

第1回法医中毒研究会春季セミナー
「分析バリデーションのABC」

平成25年3月29日(金)
午後1時~

アジレント・テクノロジー株式会社
東京芝浦オフィス 1階セミナールーム

世話人 坂 幹樹
東京大学大学院医学系研究科法医学教室

平成25年1月9日

法医中毒研究会会員の皆様

日本法医学会会員の皆様

法医中毒研究会会长 石井 晃

第1回法医中毒研究会春季セミナー開催のお知らせ

第1回法医中毒研究会春季セミナーを下記の通り開催いたします。今回の春季セミナーは東京開催ということもあり、世話人として東京大学の坂 幹樹先生にお願いいたしました。

法医中毒研究会では、日本法医学会全国集会時に、法医鑑定における薬毒物分析に関連した事例について幅広く議論する勉強会を開催する予定で準備を進めております。それと並行して、薬毒物分析の実務で遭遇するさまざまな問題点を、深く掘り下げて学ぶことを目的としたセミナーを定期的に開催することといたしました。

第1回春季セミナーは「分析バリデーション」について取り上げました。「分析バリデーション」は、薬毒物分析の精度向上のためには必須のものですが、重要とは思っていても難しくてよくわからないと不安を感じておられる方も多いのではないでしょうか。今回は、用語の解説に始まり、従来の「分析バリデーション」関連のセミナーでは取り上げなかつたような基礎的な事項を分かりやすく説明して頂きます。“分析バリデーションはどうして必要なの？”，“最低限必要な分析バリデーションとは？”など「分析バリデーションのABC」を一緒に学びませんか。

春季セミナーは法医中毒研究会会員限定の企画ですが、今回はまだ登録されていない方の参加も歓迎いたします。多数の皆さまのご参加をお待ち申し上げます。

1. タイトル：「分析バリデーションのABC」
2. 日時：平成25年3月29日（金曜日）午後1時から午後6時
3. 場所：アジレント・テクノロジー株式会社 東京芝浦オフィス 1階セミナールーム

講師：奈女良 昭 先生（広島大学医学部法医学教室）

斎藤 剛 先生（東海大学医学部外科学系救急医学）

4. 参加申し込み

参加申し込みは添付いたしました申込用紙に必要事項をご記入の上、世話人ま

で送信、郵送またはFAXにてご連絡ください。申し込みは機関ごとにお願いいたします。参加費は当日受付でお支払いください。

申込期限：平成25年3月15日（金）

参加費：法医中毒研究会会員3,000円、非会員4,000円

参加申込先、連絡先

〒113-0033 東京都文京区本郷7丁目3番1号

東京大学大学院医学系研究科法医学教室

世話人 坂 幹樹

Tel : 03-5841-3367

Fax : 03-5841-3366

E-mail : kanju@m.u-tokyo.ac.jp

5. 懇親会

セミナー終了後、8階ミーティングルームにて懇親会を行います。多数のご参加をお待ち申し上げます。

懇親会費：5,000円（予定）

法医中毒研究会への会員登録もお待ちしております。

法医中毒研究会 MeLT 事務局

メールアドレス : cfuke@med.u-ryukyu.ac.jp

第1回法医中毒研究会春季セミナープログラム

「分析バリデーションのABC」

日 時： 平成25年3月29日（金）

13:00～17:30

会 場：アジレント・テクノロジー株式会社

東京芝浦オフィス 1階セミナールーム

1. 開会の挨拶 (13:00～13:10)

座長 守屋文夫 先生 (川崎医福大)

2. 分析バリデーションのABC (その1) (13:10～13:50)

—分析バリデーションはどうして必要か—

奈女良 昭 先生 (広大)

3. 分析バリデーションのABC (その2) (13:50～14:30)

—分析バリデーションの必要性—

齋藤 剛 先生 (東海大)

休憩 14:30～14:45

4. 分析バリデーションのABC（その3） (14:45~15:45)

—バリデーションとは—

奈女良 昭 先生 (広大)

5. 分析バリデーションのABC（その4） (15:45~16:45)

—バリデーションの注意点—

齋藤 剛 先生 (東海大)

6. 質疑応答・フリーディスカッション (16:45-17:45)

