

DG2023-65

LBA基礎講座

- 初心者のための分析法構築 -

DG2023-65

Basic Course of LBA

- Analytical Method Development for Beginners -



メンバー

名前	所属
野口 翔平 (リーダー) Shohei Noguchi	株式会社新日本科学 Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.
脇谷 航平 (サブリーダー) Kohei Wakitani	メディフォード株式会社 Mediford Corporation
伊藤 達也 Tatsuya Ito	メディフォード株式会社 Mediford Corporation
寺本 康生 Yasuo Teramoto	株式会社住化分析センター Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.
東 秀行 Hideyuki Higashi	興和株式会社 Kowa Company, Ltd.
本多 栞 Shiori Honda	科研製薬株式会社 Kaken pharmaceutical Co., Ltd.
山本 有一 Yuichi Yamamoto	ファイザーR&D合同会社 Pfizer R&D Japan
山本 健一 (オブザーバー) Kenichi Yamamoto	株式会社新日本科学 Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

- 近年、種々の疾患に対して抗体医薬をはじめとする高分子医薬品が開発及び上市されており、それら医薬品の血中濃度測定には主にLigand binding assay (LBA) が使用されている。
- また、薬効や安全性の指標となる各種バイオマーカー測定においてもLBAを用いられることが多く、その重要性が高まっている。

- これまでDGではLBAに関して様々な議論が行われてきたが、最近ではLBA未経験者がLBAに従事する機会も増えており、LBA測定法開発・検体測定に必要なとなる基礎的な知識や評価項目、トラブルシューティングなどを中心に議論できる場が求められている。

本DGでは、新たにLBAに取り組むバイオアナリストを想定し、LBAの基礎や原理について理解を深め、測定系を構築できるようになるための基礎的な内容について議論した。

1. 測定法構築における主な評価項目の洗い出し
2. それぞれの所属先でのアンケート
3. 回答の共有
4. (項目や内容によっては) 回答の深掘り
5. ポスターの作成

活動内容

2023/7 キックオフミーティング、テーマ決定

2023/7 項目の洗い出し、アンケート

2023/8~9 アンケート結果の共有

2023/10 F2Fミーティング（東京）

2023/11 要旨、ポスターの作成

2023/12 ポスター仕上げ

2024/2 JBFシンポジウム

参考ガイドライン

- ICH-M10 「生体試料中薬物濃度分析法バリデーション及び実試料分析」
- 厚生労働省 「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」



用語集

略称	省略しない名称	日本語名称
LBA	Ligand binding assay	リガンド結合法
TK	Toxicokinetics	毒性試験における全 身的曝露の評価
PK	Pharmacokinetics	薬物動態学
SD	Study director	試験責任者
MRD	Minimum required dilution	最小希釈倍率
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限
ULOQ	Upper limit of quantification	定量上限
QC	Quality control	精度管理
-	Validation	バリデーション、 検証
S/N ratio	Signal to noise ratio	S/N比

はじめに：LBAとは

- Ligand binding assayの略で、分析対象に特異的に結合する抗体を用いて分析対象を測定する方法の総称。
- 抗原抗体反応を利用しており、検出に用いる抗体の標識を変えることで様々な方法で分析を行うことができる。

例)

酵素標識 (ELISA法)

放射性同位元素標識 (RIA法)

電気化学発光標識 (ECL法)

など。

LBA（ELISA法）の大まかな流れ① ～サンドイッチ法を例に～

【固相化プレートの作成】

- ① 96ウェルプレートにCapture antibody（固相化抗体）を添加
- ② インキュベート
- ③ ウェルを洗浄後、ブロッキング材添加
- ④ インキュベート

一般的に、キット添付の96ウェルプレートはすでに固相化されていることが多いため、このステップは省略される場合がある。

LBA（ELISA法）の大まかな流れ② ～サンドイッチ法を例に～

【サンプリング～Detection antibodyの添加】

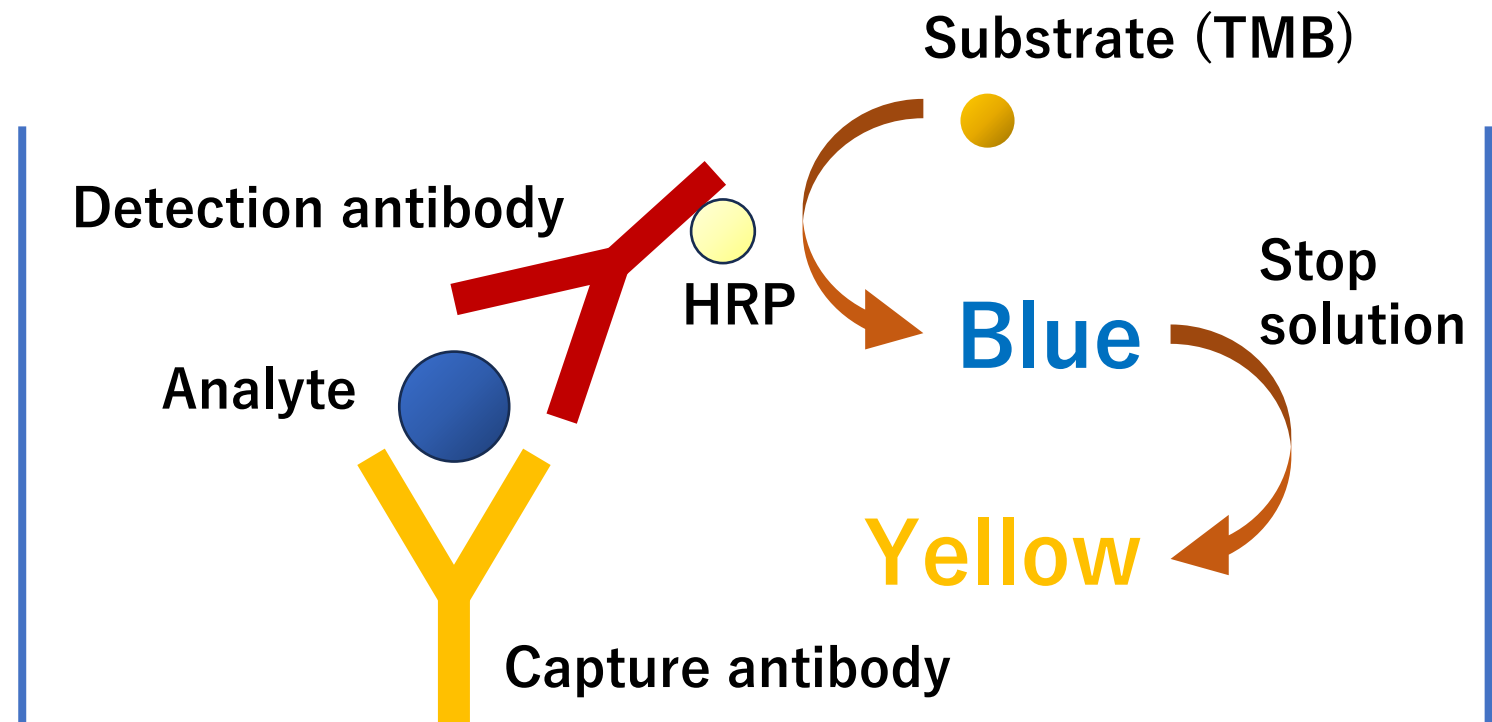
- ① ウェルを洗淨
- ② サンプルを96ウェルプレートに添加*
- ③ インキュベート
- ④ ウェルを洗淨
- ⑤ Detection antibody（検出抗体）を添加
- ⑥ インキュベート

*一般的に、1サンプルあたり2ウェルに添加する（Duplicate測定）。

LBA (ELISA法) の大まかな流れ③ ～サンドイッチ法を例に～

【基質の添加～測定】

- ① ウェルを洗淨
- ② 基質の添加
- ③ インキュベート
- ④ 停止液の添加
- ⑤ 吸光度の測定



HRP : Horse radish peroxidase
TMB : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

