

事務連絡
平成26年4月1日

各都道府県衛生主管部（局） 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法（リガンド結合法）のバリデーションに関するガイドライン質疑応答集（Q&A）」について

標記について、別添のとおり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。

医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法（リガンド結合法）の

バリデーションに関するガイドライン質疑応答集（Q&A）

《適用》

- Q1. 内因性物質とアミノ酸配列が同じ薬物も本ガイドラインの適用対象となるか？
- A1. 本ガイドラインの適用対象となる。ただし、ブランクマトリックスについては、代替マトリックスや内因性物質を除去したマトリックスを使用する等、特別な配慮が必要である（Q&A9 及び 13 を参照）。また、リガンド結合法で内因性物質と識別できない薬物の場合も、同様の配慮が必要である。

《標準物質（標準品）》

- Q2. 標準物質の有効期限が明らかでない場合には、どのように対応したらよいか？
- A2. 有効期限が設定できない場合には、リテスト日を設定するなどして品質管理を行う。
- Q3. 標準物質のロットを変更する際にはどのように対応したらよいか？
- A3. 定量分析に使用される標準物質のロットを変更する際には、分析証明書等によりロット間の同等性を確認しなければならない。分析証明書等の情報がない場合は、変更前後のロットで同様の結果が得られることをリガンド結合法により確認する必要がある。
- Q4. 標準物質のロットは、非臨床試験及び臨床試験の投与薬物ロットと同じにする必要があるか？
- A4. 分析証明書等の内容から同一の品質規格に適合していることが確認できれば、異なるロットを使用することも可能である。品質規格が定まっていない初期の非臨床試験では標準物質ロットと投与薬物ロットを同じにすることが望ましく、異なるロットを使用する場合には、それぞれのロットで同等の結果が得られることをリガンド結合法により確認する必要がある。

《フルバリデーション》

- Q5. MRD は試料の希釈とどう違うのか？
- A5. MRD は、マトリックスの影響を一定にするために、検量線用標準試料、QC 試料及び実試料を緩衝液で同一の希釈をする倍率のことである。試料の希釈は、分析対象物質濃度が検量線の定量上限を超える試料を検量線の定量範囲内に入れるために、試料をマトリックス等で希釈することである。

Q6. 一つの試料を 2 穴以上で測定する際、各穴のレスポンスまたは定量値の乖離が大きい場合はどう対処すればよいか？

A6. 乖離が大きい場合は、定量値の信頼性が低くなるため、乖離が大きい場合のデータの取り扱い（棄却の基準等）を適切に定め、事前に計画書又は手順書に記載する。

《特異性》

Q7. 特異性の評価を必要としない場合はあるか？

A7. 分析結果の解釈に必要な情報として特異性は重要であるが、リガンド結合法の特異性は結合試薬の反応性に依存するため、結合試薬の作製過程でその特性が明らかとなっている場合は、必ずしもバリデーション項目として実施しなくてもよい。

《選択性》

Q8. 疾患由来マトリックス、溶血あるいは高脂肪マトリックスなどを使用することは必要か？

A8. 必須ではないが、測定系への影響が予想される場合は検討を考慮する。

《検量線》

Q9. 内因性物質とアミノ酸配列が同じ薬物を分析する場合、マトリックスはどうすればよいか？

A9. 実試料と同じマトリックスに内因性物質が含まれている場合は、通常、代替マトリックス又は内因性物質を除去したマトリックスを使用する。これらの代替マトリックス等を使用した場合は、使用したマトリックスの妥当性を示す必要がある。

《真度及び精度》

Q10. QC 試料のうち、中濃度は検量線の間近付近、高濃度は検量線の定量上限の 3 分の 1 以上とあるが、具体的にはどのように設定するか？

A10. 中濃度が検量線の間近付近とは、定量範囲の間近付近のことであり、一般的には定量下限と定量上限の幾何平均付近を指すが、QC 試料の濃度配置のバランスを考慮して算術平均付近に接近させてもよい。高濃度が検量線の定量上限の 3 分の 1 以上とは、分析対象物質濃度を対数表示として検量線を描いた場合に、QC 試料の濃度を検量線範囲内に均等に分散させることを意図している。QC 試料全体のバランスによっては定量上限の 75%程度の値でもよい。

Q11. 分析単位内の繰り返し分析はどうすればよいか？

A11. 分析単位内の精度を1分析単位の結果から算出する場合は、少なくとも3回の繰り返し(n=3)が必要である。分析単位間の精度を算出する場合は、分析単位内では1回の測定でも許容される。また、分析単位内の繰り返し回数を2回以上として、分析単位内及び分析単位間を区別せずに分散分析などの手法を用いて評価してもよい。

Q12. トータルエラーを必要とする根拠は何か？

A12. 真度から100%を引いた値の絶対値は測定における系統的誤差(systematic error)、精度は偶然誤差(random error)を反映し、トータルエラーの評価によって、各定量値の真値からの乖離やばらつきが大きくその信頼性に問題を有するような分析法を早期に排除することができる(DeSilva et al, Pharm. Res., 2003)。リガンド結合法では、クロマトグラフィーを用いる分析法と比較して、真度及び精度の許容範囲が広く設定されており、分析結果の信頼性を確保する上で、真度及び精度の双方が許容基準値に近い分析法を極力排除するために設定した。

Q13. 内因性物質とアミノ酸配列が同じ薬物を分析する場合、真度の評価の留意点はあるか？

A13. 代替マトリックスや内因性物質を除去したマトリックスを用いるか、除去せずにブランク試料の内因性物質濃度を分析した上で以下のいずれかの式より真度を算出する。

$$\text{真度}(\%) = \frac{\text{試料中薬物濃度定量値}}{\text{内因性物質濃度} + \text{標準物質濃度}} \times 100$$

$$\text{真度}(\%) = \frac{\text{試料中薬物濃度定量値} - \text{内因性物質濃度}}{\text{標準物質濃度}} \times 100$$

