



第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム

リガンド結合法を用いた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の概要

中村隆広

(株式会社新日本科学)

Summary of the Guideline on Bioanalytical Method (Ligand Binding Assay) Validation

Takahiro Nakamura, PhD, DJSOT

(Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., SNBL)

2014年8月20日(水) 帝京大学 板橋キャンパス

リガンド結合法ガイドライン

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

「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。

本日の内容

1. リガンド結合法とは

2. リガンド結合法ガイドラインの概略

- ①適用, ②対象, ③内因性物質, ④標準物質の管理,
 - ⑤市販キット, ⑥MRD (minimum required dilution) の設定,
 - ⑦特異性の評価, ⑧選択性の評価,
 - ⑨検量線とアンカーポイント, ⑩検量線の回帰式,
 - ⑪真度及び精度, ⑫トータルエラーの評価,
 - ⑬高濃度のQC試料, ⑭希釈直線性の評価,
 - ⑮パーシャルバリデーション(重要試薬とMRD),
 - ⑯ISR (incurred sample reanalysis), ⑰平行性
- 注意事項: クロストーク、重要試薬、干渉物質

リガンド結合法とは

<用語解説>

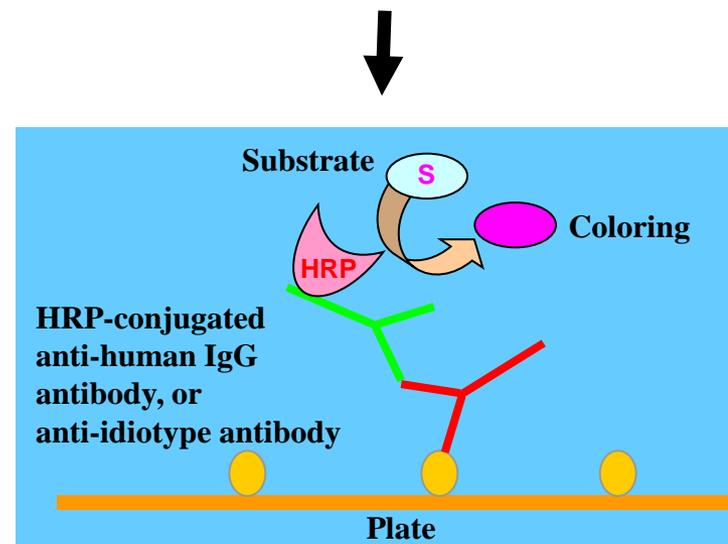
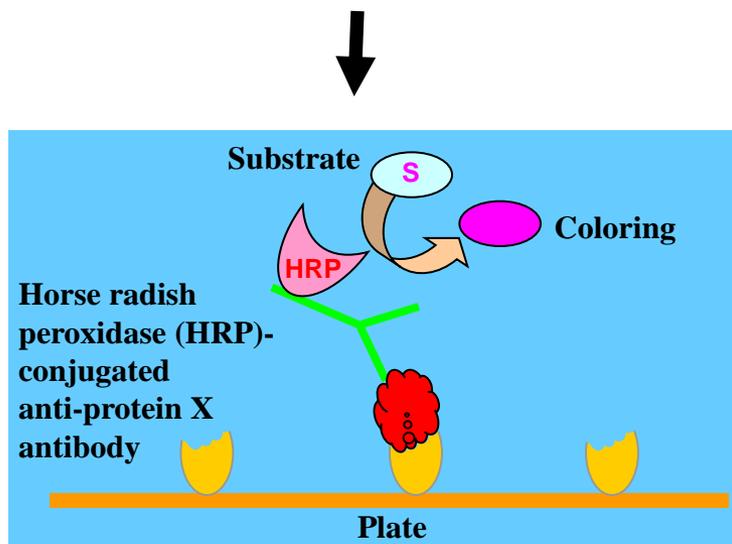
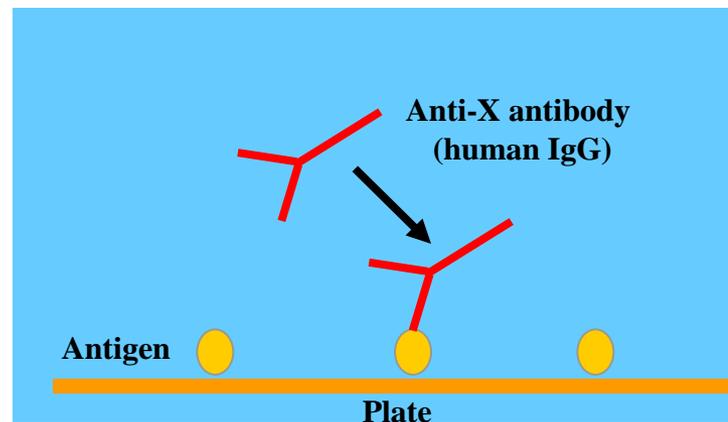
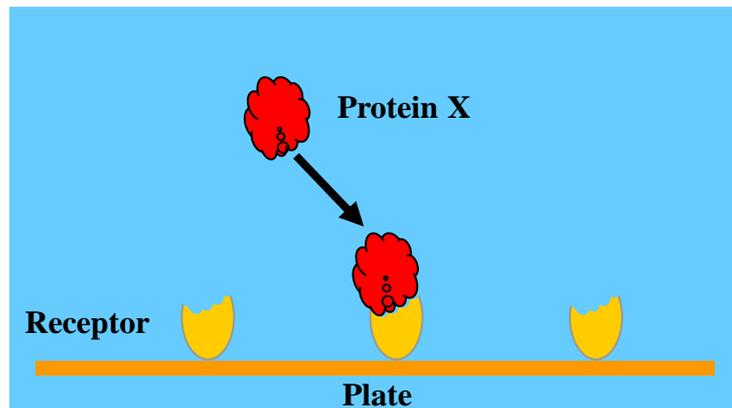
リガンド結合法 Ligand binding assay:

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.

リガンド結合法 → 間接的に分析

抗原・抗体反応や受容体を利用して分析



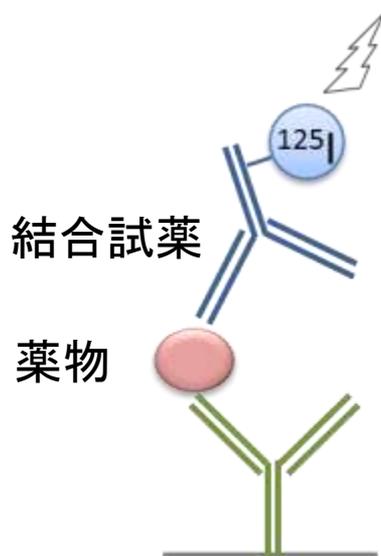
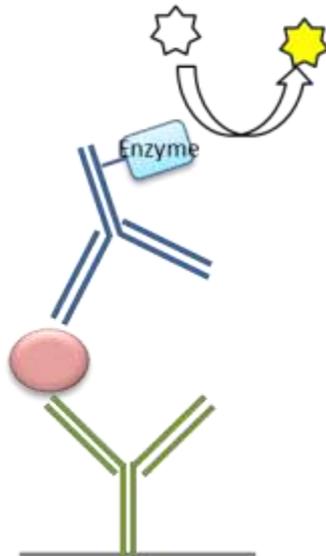
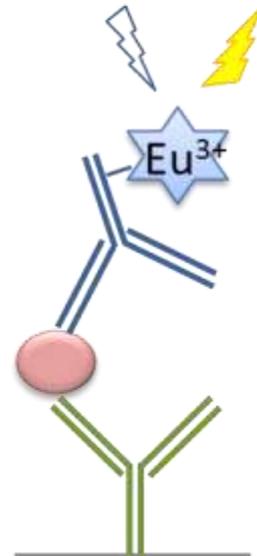
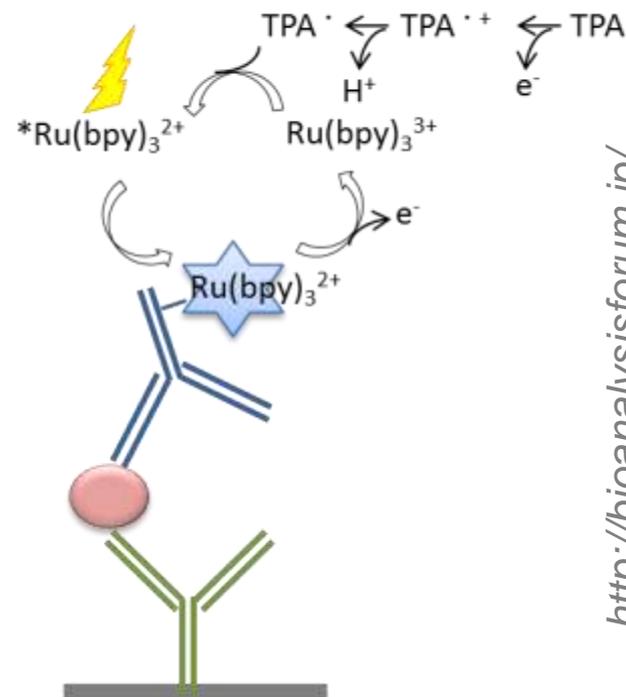
リガンド結合法の例

RIA

ELISA

TRFIA

ECLIA

放射
免疫測定法酵素
免疫測定法時間分解蛍光
免疫測定法電気化学発光
免疫測定法

リガンド結合法 → 重要試薬に依存

①分析対象物質のキャプチャー:

受容体, エピトープ, 抗イディオタイプ抗体等

②分析対象物質の検出:

