

2015年10月2日

**Online Webinar—御殿山サテライトキャンパス番外編
第1回Japan Bioanalysis Forum / SCIEXジョイントWebinar
— LBAと質量分析装置をバイオ医薬品開発に活かすために—**

「LBAを用いた測定法についてのQ&A」

JBF運営委員、DG推進委員

中村隆広

nakamura.takahiro@snbl.com

**株式会社新日本科学
安全性研究所**

注：このWebinarは2015年10月に実施したもので、その後、解釈等が変わっているものもあります。
当時の見解としてご理解ください。



はじめに

本Webinar* は、日頃皆様がリガンド結合法 (Ligand Binding Assay, LBA) を用いた測定に関して抱えている疑問点や質問等を事前にアンケートとして収集し、それらに対して講師(中村)がWebinarで回答するものです。

事前にいただいた疑問点や質問等**をまとめ、可能な範囲で一般論も含め、個人的に考えていることを回答しました。十分な回答でないものがあるかも知れませんが、皆様の業務のご参考になれば幸いです。

なお、ここでの回答は、個人的な意見であり、実際の対応については、皆様が判断して適切な方法で行われるようお願いいたします。

* Webを利用するセミナーという意味の造語

** 疑問点や質問等は意図を変えない範囲で少し変更させていただきました。なお、時間等の関係から、全てのアンケートには回答していないことをご理解下さい。



本日の内容

①薬物 (Drug) 濃度測定でのQ&A

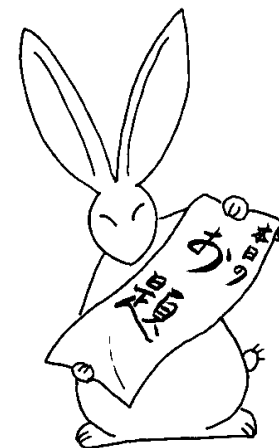
- a. 分析法の開発、b. バリデーションの実施、c. 実試料の分析
- d. LBAに関するガイドラインの内容、e. その他

②抗薬物抗体 (ADA) 測定でのQ&A

- a. 陽性対照の作製、選択及び安定性、b. ブランク試料の選択
- c. カットポイントの設定、d. 中和抗体の検出法

③バイオマーカー (BM) 測定でのQ&A

- a. 標準物質の選択、b. マトリックスの選択、
- c. バリデーションの実施項目、d. その他



本日の内容

①薬物 (Drug) 濃度測定でのQ&A

- a. 分析法の開発、b. バリデーシヨンの実施、c. 実試料の分析
- d. LBAに関するガイドラインの内容、e. その他

②抗薬物抗体 (ADA) 測定でのQ&A

- a. 陽性対照の作製、選択及び安定性、b. ブランク試料の選択
- c. カットポイントの設定、d. 中和抗体の検出法

③バイオマーカー (BM) 測定でのQ&A

- a. 標準物質の選択、b. マトリックスの選択、
- c. バリデーシヨンの実施項目、d. その他



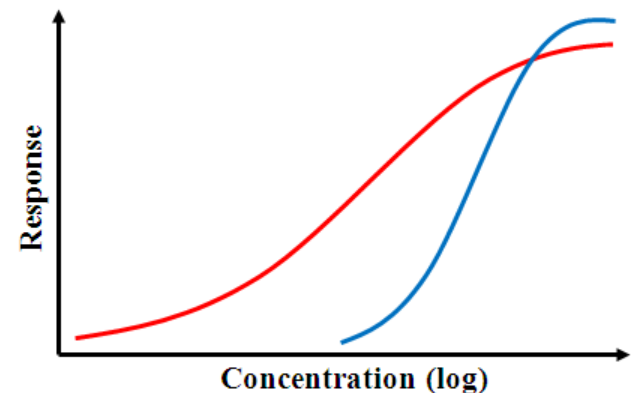
Drug: 分析法の開発

Q1: 吸着を防止するための代表的な試薬と防止方法は何か？

A1: 一般的には界面活性剤(Tween 20やTween 80)を添加する。タンパク質を添加してもよいときは、アルブミンやカゼインなど添加する。

Q2: 結合試薬(抗体等)の質によって検量線の感度やダイナミックレンジに差が出るか？ また、その原因は？ 計画的にダイナミックレンジの広い抗体の作製は可能か？

A2: 結合試薬(抗体等)の質によって、感度やダイナミックレンジは大きく変わる。抗体等のアフィニティの問題と考えられるが、計画的に適切なアフィニティの抗体等を作製するのは困難である。多数のクローンを得て、その中から目的に応じて感度が高いものや、ダイナミックレンジが広い抗体を選ぶ。



Drug: 分析法の開発

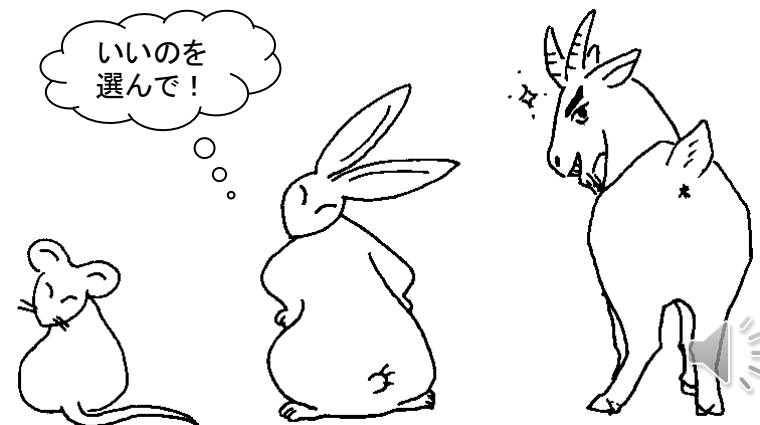
Q3: 重要試薬の開発、選定はどうするのか？

A3: 重要試薬が抗体の場合は、抗体作製を受託している会社に依頼する(自社で作製可能な場合は除く)。抗イディオタイプ抗体を依頼する場合は、経験やその後の対応(安定供給や品質など)を十分考慮して、依頼先を決定する。

