

1 バイオ医薬品の免疫原性評価に関するガイドライン（案）

2

3 目次

4	1. 緒言 .....	3
5	1.1 目的 .....	3
6	1.2 背景 .....	3
7	2. 適用範囲 .....	3
8	3. 免疫原性に影響する要因 .....	4
9	3.1 品質的要因 .....	4
10	3.2 臨床的要因 .....	4
11	4. 免疫原性の臨床的影響 .....	5
12	4.1 有効性への影響 .....	5
13	4.2 安全性への影響 .....	5
14	5. 非臨床試験における免疫原性評価 .....	5
15	6. 免疫原性評価：臨床試験における抗薬物抗体の評価 .....	6
16	6.1 臨床試験における免疫原性評価の計画 .....	6
17	6.1.1 臨床試験の計画 .....	6
18	6.1.2 臨床試料収集の要件 .....	6
19	6.1.3 臨床試験における評価項目 .....	6
20	6.2 抗薬物抗体分析の特徴と戦略 .....	7
21	6.2.1 陽性対照物質 .....	7
22	6.2.2 陰性対照試料 .....	7
23	6.2.3 多段階アプローチ（tiered approach） .....	7
24	6.2.3.1 スクリーニングアッセイ .....	8
25	6.2.3.2 確認アッセイ .....	8
26	6.2.3.3 特性解析 .....	8
27	6.3 抗薬物抗体分析法のバリデーション .....	10
28	6.3.1 カットポイント（陽性判定基準） .....	10
29	6.3.2 特異性 .....	11
30	6.3.3 選択性 .....	11
31	6.3.4 精度 .....	12
32	6.3.5 感度（検出下限） .....	12
33	6.3.6 希釈直線性 .....	12
34	6.3.7 共存薬物耐性 .....	12
35	6.3.8 安定性 .....	12
36	6.4 実試料分析 .....	12
37	6.4.1 システム適合性 .....	13
38	6.4.2 薬物濃度測定 .....	13

39	6.5 抗薬物抗体分析法に関するその他の留意事項.....	13
40	6.5.1 陽性対照物質の評価と管理.....	13
41	6.5.2 重要試薬.....	13
42	6.5.3 MRD (minimum required dilution) .....	13
43	6.5.4 共存薬物耐性の向上 (共存薬物による妨害の回避) .....	14
44	6.6 データの報告.....	14
45	6.7 その他.....	14
46	6.7.1 バイオ後続品開発における免疫原性の比較.....	14
47	6.7.2 原薬製造方法変更に伴う抗薬物抗体分析系の再構築.....	14
48	6.7.3 不純物に対する抗体の評価.....	15
49	7. リスク低減策 .....	15
50	7.1 品質的要因に関連するリスク低減策 .....	15
51	7.2 臨床的要因に関連するリスク低減策 .....	15
52	8. 製造販売後のリスク管理と情報提供.....	15
53	8.1 医薬品リスク管理計画への記載 .....	15
54	8.2 電子化された添付文書 (又は電子添文) 等での情報提供 .....	16
55	8.3 その他.....	16
56	9. 用語解説.....	16
57	参考文献 .....	17
58	補遺 1 代表的な抗薬物抗体分析法と特徴 .....	18
59	補遺 2 代表的なカットポイント設定法.....	20
60		
61		
62		
63		
64		

## 65 1. 緒言

### 66 1.1 目的

67 免疫原性とは、生体内で抗体産生等の免疫応答を誘導する性質であり、バイオテクノロジー応  
68 用医薬品（バイオ医薬品）の品質・有効性・安全性確保においては、その適切な評価とリスク低  
69 減策の構築が課題となる。本文書では、バイオ医薬品の開発から製造販売後における免疫原性に  
70 関するリスク低減のための留意事項を示すことを目的として、免疫原性に影響するリスク要因（ハ  
71 ザード）と考えられる事項について述べると共に、臨床試験での抗薬物抗体評価における留意事  
72 項を中心に、免疫原性評価において考慮すべき事項について記載する。また、品質管理や製造販  
73 売後の適正使用において考慮すべき事項も示す。

74

### 75 1.2 背景

76 バイオ医薬品は一般に、標的に対する高い特異的を有することから、低分子医薬品で問題とな  
77 る非特異的作用による安全性上の問題は少なく、副作用の多くは薬理作用の延長にあるとされて  
78 いる。しかし、高分子であるという構造上の特徴に起因する免疫原性は、薬理作用とは別に、有  
79 効性・安全性確保の上で問題となり、バイオ医薬品では、目的物質のアミノ酸配列がヒトタンパ  
80 ク質と同一であっても、抗薬物抗体が産生される場合があることが知られている。免疫原性には、  
81 目的物質のアミノ酸配列や製剤中の不純物等の品質的要因の他、患者の HLA 型等の臨床的要因  
82 が関係するとされ、その要因は複雑である。抗薬物抗体が産生されても有効性・安全性に影響が  
83 生じない場合もあるが、抗薬物抗体により血中の遊離薬物濃度の低下や薬理作用の阻害による有  
84 効性の低下が生じる場合の他、免疫応答による副作用が生じる場合もあり、その影響の程度は様々  
85 である。

86 バイオ医薬品の開発に際して、探索段階では、*in silico*法による T 細胞エピトープの予測、ヒ  
87 ト細胞を用いた *in vitro* 評価系における抗原提示細胞に提示されるペプチドの同定、抗原提示に  
88 基づく T 細胞活性化評価等の方法を用いたヒトでの免疫原性予測が行われる。これらの予測評価  
89 は陽性対照と比較した免疫原性に関わる相対的な情報を得ることが主な目的であり、ヒトでの抗  
90 薬物抗体産生との定量的な相関関係は確立されていないが、バイオ医薬品の免疫原性を評価する  
91 ための前臨床研究から、*in vitro* 手法によるリスク評価手法も提示され始めている。一方で、ICH  
92 S6(R1)ガイドラインに示されるように、動物試験における免疫原性の評価は、ヒトでの免疫原性  
93 を予測するものではない。したがって、バイオ医薬品の免疫原性評価のためには、臨床試験にお  
94 いてヒトで生じる抗薬物抗体を分析し、薬物動態、薬理作用への影響も含め、その有効性・安全  
95 性との関連を評価することが重要である。

96 免疫原性を完全に回避することは困難であるため、バイオ医薬品の開発・使用に際しては、免  
97 疫原性に起因する有効性・安全性への影響が許容できる範囲となるように、品質および臨時的な  
98 観点からリスク低減策を講じる必要がある（7.1 および 7.2 参照）。

99

## 100 2. 適用範囲

101 本文書は、遺伝子組換え技術・細胞培養技術により製造されるバイオ医薬品（ペプチド、タン  
102 パク質、及びそれらの誘導体等）を対象とする。本文書に示す考え方は、免疫原性評価が必要と

103 なるその他の医薬品や再生医療等製品に関しても参考になるが、免疫原性を示すことを意図した  
104 予防・治療用のワクチンは、本文書の適用対象外である。

105 本文書に示す内容は、既存の知識や関連する国際的動向に基づき、免疫原性評価に関する現段  
106 階での標準的な手法及び考え方を提示したものであるが、ここに記載した以外の方法を否定する  
107 ものではない。

