

医薬品開発ツールとしての核酸バイオマーカーの qPCR 法による分析法開発並びにバリデーションに関する留意点文書

1. はじめに

バイオマーカーとは、正常な生物学的プロセス、病原性プロセス、または曝露や介入（治療的介入を含む）に対する生物学的反応の指標として測定される定義された特性のことであり、バイオマーカーには、分子的、組織的、放射線的、または生理学的な特性が含まれる¹⁾。医薬品開発における成功率や安全性の向上のために、バイオマーカーの活用事例は年々増加しており、効率的な医薬品開発におけるバイオマーカーの利用は重要である。バイオマーカーを医薬品開発ツールとして、その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、参考情報として医薬品の申請資料に含める場合、その分析法は十分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は、対象とするバイオマーカーの用途・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困難である。従って、バイオマーカー分析法の評価では、Fit-for-purpose の概念²⁻⁵⁾を適応することが有用である。さらに医薬品の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いる可能性に加え、その濃度に個体差や日内変動があること等、バイオマーカー分析法に特有の問題が存在している。

内因性代謝物やタンパク質等の生体分子に加え、デオキシリボ核酸（DNA）やリボ核酸（RNA）などの核酸もバイオマーカーとなり得る。例えば、米国 FDA はウイルス由来の DNA や RNA を薬事承認のための代替エンドポイントバイオマーカーとして提示している⁶⁾。また、医薬品による副作用検出のための安全性バイオマーカーとして、循環血中のマイクロ RNA（miRNA）の利用に関する報告もなされている⁷⁾。さらに、抗がん剤による治療効果の予測バイオマーカーとしての核酸バイオマーカーの有用性やその臨床応用に関しても報告がなされている⁸⁾。上述の核酸バイオマーカーの検出や定量では、quantitative polymerase chain reaction（qPCR）法や reverse transcription qPCR（RT-qPCR）法が一般的によく利用される。

qPCR 法及び RT-qPCR 法とは、PCR による標的核酸配列の増幅と蛍光物質による検出を利用した、特異性、感度、並びに再現性が高い核酸分析手法である。近年の遺伝子治療用製品、細胞・組織加工製品、及びワクチン等の医薬品の開発数の増加に伴い、それら医薬品の品質、安全性及び有効性試験において、qPCR 法及び RT-qPCR 法の重要性が増加している。例えば、医薬品規制調和国際会議（以降「ICH」という）が 2023 年 3 月に公表した「遺伝子治療製品の非臨床生体内分布の考え方（ICH S12 ガイドライン）」⁹⁾では、遺伝子治療用製品の生体内分布試験法として qPCR 法の利用が提示されている。また、ICH の専門家会議の見解として 2009 年 6 月に公表された「ウイルスとバクテリアの排出に関する基本的な考え方」¹⁰⁾においても、排出されたウイルス/バクテリアの検出に qPCR 法及び RT-qPCR 法の利用を推奨している。一方で、qPCR 法のバリデーションに関する判定基準等の詳細は上記ガイドラインや留意点文書内

に記載されていない。

これまでに、科学研究論文に投稿する qPCR 法及び RT-qPCR 法を用いた分析法の正確性や再現性を担保するために、2009 年に The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) ガイドラインが論文として公表された¹¹⁾。また、American Association of Pharmaceutical Scientists、Workshop on Recent Issues in Bioanalysis (WRIB)、Global CRO Council や Japan Bioanalysis Forum の Discussion Group では qPCR 法及び RT-qPCR 法を用いた遺伝子治療用製品の生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関する基準に関して議論を行い、検証試験における評価項目や判定基準値に関する合意内容を公表している¹²⁾⁻¹⁶⁾。加えて、バイオマーカーを対象とはしていないものの、欧米の規制機関は食品や飼料中に含まれる遺伝子組み換え生物等に由来する特定の核酸配列の検出や定量における qPCR 法及び RT-qPCR 法の分析法バリデーションに関するガイドラインを発出している^{17), 18)}。さらに、国際標準化機構 (ISO) も qPCR 及び RT-qPCR を用いた定量法の開発やバリデーションに関する留意点についてガイドライン化している¹⁹⁾。

