

# DG2014-08

## 内因性物質の定量

---

若松 明<sup>1</sup>, 大住 孝彦<sup>2</sup>, 落合 美登里<sup>3</sup>, 河田 哲志<sup>4</sup>,  
北嶋 千賀<sup>5</sup>, 酒井 和明<sup>6</sup>, 島田 英一<sup>7</sup>, 山口 建<sup>8</sup>

グラクソ・スミスクライン株式会社<sup>1</sup>, 大塚製薬株式会社<sup>2</sup>, 東和薬品株式会社<sup>3</sup>, 株式会社新日本科学<sup>4</sup>,  
株式会社LSIメディエンス<sup>5</sup>, 帝人ファーマ株式会社<sup>6</sup>, 小野薬品工業株式会社<sup>7</sup>,  
株式会社住化分析センター<sup>8</sup>

## 背景

- ✓ 生体試料中の内因性物質を測定する場合、**ブランクの生体マトリックスにも分析対象物が含まれる**ため、検量線試料及びQC試料調製におけるマトリックスの選択や、バリデーション試験の実施方法および評価基準に課題がある
- ✓ 厚生労働省の発出したBMVガイドライン(LCガイドライン)では、**内因性物質は対象外**であることから、バリデーション試験または実試料分析の実施方法/評価基準について分析者または分析施設が各自で定めている

## 目的

- ✓ 内因性物質の定量をテーマに、バリデーション試験および実試料分析の考え方の調査と推奨方法の提示を目標に議論
- ✓ 国内の**実態調査を目的としたアンケート**の実施、集計
- ✓ アンケート結果を基にメンバー8名で議論して**推奨方法**または**問題点**を提示

## ◆2014年5月

- ✓ DGサポーターからメンバー募集

## ◆2014年6月13日

- ✓ キックオフ会議(Web会議)活動開始
- ✓ 以降、2015年2月まで月に2回のWeb会議およびメールによる議論
- ✓ Face to Face会議を一度実施(8/20)

## ◆2014年6月～2014年8月

- ✓ アンケート素案の項目&内容検討

## ◆2014年10月1日～8日

- ✓ アンケート実施

## ◆2014年10月～2015年2月

- ✓ アンケート結果をもとにした推奨方法の議論
- ✓ まとめ

# 対象とした内因性物質

DG2014-08で対象とした内因性物質は

- 低分子(分子量1000程度まで)
- 分析対象の内因性物質を投与する場合
- 分析方法をLC-MS法(LC-MS/MS含む)

としました

# アンケート結果

---

**実施期間：** 2014年10月1日～10月10日  
**配布先：** DGサポーター（140名）  
JBFパートナー（47名）  
**有効回答数：** 65名

**2014-08**

**ブランクマトリックス・  
代替マトリックス**

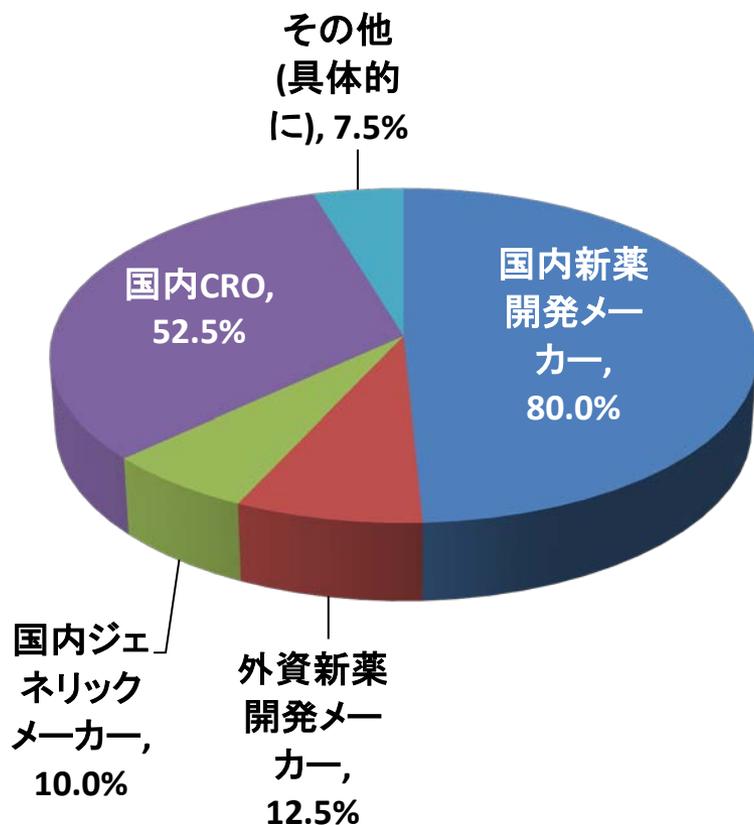
**Blank matrix , Surrogate matrix**

**酒井 和明 (帝人ファーマ株式会社)**  
**河田 哲志 (株式会社新日本科学)**  
**大住 孝彦 (大塚製薬株式会社)**

# 内因性化合物の定量アンケート

## Q1 あなたの所属をお聞かせください

有効回答数65



回答	カウント (件)	割合(%)
国内新薬開発メーカー	32	80.0%
外資新薬開発メーカー	5	12.5%
国内ジェネリックメーカー	4	10.0%
国内CRO	21	52.5%
その他(具体的に)	3	7.5%

### その他

国内医薬品原料・中間体メーカー  
 医薬品分析受託機関  
 その他

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q2 LC/MSで内因性物質を定量した経験がありますか？

(複数選択可)

有効回答数 64

回答	カウント(件)
①LC/MS(LC-MS/MS含む)で内因性物質を定量したことがある	46
②定量の経験はないが、LC/MSで内因性物質の分析法の開発をしたことがある	6
③LC/MS以外のクロマトグラフィー(LC, GC)で内因性物質の定量または分析法開発をしたことがある	15
④クロマトグラフィー以外の方法(LBAなど)で内因性物質の定量または分析法の開発をしたことがある	8
⑤その他	6

## その他の意見(6例)

LC/MSで分析法トレースを実施した。

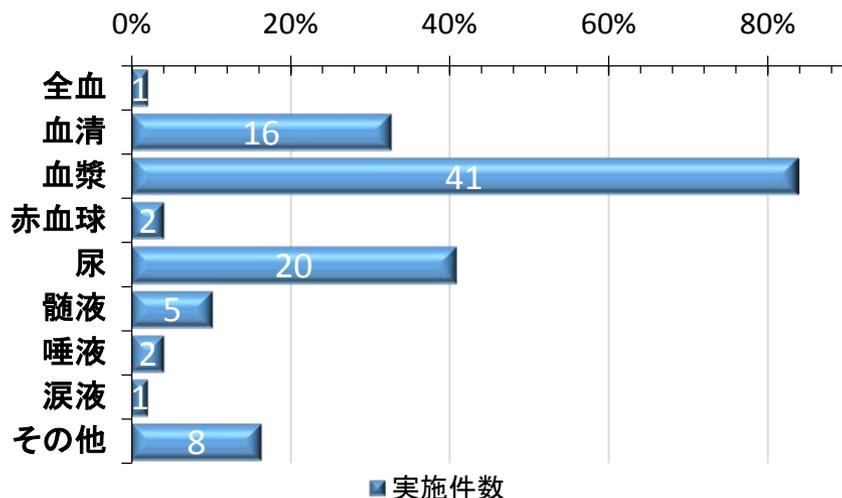
LBAにて市販キットを用いて測定を実施したことがある

②とほぼ同じですが、内因性の物質が定量に関わるほど検出されなかったことがある。経験はない。

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q3-1 前の質問で①または②と回答した方は、可能な範囲で、マトリックス、分析対象物質を選択してください。(複数選択可)

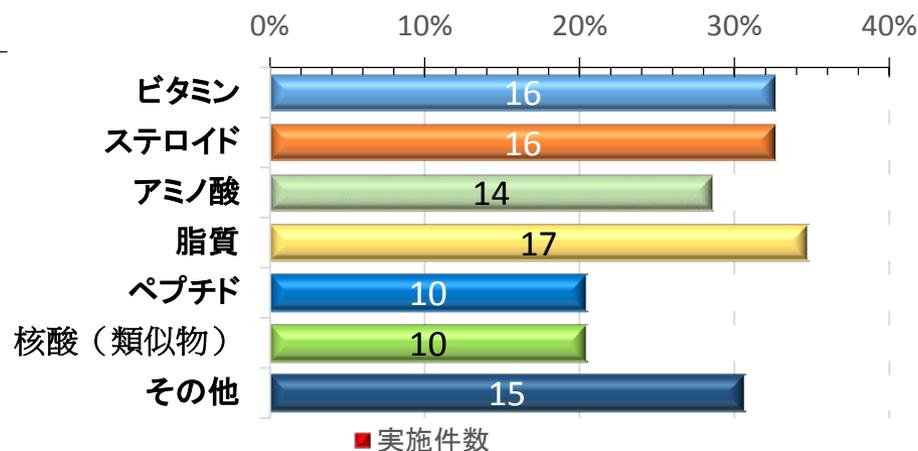
経験のあるマトリックス(回答49件中)



多くは血清、血漿、尿だが、細胞中やその他の分泌液も対象となり得る。

全血(DBS等)の実績はマイナーか？

経験のある分析対象物(回答49件中)



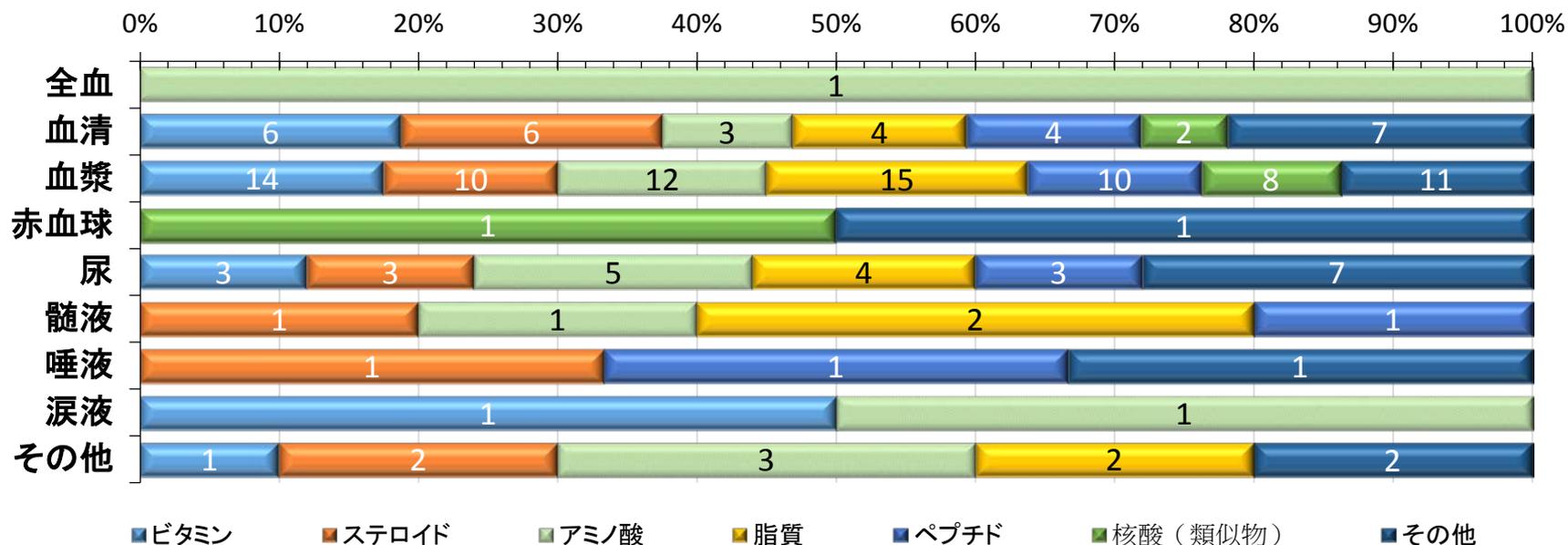
## その他の内因性化合物の定量経験

白血球(全白血球及び顆粒球)中のアミノ酸  
 喀痰中のアミノ酸  
 血漿、尿中の有機酸  
 カテコールアミン類  
 肝臓、精巣、胆汁酸、リンパ液中のビタミン、アミノ酸など  
 糞便・動物の組織中の、回答選択肢以外の分析対象物質  
 呼気凝縮液中の脂質

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q3-2 前の質問で①または②と回答した方は、可能な範囲で、マトリックス、分析対象物質を選択してください。(複数選択可)

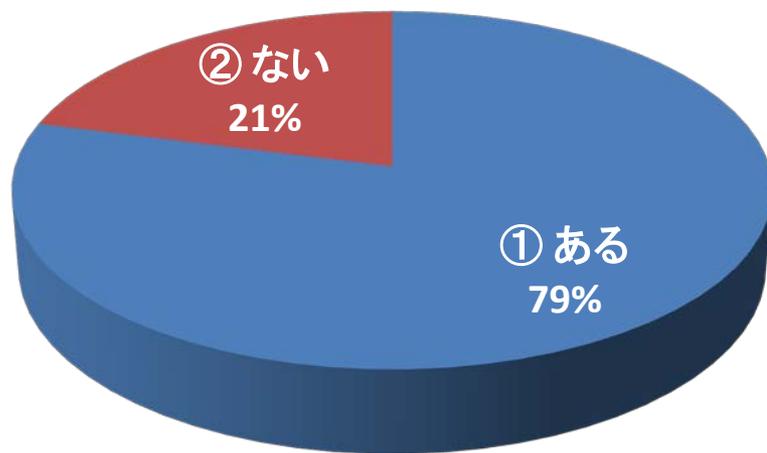
各マトリックスにおける分析対象物内訳(複数選択可)



疎水性の高い化合物(脂溶性ビタミン、ステロイド)から極性の高い化合物(アミノ酸、核酸(ヌクレオチド、キサンチン誘導体など)まで幅広い物性の化合物が想定される。

# 空白マトリックス・代替マトリックス

Q4 これまでに代替マトリックスを使用したことがありますか？



有効回答数 62

回答	カウント(件)	割合(%)
① ある	49	79.0%
② ない	13	21.0%

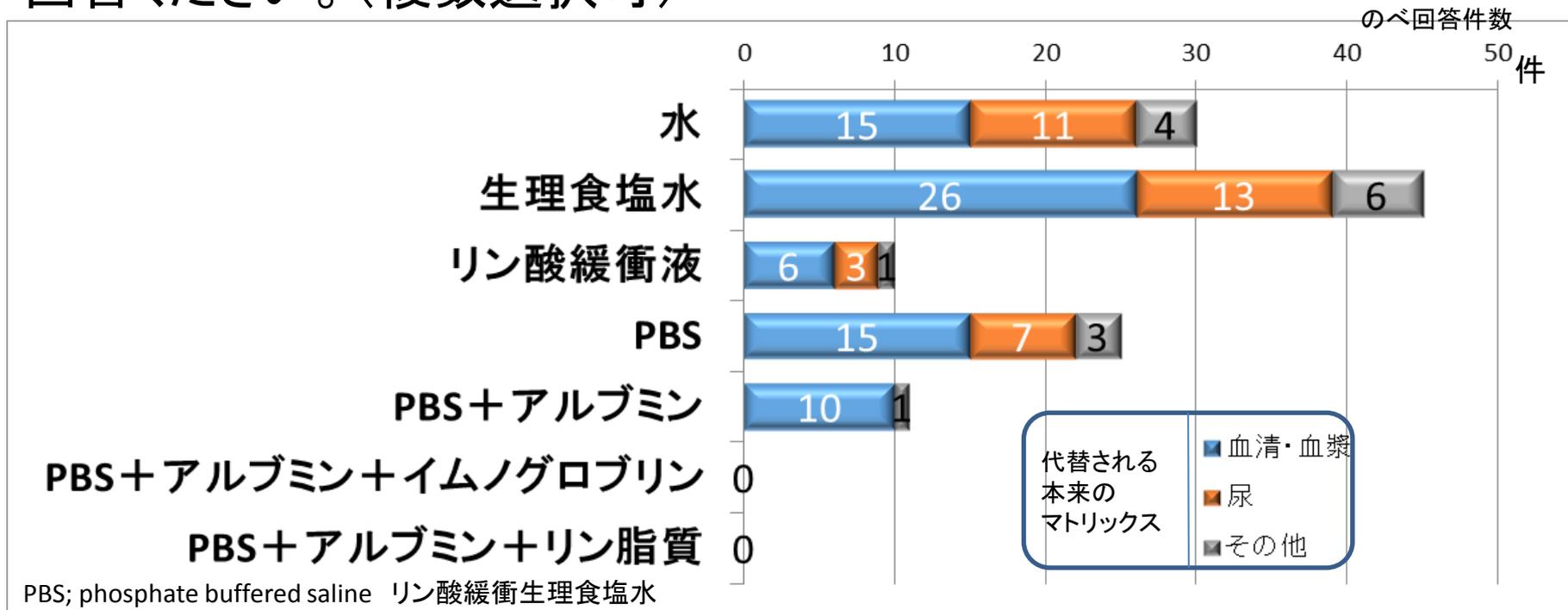
# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q5-1 これまでに使用したことのある代替マトリックスについて  
ご回答ください。(複数選択可)



# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q5-2 これまでに使用したことのある代替マトリックスについてご回答ください。(複数選択可)



## その他の代替マトリックス事例

市販キットの付属の緩衝液

尿代替マトリックス:リクイチェック尿化学コントロール

CSFの分析をする際、人工的にCSFと同様の成分になるように調製した溶液 (文献に基づいて)

サンプリングの刺激などで、内因的に測定対象物質が増加するものであったため、安定化剤を添加したヒト由来マトリックスを用いた。

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q6-1 これまでに代替マトリックスを使用した時の成功例や推奨方法を教えてください。