モノクローナル抗体の場合は、可能な限り多くのクローンから適切な組み合わせを選択する。

ポリクローナル抗体の場合は、特異性が問題になるので、抗原アフィニティ精製や類似物質での吸収処理などが必要。

重要試薬が受容体やペプチドの場合は、合成したものが薬物と結合しない場合もあるので、作製の初期段階から関与するのが妥当。



Drug: 分析法の開発

Q4: 定量感度を向上させるための検討内容として、最初に検討するのは何か？

A4: ・測定のパラットフォームによって感度が変わる。

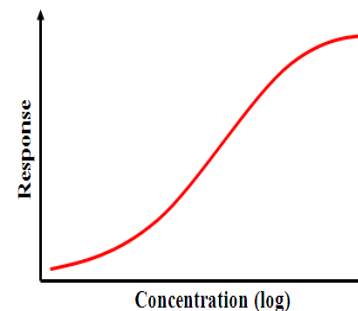
ELISA(発色、蛍光、化学発光)、RIA、TRFIA、ECLIA等

- ・アッセイフォーマットによっても感度が変わる。
- ・アフィニティの高い抗体を用いると感度が上がる。
- ・重要試薬の種類(抗原、受容体等)によっても感度が変わる。

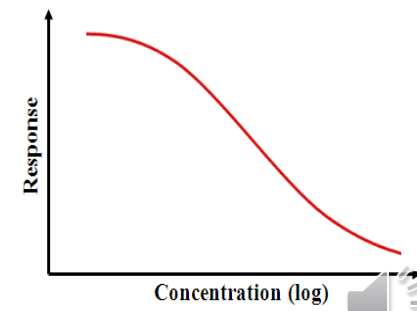
プラットフォーム → 重要試薬 → アッセイフォーマットの順に考える。

(補足) サンドイッチ法の場合は、固相化濃度を高くすると感度は高くなるが、ある濃度から低くなる場合もある。

競合法の場合は、固相化濃度を低くすると感度が上がる。固相化濃度を低くすると反応性が低下するので、二次抗体の濃度や標識の種類を工夫する。



サンドイッチ法

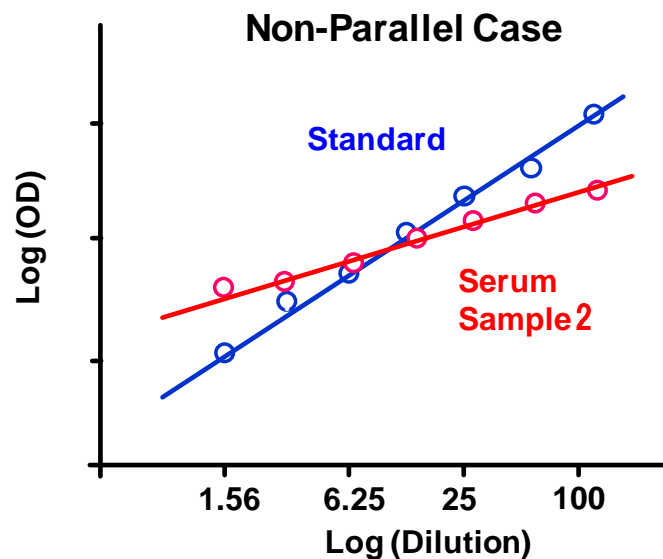
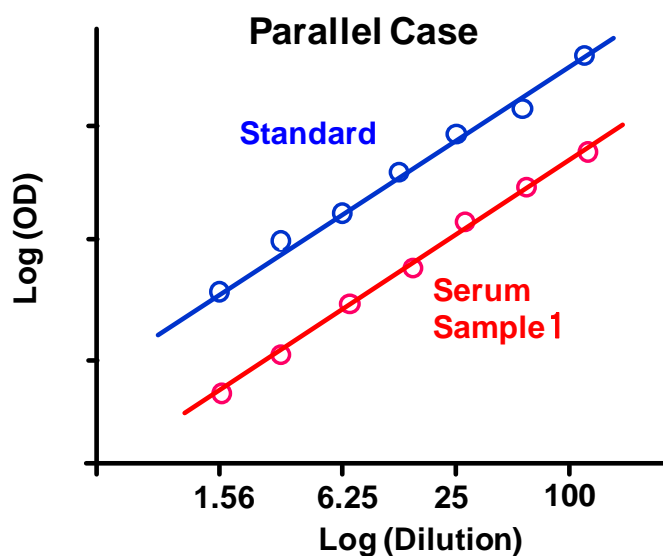


競合法

Drug: バリデーシヨンの実施

Q5: マトリックス、抗薬物抗体あるいは内因性物質による干渉をどのように検討するか？ 添加した内因性物質と実試料では干渉が同一でない場合があるが、そのときの対応は？

A5: 基本的にQC試料の真度と選択性で評価する。実試料では、これらを確認できないので、実質的には数段階の希釈を行って確認する。平行性の評価が必要になる場合もある。



Modified from Plikaytis et al. J. Clin. Microbiol. 32: 2441-2447 (1994)

Drug: バリデーシヨンの実施

Q6: LBAガイドラインの項目はすべて実施すべきか? どのような場合にどの項目が省略できるか?

