

inter-laboratory variations is necessary in addition to the analytical method validation. A handling of study samples and reference standards should be defined in the protocol or SOP for the analysis.

<< Incurred samples reanalysis (ISR) >>

Q7. Is ISR required for urine samples?

A7. ISR is mandatory for urine samples as well as for blood samples, if drug concentrations in urine are used as a primary endpoint in bioequivalence studies since no drug is detected in the blood. The need for ISR depends on the significance of urine concentrations.

Q8. How should I perform ISR in toxicokinetic studies?

A8. In a GLP toxicokinetic study, ISR should be performed once per matrix for each animal species. If an analytical method is modified or analysis is performed in a different laboratory, ISR should be performed again.

In addition, ISR can be performed during a bioanalytical method validation using study samples obtained from a non-GLP study such as a dose-finding study performed before a GLP toxicokinetic study. In this case, the study design, including dose and regimen, should be comparable to that of the GLP study.

Q9. How should I perform ISR in clinical trials?

A9. ISR should be performed in representative clinical trials whose pharmacokinetic data as a primary endpoint. To evaluate the validity of an analytical method in an early stage, ISR should be performed as early as possible in the process of pharmaceutical development.

In a clinical trial with a different population of subjects with altered matrix composition, ISR should be performed again. In a bioequivalence study which serves pharmacokinetic data as the primary endpoint, ISR should be performed in the study.

Q10. If study samples obtained from clinical trials are already available at the time of analytical method validation, can I use the samples for ISR?

A10. If you have already obtained study samples from a clinical trial at the time of analytical method validation, you can use the samples for ISR. For example, a metabolite is added to the analyte(s), or reanalysis is performed with an improved analytical method after a failure to meet ISR acceptance criteria. However, an informed consent must be obtained from each subject who provides the study samples. The procedures of ISR and related items should be predefined.

Q11. If overall results meet the ISR acceptance criteria, but the assay variability of a specific sample exceeds the threshold of  $\pm 20\%$ , is it required to reanalyze the samples to correct first value?

A11. ISR is intended to confirm the validity of an analytical method using study samples. Therefore, reanalysis of individual study samples is not required to correct the first value, even though the assay variability exceeds the threshold of  $\pm 20\%$  when overall result meets the ISR acceptance criteria.

Q12. Where in a report is appropriate to provide ISR results?

A12. When the ISR is performed in the study sample analysis, ISR results should be reported in a study sample analytical report to prove the validity of an analytical method. When the ISR is performed in the analytical method validation, ISR results should be reported in a validation report.

<< Carry-over during study sample analysis >>

Q13. Is it required to repeat assessment of carry-over during study sample analysis even if it is examined in the analytical method validation?

A13. The extent of carry-over may alter depending on the state of the analytical instrument used and the total number of samples analyzed. Thus, carry-over after the analytical method validation should be paid attention. In particular, carry-over should be assessed during study sample analysis, if carry-over cannot be avoided completely in the analytical method validation.

It is not required to report the carry-over in each assay run in a report of study sample analysis.

<< Reanalysis >>

Q14. What issues should be addressed in reanalysis for a pharmacokinetic reason?

A14. Reanalysis of study samples for a pharmacokinetic reason should be avoided, whenever possible, in order to maintain objectivity. If reanalysis due to pharmacokinetic reason is performed, the selection of reanalysis samples should be carefully considered, for example, are included the one before and one after blood sampling points of the questionable sample in the analytical run. In addition, procedures for reanalysis should be predefined, including the number of repeat and the selection of report values, in the protocol or SOP.

In principle, reanalysis of the study samples based on the analytical results obtained is not acceptable in a study using bioanalytical concentrations as a primary endpoint, such as bioequivalence studies. However, this does not restrict reanalysis for investigation and verification which does not replace the concentration data from first results.

<< Others >>

Q15. How should I perform analytical method validation for endogenous substances?

A15. This guideline does not cover the validation of an analytical method for an endogenous substance (e.g., vitamins, amino acids) in biological samples, even though it is administered as drugs; because such validation may involve some issues that are not appropriate for the application of specifications in this guideline. However, it is recommended to perform appropriate validation according to the specifications in this guideline.

It is acceptable to use an appropriate surrogate matrix to measure concentrations of endogenous substances in biological samples. In this case, the validity of the surrogate matrix should be shown in analytical method validation.

1 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  
2 バリデーションに関するガイドライン（案）  
3

4 目次

5  
6 1. はじめに  
7 2. 適用  
8 3. 標準物質（標準品）  
9 4. 分析法バリデーション  
10 4.1. フルバリデーション  
11 4.1.1. 特異性  
12 4.1.2. 選択性  
13 4.1.3. 検量線  
14 4.1.4. 真度及び精度  
15 4.1.5. 希釈直線性  
16 4.1.6. 安定性  
17 4.2. パーシャルバリデーション  
18 4.3. クロスバリデーション  
19 5. 実試料分析  
20 5.1. 検量線  
21 5.2. QC 試料  
22 5.3. ISR  
23 6. 注意事項  
24 6.1. 定量範囲  
25 6.2. 再分析  
26 6.3. キャリーオーバー  
27 6.4. クロストーク  
28 6.5. 重要試薬  
29 6.6. 干渉物質  
30 7. 報告書の作成と記録等の保存  
31 用語解説

32 はじめに

33 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析は、対象薬物やその代謝物の有効性及び安全  
34 性を評価する上で、臨床薬物動態試験や非臨床薬物動態試験（トキシコキネティクス試験を  
35 含む。）に活用され、得られた生体試料中薬物濃度は、体内動態（吸収、分布、代謝及び排泄）、  
36 バイオアベイラビリティ、生物学的同等性及び薬物間相互作用等の評価に利用されている。

37 一方、生体試料中薬物濃度分析には、一連の分析過程を通して妥当性が適切に確認され、  
38 十分な信頼性を有する方法を用いることが必要である。

39 本ガイドラインは、医薬品の製造販売承認申請に用いる試験成績の評価のために、リガン  
40 ド結合法による生体試料中薬物濃度分析法が十分な信頼性を有することを保証するためのバ  
41 リデーション及びその分析法を用いた実試料分析に関して推奨される一般的な指針を示した  
42 ものである。

43 そのため、特別な分析法を用いる場合や得られた濃度情報の使用目的によっては、科学的  
44 な判断に基づき、あらかじめ妥当な判断基準を設定する等、柔軟な対応を考慮することが必  
45 要である。

46

#### 47 1. 適用

48 本ガイドラインは、トキシコキネティクス試験及び臨床試験における生体試料中薬物濃度  
49 分析法としてリガンド結合法（ligand binding assay: LBA）を用いる際の分析法バリデー  
50 ション並びに当該分析法を用いた実試料分析に適用するものとする。対象薬物はペプチド及び  
51 タンパク質を中心とし、リガンド結合法を用いて分析する薬物であれば低分子化合物も対象  
52 とする。リガンド結合法の代表的な例としては、酵素免疫測定法（enzyme immunoassay:  
53 EIA）等の抗原抗体反応に基づく免疫学的測定法が挙げられる。