代表例：回答件数

有効回答数 29

- ①「水、バッファーetcのマトリックスで成功/推奨」+「測定対象物質の性質によっては工夫」:17件
  - ✓ 水等そもそも内因性成分を含まないものを代替にするのがシンプルで良い。定常状態の内因性成分も評価できるのが良い。マトリックス効果や回収率の影響を考慮しておく必要があるが、SIL-ISを使うと先述したリスクを大幅に軽減できる。
- ②「PBS+アルブミンのマトリックスで成功/推奨」:1件
  - ✓ ヒト血清中成分の濃度分析の際に、入手した健康成人のブランクマトリックス中にLLOQ付近またはそれ以上の食事由来と考えられる内因性成分が存在し、LOD以下のマトリックスが得られなかったため、surrogateとしてPBS+アルブミンの溶液に薬物を添加したものを検量線として使用した。バリデーション時にはPBS+アルブミンで薬物添加調整したQCs-surrogateおよび、低値の個別ブランクマトリックスをpoolしたマトリックスを用い、あらかじめ予測したQC濃度になるよう調整したQCs-fortifiedを用いた。検討に用いた人と試験で対象の人とのブランクマトリックス中での内因性成分の濃度に差異が認められることが懸念されたが、より低値ではあったが、実際の測定に用いられた人のブランクにも内因性成分が認められた。試験上問題はなく、validな測定が可能であった。

回答を尊重しできるだけ原表現で記載させていただいておりますが、一部まとめさせていただいた部分がありますのでご了承ください。

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q6-2 これまでに代替マトリックスを使用した時の成功例や推奨方法を教えてください。

## 代表例：回答件数

③「標準添加法を推奨」：1件

④「生体マトリックスから内因性成分を除去した代替マトリックスで成功/推奨」：5件

- ✓ 分析対象物質である内因性成分(および一連物質)を除去したマトリックスが市販品で販売されていた。マトリックスの性状に近い方が堅牢性の高い分析法を作成できる可能性もあるため、市販品などについて試薬メーカーやマトリックス販売業者に聞いてみる価値はある。
- ✓ ある化合物(低分子)につき、血漿を透析してコントロールマトリックスとして用いた。当時、内因性物質の定量としては適切と考えた。いわゆるマトリックス効果については(当時は)未確認。
- ✓ ヒト血清中性ホルモン濃度分析の際、健常成人血清を活性炭処理して性ホルモンを検出限界以下に除去し代替マトリックスとして使用した結果、イオン化等、差は認められなかった。(活性炭処理の成功例 他1件)

⑤「検量線の計算方法で成功/推奨」：1件

- ✓ 複数個体から採取した血清をプールし、それをブランク血清とした。検量線は $Y=AX+B$ (X: 添加濃度)で作成し、検量線の傾きのみを利用して定量値は $Y/A$ で算出した。

回答を尊重してできるだけ原表現で記載させていただいておりますが、一部まとめさせていただいた部分がありますのでご了承ください。

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q7-1 これまでに代替マトリックスを使用した時の失敗例や留意点を教えてください。

代表例：回答件数

有効回答数 25

①「マトリックス効果での問題点」+「回収率での問題点」:11件

- ✓ マトリックス効果の違いからか、ISのイオン強度が代替マトリックスと生体試料とで大きく異なる場合があった。IS補正することで定量値の真度としては問題ないと思うが、ISの変動をどこまで許容してよいのか悩みます。
- ✓ アフィニティーカラムで処理しても除去しきれなかった。明らかにイオン化効率に差があった。
- ✓ 活性炭処理では、広範な低分子が除去されてしまうので、イオン化効率が本来のマトリックスと大きく変わってしまうことがある。
- ✓ 生理食塩水を代替マトリックスとして使用したが、マトリックス効果が標品とIS(安定同位体ではない)で異なり測定結果がずれた。このときはマトリックス効果係数を乗じ、定量値を算出した。

②「選択性に関する問題点」:2件

- ✓ 血漿では多くの妨害ピークが認められ、代替マトリックスと差が大きかった。
- ✓ 活性炭処理マトリックスを代替マトリックスとした場合、選択性についてはかなり変わってしまう場合がある。真正なマトリックスにおいて選択性が確保されていることを証明することは難しく今後の課題と考えている。

回答を尊重しできるだけ原表現で記載させていただいておりますが、一部まとめさせていただいた部分がありますのでご了承ください。

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q7-2 これまでに代替マトリックスを使用した時の失敗例や留意点を教えてください。

## 代表例：回答件数

### ③「ブランクマトリックスから内因成分が除去できない等の問題点」:3件

- ✓ 食事制限をしても内因性が下がらないケースがあった
- ✓ 透析によって低分子化合物を除去しようとしたが、かなり時間を要した上、目標定量下限より低いマトリックスを作ることができなかった。
- ✓ リン酸緩衝液にFatty acid freeグレードのアルブミン添加を考えたが、そのアルブミンには分析対象物質である脂肪酸が残っており、結局使用することを諦めた。

### ④「生体由来ブランクマトリックスから内因成分を除去した際の問題点」:1件

- ✓ 活性炭使用で(定量性に)別の問題が発生したことがあった。

### ⑤「その他」:2件

- ✓ PBSの使用によって、MSが汚れた。
- ✓ 実施したときには、PBSで行っていたが、回収率が不明だった。アルブミンを添加したPBSで回収率の確認を行っておけばよかった。

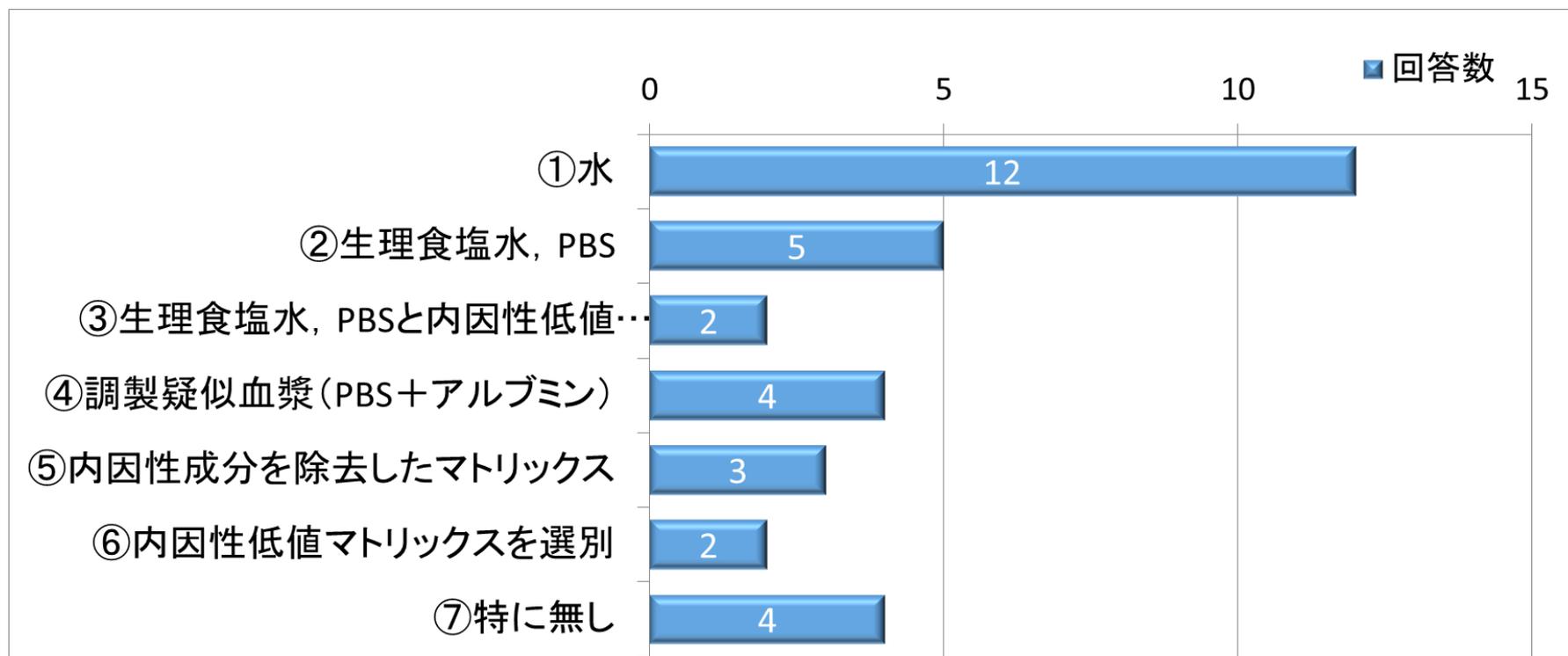
### ⑤「特に問題は無かった」:7件

回答を尊重しできるだけ原表現で記載させていただいておりますが、一部まとめさせていただいた部分がありますのでご了承ください。

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q8-1 今後主に使うと思われる(使ってみたい)代替マトリックスとその理由を教えてください。

有効回答数 30



PBS; phosphate buffered saline リン酸緩衝生理食塩水

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q8-2 今後主に使うと思われる(使ってみたい)代替マトリックスとその理由を教えてください。

有効回答数 30

## 理由・背景：代表例

### ①「水」+「生食, PBS」+「生食, PBSと内因性低値マトリックス」選択理由

- ✓ 入手や取り扱いが容易。マトリックス効果の影響が無ければ水が良い。内標準物質に安定同位体を使用すれば, マトリックス効果等の影響を無視できるため使用可能。
- ✓ 基本的にバッファーを使用(pH, イオン強度が近い)。選択性, マトリックス効果の確認に内因性低値の患者等由来の生体マトリックスを使用する [病態によって本来のマトリックスを反映しない可能性もあるが低濃度まで検討が可能のため]。

### ②「調製マトリックス(PBS+アルブミン)」選択理由

- ✓ 簡易で水よりも生体(試料)に近い。マトリックス効果の保証が容易。
- ✓ タンパク結合率の影響を考えるとバッファーでは不安。

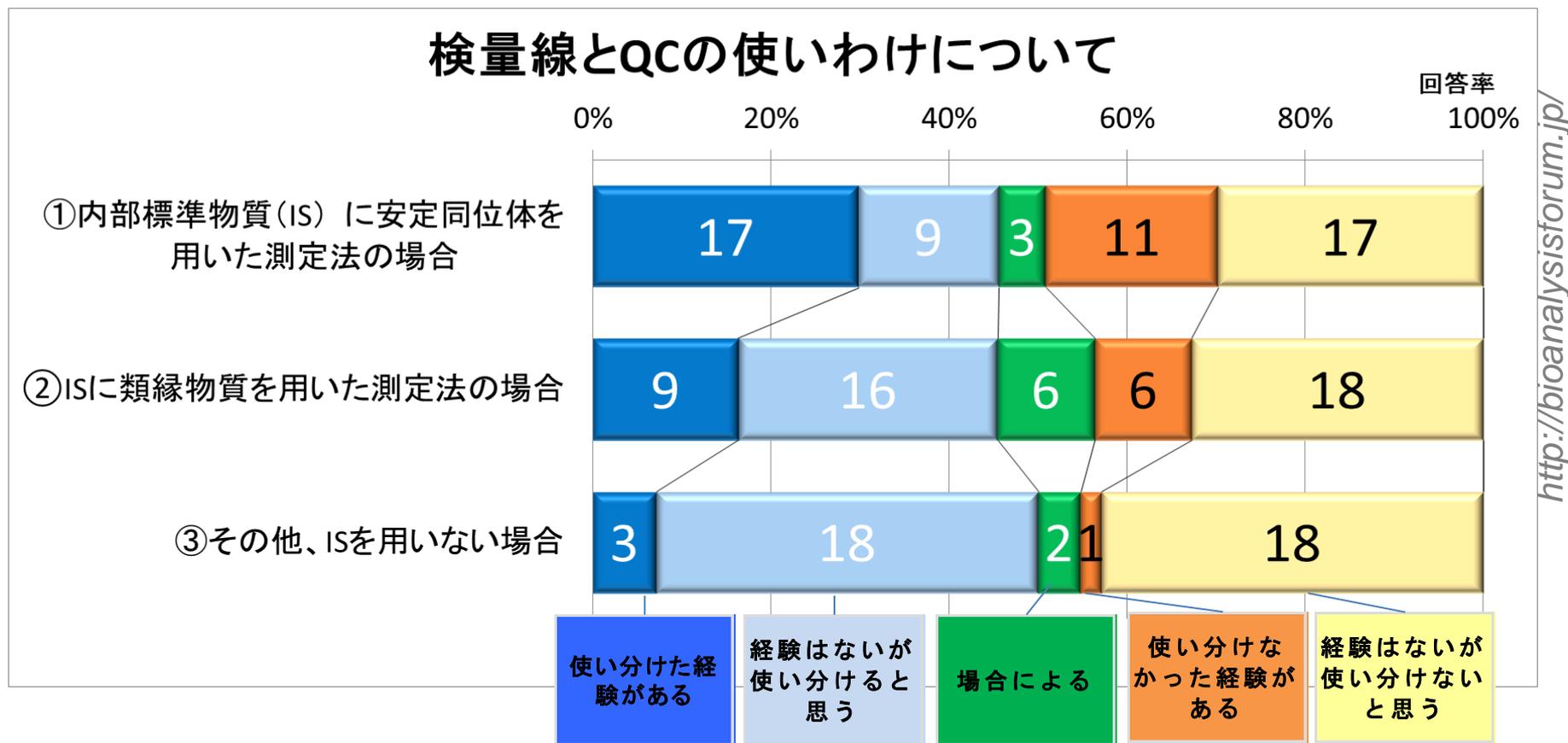
### ③「内因性成分を除去したマトリックス」+「内因性低値マトリックスを選別」+「特に無し」選択理由

- ✓ 固相(抗体)カラムなどで処理。低値マトリックスより安定して入手可能。
- ✓ 特定の内因性を除去できる方法があれば使いたい。
- ✓ 最も実サンプルに近い。マトリックス効果の評価には一番妥当。入手困難。
- ✓ ケースバイケース。適切に定量できるものであれば良い。

回答を尊重しできるだけ原表現で記載させていただいておりますが、一部まとめさせていただいた部分がありますのでご了承ください。

# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q9-1 検量線とQC試料で異なるマトリックスを使用する場合も考えられます。代替マトリックスの使い分けについて教えてください。



# ブランクマトリックス・代替マトリックス

Q9-2 検量線とQC試料で異なるマトリックスを使用する場合も考えられます。代替マトリックスの使い分けについて教えてください。また、各質問で「場合による」を選んだ方はその理由の記載をお願いします。

## 理由・背景：代表例

### 「場合による」＋「使い分けた経験有り」選択理由

- ✓ 分析法確立の段階で代替マトリックスと生体試料とでマトリックス効果に差がない場合には、使い分けは不要と思われるが、差があった場合には、検量線は代替でも生体試料に添加したQCの確認が必要になってくる。
- ✓ マトリックス効果と回収率などの結果から、リスクアセスメントを実施する必要がある。
- ✓ 測定法の精度、回収率、マトリックス効果と測定目的により使い分ける。

回答を尊重しできるだけ原表現で記載させていただいておりますが、一部まとめさせていただいた部分がありますのでご了承ください。

**2014-08**

**バリデーション試験 (1)**

**Surrogate analyte,  
Accuracy & Precision, Matrix Effect, Selectivity,  
Stability**

---

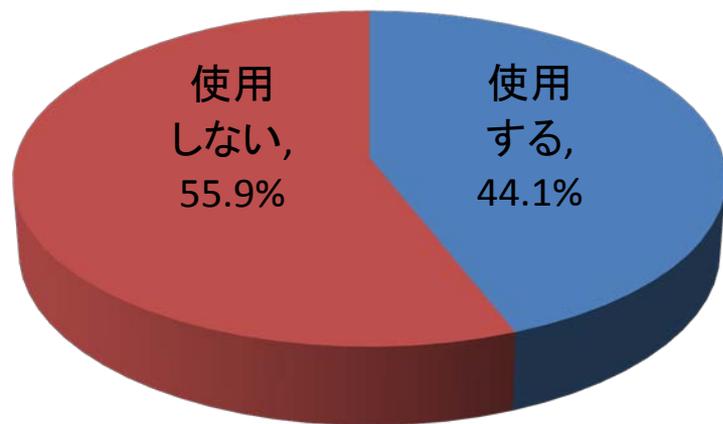
**落合 美登里 (東和薬品株式会社)**

**北嶋 千賀 (株式会社LSIメディエンス)**

**山口 建 (株式会社住化分析センター)**

## バリデーション試験 (Surrogate Analyte)

Q10 代替標準物質としてIS以外の測定対象物質の安定同位体を利用可能な場合、その安定同位体を代替標準物質として使用しますか。



有効回答数 59

回答	カウント(件)	割合(%)
使用する	26	44.1%
使用しない	33	55.9%

Q10 代替標準物質としてIS以外の測定対象物質の安定同位体を利用可能な場合、その安定同位体を代替標準物質として使用しますか。

理由・背景：代表例

①「使用する」選択理由

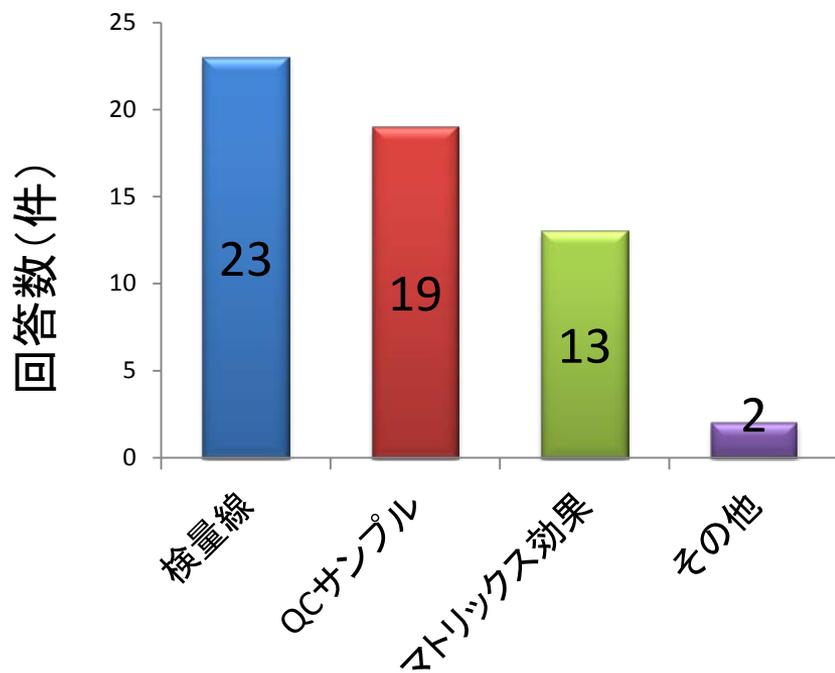
- ✓ 代替マトリックスについては検討はほぼ必要なくなる
- ✓ 代替マトリックスを使用するよりは実測試料を反映している
- ✓ 代替マトリックスが利用できないときには、有用
- ✓ 厳格な分析が必要なケースでは定量性が高い

