

## AMED 研究班

「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」「バイオマーカー分析法バリデーション検討グループ」

# 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

## 1. はじめに

医薬品の効率的な開発のため、バイオマーカーの利用が重要となっている。患者の層別化や用量設定等を目的とし、特定の医薬品の使用に必須なバイオマーカーは、コンパニオン診断薬として利用されるが、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マーカー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、医薬品の製造販売業者は、本来バイオマーカー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）」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ー分析法のバリデーションを行っているとの調査結果がある<sup>1)</sup>。

バイオマーカー分析結果を、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・副作用評価の一助に用いる場合、バイオマーカー分析法は十分評価・検証されている必要がある。一方で、バイオマーカー分析法の評価（項目や判定基準）は、バイオマーカーの変化率等、その用途・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と考えられる。従って、Fit-for-purpose の概念<sup>2)</sup>が、比較的広く受け入れられている。さ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、等のバイオマーカー分析法に特有の問題が存在している。

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ダンスを最終化した<sup>3)</sup>が、このガイダンスはバイオマーカーも対象に含んでいる。このガイダンスでは Fit-for-purpose の概念により必要な項目や判定基準は選択・設定するとの記載に加え、バイオマーカー分析においても incurred sample reanalysis (ISR) が求められている。また、バイオマーカー分析法の評価に関しては、これまでに複数の白書が論文として発表されている<sup>1,2, 4-6)</sup>。2019 年 6 月に米国 Critical Path Institute (C-Path) は FDA との共著でバイオマーカー分析法に関する留意点文書の最終版を発表した<sup>7)</sup>。この留意点文書では平行性評価の重要性が指摘されたほか、allowable Total Analytical Error (aTAE) の概念が導入された。

以上の様に、近年、医薬品開発におけるバイオマーカーの利用が増えており、海外では、その分析のための白書作成や検討が活発に行われ、規制文書での言及がなされるようになってきている。このような状況か

ら、日本でも医薬品開発において同様の議論やその白書、さらには規制関連文書が必要と考えられる。このため AMED 研究班「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」の「バイオマーカー分析法バリデーション検討グループ」の専門家メンバーで議論が行われた。本概念文書はその成果物として作成し公表するものであり、医薬品開発におけるバイオマーカーのバリデーションと実試料分析に関する国際調和の一助となることが期待される。

## 2. 適用範囲と基本原則

本概念文書は、医薬品開発におけるツールとしてバイオマーカーを利用する際（他に指針等が発出されているコンパニオン診断薬等の体外診断薬、臨床検査は対象外）に必要な分析法バリデーションと実試料分析に関し、科学的知見を基に研究班としての考えを示したものである。その対象分子は、内因性物質のうち、内因性低分子代謝物、ペプチド、タンパク質とし、測定方法は液体クロマトグラフィー（liquid chromatography: LC）、ガスクロマトグラフィー（gas chromatography: GC）、又はそれらと質量分析法（mass spectrometry: MS）を組み合わせた分析法（クロマトグラフ法）、並びにリガンド結合法（ligand binding assay: LBA）とする。抗原抗体反応により分析対象物質を分離・濃縮し、クロマトグラフ法を用いる場合も対象とする。原則として、単一の分析対象物質を測定する場合（singleplex）について記述する。

またバリデーション項目内の記述は、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を対象とした。従って本概念文書の記載内容は、医薬品承認申請資料 Common technical document (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している（研究班では、module 2 に記載するバイオマーカーを想定して議論した）が、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、実施する必要がある。本文書では、バイオマーカー特有の内容を中心に、一方で利便性を考慮して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についても記載した。

さらに、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、各バイオマーカー及び分析法ごとに、必要な評価項目及びそのレベルは異なるため各自の判断となるが、付録に考え方の一例を示した。

## 3. マトリックス

バリデーションに用いるマトリックスには、内因性物質を含む真のマトリックス、代替マトリックス（内因性物質を除去したマトリックスを含む）が挙げられる。リン酸緩衝液やこれに牛血清アルブミン等を加えたマトリックス、活性炭やアフィニティカラム等で内因性物質を除去したマトリックス等の代替マトリックスを使用する場合、分析法を確立する過程において、平行性の評価等により、その妥当性を可能な限り検証することを推奨する。また真のマトリックスと代替マトリックス間で、選択性、回収率、マトリックス効果、安定性が異なる可能性があることに留意すべきである。実試料分析においては、バリデーションで妥当性が確認されたマトリックスを用いる。マトリックスのロットを変更する場合には、そのロット間差を確認して使用する。希少マトリックスを用いる場合には、少ないロット数での評価や代替マトリックスの使用を容認する。

#### 4. フルバリデーション

特記しない限り、バイオマーカーの用途・特性（Context of use）に合わせて、原則として下記の項目についてバリデーションを行う。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する。

##### 4-1) 標準物質、内標準物質、重要試薬

###### 4-1-1) 標準物質

分析対象物質が低分子である場合は、原則として化学的に同一な化合物を用いることを推奨する。代替標準物質として、分析対象物質の安定同位体が用いられる場合もある。

分析対象物質がタンパク質や高分子ペプチドである場合は、組換え体が代替標準物質として用いられる場合が多いが、分析過程に抗原抗体反応を含む場合（リガンド結合法を含む）、抗体の反応性が内因性物質（真の分析対象物質）と異なる場合があることに留意する。