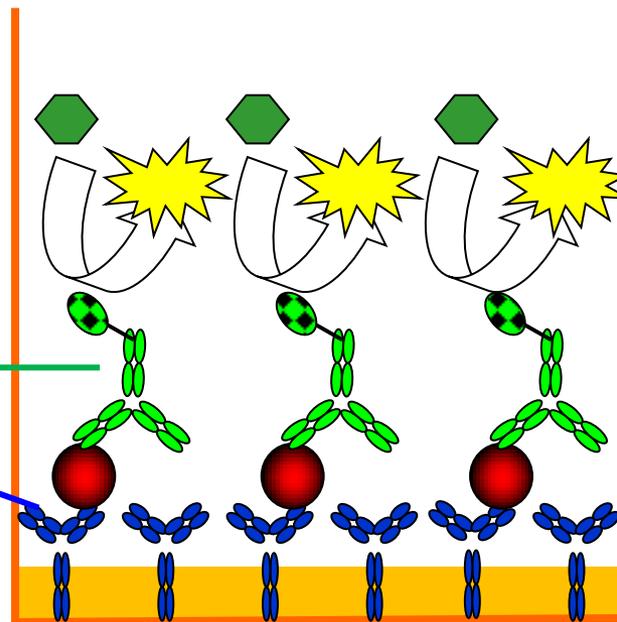
特異抗体(酵素標識等),
抗イディオタイプ抗体等

③発色, 発光等で測定

重要試薬

分析対象物質に結合する試薬

結合試薬に結合する試薬



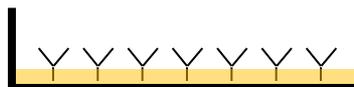
感度や定量範囲は重要試薬に依存

リガンド結合法 → ばらつき易い

1. キャプチャー抗体の固相化



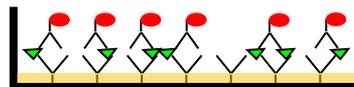
2. ブロッキング



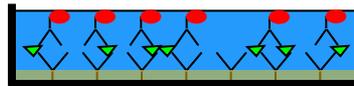
3. 試料添加



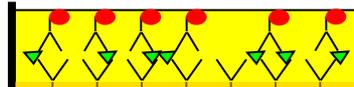
4. 検出抗体添加



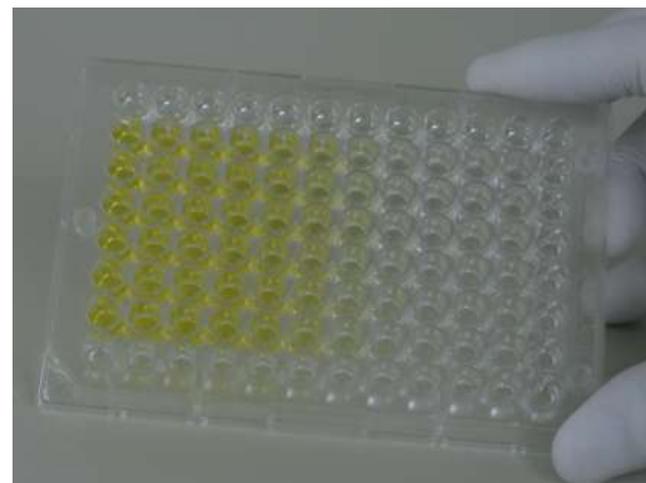
5. 基質発色液添加



6. 停止液添加



7. 吸光度測定



<http://bioanalysisforum.jp/>

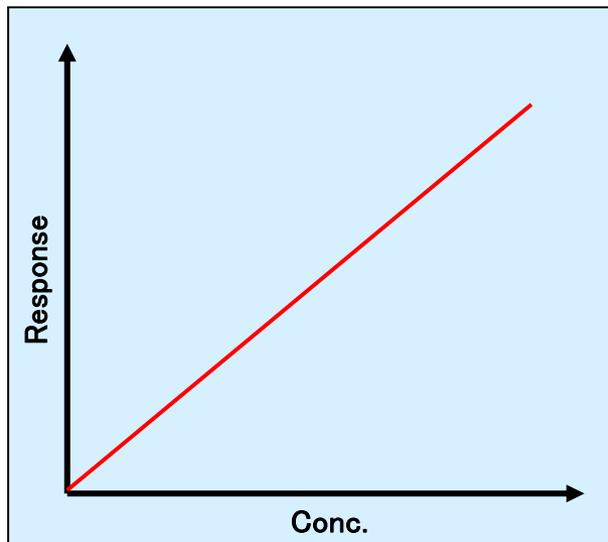
操作が多段階, ほとんど手作業

→ ばらつきの原因

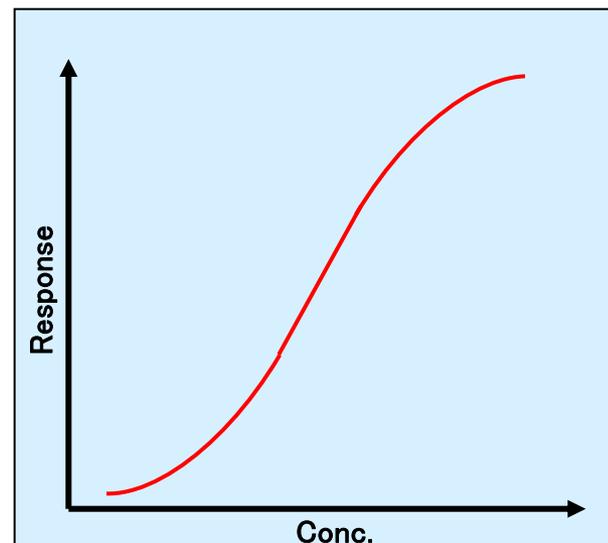
リガンド結合法 → 検量線に定量上限がある

検量線

<LC-MS/MS>



<LBA>



検量線はS字のシグモイド
高濃度で反応が飽和する

リガンド結合法とは

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

<特徴>

- ・ **間接的に**分析
- ・ 感度や定量範囲は **重要試薬**に依存
- ・ **ばらつき易い**(手作業が多い)
- ・ 検量線に **定量上限**がある

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。

分析対象物質である薬物が内因性物質と同じ場合も対象となる。

Q&A: 適用, 検量線

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.

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.

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。

標準物質はその品質が適切に管理されている必要がある。

Q&A: 標準物質(標準品)

標準物質(標準品)は適切に管理されている必要がある。

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。

4.1. フルバリデーション（文献，キット）

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。

文献の分析法や市販キットもフルバリデーションが必要

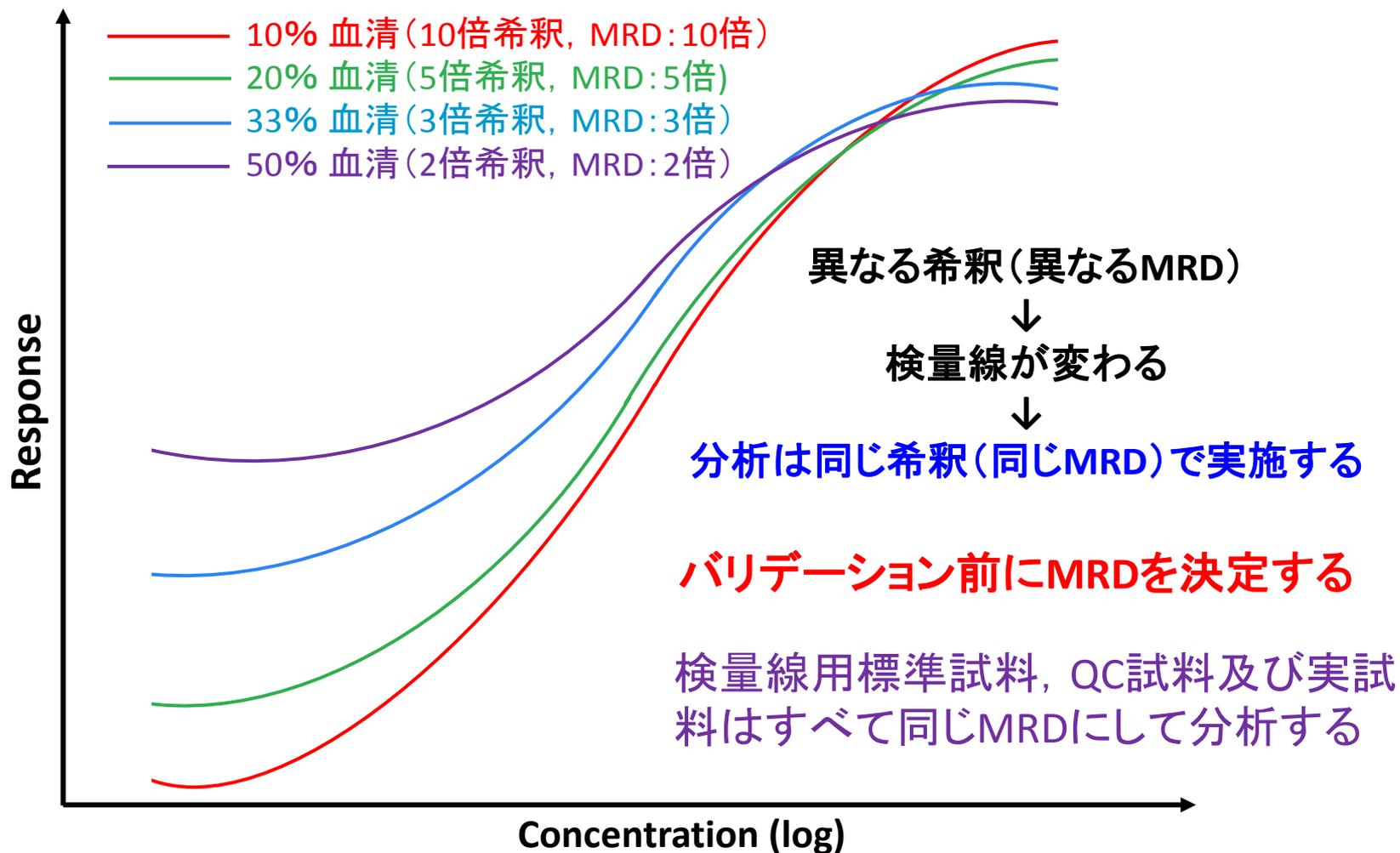
分析法バリデーションは施設ごとに実施する必要がある。
文献等で公開された方法による分析法又は市販キットにおいても同様に各施設でバリデーションする必要がある。

4.1. フルバリデーション (MRD)

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。

フルバリデーションの実施前にMRDの設定が必要である。

MRDとは



4.1.1. 特異性(フルバリデーション)

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。

分析対象物質を類似物質等と識別する特異性を評価する。

＜抗体の場合＞

分析対象物質: 抗X-ヒトIgG

感度: マトリックス中で1 ng/mL程度の抗X-ヒトIgG

マトリックス: ヒト血清(10 mg/mL程度のヒトIgGを含む)

4.1.2. 選択性 (フルバリデーション)

