



安心できる毎日をおくるために…
私たちは研究をしています。



医薬品開発ツールとしてのバイオマーカーの分析法バリデーションと実試料分析に関する留意点文書の作成について

齋藤嘉朗

国立衛研・医薬安全科学部

2021年3月9日

第12回JBFシンポジウム 「医薬品開発におけるバイオマーカー測定 of 最新事情」

バイオマーカーに関する生体試料中濃度分析法の問題

医薬品のPK測定バリデーションとの違い

1. 分析対象物質がマトリックスに含まれる
 - ➡ 代替マトリックスや代替標準物質が使われる場合がある
2. タンパク質の場合、糖鎖構造などが標準品と被験物質と異なる
 - ➡ 真度でなく、相対真度として示される
3. バイオマーカーの特性と利用目的に応じたバリデーションが必要
4. 選択性、濃度範囲、平行性、安定性等のバリデーションには、しばしば臨床試料が必要

日本のBMVガイドラインにおける内在性物質の記述

“生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン”

Q&A (Q15)

内因性物質を薬剤として投与する場合のバリデーションは、本ガイドラインで定める内容を実施することが適当ではない項目もあるために本ガイドラインの対象とはならないが、本ガイドラインの内容を参考に必要なバリデーションを実施することが望ましい。

“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”

Q&A (Q1)

内因性物質とアミノ酸配列が同じ薬物も本ガイドラインの適用対象となる。ただし、ブランクマトリックスについては、代替マトリックスや内因性物質を除去したマトリックスを使用する等、特別な配慮が必要である。

そして、バイオマーカーは適用範囲外

FDA Bioanalytical Method Validation guidance (2018.5)

Scope: This guidance helps sponsors of INDs or applicants of NDAs, abbreviated new drug applications (ANDAs), biologic license applications (BLAs), and supplements validate bioanalytical methods used in human clinical pharmacology, bioavailability (BA), and bioequivalence (BE) studies that require pharmacokinetic, toxicokinetic, or **biomarker concentration evaluation**.

- This **fit-for-purpose (FFP) concept** applies to drugs, their metabolites, and **biomarkers**.
- **Conduct a full validation of any new bioanalytical method** for the analysis of a new drug entity, its metabolite(s), or **biomarkers**.
- **ISR is expected for** all in vivo human BE studies in ANDAs, or all pivotal pharmacokinetic, pharmacodynamic, and **biomarker studies** in NDAs or BLAs.
- For assays intended to support **early drug development** (e.g., candidate selection, go-no-go decisions, proof-of-concept), the **sponsor should incorporate the extent of method validation they deem appropriate**.
- The **accuracy, precision, sensitivity, selectivity, parallelism, range, reproducibility, and stability** of a biomarker assay **are important characteristics** that define the method. The approach used for drug assays should be the starting point for validation of biomarker assays, although the **FDA realizes that some characteristics may not apply or that different considerations may need to be addressed**.

C-Path document

Points to Consider Document:

Scientific and Regulatory Considerations for the Analytical Validation of Assays Used in the Qualification of Biomarkers in Biological Matrices

- ・Critical-path 研究所 (FDAのCritical path initiativeにより設置)が概念文書を公開 (2019年6月11日最終化、著者はFDA 8名, CPI 3名, 企業 24名)

現在、研究班で日本語訳中

- Scope:
- ・ 可溶性バイオマーカーに関するLC/GC(MS) 及びsingleplexのリガンド結合法
免疫染色、Flow cytometry, genomics, imaging, Multiplex assayは対象外
 - ・ 医薬品開発のためのツール。臨床検査、コンパニオン診断薬は対象外。

目的: バイオマーカーの適格性確認(意図した使用領域、使用用途等の使用方法”Context of Use”において、当該バイオマーカーが有用であることの証明)