核酸バイオマーカーを医薬品開発ツールとして、その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、参考情報として医薬品の申請資料に含める場合、他のバイオマーカー同様、その分析法は十分検証されている必要がある。2019 年 6 月に米国 Critical Path Institute と FDA が共著で発表したバイオマーカー分析法に関する留意点文書⁴⁾や日本の AMED 研究班が公開した留意点文書⁵⁾では qPCR 法及び RT-qPCR 法を対象としていないものの、これら文書で提示されている留意点の多くは、核酸バイオマーカーの分析法の検証のための評価項目や判定基準の設定に応用できると考える。

以上の様に、海外では、医薬品や食品分野を中心に qPCR 法及び RT-qPCR 法のバリデーションのためのガイドラインや白書の作成、それらの検討が活発に行われている。しかしながら、現状医薬品開発ツールとしての核酸バイオマーカー分析における qPCR 法及び RT-qPCR 法のバリデーションに特化した国際的なガイドラインや留意点文書は公表されておらず、本邦における医薬品開発における核酸バイオマーカーの利用促進に向けて、qPCR 法及び RT-qPCR 法を用いた分析法のバリデーションと実試料分析に関する議論やその白書、さらには規制関連文書の作成が必要と考えられる。このため日本医療研究開発機構 (AMED) 研究班「薬剤性間質性肺炎・重症薬疹に関するバイオマーカー候補の適格性確認と規制要件案の作成に関する研究」の国立医薬品食品衛生研究所における議論を行い、その内容を基に 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」の専門家メンバーにおいて議論が行われた。本留意点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核酸バイオマーカーの qPCR 及び RT-qPCR 分析法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. 基本原則と適応範囲

本留意点文書は、医薬品開発におけるツールとして核酸バイオマーカーを利用する際に必要な qPCR 及び RT-qPCR の分析法開発時及びバリデーション時における留意点に加え、本法を用いた実試料分析の留意点に関し、研究班としての考えを示したものである。本文書を適応する qPCR 法及び RT-qPCR 法としては、医薬品承認申請資料 Common technical document (CTD) の module 2 に記載する医薬品開発ツールとしてのバイオマーカーを対象とした高い信頼性が求められる分析法を想定し、コンパニオン診断薬等の体外診断薬や臨床検査は対象外とした。なお、個々の核酸バイオマーカーの医薬品開発時の分析法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項目や判定基準を事前に設定して、文書化する必要がある。

核酸バイオマーカーとしての分析対象物質としては、DNA 及び RNA とする。具体的に、DNA としては、ゲノム DNA やミトコンドリア DNA、並びにセルフリー DNA 等、RNA としては、メッセンジャー RNA (mRNA) やマイクロ RNA (miRNA) 等を分析対象として想定している（ただし、これらに限定するものではない）。測定原理や解析手法が qPCR 法と異なるデジタル PCR 法は本留意点文書の適応外とする。原則として、単一の分析対象核酸バイオマーカーを測定する場合 (single-plex) について記述する。

本留意点文書では、qPCR 法及び RT-qPCR 法を用いた生体試料中における分析対象物質としての核酸バイオマーカーの濃度（即ち、単位容積当たりのコピー数）の定量を目的とする分析法開発並びにバリデーションに関する留意点が記載されている。qPCR 法を用いた遺伝子バリエーションのジェノタイプング解析は本留意点文書の適応外である。

本留意点文書の各バリデーション項目で記載される n 数は、実試料と同様に核酸抽出等の前処理を行う試料の数を意味している。また、核酸バイオマーカーの定量分析あるいはそれに向けたバリデーション試験において、測定結果の正確性の向上並びに測定値のばらつきを評価するために、各試料について通常 duplicate 以上で測定することが望ましい。なお、qPCR 法や RT-qPCR 法のバリデーションでは、通常、分析対象物質以外の DNA や RNA が含まれた試料を分析することから、選択性の評価は要しないと考えられる。

3. 核酸標準物質、測定コントロール

qPCR 法及び RT-qPCR 法による核酸バイオマーカーの定量分析では、標的核酸分子の PCR 増幅領域を含む DNA（1 本鎖または 2 本鎖）または RNA を核酸標準物質として使用することが望ましい。核酸標準物質としては、化学合成により作製されたコピー数が既知である合成核酸を用いることを推奨する。なお、化学合成された核酸標準物質の精製方法に関しては、バイオマーカーの用途・特性 (Context of use) を考慮し、分析法の信頼性が確保できる一定以上の高度な精製方法を利用することが望ましい。核酸標準物質の純度は Context of use を充たすために、可能な限り高純度であることが望ましい。一方で、分析対象物質が RNA の場合は、*in vitro* 転写により作製した RNA を核酸標準物質として選択することも可能である。核酸標準物質に関して、標準溶液中の安定性について考慮する。

