



Scientific Validation について考える

– [JBF DG活動の成果] –

DG2016-20, DG2015-15

杏林製薬
小関 望

August 28, 2017

第30回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2017)



DG2016-20 メンバー



- 芦澤 紘子 (科研製薬)
Hiroko Ashizawa
 - 石井 琢帆 (サンプラネット)
Takuho Ishii
 - 内村 隆秀 (中外医科研)
Takahide Uchimura
 - 小野 敬太 (大鵬薬品)
Keita Ono
 - 栗山 早織 (日本新薬)
Saori Kuriyama
 - 小関 望 (杏林製薬)
Nozomu Koseki
 - 戸田 亜希子 (新日本科学)
Akiko Toda
 - 副島 呉竹 (Meiji Seikaファルマ)
Kuretake Soejima
 - 中井 直子 (第一三共)
Naoko Nakai
 - 西村 直浩 (SCAS)
Naohiro Nishimura
 - 真弓 剛 (全星薬品)
Tsuyoshi Mayumi
 - 安田 穰 (TRC)
Yutaka Yasuda
 - 山川 達也 (富士フィルム)
Tatsuya Yamakawa
- Leader
- 丹羽 誠 (日本化薬)
Makoto Niwa
- Observer
- 佐野 善寿 (JBF SC, サンプラネット)

SVに取り組むきっかけ

Tiered Approachに関するDG活動
(2013年度、2014年度)

第5回、第6回
JBFシンポジウム
(2014、2015-Mar)

J-BMVガイドラインの附録に記載(国内での認知度UP)
DGでも一定の結論に達する (Bioanalysis (2016) 8(2), 93-98)

Tiered Approachに関する活動は収束

第6回JBFシンポジウムでの公開討論 (EBFからの発表)
「Tiered Approachから
今後は **Scientific validation (SV)** へ移行
(Fit for purposeの観点から)」

SVに関するDG立ち上げ

DG2015-16, DG2016-20へ

JBF-DGでの活動

Scientific Validation (SV)

目的に応じた適切な分析方法

EBF White Paper [1]

DG内での検討議論

DG内のみでなく、広く国内バイオアナリシス関係者から
日本の実態に照らした適否も含めたアンケート調査を実施・評価

国内でのSVの現状について取り纏め、論文投稿*
本会における発表実施

*Bioanalysis (2017) 9(13), 963–968

DG2015-16

第7回
JBFシンポジウム
(2016-Mar)

DG2016-20

第8回
JBFシンポジウム
(2017-Feb)



[1] P. Timmerman et al., Tiered approach into practice: scientific validation for chromatography-based assays in early development – a recommendation from the European Bioanalysis Forum. Bioanalysis (2015) 7(18): 2387–2398.

Scientific Validationとは？

現在、医薬品の承認申請に用いられるバイオアナリシスはガイドラインに従った規制下での実施が求められている。

各国（極）での ガイドライン制定時期	
米国	2001年
欧州	2011年
日本	2013年
米国（Draft版）	2013年

他に中国、韓国、ブラジル、インドなどでも制定済み

規制の対象となる試験

TK試験及び臨床PK試験における生体
試料中の薬物又はその代謝物定量
(各国(極)ガイドラインでほぼ同様)

(低分子のクロマトグラフィによる測定)

- ・血液試料と尿及び組織中濃度では生物学的な重要度が異なる。
- ・代謝物は薬理活性や毒性発現に関する寄与が未変化体と異なる。
- ・初期のTK、ヒトPK試験は申請される確率は低い。

→目的に応じた適切な分析方法：Scientific Validationの提案*

White PaperによるSVの5区分

EBF White Paperで論じられている Scientific Validation における5区分

Assay appropriate SV	血漿中代謝物（ICH-M3(R2)可否判断のため）
	尿中（未変化体）
	組織中（未変化体）
Stage appropriate SV	開発初期の非臨床血漿中未変化体 （初期のGLP-TK測定を含む）
	開発初期の臨床血漿中未変化体 （初期のPhase 1試験を含む）



White Paperでは5区分についてPre-study validation時とIn-study validation時の各バリデーション項目について詳細な検討が行われている。

アンケート実施項目

- 標準品のCOA
- 検量線・QC試料
- マトリックス
- 日間再現性
- 選択性
- 併用薬影響評価
- 安定性
- IS variability評価
- 他の試験項目
- その他
- SVによる申請



