

質問箱 受付番号	質問	統合回答
2023-01	<p>Q1：非臨床における血漿を対象とした測定法開発／構築に際して、ある測定対象で、サル血漿のみ測定対象が不安定であることがわかりました（げっ歯類では安定）。</p> <p>このような場合、サル血漿中でのみ不安定な原因として、考えられる要因はございますでしょうか？</p> <p>Q2：上記のようにサルのみ不安定であり、かつ他動物種への変更ができない場合、非臨床での分析法開発／構築に、どのようにアプローチしたらよいでしょうか？</p> <p>特に次のような観点で、ご見解をお伺いできると大変幸いです。</p> <p>例：前処理過程での対策、不安定性改善を見据えて試す具体的な添加剤、臨床を見据えて非臨床の測定法構築で留意する点、など</p>	<p>ご質問の文章だけでは、どの様な状況下で不安定であるのか詳細が分かりませんので、分析法は動物間で異ならないと仮定して、2つの原因を事例に挙げて回答いたします。</p> <p>Q1.</p> <p>①血漿中での保存安定性が悪いことに起因する場合：1つの原因事例として血漿中に存在する酵素の発現量が動物間で異なるため、動物間での安定性に差が出てします。代表的な酵素の例としてカルボキシエステラーゼ（CES）が挙げられます。代表的なCESは1及び2があり、動物間及び発現部位で発現量に差があることが知られています。酵素の発現量の違いにより安定性に影響を及ぼす場合、原因の酵素の究明はやや困難です（酵素の阻害剤を添加するなどして、安定性を確認していくなど）。カルボキシエステラーゼ関連の酵素では、げっ歯類でCES優勢、霊長類でBChE優勢との報告があります（ある基質に対しサルが特に高活性という論文もありますhttps://doi.org/10.1002/jps.23258）。霊長類がヒトにより近い可能性を考慮し、将来の臨床測定を考えるとまずは有効な阻害剤を探索するのが良いと思います。</p> <p>②分析法に問題があり、安定して測定できない場合： MSでの測定の場合は、動物種差のマトリクス効果により測定が安定しないことが考えられます。前処理法が同じであっても、内因性物質の種類や存在量によって影響が生じる可能性があります。</p> <p>Q2.</p> <p>①保存安定性の問題がある場合。保存安定性は種々の原因が存在するので、それらを解消する対策が必要です。酵素が原因である場合、酵素の阻害剤（エステラーゼの場合：フッ化ナトリウムなどの添加や酵素の失活法（徐タンパクなど）が考えられます。特異的な阻害剤が存在するのであれば、これを用いることが容易な対策となります。存在しない場合は、酸など（酢酸水溶液など）を加えて保存することや、酵素活性を低下させるための冷却下での前処理が考えられます。</p> <p>②前処理法や分析条件が最適でない場合。マトリクス効果に起因する問題は安定同位体の内標準物質を用いての補正や、カラムなどの測定条件を変更することで影響のある物質との分離で問題が解決する場合があります。ただし、安定同位体の内標準物質でも、同位体の位置や数により測定対象物質と保持時間がずれることもあり、十分な補正ができない場合もあるので注意が必要です。また、前処理法を変更することで、原因物質を除去することで解消することも考えられます。</p> <p>血漿のケースとは異なりますが、ある化合物の尿中測定法開発時に吸着回避目的で界面活性剤を添加したところ、化合物が不安定化したことがあります。酸化体が主要な分解物であり、試した抗酸化剤の中でピロ亜硫酸ナトリウムが化合物の安定化に有効でありました。このように分解物を特定することで有効な解決方法を見出せる可能性があります。また、測定対象の見かけの不安定さの裏側に、容器等への吸着が隠れている場合がありますので、その面のチェックもされてもよいかもしれません。</p>
2023-02	<p>クロマトグラフィ分野での質問をさせていただきます。</p> <p>標準物質は、COAを必要とし、</p> <p>純度によっては標準溶液作製に際して補正をかけるといった対応を必要とするかと思えます。</p> <p>その標準物質の純度の基準として、JBFでは純度は〇〇%以上を推奨する、といったような基準はありますか？</p> <p>もしくは、各社のSOPにおいては標準物質として用いる際の純度の基準は設けられているのでしょうか。</p> <p>設けられているとしたら、どの程度の値なのでしょう。</p>	<p>Regulatory Guidance/Guideline等には標準物質に関する純度の基準は無いと思います。過去のDGLにおける議論(DG2013-02)では、会社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。[https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/5th_IBF_DG2013-02.pdf]</p> <p>ある会社では、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。別の会社では、低分子化合物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。いずれにしても、各社でその測定方法とその測定値を将来の申請においてどのように使われるか？の観点で、各社なりの基準をSOP等に明記し、少なくとも一つのプロジェクト内では統一したアプローチを取ることが良いのではないかと考えます。</p>
