

バイオ医薬品開発に必要な 生体試料分析法バリデーション

ファーマ大阪事業所 白石 康平 / バイオ技術センター 曾根原 和彦

1 はじめに

現在までに国内では100品目に迫るバイオテクノロジー応用医薬品（バイオ医薬品）が上市されている。売り上げランキングも上位を占め、特許切れ後の参入障壁も高いことから、今後も医薬品市場で重要な位置を占め続けることが期待される。

これらバイオ医薬品の承認申請には生体試料分析として、薬物濃度測定と、免疫原性試験（抗体測定）が求められる。両分析とも対象物質は、分子量5000を超えるタンパク質（表1）¹⁾で、分析手法としては、低分子化合物で汎用されるクロマトグラフィーとは異なり、抗原抗体の特異的結合を利用したイムノアッセイなどのLigand binding assay法（以下LBA法と略す）が用いられる（表2）。本稿では、上記2分析法の留意点及びバリデーションについて述べる。

2 薬物濃度測定法

2.1 薬物濃度測定法の留意点

バイオ医薬品は一般に低分子化合物ほど純度が高くなく、不均一性（Isoformや糖鎖付加、りん酸化などの翻訳後修飾による変化体を含む）を持つ。また実測定までに生じた部分分解物のPK（Pharmacokinetics）（LBA法での検出の有無）とPD（Pharmacodynamics）（活性）相関の確認も必要と考えられる。

表1 低・高分子化合物の特徴比較

特徴	低分子化合物	高分子化合物（バイオ医薬品）
分子量	小 (<1000Da)	大 (> 5000Da)
構造	有機化合物	アミノ酸の生体重合体
純度	均一	不均一
溶解性	しばしば脂溶性	通常水溶性
安定性	化学的	化学的、物理的、生物学的
マトリックス中の存在	外因性	内因性 ⁽¹⁾
合成	有機化学合成	生物学的産物
代謝	明確	比較的不明確
マトリックス結合	Albumin	特異的運搬たんぱく

(1) 内因性の類似たんぱく質の存在が、薬物の測定に大きく影響する。

表2²⁾にも示したように、LBA法は、①使用試薬のロット差やアッセイバッチ・プレート間差の影響を受けやすく、②検体の緩衝液での希釈を除き一般に前処理を行わない、③検量線が非線形性のシグモイド曲線（図1）³⁾となる、④多重測定により真度が向上するため、二重測定以上で行うことが推奨される、⑤高濃度域でのレスポンスの減弱（Prozone or Hook効果）が見られる（図1）、⑥一般に定量範囲が狭い（通常二桁以内）、⑦LBA法特有のマトリックス効果（プロテアーゼ、妨害抗体）が見られる等の特徴を有す。

LBA法の検量線においては、レスポンスは低濃度側のバックグラウンド値より緩やかに上昇し、変曲点を経て、高濃度の最大反応値へと収束する。通常変曲点をはさんで対称形状となる4-parameter logistic modelで回帰されるが（次式）、時として非

4-parameter logistic modelの例

$$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)}$$

x: アナライクの濃度, Y: レスポンス
A: アナライク濃度0でのレスポンス
B: AとDの中間レスポンスでの曲線の傾き
C: 検量線の中間レスポンスでのアナライクの濃度 (EC₅₀: 50%効果濃度)
D: 最大アナライク濃度でのレスポンス

表2 クロマトグラフィーとLBA法の比較

	クロマトグラフィー	LBA法
重要構成要素	抽出器具, 装置, 分析器具等	抗原, 抗体及びキット等 ⁽¹⁾
前処理	実施（除たんぱく, 脱塩等）	実施しない ⁽²⁾ （緩衝液での希釈は実施）
内標準物質	しばしば使用	使用せず
検量線回帰	一次回帰	シグモイド曲線 ⁽³⁾
分析精度	FDAガイドランス(2001)を充足	検量線両端域でやや劣る。 アッセイバッチ・プレート間差大
高濃度領域	装置の測定上限まで直線性（以降飽和）	測定飽和濃度以上にてレスポンスの低下（Prozone or Hook効果）
定量範囲	広い（三桁～）	狭い（一桁～二桁） ⁽⁴⁾
マトリックス効果	酵素による加水分解（エステラーゼ等）、分離阻害及びイオン化阻害など	プロテアーゼによる分解、妨害抗体や抗凝固剤の影響 ⁽⁵⁾ 及び内因性の類似たんぱく質のバックグラウンド