SVにおける左記の
バリデーション項目について
White Paperの記載と
アンケート結果から、
国内医薬品開発における
適否の詳細検討を行った。

<http://bioanalysisforum.jp/>



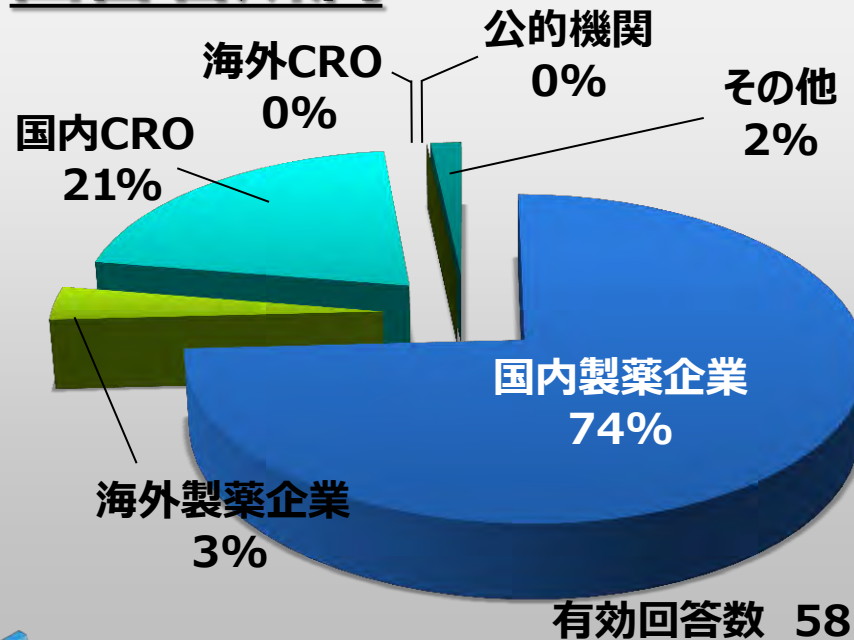
アンケート回答者背景

所属および従事年数

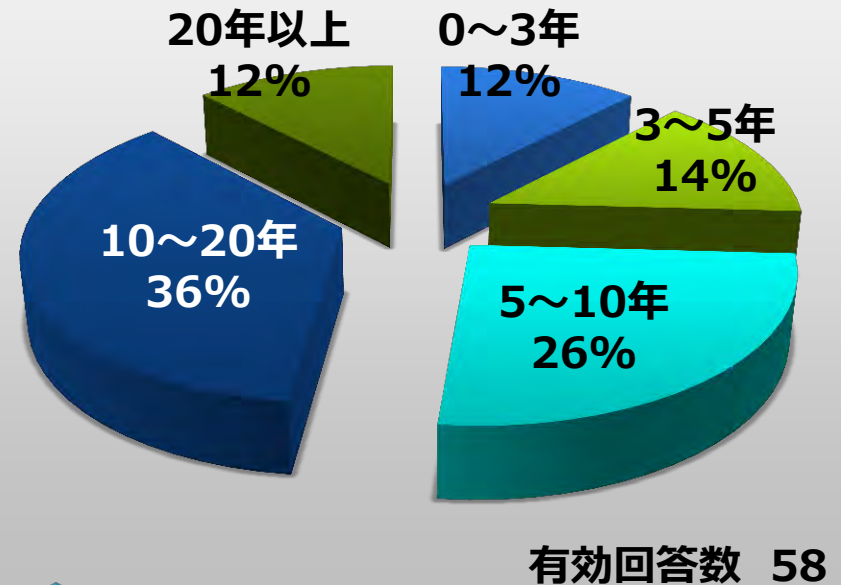


対象者：JBFのDGサポーター登録者、Webツールによりアンケート実施

回答者所属



バイオアナリシス従事年数



MEMO

国内製薬企業が3/4, CROが2割,
海外企業の割合が低い。

MEMO

回答者の経験年数分布は広範囲で
大きな偏りはない。

標準品のCOA

COAの必要性

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	COA不要 ICH-M3(R2) 対応の要否判断は可能	COA有が基本 COAが無い場合は、投与と測定で同一バッチを使用
DG	ICH-M3(R2)評価の要否判断 にはROA不要	少なくともROA必要 または投与と測定で同一バッチを使用

COA: Certificate of Analysis, ROA: Result of Analysis

アンケート結果

DGに同意: **80%**, WPに同意: **14%**, その他: **6%**

ROAについては定義が曖昧？



結論

⇒ 血漿中未変化体は少なくともROAは必要。
代謝物や非血漿マトリックスでは必ずしも必要でない。
ICH-M3(R2)への対応には検討が必要



検量線・QC試料

検量線ポイント数

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	5ポイント以上	6ポイント以上
DG	WPに合意 ただし定量範囲が100倍以上ではポイント数増加	WPに合意



アンケート結果

WPに同意: **51%**, DGに同意: **43%**
その他: **6%**



WPとDGに大きな違いはないので、
5ポイント以上で、直線性があれば問題無いと考えられる。



結論

⇒ 代謝物，尿，組織は5ポイント以上、未変化体は6ポイント以上



検量線・QC試料

QCのN数

		Assay appropriate SV	Stage appropriate SV
		代謝物・尿・組織	開発初期（未変化体）
Pre-study validation	WP	3濃度, n=3	4濃度, n=5
	DG	WPに合意、ただし代謝物・尿・組織でも高感度分析が求められる時にはLLOQの評価が必要	
In-study validation	WP	BMVガイドライン通り:3濃度, n=2	
	DG	WPに合意	

アンケート結果

**DGに同意: 64%, WPに同意: 30%,
その他: 6%**



尿中排泄の評価では、定量下限付近の測定値は評価に与える影響が小さいのでLLOQの評価を厳しくする必要性は少ないのではないか。



結論

⇒Pre-Study時：代謝物，尿，組織は3濃度，n=3
高感度分析が求められる場合はLLOQの評価を検討

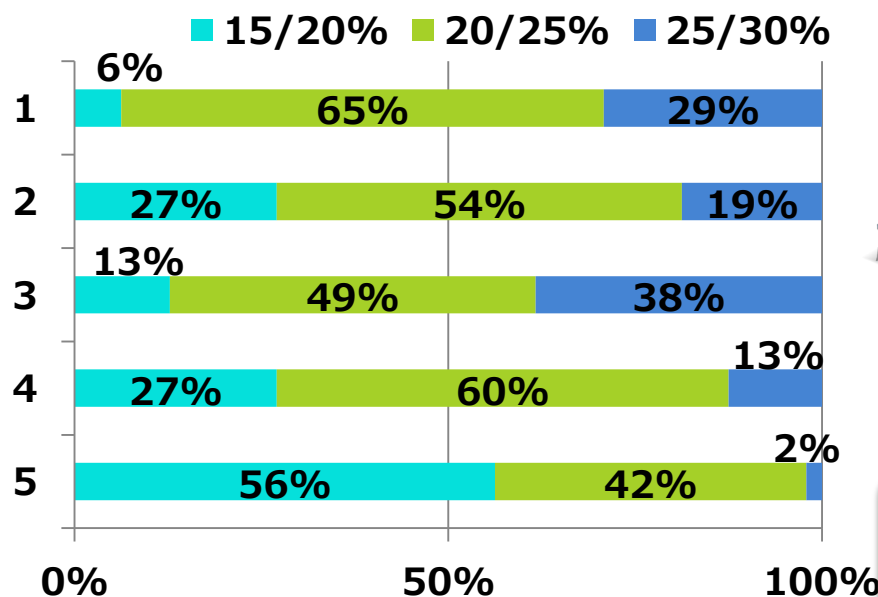


検量線・QC試料

クライテリア

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	25/30%(LLOQ)	20/25% (LLOQ)
DG	WPに合意、ただしマスバランスなどでは20/25%	WPに合意

アンケート結果



1. 血漿中代謝物
2. 尿中（未変化体）
3. 組織中（未変化体）
4. 開発初期の非臨床血漿中未変化体
5. 開発初期の臨床血漿中未変化体

WPの5区分

代謝物や組織では緩やかな基準が受け入れられるが
血漿中未変化体（開発初期）ではBMV通りが多数

結論

⇒ 血漿中未変化体以外ではBMVより
緩いクライテリアにすることは受入可



日間再現性

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	Pre-studyで日内再現性確認のみ実施。 日間再現性確認の必要無し。	同左
DG	In-study時のQC試料の結果で評価	同左

