

JBF質問箱 質問と回答

クロマトグラフィ

番号	質問	回答
C1	血漿中の内因性物質をLC-MS/MSで測定しております。 測定対象は非常に低濃度なので、血漿をマトリクスとした検量線よりも代替マトリクスを用いた検量線の方が良いと判断しておりますが、代替マトリクスとして、数%アルブミンを使用した際のピーク面積値が血漿を使用した際のピーク面積値（ブランクに含まれるピークを差し引いても）よりも明らかに低い結果です。このような場合は、どのような対応をとるのがよろしいでしょうか。前処理としては、単純で、マトリクス+標準溶液+IS（アセトニトリル）で除蛋白処理のみです。	内因性物質がタンパクなのか、脂質なのか、低分子なのか等で考慮することは変わってきます。文面から低分子なのではないかと推察し、考慮すべきことを述べます。 ①アルブミン溶液だと、血清脂質やリポタンパクまでは模していないため、血漿ではこれらと相互作用して浮遊しているが、アルブミン溶液では容器に吸着している可能性を考える。容器・器具を低吸着タイプに替える、分析対象物質の物性を考えて溶けやすい溶媒系に替える（有機溶媒濃度を上げるなど）、などを試してピーク面積値が増すかを確認する。 ②アルブミン除蛋白の際に、沈殿蛋白に巻き込まれていないかを考える。例えば除蛋白の溶媒アセトニトリルをメタノールに替えてみる。 ③イオンサプレッション/エンハンスメントを評価する。アルブミンによるイオンサプレッションが疑われる場合、アルブミン濃度や種類が適正かを検討する。あるいは、アルブミンを使用せず水やPBSにしてみる（水やPBSが血漿を反映するならそれでよい）。逆に、血漿でイオンエンハンスメントがある場合は、代替マトリクスのレスポンスが正しい可能性があるので、血漿のイオンエンハンスメントを除去できる前処理を再考する。 ④原因特定困難で、ある程度血漿成分がないと吸着する化合物の場合、血漿中の内因性物質が測定に影響しない程度まで血漿を希釈したものを代替マトリックスとする。また、最終的には面積値に多少差があっても、測定目的に対し影響を与えない差であれば許容できるので、その観点も考慮すべき点です。
C2	LC-MS/MSでの連続分析時に、感度が大きく変動していく場合がありますが、定量性が保たれていれば 問題なしとして判断して良いのでしょうか。それとも、感度が安定になるように対策をとった方が良いのかご教示頂けたらと思います。 感度の安定化が必要な場合、例えば、内標準物質の感度を基準にどの程度の感度変動を許容範囲として 設定すれば良いのでしょうか。加えて、もしある分析系でその許容範囲におさめる事が難しい場合、その分析系でのみ感度変動範囲を変更する事は問題ないかご教示頂けたら幸いです。	基本的に、安定同位体標識の内部標準物質（SIL-IS）を用いることにより、かなりな部分の変動要因は補正できると思います。しかし、①その感度が大きく変動する要因が、試料の前処理によるのか、MSのイオン源の汚れによるものなのか、イオン化を阻害する物質の影響がLCで排除されずその変動が感度として現れるのか、②変動が傾向をもってdriftしているのか、ばらついているvariabilityなのか、により対応も変わってくると思います。今回、「変動して『いく』」とのことなので、driftに重点をおいて回答します。 そのメソッドにおいて常に変動（典型的にはdrift）する場合については、感度が安定な方が定量もロバストなので、改善した方が良いと思います。水系移動相の割合が多い系でMSの熱安定が確立できず感度が一方向に変動し、移動相を流さない時間を長めにとるサイクルにして熱のバランスをとった事例があります。MSのイオン源の汚れによる場合は、汚れが少ない前処理に見直す、イオン化を阻害する物質の影響がLCで排除されずその変動が感度として現れる場合は前処理（阻害の除去）とLC条件を見直す、などが考えられます。どうしてもdriftしてしまう場合の許容範囲の参考として、ある人の個人的経験則のレベルで、1/2～2倍までに抑えたいとのコメントが得られています。極端に大きく変動するとSIL-ISでも（同位体効果などで？）定量がズレる可能性が否定できないそうです。特定の測定系に限定していつもdriftが起こる場合、前述のように何とか改善できないかの検討が望まれますが、難しい場合は、batch sizeを管理しつつ、得られた定量性を根拠に妥当性を言う方法も考えられます。また、下記のvariabilityにおいて、50-175 or 200%の基準が用いられていることも参考にすると、drift幅についても同様の幅を判断基準に考えてよいかもしれません。 特定の測定バッチに限定的に、変動（典型的にはvariability）が見られた場合は、変動（IS variability）の程度により問題と捉えるかが分かりますが、その範囲は可能ならSOPで定めるのが望ましいと思います。 IS variabilityに関しては以下が参考になります。 Bioanalysis (2014) 6(20), 2767–2774、Bioanalysis (2020) 12(8), 545–559、DG2016-20：Scientific Validationについて考える（2） IS variabilityの基準としては、FDAのEvaluation of Internal Standard Responses During Chromatographic Bioanalysis: Questions and Answers, Guidance for Industryを基に、添加試料平均の内部標準物質の面積値平均を基準として、50-175 or 200%を基準とする会社が多い印象です。 Variabilityが大きくなる原因として、操作の誤り、前処理回収率のばらつき、その分析時の装置コンディション（MS内部の汚れによる不調、LCカラム劣化によりイオン化を阻害する物質の影響がLCで排除されない）なども考えられるため、必要に応じ問題のinvestigationが必要です。 なお、drift、variabiityともに、ISがSILであり、実検体に近いマトリックスでマトリックス効果を確認（マトリックス効果によって感度変動している可能性を排除）すれば、変動があっても定量性に問題ないとの説明はしやすくなると思います。

