

*DG2018-35*

**Accuracy & Precision  
Criteria を考える(2)**



# DG2018-35 メンバー



- **石井 琢帆(サンプラネット)**  
Takuho Ishii
- **植田 あゆみ(新日本科学)**  
Ayumi Ueda
- **加藤 尚志(バイオタージ)**  
Hisashi Kato
- **中井 直子(第一三共)**  
Naoko Nakai
- **保坂 信哉(科研製薬)**  
Shinya Hosaka
- **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
- **丹羽 誠(日本化薬)**  
Makoto Niwa

# DG2018-35の取り組みについて

## 【DG2018-35 目的】



生体試料中薬物濃度分析法の  
真度及び精度の基準の設定方法において

測定対象の標品がない場合においても

より合理的な判断を実施するため、

統計学的観点より「不確かさ」を指標に、

既存の概念（真度および精度）にとどまらないアプローチを含めて  
代謝物定量の戦略を構築し、提案する。

### 【不確かさ】

正確に知ることのできない「真の値」を基準とした「誤差」を用いずに  
統計処理や実際の測定値を利用し

「真の値が存在する可能性の高い範囲」を推測した値の事。

# DG2018-35の取り組みについて

## 【背景】

- 生体試料中薬物濃度分析法のバリデーション<sup>[a-c]</sup>において一般に精度15%以内（LLOQにおいて20%以内）、真度85%から115%（LLOQにおいて80%から120%）という基準（クロマトグラフィー法の場合）が設けられているが、その設定根拠まではガイドライン・ガイダンス等に明示されていない。
- 本邦のガイドライン<sup>[a]</sup>では、特別な分析方法を用いる場合や得られた濃度情報の使用目的によっては、科学的な判断に基づき、あらかじめ妥当な判断基準を設定する等、柔軟な対応を考慮することが必要であるとされているが、判断基準の設定方法についてはコンセンサスには至っていない。
- JBF-DGとして、真度及び精度の基準の設定方法について  
2017年度（9<sup>th</sup> JBF）は、標品がある場合の濃度測定を想定して考察し  
2018年度は、標品が無い場合を想定し、引き続きDGのテーマとして設定した。

[a] 厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知:「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」について、平成25年7月11日 薬食審査発0711第1号

[b] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001.

[c] Guideline on bioanalytical method validation. 21 July 2011, EMEA / CHMP / EWP /192217 /2009 Rev. 1 Corr. 2 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).

## 目的に応じた適切な分析方法

確認 & 議論 するにあたり...

## EBF white paper [1] **in vitro**試験 [2]

詳細な読み込みを実施

7th JBF  
(DG2015-16)

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

8th JBF  
(DG2016-20)

結果をもとにDGメンバーで考察

代謝物の**定量精度**がどの程度であれば  
**10%ルール**の判断可能か？  
(MIST/ICH-M3対象となるか否か)

9th JBF  
(DG2017-28)

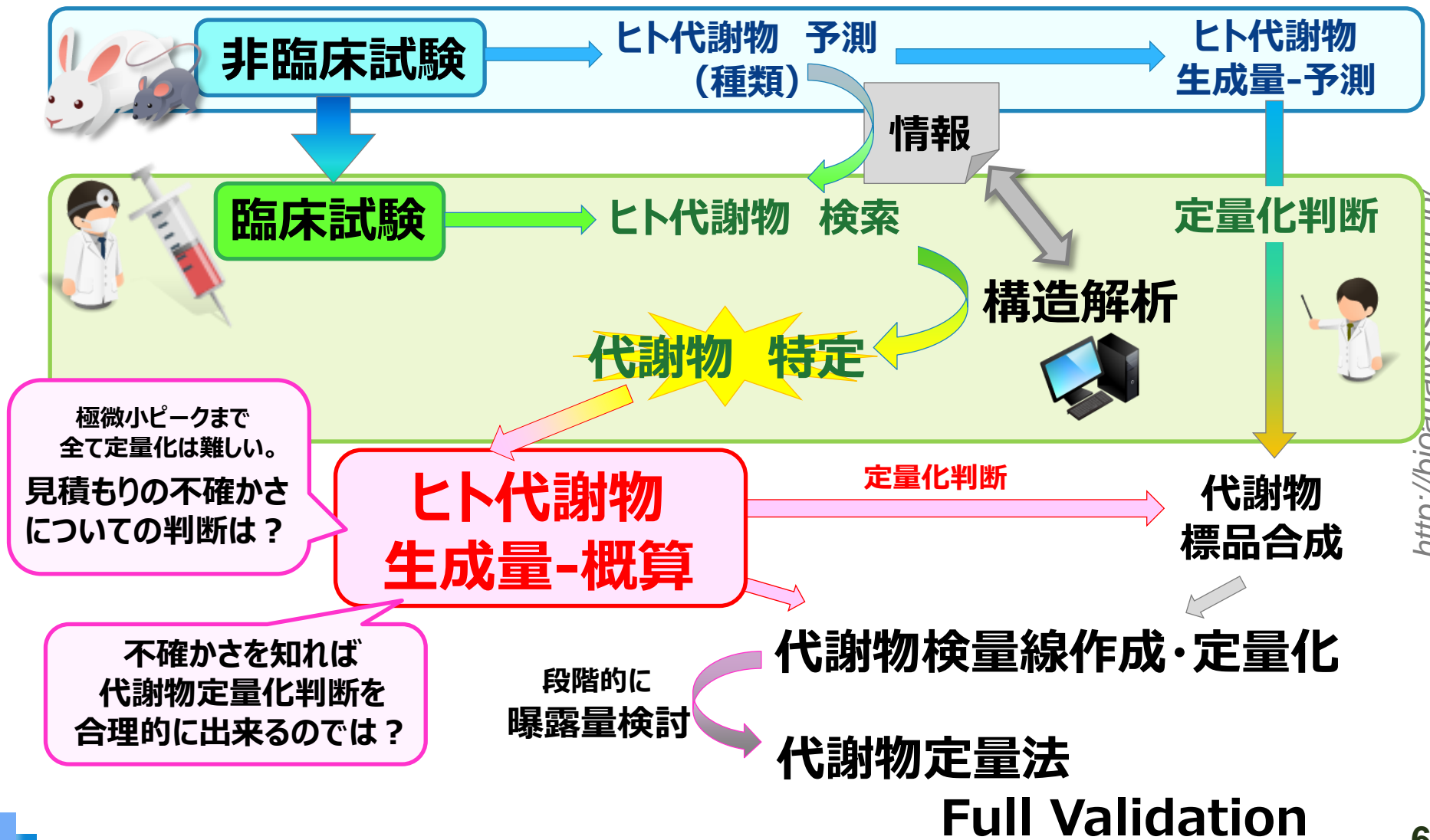
## 生体試料中薬物濃度分析法の 真度及び精度の基準の設定方法について

- (標準物質がある前提)  
「Full Validation していない代謝物の分析法の取り扱い」を考察
- (標準物質がない前提)  
既存の概念 (真度および精度)にとどまらないアプローチ  
を含めて代謝物の定量戦略を構築し、提案する

10th JBF  
(DG2018-35)



