

DG2013-01

検量線及びQC試料の調製法

五十嵐 春江¹、小山 亜紀²、青山 昭則³、副島 呉竹⁴、
富樫 一天⁵、竹上 和弘⁶、山田 直人⁷、落合 美登里⁸、
匹田 久美子⁹、鈴木 香織¹⁰、川端 光彦¹¹

グラクソ・スミスクライン株式会社¹、株式会社JCLバイオアッセイ²、科研製薬株式会社³、
富山化学工業株式会社⁴、株式会社住化分析センター⁵、株式会社東レリサーチセンター⁶、
日本たばこ産業株式会社⁷、東和薬品株式会社⁸、田辺三菱製薬株式会社⁹、小野薬品工業株式会社¹⁰、
株式会社新日本科学¹¹

- Discussion Group (DG)の目的
 - 各試験区分における国内の添加試料調製の実務手順を調査し、手順の多様性とその分布を把握する。
 - 異なる手法の特徴を認識し、その意義について考え、推奨の方法を提案する。
- Discussionの範囲
 - Small molecule限定
- トピック
 - 検量線試料の調製
 - QC試料の調製
 - 特殊試料(組織、代替マトリックスなど)



活動内容

➤ メンバー募集:

2013/9/9, 募集開始、DGサポーターのアンケートから「検量線 & QC試料調製」に興味があると回答いただいた46人を対象とした。9/25メンバー決定、11名。

➤ Kick off Meeting (Face to Face):

10/10, 3つのトピックとチームを決定

➤ アンケート作成

- ・メールベースで議論
- ・2W~4W毎にWeb会議

➤ Survey 2回:

①第1弾 12/19~27、②第2弾 1/7~1/14

➤ 集計 & 議論

議論継続中!!



アンケート：質問分類

第1弾(①):70問、第2弾(②):38問 (いずれも回答者背景2問含む)

検量線:

- 濃度設定
- 標準溶液の溶媒
- 希釈系列
- 標準試料の調製
- 2成分以上の同時定量

検量線・QC共通:

標準溶液の溶媒・添加割合、添加順序、
調製担当者、調製器具

マトリックス:

- 代替マトリックス
- ブランクマトリックスの管理
- 組織中安定性

QC:

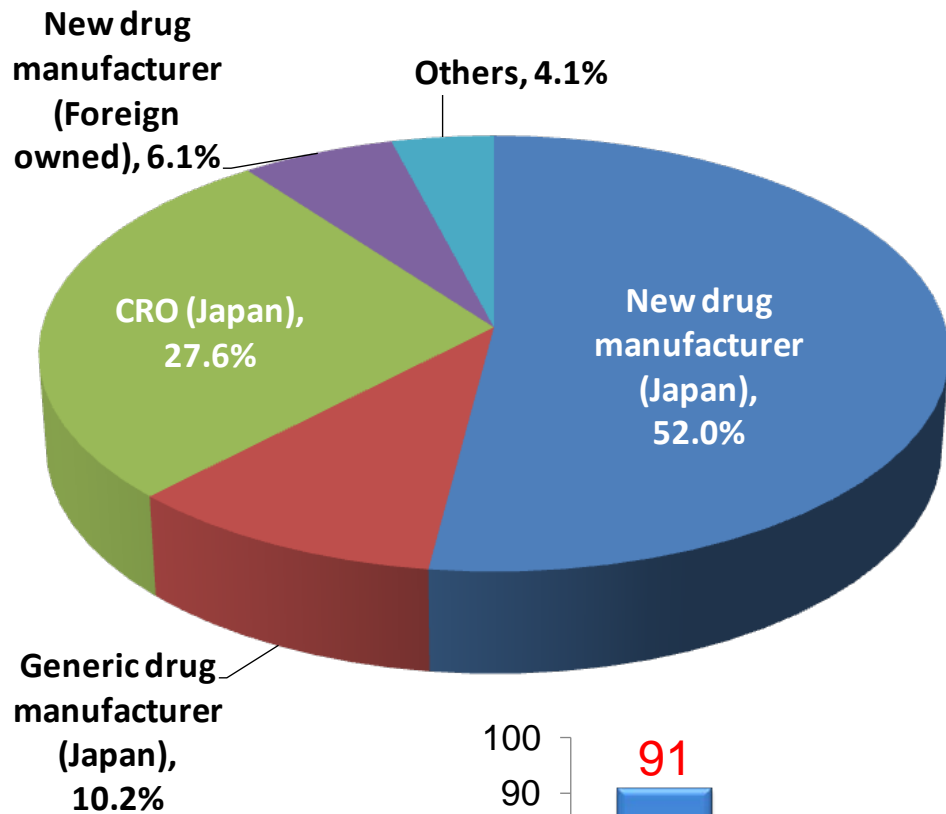
- 濃度設定
- 調製時期・容量
- 測定対象以外の化合物の添加
- 試料の濃度確認
- ベンチトップ安定性
- 回収率・マトリックス効果
- 全血中安定性
- 希釈妥当性
- 並行保存QC・希釈QC



アンケート：回答者背景

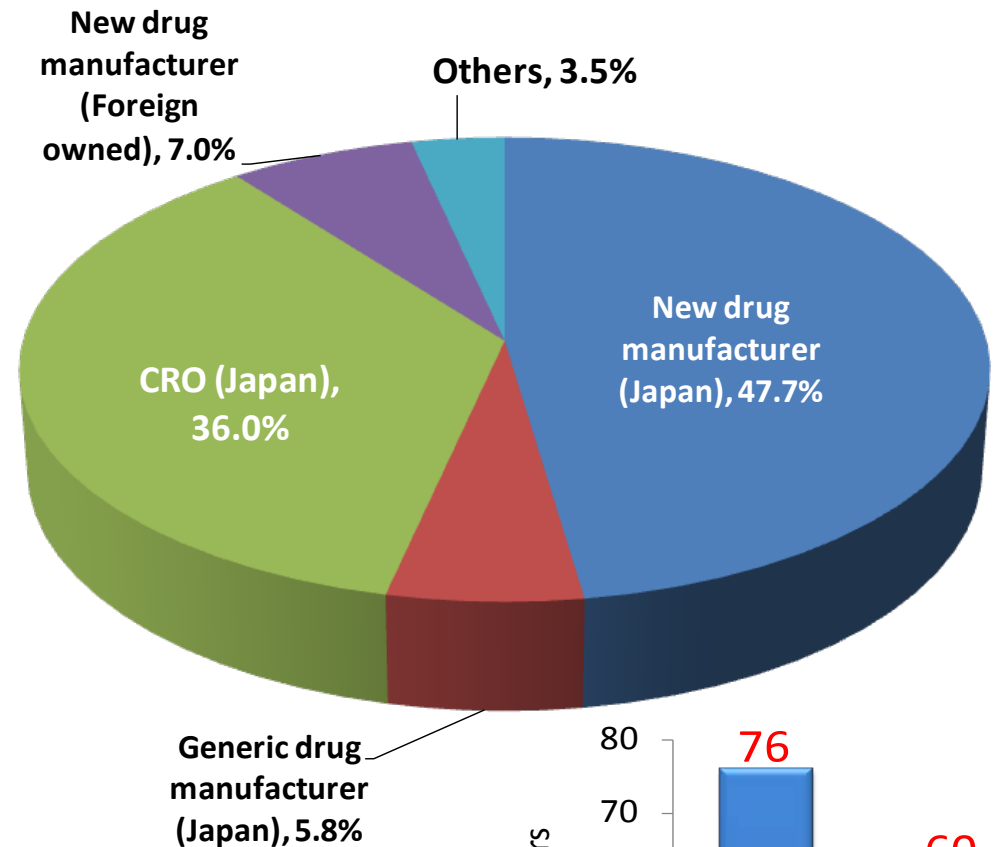
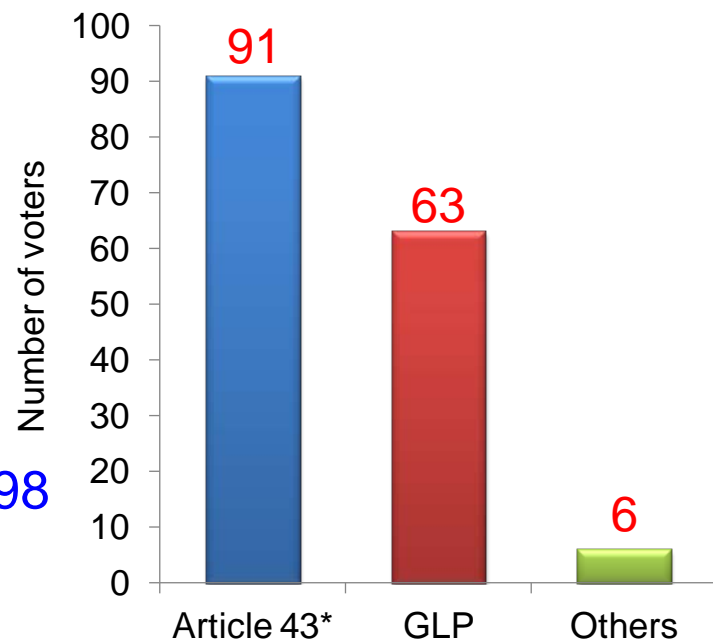
Q1. あなたの所属についてお聞かせください。

Q2. 基本的に従っている規制要件は何ですか？（複数回答可）



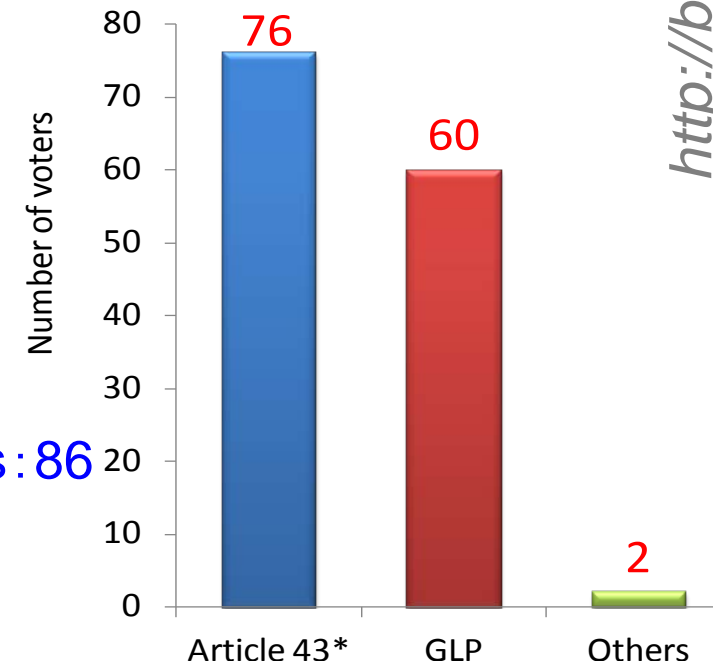
第1弾(①)

Total number of voters: 98



第2弾(②)

Total number of voters: 86



*The reliability standard for application materials in Japan.

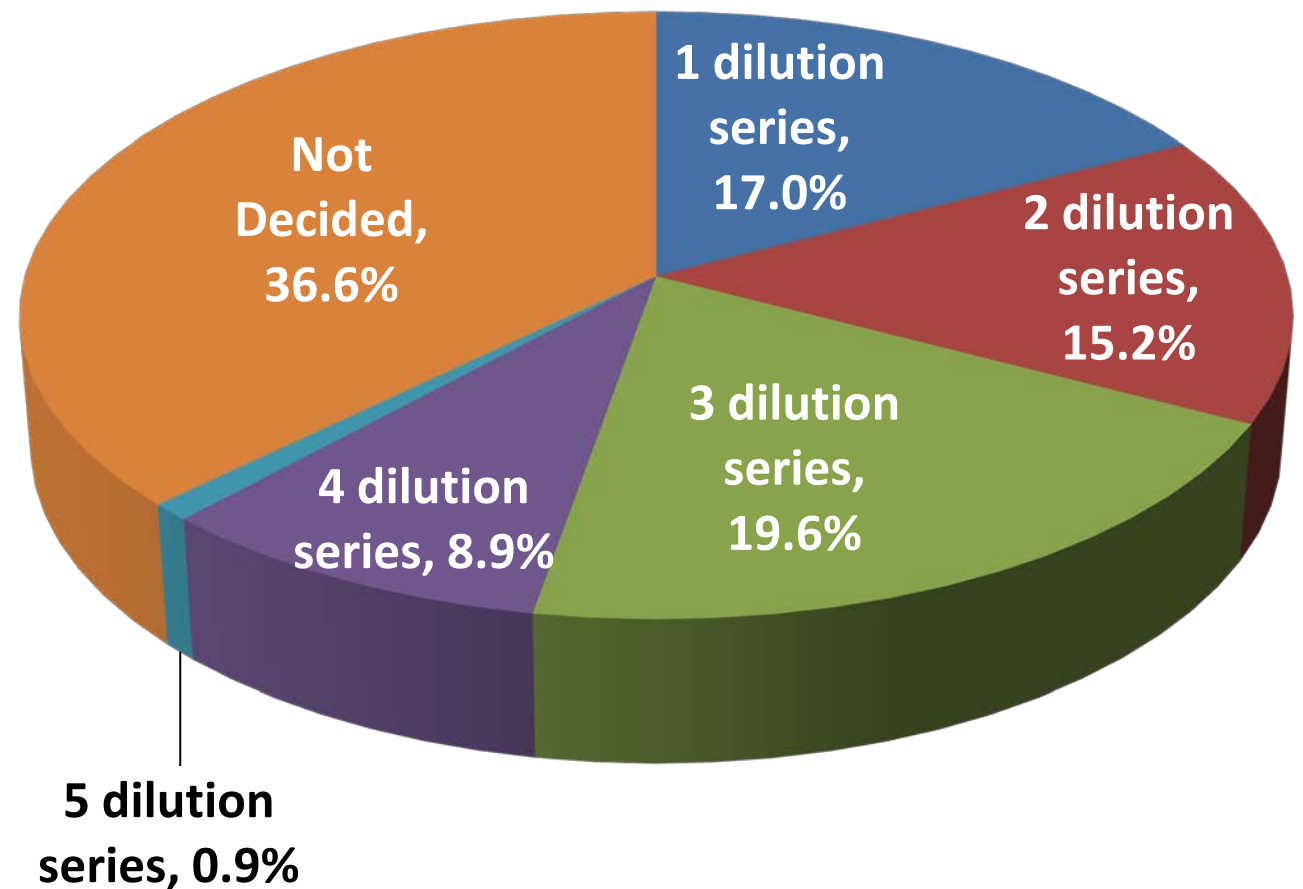
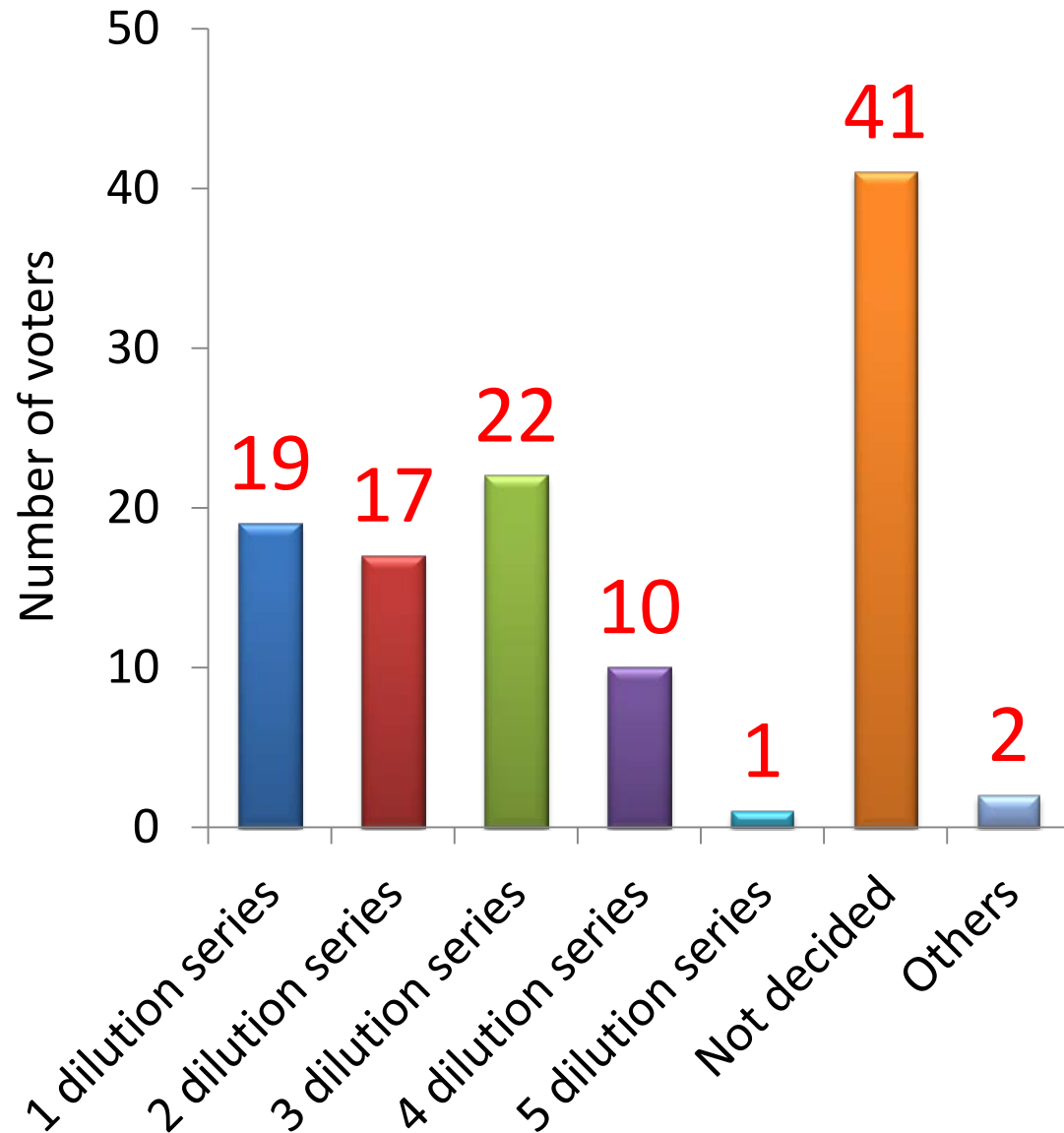
検量線

青山 昭則 (科研製薬株式会社)
匹田 久美子 (田辺三菱製薬株式会社)
山田 直人 (日本たばこ産業株式会社)



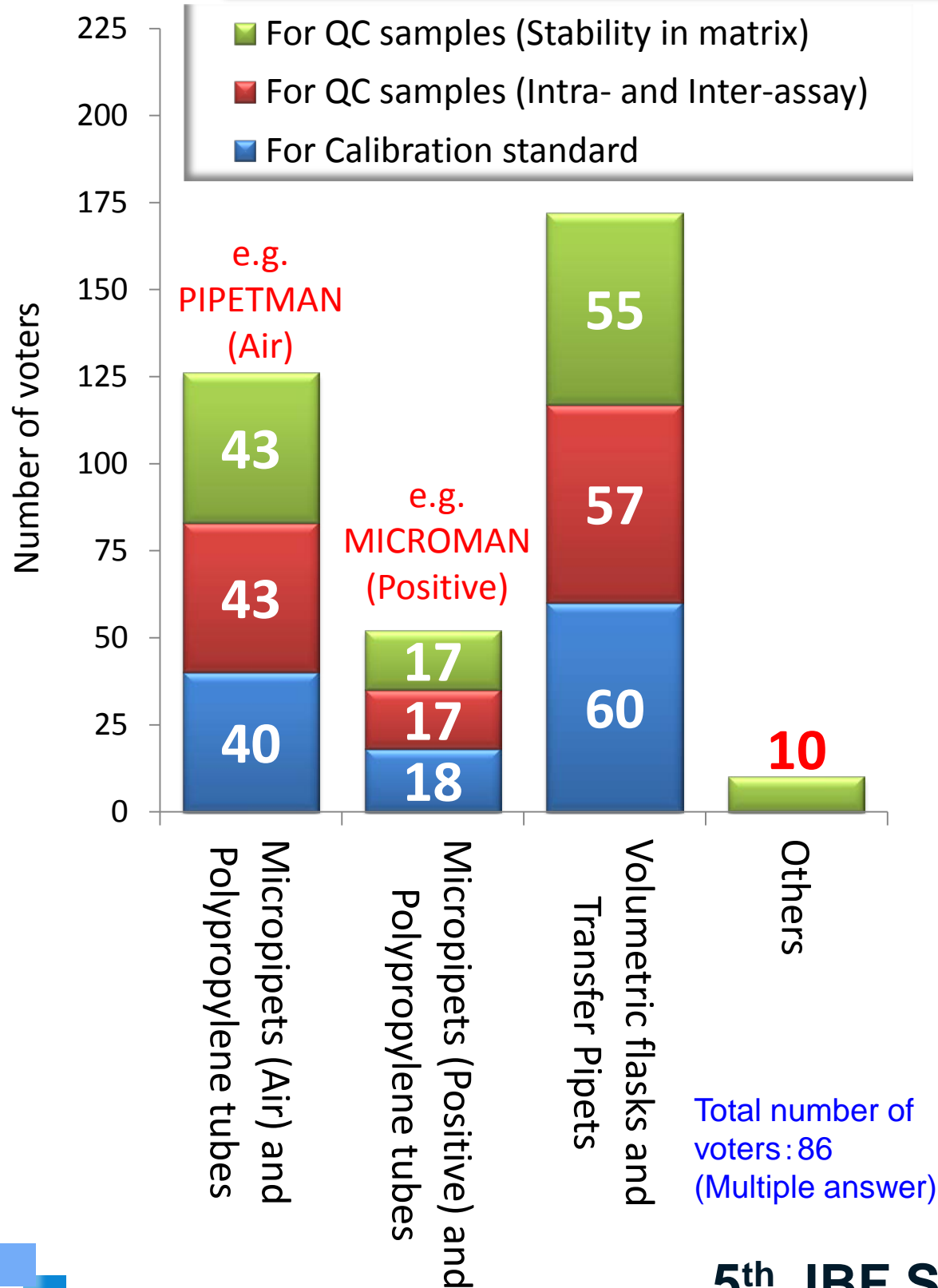
検量線：希釈系列の数

①_Q8.濃度範囲が**3オーダー**の検量線用標準溶液（Working solution）を調製する場合、その**希釈系列数**をご回答下さい。（例：1～1000 ng/mLの検量範囲で、標準原液から1000、750、500、250 ng/mLを調製し、①1000→100→10→1、②750→75→7.5、③500→50→5、④250→25→2.5と段階希釈した場合、系列数は「4」となります）（複数選択可）



Total number of voters : 112
(Multiple answer)

検量線・QC共通：使用する器具



②_Q16.標準溶液 (Working solution) を調製する際にどのような調製器具を用いますか?

Others選択者のコメント(n=9)

1st choiceがPPチューブ: 3件

PPチューブ+マルチペット(連続分注型ピペット)

PP製チューブ+ピペットの組み合わせが圧倒的に多いが、吸着等の問題がある場合、ガラスのメスフラスコ+ホールピペットを使用せざるを得ない。

最近ではほぼPPチューブ+ポジティブです。古い化合物のメソッドでは、メスフラスコ+ホールピペットを使用したことがあります

1st choiceがガラス器具: 5件

ホールピペットではなく、メスピペットを用いています。

ガラスに吸着するような化合物の場合には、PP製の容器に変更し、ピペットマンなどを用います。

ホールピペット+ガラス製チューブ

検量線用試料及び日内・日間再現性用QC試料はPPチューブではなく、ガラス容器を用いる。

試験によっては、稀にPPチューブ+ピペットマンを使用している。

ケースバイケース: 1件

ピペットはマイクロマン使用。PPチューブかメスフラスコかはケースバイケース



Discussion : 器具と希釈系列

<調製器具の比較>

<希釈系列数の比較>

3オーダーの検量線：
1~1000 ng/mL を例に

	ガラス器具	容量可変式ピペット
e.g.	ホールピペット メスフラスコ	ピペットマン (Air) マイクロマン (Positive)
公差	◎ メスフラスコ: 約0.5%以下 ホールピペット: 約1%以下	○ Air: 約2%以下 Positive: 約2%以下
1回調製量	多い	少ない
用時調製	△	◎
バッチ調製	◎	△
ガラスへの吸着	×~○ コーティング品で回避可	◎
PPへの吸着	◎	×~○ コーティング品で回避可
操作の簡便さ	△	○
調製者間の誤差	○	△
コンタミネーション	△ 洗浄に留意が必要	◎ ディスポ器具を使用

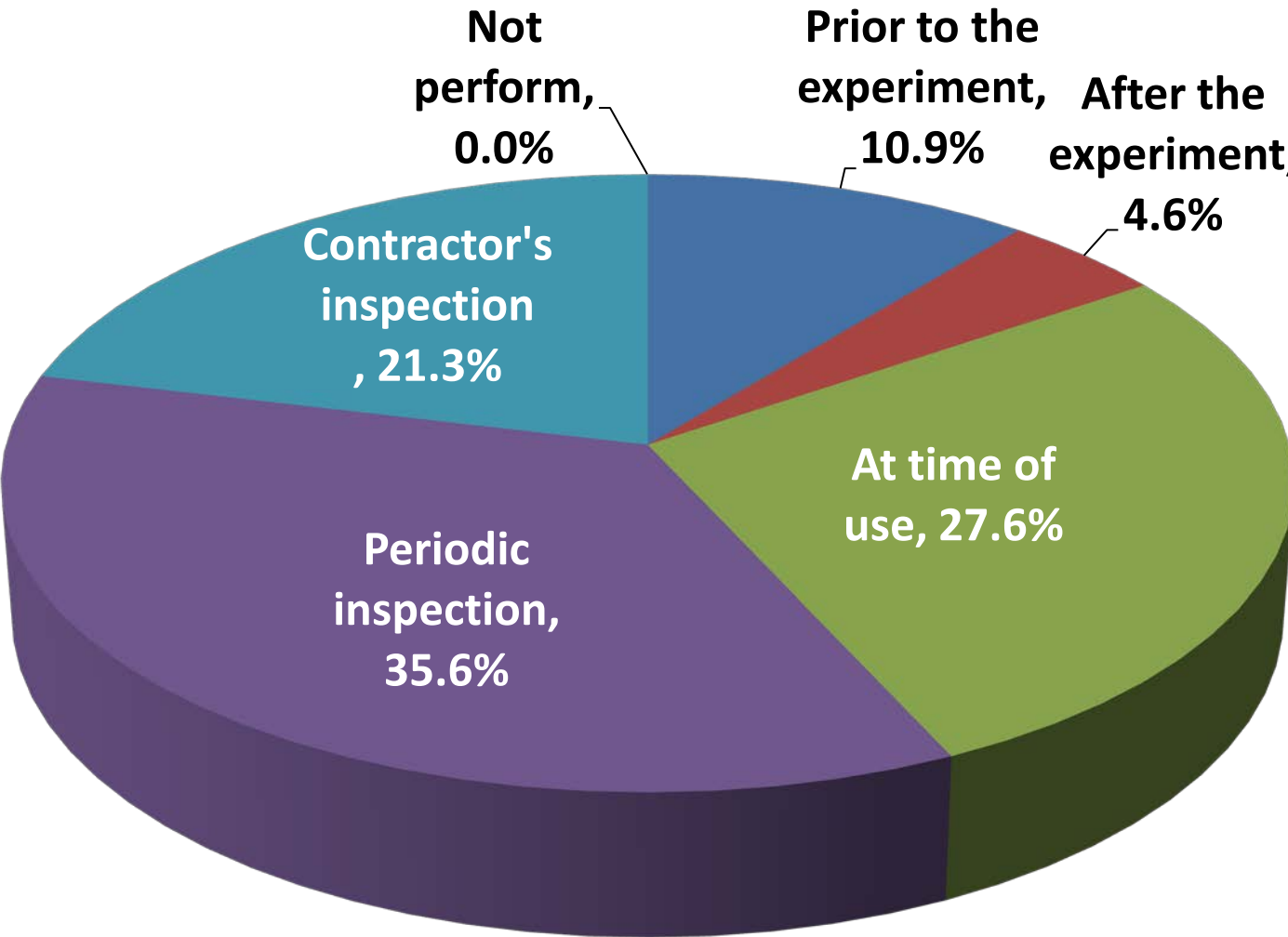
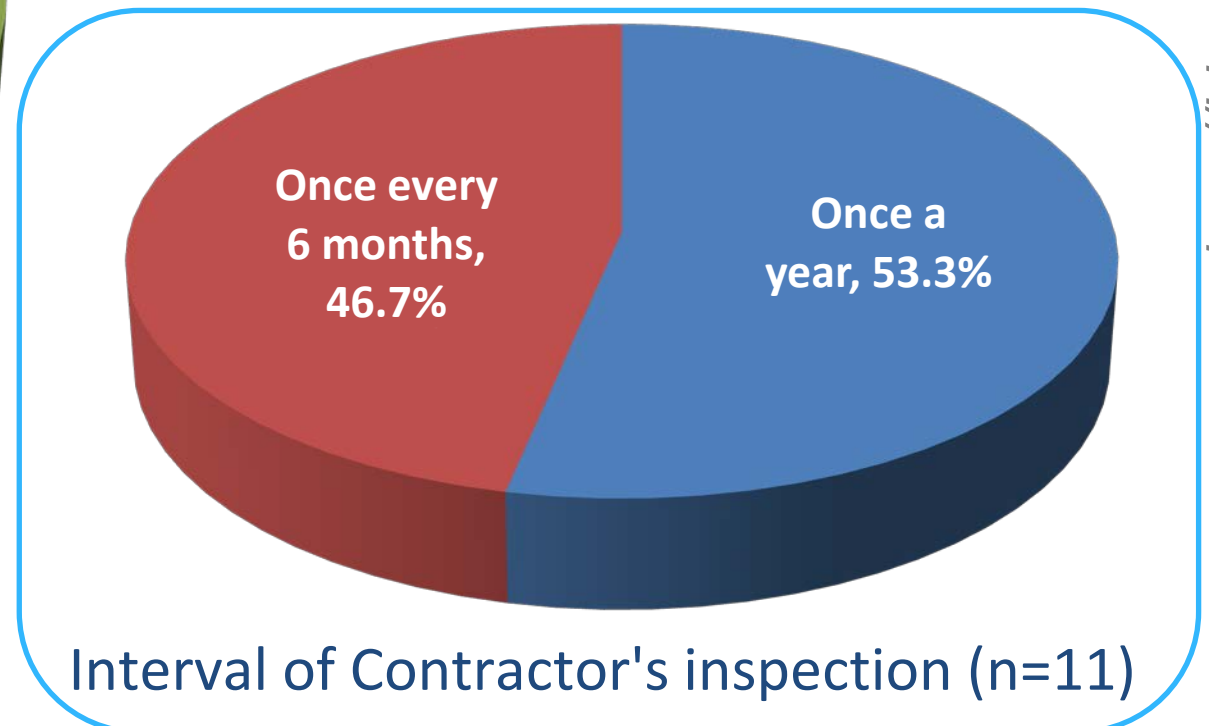
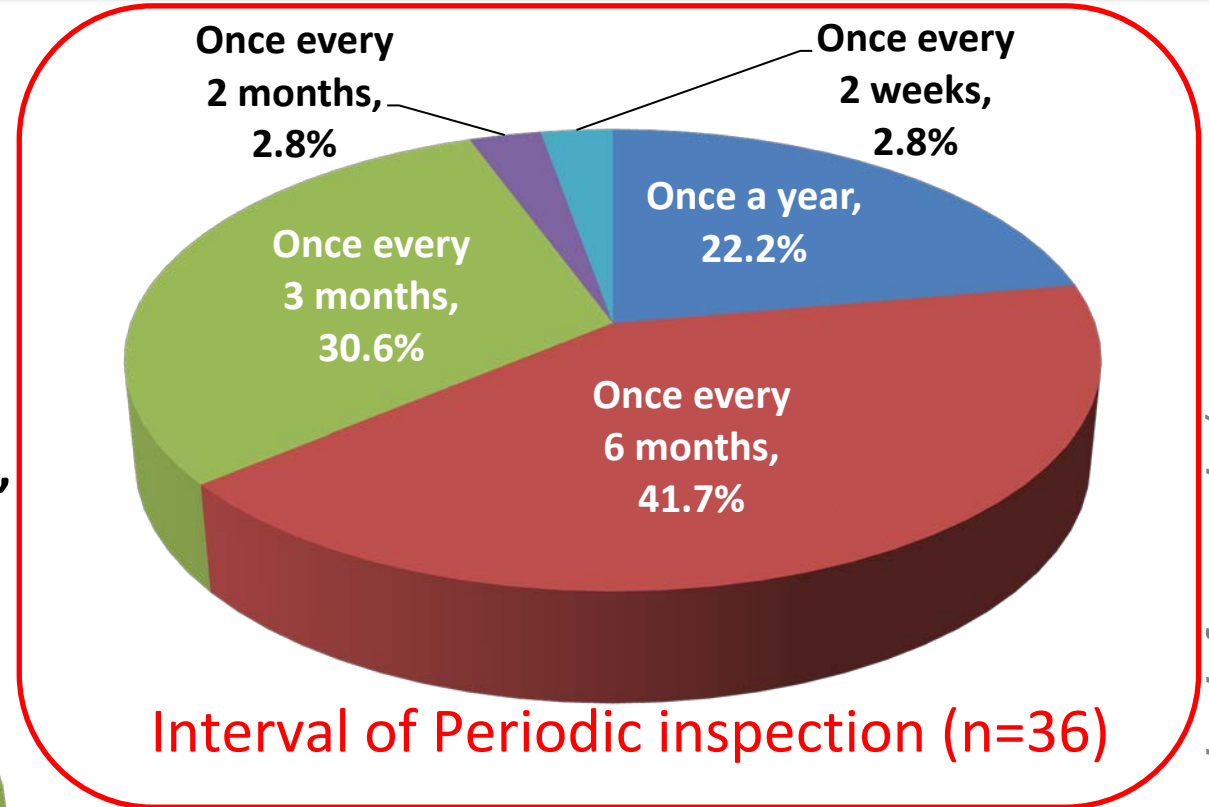
	希釈系列数「1」	希釈系列数「2」以上
誤差	◎ 同じピペットで等倍希釈の場合、理論的には誤差は「ゼロ」	○ 公差による誤差が生じるが、均等にばらつく
調製者間の誤差	◎ 同じピペットで同量採取するため、個人差が発生してもキャンセルされる	○ 公差による誤差が生じるが、均等にばらつく
段階希釈数	多い	少ない
吸着の影響	△	○
操作の直感性	○	◎
「-5%」誤差の場合のLLOQの理論値	◎ 誤差なしのため 1.000 ng/mL	△ 1000 × 0.095 ³ の誤差 0.870 ng/mL
「-2%」誤差の場合のLLOQの理論値	◎ 誤差なしのため 1.000 ng/mL	○ 1000 × 0.098 ³ の誤差 0.947 ng/mL
Y切片	◎ 理論上は原点を通る	○ Y切片が生じるが、検量線としては問題ない

http://bioanalysisforum.jp/



検量線・QC共通：ピペット管理の実際

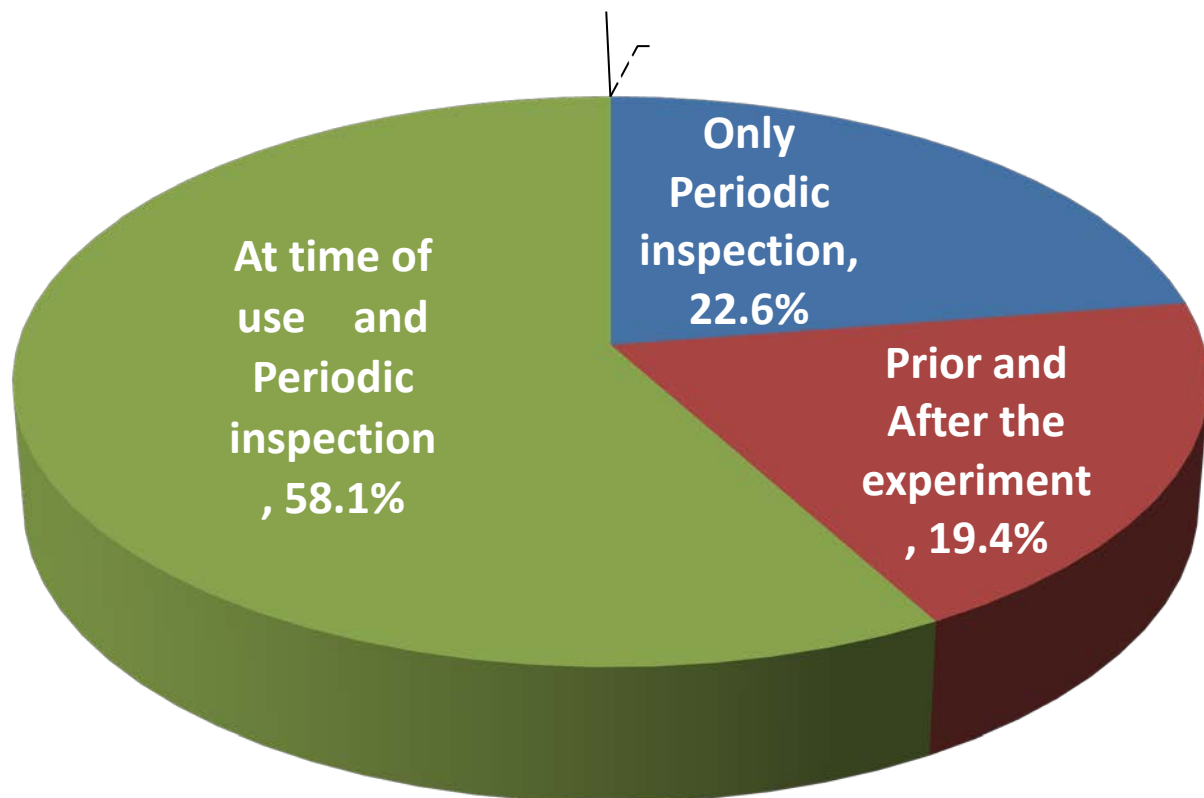
②_Q17. 容量可変型ピペットはどの
タイミングで**精度管理**をしますか？
 (組み合わせで複数回答可)



Total number of voters : 86
 (Multiple answer)

<http://bioanalysisforum.jp/>

②_Q18. Q17における組み合わせについて解説をお願いいたします。



Total number of voters : 62

★定期・業者点検のみ:14件

抜粋: 半年に1回定期点検を実施し、基準を満たしたピペットを使用する。

抜粋: GEは年2回申請のため、1申請のスケジュールの前後に点検を行う。

★使用時点検＋実験後の定期(業者)点検:36件

抜粋: 原則、使用前の点検と定期点検の結果で担保。使用の有無・頻度にかかわらず、1年に1回、定期点検実施。

抜粋: 試験の「後」で挟み込みはせず、定期点検の結果を使用して担保。使用時点検はリークチェックのみ。

抜粋: マイクロピペットのSOPに3ヶ月に1回の精度管理と試験実施時の任意の精度確認(頻度は試験計画書で規定する)がSOPに定められている。試験実施時の精度確認は試験操作に使用する日毎に実施することが多い。

★実験前後の挟みこみ:12件

抜粋: 申請資料に用いられるデータを取得する場合は、実験日ごとに最初に確認して使用(実験が数日ある場合は、最終日を除き挟み込みで保証していることになる。また、半年に1回の定期点検で問題がなければ、最終日も挟み込んで保証していることになる。

