

Topics

生体試料中薬物濃度分析（バイオアナリシス）の
歴史と国内情勢

富樫一天

The history of regulated bioanalysis and circumstances in Japan

Kazutaka Togashi

*Pharmaceutical Business Division, Pharmaceutical Analysis Osaka Laboratory, Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.**1-135, 3-chome, Kasugade-naka, Konohana-ku, Osaka 554-0022, Japan***Abstract**

This is a topical report for the Bioanalytical Method Validation (BMV) on a quantification of drugs in biological matrices such as plasma, urine, or tissue. Bioanalysis is performed in pharmacokinetic, toxicokinetics and bioequivalence studies and the results are used for the critical pharmacokinetic information. The purpose of this report is to represent the world history of the bioanalysis for the small molecules and, as recent topics, the global harmonization on regulated bioanalysis by Global Bioanalysis Consortium and the draft guideline on BMV in Japan prepared by Japan Bioanalysis Forum.

Keywords: regulated bioanalysis, bioanalytical method validation (BMV), Global Bioanalysis Consortium (GBC), Japan Bioanalysis Forum (JBF), LC/MS/MS

はじめに

生体試料中薬物濃度測定（バイオアナリシス）に関する議論の元年はいつかと問われたなら、バイオアナリストであれば、それは1990年アメリカで開催されたクリスタルシティー I 会議だと答えるに違いない。90年代当初と比べてITの恩恵を受けた今の世の中は格段に便利になった。バイオアナリシスの世界においても、科学の進歩は分析技術の発展に寄与し、高度な分析技術は医薬品開発の推進に大きく貢献した。Regulated bioanalysis（規制下バイオアナリシス）という言葉がある。バイオアナリシスの規制ガイドラインに関わる議論における大きな変化は、ほぼ10年単位で訪れ、2010年を過ぎ

た今、国際調和という新たな変革期を迎えている。本稿では、バイオアナリシスについて簡単な解説をするとともに、日本を取り巻く国内外の状況について紹介したい。

1. 生体試料分析（バイオアナリシス）バリデーション（Bioanalytical method validation, BMV）

バイオアナリシスとは、医薬品開発における非臨床（動物等）および臨床試験（ヒト）から得られる血漿、尿および組織片等の生体試料を対象とした生体試料中薬物濃度測定のことである。これらの薬物濃度測定は、開発医薬品の体内挙動（吸収、分布、代謝、排泄）を知る上でたいへん重要であり、

株式会社住化分析センター医薬事業本部ファーマ大阪事業所
〒554-0022 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1-135

Tel: 06-6466-5373

Fax: 06-6466-5479

E-mail: k.togashi@scas.co.jp

薬物動態 (Pharmacokinetic, PK) 試験、トキシコキネティクス (Toxicokinetics, TK) 試験および生物学的同等性 (Bioequivalence, BE) 試験等、化合物スクリーニングから開発ステージおよび医薬品承認後の市販後調査まであらゆる段階において必要とされる。各種試験から得られる実試料測定 (検体測定) の実施前には、濃度測定法の開発が必要であり、開発された濃度測定法の妥当性を実証するためにバリデーションの実施が必要となる。バリデーションにおいては、測定値 (定量値) の再現性データや実試料の取り扱いに関する安定性データを取得し、得られた結果をあらかじめ設定された判定基準に照らし合わせるにより、その濃度測定法の妥当性を保証する。

バリデーションにおいては、通常、測定対象物質 (未変化体および代謝物等) を溶媒に溶解した標準溶液を調製し、それを生体試料 (マトリックス) に添加する、いわゆる添加試料を用いて、添加検量線および品質管理 (Quality control, QC) 試料の測定を実施することで分析法妥当性を担保できるようなデータを取得する。一般的には、添加検量線は調製直後のフレッシュな試料を用い、各種安定性等の確認操作を実施した QC 試料について、除タンパク法、液-液抽出および固相抽出法といった前処理を施した試料を用いて測定値の確認を行い、調製既知濃度 (理論値) と乖離がないことをもって安定性や再現性の確認を行うものである。なお、バリデーション時において使用されるマトリックスは特別な理由がない場合は、正常コントロール (いわゆる健常人等) として採取された試料を用いることがほとんどであり、測定対象物質が含まれていないマトリックスを用いる。