2023-03	<p>核酸の測定をLC-MS/MSおよびhybridizationで測定しております。</p> <p>扱う核酸は主に1本鎖のPS化アンチセンスオリゴです。</p> <p>数nM程度と濃度が低いため、チップやプレートへの吸着が気になっています。</p> <p>具体的には、チップはコーティング等されていない通常のチップを用いています。</p> <p>数回の吸入・吐出で3-4割近く吸着してしまう核酸も経験しました。</p> <p>プレートはDNA低吸着タイプのもを用いていますが、経時的なレスポンスの減少が認められる場合があります。</p> <p>特にチップはDNA低吸着タイプというようなものは市販されていないように思いますが、核酸を扱う場合どのようなチップやプレートを用いているのか、コーティング等自身でされている場合もあるのかご教示頂けますと幸いです。</p>	<p>ある会社のケースですが、LC/MS分析の場合は以下の事項に気を付けているようです。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・チップは通常のチップ、チューブとプレートはDNA LoBind低吸着タイプを使用しています。 ・DNA LoBindでも吸着は起きてしまうので、標準溶液の組成や前処理中の有機溶媒濃度に気を付けています。 ・血漿や組織溶解液中の核酸が吸着した経験は今のところありません。 ・CSF中の核酸は吸着している一方で、吸着防止用に血漿やBSA、有機溶媒を添加することで対応しています。（回収率や吸着についてはDG2018-36「LC-MSによる核酸医薬品の定量」でも議論があるので参考にしてください。） <p>Hybridizationの場合は以下の事項に気を付けているようです。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・チップはPCRグレード（フィルター、DNase/RNaseフリー）、チューブとプレートはDNA LoBind低吸着タイプを使用しています。 ・標準品は基本、標準品からマトリクスにて希釈、 ・CSFの場合には吸着してしまうので、BSA等を添加することで対応しています。（使用チューブやチップについてはDG2020-48「Hybridization assayによる核酸医薬品の定量」内でも少し記載があるので参考にしてください。） <p>DNA Low bindingチップは今のところないようですが、その他のLow Bindingチップはいくつか出ているようですので、それらを試してみたいかがでしょうか？結果的に、表面平滑度が高い普通のチップが最も良かったケースもあったようです。</p>

<p>2023-04</p>	<p>IS溶液中安定性とIS使用可否判断に関しましてご質問いたします。</p> <p>ICH M10にて、ISが安定同位体標識であり、保存条件が標準溶液と同じであり、同位体交換が起こらない場合にはISの安定性評価は不要である旨が記載されているかと存じます。「同位体交換が起こらない」ことについて、化学構造からの判断だけではなく何かしらの検証が必要となるでしょうか。</p> <p>必要な場合、どのような検証方法でどのタイミング（バリデーション実施前の分析法検討段階、標準溶液の安定性評価時、分析単位ごと毎回、など）で実施するのが良いのかご教示いただけますと幸いです。</p> <p>安定性評価を実施しない（使用期限を設けない）場合、日々の分析単位ごとにISの使用可否判断が必要となるでしょうか。</p> <p>必要な場合、方法としては、ゼロ試料で分析対象に影響がないことを確認する方法や分析単位間のArea比較などが考えられますが何か他に適切な方法はありますでしょうか。</p> <p>（考慮すべき要素が何であるのか、検証を必要とされるレベルがどのくらいなのか）</p> <p>DG2016-24の資料は拝読させていただきまして非常に参考にさせていただいております。上記と似たような内容があったかとは存じますが、ICH M10への対応により見解・方法を変えたなどもし何か情報がありましたらご教示いただきたく思った次第でございます。</p>	<p>本件に関しての過去の議論では</p> <p>①化学構造から明らかに交換しない場合はそこで起こらないと判断するという意見（有機化学の知識を用いてそのH-D変換や標識部位の加水分解等の変化が起こらない理由を説明し、必要に応じてFDA等の当局と議論することは可能だと思います）、</p> <p>②予備検討期間中の溶液で生成していないことを事前確認してバリデーションに入り、バリデーション期間中にゼロ試料で検出されないことを確認しておくという意見（以後の確認を必須としないイメージだが、その後見えてきたらどうするという見方もあり）、</p> <p>③実験フォーマットを変える必要性を感じないので安定性を確認する（従来通り溶液安定性を取得するか、ゼロ試料で影響がないこととAreaに大きな変化がない事を確認し続ける）などがありました。