座長 守屋文夫 先生 (川崎医福大)

奈女良 昭 先生 (広大)

齋藤 剛 先生 (東海大)

中島 晋也 先生 (西川計測株式会社)

懇親会 (18:00~)

「8階ミーティングルーム」

分析バリデーションはどうして必要か－事例紹介－

広島大学大学院医歯薬保健学研究院法医学
奈女良 昭

日々薬物分析（鑑定を含め）を行っていく上で、分析法の選択や試薬の入手など、色々な問題が発生しています。しかし、一人あるいは数人で分析している場合、分析法や結果の解釈についての情報伝達が希薄になり、独自の判断や解釈で行わざるを得ないことが出てきます。法医学の実務上、薬物の種類や濃度が直接死因に関連する場合、分析する過程、方法には細心の注意が必要です。つまり、裁判の証拠となることを前提に分析、結果の解釈を行う必要がありますが、現状では明確な規定が定められていないため、独自の判断で分析しているのが実状と思われます。

ここでは、過去の経験上、薬物分析に関わる種々の規定（規格）の整備が望まれた事例を紹介し、法医学の実務を念頭に置いた種々の規定、特に分析法のバリデーションの重要性を認識して頂ければ幸いです。

1. 薬物同定の信憑性（刑事訴訟での事例）

【課題】

摂取した薬物が不明な場合を前提に、同定した薬物が間違いないのかを客観的かつ科学的に証明する。

【問題点】

手持ちの機器しか使用できない制限がある中で、（どの様な基準、方法で）如何に証明するか。
選択した方法に間違はないのか。

【実際例】

- 1) 血液中ゾピクロン（アモバン）の分析
- 2) カチノン系薬物（MDPVなど）の分析

2. 薬物分析時の定量値の信憑性（民事訴訟での事例）

【課題】

血中濃度より摂取量を算出、報告書に記載された量を「摂取できるはずがない」、「定量値が間違っている」とのクレームへ対処する。

【解決法】

何処で実施しても同じ値の出る分析法を使用していることを客観的に示す。

【問題点】

手持ちの機器しか使用できない制限がある中で、如何に証明するか。

選択した方法に間違いはないのか。

再鑑定（ただし、再鑑定を常態化すると法医学で鑑定する意義が無くなるので避けたい）

【実際例】

- 1) 覚せい剤の分析

何故、生体試料分析において分析法のバリデーションが必要か？

–将来の訴訟を見据えて–

分析法バリデーションとは、品質保証の概念の基づいたものであり、医薬品などの試験に用いる分析法が、その目的に適した性能を有していることを証明することです。日本薬局方（第13改正）では“分析法バリデーションとは、医薬品の試験法に用いる分析法が、分析法を使用する意図に合致していること、すなわち、分析法の誤差が原因で生じる試験の誤りの確率が許容できる程度であることを科学的に立証することである”と記載されています。平成10年4月1日以降に承認申請された医薬品の規格試験法や安定性試験法の設定においては、この分析法バリデーションの資料添付が義務づけられ、医薬部外品や化粧品の品質管理においても最近分析法バリデーションの考え方が浸透してきました。その実施項目や実施方法については、日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）での合意に基づく、“分析法バリデーションに関するテキスト（平成7年7月、薬審第755号、および平成9年10月、医薬審第338号）”に解説されています。

複数の機関・組織がバリデーション要件のガイドラインを提示していますが、その範囲はさまざまあります。バリデーションの目的は常に、分析結果の有効性を確認することにあるため、該当する分析メソッドを使用して測定する製品の品質や安全性を確保するためには、こうした確認が重要となります。

国内には、医薬品原料や製剤中の生理活性成分を念頭にした分析法バリデーションの規格は存在するものの、生体試料分析を念頭に置いた分析法バリデーションに関する規格はなく、下記の機関・組織が提示しているガイドラインを参考にしているのが現状です。最近、国内でも生体試料分析を念頭に置いた分析法バリデーションに関する規格作成の動きもあり、素案作りが始まっているようです。

米国食品医薬品局(FDA)

製薬検査共同体(PIC/S)

日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)

米国薬局方(USP)

