

【配付資料】

1. 今回の議事次第および前回議事要旨
2. ジェネリック医薬品等審査部と申請時の BMV フォーマット
3. JBF バイオマーカータスクフォースの作成したコンセプトペーパーの素案および WG 議事要旨
4. 高分子 LC/MS ワーキンググループの活動報告

以上

薬食審査発0401第1号
平成26年4月1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（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」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、リガンド結合法による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、リガンド結合法による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、酵素免疫測定法（enzyme immunoassay: EIA）等のリガンド結合法を用いた分

析法に適用するものであること。

- (2) 既に公表した低分子化合物をクロマトグラフィーで測定することを対象とした「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」(平成 25 年 7 月 11 日付け審査管理課長通知薬食審査発 0711 第 1 号)を基本に、特異性、選択性、検量線、希釈直線性、クロストーク、重要試薬、干渉物質等、リガンド結合法の特性を踏まえた記載としたこと。

2. 今後の取扱い

平成 27 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（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

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. 特異性
 - 4.1.2. 選択性
 - 4.1.3. 検量線
 - 4.1.4. 真度及び精度
 - 4.1.5. 希釈直線性
 - 4.1.6. 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
 6. 注意事項
 - 6.1. 定量範囲
 - 6.2. 再分析
 - 6.3. キャリーオーバー
 - 6.4. クロストーク
 - 6.5. 重要試薬
 - 6.6. 干渉物質
 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

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、リガンド結合法（ligand binding assay: LBA）による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生体試料中薬物濃度分析法としてリガンド結合法を用いる際の分析法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。対象薬物はペプチド及びタンパク質を中心とし、リガンド結合法を用いて分析する薬物であれば低分子化合物も対象とする。リガンド結合法の代表的な例としては、酵素免疫測定法（enzyme immunoassay: EIA）等の抗原抗体反応に基づく免疫学的測定法が挙げられる。

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（物質質量、純度又は力価）、保存条件等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。有効期限等を明らかにしておくことが望ましい。標準物質は、その入手先が明らかにされ、かつその品質が適切に管理されている必要がある。

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濃度を定量するため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。文献等で公表された分析法を使用する場合や市販されているキット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。

フルバリデーションでは、特異性、選択性、検量線、真度、精度、希釈直線性、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（主に血漿又は血清）ごとに実施する。

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。

リガンド結合法では、分析法を確立する過程において設定された MRD (minimum required dilution) に従い緩衝液で希釈した試料を調製し、フルバリデーションを実施する。プレートを使用するリガンド結合法では、通常、1 調製試料あたり少なくとも 2 穴で測定し、各穴より得られた応答変数（レスポンス）の平均値から試料の定量値を算出する、あるいは各穴の応答変数から算出された定量値を平均して試料の定量値とする。

4.1.1. 特異性

特異性とは、分析対象物質を類似物質（分析対象物質と構造的に類似した物質）等と識別して検出する能力のことである。リガンド結合法の場合、結合試薬が分析対象物質と特異的に結合し、試料中に共存する類似物質と交差反応性を示さないことが重要である。生体内に類似物質が存在すると想定される場合には類似物質が分析対象物質の測定に与える影響の程度を評価する。特異性は、分析法を確立する過程で評価できることがある。また、分析法バリデーション終了後に追加の特異性の評価が必要になることがある。

特異性は、ブランク試料（分析対象物質を添加しないマトリックス試料）、実試料に含まれると想定される濃度の類似物質を添加したブランク試料、並びに定量下限付近及び検量線の定量上限付近の QC 試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料を用いて評価する。

ブランク試料及び類似物質を添加したブランク試料が定量下限未満を示し、類似物質を添加した QC 試料の定量値の真度が理論値のそれぞれ $\pm 20\%$ 以内（定量下限及び定量上限の場合は $\pm 25\%$ 以内）でなければならない。

4.1.2. 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 10 個体から得られた個別のブランク試料及び個別のブランク試料を用いて調製した定量下限付近の QC 試料を用いて評価する。希少なマトリックスを使用する場合には、10 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。

ブランク試料の 80%以上が定量下限未満を示し、定量下限付近の QC 試料の 80%以上において定量値の真度が理論値の $\pm 20\%$ 以内(定量下限の場合は $\pm 25\%$ 以内)でなければならない。

4.1.3. 検量線

検量線は、分析対象物質の濃度の理論値と応答変数の関係を示したものである。

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、定量下限及び定量上限を含む 6 濃度以上の検量線用標準試料、及びブランク試料から構成される。カーブフィッティングを向上させる目的で、定量下限未満の濃度及び検量線の定量上限を超える濃度のアンカーポイントを設定しても良い。検量線の回帰式は、一般的には 4 又は 5-パラメーターロジスティックモデルが用いられる。報告書には、用いた回帰式及び重み付け条件を記載する。

