準偏差および隣接するデータポイント間の相関を表す自己相関係数) を算出する。
- ③ピークからシグナルパラメータ (ゼロウインドウ, ピーク面積ならびに積分領域, 詳細下記) を設定する。
- ④得られたパラメータを FUMI の基本式に代入して測定値の標準偏差 (σ) を算出する。

本ソフトウェアでは, 上記の処理①~④は自動的に進行する。ただし, パワースペクト

ル計算に使用するデータポイントの数ならびにベースラインノイズの開始点はユーザーが設定する必要がある。パワースペクトル作成に際してはフーリエ変換を使っている関係上、ベースラインノイズとして使用する範囲のデータポイント数は2の累乗に限定される。本ソフトウェアでは、クロマトグラム上ノイズの開始点を指定すると計算に使用する範囲が自動で表示されるようになっている。また、計算に使用するポイント数を指定すると、必要な時間範囲があらかじめ表示されるので、適切にノイズ範囲を指定する操作を容易にしている。なお、本ソフトウェアでは、実用性を考慮してデータポイント数を 256, 512 または 1024 から選択する形に設計した。図 5 にノイズの指定画面、図 6 にノイズ範囲計算画面を示す。

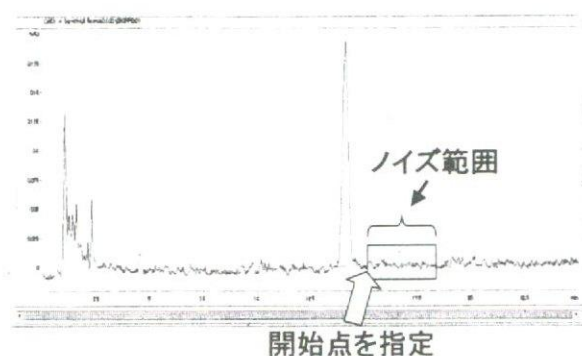
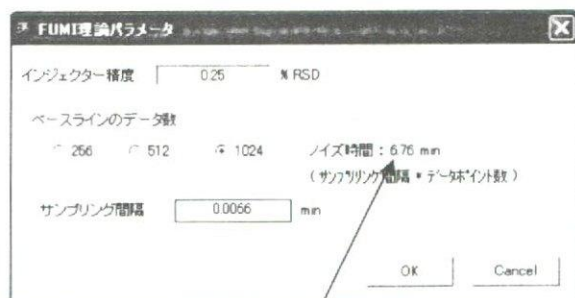


図 5 ノイズ指定画面



計算に必要な時間範囲(単位:分)

図 6 ノイズ範囲計算画面

ピークのシグナルパラメータについてはオペレーティングソフトウェアに搭載されている積分条件で得られたピーク面積を使うように設計した。従って、(積分条件が適切に設定されていれば) 上記③は自動で処理される。この場合、FUMI 理論に忠実に精度推定を行おうとすれば、ピークシグナルパラメータはもう少し厳密に規定する必要がある。すなわち、ピークのベースラインにはノイズシグナルの平均値を使用するため、その平均値算出のためのノイズ範囲であるゼロウインドウを指定しなければならない。また、積分領域についても通常はシグナル領域(一般的なクロマトグラム処理用ソフトウェアでピーク面積に使用される領域)の開始点ならびに終点の一つ内側のデータポイントで挟まれた部分とされている。ゼロウインドウの設定は長過ぎてもピーク面積算出に誤差を与えることもあるので、適切に設定するのはそれほど簡単ではない。このため、本ソフトウェアの目的である使い易さを考慮して、ピーク面積はオペレーティングソフトウェアで算出された値をそのまま採用することとした。図 7 にシグナル積分の状況を示す。

本ソフトウェアは、上記④の結果に基づき自動的に濃度-精度曲線を作成して LOD ならびに LOQ を算出するように設計されている。処理結果として、パワースペクトルと近似曲線、濃度-精度曲線(精度プロファイル)、LOD, LOQ および算出された LOD 濃度の擬似的クロマトグラムが表示されるようになっている。結果表示画面を図 8 に示す。