《希釈直線性》

Q14. 希釈直線性は希釈の妥当性とどう違うのか？

A14. 希釈の妥当性の評価は、希釈操作が定量値に影響を与えないことを確認するために実施するが、希釈直線性の評価は、希釈の妥当性に加え、フック効果またはプロゾーンの有無を確認するためにも実施する。

《クロスバリデーション》

- Q15. 判断基準が「各濃度における平均真度が原則として理論値の±30%以内」となっている理由はあるか？
- A15. 本ガイドラインでは分析法における平均真度において、理論値の±20%であることを求めている。クロスバリデーションにおいては、さらに室内及び室間再現精度の要素が加わることから、判断基準を30%とした。なお、同一試験から得られる実試料を複数の施設で分析する場合には、分析法バリデーションとは別に、実試料や標準物質の取扱いを当該分析実施に関する計画書または手順書で規定する等、実試料分析においても施設間差を最小限にすることの配慮が必要である。

《実試料分析》

- Q16. 異なるプレートで測定された検量線を用いることは可能か？
- A16. 原則として、プレートを用いる分析系ではプレートごとに検量線を作成する必要があるが、バリデーションにより妥当性が示されれば、異なるプレートで作成された検量線を用いて定量することも可能である。ただし、QC 試料はプレートごとに必要である。
- Q17. 平行性 (Parallelism) の評価は必要ないか？
- A17. 実試料の希釈系列における用量反応曲線と検量線系列の用量反応曲線が平行であり、実試料の数段階の希釈における換算値に希釈倍率による差が認められないとき、平行性が成立していると定義される。本ガイドライン発出の時点では、平行性が成立しなかった事例、平行性不成立の原因、平行性の不成立が医薬品開発に与える影響の程度等について、国内外ともに十分な知見が蓄積され議論が成熟している状況ではないことから、必ずしもすべての分析について平行性を評価する必要はない。ただし、分析対象物質や分析法の特性、あるいは、医薬品開発の過程で集積されたデータから、平行性が問題になる可能性が疑われる際には、可能な範囲で科学的に妥当な評価を行い定量値への影響を考察すべきである。

《実試料分析における QC 試料》

- Q18. プレート内の検量線及び QC 試料の配置に留意すべき点はあるか？
- A18. プレート内の試料の配置により、分析結果に一定の傾向が生じることが避けられない場合には、分析結果への影響を最小化できるように、検量線試料、QC 試料、実試料の配置や、1 調製試料あたりの測定ウェル数に留意する。

《ISR》

Q19. トキシコキネティクス試験のISRはどのように実施したらよいか？

A19. トキシコキネティクス試験の場合には、1動物種、1マトリックスあたり、1回ISRを実施すれば良い。ただし、分析方法に変更があった場合、分析施設が変わった場合などは改めてISRを実施する。

トキシコキネティクス試験に先立って行われる用量設定試験等の非GLP試験から得られる実試料を用いて、分析法バリデーション試験の中でISRを実施する方法も認められる。ただし、この場合には、用量や投与方法等の試験デザインがGLP試験と同等であることが求められる。

Q20. 臨床試験において、ISRはどのように実施したらよいか？

A20. ISRは薬物動態を主要評価項目とする代表的な試験で実施される。分析法の妥当性を早期に評価するために、なるべく医薬品開発の早い段階で実施する。

マトリックスの組成に差があると考えられる被験者群の臨床試験においては再度ISRを実施する。また、生物学的同等性試験では、試験ごとにISRを実施する。

Q21. 臨床試験において、分析法バリデーションを行う際に既に臨床試験から取得した実試料が存在する場合には、それをISRの試料として利用できるか？

A21. 代謝物を分析対象物質として追加する場合やISRの基準を満たさず分析法を改良して再分析を行う場合等、分析法バリデーションを行う際に既に臨床試験から取得した実試料が存在する場合には、それをISRの試料として利用することができる。ただし、このような場合でも実試料の提供者への同意取得は必須であり、ISRの実施の手順等はあらかじめ定めておかなければならない。

Q22. ISR全体として判断基準を満たしている場合に、乖離度が±30%以内との判断基準を逸脱した個別の実試料について、再分析は必要か？

A22. ISRの目的は実試料を用いた分析法の妥当性の確認である。このため、個別の乖離度が±30%を超える実試料があった場合にも、全体としてISRの判断基準を満たしている場合には再分析を実施する必要はない。

Q23. ISRの結果は報告書のどこに記載すべきか？

A23. 実試料分析においてはISRを実施した場合には実試料分析報告書における分析法の妥当性に関する結果として、分析法バリデーションにおいてはISRを実施した場合にはバリデーション報告書におけるバリデーションの結果としてISRの結果を報告し、分析法の妥当性について考察をする。

Q24. 非臨床試験では ISR に供する測定試料が不足することが考えられるが、試料が不足した時の対応はどうすべきか？

A24. 非臨床試験においても ISR の実施を前提として試験を計画することが必要である。一部の時点の試料が再測定等で不足したとしても、別の時点の試料を ISR に供する等、ISR を評価することは可能である。また、採取条件が同等である予備試験の試料を活用することもできる。非臨床試験においても、可能かつ適切な手段を講じ、ISR にて定量値の再現性を評価することは必要である。

《重要試薬》

Q25. 重要試薬の有効期限の設定は必要か？

A25. 使用する期間中の検量線や QC 試料の分析結果の評価から、重要試薬の品質を確認できるならば、有効期限の設定は必ずしも必要でない。