一般的に実施されるバリデーション項目とその実施内容についてまとめたものを表1に示す。これら以外にも目的に応じて、血液中の安定性や溶血血漿の影響確認等を追加項目としてバリデーションを実施する場合があり、その実施方法や確認の要否についての議論が業界内で現在も進行中である。

2. バイオアナリシスの歴史[1]

バイオアナリシスの対象は、低分子と高分子に大別され、低分子測定には液体クロマトグラフ・トリプル四重極質量分析計 (Liquid chromatograph-triple quadrupole mass spectrometer, LC-MS/MS) 等のクロマトグラフィー技術が、高分子測定には Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) や Electrochemiluminescence immunoassay (ECL) といった免疫学的測定法、いわゆるバインディングアッセイ技術が用いられる。BMV に関する議論については、低分子測定に関してはすべての議論項目に対して、かなり議論が進んでいるが、いまだ合意が得られていない項目も多い。今後はさらに高分子測定やバイオマーカーといった分野への議論の展開が見込まれる。なお、本稿においては、以下 LC/MS/MS を用いた低分子測定のバイオアナリシスについてのみ言及することとしたい。

医薬品開発に関する規制の歴史は、1960年代以降、薬害とともに始まったと言って過言ではない。世界各国で起きたサリドマイドやスモンといった深刻な薬害事件を背景に、1970年代後半から Good laboratory practice (GLP) が非臨床試験 (動物試験等、とくに安全性試験) のデータの信頼性を確保するための実施基準として導入されるようになり、1980年代以降からバイオアナリシスの品質管理方法等についても次第に確立されていった。バイオアナリシスの測定に用いられる機器は、1980年代では、LC に紫外吸光度検出器 (Ultraviolet, UV)、蛍光検出器 (Fluorescence, FL) を組み合わせたものやガスクロマトグラフ (Gas chromatograph, GC) に質量分析計を組み合わせた GC/MS 等が主流であったが、1990年代以降、LC/MS および LC/MS/MS の台頭によりバイオアナリシス技術は急激な躍進を迎えることとなる。とりわけタンデムトリプル四重極型質量分析計は、プリカーサーイオンとプロダクトイオンの二つのマスフィルターによる Selected reaction monitoring (SRM) 検出の選択性の高さから、従来の測定法と比べ、生体試料中の夾雑物ピークと測定成分との分離に長い分析時間を必要としないため、格段なハイスループット化につながり、低分子のバイオアナリシスといえば、LC/MS/MS による定量がもはや定番となった。しかしながら、一方で、選択性の高さゆえクロマトグラム上には現れない夾雑物の影響等により測定結果に疑義を生ずるような現象が確認される等、新たな議論を巻き起こしてきたことも無視できない。

1990年代以降、欧米ではバイオアナリシスに関する公式な場における議論が盛んに行われるようになった。1990年12月にアメリカ合衆国クリスタルシティで American Association of Pharmaceutical Scientists / Food and Drug Administration (AAPS/FDA) の会議 (通称クリスタルシティ I) が開かれ、その会議の内容をまとめた Shah の論文[2]がバイオアナリシス規制のベースとなった。それから2000年1月のクリスタルシティ II 会議を経て、2001年に米国 FDA から発表されたガイダンス[3]により、BMV に関する主要項目は確立され、バイオアナリシスの世界標準として、PK、TK、BE 試験等の申請データに用いられるようになった[4]。

