

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-69491

(P2004-69491A)

(43) 公開日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

G 01 N 33/53

F I

G 01 N 33/53

G

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2002-229067 (P2002-229067)	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成14年8月6日(2002.8.6)	(72) 発明者	松井 一裕 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ工場内
		(72) 発明者	石橋 卓也 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ工場内
		(72) 発明者	岡 正則 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ工場内

(54) 【発明の名称】 薬物代謝酵素活性の測定方法、並びに薬物代謝酵素の活性阻害の評価方法、およびそれらの方法のための組成物

## (57) 【要約】

【課題】本発明は、生体中で薬物代謝反応において重要な薬物代謝酵素、特にサイトクローム P 4 5 0 酵素群の活性測定法、および化学物質の薬物代謝酵素、特にサイトクローム P 4 5 0 酵素に対する活性阻害効果を、多検体を短時間に処理する評価方法、ならびにそれら方法のための組成物に関する。

【解決手段】第1反応において、薬物代謝酵素の基質となる化合物を薬物代謝酵素によって必要なコファクター類等とともに反応させ、第2反応において生じた生成物を、生成物特異的な抗体を用いた、免疫化学的測定法にて競合的に測定することで、アイソトープや効果な分析を使用することなく、また数10検体を短時間に、薬物代謝酵素活性および化学物質の薬物代謝酵素活性への阻害効果を極めて高効率に評価可能にする。この測定法を成立させるために、調製された組成物を効率的に、安定的に構築する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、3時間以内に測定することを特徴とする薬物代謝酵素活性の測定方法。

## 【請求項 2】

薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、10検体以上を3時間以内に測定することを特徴とする薬物代謝酵素活性の測定方法。

## 【請求項 3】

薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、48検体以上を3時間以内に測定することを特徴とする薬物代謝酵素活性の測定方法。

## 【請求項 4】

薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、96検体以上を3時間以内に測定することを特徴とする薬物代謝酵素活性の測定方法。

## 【請求項 5】

個々のヒトが所有する、あるいは特定のヒトのグループが共通に所有する、薬物代謝酵素が、メジャーな該薬物代謝酵素の変異型であることを特徴とする、請求項 1～4 の測定方法。

## 【請求項 6】

免疫学的手法が、生成物を特異的に認識する抗体を利用することを特徴とする請求項 1～5 の測定方法。

## 【請求項 7】

生成物を特異的に認識する抗体を用いて、酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴法、微量示差熱測定法、水晶振動共鳴法から少なくとも一つの手法を利用することを特徴とする、請求項 1～6 の測定方法。

## 【請求項 8】

薬物代謝酵素が、CYP1A～B・CYP2A～2M・CYP3A1・CYP4A～4S  
 ・CYP5・CYP6A～6W・CYP7A～B・CYP8・CYP8B・CYP9B・  
 CYP9C・CYP9F・CYP9H・CYP10・CYP11・CYP11A～B・C  
 YP12～12E・CYP13A・CYP17・CYP19・CYP19A・CYP18  
 A・CYP21・CYP21A・CYP24・CYP26・CYP26A・CYP27A  
 ～27BB・CYP28A～28D・CYP36A・CYP39・CYP44・CYP4  
 6・CYP49A・CYP51・CYP52A・CYP53A・CYP55A・CYP5  
 6・CYP57A・CYP58・CYP59A・CYP60A～60B・CYP61・C  
 YP62・CYP64・CYP65A・CYP67・CYP71A・CYP71B・CY  
 P71C・CYP71D・CYP71E・CYP73A・CYP74A・CYP75A・  
 CYP76A～76C・CYP77A・CYP78A・CYP79A～79B・CYP8  
 0A～80E・CYP82A・CYP83A～83B・CYP84A・CYP85・CY  
 P86A・CYP88A・CYP89A・CYP90A～90C・CYP91A・CYP  
 93A～93B・CYP94A・CYP97B・CYP98A・CYP99A・CYP1  
 01・CYP102A・CYP103・CYP104・CYP105A～105E・CY  
 P106・CYP106A・CYP107A～107J・CYP108・CYP109・  
 CYP110・CYP112・CYP112A・CYP113A・CYP114・CYP  
 116～117・CYP117A・CYP119～126・CYP127A・CYP12  
 8～132・CYP133B・CYP134・CYP135A・CYP135B・CYP  
 136～144・CYP152A・CYP301A・CYP302A・CYP303A・  
 CYP304A・CYP305A・CYP306A・CYP307A・CYP308A・

10

20

30

40

50

CYP309A・CYP310A・CYP311A・CYP312A・CYP313A～313B・CYP314A・CYP315A・CYP316A・CYP317A・CYP318Aの遺伝子およびそのサブファミリー・亜型に相当する蛋白質、ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの中から選ばれる1つまたは2以上の混合物であることを特徴とする請求項1～7の測定方法。

【請求項9】

薬物代謝酵素が、CYP1A1・CYP1A2・CYP1B1・CYP2A6・CYP2B6・CYP2C8・CYP2C91・CYP2C92・CYP2C93・CYP2C18・CYP2C19・CYP2D61・CYP2D610・CYP2E1・CYP3A4・CYP3A5・CYP3A7・CYP4A11・CYP4F2・CYP4F3A・CYP19の遺伝子に相当する酵素蛋白、17ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの中から選ばれる1つまたは2以上の混合物であることを特徴とする請求項1～7の測定方法。

10

【請求項10】

薬物代謝酵素活性測定に使用する基質が、テストステロン・プロゲステロン・ジヒドロテストステロン、アンドロステンジオンのの中から選択される請求項1～9の測定方法。

【請求項11】

薬物代謝酵素反応の間あるいは薬物代謝酵素反応後、薬物代謝酵素が固定化されることを特徴とする、請求項1～10の方法。

【請求項12】

薬物代謝酵素反応終了後、薬物代謝酵素とその他の反応組成物とが分離されることを特徴とする請求項1～11の方法。

20

【請求項13】

薬物代謝酵素反応後、薬物代謝酵素の活性を抑制するために、加熱処理あるいは阻害剤を添加することを特徴とする請求項1～12の方法。

【請求項14】

抗体が魚類・両性類・鳥類・爬虫類、哺乳類由来のポリクローナル抗体あるいは、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3～13の方法。

【請求項15】

薬物代謝酵素が遺伝子組換えで生産されていることを特徴とする請求項1～14の方法。

30

【請求項16】

抗体が固定化されていることを特徴とする請求項1～15の方法。

【請求項17】

薬物代謝酵素反応に必要なNADPHを補完する再生系を薬物代謝酵素反応時に共存させることを特徴とする、請求項1～16の方法。

【請求項18】

薬物代謝酵素反応に必要なNADPHを補完する再生系が、グルコース6リン酸脱水素酵素、イソクエン酸脱水素酵素を含むことを特徴とする、請求項1～17の方法。

【請求項19】

薬物代謝酵素反応の基質が、抗体による免疫反応に実質的に影響を及ぼさない濃度に調節されていることを特徴とする、請求項1～18の方法。

40

【請求項20】

次に示す(1)～(3)を含む試薬組成物であって、薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、3時間以内に測定する為の試薬組成物。

(1)薬剤代謝酵素

(2)ある物質が、薬剤代謝酵素によって作用を受け、生じた生成物を、特異的に認識する抗体

(3)(2)に記載の抗体を用いて、酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴法、微量示差熱測定法、水晶振動共鳴法のいずれか1つの方法による測定を可能にする試薬

50

## 【請求項 2 1】

特異抗体（または生成物架橋結合蛋白質）固定化プレートあるいは特異抗体固定化（または生成物架橋結合蛋白質）金薄膜チップ、特異抗体（または生成物架橋結合蛋白質）固定化水晶振動子チップ、反作用緩衝液、特異抗体液、抗体試料希釈液、標準品、標識量を定量するための酵素基質液などから適宜選択される組成物を構成パーツとするキットであって、薬剤代謝酵素の活性を測定する為のキット。

## 【請求項 2 2】

薬物代謝酵素反応の際の基質濃度が  $0.05 \text{ nM} \sim 500 \text{ } \mu\text{M}$ であることを特徴とする請求項 1 ~ 19の方法。

## 【発明の詳細な説明】

10

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、ある物質が意図している作用効果に何らかの影響を及ぼす可能性がある別の物質について、その影響の度合いを測定する方法に関するものである。あるいは、薬物代謝酵素、特にサイトクローム P 4 5 0 (Cytochrome P 4 5 0) 酵素ファミリー及びヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの活性測定に関するものであり、また化学物質等の薬物代謝酵素への阻害効果を評価するための方法に関するものである。また本発明はそれらの方法によって測定系を構築する際に使用する組成物に関するものである。

## 【0002】

## 【従来の技術】

20

薬物代謝酵素のうち、サイトクローム P 4 5 0 は生殖・性分化・成熟・成長・代謝・維持等に関わるホルモン量を調節する酵素であるとともに、また種々の薬物・毒物を代謝する酵素であり、生体内での解毒に関わる酵素である。サイトクローム P 4 5 0 に関する研究は膨大な量に及び、種々の薬物に対する作用性データが蓄積されており、近年さらにサイトクローム P 4 5 0 の一塩基置換体 (SNP) ・亜型についても知見が得られており、現在も世界的な動きで研究が進められている。これによって各種起源のサイトクローム P 4 5 0 の発現機序・構造・機能・メカニズム・進化機構だけでなく、ヒトの人種間で SNPs の違い等も解明されつつある。他の薬物代謝酵素、すなわちヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、モノアミンオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼなどの酸化還元酵素、UDP グルクロン酸転移酵素、UDP