A6: 申請者が科学的に判断し、適切と思われる項目で実施する。分析対象物質がヒト抗体であれば、特異性は不用な場合もある。

分析対象物質がヒト抗体の場合、ヒト血漿・血清中でバリデーシヨンを行い、真度と選択性に問題がなければ、特異性の評価を別途実施する必要がない可能性あり。

< 抗体の場合 >

分析対象物質: 抗X-ヒトIgG

感度: マトリックス中で1 ng/mL程度の抗X-ヒトIgG

マトリックス: ヒト血清(10 mg/mL 程度のヒトIgGを含む)

Drug: バリデーシヨンの実施

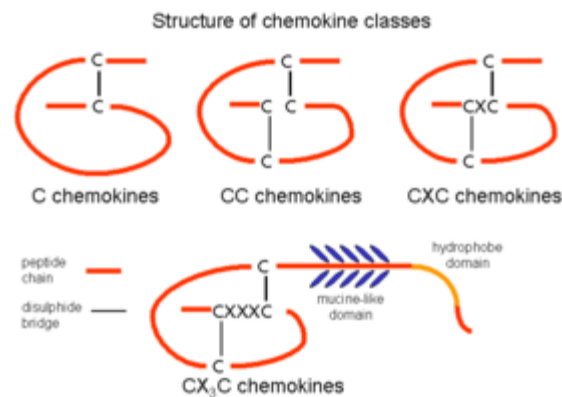
Q7: 特異性は、どのような場合に実施する必要があるか？ また、実施しなくてもよい場合はあるか？

測定対象物質と類似物質を具体的に例示してもらいたい。

A7: 特異性の評価は最初に必要である。追加の評価は、実試料測定において、特異性に問題があることが疑われた場合には、追加の特異性を確認する必要がある。ヒト抗体医薬品ではヒト試料で特異性を確認することで十分である(前頁のQ5&A5参照)。

例: サイトカインやケモカインは構造が類似したものが多数あるので、構造が似たサイトカインやケモカインと目的の薬物(サイトカイン等)との交差反応性を確認する。

<http://image.search.yahoo.co.jp/search?p=%E3%82%B5%E3%82%A4%E3%83%88%E3%82%AB%E3%82%A4%E3%83%B3%E3%80%80%E3%82%B1%E3%83%A2%E3%82%AB%E3%82%A4%E3%83%B3&aq=-1&aq=&ei=UTF-8#mode%3Ddetail%26index%3D161%26st%3D6001>



Drug: 実試料の分析

Q8: ISRの基準(2/3以上適合)は満たしても、基準から外れた試料の濃度に大きな差があった場合、原因追求が必要か？

大きな差(2倍程度)が出る原因は何か？ (次ページも参照)

A8: ガイドラインでは適合基準は2/3以上となっているので、外れた試料の濃度に大きな差(2倍程度)あったとしても許容される。

LBAガイドラインのQ&Aに以下の記載がある。

Q22. ISR 全体として判断基準を満たしている場合に、乖離度が±30%以内との判断基準を逸脱した個別の実試料について、再分析は必要か？

A22. ISR の目的は実試料を用いた分析法の妥当性の確認である。このため、個別の乖離度で±30%を超える実試料があった場合にも、全体としてISR の判断基準を満たしている場合には再分析を実施する必要はない。

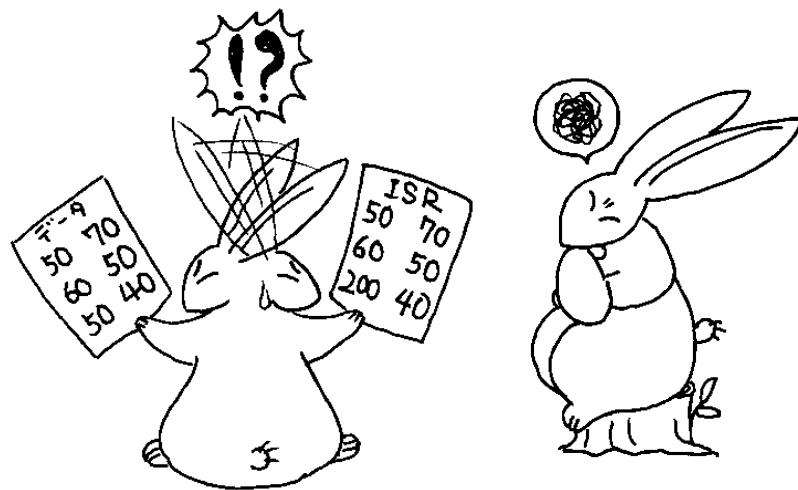
Drug: 実試料の分析

Q8: ISRで基準(2/3以上適合)は満たしても、基準から外れた試料の濃度に大きな差があった場合に原因追求が必要か？

大きな差(2倍以上など)が出る原因は何か？ (続き)

A8: 他の試料には問題がなく、一部の試料において大きく外れた場合、原因として操作性(希釈ミスなど)又は試料特異的な問題が考えられる。なお、2/3以上を満たしている場合は、その原因を追求する必要はないが、外れた試料数と差に応じて考慮する。

他の試料においても大きな差が見られる場合は、測定系に何らかの原因があると思われる。測定系によって原因は異なると考えられるので、想定される原因をひとつずつ確認していくしかない。



Drug: その他

Q9: Meso Scale Discovery社 (ECLIA) 以外で高感度測定が可能な信頼性の高い機器(会社)はないか？

A9: 最近の機器ではErenna*やSimoa**がある。

いずれも1分子測定という方法であり、今後どのように使用されていくかはまだ確定していない。現状、これらの機器は生体試料中の薬物濃度測定というより、バイオマーカー測定に使われていくと思われる。

*<http://www.primetech.co.jp/products/tabid/90/pdid/220/language/ja-JP/Default.aspx>

** http://www.scrum-net.co.jp/home/press_release.html

Erenna



Simoa



Drug: その他

Q10: 市販のELISAキットに精度管理試料がない場合はどのようにデータを保証すれば良いか?