108

### 109 3. 免疫原性に影響する要因

110 バイオ医薬品の免疫原性は目的物質の構造、作用機序、用法用量等によって異なるため、臨床  
111 試験における免疫原性の評価を立案する上で、当該製品に関するリスクの程度を見積もっておく  
112 ことが重要である。以下に、品質及び臨床の観点から、考慮すべき事項を述べる。(リスク低減策  
113 については7章を参照)

114

#### 115 3.1 品質的要因

116 免疫原性に影響するバイオ医薬品の品質的要因として、アミノ酸配列、糖鎖構造等の翻訳後修  
117 飾、高次構造、生物活性、凝集体等の目的物質由来不純物、宿主細胞由来タンパク質 (HCP: Host  
118 cell proteins) 等の製造工程由来不純物、製剤添加物、leachables 等が関与する可能性があることとさ  
119 れている。アミノ酸配列は、ヒト天然タンパク質と完全に一致していても抗原として免疫系に認  
120 識される可能性はある。また、異種動物由来の配列や、特定された T 細胞エピトープが含まれる  
121 場合はリスクが高く、非天然型の構造を持つ場合は特に注意が必要である。非ヒト型糖鎖のよう  
122 に、ヒト由来の物質に含まれない構造もリスクとなり得る。生物活性については、免疫系を亢進  
123 する場合はリスクが高いと考えられる。目的物質由来不純物の代表例である凝集体については、  
124 多価構造を持つために免疫系に認識されやすい可能性があり、免疫原性と関連する品質特性とし  
125 て重要とされている。バイオ医薬品の製造には動物細胞や微生物が用いられることが多く、製造  
126 工程由来不純物として残存する HCP は異種タンパク質であることから、それ自身に対する抗体  
127 が産生される可能性に加え、薬物に対する抗体産生を促進する可能性もあるとされている。製剤  
128 添加物や leachables についても、免疫原性を増強する場合があるとされている。

129

#### 130 3.2 臨床的要因

131 抗薬物抗体産生に影響する臨床的要因として、適用疾患、HLA 型、年齢、遺伝子欠損等の患  
132 者背景因子の他、併用薬、投与経路、投与量、投与頻度 (投与間隔)、投薬歴等が影響するとされ  
133 ている。疾患等により、免疫機能が亢進している場合は抗薬物抗体が産生されやすく、免疫機能  
134 が低下している場合は抗薬物抗体が産生されにくい可能性がある。併用薬により、免疫機能が亢  
135 進あるいは低下する場合も同様である。補充療法に用いられるバイオ医薬品の場合は、遺伝子欠  
136 損により当該タンパク質を発現していない患者では、医薬品として投与されたタンパク質が異物  
137 と認識されて抗薬物抗体が生じやすいことが知られている。投与経路に関しては、静脈内投与よ  
138 りも皮下投与や筋肉内投与の場合に、抗薬物抗体産生の頻度が高くなる可能性がある。バイオ医  
139 薬品投与前から存在する交叉反応性の既存抗体 (pre-existing antibody) についても、抗薬物抗体  
140 産生に影響する場合があるとされている。

141

#### 142 4. 免疫原性の臨床的影響

143 抗薬物抗体の臨床的影響は、抗薬物抗体の特性や量により異なり、有効性・安全性に影響がない  
144 い場合から有効性が顕著に低下する場合、重篤な副作用につながる場合まで、様々である。

145

##### 146 4.1 有効性への影響

147 有効性への影響は、薬物動態への影響を介する場合と、薬物の作用の中和の2つに大別される。  
148 抗薬物抗体が薬物に結合することにより、薬物の体内動態が変化する可能性がある。薬物・抗薬  
149 物抗体の結合により免疫複合体となり、クリアランスが増加する結果、薬物濃度が低下する場合  
150 がある一方で、クリアランスが低下し、薬物が抗薬物抗体との複合体の形で血中半減期が延長さ  
151 れる例も知られている。このような薬物動態の変化が有効性に影響する可能性が考えられる。抗  
152 薬物抗体が薬物の作用を中和する場合、有効性が低下する可能性がある。

153

##### 154 4.2 安全性への影響

155 安全性への影響は、薬物の中和による影響と、免疫応答の惹起の2つに大別される。中和によ  
156 る影響は、例えば、エリスロポエチンのような生体内物質の補充を目的としてバイオ医薬品を用  
157 いる場合に問題となり、抗薬物抗体が薬物の作用を阻害するのみならず、生体内に存在した内在  
158 性の物質の活性も中和することで、当該物質に関わる生体の恒常性維持に支障をきたし、重篤な  
159 副作用が生じる可能性がある。抗薬物抗体に関わる免疫応答として、アナフィラキシー、サイト  
160 カイン放出症候群、infusion reaction 等に分類される投与直後に生じる急性期の反応の他、遅発  
161 型の過敏症に繋がる場合がある。

162

#### 163 5. 非臨床試験における免疫原性評価

164 バイオ医薬品の多くはヒトタンパク質に類似したアミノ酸配列を持つことから、動物にとって  
165 は多くの場合異種タンパク質であり、免疫原性を示す。ICH S6 (R1)ガイドラインに示されている  
166 ように、動物での抗薬物抗体産生は、ヒトでの抗薬物抗体産生を予測するものではないが、非臨  
167 床試験において、1) 薬力学 (PD) 的な活性の変化、2) PD マーカーが利用できない場合での予  
168 期せぬ曝露量の変化、又は3) 免疫介在性反応 (免疫複合体病、脈管炎、アナフィラキシーなど)  
169 の所見が認められた場合は、抗薬物抗体を測定し、その影響を評価する必要がある。反復投与毒  
170 性試験を行う際には、薬物動態と毒性の解釈に役立てるために、医薬品の投与に伴い産生された  
171 抗体の測定を行い、必要に応じ、抗体反応の特性 (例えば、抗体価 (タイター)、応答した動物数、  
172 中和又は非中和、抗体クラス) を明らかにする。なお、動物実験において、内在性タンパク質に  
173 対する免疫応答が誘発され、内在性タンパク質の欠失や機能不全が生じた場合、その影響を評価  
174 することは有用である。

175 動物における抗薬物抗体分析は、ヒトでの有効性・安全性を直接評価できるものではないこと  
176 から、非臨床試験結果の解釈に問題が生じないように、目的に叶う分析法の開発とバリデーション  
177 を行う。すなわち、非臨床試験では、臨床試験で求められる多段階アプローチをしなくとも、例  
178 えばスクリーニングアッセイのみを実施するなど、目的に応じて非臨床試験結果を解釈するため

179 必要十分と考えられる評価方法の設定が可能である（参考文献1）。

180

## 181 6. 免疫原性評価：臨床試験における抗薬物抗体の評価

182 免疫原性は、臨床試験において、バイオ医薬品を投与された患者における抗薬物抗体の陽性率  
183 とその特性を明らかにし、抗薬物抗体の有効性・安全性への影響を考察することによって評価す  
184 る。評価に際しては、評価を行う試験の選択、臨床試料の適切なサンプリング計画や試料の取扱  
185 い、及び、抗薬物抗体分析法の信頼性確保が重要である。

