

表 11 各機関で選択した Drug tolerance 改善のための ADA 測定プロトコール(抗 B-mAb 抗体)

機関	A	B	C	D	D
測定プラットフォーム	LOCI法	ブリッジングECL法	ブリッジングECL法	ブリッジングECL法	ブリッジングECL法
MRD	10	2 ^{**}	20 ^{**}	10 ^{**}	10
選択したDrug tolerance改善方法	試料の酸解離	試料の酸解離	試料の酸解離	試料の酸解離	反応条件の変更による平衡移動
測定プロトコール	ADAとDrugを混和	ADAとDrugを混和	ADAとDrugを混和	ADAとDrugを混和	ADAと共存Drugを混和
	Assay bufferで10倍希釈	incubate (1-2hr, 25°C)→①	2倍希釈	incubate (1hr, 37°C)	incubate (1hr, 37°C)
	incubate (1hr, 23°C)→①	①30ul + 酸溶液(150mM AcOH) 30ul (対照:PBS) 5min	試料20ul + 酸溶液(300mM AcOH) 180ul (対照:TBS)→① 5min	試料 20ul + 酸溶液 (300mM AcOH) 180ul→①	Assay Bufferで希釈→①
	①2.5ul ⇒ プレート	中和液(1M Tris-HCl [pH9.5] 25ul 添加 (対照:PBS)→②	①50ul ⇒ Master Mix 90ul & 中和液(1M Tris-HCl [pH 9.5]) 17ul 添加済みプレート	incubate (40min, RT)	①50ul + 2 × Master Mix 100ul
	酸溶液 (600mM Glycine-HCl [pH3.0]) 5ul (対照:PBS) 10min	②45ul Master Mix 90ul ⇒ 別プレート	incubation (2hr, RT)→②	①50ul + 中和液(1.5M Trizma) 10ul + Master Mix 90ul	incubation (48hr, 37°C)(対照:1hr, RT)→②
	Biotin-Drug (final 50ng/ml) & Drug標識Acceptor Beads(20ug/ml) in 中和Buffer (対照: assay buffer) 7.5ul 添加	incubate (1hr, 25°C)→③	②50ul ⇒ ブロッキング済み streptavidin gold plate	incubation (1hr, RT)→②	②50ul ⇒ ブロッキング済み streptavidin plate
	incubate (1hr, 23°C)	③50ul ⇒ ブロッキング済み streptavidin gold plate	incubation (2hr, RT)	incubate (1hr, RT)	Wash
	strept-Aビジドナービーズ (final 20ug/ml) 10ul	incubate (1hr, 25°C)	wash	Wash	Read Buffer 150ul
	incubate (1hr, 23°C 避光)	2 × Read Buffer T 150 ulを添加	2 × Read Buffer T 150 ulを添加	Read Buffer 150ul	ECL 測定
	ECL 測定	ECL 測定	ECL 測定	ECL 測定	ECL 測定
	Alpha測定				
		*) 酸溶液による希釈	*) 酸溶液による希釈を含む	*) 酸溶液による希釈	

表 12 抗 B-mAb 抗体測定における Drug tolerance 改善法の検討

抗B-mAb濃度	機関	検討した改善法	共存B-mAb濃度(ug/ml)							Back ground	仮カットポイント	MRD		
			0	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10				100	
5ug/ml	A	酸解離	なし	52638			48855	12929	401	392	532	707	10	
			あり	51359			41354	18330	1149	354	378	503		
	B	酸解離	なし	33912			28863	27654	4723	289	120	116	154	2
			あり	33537			41218	35140	11043	738	132	124	165	
	C	酸解離	なし	22450			22367	18075	1873	316	77	68	91	20
			あり	27931			27630	26857	18924	3952	195	63	84	
	D	酸解離	なし	86331			83910	74747	10944	544	165	162	215	10
			あり	152919			153910	147450	108565	29301	1205	142	188	
	D	平衡移動	なし	86331			83910	74747	10944	544	165	162	215	10
			あり	72693			75992	60797	24330	13143	1521	158	210	
0.5ug/ml	A	酸解離	なし	5102			4854	1830	409	358	376	532	707	10
			あり	4196			4149	2472	1232	417	524	378	503	
	B	酸解離	なし	2191		2084	1864	663	197	117	116	154	2	
			あり	2607		2745	2601	1712	485	156	124	165		
	C	酸解離	なし	1816			1464	349	194	80	50	68	91	20
			あり	1972			1918	1859	1401	341	64	63	84	
	D	酸解離	なし	6221			5696	1582	344	159	87	162	215	10
			あり	8669			8958	8714	7137	2171	177	142	188	
	D	平衡移動	なし	6221			5696	1582	344	159	87	162	215	10
			あり	3901			3789	2490	2112	1161	236	158	210	
0.05ug/ml	A	酸解離	なし	831		990	698	527	442	410	532	707	10	
			あり	749		574	651	546	462	349	378	503		
	B	酸解離	なし	320		319	305	173	122	114		116	154	2
			あり	360		361	363	311	256	203		124	165	
	C	酸解離	なし	235			133	95	73	61	55	68	91	20
			あり	238			236	234	183	85	61	63	84	
	D	酸解離	なし	808			372	183	156	94	77	162	215	10
			あり	991			959	968	811	288	85	142	188	
	D	平衡移動	なし	808			372	183	156	94	77	162	215	10
			あり	393			355	330	297	204	131	158	210	

表 13 Drug Tolerance Limit 改善率の比較

測定法		機関A	機関B	機関C	機関D	機関D
検討したDrug tolerance 改善法		LOCI法	ECL法	ECL法	ECL法	ECL法
ADA	ADA濃度	酸解離	酸解離	酸解離	酸解離	平衡移動
Ratio ^{*)}						
抗B-mAb抗体	H (5ug/ml)	1.8 ↑↑	1.5 ↑	11.7 ↑↑	16.9 ↑↑	**)
	M (0.5ug/ml)	17.4 ↑↑	6.5 ↑	**)	77.3 ↑↑	**)
	L (0.05ug/ml)	47.0 ↑↑	**)	87.7 ↑↑	297.2 ↑↑	109.2 ↑↑
抗EPO抗体 BM802	M (0.5ug/ml)	0.66 ↓	1.1 —		1.3 —	1.0 —
	M' (0.25ug/ml)		1.9 ↑		1.3 —	1.0 —
	L (0.05ug/ml)		3.6 ↑		0.9 —	0.8 —
抗EPO抗体 LS-C11323	H (5ug/ml)	18.7 ↑↑				
	H' (2.5ug/ml)	18.9 ↑↑				
	M (0.5ug/ml)	46.0 ↑↑				
抗Adalimumab抗体 HCA204	H (5ug/ml)	0.9 —				
	M (0.5ug/ml)	5.1 ↑				
	L (0.05ug/ml)	8.9 ↑				
抗Infliximab抗体 HCA213	H (5ug/ml)	2.7 ↑				
	M (0.5ug/ml)	4.7 ↑				
	L (0.05ug/ml)	12.7 ↑↑				
抗Golimumab抗体 HCA241	H (5ug/ml)	1.4 —				
	M (0.5ug/ml)	5.5 ↑				
	L (0.05ug/ml)	**)				
抗C-mAb抗体	H (1.5ug/ml)		4.2 ↑			
	M (0.25ug/ml)		**)			
	L (0.05ug/ml)		25.2 ↑↑			

*) 4P 回帰曲線から求めたDTLの比(改善法有/改善法無)
**) 算出不可

表 14 各種バイオ医薬品と infusion reaction リスク因子の検討

医薬品成分	症例数	女性 (95%CI)	60 代以上	10 代以下
セツキシマブ	235	1.21 (0.90-1.64)	1.86 (1.28-2.73)	n.d.
インフリキシマブ	146	0.97 (0.69-1.37)	0.49 (0.34-0.70)	1.48 (0.63-3.45)
トラスツズマブ	51	0.36 (0.18-0.75)	1.07 (0.60-1.93)	n.d.
リツキシマブ	30	0.65 (0.30-1.41)	2.78 (1.13-6.84)	1.23 (0.16-9.23)
モガムリズマブ	27	0.81 (0.36-1.86)	1.38 (0.49-3.87)	n.d.
トシリズマブ	20	1.02 (0.39-2.67)	0.18 (0.06-0.53)	8.31 (3.35-20.6)
パニツムマブ	18	1.60 (0.61-4.20)	0.49 (0.19-1.29)	n.d.
ペルツズマブ	12	n.d.	0.71 (0.20-2.57)	n.d.
ベバシズマブ	10	1.06 (0.30-3.76)	1.21 (0.31-4.70)	n.d.