バイオマーカーのassay validationは、Context of Useに基づき、Fit for purposeで

バイオマーカーの使用方法に応じて項目を選択して良い。但し、医薬品開発にもちいるための適格性確認には、基本的にフルバリデーションが必要。

Table 5: Seven Key Analytical Parameters to be Considered during Biomarker Assay Validation

- Accuracy (Relative) **相対真度**
- Analytical Measurement Range
 - Lower limit of quantitation **定量下限 (LLOQ)**
 - Upper limit of quantitation **定量上限 (ULOQ)**
- Parallelism: **平行性**
 - Minimum Required Dilution **最小希釈倍数**
 - Dilutional linearity **希釈直線性**
- Precision (Imprecision; intermediate precision, reproducibility) **精度**
 - Within run **分析単位内**
 - Between runs **分析単位間**
 - Between days **日間**
 - Between operators (if applicable) **試験担当者間 (該当する場合)**
 - Between lots (if applicable) **ロット間 (該当する場合)**
- Selectivity **選択性 (試料マトリックス中に含まれる未知物質の影響評価)**
- Specificity **特異性 (試料マトリックス中に含まれる関連物質の影響評価)**
- Stability (sample) **安定性**
 - Bench top **ベンチトップ**
 - Short term **短期**
 - Long term **長期 (通常、冷凍)**
 - Freeze-thaw **凍結融解**

7種の重要な定量分析
パラメータ

Table 6: Additional Analytical Parameters to be Considered during Biomarker Assay Validation

- Accuracy/Trueness **真度/正確性**
- Robustness **堅牢性**
- Ruggedness **耐久性**
- Drug Interference **薬物干渉性**

4種の追加分析パラメータ

日本版概念文書案の作成

AMED平林班-斎藤分担(平成30-令和2年度):

- 目的: バイオマーカー分析法の規制調和に資するため、
- 2018年度: バイオマーカー分析法に関する概念文書案の作成を開始
 - 2019年度: 分析法検証部分及び実試料測定部分の案の作成を完了
 - 2020年度: **案の最終化、英文化、米国・FDAとの意見交換**

R2年度は8回(累計16回)の班会議を開催し、文案は確定し英訳済み概要に関し、WRIBで意見交換済み*

対象範囲: C-Path文書と同様

分析対象物質: 内在性の代謝物、ペプチド、タンパク質

測定方法: LC/MS、リガンド結合法(LBA)「免疫組織染色、フローサイトメトリー、ゲノム情報、MSイメージングは除外」

◆ 医薬品開発ツール(DDT)としてのバイオマーカー
(コンパニオン診断薬、臨床検査は対象外)

* Spitz et al., Bioanalysis. 2021 Jan 29. doi: 10.4155/bio-2021-0005.

概念文書の基本原則と内容の方向性

文書のImage: バイオマーカーを申請資料に含める目的で、アッセイバリデーションと実サンプル測定を行う際、必要と考えられる項目とその留意点をまとめたもの

基本原則:

- 「申請資料(CTD)のモジュール2に記載するバイオマーカーの場合」という最も厳しいケースを中心に記載を開始
- 各バリデーション項目で、あくまで「留意すべき点」を記載(Criteriaは記載しない)
- 成果文書の位置づけは、取りあえず研究班としての成果を予定
- 関連分野の研究者にも理解できるよう、用語の説明を巻末に記載

標準品、内部標準物質、重要試薬、選択性、特異性、検量線範囲、マトリックス効果、真度・精度、平行性、希釈直線性、安定性、キャリアオーバー、最小希釈倍率、Re-injection reproducibility, ISR、パーシャルバリデーション、クロスバリデーション、実試料分析、市販キット、再分析、用語集(55種)

- ・ 申請資料への記載以外の目的での分析法評価

本文 10ページ、表 2ページ、用語集 7ページ(英訳案も作成中)

