

## List of relevant guidelines

- 1) Regarding the "Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development" PFSB/ELD Notification No. 0711-1 dated July 11, 2013.
- 2) Regarding the "Questions and Answers (Q&A) for the Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development" Office Communication dated July 11, 2013.
- 3) Regarding "the Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (ICH M3(R2))" PFSB/ELD Notification No. 0219-4 dated February 19, 2010.
- 4) Regarding the "Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies" PAB/ELD Notification No. 443 dated July 2, 1996.
- 5) Regarding the "Guideline on Nonclinical Pharmacokinetics" PNSB/ELD Notification No. 496 dated June 26, 1998.
- 6) Regarding "Partial Revision of the Guideline on Bioequivalence Studies for Generic Pharmaceuticals, etc." PFSB/ELD Notification No. 0229-10 dated February 29, 2012.
- 7) Regarding Revision of the "Questions and Answers (Q &A) Concerning the Guideline on Bioequivalence Studies for Generic Pharmaceuticals" Office Communication dated February 29, 2012.
- 8) "Note on Clinical Pharmacokinetic Studies of Pharmaceuticals" etc. PFSB/ELD Notification No. 796 dated June 1, 2001.
- 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).

## Glossary

**Accuracy:** The degree of closeness of a concentration determined by the method to the theoretical concentration. Accuracy is expressed as a percentage relative to the theoretical concentration.

$$\text{Accuracy (\%)} = (\text{Measured concentration} / \text{Theoretical concentration}) \times 100.$$

**Analysis:** A series of analytical procedures from sample dilution to measurement on an analytical instrument.

**Analyte:** A specific compound being analyzed. It can be a drug, biomolecule or its derivative, metabolite, and/or degradation product in a sample.

**Analytical run:** A set of samples comprising calibration standards, QC samples, and study samples. Usually, a set of samples is prepared without interruption in time by a single analyst with the same reagents under the same conditions, and subsequently analyzed in a single plate as a single analytical run.

**Anchor point:** Samples set at concentrations below the LLOQ or above the ULOQ of the calibration curve and analyzed concurrently with calibration standards to improve curve fitting.

**Assay variability:** The degree of difference between the duplicate concentrations determined for a single sample. The difference is expressed as a percentage relative to the mean of the two.

$$\text{Assay variability (\%)} = [(\text{Concentration in comparative analysis} - \text{Concentration in reference analysis}) / \text{Mean of the two}] \times 100.$$

**Binding reagent:** A reagent that directly binds to the analyte in LBA-based bioanalytical methods.

**Blank sample:** A matrix sample that is analyzed without analyte addition.

**Calibration curve:** Presentation of the relationship between concentration and response for an analyte. A calibration curve is generated with at least 6 concentration levels of calibration standards, including LLOQ and ULOQ samples, as well as a blank sample. Anchor points may be added outside the calibration range.

**Calibration standard:** A sample spiked with the analyte of interest to a known concentration, which is used to generate calibration curves. Calibration standards are used to generate calibration curves, from which the concentrations of the analyte in QC

samples and study samples are determined.

**Carry-over:** An alteration of the measured concentration due to a residual analyte in the analytical instrument used.

**Critical reagent:** A reagent that has a direct impact on the results of an LBA-based bioanalytical method, an example being binding reagents (e.g., unlabeled or labeled antibodies).

**Cross validation:** A validation conducted when data are generated in multiple laboratories within a study or when comparing analytical methods used in different studies. Cross validation is performed after a full or partial validation.

**Cross-reactivity:** Interaction of the binding reagent with components other than the analyte.

**Cross-talk:** An alteration of a measured concentration due to leak of fluorescence or luminescence to adjacent wells in plate-based assay.

**Dilutional linearity:** A parameter demonstrating that the method can appropriately analyze samples at a concentration exceeding the ULOQ of the calibration curve without influence of hook effect or prozone effect and that these measured concentrations are not affected by dilution within the calibration range.

**Full validation:** A validation that evaluates a full panel of performance parameters, i.e., specificity, selectivity, calibration curve, accuracy, precision, dilutional linearity, and stability. A full validation is usually performed when establishing a new bioanalytical method.

**Hook effect:** Suppression of response due to very high concentrations of a particular analyte. Precautions should be taken when the hook effect is expected, because samples at a concentration exceeding the ULOQ of calibration curve may falsely produce results below the upper limit of the calibration range. A hook effect may occur in LBAs that utilize a liquid-phase reaction step for incubating the binding reagents with the analyte.

**Incurred sample:** A study sample that is obtained from a subject or animal dosed with an active study drug.

**Incurred sample reanalysis (ISR):** Reanalysis of a portion of the incurred samples in separate analytical runs on different days to determine whether the original analytical results are reproducible.

**Interfering substance:** A substance that is present in the matrix that may affect interaction between the binding reagent and the analyte.

**Ligand binding assay:** A method to analyze an analyte of interest using reagents that specifically bind to the analyte. The antigen-antibody reaction is utilized in the majority of ligand binding assays. The analyte is detected using reagents labeled with e.g., an enzyme, radioisotope, fluorophore, or chromophore. Reactions are carried out in 96-well microtiter plates, test tubes, disks, etc.

**Lower limit of quantification (LLOQ):** The lowest concentration of analyte in a sample at which the analyte can be quantified with reliable accuracy and precision.

**Matrix:** Whole blood, plasma, serum, urine, or other biological fluid or tissue selected for analysis. A matrix not containing exogenous chemicals (except anticoagulant) and their metabolites is called a blank matrix.

**Minimum required dilution (MRD):** A dilution factor where biological samples are diluted with buffer solution for the analysis by LBAs. The MRD may not necessarily be the ultimate minimum dilution but should be identical for all samples including calibration standards and QC samples.

**Partial validation:** A validation performed when minor changes are made to an analytical method that has already been fully validated. A set of parameters to be evaluated in a partial validation should be determined according to the extent and nature of the changes made to the method. It can range from as little as accuracy and precision evaluation in a day to a nearly full validation.

**Precision:** The degree of closeness between individual concentrations determined in repeated measurements. Precision is expressed as the coefficient of variation (CV) or the relative standard deviation (RSD) in percentage.

$$\text{Precision (\%)} = (\text{Standard deviation}/\text{Mean}) \times 100.$$

**Prozone:** Suppression of response due to very high concentrations of a particular analyte. This is the same phenomenon as the hook effect.

**Quality control (QC) sample:** A sample spiked with the analyte of interest to a known concentration used to assess the reliability of an analytical method. In analytical runs, QC samples are analyzed to assess the validity of the analytical method used for calibration curve and study sample analysis.

**Quantification range:** The range of concentration of analyte in which the analyte can

be quantified with reliable accuracy and precision. The quantification range of a bioanalytical method is ensured by the range of calibration curve (calibration range) and the dilutional linearity.

**Reanalysis:** Repetition of a series of analytical procedures from the dilution step to final analysis on samples that have been analyzed once.

**Reference standard:** A compound used as the standard in quantifying an analyte mainly used to prepare calibration standards and QC samples.

**Response variable:** A response obtained from the detector of the analytical instrument. In LBAs, response is generally monitored by a spectroscopic technique, which converts the response into an electrical signal, such as absorbance or luminescent intensity.

**Selectivity:** The ability of an analytical method to detect and differentiate the analyte in the presence of other components in biological samples.

**Specificity:** The ability of an analytical method to detect and differentiate the analyte from its related substances. In LBAs, it is largely dependent on the properties of binding reagents.

**Stability:** The chemical or biological stability of an analyte in a given solvent or matrix under specific conditions over given time intervals. Analyte stability is evaluated at each step to ensure that the analyte concentration is not affected by the samples move through each step of the process from sample collection to final analysis.

**Stock solution:** A non-matrix solution of reference material at the highest concentration prepared in an appropriate solvent.

**Study sample:** A biological specimen that is obtained from a toxicokinetic study or clinical trial for bioanalysis.

**Surrogate matrix:** A matrix used as an alternative to a matrix of limited availability (e.g., tissue, cerebrospinal fluid, bile). Surrogate matrix may also be used as an alternative to a matrix that contains endogenous substances that have the same structure to the analyte.

**Total error:** Sum of the absolute value of the relative error (i.e., accuracy minus 100%) and precision.

**Upper limit of quantification (ULOQ):** The highest concentration of analyte in a sample at which the analyte can be quantified with reliable accuracy and precision.

**Validation:** Demonstration of adequate reproducibility and reliability of an analytical method through various evaluations.

**Working solution:** A non-matrix solution prepared by diluting the stock solution in an appropriate solvent. It is mainly added to matrix to prepare calibration standards and QC samples.