その後、2006年5月のクリスタルシティ III 会議を経て発表された White paper[5]では、Incurred sample reanalysis (ISR) という新たな概念が盛り込まれ、バイオアナリシス業界に大きな衝撃が走ったことは記憶に新しい。ISR とは、実試料を (別の日に) 繰り返し分析することで分析法の堅牢性を検証する方法である。バリデーションはあくまで標準溶液をマトリックスに添加した QC 試料による擬似サンプルによる確認にすぎない。一方、実試料には前述のように、代謝物等の存在が考えられる他、疾病患者の場合、明らかに正常コントロールとはマトリックスの性状も異なることも多い。食生活習慣の違いによっては、マトリックスに人種差が影響することも考えられる。このため、実試料を用いて分析法の堅牢性

表1 パリテーション実施項目と実施方法並びに判定基準

パリテーション項目および内容	実施方法および判定基準
選択性 (Selectivity) : 各分析対象物質及び内標準物質の定量に対する妨害作用がないことを確認	少なくとも6個体から得られた個別のブランク試料(分析対象物質や内標準物質を添加せずに前処理するマトリックス試料)を用いて評価。 ブランク試料において妨害物質に由来するレスポンスが認められないか、若しくは妨害物質に由来するレスポンスが、定量下限における分析対象物質のレスポンスの20%以下および内標準物質の5%以下。
定量下限 (Lower Limit of Quantification, LLOQ) : 分析対象物質を定量することができる最も低い濃度	定量下限における分析対象物質のレスポンスが、ブランク試料のレスポンスの5倍以上であること。定量下限における平均の真度は理論値の±20%以内、精度は20%以下。
検量線 (Calibration curve) : 分析対象物質の濃度とレスポンスの関係	マトリックスに既知濃度の分析対象物質を添加して作成され、ブランク試料、ゼロ試料(内標準物質を添加したブランク試料)及び6濃度以上で構成される。 検量線の各濃度の真度が、定量下限において理論値の±20%以内、他濃度において理論値の±15%以内であり、全ポイントの75%以上かつ、定量下限及び検量線の最高濃度を含む少なくとも6濃度が判定基準にあること。
精度 (Precision) : 繰り返し分析によって得られる定量値間の一致の程度	QC試料を分析することによって評価。検量線の定量範囲内で、最低4濃度(定量下限、低濃度、中濃度及び高濃度)のQC試料で評価。各濃度あたり少なくとも5回の繰り返し分析をすることによって評価。分析単位間の精度は、少なくとも3回の分析単位を繰り返し分析することによって評価。 各濃度における定量値の精度が、定量下限で20%以下、他の濃度で15%以下。
真度 (Accuracy) : 測定対象物質の測定値と真の値の差	評価方法については精度と同様。 各濃度における平均の真度が、理論値の定量下限で±20%以内、他濃度で±15%以内。
マトリックス効果 (Matrix Effect) : 分析対象物質のレスポンスが試料中のマトリックス由来成分によって影響を受けること	マトリックス存在下での分析対象物質のレスポンスを、マトリックス非存在下でのレスポンスと比較することによってマトリックスファクター(MF)を算出。MFの算出には、少なくとも6個体から得られた個別のマトリックスを用いる。 MFの精度が、個体間で15%以下。
回収率 (Recovery) : 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	分析対象物質を生体試料に添加して前処理したときのレスポンスと、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ときのレスポンスを比較。最低3濃度(低濃度、中濃度及び高濃度)において少なくとも3回の繰り返し分析をすることより評価。 とくに判定基準を設けないことが多いが、各濃度において再現性があることが望ましい。
キャリアオーバー (Carry Over) : 分析装置に残留した分析対象物質が次注入の定量値に影響を与えること	最高濃度の検量線用標準試料を測定した後にブランク試料を測定することにより評価。 最高濃度の検量線用標準試料を測定した後のブランク試料のレスポンスが、定量下限における分析対象物質のレスポンスの20%以下及び内標準物質のレスポンスの5%以下。
希釈妥当性 (Dilution integrity) : 希釈による分析対象物質の定量値への影響確認	試料中における分析対象物質の濃度を検量線の定量範囲内となるようにブランクマトリックスで希釈し、希釈倍率あたり少なくとも5回の繰り返し分析をすることによって評価。 希釈された試料の平均の真度が理論値の±15%以内、精度が15%以下。
安定性 (Stability) : 試料を採取してから分析するまでの各過程において分析対象物質の安定性が分析対象物質の定量値に影響を及ぼさないことへの保証	溶媒又はマトリックス中の安定性を確認。凍結融解安定性、短期保存安定性(室温、氷冷又は冷蔵等)、長期保存安定性、前処理後試料中安定性を評価。 マトリックス中の安定性は、低濃度及び高濃度のQC試料で評価。各濃度あたり少なくとも3回の繰り返し分析を、QC試料を保存する前後に行うことで安定性を評価。各濃度における平均の真度が、原則として理論値の±15%以内。 標準溶液中の安定性は、最高濃度及び最低濃度付近の溶液で評価。各濃度あたり少なくとも3回の繰り返し分析を行う。

