

The 27th Symposium on Biomedical Analytical Sciences
第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム
JBFセッション「規制下における高分子分析」
2014年 8月20日(水)

高分子LC/MSバイオアナリシスの現状と課題について



国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部
橋井 則貴

本日の内容

- 高分子MSバイオアナリシスの現状
 - 定量に用いるMS
 - 高分子MSバイオアナリシスの流れ
 - Ligand binding assay (LBA) と LC/MSの比較
- 高分子MSバイオアナリシスの課題
- 国内の高分子MSワーキンググループ紹介

本日の内容

- 高分子MSバイオアナリシスの現状
 - 定量に用いるMS
 - 高分子MSバイオアナリシスの流れ
 - Ligand binding assay (LBA) と LC/MSの比較
- 高分子MSバイオアナリシスの課題
- 国内の高分子MSワーキンググループ紹介

定量に用いるMS

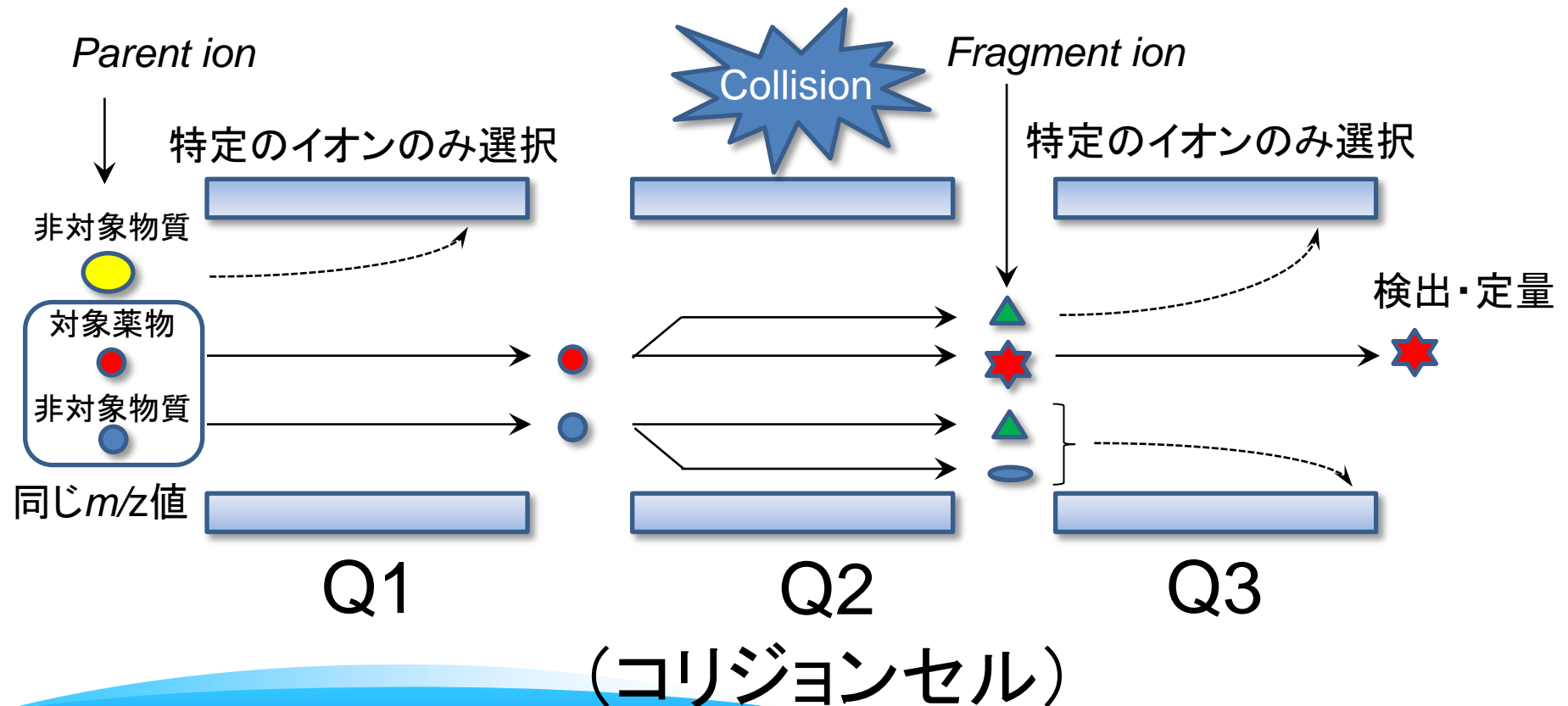
トリプル四重極型MS

測定方法

SRM (selected reaction monitoring)

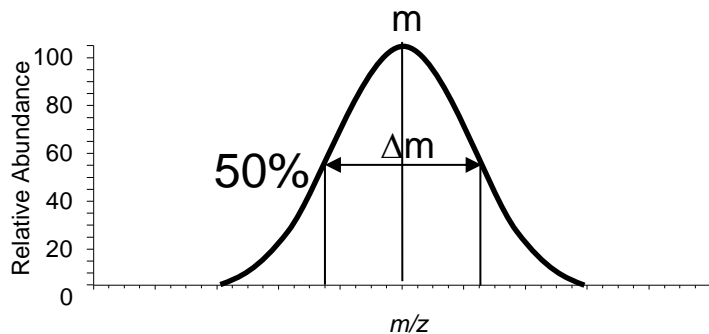
MRM (multiple reaction monitoring)

2回フィルター： 選択性の向上



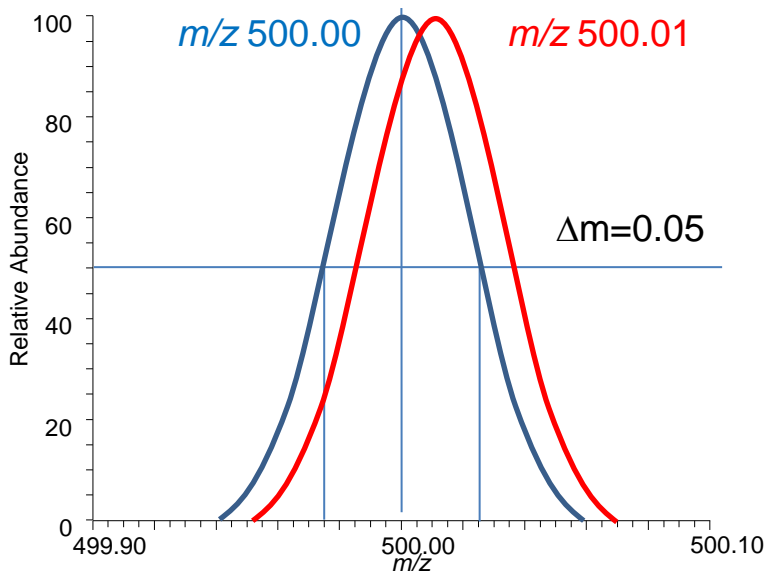
定量に用いるMS

高分解能MS (High Resolution MS, HRMS)

