

## 生体試料の定量分析について

生命のメカニズムや様々な疾病の原因究明、医薬品の開発やその評価において生体試料に含まれる物質を分析することは非常に重要である。生体試料中にはタンパク質、脂質、無機化合物などとても多くの雑多な成分が含まれている。その中に含まれているごくわずかな物質を同定したり定量したりするためには目的に応じた適切な操作を行う必要がある。本稿では定量分析を中心とした生体試料分析の概要を紹介する。

水 落 正 慶

### 1 はじめに

生物にかかわるあらゆる学問において、その対象となる生物から採取された生体試料を分析することは非常に重要である。生体試料には様々な種類があり、小さな個体であればその個体全体が対象になることもあるし、大きな個体においては各部位や臓器、細胞、血液や尿を含めた体液など対象となるマトリックスは多岐にわたる。生体試料の分析には対象を観察するイメージング、対象を構成する物質を調べる定性分析、対象に含まれる目的成分を量る定量分析やそれらを組み合わせるものなどがある。

筆者はこれまでLC-MS/MSを用いて医薬品開発における生体試料中の医薬品濃度分析に携わってきた。一般的に液体クロマトグラフィーや質量分析計については多くの教科書があり、これらは分析の分野に携わる方には身近なものと思われる。このことから本稿では機器分析のパート以外にフォーカスし、生体試料分析において最も重要と思われる試料の前処理を中心に分析を実施するまでの流れとして「試料採取」、「保管・輸送」、「前処理」及び「分析のためのバリデーション」の四つについてこれまでの経験を基に紹介する。内容については医薬品分析をベースとした記載が中心となることをご了承いただきたい。

### 2 分析の前に

多くの生体試料は医薬品などの何らかの物質が投与された影響や、特別な措置や環境下における影響を調べるために採取され分析されることが多い。これらの生体試料は主にヒトや実験動物から採取されるため、感染症や未知のウイルスなど潜在的なリスクを持ったものという認識のもと、手袋や保護メガネ、マスクといった適切な

防護具を着用して扱わなければならない。その中で、たとえば投与された物質の濃度を測定するような試験であれば、生体試料や投与物質についての情報をあらかじめ入手し、適切な対策を事前に講じる必要がある。感染性の有無や規制薬物、遺伝子組み換え技術が用いられているかを確認し、該当する場合は適切な封じ込めや出納管理、廃棄方法など、法律や安全衛生のルールに従った管理と取扱いが求められる。普段取り扱っていない物質の分析を依頼された場合、依頼元から詳細な情報を入手し、取り扱う施設にそれらの物質に対して対応できる設備があるかどうかを見極めなければならない。「知らなかったから対応していなかった」という言い訳は法律には通じないので、十分に注意が必要である。

### 3 試料採取

生体試料については大きく二つに分類される。ヒトから採取された試料とヒト以外の動物から採取された試料である。それぞれについて守るべき法律や省令、手順となるガイドラインが定められている。

#### 3・1 動物からの試料採取

国内における動物試験では代表的なものとして「動物の愛護及び管理に関する法律<sup>1)</sup>」や「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準<sup>2)</sup>」、「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針<sup>3)</sup>」、「動物実験の適正実施に向けたガイドライン（日本学術会議<sup>4)</sup>」などがあげられる。近年、動物試験においてはより進んだ動物福祉の取組みとして3Rsとよばれる行動が求められている。3RsとはRefinement（苦痛の軽減）、Reduction（動物使用数の削減）及びReplacement（代替法の活用）の頭文字であり、動物実験を実施する際に守るべき基本原則となっている。動物試験において多くの場合、経時的な観察や試料採取の実施に続き、最終的には剖検のために動物を安楽死させることになる。

使用する動物数が適切であるか、動物を使用しない実験法はないかということを一たび確認してから実験に臨むべきである。また、外部に動物試験を委託する場合は、動物愛護に関する外部認証機関である AAALAC インターナショナル（国際実験動物管理公認協会）<sup>5)</sup> の認証を得ているかなどが動物愛護の観点からの施設選びの参考になる。