**Questions and Answers (Q&A) for the Guideline on Bioanalytical Method (Ligand Binding Assay) Validation in Pharmaceutical Development**

<<Scope>>

- Q1. Is this guideline applicable to a drug having an amino acid sequence identical to an endogenous substance?
- A1. Yes, this guideline is applicable. However, selection of a blank matrix requires special precautions, such as the use of a surrogate matrix or a matrix that has been depleted of the endogenous substance concerned (see Q&A No. 9 and No. 13). Same precautions should be taken for a drug which is indistinguishable by a ligand binding assay (LBA) from the endogenous substance.

<< Reference Standard>>

- Q2. What procedures should be followed if the expiration date for the reference standard is yet to be established?
- A2. If the expiration date of the reference standard cannot be established, quality of the reference standard should be ensured by other appropriate means, such as setting a re-test date *a priori*.
- Q3. What procedures should be followed in renewing the reference standard lot?
- A3. Confirm comparability of the current and new reference standard lots by referring to the relevant Certificate of Analysis (CoA), or any appropriate documentation. If no information regarding the lot comparability is available from the CoA or other relevant documentation, it should be confirmed by an LBA.
- Q4. Does the reference standard lot have to be the same as the drug substance lot used for dosing in the non-clinical or clinical studies?
- A4. Any lot may be used as the reference standard as long as it conforms to the same quality specifications based on information available from a CoA or other appropriate document. In an early stage of non-clinical studies where a quality specifications for a standard material are yet to be established, it is preferable that the reference standard lot is the same as the drug substance lot used for dosing in the non-clinical studies; if this is not the case, the lot comparability has to be confirmed by an LBA.

<<Full validation>>

- Q5. What is the difference between the MRD and sample dilution stated in the dilutional linearity section?
- A5. The MRD is a dilution factor where samples are diluted with buffer solution to reduce the matrix effect on the analysis: an identical MRD should be applied to all samples, including calibration standards and QC samples. On the other hand, sample dilution is a procedure where samples with high analyte concentrations are diluted with blank matrix or diluted blank matrix to bring the analyte concentration within the calibration range.
- Q6. When a sample is analyzed in two or more wells and when there is a large variation in their responses or determined concentrations, what procedures should be followed?
- A6. Specify handling procedures for data with a large variation *a priori* in the protocol or standard operating procedure (SOP). Such a variation will compromise the data's reliability.

<<Specificity>>

- Q7. Is there any case where specificity evaluation is not necessary?
- A7. Specificity is important information for analytical data interpretation. In an LBA, specificity is dependent on the reactivity of the binding reagent. Therefore, if the characteristics of the binding reagent are well known from its development phase, it may not be necessary to repeat the specificity test in validation.

<<Selectivity>>

- Q8. Should the use of disease-derived, hemolyzed, or lipemic matrix be necessary?
- A8. If such a factor is likely to affect the assay system, consider using a relevant matrix, although this is not mandatory.

<<Calibration curve>>

- Q9. What should be used as a blank matrix in analysis of a drug having an amino acid sequence identical to an endogenous substance?
- A9. If the presence of the endogenous substance is anticipated in the study sample matrix, a surrogate matrix or a matrix that has been depleted of the endogenous substance can be used. When such matrices are used, their validity should be shown.



<<Accuracy and precision>>

Q10. For QC samples, it is stated that “the mid-level is in the midrange on the calibration curve, and the high-level needs to be at least one-third of the upper limit of quantification (ULOQ) of the calibration curve.” Please specify how to set these concentration levels.

A10. The mid-level, in the midrange on the calibration curve/calibration range, generally means a level near the geometric mean of the ULOQ and the lower limit of quantification (LLOQ); a level adjacent to the arithmetic mean may be used for a more balanced QC sample distribution. The high-level, at least one-third of the ULOQ of the calibration curve, is intended to equally distribute QC samples within the range of a calibration curve where the nominal analyte concentrations are plotted on a logarithmic scale. A level around 75% of the ULOQ may be used depending on the overall balance of the QC sample distribution.

Q11. How should the number of replicates be set in each analytical run when assessing the accuracy and precision?

A11. When calculating within-run accuracy and precision, at least triplicate analyses (n=3) per analytical run are required. When calculating between-run accuracy and precision, a single analysis per analytical run would be accepted. An alternative method, such as analysis of variance (ANOVA), is also accepted. When using ANOVA, at least duplicate analyses are set per analytical run to evaluate accuracy and precision.

Q12. Why is a total error required?

A12. The absolute value of the relative error (i.e., accuracy minus 100%) represents the systematic error and precision reflects the random error. Evaluation of the total error allows early elimination of an analytical method having a large variation that could compromise data reliability (DeSilva et al, Pharm. Res., 2003). Although the acceptance criteria in accuracy and precision for LBA are set wider than those for chromatography/small molecules, it is anticipated that, by evaluating the total error, a LBA-based analytical method whose accuracy and precision are both on the edge of acceptability can be eliminated; this should ensure the reliability of the analytical results obtained.

Q13. What are the points to consider in assessing accuracy for the analysis of a drug having an amino acid sequence identical to an endogenous substance?

A13. Use a surrogate matrix or a matrix that has been depleted of the endogenous substance. Alternatively, determine the concentration of the endogenous substance in the blank sample and calculate the accuracy using one of the following formulas.

$$\text{Accuracy (\%)} = \frac{\text{Measured concentration of drug in sample}}{\text{Conc. of endogenous substance} + \text{Conc. of reference standard}} \times 100$$

$$\text{Accuracy (\%)} = \frac{\text{Measured conc. of drug in sample} - \text{Conc. of endogenous substance}}{\text{Concentration of reference standard}} \times 100$$

#### <<Dilutional linearity>>

Q14. What is the difference between dilutional linearity and dilution integrity?

A14. Dilution integrity is tested to confirm that the dilution procedure has no impact on the measured concentration, while dilutional linearity is tested to confirm not only dilution integrity, but also the absence or presence of a hook effect or prozone.

#### <<Cross validation>>

Q15. What is the rationale for setting the acceptance criteria as “the mean accuracy at each level should be within  $\pm 30\%$  deviation of the theoretical concentration, in principle”?

A15. The guideline requires the mean accuracy to be within  $\pm 20\%$  deviation of the theoretical concentration for analytical method validation. The acceptance criterion was relaxed to 30% for cross validation to accommodate additional factors, i.e., intra- and inter-laboratory precision. When study samples within a single study are to be analyzed at multiple laboratories, measures should be taken to minimize inter-laboratory variation in study sample analyses, such as by defining criteria for handling of study samples and reference standards in the relevant protocol or SOP, separate from the analytical method validation.

#### << Study sample analysis >>

Q16. Should a calibration curve analysis be required for each plate?

A16. In principle, each plate should contain a set of calibration standards. If, however, assay integrity is demonstrated during the validation process, it is also acceptable to apply a single calibration standard set to multiple plates as far as each plate contains a set of QC samples.

Q17. Is it not necessary to evaluate parallelism?

A17. Parallelism is defined as an established parallel relationship between a dose-response curve from a study sample dilution series and a curve from a calibration standard series, with no difference among back-calculated

concentrations for multiple dilutions of a study sample. As of the issuance of this guideline, domestic and international knowledge has neither accumulated nor discussion yet matured regarding cases in which parallelism was not established, causes for failing to establish parallelism, and the extent of impact the failure might have on pharmaceutical development. Therefore, evaluation of parallelism is not necessarily required for all analytical methods. However, if parallelism is an intrinsic issue for an LBA-based bioanalytical method and is likely to cause a problem based on the nature of the analyte or method or data accumulated in the course of pharmaceutical development, scientifically valid evaluation and assessment of the impact on measured concentrations should be considered to the extent possible.

<<QC samples in study sample analysis>>

Q18. What should be considered in the arrangement of calibration standards and QC samples within a plate?

A18. It may sometimes occur that a certain pattern is inevitably seen in the assay results due to sample arrangement within a plate (e.g., edge effect); in such cases measures should be taken to mitigate the impact on the analysis results. Measures include the arrangement of calibration standards, QC samples, and study samples on a plate and the number of replicates for each sample prepared.

<<ISR>>

Q19. How should I perform ISR in toxicokinetic studies?

A19. In a GLP toxicokinetic study, ISR should be performed once per matrix for each animal species. If an analytical method is modified or analysis is performed in a different laboratory, ISR should be performed again.

In addition, ISR can be performed during a bioanalytical method validation using study samples obtained from a non-GLP study such as a dose-finding study performed before a GLP toxicokinetic study. In this case, the study design, including dose and regimen, should be comparable to that of the GLP study.

Q20. How should I perform ISR in clinical trials?

A20. ISR should be performed in representative clinical trials whose pharmacokinetic data as a primary endpoint. To evaluate the validity of an analytical method in an early stage, ISR should be performed as early as possible in the process of pharmaceutical development.