1

2 AMED 研究班⁴

3 「医薬品の安全性および品質確保のための医薬品規制に係る国際調和の推進に関する研究」「バイオマー
4 カー分析法バリデーション検討グループ」⁴

5 ←

6 **医薬品開発ツールとしてのバイオマーカの分析法バリデーションと実試料分析に**

7 **関する概念文書** ←

8 ←

9 ←

10 1. はじめに⁴

11 医薬品の効率的な開発のため、バイオマーカの利用が重要となっている。患者の層別化や用量設定等
12 を目的とし、特定の医薬品の使用に必須なバイオマーカは、コンパニオン診断薬として利用されるが、
13 その性能評価について本邦では既に通知文書「コンパニオン診断薬及び関連する医薬品に関する技術的
14 ガイダンス等について（厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡、平成 25 年 12 月 26 日）」に提示さ
15 れている。一方、これに該当しない臨床試験でのエンドポイント等の医薬品開発ツールとしてのバイオ
16 マーカの分析法評価に関しては、概念を含め規制文書として示されていない。従って、医薬品の製造販売
17 業者は、本来バイオマーカ分析法は適用外である、医薬品に関する「医薬品開発における生体試料中薬
18 物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン（薬食審査発 0711 第 1 号、平成 25 年 7 月 11 日）」
19 及び「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
20 ドライン（薬食審査発 0401 第 1 号、平成 26 年 4 月 1 日）」を参考に、これらバイオマーカ分析法の
21 バリデーションを行っているとの調査結果がある⁴。

22 バイオマーカ分析結果を、臨床評価のエンドポイントの一部として用いる場合や市販後にも薬効・副
23 作用評価の一助に用いる場合、バイオマーカ分析法は十分評価・検証されている必要がある。一方で、
24 バイオマーカ分析法の評価（項目や判定基準）は、バイオマーカの変化率等、その用途・特性に則し
25 て行うことが重要であり、医薬品を対象とした生体試料中薬物濃度分析法のように、一律に判定基準を定
26 めるのは難しいと考えられる。従って、Fit-for-purpose の概念²⁾が、比較的広く受け入れられている。さ
27 らに生体試料中薬物濃度分析法の場合と異なり、標準物質の特性や利用可能性に制限があり注意が必要
28 であること、マトリックス中に分析対象物質が含まれており、その濃度に個体差があること、等のバイオ
29 マーカ分析法に特有の問題が存在している。⁴

30 FDA は、2018 年 5 月に、医薬品に関する生体試料中薬物濃度分析法バリデーションの改訂ガイドン

目次

1. はじめに
 2. 適用範囲と基本原則
 3. マトリックス
 4. フルバリデーション
 - 4-1) 標準物質、内標準物質、重要試薬
 - 4-2) 選択性
 - 4-3) 特異性
 - 4-4) 検量線
 - 4-5) マトリックス効果
 - 4-6) 真度・精度
 - 4-7) 平行性
 - 4-8) 希釈直線性
 - 4-9) 安定性
 - 4-10) キャリーオーバー
 - 4-11) MRD (minimum required dilution)
 5. パーシャルバリデーション
 6. クロスバリデーション
 7. 実試料分析
 - 7-1) 検量線
 - 7-2) QC試料
 - 7-3) ISR
 8. 注意事項
 - 8-1) 市販キット
 - 8-2) 再分析
- 付録： 申請資料への記載以外の目的での分析法評価について
- 引用文献
- 用語解説

はじめに

分析結果を、臨床評価のエンドポイントの一部や市販後にも薬効・副作用評価の一部に用いる場合、バイオマーカー分析法は十分評価・検証されている必要

一方で、

バイオマーカー分析法の評価(項目や判定基準)は、その変化率等、用途・特性に則して行うことが重要であり、医薬品を対象とした生体試料中薬物濃度分析法のように、一律に判定基準を定めるのは難しい。