30

スルホン酸転移酵素、糖転移酵素、グルタチオンレダクターゼなどの抱合酵素も状況は同じであり、ドラッグディスプレイの加速化に応じた研究が進められており、薬物の代謝経路・動態・副作用のメカニズム・亜型・多型などが詳細に把握されつつある。

## 【0003】

また薬物ではなく、近年では多くの汎用化学物質や非意図的生成物・汚染化学物質が P 4 5 0 酵素を介して影響を与えるケースがでてきている。生殖作用への影響として、本来遺伝的に雌である生物が雌化する例 (サイトクローム P 4 5 0 アロマターゼ: CYP 19: 阻害) などが知られている。堀口ら (マル、エンバイロ、リサーチ 50 巻 223 - 229 頁 (2000年): Mar. Environ. Res Vol. 50, pp 223 - 229 (2000)) は貝類の例を報告している。人工化学物質による生命の性・生殖

40

への影響はいわゆる内分泌攪乱物質問題として先世紀末より、緊急性のある課題として人類が直面しているものである。また P 4 5 0 アロマターゼが、乳癌・子宮癌等の癌にも密接に関与する場合がある。エストロゲン依存性の癌の進行過程に伴って P 4 5 0 アロマターゼは発現し、近年では北脇らが、子宮内膜症・子宮腺筋腫・子宮筋腫などに伴ってアロマターゼが発現することを報告している (北脇ら Biol. Reprod. 57 巻 514 - 519 頁 (1997年): Kitawaki, J., et al. Biol. Reprod., Vol. 57, 514 - 519 (1997))。彼らは健常者では子宮内膜にアロマターゼが認められないことを、アロマターゼ特異的抗体を用いた免疫染色法にて確認している。また P 4 5 0 アロマターゼの活性測定は、良性乳腺疾患・乳癌などの治療において、ホルモン感受性の有無の判断、治療方針の決定に有用であると

50

されている。さらにアロマターゼは胎盤・卵巣・セルトリ細胞・リーデッヒ細胞・脂肪組織・筋肉・毛髪その他、脳にもその存在が確認されており、脳の性分化・性行動にも関与する可能性が指摘されている。

【0004】

非意図的生成物・汚染化学物質としての、タバコ紫煙中のベンズピレン類や種々の排ガス中の多環芳香族類等は、P450酵素類によって代謝されるものも多く、場合によっては生体内でより毒性の高い化学物質に変換される。代謝物のあるものは発癌プロモーターとなる場合もある。

【0005】

ヒトのサイトクロームP450は、人種間あるいは個人間で、アミノ酸配列が異なるものが存在し(1塩基多型:SNP等)、薬物に対して反応性が異なる場合がある。既に見出されたSNPに関しては、米国国立衛生研究所のウェブサイト上にデータベース化されたものを現在利用できる。SNPに関しては多くは塩基配列・アミノ酸配列上のデータであり、今後個々の薬物の反応性に関するデータが充実していくものと考えられる。また今後予め把握された個人のP450遺伝子群の情報に基づいて、テーラーメイド治療・投薬がありうると考えられている。

10

【0006】

サイトクロームP450の活性の阻害は、薬物副作用の生じる可能性を意味し、重要である。このため阻害効果の確認は、薬物の開発過程すなわち候補化合物の選別において、重要な意味を有している。また薬物が開発されマーケットに流通した後に、重大な相互作用が報告される場合もある。副作用のもたらす社会問題の回避、人的・経済的損失の回避のため、創薬開発においては、早い段階における候補化合物の相互作用の把握が必要であり、それが全体の開発の効率化・スピードアップに繋がる。このためかかせない薬物相互作用の前臨床試験として、薬品メーカーなどが薬物代謝酵素、特にサイトクロームP450の阻害スクリーニングを精力的に実施している。

20

【0007】

サイトクロームP450はヒト以外にも広く、哺乳類・鳥類・爬虫類・両生類・魚類・貝類などの無脊椎動物・植物・カビ等の真核微生物にも広く分布し、根幹的な酵素の一つとして位置づけられている。このことはP450酵素に対して阻害能あるいは促進能を有する人工化学物質は、特定の生物のみだけでなく広い範囲の影響を及ぼす可能性が高いことを意味する。薬剤の効率的スクリーニングだけでなく、現在人類が大規模に使用している化学物質の影響を見なおすことが必要であるが、その試験法は種々の問題を有するため高効率な新しい方法が望まれている。

30

【0008】

阻害試験法などに使用するために、サイトクロームP450は組換え技術等によって、昆虫細胞や哺乳動物細胞、酵母、大腸菌などを用いて生産されている(シグルら *ビービーアールシー* 201巻694-700頁(1994年): *Sigle R. O. et. al., B. B. R. C. Vol. 201, pp201-700(1994)* あるいは *クレスピら アドブファーマコル* 43巻171-88頁(1997年)(*Crespi et. al., Adv. Pharmacol, Vol. 43, pp171-88(1997)*)等)。これらの一部は既に商業的製品としても流通している(*グエングリッチ ネイチャー レビュー ドラッグ デイスカバリー* 1巻359-366頁(2002年): *E. P. Guengerich, Nature Reviews Drug Discovery Vol. 1, pp359-366(2002)*)。サイトクロームP450以外の薬物代謝酵素も、ヒト・微生物・植物など種々の給源のものが、抽出物・組換え生産されたものとして利用できる状況にある。

40

【0009】

サイトクロームP450の一つであるアロマターゼ(CYP19)の測定法としては、シェンケルら(*ジャーナル ステロイド バイオケム* 33巻125-131頁(1989年

50

) : Schenkel et. al., J. Steroid Biochem, Vol. 33, pp125 - 131 (1989) からの動物細胞を用いた方法、酵母細胞で発現させた酵素によるスクリーニング方法 (ポンポンら モレキュラー エンドクリノロジー 3巻1477 - 1487頁 (1989年) : Ponpon D. et. al., Molecular Endocrinology Vol. 3, pp1477 - 1487 (1989))、組換え技術によりアロマターゼを発現する哺乳動物細胞を用いる方法 (特表平4 - 502261) 等の細胞を用いた方法がある。これらはインビトロ試験で実施しうるものであるが、細胞全体を使用するため、サイトクロムP450蛋白質と試験対象の化学物質の直接の反応性を評価するものではない。アロマターゼ活性測定法として、アロマターゼ蛋白質そのものの活性を検出する方法としては、ラジオアイソトープラベルされた基質を使用する、トリチウム水遊離アッセイ法 (ベリノら ジャーナル クリニ エンドクリノロジー メタボ 44巻699頁 (1977年) : Bellino, F. L. et. al., J. Clin. Endocrinol. Metab., Vol. 44, pp699 (1977)) やクレスピラ (アナール バイオケム 248巻188 - 190頁 (1977) : Crespi, C. L., et. al., Anal. Biochem., Vol. 248, pp188 - 190 (1997)) による、サイトクロムP450によって代謝された後、蛍光性を有する基質を使用する蛍光法がある。さらに谷口ら (アナール バイオケム 181巻167 - 171頁 (1989年) : Taniguchi, H., et. al., Anal. Biochem., Vol. 181, pp167 - 171 (1989)) 等の様に、酵素反応の生成物を、液体クロマトグラフィーにより分離し、検出・定量する方法などがある。

#### 【0010】

アロマターゼ以外の薬物代謝酵素、すなわち他種のサイトクロームP450及び17ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、モノアミン酸化酵素、UDP グルクロン酸転移酵素なども上記アロマターゼの方法に準じた形でその測定・阻害効果の評価が実施されている。

#### 【0011】

##### 【発明が解決しようとする課題】

薬物代謝酵素活性を測定において、哺乳動物細胞、組換え酵母細胞、組換え昆虫細胞など細胞を用いた場合には、細胞が含む他の代謝酵素の影響を受けることが最も大きな障害となる。サイトクロムP450以外に多数の酵素が種類細胞内に存在しているが、試験対象の化学物質が、それらの酵素によって代謝される可能性は高い。また種々の化学物質の、細胞膜透過性は、動物細胞・酵母・大腸菌でそれぞれ異なるため、それぞれの細胞を用いて得た結果で差が認められるため、細胞を用いることによるバイアス込みの実験結果が得られることとなる。また使用する細胞の調製・反時間など長時間を要するという難点がある。

#### 【0012】

トリチウム標識体などアイソトープを使用する方法においては、使用する装置と器具を工夫すれば、短時間で多検体を処理しうるが、放射性化合物を取扱うための、特別の隔離空間・設備を必要とする他、アッセイ廃棄物も放射性化合物を含むため、特別の留意が必要であり、実験の操作性にも制限がある。

#### 【0013】

クレスピラによる方法はサイトクロムP450活性を測定する場合には、放射性化合物を使用することもなく、短時間で多検体を処理できうるが、サイトクロムP450阻害剤のスクリーニングにおいては、試験対象の化学物質の非常に多くが自ら蛍光を有するため、化学物質の阻害用量曲線を得る場合に、自己蛍光が測定の妨害となる。多くの化学物質が蛍光を有するためこの方法はスクリーニングとして限界を有する。

#### 【0014】

谷口らによる液体クロマトグラフィーによる方法は、放射性化合物を使用することもなく

、阻害剤スクリーニングの場合においても、液体クロマトグラフィーにより分離分析のため、試験対象物質の自己蛍光の影響も、原理的にありえない。しかしながらクロマトグラフィーによる分析の前に、除蛋白操作・分離操作を必要とするため煩雑であり、かつ長時間を要する。さらに一度に多くのサンプルを分析することができないという難点を有する。