クロマトグラフィ（続き）

番号	質問	回答
C3	LC-MS/MSでの測定時、計画書（申請用試験）には解析メソッドを規定されていますか？ 規定されている場合、事前に設定したベースの変動等で解析が全体的にうまくできないケースでは初回解析後、すぐに再解析となりますか？ それとも適切な解析パラメータに変更してから初回解析としていますか？ また、報告書（申請用試験）にも解析メソッドを記載しているかについても、教えてください。	多くの施設で解析メソッドは計画書・報告書（申請用試験）には記載していないと思います。 解析メソッドの管理には様々な考え方がある状況です。一つの考え方として、申請用試験ではベースの変動で左右されるほどギリギリを攻めた波形解析の設定を行わず（LLOQは感度に余裕を持って設定する）、途中で解析メソッドを変えることをほとんどしない運用もあります。別の考え方として、LC-MS/MSの機器の状態はValidation時や前試験から変化することは充分考えられるため、測定法再立ち上げのときに測定時の状態に合わせた最良のパラメータを設定し（再立ち上げの経緯を生データに残す）、それをその試験で用いるのが、より信頼性の高い結果のためにはよいという考えもあります。この場合、当局が解析パラメータに対して疑義があれば、申請後に問い合わせが来るので、それに対応できる準備をしておけばよいと考えます。 これらのメソッドの管理自体とは別に（上記いずれも、理想的に管理できていれば再解析に至りません）、ご質問にあります「再解析」の扱いについては、基本的に文字通りの初回解析が初回解析となり、解析パラメータ変更後解析は再解析として取り扱う必要があると思います。
C4	背景： 内因性物質のLC/MS/MS測定について、検量線は代替マトリックス（水）で作成予定です。 QCは、生体マトリックスを使用し、添加試料と非添加試料を調製予定です。 内容： 生体マトリックスの内因性濃度が高いことが判明し、検量線の中～高濃度付近になることが予想されます。低QC、中QC試料は、生体マトリックスを代替マトリックス（水）で希釈することを考えていますが、低QCではほぼ水になりそうです。ほぼ水になるまで希釈した生体マトリックスを、QC試料として使用するのはいかがでしょうか？ 内因性濃度が高濃度のときのQC試料（3濃度）の調製方法をご教示ください。	（内因性物質でもある薬物の場合）薬物の場合ですが、ICH-M10の内容も参考に、やや保守的に記載します。QC調製の前に、内因性濃度が高いとわかったところで、定量範囲設定とマトリックスロット選定を見直す必要がある可能性があります。不必要に低濃度まで測定する必要はそもそもなく、薬物であれば投与後の追跡として、意味のある濃度が十分観察できる（本試験で予測される最低濃度の少し下まで見える）系をつくり、可能ならそれより低いマトリックスロットを見つけてくるのが理想です。内因性が食物由来の場合は個人別でマトリックスを集めるのも有効で、周期があるもの（内分泌）、加齢が影響するもの、病態が影響するもの（脂質）など、性質に応じてマトリックスを探します。これら検討した結果、まだ希釈が必要であれば、代替マトリックスによる希釈は可能と考えます。 （バイオマーカーの場合）バイオマーカーの場合、状況により低QCを代替マトリックスとする対応は行われますので（例えばDG2015-15の報告 http://bioanalysisforum.jp/images/2016_7thJBFS/05_DG2015-15_HP.pdf ）、ほぼ水（=代替マトリックス）となること自体に問題はないと考えます。 （QCについて）QC試料は、実試料の測定の信頼性を担保するものですので、実試料のマトリックス組成に同じ若しくは近いことが理想です。測定対象の内因性物質の物理化学的性質、および生体マトリックス中の化合物（アルブミン等）との相互作用を充分考慮に入れ、決定されることをお勧めします。水を検量線に用いられるとのことで、特に共存するたんぱく質との相互作用はそれほど重要ではないのかもしれませんが、実試料の構成成分を考慮に入れ、BSA等を用いたbufferで希釈するのも手かもしれません。
C5	LC/MS装置の定量解析ソフトで検量線を描かせて、定量値を求めている場合に、そのソフトが正しい値を返しているかどうかは規制上、何かしら担保する必要がありますでしょうか？ それともそこまでは求められないと考えてよいのでしょうか？ また、もし担保する必要がある場合は、どのような方法で担保するのが良いのでしょうか？ CSVなどで検証が良いかとは思いますが、検証に費用が掛かってしまうため、より簡易的に担保できる方法があればご教授いただきたいです。	規制上の考え方としては、各社の使用方法に対して正しく期待通りの動作をしているかの評価がCSVであり、これによってソフトが正しい（期待通りという意味で）値を返すことを担保することになります。ご質問が計算の正確性を自ら確認すべきかということでしたら、実績のあるソフトについて計算内容を検証することまでは期待されていないと考えますが、申請に用いる定量値を算出するソフトウェアにはCSVが必要であると考えます。CSVは、ベンダーに委託して高額なCSVを行ってもらうことを必須とするものでなく、少し知識が必要になりますが、例えばメジャーなLC/MS装置の定量解析ソフトであれば、機能が使用方法に合っているかを記録し、ベンダーによりまたは自らIQ/OQを実施し、自社で何かしらのPQを実施していれば、規制上特に問題になることはないと考えています。 以下のPDFの24枚目も参考になると思います。 http://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/t-dg/JBF_t-DG_LCMS.pdf
C6	抗体のLC-MS測定について、探索初期段階における分析法のverificationとして、どこまでの真度・精度を求めればいいのか悩んでおります。 例えば、真度・精度、選択性などの基準はどこまで許容しても問題ないのでしょうか？	御社の中で、その探索初期データをどのように用いて、次のステップに繋げるかに大きく依存すると思います。 本件は各社各様の考え方であると思います。 一つの考え方として、EBFのTired approachを参照してみてもよいかもしれません。 https://www.e-b-f.eu/wp-content/uploads/2018/06/bcn2015-D3A2_4-Philip-Timmerman-web.pdf ヒト抗体をLC-MSで分析する場合、Universal peptideを用いて測定するケースが多いと思いますが、あまりばらつくことはないと思いますのでその場合は15%ルールを適用してもいいと思います。ただし、15%ルールを外れた場合であっても必ずしも再測定までは必要ではなく、得られたデータの重要性によって対処すれば良いと思います。一方、動物型抗体を投与した時にはCDR領域の特異的ペプチドを選択するため、必ずしも真度や精度が良好とは限りません。その場合もデータの重要性を考慮して、その分析法を採用するかどうか決めるべきだと思います。

クロマトグラフィ（続き）

番号	質問	回答
C7	探索段階時の動物試験において、LC-MS/MSによる血中濃度測定のカリテリアをどの程度にすれば良いか悩んでおります。 検量線、QCサンプルの真度や、再測定サンプルの採用基準は各社どのくらいに設定しているのかご教示いただけると幸いです？ やりすぎず、緩めすぎずの塩梅が知りたいです。	御社の中で、その探索初期データをどのように用いて、次のステップに繋げるかに大きく依存すると思います。 本件は各社各様の考え方であると思います。 一つの考え方として、EBFのTired approachを参照してみてもよいかもしれません。https://www.e-b-f.eu/wp-content/uploads/2018/06/bcn2015-D3A2_4-Philip-Timmerman-web.pdf 自社の状況を一事例として挙げますと、探索段階の真度は20%を基準にしています。ただ、低分子に対して20%ですと異常フラグが立たない印象はあります。DG2016-20で2016年に国内企業対象に実施したアンケートでは、開発初期において非臨床では20%が大勢を占めていました。 探索ステージでどこまで分析法の完成度にこだわるかは、得られるデータの利用目的に依存すると思います。自社の場合、真度、精度の目標の目安は15%としていますが、探索段階ではそこから外れたとしても大きな判断を見誤ることはないので再測定を実施することはほとんどありません。明らかに分析にミスがあった場合のみ再測定することにしています。
C8	LC-MS/MS測定において、イオン化されにくい低分子化合物の対応方法や、その対応方法（検討する優先順位）についてご教示いただけると助かります。	化合物の構造にもよりますが、簡単に試せるところとしては移動相の有機溶媒を変える（有機溶媒種やpH、塩の種類や濃度）、ポストカラムでイオン化を促進するような移動相を入れる、イオン化法を変える（ESIからAPCI）など。少しMSやLCの条件をふってほとんど改善が見られないようであれば、誘導体化を検討するのも良いと思います。 化合物がイオン化されにくいケースのご質問だと思うので、概念としては誘導体化が一番だと思います（安定して出来る反応があれば）。もし「イオンが得にくい」のであれば、その理由を考え、少しでも解消する方に持っていく（例えば両性イオンができるのであればpH最適化やイオンペアの使用を考える）ことも選択肢になると思います。
C9	LC/MSの実試料測定にて、ULOQを超えた検体があった場合の対応について、ご教示ください。 ・ULOQをわずかに超えた場合 ・ULOQを○倍超えた場合 ・ULOQをかなり超えた場合（相当濃い検体を測定してしまった） 上記のようなケースにおいて、ULOQを超えた検体のすぐ後の検体の定量値への影響の有無について、様々な考え方があると思います。弊社は、僅かにULOQを超えた場合でも、次のサンプルへの影響は否定できない（バリデーションではULOQのキャリーオーバーのみ評価）とし、ULOQを超えた検体の次の検体を再注入し、定量値を確認するケースがございます。 例えば、直前の検体がULOQの2倍であっても、個人的には次の検体の定量値に影響があるは考えておらず（次の検体がLLOQ付近でない限り）、毎回該当検体を再注入（ULOQを超えた検体が多数あると、その分再注入も増える）するのも手間だと思っており、弊社内で対応を考え直してみたいと思っております（JBF質問箱のご回答も、参考にさせて頂きたいと思っております）。 ・測定終了後、そのバッチ内でULOQを超えた検体があった場合、最も高濃度の検体を検量線LLOQ・ブランクと共に再注入し、キャリーオーバーの有無を確認する ・バリデーション又は検体測定試験において、想定される高濃度試料を用い、影響ない濃度を事前に検証しておく ・ULOQの○倍の検体があった場合、次の検体を再注入して定量値を確認する（○倍の根拠はないが、SOP等で規定しておく） など、対応策をいろいろ考えております。 JBFでのご見解がありましたら、ご教示いただければと存じます。	コメント①バリデーションで、キャリーオーバーの可能性について事前評価は可能と思います。もし、キャリーオーバーは疑われる場合、もしくは極端に高い濃度値が認められる場合は、それぞれの測定ランで、HQC後にブランクサンプルを測定することによって、その測定ランの理論的キャリーオーバーが算出できます。その理論的キャリーオーバーを用いて、高濃度サンプルの次のサンプルへの影響を推定できることになります。その影響が、その次のサンプルの測定値の例えば20%を超えるようなインパクトがあると判断される場合に、そのデータを棄却し、再測定することを、SOPや測定計画書に明記し実施していくことは可能と思います。 HQCの次のブランク検体でLLOQの20%未満というのは、あくまでも目安であり、その基準を満たせば実サンプルの測定では、まったく目をつぶって測定してもOKということにはならないと思います。 コメント②ご質問の取り扱いの背景として、ULOQを超えた場合、超高濃度まではレスポンスの直線性が確認されていないので、キャリーオーバーの定量的推定も難しいということがあると思います。保守的に考えると、その通りではあるのですが、実務への落とし込みでここまで保守的であるべきか疑問ではあります。基本的に、キャリーオーバーは率で考えて良いと思います（たとえばZeng W, Musson DG, Fisher AL, Wang AQ. A new approach for evaluating carryover and its influence on quantitation in high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry assay. Rapid Commun Mass Spectrom. 2006;20(4):635-40. doi: 10.1002/rcm.2353.）。①基本スタンスを変えないなら、ご提案の方法のどれか。②測定法の予備検討中に、より広い定量範囲を検討しているなら、その結果を考慮して（根拠は報告書レベルで明文化せずとも試験責任者判断にて）個別対応する。③人為的取り決めとキャリーオーバー率使用の合わせ技（例えば、一般にULOQの2倍までは直線性があると考え（無ければ頑健性が不足するから）、ULOQの2倍までの場合、次サンプルの濃度がLLOQの2倍以上なら再注入不要とする旨をSOP化）。などが考えられると思います。問題意識と効果を考え、効果的な方針を選択すると良いのではないのでしょうか。

