

Eat Well, Live Well.



# バイオマーカーとしてのアミノ酸の高精度分析 ～Regulated Bioanalysisの観点で必要となるデータとは？～

2018年2月8日

第9回JBFシンポジウム

味の素株式会社 イノベーション研究所

中山 聡

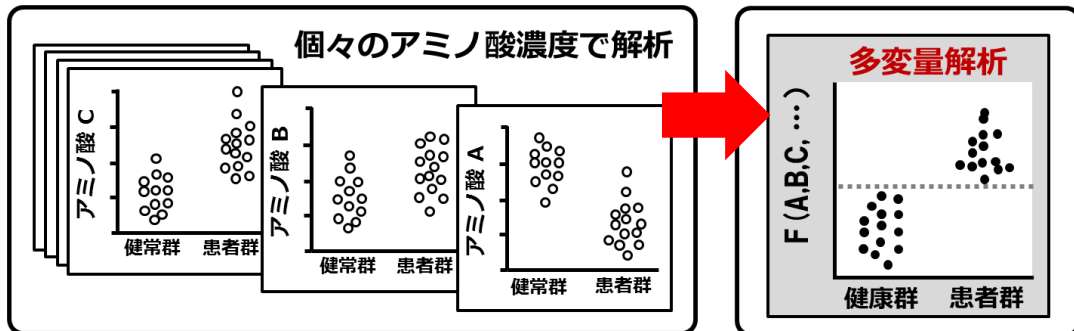




# アミノインデックス® とは

AJINOMOTO.

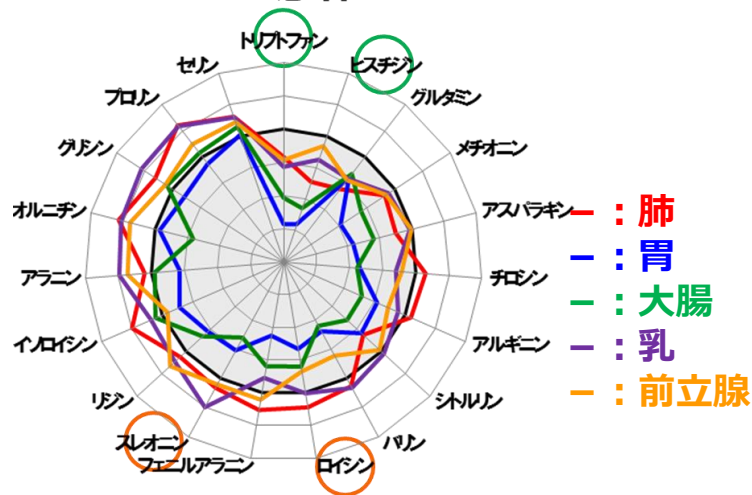
多変量解析によるインデックス式 = F(A,B,C, ...)導入



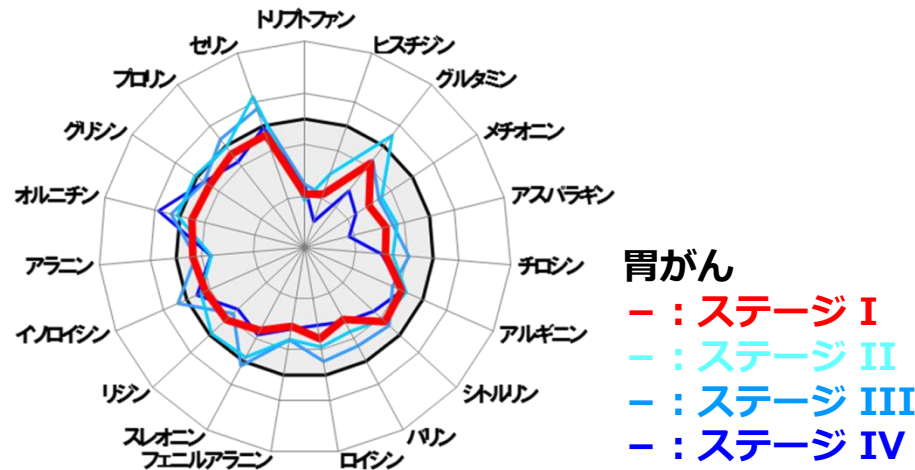
個々のアミノ酸だけでは  
判別できない患者群の  
判別能が向上



### がんごとにプロファイルが異なる がん患者



### 早いステージでプロファイルが変化



血漿中のアミノ酸約20種を バイオマーカー(BM)として「精確」に測定し、  
がん罹患のリスクを示す指標として活用

# バイオマーカー(BM)評価で必要な分析法の性能は？

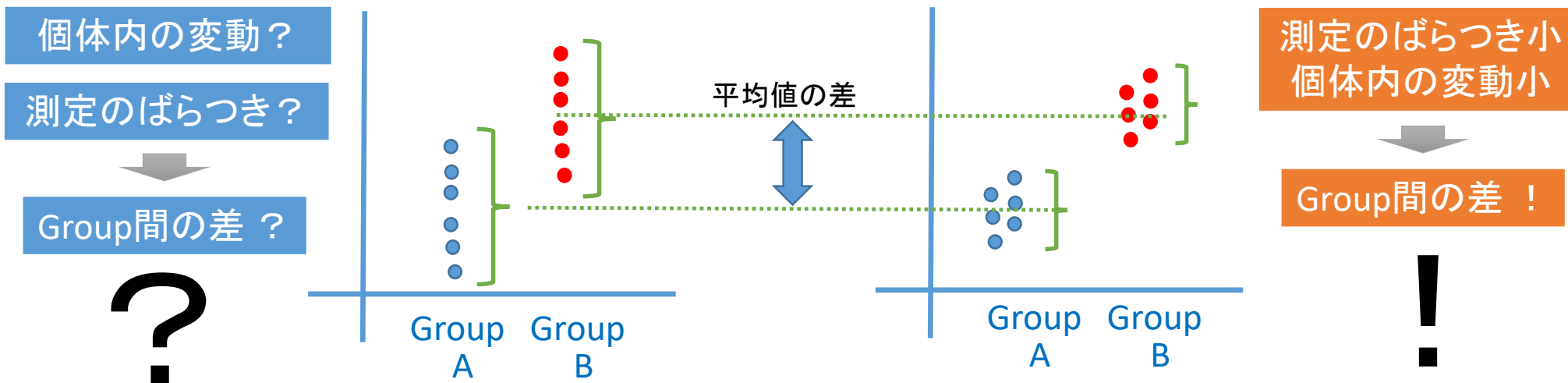
## BMの妥当性

健常人群 と 患者さんの群での差  
同一個体内でのばらつき  
個体間でのばらつき

## BM測定法の妥当性

選択性・特異性  
日内再現性(真度・精度)  
日間再現性(真度・精度)