In a clinical trial with a different population of subjects with altered matrix composition, ISR should be performed again. In a bioequivalence study which serves pharmacokinetic data as the primary endpoint, ISR should be performed in the study.

Q21. If study samples obtained from clinical trials are already available at the time of analytical method validation, can I use the samples for ISR?

A21. If you have already obtained study samples from a clinical trial at the time of analytical method validation, you can use the samples for ISR. For example, a metabolite is added to the analyte(s), or reanalysis is performed with an improved analytical method after a failure to meet ISR acceptance criteria. However, an informed consent must be obtained from each subject who provides the study samples. The procedures of ISR and related items should be predefined.

Q22. If overall results meet the ISR acceptance criteria, but the assay variability of a specific sample exceeds the threshold of  $\pm 30\%$ , is it required to reanalyze the samples to correct first value?

A22. ISR is intended to confirm the validity of an analytical method using study samples. Therefore, reanalysis of individual study samples is not required to correct the first value, even though the assay variability exceeds the threshold of  $\pm 30\%$  when overall result meets the ISR acceptance criteria.

Q23. Where in a report is appropriate to provide ISR results?

A23. When the ISR is performed in the study sample analysis, ISR results should be reported in a study sample analytical report to prove the validity of an analytical method. When the ISR is performed in the analytical method validation, ISR results should be reported in a validation report.

Q24. In non-clinical studies, it is often the case that the sample volume is not sufficient for ISR evaluation. What procedures should be followed in that case?

A24. The study plan should always assume ISR, even in non-clinical studies. Even if the volume becomes insufficient in some samples due to reanalysis or for other reasons, ISR can still be performed, for example, by using samples from other time points. ISR may also be performed by utilizing samples from a preliminary study in which samples were collected under comparable conditions. In any case, even in non-clinical studies, every practical effort should be made to evaluate the reproducibility of the measured concentrations by ISR.

<< Critical reagents >>

Q25. Should an expiration date be established for critical reagents?

A25. Expiration date is not necessarily required for a critical reagent, as long as the quality is ensured by evaluation of data from calibration standards and QC samples during the period the reagent is used.

「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(案)」  
に関する意見の募集に対して寄せられた御意見について

厚生労働省医薬食品局審査管理課

平成26年1月10日から2月10日までのパブリックコメント募集の期間に、ガイダンス案全般にわたっての多くの貴重なご意見が寄せられました。ご意見を集約すると14件の質問、コメントがあり、以下の表にご意見の内容等を整理して公表することとしました。ご協力いただいた皆様に感謝します。なお、重複した御意見、ガイダンス案の内容や趣旨に変更を与えない語句の修正のご指摘、御意見の趣旨が不明なものはお省きましたことをご了承下さい。

意見番号	頁	項目	行	該当する箇所	御意見		回答
					御提案のあった修正案	コメント	
1	2	適用	47-57	生体試料中バイオマーカの濃度分析法は適用に入らないことを明記してはいかがでしょうか。他 類似意見1件	本ガイドラインの適用にバイオマーカは入らないことを明確にするため。	生体試料中バイオマーカは、本ガイドラインの適用対象ではありません。その点は、適用に関する記載により明示されていると考え、追記はいたしません。必要に応じ、バイオマーカの濃度分析に本ガイドラインを参照することは差支えありません。	
2	2	適用	50-52	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。	内因性物質は適用範囲内なのか？	Q&AのQ1で解説しました。	
3	2	標準物質(標準品)	59	分析に使用する定量用標準品について、投与薬物と同じロットを使用するよう推奨する記載が無い。「標準品と投与薬物のバッチが異なる場合には、それらの同等性を評価するべきである」とを提案する。		Q&AのQ4で解説しました。	
4	2	標準物質(標準品)	62-66	検量線とQC試料に添加する標準物質のバッチは臨床試験に用いたバッチと同じものであるべきと考えていますか？		Q&AのQ4で解説しました。	
5	2	標準物質(標準品)	64	～並びに、有効期限又はリテスト日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。	ここで、BMVガイドライン発出版[1]では「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。」となっており、有効期限/リテスト日に対する要求性が異なっています。開発初期や代謝物など、予め標準物質の有効期限/リテスト日を設定できず、非臨床TK/臨床PK試験の前後で品質を保證するケースが想定されるため、BMVガイドライン発出版[1]と同じ表現「望ましい」が適切ではないでしょうか。また、適用となる対象薬物(分析対象物質)は同一でも、手法がLBAの場合のみ、事前に標準物質の有効期限/リテスト日の確認が必須になってしまうケースが考えられ、整合しません。		実態を踏まえつつ、低分子GLとの整合性も加味して、「有効期限等を明らかにしておくことが望ましい」としました。
6	2	標準物質(標準品)	65	標準物質は、その入手先が明らかにされ、かつその特性が精査されている必要がある。	どのような性質について、どのように調べられているべきなのか不明です。具体例を示すことはできないでしょうか。他 類似意見2件	本文を「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」に改めました。Q&AのQ3、Q4もご参照下さい。	
7	2	分析法バリデーション	69	薬物又はその代謝物の生体試料中濃度を定量する際の分析法を確立する際には、	「際」という表現が重なっており読みにくい。「際」という表現が重なっており読みにくい	御指摘を踏まえ、「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、」に修正しました。	
8	2	分析法バリデーション	69-70	薬物又はその代謝物の生体試料中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。	「代謝物」は、生体内で変換された生成物を示す言葉として低分子分野でよく用いられますが、ペプチドやたんぱく質(モノクローナル抗体など)などの高分子では分解されると言ったほうが、異化作用として体内で変換されるというよりも一般的です。本ガイドライン全般において「代謝物」を別の言葉に修正することを検討ください。	リガンド結合法で低分子を測定することも想定しており、リガンド結合法による代謝物測定が必要な場合は本ガイドラインに従うことを要求するものですので、修正の必要はないと考えます	
9	3	フルバリデーション	85	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を用いて	①「分析法を確立する過程」がバリデーションなのではないでしょうか。「分析法の検討段階」において設定されたMRD」等の表記が適切ではないでしょうか。	原文の記載で問題ないと考えます。	
10	3	フルバリデーション	85	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を用いて	②何を持って設定するのか、その根拠が必要と考えますが、ガイドライン内でMRDの設定方法を規定できないでしょうか。	ガイドラインに記載するものでなく、各施設が科学的妥当性を考慮して設定するものと考えますので、記載しません。	
11	3	フルバリデーション	85	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を用いて	③バリデーション報告書への記載を要求していることから、MRDの設定をバリデーション項目に含めるべきではないでしょうか。ただし、bestな希釈倍率を探索する目的ではなく、設定した希釈倍率で測定することでマトリックスの影響はほぼ無い、というデータを示すのみで良いと考えます。	MRDは分析条件の一つであり、バリデーション項目ではありません。MRD=1の時の記載を考慮し、「7.報告書の作成と記録等の保存」の「バリデーション報告書」の記載は、「(バリデーションに関する記載を含む)」と修正します。	
12	3	フルバリデーション	78-84		希少なマトリックス(組織など)においては科学的あるいは技術的に困難な理由で、全てのバリデーション項目を実施できないことがよくあります。「目的に応じた」あるいは「段階的アプローチ」が測定法の妥当性を最大限に保証するために有用であると考えます。希少なマトリックスのバリデーションを効果的に実行する方法を本ガイドラインに反映することをご検討ください。	希少なマトリックスを使用する場合のバリデーション項目や判断基準は、各施設の科学的判断に従って実施することでよいと考えますので、本ガイドラインには反映しません。	
13	3	フルバリデーション	82-84	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。	QC試料については、代替マトリックスを用いることを推奨しないと記載すべきでは。	代替マトリックスを使用する場合は妥当性を検証するように記載されています。	
14	3	フルバリデーション	71		本ガイドラインでは、バックグラウンドが高い場合又は選択性が悪い場合にマトリックスを希釈して測定する可能性について述べていない。	そのような場合には、適切に分析法を変更し、変更後の分析法で、バリデーションを実施してください。	
15	3	フルバリデーション	76	「分析対象となる種又はマトリックス」	「種」を「動物種」としてはどうか	「種」では曖昧で何を指すのかわかりにくい	
16	3	フルバリデーション	86	プレートを使用するリガンド結合法では、通常、「調製試料あたり少なくとも2穴で測定し、	プレートを用いる方法に限定した表現になっておりますが、プレートに限定した理由はありませんでしょうか？	リガンド結合法ではプレートフォーマットを用いる測定が一般的でありますので、プレートを例として記載しました。	
17	3	フルバリデーション	87		2穴の応答変数がばらついた時の除外基準を設けておくべきであることを記述する必要があると思われま	Q&AのQ6で解説しました。	
18	3	フルバリデーション	71-		平行性(Parallelism)のフルバリデーション項目または注意事項への掲載を希望します。他 類似意見3件	実試料において、バリデーションで設定したよりも高い濃度の試料を測定することがあり、prozone/フック効果により濃度が適切に測定できない場合があるため。	