186

### 187 6.1 臨床試験における免疫原性評価の計画

#### 188 6.1.1 臨床試験の計画

189 試験計画の立案の際には、評価対象となるバイオ医薬品の免疫原性に関するリスク（例えば、  
190 エリスロポエチンのように、同じ生理活性を持つ他の内在性物質が存在しない生体内物質と類似  
191 性が高いバイオ医薬品では、抗薬物抗体誘導により重篤な副作用が生じるリスクが高い）や免疫  
192 原性に影響する臨床的要因を考慮して、そのリスクに応じた評価計画とする。一般には、健康成  
193 人を対象とした第Ⅰ相試験から評価を行い、第Ⅱ相試験、第Ⅲ相試験でも評価を行う。免疫原性  
194 の評価対象は、過去に当該製品に暴露されたことのない集団とする。各試験におけるサンプリン  
195 グの時期、回数は、当該バイオ医薬品の免疫原性リスクの他、投与間隔、投与薬物の血中半減期  
196 等を考慮して設定する。リスクの高い製品では、初期の臨床試験において、高頻度のサンプリン  
197 グが必要となる可能性がある。抗薬物抗体出現の時間推移、すなわち、一過性であるか、持続性  
198 であるかを見極めることのできるサンプリング計画とする（参考文献2）。複数の投与経路を有す  
199 る製品では、投与経路ごとに免疫原性の評価が必要である。

200

#### 201 6.1.2 臨床試料収集の要件

202 臨床試料の収集に際しては、抗薬物抗体分析におけるマトリックスの影響や既存抗体の存在を  
203 評価するため、対照試料として投与前検体のサンプリングが必要である。血中に存在する薬物が  
204 抗薬物抗体の検出を妨害する可能性があるため、治験期間中のサンプリングは、原則として反復  
205 投与における各薬物投与前（トラフ）に実施し、各試料の薬物濃度の測定も実施する計画として  
206 おく。

207 一般に、抗薬物抗体生成リスクが高い投与早期には、より頻繁なサンプリングが必要である。  
208 薬物が長期投与される場合、免疫原性の長期的なフォローアップでは、頻度を少なくしてサンプ  
209 リングすることで、免疫原性の進展とその影響に関する追加情報を得ることが可能となる。

210 被験者に免疫応答に関わる有害事象が見られた場合には、追加的なサンプリングが必要となる  
211 場合がある。試験終了時に抗薬物抗体陽性であった被験者については、試験終了後のサンプリン  
212 グの可能性について予め検討し、実施する場合は事前に定めておく。後日、分析が必要となる場  
213 合に備え、収集した試料は、安定性を考慮して保存する。

214

#### 215 6.1.3 臨床試験における評価項目

216 抗薬物抗体の臨床的影響を評価する上で、抗薬物抗体が薬物動態および薬理作用に及ぼす影響

217 を評価することが重要となるため、抗薬物抗体評価を行う試料において、薬物濃度、及び、適切  
218 な指標がある場合は薬理作用マーカーの評価が可能な試験デザインとすることが推奨される。適  
219 切な薬理作用マーカーは、中和活性の評価においても役立つ。すなわち、抗薬物抗体分析と薬理  
220 作用マーカーの変動に関する解析結果から、抗薬物抗体の中和活性を類推できる場合もある。

221

## 222 6.2 抗薬物抗体分析の特徴と戦略

223 抗薬物抗体分析は、一般的な定量分析と異なり、分析対象物質（抗薬物抗体）に大きな多様性  
224 があることに加え、実際の分析対象物質と同じ特性を持つ標準物質を設定することが実質的に不  
225 可能であるという特徴がある。そのため、多段階アプローチ（tiered approach）によって抗薬物  
226 抗体の評価を行う。

227

### 228 6.2.1 陽性対照物質

229 抗薬物抗体は、投与された薬物を抗原として産生されたポリクローナル抗体であり、エピトー  
230 プやアイソタイプの異なる抗体の集団である。分析法の信頼性を評価するためには、通常、分析  
231 対象物質を体現した標準物質が必要であるが、バイオ医薬品投与患者に由来するヒトポリクロー  
232 ナル抗体を十分量用意することは現実的には不可能である。仮に必要量を収集したとしても、個々  
233 の患者に生じる抗薬物抗体には個人差があり、全ての分析対象物質を体現した標準物質とはなら  
234 ない。したがって、抗薬物抗体分析法の構築及びそのバリデーションを行う際には、通例、分析  
235 対象物質の代替（サロゲート）として、動物への免疫により得られたポリクローナル抗体、ある  
236 いは、動物あるいはヒトから取得したモノクローナル抗体を陽性対照物質とし、これらを標準物  
237 質の代わりに用いる。抗薬物抗体分析法のバリデーション及び実試料分析の結果を解釈する上で  
238 は、実試料に含まれる抗薬物抗体と陽性対照物質の特性に差異があることに留意が必要である。

239

### 240 6.2.2 陰性対照試料

241 バリデーションおよび実試料分析において各プレートで用いる陰性対照試料としては、通例、  
242 健康人あるいは評価対象の薬物非投与の患者由来試料をプールした試料を用いる。可能であれば、  
243 陰性対照試料は対象疾患を有する薬物非投与の患者由来試料で、性別、年齢、併用薬等の要素を  
244 含めて、マトリックスが対象集団を代表することが望ましい。また、使用する抗凝固剤の種類、  
245 量、検体の前処理及び保存に関しても、実試料と同様であることが推奨される。

246

### 247 6.2.3 多段階アプローチ (tiered approach)

248 抗薬物抗体分析は、その結果を陽性あるいは陰性として示す定性あるいは半定量的な評価法で  
249 ある。分析対象物質の多様性、及び、分析対象物質と陽性対照物質の相違という問題があり、陽  
250 性対照物質を用いて陽性判定基準を設定することができない。また、非特異的結合との区別が難  
251 しいという問題もある。したがって、抗薬物抗体は、通例、陽性の可能性がある検体を選択する  
252 スクリーニングアッセイ、陽性の可能性がある検体から陽性検体を確定する確認アッセイ、さら  
253 に、陽性検体に関する特性解析、という多段階からなるアプローチにより評価する。

254

### 255 6.2.3.1 スクリーニングアッセイ

256 1段階目のアッセイ（スクリーニングアッセイ）では、抗薬物抗体を含む可能性のある検体をも  
257 れなく検出する。スクリーニングアッセイに用いる分析法は、偽陰性を避けるため、感度が高く、  
258 誘導されたすべての抗体を検出できるものが望ましい。スクリーニングアッセイでは、バリデー  
259 ションの結果に基づいて設定したカットポイントを閾値として、陽性候補検体を選別する。