3-1) 重要試薬

分析結果に直接影響する試薬を重要試薬として、事前に規定する。これら重要試薬は、PCR グレードかつヌクレアーゼフリーであることが推奨される。PCR におけるプライマーやプローブは、重要試薬として規定し、HPLC や PAGE グレードで精製を行うことを推奨する。プライマーやプローブは Context of use を充たすために、可能な限り高純度であることが望ましい。これらプライマーやプローブの安定性についても考慮することが推奨される。

使用する水に関しては、重要試薬に規定しなくて良いと考えられるが、ヌクレアーゼの混入等に留意する。

3-2) 分析法開発における留意点

分析対象物質が DNA である場合は、標的増幅領域を含む 1 本鎖または 2 本鎖 DNA を核酸標準物質として使用することが望ましい。ただし、1 本鎖 DNA を核酸標準物質として用いて 2 本鎖 DNA の定量を行う場合は、1 本鎖 DNA が PCR の 1 サイクル目で増幅反応が起きないことに留意し、検量線作成時に

データ補正（各検量線試料の検出 quantification cycle[Cq]値より 1 を引く）を行う必要がある。また、環状 DNA を核酸標準物質として使用する際は、分析対象となる核酸分子の立体構造の PCR 増幅効率への影響を考慮し、必要に応じて直線化処理の実施を検討することを推奨する。その際には、直線化処理の際に使用する制限酵素の残存の影響を考慮し、精製する場合には、サンプルロスを考慮する必要がある。

分析対象物質が mRNA や miRNA 等の RNA である場合は、逆転写効率による分析への影響を反映できるように、RNA を核酸標準物質として分析法開発を開始することを推奨する。なお、RNA は DNA と比べ分解されやすいため、RNA を核酸標準物質として用いる場合は安定性を分析し、必要に応じて分解抑制物質（*e.g.* RNA 分解酵素阻害薬）を添加することが望ましい。DNA を核酸標準物質として用いて RNA を定量する場合は、分析法開発段階において、逆転写効率が一定であることの評価に加え、複数の逆転写産物由来の核酸標準物質を用いた検量線の平行性評価により、その妥当性を示すことが重要である。

分析法開発段階で、化学合成あるいは *in vitro* 転写された核酸標準物質のロット間差の評価を実施することを推奨する。加えて、これらの塩基長、濃度、分解度は、電気泳動法や吸光度測定法等を用いて事前に評価することが望ましい。

3-3) 分析法バリデーションにおける留意点

PCR 及び RT-qPCR の正確性の検証のために、単一の qPCR 測定単位ごとに適切な複数濃度の quality control (QC) 試料（陽性対照試料、ポジティブコントロール）、及び Extraction blank（抽出処理を行なった水もしくは緩衝液（抽出段階での汚染の確認用））、及び non-template control (NTC) を準備する必要がある。QC 試料とは、PCR 及び RT-qPCR における正しい遺伝子増幅の確認のためのコントロール試料であり、一般に核酸標準物質を一定量含有する溶液が使用される。QC 試料と検量線用標準試料は、別々に調製することを原則とし、安定性が確認された期間内に利用する。一方で、NTC は、非特異的な遺伝子増幅の評価、反応液や検体の汚染の評価のための試料であり、超純水や核酸希釈用の緩衝液等が利用される。

4. 感度 (LLOQ, LOD)

qPCR 法及び RT-qPCR 法の測定感度には、定量下限 (Lower limit of quantification, LLOQ) 並びに検出限界 (limit of detection, LOD) という指標がある。LLOQ とは、事前設定した真度・精度の判定基準を満たす最小濃度と定義可能である。一方、LOD は、一般に単一測定系で 95% 以上の実試料が検出陽性となる最小濃度と定義されることが多い。医薬品の申請資料に用いる核酸バイオマーカーの分析法バリデーションを行う場合には、LLOQ の評価が必要となる。LOD は核酸バイオマーカーの定量において、定量範囲には含まれず、バリデーション評価項目として利用される機会がほとんどないため、本留意点文書ではバリデーションの対象外とする。

4-1) 分析法開発における留意点

LLOQ は、種々の濃度の低濃度試料を測定し、Cq 値が 40 以下かつ事前に設定した Cq 値に関する測定精度の判定基準を満たす濃度として、仮に決定することができる。

