

DG2024-67

ADA 測定

「虎の巻」を作成する会





Discussion Group (DG) members

Name	Company
大塚 之博 (リーダー) <i>Yukihiro Otsuka</i>	積水メディカル株式会社 <i>Sekisui Medical Co., Ltd.</i>
小島 知子 <i>Tomoko Kojima</i>	株式会社サンプラネット <i>Sunplanet Co., Ltd.</i>
小宮 薫 <i>Kaoru Komiya</i>	シミックファーマサイエンス株式会社 <i>CMIC Pharma Science Co., Ltd.</i>
中沢 庸徳 <i>Tsunenori Nakazawa</i>	第一三共株式会社 <i>Daiichi Sankyo Co., Ltd.</i>
森原 元彦 <i>Motohiko Morihara</i>	小野薬品工業株式会社 <i>Ono Pharmaceutical Co., Ltd.</i>
原 久典 (オブザーバー) <i>Hisanori Hara</i>	<i>B2S Life Sciences</i>



活動の内容

- May 2024
 - ✓ メンバー募集
- 31 May 2024
 - ✓ キックオフミーティング
- Jun 2024~Feb 2025
 - ✓ 虎の巻作成
- 11 Oct 2024
 - ✓ F2F
- Oct 2024~Feb 2025
 - ✓ 要旨・ポスター作成

本発表における資料等に対する調査はDGメンバーがおこなったものである。
正しくは元の資料等を参照されたい。

**Disclaimer: Opinions expressed are solely my own and do not
express the views or opinions of my employer**

本DGの目的や背景

ADA測定については、Japan Bioanalysis Forum (JBF) Discussion Group (DG) で複数回議論されており、昨年のDG (DG2023-60) では「ADA測定のライフサイクルマネジメント」に関するアンケート調査を行い、シンポジウムのポスター発表でも活発な意見交換が行われました。2024年2月には、国内のガイドライン案が公示され、ADA測定への関心が今後、一層高まると予想されます。当DGでは、ADA測定の実務的な課題と経験を共有し、科学面を重視した対処法を検討・協議し、そのノウハウを「虎の巻」としてまとめました。



16th JBF Symposium, 2025

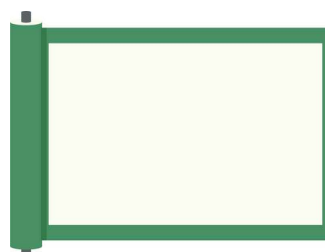


各アイコンの説明

虎の巻
(DGメンバーが協
議した内容をまとめ
たもの)



意見募集



アンケート



ガイドライン



論文



JBFシンポ講演会





Index

番外編：Confitのシンポジウム参加登録時に寄せられた
ADA/NAb関連の質問へのサポートコーナーが最後にあります！

タイトル	ページ	キーワード
測定法構築 (method development) について	7~20	一から測定法を構築するときの手順
重要試薬はどのように整理する？	21, 22	ロットの更新・変更の対応
陰性対照ロット違いの同等性評価	23-25	新旧ロット比較でのトラブル対応
陽性対照の選択	26-28	ご意見募集、論文紹介
標準物質ロット変更で確認試験は必要？	29	不要の意見が多い
Sensitivity 100 ng/mL が達成できない？	30	必達ではないが、できない説明は必要
ADAやNAbのバリデーション開始時期は？	31	MoA次第、免疫疾患は早めに手当て
カットポイント設定についての色々なこと	32~43	試料確保できず、適応疾患違い、バリ 問題なし検体測定で全部陰性大丈夫？
Drug Tolerance で確認した濃度を超えたとき	44~46	あわてず対応を考えましょう
併用薬の影響をどこまで評価しますか？	47~49	アプローチ法、科学的考察も含め
クロスバリデーション（比較試験）は実施？	50, 51	同じ検体でPosi/Neg判定一致したい
ADA測定は 3 step必要？	52	バリデーション必須だが検体測定は？
S/N比を用いた評価の有用性について	53~58	最近、海外で議論が進んでいること
FPR（偽陽性率）で困った！	59~76	カットポイント設定方や外れ値検定
非臨床ADA測定（臨床との違い）	77~80	最近、海外で議論が進んでいること

測定法構築 (*method development*) について



ADA測定法検討の標準的手順はあるか？

- ✓ 経験に基づく工夫が測定法開発成功の鍵になる
- ✓ アッセイプラットフォームは ECL を採用することが多い
(ELISA は低コストだがバックグラウンド低減などに苦勞する印象)
- ✓ Soluble Targetの存在など, 周辺の Biology を理解しておく

測定法構築 (method development) について



ADA測定法が確立できない時のトラブルシューティング

1. MRD の変更
2. 重要試薬の変更
3. バックグラウンドが高値 ⇒ ブロッキング剤, バッファー組成を変更
4. インキュベーションの温度を上げる
5. インキュベーション時間を長くする
6. ブリッジング法⇒ステップワイズのサンドイッチに切替える
7. 測定キットの変更
8. アッセイプラットフォームの変更 (例 : ECL ⇒ ELISA)
9. アッセイメソッドの変更 (ブリッジング ⇒ ステップワイズ)



※受託試験等で、提供された測定法が再現されない場合も上記対応をとる



測定法構築 (method development) について

検体測定までの流れ

※2024年度は分析法構築に焦点を当てています。

分析法構築

- ・固相、検出抗体の種類
- ・抗体の至適濃度
- ・MRDなどを検討

分析法バリデーション

- ・再現性
- ・選択性
- ・カットポイント算出など

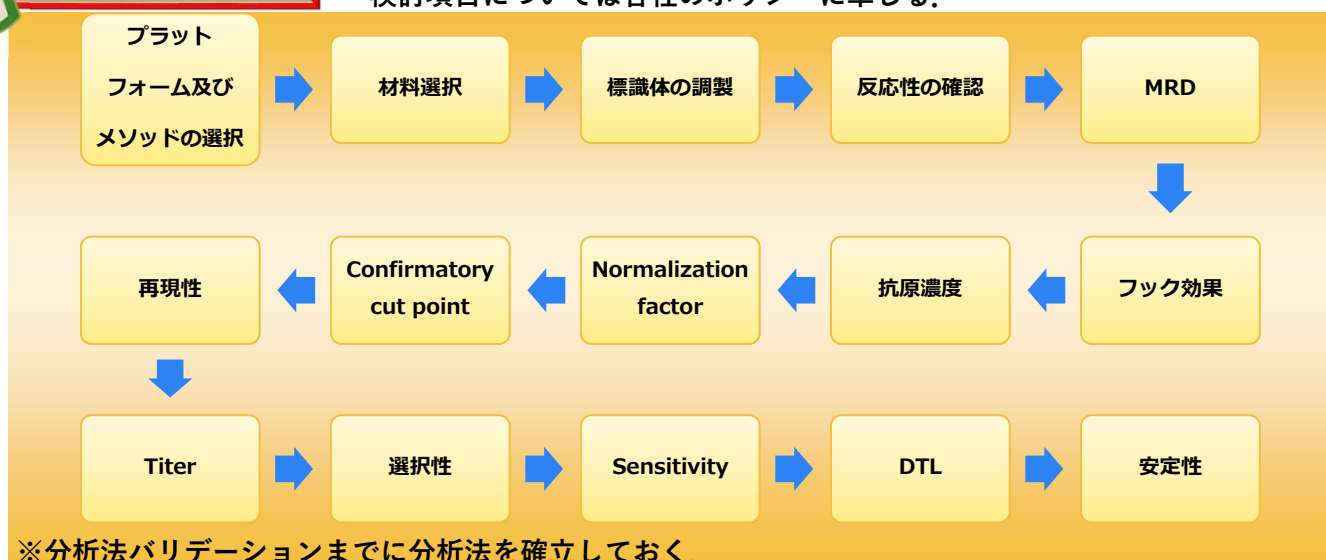
検体分析

- ・ Screening assay
- ・ Confirmatory assay
- ・ Titer assay



分析法構築フロー

※フローの一例を示す。
検討項目については各社のポリシーに準じる。



※分析法バリデーションまでに分析法を確立しておく。

測定法構築 (method development) について



アッセイプラットフォームの選択

- ✓ ECL又はELISA

※感度、経験や予算を基にアッセイプラットフォームを選択。

アッセイメソッドの選択

- ✓ ブリッジング又はステップワイズ

※どちらがいいか決まりは無い。

ブリッジングが上手くいかなかった場合、ステップワイズにすると改善するかも。

材料の選択

「陽性対照の選択: P.26-28」参照

陽性対照 :

- ✓ ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも可（特に指定は無い）。
- ただし、可能な限り両者を準備するのがおすすめ。

二次抗体 :

抗体の選択から始める場合、以下の点に注意。

- ✓ 使用予定抗体とマトリックスとの交差反応性
- ✓ 固相抗体と検出抗体の組み合わせ
- ✓ 二次抗体と固相抗体の反応性

※使用前に交差反応性について調べておく！

測定法構築 (method development) について



試薬の選択

ブロッキング剤 :

- ✓ Bovine serum albumin (BSA) (1~3%)
- ✓ Casein(1%)
- ✓ スkimミルク(5%)
- ✓ Blocker A (ECL用)

抗体(抗原)の標識化

市販の標識化キットを使用して, ビオチン, HRP等の標識化を実施

- ✓ ELISA : ビオチン標識、HRP標識、ジゴキシゲニン標識
- ✓ ECL : ビオチン標識、ルテニウム標識

キット種類	メーカー
HRP標識化キット	同仁化学
ビオチン化キット	Thermo
ビオチン化キット	同仁化学
ルテニウム化キット	MSD

※ 標識対象の溶媒に妨害物質が入っている可能性があるので、
標識化反応前のBuffer置換を限外ろ過カラム等を使用して実施することを忘れずに！

測定法構築 (method development) について



至適濃度の確認

※検討時は一重測定 or 二重測定の縛りは無い

- ・ 標識後、反応性を確認し、標識抗原の調製濃度を決定する。

例) デザイン :

- ✓ 標識抗原 (3濃度, 例 : 0.1~3 $\mu\text{g/mL}$)
- ✓ 陽性対照試料 (0を含む4濃度)

検討時基準 :

- ✓ 反応性試料の吸光度等が濃度依存的な推移を示す
- ✓ S/Nが高い標識体の組み合わせ
- ✓ S/Nが高い濃度の組み合わせ

※シグナル, 吸光度が出ない! $\Rightarrow$ 抗体再検討

※以降の検討項目は, 本項で決定した条件で実施.

Minimum required dilution (MRD)

- ・ マトリックスの影響を減らすため、前処理として緩衝液で試料を希釈する
目安としてMRD100を超えないようにしましょう (FDA2019ガイダンス参照)

例) デザイン :

- ✓ マトリックス含有率 (0を含む4希釈倍率)
- ✓ 陽性対照試料 (0を含む4濃度)

検討時基準 :

- ✓ マトリックス添加とマトリックス未添加の吸光度等を比較して
差が小さい希釈倍率を選択

測定法構築 (method development) について



フック効果

- ・ 陽性対照濃度が非常に高い場合に、レスポンスが抑制される現象

例) デザイン :

- ✓ フック効果試料 (0を含む10濃度)

検討時基準 :

- ✓ 高濃度域の試料においてレスポンスの抑制が発生しないこと

抗原濃度

- ・ 十分な免疫除去ができる抗原濃度を決める

例) デザイン :

- ✓ 抗原添加前陽性対照試料 (0含む3濃度)

- ✓ 抗原 (0含む10濃度)

検討時基準 :

- ✓ 阻害率がネガティブコントロールと同等まで下がる抗原濃度を選択する

※ 選択した抗原濃度において、抗原の全量及び使用量を鑑みて抗原溶液が調製可能であること。

測定法構築 (method development) について



Normalization factor

- ・各回のCorrection factor算出後, Normalization factor (NF) 算出.
ネガティブコントロール試料の平均値とNFよりScreening cut pointを算出.

例) デザイン :

- ✓ NF試料 (個体別ブランクマトリックス, 臨床: 50例, 非臨床: 20例)
- ✓ ネガティブコントロール試料
- ✓ 3回測定

検討時基準 :

- ✓ 分析値の場合 : $NF > 0$
- ✓ S/NまたはLog (S/N) の場合 : $NF > 1$
- ✓ NC試料の分析値 or S/N or Log (S/N) のCV : 20.0%以下

Confirmatory cut point

- ・抗原添加試料を複数回分析し, 各個体の阻害率からConfirmatory cut point算出

例) デザイン :

- ✓ NF試料 (個体別ブランクマトリックス, 臨床: 50例, 非臨床: 20例)
- ✓ ネガティブコントロール試料
- ✓ 3回測定

検討時基準 :

- ✓ Confirmatory cut point $> 0\%$

測定法構築 (method development) について



分析単位内・単位間再現性

※評価回数については, 1回 or 2回以上などの縛りは無い

- ・ 分析単位内及び分析単位間再現性として複数濃度の陽性対照試料のレスポンスの再現性を確認する.

例) <Screening assay>

デザイン :

- ✓ ネガティブコントロール試料 (n=3)
- ✓ ポジティブコントロール試料 (2濃度, 各濃度n=3)

検討時基準 :

- ✓ CV : 20.0%以下

<Confirmatory assay>

デザイン :

- ✓ ポジティブコントロール試料 (2濃度, 各濃度n=3)
- ✓ 抗原添加ポジティブコントロール試料(2濃度, 各濃度n=3)

基準 :

- ✓ 阻害率のCV : 20.0%以下

※バッチ間差が大きい! ⇒手技の見直し

測定法構築 (method development) について



選択性

- ・ブランクマトリックス中に潜在的な妨害物質が存在する条件下で、レスポンスに影響が無いか確認する。

例) デザイン :

- ✓ ネガティブコントロール試料 (n=3)
- ✓ 選択性試料 (0を含む3濃度, 健常人 : 男女各5例, 全10例)
- ✓ 溶血及び高脂血症 (各1例, 各濃度 n=1)

基準 :

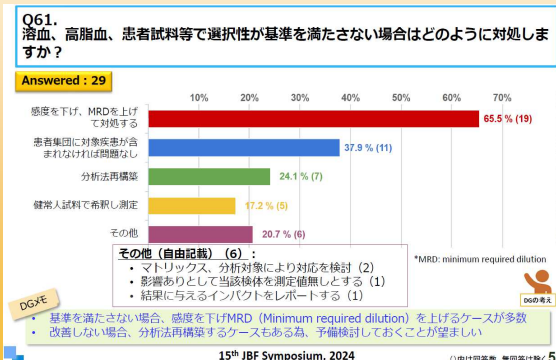
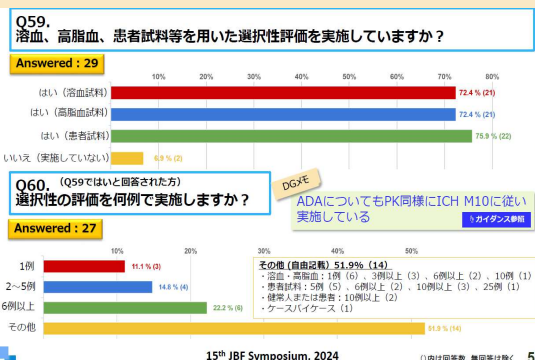
- ✓ 乖離度* : $\pm 20.0\%$ 以内

(*: 各個体の選択性試料の分析値と対応する濃度の陽性対照試料の分析値)

- ✓ 各濃度少なくとも80%が基準を満たす。

基準不適! $\Rightarrow$ MRDの再検討

昨年のDGアンケート* 集計結果



*JBF DG2023-60

<https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

16th JBF Symposium, 2025

測定法構築 (method development) について



Titer assay

- ・ 複数濃度の陽性対照試料と抗体価に濃度依存性があるかを確認する。

例) デザイン :

- ✓ ネガティブコントロール試料 (n=3)
- ✓ Titer assay試料 (10希釈濃度, 各n=1)
- ✓ 測定回数3回

基準 :

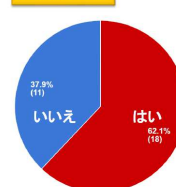
- ✓ 複数回測定の各測定バッチにおける分析値がScreening cut point以上となる試料のうち、最大の希釈倍率を抗体価とする。
なお、Screening cut point未満の分析値を示した試料の希釈倍率を超える希釈倍率は対象外とする。

昨年のDGアンケート* 集計結果



Q69. 抗体力価(Titer)を算出するときにMinimum required dilution (MRD)で補正しますか？

Answered : 29



FDA Immunogenicity Guidance 2019

D. Validation of Titration Assay

The cut-point of the titration assay may be the same as or different from that of the screening assay.