を検証することの必要性が求められたわけである。ISRの議論が湧き上がった当初、日本国内の反応はやや冷やかであった。実試料の測定値の妥当性をその実試料でしか検証できないとする考え方はたしかに正論には違いないが、欧米のISR失敗事例の多くがヒューマンエラーに起因したことに加え、世界水準から見て手先が器用で、しかも品質管理もしつ

かりしている日本人バイオアナリストにとってISRは必要ないとする意見が圧倒的多数を占めていた。しかし、FDA申請の際にはISRは必須であるといったオフィシャルな見解まで聞かれるようになると、国内バイオアナリストたちも考えを改めざるを得なかった経緯があり、現在では国内でもISRの実施はごく一般的となった。昨今、Incurred sample sta-

bility (実試料による安定性の確認) や Incurred sample accuracy (実試料による測定値の真値確認) といった概念も議論され始めており、今後の行方から目が離せない状況だ。

White paper 以降、米国のみならず欧州やアジア、世界各国で湧き起こった ISR を中心とした議論は、Global Bioanalysis Consortium (GBC) [6] で国際的な議論をするという新たな潮流につながった。GBC は 2012 年 9 月までにバイオアナリシスに関する国際調和文書の作成を目標とした民間国際団体である。北米、南米、欧州、アジアの製薬会社および受託機関 (Contract research organization, CRO) のバイオアナリストたちが各 Harmonization team (HT) に分かれて議論を進めている。各 HT のテーマ内容を表 2 に示す。A は、All molecules の略であり、低分子のクロマトグラフィー測定と高分子のバインディングアッセイ測定の両方を対象としている。L は、Large molecules の略であり、高分子のバインディングアッセイ測定を対象としている。S は、Small molecules の略であり、低分子のクロマトグラフィー測定を対象としている。20 チームからなる各 HT では、それぞれ 10 名前後のバイオアナリストが各国から集まり、電話会議やメールによる議論を繰り返している。このような世界の議論の流れに日本が乗り遅れてはならないとする危機感の中、バイオアナリシスフォーラム (Japan Bioanalysis Forum, JBF) [7] は誕生した。

3. バイオアナリシスフォーラム (JBF) の誕生と国内バイオアナリシス情勢 [8,9,10]

JBF 誕生の背景として特筆すべきは、2011 年 1 月に上海で行われた The 1st Conference in Asia Pacific on Recent Issues in GLP Regulated Bioanalysis (以下、本稿では、上海バイオアナリシス・アジアワークショップと略す) の開催である [11]。アジア初のワークショップが日本ではなく、中国で開催されたこともショックであったが、そこで紹介された GBC の活動について日本のバイオアナリストたちがほとんど認識していなかったという衝撃は、そのまま日本のバイオアナリシス業界の危機であるとして、上海から帰国したワークショップ参加者たちによって伝えられた。このままでは日本のバイオアナリシスが世界から取り残されてしまうだけでなく、中国やインドといったアジア諸国にも遅れをとってしまいかねない。昨今、日本国内から外資系製薬企業の研究所が次々と閉鎖していき、国内製薬メーカーの臨床試験もそのほとんどが海外での実施であり、血漿等の薬物濃度測定も海外受託機関で実施されるケースが非常に多い。LC/MS/MS 等の新しい分析技術の登場は、バイオアナリシス業界に大きな革命と標準化をもたらした一方で、先進国と発展途上国の分析技術の差を大きく縮める結果に繋がったともいえる。