- ◆ **Fit-for-purpose**の概念が、広く受け入れられている
- ◆ 標準物質の特性や利用可能性に制限があり、マトリックス中に分析対象物質が含まれ濃度に個体差があること等、**バイオマーカー分析法に特有の問題が存在**

概念文書の適用範囲

対象： 医薬品承認申請資料に、当該バイオマーカーを代替エンドポイントとして用いるデータや医薬品の特徴づけ(薬理作用や副作用発現等)に用いるためのデータを取得する際の分析法



本概念文書の記載内容は、医薬品承認申請資料(CTD)への記載に用いる目的で、**バイオマーカーの定量値の信頼性が求められるバイオマーカーの分析法バリデーション及び実試料分析を想定**(module 2に記載するバイオマーカーを想定して議論)

個々のバイオマーカーの医薬品開発時のバリデーションに関しては、Fit-for-purposeの原則および入手可能な実験材料等に基づき、必要なバリデーションの内容を検討し、実施する必要

バイオマーカー**特有の内容** + バイオマーカーを対象に行う**一般的な分析法バリデーション**
を記載

バリデーションの基本原則

- ✓ バイオマーカーの用途・特性(COU)に合わせて、原則として11の項目についてバリデーションを実施
= Fit for Purpose
- ✓ 評価値の判定基準は評価開始前に設定し、試験計画書等に記載

4-1) 標準物質、内部標準物質、重要試薬

1) 標準物質 (Standards)

- 低分子物質: 化学的に同一化合物を推奨(安定同位体も)
- タンパク・高分子ペプチド: 組換え体を用いる場合が多い
 - LBAで用いる抗体の反応性が内在性物質と異なる場合がある

2) 内部標準物質 (Internal Standards)

- 低分子物質: 安定同位体の利用が望ましい、入手困難な場合には類縁物質を用いることも可能(回収率・マトリックス効果が異なる場合があることに留意して分析法開発)
- ペプチド: 安定同位体を利用
- タンパク質: LC/MSで部分ペプチドを測定対象とする場合:
ペプチドの安定同位体を用いることで分析法の信頼性向上

3) 重要試薬 (Critical Reagents)

分析結果に直接影響する試薬を定義

- 一般に検量線やQC試料用の生体由来マトリックス、抗原(LBA)・抗体(LBA)は該当
- それ以外は分析法開発段階で分析法ごとに検討推奨

4-2, 3) 選択性、特異性 (Specificity, Selectivity)

選択性

LC/MS法とLBA法では、選択性の評価方法が異なることに留意

➤ 真のマトリックスを用いる場合:

LC/MS法: 6個体以上のブランクマトリックスを用いて

LBA法: 10個体以上のブランクマトリックスを用いて

➤ 代替マトリックスを用いる場合:

マトリックス組成にロット差が非常に少ない: 評価数は $n=1$ でよい

● 入手可能な場合: 対象疾患のマトリックスを用いた評価推奨

● 真のマトリックスが血漿・血清: 溶血、高脂血症の評価推奨

特異性

▪ LC/MS法: 測定段階で分離されるため、通常、評価は不要

▪ LBA法: 類似物質・活性体・分解物で入手可能な物質を評価推奨
評価を行う場合の濃度範囲は、生理的な濃度以上を推奨

4-4) 検量線 (Calibration range)

検量線範囲: LLOQ~ULOQ (濃度に個体差が大きい場合あること考慮)

- 検量線用標準試料とQC試料
 - ・ 粉末の場合: 別々の標準原液から調製することを推奨
 - ・ 液体の場合: 同じストックから調製可能 (均一性前提)
- 検量線用試料のマトリックス: 内因性物質の濃度が、
 - 十分低い場合 (LLOQの20%以下等): 真のマトリックスを推奨
 - 高い場合 (LLOQの20%以上等の場合):
 - ・ LC/MS法: 安定同位体を標準物質として用いて検量線作成
 - ・ LBA法: 代替マトリックスを用いて検量線を作成
- 検量線は単一の分析単位 (LC/MSでは1回の連続測定、LBAでは1プレート) 毎に設けることを推奨
- 検量線用標準試料の濃度数と、一濃度当たりの試料数は、バイオマーカーの特性や使用目的 (COU) に依存し、事前決定

