

Review

リガンド結合法を用いた生体試料中薬物濃度分析法に
関するガイドラインの策定状況

石井明子

Current Status of Development of the Guideline on Bioanalytical
Method Validation Using Ligand Binding Assay

Akiko Ishii-Watabe

*Division of biological chemistry and biologicals, National Institute of Health Sciences**1-18-1 kamiyoga, setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

Abstract

Ligand binding assay (LBA) is a method for detecting an analyte using binding reagents such as antibodies against an analyte. Currently, LBA is used as a standard method for the bioanalysis of therapeutic peptides or proteins. In this review, the principle and examples of LBAs used for bioanalysis as well as the reason why LBA is used as a standard method for large molecule bioanalysis is described. In addition, current situation of the development of Japanese bioanalytical method validation guideline for LBA is mentioned. This review is based on of the presentation at the 20th Chromatography symposium workshop held in Kobe in June 5th 2013.

Keywords: Ligand Binding Assay, Bioanalytical Method Validation, Guideline

緒言

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析は、対象薬物やその代謝物の有効性及び安全性を評価する上で、臨床薬物動態試験や非臨床薬物動態試験に活用され、得られた生体試料中薬物濃度は、体内動態、バイオアベイラビリティ、生物学的同等性及び薬物間相互作用等の評価に利用されている[1]。生体試料中薬物濃度分析には、一連の分析過程を通して妥当性が適切に確認され、十分な信頼性を有する方法を用いることが必要である[1]。

2013年7月11日、「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」[1]が発出

され、我が国においても、生体試料中薬物濃度分析法（バイオアナリシス）の信頼性確保の要件が明確化された。このガイドラインは、対象薬物の中心が低分子医薬品であり、主に液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、又はそれらと質量分析法を組み合わせた方法を対象としている（表1）。以下、低分子LCガイドラインと略記する。

一方、近年、承認品目が増えている高分子医薬品（ペプチド及びタンパク質医薬品等）では、生体試料中薬物濃度分析において、リガンド結合法（Ligand Binding Assay: LBA）が標準的な分析法として用いられている。バイオアナリシスに関する欧米のガイドライン[2-4]では、ガイドラインの項目

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1
TEL/FAX: 03-3700-9084
E-mail: watabe@nihs.go.jp

表1. ガイドラインの適用範囲

	低分子 LC ガイドライン	リガンド結合法 ガイドライン案
試験	トキシコキネティクス試験 臨床試験	トキシコキネティクス試験 臨床試験
対象薬物	低分子化合物が中心	ペプチド及びタンパク質が中心 リガンド結合法を用いて分析する低分子 化合物
分析対象物質	薬物またはその代謝物	薬物
分析法	主に、 液体クロマトグラフィー (LC) ガスクロマトグラフィー (GC) 又は それらと質量分析法 (MS) を組み合わ せた分析法	リガンド結合法