クロマトグラフィ（続き）

番号	質問	回答
C10	血漿中濃度を測定する際の検量線用標準試料及びQC試料の調製方法について、下記のような方法が可能なのかお教えいただきたいです。 →ULOQより高濃度の実試料を希釈して測定する場合は希釈の妥当性の評価が必要ですが、下記のケースではこの手順で妥当性の検証は十分でしょうか。もしくは、検量線用標準試料やQC試料はブランク血漿に適宜希釈した標準溶液を添加して調製すべきでしょうか？ 検量線用標準試料はブランク血漿に標準原液を添加してULOQより高濃度の血漿試料を作成し、この血漿試料をブランク血漿で段階希釈して8濃度の試料を調製。 QC試料も同様にULOQより高濃度の血漿試料を作成し、この血漿試料をブランク血漿で段階希釈してHiQC、MeQC、LoQCを調製。 検量線とQC（真度および精度）が基準を満たすことで調製方法及び各試料中濃度の妥当性を検証する。	未知検体のCmaxを超えるDilution QCを調製し、実測定の最大Dilution Factor若しくはそれを超えるDilution factorでの評価が基準を満たすことが必要と考えます。 標準溶液は一番確実に希釈できる溶媒を用い、それが定量の基準になり、それを元にしてマトリックス希釈時の希釈妥当性を確認する、という評価の建てつけになっていると思います。原則的には検量線用標準試料は適切に希釈できた標準溶液を使って調製すると思います（通常、原液が水または有機溶媒で調製されるため、類似の組成の標準溶液となることが多い）。ただし、（吸着のため）血漿希釈が最も希釈直線性が良いために血漿希釈検量線になった事例もあり、この場合はご提案の形にならざるを得なくなっています。ただし、ご提案の形は検量線・QC試料（HML）調製用の希釈率での操作であるため、希釈評価用には、評価すべき希釈率・濃度（ULOQより上から1回希釈で定量範囲内に持ってきて、検量線で定量）での評価が必要です。 場合により血漿希釈した検量線を用いることはあります。その場合、その濃度を超えるDQCを調製して希釈妥当性が確認できれば、ある程度の信頼性は担保できると考えています。
C11	C10のように、血漿希釈した検量線・QC試料を用いる場合で、実試料は低濃度が想定されて希釈操作が発生しないときの希釈妥当性の評価の必要性について、ご意見お聞かせいただけますでしょうか。 検量線とQC（真度および精度）が基準を満たすことでは不十分で、DQCを調製して希釈妥当性の評価が必要でしょうか。	実試料ですべての測定値がCalibration curveの定量上限を超えないことが証明できれば、DQCを調製しての希釈妥当性の評価は不要と考えます。 今回、水や溶媒希釈でなく血漿希釈であるので、血漿希釈の妥当性が気になると思いますが、「血漿で確実に希釈できるのか」ということを、バリデーション試験の中で評価する必要はないと考えます。希釈に用いる水あるいは有機溶媒と同列に「希釈するmedia」として血漿が用いられる理解で、この意味で確実に希釈できるかは（どの希釈溶媒を選ぶのかと同様に）予備検討で解決されるべきものと捉えています。ただし、最高濃度の血漿試料が問題なく作成できているかは予備検討で確認が必要と考えます。例えば、検量線の低濃度～中濃度程度の血漿QCを直接調製して、真度の基準を満たすか等です。 なお、開発の初期は臨床投与量や実際の測定値もはっきりと予想できないこともあるため、念のためにバリデーション項目として実施しておくという考え方もあるかもしれません。また、実施者の判断でバリデーション項目をその薬剤の開発の進行に従って追加していくという考え方もあると思います。

LBA

番号	質問	回答
L1	非臨床や臨床での抗体濃度測定において、血清試料又は血漿試料のどちらを使うか、選択基準をお教えいただけますでしょうか？ 測定時の必要量や分析感度等でしょうか（サルやヒトでは十分量の採血ができるので血清を用いている例が多い？）。	非臨床や臨床での抗体（開発品）濃度測定に適する試料（血清や血漿）は、以下のことを考慮して決定するのが良いと思います。いずれの場合においても、非臨床と臨床での試料の種類は同じにしておいた方が良いと思います。 ○安定性：開発品が抗体の場合、一般的に安定ですので血清を用いることが多いですが、血漿でも問題ありません。ただし、同時に測定する他の対象が不安定な場合は、血漿を用いる場合もあります。 ○測定系：血清は血漿と比較し、夾雑する物質が少ない血清を使う場合が多いです。特殊な測定系で抗凝固剤が測定系に影響を及ぼすかを考慮する必要があります。LC/MSで消化断片ペプチドを測定する場合は、血清の方が夾雑物が少ないので適する場合もあります。 ○必要量：抗体濃度測定に使用できる試料の量が少ない場合は、他の測定項目に試料の種類を合わせる場合があります。 ○臨床現場：臨床では血清採取・分離を受け入れにくい施設があります。また、臨床では他の測定項目を多数実施する場合がありますので、これらを考慮して、試料の種類を決定します。
L2	キットを用いたLBAで投薬物質の純度情報が明確でないため、希釈直線性の評価が出来ない状況にあります。 このため、投薬物質を段階希釈し、キットの検量線を用いて測定し、測定値（濃度）が希釈段階に対応して変化するか確認しようかと考えております。 そこで質問、このような評価方法で希釈直線性評価の代わりとなるのか？ この方法で実施した場合、検量線範囲に3濃度以上入るよう試料を調製しその濃度が希釈段階に対応して変化（測定試料が1/2希釈されていれば、濃度も1/2となっている）していれば、基準を満たしたと評価して良いか？ ②の内容で良い場合、実施はn=1 or n=3？ また、n=3で実施した場合、各希釈段階ごとの平均値の評価で問題ないか？ 他の評価方法がございましたら、ご教示いただきたいです。	今回のご質問ではいくつか明確でないものもありますので、以下の条件の場合としての回答とさせていただきます。 ○測定には市販のキットを用い、検量線にはキットの標準物質を用いている。 ○投薬物質の純度は不明だが、濃度は不純物質が含まれた値である。 ○投薬物質とキットの標準物質は、構造が同一で重要試薬との反応性も同一の場合と、構造が同一でない and/or 重要試薬との反応性が異なる場合がある。 ①投薬物質とキットの標準物質が同一である場合 投薬物質を適切な濃度に調製して、キットの標準物質を用いた検量線で測定を少ないとも 3 回（理想は 6 回）測定し、得られた値から、投薬物質の純度を決定する。CMCで純度が判明するまで、この値を暫定値とすることで、本来の値との差が小さくなり、測定結果に影響はほぼない。後日CMCで純度が確定した後に、補正を行う。希釈直線性の評価はn=1で問題ありません。評価方法はキットの検量線範囲と、該当試験で予測される最高濃度と、用いる希釈倍率を勘案してデザインしてください。もし、希釈直性をn=3で実施された場合は、各希釈段階ごとの平均値の評価で問題ありません。 ②構造が同一でない and/or 重要試薬との反応性が異なる場合 キットの標準物質から得られた投薬物質の濃度を相対濃度として対応する。キットの標準物質と投薬物質とのLBAでの反応性に違いがあることは少なからず生じますので、この場合は内因性バイオマーカーの希釈直線性に準じた評価をすれば良いと思います。参考になる文献は以下です。なお、希釈直線性のみならず、平行性についても確認しておくことを薦めます。 https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/bio-2021-0173 希釈直線性の方法については、①の場合と同様で、希釈直線性の評価はn=1で問題なく、評価方法はキットの検量線範囲と、該当試験で予測される最高濃度と、用いる希釈倍率を勘案してデザインしてください。もし、希釈直性をn=3で実施された場合は、各希釈段階ごとの平均値の評価で問題ありません。
L3	薬物が二重特異性抗体のLBAを用いた生体試料中濃度分析について、非臨床試験での測定方法として、（二重特異性抗体の2つある抗原認識部位の）片側の抗原を固相化し、薬物を抗原に結合、そこに標識抗ヒトIgG抗体を結合して検出させるような測定方法は妥当なんでしょうか。 もう片側の認識部位は考慮していないため、測定方法として妥当かどうか気になっております。	ケースバイケースとしか言いようがないです。その開発品によって可能な場合とそうでない場合があると思います。 ターゲットとなる抗原が可溶性蛋白質として血中に存在するのか、その存在量はどの程度か、病態に依存してどのように変化するのか等を充分検討の上測定方法を構築されることをお勧めします。 ご質問の測定方法は対象薬物を測定する1方法ではありますが可溶性抗原の存在、抗原への親和性等を考慮し目的に対し適切な方法であるか検証する必要があります。 2重特異性のそれぞれの抗原量に偏りが大きかった場合、抗原が少ない方の特異性を利用して開発品を捕捉（capture）すると有効性がPKから予想される想定よりも低く出るかもしれません。クラスエフェクトによる毒性でも同様な事が起きそうです。どのような目的で濃度を測定する必要があるのかを理解した上で、妥当な測定系を構築する必要があると思います。
L4	Bispecific抗体の場合、各アームに対する抗イディオタイプ抗体で評価する必要があると考えますが、親和性の違いで中和に必要な量が異なる時はどのような対応をすべきでしょうか？ （別個に評価、混合して評価など）	コメント① Bispecific抗体の中和抗体に関しても、コンセンサスがある状況ではないという理解ですが、例えばmulti-functionalなBispecificではそれぞれの機能について中和活性を別個に評価する必要があるでしょうし、Bispecific抗体が全体として単独の機能(例えばt-cellの腫瘍へのrecruitとか)を生じされる場合は、Nabが結合する場所に関わらず、その薬効に関係するBMを観察できればよいと考えます。 コメント② 各アームに対する抗イディオタイプ抗体で評価することは、Characterizationであるため、個別評価は最低限行い、それ以上は Case by Case で必要に応じて実施ということになるのではないのでしょうか？ いろいろPublicationも出ていると思いますので、それらを参考にされてはいかがでしょうか？ 例： https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-022-00724-y