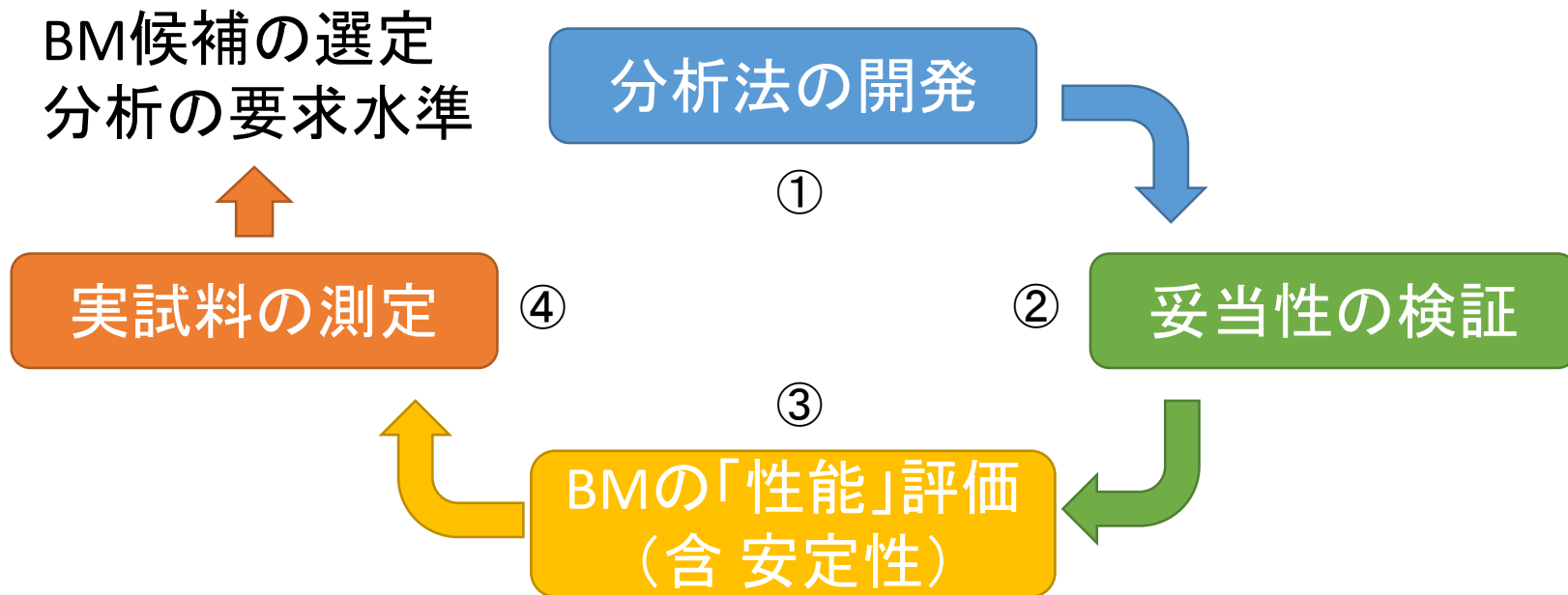
BMの個体内変動(CVi)と個体間変動(CVg)でBMの妥当性を評価 ⇒ 必要な分析性能が決まる



新規のBMではCViとCVgは不明。必要な分析性能は開発初期にはわからない

開発初期段階では、測定変動と個体内変動をなるべく小さくする工夫をするしかない

# バイオマーカー候補の選定ができるまで(第一ステップ)



	第一ステップ
分析法開発	① 暫定法開発
妥当性検証	② 性能確認 ⇒ 妥当性検証(簡易評価)
「性能」評価	③ 変動要因の確認 ⇒ 高リスク要因の洗い出し
実試料測定	④ BM候補の群間での比較 ⇒ BM候補の選定

分析要求水準(判断基準)を決めることも目的



## ①②暫定法の開発と妥当性の検証(性能確認)

BMの変動幅がわからない以上、分析的な要因による変動は最小限にしたい。

### <重要な評価項目>

○ 選択性 : 単一ピークになっているか? 保持時間の変動はないか?

○ 精度 : 評価する群間の「相対評価」ができれば良い

重要度: 日内再現性 = 同一Run内での再現性 > 日間再現性

○ マトリックス効果 : 群間でマトリックス効果に差がある可能性も捨てきれない  
LC-MSで内標準物質を使用しない場合に添加回収率で評価

### <重要度が(比較的)低い項目>

○ 直線性 : 一般的にBMの濃度範囲は狭い。少数ポイントの評価で問題ない

○ 真度 : 内在性成分であるBMの真度はあまり重要ではない

<安定性> : 分析法開発時には、安定性による変動と分析のばらつきとの区別が困難

○ 最も安定と考えられる条件で取り扱う

○ 比較する群間でハンドリングをする条件をそろえる (凍結融解や処理時間など)

○ 同一ロットの標準溶液を用いる。 (小分け⇒凍結⇒使い切り)

# ①②暫定法の開発と妥当性の検証(性能確認)

アミノインデックス® での対応 : アミノ酸アナライザー(ニンヒドリン法)の活用

Pros : 定量性の良さ ⇒ 臨床検査での実績あり

<選択性> : 生体内アミノ酸40種を良好に分離

<再現性> : 標準溶液でのCV値1%以下

生体試料でもCV2%程度測定が可能

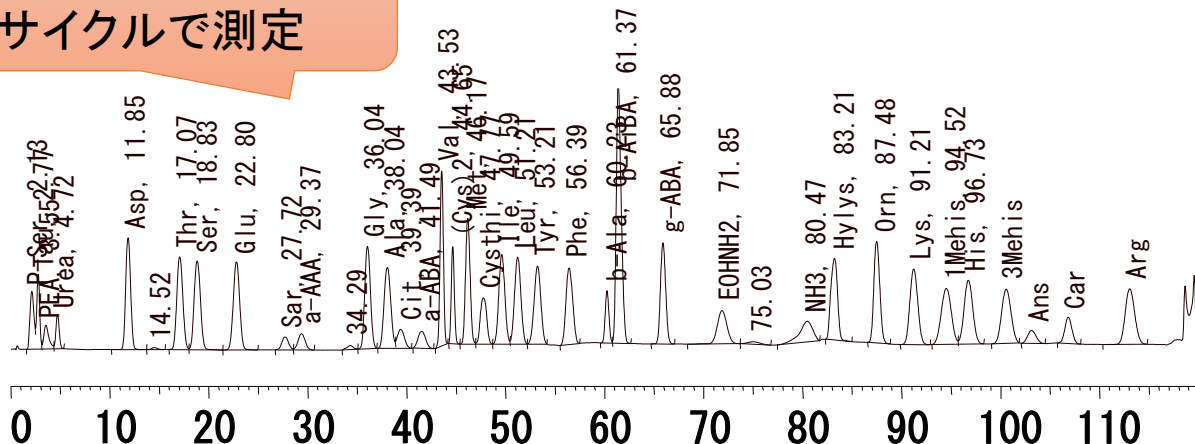
10%程度の  
微細な変動も  
捉えることができた

Cons :

○ 分析時間 : 150分/Cycle ⇒ 測定バッチを工夫して対応

○ 定量範囲があまり広くない ⇒ 相対値なので問題なし

約40種の生体内アミノ酸を  
150分サイクルで測定



アミノ酸アナライザー  
日立 L-8900  
味の素(株)との  
共同開発品

### ③ BMの「性能」評価 : リスクヘッジとリスクアセス

BMの性能とは??