260 カットポイント設定に用いる個別ブランク試料は、健康人あるいは評価対象の薬物非投与の患  
261 者由来試料を用いるが、被検者集団に近いものであるべきで、性別、年齢及び併用薬が類似して  
262 いる被験者を組み入れ、マトリックスが試験集団を代表するようにする。また、使用する抗凝固  
263 剤の種類、容量、試料の調製及び保管などについて実試料と同様に採取して取り扱うことが望ま  
264 しい。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、対象疾患ごとに設定するこ  
265 とが望ましく、異なる集団の個別ブランク試料を用いた場合にカットポイントが異なる場合は、  
266 他の分析性能の指標（例えば、感度）の再評価が必要となる場合がある。

267

### 268 6.2.3.2 確認アッセイ

269 スクリーニングアッセイにおける陽性候補検体の中には、偽陽性のものが含まれるため、陽性  
270 候補検体を対象に確認アッセイを行い、陽性検体を確定する。通例、確認アッセイでは、スクリ  
271 ーニングアッセイと同じアッセイ系を用い、反応液中に過剰量の薬物を添加して、薬物非添加の  
272 場合とレスポンスを比較する。薬物添加によりレスポンスが一定のレベル以下に低下した検体で  
273 は、反応系において抗薬物抗体とプレート等に固相化した薬物の結合が競合的に阻害されたと判  
274 断され、抗薬物抗体陽性と判定する。確認アッセイでは、通例、バリデーションで求めたカット  
275 ポイントを閾値として用いる。

276

### 277 6.2.3.3 特性解析

278 抗薬物抗体陽性と確定された検体について、タイターの評価を行う。また、中和活性の評価を  
279 行い、中和抗体の陽性率を明らかにする。さらに、必要に応じ、アイソタイプ、エピトープ解析  
280 等を行う。特性解析を実施する項目については、医薬品の特性、適応疾患、臨床症状等により、  
281 抗薬物抗体がもたらすと予想されるリスクの程度に応じて、その必要性を判断する。

282

#### 283 (1) タイター

284 抗薬物抗体陽性の検体については、通例、スクリーニングアッセイに用いた手法により、陽性  
285 結果が得られる最高希釈倍数を求め、これをタイターとする。抗体価を示す別の方法として、陽  
286 性抗体対照を用いて得られた検量線をもとに、抗薬物抗体の濃度を求めることもできるが、サロ  
287 ゲート抗体である陽性対照を基準とした見かけの濃度である点に注意が必要である。また、タイ  
288 ターの代替指標として、スクリーニング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  
289 値の比（シグナル／ノイズ（S/N）比）が用いられる場合があるが、抗薬物抗体濃度が高濃度とな  
290 る領域でフック効果が生じる場合は、S/N 比とタイターが相関しない場合があることに注意が必  
291 要である。抗薬物抗体の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  
292 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と考えられ、抗薬物抗体レベルと

293 PK, PD, 有害事象等の関連を定量的に考察する際には、タイターを用いることが望ましいと考え  
294 られる。

295

## 296 (2)中和活性

297 抗薬物抗体の中でも、薬物の活性部位内または近傍への結合や、高次構造変化により、薬物の  
298 生物学的活性を阻害する抗体、すなわち中和抗体 (Neutralizing antibody : Nabs) が存在すると、  
299 臨床的有効性に影響する可能性があるため、陽性と確定した検体について、中和活性の評価を行  
300 う。

301 中和抗体の検出には、特異的かつ感度の高い方法が必要である。中和抗体アッセイとして、細  
302 胞応答性を指標とする方法 (Cell-based assay)、及び、競合リガンド結合法 (Competitive ligand  
303 binding assay) が用いられている。薬物の作用様式、標的、エフェクター機能の有無、中和抗体  
304 発現の臨床的影響等を考慮して、適切な中和抗体アッセイ系を選択する。

305

### 306 1) 細胞応答性を指標とする中和抗体アッセイ Cell-based assay

307 アゴニスト作用を持つ薬物の場合は、細胞応答性を指標とする中和抗体アッセイが適している。  
308 臨床的有効性に関与するエフェクター機能を持つ抗体医薬品に関しても、細胞応答性を指標とす  
309 るアッセイが推奨される。中和活性の測定には、評価対象とする医薬品の品質評価において使用  
310 されているバイオアッセイが採用されることが多いが、マトリックス成分の影響を検討し、抗薬  
311 物抗体の中和活性測定法として適していることを確認した上で用いる。通常、アッセイには単一  
312 濃度の薬物を用い、各検体に関して、アッセイのレスポンスに対する阻害作用を評価する。中和  
313 活性を適切に評価するためには、薬物の用量反応曲線に基づいて試験に用いる薬物濃度を設定す  
314 ることが重要であり、薬物濃度の変化に応じてレスポンスが変化する範囲 (用量反応曲線の間  
315 領域) の濃度に設定する。薬物濃度が高すぎる場合は、中和活性を検出できず、偽陰性となる場  
316 合があるため注意が必要である。

317

### 318 2) 競合リガンド結合法による中和抗体アッセイ Competitive ligand binding assay

319 可溶性の標的に対するアンタゴニスト分子 (抗体医薬品等) では、中和抗体アッセイとして、  
320 競合リガンド結合法が適している可能性がある。ただし、薬物の作用機構や標的分子の特性をも  
321 とに、競合リガンド結合法により中和活性を評価できることを十分に説明できる必要がある。

322

323 細胞応答性試験あるいは競合リガンド結合法を用いた中和抗体アッセイにおいて中和抗体によ  
324 るレスポンスの変化が、マトリックスに含まれる他の阻害成分に起因するものでないことを確認  
325 する方法として、検体から抗体を除去して反応を調べる方法や、細胞応答性試験を用いる場合  
326 では、評価対象となる薬物以外の刺激に対するレスポンスを確認する方法等が考えられる。

327

### 328 (3) アイソタイプ

329 抗薬物抗体のクラス、サブクラスにより、臨床への影響が異なる可能性があるため、必要に応  
330 じて、IgG サブクラス、IgM、Ige 等のアイソタイプを解析する。IgE は血中濃度が低いため、ア

331 ナフィラキシーが生じるリスクを考慮した評価を行う場合等、IgE の検出を目的とする場合は、  
332 スクリーニングアッセイの段階から、高感度な手法を検討する必要がある。

333

#### 334 (4) エピトープ

335 抗薬物抗体のエピトープとなる部位を明らかにすることで、抗薬物抗体の臨床影響に関して有  
336 用なデータが得られることがある。特に、融合タンパク質や PEG による修飾タンパク質等の複数  
337 の機能ドメインを持つバイオ医薬品では、抗薬物抗体の認識部位により、臨床への影響が異なる  
338 ことが想定されるため、抗薬物抗体のエピトープを明らかにしておくことが有用である。その手  
339 法として、例えば、特定のドメインからなる組換えタンパク質と抗薬物抗体の結合性を評価する  
340 方法や、薬物と抗薬物抗体の結合に対する特定のドメインの阻害効果を評価する方法等があり、  
341 エピトープを含むドメインを明らかにすることができる。