(1) 重要試薬のロット差（純度や活性）が結果に大きく影響する。

(2) マトリックスの非特異結合が高い場合、稀に液々、固相及びimmunoaffinity抽出を行う場合あり。

(3) 4-あるいは5-parameter logistic model並びに重み付けによる回帰が汎用される。

(4) 近年、ELISAなどの従来の比色分析に代わり、化学発光、電気化学発光やbiotin-avidin法による固相化による広範囲検出手法も選択される。

(5) マトリックス中の成分により薬物存在量が過小・過大評価される。

対称形状でより柔軟性の高い5-parameter logistic modelにより良好な回帰が得られる場合がある。シグモイド曲線においては、忠実な回帰を望むため、LLOQ (Lower Limit of Quantitation)、及びULOQ (Upper Limit of Quantitation)の両外側にAnchor pointを設定することが有効である。なるべくHook効果を生じ難い濃度にて、高濃度側のAnchor pointを設定することが、安定した検量線作成のポイントである（図1）。

2.2 薬物濃度測定法バリデーション

生体試料中の薬物濃度測定は、バイオ医薬品に関しても原則FDA (Food and Drug Administration)のガイドランス(2001)⁴⁾を基準として実施されるが、用いられるLBA法の特徴を踏まえ、White paper⁵⁾も考慮の上、分析法を構築することが望ましい。表3に薬物濃度測定法におけるバリデーション項目と判定基準を示す⁶⁾。

LBA法でのバリデーションの特徴は、①選択性にて個別別陰性試料でのLLOQ付近の濃度での添加回収を確認する点、②真度・精度の20/25ルール（真度・精度の判定基準の緩和規定）、③ULOQより高濃度試料でのProzone効果の確認の他、④薬物抗体共存下でのQC (Quality Control) 試料の定量値への影響評価の実施が挙げられる。

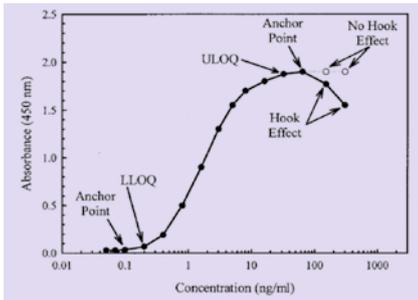


図1 シグモイド検量線とHook効果の例⁹⁾

ULOQ: 定量上限濃度, LLOQ: 定量下限濃度
Hook(Prozone)Effect: ULOQより高度域でレスポンスが減弱する現象
Anchor Point: シグモイド検量線の良好な回帰のため設定する両側の濃度ポイント

3 免疫原性 (抗体) 測定法

3.1 抗体測定法の留意点

投与された薬物に対する抗体が産生されると、薬物の体内動態やそれ自体の有効性に影響を及ぼすのみならず、類似の薬物の作用も減弱・消失させることがある。まれに薬物への過敏性や内因性の因子に対する自己免疫の形成などの重篤な副作用を生じる事もある。薬物に対する抗体産生の有無を評価する免疫原性試験における抗体測定の留意点を以下に示す。

抗体測定の薬物濃度測定と最も異なる点として、分析対象の不均一性、陽性対照 (抗体) との非同源性がある。陽性対照 (抗体) の選択肢として、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (抗体医薬の場合特に抗イディオタイプ抗体)、市販の抗体 (抗体医薬の場合、抗ヒトIgG抗体) などが挙げられるが、それぞれの長短を勘案の上での活用が必要となる⁷⁾。

免疫原性試験での抗体測定法では、適切なアッセイプラットフォーム (RIP (Radio immuno precipitation, 免疫沈降), SPR (表面プラズモン共鳴法, Surface plasmon resonance), ELISA, ECL (電気化学発光法, Electrochemiluminescent), バイオアッセイなど) のみならず、より適切なアッセイフォーマット (直接結合法 (アッセイプレートに疎水結合にて抗原を固相化する), 間接結合法, ブリッジングアッセイ法, 競合法, protein A/G法など) を選択することが重要である。直接抗原結合 ELISA 法のごとく、抗原のマスキングによる偽陰性の危険の多い方法は避け、SPR, ECL やブリッジングアッセイ (Bridging assay) 法を用いることが推奨される⁸⁾。その他の要求事項として、