ISO/IEC 17025

通常、分析法開発や分析法をバリデートするためには、測定対象物質（未変化体および代謝物等）を溶媒に溶解した標準溶液を調製し、それを生体試料（マトリックス）に添加する、いわゆる添加試料を用いて、添加検量線および品質管理（Quality control, QC）試料の測定を実施することで分析法妥当性を担保できるようなデータを取得します。一般的には、添加検量線は調製直後のフレッシュな試料を用い、各種安定性等の確認操作を実施した QC 試料について、除タンパク法、液一液抽出および固相抽出法といった前処理を施した試料を用いて測定値の確認を行い、調製既知濃度（理論値）と乖離がないことをもって安定性や再現性の確認を行います。なお、バリデーション時において使用されるマトリックスは特別な理由がない限り、正常コントロール（いわゆる健常人等）として採取された試料を用いることがほとんどであり、測定対象物質が含まれていないマトリックスを用います。

これらの分析法バリデーションで要求される項目（パラメータ）としては、下記の項目が挙げられますが、実施する目的によって要求項目が変わってきます。

- 選択性（Selectivity）
- 検出下限（Lower Limit of Detection, LLLOD）
- 定量下限（Lower Limit of Quantification, LLOQ）
- 検量線（Calibration curve）
- 精度（Precision）
- 真度（Accuracy）
- マトリックス効果（Matrix Effect）
- 回収率（Recovery）
- キャリーオーバー（Carry Over）
- 希釈妥当性（Dilution integrity）
- 安定性（Stability）

*参考とするガイドラインによって、用語の定義が異なります。

しかし、法医学においては、多数存在する成分の中から死因に関与する疑いのある薬物を確実かつ誤りなく特定する必要があることから、ICH や日本薬局方に規定されている医薬品における分析法バリデーションに比べ、対象薬物の同定過程（定性）に重点をおく必要があると考えます。ICH などのガイドラインなどでは、医薬品原料などの特定の成分を標的としているため、検査対象が未知の場合の薬物同定については、Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) Recommendations や Forensic Toxicology Laboratory Guidelines (SOFT/AAFS 2006 version)が参考となります。

バリデーション実施項目と実施方法並びに判定基準

(Chromatography, 33(2), 107-112, 2012)を改変)

選択性 (Selectivity)	各分析対象物質及び内標準物質の定量に対する妨害作用がないことを確認
	<p>少なくとも6個体から得られた個別のブランク試料（分析対象物質や内標準物質を添加せずに前処理するマトリックス試料）を用いて評価。</p> <p>ブランク試料において妨害物質に由来するレスポンスが認められないか、若しくは妨害物質に由来するレスポンスが、定量下限における分析対象物質のレスポンスの20%以下および内標準物質の5%以下。</p>
検出下限 (Lower Limit of Detection, LLOD)	<p>分析対象物質を検出することができる最も低い濃度</p> <p>検出下限における分析対象物質のレスポンスが、ブランク試料のレスポンスの3倍以上であること。定量下限における平均の真度は理論値の±20%以内、精度は20%以下。</p>
定量下限 (Lower Limit of Quantification, LLOQ)	<p>分析対象物質を定量することができる最も低い濃度</p> <p>定量下限における分析対象物質のレスポンスが、ブランク試料のレスポンスの10倍以上であること。定量下限における平均の真度は理論値の±20%以内、精度は20%以下。</p>
検量線 (Calibration curve)	<p>分析対象物質の濃度とレスポンスの関係</p> <p>マトリックスに既知濃度の分析対象物質を添加して作成され、ブランク試料、ゼロ試料（内標準物質を添加したブランク試料）及び6濃度以上で構成される。</p> <p>検量線の各濃度の真度が、定量下限において理論値の±20%以内、他濃度において理論値の±15%以内であり、全ポイントの75%以上かつ、定量下限及び検量線の最高濃度を含む少なくとも6濃度が判定基準にあること。</p>
精度 (Precision)	繰り返し分析によって得られる定量値間の一致の程度
	<p>QC試料を分析することによって評価。検量線の定量範囲内で、最低4濃度（定量下限、低濃度、中濃度及び高濃度）のQC試料で評価。各濃度あたり少なくとも5回の繰り返し分析をすることによって評価。分析単位間の精度は、少なくとも3回の分析単位を繰り返し分析することによって評価。</p> <p>各濃度における定量値の精度が、定量下限で20%以下、他の濃度で15%以下。</p>
真度 (Accuracy)	測定対象物質の測定値と真の値の差
	評価方法については精度と同様。各濃度における平均の真度が、理論値の定量下限で±20%以内、他濃度で±15%以内。
マトリックス効果 (Matrix Effect)	分析対象物質のレスポンスが試料中のマトリックス由来成分によって影響を受けること
	<p>マトリックス存在下での分析対象物質のレスポンスを、マトリックス非存在下でのレスポンスと比較することによってマトリックスファクター(MF)を算出。</p> <p>MFの算出には、少なくとも6個体から得られた個別のマトリックスを用いる。MFの精度が、個体間で15%以下。</p>
回収率 (Recovery)	生体試料の前処理過程における分析対象物質の回収効率
	分析対象物質を生体試料に添加して前処理したときのレスポンスと、ブランクの生体試料を前処理した後に分析対象物質を添加したときのレスポンスを比較。最低3濃度（低濃度、中濃度及び高濃度）において少なくとも3回の繰り返し分析をすることにより評