</p> <p>評価方法としては、③の場合に安定性（減少がないこと）を溶液にて評価し、妨害が起こらないことをゼロ試料で確認する事例が多い印象です。</p> <p>内部標準物質の構造及び標識位置からH-D変換や標識部位の加水分解等の変化の可能性が疑われる場合は、事前にバリデーション及び実資料測定をカバーできる溶液中安定性を取得しておく方が、我々として安心である場合もあります。</p> <p>ICH M10への対応という点では、IS溶液安定性の言及がMHLWガイドラインには無かったので、こちらだけを参照していた場合にはICH M10でIS安定性評価が必要になる可能性はあると認識しています。</p>
<p>2023-05</p>	<p>コンタミネーションについてご質問させて頂きたくご連絡致しました。</p> <p>弊社では、コンタミネーションをゼロにすることを目標に対策を講じておりますが、なかなかゼロにできないのが現状です。</p> <p>コンタミネーションを無くすために、どのような対策が効果的であるかご教授頂ければ幸いです。</p> <p>弊社で実施している対策について、下記に記載致します。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 秤量室、溶液調製室、前処理室および測定室を設け、部屋および着用する白衣を分ける 2. 移動相などの溶液調製は、可能な限り標準品を秤量する前に実施する 3. 前処理においてコンタミネーションする可能性のある操作への対策 <ul style="list-style-type: none"> ・検量線用標準溶液を添加した後は、手袋を変える ・チューブ、ウェルへの溶液の添加はなるべく勢いをなくす ・96穴プレートに試料を負荷する場合は、他の試料が入らない様に1列ごとにシールを貼る。 ・チューブの場合は、試料をサンプルリングする毎にチューブをずらすか蓋を閉める。 <p>チューブを立てるラックは操作する場所からなるべく遠くに置く</p> <ul style="list-style-type: none"> ・試料を移行する際には他のウェルやチューブの上をまたがない 	<p>御社で取られている対策はそれぞれ有効なものであると考えます。</p> <p>その他得られた意見は以下の通りです。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・溶液の添加の勢い→溶液を添加する際はチューブの壁を伝わらせる（直接、溶液に溶液を落下させない）、エアディスペンサー式のピペットを使う場合フォワード法ではなくリバース法を用いる（ピペットでの溶液吐き出しの際に空気を溶液中に出さない）などが有効かもしれません。 ・1列ごとのシール→有効かもしれませんが、作業時間がかかると思われ実験データの質が気になります。溶液添加の勢いを極力下げることでシールするのは回避したいところです。 ・チューブをずらすor蓋を閉める→チューブをずらすのは誤って溶液を添加することを防ぐために良い対策だと思えます。蓋を閉めるのはチューブをずらすか否かに関わらず実施するのが良いと思えます。 ・チューブラックと操作する場所→なるべく遠く置くのは良い対策だと思えますが、限度があると思えます。例えばいつもラックは左、操作する場所は右のように決まった位置で行うと定常的な操作となりコンタミリスクは減ると思えます。 ・試料を移行する際のウェルやチューブのまたぎ→またがないのは良い対策だと思えます。完全にまたがないのは不可能かもしれませんが、プレートやチューブに蓋をするのが有効と思えます。 ・秤量した後に白衣だけでなく、下のズボンも変える（ラボ用のものであれば）。 ・秤量ごとに白衣をクリーニングに出す。 ・試薬調製を別の部屋で実施する。 ・マイクロピペットの汚染を避けるためにフィルターチップを使う（コスト高いですが） ・固相抽出のサンプルロード～溶出まで、減圧/加圧マニフォールドではなく、遠心機で実施する。 ・15 mLのチューブに標準溶液を5～10 mLを調製して使用していたところ、コンタミが発生しました。→ピペットがチューブの壁に触れてしまったためにコンタミが発生したと考えられましたので、液面までの距離が短くなるように5 mLのチューブに調製することで改善されました。 ・低分子化合物のStock SolutionやWorking Solutionに関連するコンタミが、そのチューブ内での有機溶媒の這い上がり（表面張力が低いので思ったよりも上まで濡れている）に起因する可能性があります。教育の一環としてメタノールにクマシブルーを溶かした液を容器に入れ、這い上がりを見てもらったことがありました。 ・実験者の操作が問題であれば、Liquid Handling Machineを導入してなるべく人為的なコンタミの要素を減らすことが出来れば、実験者のストレスも減らして品質の向上につながる両得な状況にもなるかもしれません。