342

### 343 6.3 抗薬物抗体分析法のバリデーション

344 抗薬物抗体分析法のバリデーションでは、カットポイント、特異性、選択性、精度、感度（検出  
345 下限）、希釈直線性（フック効果）、共存薬物耐性の評価が必要である。抗薬物抗体分析法は定性  
346 あるいは半定量的な評価法であるので、バリデーションの要件は定量分析の場合と異なるが、バ  
347 リデーションにおける各評価指標（分析能パラメータ）の定義やその評価方法については、ICH  
348 M10 ガイドラインが参考になる。各項目の判定は、ICH M10 ガイドラインの基準を満たせば十  
349 分と考えられるが、抗薬物抗体分析では、陽性対照物質と実試料中の抗薬物抗体の特性が一致し  
350 ていないことに留意し、バリデーションに用いた陽性対照物質の特性（薬物との結合親和性等）  
351 も考慮して、バリデーション結果を評価する必要がある。以下に、抗薬物抗体分析法のバリデー  
352 ションにおいて特徴的な事項を示す。

353

#### 354 6.3.1 カットポイント（陽性判定基準）

355 カットポイントとは、抗薬物抗体分析時に各試料の分析結果が抗薬物抗体陽性または陰性であ  
356 るかを判定する閾値のことである。多段階アプローチによる抗薬物抗体分析の各段階においてカ  
357 ットポイントを設定する必要がある。

358

##### 359 6.3.1.1 スクリーニングカットポイント

360 スクリーニングアッセイでは、通例、陰性検体において 5%の偽陽性を許容するレベルとしてカ  
361 ットポイントを設定する。カットポイントを設定するための一般的な手順は、薬物非投与の健康  
362 人あるいは患者から採取した個別検体をブランク試料とした測定を行い、得られたデータ（バック  
363 グラウンドデータ）をもとに、統計学的アプローチによりカットポイントを決定する方法であ  
364 る。例えば、50 個体分、あるいはそれ以上の個数の個別ブランク試料のセットを 6 回以上測定し、  
365 偽陽性率が 5%になる値を設定する。カットポイント設定のためのデータとして、測定のレスポ  
366 スを用いる他、個別ブランク試料の測定値と陰性対照試料の測定値との S/N 比を用いることもで  
367 きる。実試料分析におけるカットポイントは、カットポイント設定のために実施した各分析単位  
368 (analytical run) の測定値の平均値と分散を比較し、fixed cut point, floating cut point, dynamic

369 cut point のいずれかを選択して算出する。一般的には、抗薬物抗体分析では分析単位（プレート）  
370 ごとに陰性対照試料の測定値を基準とする、floating cut point の利用が推奨される。（代表的な抗  
371 薬物抗体分析法については補遺 1、カットポイントの種類については補遺 2 を参照）

372

### 373 6.3.1.2 確認アッセイカットポイント

374 確認アッセイでは、通例、1%の偽陽性を許容するレベルとしてカットポイントを設定する。陽  
375 性カットポイントを確立するための一般的な手順は、スクリーニングカットポイントの設定に使用  
376 した個別ブランク試料から、薬物非添加試料と薬物添加試料のバックグラウンドデータを得て、  
377 これをもとに、統計学的アプローチによりカットオフ値を決定する方法である。例えば、50 個体  
378 分、あるいはそれ以上の個数の個別ブランク試料のセットを薬物添加の有無で 6 回測定し、各試  
379 料における阻害率 (%inhibition:  $(1 - \text{spiked}/\text{unspiked}) \times 100$ ) や、薬物添加／非添加におけるレス  
380 ポンスの比 (spiked/unspiked ratio) を指標として、カットポイントを設定する。確認アッセイ  
381 では、バリデーションで実施された各分析単位のカットポイントの平均値を実試料分析でも用い  
382 ることができる (fixed cut point)。

383

### 384 6.3.1.3 中和アッセイのカットポイント

385 中和アッセイのカットポイントは、偽陽性率（例えば、1%）に基づいて設定する方法の他、細  
386 胞応答の阻害あるいは活性化に関する閾値 (%) を設定する方法があり、用いた方法とその理由を  
387 説明する必要がある。

388

### 389 6.3.1.4 タイターアッセイのカットポイント

390 タイターアッセイでは、用量反応曲線の特性を考慮して、必要に応じ、タイター測定用のカッ  
391 トポイント（例えば、偽陽性率 0.1%）を設定することもできる。

392

## 393 6.3.2 特異性

394 特異性とは、類似物質との識別能のことであり、抗原となる薬物によりレスポンスが競合的に  
395 阻害されることにより確認する。別の薬物に対して調製された抗薬物抗体（交差反応することが  
396 想定されないもの）を試料とした場合に、有意なレスポンスが検出されないことにより、確認す  
397 ることも有用かもしれない。

398

## 399 6.3.3 選択性

400 選択性とは、試料中の妨害物質の存在下で、分析対象物質を適切に検出する能力のことである。  
401 抗薬物抗体分析用の試料の中には、薬物、薬物の標的分子等が含まれる可能性があり、これらの  
402 存在によりレスポンスが変動する可能性がある。薬物や薬物の標的分子以外にも、関節リウマチ  
403 患者にみられるリウマチ因子（抗 Fc 抗体）のように、抗薬物抗体分析系に影響を与え得る干渉因  
404 子が知られているので、想定される干渉因子が入手可能であれば、これらの物質の有無でレスポ  
405 ンスを比較することにより、それらの影響を評価しておくことは重要である。溶血や高脂質マト  
406 リックスについても、想定される試料の状況や対象疾患により、必要と考えられる場合は評価を

407 行う。

408

#### 409 **6.3.4 精度**

410 抗薬物抗体分析は定量を目的とする試験ではないが、得られるレスポンスとカットポイントの  
411 比較により陽性検体を識別することから、精度の評価は必要である。分析単位内および分析単位  
412 間での精度を評価する。特に、カットポイントを少し上回るレスポンスが得られる陽性対照物質  
413 濃度での精度評価が重要であり、定量分析と同様に、CVが20%以下であることが望ましい。

414

#### 415 **6.3.5 感度（検出下限）**

416 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、感度を  
417 求める。一般に、100 ng/mLの抗薬物抗体を検出できる感度が推奨されるが、バリデーションで  
418 得られる値は、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  
419 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である。

420

#### 421 **6.3.6 希釈直線性**

422 陽性対照物質を用いて、希釈直線性を確認する。プレートへの固定化試薬と検出用試薬として  
423 同じ薬物を用いるブリッジング法では、分析対象物質が高濃度の場合にレスポンスが低下するフ  
424 ック効果が見られることがあり、スクリーニングアッセイのS/N比をタイターの代替指標としよ  
425 うとする場合は、特に注意が必要となる。

426

#### 427 **6.3.7 共存薬物耐性**

428 共存薬物耐性の指標として、設定されたカットポイントにおいて、陽性対照物質が検出できる  
429 共存薬物濃度を求める。臨床試験で投与された薬物のトラフ値以上の共存薬物耐性が得られるこ  
430 とが望ましい。ただし、この値は、評価に用いる陽性対照物質の濃度や特性によって変動するた  
431 め、陽性対照物質の薬物結合親和性に依存した値になることに注意が必要であり、特性の異なる  
432 複数種類の陽性対照物質を用いることで薬物耐性をより詳細に評価することも可能である。