②「使用しない」選択理由

- ✓ 代替標準物質と本来の標準物質との結果の妥当性の評価が必要
- ✓ 代替標準物質に含まれる測定対象物質の量を濃度依存的にモニターする必要がある
- ✓ 内因性物質の測定で一番担保すべきは、他のマトリックス由来成分との選択性。異なるモニタリングイオンで行う代替標準物質では、この選択性が担保できない
- ✓ 合成コストとの兼ね合いで諦める可能性が高い

## バリデーション試験 (Surrogate Analyte)

Q11 代替標準物質はどのサンプルに使用しますか？  
(複数選択可)



有効回答数 25

	回答	カウント(件)
①	検量線	23
②	QCサンプル	19
③	マトリックス効果	13
④	その他	2

## Q11 代替標準物質はどのサンプルに使用しますか？ (複数選択可)

### 理由・背景：代表例

#### ①「検量線」+「QCサンプル」選択理由

- ✓ 標準物質の代わりに利用するため、検量線・QCどちらでも用いるべき
- ✓ 検量線とQCの真度精度が、常に確保できるなら、さほどマトリックス効果のリスクは高くない

#### ②「検量線」+「QCサンプル」+「マトリックス効果」選択理由

- ✓ 検討して問題がないのであれば、すべてに適用する
- ✓ 安定同位体であれば、測定対象物質と物理化学的性質は同じである

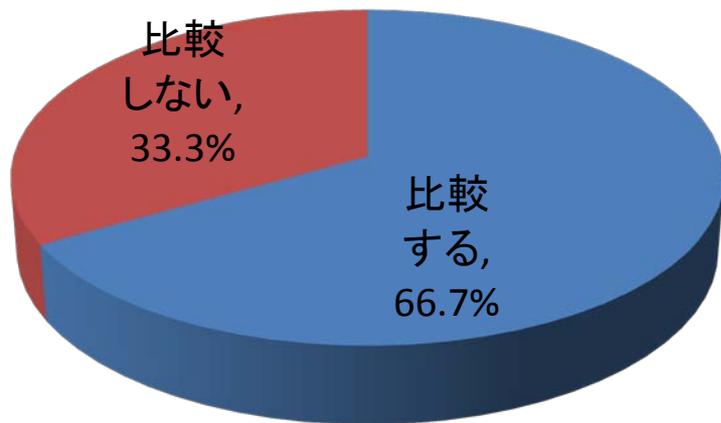
#### ③「検量線」+「マトリックス効果」選択理由

- ✓ 内因性物質に相当するピークが本当に内因性物質なのか判断することは困難。よって、夾雑のない検量線で測定したい。また、マトリックス効果の同等性を明確に確認したい。
- ✓ 測定対象物質は非標識体なので、バリデーションではその濃度が精度よく測定できることを保証する必要がある。

## バリデーション試験 (Surrogate Analyte)

Q12 代替標準物質と測定対象物質(非標識体)の比較はされますか？

有効回答数 24



回答	カウント(件)	割合(%)
比較する	16	66.7%
比較しない	8	33.3%

## Q12 代替標準物質と測定対象物質(非標識体)の比較はされますか？

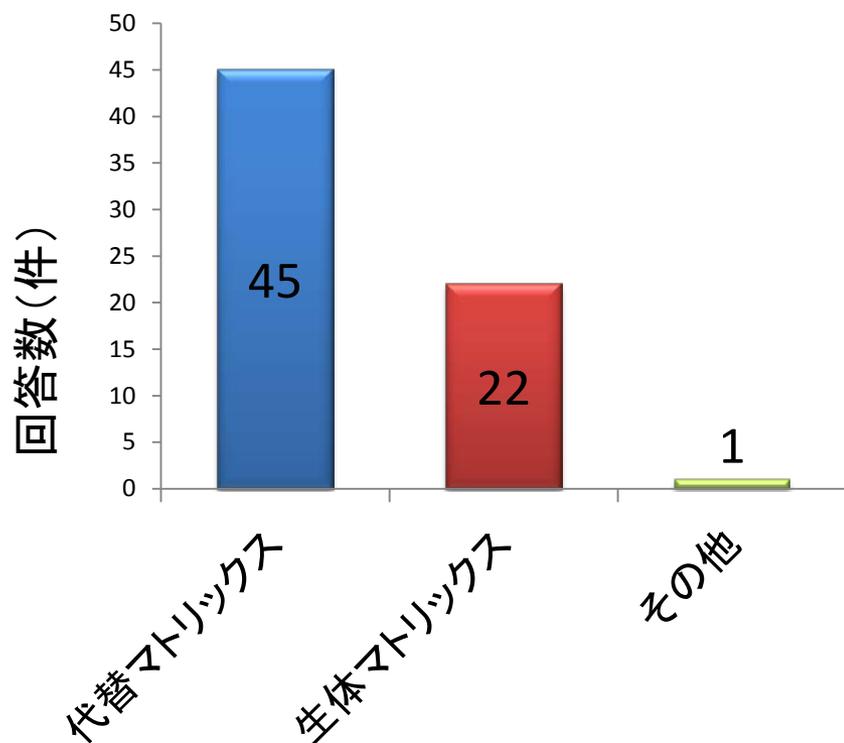
### 理由・背景：代表例

#### ①「比較する」選択理由

- ✓ ピーク形状, マトリクス効果等確認する必要がある
- ✓ 標準溶液レベルでイオン化効率が等しいことを確認する。
- ✓ マトリクス中で濃度を振ったときのシグナルの傾きが等しいことを確認する。
- ✓ 非標識QC試料の濃度を, 代替標準物質検量線で定量するとき, 添加濃度に応じた濃度になっていること(非標識と代替標準物質のレスポンスの同等性)を確認
- ✓ 代替標準物質を検量線に代替マトリクスで調整したQCサンプルを両方の標準物質で調製し差がないことなどを示す

Q13-1 A&Pの評価時に、検量線のマトリックスは何を使用しますか？(複数選択可)

【ISに安定同位体を用いた測定法の場合】

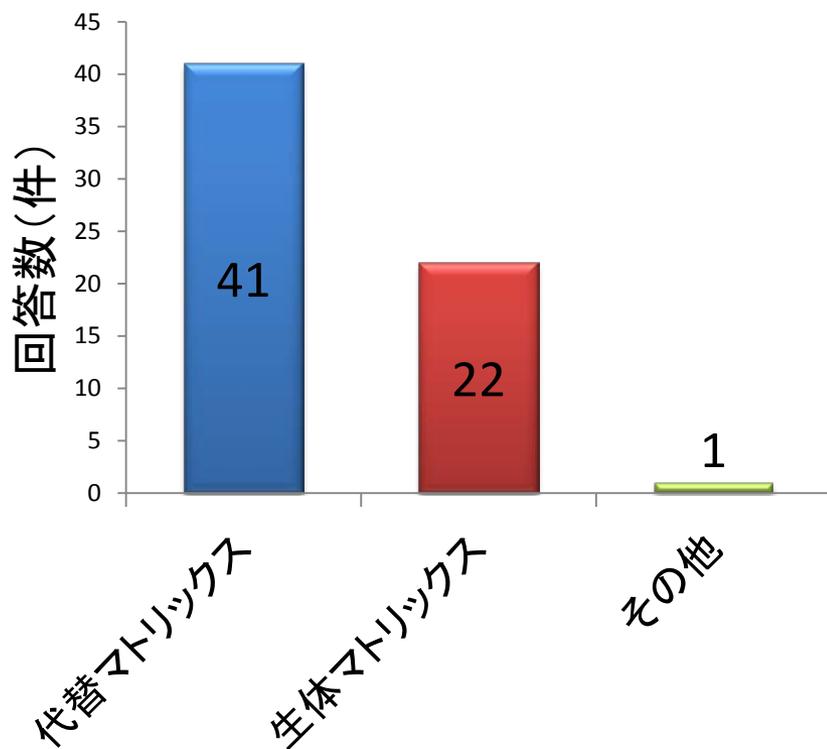


有効回答数 52

回答	カウント(件)
① 代替マトリックス	45
② 生体マトリックス	22
③ その他	1

Q13-2 A&Pの評価時に、検量線のマトリックスは何を使用しますか？(複数選択可)

**【ISに類縁物質を用いた測定法の場合】**



有効回答数 49

回答	カウント(件)
① 代替マトリックス	41
② 生体マトリックス	22
③ その他	1

Q13 A&Pの評価時に、検量線のマトリックスは何を使用しますか？

理由・背景：代表例

①「代替マトリックス」選択理由

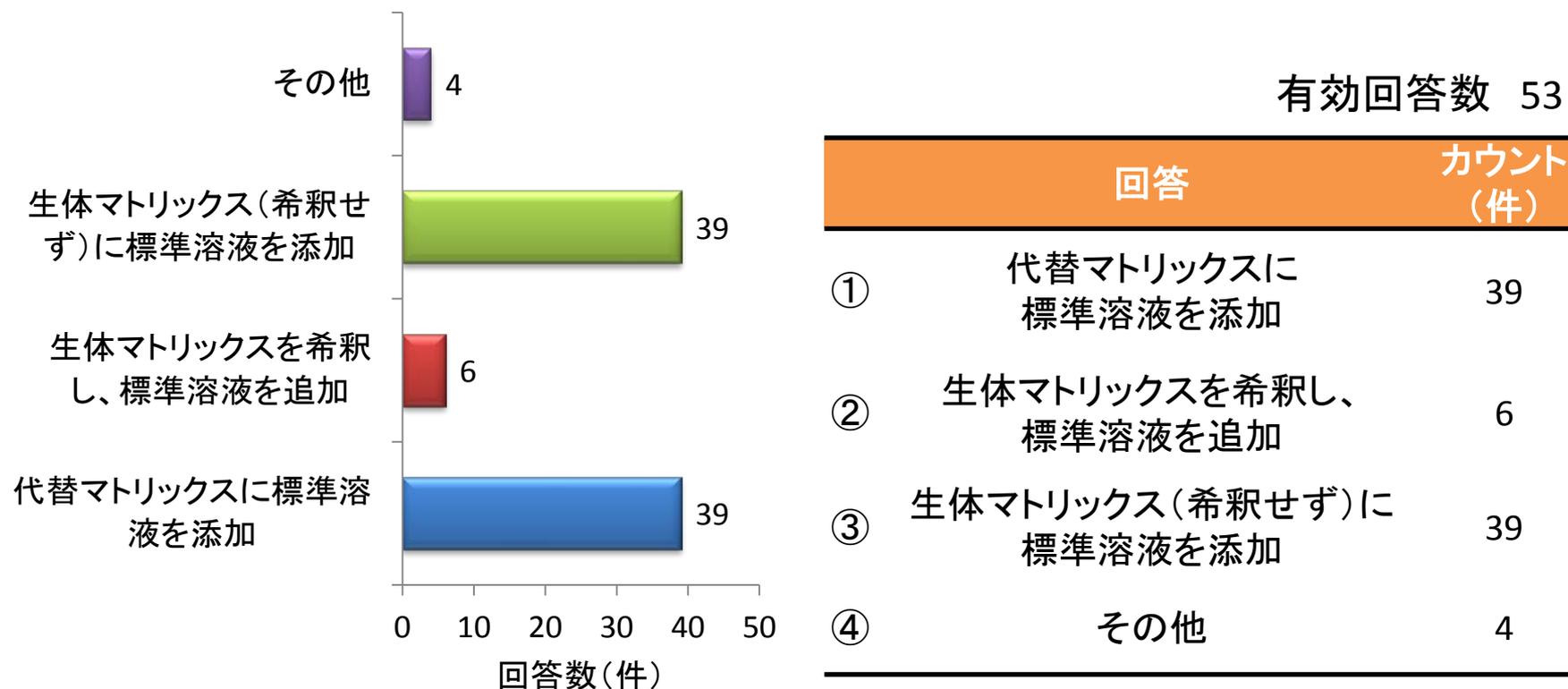
- ✓ これは第一選択であり、状況によっては他の選択もある

②選択なし

- ✓ 予め、生体マトリックスと代替マトリックスの検量線を比較し、代替可能であることを確認した後、代替マトリックスを使用してA&Pを確認

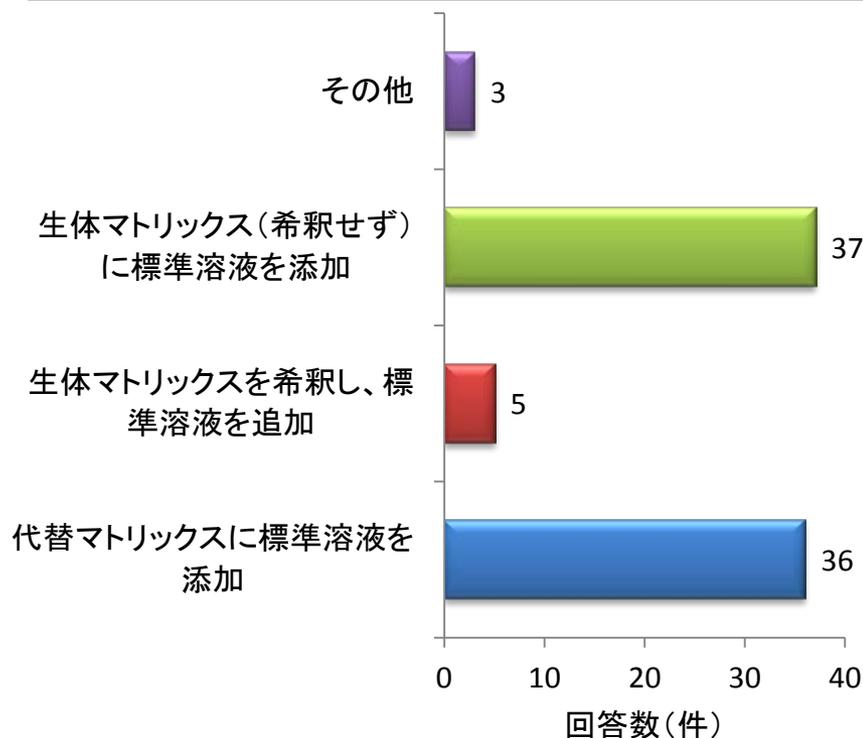
Q14-1 A&Pの評価時に、QCサンプルはどのように調製しますか？(複数選択可)

**【ISに安定同位体を用いた測定法の場合】**



Q14-2 A&Pの評価時に、QCサンプルはどのように調製しますか？(複数選択可)

【ISに類縁物質を用いた測定法の場合】



有効回答数 50

回答	カウント (件)
① 代替マトリックスに標準溶液を添加	36
② 生体マトリックスを希釈し、標準溶液を追加	5
③ 生体マトリックス(希釈せず)に標準溶液を添加	37
④ その他	3

Q14 A&Pの評価時に、QCサンプルはどのように調製しますか？

理由・背景：代表例

①「代替マトリックスに標準溶液を添加」+「生体マトリックス(希釈せず)に標準溶液を添加」選択理由

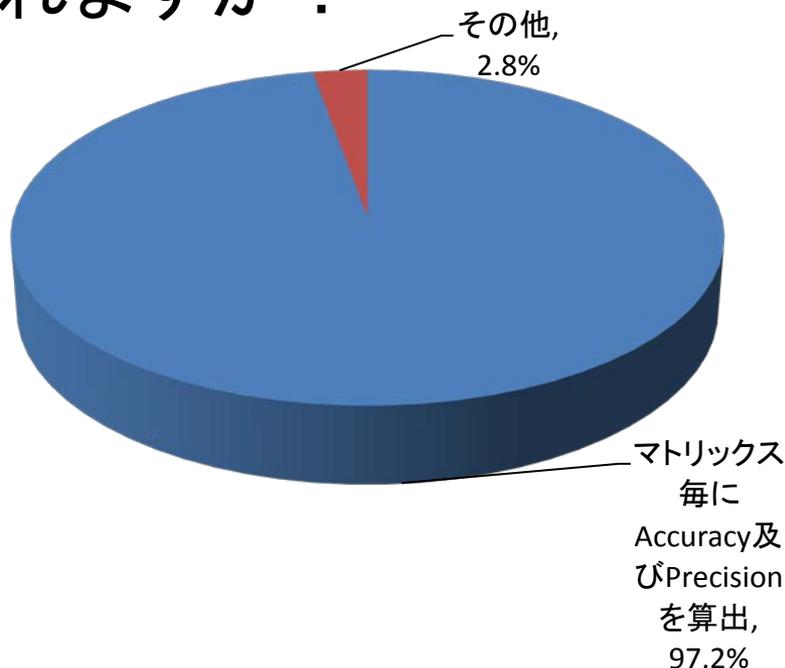
- ✓ 実試料の測定試験においてQC試料を代替マトリックスで調製する予定の場合は、代替マトリックスでの再現性を実施
- ✓ 可能な限り生体マトリックス中でのA&Pを評価したいが、内因性物質の濃度によっては、低濃度域等のA&Pが評価できないことが想定されるため、代替マトリックスとの併用が必要

②「代替マトリックスに標準溶液を添加」+「生体マトリックス(希釈せず)に標準溶液を添加」+「その他」選択理由

- ✓ 生体マトリックスに標準溶液は添加せずに使用

Q15 A&Pの評価時のQCサンプル調製に生体マトリックス・代替マトリックスの両方を使用される方のみご回答ください。Accuracy及びPrecisionの評価はどのように実施されますか？