54 なお、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成9年3月26  
55 日厚生省令第21号）の対象とならない非臨床試験で使用される分析法は、当該ガイドライ  
56 ンの適用対象ではないが、当該ガイドラインの内容を参考に必要なバリデーション等を実施  
57 してよい。

58

#### 59 2. 標準物質（標準品）

60 標準物質（標準品）は、分析対象物質を定量分析する上で基準となるものであり、主に分  
61 析対象物質を添加した既知濃度の試料である検量線用標準試料及びQuality Control（QC）  
62 試料の調製に用いられる。標準物質の品質は測定データに影響を及ぼすため、品質が保証さ  
63 れた標準物質を使用しなければならない。使用する標準物質については、ロット番号、含量  
64 （物質質量、純度又は力価）、保存条件、並びに、有効期限又はリテスト日等を明らかにした分  
65 析証明書又はそれに代わる文書が必要である。標準物質は、その入手先が明らかにされ、か  
66 つその特性が精査されている必要がある。

67

#### 68 3. 分析法バリデーション

69 薬物又はその代謝物の生体試料中濃度を定量する際の分析法を確立する際には、施設ごと

70 に分析法バリデーションを実施する。

### 71 3.1. フルバリデーション

72 分析法を新たに確立する際には、フルバリデーションを実施する。文献等で公表された分  
73 析法を使用する場合や市販されているキットを使用する場合にも、フルバリデーションの実  
74 施が必要である。

75 フルバリデーションでは、特異性、選択性、検量線、真度、精度、希釈直線性、安定性等  
76 を評価する。通常、フルバリデーションは、分析対象となる種又はマトリックス（主に血漿  
77 又は血清）ごとに実施する。

78 分析法バリデーションに用いるマトリックスは、抗凝固剤や添加剤を含め、分析対象の実  
79 試料にできるだけ近いものを使用する。希少なマトリックス（組織、脳脊髄液又は胆汁等）  
80 を対象とした分析法を確立する場合には、十分な数の個体から十分な量のマトリックスが得  
81 られない状況が問題となる場合がある。そのような場合には、代替マトリックスを使用する  
82 ことができる。代替マトリックスは、検量線を構成する各試料及び QC 試料の調製等に用い  
83 られる。ただし、代替マトリックスを使用する場合には、分析法を確立する過程においてそ  
84 の妥当性を可能な限り検証する。

85 リガンド結合法では、分析法を確立する過程において設定された MRD（minimum  
86 required dilution）を用いて試料を希釈し、フルバリデーションを実施する。プレートを使  
87 用するリガンド結合法では、通常、1 調製試料あたり少なくとも 2 穴で測定し、各穴より得  
88 られた応答変数の平均値から試料の定量値を算出する、あるいは各穴の応答変数から算出さ  
89 れた定量値を平均して試料の定量値とする。

90

#### 91 3.1.1. 特異性

92 特異性とは、分析対象物質を類縁物質等と識別して検出する能力のことである。リガンド  
93 結合法の場合、結合試薬が分析対象物質と特異的に結合し、試料中に共存する類似物質（分  
94 析対象物質と構造的に類似した物質）と交差反応性を示さないことが重要である。生体内に  
95 類似物質が存在すると想定される場合には類似物質が分析対象物質の測定に与える影響の程  
96 度を評価する。特異性は、分析法を確立する過程や分析法バリデーション終了後に評価する  
97 こともある。

98 特異性は、ブランク試料（分析対象物質を添加しないマトリックス試料）、ブランク試料に  
99 想定される濃度の類似物質を添加した試料、並びに低濃度及び高濃度付近の QC 試料に想定  
100 される濃度の類似物質を添加した試料を用いて評価する。

101 ブランク試料が定量下限未滿を示し、類似物質を添加した QC 試料の定量値の真度が理論  
102 値のそれぞれ $\pm 20\%$ 以内（定量下限及び定量上限の場合は $\pm 25\%$ 以内）でなければならない。

103

#### 104 3.1.2. 選択性

105 選択性とは、試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質を区別して検出することができ  
106 る能力のことである。

107 選択性は、少なくとも 10 個体から得られた個別のブランク試料及び個別のブランク試料

108 を用いて調製した定量下限付近の QC 試料を用いて評価する。希少なマトリックスを使用す  
109 る場合には、10 個体よりも少ない個体から得られたマトリックスを使用することも許容され  
110 る。

111 ブランク試料の 80%以上が定量下限未満を示し、定量下限付近の QC 試料の 80%以上にお  
112 いて定量値の真度が理論値の $\pm 20\%$ 以内(定量下限の場合は $\pm 25\%$ 以内)でなければならない。

113

### 114 3.1.3. 検量線

115 検量線は、分析対象物質の濃度の理論値と応答変数（レスポンス）の関係を示したもので  
116 ある。

117 検量線の作成には、可能な限り実試料と同じマトリックスを使用し、既知濃度の分析対象  
118 物質を添加して作成する。検量線は、定量下限及び定量上限を含む 6 濃度以上の検量線用標  
119 準試料、及びブランク試料から構成される。カーブフィッティングを向上させる目的で、定  
120 量下限未満の濃度及び検量線の定量上限を超える濃度のアンカーポイントを設定しても良い。  
121 検量線の回帰式は、一般的には 4 又は 5-パラメーターロジスティックモデルが用いられる。  
122 報告書には、用いた回帰式及び重み付け条件を記載する。

123 回帰式から求められた検量線用標準試料の各濃度の真度は、定量下限及び定量上限におい  
124 て理論値の $\pm 25\%$ 以内とし、定量下限及び定量上限以外においては理論値の $\pm 20\%$ 以内とする。  
125 アンカーポイントには真度の基準を設けない。アンカーポイントを除く検量線用標準試料の  
126 75%以上かつ、定量下限及び定量上限を含む少なくとも 6 濃度以上が上記の基準を満たすも  
127 のとする。

128

### 129 3.1.4. 真度及び精度

130 真度とは、分析法で得られる分析対象物質の定量値と理論値との一致の程度のことである。  
131 精度とは、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である。

132 真度及び精度は、QC 試料、すなわち分析対象物質濃度が既知の試料を分析することによ  
133 って評価される。QC 試料は、実試料分析時と同様の方法で処理したものを使用する。バリ  
134 デーション時においては、検量線の定量範囲内で、最低 5 濃度（定量下限、低濃度、中濃度、  
135 高濃度及び定量上限）の QC 試料を調製する。QC 試料の濃度については、低濃度は定量下  
136 限の 3 倍以内、中濃度は検量線の間付近、高濃度は検量線の定量上限の 1/3 以上であるも  
137 のとする。分析単位内及び分析単位間の真度及び精度は、少なくとも 6 回の分析単位を繰り  
138 返し分析することによって評価される。