A10: 得られたデータにどの程度の信頼性がよいかによって、対応は異なる。市販のELISAキットでは品質が適切に管理された標準物質でない場合があり、さらにロットによっても差があるものもある。

市販のELISAキットで信頼性を保証する場合は、検量線に用いる標準物質の品質が適切に管理されている必要がある。

標準物質が適切に管理されていないと、精度管理を行ってもあまり意味はない。標準物質が適切に管理されていれば、この標準物質を用いて、精度管理用のQC試料を作製し、データの信頼性を評価する。



本日の内容

①薬物 (Drug) 濃度測定でのQ&A

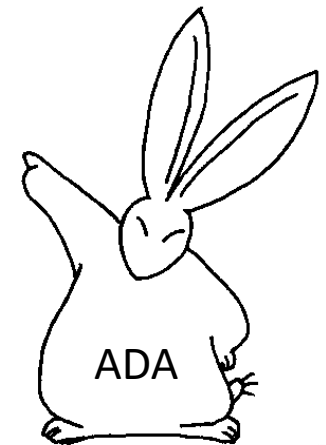
- a. 分析法の開発、b. バリデーシヨンの実施、c. 実試料の分析
- d. LBAに関するガイドラインの内容、e. その他

②抗薬物抗体 (ADA) 測定でのQ&A

- a. 陽性対照の作製、選択及び安定性、b. ブランク試料の選択
- c. カットポイントの設定、d. 中和抗体の検出法

③バイオマーカー (BM) 測定でのQ&A

- a. 標準物質の選択、b. マトリックスの選択、
- c. バリデーシヨンの実施項目、d. その他



ADA: 陽性対照の作成、選択及び安定性

Q11: どのような陽性対照が適切か？ ポリクローナル抗体？
モノクローナル抗体？ モノクローナル抗体の混合？

A11: ADAでは、一般的に、陽性対照を用いて測定試料が陰性や陽性かを評価していない。個体別の背景値を基に算出したカットポイントで評価するため、陽性対照は参考値となる。

陽性対照は薬物と反応すれば、感度以外の反応性等についてはあまり要求されない。ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも良い。ただし、実際に産生される抗体はポリクローナル抗体なので、評価するにはポリクローナル抗体が良いかもしれない。

中和測定も実施する場合は、モノクローナル抗体では中和活性がない場合もあり、ポリクローナル抗体が良いかもしれない。ただし、ポリクローナル抗体でも中和活性がない場合もあるので、事前に確認が必要。



ADA: 陽性対照の作成、選択及び安定性

Q12: 陽性対照の安定性の評価は、力価が妥当か、シグナルが妥当か？

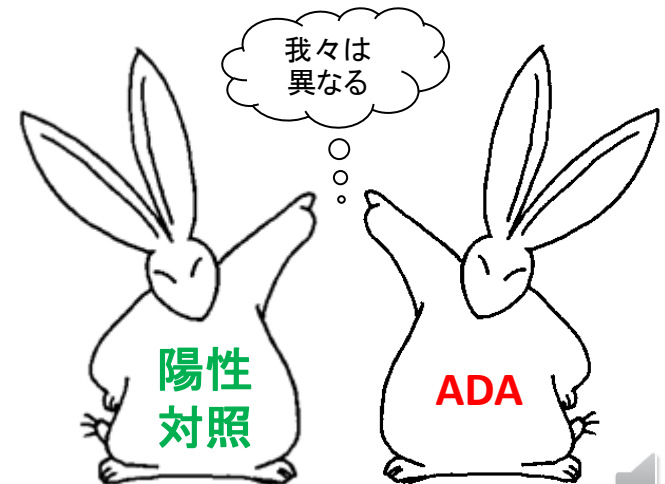
そもそも陽性対照の安定性の評価が必要か？

A12: 陽性対照は参考値であり、安定性の評価は力価でもシグナルのどちらでも問題ない。安定性を評価できる方法を選択する。

陽性対照は、測定試料(動物あるいはヒト)に含まれる抗体とは異なるものである。つまり、陽性対照は標準物質ではない。

個人的には、標準物質でない陽性対照を添加したブランク試料を用いて、測定試料中の抗薬物抗体の安定性の保証にはならないと思う。

陽性対照の安定性の評価は、陽性対照そのものの安定性を評価しているのであり、測定試料中の抗体の安定性は評価していない。



ADA: ブランク試料の選択

Q13: カットポイントを算出する個体別マトリックスの人種はどのように選択するのか？

A13: 人種については、明確にしていない場合が多い。

治験の内容に応じて、適切と思われる人種を選択する。ただし、治験では多数の試料を測定する可能性が高いので、十分な量のブランク試料を確保しておくことが必要になる。

考慮が必要なのは、人種より患者になる。適用患者によっては選択性が変化する場合もあり、患者の個体別マトリックスを準備する必要があるかもしれない。



ADA: カットポイントの設定

Q14: カットポイントを算出するためにバリデーションで用いた陰性対照が、測定期間の途中で陰性対照の種類が変更になった場合、カットポイント (Normalization factor) は同様に使用できるか？

A14: ADA測定では、多くの場合、陰性対照との差または比で陽性と陰性を判断しており、この判断となるカットポイントは normalization factor から算出されている。