有効回答数 36



回答	カウン ト(件)	割合 (%)
マトリックス毎にAccuracy及びPrecisionを算出	35	97.2%
その他	1	2.8%

Q15 A&Pの評価時のQCサンプル調製に生体マトリックス・代替マトリックスの両方を使用される方のみご回答ください。Accuracy及びPrecisionの評価はどのように実施されますか？

理由・背景：代表例

- ①「マトリックス毎にAccuracy及びPrecisionを算出」選択理由  
✓ 両方が基準値を満たせば、実測時のQCは代替でもよいと考える。
- ②「その他」選択理由  
✓ 代替マトリックスQC, 生体マトリックスQC(標準溶液添加) → AccuracyおよびPrecision  
生体マトリックス(標準溶液無添加) → Precision

## バリデーション試験 (Accuracy and Precision)

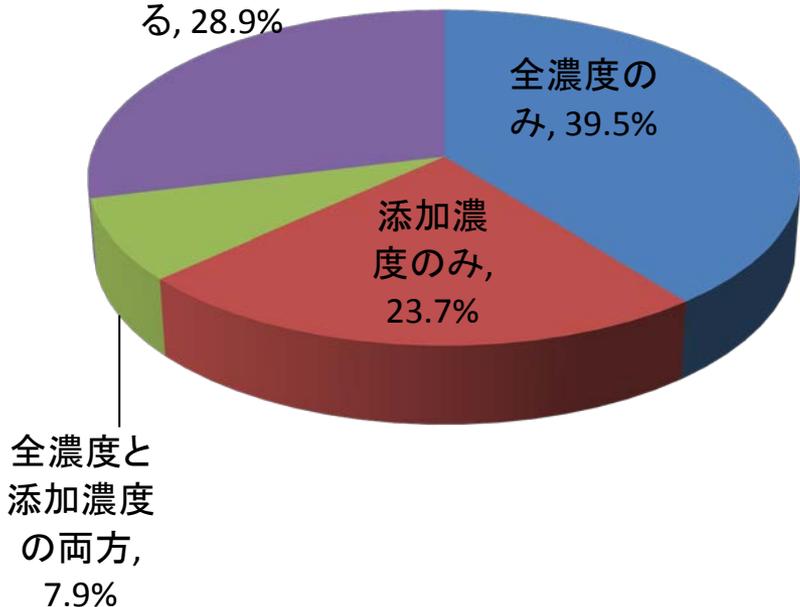
Q16 Q14のQCサンプル調製方法として、『生体マトリックスを希釈し、標準溶液を添加』または『生体マトリックス(希釈せず)に標準溶液を添加』を選択された場合のみご回答ください。 A&Pをどのように評価しますか？

選択肢の『全濃度』および『添加濃度』は下記の式から算出するものとします。

- ・全濃度 = マトリックス由来濃度 + 添加濃度
- ・添加濃度 = 全濃度 - マトリックス由来濃度

場合により使い分けしている, 28.9%

有効回答数 38



回答	カウント (件)	割合 (%)
① 全濃度のみ	15	39.5%
② 添加濃度のみ	9	23.7%
③ 全濃度と添加濃度の両方	3	7.9%
④ 場合により使い分けしている	11	28.9%

Q16 Q14のQCサンプル調製方法として、『生体マトリックスを希釈し、標準溶液を添加』または『生体マトリックス(希釈せず)に標準溶液を添加』を選択された場合のみご回答ください。A&Pをどのように評価しますか？

### 理由・背景：代表例

#### ①「全濃度のみ」選択理由

✓ マトリックス由来濃度と添加濃度の比率によっては、添加濃度で評価できない。

#### ②「添加濃度のみ」選択理由

✓ マトリックス由来濃度の算出誤差は測定誤差に含めて評価する。

✓ 測定誤差に含まれない程度の添加濃度を設定するため。

#### ③「全濃度と添加濃度の両方」選択理由

✓ 濃度が少ない場合測定誤差に含まれてしまうため。

✓ 両方で確認しておく方が、トラブル時に何が起きているかがつかみやすい。

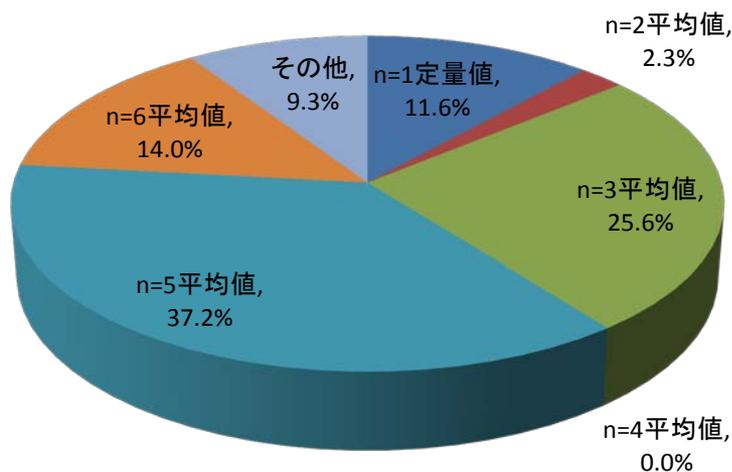
#### ④「場合により使い分けしている」選択理由

✓ 真度は添加濃度で算出。精度は全濃度で算出。

✓ 基本は総量と添加量の両方を評価したいが、精度の関係で無理な場合は、評価目的に依存

Q17 Q16の設問の評価時のマトリックス由来濃度はどのように算出しますか？

有効回答数 43



	回答	カウント(件)	割合(%)
①	n=1定量値	5	11.6%
②	n=2平均値	1	2.3%
③	n=3平均値	11	25.6%
④	n=4平均値	0	0.0%
⑤	n=5平均値	16	37.2%
⑥	n=6平均値	6	14.0%
⑦	その他	4	9.3%

Q17 Q16の設問の評価時のマトリックス由来濃度はどのように算出しますか？

理由・背景：代表例

①「n=5平均値」選択理由

- ✓ 通常のA&Pと同等にしている
- ✓ 定量下限およびLQCでの真値の基準は一段緩める 20%→25% 15%→20%

②「n=6平均値」選択理由

- ✓ 選択性の評価基準程度の例数
- ✓ CV15% or 20%以内
- ✓ CV%: 15%以内、個別のRE%: ±15%以内

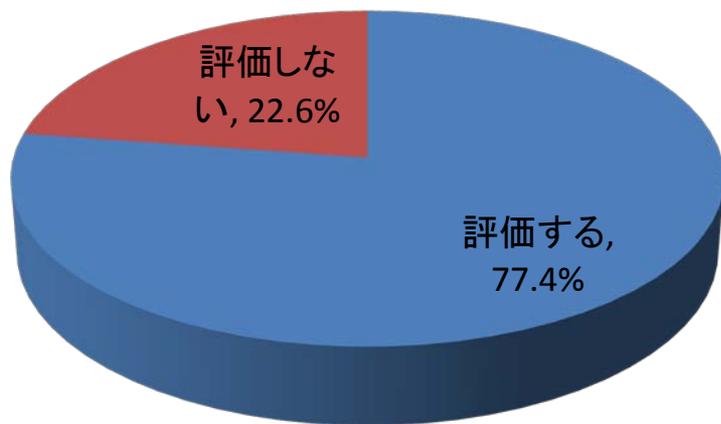
③「その他」選択理由

- ✓ 3分析単位(各分析単位のn数は6)の平均値
- ✓ とくに定まった基準はない
- ✓ 系の精度に依存する

## バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q23 マトリックス効果は評価しますか？ 評価しない場合はその理由をお教えてください。

有効回答数 53



	回答	カウント(件)	割合(%)
①	評価する	41	77.4%
②	評価しない	12	22.6%

# バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q23 マトリックス効果は評価しますか？ 評価しない場合はその理由をお教えてください。

## 理由・背景：代表例

### ①「評価する」選択理由

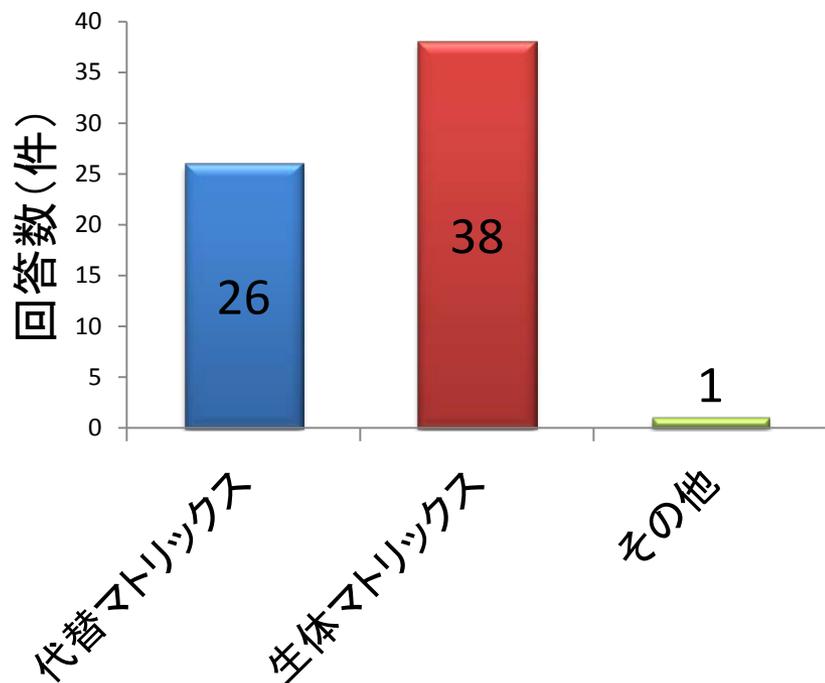
- ✓ 評価はするが、評価方法は定まっていない。
- ✓ マトリックス効果というよりは、マトリックスによる影響を確認しておきたい

### ②「評価しない」選択理由

- ✓ 測定対象物質がマトリックスに含まれる場合はマトリックス効果を評価できないため
- ✓ 高濃度側のみ(あるいは中間濃度)での実施をする
- ✓ 今までは評価の要件に入っていなかったものでやらなかった

## バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q24 マトリックス効果サンプルのマトリックスは何を使用しますか？(複数選択可)



有効回答数 42

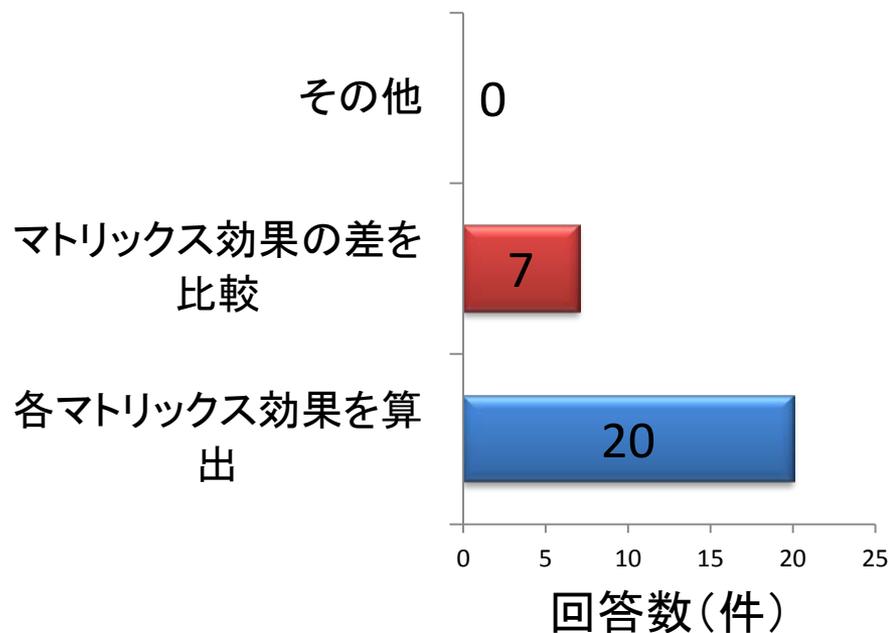
回答	カウント (件)
① 代替マトリックス	26
② 生体マトリックス	38
③ その他	1

## バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q25 マトリックス効果サンプルを生体マトリックス・代替マトリックスの両方で評価する方にのみご回答ください。マトリックス効果はどのように評価をしますか？

(複数選択可)

有効回答数 25



回答	カウント (件)
① 各マトリックス効果を算出	20
② マトリックス効果の差を比較	7
③ その他	0

# バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q25 マトリックス効果サンプルを生体マトリックス・代替マトリックスの両方で評価する方にのみご回答ください。マトリックス効果はどのように評価をしますか？

## 比較方法

### ①「マトリックス効果の差を比較」比較方法

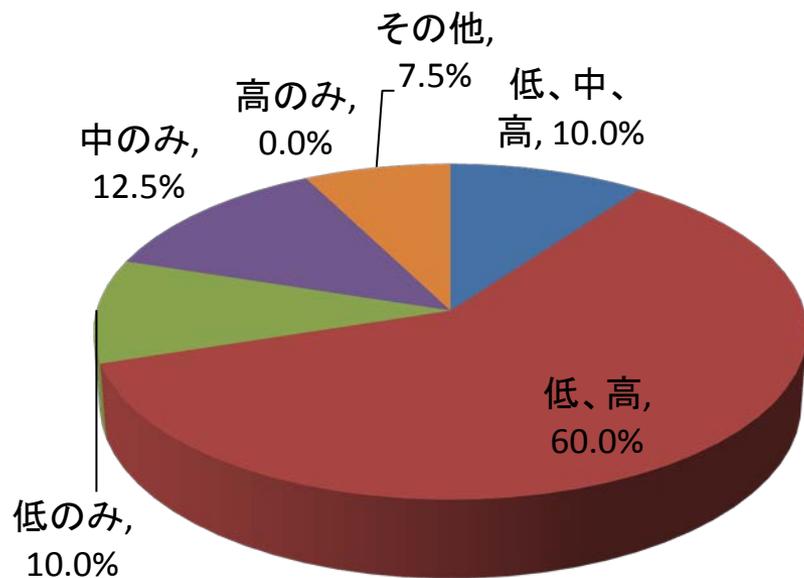
- ✓ 前処理後の試料に一定量のISを添加し、ISのイオン強度を比較する。
- ✓ (標準添加の生体マトリックス-生体マトリックス)/標準添加の代替マトリックス
- ✓ マトリックスファクターの比較

### ①「各マトリックス効果を算出」+「マトリックス効果の差を比較」比較方法

- ✓ QCサンプルでの評価
- ✓ 生体マトリックスに既に存在している内因性物質濃度を算出して、生体マトリックス及び代替マトリックスに測定対象物質を添加。生体マトリックスは添加差分を算出して、評価し、代替マトリックスとの差を比較する。

## バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q26 マトリックス効果のサンプルは検量線範囲中のどの濃度を調製しますか？



有効回答数 40

	回答	カウント(件)	割合(%)
①	低、中、高	4	10.0%
②	低、高	24	60.0%
③	低のみ	4	10.0%
④	中のみ	5	12.5%
⑤	高のみ	0	0.0%
⑥	その他	3	7.5%

# バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q26 マトリックス効果のサンプルは検量線範囲中のどの濃度を調製しますか？

## 理由・背景：代表例

### ①「低、中、高」選択理由

- ✓ 3濃度必要と考えるので、生体マトリックスでベースラインと添加濃度2濃度を設定

### ②「低、高」選択理由

- ✓ 低分子分析の条件を参考
- ✓ 低濃度が影響を受けやすいが、一方でイオン化の飽和もあり得るため

### ③「低のみ」選択理由

- ✓ 低濃度ほど影響をうけるため

### ④「中のみ」選択理由

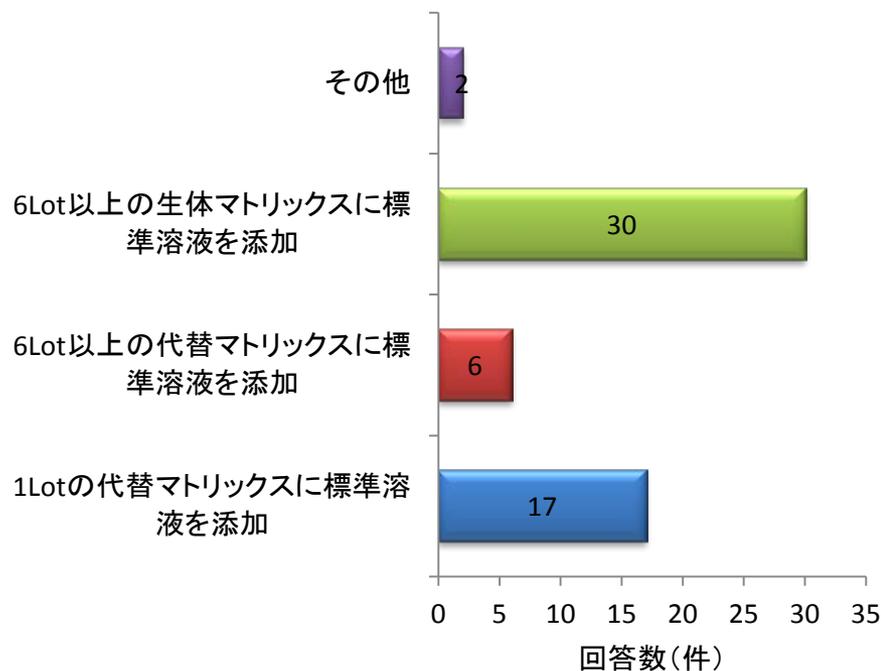
- ✓ 影響なく評価できる、比較的低い濃度
- ✓ BMV-GLに濃度記載はないため。

### ⑤「その他」選択理由

- ✓ マトリックス効果がある場合に、影響を受けやすいためLLOQサンプルを調製

## バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q27 マトリックス効果のサンプルはどのように調製しますか？（複数選択可）



有効回答数 40

回答	カウント (件)
① 1Lotの代替マトリックスに標準溶液を添加	17
② 6Lot以上の代替マトリックスに標準溶液を添加	6
③ 6Lot以上の生体マトリックスに標準溶液を添加	30
④ その他	2