代替標準物質を用いる場合には、代替標準物質と内因性物質の反応性の差異を確認するため、平行性評価等の実施が推奨される。なお、内因性物質を、標準物質を使った検量線用標準試料を用いて定量し、文献値等との整合性を評価することが、標準物質との反応性の差異の程度の確認に参考になる場合がある。複数の代替標準物質が入手可能な場合は、分析法開発段階で内因性物質の反応性と差異を検討することが望ましい。

###### 4-1-2) 内標準物質

内標準物質はクロマトグラフ法で用いられる。

分析対象物質が低分子である場合は、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である。類縁物質を内標準物質に用いる際は、回収率・マトリックス効果が異なる場合があること、分析対象物質の測定を妨害する場合があることに留意して分析法を開発する。回収率・マトリックス効果が異なる場合は、分析対象物質と内標準物質間で、その割合が一定であることを確認することが重要である。

ペプチドの場合は、安定同位体の利用が考えられる。一方、タンパク質の場合は、基本的に安定同位体を用いることは難しいが、LC/MS法で部分ペプチドを測定対象とする場合は、ペプチドの安定同位体を用いることで分析法の信頼性の向上につながる可能性がある。

###### 4-1-3) 重要試薬

分析結果に直接影響する試薬を重要試薬とする。一般に検量線やQC試料用マトリックスに用いる生体由来するマトリックスは重要試薬に該当するほか、リガンド結合法においては抗原・抗体も重要試薬に該当する。上記以外の試薬は、重要試薬に該当するか否かを分析法の開発段階で分析法ごとに検討することが推奨される。なお、重要試薬のロットの変化により分析結果に影響を与える場合があるため、重要試薬のロット間差は確認することが望ましい。

###### 4-1-4) 全般

標準物質、内標準物質、重要試薬の入手先、ロット番号、保存条件は記録とその保存が必要であり、他の重要な情報（化学構造、含量/濃度、純度、分析証明書、有効期限等）についても入手可能であれば入手して保存することが望ましい。有効期限前に性能を評価することで、一定期間、有効期限を延長することができる。また、標準物質、内標準物質の有効期限が切れた場合の継続使用やロット及びメーカーの変更時は、検量線の再現性とQC試料の真度・精度の検証を推奨する。例えば、双方を新しいロット/製品と古いロット/製品を交互に替えて評価する、あるいは実試料での再現性を確認する、等が考えられる。その他の項目も必要に応じて実施する。

#### 4-2) 選択性

クロマトグラフ法とリガンド結合法では選択性の評価方法が異なることに留意する必要がある。

内因性の分析対象物質の濃度が十分低く、検量線用標準試料に真のマトリックスを用いる場合、クロマトグラフ法では 6 個体以上、リガンド結合法では 10 個体以上のブランクマトリックスを用いて評価することを推奨する。

内因性の分析対象物質の濃度が定量下限 (LLOQ) より高い場合等で、検量線用標準試料に代替マトリックスを用いる場合、クロマトグラフ法とリガンド結合法ともに代替マトリックスの評価数は、マトリックスの組成にロット差が非常に少ない場合には  $n=1$  でもよい。代替マトリックスを用いる場合において、ロットの変更の際は以前のロットと同等であることを検証して用いることが望ましい。また、真のマトリックスに標準物質 (代替標準物質を含む) を添加して真度を評価する場合は、内因性物質の濃度を考慮して添加濃度を設定する。

対象疾患によりバイオマーカーが変動する可能性がある。特殊なマトリックスとして入手可能な場合、対象疾患のマトリックスにおける選択性を評価することを推奨する。別途、真のマトリックスが血漿・血清の場合、溶血したマトリックス、高脂質性のマトリックスについては、評価することを推奨する。

#### 4-3) 特異性

クロマトグラフ法、特に LC/MS 法では分析対象物質と妨害物質が分離されるため、通常、特異性の評価は不要である。リガンド結合法の場合は、類似物質・活性体・分解物等で入手可能な物質について評価することが望ましい。評価を行う場合、妨害物質の濃度は、生理的な濃度以上を推奨する。

#### 4-4) 検量線

検量線範囲は、定量下限 (LLOQ) ~ 定量上限 (ULOQ) と定義する。バイオマーカーの濃度は個体差が大きい場合があることを考慮して、検量線範囲を設定する。なお、リガンド結合法の場合、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フック効果の有無を評価するため ULOQ を超えるポイントを設定することが重要である。

QC 試料を標準溶液の添加により調製する場合で、標準物質が粉末の場合は、分析全体の正確性を確保するために、検量線用標準試料と QC 試料を別々の標準原液から調製することが望ましい。また、標準物質が液体の場合で溶液の均一性が確保されている場合は、安定性の保証された期間内であれば、同じ標準原液・標準溶液から調製することが可能である。なお、粉末の場合で、別々に調製した標準原液・標準溶液を用いて評価した結果が適切であれば、その後は同じ標準原液・標準溶液から検量線用標準試料と QC 試料を調製しても構わない。

検量線用試料のマトリックスとしては、内因性物質の濃度が十分低い場合 (LLOQ の 20% 以下等) には、真のマトリックスを用いることが望ましい。LC/MS 法の場合は、内因性物質の安定同位体を標準物質とし真のマトリックスに添加して検量線を作成することもできる。これら以外の場合には、代替マトリックスを用いて検量線を作成することが一般的である。QC 試料のマトリックスについては 4-6) 真度・精度に示した。