LBA（続き）

番号	質問	回答
L5	LBA分析での抗体分析における、分析対象（形態）についてどのように選択すべきか、お教えいただきたいと考えております。 液性抗原の場合、血清中にはフリーの抗体と抗原に結合した抗体の両方が存在していると思いますが、どちらの分析法（フリー体のみorTotal）を構築するのが適切でしょうか。 評価対象が、PKとTKで考え方は異なりますでしょうか。 また、近年、二重特異性抗体の開発も進んできているかと思いますが、例えば、液性抗原と膜結合型の抗原がターゲットの場合、分析対象をどのように考えるべきでしょうか。 フリー体の測定が必要との考えの場合、2分析法に分けて分析することが必須となるように考えておりますが、 このような考え方で問題ないかを知りたいと考えております。 ケースバイケースのところもあるかと思いますが、どのような考え方にに基づき分析法を構築すべきか、 指針のようなものございましたら、お教えいただけますと幸いです。	本件はケースバイケースですので、測定結果を解析されるPharmacokineticistやStatistician等と議論された上でのご判断になると思います。開発の初期段階では、どの測定結果での評価が適切かが判断できない場合がありますので、トータルとフリーの両方の測定方法の確立も考慮に入れる必要があるかもしれません。 別の視点では、BLAに於いて、CTDを作成することをイメージして、その薬剤の性質を最も的確に表現するためには、Free濃度が良いのか、Total濃度が良いのか、そのTargetの分子との相互作用、血中にそのTargetが存在するのかが等、Phisiologicalな条件で、どのように相互作用するのか、またそれらが病態に依存してどう動くのかを十分に検討してください。 TMDDモデルでの挙動が参考になると思いますが、free-totalの乖離がみられるケースの1つとして、PKにおける消失相の後、(可溶性)抗原と薬物の量比が近くなり非線形消失が顕在化した場合が思いつきます。このようなケースは薬効が不十分になることも多く、実際問題として薬物濃度を測り分ける必要性については議論のあるところだと思います。TKはさらに高濃度になることが多いので、freeとtotalの差が明確になるケースは少ない印象です。 測定する時点でどのようなdataが必要かに応じて測定系を判断していく必要があると考えます。(Bi-specificでも同様です。)EBFからのpresentationが参考になると思います。 http://bioanalysisforum.jp/images/2018_9thJBFS/5_2_Roland%20Staack.pdf Bi-specificでのFree体は両方のFree体を測定するのが求められるのか、片方がFree濃度がより重要なのかによってCapturing AntibodyとDetection Antibody, Neutralizing/non-neutralizingの組み合わせで種々の測定法が可能です。これらもCTDにおいて、その薬剤の性質を端的に示すには何を示すべきかをPharmacokineticistやStatistician等と充分議論されることをお勧めします。
L6	LBAにおけるエッジ効果がどうしても除去できません。インキュベーション温度の変更、別機器（インキュベーター、プレートリーダー）の使用、別ロットのプレート使用でも解決できず、他に考えられる原因について、ご教示いただけるとありがたいです。	温度むらを疑われているようですが、インキュベーションが必須でないならば、使用する試薬が常温であることを確認後、全ての操作を常温で行うのは試されたでしょうか。また乾燥が原因の事もありますので、洗浄後plateから極端に強く洗浄液を除かないこと、洗浄液を除いた後に試薬を添加するまでの時間を極力短縮する事などを試されたらいかがでしょうか。 エッジ効果が解決された一つの例がJBFの基礎講座で紹介されています。これを参考にされてはいかがでしょうか。 http://bioanalysisforum.jp/images/2019_10thJBFS/LBA.pdf http://bioanalysisforum.jp/event/movie.html LBAの技術的基礎講座-バラツキの原因と対策-
L7	ELISA法の測定で、反応停止液を添加後、吸光度測定の時間は一般的に試験計画書（バリデーション、測定試験）で定義していますか？ 一般的なキットですと30分以内に測定する旨記載されていますが、反応停止液の添加時の状態、混ざり具合で吸光度が安定しないことがあります。 申請用試験において、このような事象にどのように対応していますか？（一度測定して不安定と判断した場合に再測定とするなど）	反応停止液添加後、測定までの時間を試験計画書やSOPに記載するかについては、施設での判断になると思います。ELISAの場合、反応液と停止液の組み合わせやそれぞれの容量や温度によって、吸光度が安定する時間が異なりますので、どの程度の時間が適切かをそれぞれの測定方法に応じて判断し、その結果を元に試験計画書やSOPに記載するのが良いと思います。市販キットに推奨時間が記載されていれば、それを試験計画書やSOPに記載するのが良いと思います。 「反応停止液の添加時の状態、混ざり具合で吸光度が安定しないことがあります。」については、操作手順が再現されていない可能性がありますので、反応停止液添加後の攪拌条件や温度も考慮する必要があると思います。これはバリデーションを行う前に一定の値となる条件（反応液と停止液の容量、時間、温度、攪拌方法等）を確立してから、バリデーションを実施するのが良いと思います。 申請用試験であれば、事前に上記の問題を解決した後にバリデーションを行うのが本来の姿になりますが、既に実施中の場合は、試験計画書やSOPに規定された基準を外れた場合は、再測定で対応することになると思います。もし、この現象が頻発する場合は、原因を確認して、必要に応じてパーシャルバリデーションを実施するのが良いと思います。
L8	弊社では、ADA、Nabバリデーション試験において、ポジティブコントロール（抗医薬品抗体）の凍結保存安定性を評価しない考えです。その評価を実施しなくても良い旨、以下論文で報告されており、これを参考にしています。この考えの妥当性あるいは実状についてJBFのコメントをいただけると幸いです。 Heather Myler, et al. Anti-drug Antibody Validation Testing and Reporting Harmonization. The AAPS Journal 2022; 24: 4	そのご理解で良いと思います。 ポジティブコントロールは各ADA評価時に陽性対照として使用できることが確認できていれば凍結保存安定性の評価は実施する必要はないと思います。JBFの統一見解ではありませんが、弊社ではポジティブコントロール（抗医薬品抗体）の凍結保存安定性は行っていません。

