



DG2016-26

内因性物質の定量- LBA - *Quantitative analysis of endogenous substances (LBA)*

-
- LBAによる内因性物質測定における
バリデーション試験実施法 -
 - Validation of LBA for the analysis of endogenous substances -

<http://bioanalysisforum.jp/>





Name	Company
小谷 洋介 Yosuke Kotani	新日本科学 <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i>
小原 厚行 Atsuyuki Kohara	アステラス製薬 <i>Astellas Pharma Inc.</i>
笹原 里美 Satomi Sasahara	東和薬品 <i>Towa Pharmaceutical Co., Ltd.</i>
清水 浩之 Hiroyuki Shimizu	東レリサーチセンター <i>Toray Research Center, Inc.</i>
北條 恵里香 Erika Hojo	イナリサーチ <i>Ina Research Inc.</i>
中島 旭 Akira Nakajima	エーディア <i>EIDIA Co., Ltd.</i>
宮本 裕恵 Hiroe Miyamoto	住化分析センター <i>Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.</i>



JBF 活動の内容

- ◆2016年5月
 - ✓ DGサポーターからメンバー募集 Member recruitment
- ◆2016年7月25日
 - ✓ キックオフ会議
(DG2016-25及びDG2016-27との合同会議)
Kick off meeting with DG2016-25 and DG2016-27
- ◆2016年8月～2017年1月
 - ✓ Web会議(平均月1回)及びメールによる議論
Monthly teleconferences and e-mail conversations
 - ✓ DGサポーターへアンケート配信 Survey DG supporters
- ◆2016年12月～2017年1月
 - ✓ まとめ、シンポジウム発表準備 poster preparation





Backgrounds

- 生体試料中の内因性物質を測定する場合、分析対象物質がブランクの生体マトリックス中に、分析に影響を与えるレベルで含まれることがあることから、検量線試料及びQC試料の調製方法やバリデーション試験の実施方法及び評価方法が大きな課題となる。
- Ligand binding assay (LBA) での内因性物質の測定については、2015年のDG2015-15「内因性物質の定量 (2)」において、代替マトリックスの選択法及び妥当性評価に焦点をあてて議論し、第7回JBFシンポジウムでその成果を発表した。





Backgrounds

- In the quantitative assay of endogenous substances in biological samples, the preparation of standard samples and QC samples, and the implementation and evaluation of method validation are major issues because the levels of the endogenous substances contained in the original biological matrix as analyte sometimes affect the assay results.
- The quantitative assay of endogenous substances by ligand binding assay (LBA) was discussed in terms of “selection and evaluation of alternative matrix” in DG2015-15 “Quantitative analysis of endogenous substance (2)” and the outcome was presented at the 7th JBF symposium.



Backgrounds

Discussion:

内因性物質の定量 Quantitative assay of endogenous

2014 (DG2014-08): LC-MS/MS

2015 (DG2015-15): LC-MS/MS, LBA

- 代替マトリックスの選択法 “selection of surrogate matrix”



2016 (DG2016-26): LBA

- 内因性物質測定におけるバリデーション試験実施法
“the implementation and evaluation of method validation”



Objective

- 本DGではLBAで内因性物質を測定する場合のバリデーション試験の実施方法及び評価方法について焦点をあてて議論を行った。
- また、DGサポーターを対象にアンケートを実施したので、その集計結果と合わせて議論した内容について報告する。

<http://bioanalysisforum.jp/>



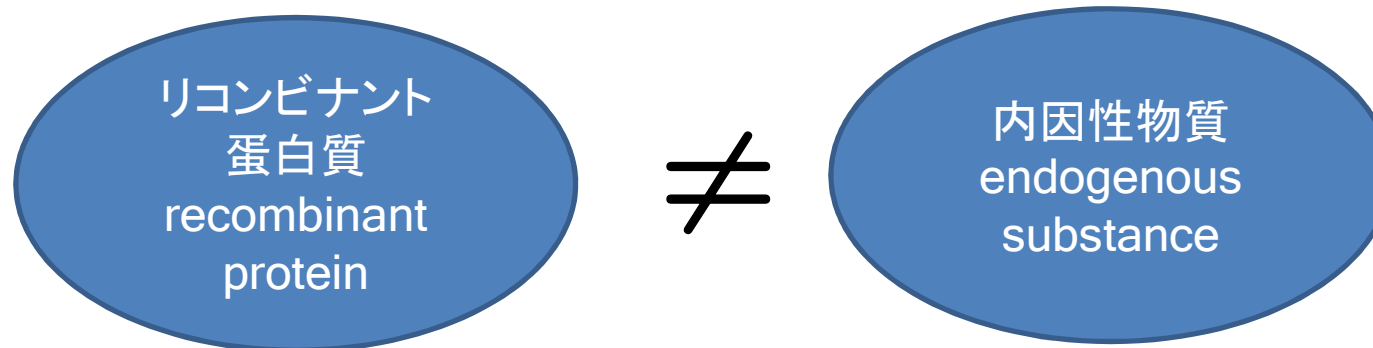
 **Objective**

- In this DG2016-26, the discussion was held with a focus on “the implementation and evaluation of method validation”.
- We surveyed the implementation and evaluation of the method validation which DG supporters had conducted. This presentation provides the results of the survey and the overview of our discussion.



How to proceed with discussion

- LBAにおいては、測定対象物質が主にタンパク質であることから、内因性物質と試験に用いる標準物質(リコンビナント蛋白質)は同じではないということも考慮する必要がある。
- The analyte is mainly protein in the LBA. It must be considered that endogenous substance and standard substance (recombinant protein) is not same.





How to proceed with discussion

測定対象物質を下記2つのパターンに分けて議論を実施

We focused two analytes as below.

- i) **分析対象物質: 医薬品**
(内因性物質のリコンビナント蛋白質等)
Analyte : medicinal substance
(recombinant protein of endogenous substance)
- ii) **分析対象物質: 内因性物質**
医薬品ではなくバイオマーカー等として利用
Analyte: endogenous substance
(used as a biomarker etc.)





Discussion contents

- バリデーションパラメーター validation parameter
⇒ 試料の調製方法、濃度ポイント、使用マトリックス(実マトリックス or 代替マトリックス)、評価方法.....
Sample preparation, Concentration level, Matrix (actual matrix or surrogate matrix), Evaluation.....
- 干渉物質 Interfering substance
- パーシャルバリデーション Partial validation
- アンケート調査 Survey to target DG supporters

<http://bioanalysisforum.jp/>



 **用語①**

語句	説明
LBAガイドライン (LBA guideline)	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
トータルエラー (Total error)	真度から100%を引いた値の絶対値と精度の和。
フック効果 (Hook effect)	分析対象物質の濃度が非常に高い場合に、レスポンスが抑制されること。フック効果がある場合は、検量線の定量上限を超える濃度の試料の定量値が検量線の定量上限以下となるため注意する。リガンド結合法のうち、特に液相中で結合試薬と分析対象物質を反応させる場合に発生する。

 **用語②**

語句	説明
希釈直線性 (Dilutional linearity)	マトリックスに標準物質などを添加し、擬似的に調製した高濃度試料を用いて希釈の直線性を確認する。直線性を得られる希釈倍率までが希釈可能倍率となる。
希釈平行性 (Parallelism)	主に投与によって得られた高濃度の実試料を用いて希釈による濃度推移が検量線と一致するかを確認する。
干渉物質 (Interfering substance)	マトリックス中に存在し、結合試薬と分析対象物質の結合等に影響を及ぼす可能性がある物質

<http://bioanalysisforum.jp/>



バリデーション 検量線・真度及び精度

Validation
Calibration curve · Precision and accuracy



検討項目 (Contents)

< 検量線 (Calibration curve) >

- ✓ 標準品及びマトリックス
(Standard and matrix)
- ✓ 判定基準 (Criteria)

< 真度及び精度 (Precision and accuracy) >

- ✓ QC試料の調製 (Preparation of QC samples)
- ✓ 評価方法 (Evaluation)
- ✓ 判定基準 (Criteria)





JBF 検量線 (標準品)

<分析対象物質:医薬品>

- 投与する物質そのものを使用する。

<分析対象物質:内因性物質>

- リコンビナントタンパク質、キット添付品、ヒト試料由来精製品などを使用する。





検量線 (使用するマトリックス)

<分析対象物質:医薬品>

- 代替マトリックス(キット添付品、タンパク添加緩衝液)
- 内因性濃度がLLOQよりも十分に低値の場合は実マトリックスを使用し、それ以上の濃度の場合は代替マトリックスを使用
- 内因性濃度がLLよりも低かった際、ブランク減算を実施し、実マトリックスを使用

<分析対象物質:内因性物質>

- 代替マトリックス(キット添付品、タンパク添加緩衝液)





検量線（判定基準）

<分析対象物質：医薬品>

- LBAガイドラインに従っている

<分析対象物質：内因性物質>

- LBAガイドラインに準拠しているが、難しい場合は+5%等基準の幅を緩める





真度及び精度（QC試料の調製）

＜分析対象物質：医薬品・内因性物質共通＞

- 代替マトリックスに標準溶液を添加して調製
(実マトリックスの内因性濃度に関わらず代替マトリックスを使用)
- 実マトリックスの内因性濃度がLLOQよりも十分に低い場合
実マトリックスに標準溶液を添加して調製
- 実マトリックスの内因性濃度がLLOQ相当またはそれ以上の場合
 - 実マトリックス以上の濃度について評価する場合は、標準溶液を添加して評価
 - 実マトリックスよりも低い濃度の評価をする場合は、その濃度のみ代替マトリックスを用いて評価する場合もあり。
- 内因性濃度のある実マトリックスを用いて(標準物質は非添加)精度のみを確認。(分析対象物質が内因性物質のみ)





真度及び精度（QC試料の調製）

＜分析対象物質：医薬品＞

- LL、L、M、H、ULの5ポイント
- n=3で実施しているという意見が多かった。
- その他、n=3～5で実施

＜分析対象物質：内因性物質＞

- LL、L、M、H、ULの5ポイント
- L、M、Hの3ポイント
- 低濃度、高濃度の2ポイント
- 代替マトリックスに標準物質を添加の場合：LL、L、M、H、UL、実マトリックスに標準物質を添加：L、M、H（LL、ULは内因性濃度により実施）
- 実マトリックスのみの場合：検量線範囲の2～3濃度
- n=3で実施しているという意見が多く、その他はn=5又は6





真度及び精度（QC試料の調製）

＜分析対象物質：医薬品＞

- クライテリアはガイドラインに従う

＜分析対象物質：内因性物質＞

- クライテリアはガイドラインに準拠または、難しい場合などは基準の幅を広げることもある
(+5% or 実際の試験で予想される変動幅に応じて対応)
- トータルエラーは評価していないという意見もあった。





真度及び精度（評価方法）

<分析対象物質：医薬品>

- 真度及び精度

<分析対象物質：内因性物質>

- 真度及び精度
- 精度のみ

⇒LBAにおけるタンパク質の定量は標準物質と生体内因性物質は異なるものであることから、本当の意味での真度は出せないと考える。





真度及び精度（評価方法）

- 実マトリックスに内因性がある場合の真度の算出方法
（真度を算出する人のみの回答）
 - 予備検討でAかBを決める
 - B
 - ブランク減算した吸光度の値から検量線の作成及び濃度算出を行っている

$$A: \text{真度}(\%) = (\text{試料中分析対象物質濃度} - \text{内因性物質濃度}) / \text{標準物質濃度} \times 100$$

$$B: \text{真度}(\%) = \text{試料中分析対象物質濃度} / (\text{内因性物質濃度} + \text{標準物質濃度}) \times 100$$





真度及び精度（判定基準）

<分析対象物質:医薬品>

- クライテリアはガイドラインに従う

<分析対象物質:内因性物質>

- クライテリアはガイドラインに準拠または、難しい場合などは基準の幅を広げることもある
(+5% or 実際の試験で予想される変動幅に応じて対応)
- トータルエラーは評価していないという意見もあった。