### 3・2 ヒトからの試料採取

ヒトを対象とした試験において試料採取を行うのは医師または看護師であり、病院で実施されることが前提となる。ヒト由来試料の使用にあたっては医薬品開発の場合であれば事前に治験審査委員会（institutional review board, IRB）において試験や研究が問題ないことを確認して実施される。また、治療の過程において切除された組織や採取された体液としてヒト試料が得られることもあり、適切な手続きの下で分析に利用されることもある。ヒト試料の場合、細胞に含まれるゲノム情報は非常に重要な個人情報であるため、近年の個人情報保護に関する法律や「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令<sup>6)</sup>」（GCP 省令）を順守することが求められる。ヒト試料は事前に被験者との間に取り交わされたインフォームドコンセントに定められた目的のみに使用され、使用後も適切に廃棄されるまで管理されることが必要である。

### 3・3 生体試料の取り扱い

生体試料の採取にあたり、分析の観点から最も気を付けるべきことは、生体試料中の分析対象物質の安定性である。生体試料分析において分析対象となる物質は多くが試料中で平衡の状態であったり、代謝分解される途中であったりする。分析結果に採取時点の状態を正しく反映させるためには、採取後に速やかに安定性を確保するための措置をとる必要がある。そのための最も基本的かつ有効な方法は冷却することである。一般的に試料を冷却することにより化学的な変化や酵素による生物学的変化のいずれも抑えることが可能である。ほかには酸や塩基を添加して pH を変える、また、酵素が安定性に影響している場合は阻害剤の添加や有機溶媒などで酵素を失活させることも有効である。しかしながら、生体試料として最も多く採用されている血漿や血清<sup>けっしょう</sup>では、採取後に静置や遠心操作が必要であり、速やかな冷却ができない。そのため、事前の検段階で想定される環境下での安定性を確認しておくことが重要である。

体液以外の骨や臓器、筋肉、脳などの組織を分析に供するためには破碎やホモジネートが必要となる。それらに使用する溶媒は水、緩衝液、界面活性剤、細胞溶解液、有機溶媒など様々な種類がある。分析対象物質が組織から抽出されることが重要であるため、溶解性や安定

性などから適した溶媒を選択する必要がある。また、使用する容器の材質も注意が必要である。分析対象物質が脂質などの疎水性の高い物質である場合に、水や緩衝液などで希釈すると樹脂製の容器に吸着して真の値から目減りしてしまうことがある。この場合は有機溶媒や界面活性剤を添加して、溶媒への溶解度を上げる必要がある。逆に分析対象物質が高極性の塩基性化合物であった場合などはガラス製容器の表面に吸着する恐れがあるので樹脂製容器を使用することで吸着を抑えることができる。ほぼ水分と無機塩で構成される尿試料においては、微量に含まれる疎水性の高い有機化合物が樹脂製の畜尿容器に吸着し定量値への影響が問題になることが多いため、特に留意する必要がある。

## 4 保管・輸送

生体試料は適切な条件下で保管する必要がある。容器の材質、保管温度、凍結融解の影響など、分析法の構築と合わせて検討し、その安定性が確認された条件で保管することが良い分析につながる。また、各施設によっては備えている冷蔵設備などが異なるため、 $-20^{\circ}\text{C}$  や  $-80^{\circ}\text{C}$  での保管ができないことも起こりうるため、いずれの施設においても対応可能な温度域での安定性を確認しておくことも重要である。また、生体試料を採取する施設と分析を実施する施設が異なることはよくあることである。この場合、生体試料を分析施設に輸送することとなるが、輸送時には前述の保管条件に準じた適切な条件で輸送しなければならない。感染性などの危険性を否定できない生体試料の輸送についてはガイドライン<sup>7)</sup> に従った対応が必要となる。

近年では比較的安価な温度データロガーも有り、輸送時に同梱することで、試料採取から試料保管までシームレスに温度管理をすることが可能になっている。

## 5 前処理

生体試料には非常に多くの成分が含まれている。それらはタンパク質をはじめとする分子量が 10 万を超える高分子有機化合物から低分子有機化合物、さらには無機化合物である種々の塩も含まれる。また、低分子でもアミノ酸とその代謝物に代表される高極性化合物やコレステロールや脂肪酸に代表される脂質なども含まれている（図 1）。そのため、生体試料の分析では「前処理」が必要となる。

生体試料の定量分析におけるメジャーな方法として高速液体クロマトグラフ（high performance liquid chromatograph, HPLC）と各種検出器を組み合わせた液体クロマトグラフィー（liquid chromatography, LC）法がある。組み合わせられる検出器として、紫外可視分光光度計（ultra violet-visible spectrophotometer, UV-Vis）やフォトダイオードアレイ検出器（photodiode array detector,