LBA（続き）

番号	質問	回答
L9	通常、ADA分析においてdrug toleranceを評価する際には、あらかじめ一定濃度の薬物とADA陽性対照を混合したサンプルを用いて、測定系のレスポンスを確認されることかと思います。薬物とADA陽性対照を混合した後、評価に用いるまでのインキュベーション時間やインキュベーションの条件について質問させて頂きたいです。 ご存じの通り、抗原抗体反応が平衡状態に達するまでには、一定の時間がかかります。その時間は温度や濃度などによって変わり得るものです。 以下の点について、ご意見を頂きたいです。 ・薬物とADA陽性対照を混合した後のインキュベーション時間の違いによって、drug toleranceが変化した経験はございますでしょうか。 ・上記のような懸念を踏まえると、どのようにdrug toleranceを評価することが適切と考えられるでしょうか。	ADAの陽性対照は、動物由来のポリクローナル抗体やモノクローナル抗体と非常に幅のある物質を用いて評価しています。このことから、一つの条件ですべてをカバーすることは困難と思われます。さらに、陽性対照は、あくまでも評価のためのサロゲート抗体であり、それが実際の検体測定を説明するすべてではないことから、陽性対照を用いた評価に余程不適切な条件でない限り「完璧」を求める必要はないと考えられます。 コメント① 条件をいろいろ変えて検討を行った経験はありませんが、同一の条件の繰り返し実験でもある程度ばらつきが出ることを勘案すると、条件を変化させることによって得られる結果も変わってくと思われます。どのような条件で実施すれば適切であるかというより、用いた実験条件を明確に提示し、その条件下で得られた結果という形で報告するのが良いと思います。もちろん極端な条件は用いないのが良いと思います。 コメント② インキュベーションについて条件を検討した経験はありませんが、一般的に温度が高いほうが早くに平衡状態に達すること、またADA分析を行う温度を考慮した上でdrug tolerance評価用試料を調製するのが良いと思います。開発したADA分析法でADA検出を行う際にどの程度の薬物がADA検出に影響を及ぼすかを確認することがdrug tolerance評価の目的であると考えますので、「一定条件」下で調製された試料を用いて薬物の影響を評価すればその目的は達成されると思います。 コメント③ 薬物とADA陽性対照を混合しておく時間でdrug toleranceが変化するのは普通にあると思われます。ご指摘のように、条件によっても平衡に達する時間に違いが出ますし、一般化した評価条件を明示するのは難しいと思われます。薬物が生体内でそれなりの時間ADAと共存しているという状況をmimicする必要があると考えるならば、assayの実施に無理が無い範囲でincubation時間を長めにとるという判断はあるかもしれません。
L10	ADA測定における判定についてお聞きしたいです。 Screening Assayで陽性判定された場合、Confirmatory Assayを実施するかと思います。 数は多くはありませんが、Confirmatory Assay時に阻害率はカットポイントを超えますが、抗原物質非添加試料のシグナル値（吸光度や発光値）がScreening Assayのカットポイントを超えない場合がございます。 こういった場合、陽性と判定しておりますでしょうか？	ご連絡いただいた状況は、CV20%以下を許容する分析法としてバリデートされているのであればご質問のような現象は起こり得ると思いますので、ばらつきを許容した上で設定しているConfirmatory asssayの判定基準に従い陽性/陰性判定を行えば良いと思います。ただし高頻度で同様の現象が発生するようなら分析法の見直しも検討すると良いと思います。 以下は、ある会社さんの考え方を示したものですので、ご参考をお願いします。 コメント① 社内SOPで「Confirmatory AssayでConfirmation assayにおける抗原物質非添加でカットポイント（SCP）より低い結果が得られた場合は、阻害率がCCPを超えても'confirmatory negative'とする」という条項がありました（過去形）。しかし、Watson LIMSではこのようなケースをサポートしておらず（将来はカバーされるかもしれませんが）、ひとつずつデータをチェックして、マニュアルで訂正をしていました（過去形）。しかし、マニュアル操作における作業の手間、時間、およびData Integrityの観点で、そのマニュアル操作は排除することになりました。 該当の条件に合う事象の頻度は経験上低いです。社内の議論では「Confirmatory AssayでConfirmation assayにおける抗原物質非添加でカットポイント（SCP）より低い結果が得られた場合は、阻害率がCCPを超えても'confirmatory negative'とする」のが科学的に妥当だとの声は多いですが、より保守的なデータの提示を行っている観点で、規制上は特に問題ないと思います。臨床試験全体の結果に及ぼすインパクトは、その頻度は低いと予想されることより、ほぼ無視できる範囲と思います。 コメント② 抗原物質非添加試料のシグナル値がScreening Assayのカットポイントを超えないという情報だけで、Screening Assayの判定が正しかったのか判断するには情報が十分でないように思います。Confirmatory Assayのカットポイントは抗原物質非添加試料のサンプルを基準として(サロゲートではありませんが)99パーセンタイルで設定しているので、自社では抗原物質非添加試料のサンプルの数値がScreeningカットポイントを超えるかどうかにかかわらず、Confirmatoryカットポイントの阻害率クライテリアで判定しています。
L11	ADA、NAb抗体分析(LBA法)の陽性対照のロットを変更した際、実施するパーシャルバリデーションの項目は何が一般的でしょうか。	感度、反応性（Nabの場合は中和活性）を確認し、先行ロットとの差を調べます。 ※もし、先行ロットの差が認められた場合のパーシャルバリデーション項目は企業ごとに考え方があると思いますので、推奨例は提示できません。 ここではある企業さんの例を示しておきます。 陽性対照でロット間差がみられた場合、「陽性対照を用いて評価するバリデーション項目」のパーシャルバリデーションを実施します。項目としては、PC濃度の再設定、Prozone影響、Screening, Confirmatory, Titrationの各assayにおける再現性、Selectivity、Drug tolerance limit、陽性対照の凍結融解安定性・室温安定性（操作における陽性対照の安定性評価）などが考えられます。適切な項目を選択して、パーシャルバリデーションを実施してください。なお、カットポイントは陽性対照に関係なく設定されますので変更する必要はありません。