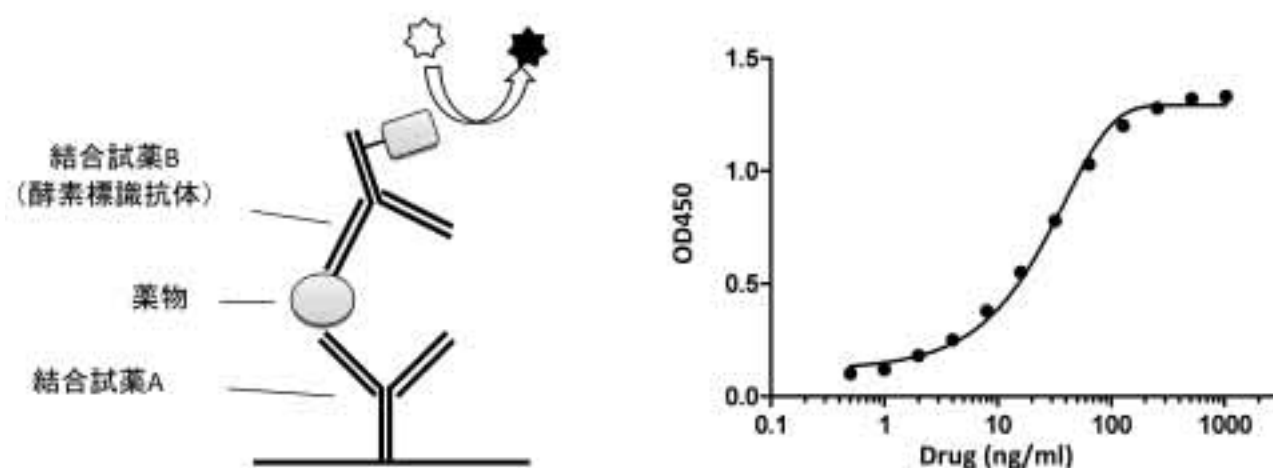


図1. 非競合 ELISA による薬物濃度測定系と検量線の例

の一つとしてリガンド結合法が含まれているが、日本では、低分子 LC ガイドラインから独立した形で、リガンド結合法を用いたバイオアナリシスに関するガイドライン案の作成が進んでいる。

本稿では、日本初のバイオアナリシスガイドラインとなった低分子 LC ガイドライン発出に先駆けて、2013年6月5日に神戸大学百年記念館六甲ホールで開催された第20回クロマトグラフィーシンポジウムワークショップ“日本のバイオアナリシス分析法バリデーションに関する『産・官・学』の取り組み”において、リガンド結合法を用いたバイオアナリシスとそのガイドラインに関して、著者が講演した内容を紹介する。

1. リガンド結合法の概要

リガンド結合法は、薬物に対して特異的に結合する「結合試薬 (リガンド)」を利用して、薬物を定量する方法である。結合試薬として、薬物に対する抗体が用いられることが多

く、リガンド結合法の多くは、抗原抗体の結合を利用した免疫学的な測定法 (イムノアッセイ) である。対象薬物が抗体医薬品の場合は、抗体医薬品の標的となる抗原が結合試薬の一つとして用いられることもある。

リガンド結合法の中で、最もよく用いられているものは、酵素標識抗体を用いた EIA (enzyme immunoassay: 酵素免疫測定法) である。EIA 中でも、最も一般的な方法は、非競合 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (図1) であり、通例、結合試薬を固相化したプレートに試料を添加して薬物を結合させ、さらに、もう一つの結合試薬 (酵素標識抗体) を結合させて、発色、発光あるいは蛍光基質の変換により得られるレスポンスを指標として、固相に結合した薬物を検出する。標準物質を用いて作成した検量線により、試料中薬物濃度が求められる。

これまでに生体試料中薬物濃度分析に用いられているリガンド結合法には、結合試薬として酵素標識抗体を利用する

EIA の他、放射性同位元素標識抗体を利用する RIA (radio immunoassay: 放射免疫測定法)、Ru 標識抗体を利用する ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay: 電気化学発光免疫測定法)、ランタノイド標識抗体を利用する TRFIA (time-resolved fluorescence immunoassay: 時間分解蛍光免疫測定法) 等がある。

リガンド結合法の多くはプレート上で結合試薬と薬物を結合させ、プレートリーダーにより光学的なレスポンスを検出する分析法であるが、連続フロー方式による SPR (surface plasmon resonance: 表面プラズモン共鳴) 測定装置のように、流路を持つ分析機器が用いられる場合もあり、プレートをを用いる分析法に限定されるものではない。

2. リガンド結合法が用いられる背景

表 2 に、低分子医薬品および高分子医薬品の特徴を記した。低分子医薬品は、分子量が数百程度のものが多いため、除タンパク質や液相抽出、固相抽出等の前処理、ならびに、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、又はそれらと質量分析法を組み合わせた方法により、生体試料中の薬物濃度に見合う感度と選択性を持つ分析法を構築することができる。低分子医薬品では、プロドラッグのように代謝物が薬理活性の本体である場合や、代謝物が薬理活性や毒性を示す場合もあるので、薬物のみならず代謝物の濃度測定が必要となる場合もあるが、これらの方法は、構造が類似している薬物と代謝物を識別して定量するためにも適した方法である。

これに対して、高分子医薬品の場合は、液相抽出等の前処理により薬物を夾雑タンパク質から分離することが容易でないこともあり、低分子医薬品で確立されているような方法での生体試料中薬物濃度分析は一般に困難である。