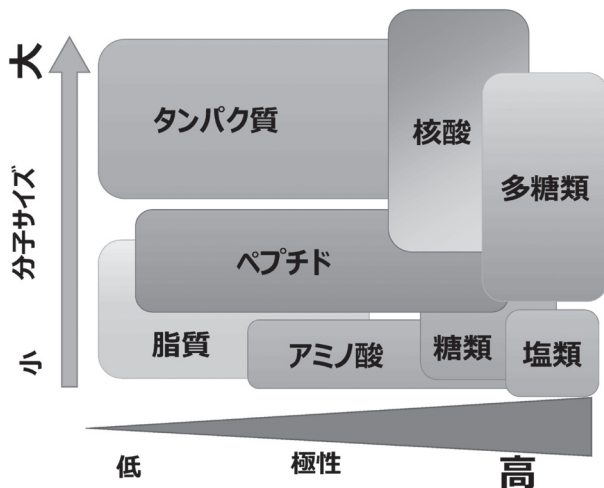


図1 生体試料に含まれる成分

PDA), 蛍光検出器 (fluorescence detector), 質量分析計 (mass spectrometer, MS) などがある。

LC法を用いることにより生体試料中の多くの成分を分離して分析することが可能であるが、分析対象物質が分析カラムから溶出する際に同時に溶出する生体試料由来の夾雑物質の影響をゼロにすることはほぼ不可能である。

UV-Vis や PDA を使用する場合は、分析対象物質と重なる吸収波長を持つ夾雑物質などによりベースラインの上昇やピーク形状の不良が引き起こされる。一般的に分析対象物質の選択性が高いと言われる MS による検出においても、夾雑物質の量が多いと同じ質量数を持つ夾雑物質のピークが検出されることや、イオン化の工程が影響を受けて物質質量に比例したレスポンスを得られないことがある。特に後者をマトリックス効果と呼び、MS を使用した生体試料分析において対応に苦慮するところとなる。また、高濃度の夾雑物質を含む試料を MS へ導入した場合、試料のイオン化部と質量分離部の汚染を引き起こし、急激な感度低下を招く原因ともなる。蛍光検出器は蛍光物質をほとんど含まない生体試料の分析と非常に相性が良いが、分析対象物質が蛍光を持つことが前提となる。投与された医薬品等であれば蛍光を持っていることも十分に考えられるが、内因性の化合物の場合は蛍光を持つ物質がほぼないため、蛍光検出器の応用は困難になる。その対応策として、分析対象物質に蛍光を持つ官能基を結合させる「誘導体化」を行い分析する方法がある。この場合は試薬が反応する構造をもつ夾雑物質も一緒に蛍光を持つことになり、検出の妨げとなることもある。

前述の通り LC により分析対象物質と種々のバックグラウンドからの影響を分離することはある程度可能であるが、生体試料を直接導入した場合は、分析対象物質に対して夾雑物質の量が非常に多くなり、分離が困難になる。これを防ぐため、可能な限り LC に導入する前に試

料を前処理することで競合する夾雑物質を除去し、LC で共溶出するバックグラウンドを可能な限り減らす必要がある。加えて生体試料中では、分析対象物質は大部分が内因性タンパク質と相互作用して可逆的な結合状態にある。そのためタンパク質から遊離させることも前処理が必要な理由の一つである。

前処理法にはいくつかの方法があり、生体試料から除去できる物質が異なっているため、生体試料をクリーンアップする目的により種々の前処理法を使い分ける必要がある。ここでは代表的な前処理法について紹介する。

### 5.1 除タンパク法

最も一般的でかつ簡便な方法として除タンパク法 (protein precipitation, PPT) が挙げられる。例えば血漿試料においてはタンパク質が約 8 % 程度含まれており、溶質として最も多くを占めている。タンパク質はアミノ酸のポリマーであり、極性に富んだ側鎖が互いに作用して、それぞれのタンパク質に特異的な立体構造をとっている。タンパク質は疎水性部位が内向し、親水性の部位が外側になり水和されることで可溶化している。除タンパク法の多くは除タンパク剤を使用することでこれらの水和水を取り除き、タンパク質の疎水性を上げて互いに凝集させることで沈殿、除去を行うものである (図 2)。