433

#### 434 **6.3.8 安定性**

435 抗薬物抗体分析に用いられる陽性対照物質は、実試料中の抗薬物抗体とは構造が異なる物質で  
436 あるので、マトリックス中での陽性対照物質の安定性を評価することは、実試料中の抗薬物抗体  
437 の安定性を担保することにはつながらない。一方で、重要試薬としての品質を評価するため、陽  
438 性対照物質を用いた安定性評価を行うことは有用である。

439

### 440 **6.4 実試料分析**

441 バリデーションにより分析性能が確認されたアッセイ系を用いて、スクリーニングアッセイ、  
442 確認アッセイを行う。各測定の実験性を確認するための方策として、下記に留意する。

443

#### 444 6.4.1 システム適合性

445 抗薬物抗体分析を行う際には、分析単位内で Quality Control (QC) 試料（陽性対照物質）及び  
446 陰性対照試料を測定し、その測定結果が予め定めた基準を満たすことを確認する。QC 試料の濃度  
447 は、少なくとも一つは、カットポイント付近の低濃度に設定する。システム適合性の例として、  
448 QC 試料のレスポンス（測定値、精度）、陰性対照試料のレスポンス（測定値、精度）等がある。  
449 陽性対照物質の用量反応曲線を得ておくことも、アッセイのトレンドを見る上で役に立つ。

450

#### 451 6.4.2 薬物濃度測定

452 試料中に残存する薬物が抗薬物抗体の検出を妨害する可能性があるため、各実試料中の薬物濃  
453 度を測定しておくことで、抗薬物抗体分析の結果の妥当性を評価することができる。また、抗薬  
454 物抗体発現時に PK の低下、上昇が認められる可能性もあるため、PK 及び抗薬物抗体測定用の採  
455 血は同時期に設定することを推奨する。

456

### 457 6.5 抗薬物抗体分析法に関するその他の留意事項

#### 458 6.5.1 陽性対照物質の評価と管理

459 陽性対照物質は、薬物に対する特異性が確認されたものを用いる。動物を免疫して得た抗体の  
460 場合、ヒト抗体とは定常領域の構造も異なるため、ヒト IgG 定常領域を認識する試薬を用いるア  
461 ッセイにおいては、陽性対照物質とすることが出来ない。様々な特性を有する抗体（例えば、中  
462 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  
463 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。  
464 陽性対照物質については、調製方法と特性解析結果を適切に記録し、意図した特性を持つ陽性対  
465 照物質であることを明確にしておく。ロット更新を行う場合は、更新時の評価法と適否の判定基  
466 準を定めておく。

467

#### 468 6.5.2 重要試薬

469 抗薬物抗体分析に用いられる重要試薬として、陽性対照物質（抗薬物抗体）、陰性対照試料（健  
470 康人あるいは患者の混合血清／血漿試料等）、標識した薬物等が挙げられる。重要試薬については、  
471 試験が行われる期間を通じて、特異性を含めて適格性が評価された同一のものを使用することが  
472 望ましいが、ロットを更新・変更する必要がある場合は、ロット更新の方法とロット更新時の基  
473 準を予め定めておく。なお、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  
474 の再設定を行う。また、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  
475 ンスを継続的に確認することにより、使用期間中の安定性を確認することが有用である。

476

#### 477 6.5.3 MRD (minimum required dilution)

478 分析法確立の際に、試料を緩衝液で希釈する適切な倍率 (MRD) を定めておく。希釈倍数を大  
479 きくすると干渉物質の影響を回避しやすくなるが、一方で、検出感度は低くなる。MRD は、必ず  
480 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、すべての試料で同一とする。

481

#### 482 6.5.4 共存薬物耐性の向上（共存薬物による妨害の回避）

483 患者試料に含まれる薬物が、誘導された抗薬物抗体と複合体を形成し、アッセイのレスポンス  
484 が減少することがある。特に、血中濃度が高く、血中半減期が長い抗体医薬品等では注意が必要  
485 である。抗薬物抗体分析のレスポンスに対する共存薬物の影響の程度を評価し、必要に応じて、  
486 その影響を回避する手法を確立する必要がある。共存薬物への耐性を向上させる方法として、例  
487 えば、酸で薬物・抗薬物抗体複合体を解離させる、固相吸着で過剰な薬物を除去する、インキュ  
488 ベーション時間を長くする、十分に試料を希釈するなどがある。このような手法を用いる場合は、  
489 これらの過程も含めて、バリデーションを実施する必要がある。また、薬物耐性向上のための試  
490 料の前処理を含む場合も、含まない場合も、バリデーションにおいて抗薬物抗体分析に影響が生  
491 じる薬物濃度（薬物耐性の限度値）を明らかにする。

492

#### 493 6.6 データの報告

494 臨床試験で評価された結果は、各試験について、対象とした被験者数、投与前後の抗薬物抗体  
495 の陽性率、投与後の抗薬物抗体発現状況、抗薬物抗体が薬物動態に及ぼす影響、中和活性の陽性  
496 率、抗薬物抗体の特性解析の結果等を検討し報告する。各試料の評価結果に関して、薬物濃度が  
497 共存薬物耐性を上回る試料については、抗薬物抗体分析の結果が陰性であっても、抗薬物抗体が  
498 存在する可能性が否定できないため、当該試料の評価結果は、判定不能（inconclusive）として報  
499 告することが適切な場合がある（参考文献2）。各被験者について複数回の検体採取を行った場合、  
500 被験者ごとの結果については、各時点の試料の測定結果を統合して判断する。抗薬物抗体が陽性  
501 であった患者において、有効性の低下や有害反応が生じていないかを評価する。

502

#### 503 6.7 その他

##### 504 6.7.1 バイオ後続品開発における免疫原性の比較

505 バイオ後続品は、先行品とは異なる方法で製造されているため、翻訳後修飾や高次構造が先行  
506 品と異なる可能性があり、臨床試験において免疫原性を比較する必要性が高い。バイオ後続品の  
507 抗薬物抗体分析には、1種類のアッセイ系を用いる方法と2種類のアッセイ系を用いる方法があ  
508 る。1種類のアッセイ系を用いる場合は、バイオ後続品を結合試薬として用い、先行品投与患者試  
509 料及び後続品投与患者試料の両方を同一のアッセイ系で評価する。この方法では、同じ分析能を  
510 持つ評価系で先行品と後続品の免疫原性を比較することができることが利点であるが、先行品に  
511 のみ結合する抗薬物抗体が生じていた場合は検出されない。2種類のアッセイ系を用いる場合は、  
512 先行品及び後続品をそれぞれ結合試薬として抗薬物抗体分析法を確立する。先行品及び後続品に  
513 対する抗薬物抗体をそれぞれ検出することができるが、2つのアッセイ系の分析性能に差異がな  
514 いことを示す必要がある。