病態・健康状態だけで変動することが望ましいが。。。。

病態・健康状態以外に変動する要因はなるべく排除したい。

#### <試験デザインでカバー> リスクヘッジ

○ 採血ポイントでコントロールできるもの

- ・ 日内変動 (Circadian rhythm)
- ・ 食事の影響



アミノ酸は変動することが知られているので  
時間管理と食事管理 (=空腹時採血) を徹底

○ 個人差に起因するもの

- ・ 性差、人種差、加齢。。。。



なるべく変動要因が少なくなるデザイン

#### <実験で検証> リスクアセスメント

- 採血方法や血漿分離までの操作に起因する項目
- サンプル保管方法 (安定性)

暫定方法の再現性が良ければ  
影響を正しく評価できる

### ③ BMの「性能」評価 : 採血方法/安定性

疾患の有無でのBMの変動が不明のため、判断基準は設定できない

リスク要因の確認

○ 採血管の差（個体内変動）：

Glu（9%）を除いて、CV3%未満

日内再現性は良好

安定性評価の基準（±3%）

○ 長期保存安定性：-20°C、-80°C

-80°Cで安定。-20°Cでは変動するアミノ酸あり。

○ 凍結融解安定性：

3回まで問題なし。

ディープフリーザでの管理で問題なし

○ 溶血の影響：

1%以上で影響あり

溶血度合いのモニターが必要

○ 血液安定性：室温、冷蔵庫、氷水

室温で変動、冷蔵庫でも変動傾向あり

氷水で直ちに冷却が必要

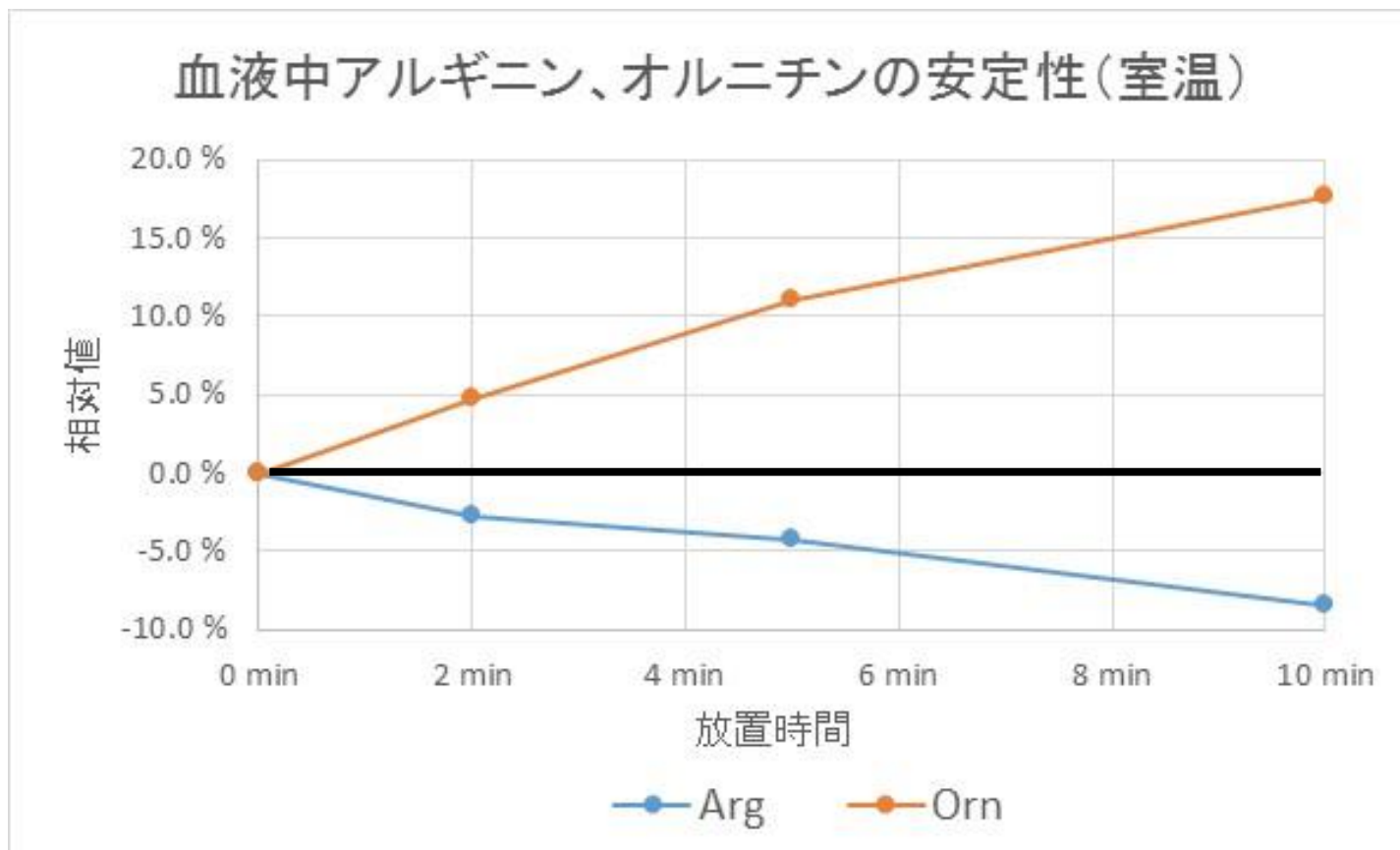
S. Takehana, H Yoshida et al., Clinica Chimica Acta 455 (2016) 68 - 74

今思えば、Benchtop Stabilityがなかった。。。 (反省)



### ③ BMの「性能」評価 : 採血方法/安定性

血漿中のアミノ酸濃度は一定に保たれているので安定だと思っていたら……



血球中のアルギナーゼで、アルギニンがオルニチンに分解

採血後、採血管をすぐに「氷水」で冷却する必要がある

# ④ 実試料の測定 : BM候補の選定と分析への要求基準

採血方法・保存方法 などをプロトコルに織り込み、実測定へ



BM候補の絞り込み  
疾患によって変動する程度が明らかになる



分析方法への要求水準が定まる。

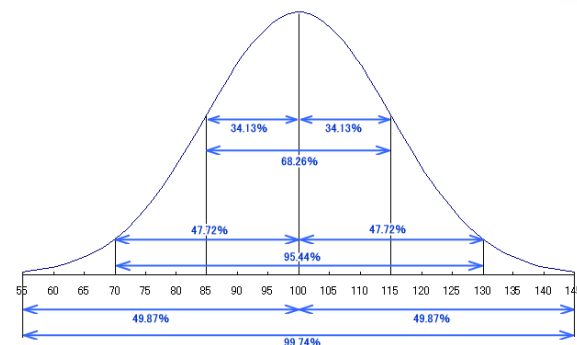
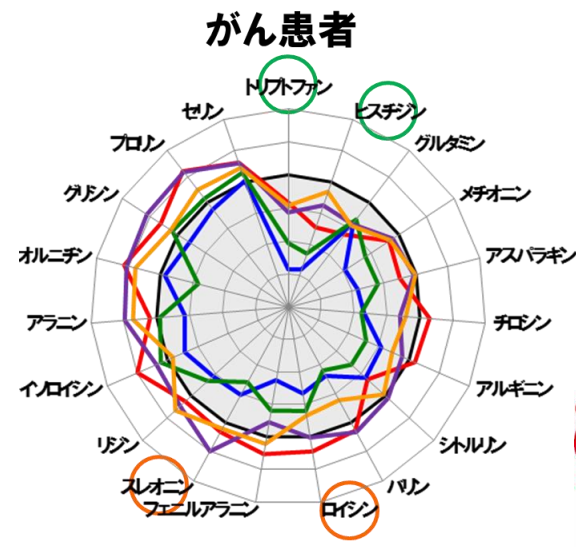
ここで  
ようやく

