

No.	Item	Comment from AAPS	Answer from BMV Study Group
12	Dilutional Linearity	Line 133 (Minor) Dilution linearity can be done without doing serial dilutions. Allow for more flexibility	If justified, approaches other than serial dilution can be used.
13	Cross validation	Line 180 (minor) While reviewer does not agree with the broader specifications for cross validation criteria, it is appreciated the regulators put some specifics around this parameter which is not covered adequately in other guidance documents.	Please refer to the Q&A no.15, where the rationale for cross-validation criteria is clarified.
14	ISR	Line 117, 231: Suggest harmonizing with the FDA guidance to set the high-level QC at 75% of the ULOQ of the calibration curve.	Please refer to the Q&A no.10, where the rationale for high-level QC setting is clarified.
15	ISR	Lines 240 –245 (to end of sentence) Consider replacing with: In bioanalysis there are several situations where the performance of standards and QCs may not adequately mimic that of study samples from dosed subjects (incurred samples). Examples may include interference with unknown breakdown products differences in patient samples, recovery issues, operational errors and sample inhomogeneity.	We appreciate the suggestions but do not intend to replace the text: This is because the description in the relevant section comes from that in the preceding Japanese BMV guideline for chromatography released on July 11, 2013.
16	Calibration range	Line 281 (minor): While the reviewer does not fully agree with not re-analyzing the samples when the calibration curve is adjusted, he/she appreciates the clarity.	We think reanalysis is not necessary in such cases as far as the concentrations calculated with the original calibration curve/range are adequately determined.
17	Reanalysis	Lines 295–300: We suggest to emphasize that reanalysis based on unexpected or anomalous result is possible. This statement may be made after the sentence currently found on lines 295–296. i.e. “Reanalysis of study samples for a pharmacokinetic reason should be avoided, whenever possible unless unexpected or anomalous results are observed.”	Please refer to the Q&A no.14 of the preceding Japanese BMV guideline for chromatography released on July 11, 2013:  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.

H26 西川班香取分担バイオアナリシス分科会

## 高分子 LC/MS ワーキンググループ

# 活動記録

座長：国立医薬品食品衛生研究所 川崎 ナナ

### メンバー

#### 製薬協

野本 眞博 MeijiSeika ファルマ(株)  
宮井 裕子 わかもと製薬(株)

#### 国立医薬品食品衛生研究所

橋井 則貴  
石井 明子  
香取 典子

#### 安研協

鵜藤 雅裕 (株)新日本科学  
秦 信子 (株)Ig-M

#### オブザーバー：

厚生労働省  
植村 展生

#### JBF BM-TF

合田 竜弥 第一三共(株)  
後藤 理恵子 JCL(株)  
清水 久夫 武田薬品工業(株)  
高村 不二子 アステラス製薬(株)  
星野 雅輝 (株)LSIメディエンス  
宮 和弘 中外製薬(株)  
山口 建 (株)住化分析センター

#### JBF-SC

大住 孝彦 大塚製薬(株)  
間渕 雅成 田辺三菱製薬(株)  
大津 善明 アステラス製薬(株)  
富樫 一天 (株)住化分析センター

## 高分子 MS に関する議論の経緯と内容について

2月のWG以降、JBFのタスクフォース(TF)メンバーで精力的に議論を行ってまいりました。以下、これまでの議論の経緯と内容を簡単に紹介させていただきます。

今回の議論を始めるにあたって、今回の成果が規制に関するものであることを意識した上で、評価項目については minimum requirement でよいと全 TF メンバーで合意しました。

この minimum requirement の観点のもと、最初の議論の対象となりましたインタクト(ペプチド、タンパク質、核酸等)につきましては、基本的に、低分子ガイドラインに従うことで問題ないと意見が一致いたしました。

このインタクトの場合については、既存のガイドラインを高分子分析に適応する際の注意点をエクセル表に取りまとめることも可能と考えていましたが、一方で、前処理時に酵素消化を必要とする場合やリガンド結合の原理を利用した前処理を必要とする場合においては、インタクトの場合と注意すべき点が大きく異なることを確認しました。

ここで、仮に高分子 MS のガイドラインを作成できた場合の適用範囲を先に決めるべきとの意見に全 TF メンバーが基本的に合意し、適用範囲はインタクトの場合を除いた「酵素消化及びリガンド結合を前処理に用いた場合」との基本的な合意に至りました。

この適用範囲内で、議論すべき下記4点を抽出し、これらの項目に集中して、引き続き積極的に議論をしてきました。

- ①リガンド結合を用いた前処理に関する事項
- ②酵素消化に関する事項
- ③ISに関する事項
- ④評価基準に関する事項

その議論の中で、これらを解決するための方策と、規制に関わるガイダンスの項目としての minimum requirement の観点を考えるに、「現時点では、高分子 MS のためのガイドラインを作成するのは好ましくなく、低分子、LBA のガイドラインを参考に、実施者が科学的に判断するのがよい」のではとの意見(現時点で全 TF メンバーの合意事項ではない)が出てきました。