4-5) マトリックス効果 (Matrix effect)

- 分析対象物質の濃度がLLOQの20%以下
標準物質として安定同位体を用いる場合 } 実試料と同一マトリックスでの評価を推奨

困難な場合は、代替マトリックスを用いた評価が可能

- ✓ LBA法: 選択性の評価にて行う
- ✓ LC/MS法: 分析対象物質が含まれる6ロット以上のブランクマトリックスに内部標準物質を加えて、マトリックスファクター又は精度を評価

4-6) 真度・精度 (Accuracy, Precision)

生体試料に含まれる内因性物質の濃度によって、

- 1) 真のマトリックスをそのまま用いる
 - 2) 真のマトリックスを代替マトリックスで希釈
 - 3) 真のマトリックスに既知濃度の標準物質(代替標準物質を含む)を添加
 - 4) 代替マトリックスに既知濃度の標準物質(代替標準物質を含む)を添加
- 等により調製するQC試料を用いて分析単位内および分析単位間の真度・精度を評価

- 4濃度以上で、バッチが異なる各濃度3回以上の繰り返し分析を推奨。代替マトリックスを用いてQC試料を調製する場合でも、少なくとも1ロットの真のマトリックスを用いて、真度・精度を評価することが望ましい。
- 低分子でも、同一構造を有する標準物質が入手できない場合は、相対真度を許容
- 内在性物質を含むマトリックスをQC試料に用いる場合、以下のいずれかの式で真度を算出(現行の日本のLBA-GLのQ&Aと同様の考え)

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

4-7) 平行性試験 (Parallelism)

- 不要なケース：「標準物質の化学構造が内因性物質と同一」
＋「真のマトリックスを用いるクロマト法」
 - それ以外の場合（特に代替マトリックスや代替標準物質を用いる場合）は実施の検討を推奨（複数の患者試料での評価を推奨）
 - 濃度の評価段階： 実サンプルの濃度域を考慮して検討（既知濃度の実試料を用いて3段階以上希釈）
 - 繰り返し回数： $n=1$ 以上
 - 許容限度値を設定する必要性は低い
 - ✓ 高濃度側の実試料が得られない場合の代替手段
 - ✓ 実試料での分析対象物質濃度が、バリデーション段階で入手可能な試料中濃度より低い場合
- の検討方法も記載

4-9) 安定性 (Stability)

「真のマトリックス中の分析対象物質」

必須： 短期の安定性 (Bench top)、長期の安定性 (Long term)、
凍結融解安定性 (Freeze-thaw)

LC/MS法では推奨： 「Processed sample stability」

その他の評価項目： 用いる分析法と分析対象物質に応じて実施

- ・ 濃度域： 想定される実試料濃度域を概ねの範囲で、低濃度・高濃度で評価
- ・ 評価の繰り返し回数 (ロット数)： 最低N=3
- ・ 凍結融解数： 想定される回数以上
- ・ 短期や長期安定性： 想定される取り扱い期間以上
- バリデーション時点で入手可能な試料で評価し、入手後にISS等による確認可
- 代替マトリックスを用いる場合
検量線やQC試料中の分析対象物質についても、実際に保存される期間における安定性を確認
- 採取後の期間
可能な限り採取してから時間が経過していない試料を用いることが望ましい
また初回分析値を基準とした残存率で評価することも可能

8. 注意事項 8-1)市販キット(Commercial kits)

市販キット:

「臨床検査用として体外診断薬や医療機器として製造販売承認を受けたキット」
「研究用キット」

- ・ 基本的に、施設ごとにバリデーションを実施する必要
但し、臨床検査用キットに関しては、使用目的やバリデーション項目等について、バイオマーカーの特性に応じてケースバイケースで、バリデーションの実施の必要性に関して判断可能。