除タンパク剤は、水と混和する有機溶媒である各種アルコールやアセトニトリル、アセトンなどが使用される。血漿に対してはおおむね 2 等量程度の有機溶媒添加により十分なタンパク質の除去が可能である。さらに過剰量の有機溶媒を添加することで塩などが析出し、無機成分の除去をある程度同時に行うことができる。また、有機溶媒の添加量を増やすことはその後、有機溶媒を留去しやすくなるというメリットもある。有機溶媒のほかに酸を添加することでも除タンパクを行うことができる。酸を添加して pH を変化させることによりタンパク質のイオン性側鎖の乖離状態を変化させ、さらに正に帯電した部分と酸との相互作用により水和水が外れ、変性、凝集を生じる。酸による除タンパクは少量の添加でも強力にタンパク質の変性を生じるため、試料成分が薄まりにくいメリットもある。酸による除タンパクで良く使用されるものにはメタリン酸、過塩素酸、トリクロロ

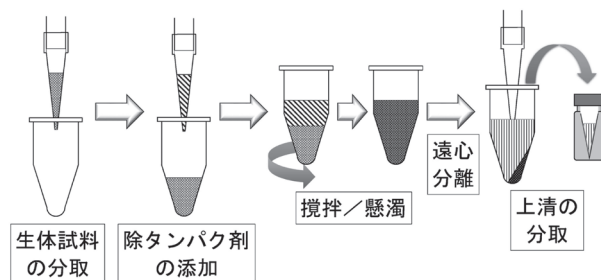


図2 除タンパク法の操作概要

酢酸などがある。これらの酸は操作後に比較的容易に除去でき、分析カラムへのダメージを減らすことができる。

除タンパクを実施する際は分析対象物質の溶解性や極性に留意する必要がある。一部の物質は使用した変性剤への溶解性が悪く析出したり、また、変性したタンパク質と共沈したりして回収が悪くなる。

除タンパク操作は析出したタンパク質成分を遠心分離により沈殿させたのち、ピペティングやデカンテーションにより上清を他容器に移すことが多い。従来のフィルターでは目詰まりによりろ液を得ることが難しかったが、近年では三次元の立体メッシュ構造を持った除タンパクフィルターが利用可能であり操作性が向上している。さらには、従来の除タンパク法では図1で示した成分のうちタンパク質や一部の無機塩の除去しかなかったが、不要な脂質の除去も可能な除タンパクフィルターも開発されており、MSを使用した分析には有効である。

多くのLC法では逆相系のカラムを用いることが多い。有機溶媒を使用して除タンパクした試料には有機溶媒が多く含まれ、逆相系カラムでの保持には不利に作用するため、有機溶媒を除去するか水系溶媒を添加してその有機溶媒比率を下げる必要がある。有機溶媒の除去には時間がかかることが多いため、水系溶媒による希釈のみでサンプル調製ができるように前処理法を構築すると時間の短縮につながる。また、逆相系カラムとは逆の機構である親水性の相互作用を利用した hydrophilic interaction chromatography (HILIC) 用カラムを使用することで有機溶媒がリッチなままで HPLC に導入することができる。

## 5・2 液々抽出法

除タンパク法と同じく従来から用いられている方法に液々抽出法 (liquid-liquid extraction, LLE) がある。互いに混ざり合わない、相分離する水系溶媒と有機溶媒を使用してそれぞれへの測定物質や夾雑物質の溶解度の違いを利用して物質を分離する方法である (図3)。

一般的にある物質の水相と有機相への溶解の度合い

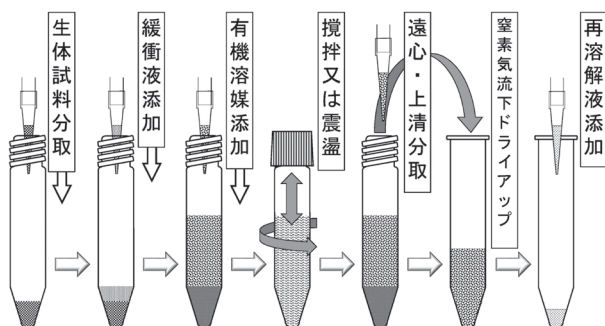


図3 液々抽出の操作概要

は、水と *n*-オクタノールを用いた場合のそれぞれの相中の濃度比“(オクタノール中の濃度)/(水相中の濃度)”の対数を取ったオクタノール/水分係数  $\log Pow$  で表される。この値が大きいくほど、その物質は有機相に溶解する濃度が大きくなる。それぞれの相に溶解する物質の量はそれぞれの相での濃度によって決まり、その濃度は溶媒量に依存しない。そのため、抽出する側の溶媒量を多くすることで、相対的に抽出される側の溶媒量が少なくなり、効率的に抽出することができる。