日間再現性試験の必要性について



アンケート結果

WPに同意:47%、DGに同意:40%、
Pre-study validationで実施:9%、その他:4%

結論



⇒必要に応じてIn-study validationで追加実施

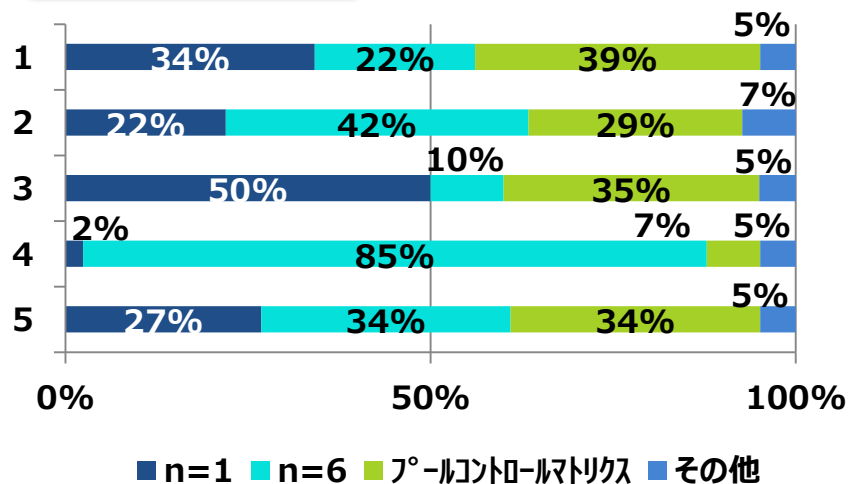


選択性

コントロールのN数

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	n=1	臨床 n=6, 非臨床 n=1
DG	WPに合意	

アンケート結果



1. ICH-M3(R2) 検討時の血漿中代謝物
2. 尿中未変化体
3. 組織中未変化体
4. 開発初期（臨床）の血漿中未変化体
5. 開発初期（非臨床）の血漿中未変化体



結論

⇒臨床血漿中未変化体はn=6
その他は緩くてもよい。



選択肢にn=3があっても良かった？



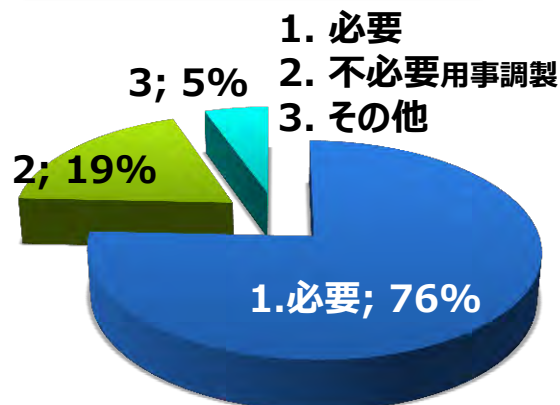
安定性

標準溶液

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	必要最小限，基準は $100 \pm 20\%$	開発初期段階で確認，または用事調製
DG	必要，基準は $100 \pm 20\%$	必要，基準は $100 \pm 15\%$

アンケート結果

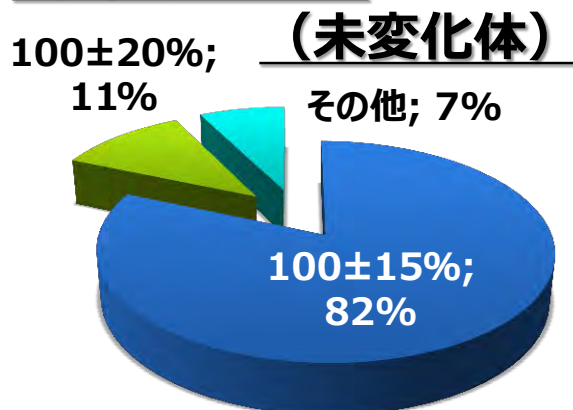
(1) 評価の必要性



有効回答数 37

必要が3/4強

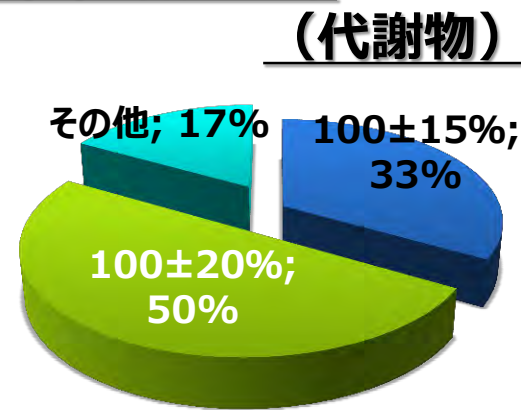
(2) 判定基準



有効回答数 27

±15%が8割強

(3) 判定基準



有効回答数 36

未変化体と代謝物で基準は別？

結論 ⇒ 標準溶液安定性は必要。基準は未変化体 $\pm 15\%$ ，代謝物 $\pm 20\%$



安定性

マトリックス中



結論のみ紹介

凍結保存	血漿中：他の安定性試験に含めて実施 尿・組織：試験目的を考慮して実施
凍結融解	実サンプルの取扱方法に従って他の安定性試験に含めて実施
前処理後	未変化体：他の安定性に含めて実施 代謝物，尿，組織：不要
全血中	不要
併用薬存在下	不要

<http://bioanalysisforum.jp/>

⇒ 血漿中未変化体は実サンプルの取扱方法に従い、他の安定性試験に含めて実施することが基本



IS variability 評価

<EBFの推奨する経験的方法>

クロマトグラムの異常確認



IS areaを注入順にプロットし異常発生の傾向を確認

散発的発生

以下の場合、異常値として再測定し、再測定値を採用

1. IS area $> 2 \times \text{Ref}_{\text{low}}$ または IS area $< 10\% \text{Ref}_{\text{low}}$
2. IS area $< 50\% \text{Ref}_{\text{low}}$ かつ測定値がLLOQ未満

特定のtime pointまたは被験者ごとなど”群単位”での発生

IS area $> 2 \times \text{Ref}_{\text{high}}$ または $< 50\% \text{Ref}_{\text{low}}$ の場合、Matrixの影響を検討し、再測定の必要性を判断 (Pre-dose matrixで調製したQC試料の測定, Std・QC調製用のblank matrixでの希釈等)