Q27 マトリックス効果のサンプルはどのように調製しますか？

理由・背景：代表例

①「1Lotの代替マトリックス」+「6Lot以上の生体マトリックス」選択理由

✓ 代替マトリックスが水、緩衝液等の場合は、調製日により組成は大きく変わらないので1Lot

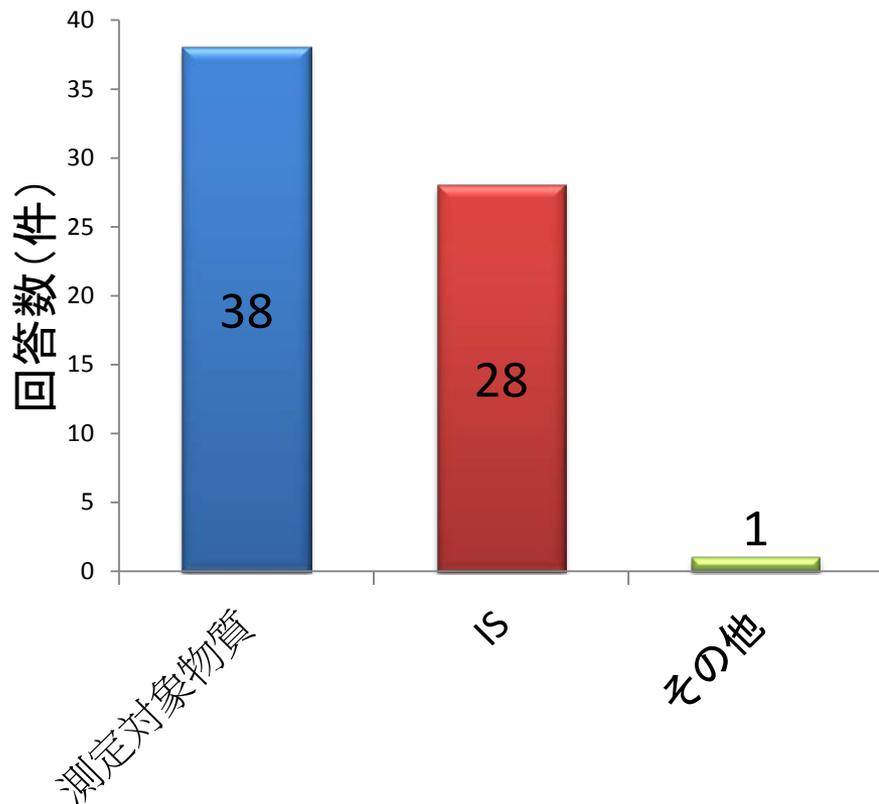
②「その他」選択理由

✓ 可能な範囲で数ロット

✓ 複数のロットとするが、確保困難なマトリックスの場合は考慮

## バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q28 マトリックス効果は何を評価に使用しますか？(複数選択可)



有効回答数 40

	回答	カウント(件)
①	測定対象物質	38
②	IS	28
③	その他	1

## Q28 マトリックス効果は何を評価に使用しますか？

## 理由・背景：代表例

## ①「測定対象物質」+「IS」選択理由

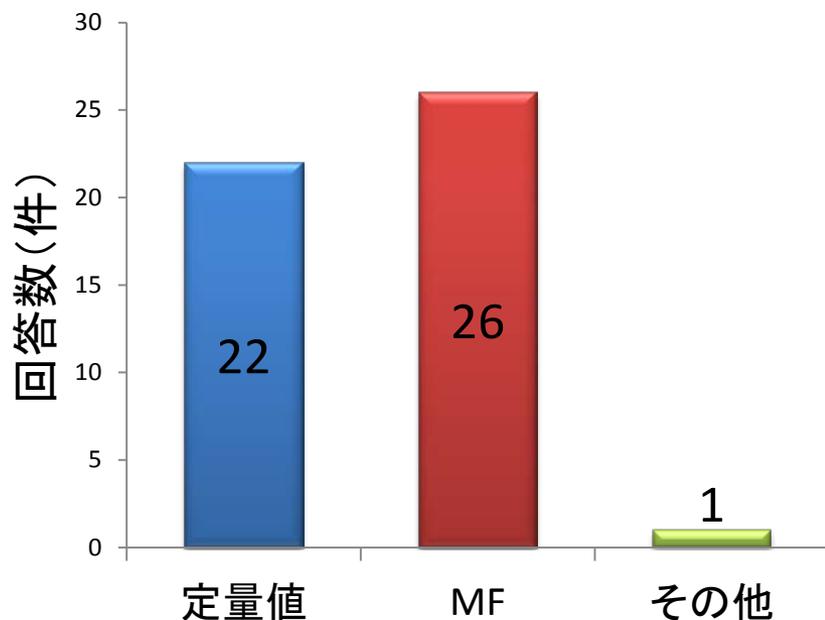
- ✓ ISで標準化したMF
- ✓ 安定同位体ISがある場合はISを, ない場合は測定対象物質を使用
- ✓ 生体マトリックスは添加濃度に対する定量値で判断
- ✓ 通常の評価と同様に運用

## ②「測定対象物質」+「その他」選択理由

- ✓ 測定対象物質濃度が高い場合は測定対象物質を用いて評価できない場合がある。安定同位体を用いる場合もある。

## バリデーション試験 (Matrix Effect)

Q29 マトリックス効果はどのように評価しますか？  
(複数選択可)



有効回答数 39

回答	カウント(件)
① 定量値	22
② MF	26
③ その他	1

Q29 マトリックス効果はどのように評価しますか？

理由・背景：

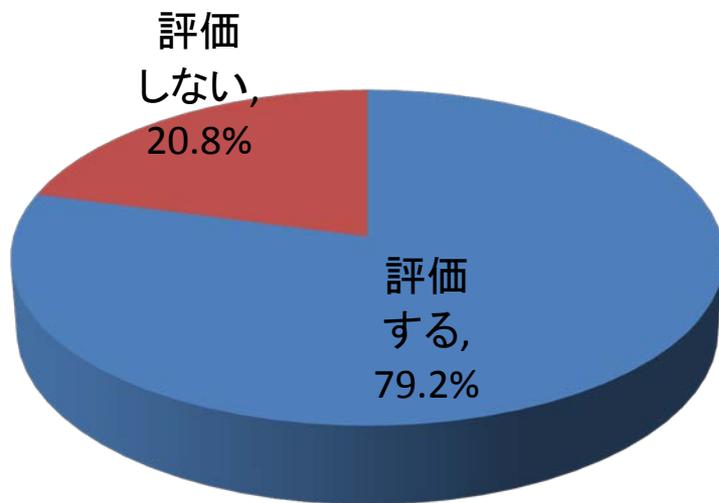
①「その他」選択理由

✓ ロットごとに検量線を作成し、その傾きに差がないことを評価

## バリデーション試験 (Selectivity)

Q30 Selectivityは評価しますか？評価しない場合はその理由をお教えてください。

有効回答数 53



回答	カウント(件)	割合(%)
評価する	42	79.2%
評価しない	11	20.8%

# バリデーション試験（Selectivity）

Q30 Selectivityは評価しますか？評価しない場合はその理由をお教えてください。

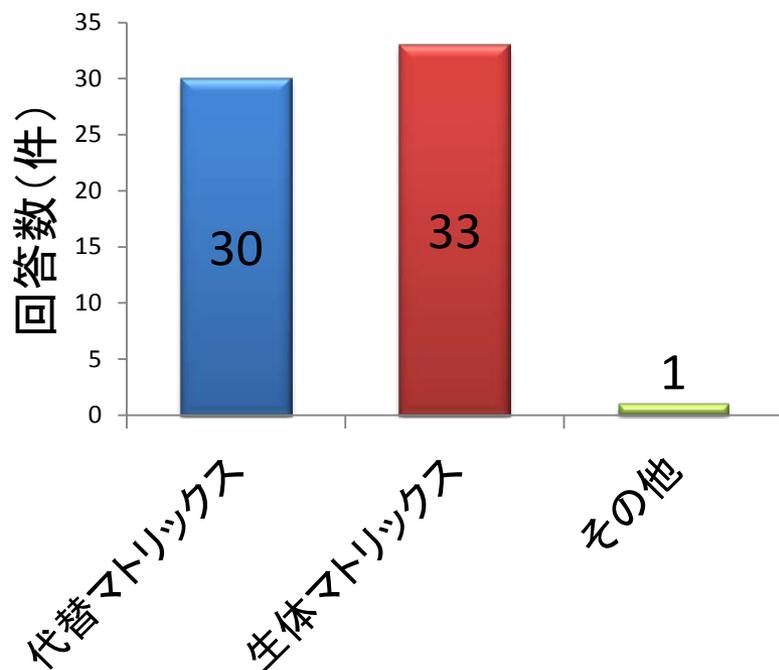
## 理由・背景：代表例

①「評価しない」選択理由

- ✓ 測定対象物質がマトリックスに含まれると評価できない

## バリデーション試験 (Selectivity)

Q31 Selectivityサンプルのマトリックスは何を使用しますか？(複数選択可)



有効回答数 42

	回答	カウント(件)
①	代替マトリックス	30
②	生体マトリックス	33
③	その他	1

Q31 Selectivityサンプルのマトリックスは何を使用しますか？

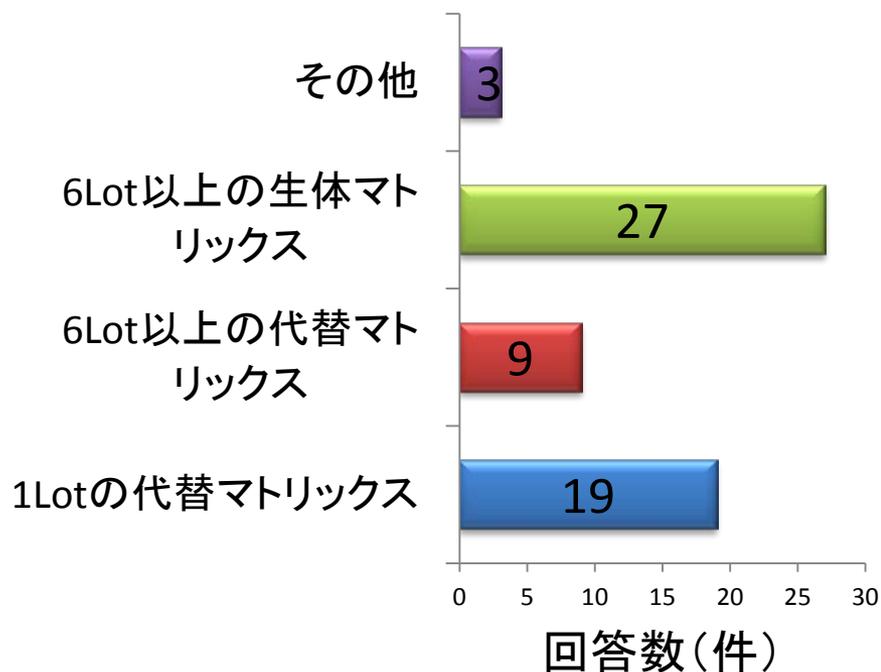
理由・背景

①「代替マトリックス」選択理由

- ✓ 代替マトリックスが生体マトリックスを反映しない場合があるのは理解しているが、代替マトリックスのデータは取得する。

## バリデーション試験 (Selectivity)

Q32 Selectivityのサンプルはどのように調製しますか？  
(複数選択可)



有効回答数 42

回答	カウント(件)
① 1Lotの代替マトリックス	19
② 6Lot以上の代替マトリックス	9
③ 6Lot以上の生体マトリックス	27
④ その他	3

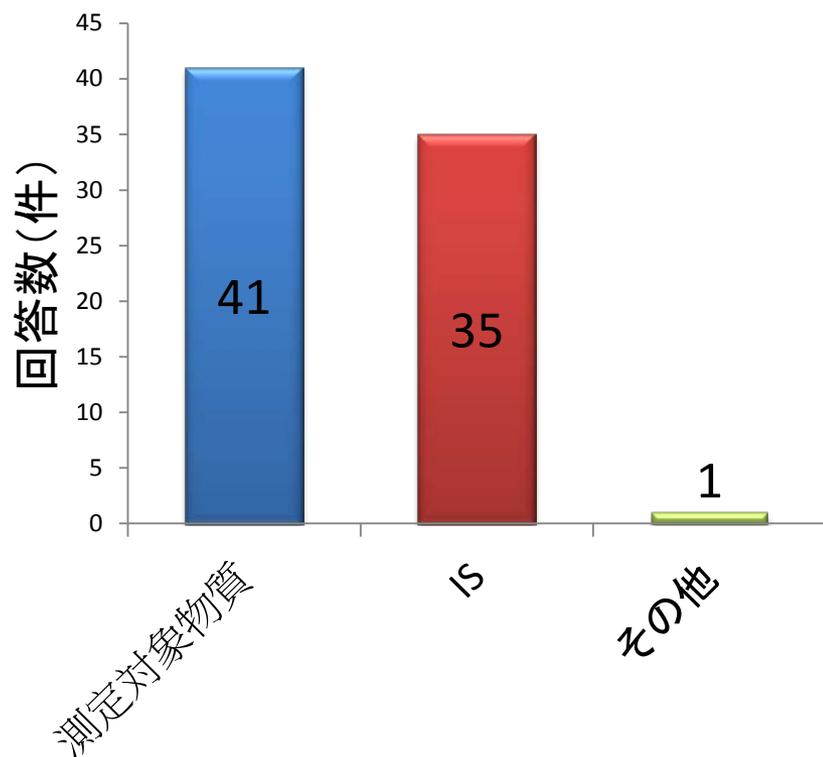
## Q32 Selectivityのサンプルはどのように調製しますか？

## 理由・背景：代表例

- ①「1Lotの代替マトリックス」選択理由
  - ✓ 生体マトリックスには内因性のものが含まれているため
- ②「6Lot以上の代替マトリックス」選択理由
  - ✓ 純粋なSelectivityは代替マトリックスのみでよい
- ③「6Lot以上の生体マトリックス」選択理由
  - ✓ 個体間での影響程度を評価。個体数は選択性評価時のGLの基準を参考。
  - ✓ 実試料定量時の検量線及びQCサンプル調製に生体マトリックスを使用するため
- ④「1Lotの代替マトリックス」+「6Lot以上の生体マトリックス」選択理由
  - ✓ 代替マトリックスが生体マトリックス由来であれば6Lot, 水・生理食塩液・緩衝液であれば1Lot.
  - ✓ 実試料定量時の検量線及びQCサンプル調製には代替マトリックスを使用するため。

## バリデーション試験 (Selectivity)

Q33 Selectivityは何を評価に使用しますか？  
(複数選択可)



有効回答数 42

回答	カウント(件)
① 測定対象物質	41
② IS	35
③ その他	1

## Q33 Selectivityは何を評価に使用しますか？

## 理由・背景：代表例

## ①「測定対象物質」選択理由

- ✓ 測定への影響と内因性の影響の両方を確認するため。

## ②「測定対象物質」+「IS」選択理由

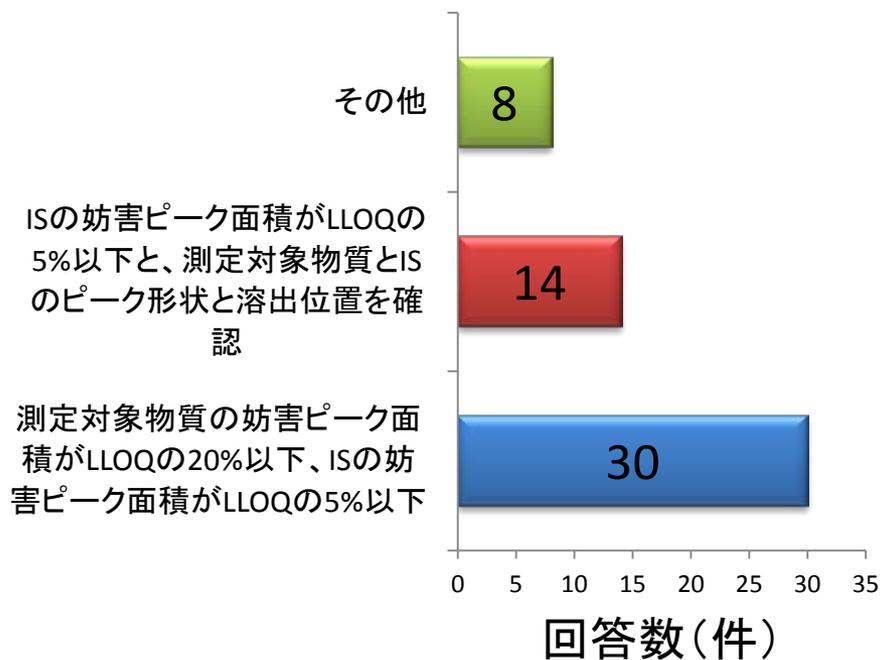
- ✓ AnalyteもISも予め夾雑ピークがかぶらないことは可能な限り確認

## ③「その他」選択理由

- ✓ 生体マトリックスについてはISのみ評価。代替マトリックスは測定対象物質とISの両方を評価。

## バリデーション試験 (Selectivity)

Q34 Selectivityはどのように評価しますか？  
(複数選択可)



有効回答数 42

回答	カウント(件)
① 測定対象物質の妨害ピーク面積がLLOQの20%以下、ISの妨害ピーク面積がLLOQの5%以下	30
② ISの妨害ピーク面積がLLOQの5%以下と、測定対象物質とISのピーク形状と溶出位置を確認	14
③ その他	8

## Q34 Selectivityはどのように評価しますか？

## 理由・背景：代表例

## &lt;選択肢&gt;

- ①測定対象物質の妨害ピーク面積がLLOQの20%以下、ISの妨害ピーク面積がLLOQの5%以下
- ②ISの妨害ピーク面積がLLOQの5%以下と、測定対象物質とISのピーク形状と溶出位置を確認
- ③その他