検量線は単一の分析単位 (クロマトグラフ法では 1 回の連続測定、リガンド結合法では 1 プレート) ごとに設けることを推奨する。検量線用標準試料の濃度数、一濃度あたりの試料数は、バイオマーカーの特性や使用目的 (Context Of Use) に依存して分析法ごとに、試験計画書等で事前に定めることとする。

代替マトリックスや代替標準物質を検量線用標準試料に用いる場合は、平行性の評価をあらかじめ実

施することが推奨される。

#### 4-5) マトリックス効果

分析対象物質の濃度が低い（例えば、LLOQ の 20%以下等）真のマトリックスが入手可能である場合や、標準物質として安定同位体を用いる場合は、実試料と同一のマトリックスをマトリックス効果の評価に用いることが望ましい。困難な場合は、代替マトリックスを用いた評価を検討することができる。

LC/MS 法を用いる場合には、マトリックス効果の評価は、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標準物質を加えた試料に関し、マトリックスファクターまたは精度を用いて評価することを推奨する。

リガンド結合法では、マトリックス効果の評価は、選択性の評価にて行う。

#### 4-6) 真度・精度

生体試料に含まれる内因性物質の濃度によって、真のマトリックスをそのまま用いる、真のマトリックスを代替マトリックスで希釈する、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）を添加する、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）を添加する等して調製する QC 試料を用いて分析単位内および分析単位間の真度・精度を評価することとなるが、可能な範囲で真のマトリックスを用いて評価を実施することが望ましい。代替マトリックス、真のマトリックスのいずれを用いる場合にも、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行うことを推奨する。なお、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する。内因性物質を含むマトリックスを QC 試料に用いる場合は、マトリックス中の内因性物質濃度の分析を行い、定量に影響しないマトリックスを選択するか、以下のいずれかの式により真度を算出する。式の選択に当たっては、バイオマーカーの特性や評価する目的を考慮し、選択した式を一貫して用いることが望ましい。

真度(%)=(試料中分析対象物質濃度-内因性物質濃度)/ 添加標準物質濃度 ×100

真度(%)=試料中分析対象物質濃度 / (内因性物質濃度 + 添加標準物質濃度)×100

真度・精度の判定基準値の設定に有用な概念の一つとして、Critical Path Institute (C-Path) の提案する Performance standard (PS) と aTAE がある。

#### 4-7) 平行性

標準物質の化学構造が内因性物質と同一で真のマトリックスを用いたクロマトグラフ法の場合は平行性の評価は不要であるが、それ以外の場合は実施を検討することが望ましく、特に代替マトリックスや代替標準物質を用いる場合は平行性評価の実施を推奨する。平行性の評価では、既知濃度の実試料を真のマトリックス又は代替マトリックス等を用いて、3 段階以上の希釈をした試料を調製する。濃度の評価段階は、実試料の濃度域を考慮して検討することが望ましい。いずれの希釈試料においても、希釈倍率に応じた定量値が得られることを確認する。また、複数の患者試料を用いて評価することが望ましい。各患者試料の評価に当たっては、評価数は n=1 以上とする。判定基準を事前に設定する必要性は低いと考えられる。

高濃度の実試料が得られない場合の代替手段としては、低濃度のみで平行性を確認する、標準物質を加

えて高濃度試料を作成する等が挙げられる。クロマトグラフ法の場合は同一物質または安定同位体の添加を推奨し、リガンド結合法の場合は組換え体の添加を許容する。一方、バリデーションの段階で入手可能な試料に比べ、実試料での分析対象物質濃度が低い場合は、高濃度試料を代替マトリックスで希釈する方法でバリデーションを行い、後日低濃度試料が入手できた場合は、高濃度側に添加していく方法での評価を検討することが可能である。

#### 4-8) 希釈直線性

希釈直線性の評価においては、検量線に用いるマトリックスに標準物質（代替標準物質を含む）を添加して、高濃度の試料を調製する。濃度は想定される実試料の最高濃度が望ましい。

実試料分析の際に想定される希釈倍率まで、検量線に用いるマトリックスで段階希釈し、定量値と調製濃度の定量値の理論値から求められる真度を評価する。実試料分析時に検量線範囲を超えた濃度を検出し、試料を希釈して分析する可能性があるため、希釈直線性を事前に検討しておくことは重要である。平行性の評価において高濃度試料を調製するために標準物質（代替標準物質を含む）を添加した場合は、希釈直線性の評価は不要である。

なお、リガンド結合法の場合、ULOQ を超える濃度の試料がフック効果の影響を受けずに適切に分析できることも評価することが重要である。

#### 4-9) 安定性

真のマトリックス中の分析対象物質について、「短期安定性 (Bench top)」、「長期安定性 (Long term)」、「凍結融解安定性 (Freeze-thaw)」は、必須の評価項目と考えられる。また、実試料の分析において、前処理後の保存が予想される場合においては、実試料の取り扱い方法に応じた内容で安定性（クロマトグラフ法では、「Processed sample stability」）を評価することが推奨される。全血中安定性等、その他の評価項目に関しては、実試料の取り扱い方法に加えて用いる分析法と分析対象物質に応じて、必要とされる安定性の評価を実施する。なお、「全血中安定性」については分析法開発の段階で検討し、安定性が低い場合は対策を講じることが推奨されるが、マトリックスが血清の場合は実施が困難であることに留意する。想定される実試料の概ねの濃度範囲で、低濃度・高濃度の試料を用いて安定性を確認することが推奨される。評価の繰り返し回数は最低  $n=3$  とする。凍結融解数としては想定される回数以上、また短期安定性及び長期安定性に関しては実際に想定される試料取り扱い期間以上について評価することが推奨される。