2種類の抗体で目的の物質を挟み込むこの方法は「サンドイッチ法」と呼ばれ、生体試料中濃度分析などで多く利用されている。

検体測定までの流れ（例）

分析法構築、Qualification

固相化抗体・検出抗体の至適濃度、MRD、検量線濃度、QC濃度、選択性、再現性などを検討し分析法を確立する。

分析法バリデーション

・検量線 ・選択性 ・フック効果 ・希釈直線性
 ・安定性 ・真度及び精度 など。

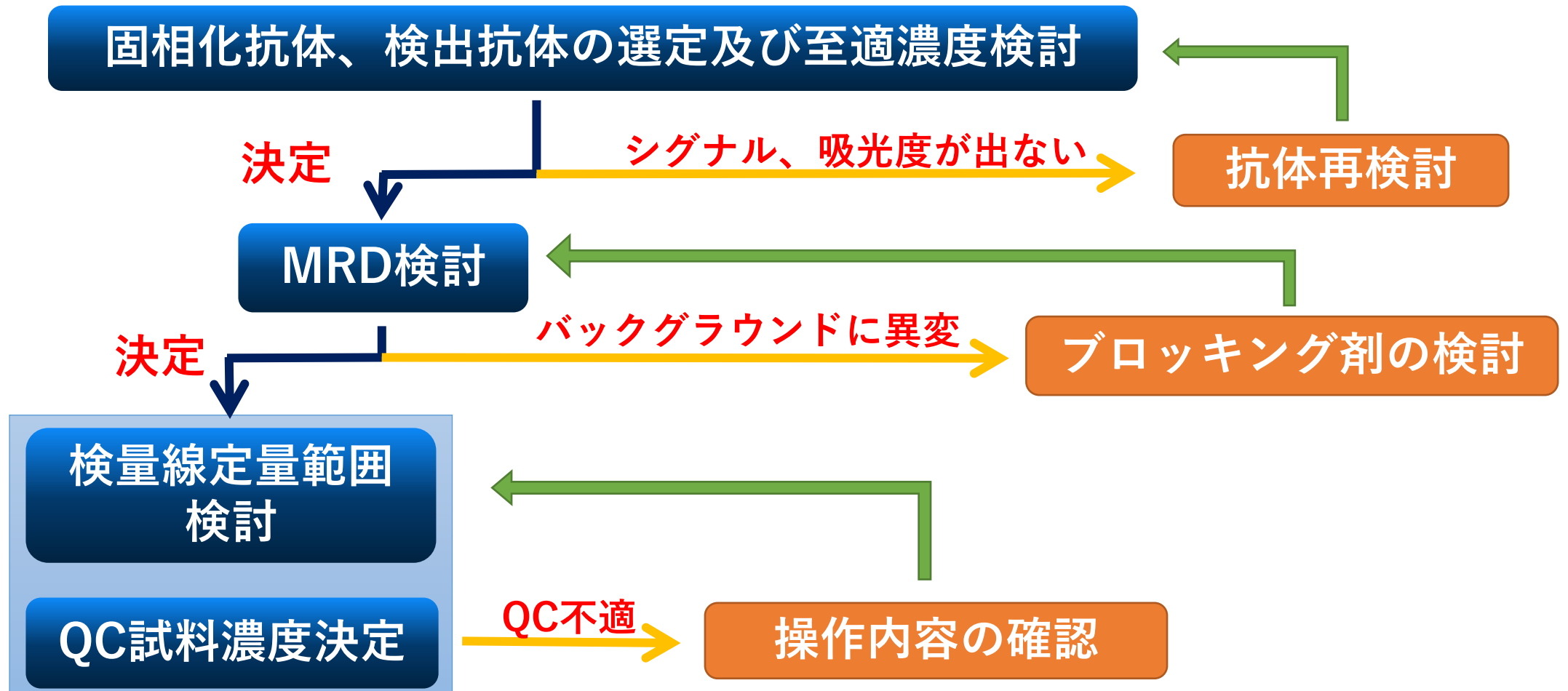
検体分析

TK / PK分析

*検体測定までの流れは目的に応じて様々であり、Non-GLPの試験ではバリデーションを実施せずに検体分析を実施することもある。

分析法構築の流れ（例）

系の構築



分析法構築の流れ（例）

Qualification

選択性

不適



MRD検討まで戻る可能性もあり

再現性

不適



手技など、実験手法の見直し

希釈直線性

不適



希釈倍率の見直し、手技の見直し

フック効果

不適



系の構築から仕直すこともあり

安定性（室温保存安定性、凍結融解安定性）

不適



氷冷操作など、条件の変更あり

確認項目は状況に応じて選択される。

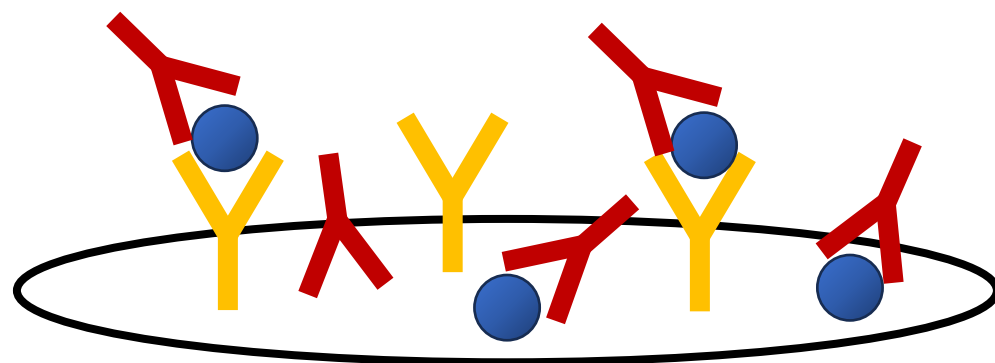
本DGで実施した議論内容

- ブロッキング剤
- 固相化抗体、検出抗体
- MRD
- 検量線
- QC試料
- 選択性
- 再現性
- 希釈直線性
- フック効果
- 安定性
- トラブルシューティング

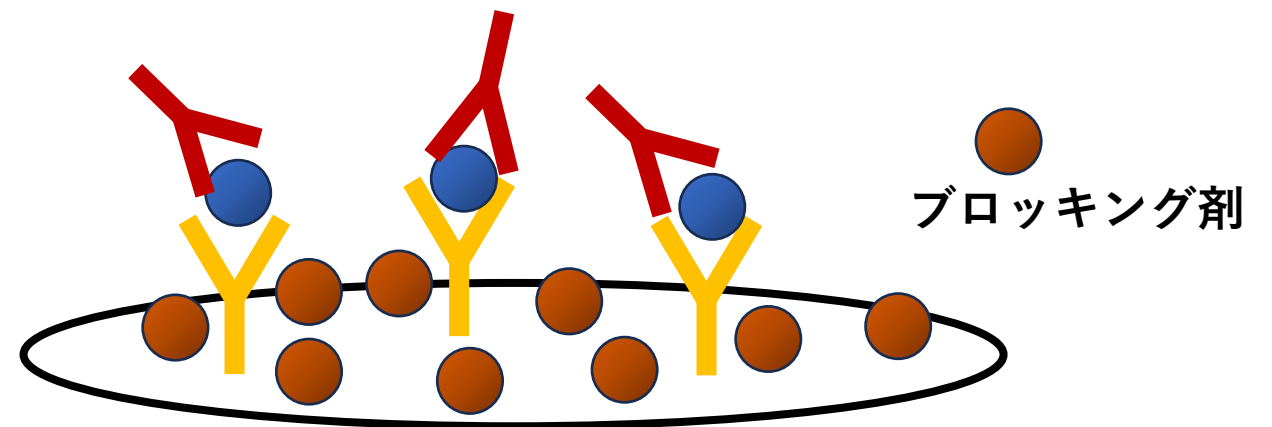
ブロッキング剤

目的（効果）

- アッセイプレートの表面に、抗原（分析対象）や2次抗体等が非特異的結合するのを阻害する。
- 非特異的なタンパク質間相互作用を阻害する。
- 後続のアッセイ成分（例：抗原、2次抗体など）との交差反応性を示さない。
- 固相アッセイに伴う相転移による変性の影響を最小化することにより、生体分子の安定化剤として機能する（または再変性を補助する）。
- 特定のタンパク質や生体分子を表面に固定化する結合を破壊しない。



ブロッキングなし



ブロッキングあり



ブロッキング試薬

Protein Blockers

- Bovine serum albumin (BSA) (1~3%)
- Non-fat dry milk or Casein (0.1~0.5%)
- Whole normal sera (~10%)
- Fish gelatin
- その他：市販のブロッキング剤

- 阻害強度：ゼラチン>カゼイン>BSA)：過去DG情報 (スライド25 DG2018-39)
- 使用実績 (第一優先)：BSA >カゼイン>スキムミルク (スライド26 DG2018-39)

その他：ポリマー

- Polyethylene glycol (PEG)
- Polyvinyl alcohol (PVA)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP)

ポリマー等の使用実績、文献などは、タンパク由来のブロッカーと比較して少ない。主にDNA array chipなどに使われている。

Detergent blocker (非イオン性界面活性剤)

- 洗浄ステップ中に特異的に結合した生体分子を物理的に除去する可能性のある表面上の領域をブロックし、物理的に捕捉された緩く結合した生体分子を除去するのに役立つため、洗浄液に有用である。
- 臨界ミセル濃度値以上の濃度で使用する必要がある (Tween 20の典型的な濃度は0.01~0.10%)。
- 極めて安定で、希釈した状態 (すなわち洗浄バッファー) で室温で長期間保存してもブロッキング活性が低下しない。

最もよく使用されるのは、Tween 20で、0.01~0.1%で使用される。

ブロッキング剤 DG内でのQ&A

よく使用されるブロッキング剤はありますか？新規測定法を検討する際、最初に検討するブロッキング剤の種類や濃度を教えてください。

A

参加者A

ECLでは市販のBlocker Casein in TBSを多く使用。
ELISAでは2% BSAを多く使用。

B

参加者B

1% BSAを第一選択。

C

参加者C

ECLでは主に4% BSA/PBS-Tを使っています。

ブロッキング剤 DG内でのQ&A

D

参加者D

ECLでは市販のBlocker Casein in TBSを多く使用。
ELISAでは2% BSAを多く使用。

E

参加者E

TK測定ではBSAを主に選択している(1~5%の濃度で使用)。

TBS : トリス緩衝生理食塩水 (Tris Buffered Saline)

PBS-T : Tween 20含有リン酸緩衝生理食塩水

(Phosphate Buffered Saline with Tween 20)

ブロッキング剤 DG内でのQ&A

ブロッキング剤を変更する必要がある場合、何を優先して検討されますか？

A

参加者A

使用する系（抗体の種類）及び得られたBackgroundの値によって選択しています。
最近では高感度化が求められる中で色々なブロッキングバッファーも出てきているので、それらを検討することもあります。

B

参加者B

バックグラウンドが高い場合やウェル間でばらつく場合は市販ブロッキング剤を試す。
（ブロックエース、スーパーブロック等）

ブロッキング剤 DG内でのQ&A

洗浄バッファーについても、同様にお聞きできればと存じます。

A

参加者A

TBS-Tを使用しています。

TBS-T : Tween 20含有
トリス緩衝生理食塩水
(Phosphate Buffered
Saline with Tween 20)

B

参加者B

PBS-Tを使用することが多いです。

C

参加者C

ECLの事例としては、以下のような組成です。
50 mM Tris, 1 mM Glycine, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween 20
(pH 8.00 ± 0.2)

ブロッキング剤 DG内でのQ&A

ブロッキング剤の選択肢とその選択基準を教えてくださいたいです。

A

参加者A

使用実績を重視しているので、選択基準などはない。

B

参加者B

安定供給可能なブロッキング剤であることも重視している。

ブロッキング剤：まとめ

- 分析法確立においてブロッキング試薬の選択は重要。
- 最もよく選択されるブロッキング試薬は、利便性、過去の経験や参考文献などによるところが大きい。
 - 第一選択としてはBSAやCaseinが用いられるラボが多い。
- バックグラウンドのシグナルが高い場合に、他のブロッキング剤を検討することがある。
- Detergent も非特異的結合（シグナル）をブロックするために、Tween 20 などがよく利用される。

固相化抗体 検出抗体



ICH-M10 : 重要試薬に関する項目

• 4.1.2 Critical Reagents

- Critical reagents, including binding reagents (e.g., binding proteins, aptamers, antibodies or conjugated antibodies) and those containing enzymatic moieties, have direct impact on the results of the assay and, therefore, their quality should be assured.
- Critical reagents bind the analyte and, upon interaction, lead to an instrument signal corresponding to the analyte concentration.
- The critical reagents should be identified and defined in the assay method.
- Reliable procurement of critical reagents, whether manufactured in-house or purchased commercially, should be considered early in method development.
- The data sheet for the critical reagent should include at a minimum identity, source, batch/lot number, purity (if applicable), concentration (if applicable) and stability/retest date/storage conditions.