「研究用キット」:本文書に記載のフルバリデーションを行う

- ・ キットの製造元が確認したキットの有効(使用)期限に関する情報は参照可能
- ・ 付属の標準物質は、分析対象とする内因性物質との相違に注意
必要に応じて別の市販品を使用することを推奨
- ・ ロット変更の際: ロット間において同一試料中の分析対象物質の定量値の差が許容できることを確認することを推奨

付録：申請資料への記載以外の目的での分析法評価

バイオマーカーの探索や社内判断に用いる場合等、申請資料への記載以外の目的で分析法評価を行う場合については、各バイオマーカーの分析法ごとに、それぞれのバイオマーカーの特性及び用途等により、必要な評価項目及びそのレベルは異なるため、一義的に各自の判断となる。即ち、それぞれの評価項目と評価レベルは、十分考慮して各自が選定すべきである。

以下は、下記の状況を想定し、その場合の一例として次項の表を掲載するものである。

- Screening assay: 複数のバイオマーカー候補から絞り込みを行う段階を想定。探索的にバイオマーカーの変動の有無を検討する場合を想定。
- Qualified assay: 本留意点文書が対象としている医薬品申請資料に記載する分析値の信頼性レベルに至る前段階を想定。異なる分析単位間での濃度レベルを比較する場合等を想定。

申請資料への記載以外の目的での分析法評価(抜粋)

項目		Screening assay	Qualified assay
3	マトリックス	代替マトリックスでよい。	代替マトリックスで良いが、 真のマトリックスでの検討の実施が望ましい。
4	フルバリデーション		
4-2)	選択性	n=1以上で確認することが望ましい。	確認することが望ましい。
4-3)	特異性	内因性の分析対象物質との反応性は確認しておくことが望ましい。 類似物質との反応性は原則として確認不要。キットの標準物質はそのまま用いてもよい。	内因性の分析対象物質との反応性は確認することが必要。 類似物質との反応性は確認することが望ましい。 キットの標準物質は、 検証しておくことが望ましい。
4-4)	検量線	必要。	必要。
4-5)	マトリックス効果	必要ない。	望ましい。
4-6)	真度・精度	代替マトリックスでの 真度/相対真度の確認でよい。 精度も同様。濃度の数や分析単位の数減らすことを許容する。	真のマトリックスでの検討の実施が望ましいが、濃度の数や分析単位の数減らすことを許容する。 または、代替マトリックスでの 真度/相対真度及び精度の確認でもよい。
4-7)	平行性	必要ない。	確認が望ましい。
4-9)	安定性	短期安定性のみ ケースバイケースで実施。	短期、長期、凍結融解での安定性評価が望ましい。

用語の説明

全55用語について、簡単に解説

医薬品に関する国内2種の指針及びM10案を参考に記載

以下は、新規項目の一部

Fit for purpose: 当該分析結果の用いられる目的を満たすために十分なレベル（項目及び判定基準）の分析バリデーションを許容する考え方。

平行性Parallelism: 真のマトリックスと代替マトリックスでは含まれる成分が異なっており、検量線の傾きと実試料を希釈した場合の傾きが異なる場合（平行でない場合）がある。代替マトリックスに標準物質を添加して調製した検量線を用いて、高濃度の分析対象物質を含む試料または標準物質を高濃度に添加した試料を、真のマトリックスまたは代替マトリックスで段階希釈した試料を分析し、得られた値をそれぞれの希釈倍率で換算した定量値が同等な場合を平行性が成立しているという。真の分析対象物質と代替標準物質の平行性を評価する場合もある。

代替標準物質（代替標準品）Surrogate reference standard: 標準物質と分析上の性質が類似しており、標準物質の替わりになるものをいう。組換えタンパク質等。