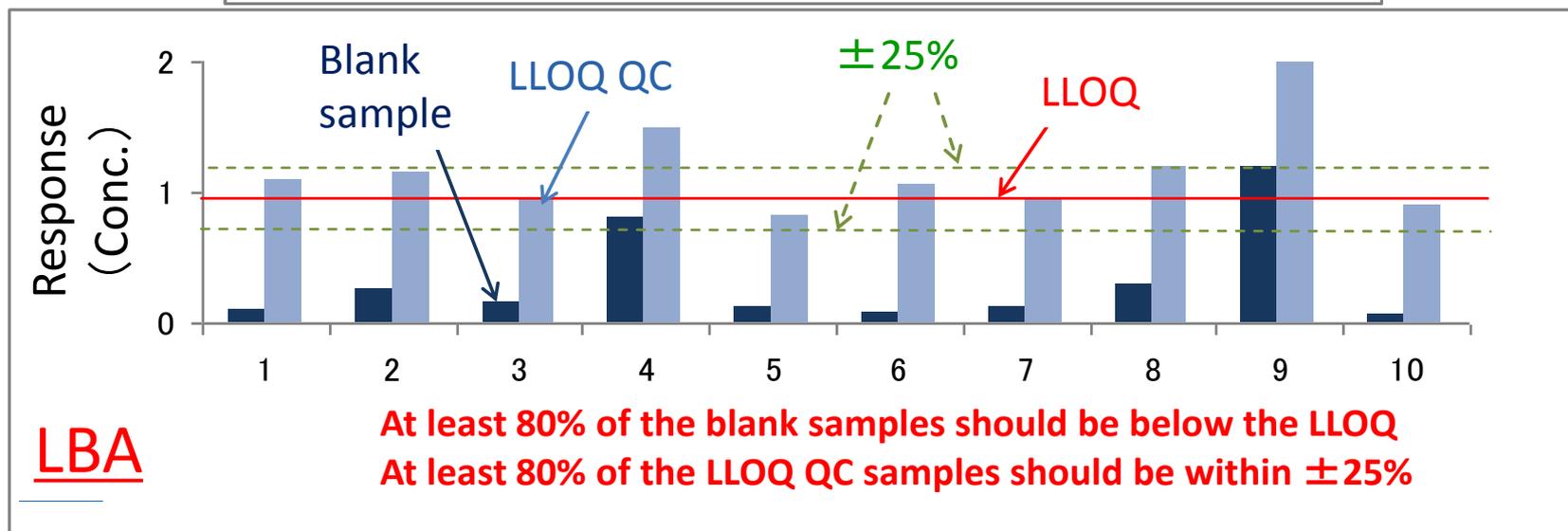
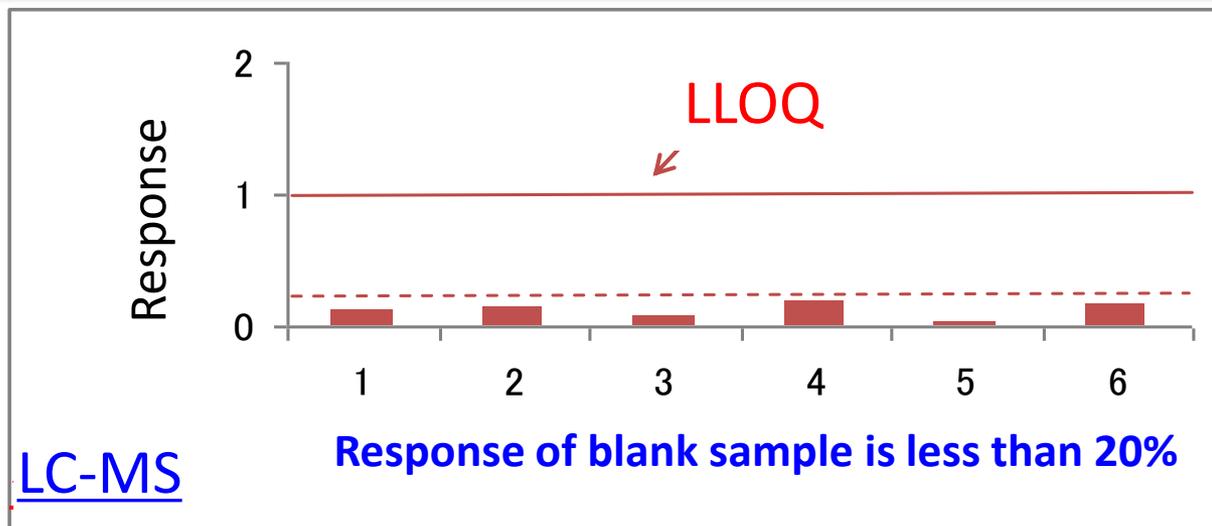
選択性とは、試料中の他の成分の存在下で、分析対象物質を区別して検出することができる能力のことである。

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±20%以内(定量下限の場合は±25%以内)でなければならない。

選択性の評価方法がクロマトグラフィーのガイドラインとは異なる。

4.1.2. 選択性 (フルバリデーション)



4.1.3. 検量線 (フルバリデーション)

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±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±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。

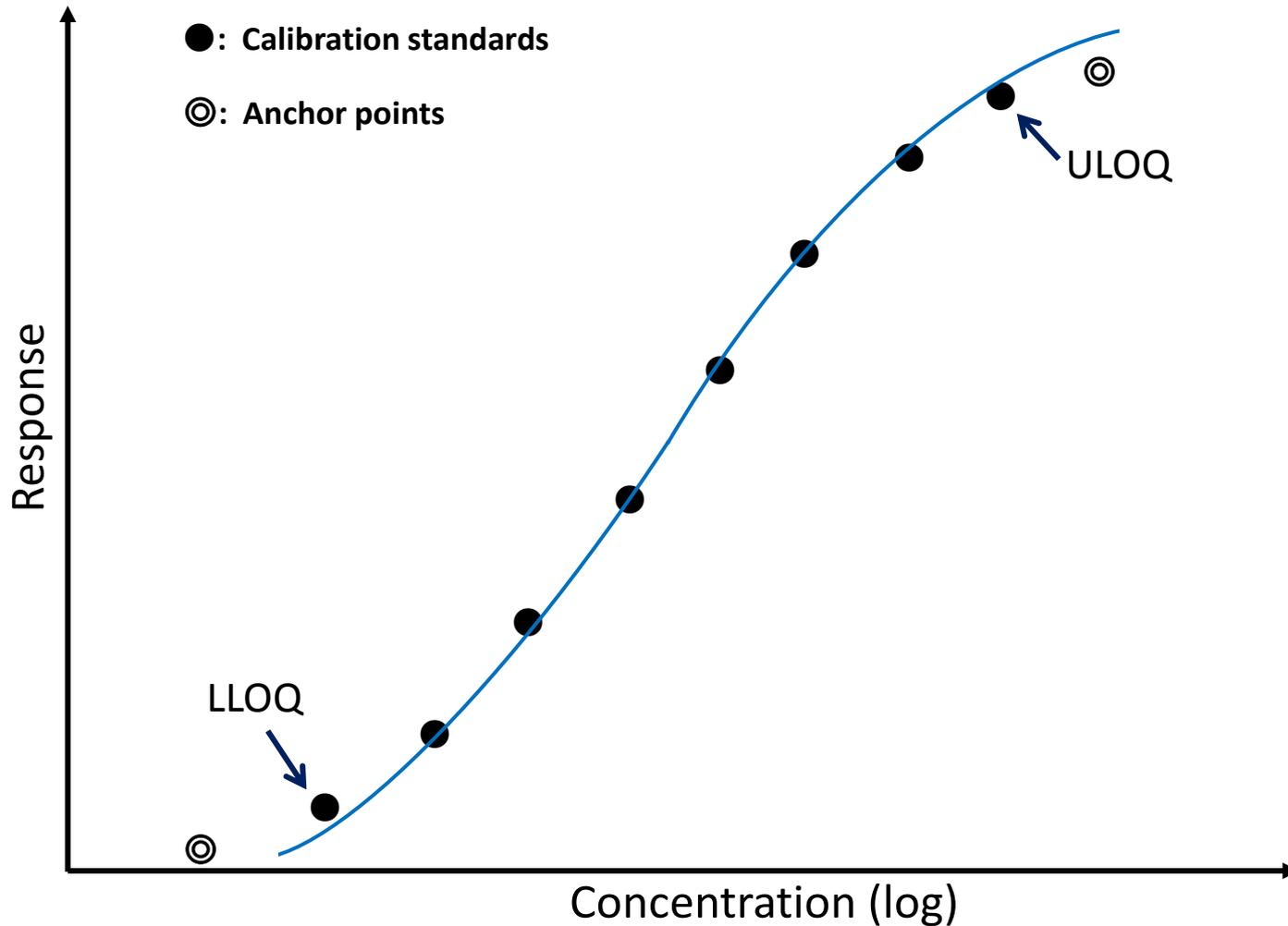
4.1.3. 検量線(フルバリデーション)

	MHLW (LBA) 2014	EMA (7. LBA) 2011	FDA (IV. LBA) draft 2013
標準試料	<p>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</p> <p>ブランク試料</p> <p>アンカーポイントを用いてもよい</p>	<p>6濃度以上の検量線用標準試料</p> <p>アンカーポイントを用いてもよい</p>	<p>定量下限を含む6濃度以上の検量線用標準試料</p>
判定基準	<p>各濃度の真度$\pm 20\%$以内 (定量上限・下限では25%以内)</p> <p>検量線用試料の75%以上, かつ, 定量上限・下限を含む6濃度以上が上記の基準を満たす.</p> <p>(アンカーポイントには基準なし)</p>	<p>各濃度の真度$\pm 20\%$以内 (定量上限・下限では25%以内)</p> <p>検量線用試料の75%以上が上記の基準を満たす.</p> <p>(アンカーポイントには基準なし)</p>	<p>各濃度の真度$\pm 20\%$以内 (定量下限では25%以内)</p> <p>定量下限を含む検量線用試料の75%以上が上記の基準を満たす.</p> <p>Total error 30%以下</p>