4-2) 分析法バリデーションにおける評価項目

4-1) で仮決定した LLOQ と同一濃度を有する QC 試料 (QC-LLOQ, n=3 以上、別日で 3 回以上の繰り返し分析での評価を推奨) の定量値から求めた真度・精度が事前に設定した判定基準を満たすか検証を

行う。

5. 特異性

マトリックス中に存在し測定に影響を与えうる類似配列を有する核酸（DNA、RNA）分子と分析対象物質である標的核酸分子を識別して検出する能力と定義される。qPCR 法及び RT-qPCR 法における特異性は、PCR に利用するプライマー・プローブの塩基配列並びに PCR のアニーリング条件（温度、時間）に依存する。

特異性の評価は、分析法開発では *in silico* 解析を中心に実施し、非特異的増幅の懸念がある配列についてバリデーション試験で実際に合成核酸等を用いて検証を行うのが望ましい。非特異的増幅の確認は、DNA シークエンス解析、融解曲線解析、電気泳動、制限酵素処理等の手法で評価可能である。非特異的増幅が事前に設定した判定基準を超える場合は、プライマー・プローブの再設計や PCR のアニーリング条件のさらなる最適化が必要と考えられる。

5-1) 分析法開発における留意点

In silico データベース（*e.g.* BLAST、Primer-BLAST）を用い、分析対象物質である核酸バイオマーカーが存在する動物種内（対象がヒトであればヒトのゲノムやトランスクリプトーム）において、分析対象物質以外の類似配列に対して遺伝子増幅を起こす可能性が低いプライマー・プローブの選定を行う。特に 3'末の配列の類似性に注意する。加えて、選定したプライマーの塩基配列の 3'末端から 1 塩基程度短い合成不純物の核酸配列に関しても *in silico* で分析対象物質に類似する配列に対する増幅の有無の確認を行うことが望ましい。

また、設計したプライマー・プローブによる遺伝子増幅産物について、DNA シークエンス解析、融解曲線解析、電気泳動、制限酵素処理等の手法により多面的に情報を得ることが望ましい。

5-2) 分析法バリデーションにおける評価項目

In silico 解析にて非特異的な遺伝子増幅の可能性が認められる核酸配列に関しては、LLOQ の濃度の分析対象物質を含有する超純水や核酸希釈用緩衝液に当該核酸配列を添加した試料を用いて非特異的遺伝子増幅の有無の確認試験を実施する。非特異的遺伝子増幅が認められた場合は、事前に設定した判定基準内であることを確認する。なお、分析法開発段階で、非特異的増幅の可能性を示す類似配列が同定されない場合は、特異性に関するバリデーションは簡略化して良いと考えられる。

6. 検量線

検量線は実試料中の核酸バイオマーカーの濃度（単位容積当たりのコピー数）を算出するために用いられ、その定量範囲は LLOQ から定量上限（upper limit of quantification、ULOQ）と定義される。LOD は検量線範囲には含まれない。分析対象物質である核酸バイオマーカーの定量に用いる検量線は、qPCR や RT-qPCR の測定単位ごとに作成される必要がある。検量線用標準試料の濃度数、一濃度あたりの試料数は、Context of use をふまえて分析法ごとに、試験計画書等で事前に定めることを推奨する。

検量線用標準試料は、真のマトリックスに既知濃度の核酸標準物質を添加して調製することもあるが、標的核酸分子の内因性濃度が高い場合や希少マトリックスを用いる場合等は、代替マトリックスを用いて検量線を作成することも可能である。QC 試料のマトリックスについては、7.)真度・精度に示す。

6-1) 分析法開発における留意点

分析法開発段階では、標的とする分析対象物質の変動幅を考慮し、分析法の信頼性を確保できる検量線の定量範囲を設定することが重要である。検量線の定量範囲は、検量線用標準試料の逆回帰濃度の真度に関して、Context of use をふまえて事前に設定を行った判定基準を満たす濃度幅に仮決定することができる。

qPCR 法及び RT-qPCR 法における検量線の回帰直線は、一般的に X 軸に検量線用標準試料の対数濃度、Y 軸に測定から得られる C_q 値を用いて、最小二乗法により求められ、下記 (式 1) の通り 1 次関数で表されることが多い。また PCR 増幅効率、検量線の回帰直線の傾きから下記 (式 2) を用いて計算される。