19	3	フルバリデーション	71-89	バリデーションの各runの適否に関する明確な基準がないので、実試料分析の項のように検量線やQC試料を用いて評価すること、及びその適否の基準が必要であることを記載してはどうかでしょうか。	バリデーションの各runにおいても、実試料測定と同様に、runの適否基準が必要と考えられるため。	バリデーションの性質上、基準は不要です。	
20	3	フルバリデーション	72-77	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、…	市販キットで特異性(交差反応性)についての情報がある場合でも実施の必要はあるか？	分析法バリデーションは特異性を含め施設ごとに実施する必要があります。市販キット又は文献等で公開された方法による分析法においても同様です。	
21	3	フルバリデーション	78-79	分析法バリデーションに用いるマトリックスは、分析対象の実試料にできるだけ近いものを使用する。異なった抗凝固剤や添加剤を使用する場合は、追加のバリデーションの必要性について科学的検証が必要である」としてはどうか	抗凝固剤のような低分子物質は、希にリガンド結合法に影響を与えるため	「4.2 パーシャルバリデーション」で言及しています。	
22	3	フルバリデーション	78-84	遊離薬物濃度を測定するためには代替マトリックスの使用を考慮すべきである。そのためのバリデーションには薬物のターゲットを含まないマトリックス(異種又は除去マトリックス)が必要である。		「薬物のターゲットを含まないマトリックス(異種又は除去マトリックス)」は代替マトリックスに含まれます。バリデーションでは代替マトリックスの使用を否定していないので、科学的判断に従って使用してよいと考えます。	
23	3	フルバリデーション	78-84	ガイドライン全体としてマトリックス干渉(たとえば特異的マトリックス干渉と非特異的マトリックス干渉について)をもっと詳細に記載するべきである。また、マトリックス効果がないことが示された場合には、代替マトリックスの使用も考慮するべきである。マトリックス、緩衝液等の使用についてより詳細に記載することを提案します。		ガイドラインの要求事項としては、原文のままで十分と考えます。	
24	3	特異性	91		併用薬がある場合の特異性評価に関する記載が無い。「併用薬が分析に干渉することが懸念される場合は、併用薬存在下で特異性の評価を行うこと」の追加を提案する。	「4.2 パーシャルバリデーション」で言及しています。	
25	3	特異性	91		特異性評価に関して、バリデーション試験実施時には代謝物が不明の場合が多いと思われるが、バリデーション試験の段階でどこまで実施すべきでしょうか？また代謝物の構造が判明するたびに特異性評価を繰り返す必要があるのでしょうか？	新たな代謝物が判明した場合の特異性の評価の実施は、代謝物の特性に応じて個別に判断してください。	
26	3	特異性	98	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)、ブランク試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料、並びに低濃度及び高濃度付近の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。	L101-102にブランク試料及び類似物質を添加したQC試料に関する評価基準を記載してありますが、下線部の試料に対応する評価基準の記載がありません。記載の必要はないでしょうか。他 類似意見3件	ブランク試料に類似物質を添加した試料の判定基準を記載しました。	
27	3	特異性	99	「低濃度及び高濃度付近」	「低濃度及び高濃度付近」という記載はもっと特定すべきである。LLOQとULOQがより適切。「…並びにLLOQ及びULOQ付近のQC試料に…」を提案する。他 類似意見1件	「定量下限付近及び検量線の定量上限付近」に修正しました。	
28	3	特異性	101-102	ブランク試料が定量下限未満を示し、…	内因性物質は適用範囲外と考えて良いか？	内因性物質はブランク試料の評価基準の適用外と考えて差し支えありません。Q&AのQ1、Q9、Q13をご参照下さい。	
29	3	特異性	96-97	「特異性は、分析法を確立する過程や分析法バリデーション終了後に評価することもある」	「特異性は、分析法を確立する過程や分析法バリデーション終了後に評価することもあるが、実試料分析の前で評価する」という内容に修正することをご検討ください。	バリデーション終了後に実試料中に薬物と類似した構造を有する未知のIsoformが存在していることが判明した場合や、バリデーション実施時に、類似物質の一部が入りできない場合等に、分析法バリデーション終了後に特異性を評価することが考えられ、必ずしも実試料分析前に限定されるものではないと考えています。	
30	3	特異性	98-100	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)、ブランク試料に想定される濃度の類似物質を添加した試料、並びに低濃度及び高濃度付近の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。	この記載は抗体薬については該当しないことを明確にいただきたい。(内因性抗体を含む血清マトリックスを用いた特異性の検討など)	科学的妥当性を考慮して実施の要否を判断して下さい。	
31	3	特異性	93	類似物質	類似物質とは具体的にどの様な物質が考えられるのでしょうか。EMAガイドライン[2]と同じものと考えてよろしいでしょうか。	薬物の特性に応じて判断して下さい。	
32	3	特異性	91-112		特異性評価と選択性評価の違いを明らかにするため、対象としている物質を例示してはどうでしょうか(特に選択性が)。	クロマトグラフィー法では特異性と選択性が混同されてきた歴史があり、両者の違いを正確に理解できていないケースがあるように感じます。適切なバリデーションを実施するためにも、どのような状況を想定したバリデーション項目なのか、ガイドライン中かQ&Aで説明が必要と思われるます。	特徴の記載は必要ないと考えます。
33	3	特異性 選択性	99, 108	特異性L.99 「低濃度及び高濃度付近のQC試料」 選択性L.108. 「定量下限付近のQC試料」	QC試料の濃度設定の表現について、特異性ではL.99「低濃度及び高濃度付近のQC試料」とありますが、選択性ではL.108「定量下限付近のQC試料を用いて評価する。」となっております。低濃度付近と定量下限付近が同じ意味であれば、表現を統一いただき、違いがあるのであれば、その違いを説明いただけないでしょうか。	特異性の項は、「定量下限付近及び検量線の定量上限付近」に修正しました。	
34	4	選択性	108	定量下限付近のQC試料を用いて評価する。	「付近」を削除してください(特異性項目と同様のコメントです)。:「付近」というのは、LLOQ又はLQCIいずれかのQCで評価すれば良いという事か、それとも「両方」が基準を満たしている必要があるのか不明瞭です。	原則としてLLOQ付近の濃度でよいと考えますが、各施設にて科学的に判断してください。	
35	4	選択性	109	「10個体より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」	最低限の個体数を示してほしい	希少なマトリックスなので、必要最低限の個体を確保する目安があると試験実施時に有用なので。	最低個体数を一律に規定することはできないので、原文のままとします。
36	3	選択性	111	「定量下限付近のQC試料」	「定量下限付近又は定量下限のQC試料…」を提案する。	「定量下限付近のQC試料」の意味は、「定量下限付近又は定量下限のQC試料」です。	