表 15 インフリキシマブの主な適用理由における有害事象の粗オッズ比

適用理由	Infusion reaction	心不全	穿孔
クローン病	1.44 (0.99-2.09)	1.60 (0.41-6.22)	20.4 (5.94-70.4)
ベーチェット症候群	1.46 (0.62-3.41)	8.49 (1.78-40.6)	n.d.
乾癬	2.62 (1.28-5.38)	n.d.	n.d.
関節リウマチ	0.72 (0.52-1.01)	0.40 (0.11-1.43)	0.03 (0.004-0.25)
潰瘍性大腸炎	0.25 (0.06-1.01)	n.d.	1.04 (0.14-7.81)

表 16 infusion reaction 症例における抗ヒスタミン剤の併用記載例数

(括弧内は各医薬品の有害事象報告全症例における併用記載例数)

併用薬	インフリキシマブ	リツキシマブ	セツキシマブ
クロルフェニラミン	14 (54)	14 (353)	101 (450)
ジフェンヒドラミン	9 (49)	4 (85)	80 (293)
ヒドロキシジン	5 (17)	1 (22)	1 (4)
フェキソフェナジン	3 (36)	0 (7)	1 (5)
シプロヘプタジン	1 (3)	0 (0)	0 (0)
プロメタジン	0 (2)	0 (1)	0 (0)
抗ヒスタミン剤 (名称が記載されていない)	4 (71)	1 (63)	4 (7)
併用例数合計	36 (232)	20 (531)	187 (759)
有害事象全体の症例数	146 (2787)	30 (1530)	235 (1065)
併用割合	24.7% (8.3%)	66.7% (34.7%)	79.6% (71.3%)

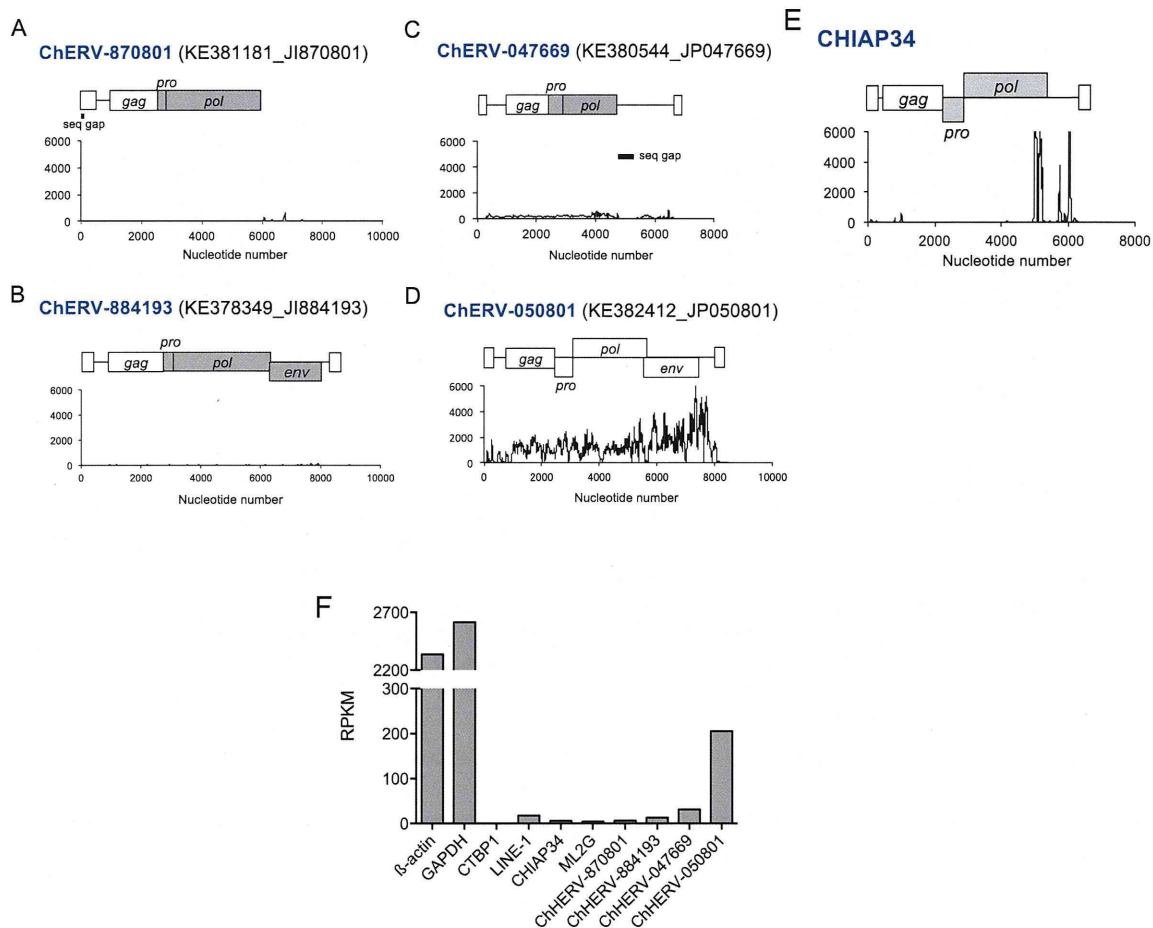


図 8 CHO 細胞の RNA-seq データから選択した gag ORF 保持内在性レトロウイルス由来転写配列のウイルスゲノム上マッピング (A-E). ChERV-050801 の発現レベル (β -actin の約 8%) (F).

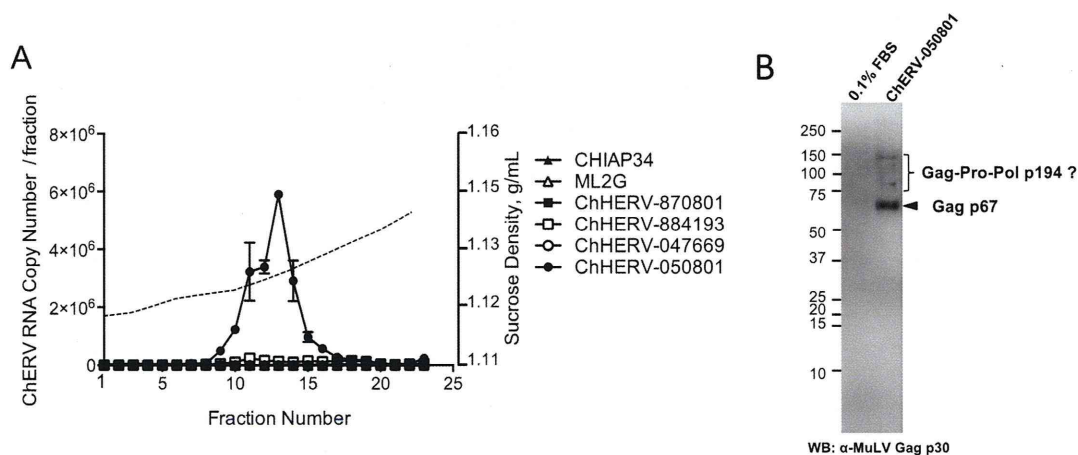


図 9 CHO 細胞の培養上清中に含まれる内在性レトロウイルス(A), 及び, WB による Gag p67 発現の確認(B)