	価。とくに判定基準を設けないが多いが、各濃度において再現性があることが望ましい。
キャリーオーバー (Carry Over)	分析装置に残留した分析対象物質が次注入の定量値に影響を与えること 最高濃度の検量線用標準試料を測定した後にブランク試料を測定することにより評価。最高濃度の検量線用標準試料を測定した後のブランク試料のレスポンスが、定量下限における分析対象物質のレスポンスの20%以下及び内標準物質のレスポンスの5%以下。
希釈妥当性 (Dilution integrity)	希釈による分析対象物質の定量値への影響確認 試料中における分析対象物質の濃度を検量線の定量範囲内となるようにブランクマトリックスで希釈し、希釈倍率あたり少なくとも5回の繰り返し分析をすることによって評価。希釈された試料の平均の真度が理論値の±15%以内、精度が15%以下。
安定性 (Stability)	試料を採取してから分析するまでの各過程において分析対象物質の安定性が分析対象物質の定量値に影響を及ぼさないことへの保証 溶媒又はマトリックス中の安定性を確認。凍結融解安定性、短期保存安定性（室温、氷冷又は冷蔵等）、長期保存安定性、前処理後試料中安定性を評価。 マトリックス中の安定性は、低濃度及び高濃度のQC試料で評価。各濃度あたり少なくとも3回の繰り返し分析を、QC試料を保存する前後に行うことで安定性を評価。各濃度における平均の真度が、原則として理論値の±15%以内。 標準溶液中の安定性は、最高濃度及び最低濃度付近の溶液で評価。各濃度あたり少なくとも3回の繰り返し分析を行う。

Analyte (%)	Analyte fraction	Unit	Recovery range (%)	RSD (%)
100	1	100%	98–102	1.3
10	10 ⁻¹	10%	98–102	2.8
1	10 ⁻²	1%	97–103	2.7
0.1	10 ⁻³	0.1%	95–105	3.7
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm	90–107	5.3
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm	80–110	7.3
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm	80–110	11
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb	80–110	15
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb	60–115	21
0.000001	10 ⁻⁹	1 ppb	40–120	30

Journal of Chromatography A, 1232 (2012) 101–109

用語について

特異性／選択性(Specificity>Selectivity)

選択性と特異性という言葉は、しばしば混同されて使用されています。

特異性とは他の影響を受けないで特異的に、それのみを測定する方法（1成分のみを検出できる方法の場合）であり、選択性とは、分離の有無に関らず多くの成分を検出できる方法（即ち、試料中に存在すると思われる夾雑物の影響を受ける事なく正確に目的成分を測定出来る能力）の場合で用いられます。