固相化抗体、検出抗体

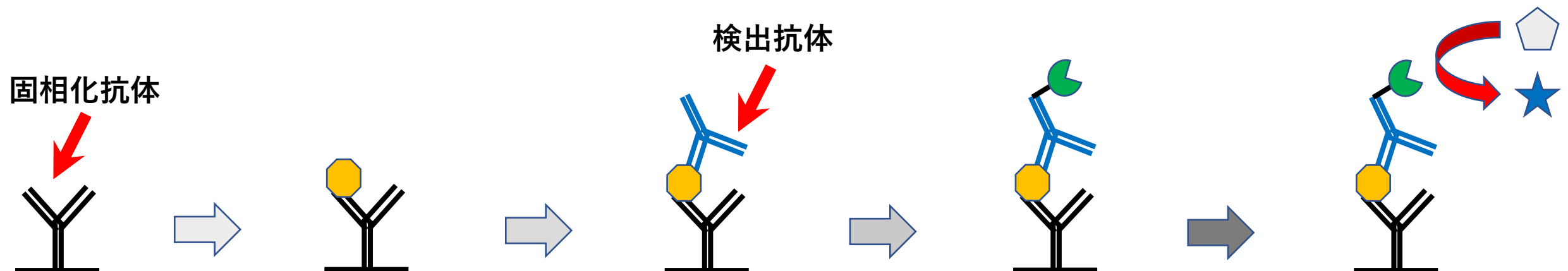
• LBA（サンドイッチELISA）の系を構築するには...

1. 固相化抗体、検出抗体の組み合わせが重要

→ エピトープ（抗体が認識する抗原の結合部位）が重ならないような組み合わせを選択

2. 抗体濃度の最適化が必要

→ 複数濃度の組み合わせで検討



固相化抗体、検出抗体 DG内でのQ&A

各種抗体の選定は、どのようにしていますか？
(固相化抗体、検出抗体)

A

参加者A

提供品や市販品を購入して使用しています。
いずれも無い場合は、市販の標識化キットで
標識化を実施しています。

C

参加者C

基本的には提供品や購入品を使用しています。
市販の標識化キットを用いて標識化を実施し
ている分析法もありますね。

固相化抗体、検出抗体 DG内でのQ&A

抗体の標識化確認は、何をしていますか？

A

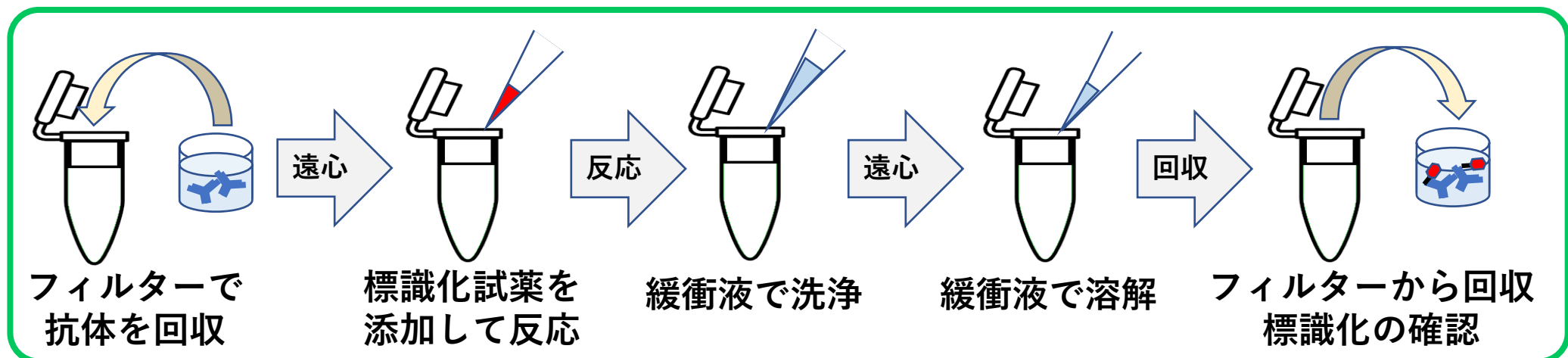
参加者A

タンパク濃度の確認を実施しています。

B

参加者B

標識化キットに従って確認を実施しています。



抗体の至適濃度決定 DG内でのQ&A

至適濃度を検討する場合、どの程度の濃度範囲で検討していますか？

A

参加者A

3パターン程度の組み合わせで抗体の反応性をみながら決定しています。

B

参加者B

0.2~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3~5パターン) の範囲で濃度を振って確認しています。

D

参加者D

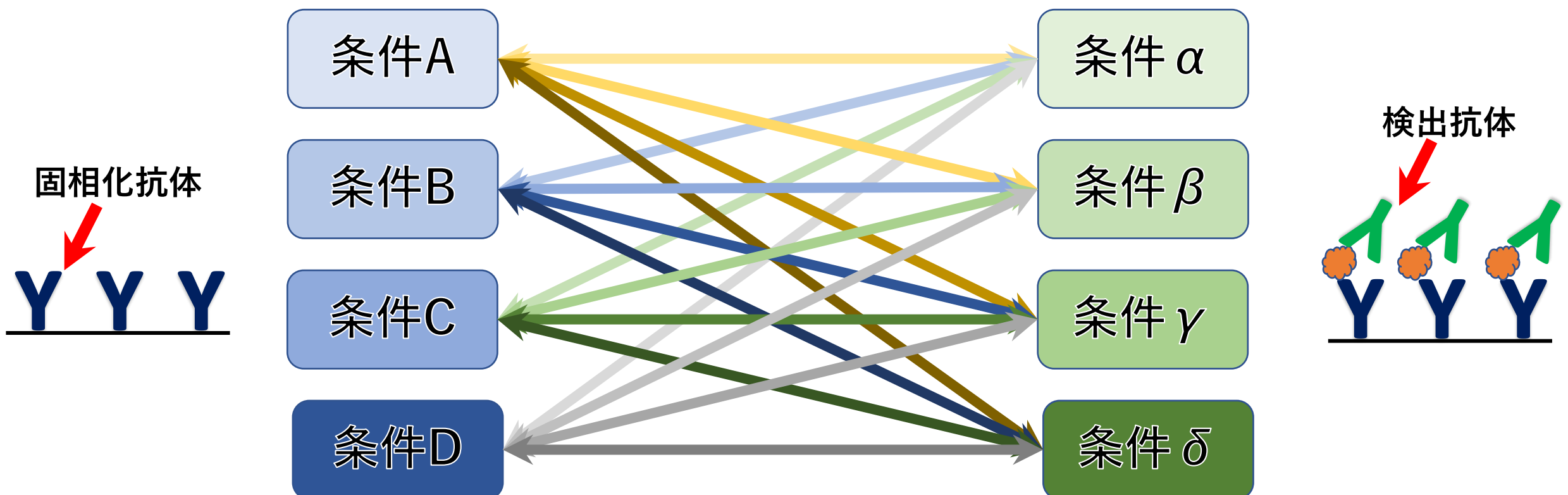
固相化、検出ともに0.1~3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で濃度を数段階設定して確認していますね。

抗体の至適濃度決定 DG内でのQ&A

F

参加者F

購入品、提供品のいずれの場合においても、推奨濃度から希釈倍率を変更して確認しています。
(0.5, 0.75, 1, 1.5倍など)



抗体の至適濃度決定 DG内でのQ&A

至適濃度の採用基準は、どのようにしていますか？

B

参加者B

吸光度が2~3（高濃度ポイントにおいて）の範囲内に収まるように設定しています。

C

参加者C

S/N比が良い条件で設定し、各抗体の使用量はなるべく減らすように検討しています。共存妨害物質へのトレランスが取れない場合は濃度を上げています。

抗体の至適濃度決定 DG内でのQ&A

E

参加者E

S/N比が大きく、バックグラウンド値が小さいものを選択しています。

F

参加者F

ブランクの値（バックグラウンド）と検量線のシグナルから濃度を設定しています。
濃度を振ってもバックグラウンドが改善されない場合や、S/N比が得られない場合などは、ブロッキングバッファの再検討を実施する場合がありますね。

S/N比：対象物のシグナル強度とその背景のノイズ強度の比率

過去DG活動：各種抗体選定について

- 各評価方法について（議論している内容）

- DG2015-19 LBAによる定量（分析法構築）

- 1.2 MSD（高感度化、最適化）

- 検出抗体、SULFO-TAG標識体、Read buffer、重要試薬の組み合わせ、MSDプレート

- 2.2 Gyrolab（高感度化、最適化）

- 固相抗体、検出抗体、抗体の標識

- 3.2 ELISA（最適化）

- 使用する検出抗体の比率

第13回JBFシンポジウムにて開催された

LBAの基礎講座「LBAの分析法開発基礎講座」にて発表

- ・抗体の構造
- ・アッセイプラットフォームの選択
- ・Generic/Specific reagentsの選択
- ・重要試薬ペアと濃度設定



MRD



ICH-M10 : MRDに関する項目

• 7.4 Minimum Required Dilution

MRD is a dilution factor employed in samples that are diluted with buffer solution to reduce the background signal or matrix interference on the analysis using LBA. The MRD should be identical for all samples including calibration standards and the QCs and it should be determined during method development. If MRD is changed after establishment of the method, partial validation is necessary. MRD should be defined in the Validation Report of the analytical method.