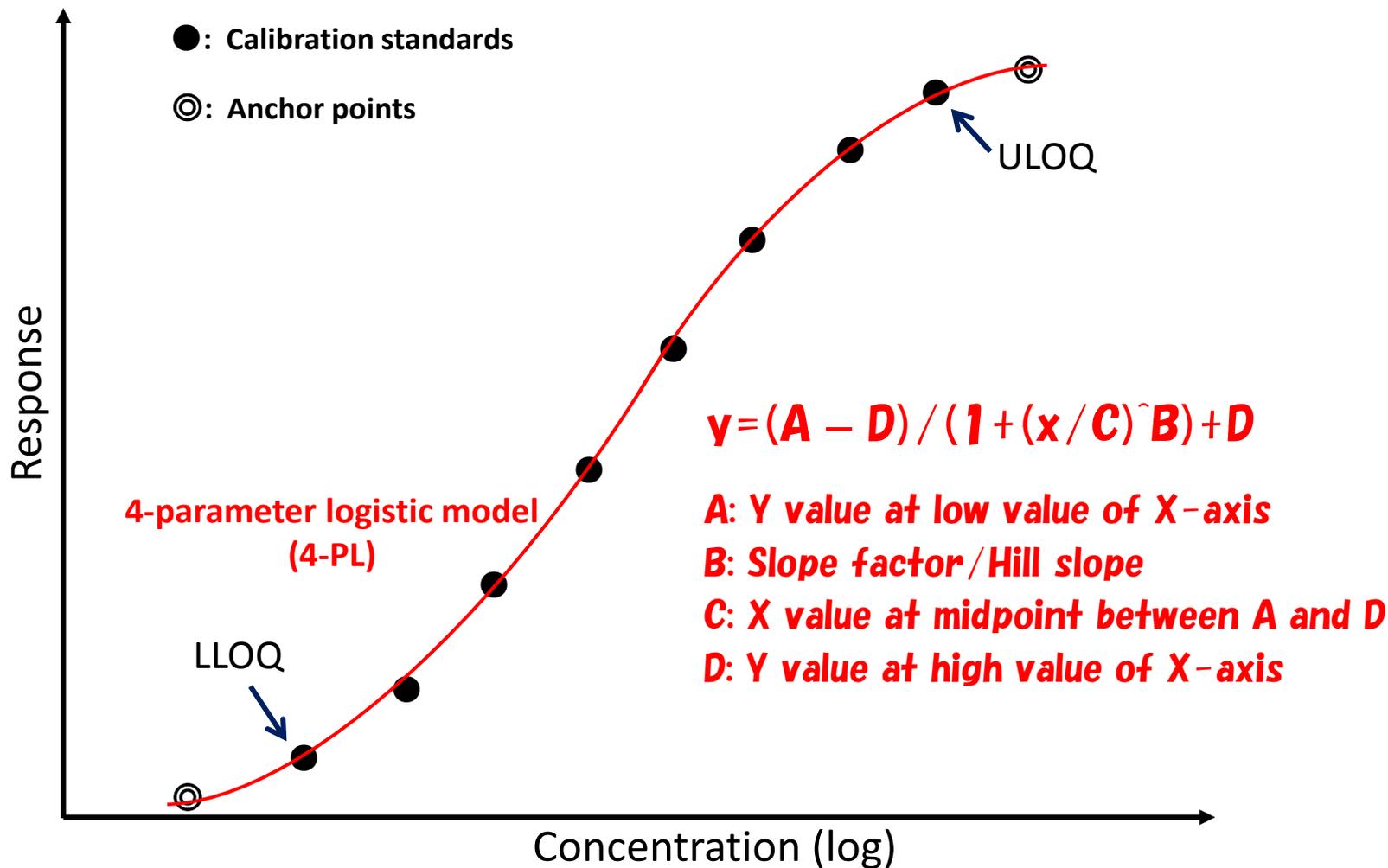
表: 石井明子 日本薬物動態学会 第8回ショートコース



4.1.3. 検量線 (フルバリデーション)

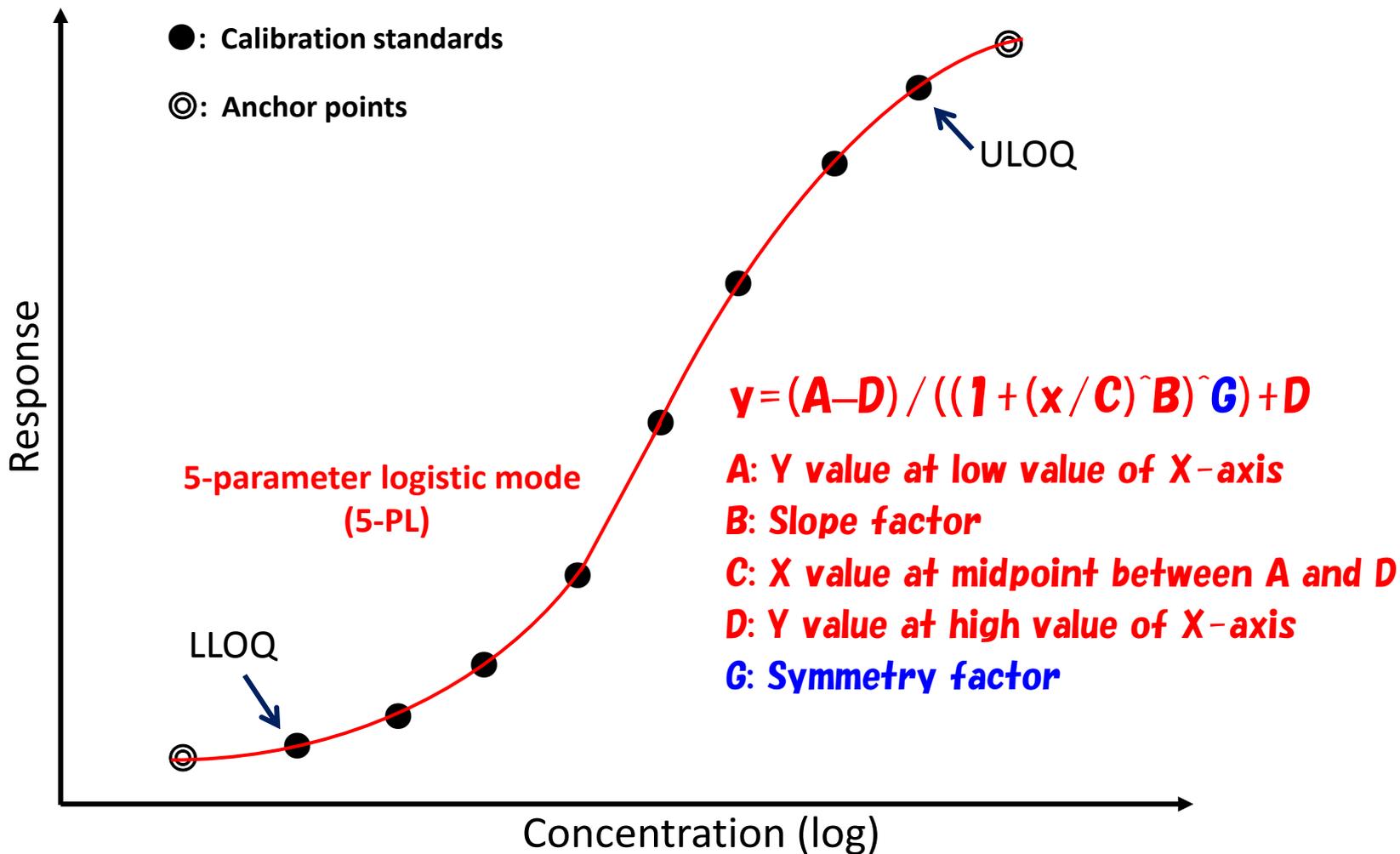


4.1.3. 検量線 (フルバリデーション)



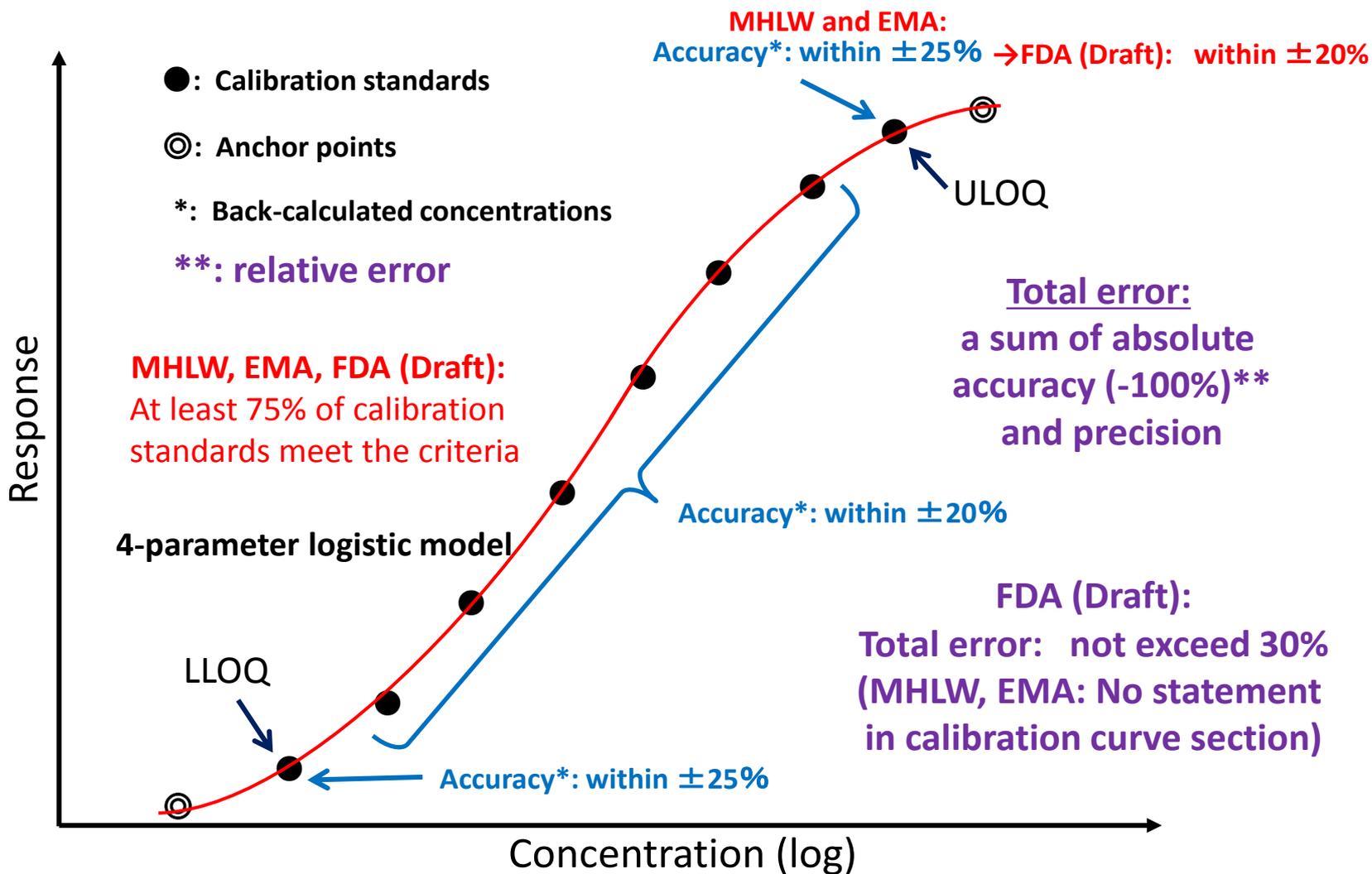


4.1.3. 検量線 (フルバリデーション)