# 一般的な代謝物定量化までの流れ



# 1. 臨床試験における 代謝物チェックのストラテジー



10<sup>th</sup> JBF  
(DG2018-35)

標品が無い場合にも  
より速い段階で  
「Full Validation & MIST対応が必要か否かの判断」  
を  
「高い確度」で行うことは出来ないか？



## 本Discussion Groupが妥当であると考える「代謝物チェックの流れ」

1. First In Human study における代謝物の探索的測定で最初のチェックを行う
2. 段階的にQualified method等で代謝物を定量
3. ヒト H<sub>0</sub>T ADMEのデータで10%ルールの評価
4. (3の結果を受け)  
Full Validated Methodによる代謝物測定実施要不要の最終判断を実施
5. (4の結果を受け)  
H<sub>0</sub>T ADMEのデータで10%超となればFull Validated Methodを作成し代謝物を測定してヒトと動物の代謝物濃度を比較する

7-9<sup>th</sup> JBF

【ICH-M3】(10%ルール)

ヒトでみられた代謝物を非臨床試験で特徴づける必要があるのは、その代謝物の臨床での曝露量が、投与薬物に関連する総ての物質の曝露量の10%を超え、かつ、ヒトにおける曝露量が毒性試験での最大曝露量よりも明らかに高い場合のみである。



# 臨床試験における代謝物チェックのストラテジー

1. FIHにおける代謝物の探索的測定で最初のチェックを行う
2. 段階的にQualified method等で代謝物を定量
3. ヒトHOT ADMEのデータで10%ルールの評価
4. (3の結果を受け)  
Full Validated Methodによる代謝物測定実施用不要の最終判断を実施
5. (4の結果を受け)  
HOT ADMEのデータで10%超となればFull Validated Methodを作成し代謝物を測定してヒトと動物の代謝物濃度を比較する

3.の「HOT ADMEでの比較」を実施すれば間違いのない最終判断が出来るが、その前に判断を実施したい。  
HOT ADMEは開発の初期に実施することは難しい。  
毒性試験実施時期等を考えると、HOT ADMEの結果を待ってられない場合もあるのでは？

HOT ADMEの結果を待たずに、Full Validation測定実施の要・不要を  
早期に繰り上げ判断する事は可能か？

客観的かつ合理的に判断する方法、ストラテジーをDGで検討

(標準物質がある場合)

昨年度DGで討議> 結果および方向性 DGが提示

9<sup>th</sup> JBF  
(DG2017-28)

(標準物質がない場合)

本年度DGで討議> どのように判断するか？

(ポスター) 2. 代謝物の曝露量見積もり

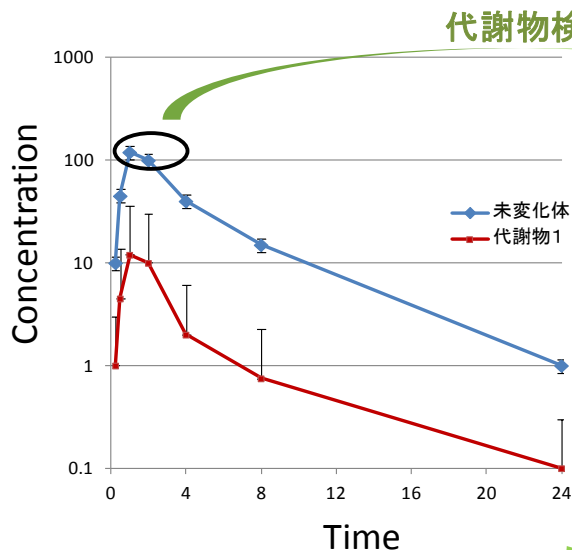
3. 標品が無い代謝物定量時の不確かさ評価

10<sup>th</sup> JBF  
(DG2018-35)

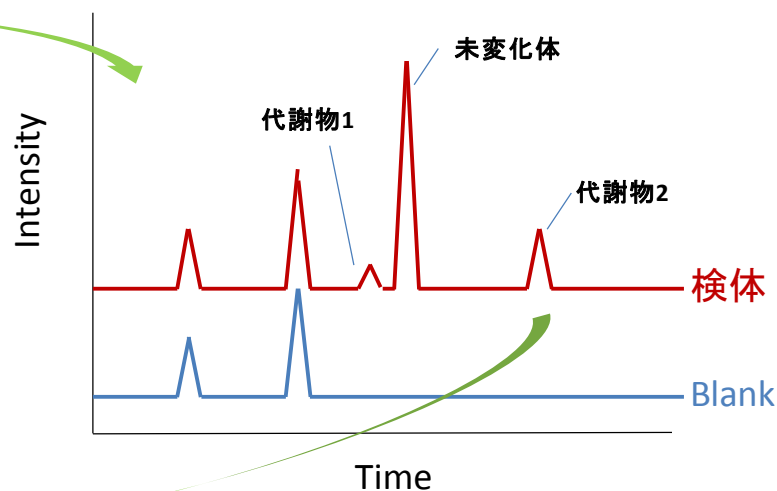
## 臨床試験における代謝物チェックのストラテジー

7-9th JBF

(標準物質がある場合)  
動物血漿で検出されている 等



(標準物質がない場合)  
未知代謝物を含む



代謝物検索と探索的な測定方法  
で定量サイクルを回す。  
代謝物曝露が未変化体の10%を  
超えるおそれがある場合には、段階  
的に測定MethodをQualifiedし  
ながら定量を継続

標品合成/定量

標準物質がない場合にも

3を待たずに、  
1 & 2の結果だけで

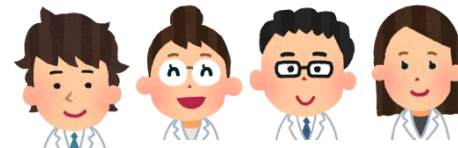
1. FIHにおける代謝物の探索的測定のデータで最初のチェックを行う
2. 段階的にQualified method等で代謝物を定量
3. ヒトHOT ADMEのデータで10%ルールの評価
4. (3の結果を受け) Full Validated Methodによる代謝物測定実施用不要の最終判断を実施
5. (4の結果を受け) HOT ADMEのデータで10%超となれば Full Validated Methodを作成し代謝物を測定してヒトと動物の代謝物濃度を比較する

## 2. 代謝物の曝露量見積もり



10<sup>th</sup> JBF  
(DG2018-35)

標品が無い場合にも  
より速い段階で  
「Full Validation & MIST対応が必要か否かの判断」  
を  
「高い確度」で行うことは出来ないか？



# 代謝物の曝露量見積もり

## 標品のない代謝物の定量戦略

【一般的に用いられている主なアプローチ】

### 1. UV 先行型

- ✓ UVにて投与前後の試料を比較（投与前にはないピーク：代謝物候補）
- ✓ UVとマスク取得 → 該当ピークのMSスペクトル作成  
→ 分子量 → MS/MS（構造を知る）

### 2. 精密質量MS 先行型

- ✓ 精密質量MSのフルスキャンからXIC → Data-dependent MS/MS
- ✓ 化合物がUV吸収をほとんど持たない場合や、  
血中濃度が低くUVでは検出困難な場合にも適用可能