## ①+②コメント

- ✓ 代替マトリックスは①、生体マトリックスは②

## ②+③コメント

- ✓ 測定対象物質除去マトリックスでピークが減少することを確認。
- ✓ ピークが単一成分から構成されているかどうか確認

## ③コメント

- ✓ ピーク単一成分であり、投与物と内因性物質が同じものであることを確認
- ✓ 定量値で評価
- ✓ LBAガイドライン的な手法で選択性を評価した法が良い場合がある

# 2014-08

## バリデーション試験 (2)

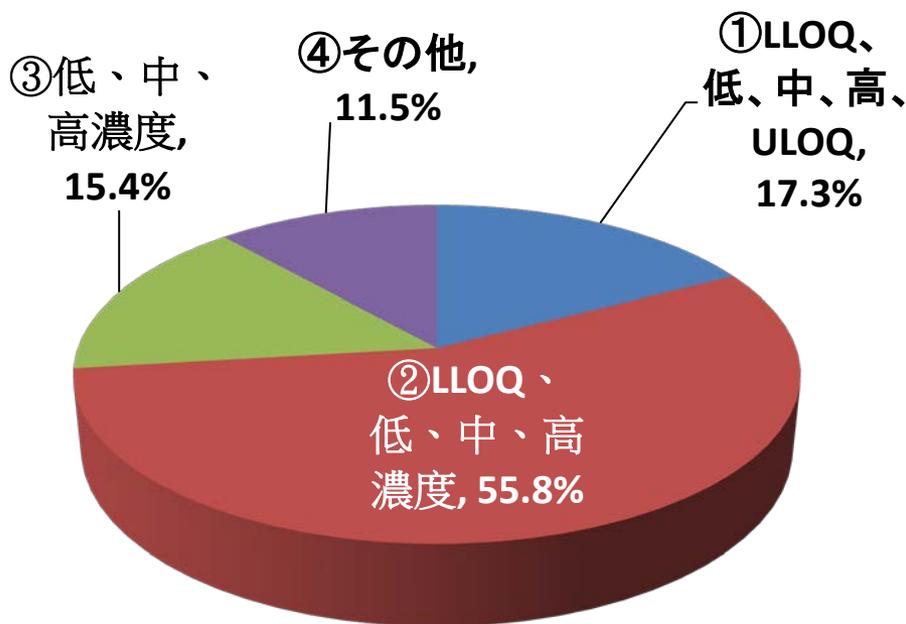
### Reproducibility, Stability

---

**若松 明 (グラクオ・スミスクライン株式会社)**  
**島田 英一 (小野薬品工業株式会社)**

# バリデーション試験 (Reproducibility)

Q18 再現性用試料の設定濃度数とその選択理由を回答してください



有効回答数52

回答	カウント (件)	割合 (%)
① LLOQ、低、中、高、ULOQ	9	17.3%
② LLOQ、低、中、高濃度	29	55.8%
③ 低、中、高濃度	8	15.4%
④ その他	6	11.5%

## Q18 再現性用試料の設定濃度数とその選択理由を回答してください

### 選択理由：代表例

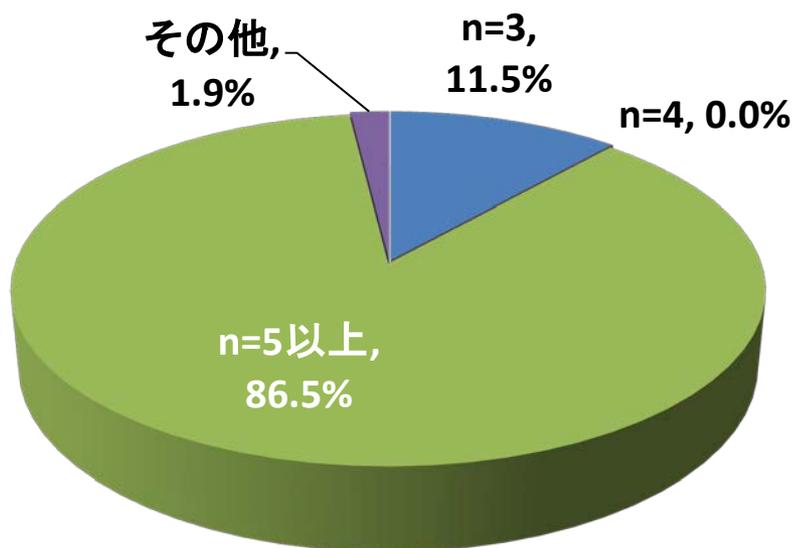
- ②「LLOQ, L, M, H」(55.8%)の選択理由
  - ✓ BMV GLに従う
  - ✓ ULOQを設定すると検量線上限を超える場合があるため.
  - ✓ 定量範囲を決めるためには, LLOQの評価が必要.
  - ✓ LLOQの評価は, 内因性物質の影響の度合いで決める.
- ①「LLOQ, L, M, H, ULOQ」(17.3%)の選択理由
  - ✓ 一般的な方法と基準を揃えるため
  - ✓ 検量線範囲の再現性を確認するべき.
- ③「L, M, H」(15.4%)の選択理由
  - ✓ LLOQの評価は難しい
  - ✓ バイオマーカー分析にバリデーションと同等の基準は必要ない

### その他の回答：代表例

- ✓ 実試料で得られる濃度範囲を網羅するように必要に応じて濃度設定を変更する.
- ✓ 代替マトリックスを使用する場合は, LLOQ, L, M, Hの4濃度. 生体マトリックスの場合はLLOQを除く.
- ✓ LLOQ, L, M, ULOQ(又はH)の4濃度
- ✓ M及びHの2濃度
- ✓ L,M,Hと無添加の4濃度

# バリデーション試験（Reproducibility）

Q19 再現性試験の，各濃度での繰り返し分析数とその理由を回答してください



有効回答数52

回答	カウント (件)	割合(%)
n=3	6	11.5%
n=4	0	0.0%
n=5以上	45	86.5%
その他	1	1.9%

# バリデーション試験 (Reproducibility)

Q19 再現性試験の、各濃度での繰り返し分析数とその理由を回答してください

## 選択理由：代表例

n=5以上 (86.5%) の選択理由

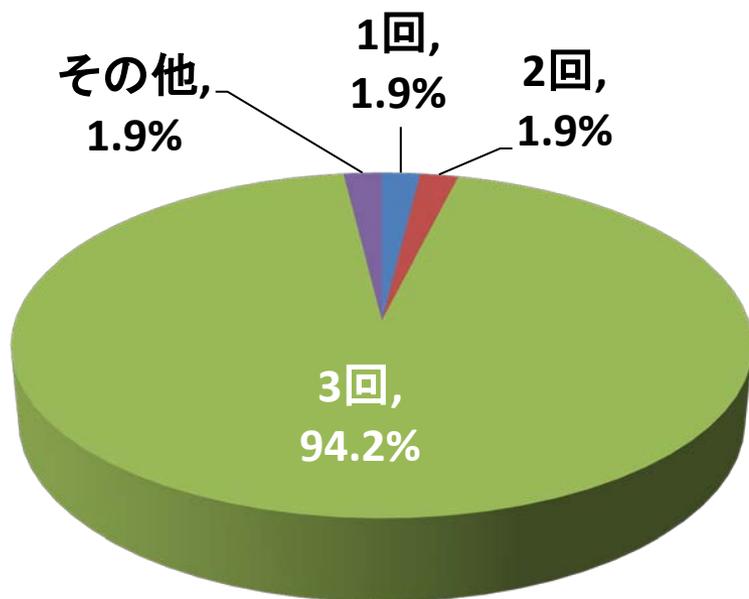
- ✓ BMV GLに従う  
(希少マトリックスの場合, n=3)
- ✓ 定量値のばらつきを考慮して, n=5以上で実施

## その他の回答：代表例

- ✓ 日内再現性n=5, 日間再現性n=2

# バリデーション試験（Reproducibility）

Q20 再現性試験の分析単位数とその理由を回答してください



有効回答数52

回答	カウント(件)	割合(%)
1回	1	1.9%
2回	1	1.9%
3回	49	94.2%
その他	1	1.9%

Q20 再現性試験の分析単位数とその理由を回答してください

選択理由：代表例

3回 (94.2%) の選択理由

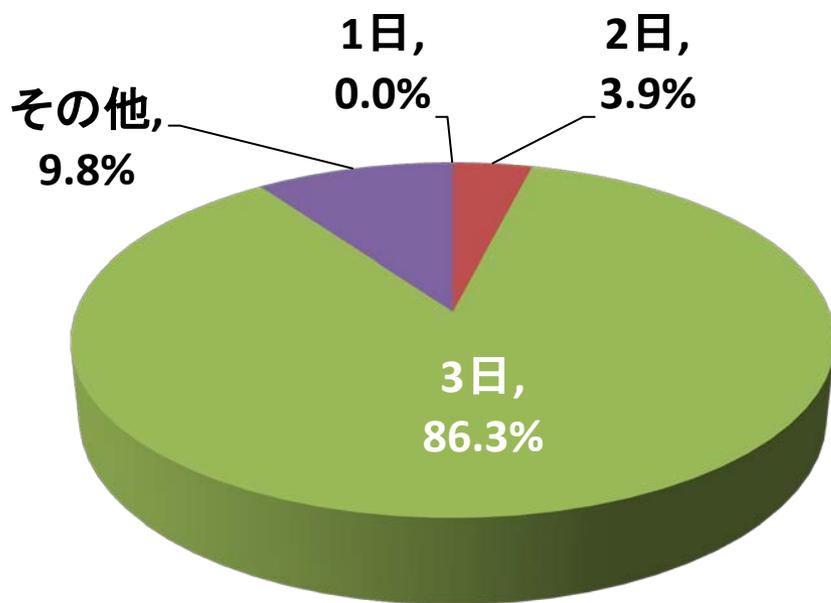
- ✓ BMV GLに従う  
(希少マトリックスの場合は他の項目と兼ねることもある)
- ✓ 分析単位間の再現性を確認するためには最低3回必要.
- ✓ マトリックスの再現性は3回. 代替マトリックスの再現性は1回.

その他の回答：代表例

- ✓ 回答なし

## バリデーション試験（Reproducibility）

Q21 前の質問で分析単位数2回以上を選択された方は、何日間で実施しますか？



有効回答数51

回答	カウント(件)	割合(%)
1日	0	0.0%
2日	2	3.9%
3日	44	86.3%
その他	5	9.8%

# バリデーション試験 (Reproducibility)

Q21 前の質問で分析単位数2回以上を選択された方は、何日間で実施しますか？

## 選択理由：代表例

3日 (86.3%) の理由

- ✓ 日間変動を考慮  
分析単位は日をかえて実施する.
- ✓ PK分析と併せる

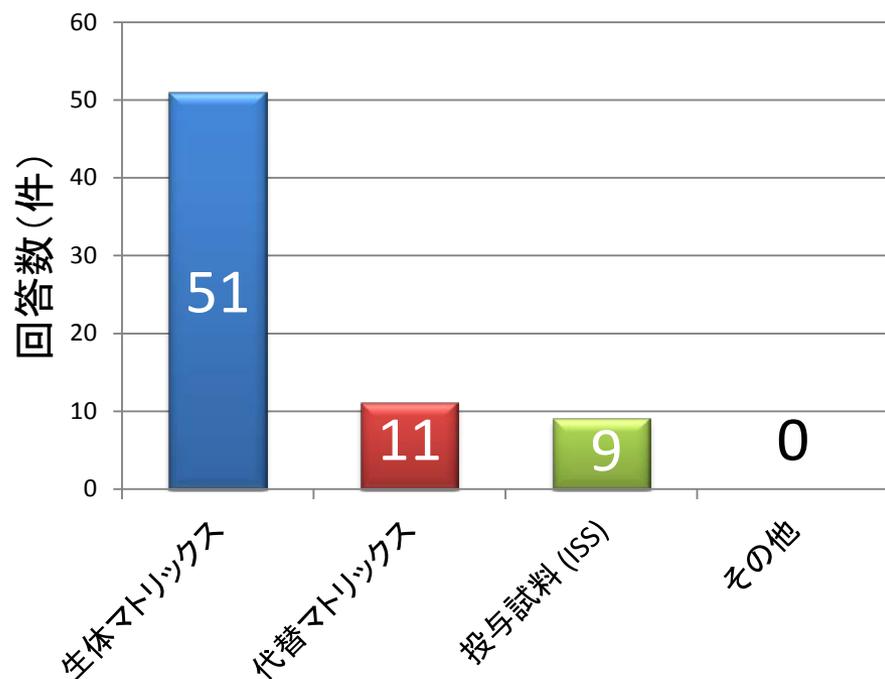
## その他の回答：代表例

その他の回答；

- ✓ EMAのGLに準じて2日以上
- ✓ 日にちではなく、分析単位が複数であることが重要.
- ✓ 特に基準なし

# バリデーション試験 (Stability)

Q35 安定性用試料の調製には、どのマトリックスを使用しますか？また、その理由をご回答ください。(複数選択可)



有効回答数53:複数選択可

回答	カウント (件)
生物マトリックス	51
代替マトリックス	11
投与試料 (ISS)	9
その他	0

# バリデーション試験（Stability）

Q35 安定性用試料の調製には、どのマトリックスを使用しますか？また、その理由をご回答ください（複数選択可）

## 選択理由：代表例

### <①生体マトリックスのみ>選択(35件)の理由

- ✓ 実際の試料に合わせる
- ✓ 内因性物質を投与する前提のため

### <①>と<②代替マトリックス>選択(8件)の理由

- ✓ 実試料分析時のQC試料を代替マトリックスで調製するため、①と②両方

### <①>と<③投与試料ISS>選択(6件)の理由

- ✓ 投与試料があればISS、なければ①

### <①><②><③>選択(2件)の理由

- ✓ どうしても入手できないマトリックスISSで評価

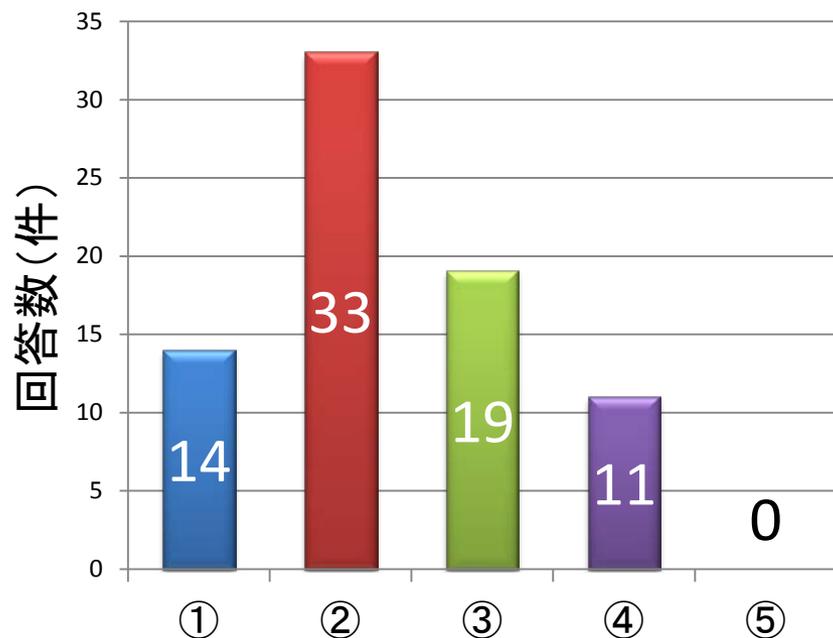
## その他の回答：代表例

その他の回答；

- ✓ なし

## バリデーション試験 (Stability)

Q36 安定性用試料はどのような方法で調製しますか？  
また、その理由をご回答ください(複数選択可)



有効回答数53:複数選択可

回答	カウント (件)
①生体マトリックスのみ	14
②生体マトリックスに標準物質を添加	33
③①と②を両方	19
④代替マトリックスに標準物質を添加	11
⑤その他	0

# バリデーション試験（Stability）

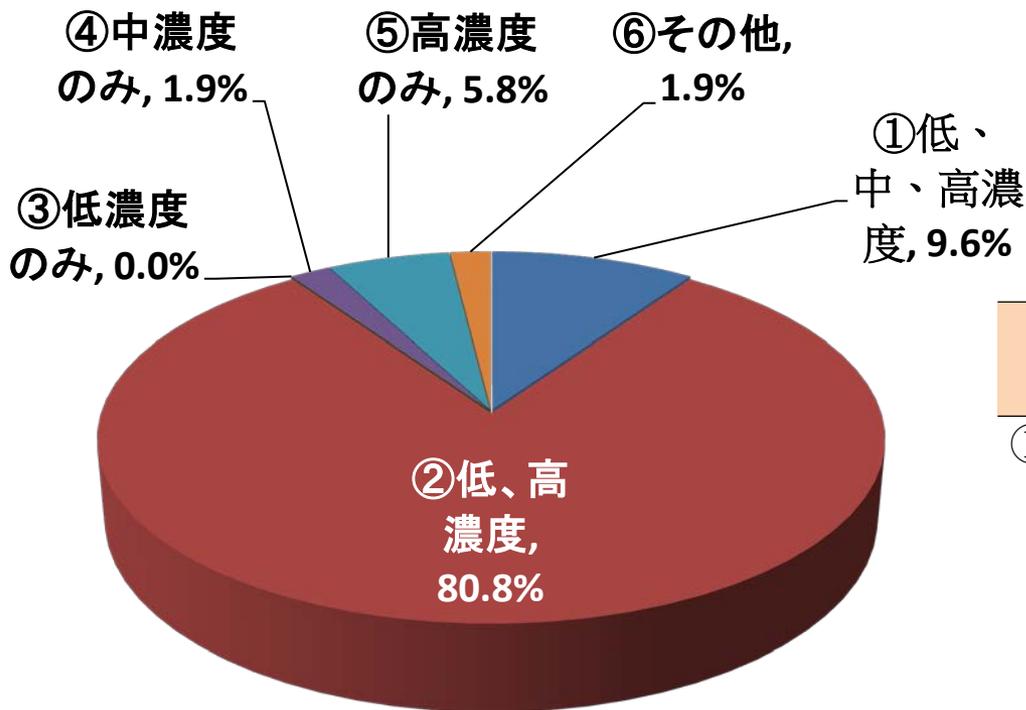
Q36 安定性用試料はどのような方法で調製しますか？  
また、その理由をご回答ください（複数選択可）