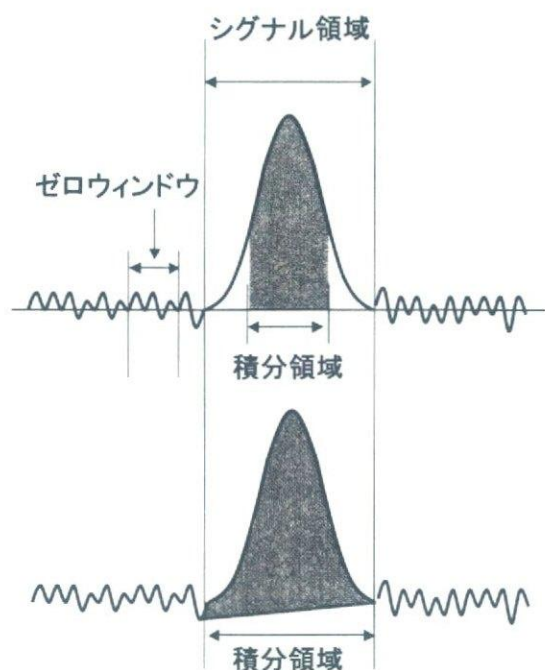


図7 積分領域指定画面
上：FUMI理論；下：オペレーティングソフトウェア

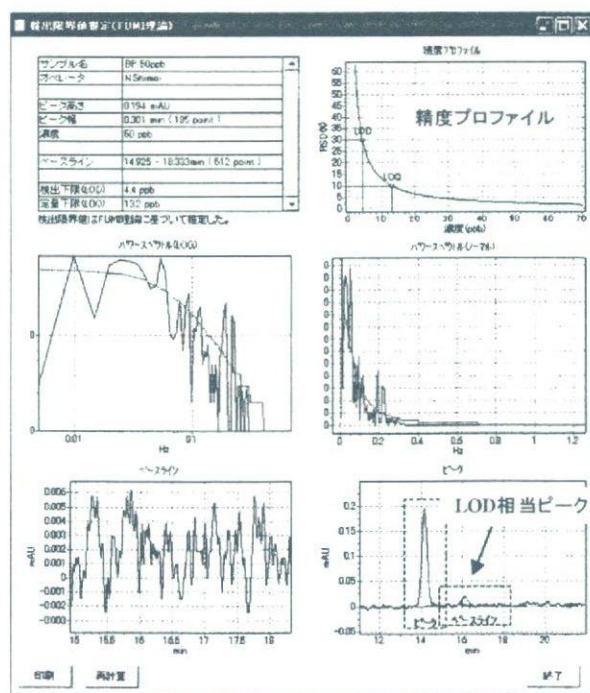


図8 結果表示画面

D. 考察

電気化学分析

従来、カラム、流速、測定電位などの HPLC 条件の設定を行うには、検討するすべての条件で1回の測定を行い、最も S/N 比が良かった条件を選択するが、この方法では選択した条件が測定精度の良い条件であるという保証がない。そこで一般には測定精度が良いかどうか確かめるため、繰り返し測定を行っている。

本研究で、CLC-ECD の精度予測に 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、予測 RSD が算出できることがわかった。予測 RSD より算出した情報量 ϕ 、分析効率 θ を利用すれば、測定精度の良い条件を最少の実験量で決定するので、このような繰り返しは必要ではない。以上のように、FUMI 理論を利用した CLC-ECD の最適化手法を用いれば、最も感度が良い分析装置、測定精度の良い条件を容易かつ短時間に設定することができ、分析における実験時間の短縮、試薬や廃液の量の軽減、人件費の削減が期待できる。
実践ソフトウェアの開発

クロマトグラフオペレーティングソフトウェアにアドオンするタイプの FUMI 理論実践ソフトウェアを作成した。このソフトウェアを用いた精度推定と実際の統計処理により得られた精度、LOD および LOQ を比較したところ、概ね良好な一致が確認され、本ソフトウェアによる精度推定の妥当性が示唆された。

