目次

2.7.1.1 背景及び概観.....5
2.7.1.1.1 製剤開発過程.....5
2.7.1.1.1.1 製剤開発の経緯.....5
2.7.1.2 個々の試験結果の要約.....5
2.7.1.2.1 グルカルピダーゼ.....5
2.7.1.2.1.1 ヒト血清中のグルカルピダーゼ活性（1845/017）.....5
2.7.1.2.1.2 ヒト血清及び尿中のグルカルピダーゼ含有量（1845/021）.....6
2.7.1.2.1.3 ヒト血清中のグルカルピダーゼ含有量（PR001-CLN-rptBA020）.....7
2.7.1.2.1.4 ELISA 法によるヒト血漿及び尿中グルカルピダーゼ濃度測定法のバリデーション試験（[redacted]852-006）.....8
2.7.1.2.1.5 ヒト血中グルカルピダーゼ濃度測定及び抗グルカルピダーゼ抗体測定（マトリックス間における測定値の比較）（[redacted]354-027）.....9
2.7.1.2.2 抗グルカルピダーゼ抗体.....9
2.7.1.2.2.1 ヒト血清中の抗グルカルピダーゼ抗体（1845/22）.....9
2.7.1.2.2.2 ヒト血清中の抗グルカルピダーゼ中和抗体（1845/034 及び 1845/061）.....11
2.7.1.2.2.3 ヒト血清中の抗グルカルピダーゼ抗体（PR001-CLN-rptBA028）.....11
2.7.1.2.2.4 ヒト血清中の抗グルカルピダーゼ中和抗体（PR001-CLN-rptBA031 及び PR001-CLN-rptBA049）.....14
2.7.1.2.2.5 ELISA 法によるヒト血漿中抗グルカルピダーゼ抗体測定法のバリデーション試験（[redacted]852-007）.....15
2.7.1.2.2.6 ヒト血中グルカルピダーゼ濃度測定及び抗グルカルピダーゼ抗体測定（マトリックス間における測定値の比較）（[redacted]354-027）.....15
2.7.1.2.3 MTX，OH-MTX 及び DAMPA.....16
2.7.1.2.3.1 ヒト血清中の HPLC-UV による MTX，OH-MTX 及び DAMPA（PR001-CLN-rptBA009）.....16
2.7.1.2.3.2 ヒト尿中の HPLC-UV による MTX，OH-MTX 及び DAMPA（PR001-CLN-rptBA008）.....17
2.7.1.2.3.3 ヒト血漿中の HPLC-UV による MTX 及び DAMPA（PR001-VTR-001）.....18
2.7.1.2.3.4 ヒト血漿中の HPLC-蛍光法による MTX 及び DAMPA（PTU 018）.....19
2.7.1.2.3.5 ヒト血漿中及びヒト血清中の HPLC-蛍光法による MTX 及び DAMPA（PTU 030）.....20
2.7.1.2.3.6 ヒト血漿中及びヒト血清中の HPLC-蛍光法による MTX，OH-MTX 及び DAMPA（PR001-CLN-rptBA015）.....20
2.7.1.2.3.7 ヒト血漿中の LC-MS/MS による MTX（PR001-NCL-rptBA017）.....21

2.7.1.2.3.8 LC-MS/MS 法によるヒト血漿中 MTX 及び DAMPA の濃度測定法バリデーション（[redacted]852-012）.....22
2.7.1.2.3.9 ヒト血漿中 MTX 及び DAMPA の濃度測定法パーシャルバリデーション（[redacted]354-023）.....23
2.7.1.2.4 LV 及び 5-MeTHF.....24
2.7.1.2.4.1 ヒト血漿中の(6R)-LV，(6S)-LV，(6) D/R-5-MeTHF 及び(6) L/S-5-MeTHF（PR001-CLN-rptBA003）.....24
2.7.1.2.4.2 ヒト血漿中の(6R)-LV，(6S)-LV，(6) D/R-5-MeTHF 及び(6) L/S-5-MeTHF（PR001-CLN-rptBA024）.....25
2.7.1.2.4.3 ヒト血漿中の(6R)-LV，(6S)-LV，(6) D/R-5-MeTHF 及び(6) L/S-5-MeTHF（PR001-CLN-BA034）.....27
2.7.1.2.4.4 LC-MS/MS 法によるヒト血漿中 LV 及び 5-MeTHF の濃度測定法バリデーション（[redacted]852-011）.....27
2.7.1.2.4.5 LC-MS/MS 法によるヒト血漿中 5-MeTHF の濃度測定法バリデーション（[redacted]852-003）.....28
2.7.1.3 全試験を通しての結果の比較と解析.....30
2.7.1.4 付録.....34
2.7.1.4.1 MTX 血液試料取扱い試験.....34
2.7.1.4.1.1 ウサギ試料の取扱い試験（PR001-NCL-repIN001）.....34
2.7.1.4.1.2 ヒト全血 MTX スパイク試験（PTU 0039）.....34
2.7.1.4.1.3 ヒト血漿 MTX 添加試験（PR001-NCL-rptPK008）.....35
2.7.1.4.1.4 グルカルピダーゼ含有血漿中での MTX 消失試験（[redacted]354-010）.....37
2.7.1.4.1.5 ヒト血漿中 MTX 及び DAMPA の濃度測定法パーシャルバリデーションにおける予備検討（[redacted]354-013）.....37

略語等一覧

略語	英語	日本語
(6) D/R-5-MeTHF	D stereoisomer of 5-methyltetrahydrofolate	(6R)-5-メチルテトラヒドロ葉酸（ロイコボリンの不活性代謝物）
(6) L/S-5-MeTHF	L stereoisomer of 5-methyltetrahydrofolate	(6S)-5-メチルテトラヒドロ葉酸（ロイコボリンの活性代謝物）
(6R)-LV	D stereoisomer of leucovorin	ロイコボリンの D-立体異性体（ロイコボリンの不活性体）
(6S)-LV	L stereoisomer of leucovorin	ロイコボリンの L-立体異性体（ロイコボリンの活性体）
5-MeTHF	5-methyltetrahydrofolate	5-メチルテトラヒドロ葉酸（ロイコボリン活性代謝物）
AU	Absorbance Unit	吸光度単位
BLQ	Below lower limits of quantitation	定量下限未満
[redacted]	[redacted]	—
[redacted]	[redacted]	—
CV	Coefficient of Variation	変動係数
DAMPA	4-deoxy-4-amino-N^{10}-methylpteroic acid	4-デオキシ-4-アミノ-N^{10}-メチルプテロイン酸（グルカルピダーゼによるメトトレキサート代謝物）
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay	酵素免疫測定
FDA（CDER）	Food and Drug Administration (Center for Drug Evaluation and Research)	米国食品医薬品局（医薬品評価研究センター）
HiPC	—	高濃度陽性対照
HPLC	High-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
[redacted]	[redacted]	[redacted]
LC-MS/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry/mass	液体クロマトグラフィー質量分析法
LLOQ	Lower limit of quantification	定量下限
LOD	Limit of detection	検出限界
LoPC	—	低濃度陽性対照
LV	Leucovorin	ロイコボリン（一般名ホリナートカルシウム，別名ロイコボリンカルシウム）
MTX	Methotrexate	メトトレキサート