化学の分野の試験・分析では、いろいろな化合物が試験試料に含まれていることが多く、これらの成分混合物の中から、目的とする成分の試験を試みます。試験法として、ある成分や、ある特性のみを特異的に検出して測定する試験もありますが、ガスクロマトグラフや液体クロマトグラフ、分光分析など、多成分を分離し、特定の成分の濃度や特性を測定する試験法が使われることが多く、これらの場合には、選択性が重視されます。たとえば、クロマトグラフの場合は、適当なカラムや、移動相の組成比やカラム温度、検出波長などの分離条件を選ぶことによって、選択性が得られます。一般的には、分析対象成分以外の成分をも含む試料と分析対象物のみの測定結果を比較することにより分析法の選択性を調べることができます。この2つの試料の定量結果の差が、分析結果の誤差となります。ただし、ブランク測定における共存他成分の影響が実試料でも同じであるとは限らないため、ブランクを差し引いたデータが正確であることを保証できないこともあることに留意が必要です。

選択性をバリデーションする方法は幾つかあり、クロマト分析の場合は、下記が挙げられる。

- ◎ ブランクの分析クロマトグラムについて分析対象ピークの確認
- ◎ 検量線の外挿点が原点を大きく外れるか、外れないかによる確認
- ◎ ピークが単一成分かどうかを分光検出器（使用可能であれば）などで確認
- ◎ 不純物が入手可能な時：試料に不純物を添加して定量した結果の分離状態を確認
- ◎ 不純物が入手出来ない場合：特性既知（バリデートされた）の別の分析法との比較

検出下限と検出限界

国内では ICH を参考にし、「分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）について（平成9年10月28日、医薬審第338号）」のなかで、「平成6年9月1日薬審第586号審査課長通知「新医薬品の規格及び試験方法の設定に関するガイドラインについて」の別添の4(15)ア中「正確さ」を「真度」に、「再現性」を「精度」に改める。同通知の別紙の2(3)3)⑥中「検出下限」を「検出限界」に、同⑩中「室内再現性」を「室内再現精度」に改める。」と通知している。

FDA、SOFT、バイオアナリシスフォーラムでは、検出下限と使用している。

分析バリデーションの必要性－事例紹介－

東海大学医学部外科学系救命救急医学
齊藤 剛

現在、法医学において薬毒物分析を行う上でバリデーションという工程（概念）が存在することは多くの関係者に認知されていると思われます。

ここでは、過去、法医学で薬毒物分析を行う上でバリデーションという概念が存在しなかった時に遭遇した、ある事例を紹介します。

この事例を通じて、薬毒物分析を一人あるいは組織的に取り組んでいたとしても、その結果を個人あるいは組織内で正しいと評価できる、あるいは第三者が客観的に正しいと言えるにはどうしたら良いのだろう？という疑問が生じたのです。

これらすべてを解決するのが、現在、薬毒物分析を行う分野で広く行われているバリデーションだったのです。

バリデーションを十分に行っていない白紙のような状態で薬毒物分析を行った場合、一度、問題となると一体どのような事態に陥るのか過去の事例に学びバリデーションの必要性を認識して頂ければ幸いです。

3. アルコール検査の信憑性（民事訴訟の事例）

【課題】

対象となる検体にアルコールが確実に含まれ検査結果が正しいことを客観的かつ科学的に証明するにはどうすればよいのか。

【問題点】

測定した検体が本人のものかに始まり定量結果の解釈まで全てが問題となつた。

これらを解決する方法はないのか？

分析バリデーションの注意点

1次試験と2次試験

薬毒物分析を行う際、摂取化合物が不明確な場合、大抵、機器分析の前に何らかの1次検査が行われます。本邦では、多くの機関で Triage 等に代表されるイムノアッセイが使われています。もし、この1次検査が陽性となった場合、偽陽性の確認を含めて2次検査として機器分析が行われます。

もし、尿の Triage 試験が陽性であったにも関わらず、血液を使った機器分析からは対象化合物が検出されなかった場合それは偽陽性なのでしょうか？これは対象となるマトリックスが異なるからという理由で受入れられるでしょう。

それでは、血液の1次検査が陽性となり、2次試験の機器分析で陰性となった場合はどうでしょうか？1次検査が偽陽性と結論付けるためには、2次試験が1次試験の LOD より低濃度側が確認できる必要があります。

2次検査を各施設で現有する分析機器で実施しようとする際、事前に分析方法の確立が行われるはずです。その際、もし相当する1次検査が存在するなら、その検出限界を十分に認識してその濃度が十分確認できる分析法の開発を行う必要があります。