515

##### 516 6.7.2 原薬製造方法変更に伴う抗薬物抗体分析系の再構築

517 バイオ医薬品の開発過程で、原薬製造方法の変更が行われる場合、薬物の抗原性に変化が生じ  
518 る可能性があるため、製法変更の程度を考慮して、必要と考えられる場合は、抗薬物抗体分析に  
519 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、製法変更後の製品を用いて再調製し、

520 評価系を再構築する。

521

### 522 6.7.3 不純物に対する抗体の評価

523 バイオ医薬品の免疫原性に関するこれまでの事例から、バイオ医薬品製剤中に残存する HCP に  
524 対して、抗体が生じる場合があることが知られている。薬物に対する抗体の分析の他、製剤中に  
525 特定の HCP 分子種が残存していることが懸念される場合は、その HCP 分子種に対する抗体を検  
526 出するための分析を行うことが有用である。

527

## 528 7. リスク低減策

529 品質管理戦略の構築の過程、および、臨床試験で得られた情報を元に、品質および臨床的な観  
530 点から、リスク低減策を講じる。

531

### 532 7.1 品質的要因に関連するリスク低減策

533 バイオ医薬品の開発過程では、3.1 項に述べた要因に関して、免疫原性リスク低減策の一環とし  
534 て、製造工程パラメータの設定による翻訳後修飾やその他の分子変化体プロファイルの管理手法  
535 の確立、不純物の低減、処方最適化、適切な製剤容器の選択を行う。臨床試験に用いられたロ  
536 ットの分析結果と、臨床試験で得られた抗薬物抗体評価結果等の関連を評価し、品質特性と免疫  
537 原性の関連を示唆する知見が得られた場合は、ハザードの特定に努め、更なるリスク低減策を講  
538 じる。

539

### 540 7.2 臨床的要因に関連するリスク低減策

541 免疫原性評価が行われた各臨床試験において、抗薬物抗体陽性の被験者が見いだされた場合、  
542 抗薬物抗体の出現と、薬物濃度、薬理作用マーカー、有効性、安全性の関連を評価し、有効性・安  
543 全性への影響を考察する。また、抗薬物抗体の出現について、投与量、投与経路、投与間隔、患者  
544 の年齢、性別、併用薬等との関連を評価し、抗薬物抗体出現に影響する要因（ハザード）が見い  
545 だされた場合は、リスク低減のための対応が必要であるかを検討する。特定されたハザードに対  
546 するリスク低減策に関し、開発過程で検討できることとして、投与量、投与経路、対象患者の選  
547 定や、併用薬の利用などの対応が考えられる。製造販売後においては、リスク低減策の一環とし  
548 て、医薬品リスク管理計画や添付文書等において、適切な情報提供を行う。

549

## 550 8. 製造販売後のリスク管理と情報提供

### 551 8.1 医薬品リスク管理計画への記載

552 免疫原性に関して得られているデータを基にリスク評価を行い、必要に応じて医薬品リスク管  
553 理計画に記載する。該当する安全性検討事項の区分（重要な特定されたリスク、重要な潜在的リ  
554 スク、重要な不足情報）を示し、得られている臨床試験の結果の概要に基づき、その区分に該当  
555 する理由を記載する。臨床試験の結果の概要に関しては、抗薬物抗体陽性率、抗薬物抗体の薬物  
556 動態や有効性への影響および有害事象との関連等について、可能な範囲で考察し記載する。医薬  
557 品安全性監視活動、リスク最小化活動について、それぞれの内容と選択理由を記載する。

558

559 参照する主な通知：医薬品リスク管理計画指針について（平成 24 年 4 月 11 日 薬食安発 0411  
560 第 1 号薬食審査発 0411 第 2 号）

561

## 562 8.2 電子化された添付文書（又は電子添文）等での情報提供

563 「15. その他の注意」の「15.1 臨床使用に基づく情報」の項目において、代表的な臨床試験に  
564 おける、抗体陽性率及び中和抗体陽性率を記載する。また、対象疾患、主要な投与量及び投与間  
565 隔等の抗薬物抗体出現に影響する要因を推察する上で必要な試験情報を簡潔に記載する。当該条  
566 件下での抗薬物抗体陽性例に関して、必要に応じて薬物動態への影響、有効性への影響、副作用  
567 等との関連の考察を記載する。その他に、臨床試験の結果や製造販売後の情報から、適正使用上、  
568 情報提供が必要な場合には、(7)用法及び用量に関連する注意、(8)重要な基本的注意、(9)特定の背  
569 景を有する患者に関する注意、(11)副作用、等の項目に、該当する内容を記載する。医療従事者向  
570 けのその他の情報提供資材を活用することもできる。

571

572 参照する主な通知：医療用医薬品の電子化された添付文書の記載要領について（令和 3 年 6 月 11  
573 日 薬生発 0611 第 1 号、令和 5 年 2 月 17 日最終改正）

574

## 575 8.3 その他

576 承認後に、投与後の無効例が多い場合や抗薬物抗体に起因すると考えられる重篤な副作用の発  
577 現が認められた場合には、原因究明や追加の安全対策を講じることが必要となる場合がある。

578

579

## 580 9. 用語解説

581 ・薬物

582 投与されたバイオ医薬品に含まれる有効成分。

583

584 ・抗薬物抗体（ADA：anti-drug antibody）

585 投与されたバイオ医薬品に対して生じた抗体。

586

587 ・スクリーニングアッセイ

588 抗薬物抗体を含む可能性のある検体を選択する試験。

589

590 ・確認アッセイ

591 スクリーニングアッセイで陽性となった検体について、得られたレスポンスが抗薬物抗体に起  
592 因するものであることを確認する試験。

593

594 ・カットポイント

595 スクリーニングアッセイ及び確認アッセイにおいて、抗薬物抗体陽性と判定する閾値。

596

597 ・ Normalization factor (N-factor)

598 スクリーニングアッセイにおいて floating cut point を用いる場合、陰性対照試料の測定結果か  
599 らカットポイントを算出するために用いる係数.

600

601 ・ 陽性対照物質

602 アッセイ系の評価に用いる抗薬物抗体. 通例, 動物を免疫して調製するポリクローナル抗体や  
603 モノクローナル抗体が用いられる. ヒト抗体ライブラリーやヒト化動物等から得られるヒトモノ  
604 クローナル抗体が用いられる場合がある.

605

606 ・ 陰性対照試料

607 抗薬物抗体を含まないマトリックス試料. 通例, 複数個体に由来するマトリックスを混合した  
608 ものが用いられる.

609

610 ・ 個別ブランク試料

611 抗薬物抗体を含まないマトリックス試料で, 各個体から得た個別のマトリックス試料.

612

613 ・ マトリックス

614 試料中の分析対象物質以外の成分を指し, 抗薬物抗体分析の場合は, 血清あるいは血漿成分が  
615 該当する.