When a titration assay specific cut-point is used, it should be validated. When the titration assay is not used for screening, the cut-point may be established using a 0.1% false-positive rate. When the titration assay is used for screening (for example, when the subject population has a high incidence of pre-existing ADA), the cut-point should be established using a 5% false-positive rate.

K. Reporting Results for Qualitative and Quasi-Quantitative Assays

All sample dilutions, such as the MRD and acid dissociations, should be factored into the calculations of titers and provided when reporting titers.

15th JBF Symposium, 2024

①内は回答数、無回答は除く 59

*JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

16th JBF Symposium, 2025

測定法構築 (method development) について



Sensitivity

- ・陽性対照試料がScreening assayにおいて、陽性となる最小濃度を確認する。

例) デザイン :

- ✓ネガティブコントロール試料 (n=3)
- ✓Sensitivity試料 (10希釈濃度, 各n=1)
- ✓測定回数3回

基準 :

- ✓3回測定の各バッチにおける分析値がScreening cut point (ScCP) 以上となる試料のうち、最小濃度をPreliminary sensitivityとする。
3回のうち最大の濃度をSensitivityとする。
なお、ScCP未満の分析値を示した最大濃度のSensitivity試料よりも下の濃度の試料は対象外とする。

推奨感度

非臨床 : マトリックス中濃度500 ng/mL

臨床 : マトリックス中濃度100 ng/mL

*JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

16th JBF Symposium, 2025

測定法構築 (method development) について



Drug tolerance limit (DTL)

- 共存薬物の影響受けて陽性対照試料を検出することが可能な共存薬物の限界濃度値を確認する。

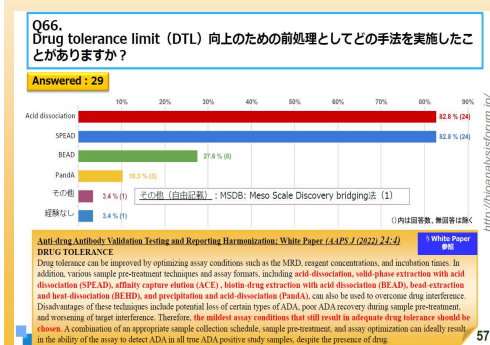
例) デザイン:

- ✓ ネガティブコントロール試料 (n=3)
- ✓ DTL試料 (3濃度, 各濃度 n=1)
- ✓ 測定回数3回

基準:

- ✓ 乖離度: $\pm 20.0\%$ 以内
- ✓ 分析値がScCP以上となる試料のうち, 最高濃度の抗原物質濃度をDTLとする。なお, ScCP未満の分析値を示した試料の抗原物質濃度を超える濃度の試料は対象外とする。

DTL改善の手法: 過去DG*の内容



Japan Bioanalysis Forum

JBBF ADA各種分析手法 Pros/Cons (1/2)

分析法	Pros	Cons
Bridging法	- 測定系構築が簡単 - 実施経験が多い	DTLが得にくい
酸解離法	- Bridging法より高いDTLが得られる - 実施経験が多い	- 酸の影響を受ける場合がある - pH中和時にFree DrugとADAが再結合する可能性
HISDA法	- 酸を使用しないため抗体の変性が起こりにくい - 中和操作が無く、前処理操作が簡便	実施経験が少ない
ACE法	- 酸解離法より高いDTLが得られる - 系によっては標識抗体が一種類でよい	- 酸の影響を受ける場合がある - pH中和時にFree DrugとADAが再結合する可能性

Japan Bioanalysis Forum

JBBF ADA各種分析手法 Pros/Cons (2/2)

分析法	Pros	Cons
SPEAD法	酸解離法より高いDTLが得られる	- 酸の影響を受ける場合がある - pH中和時にFree DrugとADAが再結合する可能性
BEAD法	SPEAD法より高いDTLが得られる	- 新規技術であり経験が少ない - 前処理が煩雑で測定法構築に時間がかかる - 条件検討が必要 - ビーズ試薬が高価
PandA法	SPEAD法より高いDTLが得られる	- 新規技術であり経験が少ない - 前処理が煩雑で測定法構築に時間がかかる - PEGのロットによってばらつき可能性 - 条件検討が必要 - 米国では特許に抵触する (2018年に調べた情報)

*JBBF DG2021-51 https://bioanalysisforum.jp/images/2022_13thJBFS/DG2021-51.pdf

16th JBBF Symposium, 2025

測定法構築 (method development) について



安定性

・検体の取扱い条件での安定性を担保する。

例) 条件:

- ✓ 室温 (1条件), 冷蔵 (1条件), 凍結保存 (2条件)
- ✓ 凍結融解 (3~6回)
- ✓ デザイン: 安定性試料 (2濃度, 各n=3)
- ✓ 許容基準: 残存率*: $\pm 20.0\%$ 以内 (*S/N比等)

昨年のDGアンケート** 集計結果

抗体治療薬の4つの臨床試験からのADAサンプルが、 -80°C 長期保管 (1~10年)、 4°C 、 22°C 、 37°C 短期保管 (24時間~2週間) 後も安定で、16回の凍結融解後も安定だった (AAPS J 27, 45 (2025))。ADAの安定性は、その抗原特異性に関わらず同じであると仮定する (J Pharm Biomed Anal. 2008;48(5):1267-81) と、一般論としてADAは安定とさえそうです。



JBF バリデーション: 安定性

Q62. ADA測定法バリデーションで、陽性対照の生体試料中安定性の評価を実施しますか?

Answered: 29



Q63. (Q62ではいいと回答された方) どのような安定性を評価しますか?

Answered: 22



15th JBF Symposium, 2024

()内は回答数、無回答は除く 54

Q65. (Q62でいいと回答された方)

陽性対照の生体内安定性評価を実施しない理由を教えてください。

Answered: 7

自由記載、一部抜粋

- ・陽性対照の安定性はヒトのADAの安定性を担保するものではないため (2)
- ・一般的な抗体の安定性と同等と判断。懸念はないはず (2)
- ・委託者からリクエストされていない (2)
- ・過去に5年間の保存安定性評価をしたことがあるが問題無かったため (1)
- ・参考値としての取り扱いにしかないため、nice to haveとしている (1)
- ・ADAバリデーションの期間を超えて陽性対照の安定性評価を実施しているため (1)

FDA Immunogenicity Guidance 2019

H. Robustness and Sample Stability

FDA recommends that sponsors minimize freeze-thaw cycles by appropriately aliquoting subjects' samples because freezing and thawing such samples may also affect assay results. However, studies evaluating short-term stability, including, as relevant, freeze-thaw cycle and refrigerator- and room-temperature stability of positive control antibodies, may be useful.

15th JBF Symposium, 2024

()内は回答数、無回答は除く 55

**JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

16th JBF Symposium, 2025

重要試薬はどのように整理する？

ロットの更新・変更の対応

- ・更新の方法と更新時の基準を予め定めておく
- ・陰性対照試料のロット更新は、カットポイントの再設定を行う
- ・有効期間を予め設定するか、実試料分析において陽性対照試料のレスポンスを継続的に確認することで、使用期間中の安定性を確認することが有用
- ・市販品であっても反応性に差が出るケースがあるため、陰性対照のシグナルや全体的なパフォーマンスに注視する必要がある

昨今のDGでの検討比較

DG2022-56 (LBAのライフサイクルマネジメント, P69) においては、重要試薬のロット変更時にカットポイント及びDTLを再評価することが望ましいとしていたが、DG2023-60アンケート結果 (ADA測定のライフサイクルマネジメント, P39) では、実際に再評価しているという回答は少なかった。

ADAにおいて、重要試薬はレスポンス、陽性/陰性判定に直結するためカットポイント及びDTLを再評価するのが理想だが、測定系に合わせて適切な実施方法・評価方法で確認することも可能と考えられるという意見もDG内で多く挙げられた。



「重要試薬」とは

- 抗薬物抗体分析に用いられる重要試薬
- ・陽性対照物質 (抗薬物抗体)
 - ・陰性対照試料 (健康人あるいは患者の混合血清/血漿試料等)
 - ・標識した薬物等

ADA評価ではシグナルの変化が判定にクリティカルに影響するため、新旧ロットを用いて評価をするべきですね。

ロット変更時の対応は？
試薬の活性が落ちたため、ロット変更をした。
シグナルが多少変化しても、陽性/陰性の判定が覆らなければ変更する必要はない？



使用期限の管理はどうしている？
QC試料などアッセイパフォーマンスから総合的に判断し、延長対応することが望ましいですね。

重要試薬はどのように整理する？



- 試薬の製造、ラベリング、保管、使用の一貫性は、試薬ロットの切替において重要
適切な試薬管理をするために、文書化されたプロセスが推奨される
- 経時的なバラツキは、試験間および試験内に存在する可能性があり、根本的な原因
は特定されていない
- 試験法のバラツキは最終的なADA発症率の決定には影響しないかもしれない
- ロット間のバイアスを調べることを推奨する



2021 15th WRIB (Workshop on Recent Issues in Bioanalysis) White Paper Critical Reagent Assay Comparability

- The consistency of the reagent production, labeling, storage and use are critical to the initial qualification of new reagent lots and to ensure seamless bridging to existing lots. A well documented process is recommended to ensure proper reagent control.
- Lot-to-lot bridging cannot always be expected to be a replicate of current performance. 686 *Bioanalysis* (2022) 14(10) future science group 2021 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: Part 2 White Paper
- Variability within acceptance criteria is observed throughout the life cycle of an assay.
- Variability of performance of assays over time will exist even when additional control parameters are in place, e.g., automated liquid handling. This variability can exist across and within studies, with **no determined singular root cause**.
- Assay variability may not impact the final determination of ADA incidence.
 - For vaccines, change of reagents or other variability can impact final endpoints.
- Variability and bias are different and can have different impacts.
- It is recommended to look for bias between lots.

Hersey S et al., *Bioanalysis*. 2022. doi: 10.4155/bio-2022-0080.

16th JBF Symposium, 2025

陰性対照のロット違いの同等性評価

長期試験の途中で陰性対照がなくなった場合、ロット変更の際の対応は？

ガイダンスでは、陰性対照試料のロット更新が必要となった場合は、カットポイントの再設定を行う、と書かれていますが、実際にはどのような対応が必要？

ロット変更時の確認項目は？
DG2023-60ではPlate Control確認が回答多数だけど、Plate Controlは何を確認すればいいの？

参考：DG2022-56では、陰性対照のロット変更時にはCut point再評価が必要と議論されているが（DG2022-56ポスター、P69）、Cut pointの確認については20%に留まった。Plate control（NC及びPC）の確認が最も多かったため、変更前後の陰性対照の同等性を示すことでCut pointの確認を実施していないケースもあるのではと考えられた。



あらかじめ長期臨床試験での使用量を見越して十分量のNCを準備しておくことが重要です。

ロット切替が生じる場合には、

- ① 個体別マトリックスをスクリーニングし、外れ値の検証（Box Plotなど）
- ② 旧ロットと同等のレスポンスとなるよう確認
- ③ 市販品プールマトリックスを使用する場合、いくつかのロットで事前にレスポンスを確認し、旧ロットと同等のレスポンスを示すロットを選択することが望ましいです。

ロット変更時のPlate Control確認の具体的な手法は、
① NCのレスポンス確認、設定したカットポイントで妥当に評価できることを確認

- ② PCをスパイクし、設定したカットポイント（Floating Cut Point）で妥当に評価できることを確認

陰性対照のロット違いの同等性評価

市販の健常人個別別をプールして調製しています。
外れ値の基準はどうしていますか？

使用していたロットが異常値
になってしまって、新ロット
を調製した場合の対応は？

新旧ロット比較でレスポンス
が違った場合、再調製？
カットポイント再算出？
外れ値設定見直し？

希少マトリックスや疾患マトリッ
クスはどのように確保している？



新旧ロットでレスポンスが変わってしまう場合、
①カットポイントの再設定
②外れ値除外基準の再設定
などが必要



旧ロットが異常値となる原因を
探る必要がありますね。
原因次第では、評価系の見直し
が必要かもしれません。
設定したカットポイントが妥当
であれば、新ロットを調製し、
妥当性を評価する必要があります。



希少疾患や入手困難なマトリックスの場合、
①健常人マトリックスで代用する
②疾患マトリックスPre-dose検体と健常人マトリックスでレスポ
ンスを比較する
など、Case by caseの対応となる。
ADA評価結果のインパクトやリスクを各社ポリシーで判断する。
社内で（特に早期で）正しい判断ができるようにBioanalystが臨
床薬理担当者、プロジェクト関係者に説明&教育する



陰性対照のロット違いの同等性評価

A Systematic Approach for Generation and Qualification of New Lots of Negative Control for Supporting Immunogenicity Assays

2021 B2S Life Sciences

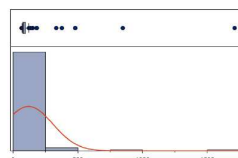


Step1: Matrix Screening

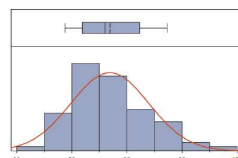
Table 1: Conditions for Screening Individual Matrix Lots

Conditions		Information Provided
PC Antibody Supplementation	Confirmatory Drug Supplementation	
No	No	Signal response similar to negative samples
	Yes	Absence of positive or negative inhibition
Yes	No	Lack of a false negative response
	Yes	Acceptable level of inhibition

Distribution of Individual Matrix Lot Response And Outlier removal



Before Outlier Removal, significant non-normality ($p < 0.001$), skewness = 7.11

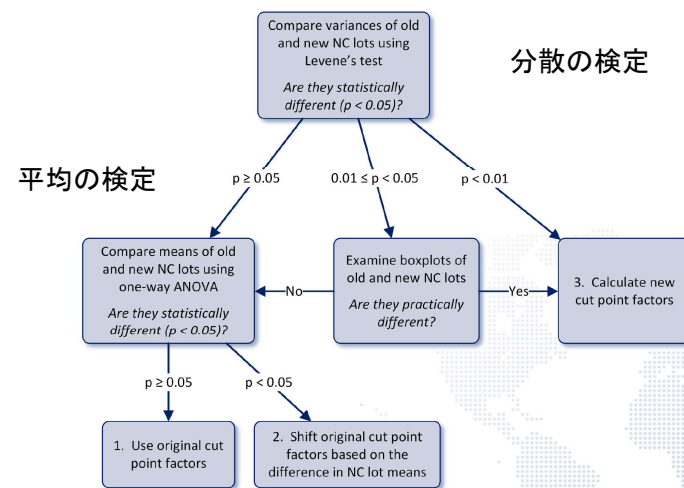


After Outlier Removal, good normality ($p > 0.05$), skewness = 0.63

Step2: New Negative Control Lot Qualification

Unspiked samples of the old and new lot
2analyst x 2Run x Plate Map

Assessment of Cut Point Impact



1. Continue using the original cut point factor
2. Adjust the cut point factor based on the new NC pool performance
3. Determine a new cut point factor

陽性対照の選択

陽性対照が獲得できない場合はどうしたらいいの？



- ✓ 動物免疫で獲得できない場合は、ファージディスプレイなど非動物免疫での作製をトライする
- ✓ 様々な特性を有する抗体（例えば、中和/非中和抗体、エピトープやサブクラスの異なる抗体）を含む陽性対照パネルを準備することも有用である。このようなパネルを用いることで、アッセイ系の分析能をより適切に評価できる

皆さんからも陽性対照が獲得困難なケースの対処法を教えてください！

例 1) ADCのPayload (Domain Specificity評価用) に対する陽性対照

例 2) 核酸医薬品に対する陽性対照

陽性対照の選択



陽性対照として、ポリクローナルAb・モノクローナルAbの使用については、両者の特性を考慮し選択する必要がある



2021 15th WRIB (Workshop on Recent Issues in Bioanalysis) White Paper Challenges with Positive Control Generation for ADA Assays

- PC can help to monitor assay performance but may not represent ADAs in patient samples. Thus, **PC in general may not likely have clinical relevance.**
- **Either a pAb or mAb can be used as a PC;** using a mAb to determine drug tolerance is acceptable.
- Data with **both mAb and pAb PCs**, if used, may need to be provided in the submission. Since **the PC is a surrogate control, clinical samples may behave differently** in terms of sensitivity or drug tolerance.
- **pAb PCs are considered more representative with respect to clinical samples** and preferred to be used in assay characterization. However, **reproducibility issues associated with the new batches may impact assay performance.**
- **mAb PCs** can be the preferred choice for **monitoring assay performance** to support **long-term clinical development and life cycle management**, because of their lot-to-lot consistency.
- Important to establish systematic and organized reagent production processes to deliver quality reagents in time to support assay development.
- Important to have biophysical characterization capabilities to characterize and provide a new lot of reagent that has consistent biophysical characteristics with the previous lot using key QC methods (e.g., LCMS and SEC-MALS)

Hersey S et al., Bioanalysis. 2022. doi: 10.4155/bio-2022-0080.