## 選択理由：代表例

- ✓ 代替マトリックスを使用しない場合：生体マトリックス（生体マトリックスのみ＋標準物質添加）
- ✓ 代替マトリックスを使用する場合：上記＋代替マトリックスに標準物質添加

## バリデーション試験 (Stability)

Q37 前の質問で②～⑤を選択された方のみご回答ください。安定性用試料はどの濃度を調製しますか？



有効回答数52

回答	カウント (件)	割合(%)
①低、中、高濃度	5	9.6%
②低、高濃度	42	80.8%
③低濃度のみ	0	0.0%
④中濃度のみ	1	1.9%
⑤高濃度のみ	3	5.8%
⑥その他	1	1.9%

# バリデーション試験 (Stability)

Q37 前の質問で②～⑤を選択された方のみご回答ください。安定性用試料はどの濃度を調製しますか？

## 選択理由：代表例

<②低、高濃度(42件)>選択の理由

- ✓ BMV-GLに準じる
- ✓ 慣習など

<⑤高濃度(3件)>選択の理由

- ✓ 低濃度は内因性物質濃度を利用、高濃度だけ添加する

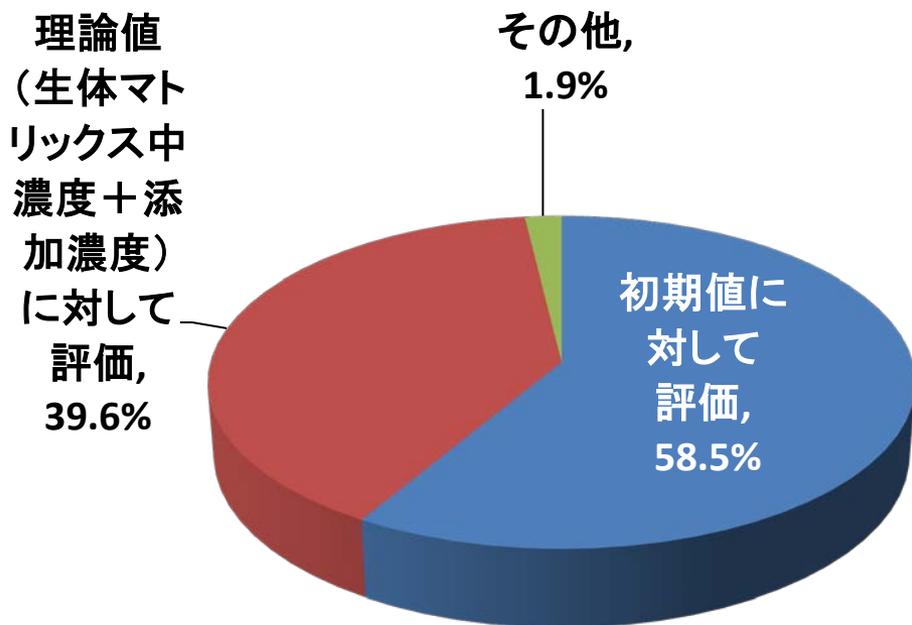
## その他の回答：代表例

その他の回答；

- ✓ 実試料の濃度が十分高いときは内因性の濃度と高濃度の2点。内因性濃度がLQC以下なら低濃度と高濃度。

## バリデーション試験（Stability）

Q38 安定性はどのような方法で評価しますか？また、その理由をご回答ください



有効回答数53

回答	カウント (件)	割合(%)
初期値に対して評価	31	58.5%
理論値(生体マトリックス中濃度+添加濃度)に対して評価	21	39.6%
その他	1	1.9%

# バリデーション試験（Stability）

Q38 安定性はどのような方法で評価しますか？また、その理由をご回答ください

## 選択理由：代表例

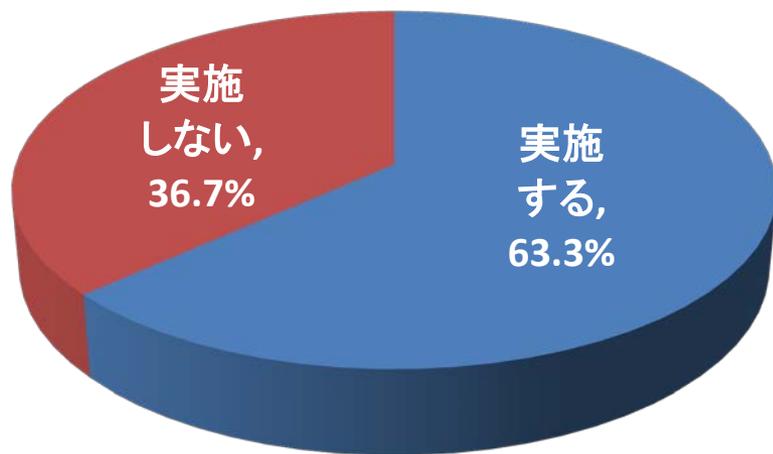
- <①初期値に対して(31件)>選択の理由
  - ✓ 生体マトリックス中の内因性物質濃度の影響を相殺するため
  - ✓ 慣習など
- <②理論値に対して(21件)>選択の理由
  - ✓ BMV-GLに準じる
  - ✓ 基本②理論値だが、場合により①初期値も用いる(生体マトリックスのみも評価する場合、内因性物質濃度が非常に高い場合)

## その他の回答：代表例

- その他の回答；
- ✓ 定まった基準はない

## バリデーション試験 (ISR)

Q39 実試料分析時にISR; Incurred samples reanalysisを実施しますか？また、その理由を回答してください



有効回答数49

回答	カウント(件)	割合(%)
実施する	31	63.3%
実施しない	18	36.7%

# バリデーション試験 (ISR)

Q39 実試料分析時にISR; Incurred samples reanalysisを実施しますか？また、その理由を回答してください

## 選択理由：代表例

<①実施する(31件)>選択の理由

- ✓ 内因性物質を投与する前提では低分子化合物と同じと判断して実施
- ✓ BMV-GLに従い実施する
- ✓ 結果の妥当性確認のため実施する
- ✓ 場合により実施しないこともあり

<②実施しない(18件)>選択の理由

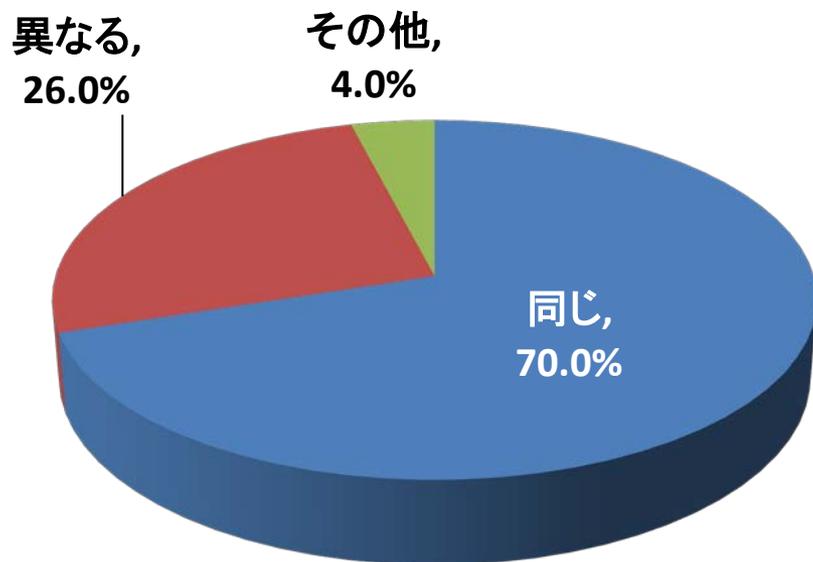
- ✓ BMV-GLの適用外のため実施しない
- ✓ ISSとして実施するため

## 無回答：代表例

<無回答(2件)>;代表例

- ✓ ISRについては未定
- ✓ 経験なし

Q40 内因性物質（バイオマーカー）の再現性の評価方法は、一般の薬物などを定量する場合と同じですか？



有効回答数50

回答	カウント(件)	割合(%)
同じ	35	70.0%
異なる	13	26.0%
その他	2	4.0%

Q40 内因性物質（バイオマーカー）の再現性の評価方法は、一般の薬物などを定量する場合と同じですか？

### 選択理由：代表例

<①同じ(70%)>選択理由

- ✓ 生体内の測定対象物質濃度に依存する

<②異なる(26%)>選択の理由

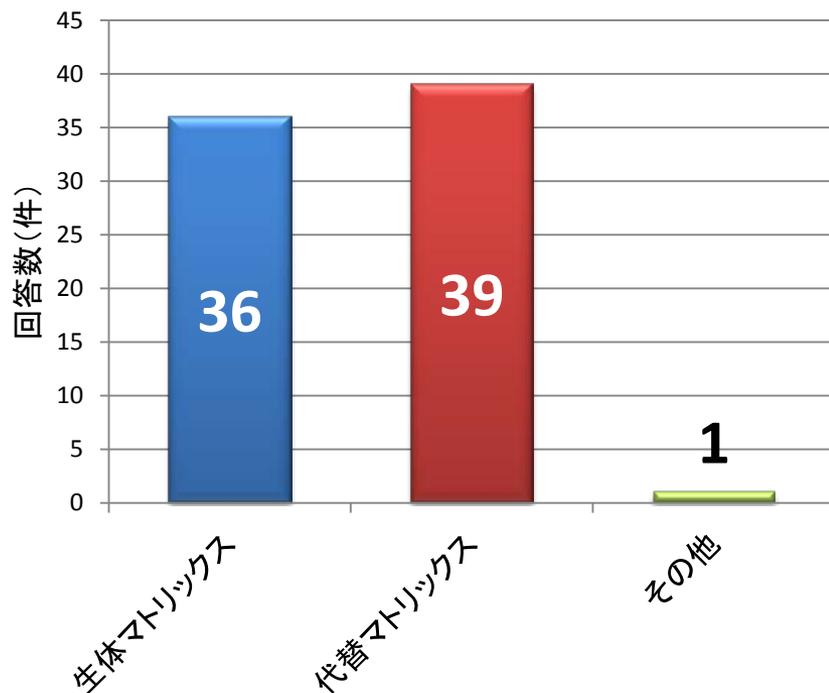
- ✓ LLOQを評価しない（低濃度の生体マトリックスQC試料は調製できないため）
- ✓ 生体内の測定対象物質濃度に依存する
- ✓ 代替マトリックスを使用する

### その他の回答：代表例

その他の回答；

- ✓ 経験がなく、十分に状況を想定できていないため、以下、回答を控えさせていただきます

Q41 内因性物質（バイオマーカー）の再現性用試料（Accuracy & Precision）の調製にはどのようなマトリックスを使用しますか？（複数選択可）



有効回答数49:複数選択可

回答	カウント (件)
生体マトリックス	36
代替マトリックス	39
その他	1

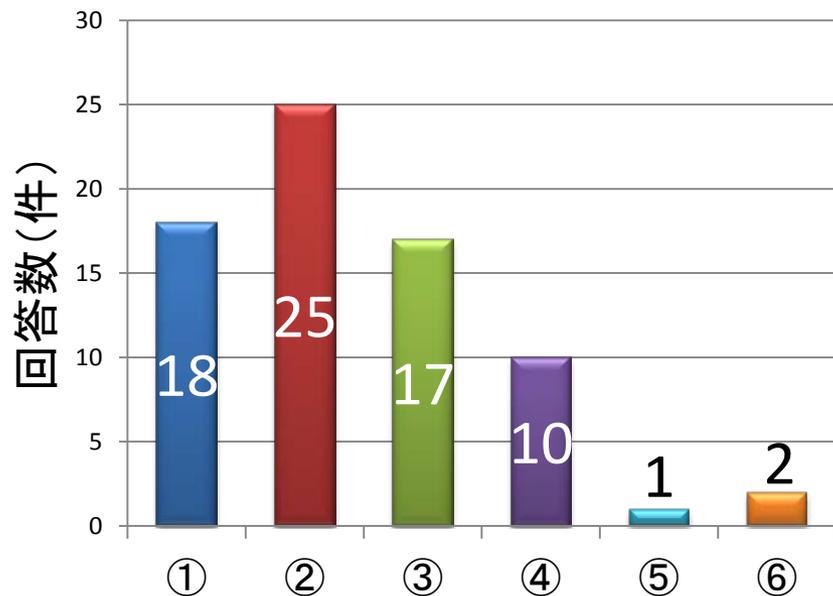
Q41 内因性物質（バイオマーカー）の再現性用試料（Accuracy & Precision）の調製にはどのようなマトリックスを使用しますか？（複数選択可）

選択理由：代表例

ほとんどの回答が<①生体マトリックス>、<②代替マトリックス>両方を選択

- ✓ 低濃度域は生体マトリックスでカバーできないため、代替マトリックスとの併用が必要
- ✓ 低濃度側を見る必要があるため代替マトリックスを優先的に使用する。補助的に生体マトリックスを使用し代替マトリックスとの一致性を確認

Q42 内因性物質（バイオマーカー）を定量する場合のStability（安定性用）試料はどのような方法で調製しますか？また、その理由をご回答ください。（複数選択可）



有効回答数50:複数選択可

回答	カウント (件)
① 標準物質を添加しない生体マトリックス	18
② 生体マトリックスに標準物質を添加	25
③ ①と②を両方実施	17
④ 代替マトリックス	10
⑤ 生体マトリックスを代替マトリックスで希釈して標準物質を添加	1
⑥ その他	2

Q42 内因性物質（バイオマーカー）を定量する場合のStability（安定性用）試料はどのような方法で調製しますか？また、その理由をご回答ください。（複数選択可）

## 結果の内訳

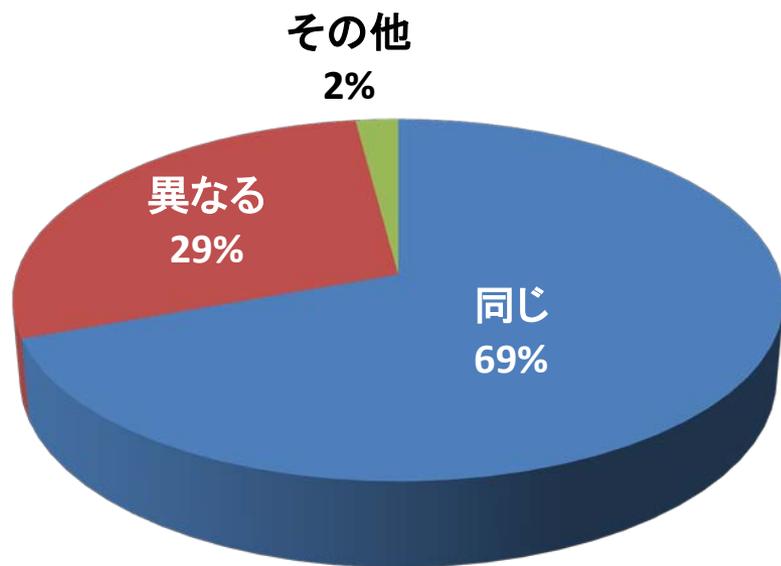
①	②	③	④	⑤	⑥	件数
		✓				15
✓	✓					10
	✓					9
✓						4
	✓		✓			3
✓			✓			2
		✓	✓			2
			✓			1
✓	✓		✓			1
✓	✓		✓		✓	1
	✓				✓	1
				✓		1

## 選択理由：代表例

- ✓ 生体マトリックス中の内因性物質濃度により、①か②を選択する
- ✓ 最高濃度は生体マトリックスを使えるが、低濃度は代替マトリックスしか使えないため①と④

回答	カウント (件)
① 標準物質を添加しない生体マトリックス	18
② 生体マトリックスに標準物質を添加	25
③ ①と②を両方実施	17
④ 代替マトリックス	10
⑤ 生体マトリックスを代替マトリックスで希釈して標準物質を添加	1
⑥ その他	2

Q43 内因性物質（バイオマーカー）を定量する場合のStability（安定性）の評価方法は、一般の薬物などを定量する場合と同じですか？異なる場合は、異なる点とその理由を回答してください。その他を選択された場合は、具体的な方法とその理由を回答してください



有効回答数49

回答	カウント(件)	割合(%)
同じ	34	69.4%
異なる	14	28.6%
その他	1	2.0%

Q43 内因性物質（バイオマーカー）を定量する場合のStability（安定性）の評価方法は、一般の薬物などを定量する場合と同じですか？異なる場合は、異なる点とその理由を回答してください。その他を選択された場合は、具体的な方法とその理由を回答してください

#### 選択理由：代表例

- <①同じ(69.4%)>選択理由
  - ✓ 評価は調製濃度ではなく、初期値にする
- <②異なる(28.6%)>選択理由
  - ✓ 初期値に対する変化率・残存率で評価
  - ✓ 低濃度を評価できない
  - ✓ 代替マトリックスを使用する

#### その他の回答：代表例

- その他の回答；
- ✓ 残存率で評価

# 推奨方法

---

**アンケート結果を基にメンバー8名で議論**

**2014-08**

# 代替マトリックスの選択

Surrogate Matrix Selection

---

**酒井 和明** (帝人ファーマ株式会社)  
**河田 哲志** (株式会社新日本科学)  
**大住 孝彦** (大塚製薬株式会社)

# 代替マトリックス-選択における課題-

*(Surrogate Matrix Selection : A problem to be solved)*

## ～背景～

- 分析対象物が生体マトリックスに含まれる場合に検量線の作成に課題が発生する
  - ✓ 通常の生体マトリックスにLLOQ以上の分析対象物が含有されている時、
  - ✓ 検量線作成に用いる代替マトリックスを選定する場合について考える

## ～アンケートで理想に挙げられた代替マトリックス～

- 水、生理食塩水、緩衝液、緩衝液＋アルブミン、分析対象の内因性物質を除去した代替マトリックス、等々
- 回答に共通する前提条件は、生体マトリックスを比較対象にしたとき、回収率、イオン化効率、マトリックス効果が同じ

## ～深まる課題～

代替マトリックス製の検量線に求められる性能は？十分な検討項目は？  
実際に調製は可能か？

# 代替マトリックス-選択における課題-

*(Surrogate Matrix Selection : A problem to be solved)*

## 【想定される留意点】

- 温度、pH、イオン強度、溶解補助剤(成分)などが溶解性や吸着に影響を及ぼすと推察される。前処理回収率への影響やバイアスを生じる要因になり得る
- 分析対象物の物性だけでなく、夾雑物となる内因性物質が分析に影響を及ぼす場合もある
- 安定同位体を利用しても、イオン化効率が異なるとピークサイズが異なる。検出感度(定量下限)への影響、ピークのS/Nの変化による精度への影響は？
- ...