略語	英語	日本語
PBS	Phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水溶液
QC	Quality Control	品質管理
RE	Relative Error	相対誤差
TMB	Tetramethylbenzidine	テトラメチルベンジジン
ULOQ	Upper limit of quantification	定量上限
UV	Ultraviolet	紫外線

2.7.1.1 背景及び概観

グルカルピダーゼ（遺伝子組換え）（以下，グルカルピダーゼ）は静脈内投与されることから，生物薬剤学試験は実施していない．

本項では，検体中に含まれるグルカルピダーゼ，抗グルカルピダーゼ抗体，メトトレキサート（MTX），4-deoxy-4-amino-N^{10}-methylpteroic acid（DAMPA），ロイコボリン（LV）及びその活性代謝物 5-メチルテトラヒドロ葉酸（5-MeTHF）濃度の測定法の概要について記載した．

一部の測定法については複数の手法を記載しているが，これらは開発当時の最も適した方法への改良，若しくは，規制ガイドラインへの適用などによるものである．

記載順序についてはバリデーションを実施した時系列に従っている．また，全試験を通しての結果の比較と臨床試験への適用について 2.7.1.3 に示した．

2.7.1.1.1 製剤開発過程

2.7.1.1.1.1 製剤開発の経緯

グルカルピダーゼの製造方法は開発段階において，DNA 供与体である *Variovorax Paradoxus* から抽出／精製した製法，英国の[redacted]での遺伝子組換え大腸菌を使用した製法，ベルギーの[redacted]での遺伝子組換え大腸菌を使用した小スケールでの製法，[redacted]での遺伝子組換え大腸菌を使用した実生産スケールでの製法と変更している．臨床試験で用いた製剤は，[redacted]での実生産スケールでの製法により製造した原薬を使用した．製剤の製造場所は，当初は[redacted]で製造され，2003年にカナダの[redacted]に移管され，2009年に米国の[redacted]に移管された．[redacted]及び[redacted]で製造された製剤が臨床試験で用いられた．[redacted]及び[redacted]での製造プロセスは，新たな機器の設置対応のための軽微な変更を行なったが，大きな変更はない．

原薬製法の開発経緯は 2.3.S.2.6，製剤製法の開発経緯は 2.3.P.2.3 に示した．

2.7.1.2 個々の試験結果の要約

2.7.1.2.1 グルカルピダーゼ

2.7.1.2.1.1 ヒト血清中のグルカルピダーゼ活性（1845/017）

（期間：20[redacted]年[redacted]月～20[redacted]年[redacted]月）（添付資料：5.3.1.4-2）

ヒト血清中グルカルピダーゼ活性の分析法バリデーションは，[redacted], UK で実施された．グルカルピダーゼ活性は，酵素－基質分光法によって測定される．つまり，基質である MTX の分解は 320 nm における紫外線（UV）吸収を経時的にモニターすることにより測定される．吸光度の変化率はグルカルピダーゼ活性と直接的に関連する．過剰量の基質が存在するとき，時間に対する吸光度の増加は直線となる．対照反応溶液の傾き（Abs/min）と，正確な既知濃度のグルカルピダーゼを含む並行反応液の傾きを比較することで，未知の試験試料中の酵素活性及び酵素濃度を算出できる．この定量は pH

と温度に影響を受けるため，最大バッチサイズとして 51 試料[校正用標準及び品質管理(QC)用試料を含む] についてバリデートした．

標準溶液の直線定量範囲は 0.26～1.29 μg/mL であった．検量線について得られた R^2 相関係数は 0.9945 であり，直線部を規定する定量下限（LLOQ）は 0.26 μg/mL であった．

日常的に実施する定量には以下の QC 試料が推奨された：低濃度 QC 0.6 μg/mL，中濃度 QC 0.9 μg/mL，高濃度 QC 1.2 μg/mL．QC 試料の定量値の精度及び真度は，低濃度 QC を除き，設定濃度の 15%以内とした．また，低濃度 QC については，設定濃度の 20%以内とした．

中濃度 QC のレベルにある 6 例のヒト血清試料の真度 (%) は 104.7%であったことから，本定量法はグルカルピダーゼに特異的であると判定された．中濃度 QC のレベルでヒト血清試料にグルカルピダーゼをスパイクしたとき，3 回の凍結／融解サイクルで安定であると判定された．

別の安定性試験（1845/20，添付資料：5.3.1.4-3）において 0.6，0.9 及び 1.2 μg/mL の QC レベルにあるグルカルピダーゼを含むヒト血清試料は 25℃（設定温度）では最長 48 時間，また－70℃（設定温度）では最長 12 週間安定であると判定された．

2.7.1.2.1.2　ヒト血清及び尿中のグルカルピダーゼ含有量（1845/021）

（期間：20[redacted]年[redacted]月～20[redacted]年[redacted]月）（添付資料：5.3.1.4-4）

ヒト血清中及び尿中のグルカルピダーゼ含有量の分析法バリデーションは，[redacted], UK において実施された．この方法は，Cytimmune Sciences Inc (College Park, MD, USA) が開発したイムノアッセイ［競合的酵素免疫測定（ELISA）法］に基づいている．

初めに 96 ウェルマイクロタイタープレートのウェルをヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G（IgG）（Fc 特異的）でコーティングした．適切に希釈したウサギ IgG 抗グルカルピダーゼは，一定量のビオチン標識グルカルピダーゼを混合させておいた連続希釈標準溶液，対照試料又は検体試料と共にインキュベーションした．インキュベーション後，ウサギ抗グルカルピダーゼ／グルカルピダーゼ複合体は，マイクロタイタープレート上にコーティングされたヤギ抗ウサギ抗体により捕捉される．標準溶液，対照試料及び検体試料中の未標識グルカルピダーゼは，ビオチン標識グルカルピダーゼと競合してウサギ IgG 抗グルカルピダーゼと結合する．ストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼ試薬を添加することによって，結合したビオチン—グルカルピダーゼを検出した．測定は，アルカリホスファターゼ発色試薬による比色反応（492 nm）により行った．

血清及び尿中グルカルピダーゼ濃度定量法のバリデーション試験は，0.5～750 ng/mL の濃度範囲で検討した．QC 試料は 75，125，250，500 及び 750 ng/mL の血清中濃度で評価し，測定は 10 倍希釈にて行った．尿対照試料の濃度は 12，24，100，200 及び 500 ng/mL とし，測定は 4 倍希釈にて行った．

高濃度側の 2 つの尿中濃度を除き，対照試料のアッセイ内及びアッセイ間の精度及び真

度は全て30%未満であり判定基準内であった．高濃度側の定量上限（ULOQ）の尿対照試料の分析単位内変動の真度は，35%未満であった．バッチの最初と最後に評価した血清及び尿の対照試料に，アッセイドリフトは認められなかった．

LLOQ及びULOQは，血清で75及び750 ng/mL，尿中で12及び500 ng/mLとした．

6例の血清試料にグルカルピダーゼを250 ng/mLの濃度までスパイクした結果から，特定の個体において血清によるマトリックス効果が認められた．したがって，全ての試料の分析はn=2又はn=3で行うこととした．6例の尿試料に100 ng/mLのグルカルピダーゼ濃度までスパイクした結果，その真度は全て設定濃度の±30%であり判定基準を満たしていた．