陽性対照の選択



Table 3. Advantages and Disadvantages for PC Options.

	Advantages	Disadvantages
mAb	- Can obtain a panel of anti-id - Potential to select PCs to assess NAb and binding antibodies - Relatively easy to purify and resupply individual mAbs	- Single mAb as PC will only represent a single epitope with a single affinity - mAb technologies labor intensive
pAb	- Specific for multiple epitopes and potential for a range of affinities - Rabbits typically mount robust antibody responses with a few boosts	- Finite supply; need to pool and store bleeds - Affinity purification may result in loss of low and high antibodies
Antibody display technologies (e.g., phage yeast)	- Can screen for specificity of interest - Can modify affinities by engineering	- Affinities may be low if there is no affinity maturation step implemented - Can exhibit nonspecific binding - Requires antibody engineering expertise
Human purified ADA	Clinically relevant immunogenic epitopes, binding kinetics and isotypes/subclasses	- Need a large pool of donors - Will not be available for early trials - Requires informed consent, scientific rigor and expertise

Table 4. Possible differences between animal-derived PCs and human purified ADA.

Features	Animal-Derived		Human Purified ADA
	mAb	pAb	
Isotypes	Single IgG subclass	IgG isotypes	IgM, IgG144, IgA, IgE
Affinity	Single affinity	A range of affinities after hyperimmunization	Ranges in affinities which may change with time over the course of the immune response
Epitope	Single	Multiple	Multiple
Epitope specificity	Non-conserved human regions in CDR/FW/Fc, non-native structures	Non-conserved human regions in CDR/FW/Fc, non-native structures	Variable regions (residual mouse or amino acid modifications), non-native structures

Hersey S et al., Bioanalysis. 2022. doi: 10.4155/bio-2022-0080.

標準物質のロット変更で確認試験必要？

ロットが変わった際の対応はどのようにしたらよいですか？

ガイダンスでは、原薬製造方法が変更された場合、抗原性が変化する可能性があるため、必要な場合には抗薬物抗体に用いる結合試薬や確認アッセイに用いる薬物についても再調製し評価系を再構築する、と記載されています



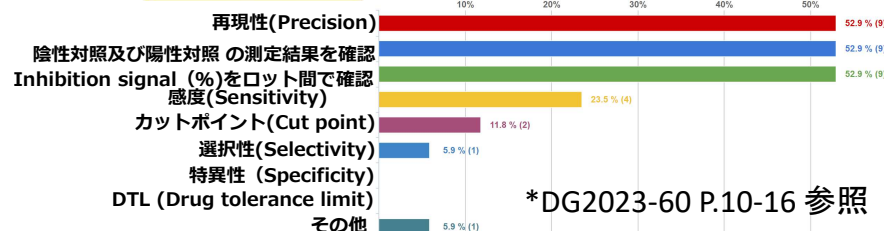
ガイダンスには製品のロット変更（製造プロセスの変更等）の際の不純物に対するADAの評価の実施がうたわれており、標準物質といえども製造法やロット変更に伴う不純物やその組成等の測定系への影響については配慮することが望ましいと考えられます。



DG2023-60アンケートでは、ロット変更時の確認試験は実施していない方が多数でした。理由としては、試験成績書で品質が保証されていることや、ADA測定での使用用途はDTL評価時の添加物質、Confirmation assay実施時の阻害試薬であり、ADA分析へのロット変更の影響は少ないと考えるためです。



Answered : 17



*DG2023-60 P.10-16 参照

*JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

16th JBF Symposium, 2025

Sensitivity 100ng/mL 達成できない？

Sensitivity 100ng/mLが達成できないときはどうしますか？



100ng/mLに科学的な根拠はなく、努力目標（目安）であると考えましょう
但し、達成しない場合は理由や妥当性、臨床的意義を説明することが求められる可能性があります

ご意見募集中

NAbはガイダンスに達成が困難な場合の記載があります。努力の形跡を見せつつ、納得感のある説明を行うことになるが、このような経験された方はご意見ください

参考：FDA/EMAガイダンス

- ✓ 設定されたカットポイントにおいて、陽性対照物質を検出できる限界のレベルとして100 ng/mL の抗薬物抗体を検出できる感度が推奨されている
- ✓ サロゲートである陽性対照物質の検出感度であり、陽性対照物質の特性、特に薬物との結合親和性により得られる値が異なることに注意が必要

ADAやNAbのバリデーション開始時期で困った！

ADAやNAbのバリデーション試験はいつまでに実施したらよいですか？



当局ガイドラインには規定されていません。各社が、どのタイミングで、どのような判断をするかにより決まります。MoA等から、ADAが生成し薬効や安全性への影響があるときには実施時期を早める必要があります。免疫疾患、リウマチなどはADAが出来やすい可能性があります。NAb測定法のセルベースアッセイなどはCMC/臨床薬理/Bioanalysisが連携する必要がありますが、どの部署が主導するかは各社で違うようです

昨年のDGアンケート*Q56集計結果より



Q56. 臨床ADA測定法バリデーション実施時期（検討開始時期）はいつ頃ですか？

Answered : 38



- ✓ 臨床試験開始 1年前が42%と最も多い回答
- ✓ 陽性対照の準備は前倒して実施という意見もあり

*JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

16th JBF Symposium, 2025

カットポイント設定用の試料数が確保できない時の対応は？

試料数が確保できません
どうしましょう？



ガイダンス（以下、FDAガイダンス抜粋）では $n=50$ 以上を推奨していますが、目安であり、必須という考え方はしなくても大丈夫です。実際に、試料数が不足していても入手できたものでカットポイントを算出したことはあります。 n 数が多い方がよいので、 n 数の確保（ $n=50$ を目安）に努めるべきです。バリデーションは健常者検体を使用するのが一般的なため、購入を検討しましょう。疾患患者検体は入手困難なこともあり、 n 数は少ないときもあります。臨床試験での投与前検体を用いてカットポイントを設定することもできます。



Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products — Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection

Guidance for Industry

<https://www.fda.gov/media/119788/download>

2. Cut-Point of Screening Assay

The cut-point should be determined statistically with an appropriate number of treatment-naïve samples, generally around 50, from the subject population. Each sample should be tested by at least two analysts on at least three different days for a total of at least six individual measurements. One approach that allows for high assurance of a 5% false-positive rate is to apply a 90% one-sided lower confidence interval for the 95th percentile of the negative control population (Shen et al. 2015). This will assure at least a 5% false-positive rate with a 90% confidence level. This approach improves the probability of the assay identifying all subjects who may develop antibodies. When using the approach published by Shen et al., the reportable value for each sample should be the average of the six measurements. The statistical method used to determine the cut-point should be based on the statistical distribution of the data. For example, the 95th percentile of the normal distribution is estimated by the mean plus 1.645 standard deviation. Other approaches may be used for estimating 95th percentile, including the use of median and median absolute deviation value instead of mean and standard deviation.

カットポイント設定用の試料数が確保できない時の対応は？

正規性がある場合、カットポイント算出式は正規分布に従っていますが、検体数が少ない場合、正規分布を前提とした算出式でカットポイントを求めることは不適切ではないかと疑問を持っています。t 分布は30例以上でほぼ正規分布と重なることから、30例未満では t 分布に基づいた算出式を適応してカットポイントを求めるのはいかがでしょう



例数に関係なく、正規性が確認できた場合は正規分布に従った算出式を使うのはどうでしょう。n=50にこだわりすぎかもしれません。n=50であれば、絶対大丈夫ということでもなく、確率の問題です。バリデーションで、市販の疾患患者のマトリクスで評価したら、健常者検体との差を比べることはできるので、偽陰性となるリスクを減らせる可能性はありますが、実際の検体測定試験で疾患患者検体を測定するときのリスクはゼロにならないので、実施の可否は状況に応じて判断するしかありません。なお、基本的にLog変換して正規性を評価するのでよいでしょう。Log変換無しで正規性が確認されれば、Log変換後も正規性が維持される可能性が高いと考えられます

カットポイントは市販品、治験検体どちらで設定？

市販品か治験検体
どちらを選択したほうが
いいですか？



まず最初に、市販品の健常者又は疾患患者検体（入手可能であれば）を使用し、バリデーションでそれぞれのカットポイントを設定するのが好ましいです。治験検体の測定試験では、基本的にバリデーションで設定したカットポイントを使用しますが、適応疾患によってはバリデーションで設定したカットポイントが適切でない場合もあります。この場合、治験の投与前検体を用いてカットポイントの再設定が必要になることがあります。

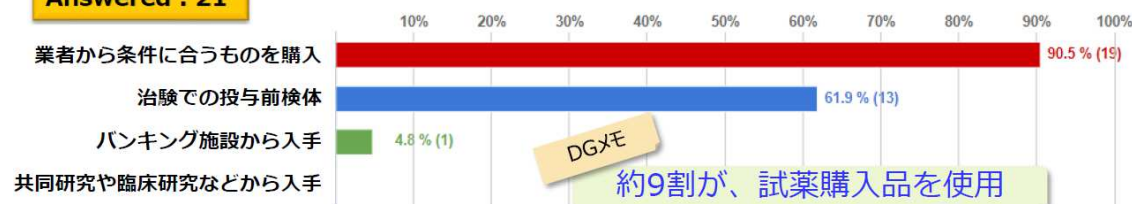
カットポイントは市販品、治験検体どちらで設定？

昨年のDGアンケート Q85、Q89集計結果



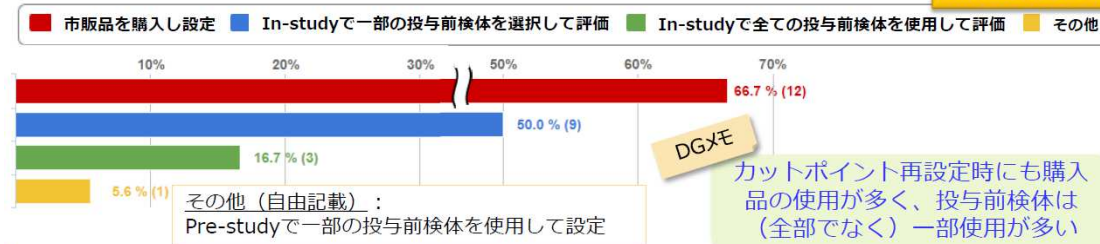
Q85. (Q83ではいと回答された方) 患者試料はどのように入手しましたか？

Answered : 21



Q89. (Q87でカットポイントを評価すると回答された方) 患者試料でのカットポイントの設定を具体的にどのように実施しますか？

Answered : 18



がん種によりカットポイントが異なることはあるか？

がん種によりカットポイント設定に影響が異なることはありますか？



内因性蛋白質などの量が異なるときには、影響する可能性があるかもしれません。がんの治験に参加する患者さんは、複数疾患に罹患されている場合や、複数薬剤の投薬歴があることもあるため、測定値に与える因子が特定できず、カットポイントを設定できないという事象もあるようです。

2024年のJBFシンポジウムの抗薬物抗体（ADA）評価・抗薬物抗体測定におけるカットポイント設定の課題【Establishing Appropriate Immunogenicity Assay Cut Points in Oncology Disease Indications】*にて、次ページの報告がされました。がん種毎にADA アッセイのバックグラウンド応答を評価する必要性は低いかもしれません。

がん種毎に評価するのではなく、大まかにがん種を分類分けして（肉腫、癌腫、リンパ腫 etc...）検討してみることもできるかもしれません。

*https://bioanalysisforum.jp/images/2024_15thJBFS/D2-A1-02_JBF15_Michael_Partridge.pdf

がん種によりカットポイントが異なることはあるか？

がん種によりカットポイント設定に影響が異なることはありますか？



2024年のJBFシンポジウムの抗薬物抗体（ADA）評価・抗薬物抗体測定におけるカットポイント設定の課題【Establishing Appropriate Immunogenicity Assay Cut Points in Oncology Disease Indications】資料*から抜粋



Conclusions II

- Data is consistent samples representing a mixture of different biological phenotypes in serum, as opposed to groupings like “NSCLC” or “BCC,” since cancer is a genetic disease.
- Other therapeutic areas (e.g., inflammatory diseases) may have subpopulations that require a specific cut point.
 - Rheumatoid arthritis has a type of autoantibody, rheumatoid factors, that binds to IgGs.
- Populations known to have potential impact on cut point calculations, disease matrix is typically used during validation.
- Sampling variability may contribute to differences in observed positivity (vs. population differences)

The biological differences of indications should be considered when sCPFs are evaluated for and applied to different populations.

For a low-risk mAb, we found that new cut points were not required for each oncology population.

*https://bioanalysisforum.jp/images/2024_15thJBFS/D2-A1-02_JBF15_Michael_Partridge.pdf

がん種によりカットポイントが異なることはあるか？

がん種によりカットポイント設定に影響が異なることはありますか？



昨年のDGアンケート* Q93集計結果



JBF 患者試料

Japan Bioanalysis Forum

Q93. 患者層の違い（Target indication）が結果に与える影響について
ご意見があれば記載ください

Answered : 10

自由記載
(一部抜粋、回答数各1)



分類	アンケート結果	DGメンバーでの議論	DGの考え
患者層、 背景の違い	- リウマチ因子は影響を与える場合が多いため確認する必要がある。 - 患者層によって特有の生体内成分が測定系に影響を及ぼす可能性はやはりあると思います。例えば、ターゲットのタンパクが可溶性の場合、その濃度によって測定結果が異なる可能性などが考えられるため。 - ターゲットタンパク質の濃度の違いがADA分析法に影響を与える。	- ADA分析法が影響を受け易い「疾患」の情報は共有できないか？（例：リウマチ、自己抗体できる疾患） - 結果に与える様々な要因があることがわかった（例：疾患患者血中でのADA生成メカニズムが変化、内因性成分の質、量の違いやターゲットタンパク質濃度がADA分析法に影響）	
同等性が確認でき 事なきを得た	- 陽性率に違いが生じたが、統計解析により、他試験と同等と判断されたため、分析法の再検討には至らなかった。 - 健康人、患者、各シグナルの同等性を確認出来れば、カットポイントは共通のものを使用可能と考える。	同等性を示すためのロジックを示した論文調査は有効（AAPSのWhite paper*に記述あり）*AAPSJ, 2022, 24:4	
経験、今後 に向けて	実際に患者層と健康人でシグナルが異なる傾向にあり、異なる人種の集団でも再現されたのはびっくりした。その疾患がADAの測定にどのように影響を及ぼすのかもっと知見を集める必要があると思います。	FPR (2-11%) で同等性を評価し、違いが生じたらカットポイントの再設定が必要。	

<http://bioanalysisforum.jp/>

15th JBF Symposium, 2024

80

*JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

16th JBF Symposium, 2025

適応疾患拡大でカットポイントを見直す必要がある？

適応疾患が追加される見込みです。カットポイントは見直した方がいいですか？



ADA測定はいろいろな内因性物質の影響を受けます。適応症が変わると患者背景も変わるため、疾患特有の成分による影響を受けてS/Nが変わり、陽性/陰性検出の基準であるカットポイントが変わる可能性があります。ただ、これは実際に検討してみないとわからないですね。

まずはすでに求めているカットポイント（バリデーションや患者群）を用いて測定を開始していいと思われます。ある程度例数が集まってきたら、FPRで評価することや、個別のS/Nの平均/分散を比較するとより確実になります。

なお、Dose adjustmentや開発中止の判断基準等に求められることが想定される場合、臨床試験初期からかなり正確なADAの結果が求められるケースがあります。その場合には、対象となる患者群でのカットポイントを早期に求める方針で進めることが望ましいです。測定結果が臨床試験スケジュールや試験結果の評価に深くかわりますので開発チームとの綿密な打ち合わせが必要になってきます。

最近、ADAをカットポイントではなくS/Nで評価するといった議論が活気を帯びています。そうすると“カットポイントの見直し”といった対応は不要になってくる可能性もあります（必要に応じて対応）。

*JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

16th JBF Symposium, 2025

関連アンケート項目：Q74-78, 83-93

適応疾患拡大でカットポイントを見直す必要がある？



ガイダンスにも、病状によって生体中にあらかじめ存在している抗体の状態が変わる可能性が指摘されており、測定系への影響を考慮する必要があることがうたわれています。

適応症が異なっても、同程度のカットポイントになることも多いかと思いますが、ADA測定結果に影響がないことを説明できるような準備はしておく方がいいと思われます。



<補足> FDA Guidance (Jan 2019)の記載

- *Additionally, the observed incidence of ADA is influenced by multiple factors including method, sample handling, timing of sample collection, concomitant medications, and disease condition.*

• **B. Assay Cut-Point**

The cut-point of the assay is the level of response of the assay that defines the sample response as positive or negative. Information specific to establishing the cut-point for the respective assay types is provided in sections V and VI. Establishing the appropriate cut-point is critical to minimizing the risk of false-negative results.