バリデーション 選択性・安定性

Validation
Selectivity · Stability



検討項目 (Contents)

< 選択性 (Selectivity) >

- ✓ 濃度ポイント (Concentration level)
- ✓ 判定基準 (Criteria)

< 安定性 (Stability) >

- ✓ QC試料の調製 (Preparation of QC samples)
- ✓ 評価方法 (Evaluation)
- ✓ 判定基準 (Criteria)





選択性（濃度ポイント）

<分析対象物質：医薬品>

- 濃度はLLOQ又はLOQで実施するという意見が多かった。
- 高濃度の場合は、MQC又はHQCで実施
- 高濃度の場合は、内因性のばらつきに吸収されない程度の添加濃度を設定

<分析対象物質：内因性物質>

- LQC～HQC
- 実試料の定量値に近い濃度の標準品を実マトリックスに添加して評価する。





JBF 選択性（判定基準）

<分析対象物質：医薬品>

- クライテリアはガイドラインに従う

<分析対象物質：内因性物質>

- クライテリアはガイドラインに準拠または、難しい場合などは基準の幅を広げることもある(+5%など)





安定性 (QC試料の調製)

<分析対象物質: 医薬品>

- LQC及びHQC (LBAのガイドラインに従うという意見で一致)
- 調製方法としては、実マトリックスに標準物質を添加。

<分析対象物質: 内因性物質>

- LQC及びHQC、3濃度、あるいは低濃度側と高濃度側の2濃度
- 内因性濃度が低い場合は、実マトリックスに標準物質を添加して実施。
- 内因性濃度が低濃度または高濃度の実マトリックスを用いる。
- 内因性濃度が高い場合は、低濃度及び高濃度付近となるように希釈して使用。
- 検量線の間濃度の実試料を使用

⇒本来の内因性物質については、調製方法は様々



安定性（評価方法・判定基準）

<分析対象物質：医薬品>

- ガイドラインに従う。

<分析対象物質：内因性物質>

- 真度、残存率又は変化率で評価
- 判定基準はガイドライン（±20%）に従うが、難しい場合は+5%幅を広げる。
- 予想される変動幅に応じてクライテリアを緩める。





バリデーション 希釈直線性 / 希釈平行性

Validation
Dilution linearity / Dilution parallelism



検討項目 (Contents)

< 希釈直線性 (Dilutional linearity) >

- ✓ フック効果の濃度設定
(Concentration level of sample for hook effect)
- ✓ 希釈溶媒 (Buffer solution for dilution)
- ✓ 評価方法 (Evaluation)
- ✓ 判定基準 (Criteria)
- ✓ フック効果があった場合の対処
(Troubleshooting for hook effect)
- ✓ キット使用などで高濃度試料を調製できない場合の対処
(Troubleshooting for sample preparation)





検討項目 (Contents)

< 希釈平行性(Parallelism) >

- ✓ 実施経験の有無
(Experience of parallelism)
- ✓ 実施のタイミング (Implementation period)
- ✓ 希釈溶媒
(Buffer solution for dilution)
- ✓ 評価方法(Evaluation)
- ✓ 判定基準 (Criteria)





希釈直線性（フック効果の濃度設定）

＜分析対象物質：医薬品＞

- 予想されるCmax以上
- 調製可能な最高濃度

＜分析対象物質：内因性物質＞

- 測定する内因性物質の最高濃度
- 調製可能な最高濃度
- 実施しない。または、調製が難しい場合は実施していない。





希釈直線性（希釈溶媒）

<分析対象物質：医薬品>

- 内因性濃度が測定系に影響のない場合は実マトリックスで希釈する。
- 実マトリックスで希釈して濃度補正を行う。
- 代替マトリックスで希釈する。

<分析対象物質：内因性物質>

- 代替マトリックス（検量線を調製するマトリックスと同じマトリックス）





希釈直線性（評価濃度数, n 数, 希釈倍率）

＜分析対象物質：医薬品・内因性物質共通＞

- 2～5濃度、 n 数は1～6までであるが、 $n=3$ で実施するという意見が多かった。
- 希釈可能倍率は確認できた倍率までであれば変更可能としていることが多いが、確認済みの希釈倍率のみ可能との取り扱いもある。

<http://bioanalysisforum.jp/>





希釈直線性（判定基準）

<分析対象物質：医薬品>

- LBAガイドラインに従う。
（複数の希釈倍率のサンプルをまとめて評価していることがある。）

<分析対象物質：内因性物質>

- 基本的にLBAガイドラインに従うが、従うことが難しい場合には許容範囲を5%広げるなどの対応を行うことがある。





希釈直線性（フック効果があった場合の対処）

＜分析対象物質：医薬品・内因性物質共通＞

- 分析法の変更を行う。
（固相化抗体濃度を上げる。MRDを上げる。）
- サンドイッチELISAではフック効果は起こりにくい？
- 実試料分析において、再測定の基準を変更するなどの対処法を検討する。

<http://bioanalysisforum.jp/>





希釈直線性 (キット使用などで高濃度試料を調製できない場合)

<分析対象物質:内因性物質>

(投与するものについては標品は投与品と同じものを使用するため該当しない。)

- 調製できる最高濃度で対応する。
- 標準物質を変更する。
- MRD後の試料でCmax以上になるように調製して評価する。
- 高濃度試料を調製できない場合はフック効果の確認は実施しない。





JBF 希釈平行性

＜分析対象物質：医薬品・内因性物質共通＞

- 現状では実施しないことが多い。
- 実施時期としてはバリデーション時に実施したいが、実際は実試料を入手できる時期となる。
- 希釈溶媒は希釈直線性と同じものを使用する。
- 実施内容は希釈直線性と同様の内容、数個体で実施する。
- 判定基準はEMAガイドラインに従うが、本来の内因性の場合、状況に応じて許容範囲を拡げることも可能と考える。





干渉物質、 パーシャルバリデーション

Interference Substance,
Partial Validation



検討項目 (Contents)

<干渉物質 (Interference Substance)>

- ✓ 対象 (Target)
- ✓ 評価方法 (Evaluation)
- ✓ 判定基準

<パーシャルバリデーション (Partial Validation)>

- ✓ 対象 (Target)
- ✓ 評価方法 (Criteria)





JBF 干渉物質（対象）

- HAMA (Human Anti Mouse Antibody)
- RF (Rheumatoid Factor)
- 血中物質（ビリルビン、乳び、溶血ヘモグロビン等）
- 薬剤（投与薬剤、併用薬剤）

RF、血中物質については実施例がなかった。





干渉物質（HAMA：評価方法）

<分析対象物質：医薬品>

- 干渉抑制剤添加試薬でバリデーション試験全項目の実施
- HAMA検出キットによる確認

<分析対象物質：内因性物質>

- 干渉物質抑制剤添加試薬でバリデーション試験全項目の実施
- 添加回収試験
- HAMA検出キットによる確認





干渉物質 (HAMA : 判定基準)

<分析対象物質:医薬品>

- クライテリアはLBAガイドラインに従う

<分析対象物質:内因性物質>

- クライテリアはガイドラインに準拠または、難しい場合などは基準の幅を広げることもある(±5~10%など)





干渉物質（薬剤：評価方法）

<分析対象物質：医薬品>

- 特異性、選択性、安定性、再現性

<分析対象物質：内因性物質>

- 選択性、再現性（血中最高濃度付近の濃度を添加して実施）
- 添加、未添加検体を調製して影響度合いを確認する。





干渉物質（薬剤：判定基準）

<分析対象物質：医薬品>

- クライテリアはLBAガイドラインに従う

<分析対象物質：内因性物質>

- クライテリアはガイドラインに準拠または、難しい場合などは基準の幅を広げることもある(±5%など)
- 基準は設けず影響度合いを確認する





パーシャルバリデーション

＜分析対象物質：医薬品、内因性物質共通＞

対象

- ロット変更（重要試薬（抗体・標準物質）、キット等）
- 主要機器の変更（測定機器等）
- 測定者の変更

評価方法

- 検量線、真度及び精度





<対象物質:医薬品 Analyte: medicinal substance>

内因性濃度を考慮する必要があるものの、概ねガイドラインに従って実施されている。

It is generally conducted according to the guideline, although it is necessary to consider the levels of the endogenous substances in biological samples.

<測定対象物質:内因性物質 Analyte: endogenous substance >

測定する目的にもよると思われるが、上記の場合とは異なり、その評価方法及び手法はさまざま。

There is various evaluation in contrast to <Analyte: medicinal substance> depending on purpose of quantitative assay.



DG2016-26

内因性物質の定量- LBA -

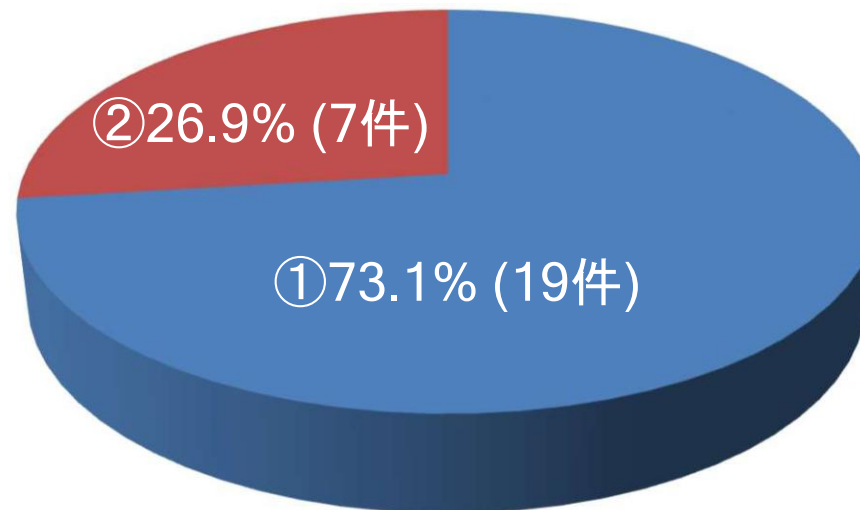
アンケート結果

<http://bioanalysisforum.jp/>



Q1:所属について教えてください。

- ①製薬メーカー
- ②CRO
- ③その他

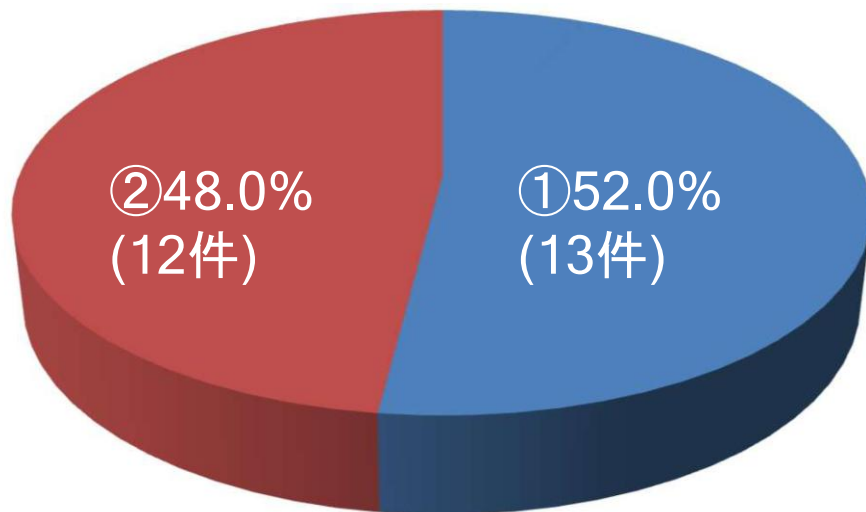




JBF 回答の可否

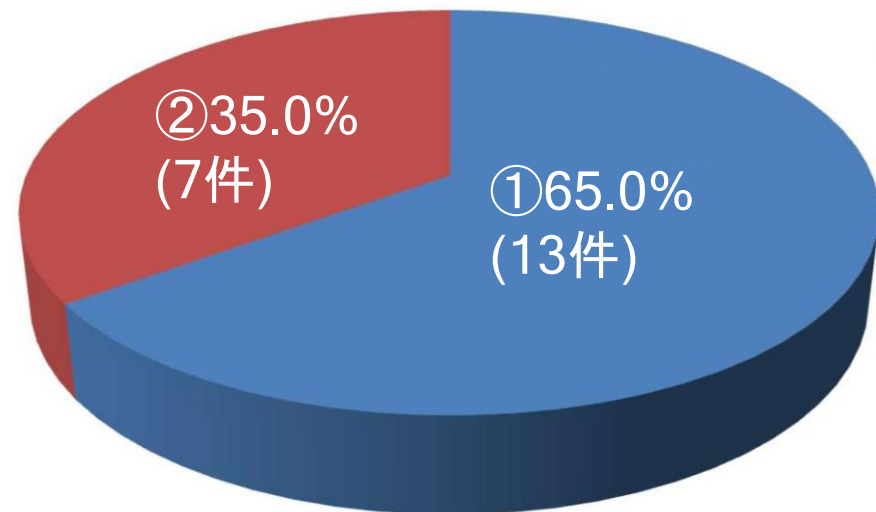
分析対象物質が**医薬品**(内因性物質のリコンビナント蛋白質等)の内因性物質定量についてご回答いただけますか？

