



DG2016-20

Scientific Validation について考える

February 8-9, 2017

8th JBF Symposium



DG2016-20 メンバー



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



活動内容 (1)

Scientific Validation

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]

詳細な読み込みを実施

DG検討結果

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

前回の報告
(DG2015-16)

今回の報告



<http://bioanalysisforum.jp/>

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



活動内容 (2)

in vitro試験 [2]

分析法の検証方法に
一定の考え方が存在しない

Scientific Validation

目的に応じた適切な分析方法

概念が適用できるか...

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

今回の報告



<http://bioanalysisforum.jp/>

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



Executive Summary

Scientific Validation

Status in Japan

- **EBF White Paper Items / *In vivo* Studies**
 - Use of scientific validation (SV) is still limited while there is a desire to use this and BMV guideline includes the addendum on tiered approach
 - Some bioanalysts are reluctant to use SV in “main” studies: Different desire for application of SV was detected (non-pivotal study vs preliminary study)
 - Use of matrix matching is not well-recognized
- ***In vitro* Studies**
 - Japanese bioanalysts have high level of interests in the purity of analytical standards even in *in vitro* studies
 - BMV-like format is actually used and desire to use scientific-driven approach was detected



アンケート (1)

EBFの

Scientific Validation

White Paperを題材とした
DG検討内容※について
納得できるか、補うべきものがないか

※ (7th JBF Symposium, 2016 DG2015-16 DG発表)



EBF による5区分

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

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

<http://bioanalysisforum.jp/>



EBFによって分類された5区分について、昨年度のDGでの議論を基に各バリデーション項目のSV適用に関するアンケート調査を実施し検討を行った。



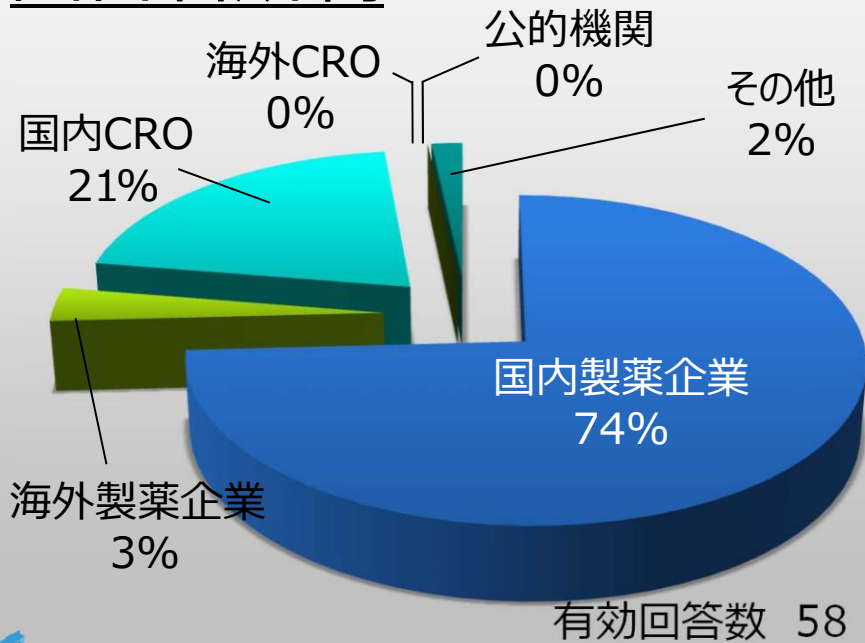
回答者背景

所属および従事年数

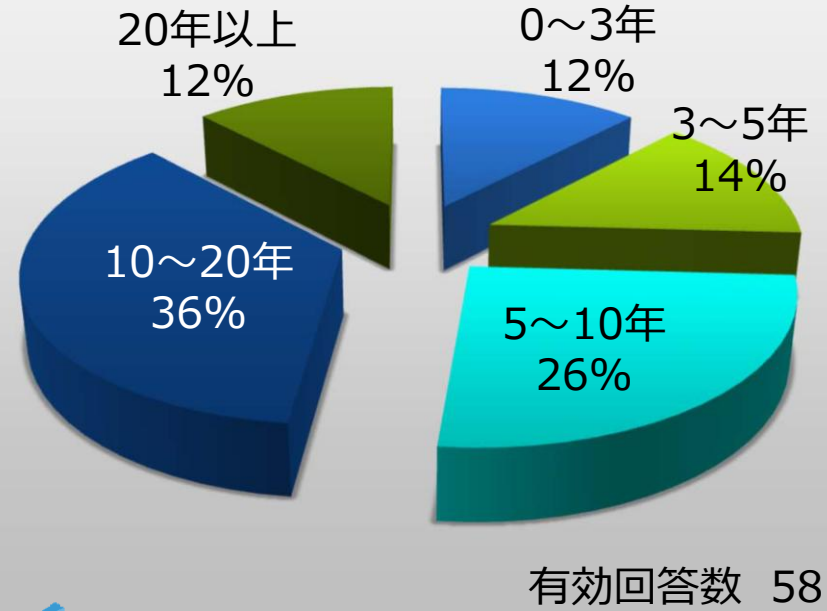


アンケート集計結果

回答者所属



バイオアナリシス従事年数



<http://bioanalysisforum.jp/>



国内製薬企業が3/4, CROが2割, 海外企業の割合が低い。



回答者の経験年数分布は広範囲で大きな偏りはない。



DG Discussion 1

SV項目		Assay appropriate SV	Stage appropriate SV
		代謝物・尿・組織	開発初期（未変化体）
1. 標準品のCOA	EBF	<p>COA不要</p> <p>同一バッチの標準物質での複数動物種の測定で、相対的な暴露量比較が可能で、ICH-M3(R2) 対応の要否判断が可能</p>	<p>COA有が基本</p> <p>COAが無い場合は、投与と測定で同一バッチを使用</p>
1-1. 必要性	DG	<p>ICH-M3(R2) 評価を実施するためにはROAは必要。しかし、ICH-M3(R2)評価の要否判断にはROA不要</p>	<p>ROA有、または投与と測定で同一バッチを使用</p>
1-2. COA, ROAがない場合に投与と同一バッチで測定することについて	EBF	<p>代謝物：不要</p> <p>尿，組織：投与した被験物質と同一バッチで測定</p>	<p>投与した被験物質と同一バッチで測定</p>
	DG	<p>投与量と測定濃度が絡むパラメータでは同一バッチで測定する意義が高いが国内でCOAやROAが無い場合は考え難い。</p>	

<http://bioanalysisforum.jp/>



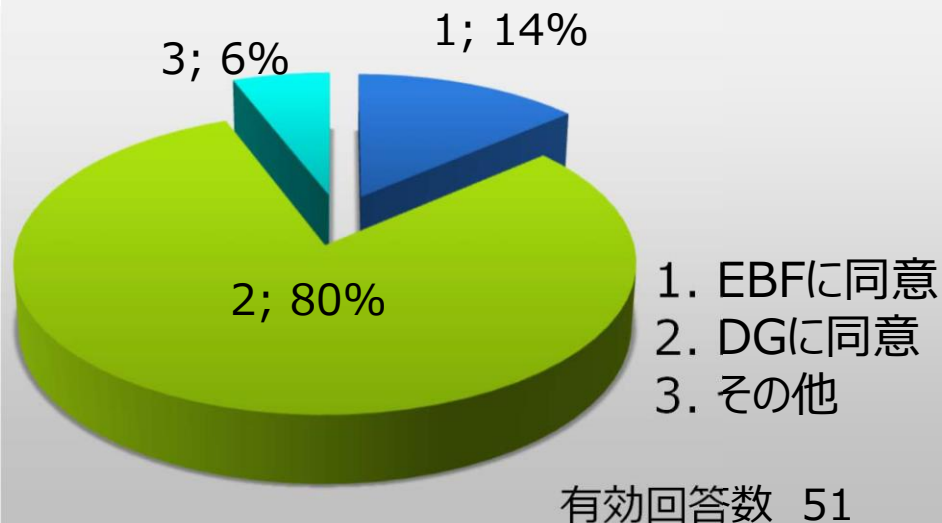
1. 標準品のCOA

1. 必要性

(1/2)



アンケート集計結果



8割がDGに賛成しているがROAについては定義が曖昧であり、回答者間で認識が一致していない。



結論

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

<http://bioanalysisforum.jp/>



アンケート回答者コメント有



1. 標準品のCOA

1. 必要性

(2/2)



アンケートコメント

- ROAという標準品の把握手法を認めていくDGの議論は理解できる。ただ、現実には、最小記載事項のみのCOA(簡易COA)を準備することが可能であるかもしれない(保存条件の設定根拠が厳密でなくてよいという社内了解があるなどの条件が整えば)。
- 純度や含量の程度にもよることと思います。
- DGの意見にて、MIST評価の実施にはROAが必要とのことですが、純度または含量で補正をすべきという考えでしょうか？→SVでは含量補正のことは議論していません。
- あまり多くの経験をしたわけではありませんが、規格値がなくてもCOAとして、書類を発行しているケースをよく見かけと思います。
- 『ROAにロットを記載しなくとも、ROAと標準物質の紐づけが可能』、『標準物質の実際の保存条件とその条件で標準物質が安定性であったことを確認可能』な状況とできるのであれば、ROAは許容可能だと思います→SVではROAにロットの記載有無のことは議論していません。ロット記載はあるものとの認識です。
- ICH-M3(R2)代謝物試験の必要性判断のための評価において、代謝物の曝露量を種間で比較する場合には、その代謝物のCOA/ROAともに必須ではない。一方、同一種間で未変化体や他の代謝物の曝露と比較する(10% Totalの判断につかう)のであれば、COA, ROAが必須と考える。
- 当然TK分析に用いる場合にはCOAは必須。
- ROAに記載した結果が有効な期限をどう考えるのか(保存条件はどんなの？ロットを記載しないROAがありえるのか?)という点のベースを合わせるのが必要ではないかと思います。



1. 標準品のCOA

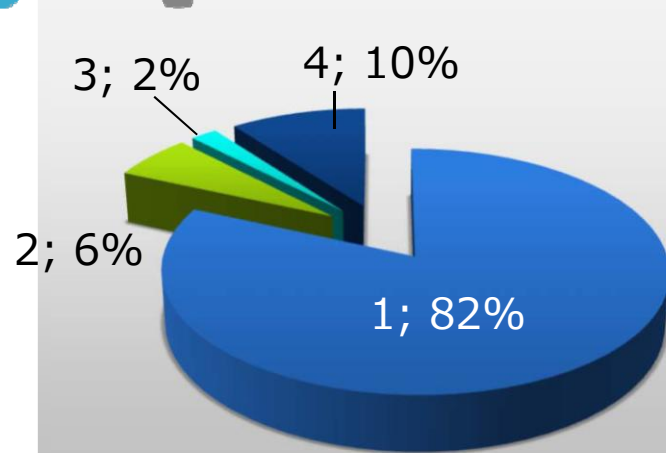
(1/2)

2. COA, ROAがない場合に

投与と同一バッチで測定することについて



アンケート集計結果



1. DGに同意
2. 全て同一バッチによる測定が良い
3. 投与と測定を同一バッチで測定する必要無し
4. その他

有効回答数 49



COA/ROAはなくても化合物を同定できる資料は必要



アンケートコメント (抜粋)

- そもそも、COA/ROAのない被験物質を投与した試験についてその信頼性を確保することは難しいのではないか。



結論

⇒ 投与量と測定濃度が絡むパラメータでは、同一バッチで測定する意義が高いが、国内でCOAやROAが無い場合は考え難い。



アンケート回答者コメント有

<http://bioanalysisforum.jp/>



1. 標準品のCOA

(2/2)

2. COA, ROAがない場合に 投与と同一バッチで測定することについて



アンケートコメント

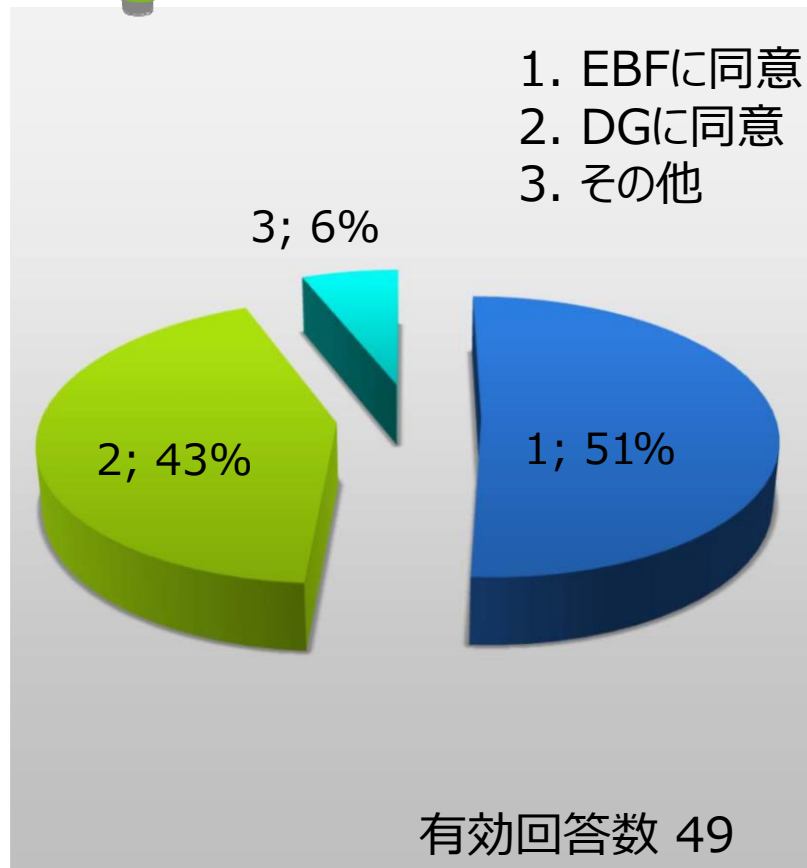
- 申請用試験でCOAがない化合物を被験物質にする状況がイメージできません。
- 非臨床試験の場合は同意します。
- バッチサイズが大きくなる場合は、大体のバッチのキャパシティを把握しておく必要があるように思われる。
- 大きなバッチで測定するよりも、小さなバッチに分けて測定したほうが真度が保たれる場合もある。→ここではバッチサイズによってROA補正のことは議論していません。
- PKパラメータを算出するような場合は同一バッチの必要があるが、曝露確認等では必ずしも必要ではないと思う。
- 基本的に異論はありませんが、弊社では、SVが必要な時点において、ROAに該当する情報がない被験物質を投与する状況を思いつきませんでした。また、投与した被験物質と同一バッチで測定することができない状況も思いつきませんでした。
- ROAに該当する情報はあるけども、ROAという書類を発行できないときの対応ということでしょうか？
- 投与した被験物質の安定性が保証できているならば、同一バッチでなくても良いと思う。
- 少なくとも低分子の薬物でバッチの違いが定量に影響する様な被験物質は、使用すべきではないと思います。



2. 検量線・QC試料 1.ポイント数 (1/2)



アンケート集計結果



EBF案とJBF案に大きな違いはないので、ポイント数が4以下でなく、直線性があれば問題無いと考えられる。



結論

⇒ 代謝物, 尿, 組織は
5ポイント以上
未変化体は
6ポイント以上で合意

<http://bioanalysisforum.jp/>



アンケート回答者コメント有



DG Discussion 2

SV項目		Assay appropriate SV	Stage appropriate SV
		代謝物・尿・組織	開発初期（未変化体）
2.検量線・QC試料	EBF	5ポイント以上	6ポイント以上
2-1.検量線のポイント数	DG	5ポイント以上。定量範囲が広い場合 (100倍以上)ではポイント数を増やすべき	EBFに合意
2-2.クライテリア	EBF	25/30%(LLOQ)	20/25% (LLOQ)
	DG	試験の重要度が低い場合は 25/30%も可マスバランスなどでは 少なくとも20/25%	EBFに合意
2-3. QC試料の繰り返し 測定数(Pre-study)	EBF	3濃度, n=3	4濃度, n=5
	DG	EBFに合意だが, 代謝物・尿・組織でも高感度分析が求められる時にはLLOQの評価が必要	
2-3. QC試料の繰り返し 測定数(In-study)	EBF	BMVガイドライン通り:3濃度, n=2	
	DG	EBFに合意	
2-4.標準溶液の調製 (別々のストック溶液から検量線 /QCの標準溶液を調製)	EBF	代謝物: 不要 尿・組織: 必要	必要
	DG	DGの意見はまとまらなかった。	

http://bioanalysisforum.jp/



2. 検量線・QC試料 1.ポイント数 (2/2)



アンケートコメント

- 科学的にはDGの意見が好ましいですが、そこは科学的判断にゆだねて、一般的な検量線の精度の必要性から5点とするという決め方でよいのではないのでしょうか。
- 参考文献を見れないため、「5」の根拠をもう少し詳しく教えていただけませんか。

DGコメント

統計的に検量線の精度はポイント数 n に依存しますが、主に $n-2$ を自由度とすると統計量が関係します。 n が4以下になると t 統計量が大きくなり、検量線の精度が大幅に低くなるので、 n は5までが許容できると考えました。

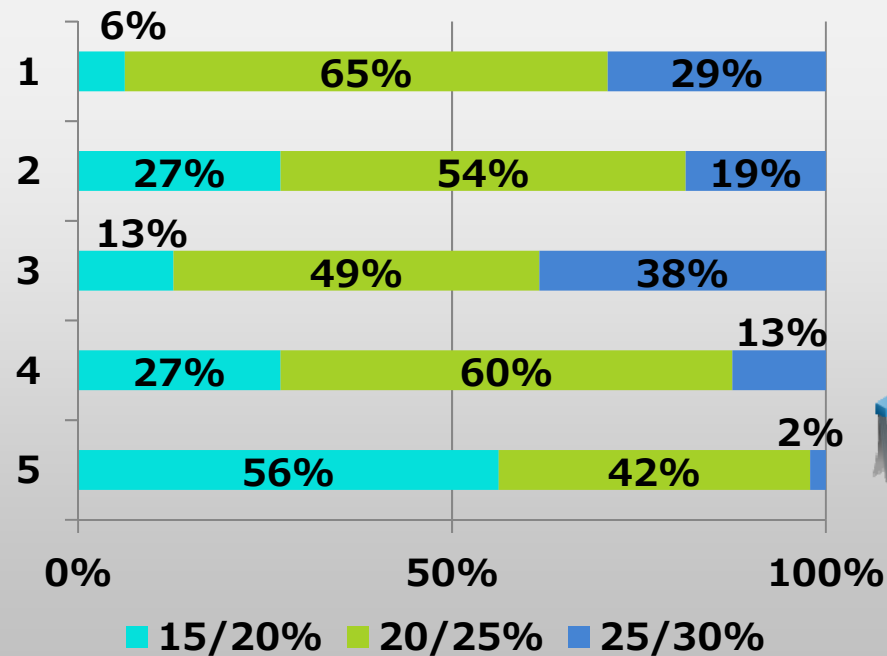
- ガイドラインにポイントを規定されているので仕方ないが、検量線は妥当性が示されれば、少ないほどよいと考える。
- 「以上」の中にDGで加えられたことが含まれるのではないのでしょうか。
- SVの場合は、妥当性を自分で評価すべき。必要以上の縛りは入れる必要はないのでは？ もちろんサイエンスとしては、DGの意見に賛成ではありますが。
- 言っていることは同じですよね。あとは、目的次第だと思いますが、ガイダンスに記載するなら、EBF案。
- フォーラム内で、こんな感じですよーと共有するためならJBF案。ただし”べき”という言い方は受け入れられたくない。



2. 検量線・QC試料 2. クライテリア (1/3)



示した5区分における適切なクライテリアは？



有効回答数 48

EBFの5区分

1. 血漿中代謝物
(ICH-M3(R2) 可否判断のため)
2. 尿中 (未変化体)
3. 組織中 (未変化体)
4. 開発初期の非臨床血漿中未変化体
5. 開発初期の臨床血漿中未変化体

代謝物や組織では緩やかな基準で良いが、血漿中未変化体 (開発初期) ではGL通りが多数



結論

⇒ 血漿中未変化体以外ではGLよりも緩いクライテリアにすることは受入可

<http://bioanalysisforum.jp/>



DG検討, アンケート回答者コメント有



2. 検量線・QC試料 2.クライテリア (2/3)



DGでの検討

- DGメンバーの所属企業の中には、尿は測定する機会が少ないので、やるときには厳しく(15/20?)するべきであるという社内意見もあった。
- 開発初期(非臨床)は20/25%という意見が多かったが、この対象範囲に初期GLP試験が含まれることが認知されていない可能性が高い。
- 尿は20/25%でよいのではないだろうか。尿中排泄が少ない化合物では測定しない場合もあるくらいなので、測定するとしてもSVを用いて出来るだけ負担を減らす方針で良いのではないだろうか。



2. 検量線・QC試料 2.クライテリア (3/3)



アンケートコメント

- Validated Methodに準じたデータの扱いの場合に15/20%, 粗さを許容するときに20/25%, 代謝物の概要把握に25/30%という感覚があります。
- 試験の開発段階や重要度によると思います。重要度が高い試験は15/20%が望ましいと考えます。
- 未変化体については結局BMVガイドラインに従う必要があるため、最初からそれを念頭に置いた分析法が良いと思います。尿中未変化体についてはBMVガイドラインの範疇かと思っておりましたが、SVが許容できるのであればありがたいと思います。代謝物についてはMIST前であれば基準を緩めるのもありかと思いますが、MIST判定後に分析法を大きく変えたくはないので、広げたとしても5%が良いと思いました。
- PKPD解析をする場合は厳格な基準で測定すべきであるが、相対的な確認をしたい場合は少し判定基準を広げてもよいと考えている。
- 未変化体なら、本来は15/20でやるべきだが、20/25でもやむを得ない部分もある。SVは、科学的な妥当性を加味して、自ら判断基準を定めるのが本筋。この数字はあくまでも参考値とすべき。
- データの使用目的・重要性次第、場合によっては25/30よりも広い範囲も許容可能と考えていますし、逆もあり得ると思います。いずれにしても、感覚的な議論に終始しているようにも思いますので、可能であれば、15/20, 20/25, 25/30, それぞれのクライテリアで分析した場合に得られるデータの範囲がどのように重なるのかを視覚的に示していただくと良いツールになるのではないかと思います。
- 開発初期に十分に検討を実施し、未変化体についてはいずれのステージも真度及び精度は15/20%であることが望ましいと考える。ただし、早期の代謝物測定については、標品が十分でないケースが多いためこの限りではないと考える。



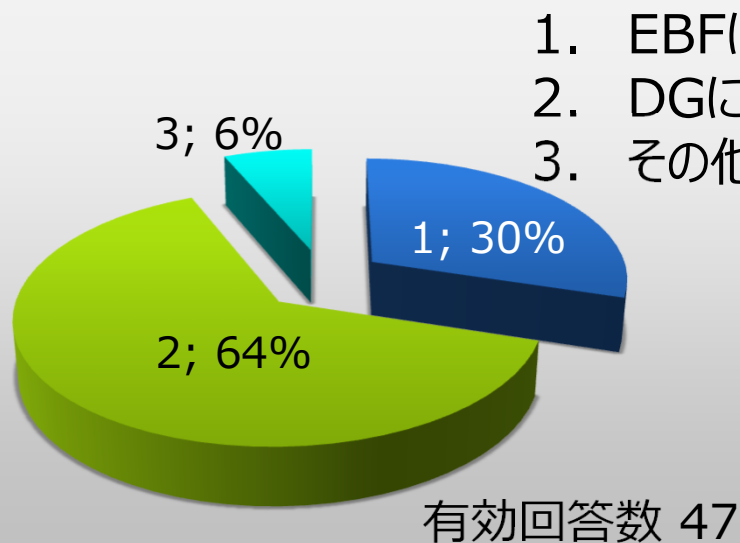
2. 検量線・QC試料

(1/2)

3. QC試料の繰り返し測定数



Assay appropriate SV (代謝物・尿・組織) の
Pre-study validation時のQC試料の繰り返し測定数は？



1. EBFに同意
2. DGに同意
3. その他



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

<http://bioanalysisforum.jp/>



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



アンケート回答者コメント有



2. 検量線・QC試料

(2/2)