例えば

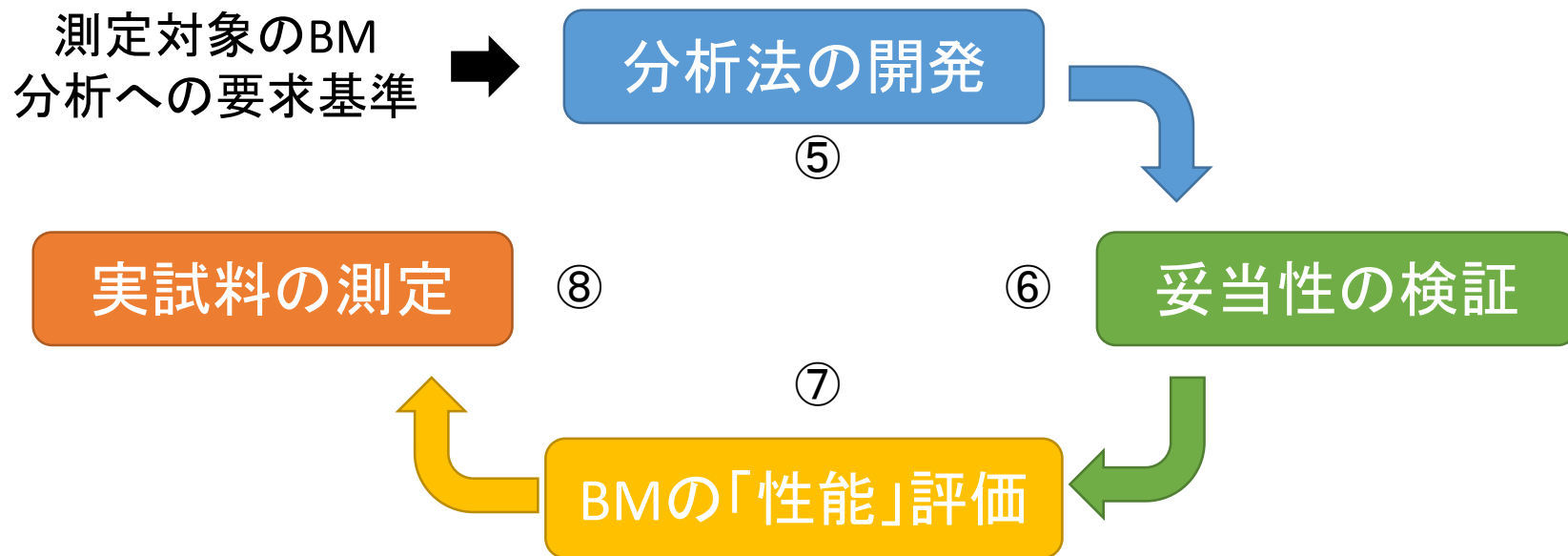
30%の変動を捉えるのに必要な分析精度は ?

Bias ± 2σ が30%に収めようと思えば、  
真度・精度は 10%程度でコントロールする必要あり

BMVガイドラインの基準で評価していたら  
BMの変動を捉えられない



# バイオマーカーの「測定」ができるまで(第二ステップ)



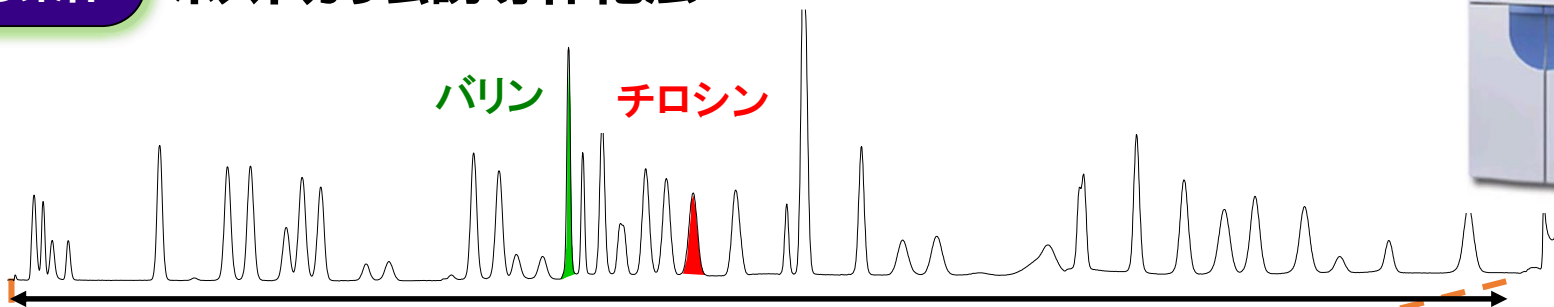
	第二ステップ
分析法開発	⑤ 試験法の確定 (BM変動を捉えられる性能)
妥当性検証	⑥ BMVガイドラインに準拠したValidation試験 (含安定性)
「性能」評価	⑦ 変動要因の確認と対応法の確立
実試料測定	⑧ 実測定でのBM測定 (ゴール)

# ⑤ 分析法の開発

## BMVガイドライン(項目)をクリアできる定量性 多検体測定ができる堅牢性・短時間化

従来の条件

### ポストカラム誘導体化法



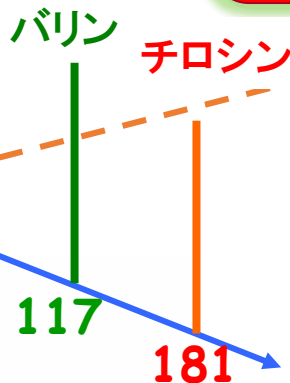
約2時間

味の素(株) : 3つの技術

- ① 質量分析計の導入 : 質量の違いでもアミノ酸を分離
- ② 分析試薬の開発 : 分離効率・感度を高める
- ③ 分離分析技術 : 質量の同じアミノ酸を8分でカラム分離