The cut-point of the assay can be influenced by a myriad of interfering product or matrix components.¹⁸ These components should be considered early on in assay development when defining the cut-point and are discussed in detail in section IV.K. Because samples from different target populations and disease states may have components that can cause the background signal from the assay to vary, different cut-points may be needed for discrete populations.

- *Although pre-existing antibodies to a variety of endogenous proteins are present in healthy individuals, these can be much higher in some disease states. The sponsor should identify those samples with pre-existing antibodies (for example, through competition with drug) and remove them from the cut-point analysis. If subjects in the study have pre-existing antibodies, it may be necessary to assign positive responses using a cut-point based on the difference between individual subject results before and after exposure to identify subjects in whom ADA increases following treatment, also known as treatment-boosted ADA.*

バリデーションは十分な検体数で評価し、きれいにカットポイントの設定ができたけれど、検体測定は全部陰性で大丈夫!?



バリデーション実施時の設定基準を元に考えると考察しやすいと思います。

Screening : 5%

confirmatory : 1%

このくらいの頻度では偽陽性が出る測定系を目指して設定しているので、その程度の割合で陽性が認められていれば、全ての検体で陰性だったとしても科学的に健全な結果と言えると思います。

一方で、Screeningで全く陽性が出ないような場合は、一度測定系を疑ってもいいかもしれません(*)。(確かに本当に測定出来ているの?と疑問に思いたくなりますよね)

臨床試験の検体測定で全部、陰性の結果だけど本当に陰性なの?



追加検討が必要となる場合の検証ポイント(例)

- ✓ 陰性対照の設定がよくない
 - バックが高すぎる?
 - 作り直すのも一案かも
- ✓ 生体試料中に測定系に影響する何ものかが存在している
 - 選択性に不備あり?
 - 測定系の再検討が必要かも

*測定系の他にも、患者群でsoluble targetの濃度が高い等、陽性が検出できないケースとして色々なシナリオが考えられます。複合的に考察することができるともバイオアナリシス担当者の使命です。

参照 : [DG2023-60](#) 関連アンケート項目 : Q74-77, 92-94

バリデーションは十分な検体数で評価し、きれいにカットポイントの設定ができたけれど、検体測定は全部陰性で大丈夫!?



いろいろ検討してもやっぱり全部の検体が陰性になることもあります。

そんなときは、一度原点に戻てみましょう。

全部の検体が陰性となった測定結果を目の前にすると「バリデーションで確立した測定法は臨床検体の測定でもその性能が発揮できているの?」といった疑問がわきますよね。

臨床試験の検体測定で全部、陰性の結果だけど本当に陰性なの?



そんな疑問に対しては、バリデーションで確認（Drug Toleranceも含め総合的に）した測定法が実検体の測定でもきちんと機能していることを客観的に検証しておくことが重要です。

例えば、・・・

カットポイント設定で用いた個別試料と各臨床試験でのBaselineサンプルのS/Nについて平均と分散を比較して、差がないことを示すといった方法も有効と思います。



バリデーションは十分な検体数で評価し、きれいにカットポイントの設定ができたけれど、検体測定は全部陰性で大丈夫!?



検体中のADA陽性／陰性を判定するためにカットポイントが設定されます。しかしながらADA測定法は時として生体内成分の影響を受けることがあるため、本来陽性のものが陰性になってしまうリスクがあります。実際の検体で生じうる影響の可能性を考慮して適切な評価をする必要があります。

生体内成分には個体差や疾患などによりその存在量や種類に差があることが推察されるため、その影響がないことを何らかの形で確認しておくことになります。

あわせて、Soluble targetの影響など薬効メカニズム (Mode of action)などの視点からの考察も必要になってきます。バリデーションが成立してから測定系の検討は続きます。



<補足> FDA Guidance(Jan.2019)の記載

- *of response of the assay that defines the sample response as positive or negative. ... Establishing the appropriate cut-point is critical to minimizing the risk of false-negative results. ... The cut-point of the assay can be influenced by a myriad of interfering product or matrix components. ... samples from different target populations and disease states may have components that can cause the background signal from the assay to vary, different cut-points may be needed for discrete populations.*
- *During assay development, a small number of samples may be used to estimate the cut-point. ...The sponsor should consider the impact of statistically determined outlier values and true-positive samples when establishing the cut-point.*
- *Apparent positive values and samples may derive from the presence of pre-existing antibodies or other serum factors in subject samples. ... Although pre-existing antibodies to a variety of endogenous proteins are present in healthy individuals, these can be much higher in some disease states.*
- *The sponsor should identify those samples with pre-existing antibodies (for example, through competition with drug) and remove them from the cut-point analysis. If subjects in the study have pre-existing antibodies, it may be necessary to assign positive responses using a cut-point based on the difference between individual subject results before and after exposure to identify subjects in whom ADA increases following treatment, also known as treatment-boostered ADA. A common approach to evaluating treatment-boostered ADA responses is to assess changes in antibody titers.*

検体中薬物濃度がバリデーションで確認した Drug Tolerance より高かったけど大丈夫!?

治験検体中薬物濃度が、バリ
で確認したDrug Toleranceの
濃度範囲を上回ったときはど
うしますか？



(\)・・・とはいうものの、あくま
でも“類推”なので実際の臨床検体の濃
度条件下でもADA評価できるような
Drug Toleranceが確保できる測定系の
獲得に向けて検討を続けていくのが望
ましいと思われます。
もうちょっとだけ頑張りましょう！

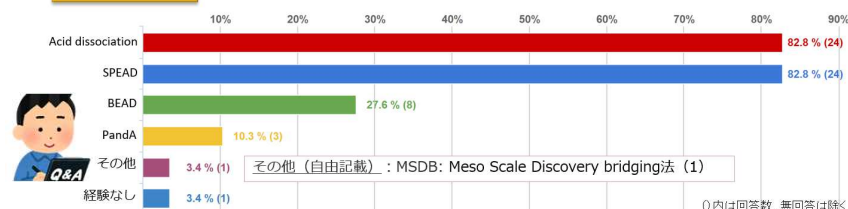


薬物濃度が高い検体でADA陰性と評価されたとき、“ADA
が検出できていない可能性”（偽陰性）を否定することは
ちょっと難しいですね。可能であれば追加バリデーション
で臨床濃度をカバーする高濃度の薬物添加条件で検討を実
施し、評価系に影響がないこと（陽性対照試料が陽性の結
果となる）を確認しておくといいでしょう。

ただ、バリデーションの限界もありますので、高濃度で
のDrug Toleranceが確認できない場合には、同一試験内の
他の被験者や他の時点の結果からその評価時点のADAの生
成量を類推（ADA生成の有無及び最大予想Titer）して、
PK/PDあるいは Safetyのデータと合わせて総合的にADAの
影響を考察するといった対応をとることになります（\)

Q66.
Drug tolerance limit (DTL) 向上のための前処理としてどの手法を実施したこ
とがありますか？

Answered : 29



検体中薬物濃度がバリデーションで確認した Drug Tolerance より高かったけど大丈夫!?

治験検体中薬物濃度が、バリ
で確認したDrug Toleranceの
濃度範囲を上回ったときはど
うしますか？



・・・とはいえ、実際、トラフ時点の検体でバリ
デーション（100 ng/mLの陽性対照で実施）で
評価した濃度をはるかに超える薬物濃度が得られ
ることも少なくないのが現状です。

トラフ薬物濃度に関して100ng/mLをターゲッ
トとしたDrug Toleranceがクリアできなかった際
には、陽性対照濃度100ng/mLから始めて、順次
Sensitivity Levelを引き上げ、トラフ時点の薬物
濃度がほぼカバーできるまでいくつかのレベルで
評価しておくことは有用です（例えば250 ng/mL
など、AAPS 2021 White Paper*より）

どの程度の薬物濃度であればどのPCレベルまで
検出ができるかを示すことができれば、科学的に
適切な評価を実施していることを説明する根拠デ
ータとなります。

* Myler H et al., AAPS J. 2021, doi: 10.1208/s12248-021-00649-y.

検体中薬物濃度がバリデーションで確認した Drug Tolerance より高かったけど大丈夫!? (対処法案)



最初から満足できるDrug Toleranceが取れるとは限らないため、最初はDrug Tolerance評価濃度は決め打ちせざるを得ないのは事実。まずは各人（各社）が有しているノウハウを駆使し実施可能な範囲で測定系を立ち上げることを目指しましょう。

Drug Tolerance 向上には、生体内を動き回る薬物とADAとの結合体を解離させる対応をとります（酸解離など）。ただ、酸性条件下で不安定なものもあるため、慎重に事を進める必要があります。ADAの生成を適切に見極めるという視点からもDrug Toleranceの影響を常に意識することが必要です。



<補足> FDA Guidance(Jan.2019)の記載

FDA recommends that sponsors examine assay drug tolerance early in assay development. The sponsor may examine drug tolerance by deliberately adding different known amounts of positive control antibody into ADA-negative control samples in the absence or presence of different quantities of the therapeutic protein product to determine whether the therapeutic protein product interferes with ADA detection.

Drug tolerance may be improved using approaches such as acid dissociation that disrupt circulating ADA-drug complexes.

For example, acid dissociation may not be appropriate when antibodies are acid labile or the drug target is soluble. Interference from the therapeutic protein product can be minimized by collecting subject samples at trough drug levels. See section VII.A for recommendations regarding the timing of ADA sample collection.



Anti-drug Antibody Validation Testing and Reporting Harmonization; White Paper (AAPS J (2022) 24:4)

DRUG TOLERANCE

Drug tolerance can be improved by optimizing assay conditions such as the MRD, reagent concentrations, and incubation times. In addition, various sample pre-treatment techniques and assay formats, including **acid-dissociation**, **solid-phase extraction with acid dissociation (SPEAD)**, **affinity capture elution (ACE)**, **biotin-drug extraction with acid dissociation (BEAD)**, **bead-extraction and heat-dissociation (BEHD)**, and **precipitation and acid-dissociation (Panda)**, can also be used to overcome drug interference. Disadvantages of these techniques include potential loss of certain types of ADA, poor ADA recovery during sample pre-treatment, and worsening of target interference. Therefore, **the mildest assay conditions that still result in adequate drug tolerance should be chosen**. A combination of an appropriate sample collection schedule, sample pre-treatment, and assay optimization can ideally result in the ability of the assay to detect ADA in all true ADA positive study samples, despite the presence of drug.

White Paper
参照

併用薬が決まった場合、ADA測定への影響を確認すべき？どのような基準で？

併用薬*のADA測定への影響は確認すべきでしょうか？

*併用薬：ここでは、常にその薬物と一緒に服用するもの（一次的な薬物は対象外）と定義



まず、“併用薬”と“測定法”の組み合わせで必要性を考えてはいかがでしょうか。

測定系に影響を及ぼすかどうかポイントになりますので、測定系がLC/MSであれば、イオン抑制が起きるかどうかを評価する。LBAでは重要試薬に反応するような物質（競合するもの）かどうかを考慮する。

科学的に判断できない場合は、実際にMatrixに併用薬を添加して、測定系への影響を評価しておいた方が安心だと思います。

（そうしないと、測定検体が全部陰性になるとか全部陽性になるとかという悩ましい結果が得られてしまうかもしれません。）



Mode of Actionを考え、併用薬によっては、分子間相互作用等も考慮に入れて総合的に判断することも重要なポイントですね。



では、評価法は？

併用薬で予想される最高濃度を添加してADA測定系への影響をみるのが最初のアプローチかと思います。（少なくとも評価予定時点の予測濃度以上）

併用薬添加／非添加の条件でScreeningおよびConfirmatory 評価を実施し、ADAの陽性／陰性の結果が併用薬添加の有無で同じ（例えば80%程度の一致）になることを確認するといった方法が考えられます。

治療の判断、患者の選択等をTiterの値で評価するような場合は、Titerへの影響を調べることも考慮しましょう。

併用薬が決まった場合、ADA測定への影響を確認すべき？ どのような基準で？



併用薬がADA評価系に影響を及ぼす可能性があることがガイダンスにもうたわれています。併用薬の影響を評価せずに測定を進めた場合、偽陽性／偽陰性の結果が得られてしまう可能性が考えられます。



＜補足＞ FDA Guidance (Jan 2019) の記載

- *When possible, negative control samples should be collected from treatment-naïve subjects with the medical condition being studied and should include subjects with similar gender, age, and concomitant medications so that the sample matrix is representative of the study population.*
- *... detection of ADA formation is highly dependent on the sensitivity, specificity, and drug tolerance level of the assay. Additionally, the observed incidence of ADA is influenced by multiple factors including method, sample handling, timing of sample collection, concomitant medications, and disease condition.*
- *Various substances in the matrix, such as free hemoglobin (hemolysis), lipids (lipemia), bilirubin (interus), and presence of concomitant medications, can interfere with assay results.*

併用薬が決まった場合、ADA測定への影響を確認すべき？ どのような基準で？

併用薬のADA測定への影響
を科学的に考察することは
できますか？



ADA評価法で使用している陽性対照（ポジティブコントロール：PC）は、あくまでも“薬物と結合する性質を持つ抗体”（代用指標）であって、実際に薬物を投与してヒトで生成する抗薬物抗体そのものではないことに注意が必要です。

つまり、『薬物への結合親和性』や『薬物に対する認識部位』などはPCと実際に生体内で生成する抗体とでは異なることが想定されるため、現状では実質的にPCを“相対物差し”としてADAの評価を実施せざるを得ません。

そのような評価系の特性だからこそ、偽陰性の結果とならないように、できる範囲で測定系に影響を及ぼす可能性のある因子の評価は実施しておきたいところです。

ADA測定でクロスバリデーション（比較試験）は実施する？

この試験ではADA測定施設が複数ありますよね。
PKのようにクロバリって必要ですか？



FDAガイドラインにも、測定施設間での“Immunogenicity の評価”をしっかりとやるようにうたわれています。個々の試験内で陽性を示した割合を求めたり、陽性率とPK/PDやSafetyとの関連性を評価することになります。

そうすると、複数施設で得られる結果が同じもの（陽性は陽性、陰性は陰性など）であることを確認しておいた方がスッキリしませんか？

ADA評価の特性から、PKのようながっちりした比較試験は実施できないと思われますので、せめて同じ検体で陽性／陰性が同じ結果になることを確かめるという努力はしておいた方がよさそうです。

（自分たちの安心のためにも）



試験法のお勧めは以下の通り。

- ✓ Reference labから、個別のマトリックス他、可能な限り重要試薬をTesting Labに供給して、できるだけ同じ条件下で両施設で測定を実施する
- ✓ NC, LPC, HPCを30程度ずつ測定する
- ✓ それぞれ80%の一致が得られれば同等と判断する

Q82. (Q79で実施したことがあると回答された方)

クロスバリデーション時のクライテリアはどのように設定していますか？

Answered : 6

自由記載 :

- CV:20%以下 (1)
- NC, LPC, HPCのそれぞれで、陽性/陰性の一致率が80%以上 (2)
- 両施設で同一検体を測定し、測定結果が一定割合以上となることを確認 (陽性検体2/3、陰性検体4/5等) (1)
- 基準はない。関係性を比較考察ができれば良い (1)

DMX

ADAのクロスバリデーションの評価項目や基準などが不明確なため、議論の必要がある。



参考: DG2023-60関連アンケート項目: Q79-82

ADA測定でクロスバリデーション（比較試験）は実施する？



陽性・陰性の評価に加え、Titerについても同等性を評価する例もあります。いずれも、ADA測定の原点（目的）に戻り、個々の薬物の特性を考慮した上で必要に応じた対応が望ましいと考えます。

とはいっても、ADAの測定結果のばらつき加減から考えると、複数施設間で同じ結果を示すことを確認できない（同等性が設定基準を満たさない）可能性も十分にあり得ます。

その時は個々の試験内で陽性検体の発生率の傾向や、陽性が認められた当該被験者での安全性や有効性の結果との関連性等を合わせて評価し、総合的に“Immunogenicity”を評価する”という対応も考えられます。



<補足> FDA Guidance (Jan 2019)の記載

A. General Considerations for Assay Validation

Samples derived from pivotal studies should be tested with fully validated assays. At the time of license application, the sponsor should provide data demonstrating that the assays are fully validated. Validation includes assessments that demonstrate that an assay used for measurement of ADA is suitable for the intended purpose. The fundamental parameters for validation include (1) cut-point, (2) sensitivity and drug tolerance, (3) specificity and selectivity, (4) precision, (5) reproducibility³¹ when relevant, (6) robustness of some assay features, and (7) in-use stability of critical reagents.