3. QC試料の繰り返し測定数



アンケートコメント

- 高感度分析の意味が良く分かりません。実試料中濃度がlow-QCやLLOQ付近に集中する分析法のことでしょうか？「高感度分析が求められるとき」の基準が不明瞭ですので、基本すべてLLOQは含めた方が良く考えます。
- サンプル中濃度が低濃度付近であることが分かっている場合はLLOQの評価が必要であると考えます。
- 高感度分析が求められる時=LLOQとLOQの間の測定値が薬物動態的に意味があるというケースですよね。そういうケースがあるなら、DGに賛成ですね。
- Scientificに考えて決めればよい。

<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF 2. 検量線・QC試料

(1/2)

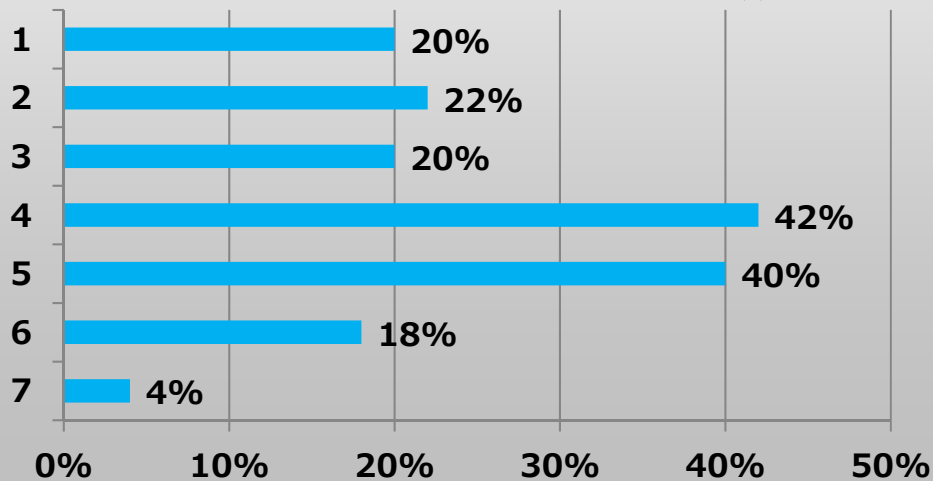
4. 検量線とQC試料の標準溶液を別々のストック溶液から調製



以下の意見（2～6）に賛同可能か？

1. EBFに同意
2. 必要（標準溶液の確認のため）
3. In-studyは必要，Pre-studyは不要
4. 代謝物で量が限られている場合は不要
5. 秤量値と調製作業の記録が保存されていれば不要
6. BMV-GL-Jに未記載なので，フルバリでも実施しない
7. その他

有効回答数 45



DGの意見も回答者の回答もバラバラであり，DGとして特定の項目を推奨するのは難しい。



結論

⇒ 意見の一致は無く
現時点での結論は
出ていない。

<http://bioanalysisforum.jp/>

DG検討，アンケート回答者コメント有



2. 検量線・QC試料

(2/2)

4. 検量線とQC試料の標準溶液を別々のストック溶液から調製



DGでの検討

- 4割が代謝物では不要，記録があれば不要としている。1～3は2割と，十分な合意には至っていない。
- DGの意見もバラバラであったが，回答者の回答もバラけていて，DGとして特定の項目を推奨するのは難しい。回答選択肢5（記録が残っていれば別々の秤量必要なし）が40%と高い値を示したのは少し意外だった。
- 合成量が限られている化合物（代謝物等）の場合は，CCとQCで調製を分けなくても，その旨を断れば問題ないということはあるのではないかと。



アンケートコメント

- 検量線とQC試料用の標準溶液を別々に調製することで，どのようなリスクが回避され，どのようなリスクが回避できないのか，それが現実的に起きうるリスクなのか，整理してみるべきではないか。
- 試験の重要度にもよるが，SVではストック溶液を分ける必要はないと思います。
- 5の試験記録があれば検量線用溶液とQC用溶液は同一濃度であると考えるのは少々難しいと感じる。
- 当然，秤量値と調製作業の記録が試験記録として保存されていることが前提です。
- 事前に秤量の妥当性を確認できていれば，その後不要。



DG Discussion 3

SV項目		Assay appropriate SV	Stage appropriate SV
		代謝物・尿・組織	開発初期（未変化体）
3.マトリックス	EBF	マトリックスマッチング可	N/A
3-1.マトリックスマッチング・代替マトリックスについて	DG	マトリックスマッチング可 状況により代替マトリックスも可能	N/A
3-2.マトリックス マッチングの評価項目	EBF	25/30%(LLOQ)	20/25% (LLOQ)
	DG	試験の重要度が低い場合は 25/30%も可 マスバランスなどでは少なくとも 20/25%	EBFに合意
3-3.代替マトリックスの 評価項目	EBF	3濃度, n=3	4濃度, n=5
	DG	EBFに合意だが、代謝物・尿・組織でも 高感度分析が求められる時にはLLOQの評価が必要	
4. (日間)再現性	EBF	Pre-studyで日内再現性確認のみ実施。 日間再現性確認の必要無し。	同左
	DG	EBFの意見に加えて、 In-study時の QC試料の結果で評価する。	同左



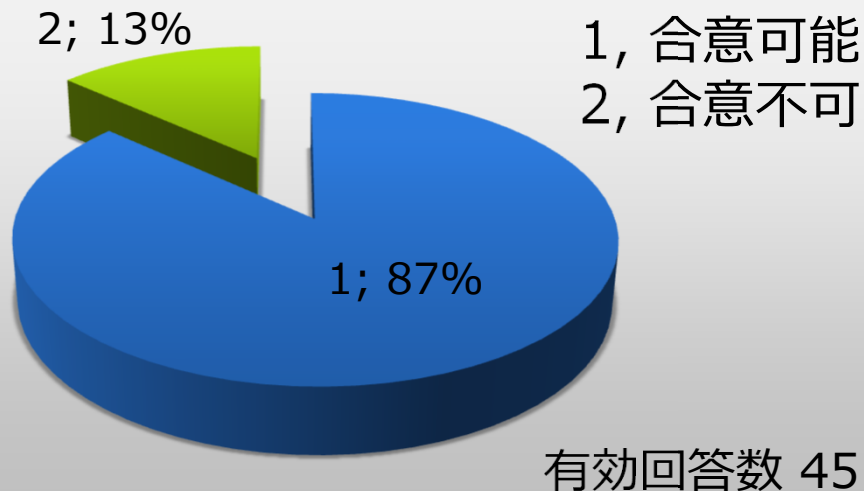
3. 検量線・QCのマトリックス

(1/3)

1. マトリックスマッチング, 代替マトリックスについて



尿・組織はマトリックスマッチング可, 状況により
代替マトリックスも可としたDGの意見に合意可能か?



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

<http://bioanalysisforum.jp/>

結論

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



DG検討



3. 検量線・QCのマトリックス

(2/3)

1. マトリックスマッチング, 代替マトリックスについて



DGでの検討

- 合意可が8割を超え, おおよそDGの意見に賛成であった。しかし, マトリックスマッチングや代替マトリックスについても, 一般的方法とまでは理解が進んでいないのが現状と捕らえるべきで, まだどのような問題があるか, 認識が不十分かもしれない。
- 血漿を用いてのマトリックスマッチングでは血漿でバリデートされていることが前提などの条件の提示は必要だったかもしれない。その点が理解されなければ, EBFはマトリックスマッチングでバリデーションをスキップしたいという意図を持っていることも伝わっていないだろう。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線・QCのマトリックス

(3/3)



アンケートコメント

- どの試料を代替マトリックスで行うのかにもよるが、代替マトリックスしか使わないバリデーションに何の意味があるのか理解できない(実サンプルの測定の保証になっているか、妥当性が説明できないのではないか)。
- 尿については合意できるが、組織についてタンパクフリーのバッファーをマトリックスに使用することは合意できない。
- 個人的にはEBFの考え方を好みますが、DGの意見も理解できます。
- 代替マトリックスとして使用可能な条件(最低限の必要確認事項)についても示していただけませんかマトリックスマッチングでの最大添加割合はどの程度を考えておられるでしょうか。
- EMAのmatrix matchingは「試験試料に相当する代替マトリックス」と認識しておりました。検量線試料については何のマトリックスを用いてもよいと思いますが、QC試料は測定試料と同等マトリックスである必要があると思います。
- 未変化体、代謝物の場合、代替マトリックスに代用する必要がないと考えます。基準も緩めることになるので。
- 妥当性が説明でき、正確に精度よく分析できるのであれば、代替マトリックスの使用は問題ないとする。
- 代替マトリックスについては合意しますが、マトリックスマッチングは賛同しかねます。
- 測定値の使われ方によります。相対値でいいなら、マトリックスマッチングなど余計なことはしないほうがいいようにも思えます。
- 科学的にはDGの方法は許容できますが、そもそもSVを適応しようとしてきた背景(医薬品開発の効率化)を踏まえると、血漿の使用が原則となるように思います。なぜなら、基本的な概念として、マトリックスマッチングを用いることで、一つの核となる分析法を開発することで、他のマトリックスも精度高く分析するということがあると思うからであり、そうすると血漿での希釈が現実的であると思います。



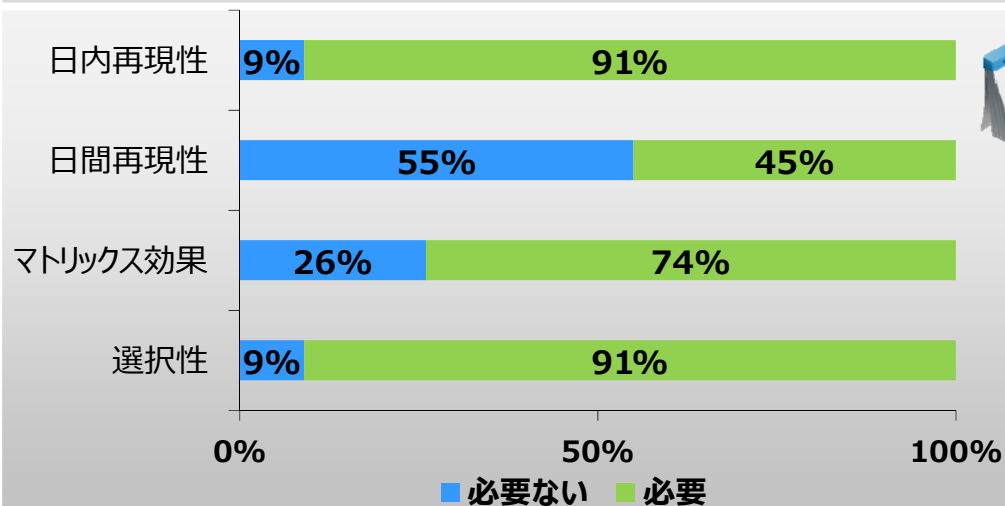
3. 検量線・QCのマトリックス

(1/2)

2. マトリックスマッチングの評価項目



Pre-study validationではどの評価項目が必要か？



有効回答数 44



アンケートコメント (抜粋)

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

<http://bioanalysisforum.jp/>



結論

⇒ 日内再現性, 選択性, マトリックス効果は基本的に評価する。

- SILをISに用いる場合はマトリックス効果の評価は必要ないのでは？



アンケート回答者コメント有



3. 検量線・QCのマトリックス

(2/2)

2. マトリックスマッチングの評価項目



アンケートコメント

- 予め別のマトリックスを混合して保存しないなら、安定性評価は必須。
- マッチングが用いられる対象マトリックスを考えると、日間は要らない気がします。マトリックス効果と選択性はそれぞれのマトリックスで評価済であれば重ねて評価は不要と思います未評価であればまとめて評価する必要があると思います。
- 上記は尿に血漿を添加したブランクマトリックスを用いたQCによる評価であり、血漿中濃度測定はフルバリデーションされている仮定という認識です。
- ミニマムリクワイアメント。分析法及び目的により、懸念される場合は日間再現性の確認も必要。
- これもケースによりますが、一般論としては、やらなくていい理由は見当たりません。
- 本来のマトリックスも含まれるので、マトリックス効果は確認、しかしながら選択性は意味を成さない。
- 血漿の分析法でSVが実施されていることが前提として、あとは血漿でどの程度希釈するかで評価の内容を決めると思います。何も評価しないということから、フルバリデーションに近いところまであり得ると思います。

<http://bioanalysisforum.jp/>



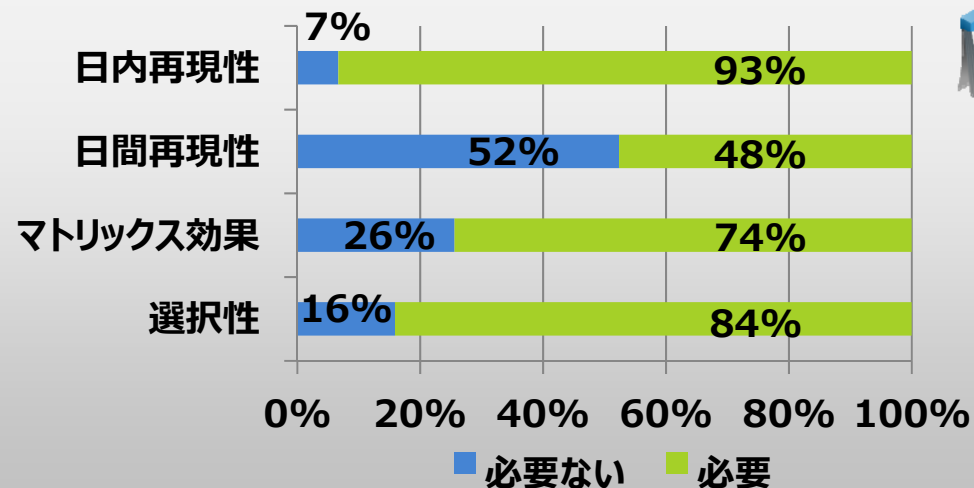
3. 検量線・QCのマトリックス

(1/2)

3. 代替マトリックスの評価項目



Pre-study validationではどの評価項目が必要か？



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

<http://bioanalysisforum.jp/>



結論

⇒3-2 (マトリックスマッチング) と同様な項目実施。
ISに同位体を用いることが有効と考えられた。



アンケート回答者コメント有



3. 検量線・QCのマトリックス

(2/2)

3. 代替マトリックスの評価項目



アンケートコメント

- QC試料は測定対象マトリックス, 検量線のみ代替マトリックスという前提。QCが代替マトリックスのバリデーションは妥当性がないと考えられる。
- **マトリックス効果はISに安定同位体を使用すること, マトリックスに生体試料を用いないことが前提, 選択性は試薬ブランクとしての評価。**
- マトリックス効果と選択性は一応確認としていますが, バッファーで固相抽出のときなど, 科学的に無意味なら省略でよいと思います。
- 上記は, 本来のブランクマトリックスを用いたQCを代替マトリックスで作成した検量線で評価する内容という認識です。
- ISが安定同位体で, In-studyでISのばらつきを評価できる場合, pre-studyのマトリックス効果評価は不要と思います。
- 代替マトリックスでは選択性やマトリックス効果の意味がない。
- フルバリデーションですよね。
- マトリックス効果の必要性はケースバイケース。

<http://bioanalysisforum.jp/>



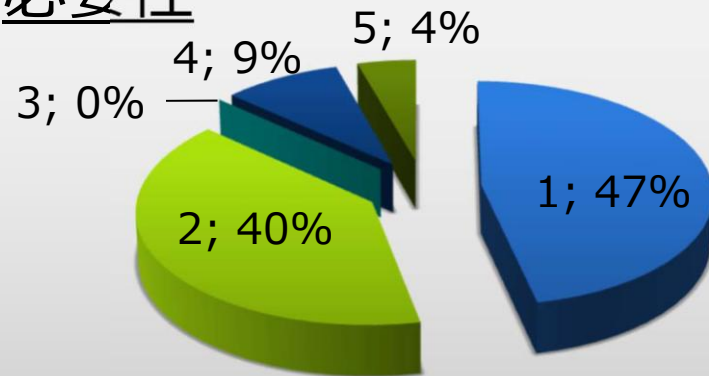
4. 日間再現性の実施

(1/3)



アンケート集計結果

必要性



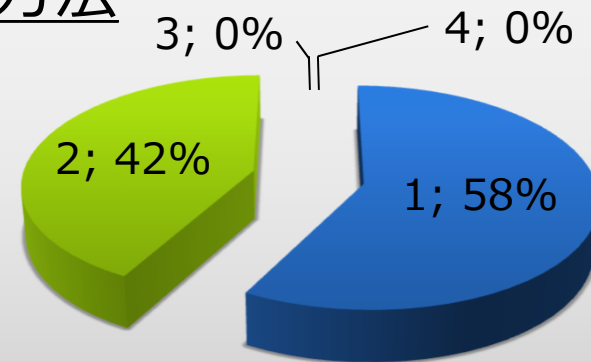
1. EBFに同意
2. DGに同意
3. 開発初期の血漿中未変化体測定では In-studyで実施すべき
4. Pre-studyで実施すべき
5. その他

有効回答数 45

結論

⇒必要に応じてIn-studyで追加実施

評価方法



1. 実試料分析時QC試料の確認のみ (各測定バッチ内での評価で良い)
2. 上記1に、各測定バッチ間での評価を加える
3. 実試料分析用QC試料とは別に、日間変動 確認用のQC試料を測定して評価
4. その他

有効回答数 19

結論

⇒実試料分析時のQC試料で評価可能

<http://bioanalysisforum.jp/>

DG検討, アンケート回答者コメント有



4. 日間再現性の実施

(2/3)



DGでの検討

【必要性】

- ・ 日間変動をpre-studyで実施すべきと考える人は少数であったが、DG案とEBF案への支持が拮抗しているため、日間変動をin-studyで評価するか否かについては意見の一致はないといえる。回答全体の印象としては、基本的にはEBF案(日内のみ実施)でよいが、DGの意見も受け入れられるということのようだ。

【評価方法】

- ・ 測定内バッチの変動確認だけで良いという人が多数派。
- ・ In-studyのバッチ内でのQC確認では、日内変動の評価のみでよいとしているEBF案との違いが明確ではないのではないか。
- ・ 毎回測定時のQCが基準を満たしていることは当然であるといえる。バッチ間の差を確認して初めて日間変動を評価したと言えるのではないか。
- ・ 回答者に設問の意図が伝わらなかったということも考えられる。

<http://bioanalysisforum.jp/>



4. 日間再現性の実施

(3/3)



アンケートコメント

- QC試料を分析時に調製する方法であるなら、日間再現性の意義はあまりないように思う。日間再現性の評価、解析方法にもよるが、想定されるリスクに対して、適切な評価方法が何かをすり合わせてみる必要を感じる。
- in-studyでデータが取れば評価しますが、必須とはとらえていないため、EBF寄りと回答しました。
- 1と2の違いが分かりません。実際の操作は同じだと思いますが、考察を文章化するかどうかの違いでしょうか？また、文章化する場合、どのレポートに含められるのでしょうか？pre-study validation reportへの追加ですか？

DGコメント

1はバッチ内のQCが基準を満たしたことが各バッチで確認することによる評価で、2は各バッチで測定したQC試料の測定結果の平均真度と精度を評価することになります。

- ガイドライン適用試験(初期臨床試験及び初期非臨床試験のTK試験)についてはガイドラインに従うべきと思います。それ以外の測定ではPre-studyでは日内再現性のみでよいと思います。結果的にIn-studyの精度管理用QC試料で日間再現性は確認できますが、日間再現性として取りまとめて報告する必要はないと考えます。
- サイエンスとしてはDGに賛成だが、GLとしては、EBFでもいいと思う。どっちにしろ、複数日測定すれば、日間再現性のデータはそろそろ。ばらついたときに、データを棄却できるかがポイント。
- DGの提案に異論はありませんが、それに縛られるものではないと考えます。



DG Discussion 4

SV項目	Assay appropriate SV		Stage appropriate SV
	代謝物・尿・組織		開発初期（未変化体）
5. 選択性	EBF	n=1	臨床 n=6, 非臨床n=1
	DG	EBFに合意	
6 .DDI併用薬 存在下の 選択性の検討	EBF	不要	
	DG	「一律不要」ではなく、「状況によって」などと表現できないかという提案あり。但し、評価方法は併用薬の代謝物が関係する場合も考えられることから、併用薬が関わる選択性の問題をPre-studyで全て検出できるかは疑問	

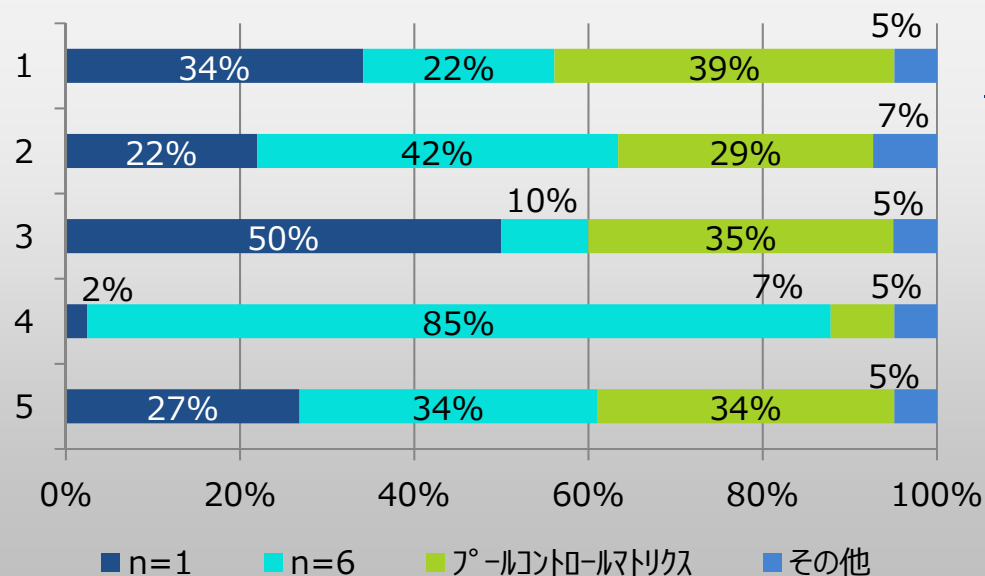
<http://bioanalysisforum.jp/>

JBF 5. 選択性

(1/2)



選択性検討においてEBFの5区分で適切な方法は？



EBFの5区分

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

有効回答数 41

<http://bioanalysisforum.jp/>

MEMO

選択肢にn=3があっても良かった？
未変化体（非臨床）でn=6に偏らなかったのは、早期GLP/TKが含まれることが認識されていなかった可能性あり。



結論

⇒臨床未変化体はn=6
その他は緩くてもよい。

DG検討, アンケート回答者コメント有

JBF 5. 選択性

(2/2)



DGでの検討

- ・ 尿でn=6を選んだ人が比較的多かったのは臨床試験を意識してのことか。
- ・ n=1と6の中間の選択肢(n=3など)があっても良かったかもしれない。



アンケートコメント

- ・ n=1よりはプールコントロールマトリックスが情報が多く好ましいと考えている(本当は違うかも)が、実際には必ずしも都合よく準備できない。
- ・ 尿中未変化体に関して、臨床試料の場合はガイドラインに従いn=6が必要と思います。それ以外はn=1でいいと思います。
- ・ 開発初期段階(非臨床)に関して、GLP/TKの場合はガイドラインに従いn=6が必要と思います。それ以外はn=1でいいと思います。
- ・ 対象とする試験と目的により、考え方が異なる。
- ・ 尿については個体差が大きいいため、nを増やした検討が必要と考えます。
- ・ 4についてはガイドラインどおりではあるが、6例も必要なのか疑問。
- ・ 血漿中の未変化体なら、基準を緩める理由はない。
- ・ LC/MS/MSを前提とすると、定量下限ピークのS/Nの十分な場合は、少ない例数でもよいかもしれない。