LBA（続き）

番号	質問	回答
L12	ADAアッセイ法構築にはADAのポジコン抗体が必要かと思いますが、ADAのポジコン抗体を作る場合に、中分子や高分子化合物にもかかわらず、免疫原性が無く（又は低く）、動物に投与しても抗体価が上がらずポジコン抗体が入手できない場合、ADAの評価をスキップすることは可能なのでしょうか？ スキップできる場合は、当局にどのような説明や資料が必要でしょうか？ それとも、あらゆる手段（作製メーカーを変える、免疫に使う薬剤の構造を変えるなど）を尽くしてでもポジコン抗体を作製すべきなのでしょうか？	物に免疫原性がないことを科学的に証明できれば、ADAの測定は不要と考えられます。しなしながら、免疫原性は人において個体差が非常に大きく、免疫原性がないことを証明することは困難です。また、中分子や高分子の場合は、免疫原性が低いことはあっても、無いとは言いきれませんが、ADAの評価をスキップすることはできないと思います。中分子として核酸があり、生体由来の核酸と構造上同じ場合のみ、ADAの評価がスキップが可能になる場合があります。しかしながら、薬物としての核酸の場合、血中での半減期を長くするため、通常人工核酸にしている場合が多く、人工核酸の場合は、ADAの測定が必要になります。いずれにしても、免疫原性がないことを証明は科学的に困難であり、中分子や高分子の場合は、ADAの評価は必要になります。このような状況になりますので、何らかの方法で、開発薬物に対する陽性対照の作製は必須になります。その際、ポリクローナル抗体に限定する必要はなく、モノクローナル抗体でも問題ありません。モノクローナル抗体の場合、1種類でも良いのですが、可能なら何種類かを混和するのが良いかも知れません。
L13	抗体医薬について、非臨床試験でのADA評価においてScreeningでポジとなり、titerやconfirmatoryアッセイでもポジとなった場合、中和活性評価が必要になるかと思いますが、非臨床の動物での試験の場合も中和活性評価は必須でしょうか？ それとも、ヒトを対象とした医薬品で動物に用いた場合は基本的に免疫原性が生じると考えられるので、非臨床試験では必須でないと考えてよいのでしょうか？	動物にヒトを対象とした医薬品を投与すると、ほとんどの場合、免疫原性があります。開発品の特性に応じて非臨床でも中和活性を測定する場合がありますが、通常非臨床で中和活性を測定することはありません。 各社の非臨床データの評価によってはその動物種での薬理薬効評価をサポートする目的で中和活性を実施されるかもしれませんが、ケースバイケースで考える必要があります。開発を担当される方々で非臨床データパッケージをどのように構築するかを議論されることをお勧めします。
L14	現在、社内でcell-based assayを用いた中和抗体分析法を検討しております。 Cell-based assayは、最終濃度10 ng/mLになるように薬物をメディウムに添加した時に、薬効の指標となるサイトカインが細胞から放出されますので、それをELISAで定量するフォーマットになっております。 陽性対照である抗イディオタイプ抗体を添加しますと、最終濃度10 ng/mL以上で上記のサイトカイン放出量の低下が確認できています。 血漿からの中和抗体の精製はBEAD法を採用しておりますが、回収率があまり良くないため、中和抗体分析法の感度は血漿中濃度換算で1～10 μg/mLになると考えられます。 すでに上市されている他の薬物の中和抗体分析法と同等の感度と認識しておりますが、どれくらいを目標とすればよいかご回答いただけますでしょうか。	いただいたご質問に統一的な回答は困難でしたので、個人的な意見としていくつか紹介しますので、これらを参考にしてください。 コメント① Nabの感度に関しては、ガイドライン等での言及がない状態。ADAの感度としては100 ng/mLという目安がありますが、Nabではそこまでは求められていないという理解です。薬物抗体の薬効を阻害する中和抗体が生じているかどうかを確認できることが重要であるため、例えば薬物のトラフ濃度が維持された場合のBMの値を明確に低減させるのに十分な中和抗体濃度をターゲットにするなどの考え方があるかもしれません。一方で陽性対照はサロゲートなので、あまり感度の目標値にこだわりすぎなくても良いのではという印象です。高感度に越したことはないですが、薬物による有効性がNabで低下するという現象が生じた際に、中和抗体として検出できるかどうかという事が重要だと考えます。 コメント② 中和抗体分析法は産生されたADAが中和活性を示すか確認するための分析法ですので、開発薬剤の特性に応じて目標感度を設定するとよいと思います。血中濃度を維持する必要がある薬剤であればトラフ濃度存在下で中和活性を評価できる必要があります。一方で例えば抗腫瘍薬を目指す薬剤であれば薬物濃度が低下する時点で中和活性を評価できれば分析法として一応の目的は達成すると思います。 コメント③ 中和抗体分析、特にCell Based Assayは、感度やDrug toleranceが非常に難しいことは知られており、また規制当局もそれを十分理解しています。目標感度については、良いに越したことはありませんが、そのターゲットとなる薬剤の（トラフ）濃度下で中和抗体活性が検知できることが最低限の目標になると思います。競合薬の分析法の感度と同等を目指すのは目安としては良いのですが、最終的にはそのターゲットとなる薬剤に適切な感度、およびDrug Toleranceを目指すということになると思います。逆の側面からすると、臨床検体を測定してすべてがNegativeであると要注意（FPR=1%）、ある程度適切と思われる頻度でのPositiveな結果が得られれば、当局の要求を最低限満たしていると考えられると思います。
L15	SPEADやACEなどの酸解離法を用いてDTLを高くできないか検討いたしました。最初設定したDTLをより高くすることはできませんでした。 このような場合、PC濃度100 ng/mLにおいて、弊社の抗体薬のトラフ濃度を越えるDTLが設定できるまで、他の酸解離法などをさらに試したほうがよいのか、それとももうこれ以上のDrug toleranceの向上は諦めて、「偽陰性となる可能性がある条件でのADA陽性の判定を行っている」などと注意書きを入れて、現行の測定法でADAの測定を行ってもよいのかご意見をいただけますでしょうか。また、PC濃度を500 ng/mLや1000 ng/mLとした条件でDTLを設定することは許容されますでしょうか。	FDAがADA測定方法のSensitivityの目標として、100ng/mLを明示しており、ほとんどの会社はDtug Toleranceをその100ng/mLのPositive control（PC）をトラフのPK濃度をほぼすべてカバーできるような測定方法を構築する努力をしていると思います。以下は一つの例です。 非臨床：100 ng/mL、500 ng/mL、HPC 臨床：100 ng/mL、250 ng/mL、HPC SPEAD、PandA、Beads assay等を用いてもそのレベルに到達できないケースもそれなりに生じます。その際は、測定方法改善について実施したことをレポートにまとめて、努力した結果の最善の測定方法での結果であること、得られたADAの結果と毒性、薬効の個々の患者における比較考察を行い、報告していくしかないケースも多々あると思います。また、PCはあくまでサロゲート抗体であることから、PCの種類を変更するのもひとつの方法です。一般的にポリクローナル抗体を使用する事が多いですが、モノクローナル抗体で対応するのもひとつの方法になります。 測定方法やPCの変更によっても、努力目標（100 ng/mL）が達成できない場合は、できうる説明をしていくしかないと思います。そのような際には、Positive controlのTarget Sensitivityを段階的に引き上げ、Trough PK濃度のほとんどをカバーできるだけの複数のDrug Toleranceのデータを得ておく、その後の考察に有用です。それとは別ですが、ADAやNAbでもFit for Purposeバリデーションが議論されています。最初から完璧な測定法を作らずとも、そのプロジェクトの推移をにらみながら、その測定方法をバージョンアップしていくRisk Based Approachの考え方もあってよいと思います。

LBA（続き）

番号	質問	回答
L16	「組織中の薬物濃度測定について」 特にLBAでの測定に関して、見たいものを適切に検出するためにどのように処理・測定をすべきか、悩んでおります。LCMS測定の場合も合わせて、質問をさせていただきたく思います。 ＊血液のコンタミの除去・評価について（ラットやマウス） 特に肝臓など灌流が比較的容易な臓器ならよいですが、灌流が難しい組織も多いと思います。どのように灌流を行うか、また、しっかり灌流できているかどうかをどのように判断するか、もし事例やご経験等がありましたらご教示ください。 ＊前処理について ホモジネート調製の場合のプロテアーゼ阻害剤添加の有無や、可溶化の有無、また、そのやり方について。特に、膜抗原に結合しているような抗体医薬品等に対してどのような処理を行っているか、細胞で内在化された抗体についてどのように考えるか、また、それらの処理の適切さを何かしらの指標で評価されているのかどうか。 上記について、ご経験やご意見をお聞かせいただけると幸いです。	＊血液のコンタミの除去・評価について コメント①ラットやマウスに麻酔を行い、開腹後腹大静脈を露出させる。室温～40℃の生理食塩液を点滴と同じようにして、細目の注射器針で動いている心臓の左心室に刺し、心臓が動いたままの状態を維持できる程度の生理食塩水を流し始める。ほぼ同時に腹大静脈に切れ目を入れ、血液が流れでるようにする。腹大静脈から流れ出てくる血液が、完全に透明になるまで心臓から生理食塩液を流す。 コメント②以下の論文によると、全血液量の3倍量を心臓灌流するのが最適とある。Anal. Chem. 2020, 92, 22, 15152–15161 ＊前処理について プロテアーゼ阻害剤（カクテル）添加は必須、ものによっては、tritonX-100などの膜を溶かす溶媒を使用する場合もある。常に氷冷下で行う。試薬類も氷冷しておく。細胞内のものを測定しているかについては、細胞外液を十分に洗浄した細胞を用いることで定性的な確認は可能であるが、定量的な確認は困難と思います（多い少ないの評価は可能）。
L17	LBAの場合、測定に用いる重要試薬の認識部位によって検出されるものが異なると思います。 どのような組み合わせの抗体を使って測定を行っているのか、実際にいろいろな部位を認識するもので測り比べたご経験があれば、お教えいただけると嬉しく思います。上記の組織中の測定も前提にしています。	得られたpAbやmAb用いて、感度やSelectivity他重要なパラメータを比較して、最良のものを選択するとしか、測定法の開発段階では言えないのではないかと思います。その他は、その測定の目的、マトリックス（組織中も含む）内での他の分子との相互作用を勘案して認識部位を重要視する等、Case by Caseと言わざるを得ないのではないかと思います。 LBAのPKで測定しているものは基本的にfree drugとtotal dragの間のどこかであり、質問にもありますが、ツールのエピトープや内在性の結合タンパク質の有無、実験条件など色々な条件で何を測定しているのかは違ってきます。 いろいろな部位を認識するもので測り比べるというより、マトリックスも含むassay溶液中でどのような現象が起きているかを理解した上で、使っているツール分子で得られる結果が種々の解析を行う上で必要な数値となっているか(感度、特異性、選択性、PK/PDへの使用、毒性との関連性など薬物の有効性など目的に依存する部分も)を判断する事が重要だと思われます。