しかし、一方で、タンパク質の場合、それ自身が免疫原性を示し得るため、薬物を動物に免疫することにより、薬物に特異的に結合する抗体を調製することができる。また、薬物の分子量が大きいため、結合試薬どうしの競合を起さずに、複数の結合試薬を用いたリガンド結合法による分析法を

構築することもできるなど、高分子医薬品は、リガンド結合法の構築に適した性質を持っている。ホルモン、サイトカイン等の生理活性タンパク質やその類縁体を医薬品とする場合、有効血中濃度が低いものが少なくないが、リガンド結合法では、それら医薬品の生体試料中濃度に見合う感度の分析法を構築することが可能である。

すなわち、高分子医薬品では、低分子医薬品で標準的手法として用いられているクロマトグラフィーを利用した分析法の構築が難しい一方で、抗体等の結合試薬の調製に適した分子量を持ち、結合試薬を利用することで、求められる性能を有する分析法の構築が可能である、という背景から、リガンド結合法が標準的な手法として用いられていると言えるであろう。

3. リガンド結合法に関するガイドラインの策定状況と要点

2012年9月に、リガンド結合法ガイドライン作成に関するワーキンググループが組織され、ガイドライン案の作成が開始された。ワーキンググループは、バイオアナリスフォーラム (JBF) リガンド結合法タスクフォース、日本製薬工業協会、国立医薬品食品衛生研究所のメンバーで構成され、オブザーバーとして厚生労働省からも参加頂いており、著者が座長を拝命している。2014年の完成を目指し、現在、タスクフォースを中心に、ガイドライン案の改訂作業を進めているところである。

表 3 に、リガンド結合法ガイドライン案の項目を示す。下線部分は、リガンド結合法に特有の留意点が多く含まれる項目である。

以下に、若干の解説を加えながら、これらの評価項目の概要を述べる。

[バリデーションにおける評価項目]

特異性

特異性とは、分析対象物質を類縁物質等と識別して検出する能力のことである (表 4)。リガンド結合法の場合、結合

表 2. 低分子及び高分子医薬品とその生体試料中薬物濃度分析の特徴

	低分子医薬品	高分子医薬品
分子量	数百	数千～数十万
代謝物	薬理活性の本体である場合や、毒性を示す場合がある	アミノ酸にまで分解されるため、薬理活性や毒性を示す懸念は少ない
主な分析対象物質	薬物及び代謝物	薬物
分画などの前処理による粗精製	除タンパク質、液相または固相抽出などが標準的手法として用いられている	リガンド結合法では、通常は行われない
LC, GC, LC/MS, GC/MS による定量	標準的手法として用いられている	LC/MS に関して、技術開発途中
リガンド結合法による定量	適用されることはあるが、例は多くない	標準的手法として用いられている

表 3. リガンド結合法ガイドライン案の目次

1. はじめに	5.1. 検量線
2. 適用	5.2. QC 試料
3. 標準物質 (標準品)	5.3. ISR
4. 分析法バリデーション	6. 注意事項
4.1. フルバリデーション	6.1. 定量範囲
4.1.1. 特異性	6.2. 再分析
4.1.2. 選択性	6.3. キャリーオーバー
4.1.3. 検量線	6.4. クロストーク
4.1.4. 真度及び精度	6.5. 重要試薬
4.1.5. 希釈直線性	6.6. 干渉物質
4.1.6. 安定性	7. 報告書の作成と記録等の保存
4.2. パーシャルバリデーション	用語解説
4.3. クロスバリデーション	
5. 実試料分析	

表 4. 特異性

	低分子 LC ガイドライン	リガンド結合法ガイドライン案
解説	－ (特異性は選択性の究極の形としてこれらを区別する指摘もある)	分析対象物質を類縁物質等と識別して検出する能力
評価に用いる試料	－	・ ブランク試料 ・ ブランク試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料 ・ 低濃度及び高濃度付近の QC 試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料
判定基準	－	ブランク試料が定量下限未満を示し、類似物質を添加した QC 試料の定量値の真度が理論値のそれぞれ $\pm 20\%$ 以内 (定量下限及び定量上限の場合は $\pm 25\%$ 以内)

