



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

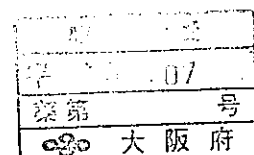
医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法は、臨床薬物動態試験又は非臨床薬物動態試験（トキシコキネティクス試験を含む。）において、体内動態（吸収、分布、代謝及び排泄）、バイオアベイラビリティ、生物学的同等性、薬物間相互作用等の評価に利用されているものですが、一連の分析過程を通して妥当性が適切に確認され、十分な信頼性を有することが必要です。

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



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

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。

4.1.5. 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限り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。

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

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。

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)

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