この考えには、現時点での議論が、現在の最新の公知技術に基づいたものではあるものの、各分野において将来起こりうる技術的発展を無視して議論を進めることが妥当なのかという疑問も含まれています。事実、現在に

において、既知以外の技術を開発しようとしている動きもあり、これは、現在の技術レベルが世の中の的に満足されていない(=改善の余地がある)ことを反映しているものと考えています。

最終的に、「今後の発展が望まれる様々な技術をのぞいた既知の技術ベースでの議論を基に、未成熟な分野での規制としてのガイドラインを現時点で作成することは好ましくない」との意見に、全 TF メンバーが基本的に合意いたしました。

以上のような活動背景から、既存のガイドラインを高分子分析に適応する際の全ての注意点をエクセル表に取りまとめることは難しいと判断いたしました。

つきましては、エクセル表に代わりまして、WORD 文書にて、これまでの各議論の要約を作成しましたので、提出させていただきます。

- ・まとめ\_インタクト\_20410612
- ・まとめ\_リガンド結合\_20410612
- ・まとめ\_酵素消化\_20140612
- ・まとめ\_今後の議論\_20140612

なお、現時点では、最終成果物としては、低分子ガイドラインを高分子薬物分析に適用する場合の現時点での注意点を、Q&A のような形で作成できればと考えています。

今後のスケジュールにつきましては、7 月の WG でご相談させていただければ幸いです。

以上となりますが、今後とも宜しく願いいたします。

高分子 MS タスクフォースメンバー一同

## 高分子 MS タスクフォース・これまでの議論のまとめ (インタクト測定関連)

### インタクトで測定する高分子について

#### 高分子 MS タスクフォースの結論

酵素消化等を用いることなく、インタクトで LC/MS 測定する高分子(ペプチド、タンパク質、核酸オリゴマー等)については基本的に既存の低分子 LC/MS ガイドラインの適用に含めることができる。しかしながら、特に分子量が大きい高分子では多価イオンを測定することに起因する感度の分散やバラツキの増大、定量的に回収することが困難であること等、高分子特有の分析上の問題がある場合も多い。そのため、低分子 LC/MS ガイドラインのクライテリアをそのまま高分子 LC/MS に適応することが困難であると科学的に判断される場合は、柔軟な対応を考慮することが必要である。また、インタクトであっても LC/MS 測定にリガンド結合の原理を利用した前処理などの複雑な前処理・分析手法を用いる場合、一律に低分子 LC/MS ガイドラインを適用することは難しい。

#### (高分子 MS タスクフォースの意見)

インタクトで測定する高分子(ペプチド、タンパク質、核酸オリゴマー等)は多くの場合、低分子と同様の手法で定量可能であり、特殊なケース(分子量が大きい場合、リガンド結合の原理を利用した前処理などの複雑な前処理・分析手法を用いる場合、酵素消化物が測定対象物質となる場合など)を除いて、基本的に低分子 LC/MS ガイドラインに適用含めることができると考えられる。

## 高分子 MS タスクフォース・これまでの議論のまとめ (抗体関連)

### (1) リガンド結合による前処理を行う場合の注意点

#### 1) 結合試薬の品質

結合試薬の品質は、使用する期間中の検量線や QC 試料の分析結果の評価で確認することで十分であり、使用期限の設定を必要としない。

#### 2) 希釈直線性(希釈妥当性とは異なる)

リガンド結合の原理を利用した前処理を行う場合は、必要に応じて希釈直線性を確認する。希釈直線性は、検量線の定量上限を超える試料の濃度を適切に分析できることを確認するために実施する。希釈直線性が得られない場合の原因としては、試料の分析対象物質濃度が高く、結合サイトが飽和するためなどがあげられる。

#### 3) 選択性(低分子ガイドラインの選択性とは異なる)

選択性とは、リガンド結合に使用する結合試薬が、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る能力のことである。高分子 MS の前処理としてリガンド結合を行う際に選択性の評価が必要であるかどうか及び必要である場合の評価方法には現時点で定見はない。

#### 4) 内部標準物質

現状では whole molecule の安定同位体標識体を合成することは技術的に困難であるため、ペプチド断片の安定同位体標識体を内部標準物質として使用することが多い。内部標準物質として安定同位体標識ペプチド断片を用いる場合、前処理における回収率のばらつきを内部標準物質により補正することができない。