616

617 参考文献

618 1) J Pharm Biomed Anal. 2008, 48(5) 1267-81

619 2) AAPS J. 2014, 16(4) 658-673

620

## 621 補遺 1 代表的な抗薬物抗体分析法と特徴

622 抗薬物抗体分析には、通例、薬物に対する抗薬物抗体の結合性を指標としたリガンド結合法が  
623 用いられる。代表的な方法として、酵素免疫測定法 (ELISA: Enzyme-linked immunosorbent  
624 assay)、電気化学発光法 (ECL: Electrochemiluminescence)、表面プラズモン共鳴法 (SPR:  
625 Surface plasmon resonance) 等があり、各分析法は、抗薬物抗体の薬物への結合に由来するレス  
626 ポンスの検出法に関して、それぞれ特徴がある。

627 ELISA や ECL は、マイクロプレートを用いて、プレートに固相化した薬物に結合した抗薬物  
628 抗体を標識薬物もしくは抗ヒト Ig 抗体などで検出する方法であり、抗薬物抗体分析に最もよく用  
629 いられる方法である。薬物をプレートに固相化し、試料中の抗薬物抗体を結合させたのち、検出  
630 用試薬 (薬物、抗ヒト Ig 抗体等) を結合させるステップワイズ法、および薬物、試料 (抗薬物抗  
631 体)、及び検出用試薬を混合して結合させた後、薬物を捕捉できる処理が施されたプレートに添加  
632 するホモジーニクス法の 2 種類の方法が使用される。また、抗薬物抗体のプレートへの捕捉と検  
633 出用試薬の両方に薬物を用いる方法は、ブリッジング法と呼ばれる。抗薬物抗体分析では、多く  
634 の場合、抗薬物抗体が多価の分子であることを利用し、ブリッジング法が採用されている。

635 抗薬物抗体の中和活性の測定には、薬物と標的分子の結合に対する抗薬物抗体の阻害効果を評  
636 価する競合リガンド結合法の他、薬物の生物活性を評価可能な細胞応答性試験が用いられる。

637

### 638 (1) 酵素免疫測定法 (ELISA)

639 ELISA は、酵素標識した検出用試薬を用いる方法で、ステップワイズ法の場合は通例、薬物を  
640 プレートに固相化し、試料中の抗薬物抗体を結合させたのち、酵素標識した検出用試薬 (薬物、  
641 抗ヒト Ig 抗体等) を結合させ、酵素の基質を添加して反応させることで、固相に結合した抗薬物  
642 抗体を検出する。直接固相化法及び間接固相化法があり、直接固相化法では薬物をプレートに直  
643 接結合させ、間接固相化法ではビオチン等で修飾した薬物を、アビジン等を固相化したプレートに  
644 結合させる。

645 特殊な機器を用いる必要がなく、多検体処理が可能であるが、マトリックスの影響を受けやす  
646 く、洗浄回数が多いため低親和性の抗体が検出されにくい可能性がある。一般に、ELISA は、ブ  
647 リッジング ECL と比較して高濃度側での飽和が起こりやすく、測定範囲が狭い。

648

### 649 (2) 電気化学発光法 (ECL)

650 ECL は、電極を備えたプレート上で反応を行う方法である。ブリッジング法を用いたホモジー  
651 ニクス ECL の場合は通例、試料を 2 種類 (ビオチン、ルテニウム錯体) の標識薬物と反応させた  
652 ものをアビジンコートしたプレートに移し、プレートの電極上からの電気化学的刺激によりルテ  
653 ニウム錯体を発光させて、固相に結合した抗薬物抗体を検出する。

654 最もよく用いられる方法であり、多検体処理が可能であり、マトリックスの影響を受けにくい  
655 とされるが、ブリッジング法では高濃度領域でフック効果が生じやすい。

656

### 657 (3) 表面プラズモン共鳴法 (SPR)

658 SPR は、センサーチップ上の質量の変化を、表面プラズモン共鳴により生じる反射光の消失角

659 度の変化として検出する方法で、通例、薬物をセンサーチップに固定化し、試料中の抗薬物抗体  
660 を結合させる。抗体のサブクラスを識別できる 2 次抗体を用いることで、抗薬物抗体の特性解析  
661 に用いることもできる。

662 プレートを用いる方法と比較すると、処理できる検体数が少ないが、プレート上での洗浄操作  
663 を要しないこともあり、低親和性の抗体の検出が可能である。ELISA や ECL と比較すると、感  
664 度は高くない場合が多い。

665

#### 666 (4) 競合リガンド結合法（中和活性測定）

667 薬物における抗薬物抗体の結合部位が、薬物の標的分子結合に関わる部位であることを評価す  
668 るため、薬物と標的分子の結合を評価できる ELISA や ECL 等のアッセイ系に抗薬物抗体を添加  
669 し、抗薬物抗体による競合阻害を評価する。中和抗体アッセイに用いられる。

670 細胞を用いる必要がなく、スクリーニングアッセイや確認アッセイと同様のプラットフォーム  
671 を用いることができる利点があるが、測定系に用いる標的分子の構造が保持されていない可能性  
672 等もあることから、中和活性を反映する妥当な測定系を用いるべきである。標的分子の構造の保  
673 持が問題となる場合等では、標的分子を発現する細胞を用いてフローサイトメトリーによる評価  
674 も可能である。

675

#### 676 (5) 細胞応答性試験（中和活性測定）

677 標的分子（例：受容体）を介した薬物（例：リガンド）の作用を評価できる細胞応答性の評価系  
678 に、抗薬物抗体を添加し、その阻害作用を評価する。中和抗体アッセイに用いられる。

679 薬物の作用機序を反映した中和抗体の評価が可能であるが、リガンド結合法と比較すると頑健  
680 性が低い場合がある。

681

682 補遺 2 代表的なカットポイント設定法

683 (1) Fixed cut point

684 カットポイント設定のために実施した各分析単位間において、個別ブランク試料の測定値の平均  
685 値と分散に統計的な差がない場合に用いられる方法であり、分析法開発の際に算出されたカット  
686 ポイントと同じ値を実試料分析におけるカットポイントとする。この方法では、すべての分析  
687 単位で同じカットポイントを用いることになる。

688

689 (2) Floating cut point

690 カットポイント設定のために実施した各分析単位において、個別ブランク試料の平均値に統計  
691 的な差があるものの、分散に統計的な差がない場合は、floating cut point を利用する。Floating  
692 cut point を用いる場合は、カットポイント設定のために実施した各分析単位において算出された  
693 カットポイントから陰性対照試料の測定値を差し引くことにより normalization factor (N-factor)  
694 を求め、実試料分析時の陰性対照試料測定値に N-factor を加算した値をカットポイントとする。  
695 データの正規化のために測定値を対数変換した場合は、各分析単位の個別のカットポイントを陰  
696 性対照試料の測定値で除して N-factor を求め、実試料分析時の陰性対照試料測定値に N-factor を  
697 乗じた値をカットポイントとする。

698

699 (3) Dynamic cut point

700 分析単位間で個別ブランク試料の分散に統計的に差があれば、平均値の差の有無にかかわらず、  
701 dynamic cut point を利用する。この方法では、分析法開発時に得られたカットポイントを利用せ  
702 ず、実試料測定時に、陰性対照試料測定値からカットポイントを算出する。

703

704 ※外れ値の除外・データ変換について

705 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  
706 (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  
707 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、  
708 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  
709 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  
710 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  
711 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  
712 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  
713 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  
714 る。

715