これらで対処できそうにない場合、
個別に基準設定(Std・QCのIS area 平均値とSDを使用等)
妥当性についてはScientific judgmentが必要

http://bioanalysisforum.jp/

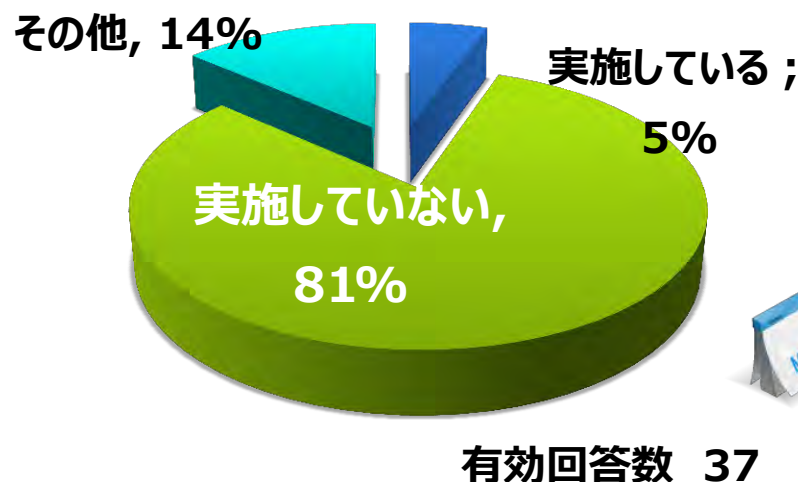


IS variability 評価

許容値設定

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	Scientific judgment	前のスライド参照(Bioanalysis (2014) 6(20), 2767-2774)
DG	現状は実施していないか、±50%	

アンケート結果



アンケートコメント（抜粋）

【使用されている基準】

- ・バッチの平均レスポンス値±50%
- ・ブランク試料を除く全試料の平均値の±50%
- ・CVで50%以下

8割以上で許容値設定していない。
設定している場合は50%が一つの目安

結論

⇒IS response変動幅の許容値設定までは至っていない。



IS variability 評価

評価の必要性
と許容値

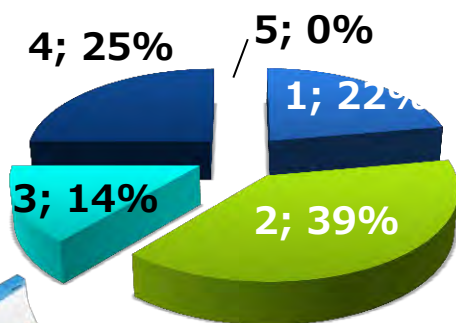
	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	Scientific judgment	Matrix effects検出のために有効 評価基準はreference paper
DG	WPに合意	

アンケート結果

評価の必要

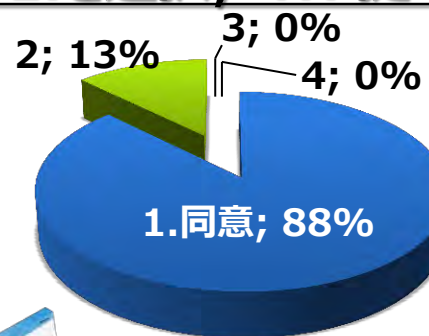
1. 許容範囲設定有(事前)
2. 許容範囲設定有(事後)
3. 場合によっては同意
4. 評価不要
5. その他

有効回答数 36



許容基準設定は意見が分かれる。**SIL-IS**では評価不要，基準緩くの意見多数

←1.を選択，WP提唱の方法について



1. 同意
2. 場合によって同意
3. 同意できない
4. その他

有効回答数 8

事前の基準を設定すべきと回答した方にWPの基準は受け入れられた。

結論

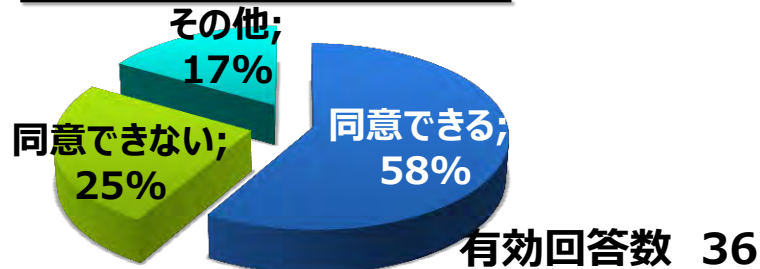
⇒In study validationでIS response 変動は評価すべき。
WP提案のIS 許容幅設定方法は受け入れ可能

IS variability 評価

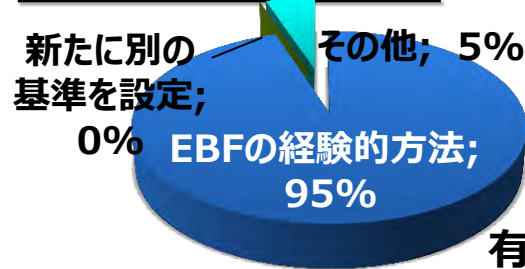
	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	代謝物：不要	IS variabilityで検出可 評価基準はreference paper
DG	WPに合意	