MRD (Minimum required dilution)

• MRDとは？

LBAでの分析用に調製された試料において、緩衝液により生体試料が希釈されている倍率のこと。

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試料も含めて、すべての試料で同一倍率でなければならない。

⇒ マトリックスの影響を減らすために、試料の前処理工程の一つとして緩衝液で試料を希釈する。

MRDの選定 DG内でのQ&A

MRD選定時の確認は、どのようにしていますか？

A

参加者A

血漿0%（Bufferのみ）、血漿1%、5%、10%（MRD100倍、20倍、10倍に相当）を調製して確認して確認しています。

B

参加者B

溶液を含む3種（10～100倍）程度で確認しています。

MRDの選定 DG内でのQ&A

C

参加者C

MRD10、20、50で個体別ブランク試料を測定して確認しています。

D

参加者D

複数の個体別ブランク試料を用いて添加回収、希釈直線性を実施し、マトリックスの影響がみられない希釈倍率を決定しています。

MRDの選定 DG内でのQ&A

MRD選定時の基準は、どのようにしていますか？

A

参加者A

マトリックス添加Blankの吸光度が0.1以下であること、BlankとLLOQの吸光度差が0.06～0.1程度であることとしています。

B

参加者B

Bufferのみと同程度のレスポンスが得られる最低倍率を選択しています。

MRDの選定 DG内でのQ&A

C

参加者C

吸光度のバラツキが少なく、マトリックスフリーのシグナルと近似しているものを選択しています。

E

参加者E

定量下限がMRDによって変わるため、その兼ね合いも考慮して検討しています。



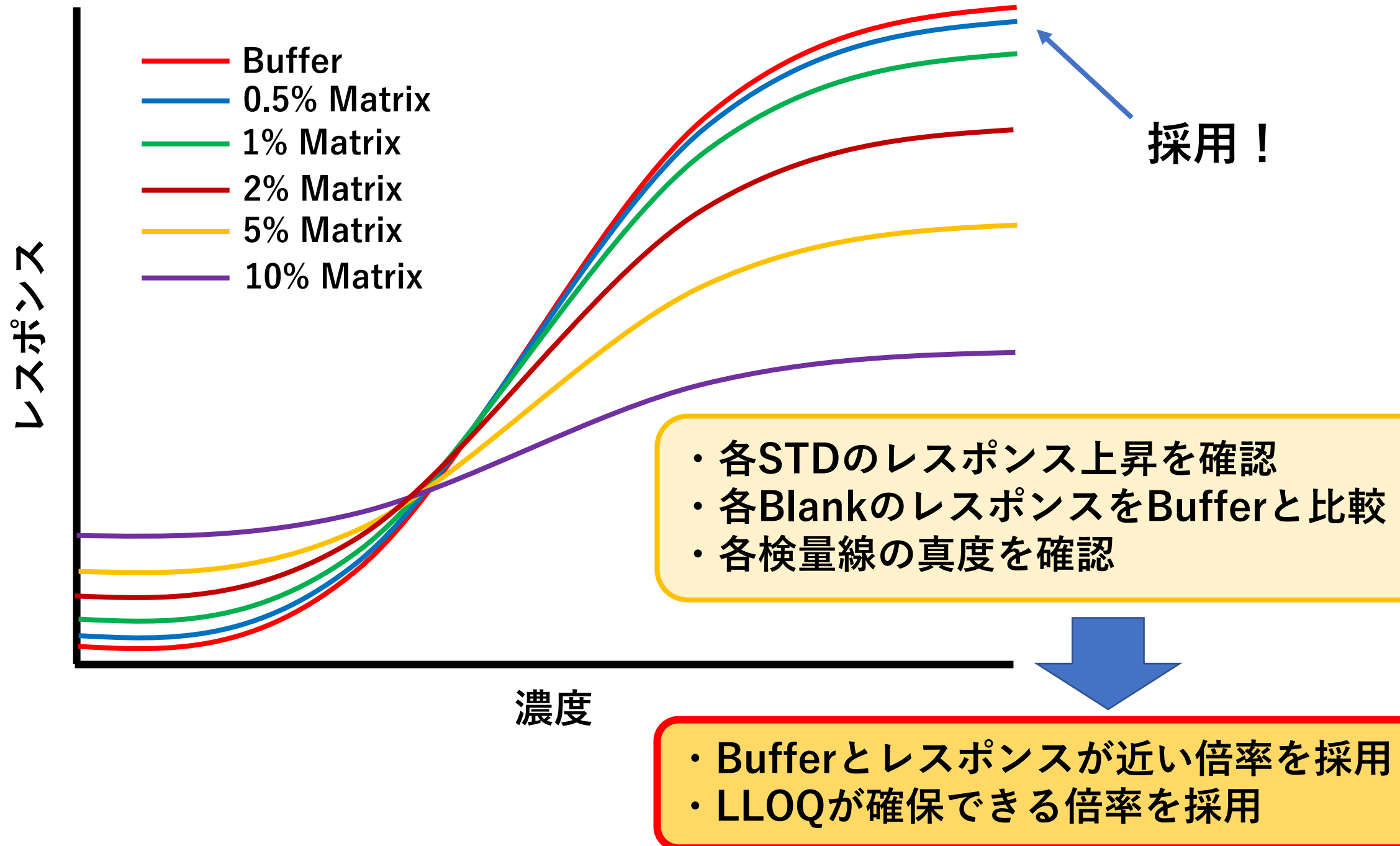
MRDの選定について

- 分析対象を異なるプールマトリックス濃度の緩衝液に添加して確認

Sample Name	Signal					
	Buffer	Matrix				
		10%	5%	2%	1%	0.5%
STD.0	60	867	543	479	326	105
STD.1	180	792	612	577	500	256
STD.2	551	925	921	862	799	612
STD.3	1982	1950	2134	1972	2012	2014
STD.4	7139	4863	5623	6767	6781	6987
STD.5	18804	12245	13543	16235	18125	18998
STD.6	36841	21456	25665	29890	32378	33678
STD.7	56232	31125	36856	45568	47334	52375

MRDの選定について

- 各MRDの検量線



MRDの選定 DG内でのQ&A

同じ測定条件においても、マトリックス違い（血清や血漿）、種差（ヒトや実験動物）の違いによってMRDが異なるケースはありますか？

C

参加者C

経験として、マトリックスの違いでMRDが異なるケースはありました。
動物種の違いについては、経験ないですね。

MRDの選定 DG内でのQ&A

緩衝液の種類についても検討しますか？

A

参加者A

基本的には、PBSまたはPBS-TにBSAを添加して使用しています。
市販キット付属の緩衝液を用いる場合もありますね。

<http://bioanalysisforum.jp/>

PBS : リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline)

過去DG活動：MRDについて

• MRDについて（議論している内容）

➤ DG2018-39 LBAの失敗 &トラブル事例と解決策

メソッド開発について(測定準備)

- 感度向上のためMRD(希釈倍率)を下げたいがsample量が厳しい…
- MRDの設定判断に迷います。

マトリックス干渉について(測定中)

- マトリックス干渉を避けるための有効な方法がありますか？

第13回JBFシンポジウムにて開催された
LBAの基礎講座「LBAの分析法開発基礎講座」にて発表

- 検量線の検討（MRD）
- MRDと希釈直線性の違い



検量線



ICH-M10 : 検量線に関する項目

- 4.2.3 Calibration Curve and Range

The calibration curve demonstrates the relationship between the nominal analyte concentration and the response of the analytical platform to the analyte.

Calibration standards should be prepared in the same biological matrix as the study samples. The calibration range is defined by the LLOQ, which is the lowest calibration standard, and the ULOQ, which is the highest calibration standard.