液々抽出には、水と相互溶解しない低極性の有機溶媒が用いられる。代表的なものとしてヘキサン、*tert*-ブチルメチルエーテル、酢酸エチル、ジエチルエーテルなどが挙げられる。これらの間でも極性には差があるため、目的とする物質に対して十分な溶解度があり、かつ可能な限り疎水性の高い溶媒を選択する。極性が比較的大きい(誘電率が大きい)有機溶媒は、抽出できる化合物の幅も広くなり使用しやすいが、その分、分析を妨害する夾雑物質の量が増える可能性も高くなるので注意が必要である。

生体試料の濃度が高い場合など、有機相と水層が白濁したエマルジョンを形成して分離不十分になることがある。このような場合はそれぞれの溶媒を増量するか、塩化ナトリウムなどの塩を添加して「塩析」を生じさせることで分離できることもある。塩の添加はそれぞれに相互溶解している溶媒量を減らすことができ、結果として分析時のバックグラウンドを減らせることもある。また、塩析の効果により通常の水では相互溶解するアセトンやテトラヒドロフラン、アセトニトリルなどの溶媒に対しても液々抽出を行えるようになり、通常疎水性溶媒では抽出できない極性の高い化合物の抽出が可能になる。この原理は QuEChERS (キャッチャーズ) 法として食品分析の分野ではよく用いられる手法である。

対象とする化合物がイオン性の官能基を持つ場合は水相の条件設定に注意する必要がある。酸性化合物や塩基性化合物の場合は水相の pH をそれぞれの  $pK_a$  よりも高くするか、低くするかによってその溶解度を変えることができる。酸性化合物の場合は pH を  $pK_a$  よりも 2 以上低く、塩基性化合物は pH を  $pK_a$  よりも 2 以上高くすることで分子を非乖離状態にすることができ、有機相への抽出効率が上がる。また、非乖離型にて有機相に抽出した物質に対して、再度 pH を変化させて乖離型にすることで再び水相に抽出する「逆抽出」といった操作も可能である。逆抽出で精製した試料は非常にクリーンアップ度が高い試料となるが、pH の設定には物性を熟知していることや、抽出操作を 2 回繰り返すことで前処理が複雑になることからハンドリングにおける高い技術が求められる。

生体試料のように比較的少量、数 mL 以下の試料を処理する場合は分液ロートではなく、キャップ付きの遠沈

管を用いて、<sup>かくはん</sup> 攪拌と遠心分離を組み合わせて液々抽出を行うことにより、効率的に多検体を処理することができる。また、遠心分離後の遠沈管をドライアイス-アセトンなどの冷媒に浸漬し水相を凍結させて有機相をデカンテーションにより採取することで、より簡便に操作することができる。

液々抽出と同じ原理である<sup>けいそう</sup> 珪藻土カラム/カートリッジの利用も有用である。珪藻土は二酸化ケイ素を主成分とし、極性が高く水と非常によくなじむ。緩衝液で希釈した生体試料を珪藻土カラムに浸み込ませることで水と生体試料に含まれる無機塩や高極性化合物は珪藻土に奥深く浸み込んでいく。一方で疎水性の高い物質は珪藻土表面に取り残された状態となる。この表面に残った疎水性の高い化合物を水と混和しない有機溶媒で洗い流すことで回収する。液々抽出で用いる有機溶媒は水系溶媒と層を成しているが、実際はある程度相互に溶解した状態になっている。このため、有機溶媒中にも望まない水溶性の夾雑物質が溶け込んでいることになる。珪藻土カラムを用いることでこの相互溶解を抑えることができるため、同じ有機溶媒を使用した液々抽出操作よりも精製度の高い試料が得られることが多い。また、ピペットによる相の分取や遠心分離による相分離の操作が不要になるため簡便である。