- ①回答できる
- ②回答できない



分析対象物質が**医薬品**ではなくバイオマーカー等として利用する内因性物質定量についてご回答いただけますか？

- ①回答できる
- ②回答できない



<http://bioanalysisforum.jp/>

コメント: 回答できない理由は、経験がないため

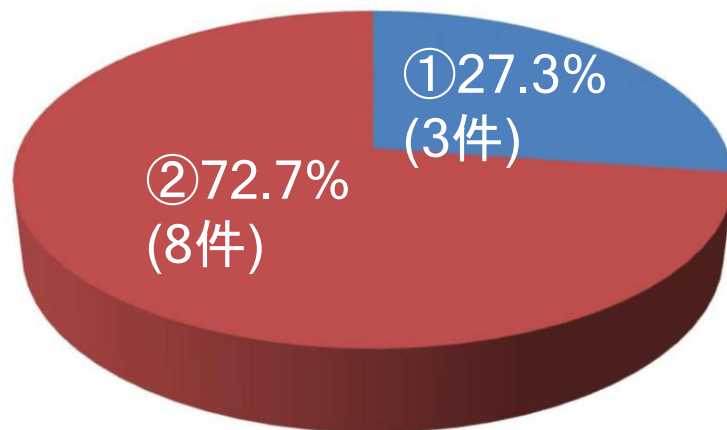


分析法確立における内因性物質濃度

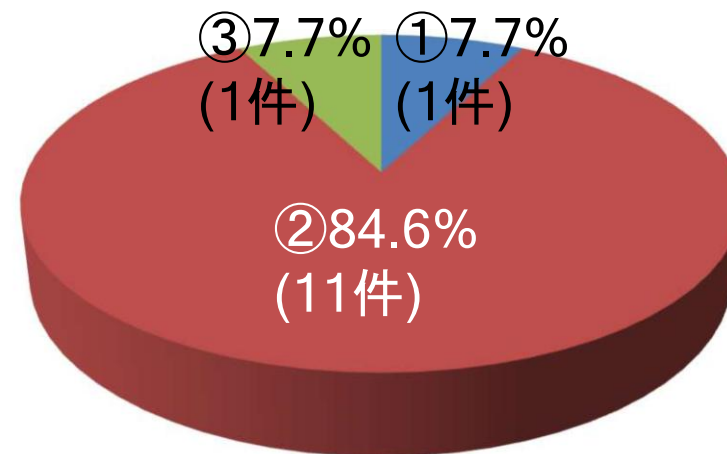
内因性物質の濃度はどの程度になるように分析法を確立されていますか。ご経験上、多いと思われる方をご選択ください。

- ①内因性物質の濃度がLLOQ未満となるような分析法を確立する
- ②内因性物質の濃度がLLOQ以上となるような分析法を確立する
- ③その他

<分析対象物質:医薬品>



<分析対象物質:内因性物質>



<http://bioanalysisforum.jp/>

コメント:<分析対象物質:内因性物質>

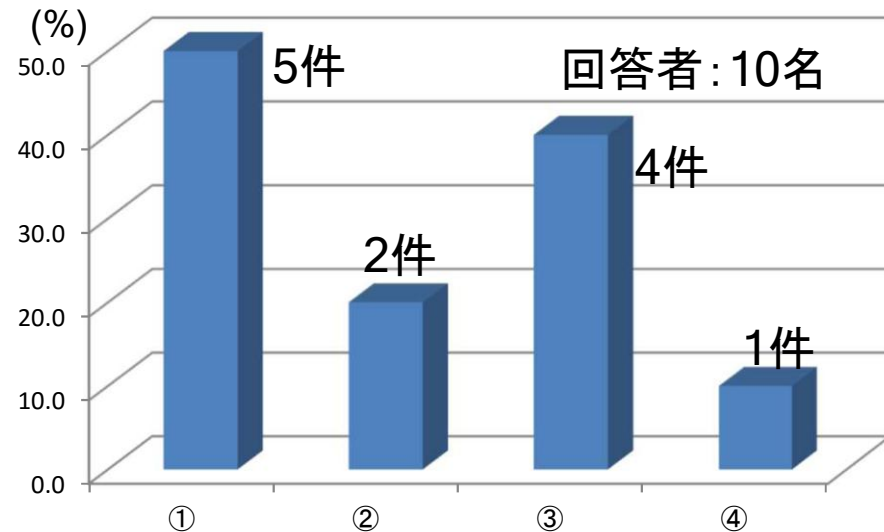
- 生化学検査や尿検査の一環として、市販のELISAキットを使用しているため、分析法を確立した経験はない。



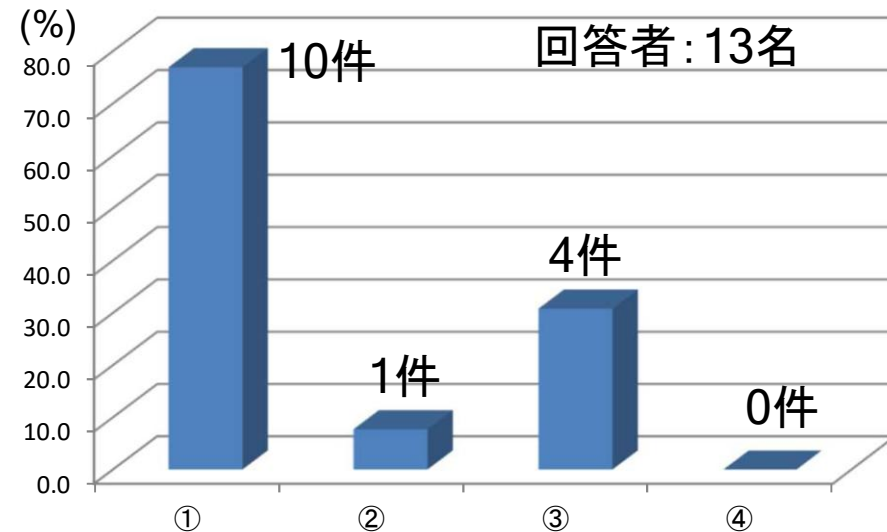
検量線 (マトリックス①)

検量線のマトリックスは何を使用していますか？ (複数回答可)

<分析対象物質: 医薬品>



<分析対象物質: 内因性物質>



- ①代替マトリックス
- ②実マトリックス(内因性濃度に関係なく)
- ③内因性濃度がLLOQ相当の濃度よりも低い場合は実マトリックス、LLOQ相当以上の場合は代替マトリックス
- ④その他

<http://bioanalysisforum.jp/>





検量線（マトリックス②）

コメント：＜分析対象物質：医薬品＞

- 測定系に影響しない程度に低い内因性濃度のマトリックスがあれば、実マトリックスで調製する。
- 内因性物質を吸収した実マトリックスを使用する。

コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

- 市販のキットを使用するため、キット付属の緩衝液を使用する。

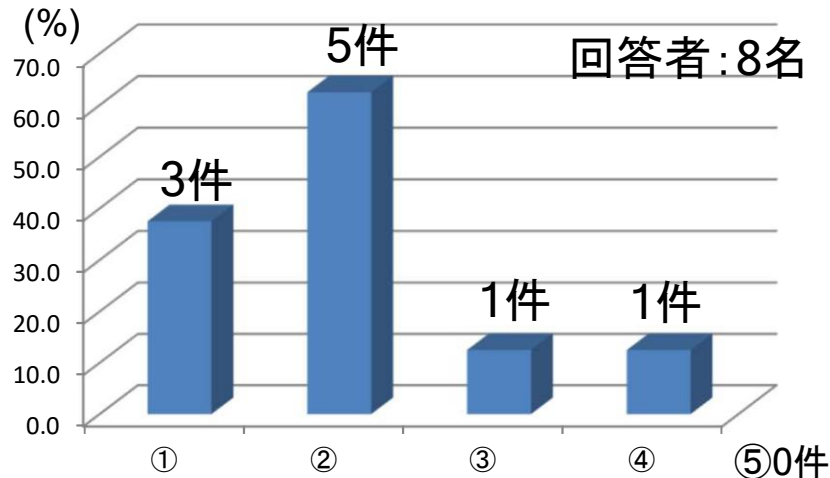




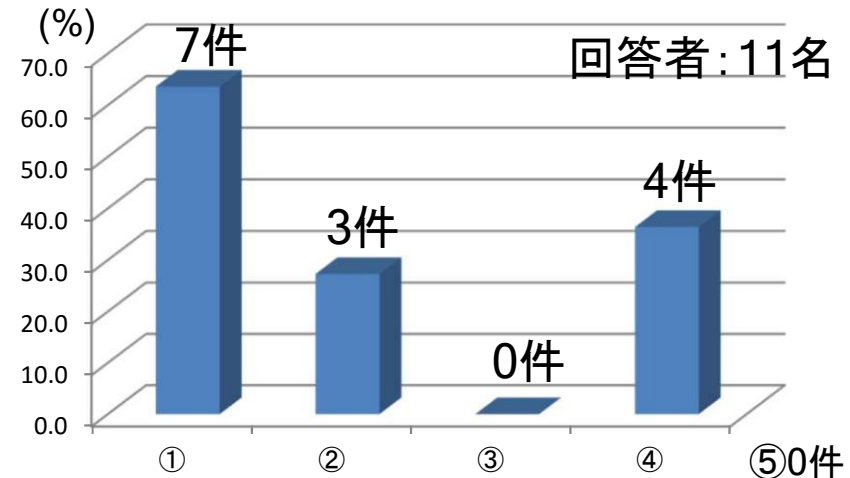
真度及び精度 (QC試料のマトリックス)

QC試料のマトリックスは何を使用していますか？(複数回答可)

＜分析対象物質：医薬品＞



＜分析対象物質：内因性物質＞



- ①代替マトリックス
- ②実マトリックス(内因性濃度に関係なく)
- ③内因性濃度がLLOQ相当の濃度よりも低い場合は実マトリックス、LLOQ相当以上の場合は代替マトリックス
- ④内因性濃度によって、代替マトリックス及び実マトリックスの両方を使用することがある。
- ⑤その他

コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

- 市販のキットを使用するため、キット付属の緩衝液を使用する。

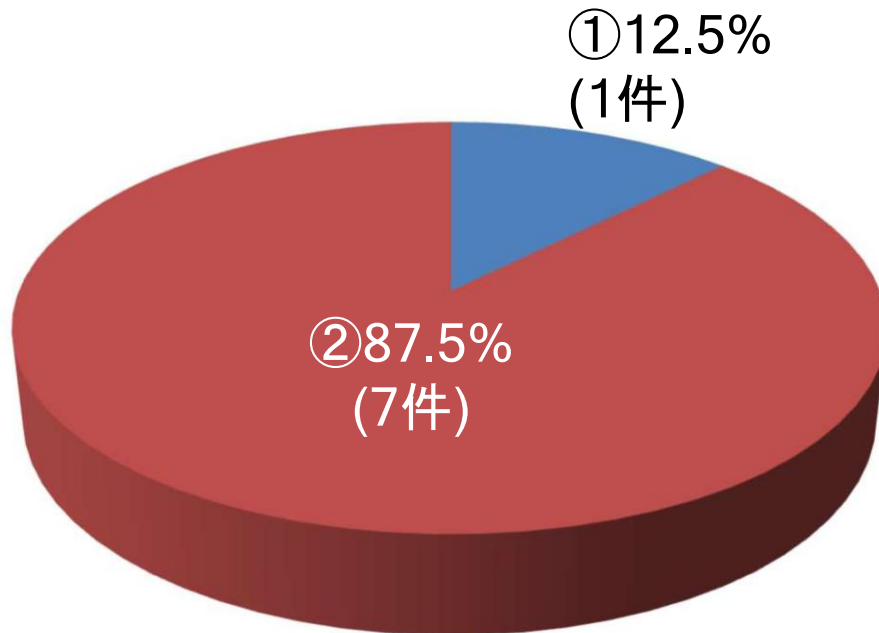


真度及び精度 (QC試料の調製方法①)

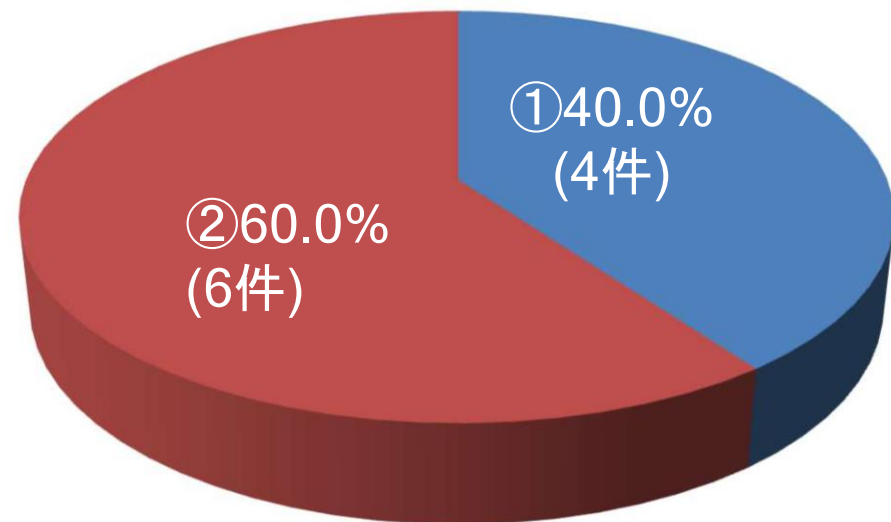
実マトリックスで調製する場合、QC試料の調製法 (n数、濃度ポイント数など) を教えてください。

- ① 代替マトリックスでしか調製しない
- ② 実マトリックスで調製する

<分析対象物質: 医薬品>



<分析対象物質: 内因性物質>



<http://bioanalysisforum.jp/>





真度及び精度 (QC試料の調製方法②)

コメント: <分析対象物質: 医薬品>

- 測定に影響しないレベルに低濃度の実マトリックスを選び、QC試料の調製に用いる。低レベルの実マトリックスがない場合、実マトリックスの濃度に合わせて可能な限り実マトリックスで調製し、調製できない濃度のQC試料は代替マトリックスで調製する(その場合、理論値は実マトリックスの内因性濃度 + 添加濃度の合計値)。QC試料の濃度はLLOQ、L、M、H、ULOQの5濃度とする。
- n=5、5 levels + blank
- 実マトリックス中の内因性物質濃度が低い場合しか経験がないが、n=2、濃度ポイント数=2で実施した。
- 内因性濃度が低い場合:(LLQC)、LQC、MQC、HQC、ULQC、各n=3
内因性濃度が高い場合:調製できる最低濃度~HQC、ULQC、各n=3





真度及び精度 (QC試料の調製方法③)

コメント: <分析対象物質: 医薬品>

- 内因性濃度に標準溶液を添加した濃度が検量線範囲となるポイントで実施 (n=3、繰り返し6回) また、代替マトリックスを用いても実施する (n=3、繰り返し1回)。
- 内因性濃度が高い場合は、個別血漿(投与前)をブランク血漿としてQC試料の調製に用いる。
- 実マトリックス中濃度がLLOQ以下であれば、通常同様にn=2、3濃度





真度及び精度（QC試料の調製方法④）

コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

- 検量線範囲の低濃度側と高濃度側の2濃度で各濃度n=5で実施する。
- n=5、5 levels + blank
- 実マトリックス中の内因性物質濃度が低い場合しか経験がないが、n=2、濃度ポイント数=2で実施した。
- 標準物質を添加せずに元々含まれている内因性物質のみをQC試料とするときもある。





真度及び精度（QC試料の調製方法⑤）

コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

- 代替マトリックスはn=3、繰り返し回数1回で必ず実施。実マトリックスを使用する場合は、内因性濃度と添加濃度の和が検量線範囲内に収まるような濃度ポイントで実施（n=3、繰り返し回数6回）。
- 内因性の濃度により調製するが、n=2、3濃度を目指す。
- 濃度が高い場合は、多めに試料を採取・poolし、小分け凍結保管してQC試料として用い、濃度が低い場合は標準溶液を添加してQC試料を調製する。



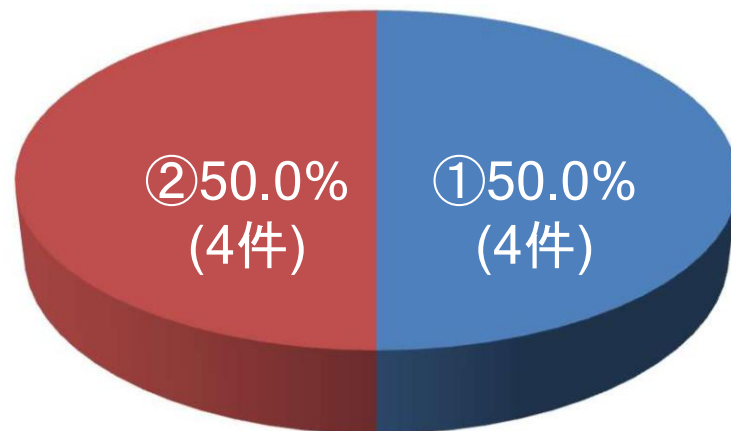


真度及び精度（評価方法及び評価基準）

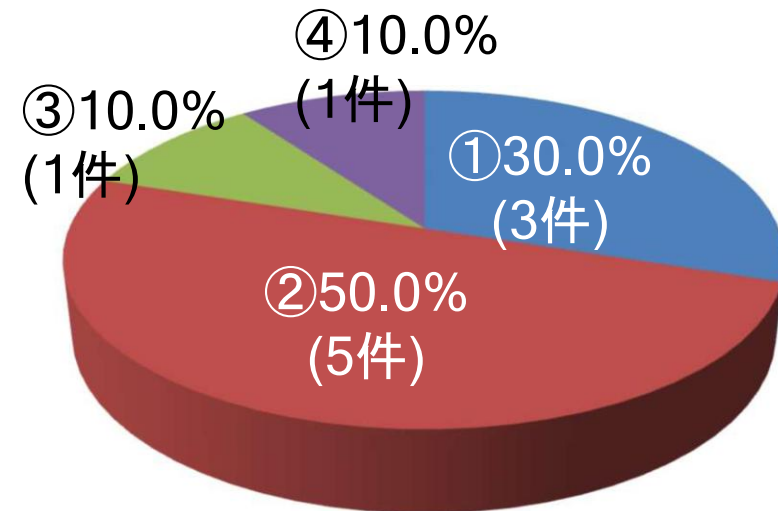
真度及び精度について、評価方法及び評価基準を教えてください。

- ①真度、精度及びトータルエラーを評価し、評価基準はLBAガイドラインに従う
- ②真度及び精度を評価し、評価基準はLBAガイドラインに従う
- ③精度のみ評価し、評価基準はLBAガイドラインに従う
- ④その他

＜分析対象物質：医薬品＞



＜分析対象物質：内因性物質＞



<http://bioanalysisforum.jp/>

コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

➤ 場合によっては基準を5%ひろげる。



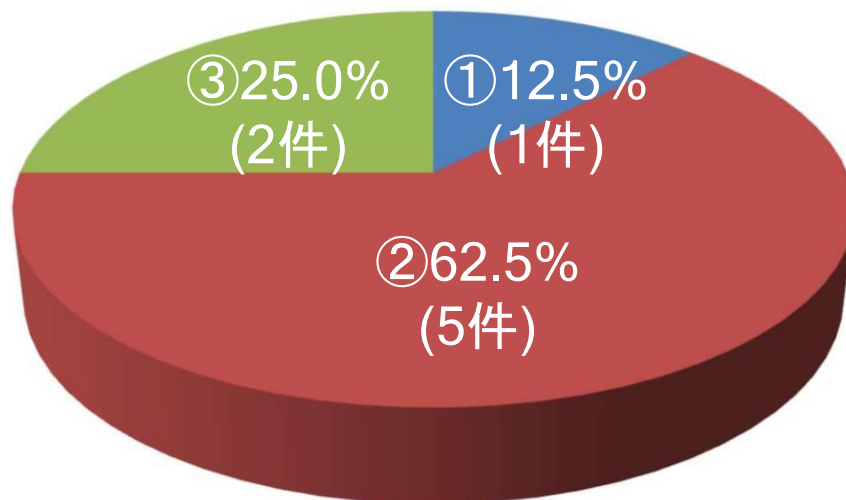


JBF 選択性試料（濃度設定①）

選択性試料の濃度設定について、LBAガイドラインでは定量下限付近のQC試料を用いて評価とありますが、定量範囲内の内因性濃度が検出される場合、どの辺りの濃度まで妥協しますか。

- ① LLOQ
- ② LQC
- ③ MQC

<分析対象物質: 医薬品>



コメント:

- 内因性濃度が検出される場合、内因性濃度+添加濃度で評価します。添加濃度はQC-Lまでの濃度を目安としている。
- できるだけ低濃度が望ましいが、内因性濃度と十分区別できる濃度を添加する。

<http://bioanalysisforum.jp/>

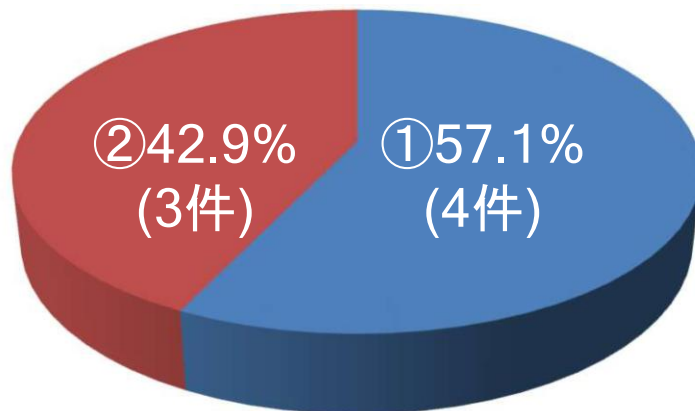


選択性試料（濃度設定②）

選択性試料の濃度設定について、内因性濃度が高い場合など、濃度設定はどのように対応しますか。または、内因性の濃度によって濃度は変更しますか。

- ①変更あり
- ②変更なし

＜分析対象物質：内因性物質＞



コメント:

- 内因性濃度に関わらず添加濃度がQC-L程度となるように調製して評価している。
- 内因性濃度が高い場合は、標準物質を添加しない個別別マトリックスを選択性試料とするときもある。
- 内因性濃度から区別可能な濃度を添加し、内因性濃度を差し引いた真度を評価。

<http://bioanalysisforum.jp/>

(②変更なしを選択した方)
選択性試料の設定濃度を教えてください。

- ①LQC: 33.3% (1件)
- ②MQC: 66.7% (2件)