### (2) 標準物質

一般に、バイオ医薬品の成分は生物学的方法により製造されるため、不均一であり、また不純物を完全に除外することはできない。したがって、バイオ医薬品の TK 及び臨床 PK 分析をする場合、標準物質のロット変更の際に低分子薬物のロット変更以上のケアが必要であることに注意する。

2014 年 6 月 12 日

(1) 内標準物質

分析対象タンパク質の精製、酵素消化を含む処理工程時のバラツキを補正するために、分析対象タンパク質の安定同位体標識体を内標準物質として使用することが理想的である。しかし、その合成は時間及び費用の観点から困難な場合が多い。このため、分析対象タンパク質の消化断片ペプチドの安定同位体標識体を使用も考えられる。この他、構造類似体（タンパク、ペプチド）の使用も考えられる。いずれにしろ、その内標準物質の使用の妥当性が確認できれば問題ない。

(2) 酵素消化後の MS 分析を行う場合の注意点

病態等によりアルブミン、グロブリン等のタンパク質量が個体によって、変化することが考えられるため、充分量の消化酵素が必要である。しかしながら、大量の消化酵素を使用する事により、目的外のタンパク質に由来するペプチドも大量に生成する。これらが分析対象ペプチドの分析を妨害し得ることを考慮する必要がある。このため、Methods 開発段階において、消化された Analyte 及び消化された内標準物質の選択性の他、夾雑ピークの増加、それに伴うカラム負荷、酵素量の妥当性等に関する考慮が必要である。

以上

高分子の MS 分析において、今後の議論が必要である部分

## 1) 真度及び精度の採用基準（議論中）

### ①低分子分析との比較

タンパク質酵素消化分析では、生化学的な酵素反応の利用、長時間に及ぶ前処理、質量が大きいため多価イオンが存在する事を考慮すると、低分子分析と比較して、真度および精度に与える影響が懸念される。

### ②低分子 MS の基準と LBA 基準採用の比較

低分子 MS の基準である 15%基準を採用した場合、LBA の 20%基準と比較しての懸念事項として、難易度が高いため、分析法開発に要する時間及びコストがかかる事に加え、S/N 比を確保しなければならない事から、定量下限値が高くなり、低濃度の評価が困難になる可能性等が考えられる。

### ③記載について

高分子 MS を利用する際の指針を出して、高分子 MS への取り組みを促進し、経験や事例を積み上げていくことは重要と思われるため、Q&A のような形で従来の低分子分析のガイドラインに補足する事が望ましい。

以下に議論の内容を記載する。

例 1: 「低分子及び LBA のガイダンスを参考に、実施者が科学的に判断する。」

「(科学的根拠) が理由で精度の高い定量が困難な場合は、20%としてもよい」

- ・日本が先行してガイドラインを設けても、FDA や EMA と実施状況が、今後乖離する可能性を否定できない事が懸念される。
- ・高分子 MS は、低分子や LBA ほど実績がなく、技術的にも発展途上であるため、現時点で定型化は避けたい。
- ・低濃度を評価できなくなる事により、必要とされる感度が確保できない場合（患者の不利益になると判断される場合）は、その難易度を根拠に LBA の基準等を用いればよい。
- ・低分子 LC-MS ガイドラインの「適用」の項目において、「対象薬物は低分子化合物（内因性を除く）を中心とし・・・と記載があることから、低分子 LC-MS ガイドラインは低分子以外の薬物も対象にできると解釈できる。

例 2: 「LBA の 20%基準を用いる事を推奨する。」

- ・実施者が科学的に判断する場合、同じ事象であっても、分析実施者によって異なる基準が適応される事が懸念される。



- ・クロマトグラフィーアッセイの 15%基準は低分子の経験を基に作成されている。この事実を考慮すると、クロマトグラフィーアッセイの低分子基準をトレースするのではなく、タンパク質の酵素消化分析の特性を考慮した基準を設ける事が望ましい。
  - ・明確な基準の記載がないということは、現実的には、15%という基準が用いられるケースが多くなる事を懸念する。
  - ・20%が許容される認識があるのであれば、明確に文書化することにより、本分野の促進に繋がると考えられる。20%許容の境界としては、消化の有無で設ける事が最もシンプルで説得力があると思われる。(濃度を境界にするには科学的根拠の説明がし難い様に思います。)
  - ・LC-MS だからといって 4-6-15 ルールに拘束される必要もないのかもしれませんが。LBA の 4-6-20 に比べて 4-6-15 にしないと信頼性が低くなるとは考えにくい。
  - ・「(科学的根拠) が理由で精度の高い定量が困難な場合は・・・」の表現にすると、LBA の 20%を選択するでしょう。わざわざ将来の実試料測定における不確定要素で自ら首を絞めることはしないでしょうから。
  - ・現状では LBA の代替の位置づけであり、わざわざ 15%にする必要はないと思います。
- 逆に 15%にするとどのようなメリットが生じるでしょう？被験者数を減らせる？被験者あたりの検体数を減らせる？
- ・科学的に低分子 LC/MS ガイドラインが適用できるかどうかにかかっている