37	4	選択性	112	(定量下限の場合は±25%以内)	LLQやLQと限定せず、「付近」としたのには特別な理由がございませうか。現行の記載ですと、検討には低濃度又は定量下限のQC試料、高濃度又は定量上限のQC試料、それぞれどちらを用いてもよいとの理解でよいでしょうか。	(付近、と記載してはいるがクライアントにはLLQ及びULQも記載しているため)	「定量下限付近」に修正しました。定量下限付近又は定量下限のQC試料、それぞれどちらを用いてもよいとの理解で差支えありません。
38	3	選択性	104-110		疾患由来マトリックスの使用や、溶血あるいは高脂質マトリックスの使用を追加する、あるいはQ&Aで対応してはいるかがでしょうか。	必要により疾患由来マトリックス(適用する病態の患者から採取したプラークマトリックス)、血液を添加した溶血マトリックスや高脂質マトリックスを使用した場合の選択性を確認した方がよいと考えます。	Q&AのQ8で解説しました。
39	4	選択性	108, 111	「定量下限付近のQC試料」	「定量下限付近のQC試料」を「低濃度またはそれ以下の濃度のQC試料」に変更することを提案します。		「定量下限付近のQC試料」の意味は、「定量下限付近又は定量下限のQC試料」です。
40	4	選択性	111-112	ブランク試料の80%以上が定量下限未満を示し、...	内因性物質は適用範囲外と考えて良いか?		内因性物質はブランク試料の評価基準の適用外と考えて差し支えありません。Q&AのQ1, Q9, Q13をご参照下さい。
41	4	検量線	117	「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...」	「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...」の部分は、バリデーションで妥当性が確認されていれば異なるマトリックスでもよいことを記載するよう提案する。		「可能な限り」と記載しているため、原文のままとしました。
42	4	検量線	117		薬物のリガンド-結合物質の濃度が高い場合で、遊離薬物と結合型薬物を分けて分析することが要求される場合には、「実試料と同じマトリックス」の検量線を使用するのは誤りである。(see Staack, Jordan, Heinrich, Bioanalysis, 2012 Feb;4(4):381-95 for the theoretical considerations and Staack, Jordan, Dahl, Heinrich, Bioanalysis, Nov 2013, 1-12 for a practical "free analyte QC approach"). 本ガイドラインは代替マトリックスの使用を許容しているようであるが、もっと明確に記載されることが望ましい。さらに、非特異的なマトリックス効果が無いことが示されている場合は、薬物のターゲットを含まない緩衝液で作成する検量線も選択肢として記載するべきである。代替マトリックス及び緩衝液の検量線について明確な記載を含めることを提案する。		ガイドラインとしては原文の記載で十分と考えます。
43	4	検量線	117	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、	他の記載(78~79行目, 164~165行目)にあわせ、「可能な限り実試料に近いマトリックス」としてはいるかがでしょうか。代替マトリックスは同じではないため、表現に違和感を感じます。		原文のままでも問題ないと判断しました。
44	4	検量線	118	「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。」	以下のように変更することを勧める。「検量線は、定量下限及び定量上限を含むアンカーポイントでない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。」		誤認される可能性は低いので、原文のままとしました。
45	4	検量線	118	6濃度以上の検量線	「ゼロ以外の6濃度の検量線」というアプローチは、他の選択肢を限定する。通常のELISAの精度では2重測定を勧める。また、新規の技術による分析法では6濃度より少ない検量線から定量値を算出することが可能になるかもしれない。ガイドラインは検量線作成についてより柔軟性を持つべきである。最少濃度数を記載する必要はないのではないか。「検量線は、LLQ, ULQ, QC及びブランク試料を含む適切な数の濃度...」を提案する。		通常6濃度の検量線試料は必須であると考えますが、それより少ない検量線試料を使用する場合にはバリデーションで妥当性を示す必要があります。
46	4	検量線	119	~、及びブランク試料から構成される。	低分子QIと記載を統一するために以下線部を追加して明確にしてはいるかがでしょうか。~、及びブランク試料から構成される。回帰式の算出にはブランク試料を用いない。他 類似意見1件		回帰式の算出にはブランク試料の応答変数を差し引いた値を用いて回帰式を求める場合があります。
47	4	検量線	121		「濃度とレスポンスの関係を適切に示す最も単純な回帰モデルをフィッティングに使用する」の記載追加を提案する。		必ずしも最も単純な回帰モデルである必要はないと考えます。
48	4	検量線	121	~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。	市販のキットなどは必ずしも4 or 5-ロジスティックモデルではないため、以下のように変更してはいるかがでしょうか。素案には記載がございましたが、もし削除するのでしたらその理由を教えてください。: ~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が、これに限定されない。	市販のキットなどは必ずしも4 or 5-ロジスティックモデルではない	「一般的」という記載で十分であると考えます。
49	4	検量線	117-122		検量線中にも最低2wellで行うことを明記してはいるかがでしょうか。~アンカーポイントを設定しても良い、プレートを用いるリガンド結合法の検量線用標準試料の測定では、1試料あたり少なくとも2穴(2 wells)で測定し、平均値を試料の値とする。	プレートを用いるLBAの検量線においても2wellで行うことを明確にするため。	検量線用の標準試料も少なくとも2穴で測定します。誤認される可能性は低いので、原文のままとしました。
50	4	検量線	125~	「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濃度以上が上記の基準を満たすものとする。」	以下のように変更することを勧める。「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濃度以上が上記の基準を満たすものとする。判断基準に合わない及び原因を突き止められるもの以外の理由でCalibratorを除外することは推奨しない。」		本文への記載の必要性は低いので、原文のままとしました。
51	4	検量線			以下の文章を追加することを提案します。「特定可能な操作ミス(例、ピペティングエラー)があった場合、検量線用標準試料を検量線作成から除いてもよい」ただし、2つ連続した濃度の検量線用標準試料を除くことはできない。		各施設が科学的に判断すべきでありガイドラインへの記載は必要ないと考えます。
52	4	真度及び精度	133	QC試料は、実分析時と同様の方法で処理したものを使用する。	例えば、実分析時に凍結融解をする場合はQC試料も同様に凍結融解することなどを示しているのでしょうか。具体例を挙げて説明いただけませんか。		実試料の保存等の処理条件はバリデーション結果をもとに決められること、バリデーションでの真度精度評価時には安定性を確保できる保存条件が明らかになっていない場合があること等から、「4.1.4. 真度及び精度」の本文から「QC試料は、実分析時と同様の方法で処理したものを使用する。」を削除しました。実試料分析のQC試料に関しては、本文「5.2 QC試料」に「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」という記載があり、QC試料を実試料と同様の方法で処理することが求められます。なお、凍結融解の安定性が保証されている場合には、必ずしもQC試料を凍結する必要がない場合もあると考えます。