別の安定性試験（1845/20，添付資料：5.3.1.4-3）において125，250及び500 ng/mLのグルカルピダーゼを含むヒト血清試料は25℃（設定温度）では最長48時間，また−70℃（設定温度）では最長12週間安定であると判定された．24，100及び200 ng/mL濃度のヒト尿試料は25℃（設定温度）では最長48時間，また，−70℃（設定温度）では最長8週間安定であると判定された．

2.7.1.2.1.3　ヒト血清中のグルカルピダーゼ含有量（PR001-CLN-rptBA020）

（期間：20■年■月～20■年■月）（添付資料：5.3.1.4-5）

ヒト血清中のグルカルピダーゼを検出するための定量的ELISA法の分析法バリデーションは，[redacted], UKにおいて実施された．

なお，この分析法バリデーションは，ICH Q2（R1）分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）に示されている重要パラメータを評価するために設計された手順に基づいて実施された．また，本試験計画書は，米国食品医薬品局（医薬品評価研究センター）［FDA（CDER）］のGuidance for Industry, Bioanalytical Method Validation（生体試料分析法バリデーションに関する業界向けガイダンス）（2001年5月）の要件を満たし，かつ業界の見解も取り入れて設計された．

平底96ウェルイムノプレートに2 μg/mLのウサギ抗グルカルピダーゼ抗体をコーティングし，その後，非特異的タンパク質［リン酸緩衝生理食塩水溶液（PBS）／0.05%Tween-20］でブロッキングした．グルカルピダーゼを2.5 mg/mLとなるように調製し（この溶液は，標準液及びQC試料の調製に用いられた），その後所定のサンプルウェルに添加した．次に，HRP標識ヤギ抗グルカルピダーゼ抗体を添加し，発色基質であるテトラメチルベンジジン（TMB）を添加することにより発色した．塩酸を添加した後，分光光度計により450 nmで検出した（リファレンス630 nm）．試料中のグルカルピダーゼ濃度は検量線から算出した．

バリデーションされたグルカルピダーゼの検量線の範囲は2～100 ng/mLであった．QC試料をヒト血清中で2，5，25，50及び75 ng/mLの濃度で評価し，測定は10倍希釈にて行った．対照試料の分析単位内変動及び分析単位間変動の精度及び真度は全て25%未満であり判定基準を満たしていた．LLOQ及びULOQは2及び75 ng/mLに設定した．

中濃度QCの吸光度測定値に基づいたプレート全体の精度［変動係数（CV）%］は3.6%であった．プレートの個々の行及び列の精度は8.0%以内であった．プレートの最初と最後

の位置におかれたQC試料間のドリフトは，低濃度QCレベルで－18.7%，中濃度QCレベルで－12.3%，高濃度QCレベルで－14.7%であった．

640倍まで希釈された試料はバリデーションされ，この測定法において高濃度のフック効果は認められなかった．10例のヒト血清試料に高濃度QCレベル及び低濃度QCレベルをスパイクしたとき，グルカルピダーゼの回収率は±25%の範囲内であった．しかし，溶血血清又は高脂血症の血清では真度の結果は±25%の範囲外であった．MTX（0.16及び390 μg/mL）及びLV（0.005～9.35 μg/mL）の定量に対する影響は認められなかった．

5及び50 ng/mLの濃度のグルカルピダーゼを含むヒト血清試料は，室温で少なくとも24時間安定であり6回の凍結／融解サイクルまで安定であると判定された．

2.7.1.2.1.4　ELISA法によるヒト血漿及び尿中グルカルピダーゼ濃度測定法のバリデーション試験（[redacted]852-006）

（期間：20[redacted]年[redacted]月～20[redacted]年[redacted]月）（添付資料：5.3.1.4-6）

ELISA法によるヒト血漿及び尿中グルカルピダーゼ濃度測定法のバリデーション試験は[redacted]にて実施された．

本試験は，申請資料の信頼性の基準（「医薬品，医療機器等の品質，有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則」（昭和36年厚生省令第1号）第43条）に従った．

評価したバリデーション項目は，検量線，特異性，分析単位内変動，分析単位間変動，定量限界，希釈再現性，室温保存安定性，冷蔵保存安定性，凍結融解安定性，凍結保存安定性，標準原液安定性及び血清試料との比較である．検量線確認試験では，グルカルピダーゼ濃度が10，20，40，80，160，320及び640 pg/mLとなるように調製した試料を用いて検討した．この濃度範囲で検量線のr（相関係数）は0.9900以上であり，各濃度のRE（相対誤差）は検量線上限及び下限では±25%以内，その他の濃度で±20%以内となり良好であった．分析単位内変動確認試験及び分析単位間変動確認試験では，血漿及び尿共に再現性（ULOQ及びLLOQの精度が35%以内，その他は30%以内，ULOQ及びLLOQのREが±35%以内，その他は±30%以内）があることが確認された．その結果から血漿及び尿中グルカルピダーゼ濃度測定のULOQは64 ng/mL，LLOQは1 ng/mLとした．特異性確認試験では，男女各10例の血漿及び尿の特異性試料を測定したところ，特異性添加試料のREは±30%以内となり，特異性があることが確認された．ヒトプールブランク血漿及び尿にグルカルピダーゼを添加した試料を用いて希釈再現性確認試験を行ったところ，血漿試料はアッセイバッファーII[*1]で，尿試料はアッセイバッファーIII[*2]でそれぞれ10,000倍まで希釈可能であることが確認された．血漿及び尿中グルカルピダーゼは，それぞれ凍結融解操作は3回まで，室温及び冷蔵保存条件下で24時間まで，凍結保存条件下（－70℃以下）で3ヵ月間（94日間）まで安定であることが確認された．また，溶解後のグルカルピダーゼ（標準原液）は凍結保存条件下（－70℃以下）で3ヵ月間（94日間）まで安定であることが確認された．

以上の結果から，本分析法はいずれの検討項目も適合基準を満たしており，ヒト血漿及び尿中グルカルピダーゼ濃度測定法として十分信頼できるものと判断した．

＊1：アッセイバッファーI[*3]で100倍希釈したヒトプールブランク血漿
＊2：アッセイバッファーI[*3]で100倍希釈したヒトプールブランク尿
＊3：洗浄バッファー中1 w/v%スキムミルク

2.7.1.2.1.5　ヒト血中グルカルピダーゼ濃度測定及び抗グルカルピダーゼ抗体測定（マトリックス間における測定値の比較）（[redacted]354-027）

（期間：20[redacted]年[redacted]月～20[redacted]年[redacted]月）（添付資料：5.3.1.4-7）

ヒト血中におけるグルカルピダーゼ濃度測定は，[redacted]にて実施された．

本試験は，申請資料の信頼性の基準（「医薬品，医療機器等の品質，有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則」（昭和36年厚生省令第1号）第43条）に従った．

採血方法の違い（血清用採血管及びヘパリンNa含有採血管）によるグルカルピダーゼ濃度の定量値の差を比較した．なお，測定法に関しては「ELISA法によるヒト血漿及び尿中グルカルピダーゼ濃度測定法のバリデーション試験（[redacted]852-006，2.7.1.2.1.4）」に基づいた．

男女各3個体のヒト個体別ブランク血液に3濃度のグルカルピダーゼを添加し，得られた血清及び血漿試料を分析したところ，変化率は80～120%の範囲内であった．よって異なるマトリックスにおけるグルカルピダーゼの定量値の差は認められないと判断し，採血方法の測定結果に差はないと結論づけた．

