

第3回法医中毒研究会セミナー

「バリデーションを行ってみよう！」

平成26年3月14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 8階ミーティングルーム

世話人 矢島 大介
千葉大学大学院医学研究院法医学教室

第3回法医中毒研究会春季セミナー 「バリデーションを行ってみよう！」資料集

目次

第3回法医中毒研究会春季セミナー開催のお知らせ	2-3
第3回法医中毒研究会春季セミナー「バリデーションを行ってみよう！」プログラム	4-5
1. はじめに	7
2. 事例提示	9-15
3. 薬毒物 Validation-Support/Excel の解説書 V1	15-38
4. 参考資料 厚生労働省 (2012.7.11) 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法の バリデーションに関するガイドライン」について	39-57
5. 参考資料 5. データ処理時に得られた分析値をどこまで使用するか？ －棄却検定－	59-62
6. 参考資料 第1回法医中毒研究会セミナー「分析バリデーションのABC」 実施時のアンケート回答	63-66

平成 26 年 1 月 21 日

法医中毒研究会会員の皆様
日本法医学会会員の皆様

法医中毒研究会会長 石井 晃

第 3 回法医中毒研究会セミナー開催のお知らせ

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しております。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しております。

第 3 回法医中毒研究会セミナーは下記の通り、世話人を千葉大学の 矢島 大介先生にお願いし、東京で開催いたします。本セミナーでは「法医分析におけるバリデーション」について取り上げます。分析バリデーションについては第 1 回のセミナーですでに取り上げてはありますが、その後実際に導入する参考となりましたでしょうか。

今回は法医学以外の分野ではどのような分析バリデーションを行っているのか臨床化学分野からその実際を講義していただきます。そして、第 1 回の終了後のアンケートにて具体的な方法を知りたいとの要望が多かったことから、各自パソコンをご持参いただき簡単なバリデーションのためのソフトを用いて演習を行ってもらうこととしました。また、昨年厚生労働省より通達された「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」も参考にして、各施設でどの程度までのバリデーションが必要か話し合ってみたいと思います。前回のセミナー受講後あるいは実務の中で疑問に思ったこと、ご要望などありましたら参加申し込み用紙の質問・ご要望欄にご記入ください。今回のセミナーでできる限りお答え、または参加者で討論したいと思います。

当日セミナーで使用したソフトはお持ち帰りいただけますので、是非実務に利用していただきたいと思います。

本セミナーは法医中毒研究会会員を対象とした企画ですが、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：「バリデーションを行ってみよう！」
2. 日時：平成 26 年 3 月 14 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 8階セミナールーム

講師：佐藤 正一 先生 （千葉県救急医療センター 医療局 検査部 検査科）
奈女良 昭 先生 （広島大学医学部法医学教室）
斉藤 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 e-mail で送信ください。申し込みは機関ごとをお願いいたします。参加費および情報交換会費は当日受付でお支払いください。

申込期限：平成26年2月28日（金曜日）

参加費：法医中毒研究会会員 2,000 円、非会員 3,000 円

参加申込先、連絡先

〒260-8670 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

千葉大学大学院医学研究院 法医学

世話人 矢島 大介

Tel：043-226-2078

E-mail：chibahouitoxi@gmail.com

5. 情報交換会

セミナー終了後、情報交換会を行います。多数のご参加をお待ち申し上げます。

会費：4,000 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3回法医中毒研究会セミナープログラム

「バリデーションを行ってみよう！」

日 時： 平成 26 年 3 月 14 日（金）

13:00～17:00

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 8階ミーティングルーム

座長 奈女良 昭 先生 （広大）

1. はじめに （13：00～13：10）

法医中毒研究会会長 石井 晃 先生 （名大）

2. 事例提示 （13：10～14：00）

斉藤 剛 先生 （東海大）

3. バリデーション演習（その1） （14：00～15：00）

佐藤 正一 先生 （千葉県救急医療センター）

休憩 15：00-15：15

4. バリデーション演習（その2） （15：15～16：15）

佐藤 正一 先生 （千葉県救急医療センター）

5. 質疑応答・フリーディスカッション （16：15-17：00）

座長 奈女良 昭 先生 （広大）

斉藤 剛 先生 （東海大）

佐藤 正一 先生 （千葉県救急医療センター）

中島 晋也 先生

（西川計測株式会社）

情報交換会 （17：30～）

「1 階セミナールーム」

1. はじめに

—春期セミナーのご挨拶—

名古屋大学大学院医学系研究科法医・生命倫理学
石井 晃

みなさん、こんにちは。法医中毒研究会のセミナーもこれで第三回になりました。今回のセミナーに関しては、講演者の佐藤先生、奈女良先生、斎藤先生のご尽力をはじめ、多数の先生方のご協力によって実現されたものであり、心よりお礼申し上げます。

また、今回のセミナーに関しても、法医中毒研究会に登録して下さった、すべての会員の皆様に対して、改めてお礼を申し上げたいと思います。皆様の援助と積極的な参加なしでは、この会は維持できません。この点に関しては、いくら強調しても強調しすぎることはないでしょう。

さて、今回のテーマはバリデーションについてです。バリデーションというと、先生方は、おそらく、手間がかかるんじゃないかなあとか、今の人的パワーで対応できるかなあ、と感じられるかもしれません。実は、私もそういう気持ちは確かに持っております。

ところで、死後に体液中から測定された薬物濃度は、生前の薬物濃度を反映しているのでしょうか？この質問に、正確な回答を得ることはできるかは、かなり困難と思われます。腐敗等の過程で生じる、分解や夾雑物の混入がありますし、薬物分布の不均一化も起きますでしょう。その他、色々な攪乱要因が考えられます。従って、ご遺体から検出された薬物濃度を検討する際には、これらを考慮に入れ、慎重に検討する必要があります。

しかしながら、というより、だからこそバリデーションは必要となると考えられます。一例ごとに状況や資料の条件に差がある法医学領域において、色々なレベルの差はあるにせよ、測定値の再現性について担保することは、事例の適切な法的処理にあたっては重要なポイントであります。

とは言うものの、法医学を取り巻く厳しい状況を鑑み、少ない人員で多数のサンプルを処理しなければならない分析者の皆さんにとり、バリデーションが大きな負担になってしまいうなら、これは本末転倒と言わざるを得ません。今回のセミナーが、どのように効率よくポイントを押さえられるかについても含め、先生方の参考になればと願ってやみません。

そして、今回のセミナーは、鑑定を総括する執刀者の先生方にも、ぜひ参加していただきたいと希望しております。この機会を通して、薬物測定のはらむ困難さの一つであるバリデーションについて、鑑定人の先生方のご理解をいただければとも願っております。

この文章をもって、ご挨拶と致したく存じます。

2. 事例提示

東海大学医学部外科学系救命救急医学

齊藤 剛

ここでは、実際に行ったバリデーションの解説を行います。

バリデーションの実際例

塩酸エペリゾン（ミオナール）は、腰痛、肩こり、五十肩の方に処方される薬ですが、過量摂取すると心電図上 QT の延長が観察され極度の除脈となる場合があります。過量摂取の場合、血中エペリゾン濃度は GC-MS で測定可能ですが、常用量の血中濃度は低濃度のため LC-MSMS 分析が適します。そこで、治療域から中毒域までの血清中のエペリゾン濃度を LC-MSMS で分析が行えるようにしました。今回、その際に行ったバリデーションをご紹介します。

LC-MSMS 条件の検索

はじめに、LC ラインから分離用カラムを外してエペリゾン分析における MSMS の分析条件の検索を行う。確認としてキャリブレーターの 1 $\mu\text{g/ml}$ 溶液を用いた。化合物のプリカーサーイオン、プロダクトイオン、フラグメンター電圧（ドリフト電圧）、コリジョンエネルギーの最適条件を求める。フラグメンター電圧は感度に影響を与えるため最適な条件をみつけた。

MSMS 条件

MSMS 条件が決定後、各条件を入力した。

ルーチン分析で使用している LC 用カラムを用いて LC の分析条件を検索した。

エペリゾン、エペリゾン-d10(IS)の混合液、0.5 ng/ml を使用した。

抽出条件

あらかじめ採取した健常人の血清をブランク血清として使用したが、使用前に各血清にエペリゾン(d0、d10)が含まれてないことを確認した。抽出は MonoSpin C18 を用いた。

スタート時の血清量を 50 μl としてエペリゾンを 0.5 ng 添加 (10 ng/ml)。IS を 1 ng 添加して抽出した。

検出限界 (LLOD)

10 ng/ml で十分に確認できたため、エペリゾンを段階的に減量添加して抽出した。

s/n 比 = 3 としたところ、0.5 ng/ml を LLOD とした。

検量線

0.5 ng/ml から 500 ng/ml までの間で 7 点を決め 50 μ l の血清にキャリブレーターと IS (1 ng) を添加して抽出した。1 - 500 ng/ml の間で良好な結果が得られた。

日内・日差変動

エペリゾンの quality control (QC) を新たに調整して用いた。

1 - 500 ng/ml の間の任意の濃度、1 ng/ml、8 ng/ml、60 ng/ml、440 ng/ml を QC として、各 QC は 6 本を 1 組とした。ブランク血清、ブランク血清+IS、キャリブレーター 1 組、各濃度の QC (6 本 \times 4 濃度) を調整した。抽出後に分析した。以上の操作を 6 日間行った。

データ処理

キャリブレーターの分析によって検量線を作成する。この検量線を用いて各 QC を定量する。設定した濃度から、LLOQ は $\pm 20\%$ 以内、他の QC は $\pm 15\%$ 以内に含まれることを確認した。

初日に行った結果を日内変動、全ての結果を用いて計算処理して日差変動を求めた。

マトリックス効果

以下の①、②、③を行い、マトリックス効果を求めた。

- ① IS、QC (低、中、高濃度) は、抽出を行わず分析時は抽出した試料と同じ条件にした。
- ② ブランク血清のみの抽出を行い、抽出液に IS、QC (低、中、高濃度) を添加した。その後の処理は同様に分析した。
- ③ ブランク血清に IS、QC (低、中、高濃度) を添加して抽出した。抽出後は②と同様の処理を行い分析した。

上記の結果を以下の計算によってマトリックス効果と回収率を求めた。

$$\text{マトリックス効果 (\%)} = \text{②/①} \times 100$$

$$\text{回収率 (\%)} = \text{③/②} \times 100$$

試料の安定性

試料中の化合物の安定性を知るために行う試験である。

ブランク血清に QC (LLOQ、低、中、高) を添加した。室温 24 時間、4℃ 1 週間、-30℃ 4 週間、凍結/融解を 3 回。これらの条件を経過した試料に IS を添加して抽出した。調整直後の試料の分析結果と比較して安定性を確認した。

応用例

安定性の試験では、 -30°C における保存が比較的安定していたため、保存してあった試料の分析を行った。

ルーチン分析の注意点

バリデーションは、その方法の確かさを集中的に確認する方法です。再現があり実務に使い始めると追加の化合物が無い限り再度バリデーションは行われない可能性がある。そのような場合、日常的に行う分析においても、IS を含めた標準品の劣化が気づかぬ内に進行することがある。そこで、定期的に標準品の再調整を行うことを勧めます。あるいは IS とキャリブレーター、QC 液をそのまま分析してピークの高さ等を定期的にチェックすることが有効になります。また、既知濃度試料を陽性コントロールとして使い、分析によって継続的に正しく定量されているか等の確認を行うと安心できると思います。

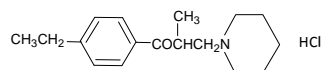
バリデーションの実際例

LC-MSMSによる血清中エペリゾンの分析

東海大学医学部
外科学系救命救急医学
齊藤 剛

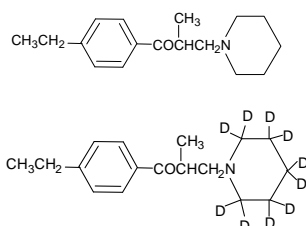
エペリゾン塩酸塩

- 製品名:ミオナール
- 腰痛、肩こり、五十肩に対して処方
- 過量摂取によって心電図上QTの延長、徐脈



LC-MSMS条件の検索

- エペリゾン キャリブレーター (1 µg/ml)
- エペリゾン-d10 (1 µg/ml)



LC-MSMS条件の検索

- プリカーサーイオン
- プロダクトイオン
- フラグメンター電圧(ドリフト電圧)
- コリジョンエネルギー

フラグメンター電圧は感度に影響を与える

MSMS条件

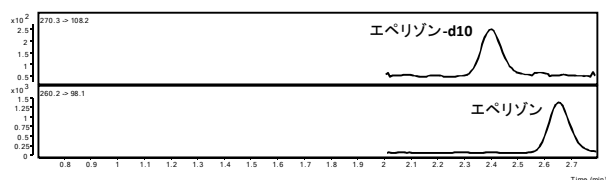
	Mass	Precursor	Product	Frag.	CE	Polarity
エペリゾン	259.19	m/z 260.2	m/z 98.1	100	17	Positive
エペリゾン-d10	269.27	m/z 270.3	m/z 108.2	110	13	Positive

LCの分離条件

- Agilent 1200LC-6410MSMS (ESI)
- InertSustain C18 HP 3 µm (3 mm × 100 mm)
- 移動相 10 mM 蟻酸アンモニウム/MeCN
- アイソクラティック (MeCN 40%)

保持時間の確認

エペリゾン、エペリゾン-d10の混合液
0.5 ng/mlを使用



抽出方法

- 50 μ lの血清
 - エペリゾン 0.5 ng
 - エペリゾン-d10 1 ng
 - 純水 800 μ l
- 10 ng/ml
- MonoSpin C18を使用
 - MeCN、純水
 - 試料通液
 - 洗浄(純水5%MeOH)
 - 溶出(100 μ l MeCN)
 - LC-MS/MS分析

LLOD

- 50 μ lの血清
 - エペリゾン-d10 1ng
 - 純水 800 μ l
 - エペリゾン
 - 10 ng/ml
 - 5 ng/ml
 - 1 ng/ml
 - 0.5 ng/ml ← LLOD
 - 0.1 ng/ml
- 抽出、分析

直線性

- 0.5 ng/ml – 500 ng/ml
キャリブレーターで調整
- | | |
|-------------|----------------------------------|
| 0.5 ng/ml | ⇒ 直線性
1.0 ng/ml – 500.0 ng/ml |
| 1.0 ng/ml | |
| 5.0 ng/ml | |
| 10.0 ng/ml | |
| 25.0 ng/ml | |
| 100.0 ng/ml | |
| 500.0 ng/ml | LLOQ 1.0 ng/ml |

Quality control (QC)の調整

- エペリゾン溶液をQC用に調整
- 1.0 ng/ml – 500.0 ng/ml(直線性)

ng/ml	ng/ml
1.0	← 1 (LLOQ)
5.0	
10.0	← 8 (低)
25.0	
100.0	← 60 (中)
500.0	← 440 (高)

日内・日差変動

ブランク
 ブランク+IS
 キャリブレーター1組 (1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 100.0, 500.0 ng/ml)
 QC (LOQ) × 6
 QC (低) × 6
 QC (中) × 6
 QC (高) × 6

 合計32本の分析
 32 × 3分 = 96分
 1回(日)の分析一日内変動
 6回(日間)の分析一日差変動

日内・日差変動

ng/ml	日内変動		日差変動	
	RSD(%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)
1	6.7	102.0	9.0	100.4
8	11.5	98.8	11.2	99.3
60	14.6	102.3	9.6	102.3
440	9.6	101.9	8.9	98.9

マトリックス効果・回収率

- QC (低, 中, 高濃度)

- ① IS、QC抽出なし → 分析
- ② ブランク血清抽出 → +(IS、QC) → 分析
- ③ ブランク血清+(IS、QC) → 抽出 → 分析

$$\text{マトリックス効果(\%)} = \frac{\text{②}}{\text{①}} \times 100$$

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{③}}{\text{②}} \times 100$$

マトリックス効果・回収率

	ng/ml	マトリックス効果(%)	回収率 (%)
エベリゾン	1	98.6	98.6
	8	99.8	98.8
	60	99.2	98.0
	440	98.7	99.1
エベリゾン-d10		98.6	99.2

試料の安定性

- QC (LLOQ、低、中、高濃度)