表3 LBA法での薬物濃度測定法バリデーション項目と判定基準

項目	内容	判定基準
選択性	LLOQ 付近で評価 ブランクマトリックス 10 ロット以上を使用	・80%以上のロットで 真度: 75 ~ 125%
検量線	ブランク及び 6 濃度ポイント以上で評価 6 バッチ測定	・Anchor point を除く 75%以上で真度: 80 ~ 120% (LLOQ・ULOQ: 75 ~ 125%) ・6 バッチの平均真度: 85 ~ 115% (LLOQ・ULOQ: 80 ~ 120%) ・精度: <15% (LLOQ・ULOQ: <20%)
真度及び精度	5 濃度 (QC-LLOQ, L, M, H, ULOQ) で評価 n ≥ 2/ 各バッチ 計 6 バッチ測定	・真度: 80 ~ 120% (LLOQ・ULOQ: 75 ~ 125%) ・バッチ内・バッチ間再現性で精度: <20% (LLOQ・ULOQ: <25%) ・バッチ間再現性で精度・真度の絶対値合計: <30% (LLOQ・ULOQ: <40%)
希釈直線性	ULOQより高濃度 (100 ~ 1000 倍, ProzoneQC) 及び検量線上限, 中間, 下限となる希釈試料で評価	・ProzoneQC のレスポンス: > ULOQ ・真度: 80% ~ 120% ・精度: <20%
安定性	2 濃度 (QCL, QCH) で評価 室温, 凍結融解, 長期保存 (凍結), 冷蔵	・真度: 80 ~ 120% ・精度: <20%
薬物抗体共存の影響	薬物抗体共存下での薬物検出への影響 (定量値, 阻害率 (%))	・定型の基準なし ⁽¹⁾

(1) 薬物, アッセイの特徴を勘案し個別に設定する。

表4 各アッセイプラットフォーム・フォーマットの長所・短所

方法	長所	短所
直接結合法 ELISAまたはECL法	・高処理能力 ・2サイト結合	・epitopeがマスク ・Isotype特異的・動物種特異的検出 ・頻回洗浄にて低親和性抗体が剥離 (・陽性対照と検体で検出抗体が異なる) ・機器, 器具の独占供給 ⁽¹⁾
間接結合法 ELISAまたはECL法	・高処理能力 ・抗原の一貫した配向性 ・epitopeを露出可 ・比較的高感度	・Isotype特異的・動物種特異的検出 ・頻回洗浄にて低親和性抗体が剥離 ・機器, 器具の独占供給 ⁽¹⁾
ブリッジングアッセイ ELISAまたはECL法	・高処理能力 ・液相反応 ・全てのIsotypeを検出 ・検体の動物種を問わない ・薬物共存下で検出可能 ・洗浄回数削減により低親和性抗体を検出 (ECL)	・標識体が2種必要 ・標識の際に一部epitopeがマスク ・機器, 器具の独占供給 ⁽¹⁾
SPR法	・液相反応 ・全てのIsotypeを検出 ・検体の動物種を問わない ・リアルタイム検出により低親和性抗体を検出 (結合・解離を検出) ・標識抗体不要 ・薬物共存下で検出可能 (酸解離法)	・抗原固定の際に一部epitopeがマスク ・Dextranによりepitopeがマスク ・機器, 器具の独占供給 ・低処理能力 ・同種のIsotypeの場合, 抗体医薬での確認アッセイが困難 ・比較的感受度が劣る

(1) ECL 法の場合

全ての Isotype を検出できること、感度は前臨床試験では 500 ~ 1000 ng/mL、臨床試験では 250 ~ 500 ng/mL を確保することなどが上げられる。また、頻回洗浄により抗原抗体結合が解離し易い低親和性抗体の検出や、薬物共存下での抗体検出能が求められる (表 4)⁹⁾。

抗体測定に用いる LBA 法は抗原抗体の特異的結合を用いるため、低分子化合物の生体試料分析にて通常用いられるクロマトグラフィのように、抽出などの前処理は通常要求されないが、生体試料中の夾雑物の影響 (マトリックス効果) を緩和するため、緩衝液にて希釈の上、アッセイに供する (感度を確保するため希釈は 1% を限度とする)¹⁰⁾。