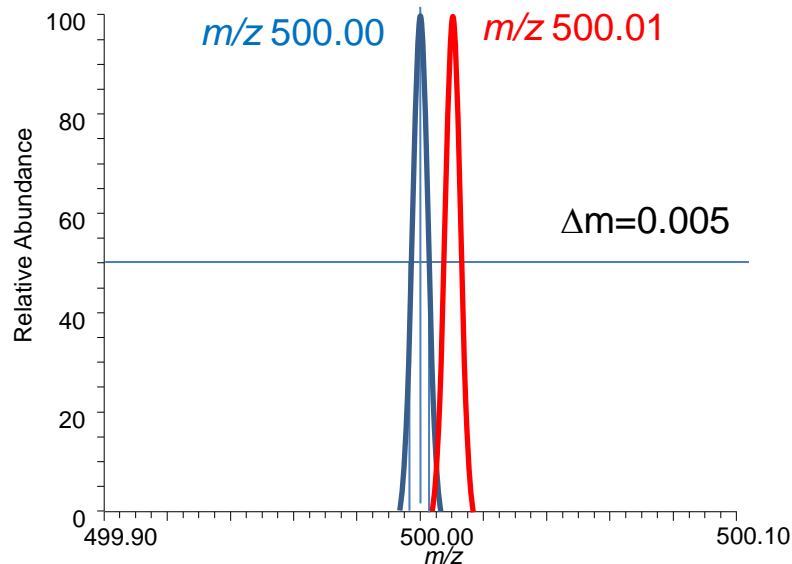


半値幅法
分解能(R)= $m / \Delta m$

$R=10,000$



$R=100,000$



精密質量測定： 選択性の向上

SRM vs HRMS

SRM (トリプル四重極)

- MSによるバイオアナリシスの主流
- 高感度
- 広いダイナミックレンジ
- メソッド開発に時間を要する.

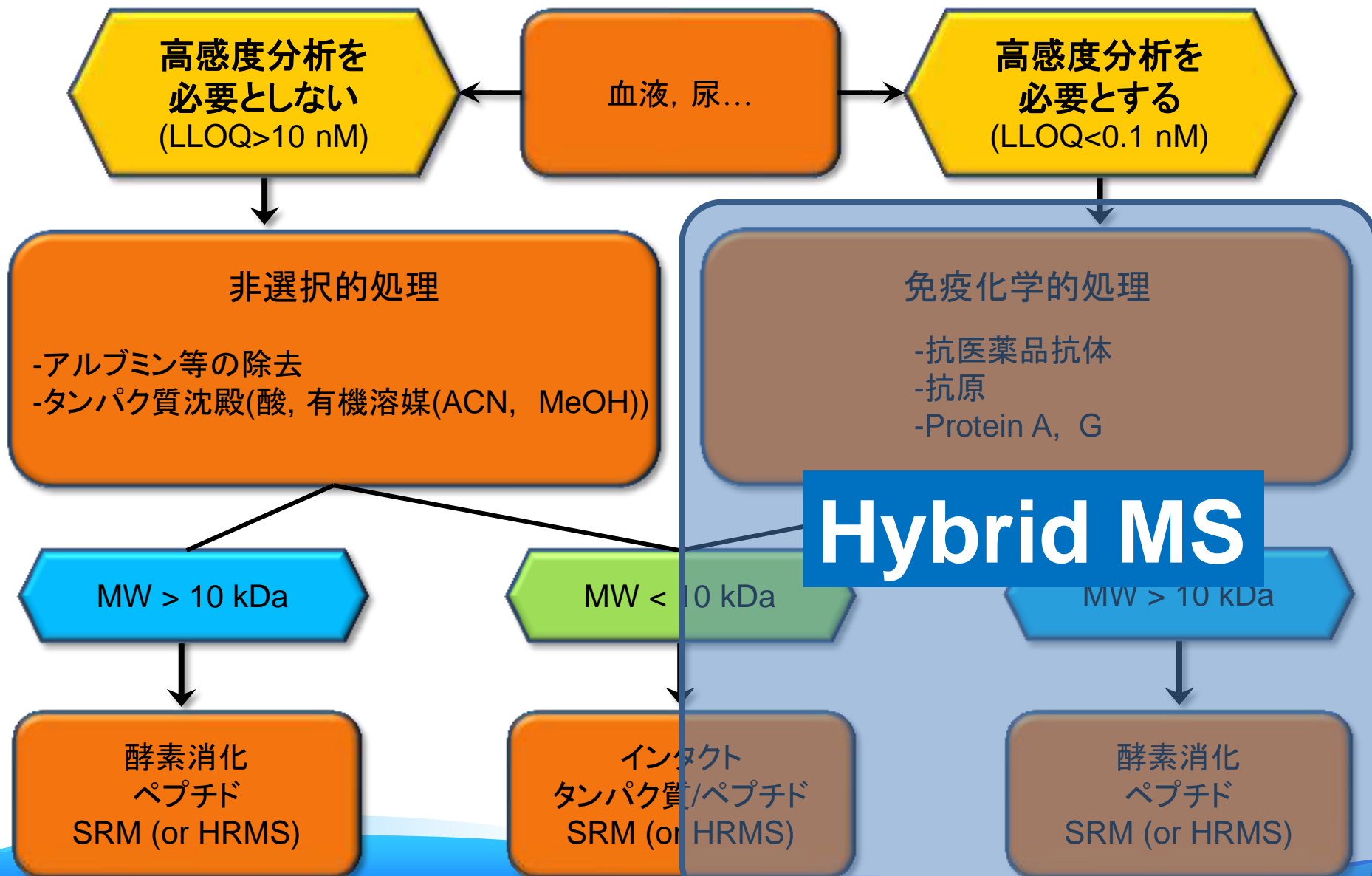
HRMS (FTMS, QTOF)