³¹ *Reproducibility (also called cross-validation) is needed when more than one laboratory will be used to assess samples*

ADA測定効率化： Screening / Confirmatory / Titer 3 step必要？

Screening と Confirmatory Assay
どちらも実施しなければだめ？



バリデーションでは 3 step (screening, confirmatory, titer) の測定系を構築する必要がありますが、検体測定試験で、ほとんどが陽性だったり、検体数が極端に少ないとき等には、2 step (Screening / confirmatory と titer) に変更してもよいかもしれません。海外 (EBFや AAPS) では、3 step 必須でないとの議論がされており、Screening/Confirmatory のどちらを選択すべきかについても議論されています。ADAは Context of use (バイオマーカー思考) で考えるもので、ガイダンスは指標であり、努力目標と考えたらよいのかもしれません。



EBFのWhite paper*では1% FPR の screening assay のみ (confirmationは無し) で、titerは陽性サンプルをカットポイント以下に段階的に希釈して評価することを推奨。また、指摘されたときに力価評価できるよう、検体は保存しておくことを推奨しています

[*https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17576180.2024.2376949#abstract](https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17576180.2024.2376949#abstract)

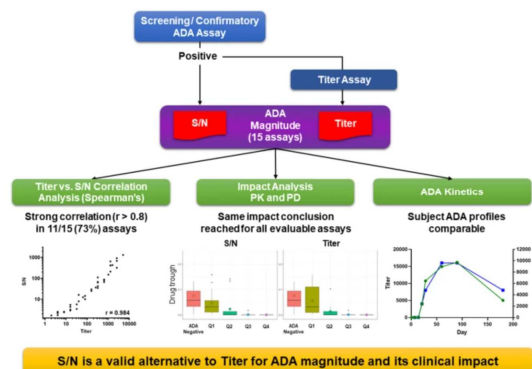
S/N比を用いた評価の有用性について

Titer の代替としてS/N比で評価するのはどうでしょう？



国内のバイオ医薬品の免疫原性評価に関するガイドライン案*では、Titer の代替指標として、Screening アッセイにおける各試料の測定値と陰性対照試料の測定値の比 (S/N 比) の使用について記載していますね。その内容は以下に示します。

- ✓ レスポンスが全般に低い検体のみの場合や、抗薬物抗体レベルの全体の傾向を把握する程度の目的の場合等は S/N 比を使うことが可能
- ✓ フック効果が生じる場合は、S/N 比と Titer が相関しない場合があることに注意
- ✓ 抗薬物抗体レベルとPK, PD, 有害事象等の関連を定量的に考察する際には、Titerを用いることが望ましい



海外でも議論されており、製薬企業としてはS/N比が有用であると考えていますが、科学的妥当性を示す根拠データを模索中のようです。本シンポジウム1日目、17:35-19:05：「バイオリジクス開発の進展：免疫原性評価の包括的かつ最適なアプローチ」セッションに注目しましょう。

• バイオ医薬品の免疫原性評価に関するガイドライン(案)
<https://public-comment.e-gov.go.jp/pcm/download?seqNo=0000268010>

Starcevic Manning M et al., AAPS J. 2022, doi: 10.1208/s12248-022-00728-8.

16th JBF Symposium, 2025

S/N比を用いた評価の有用性について



製薬企業ではS/N比の代替は有用であると考えているが、規制当局への承認申請には至っておらず、さらなるデータの蓄積および議論が必要と考えます。TiterとS/N比をプロットして検証することが有用です。



The Immunogenicity Working Group from the IQ Consortium (Clinical Pharmacology Leadership Group) Regulatory considerations (Q20–Q25)

There is a debate within the bioanalysis community whether ADA clinical reporting, which currently is primarily done by ADA titers, could instead utilize signal-to-noise (S/N) values which are calculated from the screening tier. To understand current practices, questions were asked regarding utilization of this approach. None of the 19 responding companies received a regulatory approval or submitted ADA data using S/N in lieu of the traditional ADA titer assay (Q20, Q22). However, 2/19 respondents reported receiving regulatory approvals with inclusion of both ADA titer and S/N (Q21). It was not specified which phase of clinical studies were used to provide the immunogenicity datasets for the submission.

(要旨) IQコンソーシアムにおいても、スクリーニングの代替としてのS/Nの利用について議論され、製薬企業を対象にSurveyを実施した。回答した19社中、ADA Titerの代わりにS/Nを用いて規制当局の承認を得たり、S/Nを用いたADAデータを提出した企業はなかった。19社中2社は、ADA TiterとS/Nの両方を用いて承認された、と回答している。(提出された免疫原性データセットがどの臨床試験に使用されたかは特定されていない)

Grimaldi C et al., Clin Pharmacol Ther. 2025, doi: 10.1002/cpt.3568.

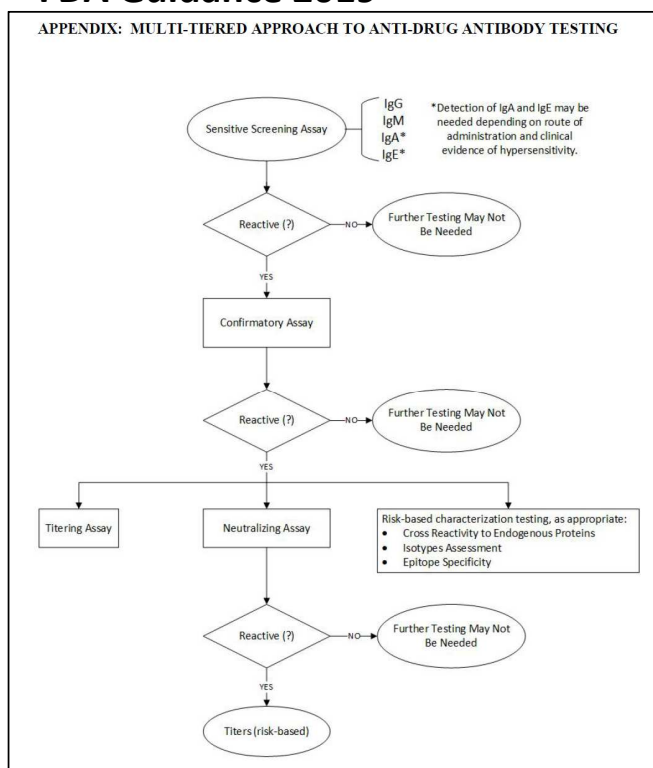
S/N比を用いた評価の有用性について



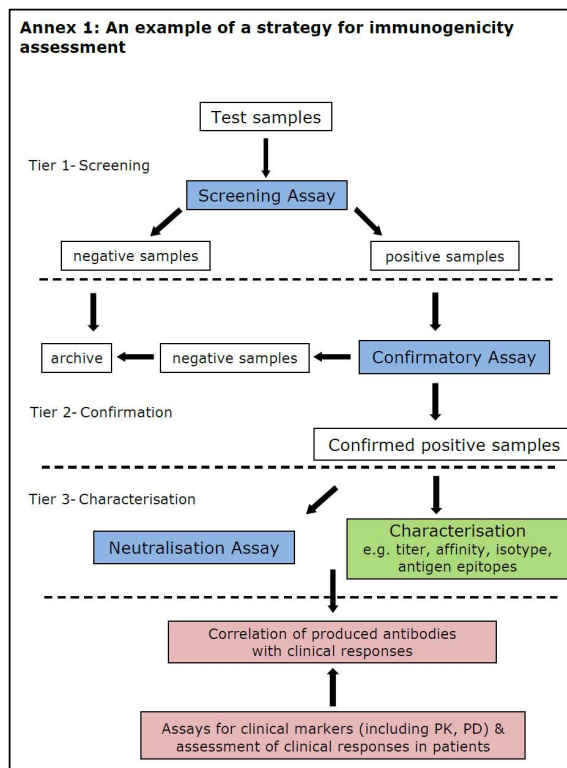
海外当局ガイダンスでは多段階アプローチを推奨しており、国内ガイドライン案では、特性解析のTiter評価における代替としてScreeningの測定値を用いたS/N比の評価について記載しています。製薬企業では多段階アプローチの必要性についても議論されています。



FDA Guidance 2019



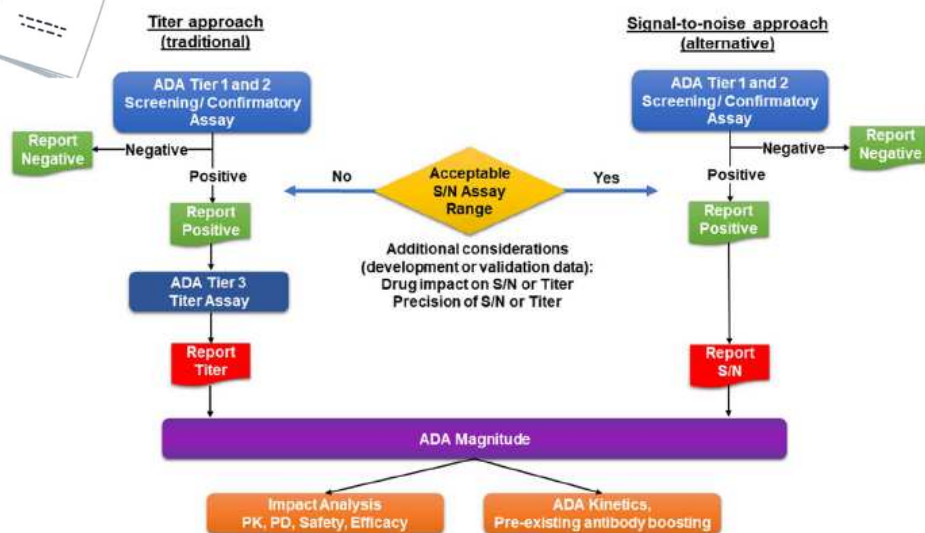
EMA Guideline 2017



S/N比を用いた評価の有用性について



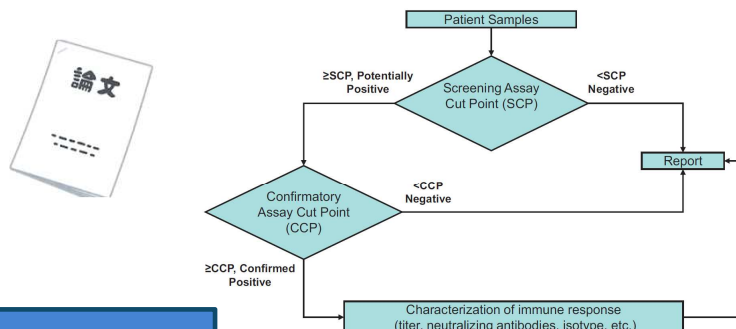
AAPSでは、TiterとS/N比の両アプローチの長所と短所について検証しています。S/N比は精度と潜在的に低い親和性/活性応答を検出することに有効です。ADAの程度評価し、臨床反応への影響評価する上で、S/N比は有用な可能性があります。Titerは陽性試料のみの評価ですが、S/N比は全試料の情報を得ることができることもメリットです。



- 適切な測定範囲を有する試験法では、S/N比を用いることにより、ADAの大きさの決定及び免疫原性の臨床的影響の評価をうまく行うことができる
- S/N比を用いる方法は、適切な科学的根拠に基づいて実施する必要がある
- シンプルなアプローチにより、スクリーニング結果の判定に使用したのと同じ検体から準定量的な読み出しが可能となる
- 優れた精度、低親和性/低アビディティ反応の検出の向上、より時間的・コスト的に効率的な分析ワークフローが実現する

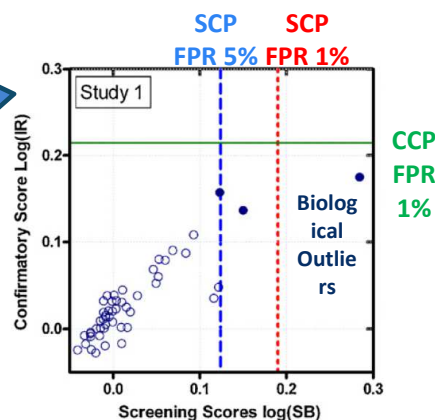
Starcevic Manning M et al., AAPS J. 2022, doi: 10.1208/s12248-022-00728-8.

S/N比を用いた評価の有用性について



Scheme 1. Typical multi-tiered immunogenicity testing approach employed in clinical trials.

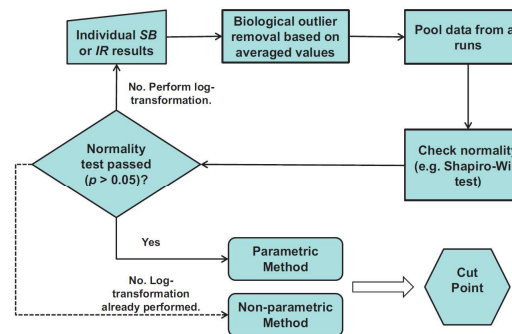
SCP (FPR1%)
とCCP
(FPR1%)は相
関⇒1段階ア
プローチで評価可
能ではないか？



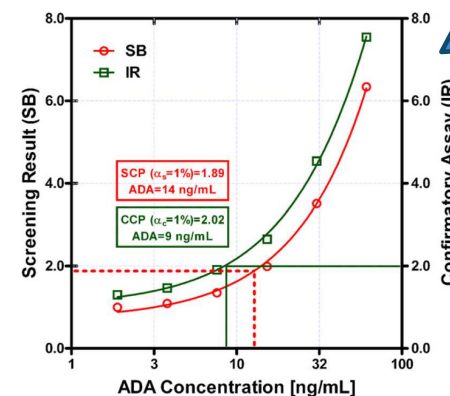
Correlation between the screening and confirmatory scores.

Graphs show average screening and confirmatory scores for 50 drug-naïve serum samples measured in validation Studies 1–3.

Kubiak RJ et al., J Pharm Biomed Anal. 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2012.10.027.



Scheme 2. Algorithm used for calculation of the screening and confirmatory cut points.



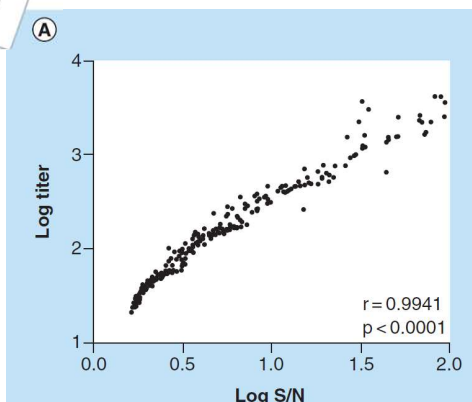
Titerも一致する
SCP (FPR1%) :
ADA PC 14ng/mL
CCP (FPR1%) :
ADA PC 9ng/mL

SB: Signal to
Baseline
IR: Inhibition
Ratio

Titration of a surrogate positive ADA control in screening and confirmatory assays.

S/N比を用いた評価の有用性について

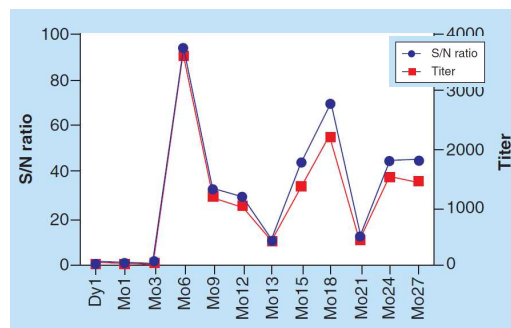
- ◆ 3種類のモノクローナル抗体治療用ADAアッセイが、第II相臨床試験における免疫原性のモニタリングに用いられた。



Correlation of S/N and titer in samples from Phase II clinical studies.

S/N: Signal-to-noise.

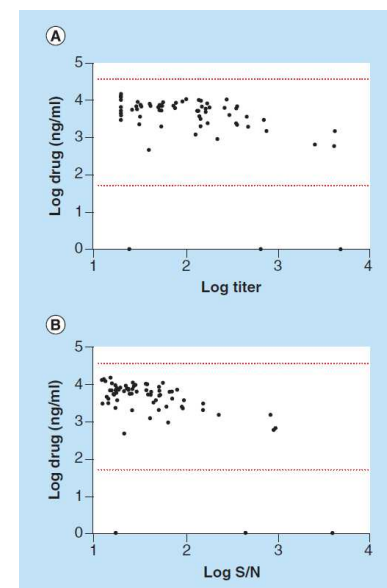
S/NとTiterは強い相関がある



Individual subject profiles for subjects with the highest S/N values.

Dy: Day; Mo: Month; S/N: Signal-to-noise; Wk: Week.

被検者のADAプロファイルは類似



Impact of ADA on pharmacokinetics.

S/N (A) or titer (B) is used.