3.2 免疫原性測定法バリデーション

免疫原性評価の戦略が EMA (European Medicines Agency) のガイドライン⁶⁾

並びに White paper¹¹⁾ に示されている。EMA ガイドラインでは、ステップバイステップ (スクリーニングアッセイ, 確認アッセイ, バイオアッセイ, キャラクタライゼーション) による検体の絞込み評価が提示されている。一方 White Paper では、スクリーニングアッセイの陽性・陰性両検体につき、各全検体での確認アッセイ・薬物濃度測定の実施が示されている。

免疫原性試験についても、レギュレーション上は、国際調和途上であるが、2008 年 4 月の EMA のガイドライン⁸⁾ と 2009 年 12 月の FDA ドラフトガイダンス¹⁰⁾ 並びに White paper 類¹¹⁾ を参考に、開発剤並びに抗体測定の特異性を勘案の上、分析法を構築することが求められる。EMA ガイドラインの抗体検出及び特性評価スキーム (図 2) を示す。

採取された検体より、スクリーニング

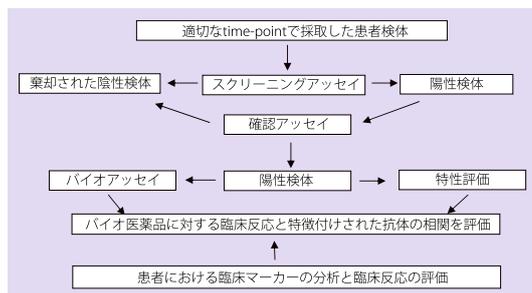


図2 抗体検出及び特性評価スキーム例

アッセイにて選抜された陽性検体は、確認アッセイ（または阻害アッセイ）にて過剰量の薬物添加により、薬物特異的なレスポンスの減弱の有無を調べられる。確認アッセイでの陽性検体については、バイオアッセイなどにて中和・非中和を調べ、又 Isotyping 等の特性評価を行い、抗体産生の検証及び typing が行われる。以上の結果と臨床マーカー分析を総合し抗体の特性と臨床の反応の相関性が評価される。

免疫原性測定法のバリデーション項目・判定基準の例を表5に示す¹⁰⁾。

3.2.1 カットポイント決定

カットポイントの決定には、被験薬物の暴露の無い個別陰性（対照）試料を用いる。例数はアッセイ系の開発時には5～10例、バリデーション時には50～100例程度用いるならその信頼性が確保される。なお異常個体の採用によるカットポイントの高値による偽陰性を防ぐため、測定値が平均値±3S.D.以内を満たさない個体は除く。また採用試料より（プール）陰性対照を調製する。カットポイントは偽陰性を避けるために、個別陰性対照にて5%の偽陽性を含む95%信頼区間上限を用いる。個別陰性試料を測定し、測定値から次式に従い算出する。測定バッチ差確認のため少なくとも3日実施する。