- ノミナル質量が同じ分子を, 精密質量により区別することが可能
- メソッド開発が簡便
- 感度, ダイナミックレンジが課題
(高感度且つ定量性の高い装置が登場)

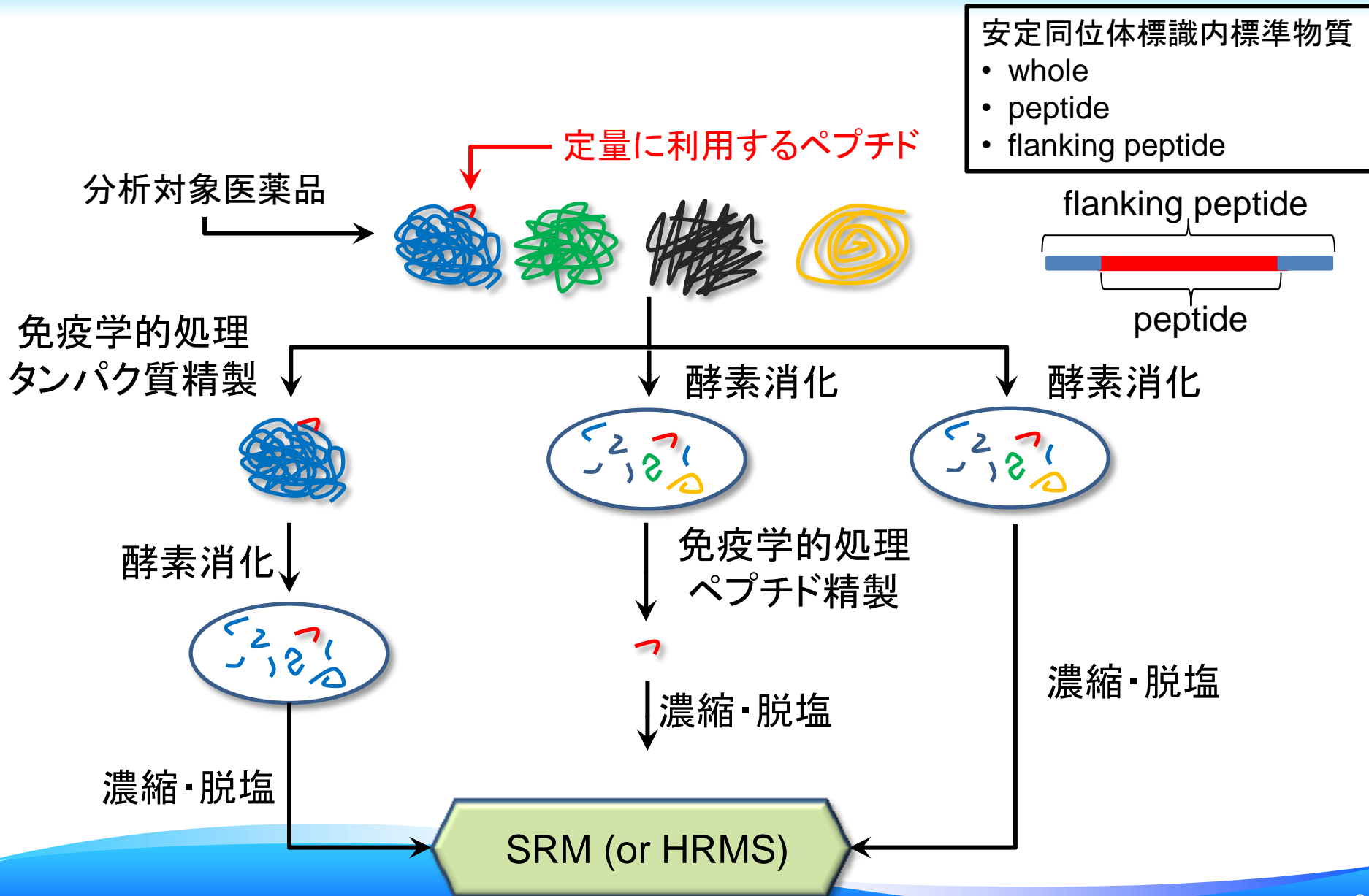
ノミナル質量

各元素についてそれぞれ天然存在比が最大の同位体の質量に最も近い整数値を用いて計算したイオンまたは分子の質量

高分子MSバイオアナリシスの流れ(インタクト or 酵素消化物)



高分子MSバイオアナリシスの流れ(酵素消化物)



LBAとLC/MSの比較

低分子: LC/MS

高分子: LBA(+LC/MS?)

代表的手法

~~LC/MS vs LBA~~

LC/MS ↔ LBA

補完

LBA 長所

➤ 柔軟性

- 複数の定量手法 (ELISA, GYROS etc.)
- 適切な試薬を選択することにより, total, free drug 等の定量が可能

➤ 生物学的処理

- 抗原を結合試薬として用いる場合, 抗原結合能を持つ分子を定量できる.

➤ 高感度

➤ ELISAでは特別な装置を必要としない

- 日常的な試験, 治療効果のモニタリングに適している.

LBA 短所

- 特異性/選択性
 - 様々な要因の干渉を受けやすい
 - 交差反応性
(特異性の高い抗体等の試薬が必要)
- 狭いダイナミックレンジ