当社取得特許

8分に短縮



### 自動誘導体化アミノ酸分析装置 UF- Amino Station

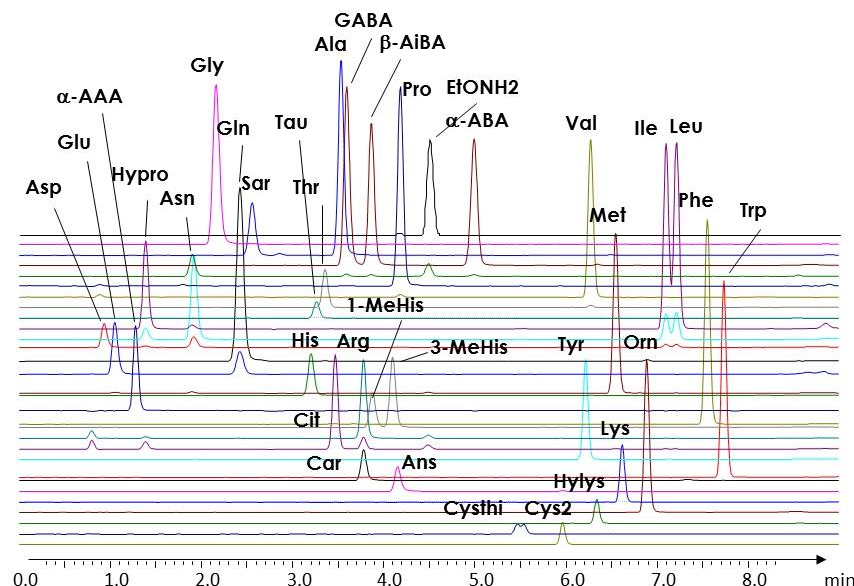
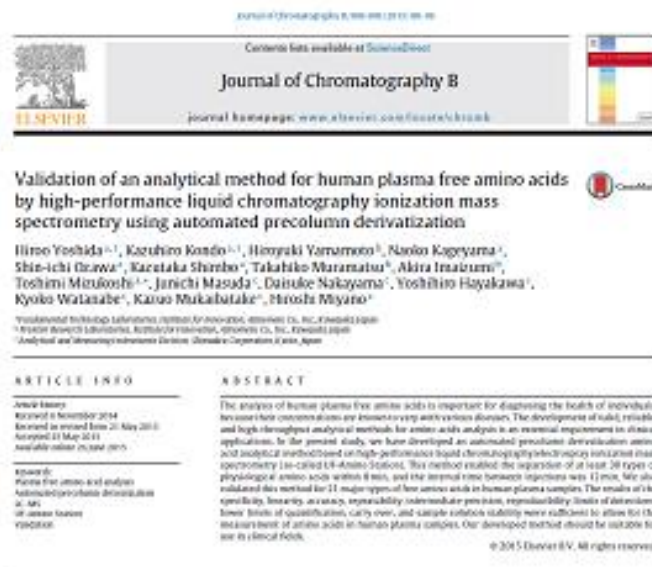
### プレカラム誘導体化LC/MS法



## ⑥ 分析法バリデーション

### BMVガイドラインに準拠したバリデーション試験

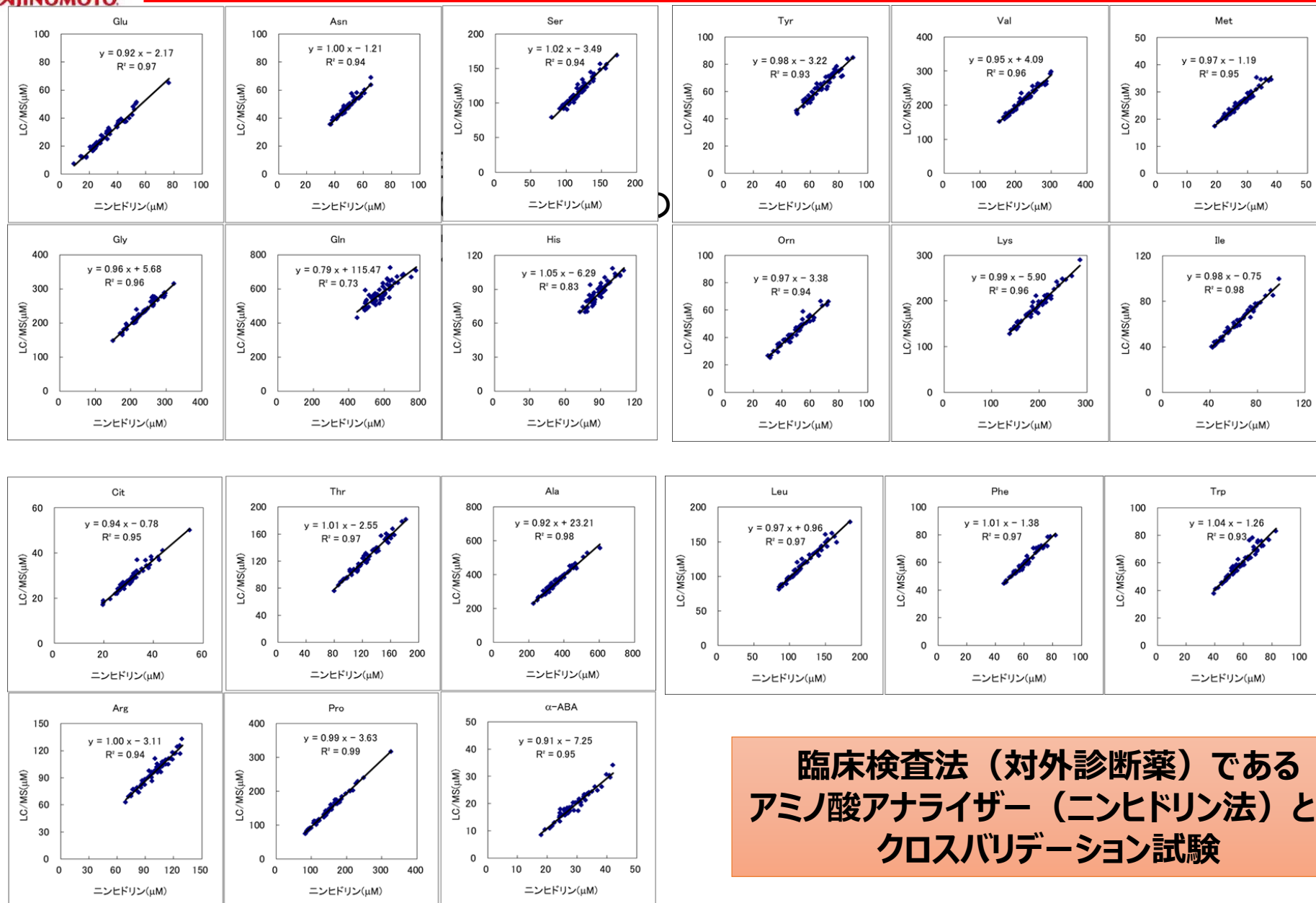
- 代替マトリックスとして水を使用
- 安定同位体ラベルした内標準物質を使用
- 添加回収試験(既知濃度のアミノ酸を添加)にて真度を評価