### 3. Predicted SRM型

- ✓ Predicted SRM→そのまま同プラットフォームでQualified method

# 代謝物の曝露量見積もり

【一般的に用いられている主なアプローチ】

## UV 先行型

**UV** : 被験者の投与前後の  
血漿との比較

**MS** : 該当ピークの  
MSスペクトル取得

**MS/MS** : 構造を知る  
場合によってMS<sup>n</sup>

## 精密質量MS 先行型

**精密質量MS** :  
フルスキャンからXIC

**MS/MS** :  
Data - dependent  
MS/MS 実施

## Predicted SRM 先行型

代謝物予測ソフト  
で予測した代謝物

**Predicted SRM** :  
条件生成

測定  
(特徴的SRMで、投与前には無いピーク)

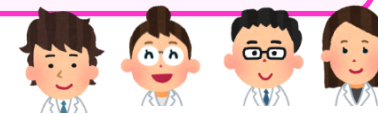
得られた情報を基に代謝物を合成  
一致するかを確認

合成品による定量化へ

状況により UVピーク・MSレスポンス  
から量の見当をつける場合あり

標品無しでの見当づけが  
どの程度信頼できるか

10<sup>th</sup> JBF  
(DG2018-35)



# 代謝物の曝露量見積もり

## バリデーション未実施の代謝物の定量化

### 標品のある場合

バリデーション未実施でも検量線作成、定量して検討をつける。

9<sup>th</sup> JBF  
(DG2017-28)

### 標品のない場合

研究現場としては、標品がない場合でも定量的に代謝物を評価したい。  
 →Qualified methodとしたい。 (可能であれば標品合成も)  
 評価の妥当性に悩むよりも標品合成した方が良いのではないかと意見あり。  
 (⇒標品合成についてDG検討)

10<sup>th</sup> JBF  
(DG2018-35)

### UV(MS)について

UV(MS)ピークから量の見当をつけ、量が多ければ標品合成を推奨。  
 UVでモル吸光係数 (MSでイオン化効率) が維持されている、という仮定はどのくらい正しいか。  
 仮定については経験や化学的視点から考えると良いかも。

(⇒ 定量性および、Radio-HPLC (以下ラジオ) との紐付けについてDG検討)

「UVで代謝物のモル吸光係数が維持されている」という仮定はどの程度正しいか



## 検討内容：公知論文からの解析

未変化体の検量線傾き $a$ 、代謝物の検量線傾き $a'$

※ISが共通であれば傾きはそのまま使用

未変化体回収率 $b$ 、代謝物回収率 $b'$

推定レスポンス比 ( $a' \cdot b / a \cdot b'$ ) を求めてみる

回収率を考慮して補正した代謝物のレスポンス( $a'/b'$ )が未変化体レスポンス( $a/b$ )の何倍か

$a'$ は分子量補正し、 $(a' \cdot b) / (a \cdot b')$ がモル吸光係数の比となるようにした



## 検討内容：論文選択基準

データベース：PubMed

2013年～2018年

データ抽出ルール（概要把握のため）：

複数マトリックスある場合は一番初めに登場する（一番関心が高い）データ、回収率は濃度依存性がないことを確認後、高濃度の数値を代表として使用。

検索式 ('metabolite' 'liquid chromatography' 'reversed phase') NOT 'mass spectrometry'

蛍光検出をマニュアル除去、UV検出を選択

検量線パラメータ、回収率の記載がある文献を選択

## 代謝物の曝露量見積もり

「UVで代謝物の吸光度が維持されている」という仮定はどの程度正しいか

出典	波長 nm	未変化体	未変化体 MW	代謝物 MW	a	b	代謝物	a'	b'	(a' b') / (ab')
1	238	Risperidone	410.49	426.49	0.0193	0.93	9-OH体	0.0154	0.92	0.805
2	325	Columbianadin	328.36	246.26	0.2804	0.8535	エステル脱離体*	0.1361	0.8537	0.485*
3	273	Caffeine	194.19	180.16	0.508	0.9328	脱メチル体	0.484	0.9493	0.937
4	243	Toltrazuril	423.41	455.41	674	0.944	スルホン体	460	0.900	0.716
			423.41	439.41			スルホキシド体	688	0.914	1.06
5	335	Lumefantrine	528.94	472.83	0.0013	0.8780	脱ブチル体	0.0013	0.9220	0.921
6	280	Tamoxifen	371.52	357.50	0.00647	0.755	N-脱メチル体	0.0201	0.860	2.73
			371.52	387.52			4-水酸化体	0.05457	0.958	0.664
			371.52	373.50			Endoxifen	0.0122	0.805	1.76

<http://bioanalysisforum.jp/>

a: 未変化体の検量線傾き a': 代謝物の検量線傾き b: 未変化体回収率 b' 代謝物回収率

\* 代謝で脱離した側に共役二重結合有り

a'は分子量補正し, (a' b') / (ab')がモル吸光係数の比となるようにした

赤字は大きく変化した値



概ね、酸化、脱アルキルなどの代謝によって大きくは変化しない  
(代謝物は未変化体の1.0±0.4倍程度) が場合により大きく動くことがある。



- [1] Mandrioli R, Mercolini L, Lateana D et al., "Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV ", Journal of Chromatography B, 2011 879, 167-173.
- [2] Zhang YB, Yang XW, "Tissue distribution study of columbianadin and its active metabolite columbianetin in rats " , Biomedical Chromatography 2016 30:2, 256-262.
- [3] Begas E, Kouvaras E, Tsakalof AK, Bounitsi M et al., "Development and validation of a reversed-phase HPLC method for CYP1A2 phenotyping by use of a caffeine metabolite ratio in saliva", Biomedical Chromatography 2015 29:11 1657-1663.
- [4] Zheng W, Jiang Z, Zhang L et al., "Simultaneous determination of toltrazuril and its metabolites in chicken and pig skin+fat by UPLC-UV method", Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2014 972, 89-94.
- [5] Khuda F, Iqbal Z, Shah Y et al., "Method development and validation for simultaneous determination of lumefantrine and its major metabolite, desbutyl lumefantrine in human plasma using RP-HPLC/UV detection", Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2014 944, 114-122.
- [6] Antunes MV., Rosa DD., Viana TDS et al., "Sensitive HPLC-PDA determination of tamoxifen and its metabolites N-desmethyltamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and endoxifen in human plasma", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013 76, 13-20.

**MS：未変化体で代替した検量線での評価はどの程度信頼できるか？****検討内容：公知論文にみられる検討**

- ✓ 未変化体検量線（代替検量線）で代謝物を定量とした仮定でのケーススタディ（文献1）  
⇒ MSの代謝物レスポンスは未変化体レスポンスの0.014～8.6倍で大きな変化幅があり、そのまま代替検量線とはできない。
- ✓ 放射性標識体データを利用して代謝物定量のための補正を行っている事例（文献2, 3）  
⇒ MSについては、未変化体検量線（代替検量線）で代謝物を定量することはできず、代謝物定量のための補正が避けられない。

[1] Hatsis P, Waters NJ, Argikar UA, Implications for metabolite quantification by mass spectrometry in the absence of authentic standards. Drug Metab. Dispos. 2017; 45(5): 492-496.