$$(式 1) y=ax+b$$

y; 測定から得られる C_q 値, x; 検量線用標準試料の対数濃度, a; 回帰直線の傾き, b; 回帰直線の切片

$$(式 2) PCR 増幅効率 (\%) = [10^{(-1/a)} - 1] \times 100 \text{ (X 軸の検量線用標準試料に常用対数を用いた場合)}$$

a; 式 1 で求められた回帰直線の傾き

6-2) 分析法バリデーションにおける評価項目

少なくとも 3 回以上の繰り返し測定を別日に実施し、PCR 増幅効率、直線性 (検量線の回帰直線の R² 値)、各検量線用標準試料の逆回帰濃度の真度及び精度について評価することを推奨する。

検量線の回帰直線の傾きから求められた PCR 増幅効率 (式 2) の平均値は 90%–110% (傾き-3.1 から-3.6 の間) であることが望ましい。検量線の回帰直線の R² 値の平均値は 0.98 以上であることが望ましい。各検量線用標準試料の逆回帰濃度の真度及び精度の平均値は、事前設定した判定基準を満たすことが必要である。代替マトリックスを用いて検量線用標準試料を作成する場合には、真のマトリックスを用いた場合の PCR 増幅効率が上記の基準の範囲内にあることを確認することが望ましい。

7. 真度・精度

qPCR 法及び RT-qPCR 法の真度及び精度は、既知濃度の QC 試料を用いて分析単位内および分析単位間で評価するのが望ましい。QC 試料の調製に用いるマトリックスは、核酸バイオマーカー (分析対象物質) の内因性濃度に応じて、真のマトリックス、代替マトリックスのいずれかを選択することを推奨する。真のマトリックスを用いて QC 試料を調製する場合、ブランクマトリックス中の分析対象物質の内因性濃度の分析を行う。

真度の算出には以下のいずれかの式を用いて実施する。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。

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

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

7-1) 分析法開発における留意点

分析法開発段階では、複数濃度の QC 試料を用いて、目的とする定量範囲における分析法の再現性を確認することが推奨される。その際の QC 試料の濃度は、バリデーション試験を想定して、高濃度 QC

(QC-H) は ULOQ の半分の濃度、中濃度 QC (QC-M) は検量線の間中付近の濃度、低濃度 QC (QC-L) は LLOQ の 2 倍の濃度を目安として複数点設定することを推奨する。

7-2) 分析法バリデーションにおける評価項目

真度・精度の評価は、代替マトリックスまたは真のマトリックスから調製された既知濃度の QC 試料を用いて行うことができる。精度については、既知濃度の QC 試料を用いた評価に加え、濃度が異なる実試料を 2 点 (例: 低濃度及び高濃度) 用意し、その繰り返し測定による評価も実施することが望ましい。真度・精度の評価のためのバリデーション試験では、各分析単位内で異なる 4 点の既知濃度 QC 試料 (QC-LLOQ、QC-L、QC-M、QC-H、各濃度 n=3 以上) を用いて、異なる分析単位で異なる日に最低 3 回以上測定を実施し、分析単位内並びに分析単位間の真度・精度が事前に設定した判定基準内になることを推奨する。なお、異なる分析単位での繰り返し測定の回数 (3 回以上の数) については、標的とする核酸バイオマーカーの Context of use をふまえて事前に設定する。

8. マトリックス効果

qPCR 法及び RT-qPCR 法を用いた生体試料中の核酸バイオマーカー (分析対象物質) の定量においては、PCR 阻害物質等の混入に起因するマトリックス効果を考慮することが重要である。また、測定対象とする生体マトリックスの種類 (組織、血液、尿等) に応じて、マトリックス効果の主な原因となりうる PCR 阻害物質の種類並びにその含有量が異なることを考慮し、測定対象のマトリックスごとにマトリックス効果を評価することが重要である。内標準物質を用いることにより、マトリックス効果の評価が容易になる可能性がある。