バイオマーカー分析においては、バリデーション時に入手できる試料に限られる場合もあるため、バリデーションを行う際には、入手可能な試料を用いて可能な範囲で安定性の評価を行い、実試料分析開始後に、実試料を用いた安定性評価 (incurred sample stability; ISS) 等により確認することが推奨される。また、実試料の入手前時点での分析法バリデーションにおける安定性の評価には、代替標準物質を添加した試料も利用できるが、その場合は、対象とする濃度範囲の低濃度・高濃度における安定性評価に関して、実試料分析開始後に、ISS 等により確認することが重要である。

実試料のマトリックスと検量線用標準試料や QC 試料に用いるマトリックスが異なる場合には、検量線や QC 試料のマトリックスについても、実際に保存される期間における安定性を確認する。実試料を用いた安定性確認においては、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。採取後に時間が経過した場合等でも、バリデーション時の初回分析値を基準とした残存率で評価することが可能である。

試料調製段階における安定性については、バリデーションにおいて可能な範囲で評価を実施し、実試料分析において実際に実施される条件を含めることが望ましい。

分析施設で溶解・希釈して調製した標準溶液を保存する場合はその安定性を評価する。

#### 4-10) キャリーオーバー

分析法開発段階において可能な限り低減化し、バリデーションで評価すると共に、実試料分析におけるモニタリングを推奨する。一般に、ULOQ の試料の後に、応答性がないブランク試料を測定して評価する。

#### 4-11) MRD (minimum required dilution)

リガンド結合法では評価することを推奨する。バイオマーカー分析においては、検量線範囲に入るよう内因性物質が低濃度の真のマトリックスまたは代替マトリックスを用いて、様々な希釈率で実試料を希釈することが多く行われる。このため、同一分析法でも一律の希釈倍率を適用できない場合が多い。

想定される濃度範囲での希釈の影響を評価することが推奨される。また、分析法開発段階において検討し、バリデーション段階においても、評価することが望ましい。さらに、実試料分析中に MRD を変更する場合はパーシャルバリデーションが必要である。

### 5. パーシャルバリデーション

フルバリデーションを実施した分析法に関し、軽微な変更を施す場合には、パーシャルバリデーションを実施する。パーシャルバリデーションで評価する項目は、分析法の変更の程度とその性質に応じて設定する。

パーシャルバリデーションを実施する典型的な事例として、分析法の他施設への移管、分析機器の変更、定量範囲の変更、分析に使用する試料量の変更、抗凝固剤の変更、前処理法や分析条件の変更、試料の保存条件の変更、希少なマトリックスの新たな使用、重要試薬のロット変更、MRD の変更等が挙げられる。

パーシャルバリデーションにおける判断基準には、原則として事前に設定したフルバリデーションの許容基準と同様の基準を用いる。

### 6. クロスバリデーション

クロスバリデーションは、例えば、一つの臨床試験の試料を複数施設で実施する場合や異なるプラットフォームの分析法間で定量値を比較する場合等で実施する。クロスバリデーションによる比較は、それぞれの分析法においてフルバリデーション又はパーシャルバリデーションを実施した上で実施する。QC 試料及び実試料を分析し、QC 試料の各濃度の平均真度、及び実試料の濃度の乖離度を評価する。

クロスバリデーションの具体的な方法としては、室内及び室間再現精度を考慮し、低濃度、中濃度、高濃度の各濃度で3回以上の繰り返し分析による QC 試料の平均真度に関し評価を行うことが推奨される。また、実試料による評価については、分析対象物質の特性に依存するが、試料数は $\geq 30$ を目安とし、試料の選択に当たっては可能な範囲で濃度分布を考慮し、多くの個体からの試料を含めることが望ましい。実試料の分析回数は1回でも良い。評価値の判定基準は、バイオマーカーの用途・特性等に基づき事前に設定し、試験計画書等に記載する。

## 7. 実試料分析

実試料とは、生体試料中濃度分析に供する試料のことである。実試料分析には、バリデーションによって確立された分析法を用いる。実試料分析において、バリデーションで安定性が確認された条件下で実試料を取り扱い、安定性が確認された期間内に検量線及び QC 試料と共に実試料を分析する。更にバイオマーカーが重要な評価項目に位置付けられた場合等の代表的な臨床試験において、異なるマトリックスごとに ISR を実施し、分析法の再現性を確認することが望ましい。なお、キャリアオーバーが懸念される場合、分析単位ごとにキャリアオーバーを検討し、実試料分析結果への影響を考慮することが推奨される。

特記しない限り、バイオマーカーの用途・特性に合わせて、下記の項目（7-1～7-3）に関し判定基準を実試料の測定開始前に設定し、試験計画書等に記載する。分析法バリデーションの実施結果によっては、実試料分析の前に被験者試料を用いて分析法の確認を行うことが必要な場合がある。