139 各濃度における平均の真度は、理論値の $\pm 20\%$ 以内でなければならない。ただし、定量下限  
140 及び定量上限では $\pm 25\%$ 以内であるものとする。各濃度における定量値の精度は、20%以下で  
141 なければならない。ただし、定量下限及び定量上限では 25%以下とする。さらに、各濃度  
142 における真度の絶対値と精度の和（トータルエラー）は、30%以下でなければならない。ただ  
143 し、定量下限及び定量上限では 40%以下とする。

144

145 3.1.5. 希釈直線性

146 希釈直線性の評価は、定量上限を超える濃度の試料がフック効果又はプロゾーンの影響を  
147 受けずに適切に分析できること、及び、検量線内においても定量値に希釈による影響がない  
148 ことを確認するために実施する。希釈直線性は、定量上限を超える QC 試料及びこの試料を  
149 段階希釈した複数濃度の試料を分析して評価する。上記試料において、レスポンス低下（フ  
150 ック効果又はプロゾーン）の有無を確認し、レスポンス低下が認められた場合には実試料分  
151 析に影響を及ぼさないような手段を考慮する必要がある。また、試料の定量値を希釈倍率で  
152 補正した後の真度は理論値の $\pm 20\%$ 以内、精度は 20%以下でなければならない。  
153

154 3.1.6. 安定性

155 分析対象物質の安定性評価は、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  
156 の濃度に影響を及ぼさないことを保証するために実施する。安定性の評価は、実際の保存条  
157 件又は分析条件にできる限り近い条件で行う。安定性の評価においては、溶媒又はマトリッ  
158 クスの種類、容器の材質、保存条件等に留意する。

159 バリデーション試験では、凍結融解安定性、短期保存安定性（室温、氷冷又は冷蔵等）、長  
160 期保存安定性を評価する。いずれの安定性についても、実際の保存期間を上回る期間で評価  
161 する。

162 標準原液及び標準溶液中の安定性の評価には、実際に保存する溶液のうち、最高濃度及び  
163 最低濃度の溶液を用いる。マトリックス中の安定性の評価には、低濃度及び高濃度の QC 試  
164 料を用いる。QC 試料の調製には、抗凝固剤や添加剤を含め、実際の条件にできるだけ近い  
165 マトリックスを使用する。各濃度あたり少なくとも 3 回の繰り返し分析を、QC 試料を保存  
166 する前後に行うことで安定性を評価する。原則として各濃度における平均真度を指標として、  
167 理論値の $\pm 20\%$ 以内でなければならない。なお、分析対象物質の特性等を考慮し、他の指標が  
168 科学的により適切に評価できる場合には、当該指標を用いても良い。  
169

170 3.2. パーシャルバリデーション

171 既にフルバリデーションを実施した分析法に軽微な変更を施す場合には、パーシャルバリ  
172 デーションを実施する。パーシャルバリデーションで評価する項目は、分析法の変更の程度  
173 とその性質に応じて設定する。

174 パーシャルバリデーションを実施する典型的な事例として、分析法の他施設への移管、分  
175 析機器の変更、重要試薬のロットの変更、定量範囲の変更、MRD の変更、抗凝固剤の変更、  
176 分析条件の変更、試料の保存条件の変更、併用薬の分析に与える影響の確認又は希少なマト  
177 リックスの使用等が挙げられる。

178 パーシャルバリデーションにおける判断基準には、原則としてフルバリデーションと同様  
179 の判断基準を設定する。  
180

181 3.3. クロスバリデーション

182 クロスバリデーションは、主に同一の試験内で複数の分析施設で分析する場合、又は異なる



183 る試験間で使用された分析法を比較する場合に実施される。クロスバリデーションによる比  
184 較は、それぞれのフルバリデーション又はパーシャルバリデーションを実施した上で実施す  
185 る。分析対象物質を添加した同一の QC 試料又は実試料を分析し、QC 試料の各濃度の平均  
186 真度を評価又は実試料の濃度の乖離度を評価する。

187 同一の試験内で複数の分析施設を用いる際のクロスバリデーションにおいては、室内及び  
188 室間再現精度を考慮し、低濃度、中濃度及び高濃度各濃度で少なくとも 3 回の繰り返し分析  
189 による QC 試料の平均真度は、原則として理論値の±30%以内でなければならない。実試料  
190 を使用する場合には、少なくとも 3 分の 2 の試料の乖離度が±30%以内でなければならない。

191 原理等が異なる分析法を用いる際のクロスバリデーションにおいては、分析法の性質を考  
192 慮した上で、科学的な判断に基づき、個別にその実施方法及び許容できる平均真度又は乖離  
193 度による基準を設定して評価する。

194

#### 195 4. 実試料分析

196 実試料とは、トキシコキネティクス試験又は臨床試験等から得られる試料のうち、生体試  
197 料中薬物濃度分析に供する試料のことである。実試料分析には、分析法バリデーションによ  
198 って確立された分析法を用いる。実試料分析では、分析法バリデーションで安定性が確認さ  
199 れた条件下で実試料を取り扱い、安定性が確認された期間内に検量線（ブランク試料及び 6  
200 濃度以上の検量線用標準試料）及び QC 試料（3 濃度以上）と共に実試料を分析する。なお、  
201 プレートを使用するリガンド結合法では、通常、1 調製試料あたり少なくとも 2 穴で測定し、  
202 各穴より得られた応答変数の平均値から試料の定量値を算出する、あるいは各穴の応答変数  
203 から算出された定量値を平均して試料の定量値とする。

204 実試料分析での分析法の妥当性は、分析単位ごとに検量線、QC 試料で評価する。プレー  
205 トを用いる分析法では、プレートを分析単位とする。更に薬物動態を主要な評価項目とする  
206 試験では、異なるマトリックスごとに代表的な試験を選択して ISR (incurred sample  
207 reanalysis ; 定量値の再現性確認のため、異なる日に別の分析単位で投与後試料を再分析す  
208 ること) を実施し、分析法の再現性を確認する。

209

#### 210 4.1. 検量線

211 検量線は、実試料中の分析対象物質の濃度を算出するために用いられる。実試料分析に用  
212 いる検量線は、分析法バリデーションで確立した方法によって、分析単位ごとに作成される  
213 必要がある。検量線の回帰式及び重み付け条件には、分析法バリデーションのときと同様の  
214 モデルを用いる。