<http://bioanalysisforum.jp/>

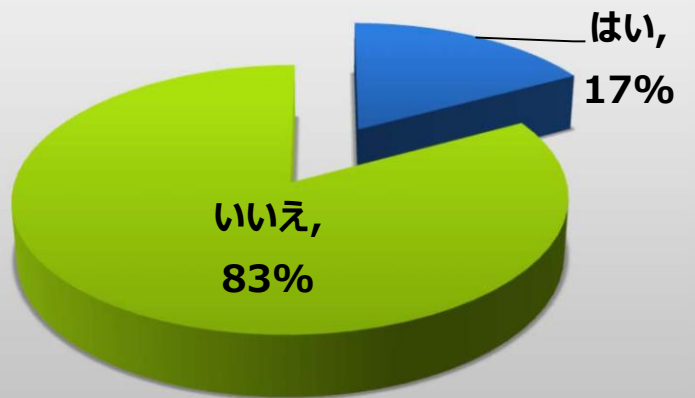
JBF 6. 併用薬

1. 影響の経験・内容



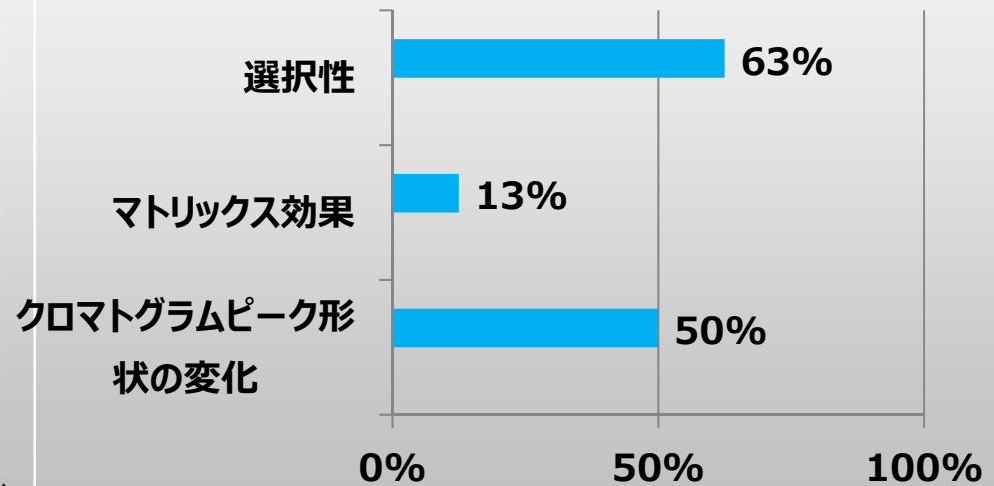
アンケート集計結果

併用薬又はその代謝物が測定系へ影響を及ぼした経験は有るか？



有効回答数 41

←で「はい」と回答の方。それはどのような影響か？（複数回答可）



有効回答数 8

<http://bioanalysisforum.jp/>



結論

⇒17%の回答者が経験ありで頻度が予想以上。注意必要か。



結論

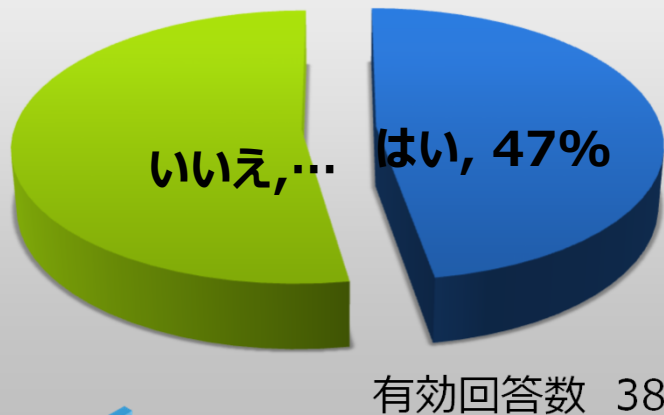
⇒妨害ピークがクロマト上に出現したと思われる。併用薬の代謝物等か？

JBF 6. 併用薬

2. バリデーションでの評価有無・評価項目

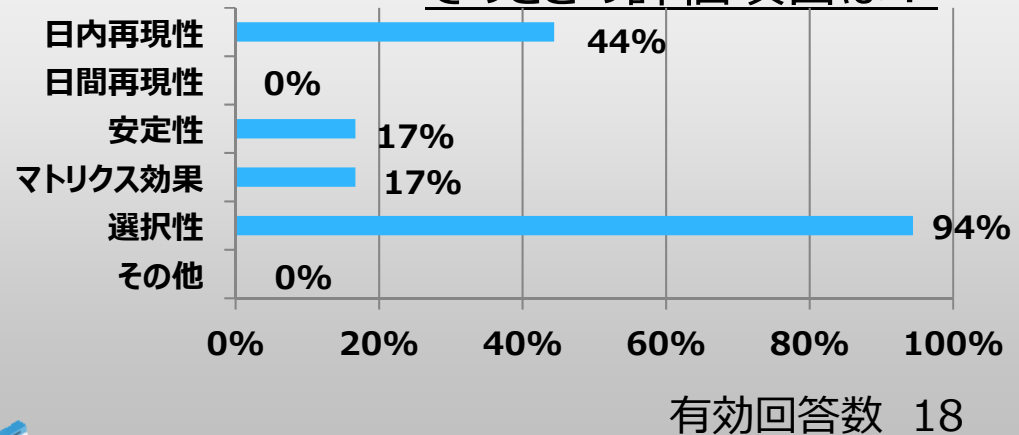
アンケート集計結果

併用薬の影響の
バリデーション試験で評価有無



MEMO
実施有無は治験デザインにも依存か？

←で「はい」と回答の方。
そのときの評価項目は？



MEMO
選択性は94%が確認。クロマト分離の確認で十分で日内再現性は不要、が大勢。再現性実施はケースバイケースで念のため確認。

結論

⇒ 実施の有無は拮抗。実施の場合、選択性は必須の試験項目

JBF 6. 併用薬

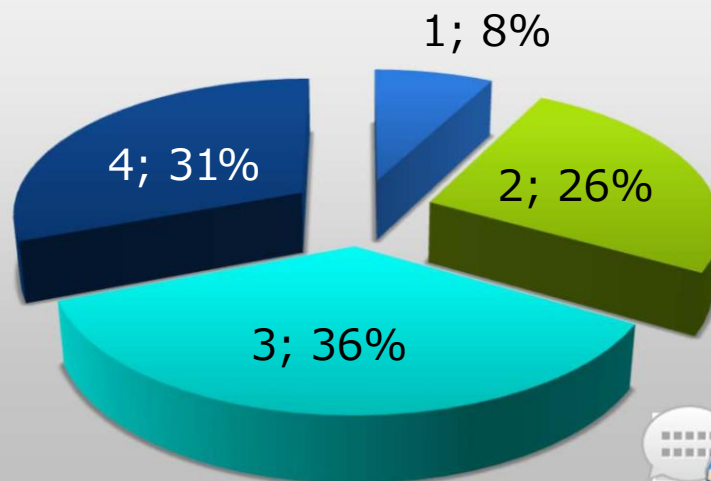
3. 評価の必要性

(1/2)



アンケート集計結果

併用薬の影響は原則的にバリデーション試験で評価すべきだと思いますか？



1. フルバリデーション, SVを問わずにバリデーション試験で実施する
2. フルバリデーションでは実施するが, SVでは実施しない
3. バリデーション試験で実施しない
4. その他

有効回答数 39



アンケートコメント (抜粋)

- 併用薬必須の試験を予定している場合はPre-studyで, それ事後はIn-studyでの確認でよい。



結論

⇒ 意見分かれる。各社でやり方が異なる。



アンケート回答者コメント有



6. 併用薬

3. 評価の必要性

(2/2)



アンケートコメント

- MS/MSでの分析であれば, 影響する可能性は低い。
- ケースバイケース。分析の目的や開発段階も考慮。
- 未知の併用薬のケースでは評価できない。
- 併用薬の影響は定量法の予備検討で確認。



DG Discussion 5

SV項目	Assay appropriate SV		Stage appropriate SV
		代謝物・尿・組織	開発初期（未変化体）
7.安定性	EBF	必要最小限, 基準は100±20%	開発初期段階で確認, または用時調製
7-1.標準溶液 (1)評価の必要性 (2)基準（未変化体） (3)基準（代謝物）	DG	必要, 基準は100±20%	必要, 基準は100±15%
7-2.凍結融解	EBF	代謝物: ISSで検証 尿, 組織: 1 cycleのみ検証	他の安定性試験に含めて実施
	DG	実サンプルの取扱方法に従って他の安定性試験に含めて評価 ISSでは試験前に安定性情報が得られないという意見有	
7-3.凍結保存	EBF	代謝物: 実施, 基準は100±20% 尿, 組織: 不要	他の安定性試験に含めて実サンプルに合 うように実施
	DG	代謝物: EBFに合意 尿, 組織: 試験目的に応じて保存状況での安定性を検討	EBFに合意
7-4.全血中未変化体	EBF	代謝物: 不要 (問題となる化学構造がない限り) 組織: N/A	不要 (問題となる化学構造がない限り)
	DG	EBFに合意	
7-5. Bench-topと 前処理後	EBF	不要	Bench-top: 他の安定性試験に含めて実 施 前処理後: Scientific judgment
	DG	EBFに合意 (不安定であれば検量線やQCで検出可能)	
7-6.併用薬存在下	EBF	不要	
	DG	EBFに合意	



7. 安定性

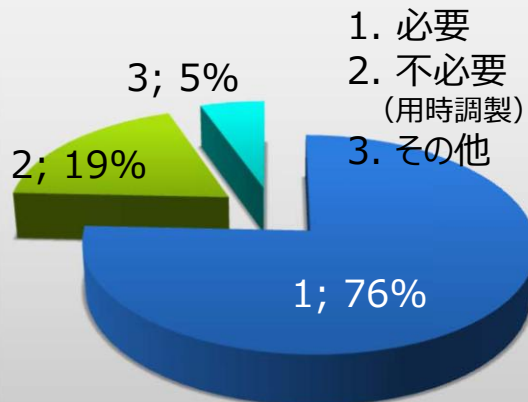
1. 標準溶液

(1/4)



アンケート集計結果

(1) 評価の必要性

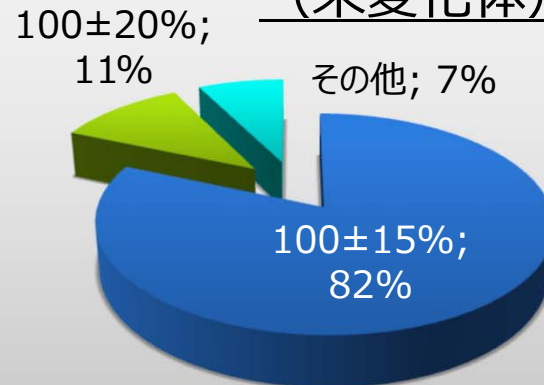


有効回答数 37

必要が3/4強，代謝物は不安定な物があるため，むしろ実施すべきという意見有り。

(2) 判定基準

(未変化体)

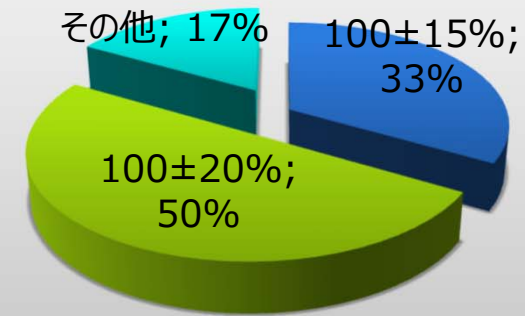


有効回答数 27

±15%が8割強 添加試料より厳しくするという意見有り。

(3) 判定基準

(代謝物)



有効回答数 36

何故未変化体と代謝物で基準を変えるか，といった意見有り。ICH M(3)のための評価なら，代謝物の基準は緩くても良い，ということが背景にあると考えられる。

結論

⇒ 標準溶液安定性は必要。基準は未変化体 ±15%， 代謝物 ±20%

DG検討，アンケート回答者コメント有



7. 安定性

1. 標準溶液

(2/4)

(1) 評価の必要性



DGでの検討

- 必要が3/4を占めた。代謝物は不安定な物があるため、実施したほうが良いという意見もあり。
- しかるべき範囲内で確認はすべき。ただし、代謝物の基準は緩くてよいのでは。
- **標準溶液の基準はQCなどより厳しくすべきでは。**
- 分析方法をどうするか。HPLCで測定し、5%の許容基準とする意見もあるが、通常我々バイオアナリストはUVでの測定まで実施せず、LC/MSで測定するので、基準はきつくしても10%か。
- 不安定な代謝物測定を現在実施していて、基準作りにもどうすべきか迷いがある。
- 化合物の性質により最後はサイエンティフィックジャッジメントか。



アンケートコメント

- 代謝物については、安定でないものも多く、何らかの形でデータは必要。
- 保存期間に関わらず、保存容器への吸着の可能性もあり得るので、確認した方が良いと考える。
- **安定性が確保されない場合は用時調製。**
- 用時調製する場合は不要。しない場合は必要



7. 安定性

1. 標準溶液

(3/4)

(2) 判定基準 (未変化体)



DGでの検討

- **±15%が8割強, 添加試料より厳しくする, というその他意見有り。**
- 代謝物と未変化体の基準を分けることが, そもそもおかしいという意見はあるが, 標準物質としての純度が低い代謝物の場合の基準を同じにするのも疑問が残る。GLP, GCPに関係するため基準は厳しく, という意見が背景にはありそう。



アンケートコメント

- マトリックス中の濃度測定法ではなく, 別のHPLC等による方法で±5%程度の基準で判定するのが, 本来は望ましいと思う。保存後に-14%となるような標準溶液を用いて実サンプルを分析する気にはなれない。
- 前処理後の測定値の判定基準が $100 \pm 15\%$ なので, 溶液の基準は $100 \pm 10\%$ としています。
- **添加試料の真度より厳しい基準でなければならない。(QC試料の判定基準が $100 \pm 15\%$ 以内ならば, 標準溶液中安定性の基準は $100 \pm 10\%$ 以内にするなど)**
- 濃度データの使用目的次第。

<http://bioanalysisforum.jp/>



7. 安定性

1. 標準溶液

(4/4)

(3) 判定基準 (代謝物)



DGでの検討

- 代謝物では±20%が半数, その他では何故未変化体と代謝物で基準を変えるか, といった意見有り。ICH M(3)のための評価であれば, 代謝物の基準は緩くても良い, ということが背景にあると考えられる。



アンケートコメント

- 正確さが必要な分析方法であるなら, HPLCを用いて±5%で評価することも検討すべきである。
- 未変化体の判断基準に従う。
- 形式的には100±15%であるが, 10%以下を目標
- 100±10%
- 前問と同様. **そもそもなぜ未変化体と代謝物で判定基準を変えることがありえるのか, DGの見解を示していただきたい。**
DG回答; 代謝物のQC・検量線のクライテリアが未変化体より緩いのでそれに比例して標準溶液の安定性も緩くて良い、と考えています。
- マトリックス中濃度の検量線等のクライテリアに準ずる形で基準を決めればよいと思う。
- ±20%あればよいが, あくまで原則であり, ±30%でも許容できるなど文言的には幅が欲しい。

<http://bioanalysisforum.jp/>



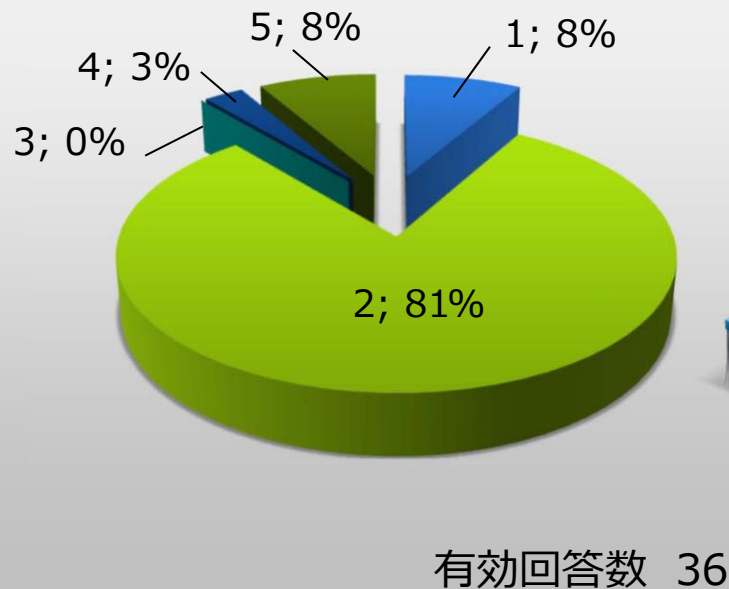
7. 安定性

2. 凍結融解

(1/2)



アンケート集計結果



1. EBFに同意
2. DGに同意
3. In-study で実施。実施方法は並行保存QC, 必要回数凍結融解。
4. In-study で実施。実施方法はISS。
5. その他



DGに賛成が8割と多数を占めたが、少数意見では、最終的に安定性が保証出来ればいいのでISSでもOKという意見有り。

<http://bioanalysisforum.jp/>


結論

⇒ 実サンプルの取扱方法に従い他の安定性試験に含めて実施



DG検討, アンケート回答者コメント有



7. 安定性

2. 凍結融解

(2/2)



DGでの検討

- DGに賛成が8割と多数を占めたが、少数意見では、最終的に安定性が保証出来ればいいのでISSでもOKという意見有り。
- **DGの意見, 実サンプルの取り扱いに合わせて他のPK試験と合わせて実施が良い。**



アンケートコメント

- 2と3の両方を状況により使い分けるのが適切と思います。
- **最終的に安定性を保証することでよいと考える。開発初期は構造からあるいは扱っているAnalog等から安定性を判断してもよいと考える。**
- Spiked sampleと実sampleが異なる場合あり。ISSも考慮する。
- 結果論でいいなら、ISSでもいいですけどね。
- 代謝物のSVを実施するタイミングではすでに臨床検体を所持していると思われるので、EBFの主張も一理あると思います。

<http://bioanalysisforum.jp/>



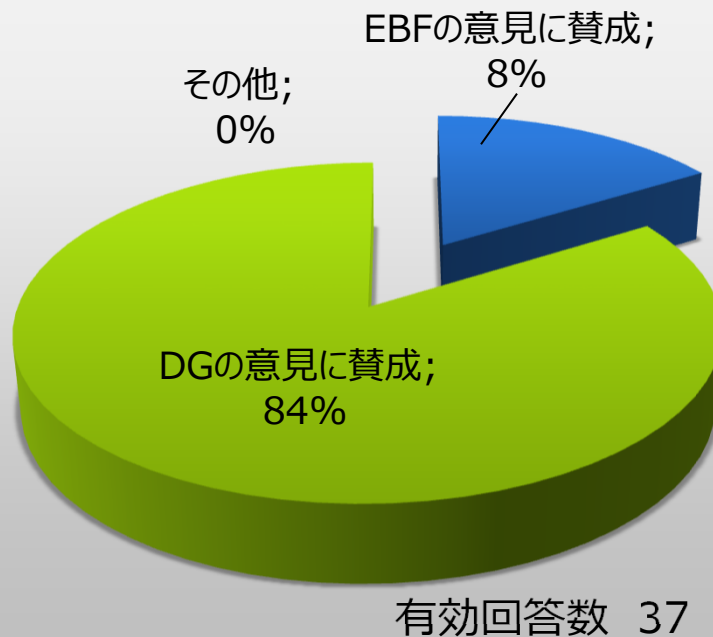
7. 安定性

3. 凍結保存

(1/2)



アンケート集計結果



DGに賛成が8割と多数を占めたが、少数意見では、最終的に安定性が保証出来ればいいのでISSでもOKという意見有り。DGに賛成が8割以上、尿や組織についても必要に応じて安定性確認は必要という認識と考えられる。

必要に応じて実施で良い、安定性確認は必要。

クライテリアについてのコメントが無いが、代謝物が20%には同意。

<http://bioanalysisforum.jp/>


結論

⇒EBF案に加え、尿・組織については試験目的を考慮して安定性を実施

DG検討, アンケート回答者コメント有



7. 安定性

3. 凍結保存

(2/2)



DGでの検討

- DGに賛成が8割以上であった。尿や組織についても必要に応じて安定性確認は必要ということが、大勢と考えられる。
- 必要に応じて実施が良い、安定性確認は必要。
- クライテリアについてのコメントが無いが、代謝物が20%には同意。



アンケートコメント

- EBFが尿と組織の凍結融解安定性を不要とした理由は何でしょうか。

<http://bioanalysisforum.jp/>



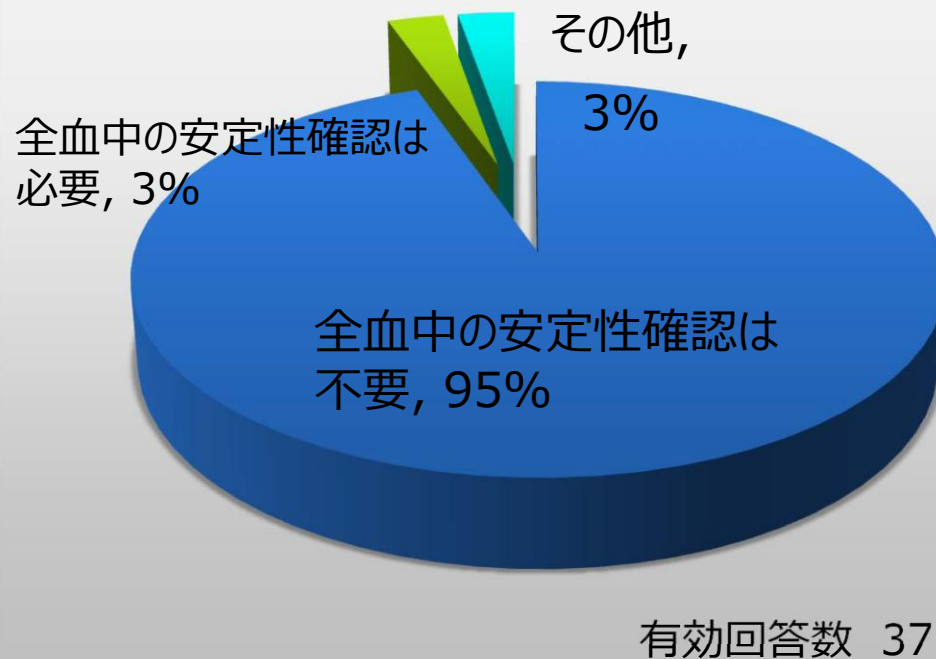
7. 安定性

4. 全血中未変化体

(1/2)



アンケート集計結果



MEMO

SVでは必要無しが95%と多数。「必要に応じて」も少数意見。EBFのWPでも不要としているので妥当な結果。予想通りで、懸念が無い場合は評価していない。

<http://bioanalysisforum.jp/>

結論

⇒ 全血中の安定性評価は不要



アンケート回答者コメント有



7. 安定性

4. 全血中未変化体

(2/2)



アンケートコメント

- 必要に応じ全血中の安定性は必要。安定化剤が必要なときもあると考えられる。ただし、懸念される場合は実施する。
- 血漿サンプルの場合、採血後遠心分離して血漿分離するまでの想定される時間の間の安定性を評価。全血に標準溶液を添加して、添加直後と添加して保存後のサンプルを評価