【 0 0 1 5 】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、放射性化合物を使用することなく、試験対象化学物質の自己蛍光の影響を受けることがなく、煩雑な操作を必要としない、ハイスループットに適した薬物代謝酵素（特にサイトクローム P 4 5 0）活性の測定方法（特にサイトクローム P 4 5 0）、及び薬物代謝酵素（特にサイトクローム P 4 5 0）活性の阻害剤のスクリーニング方法につき鋭意努力検討した結果、それら薬物代謝酵素によって変換されて生じた生成物を、免疫化学的に測定することで諸問題が解決され、さらに多検体を短時間に処理できることに想到し、本願発明を完成させるに至った。

10

【 0 0 1 6 】

すなわち本発明は、以下のような構成からなる。

[ 1 ] 薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、3時間以内に測定することを特徴とする薬物代謝酵素活性の測定方法。

[ 2 ] 薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、10検体以上を3時間以内に測定することを特徴とする薬物代謝酵素活性の測定方法。

20

[ 3 ] 薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、48検体以上を3時間以内に測定することを特徴とする薬物代謝酵素活性の測定方法。

[ 4 ] 薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、96検体以上を3時間以内に測定することを特徴とする薬物代謝酵素活性の測定方法。

[ 5 ] 個々のヒトが所有する、あるいは特定のヒトのグループが共通に所有する、薬物代謝酵素が、メジャーな該薬物代謝酵素の変異型であることを特徴とする、[ 1 ] ~ [ 4 ] の測定方法。

30

[ 6 ] 免疫学的手法が、生成物を特異的に認識する抗体を利用することを特徴とする [ 1 ] ~ [ 5 ] の測定方法。

[ 7 ] 生成物を特異的に認識する抗体を用いて、酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴法、微量示差熱測定法、水晶振動共鳴法から少なくとも一つの手法を利用することを特徴とする、[ 1 ] ~ [ 6 ] の測定方法。

[ 8 ] 薬物代謝酵素が、CYP1A~B・CYP2A~2M・CYP3A1・CYP4A~4S・CYP5・CYP6A~6W・CYP7A~B・CYP8・CYP8B・CYP9B・CYP9C・CYP9F・CYP9H・CYP10・CYP11・CYP11A~B・CYP12~12E・CYP13A・CYP17・CYP19・CYP19A・CYP18A・CYP21・CYP21A・CYP24・CYP26・CYP26A・CYP27A~27BB・CYP28A~28D・CYP36A・CYP39・CYP44・CYP46・CYP49A・CYP51・CYP52A・CYP53A・CYP55A・CYP56・CYP57A・CYP58・CYP59A・CYP60A~60B・CYP61・CYP62・CYP64・CYP65A・CYP67・CYP71A・CYP71B・CYP71C・CYP71D・CYP71E・CYP73A・CYP74A・CYP75A・CYP76A~76C・CYP77A・CYP78A・CYP79A~79B・CYP80A~80E・CYP82A・CYP83A~83B・CYP84A・CYP85・CYP86A・CYP88A・CYP89A・CYP90A~90C・CYP91A・CYP93A~93B・CYP94A・CYP97B・CYP98A・CYP99A

40

50

- ・ CYP101・CYP102A・CYP103・CYP104・CYP105A～105E・CYP106・CYP106A・CYP107A～107J・CYP108・CYP109・CYP110・CYP112・CYP112A・CYP113A・CYP114・CYP116～117・CYP117A・CYP119～126・CYP127A・CYP128～132・CYP133B・CYP134・CYP135A・CYP135B・CYP136～144・CYP152A・CYP301A・CYP302A・CYP303A・CYP304A・CYP305A・CYP306A・CYP307A・CYP308A・CYP309A・CYP310A・CYP311A・CYP312A・CYP313A～313B・CYP314A・CYP315A・CYP316A・CYP317A・CYP318Aの遺伝子およびそのサブファミリー・亜型に相当する蛋白質、ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの中から選ばれる1つまたは2以上の混合物であることを特徴とする〔1〕～〔7〕の測定方法。
- 〔9〕 薬物代謝酵素が、CYP1A1・CYP1A2・CYP1B1・CYP2A6・CYP2B6・CYP2C8・CYP2C91・CYP2C92・CYP2C93・CYP2C18・CYP2C19・CYP2D61・CYP2D610・CYP2E1・CYP3A4・CYP3A5・CYP3A7・CYP4A11・CYP4F2・CYP4F3A・CYP19の遺伝子に相当する酵素蛋白、17 ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの中から選ばれる1つまたは2以上の混合物であることを特徴とする〔1〕～〔7〕の測定方法。
- 〔10〕 薬物代謝酵素活性測定に使用する基質が、テストステロン・プロゲステロン・ジヒドロテストステロン、アンドロステンジオンの中から選択される〔1〕～〔9〕の測定方法。
- 〔11〕 薬物代謝酵素反応の間あるいは薬物代謝酵素反応後、薬物代謝酵素が固定化されることを特徴とする、〔1〕～〔10〕の方法。
- 〔12〕 薬物代謝酵素反応終了後、薬物代謝酵素とその他の反応組成物とが分離されることを特徴とする〔1〕～〔11〕の方法。
- 〔13〕 薬物代謝酵素反応後、薬物代謝酵素の活性を抑制するために、加熱処理あるいは阻害剤を添加することを特徴とする〔1〕～〔12〕の方法。
- 〔14〕 抗体が魚類・両性類・鳥類・爬虫類、哺乳類由来のポリクローナル抗体あるいは、モノクローナル抗体であることを特徴とする〔3〕～〔13〕の方法。〔15〕 薬物代謝酵素が遺伝子組換えで生産されていることを特徴とする〔1〕～〔14〕の方法。
- 〔16〕 抗体が固定化されていることを特徴とする〔1〕～〔15〕の方法。
- 〔17〕 薬物代謝酵素反応に必要なNADPHを補完する再生系を薬物代謝酵素反応時に共存させることを特徴とする、〔1〕～〔16〕の方法。
- 〔18〕 薬物代謝酵素反応に必要なNADPHを補完する再生系が、グルコース6リン酸脱水素酵素、イソクエン酸脱水素酵素を含むことを特徴とする、〔1〕～〔17〕の方法。
- 〔19〕 薬物代謝酵素反応の基質が、抗体による免疫反応に実質的に影響を及ぼさない濃度に調節されていることを特徴とする、〔1〕～〔18〕の方法。
- 〔20〕 次に示す(1)～(3)を含む試薬組成物であって、薬物代謝酵素の活性を測定する方法であって、薬物代謝酵素を作用させた後、生じた生成物を免疫化学的手法により、3時間以内に測定する為の試薬組成物。
- (1) 薬剤代謝酵素
- (2) ある物質が、薬剤代謝酵素によって作用を受け、生じた生成物を、特異的に認識する抗体
- (3) (2)に記載の抗体を用いて、酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴法、微量示差熱測定法、水晶振動共鳴法のいずれか1つの方法による測定を可能にする試薬
- 〔21〕 特異抗体(または生成物架橋結合蛋白質)固定化プレートあるいは特異抗体固定化(または生成物架橋結合蛋白質)金薄膜チップ、特異抗体(または生成物架橋結合蛋白質)

10

20

30

40

50

白質)固定化水晶振動子チップ、反作用緩衝液、特異抗体液、抗体試料希釈液、標準品、標識量を定量するための酵素基質液などから適宜選択される組成物を構成パーツとするキットであって、薬剤代謝酵素の活性を測定する為のキット。

[ 2 2 ] 薬物代謝酵素反応の際の基質濃度が 0 . 0 5 n M ~ 5 0 0 μ Mであることを特徴とする [ 1 ] ~ [ 1 9 ] の方法。

【 0 0 1 7 】

【 発明の実施の形態 】

本発明の薬物代謝酵素阻害剤のスクリーニングに使用する、薬物代謝酵素の給源としては、ヒト・ラット・マウスなどの哺乳類由来のもの、ニワトリなど鳥類由来のもの、ワニなどの爬虫類由来のもの、カエルなどの両性類由来のもの、マス・メダカなど魚類由来のもの、貝類・軟体動物等の無脊椎動物由来のもの、植物由来のもの、酵母・カビ等の真核微生物由来のものを使用することができる。また本発明での測定対象としての薬物代謝酵素は、例えば、ヒト・ラット・マウスなどの哺乳類、ニワトリなど鳥類、ワニなどの爬虫類、カエルなどの両性類、マス・メダカなど魚類、貝類等の無脊椎動物、植物、カビ・酵母等の真核微生物から採取したものなどに含まれるが特に限定されない。

10

【 0 0 1 8 】

薬物代謝酵素としては、サイトクローム P 4 5 0、ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、モノアミンオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼなどの酸化還元酵素、UDP グルクロン酸転移酵素、UDP - スルホン酸転移酵素、糖転移酵素、グルタチオンレダクターゼなどの抱合酵素あるいは加水分解酵素を本発明は対象とする。

20

【 0 0 1 9 】

これらの薬剤代謝酵素は、本願出願時点において、生体内における代謝機構が比較的良好に研究されているものであり、測定対象として好ましいものであるが、今後、研究の進展にともない知見が蓄積されるであろう他の代謝酵素を測定の対象とすることを妨げない。具体的には H M G C o A レダクターゼ、スクアレンシンセターゼなどの脂質代謝酵素あるいは H I V、H C V、H E V などの特定のウイルス・微生物のライフサイクルに決定的な重要性を有している各種プロテアーゼ、グルタミンシンセターゼなど癌細胞にのみ特に過剰に発現している代謝酵素などが予想されるが、それらに限定されるものではない。このことは、前述の薬物代謝酵素の給源、あるいは、後述する薬物代謝酵素の形態、酵素反応により生じた生成物を測定する方法、及び測定に使用する試薬類などについても同様である。