抜粋: 実験の前後で挟み込みを実施し、精度に問題が無いことを確認する。実験期間の長短は考慮しない。

★使用時(実験前)点検の手法:約50例

抜粋: 水を秤量し精度確認(意見多数、約40件)。

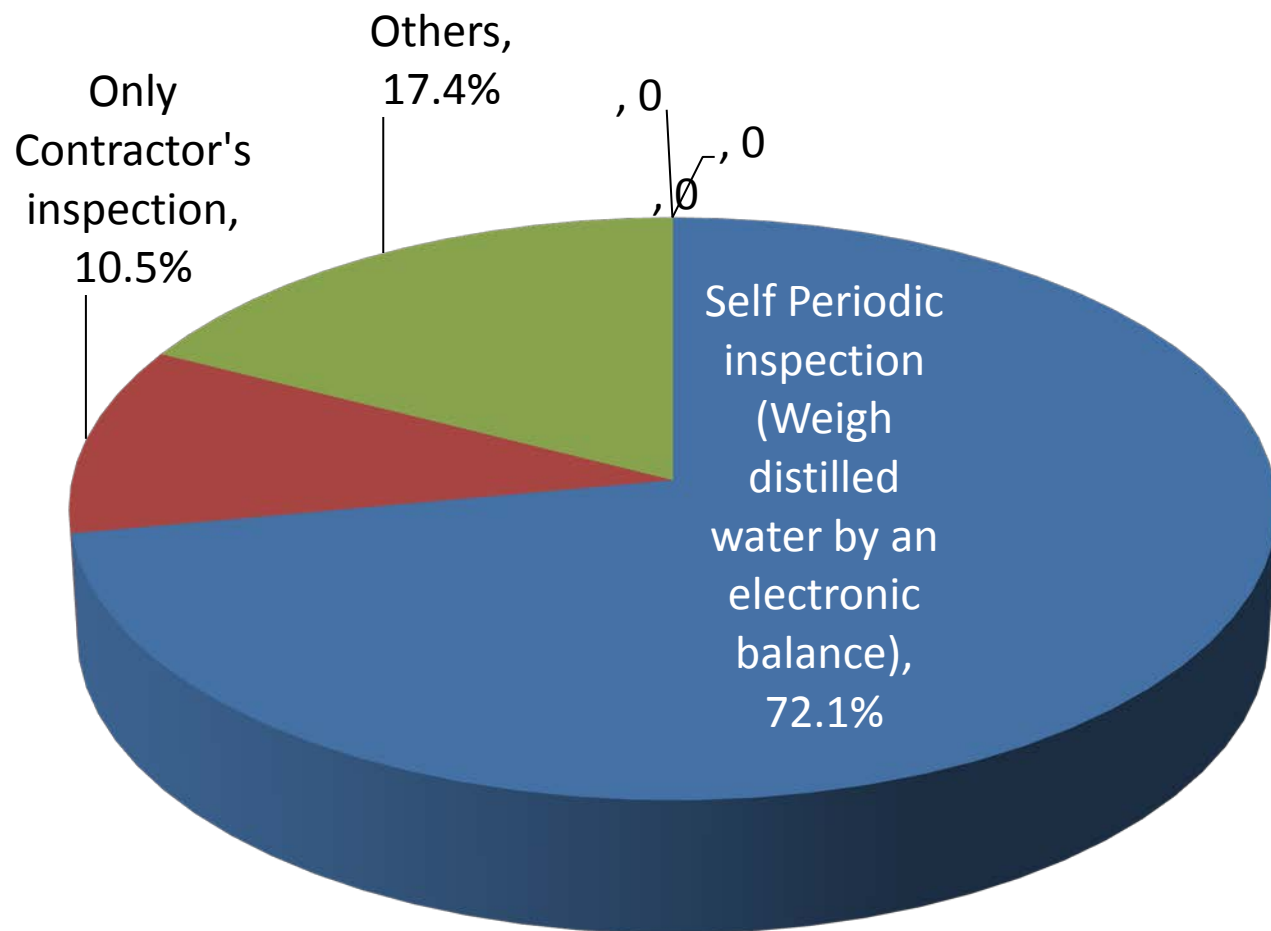
抜粋: 動作確認とリークチェックのみ(4件)。

抜粋: 専用の(目盛り付き)チップなどで確認(5件)。



検量線・QC共通：ピペット管理の実際

②_Q19. 業者点検以外の精度管理について、どのような方法で実施していますか？



Total number of voters: 86

Others選択者 のコメント(n=15)

★吸光度法・検定機器で実施:12件

抜粋: 使用時点検(日常点検)は重量法(n=1で真度)、定期点検は吸光度(n=4で真度・精度)

抜粋: 200 μ L、1000 μ L用ピペットの場合は質量法、100 μ L未満はピペット検定機で精度管理を行っている。

抜粋: 使用時点検は、アキュマスター(吸光度)を使用。

抜粋: 定期点検には電子天秤を使用。使用時点検は通常ピペットキャリブレーションを使用。

抜粋: 容量の小さいものは、光度計と専用試薬を用いて確認する
抜粋: ピペットキャリブレーションシステム機器(吸光度法)を使用する

★その他:3件

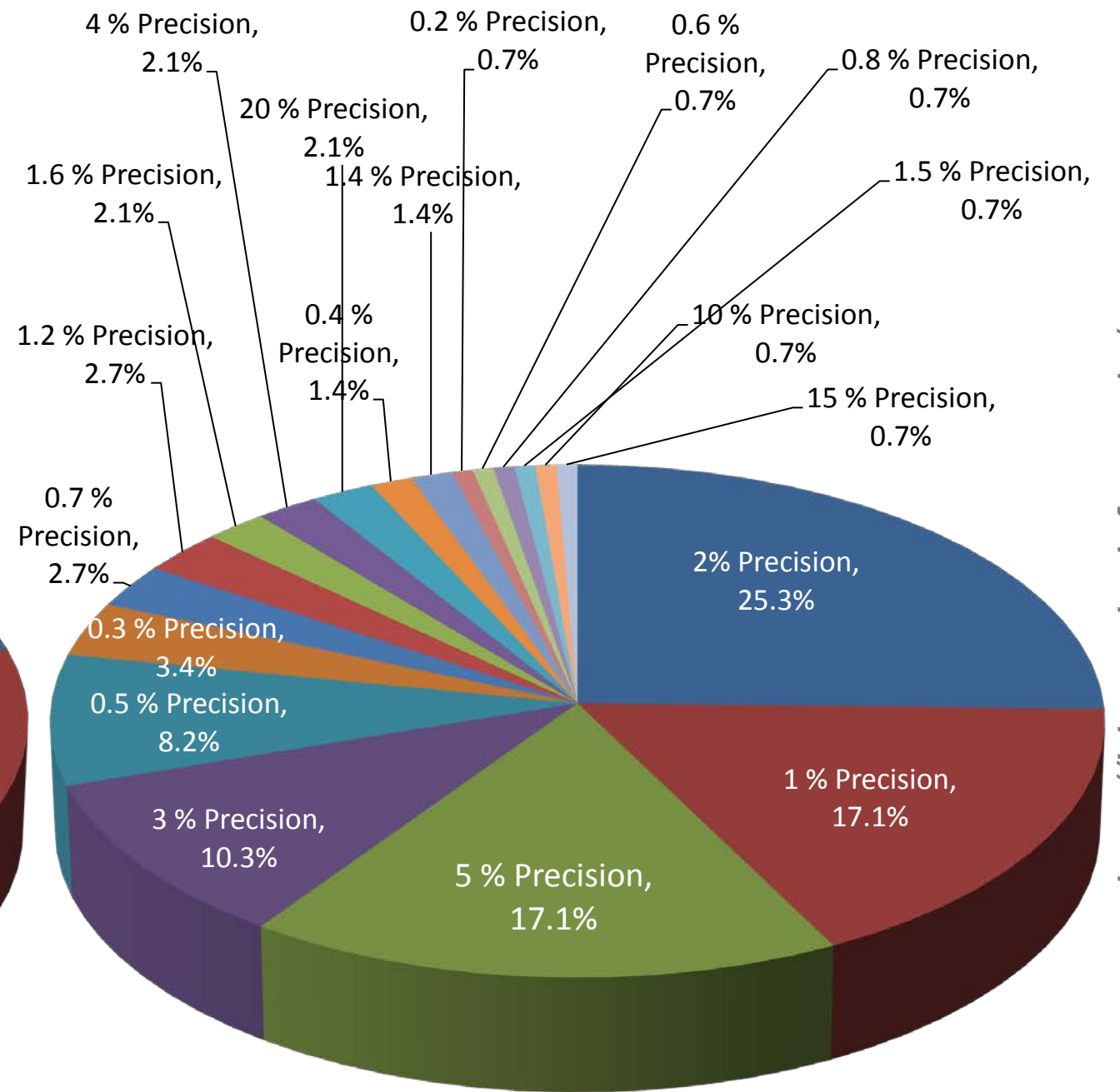
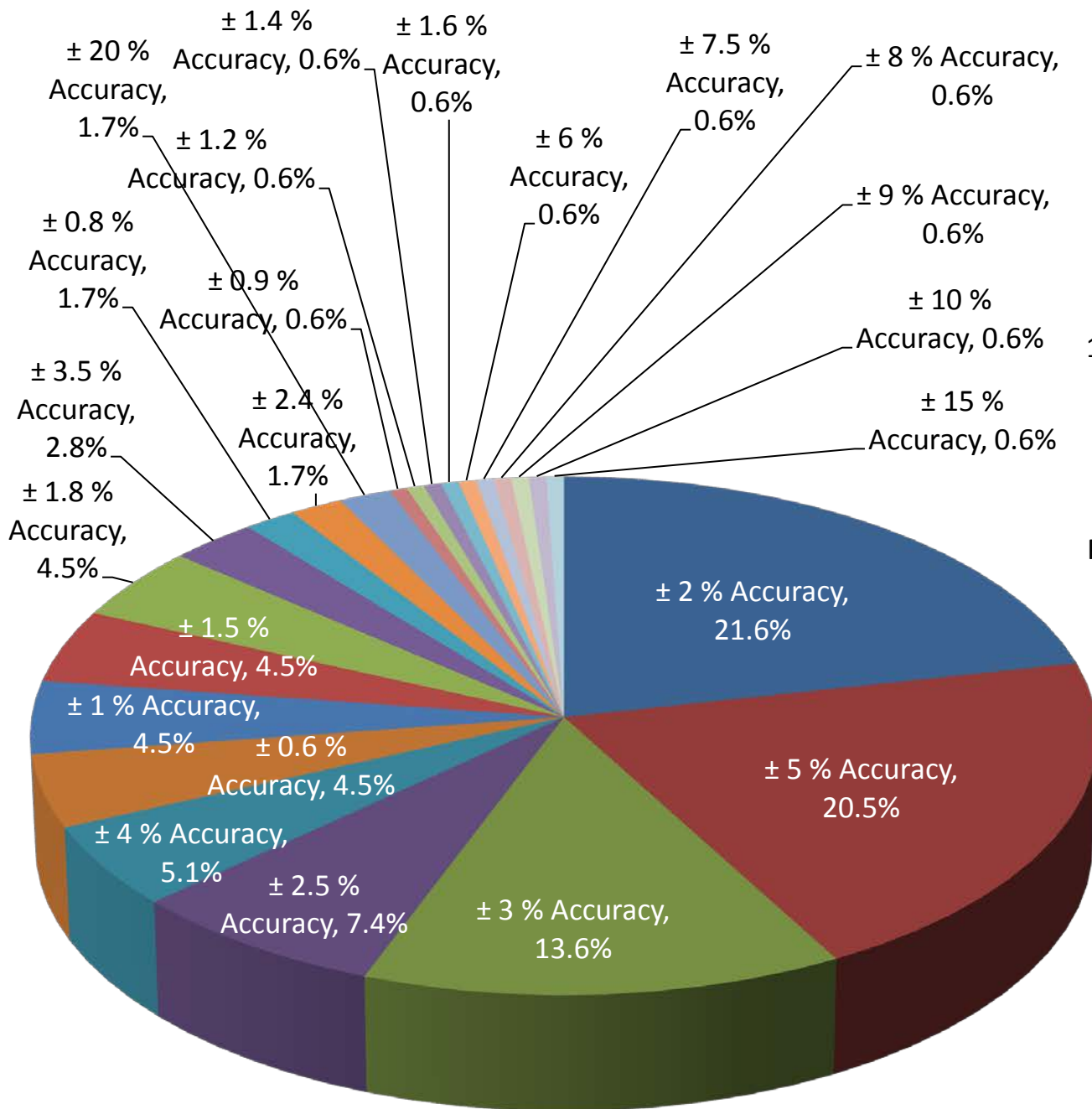
定期点検は電子天秤で蒸留水を秤量。使用時点検では目視判断。

電子天秤で超純水を秤量。

リークテスト。容量がマークされたチップを使い、その量がサンプリングされること、液漏れがないことを確認する。



検量線・QC共通：管理のクライテリア



真度のクライテリアは±2%, ±5%, ±3%, ±2.5%, ±4%で約70%を占める

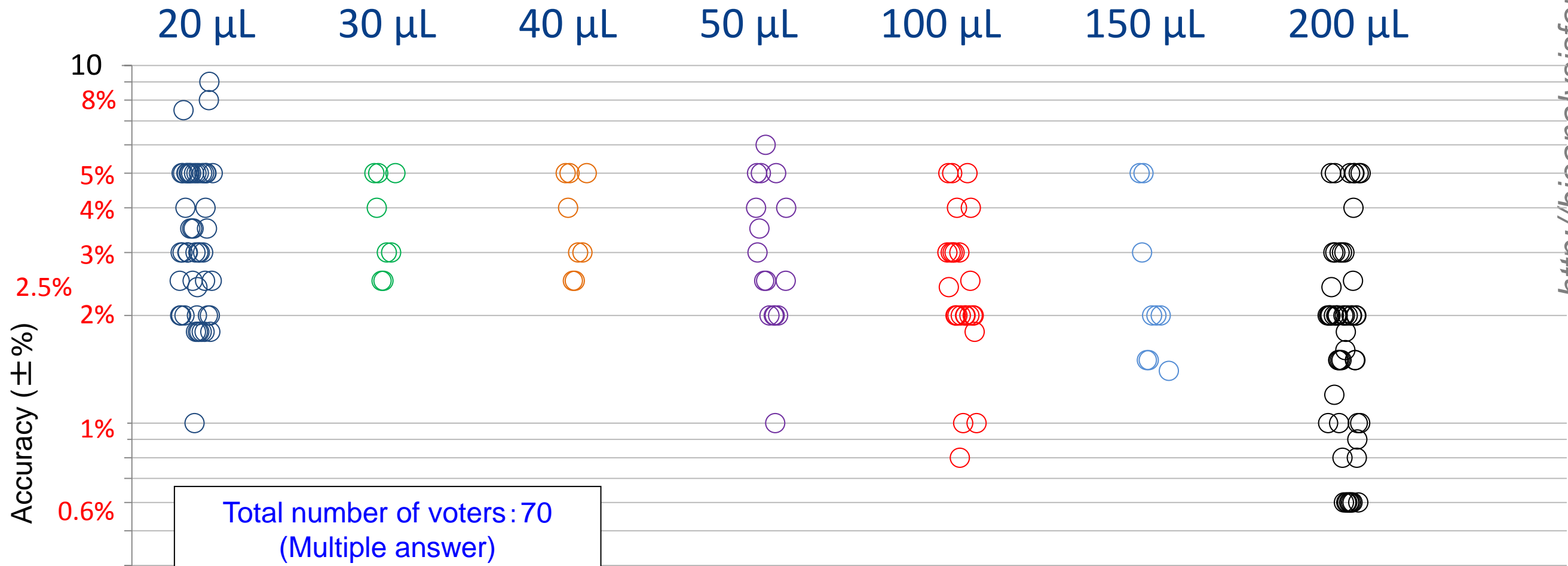
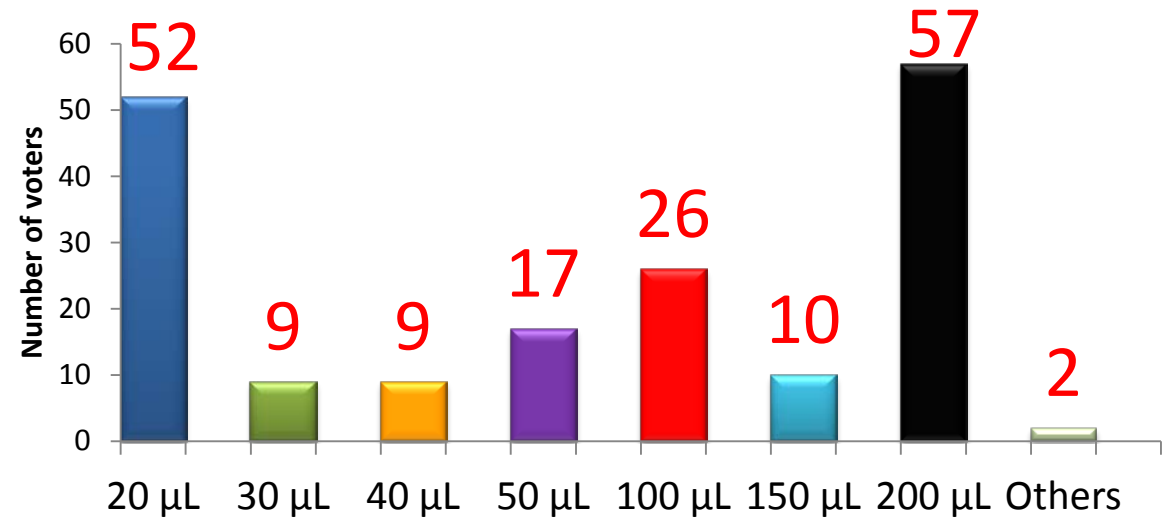
精度のクライテリアは2%, 1%, 5%, 3%で約70%を占める

<http://bioanalysisforum.jp/>



検量線・QC共通：点検方法（真度）

②_Q20. 容量可変型ピペット（20～200 μL ）の場合、どの**容量**で**真度**を確認していますか？（複数回答可）
また、その際の**クライテリア**についてもご記載ください。

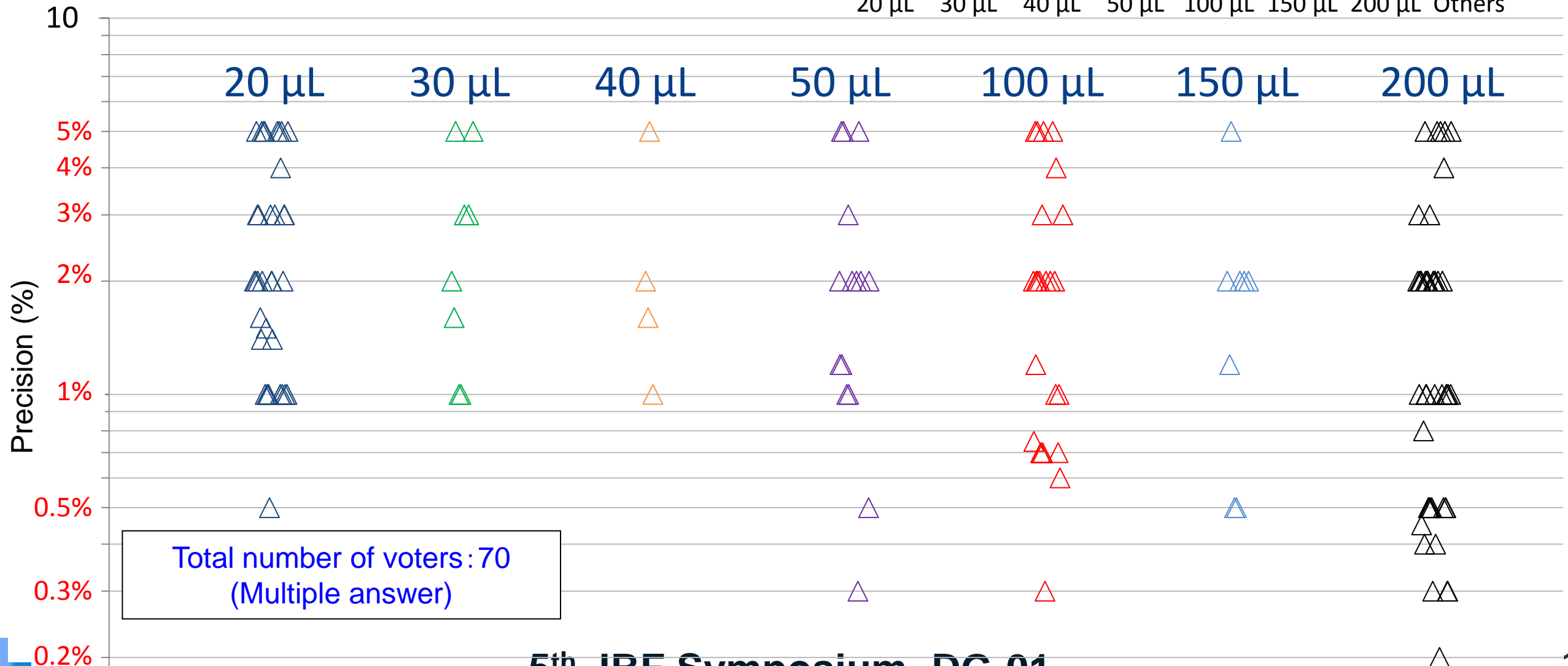
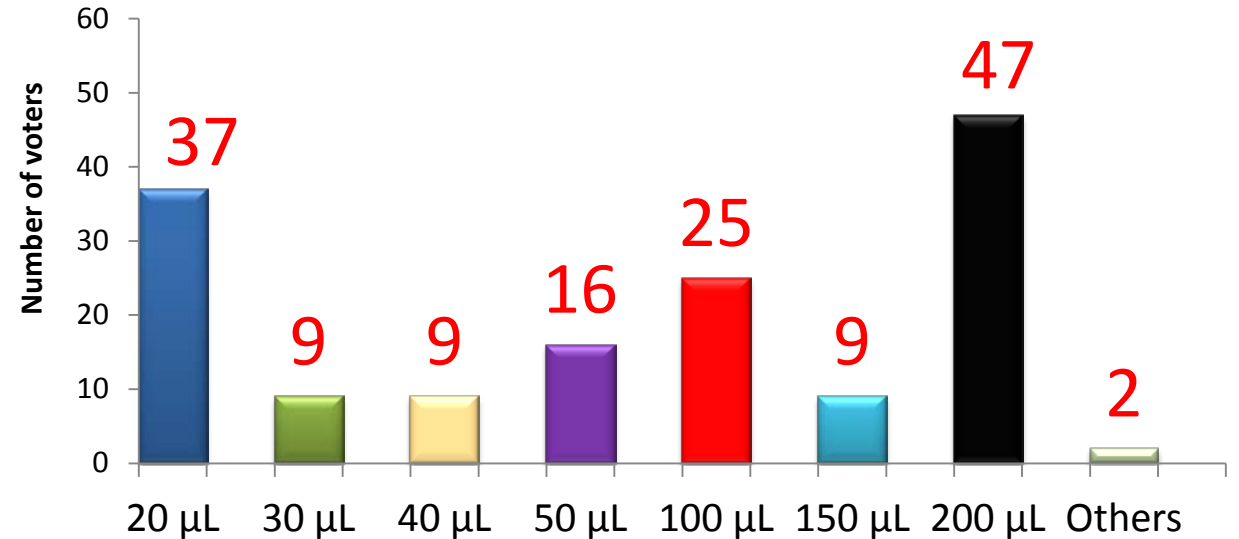


<http://bioanalysisforum.jp/>



検量線・QC共通：点検方法（精度）

②_Q20. 容量可変型ピペット（20～200 μL ）の場合、どの**容量**で**精度**を確認していますか？（複数回答可）
また、その際の**クライテリア**についてもご記載ください。



<http://bioanalysisforum.jp/>

Discussion : ピペットの管理

①容量可変式ピペットの管理

① 使用前点検＋定期（業者）点検（58.1%）

② 定期（業者）点検のみ（22.6%）

③ 使用前後で挟み込み（19.4%） の順であった。

- 検定機器や蛍光試薬（e.g.アキュマスター）の使用例もあった。
- 使用時点検：リークチェック・目盛りチップで簡略化の例もあり。

②真度のクライテリア

- $\pm 2\%$, $\pm 5\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2.5\%$, $\pm 4\%$ で約70%を占めた。

③精度のクライテリア

- 2%, 1%, 5%, 3%で約70%を占めた。

→ (\pm) 5%のクライテリアは「やや甘い」と考えられるが、

検定の実測値は (\pm) 2%以内が多いようである (DG内意見)。



Appendix : 器具の公差

Air Displacement Pipet (PIPETMAN)

	Volume (μL)	GILSON		ISO 8655	
		Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)
P-2	0.2	± 12	6	± 40	20
	0.5	± 5	2.4	± 16	8
	2	± 1.5	0.7	± 4	2
P-10	1	± 2.5	1.2	± 12	8
	5	± 1.5	0.6	± 2.4	1.6
	10	± 1	0.4	± 1.2	0.8
P-20	2	± 5	1.5	± 10	5
	5	± 2	0.8	± 4	2
	10	± 1	0.5	± 2	1
	20	± 1	0.3	± 1	0.5
P-100	20	± 1.75	0.5	± 4	1.5
	50	± 0.8	0.24	± 1.6	0.6
	100	± 0.8	0.15	± 0.8	0.3
P-200	50	± 1	0.4	± 3.2	1.2
	100	± 0.8	0.25	± 1.6	0.6
	200	± 0.8	0.15	± 0.8	0.3
P-1000	200	± 1.5	0.3	± 4	1.5
	500	± 0.8	0.2	± 1.6	0.6
	1000	± 0.8	0.15	± 0.8	0.3
P-5000	1000	± 1.2	0.3	± 4	1.5
	2000	± 0.6	0.25	± 2	0.75
	5000	± 0.6	0.16	± 0.8	0.3
P-10ml	1000	± 3	0.6	± 6	3
	2000	± 1.5	0.3	± 3	1.5
	5000	± 0.8	0.2	± 1.2	0.6
	10000	± 0.6	0.16	± 0.6	0.3

Positive Displacement Pipet (MICROMAN)

	Volume (μL)	GILSON		ISO 8655	
		Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)
M-10	1	± 9	3	± 20	10
	5	± 2	0.6	± 4	2
	10	± 1.5	0.6	± 2	1
M-25	3	± 8.3	2.7	± 23.3	10
	10	± 2.7	0.8	± 7	3
	25	± 1.2	0.4	± 2.8	1
	20	± 1.7	1	± 3.5	1.5
M-50	50	± 1.4	0.6	± 1.4	0.6
	10	± 5	2	± 15	6
M-100	50	± 1.5	0.6	± 3	1.2
	100	± 1	0.4	± 1.5	0.6
	50	± 3	0.6	± 12	4
M-250	100	± 1.7	0.3	± 6	2
	250	± 1	0.2	± 2.4	0.8
	100	± 3	1.6	± 12	4
M-1000	500	± 1	0.5	± 2.4	0.8
	1000	± 0.8	0.4	± 1.2	0.4

Transfer Pipet

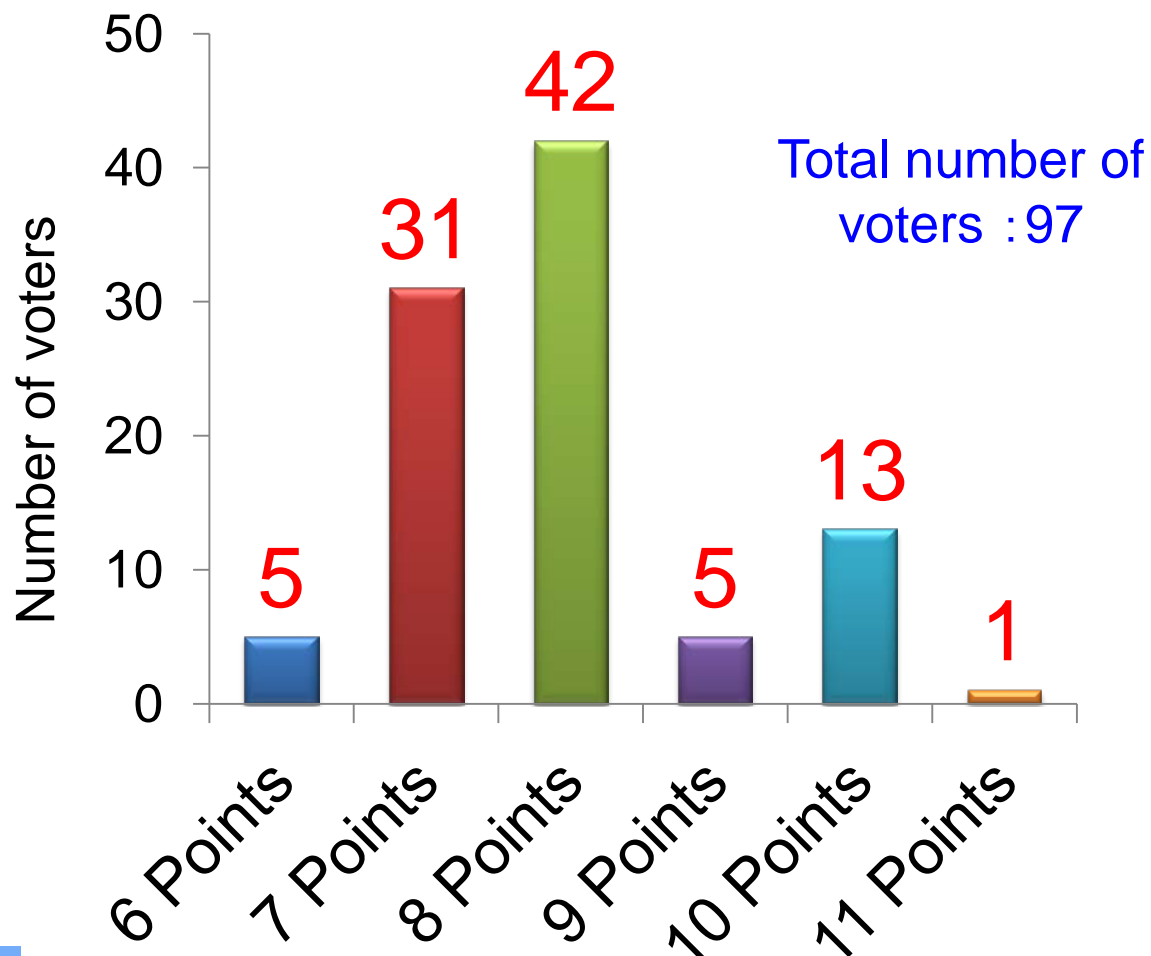
Volume (mL)	ISO Class A	ISO Class B
	Accuracy (%)	Accuracy (%)
0.5	± 1	± 2
1	± 0.8	± 1.5
2	± 0.5	± 1
5	± 0.3	± 0.6
10	± 0.2	± 0.4
20	± 0.15	± 0.3
25	± 0.12	± 0.24
50	± 0.1	± 0.2
100	± 0.08	± 0.15
200	± 0.05	± 0.1

Volumetric Frask

Volume (mL)	ISO Class A	ISO Class B
	Accuracy (%)	Accuracy (%)
5	± 0.5	± 1
10	± 0.25	± 0.5
20	± 0.2	± 0.4
25	± 0.16	± 0.32
50	± 0.12	± 0.24
100	± 0.1	± 0.2
200	± 0.075	± 0.15
250	± 0.06	± 0.12
300	± 0.083	± 0.17
500	± 0.05	± 0.1
1000	± 0.04	± 0.08
2000	± 0.03	—
3000	± 0.067	—
5000	± 0.04	—

検量線：設定するポイント数

①_Q3, 4. フルバリデーション時に**3オーダー**（1～1000 ng/mL）の検量線を作成する場合についてうかがいます。**検量線を何ポイント設定するか、もっとも多く用いる設定を以下からひとつ選択して下さい**（ブランクとゼロは除いたポイント数を選択して下さい）。



★ルールによるという意見: 8件

SOPやガイドラインで最低6ポイント以上となっているため(2件)。

1オーダーに3ポイントを設定するルールになっているため。

基本設定が「1, 2, 5, 20, 50, 200, 500, 1000」の倍率で設定するため (2件)。

濃度レンジが200倍以内なら8ポイント。

各オーダー(1の位、10の位、100の位)に3濃度

1-3-10-30..., 1-2-10-20...等のパターンで設定するため、自ずと数が決まってくる。

★ガイドラインで2ポイント除外可能なことを念頭に置いた意見: 13件

「BMVガイドライン」に準じて、8ポイント(75%=2ポイント除外→6ポイント)を検量線の基準とする(13件)。

★「公比」の考え方によるという意見: 6件

公比「2」で設定(2件)。公比「3」で設定(3件)。公比2~3で設定。

★実験者の裁量によるという意見: 3件

上記数字は最低の濃度ポイント数であり、それ以上に設定するのは各分析科学者の裁量

実験者に任されているので、実験者に依存します。

慣例。

★その他の意見: 2件

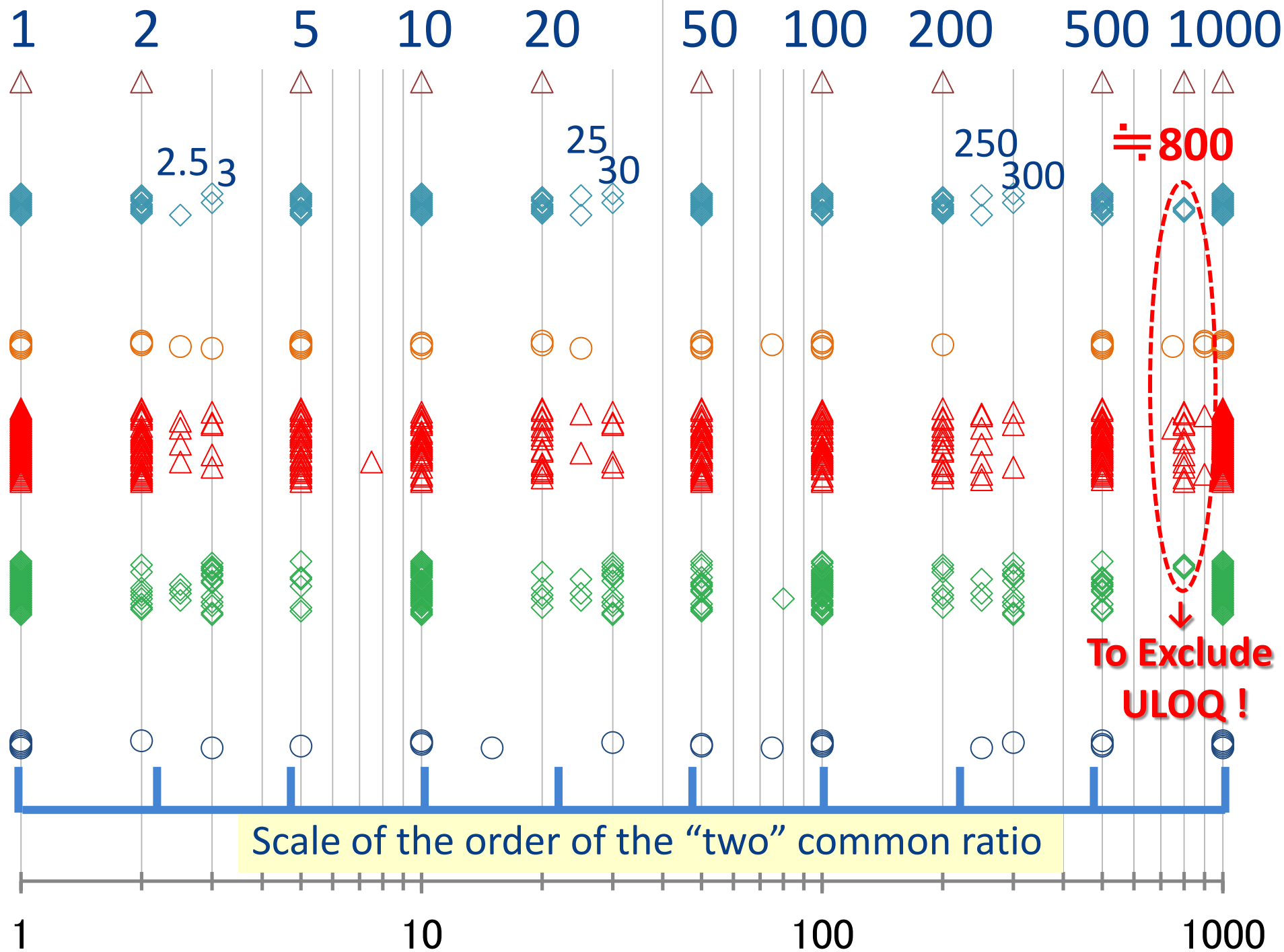
標準溶液の調製本数を少なくしたいことと、全ポイントで真度の基準を満たさなくてはならない心理的な重圧を回避するために、7ポイントとしています。

異常値等の対応のため1点外せる環境下で実施しています。2点外すと少し信頼性に欠けると考え7点で実施しています。



検量線：具体的な設定濃度

①_Q5. 1~1000 ng/mLの検量線を作成する場合、**具体的にどの濃度**を設定しますか？



- △ 11 Points (n=1)
- ◇ 10 Points (n=13)
- 9 Points (n=5)
- △ 8 Points (n=42)
- ◇ 7 Points (n=31)
- 6 Points (n=5)

<http://bioanalysisforum.jp/>

検量線：設定濃度のコメント

①_Q5.
**選択の理由
 などコメント
 があれば
 記入ください。**

<6ポイント>

LLOQ以上L-QC以下で2ポイント, U-QC以上ULOQ以下で2ポイントあれば良い(注釈:1, 2, 30, 150, 800, 1000を設定)。

基本的に公比的な配置

すべてのオーダーを均等に含むように設定(2件)

<7ポイント>

特に他に理由がなければ、1 - 5 - 10 - 50 ... の系列で設定します。

検量線グラフを、両対数グラフとした時に均等な濃度ポイント設定となるため(2件、注釈:1-3-10...パターン)。

公比約2を目安に(1件)。公比約3を目安に(2件)。

重み付けと比較して、ポイントの割り振りは定量精度に大きく影響しないとの実感があります。

LLOQやULOQが外れた場合でも、LQCとHQCが検量線の範囲内に収まる(2件、注釈:2と800を設定)。

<8ポイント>

LLOQ, ULOQ以外には「1, 10, 100, 1000」を使用したくないため(注釈:1, 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000の設定)

重み付けを行い、定量下限を外しても何とかできるように低濃度のポイントを多めに。(注釈:1, 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000の設定)

状況により変化しますが、多いのは「1」、「5」...の組み合わせです。(注釈:1, 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000の設定)

ログスケールで凡そ均等になるように設定(2件)。

低濃度側はいざというときLLOQを変更できるように(LQCの濃度を3ng/mLにするなどで対応)。(注釈:2を設定)

実測定で定量する濃度値(推測)に応じて、適宜変更します。

分析CROの意向等も踏まえて科学的に問題ないと判断できる限りケースバイケースの対応となることが多い。

<9ポイント>

公比2~3で設定。

低濃度域を重視した測定を行うことが多いため

上限および下限値が基準外となってもQC試料濃度範囲をカバーできるように。(注釈:2と900を設定)。

<10ポイント>

1, 3, 5, 10...とするか、5-10の間に1ポイント入れるかは実際に検量線とQCサンプルの具合をみて考える。

1オーダーに3ポイント設定するルールがあるため

EMAやJPのGLでは、測定時にLLOQやULOQが基準を満たさない場合は除外できるため、

これら付近の濃度を設定しておく(QC濃度も考慮して)

低濃度の方を若干ポイントが多い場合がある。

対数で均等なポイントをとる(2件)。

Discussion : 濃度ポイントの設定

① 対数で均等な濃度選択（公比設定）を行うケースがほとんどであった。

- Ex. 公比「約2」（1-2-5-10-20-パターン）、公比「約3」（1-3-10-30-パターン）

② 「8ポイント」（43.3%）、「7ポイント」（32.0%）で全体の75%以上を占めた。

- 「BMVガイドライン」の規定によると考えられる。★8ポイントの75%はGLが求める、最低数の6ポイントである。2ポイントが除外可能であり、最も「お値打ち感」がある。

③ 約25%の回答者が「対数で均等ルール」から外れるポイント(750～900)を設定していた。（750: 2例、800: 18例、900 :5例＝合計25例、全回答：97例）。