<http://bioanalysisforum.jp/>

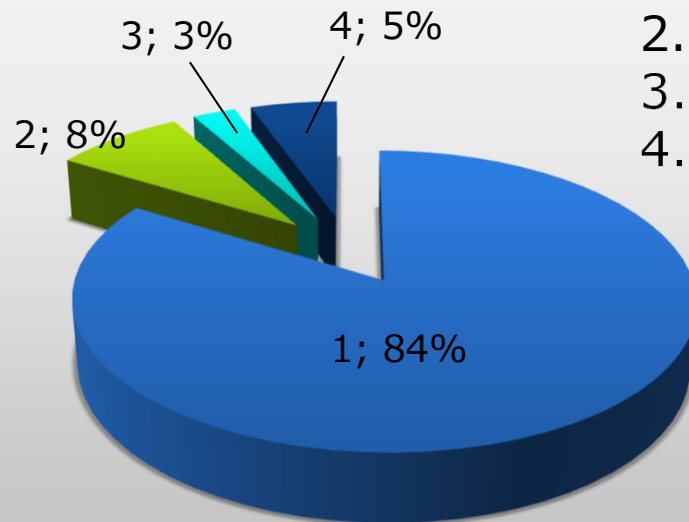


7. 安定性

5. Bench-topと前処理後 (1/2)



アンケート集計結果



1. EBF, DGの意見に同意
2. 代謝物, 尿, 組織でも実施
3. 血漿中未変化体は独立して実施
4. その他



アンケートコメント (抜粋)

Bench-Topと前処理後の安定性が濃度データに影響を与えそうか否かを判断する。不安定性が懸念されるような場合、その程度を把握するという手順も可能



予想通り。代謝物や尿中は実施すべきという少数意見有り。

有効回答数 37



結論

⇒ 代謝物, 尿, 組織では実施せず。
未変化体では他の安定性に含めて実施



アンケート回答者コメント有



7. 安定性

5. Bench-topと前処理後 (2/2)



アンケートコメント

- 尿中の未変化体については実施すべきかと思えます。
- なぜ、マトリックスごとに対応が異なるのか、科学的には説明できません。



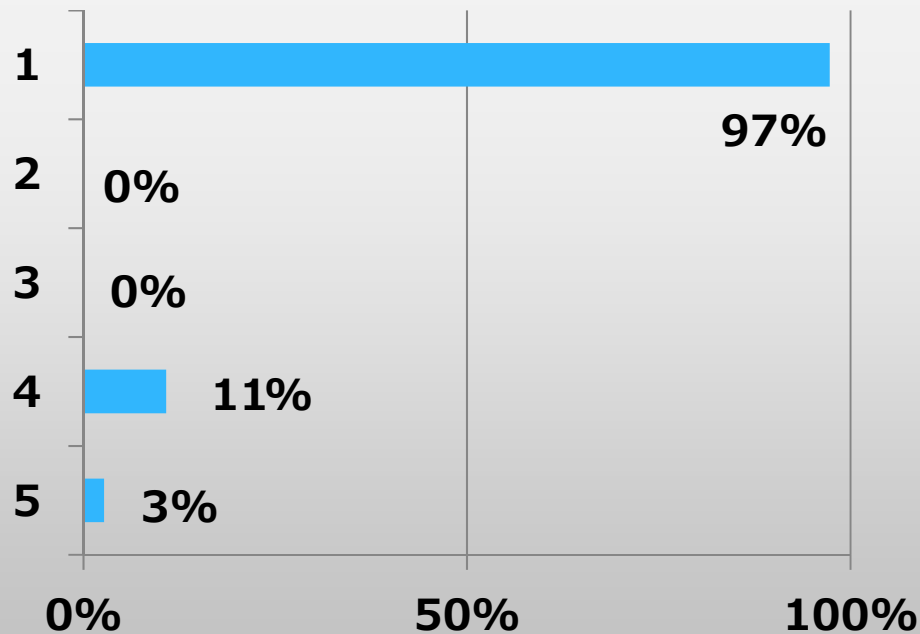


7. 安定性

6. 併用薬存在下



アンケート集計結果



有効回答数 37

1. EBF, DGの意見に同意
2. 代謝物, 尿, 組織の全て, または一部で実施
3. 開発初期段階で他の安定性試験に含めず, 独立して実施
4. SVではなくフルバリデーション時にも実施していない
5. その他



アンケートコメント

これは科学的に必要性がないところだと感じています。併用薬よりインパクトの大きい因子があるような気がします。

MEMO

ほぼ全員が合意, 併用薬存在下の安定性試験は必要無し。



結論

⇒ 併用薬存在下の安定性は必要なし。



DG Discussion 6

SV項目		Assay appropriate SV	Stage appropriate SV
		代謝物・尿・組織	開発初期（未変化体）
8. IS variability 評価	EBF	Scientific judgment	Bioanalysis (2014) 6(20), 2767-2774参照 (直下のスライド)
8-1.許容値設定	DG	現状は実施していないか、±50%	
8-2,3. 評価の必要性と 許容値の設定方法	EBF	Scientific judgment	Matrix effects検出のために有効、 評価基準はreference paper
	DG	EBFに合意	
8-4, 5. 高脂血漿・溶血血漿 での影響評価と 評価基準	EBF	不要	IS variabilityで検出可 評価基準はreference paper
	DG	EBFに合意	

JBF 8. IS variability 評価

<経験的方法>

EBF Recommendation:

クロマトグラムの異常確認 

IS areaを注入順にプロットし異常発生の傾向を確認

散発的発生

特定のtime pointまたは
被験者ごとなど”群単位”での発生

以下の場合、異常値として
再測定し、再測定値を採用

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

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

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

<http://bioanalysisforum.jp/>



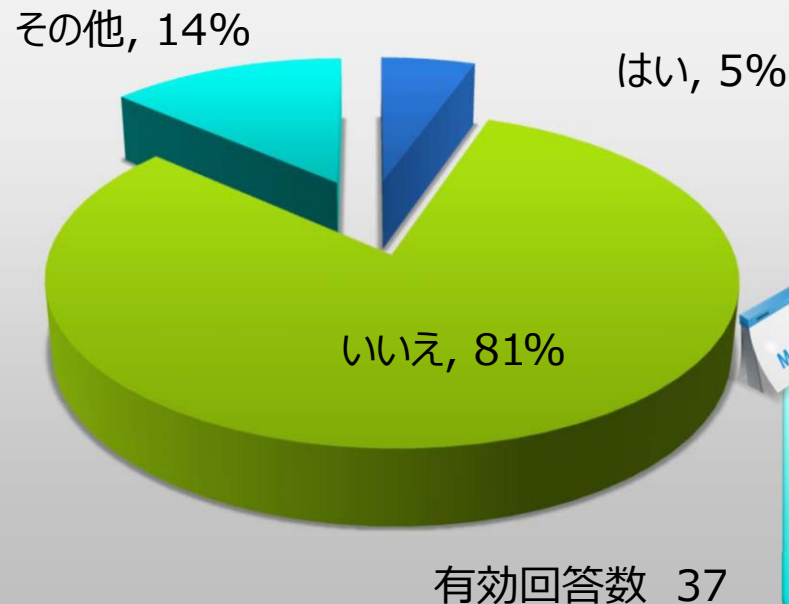
8. IS variability 評価

(1/2)

1. IS response の変動幅に許容値を設定しているか？



アンケート集計結果



アンケートコメント (抜粋)

【使用されている基準】

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

予想通り、8割以上でIS responseの変動幅に許容値設定していない。
設定している場合もEBFのWPとは違なり、50%が一つの目安となっている。



結論

⇒IS response変動幅の許容値設定までは至っていない。



アンケート回答者コメント有



8. IS variability 評価

(2/2)

1. IS response の変動幅に許容値を設定しているか？



DGでの検討

- 8割以上でIS response変動値で許容値設定していない。設定している場合もEBFのWPとは違い、50%がひとつの目安となっているよう。
- 国内の現状は予想通り。



アンケートコメント

- まだ試行錯誤の段階だが、バッチの平均レスポンス値 $\pm 50\%$ としたことがある。
- ISピーク面積の最大値と最小値が2倍以上差がある場合は、再分析、再注入の必要性を判断することにしてはいますが、厳格な許容幅を設けているわけではありません。
- ブランク試料を除く全試料の平均値の $\pm 50\%$
- **数値基準は設定しないがクロマトレビューして疑義がある場合はリジェクトする。**
- Case by Case
- **変動は注意するようにしているが、分析対象物質や分析法により幅があるため、許容値は設定していない。許容値の設定にはある程度の測定数(プロット数)が必要ではないかと考える。統計的に評価する等、何らかの許容基準も必要**
- 委託試験では設定した経験がある。CVで50%以下
- 値は見ているが、Criteriaは設定していない。
- 積極的には設定していない。ただし、定量下限のピークが検出できなくなるような変動がないかは注視している。また、海外のCROなど自社SOPに設定されている場合には、その内容を把握したうえでそれに従って進めている。



8. IS variability 評価

(1/4)

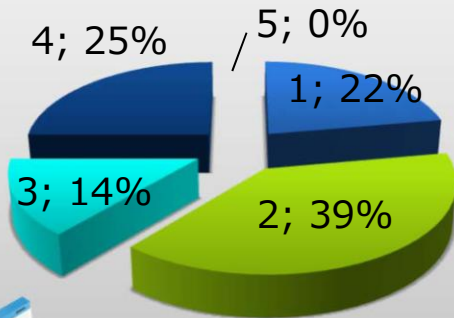
2. 評価の必要性

3. 許容値の設定方法



アンケート集計結果

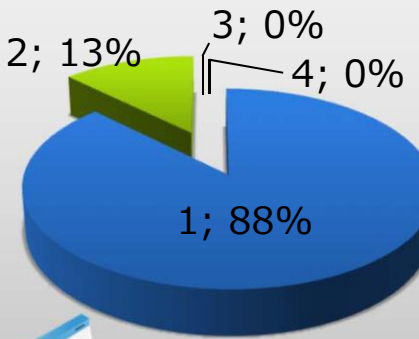
IS response 変動をIn-study で評価することについて



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

有効回答数 36

←で1.を選択した方, 許容幅設定方法でEBF提唱の経験的方法について



1. 同意
2. 場合によって同意
3. 同意できない
4. その他

有効回答数 8



事前の許容基準設定は意見が分かれる。同位体ISのときは評価不要, あるいは許容基準を緩くする, という意見多数



事前の基準を設定すべきと回答した方にEBFの基準は受け入れられた。



結論

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

DG検討、アンケート回答者コメント有



8. IS variability 評価

(2/4)

2. 評価の必要性



DGでの検討

- 事前に許容基準を設定すべきか意見が分かれている。また、ISに同位体を用いるときは評価不要、あるいは許容基準を緩くする、という意見多数あり。
- 同意の割合が高く、何らかの評価の必要性を感じる。ISのタイプ(SIL-IS or not)でケースバイケースでは。
- 同僚の意見では不要であり、同意できないが25%は少ないと感じた。ISの添加ミスを検出するには有効と考えられるが、一方でマトリックス効果を確認してあれば評価の必要なしとも考えられる。

<http://bioanalysisforum.jp/>



8. IS variability 評価

(3/4)

2. 評価の必要性



アンケートコメント

- ISが類縁物質かSIL-ISかによって許容範囲は変えてよい。SIL-ISの場合は, analyteとISが同じ挙動をすると仮定して, 検量線のLLOQのレスポンスとULOQのレスポンスの頭打ちが担保できる範囲で広げてよいのではないか。
- **ISに安定同位体を用いる場合は, 評価不要としてもよいと思います。**
- 例えば代表サンプルの50-200%とかの粗い許容範囲は判断に必要だと思います。
- ISが安定同位体であることが前提と思います。またPre-studyでマトリックス効果の評価を実施している場合は不要としてよいと思います。
- ISに何を使用するかにより, 必要性が異なる。
- 再分析の指標として, 下は0, 上は2倍以上とか。
- IS Responseが他のピーク面積の2倍以上のものは, IS添加のミスが疑われるため考慮すべきであるが, それ以外のケースでは不要ではないかと思う。

<http://bioanalysisforum.jp/>



8. IS variability 評価

(4/4)

3. 許容値の設定方法



DGでの検討

- IS response変動基準を事前に設定すべきと回答した方に、EBFの基準は受け入れられた。
- 具体的な基準は他にまだ示されていない。論文化されている基準であれば説得力があるためと考えられる。



アンケートコメント

- 最大値(Refhigh)と最小値(Reflow)が平均値から大きくずれていないのであれば同意。平均値から15%以上ずれるようであれば、本値自体が異常値の可能性を否定できないため、その値を基準とすることはできないのではないか。

<http://bioanalysisforum.jp/>



8. IS variability 評価

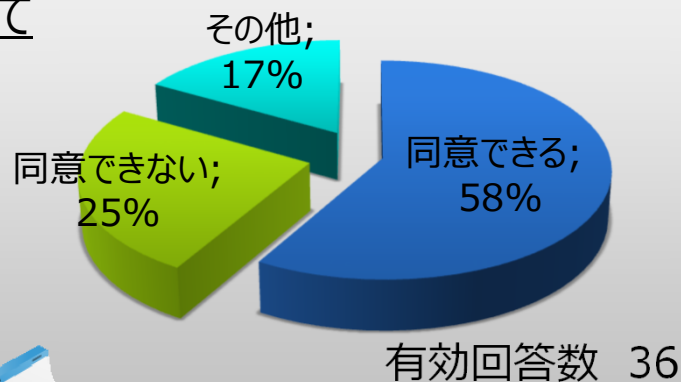
(1/4)

4. 高脂血漿・溶血血漿での影響評価 5. 評価基準



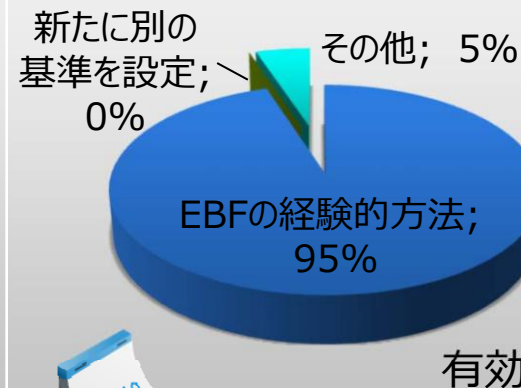
アンケート集計結果

IS responseによる高脂血漿/溶血血漿が測定結果に及ぼす影響評価について



同意は6割程度，ISが安定同位体か否かで対応が違う意見有り

←で1を選択した方，高脂血漿/溶血血漿が測定結果に対する影響評価の許容基準は？



具体的な基準は他にまだ示されていない。論文化された基準であれば説得力があるためと考えられる。

コメント (抜粋)

血球移行率の高い薬物の溶血の影響評価は出来ないのでは？

結論

- ⇒4. IS response 変動で高脂血漿/溶血血漿影響評価は可能
- ⇒5. EBFの基準は受け入れ可能

DG検討，アンケート回答者コメント有



8. IS variability 評価

(2/4)

4. 高脂血漿・溶血血漿での影響評価



DGでの検討

- 同意は6割程度，やはりISが安定同位体であるか否かで対応が違う意見有り。
- 同意が過半数だが，同意できないの意見のコメント「駄目だった時はどうする」などには納得する。
- SIL-ISが前提とも考えられる。
- 未変化体はSIL-ISの場合が多いが，代謝物では稀。SIL-ISか否かで対応が変わってくる。アンケート作成時にはそこまで考えが及んでおらず，今後の課題と考えられた。

<http://bioanalysisforum.jp/>



8. IS variability 評価

(3/4)

4. 高脂血漿・溶血血漿での影響評価



アンケートコメント

- SIL-ISであることを前提として。
- ISと分析対象の感度がバラバラに動く可能性があるので、一概にはいえないが、考え方の根幹には同意できる。SIL-ISであれば許容できる。
- IS responseが変動しても、測定対象が同じように変動して、理論値通りの濃度値が出ていれば問題ないとする。特にISが測定対象の安定同位体を用いているのであれば、高脂質血漿や、溶血血漿を用いた評価は必要ないとする。
- ISが安定同位体の時に限ると思います。
- **血球移行率の高い場合の溶血の影響は、validationでは評価できないのではないのでしょうか？**
- 仮にISのレスポンスが変化した場合、測定結果についてはどう考えることになるのでしょうか。Analyteのレスポンスが変化したか否かが不明なため、はっきりとしたことは言えないのではないかと思います。
- **ここでの溶血の問題は血液成分が定量に及ぼす影響であって、血球に移行した薬物の影響ではないと思います。血球で濃縮される様な薬物の溶血サンプルについては開発企業が別途考えるべき事であり、DG(影響力が大きいと思います)の意見として記載されると混乱させるだけだと思います。**
- 上記の血漿の状態は程度問題であり、それらについて定義づけてから議論すべきではないかと思う。

<http://bioanalysisforum.jp/>



8. IS variability 評価

(4/4)

5. 評価基準



DGでの検討

- 基準についてはEBF提案が受け入れられた。
- 具体的な基準は他にまだ示されていない。論文化されている基準であれば説得力があるためと考えられる。WPには検討時に実施の記載なし。
- SVで対象としていない。
- $\pm 50\%$ の基準はIS添加ミスなどを検出するため、この基準で高脂血漿・溶血血漿の異常値を検出できるか疑問



アンケートコメント

- ISが安定同位体であれば前々問で定めた基準と同じで同意します。



DG Discussion 7

SV項目		Assay appropriate SV	Stage appropriate SV
		代謝物・尿・組織	開発初期（未変化体）
9.他の試験項目		EBF	不要
9-1.回収率	DG	EBFに合意	
9-2.キャリーオーバー		EBF	Pre-study validationでは実施せず，In-study validationで影響評価
		DG	予備検討中にキャリーオーバーを検出したときには積極的な対応が必要だが，問題がないときにはEBFに合意
9-3.ISR		EBF	不要
		DG	実施する意義を考えて対応する（薬効評価に重要な場合など）
9-4.希釈の妥当性		EBF	必要に応じて In study validationで実施
		DG	単回用量漸増試験などでは定量対象の濃度範囲が広いいため，Pre-study で希釈の妥当性評価の必要性がでてくる

http://bioanalysisforum.jp/

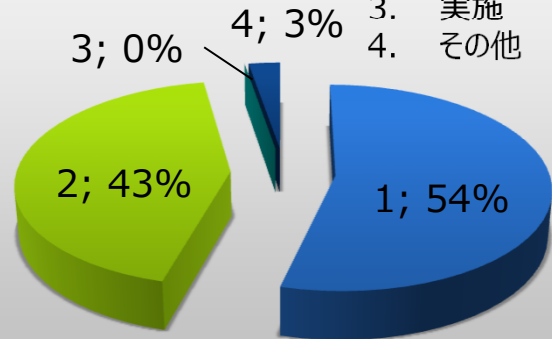
JBF 9. 他の試験項目

1. 回収率 2. キャリーオーバー (1/2)

アンケート集計結果

回収率

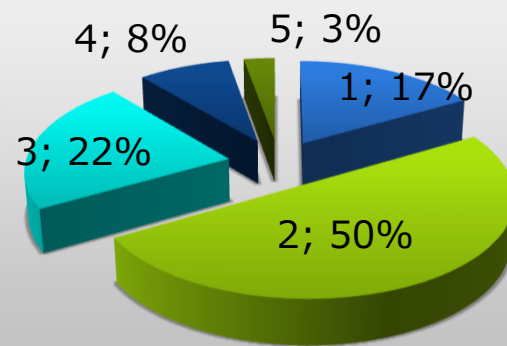
1. 実施無 (GLで必要無)
2. 実施無 (検討時確認)
3. 実施
4. その他



有効回答数 37

キャリーオーバー

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



有効回答数 36

アンケートコメント

試験法検討段階で回収率が低い方法は避けるため、試験は必要ない。



検討時に評価している回答者が多く妥当と考えられた。

http://www.rainbowriver.jp/

結論

⇒ 実施しないで一致

結論

⇒ 問題がなければ、pre-studyでも実施しないという意見が多数



DG検討, アンケート回答者コメント有



9. 他の試験項目

2. キャリーオーバー (2/2)



DGでの検討

- In-studyでは何らかの評価すべきが過半数, Pre-studyで評価すべきは1/3。
- 少数派(8.3%)ではあるが常に評価する回答者もいた。
- **検討時に評価している回答者が多く, 妥当と考えられた。**



アンケートコメント

- 通常は分析法開発時に対策をとって影響ない状況にしてからpre-study validationを実施すると思うので, 必ずしもpre-study validationで実施する必要はないが, 試料数が多くなってくると影響が考えられるのでin-studyでは評価すべきである。(SV以前に, 通常のフルバリでの評価方法にコンセンサスがあるのか?)
- **分析法検討時のデータがドキュメント化されているならSVで実施不要。**
- Pre-study validationで許容範囲外(あるいはぎりぎり)であった場合には, In-studyでも確認(及び対策)が必要と考えます。

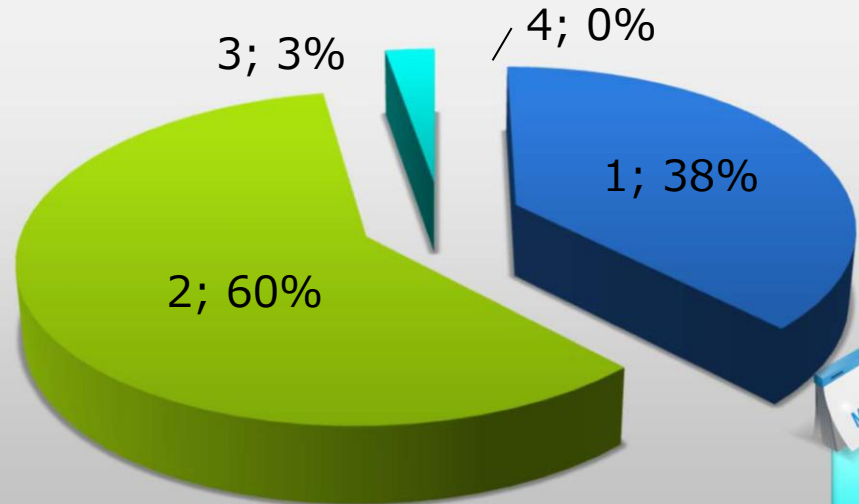
JBF 9. 他の試験項目

(1/2)

3. ISR (代謝物, 尿, 組織)



アンケート集計結果



有効回答数 37

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

MEMO

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



結論

⇒ 代謝物, 尿, 組織ではISRは必須でない。

DG検討, アンケート回答者コメント有

JBF 9. 他の試験項目

(2/2)

3. ISR (代謝物, 尿, 組織)



DGでの検討

- 尿はフルバリデーション時でも実施の必要性には疑問が残る。必要性があるのは、尿中薬物が薬理作用に関係するような場合に限られるのでは。



アンケートコメント

- Pre-study validationで何を評価しているかによる。
- 血漿中濃度測定もISRは必要ないと考えている。しっかりした試験方法を作成していれば、必要ないと考える。
- SV下の測定を申請データにしないなら不要。同じような試験をやり直すことになるなら、あえてISRを義務にする必要はない。
- EBFは「実施しなくてもよい。」としており実施を妨げるものではない事から、あえて「必要に応じて実施した方がよい」とする必要は無いと思います。そのような書き方にすることで、拘束力が生じる事は避けるべきと考えます。

<http://bioanalysisforum.jp/>

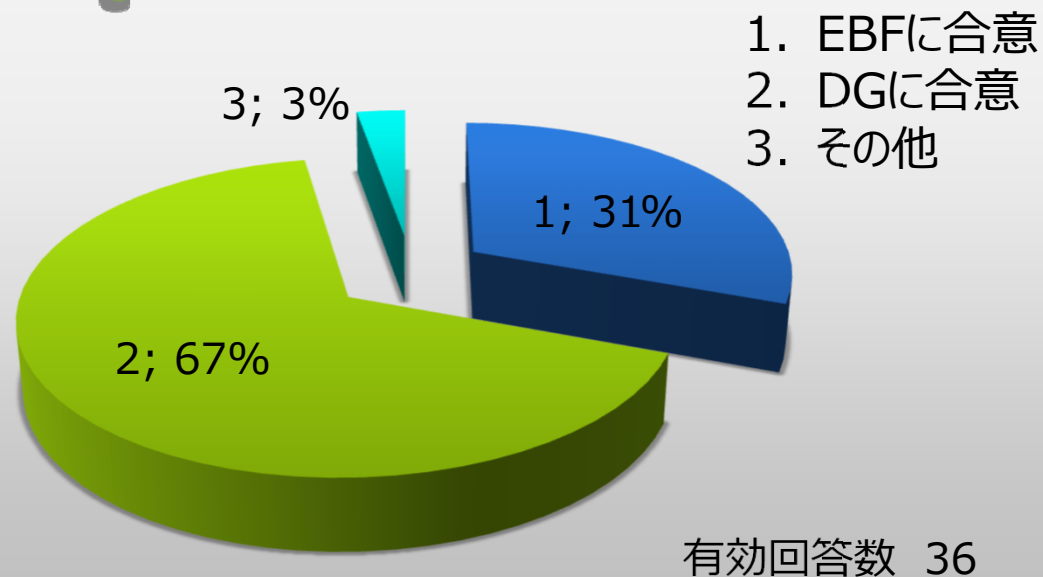
JBF 9. 他の試験項目

(1/2)