バイオマーカー

番号	質問	回答
B1	バイオマーカーを対象としたバリデーションにおいて、安定性確認用QC（低濃度/高濃度）の調製の際に 内因性が低濃度でしか得られない場合の調製方法として、 ・低濃度QCを内因性のみのQCとし、高濃度QCを標準品添加QCとする ・低濃度QC、高濃度QCいずれも標準品添加QCとする のいずれがいいのでしょうか。 できる限り内因性のもので確認すべきというところと、低濃度QCと高濃度QCでみているものが違ってしまうという点が気になり質問致しました。	開発の初期段階においては高濃度試料の入手が困難な場合がありますので、入手できる濃度の実試料で安定性を評価してください。高濃度試料がない場合は、代替標準物質を添加して、仮の安定性を評価しておくことになります。後日、高濃度の試料を入手後に安定性を評価してください。本件については、以下の文献を参考にしてください。 https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/bio-2021-0173 http://www.nihs.go.jp/mss/PTC%20document-Biomarker%20Assay%20Validation.pdf
B2	バイオマーカーを対象としたバリデーションにおいて、安定性確認用QC（低濃度/高濃度）の調製の際に 内因性が低濃度でしか得られない場合の調製方法として、 ・低濃度QCを内因性のみのQCとし、高濃度QCを標準品添加QCとする ・低濃度QC、高濃度QCいずれも標準品添加QCとする のいずれがいいのでしょうか。 できる限り内因性のもので確認すべきというところと、低濃度QCと高濃度QCでみているものが違ってしまうという点が気になり質問致しました。	開発の初期段階においては高濃度試料の入手が困難な場合がありますので、入手できる濃度の実試料で安定性を評価してください。高濃度試料がない場合は、代替標準物質を添加して、仮の安定性を評価しておくことになります。後日、高濃度の試料を入手後に安定性を評価してください。本件については、以下の文献を参考にしてください。 https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/bio-2021-0173 http://www.nihs.go.jp/mss/PTC%20document-Biomarker%20Assay%20Validation.pdf

共通、その他

番号	質問	回答
O1	マイクロサンプリングに関して、JBFでは数年前に議論、調査があったかと思ひます。そこから数年経ち、何かアップデートありましたら教えていただきたいです。	その後のアップデートはございません。第49回日本毒性学会学術年会において、ラットで採血量が50 μL以下/時点であれば、赤血球関連パラメーターや毒性への影響がみられなかったと報告がありました。
O2	ラットを用いたPK試験で頸静脈からの採血を予定していますが、採血時点が多く、1個体で許容される採血量を超えてしまいそうです。諸事情によりマイクロサンプリングもできないのですが、このような場合、採血時点前半のみ実施する個体と、後半のみ実施する個体を設定するような方法は有効でしょうか。または、前半・後半ではなく交互に分けた方がより良いでしょうか。予備的な試験では適応可能（本試験では避けるべき）とか、個体間でのばらつきがある場合はやめた方がよいなどのご意見をいただけると幸いです。	PK試験の場合は、可能であれば1個体からの採血が適切です。しかしながら、今回のような事情の場合は、動物を分けて交互の採血をせざるを得ないと思います。個体差がある場合、前半と後半に分けると個体差がPK解釈に影響する可能性がありますので、交互採血が良いと思います。交互であれば個体差が多少あっても濃度は平均化され、個体差と採血時期の関係は緩和されたとして本試験で使えます（本試験のPK解析は平均濃度からPKパラメータを出す事例が多いと思います）。解説はJournal of Controlled Release (2020) Volume 323, Pages 83-101などを参照ください。
O3	バイオアナリシスで使用する標準物質の純度について、補正は何パーセント未満で行うか、何か目安を示した公的な文書はありますでしょうか？ また、差支えなければ、各施設で何パーセント未満で補正をするかの設定状況を教えてください。	公的な文書は無いと思います。施設によって判断基準が異なり、全て補正する、98%未満や95%未満で補正する、特に標準化はせず、ケースバイケースとするなどです。 ある施設では、PK試験の場合は基本的に全て純度補正しています。バイオマーカー測定で、厳密な定量値が不要な試験の場合は、98%以上であれば補正しない場合もあります。 ある施設では、低分子合成品を標品に用いる場合は、その純度がほぼ一義的に定義されることより、純度補正をおこない、純度が一義的に定義できないバイオリジクスはその表示値を用い、純度補正をしないところもあります。
O4	標準原液及び標準溶液の保管方法について 標準原液及び標準溶液はメスフラスコを用いて調製するケースが多いかと思ひますが、調製後の原液及び溶液はどのような容器で保管することが推奨されるのでしょうか。 メスフラスコのまま、試薬瓶に移す等あるかと思ひますが、推奨される保管容器をご教示頂けますと幸いです。	ご質問の件は、測定対象物質および用いようとする溶媒の物理化学的性質に依存するものであり、特定の強い推奨はありません。容器を変えるリスクをとらずメスフラスコのまま保存する考え方、信頼がおける容器に移し替える考え方のいずれも、間違いではないと思います。なお、検討したところ、密閉度の点でメスフラスコは避けるべきという意見、ポリプロピレン容器は溶出を懸念してガラスを優先する、ガラスが割れるリスクを避けて問題が無ければポリプロピレンを選択、光からの保護と揮発の回避（気密性）の点で蓋がしっかりした褐色のねじ口瓶、などの多様な意見が得られています。なお、JBFのDG2013-02では、ガラスを優先することを推奨する意見が強く得られました。
O5	最終報告書の作成について、最終報告書に計画書を埋め込んで、最終報告書の記載は計画書に従って実施したというような記載にすることは可能なんでしょうか？ もちろん、計画書と異なる箇所や結果などは、正しく記載しますが、例えば、試薬調製の項目や前処理方法、分析条件など、計画書を過去形にして記載するだけのようなところの場合に、 「計画書に従い実施した」というような記載でも許容できるものかお聞きしたいです。 背景として、英文でレポートを作成する場合に、計画書の記載を過去形にして書き直すケースが多く、手間がかかるため、簡略化できないかという観点からです。	試験が再現できる情報が最終報告書に記載されていれば、形式は問われません。三人の方の意見を紹介します。 ①最終報告書は各社の考えに従って作成すれば良いのであり、試験計画書の通り行ったと記載しても問題ございません。ただし、最終報告書は行った試験が再現できる情報が含まれている必要があります。試験計画書に記載されている時間や温度が実際の時間と温度と全く同じであれば問題ありません。なお、試料を保管した期間や温度の記載は必要になります。 ②最終報告書の作成について、最終報告書に計画書を埋め込んで、最終報告書の記載は計画書に従って実施したというような記載にすることは可能と考えます。計画書も添付せず、計画書に従って実施したとのみ記載するのは、レビューアーに対して十分な情報を提供していないという観点でお勧めしません。 ③最終報告書という意味では、重要事項が本文で網羅される必要があるという考えから、「計画書に従い実施した」は許容されていない認識です。ただし、繰り返し操作にSOPを活用することが推奨されるという理念もあるので、その意味でSOP参照とすることはできるため、測定法をSOP化しておき、前処理方法や分析条件の詳細はSOP参照とする対応は出来ると思います。
O6	現状、依頼者が受託分析会社を訪問して現地で信頼性調査をおこなうことが難しくなっていると思ひます。 こういう状況で依頼者として分析試験の信頼性確保のためにどのような打ち手があるのか、virtual oversightでどのくらい対応可能なのか、やっぱりafter pandemicでは訪問によるoversightが復活していくのか、などご意見お願いします。 また、受託分析会社では、virtual oversightにどう対応していくのか。将来的にオンラインで依頼者が電子ラボノートやLIMSにアクセスして状況確認できるようになるのか。などご意見伺いたひです。（すでに電子ラボノートデータを電子ファイルで送ってくれる会社は一部あります） また、JBFとしてoversightの実施方法や環境変化などを調査するような計画はありますか？	Regulatorのinspectionの大半がOn-line で実施されていますが、そのやり方が参考になると思ひます。 個人的に、すべてがon-lineで済むとは思えないのですが、コスト・利便性・環境負荷その他を考えると、その多くがon-lineに置き換わっていくのではないかと想像します。 弊社の状況は、もともと訪問調査の頻度を明確に定めておらず、コロナ禍中もvirtual対応はとくにとらず調査延期、最近では訪問調査の復活を計画したりしています。個人的見通しとしては、セキュリティを十分考慮の上、電子ラボノートやLIMSのアクセスが出来る状態になればvirtual sponsor auditが可能になりますが、それが未完了の段階では現地で見た方がお互いに楽なため、暫くの間、訪問auditが復活すると考えています。いずれにしても、各社で信頼性確保についてシステムの考えた上で、oversightはその一要素になるので、各社のシステムのつくりによって実施方法には個性が出るものと思ひます。 なお、最後のご質問ですが、現時点ではJBFとして計画はございません。