- 血清に各QCを添加

- 室温24時間
 - 4℃、1週間
 - -30℃、4週間
 - 凍結/融解×3回
- IS添加後抽出
- 調整直後に抽出
- 比較

安定性の結果

	室温24時間	4℃ 1週間	-30℃ 4週間	凍結/融解×3
1	87.7	78.8	82.5	53.8
8	103.3	90.2	88.0	79.8
60	100.8	67.9	85.3	33.1
440	102.9	74.9	86.4	45.8

ルーチン分析の注意点

- ISを含め標準品の劣化に気付くには・・・
 - 定期的にIS、キャリブレーター、QCの再調整
 - 定期的にIS、キャリブレーター、QCの分析
(抽出は行わず、アバンドランスの比較)
 - 既知濃度試料の分析(陽性コントロール)

3. バリデーション演習

薬毒物 Validation-Support/Excel の解説書 V1

千葉県救急医療センター医療局検査部長
佐藤 正一

法中毒用バリデーション算出用プログラム

法中毒 Validation-Support/Excel V1.0 の操作方法

第 1 版 2014.02.28

目次

1	はじめに	3
1)	対象項目	3
2)	臨床検査法と法中毒に関するバリデーションの差異について	3
3)	バリデーションをユーザーが効率よく行う手順	5
2	法中毒 Validation-Support/Excel について	5
(1)	法中毒 Validation-Support/Excel の特徴	5
(2)	法中毒 Validation-Support/Excel の使用方法	5
(3)	使用上の注意点	6
(4)	必要システム と マクロの利用方法	6
(5)	免責・転載・配布について	6
(6)	セキュリティレベルの変更方法	6
3	各分析シートの使用法	9
(1)	各シートの共通仕様	9
(2)	目次シート	9
(3)	併行精度シート	10
(4)	分析単位精度シート（室内精度 1～4）	11
(5)	正確さの評価（真度の評価シート）	12
(6)	相関分析シート	14
(7)	直線性シート（検量線）	17
(8)	検出限界と定量限界シート	19
(9)	特異性・選択性シート	21
(10)	報告書シート	21
(11)	参考文献：	24

1 はじめに

臨床検査室におけるバリデーションは、測定試薬、装置から得られる結果が、期待する結果であることを**検証**し、**文書化**するものとしています。目的は、報告する検査結果に再現性があり、信頼性があるものであることを科学的に保証したうえで検査値を報告することにあります。

日本薬局方においても「分析法の誤差が原因で生じる試験の判定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」と定義されており、確率はその試験の重要度によって決定される。また、分析パラメータについては、精度と真度については必ず実施し、その他に関しては分析の目的によって必要度が変わるとしています。

今回、法中毒分析におけるバリデーションを実施するに当たり、臨床検査用のバリデーション検証用ソフトを改変し、対応できるようにしました。そこで、その使用手順と解釈について解説いたします。

1) 対象項目

バリデーションの対象となる項目には、以下のものがあります。

- (1) 特異性 (specificity), 選択性 (selectivity) 。
- (2) 真度 (trueness), 正確さ (accuracy)
真度は真の値との偏差を意味し、正確さは真度との一致の程度を表す。
- (3) 精度 (precision) ← バラツキの程度を表す指標
 - ① 併行精度 (repeatability)
 - ② 室内再現精度 (intermediate precision) 日時,校正,ロット,人などが違う条件
 - ③ 室間再現精度 (reproducibility)
- (4) 検出限界 (limit of detection) ← 検出限界は測定対象物の検出可能な最低の量
- (5) 定量限界 (limit of quantitation) ← 適切な精度と正確さで定量できる最少量
- (6) 直線性 (linearity)
- (7) 範囲 (range) ← 直線性を検討することで検証
- (8) 頑健性 (robustness)
← 試薬の組成や pH などを変化させても、測定値に影響をしない安定性能。
- (9) トレーサビリティ (traceability) と不確かさ (uncertainty)

2) 臨床検査法と法中毒に関するバリデーションの差異について

臨床検査室におけるバリデーションは、日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会「定量測定法に関するバリデーション指針」2011 によって提案されたものです。臨床検査の場合、分析する項目に対応した試薬が試薬メーカーより提供され、自動分析

装置で測定できるように試薬設計がなされたもので測定が行われるため、バリデーションの適応範囲として、メーカーが行う範囲とユーザーが行う範囲があります（表 1）。

一方、法中毒では全ての項目を自ら実施しなくてはなりません(表 2)。

また、臨床検査における精度・真度の許容限界は、**生理学的変動幅の 1/2** を基本としており、最大が CV 5%であるのに対して、法中毒では、定量下限で 20%、その他の濃度域で 15%以下となっています。

真度については、臨床検査では各施設で購入可能な標準試料を基に構築されますが、法中毒では、自らが作成した QC 試料で行うことになります。

表 1. 臨床検査におけるバリデーション特性と適用範囲

バリデーションの特性	メーカーの	ユーザーの場合	測定条件・手順を
特異性, 選択性	+	—	+
真度, 正確さ	+	+	+
併行精度	+	+	+
室内再現精度	+	+	+
室間再現精度	- + *	- + *	- + *
検出限界	- + **	- + **	- + **
定量限界	+	+	+
直線性	+	+	+
範囲	+	—	+
頑健性	- + ***	- + ***	- + ***
トレーサビリティと不確かさ	+	+	+

+ 通常実施する — 通常実施しない

* : 室間共同試験による

** : 測定対象が微量な場合は実施

*** : 規定した測定条件で実施可能な場合

表 2. 法中毒におけるバリデーションの特性と適用範囲

	確認試験	純度試験		定量法 ○含量/力価
		定量試験	限度試験	
真度	—	+	—	+
併行精度	—	+	—	+
室内再現精度	—	+ ⁽¹⁾	—	+ ⁽¹⁾
特異性 ⁽²⁾	+	+	+	+
検出限界	—	- ⁽³⁾	+	—
定量限界	—	+	—	—
直線性	—	+	—	+
範囲	—	+	—	+

(1) 室間再現精度（用語解説を参照のこと。）を評価する場合には、室内再現精度の評価は必要ない。

(2) 分析法が特異性に欠ける場合には、関連する他の分析法によって補うことができる。

(3) 評価が必要な場合もある。

第 1 回法中毒研究会春季セミナー資料（平成 9 年 10 月 28 日 医薬審第 338 号）より

3) バリデーションをユーザーが効率よく行う手順

各項目の重複測定を避けることで効率的な分析に繋がります。

- ① 併行精度を行う時に管理試料のデータであれば、正確さの評価に利用。
- ② 低濃度の精度は検出限界や定量限界の実験を行う場合の重要な基礎データとして利用。

2 法中毒 Validation-Support/Excel について

本プログラムは、Microsoft EXCEL 上でバリデーション関連の計算を容易に行うために開発したものです。Chromatography,33(2),107-112,2012 の指針に従って作成しました。

(1) 法中毒 Validation-Support/Excel の特徴

特徴としては、データ入力と同時に分布型検討用のグラフや散布図等が描かれ、グラフを確認しながらデータ処理ができることです。これは、平均、標準偏差や回帰などの統計処理は、データ集団が正規分布であることを前提としていることから、扱うデータの分布がどのようなものであるのかに注意する必要があるためです。特に、**外れ値**の混入に気づかずに誤ったデータ処理をしてしまう危険を避ける意味で、得られたデータの分布状況の検討は常に注意することが求められます。

2 番目には、各シートには「解説セル」があり、そのセルにマウスを合わせると実施手順や注意点などが示されるようになっていることです。

(2) 法中毒 Validation-Support/Excel の使用方法

- 「目次シート」の項目にアンダーラインのあるセルは、クリックによって目的とするシートへ飛ぶので、すぐに入力処理が可能です。
- 各シートには、サンプルデータが入っているので、このデータを利用して、本ソフトの操作方法に慣れて頂ければと思います。
- 何れのシートにおいても 「青色セル」は、入力可能範囲を示し、それ以外の部分にはロック（保護処理）がかけられているので入力できません。
- 「青色セル」に関しては、桁数の変更、書式の変更、条件付書式の変更および並べ替えは可能です。なお、桁数の変更に伴いグラフの桁数も変更されます。
- また、各シートには「解説セル」があり、各統計処理の方法や注意点が記載されています。セルにマウスを合わせることで表示されます。

(3) 使用上の注意点

各シートには、あらかじめサンプルデータとして各種検討時のデータが入っています。実データを入力する際には、削除してから実行してください。

また、他のシートからのデータコピー時には「編集」「形式を選択して張り付け」 張り付け方法を「値」として実行するにしてください。そのまま貼り付けてしまうと計算式、書式等までが張り付いてしまい、計算やグラフ化が行えなくなる可能性があります。また、表入力の際には、空欄のデータがないように左上詰めで入力してください。

なお、データの中に数値ではなく、文字が含まれていることがあります。データの中に全角文字が入っていないか確認してデータ入力処理を行なってください。ワープロなどで作ったデータは、もう一度キーボードから入力することをお勧めします。

マクロボタンを押す際には、グラフが選択されていないようにしてください。シート上のセルが選択されていない場合正常な処理が行えません。

(4) 必要システム と マクロの利用方法

基本ソフトウェア：

本ソフトは、OS として Windows XP / Vista / 7 / 8 上の Excel 2007 以降のシステムで動作します。(Excel2003 以前のものでは、マクロ処理に不具合が生じます)

(5) 免責・転載・配布について

このソフトウェアを使用しての問題発生に関して、一切責任を問われないものとします。また、このプログラムはフリーウェアで自由に配布可能です。ただし配布時は、元ファイルまま配布してください。

(6) セキュリティレベルの変更方法

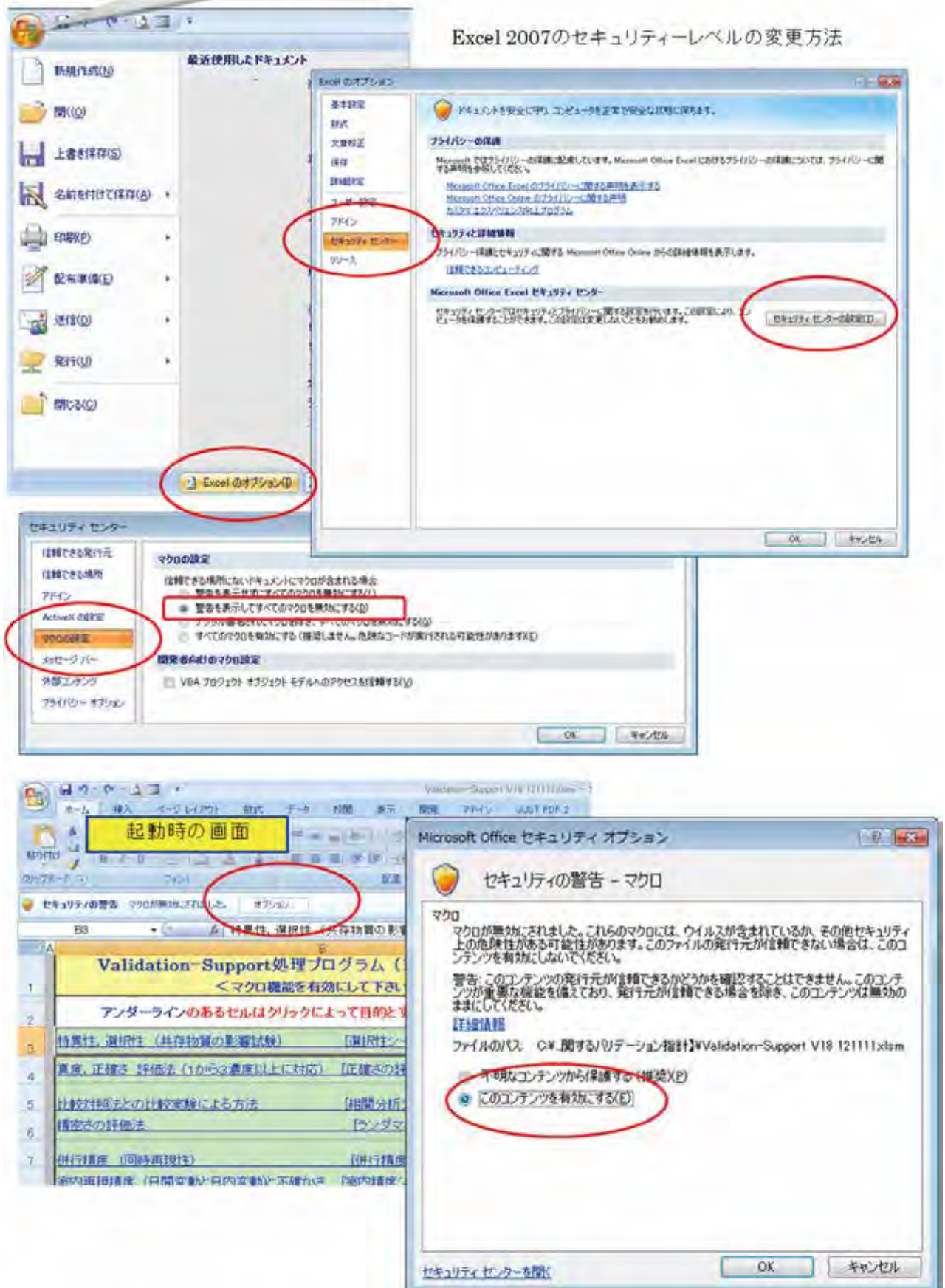
本プログラムを使用するためには、マクロを有効にする必要がある。以下にその方法を示します。

Excel 2007 / 2010 では、[Microsoft office]ボタン、Excel2013 ではファイルをクリックして、[Excel のオプション] ボタンをクリックします。つづいて [セキュリティセンター] → [セキュリティセンター]の設定 進み、[マクロの設定] → 「警告を表示してすべてのマクロを無効にする (D)」を選択します。こうすることで、起動時の選択によってマクロ機能が使えるようになります。

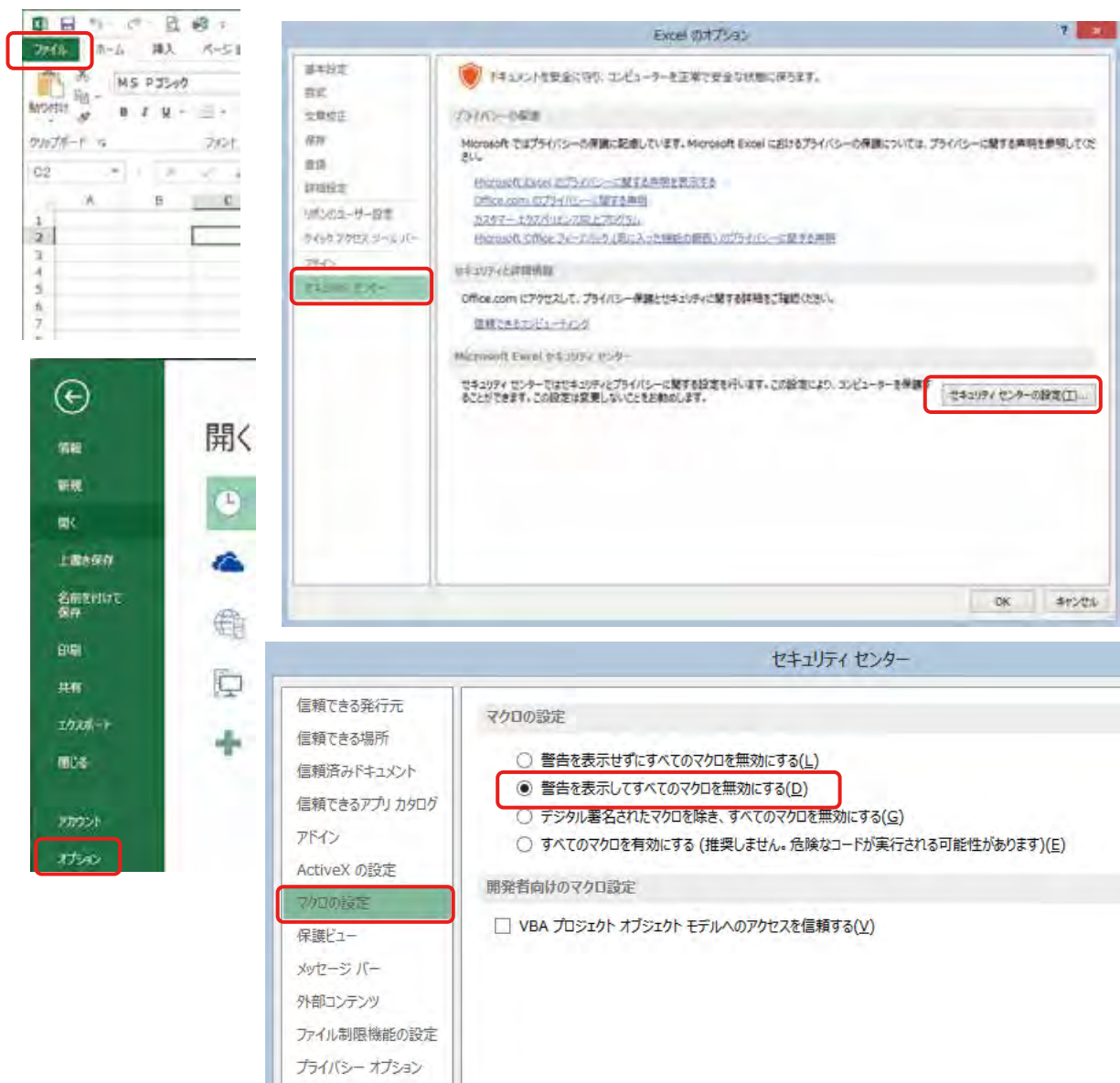
法中毒 Validation-Support/Excel 起動時には、[セキュリティの警告 マクロを無効にされました]が表示されるが、オプションボタンを押して[**このコンテンツを有効にする**]を選択することで、マクロが使用できるようになります。

