

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	網脇祥子 …… 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
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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 北原進一
- (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
- (10) 昭和大学 前田昌子
- (11) ホリバ・バイオテクノロジー 奥村弘一
- (12) ヤザワ 矢澤久雄
- (13) 日本エンバイロケミカルズ 藤本茂
- (14) 栄研化学 柿島博志

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回も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、本報告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。本研究の成果は不確かさを求める方法の一般化・標準化として、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
- 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。

(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 およびキャピラリー液体クロマトグラフィ (CLC-ECD) 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 K0461 競合免疫測定方法通則) として既に制定され、国際規格 (ISO11843-5) としても日本から提案されている。

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。その結果、予測 RSD と実測 RSD はよく一致していた。以上のことから、CLC-ECD の精度予測に FUMI 理論が利用でき、繰返し測定を行わずに RSD の予測が可能であることが示された。

次に、情報量 ϕ と分析効率 θ を用いて、バイカリンとバイカレインの測定電位について CLC-ECD 条件の最適化を行った。今までハイ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、FUMI 理論による予測 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。

ラジオアイソトープ HPLC

医学検査に用いられる多くの放射性同位元素は、健康への影響を最小限に押さえるために、半減期が短い核種が使われている。このため、測定時間中での減衰の割合が大きいため、くり返し測定により分析値の精度を求めることが不可能である。そこで、便宜的な方法として、測定データに対して減衰補正を行うが、この減衰補正自体が測定誤差を変化させるために、分析精度を正しく評価できるとは言い難い。そこで、減衰補正なしに、1回の測定から測定精度を求められる FUMI 理論の適用可能性を検討する。

SPECT 検査で用いられる ^{123}I ($T_{1/2}$:13.27h, 159KeV)の HPLC 測定を研究対象とする。実験から、FUMI 理論から推定した精度と実測から推定した精度はよく一致することが分かった。この結果から、FUMI 理論を用いれば、従来の減衰補正を行わないで、ラジオアイソトープ HPLC の測定精度を知ることが可能であることが分かった。

粉末 X 線回折

一成分系と同様、製剤のような多成分の混合系においても、添加剤混合物の粉末 X 線回折パターンに、回折ピークを示さない角度範囲が存在する場合、FUMI 理論による精度推定が可能であると考えらる。

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 回くり返して粉末 X 線回折測定を行った。く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。

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、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。

実践ソフトウェアの開発

開発したソフトウェア (FUMI 理論に関する機能) は、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。

本ソフトウェアは、自動的に精度プロファイル (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、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。

D. 考察

電気化学分析

本研究では、CLC-ECD の精度予測に FUMI 理論が適応できることが明らかにし、FUMI 理論を利用することで繰り返し測定を行わずに、予測 RSD が算出できることを示した。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。

ラジオアイソトープ HPLC

くり返し測定の結果に減衰補正を行って求めた測定精度を、FUMI 理論を用いることにより、1 回の測定から求めることが可能となった。本研究で用いた試料は、逆相の HPLC カラムに保持されない Na^{123}I とした。実際には、この化合物を放射性医薬品として使用することはないが、測定時間を短くするためのモデル化合物として採用した。カラムに保持される化合物に対しても FUMI 理論が適用できることを証明するために、長半減期核種である $^{125}\text{I}(T_{1/2}:60.1\text{d})$ の化合物を用いた。この場合も、くり返し測定と FUMI 理論から求めた精度はよく一致した。

粉末 X 線回折

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。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

本研究で開発した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。

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。

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) 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.

- 3) 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.
- 4) 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 譲, 松田りえ子, 福泉敦尚, 楠 文代: ボ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.
- 3) 小谷 明, 小島智史, 林 譲, 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 譲: 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 譲: 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 譲: 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

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