この背景から、陰性対照の種類が変わった場合には、再度 normalization factor を求めるのが妥当と思われる。

現実的には、陰性対照が変更されても同じカットポイントが出るように normalization factor を変更するのが実態と思われる。

このような事態が生じないよう、長期の臨床試験の測定では、十分量の陰性対照を準備するのが良い。

ADA: 中和抗体の検出法

Q15: 中和抗体測定にinhibition assay (LBA)と比較して低感度、低精度のcell based assayが推奨されていることに疑問を感じる。測定対象の性質に適した手法を選択すべきと思う。

A15: 個人的には、測定対象の性質に適した手法で良いと考えている。ただし、生理的な条件での中和を考えると、cell based assayが妥当かも知れない。LBAによる方法で、生理的な条件と同等であれば、inhibition assayでも評価できると考えている。



本日の内容

①薬物 (Drug) 濃度測定でのQ&A

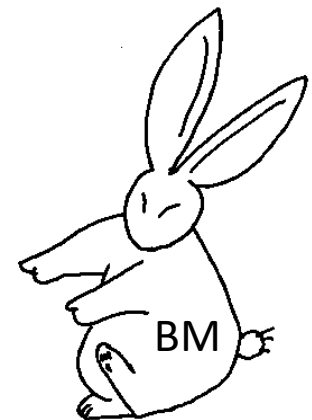
- a. 分析法の開発、b. バリデーシヨンの実施、c. 実試料の分析
- d. LBAに関するガイドラインの内容、e. その他

②抗薬物抗体 (ADA) 測定でのQ&A

- a. 陽性対照の作製、選択及び安定性、b. ブランク試料の選択
- c. カットポイントの設定、d. 中和抗体の検出法

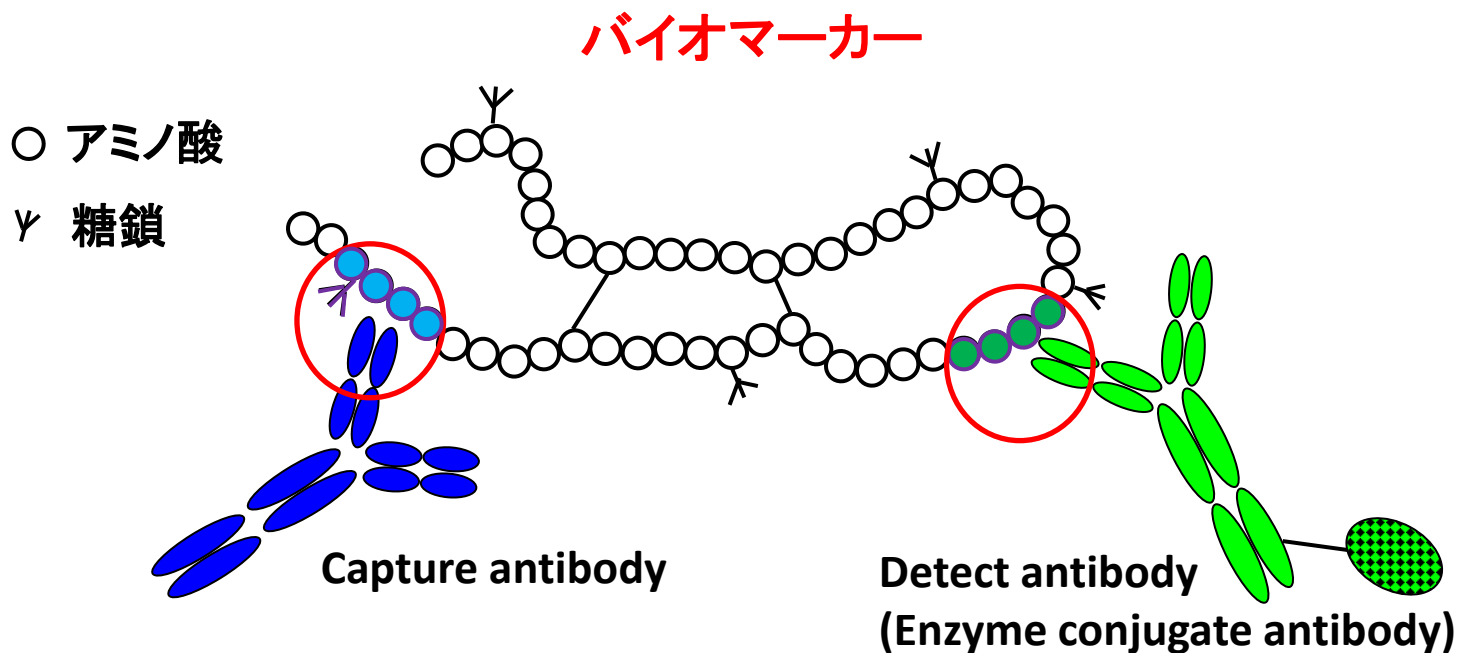
③バイオマーカー (BM) 測定でのQ&A

- a. 標準物質の選択、b. マトリックスの選択、
- c. バリデーシヨンの実施項目、d. その他



バイオマーカーの分析

リガンド結合法を用いたバイオマーカーの分析では、バイオマーカーの一部の配列を認識する重要試薬を用いて分析する。



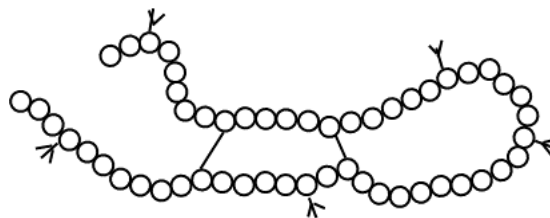
BM: 標準物質の選択

Q16: Universal standardがない場合や品質が適切に管理された標準品が存在しない場合はどう対応するのか？

A16: 市販品があれば、これを使う。市販品がない場合は、遺伝子配列が分かっているものが多いと思われるので、合成する。合成したものと実際の物では、反応性が異なる場合もある。可能ならCHO細胞など、糖鎖が付加されるようなものの方が良いかも知れない。