共通、その他（続き）

番号	質問	回答
07	真度（理論値の±15%）や残存率（100%±15%）を表記する際、表示桁数をどのようにするのが妥当（一般的）でしょうか。 ・有効数字3桁 ・小数点以下一桁 例えば、 定量値や面積値（比）を有効数字3桁で算出し、その値から真度や残存率を算出し、有効数字3桁（85.0～115%）で表記する 定量値や面積値（比）を有効数字3桁で算出し、その値から真度や残存率を算出し、小数点以下一桁（85.0～115.0%）で表記する 定量値や面積値（比）を有効数字4桁で算出し、その値から真度や残存率を算出し、小数点以下一桁（85.0～115.0%）で表記する のようなケースです。	何が妥当（一般的）ということではなく、事前に定義されていればいずれの表記方法でも問題ないと思います。三人の方の意見を紹介します。 ①一般的かどうかはわかりませんが、弊社は%表記のものは小数点以下一桁で表記しています。有効数字3桁で表示する場合は、例えば計算上115.4%まで許容されてしまうので、計画書やSOPで規定されていれば良いのかもしれませんが、より厳しい方で評価しておいた方が無難かと思います。%は割合なので、使用する数値の桁数が合っていれば気にしなくてよいと認識しています。 極端なルールでない限り、御社で決められたルールが、少なくとも一つのプロジェクトで統一的使用されていれば問題ないと思います。 ②3つのケースが挙げられていますが、どれも可能と思いますが、弊社は2番目のルールを用いています。 ③弊社は2番目の方法ですが、1番目と2番目は見たことがあります。有効数字の考え方からすると、定量値の有効数字を維持した方が理屈が通る（真度・残存率は割り算のため数値の有効数値3桁が持ち越される）のですが、一方で、%は「『確定値として出した定量値』の、理論値に占める割合を『計算しただけ』なので、有効数字の概念で悩まずとも良い」という考え方もあるようです。一般的といえるコンセンサスは確立していないように思います。
08	高脂質マトリックスとして、“高脂質血漿”がバリデーションのために必要ですが、海外から購入した高脂質血漿では、食品添加物の影響を受けるため使用できず（ボランティアには食事制限）、人工的に脂質をボランティアから採取した血漿に添加して調製することとしました。 推奨されるメソッドなどが見つけられず、Sigma-Aldrich.で取り扱いのイントラリピッド（20%、emulsion）という試薬を10%配合した血漿を高脂質マトリックスとして評価いたしました。 当該試薬は、『大豆油を主成分とする脂肪乳剤』という記載があり、高脂質マトリックスのイメージではあまりないと感じております。そこで質問としては、 ・推奨されるメソッドがあるのでしょうか？ ・当該方法は妥当でしょうか？ ・妥当ではない場合、その他、どんな選択肢があるのでしょうか？ 測定時の必要量や分析感度等でしょうか（サルやヒトでは十分量の採血ができるので血清を用いている例が多い？）。	現状では、ご指摘のBioIVT等の海外からの高脂血漿を用いるか、Publicationにある脂質を添加する方法のいずれかを用いることがほとんどと思います。 「測定サンプルも食事制限をした被検者」とのことですので、被検者スクリーニング若しくは治験中にその被験者の血中脂質濃度をモニタし、高脂血症が該当治験中で発生しないこと証明できれば、高脂血漿を用いたSelectivity等は必要ではないと思います。 しかし、まったくデータがないので不安ということであれば、例示されている『大豆油を主成分とする脂肪乳剤』を用いた疑似高脂質マトリックスで実施するのは、ある程度納得のできる妥協点だと思います。 「食事制限をしたボランティアによる血漿をブランクマトリックスとして使用しバリデーション評価をしているため（食事制限をしてない）海外品の購入可能な高脂質マトリックスでは、バリデーションに適しておりません。」とのことですが、Selectivity等の特定の項目の評価にすら使用できないということでしょうか？ということであれば、当局の立場からすると、治験中に何らかの問題で高脂血症の被験者が発生したときに、その測定値は信頼できないという解釈をされる可能性があります。 患者血を使用しない場合、一般的にはトリグリセリドを添加する事が多いと思います。添加量は高脂血症の診断を基準に設定する方法があるとおもいます。そのような試料でも選択性に問題が出た場合は、どのような状態のマトリックスで適切な数値を出すことが可能かを確認した上で、個別の試料で信頼できる数値が得られているか評価する事を考慮するののひとつの方法と思います。 本件についてクロマトグラフィとLBAでは大きな差はありませんが、LBAの場合、マトリックスに含まれる成分によって反応性が異なる場合がある（MRDが異なれば、反応性が変わる）ので、SelectivityとHQCで十分な確認が事前に必要と思います。
09	GLPや信頼性基準下でのバイオアナリシスの実験記録を紙の記録から電子実験ノートを使えないかと考えております。 ですが、調べましてもあまりレギュレーション下での電子実験ノートの実績情報が得られず、そもそも今のレギュレーションに対応するような形で電子実験ノートを使うことは難しいのかとも思っております。 GLPや信頼性基準下でのバイオアナリシスの実験記録で電子実験ノートの適用実績があるかどうかや、 どこのメーカーの電子実験ノートが実績あるか・対応できそうかなど、ご存知ありませんでしょうか。 難しい場合はどういう点で対応が難しいかなどもご意見頂戴できますと幸いです。	日本では電子実験ノートを導入されているところが少ないかもしれませんが、何社かあるようです。また海外では電子実験ノートは一般的とまでは言いませんが、普通に実施されています。ある会社では、IDBS社のBioBookをGLP/GCP Labで使用し、SwissMedicのGLP/GCP Inspectionを少なくとも2回は受け、特に指摘事項は受けていないということです。以下を参考されてはいかがでしょうか。 https://ls.ctc-g.co.jp/products/idbs/biobook.html JBFのDGではDXをテーマにしているのもありますので、JBFシンポジウムやDGに参加されて情報を集められるのをお勧めします。

共通、その他（続き）

番号	質問	回答
O10	測定マトリックスが血漿の場合は、全血に測定対象を添加し、添加直後と一定時間後に遠心分離して血漿とし、前処理・測定して、残存率から全血中安定性を評価すると思います。 しかし、測定マトリックスが血清の場合、全血に測定対象を添加した直後には血清を得られず、しばらく静置して凝固させてから遠心分離して血清とする必要があります。 測定マトリックスが血清の場合はどのように全血中安定性を評価するのが良いでしょうか？ 例えば、静置時間30分を直後、静置時間1時間半を一定時間後として評価するものでしょうか？この方法で評価できるのは血清中安定性のようにも思われますが、全血中安定性を評価したことになるものでしょうか？	マトリックスが血清の場合の全血での安定性は求められていません。