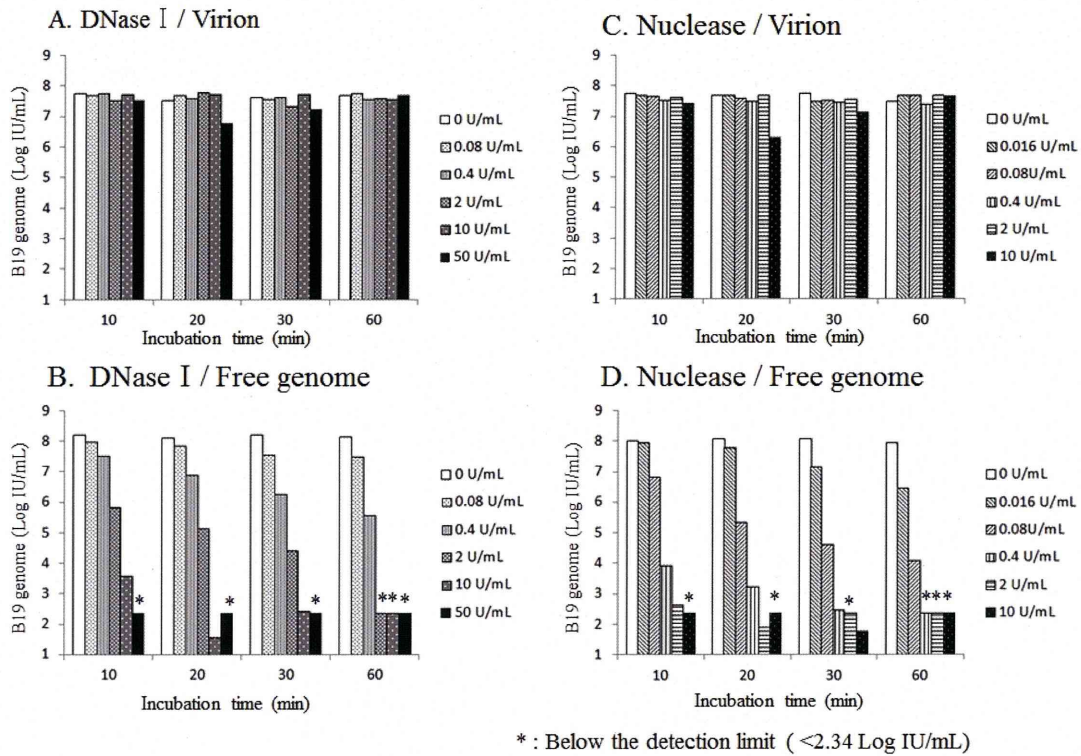


図 10 B19 ビリオン中ゲノム及び遊離ゲノムに対する DNase I 又は Micrococcal Nuclease の作用

表 17 ウイルス除去膜 (Planova 20N) での B19 除去率評価
—Q-PCR での評価における Nuclease 処理の効果と感染価との比較—

Assay	B19 titer [log (total IU)] or Log (total TCID ₅₀) (run1 / run2)		LRV	
	Load	Filtrate or holding		
Q-PCR (Nuclease -)	10.25 / 10.25	F1	7.96 / 7.88	2.29 / 2.37
		F2	8.09 / 8.21	2.16 / 2.04
		F3	8.08 / 8.20	2.17 / 2.05
		FE	7.69 / 8.05	2.56 / 2.20
		H1	10.12 / 10.20	0.13 / 0.05
		H2	10.27 / 10.20	-0.02 / 0.05
Q-PCR (Nuclease +)	9.90 / 10.13	F1	<4.87 / <4.87	≥5.03 / ≥5.26
		F2	<4.87 / <4.87	≥5.03 / ≥5.26
		F3	<4.87 / <4.87	≥5.03 / ≥5.26
		FE	<4.87 / <4.87	≥5.03 / ≥5.26
		H1	10.14 / 10.17	-0.24 / -0.04
		H2	10.19 / 10.13	-0.29 / 0.00
Infectivity	7.23 / 7.03	F1	<5.03 / <5.03	≥2.20 / ≥2.00
		F2	<5.03 / <5.03	≥2.20 / ≥2.00
		F3	<5.03 / <5.03	≥2.20 / ≥2.00
		FE	<5.03 / <5.03	≥2.20 / ≥2.00
		H1	<5.03 / 5.23	≥2.20 / 1.80
		H2	5.23 / 5.83	2.00 / 1.20

- Load : ウイルス除去膜工程前試料
- F1, F2, F3, FE : ウイルス除去工程後試料 (溶出順にそれぞれ 4 分割して回収した)
- H1 : 無処理で除去膜工程と同時間 24°C で静置した工程対照試料
- H2 : 無処理で除去膜工程と同時間 5°C で静置した工程対照試料

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発

研究分担者 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

要旨 バイオ医薬品凝集体評価法の開発を目的に、各種の凝集体分析法の特徴を比較するための共同研究を設定した。国立衛研は、動的光散乱を実施し、60 nm, 220 nm, 500 nm の粒子に対しては、それぞれ、0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 及び 0.50 $\mu\text{g/mL}$ 以上で RSD が 5% 以下の精度で粒子径を測定できること、900 nm 以上、特に 2 μm の粒子では、自己相関関数の質が低く粒子径の測定値のばらつきが大きくなることを確認した。動的光散乱は定量的な方法ではないため、凝集体評価法としての利用については今後議論が必要である。

研究協力者

原園 景 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 主任研究官

(1) 試薬等

Thermo Fisher Scientific 社より、NICB トレーサブル粒子径標準粒子 60 nm, 220 nm, 500 nm, 2 μm 及び 10 μm (ポリスチレン) 並びに 1 μm (シリコン) を購入した (表 1)。

A. 目的

バイオ医薬品開発が世界的に活発化しており、新薬開発全体に占めるバイオ医薬品の割合は年々増加している。バイオ医薬品の開発と製造において、糖鎖修飾などの翻訳後修飾、並びに凝集体及び宿主細胞由来タンパク質などの不純物は、薬物動態や免疫原性などに影響を及ぼす可能性がある品質特性であることから、評価法・試験法の整備が必要である。

凝集体サブグループでは、凝集体の特性ごとに適した評価方法の開発と標準化を行うことを目的に、標準粒子を用いて各種の凝集体分析法の特徴を比較する。国立衛研はアンケート調査により共同研究を設定し、動的光散乱を検討した。

(2) 共同研究の設定

標準粒子は 0.2 μm のフィルターを通したミリ Q 水を用いて希釈し、ポリスチレン粒子は 0.001 %, 0.0005 %, 0.00025 %, 0.0001 %, 0.00005 % 及び 0.000025 % の溶液、シリカ粒子は、0.002 %, 0.001 %, 0.0005 %, 0.0002 %, 0.0001 % 及び 0.00005 % の溶液を作成した。希釈液は分注し、共同研究参加機関（アステラス製薬株式会社、株式会社島津製作所、武田薬品工業株式会社、中外製薬株式会社、株式会社東レリサーチセンター、一般社団法人日本血液製剤機構、持田製薬株式会社、株式会社ユーメディコ、協和発酵キリン及び大日本住友製薬株式会社）へ室温にて配布した。配布した濃度範囲が測定に適していない場合は必要に応じて希

