

## 調査・研究報告書

薬局・ドラッグストアで実施できる簡便かつ迅速な生化学検査薬の開発

摂南大学薬学部 河野 武幸

(〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町 45-1 072-866-3113)

### 要旨

高血圧、糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病治療薬は、スイッチ OTC として薬局等で販売されることが予想されている。しかし、それを可能とするには、薬局・ドラッグストア等で患者病態をアセスメントできる基盤整備が必要不可欠である。本申請課題では、Polybead Microspheres の凝集反応を応用した簡便かつ迅速な測定が可能な生化学的検査薬の開発を目的とした。

NZW ウサギ (雌、10 週齢) をブタ AST あるいはヒト AST (aspartate aminotransferase) で感作し、抗 AST 血清を得た。この血清から抗 AST IgG を精製し、Polybead Microspheres (粒子径 0.2  $\mu\text{m}$ ) に不溶化した。特性チップに 0.1% 抗 AST IgG 不溶化 Polybead Microspheres 懸濁液と AST を含む血清試料を加え、反応後、遠心分離し、凝集したラテックスを沈殿させた。沈殿物の高さを肉眼的に計測した。

沈殿物の高さはブタ AST およびヒト AST でそれぞれ 0.5~30.0  $\mu\text{g/mL}$  および 0.25~3.00  $\mu\text{g/mL}$  (10~120 U/L) の範囲で直線性を示した。また、測定精度 (日内再現性、日差再現性、添加回収率) も良好であった。

本測定法はヒト血清 AST の成人基準値上限 (40 U/L) 付近を十分に測定でき、異常/正常の判定が可能であった。また、少量 (10  $\mu\text{L}$ ) の血清試料と Polybead Microspheres 試薬を混合し、遠心分離するだけの手技で血清 AST 濃度を測定できる。即ち、既存法と異なり、特別な機器を必要としない。以上のことから、本測定法は薬局やドラッグストアで実施可能な測定法に成り得ると考えられた。

### 1. 調査研究目的

我が国の疾病構造は、感染症などの急性疾患から高血圧、糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病に置き換わり、それら慢性疾患治療薬はスイッチ OTC (Over-The-Counter) として薬局等で販売されることが予想されている。即ち、国民自らが健康に責任を持ち、自身の病状を把握し、OTC 医薬品などを用いて治療を目指す社会への変革が求められている。しかし、それを可能とするには、セルフメディケーションの受け皿となる基盤

整備が必要不可欠である。従って、薬局等で患者病態をアセスメント出来る物的資源の供給が求められている。このような背景で、簡便かつ迅速測定が可能な生化学的検査薬を開発することを目的に本研究を展開した。これにより、治療効果の判定が容易となり、薬局等の社会インフラを活用したセルフメディケーションが一層推進すると考えられる。

以上の背景で本申請課題では、Polybead Microspheres の凝集反応を応用した AST (aspartate aminotransferase) の簡易測定法を開発し、その測定精度を評価した。

## 2. 調査研究方法

### 2-1. 動物および倫理

NZW ウサギ（雌性、9 週齢）は日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入した。コンベンショナル環境下で飼育し、餌（LRC4（オリエンタル酵母工業株式会社、東京））および水は自由摂取させた。動物実験を行うに際し、摂南大学薬学部動物実験指針に従った。

### 2-2. 抗体

#### 2-2-1. 抗血清

抗ブタ AST 血清および抗ヒト AST 血清は、それぞれ NZW ウサギ（雌性、10 週齢）をフロイント完全アジュバント（Difco Laboratories, U.S.A.）存在下、ブタ AST（Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany）あるいはヒト AST（ATGen Co., South Korea）で感作し、調製した。

#### 2-2-2. IgG

IgG は血清から硫酸ナトリウム分画およびジエチルアミノエチル-セルロース（Whatman, Ltd., England）カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製した IgG を 17.5 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0 で 2.86 mg/mL の濃度になるように調製した。

### 2-3. 抗 AST IgG 不溶化 Polybead Microspheres

2.5% Polybead Microspheres（Polysciences Inc, U.S.A.）（0.5 mL）に 0.1 mol/L ホウ酸ナトリウム緩衝液, pH 8.5（1.0 mL）を加え、攪拌後、遠心分離（21,000×g、10 分間、室温）した。上清を除去し、同緩衝液, pH 8.5（1.5 mL）を加え、攪拌後、遠心分離（21,000×g、