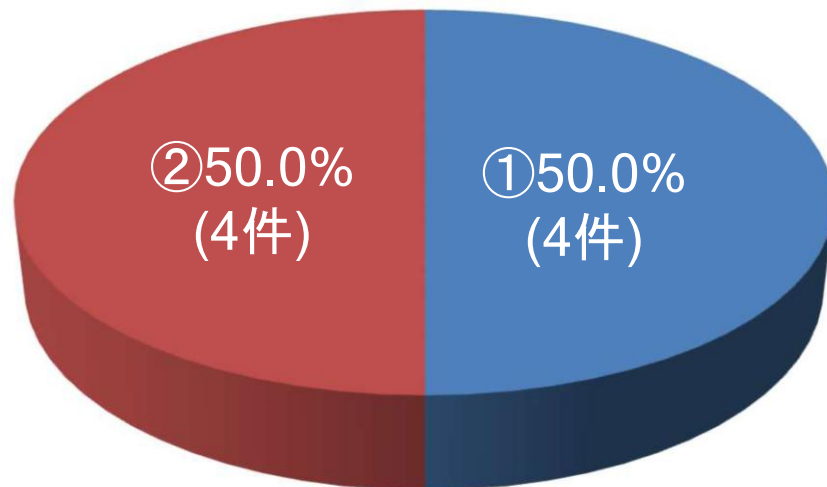


JBF 選択性（評価基準）

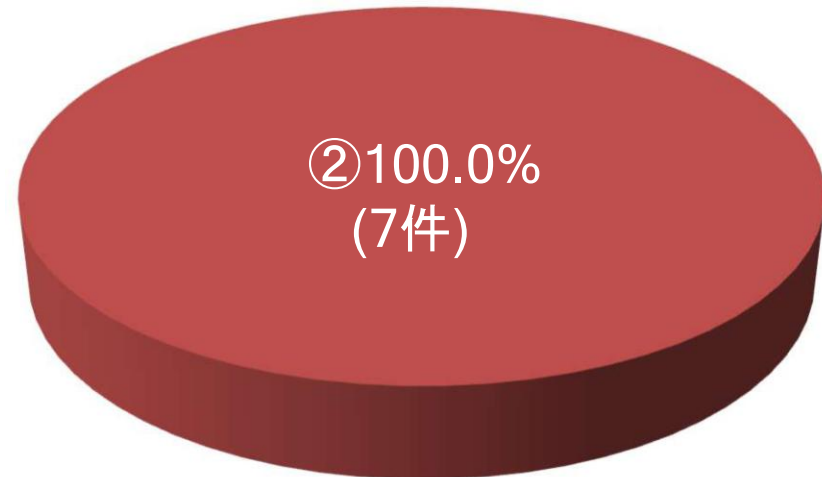
選択性の評価基準について、許容範囲の設定を教えてください。

- ①LBAガイドラインに従う。
- ②基本LBAガイドラインに従うことを目指すが、難しい場合は5%幅を広げるなど基準を緩める。

<分析対象物質：医薬品>



<分析対象物質：内因性物質>



<http://bioanalysisforum.jp/>





JBF 安定性（濃度設定①）

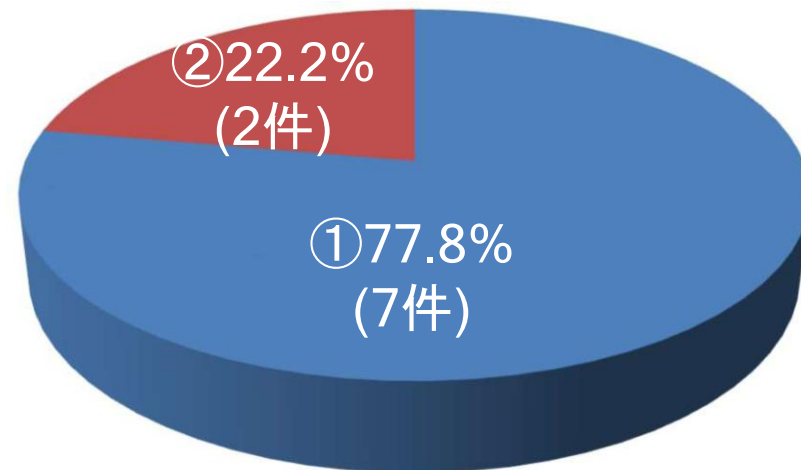
安定性について、濃度ポイントはどのように設定していますか。内因性濃度（高い場合又は低い場合）により設定濃度や調製法等が異なる場合はその対応法も教えてください。

- ①LBAガイドラインに従う(LQC、HQC)
- ②その他

<分析対象物質：医薬品>



<分析対象物質：内因性物質>



<http://bioanalysisforum.jp/>





安定性（濃度設定②）

コメント：＜分析対象物質：医薬品＞

- 内因性濃度が高い場合はある程度妥協せざるを得ない。

コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

- 内因性濃度が高い場合は、標準物質を添加しない試料を安定性に用いる時もある。
- 検量線濃度範囲でおよそ低、中、高となる濃度で実施。
- 出来るだけ濃度の異なる複数個体のマトリックスで内因性物質の安定性を確認する。



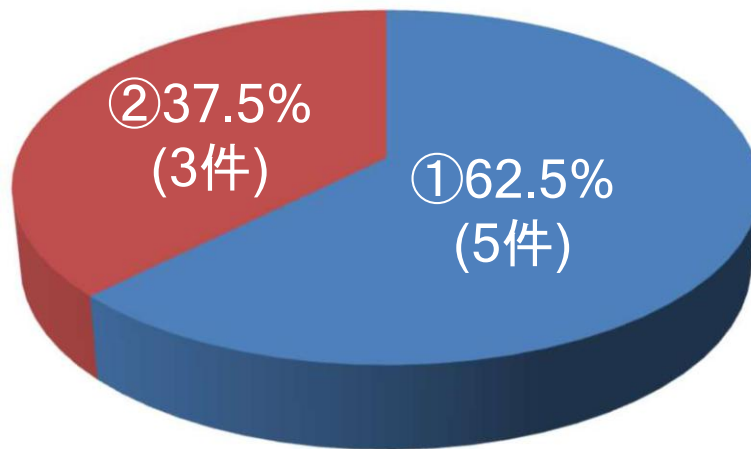


JBF 安定性（評価方法）

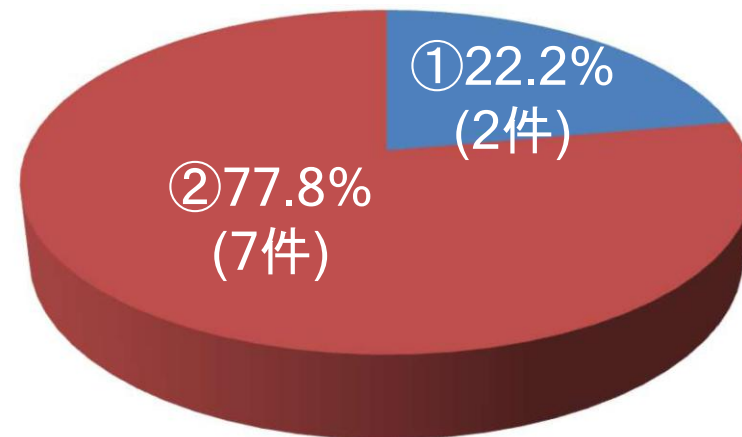
安定性について、何を用いて評価をしていますか。

- ①真度
- ②残存率

<分析対象物質：医薬品>



<分析対象物質：内因性物質>



コメント：<分析対象物質：医薬品>

- 検出されるレベルの濃度を持ったマトリックスを使用する場合は残存率を用いて評価する。
- 内因性濃度を差し引いて真度を評価

JBF 安定性（評価基準）

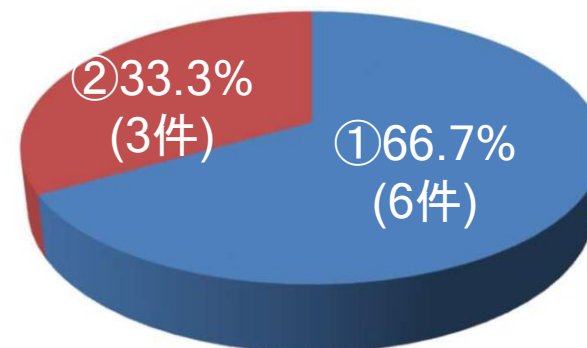
安定性について、評価基準はどのように設定していますか。

- ①LBAガイドラインに従う
- ②その他

＜分析対象物質：医薬品＞



＜分析対象物質：内因性物質＞



コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

- 基本的にはLBAガイドラインと同じですが、その他の評価項目での評価基準に応じて変更しています。（例えば、精度評価の基準を緩めた場合には安定性の評価も同じレベルに緩めます。）
- 基準を5%ひろげる時もある。
- 残存率±20%以内

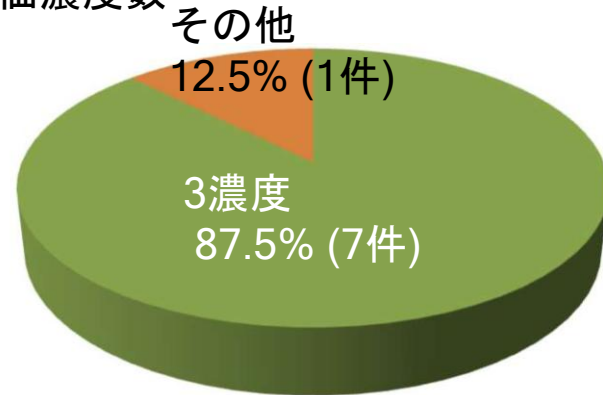


JBF 希釈直線性（濃度設定及び例数）

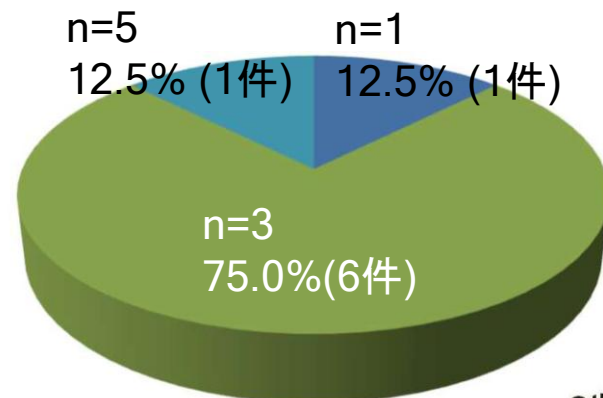
希釈直線性の評価濃度数と1濃度あたりの例数(n数)を教えてください。

<分析対象物質: 医薬品>

評価濃度数

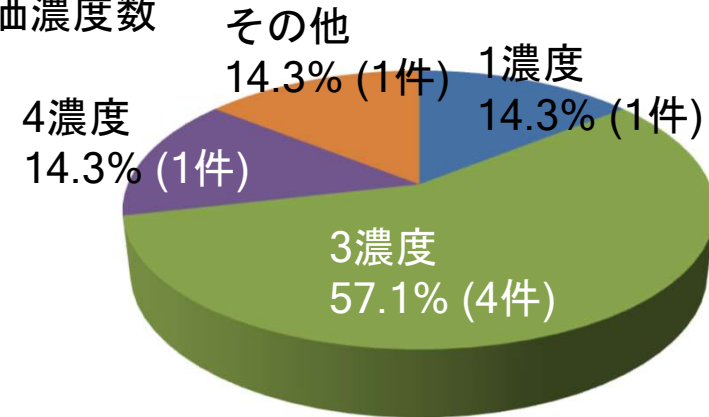


1濃度あたりの例数(n数)