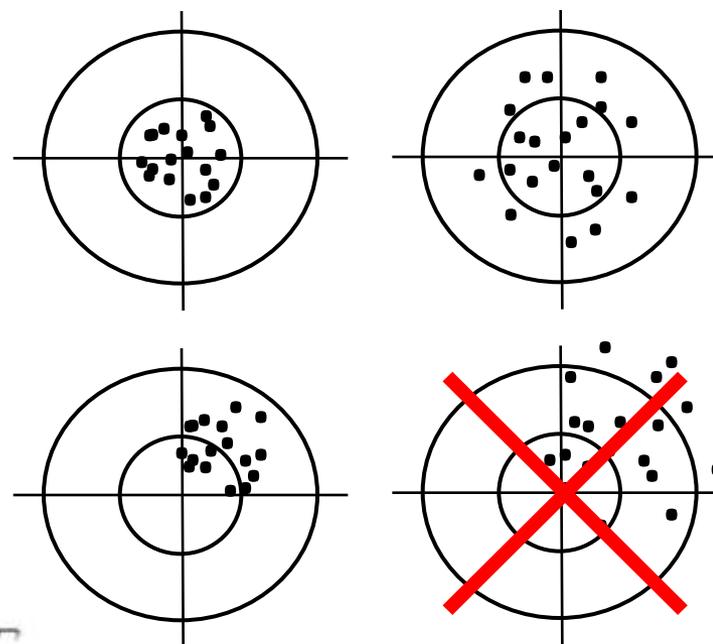
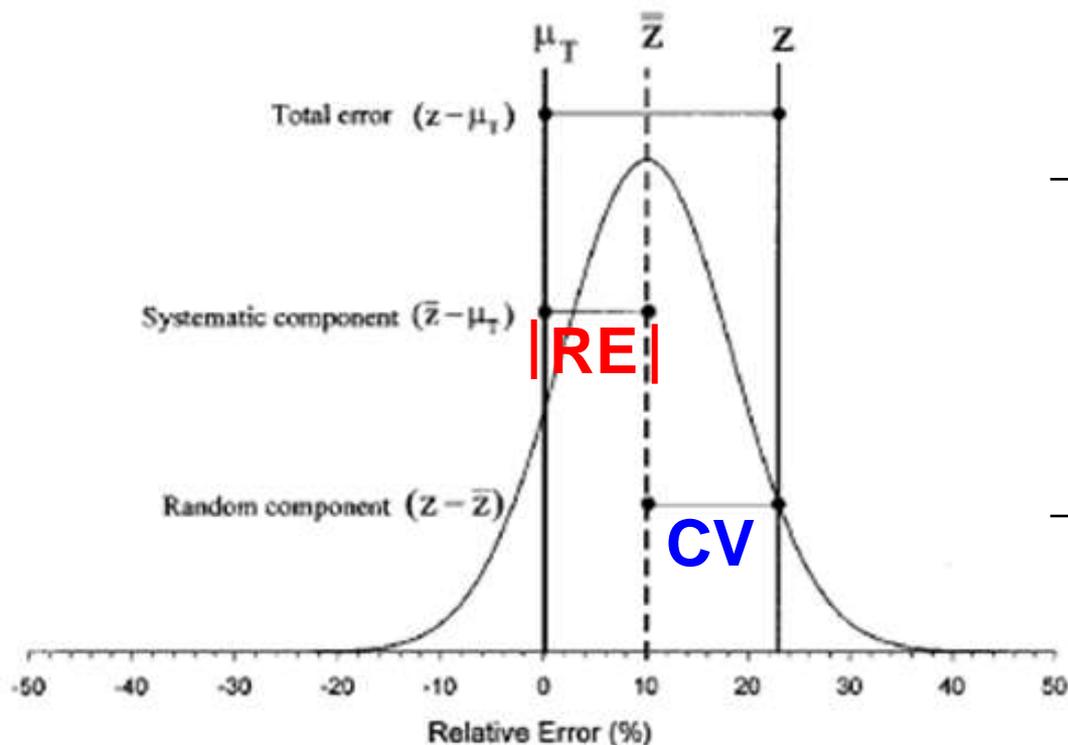


4.1.3. 検量線 (フルバリデーション)



トータルエラーとは

$$\text{Total error} = |\text{RE}| + \text{CV}$$



Modified from B. DeSilva *et al.*, Pharm. Res., 20: 1885-1900 (2003)

トータルエラーとは

日本のBMVガイドラインにおける真度及び精度の判定基準

クロマトグラフィー

真度：理論値の **±15%** 以内

(定量下限では ±20% 以内)

精度：**15%** 以下

(定量下限では20%以下)

リガンド結合法

真度：理論値の **±20%** 以内

(定量下限及び定量上限では ±25% 以内)

精度：**20%** 以下

(定量下限及び定量上限では25%以下)

トータルエラー：**30%** 以下

(定量下限及び定量上限では40%以下)

$$\text{Total error} = |\text{Relative Error (accuracy-100)}| + \text{CV}$$

例. 真度：115%, 精度：15% → トータルエラー = (115-100) + 15 = 30 (%)

4.1.4. 真度及び精度(フルバリデーション)

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、中濃度は検量線の中間付近、**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。

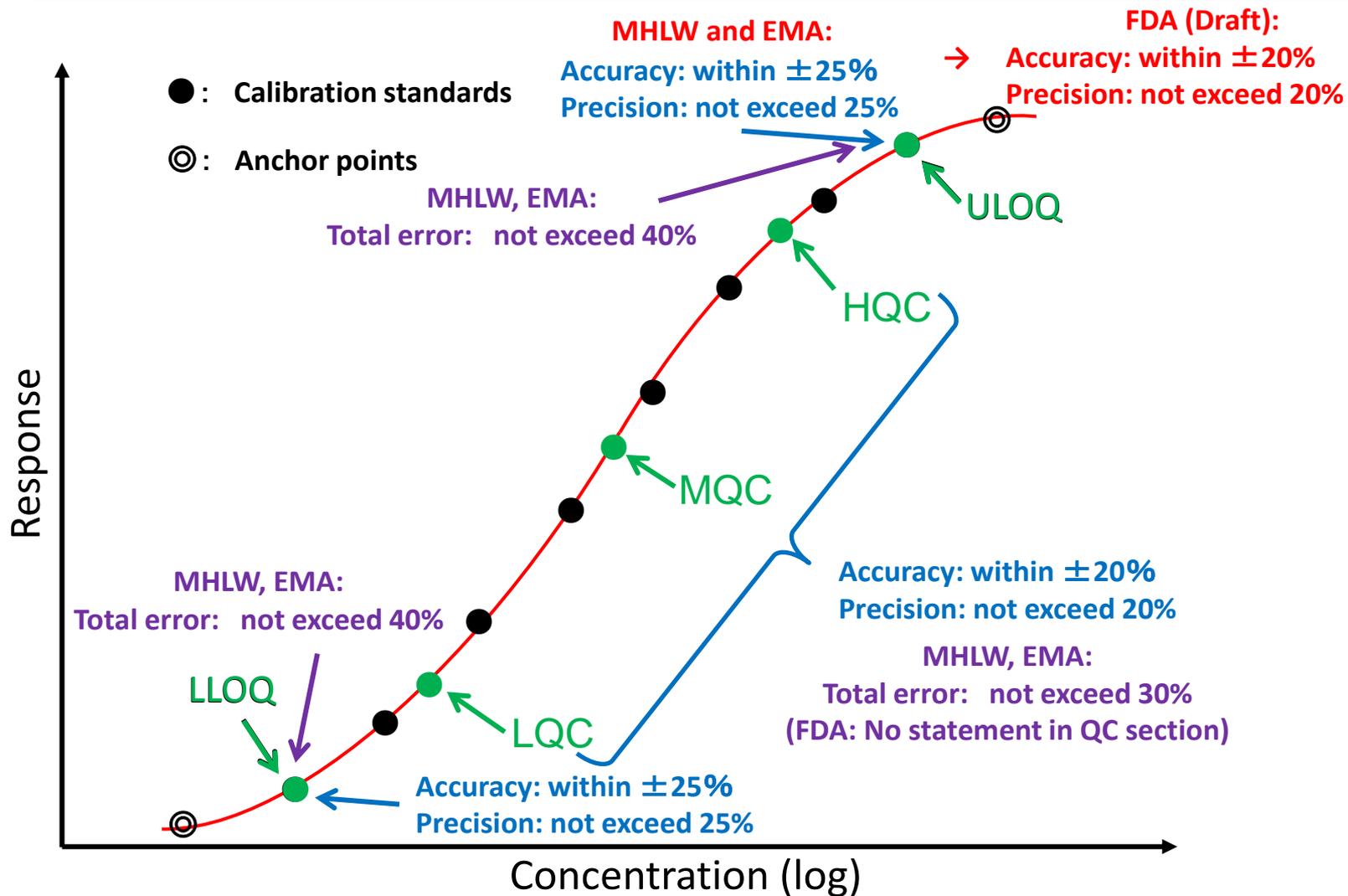
各濃度における分析単位内及び分析単位間の平均の真度は、理論値の $\pm 20\%$ 以内でなければならない。ただし、定量下限及び定量上限では $\pm 25\%$ 以内であるものとする。各濃度における分析単位内及び分析単位間の定量値の精度は、 20% 以下でなければならない。ただし、定量下限及び定量上限では 25% 以下とする。さらに、各濃度において、**真度から100%を引いた値の絶対値と精度の和(トータルエラー)**は、 30% 以下でなければならない。ただし、定量下限及び定量上限では 40% 以下とする。

4.1.4. 真度及び精度(フルバリデーション)