アンケート結果

IS responseによる高脂血漿/溶血血漿の影響評価について



←同意した方、高脂血漿/溶血血漿の影響評価の許容基準は？



コメント（抜粋）

血球移行率の高い薬物の溶血の影響評価は出来ないのでは？

同意は6割程度，SIL-ISか否かで対応が違う意見有り

具体的な基準は他に無い。論文化された基準であれば説得力があると考えられる。

結論

⇒IS response 変動で高脂血漿/溶血血漿影響評価は可能
⇒WPの基準は受け入れ可能

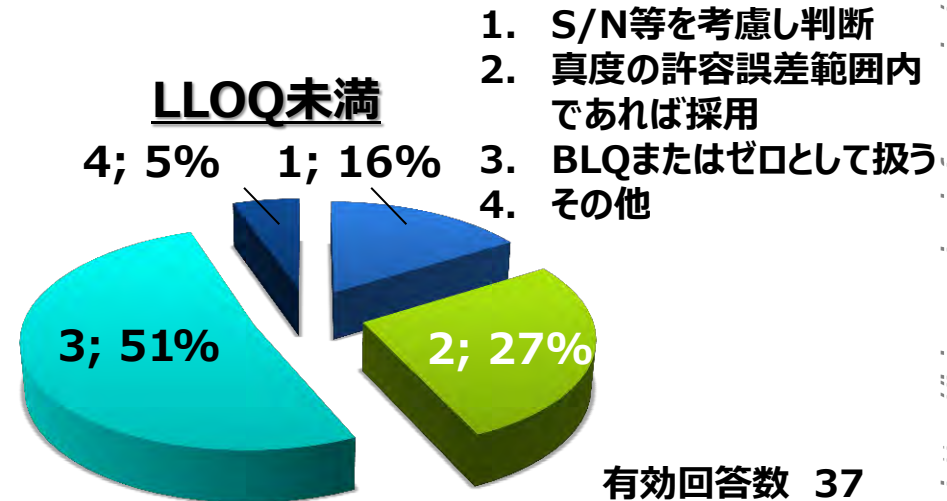
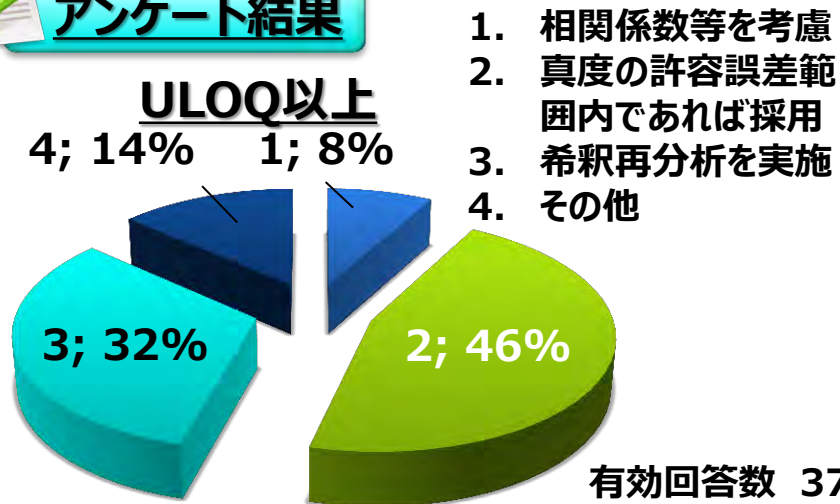


その他

定量範囲外への外挿

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
EBF	科学的な判断評価にもとづく外挿は可能	
DG	LLOQ未満は不可	

アンケート結果



ULOQ以上は外挿可が多いが、LLOQ未満はSVでも外挿不可が多い。



結論

⇒ ULOQ以上は許容誤差以内であれば外挿可能
LLOQ未満は外挿不可で、BLQまたはゼロとして取り扱う。

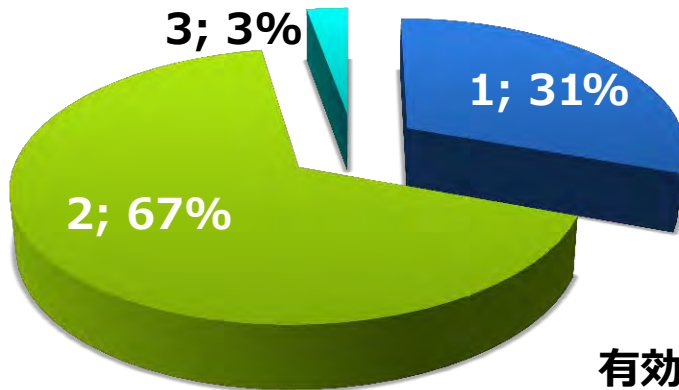


他の試験項目

希釈の妥当性

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	必要に応じて In study validationで実施	
DG	単回用量漸増試験などでは定量対象の濃度範囲が広い ため Pre-study で希釈の妥当性評価の必要性がでくる	

アンケート結果



有効回答数 36

1. WPに合意
2. DGに合意
3. その他

Pre-studyで実施が理想的だが、必要が生じてから In-studyで実施でもよいという意見が多数

結論

⇒Pre-studyまたはIn-studyのどちらかで実施すれば良い。

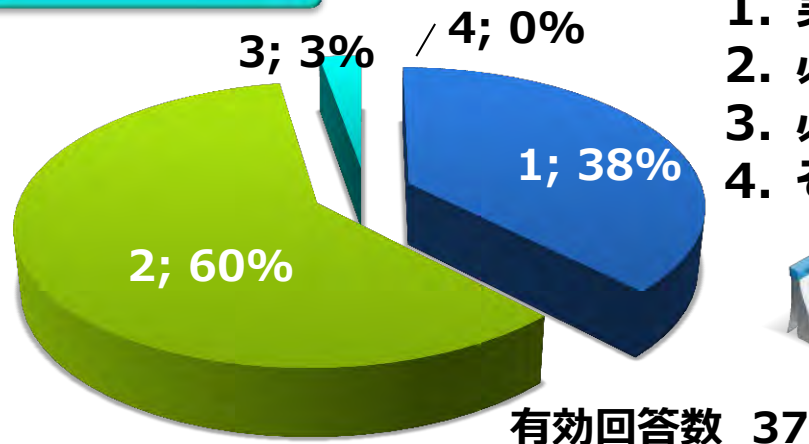


他の試験項目

ISR（代謝物，尿，組織）

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	不要	実施
DG	実施する意義を考えて対応する （薬効評価に重要な場合など）	WPに合意

アンケート結果



1. 実施しなくてもよい
2. 必要に応じて実施
3. 必ず実施
4. その他

実施しないまたは必要に応じて実施が9割以上で、必須とする意見は少数となっている。



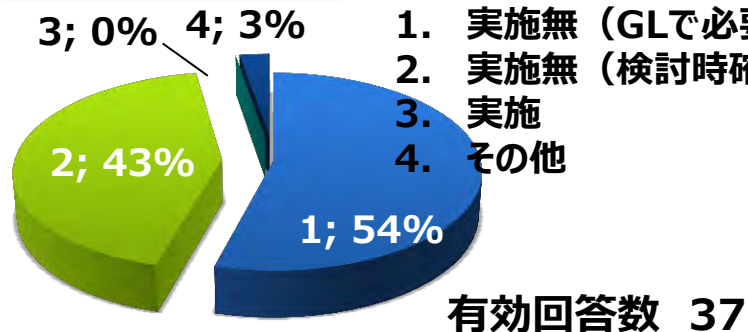
結論

⇒ 代謝物，尿，組織でISRは必須でない。

		Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
回収率	WP	不要	
	DG	WPに合意	
キャリーオーバー	WP	Pre-studyでは実施せず，In-studyで影響評価	
	DG	予備検討中に検出したときには積極的な対応が必要	