[2] Tozuka Z, Aoyama S, Nozawa K, et al., Comprehensive quantitative and qualitative liquid chromatography-radioisotope-mass spectrometry analysis for safety testing of tolbutamide metabolites without standard samples. J. Pharm. Sci. 2011; 100(9): 4024-36.

[3] Gong Y, Chen J, Shi Y et al., Standard-free bioanalytical approach for absolute quantitation of drug metabolites utilizing biosynthesis of reciprocal radio and stable isotopologues and its application. Anal Chem. 2017; 89(16): 8399-8404.

# 代謝物の曝露量見積り

## 代替検量線の妥当性についての小括

【一般的に用いられている主なアプローチ】

### MS代替検量線

### 精密質量MS 先行

### Predicted SRM

- ✓ 代謝物レスポンスは未変化体レスポンスと大きく異なる場合が多い
- ✓ 未変化体検量線での代謝物定量は適切でない
- ✓ 代謝物グループ分け（物性の近いもので代替検量線を作る）は避けられない

### UV 代替検量線

### UV 先行

- ✓ 代謝物レスポンスは概ね未変化体の  $1.0 \pm 0.4$  倍程度
- ✓ だが場合により大きく動く⇒ **どの程度推奨できるか？**

上記2つとラジオを組み合わせる事によって、

レスポンスと絶対量（濃度）の関係を知らることが出来る

### ラジオによるUV、MSレスポンスの補正

- ✓ 真度は格段に良くなるが精度はどうか、「見当付け」にそこまで必要か
- ✓ ⇒ **値付けは推奨できるか？**

課題を包括的に扱うため、  
不確かさの概念を取り入れて検討することにした

# 【不確かさ】とは

- 「不確かさ」は、正確に知ることのできない「真の値」を基準とした「誤差」を用いずに統計処理や実際の測定値を利用し「真の値が存在する可能性の高い範囲」を推測した値の事。
- 「誤差」は、「真の値」からのズレ値と定義されてきたが「真の値」は誰にもわからないため、厳密には「誤差」を求めることは不可能。 （「真の値」はJIS Z8103に定義）
- 「不確かさ」は、測定全体の各手順において測定値のばらつきを引き起こす様々な要因について評価し統計的な処理を行うことで

**「真の値」が存在しうる範囲**として求められる。

### 3. 標品が無い代謝物 定量時の不確かさ評価



10<sup>th</sup> JBF  
(DG2018-35)

標品が無い場合にも  
より速い段階で  
「Full Validation & MIST対応が必要か否かの判断」  
を  
「高い確度」で行うことは出来ないか？



## 不確かさ試算を如何に行うか

MEMO

## 不確かさ導入の意義

- ✓ 真度・精度を議論するには、生データレベルでのリアルデータが必要。しかし、各社のデータを発表することは難しい。
- ✓ 不確かさを導入することで、実際の個別代謝物定量値が得られていない状況でも、公知論文等も参照しつつ、一般的な経験値を基に議論を重ねる事が出来る。
- ✓ 標準偏差で検討していけるメリットはDGにとって大きい。

代謝物定量の不確かさを評価し

本当に代替検量線では目的を達しないのか

目的を達成するためには何が重要なのかを検討することにした。

今回のDGでは、UVとラジオを用いた  
定量における不確かさを比較し、評価する。

10<sup>th</sup> JBF  
(DG2018-35)



## シナリオ1 UVで代謝物を定量化する場合

代謝物標品無し 未変化体標品あり 未変化体の一点代替検量線使用  
内標準物質有り (未変化体用の内標準物質のイメージ)

### 標準溶液／内標準溶液の調製

### 不確かさ要因

未変化体標準物質 **10 mg**  
(又は内標準物質)

**5桁天秤**  
(セミマイクロ天秤; 最小表示 0.01 mg)

↓ 溶媒\*添加      \*溶媒: 超純水又はアセトニトリル

メスアップ **10 mL** (原液: 1 mg/mL)

**メスフラスコ**

原液 **1 mL** + 溶媒\* → **50 mL** (溶液: 20000 ng/mL)

**ホールピペット  
メスフラスコ**

↓

溶液 (20000 ng/mL) **1 mL** + 溶媒\* → **50 mL** (溶液: 400 ng/mL)

↓

溶液 (400 ng/mL) **2.5 mL** + 溶媒\* → **100 mL** (溶液: 10 ng/mL)

標準液濃度 (Cst)  
試料中  
内標準液濃度 (Cism)  
標準液中  
内標準液濃度 (Cis)

## シナリオ1 UVで代謝物を定量化する場合

代謝物標品無し 未変化体標品あり 未変化体の一点代替検量線使用  
内標準物質有り (未変化体用の内標準物質のイメージ)

## 代替検量線試料の調製

標準溶液 100  $\mu\text{L}$  + 内標準溶液 10  $\mu\text{L}$  → 代替検量線用試料

不確かさ要因

ピストン式  
ピペット

## 血漿試料の調製

血漿 100  $\mu\text{L}$  + 内標準溶液 10  $\mu\text{L}$  + メタノール 500  $\mu\text{L}$



フィルターろ過後に窒素乾固



水/アセトニトリル(90/10) 100  $\mu\text{L}$ を加えて再溶解



血漿試料

ピストン式  
ピペット前処理中  
回収率

標準液濃度  
(Cst)  
試料中  
内標準液濃度  
(Cism)  
標準液中  
内標準液濃度  
(Cis)

前処理  
回収率  
(SP)



## シナリオ1 UVで代謝物を定量化する場合

代謝物標品無し 未変化体標品あり 未変化体の一点代替検量線使用  
内標準物質有り (未変化体用の内標準物質のイメージ)

## HPLC-UV 測定

代替検量線用試料／血漿試料 をHPLCに注入

HPLC移動相：水／アセトニトリル  
90/10⇒10/90グラジエント

UVピークレスポンス比を算出

代替検量線用試料 (未変化体標準物質／内標準物質)  
血漿試料 (代謝物／内標準物質)

† 未変化体と代謝物の間でモル吸光係数の違いは**50%以内**であると仮定

不確かさ要因

ピーク強度  
測定ばらつき  
感度ばらつき†

代謝物測定値  
(R<sub>met</sub>)

試料中  
内標準測定値  
(R<sub>ism</sub>)

未変化体  
標準液測定値  
(R<sub>st</sub>)

標準液中内標  
準測定値  
(R<sub>iss</sub>)

レスポンス比  
(RR)

血漿試料のUVピークレスポンス比：代謝物/内標準物質  
標準試料のUVピークレスポンス比：未変化体標準物質/内標準物質

$$\text{ヒト代謝物濃度} = \frac{\text{血漿試料のUVピークレスポンス比}}{\text{標準試料のUVピークレスポンス比}} \times \text{標準溶液濃度 } 10 \text{ (ng/mL)}$$