ADAが薬物動態に与える影響でも同等の結果

- ◆ S/N法は、力価測定法よりも時間、試薬、サンプル量が少なく、資源効率が高い。
- ◆ S/Nは、ADA反応の大きさの適切な準定量的尺度となりうる。

Starcevic Manning M et al., Bioanalysis. 2017, doi: 10.4155/bio-2017-0185.

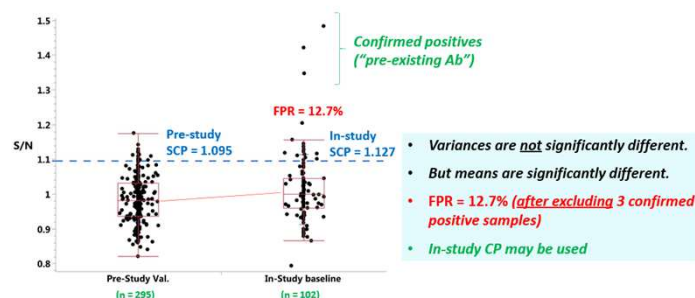
FPR (False Positive rate、偽陽性率) で困った！

【どう困った？】

- ✓ 検体測定試験でFPRが高く、投与前検体を全部集めて
カットポイントを再設定
- ✓ FPRが低く、真にADA陽性の検体が検出できていない
と疑われる？



Case-study 2



- Variances are not significantly different.
- But means are significantly different.
- FPR = 12.7% (after excluding 3 confirmed positive samples)
- In-study CP may be used

昨年のJBFシンポ「免疫原性測定におけるカットポイント評価方法の実践およびエクセルツールのデモンストレーション」を発表*された Viswanath Devanarayan 氏の論文、当局ガイダンスやWhite paperなどの論文情報を基に、カットポイント設定、外れ値検定について考えてみましょう

[https://bioanalysisforum.jp/images/2024_15thJBFS/D2-A1-01\(1\)_JBF15_Viswanath%20Devanarayan_Cut_Point.pdf](https://bioanalysisforum.jp/images/2024_15thJBFS/D2-A1-01(1)_JBF15_Viswanath%20Devanarayan_Cut_Point.pdf)

16th JBF Symposium, 2025

FPR (False Positive rate、偽陽性率) で困った！



Shanker氏らの2008年論文は、ADA測定法のバリデーションについて優れた基礎を築き、現在でも広く引用されていますが、当時、Immunogenicityの議論に統計学者も入って議論が盛り上がった頃で、Floating カットポイントも出始めでした。あれから10年以上が経過し、分析装置も感度向上し、ノイズ少ないデータが得られるようになり、製薬業界の経験値も増え、2017年のDevanarayan氏の論文や2024年のJBFシンポでの発表内容が現在のトレンドになってきています。即ち、Fixed、Dynamic、Floatingから選択する必要は無く、Floating の1択で問題ないと思われます。特に Dynamic カットポイントを設定するとしたら、数百検体以上を評価する必要があるため、現実的でなく、測定法が悪いので改修した方がよいと指摘される可能性もあります。Floating の1択であることを知らなければ、Dynamicカットポイントを例数少なくとも決められないかなど、おかしな悩みに陥るかもしれません。外れ値の扱い方も分析研究者には悩ましい課題です。外れ値はきちんと外さないとカットポイント設定に悪影響を及ぼすのでBiological Outlier（生物学的な外れ値）、Analytical Outlier（実験的な外れ値）を外す必要があります。

FPR (False Positive rate、偽陽性率) で困った！



スクリーニング分析法で FPR が 2-11% となるようにカットポイントを設定することは、以下の White paper で提示され、現在、事実上のスタンダードになっています

Immunogenicity

The use of floating cut-points by pooling the variability across all the assay runs is generally acceptable for screening cut-point evaluations even when the variances are significantly different between assay plates/runs because the use of dynamic cut-points is often impractical. However, as explained in the USP chapter, prior to directly implementing the floating cut-point approach, potential causes for the variance heterogeneity should be investigated and re-optimization of the assay should be considered when feasible. For confirmation assays, the fixed cut-point approach is still the most viable strategy even when the means and/or variances are significantly different across assay plates/runs. Methods for floating cut-point strategy may be considered by spiking the negative control with excess study drug, but this requires further evaluation and validation. Titration cut-points are necessary when the screening cut-points are too low and fall on the lower plateau of the positive control dilution curve. **The cut-points determined during validation may sometimes not be suitable for testing the clinical study samples. If the false positive rate of the clinical baseline samples based on the prestudy validation screening cut-point is under 2% or over 11%, the use of a study-specific cut-point should be considered.**



2015 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: Focus on New Technologies and Biomarkers (Part3 – Lba, Biomarkers and Immunogenicity) (Bioanalysis (2015) 7(24), 3107–3124) <https://doi.org/10.4155/bio.15.226>

検体測定試験で、FPRが 11%以上 で困った

検体測定試験の Screening アッセイ
で FPR が 11% 以上になってます
何か手当した方がいいですか？



すぐの対応は必要ないかもしれませんが、注意深く
モニタするのがおススメです。 Confirmatory の
カットポイントが高すぎる、もしくは、Screening
のカットポイントが低い可能性があります。
この場合、バリデーションの個別サンプルと治験
in study の投与前検体の S/N 比の平均値と分散を
比較してみましょう。 ScreeningとConfirmatory
で、どちらのカットポイントの設定も適切であるこ
とを検証するとよいでしょう。一方、Biosimilars
では、11%以上でも、EMAからの指摘があったと
の口コミ情報がありました。

検体測定試験で、FPRが 2%未満 で困った

検体測定試験の Screening アッセイ
で FPR が 2% 未満になってます
何か手当した方がいいですか？



比較的早い対応がおすすめです。

分析法に問題は無くても、カットポイントの設定が適切でない可能性があり、当局から追加で確認試験が必要となる場合があります。偽陰性や陽性検体を「陰性」として報告されると、陽性として報告すべき情報が隠されているととられる場合があるため、要注意です。

FDAガイドラインのカットポイント設定（抜粋）



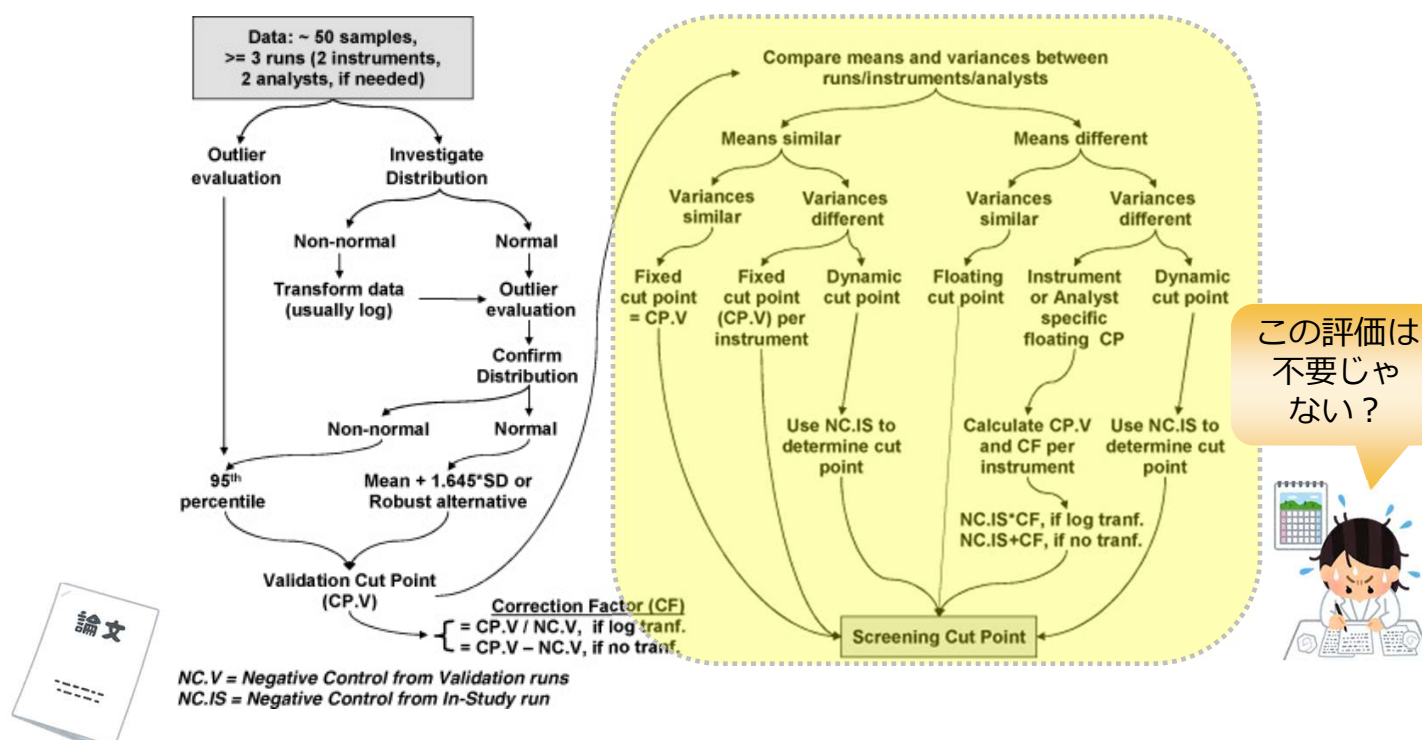
- ✓ 未治療サンプル（一般に50検体）を2名の分析者が異なる日に少なくとも3回、計6回以上の分析を行う。
- ✓ 患者集団に応じてカットポイントが異なる可能性があるため、対象疾患ごとの設定が望ましい。
- ✓ 平均値が試験、プレート、試験者間で変動しても平均値を中心とした分散が一定である場合、標準化係数を統計的に決定し、試験内に適用できる。フローティングカットポイントは最も一般的なカットポイントである。Fixed カットポイントを使用するのは試験内でネガティブコントロールの平均値が変動する可能性を排除できないので奨められない。
- ✓ 平均値、分散が変動するときには分析法、プレート、分析者ごとにカットポイントを設定する、Dynamic カットポイントを用いることも可能とされるが、検体測定と同時に多数のネガコン測定を多く行うので実践的でないことが多い。Dynamicカットポイントを使うよりは試験法の開発を検討すべき。

<https://www.fda.gov/media/119788/download>

Shanker氏論文 (2008) カットポイント設定を振り返る



下右図のように、複数の設定方法から選択してますが、最近では、Floating カットポイントの1 択でほぼ問題ないとの見解が多いようです



J Pharm Biomed Anal 2008 Dec 15;48(5):1267-81. Gopi Shankar et al., doi: 10.1016/j.jpba.2008.09.020.

Shanker氏論文とDevanarayan氏論文の推奨との比較表



Table I. Comparison of New Cut Point Data Analysis Recommendations in this Publication and those Originally in Reported in the Validation White Paper by Shankar *et al.* (1)

Characteristic	Shankar <i>et al.</i> , 2008	New recommendations
Type of CPs recommended	Fixed, floating, and dynamic CPs were suggested for specific situations.	- Floating CP is recommended for all scenarios. Even when a fixed CP is justified, the floating CP provides assurance against potential drift during in-study phase. - Use of a dynamic CP is not advised, as it is generally regarded as being impractical for routine application.
Data transformation	None is specifically recommended	Log S/N ratio is offered as default transformation for routine application.
Sources of variation	Only the intra-assay and inter-subject variability are used in the CP evaluation.	Both fixed and random sources of variation are considered for CP calculation (inter-assay, intra-assay, inter-analyst, inter-subject, etc.).
Outlier identification	Outliers are not differentiated as being analytical <i>versus</i> biological.	A systematic analysis process is suggested to yield differentiation for analytical and biological outliers.
Outlier removal	Outliers are evaluated from a single iteration of ANOVA, without consideration of analytical <i>versus</i> biological outliers.	Analytical outliers are first identified and removed, and then the model is refit to the remaining data to identify and remove the biological outliers.
CP determination	Analysis is done directly on the assay signal, instead of S/N. Normalization (subtraction or division) with NC for floating CP is done only in the end using pooled data from each run.	Analysis is done directly on the log S/N from the corresponding plate. Fixed CP on ratios equates to a floating CP on the signal.
CP normalization	Floating CP normalization using NC is computed at the run-level.	Floating CP normalization is computed at the plate-level to adjust for plate-to-plate variability.
Application of parametric <i>versus</i> nonparametric CPs	Nonparametric percentile method was recommended, when the S-W test <i>p</i> value is <0.05.	Nonparametric method is recommended only when both the S-W test <i>p</i> value is <0.05 and the absolute value of skewness coefficient is >1 or < -1.
Application of in-study CPs	No recommendations on when and how to evaluate in-study CPs.	Recommendations are provided for when and how to evaluate in-study CPs

Floating カットポイント 推奨

CP cut point, S/N or N/NC signal-to-noise, S-W Shapiro-Wilk

AAPS J. 2017 Sep;19(5):1487-1498. <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-017-0107-3>

16th JBF Symposium, 2025

Devanarayan氏の論文 (2017) を読み解く

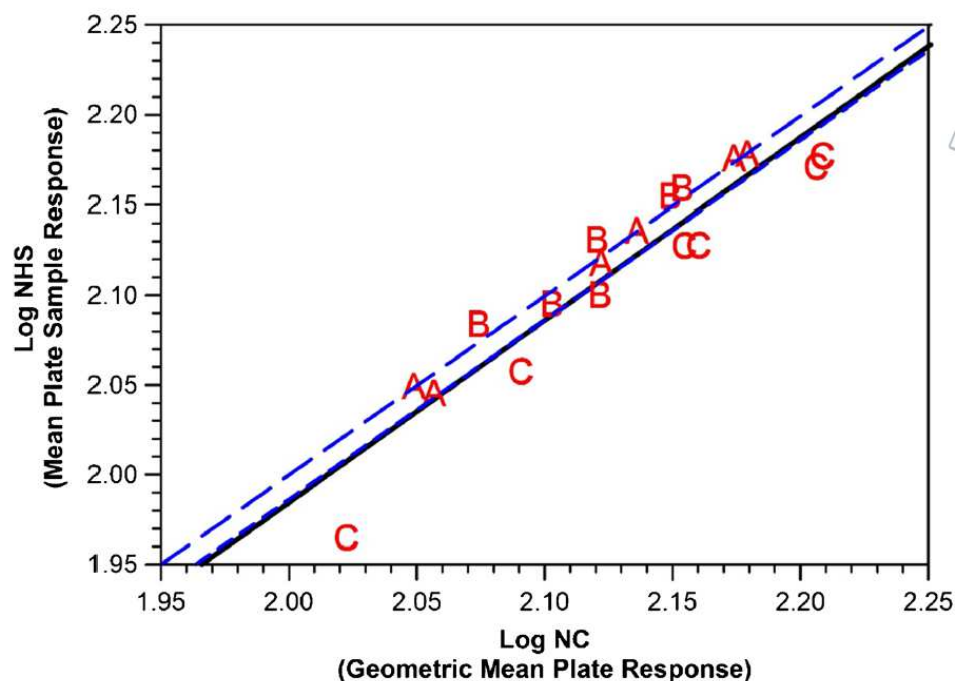


Fig. 3. Scatter plot of log of sample means *versus* log(NC) mean by plate. Scatter plot of log of the individual sample means *versus* the log of the mean negative control for the corresponding plates. In this figure, A, B, and C denote the three sample groups that were tested in each of the assay runs. The *solid line* shows the linear regression, while the *dashed lines* each have a slope of 1. The *short dashed line* has an intercept of -0.0134 and the *long dashed line* has an intercept of 0



Screening カットポイントのNormalization Factorの妥当性を確認するために、左図のように、陰性対照と被験者血清の測定値との相関をプロットし、正の相関を示すか検証できます。相関無し、もしくは負の相関のときには、より適切な陰性対照を対象疾患群から集める必要があります

AAPS J. 2017 Sep;19(5):1487-1498. <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-017-0107-3>