生体試料から標準品を精製するのが最も良いが、物の絶対量が少ない場合が多く、現実的ではない場合が多い。

いずれの場合も、ロット間差が大きい場合があるので、各ロットの反応性の確認が必要である。



BM: 標準物質の選択

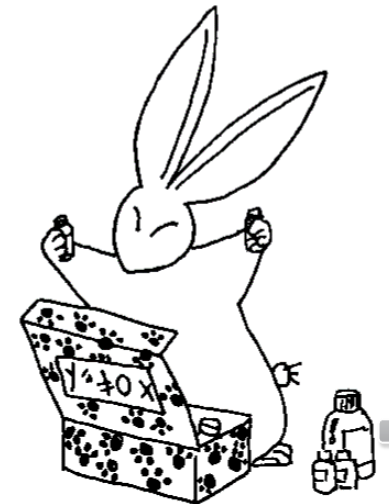
Q17: 市販のELISAキットの標準品でもよいのか？

ELISAキットの標準品は内因性バイオマーカーと同じでない場合（ペプチドなど）があるが、それでもよいのか？

A17: 目的に応じてどのような標準品が妥当かを考慮する。キットの標準品にはいろいろなものが使われており、キットの製造メーカーに標準品の内容について確認するなどの対応が必要。

測定するバイオマーカーに特徴的な配列であれば、ペプチドでも使用できる。ただし、ペプチド以外の配列に活性部位などがあれば、活性の有無を区別できない場合もある。

市販のキットを用いる場合は、キットの標準品がどのようなものであり、重要試薬が標準品のどこを認識しているかを事前に確認する必要がある。

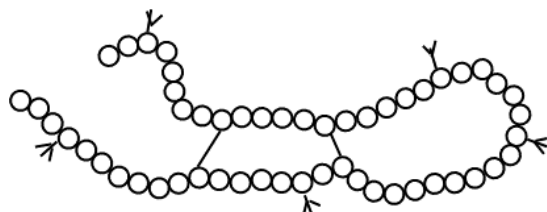


BM: 標準物質の選択

Q18: LC-MS/MSでは合成ペプチドが標準品として問題なく使用できても、作製するメーカーや製造ロットが異なると、LBAでの反応性が異なることを経験している。どのように対処すべきか？

A18: 重要試薬が認識している部位が、製造過程で何らかの変化が生じている可能性がある。重要試薬の認識部位に変化が生じないような製造が必要になるが、これの調整は難しい。

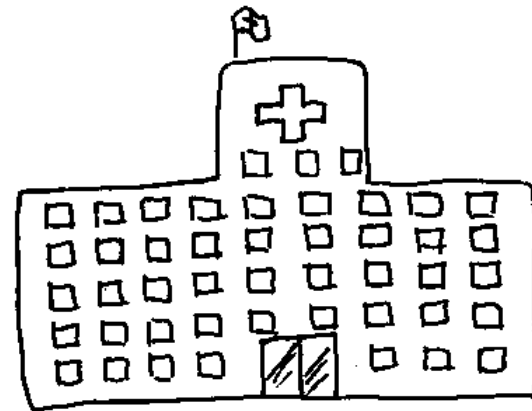
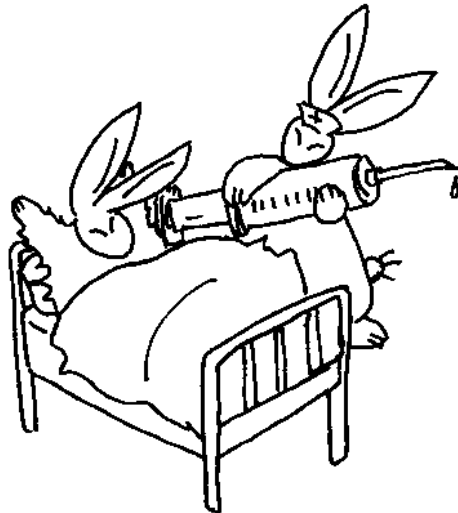
合成品では糖鎖がないので、これが影響していることも考えられる。遺伝子組換えによる作製に変更するなどの対応が必要。また、CHO細胞などの糖鎖の付加が可能な細胞での作製も必要かもしれない。なお、これらの方法で完全に解決しない場合も想定される。