### 7-1) 検量線

検量線は、実試料中の分析対象物質の濃度を算出するために用いられる。実試料分析に用いる検量線は、バリデーションで確立した方法によって、分析単位ごとに作成されることを推奨する。検量線の回帰式及び重み付け条件は、バリデーションで確認されたものを用いる。

回帰式から求められた検量線用標準試料の各濃度の真度又は相対真度を評価することで、実試料分析での分析法の妥当性を評価する。実試料分析において、検量線用標準試料の LLOQ 又は ULOQ が、事前に設定した判定基準を満たさなかった場合には、これらの次の濃度の検量線用標準試料を、LLOQ 又は ULOQ としてもよい。

### 7-2) QC 試料

QC 試料は、検量線や実試料の分析に用いられた分析法の妥当性を評価するために分析され、分析単位ごとに評価することが推奨される。真のマトリックス、代替マトリックスで希釈した真のマトリックス、標準物質（代替標準物質を含む）を添加した真のマトリックス、標準物質（代替標準物質を含む）を添加した代替マトリックス等の QC 試料を検量線の濃度範囲内で、原則、3 濃度（低濃度、中濃度及び高濃度）用意し、分析単位ごとに分析することを推奨する。真のマトリックスの QC 試料を用いることを、可能な範囲で考慮する。

代替マトリックスに標準物質（代替標準物質を含む）を添加した QC 試料のみを用いる場合に、同時に真のマトリックスを用いた QC 試料の分析を参考として追加で行う（判定基準には含めない）ことは、分析単位間や試験間の比較をする際に、真の分析対象物質/マトリックス特有の有益な情報が得られる場合もあり望ましい。また QC 試料は、実試料をはさむように配置することが望ましい。QC 試料の真度を評価することで、実試料分析での分析法の妥当性を評価する。

### 7-3) ISR

バイオマーカーを用いて医薬品を特徴づける重要な評価に用いる場合（例えば臨床試験後期における代替エンドポイント等として用いる場合）等の代表的な臨床試験の試料を対象に、異なるマトリックスごとに ISR を実施することが推奨される。

安定性が保証された期間内に ISR を実施することが重要である。ISR を実施する実試料数は、1000 を超えない実試料数に対してその約 10%、1000 を超えた実試料数では、それに 1000 の超過数に対して



約 5%に相当する試料数を加えた数を目安とすることを推奨する。試料の濃度範囲については、実試料中のバイオマーカーの濃度範囲を考慮して選択することが望ましい。乖離度を評価することで、実試料分析での分析法の妥当性を評価する。

## 8. 注意事項

### 8-1) 市販キット

バイオマーカーの分析においては市販キットが用いられることがある。市販キットには、臨床検査用に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と、研究用キットがある。基本的に、市販キットを使用する場合には、施設ごとにバリデーションを実施する必要がある。

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、バイオマーカーの用途・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することができる。

研究用キットに関しては、キットに付属のバリデーション情報を利用することなく、フルバリデーションを行う。当該キットが当該バイオマーカーの用途・特性に合致するか（検量線範囲や特異性等）、十分検討を行った上で利用を判断することが望ましい。キットの製造元が確認したキットの有効（使用）期限に関する情報を参照しても良い。また研究用キットに付属の標準物質は、分析対象とする内因性物質との相違に注意し、必要に応じて別の市販品等での評価が望まれる。キットのロット変更の際には、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が推奨される。また研究用キットは、入手できなくなる可能性があるため、代替方法を考慮しておいたほうがよい。

### 8-2) 再分析

実試料の分析を開始する前に、実試料の再分析を実施する時の理由、繰り返し再分析をする回数、及び報告する定量値の選択基準を、規定することが重要である。

以下に、実試料を再分析する理由の具体例を示す。

- ・検量線用標準試料と QC 試料が、事前に設定した判定基準を満たさなかった場合
- ・得られた値が ULOQ を超えている場合
- ・最低濃度の検量線用標準試料が検量線から棄却されたことにより、変更後の LLOQ が他の分析単位に比べて高くなった分析単位において、得られた濃度が変更後の LLOQ よりも低い場合
- ・不適切な試料注入又は分析機器の不具合が生じた場合
- ・希釈して測定した実試料の濃度が LLOQ よりも低い場合

再分析した試料は記録し、初回定量値、再分析の理由、再分析で得られた定量値、最終的に採用した定量値、及び採用の妥当性を考察することが望ましい。

初回の分析結果で報告可能な結果が得られなかった場合（例えば、ULOQ を超える濃度、分析機器の不具合）、1 回の再分析で十分である。定量値を確認する必要がある場合、使用可能な試料量があれば、複数回の繰り返し分析を行うことが推奨される。

なお、臨床試験においては、被験者の安全性が試験のいかなる状況よりも優先される。したがって、調査目的のため、特定の実試料の再分析を必要とする状況が起こり得る。

### 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

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している。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している。
- **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している。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している。

\*「2. 適用範囲と基本原則」に記載の通り、当該バイオマーカーを代替エンドポイントや医薬品の特徴（薬理作用や副作用発現等）を主張するためのデータとして、医薬品の申請資料に含める場合