16th JBF Symposium, 2025

Devanarayan氏の論文 (2017) を読み解く

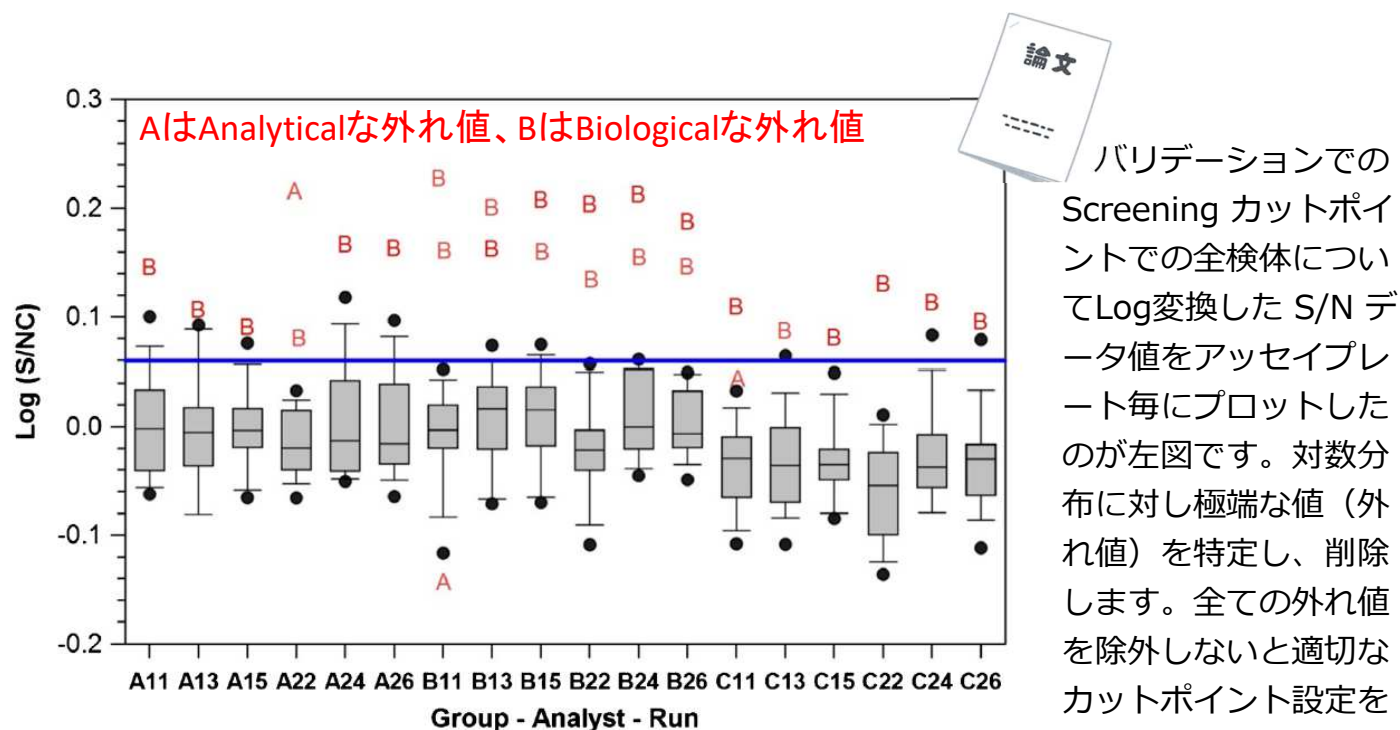


Fig. 4. Scatter plot of log(S/N) ratio values. Scatter plot of log(S/N) values for the 18 assay plates, grouped by sample group, analyst and run. The figure includes all the valid values from the dataset (those that were within the specified precision). The analytical outliers identified by the statistical model are indicated with an *A* and the biological outliers are indicated with a *B*. The reference line is the parametric cut point value in the log scale

AAPS J. 2017 Sep;19(5):1487-1498. <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-017-0107-3>

Devanarayan氏の論文 (2017) を読み解く



Screening と Confirmatory のカットポイント設定のフローです。全ての外れ値を除外した後、パラメトリックまたはノンパラメトリック法で評価しています

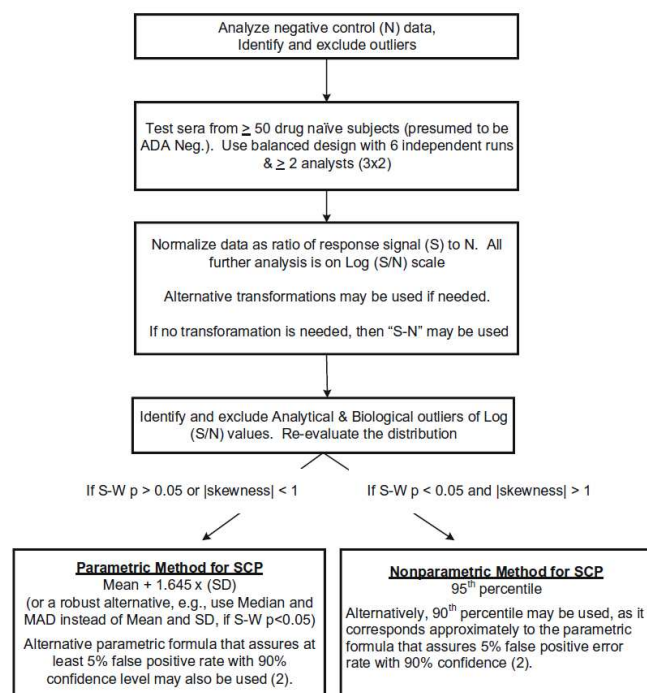


Fig. 5. Flow diagram for determination of an ADA screening cut point

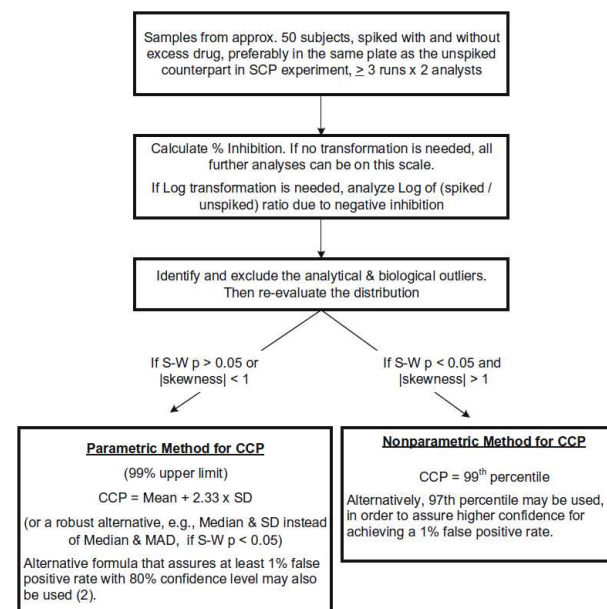


Fig. 6. Flow diagram for determination of an ADA confirmatory cut point

AAPS J. 2017 Sep;19(5):1487-1498. <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-017-0107-3>

16th JBF Symposium, 2025

Devanarayan氏の論文 (2017) を読み解く

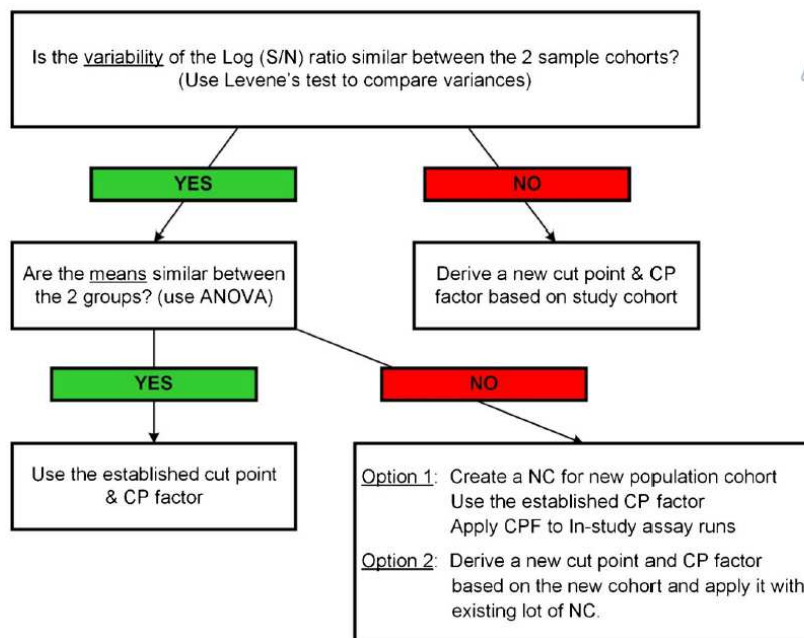


Fig. 8. Decision tree flow diagram for deciding if a new in-study cut point is needed. If populations are different (e.g., disease, change in demographics, etc.) or there is a need to verify if previously established cut points are suitable for use in-study, then the following decision tree is recommended to aid decision-making



In study でのカットポイント設定が必要かを判断するフロー
新しい患者集団のデータ (n=20以上、2回アッセイ) と箱ひげ図をプロット、視覚化し、統計解析により、分散と平均値両方に有意差がなければ、従来のカットポイント設定は使用してもよいが、異なるときには再設定が必要となる

AAPS J. 2017 Sep;19(5):1487-1498. <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-017-0107-3>

16th JBF Symposium, 2025

Devanarayan氏の論文 (2017) を読み解く



検体の平均阻害率の散布図。Screeningの陽性判定がConfirmatoryでも一致することを確認する方法

外れ値と判定されなかった検体群

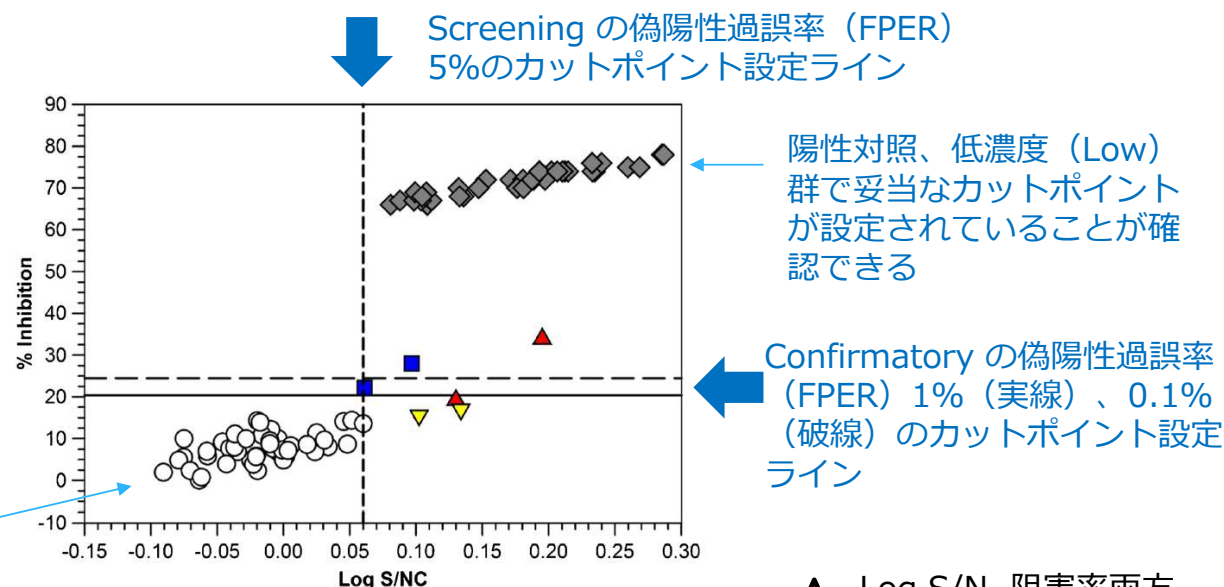


Fig. 7. Scatter plot of sample mean percent inhibition versus sample mean S/N ratio by type of outlier for all valid values. Scatter plot of sample mean percent inhibition versus mean log (S/N) for individual subjects after excluding analytical outliers. The vertical dashed line represents the screening cut point corresponding to 5% false positive error rate (FPER). The solid and dashed horizontal lines represent the confirmatory cut point values corresponding to 1 and 0.1% FPER. Open circles indicate samples that were not determined to be outliers. The yellow triangles are biological outliers for the log S/N (screening assay). The blue squares are biological outliers for percent inhibition (confirmatory assay). The red triangles are biological outliers for both log S/N and percent inhibition. The gray diamonds show the individual responses for the low positive control. As shown, these low controls consistently produced screening and percent inhibition responses that exceeded the established cut points verifying their appropriateness for use at the LPC

- Log S/N, 阻害率両方のBiologicalな外れ値
- S/NでのScreeningでのBiologicalな外れ値
- Confirmatoryでの阻害率のBiologicalな外れ値

AAPS J. 2017 Sep;19(5):1487-1498. <https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-017-0107-3>

16th JBF Symposium, 2025

外れ値の除外方法に疑問が生じた！

Shanker 論文の方法でカットポイントを設定するフローの中で正規性を評価しますが、①全バッチ*の測定結果を合わせて外れ値を評価するか、②バッチ毎で評価するのどちらが適切ですか？



6バッチ*で正規性がとれるかとれないかで半々になると困るので①全バッチで外れ値を評価します。またバッチ毎で正規性を評価し、パラメトリックかノンパラメトリックか決定します。バッチ毎の差は試験担当者 2 名の実験的な外れ値が影響しますが、基本的には訓練された分析研究者が実施するので顕著な差は生じないと予想されます。全バッチとバッチ毎の2回で外れ値除外するのは適切ではありません。

*ここでのバッチとは全検体を1回（複数プレートに跨って）測定。全データはそれの複数回分（バリデーションなら6バッチ）

陰性対照プール試料の外れ値の除外基準で困った！

陰性対照をプールする時、
個体別のスクリーニング
の外れ値を除外する基準
はありますか？



客観的指標として、統計解析で除外しましょう。Box-plotで評価するのは標準的。通常は、S/Nの評価だが、PEG-Drug等 pre-existing ADAが危惧される場合は、陰性対照や個別サンプルのスクリーニングの際から+/- Drugでのシグナルの特異性を評価し、high S/Nかつ high % inhibitionはまず除外する。そこから外れ値の評価をしないと、とてつもなく高いSCPFが得られたりするので注意が必要です。新規化合物を評価し始めるときには、カットポイントとその薬剤のバイオロジ勉強することが必要ですね。

昨年のDGアンケート*Q29集計結果

Answered : 36



その他（自由記載、一部抜粋）：

- Box-plot法で外れ値を算出
- シグナルの高い個体10%を外して調製する

*JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

16th JBF Symposium, 2025

FDAガイドラインでの外れ値除外（抜粋）



- ✓ 治験依頼者は、カットポイントを設定する際に、統計学的に決定された外れ値及び真の陽性検体の影響を考慮すべきである。治験依頼者は、データポイントを削除し、そのステータスを判断するために使用したそれぞれの方法について正当な理由を提示しなければならない。治験依頼者は、外れ値を除外することに懸念がある場合は、FDAに相談すること。

原文：IV B Assay Cut-Point

The sponsor should consider the impact of statistically determined outlier values and true positive samples when establishing the cut-point. The sponsor should provide justification for the removal of any data points, along with the respective method used to determine their status as outliers. Sponsors should consult with FDA if there is a concern regarding the exclusion of outliers.