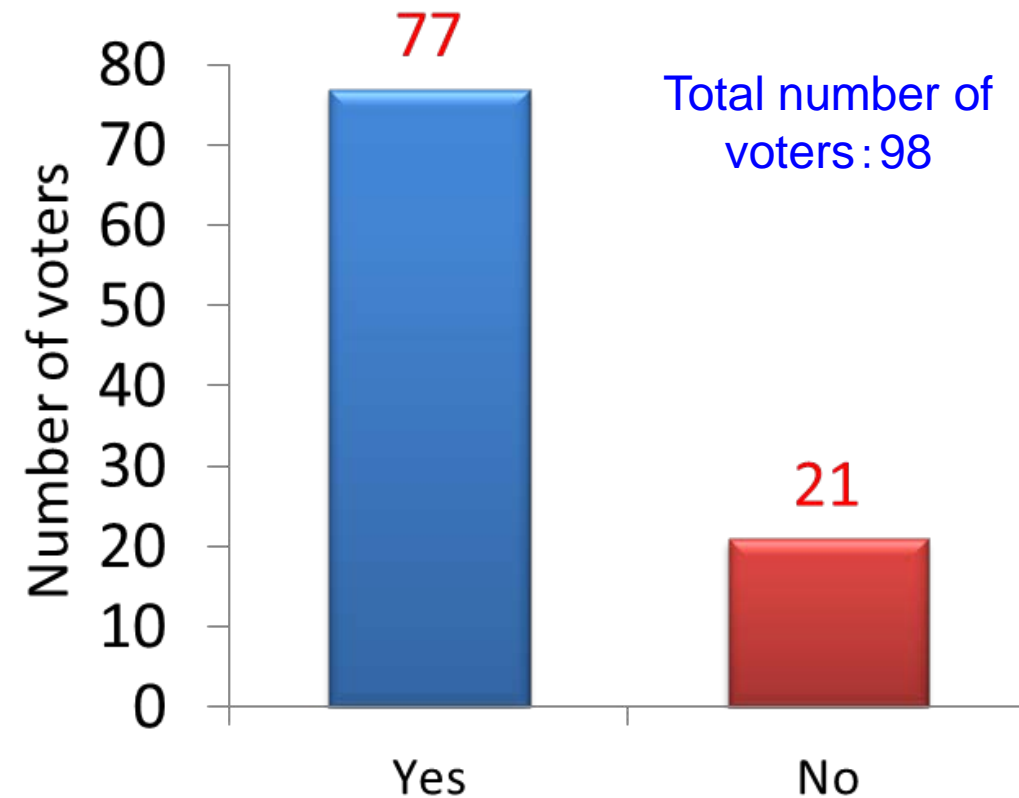
- 「BMVガイドライン」の規定によると考えられる。
- 高濃度QCを「750」に設定 : ULOQ(=1000)が除外可能。
- 低濃度QCを「3」に設定 : 公比約2のポイント「2 or 2.5」が存在するため、LLOQ(=1)が除外可能。

④ 低濃度側にポイントを多く設定する意見も散見された。

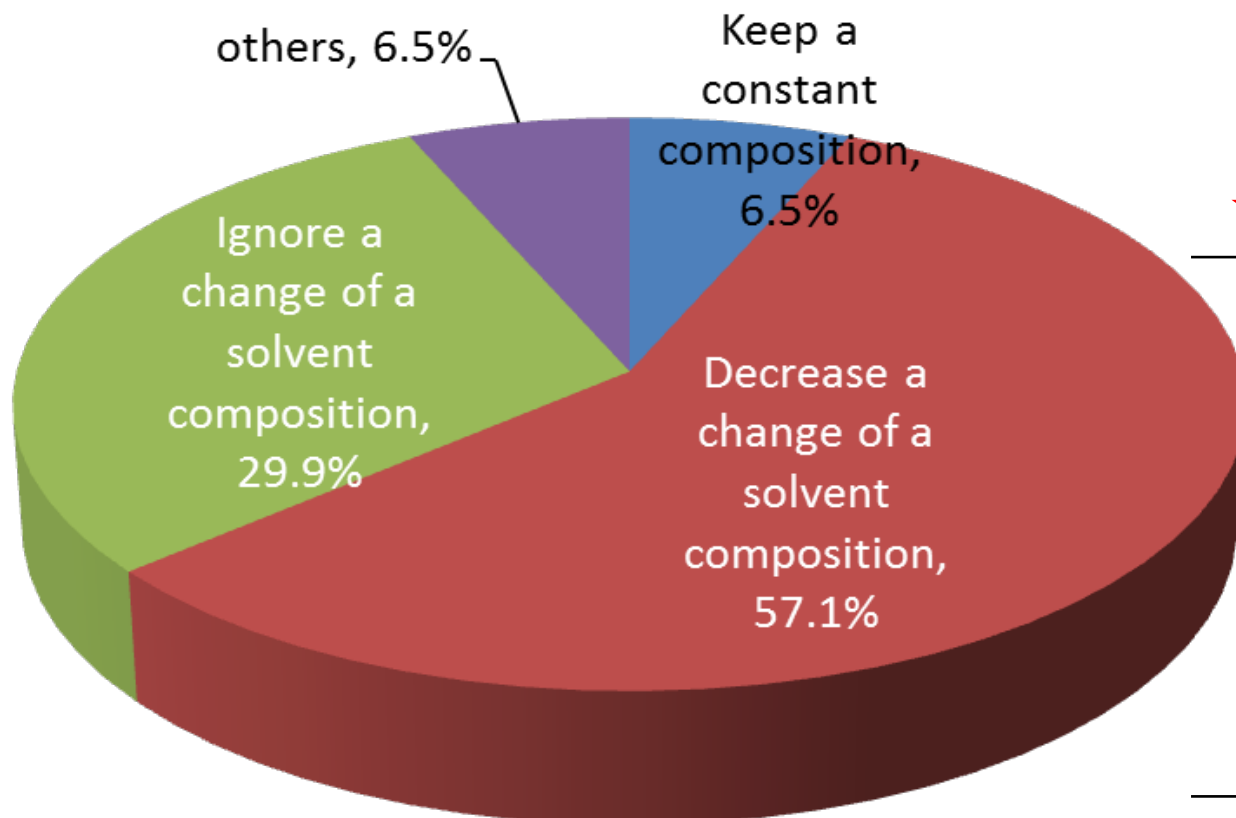
- 対数均等でないため、重み付けに問題が出る可能性に留意。
 - ✓ 重み付けは本来、 $1/y$ 、 $1/y^2$ で付与するべきであるが、 $1/x$ 、 $1/x^2$ が多用されている。
 - ✓ 「 $1/x$ 」の重み付け：濃度xに「yの標準偏差が比例する」と仮定した場合に使用する。
 - ✓ 「 $1/x^2$ 」の重み付け：濃度xに「yの分散が比例する」と仮定した場合に使用する。

検量線：標準溶液の調製

①_Q6. 検量線用標準溶液 (Working solution) を調製する際、検量線用標準原液 (Stock solution) と異なる溶媒を用いて調製をした経験はありますか？



①_Q7. ①_Q6において、「経験あり」とお答えの方に質問です。各濃度の検量線用標準溶液 (Working solution) で溶媒の組成 (比率) の変化が生じる可能性があります、どのように対処していますか？



★Othersの意見: 5例

溶媒の組成変化を小さくし、安定性評価等では気にかける。

検量線の確認や安定性試験で標準原液、標準溶液の高濃度、低濃度を測定するなど比率変化による問題がないことを確認する。

「比率にある程度の変化があったとしても無視する」及び溶液の安定性で溶液の一番下と一番上の濃度それぞれの安定性を見ているから良しとしている。

「溶媒の比率の変化を小さくし無視」と「比率にある程度の変化があったとしても無視」の両方。

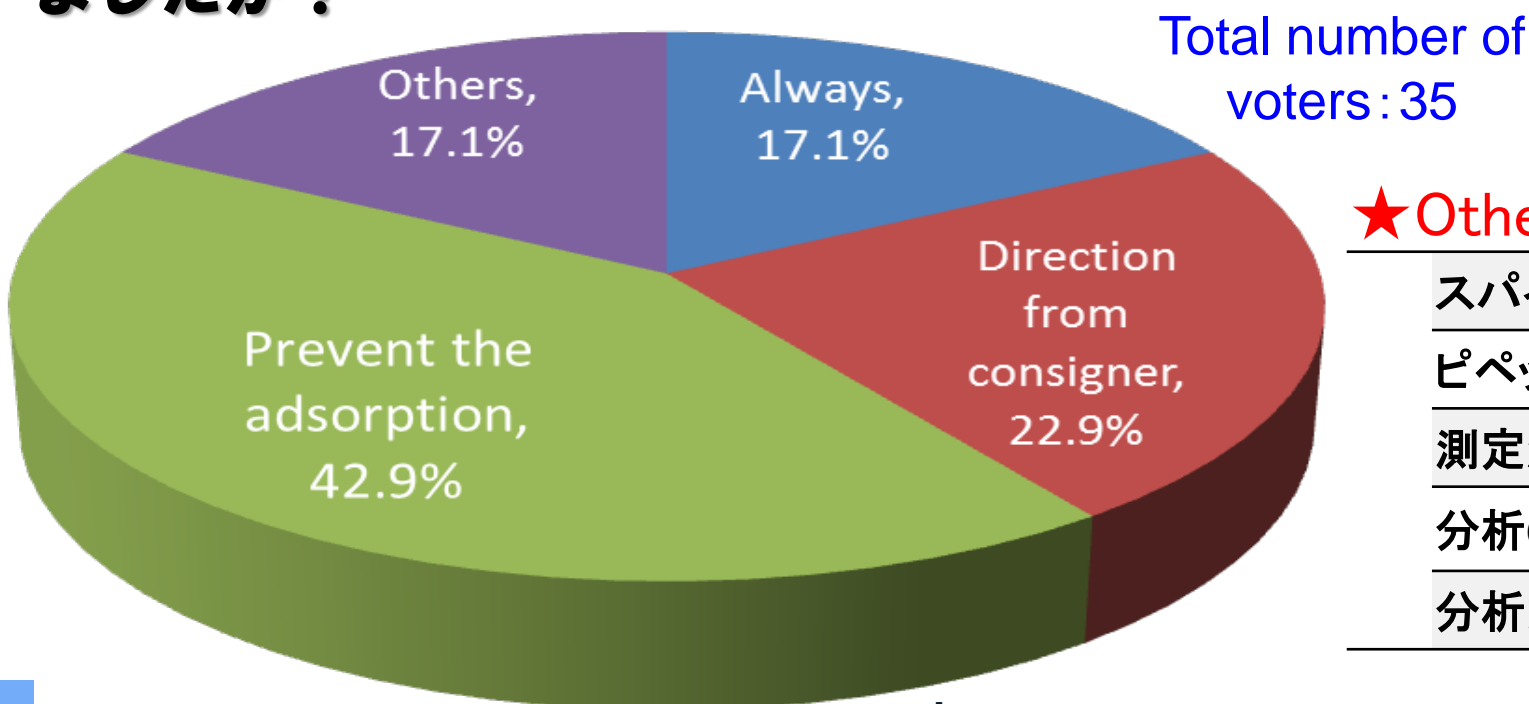
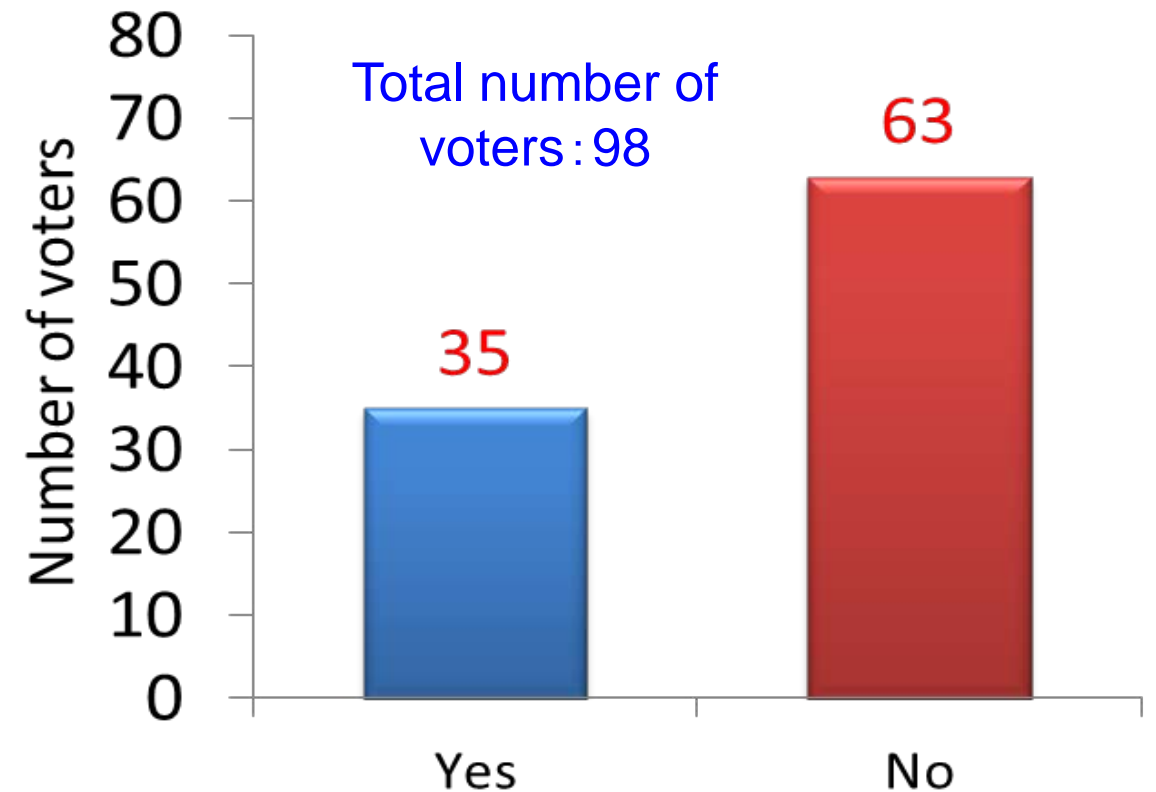
基本的には「溶媒の比率の変化を小さくし無視」を指向しているが、「比率にある程度の変化があったとしても無視」となってもそれほどまで気にしていない。

検量線：検量線用標準試料

①_Q9. 高濃度の分析対象物質を含むマトリックス試料を**ブランクマトリックスで（段階）希釈し、検量線用標準試料（Calibration standard）**を調製した経験はありますか？

（例：10 µg/mLの分析対象物質を含む血漿溶液をブランク血漿で段階希釈し1～1000 ng/mLの検量線用標準試料を調製する方法など）

①_Q10. ①_Q9において、「経験あり」とお答えの方に質問です。**どのような場合にブランクマトリックスで希釈する方法を用いましたか？**



★Othersの意見：6例（有効回答5例）

スパイクした試料での再現性、直線性が悪かった時。

ピペッティングの溶媒による誤差を最少とするため。

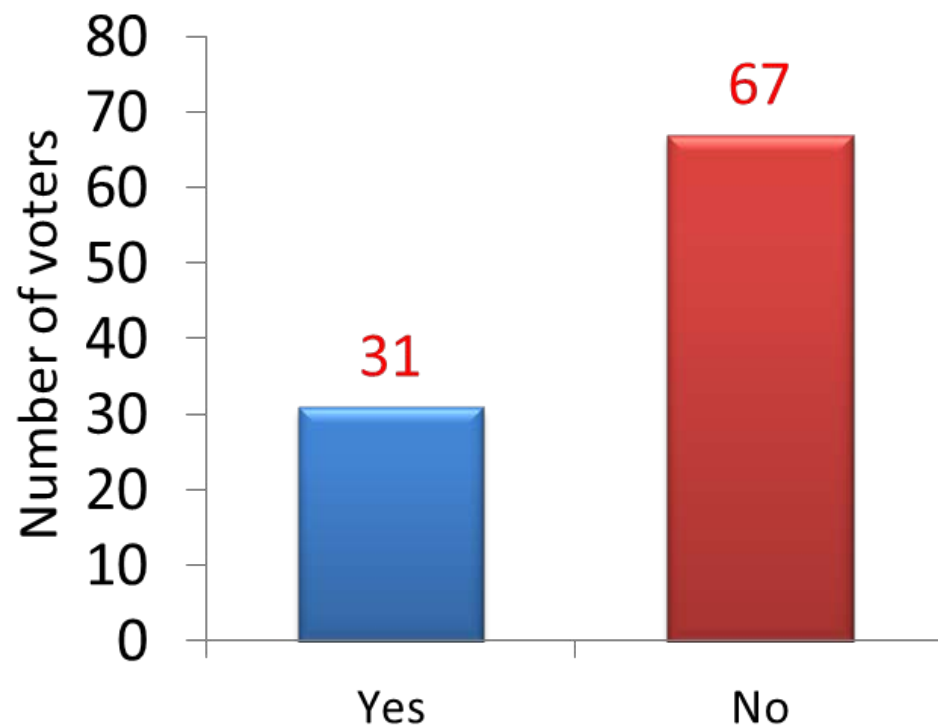
測定法移管の場合に、元の調製方法にあわせるため。

分析CROの希望によって。

分析対象物の安定性を考慮するため。

検量線：検量線用標準試料

①_Q12.一定量（1回分以上の）の検量線用標準試料（**Calibration standard**）を「**一括調製（バッチ調製）**」し、分注・保存したものを使用した経験はありますか？それはどのような場合ですか？



Total number of voters : 98

★安定性：6件

安定性が確認されている場合。（4件）

安定性に問題がない限り、基本的に一括で調製している。

マトリックス中の安定性は確認されているが、溶液中の安定性を確認していない。

★分析法の移管：6件

海外で確立された測定法を移管したとき。（2件）

測定法移管の場合に、元の調製方法にあわせるため。（2件）

委託者からの方法開示による。

分析CROの希望によって。

★作業の効率化：8件

その測定対象物質の安定性が確認された後に、ある程度の検体数を測定する必要がある際。

標準試料の安定性が確保されており、測定対象サンプルが大量で、数バッチに分けて分析が必要な場合。

凍結融解を繰り返さないため（一括で調製するが、使用時が1回目の融解になるように、また、作業効率を上げるため。）

マトリックス中での安定性が確認できた場合に、作業量を踏まえて試みたことがある。

検量線用標準試料の調製が煩雑な場合。

予備検討での時間節約。

大規模の実試料の分析をする場合、毎日の作業の効率を考えて。

開発後期の試験で、検量線ポイント数が多く、従前の試験で検量線用標準試料の安定性が確認できたために採用した。

★その他：4件

一本仕込み検量線では問題があった場合（QC試料と結果が相関しないなど）。標準溶液の安定性に問題があり、マトリックス中では安定であることが確認できた場合。

同一試験内では、1バッチを使用。

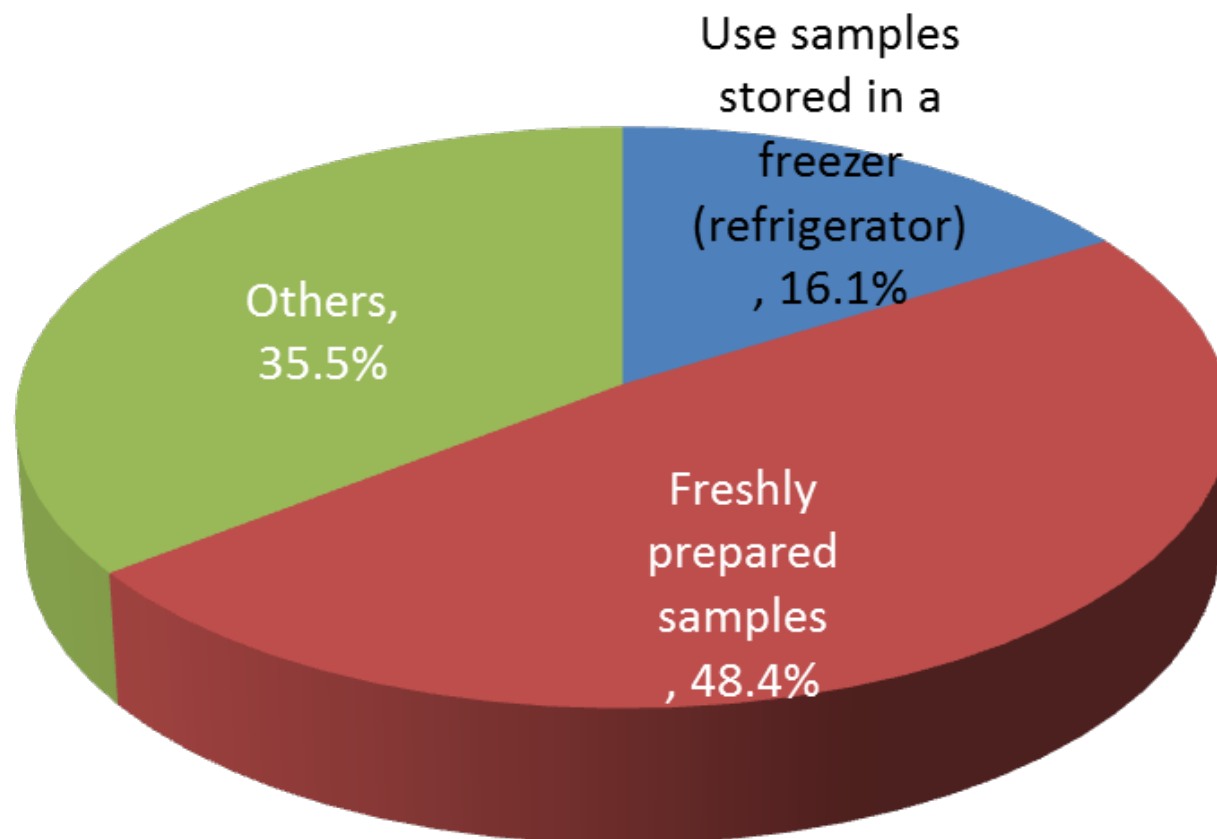
Q9でのブランクマトリックスで希釈して検量線用標準試料を調製し、マトリックス中安定性が確認されている場合に安定性確認済み期間内で分注・保存したものを使用。

検量線標準試料の調製量が多くなる場合、調製した試料が無駄にならないように。

検量線：検量線用標準試料

①_Q13. ①_Q12において、「一括調製（バッチ調製）」の経験があるとお答えの方にかがいます。

「**一括調製（バッチ調製）**」した検量線用標準試料（**Calibration standard**）を1回目に使用する際、**必ず凍結（冷蔵）**保存した後に使用しますか？



Total number of voters: 31

★その他の意見: 11例

凍結融解の安定性が確認できていれば拘らない。

安定性に問題ないことを確認しているので、どちらでも気にしない。

特にこだわらない。

特に決めなかったように記憶しています。

規定なし。

どちらでも問題なく定量できることが確認できていれば、拘らない。

いずれの場合もある。(2件)

ケースバイケース。(2件)

低分子の場合、あまりこだわりはない。実務上、分注などの操作を考えると、調製と測定を同日に行うのはあまり現実的ではないように思える。



検量線：検量線用標準試料

①_Q14. ①_Q12において、「一括調製（バッチ調製）」の経験があるとお答えの方にかがいます。

「一括調製（バッチ調製）」した検量線用標準試料（**Calibration standard**）を保存する場合、その**有効期限**はどのように設定していますか？

選択肢

① Long-term stability:

長期保存安定性の確認された期間と同様
(例:凍結保存、数ヶ月など)

② Short-term stability:

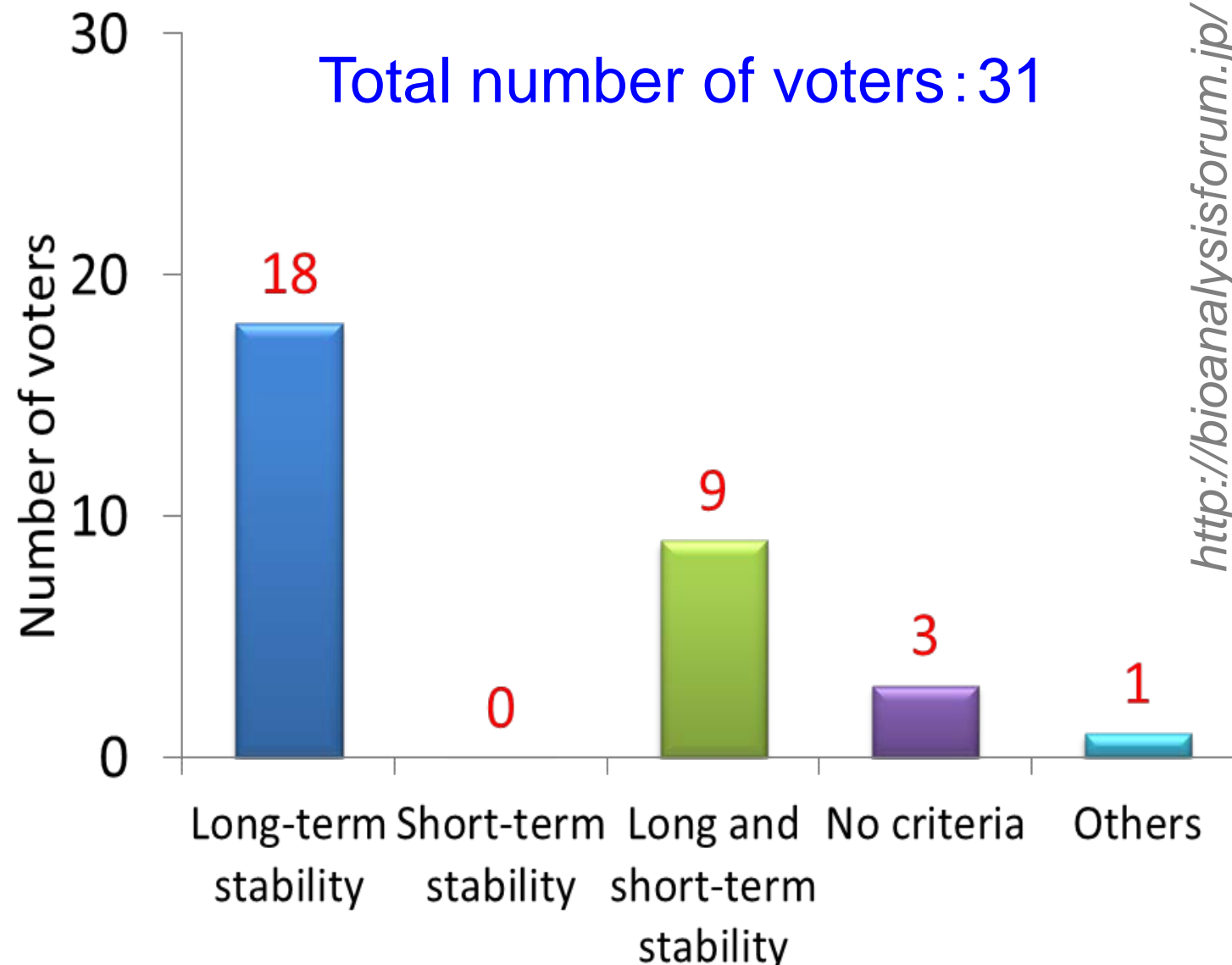
短期保存安定性の確認された期間と同様
(例:冷蔵保存、数日など)

③ Long and short-term stability:

上記の両方

④ Others:

特に規定していない



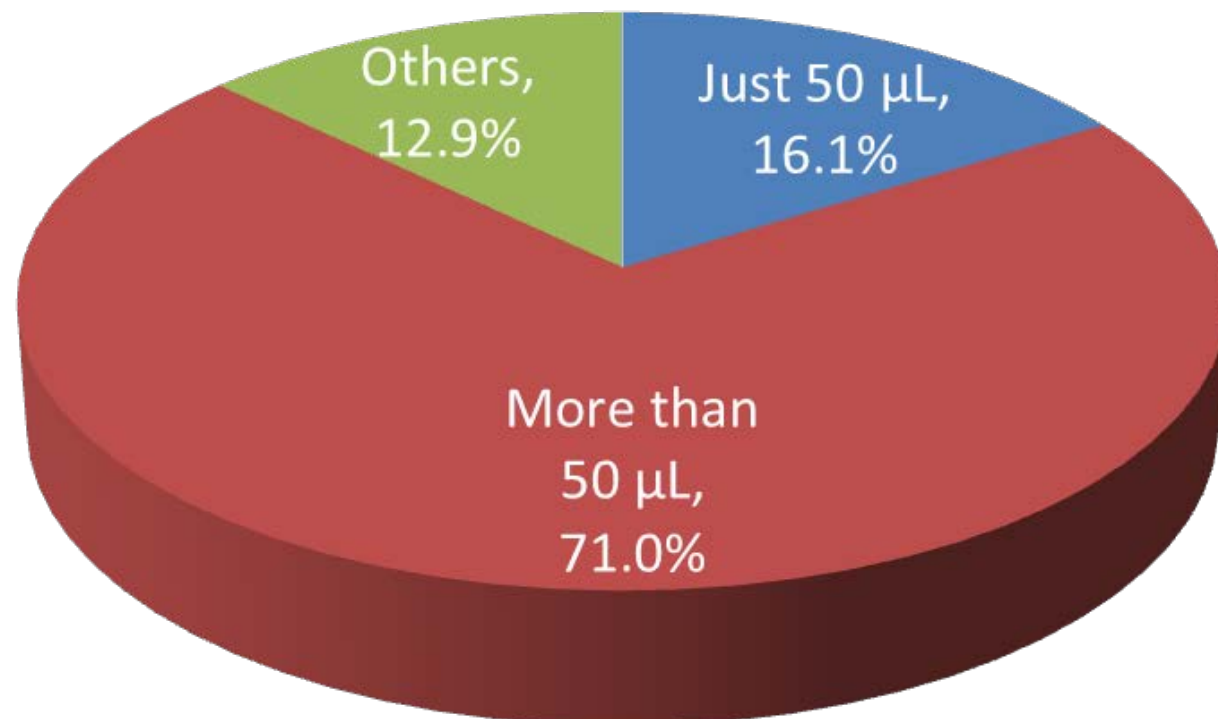
検量線：検量線用標準試料

①_Q15. ①_Q12において、「一括調製（バッチ調製）」の経験があるとお答えの方にかがいます。

検量線用標準試料（**Calibration standard**）を一括調製（**バッチ調製**）する場合、**保存容器への「分注量」**はどのようにしていますか？

補足に示した仮定を前提にご回答ください。

（補足：検量線用標準試料（**Calibration standard**）の前処理には50 μ Lを用いると仮定します）



★その他の意見：4例

基本50 μ L以上ですが、50 μ Lちょうども使うかもしれないです（保存容器のまま前処理装置に適応する場合など）。

化合物の物性や、前処理方法に応じて、ケースバイケース。

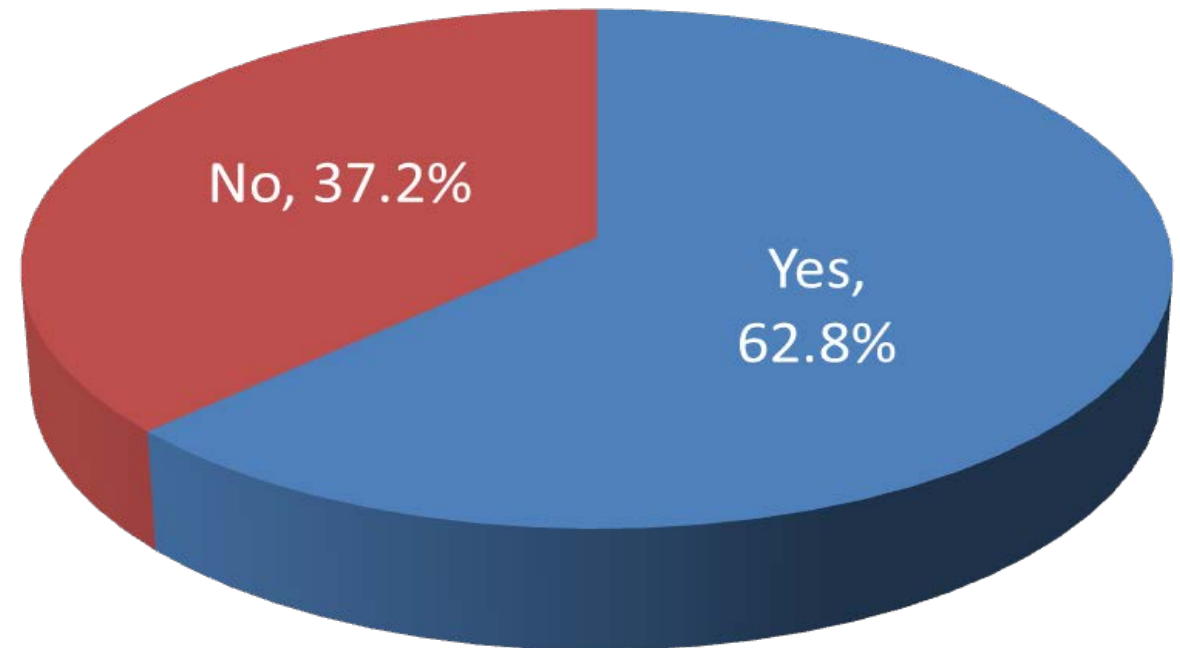
1回しか経験はないですが、どちらもありうると思います

安定性試験を実施した際の分注量に合わせる。少なくとも、分注量の数倍にはしている。

Total number of voters : 31

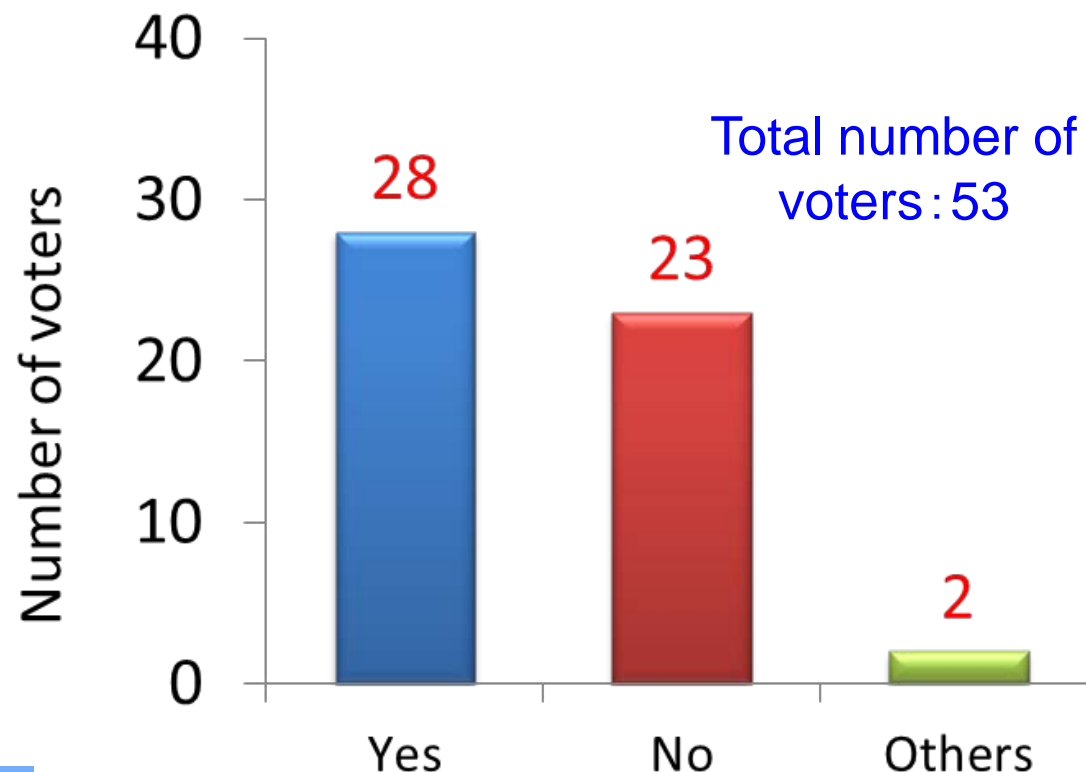
検量線・QC共通：調製担当者

②_Q13.バリデーション及び実試料分析において、同一の試験内で、検量線やQC試料の調製を**複数の担当者**が行うことはありますか？



Total number of voters: 86

②_Q14. ②_Q13において、複数の調製者で実施するとお答えの方にお伺いします。**調製者間の違いを確認**しますか？



★その他の理由：2例

バリデーションにおいて基準を満たせば、問題ないと考える。ただし、バリデーションの担当者の実試料分析の担当者は原則変わらないとする。

結果として検量線、QC試料がそれぞれクライテリアを満たしていれば、問題ないとしています。



検量線・QC共通：調製担当者

②_Q15. ②_Q14について、**確認する**とお答えの方にお伺いします。
どのように確認しますか？

選択肢

① Prepare a set of calibration and QC by individual analyst:

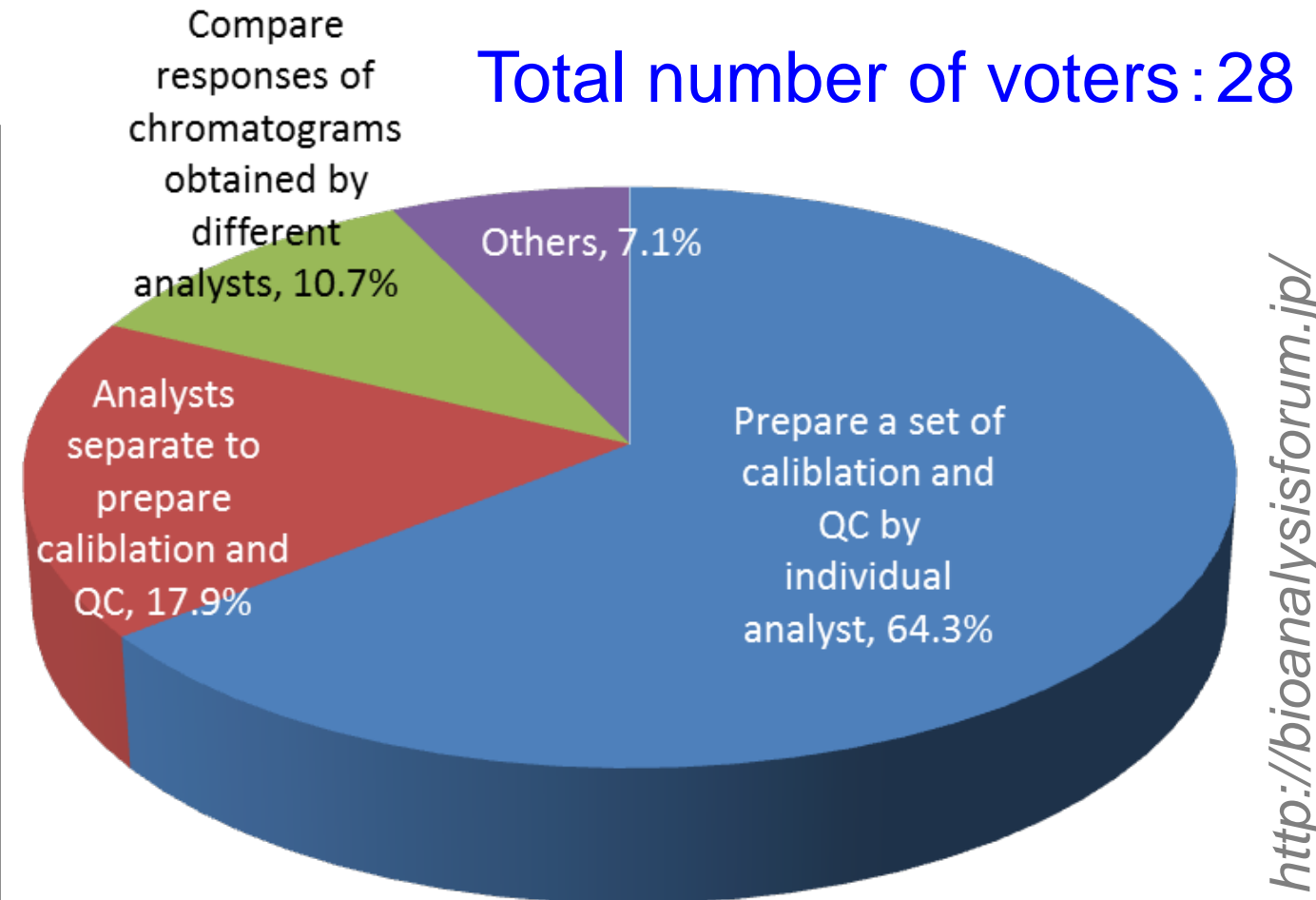
検量線及びQC試料を同じ人が調製し、調製者ごとに基準を満たすかどうか

② Analysts separate to prepare calibration and QC:

検量線試料とQC試料をそれぞれ異なる調製者が調製して基準を満たすかどうか

③ Compare responses of chromatograms obtained by different analysts:

調製者間のクロマトグラムのレスポンスを比較して確認



★その他の理由：2例

バリデーションでは1番目の回答、実試料測定では2番目の回答になります。

委託先のポリシー次第

Discussion : 調製方法と担当者

① 標準溶液 (Working solution) の調製

- 90%近くの回答者が、標準溶液の溶媒組成のわずかな変化は無視している。

② 検量線用標準試料 (Calibration standard) の調製

- 少数意見ではあるが、常に検量線用標準試料をマトリクスで希釈したり、検量線用標準試料を一括 (バッチ) 調製している。
- 煩雑な調製操作を効率化している。

③ 調製担当者

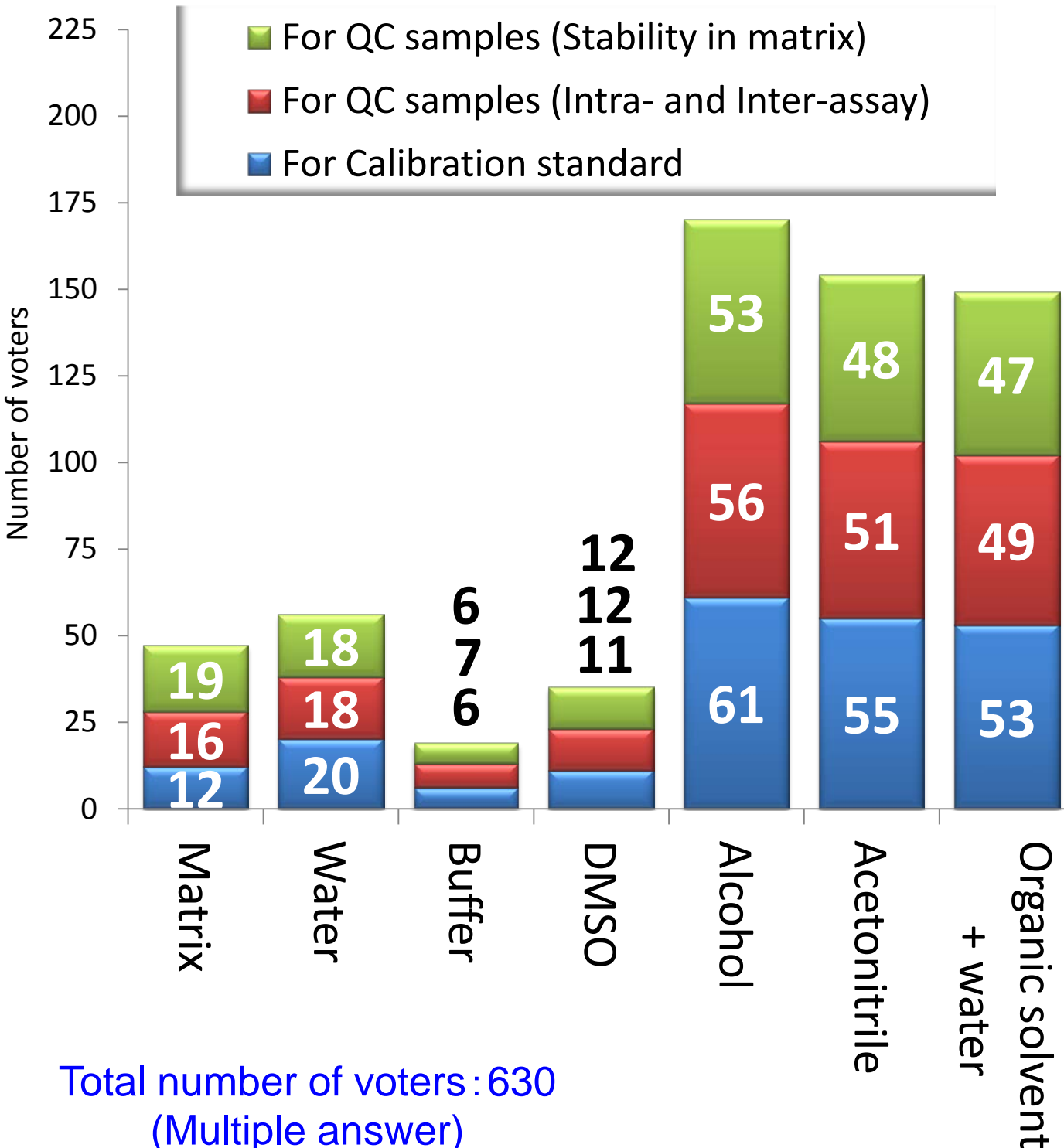
- 回答者の1/3程度が、調製者間の比較は行わないとしているがこの内のすべての回答者は、信頼性基準あるいはGLPで試験を行っている。
- この回答から詳細な意図は読み取ることができないが、確認せずに調製者を変更することに不安はないのだろうか?