30

【 0 0 2 0 】

本発明で対象とする P 4 5 0 の種類としては、特にサイトクローム P 4 5 0 が、C Y P 1 A ~ B、C Y P 2 A ~ 2 M、C Y P 3 A 1、C Y P 4 A ~ 4 S、C Y P 5、C Y P 6 A ~ 6 W、C Y P 7 A ~ B、C Y P 8、C Y P 8 B、C Y P 9 B、C Y P 9 C、C Y P 9 F、C Y P 9 H、C Y P 1 0、C Y P 1 1、C Y P 1 1 A ~ B、C Y P 1 2 ~ 1 2 E、C Y P 1 3 A、C Y P 1 7、C Y P 1 9、C Y P 1 9 A、C Y P 1 8 A、C Y P 2 1、C Y P 2 1 A、C Y P 2 4、C Y P 2 6、C Y P 2 6 A、C Y P 2 7 A ~ 2 7 B B、C Y P 2 8 A ~ 2 8 D、C Y P 3 6 A、C Y P 3 9、C Y P 4 4、C Y P 4 6、C Y P 4 9 A、C Y P 5 1、C Y P 5 2 A、C Y P 5 3 A、C Y P 5 5 A、C Y P 5 6、C Y P 5 7 A、C Y P 5 8、C Y P 5 9 A、C Y P 6 0 A ~ 6 0 B、C Y P 6 1、C Y P 6 2、C Y P 6 4、C Y P 6 5 A、C Y P 6 7、C Y P 7 1 A、C Y P 7 1 B、C Y P 7 1 C、C Y P 7 1 D、C Y P 7 1 E、C Y P 7 3 A、C Y P 7 4 A、C Y P 7 5 A、C Y P 7 6 A ~ 7 6 C、C Y P 7 7 A、C Y P 7 8 A、C Y P 7 9 A ~ 7 9 B、C Y P 8 0 A ~ 8 0 E、C Y P 8 2 A、C Y P 8 3 A ~ 8 3 B、C Y P 8 4 A、C Y P 8 5、C Y P 8 6 A、C Y P 8 8 A、C Y P 8 9 A、C Y P 9 0 A ~ 9 0 C、C Y P 9 1 A、C Y P 9 3 A ~ 9 3 B、C Y P 9 4 A、C Y P 9 7 B、C Y P 9 8 A、C Y P 9 9 A、C Y P 1 0 1、C Y P 1 0 2 A、C Y P 1 0 3、C Y P 1 0 4、C Y P 1 0 5 A ~ 1 0 5 E、C Y P 1 0 6、C Y P 1 0 6 A、C Y P 1 0 7 A ~ 1 0 7 J、C Y P 1 0 8、C Y P 1 0 9、C Y P 1 1 0、C Y P 1 1

40

50

2・CYP112A・CYP113A・CYP114・CYP116～117・CYP117A・CYP119～126・CYP127A・CYP128～132・CYP133B・CYP134・CYP135A・CYP135B・CYP136～144・CYP152A・CYP301A・CYP302A・CYP303A・CYP304A・CYP305A・CYP306A・CYP307A・CYP308A・CYP309A・CYP310A・CYP311A・CYP312A・CYP313A～313B・CYP314A・CYP315A・CYP316A・CYP317A・CYP318Aの遺伝子およびそのサブファミリー・亜型に相当する酵素蛋白の中から選ばれる1つまたは2以上の混合物を使用することができ、さらに特に、CYP1A1・CYP1A2・CYP1B1・CYP2A6・CYP2B6・CYP2C8・CYP2C91・CYP2C92・CYP2C93・CYP2C18・CYP2C19・CYP2D61・CYP2D610・CYP2E1・CYP3A4・CYP3A5・CYP3A7・CYP4A11・CYP4F2・CYP4F3A・CYP19の遺伝子に相当する酵素蛋白の中から選ばれる1つまたは2以上の混合物を使用することが好適である。

#### 【0021】

本発明で対象とする薬物代謝酵素の形態としては、純化され活性のある蛋白以外に、動物組織・植物組織・微生物から部分精製、粗精製あるいは未精製抽出物が使用可能である場合がある。

#### 【0022】

本発明で好適な薬物代謝酵素とその反応に使用する基質及び、特異的抗体の組合せとしては、例えば ヒトCYP19とテストステロン及び抗テストステロン抗体、 ヒトCYP19とアンドロステンジオン及び抗エストロン抗体、 ヒトCYP3Aとプロゲステロン及び抗6 ヒドロキシプロゲステロン、 ヒトCYP21Aとプロゲステロン及び抗11 デオキシコルチコステロン抗体、ヒトCYP1A2と(R) ワルファリン及び抗ヒドロキシワルファリン抗体、(ヒトCYP2C8又はヒトCYP2C9又はヒトCYP2C19)とジベンジルフルオレセインと抗フルオレセイン抗体、ヒト17 ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ等の組合せがある。これらに薬物代謝酵素の生物種間においてあるいはヒトの1塩基多型による種別によって、薬物代謝酵素の基質特異性の差異を考慮に入れる必要が生じる場合があるであろう。

#### 【0023】

本発明における免疫化学的測定方法としては、薬物代謝酵素によって変換された生成物を特異的な抗体を利用した、酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴法、微量示差熱測定法、水晶振動共鳴法などを選択することができる。酵素免疫測定法として、生成物をハプテンとして酵素と結合させた、酵素標識体と固相化された生成物特異的抗体とを組み合わせた競合法か、生成物を牛血清アルブミン等と架橋結合させたものを固相化し、酵素標識された生成物特異的抗体を組合せた競合法を使用することができる。またこれらの方法を適宜変更して応用することが可能である。これらの酵素免疫測定競合法においては、薬物代謝酵素によって変換されて生じた生成物が多いほど、最終的に検出する酵素標識体は少なくなり、結果として得られるシグナルは小さくなる。表面プラズモン共鳴法を利用する場合は、使用する金薄膜表面に、生成物特異的抗体または生成物を牛血清アルブミン等と架橋結合したものを、固定化して使用することができる。微量示差熱測定法の場合は、生成物と抗体との反応時に生じる微量熱量を直接測定することができる。水晶振動共鳴法の場合は水晶振動子上に生成物特異的抗体または生成物を牛血清アルブミン等と架橋結合したものを、固定化して使用することができる。

#### 【0024】

本発明の免疫化学的測定において使用する抗体とは、免疫グロブリンの各クラス、すなわちIgG、IgM、IgE、IgA、IgDのことを言い、各抗体は魚類・両性類・爬虫類・哺乳類のものを使用することができる。また抗体はこれら各種動物の生体液から得られたポリクローナルなものであっても、ハイブリドーマより産生されたモノクローナルもので、遺伝子工学的に製造されたものであってもよい。さらには抗体は全体の分子であ

っても、結合部分の活性を保持しえれば、 $F a b$ 、 $(F a b)_2$ 、 $F a b'$ 、 $F v$ 、 $s c F v$ あるいはミニボデイなどいかなる形態のフラグメントであってもよい。それらの抗体は生成物に対して、測定時において薬物代謝酵素による生成物に対して十分に高い特異性を有することが好ましい。

ここで十分に高い特異性とは、基質となる化合物に類似した構造を有する化学物質群に対して、反応性が、例えば、千分の1以下、より好ましくは1万分の1以下であることをいう。これらの反応性は低ければ低いほど好ましい。またここで類似した構造を有する化学物質群は複数であり、多種類であるほど好ましい。反応性は、例えば通常の酵素免疫競合法などの方法により評価することができる。

#### 【0025】

本発明の免疫化学的測定において使用する抗体は、酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴法、水晶振動共鳴法の場合、不溶性担体に固定化して使用しても良いし、固定化せず溶液状態で使用しても良い。微量示差熱測定法での抗体の使用は、固定化する必要性はない。酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴法、水晶振動共鳴法で、抗体を不溶性担体に固定化することなく、溶液状態で使用する場合は、生成物を架橋結合した蛋白質（生成物  $B S A$  コンジュゲート等）を不溶性担体に固定化することが必要となる。

#### 【0026】

本発明でいう競合法とは、特異的抗体の結合対象である生成物  $A$  の標識体 ( $A - L$ ) を、 $A$  特異的抗体 ( $I g$ ) が固定化された担体上で、薬物代謝酵素によって生成された ( $A$ ) と ( $A - L$ ) の競合反応を行なわせた後、遊離の ( $A - L$ ) もしくは固相に結合した ( $A - L$ ) の標識 ( $L$ ) の量を計測する、測定系のことをいう。図1に標識として酵素（ペルオキシダーゼ）を用いた競合法測定系の例を示す。あるいは図2の様に、シグナルを生じない蛋白質 ( $B$ ) と  $A$  を架橋結合した複合体 ( $A - B$ ) を固定化した担体を用いて、標識抗体 ( $I g - L$ ) と薬物代謝酵素によって生成された ( $A$ ) を競合反応させる系も可能である。この場合遊離の ( $I g - L$ ) もしくは担体と結合した ( $I g - L$ ) の標識 ( $L$ ) の量を計測する。特異的抗体を固相化したものと酵素標識生成物を用いた測定系において得られる、薬物代謝酵素阻害のドーズレスポンスカーブ（用量曲線）を図3に模式的に示す。

#### 【0027】

本発明において表面プラズモン共鳴法、水晶振動共鳴法を用いた場合の測定原理を図4に示す。これらの方法の場合、特異的抗体を金薄膜表面あるいは水晶振動子上に固定化するか、シグナルを生じない蛋白質 ( $B$ ) と  $A$  を架橋結合した複合体 ( $A - B$ ) を金薄膜表面あるいは水晶振動子上に固定化するかいずれかである。