<https://www.fda.gov/media/119788/download>

日本ガイドライン（案）での外れ値除外（抜粋）

補遺 2 代表的なカットポイント設定法

カットポイント設定のための個別ブランク試料測定においては、分析法に起因する外れ値 (analytical outlier) や、マトリックス成分に由来する外れ値 (biological outlier) が生じる可能性がある。カットポイント算出に際して、バックグラウンドデータにおける外れ値の除外の有無、及び除外方法（外れ値の定義）、データ変換の有無及び変換方法、データの正規性の検討結果による解析方法（パラメトリック手法かノンパラメトリック手法か）、分析単位間の分散分析方法などに関しては、データの構造を十分に検討した上での対応が必要となる。統計的に外れ値と判定された高値を示す試料を除外すると、除外しない場合と比較してカットポイントの値は低くなるため、外れ値を除外することで偽陰性を生じるリスクが高まることはない。一方で、外れ値を除外しない場合はカットポイントが高くなり、偽陰性を生じるリスクが高まることに注意が必要である。



<https://public-comment.e-gov.go.jp/pcm/download?seqNo=0000268010>

四分位範囲 (IQR / Interquartile range) 設定で疑問が生じた！

IQRはどのように設定したらいいですか？



四分位範囲 (IQR / Interquartile range) とは、75パーセンタイル (第3四分位数、Q3) から25パーセンタイル (第1四分位数、Q1) を引いた値です。分析というよりは、統計解析の観点からは 1.5 がデフォルトですが、各施設でのポリシー、SOPや経験で決められていると思います。委託試験であれば、依頼者と受託者でよく相談しましょう。

非臨床 ADA 評価（臨床との違い）

DG2023-60のアンケート*では、
非臨床試験のADA評価について

- ・ Screening/Confirmatory評価
 - ・ Cut pointの設定は臨床試験より少ない例数(11~20例程度)
 - ・ 信頼性区間5%で設定
 - ・ 目標感度 100または 500ng/mL
 - ・ DTLは推定血中トラフ濃度
 - ・ 臨床試験と同様の分析法
 - ・ 重要試薬の管理は臨床と同様
- という回答が多いようでした



国内の免疫原性ガイドライン（案）**では、動物でのADA分析は、ヒトの有効性・安全性を直接評価できるものではないため、目的に叶う分析法開発とバリデーション、非臨床試験結果を解釈するための必要十分な設定が可能と記載されていますね。具体的には、

- ・ PD的な活性の変化
- ・ 予期せぬ曝露量の変化
- ・ 免疫介在反応（免疫複合体、脈管炎、アナフィラキシーなど）の所見がみられた時
- ・ 薬物動態と毒性の解釈のため、必要に応じて特性評価（抗体価、応答した動物数、中和、抗体クラス）を明らかにする、と記載されています



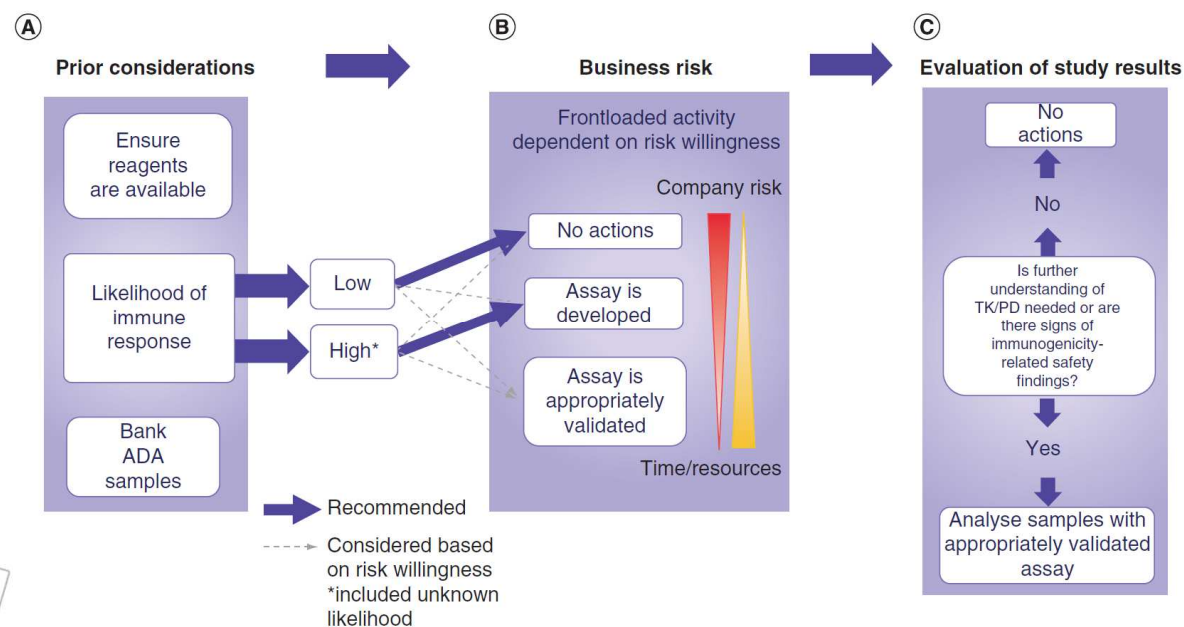
*JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

**バイオ医薬品の免疫原性評価に関するガイドライン（案） <https://public-comment.e-gov.go.jp/pcm/download?seqNo=0000268010>

非臨床 ADA 評価（臨床との違い）



非臨床試験ADA評価について、EBFでは目的に応じた最小限の戦略的アプローチについて広範な議論が行われ、コンセンサスが得られているようです。



Lauren A et al., Bioanalysis. 2021, doi: 10.4155/bio-2021-0028.

非臨床 ADA 評価（臨床との違い）

◆ EBF（2021）での非臨床ADA評価に関する議論（参考）



Table 2. Overview of recommended anti-drug antibody validation parameters for nonclinical immunogenicity assessment.

Parameter	Minimal number of runs and samples	Comment
SCP	Two runs of 30 individuals or Four runs of 15 individuals	Minimum 60 data-points FPR and no confirmatory
Sensitivity	One run	At least 1000 ng/ml $\geq$ SC
Selection of LPC	Tested as part of precision	LPC is predefined during selected at a reasonable
Drug tolerance	One run	At LPC (or for more sens appropriate drug concer
Precision	Three runs	Ensure that the LPC and Acceptance criteria defin

HPC: High positive control; LPC: Low positive control; NP: Negative control; SCP: Screening cut

- 目的に合致した最小限の戦略アプローチ
- FPR 1-0.1%の厳格なCut Point設定で偽陽性は排除できる (FPR 1%が一般的)
⇒Confirmatory不要
- 非臨床は臨床を踏襲するのではなく、3Rの原則から、動物数を減らすことも考慮
- S/Nで陰性/陽性判定することも可。
- TK（毒性）を目的とするのであれば、感度よりもDTを優先する。
- MRDを上げることを許容、感度は1000ng/mLで十分。

Table 3. Overview of optional anti-drug antibody nonclinical validation parameters.

Parameter	Minimal number of runs	Comment
Titration	Case-by-case	May be relevant to explain differences in the TK profiles in cases with a positive/negative or a S/N approach is not appropriate
Selectivity	One run	In cases where assessed (e.g., small m needed
Specificity	One run	Specificity against multimeric epitope endogenous proteins
Sample stability	One run	Include only short-term stability ana
Changes in critical reagents	Case-by-case	Include only on a case-by-case basis as partial or in-study validation, for example, to assess the performance of critical reagents or minor method parameter changes

LPC: Low positive control; MRD: Minimal required dilution; S/N: Signal to noise ratio; TK: Toxicokinetic.

- TiterはCase-by-case
- 短期間試験のため、Short-term stabilityと Freeze/Thawの評価のみでよい
- 重要試薬の評価はCase-by-case

Lauren A et al., Bioanalysis. 2021, doi: 10.4155/bio-2021-0028.

非臨床 ADA 評価（臨床との違い）



昨年のDG2023-60アンケートでは、非臨床と臨床ADA評価は同様の結果でしたが、海外では非臨床ADA評価は、目的に合致した最小限の戦略アプローチへと議論がシフトしているようです



アンケート結果	DGメンバーでの議論	DGの考え
ADA評価はScreening/Confirmatory assayまで実施する回答が増加。	非臨床ではADAの有無を評価することに重きが置かれている傾向が伺えた。	
DTLの目標値は「推定血中トラフ濃度」という回答が増加した一方、「設定しない」という回答も一定数ある。	DTLの目標値設定は、非臨床では臨床濃度を超える条件下でのADA測定となることを考慮して、設定要否を判断していると思われた。	
非臨床でのCut point算出は、臨床と比較すると使用個体数が少なく統計処理を簡便とする回答が多い。	非臨床試験に特有の条件（測定法、個体のバラツキの少なさ等）を考慮して、評価条件の設定に取り組んでいる状況が伺えた。	
- Screening assayの信頼区間は5%を設定する回答が多い。 - 臨床試験の進展に伴う、非臨床ADA測定法の変更経験はない。 - 陰性対照調製時の異常値は、信頼区間または全体の傾向から除外する回答が多い。 - 重要試薬の取り扱いに非臨床と臨床で大きな違いはない。	その他の項目については、臨床・非臨床で大きな差はなく、共通した対応がなされている様子が伺えた。	

*JBF DG2023-60 <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2023-60.pdf>

ADA 測定「虎の巻」を作成する会（終わりにあたって）

- ✓ 昨年実施されたDG（DG2023-60）においても、ADA測定時に発生した疑問点に対しては、その測定法の複雑さも起因して手探りでかつ個々の考えに基づいた対応がとられていることが再認識されています。
- ✓ そしてDG活動のまとめには「ADA測定法のライフサイクルマネジメントにおける疑問点について、JBFメンバー内で対応ノウハウを共有するなどの取り組みを実施し、議論を継続していくことが必要」と書いてあります。
- ✓ これを受け、本DGではメンバーが日頃疑問に思っていることに焦点をあて、ガイドラインや各々の経験等を踏まえた議論を重ねてDGの意見をまとめて共有することで、ノウハウのようなものを形にすることを目指しました。
 - ⇒ そして作成したのが、その名も「虎の巻」
- ✓ まだこんなのがあったらいいなというイメージレベルですが、必要性の有無も含め皆様のご意見を盛り込みながら、皆さんと一緒にこの活動を発展させていけたら良いと思っています。



Conclusion

- Last year, during DG (DG2023-60), it was recognized that questions arising from ADA measurements were handled in a tentative manner, based on individual thoughts, due to the complexity of the measurement methods.
- The summary of DG activities states, "It is necessary to share know-how among JBF members regarding questions in the lifecycle management of ADA measurement methods and to continue discussions."
- In response, this DG focused on common questions among members and aimed to create a "Tora-no-maki (manual)" by discussing guidelines and personal experiences, summarizing the DG's opinions to shape this knowledge.
- We are still at a basic idea stage of what this could be, but we hope to gather everyone's opinions, including the need for this initiative, and develop this activity together.

皆さんのご意見（みんなで作る虎の巻）

【JBFシンポジウム（2025年3月、姫路）で頂いたご意見】

- ✓ 若手研究者の教育用資料によさそう
- ✓ 困ったときに「みんなはどうしているか」の一例として参考にしたい
- ✓ Web版が出たら細かいところまでゆっくり見たい。会場では見きれなかった
- ✓ S/N比とTiterの比較など、実データで解析してみないと実感がない
- ✓ 各社のデータで解析し、持ち寄ってディスカッションできたらよいが、会社許可が得られるかは難しいかもしれないので、うまくいったいかないを共有するくらいならできるか。公知データでデモ解析して持ち寄れたらよいかもしれない

皆さんのご意見（みんなで作る虎の巻）

Q1: ブロッキング剤（カゼイン）の濃度は1%未満では不十分でしょうか？

A1: カゼインのブロッキング剤の濃度は一般的に1%（w/v）が推奨されています。
1%未満の濃度では、非特異的結合を十分に抑制できない可能性があり、バックグラウンドノイズが増加することがあります。

Q2: ELISAの固相化について①「ノーマルプレート+抗原」と
②「アビジンプレート+ビオチン標識抗原」の使い分けの理由は？

A2: 1. 特異性と感度の向上:

- ①: 抗原の吸着効率や特異性が低い場合があります。
- ②: ビオチン標識抗原を使用することで、抗原の特異的な固定が可能になり、感度が向上します。

2. 立体障害の回避:

- ①: 抗原が直接プレートに吸着するため、抗体の結合部位が隠れてしまうことがあります。
- ②: ビオチン標識抗原を使用することで、抗原がアビジンに結合し、立体障害を回避できます。

3. 増幅効果:

- ②: アビジンに複数の酵素を結合させることで、信号の増幅が期待できます。

皆さんのご意見（みんなで作る虎の巻）

Q3：免疫除去における薬物濃度は？

A3：使用するアッセイプラットフォームによって異なります。
測定系構築時に最適な濃度を設定してください。

Q4：非臨床と臨床試験で推奨感度が違うのはなぜ？

A4：非臨床試験では、薬剤の安全性や有効性を評価するため、感度が低く設定されることがあります。これは、動物モデルでの免疫反応が人間とは異なるためです。一方、臨床試験では、患者の免疫系が薬剤に対してどのように反応するかを詳細に把握する必要があるため、感度が高く設定されます。高感度の測定により、低濃度のADAも検出でき、薬剤の効果や副作用をより正確に評価することが可能になります。

参照スライド：

臨床：スライド30、非臨床：スライド77

皆さんのご意見（みんなで作る虎の巻）

**Q5：偽陽性を判断する指標はありますか？
偽陽性率を算出した経験はありますか？その方法は？**

**A5：算出した経験があります。
算出方法については、以下の文献、スライド59～63を参照してください。**

2015 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis: Focus on New Technologies and Biomarkers (Part3 – Lba, Biomarkers and Immunogenicity) (Bioanalysis (2015) 7(24), 3107–3124) <https://doi.org/10.4155/bio.15.226>

Q6：偽陽性率が基準を満たさなかった時の対応は？

**A6：対応は試験の背景によって異なります。
予算の都合も考慮されますが、最大限の対応として以下のパターンが考えられます。**

- ①再バリデーション
- ②全検体の再測定

番外編：Confitのシンポジウム参加登録時に寄せられた ADA/NAb関連の質問へのサポートコーナー（1/4）

このコーナーでは、Confitのシンポジウム参加登録時に寄せられたADA/NAb関連の質問につき、本ポスターで関連する番号をまとめてみました。なおポスター中には、カットポイント設定など、各所に記載がある場合もありますので、ポスター全体も確認してみてください！



皆さん、ADAのお悩みは、多くあるようです
JBFシンポやDGで、皆で意見交換して
解消できたらいいですね

番外編：Confitのシンポジウム参加登録時に寄せられた ADA/NAb関連の質問へのサポートコーナー（2/4）

質問内容	対応ポスター番号
経験がなく、初めて自社で実施する場合の留意点を教えてほしい	7-20 (一から測定法構築)
安定性試験を実施しているかどうか	20
ADAの安定性評価の必要性をどのように考えているか、つい先日ADAの安定性評価を行った論文が出たが、その論文をリファレンスとして安定性評価をスキップすることの妥当性について	20
生体試料における抗薬物抗体の保存安定性の考え方、担保の仕方について	20
免疫原性が低く陽性対照を得られにくいケースで、なんとかして得るためにどのような対応を取られているか	26
感度が100 ng/mL以下の場合、LPCをどのように設定しているか。仮にLPCを100 ng/mLに設定した場合は、それ以下の濃度の信頼性を担保するような基準を設定しているか	30
臨床のADA測定に関して中和抗体の測定のタイミングなど、ADA測定関連全般	31
In-study cut-point設定時の使用例数	32
中和cell based assayの実施タイミングと評価フォーマットについて	31 (NAb詳細は DG2020-49参照*)

* <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2020-49.pdf>

番外編：Confitのシンポジウム参加登録時に寄せられた ADA/NAb関連の質問へのサポートコーナー（3／4）

質問内容	対応ポスター番号
疾患変更時のスクリーニングカットポイント設定において、ガイドライン案の50個体×6batch以外のカットポイントの設定方法の具体例。50例以上の個別検体が入手できなかった場合、取り得る対応について	32-43, 59-71
健康成人と患者で投与前検体シグナルの平均とばらつきが異なるケースで、平均だけ異なる場合、ばらつきだけ異なる場合、両方異なる場合で対応方が変わってくると理解している。これらの複雑な対応は実際に経験しないと習得が難しいと感じているが、社内の若手にどのように教育しているか	39-43
ADAのカットポイント（特に患者）について	39-43, 59-71
測定における偽陽性率について、測定終了後、偽陽性率を算出するが、推奨される偽陽性率の範囲から外れた場合、どのような対応、考察が必要であるか	41-43, 59-71
ADAで薬物濃度がDTL超えている時（DTLの改善が見込めない場合）の免疫原性の評価と将来的に必要な対応、内因性タンパク製剤のADAが内因性タンパクに及ぼす影響評価方法	44-46
施設間クロスバリデーションについて	50, 51
ADA測定やクロスバリ等における統計手法に対する考え方について	50, 51, 59-71
スクリーニングアッセイ、確認アッセイ、力価アッセイの順に測定していくことが通常ではあるが、検体数が少数の場合、スクリーニングアッセイを実施せず、確認アッセイからの実施でよいように考えるが、この場合の問題点は何になるか？	52
臨床検体を測定する測定系の妥当性を確認するうえで、臨床検体をスクリーニングアッセイで測定した時の偽陽性率を算出は行っているか。また、Confirmatory assayやTiter assayについても、何か測定系の妥当性を確認するため、臨床検体を使った確認を行った経験はあるか。	52, 61
タイターカットポイントを設定してるかどうか	53-58
ADA測定を外部委託した場合、カットポイント算出方法に関する結果が申請に耐えうるものか判断するための重要なポイントを教えてください	64（FDAガイダンスからの抜粋）

番外編：Confitのシンポジウム参加登録時に寄せられた ADA/NAb関連の質問へのサポートコーナー（4／4）

質問内容	対応ポスター番号
NAb分析の感度評価を行っているか。どこまでの分析感度を目指すべきか。 NAb分析用に標準抗体を別途取得してくるケースはあるのか	?（NAb詳細は DG2020-49参照*）
ADAのアイソタイピングは基本的には不要という認識だが、アナフィラキシーを ケアするのであればIgE分析が求められるケースもある。各社の特異的IgE分 析についての考え方について知りたい（方法論や分析感度をどこまで求める かなど）	?（シンポ会場できいてみ てください）
Devanarayanの解析手法を用いたADAカットポイント算出の各社の実績 について知りたい	?（シンポ会場できいてみ てください）
ADAカットポイントに関するPMDAからの指摘事項の事例紹介をしてほしい。	?（シンポ会場できいてみ てください）
Cutpointの設定について	?（ポスター各所に色々 な話題あります）

* <https://bioanalysisforum.jp/common/pdf/event/dg/DG2020-49.pdf>