BM: 標準物質の選択

Q19: バイオマーカーの測定では、健常と病態に差が認められれば良いので、絶対値は重要か？

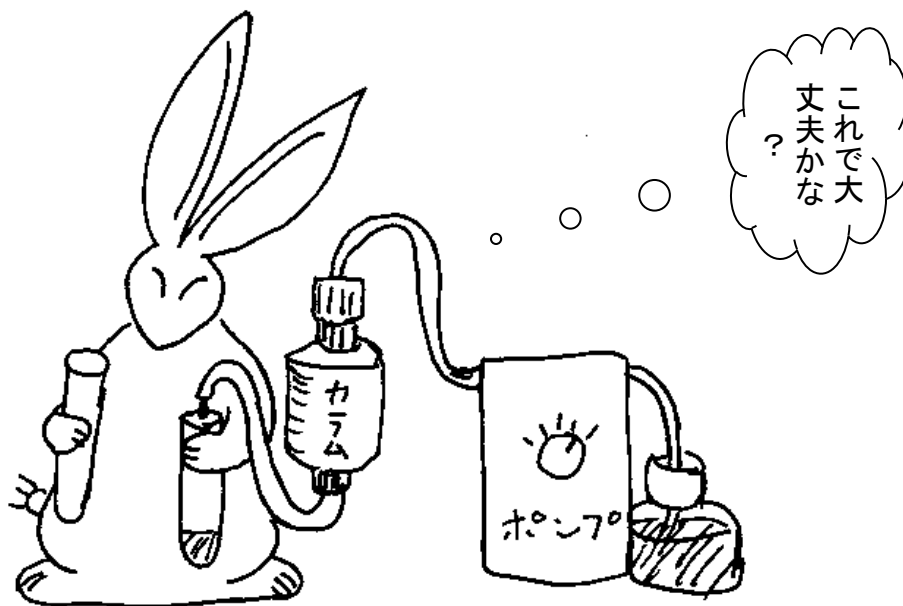
A19: 測定目的や開発段階に応じて、相対値で良いのか、絶対値が妥当なのかを考える必要がある。これらに応じて、適切な標準品を用いて、相対値あるいは絶対値を求める。バイオマーカーの測定目的や開発段階に応じた定量を行う。



BM: 標準物質の選択

Q20: 測定対象物質が含まれないマトリックスの調製が難しい場合は、LC-MS/MSでは安定同位体標識標準物質を使う定量も用いられると思われるが、LBA法ではこれに相当する方法はないか？

A20: LBAでは、LC-MS/MSでの安定同位体による測定のような方法は現状ないと思う。よって、代替マトリックスを用いるか、目的のバイオマーカー(分析対象物質)を抗体結合カラムで除去するなどの方法が考えられる。



BM: マトリックスの選択

Q21: 代替マトリックスとして有機溶媒をそのまま使う文献をみかけるが、本来のマトリックスの組成に似せる必要があるのではないか？ ブランク試料にBMの分析対象物質が含まれる場合、マトリックスは何がよいか？

A21: 測定方法によるが、LBAの場合、試料をそのまま測定（希釈を行う場合が多い）するので、代替マトリックスとして有機溶媒等は適さない可能性がある。

代替マトリックスとして、アルブミンやカゼインを含む緩衝液を用いる場合がある。内因性物質を含む測定試料にBMを添加し、代替マトリックスで調製した検量線を用いて、添加したBMの真度を確認する（真度の算出方法は、LBAガイドラインのQ13&A13参照）。

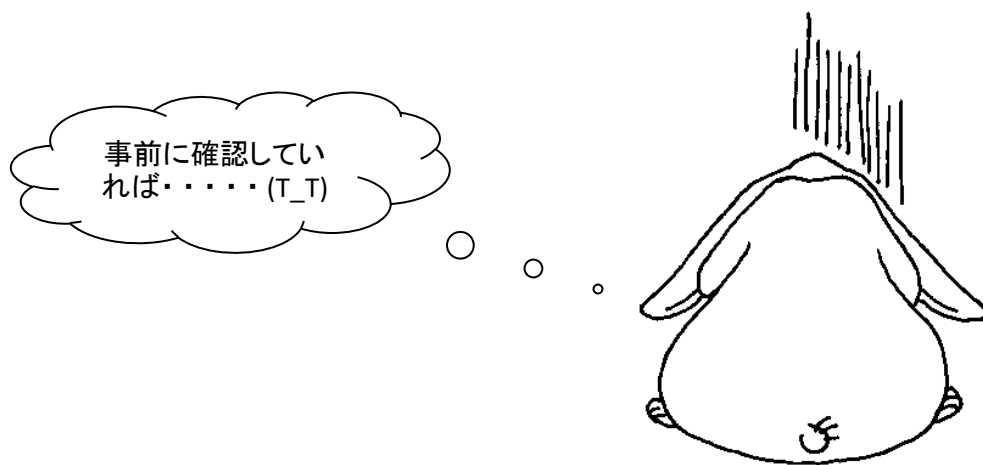
上記以外の方法として、抗バイオマーカー抗体結合カラムでバイオマーカーをマトリックスから除去したものを使用する。

BM: その他

Q22: 特異性の担保は必要か？

A22: 特異性の担保は、LBAでのバイオマーカー測定で非常に重要である。特異性が不十分なまま測定すると、最終的に測定していたものが異なっていたという事態になる。事前に十分な確認が必要である。