#### 引用文献

- 1) Ohtsu Y, Matsumaru T, Katashima M, Kakehi M, Kakuo H, Suzuki T, Mabuchi M, Nakamura R, Nakamura T, Katori N, Tanaka S, Saito Y. Biomarker assay validation for clinical trials: a questionnaire survey to pharmaceutical companies in Japan. *Bioanalysis*, 2019; 11: 55-60.
- 2) Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, Weiner R, Allinson J, Fountain S, Keller S, Weinryb I, Green M, Duan L, Rogers JA, Millham R, O'Brien PJ, Sailstad J, Khan M, Ray C, Wagner JA.: Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res*. 2006; 23: 312-328.
- 3) US FDA. Bioanalytical Method Validation; Guidance for Industry. May 2018. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
- 4) Timmerman P, Herling C, Stoellner D, Jaitner B, Pihl S, Elsby K, Henderson N, Barroso B, Fischmann S, Companjen A, Versteilen A, Bates S, Kingsley C, Kunz U; European Bioanalysis Forum. European Bioanalysis Forum recommendation on method establishment and bioanalysis of biomarkers in support of drug development. *Bioanalysis*, 2012; 4: 1883-1894.
- 5) Houghton R, Gouty D, Allinson J, Green R, Losauro M, Lowes S, LeLacheur R, Garofolo F, Couerbe P, Bronner S, Struwe P, Schiebl C, Sangster T, Pattison C, Islam R, Garofolo W, Pawula M, Buonarati M, Hayes R, Cameron M, Nicholson R, Harman J, Wieling J, De Boer T, Reuschel S, Cojocaru L, Harter T, Malone M, Nowatzke W. Recommendations on biomarker bioanalytical method validation by GCC. *Bioanalysis*, 2012; 4: 2439-2446.
- 6) Arnold ME, Booth B, King L, Ray C. Workshop Report: Crystal City VI—Bioanalytical Method Validation for Biomarkers. *AAPS J*, 2016; 18: 1366-1372.
- 7) Biomarker Assay Collaborative Evidentiary Considerations Writing Group, Critical Path Institute. Points to Consider Document: Scientific and Regulatory Considerations for the Analytical Validation of Assays Used in the Qualification of Biomarkers in Biological Matrices. June 2019. <https://c-path.org/wp-content/uploads/2019/06/evidconsid-whitepaper-analyticalsectionv2019.pdf>

項目			Screening assay	Qualified assay
2	適用範囲と基本原則		-	-
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		-	-
	4-1)	標準物質、内標準物質、重要試薬		
		4-1-1)	標準物質	必要。高分子（リガンド結合法：LBA）では代替標準物質が良い。
		4-1-2)	内標準物質	用いることが望ましい。
		4-1-3)	重要試薬	分析法の開発段階で、重要試薬を分析法ごとに定めることが望ましい。
		4-1-4)	全般	入手先、ロット番号、保存条件の記録と保存が必要。
	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のが望ましい。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、検証しておいた方が望ましい。
	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を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を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。
	4-8)	希釈直線性	LC：必要ない。 LBA：望ましい。	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。
	4-10)	キャリーオーバー	必要ない。	確認が望ましい。
	4-11)	MRD	どの MRD にするかを決めておく。	同左
5	パーシャルバリデーション		必要ない。LBA においては、MRD や重要試薬のロット変更時は確認しておくのが望ましい。	本文の記載どおりに実施するのが望ましい。
6	クロスバリデーション		必要となる状況が通常は発生しないと思われる。	実施が望ましい。
7	実試料分析			
	7-1)	検量線	必要。	必要。
	7-2)	QC 試料	入れることが望ましい。	必要。
	7-3)	ISR	必要ない。	ケースバイケース
8	注意事項			
	8-1)	市販キット	そのまま用いてもよい。	標準物質の妥当性を評価することが望ましい。
	8-2)	再分析	明らかに異常な値の場合は実施することが望ましい。	同左。追加として、事前に再分析の基準を決めた上で、実施することが望ましい。

## 用語解説

- **Allowable Total Analytical Error**:分析結果の有用性に影響を与えることなく、許容できる分析的な総誤差
- **アンカーポイント Anchor point** : 検量線のカーブフィッティングを向上させる目的で、検量線用標準試料と同時に測定する定量下限 (LLOQ) 未満又は検量線の定量上限 (ULOQ) を超える濃度の試料。
- **安定性 Stability** : 所定の時間、特定の条件下での溶媒中又はマトリックス中における分析対象物質の化学的又は生物学的安定性。分析対象物質の安定性評価は、試料を採取してから分析するまでの各過程が分析対象物質の濃度に影響を及ぼさないことを保証するために実施される。
- **Incurred sample reanalysis (ISR)** : 定量値の再現性確認のため、異なる日に別の分析単位で実試料を再分析すること。
- **回収率 Recovery** : クロマトグラフ法において、生体試料の前処理過程における分析対象物質の回収効率。  
回収率(%) =  $100 \times \frac{\text{分析対象物質をブランクの生体試料に添加して前処理した後のレスポンス}}{\text{ブランクの生体試料を前処理した後に分析対象物質を添加した時のレスポンス}}$
- **乖離度 Assay variability** : 同じ試料を用いて行った定量値間の相違の程度。両者の平均に対する両者の差をパーセント表記したもの。  
乖離度(%) =  $\frac{\text{比較する分析の定量値} - \text{基準となる分析の定量値}}{\text{両者の平均値}} \times 100$
- **希釈直線性 Dilution linearity** (クロマトグラフ法では希釈の妥当性 **Dilution integrity** という用語も用いられる) : 試料を希釈して分析する場合に、希釈が分析対象物質の定量値に影響を与えないことを確認するために評価される。リガンド結合法の希釈直線性の評価では検量線の定量上限 (ULOQ) を超える濃度の試料がフック効果の影響を受けずに適切に分析できることも評価する。
- **キャリーオーバー Carry over** : 分析機器に残留した分析対象物質が定量値に影響を与えること。
- **QC 試料 Quality control (QC) sample** : 分析法の信頼性を評価するために用いる既知濃度の試料。実試料分析において QC 試料は、検量線や実試料の分析に用いられた分析法の妥当性を評価するために分析される。生体試料に含まれる内因性物質の濃度によって、①生体試料そのままの場合 (**matrix QC** または **endogenous QC** と呼ばれることもある)、②生体試料を代替マトリックスで希釈する場合、③生体試料に既知濃度の分析対象物質