4. 希釈の妥当性



アンケート集計結果



1. EBFに合意
2. DGに合意
3. その他

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

<http://bioanalysisforum.jp/>



結論

⇒Pre-studyまたは
In-studyのどちらかで実施すれば良い。



DG検討,
アンケート回答者
コメント有

JBF 9. 他の試験項目

(2/2)

4. 希釈の妥当性



DGでの検討

- 必要性が予測される場合、Pre-studyで実施が2/3、In-studyで実施が1/3であり、どちらかで実施してあれば良いのでは、と考えられる。
- Pre-studyで実施が理想的だが、必要が生じてからIn-studyで実施でもよい、という意見が多数。



アンケートコメント

- 1,2どちらも可かと思えます。
- 検量線のレンジの強度が合っていない場合もある。濃度を見誤らないようにする。
- **Pre-study validationの実施を必須とする必要はない。**
- ここに記載されているSADは非臨床、臨床どちらでしょうか。臨床試験でSADを実施する場合、弊社ではフルバリデーションが前提です。

<http://bioanalysisforum.jp/>



DG Discussion 8

SV項目		Assay appropriate SV	Stage appropriate SV
		代謝物・尿・組織	開発初期（未変化体）
10.その他	EBF	吸着の影響や安定化剤添加の必要性などを試験の開始前に検討し、文書化しておくことが重要	
10-1.試料採取方法	DG	予備検討で吸着の影響や安定化剤添加の必要性は確認しておくべき。	
10-2.検量線の外挿	EBF	科学的な判断評価にもとづく外挿は可能	
	DG	スライド参照	
10-3.再分析	EBF	実施しない	n=2で再測定
	DG	Scientific judgmentで再分析の可否を判断	SOPまたは試験計画書に従って再分析を実施
10-4.計画書・報告書	EBF	簡略化を推奨	
	DG	EBFに合意	
10-5.SOP	EBF	どの様な場合に実施するか、何を実施するか定めるべき	
	DG	国内企業ではほとんど整備されていない	



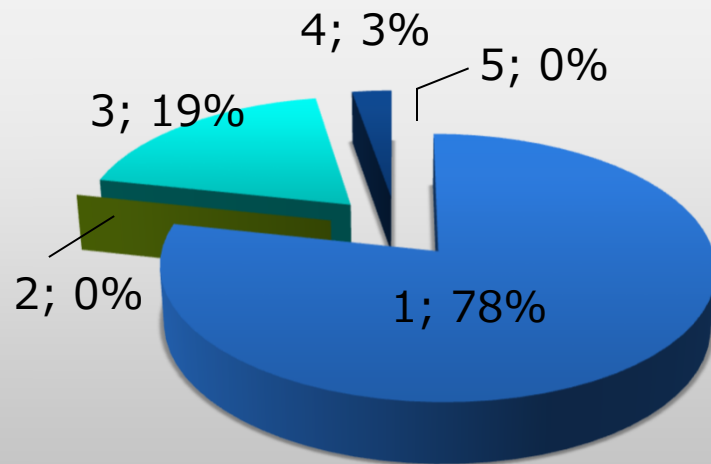
10. その他

1. 試料採取方法

(1/2)



アンケート集計結果



有効回答数 37

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



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

<http://bioanalysisforum.jp/>


結論

⇒ 試料採取方法は事前に検討しておけば良い。



DG検討, アンケート回答者コメント有



10.その他

1. 試料採取方法

(2/2)



DGでの検討

- どのように「文書化」するのがポイントでは。In-studyなどでは報告書に記載できるが、ちょっとした検討結果の残し方はどうするか？会社によって方法はマチマチ。月報で検討実施事項を報告する場合もあるが、意味合いが違う。



アンケートコメント

- サンプルのハンドリングに関する項目は、やり直しがきかないので事前にデータを取っておく必要あり。

<http://bioanalysisforum.jp/>



10. その他

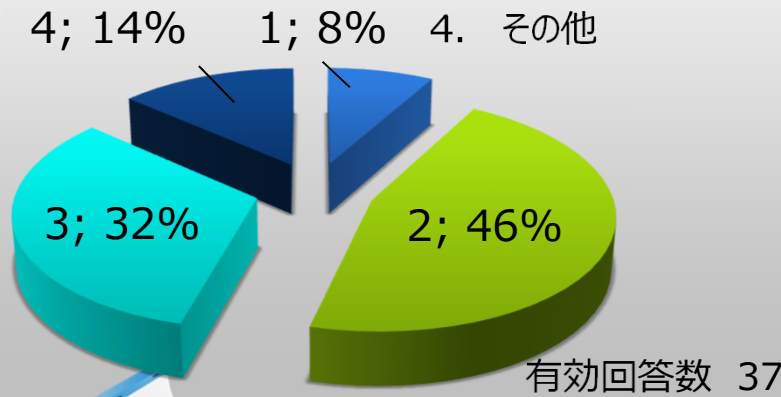
2. 検量線範囲外試料濃度の外挿 (1/2)



アンケート集計結果

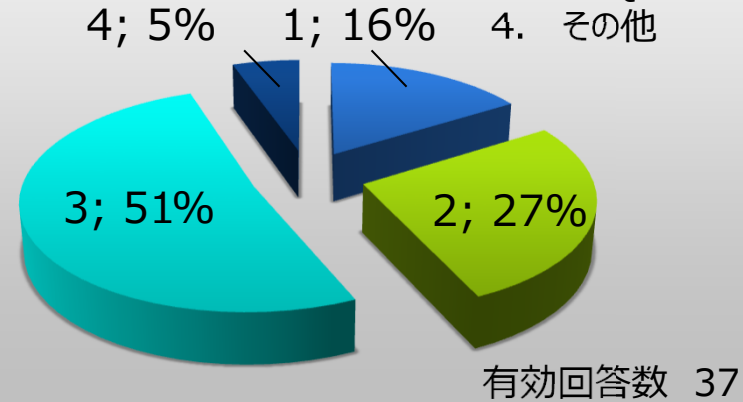
ULOQ以上

1. 相関係数等を考慮
2. 真度の許容誤差範囲内であれば採用
3. 希釈再分析を実施
4. その他



LLOQ未満

1. S/N等を考慮し判断
2. 真度の許容誤差範囲内であれば採用
3. BLQまたはゼロとして扱う
4. その他



ULOQ以上は外挿可が多いが、LLOQ未満はSVでも外挿不可が多い。



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

DG検討, アンケート回答者コメント有

http://www.rainy.or.jp



10. その他

2. 検量線範囲外試料濃度の外挿
(2/2)

DGでの検討

- 外挿容認が過半数だが、データの取扱が面倒では。
- ULOQ以上はOKだが、LLOQ未満はSVでも定めた下限値はゼロとすべき



アンケートコメント

【ULOQ以上】

- DG案に同意です。
- **あらかじめ試験計画書に記載していれば上記の外挿は可能と思います。**
- 希釈再分析又はULOQとして報告。
- 希釈を実施しているが、検量線の限界でなければ、外挿はありと考える。
- 検量線のレスポンスや真度によって、許容できる場合とできない場合があると思われる。
- **飽和しかかっているULOQ等の場合は、外挿不可。**
- 検量線の回帰モデルが直線であれば、EBFまたはDGの意見に賛成する。
- 理由がつけられるならいいが、データの使用目的次第。絶対値が大事であれば、希釈測定することが多いと思う。

【LLOQ未満】

- 必要に応じて判断。重要な測定値であれば、何らかの保証(確認)が必要。
- 下限は基本的に認められない。(リスクが大きすぎる)
- **データの使用目的次第。**



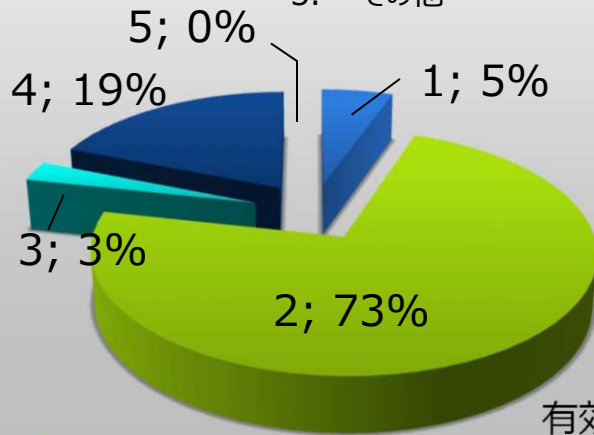
10.その他 3.再分析



アンケート集計結果

代謝物, 尿, 組織

1. EBFに合意
2. DGに合意
3. 追加分析 (n=2)
4. SOP又は試験計画書に従って再分析
5. その他

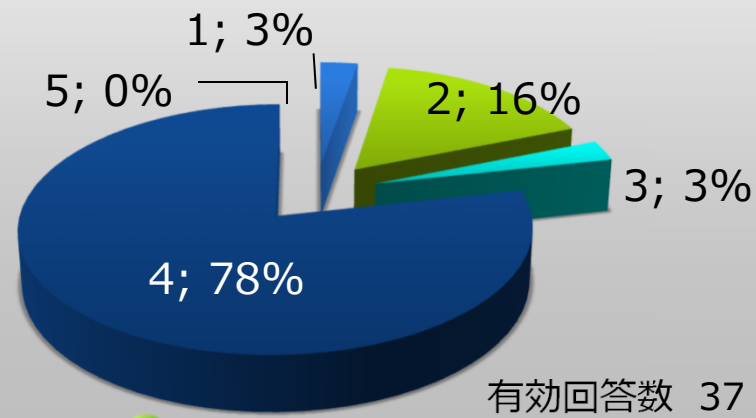


結論

⇒ Scientific judgmentの意見が多数で事後評価が受入れ可

血漿未変化体 (開発初期段階)

1. 実施しない
2. Scientific judgment
3. EBFに合意
4. SOP又は試験計画書に従って再分析
5. その他



結論

⇒ SOPに従うが約8割で組織・尿と逆転

http://bioanalysisforum.jp/



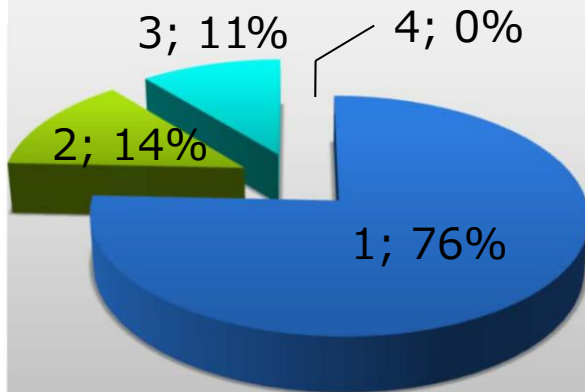
10. その他

4. 試験計画書・報告書

(1/2)



アンケート集計結果



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

有効回答数 37



アンケートコメント (抜粋)

申請資料にするのであれば, SVでもQA監査は実施すべき。



結論

⇒ 簡略化に問題はないが
QA監査の是非とは
切り離して考えるべき。



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



DG検討, アンケート回答者コメント有



10.その他

4.試験計画書・報告書

(2/2)



DGでの検討

- 簡略化OKは多数であるが、そのうち10%は監査必要としている。申請資料するか否かは特に触れなかったが、SVは申請に使用されることが前提のはず。その認識がない？



アンケートコメント

- 評価項目は省略しても良いが、実施したことやその結果の判断は正確に記述すべきである。そうでなければ分析の質をコントロールできないし、第三者に対して妥当性を説明できない場合があるのではないか。
- 実施内容がわかる記録があればよい。
- 申請データとして使用しないなら簡略化はOK

<http://bioanalysisforum.jp/>

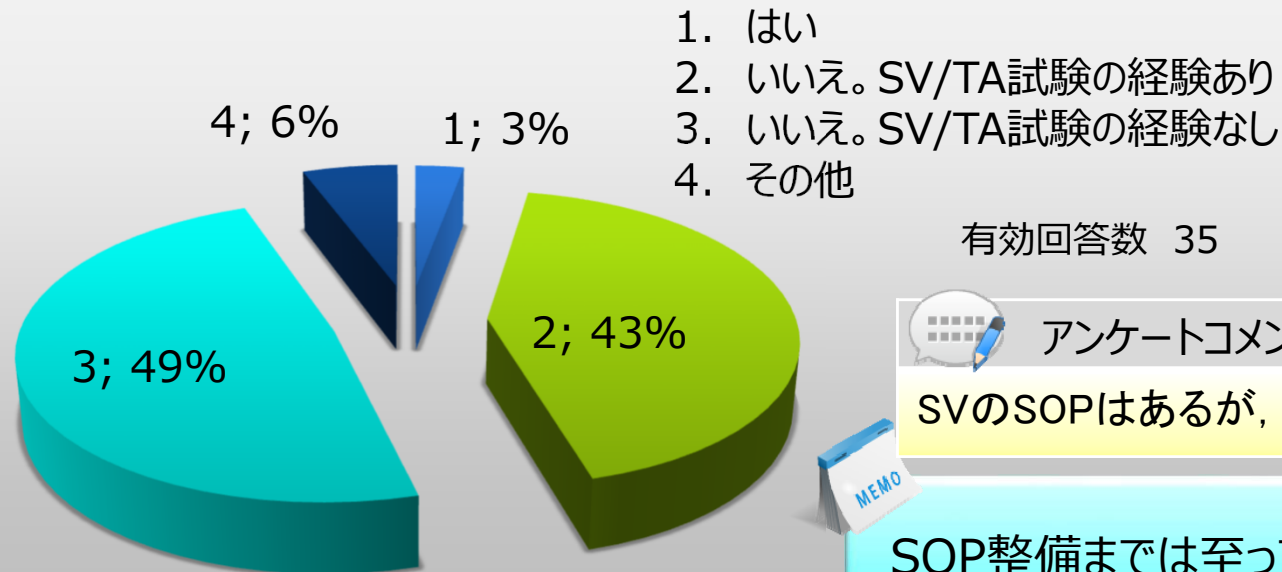


10.その他 5.SOP

(1/2)



Scientific validation / Tiered approach
(以下, SV/TA) の手順書は整備されていますか?



アンケートコメント (抜粋)

SVのSOPはあるが、TAのSOPは無い。

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



結論

⇒ 手順書はほとんどの会社で整備されていないが実施の広がりは認められている。

<http://bioanalysisforum.jp/>

DG検討有



10.その他 5. SOP

(2/2)



DGでの検討

- SV, TieredのSOPなどはほとんどの会社で整備されていない。ただし、実施経験は4割以上で、かなり考え方は浸透してきている。
- 会社のSOPではTieredについてはJガイドラインと同様に付録として記載し、やり方として紹介している

<http://bioanalysisforum.jp/>

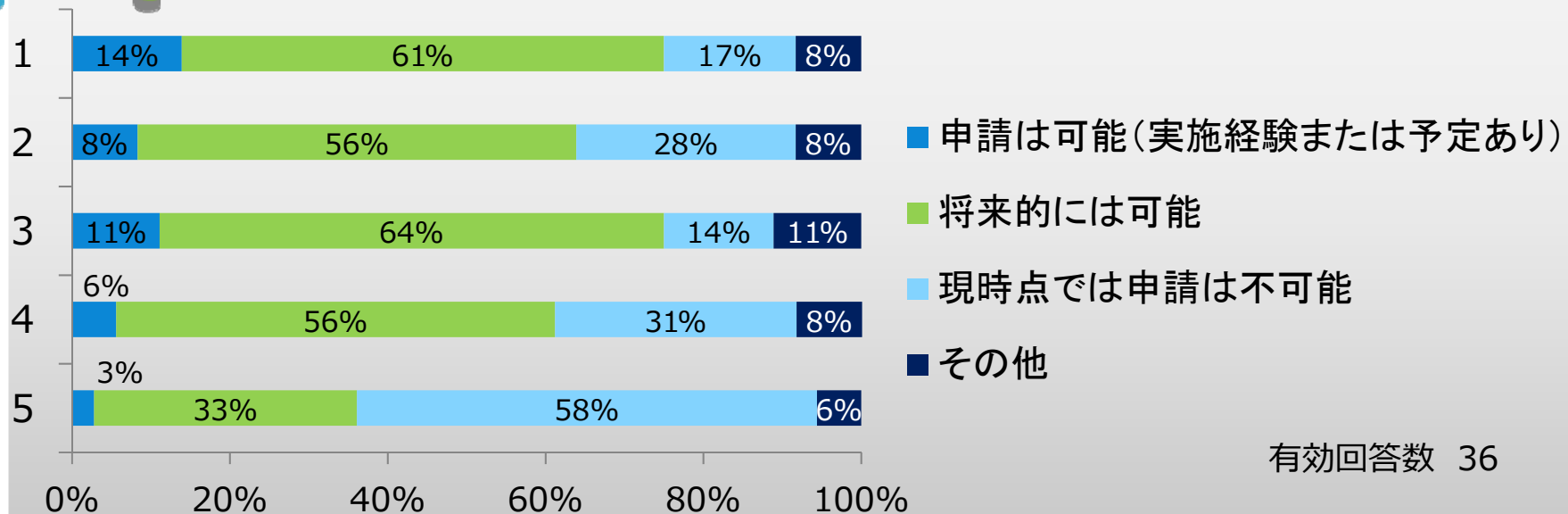


11. EBFの5区分でのSVによる申請



アンケート集計結果

(1/5)



EBFの5区分

1. 血漿中代謝物 (ICH-M3(R2)可否判断のため) 測定

2. 尿中 (未変化体) 測定

3. 組織中 (未変化体) 測定

4. 開発初期の非臨床血漿中未変化体測定 (初期のGLP-TK測定を含む)

5. 開発初期の臨床血漿中未変化体測定 (初期のPhase 1試験を含む)



結論

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

DG検討, アンケート回答者コメント有



11. EBFの5区分でのSVによる申請

(2/5)

1. 血漿中代謝物 (ICH-M3(R2)可否判断のため) 測定
2. 尿中 (未変化体) 測定
3. 組織中 (未変化体) 測定



DGでの検討

- 評価資料として申請するか, 参考資料として申請するかで意見は分かれる可能性は考えられた (代謝物)。
- SVで申請に用いる場合もデータの位置づけ次第では (他のマトリックスでも同じ)。
- **尿のほうが血中代謝物よりSV申請不可の意見が多いのは意外。尿はヒト排泄率測定に用いるデータとなっていること等を想定しているか。**
- 回答が製薬会社とCROで違う (CROの方が申請不可の意見が多い)
- 組織中未変化体は血中代謝物とほぼ同様の傾向

4. 開発初期の非臨床血漿中未変化体測定 (初期のGLP-TK測定を含む)
5. 開発初期の臨床血漿中未変化体測定 (初期のPhase 1試験を含む)



DGでの検討

- GLPでやり直すならSVのデータは申請に使わないという意見あり。
- BMVガイドラインのScopeにSVは困難と考えるのが主流。マイクロドーズ試験はSVという意見あり。
- **P1をSVで実施は有り得ない, という反応。ICH10でハーモナイズされれば変わる可能性有り。**



11. EBFの5区分でのSVによる申請

1. 血漿中代謝物 (ICH-M3(R2)可否判断のため) 測定

(3/5)



アンケートコメント

- 「代謝物試験必要性判断のための評価」であれば、BMVガイドラインを適用せずSVで実施、その結果を申請資料に盛り込むことは可と考えている。BMVガイドラインやSVという言葉がなかった時代からそうしている状況
- 申請資料における使用データの位置づけによる。
- 参考資料としては問題ないが、申請資料としては現状難しいと思う。
- 当局側がどの程度の科学的妥当性があるのかが分からないことになるので、受け入れは難しいだろう。
- 規制当局の判断によるので、何とも言えない。



11. EBFの5区分でのSVによる申請

2. 尿中（未変化体）測定

(4/5)



アンケートコメント

- 臨床検体については、SVとすることでデータの扱いのレベルを下げる想定となるため、データの使い方を戦略的に考える必要があるが、可能か不可能かといえば、可能と考える。
- ヒト尿の場合、ガイドライン上フルバリデーションが求められてると理解しています。またガイドラインをクリアしても尿中濃度がエンドポイントになる場合はSVは不可と思います。
- 申請資料における使用データの位置づけによる。
- 簡略化したバリデーションをSVと呼ぶなら、可能。申請データの数値は、バリデーションが必要（仮に、In Studyであっても）
- 規制当局の判断によるので、何とも言えない。

3. 組織中（未変化体）測定



アンケートコメント

- ADMEとして組織分布を把握する目的であれば、必ずしもBMVガイドラインに従わなくてよいので、SVで申請可能と考える。
- 組織中測定もGLP/TKの場合はフルバリデーションが必要と思います
- 経験不足で判断できません。
- 申請資料における使用データの位置づけによる。
- 尿と同じ。
- 規制当局の判断によるので、何とも言えない。



11. EBFの5区分でのSVによる申請

4. 開発初期の非臨床血漿中未変化体測定（初期のGLP-TK測定を含む）（5/5）



アンケートコメント

- TK予備試験にはSVを活用しており、その結果を必要に応じて申請資料に盛り込むことは可能と考える。本試験前にややポイントの多いTKプロファイリングを非GLPで行い、申請時に非臨床PKの項目に表現する等はある。
- 開発初期の試験の一部は、SVまで実施していないため、SVでの申請は不可能
- GLP/TKの場合はフルバリデーションが必要と思います。
- 申請資料における使用データの位置づけによる。
- 同じような試験をやり直すはず。あえて、SVのデータを出す必要はない。
- 規制当局の判断によるので、何とも言えない。

5. 開発初期の臨床血漿中未変化体測定（初期のPhase 1試験を含む）



アンケートコメント

- マイクロドーズはSVでいいと考えるが、予定はない。
- ガイドライン上、フルバリデーションが求められてると理解しています。
- 申請資料における使用データの位置づけによる。
- 非臨床と同じ考え
- FullとSVのPros/Consを踏まえて、積極的にSVとする意義は小さいと原則的には考えている。超高感度分析や、非常に広い定量範囲が必要な場合には考慮するかもしれませんが。
- 規制当局の判断によるので、何とも言えない。



12. アンケート結果の要約 (1)

(1/3)

SVについてDGでの検討結果からアンケート調査を実施・評価

1. 標準品のCOA : COA (ROA) は簡易版で良い。
代謝物ICH-M3(R2)対応時は正式版必要
2. 検量線・QC試料 : SVではGLより基準を緩くすることは受入可
3. マトリックス : 代替マトリックス・マトリックスマッチング利用の合意形成は不十分
4. (日間)再現性 : SVでは必要に応じてIn-Studyで追加実施で可
5. 選択性 : 臨床未変化体はn=6, 他は緩くてOK, プールは有用
6. 併用薬影響評価 : 原則不要, ただし妨害ピーク等報告有(17%)
7. 安定性 :
 - 7-1. 標準溶液中安定性 : 未変化体 $\pm 15\%$, 代謝物 $\pm 20\%$
 - 7-2. 凍結融解 : 実サンプル取り扱いに従って実施
 - 7-3. 凍結保存 : 実サンプル取り扱いに従って実施
 - 7-4~6 : 全血中, 併用薬存在下, 前処理後の評価は不要



12. アンケート結果の要約 (2)



(2/3)

SVについてDGでの検討結果からアンケート調査を実施・評価

8. IS variability評価： まだ一般的ではないが、有用な認識は広がりつつある。
EBF基準は受入可。SIL-ISと類縁体ISで別けるべき。

9. 他の試験項目

9-1. 回収率：不要

9-2. キャリーオーバー：検討時又はIn-studyで評価

9-3. ISR：尿・組織は実施しないが9割（必要に応じて、を含む）

9-4. 希釈再現性：必要性が予測可時はPre-studyで実施が2/3

10. その他

10-1. 試料採取方法：予備検討で確認し、文書化しておく

10-2. 検量線の外挿

ULOQ以上の外挿：+20%以内OKと不可が半々

LLOQ以下の外挿：過半数が外挿不可でBLQ扱い

10-3. 再分析：代謝物・尿はScientific Judgment, 血漿はSOPに従う。



12. アンケート結果の要約 (3)

(3/3)

SVについてDGでの検討結果からアンケート調査を実施・評価

10. その他 (続き)

10-4. 計画書・報告書：簡略化を推奨

10-5. SOP：Tiered approach/SVのSOP化はほとんど進行せず。

実施経験4割

11. SVによる申請：将来的には可能が過半数，ただし臨床未変化体はガイドライン通りが60%。SV実施が申請時評価資料として扱うか，参考資料とするかで意見は分かれた。

Domesticな今後の課題

EBFのWPを題材に昨年度DGで検討

今年度：DG検討結果についてアンケート調査を実施
国内のバイオアナリストから有効回答数58の回答を得た。



BMVガイドラインのスコープ外である尿や組織，代謝物測定，または開発初期段階の非臨床・臨床試験のバイオアナリシスは，ガイドラインの基準に必ずしも従わないというEBFの主張や，これを国内への導入についてDGで検討した結果は，概ね国内で受け入れられている状況と考えられた。しかしながら，細部についてはまだ検討や周知が必要と考えられた。



12. Summary of survey results (1)



Evaluation of survey results about SV in DG

1. COA(ROA): Acceptable for simplification, however, regular COA is required for ICH-M3(R2) test of metabolite
2. Acceptance criteria for CAL and QC : Acceptable for relaxed criteria
3. Matrix : Alternative matrix/matrix matching is insufficient agreement
4. (Inter-day) reproducibility : Evaluation in In-Study, if necessary
5. Selectivity : Early clinical: n=6, Others: n=1 or pooled
6. Evaluation of co-med effect: Not requirement (but 17% positive result)
7. Stability
 - 7-1. Stock solution stability: Unchanged $\pm 15\%$, metabolite $\pm 20\%$
 - 7-2. F&T : Required based on the sample treatment
 - 7-3. Duration of storage : Required based on the sample treatment
 - 7-4~6 : Not required in whole blood, with co-med, processed sample



12. Summary of survey results (2)

Evaluation of survey results about SV in DG

8. Evaluation by IS variability: Not common, but recognizing utility of it, EBF criteria acceptable, SIL/Analogue IS difference recognized.
9. Other items
 - 9-1. Recovery: Not required
 - 9-2. Carryover: Evaluation in investigation stage or In-study
 - 9-3. ISR: Not required for urine and tissue(>90%, including if necessary)
 - 9-4. Dilution: If necessary, >2/3 in Pre-study
10. Others
 - 10-1. Sample preparation: the document for sampling method is prepared based on the preliminary investigation
 - 10-2. Extrapolation
 - Over ULOQ: Half and half for not accept and within +20%
 - Under LLOQ: Not accept was major, treat as BLQ or zero.
 - 10-3. Reanalysis: Metabolite, urine: scientific judgment, Plasma: under, SOP



12. Summary of survey results (3)

Evaluation of survey results about SV in DG

10. Others (continued)

10-4. Documentation : Acceptable simplification for protocol and report.