35種類のアミノ酸分析を12分/サイクルで達成



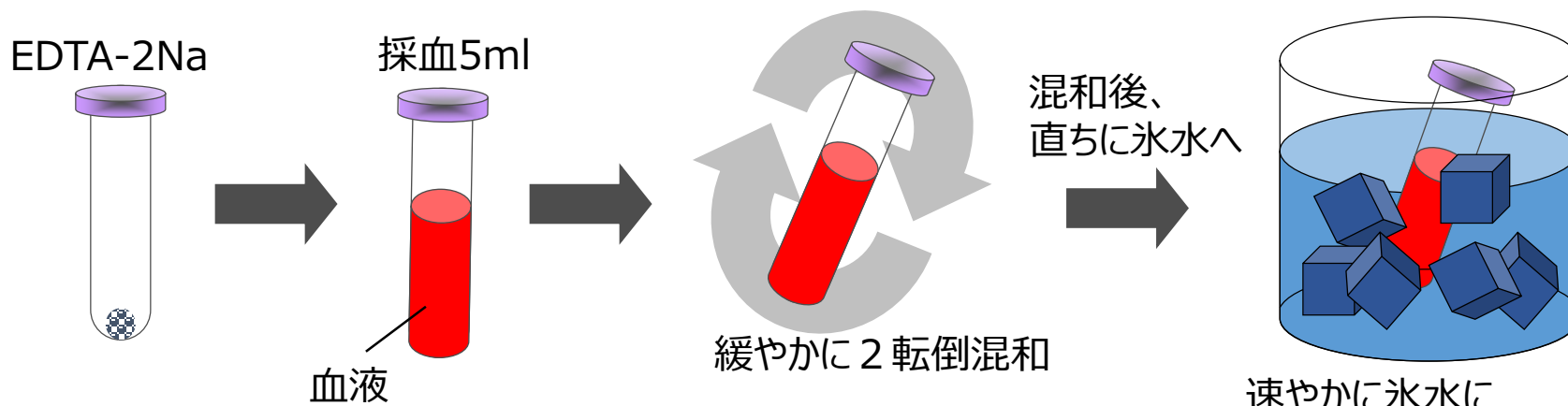
# ⑥ 分析法バリデーション



**臨床検査法（対外診断薬）である  
アミノ酸アナライザー（ニンヒドリン法）との  
クロスバリデーション試験**

# ⑦ バイオマーカーの性能評価 : 変動要因の確認と対応

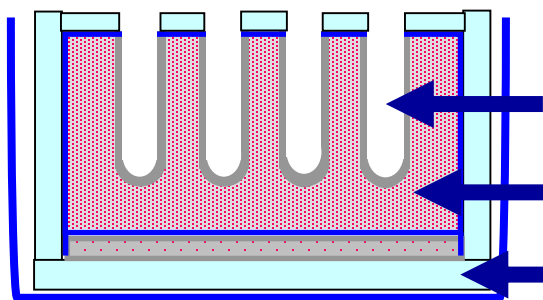
臨床現場でも使える真空採血管専用の冷却装置を開発



氷水で検体を冷却すればアミノ酸を安定化できることが分かっている。  
しかし臨床現場では氷水を使用することはできない。

**キューブクーラー**<sup>®</sup>

当社取得特許



アルミ製  
蓄冷材  
断熱材

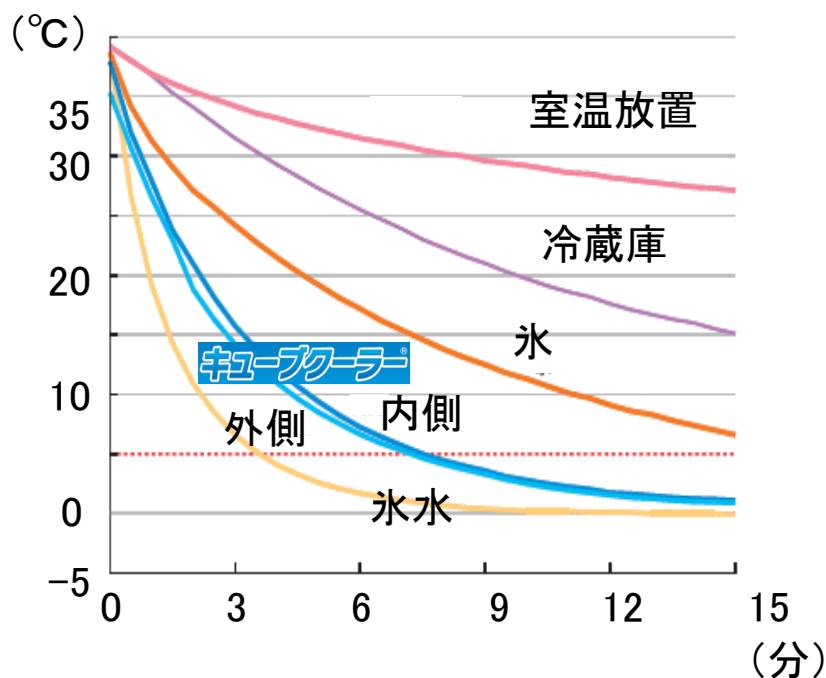


# ⑦ バイオマーカーの性能評価 : 変動要因の確認と対応

臨床現場でも使える真空採血管専用の冷却装置を開発

## 急速冷却

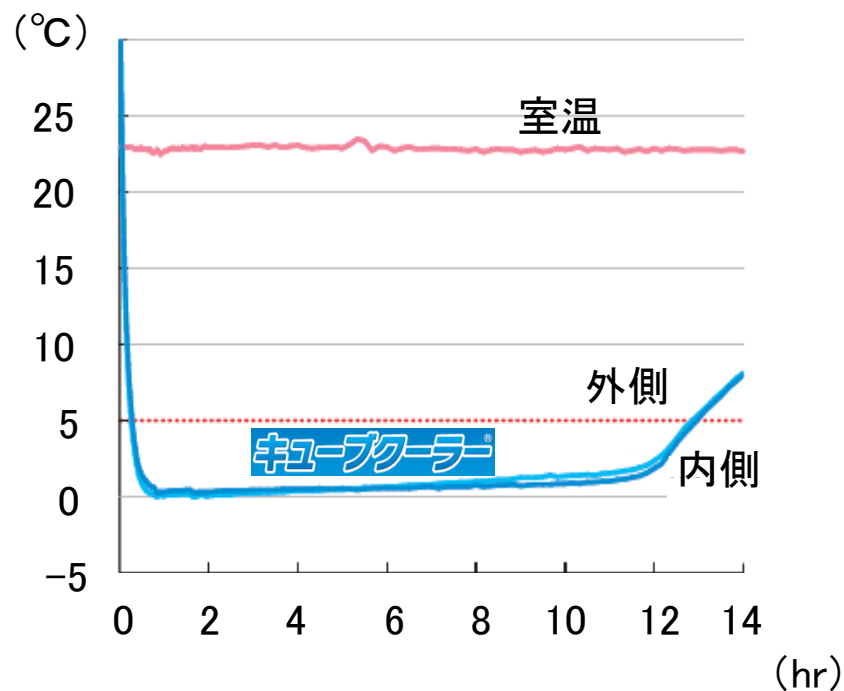
氷水に近い冷却速度