#### 【0028】

本発明における生成物特異抗体あるいは生成物 - 蛋白質架橋複合体を固定化するための不溶性担体としては、ポリスチレン・ナイロン・ポリカーボネートなどプラスチック、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、デキストラン、セファロース、ニトロセルロース、ガラス、濾紙などが使用可能である。各担体には各種の官能基（ヒドラジド基、アルキルアミノ基、アミノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基など）が導入されていてもよい。担体の形状としては、マイクロタイタープレート、膜、シート、チップ、ビーズなど操作性のよいものを使用することができる。各不溶性担体の吸着可能能力・結合能力はあらかじめ確認できている方が好ましいが、それらの情報は必ずしも必須ではない。本発明では、固相担体作製時に、共有結合によるカップリングも実施可能である。カップリング試薬としては、グルタルアルデヒド、カルボジイミドなどが用いられる。

#### 【0029】

本発明における抗体固相あるいは生成物 - 蛋白質架橋複合体を固定化する際に使用する吸着液のベース緩衝液としては、10 mM リン酸緩衝液（150 mM  $N a C l$  含有：pH 7.2）、50 mM 炭酸緩衝液（pH 9.6）、10 mM トリス塩酸緩衝液（150 mM  $N a C l$  含有：pH 8.5）など、一般的に用いられているものを、抗体あるいは生成物 - 蛋白質架橋複合体の安定性が保持される pH 範囲内（pH 3.0 ~ 10.0：好ま

10

20

30

40

50

しくはpH5.0~9.0)で使用することができる。塩の種類、緩衝液の濃度は示した例に限定されるものではなく、適宜変更することができ、抗体固相あるいは生成物-蛋白質架橋複合体の種類によっては、KCl、MgCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、あるいは微量の重金属塩等を0.01mM~300mMの範囲で添加することが可能である。吸着・結合反応後、牛血清アルブミンやカゼイン・ゼラチンなどを、非特異的反応防止の為にブロッキング剤として0.01%~10%(W/V)の範囲で使用することができる。このブロッキング剤のベース緩衝液としては吸着液に使用したりん酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液の他に、マレイン酸、乳酸などの有機酸緩衝液を10mM~300mMの範囲で使用することができる。pHは測定系に関連するレセプター(抗体を含む)の安定化に最もふさわしい範囲を選択できるが、一般的にはpH5.0~pH8.5で使用することが多い。また固定化後の安定化のためにサッカロース・グルコース・デキストランなどの糖類を安定化剤として0.01%~20%(W/V)の範囲で適宜添加することができる。

10

## 【0030】

測定系に關与する抗体あるいは生成物-蛋白質架橋複合体を固定化させる時の濃度としては、0.1pg(ピコグラム)/ml~1mg/mlの範囲を使用することができる。より好ましくは10pg/ml~50µg/mlを、さらに好ましくは0.1µg/ml~10µg/mlを選択することができる。

## 【0031】

吸着・結合時に必要な時間としては、5分~72時間が選択可能であるが、より好ましくは1時間~36時間が選択できる。インキュベートする温度としては、1~45°Cが

20

## 【0032】

本発明で不溶性担体に抗体または生成物-蛋白質架橋複合体を吸着させた後、適宜10mMりん酸緩衝液(150mM NaCl含むpH7.2)などの洗浄液で洗浄することができる。洗浄剤にはツイーン20やトリトンX-100など、温和な非イオン界面活性剤などを適宜加えることもできる。

## 【0033】

薬物代謝酵素活性測定に使用する基質としては、例えばCYP19に対しては、テストステロン、ジヒドロテストステロン、アンドロステンジオン、7-エトキシ-3-シアノクマリン、7-メトキシ-4-トリフルオロメチルクマリン、7-ベンジロキシ-4-トリ

30

フルオロメチルクマリン、ジベンジルフルオレセイン、7-エトキシ-4-トリフルオロメチルクマリン等を使用することができる。CYP1A2に対しては、アミノフィリン、アミトリプチリン、ベタキソロール、カフェイン、クロミブラミン、クロザピン、クロルプロマジン、フルボキサミン、ハロペリドール、イミプラミン、メトクロプラミド、オランザピン、オンダンセトロン、プロプラノロール、タクリン、テオフィリン、チオリダジン、トリフルオペラジン、ヴェラパミル、(R)ワルファリン等を使用することができる。CYP2C9に対しては、アミトリプチリン、セリヴァスタチン、デイコフェナック、フルオクセチン、フラバスタチン、イブプロフェン、ロザルタン、ネプロケセン、トルブタミド、トルセミド、(S)ワルファリン等を使用することができる。

40

CYP2C19に対しては、アミトリプチリン、シタロプラム、クロミブラミン、

50

は、アラブラゾラム、アミオダロン、アミトリプチリン、アステミゾール、ブデソニド、ブプロピン、ブスピロン、カフェイン、カルバマゼピン、セリバスタチン、シサブライド、クラリソマイシン、クロミプラミン、クロナゼパム、コデイン、シクロスポリン、デキサメタゾン、デキストロメソファン、ジヒドロエピアンドロステロン(DHEA)、ジアゼパム、ジルチアゼム、ジソピラミド、ドネペジル、ドキシサイクリン、エリスロマイシン、エストラジオール、エチニルエストラジオール、フェロデピン、フルオクセチン、イミプラミン、ランソプラゾール、リドカイン、ロラタジン、ロバスタチン、ミダゾラム、ネファゾドン、ニカルデピン、ニフェデピン、ニソルデイン、ノルエティンドロン、オメプラゾール、オンダセルトン、オルフェナドリン、パロキセチン、プロゲステロン、プロパフェノン、クエティアピン、キニジン、リファンプン、セルトライン、ジブトラミン、ジルデナフィル、シムバスタチン、タクロリムス、タモキシフェン、テルフェナミド、テストステロン、テオフィリン、トラゾドン、トリアゾラム、ヴェンラファキシン、ベラパミル、ヴィンブラスチン、(R)ワルファリン、ゾルピデム等を使用することができる。17 ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼに対しては、エストロン、等を使用することができる。これらの基質の多くは内在性のホルモンかあるいは薬物として使用されているものであり、これらを本発明の薬物代謝酵素阻害剤の評価に使用する場合は、薬物代謝酵素に対する阻害効果に加えてさらに、薬物 薬物相互作用の効果も含んだ評価となる。

10

## 【0034】

薬物代謝酵素活性測定に使用する抗体としては、上述の基質が代謝された生成物を特異的に認識する抗体であれば、使用に制限はないが、例えば抗テストステロン抗体、抗エストロン抗体、抗6 ヒドロキシプロゲステロン抗体、抗11 デオキシコルチコステロン、抗ヒドロキシワルファリン抗体、抗フルオレセイン抗体等を使用することができる。基質との交差反応性が低く、代謝生成物に対する感度が高い、実用的なモノクローナル抗体の使用が好適である。

20

## 【0035】

薬物代謝酵素活性阻害効果を評価する際に、反応後、薬物代謝酵素反応時、薬物代謝酵素は固定化されていても良い。また薬物代謝酵素反応後、不溶性担体に固定化された薬物代謝酵素特異的抗体により補足・固定化し、反応系外に除去しても良い。また予め薬物代謝酵素をビオチン化しておき、薬物代謝酵素反応後、不溶性担体に固定化されたストレプトアビジンにて反応系外に除去しても良い。あるいは薬物代謝酵素活性阻害効果を評価する際に、反応後、薬物代謝酵素の活性を抑制するために、加熱処理をすることができる。あるいは反応後、既知の薬物代謝酵素の阻害剤を添加することができる。

30

## 【0036】

薬物代謝酵素、特にサイトクロームP450反応に必要なニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸(還元型)(以下NADPHとも記載)を補完する再生系としては、NADPHを産生することができる酵素系であれば限定されることはないが、薬物代謝酵素反応及び薬物代謝酵素反応後の免疫反応に影響を与えないことが望ましい。この様な酵素系として、グルコース6リン酸、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸(酸化型)(以下NADP<sup>+</sup>とも記載)とグルコース6リン酸脱水素酵素の組合せ、イソクエン酸、NADP<sup>+</sup>とイソクエン酸脱水素酵素の組合せ等がある。

40

## 【0037】

薬物代謝酵素反応の基質は、極めて多量に存在する場合、薬物代謝酵素反応後の免疫化学反応に影響を与える場合がある。このため実質的に影響が出ないレベルにまで、基質の量を調節することが好ましい。具体例として、サイトクロームP450 CYP19の場合、基質としてテストステロンを、特異抗体として抗17 エストラジオール抗体、標識体として17 エストラジオール標識ペロキシダーゼを選択した場合、抗17 エストラジオール抗体の特異性が非常に高く、テストステロンに対する交差反応性が極めて低い場合においても、一般に薬物代謝酵素の反応として使用する際の基質濃度(1 mM ~ 100 mM)では、特異的抗体にとって量的に極めて過剰であり、抗17 - エストラジオー

50

ル抗体と17-エストラジオールの免疫反応に影響を及ぼす場合がある。この場合基質濃度としてテストステロン濃度を減じることで、実質的に免疫反応に影響が出ないようにすることができる。他のアンドロジェン基質も、生成物特異的抗体の性能にもよるが、サイトクロームP450反応時の基質濃度が0.05 nM ~ 500 μMであることが好ましい場合がある。あるいはサイトクロームP450 CYP2C19の場合、基質としてジベンジルフルオレセインを、特異抗体として抗フルオレセイン抗体、標識体としフルオレセインイソシアネート標識ペルオキシダーゼを選択した場合、抗フルオレセイン抗体の特異性が非常に高く、ジベンジルフルオレセインに対する交差反応性が極めて低い場合においても、酵素の反応として使用する際の基質濃度(1 mM ~ 100 mM)では、特異的抗体にとって量的に極めて過剰であり、抗フルオレセイン抗体とフルオレセインとの免疫反応に影響を及ぼす場合がある。この場合基質濃度としてジベンジルフルオレセイン濃度を減じることで、実質的に免疫反応に影響が出ないようにすることができる。抗体の性能にもよるが、サイトクロームP450 2C19反応時の基質濃度が0.05 nM ~ 500 μMであることが好ましい場合がある。