測定している物質をLC/MS等で確認するなどの対応も必要になる場合もある。LBAでは検出できるのに、LC/MSでは物がないということもあるかも知れない。

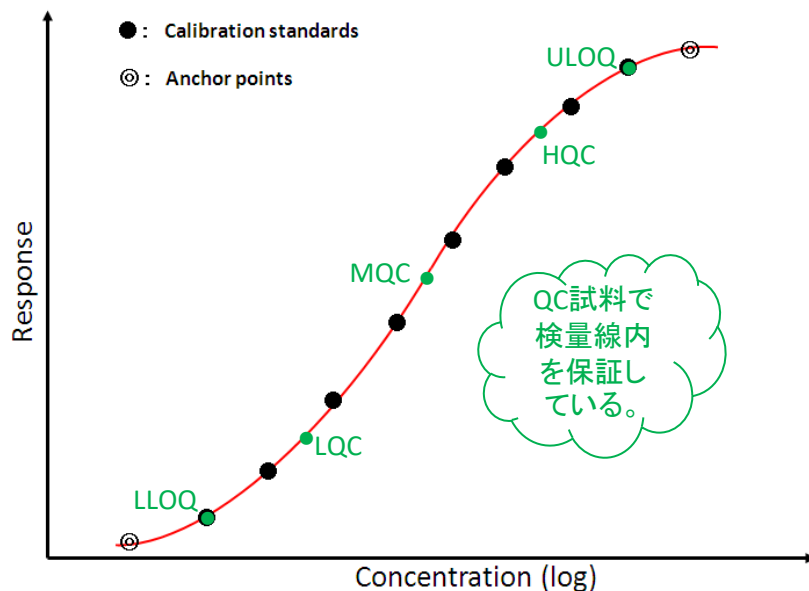


BM: バリデーションの実施項目

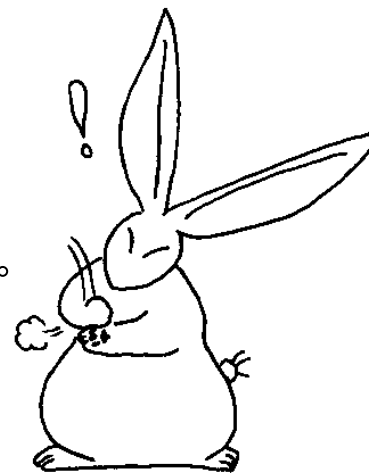
Q23: 内因性物質の定量は検量線のどの付近で測定するのが適切か？

A23: LBAでは希釈して測定することが多く、検量線のどの付近が適切ということはない。

測定系の感度やダイナミックレンジ等(検量線の範囲)に応じて希釈して対応することになる。



希釈するから
どこでもよし。



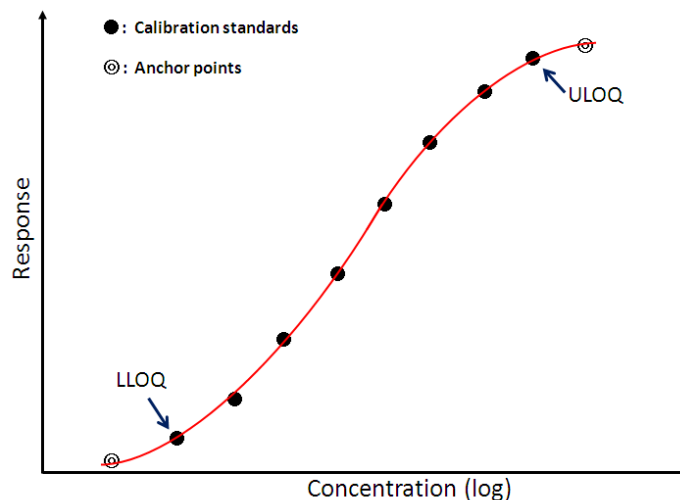
BM: その他

Q24: バイオマーカーの定量法バリデーションの評価基準は、薬物測定の本ガイドラインの評価基準と同じでよいか？

ベースラインから30%前後の変動を評価するのに同じ程度のばらつきを有する定量法を使うのは抵抗がある。

A24: バイオマーカーを測定する目的や開発段階に応じて、評価基準を決める。薬物測定の本ガイドラインに拘る必要はない。

質問のような場合(ベースラインと同程度のバラツキ)には、適切な測定方法や基準を設けて対応する。

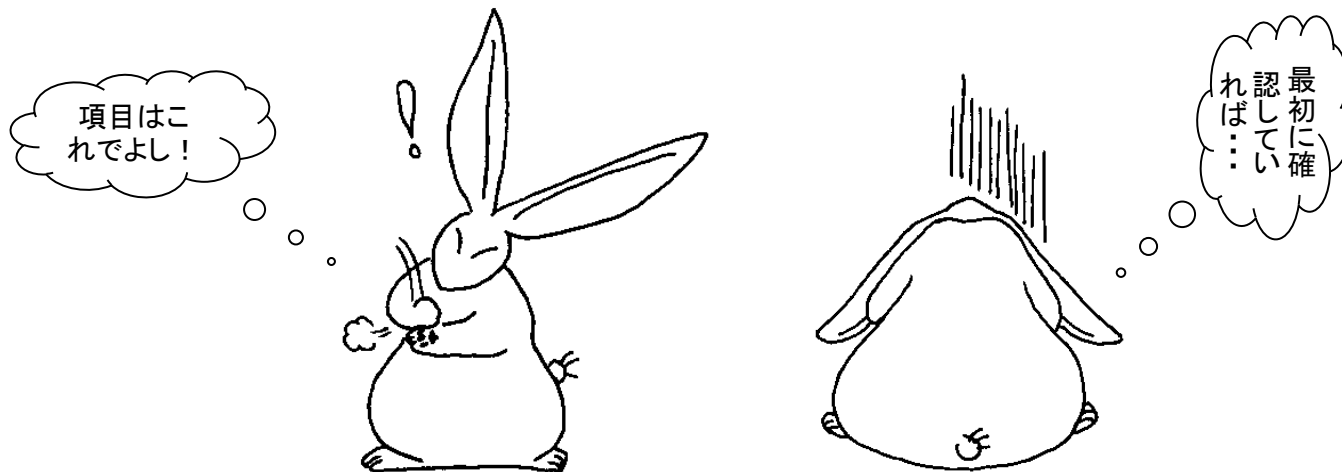


BM: その他

Q25: バイオマーカーの測定は、LBAガイドラインには従わなくてよいとなっているが、その場合最低限どの程度のバリデーションが必要か？

A25: バイオマーカーを測定する目的や開発段階に応じて、バリデーションの項目を決めることになる。また、定性や擬似的な測定の場合は、最低限の項目が良い。

特異性は最初に確認する必要がある。後日確認して、特異性に問題があれば、結果そのものが使えなくなる場合もある。



「LBAを用いた測定法についてのQ&A」

ご清聴ありがとうございます。

ご質問等



別途メールでも受け付けます： nakamura.takahiro@snbl.com