本ソフトウェアでは、クロマトグラムオペレーティングソフトウェアの積分条件を用いてシグナル処理を行っており、本来の FUMI 理論精度推定に比べてやや厳密性に欠けるものの、操作的には極めて容易である。また、シグナル処理のパラメータを固定できるので、

測定者あるいは測定日を問わず同一条件によるシグナル処理が可能であること、および日常の測定により近い状態での精度推定ができるなどの利点が考えられる。さらに、本ソフトウェアではクロマトグラムをデータ変換することなく直接処理できるので、精度推定処理に際して人的ミスを低減できると思われる。多数の繰り返し測定に基づく統計的手法による精度推定は、日常的な精度保証あるいは測定条件の最適化の検討などに関しては、実用的上困難が予想される。このようなケースに対して、データ変換することなく同一条件で容易に精度測定ができる本ソフトウェアは特に有用であると考えている。

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) A. Kotani, F. Kusu, R. Matsuda, Y. Hayashi, Expression of Uncertainty in Measurement and Its Application to Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, *Trend in Chromatography* (2007, in press).
- 2) K. Segawa, T. Nakano, K. Nakata, Y. Hayashi, Birth-and-death process of

computer viruses, *Bulletin of National Institute of Health Sciences*, 124 (2006) 60-61.

- 3) H. Hasegawa, Y. Shinohara, T. Hashimoto, R. Matsuda and Y. Hayashi, Prediction of measurement uncertainty in isotope dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A*, in press.
- 4) D. H. Choi, Y. Katakura, R. Matsuda, Y. Hayashi, M. Hirobe, Y. Goda, K. Ninomiya, S. Shioya, Validation of a method for predicting the precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA, *Analytical Sciences*, 23 (2007) 215-218.
- 5) D. H. Choi, Y. Katakura, R. Matsuda, Y. Hayashi, M. Hirobe, Y. Goda, K. Ninomiya, S. Shioya, A simulation model for predicting the limit of detection and range of quantitation of competitive ELISA, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press.

2. 学会発表

- 1) 小谷 明, 林 謙, 松田りえ子, 福泉敦尚, 楠 文代: ポルタンメトリー用作用電極の FUMI 理論を活用した評価. 第 67 回分析化学討論会, 2006 年 5 月 13 ~ 14 日, 秋田
- 2) A. Kotani, Y. Hayashi, R. Matsuda, A. Fukuizumi, F. Kusu, Power Spectral Analysis of Background Noise in Controlled Potential Electrolysis at Boron-Doped Diamond and Plastic-Formed Carbon Electrodes, *International Congress of Analytical Sciences (ICAS 2006)*, 2006 年 6 月 25

～30日, Moscow, Russia.

なし.

- 3) 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, 袴田秀樹, 楠 文代: アトモルレベルの電気化学検出キャピラリーLCの開発とFUMI理論による最適化. 第19回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2006年8月1～3日, 博多
- 4) A. Kotani, Y. Hayashi, R. Matsuda, A. Fukuizumi, T. Ueda, Y. Kimura, F. Kusu, Evaluation of a Working electrode using the Power Spectral Analysis of Background Current Noise, The 57th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE 2006), 2006年8月27～9月1日, Edinburgh, UK.
- 5) 小谷 明, 袴田秀樹, 福泉敦尚, 楠 文代: ボロンドープダイヤモンド電極を用いた電気化学検出 HPLC による食肉中コレステロールの定量. 日本薬学会第127年会, 2007年3月28～30日, 富山
- 6) 松田りえ子, 米谷民雄, 岩木和夫, 大羽宏, 中村由美子, 林謙: 標準添加法の不確かさについて. 日本薬学会第127年会, 2007年3月28～30日, 富山
- 7) 北島昭人, 南澤孝夫, 豊岡利正, 松田りえ子, 林謙: radio-HPLCの分析法バリデーションにおける減衰補正の問題点. 日本薬学会第127年会, 2007年3月28～30日, 富山
- 8) 松田りえ子, 岩木和夫, 小谷明, 楠文代, 林謙: クロマトグラフィにおけるピーク検出の新アルゴリズム. 日本薬学会第127年会, 2007年3月28～30日, 富山

2. 実用新案登録

なし.

3. その他

なし.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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