215 回帰式から求められた検量線用標準試料の各濃度の真度は、定量下限及び検量線の定量上  
216 限においては理論値の±25%以内、それ以外の濃度においては理論値の±20%以内でなければ  
217 ならない。アンカーポイントには真度の基準を設けない。アンカーポイントを除く検量線用  
218 標準試料の 75%以上かつ少なくとも 6 濃度の検量線用標準試料が上記基準を満たさなければ  
219 ならない。

220 実試料分析において、検量線用標準試料の定量下限又は検量線の定量上限が基準を満たさ  
221 なかった場合には、これらの次の濃度の検量線用標準試料を定量下限又は検量線の定量上限

222 としてもよい。その場合、変更された検量線の濃度範囲は、少なくとも3濃度（低濃度、中  
223 濃度及び高濃度）のQC試料を含まなければならない。  
224

#### 225 4.2. QC試料

226 QC試料は、検量線や実試料の分析に用いられた分析法の妥当性を評価するために分析さ  
227 れる。

228 検量線の濃度範囲内で、少なくとも3濃度（低濃度、中濃度及び高濃度）のQC試料を分  
229 析単位ごとに分析する。通常、低濃度は定量下限の3倍以内、中濃度は検量線の間付近、  
230 高濃度は検量線の定量上限の3分の1以上と設定される。QC試料は、実試料と同様の方法  
231 で処理したものを使用する。分析するQC試料の数としては、各濃度あたり2試料又は分析  
232 単位内の実試料数の5%以上のいずれか多い方とする。

233 QC試料の真度は理論値の $\pm 20\%$ 以内であるものとし、全QC試料の3分の2以上かつ各濃  
234 度の2分の1以上のQC試料が上記基準を満たさなければならない。  
235

#### 236 4.3. ISR (Incurred samples reanalysis)

237 生体試料中薬物濃度分析においては、分析法バリデーションや実試料分析に用いられる検  
238 量線用標準試料及びQC試料による分析法の妥当性確認を実施しても、実試料を用いた分析  
239 結果に再現性がない事例が少なくない。実試料の不均一、コンタミネーションのような操作  
240 誤りに基づくものから実試料に特有の生体由来成分や未知代謝物の影響に至るまで、その原  
241 因には様々なものが想定される。ISRとは、定量値の再現性確認のため、異なる日に別の分  
242 析単位で投与後試料を再分析することであり、ISRを実施して、再現性を確認しておくこと  
243 が分析値の信頼性を高めるものとなる。また、ISRで再現性が確認できない分析法がある場  
244 合に、その原因を調査し、改善策を講じる契機となる。

245 通常、ISRは薬物動態を主要なエンドポイントとする試験で異なるマトリックスごとに代  
246 表的な試験を選択して実施される。例えば、非臨床試験ではトキシコキネティクス試験の異  
247 なる動物種ごとに、臨床試験においては、健康被験者、腎機能又は肝機能低下のある被験者  
248 を対象とするそれぞれの薬物動態試験のうち代表的な試験、並びに生物学的同等性試験で実  
249 施される。なお、非臨床試験のISRを実施する実試料には、採取条件が同等である非臨床試  
250 験の予備試験等から得られる実試料を活用することもある。

251 ISRを実施する試料数は、できるだけ多くの個体から通常最高血中濃度及び消失相付近の  
252 試料を含むよう選択し、安定性が保証された期間内にISRを実施する。ISRを実施する実試  
253 料数は、1000を超えない実試料数に対してその約10%、1000を超えた実試料数では、それ  
254 に1000の超過数に対して約5%に相当する試料数を加えた数を目安とする。

255 ISRの評価には、乖離度を用いる。乖離度は、ISRにより得られた定量値と初回の定量値  
256 の差を両者の平均値で除した値に100を乗じることで算出される。ISRを実施した試料のう  
257 ち、少なくとも3分の2以上の試料において、乖離度が $\pm 30\%$ 以内でなければならない。ISR  
258 の結果が上記基準を満たさなかった分析法では、その原因を調査し、実試料分析への影響を  
259 考察して必要に応じた対応を取らなければならない。

260 なお、ISRは、乖離度のばらつきを評価するために実施しているものであり、個別の実試

261 料において ISR の結果が $\pm 30\%$ を超えても、その初回の定量値を、再分析値へ置き換える又  
262 は棄却してはならない。

263

## 264 5. 注意事項

### 265 5.1. 定量範囲

266 リガンド結合法の定量範囲は結合試薬の特性に大きく依存するため、定量範囲を任意に設  
267 定することが困難なことがある。その場合は希釈直線性の範囲を適切に設定するよう注意し  
268 なければならない。

269 定量範囲を変更する場合には、パーシャルバリデーションを実施する。ただし、検量線の  
270 定量範囲又は QC 試料の濃度又は数を変更する前に分析した実試料を、これらの変更後に再  
271 分析する必要はない。

272

### 273 5.2. 再分析

274 サンプルの分析を実施する前に、あらかじめ再分析を実施する場合の理由、再分析の手順  
275 及び再分析を行った場合の定量値の取扱いに関する事項を計画書又は手順書に設定する。

276 再分析を実施する際の例として、検量線又は QC 試料が分析法の妥当性の基準を満たさな  
277 かった場合、定量値が検量線の定量上限を超えた場合、又は過剰希釈により定量下限未満と  
278 なった場合、投与前試料又は実薬非投与前群の試料中に分析対象物質が認められた場合、分析  
279 操作又は分析機器の不具合が発生した場合に実施される他、異常値の原因追求等が挙げられ  
280 る。

281 薬物動態学的な理由による再分析については、可能な限り実施しないことが望ましい。特  
282 に生物学的同等性試験においては、薬物動態的に不自然という理由のみで再分析を実施して  
283 定量値を変更してはならない。ただし、臨床試験において、被験者の安全性に影響を及ぼす  
284 可能性がある予期しない結果又は異常な結果が確認された場合に、特定の試験サンプルを再  
285 分析することは制限されない。

286 いずれにせよ、再分析を実施した場合には、用いた試料の情報、再分析を実施した理由、  
287 初回の定量値が得られている場合には初回定量値、再分析によって得られた定量値並びに採  
288 用値及びその選択理由と選択方法を報告書に記載することが必要である。

289

### 290 5.3. キャリーオーバー

291 キャリーオーバーとは、分析装置に残留した分析対象物質が定量値に影響を与えることで  
292 ある。

293 プレートやチューブを用いて分析する場合はキャリーオーバーを考慮する必要はないが、  
294 同一のフローセル、流路、オートサンプラーを用いて分析する場合は考慮する必要がある。

295 キャリーオーバーの回避が困難な場合には、その程度を検討し、実際の実試料分析に影響  
296 を及ぼさないような手段を考慮する。キャリーオーバーが実試料中の分析対象物質の定量分  
297 析に影響を及ぼすと懸念される場合には、実試料分析中にキャリーオーバーを評価し、定量