53	4	真度及び精度	134	最低5濃度のQC試料を調製する。	他の箇所「低濃度」「高濃度」という記載があるが、これらは個々に記載されている濃度の定義と同じと考えてよいか？	濃度の定義をしておかないと、異なる定義で濃度設定がされる可能性が考えられるので。	本ガイドラインで「低濃度」と記載がある場合は、すべて「4.1.4真度及び精度」の項で定義された意味と同じです。「高濃度」も同様です。
54	4	真度及び精度	136	「高濃度は検量線の定量上限の」	定量上限は検量線の上限を指すものであり、表現が重複しています。「高濃度は検量線の定量上限の」→「高濃度は定量上限の」		検量線の上限を超えても、希釈して定量できれば定量上限ということも可能ですので、誤解がないように「検量線の定量上限」と記載しました。
55	4	真度及び精度	136	高濃度は検量線の定量上限の1/3以上であるものとする	「高濃度は検量線の定量上限の1/3以上であるものとする」の1/3は上限濃度の1/3(例:上限90 ng/mLの1/3 = 30 ng/mLのように読み取れますが、低すぎないでしょうか。定量上限の75%以上とするのが適当と思われま。高用量について、どういった観点で濃度を設定すべきか不明確かと思えます。定量上限の1/3以上と設定した根拠についてお聞かせいただけないでしょうか。他 類似意見4件	一般的に上限濃度の75～80%に設定されると考えられます。クロマトグラフィー法のガイドラインでも75%以上とされています。	Q&AのQ10で解説しました。
56	4	真度及び精度	137-138	分析単位内及び分析単位間の真度及び精度は、少なくとも6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。	分析単位内についての真度及び精度も、各濃度あたり少なくとも6回の繰り返し分析をすることによって評価されるという意味か？分りづらいつ文章なので、低分子のクロマトグラフィーのガイドラインと同様に、分析単位内と分析単位間で分けて記載した方が分かりやすいのではないかと。他 類似意見2件		Q&AのQ11で解説しました。
57	4	真度及び精度	142	～(トータルエラー)は、30%以下でなければならない。ただし、～40%以下とする。	①真度と精度の個別の許容基準を足し合わせたものよりも厳しい値を要求する必要があるでしょうか？トータルエラーの概念の必要性も含め補足説明の追加をお願いしたいです。		Q&AのQ12で解説しました。
58	4	真度及び精度	142	～(トータルエラー)は、30%以下でなければならない。ただし、～40%以下とする。	②L137で分析単位内の繰り返し測定が仮にn=6という意図でしたら、トータルエラーに関する記載は不要と考えます(低分子QLでも記載は無い)。		Q&AのQ12で解説しました。
59	4	真度及び精度	142	～(トータルエラー)は、30%以下でなければならない。ただし、～40%以下とする。	③トータルエラーに関する記載は素案には無かったのですが、復活した理由がございましたら説明いただきたいです。L137で分析単位内の測定数が仮にn=(dupli平均)であるならば、この記載はそのままで問題ないとは考えます。いずれにしても、L137とL142の記載が不明確であり、誤解を招くため変更していただきたいです。		Q&AのQ12で解説しました。
60	4	真度及び精度	137-138	分析単位を少なくとも6回以上	分析単位を少なくとも6回以上ありますが、複数の日にわたって分析単位を実施することを明記してほしいかがでしょうか(少なくとも2日以上、等)。	日間変動を評価することが必須と考えられるため。	実試料分析の変動要因を考慮して、判断すべきと考えます。
61	4	真度及び精度	137-138	分析単位内及び分析単位間の真度及び精度は、少なくとも6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。	異なる分析日あるいは分析者について言及されていません。例えば、2日以上異なる分析日や2名以上の異なる分析者による検討についても記載してほしいかがでしょうか。		実試料分析の変動要因を考慮して、判断すべきと考えます。
62	4	真度及び精度	141-143	薬物又はその代謝物の生体試料中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。	トータルエラーについては、「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(薬食審査0711第1号 平成25年11月11日付)では明示されていませんが、当該ガイドラインのみ基準を設定した理由についてご教示いただけないでしょうか？		Q&AのQ12で解説しました。海外においても、リガンド結合法のバリデーションではトータルエラーを判定基準に含める例が多く、トータルエラーの設定は、実態を踏まえつつ、国際的整合性を加味したものです。
63	5	希釈直線性	148-149	希釈直線性は、定量上限を超える試料及びこの試料をブランクマトリックスで段階希釈した複数濃度の試料を分析することによって評価する。	段階希釈した複数濃度での評価は必須か？例えば、一段階希釈の単一濃度の評価でも許容されるのか？		段階希釈した複数濃度での評価は必須と考えます。
64	5	希釈直線性	148-149	希釈直線性は、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。	「想定される濃度範囲を考慮して、定量上限を超えるQC試料を作成し、ブランクマトリックスで複数の濃度に段階希釈した試料を分析して評価する」ことで良いでしょうか。		ご意見の通りの評価方法で問題ないと考えます
65	5	希釈直線性	148-149		繰り返し分析の回数を追記することをご検討ください。		科学的妥当性を考慮して、繰り返し数を設定してください。
66	5	希釈直線性	149-151	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する。その際に、フック効果又はプロゾーンの認められた場合には、それらの影響が実試料分析に及ぼすリスクを排除するための手段を講ずる必要がある。すなわち、実試料分析に影響を及ぼさないような手段を考慮したり、フック効果又はプロゾーンの排除するため、それらの効果を超える程度まで試料が十分に希釈されていることが示されるように複数の割合で希釈した試料を用いて測定する必要がある。」としてどうか	「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する。その際に、フック効果又はプロゾーンの認められた場合には、それらの影響が実試料分析に及ぼすリスクを排除するための手段を講ずる必要がある。すなわち、実試料分析に影響を及ぼさないような手段を考慮したり、フック効果又はプロゾーンの排除するため、それらの効果を超える程度まで試料が十分に希釈されていることが示されるように複数の割合で希釈した試料を用いて測定する必要がある。」としてどうか	フック効果又はプロゾーンの排除するため、それらの効果を超える程度まで試料が十分に希釈されていることが示されるように複数の割合で希釈することに言及した。	実試料分析に影響を及ぼさないような手段として、ご指摘のような方法が考えられますが、これに限られるものでもなく、ケースバイケースでの判断が必要となることから、本文には記載しないこととします。
67	5	安定性	160	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。	「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及び凍結融解回数で評価する。」を提案する。		「期間」には、「凍結融解回数」の意味も含まれると考えてください。
68	5	安定性	164	抗凝固剤や添加剤を含め	「分析法バリデーションに用いるマトリックスは、分析対象の実試料にできるだけ近いものを使用する。異なる抗凝固剤や添加剤を使用した場合は、追加のバリデーションの必要性について科学的な検証が必要である」としてはどうか	抗凝固剤のような低分子物質は、希にリガンド結合法に影響を与えるため	「4.2 パーシャルバリデーション」で言及しています。
69	5	安定性	165	各濃度あたり少なくとも3回の繰り返し分析	安定性を評価するために必要な最低限の測定回数の記載を削除してはどうか	「繰り返し」という表現は不明瞭である。「3回の分析」とは、1濃度についてのみマイクロプレートの3穴の測定と解釈できる。また、「3濃度の分析」とは、3濃度につきマイクロプレートの2穴の測定が3回と解釈できる。この表現が後者の意味であるならば、現在の表現ではその意味ずるとおり安定性試験を行うことは困難であるとする。	3穴でなく、3回分析することを意図しています。誤認される可能性は低いので、原文のままとしました。
70	5	安定性	166		「安定性の評価のためのQC試料(保存前及び保存後)の測定に使用する検量線試料は新しく調製したものを使用しなければならない。」の追加を提案する。		各施設が科学的に判断すべきでありガイドラインへの記載は必要ないと考えます。



71	5	安定性	162-163	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、最高濃度及び最低濃度の溶液を用いる。	低分子のクロマトグラフィーのガイドラインでは最低濃度付近と異なっている。特に理由がなければ、低分子のクロマトグラフィーのガイドラインに合わせても良いのではないかと。		最高濃度及び最低濃度に限定する必要はないため、「付近」を入れました。
72	5	安定性	162-163		実際に保存する溶液が1濃度の場合はその濃度だけを実施するという理解で良いでしょうか。		実際に保存する溶液が1濃度の場合はその濃度だけを実施します。
73	5	安定性	162-168		安定性試験でQC試料を分析するときは新たに調製した検量線試料(凍結してないもの)を用いることを追記することを提案します。		各施設が科学的に判断すべきでありガイドラインへの記載は必要ないと考えます。
74	5	バーシヤルバリデーシオン	174	「バーシヤルバリデーシオ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、…」	用語解説とセクション3.2に記載されている分析法の他施設への移管に関するバーシヤルバリデーシオンの定義に齟齬がある。分析法の移管をバーシヤルバリデーシオンで許容することを目的としているのであれば、以下のように変更することを勧める。「バーシヤルバリデーシオンを実施する典型的な事例として、バリデーシオンされた分析法の他施設への移管、分析機器の変更、…」		「既にフルバリデーシオンを実施した分析法」という記載があるので、修正は不要と考えます。
75	5	バーシヤルバリデーシオン	175	重要試薬のロットの変更	「重要試薬の大幅な変更」としてはどうか	通常、重要試薬のロット番号の変更のためにバーシヤルバリデーシオンは行わない。ロット番号の変更の場合、バーシヤルバリデーシオンの報告書ではなく、当該測定法の生データの1つとして文書化されるような試験によって評価される。重要試薬(例えば、異なるクローンから得たモノクローナル抗体)の大幅な変更に基づくバーシヤルバリデーシオンの実施であれば適切と考える。	原則としてバーシヤルバリデーシオンが必要で。
76	5	バーシヤルバリデーシオン	175	重要試薬のロットの変更	「重要試薬のロットの変更」はバーシヤルバリデーシオンに含めるべきではない。実試料測定に先立って評価を実施し、原データとして記録しておくべきである。		原則としてバーシヤルバリデーシオンが必要で。
77	5	バーシヤルバリデーシオン	175	定量範囲の変更、MRDの変更、抗凝固剤の変更、…	MRDの変更がバーシヤルバリデーシオンの対象になるなら、バリデーシオン項目にもMRDを含めるほうが良いと考えます。		MRDは分析条件の一つであり、バリデーシオン項目ではありません。
78	5	バーシヤルバリデーシオン	172-173	バーシヤルバリデーシオ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。	変更の程度によってはフルバリデーシオンが必要な場合もある。という理解で良いでしょうか。そのような記載にしてはいかがでしょうか。例:〜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、一部で済む場合からはほぼフルバリデーシオンが必要な場合まであり、適切に設定する。	「〜程度とその性質により設定する。」というところがあいまいでわかりにくい。	「分析法の変更の程度とその性質に応じて設定する」の記載により、フルバリデーシオンの必要があることを否定していないので、原文のままとします。
79	5	バーシヤルバリデーシオン	174-177	バーシヤルバリデーシオ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、重要試薬の変更、…	市販キットで、当該ロットの品質保証書(測定データ)がある場合、バーシヤルバリデーシオンは不要と考えて良いか?		市販キットで、当該ロットの品質保証書(測定データ)がある場合でも、バーシヤルバリデーシオンは原則として必要で。
80	6	クロスバリデーシオン	189	各濃度で少なくとも3回の繰り返し分析	「3回」の意味が不明瞭なので、もう少し具体的に記載してはどうか	L165に対するコメント参照	3回分析することを指しています。誤読される可能性は低いので、原文のままとしました。
81	6	クロスバリデーシオン	187-190	3回の繰り返し分析	QC試料を使用する場合は3回の繰り返し分析をするのに対して、実試料は1回の分析となっている。この理由が明確ではない。「3回の繰り返し分析」を削除し、QC試料の分析も1回の繰り返しとするよう提案する。		実試料は複数の試料を分析できることから繰り返し分析は必要ないと考えますが、QC試料は繰り返し分析により平均真度を確認するべきと考えます。
82	6	実試料分析	195		このセクションでは「検量線範囲を超える実試料の濃度を検量線の外挿によって算出することを許容しない」ことを記載するべきである。		御指摘の内容までを記載する必要性は低いと考えます。
83	6	実試料分析	196	「トキシコキネティクス試験」	「トキシコキネティクス試験」を「非臨床薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験」と修正してはいかがでしょうか。		非臨床薬物動態試験への本GLの適用は必須とはしていないため、本文には記載しません。
84	6	実試料分析	199	6濃度以上の検量線	「ゼロ以外の6濃度の検量線」というアプローチは、他の選択肢を限定する。通常のELISAの精度では2濃度測定を勧める。また、新規の技術による分析法では6濃度より少ない検量線からも定量値を算出することが可能になるかもしれない。ガイドラインは検量線作成について柔軟性を持つべきである。最少濃度数を記載する必要はないのではないかと、「検量線は、LLOQ、ULOQ及びブランク試料を含む適切な数の濃度…」を提案する。		通常6濃度の検量線試料は必須であると考えますが、それより少ない検量線試料を使用する場合にはバリデーシオンで妥当性を示す必要があります。
85	6	実試料分析	201	1試料あたり少なくとも2穴	複数のウェルで測定した試料の評価基準を記載するよう提案する。		フルバリデーシオンに関するQ&AのQ8で解説しました。
86	6	実試料分析	201	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。	2穴のデータが得られなかったとき(一方が定量下限未満又は定量上限超過、あるいは一方で操作ミスが明らかな場合など)の対応については、施設ごとにSOP若しくは各計画書等で定めることよろしいでしょうか。確認したいです。		フルバリデーシオンに関するQ&AのQ6で解説しました。
87	6	実試料分析	205	プレート分析単位とする。	この記載を、3分析法バリデーシオン の本文中にも加えたほうが良いと考えます。		用語解説の「分析単位」を参照ください。
88	6	実試料分析	200-203	なお、プレートを使用するリガンド結合法では…	「なお、プレートを使用するリガンド結合法では…」はバリデーシオンの項(3.1項)に記載しておくのが望ましい。バリデーシオンでは実試料測定と同じ条件で測定しておくことを明記してはどうでしょうか。(213行のように)		原文の記載で問題はないと考えます。
89	6	実試料分析	202~	「…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。」	以下のように変更することを勧める。「…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。バリデーシオンに使われたのと同じ算出方法を用いて試料の定量値を求める。」		御指摘の内容までを記載する必要性は低いと考えます。
90	6	検量線	217-219	アンカーポイントには真度の基準を設けない。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。	検量線用標準試料とアンカーポイントの除外基準について、事前に定義すべきであることを記載してはいかがでしょうか。		科学的妥当性を考慮し、必要に応じて、あらかじめ各施設の手順書、各試験の計画書等で定めておくべきです。