### 5.3 固相抽出法

固相抽出 (solid phase extraction, SPE) はカラムクロマトグラフィーと同様の原理で発展してきた前処理手法である。固相にはシリカゲルやポリマー、アルミナ、活性炭、イオン交換樹脂などが用いられ、これらがカートリッジと呼ばれるシリンジタイプのバレルや96ウェルフォーマットのプレートに充填された形で利用される。分析対象物質とその他の夾雑物質の固相への親和性や溶出液への親和性 (溶解性) の違いを利用して精製を行う。生体試料の前処理には疎水性相互作用を利用した、いわゆる逆相系の分離機構を用いることが多い。逆相系には多孔質形状のシリカゲルやポリマーをベースにオクタデシル基 (C18) に代表される種々の疎水性官能基を導入した固相が用いられる (図4)。

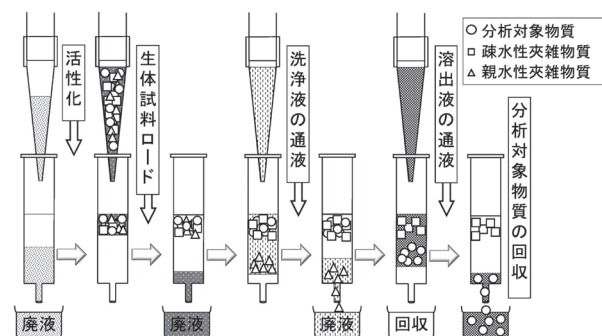


図4 固相抽出の操作概要

使用前の固相は通常乾いた状態になっており、多孔質の細孔内にある疎水性官能基は溶媒和されていない。このままでは導入した生体試料中の成分と相互作用することなく固相表面を通して保持されずに排出されてしまう。固相に導入されている官能基が疎水性を発揮するためには水系溶媒に濡れている状態が必要となるが、乾いた固相に直接水を通液しても官能基そのものの撥水性により弾かれてしまう。そのため、固相を使用するには平衡化または活性化と呼ばれるコンディショニングが必要となる。平衡化は初めに水と相互溶解する有機溶媒 (メタノールやアセトニトリルなど) を通液して固相の細孔内を満たし、続いて水系溶媒を通液することで細孔内の溶媒が呼び水となり、細孔内が水系溶媒で湿潤した状態になることで官能基の疎水性が発揮される。2000年代以前では、シリカゲルベースやポリマーベースの固相はその撥水性によりいったん上記の手順で湿潤させた場合でも、放置して枯らして (乾燥して) しまうと、細孔内が再度撥水してしまい、平衡化前の状態に戻ることがしばしばあった。これは生体試料を負荷 (ロード) させるときや洗浄するときも同様であり、いったん枯らしてしまうと溶出の際のバラツキの原因となるため、固相をハンドリングする際の液面管理には非常に気を遣うものであった。2000年前後にポリマーベースの一部に親水性官能基が導入された固相が開発され、このタイプの固相は枯らしてしまっても細孔内が水で湿潤した状態を保つ機能を持つことで活性化状態を維持することが可能になった。他にも多くの改良が加えられ、固相抽出法は現在では生体試料の前処理においてメジャーな手法となった。また、逆相系固相とイオン交換樹脂を組み合わせたミックスモードと呼ばれる固相も普及し、イオン性の官能基を持つ化合物に対してイオン性相互作用で保持できるようになった。この場合、有機溶媒100%での洗浄工程が可能になり、より精製度の高い試料を作製できるようになった。

固相に試料や試薬液を通液させる操作方法にはいくつか種類がある。最もシンプルな方法は重力を利用した自然落下である。自然落下では、通液速度が比較的ゆっくりで、分析対象物質と固相の接触時間が長く、良好な保持を得やすい反面、通液完了まで時間がかかるため多検体の処理には向いていない。重力の代わりに遠心分離機を使用し、遠心力により通液させることもできる。この方法では、すべての試料に同一条件の負荷がかかり、バッチ間の差をなくすることができる優れた方法である。固相を専用の減圧可能な器具に設置し、アスピレーターや真空ポンプで減圧して吸引する方法もよく使用される。複数の固相を同時に処理することが可能であるが、固相の通液速度は同一ロットの固相でも個体差があるため、先に通液が終了した固相に対して余分に気体が通過してしまい乾燥の原因となる。このことを防ぐためにコッ