B. 研究方法

積液を作成することとした。粒子径標準粒子の希釈液は、よく混合し、適切な方法で脱気した後、分析に供することとした。

(3) 動的光散乱の測定

装置には、ゼータサイザー ナノ ZS (マルバークン社) を用いた。共同研究試料は十分に攪拌後、水流ポンプを用いた減圧デシケーター中に約 2 分間放置し、脱気を行った。ゆっくりと転倒混和した後、ディスプレイセル (UV マイクロキュベット) に 125 μ l を入れ、試料ホルダーにセットした。次の条件で分析を行った。

測定原理：光子相関法

光学配置：ホモデザイン法

測定角度：173°

測定温度：25°C

平衡化時間：120 秒

試料：ポリスチレン (RI 1.590; 吸収率 0.010)

または、シリカ (RI 1.41; 吸収率 0.010)

分散媒：水 (屈折率 1.330; 粘度 0.8872)

測定時間：10 秒を 11 回

測定回数：4 回

解析手法：キュムラント法及び分布解析法 (非負最小二乗法)

<倫理面への配慮>

市販試薬を用いているので、倫理面への配慮は必要としない。

C. 結果及び考察

(1) 共同研究の設定

配布する粒子径標準粒子として、装置の校正や確認に汎用されるポリスチレン粒子から 60 nm, 220 nm, 500 nm, 900 nm, 2 μ m, 5 μ m 及び 10 μ m を、及びタンパク質凝集体の屈折率に近いと言われているシリカ粒子から 1 μ m を

選択した (表 1)。粒子径標準粒子の濃度は概算であること、並びに各機関で希釈した場合、濃度のばらつき、及び水や環境からの粒子の持ち込みに違いが生じる恐れがあることから、代表機関にて希釈系列を作成して配布した。10 μ g/mL より濃い濃度では白濁が容易に認められることから、希釈系列の濃度は、最大の 10 μ g/mL とした。シリカ粒子においては、密度がポリスチレンの約 2 倍であったことから、2 倍の濃度 (w/w) の希釈液を作成した。

共同研究において、光遮蔽、フローイメージング、レーザー回折、動的光散乱、ナノ粒子トラッキング解析及び共振式質量測定を用いた。超遠心分析及びフィールドフロー分画は、標準粒子の分析には適していないことから除外した。測定する標準粒子の粒子径は、各装置の測定可能な粒子径を基に決定した (表 2)。それぞれの分析結果は、分析を実施した機関の分担研究報告書にて示される。

(2) 動的光散乱

国立医薬品食品衛生研究所は、共同研究試料を動的光散乱により分析した。動的光散乱は、溶液中の粒子にレーザー光を照射し、散乱光の干渉による強度分布のブラウン運動によるゆらぎから光子相関法により自己相関関数を求め、粒子径及び粒子径分布を得る方法である。キュムラント法による解析は、ISO 13321 及び ISO 22412 で定義されており、結果は Z-平均及び多分散指数で示され、装置間で類似した結果が得られる。単分散を仮定せず粒子径及びその分布を解析するアルゴリズムにはいくつか種類があり、装置及びソフトウェアにより得られる結果が変動する。動的光散乱は定量的な方法ではないことから、凝集体評価法としては、タンパク質単量体のシグナルと、凝集体の粒子径

及びシグナルを比較することが考えられるだろう。そこで、標準粒子を用いて、粒子を検出可能な濃度及び得られる粒子径の精度について検討した。なお、動的光散乱では流体力学径が得られるので、標準粒子の粒子径とは少し異なった値となる。

表3に、キュムラント法にて計算された粒子径及び多分散性指数 (PdI) を示す。60 nm のポリスチレン粒子の測定では、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径が認証値よりも20%以上大きくなり、また多分散指数が0.1より大きくなった。

220 nm のポリスチレン粒子の測定では、0.01 $\mu\text{g/mL}$ の濃度まで粒子径が認証値の20%以内の範囲であり、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で多分散指数が0.1より大きくなった。

500 nm のポリスチレン粒子の測定では、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径が認証値より20%以上大きくなり、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 及び0.25 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で多分散指数が0.1より大きくなった。

900 nm のポリスチレン粒子の測定では、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径が認証値より20%以上大きくなり、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 及び1.0 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径の相対標準偏差が10%以上となり、測定した全濃度 (0.10~10.0 $\mu\text{g/mL}$) で多分散指数が0.1より大きくなった。

2 μm のポリスチレン粒子の測定では、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径が認証値と著しく異なった、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径の相対標準偏差が10%以上となり、測定した全濃度 (0.25~10.0 $\mu\text{g/mL}$) で多分散指数が0.3以上となった。

1 μm のシリカ粒子の測定では、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径が認証値より20%以上大きくなり、20, 5, 2 $\mu\text{g/mL}$ で多分散指数が0.1以上、1.0 及び0.20 $\mu\text{g/mL}$ で0.3以上となっ

た。

表4に、同じ測定で分布解析 (非負最小二乗法) にて粒子径を求めたデータを示す。60 nm のポリスチレン粒子の測定では、0.25 $\mu\text{g/mL}$ を除き全ての濃度で粒子径が認証値よりも20%以上大きくなった。

220 nm のポリスチレン粒子の測定では、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径が認証値より20%以上大きくなった。

500 nm のポリスチレン粒子の測定では、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 及び0.25 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径が認証値より20%以上大きくなった。

900 nm のポリスチレン粒子の測定では、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径が認証値の20%以上大きくなり、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径の相対標準偏差が10%以上となった。

2 μm のポリスチレン粒子の測定では、全ての濃度で粒子径が認証値と著しく異なり、また、相対標準偏差は20%以上となった。

1 μm のシリカ粒子の測定では、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 及び0.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で粒子径の相対標準偏差が10%以上となった。

60 nm, 220 nm 及び500 nm の粒子では、それぞれ0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 及び0.50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度まで粒子径の相対標準偏差が5%以下で測定可能であった。これに対して、900 nm 及び2 μm のポリスチレン粒子及び1 μm のシリカ粒子では、粒子径解析ソフトウェアにより自己相関関数の質が低いと判断されており (データ非表示)、分析結果のばらつきが大きく、また、多分散指数も大きな値となった。特に2 μm の粒子では、分布解析では得られた粒子径は全く異なっていた。自己相関関数がベースラインまで下がりきらずに延長しており (参考図)、この原因として、粒子の凝集体の存在、及び測定体積内の粒子数が少ないため散乱光強度にば

らつきが生じたことなどが考えられる。粒子径の大きな粒子においては、粒子径のばらつきが大きいことに気をつける必要がある。

動的光散乱は定量的な方法ではないことから、凝集体評価にどのように利用可能かについて、今後議論が必要である。

D. 結論

60 nm, 220 nm, 500 nm の粒子では、それぞれ、0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 及び 0.50 $\mu\text{g/mL}$ 以上で相対標準偏差が 5%以下の精度で粒子径を測定できること、900 nm 以上、特に 2 μm の粒子では、自己相関関数の質が低く粒子径の測定値のばらつきが大きくなることを確認した。動的光散乱は定量的な分析法ではないことから、凝集体評価にどのように利用可能かについては、今後議論が必要である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表等

論文発表等（総説も含みます）

- 1) Hashii, N., Harazono, A., Kuribayashi, R., Takakura, D., Kawasaki, N.: Characterizations of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. Rapid Commun. Mass Spectrom., 28: 921-932 (2014).

- 2) 原園 景, 石井明子, 川崎ナナ: 日本薬局方収載に向けて 糖鎖試験法の解説 Pharm. Tech. Japan 31(1) 81-92 (2015)
- 3) 石井明子, 川崎ナナ: 第 13 章第 2 節 バイオ医薬品（組換えタンパク質医薬品）の品質関連規制と対応の留意点. 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, pp. 523-531, 技術情報協会 東京 (2014).