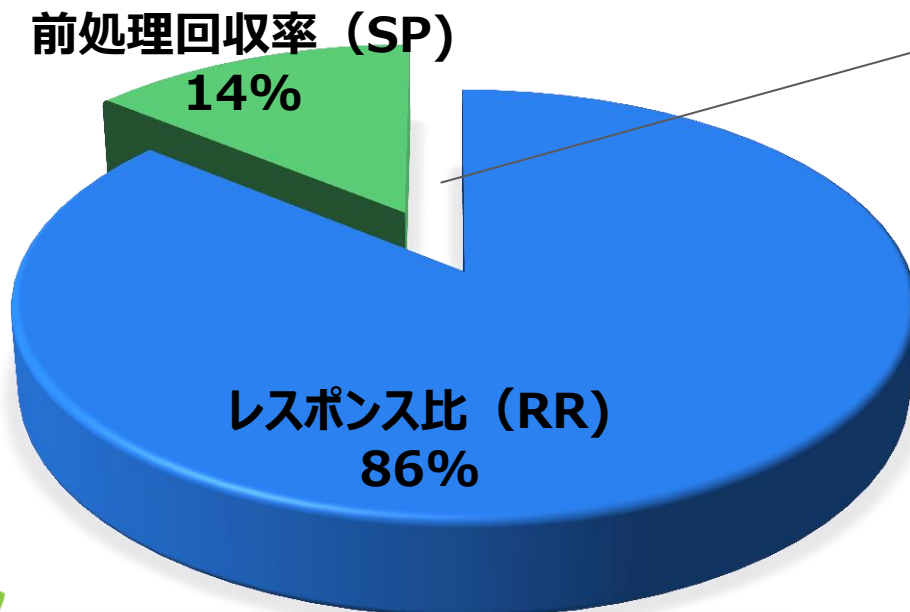
## シナリオ1 UVで代謝物を定量化する場合

不確かさ要因	値	単位	標準 不確かさ	単位	感度係数	標準 不確かさ (ng/mL)
<b>代謝物濃度(C<sub>met</sub>)</b>	<b>1.00</b>	<b>ng/mL</b>			<b>1</b>	<b>0.539</b>
代謝物測定値(R <sub>met</sub> )	100000	count	1000	count	$C_{ism} \cdot C_{st} \cdot SP \cdot RF \cdot R_{iss} / (C_{is} \cdot R_{ism} \cdot R_{st})$	0.010
試料中内標準測定値(R <sub>ism</sub> )	100000	count	1000	count	$-C_{ism} \cdot C_{st} \cdot SP \cdot R_{met} \cdot RF \cdot R_{iss} / (C_{is} \cdot R_{ism}^2 \cdot R_{st})$	0.010
未変化体標準液測定値(R <sub>st</sub> )	909000	count	9090	count	$-C_{ism} \cdot C_{st} \cdot SP \cdot R_{met} \cdot RF \cdot R_{iss} / (C_{is} \cdot R_{ism} \cdot R_{st}^2)$	0.010
標準液中内標準測定値(R <sub>iss</sub> )	90900	count	909	count	$C_{ism} \cdot C_{st} \cdot SP \cdot R_{met} \cdot RF / (C_{is} \cdot R_{ism} \cdot R_{st})$	0.010
標準液濃度(C <sub>st</sub> )	9.09	ng/mL	0.076	ng/mL	$C_{ism} \cdot SP \cdot R_{met} \cdot RF \cdot R_{iss} / (C_{is} \cdot R_{ism} \cdot R_{st})$	0.008
試料中内標準液濃度(C <sub>ism</sub> )	1.00	ng/mL	0.012	ng/mL	$C_{st} \cdot SP \cdot R_{met} \cdot RF \cdot R_{iss} / (C_{is} \cdot R_{ism} \cdot R_{st})$	0.012
標準液中内標準液濃度(C <sub>is</sub> )	0.91	ng/mL	0.010	ng/mL	$-C_{ism} \cdot C_{st} \cdot SP \cdot R_{met} \cdot RF \cdot R_{iss} / (C_{is}^2 \cdot R_{ism} \cdot R_{st})$	0.011
<b>レスポンス比(RR)</b>	1		0.5		$C_{ism} \cdot C_{st} \cdot SP \cdot R_{met} \cdot R_{iss} / (C_{is} \cdot R_{ism} \cdot R_{st})$	<b>0.500</b>
前処理回収率(SP)	1		0.2		$C_{ism} \cdot C_{st} \cdot R_{met} \cdot RR \cdot R_{iss} / (C_{is} \cdot R_{ism} \cdot R_{st})$	<b>0.200</b>



$$C_{met} = C_{ism} \cdot \frac{C_{st}}{C_{is}} \cdot \frac{RR \cdot SP \cdot R_{met}}{R_{ism}} \cdot \frac{R_{iss}}{R_{st}}$$

## シナリオ1 UVで代謝物を定量化する場合



レスポンス比の見積もりを正確にする  
and/or 前処理の再現性向上により  
代謝物濃度測定の精度向上が可能

レスポンス比(RR) =

$(\text{代謝物レスポンス} / \text{内標準物質レスポンス}) / (\text{未変化体標準物質レスポンス} / \text{内標準物質レスポンス})$

実質は代謝物のモル吸光係数 / 未変化体のモル吸光係数

代謝物測定値(Rmet)  $\cong$  0%

試料中内標準測定値(Rism)  $\cong$  0%

未変化体標準液測定値(Rst)  $\cong$  0%

標準液中内標準測定値(Riss)  $\cong$  0%

標準液濃度(Cst)  $\cong$  0%

試料中内標準液濃度(Cism)  $\cong$  0%

標準液中内標準液濃度(Cis)  $\cong$  0%

今回使用を仮定した天秤は、  
**本来の使い方より粗い。**

(10 mgを秤量する場合には、6桁天秤が必要。  
5桁天秤の精度としては、100 mg単位の桁数しか  
保障されないので、10 mgの秤量には不十分)

各プロセスの不確かさを評価すると、  
レスポンス比および前処理回収率以外の  
要因が結果測定の  
不確かさに与える影響はごく小さい。

シナリオ1 UVで代謝物を定量化する場合

実際の検討例

10th JBF  
(DG2018-35)UVのみで測定した場合

代謝物濃度(1 ng/mL) に対して

合成標準不確かさ:0.54 ng/mL

拡張合成標準不確かさ( $k=2$ ):1.08 ng/mL

⇒この時、代謝物の濃度は

**1.00 ± 1.08 ng/mLの範囲に存在する。**

- ✓ 代謝物は最大2.08 ng/mLと見積もられるので、未変化体が20.8 ng/mL以上あればその採血時点における代謝物は95%の確率で10%ルールにかからない。 \*ハミルトンプール法 (p.39参照)
- ✓ これより、プール\*後の血漿を測定することでAUCを濃度として評価することができる
- ✓ 今回試算のUV条件(代替検量線)で、血漿プールのAUC測定値が5%であれば真値10%ではないといえる ⇒ **Recommendationの一つ**

合成標準不確かさ:

各要因の標準不確かさの2乗和の平方根  
(測定プロセス全体の不確かさそのもの)

拡張合成標準不確かさ:

得られた合成標準不確かさに包含係数( $k$ )を乗じて得られた値  
包含係数 $k=2$ の場合、全測定値の95%がこの範囲に含まれることを意味する

## シナリオ2 ラジオ（非臨床）併用、UV（臨床）で代謝物を定量化する場合

代謝物標品無し，未変化体標品あり，未変化体の一点検量線使用．代謝物と未変化体のピークレスポンス比\*の関係をラジオの測定を介して紐づける． \*ピークレスポンス比：代謝物のモル吸光係数／未変化体のモル吸光係数