スクリーニング

法医学では、臨床と異なり全ての試料が薬毒物分析用に採取できるわけではありません。従って、体液や組織を使いスクリーニングを行う必要があります。当然、対象化合物の濃度は体液や組織中では異なるので各マトリックスに適したスクリーニング法を選択する必要があります。多くの場合、化合物の未変化体が注目されますが、化合物あるいはマトリックスによっては代謝物も十分にスクリーニングの対象に含まれるので注意が必要です。分析法の開発を行う際、ブランクへの添加回収試験が行われます。このブランクとして使用するマトリックスに対しても使用前に確実にブランクとして使用可能なのか確認しておく必要があります。また、ブランク中には、バックグラウンドとして対象化合物が存在しないことを確認する目的で可能な限り数多く集める必要があります。

法中毒におけるバリデーション

法中毒に限らず薬毒物分析を理論的、科学的に行うには定性試験が重要です。その際、実行する定性試験の化合物に対する選択性、検出限界を認識する必要があります。

この定性試験では、精度、回収率、堅牢性は選択性や検出限界ほど重要視されません。

一方、定量を前提とした場合、化合物の選択性、定量可能な範囲、安定性、精度、定量下限が重要となります。

LC-MS(-MS)分析

近年、薬毒物分析の分野では、世界的に多くの機関で LC-MS(-MS)が使われています。これは、GC-MS が苦手としている熱不安定化合物を効率良く分析できる、あるいは分析前の試料調整が容易というのが背景にあります。しかし、LC-MS(-MS)分析では、マトリックス効果が生じる可能性が高いという事実があります。大抵の場合、ion suppression が生じま

す。これは、マトリックスから化合物を抽出した後に出現する現象で原因は幾つか考えられます。しかし、APCI より ESI で多く出現する傾向にあり極性化合物が影響を受けやすいとされています。LC-MS(-MS)分析は、前処理として除タンパク操作のみで分析は可能ですがこの場合においても ion suppression の問題は生じます。一方、GC-MS 分析用に行われていた液液抽出では、ion suppression は生じないなどの報告もあるので、LC-MS(-MS)分析において ion suppression をバリデーション項目に加える必要があるのではないかと感じます。

内部標準物質

現在、薬毒物分析を行う上で裁判科学を視野に入れた場合、質量分析計を用いるのが常套手段となっているのではないかと思います。この中で、化合物同定の確実性、定量の精度を上げるために内部標準物質として重水素体の使用が望されます。

しかし、重水素体化合物の中には、重水素を含まない化合物(-d0)が含まれる可能性があります。重水素体化合物の使用前に、d0 体が含まれないことの確認を行う必要があります。また、使用するマトリックスにおいても重水素体化合物が含まれないことを事前に確認しておく必要があります。

内部標準物質として医薬品を使用する報告があります。たとえ、その医薬品が特定の国や地域でのみ入手不可能だとしてもグローバルな視点からすれば医薬品を内部標準物質として使用することは避けるべきです。数多くのブランクマトリックスから検出されなかつたとしても分析試料に含まれていれば定量値は低くなってしまいます。そのため、なるべく多くの重水素化合物を所有するのが理想です。

回収率

機器の感度が向上すると従来よりも少ない試料で分析することが可能となります。あるいは、低い回収率でも分析が可能となります。定量分析で重要なのは、回収率よりも定量下限でありその再現性が重要となります。しかし、回収率は、50%以上が望ましいという意見も根強くあります。

また、GC-MS 分析を行う際、しばしば誘導体化が行われます。この場合も回収率を求めるのは難しいのが現状です。試薬を溶解して直接分析可能であれば問題は生じませんが、化合物が 100%の状態で誘導体化された試薬が存在しないので困難です。LC-MS(-MS)分析においても、ion suppression/enhancement の問題があるので回収率の算出は更に難しいでしょう。

稀な症例

全ての分析にバリデーションは実施できないという意見はもっともです。しかし、ルーチン検査としている分析方法は、バリデートされているとして稀な症例は実施する必要があるのでしょうか？もし、定量下限と再現性が得られていれば、回収率は必要ないと考えられます。しかし、論文化するとなるとこの限りではないと考えます。

分析法の開発手順

論文の説明。