学会発表等

- 1) ISHII-WATABE, Akiko, SUZUKI, Takuo, NISHIMURA, Kazuko, MORI, Keitaro, YAMAGUCHI, Hideto, TORIKAI, Masaharu, YANAGIHARA, Shigehiro, KOGA, Junichi, WATANABE, Takayuki, HAMAJI, Yoshinori, ISHIDA, Masato, MIYAMOTO, Tomomi, KAWASAKI, Nana “Design and the validity test suitable for a therapeutic antibody potency assay using ELISA”, USP 6th Bioassay Workshop, Jun. 2-3 (2014) Rockville, USA

報道発表等

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 共同研究に用いた粒子径標準粒子

粒子径標準物質		Mean Diameter (NIST Traceable)				Hydrodynamic Diameter	Size Distribution		Density	Index of Refraction
粒子径	材質	lot	nm			nm	Std Dev	%CV	g/cm ³	@589
60 nm	ポリスチレン	42962	60	±	4	58-68	10.2	17.0	1.05	1.59
220 nm	ポリスチレン	42494	216	±	4	216-220	5.0	2.3	1.05	1.59
500 nm	ポリスチレン	43353	498	±	9		7.9	1.6	1.05	1.59
900 nm	ポリスチレン	42457	903	±	12		4.1	0.5	1.05	1.59
2 μm	ポリスチレン	43049	2.020	±	0.015		0.021	1.0	1.05	1.59
5 μm	ポリスチレン	43740	5.021	±	0.041		0.05	1.0	1.05	1.59
10 μm	ポリスチレン	43717	10.12	±	0.06		0.09	0.9	1.05	1.59
1 μm	シリカ	43789	0.99	±	0.02		0.02	2.0	2.01	1.40

表2. 共同研究に用いた分析法と測定した粒子径

標準粒子		分析法	LO	FI	LD	DLS	NTA	RMM
粒子径	材質	機関数	(5)	(5)	(2)	(5)	(1)*	(1)*
60 nm	ポリスチレン					○	○	
220 nm	ポリスチレン				○	○		
500 nm	ポリスチレン				○	○		
900 nm	ポリスチレン				○	○	○	○
2 μm	ポリスチレン		○	○	○	○		○
5 μm	ポリスチレン		○	○	○			
10 μm	ポリスチレン		○	○	○			
1 μm	シリカ		△	○	○			

LO：光遮蔽；FI：フローイメージング；LD：レーザー回折；DLS：動的光散乱；NTA：ナノ粒子トラッキング解析；RMM：共振式質量測定法
 *, 希釈系列は実施機関にて作成した。

○：測定を実施した粒子径；△：一部の機関でのみ実施

表3. 動的光散乱 キュムラント法により求めた粒子径と多分散指数

ポリスチレン 濃度 μg/mL	60nm				220 nm				500 nm			
	粒子径		PdI		粒子径		PdI		粒子径		PdI	
	平均	RSD (%)	平均	SD	平均	RSD (%)	平均	SD	平均	RSD (%)	平均	SD
0.01					251	3.0	0.15	0.10				
0.025					242	2.9	0.13	0.07				
0.05	83.1	4.6	0.17	0.03	255	1.1	0.12	0.03				
0.10	74.2	5.6	0.13	0.05	232	0.5	0.06	0.03	690	7.9	0.11	0.02
0.25	67.0	0.6	0.03	0.02	230	1.4	0.01	0.00	644	5.8	0.24	0.11
0.50	68.7	1.1	0.05	0.03	232	0.5	0.01	0.01	544	3.4	0.07	0.04
1.0	68.4	0.3	0.04	0.04	233	0.9	0.02	0.02	591	1.7	0.12	0.07
2.5	68.9	1.4	0.03	0.01	235	1.1	0.01	0.01	539	3.6	0.07	0.06
5.0	69.7	1.3	0.04	0.01	233	0.9	0.03	0.02	544	2.6	0.08	0.04
10	71.7	1.2	0.02	0.01	236	1.6	0.02	0.01	556	0.9	0.03	0.03

粒子径のずれが特に大きい (±20 %) 箇所、粒子径のばらつきが大きい (RSDが10 %以上) 箇所、多分散指数が特に大きい (0.2以上) 箇所を赤で示した。

粒子径のずれが大きい (±10 %) 箇所、粒子径のばらつきが大きい (RSDが5 %以上) 箇所、多分散指数が大きい (0.1以上) 箇所を薄茶で示した。

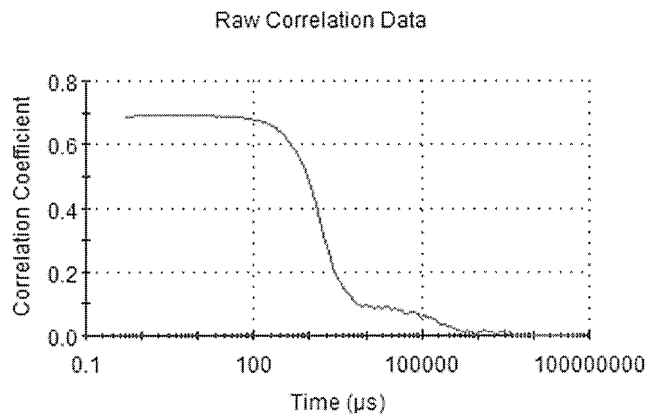
ポリスチレン 濃度 μg/mL	900 nm				2 μm				シリカ 濃度 μg/mL	1 μm			
	粒子径		PdI		粒子径		PdI			粒子径		PdI	
	平均	RSD (%)	平均	SD	平均	RSD (%)	平均	SD		平均	RSD (%)	平均	SD
0.01									0.02				
0.025									0.05				
0.05									0.10				
0.10	1513	15.1	0.81	0.19					0.20	1249	6.9	0.31	0.45
0.25	1666	37.5	0.83	0.20	14423	140	0.96	0.08	0.50	1255	5.2	0.09	0.10
0.50	1079	19.2	0.14	0.08	11042	147	0.95	0.07	1.0	1055	8.6	0.35	0.26
1.0	1079	11.0	0.19	0.14	2341	26	0.91	0.17	2.0	989	10.5	0.19	0.13
2.5	1012	8.2	0.23	0.13	2113	33	0.82	0.26	5.0	1194	8.1	0.10	0.08
5.0	1014	10.5	0.18	0.02	1828	8.1	0.45	0.18	10	1157	3.3	0.06	0.03
10	1053	7.7	0.29	0.13	1624	5.1	0.34	0.22	20	1155	2.1	0.11	0.06

表4. 動的光散乱 分布解析により求めた粒子径

ポリスチレン 濃度 μg/mL	60nm		220 nm		500 nm		900 nm		2 μm		シリカ 濃度 μg/mL	1 μm	
	粒子径 平均	RSD (%)	粒子径 平均	RSD (%)	粒子径 平均	RSD (%)	粒子径 平均	RSD (%)	粒子径 平均	RSD (%)		粒子径 平均	RSD (%)
0.01			270	7.8							0.02		
0.025			261	2.9							0.05		
0.05	98.0	6.9	281	1.1							0.10		
0.10	80.1	6.0	248	1.7	736	9.2	709	61.3			0.20	978	10.7
0.25	70.9	1.0	238	1.4	640	6.0	513	73.7	1.4	90	0.50	981	11.3
0.50	73.4	0.7	241	0.8	564	0.5	961	18.3	202	99	1.0	979	13.5
1.0	72.8	3.0	242	0.6	605	1.9	813	7.6	343	69	2.0	820	9.0
2.5	72.7	1.5	244	1.3	552	1.7	1029	3.7	444	51	5.0	927	14.9
5.0	73.9	1.5	242	0.7	567	1.5	986	4.8	964	25	10	894	6.8
10.0	75.1	1.1	245	1.0	572	1.0	1038	1.2	1062	30	20	982	5.5