試薬が分析対象物質と特異的に結合し、試料中に共存する類似物質 (分析対象物質と構造的に類似した物質) と交差反応性を示さないことが重要である。類縁物質は、例えば、分析対象物質がインスリンの改変体である場合、類似物質の一つにインスリンが挙げられる。

特異性は、ブランク試料 (分析対象物質を添加しないマトリックス試料)、ブランク試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料、並びに、低濃度及び高濃度付近の QC 試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料を用いて評価する。

選択性

選択性とは、試料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ことができる能力のことである (表 5)。前述の特異性と異なり、選択性の評価において影響を考えるべき「試料中の他の成分」とは、薬物と構造が類似し

ていない成分で、例えば、タンパク質分解酵素、脂質、溶血した試料での混入が懸念される赤血球由来の成分等が考えられる。

選択性は、通例、少なくとも 10 個体から得られた個別のブランク試料及び個別のブランク試料を用いて調製した定量下限付近の QC 試料を用いて評価する。

上記のように、特異性 (Specificity) と選択性 (Selectivity) を別項目として評価する点は、リガンド結合法を用いるバイオアナリシスのバリデーションに特有の考え方である。クロマトグラフィーを用いたバイオアナリシスでは、選択性の評価の際に、マトリックス中に含まれる類縁物質の影響も含めて試料中の他の成分の影響について評価されるため、低分子 LC ガイドラインでは選択性のみがバリデーションにおける評価項目として挙げられている (表 4、5)。

なお、クロマトグラフィーを用いる分析法を含め、品質に

表 5. 選択性

	低分子 LC ガイドライン	リガンド結合法ガイドライン案
解説	試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質及び内標準物質を区別して検出することができる能力	試料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ことができる能力
評価に用いる試料	・少なくとも 6 個体から得られた個別のブランク試料	・少なくとも 10 個体から得られた個別のブランク試料 ・個別のブランク試料を用いて調製した定量下限付近の QC 試料
判定基準	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、又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 20% 以下及び内標準物質の 5 % 以下	ブランク試料の 80% 以上が定量下限未滿を示し、定量下限付近の QC 試料の 80% 以上において定量値の真度が理論値の $\pm 20\%$ 以内（定量下限の場合は $\pm 25\%$ 以内）

関する分析法バリデーションガイドライン（ICH Q2 ガイドライン）[5]では、「特異性」という言葉が使われている。低分子 LC ガイドラインにおける「選択性」と Q2 ガイドラインにおける「特異性」に関して、低分子 LC ガイドラインの Q&A において説明されているので、以下に引用する。

参考：低分子 LC ガイドラインにおける「選択性」に関する解説

平成25年 7 月11日 厚生労働省医薬食品局審査管理課
事務連絡「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質疑応答集（Q&A）」について

Q. 分析法バリデーションで取得する項目として選択性が挙げられているが、特異性とは異なるか？

A. 本ガイドラインでは、分析法バリデーションで確認すべき項目として、試料中の他の成分の存在下で分析対象物質等を区別して検出できる能力である「選択性」は、「分析法バリデーションに関するテキスト（実施項目）について」（平成 7 年 7 月20日付け薬審第755号厚生労働省薬務局審査課長通知）に記載されている「特異性」に相当する評価項目である。クロマトグラフィーを用いた生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションにおいては、「選択性」という用語が広く使用され、海外の関連ガイドラインでも「選択性（Selectivity）」という用語が採用されているものである。したがって、既に取得した資料中、特異性という用語が使用されていても、本ガイドラインの選択性に相当する評価項目として取扱うことができる。

量線は、定量下限及び定量上限を含む 6 濃度以上の検量線用標準試料、及びブランク試料から構成される。クロマトグラフィーと異なり、リガンド結合法の検量線は直線にならず、図 1 に例示したような、一般的には 4 又は 5 - パラメーターロジスティックモデルで回帰されるシグモイド型の曲線となることが多い。カーブフィッティングを向上させる目的で、定量下限未滿の濃度及び検量線の定量上限を超える濃度のアンカーポイントを設定しても良い。