298 値への影響について考察する。  
299

#### 300 5.4. クロストーク

301 クロストークとは、プレートを用いた分析において、蛍光あるいは発光等が隣接するウェ  
302 ルに漏れ、定量値に影響を与えることである。

303 クロストークの回避が困難な場合には、その程度を検討し、実際の実試料分析に影響を及  
304 ぼさないような手段を考慮する。クロストークが実試料中の分析対象物質の定量分析に影響  
305 を及ぼすと懸念される場合には、実試料分析中にクロストークを評価し、定量値への影響に  
306 ついて考察する。  
307

#### 308 5.5. 重要試薬

309 重要試薬とは、リガンド結合法による生体試料中薬物濃度分析において分析結果に直接影  
310 響する試薬を指し、主に結合試薬（抗体及びその標識体等）が該当する。

311 重要試薬は、分析対象物質に対する特異性に留意して選択し、品質が維持できる条件で保  
312 存する。重要試薬の品質は、分析法バリデーション並びに実試料分析に使用される期間を通  
313 じて適切に確保される必要がある。重要試薬のロット変更の際には原則としてパーシャルバ  
314 リデーションが必要である。  
315

#### 316 5.6. 干渉物質

317 干渉物質とは、薬物の可溶性リガンドあるいは抗薬物抗体等、実試料分析において定量値  
318 に影響を及ぼす可能性のあるものをいう。

319 干渉物質が実試料中に存在する可能性がある場合には、定量値への影響の程度を検討して  
320 おくことが望ましい。  
321

### 322 6. 報告書の作成と記録等の保存

323 十分な再現性及び信頼性を有することを保証するため、分析法バリデーション及び実試料  
324 分析によって得られた結果を、以下に示すバリデーション報告書及び実試料分析報告書とし  
325 て作成し、関連の記録や生データと併せて適切に保存する。

326 また、関連の記録や生データは、標準物質、ブランクマトリックス及び重要試薬に関する  
327 授受、使用及び保存の記録、試料に関する授受、調製及び保存の記録、分析の実施記録、装  
328 置の校正記録及び設定値、逸脱の記録、通信の記録、並びに分析結果等の生データは、棄却  
329 された分析単位において得られたデータも含めて全て保存する。  
330

331 バリデーション報告書

332

333 ● バリデーションの要約

334 ● 標準物質に関する情報

335	● ブランクマトリックスに関する情報
336	● 重要試薬に関する情報
337	● 分析方法（MRD を含めて記載する.）
338	● バリデーシヨンの評価項目と判断基準
339	● バリデーシヨンの結果及び考察
340	● 分析の棄却及びその理由
341	● 再分析に関する情報
342	● 計画書及び手順書からの逸脱事項並びに試験結果に対する影響
343	● 参照する別試験，手順書及び参考文献の情報
344	
345	実試料分析報告書
346	
347	● 実試料分析の要約
348	● 標準物質に関する情報
349	● ブランクマトリックスに関する情報
350	● 実試料の受領及び保存に関する情報
351	● 重要試薬に関する情報
352	● 分析方法
353	● 分析の妥当性に関する評価項目と判断基準及びその結果
354	● 実試料分析の結果及び考察
355	● 分析の棄却及びその理由
356	● 再分析に関する情報
357	● 計画書及び手順書からの逸脱事項並びに試験結果に対する影響
358	● 参照する別試験，手順書及び参考文献の情報
359	
360	
361	

以上

362 用語解説

- 363 アンカーポイント Anchor point : 検量線のカーブフィッティングを向上させる目的で、検量  
364 線用標準試料と同時に測定する定量下限未満又は定量上限を超える濃度の試料。
- 365 安定性 Stability : 所定の時間、特定の条件下での溶媒中又はマトリックス中における分析対  
366 象物質の化学的又は生物学的安定性。分析対象物質の安定性評価は、試料を採取してから分  
367 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を保証するために実施さ  
368 れる。
- 369 応答変数 (レスポンス) Response variable : 分析機器の検出器から得られた応答のこと。  
370 リガンド結合法では、通常、分光学的手法で得られた応答を電気信号に変換して得られる吸  
371 光度又は発光強度等で表される。
- 372 乖離度 Assay variability : 同じ試料を用いて行った定量値間の相違の程度。両者の平均に対  
373 する両者の差をパーセント表記したもの。  
374 乖離度(%) = {(比較する分析の定量値) - (基準となる分析の定量値)} / (両者の平均値) × 100
- 375 干渉物質 Interfering substance : マトリックス中に存在し、結合試薬と分析対象物質の結合  
376 等に影響を及ぼす可能性がある物質。
- 377 希釈直線性 Dilutional linearity : 定量上限を超える濃度の試料がフック効果又はプロゾーンの  
378 影響を受けずに適切に分析できること、及び、検量線内においても定量値に希釈による影  
379 響がないことを示す指標。
- 380 キャリーオーバー Carry over : 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  
381 と。
- 382 クロストーク Cross talk : プレートを用いた分析法において、蛍光あるいは発光等が隣接す  
383 るウェルに漏れ、定量値に影響を与えること。
- 384 クロスバリデーション Cross validation : 同一の試験内で複数の分析施設で分析する場合、  
385 又は異なる試験間で使用された分析法を比較する場合に実施されるバリデーション。クロス  
386 バリデーションによる比較は、それぞれのフルバリデーション又はパーシャルバリデーショ  
387 ンを実施した上で実施する。
- 388 結合試薬 Binding reagent : リガンド結合法で用いる試薬のうち、分析対象物質に直接結合  
389 する試薬。
- 390 検量線 Calibration curve : 分析対象物質の濃度とレスポンスの関係を示したもの。定量下  
391 限及び上限を含む 6 濃度以上の検量線用標準試料及びブランク試料から構成される。定量範  
392 囲外にアンカーポイントを設定しても良い。
- 393 検量線用標準試料 Calibration standard : 検量線の作成に用いる分析対象物質を添加した既  
394 知濃度の試料。検量線用標準試料を用いて検量線を作成し、QC 試料や実試料の濃度を算出  
395 する。
- 396 交差反応性 Cross-reactivity : 結合試薬が、分析対象物質以外の物質に結合すること。
- 397 再分析 Reanalysis : 試料の希釈から分析に係る一連の操作を再度行うこと。