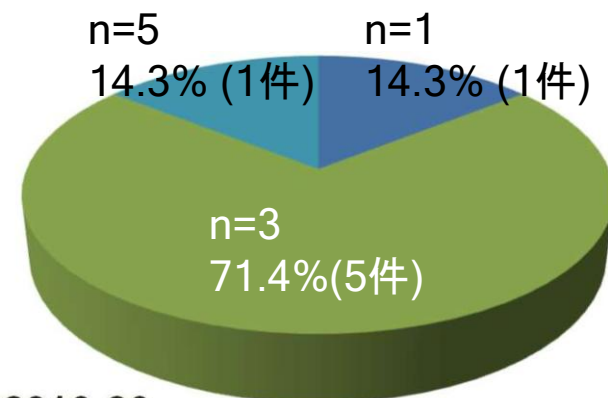


<分析対象物質: 内因性物質>

評価濃度数



1濃度あたりの例数(n数)



<http://bioanalysisforum.jp/>



希釈直線性（評価基準）

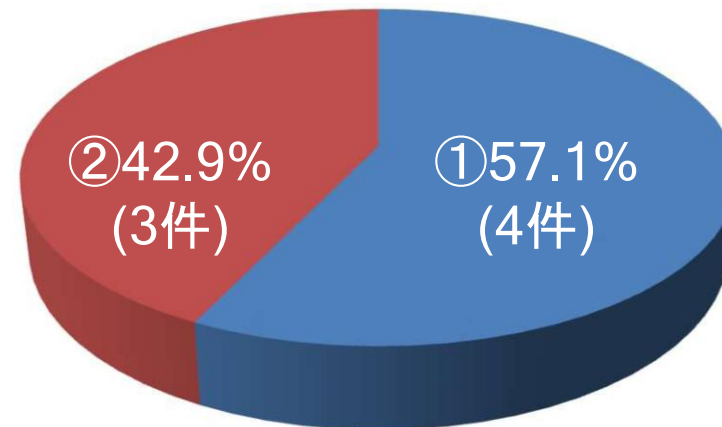
希釈直線性の評価基準を教えてください。

- ①LBAガイドラインに従う
- ②LBAガイドラインとは異なる基準を設定する

＜分析対象物質：医薬品＞



＜分析対象物質：内因性物質＞



コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

- 評価する濃度ポイント数は検量線の濃度範囲や調製可能な高濃度試料に依存します。
- 場合によっては基準を5%ひろげる時もある。
- 理論値と比較し、相対値が±20%以内

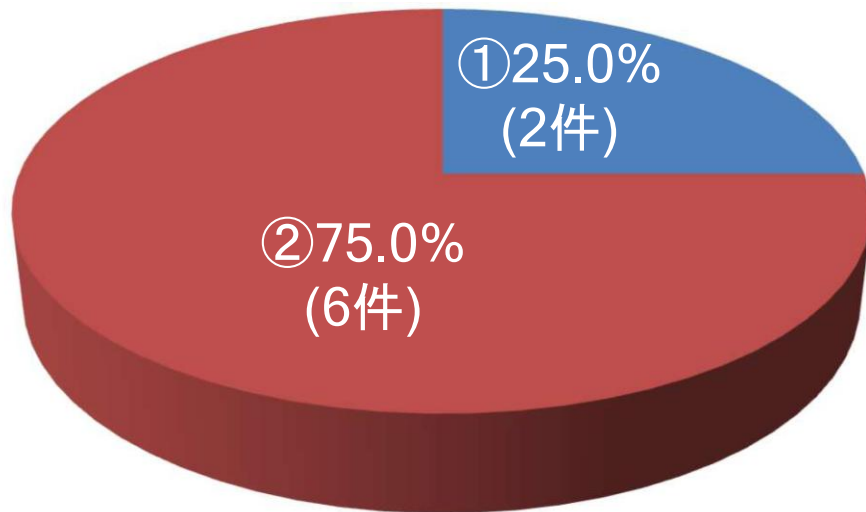


JBF 希釈直線性（希釈媒体）

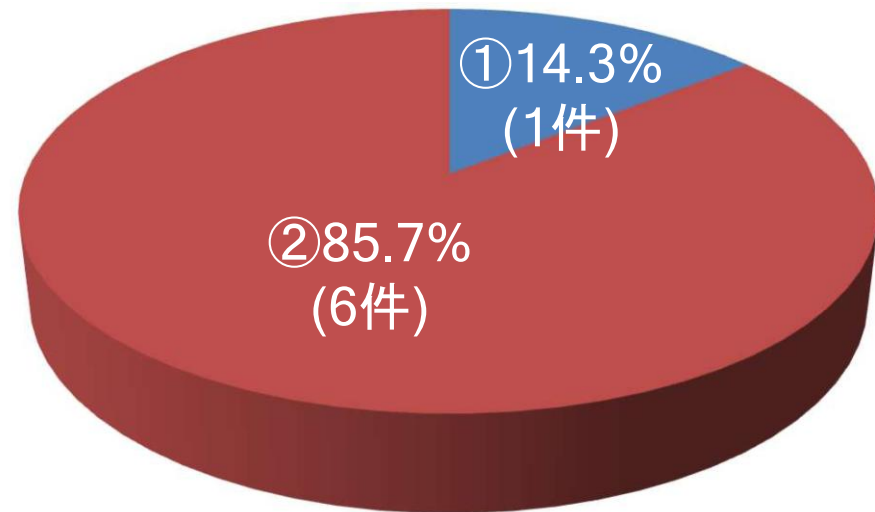
希釈直線性の希釈媒体は何を使用しますか。

- ①実マトリックス
- ②代替マトリックス
- ③その他

<分析対象物質:医薬品>



<分析対象物質:内因性物質>



<http://bioanalysisforum.jp/>

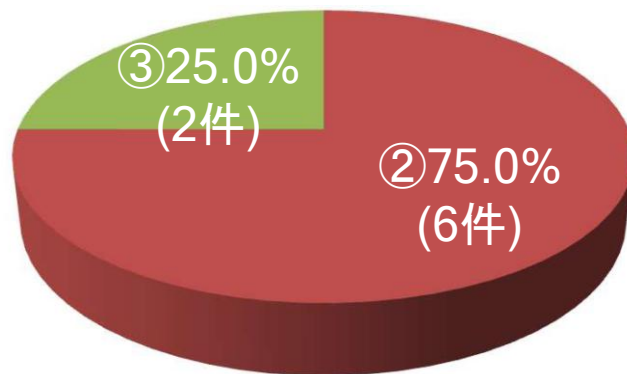


希釈直線性（濃度設定：フック効果確認用試料）

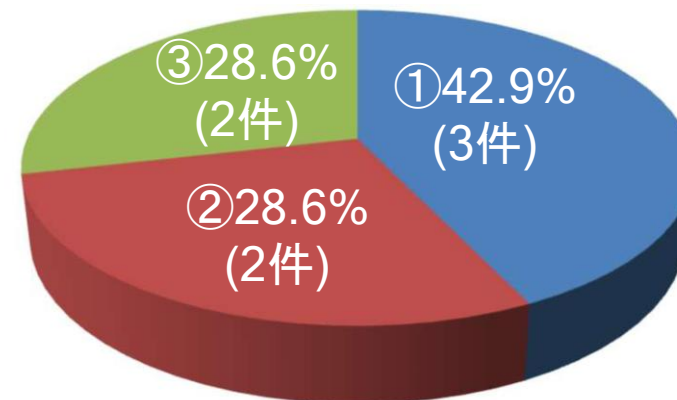
「検量線の定量上限を超える濃度の試料（フック効果確認用試料）」の濃度はどのように設定しますか？

- ①フック効果確認は実施しない
- ②予想されるCmaxを超える濃度
- ③調製可能な最高濃度（市販の測定キットを使用する場合や標準物質の濃度が低い場合など）
- ④その他

＜分析対象物質：医薬品＞



＜分析対象物質：内因性物質＞



コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

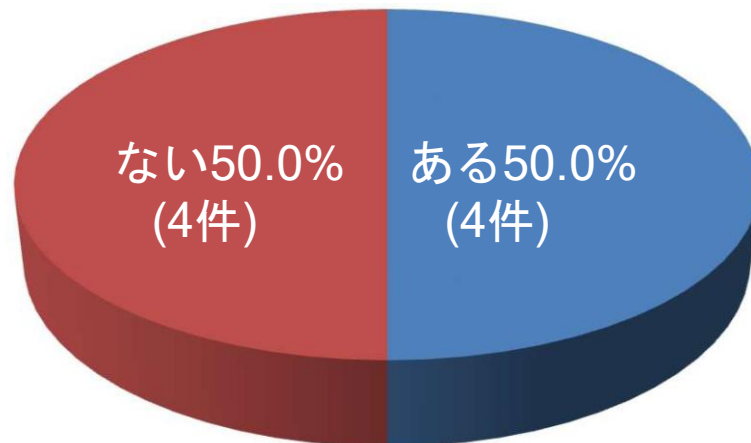
- やむを得ず調製可能な最高濃度で実施する場合も多い。



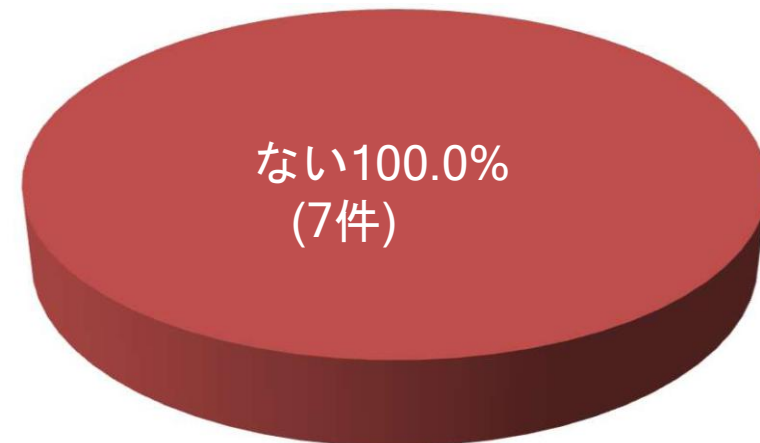
希釈直線性（フック効果の経験）

フック効果を経験したことはありますか？

<分析対象物質：医薬品>



<分析対象物質：内因性物質>



<http://bioanalysisforum.jp/>

（あると回答した方）フック効果への対応に対するコメント：

- 全試料を最大希釈倍率で測定し、定量下限未満となったサンプルについて希釈倍率を下げて測定するという手順で分析した。
- 2種の希釈倍率で希釈直線性が成り立つか。
- 固相化抗体濃度の変更、その他使用する抗体の再検討などを実施。



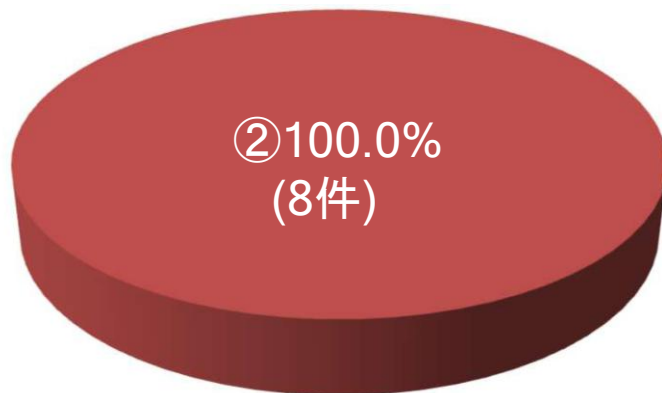


JBF 希釈平行性（実施経験）

希釈平行性の実施経験を教えてください。

- ①必ず実施する
- ②経験なし
- ③実施する場合としない場合がある

<分析対象物質:医薬品>



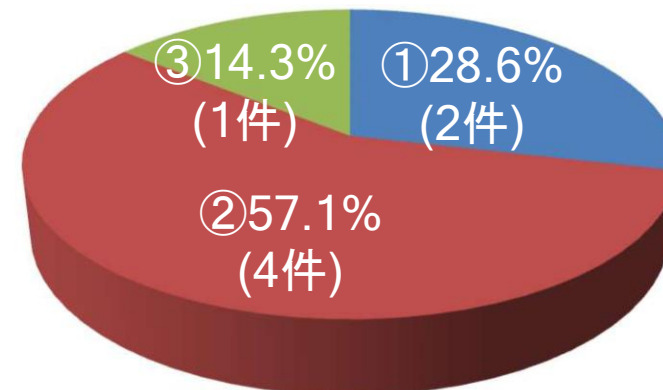
コメント:<分析対象物質:医薬品>

- 要望に応じて実施。

コメント:<分析対象物質:内因性物質>

- サンプルが入手可能な場合は可能な限り実施。

<分析対象物質:内因性物質>





希釈平行性（実施時期）

希釈平行性の実施時期を教えてください。

＜分析対象物質：内因性物質＞

- ①バリデーション時：100.0%（3件）
- ②実試料分析時：0%

コメント（①の場合の評価試料の準備方法）：

- 高濃度内因性含有試料を段階希釈して精度を確認。
- 市販試料が入手可能な場合、早期に実施。



希釈平行性（評価方法及び評価基準）

希釈平行性の評価方法及び評価基準を教えてください。

＜分析対象物質：内因性物質＞

質問	回答
評価する個体数	3個体：1件 その他：2件
1試料からの希釈濃度数	3濃度：1件 その他：2件
1つの試料から希釈した際のn数	n=1：1件 n=3：1件 n=5：1件
評価基準	EMAガイドラインに準じる（精度を評価、30%を基準とする）：3件 EMAガイドラインとは異なる基準を設定：0件