10-5. SOP preparation for Tiered/SV : Not progress , but 40% experience.

11. Application by SV: Acceptable in future was majority, but unchanged in clinical adhered to GL was 60%. It is Japanese domestic issue that SV data treat as evaluation result or reference result in raw data hearing after submission.



Discussion in DG based on the EBF WP (2015)

Survey to bioanalyst
from discussion result in DG (2016)
Effective response: 58



SV is generally acceptable in Japanese bioanalysis, which is EBF opinion that does not always comply BMV guideline for analysis of urine, tissue, metabolite in plasma, and early non-clinical and clinical study for unchanged in plasma, and result of DG discussion for introduce SV into Japanese bioanalysis. However, it is necessary for well-recognized and discussion in detail.



アンケート (2)

In vitro 試験において
目的に応じた適切な分析方法として

Scientific Validation

の概念が応用できるか否か





活動内容 (2)

in vitro試験 [2]

分析法の検証方法に
一定の考え方が存在しない

Scientific Validation

目的に応じた適切な分析方法

概念が適用できるか...

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

今回の報告



<http://bioanalysisforum.jp/>

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



活動内容 (2) のポスター発表について

in vitro 試験の分類

DG2016-20 における議論において、
評価項目とそのクライテリアに違いがあると考え
本活動では *in vitro* 試験を、大きく 2 つに分類した。

蛋白結合試験

得られた数値を
計算に用いる

その他試験

数値比較により傾向を判断する

想定される試験

- ✓細胞試験
- ✓CYP代謝酵素を用いた試験
- ✓トランスポーターを用いた試験 など

<http://bioanalysisforum.jp/>



EBF の提案に基づき DG2016-20 にて議論し推奨する 評価項目及びクライテリア (In vitro 試験) (1/2)

DG Recommendationとしてグラフ内に記載

評価項目	蛋白結合試験	その他試験※
COA (確認試験, 純度試験のみ)	不要 (試験に使用したバッチと同じものを使う場合)	
検量線 (ポイント)	6 ポイント以上必要	
検量線 (評価基準)	全ポイントの 75%以上か少なくとも 6 ポイントが理論値の 15%以内 (LLOQ は 20%以内)	
マトリックス	試験で測定するマトリックスと同じ	
QC (濃度レベル, n 数)	低・中・高濃度, n=3	LLOQ・低・中・高濃度, n=3
QC (真度)	±15% (LLOQ : 20%)	
QC (精度)	15% (LLOQ : 20%)	
LLOQ	検量線の LLOQ で評価	検量線とは別に評価 (n=3)
測定単位間再現性	不要	
QC 及び検量線用標準原液	同じ標準原液を使用	
選択性	1 個体またはプールのマトリックスで評価 (複数の個体のマトリックスを準備しなくともよい)	

http://bioanalysisforum.jp/

※ 蛋白結合試験以外の in vitro 試験 (例として細胞、CYP 等の代謝酵素、
トランスポーター等を用いて実施する試験での LC-MS/MS を用いた濃度測定を想定)



EBF の提案に基づき DG2016-20 にて議論し推奨する 評価項目及びクライテリア (In vitro 試験) (2/2)

DG Recommendationとしてグラフ内に記載

評価項目	蛋白結合試験	その他試験※
回収率	不要	
キャリアオーバー	実試料測定と同時に確認 (In Study Validation)	
マトリックス効果	限外ろ過であれば血清と濾液、 透析であれば血清と緩衝液、 超遠心であれば血清と上清、 それぞれで確認する事が望ましいが、 上記以外の試験法の場合は不要	不要
希釈の妥当性	実試料測定と同時に確認 (In Study Validation)	
安定性 (標準原液・室温)	不要	
安定性 (保存中・凍結融解時)	当てはまらない	
試験中の安定性・再現性	不要	
バリデーション計画書	BMV ガイドラインに準拠	
バリデーション報告書	BMV ガイドラインに準拠	

<http://bioanalysisforum.jp/>

※ 蛋白結合試験以外の in vitro 試験 (例として細胞、CYP 等の代謝酵素、
トランスポーター等を用いて実施する試験での LC-MS/MS を用いた濃度測定を想定)



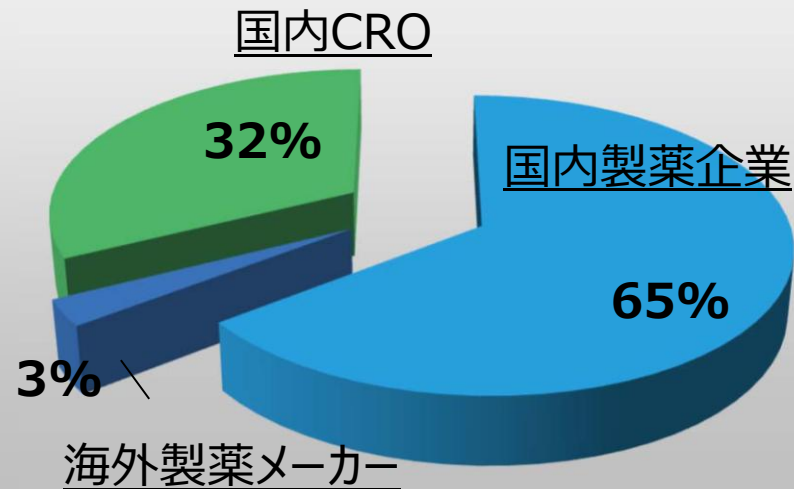
1. 回答者背景

1. 所属 2. 従事年数

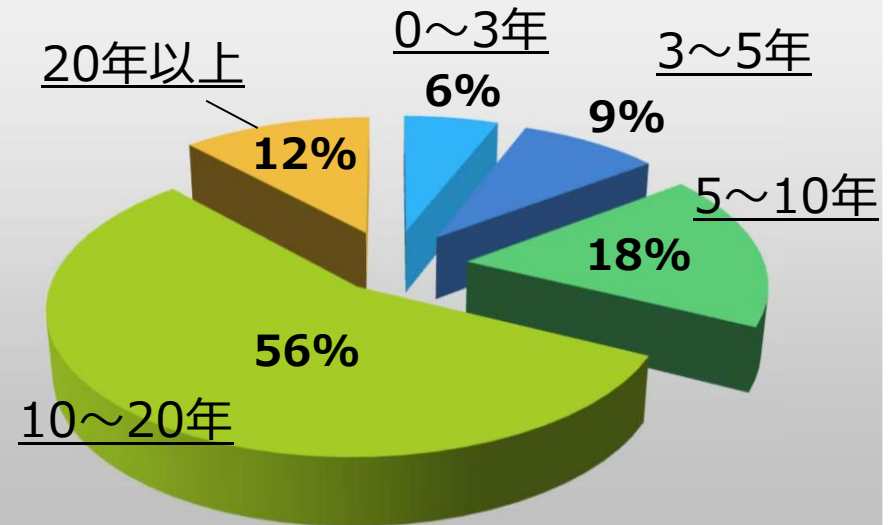


アンケート集計結果

回答者所属



バイオアナリシス従事年数



有効回答数 34

国内企業が90%以上、内CROが30%、海外企業の割合が低い
回答者の経験年数分布は広範囲で、大きな偏りはない

<http://bioanalysisforum.jp/>



1. 回答者背景

3. 実施レベル 4. 試験選択



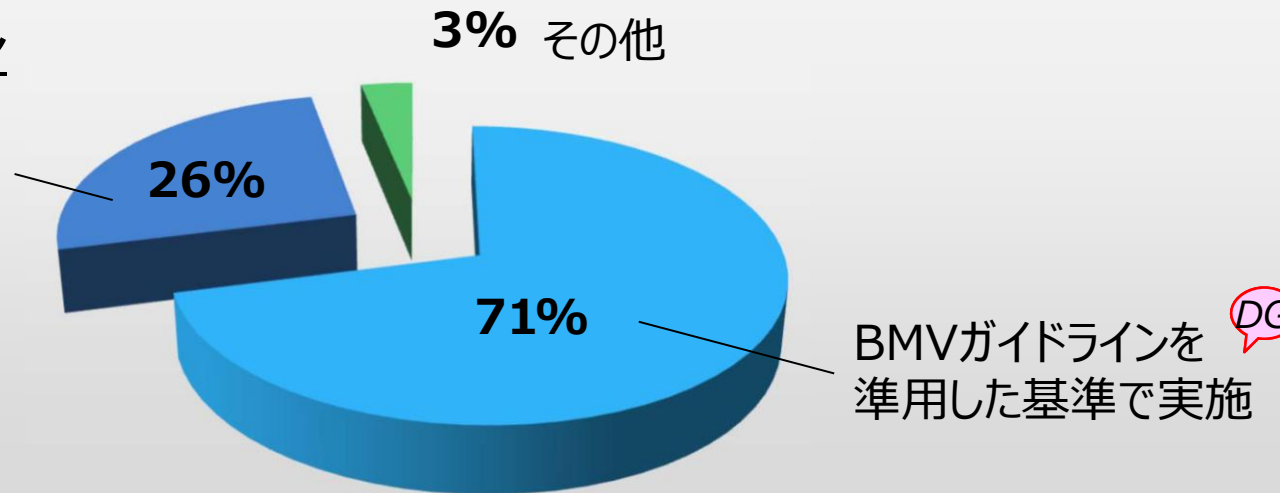
アンケート集計結果



DG Recommendation

実施レベル

基準外で実施
(基準：
BMVガイドライン等)



BMVガイドラインを準用した基準で実施

試験選択

「その他試験」としてSVでの実施が想定される試験
(コメントとして寄せられたご意見)

- | | |
|--------------------|-----------------------|
| ✓ <u>血球移行性試験</u> | ✓ <u>薬物のケラチン親和性試験</u> |
| ✓ <u>PK試験</u> | ✓ <u>細胞内取り込み試験</u> |
| ✓ <u>薬物の爪透過性試験</u> | ✓ <u>ベシクルを用いた試験</u> |

http://bioanalysisforum.jp/



1. 回答者背景

5. 実施タイミング

(1/3)

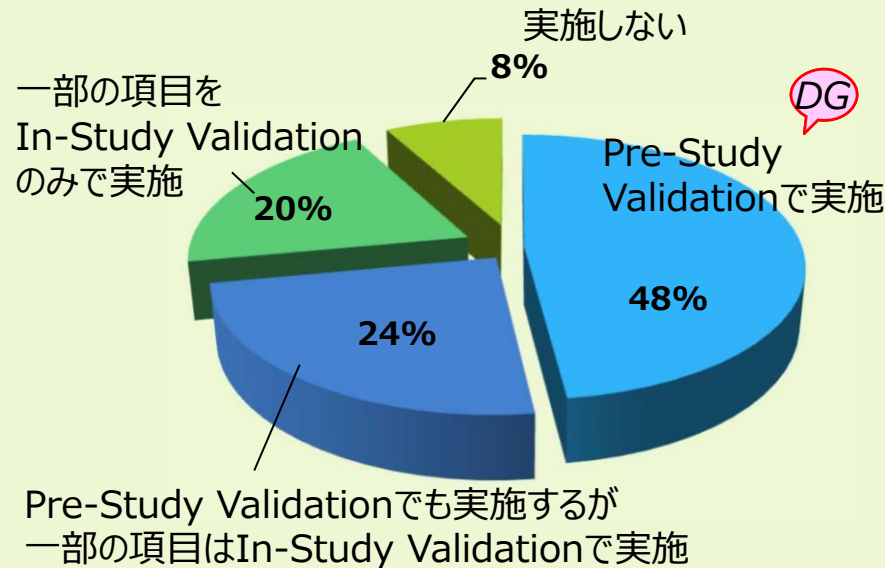


アンケート集計結果

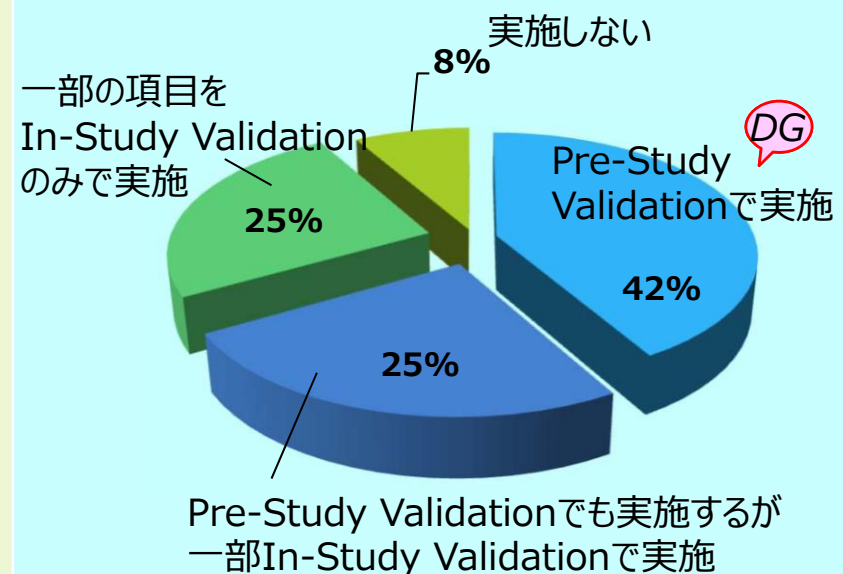


DG Recommendation

蛋白結合試験



その他試験



<http://bioanalysisforum.jp/>



蛋白結合試験
その他試験

どちらも

Pre-Study Validationで実施する

Pre-Study Validationの実施有無にかかわらず、一部の項目はIn-Study Validationで実施するとの意見も多く見られた



1. 回答者背景

5. 実施タイミング

(2/3)



アンケートコメント

蛋白結合試験

- | | |
|-------------------------------------|---|
| <p>【Preで実施するが一部の項目はIn-Studyで実施】</p> | <ul style="list-style-type: none"> • 現状、安定性についてはIn-Study Validationで確認するが、それ以外の項目はPre-Studyで実施する。 • ヒト血漿でPre-Study Validationを行い、他の動物種の血漿はIn-Study Validationで特異性、真度を確認する。 • バリデーション試験を立てることもあるが、本試験内でバリデーションを実施するパターンがある。 |
| <p>【Preで実施せず一部の項目をIn-Studyで実施】</p> | <ul style="list-style-type: none"> • 選択性、再現性、キャリーオーバー • 特性、検量線直線性、日内再現性、オートサンプラー中安定性 |
| <p>【その他】</p> | <ul style="list-style-type: none"> • 現時点ではフルバリデーションで実施 • 本試験はHotで実施 |

<http://bioanalysisforum.jp/>



1. 回答者背景

5. 実施タイミング

(3/3)



アンケートコメント

その他試験

【Preで実施するが
一部の項目は
In-Studyで実施】

- 先に実施している試験のValidationデータからIn-Study Validationで問題が生じなさそうとの見当がつけば、ほとんどの項目をIn-Studyで実施する。
- 試験によるが、キャリーオーバーに関してはIn-Study Validationにて確認している。
- バリデーション試験を立てることもあるが、本試験内でバリデーションを実施するパターンがある。

【Preで実施せず
一部の項目を
In-Studyで実施】

- 真度を実試料分析のQCで評価。
- 特性、検量線直線性、日内再現性、オートサンプラー中安定性

<http://bioanalysisforum.jp/>



2. COA (ROA)

(1/3)

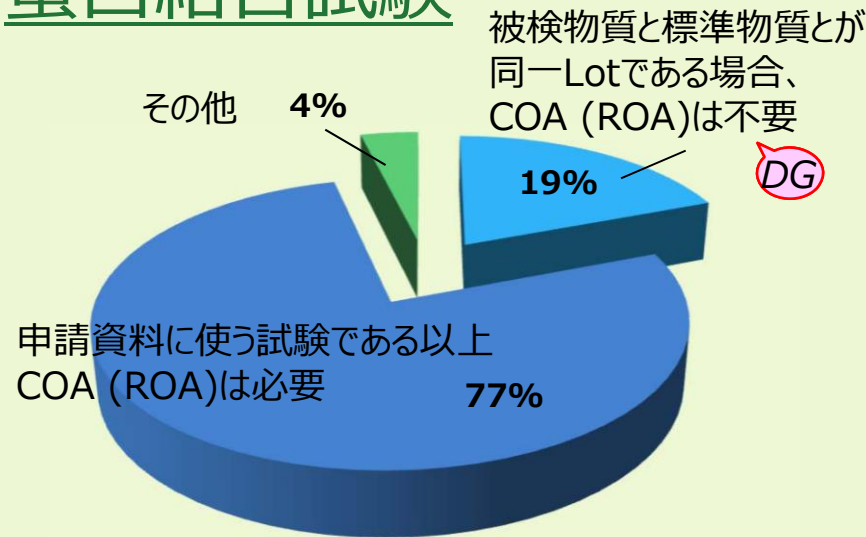


アンケート集計結果

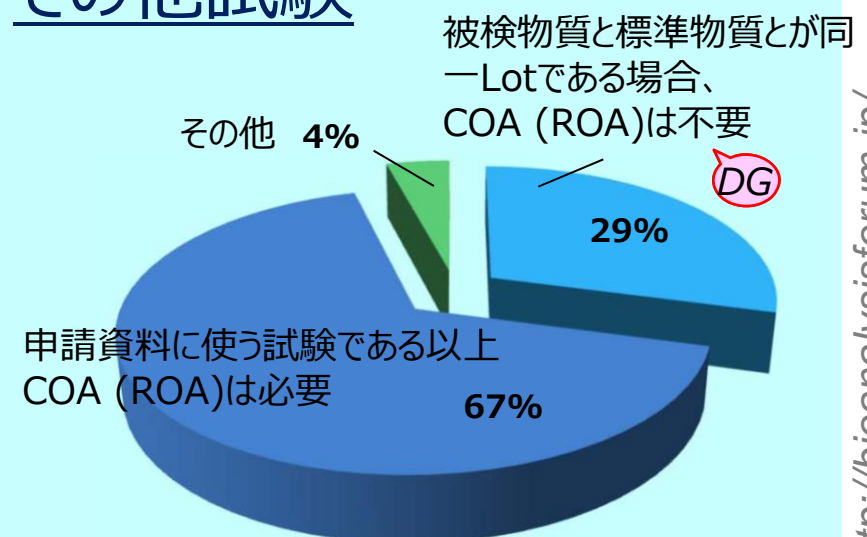


DG Recommendation

蛋白結合試験



その他試験



蛋白結合試験

その他試験

どちらも 申請資料に使う以上COA (ROA) は必要

一方、 In Vitro試験においては、通常、被検物質と標準物質とが同一であり純度等の影響がキャンセルされるため、COA(ROA)は不要であると考えた。

<http://bioanalysisforum.jp/>

会場のご意見をお聞かせください。





2. COA (ROA)

(2/3)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験 共通

- 【必要】**
- HotはCOA有りが通常。(蛋白結合試験)
 - 濃度を得ることが最終目的であれば、COAは必要。(その他試験)
 - 純度すらわからないのでは添加濃度が計算できないのではないか。(蛋白結合試験)
 - 純度が試験の結果に影響する可能性があると考えCOA(未変化体と代謝物等では記載内容に差がある)は必ず準備する。
 - CROは最終的なデータの取り扱いは不明。入手できる情報は、入手しておきたい。
 - COAがなくてもよいと思うが、通常COA(あるいはROA)があるため添付する。
 - 定量性からは不要というのは理解するが、新医薬品適合性書面調査(品質・非臨床)チェックリストをクリアするのに純度が必要。
 - 明らかに純度が低い場合や、安定性に問題がありそうな場合はCOAをつける。
- 【不要】**
- ある程度の純度があり、1測定で全測定が終了し、相対値で正しい評価ができるのであれば(平衡透析法)COAは必須ではない。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線

1. 範囲

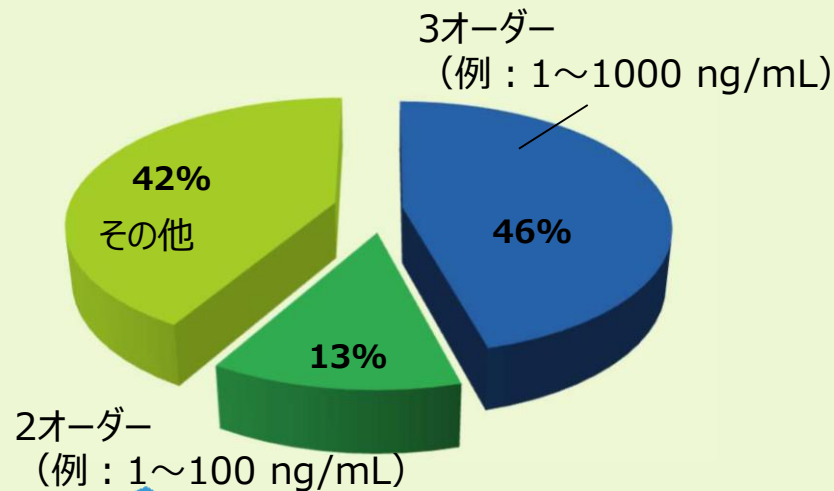
(1/2)