検量線・QC共通：標準溶液の調製溶媒

②_Q3.標準溶液（Working solution）を調製する際によく使用する溶媒の種類について、各試料ごとにご回答下さい。（複数回答可）

<http://bioanalysisforum.jp/>



Total number of voters: 630
(Multiple answer)

★その他の意見: 2例

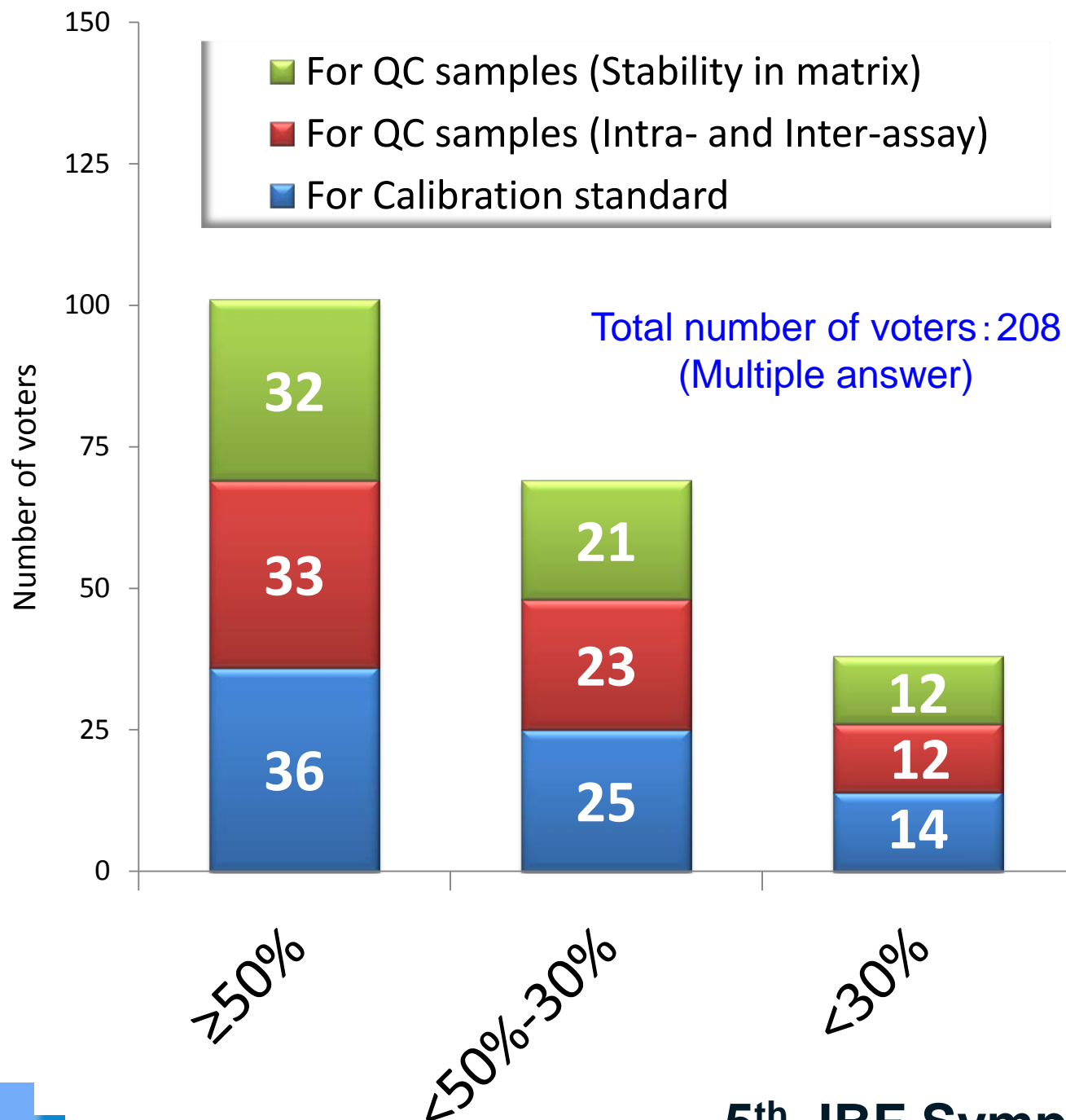
有機溶媒と緩衝液の混液

酸性水溶液



検量線・QC共通：標準溶液の調製溶媒

②_Q4. ②_Q3で有機溶媒と水の混液を選択された方、その**有機溶媒の濃度**及びその濃度に**設定する理由**を教えてください。（複数回答可）



★設定理由

取り扱いやすさと溶解度の兼ね合い。

化合物の溶解性, 吸着性, マトリックスへの影響(除タンパク)等に配慮。

水が多いと雑菌の繁殖が懸念される。

有機溶媒が多いと取扱いしにくい(粘度, 揮発の影響, チップでののはじき, 温度による容積変化)。

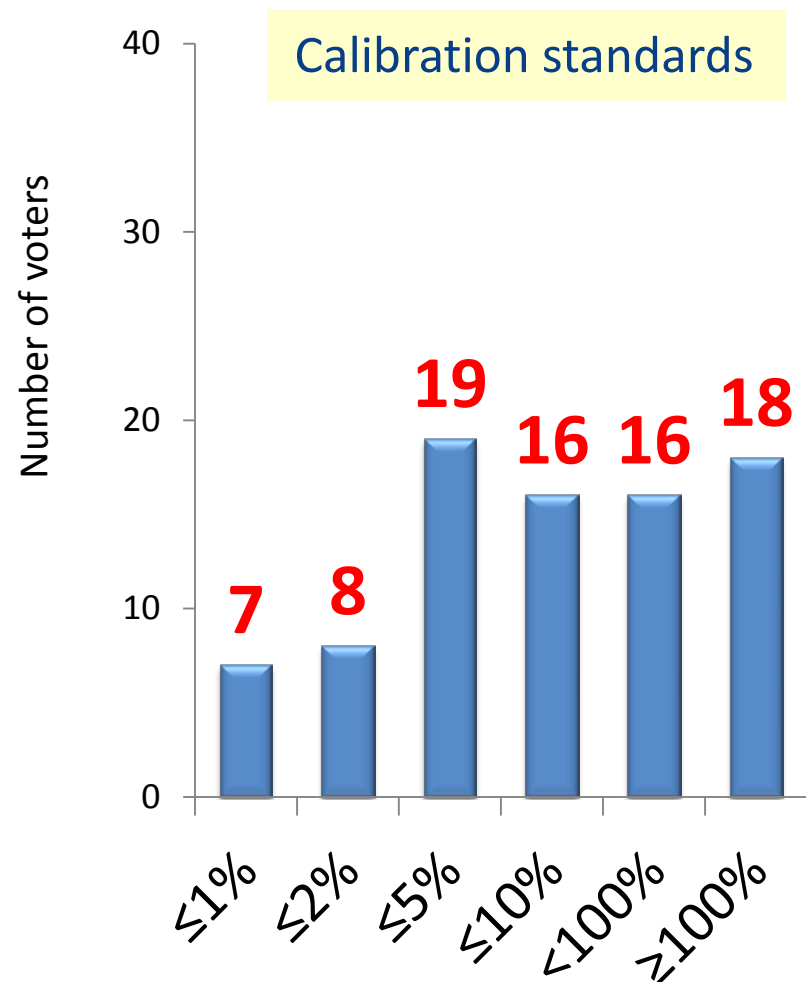
LC移動相の組成にあわせる。

凍結保存時に液体保存となるように。

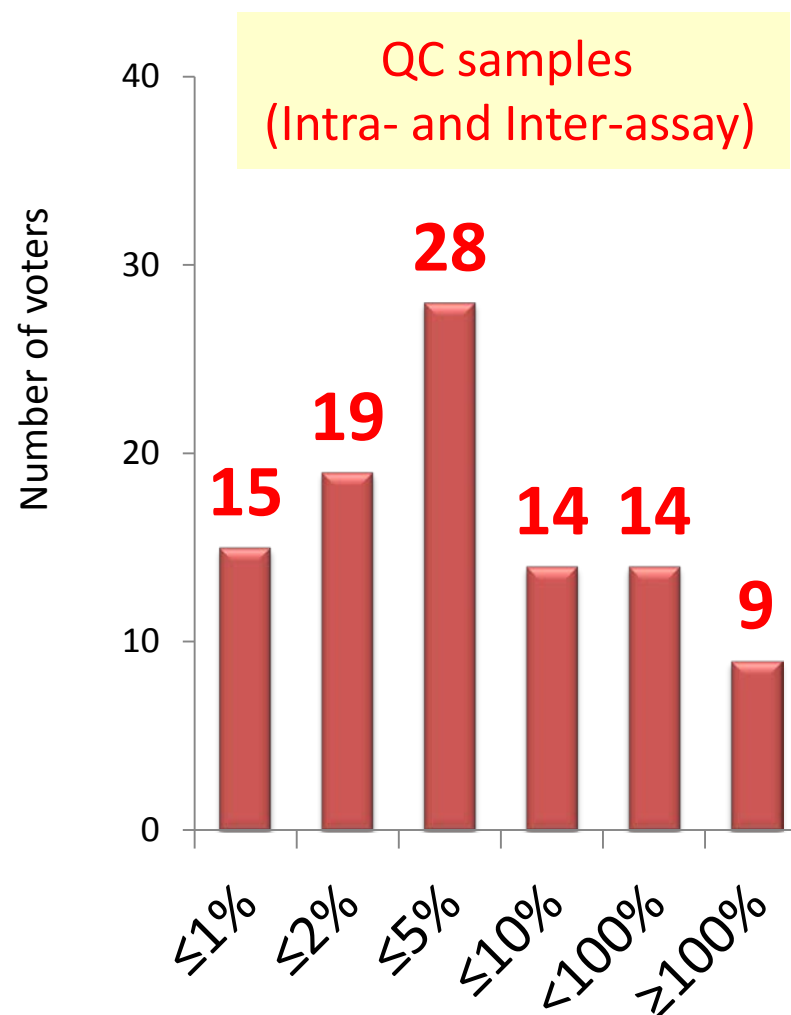


検量線・QC共通：標準溶液の添加割合

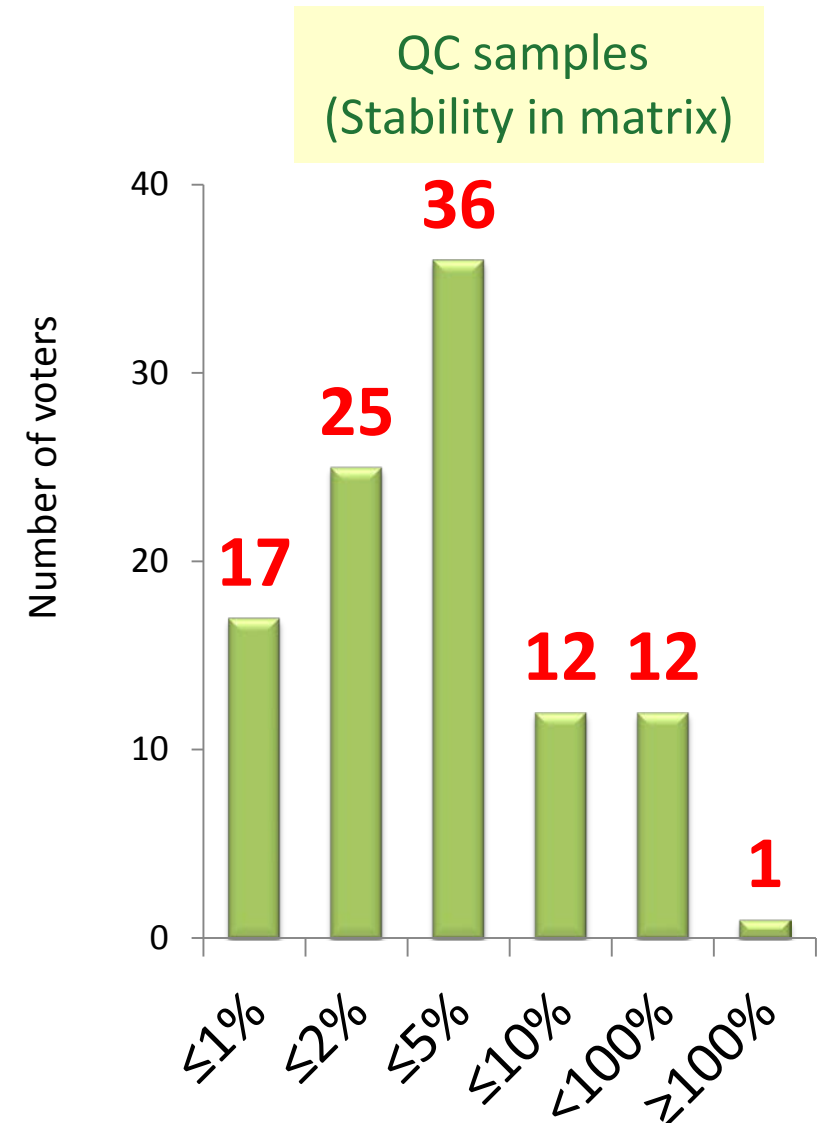
②_Q5. ブランクマトリックスに対して添加する標準溶液（**Working Solution**）の割合について、各試料ごとにもっともよく**添加する割合**を以下から選択してください。



Total number of voters: 84
(Multiple answer)



Total number of voters: 99
(Multiple answer)



Total number of voters: 103
(Multiple answer)

<http://bioanalysisforum.jp/>

検量線・QC共通：標準溶液の添加割合

②_Q6. ②_Q5について、補足があればご記入ください。

★検量線用試料: 6件

基本的に有機溶媒量を気にしない。(≥100%)

物差しとしての役割が一番大きいいため、添加比率に特に規制は無い。(＜100%)

除たん白法(100%以上)を用いる場合、添加割合についてはあまり気にしない。(≥100%)

ブランクマトリックス使用量が少ない場合(50 μL以下など)は等量添加。(＜100%)

ハンドリング上溶液を微量で添加することが難しいため、20%程度になってしまうことが多い。(＜100%)

多く添加した場合はQC等にブランクの有機溶媒を添加して終濃度を調整すればよい。(＜100%)

★日内・日間再現性用QC試料: 4件

100%有機溶媒を添加する場合はできる限り添加量を少なくする。(≤5%)

Total organic solventが重要。(≤5%)

ブランクマトリックス使用量が少ない場合(50 μL以下など)は等量添加。(＜100%)

真のマトリックスに近づけるため溶液添加量は最小にすべき。(≤2%)

★マトリックス中安定性用QC試料: 3件

可能な限り添加する標準溶液の比率が低くなるようにする。(≤5%)

バルクで作成する場合、基本的には1%以下、調製が難しければ5%以内程度。(≤2%)

真のマトリックスに近づけるため溶液添加量は最小にすべき。(≤2%)

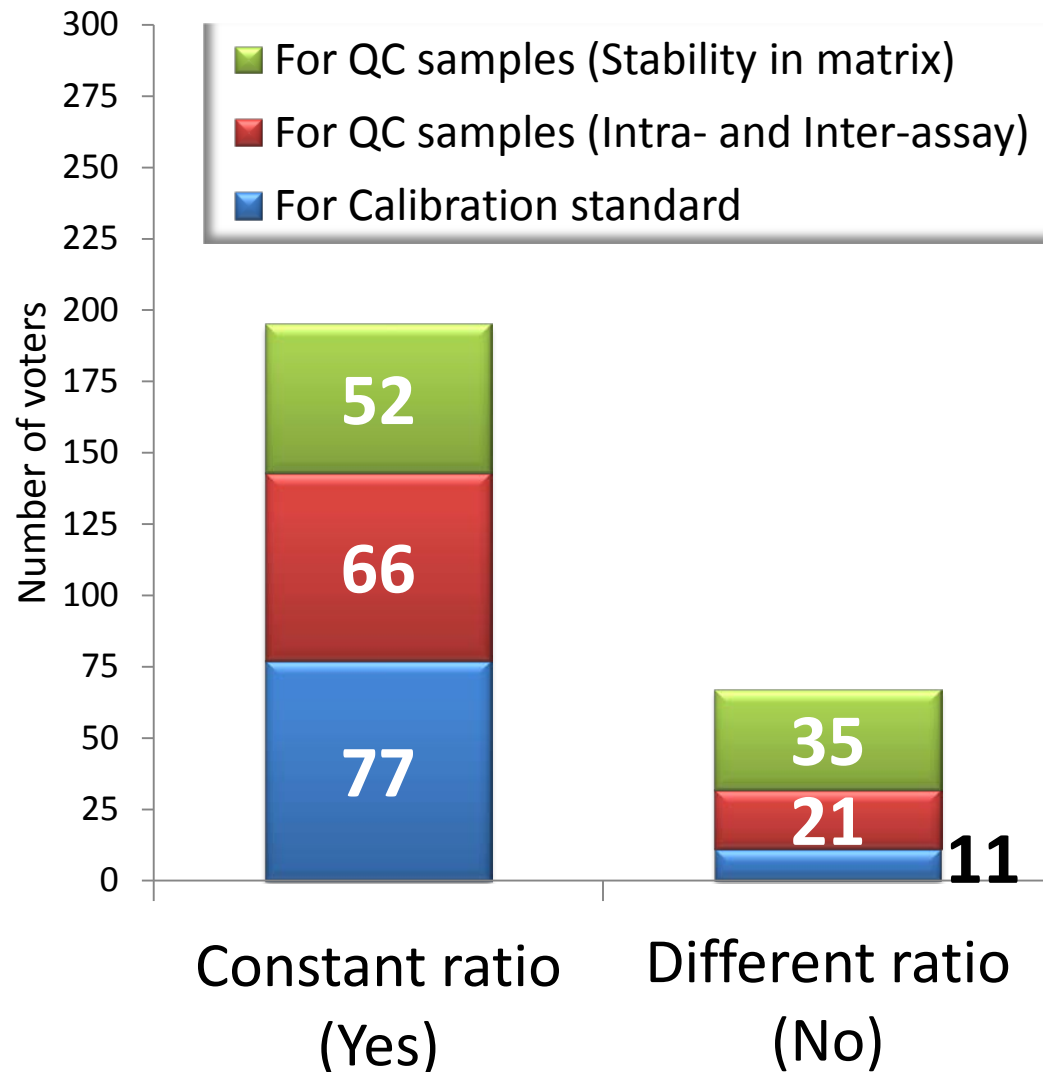
(): 回答者が選
択した添加割合



検量線・QC共通：標準溶液の添加割合

②_Q7. 全ての添加濃度で、標準溶液 (Working Solution) は**一定の割合**で添加していますか？

②_Q8. ②_Q7について、理由があればご記入ください。



Total number of voters: 262
(Multiple answer)

★一定にしている: 14件

有機溶媒の影響を極力避けるため(回収率, マトリクス効果). (4件)

実験担当者による差が小さく安定した調製ができるため。操作ミスを防ぐため。(4件)

変える理由がない。一定にするのが当然。(2件)

検量線の場合は、実測定検体に添加容量補正分の溶液添加を行うため一定割合の添加を行う。(2件)

溶解度や使用溶媒の問題がなければ一定にする。

dilutionを含め可能な限り対応。

★濃度によって異なる: 9件

5%以下の添加量の範囲での変動は気にしていない。(3件)

溶解性等が原因で標準原液で十分濃い濃度が作れなかった場合には検量線の濃い方は溶媒量が多くなることもある。(2件)

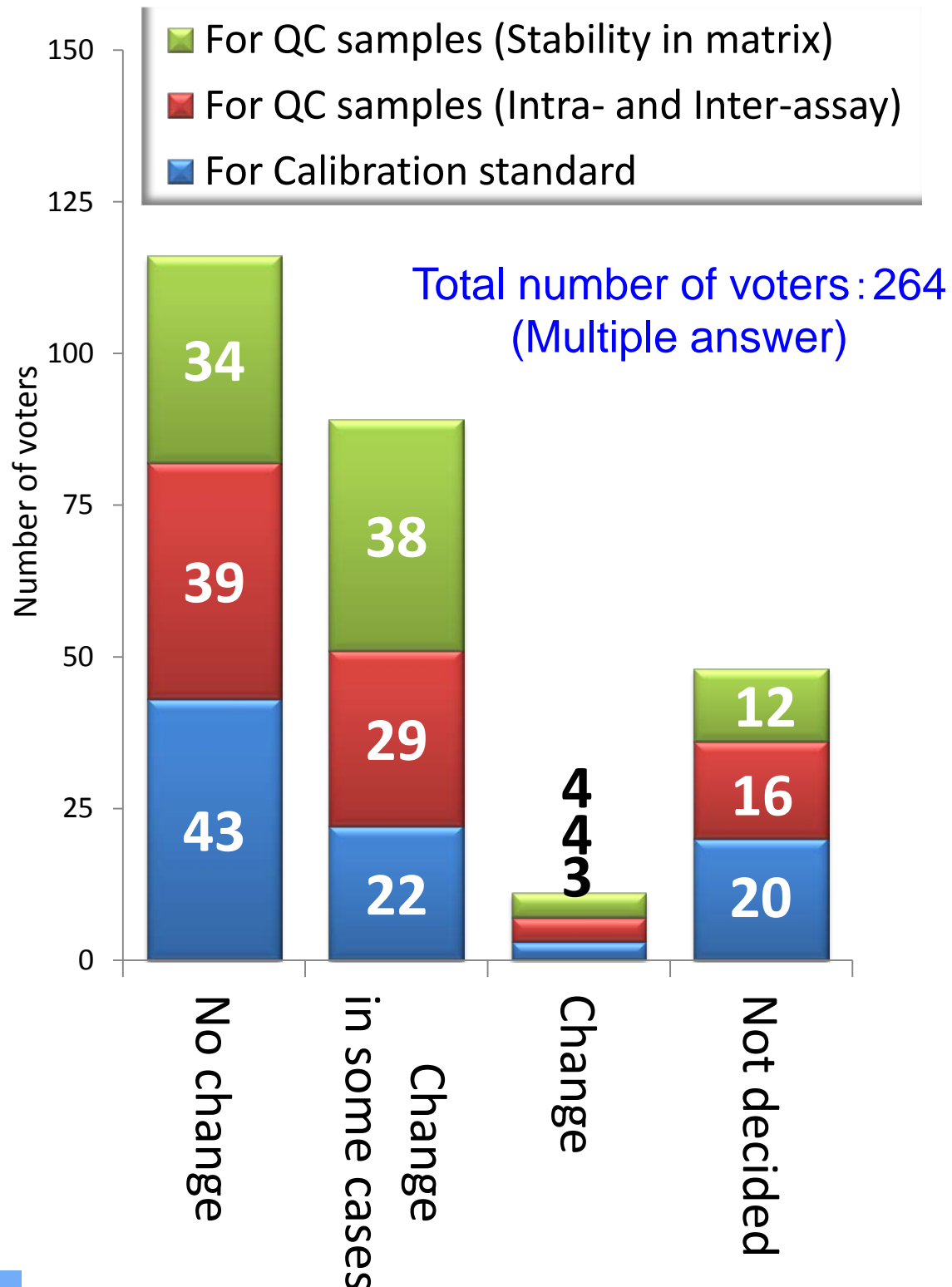
標準溶液の添加量を調整することで複数のQC試料調製が可能になるため。(2件)

高濃度試料は有機溶媒を1%以下で調製する。それより低い濃度の試料は高濃度試料から段階希釈するので、高濃度試料からの希釈率に応じてマトリクス以外の成分は異なることになる。

希釈相関用QC試料では高濃度で調製するため、添加量を変更する場合がある。



検量線・QC共通：標準溶液の添加割合



②_Q9.標準溶液の溶媒の種類（水か有機溶媒）によってマトリックスに対して添加する割合を変えていますか？

②_Q10. ②_Q9について、補足があればご記入ください。

★変えていないという方の意見: 1件

10%以下であれば特にこだわらない。

★変えることがあるという方の意見: 7件

100%有機溶媒をマトリックスに添加する場合は、できるだけ添加量を少なくする(1-5%以下)。(5件)

冷凍保存試料は、状況(有機溶媒比率や種類)によって添加比率を変える。

水系は多めに入れてもOK。

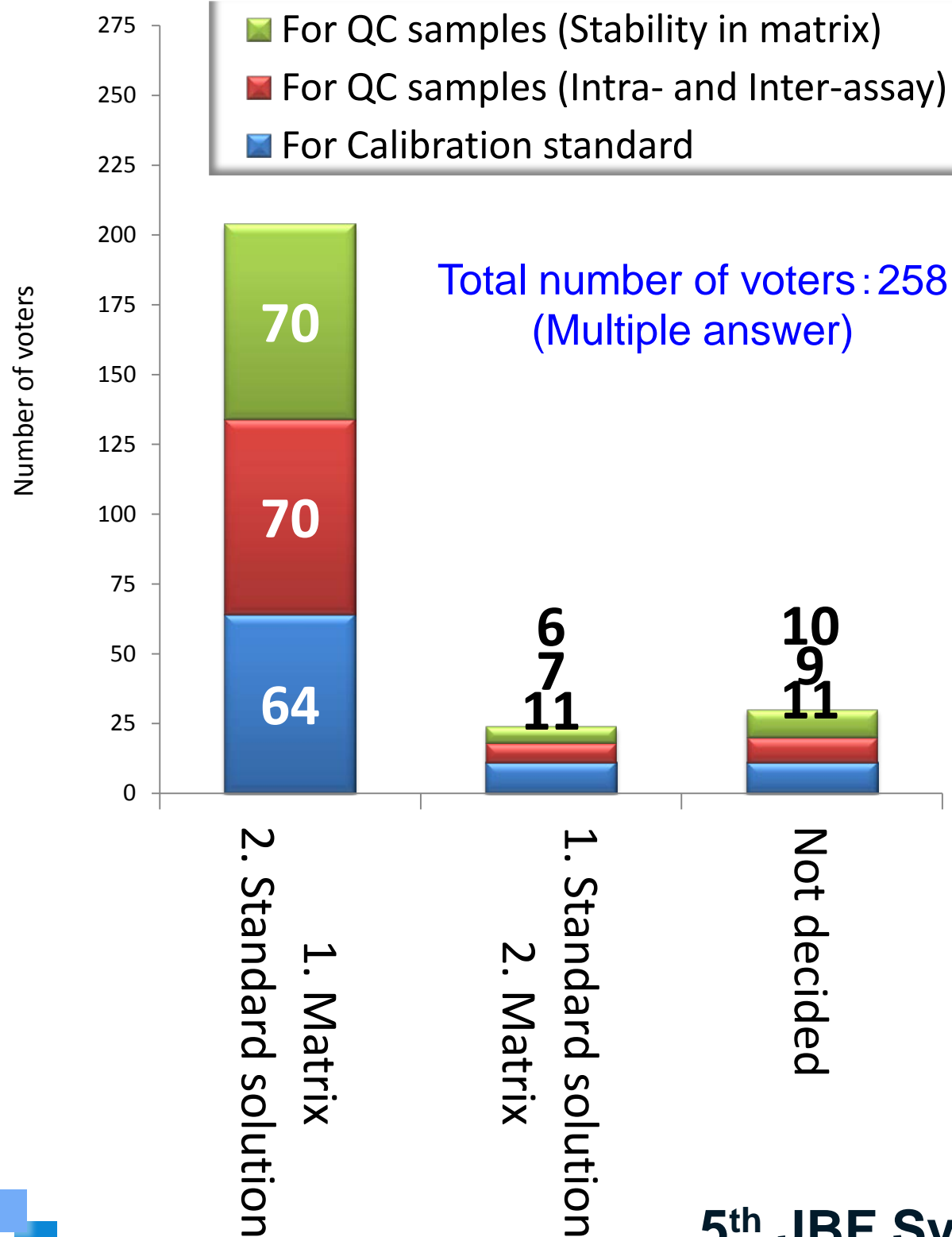
★変えているという方の意見: 1件

有機溶媒の割合による。

★特にこだわらないという方の意見: 1件

血漿が薄まるという意味では同義。

検量線・QC共通：調製時の添加順序



②_Q11.マトリックスと標準溶液 (Working Solution) の**添加する順番**をお答えください。

②_Q12. ②_Q11について、補足があればご記入ください。

★マトリックスに標準溶液を添加する方の意見: 11件

被験物質の容器への吸着回避のため。(6件)

マトリックスへのコンタミ防止のため。(3件)

標準溶液の方が添加量が少ないため、マトリックスで共洗いしている。

溶液(緩衝液など)をマトリックスに添加したあとで標準溶液を添加することがある。

★標準溶液にマトリックスを添加する方の意見: 1件

標準溶液を蒸発乾固する場合。



Discussion :

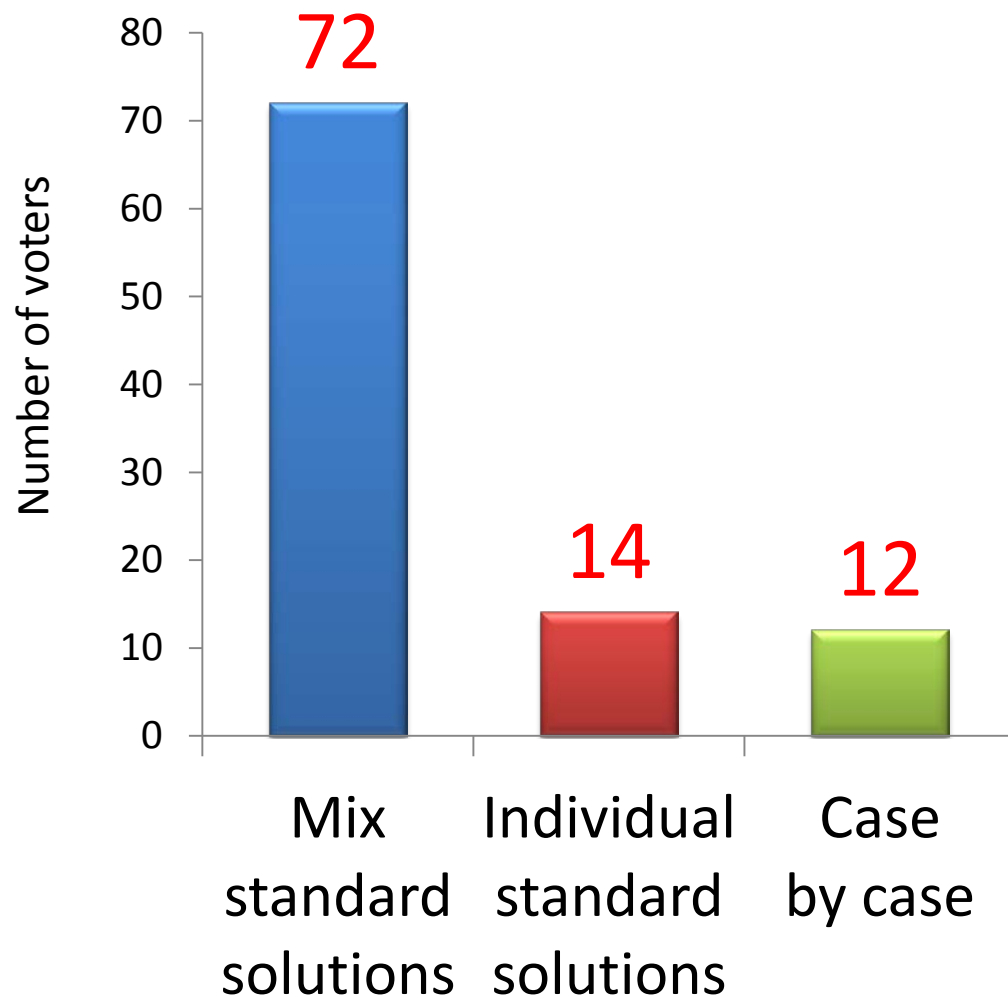
標準溶液の添加割合、調製溶媒、添加順序

試料	検量線用試料	日内・日間再現性用QC試料	マトリックス中安定性用QC試料
① 添加割合	用時調製が多いため、 10%以上を許容する割合が約60%	調製方法による。 一括調製:5%以下 用時調製:10%以上を許容	一括調製がほとんどのため、5%以下の割合が約75% ⇒ <u>実試料に近づけるため</u>
	調製濃度、溶媒種によって割合は変えないという 回答多数	調製濃度、溶媒種によって割合を変える場合ありの 回答率がアップ 溶解性等に依存する。	調製濃度、溶媒種によって割合を変える場合ありの 回答多数 溶解性等に依存する。
② 調製溶媒	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 調製試料によらず以下の順に回答が多かった。 ①アルコール系有機溶媒 > ②アセトニトリルなどの有機溶媒 > ③有機溶媒と水の混液 ➤ 「有機溶媒と水の混液」を選択する理由は、有機溶媒の取り扱い難さを改善し、水の雑菌繁殖等を回避するため。 ➤ 有機溶媒含量は溶解度、吸着等を考慮して設定され、50%以上という回答が最も多い。 		
③ 添加順序	➤ <u>調製試料によらずマトリックスに標準溶液を添加する方法の回答が最も多い。</u>		

<http://bioanalysisforum.jp/>

検量線：2成分以上の同時定量

①_Q16. **2成分以上**の分析対象物質を同時定量する場合についてお聞きします。検量線用標準試料（**Calibration standards**）の調製は、以下のどの方法で実施しますか？その**選択理由**は？



Total number of voters : 98

★全ての分析対象物質を含有する、混合検量線用標準溶液（Working solution mixture）を調製：12件

同じ検量線範囲であれば、混合検量線用標準溶液を調製することにより対応。（3件）

分析対象ごとにWorking solutionがあると、試料調製時の手間が増えるため、混合Working solutionを使用している。（3件）

調製がより簡便で操作ミスが生じにくいいため。（2件）

分析対象が相互に影響がないことを確認する。（2件）

標準溶液の添加量を減らすため。

標準原液は成分ごとに調製するが、最初に標準溶液を調製する時に混合して調製する。
用時調製なので科学的に問題ないと考える。

★1つの分析対象物質のみを含有する検量線用標準溶液（Working solution）溶液をそれぞれ調製：7件

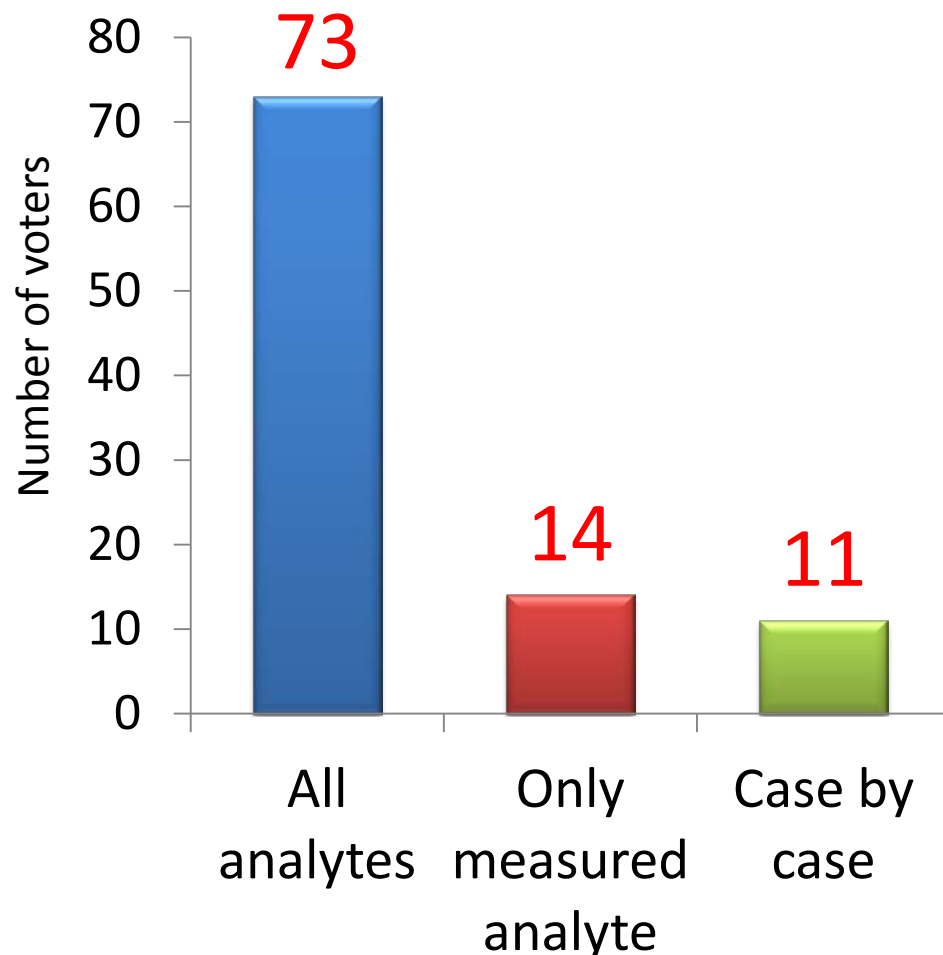
検量線範囲が異なるなどの理由で混合不可の場合は別々に標準溶液を調製する。（3件）

保存期間中における成分間の相互作用，相互変換のリスクを除去するため。（2件）

最適な希釈溶媒が異なる場合があるため。（2件）

検量線：2成分以上の同時定量

①_Q17. 2成分以上の分析対象物質を同時定量する場合についてお聞きします。2成分以上の同時定量でフルバリデーションを実施したが、実試料分析時に分析対象物質を減らしたい場合、検量線用標準試料（**Calibration standards**）はどのように調製しますか？その**選択理由**は？



Total number of voters : 98

★フルバリデーションと同じ方法(全ての分析対象物質を含有)で調製する。:6件

基本的にフルバリデーション取得時と同等の条件で調製する。(3件)

分析対象が含まれている状態でのバリデーションが前提なので、測定も含めてフルバリデーションと同じ方法で実施し、解析対象から除外する。

混合検量線用標準溶液ですべての分析対象物を含有するように調製し、データも多成分取り込みをしてバリデーションを実施しているため。

定量性能が変わる危険性があると感じています。溶液のpHが変わる場合がありますので、特に、「標準溶液中の安定性」や「調製段階の容器への吸着」に不安を感じます。

★目的とする分析対象物質のみで調製する。:8件

分析対象外の物質の有無が測定に影響しないと考えられる場合は、不要な操作は割愛します。(4件)

目的とする物質のみでパーシャルバリデーションを実施した上で成分を減らす。(2件)

標品が希少な場合にはやむなく対象物質を減らすことになると思う。(2件)

Discussion : 2成分以上の同時定量

① 検量線用標準試料 (Calibration standards) の調製方法

- 73.5%の回答者が全ての分析対象物質を含有する**混合検量線用標準溶液 (Working solution mixture)** を用いている。

選択理由 : 調製の簡便化。操作ミスの回避。

選択条件 : 分析対象物質が相互に影響しないこと。同じ定量範囲であること。

② 実試料分析時に分析対象を「減らす」場合の検量線用標準試料 (Calibration standards) の調製方法

- 74.5%の回答者が**フルバリデーションと同じ方法** (全ての分析対象物質を含有) で調製している。

選択理由 : フルバリデーション取得時と同等の条件とし、定量性能 (安定性、吸着等) が変わることを避ける。

- 14.3%の回答者が**目的とする分析対象物質のみ** で調製している。

選択条件 : 測定に影響しないと考えられる場合。希少な標準物質である場合。

- 非分析対象物質の添加を中止するために必要なパーシャルバリデーション項目とは?