カットポイント(95%信頼区間上限) = 平均値 + 1.645 × 標準偏差

検体測定においては、カットポイントより高レスポンスの検体を陽性、低レスポンスの検体を陰性と判定する。

3.2.2 ノーマライゼーションファクター

カットポイント（95%信頼区間上限）と同じバッチ測定にて、陰性対照試料を測定し、ファクターを算出する。複数日測定

表5 バリデーション項目と判定基準（一例）

項目	評価内容	判定基準
カットポイント決定	個別陰性試料を測定 50-100検体 レスポンスが平均値±3S.Dを外れる検体は除外 少なくとも3日実施	・95%信頼区間上限 =平均+1.645×標準偏差 平均値±3S.D内の試料にて陰性対照（プールマトリックス）を調製
Normalization factor算出	「95%信頼区間上限/陰性対照のレスポンス」を算出 少なくとも3日実施	・複数日の平均（検体測定の際に、陰性対照にてカットポイントを再計算）
日内・日差再現性	複数濃度の陽性対照（抗体）を測定 少なくとも6バッチ実施 （少なくとも3日の2～3回の繰返し測定）	・複数日のレスポンスの精度20%以内
感度		・陽性対照（抗体）250～500 ng/mLでの陽性
確認アッセイ（阻害アッセイ）	複数濃度の陽性対照（抗体）を、複数濃度の薬物共存下で測定 阻害率（%）を算出	・定型の基準なし ⁽¹⁾ （共存薬物濃度は <i>in vivo</i> での Cmax を網羅）
抗体価算出	複数濃度の陽性対照（抗体）を陰性対照試料にて希釈（通常公比10希釈）測定	・レスポンスがカットポイント以上となる最大希釈倍率を抗体価とする ・複数濃度の陽性対照と抗体価との相関性が維持される
（保存・凍結融解・室温）安定性	複数濃度の陽性対照（抗体）を陰性対照試料に添加し、保存・処理前後で測定	・レスポンスの残存率80～120%
中和抗体測定（競合LBA法）	薬物濃度測定アッセイ ⁽²⁾ にて（複数濃度の）抗体共存による（複数濃度の）薬物検出への影響を測定 阻害率（%）を算出	・定型の基準なし ⁽¹⁾

(1) 薬物、アッセイの特徴を勘案し個別に設定する。

(2) 内因性たんぱくでは分子標的（受容体等）への結合を用いたLBA、抗体医薬ではイディオタイプ抗体を用いたLBAでも可能。

のファクターの平均をノーマライゼーションファクターとして確定する。以降の測定バッチでは、バッチ毎に測定した陰性対照試料と決定されたノーマライゼーションファクターにて再計算したカットポイントをバッチ毎の評価に用いる。

ファクター = 95%信頼区間上限 / 陰性対照試料の測定値の平均値

ノーマライゼーションファクター = ファクターの平均

(バッチ毎に再計算した) カットポイント = (バッチ毎の) 陰性対照試料のレスポンス × ノーマライゼーションファクター

3.2.3 日内・日差再現性

日内・日差再現性として複数濃度の陽性対照試料のレスポンスの再現性を調べる。検体の評価に重量濃度単位（例えば ng/mL）を用いず、抗体価（後述）を用いる場合、検量線を用いた定量値は算出しないため、再現性の評価にはレスポンスの絶対値を用いる。陽性対照試料を測定し、測定値（レスポンス）の平均値、S.D. 及び CV を算出する。測定日を変えてこの操作を少なくとも3回繰り返す。また、各日に少なくとも2～3回の繰返し測定を行う。

3.2.4 感度

陽性対照試料がスクリーニングアッセイにおいて、陽性となる最小濃度を調べる。FDAドラフトガイダンスでは、臨床用に250ng/mL、前臨床では500ng/mLの感度を推奨している。

3.2.5 確認アッセイ（阻害アッセイ）

偽陽性を排除するために、薬物共存による陽性対照のレスポンスの変化を調べる。検体での阻害アッセイを実施する際に用いる薬物の濃度設定を行う。複数濃度の陽性対照に対し、薬物の濃度を振って調製した試料を測定し、薬物非共存に対する阻害率（%）を算出する。薬物を共存させることでレスポンスがどのように影響を受けるかを確認し、阻害アッセイに用いる薬物濃度を設定する。

3.2.6 抗体価測定

陽性対照を用いて、抗体価測定に再現性があるか調べる。複数濃度の陽性対照試料及びそれを段階希釈（通例公比10）した試料を測定する。また、陰性対照試料の測定値から次式に従いカットポイントを算出する。

カットポイント = ノーマライゼーションファクター × 陰性対照試料の測定値の平均値

表6 汎用の細胞バイオアッセイでの中和抗体アッセイ

検出アッセイ	作用機序	エンドポイント
Thymidine取り込み cAMP測定	細胞増殖・細胞死誘導 (アッセイフォーマットによる)	細胞増殖
イムノアッセイ	たんぱく発現誘発・変化	たんぱく発現
Branched DNA技術 PCRでの定量	mRNA発現への影響	mRNA発現
イムノアッセイ	りん酸化または たんぱくりん酸化によるシグナル結果	りん酸化
Luciferase, β -galactosidase	レポーター遺伝子発現への影響, 変化	レポーター遺伝子発現
Flow Cytometry	細胞の分化 (増殖)	特定細胞のポピュレーション