## 2) マトリックス効果

MS 分析法におけるマトリックス効果の定義は「マトリックス有無での分析対象物質へのレスポンスへの影響」であり、前処理工程時のバラツキは考慮されない。一方で、個別マトリックスを用いて調整した QC 試料評価では、酵素消化を含む前処理の影響も含めた個体差を評価できる。

高分子化合物のマトリックス無での分析対象物質の測定における難易度等も考慮した場合、低分子ガイダンスに記載されているマトリックスを用いて調製した QC 試料を分析する事を推奨することも可能かもしれない(一方で、既に低分子ガイダンスに記載されており、メソッド開発段階で評価すべき項目であることから、特に変更・記載等は必要ないとの意見もある)。

## 3) 今後の協議について

非常に重要な問題であることから、製薬協及び安研協通じて、アンケートを実施の必要性を検討する。

アンケートでの課題内容例（多価イオンの影響、インタクトの Criteria、内標準物質の記載、消化物の Criteria の希望及び背景、その他記載の希望等）

医薬品開発における生体試料中高分子薬物濃度分析法（高分子 LC）のバリデーションに関する質疑応答集（Q&A）作成のための論点メモ

<はじめに>

「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ンに関するガイドライン」(LC ガイドライン)は、液体クロマトグラフィー(LC)、ガスクロマトグラフィー(GC)、又はそれらと質量分析法(MS)を組み合わせた分析法を対象とするガイドラインであり、その対象薬物は低分子化合物(内因性物質を除く)を中心としていた。近年、リガンド結合法(ligand binding assay, LBA)を用いて測定することが一般的であった高分子薬物の LC 又は LC/MS を用いた定量が可能となってきたが、酵素消化反応やリガンド結合による前処理等を用いる場合に、これら分析法に対して LC ガイドラインをそのまま適用することが困難な場合が存在する。そこで、LC ガイドラインに準じて高分子薬物を分析する際の留意点を記した Q&A を作成した。

この Q&A では、高分子薬物の中でも酵素消化反応やその他の処理による質量変化を伴わない状態の分析対象薬物そのものを「インタクト薬物」と表現するが、インタクト薬物として定量する場合、原則として LC ガイドラインに従うこととする。しかし、インタクト薬物の安定同位体標識体を使用困難な場合や前処理時の低回収率、選択性の問題等により、LC ガイドラインの基準をそのまま適応することが困難である場合は、科学的な判断に基づき、あらかじめ妥当な判断基準を設定する等、柔軟な対応を考慮してもよい。また、インタクト薬物として定量する場合であっても、リガンド結合による前処理を行う分析法の場合については、本 Q&A を参考にバリデーションを実施するとよい。

なお、本 Q&A は作成時点での技術水準及び経験を考慮して作成されたものであり、高分子薬物の LC 及び LC/MS 分析の実施にあたっては本 Q&A を参考にする一方で、今後の技術的進歩や実施経験の蓄積に応じて柔軟な対応を考慮していくことが重要である。

<適用>

Q. 本 Q&A の対象薬物は？

A. 本 Q&A の対象薬物は、医薬品として使用されるペプチド、タンパク質(抗体薬物複合体等の修飾タンパク質を含む)、核酸とする。バイオマーカーは本 Q&A の対象に含まれない。内因性物質と同じ構造をもつ高分子薬物については、LC ガイドラインが内因性物質を対象外としていることから本 Q&A の対象外とするが、バイオマーカーガイドラインを参照可能である。

<標準物質(標準品)>

Q. 標準物質に関してどのような点に注意する必要があるか？

A. 生物学的方法により製造されるバイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)の場合、その成分は、一般的に不均一であり、また不純物を完全に除外することはできない。したがって、標準物質のロット変更の際に低分子薬物のロット変更以上に品質の管理が必要であることを注意する。具体的には、「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)のバリデーションに関するガイドライン」(LBA ガイドライン)に準拠することが望ましい。

Q. 内標準物質としてどのようなものを用いることができるか？

A. 分析対象薬物の安定同位体標識体が合成可能な場合、酵素消化反応及びリガンド結合による前処理等も含めた前処理時のバラツキを補正するために、それを使用することが望ましい。しかし、分子量の大きいタンパク質の場合、その安定同位体標識体の合成は、技術的、時間的及び費用の観点で未だ困難である。このため、分析対象タンパク質の消化断片ペプチドまたは消化断片ペプチドよりも数残基長いペプチド (flanking peptide) の安定同位体標識体の使用が可能と考えられる。また、分析対象薬物の分子量に近い類似体 (タンパク質、ペプチド、核酸等) の使用も可能と考えられる。