91	6	検量線	215	「定量下限及び検量線の定量上限」	表現が重複しています。「定量下限及び検量線の定量上限」「定量下限及び定量上限」もしくは「定量下限及び検量線の定量上限」	「定量上限」は、検量線の定量範囲、及び、希釈直線性の検討結果を考慮して、分析可能な濃度範囲の上限とし、「検量線の定量上限」は、検量線の定量範囲の上限として、用語を区別しています。検量線の上限を超えても、希釈して定量できれば定量範囲内ということも可能ですので、誤解がないように「検量線の定量上限」と記載しました。
92	6	検量線	218	6濃度以上の検量線	「ゼロ以外の6濃度の検量線」というアプローチは、他の選択肢を限定する。通常のELISAの精度では2重測定を勧める。また、新規の技術による分析法では6濃度より少ない検量線からも定量値を算出することが可能になるかもしれない。ガイドラインは検量線作成についてより柔軟性を持つべきである。最少濃度数を記載する必要はないのではないが、「検量線は、LLOQ、ULOQ及びブランク試料を含む適切な数の濃度・・・」を提案する。	通常6濃度の検量線試料は必須であると考えますが、それより少ない検量線試料を使用する場合にはバリデーションで妥当性を示す必要があります。
93	6	検量線	211-214		検量線試料の調製法を明記することをご検討ください(例:用時調製)。	御指摘の内容までを記載する必要性は低いと考えます。検量線試料の調製法は科学的妥当性を考慮して判断して下さい。
94	6	検量線	217~	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。	以下のように変更することを勧める。「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。判断基準に合わない及び原因を突き止められるもの以外の理由でCalibratorを除外することは推奨しない。」	各施設が科学的に判断すべきでありガイドラインへの記載は必要ないと考えます。
95	7	QC試料	230	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。	以下のように変更することを勧める。高濃度は検量線の定量上限の3分の2以上と設定される。」	Q&AのQ10で解説しました。
96	7	QC試料	230-231	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。	QC試料を実試料と同様に保管することを含めることを提案します。「QC試料は実試料とともに保管し、実試料と同様に処理する」	QC試料は実試料とともに保管することを本ガイドラインでは要求はしません。
97	7	QC試料	231-232	分析するQC試料の数としては、各濃度	分析単位内の実試料数の5%を設定した理由を教えてください。	実態を踏まえつつ、国際的整合性も加味したものです。
98	7	ISR	236	ISR	ISRを実施するにあたり、最低限の試料数はどの程度か？(低分子のクロマトグラフィーのガイドラインでも記載はないが)	ガイドライン本文に記載のとおり、試料数は実試料の約10%とし、最低限の本数は特に規定しません。
99	7	ISR	249-250	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。	ISRを実施する実試料には投与後採取試料を用いることを明記してはいいかがでしょうか(約10%あるいは約5%に相当するISR試料は投与前の個体を含まない)	ISRの対象は、投与後採取した定量下限以上の試料です。
100	8	定量範囲	267-268	希釈直線性範囲を適切に設定	「希釈直線性範囲を適切に設定」は具体的にどのように注意して行うのか、Q&A等で例示していただくよう要望します。	希釈直線性の範囲は予想血中濃度を考慮して、設定すればよく、例示する必要はないと考えます。
101	8	再分析	273-288		再測定は実試料分析の項に移してはいいかがでしょうか。	再分析は分析法バリデーションにも関係するので、原文のままとします。
102	8	再分析	286-288	「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。」	「全ての棄却された測定単位については、その棄却理由とともに報告書に記載すべきである。検量線やQC試料が原因、または繰り返し分析した結果のばらつき(OV)が非常に大きいことが原因で分析単位の棄却となった以外の理由で再測定された試料に関しては、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。」としてはどうか	一般的な理由(検量線やQC試料が基準を満たさない)のために分析単位が棄却された場合や、繰り返し分析した結果のばらつきが大きい測定結果が棄却されたときは、これにより影響を受けた試料として報告書に記載することは希である。棄却された分析単位や棄却理由については報告書に記載するが、棄却された測定単位に含まれる試料を特定して報告書に記載することはあまりないため。
103	8	キャリーオーバー	290		バリデーションにおいてキャリーオーバーを評価しても良いことを追加してはいいかがでしょうか。	バリデーションにおいてキャリーオーバーを評価しても問題ありません。本文は原文のままとします。
104	9	クロストーク	300		クロストークは分析法開発時に考慮すべき項目であることを明記してはいいかがでしょうか。	評価時期をガイドラインに記載する必要はなく、適切な時期に行えばよい。本文には記載しません。
105	9	重要試薬	313	重要試薬のロット変更の際には原則としてバーチャルバリデーションが必要である。	ロット変更の際にバーチャルバリデーションが必要とされている。「試薬のロット変更の際には性能を確認及び比較するべきであるが、バーチャルバリデーションを実施する必要はない」ことを提案する。	原則バーチャルバリデーションの必要があると考えます。
106	9	重要試薬	313-314	重要試薬のロット変更の際には原則としてバーチャルバリデーションが必要である。	市販キットで、当該ロットの品質保証書(測定データ)がある場合、バーチャルバリデーションは不要と考えて良いか？	原則バーチャルバリデーションの必要があると考えます。
107	9	重要試薬	313-314	重要試薬のロット変更の際には原則としてバーチャルバリデーションが必要である。	「重要試薬のロットが変更される場合、新しいロットの適合性が確認される。その確認の結果は、いずれかの書類に記録される。バーチャルバリデーションは、重要試薬の大幅な変更(例えば、異なるクローンから得たモノクローナル抗体が使用された場合)に基づき実施されることがある。バーチャルバリデーションの必要性については科学的な判断が重要である。」としてはどうか	175行目に対するコメント参照。通常、重要試薬のロット番号の変更のためにバーチャルバリデーションは行わない。ロット番号の変更の場合、バーチャルバリデーションの報告書ではなく、当該測定法の生データの1つとして文書化されるような試験によって評価される。重要試薬(例えば、異なるクローンから得たモノクローナル抗体)の大幅な変更に基づくバーチャルバリデーションの実施であれば適切と考える。
108	9	干渉物質	316		このセクションは冗長である。特異性の項目ですでに述べられている。可溶性リガンドや抗薬物抗体に関する記載を特異性の項目に含め、本項は削除することを提案する。	干渉物質と類似物質は異なる概念ですので、原文のままとします。
109	9	干渉物質	316-320		3.1.フルバリデーションの項下に移してはいいかがでしょうか。	フルバリデーション実施時に考慮すべき内容のため。
110	10	報告書の作成と記録等の保存	341	バリデーション報告書、再分析に関する情報	再分析は操作ミスのときに限ることを明記してください。	干渉物質は、フルバリデーション必須の項目ではないため、「4.1 フルバリデーション」の項下には移しません。再分析は操作ミスの時に限られるものではありません。