- 398 実試料 Study sample : トキシコキネティクス試験又は臨床試験等から得られる試料のうち、  
399 生体試料中薬物濃度分析に供する試料。
- 400 重要試薬 Critical reagent : リガンド結合法に用いる試薬のうち、分析結果に直接影響する  
401 試薬を指し、主に結合試薬（抗体及びその標識体等）が該当する。
- 402 真度 Accuracy : 定量値と理論値との一致の程度。理論値を 100%としたときの、パーセン  
403 ト表記で表される。  
404 
$$\text{真度}(\%) = ((\text{定量値}) / (\text{理論値})) \times 100$$
- 405 精度 Precision : 繰り返し分析して得られる定量値間の一致のばらつきの程度。変動係数  
406 (CV) または相対標準偏差 (RSD) のパーセント表記で表される。  
407 
$$\text{精度}(\%) = ((\text{標準偏差}) / (\text{平均値})) \times 100$$
- 408 選択性 Selectivity : 生体試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質を区別して検出するこ  
409 とができる能力。
- 410 代替マトリックス Surrogate matrix : 希少なマトリックス（組織、脳脊髄液、胆汁等）のた  
411 め量に限りがある場合等、本来のマトリックスの代わりとして用いられるマトリックス。ま  
412 た、薬物と同じ構造の内因性物質が存在する場合に、本来のマトリックスの代わりとして用  
413 いられることがある。
- 414 定量下限 Lower limit of quantification (LLOQ) : 試料中において分析対象物質を信頼でき  
415 る真度及び精度で定量することができる最も低い濃度。
- 416 定量上限 Upper limit of quantification (ULOQ) : 試料中において分析対象物質を信頼でき  
417 る真度及び精度で定量することができる最も高い濃度。
- 418 定量範囲 Quantification range : 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  
419 定量することができる濃度の範囲。生体試料中薬物濃度分析に用いる分析法の定量範囲は、  
420 検量線の定量範囲及び希釈直線性によって保証される。
- 421 投与後試料 Incurred sample : 実試料のうち、実薬を投与した後に得られる試料。
- 422 特異性 Specificity : 分析対象物質を類似物質と識別して検出する能力。リガンド結合法では  
423 結合試薬の特性に大きく依存する。
- 424 トータルエラー Total error : 真度の絶対値と精度の和。
- 425 パーシャルバリデーション Partial validation : 既にフルバリデーションを実施した分析法  
426 に軽微な変更を施す場合に実施するバリデーション。パーシャルバリデーションで評価する  
427 項目は、分析法の変更の程度とその性質に応じて考慮する必要があり、その範囲は日内の真  
428 度及び精度のみの評価からほとんどフルバリデーションに至るまで多岐にわたる。
- 429 バリデーション Validation : 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  
430 証すること。
- 431 標準物質（標準品） Reference standard : 分析対象物質を定量分析する上で基準となるもの  
432 であり、主に検量線用標準試料や QC 試料の調製に用いられる。

- 433 標準溶液 Working solution: 標準物質を適切な溶媒で希釈して調製した非マトリックス溶液。  
434 主として、検量線用標準試料や QC 試料を調製するため、マトリックスに添加する。
- 435 フック効果 Hook effect: 分析対象物質の濃度が非常に高い場合に、レスポンスが抑制され  
436 ること。フック効果がある場合は、定量上限を超える濃度の試料の測定値が定量範囲内また  
437 は定量範囲以下となるため注意する。リガンド結合法のうち、特に液相中で結合試薬と分析  
438 対象物質を反応させる場合に発生する。
- 439 ブランク試料 Blank sample: 分析対象物質を添加せずに分析するマトリックス試料。
- 440 フルバリデーション Full validation: すべてのバリデーション項目、即ち、特異性、選択性、  
441 検量線、真度、精度、希釈直線性及び安定性を評価する。通常、分析法を新たに確立する際  
442 に実施する。
- 443 プロゾーン Prozone: 分析対象物質の濃度が非常に高い場合に、レスポンスが抑制されるこ  
444 と。フック効果と同じ現象である。
- 445 分析 Analysis: 試料の希釈から分析機器による測定までを含めた一連の分析のプロセス。
- 446 分析対象物質 Analyte: 試料中の分析の対象となる物質。医薬品、生体分子又はその誘導体、  
447 代謝物、分解産物等。
- 448 分析単位 Analytical run: 検量線、QC 試料及び実試料等から成る試料群。通常、同一条件  
449 のもと、同じ試薬を用いて同じ試験実施者により中断されることなく調製された一連の試料  
450 群を 1 つの分析単位として同一プレートで分析する。
- 451 マトリックス Matrix: 分析のために選択された全血、血漿、血清、尿又は他の体液や組織。  
452 マトリックス中の組織外因性化学物質（抗凝固剤を除く）及びその代謝物を含まないものを  
453 ブランクマトリックス (blank matrix) と呼ぶ。
- 454 リガンド結合法 Ligand binding assay: 分析対象物質に特異的に結合する試薬を利用して分  
455 析対象物質を分析する方法。リガンド結合法の多くは抗原抗体反応を利用したものである。  
456 検出に酵素標識、放射性同位元素標識、蛍光標識又は発光標識等を施した試薬を使用する。  
457 反応は、96 穴プレート、試験管又は円盤内等で行う。
- 458 リテスト日 Retest date: 標準物質の分析証明書の作成から一定期間後に再度その品質を評  
459 価する日。
- 460 ISR Incurred sample reanalysis (ISR): 定量値の再現性確認のため、異なる日に別の分析単  
461 位で投与後試料を再分析すること。
- 462 MRD Minimum required dilution (MRD): 試料を適切に分析するために、緩衝液で試料（検  
463 量線用標準試料や QC 試料も含む）を希釈する倍率。MRD はすべての試料で同一でなけれ  
464 ばならないが、必ずしも試料を分析できる最小の希釈倍率である必要はない。
- 465 QC 試料 Quality control (QC) sample: 分析法の信頼性を評価するために用いる分析対象物  
466 質を添加した既知濃度の試料。実試料分析において QC 試料は、検量線や実試料の分析に用  
467 いられた分析法の妥当性を評価するために分析される。



## －安全性評価のためのバイオマーカーについての調査研究－

研究分担者：大野 泰雄（国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員）

### 研究要旨

バイオマーカーは、医薬品の活用において患者層別化に寄与することなどから個別医療への貢献が期待されている。さらには病態との関連を明確にすることから医薬品開発段階においても利用されることが期待され、医薬品開発の効率化に寄与している。本研究においては、医薬品開発段階での安全性評価に利用されるバイオマーカーに焦点をあて文献調査研究を進めてきた。前年度までに、安全性バイオマーカーとして肝臓、腎臓、心臓、神経、血管・炎症、精巣、消化管、骨について、調査を実施し、肝臓、腎臓、心臓などにおいては、安全性バイオマーカーとして期待できることを報告してきた。このような安全性バイオマーカーに関しての関心は高く、その可能性が報告されている一方で、個々のバイオマーカーに関して、バリデーションなどを含めて、どのような研究がされ、安全性バイオマーカーとしてどのような課題があるかに関しては、まとめられていない部分が多く、バイオマーカーの可能性や必要性に言及する段階に留まっている現状もある。