## Cold標準溶液／内標準溶液の調製

## 不確かさ要因

未変化体標準物質 **10 mg**  
(又は内標準物質)

**5桁天秤**  
(セミマイクロ天秤；最小表示 0.01 mg)

↓ 溶媒\*添加      \*溶媒：超純水又はアセトニトリル

メスアップ **10 mL** (原液：1 mg/mL)

メスフラスコ

原液 **1 mL** + 溶媒\* → **50 mL** (溶液：20000 ng/mL)

ホールピペット  
メスフラスコ

↓  
溶液 (20000 ng/mL) **1 mL** + 溶媒\* → **50 mL** (溶液：400 ng/mL)

↓  
溶液 (400 ng/mL) **2.5 mL** + 溶媒\* → **100 mL** (溶液：10 ng/mL)

標準液濃度  
(Cst)

試料中代謝物  
ピーク強度  
(UV)

Rmet,uv

標準液中  
内標準  
ピーク強度  
(UV)

Ris,uv

## シナリオ2 ラジオ（非臨床）併用、UV（臨床）で代謝物を定量化する場合

代謝物標品無し，未変化体標品あり，未変化体の一点検量線使用．代謝物と未変化体のピークレスポンス比\*の関係をラジオの測定を介して紐づける． \*ピークレスポンス比： 代謝物のモル吸光係数／未変化体のモル吸光係数

## 未変化体値付け検量線用試料の調製

標準溶液 100  $\mu\text{L}$  + 内標準溶液 10  $\mu\text{L}$  → 代替検量線用試料

## 不確かさ要因

ピストン式  
ピペット

## Hot動物試料の調製

動物血漿 100  $\mu\text{L}$  + 内標準溶液 10  $\mu\text{L}$  + メタノール 500  $\mu\text{L}$



フィルターろ過後に窒素乾固



水／アセトニトリル(90/10) 100  $\mu\text{L}$ を加えて再溶解



Hot動物試料

ピストン式  
ピペット

標準液濃度  
(Cst)

試料中代謝物  
ピーク強度  
(UV)

Rmet,uv

標準液中  
内標準  
ピーク強度  
(UV)

Ris,uv

# 標品が無い代謝物 定量時の不確かさ評価

シナリオ2 ラジオ（非臨床）併用、UV（臨床）で代謝物を定量化する場合

代謝物標品無し，未変化体標品あり，未変化体の一点検量線使用．代謝物と未変化体のピークレスポンス比\*の関係をラジオの測定を介して紐づける． \*ピークレスポンス比：代謝物のモル吸光係数／未変化体のモル吸光係数

## Cold臨床試料の調製

ヒト血漿 100  $\mu$ L + 内標準溶液 10  $\mu$ L + メタノール 500  $\mu$ L



フィルターろ過後に窒素乾固



水／アセトニトリル(90/10) 100  $\mu$ Lを加えて再溶解



Cold臨床試料

## 不確かさ要因

ピストン式  
ピペット

前処理中  
回収率

標準液濃度  
(Cst)

試料中代謝物  
ピーク強度  
(UV)  
Rmet,uv

標準液中  
内標準  
ピーク強度  
(UV)  
Ris,uv

前処理  
回収率  
(SP)

## シナリオ2 ラジオ（非臨床）併用、UV（臨床）で代謝物を定量化する場合

代謝物標品無し，未変化体標品あり，未変化体の一点検量線使用．代謝物と未変化体のピークレスポンス比\*の関係をラジオの測定を介して紐づける． \*ピークレスポンス比：代謝物のモル吸光係数／未変化体のモル吸光係数

## HPLC-UV 測定

未変化体値付け検量線用試料を HPLCに注入

HPLC移動相：水／アセトニトリル  
90/10⇒10/90グラジエント

UVピークレスポンス比  
(未変化体標準物質／内標準物質) を算出 ①

Cold臨床試料を HPLCに注入

HPLC移動相：水／アセトニトリル  
90/10⇒10/90グラジエント

UVピークレスポンス比  
(目的代謝物／内標準物質) を算出 ②

## 不確かさ要因

ピーク強度  
測定ばらつき

ピーク強度  
測定ばらつき

標準未変化体  
ピーク強度  
(RID)Rst,rid  
標準未変化体  
ピーク強度  
(UV)Rst,uv  
試料中代謝物  
ピーク強度  
(UV)Rmet,uv  
標準液中内標準  
ピーク強度  
(UV)Ris,uv  
試料中内標準  
ピーク強度  
(UV)Rsim,uv

<http://bioanalysisforum.jp/>



# 標品が無い代謝物 定量時の不確かさ評価

## シナリオ2 ラジオ（非臨床）併用、UV（臨床）で代謝物を定量化する場合

代謝物標品無し，未変化体標品あり，未変化体の一点検量線使用．代謝物と未変化体のピークレスポンス比\*の関係をラジオの測定を介して紐づける． \*ピークレスポンス比： 代謝物のモル吸光係数／未変化体のモル吸光係数

### UV 測定 ⇒ RID（ラジオ測定）

Hot動物試料 HPLCに注入



HPLC移動相：水／アセトニトリル  
90/10⇒10/90グラジエント

UV ピークレスポンスを算出

- 動物未変化体UVレスポンス③
- 動物代謝物UVレスポンス④

RID ピークレスポンスを算出

- 動物未変化体RIDレスポンス⑤
- 動物代謝物RIDレスポンス⑥

不確かさ要因

ピーク強度  
測定ばらつき

※下記比率の割り出しは試料毎に行うと仮定し，  
内標準物質のレスポンスは使用しない仮定。

動物中未変化体  
ピーク強度  
(RID)  
Rsta,rid

動物中未変化体  
ピーク強度  
(UV)  
Rsta,uv

動物中代謝物  
ピーク強度  
(RID)  
Rmeta,rid

動物中代謝物  
ピーク強度  
(UV)  
Rmeta,uv

等モルでの代謝物／未変化体UVレスポンスの比 (⑦)