バイオアナリシスのみならず医薬品開発に係わる分析や製

表 2 Global Bioanalysis Consortium (GBC) における Harmonization Team (HT) のテーマ

Harmonization teams focusing on topics which apply for both chromatography based assays and ligand binding assays (All molecules)	
A1	Scope and regulations
A2	Tiered approaches to method validation
A3	Method transfer, partial and cross validation
A4	Reference standards and reagents
A5	Sample management
A6	Stability
A7	Repeat analysis and ISR
A8	Documentation
A9	Analytical instrument qualification
A10	New frontiers
A11	Biomarkers
Harmonization teams focusing on topics which apply for chromatography based assays (Small molecules)	
S1	Small molecule – Specific run acceptance
S2	Small molecule specific assay operation
S3	Chromatographic run quality assessment
Harmonization teams focusing on topics which apply for ligand binding assays (Large molecules)	
L1	Run acceptance
L2	Large molecule specific assay operation
L3	Assay formats
L4	Reagents and their stability–Link with tiered approach
L5	Automation practices in LM bioanalysis
L6	Anti–drug antibody (ADA) Interference of PK assessments

造は、かつては製薬メーカーの研究所や工場内でそのすべてを担ってきたが、構造再編による効率化等が進められていく中、外部委託という流れが1990年代後半より顕著となった。とりわけバイオアナリシスにおいては、まさにLC/MS/MS技術躍進とともにCRO事業は拡大したとあってよい。国内でも動物試験施設や臨床試験施設といった医薬品開発支援業界のみならず、広範囲に及ぶ分野の受託機関がLC/MS/MSを導入し、バイオアナリシス受託事業に参入したのもこの時期であった。そして外部委託が進むにつれ製薬メーカー研究所内にあったバイオアナリシスという仕事もその技術とともにCROへとアウトソースされていったのである。医薬品開発費における外部委託費が嵩み始めると、それを節約しようとする国内製薬メーカーは、次第に海外施設への委託を検討するようになった。それでも2000年当初は、言語の壁や時差の問題もあり、日本の受託機関に対する技術や品質において、国内製薬メーカーからの信頼もまだ根強かった。しかし、2010年前後より海外受託機関の利用が急速に伸び始めた。それには海外受託機関が国内のそれと比べ半値以下という低コストに加え、海外受託機関において前処理ロボット導入による自動化やラボラトリー情報管理システム (Laboratory information management system, LIMS) 導入によるデータ処理等のIT化により品質が大きく向上したことも一因と考えられる。

上海バイオアナリシス・アジアワークショップが開催された2011年1月当時、日本にはまだバイオアナリシスを議論する公式な場はなかった。それがGBCへの参加に乗り遅れた原因であったことに危機感を募らせた発起人たちは、2011年3月JBF設立に向けて本格的な検討を開始した。JBF設立の準備と同時に日本バイオアナリストたちによるGBCへのアプローチが急速に進められた。慶応義塾大学薬学部の黒川達夫教授がJBF代表として日本唯一のGBC-SC (Steering committee) に加わり、GBCの20チーム全てのHTに各一名ずつの日本人がHTメンバーとして採用されるにいたった。これは、GBCのようなグローバルな活動に日本人がコミットしなければならないというJBF立ち上げ当初の悲願を見事に達成した瞬間であった。その後、JBFは2011年8月東京にて第1回シンポジウムを開催し、200名もの参加者を迎え、設立を宣言した[12]。JBF運営委員会は、産官学のバイオアナリシス関係者により構成され、低分子および高分子の規制下バイオアナリシス全般を対象としたシンポジウムの開催、国内BMVに関する議論の活発化、BMV国際調和の日本窓口、国内BMV指針案の作成等を活動目的として掲げている。