そこで本年度は、医薬品開発の上で、個々の安全性バイオマーカーの臨床的・非臨床的有用性を評価する試みを行うこととした。その材料として、文献的な評価が一定程度されていること、臨床で診断応用されているにも関わらず、非臨床安全性評価においては十分に活用されていない、さらには従来的一般毒性試験等の臨床病理学的検査において評価に加えられる可能性が高いものとして、心臓毒性マーカーを選択し、評価した。心臓には、トロポニンなど臨床応用されている事例が多く、かつ非臨床一般毒性試験における臨床病理学的検査には含まれていない等、上述の条件に一致する点が多い。なお、今回の調査においては、これらに加えて今後、研究及び臨床応用が期待されるmiRNA、イメージングを対象に含めた。

各調査において、心臓への影響を診断するパラメーターとしての実績は、miRNAを除き十分に有しており、非臨床への応用は十分に可能であることが再確認された。またトロポニンに関しては、医薬品承認申請資料にも利用されているケースも散見され、非臨床試験への応用の妥当性は十分にあるものと考えられた。一方で、これらの評価が経時的に解析されている報告、また、一般毒性や機能への影響との関連性の報告等はない、あるいはごく少なく、それらの評価は、各研究施設や開発会社での施設内での判断に依存している。これらの評価、データを広く普及させ、標準的な評価として確立してゆくためには、各研究施設、開発会社毎に集積してきたデータから、測定手法、評価手法を標準化し複数の施設でバリデーションを兼ねた共同試験が必要になってくると考えられる。これらの課題は、既にある程度評価が定まっている腎臓や、今後評価していかなければならない肝臓等にも共通しており、課題を克服してゆくにはコンソーシアム等を形成し検証してゆくことが必

要であると考えられる。

キーワード：バイオマーカー、国際的整合性、ICH、安全性評価

## 研究協力者

田口和彦（ブリストル・マイヤーズ）、本山径子（ヤンセンファーマ）、荻野大和（トーアエイヨー）、下元貴澄（帝人ファーマ）、戸田秀一（田辺三菱）、韓大健（日本イーライリリー）、佐々木正治（アヅヴィ）、鈴木 睦（協和発酵キリン）、服部慎一（三和化学研究所）、森山賢二（大鵬薬品工業）、小崎 司（富山化学工業）、友廣雅之（日本アルコン）、小林章男（日本たばこ産業）、三浦慎一（第一三共）、中村和市（塩野義製薬）：日本製薬工業協会 基礎研究部会一般毒性課題対応チーム

高橋光一、石塚修司：久光製薬（株）研究開発本部  
基礎研究所

宇山佳明：医薬品医療機器総合機構 レギュラトリーサイエンス推進部研究課長

熊谷雄治：北里大学東病院 治験管理センター

## A. 研究目的

医薬品開発においては、候補物質の有効性および安全性をどのようにとらえるか、また、それをどのように評価し、開発過程における意志決定に反映させるかが重要である。その際、臨床における病気による苦痛の軽減や延命、Quality of Lifeの改善などの真の臨床指標が明確かつ短期的に把握できるものは開発を進めやすい。しかし、長期間における作用の結果現れる薬効や副作用、体外からは観察しにくい副作用については、通常の臨床試験で行われている数ヶ月程度の臨床試験では捉えられないことがある。このような場合、検出された時には既に重篤化していたり、販売承認を受けた後に思いがけない副作用が検出されたりして、回収・販売停止等の措置につながることもある。したがって、安全性評価に関わるバイオマーカーでは、毒性が軽症で可逆的のうちに出検できる感度の高いマーカーが望ましい。また、選択性が高く、測定が容易なものが望ましい。真の臨床指標に替わるバイオマーカーの確立は、医薬品

開発を効率的かつ迅速に進める上で極めて重要であり、様々なアプローチで新規毒性バイオマーカーが開発されている<sup>1)</sup>。米国では国と企業とが協力し、バイオマーカーコンソーシアムを設立し、そのようなバイオマーカーの開発に努めている。一方、もし、有効なバイオマーカーが特定の企業に独占されるようなことになると、他の企業の医薬品開発に支障を来すことになる。このような背景から、本研究班では、産官の共同研究として、安全性評価に関わるバイオマーカーについて、文献的に探索し、その有用性を調査することとした。

本研究では平成22～24年度において、心臓・筋肉・神経・肝傷害、肝脂肪化、肺炎及び血管炎、精巣毒性、骨毒性、及び消化管毒性に関わるバイオマーカー情報を検索し、有用と思われるものを抽出し、報告してきた。

今年度は、これらのバイオマーカーが真に非臨床試験や臨床試験に使用できるか否かについて評価する試みを、心臓毒性マーカーを材料として実施した。

## 参考文献

- 1) Marrer E. and Dieterle F.: Impact of biomarker development on drug safety assessment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 243(2): 167-179 (2010)

## B. 方法

今までの調査結果を踏まえて、バイオマーカーを評価するためのポイントについて審議し、表としてまとめた（添付資料1）。ついで、心臓毒性についてのバイオマーカーを検討することとし、従来の調査結果に基づき、ワーキンググループ委員はそれぞれ評価すべきバイオマーカーを分担し、前記の表に基づいて基本的な情報の有無とその内容について文献調査を実施し、その結果をワーキンググループで評価した。これに基づき、評価結果を文書としてまとめた。

## C. 結果

### C-1: トロポニン

#### 1. 歴史・由来

トロポニン (Tn) は筋収縮のカルシウム調節を担う蛋白質であり、東京大学医学部の江橋節郎らのグループによって1965年に発見された<sup>1)</sup>。心筋梗塞等の心筋損傷の診断に汎用されてきた生化学的指標は、CK、AST、LDHなどの血清酵素であったが、これらは全身の筋細胞からも逸脱する酵素であるため、運動や筋肉注射などの因子によっても変動する。したがって、筋肉の構成成分を筋損傷の指標として利用する考えが提唱され、心筋Tn (cTn) の測定の基礎と臨床的評価が検討されてきた<sup>2)</sup>。

#### 2. 生理学的特徴

TnはTnI、TnT及びTnCの3つの成分によって構成される複合タンパク質であり、カルシウムの活性化に関与して筋収縮機能を調節している。cTnは心筋特異性が高く、心筋損傷のバイオマーカーとして汎用されている。これらの中で、cTnT及びcTnIは心筋と骨格筋でアミノ酸配列が異なるため、特に高い心筋特異性を示す。近年、cTnは筋壊死だけではなく、心不全、腎不全、敗血症、肺塞栓などでも上昇することが報告されている<sup>3)</sup>。