挿入部位の違いによる温度差はない。

## 長時間保冷

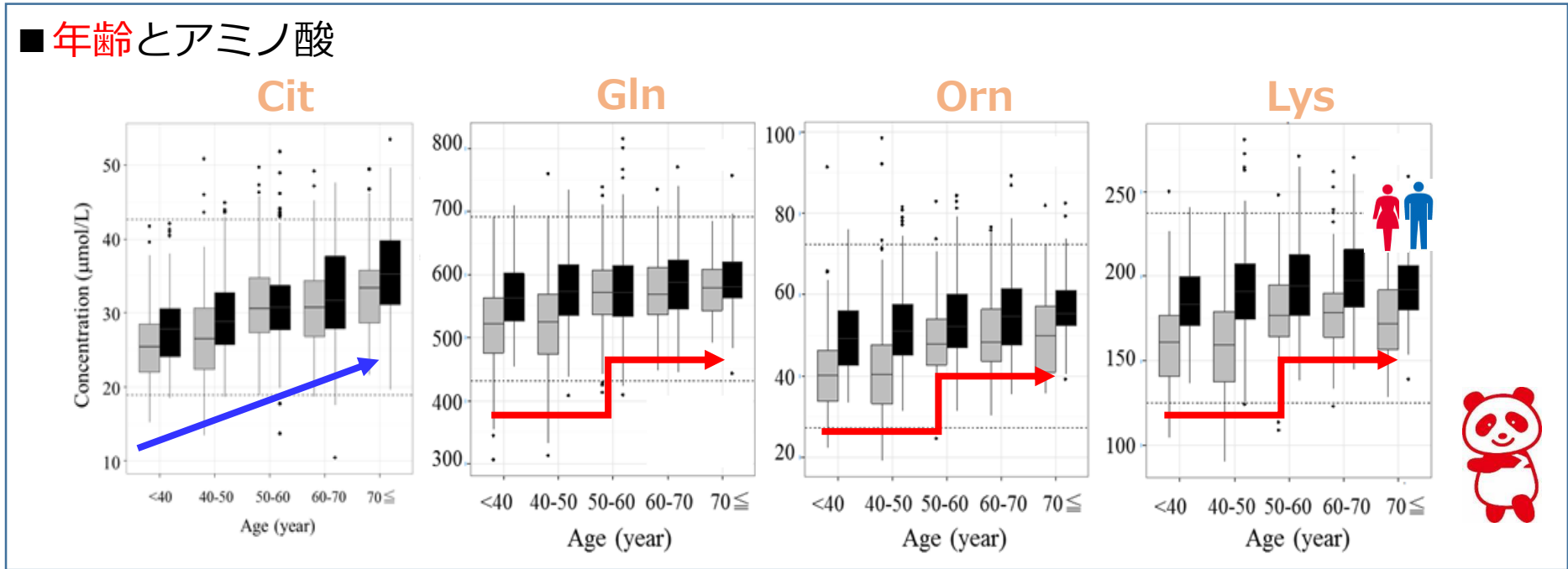
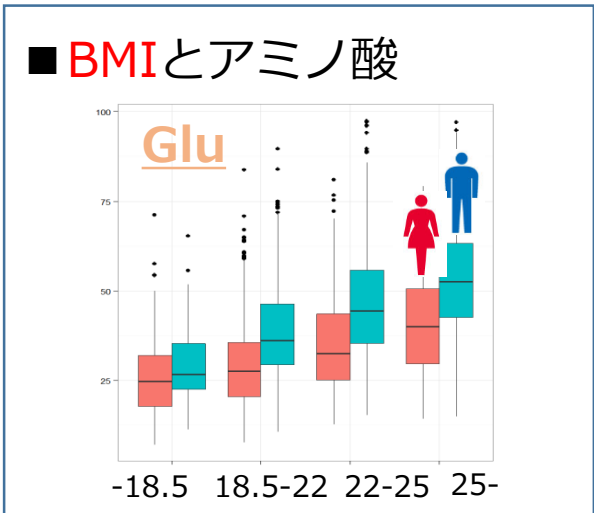
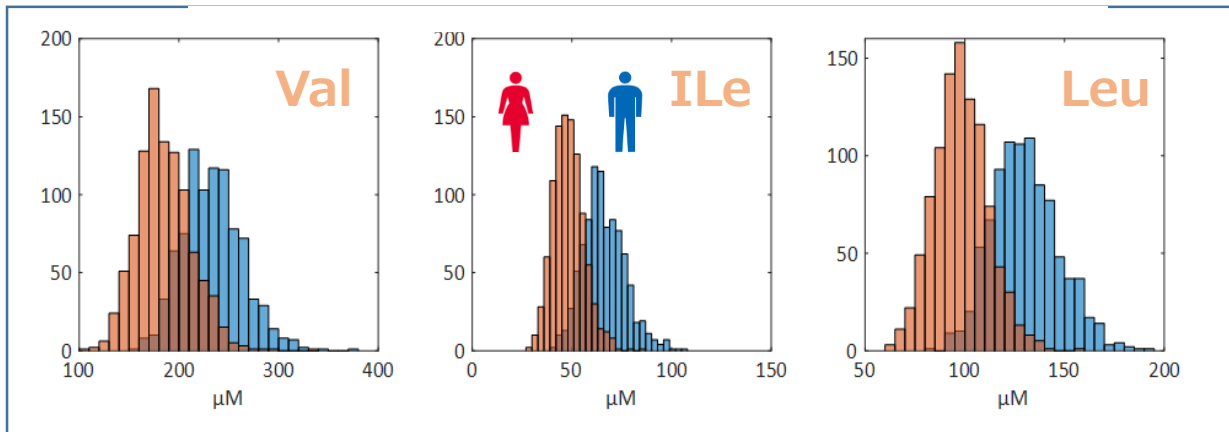
10時間以上0°Cを維持





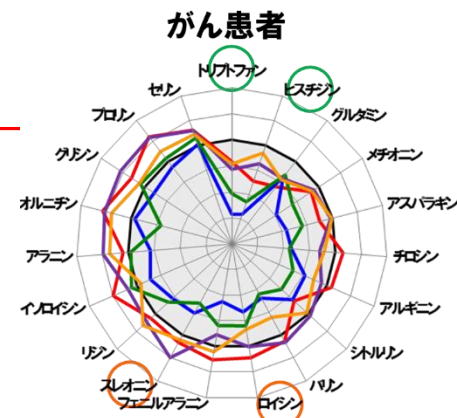
# ⑦⑧ バイオマーカーの性能評価 / 実試料測定

## BMとしての変動要因を検証



# ⑧ 実試料の測定: 分析性能の再検証

## BMデータを取得して、分析性能の過不足を再検証



探索初期

データ不足で基準設定ができない  
再現性(精度)を重視した分析法

BM選定段階でのデータ

BM候補の推定変動幅から  
分析法への要求基準を定める

初期段階のデータを  
妥当なものであったか

BM検証段階でのデータ

分析性能が十分であるか検証

過不足のない性能か

BM測定結果

分析性能を維持するための  
管理パラメータを定める

性能を維持できるか

無条件に15%で  
いいのかな?