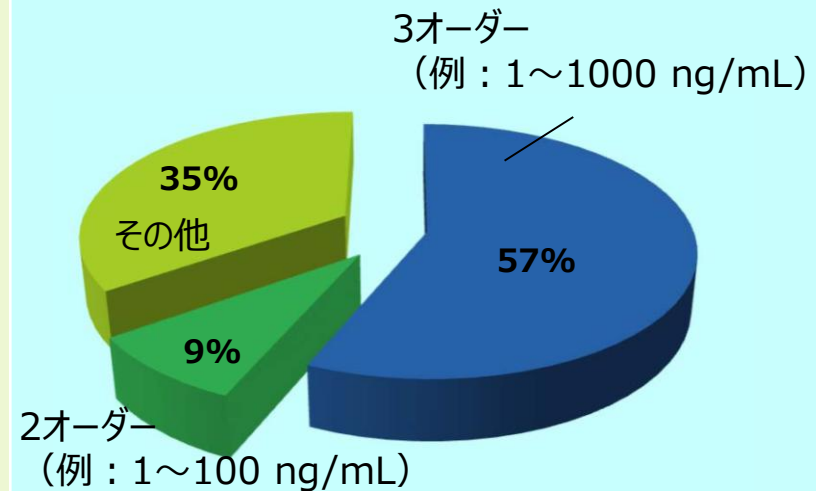
アンケート集計結果

EBF Recommendation : 特になし

蛋白結合試験



その他試験


<http://bioanalysisforum.jp/>

蛋白結合試験：

フレキシブルに設定するという意見が3オーダーとほぼ同数であった

その他試験：

3オーダーとした意見が過半数を占め、蛋白結合試験と若干異なっていた



3. 検量線 1. 範囲

(2/2)



アンケートコメント すべて【その他】としていただいたご意見

蛋白結合試験・その他試験 共通

- 予想される濃度により試験毎に設定。
- 実検体濃度を考慮して検量線範囲を設定する。
- 結果として必要な濃度範囲を考慮して決める。
- 実検体の濃度を考慮して検量線範囲は設定しています。
- MS感度、実験体濃度を考慮して検量線範囲を設定する。
- 化合物による。

蛋白結合試験

- 血漿、緩衝液のそれぞれについて想定される実検体濃度に基づき定量範囲を設定
- 実検体の濃度を考慮して検量線範囲は設定しています。
- 実検体を考慮して、検量範囲を設定する。希釈操作が不要な最大の検量範囲(評価系)を設定できるほうがありがたい。想定される結果が10倍なら10倍で十分。
- 実検体濃度を考慮して検量線範囲を設定する。できればfree側と血漿(清)側を同一検量線で希釈再現性なしで測りたいので、無理な時はあらかじめ希釈再現性をとります。

その他試験

- 実験体濃度を考慮して設定します。
- 実態にあわせて実施。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線 2. ポイント数

(1/5)



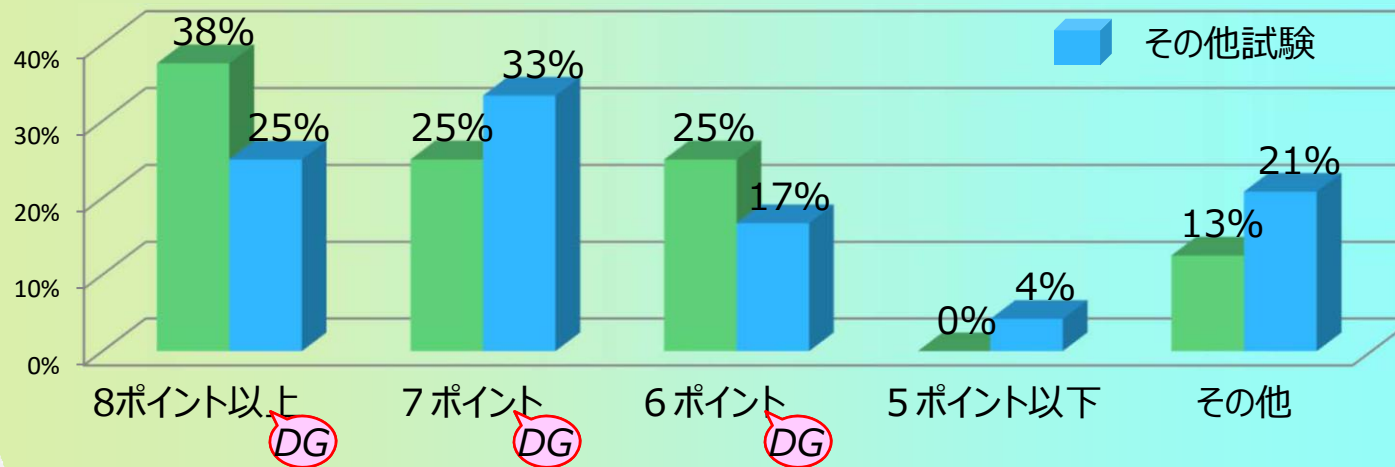
アンケート集計結果

EBF Recommendation : 6ポイント以上

蛋白結合試験・その他試験

DG DG Recommendation

■ 蛋白結合試験
■ その他試験



蛋白結合試験：回答者の9割近くが6ポイント以上と回答した
 その他試験：6ポイント以上と回答した割合が1割程度減少した
 蛋白結合試験の検量線は若干厳しめに設定しているとも考えられる

DG 6ポイント以上であり、多数の回答者と同じ意見であった

http://bioanalysisforum.jp/



3. 検量線 2. ポイント数

(2/5)



アンケートコメント

蛋白結合試験 (1/2)

【8ポイント以上】

- in vivoの測定との併用を想定して分析条件を作成することが多いのであえてポイント数を減らすことはしません。
- BMVに合わせています。
- Bioanalysisの基準をベースにしているため。
- 200倍の検量範囲では、公比2~2.5倍で8ポイントとれるため。
- 広い範囲をカバーするほうがリスクが軽減できる。2点外れても問題ないため、8点を選択している。
- 現実にはBMVガイドラインを意識して8ポイント準備(2ポイント外しても6ポイント残る)する。
- In vivoの検量線と同様のポイント数であり、検量線のポイント数を減らすことで作業量が大きく減るとも思わないため。

【7ポイント】

- 1ポイント外してもバッチ成立条件を満たすため。
- BMVガイドラインを参考にしているため。TKバリデーションの方法の一部改変で実施するケースが多いため。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線

2. ポイント数

(3/5)



アンケートコメント

蛋白結合試験 (2/2)

- 【7ポイント（続き）】
- 1オーダーあたり2点を基本とする。
 - BMVガイドラインの最小点数を考慮。
 - 原則6ポイントで1ポイント逸脱しても対応できるように7ポイントに設定する。
 - TKなどの測定系を使うことが多いので7か8が多いです。
- 【6ポイント】
- BMVガイドラインの最低水準。
 - BMVガイドラインに基づいて設定。
 - 実際には6ポイント以上としています。検量線範囲に因ります。血漿中濃度については先に血漿中濃度測定法のValidationが実施されていればそのValidationデータを引用しますので、6ポイント以上となります。
- 【その他】
- 外れ値を除外する可能性を考慮して、ポイントを増やしているが、おおよその直線性を求めている場合、かつ再現性の良い方法の場合には3～5ポイントあれば十分。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線 2. ポイント数

(4/5)



アンケートコメント

その他試験 (1/2)

【8ポイント以上】

- BMVに合わせています。
- Bioanalysisの基準をベースにしているため。
- 200倍の検量範囲では、公比2~2.5倍で8ポイントとれるため。
- 広い範囲をカバーするほうがリスクが軽減できる。2点外れても問題ないため、8点を選択している。
- 現実にはBMVガイドラインを意識して8ポイント準備(2ポイント外しても6ポイント残る)する。

【7ポイント】

- 1ポイント外してもバッチ成立条件を満たすため。
- BMVを参考にしているため。TKバリデーションの方法の一部改変で実施する機会が多いため。
- 1オーダーあたり2点を基本とする。
- BMVガイドラインの最小点数を考慮。
- 原則6ポイントで1ポイント逸脱しても対応できるよう7ポイントに設定する。
- TKなどの測定系を使うことが多いので7か8が多いです。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線

2. ポイント数

(5/5)



アンケートコメント

その他試験 (2/2)

【6ポイント】

- BMVガイドラインの最低水準。7ポイント以上を否定するものではない。
- BMVガイドラインに基づいて設定。

【その他】

- 検量線の下限から上限までのおおよその直線性が示せば問題ないため、ポイント数を限定していません。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線

3. 採用基準

(1/2)



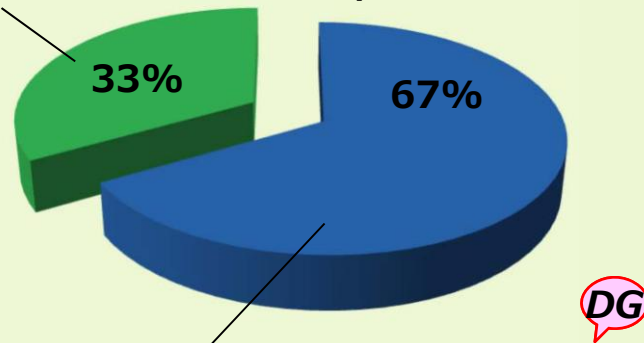
アンケート集計結果

DG DG Recommendation

BMV: 検量線用標準試料の75%以上かつ、少なくとも6ポイントが15% (LLOQは20%)
 EBF: 検量線用標準試料の75%以上かつ、少なくとも6ポイントが20% (LLOQは25%)

蛋白結合試験

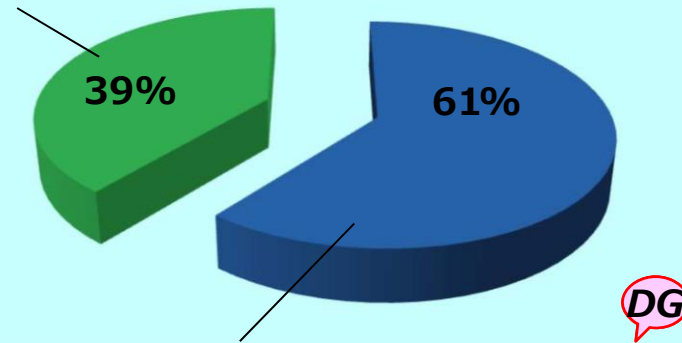
結果的に15/20%に収めることが多いが、5%は軽微な逸脱と考え、20/25%を基準とする



BMVガイドラインの基準 (15/20%) が妥当 **DG**

その他試験

結果的に15/20%に収めることが多いが、5%は軽微な逸脱と考え、20/25%を基準とする



BMVガイドラインの基準 (15/20%) が妥当 **DG**



両試験とも、BMVガイドラインに従う意見 (15/20%) が過半数 (6割以上) を占め、それ以外の回答者は20/25%を選択した。その他を選択した回答者は居なかった。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線

3. 採用基準

(2/2)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験 共通

【結果的に15/20%に収めることが多いが、
5%は軽微な逸脱と考え、20/25%を基準とする】

- BMVを参考にしているため。TKバリデーションの方法の一部改変で実施する機会が多いため。
- %は厳しくし、逸脱するポイントは使用しないという選択がありうる。
- 基準を緩める必要性がない。
- 実際には逸脱が想定しにくいので15/20%のままとする。
- MS/MSでの測定である以上15%未満の基準は厳しい。マトリックスが血漿に比して単純な系で基準を緩める必要はない。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線

4. 外挿

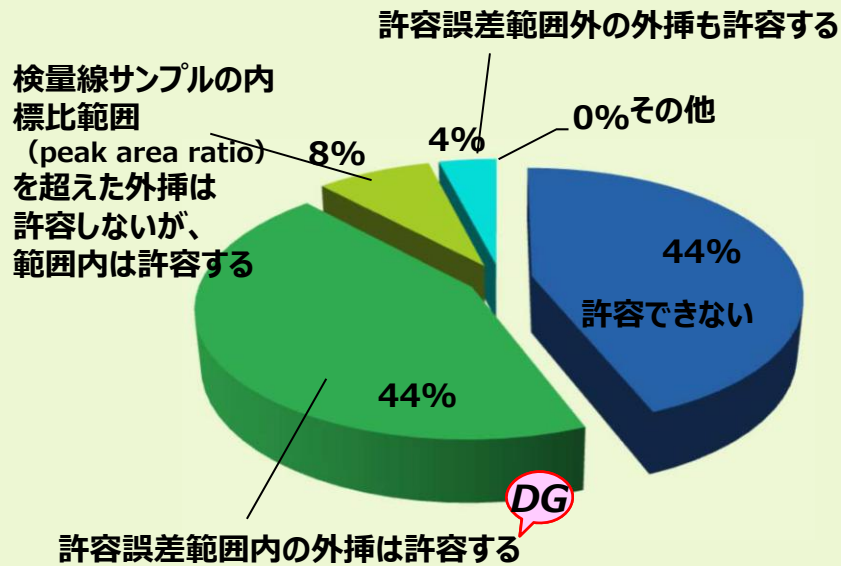
(1/2)



アンケート集計結果

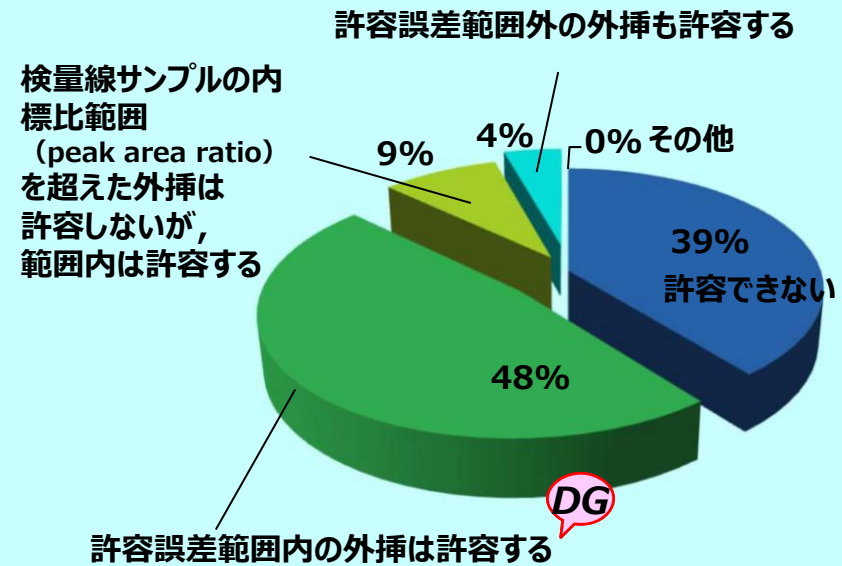
EBF Recommendation : LLOQ理論値の-25%からULOQ理論値の20% (許容誤差を25/20%とする場合)

蛋白結合試験



その他試験

DG DG Recommendation



両試験とも、何らかの形も含め「許容する」とした意見が過半数を占めた。その一方、どんな形でも「許容しない」とする意見も約4割認められた。

<http://bioanalysisforum.jp/>



3. 検量線 4. 外挿

(2/2)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験 共通

【許容できない】

- BMVを参考に行っているため。TKバリデーションの方法の一部改変で実施する機会が多いため。外挿について、世間では許容されていることを知りませんでした。
- 定量上限超えはin vitroでは有り得ない。BLQはXXng/mL 未満, or XX%未満などとなる。
- 許容できる根拠に乏しい。検量線に入るように試験デザインすべき。
- LLOQの値から結合率を算出し、例えば99.99<という報告でいいのでは？誤差範囲の値をがんばって採用しても評価は変わらないと思います。

【許容誤差範囲内の外挿は許容】

- もともと各点ともその誤差は許容しているため。
- 検量線の直線性が担保できていればいいと思いますが、実際には「できない」として実施しています。
- 「誤差範囲です」と言い切れるので正当化が可能と考えます。

<http://bioanalysisforum.jp/>



4. 検量線・QC試料に使用するマトリックス

1. 緩衝液を代替マトリックスとして使用する場合の評価



アンケート集計結果

EBF Recommendation:

検量線・QC試料に使用するマトリックスは評価試料と合わせることが基本

蛋白結合試験・
その他試験

DG DG Recommendation

in vitro試験においては
PBSなどの緩衝液で
代用が可能となるケースもある。

特に評価しない

9%

0% その他

妥当性を必ず評価

39%

52%

DG
評価試料に応じて
妥当性を評価



代替マトリックスを使用する場合、約半数が評価試料に応じて妥当性を評価する一方、必ず妥当性を評価するとの回答も4割程度あり、妥当性を評価すること自体への賛成は多かったが、その基準について意見は分かれた

<http://bioanalysisforum.jp/>



4. 検量線・QC試料に使用するマトリックス

2. 代替使用に際し妥当性評価が必要なマトリックス

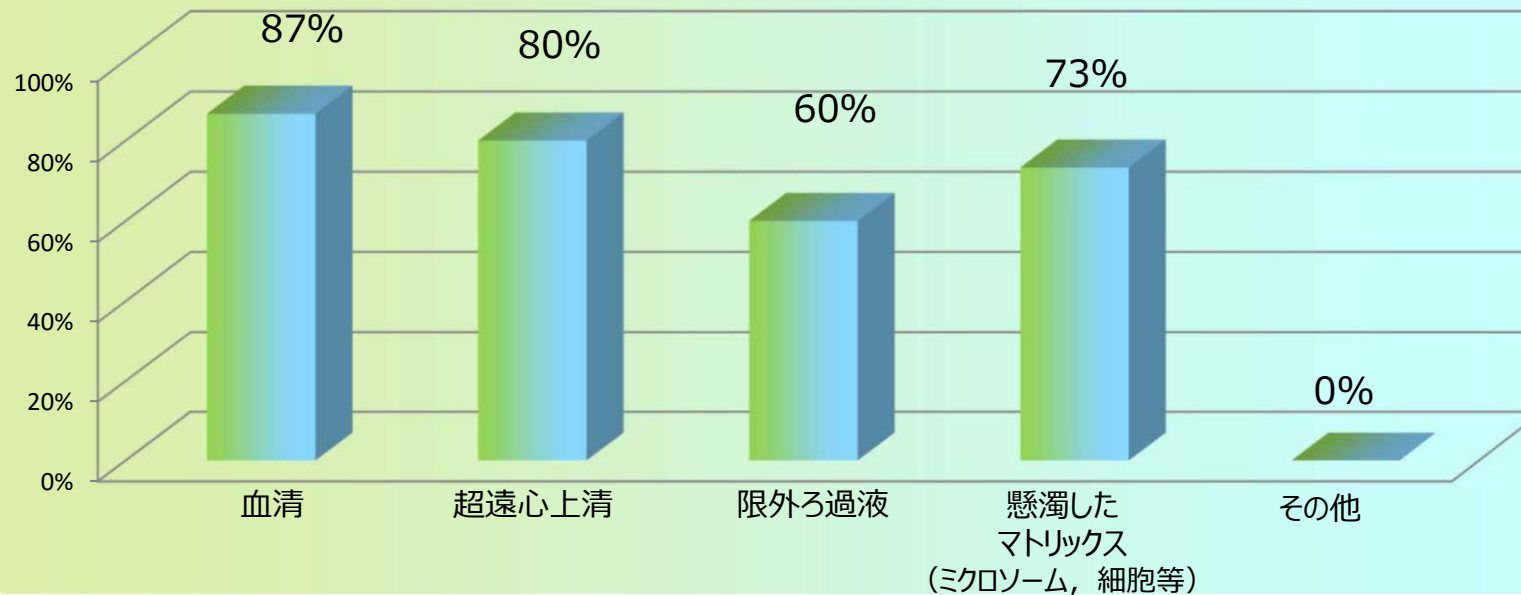


アンケート集計結果

前問で「評価試料に応じて妥当性を評価」を選択した方からのご回答

蛋白結合試験・その他試験

(複数回答)



MEMO

全てのマトリックスとの妥当性を評価する例が多い

<http://bioanalysisforum.jp/>



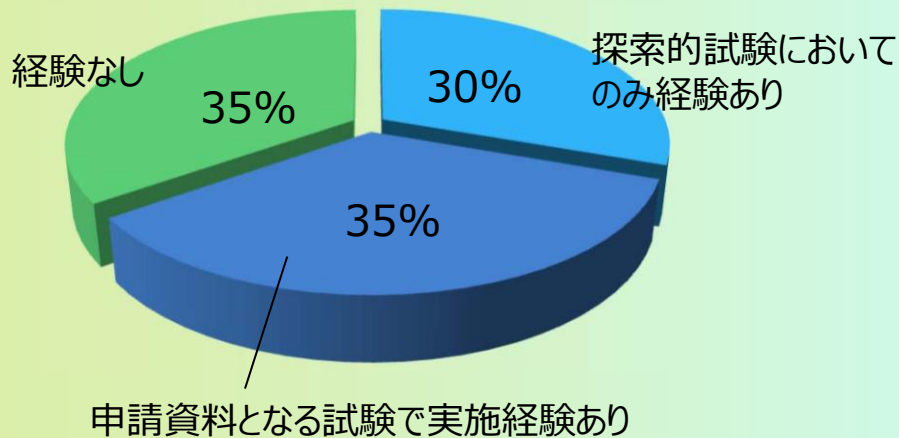
4. 検量線・QC試料に使用するマトリックス

4.3-1. マトリックスマッチング: 実施経験



アンケート集計結果

蛋白結合試験・その他試験



マトリックスマッチング

例えば蛋白結合率を測定する際、平衡透析法を用いて評価する場合には、血清画分に等量の緩衝液を、緩衝液画分に等量の血清を添加し、血清:緩衝液(1:1)混液で検量線・QCを調製し定量するという手法

<http://bioanalysisforum.jp/>



探索的試験のみならず申請資料となる試験でも実施経験あり
過半数（60%以上）の方がマトリックスマッチングの経験あり



4. 検量線・QC試料に使用するマトリックス

(1/2)

4.3-2. マトリックスマッチング: メリットデメリット



アンケート集計結果

メリット

- 検量線の数が減らせる。(8/14)
- 緩衝液画分に血清のペプチド等の成分が流入しており、バリデーションの時に代替マトリックスで緩衝液のみを用いると、本測定の実試料でイオンサプレッションが見つかることがあるが、本法は血清を混ぜているので、(代替)マトリックスは血清:緩衝液(1:1)混液となり、その心配がない。
- 血漿中濃度がバリデートされていれば蛋白結合測定もカバーされる。
- マトリックス効果がキャンセルできる。
- FreeとTotalを同条件下で測定できるので結果の精度に自信が持てる。
- 緩衝液画分の容器等への吸着防止。
- 複数の動物種でバリデーションを取ろうとすると2倍の時間を要し、またデータが複雑になるが、マトリックスマッチングにするとシンプルかつ短時間で済む。



メリットとしては、検量線の本数減少、時間の短縮など、作業量の削減に関する意見が最も多く、また、マトリックス効果の相殺や吸着防止などの利点も挙げられた。



4. 検量線・QC試料に使用するマトリックス

(2/2)

4.3-2. マトリックスマッチング: メリットデメリット



アンケート集計結果

デメリット

- 試料採取時の作業工程が複雑になる。(3/11)
- 高感度が必要とされる。(4/11)
- 等量の血清又は緩衝液を添加する前に試料の重量を測定する必要があり、手間が多い。比重も1と仮定しての添加となるため、必ずしもすべてのサンプルが血清:緩衝液が(1:1)と揃っているとは限らない。TKバリデーションとマトリックスが変わるので、結局、バリデーションが必要。
- (蛋白結合率が高い場合) 緩衝液側の感度が足りないことがある。また、緩衝液側と血清側の濃度差が大きいため、広範囲の測定が可能な測定法の確立が必要となる。
- 添加するブランク試料を要する。
- 特にデメリットを感じた経験がない。