<http://bioanalysisforum.jp/>

コメント：個体数等は、内因性濃度、マトリックスの希少性に依存する。

Case by Case

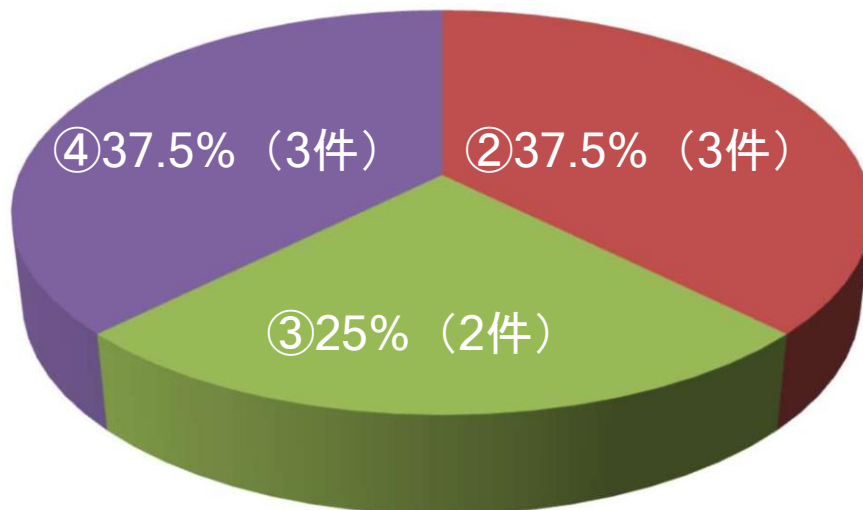


HAMAの影響確認試験

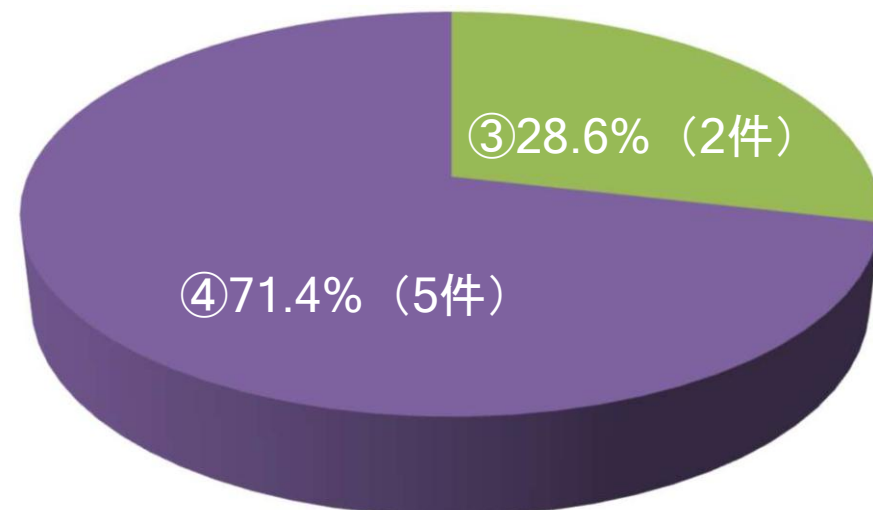
HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies) の影響を確認する試験を実施していますか？

- ①実施する
- ②必要に応じて実施する
- ③予備検討時に確認する
- ④実施しない
- ⑤その他

<分析対象物質: 医薬品>



<分析対象物質: 内因性物質>



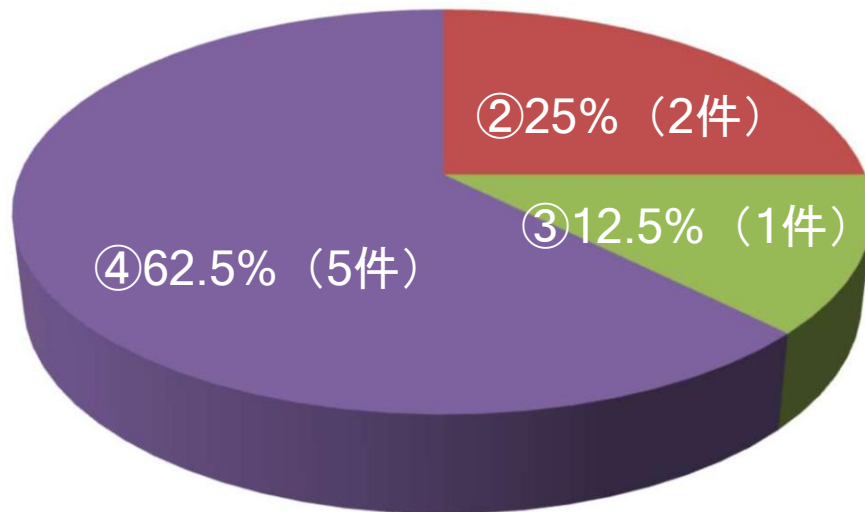


リウマチ因子の影響確認試験

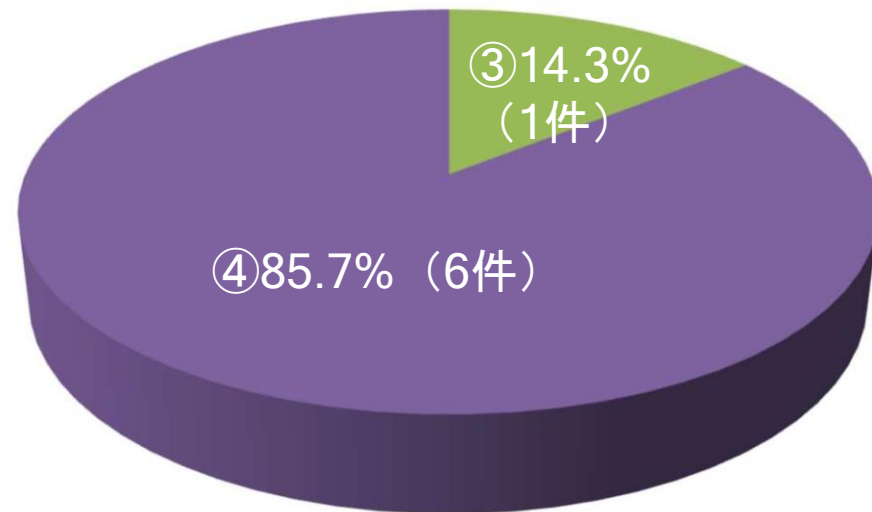
RF (Rheumatoid Factor) の影響を確認する試験を実施していますか？

- ①実施する
- ②必要に応じて実施する
- ③予備検討時に確認する
- ④実施しない
- ⑤その他

<分析対象物質:医薬品>



<分析対象物質:内因性物質>



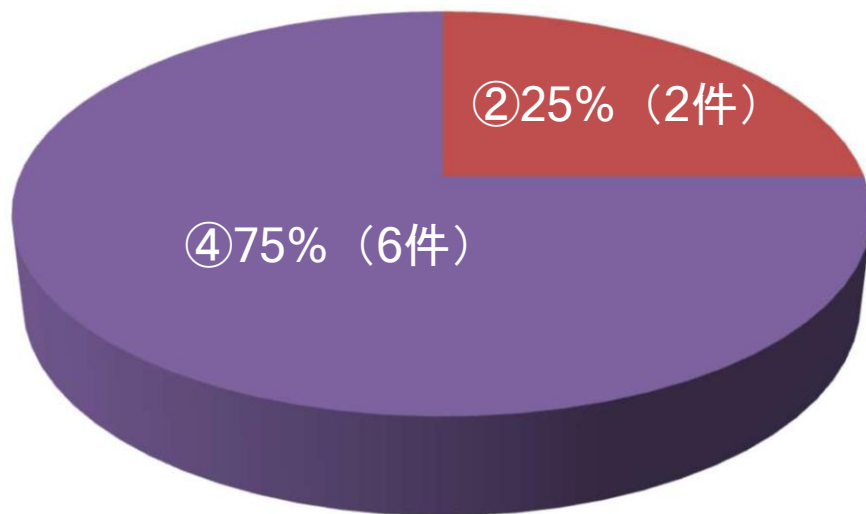


その他血中物質の影響確認試験

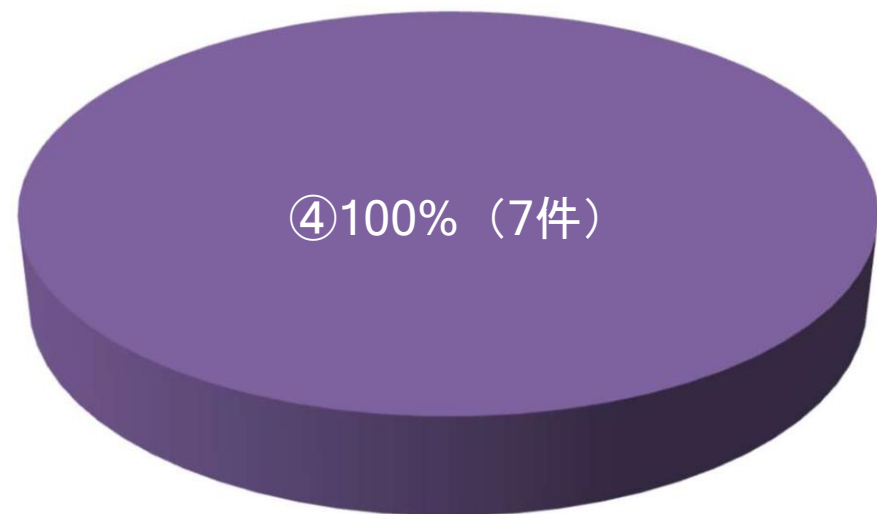
血中物質(ビリルビン、乳び、溶血ヘモグロビン等)の影響を確認する試験を実施していますか？