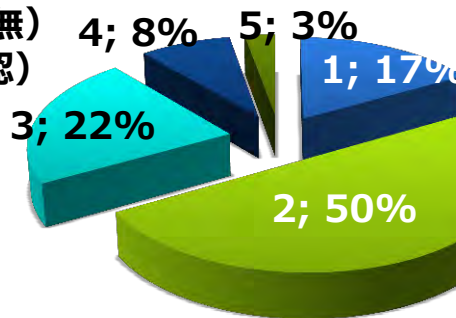
アンケート結果

回収率



1. 実施無（GLで必要無）
2. 実施無（検討時確認）
3. 実施
4. その他

キャリーオーバー



1. Pre-及びIn-study 共に評価しなくてよい
2. WPに合意
3. 検討時に懸念の場合 Pre-studyで評価
4. Pre、In-study共に評価
5. その他

アンケートコメント

試験法検討段階で回収率が低い方法は避けるため，試験は必要ない。

検討時に評価している回答者が多く妥当と考えられた。

結論

⇒ 実施しないで一致

⇒ 問題がなければ，
pre-studyでも実施しない

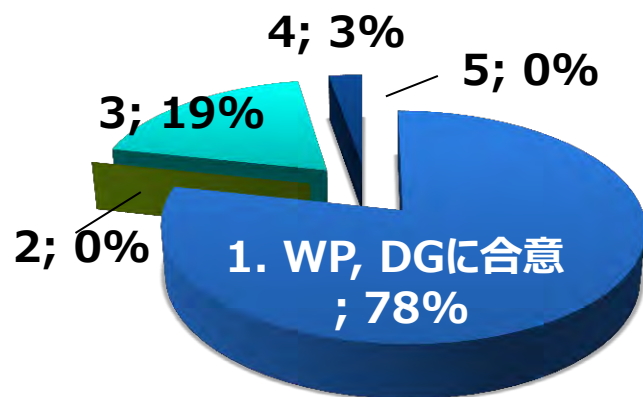


その他

試料採取方法

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
EBF	吸着の影響や安定化剤添加の必要性などを試験の開始前に検討し、文書化しておくことが重要	
DG	予備検討で吸着の影響や安定化剤添加の必要性は確認しておくべき。	

アンケート結果



有効回答数 37

1. WP、DGに合意
2. SVとしてpre-studyで実施し、報告書に記載
3. 注意が必要な場合、SVのpre-studyで実施し、報告書を作成
4. In-studyで問題が生じた場合に確認
5. その他



おおよそ事前に検討しておけば良いという意見で、予備検討の重要性が増している。



結論

⇒ 試料採取方法は事前に検討しておけば良い。



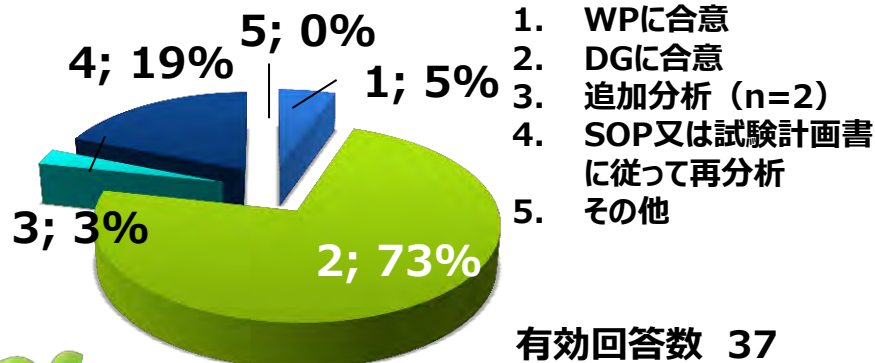
その他

再分析

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
EBF	実施しない	n=2で再測定
DG	Scientific judgment	SOPまたは試験計画書に従う

アンケート結果

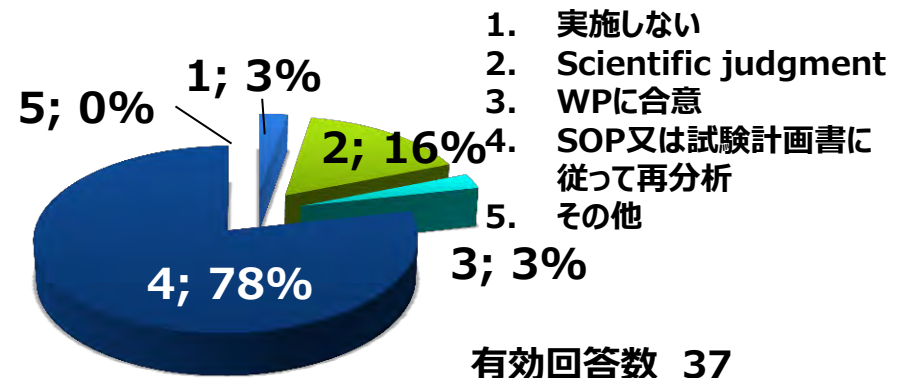
代謝物，尿，組織



結論

⇒ Scientific judgmentの意見が多数で事後評価が受入れ可

血漿未変化体（開発初期段階）



⇒ SOPに従うが約8割で組織・尿と逆転

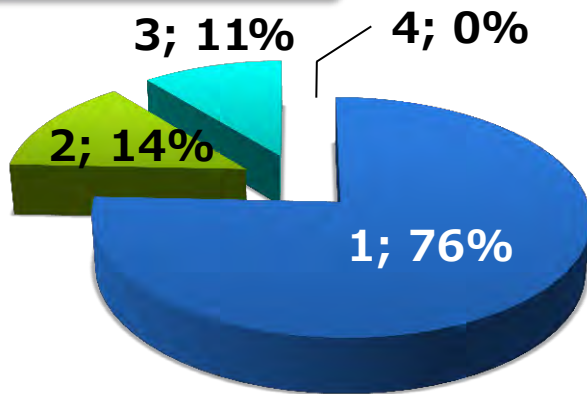


その他

試験計画書・報告書

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	簡略化を推奨	
DG	WPに合意	

アンケート結果



1. 計画書/報告書いずれも簡略化して問題ない
2. 計画書は簡略化可, 報告書は通常レベル
3. 計画書/報告書いずれも簡略化して問題ないが, QA監査は必要
4. その他