 - ほとんどの試料は希釈操作を必要とする
- 長い分析法開発時間
 - 試験法開発前の試薬開発

LC/MS 長所(1)

➤ 選択性

- SRM等により選択性の高い定量が可能

➤ 多検体の測定

- 一回の分析で多検体の測定が可能

➤ 柔軟性

- 定量法を最適化(sensitivity, selectivity etc.)するために, 異なったsurrogate peptideを選択可能
- 翻訳後修飾及び切断体等をモニタリング可能

LC/MS 長所(2)

- 干渉作用及びマトリックス効果を容易に軽減できる
 - クロマトグラフィー, 固相抽出 etc.
- 早い分析法開発
- 広いダイナミックレンジ(3-5 orders)
- 血中タンパク質の影響を受けにくい
 - リガンド分子, ADA等

LC/MS 短所

➤ 酵素消化が必要

- 小さいペプチドを除いてインタクト測定は難しい.
- 血液試料の消化より, バックグラウンドが複雑になる.

➤ 感度

- 感度 (pg/ml) を得るために, 前処理が必要
(pre and/or post digestion)

LBA, LC/MSによる高分子薬物の定量

- 薬物に対する抗体, あるいはその他の結合試薬が入手できるか?
- その抗体(結合試薬)の特異性は十分か?
- ADA等による干渉なしに測定できるか?