111	10	報告書の作成と記録等の保存	342	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	「試験結果」という表現は、バリデーションの結果に対する影響を意味しているのであれば、以下の文章に変更してはどうか。 「計画書及び手順書からの逸脱事項並びに測定法バリデーションの結果に対する影響」	「試験結果」という表現は、(非)臨床試験の検体の分析結果とも読み取れる。(非)臨床試験の検体は通常バリデーションの際には測定されない。この表現が本当に(非)臨床試験の検体の測定結果を意味しているのであれば、その説明が必要である。	誤認される可能性は低いので、原文のままとした。
112	10	報告書の作成と記録等の保存	345		ISRを実施した場合の結果及びISRがfailed場合の調査結果は報告書に含めなくてよいでしょうか。		ISRの結果などに関しては、実試料分析報告書の「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」に含まれているという理解です。
113	10	報告書の作成と記録等の保存	345	実試料分析報告書	実試料分析報告書に、ISRの結果を記載するべきである。		ISRの結果などに関しては、実試料分析報告書の「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」に含まれているという理解です。
114	10	報告書の作成と記録等の保存	334-336	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	記載が不明瞭なので、もう少し具体的に記載してはどうか	これらに関して、どのレベルまでの情報を報告書に記載すべきか不明瞭である。	詳細は、ガイドラインには書く必要がないと考えます。
115	10	報告書の作成と記録等の保存	348-351	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	記載が不明瞭なので、もう少し具体的に記載してはどうか	これらに関して、どのレベルまでの情報を報告書に記載すべきか不明瞭である。	詳細は、ガイドラインには書く必要がないと考えます。
116	11	検量線	391	6濃度以上の検量線	「ゼロ以外の6濃度の検量線」というアプローチは、他の選択肢を限定する。通常のELISAの精度では2重測定を勧める。また、新規の技術による分析法では6濃度より少ない検量線からも定量値を算出することが可能になるかもしれない。ガイドラインは検量線作成についてより柔軟性を持つべきである。最少濃度数を記載する必要はないのではないか。「検量線は、ULOQ、ULOQ及びブランク試料を含む適切な数の濃度…」を提案する。		通常6濃度の検量線試料は必須であると考えますが、それより少ない検量線試料を使用する場合にはバリデーションで妥当性を示す必要があります。
117	11	検量線	390~	「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…」	以下のように変更することを勧める。「定量下限及び上限を含むアンカーポイントではない6濃度以上の検量線用標準試料及び…」		誤認される可能性は低いので、原文のままとした。
118	12	代替マトリックス	410-413	また、薬物と同じ構造の内因性物質が存在する場合に、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。	BMVガイドライン発出版[1]の適用であった「対象薬物は低分子化合物(内因性物質を除く)」の表現がないことから、本LBAガイドラインは内因性物質を対象とすると考えてよいでしょうか。その場合、内因性物質を含むマトリックスでの検量線や真度・精度、選択性・特異性、安定性等の考え方はどの様にしたらよろしいでしょうか。留意点などもお聞かせいただけないでしょうか。		Q&AのQ1、Q9、Q13で解説しました。
119	12	トータルエラー	424	真度の絶対値と精度の和	トータルエラーの定義は、「相対誤差の絶対値と精度の和」を提案する。		「真度から100%を引いた値の絶対値と精度の和」と修正しました。
120	13	MRD	462-464	MRD	MRDについて現行表記だと、試料の濃度が高い場合でもMRDにて希釈しなければならぬ誤解を受けやすくなります。「試料を適切に分析するために、緩衝液で試料(検量線用標準試料やQC試料も含む)を希釈する最小の倍率。すべての試料はMRD以上の倍率で希釈しなければならない。」としてはいかがでしょうか？		試料を緩衝液で希釈する場合は、「MRD以上」ではなく「MRD」となるよう希釈します。
121		その他			【意見】BMVガイドラインでは記載のあった「システム適合性」に関する記載が無いのは何故か？	【理由】「システム適合性」は、BMVでもLBAでも必須と考えられるため。	システム適合性は必須ではありません。
122		その他			本ガイドラインは、トータル薬物濃度のみをカバーしており、正しい遊離薬物濃度測定の必要性について考慮していない。本ガイドラインに遊離薬物濃度に関する概念やガイダンスを記載することは有用である。例として、(Staack, Jordan, Dahl, Heinrich, Bioanalysis, Nov 2013, 1-12)の記載。		御指摘の内容までを記載する必要は低いと考えます。遊離薬物濃度の測定の要否は科学的な妥当性を考慮して判断して下さい。

No.	Item	Comment from AAPS	Answer from BMV Study Group
1	Consolidated	“Method Development, Method Pre-Validation, Method Validation and Method In-study Validation” should be defined and identified as distinct phases in the lifetime of an assay. (See DeSilva et al., 2003)	We do not intend to set any special term definition as these terms are already commonly used in the industry.
2	Consolidated	The document should address a number of things that have been debated by industry and cited in FDA 483s (including but not limited to): whole blood stability, hyperlipidemia testing, hemolysis testing, change in counter-ion, matrix factor, matrix effects, appropriateness of dynamic range for studies with majority of samples >ULOQ.	The current guideline does not require any distinct criteria for the proposed testings; however, issues for hyperlipidemia and hemolysis testings are mentioned in the Q&A no.8.
3	Scope	Line 26 (minor): Clarify that this is not applicable for non-clinical studies	As mentioned in the “Scope” section, this guideline also applies to regulated bioanalysis for toxicokinetic studies even if they are non-clinical ones; therefore we do not intend to revise the body text.
4	Analytical Method Validation	Line 41(minor): Clarify “The method to be validated at every relevant analytical facility” Pertains only to sites where regulated bioanalysis are performed?	“Every relevant analytical facility” pertains only to sites where regulated bioanalysis are performed. We, however, do not clarify this in the body text as this guideline is intended only for the use of regulated bioanalysis.
5	Full validation	Line 46 (minor): Not sure why an analytical method that is “disclosed in literature” would necessitate a Full Validation. Please clarify.	We think that every analytical facility should perform a validation study on its own. This concept also applies in using commercial kits or methods that are disclosed in literature.
6	Full validation	Line 57 (minor) Use of surrogate matrix for QCs allowed)– probably not a good idea Lines 53–57 (Minor): Consider rewording to: “When an analytical method is to be established for a matrix of limited availability (rare matrix, e.g., tissue, cerebrospinal fluid, bile), and a sufficient amount of matrix cannot be obtained, a surrogate matrix may be used to prepare calibration standards and QC samples.”	Line 57: We think the use of a surrogate matrix is allowed as far as it is rigorously justified. Please refer to the Section 4.1. Lines 53–57 were corrected as suggested.
7	Specificity	Lines 69–72 (minor) Specificity is very well defined but the experiments for specificity is confused with selectivity	Specificity experiment should aim at evaluating the effect of structurally-related substances, if present, and we assume the current description would satisfy the requirement.
8	Selectivity	Lines 78–87: For selectivity, the “near-LLOQ QC” sample should be defined. How “near” to the LLOQ should the QC be placed.	The “near-LLOQ QC” sample means a sample at or around the LLOQ. The extent of closeness to the LLOQ should be defined by each facility in scientific consideration.
9	Selectivity	Lines 82–86 (Minor): Selectivity being performed at a concentration “near-LLOQ-QC” may cause confusion. Would request more specifics here especially with respect to the acceptance criteria as well.	The “near-LLOQ QC” sample means a sample at or around the LLOQ. The extent of closeness to the LLOQ should be defined by each facility in scientific consideration.
10	Calibration curve	Line 95 (minor): Suggest using a different term than “blank”… possibly “non-spiked sample.” “Blank” implies that the result should be subtracted out from all other results.	Please refer to the “Glossary” section, where the term “Blank sample” is defined.
11	Accuracy and precision	Line 117, 231: Suggest harmonizing with the FDA guidance to set the high-level QC at 75% of the ULOQ of the calibration curve.	Please refer to the Q&A no.10, where the rationale for high-level QC setting is clarified.