有効回答数 37



アンケートコメント（抜粋）

申請資料にするのであれば, SVでもQA監査は実施すべき。

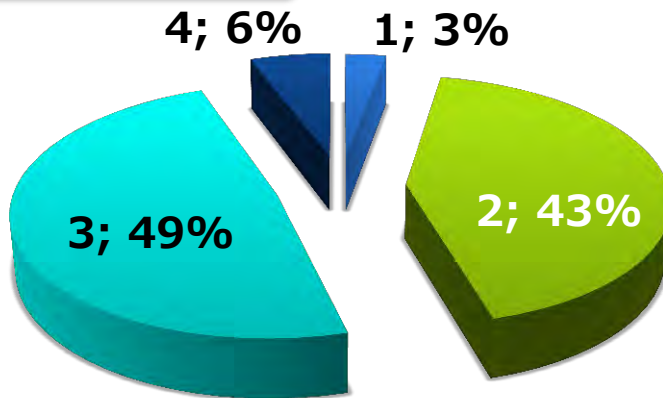
簡略化は受け入れられるが, 申請データにSVはNGという回答あり。そもそも「SVとは」が認識不十分な回答者もいるようで, もっと啓蒙が必要。

結論

⇒ 簡略化に問題はないが、QA監査の是非とは切り離して考えるべき。

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	どのような場合に実施するか、何を実施するか定めるべき	
DG	国内企業ではほとんど整備されていない	

アンケート結果



1. はい
2. いいえ。SV/TA試験の経験あり
3. いいえ。SV/TA試験の経験なし
4. その他

有効回答数 35

アンケートコメント（抜粋）

SVのSOPはあるが、TAのSOPは無い。



結論

SOP整備までは至っていないが、考え方は広まってきている印象を受ける。
今後の課題として、後追いで文書化するなどの対応が考えられる。

⇒ 手順書は多くの会社で整備されていないが、実施の拡がりは認められている。

検量線・QC試料のマトリックス

マトリックスマッチング・代替マトリックスの利用について

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	マトリックスマッチング可	N/A
DG	マトリックスマッチング可 状況により代替も可	N/A

アンケート結果

DGの意見に合意可能ですか？

合意可:**87%**、合意不可:13%



代替マトリックスとマトリックスマッチングの認識が回答者によって差があった。
前提条件の提示が必要だったかもしれない。



結論

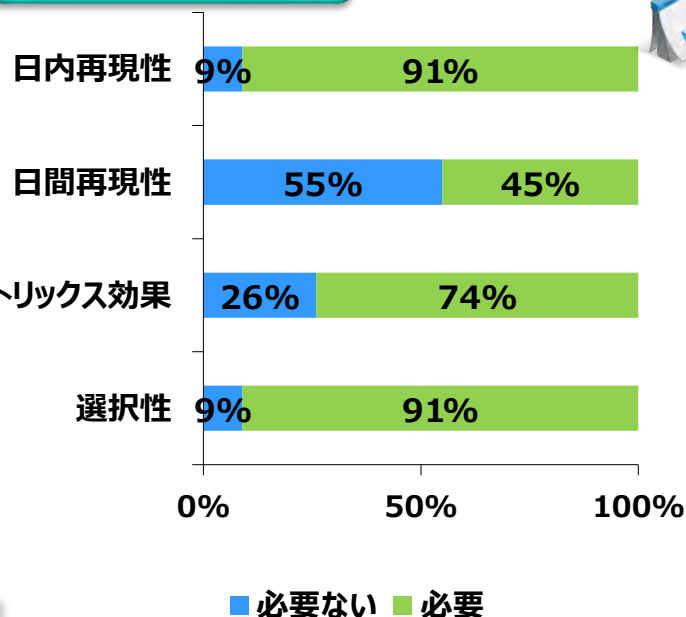
⇒ DGの意見に賛成多数であるが、回答者の代替マトリックスやマトリックスマッチングへの認識が不十分と考えられた。

検量線・QC試料のマトリックス

マトリックスマッチングの評価項目

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	25/30%(LLOQ)	20/25% (LLOQ)
DG	試験の重要度が低い場合は25/30%も可 マスバランスなどでは少なくとも20/25%	WPに合意

アンケート結果



これらの項目を実施しないで良いと言える理由が見当たらないという意見や、安定性評価が必要であるという意見があった。日間再現性実施については意見が分かれた。

SIL-ISならマトリックス効果の評価は必要ないのでは？



結論

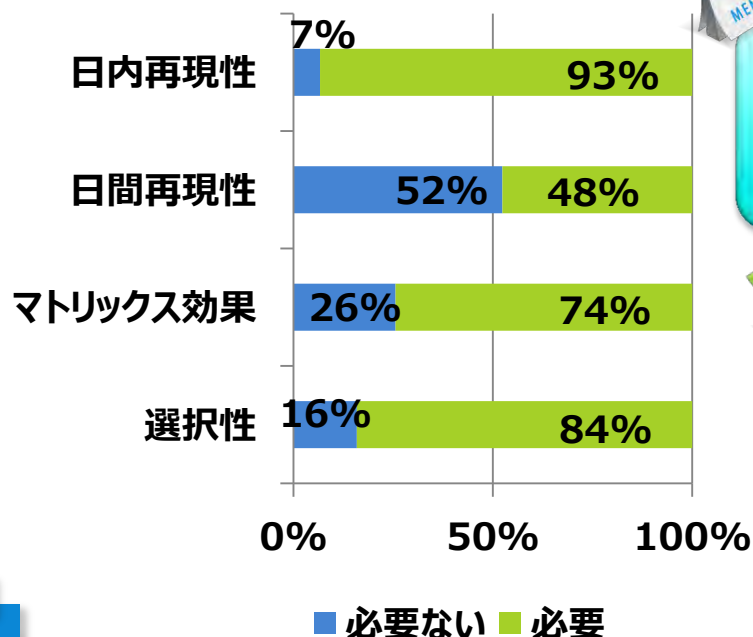
⇒ 日内再現性，選択性，マトリックス効果は基本的に評価する。

検量線・QC試料のマトリックス

代替マトリックスの評価項目

	Assay appropriate SV 代謝物・尿・組織	Stage appropriate SV 開発初期（未変化体）
WP	3濃度, n=3	4濃度, n=5
DG	WPに合意だが、代謝物・尿・組織でも 高感度分析が求められる時にはLLOQの評価が必要	