2.7.1.2.2　抗グルカルピダーゼ抗体

2.7.1.2.2.1　ヒト血清中の抗グルカルピダーゼ抗体（1845/22）

（期間：20[redacted]年[redacted]月～20[redacted]年[redacted]月）（添付資料：5.3.1.4-8）

グルカルピダーゼに対する免疫IgG抗体検出用の分析法のバリデーションは[redacted]，UKで実施された．

直接ELISA法では，まず1 μg/mL（PBS）の濃度において4℃（設定温度）で14～24時間インキュベーションすることにより96ウェルマイクロプレート上に（100 μL/ウェル）グルカルピダーゼを吸着させた．その後，プレートを洗浄し（4回，PBS中0.1 v/v% Tween 20，400 μL/ウェル），非特異的結合を防ぐためにブロッキングを行った［1時間，PBS（アッセイバッファー）中1 w/v%ウシ血清アルブミン（BSA），200 μL/ウェル］後，再度洗浄した（4回，PBS中0.1 v/v% Tween 20，400 μL/ウェル）．ヒト血清試料及びウサギ抗グルカルピダーゼ抗体陽性対照試料をアッセイバッファーで100倍希釈し，プレートに添加した（100 μL/ウェル）．プレートを25℃（設定温度）で1時間インキュベーションした．プレートを洗浄し（4回，PBS中0.1 v/v% Tween 20，400 μL/ウェル），その後ビオチン標識プロテインGを各ウェルに添加し（100 μL/ウェル，1,000倍希釈），25℃（設定温度）で1時間インキュベーションした．プレートを洗浄し（4回，PBS中0.1 v/v% Tween 20，400 μL/ウェル），その後ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼを添加し（10,000倍希釈，100 μL/ウェル），25℃（設定温度）で30分間インキュベーションした．さらに洗浄した後（4回，PBS

中 0.1 v/v% Tween 20，400 µL/ウェル），TMB 基質を添加（100 µL/ウェル），プレートを 25℃（設定温度）で 20 分間インキュベーションした．塩酸溶液を添加（100 µL/ウェル）して反応を停止させ，吸光度を 450 nm で読み取り 540 nm でバックグラウンド補正を行った．

ウサギ抗グルカルピダーゼ抗血清（純度及び比質量単位は未知）を陽性対照として使用した．凍結乾燥抗血清を 1 mL ヒト血清中に溶解して「100 倍希釈高濃度陽性対照（HiPC）」を調製し，これを更にヒト血清で 5 倍希釈して「500 倍希釈低濃度陽性対照（LoPC）」を調製した．分析前に全ての陽性血清対照及び陰性血清対照及び試料を，PBS 中 1 w/v% BSA（アッセイバッファー）で 100 倍希釈した．

HiPC の吸光度測定値から，プレート全体の精度（CV%）5.6%が算出された．プレートの個々の行及び列の精度は 5.5%以内であった．プレートの最初と最後の位置におかれた対照試料間のドリフトは，LoPC レベルで－19.6%，HiPC レベルで－9.7%であった．

吸光度測定値に基づくアッセイ内精度は，LoPC で 3.2%，HiPC で 5.4%であり，陰性対照で 9.0%であった．アッセイ間精度は，LoPC で 33.4%，HiPC で 28.2%であり，陰性対照で 29.6%であった．

3 つのバリデーションバッチあたり 1 回 45 例の未処理のブランクヒト血清試料を分析して，本定量法の検出限界（LOD）及び陽性／陰性カットオフ値を算出した．測定された平均吸光度＋3 標準偏差から，LOD は 0.204 吸光度単位（AU）と計算された．

LoPC 試料及び HiPC 試料は，室温で 24 時間，3 回までの凍結／融解サイクルに対しベースライン吸光度の±20%以内で安定していた．

6 例の被験者からの未処理の血清を，スパイクなし（ブランク）及び LoPC と同濃度までスパイクして分析した．全てのブランク試料は陰性の結果を示したが，スパイクされた試料は陽性反応を示し，その精度（CV%）は 11.3%であった．定量法の特異性を確認するため，ウェルを BSA 又はヒト IgG でコーティングした．ウェルを BSA でコーティングしたとき，平均吸光度は 0.007 AU となり，二次検出物質であるプロテイン G が BSA に非特異的に結合しないことを確認した．次に，ウェルをヒト IgG でコーティングしたとき，最大吸光度（平均値 : 3.742 AU）が得られ，グルカルピダーゼでコーティングされたウェルに IgG の結合の有無を二次検出物質であるプロテイン G によって検出できたことを確認した．

未知濃度の臨床検体の分析には，以下の条件を推奨する．

陰性対照試料及び陽性対照試料を，各試料バッチの最初と最後に測定するべきである．陽性対照及び陰性対照の反復試験試料の精度（CV%）は 25%以内であること．陰性対照の吸光度は，LOD の 0.204 AU 未満であること．陽性対照の吸光度は，LOD の 0.204 AU 以上であること．

本測定法に対して事前に決定された LOD は 0.204 AU であった．測定値がこれを下回った試料は，抗グルカルピダーゼ抗体陰性と判断する．

2.7.1.2.2.2 ヒト血清中の抗グルカルピダーゼ中和抗体（1845/034 及び 1845/061）

（期間：20■ 年■ 月～20■ 年■ 月）（添付資料：5.3.1.4-9）

（期間：20■ 年■ 月～20■ 年■ 月）（添付資料：5.3.1.4-10）

MTX に対するグルカルピダーゼの酵素活性に対して中和活性を有する抗グルカルピダーゼ抗体の分析法の開発と分析法バリデーションは，[redacted]，UK にて実施された．

本定量法は，グルカルピダーゼ活性測定法（1845/017，2.7.1.2.1.1）を基に開発された．つまり，グルカルピダーゼが MTX のグルタミン酸部分を加水分解し，その生成物の吸光度が MTX と異なることを利用し，分光光度法により酵素活性を測定している．

320 nm での UV 吸光度で反応を経時的にモニターすることによって MTX の加水分解速度が得られる．過剰量の MTX（基質）が存在するとき，吸光度の経時的な減少が直線的なプロットとして得られる．分析法バリデーションで，本定量法でグルカルピダーゼが直線をとる範囲は 0.071～0.014 μg/mL と決定され，中濃度 QC のグルカルピダーゼレベルは，±15.0%以内の精度及び真度で 0.043 μg/mL と算出された．

上述の反応液中に抗グルカルピダーゼ中和抗体が共存する場合，アッセイ内のグルカルピダーゼの活性が阻害されることから反応速度が低下する．そのため，検量線から補完したグルカルピダーゼ濃度の結果は低くなる．

バリデーションでは 0.043 μg/mL のグルカルピダーゼを含む QC 試料（ヒトプール血清）及び 300 倍希釈したウサギ抗グルカルピダーゼ陽性対照抗血清をスパイクした QC 試料（ヒトプール血清）を同一アッセイ内で算出した濃度は 0.025 μg/mL であり，その精度（CV%）は 7.2%であった．アッセイ間で算出した平均濃度も 0.025 μg/mL であり，その精度は 8.1%であった．グルカルピダーゼと陽性対照を同様にスパイクした 6 例のヒト血清試料において認められた平均濃度は 0.026 μg/mL であり，その精度は 4.6%であった．抗グルカルピダーゼ抗体をスパイクしていない 6 例の血清試料中の平均グルカルピダーゼ濃度は 0.044 μg/mL であり，その精度は 4.5%であった．