なお、実質的に影響が出ないレベルとは、免疫測定反応における標準曲線における基準値(評価対象化学物質が0濃度)のシグナルに対して10%以内の影響度であることをいう。

#### 【0038】

薬物代謝酵素、特にサイトクロームP450反応のもう一つの電子伝達体としてのNADPHを使用する場合は、NADPHとして直接反応系に、一般に使用される0.1 mM ~ 10.0 mMの範囲で添加することが可能である。あるいはNADP<sup>+</sup>として添加し、上述の再生系の組合せを添加しても良い。グルコース6リン酸、NADP<sup>+</sup>、グルコース6リン酸脱水素酵素の組合せの場合、それぞれ0.2 mM ~ 20 mM、0.1 mM ~ 5.0 mM、0.1 ユニット/ml ~ 20 ユニット/mlの範囲で使用可能である。より好ましくはそれぞれ0.5 mM ~ 10 mM、0.5 mM ~ 3.0 mM、0.5 ユニット/ml ~ 10 ユニット/mlの範囲で使用可能である。なおグルコース6リン酸、NADP<sup>+</sup>、NADPHはナトリウム塩、カリウム塩等の形で使用することができ、酵素類は高純度精製品・部分精製品・硫酸懸濁品等を使用することができる。

#### 【0039】

免疫化学的測定として酵素免疫測定法を用いる場合、標識用酵素として、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、リゾチーム等、一般の酵素免疫測定法に使用されているものを制限なく利用できる。また適宜それら選択した酵素に応じて、テトラメチルベンチジン(TMB)、*o*-フェニレンジアミン、2,2-アジノジ-(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム(ABTS)、*p*-ニトロフェニルリン酸、*o*-ニトロフェニル-D-ガラクトシド等の各種酵素に対応した基質が使用できる。

#### 【0040】

薬物代謝酵素反応及び免疫化学的反応においては、評価対象とする化学物質の溶解性を高めるため、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド等の有機溶媒を含むことができる。それらの有機溶媒はサイトクロームP450反応及び免疫化学反応に影響しない範囲が、影響を無視できる範囲で使用することができる。サイトクロームP450の種類によって異なるが、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドは、およそ0.1 ~ 20%、好ましくは0.2% ~ 10%、より好ましくは0.2% ~ 5%で使用することができる。

#### 【0041】

本発明でいう測定用キットとは、上述の生成物を特異的に認識する抗体を用いて、酵素免疫測定法、表面プラズモン共鳴法、微量示差熱測定法、水晶振動共鳴法などによる測定を可能にする各種の試薬群(固相化された担体を含む)のことである。具体的には特異抗体(生成物架橋結合蛋白質)固定化プレートあるいは特異抗体固定化(生成物架橋結合蛋白質)金薄膜チップ、特異抗体(生成物架橋結合蛋白質)固定化水晶振動子チップ、反応用

緩衝液、特異抗体液、抗体試料希釈液、標準品、標識量を定量するための酵素基質液などから適宜選択される組成物を組合せたセットをいう。

【0042】

本発明でいう非ステロイド性化学物質とは、いわゆるステロイド骨格を有しない、アミノグルテチミド、ナフトフラボンなどをいう。ステロイド骨格を有する化学物質のうちあるものは、薬物代謝酵素、特にサイトクロームP450等の生成物質と構造的に類似するため、生成物特異的抗体に対して若干交差反応性を有する場合がある。これらの場合得られる阻害効果は、低く見積られ、偽陰性の結果を生じる可能性がある。こうした化学物質を評価する場合、特に薬物代謝酵素のみを除いた測定系にて評価した結果と照らし合わせて、化学物質の阻害効果を論じなければならない。しかしながらサイトクロームP450阻害剤のうち、薬剤として開発されるものは、種々の理由からステロイド骨格を有しないものもあり、本発明は特に非ステロイド性サイトクロームP450阻害剤のスクリーニングとしても有用である。また内分泌攪乱物質として問題になっている物質の多くは芳香環を有するが、非ステロイド性のものが多く、本発明は特に内分泌攪乱物質のスクリーニングとしても有用である。

10

【0043】

本発明に使用する反応容器としては、薬物代謝酵素反応時においては、ポリプロピレン製など蛋白質および評価する化学物質を吸着しにくい96穴のマイクロプレート、チューブなどを使用することができる。免疫反応時においては、薬物代謝酵素反応にて生成した生成物に対する特異的抗体を、ポリスチレン製、ナイロン製の96穴マイクロプレート、チューブなどを使用することができる。特に96穴プレートあるいは384穴プレートなどの使用により、同時多検体処理を効率よく実施することができる。

20

【実施例】

本発明の実施における望ましい態様を実施例として以下に述べる。なお、本発明が以下の実施例に限定されないことは言うまでもない。

【0044】

[実施例1]

(抗エストラジオール抗体固定化プレートの作製)

エストラジオールの3位の位置を利用して架橋された蛋白質を抗原として得た、精製抗エストラジオール抗体を、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように50mM炭酸緩衝液(pH9.6)に希釈し(抗体吸着液)、コーニングコースター社製のマクロタイタープレート(96ウェルタイプ:材質はポリスチレン)に1ウェルあたり100 $\mu\text{L}$ づつ分注した。分注後プレート表面をシールし、4にて終夜静置した。翌日抗体吸着液を除去し、1ウェルあたり10mMりん酸緩衝液(pH7.2;150mM NaClを含む)200 $\mu\text{L}$ にて3回洗浄した。洗浄後10mMりん酸緩衝液(pH7.2;150mM NaClを含む:りん酸緩衝液1)をベースとし、0.2%カゼイン、10%サッカロースを含むブロッキング溶液200 $\mu\text{L}$ を1ウェルづつ満たした。ブロッキング液を満たした後プレートを4にて終夜静置し、翌日ブロッキング液除去後16時間の真空乾燥を実施した。真空乾燥したプレートは減圧化にて保管袋に密封し、以下の測定に供するまで4にて保存した。

30

40

(サイトクロームP450の測定)

ジェンテスト(GENTEST)社製の組換えヒトサイトクロームP450 CYP19を、100mMりん酸緩衝液(pH7.2;0.1%BSAを含む:りん酸緩衝液2)にて希釈し、各濃度系列を作製した。この各濃度系列25 $\mu\text{L}$ と、りん酸緩衝液2をベースとした、グリセロール-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(以下G6PDHとも記載)(0.5ユニット/ml)、 $\text{MgCl}_2$ 4.13mM、 $\text{NADP}\cdot 2\text{Na}$ 1.63mM、 $\text{G6P}\cdot\text{Na}$ 4.13mM、テストステロン62.5 $\mu\text{M}$ の反応混合液100 $\mu\text{L}$ 及びりん酸緩衝液225 $\mu\text{L}$ をポリプロピレン製アッセイプレート(96ウェル)中にて混合し、37にて20分間反応させた。ヒトサイトクロームP450 CYP19はテストステロンを17 エストラジオールに変換するものである(アロマターゼと

50

も呼ばれる)。この反応液を50 $\mu$ Lとり、10mMリン酸緩衝液(pH7.2; 0.1%BSAを含む:リン酸緩衝液3)をベースとしたペルオキシダーゼ標識エストラジオール(E2-HRP)50 $\mu$ Lと、抗エストラジオール抗体固定化プレート上にて混合し、4にて1時間反応させた。反応後ツイン200.1%を含むリン酸緩衝液1200 $\mu$ Lにてプレートを3回洗浄後、テトラメチルベンチジンを含む酵素反応溶液100 $\mu$ Lを加え、37にて20分間インキュベートした。この後1N硫酸100 $\mu$ Lにて酵素反応をとめ、450nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測光し、データ処理を実施した。ヒトアロマトーゼの各濃度系列と得られる吸光度の関係を図5に示す。アロマトーゼの濃度と吸光度は非常に高い相関性をもっており、本実施例の方法により吸光度のデータより試料中のヒトサイトクロームP450 CYP19活性が測定できることが示されている。

【0045】

[実施例2]

(化学物質のヒトサイトクロームP450 CYP19への阻害効果の評価 1)

ジェンテスト(GENTEST)社製の組換えヒトサイトクロームP450 CYP19を、リン酸緩衝液2にて約1600倍希釈し、このヒトサイトクロームP450 CYP19溶液25 $\mu$ Lと、リン酸緩衝液2をベースとした、G6PDH(0.5ユニット/ml)、MgCl<sub>2</sub> 4.13mM、NADP $\cdot$ 2Na 1.63mM、G6P $\cdot$ Na 4.13mM、テストステロン62.5 $\mu$ Mの反応混合液100 $\mu$ L及びリン酸緩衝液2をベースとした25 $\mu$ Lのナフトフラボン0 $\mu$ M~3.2 $\mu$ M溶液(終濃度:n=6、8水準:計48サンプル)を、ポリプロピレン製アッセイプレート(96ウエル)中にて混合し、37にて20分間反応させた。この反応液を50 $\mu$ Lとり、以後実施例1と同様の操作を実施し、各ナフトフラボン溶液濃度と450nmでの吸光度の関係を求めた。図6にその対応関係を示す。ナフトフラボンの量の増加に伴って、サイトクロームP450 CYP19の阻害が強くなり、生成するエストラジオール量が少なくなり、酵素免疫測定法でのシグナル量が増加していることが判る。

【0046】

[実施例3]

(化学物質のサイトクロームP450 CYP19への阻害効果の評価 2)