QC試料の調製

- 川端 光彦 (株式会社新日本科学)
落合 美登里 (東和薬品株式会社)
副島 呉竹 (富山化学工業株式会社)
小山 亜紀 (株式会社JCLバイオアッセイ)

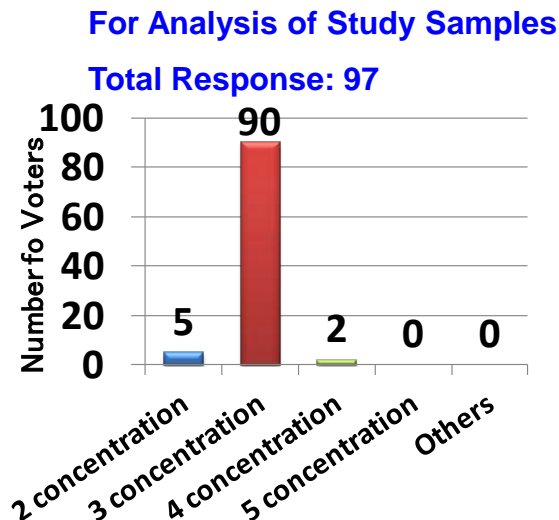
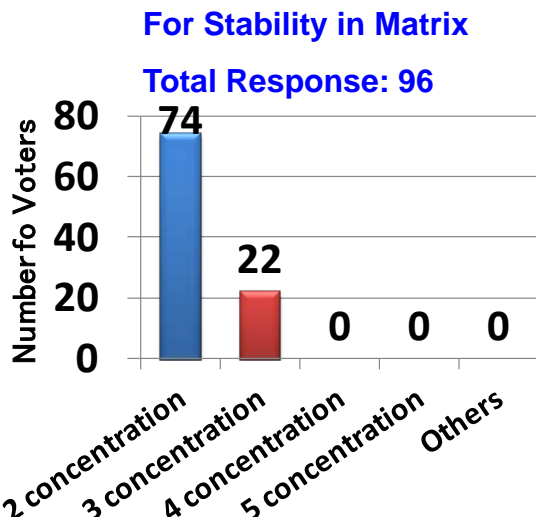
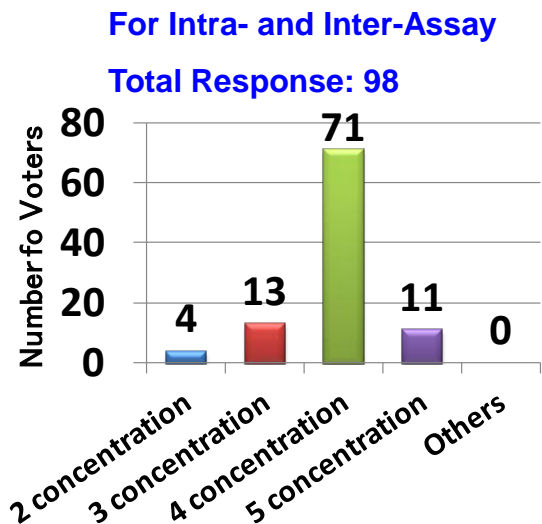


QC : QC試料の濃度設定

①_Q18. 基本的な濃度設定数を以下から選択してください。

有効回答数: 98件 96件 97件

QC	日内及び日間再現性用	安定性用	実試料分析用
回答	カウント(件)		
2濃度	4	74	5
3濃度	13	22	90
4濃度	71	0	2
5濃度	11	0	0
その他	0	0	0



<http://bioanalysisforum.jp/>

QC : QC試料の濃度設定

①_Q19. **定量下限濃度**の設定について以下から選択してください。

有効回答数:

98件

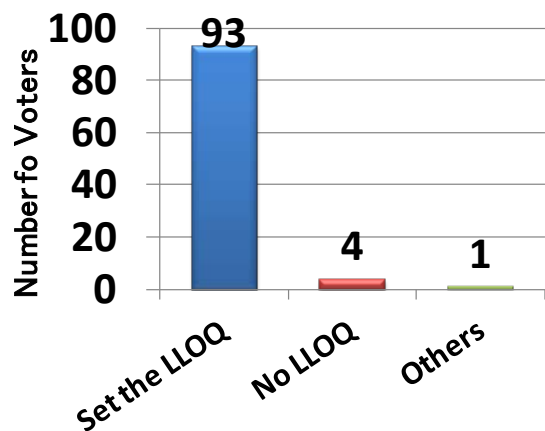
91件

93件

QC	98件	91件	93件
回答	カウント(件)		
定量下限濃度を設定する	93	10	13
定量下限濃度を設定しない	4	81	79
その他	1	0	1

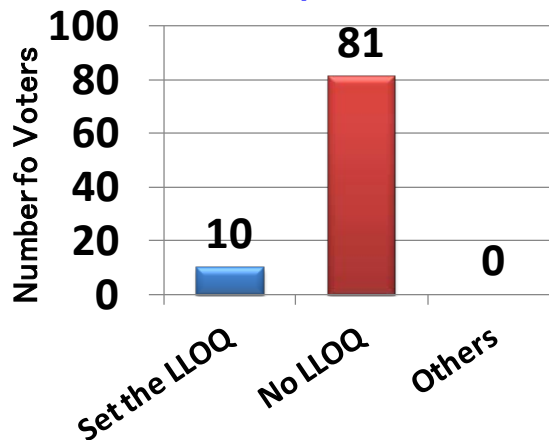
For Intra- and Inter-Assay

Total Response: 98



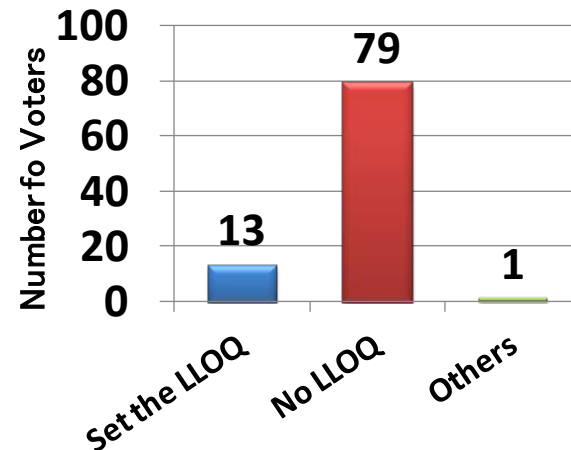
For Stability in Matrix

Total Response: 91



For Analysis of Study Samples

Total Response: 93



QC : QC試料の濃度設定

①_Q20. **低濃度**の設定について以下から選択してください。

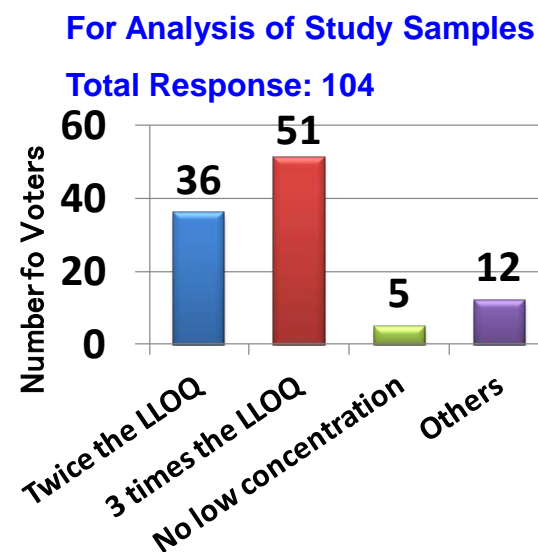
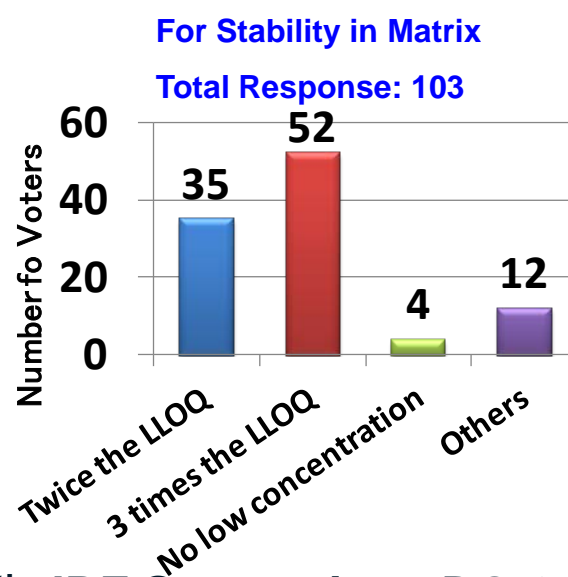
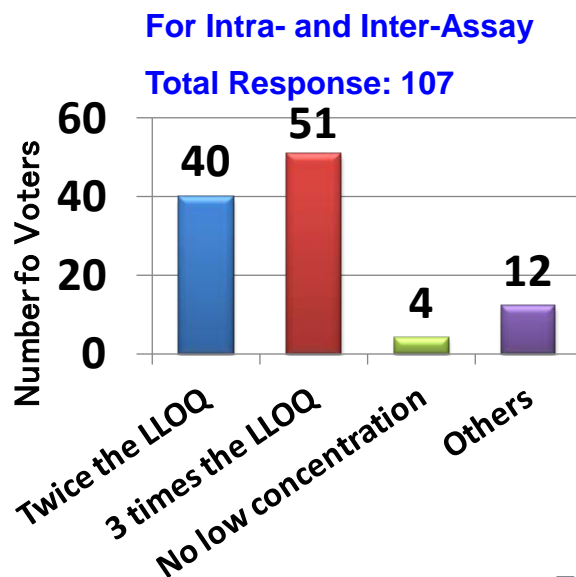
有効回答数:

107件

103件

104件

QC	日内及び日間再現性用	安定性用	実試料分析用
回答	カウント(件)		
定量下限の2倍	40	35	36
定量下限の3倍	51	52	51
低濃度を設定しない	4	4	5
その他	12	12	12



QC : QC試料の濃度設定

①_Q19. 定量下限濃度の設定についてその他コメント。

<その他のコメント>

<日内及び日間再現性用QC>

QCとは別に定量下限濃度確認用の試料を調製します。

<実測定用QC>

(バリデーション試験では設定しているが)QCから設定をしない

①_Q20. 低濃度の設定についてその他のコメント

<その他のコメント>

<2~3倍(倍率を固定していない)>

設定倍率は固定していない(すべてのQCで同じ濃度を使用)

実際には定量下限の2倍以上, 3倍以下

定量下限の2~3倍(5件)

基本的にLLOQの3倍ですが3倍以下のときもあります。

3倍とは決めずに、3倍以内という基準にしている。(2件)

いずれも検量線の下から2番目のポイント(定量限界の2~3倍に相当)と同じ濃度を選択しています。

<2.5倍>

2.5倍

QC : QC試料の濃度設定

①_Q21. **中濃度**の設定について以下から選択してください。

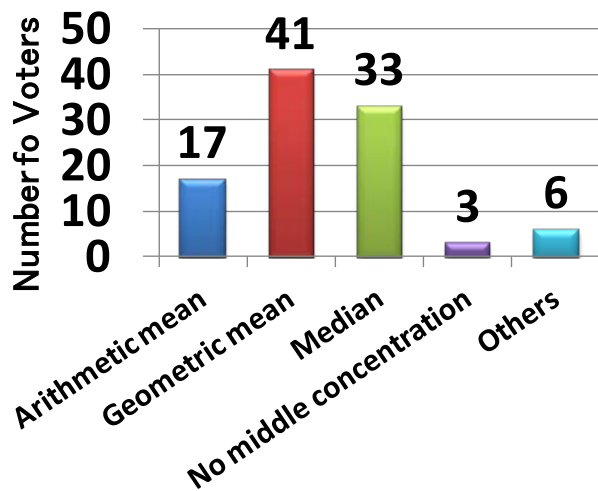
有効回答数:	103件	93件	97件
QC	日内及び日間再現性用	安定性用	実試料分析用
回答	カウント(件)		
算術平均 : 検量線範囲の中間付近 (1~1000の場合, 500付近)	17	8	16
幾何平均 : 検量線の定量下限と定量上限からの倍率が近接した濃度 (1~1000の場合, 30付近)	41	17	41
中央値 、中央値付近: 検量線の濃度ポイントの中間付近	33	13	31
中濃度を設定しない	3	52	4
その他	6	3	5

QC : QC試料の濃度設定

①_Q21. 中濃度の設定について以下から選択してください。

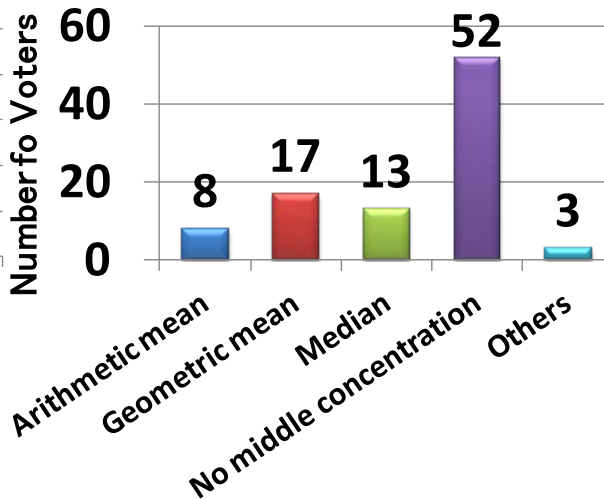
For Intra- and Inter-Assay

Total Response: 103



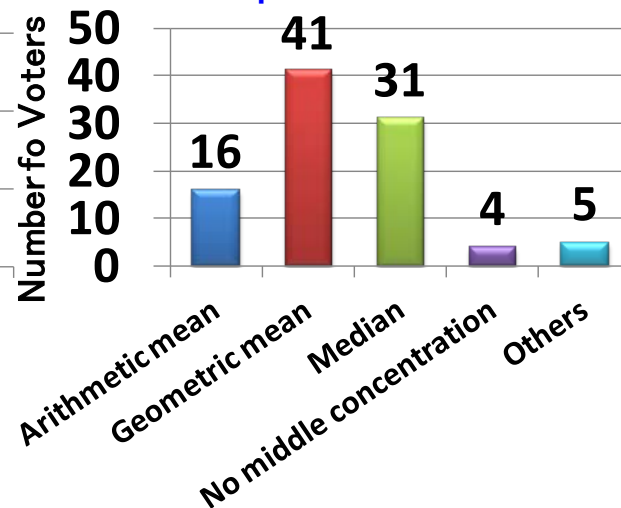
For Stability in Matrix

Total Response: 93



For Analysis of Study Samples

Total Response: 97



<その他のコメント>

中央値が幾何平均になるようにMQCを設定する。

少し高めに設定することもある。

濃度範囲が広い場合は、中濃度を2ポイント設定する。

50~100くらいでポイントも考慮して決める。

LQC と HQC の幾何平均

こだわりなし。比較的低い濃度で設定する。(Low QCの10倍程度)

QC : QC試料の濃度設定

①_Q22.高濃度の設定について以下から選択してください。

有効回答数:

99件

98件

98件

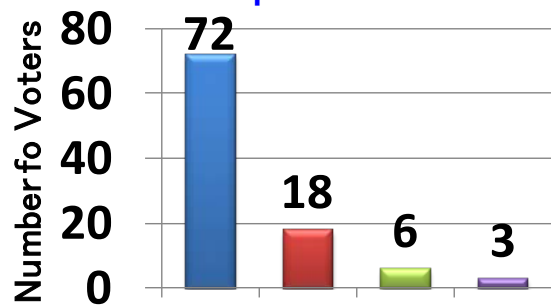
QC	日内及び日間再現性用	安定性用	実試料分析用
回答	カウント(件)		
定量上限の75%以上～85%以下	72	76	75
定量上限の75%以上～100%未満	18	15	14
高濃度を設定しない	6	4	6
その他	3	3	3

For Intra- and Inter-Assay

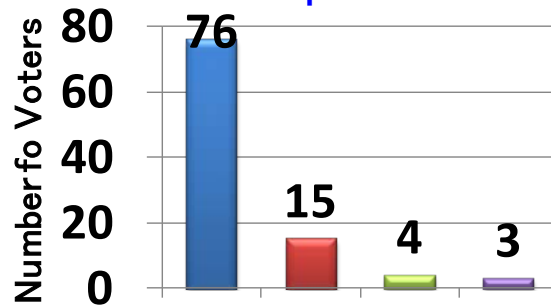
For Stability in Matrix

For Analysis of Study Samples

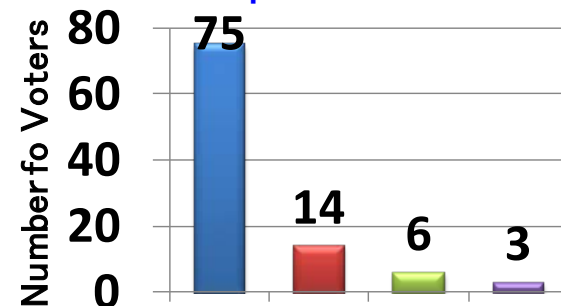
Total Response: 99



Total Response: 98



Total Response: 98



75% to 85% of the ULOQ
75% to 100% of the ULOQ
No high concentration
Others

75% to 85% of the ULOQ
75% to 100% of the ULOQ
No high concentration
Others

75% to 85% of the ULOQ
75% to 100% of the ULOQ
No high concentration
Others

QC : QC試料の濃度設定

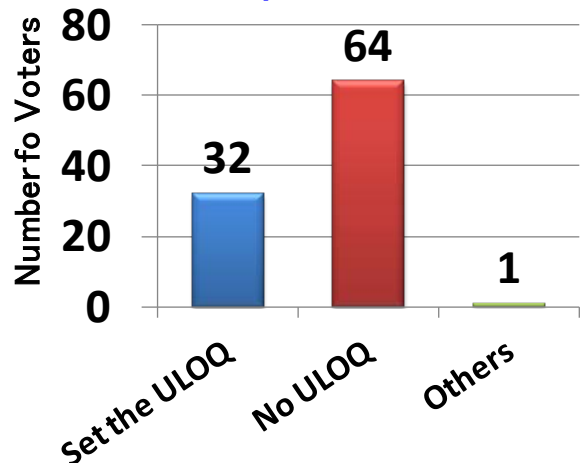
①_Q23. **定量上限濃度**の設定について以下から選択してください。

有効回答数: 97件 95件 97件

QC	日内及び日間再現性用	安定性用	実試料分析用
回答	カウント(件)		
定量上限濃度を設定する	32	11	12
定量上限濃度を設定しない	64	84	84
その他	1	0	1

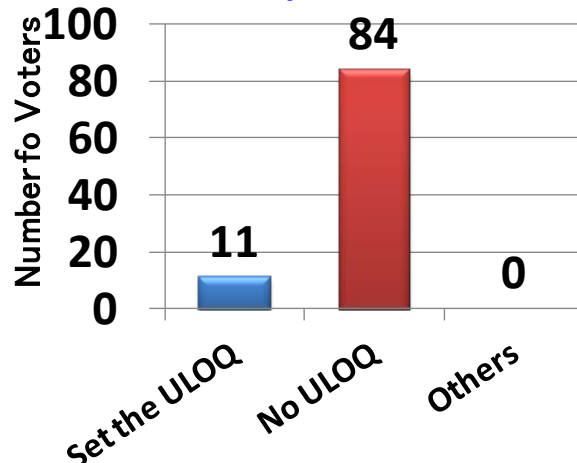
For Intra- and Inter-Assay

Total Response: 97



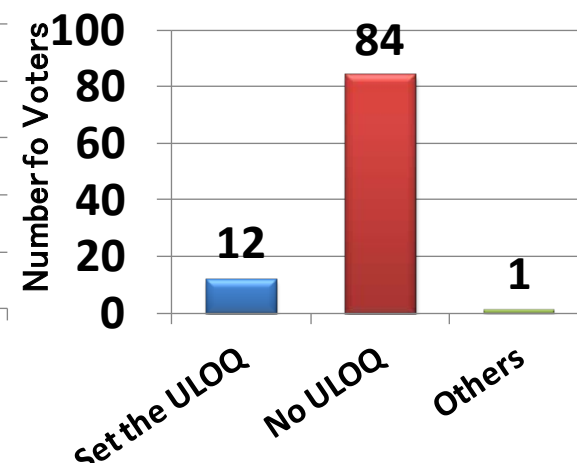
For Stability in Matrix

Total Response: 95



For Analysis of Study Samples

Total Response: 97



QC : QC試料の濃度設定

①_Q22.高濃度の設定についてその他のコメント。

<その他のコメント>

<ULOQを含む>

定量上限の75%以上～100% (定量上限を含む)のどこかの濃度を高濃度とする。(日内及び日間再現性, 安定性, 及び実試料QC)

ULOQで実施の場合もあり。(75%以上～100%: 日内及び日間再現性, 安定性)

定量上限濃度を高濃度として設定。(日内及び日間再現性, 安定性, 及び実試料QC)

<実試料分析時>

実試料分析時のQCでは、75%以上, 90%以下にします。

①_Q23.定量上限濃度の設定についてその他のコメント

<その他のコメント>

QCとは別に定量上限濃度確認用の試料を調製します。(日内及び日間再現性用QC)

QCから設定をしない。(実試料用QC)

QC : QC試料の濃度設定

①_Q24. **その他の濃度域**について、**設定する場合は、具体的な内容をコメント欄にご記入ください。**

有効回答数:

96件

96件

95件

QC	日内及び日間再現性用	安定性用	実試料分析用
回答	カウント(件)		
その他の濃度域は設定しない	94	94	94
その他の濃度域を設定する	2	2	1

<その他の濃度域を設定する内容>

検量線範囲が広いときは、中濃度として2点以上設定します。(日内及び日間再現性用QC)
等差と等比を混ぜて設定する(日内及び日間再現性用QC)

<その他の濃度域を設定する内容>

検量線外高濃度試料としての安定性試料の調製があります。(安定性用QC)
定量上限を超えたものを設定します。(安定性用QC)

<その他の濃度域を設定する内容>

実試料分析で希釈試料がある場合、希釈QCを加えることがある。(実試料用QC)

QC : QC試料の濃度設定

①_Q25. Q18~Q24について、**選択の理由**などコメントがあればご記入ください。

<選択の理由のコメント>

<ガイドラインに従っている>

BMVガイドラインに準じて設定します

BMVガイドラインの記載内容に合わせて設定している。

<SOPに規定している>

SOPに規定している。

<再現性以外はおおよその範囲で設定>

再現性で検量線範囲をカバーし、その他はおおよその範囲(LLOQ×2, ULOQ×0.8)でカバーできると考えるため。

<中濃度>

中濃度に算術平均値を使用すると、高・中濃度ともにほとんどの検体の血漿中濃度を超えるため、中濃度としては幾何平均の方が適していると考えています。

<実試料用QC>

精度、実試料は、定量下限、定量下限の2~3倍、検量線の真ん中、定量上限でQCを設定している。

<高濃度>

QCHIは定量上限の8割で設定していますが、測定値のばらつきで+15%となった場合にでも上限未満となるためです。

<検量線外高濃度>

検量線外の高濃度試料の安定性は、どの段階でも確認されていない。どのような状態になっているかの確認のために、検量線外高濃度QC試料の調製を行う。全ての化合物ではなく、化合物による。

QC : QC試料の濃度設定

- ガイドラインでは、定量下限、低濃度、中濃度、高濃度の4点であるが、高濃度をULOQとする場合が見られる。
- ULOQでは、評価時に検量線外の値になる場合があるので、ULOQを設定しないとする場合もある。（検量線のULOQのRatio以下の値を採用するとの考え方もあるため）
- 定量限界点での定量精度・再現性を評価しないと検量線範囲をすべて定量できることを検証できないとして5濃度または、4濃度で高濃度をULOQとして評価。

（DG-01での議論及びアンケート結果の議論から）

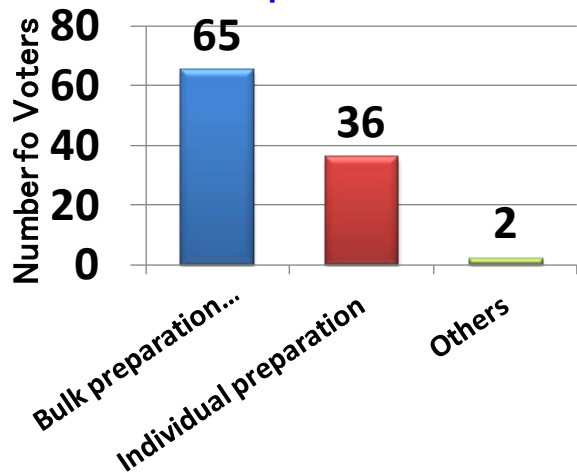
QC : QC試料の調製時期・容量

①_Q26. QC試料の調製方法について以下から選択してください。有効回答数: 103件 102件

QC	日内及び日間再現性用	実試料分析用
回答	カウント(件)	
一括調製(バッチ調製)	65	67
1本ごと調製	36	33
その他	2	2

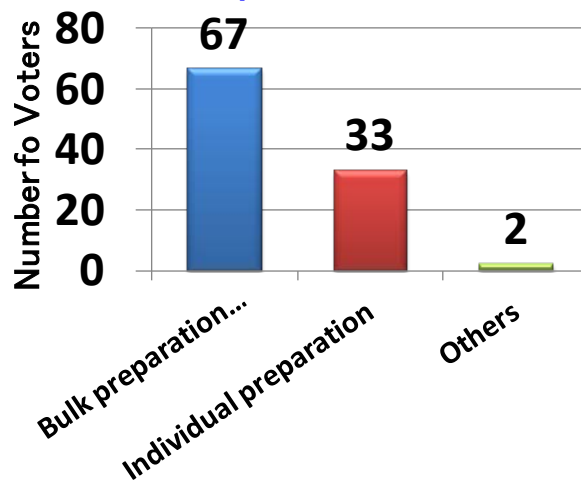
For Intra- and Inter-Assay

Total Response: 103



For Analysis of Study Samples

Total Response: 102



<その他のコメント>

いずれのケースもあります
ケースバイケース

<一括調製でのコメント>

・(再現性用QCと実試料用QCで)
同一のものを使う。
・レアマトリックスの場合には1本
ごとの調整の場合が有ります。
(一括調製ではマトリクス量を
多く必要とする)

QC : QC試料の調製時期・容量

①_Q27. QC試料の調製方法について以下から選択してください。

有効回答数:

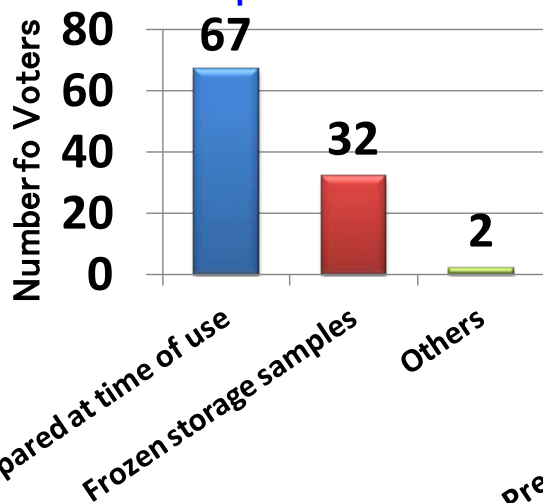
101件

103件

QC	日内及び日間再現性用	実試料分析用
回答	カウント(件)	
用時調製	67	52
凍結保存したものを使用	32	49
その他	2	2

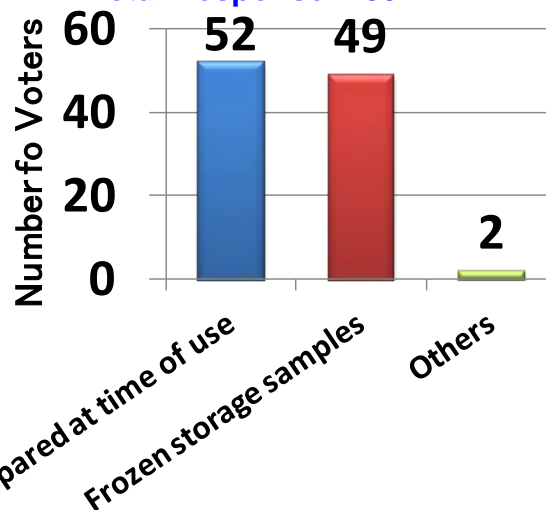
For Intra- and Inter-Assay

Total Response: 101



For Analysis of Study Samples

Total Response: 103



<その他のコメント>

いずれのケースもあります
ケースバイケース

<再現性用及び実試料用QCでのコメント>

・再現性用QCに関しては、凍結したものを使用する場合があります。
(再現性用QC: 用時調製)
・調製直後に使用することもある。
(再現性用QC: 凍結保存, 実試料用QC: 凍結保存)
・バリデーション実施時は、用時調整が望ましいが、後付けで安定性を確認するリスクを許容するなら凍結保存でも可。
(再現性用QC: 用時調製)

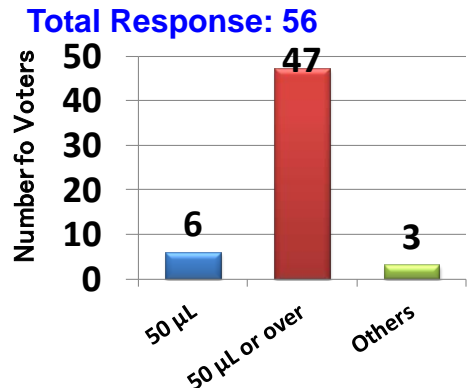
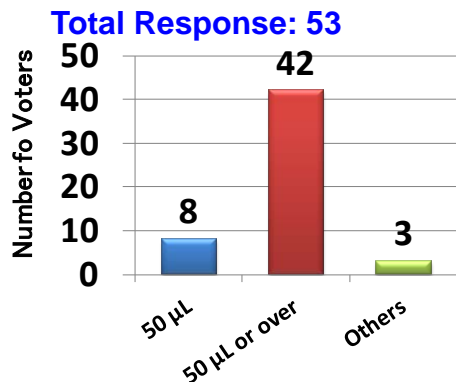
QC : QC試料の調製時期・容量

①_Q28. ①_Q27で凍結保存とお答えいただいた方で一括調製して保存する場合、**保存容器への分注量**はどのようにしていますか。
(前処理には、50 μ Lを用いるとする)

有効回答数:	53件	56件
QC	日内及び日間再現性用	実試料分析用
回答	カウント(件)	
50 μ Lちょうどを分注する。 (分注した保存容器で前処理する方法など)	8	6
50 μL以上を分注する。 (別の容器に採取して前処理する方法)	42	47
その他	3	3

For Intra- and Inter-Assay

For Analysis of Study Samples



<その他のコメント>

- ・1番と2番の両方です(分注容器を前処理装置にセットできる場合は1番)
- ・いずれのケースもあります
- ・特にこだわりなし

<50 μ L以上を分注する場合のコメント>

(実測定)の検体と同様に、分注操作を行うべき。

QC : QC試料の調製時期・容量

①_Q29. ①_Q26~Q28について、選択の理由やその他詳細などコメントがあればご記入ください。

<詳細コメント>

<採取操作もバリデートしていると考えため多めに分注>

採取する動作からバリデーションとして保証する必要があると考えるため。

実試料では、採取過程が入るので、状況を揃えるために、採取量より多く分注して、そこから採取するのが一般的です。化合物によっては、グロス調製が難しい場合など特殊な場合は、個別調製の場合もあり。

Q28: 実試料の採取方法に合わせるため(基本的に分注しないため、50 uLの抜き取りがひつようとなるため)。

なるべく実試料保存量に合わせる。

Q28: 採取時のn数が採取できるように分注する。(ex.50uL採取をn=3の場合、200uLずつ分注する)

凍結保存時の分注量は、実測時の状況を想定して設定します。

<安定性と再現性用QC>

Q26, Q27: 再現性と安定性は別項目とんがえるため。

<用時調製>

凍結する場合は安定性項目で評価しているから良いのではないかと思う あくまで再現性は測定系の評価と考えている。

<用時調製>

一括調製では、調製ミスがあるとマトリックスを多く消費してしまうので、用事調製としている。

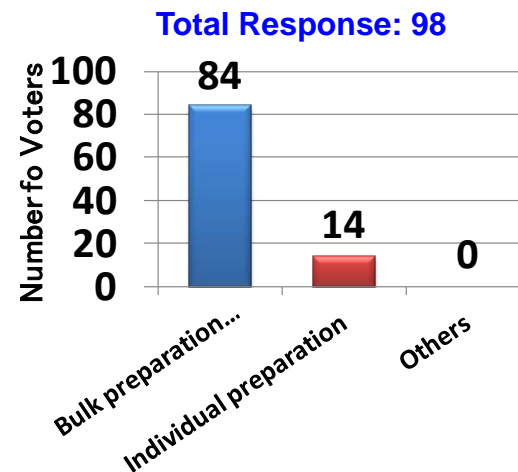
検量線、QC(実試料、日内日間再現性用)の調製は、同じ方法で、ストックの検量線用標準溶液から用時調製を行っている。

QC : QC試料の調製時期・容量

①_Q30.マトリックス中安定性評価時のQC試料の調製方法について以下から選択してください。

有効回答数: 98件

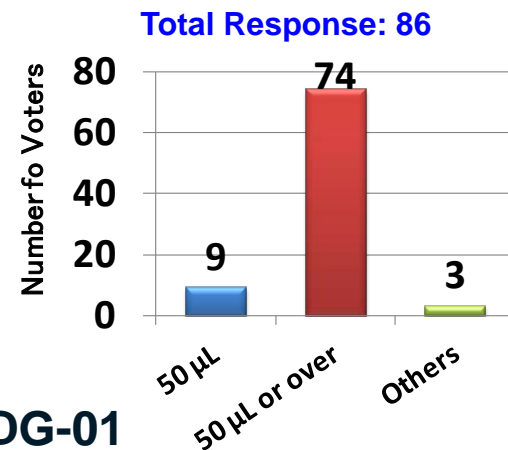
安定性用QC	
回答	カウント(件)
一括調製(バッチ調製)	84
1本ごと調製	14
その他	0



①_Q31.「一括調製」の経験がある方で、保存容器への分注量はどのようにしていますか。

有効回答数: 86件

安定性用QC	
回答	カウント(件)
50 μ Lちょうどを分注する。	9
50 μ L以上を分注する。	74
その他	3



QC : QC試料の調製時期・容量

①_Q31.①_Q30で「一括調製」の経験がある方で、保存容器への分注量はどのようにしていますか。

<その他のコメント>

検体の保存容器・量を合わせるのがベスト。

前処理の方法によりけりです。除タンパク法では50 μ Lを取りますが、液液抽出などではエッペンなどの保存容器で保存後、さらに別容器に分取しないとイケませんが、凍結あるいは室温保存により水がとび、定量値が高くなる可能性があるため、その場合には多めに分注しています。

①_Q32. ①_Q30~Q31について、選択の理由やその他詳細などコメントがあればご記入ください。

<詳細コメント>

<採取操作も合わせてバリデートしていると考えため多めに分注>

バリデーション試験は、実試料測定の実験操作を再現する試験であると考えため、実試料測定と同様の操作過程を含む必要がある。

実試料の保存方法、マトリックスの採取法と合わせている。(8件)