粒子径のずれが特に大きい (±20 %) 箇所、粒子径のばらつきが大きい (RSDが10 %以上) 箇所を赤で示した。

粒子径のずれが大きい (±10 %) 箇所、粒子径のばらつきが大きい (RSDが5 %以上) 箇所を薄茶で示した。



参考図. 2 μm のポリスチレン粒子 (10 μg/mL) を分析した時の自己相関関数

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書
医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発

分担課題名 質量分析を用いたバイオ医薬品の血中濃度測定技術の開発

研究分担者 橋井 則貴 所属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

研究要旨 液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を用いた高分子薬物の血中濃度測定技術の最適化、及び分析法バリデーションにおける真度及び精度に関する適否の判定基準の提案を目的として、市販の抗体医薬品を添加したマウス血清を試料として、前処理方法の最適化を行った。また、既存のガイドラインに従って分析法バリデーションを行った。

A. 研究目的

高分子薬物の血中濃度測定（バイオアナリシス）において、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を用いた選択反応モニタリング (selected reaction monitoring (SRM)) は、ダイナミックレンジが広いこと、及び分析法開発時間が短いことなどの理由から、リガンド結合法によるバイオアナリシスを補完する手法として注目されている。一方、マトリックス等の影響により、分析対象薬物を選択的、高感度かつ精度良く分析することが困難なことがあり、前処理方法を含めた測定方法の最適化が課題となっている。また、酵素消化反応やリガンド結合等を前処理で行う場合に、既存の分析法バリデーションのガイドライン^{1,2)}をそのまま適用することが難しい場合があることも課題の一つとして挙げられている。

そこで、LC/MS を用いた SRM による高分子薬物の血中濃度測定技術の最適化と分析法バリデーションを実施する際の真度及び精度に関する適否の判定基準の提案を目的として、本年度は、市販の抗体医薬品を添加したマウス血清を試料として、前処理方法の最適化を行うとともに、「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)りに従いバリデーションを行い、同ガイドラインの基準値を利用可能か否かの検討を行った。

- 1) 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」薬食審査発 0711 第 1 号 H25 年 7 月 11 日
- 2) 「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」薬食審査発 0401 第 1 号 H26 年 4 月 1 日

B. 研究方法

B-1. 試料等

①抗体

市販の抗体医薬品 A（ヒト IgG1）を使用した。添付文書に従い、50 mg/mL の溶液を調製した。

②マウス血清

以下の 6 種類のマウス血清を使用した。

- 1.マウス血清 (Cedarlane Laboratories Ltd.)
- 2.マウス血清 (KOHJIN BIO)
3. Normal Mouse Serum (Fitzgerald)
4. Mouse serum (SIGMA-ALDRICH)
5. Normal Mouse Serum (Abcam)
6. Serum, C57BL6 Mouse (INNOVATIVE RESEARCH)

③トリプシン

残存するキモトリプシンを不活性化するために Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK) 処理したトリプシン (SIGMA-ALDRICH, T1426) を使用した。50 mM 酢酸溶液を用いて、8 mg/mL のトリプシン溶液を調製した。

④分析対象物 (analyte) 及び内標準物質 (SIL-IS)

ヒト IgG1 の CH2 領域のペプチド (VVSVLTVLHQDWLNGK) を analyte とした(図 1A)。SIL-IS として、安定同位体標識ペプチド (VVSVLTVLHQDWL(¹³C₆,¹⁵N)NGK, スクラム社製、純度 99.7%) を用いた。1 µg/mL の DMSO 溶液を調製し、SIL-IS 溶液とした。図 1B に analyte 及び SIL-IS の MS/MS スペクトルを示した。それぞれ、*m/z* 806 及び *m/z* 809 に主フラグメントイオンを生じることがわかる。

⑤還元溶液

ジチオスレイトール (DTT) を H₂O に溶かして、10 mM DTT 溶液とした。

B-2. 前処理の手順

①メタノール沈殿

血清 25 µL に 75 µL のメタノールを添加後、混

合した後、遠心分離 (20,000 ×g, 5min) した。

②トリプシン消化

メタノール沈殿後、上清を除去した後、沈殿物に 100 μL の 200 mM NH₄HCO₃, 10%CH₃OH-H₂O を加えて、懸濁液とした。SIL-IS 溶液 (10 μL) 及び DTT 溶液 (20 μL) を添加後、60°C, 30 分間インキュベートした。室温まで冷却した後、トリプシン溶液 (10 μL) を加えて、37°C, 16 時間インキュベートした。反応終了後、遠心分離 (20,000 ×g, 20 分間) を行い、上清を分取して、LC/MS 分析試料とした (-20°C 保存)。

尚、前処理の手順を図 2 にまとめた。

B-3. LC/MS

以下の条件で行った。

①LC

装置 : Ultimate 3000 (Dionex)

カラム : ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μm (1.0 × 100 mm, Waters)

カラムオープン温度 : 60°C

移動相 A : 0.1% ギ酸/2% アセトニトリル

移動相 B : 0.1% ギ酸/90% アセトニトリル

移動相 C : 90% イソプロパノール

グラジュエント (分析時)

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0~15 分	90 → 40	10 → 60

グラジュエント (洗浄時)

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 C (vol%)
0~5 分	95 → 10	5 → 90
5~10 分	10 → 95	90 → 5
10~15 分	95 → 10	5 → 90
15~20 分	10 → 95	90 → 5
20~25 分	95 → 10	5 → 90

25~35 分 : 95%A, 5%B

流速 : 40μL/min

サンプル注入量 : 5μL

オートサンプラー温度 : 4°C

②MS

装置 : TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific)

Spray voltage: 3000V

Capillary Temp.: 209°C

CE: 15V

Q1 Precursor ion: *m/z* 603.7 (analyte), 606.0 (SIL-IS)

Q1 Peak width: 0.7

Q3 Product ion: *m/z* 805.7 (analyte), 809.2 (SIL-IS)

Q3 Peak width: 0.7

Scan time: 0.1s

B-4. 濃度算出法

検量線用試料を測定し、それらのピーク面積比 (analyte/SIL-IS) を用いて、最小二乗法により一次回帰直線式から検量線 ($Y=aX+b$; Y, ピーク面積比; X, 濃度) を作成した。測定対象となる試料のピーク面積比を検量線にあてて測定値を算出した。最終的な抗体濃度範囲は、1~500 μg/mL とした。

(倫理面への配慮)

市販の抗体医薬品及び動物血清を試料として用いているため、特に配慮を必要としない。

C. 研究結果

C-1. 前処理条件の検討

①メタノール沈殿条件

血清中の脂質除去を目的として、メタノール沈殿によるタンパク質精製を検討した。メタノール濃度を最適化するために、75%、50%及び 25%メタノール沈殿による抗体医薬品 A の回収率を比較した。抗体溶液 (250 μg/mL in PBS, 25 μL, n=3) に、75%、50%、及び 25%となるようにメタノールを添加後、混合、及び遠心分離 (20,000 ×g, 5min) した。上清を除去後、沈殿物を 200mM NH₄HCO₃, 10%CH₃OH-H₂O (25 μL) に再溶解した。BCA 法 (PIERCE, #23250) により、タンパク質定量を行い、以下の式を用いて、対照との比較により回収率を求めた。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{メタノール沈殿物溶解液の平均定量値}}{\text{対照 (抗体溶液) の平均定量値}} \times 100$$

表 1 に検討結果を示した。メタノールの濃度を 75%、50%及び 25%としたときの回収率 (%) は、それぞれ、94.9%、85.3%及び 15.6%であり、75%のとき最も回収率が高かった。そこで本研究では、メタノール濃度を 75%とする沈殿法を採用することとした。