10 分間、室温) した (洗浄)。同様の手順で、2 回洗浄した。次に、0.1 mol/L 同緩衝液、pH 8.5 (1.0 mL) および 2.86 mg/mL 抗 AST IgG 溶液 (140  $\mu$ L) を加え、室温にて終夜静かに攪拌し、遠心分離 (21,000 $\times$ g、10 分間、室温) した。上清を除去し、1% ウシ血清アルブミン (BSA、ナカライテスク株式会社、京都) を含む同緩衝液 (1.0 mL) を加え、30 分間保温し、遠心分離 (21,000 $\times$ g、10 分間、室温) した。上清を除去し、1% BSA を含む同緩衝液 (1.0 mL) を加え、攪拌後、遠心分離 (21,000 $\times$ g、10 分間、室温) した。同様の手順で、2 回洗浄後、1% BSA、0.1% アジ化ナトリウムおよび 5% グリセロールを含むリン酸緩衝生理食塩水、pH 7.0 (1.0 mL) を加え、抗 AST IgG 不溶化 Polybead Microspheres 懸濁液を調製した。

#### 2-4. タンパク質不溶化セファロース 4B を用いた血清中 AST の除去

GE Healthcare Bio-Sciences AB の添付文書に記載された方法に従って CNBr 活性化セファロース 4B (GE Healthcare Bio-sciences AB, Sweden) に抗 AST IgG を不溶化した<sup>1)</sup>。血清を抗 AST 抗体不溶化セファロース 4B カラムに流下させ、AST を除去し、これをブランク血清として用いた。

#### 2-5. Polybead Microspheres の凝集反応を用いた AST の測定

特性チップ (図 1(A)) に 0.4 mol/L NaCl を含むトリス塩酸緩衝液、pH 8.2 で 5 倍希釈した抗 AST IgG 不溶化 Polybead Microspheres 懸濁液 (600  $\mu$ L) および血清試料 (10  $\mu$ L) を加え、攪拌し、室温にて 15 分間静置した。静置後、遠心分離 (1,500 $\times$ g、2 分間、室温) し、沈殿物の高さを肉眼的に計測した (図 2)。

### 3. 調査研究成果

#### 3-1. 検量線

AST 各濃度における沈殿物の高さから検量線濃度「0」の自己凝集による沈殿物の高さを差し引いた特異的な沈殿物の高さを算出し、検量線を作成した。ブタ AST では 0.5  $\mu$ g/mL $\sim$ 30.0  $\mu$ g/mL の範囲で、ヒト AST では 0.25 $\sim$ 3.00  $\mu$ g/mL (10 $\sim$ 120 U/L) の範囲で AST 濃度に依存した特異的な沈殿物の高さの増加が認められた ((図 1(B)、図 3)。

#### 3-2. 再現性

##### 3-2-1. 日内再現性

3 濃度の血清試料(ブタ AST 血清: 1.25, 3.75, 12.5  $\mu$ g/mL、ヒト AST 血清: 1.00, 1.75, 2.50

μg/mL) を、各濃度 5 回、定量法に従い分析し、検量線より定量値を算出した。変動係数はブタ AST で 6.1～16.1 %、ヒト AST で 10.7～19.2 % と良好であった。また、真度はブタ AST で -12.5～4.4 %、ヒト AST で 1.8～8.7 % であった (表 1)。

### 3-2-2. 日間再現性

3 濃度の血清試料(ブタ AST 血清: 1.25, 3.75, 12.5 μg/mL、ヒト AST 血清: 1.00, 1.75, 2.50 μg/mL) を、各濃度 1 日 1 回、6 日間、定量法に従い分析し、検量線より定量値を算出した。変動係数はブタ AST で 11.2～19.0 %、ヒト AST で 9.9～14.9 % と良好であった。また、真度はブタ AST で -8.2～17.9 %、ヒト AST で -23.0～0.0 % であった (表 2)