#### 3. 臨床における使用の特徴 - 診断マーカーとして -

cTnは心筋梗塞の診断基準のバイオマーカーとして確立されている<sup>4), 5)</sup>。また、慢性心不全のマーカーとしても有用性が認められており、慢性心不全治療ガイドライン<sup>6)</sup>において、cTn測定は重症度、予後評価でクラスIIa (エビデンスから有用であることが支持される) に分類されている。ただし、cTnをガイドとした心不全治療の予後改善効果をみた大規模な前向き研究はなく、慢性心不全ガイドラインにおいても治療効果判定としては述べられていない<sup>7)</sup>。慢性心不全ではcTnが測定感度以上の高値を示すのはわずか10%前後であるため、予後予測のためには、より高感度な測定による定量評価が必要とされている<sup>7)</sup>。

#### 4. 測定方法

2007年に米国ACC/AHA、欧州ESC、世界心臓病連合 (WHF) の共同タスクフォースから心筋梗塞の国際的診断基準が発表され<sup>4)</sup>、心筋に特異性のあるバイオマーカーはcTnであり、診断のための基準値は健常者の99パーセンタイル値で、その値以下でのCVが10%未満を示すcTn測定法が推奨されたことから、高感度測定試薬の開発が進展した。

ARCHITECT STATを用いた高感度cTnI測定法 (cTnI hs-ARCH)、ADVIA Centaur XPを用いた高感度cTnI測定法 (cTnI-Ultra)、及びモジュラーアナリティクスを用いた高感度cTnT測定法 (cTnT-hs) の性能を比較した報告<sup>8)</sup> では、測定原理は上記3法とも異なるが、測定結果の再現性はほぼ同程度であり、定量下限はcTnI hs-ARCHが2.5 pg/mLと最も感度が高かった。

#### 5. 非臨床への応用/種差

cTnI及びcTnTは、ラット、マウス、イヌ及びサル等の複数動物種において心筋傷害の鋭敏かつ特異的なバイオマーカーとして利用されている<sup>3), 9)</sup>。ラットではDatabase (Tissue-specific Gene Expression and Regulation: TiGER) を用いて30臓器についてTnni3 (cTnI) 及びTnnt2 (cTnT) の遺伝子を調べた結果、これら遺伝子の心臓特異的発現が確認されている<sup>10)</sup>。また、サルではcTnT及びcTnIともに、心臓以外の臓器 (肺、胃、十二指腸、大腸、肝臓、腎臓、脳及び骨格筋) ではほとんど検出されない<sup>11)</sup>。なお、測定方法によっては種によって検出感度が異なる場合があるので、薬物応答性の種差を調べる上では注意が必要である<sup>9)</sup>。

#### 6. 非臨床への応用/薬剤応答性

臨床のみならず非臨床においても、バイオマーカーとしてのcTnの有用性については多くの報告があり、既に広く利用されている<sup>12)</sup>。さらに、上市済みの複数医薬品で非臨床毒性試験においてcTnが測定されており、安全性評価の一環として実用化されている。

## 7. 非臨床への応用／予見性・回復性

カニクイザルにIsoproterenol (0.03、0.3、3 mg/kg) 及びVasopressin (0.3 mg/kg) を単回併用投与すると、(最初の測定時点である) 投与2時間後からcTnI及びcTnTが上昇、3～8時間をピークにその後減少し、投与3～7日後には回復する<sup>11)</sup>。このことは、心筋傷害発生後速やかにTnが上昇し、傷害が持続しなければ血中から消失することを示唆している。

## 8. 非臨床への応用／病理との相関

先に述べたカニクイザルを用いた試験において、各種血中バイオマーカー (AST、ALT、LDH、CPK、ALD、Mb、CRP、H-FABP、cTnT及びcTnI) のうちcTnT及びcTnIが心臓病理所見の程度と極めて高く相関していることが示されている<sup>11)</sup>。また、ラットにおいても薬物 (Isoproterenol、Metaproterenol、Cyclophosphamide、Acetaminophen、Methapyrilene、Naphthylisothiocyanate、Doxorubicin、Mitoxantrone、Allylamine、Aminoglutethimide、Cyclosporine A及びAllyl alcohol) を単回投与後の各種血中バイオマーカー (AST、LDH、CK、ALT、TBil、DBil、GGT、cTnI、cTnT、FABP3、MYL3、sTnI) のCmax及びAUCに対する心臓病理所見のROC解析を実施した結果、cTnI及びcTnTが診断マーカーとして最も有用であることが示唆された<sup>10)</sup>。なお、Tn高感度測定法の発達により、病理所見を伴わずにTnがわずかに上昇する場合もある<sup>3)</sup>。

## 9. 臨床／非臨床の相関性 (定性的／定量的)

上記で述べたように、cTnは臨床／非臨床ともに心毒性を検出できるバイオマーカーである。今後、さらに本格的なバイオマーカーにしていくためには、臨床で用いられている測定基準を参考に、非臨床においても (測定系の違いを考慮した) 検出感度と病理組織変化との関連性を詳細に解析する必要がある。

## 10. ガイドライン

2007年に米国ACC/AHA、欧州ESC、世界心臓病連合 (WHF) の共同タスクフォースから心筋梗塞の国際的診断基準<sup>3)</sup> が発表され、cTnの高感度測定値が最

も心筋特異的で診断上信頼がおけるバイオマーカーと評価された。また、2010年に改訂された日本循環器学会の「慢性心不全治療ガイドライン」<sup>6)</sup> では、cTnが心不全の重症度・予後評価のバイオマーカーとしてClass IIaに分類された。

## 11. まとめ

トロポニン は心筋梗塞の診断においてはすでに確立されたバイオマーカーであるが、高感度測定系の開発により心筋梗塞の早期診断や心不全診断への応用に関してさらなるエビデンスの構築が期待される。今後、さらにほかの様々な生化学的指標と組み合わせるリスク評価を行うマルチバイオマーカーストラテジーが、心血管疾患診療に有用な戦略となっていくことが期待されている<sup>7)</sup>。トロポニンは、ラット、マウス、イヌ及びサルにおいても心筋傷害の高感度かつ臓器特異性の高いバイオマーカーとして利用されているが<sup>9)</sup>、測定方法によっては検出感度が異なる動物種があるため、薬物応答性の種差を調べる上では注意が必要である。

## 12. 参考文献

- 1) Ebashi S. and Kodama A., A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *J. Biochem.*, 59: 425-426, 1965.
- 2) 心筋梗塞の新しい診断指標、高木康、医学のあゆみ、161(12): 937-937, 1992.
- 3) Newby L. K. et al., Troponin measurements during drug development --considerations for monitoring and management of potential cardiotoxicity: An educational collaboration among the Cardiac Safety Research Consortium, the Duke Clinical Research Institute, and the US Food and Drug Administration. *Am. Heart J.*, Jul; 162(1): 64-73, 2011.
- 4) Thygesen K. et al., Joint ESC / ACCF / AHA / WHF Task Force for the Redefinition of Myo-cardial infarction. Universal definition of myocardial Infarction. *Circulation*, 116: 2634-2653, 2007.
- 5) Morrow D. A. et al., National Academy of Clinical