Microsoft office ボタン

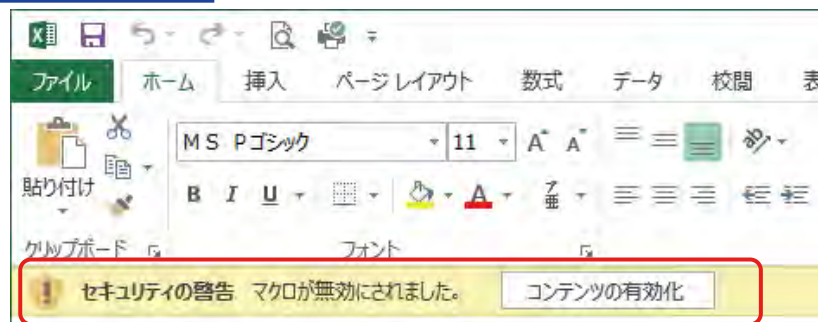
Excel 2007のセキュリティーレベルの変更方法



Excel2013 のセキュリティーレベルの変更方法



起動時の画面



3 各分析シートの使用法

(1) 各シートの共通仕様

- ◆ 各シートには、サンプルデータが入っています。
- ◆ 何れのシートにおいても「青色セル」は、入力可能範囲を示し、それ以外の部分にはロック（保護処理）がかけられているので入力できません。
- ◆ 各シートには「解説」セルがあり、各統計処理の方法や注意点が記載されています。セルにマウスを合わせることで表示されます。
- ◆ 極力マクロ処理を行わない方法で作成していますが、Excel の使用上の制限からマクロを実施した方が効率的な場合は、マクロ処理をしています。
マクロ処理を必要とするシートは、室内精度の分散分析、正確さの評価の計算及びグラフ化、相関分析シートのブートストラップ、分布型と反復切断法シートの分布型検定と反復切断実行および桁数変更ボタンの6つがあります。

(2) 目次シート

目次シートでは、法中毒 Validation-Support/Excel で実施できるシートの紹介をしています。また、アンダーラインのあるセルにカーソルを合わせると、各分析方法の手順と解説を見ることができます。セルの中でクリックすると目的のシートへハイパーリンクで飛び機能もあります。

シートの解説では、実施手順の順で解説を行う。

The screenshot shows the 'Validation Support' Excel spreadsheet. The 'Table of Contents' (目次) sheet is visible, listing various analysis methods with hyperlinks. A callout box points to a cell containing a comment, labeled 'コメントの表示' (Display Comment).

Validation Support 処理プログラム (Excel 2007~)
マクロ機能を有効化して下さい。

アンダーラインのあるセルはクリックによって目的とするシートへ移動します。

目次

項目	シート名
1. 特異性・選択性 (共存物質の影響試験)	【特異性・選択性シート】
2. 精度・正確さ (評価法) (1) から (3) まで (1) (2) (3) の評価シート	【精度・正確さの評価シート】
3. 比較対照法との比較実験による方法	【相関分析シート】
4. 検出限の評価法	【ランダム化検定シート】
5. 検出限 (同時再現性)	【検出限シート】
6. 検出限 (日間変動と日内変動) (1) から (3) まで (1) (2) (3) の評価シート	【検出限・精度・正確さシート】
7. 検出限 (定量的検定)	【検出限・定量的検定シート】
8. 検出限 (検出限)	【検出限シート】
9. 検出限 (検出限と検出限) (1) から (3) まで (1) (2) (3) の評価シート	【検出限・精度・正確さシート】
10. 検出限 (検出限)	【検出限シート】
11. 検出限 (検出限と検出限) (1) から (3) まで (1) (2) (3) の評価シート	【検出限・精度・正確さシート】
12. 検出限 (検出限)	【検出限シート】
13. 検出限 (検出限と検出限) (1) から (3) まで (1) (2) (3) の評価シート	【検出限・精度・正確さシート】
14. 検出限 (検出限)	【検出限シート】
15. 検出限 (検出限と検出限) (1) から (3) まで (1) (2) (3) の評価シート	【検出限・精度・正確さシート】
16. 検出限 (検出限)	【検出限シート】
17. 検出限 (検出限と検出限) (1) から (3) まで (1) (2) (3) の評価シート	【検出限・精度・正確さシート】
18. 検出限 (検出限)	【検出限シート】

コメントの表示

特異性・選択性
試料に共存する可能性のある類似成分、反応に影響すると予想される成分を試験する。
確認試験としては、測定対象物を含む試料(多くの場合、既知濃度の標準物質、既知濃度試料)に妨害を引き起こす可能性のある物質を添加して求めた結果、および測定対象物質を含まない試料に妨害を引き起こす可能性のある物質を添加した結果とを比較することによって確認できる。

共存物質の影響試験
1) 測定試料の準備:
各干渉物質が添加された添加ベース血清とベース血清プラークを用いて、5~10段階の混合系列を作成し、添加試料ごとに添加濃度を計算する。
2) 試料の測定:
それぞれの試料を3重測定以上行う
3) 結果を「共存物質シート」に入力
4) プロット図を作成
タイトル・混合系列濃度および測定結果を入力すると、自動的にグラフ化される。
5) 結果の解釈
プロット図および変化率を視察し、許容される変化率を判断する。
何らかの影響があった場合は、妨害物質添加の影響原因について、①非特異反応、②反応性変化、③その他の原因と区別し、対策を行う。

(3) 併行精度シート

精度は、繰り返し分析によって得られる定量値間の一致の程度を表します。

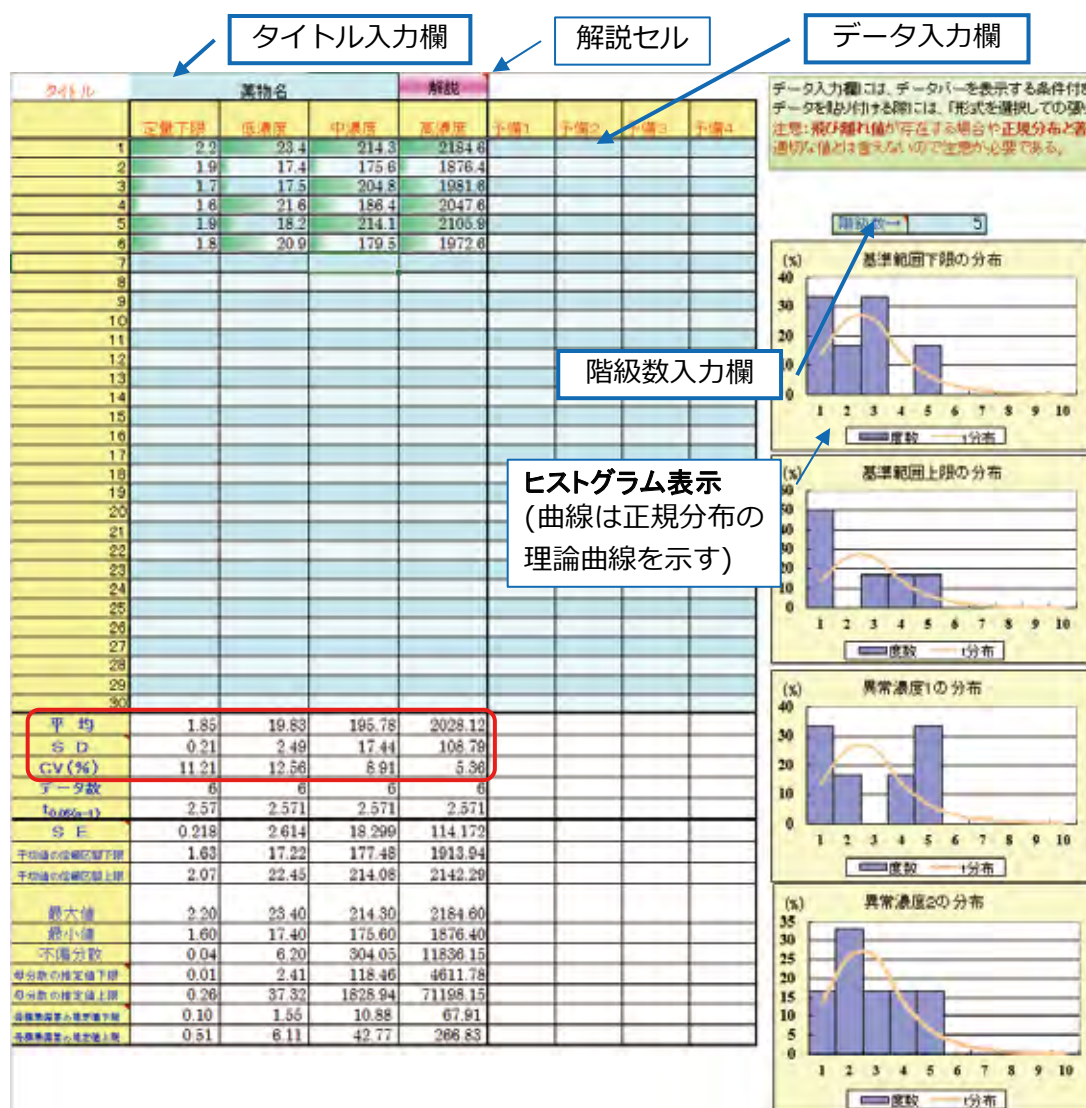
このシートでは数値だけの処理による解析間違いを避ける意味で、ヒストグラムを作成するようにになっています。数回のデータで分布を把握することは困難ですが、外れ値などの結果に大きく影響するデータの把握は可能です。

QC 試料の準備と測定法

- 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。

結果の解釈

- 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。



(4) 分析単位精度シート (室内精度 1～4)

(シートは 3 種類の濃度に対応するため同じシートが 4 つ用意されています。1 濃度に対して 1 シート使います。)

このシートは、長期安定な管理試料を用いて分析単位精度（日間変動と日内変動）の比較を行います。

実施方法

- 分析単位間の精度は、4 濃度以上、5 回以上の繰り返し分析を少なくとも 3 回の分析単位を繰り返し分析することによって評価します。

結果の解釈

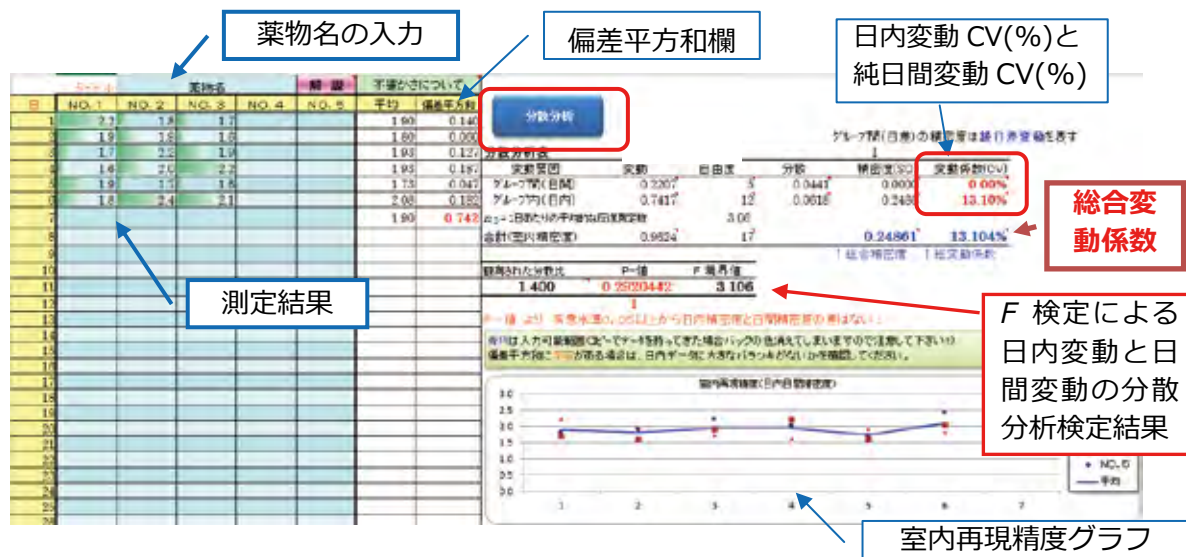
- 室内再現精度グラフから、日内変動と日間変動に極端値がないかを確認する。
- 各濃度における定量値の精度が、定量下限で 20%以下、他の濃度で 15%以下。

(総合変動係数で評価)

例題では、低濃度の標準試料の結果を示します。1 日 3 回、5 日間測定した結果です。得られたデータに極端値は見られません。

(法中毒分析では精密度と変動係数欄は使用しませんので無視してください。)

F 検定による日内変動と日間変動の分散分析検定結果に着目して、確率 P 値を見て $P < 0.05$ でなければ日間変動と日内変動に違いはなく、安定した測定結果が得られていると判断できます。総合変動係数は 13.1%で基準を満たしています。その他の濃度についても確認してください。



(5) 正確さの評価（真度の評価シート）

このシートでは標準試料を測定し、表示値との比較を行います。8 種類までの標準試料（または標準試料の希釈試料）に対して評価を行うことが可能です。また、法中毒分野における検量線の評価も可能です。測定結果を入力後、**[計算およびグラフ化ボタン]**を押すことで、計算結果の表示とグラフ化が自動的行われます。

標準試料の許容限界値に平均値が収まっているかを評価します。検量線評価を行う場合には、ブランク試料を含む 6 濃度以上で構成した試料を分析して、結果を入力してください。