### 3-3. 添加回収率

ブタ AST およびヒト AST を健常ブタ血清およびヒト血清にそれぞれ 2.50, 3.75, 5.00, 12.5 μg/mL および 0.25, 0.50, 1.00, 3.00 μg/mL となるように添加し、検量線を用いて定量値を算出した。得られた定量値から添加回収率を求めた結果、ブタ AST では 2.50, 3.75, 5.00, 12.5 μg/mL の添加で 72.7, 87.1, 93.9, 97.7 % であった。また、ヒト AST でも 0.25, 0.50, 1.00, 3.00 μg/mL の添加で 86.5, 116.9, 118.3, 83.5 % であり、ブタ AST およびヒト AST いずれも回収率は良好であった (表 3)。

## 4. 考察

近年のセルフメディケーションの主眼は、疾病構造の変化と超高齢化社会への対応に置かれ、これに呼応する形で生活習慣病治療薬を中心に医療用医薬品のスイッチ OTC 化が計画されている。しかし、これを可能とするためには、薬局・ドラッグストア等で患者病態をアセスメントできる基盤整備が必要不可欠である。このことから、薬局やドラッグストアの店頭で実施可能な AST の簡便かつ迅速な生化学検査薬の開発が求められている。

AST (aspartate aminotransferase) は、肝炎、肝硬変症や胆道系疾患などの重要な検査マーカーである。一般に、その測定には MDH-UV (malic acid dehydrogenase-紫外部) 法を利用した JSCC 常用基準法が採用されている。しかし、1) 多量の血清試料 (300 μL)、2) 高額機器 (分光光度計) および 3) 正確な温度管理が必要である。また、使用する試薬の保存期間が短いなど、薬局やドラッグストアで実施するには難点が多い。一方、ラテックス凝集反応を応用した本測定法は、既存法と比較し、1) 必要サンプル量が少量 (10 μL) で 2) 室温で迅速 (15 分間) に測定できる。また、3) 測定精度 (日内再現

性、日差再現性、添加回収率)も良好であった(表 1~3)。以上のことから、本測定法は、薬局やドラッグストアの店頭で実施可能と考えられた。

## 5. まとめ

日本 OTC 医薬品協会と日本臨床検査薬協会が実施した一般用 (OTC) 検査薬に関する調査の結果では、生活者が一般用 (OTC) 検査薬を使用して健康状態を検査したいという意向が 80%以上あり、検体採取方法に関して、唾液、涙、尿およびごく微量の血液いずれも検査意向が 50%以上であった<sup>2)</sup>。また、使用したい理由が「手軽で簡単」、「すぐに結果が出る」など、それら生活者ニーズと本測定法の利点は合致している。今後、他の検査項目についても検討を加え、測定可能検査項目を拡大し、薬剤師がその場で簡易に検査結果を評価できるシステムを構築できれば、将来、予測される生活習慣病治療薬等のスイッチ化やリフィル処方、さらには共同薬物治療管理 (CDTM, collaborative drug therapy management) への対応がより充実すると考えられる。

## 6. 調査研究発表

### 6-1. 学会発表

中山太一, 首藤みほ, 吉田侑矢, 辻琢己, 河野武幸 (摂南大学薬学部 病態医科学研究室): 薬局・ドラッグで実施できる簡便かつ迅速な生化学検査薬の開発, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 2012 年 3 月.

### 6-2. 誌上発表

吉田侑矢, 辻琢己, 細田敦規, 河野武幸, 久保貞也, 佐竹正人, 難波洋, 瀬野智美, 前田定秋: 実地臨床に従事する薬剤師参加型のセルフメディケーション演習の有用性, 医療薬学, in press.

## 7. 引用文献

1. 田中祥之, 岡野由貴, 吉田侑矢, 辻琢己, 河野武幸: イムノアッセイによるセラペプターゼの定量法開発とバリデーション, 生物試料分析, 第 33 巻第 3 号, pp260-266, 2010 年.
2. [http://www.jacr.or.jp/osirase/shiryoku/doc/111220OTC\\_cyousa-kekka.pdf](http://www.jacr.or.jp/osirase/shiryoku/doc/111220OTC_cyousa-kekka.pdf)