Q. 内標準物質として消化断片ペプチドの安定同位体標識体又は消化断片ペプチドよりも数残基長いペプチド (flanking peptide) の安定同位体標識体を用いる場合に注意すべきことはあるか？

A. 消化断片ペプチドよりも数残基長いペプチド (flanking peptide) を使用する場合、事前に (例えば分析法開発の段階で) 分析対象薬物であるタンパク質と flanking peptide における酵素消化効率の同等性について出来る限りの検討を実施しておくべきである。これは酵素消化効率補正の目的として flanking peptide を使用する場合でも、分析対象薬物のタンパク質と比較して酵素消化効率が必ずしも同等でない場合があり得るためである。また、消化断片ペプチドを用いる場合、その添加時期に関わらず酵素消化効率の補正はできない。従って、酵素消化反応が定量的に進行する条件をあらかじめ評価しておく必要がある。

一方、酵素消化前に行われるリガンド結合による前処理では、分析対象薬物とこれら内標準物質に対する結合試薬の反応性が異なることが予想されるため、リガンド結合による前処理後の酵素消化反応前にこれら内標準物質を添加することが望ましい。

< 実試料分析の繰り返し回数 >

Q. 1 試料あたりの繰り返し回数どのように設定すればよいか。

A. 通常、1 試料あたりの繰り返し回数は 1 回でよい。分析法確立の段階で分析法の精度等にもとづいて繰り返し回数を設定し、バリデーションを実施することによりその妥当性を確認する。

< 定量下限 >

Q. 酵素消化反応及びリガンド結合による前処理を用いて分析対象薬物を定量する場合の定量下限の基準は？

(案 1: 数値基準を記載し、数値基準をさらに広げる事を考慮しない場合)

A. 酵素消化反応やリガンド結合による前処理時に起因するバラツキを考慮し、LC ガイドラインにおける真度及び精度に +5% した値を推奨する (定量下限での真度は理論値の  $\pm 25\%$  以内、精度は 25% 以下)。

(案 2: 数値基準を記載せず、数値基準をさらに広げる事を考慮する場合)

A. 既存のガイドラインを参考に、科学的な判断に基づき、あらかじめ妥当な判断基準を設定する。ただし、分析値の許容できる真度及び精度の範囲として、LBA ガイドラインにおける真度及び精度の基準に準じるのが望まし

い。ただし、代替分析法が存在しない場合等には、その分析法の特性を考慮し、より広い基準を採用してもよい。

(案 3: 数値基準を記載し、かつ数値基準をさらに広げる事を考慮する場合)

A. 現時点では、酵素消化反応やリガンド結合による前処理時に起因するバラツキを考慮し、LC ガイドラインにおける真度及び精度に+5%した値を推奨する(定量下限での真度は理論値の $\pm 25\%$ 以内、精度は 25%以下)。ただし、分析対象物質の安定同位体標識体が使用困難な場合や、前処理時の低回収率、選択性の問題が解決困難な場合、代替分析法が存在しない場合等により前述の許容基準を満たすことが困難である場合には、科学的な判断に基づきより広い基準を採用してもよい。

< 検量線 >

Q. 酵素消化反応及びリガンド結合による前処理を用いて分析対象薬物を定量する場合の検量線の基準は？

(案 1: 数値基準を記載し、数値基準をさらに広げる事を考慮しない場合)

A. 酵素消化反応やリガンド結合による前処理時に起因するバラツキを考慮し、LC ガイドラインにおける真度に+5%した値を推奨する(定量下限での真度は理論値の $\pm 25\%$ 以内、定量下限以外では真度は理論値の $\pm 20\%$ 以内)。

(案 2: 数値基準を記載せず、数値基準をさらに広げる事を考慮する場合)

A. 既存のガイドラインを参考に、科学的な判断に基づき、あらかじめ妥当な判断基準を設定する。ただし、分析値の許容できる真度の範囲として、LBA ガイドラインにおける真度の基準に準じるのが望ましい。ただし、代替分析法が存在しない場合等には、その分析法の特性を考慮し、より広い基準を採用してもよい。

(案 3: 数値基準を記載し、かつ数値基準をさらに広げる事を考慮する場合)

A. 現時点では、酵素消化反応やリガンド結合による前処理時に起因するバラツキを考慮し、LC ガイドラインにおける真度に+5%した値を推奨する(定量下限での真度は理論値の $\pm 25\%$ 以内、それ以外では真度は理論値の $\pm 20\%$ 以内)。ただし、分析対象物質の安定同位体標識体が使用困難な場合や、前処理時の低回収率、選択性の問題が解決困難な場合、代替分析法が存在しない場合等により前述の許容基準を満たすことが困難である場合には、科学的な判断に基づきより広い基準を採用してもよい。