実施方法

- ① 標準試料の値を標準値の欄に入力します。
- ② 許容限界欄に標準試料の定量下限で 20%、他の濃度で 15%の値を入力。
- ③ 測定結果を入力します。

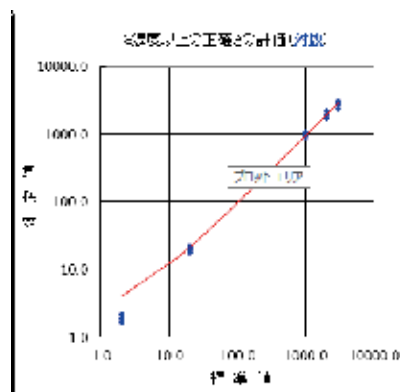
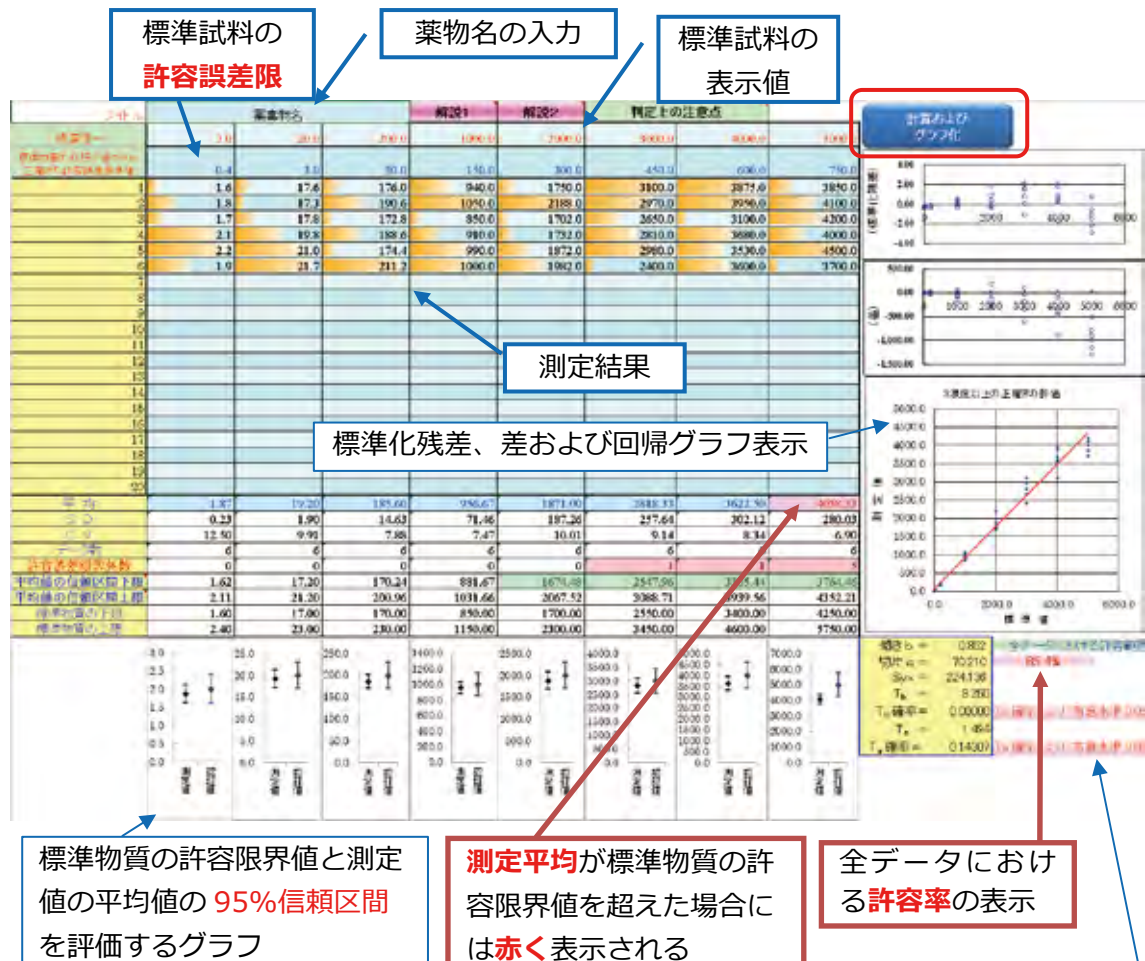
結果の解釈

- ① 差のプロットが測定値の平均値の大きさにかかわらず、ほぼ一様であることを調べます。
- ② 極端に大きな差がある測定値は、外れ値ではないかを検討します。
- ③ 理論値の定量下限で平均値の真度が $\pm 20\%$ 以内、他濃度で $\pm 15\%$ 以内であることを確認します。（平均値の欄の赤字は許容限界外のデータ）
- ④ このシートでは、**法中毒における検量線の評価機能**もあります。直線範囲の評価は③の評価に加え、「全ポイントの 75%以上かつ定量下限およ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。」とされています。（全ポイントに対する許容範囲内率を見て確認）

この例は、検量線評価例を示します。標準試料の測定濃度が 2.0～5000 とレンジが広く、また、対数的な測定値であることから、標準化残差、差グラフから高濃度試料ではバラツキが大きなものであることがわかります。

一方、標準試料の許容誤差限界と測定値の 95%信頼区間評価グラフをみると濃度 5000 以外では、いずれの濃度域の試料も許容範囲内であることがわかります。5000 の平均値欄にも赤字がついています。全データの許容率を見ると、最高濃度を含めた段階においても 85%が許容限界内に収まっているので、結果の解釈④

の要件は満たしています。濃度 5000 のデータを削除して、再度グラフ化を行い、データ確認をします。総合的に考えて直線範囲は 2.0~4000 までと思われます。



(6) 相関分析シート

このシートは、正確さの評価の一つである多数の試料を用いた比較対照法との比較評価の行うためのものです。標準試料を使って、異なる方法間でのデータ比較などにも使用できます。

単に比較評価だけでなく、相関分析、回帰分析（直線回帰、標準主軸回帰、Demingの回帰）および Mahalanobis 等確率楕円をグラフ表示する機能がります。特に方法間比較では基本的に従来からある直線回帰（最小二乗法）は、前提条件として説明変数側に誤差がなく、回帰の周りデータ分布が正規分布であるとしており、方法間比較のような x 軸 y 軸ともに誤差が基本的にあるデータに関して使用すべきではあません。そこで、線形関係式である標準主軸回帰、Deming の回帰を使用して処理ができるようにしています。また 2 群データを同時に作画することも可能ですので、2 種類の検討や濃度別の検討に利用してください。

① 標準主軸回帰

標準主軸回帰（standard major axis regression）は、次式で表され、幾何平均回帰（metric mean regression）とも呼ばれます。この直線の特徴として、常に等確率楕円長軸に一致することと、変数 x と変数 y の計測尺度の違いに対して頑強であることです。散布図上および視覚的にも両変数を平等に扱った関係式として理解しやすいものです。

$$b = \sqrt{b_1 \cdot b_2} = \sqrt{\frac{S_{yy}}{S_{xx}}}$$

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$a = \bar{y} - (b \times \bar{x})$$

② Deming 回帰

Deming 回帰は、各点の x 軸方向の計測誤差 e_x と y 軸方向の計測誤差 e_y の間に差があるとして、次式の誤差分散比 λ で補正し（誤差の少ないほうの変数によりウェイトを置いて）回帰式に対する標準偏差 s_d が最小となるように回帰直線を求め方法です。技術的誤差に関しては、ランダムイズ 2 回測定法などから算出します。

$$\lambda = \frac{(\text{各点の } y \text{ 成分の技術誤差})^2}{(\text{各点の } x \text{ 成分の技術誤差})^2} = \frac{e_y^2}{e_x^2}$$

$$b = \frac{S_{yy} - \lambda S_{xx} + \sqrt{(S_{yy} - \lambda S_{xx})^2 + 4\lambda S_{xy}}}{2S_{xy}}$$

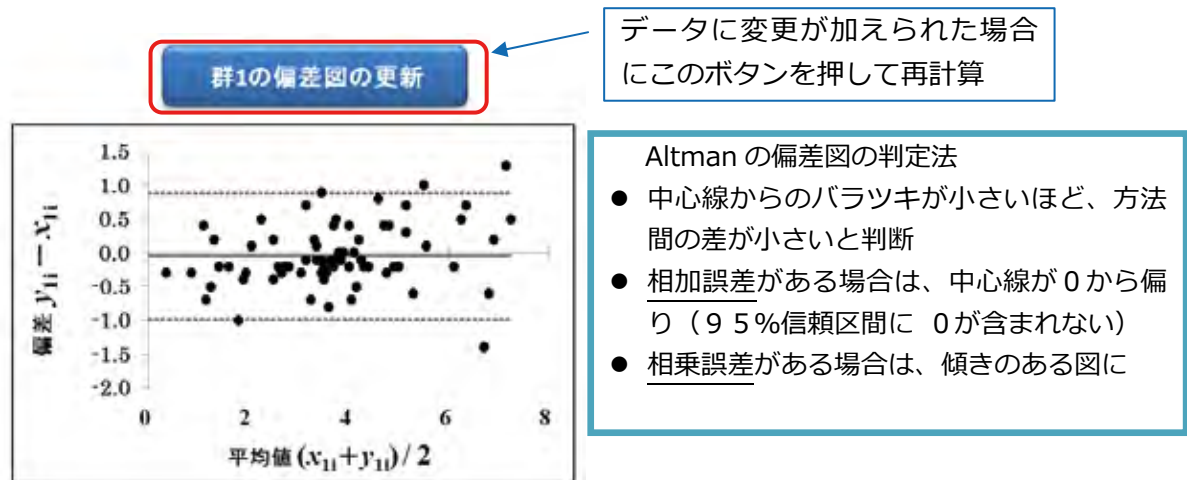
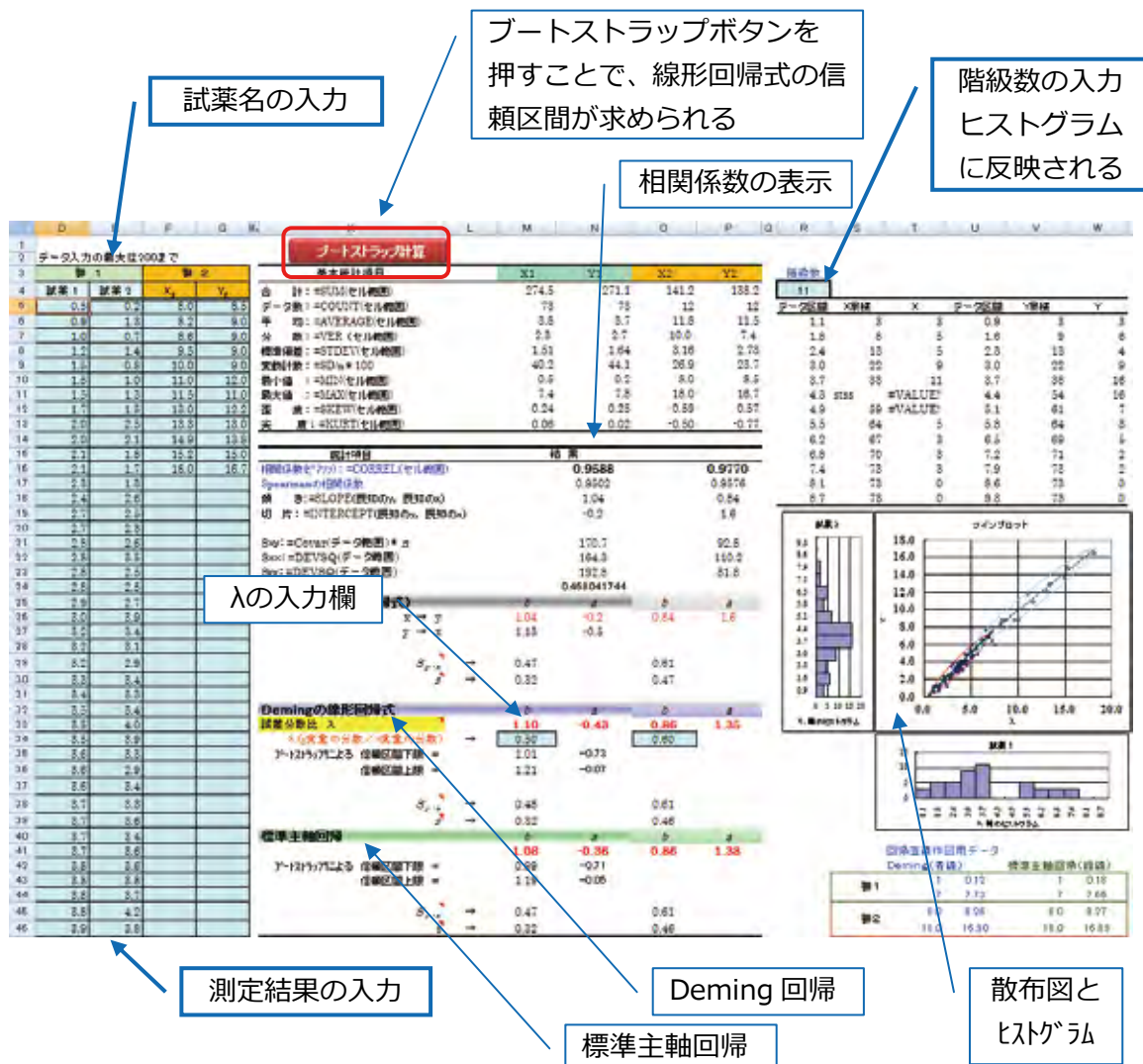
③ Bootstrap 法

関係式における傾き b と切片 a の信頼区間を推定する方法としては、Bootstrap 法を採用しています。これは、不特定多数の試料を使用する場合、分布に正規分布を仮定することが難しいため、分布型によらない推定量を得るため使用するものです。Bootstrap 法による 95%信頼区間を求めるためには、シートの上部にある **ブートストラップ計算** ボタンを押すことで得られます。なお、乱数を使用して計算するものであるため、計算する度に多少異なるデータとなります。

④ Altman の偏差図

このシートでは Altman の偏差図の表示機能もあります。Altman の偏差図は、2 つの測定値の差が、測定系全体としてどうなっているかを作図によって評価するものです。

この例では Altman の偏差図で、値が大きくなるに従ってバラツキが大きくなっていることがうかがえます。標準偏差のガイド線は、0 を含んでおり相加誤差は無いと思われませんが、バラツキが大きいためこのような結果となったことも考えられます。また、傾きは認められないので相乗誤差は無いと思われれます。



(7) 直線性シート（検量線）

このシートは、直線範囲を評価するためのシートです。多くの測定項目で高濃度になると直線性が保たれなくなり低値に測定されるため、その限界を求めるために使用します。

被検試料理論値と測定値を入力します。直線回帰式の傾きと切片が算出されグラフ化されると同時に直線性を評価する分散分析表が作成されます。

QC 試料の準備と測定法

検量線評価を行う場合には、ブランク試料を含む 6 濃度以上で構成した試料を分析して、結果を入力してください。

結果の判定

結果は、真度が $\pm 20\%$ 以内、他濃度で $\pm 15\%$ 以内であること、全ポイントの 75%以上かつ定量下限およ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。

この例は、正確さの評価シートと同じデータを使用し 2.0～5000 までの直線性範囲を求めたものです。作成されたグラフから極端値の存在や入力間違いなどをチェックします。分散分析の結果より「測定範囲内で直線性は認められない」と判定されました。また、グラフの実測値の平均値（黒）と予測式（赤）からその一致度をみると黒線が大きく湾曲していることがわかります。最高濃度の 5000 のデータを削除して再度結果を見ると、有意確率は 0.9097 で「測定範囲内で直線性がある」と判定されたことから、直線性が確保できるのは 4000 までと考えられます。

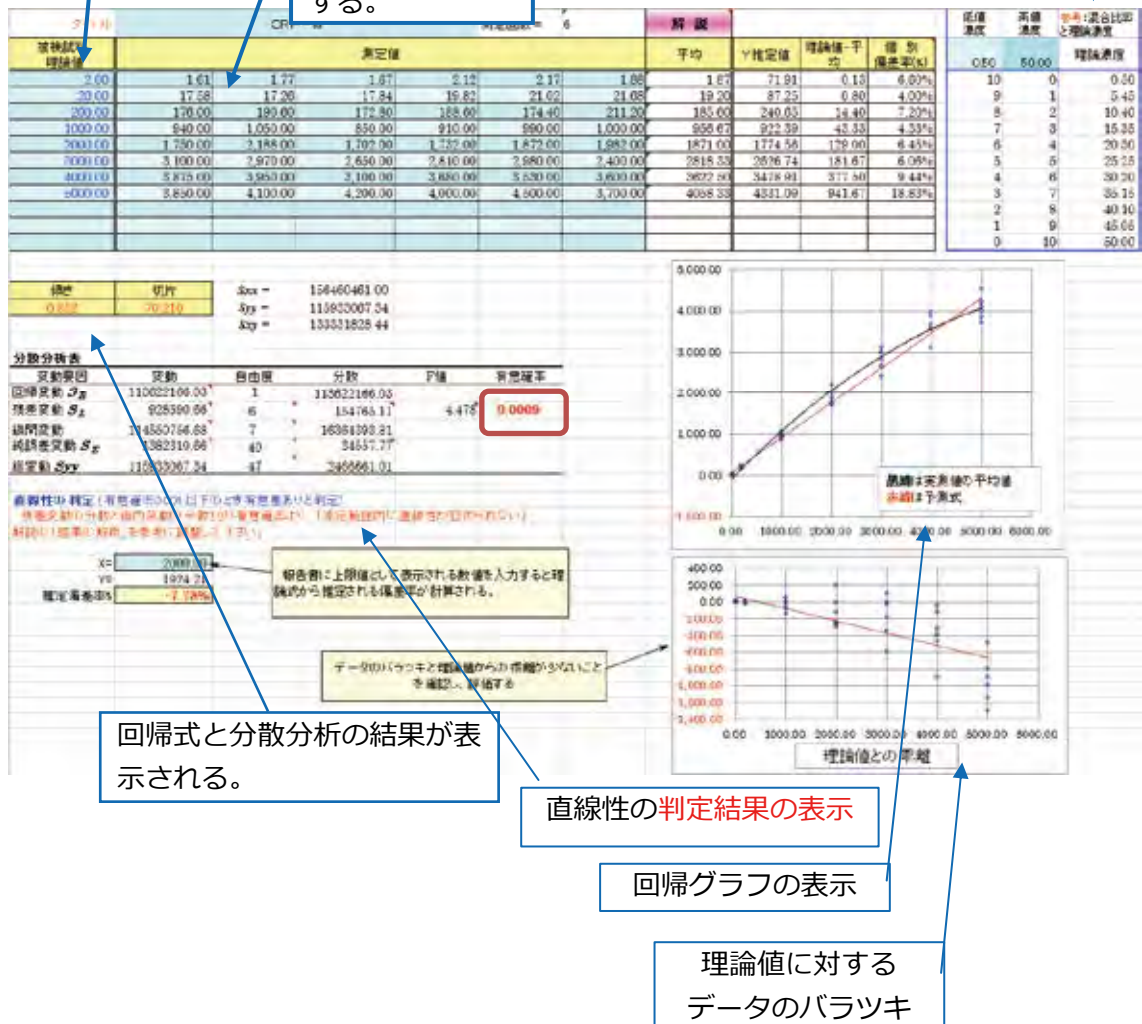
臨床検査分野では分散分析の結果で直線性を判定します

この例では、分散分析表で残差分散と準誤差分散の比からの F 統計量より有意確率 0.0009 で「直線性が認められない」結果となりました。このことから、最高濃度のデータすべてを削除し、再び有意確率をみると 0.9097 となったことから、直線範囲は～4000 までであるとししました。