	MHLW (LBA) 2014	EMA (7. LBA) 2011	FDA (IV. LBA) draft 2013
QC試料	<p>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</p> <p>低濃度：定量下限の3倍以内 中濃度：検量線の間近 高濃度：検量線の定量上限の3分の1以上</p>	<p>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</p> <p>低濃度：定量下限の3倍以内</p>	<p>実試料で想定される濃度の範囲内で最低3濃度のQC試料</p>
真度及び精度	<p>各濃度における平均の真度 $\pm 20\%$ 以内 (定量上限・下限では25%以内)</p> <p>各濃度における定量値の精度 20% 以下 (定量上限・下限では25%以下)</p> <p>各濃度における Total error 30% 以下 (定量上限・下限では40%以下)</p>	<p>各濃度における平均の真度 $\pm 20\%$ 以内 (定量上限・下限では25%以内)</p> <p>精度 20% 以下 (定量上限・下限では25%以下)</p> <p>Total error 30% 以下 (定量上限・下限では40%以下)</p>	<p>真度 $\pm 20\%$ 以内 (定量下限では25%以内)</p> <p>精度 20% 以下 (定量下限では25%以下)</p> <p>Total errorがない</p>

表：石井明子 日本薬物動態学会 第8回ショートコース

4.1.4. 真度及び精度(フルバリデーション)



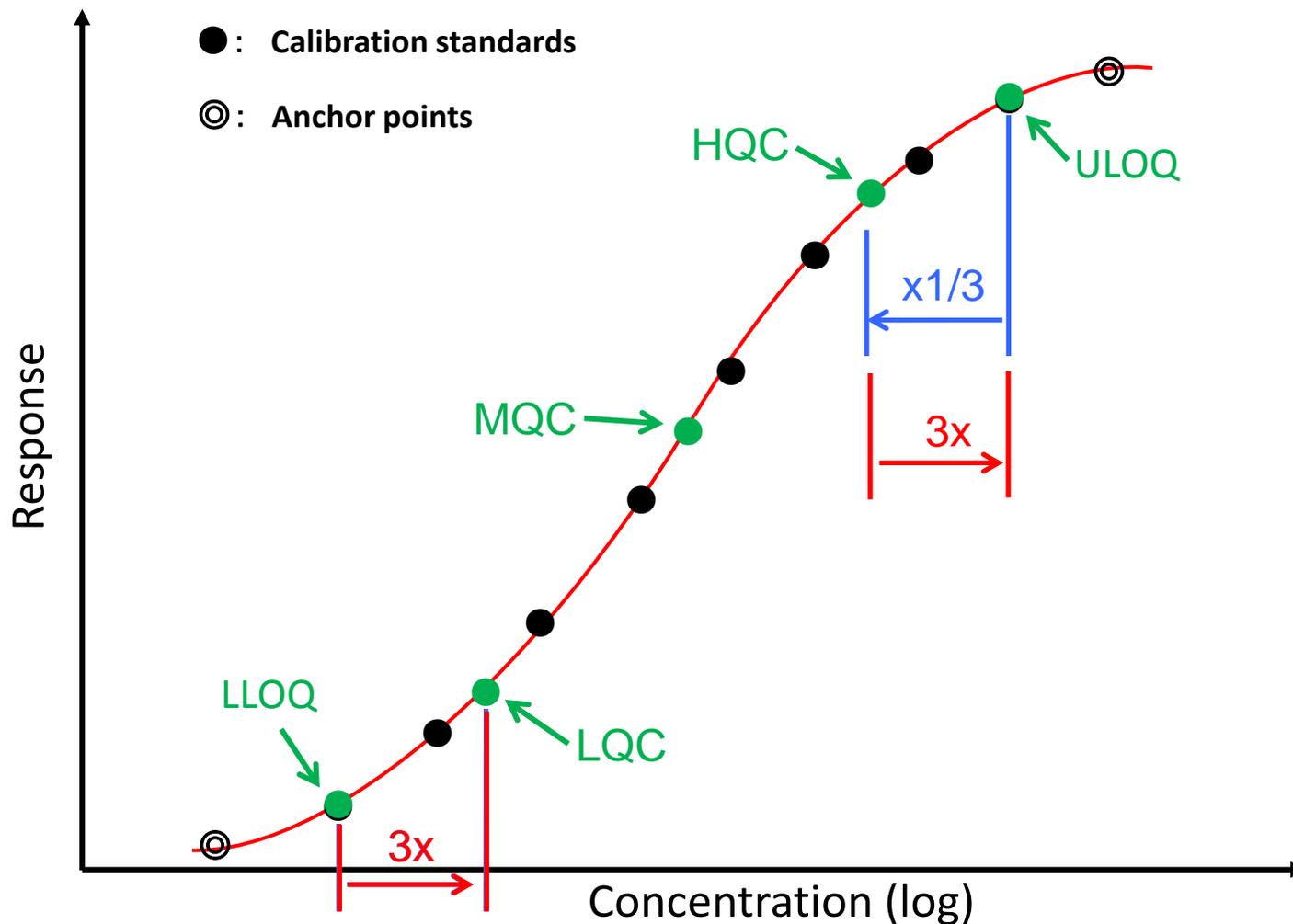
4.1.4. 真度及び精度(フルバリデーション)

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、中濃度は検量線の中間付近、**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。

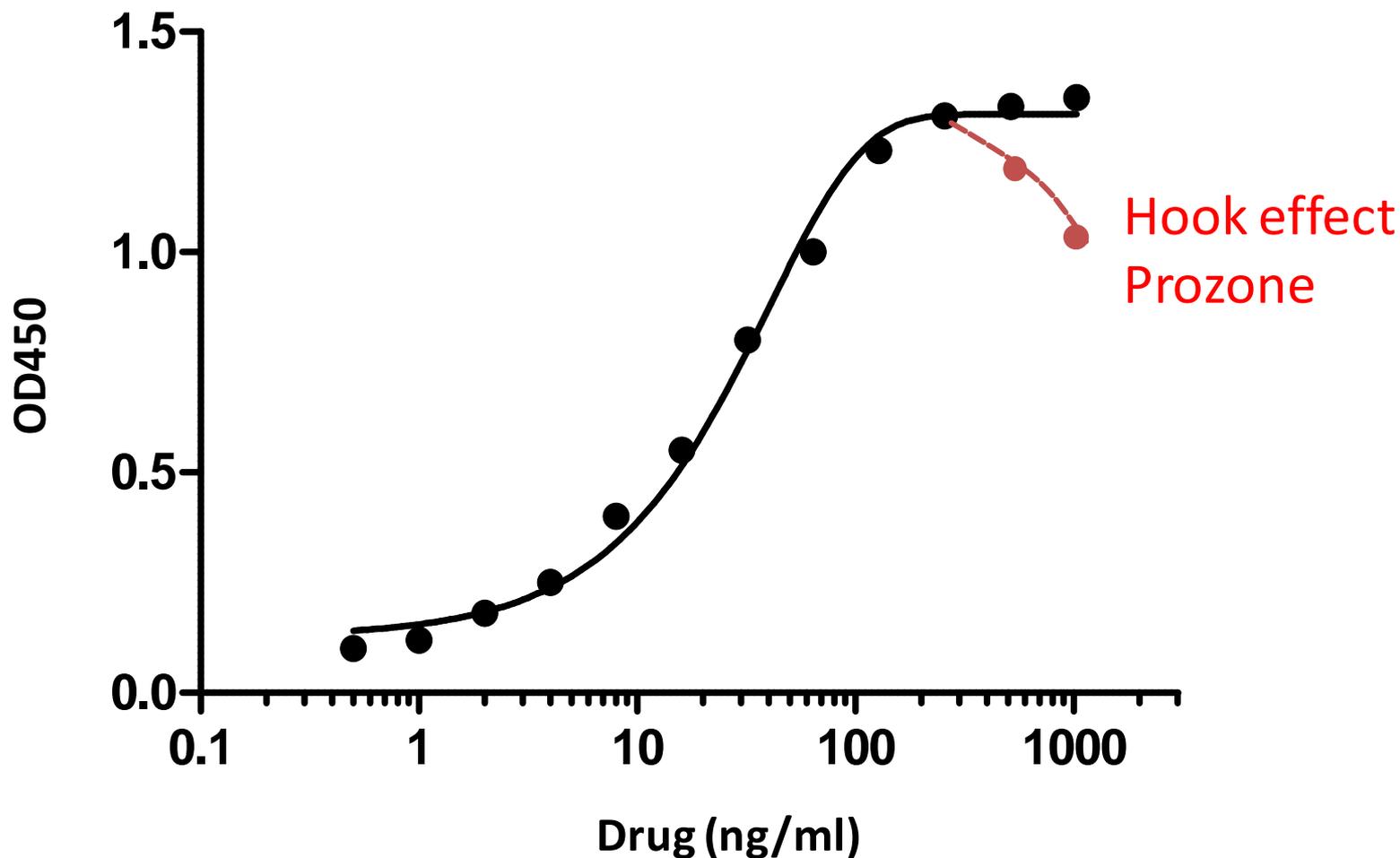
4.1.4. 真度及び精度(フルバリデーション)



4.1.5. 希釈直線性(フルバリデーション)