< 真度及び精度 >

Q. 酵素消化反応及びリガンド結合による前処理を用いて分析対象薬物を定量する場合の真度及び精度の基準は？

(案 1: 数値基準を記載し、数値基準をさらに広げる事を考慮しない場合)

A. 酵素消化反応やリガンド結合による前処理時に起因するバラツキを考慮し、LC ガイドラインにおける真度及び精度に+5%した値を推奨する(定量下限での真度は理論値の $\pm 25\%$ 以内、精度は 25%以下、定量下限以外

では真度は理論値の $\pm 20\%$ 以内、精度は $20\%$ 以下).

(案 2: 数値基準を記載せず、数値基準をさらに広げる事を考慮する場合)

A. 既存のガイドラインを参考に、科学的な判断に基づき、あらかじめ妥当な判断基準を設定する。ただし、分析値の許容できる真度及び精度の範囲として、LBA ガイドラインにおける真度及び精度の基準に準じるのが望ましい。ただし、代替分析法が存在しない場合等には、その分析法の特性を考慮し、より広い基準を採用してもよい。

(案 3: 数値基準を記載し、かつ数値基準をさらに広げる事を考慮する場合)

A. 現時点では、酵素消化反応やリガンド結合による前処理時に起因するバラツキを考慮し、LC ガイドラインにおける真度及び精度に $+5\%$ した値を推奨する(定量下限での真度は理論値の $\pm 25\%$ 以内、それ以外では真度は理論値の $\pm 20\%$ 以内)。ただし、分析対象物質の安定同位体標識体を使用困難な場合や、前処理時の低回収率、選択性の問題が解決困難な場合、代替分析法が存在しない場合等により前述の許容基準を満たすことが困難である場合には、科学的な判断に基づきより広い基準を採用してもよい。

< 選択性 >

Q. 選択性の評価をどのように評価するか?

A. 酵素消化反応及びリガンド結合による前処理を用いる場合でも原則として、LC ガイドラインに従う(個別別試料で少なくとも  $n = 6$ )。

リガンド結合による前処理を行う場合、類似物質との識別が問題となる場合があるが、LC/MS の場合、LC(カラム)での分離と MS(質量、正確には  $m/z$ )での分離が可能であるために、類似物質の存在が問題とならないことが多いため、LBA ガイドラインで求められている特異性の評価は原則として必要ないと考えられる。

< 希釈直線性 >

Q. リガンド結合による前処理を行う場合、LBA ガイドラインの希釈直線性(希釈妥当性とは異なる)の評価は必要か?

A. 分析対象薬物の抽出を目的としてリガンド結合による前処理を行う場合は、必要に応じて希釈直線性を確認する。希釈直線性は、検量線の定量上限濃度を超える試料を、定量上限を超える濃度として検出できることを確認するために実施する。希釈直線性が得られない場合の原因としては、試料の分析対象物質濃度が高く、結合サイトが飽和するため等があげられる。

一方、夾雑物質の削除を目的としてリガンド結合による前処理を行う場合は、希釈直線性の確認は必要ないと考えられる。

< 結合試薬 >

Q. リガンド結合による前処理を行う場合、結合試薬の品質に関してどのような点に留意すべきか?

A. 結合試薬の品質は、使用する期間中の検量線や QC 試料の分析結果の評価で確認することで十分であり、使用期限の設定を必要としない。ただし、反応性のロット間差の影響を避けるために、同一バッチ内では、同一口

ットを使用すること等に注意する.