を添加する場合、④代替マトリックスに既知濃度の分析対象物質を添加する場合（代替マトリックス QC）等がある。

- **クロスバリデーション Cross validation** : 同一の試験内で複数の分析施設で分析する場合、又は異なる試験間で使用された分析法を比較する場合に実施されるバリデーション。クロスバリデーションによる比較は、それぞれのフルバリデーション又はパーシャルバリデーションを実施した上で実施する。
- **結合試薬 Binding reagent** : リガンド結合法で用いる試薬のうち、分析対象物質に直接結合する試薬。
- **検量線 Calibration curve** : 分析対象物質の濃度とレスポンスの関係を示したもの。定量下限 (LLOQ) 及び定量上限 (ULOQ) を含む検量線用標準試料及びブランク試料から構成される。クロマトグラフ法においてはゼロ試料（内標準物質を添加したブランク試料）も用いられる。ULOQ を必ず含めることとし、リガンド結合法においては必要に応じてアンカーポイントを設定してもよい。
- **検量線用標準試料 Calibration standard** : 検量線の作成に用いる分析対象物質を添加した既知濃度の試料。検量線用標準試料を用いて検量線を作成し、QC 試料や実試料の濃度を算出する。
- **再分析 Reanalysis** : クロマトグラフ法では試料の前処理から測定までの一連の操作、リガンド結合法では試料の希釈から分析に係る一連の操作、を再度行うこと。
- **実試料 Study sample** : 臨床試験等から得られる試料のうち、生体試料中バイオマーカー濃度分析に供する試料。
- **市販キット Commercial kit** : 定量に必要な試薬類および標準物質をまとめたもので、販売されているもの。試験研究用または体外診断薬等として市販されている。
- **重要試薬 Critical reagent** : 分析結果に直接影響する試薬を指し、結合試薬（抗体及びその標識体等）等が該当する。
- **真度 Accuracy** : 定量値と理論値との一致の程度。理論値を 100%としたときの、パーセント表記で表される。
- **真のマトリックス Authentic matrix** : 実試料と同じ種類のマトリックス（血漿、血清、全血、尿等）が、実試料と同様の方法で採取され、保存されたものを指す。実試料において抗凝固剤や添加剤を用いる場合は、これらも添加する。代替マトリックスと対をなす用語。True matrix、biological matrix 等と呼ばれることもある。

- 精度 **Precision** : 繰り返し分析して得られる定量値のばらつきの程度。変動係数 (CV) または相対標準偏差 (RSD) のパーセント表記で表される。  
精度(%) =  $100 \times \text{標準偏差} / \text{平均値}$
- 選択性 **Selectivity** : マトリックス中の他の成分の存在下で、分析対象物質を区別して検出する能力。
- 総誤差 **Total analytical error** : 真度の絶対値と精度の和。
- 相対真度 **Relative accuracy** : 代替標準物質 (代替標準品) を検量線に用いて算出した真度。
- 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。
- 代替分析対象物質 **Surrogate analyte** : 分析対象物質と分析上の性質が類似しており、分析対象物質の替わりになるものをいう。安定同位体標識化合物等。
- 代替マトリックス **Surrogate matrix** : 内因性物質が分析において妨害される (もしくは妨害が予想される) 場合に真のマトリックスの代わりに用いられる。また、希少なマトリックス (組織、脳脊髄液、胆汁等) のため量に限りがある場合等、本来のマトリックスの代わりとして用いられる。例として、リン酸緩衝液やこれに牛血清アルブミン等を加えたマトリックス、**Stripped matrix** (活性炭等で内因性物質を除去したマトリックス) 等。
- 定量下限 **Lower limit of quantification (LLOQ)** : 試料中において分析対象物質を信頼できる真度及び精度で定量することができる最も低い濃度。
- 定量上限 **Upper limit of quantification (ULOQ)** : 試料中において分析対象物質を信頼できる真度及び精度で定量することができる最も高い濃度。
- 定量範囲 **Quantification range** : 試料中において分析対象物質を信頼できる真度及び精度で定量することができる濃度の範囲。生体試料中バイオマーカーの濃度分析に用いる分析法の定量範囲は、検量線の定量範囲及び希釈直線性によって保証される。
- 特異性 **Specificity** : マトリックス中に存在し測定に影響を与え得る類似物質と分析対象物質を識別して検出する能力。
- 内標準物質 **Internal standard (IS)** : 分析対象物質の前処理中の回収率や分析機器によるレスポンスの補正を目的に添加される物質。分析対象物質に構造の類似した物質や安定同位体でラベル化した物質が用いられる。