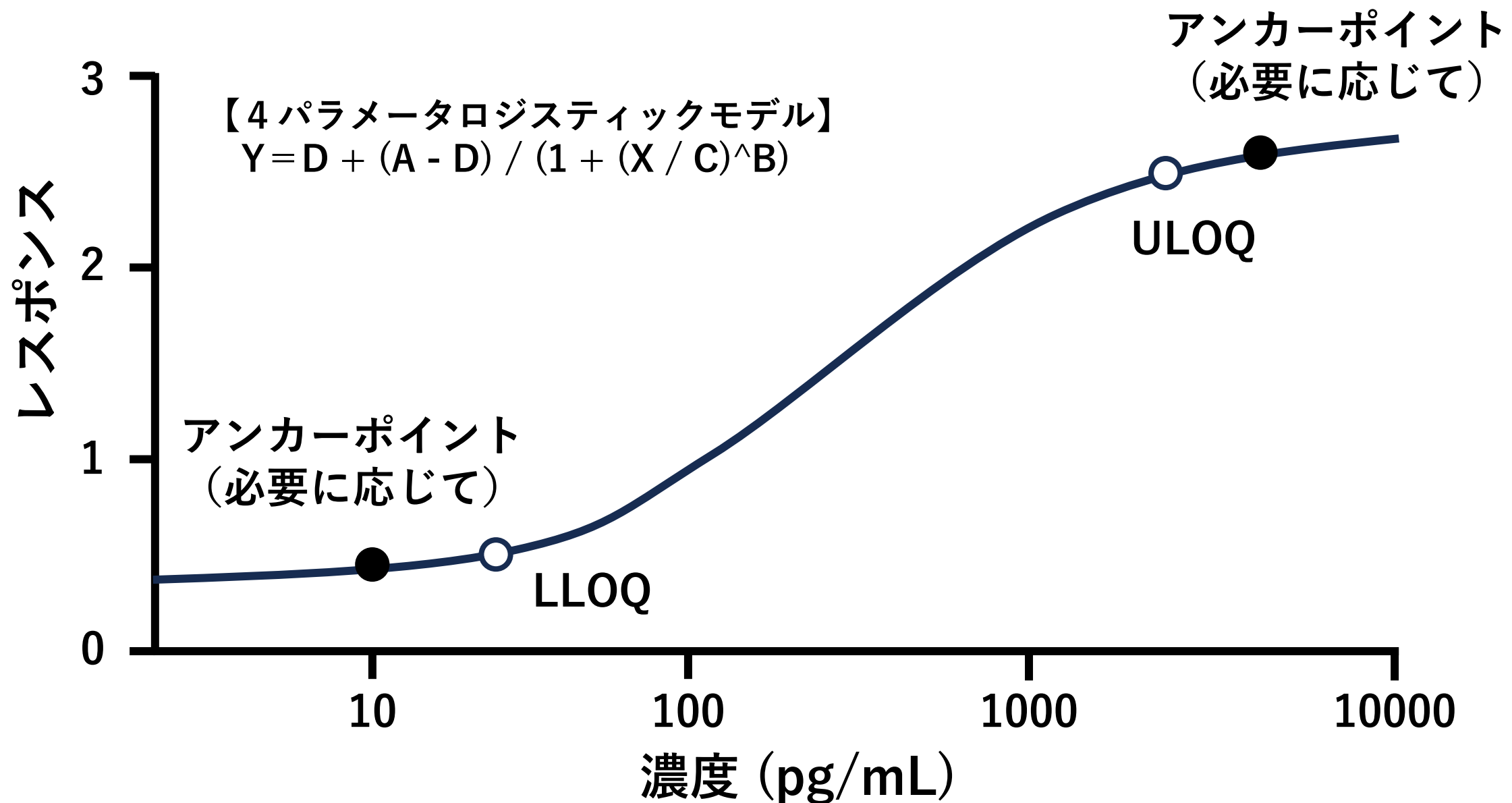
There should be one calibration curve for each analyte studied during method validation and for each analytical run.

検量線とは

- ・ 検量線は、分析対象物質の濃度の理論値と応答変数の関係を示したものである。
- ・ 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する。
- ・ 検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。
- ・ カーブフィッティングを向上させる目的で、定量下限未満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。

検量線のイメージ

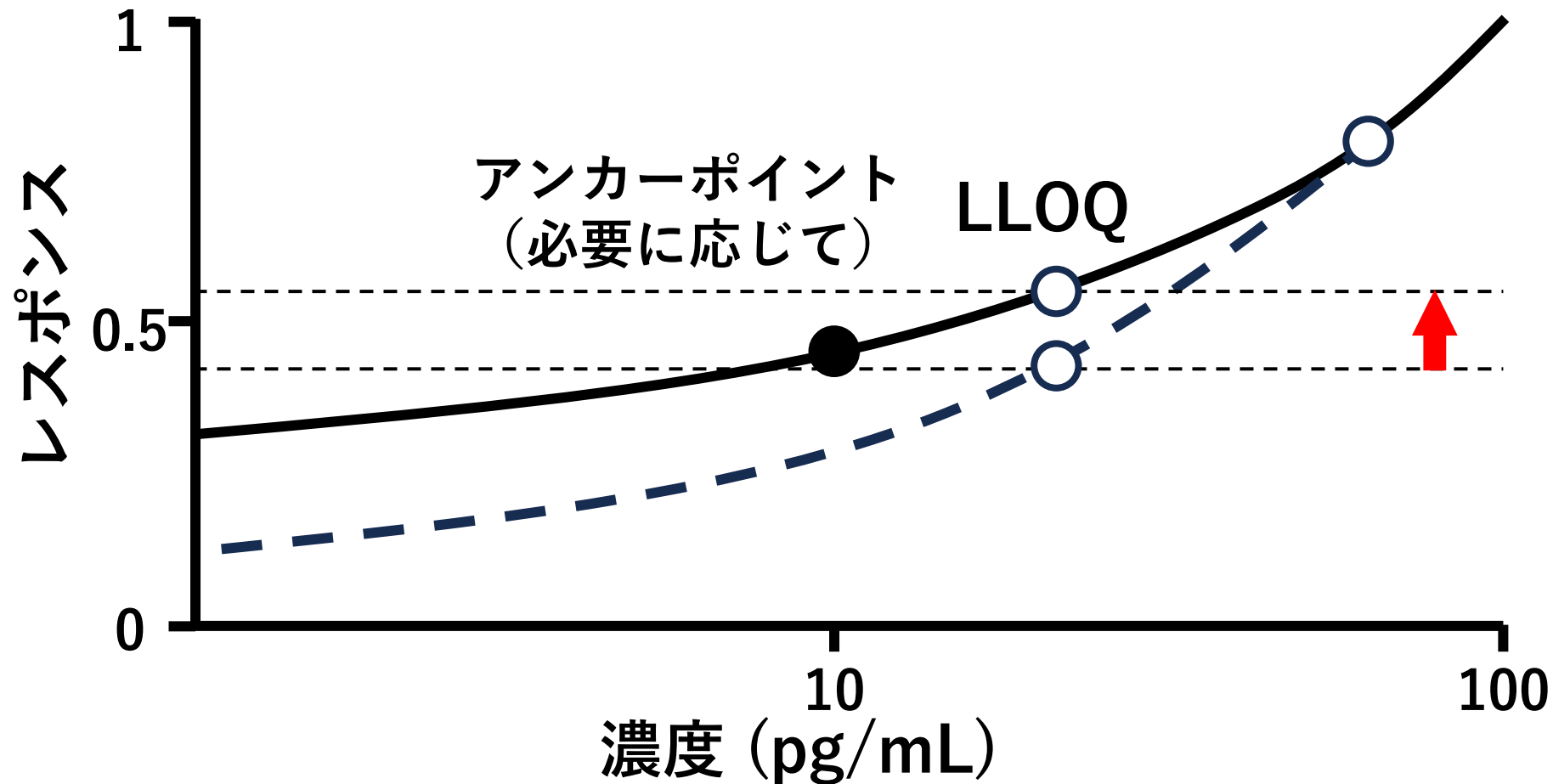
検量線の回帰式は、一般的には4又は5-パラメーターロジスティックモデルが用いられる。



アンカーポイント

検量線のカーブフィッティングを向上させる目的で測定される、定量上限または定量下限を超える検量線試料。

通常、CVやREなどの基準値は設定されないことが多い。



LLOQ側にアンカーポイントを設定した例。カーブの補正により、LLOQの値が上振れしている。

検量線 DG内でのQ&A

検量線の定量範囲の検討はどのようにしていますか？

A

参加者A

Blank+6~7段階、1~100倍の範囲（検量線試料）で実施。

B

参加者B

S/N比は3以上をLLOQとして、公比2~3で7ポイント以上。

C

参加者C

ECLであればS/N比を5程度をLLOQとし、公比2~3で検量線を引く。

検量線 DG内でのQ&A

D

参加者D

実試料の想定濃度を基に濃度範囲を決定する（8ポイント程）。2つ目の抗体濃度検討の際に得られて吸光度から濃度の変更を検討する。S/N比で定量下限を決定することが多いが、低濃度がブレやすいため、感度が欲しい場合にはアンカーを設定したり、重みづけをしている。

検量線範囲の検討は7~8ポイント以上の濃度範囲で公比2~3で検量線を引く。アンカーポイントはカーブフィッティングを向上させる目的で設ける。

検量線 DG内でのQ&A

Fittingと重みづけはどのように選択しますか？

A

参加者A

Fittingは試験計画書に沿って行う。
重みづけはECLにおいては下限付近で必要なことがある。

B

参加者B

重みづけは基本的にあると考えてよい。
Fittingについては複数のパターンを確認している。

検量線測定結果の例

理論濃度 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	CV (%)	RE (%)
0	-	-	-
20.0	19.8	2.1	-1.0
40.0	37.1	3.3	-7.3
80.0	84.6	5.1	5.7
160	155	1.3	-3.1
320	331	5.3	3.5
640	654	6.4	2.2
1280	1286	5.1	0.5