$$= (④ / ⑥) \div (③ / ⑤) = (④ \times ⑤) / (⑥ \times ③)$$

ヒト代謝物濃度 = (② / ①) × 標準溶液濃度10 (ng/mL) ÷ ⑦

## シナリオ2 ラジオ（非臨床）併用、UV（臨床）で代謝物を定量化する場合

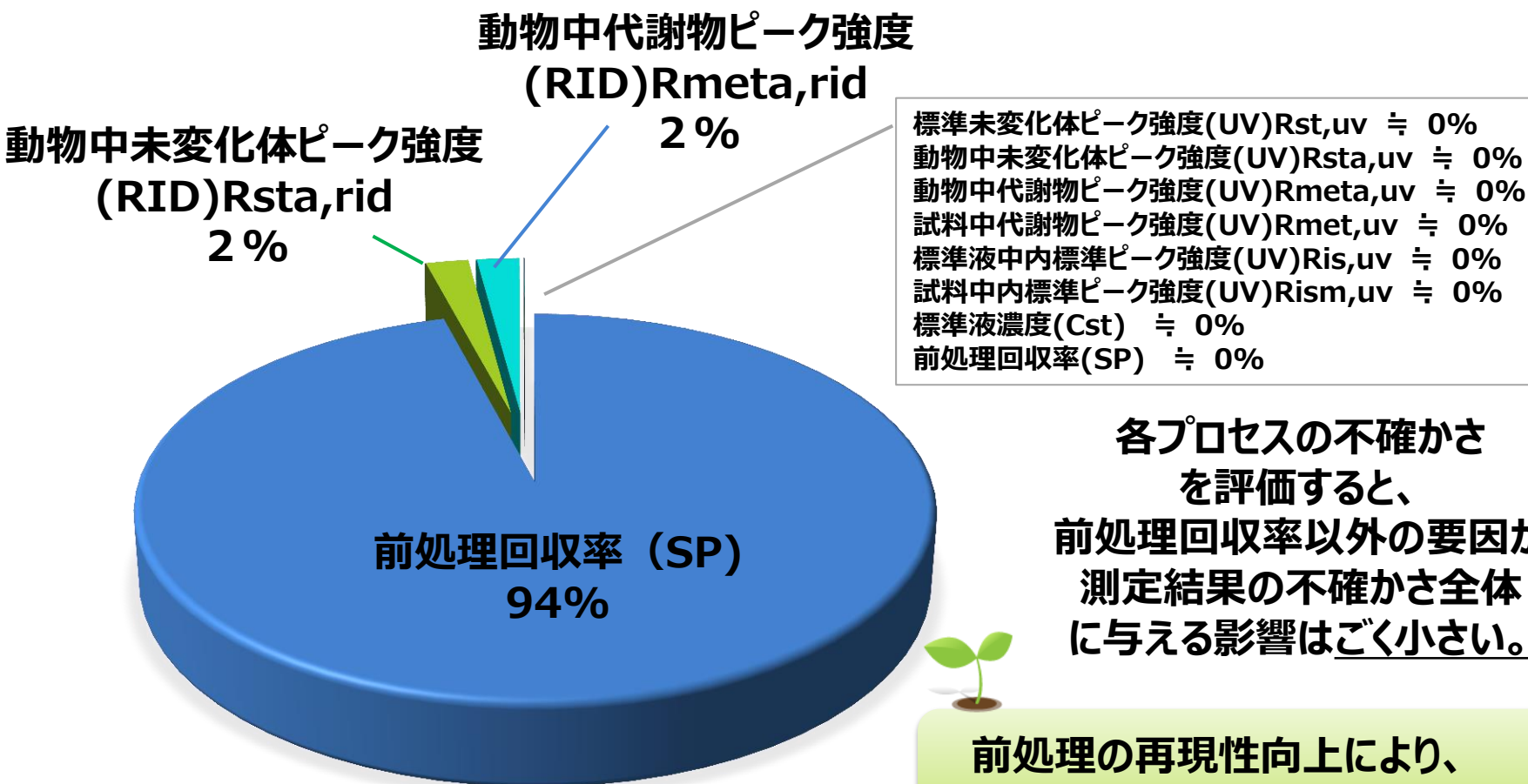
不確かさ要因	値	単位	標準 不確か さ	単位	感度係数	標準 不確か (ng/mL)
代謝物濃度(Cmet)	1.00	ng/mL			1	0.206
標準未変化体ピーク強度(UV)Rst,uv	150	count	2	count	$-(SP \cdot R_{met,uv} / R_{ism,uv}) \cdot (R_{is,uv} / R_{st,uv}^2) \cdot C_{st} \cdot (R_{sta,uv} \cdot R_{meta,rid}) / (R_{meta,uv} \cdot R_{sta,rid})$	0.010
動物中未変化体ピーク強度(RID)Rsta,rid	50000	count	1500	count	$-(SP \cdot R_{met,uv} / R_{ism,uv}) \cdot (R_{is,uv} / R_{st,uv}) \cdot C_{st} \cdot (R_{sta,uv} \cdot R_{meta,rid}) / (R_{meta,uv} \cdot R_{sta,rid}^2)$	0.030
動物中未変化体ピーク強度(UV)Rsta,uv	1500	count	15	count	$(SP \cdot R_{met,uv} / R_{ism,uv}) \cdot (R_{is,uv} / R_{st,uv}) \cdot C_{st} \cdot (R_{meta,rid}) / (R_{meta,uv} \cdot R_{sta,rid})$	0.010
動物中代謝物ピーク強度(RID)Rmeta,rid	5000	count	150	count	$(SP \cdot R_{met,uv} / R_{ism,uv}) \cdot (R_{is,uv} / R_{st,uv}) \cdot C_{st} \cdot (R_{sta,uv}) / (R_{meta,uv} \cdot R_{sta,rid})$	0.030
動物中代謝物ピーク強度(UV)Rmeta,uv	150	count	1.5	count	$-(SP \cdot R_{met,uv} / R_{ism,uv}) \cdot (R_{is,uv} / R_{st,uv}) \cdot C_{st} \cdot (R_{sta,uv} \cdot R_{meta,rid}) / (R_{meta,uv}^2 \cdot R_{sta,rid})$	0.010
試料中代謝物ピーク強度(UV)Rmet,uv	150	count	1.5	count	$(SP / R_{ism,uv}) \cdot (R_{is,uv} / R_{st,uv}) \cdot C_{st} \cdot (R_{sta,uv} \cdot R_{meta,rid}) / (R_{meta,uv} \cdot R_{sta,rid})$	0.010
標準液中内標準ピーク強度(UV)Ris,uv	150	count	1.5	count	$(SP \cdot R_{met,uv} / R_{ism,uv}) \cdot (1 / R_{st,uv}) \cdot C_{st} \cdot (R_{sta,uv} \cdot R_{meta,rid}) / (R_{meta,uv} \cdot R_{sta,rid})$	0.010
試料中内標準ピーク強度(UV)Rism,uv	150	count	1.5	count	$-(SP \cdot R_{met,uv} / R_{ism,uv}^2) \cdot (R_{is,uv} / R_{st,uv}) \cdot C_{st} \cdot (R_{sta,uv} \cdot R_{meta,rid}) / (R_{meta,uv} \cdot R_{sta,rid})$	0.010
標準液濃度(Cst)	1	ng/mL	0.009	ng/mL	$(SP \cdot R_{met,uv} / R_{ism,uv}) \cdot (R_{is,uv} / R_{st,uv}) \cdot (R_{sta,uv} \cdot R_{meta,rid}) / (R_{meta,uv} \cdot R_{sta,rid})$	0.009
前処理回収率(SP)	1		0.2		$(R_{met,uv} / R_{ism,uv}) \cdot (R_{is,uv} / R_{st,uv}) \cdot C_{st} \cdot (R_{sta,uv} \cdot R_{meta,rid}) / (R_{meta,uv} \cdot R_{sta,rid})$	0.200



$$C_{met} = C_{st} \cdot \frac{SP \cdot R_{met,uv}}{R_{ism,uv}} \cdot \frac{R_{is,uv}}{R_{st,uv}} \cdot \frac{R_{sta,uv}}{R_{sta,rid}} \cdot \frac{R_{meta,rid}}{R_{meta,uv}}$$