実施例2のナフトフラボンにかえて、0~9 $\mu$ M(終濃度:n=8、8水準:計64サンプル)のアミノグルテチミド溶液を用いて同様の操作を実施し、各アミノグルテチミド溶液濃度と450nmでの吸光度の関係を求めた。図7にその対応関係を示す。アミノグルテチミドの量の増加に伴って、実施例2同様にサイトクロームP450 CYP19の阻害が強くなり、生成するエストラジオール量が少なくなり、酵素免疫測定法でのシグナル量が増加していることが判る。

【0047】

[実施例4]

(化学物質の17 $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼへの阻害効果の評価)

実施例2のサイトクロームCYP19に変えて、東洋紡績社製シュードモナス由来の17 $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼと、基質のテストステロンに変えて、エストロンを、さらに実施例2のナフトフラボンにかえて、0~20 $\mu$ M(終濃度:n=6、8水準:計48サンプル)のゲニステイン溶液を用いて同様の操作を実施し、各溶液濃度と450nmでの吸光度の関係を求めた。ここで17 $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼは、エストロンを17 $\beta$ -エストラジオールに変換するものである。図8にその対応関係を示す。アミノグルテチミドの量の増加に伴って、実施例2同様に17 $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの阻害が強くなり、生成するエストラジオール量が少なくなり、酵素免疫測定法でのシグナル量が増加していることが判る。

【0048】

[実施例5]

(抗フルオレセイン抗体固定化プレートの作製)

10

20

30

40

50

フルオレセインのX位の位置を利用して架橋された蛋白質を抗原として得た、精製抗フルオレセイン抗体を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように $50 \text{ mM}$ 炭酸緩衝液( $\text{pH} 9.6$ )に希釈し(抗体吸着液)、コーニングコースター社製のマクロタイタープレート(96ウエルタイプ:材質はポリスチレン)に1ウエルあたり $100 \mu\text{L}$ づつ分注した。分注後プレート表面をシールし、4にて終夜静置した。翌日抗体吸着液を除去し、1ウエルあたり $10 \text{ mM}$ りん酸緩衝液( $\text{pH} 7.2$ ;  $150 \text{ mM}$   $\text{NaCl}$ を含む)  $200 \mu\text{L}$ にて3回洗浄した。洗浄後 $10 \text{ mM}$ りん酸緩衝液( $\text{pH} 7.2$ ;  $150 \text{ mM}$   $\text{NaCl}$ を含む:りん酸緩衝液1)をベースとし、 $0.2\%$ カゼイン、 $10\%$ サッカロースを含むブロッキング溶液  $200 \mu\text{L}$ を1ウエルづつ満たした。ブロッキング液を満たした後プレートを4にて終夜静置し、翌日ブロッキング液除去後16時間の真空乾燥を実施した。真空乾燥したプレートは減圧化にて保管袋に密封し、以下の測定に供するまで4にて保存した。

10

(ヒトサイトクロームP450 CYP2C19の測定)

ジェンテスト(GENTEST)社製の組換えヒトサイトクロームP450 CYP2C19を、 $100 \text{ mM}$ りん酸緩衝液( $\text{pH} 7.2$ ;  $0.1\%$  BSAを含む:りん酸緩衝液2)にて希釈し、各濃度系列を作製した。この各濃度系列 $25 \mu\text{L}$ と、りん酸緩衝液2をベースとした、 $0.5$ ユニット/ $\text{ml}$ のG6PDH、 $4.13 \text{ mM}$ の $\text{MgCl}_2$ 、 $1.63 \text{ mM}$ の $\text{NADP} \cdot 2\text{Na}$ 、 $4.13 \text{ mM}$ の $\text{G6P} \cdot \text{Na}$ 、ジベンジルフルオレセイン  $62.5 \mu\text{M}$ の反応混合液  $100 \mu\text{L}$ 及びりん酸緩衝液2  $25 \mu\text{L}$ をポリプロピレン製アッセイプレート(96ウエル)中にて混合し、37にて20分間反応させた。この反応液を $50 \mu\text{L}$ とり、 $10 \text{ mM}$ りん酸緩衝液( $\text{pH} 7.2$ ;  $0.1\%$  BSAを含む:りん酸緩衝液3)をベースとしたシグマ社より入手したペルオキシダーゼ標識フルオレセン(E2-HRP)  $50 \mu\text{L}$ と、コスモバイオ社より入手した抗フルオレセイン抗体固定化プレート上にて混合し、4にて1時間反応させた。反応後ツイン20  $0.1\%$ を含むりん酸緩衝液1  $200 \mu\text{L}$ にてプレートを3回洗浄後、テトラメチルベンチジンを含む酵素反応溶液  $100 \mu\text{L}$ を加え、37にて20分間インキュベートした。この後 $1 \text{ N}$  硫酸  $100 \mu\text{L}$ にて酵素反応をとめ、 $450 \text{ nm}$ での吸光度をマイクロプレートリーダーにて測光し、データ処理を実施した。ヒトサイトクロームP450 CYP2C19の各濃度系列と得られる吸光度の関係を図9に示す。ヒトサイトクロームP450 CYP2C19の濃度と吸光度は非常に高い相関性をもっており、本実施例の方法により吸光度のデータより試料中のヒトサイトクロームP450 CYP2

20

30

【0049】

[実施例6]

(化学物質のヒトサイトクロームP450 CYP2C19への阻害効果の評価 1)

ジェンテスト(GENTEST)社製の組換えヒトサイトクロームP450 CYP2C19を、りん酸緩衝液2にて約2000倍希釈し、このヒトサイトクロームP450 CYP2C19溶液  $25 \mu\text{L}$ と、りん酸緩衝液2をベースとした、 $0.5$ ユニット/ $\text{ml}$ のG6PDH、 $4.13 \text{ mM}$ の $\text{MgCl}_2$ 、 $1.63 \text{ mM}$ の $\text{NADP} \cdot 2\text{Na}$ 、 $4.13 \text{ mM}$ の $\text{G6P} \cdot \text{Na}$ 、ジベンジルフルオレセイン  $30 \mu\text{M}$ の反応混合液  $100 \mu\text{L}$ 及びりん酸緩衝液2をベースとした $25 \mu\text{L}$ のシグマ社製ケトコナゾール  $0 \mu\text{M} \sim 12 \mu\text{M}$ (終濃度: $n=12$ 、8水準:計96サンプル)溶液を、ポリプロピレン製アッセイプレート(96ウエル)中にて混合し、37にて20分間反応させた。この反応液を $50 \mu\text{L}$ とり、以後実施例1と同様の操作を実施し、各ケトコナゾール溶液濃度と $450 \text{ nm}$ での吸光度の関係を求めた。図10にその対応関係を示す。ケトコナゾールの量の増加に伴って、ヒトサイトクロームP450 CYP2C19の阻害が強くなり、生成するフルオレセイン量が少なくなり、酵素免疫測定法でのシグナル量が増加していることが判る。

40

【0050】

[実施例7]

50

( 化学物質のヒトサイトクローム P 4 5 0 C Y P 2 C 1 9 への阻害効果の評価  
2 )

実施例 2 のケトコナゾールにかえて、0 ~ 2  $\mu$ M ( 終濃度 : n = 1 2、8 水準 : 計 9 6 サンプル ) のチクロピダイン溶液を用いて同様の操作を実施し、各チクロピダイン溶液濃度と 4 5 0 nm での吸光度の関係を求めた。図 1 1 にその対応関係を示す。チクロピダインの量の増加に伴って、実施例 2 同様にヒトサイトクローム P 4 5 0 C Y P 2 C 1 9 の阻害が強くなり、生成するフルオレセイン量が少なくなり、酵素免疫測定法でのシグナル量が増加していることが判る。

【 0 0 5 1 】

[ 実施例 8 ]

( 検体処理能力 )

実施例 2 の ナフトフラボンの希釈系列のかわりに、既知濃度の ナフトフラボンを 1 0 水準・4 8 水準・9 6 水準調製・準備し、それぞれを n = 2 にて、9 6 穴マイクロプレート ( ポリプロピレン製 ) 中でアロマターゼ反応を、抗体固定化 9 6 穴マイクロプレート ( ポリスチレン製 ) 中にて、免疫反応と発色反応を手作業にて実施したところ、総計所要時間はそれぞれ 約 2 時間、約 2 時間、約 2 時間 1 5 分となった。時間の差は主として、洗浄時のプレート枚数の違いによるものと、免疫反応・酵素反応においてタイミングを合わせるため生じたものによる。多水準のサンプルをおよそ 2 時間程度で効率よく測定できることが判る。

【 0 0 5 2 】

【 発明の効果 】

本発明により、放射性化合物を用いることなく、簡便・迅速に効率よく薬物代謝酵素活性を測定することができる。また本発明により、放射性化学物質を用いることなく、簡便・迅速にかつ効率的に多数の化学物質の薬剤代謝酵素阻害活性の評価を実施することができる。本発明はこれらの簡便・迅速性より、特に薬物代謝酵素を標的とする薬剤および攪乱化学物質の評価に好適である。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】本発明で包含する競合法 ( 抗体を固定化 ) の酵素免疫測定法での測定原理を模式的に示す。