希釈系列の理論値を
入力する。

測定結果を入力する。

希釈系列を作成するためのサポートデータ。低値試料の濃度と高値試料の濃度を入れると理論濃度が表示される。(この例では利用していない)

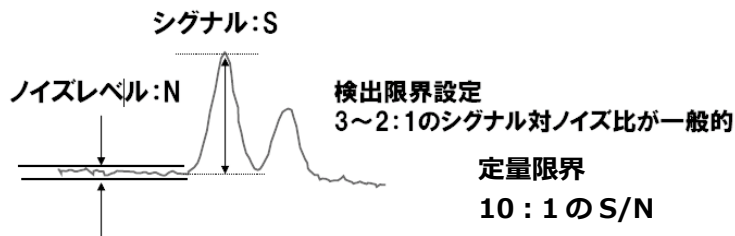


(8) 検出限界と定量限界シート

検出限界を求める方法には下記のような方法がある。

(1) 視覚的評価に基づく方法

(2) シグナル対ノイズに基づく方法



(3) レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法

このシートは、ISO の基準に基づく方法で、標準偏差値から検出限界 (LoD: Limit of Detection) と定量限界 (LoQ: Limit of Quantitation) を求めるためのものです。

検出限界 (LoD) は、 α エラーと β エラーを 1.65 とすると、ちょうど $\alpha = \beta = 0.05$ (5%) となることから、ブランクの平均値の 2 倍離れた値をもって検出限界としました。すなわち、相対標準偏差 (RSD) は、 $\sigma / \bar{x} = 1/3.3 = 0.3$ より RSD が **30%** が検出限界となります。

一方、定量限界 (LoQ) については検出限界値の 3.3 倍である $\sigma / \bar{x} = 1/10.0 = 0.1$ RSD が **10%** をもって定量限界とすることになります。

【方法】

検出限界 (LoD) は、被験物質を含まない検体を用いてブランク上限 (LoB: Limit of Blank) を求め、検出限界 (LoD) に近いと推定される濃度の検体を使用して算出した合成標準偏差と合わせることによって計算されます。

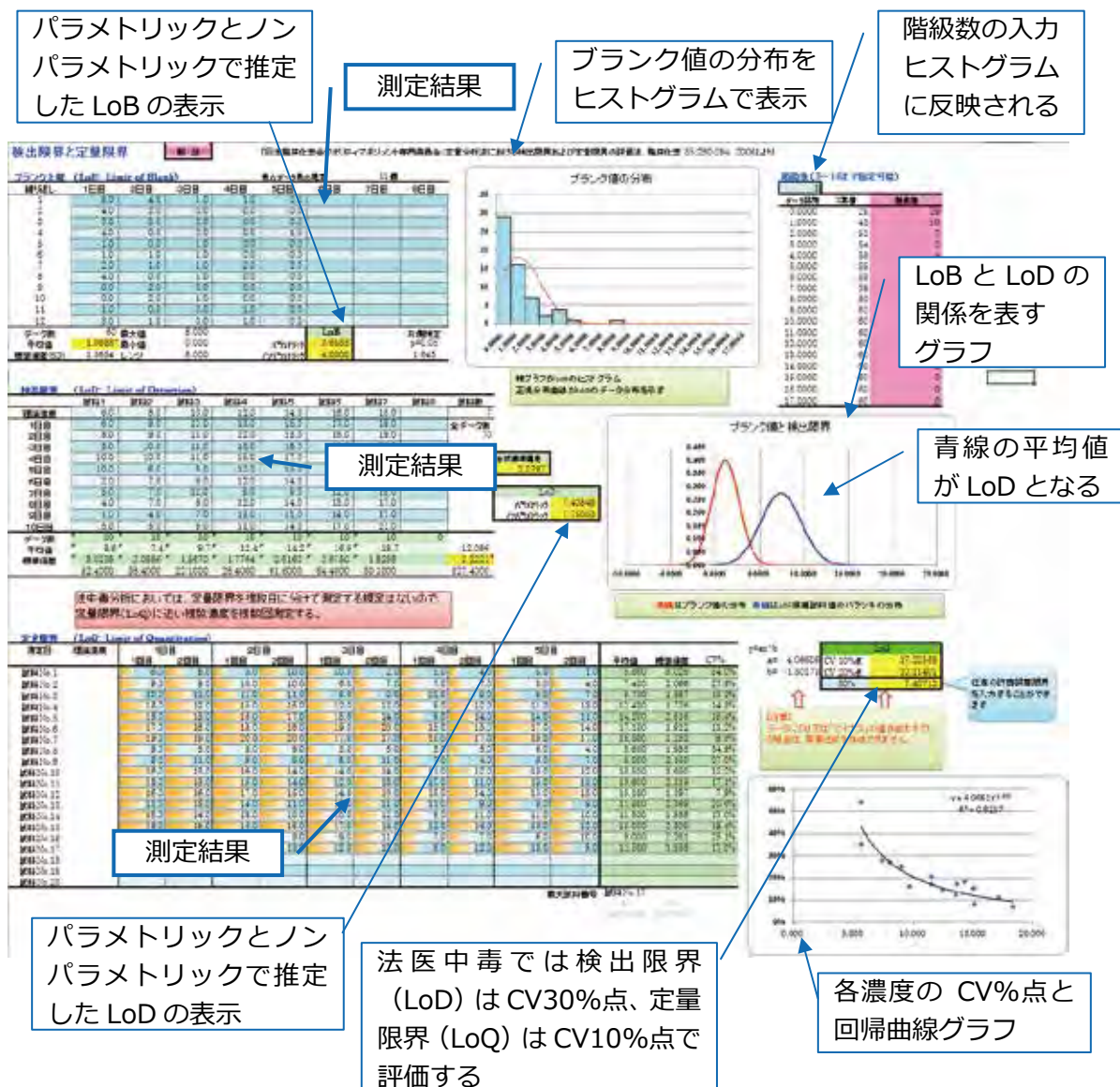
別の方法として、定量限界 (LoQ) の 30% 点が検出限界 (LoD) と一致することから、ブランク検体を多数測定するのではなく、30% 点付近の濃度について測定することで検出限界 (LoD) が得られます。この方法は合理的なだけでなく、ブランク測定のバラツキが大きな項目のときに有効です。

定量限界 (LoQ) は、LoQ に近い濃度の試料を複数用意し、5 回程度の反復測定を実施して回帰曲線を求め、許容限界 CV (10% または任意%) の点から推定します。

この例は、CRP の LoD と LoQ を求めた事例です。LoD は、パラメトリックとノンパラメトリックとも同等な値で、0.0074 と推定できました。また、LoQ の CV30% 点

も同値でした。

LoQ は、CV10%点を採用すると 0.017 と考えられます。LoD、LoQ とともに正規分布を仮定しており、外れ値の影響を大きく受けるため注意が必要です。



(9) 特異性・選択性シート

測定への影響物質の影響度を見るためのシートです。影響物質の濃度と測定結果を入力すると自動的に変化率(%)と測定値がグラフ化されます。

マトリックスの存在下での分析対象物質のレスポンスと、非存在下のレスポンスを比較することでマトリックスファクター（MF）を算出します。

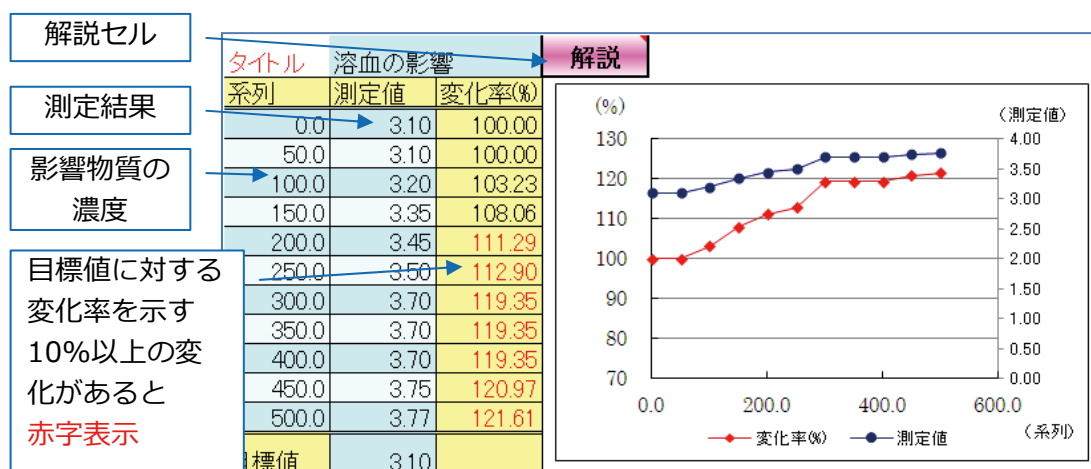
QC 試料の準備と測定法

MF の算出には、6 個体から得られた個別のマトリックスを用います。

結果の判定

MF の精度が、個体間で 15%以下。

この例では、ヘモグロビン添加濃度が 200mg/dL 以上のとき変化率が 10%を超えていることから、許容範囲は 150mg/dL となります。なお、許容範囲はその項目の臨床的重要性や生理的変動などによって変わるので、単に数値による評価は適当ではありません。



(10) 報告書シート

このシートは、これまで行ってきた検討結果をまとめたものです。精度、真度・正確さ、検出限界と定量限界、直線性、特異性 選択性をまとめて表示することで、これまでの検討結果の把握が容易となります。バリデーションの最後の仕事として結果を明示するためのものです。

なお、このシートには、ロックがかかっていないので、書式やレイアウト等の変更が自由に行えるようになっていきます。

バリデーション報告書

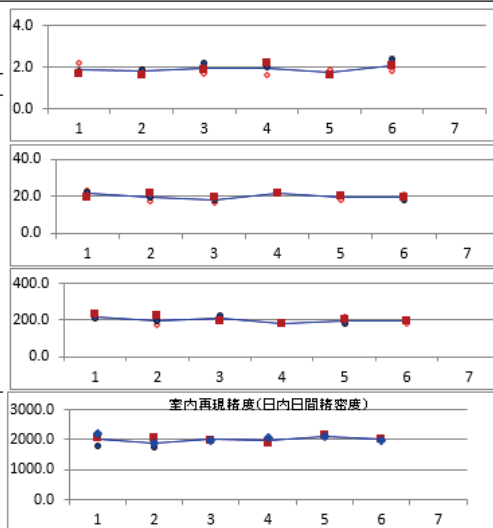
1. 精度

1-1 併行精度

薬物名	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7	試料8
データ数	6	6	6	6	6			
平均	1.85	19.83	195.78	2028.12				
最大値	2.2	23.4	214.3	2184.6				
最小値	1.6	17.4	175.6	1876.4				
Range	0.6	6.0	38.7	308.2				
S D	0.21	2.49	17.44	108.79				
CV(%)	11.21	12.56	8.91	5.36				

1-2 室内精度

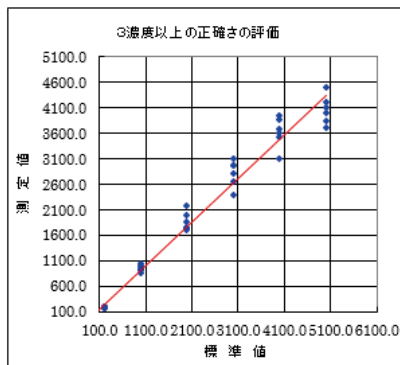
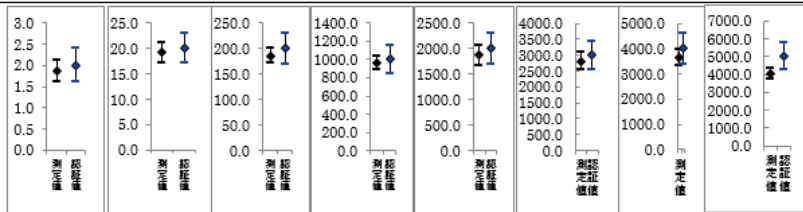
	試料1	試料2	試料3
データ数	18	18	18
平均	1.90	20.04	200.66
最大値	2.4	23.4	229.1
最小値	1.6	16.5	175.6
Range	0.8	6.9	53.5
日内精密度	0.25	1.58	14.78
日間精密度	0.00	1.14	8.93
総合精密度	0.25	1.95	17.27
日内CV(%)	13.10	7.89	7.37
日間CV(%)	0.00	5.68	4.45
総合CV(%)	13.10	9.72	8.61
標準物質の拡張不確かさ(%)	5.45	10.00	5.00
日常検査の拡張不確かさ(%)	26.77	21.87	17.93



2. 真度 正確さ

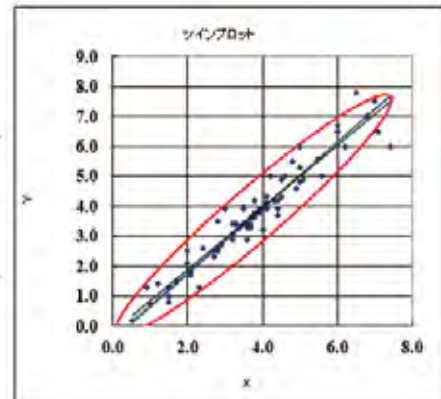
2-1 標準物質を用いた偏り

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6	試料7	試料8
データ数	6	6	6	6	6	6	6	6
標準値	2.00	20.00	200.00	1000.00	2000.00	3000.00	4000.00	5000.00
標準物質の拡張不確かさ	0.40	3.00	30.00	150.00	300.00	450.00	600.00	750.00
信頼区間下限	1.62	17.20	170.24	881.67	1674.48	2547.96	3305.44	3764.46
信頼区間上限	2.11	21.20	200.96	1031.66	2067.52	3088.71	3939.56	4352.21
標準物質の下限	1.60	17.00	170.00	850.00	1700.00	2550.00	3400.00	4250.00
標準物質の上限	2.40	23.00	230.00	1150.00	2300.00	3450.00	4600.00	5750.00



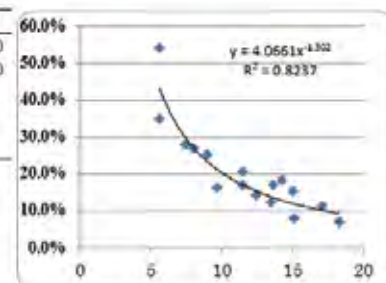
2-2 比較対照法との比較試験

	X_1	Y_1
データ数	73	73
最大値	7.4	7.8
最小値	0.5	0.2
相関係数 $r =$	0.989	
回帰式 $y = bx + a$	b	a
Demingの線形回帰式	1.10	-0.43
標準主軸回帰	1.08	-0.36
S_{yx}	0.47	
s	0.32	
Deming信頼区間下限	1.00	-0.78
Deming信頼区間上限	1.20	-0.09
標準主軸回帰信頼区間下限	0.98	-0.70
標準主軸回帰信頼区間上限	1.18	-0.06