希釈直線性

希釈直線性の評価は、検量線の定量上限を超える試料の濃度を適切に分析できることを確認するために実施する。希釈直線性は、定量上限を超える試料及びこの試料をブランクマトリックスで段階希釈した複数濃度の試料を分析することによって評価される。

リガンド結合法では、高濃度試料でのレスポンス低下（プロゾーン、フック効果）が見られることがあるため、レスポンス低下が認められた場合には、実試料分析に影響を及ぼさないような手段を考慮する必要がある。

〔注意事項〕

クロストーク

クロストークとは、プレートを用いた分析において、蛍光あるいは発光等が隣接するウェルに漏れ、定量値に影響を与えることである。クロストークの回避が困難な場合には、その程度を検討し、実際の実試料分析に影響を及ぼさないような手段を考慮する。クロストークが実試料中の分析対象物質の定量分析に影響を及ぼすと懸念される場合には、実試料分析中にクロストークを評価し、定量値への影響について考察し、必要に応じて回避できる方策を考案する。

重要試薬

重要試薬とは、リガンド結合法による生体試料中薬物濃度

検量線

検量線の作成には、可能な限り実試料と同じマトリックスを使用し、既知濃度の分析対象物質を添加して作成する。検

分析において分析結果に直接影響する試薬を指し、主に結合試薬（抗体及びその標識体等）が該当する。

重要試薬は、分析対象物質に対する特異性に留意して選択し、品質が維持できる条件で保存する。重要試薬の品質は、分析法バリデーション並びに実試料分析に使用される期間を通じて適切に保証される必要がある。使用する期間中の検量線及びQC試料の分析結果を評価することにより、重要試薬の品質を確認することが望ましい。また、重要試薬のロット変更の際には原則としてパーシャルバリデーションが必要である。

干渉物質

干渉物質とは、薬物の可溶性リガンドあるいは抗薬物抗体等、実試料分析において定量値に影響を及ぼす可能性のあるものをいう。干渉物質が実試料中に存在する可能性がある場合には、定量値への影響の程度を検討しておくことが望ましい。

おわりに

以上、リガンド結合法の概略、リガンド結合法が用いられる背景、ガイドライン策定状況と要点を概説した。リガンド結合法に関しても、既に発出された低分子LCガイドラインと同様、日本におけるバイオアナリシスの信頼性確保に貢献すべく、ワーキンググループでの作業を継続しており、ガイドライン案の完成に向けて、多方面からのご意見を賜りたいと考えている。

謝辞

バイオアナリシスに関する一連のガイドライン作成は、厚生労働科学研究費補助金 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業「医薬品の品質、有効性及び安全性確保のための規制の国際調和の推進に係わる研究（研究代表者：大野泰雄、研究分担者：香取典子）」の活動を基盤としたものであり、リガンド結合法ガイドライン案は、下記ワーキンググループのメンバーが中心となって作成されています。ガイドライン案作成にご尽力されている諸先生方に敬意を表すると共に、深く感謝申し上げます。

JBF-LBA タスクフォース

谷口 佳隆 (株)東レリサーチセンター
今里 真実 ノバルティスファーマ(株)
掛樋 真彰 武田薬品工業(株)
中村 隆広 (株)新日本科学
南出 善幸 (株)島津テクノロジーサーチ
宮 和弘 中外製薬(株)
細木 淳 協和発酵キリン(株)

日本製薬工業協会

片島 正貴 アステラス製薬(株)
前川浩太郎 久光製薬(株)

国立医薬品食品衛生研究所

奥田 晴宏 副所長
香取 典子 薬品部
川崎 ナナ 生物薬品部
新見 伸吾 医療機器部

厚生労働省（オブザーバー）

光岡 俊成 医薬食品局審査管理課

参考資料

- [1] 「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」について 厚生労働省医薬食品局審査管理課 薬食審査発0711第1号 平成25年7月11日
- [2] Guideline on bioanalytical method validation EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 (21 July 2011)
- [3] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, FDA (May 2001)
- [4] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (DRAFT), FDA (Sep 2013)
- [5] 分析法バリデーションに関するテキスト（実施項目）について 厚生省薬務局審査管理課長通知 薬審第755号 平成7年7月20日