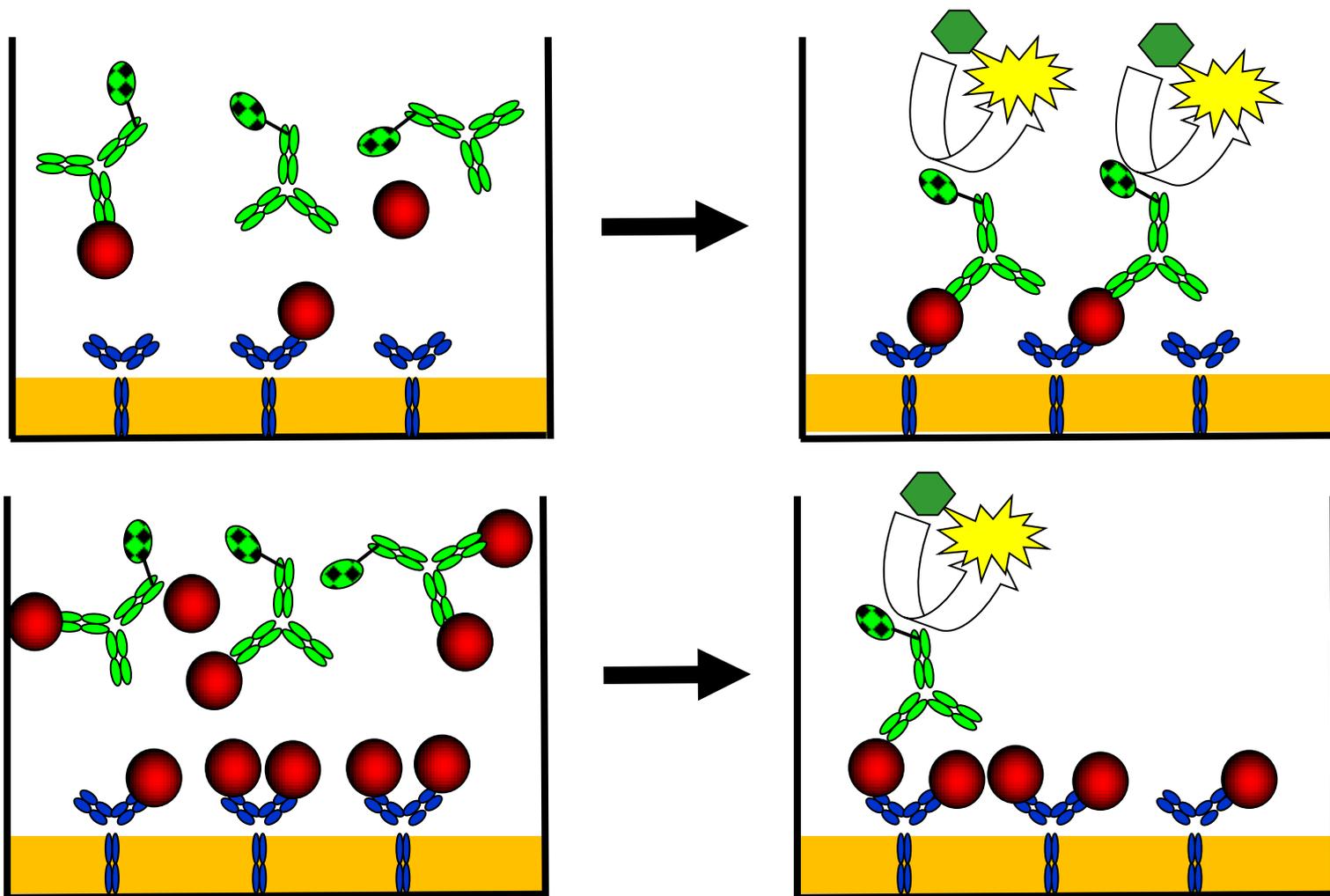
希釈直線性の評価は、検量線の定量上限を超える濃度の試料がフック効果又はプロゾンの影響を受けずに適切に分析できること、及び、検量線内においても定量値に希釈による影響がないことを確認するために実施する。希釈直線性は、検量線の定量上限を超えるQC試料及びこの試料を段階希釈した複数濃度の試料を分析して評価する。上記試料において、レスポンス低下(フック効果又はプロゾン)の有無を確認し、レスポンス低下が認められた場合には実試料分析に影響を及ぼさないような手段を考慮する必要がある。また、試料の定量値を希釈倍率で補正した後の真度は理論値の±20%以内、精度は20%以下でなければならない。

4.1.5. 希釈直線性(フルバリデーション)



Modified from B. DeSilva *et al.*, Pharm. Res., 20: 1885-1900 (2003)

4.1.5. 希釈直線性 (フルバリデーション)

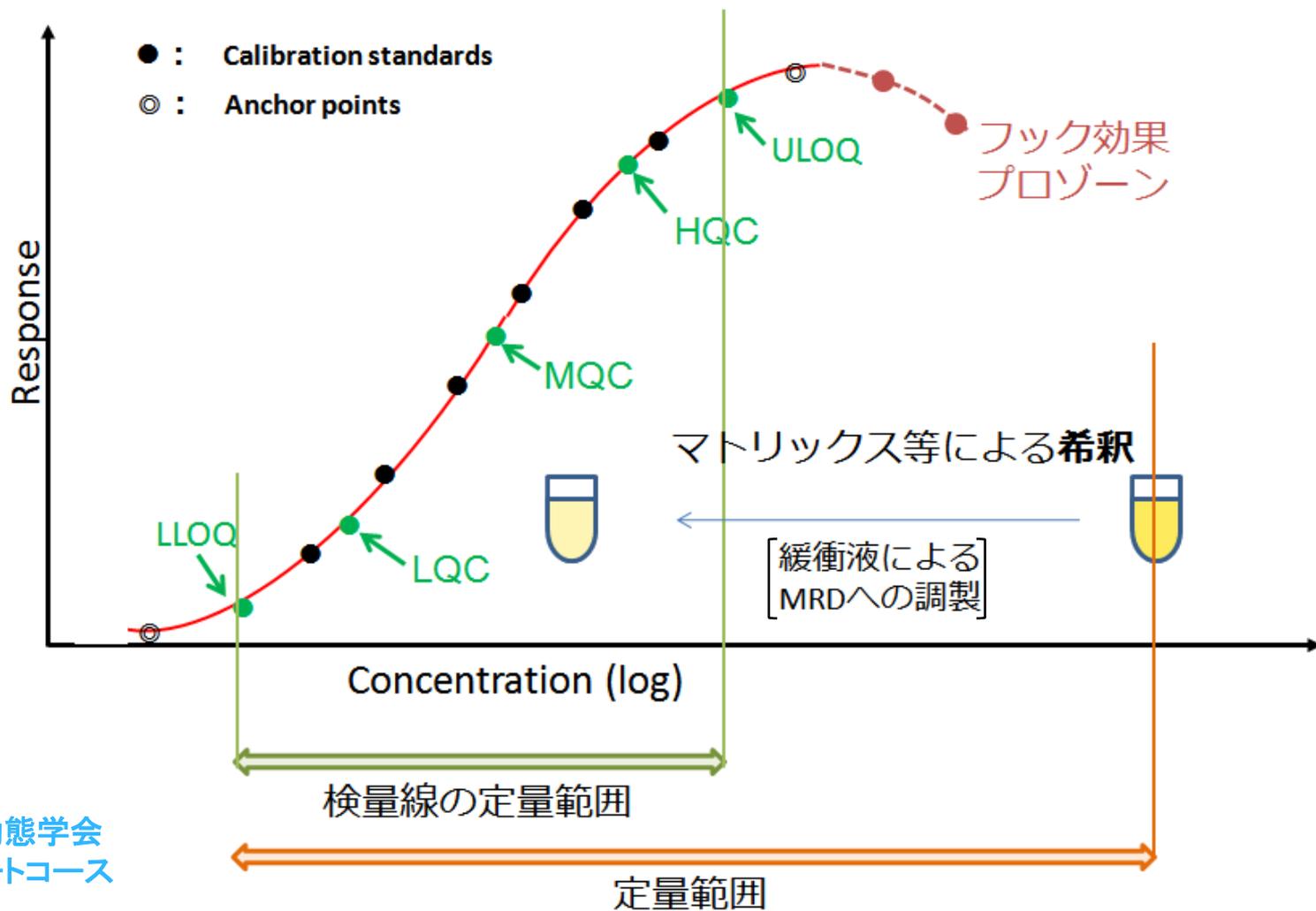


4.1.5. 希釈直線性(フルバリデーション)

Nominal conc. (ng/mL)	Dilution	Measured conc. (ng/mL)	Final conc. (ng/mL)	Accuracy (%)
100000	1	>ULOQ	>ULOQ	-
1000	1	>ULOQ	>ULOQ	-
100	1	>ULOQ	>ULOQ	-
40.0	5000	42.54	212700	106.4
20.0	10000	18.51	185100	92.6
10.0	20000	9.76	195200	97.6
5.00	40000	5.34	213600	106.8
2.50	80000	2.48	198400	99.2
1.25	160000	1.23	196800	98.4
Mean			200300	
SD			10987	
%CV			5.5	

Ref. standard: 200000 ng/mL
ULOQ: 50 ng/mL

4.1.5. 希釈直線性(フルバリデーション)

<http://bioanalysisforum.jp/>

図*: 石井明子
日本薬物動態学会
第8回ショートコース
*Modified

Q&A: MRD, 希釈直線性

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。

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。

4.1. 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。

**重要試薬のロット変更やMRDの変更時に
パーシャルバリデーションが必要である。**

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, 5.2. QC試料(実試料分析)

	MHLW (LBA) 2014	EMA (7. LBA) 2011	FDA (IV. LBA) draft 2013
検量線 標準試料	各濃度の真度 $\pm 20\%$ 以内 (定量上限・下限では25%以内) 検量線用試料の75%以上, かつ, 6濃度以上が上記 の基準を満たす. (アンカーポイントには基準なし)	各濃度の真度 $\pm 20\%$ 以内 (定量上限・下限では25%以内) 検量線用試料の75%以上 かつ, 6濃度以上が上記 の基準を満たす. (アンカーポイントには基準なし)	
QC試料	真度 $\pm 20\%$ 以内 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試料が上記の基 準を満たす.	真度 $\pm 20\%$ 以内 全QC試料の67%以上, か つ, 各濃度の50%以上の QC試料が上記の基準を 満たす.	真度 $\pm 20\%$ 以内 全QC試料の67%以上, か つ, 各濃度の50%以上の QC試料が上記の基準を 満たす.