クが個別についている器具の使用が望ましい。また、吸引とは逆に固相の上面から加圧して通液させる方法もある。加圧レギュレーターを介することですべての固相に対して均一に圧を掛けることができる。加圧装置は通液後に過剰な加圧気体の通過を防ぐ機構がついており、ある程度固相の乾燥を抑えることができる。

逆相系の固相抽出法による試料処理は、洗浄液をコントロールすることで分析対象物質よりも極性の高い物質を洗い出し、溶出液をコントロールすることで分析対象物質よりも極性の低い物質を固相に残すことができる。また、タンパク質などは固相の細孔に対してサイズが大きいため、保持されずにロードもしくは洗浄の時点で洗い流すことができる。このように、固相による処理はタンパク質などの高分子をはじめ不要な高極性化合物と疎水性の高い化合物を同時に排除することができる精製ツールとなる。さらにミックスモードを利用してイオン交換を組み合わせることで目的対象物質とは逆の酸性または塩基性、並びに中性物質を排除することもできる。

#### 5.4 希釈

生体試料の中でも比較的きれいな、溶質量の少ないマトリックスである尿や脳脊髄液、涙液、眼房水、透析液などは希釈のみで分析可能な場合があるが、利用の範囲は限られる。

## 6. バリデーション

生体試料の分析に限らず、法律や省令などの規制下における分析ではその方法の妥当性を示すためにバリデーションの取得が求められる。現在、日本国内で医薬品分析の分野で運用されているガイドライン<sup>8)</sup>において、バリデーションは「種々の評価を通じて十分な再現性及び信頼性を有することを立証すること」となっている。

生体試料は非常に多くの雑多な成分を含み、さらに試料を採取する個体間でも分析への影響が異なることがあるため、分析方法にそれらの影響がないことを確認しなければならない。LC法をはじめ、クロマトグラフィーを用いた定量に関するガイドラインには表1に示す項

目が含まれている。

クロマトグラフィー法のガイドラインでは各項目に対して真度と精度の判断基準が定められており、定量下限においては真度が100±20%以内、精度が20%以下、それ以外の濃度においては真度が100±15%以内、精度が15%以下とされている。

これらは生体試料中の医薬品の定量分析に対して定められており、原則として、投与後に生体内濃度が増加する物質が想定されている。しかしながら、内因性の化合物、一般的にバイオマーカーと呼ばれる化合物においては、必ずしも生体内濃度が増加傾向を取るとは限らない。また、多くの投与された医薬品が経時的に10~1000倍以上の濃度変動があり、対数的な数値の増減を示すのに対して、内因性の化合物は、普段は恒常的な値を示し、変動幅が小さく、元の値に対して数割しか変化しないものも多くある。これら内因性の化合物に対しては、先に示した判断基準は必ずしも妥当なものではないため、分析対象物質とその分析結果の利用目的に応じて個々に判断基準を設定する必要がある。また、バリデーション項目についても分析を行う目的や開発段階に応じて、適宜削除または追加をする必要がある。生体試料の定量法を構築する前には「なぜその物質を測るのか」「予測される変動幅はどの程度か」「結果を評価するために必要な精度はどの程度か」などの背景情報を収集し、目的に相応した適切な分析法を構築する必要がある。過剰な精度を持つ分析法の構築は、不必要な検討時間の増加につながる。また緩すぎる判断基準を設定すると、試験結果を正しく評価することが出来なくなる危険性がある。

医薬品開発の現場では近年、分析法を構築しバリデートする際には「fit for purpose」や「context of use」というフレーズとともにその判断基準やバリデーション項目を設定することが求められている。分析者は分析法の知識だけでなく、分析の目的及び背景を理解して適切な分析法を構築するためにより幅広い知識が求められている。

なお、主に生体試料中のタンパク質など高分子定量に

表1 ガイドラインにあるバリデーションの項目

項目	説明
選択性	試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質及び内標準物質を区別して検出することができる能力のこと
定量下限	試料中において分析対象物質を信頼できる真度及び精度で定量することができる最も低い濃度
検量線	分析対象物質の理論値とレスポンスの関係をグラフに示したもの
真度及び精度	真度：分析対象物質の定量値と理論値との一致の程度のこと 精度：それぞれの繰り返し分析によって得られる定量値のばらつきの程度のこと
マトリックス効果	分析対象物質のレスポンスが試料中のマトリックス由来成分によって影響を受けること
キャリアオーバー	分析機器に残留した分析対象物質が定量値に影響を与えること
希釈の妥当性	希釈が分析対象物質の定量値に影響を与えないこと
安定性	試料を採取してから分析するまでの各過程が分析対象物質の濃度に影響を及ぼさないこと