#### <ISR>

Q. ISR を実施する際の判断基準はどのようにすればよいか？

A. 基本的な考え方は LC ガイドラインに準じるが、評価する分析法のバリデーション実施時の真度の基準をもとに妥当な判断基準(乖離度)を設定する.

#### <クロスバリデーション>

Q. クロスバリデーションを実施する際の判断基準はどのようにすればよいか？

A. 基本的な考え方は LC ガイドラインに準じるが、評価する分析法のバリデーション実施時の真度の基準をもとに妥当な判断基準(平均真度又は乖離度)を設定する.

#### <酵素消化反応を利用する場合の留意点>

Q. 酵素消化反応を行う場合、どのような点に留意すべきか？

A. 分析対象薬物としてのタンパク質を酵素消化して定量する場合、病態等によりアルブミンやグロブリンなどの生体内タンパク質レベルが個体によって異なると想定されるため、充分量の消化酵素を前処理時に用いることが必要と考えられる. 一方で、大量の消化酵素を使用した場合、目的外のタンパク質由来のペプチド(夾雑ペプチド断片)が大量に生成し、また、不純物として含まれる酵素によって分析対象物質のペプチド断片がさらに消化される可能性も存在する. このため、分析法開発の段階で夾雑ペプチド断片が分析対象物質のペプチド断片の定量に与える影響、定量に用いる分析対象物質のペプチド断片の設計、分析対象物質のペプチド断片の安定化、加えて、酵素添加量と反応時間の最適化等を十分に検討する必要がある. 酵素消化効率や夾雑ペプチドの個体差が問題となる場合、個別マトリックスを用いて調製した QC 試料による評価の実施や、個別マトリックスの個体数を増やして選択性を確認する等により、これらの影響を考察することが可能である.

#### <用語>

分析対象薬物(分析対象タンパク質、分析対象ペプチド、等のインタクト薬物)

分析対象物質(薬物から発生する断片等の対象物質も含む)

分析対象薬物(分析対象物質)の安定同位体標識体

消化断片ペプチド

消化断片ペプチドよりも数残基長いペプチド(flanking peptide)

酵素消化反応

リガンド結合による前処理

LC ガイドライン

LBA ガイドライン

【議論の記録として】

<ブランク試料>

Q.医薬品として投与される内因性物質と同じアミノ酸配列をもつ薬物が分析対象物質である場合のブランク試料はどうすべきか？

A. 代替マトリックスや内因性物質を除去したマトリックスを使用するなどの方法がある。これらの代替マトリックスを使用した場合は、使用したマトリックスの妥当性を示す必要がある。

(TFメモ)内因性物質のLC/MSによる定量に関しては、上記ブランク試料の議論のほか、内因性物質のマトリックス効果や選択性についても議論したが、LCガイドラインで適用外であることから、本TF内のみで結論を示すことは困難と考えられた。従って本TFでは既存のLCガイドラインに準じて実施する高分子薬物分析にフォーカスし、一般的な内因性物質の評価法については別会議体(バイオマーカーWG等)の結論を参照することとした。



H26 西川班香取分担バイオアナリシス分科会

## バイオマーカー ワーキンググループ

## 活動記録

座長：国立医薬品食品衛生研究所 鈴木 孝昌

## メンバー

## 製薬協

古田 盛	ゼリア新薬工業(株)	国立医薬品食品衛生研究所
田中 誠治	あすか製薬(株)	斎藤 嘉朗
片島 正貴	アステラス製薬(株)	香取 典子

## 安研協

伊藤雅彦	(株)ボゾリサーチセンター	オブザーバー： 厚生労働省 植村 展生
------	---------------	---------------------------

## JBF BM-TF

掛樋 真彰	武田薬品工業(株)
小林 信博	第一三共(株)
松丸 剛久	大塚製薬(株)
飯嶋 康祐	協和発酵キリン(株)
宮山 崇	中外製薬(株)
谷口 佳隆	(株)東レリサーチセンター
中村 隆広	(株)新日本科学
江口 睦志	(株)LSI メディエンス
山口 頂	(株)住化分析センター
團野 典行	(株)JCL バイオアッセイ

## JBF-SC

大住 孝彦	大塚製薬(株)
間渕 雅成	田辺三菱製薬(株)
大津 善明	アステラス製薬(株)
富樫 一天	(株)住化分析センター
中山 聡	味の素製薬(株)

H26 西川班香取分担バイオアナリシス分科会  
バイオマーカー ワーキンググループ キックオフミーティング

議事要旨

日時:平成 26 年 9 月 3 日(水) 14:00～

場所:国立医薬品食品衛生研究所 講堂 (11 号館 3 階)  
(東京都世田谷区上用賀1-18-1)

議事次第(案)

出席者:

製薬協

古田 盛 ゼリア新薬工業(株) (非臨床薬物動態チーム)

田中 誠治 あすか製薬(株) (非臨床薬物動態チーム)

安研協

伊藤雅彦 (株)ボゾリサーチセンター

JBF バイオマーカーTF

松丸剛久 大塚製薬(株)

宮山 崇 中外製薬(株)

飯嶋康祐 協和発酵キリン(株)

掛樋真彰 武田薬品工業(株)

小林信博 第一三共(株)

谷口佳隆 (株)東レリサーチセンター

中村隆広 (株)新日本科学

江口睦志 (株)LSI メディエンス

山口頂 (株)住化分析センター

團野典行 (株)JCL バイオアッセイ

国立医薬品食品衛生研究所

鈴木 孝昌 遺伝子細胞医薬部 第三室長(座長)

斎藤 嘉朗 医薬安全部長

香取 典子 薬品部 第三室長

オブザーバー

JBF-SC

間瀬 雅成 田辺三菱製薬(株)