45 例の未処理のヒト血清試料にグルカルピダーゼを 0.043 μg/mL（中濃度 QC レベル）スパイクしたとき，逆算された平均グルカルピダーゼ濃度は 0.042 μg/mL であり，真度は 97.2%，精度は 5.2%であった．45 例の試料の標準偏差は 0.0022 であった．したがって，阻害の LOD は平均値から 3×標準偏差を引くことによって決定され，その値は 0.035 μg/mL と求められた．この値は，中濃度 QC の活性である 81.4%に相当した．

0.043 μg/mL の中濃度 QC レベルのグルカルピダーゼをスパイクした臨床検体は，最終測定グルカルピダーゼ濃度が 0.035 μg/mL 未満，すなわち活性が 81.4%を下回った場合に，抗グルカルピダーゼ中和抗体陽性と判断することとする．

2.7.1.2.2.3 ヒト血清中の抗グルカルピダーゼ抗体（PR001-CLN-rptBA028）

（期間：20■ 年■ 月～20■ 年■ 月）（添付資料：5.3.1.4-11）

2006 年 7 月 18 日から 2007 年 9 月 6 日までに FDA から寄せられた，上記 2.7.1.2.2.1 及び

2.7.1.2.2.2 に述べた試験法が不適切であるとの指摘に応え，ヒト血清中の抗グルカルピダーゼ抗体のブリッジング ELISA 法による検出，確認及び半定量のための試験法が，[redacted],UK にて開発され，バリデーションが実施された．この試験法は，Mire-Sluis らの勧告[1]に基づいたもので，試料をまず陽性／陰性カットオフ値に対してスクリーニングし，その後，過剰量のグルカルピダーゼによって免疫除去を行った後に再分析を行い，スクリーニング陽性試料が真の陽性であることを確認した．本定量法は，グルカルピダーゼによるアフィニティー精製によって得られたウサギ抗グルカルピダーゼ抗体陽性対照の検量線を使用することによって半定量的な等価質量単位の結果が得られるように開発されている．

この試験法ではまず 0.5 μg/mL（PBS 中）のグルカルピダーゼ溶液を 96 ウェルマイクロプレート（100 μL/ウェル）に分注し 4℃（設定温度）で一晩放置することによりグルカルピダーゼを吸着させた．ブロッキング（2 時間，PBS 中 2 w/v% BSA，200 μL/ウェル）後，プレートを洗浄した（4 回，PBS 中 0.05 v/v% Tween 20，300 μL/ウェル）．ヒト血清試料，抗グルカルピダーゼ標準液，及びブランクを PBS 中 2 w/v% BSA で 2 倍希釈した後，プレートに添加した（100 μL/ウェル）．プレートを 25℃（設定温度）で 2 時間，緩やかに振盪しながらインキュベーションした．プレートを洗浄し（4 回，PBS 中 0.05 v/v% Tween 20，300 μL/ウェル）免疫グロブリンの 2 価／多価の性質を利用することによって，ビオチン標識グルカルピダーゼを更に添加することで（0.5 μg/mL，100 μL/ウェル）結合した抗グルカルピダーゼ抗体を検出した．プレートを 25℃（設定温度）で 2 時間，緩やかに振盪しながらインキュベーションし，その後洗浄した（4 回，PBS 中 0.05 v/v% Tween 20，300 μL/ウェル）．ExtrAvidin ペルオキシダーゼ試薬（2,000 倍希釈，100 μL/ウェル）を添加し，プレートを 25℃（設定温度）で 1 時間インキュベーションした．洗浄後（4 回，PBS 中 0.05 v/v% Tween 20，300 μL/ウェル），TMB 基質を添加し（100 μL/ウェル），プレートを 25℃（設定温度）で 15 分間インキュベーションした．硫酸を添加（0.5 mol/L，100 μL/ウェル）して反応を停止させ，吸光度を 450 nm で読み取った（540 nm でバックグラウンド補正を行った）．

分析法バリデーション試験及びその後の臨床検体の分析では，血清の最低希釈倍率（MRD）は 2 倍を用いた．アッセイ反応のカットオフ値を 50 例の血清試料（健康被験者及びがん患者）からパラメトリックアプローチを用いて設定した（平均値＋1.645 標準偏差，95 パーセンタイル）．

各試料を 3 回分析し，全体の平均カットオフ値として 0.095 AU が得られた．24 枚のプレートから 10～12 試料を 1 グループとして各血清を評価し，0.016～0.117 AU のカットオフ値（平均値 0.047 AU）が得られた．標準化した陰性対照のプール試料で得られたデータを用いたとき，カットオフ値は 0.023～0.133 AU（平均値 0.048 AU）と求められた．50 例の血清試料に関する偽陽性率（すなわち，結果がカットオフ値以上）は，全体カットオフ値 0.095 AU を用いたとき 1.6%（4/255）であった．各血清プレートのカットオフ値に対して評価したとき，その偽陽性率は 9.4%（24/255）であった．標準化したプレートカットオフ値に対して評価したとき，その偽陽性率は 6.7%（17/255）であった．

プレートのカットオフ値とウサギ抗グルカルピダーゼ抗体検量線の交点での本定量法のおおよその感度は 0.5～31.1 ng/mL（平均値 15.7 ng/mL）であった．健康被験者（n＝8）の血清及びがん患者（n＝7）の血清に 100 ng/mL となるように陽性対照をスパイクしたとき，各プレートのカットオフ値，全体カットオフ値，及び標準化したプレートカットオフ値に対して全て陽性であった．

ヒト血清中で 100，200，400，750 及び 1,500 ng/mL となるように調製された陽性対照 QC 試料は，アッセイ内及びアッセイ間のいずれにおいても許容可能な精度及び真度を示した（RE20%未満，CV20%未満）．全ての QC レベルでの最大アッセイ間合計誤差（精度の CV%＋真度の RE%）は 28.1%であった．100 ng/mL の全ての QC 試料は，各プレートのカットオフ値に対して陽性の結果を示した．陽性対照に対して LLOQ を 62.5 ng/mL と設定した．

陽性対照をスパイクした試料を低いカットオフ値未満まで希釈することは困難であったことから，陽性抗体反応の定量法として力価測定を行うことは避けるべきであると考える．インキュベーション時間を±10 分の間で意図的に変化させた場合でも本定量法は頑健であると判断された．本定量法にドリフトは認められなかった．

6 例の健康被験者からの血清試料に 0.19 μg/mL となるようにグルカルピダーゼを加え，プレインキュベーションした後に 200 ng/mL の陽性対照にスパイクすると，アッセイの反応は 94.1～96.0%に低下した．この差は t 検定で有意であった（$p<0.05$）．上記と同じ血清に抗グルカルピダーゼ抗体をスパイクしなかったとき，グルカルピダーゼとのプレインキュベーションの有無を問わず，t 検定による有意差は認められなかった（$p>0.05$）．これらのデータは 0.19 μg/mL のグルカルピダーゼ及び t 検定のアプローチを用いて抗体陽性を確認することが適切であることを示している．カットオフ値でのアッセイの反応は極めて低いが，確認アッセイの段階では 20%以上（平均差＋3 標準偏差に基づく）の低下を判定基準とすることも認められた．