JBFは第1回シンポジウム終了後、すぐに第2回シンポジウムの準備に取り掛かった。その間、GBC日本人SCが黒川教授から株式会社島津テクノリサーチ工藤忍氏へ交代となった他、厚生労働科学研究の一環としてBMV研究班 (研究代表者：国立医薬品食品衛生研究所大野泰雄所長) が立ち上げ

られた。BMV研究班の目的は、BMVの国内における現状分析と関連する海外規制文書の比較検討であったが、その最終目標には日本版BMVガイドラインの制定が掲げられた。2011年11月に研究班から指針の作成依頼が提出されるや、JBF内で結成されたガイドラインタスクフォースは異例の速さで素案を作成し、2012年2月にこれを研究班へ提出した。今後、このJBF案[13]を、日本製薬工業協会、日本ジェネリック製薬協会および安全性受託研究機関協議会等、バイオアナリシス業界に関与する各種団体でレビューを進めると同時にBMV研究班での議論を反映した指針ドラフト版を発表する予定である。

おわりに

世界的な議論からやや遅れを取っていた日本のバイオアナリシス業界が、JBF設立やGBCへの参加により、ようやく世界に追いつく。技術面において、必ずしも世界に立ち遅れてはいない日本のバイオアナリシス技術が、世界市場から取り残されないためにもこうした世界の議論へ積極的に参加していくことこそが重要であることはいままでもない。莫大な医薬品研究開発費や期間を節約するために、海外で臨床試験を行い、そのまま濃度測定も海外で実施されるケースは近年急激に増えつつある。着実に技術力をつけ、自動化やIT化の進んだ海外受託機関とのコスト競争は、国内受託機関の存在を脅かしている。こうした状況下で、日本のバイオアナリシス業界が目指すべき活路は、アジアにおける日本、世界における日本として何を発信していけるかに懸かっている。今後、JBFの活動の場が、世界に大きく発展していくことを強く願っている。

引用文献

- [1] Global Bioanalysis Consortium Members (翻訳：工藤忍), *Pharm Tech Japan* **2012**, vol. 28, No. 3, 9(489)–19(499).
- [2] Shah, V. P.; Midha, K. K.; Dighe, S.; McGilveray, I. J.; Skelly, J. P.; Yacobi, A.; Layloff, T.; Viswanathan, C. T.; Cook, C. E.; McDowall, R. D. *Eur. J. Drug Metab Pharmacokin* **1991**, 16, 249–255.
- [3] Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry. FDA (May, 2001): <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- [4] 井上則子. 国内のバイオアナリシスディスカッションの歩み, 第一回JBFシンポジウム発表資料.
- [5] Viswanathan, C. T.; Bansal, S.; Booth, B.; DeStefano, A. J.; Rose, M. J.; Sailstad, J.; Shah, V. P.; Skelly, J. P.; Swann, P. G.; Weiner, R. *The AAPS Journal* **2007**, 9 (1) Article 4.
- [6] Global Bioanalysis Consortium (GBC): <http://www.global-bioanalysisconsortium.org/>

- [7] バイオアナリシスフォーラム (Japan Bioanalysis Forum, JBF): <http://www.bioanalysisforum.jp/>
- [8] Tatsuo Kurokawa. *Pharm Tech Japan* **2012**, vol. 28, No. 3, 7(487).
- [9] Noriko Katori. *Pharm Tech Japan* **2012**, vol. 28, No. 3, 21 (501)–23(503).
- [10] Hidehisa Tachiki. *Pharm Tech Japan* **2012**, vol. 28, No. 3, 25(505)–27(507).
- [11] Dumont, I.; Garofolo, F. *Bioanalysis* **2011**, 3 (7), 723–731.
- [12] 大津善明. *ぶんせき*, **2012**, 1, 52.
- [13] 米山智城; 井上則子; 立木秀尚; 富樫一天; 中山聡; 工藤 喬; 清水久夫; 香取典子. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, “in press”.