大津 善明 アステラス製薬(株)

富樫 一天 (株)住化分析センター

中山 聡 味の素製薬(株)

1. 自己紹介

2. 活動方針について

- 研究班の活動予定期間が 2015 年 3 月末であり、それまでが一つの区切りになる。来年度以降については不確定だが、検討すべきテーマがある場合は継続できるよう努力する。
- バイオマーカー(BM)の測定方法に関するコンセプトペーパー(A4で3枚前後)の素案を JBF からワーキンググループに提出し、議論の後にワーキング案を作成する。
- 各関連団体、全体班、続いて PMDA の意見を募集する。
- 日本語版を作成後、英訳版を作成する。

### 3. コンセプトペーパーの内容について

- タイトル案「医薬品開発において内因性物質をバイオマーカーとして利用する際の分析法に関する留意点」
- 医薬品開発においてバイオマーカーを活用しやすくなるようなガイドとする。
- 共通理解がないと、申請者はどうしても過剰品質 (over quality) になりがちであるので、この状況を改善したい。
- BM 特有の難しい点を PMDA に理解していただく。また、科学的に必要な部分、不要な部分を明確にする。BM 特有の難しい点について、もし可能なら解決策を助言できるといい。
- コンパニオン診断薬はスコープ外とする。
- 測定法原理は LBA と LC-MS に限定し、同一のコンセプトペーパーに記載する。
- 適応範囲を臨床のみで、非臨床は適用外であることをコンセプトペーパー中に明記する。
- BM に良く適用される fit-for-purpose の概念を盛り込む (PMDA には理解しづらい内容であるため)。ただし、コンセプトペーパーのスコープは開発後半に測定され、申請資料に盛り込まれる BM データに限定することをはっきり書き、fit-for-purpose の概念のもとに医薬品開発初期段階などで簡易的に測定されるものは除外されることが分かるようにする。
- 標準物質に関する問題点について解説を加える。
- 章立ては以下の内容で仮決定する。分析法の原理 (LC-MS vs LBA) で章をわけることはしない。

はじめに  
適用範囲  
マトリックス  
特異性・選択性  
検量線  
定量下限  
精度・真度  
安定性

### 4. その他の意見

- 高分子が analyte の場合、生体内成分と市販の標準品が全く同一ではない場合がある。
- 安定性を検討する際には実試料と同一マトリックスでの安定性を確認するのが望ましいが、PK 測定のようにいかないケースが多い。実試料を一定期間保存後に再測定して初回測定値と比較すること (= incurred sample stability ; ISS) が有用である場合がある。
- CRO の経験から、スポンサーによってバリデーション項目が大きく異なる場合がある。
- 製薬会社では開発段階や測定結果の利用目的などによって、バリデーション項目を変えており、項目の統一は難しい。一方、申請直前の BM 測定は患者の安全性や有効性に直結することになるので、規制による統一が望ましい。
- ヒト用の市販キットがサルやイヌに使えない場合が多くあり、苦勞している
- FDA は、第 5 回 JBF シンポジウムや論文で、重要な BM については ISR を要求している。
- バリデーション試験は PK 測定と同じく、信頼性基準でよいか。また、臨床サンプル測定は PK 測定の場合は GLP 準拠が望ましいことになっているが、BM 測定の場合は GLP/GCP/GCLP/信頼性基準のいずれが適当か。(香取が PMDA に確認する)
- 臨床検査については精度管理が求められている(厚生労働省医薬食品局「治験における臨床検査等の精度管理に関する基本的考え方について」平成 25 年 7 月 1 日事務連絡)。BM 測定での要求事項を確認したい。
- 市販測定キットの求められるバリデーションに関しては議論が必要。市販キットは分析ツールの一つとらえて、章立てでは独立した項目にしなくてもいい。

### 5. 今後のスケジュール

- 10/24 までに JBF-TF がコンセプトペーパー素案をワーキンググループに提出する。
- 10/30 の全体班会議でコンセプトペーパーの章立てを報告する。
- 10/31 に WG 会議を開催し、コンセプトペーパーの JBF 素案を吟味し、その後 2 週間ほどで JBF TF にて改訂案を作成、WG を通じて関連団体のレビューを受ける。
- 12 月の全体班会議で議論し、JBF TF にて改訂案を作成、その後 PMDA のレビューを受け(1 か月程度?)、JBF TF にて改訂案を作成する。
- 全体班で議論し、最終化に進める。
- 日本語版を 3 月末までに最終化する。
- 英語版は日本語版を翻訳業者に提供して作成する。最終化は 3 月末以降でも可。

4. 次回のバイオマーカーワーキング会議

日時:10 月 31 日 、場所:国立医薬品食品衛生研究所

以上