②酵素消化条件

酵素消化条件において、酵素溶液の濃度、及び温度については、それぞれ、8 mg/mL、及び 37°C で固定することとし、消化時間を検討することとした。抗体医薬品 A を DTT 溶液で還元後、1~16 時間消化して得られた消化物の SDS-PAGE を行い、消化効率を検討した結果、8 時間以上の消化によ

り、ほぼ完全に消化されることが明らかとなった。本研究では、酵素消化時間として、16 時間を採用することとした。

C-2. 分析法バリデーション

検討した前処理方法を含めて、測定方法の信頼性を検証するために、LCガイドラインに従って、分析法のバリデーションを実施した。バリデーション項目は、選択性、定量限界、検量線、真度及び精度、マトリックス効果、希釈の妥当性、並びにオートサンプラー内安定性の確認を行った。低分子MSガイドラインの評価方法及び基準を表2にまとめた。なお、真度、精度及び安定性は、次の計算式から算出した。

・真度 (SE)

$$RE(\%) = \frac{\text{測定値} - \text{理論値}}{\text{理論値}} \times 100$$

・精度(CV)

$$CV(\%) = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均値}} \times 100$$

・安定性 (残存率)

$$\text{残存率}(\%) = \frac{\text{保存後の測定値}}{\text{用時調製した測定値}} \times 100$$

①選択性

6 種類のマウス血清を用いて、それぞれのクロマトグラム上の analyte 及び SIL-IS の保持時間付近における妨害ピークの有無について検討した。評価方法は、以下の式により行った。

$$\frac{\text{個別マウス血清のanalyteの妨害ピーク面積}}{\text{analyte LLOQのピーク面積}} \times 100$$

$$\frac{\text{個別マウス血清のSIL-ISの妨害ピーク面積}}{\text{SIL-ISのピーク面積}} \times 100$$

その結果、analyte 及び SIL-IS の保持時間付近に妨害ピークは確認されなかった(図 3)。

②定量限界 (LLOQ)

バイオアナリシスにおける定量限界とは、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であり、必ずしもSN比や検量線の切片のばらつきから理論的に求めた値とはならない。本研究では、選択性、並びに真度及び精度の結果に基づいて、LLOQを1 µg/mLとした。

③検量線

6種類のマウス血清のプール血清を用いて、検量線用標準試料(抗体医薬品A濃度: 500, 100, 50, 10, 5, 1 µg/mL)、ブランク試料及びゼロ試料を調製(各濃度, n=3)して、図2に示した手順に従って測定を行った。図4に、縦軸にピーク面積比(analyte/SIL-IS)、横軸に抗体濃度(µg/mL)として作成した検量線を示した。回帰式は $Y=0.1107X+0.0337$ 、相関係数(R)は0.9968となり、直線性は良好であった。回帰式から求めた検量線用標準試料の各濃度の真度は-4.7%~7.9%であった。尚、残差プロットを用いて、RE(%)の傾向の検討により、重み付けに $1/X^2$ を採用した。

④真度及び精度

QC試料(高濃度, 500 µg/mL; 中濃度, 250 µg/mL; 低濃度, 3 µg/mL; LLOQ, 1µg/mL)の分析(各濃度, n=3)により評価した。各濃度における平均真度は-18.3%~13.1%、平均精度は、15.4%以下であった。

⑤マトリックス効果

6種類のマウス血清を用いて調製したQC試料(高濃度, 500 µg/mL;低濃度, 3 µg/mL)を分析することにより評価した。高濃度及び低濃度の試料を分析したときの個体間の精度は、それぞれ、11.9%及び14.0%であった。

⑥キャリアオーバー

最高濃度の検量線用標準試料(500 µg/mL)を測定した後にブランク試料を測定することによって選択性評価で用いた式により評価した。ブランク試料を測定したとき、analyte及びSIL-ISのピークは検出されなかった。

⑦希釈の妥当性

マウスプール血清を用いて、1000 mg/mLの試料溶液を調製した後、10倍希釈して、希釈妥当性評価試料とした。5回の繰り返し分析の結果、平均真度は、13.7%及び精度は1.5%であった。

⑧安定性

QC試料(高濃度, 500 µg/mL;低濃度, 3 µg/mL)を用いて、オートサンプラー内安定性を評価した。調製直後に測定した試料(用時調製試料)及び48時間保存後の試料(保存後の試料)の測定値から残存率(%)を求めた。その結果、高濃度試料及び低濃度試料の真度は、それぞれ、0.1%及び-6.9%であった。

以上のバリデーション結果について、表3に要

約した。

D. 考察

D-1. 前処理条件

①メタノール沈殿

脂質を除去するために採用したメタノール沈殿では、メタノールの最終濃度を75%とすることで最も高回収率となることが示唆された。一方で、メタノール沈殿後、pellet 状のタンパク質から懸濁液を調製する際に時間を要したことが、精度等に影響を及ぼした可能性がある。沈殿後の遠心分離条件を再検討することで、より高精度の測定が可能になるものと思われる。

②酵素消化

当初は、還元処理を行わずに、トリプシン消化時間 (1~16 時間) 及び温度 (37°C 及び 60°C) を検討したが、16 時間の消化時間であっても、完全な消化が困難であった。DTT 等による還元処理は不可欠であると考えられる。

D-1. 分析法バリデーション

検討した前処理条件を含む測定法の妥当性を確認するために、LC ガイドラインに従ってバリデーションを実施した。選択性について検討した結果、マウス血清中に測定を妨害するピーク成分はみられず、ガイドラインの基準を満たした。検出限界は 1 µg/mL、直線性の確認された範囲は 1~500 µg/mL であった。抗体医薬品の血中濃度は、品目毎に異なるものの、大凡、µg/mL オーダーであることを考慮すると、本測定方法は十分な感度であることが示唆された。真度及び精度については、それぞれ-18.3%~10.1%、13.9%以下であり、LC ガイドラインの基準 (真度, ±15%以内(LLOQ, ±20%以内); 精度, 15%以下(LLOQ, 20%以下)) を満たさなかった。この結果は、低分子化合物と比較して、前処理工程が複雑なことが影響しているものと考えられる。マトリックス効果、キャリアオーバー、希釈の妥当性及びオートサンプラー内安定性については、LC ガイドラインの基準を満たした。

以上の結果、抗体医薬品を添加したマウス血清

を試料とする場合、LC ガイドラインの真度及び精度の基準に基づき分析法バリデーションを実施することは困難である可能性が示唆された。一方、血清中からの抗体医薬品の精製方法、及び酵素消化後のペプチドの濃縮・精製方法については、現在、様々な方法が報告されている。今後、継続的に前処理方法等の改良を進めることで、より高精度、高感度かつ頑健性の高いバイオアナリシスが可能になると思われる。

E. 結論

本研究では、市販の抗体医薬品を添加したマウス血清を試料として、前処理方法を検討した。また、LC ガイドラインに従いバリデーションを行った。LC/MS により、高分子薬物を添加した動物血清を試料としてバイオアナリシス実施する場合、LC ガイドラインとは異なる真度及び精度の基準を設定する必要があるものと思われる。

F. 研究発表

(1)論文発表

- 1) Hashii N, Harazono A, Kuribayashi R, Takakura D, Kawasaki N: Characterizations of N-Glycan Heterogeneities of Erythropoietin Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Multivariate Analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 30;28(8), 921-932 (2014)

(2)学会発表

- 1) 橋井則貴. 高分子 LC/MS バイオアナリシスの現状と課題について. 第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム帝京大学 (2014.8)(板橋)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得 なし

(2) 実用新案登録 なし

(3) その他 なし

表1 メタノール沈殿の最適化

CH ₃ OH(%)	回収率(%)	定量値の RSD(%)
75	94.9	10.3
50	85.3	6.1
20	15.6	22.6
control	—	4.4

表2 「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) のフルバリデーションに記載された項目、評価方法及び基準