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、定量下限及び定量上限において理論値の $\pm 25\%$ 以内とし、定量下限及び定量上限以外においては理論値の $\pm 20\%$ 以内とする。アンカーポイントを除く検量線用標準試料の 75%以上かつ、定量下限及び定量上限を含む少なくとも 6 濃度の検量線用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、分析法で得られる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、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。バリデーション実施時には、検量線の定量範囲内で、最低 5 濃度(定量下限、低濃度、中濃度、高濃度及び定量上限)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、高濃度は検量線の定量上限の 3 分の 1 以上であるものとする。真度及び精度は、分析単位を少なくとも 6 回繰り返し分析することによって評価される。

各濃度における分析単位内及び分析単位間の平均の真度は、理論値の $\pm 20\%$ 以内でなければならない。ただし、定量下限及び定量上限では $\pm 25\%$ 以内であるものとする。各濃度における分析単位内及び分析単位間の定量値の精度は、20%以下でなければならない。ただし、定量下限及び定量上限では 25%以下とする。さらに、各濃度において、真度から 100%を引いた値の絶対値と精度の和(トータルエラー)は、30%以下でなければならない。ただし、定量下限及び定量上限では 40%以下とする。

4.1.5. 希釈直線性

希釈直線性の評価は、検量線の定量上限を超える濃度の試料がフック効果又はプロゾーンの影響を受けずに適切に分析できること、及び、検量線内においても定量値に希釈による影響がないことを確認するために実施する。希釈直線性は、検量線の定量上限を超える QC 試料及びこの試料を段階希釈した複数濃度の試料を分析して評価する。上記試料において、レスポンス低下（フック効果又はプロゾーン）の有無を確認し、レスポンス低下が認められた場合には実試料分析に影響を及ぼさないような手段を考慮する必要がある。また、試料の定量値を希釈倍率で補正した後の真度は理論値の $\pm 20\%$ 以内、精度は 20%以下でなければならない。

4.1.6. 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、実際に保存する溶液のうち、最高濃度付近及び最低濃度付近の溶液を用いる。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 $\pm 20\%$ 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、重要試薬のロットの変更、定量範囲の変更、MRD の変更、抗凝固剤の変更、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 試料又は同一の実試料を分析し、QC 試料の各濃度の平均真度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、中濃度及び高濃度の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±30%以内でなければならない。実試料を使用する場合には、少なくとも 3 分の 2 の試料の乖離度が±30%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（ブランク試料及び 6 濃度以上の検量線用標準試料）及び QC 試料（3 濃度以上）と共に実試料を分析する。なお、プレートを使用するリガンド結合法では、通常、1 調製試料あたり少なくとも 2 穴で測定し、各穴より得られた応答変数の平均値から試料の定量値を算出する、あるいは各穴の応答変数から算出された定量値を平均して試料の定量値とする。

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。プレートを用いる分析法では、プレートを分析単位とする。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。

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、定量下限及び検量線の定量上限においては理論値の±25%以内、それ以外の濃度においては理論値の±20%以内でなければならない。アンカーポイントを除く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定量上限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定量上限としてもよい。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、高濃度は検量線の定量上限の3分の1以上と設定される。QC試料は、実試料と同様の方法で処理したものを使用する。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試料の真度は理論値の $\pm 20\%$ 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 sample 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は薬物動態を主要評価項目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を実施する試料数は、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 $\pm 30\%$ 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 $\pm 30\%$ を超えても、その初回の定量値を、再分析値へ置き換えたり棄却したりしてはならない。

6. 注意事項

6.1. 定量範囲

リガンド結合法における検量線の定量範囲は結合試薬の特性に大きく依存し、定量範囲を任意に設定することが困難なことがある。また、リガンド結合法における検量線の定量範囲は比較的狭いため、実試料中の分析対象物質の濃度が、希釈後に検量線の定量範囲内となるよう、希釈直線性の範囲を適切に設定しなければならない。

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、定量範囲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、定量値が検量線の定量上限を超えた場合、又は過剰希釈により定量下限未満となった場合、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、分析操作又は分析機器の不具合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、被験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. キャリーオーバー

キャリーオーバーとは、分析装置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。

プレートやチューブを用いて分析する場合はキャリーオーバーを考慮する必要はないが、同一のフローセル、流路、オートサンプラーを用いて分析する場合は考慮する必要がある。

キャリーオーバーの回避が困難な場合には、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。キャリア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、実試料分析中にキャリアオーバーを評価し、定量値への影響について考察する。

6.4. クロストーク

クロストークとは、プレートを用いた分析において、蛍光あるいは発光等が隣接するウェルに漏れ、定量値に影響を与えることである。

クロストークの回避が困難な場合には、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。クロストーク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、実試料分析中にクロストークを評価し、定量値への影響について考察する。

6.5. 重要試薬

重要試薬とは、リガンド結合法による生体試料中薬物濃度分析において分析結果に直接影響する試薬を指し、主に結合試薬（抗体及びその標識体等）が該当する。

重要試薬は、分析対象物質に対する特異性等に留意して選択し、品質が維持できる条件で保存する。重要試薬の品質は、分析法バリデーション並びに実試料分析に使用される期間を通じて適切に確保される必要がある。重要試薬のロット変更の際には原則としてパーシャルバリデーションが必要である。