- パーシャルバリデーション **Partial validation** : 既にフルバリデーションを実施した分析法に軽微な変更を施す場合に実施するバリデーション。パーシャルバリデーションで評価する項目は、分析法の変更の程度とその性質に応じて考慮する必要があり、その範囲は分析単位内の真度及び精度のみの評価からほとんどフルバリデーションに至るまで多岐にわたる。
- **Performance Standard**:分析対象物質の当該濃度における **allowable Total Analytical Error**
- バリデーション **Validation** : 種々の評価を通じて十分な再現性及び信頼性を有することを立証すること。
- 標準原液 **Stock solution** : 標準物質を適切な溶媒に溶解または希釈して調製した最高濃度の非マトリックス溶液。
- 標準物質 (標準品) **Reference standard** : 分析対象物質を定量分析する上で基準となるものであり、主に検量線用標準試料や **QC** 試料の調製に用いられる。内因性物質と同一構造の標準物質の他、代替標準物質を含む。
- 標準溶液 **Working solution** : 標準原液を適切な溶媒で希釈して調製した非マトリックス溶液。主として、検量線用標準試料や **QC** 試料を調製するため、マトリックスに添加する。
- 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 (**ULOQ**) を超える濃度の試料の測定値が検量線の **ULOQ** 以下の値となるため注意する。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。
- 部分ペプチド **Signature peptide** : タンパク質やペプチドを分析するために適した分子量に切断したペプチドの断片。タンパク質やペプチド等を酵素消化等で切断、これらに特徴的な配列で測定に適したペプチドを選定して、測定対象として用いる。
- ブランク試料 **Blank sample** : 標準物質や内標準物質を添加せずに、必要に応じて前処理し、分析するマトリックス試料。
- フルバリデーション **Full validation** : 当該バイオマーカーの **Context Of Use (COU**:バイオマーカーの特性や使用目的) のために必要な分析法バリデーションの全ての項目を評価する。通常、分析法を新たに確立する際に実施する。
- 分析 **Analysis** : 試料の希釈から分析機器による測定までを含めた一連の分析のプロセス。



- 分析対象物質 **Analyte** : 試料中の分析の対象となる物質。内因性 (分析対象) 物質 (**true analyte** や **endogenous analyte** と表記されることもある) と、その代替 (分析対象) 物質 (**surrogate analyte** と表記されることもある) 等の種類がある。
- 分析単位 **Analytical run** : 検量線、QC 試料及び実試料等から成る試料群。通常、同一条件のもと、同じ試薬を用いて同じ試験実施者により中断されることなく調製もしくは前処理された一連の試料群 (バッチ) を 1 つの単位として分析する。リガンド結合法の場合は同一プレートやディスクを 1 つの分析単位とすることが多い。
- 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。
- **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。
- **Blank matrix** : マトリックス中の分析対象物質や外因性化学物質 (抗凝固剤を除く) 及びその代謝物等を含まないもの。バイオマーカー分析においては、分析対象物質の濃度が定量下限 (LLOQ) 未満のものや **Stripped matrix** 等を空白マトリックスとすることもある。
- **Processed sample** (前処理後試料) : 分析装置による測定に供される試料であり、生体試料を前処理することによって得られる。
- **Interfering substance** : マトリックス中に存在し、分析対象物質の分析に影響を及ぼす可能性がある物質。
- **Matrix** : 分析のために選択された真のマトリックスと代替マトリックスをいう。
- **Matrix effect** : 試料中のマトリックス由来成分による分析対象物質のレスポンスへの影響。
- **Matrix factor (MF)** : マトリックス非存在下での分析対象物質のレスポンスに対するマトリックス存在下での分析対象物質のレスポンスの割合。  

$$MF = \text{マトリックス存在下での分析対象物質のレスポンス} / \text{マトリックス非存在下で}$$

## の分析対象物質のレスポンス

- **Minimum required dilution (MRD)** : リガンド結合法での分析用に調製された試料において、緩衝液により試料が希釈されている倍率。MRD は、必ずしも試料を分析できる最小の希釈倍率である必要はないが、検量線用標準試料や QC 試料も含め、すべての試料で同一が望ましい。
- リガンド結合法 **Ligand binding assay** : 分析対象物質に特異的に結合する試薬を利用して分析対象物質を分析する方法。リガンド結合法の多くは抗原抗体反応を利用したものである。多くの場合、検出に酵素標識、放射性同位元素標識、蛍光標識又は発光標識等を施した試薬を使用する。反応は、96 穴プレート、試験管又はディスク等で行う。
- レスポンス **Response variable** : 分析機器の検出器から得られた応答のこと。通常、クロマトグラフ法では応答を電気信号に変換して記録されたクロマトグラムから得られるピーク面積値（あるいはピーク高さ値）で表し、リガンド結合法では分光学的手法で得られた応答を電気信号に変換して得られる吸光度又は発光強度等で表される。