「逆回帰濃度の真度（RE）と精度（CV）は、LLOQ及びULOQでは±25.0%以内、その他の濃度では±20.0%以内に設定することが多い。」

結果Tableの例。上の結果だと、CV、REいずれも基準を満たしており、適切な検量線といえる。

$CV(\%) = \text{測定値 (Duplicate) の標準偏差} / \text{測定値 (Duplicate) の平均} \times 100$

$RE(\%) = (\text{測定値} - \text{理論濃度}) / \text{理論濃度} \times 100$

過去のDG活動：検量線範囲について

- 評価方法について

- DG2015-19 LBAによる定量（分析法構築）

- 1.2 MSD（高感度化，最適化）

- サンプル（検量線，QCサンプル，実試料）

- 2.2 Gyrolab（高感度化，最適化）

- サンプル（検量線，QCサンプル，実試料）

- 3.2 ELISA（最適化）

- サンプルの取り扱いや検量線範囲



QC試料

<http://bioanalysisforum.jp/>



ICH-M10 : QC試料に関する項目

• 4.2.4.1 Preparation of Quality Control Samples

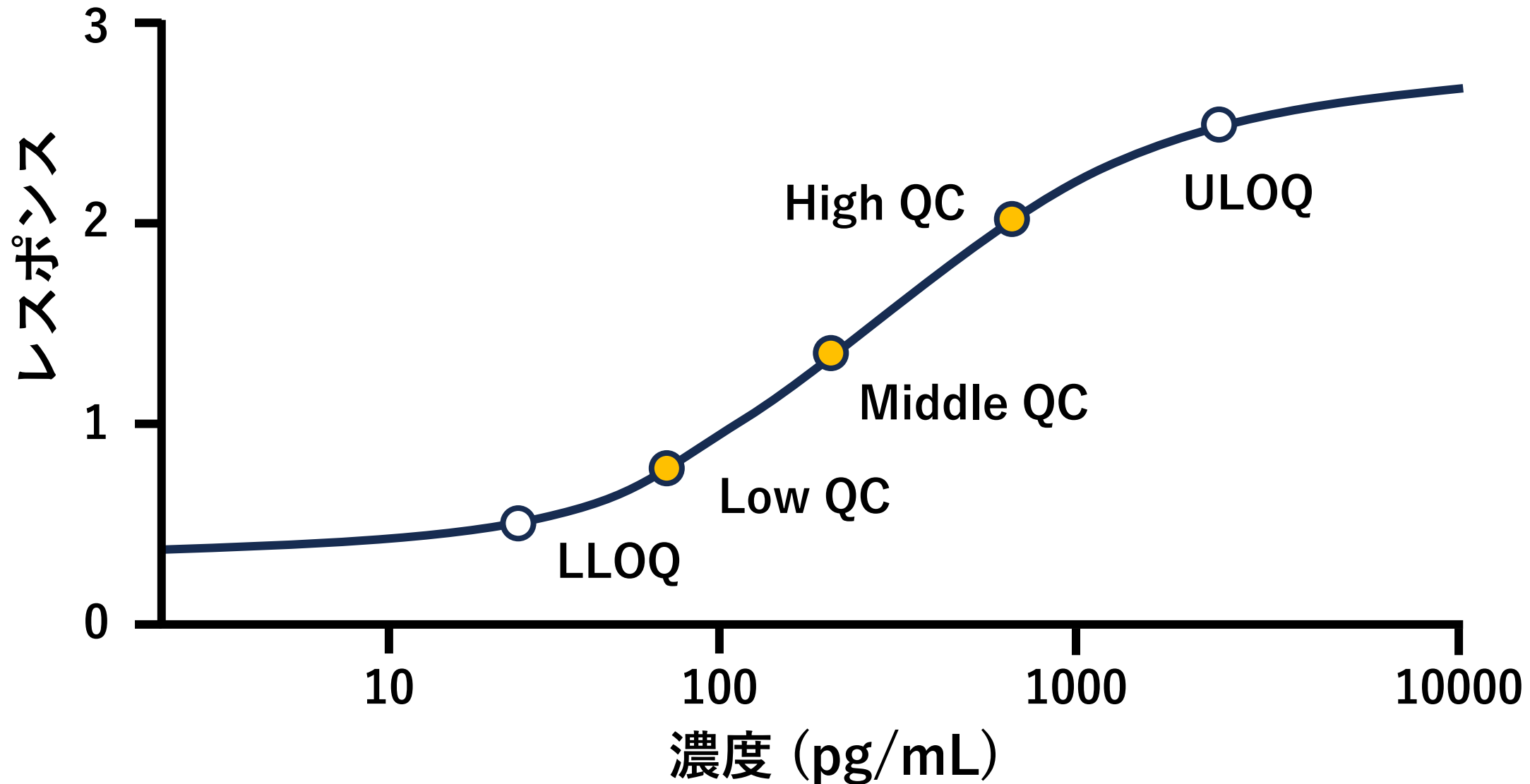
The QCs are intended to mimic study samples and should be prepared by spiking matrix with a known quantity of analyte, storing them under the conditions anticipated for study samples and analysing them to assess the validity of the analytical method.

The QCs should be prepared at a minimum of 5 concentration levels within the calibration curve range: The analyte should be spiked at the LLOQ, within three times of the LLOQ (low QC), around the geometric mean of the calibration curve range (medium QC), and at least at 75% of the ULOQ (high QC) and at the ULOQ.

QC試料とは

- ・ QC (Quality Control) 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もの。
- ・ 検量線の濃度範囲内で、少なくとも3濃度（低濃度、中濃度及び高濃度）のQC試料を分析単位ごとに分析する。
- ・ 低濃度は定量下限の3倍以内、中濃度は検量線の間付近、高濃度は検量線の定量上限の3分の1以上と設定される。

QC試料のイメージ



- Low QC : LLOQ × 3以内
- Middle QC : 検量線の間濃度
- High QC : ULOQ × 2/3以上

QC試料濃度 DG内でのQ&A

QC試料濃度の選定はどのようにしていますか？

B

参加者B

定量範囲決定後にガイドラインの記載に沿って設定（LLOQの3倍以下、幾何平均付近、ULOQの80%以上）。

C

参加者C

LQC：LLOQの3倍以下、MQC：LLOQとULOQの相乗平均、HQC：ULOQの75%以上。

QC試料濃度 DG内でのQ&A

D

参加者D

ガイドラインで規定されている濃度に設定
(QL: 定量下限の3倍以内、QM: 中濃度の幾何平均値付近、QH: 定量上限の1/3以上)。
バイオマーカーの測定の場合には実試料を使用したいため、前述の濃度付近となるよう個別別をn=6で測定し、平均値を基準に設定。

QC試料の濃度はLow QC(LLOQ × 3以内)、Middle QC(検量線
の中間濃度)、High QC(ULOQ × 2/3以上)の3点で設定する。

過去のDG活動：QCサンプルについて

- 評価方法について

- DG2015-19 LBAによる定量（分析法構築）

- 1.2 MSD（高感度化，最適化）

- サンプル（検量線，QCサンプル，実試料）

- 2.2 Gyrolab（高感度化，最適化）

- サンプル（検量線，QCサンプル，実試料）

- 3.2 ELISA（最適化）

- サンプルの取り扱いや検量線範囲



選択性

<http://bioanalysisforum.jp/>



ICH-M10 : 選択性に関する項目

- 4.2.2 Selectivity

Selectivity should be evaluated at the low end of an assay where problems occur in most cases, but it is recommended that selectivity is also evaluated at higher analyte concentrations.

Selectivity should be evaluated at the low end of an assay where problems occur in most cases, but it is recommended that selectivity is also evaluated at higher analyte concentrations.

Therefore, selectivity is evaluated using blank samples obtained from at least 10 individual sources and by spiking the individual blank matrices at the LLOQ and at the high QC level.

選択性とは

- ・ 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。
- ・ 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）。
- ・ 選択性は、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。

選択性 DG内でのQ&A

選択性はどのように評価していますか？

A

参加者A

少なくとも10個体から評価する。

B

参加者B

少なくとも2個体、可能なら全個体で確認する。

C

参加者C

2濃度（LLOQ及びHQC）で少なくとも10個体から評価する。

選択性 DG内でのQ&A

D

参加者D

選択性は求める感度とMRDで条件決定する。検討段階で選択性は求める感度とMRDで条件決定をしている。MRDと同時進行で6個体程度で評価している。

選択性はバリデーションの場合は10個体程度、検討時は2~6個体程度で確認することが多い。

選択性 測定結果の例

選択性測定結果の例

名称	未添加試料	添加試料	
添加濃度 (pg/mL)	0	20.0	
被験者名	測定値 (pg/mL)	測定値 (pg/mL)	RE (%)
1	<u>0</u>	<u>19.7</u>	-1.5
2	<u>0</u>	<u>14.7</u>	-26.5
3	<u>0</u>	20.4	2.0
4	<u>0</u>	<u>18.8</u>	-6.0
5	<u>0</u>	<u>19.1</u>	-4.5
6	<u>0</u>	<u>15.9</u>	-20.5
7	<u>0</u>	<u>17.6</u>	-12.0
8	<u>0</u>	<u>18.5</u>	-7.5
9	<u>0</u>	<u>17.4</u>	-13.0
10	<u>0</u>	<u>19.5</u>	-2.5

下線：定量下限未満 (<20.0 pg/mL)

真度(RE)は、評価した個体の少なくとも80%において、定量下限の場合は理論値の±25%以内、高濃度QCの濃度の場合は理論値の±20%以内でなければならない。

左図は定量下限のQCサンプルを添加した例。2番の被験者のみがREが理論値の±25%を超えており、選択性が見られなかったが、残りの9検体においては基準内であった。9割の個体が基準を満たしているため、選択性は合格であるといえる。

$$RE(\%) = (\text{添加後の測定値} - \text{添加濃度}) / (\text{添加濃度}) \times 100$$



再現性

<http://bioanalysisforum.jp/>



ICH-M10 : 再現性に関する項目

- ICH-M10 Guideline

- 4.2 Validation

- 4.2.4 Accuracy and Precision

- 4.2.4.1 Preparation of Quality Control Samples

- 4.2.4.2 Evaluation of Accuracy and Precision

- 4.3 Study Sample Analysis

- 4.3.1 Analytical Run

- 4.3.2 Acceptance Criteria for an Analytical Run



ICH-M10 : 再現性に関する項目

• ICH-M10 Guideline

Accuracy:

The degree of closeness of the measured value to the nominal or known true value under prescribed conditions (or as measured by a particular method). In this document accuracy is expressed as percent of the nominal value.

$$\text{Accuracy (\%)} = (\text{Measured Value} / \text{Nominal Value})$$

Precision:

The closeness of agreement (i.e., degree of scatter) among a series of measurements. Precision is expressed as the coefficient of variation (CV) or the relative standard deviation (RSD) expressed as a percentage.

$$\%CV = (\text{Standard Deviation} / \text{Mean}) \times 100$$

再現性 DG内でのQ&A

再現性の検討・評価方法は？

A

参加者A

5濃度、各n=3で評価。真度及び精度が20%以下、定量上下限は25%以下を適とする。

B

参加者B

5濃度、各n=3で評価（日内1~2回）。LLOQなどでブレが生じやすい系などでは、日間も評価する。

C

参加者C

5濃度、各n=3で評価（分析単位内と単位間で実施）。単位間は6Run行い、トータルエラーも確認する。

再現性 DG内でのQ&A

D

参加者D

LLOQが安定して再現できる条件を設定する。
抗体濃度、反応時間等で感度重視する。

E

参加者E

検量線範囲、QC濃度を決めてから実施している。LLOQがブレやすい系などでは、LLOQを段階的に2濃度作成して、再現性を見てから定量下限濃度を決定している。回数については、ある程度決まった段階で複数回実施して確認している。

QC試料を5濃度、各n=3で日内再現性を確認し、
状況に応じて日間再現性を確認することが多い。

過去のDG活動：再現性について

• 評価方法について

➤ DG2015-19 LBAによる定量（分析法構築）

1.2 MSD（高感度化，最適化）

サンプル（検量線，QCサンプル，実試料）

2.2 Gyrolab（高感度化，最適化）

サンプル（検量線，QCサンプル，実試料）

• 評価基準について

➤ DG2017-28 「Accuracy&Precision Criteria」について考える

➤ DG2018-35 Accuracy&Precision Criteriaについて考える（2）

➤ DG2019-40 BEにおけるAccuracy&Precision Criteria

BE：生物学的同等性（Bioequivalence）



希釈直線性



ICH-M10 : 希釈直線性に関する項目

- ICH-M10 Guideline

- 4.2 Validation

- 4.2.6 Dilution Linearity and Hook Effect

*4.3 Study Sample Analysis に Dilution Linearity に関する記載はない

Dilution Linearity:

A parameter demonstrating that the method can appropriately analyse samples at a concentration exceeding the ULOQ of the calibration curve without influence of prozone (hook) effect and that the measured concentrations are not affected by dilution within the calibration range in LBAs.

希釈直線性 DG内でのQ&A

希釈直線性の検討・評価方法は？

A

参加者A

3濃度段階、各n=3で評価。理論値の $\pm 20\%$ 以内、精度20%以下であれば適とする。

B

参加者B

標準品原液で調製可能な最高濃度からL、M、H濃度付近になる希釈倍率で評価。または、実検体で想定される濃度を考慮した高濃度試料を設定し、定量域まで希釈（3～4濃度段階）。

希釈直線性 DG内でのQ&A

C

参加者C

3濃度段階、各n=3で評価。
実試料分析で測定可能な分の希釈倍率を担保する。

D

参加者D

3濃度段階、各n=3で評価。
20~25%を基準にして確認する。
ぶれが生じやすい系だと、広めの判定としている。

希釈直線性試料を3~4濃度段階、各n=3で評価することが多い。

希釈直線性 DG内でのQ&A

理論値から外れやすいことはあった？

A

参加者A

特に経験したことはないが、バイオマーカーでは想定している理論値から外れる場合があった。

測定試料の想定値はどのように設定している？

A

参加者A

委託者へのヒヤリングで確認。検量線範囲を決定した後に、測定試料中の想定値を考慮して、希釈直線性を確認する。

希釈直線性は、基準外となった経験は多くはないが、測定試料の想定値を考慮して希釈範囲を決めることが重要と思われる。

過去のDG活動：希釈直線性について

- 評価方法について

- DG2015-19 LBAによる定量（分析法構築）

- 1.2 MSD（高感度化，最適化）

- マトリックスの影響，バリデーション前に確認しておきたい事項

- 2.2 Gyrolab（高感度化，最適化）

- 高感度化，バリデーション前に確認しておきたい事項

- 3.2 ELISA（最適化） Plate, ELISA kit

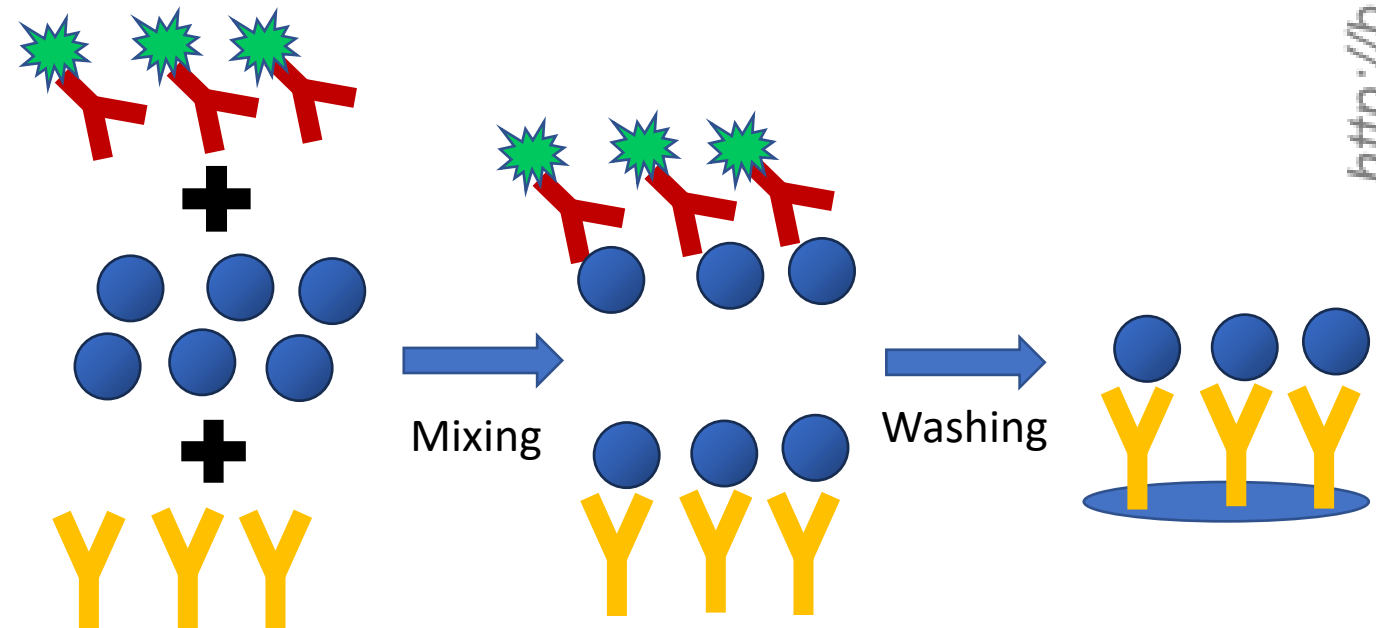
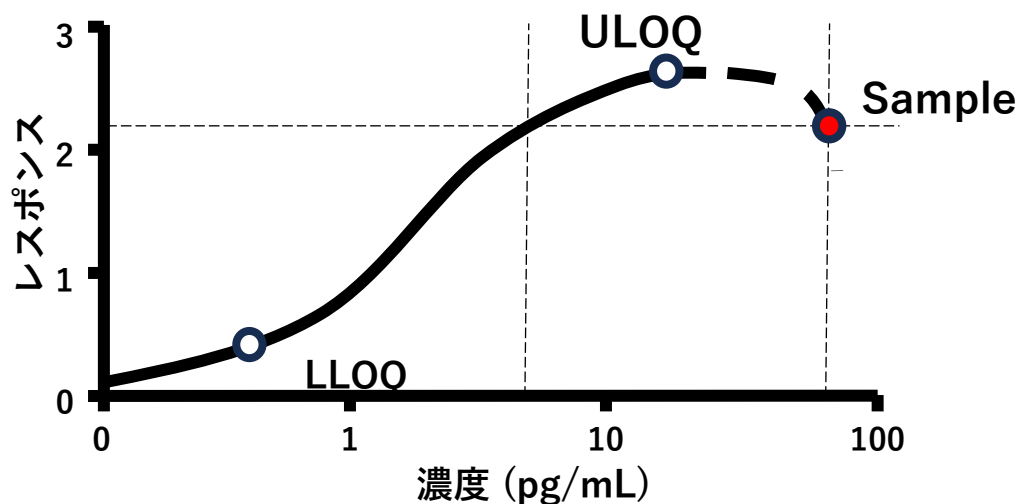