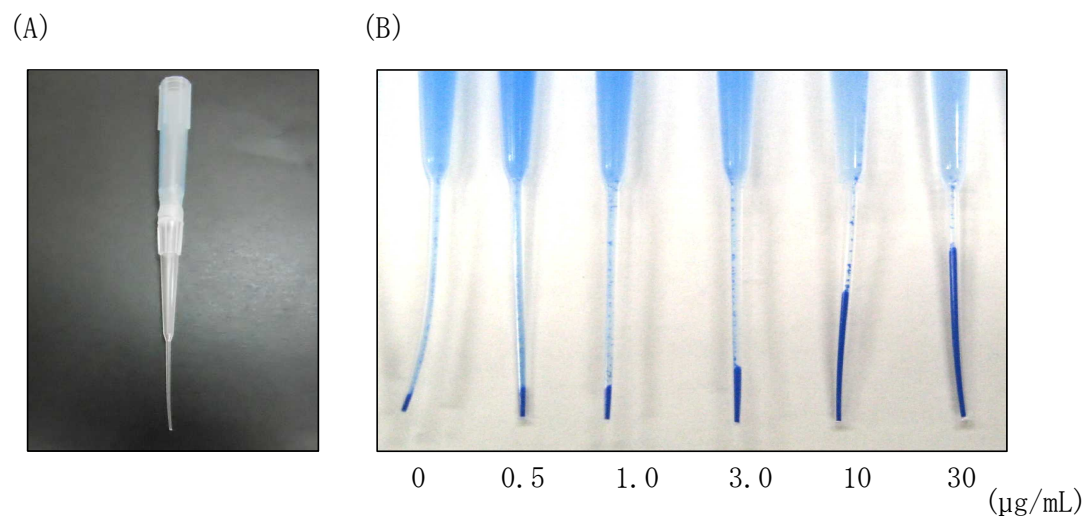


図1 特性チップおよび測定写真

(A) 本測定に使用した特性チップの外観。(B) ブタ AST の測定写真 (左から 0, 0.5, 1.0, 3.0, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

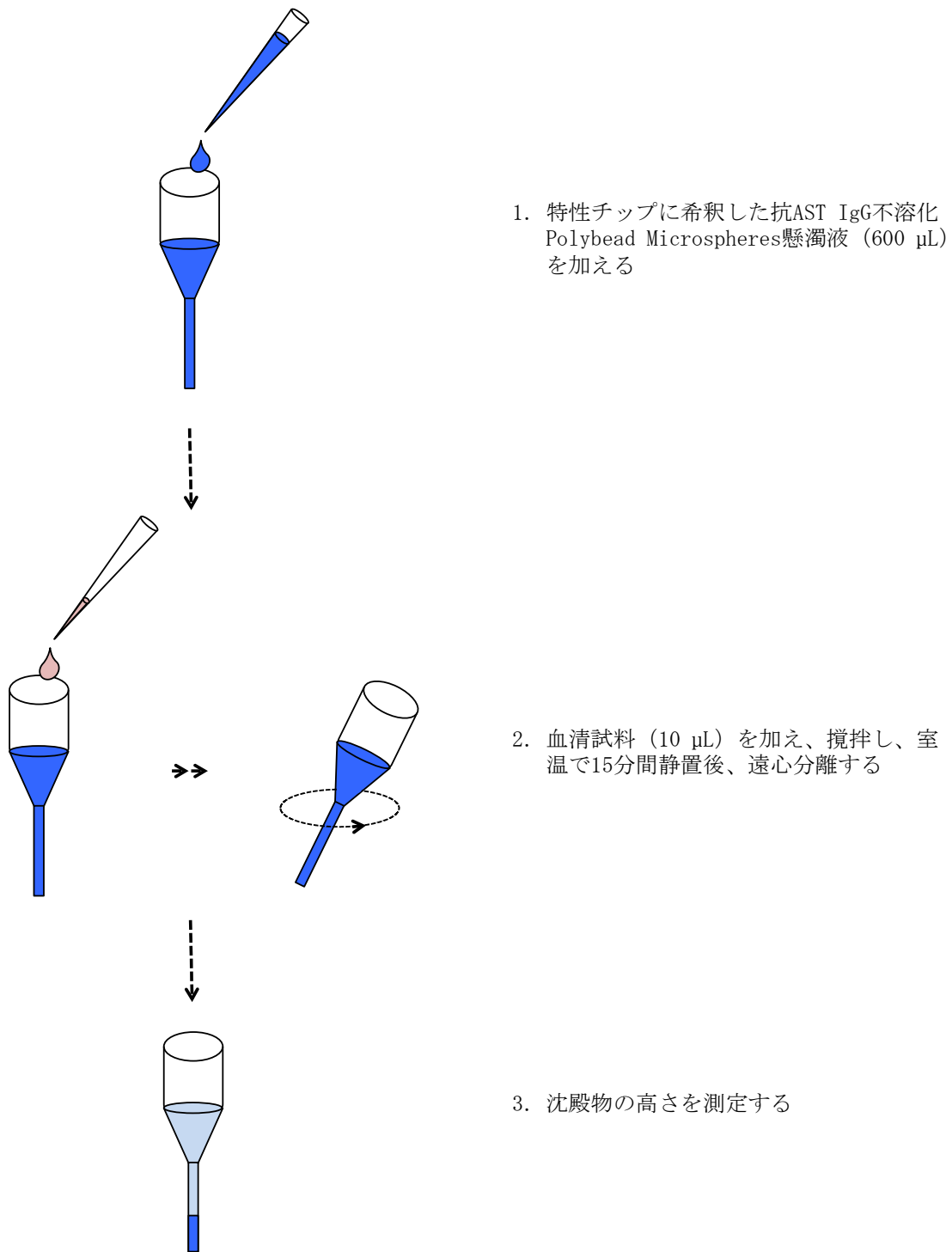
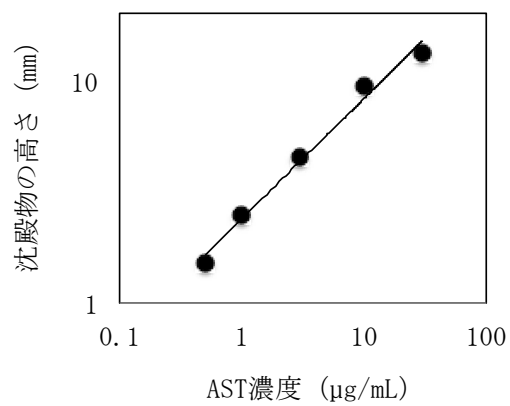