項目	評価方法及び基準
選択性	6 個体 ブランク試料において妨害物質に由来する応答変数 (レスポンス) が認められない, 又は妨害物質に由来するレスポンスが定量下限における分析対象物質の 20%以下及び内標準物質の 5%以下
定量下限	定量下限における分析対象物質のレスポンスは, ブランク試料の 5 倍以上. 定量下限における平均真度は, 理論値の±20%以内, 精度は 20%以下
検量線	定量下限を含む 6 濃度以上の検量線用標準試料, ブランク試料及びゼロ試料(内標準物質を添加したブランク試料)から構成する. 検量線の回帰式及び重み付け条件には, 一般的に濃度とレスポンスの関係を示す最も単純なモデルを用いる. 検量線の回帰式の算出には, ブランク試料及びゼロ試料を用いない. 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, 定量下限において理論値の±20%以内, 定量下限以外においては理論値の±15%以内. 検量線用標準試料の 75%以上かつ, 定量下限及び検量線の最高濃度を含む少なくとも 6 濃度の標準試料が, 上記の基準を満たすものとする.
真度・精度	各濃度における平均真度は, 理論値の±15%以内. ただし, 定量下限では±20%以内. 各濃度における定量値の精度は, 15%以下. ただし, 定量下限では 20%以下.
マトリックス効果	MF による評価: MF は, マトリックス存在下での分析対象物質のレスポンスを, マトリックス非存在下でのレスポンスと比較することによって算出される. MF の算出には, 少なくとも 6 個体から得られたマトリックスを用いる. 内標準物質の補正可. MF の精度は, 個体間で 15%以下. マトリックスを用いて調製した QC 試料による評価: 少なくとも 6 個体から得られたマトリックスを用いて調製した QC 試料を分析し, 定量値の精度は, 個体間で 15%以下.
キャリアオーバー	最高濃度の検量線用標準試料を測定した後のブランク試料のレスポンスは, 原則として, 定量下限における分析対象物質 20%以下かつ内標準物質の 5%以下.
希釈の妥当性	希釈の妥当性は, 試料中における分析対象物質の濃度を検量線の定量範囲内となるようにブランクマトリックスで希釈する場合, 実試料分析における希釈方法を考慮した適切な希釈倍率を選択し, それぞれを少なくとも 5

	<p>回の繰り返し分析をすることによって評価する。 希釈された試料の平均真度は理論値の±15%以内，精度は15%以下。</p>
安定性	<p>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試料を用いる。 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，理論値の±15%以内でなければならない。</p>

表3 バリデーション結果要約

項目	評価結果		
	妨害物質 / analyte LLOQ (%)	妨害物質 / IS (%)	
選択性	1.0	1.0	
	2.0	2.0	
	3.0	3.0	
	4.0	4.0	
	5.0	5.0	
	6.0	6.0	
定量下限	濃度 (µg/mL)		
	1		
検量線	検量線傾き 検量線切片 相関係数 (R) 重み付け	検量線用 標準試料 濃度 (µg/mL)	RE(%)
	0.1107	1.500	1. -4.7
	0.0337	2.100	2. 3.6
	0.9968	3.50	3. -1.4
	1/x ²	4.10	4. -4.2
		5.5	5. 7.9
	6.1	6. -1.2	
真度・精度	CV(%)	RE(%)	
	高濃度: 6.6 中濃度: 4.8 低濃度: 15.4 LLOQ: 10.2	高濃度: -17.8 中濃度: -18.3 低濃度: -7.0 LLOQ: 13.1	
マトリックス効果	評価方法	CV(%)	
	マトリックスを用いて調製した QC 試料 (500, 3 µg/mL) による評価	500 µg/mL: 11.9 3 µg/mL: 14.0	
キャリーオーバー	ブランク試料のレスポンス / analyte LLOQ (%)	ブランク試料のレスポンス / IS (%)	
	0	0	
希釈の妥当性	希釈妥当性評価用試料濃度(µg/mL)(理論値)	希釈倍率	CV(%)
	800	10	1.5
安定性	評価内容	RE(%)	
	オートサンプラー内安定性	500 µg/mL: 0.1 3 µg/mL: -6.9	
			13.7

内標準物質 (IS)
 VVSVLTVLHQDWL (13C6 ; 15N) NGK
 分析対象物 (Analyte)
 VVSVLTVLHQDWL (12C6 ; 14N) NGK

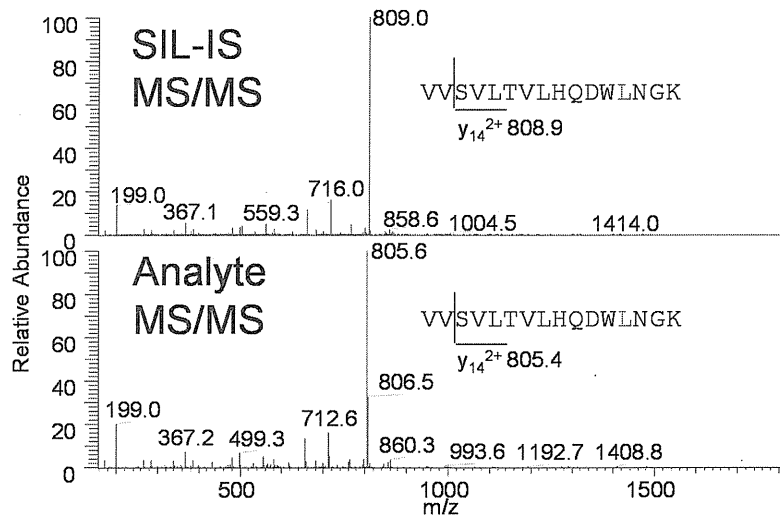
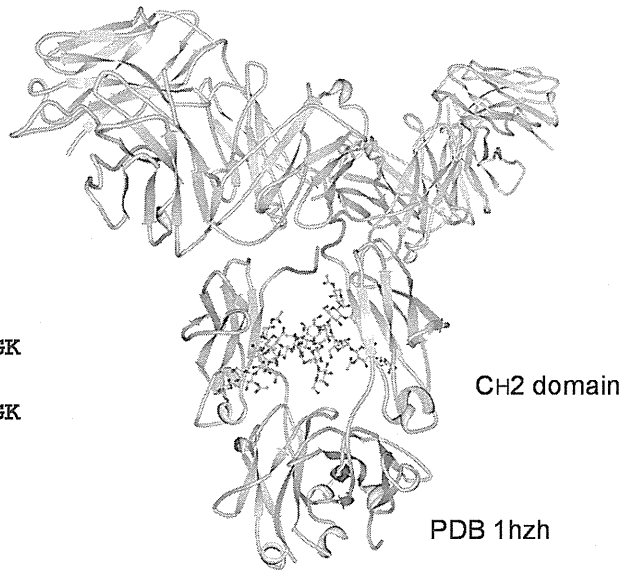


図1 分析対象物 (analyte) 及び内標準物質 (SIL-IS). (A) ヒトIgGにおける analyte の位置 (緑色), (B) SIL-IS (m/z 606, $[M+3H]^{3+}$), 及び analyte (m/z 603, $[M+3H]^{3+}$)のMS/MSスペクトル.

血清試料 25 μ L



- CH₃OH添加 (75 μ L)
- 混合, 遠心分離 (20,000 \times g, 5min)
- 上清除去

沈殿物



- 200mM NH₄HCO₃, 10%CH₃OH-H₂O (100 μ L) 添加・混合
- SIL IS (10 μ L) (1 μ g/mL) 添加
- 10mM DTT溶液 (20 μ L) 添加
- インキュベート (60°C, 30min)
- トリプシン溶液 (10 μ L)
- インキュベート (37°C, 16hr)
- 遠心分離 (20,000 \times g, 20min)
- 上清除去

トリプシン消化物



SRMによる定量

図2 前処理の手順