フック効果

<http://bioanalysisforum.jp/>

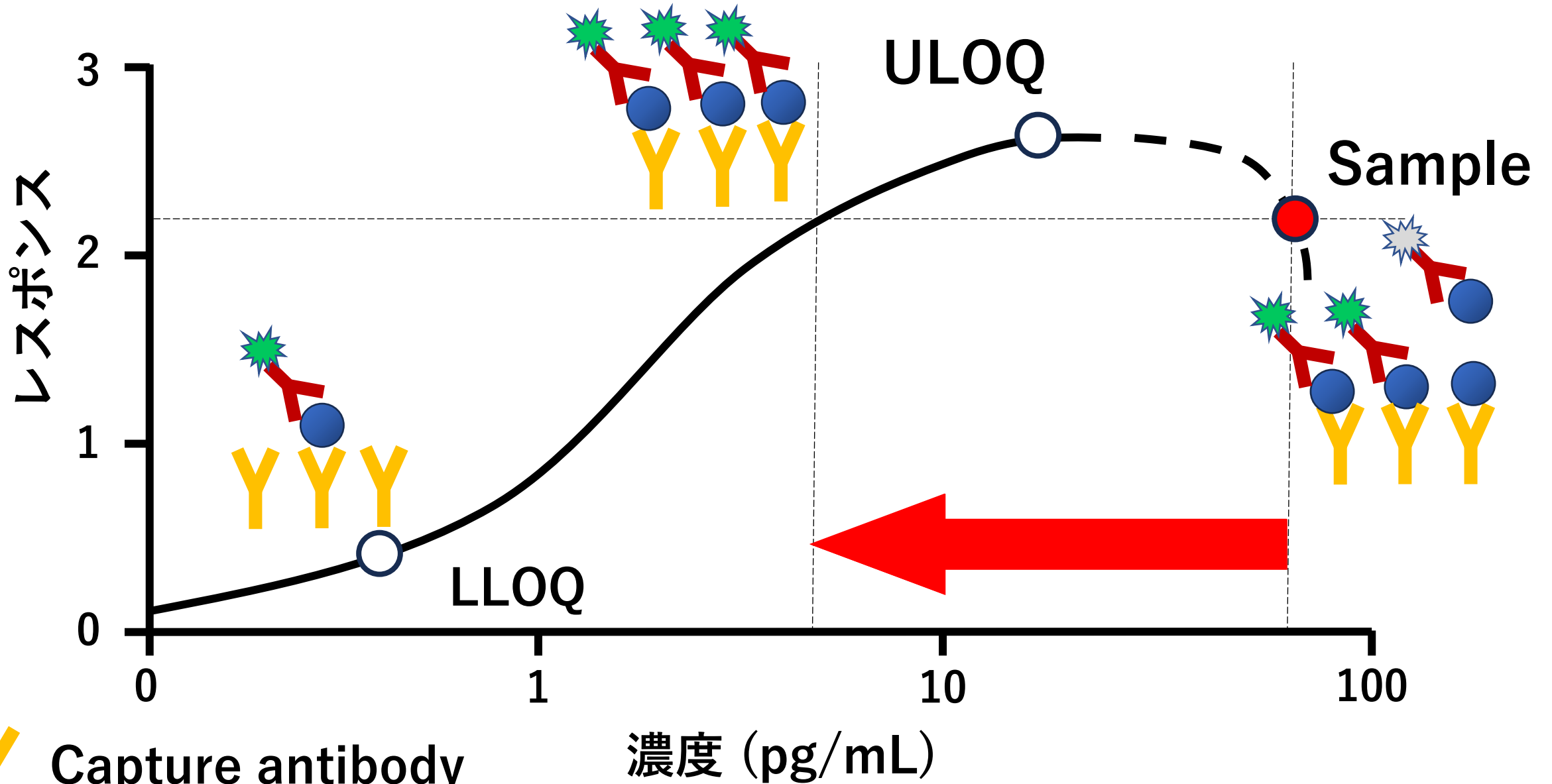
フック効果とは




- 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、検量線の定量上限を超える濃度の試料の定量値が検量線の定量上限以下となるため注意する。
- リガンド結合法のうち、特に液相中で抗体試薬と分析対象物質を反応させる場合に発生する。





フック効果のイメージ



-  Capture antibody
-  Detection antibody
-  Analyte

定量上限を超える試料がフック効果により、
実際の値より低く算出されてしまう例。

<http://bioanalysisforum.jp/>

フック効果検討のタイミング

- バリデーションガイドラインでは希釈直線性の評価時に検討する。

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

4.1.5. 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濃度の試料がフック効果又はプロゾンの影響を受けずに適切に分析できること、及び検量線内においても定量値に希釈による影響がないことを確認するために実施する。希釈直線性は、検量線の定量上限を超えるQC試料及びこの試料を段階希釈した複数濃度の試料を分析して評価する。上記試料において、レスポンス低下（フック効果又はプロゾン）の有無を確認し、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。また、試料の定量値を希釈倍率で補正した後の真度は理論値の $\pm 20\%$ 以内、精度は20%以下でなければならない。

ガイドラインでは希釈直線性の評価時に、検討することになっているが、実際には系の構築（Qualification）の段階でhook effectの有無を確認し、早い段階で分析系を見直す場合もある。

フック効果の対応策

- Assay qualification/validation時
 - 起こったときは、分析条件を再検討する。
 - 系の構築の再検討。
 - 抗体ペアを変える。
 - MRDを変える。
 - Stepwise法を試してみる。
 - 系の再構築が難しい場合はsample analysisで対応することもある。
- Sample analysis時
 - 各検体について複数の希釈検体を分析する。
例：MRD, MRD×10倍？

フック効果 DG内でのQ&A

フック効果をどのように確認していますか。

A

参加者A

ULOQより少し高い濃度から10倍公比で3ポイント。

B

参加者B

標準原液で調製可能な最高濃度試料を準備して確認。

C

参加者C

キットを用いる場合、高濃度を設定できない場合があるが、工夫して確認を実施することもある。

フック効果 DG内でのQ&A

フック効果をご経験されたことはありますか？

A

参加者A

あまり経験していません。

B

参加者B

バリデーションでは確認できなかったが、実検体（高濃度）で見られたことがあった。高濃度と想定していた検体において、低値だった。

C

参加者C

CaptureとDetection抗体のバランスが悪いことで起こることもある（バランスを変えることで改善された）。

フック効果 DG内でのQ&A

ある特定の検体（患者由来）などで起こることはありますか？

A

参加者A

その分析系に対して起こる事象であるので、検体特異的に起こることはないと思います。今までの経験では起こったことはないです。

B

参加者B

フック効果に類似した現象として、個別検体に含まれる内在性の抗体等が誤ってシグナルを増減することがある、という文献による報告例はあります。

- フック効果は、One-step immunoassayに起こりやすい現象であり、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。
- ガイドライン上は、希釈直線性の検討段階でフック効果の有無を確認する。
- 分析法の構築段階及び検体分析時で、各々対応策がある。
- 検体分析時での対応を回避するためには、分析法構築の早い段階で確認したほうがよい。

安定性

4.2.7 Stability

Stability evaluations should be carried out to ensure that every step taken during sample preparation, processing and analysis as well as the storage conditions used do not affect the concentration of the analyte.

安定性の評価は、試料の調製、前処理、分析の各手順や保存条件が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する。

安定性 評価項目

【評価試料】

低濃度及び高濃度のQC試料（LQC、HQC）

【評価条件】

マトリックス中の凍結融解安定性

凍結及び融解を複数回繰り返した後の安定性を評価

マトリックス中のベンチトップ安定性

試料をベンチトップ条件下で扱うときの安定性を評価

マトリックス中の長期保存安定性

長期の冷凍保存時における安定性を評価

安定性 DG内でのQ&A

何サイクルの凍結融解安定性を評価しますか？

A

参加者A

3回程度です。

B

参加者B

5回を評価することが多いです。

安定性 DG内でのQ&A

ベンチトップ安定性はどのような条件で評価しますか？

C

参加者C

室温、24時間で検討します。

D

参加者D

室温での安定性が取れない場合は、氷冷下で検討します。

安定性 DG内でのQ&A

長期保存安定性はどのような条件で評価しますか？

E

参加者E

保存温度は-70°C以下、保存期間は2週間、1ヵ月、3ヵ月を検討します。

F

参加者F

予備検討ではあまり長い期間の評価はしません。

安定性 DG内でのQ&A

安定性が基準を外れたときの対応は？

A

参加者A

第一ステップとして再現性を確認します。

B

参加者B

基準を満たさなかった場合、条件を緩めて再検討します（Ex. 凍結融解5回→3回、室温→氷冷）。

安定性 DG内でのQ&A

安定性評価の際の保存サンプル数は？

C

参加者C

2倍以上の測定ができるように予備サンプルを準備します。

D

参加者D

最高で2回再分析することになるので、それに備えて調製します。

安定性 DG内でのQ&A

不安定だと想定されるものを扱う際の留意事項は？

E

参加者E

まず室温安定性24時間を検討し、基準を満たさないようなら、時間を短くしたり、氷上での取り扱いに変更したりします。

F

参加者F

低吸着チューブやチップの使用により、吸着のケアをすることもあります。

安定性 DG内でのQ&A

安定性の初期値が基準内ではあるものの、低い場合の対応は？

A

参加者A

TKの場合は初期値との比較ではないので、問題ないと考えます。

B

参加者B

初期値の基準を $\pm 10\%$ とするケースがありました。

過去のDG活動：安定性について

- 評価方法について

- DG2014-12 LBAを用いる定量（PK/Biomarker）

- 4.1 バリデーション試験において評価すべき項目

- 評価する安定性条件・期間

- 安定性試料が偶発的に基準を満たさなかった場合の対応方法



ト ラ ブ ル シ ュ ー テ ィ ン グ

<http://bioanalysisforum.jp/>

トラブル時の確認事項

【分析結果の異常】

全体的なシグナル異常

考えられる要因	対応方法
試薬の添加忘れ・操作ミス	チューブ残量を確認
プレートに問題がある (コーティング不良等)	プレートのロットを変更
混和不足	混和時間、振とう数を確認
試薬の失活	試薬の使用期限、適切な温度管理に 注意を払う

トラブル時の確認事項

【分析結果の異常】

値のばらつき

考えられる要因	対応方法
ピペッティング操作	ピペッティング回数、採取量を確認
操作のムラ	添加時間や添加の順番を揃える
ほこり、プレートの傷	ほこり等が入らないような環境整備
コンタミ	操作時に液の跳ね等がないよう気を付ける
ウェルの乾燥	プレートシールを貼る 素早く添加する
インキュベート時の温度ムラ	添加する試薬は常温に戻す

トラブル時の確認事項

【操作時のトラブル】

トラブル	対応方法
操作時にチップが外れる	クリップチップの使用
プレートシールをはがす際に中の液が飛んでしまう	操作時に注意を払う

過去のDG活動：トラブルシューティングについて

- DG2018-39 LBAの失敗&トラブル事例と解決策