【 図 2 】本発明で包含する競合法 ( 生成物 - 蛋白質架橋複合体 ) の酵素免疫測定法での測定原理を模式的に示す。

【 図 3 】本発明で阻害剤をスクリーニングする際に得られるドーズレスポンスカーブのモデルを模式的に示す。

【 図 4 】本発明で包含する表面プラズモン共鳴法での測定原理を模式的に示す。

【 図 5 】実施例 1 での、ヒトサイトクローム P 4 5 0 C Y P 1 9 の 各濃度系列と得られる吸光度の関係を示す。

【 図 6 】実施例 2 での、各 ナフトフラボン溶液濃度と 4 5 0 nm での吸光度の関係をを示す。

【 図 7 】実施例 3 での、各アミノグルテチミド溶液濃度と 4 5 0 nm での吸光度の関係を示す。

【 図 8 】実施例 4 での、各ゲニステイン溶液濃度と 4 5 0 nm での吸光度の関係を示す。

【 図 9 】実施例 5 での、ヒトサイトクローム P 4 5 0 C Y P 2 C 1 9 の各濃度系列と得られる吸光度の関係を示す。

【 図 1 0 】実施例 6 での、各ケトコナゾール溶液濃度と 4 5 0 nm での吸光度の関係をを示す。

【 図 1 1 】実施例 7 での、各チクロピダイン溶液濃度と 4 5 0 nm での吸光度の関係を示す。

【 図 1 2 】本発明で包含する水晶振動法での測定原理を模式的に示す。

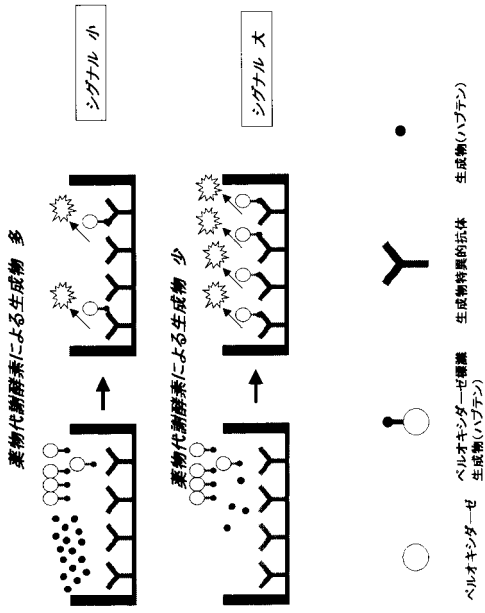
10

20

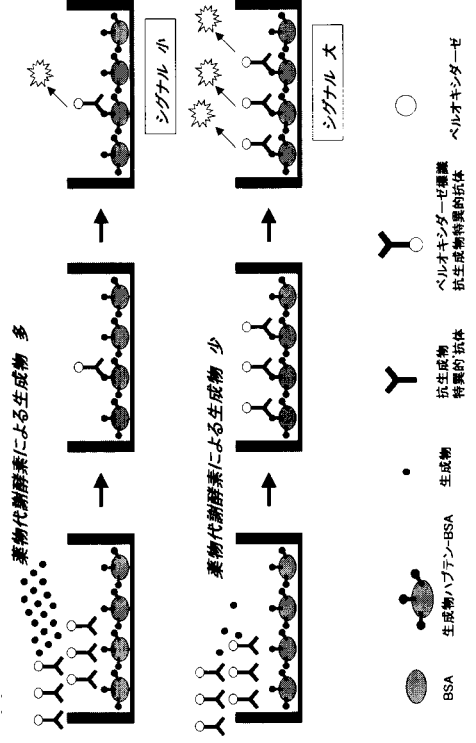
30

40

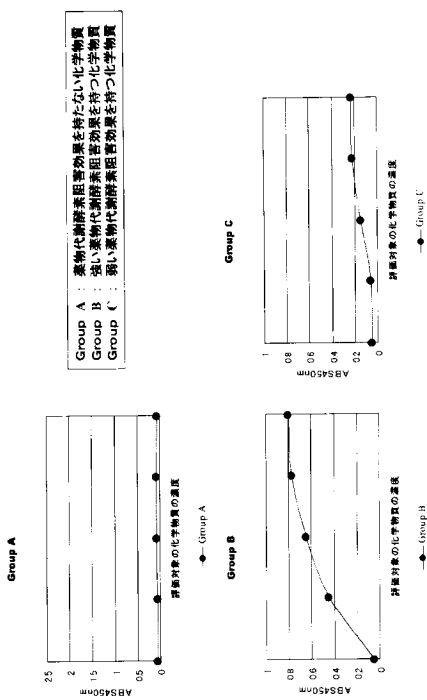
【 図 1 】



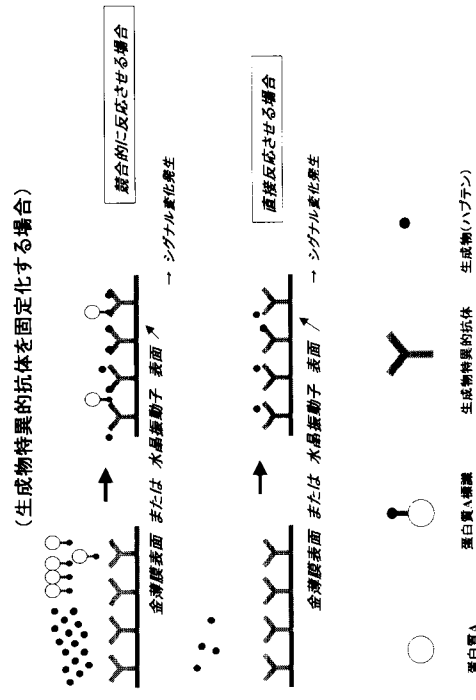
【 図 2 】



【 図 3 】



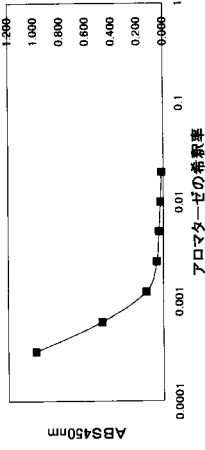
【 図 4 】



【 5 】

CYP19の発現量 原液 0.3225μl/ml	0 (希釈液のみ)	0.000325 (1/9200)	0.000625 (1/1800)	0.00125 (1/800)	0.0025 (1/400)	0.005 (1/200)	0.01 (1/100)	0.02 (1/50)
検出されるシグナル(ABS450)	1.845	0.985	0.473	0.131	0.051	0.034	0.022	0.015

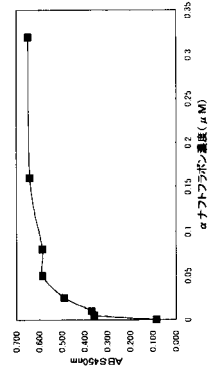
サイトクロームP450 CYP19の希釈直線



【 6 】

αナフトフラボン検量線 (CYP19 希釈液のみ)	0 (希釈液のみ)	0.005	0.01	0.025	0.05	0.16	0.32
検出されるシグナル(ABS450)	0.085	0.359	0.589	0.491	0.586	0.587	0.649

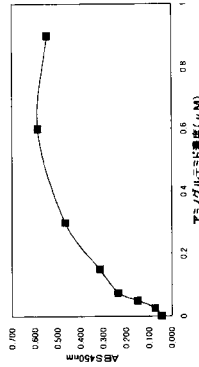
αナフトフラボンのドーズ レスポンス カーブ



【 7 】

アミノグルテリミド検量線 (CYP19 希釈液のみ)	0 (希釈液のみ)	0.025	0.06	0.075	0.15	0.3	0.6	0.9
検出されるシグナル(ABS450)	0.044	0.073	0.150	0.235	0.316	0.467	0.587	0.546

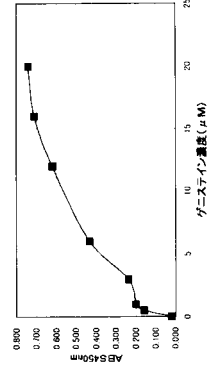
アミノグルテリミドのドーズ レスポンス カーブ



【 8 】

ゲニステイン検量線 (希釈液のみ)	0 (希釈液のみ)	0.5	1	3	6	12	16	20
検出されるシグナル(ABS450)	0.020	0.156	0.197	0.236	0.432	0.620	0.710	0.740

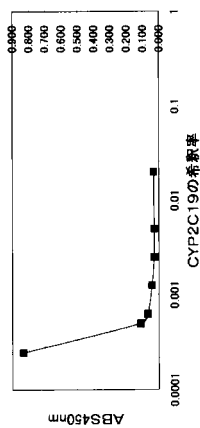
ゲニステインのドーズ レスポンス カーブ



【 9 】

CYP2C19の希釈率 (希釈率のみ)	0	0.0025 (1/400)	0.005 (1/200)	0.00625 (1/160)	0.0125 (1/80)	0.025 (1/40)	0.05 (1/20)	0.1 (1/10)
検出限界値(ABS450)	1.432	0.832	0.112	0.088	0.044	0.030	0.028	0.034

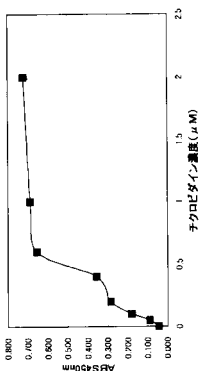
サイトクローマム450 CYP2C19の希釈直線



【 1 1 】

チクロピダイン希釈率 (希釈率のみ)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	1	2
検出限界値(ABS450)	0.044	0.090	0.180	0.206	0.355	0.554	0.889	0.721

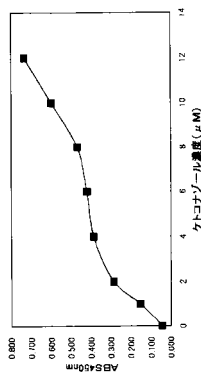
チクロピダインのドーズ レスポンス カーブ



【 1 0 】

ケトコゾール希釈率 (希釈率のみ)	0	1	2	4	6	8	10	12
検出限界値(ABS450)	0.045	0.154	0.287	0.387	0.421	0.469	0.588	0.734

ケトコゾールのドーズ レスポンス カーブ



【 1 2 】

(生成物-蛋白質を固定化する場合)