# 標品が無い代謝物 定量時の不確かさ評価

シナリオ2 ラジオ（非臨床）併用、UV（臨床）で代謝物を定量化する場合



各プロセスの不確かさを評価すると、  
前処理回収率以外の要因が  
測定結果の不確かさ全体  
に与える影響はごく小さい。

前処理の再現性向上により、  
代謝物濃度測定精度向上が可能

シナリオ2 ラジオ（非臨床）併用、UV（臨床）で代謝物を定量化する場合

10<sup>th</sup> JBF  
(DG2018-35)UVとラジオで測定した場合

代謝物濃度(1 ng/mL) に対して

合成標準不確かさは**0.21** ng/mL拡張合成標準不確かさ( $k=2$ )は**0.41** ng/mL

⇒この時、代謝物の濃度は

**1.00 ± 0.41 ng/mLの範囲**に存在する。

- ✓ 代謝物は最大1.41 ng/mL と見積もられるので、未変化体が14.1 ng/mL以上あればその採血時点における代謝物は 95%の確率で10%ルールにかからない。
- ✓ これより、プール\*後の血漿を測定することでAUCを濃度として評価することができる
- ✓ 今回試算のラジオ条件（代替検量線）で、血漿プールのAUC測定値が7%であれば真値10%ではないといえる ⇒ **Recommendationの一つ**

## 実際の検討例

合成標準不確かさ：

各要因の標準不確かさの2乗和の平方根  
(測定プロセス全体の不確かさそのもの)

拡張合成標準不確かさ：

得られた合成標準不確かさに包含係数( $k$ )を乗じて得られた値包含係数 $k=2$ の場合、全測定値の95%がこの範囲に含まれることを意味する

## 代謝物推定における不確かさ

## 【結果】

求めたい値：未変化体と代謝物のレスポンス比（モル吸光係数比）

## シナリオ1 UVで代謝物を定量化

UVのみで測定した場合、

代謝物濃度(1 ng/mL) の場合  
 合成標準不確かさは0.54 ng/mL  
 拡張合成標準不確かさ(k=2)は  
 1.08 ng/mL

## シナリオ2 ラジオ（非臨床）併用で定量化

UVとラジオのレスポンス比を測定することにより

代謝物濃度(1 ng/mL) の場合  
 合成標準不確かさは0.21 ng/mL  
 拡張合成標準不確かさ(k=2)は  
 0.41 ng/mL

ラジオを併用する事により、**拡張不確かさを1/2以下にする事が出来る**

UV条件（代替検量線）では、  
 血漿プールのAUC測定値が**5%**で  
 あれば真値10%ではないといえる。

ラジオ併用条件（代替検量線）では、  
 血漿プールのAUC測定値が**7%**で  
 あれば真値10%ではないといえる。

代謝物推定における不確かさ

## 【考察】

不確かさの主成分は**未変化体と代謝物のレスポンス比の差異**。  
その次に前処理操作におけるばらつきとUV測定の不確かさが大きく寄与する。

標準液等の調製不確かさの寄与は小さく、天秤やピペットの種類の違いによる精度の差も（適切に使用していれば）ほとんど寄与しない。

代謝物と未変化体との間のUV検出における**レスポンス比の差を正確に見積もれば不確かさは小さくできる**。

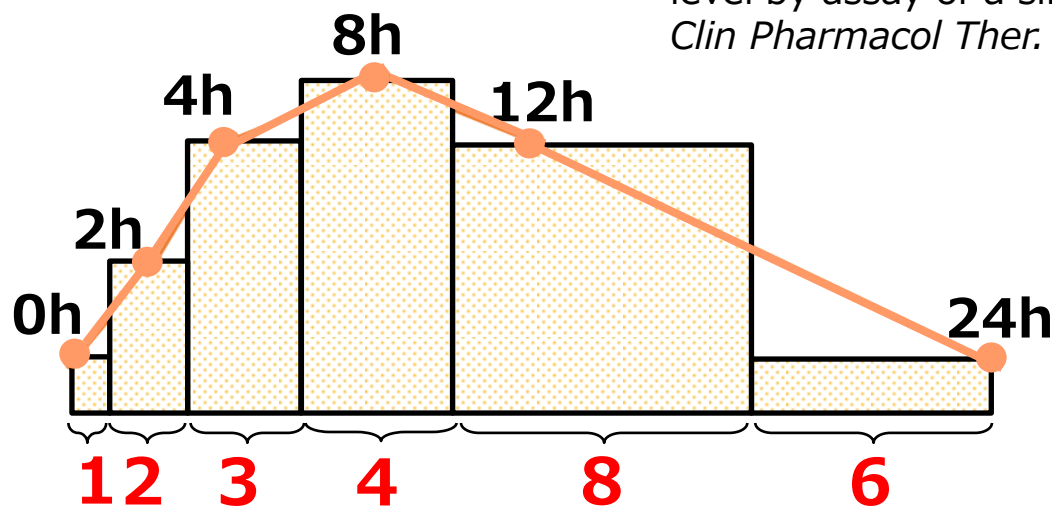
また前処理のばらつきを抑えることでも、不確かさを小さくすることはできる。

ラジオを併用した場合、前処理のばらつきが不確かさの殆どを占めるため、**前処理操作の再現性を高めることでより精度の高い代謝物濃度の推測が可能となる**。

# 参考：ハミルトンプール法

- ✓ 代謝物比率の評価に必要なものは時点毎の濃度ではなくAUC
- ✓ 「ハミルトンプール」により平均血漿中濃度が得られる
- ✓ 平均血漿中濃度に試料採取時間 (ex. 24h) をかけるとAUCになる
- ✓ 試料採取時間は定数のため、ハミルトンプール後の未変化体と代謝物の濃度比は両者のAUC比に等しい

Hamilton RA, Garnett WR, Kline BJ.  
Determination of mean valproic acid serum level by assay of a single pooled sample.  
*Clin Pharmacol Ther.* 1981; **29**: 408-413.



プール比率

## 4. まとめ

標品が無い場合にも  
より速い段階で  
「Full Validation & MIST対応が必要か否かの判断」  
を  
「高い確度」で行うことは出来ないか？

10<sup>th</sup> JBF  
(DG2018-35)





## まとめ – 代替検量線のあり方

DG35's Recommendation

10th JBF  
(DG2018-35)

1. MSでの代謝物レスポンスは未変化体レスポンスと大きく異なる場合が多く、未変化体検量線で代謝物をそのまま定量することは適切でない。  
代謝物をグループ分けし、物性の近いもので代替検量線を作る等の対応は必要。
2. UVの代謝物レスポンスは、概ね未変化体の  $1.0 \pm 0.4$  倍程度だが場合により大きく動くことがある。

⇒ 科学的妥当性を考えた対応、  
レスポンスが動く可能性を考慮した対応が必要

## DG35's Message

10th JBF  
(DG2018-35)

1. 今まで知られている代謝物UVレスポンスの情報から、レスポンスが桁違いに小さい代謝物が、大きいピークと Comparableな曝露を示すことは考えにくい。

## DG35's Recommendation

放射性標識未変化体から生成した代謝物を含む試料を HPLC又はLC/MSで測定して、代謝物レスポンスの値付けをすることにより、大きく不確かさを改善、実用的な不確かさを得ることができる。