- ①実施する
- ②必要に応じて実施する
- ③予備検討時に確認する
- ④実施しない
- ⑤その他

<分析対象物質:医薬品>



<分析対象物質:内因性物質>



<http://bioanalysisforum.jp/>



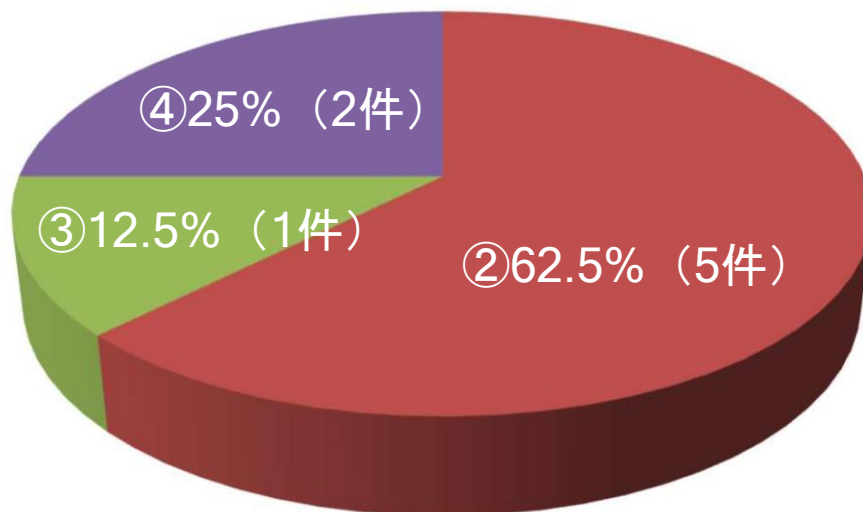


併用薬剤の影響確認試験

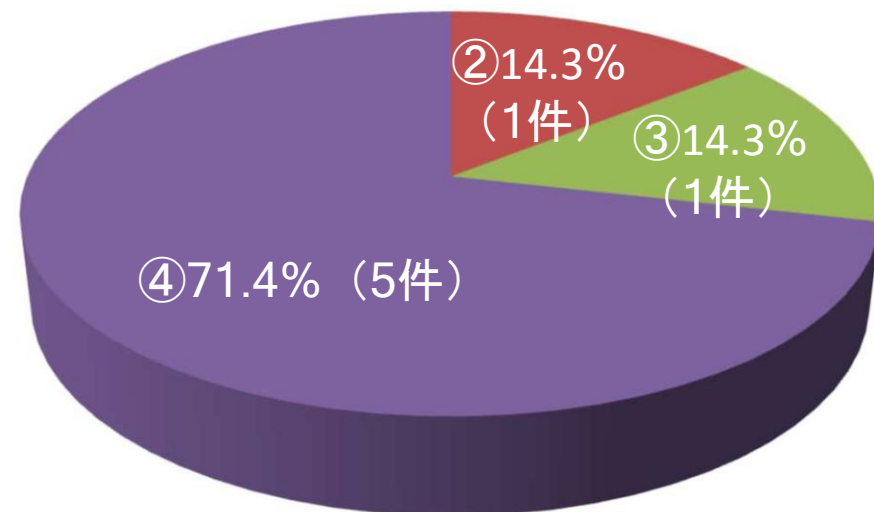
併用薬剤の影響を確認する試験を実施していますか？

- ①実施する
- ②必要に応じて実施する
- ③予備検討時に確認する
- ④実施しない
- ⑤その他

<分析対象物質：医薬品>



<分析対象物質：内因性物質>



<http://bioanalysisforum.jp/>



干渉物質の影響確認試験における評価基準

干渉物質の影響を確認する試験を実施している場合、どの項目に対して、どのような試験を設定し、どのような合格基準を設けて実施していますか？

<分析対象物質:医薬品>

- 干渉物質共存下で選択性と同じ内容の評価を実施する。
- 干渉物質の影響の試験は実施していないが、実施する場合の合格基準は真度が $\pm 20\%$ とする。
- 高濃度干渉物質を添加し、選択性と同様の評価を行う。
- 干渉の影響があるかの確認を実施する。
- 干渉物質存在下でLLOQの測定対象物質を添加し、真度 $\pm 25\%$ 以内を基準とする。

<分析対象物質:内因性物質>

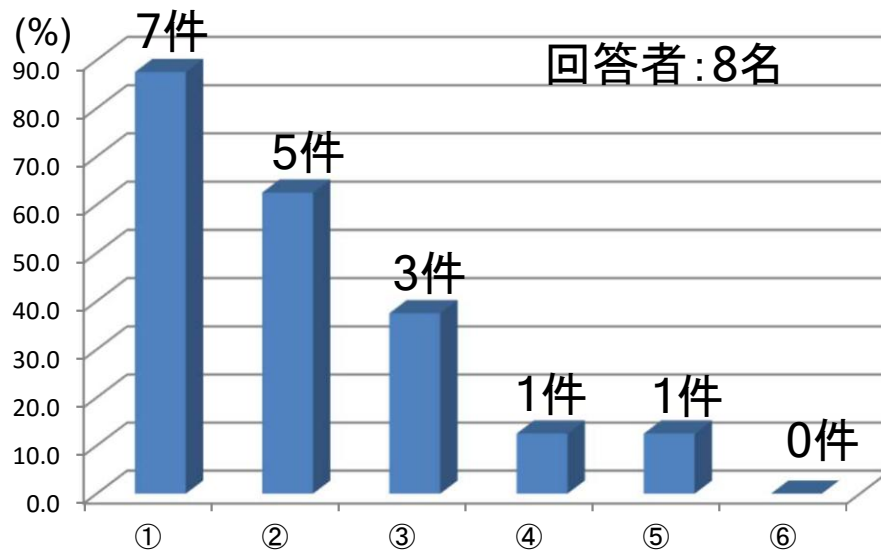
- 開発検体の共存、ADAの影響などを確認する。
- 高濃度干渉物質を添加した選択性を評価する。
- 基準は設けずに、検討のみを実施する。



パーシャルバリデーション（実施基準）

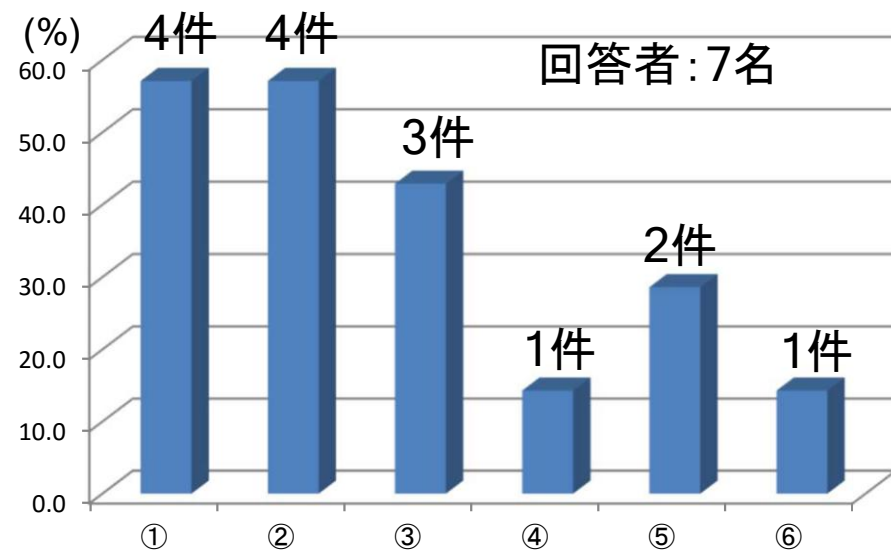
パーシャルバリデーションはどんなときに実施していますか？（複数回答可）

＜分析対象物質：医薬品＞



- ① 重要試薬（抗原や抗体等）のロットが変更になったとき
- ② 使用する測定機器が変更になったとき
- ③ 測定者が変更になったとき

＜分析対象物質：内因性物質＞



- ④ 標準品のロットが変更になったとき
- ⑤ パーシャルバリデーションを実施したことはない/実施しない
- ⑥ その他

コメント：＜分析対象物質：内因性物質＞

➤ 主にキットを使用する測定が多いので、キット添付の重要試薬は確認していない。

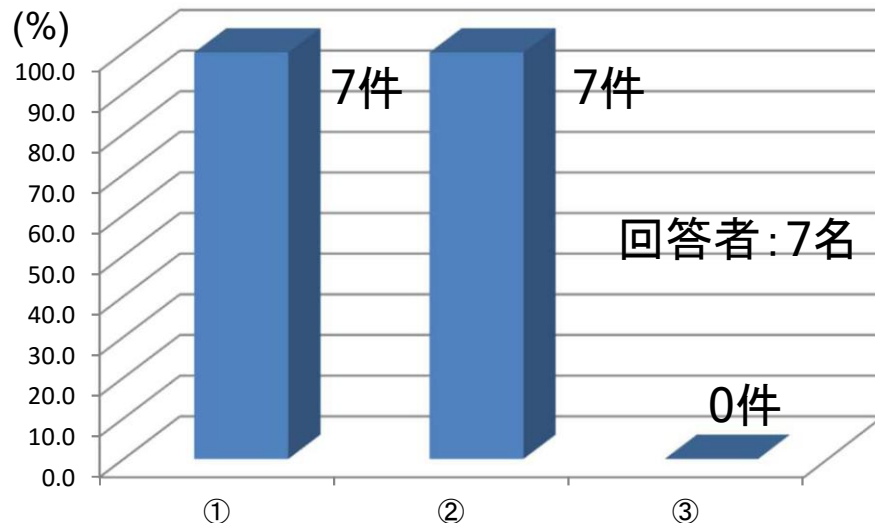
<http://bioanalysisforum.jp/>



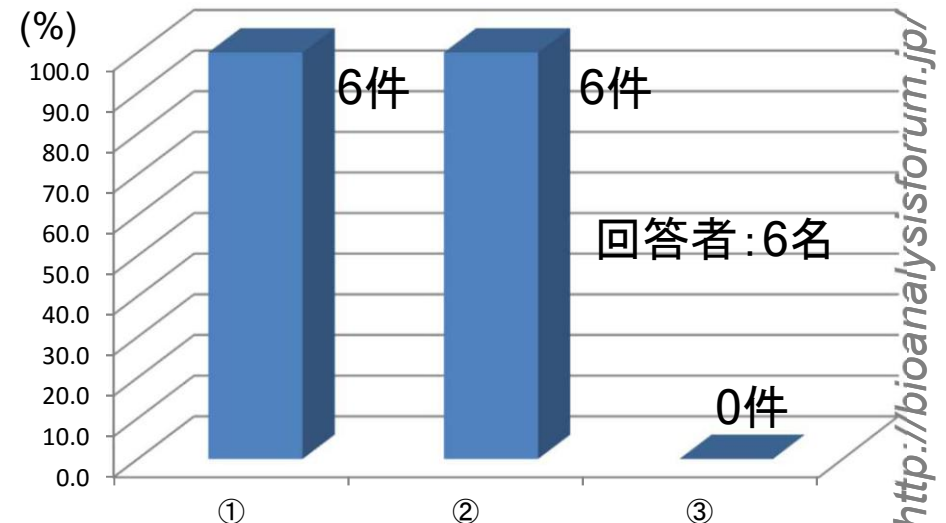
パーシャルバリデーション（評価項目）

パーシャルバリデーションを実施する場合は、どの項目で評価を行っていますか？（複数回答可）

<分析対象物質：医薬品>



<分析対象物質：内因性物質>



- ① 検量線
- ② 精度・真度
- ③ その他

コメント：

➢ 抗体等のロット変更の場合は、可能であれば変更前と変更後の比較を行う。





トラブル対応

分析法バリデーション及び実試料の分析において、トラブル対応として紹介していただける案件がありましたら記入してください。

<分析対象物質:医薬品>

- 選択性試験の添加回収において、マトリックス中の内因性物質濃度が測定法のLLOQ未満であったが、内因濃度を無視すると基準を満たすことができなかったため、LLOQ未満でも外挿値を内因濃度として用いた。
- 分析法バリデーションの前に基準を決定する予備検討を行うので困ることはほとんどない。内因性物質がある一定濃度のブランクマトリックスを確保するのに困ることがあるので、ある一定量を保存するようにしている。

<http://bioanalysisforum.jp/>



JBF 困っていること

困っていること、聞いてみたいことなどあれば教えてください。

<分析対象物質:内因性物質>

- LBAガイドラインの評価基準に合わせる必要があるかどうか多くの方のご意見をお聞きしたいです。
- 内因性濃度がLQC以上とした場合、低濃度側の安定性試料の調製はどのように対応するのが良いのか判断が難しい。(特にバイオマーカーで減少を見たい場合は必要?)

<http://bioanalysisforum.jp/>