本定量法は抗グルカルピダーゼ抗体に特異的と考えられた．構造的類縁酵素であるカルボキシペプチダーゼ B（0.19 μg/mL）の存在下でも，LV（10 μg/mL）や MTX（400 μg/mL）を併用投与しても，シグナルの有意（$p<0.05$）な低下は認められなかった．

ヘモグロビン，脂質，ビリルビン及びリウマチ因子の存在下でアッセイの選択性を評価したとき，QC 試料の回収率，標準化したプレートカットオフ値に対する結果のいずれにおいても影響は認められなかった．ヒト（健康被験者及び白血病／リンパ腫患者）血清試料の感度評価から，アッセイカットオフ値に関連した本定量法の結果に影響するような重大なマトリックス効果は認められないことが示された．全ての LLOQ（100 ng/mL）濃度をスパイクした血清は，各カットオフ値に対して陽性の結果を示した．

ヒト血清で希釈した陽性対照の抗グルカルピダーゼ抗体は＋4℃保存又は室温保存（約 22℃）で少なくとも 24 時間，3 回の凍結／融解サイクルまで安定であった．さらに，－70℃（設定）保存については 34 日間安定であった．その他，本アッセイの重要な構成要素及び試薬の安定性評価については，ボラキサーゼコーティングプレートが最大 7 日まで，未標識グルカルピダーゼ標準原液が－70℃（設定）保存で 1 年間，ビオチン標識グルカルピダーゼ

が－70℃（設定）保存で調製から 4 年間安定であった（PR001-CLN-rptBA041，添付資料：5.3.1.4-12）．

2.7.1.2.2.4　ヒト血清中の抗グルカルピダーゼ中和抗体（PR001-CLN-rptBA031 及び PR001-CLN-rptBA049）

（期間：20■ 年■ 月～20■ 年■ 月）（添付資料：5.3.1.4-13）
（期間：20■ 年■ 月～20■ 年■ 月）（添付資料：5.3.1.4-14）

分光光度法による抗グルカルピダーゼ中和抗体の分析法は，最初に適格な分析法が開発され（PR001-CLN-rptBA031，添付資料：5.3.1.4-13），その後[redacted], UK により正式なバリデーションが実施された（PR001-CLN-rptBA049，添付資料：5.3.1.4-14）．

抗グルカルピダーゼ中和抗体の分析法は，グルカルピダーゼ活性測定法（1845/017，2.7.1.2.1.1）を基に開発された．

反応液中に抗グルカルピダーゼ中和抗体が共存する場合，アッセイ内のグルカルピダーゼの活性が阻害されるため反応速度は低下し，検量線から補完したグルカルピダーゼ濃度の測定結果も低下する．このグルカルピダーゼ濃度の低下を基に，中和抗体の陽性／陰性を判定するための分析法を確立することを目的として，試験を実施した（PR001-CLN-rptBA031，添付資料：5.3.1.4-13）．本試験の結果より，抗グルカルピダーゼ抗体検量線の範囲は 4～15 μg/mL と結論づけられた．ただし，未知検体中の分析感度「再現性（QC 試料の 90%超が陽性）が認められる濃度」は 7.5 μg/mL（本濃度での真度及び精度は反応及び濃度の両指標で許容範囲内）であったが，カットオフ値と抗グルカルピダーゼ抗体検量線の交点を超える濃度での本分析法のおおよその感度は 4 μg/mL であったことから，本法の検出可能な範囲は 7.5～15 μg/mL と考えられた．理論的には，グルカルピダーゼ濃度を上昇させることにより，定量範囲を広げることが可能であるが，実際の定量範囲が狭いことから，cut point approach（標準抗体に相当する 7.5 μg/mL 以上を陽性と判定）を採用することが推奨された．以上より，本法は，患者集団から得られた血清試料を用いるバリデーション試験に移行することに適した分析法であると考えられた．

バリデーション試験（PR001-CLN-rptBA049，添付資料：5.3.1.4-14）では，PR001-CLN-016 試験において，バインディングアッセイで抗グルカルピダーゼ抗体陰性と判定された MTX 排泄遅延を有する患者 40 例の血清試料を用い，中和抗体の陽性／陰性を判定するためのカットポイントを設定した．また，少数例（10 例）の健康被験者の血清試料を用いた検討も行った．本バリデーションでは陰性対照の設定，添加するグルカルピダーゼ量の適格性の確認，ウサギ抗グルカルピダーゼ陽性対照抗血清に対する分析感度の評価，陽性対照試料の精度の評価，分析期間中（2 時間，氷上）の試料の安定性の検討を行った．

ウサギ抗グルカルピダーゼ抗体陽性対照試料に対する本測定法の推定感度は約 7.5 μg/mL であることが確認された．陰性対照血清試料では分析間精度（CV）は 10.3%であった（バッチ：n＝6）．陽性対照試料では CV が 25%を超えたものがあったが，傾きの値が低いと（特に，反応のほとんどが中和されると傾きがゼロに近づく），CV は大きくなることから，

この結果は予想した範囲内であった．また，陽性対照試料を測定前に氷上で 2 時間放置した際の安定性が確認された．

2.7.1.2.2.5　ELISA 法によるヒト血漿中抗グルカルピダーゼ抗体測定法のバリデーション試験（[redacted]852-007）

（期間：20[redacted] 年[redacted] 月～20[redacted] 年[redacted] 月）（添付資料：5.3.1.4-15）

ELISA 法によるヒト血漿中抗グルカルピダーゼ抗体測定法のバリデーション試験は，[redacted]にて実施された．

本試験は申請資料の信頼性の基準（「医薬品，医療機器等の品質，有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則」（昭和 36 年厚生省令第 1 号）第 43 条）に従った．

バリデーション項目は，Screening assay として分析単位内変動確認試験及び分析単位間変動確認試験，95%信頼区間の算出，Normalization Factor*1 及びカットポイントの算出，Confirmation assay として免疫除去確認試験及び抗体価算出を実施した．また，血清試料との比較試験，室温保存安定性確認試験，冷蔵保存安定性確認試験，凍結融解安定性確認試験及び凍結保存安定性確認試験を実施した．Screening assay において陽性対照試料及び陰性対照試料を用いて再現性確認試験を実施したところ，再現性（精度が 20%以内）のあることが確認された．また 50 例の個体別ブランク血漿から算出した 95%信頼区間の値及び Negative Control の値から Normalization Factor*1 を算出したところ 1.1432 となった．Confirmation assay において免疫除去試料を 3 日間測定したところ変化率が－20%未満となりグルカルピダーゼの濃度依存的に変化率が減少することを確認した．抗体価算出試料を 3 日間測定したところ，抗体価算出試料（Titer-1～Titer-9）の吸光度がカットポイント以上となる試料のうち最大希釈倍率が各測定日で同じ（最大希釈倍率：1,280）であったことから，再現性のあることが確認された．また，血清試料と比較したところ，相関率が 90%以上であることを確認した．安定性試験においては，凍結融解は 5 回まで，室温及び冷蔵保存条件下で 24 時間，凍結保存条件下（－70℃以下）で 3 ヵ月間（104 日間）までは安定であることが確認された．