YES

LBAの検討

↓
定量可能

LBAによる定量

NO

LC/MSの検討

- 十分な感度と選択性があるか?
- 特徴的なペプチドはあるか?

NO

↓
定量不適

YES

↓
定量可能

MSによる定量

本日の内容

- 高分子MSバイオアナリシスの現状
 - 定量に用いるMS
 - 高分子MSバイオアナリシスの流れ
 - Ligand binding assay (LBA) と LC/MSの比較
- 高分子MSバイオアナリシスの課題
- 国内の高分子MSワーキンググループ紹介

高分子MSバイオアナリシスの主な課題

- 前処理が複雑
 - 精製・濃縮（固相抽出法, 免疫化学的手法）
 - 酵素消化

└──────────┬──────────> Hybrid MS
- 安定同位体標識内標準物質
 - whole, peptide, flanking peptide
 - 添加方法
- 重要試薬の品質
 - 濃縮に使用するリガンド, 酵素等
- HRMSによる定量方法（複数の多価イオン）
- MHLW LC GL とLBA GLのどちらを参照するか？あるいは独自のバリデーション方法が必要か？

MHLW LC GL及びMHLW LBA GL Criteria 比較

項目	LC GL	LBA GL
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	10個体 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%以上において定量値の真度が理論値の±20%以内(定量下限の場合は±25%以内)
定量下限 真度	±20%以内	±25%以内
検量線用標準試料 真度	±15%以内(LLOQ 20%)	±20%以内(LLOQ 25%)
真度・精度	±15%以内(LLOQ 20%) ・±15%以下(LLOQ 20%)	±20%以内(LLOQ 25%) ・±20%以下(LLOQ 25%) トータルエラー 30%以下 (LLOQ 40%)

MHLW LC GL及びMHLW LBA GL Criteria 比較

項目	LC GL	LBA GL
希釈の妥当性 真度・精度	±15%以内・15%以下	
希釈直線性 真度・精度		±20%以内・20%以下
マトリックス効果 精度	6個体 個体間で15%以下	
マトリックス中の安定性 真度	±15%以内	±20%以内
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 且つ内標準物質の5%以下	プレートやチューブを用いて分析する場合はキャリアオーバーを考慮する必要はないが、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

高分子MSバイオアナリシスに適したバリデーション方法は？

本日の内容

- 高分子MSバイオアナリシスの現状
 - 定量に用いるMS
 - 高分子MSバイオアナリシスの流れ
 - Ligand binding assay (LBA) と LC/MSの比較
- 高分子MSバイオアナリシスの課題
- 国内の高分子MSワーキンググループ紹介

高分子MSワーキンググループ

製薬協

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

安研協

- 鵜藤 雅裕 (株)新日本科学
- 秦 信子 (株)Ig-M

JBF高分子MSタスクフォース

- 合田 竜弥 第一三共(株)
- 後藤 理恵子 (株)JCLバイオアッセイ
- 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

国立衛研

- 川崎 ナナ 生物薬品部長(座長)
- 香取 典子 薬品部 第三室長
- 石井 明子 第二室長
- 橋井 則貴 第一室長

オブザーバー

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

(敬称略)

高分子MSワーキンググループ これまでの活動(予定)

平成26年2月6日

高分子MSワーキンググループ キックオフミーティング
(第1回班会議)

平成26年7月30日

高分子MSワーキンググループ第2回班会議

平成26年10月

高分子MSワーキンググループ第3回班会議(予定)

JBF 高分子MS タスクフォースによる議論

- インタクトで測定する高分子について
- 抗体関連
 - リガンド結合による前処理を行う場合の注意点
 - 標準物質
- 酵素消化後のMS分析
 - 内標準物質
 - 酵素消化後のMS分析を行う場合の注意点
- 今後の議論が必要なポイント
 - 真度及び精度の採用基準
 - マトリックス効果

ご清聴ありがとうございました