用いられる手法としてリガンド結合法 (ligand-binding assay, LBA) があるが、クロマトグラフィー法とは別に LBA 法に対するバリデーションのガイドライン<sup>9)</sup>も作成されており合わせて参照することをお勧めする。

## 7 最後 に

生体試料分析に関わる技術や分析法は分析対象物質ごと、マトリックスごとに幅広く、それらが掛け合わされることで選択肢が膨大となる。文献や web の検索だけでは最適な分析法や前処理法の情報が得られず、多くの場合において検討が必要なる。経験上、個人の知識や経験による部分がまだまだ大きい分野だと感じている。前処理に使用するデバイスメーカーのホームページなどを参考にすることで、具体的な手順や試薬、その使用量の情報を得られることが多い。

LC 法を用いた分析については日本分析化学会が編集している「液クロ 虎の巻シリーズ」, 「LC/MS, LC/MS/MS シリーズ」, 「コツ・How to シリーズ」は基礎から応用までを含めて、生体試料分析の分野においても非常に参考になるため、これから分析を始められる方にはぜひお勧めしたい。

### 文 献

- 1) 環境省：“動物の愛護及び管理に関する法律”，〈[https://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/1\\_law/index.html](https://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/1_law/index.html)〉, (accessed 2023. 2. 9).
- 2) 環境省：“実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関

する基準”，〈[https://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2\\_data/nt\\_h180428\\_88.html](https://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/nt_h180428_88.html)〉, (accessed 2023. 2. 9).

- 3) 厚生労働省：“厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針”，〈<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/hokabunya/kenkyujigyou/i-kenkyu/index.html>〉, (accessed 2023. 2. 9).
- 4) 日本学術会議：“動物実験の適正な実施に向けたガイドラインについて”，〈<https://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/2006.html>〉, (accessed 2023. 2. 9).
- 5) AAALAC International：〈<https://www.aaalac.org/>〉, (accessed 2023.1.28).
- 6) 厚生労働省：“医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令”，〈<https://www.pmda.go.jp/int-activities/int-harmony/ich/0076.html>〉, (accessed 2023. 2. 9).
- 7) 国立感染症研究所：感染性物質の輸送規則に関するガイドダンス 2013-2014 (日本語版).
- 8) 厚生労働省：薬食審査発 0711 第 1 号，“医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーショに関するガイドライン”。
- 9) 厚生労働省：薬食審査発 0401 第 1 号，“医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法 (リガンド結合法) のバリデーショに関するガイドライン”。



水落 正慶 (Masayoshi Mizuochi)

シミックファーマサイエンス株式会社  
(〒677-0032 兵庫県西脇市中畑町 17-18). 富山大学大学院理工学研究科修士課程修了。修士 (工学)。LC/MS 分析士三段。《現在の研究テーマ》核酸やペプチド、低分子の LC-MS による生体試料中濃度測定法開発。《趣味》美術館・博物館めぐり、お菓子作り。

E-mail: masayoshi-m.cs@cmicgroup.com

## 『ぶんせき』再録集 vol. 1 出版のお知らせ

ぶんせき誌の過去記事の有効利用の一環として、『ぶんせき』再録集 vol. 1 が出版されました。2011 年から 2020 年まで、10 年間分の〈ミニファイル〉の記事が詰まっています。

下記 10 章からなり、それぞれ 12 から 14 の話題が集められています。

1. 実験器具に用いられる素材の特徴, 2. 分析がかかわる資格, 3. 顕微鏡と画像データ処理, 4. 最新の web 文献検索データベース, 5. ポータブル型分析装置, 6. 分析化学と材料物性, 7. 分析化学者のための多変量解析入門, 8. 土壌分析, 9. サンプルング, 10. 前処理に必要な器具や装置の正しい使用法。

本書はアマゾンオンデマンド出版サービスを利用して出版した書籍ですので、書店には並びません。アマゾンサイトからのネット注文のみとなりますので、ご注意ください。詳しくは「ぶんせき」誌ホームページをご確認ください。