6.6. 干渉物質

干渉物質とは、薬物の可溶性リガンドあるいは抗薬物抗体等、実試料分析において定量値に影響を及ぼす可能性のあるものをいう。

干渉物質が実試料中に存在する可能性がある場合には、定量値への影響の程度を検討しておくことが望ましい。

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（標準物質、ブランクマトリックス及び重要試薬に関する授受、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
- 重要試薬に関する情報
- 分析方法（MRDに関する記載を含む.）
- 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

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
- 重要試薬に関する情報
- 分析方法（MRDに関する記載を含む.）
- 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

以上

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通知：「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，平成 25 年 7 月 11 日 薬食審査発 0711 第 1 号
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡：「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質疑応答集 (Q&A)」について，平成 25 年 7 月 11 日
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知：「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))
- 4) 厚生省薬務局審査管理課長通知：「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
- 5) 厚生省医薬安全局審査管理課長：「非臨床薬物動態試験ガイドライン」について，平成 10 年 6 月 26 日 医薬審第 496 号
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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)
- 10) EMA: Guideline on bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, Committee for Medicinal Products for Human Use(2011)

用語解説

アンカーポイント Anchor point : 検量線のカーブフィッティングを向上させる目的で、検量線用標準試料と同時に測定する定量下限未満又は検量線の定量上限を超える濃度の試料。

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。リガンド結合法では、通常、分光学的手法で得られた応答を電気信号に変換して得られる吸光度又は発光強度等で表される。

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。

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

干渉物質 Interfering substance : マトリックス中に存在し、結合試薬と分析対象物質の結合等に影響を及ぼす可能性がある物質。

希釈直線性 Dilutional linearity : 検量線の定量上限を超える濃度の試料がフック効果又はプロゾンの影響を受けずに適切に分析できること、及び、検量線内においても定量値に希釈による影響がないことを示す指標。

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。

クロストーク Cross talk : プレートを用いた分析法において、蛍光あるいは発光等が隣接するウェルに漏れ、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。

結合試薬 Binding reagent : リガンド結合法で用いる試薬のうち、分析対象物質に直接結合する試薬。

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。定量下限及び上限を含む 6 濃度以上の検量線用標準試料及びブランク試料から構成される。アンカーポイントを設定しても良い。

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。

交差反応性 Cross-reactivity : 結合試薬が、分析対象物質以外の物質に結合すること。

再分析 Reanalysis : 試料の希釈から分析に係る一連の操作を再度行うこと。

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。

重要試薬 Critical reagent : リガンド結合法に用いる試薬のうち、分析結果に直接影響する試薬を指し、主に結合試薬（抗体及びその標識体等）が該当する。

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。

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

選択性 Selectivity : 生体試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質を区別して検出することができる能力。

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。また、薬物と同じ構造の内因性物質が存在する場合等にも、本来のマトリックスの代わりとして用いられることがある。

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。

定量上限 Upper limit of quantification (ULOQ) : 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高い濃度。

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直線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 : 分析対象物質を類似物質と識別して検出する能力。リガンド結合法では結合試薬の特性に大きく依存する。

トータルエラー Total error : 真度から 100%を引いた値の絶対値と精度の和。

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り、その範囲は分析単位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または希釈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。

フック効果 Hook effect : 分析対象物質の濃度が非常に高い場合に、レスポンスが抑制されること。フック効果がある場合は、検量線の定量上限を超える濃度の試料の定量値が検量線の定量上限以下となるため注意する。リガンド結合法のうち、特に液相中で結合試薬と分析対象物質を反応させる場合に発生する。

ブランク試料 Blank sample : 分析対象物質を添加せずに分析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、特異性、選択性、検量線、真度、精度、希釈直線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。

プロゾーン Prozone : 分析対象物質の濃度が非常に高い場合に、レスポンスが抑制されること。フック効果と同じ現象である。

分析 Analysis : 試料の希釈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調製された一連の試料群を 1 つの分析単位として同一プレートで分析する。

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。

リガンド結合法 Ligand binding assay : 分析対象物質に特異的に結合する試薬を利用して分析対象物質を分析する方法。リガンド結合法の多くは抗原抗体反応を利用したものである。多くの場合、検出に酵素標識、放射性同位元素標識、蛍光標識又は発光標識等を施した試薬を使用する。反応は、96 穴プレート、試験管又は円盤内等で行う。

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。

MRD Minimum required dilution (MRD) : リガンド結合法での分析用に調製された試料において、緩衝液により生体試料が希釈されている倍率。MRD は、必ずしも試料を分析できる最小の希釈倍率である必要はないが、検量線用標準試料や QC 試料も含め、すべての試料で同一でなければならない。

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。

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、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とは、定量範囲の間近付のことであり、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。