測定値がカットポイント以上となる試料の最大希釈倍率を抗体価とする。複数濃度の試料と抗体価の関わりに濃度依存性があるかを確認する。

3.2.7 各種安定性 (室温, 凍結保存, 凍結融解)

検体の取り扱い条件での安定性を担保する。一定期間保存・処理後の試料と調製直後の試料を測定し、回収率 (%) を確認する。

3.3 中和活性評価

中和抗体は薬物の分子標的への相互作用抑制や、薬物そのものの排除により、薬物の薬理活性を減弱する抗体と定義できる。中和抗体の検出には、*in vivo* の環境をより反映されるとして細胞バイオアッセイ (Cell-based biologic assay) の活用が推奨されるが、抗体医薬の超可変領域に対する抗体 (抗イディオタイプ抗体) 型の中和抗体には、細胞を用いない競合リガンドバインディングアッセイ (competitive ligand-binding assay) がより適している場合もある。

ICH S6 Step5 「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」¹²⁾ においては、反復投与毒性試験の解釈に役立てるため、抗体産生の有無とその中和、非中和を明らかにしないといけないと規定されるが、ICH S6 (R1) Step3¹³⁾ では、*in vivo* 毒性試験においては、十分に薬物の PK/PD が示される場合は、中和活性についての解釈は通常必要ないと柔軟な対応を認めている。汎用の細胞バイオアッセイでの中和抗体アッセイを示す (表 6)¹⁴⁾。

3.3.1 LBA 法での中和抗体アッセイ

中和活性の評価は薬物濃度の測定系で検体を共存させることで薬物が吸収 (検出阻害を受けるか) されるかどうかを調べる。バリデーションでは用いる薬物の濃度設定を行う。複数の濃度の陽性対照に対し薬物の濃度を振って吸収率 (%) を算出する。陽性対照を共存させることで薬物の測定値がどのように影響を受けるか確認し、中和活性評価に用いる薬物濃度を設定する。

4 おわりに

バイオ医薬品の生体試料分析は、21 世紀に入りようやく方法論のコンセンサスが得られてきた。当社では、最新の技術・規制動向を注視しつつ、豊富な経験を生かし、お客様の多様な分析ニーズに対応し、バイオ医薬品開発に貢献していきたい。

文 献

- 1) Marian Kelly et al.: Key Element of Bioanalytical Method Validation for Macromolecules, The AAPS Journal, 9 (2) Article 17ppE156-E162 (2007)
- 2) Bonia Rup et al.: Critical Ligand Binding Reagent Preparation/Selection: When Specificity Depends on Reagents, The AAPS Journal, 9 (2) Article 16 ppE148-E155 (2007)
- 3) Binodh DeSilva et al.: Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-Binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules, Pharmaceutical Research, 20 (11), pp1885-1900 (2003)
- 4) Food and Drug Administration: Guidance of industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001

- 5) C.T.Viswanathan et al.: Workshop/Conference report - Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays, The AAPS Journal, 9 (1) Article4 (2007)
- 6) 高田昌太郎: GLP分析法バリデーション～実施範囲・測定における判断基準等～ (製剤/原薬・TK/PK別) 分析法バリデーション事例集, 第2刷, 情報機構
- 7) Valerie Quarumby: ATA Screening Assays: Development, Optimization & Validation, AAPS LBA Immunogenicity Course, AAPS NBC June 24 (2009)
- 8) European Medicines Agency: Guidelines on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins, April 2008
- 9) Mire-Sluis, A.R. et al.: Recommendations for the design and optimizations of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products, Journal of Immunological Methods 289 pp1-16 (2004)
- 10) Food and Drug Administration: Guidance of industry: draft Guidance, Guidance for Industry Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins, December 2009
- 11) E. Koren et al.: Recommendations on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products, Journal of Immunological Methods, 333 pp1-9 (2008)
- 12) ICHS6 Step5, バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価
- 13) ICHS6 (R1) Step3 (検討中, 意見・情報募集終了)
- 14) Arunan K. et al: Immunogenicity assessment of Therapeutic proteins and peptides, Current Pharmaceutical Biotechnology, 10,PP352-358 (2009)



白石 康平
(しらいし こうへい)
ファーマ大阪事業所



曾根原 和彦
(そねはら かずひこ)
バイオ技術センター