以上の結果から，本測定法はいずれの検討項目も適合基準を満たしており，ヒト血漿中抗グルカルピダーゼ抗体の測定法として十分信頼できるものと判断した．

＊1：3 日間の Factor*2 の Mean

＊2：95%信頼区間／各測定時における陰性対照試料の測定値の Mean

2.7.1.2.2.6　ヒト血中グルカルピダーゼ濃度測定及び抗グルカルピダーゼ抗体測定（マトリックス間における測定値の比較）（[redacted]354-027）

（期間：20[redacted] 年[redacted] 月～20[redacted] 年[redacted] 月）（添付資料：5.3.1.4-7）

ヒト血中における抗グルカルピダーゼ抗体測定は，[redacted]にて実施された．

本試験は，申請資料の信頼性の基準（「医薬品，医療機器等の品質，有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則」（昭和 36 年厚生省令第 1 号）第 43 条）に従った．

採血方法の違い（血清用採血管及びヘパリンNa含有採血管）による抗グルカルピダーゼ抗体の測定値の差を比較した．なお，測定法に関しては「ELISA法によるヒト血漿中抗グルカルピダーゼ抗体測定法のバリデーション試験（[redacted]852-007，2.7.1.2.2.5）」に基づいた．

男女各3個体のヒト個体別ブランク血液に2濃度の抗グルカルピダーゼ抗体を添加し，得られた血清及び血漿試料を分析したところ，変化率は80～120%の範囲内であった．よって異なるマトリックスにおける抗グルカルピダーゼ抗体の定量値の差は認められないと判断し，採血方法の測定結果に差はないと結論づけた．

2.7.1.2.3　MTX，OH-MTX及びDAMPA

ヒトの血清，血漿及び尿におけるMTX，OH-MTX及びDAMPAの濃度を，以下に示したバリデーション済みの方法により測定した．また，試料採取から分析までの間にグルカルピダーゼによりMTXが*ex vivo*で代謝される可能性を検討した試験を，血液及び血漿中で行い2.7.1.4.1に示している．これら試験の結果は，MTXについて用いられる全ての生体試料の分析法に適用できると考えられる［ただし，国内試験である大量MTX療法時に生じるMTX排泄遅延に対してのグルカルピダーゼの有効性・安全性試験（CPG2-PII）では適用されなかった］．

2.7.1.2.3.1　ヒト血清中のHPLC-UVによるMTX，OH-MTX及びDAMPA（PR001-CLN-rptBA009）

（期間：20[redacted]年[redacted]月～20[redacted]年[redacted]月）（添付資料：5.3.1.4-16）

血清中のMTX，OH-MTX及びDAMPA濃度を測定するために高速液体クロマトグラフィー（HPLC）-UV法による生体試料分析法が[redacted]で開発された．本法は，逆相HPLC法による簡便なアイソクラティックーUV検出（RP18e Chromolithカラム）を利用している．

この測定法については，検量線の分析，QC試料及び回収率測定などの限定的なバリデーションが行われた．このバリデーション試験から利用可能な方法及び結果は，後に[redacted]，UKによって報告書にまとめられている．

グルカルピダーゼによりMTXが*ex vivo*で加水分解される可能性を否定するため，バリデーション試験で使用した血清1 mLに0.1 mLの1 mol/L HClを添加して試料を酸性にした．抽出工程では，過塩素酸を用いて試料を除タンパク処理した．

MTX及びDAMPAの検量線の範囲は0.05～50 μmol/L，OH-MTXの検量線の範囲は0.053～52.7 μmol/Lであった．MTX，OH-MTX及びDAMPAのピーク面積値とMTX，OH-MTX及びDAMPAの血清中濃度との関係は，検量線の範囲全体で線形性を示した（相関係数＞0.999，n=4）．データの重み付けのない最小二乗回帰分析を用いて，傾き，切片及び相関係数を算出した．試料600 μLを処理したときの検量線の下限値はMTX及びDAMPAについては0.05 μmol/L，OH-MTXについては0.053 μmol/Lであった．ヒト血清抽出液中に，MTX，OH-MTX及びDAMPAの測定に影響するような妨害ピークは認められなかった．

MTXについて，QC試料（0.1～6.1 μmol/L）の分析単位内変動（CV%）は0.4～7.2%の範囲であった．QC試料（0.8～6.1 μmol/L）の分析単位間変動は1.6～4.7%の範囲であった．MTXについて，ヒト血清からの平均回収率（抽出効率）は96～105%であった．

DAMPAについて，QC試料（0.2～4.0 μmol/L）の分析単位内変動（CV%）は1.1～3.9%であった．QC試料（0.8～2.5 μmol/L）の分析単位間変動は4.0～6.2%であった．DAMPAについて，ヒト血清からの平均回収率（抽出効率）は97～112%であった．

OH-MTXについて，QC試料（0.21～2.64 μmol/L）の分析単位内変動（CV%）は1.0～3.1%であった．QC試料（0.84～2.64 μmol/L）の分析単位間変動は4.5～8.0%であった．OH-MTXについて，ヒト血清からの平均回収率（抽出効率）は91～102%であった．

2.7.1.2.3.2　ヒト尿中の HPLC-UV による MTX，OH-MTX 及び DAMPA（PR001-CLN-rptBA008）

（期間：20■年■月～20■年■月（添付資料：5.3.1.4-17）

尿中のMTX，OH-MTX及びDAMPA濃度を測定するためにHPLC-UV法による生体試料分析法が[redacted]で開発された．本法は，逆相HPLC法による簡便なアイソクラティックーUV検出（RP18e Chromolithカラム）を利用している．

この方法については，ヒト尿を用いた検量線の分析，QC試料及び回収率測定などのパーシャルバリデーションが行われた．バリデーション試験から利用可能な方法及び結果は，後に[redacted]，UKによって報告書にまとめられている．

試料は50 mmol/Lリン酸緩衝液で5倍希釈した後にクロマトグラフィーに供した．

MTX及びDAMPAの検量線の範囲は0.5～50 μmol/Lで，OH-MTXの検量線の範囲は0.527～52.74 μmol/Lであった．MTX，OH-MTX及びDAMPAのピーク面積値とMTX，OH-MTX及びDAMPAの尿中濃度との関係は，検量線の範囲全体で線形性を示した（相関係数＞0.999，n＝4）．データの重み付けのない最小二乗回帰分析を用いて，傾き，切片及び相関係数を算出した．200 μLの試料を処理したとき，検量線の下限値はMTX及びDAMPAについて0.5 μmol/L，OH-MTXについて0.527 μmol/Lであった．希釈したヒト尿中に，MTX，OH-MTX及びDAMPAの測定に影響を及ぼすような妨害ピークは認められなかった．

MTXについて，QC試料（0.7～25 μmol/L）の分析単位内変動（CV%）は0.4～2.4%であった．QC試料（2.5～25 μmol/L）の分析単位間変動は3.1～4.9%であった．MTXについて，ヒト尿からの平均回収率（抽出効率）は98～103%であった．

DAMPAについて，QC試料（2.5～25 μmol/L）の分析単位内変動（CV%）は1.6～3.0%であった．QC試料（2.5～25 μmol/L）のバッチ間精度は3.5～4.8%であった．DAMPAについて，ヒト尿からの平均回収率（抽出効率）は98～106%であった．