化合物によっては、グロス調製が難しい場合など特殊な場合は、個別調製の場合もありますが、非常に稀です。

安定性の評価であり、再現性の評価ではないため、再現性の評価に関する要因を排除したいから。

吸着性の高い化合物は使用量ちよどの分注では安定という結果になってしまう可能性があるため。

基本的に、臨床検体をミミックできるようにする。

安定性評価に容器への吸着影響確認を含めるため、多めに分注して前処理前に必要量分取し前処理しています。

マトリックスに対して添加量は1%以下に可能ならする。無理なら、3%or5%以下。Q31はケースバイケースだが、基本は多めに分注して採取する。

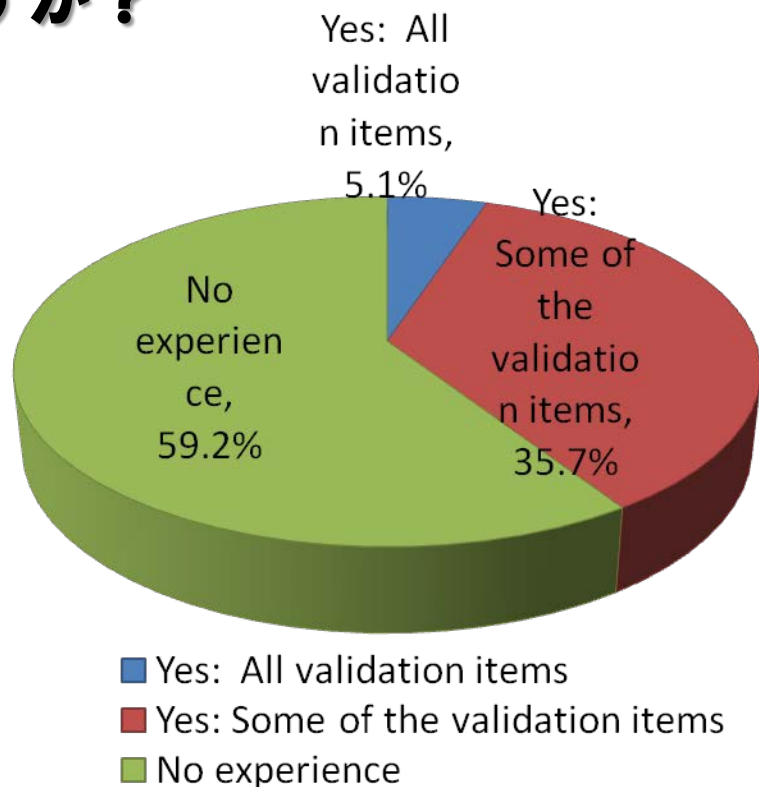
QC : QC試料の調製時期・容量

- 再現性は、バッチ及び測定日を変えて測定した時のバラツキを検証するものだとして一括調製が基本になる。
- 用時調製とする場合は、一括調製では、標準溶液の添加割合などの関係から、調製時に大量に作られ無駄が出ることや化合物の物性による調製の困難などの理由から。
- QC試料は、実試料の模擬的試料との考えから、実試料と同じ操作をするために採取量より多く分注する。

(DG-01での議論及びアンケート結果の議論から)

QC : 測定対象以外の化合物添加

①_Q33 バリデーションにおいて、測定対象以外の化合物（代謝物や併用薬など）を添加してQC試料を調製した経験はありますか？



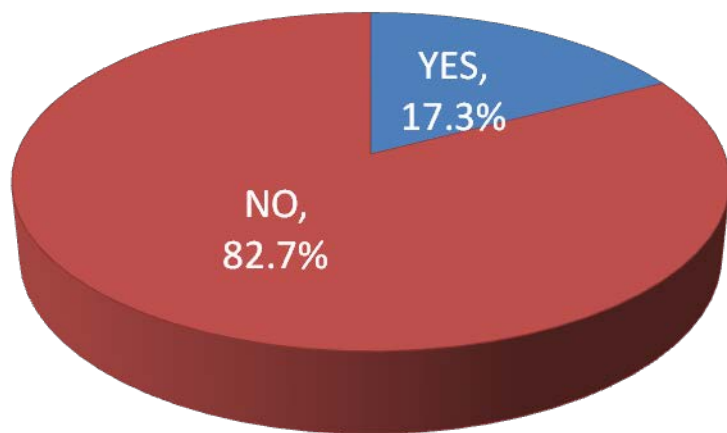
<添加する化合物>	(件)
併用薬	9
配合剤	1
添加剤	2
代謝物	4
可逆的反応の代謝物	1
代謝酵素	1

<添加するVD項目>	(件)
安定性	3
真度・精度	7
選択性	5
マトリックス効果	1

Total number of voters: 98

QC : 測定対象以外の化合物添加

①_Q34 実試料分析において、測定対象以外の化合物を添加してQC試料を調製した経験はありますか？



■ YES

■ NO

Total number of voters: 98

<実施理由>

分析法バリデーションを代謝物を含めて実施したが、実試料分析で対象外とした (3件)

併用薬が明らかな場合 (1件)

安定剤を添加する場合 (1件)

<評価方法>

検量線ULOQの2倍に設定し、測定対象化合物への影響を確認

併用薬のCmax濃度をブランク試料およびQC試料に添加して影響を確認

【Discussion】

Q33 : 分析法バリデーション (VD) で経験あり約40%

Q34 : 実試料分析で経験あり約17%

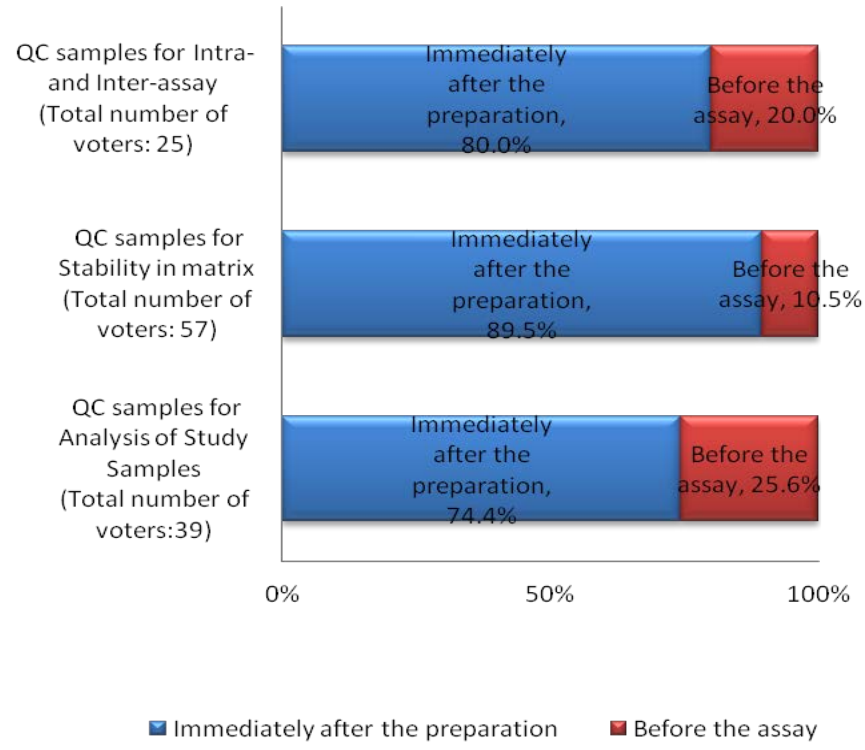
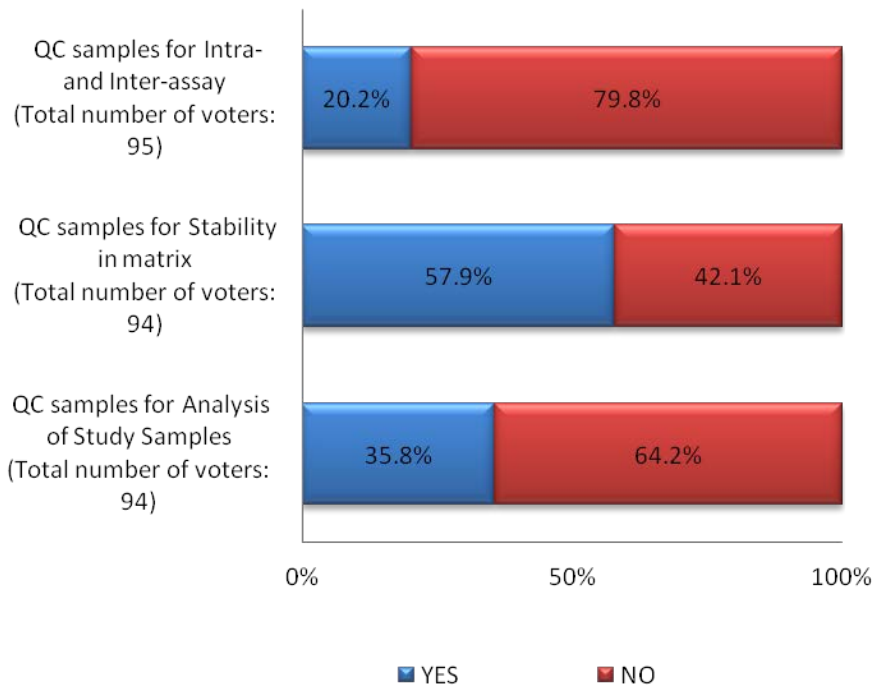
- VDで影響を確認した場合、実試料分析では評価しないケースが多い。
- 評価は入手できる代謝物や想定可能な併用薬に限定される。
- …VDではすべての因子を評価できるわけではない
→ISRの重要性



QC : QC試料の濃度確認

①_Q35 調製後にQC試料の調製濃度が正しく調製されていることを確認してから試験に用いますか？

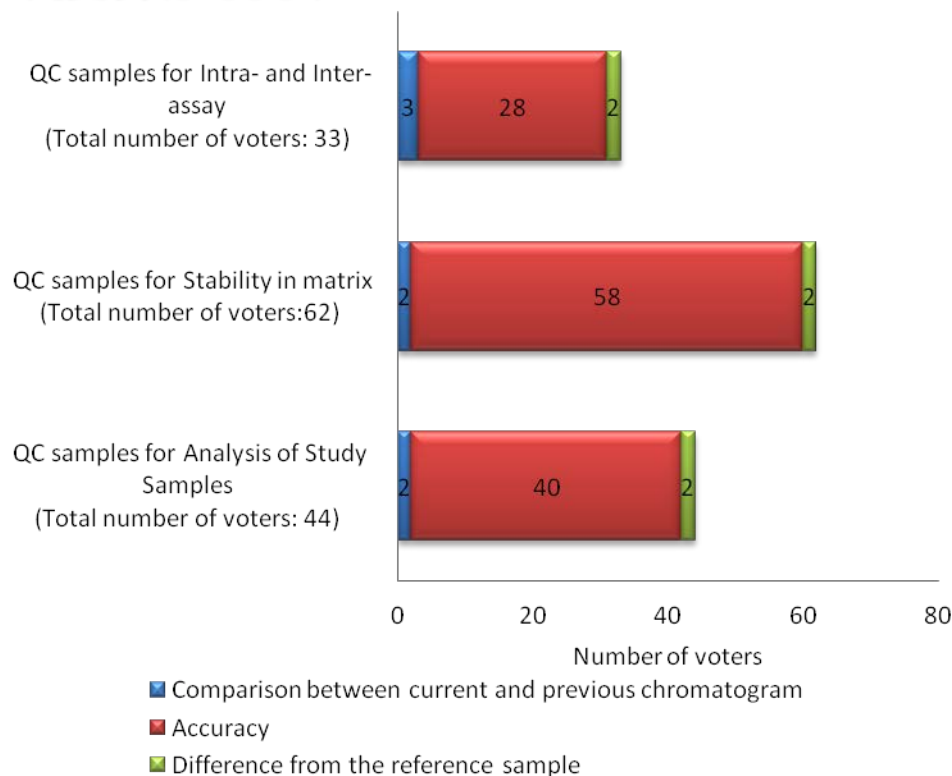
①_Q36 ①_Q35で確認する場合、いつ確認しますか？



<http://bioanalysisforum.jp/>

QC : QC試料の濃度確認

①_Q37 ①_Q35で**確認する**場合、調製濃度の妥当性をどのように評価しますか？
(複数回答)



①_Q38 ①_Q35~Q37についてのコメント

<確認する理由>

安定性用のQC試料は、調製直後(時間ゼロ)の濃度として評価する

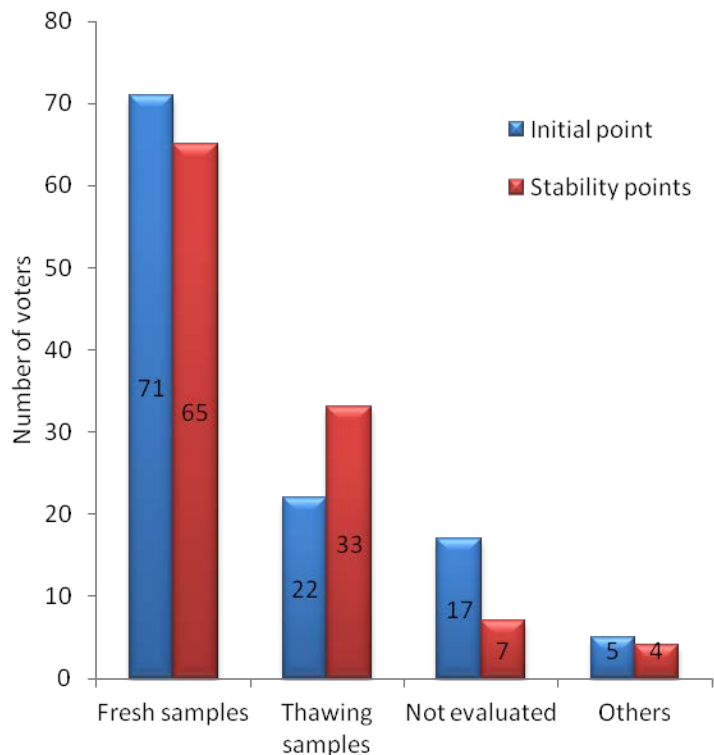
顧客の要望

<確認しない理由>

手順に従って調製されたものは問題ないという概念で実施しているため

QC : ベンチトップの安定性

①_Q39-Q41 ベンチトップの安定性の評価に用いるQC試料について、以下から選択してください
(複数回答)



Total number of voters: 96

<調製直後を選択>

採血直後を想定して調製している

採取後に凍結せずに測定する場合がある

冷凍の影響を除外するため

<凍結後に融解した試料を選択>

分析のラボは通常凍結状態で実試料を受け取るため

<使い分け>

凍結保存・凍結融解の安定性に応じて

顧客の要望(CRO)(2件)

【Discussion】

ベンチトップの安定性はどの工程を想定して実施しているか？

- サンプル採取～分析？
- サンプル採取～凍結保存？
- サンプル融解～分析？

ご意見
お聞かせください

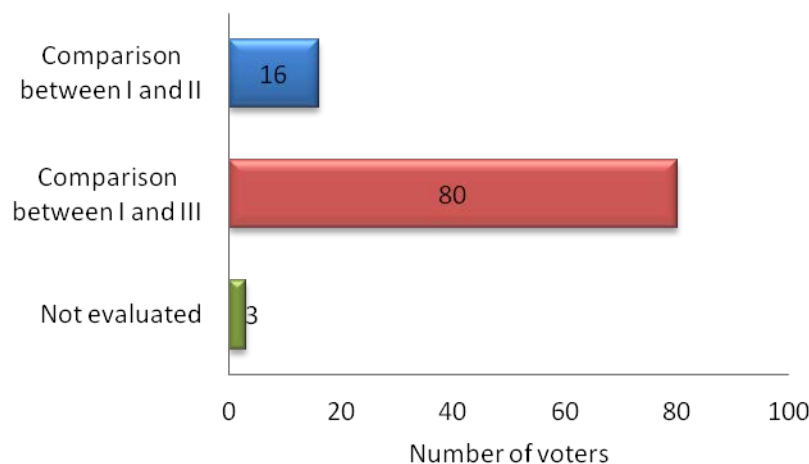
調製直後の選択には、単純に凍結融解のファクターを除いたマトリックス中での安定性を評価したいというケースも含まれる。

→凍結保存した実試料を想定するのであれば、凍結融解安定性の融解時間で設定(例:室温で24時間以上放置)することで評価可能？

JBF QC : 回収率

①_Q42 回収率評価に用いる試料の組み合わせを選択してください（複数回答） Total number of voters: 96

- I : マトリックスに標準物質を添加して前処理した試料（通常のQC試料）
- II : マトリックス以外（生理食塩水やバッファーなど）に標準物質を添加した試料（マトリックスを含まないQC試料）
- III : 前処理後のブランク試料に標準物質を添加した試料



①_Q43 Q42のコメント

<IとIIの比較の理由>

溶解度の低い化合物の場合、IIIが調製できない場合(1件)
マトリックス効果の影響が小さい場合(1件)

<IとIIIの比較の理由>

マトリックス効果の影響を除外するため(10件)
SOP、BMVガイドライン(日本の2013年7月の発行)に記載されているから(3件)
マトリックス以外に化合物が溶解しないため

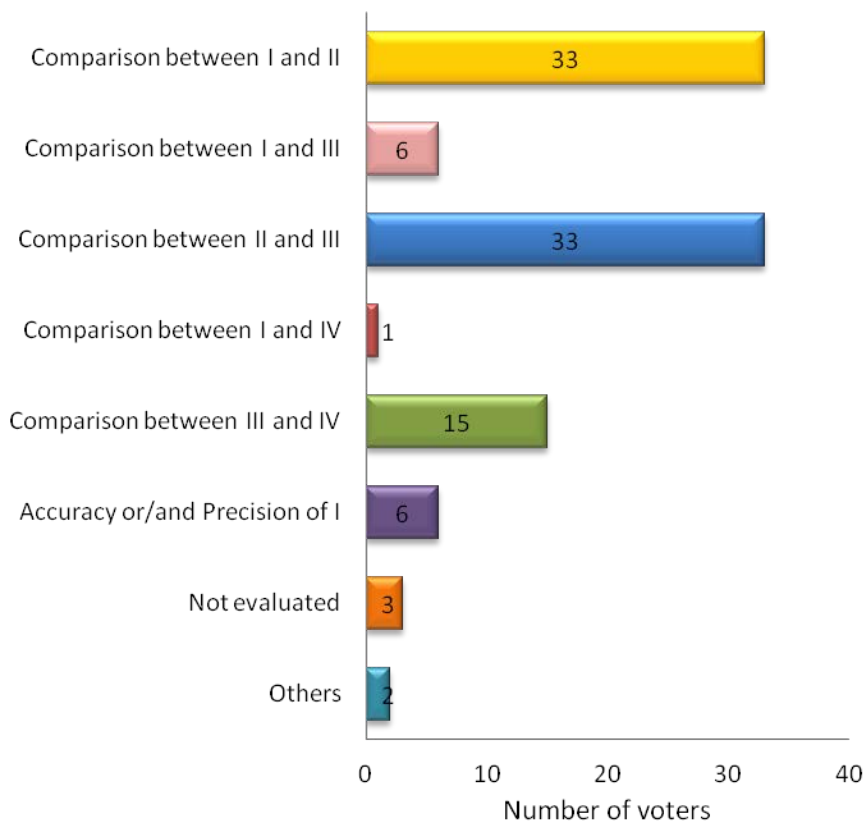
<回収率を評価しない理由>

評価基準を設定できない項目をバリデーションに入れるべきではない

QC : マトリックス効果

①_Q44 マトリックス効果の評価に用いる試料の組み合わせを選択してください。（複数回答）

- I : マトリックスに標準物質を添加して前処理した試料（通常のQC試料）
- II : マトリックス以外（生理食塩水やバッファなど）に標準物質を添加した試料（マトリックスを含まないQC試料）
- III : 前処理後のブランク試料に標準物質を添加した試料
- IV : 前処理後のマトリックス以外（生理食塩水やバッファなど）の試料に標準物質を添加した試料



Total number of voters: 96

QC : マトリックス効果

①_Q45 ①_Q44について、選択の理由やその他詳細などコメントがあればご記入ください。

<IとIIの比較の理由>

溶解度の低い化合物の場合、IIIが調整できないケースがあるから
回収率がほぼ100%であれば評価に影響しないと考えるから
マトリックスによる回収率の変化も一種のマトリックス効果と考えるから

<IIとIIIの比較の理由>

回収率の影響を除外するため(3件)
IIIとIVよりも実務上はIIとIIIで前処理の影響を含めて評価するほうが有用なため

<IIIとIVの比較の理由>

回収率の影響を除外して、試料前処理に用いる器具への吸着や妨害等の溶出を含めたイオン化の再現性を評価するため(3件)
SOPに規定 (2件)

<その他>

内部標準物質として安定同位体を用いて定量下限における内標比の変動の程度を評価

回収率・マトリックス効果

- I : マトリックスに標準物質を添加して前処理した試料（通常のQC試料）
- II : マトリックス以外（生理食塩水やバッファーなど）に標準物質を添加した試料（マトリックスを含まないQC試料）
- III : 前処理後のブランク試料に標準物質を添加した試料
- IV : 前処理後のマトリックス以外（生理食塩水やバッファーなど）の試料に標準物質を添加した試料

分析(前処理後)サンプル中の影響因子	サンプル			
	I	II	III	IV
A : マトリックス成分	あり	なし	あり	なし
B : 前処理での化合物の回収率	あり	なし	なし	なし
C : 前処理操作・前処理資材からの溶出物	あり	なし	あり	あり

回収率・マトリックス効果

- I : マトリックスに標準物質を添加して前処理した試料（通常のQC試料）
- II : マトリックス以外（生理食塩水やバッファーなど）に標準物質を添加した試料（マトリックスを含まないQC試料）
- III : 前処理後のブランク試料に標準物質を添加した試料
- IV : 前処理後のマトリックス以外（生理食塩水やバッファーなど）の試料に標準物質を添加した試料
- A : マトリックス成分の影響
- B : 目的化合物の前処理における回収率の影響
- C : 前処理の資材からの溶出物や前処理操作の影響

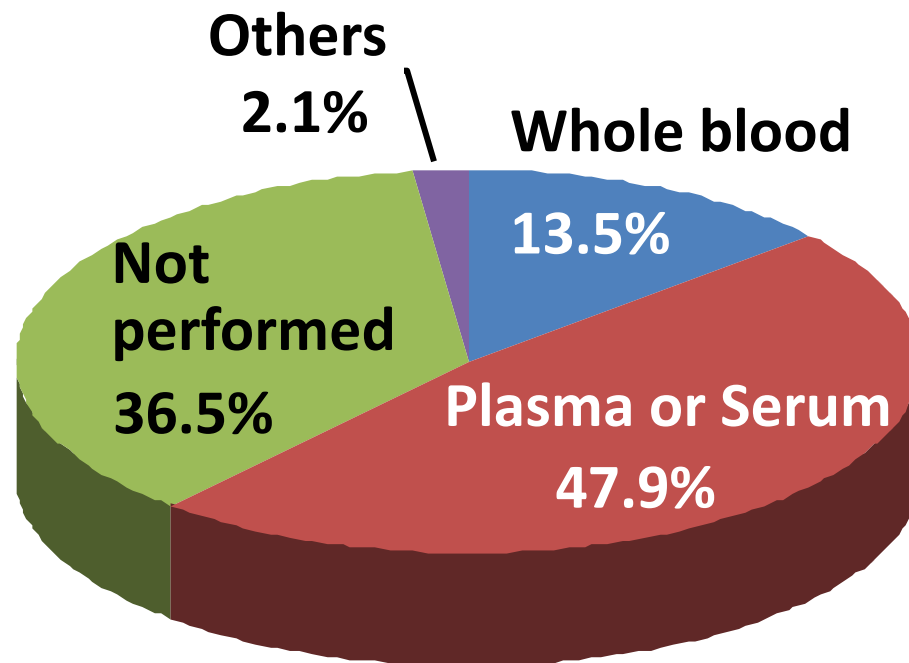
比較サンプル	比較因子	確認可能な項目	
IとII Iのみ	A・B・C	⇒ 回収率 マトリックス効果	<ul style="list-style-type: none"> ・回収率またはマトリックス効果が100%付近の場合のみそれぞれの項目の評価が可能 ・光学検出器での分析では回収率の評価可能 ・実試料分析ではマトリックス効果+回収率の両方が同時に影響するので複数個体のブランクマトリックスで調製したQC試料の真度・精度からマトリックス効果は評価可能(Iのみで評価時)
IとIII	B	⇒ 回収率	<ul style="list-style-type: none"> ・マトリックス効果の影響を除外した回収率を評価可能 ・添加する標準溶液の濃度が異なる場合は調製誤差が影響する
IIとIII	A・C	⇒ マトリックス効果 マトリックスファクター	<ul style="list-style-type: none"> ・回収率の影響を除外したマトリックス効果を評価可能 ・機材の影響を含めて検証可能 ・添加する標準溶液の濃度が異なる場合は調製誤差が影響する
IIIとIV	A	⇒ マトリックス効果 マトリックスファクター	<ul style="list-style-type: none"> ・回収率や前処理資材の影響を除外したマトリックス効果を評価可能 ・厳密にマトリックス効果のみを検証できるが、実検体では必ずCの影響があるので、他の項目でCの評価が必要になる？
IとIV	A・B	⇒ 回収率 マトリックス効果	<ul style="list-style-type: none"> ・回収率またはマトリックス効果が100%付近であれば、それぞれの項目の評価が可能 ・光学検出器での分析は回収率の評価可能 ・添加する標準溶液が異なる場合は濃度の調製誤差が影響する

QC : 全血中の安定性評価

①Q46. 全血中の安定性評価について、
評価に用いる試料を選択してください。

Total Responses: 96

回答	カウント (件)
全血を前処理して評価	13
血漿または血清を採取 した後に前処理して評価	46
全血中の安定性を 評価しない	35
その他	2

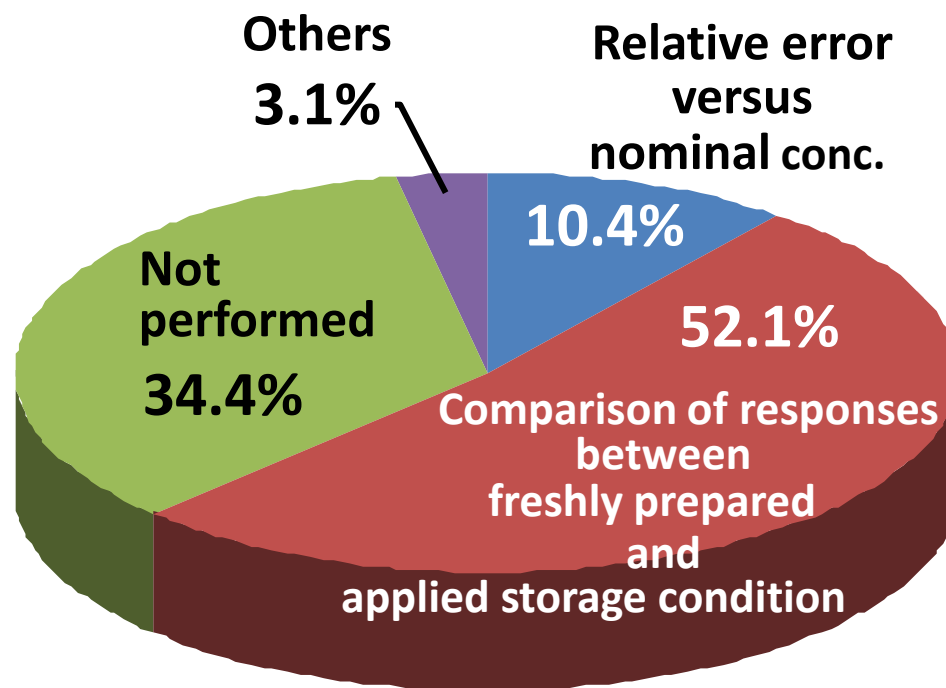


QC : 全血中の安定性評価

①Q47. 全血中の安定性評価について、評価方法を以下から選択してください。

Total Responses: 96

回答	カウント (件)
理論値の真度から評価	10
調製直後試料とのレスポンスの比較	50
全血中の安定性を評価しない	33
その他	3



QC : 全血中の安定性評価

①Q48. Q46,Q47について、選択の理由、その他詳細などコメント

《全血を前処理して評価》

血漿にした際の濃度も同時に測定し、初期値からの低下の程度も評価しています。

《血漿または血清を採取したのちに前処理して評価》

46, 47は血清や血漿を測定に用いる場合の、臨床施設で分離前の全血中の安定性の評価と理解しています。

全血よりも血漿にしたほうが測定結果の信頼性が担保されると考えるため

全血そのものの測定法のバリデーションを実施しないため。

全血から血漿を採取して分析すると理論値の真度では評価が難しいため

血漿中濃度の測定法を基本とするので、血漿にしてから測定します。

全血に添加した際の血漿中に理論値は分からないので、調製直後との比較をします。

全血の測定法が信頼できるか、理論値が信頼できるかという点を考えると、この選択が理想ではないが最善と考えるため。

全血中安定性の評価で理論値は正確に求められるのでしょうか。

《全血中の安定性を評価しない》

予備検討などで安定性に問題がなければバリデーションでは実施しない。(3件)

(安定でない場合、血液中での安定化の方法をあらかじめ検討し、取り扱うとのコメントも)

SOP化していない

《その他》

血球移行時間を懸念(2件)

最近では血液中安定性は評価しないことが多いと聞いたので、バリデーション項目から外すことを考えている。

今後は、科学的に安定であることを主張できる場合には、バリデーション試験の項目としては実施しない方針

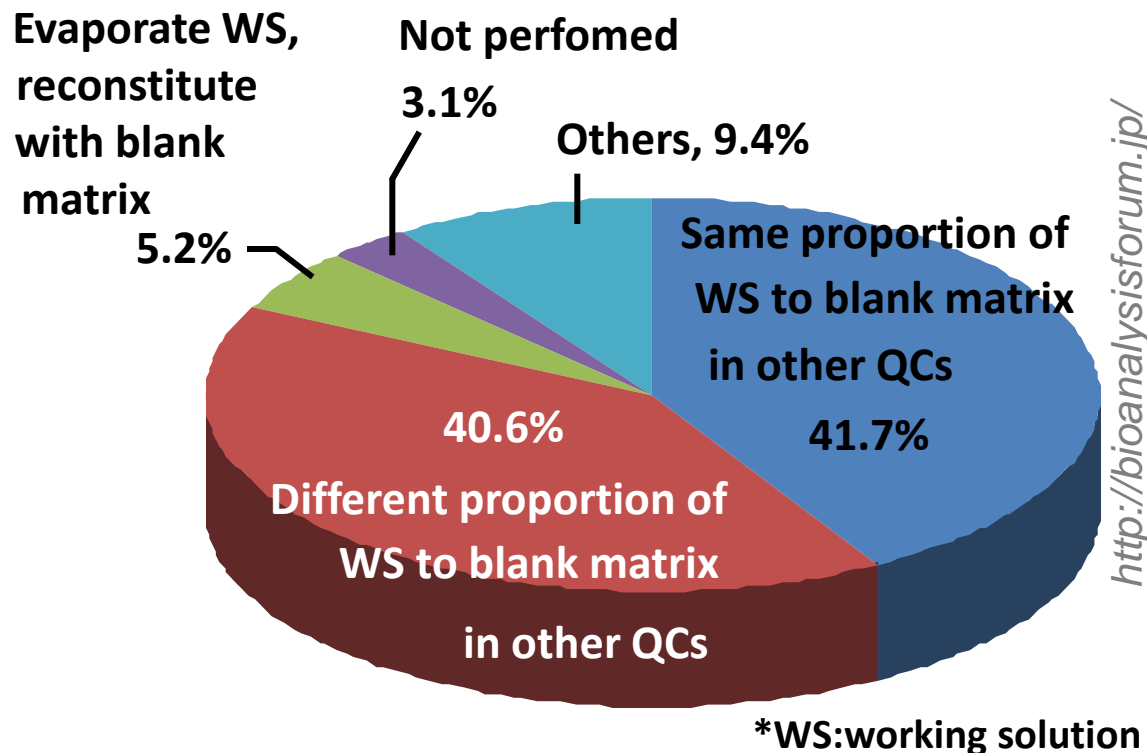
是非
フリースペース等で
議論を!

QC：希釈妥当性試料の調製

①Q49. 希釈妥当性用のQC試料において、 希釈元となる検量線外高濃度QCの調製法について

Total Responses: 96

回答	カウント (件)
他のQC試料と同比率で 標準溶液をblankに添加	40
他のQC試料と異なる比率で 標準溶液をblankに添加	39
標準溶液を窒素乾固などで 濃縮したものをblankで溶解	5
希釈妥当性を評価しない	3
その他	9

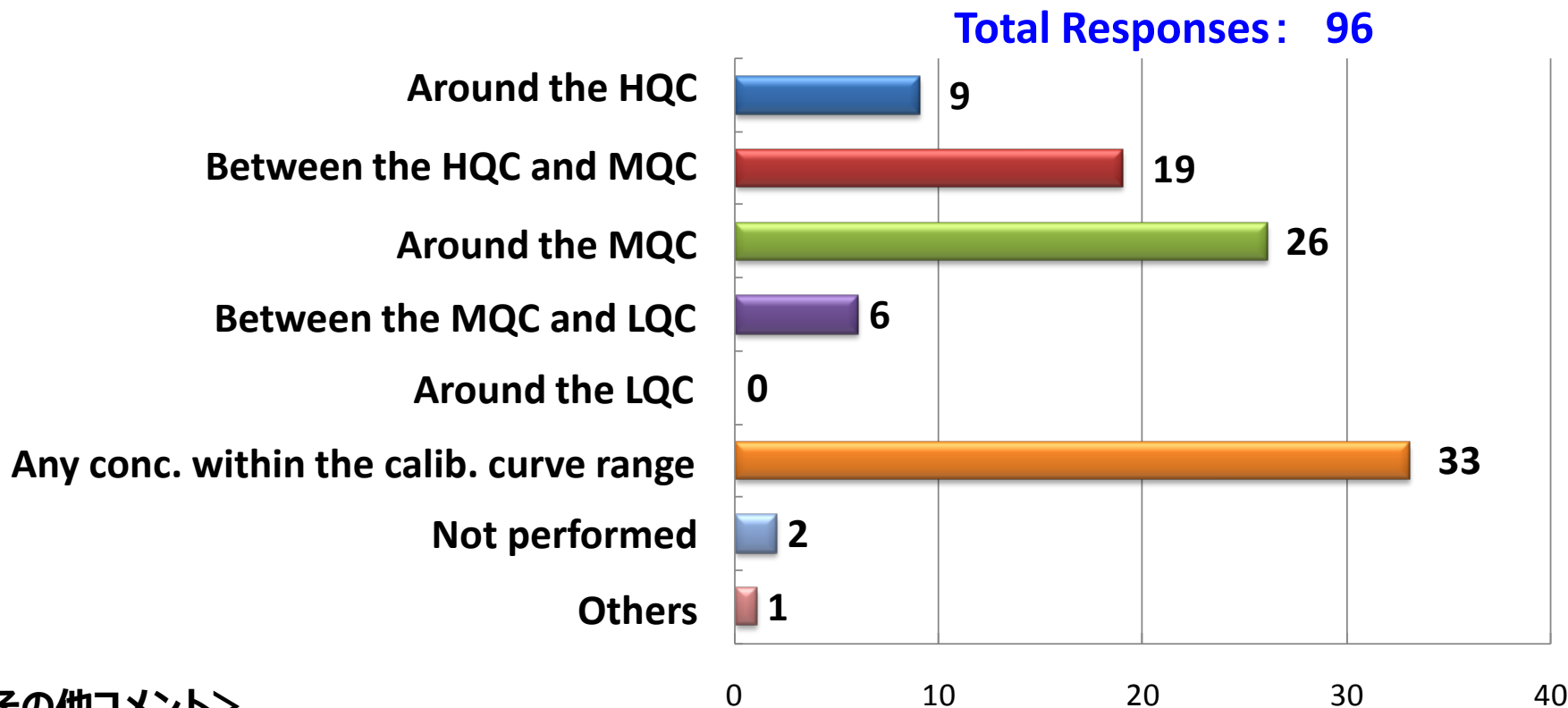


<その他コメント>

ケースバイケース、添加溶媒は可能な限り少量、
有機溶媒組成上限5%としこれ以下の有機溶媒は無視する

QC : 希釈妥当性試料の調製

①Q50. 希釈妥当性の評価における検量線外高濃度QC試料の希釈後の濃度設定について



<その他コメント>

測定のばらつきを考慮, LQC~HQCの範囲であれば気にしない
(測定のばらつきを含め希釈試料が検量線外にならぬよう設定)

QC：希釈妥当性試料の調製

①Q51. Q49, Q50について、選択の理由、その他詳細などコメント

《希釈QC調製時の溶媒濃度について》

通常のQC試料では、WSの添加量をマトリックスの10%程度にしていますが、希釈試料（安定性も）ではなるべく有機溶媒の比率を低くしています。

《標準溶液を窒素乾固などで濃縮後blankで溶解する手法について》

上限越えサンプルの制限濃度（ブランクマトリクスへの溶解性の限界）や必要希釈倍率によって制限がかかってしまう。（実施者）

標準溶液を窒素乾固してブランク血漿で溶解させるとき完全に溶解するか不安である。

「標準溶液を窒素乾固などで濃縮したものをブランクマトリックスで溶解して調製」はうまく行くのでしょうか？
かなりリスクが高いと思われます。

《希釈妥当性サンプルの希釈後の濃度設定について》

検量線の範囲内であればどの付近の濃度でも構わない

高い希釈倍率を経験していないので、このような結果になっていると考えています。

2段階希釈について、それぞれを評価することがあるため。

中濃度～高濃度QC試料濃度付近で評価

希釈試料を10倍以内で測定するルールになっているため

特に決まりはない。

低濃度～中濃度QC試料濃度付近で評価

数段階の希釈レベルを評価するため

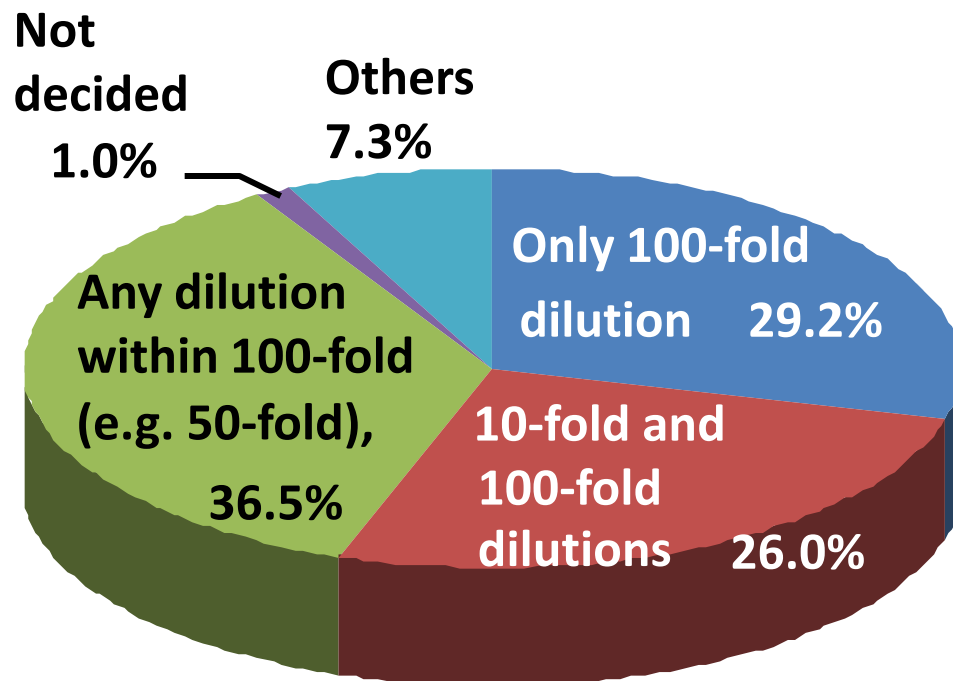
重み付き検量線の重心付近より少し上

QC：希釈操作の許容基準

①Q52. バリデーションにおいて希釈妥当性を、10 μ L + 90 μ Lで2段階、100倍希釈のみ確認した場合、実測定で許容する希釈操作について

Total Responses: 96

回答	カウント (件)
100倍希釈のみ	28
10倍及び100倍希釈両方	25
100倍希釈以内 (例, 50倍希釈など)	35
希釈倍率はこだわらない	1*
その他	7