開発ステージに応じて分析精度(特に、再現性)を上げていくという発想ではない

## ⑧ 実試料の測定：性能を維持する仕組み

相対値 ⇒ 絶対値へ

- 異なるRunの測定値を比較するため  
⇒ 追加データや基準 (Run Acceptance) が必要

### ・ サンプル由来の要因

- 共存成分 (個体差、食事の影響)  
⇒ 内標準物質の測定値の変動に注意  
⇒ 実試料に近いマトリックスを使った追加評価

測定値が補正されるだけでなく  
変動要因を突き止められる

LC-MSを用いての高精度評価を実施するなら  
安定同位体ラベル体は必須

### ・ 装置由来の要因

検量線の傾き、真度のずれの方向に注意

- ✓ 定量上下限の誤差の影響は定量範囲全体に及ぶ  
⇒ 必要以上に「重みづけ」を使わない  
⇒ 必要以上に「定量範囲」を広げない
- ✓ 安定同位体ラベル体は有用だが。。。  
⇒ d体よりは、<sup>13</sup>C、<sup>15</sup>Nラベル体を  
⇒ 内標準物質の添加量

高濃度側：頭打ちの度合い  
低濃度側：感度・吸着度合い

d体の場合、補正していても  
10%程度変動してくることも

実測定値の結果から  
分析法を見直す判断も

想定されるBMの変動幅 ⇒ Run Acceptanceを厳しくするか、許容範囲とみなすか

## ⑧ 実試料の測定：性能を維持する仕組み

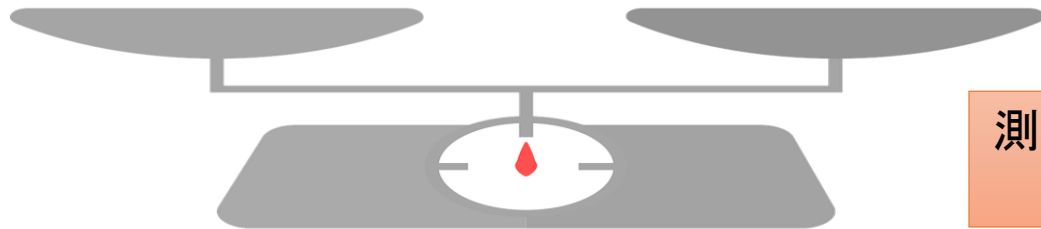
相対値 ⇒ 絶対値へ

- 異なるRunの測定値を比較するため  
⇒ 「標準物質/標準溶液由来の誤差」の管理が必要

実測定値をみながら  
調製法を再検討する  
(過不足のない対応)

- ① 秤量誤差のリスク
- ② 調製誤差のリスク
- ③ 安定性のリスク

- ④ 手間(測定対象)
- ⑤ コスト(使用量)



測定値の目的 (相対値 or 絶対値)  
管理基準 (BMの変動幅で変動)

15%、10%、5%では、  
えらい違い

### ・ リスクヘッジの方向性

#### ＜開発初期＞

- ・ 同一原液を用いる (開発初期)
- ・ 標準溶液/原液は小分けして、使い切りにする

#### ＜開発後期＞

- ・ 検量線とQCサンプル調製で使用する原液を変える
- ・ バッチ間の標準溶液/原液を比較する
- ・ 標準物質の含量(≠純度)補正を行う

BM変動幅が小さい

分析性能への要件水準が高い

標準物質・標準溶液への  
要求水準が高い

# 血漿中アミノ酸分析測定 of 標準化 : BM測定法のゴール



栄養専門部会プロジェクト  
 血漿アミノ酸濃度の基準範囲設定 (代表者: 滑原博)

**Reference intervals for plasma-free amino acid in a Japanese population**  
 Yamamoto & Kondo et al  
*Ann Clin. Biochem.*, first published on March 31, 2015 as doi:10.1177/0004563215583360

**Plasma amino acid profiles in healthy East Asian subpopulations living in Japan.**  
 Nakamura et al, *Am J Hum Biol.* 2015 Sep 26. doi: 10.1002/ajhb.22787



Eat Well, Live Well.



AJINOMOTO

**Validation of an analytical method for human plasma free amino acids by HPLC-ESIMS using automated precolumn derivatization**  
 Yoshida, Kondo et al. *J. Chromatogr. B* 2015 Aug 15;998-999:88-96.

**The effects of pre-analysis sample handling on human plasma amino acid concentrations**  
 Takehana et al. *Clinica Chimica Acta* 29 January 2016 doi:10.1016/j.cca.2016.01.026



Validation of an analytical method for human plasma free amino acids by high-performance liquid chromatography ionization mass spectrometry using automated precolumn derivatization

Accepted Manuscript

The effects of pre-analysis sample handling on human plasma amino acid concentrations  
 Shunji Takehana, Hiroo Yoshida, Shinichi Ozawa, Junko Yamazaki, Kazunaka Shimbo, Akira Nakayama, Toshimi Mizukoshi, Hiroshi Miyano  
 PII: S0009-8981(16)30033-X



日本アミノ酸学会  
 The Japanese Society for Amino Acid Sciences



独立行政法人産業技術総合研究所  
 計量標準総合センター

日本アミノ酸学会第8回学術大会(JSAAS2014)) -- (シンポジウム 標準アミノ酸とその応用)  
 アミノ酸認証標準物質開発の終了報告 高津章子 アミノ酸研究 8(2), 131-133, 2014

# まとめ: バイオマーカー測定

## Regulated Bioanalysisの観点で必要となるデータとは

バイオマーカー測定方法の評価、試料の取り扱いに関する情報取得の流れ

メタボロミクス等の網羅分析法 / Stockの試料を使った測定

再現性を重視した分析法(暫定法)

個体変動を意識した取り扱い

アミノ酸アナライザー

低温でのハンドリング、凍結融解

測定値に影響を与える要因の特定  
(試料採取・ハンドリング方法 / 安定性 etc)

採血後の安定性がポイント

バリデーション試験  
追加評価項目

BM候補の選定・分析法への要求水準の決定

血液安定性  
溶血の影響

判断基準の  
設定

分析法開発

高精度分析

BMVガイドラインより  
厳しい判断基準

試料採取条件

空腹・午前採血

分析法バリデーション試験

実測定におけるRun Acceptanceの設定 (In Study Validation)

システマティックなデータマネージメントにより、効率的な測定法開発につながるはず

Eat Well, Live Well.



本発表は、  
15年に及ぶアミノインデックス<sup>®</sup> 研究データのうち  
バイオマーカー測定法開発についてまとめたものです。  
サンプルを提供していただいた被検者様  
共同研究者、ビジネスパートナーの皆様  
に感謝申し上げます。

ご清聴ありがとうございました。