課題解決に向けて活動を継続、次期DGで推奨法を！

**2014-08**

**バリデーション試験 (1)**

**Surrogate analyte,  
Accuracy & Precision, Matrix Effect, Selectivity,  
Stability**

---

**落合 美登里 (東和薬品株式会社)**

**北嶋 千賀 (株式会社LSIメディエンス)**

**山口 建 (株式会社住化分析センター)**

## バリデーション試験（Accuracy and Precision）

- 生体マトリックスで低濃度QCサンプルの調製が出来ない場合、代替マトリックスを用いた試料を追加する。
- 代替マトリックスを使用する場合、A&Pは代替マトリックスと生体マトリックスの相互確認がとれるよう実施する。以下に確認方法例を示す。

### ➤ 確認方法例①

検量線に代替マトリックスを使用し、QCサンプルに代替マトリックスと生体マトリックスの両方を使用し、A&Pを実施する。生体マトリックスのA&Pと代替マトリックスのA&Pをそれぞれ算出する。

### ➤ 確認方法例②

検量線に代替マトリックスと生体マトリックスの両方を使用し、傾きに差がないこと、QCサンプルに生体マトリックスを使用し、どちらの検量線でも定量に問題がないことを確認する。

## バリデーション試験（Accuracy and Precision）

- ✓ 生体マトリックスQCサンプル調製には、標準溶液を添加することが望ましい。生体マトリックスの希釈はしないことが望ましい。
- ✓ 生体マトリックスQCサンプル濃度を全濃度についてA&Pを算出するか、又は、添加濃度についてA&Pを算出するか、両方とするかについては、生体マトリックス由来濃度\*と添加濃度を考慮し、適宜選択する。実測定でのQCサンプル濃度算出方法と同一とすることが望ましい。
- ✓ \*: 生体マトリックス由来濃度がLLOQのピーク強度の20%以上かどうか、検量線範囲に対してどの程度の濃度か等について考慮する。
- ✓ 生体マトリックス由来濃度をA&P算出に使用する際は、QC試料の理論濃度算出に重要な値であるため、同時に複数測定し、その平均値を用いることが望ましい。

## バリデーション試験（Matrix Effect）

- 生体マトリックスのマトリックス効果評価は必須とする。
- 代替マトリックスのマトリックス効果評価をする場合、代替マトリックスと生体マトリックスの相互確認がとれるよう実施する。以下に確認方法例を示す。

### ➤ 確認方法例①

検量線に代替マトリックスを使用し、マトリックス効果サンプルに代替マトリックスと生体マトリックスの両方を使用し、マトリックス効果を定量値のPrecisionにて確認する。生体マトリックスでの低濃度マトリックス効果評価が困難な場合、生体マトリックス由来濃度の影響を受けない添加濃度で実施する。

### ➤ 確認方法例②

マトリックス効果サンプルに代替マトリックスと生体マトリックスの両方を使用し、マトリックスファクターのPrecisionにて確認する。

## バリデーション試験（Matrix Effect）

- ✓ マトリックス効果サンプル調製濃度は検量線範囲及び生体マトリックス由来濃度\*を考慮し適宜設定する。
- ✓ 生体マトリックスサンプル濃度を全濃度について定量値を算出するか、又は、添加濃度について定量値を算出するか、両方とするかについては、生体マトリックス由来濃度\*と添加濃度を考慮し、適宜選択する。実測定でのQCサンプル濃度算出方法と同一とすることが望ましい。
- ✓ \*: 生体マトリックス由来濃度がLLOQのピーク強度の20%以上かどうか、検量線範囲に対してどの程度の濃度か等について考慮する。
- ✓ 生体マトリックス由来濃度をマトリックス効果算出に使用する際は、サンプルの理論濃度算出に重要な値であるため、同時に複数測定し、その平均値を用いることが望ましい。

## バリデーション試験（Matrix Effect）

- ✓ 原則代替マトリックスと生体マトリックスは各々6Lot以上とする。  
ロット差の懸念がある代替マトリックスを使用する場合、マトリックス効果を評価する。試薬等を代替マトリックスとする場合、マトリックス効果の評価は必須としない。
- ✓ 生体マトリックスのPrecisionと代替マトリックスPrecisionをそれぞれ算出する。

## バリデーション試験 (Selectivity)

代替マトリックスを使用する場合、Selectivityは代替マトリックスと生体マトリックスの両方にて実施する。以下に推奨方法を記載する。

### ➤ 代替マトリックス

測定対象物質: 代替マトリックスサンプル(ブランク)における測定対象物質の妨害ピーク強度が代替マトリックスLLOQの20%以下であることを確認する。

IS: 代替マトリックスサンプル(ブランク)におけるISの妨害ピーク強度がIS添加代替マトリックスサンプルの5%以下であることを確認する。

### ➤ 生体マトリックス

測定対象物質: 生体マトリックスサンプル(ブランク)を用いて、測定対象物質のピーク形状と溶出位置を確認する。

IS: 生体マトリックスサンプル(ブランク)におけるISの妨害ピーク強度がIS添加生体マトリックスサンプルの5%以下であることを確認する。

### ✓ 生体マトリックス参考方法

可能であれば、測定対象物質については、通常用いるtransition (m/z)に加え、他の複数のtransition (m/z)で分析を行い、各transition (m/z)の強度比が標準物質と差がなければ、そのピークが単一成分から構成されている可能性が高いとの傍証とする。

# 2014-08

## バリデーション試験 (2)

### Reproducibility, Stability

---

**若松 明 (グラクオ・スミスクライン株式会社)**  
**島田 英一 (小野薬品工業株式会社)**

(\*)本項はアンケートの回答を基に「推奨方法」として提示する。

## バリデーション試験 (Reproducibility)

再現性試験の設定濃度数は下記の回答が最も多く、BMVガイドラインでのQC試料濃度設定と合致しているため、これを推奨方法とする(カッコ内の数値はアンケートの回答率)。

- 4濃度(LLOQ、低、中、高濃度)(55.8%)

なお、再現性試料の設定濃度は様々な条件(実試料の濃度範囲、生体マトリックス利用の可否、代替マトリックス利用の可否等)で決定され、以下の回答も多かった。

- 5濃度(LLOQ、低、中、高、ULOQ)(17.3%)
- 3濃度(低、中、高)(15.4%)

(\*)本項はアンケートの回答を基に「推奨方法」として提示する。

## バリデーション試験 (Reproducibility)

再現性試験の繰り返し分析数、分析単位数、分析単位2回以上の場合の日数については、どの回答もほぼ一致して下記のとおりであった(カッコ内の数値はアンケート結果の回答率)。

- 繰り返し分析数  
n=5以上(86.5%)
- 分析単位数  
3回(94.2%)
- 日数  
3日間(95.7%)

## バリデーション試験 (Stability)

### ➤ 濃度

目的とする濃度範囲を含む2濃度(目標濃度:LLOQの3倍以内、ULOQの75%以上)で検討する。

### ➤ 安定性評価試料

- ✓ 生体マトリックス中における安定性の確認は必須である。
- ✓ 生体マトリックスをそのまま使用する、または生体マトリックスに標準物質を添加した試料を調製し、上記2濃度に近い濃度にて評価を行う。
- ✓ 実試料分析において、代替マトリックスに標準物質を添加した試料を保存、使用する場合は、その安定性も評価する。

### ➤ 評価方法

検量線を用いて算出した定量値に関して、初期値に対して評価する(初期値の定量値を基準として安定性試料の乖離を評価する)。

## ISR (Incurred Samples Reanalysis)

内因性化合物を投与する場合は、一般の化合物と同様と考え、ISRを実施する。

# **Translation in English for “Recommendation”**

---

# DG2014-08

## Quantitative analysis of endogenous substance

---

Akira Wakamatsu<sup>1</sup>, Takahiko Osumi<sup>2</sup>, Midori Ochiai<sup>3</sup>,  
Satoshi Kawada, Chika Kitajima<sup>5</sup>, Kazuaki Sakai<sup>6</sup>, Eiichi  
Shimada<sup>7</sup>, Takeru Yamaguchi<sup>8</sup>

**1** GlaxoSmithKline K.K., **2** Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., **3** Towa Pharmaceutical Co., Ltd., **4** Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., **5** LSI Medience Corporation, **6** Teijin Pharma Ltd., **7** Ono Pharmaceutical Co., Ltd., **8** Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.

# 2014-08: Target endogenous

The “endogenous substances” are defined in DG2014-08 as follows;

- low molecules below ca 1000 MW units
- assumed when the endogenous substances are dosed (ex vitamins etc)
- LC-MS or LC-MS/MS as analytical method

# ***Surrogate Matrix Selection :***

## ***A problem to be solved***

### **Background**

- When analyte more than LLOQ are contained in a blank matrix, preparation of calibration standards have many problems.
  - ✓ The case which an analyte is included in a normal biological matrix as an endogenous substance
  - ✓ The case which should be making calibration standards by a surrogate matrix

### **Ideal surrogate matrix as a result of survey**

- Water, Saline, Buffers, Protein buffers, Extracted matrix and so on.
- The common items which we should evaluate are as follows, Recovery, Ionization efficiency, Matrix effect.

### **Further problem**

What performance to the calibration standards by a surrogate matrix is needed? How to evaluate adequately ? Can we select ideal surrogate matrix for preparation of calibration standards ?

# *Surrogate Matrix Selection :*

## *A problem to be solved*

### Point to consider

- It is suggested that temperature, pH, ionic strength, a solubilizing ingredient have an influence on solubility and an adsorption of analyte. They can become the influence on recovery and factor of bias.
- Endogenous substances other than target analyte may become the interference in the analysis.
- Use of the stable isotope may not be enough. The change of the ionization efficiency changes peak size. It influences sensitivity and changes the ratio of noise ingredient included in the peak. So, precision will be changed.
- ...

Action for the problem solution will be continued.

## Validation Study (Accuracy and Precision)

- If low QC samples of biological matrix are not able to be prepared, QC samples of surrogate matrix should be added to validation samples.
- If surrogate matrix is used, accuracy and precision should be conducted to confirm the relationship between biological matrix and surrogate matrix. Examples of confirmation methods are shown next.

## Validation Study (Accuracy and Precision)

➤ Example of confirmation methods 1

Calibration standards will be prepared by surrogate matrix and QC samples will be prepared by both surrogate matrix and biological matrix. The accuracy and the precision in surrogate matrix and biological matrix will be separately calculated.

➤ Example of confirmation methods 2

Calibration standard will be prepared by both surrogate matrix and biological matrix. QC samples will be prepared by biological matrix. The slope values of calibration curve should be identical between surrogate matrix and biological matrix. QC sample concentrations will be calculated separately with both calibration curves of surrogate matrix and biological matrix and the obtained QC concentrations should be similar.

## Validation Study (Accuracy and Precision)

- ✓ It is recommended that a reference standard is spiked into biological matrix to prepare QC samples. It is recommended that no diluted biological matrix is used.
- ✓ Based on an endogenous substance concentration in original biological matrix\* and a spiked reference standard concentration, a style of expression for QC samples concentrations for A&P should be appropriately selected from types of total concentration (endogenous substances concentration in biological matrix + spiked reference standard concentration), spiked reference standard concentration and both. It is recommended that concentration for A&P in QC samples in a validation study is the same as that in a study sample analysis.

## Validation Study (Accuracy and Precision)

- ✓ \*The following examples should be considered:  
Whether the peak response of endogenous substance in biological matrix is more than 20% of the lower limit of quantification for the analyte.  
The concentration level of endogenous substance in biological matrix to the calibration curve range.
- ✓ If concentration of endogenous substance in nature biological matrix is used to calculate accuracy and precision, the concentration is important to calculate nominal concentration in QC samples. It is recommended that more than one biological matrix sample is analyzed in the same batch and the mean concentration is used.

## Validation Study (Matrix Effect)

- Biological matrix effect must be investigated.
- If surrogate matrix effect is investigated, matrix effect should be conducted to confirm the relationship between biological matrix and surrogate matrix. Examples of confirmation methods are shown next.

## Validation Study (Matrix Effect)

- Example of confirmation methods 1  
Calibration standards will be prepared by surrogate matrix and matrix effect samples will be prepared by both surrogate matrix and biological matrix. Precision of concentrations in matrix effect samples will be calculated. If low level matrix effect samples of biological matrix are not able to be prepared, matrix effect in biological matrix should be investigated with a spiked concentration on which a biological matrix concentration has no effect.
- Example of confirmation methods 2  
Surrogate matrix and biological matrix will be used to prepare matrix effect samples and precision of matrix factors are calculated.

## Validation Study (Matrix Effect)

- ✓ Nominal concentrations in matrix effect samples should be appropriately selected, considering a calibration range and a biological matrix concentration\*.
- ✓ Considering an endogenous substance concentration in original biological matrix \* and a spiked concentration, a style of expression for concentration of matrix effect samples should be appropriately selected from types of total concentration (endogenous substance concentration in biological matrix concentration + spiked concentration), spiked concentration or both. It is recommended that concentration type of matrix effect samples in a validation study is the same as that of QC samples in a study sample analysis.

## Validation Study (Matrix Effect)

- ✓ \*The following examples should be considered:  
Whether the peak response of endogenous substance in biological matrix is more than 20% of the lower limit of quantification for the analyte.  
The concentration level of endogenous analyte in biological matrix to the calibration curve range.
- ✓ If concentration of endogenous substance in nature biological matrix is used to calculate matrix effect, the concentration is important to calculate nominal concentration in matrix effect samples. It is recommended that more than one biological matrix sample is analyzed in the same batch and the mean concentration is used to calculate matrix effect.

## Validation Study (Matrix Effect)

- ✓ At least 6 lots each of biological matrix and surrogate matrix should be used. If inter lot variation will be expected in some surrogate matrix, matrix effect of surrogate matrix should be investigated. If reagent is used as surrogate matrix, matrix effect of surrogate matrix may not be investigated.
- ✓ Precision in surrogate matrix and biological matrix are separately calculated.

## Validation Study (Selectivity)

If surrogate matrix is used, selectivity should be investigated using both biological matrix and surrogate matrix. The recommended method for selectivity is shown below.

### ➤ Surrogate matrix

**Analyte:** The evaluation should demonstrate that a response attributable to interfering components in the surrogate matrix (blank) is not higher than 20% of the response in the surrogate matrix LLOQ samples.

**IS:** The evaluation should demonstrate that a response attributable to interfering components in the surrogate matrix (blank) is not higher than 5% of the response in the surrogate matrix IS spiked samples.

### ➤ Biological matrix

**Analyte:** The peak shapes and the retention times of the analyte in the biological matrix (blank) should be confirmed.

**IS:** The evaluation should demonstrate that a response attributable to interfering components in the biological matrix (blank) is not higher than 5% of the response in the biological matrix IS spiked samples.

### ✓ Reference method for biological matrix

*When possible, another transition ( $m/z$ ) for the analyte is used. If each transition response ratio between the reference standard and biological matrix are similar, it is a collateral evidence for which the analyte peak is one component.*

(\*) Recommendation for concentration levels of reproducibility QC samples are based on the answer to the questionnaires.

## Validation Study (Reproducibility)

The most common answer to the concentration levels for reproducibility QC samples is 4 levels as follows and the same levels are proposed in the BMV guideline. Therefore the following 4 levels are considered as recommendation levels.

- 4 concentrations (LLOQ, Low, Medium, High) (55.8%)

On the other hand, lots of researchers decide the levels for reproducibility QC samples depending on the condition of validation study and sample analysis, ex concentration range of sample analysis and/or in case of utilizing biological matrix, surrogate matrix as blank matrix to prepare calibration standards and QC samples. The following 5 or 3 concentration levels are considered as second best ways as recommendation.

- 5 concentrations (LLOQ, Low, Medium, High, ULOQ)(17.3%)
- 3 concentrations (Low, Medium, High)(15.4%)

(Figures in parenthesis) represent percentage of respondents

(\*) numbers of replicates, numbers of analytical run and days for between run reproducibility are based on the answer to the questionnaires.

## Validation Study (Reproducibility)

Almost answers to reproducibility evaluation are consensus views as follows and the following are considered as recommendation.

- Replicates to evaluate within run reproducibility:
  - ✓ at least 5 replicates (86.5%)
- Analytical batch to evaluate between run reproducibility:
  - ✓ at least 3 analytical run(94.2%)
- Days for evaluation of between run reproducibility:
  - ✓ at least 3 days(95.7%)

(Figures in parenthesis) represent percentage of respondents

# Recommendation

## Validation Study (Stability)

- Levels of concentrations for stability samples
  - ✓ 2 levels of concentration (Target concentration: within 3times the LLOQ and at least 75% of ULOQ).
- Stability Sample
  - ✓ Stability in biological matrix must be determined.
  - ✓ The above 2 levels of concentration should be determined using the biological matrix without and/or with spiking reference standard of target endogenous substance.
  - ✓ If surrogate matrix will be used for preparing QC samples and QC samples will be stored with study samples until analysis, stability should be determined using surrogate matrix spiked with reference standard of target endogenous substance
- Evaluation of stability
  - ✓ Stability samples will be analyzed against calibration standards and the obtained concentration should be compared with initial concentrations at the start time point of stability test.



# *Recommendation*

---

## ISR (Incurred Samples Reanalysis )

ISR should be determined considering as same as analysis of drug concentration.