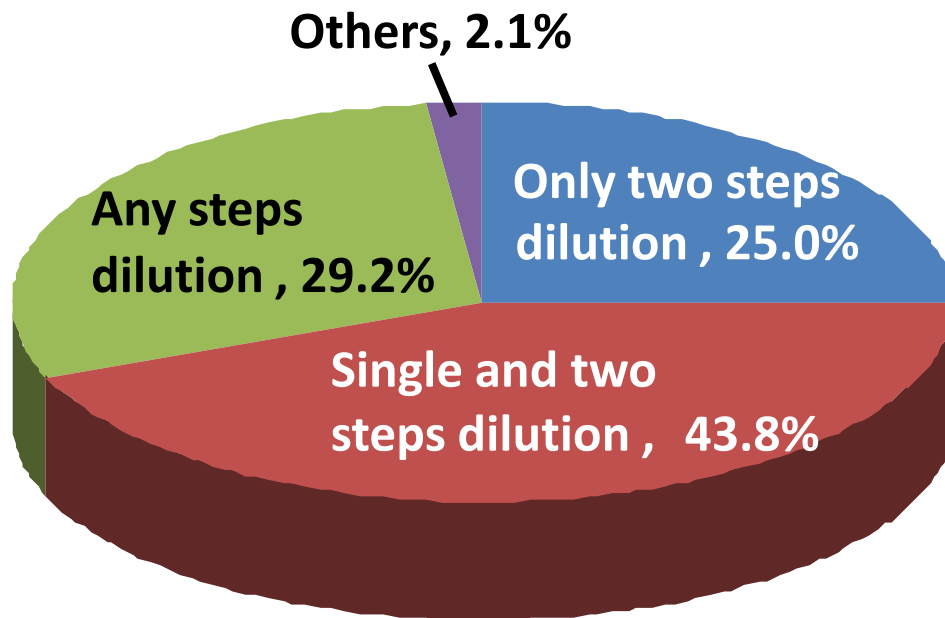
* , Q49にて希釈妥当性を評価しないと回答された方

QC：希釈操作の許容基準

①Q53. Q52の前提において、 実測定で許容する希釈の段階数について

Total Responses: 96

回答	カウント (件)
2段階のみ	24
1段階及び2段階の両方	42
段階数はこだわらない	28
その他	2

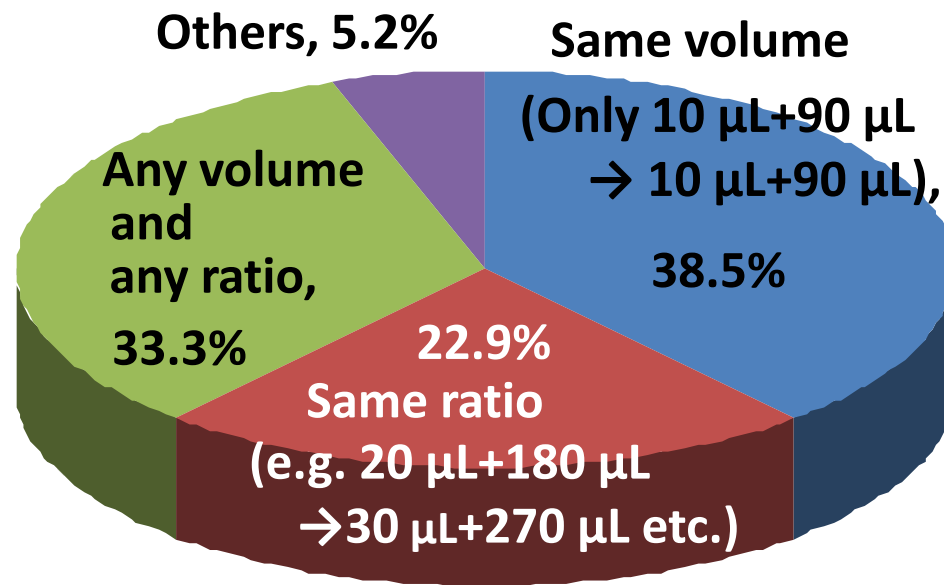


QC：希釈操作の許容基準

①Q54. Q52の前提において、 実測定で許容する調製用量について

Total Responses: 96

回答	カウント (件)
同じ容量のみ (10 μ L+90 μ Lのみ)	37
容量比が同じであれば許容 (20 μ L+180 μ L \rightarrow 30+270 μ Lなど)	22
調製容量はこだわらない	32
その他	5



QC：希釈操作の許容基準

Q52～Q54について、その他としていただいた 選択の理由やコメント

《希釈倍率について》

2段階希釈および10 μ L以上の採取量による100倍希釈のみ許容する
(試料5 μ Lとブランク495 μ Lによる100倍希釈は許容しない)

委託者により様々。上記3つすべてのパターンで経験あり。

希釈直線性が認められないケースは、濃度との関連があることが多いので、
倍率ベースで考えるのではなく、濃度と希釈手順 (= 倍率) の関係のある程度標準化します。

希釈に使用するマトリクス量を10mLとする縛りを入れ、100倍希釈以内を許容します。

「100倍希釈以内であれば許容する」が、希釈の元となる検量線外の高濃度QC試料の濃度を超えないものとする。
FDAは必ずこの点を突いてきます。

《希釈時の調製容量について》

用量比許容ですが、試料の採取容量はバリデーションで確認した容量以上 (5 μ L採取は許容しない)

基本的にバリデーションと同じ容量で実施しますが、それ以上の容量で実施することも許容と考えます。

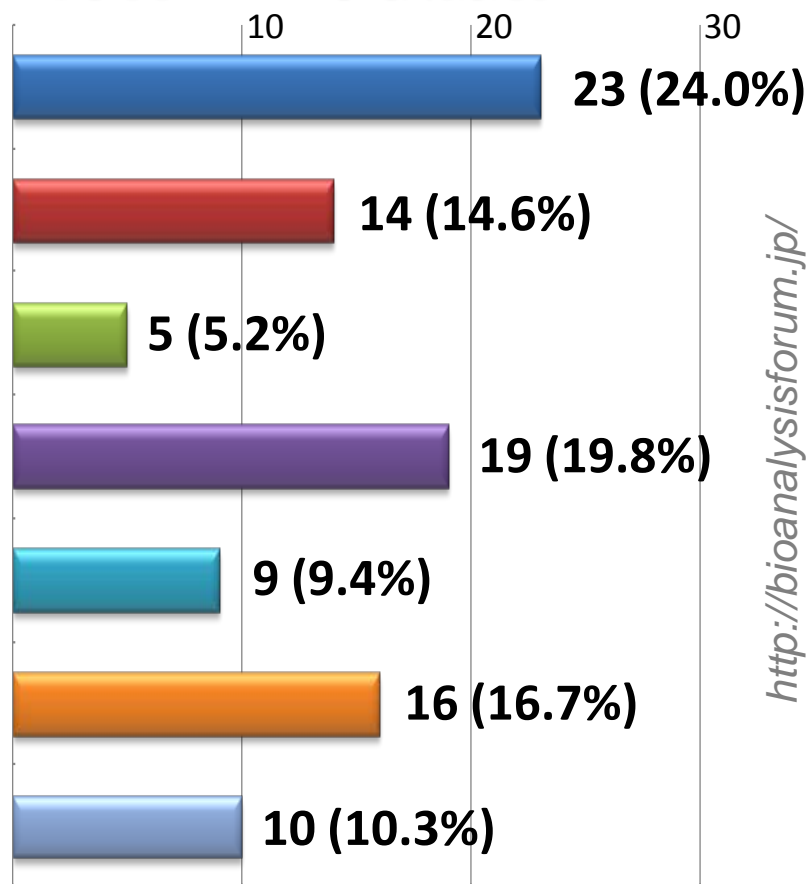
容量比が同じであればOKとしますが、ダウンスケールは許容しません。

10+10で2倍希釈、10+40で5倍希釈を許容します。

QC : 希釈操作の許容基準

Q52~Q54 回答結果からみる実測定で許容する希釈操作

- ① 100-fold dilution, 2 steps, same volume
(Same procedure as the validation)
- ② 10- and 100-fold dilution, 2 steps, same volume
(Same procedure as the validation)
- ③ 100-fold dilution, 2 steps, same ratio
- ④ 10- and 100-fold dilution, 2 steps, same ratio
- ⑤ Any dilution within 100- fold, 1 and 2 steps,
any volume and ratio
- ⑥ Any dilution within 100- fold, any steps,
volume and ratio
- ⑦ Others



<http://bioanalysisforum.jp/>

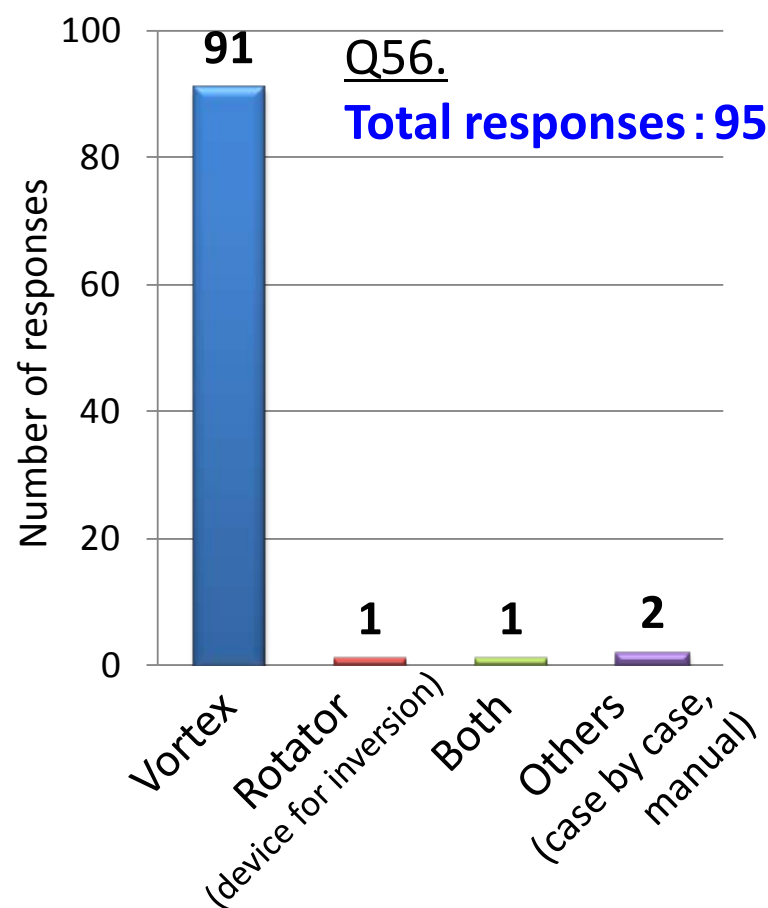
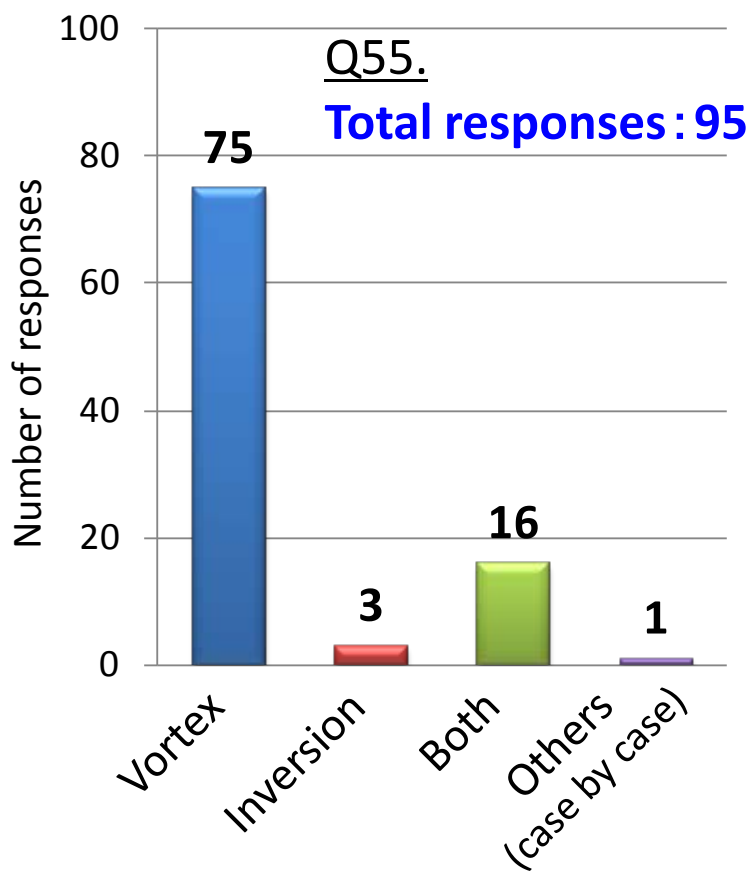
バリデーション時の操作方法を基に希釈する方(①~④,約65%)が多い。
10倍希釈を認めるか, 調製用量をバリデーション時と同じにするか
で意見が分かれている

Total Responses : 96

QC : QC試料調製時の攪拌

①Q55. QC試料調製時の攪拌方法についての第一選択

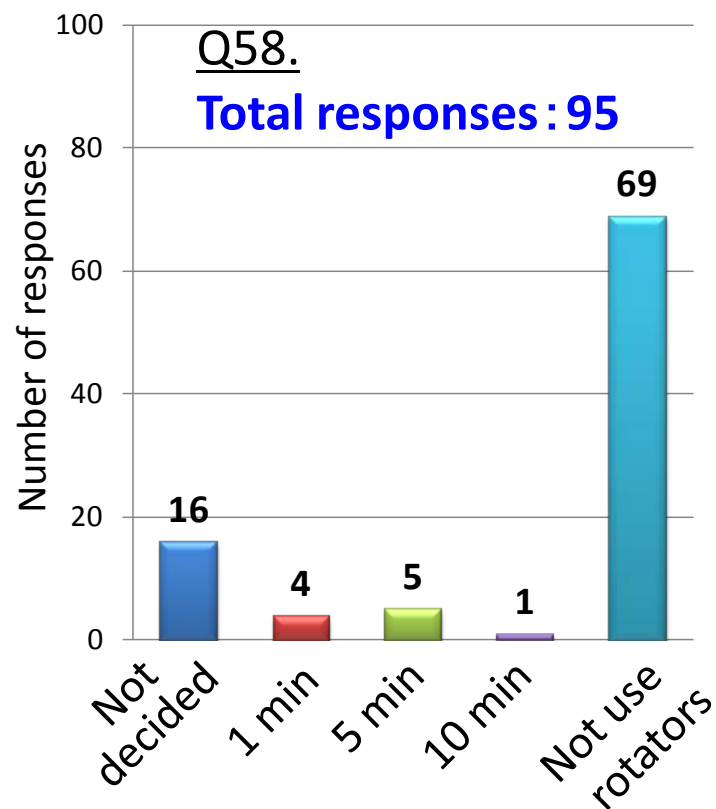
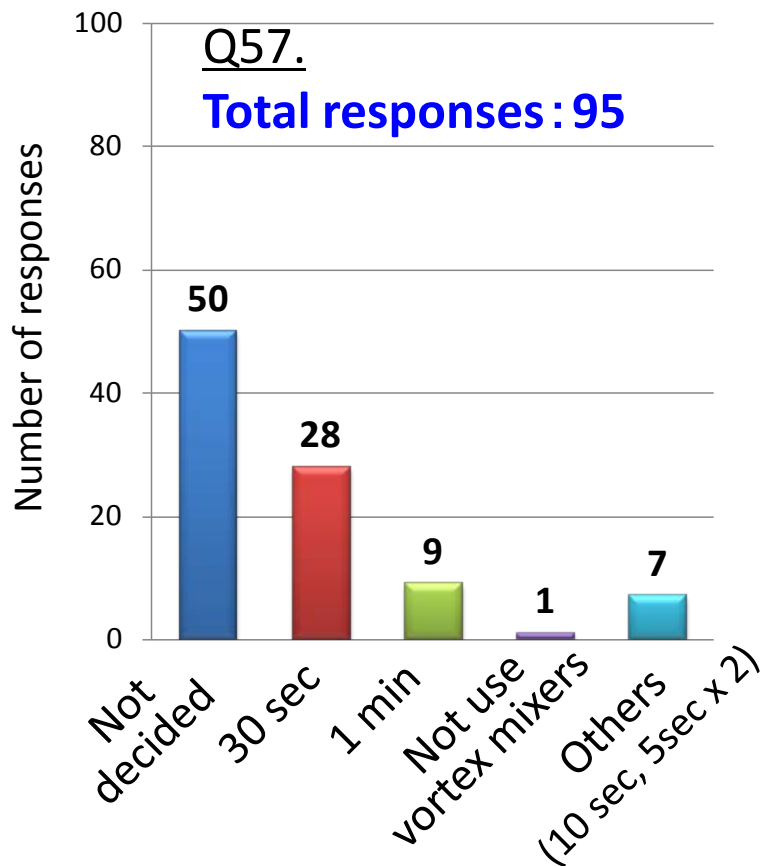
①Q56. QC試料調製時の攪拌に用いる機器についての第一選択



QC : QC試料調製時の攪拌

①Q57. QC試料調製時のVortexによる攪拌時間の第一選択

①Q58. QC試料調製時のRotatorによる攪拌時間の第一選択

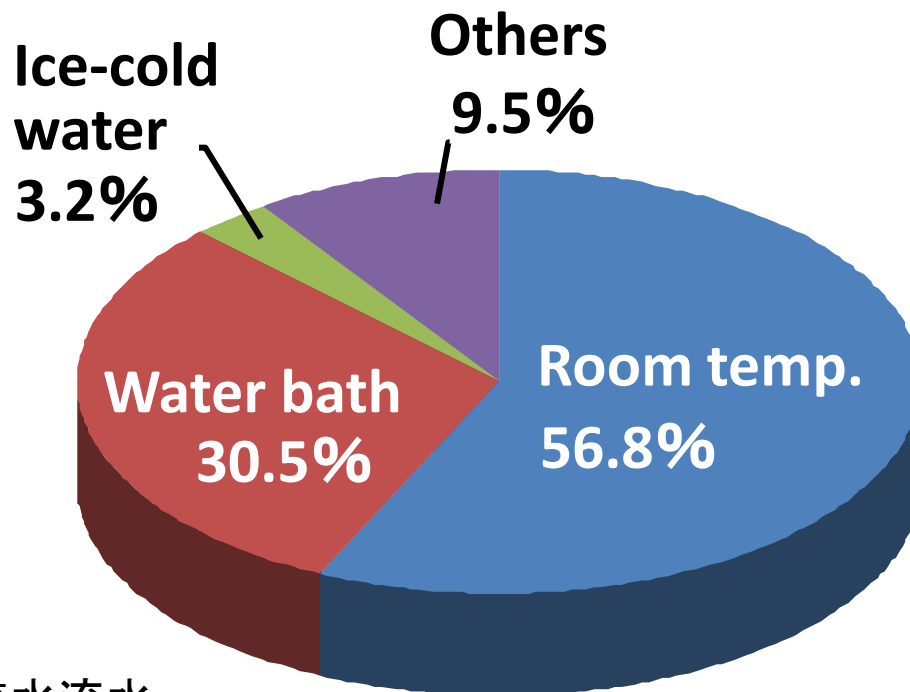


QC : 凍結QC試料の融解

①Q59. QC試料の融解時の温度についての第一選択

Total Responses: 95

回答	カウント (件)
室温	54
水浴	29
氷水下	3
その他	9



<その他コメント>

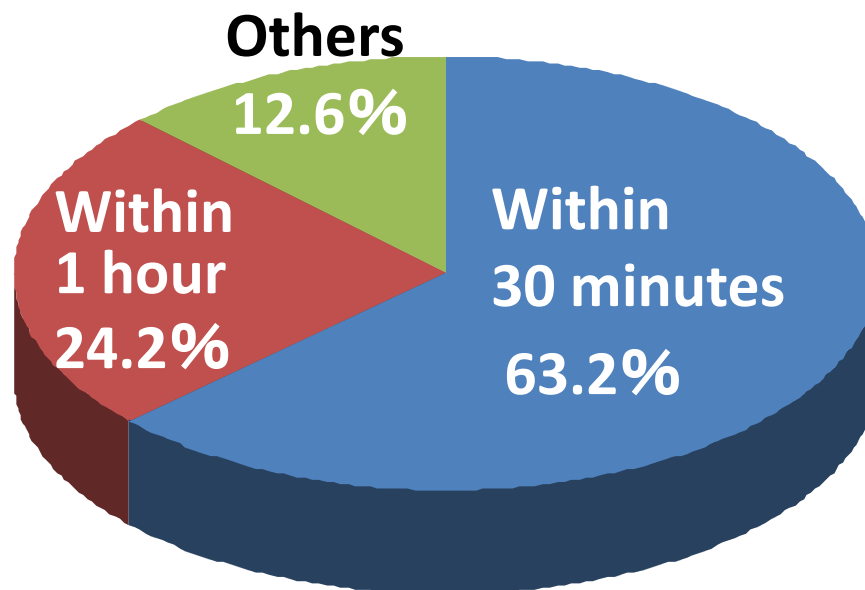
化合物にあわせて判断する, 水道水流水,
ケースバイケース, 安定性による,
分析者の好み, 微温湯浴

QC : 凍結QC試料の融解

①Q60. QC試料の融解時間についての第一選択

Total Responses: 95

回答	カウント (件)
30分以内	60
1時間以内	23
その他	12



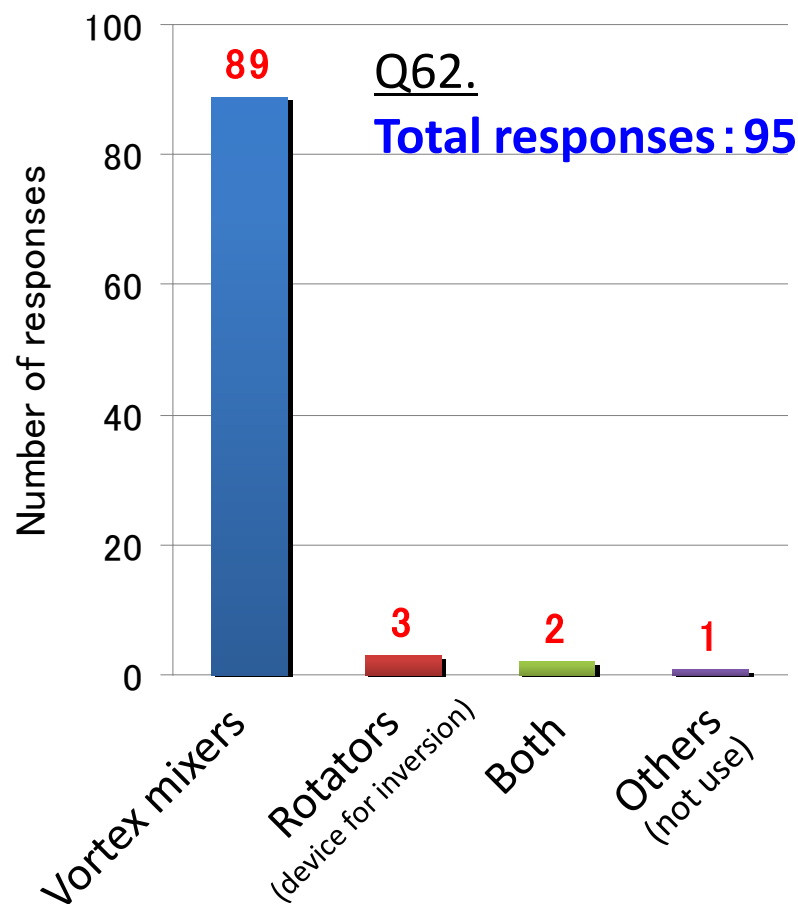
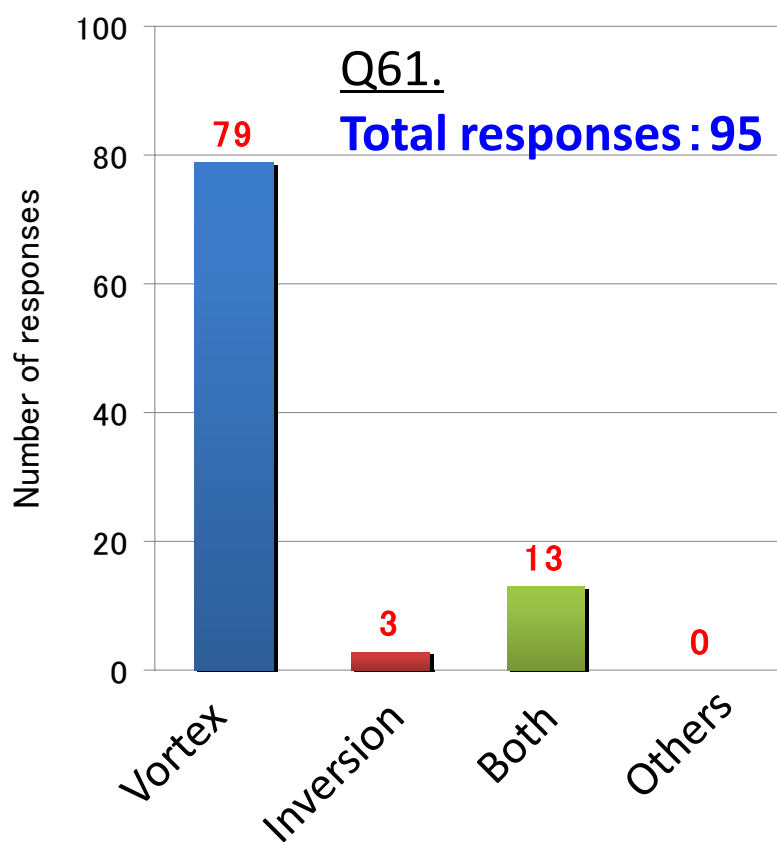
<その他コメント>

化合物にあわせて判断する,
目視で溶解を確認した時間,
安定性の時間内,完全に融解するまで,
小分け保存のため数分で融解し放置しない,
特になし,室温で不安定でない限り規定しない

QC : 融解後の攪拌

①Q61. QC試料融解後の攪拌方法についての第一選択

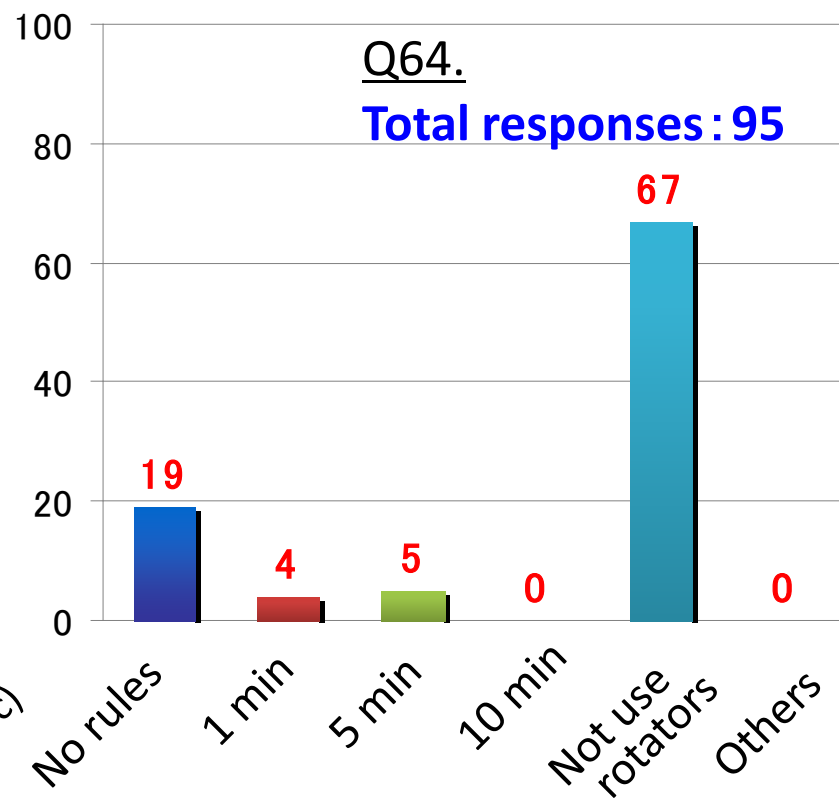
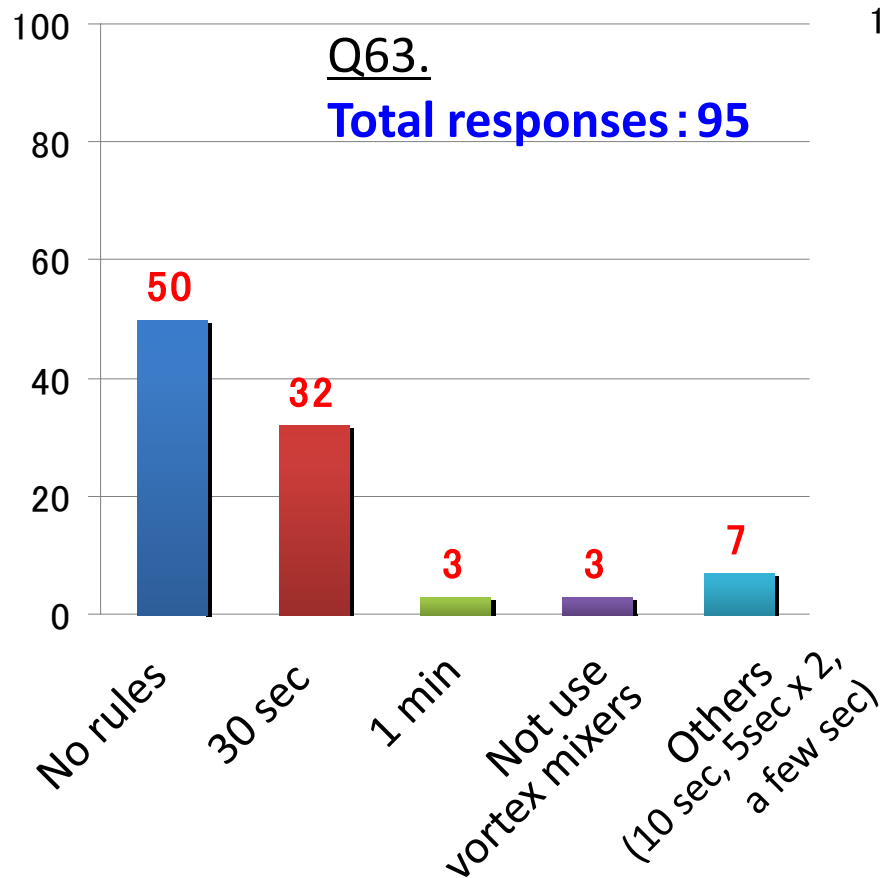
①Q62. QC試料融解後の攪拌に用いる機器についての第一選択



QC : 融解後の攪拌

①Q63. QC試料融解後の Vortexによる攪拌時間の第一選択

①Q64. QC試料融解後のRotatorによる攪拌時間の第一選択

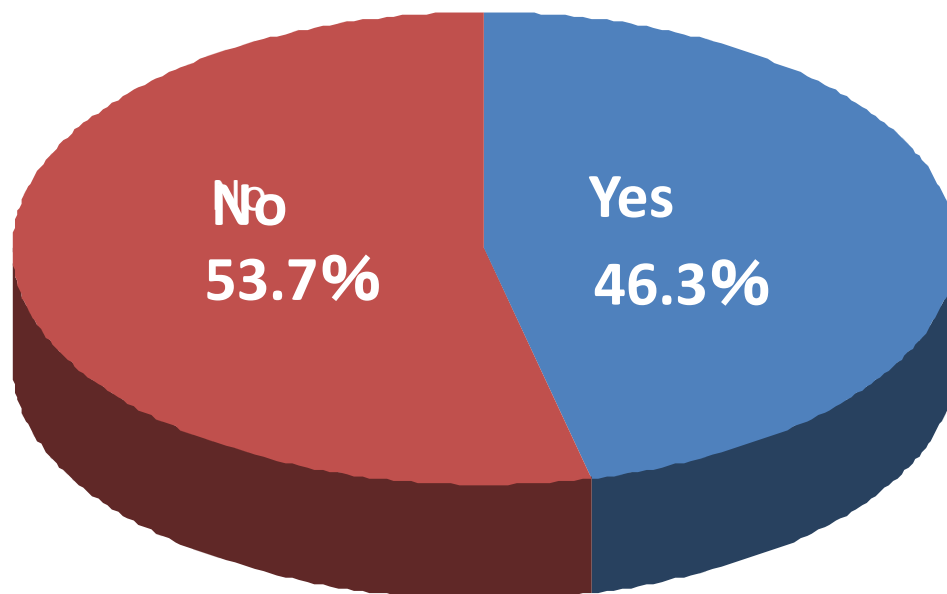


QC：融解後の遠心操作

①Q65. 融解したQC試料の攪拌後の遠心操作について、お答えください。

Total Responses: 95

回答	カウント (件)
実施する	44
実施しない	51



QC : その他、QC試料の取扱い

①Q66. QC試料の取り扱いについて、その他気をつけていることなどあれば記入ください。

Total Responses: 8

撈拌について(3件)

調製後の十分な撈拌、融解後の十分な撈拌。

ローターは使用していませんが、「逆さボルテックス」や「手で転倒混和」することは必ず実施しています。

撈拌の方法は、試料の容量にもよると思っています。

遠心について(3件)

65はごく軽く遠心し、脂質が分離しないように気をつける。特に脂溶性の高いものは、分離した脂質層に取り込まれる危険性が高い。

化合物によっては、融解撈拌後の遠心をしない場合もあります。化合物ごとによって異なります。融解後にフィブリン除去のために遠心分離することがあるが、その場合は遠心後に再度、ボルテックスをかける(溶液中の密度勾配が怖いので)。

その他(2件)

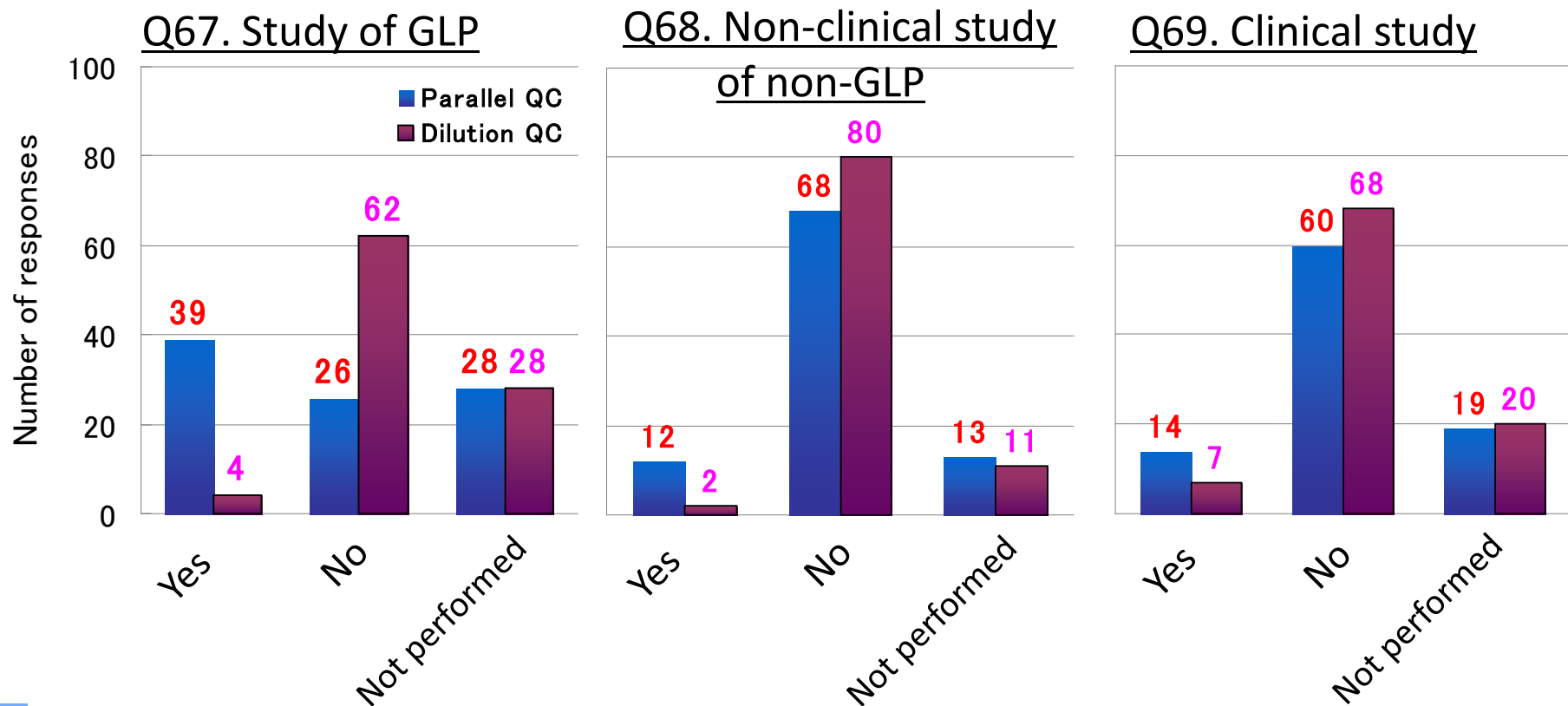
原則として、検体と同様の取り扱いをする。

血漿の場合フィブリンが出てくるので、ピペティングには注意する

QC : 並行保存QC ・ 希釈QC試料

①Q67～69. 並行保存QC試料あるいは希釈QC試料の調製の有無（複数回答あり）

Total Responses: 94



QC : 並行保存QC ・ 希釈QC試料

①Q67～69. 並行保存QC試料あるいは希釈QC試料の調製の有無（複数回答あり）

Total Responses: 94

Q67. Study of GLP

<その他コメント> 8件

- ・依頼があれば実施
- ・ケースバイケース
- ・必要があれば
- ・設定していることはあるが稀に実施
- ・希釈QCは原則設定していないが設定する場合もある
- ・以前は実施していた

Q68. Non-clinical study of non-GLP

<その他コメント> 3件

- ・必要があれば
- ・輸送がある場合バリデーションで担保していなければ並行保存QCを設定
- ・希釈QCを設定した経験あり

Q69. Clinical study

<その他コメント> 6件

- ・ケースバイケース
- ・必要があれば
- ・今後検討する予定
- ・設定しないことが標準だが設定した経験あり
- ・希釈QCは設定している場合としていない場合がある
- ・FIM(1施設のみの実施)の場合には並行保存QCを調製する場合あり

QC : 並行保存QC ・ 希釈QC試料

① Q70. Q67～Q69での設定の理由, その他詳細などコメント

並行保存QC試料 (Total Responses: 32)

GLPで求められているから(4件)

TKの場合、かつて当局の指導があったため実施
GLP解説に並行保存QCが記載されているから

実試料の安定性担保のため(23件)

実試料搬入前には、精度管理用QCとして保存しているので、それで保管期間中を保証している
温度ロガーの場合もあるが、このケースが一般的

輸送における異常事態及び保存安定性の担保を兼ねることが出来るため。

実試料の保存安定性と分析時の精度を保証するため。

想定外の事態に対応して、QCで安定性を担保するため。

安定性が事前に確認されていない場合に設定する。

保存条件逸脱時の安定性確認

検体の調製保存、輸送、測定までを保証するため

測定失敗、ISR逸脱など、保管条件逸脱などに対するため

要望されているため(3件)

顧客要望

日本では事実上、要求されていると考える

その他

臨床試験と違いサンプル量に限りがありバックアップサンプルが設定できないため、GLP試験なので、
ほとんど国内なので送付しやすい

バリデーションで保証済みのため、実施していません。

QC : 並行保存QC ・ 希釈QC試料

①Q70. Q67～Q69での設定の理由, その他詳細などコメント

希釈QC試料 (Total Responses: 13)

実試料の希釈操作の担保(1件)

希釈実試料の分析精度を保証するため。

海外の場合(2件)

化合物によっては設定しています。海外の場合, 設定のケースが多い
海外の測定施設(臨床サンプル)では設定していることが多い

原則不要(3件)

バリデーションで確認済みなら原則不要

その他

不慮の事故の時にサンプルを救うため
リージョンによるポリシーの相違
希釈のQCは、希釈再現性をバリデーションで評価していなかった場合のみ実施
「希釈QC」の意味を知らない
必要があれば