アンケート結果



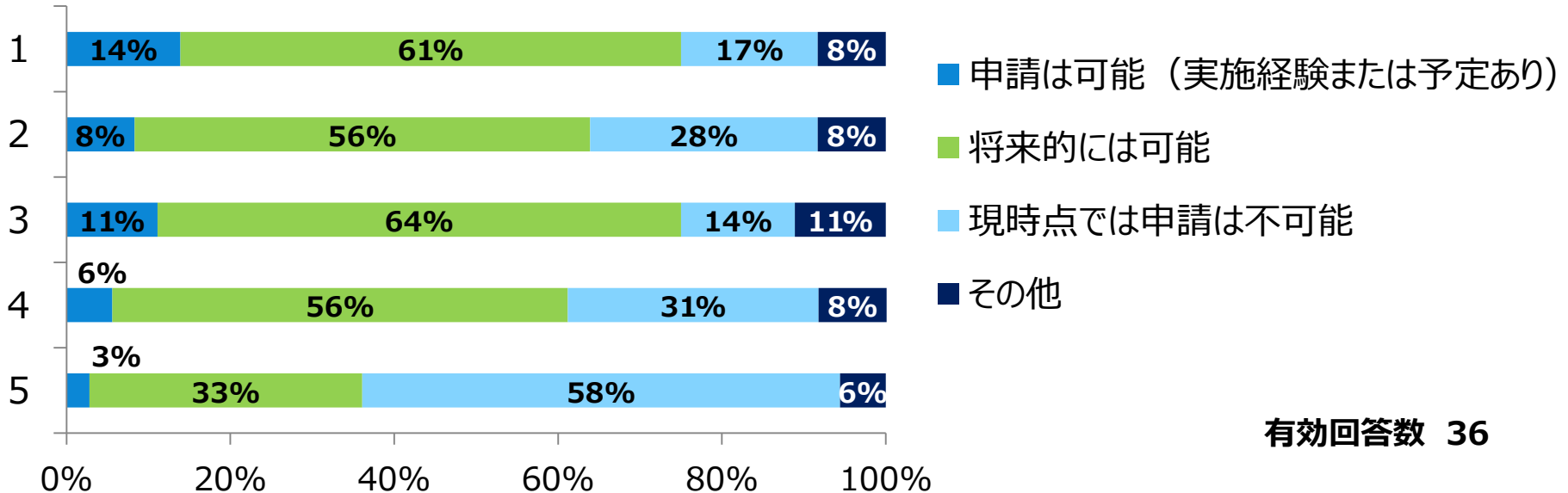
回答結果はマトリックスマッチングと同様。
マトリックス効果は代替マトリックスで評価しても
意味はないという意見もあった。

結論

⇒マトリックスマッチングと同様な項目
実施。ISに同位体を用いることは有効
と考えられた。

EBFの5区分のSV国内申請・承認

アンケート結果



EBFの5区分

1. 血漿中代謝物 (ICH-M3(R2)可否判断のため) 測定
2. 尿中 (未変化体) 測定
3. 組織中 (未変化体) 測定
4. 開発初期の非臨床血漿中未変化体測定 (初期のGLP-TK測定を含む)
5. 開発初期の臨床血漿中未変化体測定 (初期のPhase 1試験を含む)



結論

⇒ 血漿中代謝物, 尿中及び組織中未変化体はSVで申請可能と考えられるが, 血漿中未変化体は申請不可

SVについてDG内検討結果からアンケート調査を実施
有効回答数58の回答を得た。



アンケート結果 (対象 **国内のバイオアナリスト**)

＜WPの主張＞

BMVガイドラインのスコープ外である尿や組織，代謝物測定，または開発初期段階の非臨床・臨床試験のバイオアナリシスはガイドラインの基準に必ずしも従わなくてよい。



結論

⇒ 上記の主張が

概ね受け入れられている状況と考えられた。

しかしながら，細部についてはまだ検討や周知が必要と考えられる。



SVの今後

Scientific Validation(SV)

から

Fit for Purpose Validation(FFP-V)へ？

今年の WRIB(Workshop on Recent Issues in Bioanalysis : 4月3-7日Los Angelesで開催)では、**SV**ではなく、**FFP-V**としての議論が活発だった。

→ **SV** と **FFP-V** の違いは？

*In vitro*試験のScientific Validationについて

*in vitro*試験 [*]

分析法の検証方法に
一定の考え方が存在していない

Scientific Validation

目的に応じた適切な分析方法

概念が適用できるか...

JSSX 2017 **
で報告

日本の実態に照らした適否も含めアンケート調査を実施・評価

* B. Buscher et al., Bioanalysis for plasma protein binding studies in drug discovery and drug development: views and recommendations of the European Bioanalysis Forum. Bioanalysis (2014) 6(5):673-82.

** 2017年11月29日(水)～12月1日(金). 会場. タワーホール船堀

本発表内容の詳細について



1. 公表論文 : Bioanalysis (2017) 9(13), 963–968

Free access !

For reprint orders, please contact reprints@future-science.com

Bioanalysis

Giving consideration to scientific validation in Japanese drug application by Japan Bioanalysis Forum discussion group

“Scientific validation is still a new concept in Japan, hence, the first purpose of our activity is to have it well-recognized and discussed in detail.”

First draft submitted: 21 April 2017; Accepted for publication: 8 May 2017;
Published online: 13 July 2017

Keywords: Bioanalytical Method Validation • BMV • guideline • drug metabolites analysis • early clinical development • early preclinical development • EBF • European Bioanalysis Forum • JBF • Japan Bioanalysis Forum • scientific validation • SV • tiered approach • tissue analysis • urine analysis

Background

white paper in detail applicable to the Japa-

Nozomu Koseki^{*1}, Hiroko Ashizawa², Takuho Ishii³, Takahide Uchimura⁴, Keita Ono⁵, Saori Kuriyama⁶, Akiko Toda⁷, Kuretake Soejima⁸, Naoko Nakai⁹, Naohiro Nishimura¹⁰, Tsuyoshi Mayumi¹¹, Yutaka Yasuda¹², Tatsuya Yamakawa¹³ & Makoto Niwa¹⁴

<http://bioanalysisforum.jp/>



2. 第8回JBFシンポジウム発表スライド
JBFホームページ（ <http://bioanalysisforum.jp/> ）から
ダウンロード可能