組織由来の代表的な PCR 阻害物質としては、コラーゲン、メラニン、ミオグロビン等が知られており、血液由来の阻害物質としては、ヘモグロビン、ヘマチン、免疫グロブリン G 等が報告されている^{20), 21)}。尿の場合は、尿素が PCR 阻害効果を有することが報告されている²²⁾。生体試料由来成分以外にも、採血時に使用する抗凝固剤 (EDTA やヘパリン)、並びに核酸抽出過程で添加する試薬類 (アルコール、フェノール、界面活性剤等) の残留がマトリックス効果の原因として報告されている²³⁾。さらに、核酸類似構造を有する抗ウイルス薬 (e.g. アシクロビル) の混入による PCR 阻害効果についても報告がある^{20), 24)}。分析法開発並びにバリデーション試験のいずれの段階においても、実試料中への上記 PCR 阻害物質の残留や混入に留意し、評価を実施することが望ましい。

8-1) 分析法開発における留意点

信頼性の高い分析法の構築のためには、分析法開発段階において、実試料と同じマトリックスにおけるマトリックス効果の確認を行うことを推奨する。代替マトリックスを用いて、検量線用標準試料並びに QC 試料を調製する場合にも、真のマトリックスを用いたマトリックス効果の有無の確認を行うことが望ましい。qPCR 法及び RT-qPCR 法におけるマトリックス効果の評価は、例えば以下の方法がある。真のマトリックスから核酸抽出を実施し、その後既知量の核酸標準物質を添加した試料 (試料①)、真のマトリックスから核酸抽出を実施した試料 (試料②)、試料①と同量の核酸標準物質を核酸希釈用緩衝液に添加した試料 (試料③) の定量値を用いて評価することが可能である。本評価では、各試料の測定は n=3 以上で行うことが望ましい。一般に、試料①の定量値と、試料②と③の定量値の合計との間に差異が無い場合は、マトリックス効果が認められないと考えられる。一方、試料①の定量値が、試料②と試料③の合計

値よりも少ないあるいは多い場合は、マトリックス効果があると考えられる。また検量線の傾きを指標にして評価する方法もある。

マトリックス効果への対処法として、PCR 阻害物質の影響を軽減するためにマトリックスとして用いる実試料の希釈を実施する、分析法に使用する試薬を変更する、(分析対象物質とは異なる) 内標準物質を利用する、核酸抽出法の改変を行う、等が考えられる。

8-2) 分析法バリデーションにおける評価項目

10 個体の異なるブランクマトリックスそれぞれから核酸抽出を実施した試料、既知量の核酸標準物質をそれら抽出液または核酸希釈用緩衝液に添加した試料を用いて、マトリックス効果を評価することが推奨される。本評価では、基本的にマトリックス効果が認められないことが望ましい。実試料についてマトリックス効果が確認された場合でも、核酸の内標準物質を利用して内標準物質の測定値によるデータ補正を実施した後の定量値から算出される真度が判断基準を満たす場合は、分析法の定量性に影響がないと考えて構わない。

9. 平行性

qPCR 法及び RT-qPCR 法を用いた核酸バイオマーカーの分析では、一般に試料の希釈を実施することで、生体試料中の PCR 阻害物質 (8.マトリックス効果を参照) の効果が軽減するため、実試料を用いた平行性の評価が推奨される。実試料の希釈には、代替マトリックスまたは真のマトリックスを用いることが可能であるが、希釈液の種類で評価内容が変わることに注意する。

代替マトリックスを希釈液として利用する場合、マトリックス効果の評価と同様、希釈による PCR 阻害物質の減少効果を評価することが可能である。希釈に真のマトリックスを使用する場合は、実試料中のマトリックス由来 PCR 阻害物質の量は変わらないが、種々の濃度の分析対象物質が存在する条件下で、共存する PCR 阻害物質の定量値への影響を確認することが可能であり、分析対象物質として、核酸標準物質と内在性物質との相違も評価しうる。

平行性の評価では、高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し、希釈倍率に応じた定量値が得られることを確認する。

10. 安定性

核酸バイオマーカーは、マトリックス中に存在するヌクレアーゼによる分解を受けやすいため、分析法開発段階から分解酵素による分析対象物質の分解の可能性に注意する必要がある。分析対象物質の分解が認められる場合には、市販の核酸安定化試薬の利用を推奨する。

バリデーション試験における安定性の評価では、真のマトリックスを用いて調製した QC 試料を用いて「短期安定性 (Bench top and Short term)」、「長期安定性 (Long term)」、「凍結融解安定性 (Freeze-thaw)」の評価を行うことが必須である。加えて、実試料分析においては、前処理した実試料の保存や希釈が想定されるため、前処理後の実試料の取り扱い方法に応じた内容で安定性 (Processed sample stability) を評価することが望ましい (mRNA から逆転写した cDNA 等を保管する場合は該当するケースもある)。これらの評価では、想定される実試料の概ねの濃度範囲で、低濃度及び高濃度の QC 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の取扱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も可能である。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、代替核酸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。