QC : QC試料の取扱い

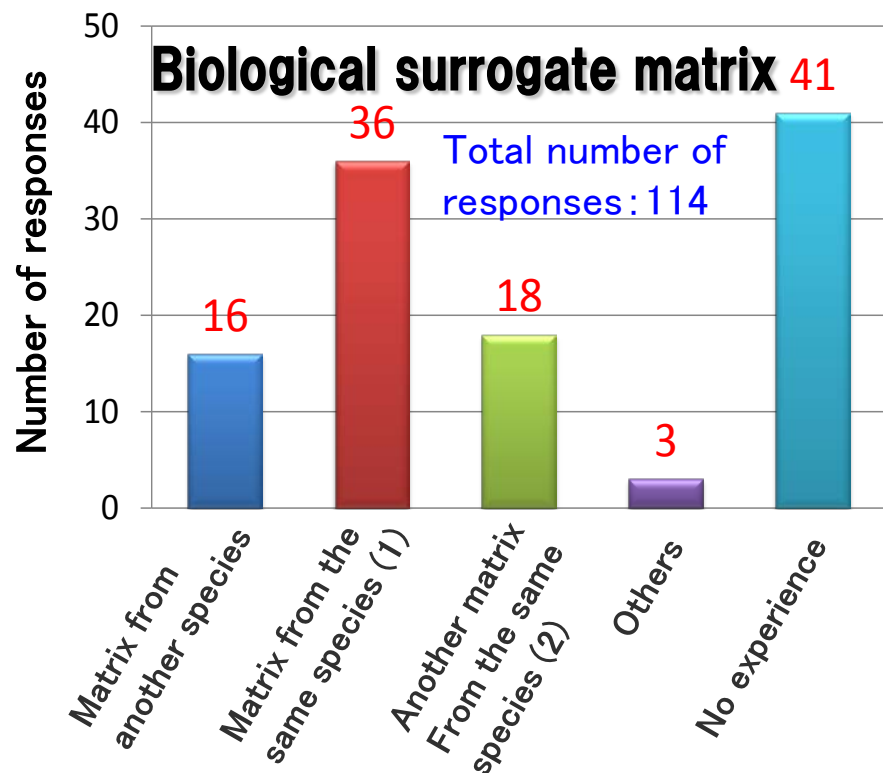
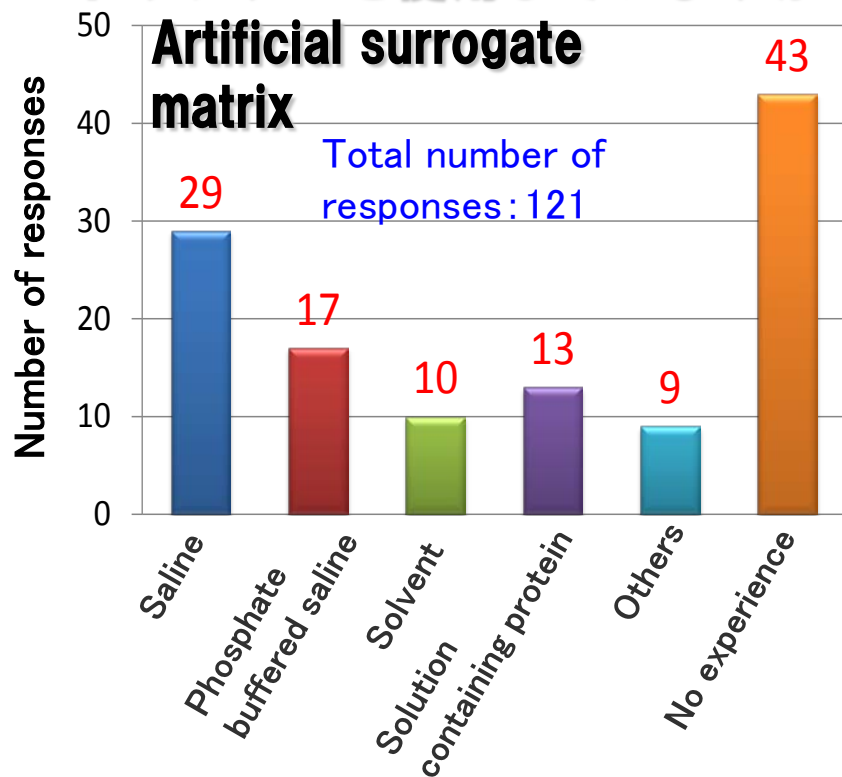
- QC試料の調製及び融解後の取扱いとしては、ボルテックスミキサーを用いての攪拌がほとんどである。
- 凍結QC試料の融解温度と融解時間について、室温で30分以内という回答が多かったが、室温で1時間以内という回答もあり、実試料の取り出しから使用までの取扱いを考慮していると考えられる。
- 凍結QC試料の融解後の遠心操作の有無はほぼ半分に分かれたが、遠心の影響を経験されている方もいる。
- 並行保存QC試料の設定理由としては、ほとんどが実試料の安定性担保のためであるが、輸送時、保存時、想定外の事態など、さまざまな場面を想定している。
- 希釈QC試料はどんな試験でもあまり設定されていない。

マトリックス

竹上 和弘（株式会社東レリサーチセンター）
鈴木 香織（小野薬品工業株式会社）

代替マトリックス

②Q21. ②Q25. 入手が困難な生体マトリックスの代わりに、「人工的に調製できるマトリックス」や「他の生体マトリックス」を「代替マトリックス」として使用することがあるかと思えます。このようなケースで、どのような代替マトリックスを使用していますか？



(1) e.g. Use normal animal instead of the disease-model animal

(2) e.g. Use liver instead of kidney

代替マトリックス

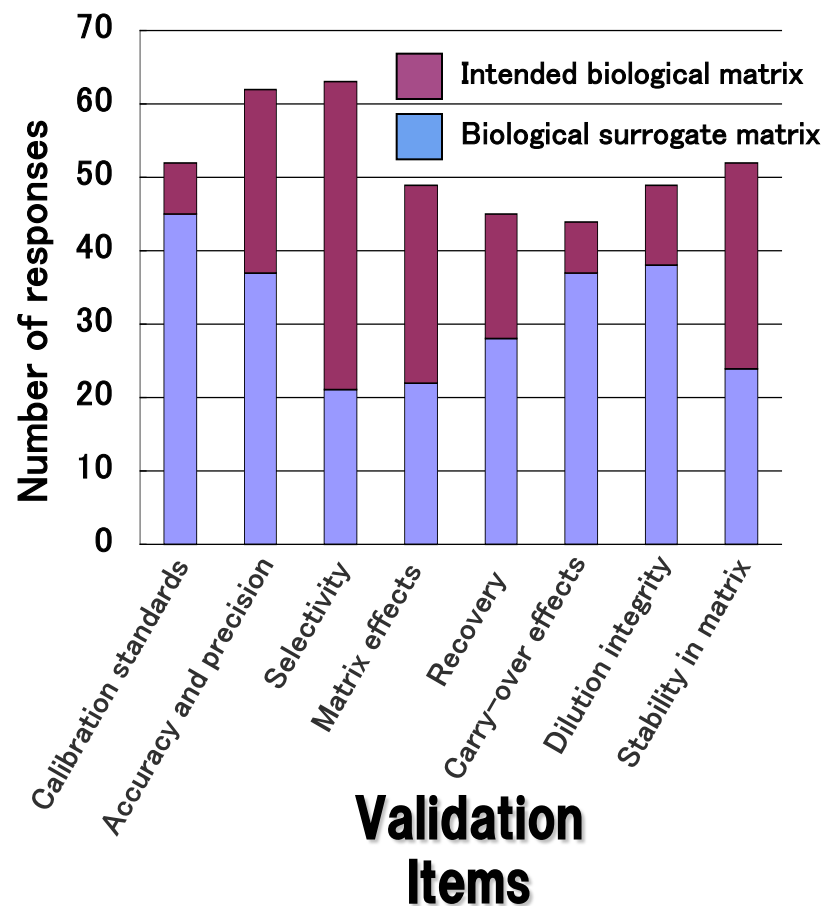
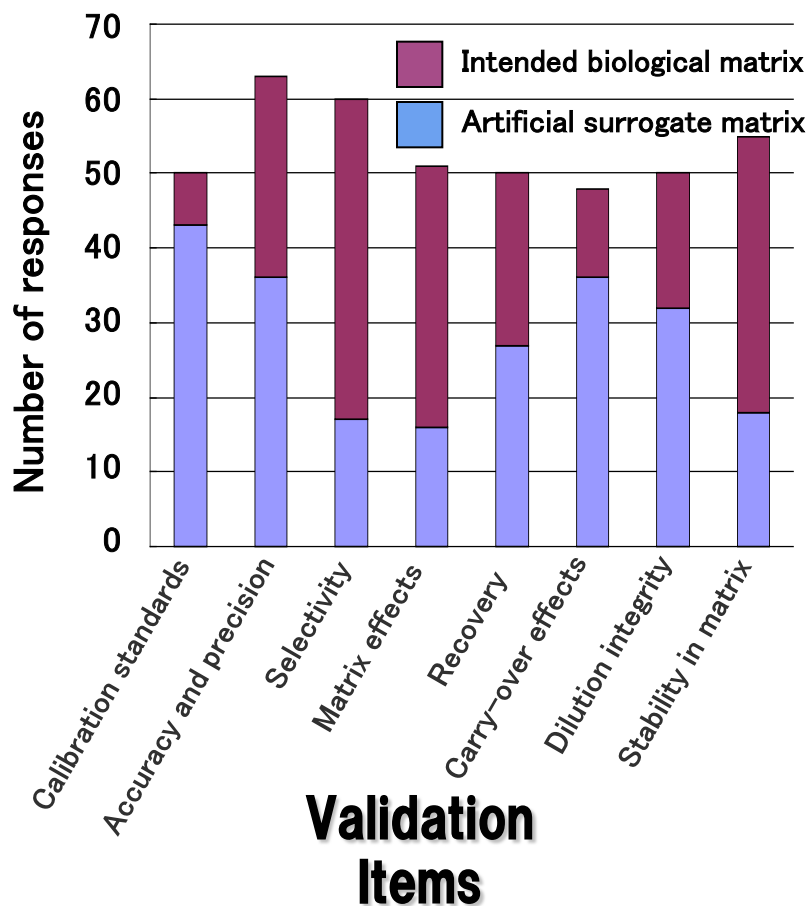
②Q22. ②Q26. どのような生体マトリックスの代わりに、どのような代替マトリックスを使用していますか？

生体マトリックス	代替マトリックス (人工的なマトリックス)
CSF (回答8件)	生理食塩水 リン酸緩衝液 人工CSF
血漿 (回答4件)	水 生理食塩水 リン酸緩衝液 BSA添加リン酸緩衝生理食塩水 血漿/水(1:1)混合液
涙液 (回答2件)	人工涙液 リン酸緩衝生理食塩水
組織ホモジネート (回答1件)	ホモジネート調製媒体 (生理食塩水など)
肺胞洗浄液 (回答1件)	BALF
その他 (回答1件)	タンパク量を生体マトリックスに 合わせて調製した溶液

本来の生体マトリックス	代替マトリックス (他の生体マトリックス)
モデル動物のマトリックス (回答11件)	ノーマル動物のマトリックス, 系統違いの同種のマトリックス
肝臓以外の臓器ホモジネート (回答2件)	肝臓ホモジネート
ヒト肺胞洗浄液 (回答1件)	ウシ肺胞洗浄液
脳脊髄液, 組織, 腹水 (回答1件)	血清, 血漿
血漿 (回答1件)	別系統の血漿
Wisterラット血漿 (回答1件)	SDラット血漿
マウス (回答1件)	ラット
ヒトの母乳 (回答1件)	市販の牛乳
ヒトの腫瘍組織 (回答1件)	動物の腫瘍組織
眼組織など (回答1件)	血漿
解剖学的に分割した脳の一部 (回答1件)	脳全体
ヒト組織ホモジネート (回答1件)	ラット筋組織ホモジネート
ヒト筋肉 (回答1件)	トリ肉

バリデーションでの代替マトリックス

②Q23. ②Q27. 分析法バリデーションを実施する際、代替マトリックスと本来のマトリックスをどのように使い分けていますか？



人工的な代替マトリックス

②Q24. バリデーションにおいて「人工的な代替マトリックス」を使用する場合、代替マトリックス／本来のマトリックスの使い分けの方針や根拠は？

<バリデーションの基本方針に関する意見：10件>

代替マトリックスと本来のマトリックスで差がないことをいくつかのバリデーション項目で確認後、代替マトリックスを使用して評価を行う。

本来のマトリックスとレスポンスの変わらない代替マトリックスを作る。マトリックスの影響を受けにくい前処理や検出法を選ぶ。

分析の影響の直接作用する可能性がある項目は、本来のマトリックスを使う。

代替マトリックスを使用するの希釈妥当性を確認しておけば実サンプル希釈で代替マトリックスを使用することに問題はないと考えられる。

代替マトリックスを検量線としたときの本来のマトリックスの定量性と安定性を最低限確認できることを意識しています。

実試料測定で運用しようとする試験デザインに合わせてバリデーションを実施。

選択性、マトリックス効果、回収率、検量線はマトリックスでも1回だけ確認し、代替マトリックスと大きな差異がないことを確認する。

マトリックスの違いにより生じる差異が、大きく影響する可能性が低いもの

本来のものでないといけないもののみ。

代替マトリックス使用が測定試験での測定結果に影響のないことを示せるようにバリデーションを実施。

<バリデーション項目の優先順位に関する意見：4件>

選択性、マトリックス効果 or 回収率、真度及び精度の代表濃度で代替マトリックスと本来のマトリックスのブリッジ的な実験をする。

その他の項目については、本来のマトリックスの入手可能性を考慮し、決める。

本来のマトリックスでの検証の必要性が高い順に見ていくことになると思いますので、選択性、真度精度、安定性、マトリックス効果の順でランク付けをしたいと思います。

本来のマトリックスでは、優先順位で真度・精度>長期保存安定性>選択性が必要と個人的には思います。余裕があればマトリックス効果も見たい。

本来のマトリックスの使用可能性に依存しますが、第一優先は選択性と考えています。

<本来のマトリックスの使用可能性に関する意見：4件>

レアなマトリックスで、入手できない場合、または購入したブランクマトリックスが内因性あるいは外因性の測定対象物質をやむを得ず微量含んでいる場合など。

本来のマトリックスの入手可能性によりケースバイケース

どれほど貴重か(もしくは入手困難さ)で事情が変わってくるのではと思います。

入手が不可能なものである場合は代替マトリックスに頼らざるを得ない。また、あまり困難さを説明できないものであれば希釈媒体ぐらいでしか後々説明しにくいように考えます。

本来のマトリックスは入手困難であるため、主に代替マトリックスを使用している。

生体由来の代替マトリックス

②Q28. バリデーションにおいて「他の生体マトリックス」を「代替マトリックス」として使用する場合、代替マトリックス/本来のマトリックスの使い分けの方針や根拠は？

<バリデーションの基本方針に関する意見: 8件>

本来のマトリックスとレスポンスの変わらない代替マトリックスを選ぶ。マトリックスの影響を受けにくい前処理や検出法を選ぶ。分析の影響の直接作用する可能性がある項目は、本来のマトリックスを使う。

入手可能な限り本来のマトリックスを使用するが、測定に影響がないことが確認できた場合は、比較的大量に使用する試料を他の生体マトリックスで調製する。

基本的には疾患モデルや実患者のマトリックスと正常マトリックスに差がないことを実証するためのバリデーションというポリシー。入手できるだけ本来のマトリックスで評価、差が測定に影響することが疑わしい項目は両方で評価
本来のものでないといけないもののみ。

マトリックスの違いにより生じる差異が、大きく影響する可能性が低いもの。

代替マトリックスの測定への影響は本来のマトリックスと同等と判断。

<バリデーション項目の優先順位に関する意見: 1件>

本来のマトリックスでは、優先順位で真度・精度>長期保存安定性>選択性が必要と個人的には思います。余裕があればマトリックス効果も見たい。

<本来のマトリックスの使用可能量に関する意見: 4件>

本来のマトリックスが継続的に購入(入手)可能かどうかにより判断。

入手可能量に依存するが、できるだけ本来のマトリックスを用いて検討する。

どれほど貴重か(もしくは入手困難さ)で事情が変わってくるのではと思います。

入手が不可能なものである場合は代替マトリックスに頼らざるを得ない。

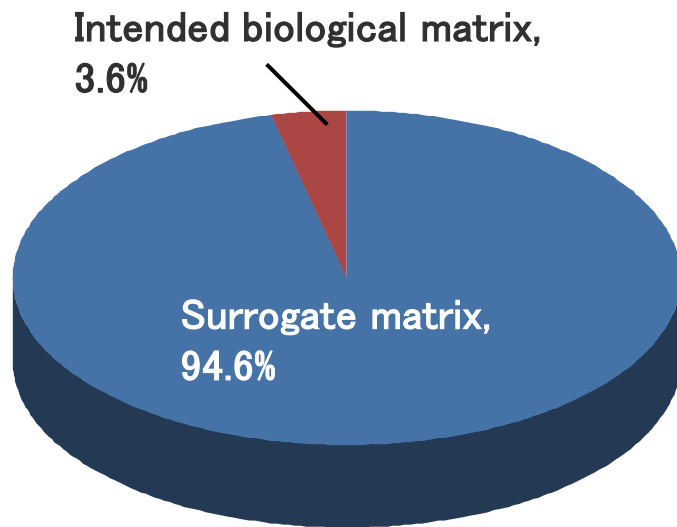
また、あまり困難さを説明できないものであれば希釈媒体ぐらいでしか後々説明しにくいように考えます。

本来のマトリックスは入手困難であるため、主に代替マトリックスを使用している。

実試料分析での代替マトリックス

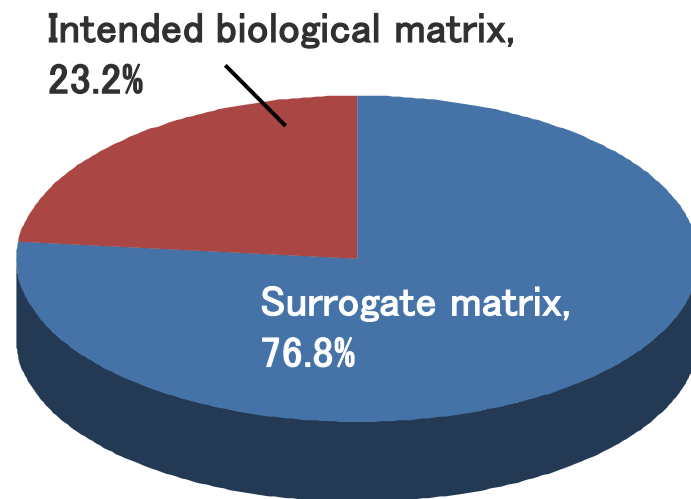
②Q29. バリデーションにおいて代替マトリックスを使用する分析法の妥当性が確認された場合、その後の実試料分析において、代替マトリックスと本来のマトリックスをどのように使い分けていますか？

Calibration Standards



Total number of voters: 55

QC Samples (for accuracy monitoring)



Total number of voters: 56

実試料分析での代替マトリックス

②Q30. 実試料分析について、代替マトリックス／本来のマトリックスの使い分けについての方針や根拠は？

<代替マトリックスのみ使用する意見：7件>

バリデーションにて代替マトリックス使用の妥当性が確認されたと判断し、以降は代替マトリックスを使用する。

バリデーションで代替マトリックスの使用妥当性が確認できれば、実試料測定では代替マトリックスのみでよいと思う。

代替マトリックスの検量線・QCによって本来のマトリックスが測定できることをバリデーションで確認したら、後はすべて代替マトリックスを用いる。

代替で問題ないと判断できれば、全て代替で行う。

フルバリで問題ないことを確認していれば、検量線もQCも希釈媒体もすべて代替マトリックス。

バリデーションでマトリックス間の差がないことを実証した上で実試料分析では代替マトリックスのみを使用。

バリデーション試験にて妥当性が確認されているため、実試料分析にて本来のマトリックス使用は不要と判断。

<本来のマトリックスも使用する意見：4件>

入手可能量に依存するが、QC試料は本来のマトリックスが望ましいと考える。

余裕があれば本来のマトリックスでQCを追加で作成。

選択性、マトリックス効果、回収率、検量線はマトリックスでも1回だけ確認し、代替マトリックスと大きな差異がないことを確認する。

可能な限り本来のマトリックスを使用する。

<本来のマトリックスの使用量に依存する意見：2件>

使用量を考慮し、本来のマトリックスを入手するために屠殺する動物数との兼ね合いで選択します。

本来のマトリックスは入手困難であるため、主に代替マトリックスを使用している。

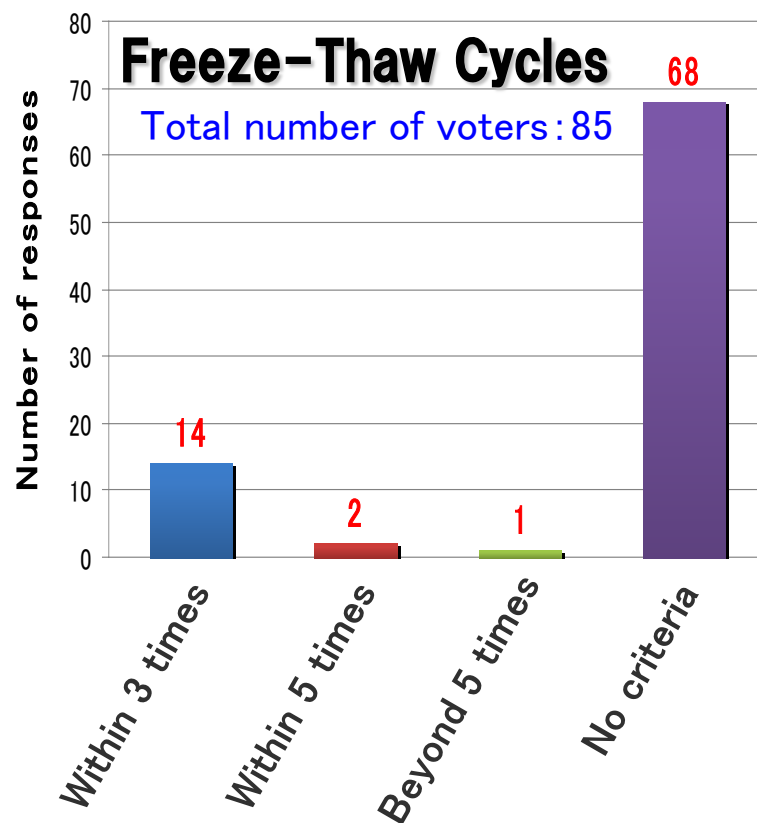
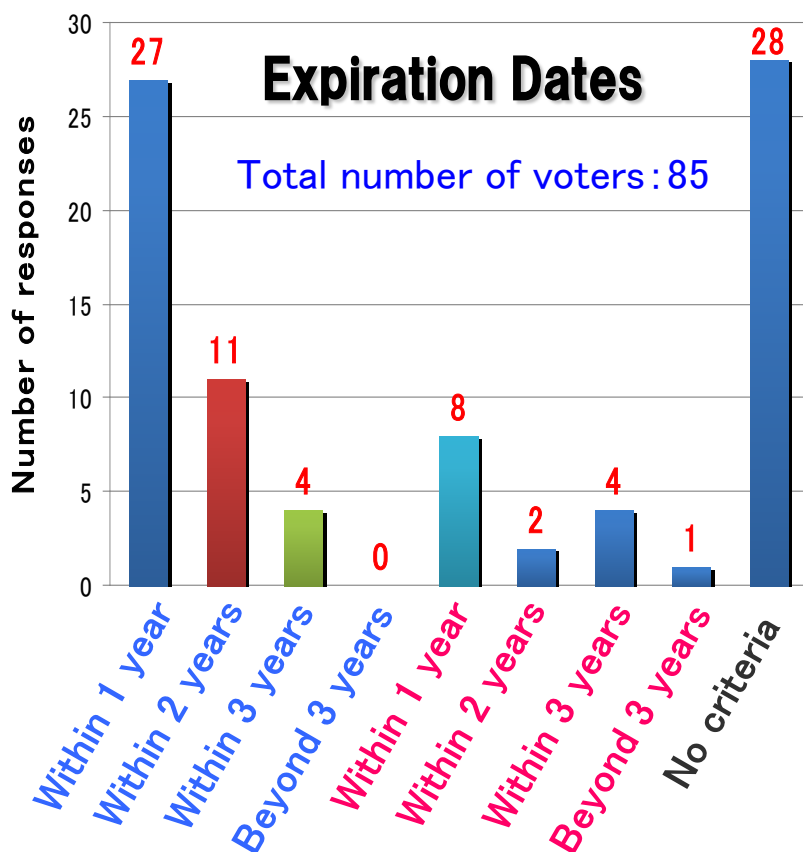
<その他の意見：2件>

バリデーション結果に依存して判断する。

基本的には内部標準物質をできる限り安定同位体ラベル化体にするようにして両者の乖離を減らすようしています。

ブランクマトリックスの管理

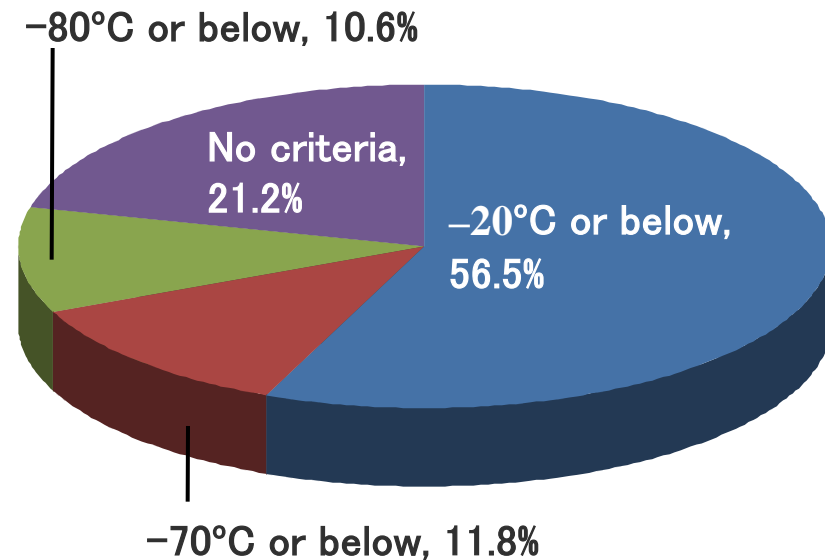
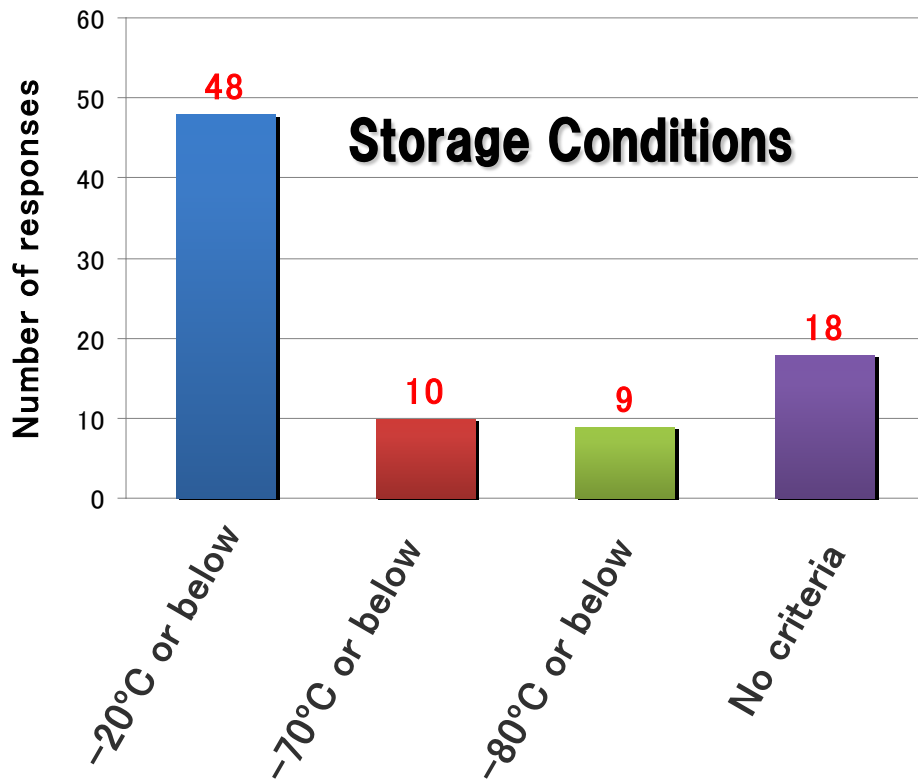
②Q31. ②Q32. ブランクマトリックスの管理について基準を設けていますか？
使用期限および凍結融解回数について、選択してください。



After the receipt After the collection

ブランクマトリックスの管理

②Q33. ブランクマトリックスの管理について基準を設けていますか？
保存温度について、最も近いものを選択ください。



Total number of voters : 85

ブランクマトリックスの管理

②Q34. 使用期限、凍結融解回数、保存温度以外に規定されている項目があればご回答ください。

<使用期限, 凍結融解回数, 保存温度に関連のある規定など: 4件>

小分けして使い切りにしている。

GLP調査で「使用期限が1年以内なら問題無い」と言われました。

入手後-80℃で保存し、使用したら-20℃へ移動し、検討用などで使用。

最初に融解した後、小分けにして凍結融解の回数を減らすようにしています。

<その他の規定など: 4件>

ヒト倫理規定に則り、目的終了後は速やかに廃棄する。

バイオハザード規定に則り、散逸の無いように取扱い、実験終了時に適切に廃棄する。

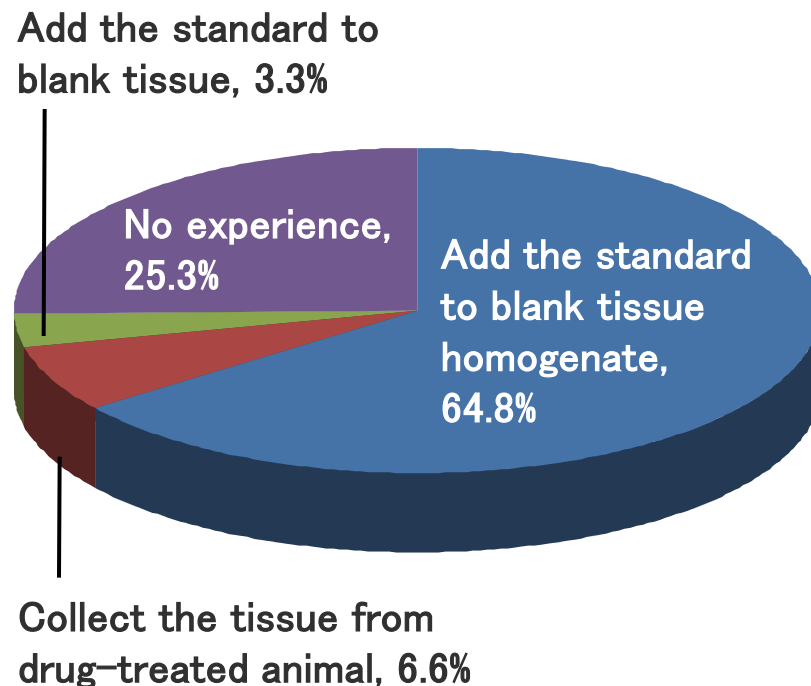
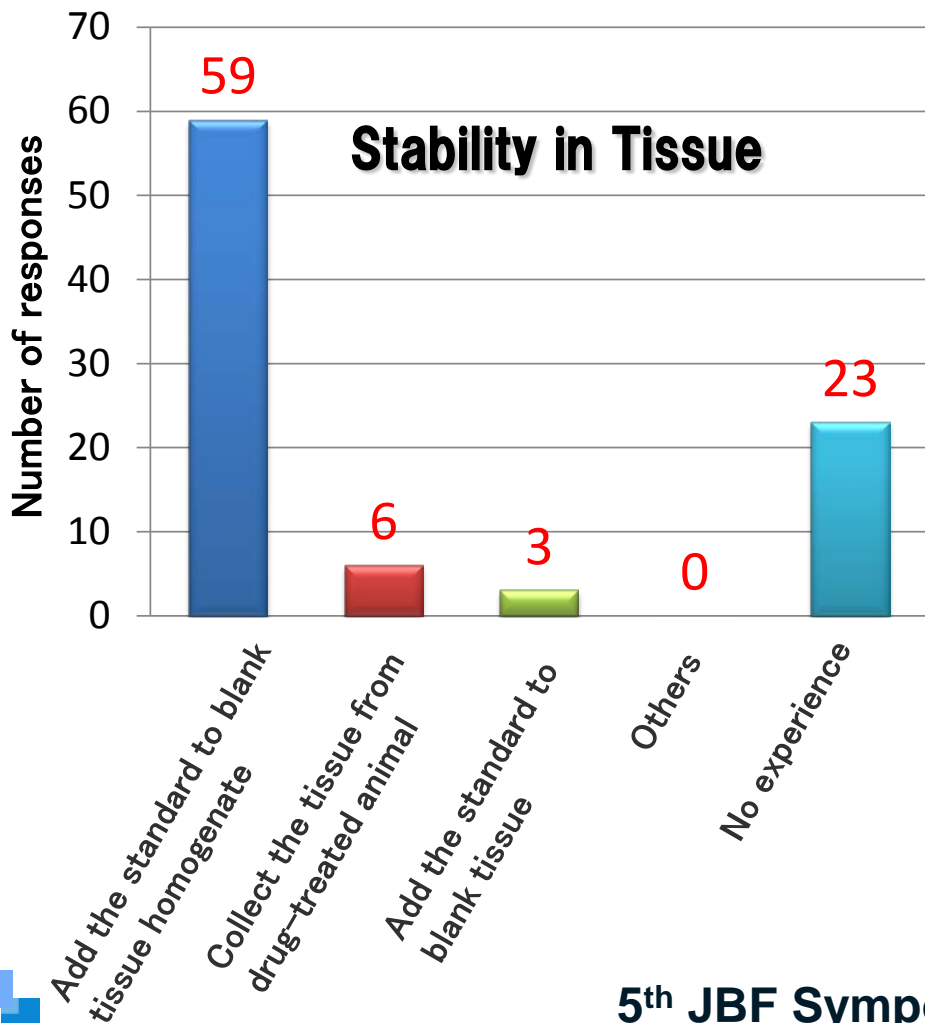
供給元の仕様に準じる。

融解時の遠心の有無と遠心条件を規定している。

雌雄の区別, プール/個体別の区別。

組織中薬物の安定性評価

②Q35. 組織中の薬物濃度を測定する試験において、安定性をどのように評価しますか？（複数回答可）



Total number of voters: 91

組織中薬物の安定性評価

②Q36. 「薬物を投与した個体から採取した組織片を使用して安定性を評価する」際の安定性評価の具体的な方法をご回答ください。

＜薬物を投与した動物の組織を使用した安定性評価：6件＞

動物試験の予備的検討などで組織片が入手可能な場合に実施します。
投与・剖検後すぐの組織片をそのまま、あるいはホモジネートして複数小分け保存し、そのうちの1部をすぐに測定、安定性を確認したい期間の1/2程度で測定、安定性を確認したい期間で測定（都合3時点測定）などします。

均一組織の場合、投与後の一部の組織の組織内濃度を基準として、一定保管後の組織内濃度を再測定する。

特別に懸念がある場合のみですが、採取後できる限り速やかに測定したときと、一定期間経過後に測定した時で、継時的減少傾向が見られないかを確認します。

一定期間保存した後に再度測定し、再現性を確認する。

初期測定から数日後再測定を実施。その後乖離値を評価。

採取後に実試料を測定し、組織片として一定期間保存した後に再度測定して変化のないことを確認する。
メインにはホモジネートで安定性を評価し、実試料は参考としている。
(ホモジネートでの評価の妥当性確認。全ての濃度範囲の試料を得られない場合もあるため)

組織中薬物の安定性評価

②Q37. 「空白組織に標準物質（または標準溶液）を添加して安定性を評価する」際に、組織に薬剤を添加する具体的な方法をご回答ください。

<組織に薬物を添加する方法:4件>

混ぜたり、インキュベートしたり。

空白組織に直接標準溶液を塗布した状態で保存し、測定時にホモジネートする。

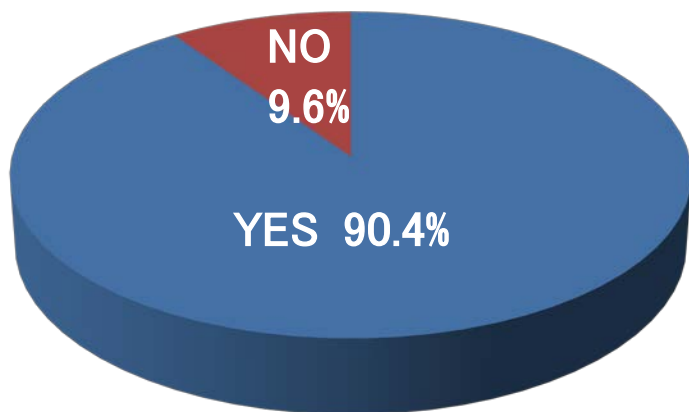
ミンスした組織に標準溶液を添加して、再度ホモジナイズする。

添加する標準溶液が10%以下になるように高濃度の溶液を調製し、低濃度と高濃度のQC試料を調製する。

組織中薬物の安定性評価

②Q38. 「組織サンプルを採取後に速やかに破碎し、ホモジネート液にして保存するのであれば、組織中の安定性を評価する必要はない（ホモジネート液中の安定性のみを評価すればよい）」との考え方を許容できますか？

If the tissue homogenate is prepared after the sampling immediately, can we omit the stability test in the (intact) tissue?



Total number of voters : 83

<NO(許容できない)を選択した理由: 8件>

ホモジネート液にしても必ずしも安定である保証がないため。

ケースバイケースです。非臨床試験ではすみやかに破碎が可能ですので、「許容」、臨床サンプルの場合(爪や毛髪など)は「許容できない」。

通常の薬物動態試験の目的(マクロな動態の把握)からすると未変化体測定であれば基本的に許容できると考えますが、特別に不安定な代謝物が分析対象である場合にはあてはまらないと考えるので、選択肢は「許容できない」としました。

安定性は確認する必要がある。

高レベルで時間を要する組織分画操作を要する場合は、採取後速やかに対応することが困難なケースがあるため、採取後数日間保管していた組織をホモジネートする場合も一ケースとして許容する必要があると考えます。

ホモジネート液中での安定性を確認する必要があるため。

ホモジネートすることにより、化合物を分解する酵素が溶出し、不安定になることがあるから。

組織中での安定性はプレバリデーションなどの段階で構わないので、データを取得しておくことが望ましいと考えます。例えば、薬物投与後の組織サンプルを、半量に分割し、採取直後及び6~24時間時間程度経過して破碎しホモジネートしたものの濃度を比較し、組織中での安定性に問題がないデータを事前に取得すればよいのではないかと考えました。

Discussion : 代替マトリックスの使用

バリデーション :

- **検量線**は代替マトリックス, **再現性QC**は本来のマトリックスを使用し, 両者間の**測定値の整合性を確保**すべきである.
- **選択性**, **回収率**は本来のマトリックスを使用することが望ましい.
- **希釈の妥当性**の希釈操作に代替マトリックスを使用すれば, 実測試験での希釈に代替マトリックスを適用できると考えられる.
- **保存安定性**は本来のマトリックスを使用することが望ましいが, 困難な場合は代替マトリックスで実施するか, 投与サンプルで安定性を評価する等の対応を検討するべきである.

実測試験 :

- バリデーションで両者間の**測定値の整合性が確保**されていれば, **検量線**, **精度管理QC**, **試料の希釈に用いるマトリックス**として**代替マトリックスを使用してよい**と考えられる.
- **並行保存QC**をいずれのマトリックスで調製すべきか, バリデーションにおける保存安定性の評価方法, および, 本来のマトリックスの使用可能量に応じて検討するべきである.