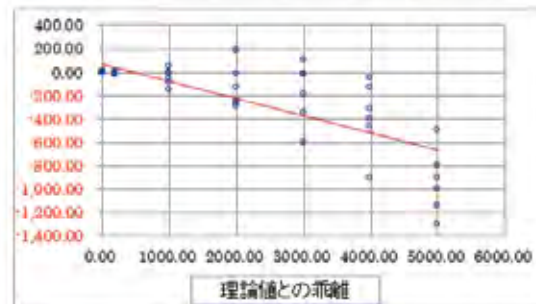
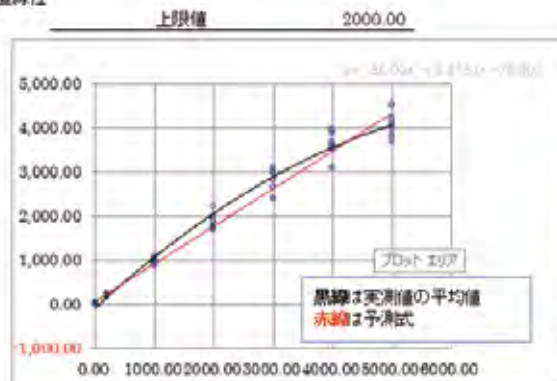


検出限界と定量限界

	パラメトリック	ノンパラメトリック
ブランク上限 (LoB: Limit of Blank)	3.6585	4.0000
検出限界 (LoD: Limit of Detection)	7.4085	7.7500
定量限界 (LoQ: Limit of Quantitation)		
任意点	CV 10%点	17.225684
	CV 20%点	10.114014
	CV 30%点	7.4071175



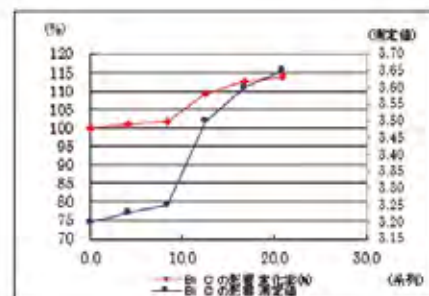
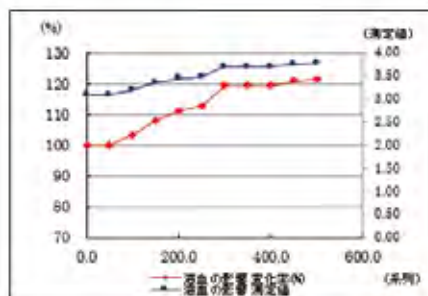
直線性



範囲

測定範囲 下限	= LoQ
上限	2000.00

特異性 選択性



(11) 参考文献：

- 1) 市原清志：臨床検査の分析能の比較評価法. 臨床化学 Vol.27, No.1, 21-49, 1998.
- 2) 細萱茂美:直線性の評価と試料希釈誤差補正法. 検査と技術 Vol.28, No.2, 131-134, 2000.
- 3) 細萱茂実, 尾崎由基男: トレーサビリティーと不確かさの概念. 臨床検査増刊号 Vol.49, No.12, 1283-1288, 2005.
- 4) 細萱茂美, 尾崎由基男: 一要因分散分析と精密度の正しい推定法. 臨床検査増刊号 Vol.49, No.12, 1289-1292, 2005.
- 5) 細萱茂美, 市原清志: 検出限界と定量限界の設定法. 臨床検査増刊号 Vol.49, No.12, 1307-1312, 2005.
- 6) 市原清志: 臨床検査の方法間比較. 臨床検査増刊号 Vol.49, No.12, 1315-1326, 2005.
- 7) 山本慶和, 細萱茂実, 桑克彦, 大沢進, 高木康: 定量測定法に関するバリデーション指針. 臨床化学 Vol.40, No. 2 , 149-157
- 8) 第 1 回法中毒研究春季セミナー「バリデーションの ABC」, 2013.
- 9) Chromatography,33(2),107-112,2012

薬食審査発 0711 第 1 号
平成 25 年 7 月 11 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局審査管理課長
（公 印 省 略）

「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」について

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法は、臨床薬物動態試験又は非臨床薬物動態試験（トキシコキネティクス試験を含む。）において、体内動態（吸収、分布、代謝及び排泄）、バイオアベイラビリティ、生物学的同等性、薬物間相互作用等の評価に利用されているものですが、一連の分析過程を通して妥当性が適切に確認され、十分な信頼性を有することが必要です。

今般、生体試料中薬物濃度分析法が十分な信頼性を有することを保証するためのバリデーション及びその分析法を用いた実試料分析に関して推奨される一般的な指針を、別添のとおりガイドラインとして取りまとめましたので、貴管下関係業者に対して周知方お願いします。

記

1. 本ガイドラインの要点

- (1) 本ガイドラインは、医薬品の製造販売承認申請に用いる試験成績の評価のために、生体試料中薬物濃度分析法が十分な信頼性を有することを保証するためのバリデーション及びその分析法を用いた実試料分析に関する指針を示したものであること。
- (2) トキシコキネティクス試験及び臨床試験における生体試料中の薬物又はその代謝物の濃度を定量する際に用いられる分析法であって、低分子化合物（内因性物質を除く。）の液体クロマトグラフィー、ガスクロマト

グラフィー、又はそれらと質量分析法を組み合わせた分析法に適用するものであること。

- (2) ISR (Incurred samples reanalysis)、段階的アプローチ等の欧米のガイドライン等に取り込まれている考え方を導入したこと。
- (3) リガンド結合法（免疫学的分析法等）に関する生体試料中薬物濃度分析法についても、同様のガイドラインを整備する予定であること。

2. 今後の取扱い

平成 26 年 4 月 1 日以降に開始される本ガイドラインの適用範囲となる生体試料中薬物濃度試料分析法は、本ガイドラインの基準に基づくものであること。なお、当該分析法を活用した試験成績は、医薬品の製造販売承認申請に際し添付すべき資料とすることができる。

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法 のバリデーションに関するガイドライン

目次

1. はじめに
 2. 適用
 3. 標準物質（標準品）
 4. 分析法バリデーション
 - 4.1. フルバリデーション
 - 4.1.1. 選択性
 - 4.1.2. 定量下限
 - 4.1.3. 検量線
 - 4.1.4. 真度及び精度
 - 4.1.5. マトリックス効果
 - 4.1.6. キャリーオーバー
 - 4.1.7. 希釈の妥当性
 - 4.1.8. 安定性
 - 4.2. パーシャルバリデーション
 - 4.3. クロスバリデーション
 5. 実試料分析
 - 5.1. 検量線
 - 5.2. QC 試料
 - 5.3. ISR
 - 5.4. キャリーオーバー
 6. 注意事項
 - 6.1. 定量範囲
 - 6.2. 再分析
 - 6.3. クロマトグラムの波形処理
 - 6.4. システム適合性
 - 6.5. 回収率
 7. 報告書の作成と記録等の保存
- 関連ガイドライン一覧
- 用語解説
- 附録 段階的アプローチの利用

1. はじめに

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析は、対象薬物やその代謝物の有効性及び安全性を評価する上で、臨床薬物動態試験や非臨床薬物動態試験（トキシコキネティクス試験を含む。）に活用され、得られた生体試料中薬物濃度は、体内動態（吸収、分布、代謝及び排泄）、バイオアベイラビリティ、生物学的同等性及び薬物間相互作用等の評価に利用されている。

一方、生体試料中薬物濃度分析には、一連の分析過程を通して妥当性が適切に確認され、十分な信頼性を有する方法を用いることが必要である。

本ガイドラインは、医薬品の製造販売承認申請に用いる試験成績の評価のために、生体試料中薬物濃度分析法が十分な信頼性を有することを保証するためのバリデーション及びその分析法を用いた実試料分析に関して推奨される一般的な指針を示したものである。

そのため、特別な分析法を用いる場合や得られた濃度情報の使用目的によっては、科学的な判断に基づき、あらかじめ妥当な判断基準を設定する等、柔軟な対応を考慮することが必要である。

2. 適用

本ガイドラインは、トキシコキネティクス試験及び臨床試験における薬物又はその代謝物の生体試料中薬物濃度を定量する際に用いられる分析法のバリデーション並びに当該分析法を用いた実試料分析に適用するものとする。対象薬物は低分子化合物（内因性物質を除く。）を中心とし、主に液体クロマトグラフィー（liquid chromatography: LC）、ガスクロマトグラフィー（gas chromatography: GC）、又はそれらと質量分析法（mass spectrometry: MS）を組み合わせた分析法を対象とする。

なお、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成9年3月26日厚生省令第21号）の対象とならない非臨床試験で使用される分析法は、当該ガイドラインの適用対象ではないが、当該ガイドラインの内容を参考に必要なバリデーション等を実施してよい。

3. 標準物質（標準品）

標準物質（標準品）は、分析対象物質を定量分析する上で基準となるものであり、主に分析対象物質を添加した既知濃度の試料である検量線用標準試料及び Quality Control (QC) 試料の調製に用いられる。標準物質の品質は測定データに影響を及ぼすため、品質が保証された標準物質を使用しなければならない。使用する標準物質については、ロット番号、含量又は純度、及び保存条件を明らかにした分析証明書又はそれに代わる文書が必要である。入手先、化学構造及び有効期限等を明らかにしておくことが望ましい。内標準物質に対する分析証明書等は必ずしも必要ではないが、分析対象物質の分析に影響を与えないことを確認した上で内標準物質を用いる必要がある。

4. 分析法バリデーション

薬物又はその代謝物の生体試料中薬物濃度を定量する際の分析法を確立する際には、施設ごとに分析法バリデーションを実施する。

4.1. フルバリデーション

分析法を新たに確立する際には、フルバリデーションを実施する。

フルバリデーションでは、選択性、定量下限、検量線、真度、精度、マトリックス効果、キャリーオーバー、希釈の妥当性及び安定性等を評価する。通常、フルバリデーションは、分析対象となる種又はマトリックス（主に血漿、血清、全血又は尿）ごとに実施する。

既にフルバリデーションを実施した分析法に、代謝物等を新たな分析対象物質として追加する場合には、フルバリデーションの実施を考慮する。また、文献等で公表された分析法を使用する場合にも、フルバリデーションの実施が必要である。

分析法バリデーションに用いるマトリックスは、抗凝固剤や添加剤を含め、分析対象の実試料にできるだけ近いものを使用する。希少なマトリックス（組織、脳脊髄液又は胆汁等）を対象とした分析法を確立する場合には、十分な数の個体から十分な量のマトリックスが得られない状況が問題となる場合がある。そのような場合には、代替マトリックスを使用することができる。代替マトリックスは、検量線を構成する各試料及び QC 試料の調製等に用いられる。ただし、代替マトリックスを使用する場合には、分析法を確立する過程においてその妥当性を可能な限り検証する。

4.1.1 選択性

選択性とは、試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質及び内標準物質を区別して検出することができる能力のことである。

選択性は、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）を用いて評価する。各分析対象物質及び内標準物質に対する妨害がないことを確認する。希少なマトリックスを使用する場合には、6 個体よりも少ない個体から得られたマトリックスを使用することも許容される。

ブランク試料において妨害物質に由来する応答変数（レスポンス）が認められない、又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 20%以下及び内標準物質の 5%以下でなければならない。

4.1.2. 定量下限

定量下限とは、試料中において分析対象物質を信頼できる真度及び精度で定

量することができる最も低い濃度である。

定量下限における分析対象物質のレスポンスは、ブランク試料の 5 倍以上である必要がある。定量下限における平均真度は、理論値の $\pm 20\%$ 以内、精度は 20% 以下でなければならない。

4.1.3. 検量線

検量線は、分析対象物質の理論値とレスポンスの関係をグラフに示したものである。

検量線は、分析対象物質ごとに作成される必要がある。検量線の作成には、可能な限り実試料と同じマトリックスを使用し、既知濃度の分析対象物質を添加して作成する。検量線は、定量下限を含む 6 濃度以上の検量線用標準試料、ブランク試料及びゼロ試料（内標準物質を添加したブランク試料）から構成する。検量線の回帰式及び重み付け条件には、一般的に濃度とレスポンスの関係を示す最も単純なモデルを用いる。重回帰式を用いても良い。ただし、検量線の回帰式の算出には、ブランク試料及びゼロ試料を用いない。報告書には、用いた回帰式を記載する。

回帰式から求められた検量線用標準試料の各濃度の真度は、定量下限において理論値の $\pm 20\%$ 以内とし、定量下限以外においては理論値の $\pm 15\%$ 以内とする。検量線用標準試料の 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 濃度の標準試料が、上記の基準を満たすものとする。

4.1.4. 真度及び精度

真度とは、それぞれの分析対象物質の定量値と理論値との一致の程度のことである。精度とは、それぞれの繰り返し分析によって得られる定量値のばらつきの程度のことである。

真度及び精度は、QC 試料、すなわち分析対象物質濃度が既知の試料を分析することによって評価される。バリデーション時には、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 試料を調製する。QC 試料の濃度については、低濃度は定量下限の 3 倍以内、中濃度は検量線の間付近、高濃度は検量線の最高濃度の 75%以上であるものとする。分析単位内の真度及び精度は、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される。分析単位間の真度及び精度は、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される。

各濃度における平均真度は、理論値の $\pm 15\%$ 以内でなければならない。ただし、定量下限では $\pm 20\%$ 以内であるものとする。各濃度における定量値の精度は、15%以下でなければならない。ただし、定量下限では 20%以下とする。

4.1.5. マトリックス効果

マトリックス効果とは、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である。マトリックス効果の評価は、MS を用いる分析法で実施される。

マトリックス効果は、マトリックスファクター (MF) を算出することによって評価される。MF は、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算出される。MF の算出には、少なくとも 6 個体から得られたマトリックスを用いる。内標準物質を用いて、MF を補正しても良い。MF の精度は、個体間で 15%以下でなければならない。

マトリックスを用いて調製した QC 試料を分析することによっても、マトリックス効果の評価できる。少なくとも 6 個体から得られたマトリックスを用いて調製した QC 試料を分析し、定量値の精度は、個体間で 15%以下でなければならない。

なお、希少なマトリックスを使用する場合には、6 個体よりも少ない個体から得られたマトリックスを使用してよい。

4.1.6. キャリーオーバー

キャリーオーバーとは、分析機器に残留した分析対象物質が定量値に影響を与えることである。

キャリーオーバーは、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って評価される。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は、原則として、定量下限における分析対象物質 20%以下且つ内標準物質の 5%以下でなければならない。

この基準を満たさない場合には、その程度を検討し、実際の実試料分析に影響を及ぼさないような手段を考慮する。

4.1.7. 希釈の妥当性

試料を希釈して分析する必要がある場合には、希釈が分析対象物質の定量値に影響を与えないことを確認する。

希釈の妥当性は、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する場合、実試料分析における希釈方法を考慮した適切な希釈倍率を選択し、それぞれを少なくとも 5 回の繰り返し分析をすることによって評価する。希釈された試料の平均真度は理論値の $\pm 15\%$ 以内、精度は 15%以下でなければならない。

試料の希釈に代替マトリックスを用いる場合は、同様にして、当該マトリックスを用いることが真度又は精度に影響を及ぼさないことを示す。

4.1.8. 安定性

分析対象物質の安定性評価は、試料を採取してから分析するまでの各過程が

分析対象物質の濃度に影響を及ぼさないことを保証するために実施する。安定性の評価は、実際の保存条件又は分析条件にできる限り近い条件で行う。安定性の評価においては、溶媒又はマトリックスの種類、容器の材質、保存条件等に留意する。

バリデーション試験では、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する。いずれの安定性についても、実際の保存期間を上回る期間で評価する。

標準原液及び標準溶液中の安定性の評価には、通常、最高濃度及び最低濃度付近の溶液を用いる。各濃度あたり少なくとも 3 回の繰り返し分析を行う。

マトリックス中の安定性の評価には、低濃度及び高濃度の QC 試料を用いる。QC 試料の調製には、抗凝固剤や添加剤を含め、実際の条件にできるだけ近いマトリックスを使用する。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する。原則として各濃度における平均真度を指標として、理論値の $\pm 15\%$ 以内でなければならない。なお、分析対象物質の特性等を考慮し、他の指標が科学的により適切に評価できる場合には、当該指標を用いても良い。