OH-MTXについて，QC試料（2.64～26.4 μmol/L）の分析単位内変動（CV%）は1.8～3.6%であった．QC試料（2.64～26.4 μmol/L）の分析単位間変動は3.6～5.5%であった．OH-MTXについて，ヒト尿からの平均回収率（抽出効率）は98～103%であった．

2.7.1.2.3.3 ヒト血漿中の HPLC-UV による MTX 及び DAMPA（PR001-VTR-001）

（期間：20■ 年■ 月～20■ 年■ 月）（添付資料：5.3.1.4-18）

血漿中の MTX 及び DAMPA を測定するための HPLC-UV 法による生体試料分析法は，[redacted], USA でバリデーションされた [2,3]．MTX を投与された患者を対象とする臨床試験検体の分析には長年アイソクラティック逆相 HPLC 法が用いられており，20■ 年に正式な分析法バリデーションが行われる前に，臨床検査室改善法の承認を受けていた（PR001-CLN-rptBA006，添付資料：5.3.1.4-19）．

この方法では，前処理された（メタノール－水－リン酸ナトリウム緩衝液：0.1 mol/L，pH 6.8）Bond Elut C-18 固相抽出カラム（500 mg，3 mL）を用いて，ヒト血漿の一部（1 mL）と塩酸（100 µL，1 mol/L）の混合液から MTX 及び DAMPA を抽出する．MTX 及び DAMPA はメタノールで溶出し，溶出液を窒素下で蒸発乾固した．残留物を 200 µL 移動相（0.1 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液：pH 6.8-メタノール，80：20）に溶解し，その一部（50 µL）を NovaPak，C-18 カラム（Waters C-18 µ Bondapak ガードカラム使用）に注入した．MTX 及び DAMPA はアイソクラティッククロマトグラフィーで分離し，UV 波長 303 及び 313 nm で検出した．

ヘパリン加ヒト血漿を用いて行った分析法バリデーション試験は，選択性，真度，精度，回収率，LOD，LLOQ，定量範囲及び希釈度を含めて，Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation（生体試料分析法バリデーションに関する業界向けガイダンス），FDA（CDER）（2001 年 5 月）に基づいて実施された．

定量範囲全体（MTX に対して 0.05～10 µmol/L，DAMPA に対して 0.1～10 µmol/L）で，全体として許容可能な選択性，真度，精度及び回収率が認められた．ヒト血漿中に，MTX 又は DAMPA の測定に影響する妨害ピークは認められなかった．バリデーションされた範囲を超えた濃度の MTX 及び DAMPA を含む血漿試料は，ブランク血漿によって検量線の範囲内まで希釈した後に，精密かつ正確に測定することができた．

スパイクされた血漿試料からの MTX の平均回収率は 1 µmol/L で 101.9%，2.5 µmo/L で 98.2%，10 mol/L で 90.4%であった．血漿からの DAMPA の平均回収率は，1 µmol/L で 105.2%，2.5 µmol/L で 96.7%，10 µmol/L で 95.3%であった．

血漿中の MTX のピーク面積値（AUC）と MTX 濃度との相関は 0.05～10.0 µmol/L の定量範囲にわたり線形性を示した．R^2 相関係数の平均値は 0.999 であった．血漿中 MTX の QC 試料［低濃度（0.5 µmol/L）及び高濃度（5 µmol/L）］から 5 日間測定して得られた平均分析単位間真度は，それぞれ－4.2%，0.5%であった．MTX の QC 試料の分析単位間真度は 9.2%及び 2.7%であった（二乗平均平方根，%RE）．

同様に DAMPA について血漿中の DAMPA のピーク面積値（AUC）と DAMPA 濃度との相関は 0.1～10.0 µmol/L の定量範囲にわたり線形性を示した．R^2 相関係数の平均値は 0.998 であった．血漿中 DAMPA の QC 試料［低濃度（0.5 µmol/L）及び高濃度（5 µmol/L）］から 5 日間測定して求められた平均分析単位間真度は，それぞれ－2.1%，－0.3%であった．DAMPA の QC 試料の分析単位間真度は 10.6%及び 3.0%であった（二乗平均平方根，%RE）．

2.7.1.2.3.4 ヒト血漿中の HPLC-蛍光法による MTX 及び DAMPA（PTU 018）

（期間：20■ 年■ 月～20■ 年■ 月）（添付資料：5.3.1.4-20）

HPLC-蛍光法[4]によるヒト血漿中の MTX 及び DAMPA の生体試料分析法のバリデーションは[redacted], UK で実施された.

この方法では，前処理した［メタノール（3 mL），水（3 mL）及びリン酸ナトリウム緩衝液（2×3 mL，0.1 mol/L，pH 6.5）］C18 BondElut 又は Strata（500 mg，3 mL）抽出カートリッジを用いて，ヒトヘパリン加血漿（1 mL）と塩酸（111 µL，1 mol/L）の混合液から MTX 及び DAMPA を抽出する．MTX 及び DAMPA をメタノール（3 mL）によって抽出カートリッジから溶出し，溶出液を＋50℃（設定温度）の窒素気流下で蒸発乾固した．残留物を移動相（200 µL）に溶解し，一部（10 µL）を Zorbax RX-C8 5 µm C8 カラムに注入した．MTX 及び DAMPA はアイソクラティッククロマトグラフィーで分離し，ポストカラム法により光誘導体化した後，蛍光により検出した．なお，励起波長は 350 nm，発光波長は 435 nm であった.

バリデーションの手順は，Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation（生体試料分析法バリデーションに関する業界向けガイダンス），FDA（CDER）（2001 年 5 月）に基づいて実施した.

MTX 及び DAMPA について，バリデーションされた検量線の範囲は 0.1～10 µmol/L であった．全ての検量線の全域における逆算濃度の真度（RE で表示）は，MTX について－4.0～4.1%，DAMPA について－4.0～3.0%であった.

0.3，1 及び 8 µmol/L の QC 試料に対する 3 回分析値について，MTX 及び DAMPA のバッチ内精度（CV%）はそれぞれ 1.7～5.1%，1.9～4.9%であった．0.3，1 及び 8 µmol/L の QC 試料に対する 3 回分析値について，MTX 及び DAMPA のバッチ内真度（RE）はそれぞれ－2.6～13.7%，－11.0～1.3%であった．MTX 及び DAMPA の LLOQ（0.1 µmol/L）での精度は，それぞれ 1.3～2.7%，1.7～2.2%であった．QC 試料を 3 回分析したとき，LLOQ での真度（RE）はそれぞれ 1.0～19.0%，－3.6～－1.2%であった.

検量線の範囲における回収率は，MTX について 76.2～100.5%，DAMPA について 46.9～71.6%であった．バリデーションされた検量線範囲では，MTX 又は DAMPA の測定に影響を及ぼすようなヒト血漿による妨害は認められなかった．検量線の定量範囲外の試料については，最大 100 µmol/L の濃度まで測定可能となるように希釈係数 10 でバリデーションを行った．血漿中の MTX 及び DAMPA は－70℃（設定温度）で保存したときは最長 29 日間安定，3 回の凍結／融解サイクルにおいて安定及び＋22℃（設定温度）では最長約 2 時間安定であることが示された．血漿抽出液中の MTX 及び DAMPA は＋22℃（設定温度）では少なくとも 24 時間安定であり，標準液中では＋4℃（設定温度）で少なくとも 36 日間まで安定であることが示された.