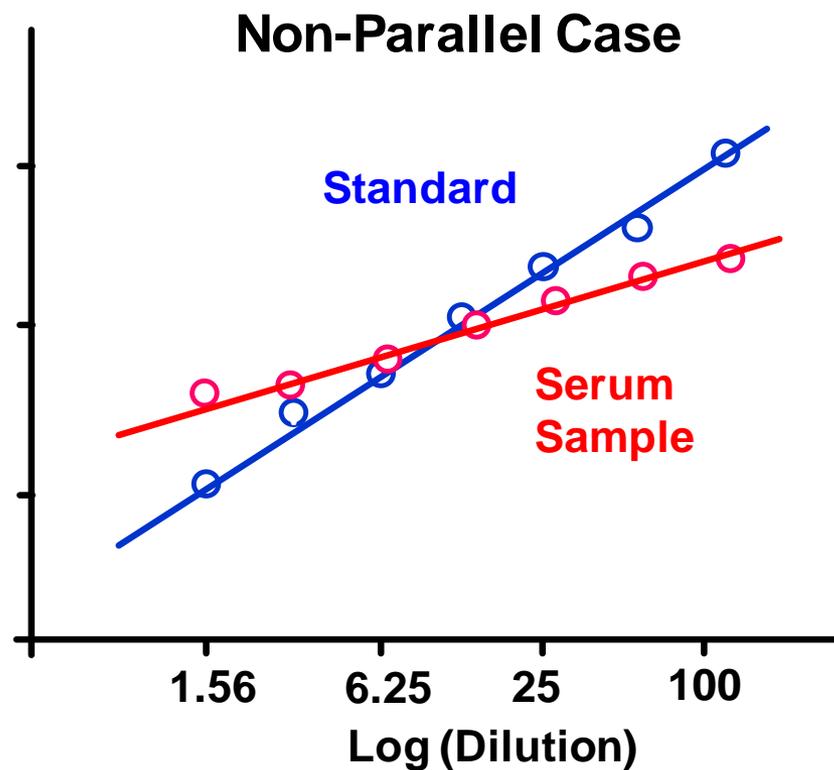
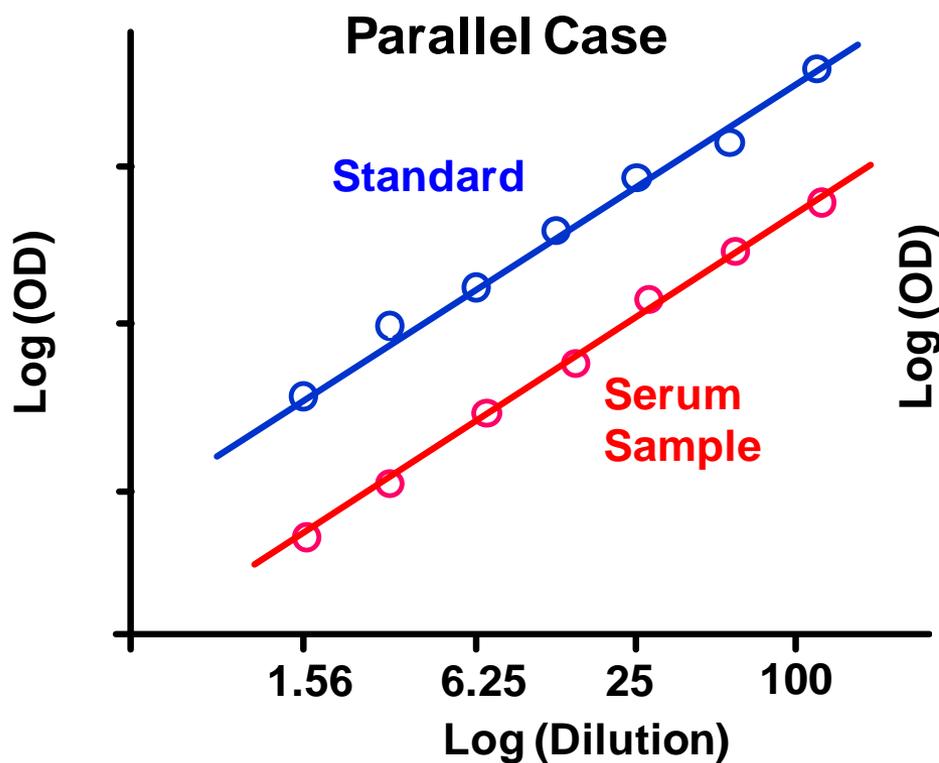
表: 石井明子 日本薬物動態学会 第8回ショートコース

5.3. ISR (実試料分析)

	MHLW (LBA) 2014	EMA (7.LBA) 2011	FDA (IV. LBA) draft 2013
再現性確認の試料数	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 .	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 .	総実試料数に対してその7%に相当する試料数 .
判定基準	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±30%以内でなければならない .	ISR を実施した試料のうち , 少なくとも67% (2/3) の試料において , 乖離度が±30%以内でなければならない .	ISR を実施した試料のうち , 3分の2以上 (67%) の試料において , 乖離度が±30%以内でなければならない .



平行性



<http://bioanalysisforum.jp/>

Modified from Plikaytis et al. J. Clin. Microbiol. 32: 2441-2447 (1994)



平行性

日本のLBAガイドライン: 記載なし

EMA Guideline: 7.1.1.10. Parallelism

If study samples are available, parallelism between the calibration standard curve and serially diluted study samples should be assessed to detect possible matrix effect or differing affinities for metabolites.

FDA Draft Guidance: 1. Selectivity b. Matrix Effects

Parallelism of diluted study samples should be evaluated with diluted standards to detect matrix effects.

平行性

Q17. 平行性 (Parallelism) の評価は必要ないか？

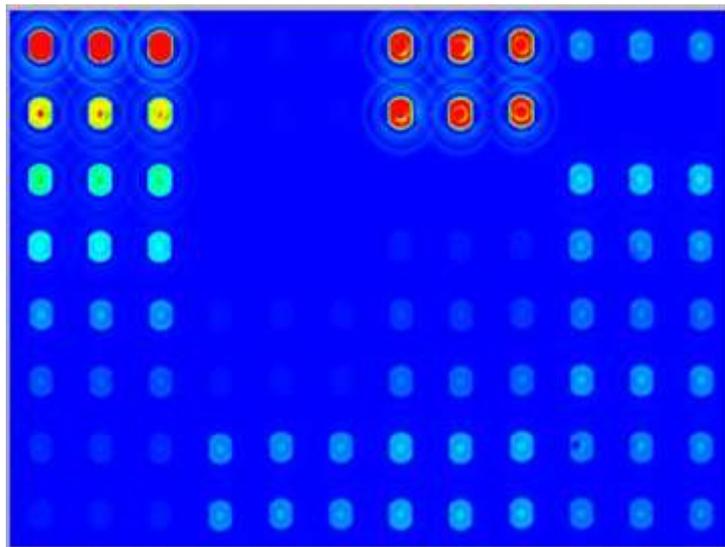
A17. 実試料の希釈系列における用量反応曲線と検量線系列の用量反応曲線が平行であり、実試料の数段階の希釈における換算値に希釈倍率による差が認められないとき、平行性が成立していると定義される。本ガイドライン発出の時点では、**平行性が成立しなかった事例、平行性不成立の原因、平行性の不成立が医薬品開発に与える影響の程度等について、国内外ともに十分な知見が蓄積され議論が成熟している状況ではないことから、必ずしもすべての分析について平行性を評価する必要はない。ただし、分析対象物質や分析法の特性、あるいは、医薬品開発の過程で集積されたデータから、平行性が問題になる可能性が疑われる際には、可能な範囲で科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。**

注意事項

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。



注意事項

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。

Q25. 重要試薬の有効期限の設定は必要か？

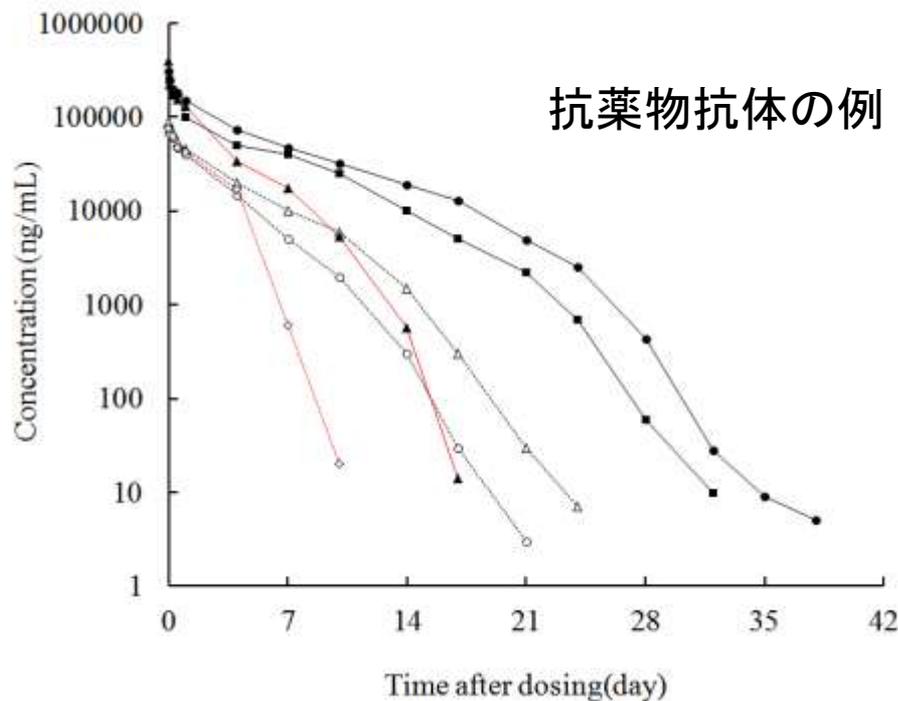
A25. 使用する期間中の検量線やQC試料の分析結果の評価から、重要試薬の品質を確認できるならば、有効期限の設定は必ずしも必要でない。

注意事項

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。



リガンド結合法ガイドライン：まとめ(1/2)

1. リガンド結合法を用いる分析法バリデーション及び当該分析法を用いた実試料分析に適用される。
2. リガンド結合法を用いて分析する薬物(低分子化合物も含む)が対象となる。
3. 測定対象物質である薬物が内因性物質と同じ場合も対象となる。
4. 標準物質はその品質が適切に管理されている必要がある。
5. 市販キットもフルバリデーションが必要である。
6. フルバリデーションの実施前にMRD(minimum required dilution)の設定が必要である。
7. 分析対象物質を類似物質等と識別する特異性を評価する。
8. 選択性の評価方法がクロマトグラフィーのガイドラインとは異なる。
9. 検量線の定量下限未満の濃度及び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よい。

リガンド結合法ガイドライン: まとめ(2/2)

10. 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を用いる.
11. 真度及び精度は、検量線の定量上限についてもQC試料の評価が必要である.
12. トータルエラーの評価が必要である.
13. 高濃度のQC試料の濃度を定量上限の1/3以上とする.
14. 希釈直線性の評価が必要である.
15. 重要試薬のロット変更やMRDの変更時にパーシャルバリデーションが必要である.
16. ISR (incurred sample reanalysis) が必要である.
17. 平行性については言及していない.

注意事項

クロストーク、重要試薬及び干渉物質に注意が必要

謝辞 (敬称略)



厚生労働省<MHLW>

光岡俊成



国立医薬品食品衛生研究所<NIHS>

石井明子

香取典子

奥田晴宏

川崎ナナ

新見 伸吾



日本製薬工業協会<JPMA>

片島正貴 (アステラス製薬)

前川 浩太郎 (久光製薬)



バイオアナリシスフォーラム<JBF>

運営委員

JBF LBA TFメンバー



リガンド結合法を用いた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の概要

Volcano Sakurajima
in Kagoshima, Japan



<http://bioanalysisforum.jp/>

ご清聴ありがとうございます。