4.2. パーシャルバリデーション

既にフルバリデーションを実施した分析法に軽微な変更を施す場合には、パーシャルバリデーションを実施する。パーシャルバリデーションで評価する項目は、分析法の変更の程度とその性質に応じて設定する。

パーシャルバリデーションを実施する典型的な事例として、分析法の他施設への移管、分析機器の変更、定量範囲の変更、分析に使用する試料量の変更、抗凝固剤の変更、前処理法や分析条件の変更、試料の保存条件の変更、併用薬の分析に与える影響の確認又は希少なマトリックスの使用等が挙げられる。

パーシャルバリデーションにおける判断基準には、原則としてフルバリデーションと同様の判断基準を設定する。

4.3. クロスバリデーション

クロスバリデーションは、主に同一の試験内で複数の分析施設で分析する場合、又は異なる試験間で使用された分析法を比較する場合に実施される。クロスバリデーションによる比較は、それぞれのフルバリデーション又はパーシャルバリデーションを実施した上で実施する。分析対象物質を添加した同一の QC 試料又は実試料を分析し、QC 試料の各濃度の平均真度を評価又は実試料の濃度の乖離度を評価する。

同一の試験内で複数の分析施設を用いる際のクロスバリデーションにおいては、室内及び室間再現精度を考慮し、低濃度、中濃度及び高濃度各濃度で少なくとも 3 回の繰り返し分析による QC 試料の平均真度は、原則として理論値の $\pm 20\%$ 以内でなければならない。実試料を使用する場合では、少なくとも 3 分の 2 の試料の乖離度が $\pm 20\%$ 以内でなければならない。

原理等が異なる分析法を用いる際のクロスバリデーションにおいては、分析法の性質を考慮した上で、科学的な判断に基づき、個別にその実施方法及び許容できる平均真度又は乖離度による基準を設定して評価する。

5. 実試料分析

実試料とは、トキシコキネティクス試験又は臨床試験等から得られる試料のうち、生体試料中薬物濃度分析に供する試料のことである。実試料分析には、分析法バリデーションによって確立された分析法を用いる。実試料分析では、分析法バリデーションで安定性が確認された条件下で実試料を取り扱い、安定性が確認された期間内に検量線（ブランク試料、ゼロ試料及び 6 濃度以上の検量線用標準試料）及び QC 試料と共に実試料を分析する。

実試料分析での分析法の妥当性は、分析単位ごとに検量線、QC 試料で評価する。更に薬物動態を主要な評価項目とする試験では、異なるマトリックスごとに代表的な試験を選択して ISR (incurred sample reanalysis；定量値の再現性確認のため、異なる日に別の分析単位で投与後試料を再分析すること) を実施し、分析法の再現性を確認する。

なお、キャリーオーバーが懸念される実試料分析では、妥当性の評価項目にキャリーオーバーを加える。

5.1. 検量線

検量線は、実試料中の分析対象物質の濃度を算出するために用いられる。実試料分析に用いる検量線は、分析法バリデーションで確立した方法によって、分析単位ごとに作成される必要がある。検量線の回帰式及び重み付け条件には、分析法バリデーションのときと同様のモデルを用いる。

回帰式から求められた検量線用標準試料の各濃度の真度は、定量下限においては理論値の $\pm 20\%$ 以内、定量下限以外においては理論値の $\pm 15\%$ 以内でなければならない。検量線用標準試料の 75%以上かつ少なくとも 6 濃度の検量線用標準試料が上記基準を満たさなければならない。

実試料分析において、検量線用標準試料の定量下限又は検量線の最高濃度が基準を満たさなかった場合には、これらの次の濃度の検量線用標準試料を定量下限又は検量線の最高濃度としてもよい。その場合、変更された検量線の濃度範囲は、少なくとも 3 濃度（低濃度、中濃度及び高濃度）の QC 試料を含まなければならない。

5.2. QC 試料

QC 試料は、検量線や実試料の分析に用いられた分析法の妥当性を評価するために分析される。

検量線の濃度範囲内で、少なくとも 3 濃度（低濃度、中濃度及び高濃度）の QC 試料を分析単位ごとに分析する。通常、低濃度は定量下限の 3 倍以内、中濃

度は検量線の間付近、高濃度は検量線の最高濃度の 75%以上と設定される。分析する QC 試料の数としては、各濃度あたり 2 試料又は分析単位内の実試料数の 5%以上のいずれか多い方とする。QC 試料は、少なくとも実試料の前後で測定される必要がある。

QC 試料の真度は理論値の $\pm 15\%$ 以内であるものとし、全 QC 試料の 3 分の 2 以上かつ各濃度の 2 分の 1 以上の QC 試料が上記基準を満たさなければならない。

5.3. ISR (Incurred samples reanalysis)

生体試料中薬物濃度分析においては、分析法バリデーションや実試料分析に用いられる検量線用標準試料及び QC 試料による分析法の妥当性確認を実施しても、実試料を用いた分析結果に再現性がない事例が少なくない。実試料の不均一、コンタミネーションのような操作誤りに基づくものから実試料に特有の生体由来成分や未知代謝物の影響に至るまで、その原因には様々なものが想定される。ISR とは、定量値の再現性確認のため、異なる日に別の分析単位で投与後試料を再分析することであり、ISR を実施して、再現性を確認しておくことが分析値の信頼性を高めるものとなる。また、ISR で再現性が確認できない分析法がある場合に、その原因を調査し、改善策を講じる契機となる。

通常、ISR は薬物動態を主要なエンドポイントとする試験で異なるマトリックスごとに代表的な試験を選択して実施される。例えば、非臨床試験ではトキシコキネティクス試験の異なる動物種ごとに、臨床試験においては、健康被験者、腎機能又は肝機能低下のある被験者を対象とするそれぞれの薬物動態試験のうち代表的な試験、並びに生物学的同等性試験で実施される。なお、非臨床試験の ISR を実施する実試料には、採取条件が同等である非臨床試験の予備試験等から得られる実試料を活用することもある。

ISR を実施する試料は、できるだけ多くの個体から通常最高血中濃度及び消失相付近の試料を含むよう選択し、安定性が保証された期間内に ISR を実施する。ISR を実施する実試料数は、1000 を超えない実試料数に対してその約 10%、1000 を超えた実試料数では、それに 1000 の超過数に対して約 5%に相当する試料数を加えた数を目安とする。

ISR の評価には、乖離度を用いる。乖離度は、ISR により得られた定量値と初回の定量値の差を両者の平均値で除した値に 100 を乗じることで算出される。ISR を実施した試料のうち、少なくとも 3 分の 2 以上の試料において、乖離度が $\pm 20\%$ 以内でなければならない。ISR の結果が上記基準を満たさなかった分析法では、その原因を調査し、実試料分析への影響を考察して必要に応じた対応を取らなければならない。

なお、ISR は、乖離度のばらつきを評価するために実施しているものであり、個別の実試料において ISR の結果が $\pm 20\%$ を超えても、その初回の定量値を、再分析値へ置き換える又は棄却してはならない。

5.4. キャリーオーバー

キャリーオーバーが実試料中の分析対象物質の定量分析に影響を及ぼすと懸念される場合には、実試料分析中に 4.1.6 と同様の手法を用いてキャリーオーバーを評価し、定量値への影響について考察する。

6 注意事項

6.1. 定量範囲

実試料分析によって得られる定量値が、検量線の定量範囲の中で狭い範囲を推移する場合には、それに応じて QC 試料濃度の再設定を行うことが望ましい。

検量線の定量範囲を変更する場合には、パーシャルバリデーションを実施する。ただし、検量線の定量範囲又は QC 試料の濃度又は数を変更する前に分析した実試料を、これらの変更後に再分析する必要はない。

6.2. 再分析

サンプルの分析を実施する前に、あらかじめ再分析を実施する場合の理由、再分析の手順及び再分析を行った場合の定量値の取扱いに関する事項を計画書又は手順書に設定する。

再分析を実施する際の例として、検量線又は QC 試料が分析法の妥当性の基準を満たさなかった場合、定量値が検量線の最高濃度以上であった場合、投与前試料又は実薬非投与群の試料中に分析対象物質が認められた場合、前処理操作又は分析機器の不具合、クロマトグラムの異常等が発生した場合に実施される他、異常値の原因追求等が挙げられる。

薬物動態学的な理由による再分析については、可能な限り実施しないことが望ましい。特に生物学的同等性試験においては、薬物動態的に不自然という理由のみで再分析を実施して定量値を変更してはならない。ただし、臨床試験において、患者の安全性に影響を及ぼす可能性がある予期しない結果又は異常な結果が確認された場合に、特定の試験サンプルを再分析することは制限されない。

いずれにせよ、再分析を実施した場合には、用いた試料の情報、再分析を実施した理由、初回の定量値が得られている場合には初回定量値、再分析によって得られた定量値並びに採用値及びその選択理由と選択方法を報告書に記載することが必要である。

6.3. クロマトグラムの波形処理

クロマトグラムの波形処理及び再波形処理の手順は、あらかじめ計画書又は手順書等に設定しておく必要がある。

再波形処理を実施した場合には、再波形処理を実施した理由及び再波形処理

を行う前後のクロマトグラムを保存しておく必要がある。

6.4. システム適合性

生体試料中薬物濃度分析には、適切に維持及び管理された分析機器を用いるべきである。このため、機器の定期点検に加えて、生体試料中薬物濃度分析に用いる機器が適切に動作していることを、システム適合性の確認として測定前に確認することが望ましい。ただし、生体試料中薬物濃度分析においては、システム適合性の確認とは別に、通常分析単位ごとに検量線及び QC 試料の評価によって分析法の妥当性を確認するため、システム適合性の確認は必須ではない。

6.5. 回収率

回収率とは、試料の前処理過程における分析対象物質の回収効率である。

回収率は、分析法の特性を明らかにするために評価することが望ましい。

回収率は、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とを比較することによって算出される。回収率は、値そのものより再現性があることが重要である。

7. 報告書の作成と記録等の保存

十分な再現性及び信頼性を有することを保証するため、分析法バリデーション及び実試料分析によって得られた結果を、以下に示すバリデーション報告書及び実試料分析報告書として作成し、関連の記録や生データと併せて適切に保存する。

また、関連の記録や生データは、標準物質及びブランクマトリックスに関する授受、使用及び保存の記録、試料に関する授受、調製及び保存の記録、分析の実施記録、装置の校正記録及び設定値、逸脱の記録、通信の記録、並びに分析結果及びクロマトグラム等の生データは、棄却された分析単位において得られたデータも含めて全て保存する。

バリデーション報告書

- バリデーションの要約
- 標準物質に関する情報
- ブランクマトリックスに関する情報
- 分析方法
- バリデーションの評価項目と判断基準
- バリデーションの結果及び考察
- 分析の棄却及びその理由

- 再分析に関する情報
- 計画書及び手順書からの逸脱事項並びに試験結果に対する影響
- 参照する別試験，手順書及び参考文献の情報
- 代表的なクロマトグラム

実試料分析報告書

- 実試料分析の要約
- 標準物質に関する情報
- ブランクマトリックスに関する情報
- 実試料の受領及び保存に関する情報
- 分析方法
- 分析の妥当性に関する評価項目と判断基準及びその結果
- 実試料分析の結果及び考察
- 分析の棄却及びその理由
- 再分析に関する情報
- 計画書及び手順書からの逸脱事項並びに試験結果に対する影響
- 参照する別試験，手順書及び参考文献の情報
- 必要に応じて代表的なクロマトグラム

関連ガイドライン一覧

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長：「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について，平成22年2月19日薬食審査発0219第4号（ICH M3(R2)）
- 2) 厚生省薬務局審査管理課長：「トキシコキネティクス（毒性試験における全身的暴露の評価）に関するガイダンス」について，平成8年7月2日薬審第443号
- 3) 厚生省医薬安全局審査管理課長：「非臨床薬物動態ガイドライン」について，平成10年6月26日医薬審第496号
- 4) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知：「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について」，平成24年2月29日薬食審査発第0299第10号
- 5) 事務連絡：「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインに関する質疑応答集（Q&A）について」等の改正等について，平成24年2月29日
- 6) 厚生労働省医薬局審査管理課長通知：「医薬品の臨床薬物動態試験について」，平成13年6月1日医薬審発第796号
- 7) US FDA: Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine(2001)

8) EMA: Guideline on bioanalytical method validation,
EMA/CHMP/EWP/192217/2009, Committee for Medicinal Products for
Human Use(2011)

用語解説

安定性 Stability：所定の時間、特定の条件下での溶媒中又はマトリックス中における分析対象物質の化学的又は生物学的安定性。分析対象物質の安定性評価は、試料を採取してから分析するまでの各過程が分析対象物質の濃度に影響を及ぼさないことを保証するために実施される。

応答変数（レスポンス） Response variable：分析機器の検出器から得られた応答のことであり、通常、応答を電気信号に変換して記録されたクロマトグラムから得られるピーク面積値（あるいはピーク高さ値）で表す。

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。
$$\text{回収率(\%)} = (\text{分析対象物質を生体試料に添加して前処理した後のレスポンス}) / (\text{ブランクの生体試料を前処理した後に分析対象物質を添加した時のレスポンス}) \times 100.$$

乖離度 Assay variability：同じ試料を用いて行った定量値間の相違の程度。両者の平均に対する両者の差をパーセント表記したもの。

$$\text{乖離度(\%)} = \{(\text{比較する分析の定量値}) - (\text{基準となる分析の定量値})\} / (\text{両者の平均値}) \times 100.$$

希釈の妥当性 Dilution integrity：試料を希釈して分析する場合に、希釈が分析対象物質の定量値に影響を与えないことを確認するために評価される。

キャリーオーバー Carry over：分析機器に残留した分析対象物質が定量値に影響を与えること。

クロスバリデーション Cross validation：同一の試験内で複数の分析施設で分析する場合、又は異なる試験間で使用された分析法を比較する場合に実施されるバリデーション。クロスバリデーションによる比較は、それぞれのフルバリデーション又はパーシャルバリデーションを実施した上で実施する。

検量線 Calibration curve：分析対象物質の濃度とレスポンスの関係を示したもの。定量下限を含む 6 濃度以上の検量線用標準試料、ブランク試料及びゼロ試料（内標準物質を添加したブランク試料）から構成される。

検量線用標準試料 Calibration standard：検量線の作成に用いる分析対象物質を添加した既知濃度の試料。検量線用標準試料を用いて検量線を作成し、QC 試料や実試料の濃度を算出する。

再分析 Reanalysis：試料の前処理から測定までの一連の操作を再度行うこと。

システム適合性 System suitability：測定前に、分析対象物質の標準試料溶液等を用いて分析機器が適切に動作していることを確認すること。

実試料 Study sample：トキシコキネティクス試験又は臨床試験等から得られる試料のうち、生体試料中薬物濃度分析に供する試料。

真度 Accuracy：定量値と理論値との一致の程度。理論値を 100%としたときの、

パーセント表記で表される。

$$\text{真度}(\%) = ((\text{定量値}) / (\text{理論値})) \times 100$$

精度 Precision : 繰り返し分析して得られる定量値間の一致のばらつきの程度。変動係数 (CV) または相対標準偏差 (RSD) のパーセント表記で表される。

$$\text{精度}(\%) = ((\text{標準偏差}) / (\text{平均値})) \times 100$$

ゼロ試料 Zero sample : 内標準物質を添加したブランク試料。

選択性 Selectivity : 試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質及び内標準物質を区別して検出することができる能力。しばしば特異性と同義語のようにも使われるが、特異性は選択性の究極の形としてこれらを区別する指摘もある。この指摘を踏まえると、特異性は一般的に一つの成分のみを検出することができる能力である一方で、選択性とはある特性を持った一群の物質を検出する能力と定義できる。すなわち、選択性とは分析対象物質及び内標準物質以外の成分を検出する可能性もあるが、比較的これらの物質を区別して定量できる能力を意味する。

代替マトリックス Surrogate matrix : 希少なマトリックス (組織、脳脊髄液、胆汁等) のため量に限りがある場合等、本来のマトリックスの代わりとして用いられるマトリックス。

段階的アプローチ Tiered approach : 分析法の妥当性の検証を限定的な内容とするものであり、開発の段階が進むにつれて、検証内容をフルバリデーションに近づけていく手法。(附録参照)

定量下限 Lower limit of quantification (LLOQ) : 試料中において分析対象物質を信頼できる真度及び精度で定量することができる最も低い濃度。