11. 回収率

核酸バイオマーカー分析のための前処理法の回収率は、当該核酸バイオマーカーの Context of use に基づき、一定の範囲内であることを分析法開発段階で確認することが望ましい。分析に用いる生体マトリックスの特性上、回収率がばらつく傾向がある場合は、内標準物質を利用し、その測定値によるデータ補正を実施することが望ましい。

12. パーシャルバリデーション⁵⁾

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、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、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判定基準と同様の基準を用いる。

13. クロスバリデーション⁵⁾

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分析を実施する場合や、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、実験施設が試験間で移転する場合等で実施する⁵⁾。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にて評価することが可能である。

クロスバリデーションの具体的な方法としては、例えば、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可能である。また、実試料による評価については、分析対象物質/マトリックスの特性に依存するが、試料数は ≥ 30 を目安とすることが可能であり、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。特に、疾患の重症度により試料マトリックスの組成が大きく変動する場合は、QC 試料による評価のみでは分析法の性能を十分に評価することが困難であるため、実試料を用いた評価が推奨される。実試料の分析回数は 1 回でも良い。

14. 実試料分析⁵⁾

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用標準試料及び QC 試料と共に実試料を分析する。

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（14-1～14-3）を実試料の分析開始前に判定基準を設定し、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。

RNA が分析対象物質の場合には、実試料中の RNA の品質を電気泳動法あるいは分光光度法で評価することを推奨する。

14-1) 検量線⁵⁾

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。

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。

14-2) QC 試料⁵⁾

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、核酸標準物質を添加した真のマトリックス、核酸標準物質を添加した代替マトリックス等のバリデーション時に設定した QC 試料を、原則として 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。また NTC 試料及び Extraction blank を同時に分析することが望ましい。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核酸標準物質を添加した 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、実施が望ましい。分析法バリデーションで使用したのと同じの事前設定された判定基準値を用いて、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。

14-3) Incurred Sample Reanalysis (ISR)⁵⁾

Context of use 及び臨床評価項目としての位置づけに基づき、バイオマーカーを、医薬品を特徴づける重要な評価に用いる場合等（例えば臨床試験後期におけるエンドポイント等として用いる場合）の際は、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。

15. 注意事項

15-1) 核酸吸着

標的とする分析対象物質の内因性濃度が低い場合は、分析対象物質の実験器具への吸着が生じる可能性がある。必要に応じて核酸低吸着仕様の実験器具を利用することが有用である。加えて、分析性能に影響を与えない範囲内で、吸着防止を目的としたキャリアー核酸の活用を行うことも可能である。

15-2) 市販キット⁵⁾

核酸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、各標的バイオマーカーについて、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、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、バリデーション項目や内容等につい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核酸標準物質については、その適切性を考慮する。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。

15-3) 再分析⁵⁾

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が、下記の例には限らない。

- ・ 検量線用標準試料、QC 試料等が、事前に設定した判定基準を満たさなかった場合
- ・ 得られた濃度が 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
- ・ 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
- ・ 実試料に関して、マトリックス効果等により増幅が得られなかった場合