図2 本測定プロトコル

(A) ブタAST



(B) ヒトAST

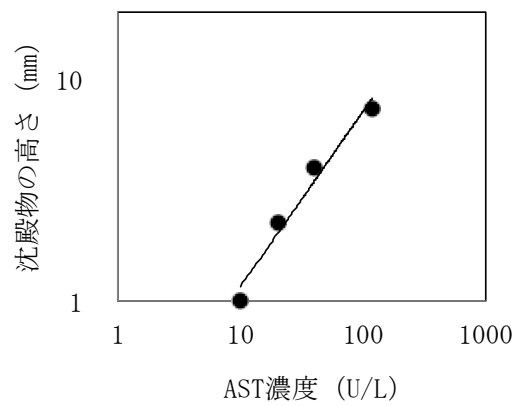


図3 検量線

特性チップに抗AST IgG不溶化Polybead Microspheres懸濁液および血清試料を加え、反応・遠心分離後、沈殿物の高さを測定し、検量線を作成した((A): ブタAST、(B): ヒトAST)。



表 1 日内再現性

ブタAST (n=5)

理論値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	平均値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	CV (%)
1.25	1.31	0.21	16.1
3.75	3.28	0.39	11.8
12.50	12.29	0.75	6.1

ヒトAST (n=5)

理論値		平均値	SD	CV
( $\mu\text{g/mL}$ )	(U/L)	(U/L)		(%)
1.00	40	36.4	0.15	16.6
1.75	70	68.8	0.18	10.7
2.50	100	93.2	0.45	19.2

表 2 日間再現性

ブタAST (n=6)

理論値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	平均値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	CV (%)
1.25	1.47	0.28	19.0
3.75	3.44	0.51	14.9
12.50	13.47	1.51	11.2

ヒトAST (n=6)

理論値		平均値	SD	CV
( $\mu\text{g/mL}$ )	(U/L)	(U/L)		(%)
1.00	40	49.2	0.18	14.9
1.75	70	73.6	0.18	9.9
2.50	100	100.0	0.37	14.9

表 3 添加回収率

ブタAST (n=2)

理論値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	平均値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	回収率 (%)
2.50	1.82	72.7
3.75	3.27	87.1
5.00	4.69	93.9
12.50	12.22	97.7

ヒトAST (n=2)

理論値		平均値	回収率
( $\mu\text{g/mL}$ )	(U/L)	(U/L)	(%)
0.25	10	8.7	86.5
0.50	20	23.4	116.9
1.00	40	47.3	118.3
3.00	120	100.2	83.5