定量範囲 Quantification range : 試料中において分析対象物質を信頼できる真度及び精度で定量することができる濃度の範囲。生体試料中薬物濃度分析に用いる分析法の定量範囲は、検量線の定量範囲及び希釈の妥当性によって保証される。

投与後試料 Incurred sample : 実試料のうち、実薬を投与した後に得られる試料。

特異性 Specificity : 「選択性」の用語解説を参照。

内標準物質 Internal standard (IS) : 分析対象物質の前処理中の回収率や分析機器によるレスポンスの補正を目的に添加される物質。分析対象物質に構造の類似した物質や安定同位体でラベル化した物質が用いられる。

パーシャルバリデーション Partial validation : 既にフルバリデーションを実施した分析法に軽微な変更を施す場合に実施するバリデーション。パーシャルバリデーションで評価する項目は、分析法の変更の程度とその性質に応じて考慮する必要がある、その範囲は日内の真度及び精度のみの評価からほとんどフル

バリデーションに至るまで多岐にわたる。

バリデーション Validation：種々の評価を通じて十分な再現性及び信頼性を有することを立証すること。

標準原液 Stock solution：標準物質を適切な溶媒に溶解して調製した最高濃度の非マトリックス溶液。

標準物質（標準品） Reference standard：分析対象物質を定量分析する上で基準となるものであり、主に検量線用標準試料や QC 試料の調製に用いられる。

標準溶液 Working solution：標準原液を適切な溶媒で希釈して調製した非マトリックス溶液。主として、検量線用標準試料や QC 試料を調製するため、マトリックスに添加する。

ブランク試料 Blank sample：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。

フルバリデーション Full validation：すべてのバリデーション項目、即ち、選択性、定量下限、検量線、真度、精度、マトリックス効果、キャリーオーバー、希釈の妥当性及び安定性を評価する。通常、分析法を新たに確立する際に実施する。

分析 Analysis：前処理から分析機器による測定までを含めた一連の分析のプロセス。

分析対象物質 Analyte：試料中の分析の対象となる物質。医薬品、生体分子又はその誘導体、代謝物、分解産物等。

分析単位 Analytical run：検量線、QC 試料及び実試料等から成る試料群。通常、同一条件のもと、同じ試薬を用いて同じ試験実施者により中断されることなく前処理された一連の試料群（バッチ）を 1 つの単位として分析する。

前処理後試料 Processed sample：分析装置による測定に供される試料であり、生体試料を前処理することによって得られる。

マトリックス Matrix：分析のために選択された全血、血漿、血清、尿又は他の体液や組織。マトリックス中の組織外因性化学物質（抗凝固剤を除く）及びその代謝物を含まないものをブランクマトリックス（blank matrix）と呼ぶ。

マトリックス効果 Matrix effect：試料中のマトリックス由来成分による分析対象物質のレスポンスへの影響。

マトリックスファクター Matrix factor (MF)：マトリックス非存在下での分析対象物質のレスポンスに対するマトリックス存在下での分析対象物質のレスポンスの割合。

$$MF = (\text{マトリックス存在下での分析対象物質のレスポンス}) / (\text{マトリックス非存在下での分析対象物質のレスポンス})$$

ISR Incurred sample reanalysis (ISR)：定量値の再現性確認のため、異なる日

に別の分析単位で投与後試料を再分析すること。

QC 試料 Quality control (QC) sample : 分析法の信頼性を評価するために用いる分析対象物質を添加した既知濃度の試料。実試料分析において QC 試料は、検量線や実試料の分析に用いられた分析法の妥当性を評価するために分析される。

附録 段階的アプローチの利用

臨床薬物動態試験で分析の対象とするヒトでの代謝物は、臨床試験の早期段階では必ずしも明らかにならないことが多く、標準物質としてバリデーションに供するために十分な量を準備するにはある程度の期間が必要なため、医薬品開発の効率化を考慮し、分析法バリデーションを段階的アプローチと呼ばれる方法を採用して進めることがある。

段階的アプローチとは、分析法の妥当性の検証を限定的な内容とするものであり、開発の段階が進むにつれて、確認項目及びその内容をフルバリデーションに近づけていく手法である。医薬品の開発の初期から中期に段階的アプローチを利用することによって、開発の早期段階での評価を可能とし、医薬品開発の見通しを立てやすくすることにより、効率的な医薬品の研究開発につながるものと期待される。

ただし、段階的アプローチを用いる場合においても、得られる濃度データの再現性及び信頼性を高めるために、分析法の妥当性の検証には、科学的な判断に基づいてあらかじめ妥当な判断基準を設定することが望ましい。

- 1) Viswanathan, C.T., Bansal, S., Booth, B., DeStefano, A.J., Rose, M.J., Sailstad, J., Shah, V.P., Skelly, J.P., Swann, P.G. and Weiner, R.: *AAPS J.*, 9(1), E30-E42(2007)
- 2) Timmerman, P., Kall, M.A., Gordon, B., Laakso, S., Freisleben, A. and Hucker, R.: *Bioanalysis*, 2(7), 1185-1194(2010)
- 3) US FDA: Guidance for Industry, Safety Testing of Drug Metabolites, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research(2008)

参考資料 5. データ処理時に得られた分析値をどこまで使用するか？

－棄却検定－

分析の結果は、最終的には数字で判断される。しかし、精度や真度、再現性のデータを処理する際に飛び抜けて離れた値が存在し、平均値や標準偏差に大きく影響を及ぼすために、その後のデータ処理に使わないか（データの棄却）どうか悩むことをしばしば経験する。

前処理時の間違いや測定時の不手際など、飛び抜けて離れた値の原因が合理的に説明できる場合は、分析値の棄却は容易に判断できる。しかし、判断できない場合には、統計的に処理してデータの棄却に当てはまるかを検証（棄却検定）することが望まれる。

例えば、 n 個の測定データについて $x_1 < x_2 < \dots < x_n$ の順に並べられたとすると、最大のデータか最小のデータが異常値として問題となる。この最大か最小のデータ 1 個について、棄却できるか否かの判別法として ISO や JIS では Grubbs の方法が推奨されている。

まず、全てのデータについて

$$\text{平均 } \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad \text{と標準偏差 } s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \text{を計算する。}$$

$$\text{これを用い、 } T_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{s} \quad \text{あるいは } T_n = \frac{x_n - \bar{x}}{s} \quad \text{を算出する。}$$

有意水準とデータ数に対応した棄却限界を与える数表が、Grubbs の棄却検定表に示されておりこの値を検定表値と比較し、検定表の値よりも大きければ棄却することができる。

表 1 Grubbs の棄却検定表

データ数 n	上側確率 (α)			
	0.05	0.025	0.01	0.005
3	1.153	1.155	1.155	1.155
4	1.463	1.418	1.492	1.496
5	1.672	1.715	1.749	1.764
6	1.822	1.887	1.944	1.973
7	1.938	2.020	2.097	2.139
8	2.032	2.126	2.221	2.274
9	2.110	2.215	2.323	2.387
10	2.176	2.290	2.410	2.482

【例題】検査結果値 66, 63, 59, 57, 61, 58, 28, 60, 52, 48 が得られたとする。検査値のいずれかが棄却できるかを判定しなさい。

10 個の値を小さい順に並び替えると 28, 48, 52, 57, 58, 59, 60, 61, 63, 66 となり、問題となるのは最小値の 28 と最大値の 66 である。

この検査結果の平均値は 55.2、標準偏差は 10.9 となる。

最小値 28 の場合、 $T_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{s} = \frac{55.2 - 28}{10.9} = \frac{27.2}{10.9} = 2.50$ となる。この値を 1%（あるいは 5%）水準の検定値 2.410（あるいは 2.176）と比べた場合、計算値の方が大きくなるため、1%（あるいは 5%）の水準で有意差を示したことになり棄却しても良いことになる。

また最大値 66 の場合、 $T_{10} = \frac{x_{10} - \bar{x}}{s} = \frac{66 - 55.2}{10.9} = \frac{10.8}{10.9} = 0.99$ となる。この値を 1%（あるいは 5%）水準の検定値 2.410（あるいは 2.176）と比べた場合、計算値の方が小さくなるため、1%（あるいは 5%）の水準で有意差は無いことになり棄却できないことになる。

より簡便な方法として、Dixon の方法も利用されている。この方法は、平均や分散などを算出しなくても電卓などで簡便に計算することができるために利用されている。

表 2 Dixon の棄却検定表

データ数 n	有意水準			計 算 式
	0.10	0.05	0.01	
3	0.886	0.941	0.988	最小値が疑わしい: $r_{10} = (x_2 - x_1)/(x_n - x_1)$
4	0.679	0.786	0.888	
5	0.567	0.642	0.780	最大値が疑わしい: $r_{10} = (x_n - x_{n-1})/(x_n - x_1)$
6	0.492	0.560	0.690	
7	0.434	0.507	0.637	
8	0.479	0.554	0.683	最小値が疑わしい: $r_{10} = (x_2 - x_1)/(x_n - x_1)$
9	0.441	0.512	0.635	
10	0.409	0.477	0.597	
11	0.517	0.576	0.679	最小値が疑わしい: $r_{21} = (x_3 - x_1)/(x_{n-1} - x_1)$
12	0.490	0.546	0.642	
13	0.467	0.521	0.616	
14	0.492	0.546	0.641	最小値が疑わしい: $r_{22} = (x_3 - x_1)/(x_{n-2} - x_1)$
15	0.472	0.526	0.616	
16	0.454	0.507	0.596	
17	0.438	0.490	0.577	
18	0.424	0.475	0.561	
19	0.412	0.462	0.547	
20	0.401	0.450	0.535	
21	0.391	0.440	0.524	
22	0.382	0.430	0.514	
23	0.374	0.421	0.506	
24	0.368	0.413	0.497	
25	0.360	0.406	0.490	

最大値と最小値の両方が疑わしい場合には、Peason-Stephens の方法が推奨されている。

この方法では、Grubbs の方法で用いられている T_1 や T_n の代わりに下記の式で計算される

R/σ が用いられる。

$$\frac{R}{\sigma} = \frac{x_n - x_1}{\sigma}$$

有意水準とデータ数に対応した棄却限界を与える数表が示されており、表の値以上で有

れば最大値と最小値の両方を棄却できる。

表 3 Peason-Stephens の棄却検定表

データ数 n	上側確率(α)			
	0.05	0.025	0.01	0.005
3	1.999	2.000	2.000	2.000
4	2.429	2.439	2.445	2.447
5	2.753	2.782	2.803	2.813
6	3.012	3.056	3.095	3.115
7	3.222	3.282	3.338	3.369
8	3.399	3.471	3.543	3.585
9	3.552	3.634	5.720	3.772
10	3.685	3.777	3.875	3.935

6. 参考資料 第1回法医中毒研究会セミナー「分析バリデーションのABC」 実施時のアンケート回答

第1回法医中毒研究会春季セミナーアンケートの結果

「分析バリデーションのABC」へのご参加ありがとうございました。
当日回収させていただいたアンケートをまとめました。寄せられたご意見などは、次回セミナーの参考にさせていただきます。ご協力ありがとうございました。

また、参加されなかった先生方にも参考としていただけるようお願いいたします。

アンケート配布者 45 名，アンケート回収数 30 名

I. 本セミナーに出席されたことによって、以下の 1. から 9. 各項の認識に変化があったかどうか、a-c のうち適当なものにチェックをお願いいたします。c. を選ばれた場合、簡単にご意見をご記入ください。

a. 変化なし，b. 理解が深まった，c. 追加の意見がある

1. スクリーニング

a. 12/30, b. 17/30, c. 1/30

- ・学会として法医中毒学検査で対象とすべきスクリーニング薬物を挙げてほしい。

2. 確認試験

a. 9/30, b. 20/30, c. 1/30

- ・機器が異なると統一した定性の基準は難しいが、代表的なものについては挙げることはできると思います。

3. 特異性 Specificity

a. 11/30, b. 19/30, c. 0/30

4. 選択性 Selectivity

a. 11/30, b. 19/30, c. 0/30

5. 検出下限 Limit of detection

a. 2/30, b. 28/30, c. 0/30

6. 検量線 Calibration curve

a. 3/30, b. 27/30, c. 0/30

Ⅱ. 左に挙げた語句以外で、分析バリデーションを考えるうえで重要と考えておられるものを挙げてください。

- ・ 日間変動, 日内変動
- ・ 検量線, 真度, 精度
- ・ 真度と精度
- ・ 精度, 検量線, 回収率, キャリーオーバー
- ・ Accuracy, Precision, Stability
- ・ 定量下限
- ・ 検体の保存状態・環境について
- ・ 検体の性状 (状態)
- ・ 定量下限, 精度
- ・ 法医中毒学的検査においては様々なバリデーション方法のうちどれを選んだらよいかを知りたい。

Ⅲ. 法中毒分析の検量線マトリックスとして最適なものは何がよいでしょうか。

- ・ 入手しやすい購入した血清や保存血を使用している。新鮮血がよいのだろうが、入手方法は？
- ・ 血液, 尿
- ・ お勧めを教えてください。
- ・ 血液及び尿
- ・ 全血・血清・尿など、その試料にあわせて健常人のものをを用いれば良い。
- ・ 全血, 尿
- ・ 血液
- ・ 同一種 (ヒト) 同一試料 (全血, 血清, 尿など) が望ましいが、難しい場合は別種 (例えばヒツジ, トリ, ブタなど) の同一試料あるいは標準添加法を用いる。
- ・ 法医試料を使った標準添加法が好ましいが、方法がよくわからないので新鮮血を使用している。他のマトリックスについては QC を使用している。
- ・ 下大動脈血
- ・ 血液
- ・ Whole blood, Urine
- ・ 血液 (腐敗したものや溶血したものを除く)
- ・ 測定対象検体と性状に近い血液・血清
- ・ Case by case なので良く分らないが、一般には血液。

Ⅳ. 剖検検査や論文投稿などで分析バリデーションに不安を感じたことがありますか。

- ・ どの方法をとってよいのかわからない。例えば LOD を求める場合において。
- ・ ある

- ・ 常に感じている
- ・ ある
- ・ 常にある
- ・ ある
- ・ カラムや検出器の汚染がひどく、また、分析経験も浅いので、バリデーションをやり直すタイミングが分らない。気付いた時には、再分析になることが度々ある。
- ・ （剖検検査において）普段感じている。
- ・ ブランクとして使うべきマトリックスが見つからない。
- ・ 論文によって言及しているバリデーションの項目が異なる。
- ・ 回収率
- ・ 同一人物の血液でも採血箇所や動脈血・静脈血で検査値が異なった例があり、不安を感じた。
- ・ 検体を冷凍保存にしても未知変化をしている可能性があり、再現性がほとんどない部分。
- ・ ある

V. 本セミナーのテーマ、分析バリデーションへの取り組みを継続的に進めていくことについてのご意見をお願いいたします。

- ・ 続けていってほしい。具体的なやり方を知りたい。
- ・ 分析バリデーションの具体例、バリデーションをするときの具体的な方法を教えてほしい。
- ・ 具体的な進展があれば良い。
- ・ 重要なテーマだとは思いますが、更なる話題があるかどうかは疑問。
- ・ とても勉強になった。次回も参加したい。
- ・ ぜひ3ヶ月に1回くらいのペースで。
- ・ 安定性の基準となるデータを作る。
- ・ 明文化、マニュアル化の必要性
- ・ 実例を挙げる。
- ・ 年1回くらいのペースで学会とは別に開催して欲しい。
- ・ とても良いと思うので今後も期待している。

VI. 今後、セミナーで取り上げてほしいテーマがありましたらお願いいたします。

- ・ バリデーションの具体的な方法。実際にどのようにやったらよいか。
- ・ 外部精度管理について
- ・ 統一手法の確定
- ・ SOPの作成の仕方と演習
- ・ 重要な薬物（例えばアルコール、覚せい剤）について詳細な分析法および結果の解釈の解説
- ・ 経験が浅いので、分析の前処理の方法（定量用）など、具体的な分析手技を取り上げてほしい。
- ・ 入手しにくい標準品の入手方法
- ・ 試料の状態など。死後に血液がどのように値が変動しているか。
- ・ スクリーニング検査（GC, LC）

- Cut off 値の評価
- 統計
- 分析結果解析について（文献や資料活用など）、信頼できるデータ（致死量など）集など.
- Sample（試料）の採取法