再分析した試料については、その試料名、再分析の理由、最終的に採用した定量値、及び採用の妥当性の考察（考察のために用いた情報を含む）等を記録すること。

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。

16. 引用文献

- 1). FDA-NIH BIOMARKER WORKING GROUP. BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) resource [Internet]. 2016.
- 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(2):312-28.
- 3). Piccoli SP, Garofolo F. Biomarker assay validation. *Bioanalysis*. 2018;10(12):889-891.
- 4). 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>
- 5). Ohtsu Y, Tanaka S, Igarashi H, Kakehi M, Mori T, Nakamura T, Ohashi R, Shimizu H, Yasuda Y, Okayama T, Kakuo H, Yokoi H, Horiuchi M, Katashima M, Nakamura R, Saito K, Saito Y. Analytical method validation for biomarkers as a drug development tool: points to consider. *Bioanalysis*. 2021 Sep;13(18):1379-1389. doi: 10.4155/bio-2021-0173.
- 6). US FDA. Table of Surrogate Endpoints That Were the Basis of Drug Approval or Licensure. <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/table-surrogate-endpoints-were-basis-drug-approval-or-licensure>
- 7). Schofield AL, Brown JP, Brown J, Wilczynska A, Bell C, Glaab WE, Hackl M, Howell L, Lee S, Dear JW, Remes M, Reeves P, Zhang E, Allmer J, Norris A, Falciani F, Takeshita LY, Seyed Forootan S, Sutton R, Park BK, Goldring C. Systems analysis of miRNA biomarkers to inform drug safety. *Arch Toxicol*. 2021;95(11):3475-3495.
- 8). Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*. 2015;4(3):256-269.
- 9). ICH. Nonclinical Biodistribution Considerations For Gene Therapy Products S12. 2023. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_S12_Step4_Guideline_2023_0314.pdf
- 10). ICH. General Principles to Address Virus and Vector Shedding. https://admin.ich.org/sites/default/files/2019-04/ICH_Considerations_Viral-Vector_Shedding_.pdf
- 11). Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
- 12). Hays A, Islam R, Matys K, Williams D. Best Practices in qPCR and dPCR Validation in Regulated Bioanalytical Laboratories. *AAPS J*. 2022;24(2):36.
- 13). Corsaro B, Yang TY, Murphy R, Sonderegger I, Exley A, Bertholet S, Dakappagari N, Dessy F, Garofolo F, Kierstead L, Koch H, Sarikonda G, Savoie N, Siggers R, Solstad T, Lu Y, Milton M, Marshall JC, DelCarpini J, Gorovits B, Gupta S, Jesaitis L, Kamerud J, Kromminga A, Ma A, McNally J, Yan H, Wu B, Verthelyi D, Kirshner S, Pedras-Vasconcelos J, Rajadhyaksha M, Staack RF, Cherry E, Cludts I, Dahlbäck M, Gunn GR, Ishii-Watabe A, Jawa V, Kubiak R, Partridge M,

- Petrillo M, Pine SO, Poetzl J, Song S, Stebbins C, Wu Y, Zhang L, Kar S, Liang M, Abhari MR, Schweighardt B, Stubenrauch K, Xu Y. 2020 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: Vaccine Assay Validation, qPCR Assay Validation, QC for CAR-T Flow Cytometry, NAb Assay Harmonization and ELISpot Validation (Part 3 - Recommendations on Immunogenicity Assay Strategies, NAb Assays, Biosimilars and FDA/EMA Immunogenicity Guidance/Guideline, Gene & Cell Therapy and Vaccine Assays). *Bioanalysis*. 2021;13(6):415-463.
- 14). Wissel M, Poirier M, Satterwhite C, Lin J, Islam R, Zimmer J, Khadang A, Zemo J, Lester T, Fjording M, Hays A, Hughes N, Garofolo F, Guilbaud R, Groeber E, Renfrew H, Colletti K, Yu M, Lin J, Fang X, Shah S, Garofolo W, Kar S, Hayes R, Pirro J, Kane C, Luna M, Xu A, Cape S, O'Dell M, Wheller R, Ritzen H, Vance J, Farley E, Matys K, Tabler E, Mylott W, Yuan M, Karnik S, Voelker T, DuBey I, Williard C, Shi J, Yamashita J. Recommendations on qPCR/ddPCR assay validation by GCC. *Bioanalysis*. 2022;14(12):853-863.
 - 15). Ma H, Bell KN, Loker RN. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;20:152-168.
 - 16). Uchiyama A, Naritomi Y, Hashimoto Y, Hanada T, Watanabe K, Kitta K, Suzuki G, Komatsuno T, Nakamura T. Understanding quantitative polymerase chain reaction bioanalysis issues before validation planning: Japan Bioanalysis Forum discussion group. *Bioanalysis*, 2023 Jan 9. doi: 10.4155/bio-2022-0190.
 - 17). US FDA. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetics and Veterinary Products. 2020. <https://www.fda.gov/media/121751/download>
 - 18). European Network of GMO Laboratories. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. 2015. https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%2020_10_2015.pdf
 - 19). ISO. Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR. ISO 20395:2019(en). <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:20395:ed-1:v1:en>
 - 20). Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(9):2009-2023.
 - 21). Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012;113(5):1014-26.
 - 22). Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol*. 1991;44(5):360-5.
 - 23). Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem*. 2010;396(6):1977-90.
 - 24). Yedidag EN, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis M. Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation*. 1996;62(2):238-42.