デメリットとしては、試料採取時の作業の複雑化、MSの高感度化などの意見が最も多く、また結合率が高い化合物の場合には広い検量線範囲を要する、といった意見も挙げられた。



5. QC試料の評価 1. LLOQの必要性

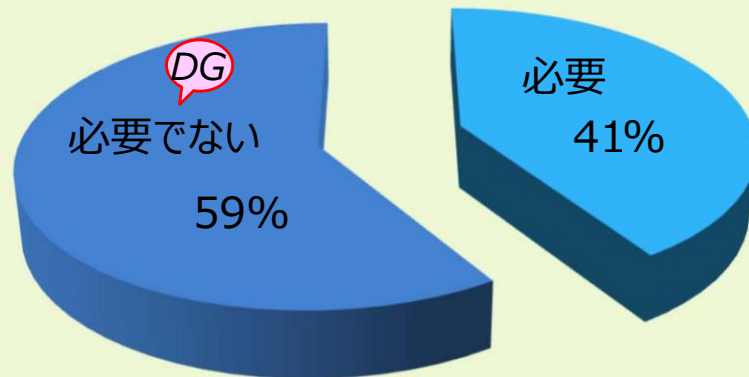


アンケート集計結果

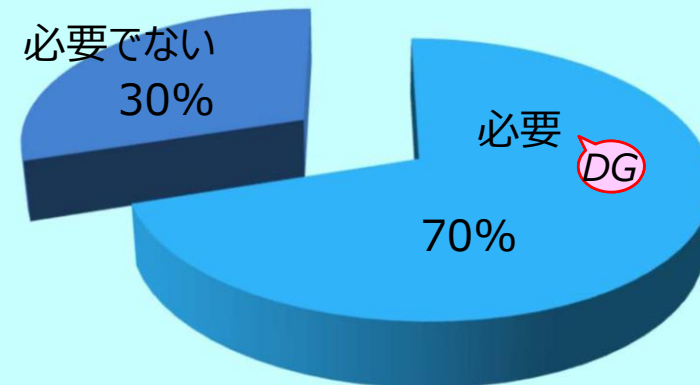


DG Recommendation

蛋白結合試験



その他試験



蛋白結合試験：必要でない その他試験 ：必要

一方、 想定される定量値を考慮して、蛋白結合試験では不要、その他試験では必要と考えた。

<http://bioanalysisforum.jp/>



5. QC試料の評価

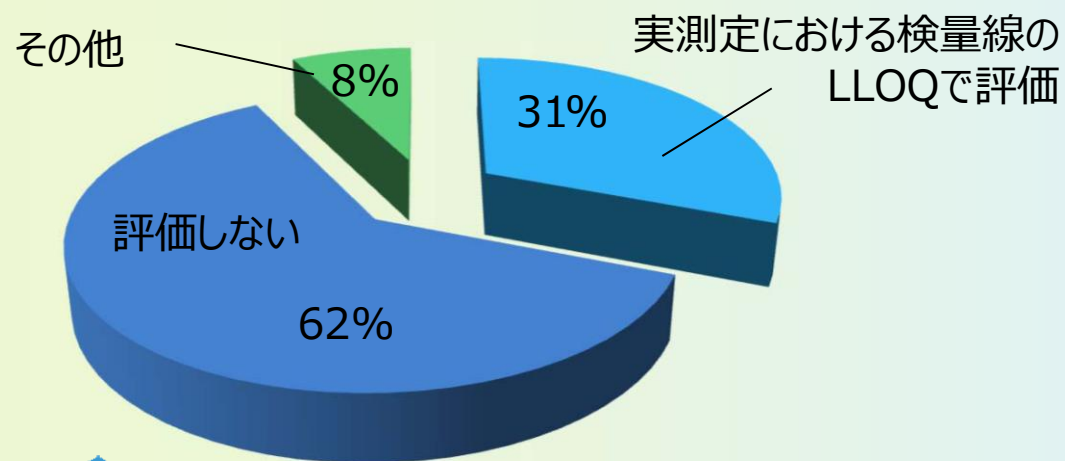
2. LLOQの評価時期 (SVで評価 以外)



アンケート集計結果

前問で「必要ない」を選択した方からのご回答

蛋白結合試験・その他試験



アンケートコメント

【その他】

- 基本的にLQC-HQCの濃度範囲で定量するため、LLOQの評価は不要と考える。または、LLOQ~LQCのサンプルが出たら評価する。



蛋白結合試験・その他試験

過半数（60%以上）が基本的にはLLOQを評価しないが、実測定における検量線のLLOQで評価するとの回答も30%程度あり。



5. QC試料の評価 3. 試料の繰り返し数

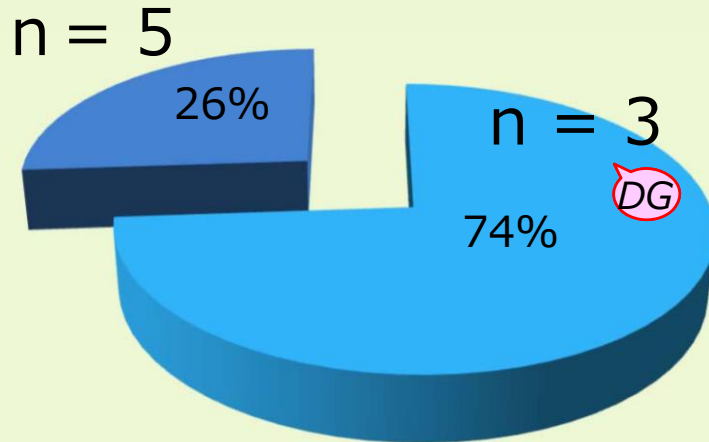


アンケート集計結果

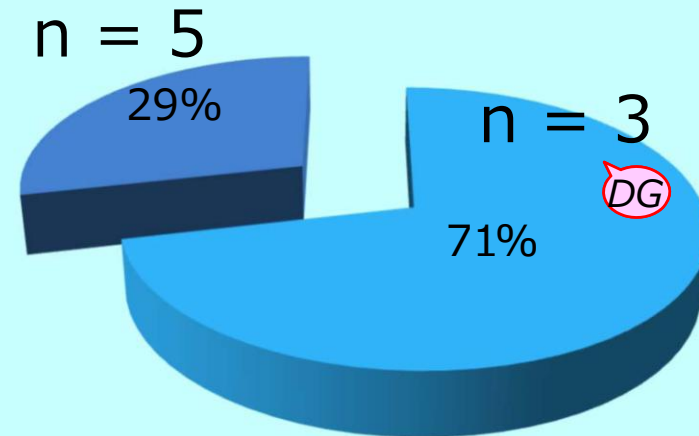


DG Recommendation

蛋白結合試験



その他試験



<http://bioanalysisforum.jp/>



蛋白結合試験
その他試験

どちらも 過半数(70%以上)がn = 3 で実施



5. QC試料の評価

1. LLOQの必要性 2. 評価時期 3. 繰り返し数



アンケートコメント

蛋白結合試験

- 【その他】
- LLOQ～LQCの間のサンプルの有無によって判断する。
 - 評価はして、クライテリアをゆるくしたらいいと思う。
 - 確認はしておく必要があるのでは。
 - 測定値がばらつくのであればn=5でもよい。
 - 蛋白結合の高い化合物、評価濃度が低い化合物の場合は、
 - LLOQ付近で定量される可能性もある。
 - LLOQの評価を省くのであれば挟み込みの考え方でlow-QCをLLOQの代わりに用いる。

その他試験

- 【その他】
- LLOQ～LQCの間のサンプルの有無によって判断する。
 - 測定目的に併せて定量範囲を設定するのは妥当であるが、
 - 目的に併せてQCの濃度範囲を設定するのは妥当ではない。
(バリデーションは設定された定量範囲における分析法自体の妥当性を担保するためのものなので)



5. QC試料の評価 4. 評価基準

(1/2)



アンケート集計結果

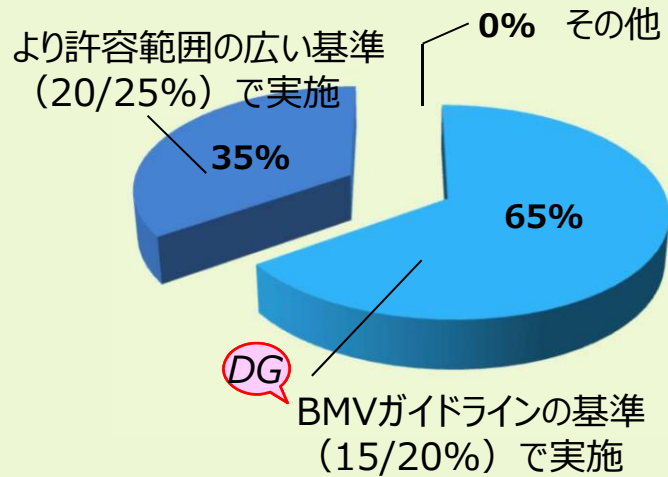


DG Recommendation

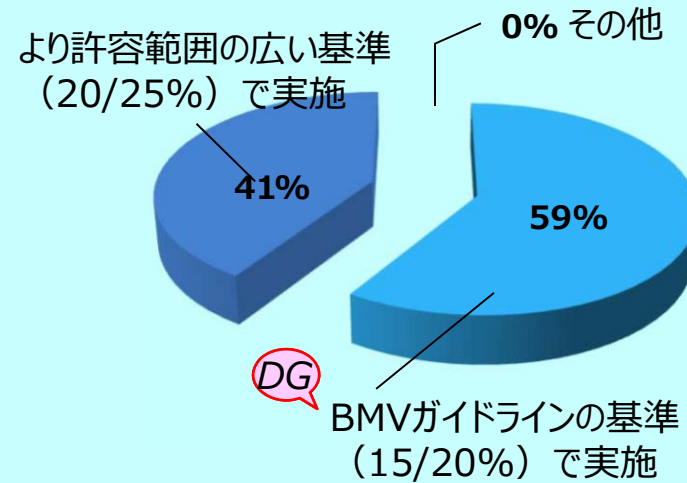
BMV Recommendation : QC試料の評価基準 : 15% (LLOQは20%)

EBF Recommendation : QC試料の評価基準 : 20% (LLOQは25%)

蛋白結合試験



その他試験



蛋白結合試験
その他試験

どちらも 半数以上がBMVガイドライン(15/20%)の基準で実施

一方で, 4割程度はより広い許容範囲(20/25%)を支持し, 意見は分かれた.

<http://bioanalysisforum.jp/>



5. QC試料の評価 4. 評価基準

(2/2)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験

【BMVガイドラインの基準で実施】

- 基本的に15/20%基準で実施するが、この基準を満たすことが困難な場合、妥当性を確認した後、20/25%基準で評価する。
- MS/MSでの測定である以上15%未満の基準は厳しい。マトリックスが血漿に比して単純な系で基準を緩める必要はない。

<http://bioanalysisforum.jp/>



6. 測定単位間再現性

(1/2)



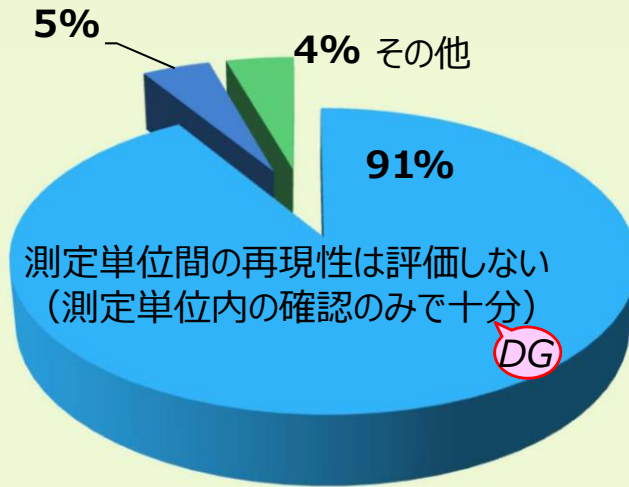
アンケート集計結果



DG Recommendation

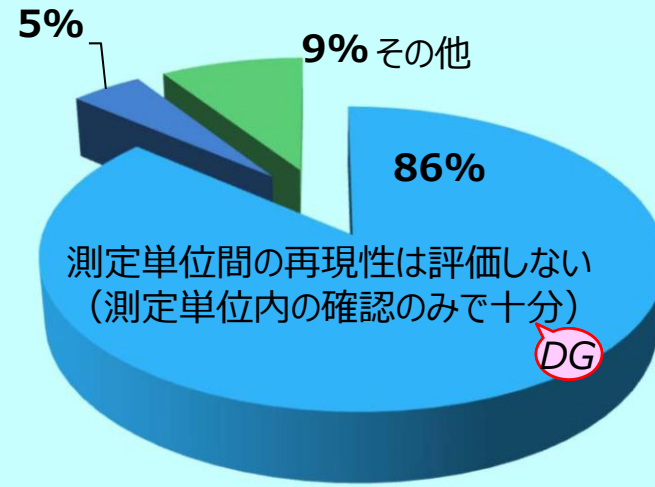
蛋白結合試験

測定単位間再現性は評価する



その他試験

測定単位間再現性は評価する



<http://bioanalysisforum.jp/>



蛋白結合試験 どちらも 85%以上が測定単位間の再現性は評価しない
 その他試験



6. 測定単位間再現性

(2/2)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験

【測定単位間の評価は不要】

- 1測定で評価が終了する試験かつ相対的な濃度で正確な評価ができる試験については、測定単位内再現性の確認のみで十分。
- 測定単位間再現性を実施しない理由として「繰り返し測定する試験ではないため」は適切ではない。本来、測定単位間再現性は、測定を他の日に何回行おうと同じ結果が得られることを担保するものなので、一回限りの測定結果が申請データになるからこそ、測定単位間の再現性は重要になると考えます。また、in vivoでも実試料に対して繰り返し測定は通常行いません。「測定単位間は評価しない」を選択したのは実試料分析時にもQCを設定して、そのときの分析の妥当性を評価可能との理由からです。
- 単位間再現性も評価した方がいいと思うが、必須ではないと思います。

<http://bioanalysisforum.jp/>



7. 標準溶液

(1/2)

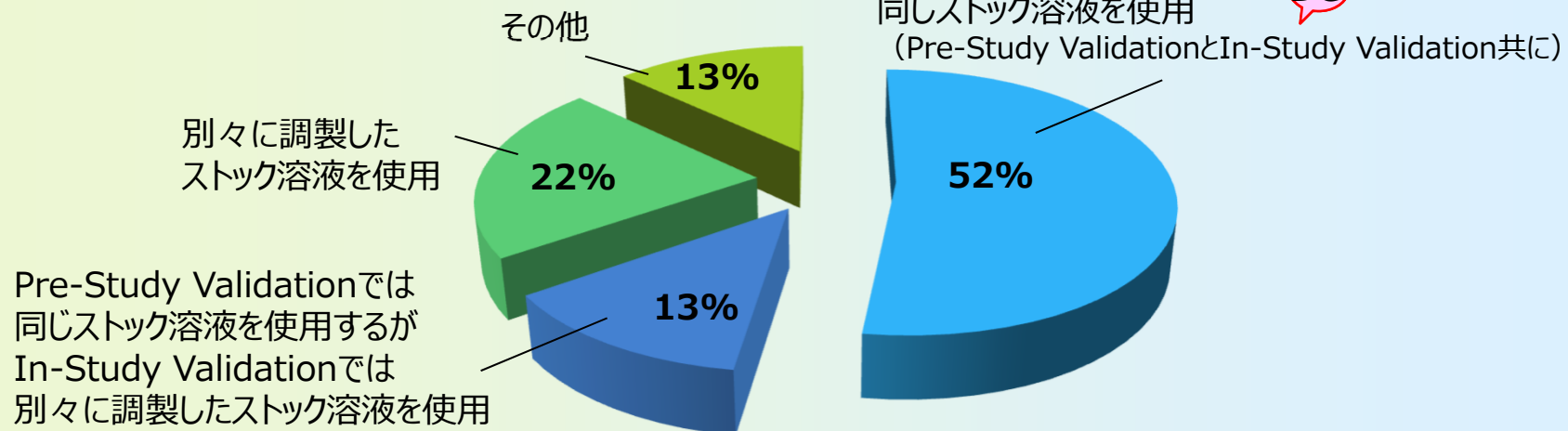


アンケート集計結果



DG Recommendation

蛋白結合試験・その他試験


<http://bioanalysisforum.jp/>


蛋白結合試験
その他試験

回答者の約半数がValidationでは
同じストック溶液を使用する

Pre-Study、In-Study Validation共に「同じストック溶液を使用する」傾向が見られたが In-Study Validationにおいては「別々のストック溶液を使用する」との回答も35%あり



7. 標準溶液

(2/2)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験

【その他】

- 相対的評価で問題ない場合は、同じストック溶液の使用が可能。
- 別々のものを使用しなくとも、調製が他の方法で問題ないことが確認できればよいのでは。検量線、マトリックスが貴重で入手しにくいのであれば、同じストックで問題ないことを確認する。
- 今は別々のストック溶液を使用しているが、同じストック溶液でいいなら同じものを使用したい。

<http://bioanalysisforum.jp/>



8. 選択性

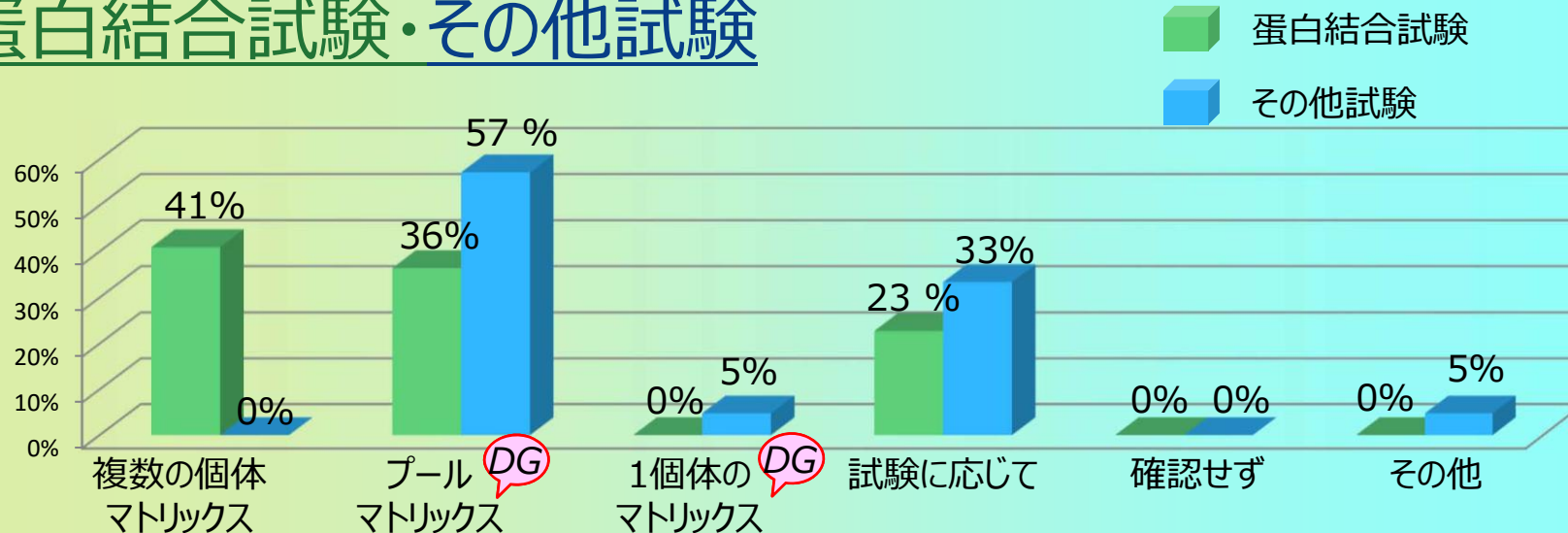
(1/3)



アンケート集計結果

DG Recommendation

蛋白結合試験・その他試験



MEMO

蛋白結合試験：複数個体／プールマトリックスがいずれも約4割
 その他試験：プールマトリックスが約6割

＜評価基準＞ ブランク試料のレスポンスが、LLOQにおける分析対象物質20%以下
 かつ内標準物質の5%以下 (意見全数 両試験とも)

一方、 In vitro試験では均一なマトリックスを使用する場合も多いことから
 「1個体またはプールマトリックス」で十分と考えた。

<http://bioanalysisforum.jp/>



8. 選択性

(2/3)



アンケートコメント

蛋白結合試験

- 【複数個体】
- n=3 (8/9)
 - 使用予定のロット毎にn=1
- 【プール】
- n=6
 - 実際のサンプルと同じマトリックスを使用。
- 【試験毎】
- n=3
 - 蛋白結合試験(血漿中濃度)はBMVに従うのがベスト。上清やろ液はプールでn=1-3でよい。
 - 複数の動物種を1つの測定系で定量する場合(ラット、マウス、ブタ、ヒト血漿について、ラット血漿の検量線で評価)は、各動物種についてn=6のプールマトリックスを用いて評価する。
 - 試験デザインにもよるが使用予定のロットごとにn=1で確認する
 - 個体試験を実施していれば、用いた個体のマトリックス(数)プールであれば試験に用いたプール1試料。
 - 代替マトリックスを使用しない場合、検量線のブランク試料で評価する。

<http://bioanalysisforum.jp/>



8. 選択性

(3/3)



アンケートコメント

その他試験

- 【プール】
 - $n=1(1 \text{ lot})(2/4)$ 、 $1-3(1/4)$ 、 $6(1/4)$
- 【1個体】
 - 細胞毎に評価
- 【試験毎】
 - ロット間差を評価する($n=3$)
 - 細胞・条件毎に実施するが $n=1$ でよいと考える。
 - 代謝試験は使用するマイクロソーム(目的により個別 $n=1$ またはプールドマイクロソーム当該ロット現物)で実験直前に確認する
 - マトリックスロットにおける画一性を考慮(例えばS9により、より精製度の高いマイクロソームは画一性が高いと考えられる)
 - 肝細胞を使用する際は $n=3$ 以上のプールマトリックスにて、トランスポーター発現細胞・ベシクルを使用する際は実施条件毎に評価する。
 - 代替マトリックスを使用しない場合、検量線のブランク試料で評価する。

<http://bioanalysisforum.jp/>



9. 回収率

(1/2)

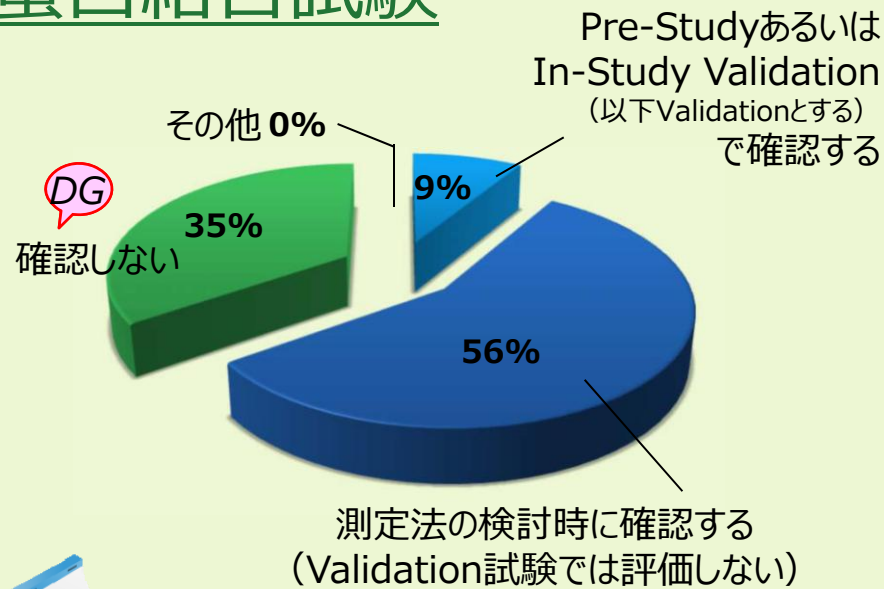


アンケート集計結果

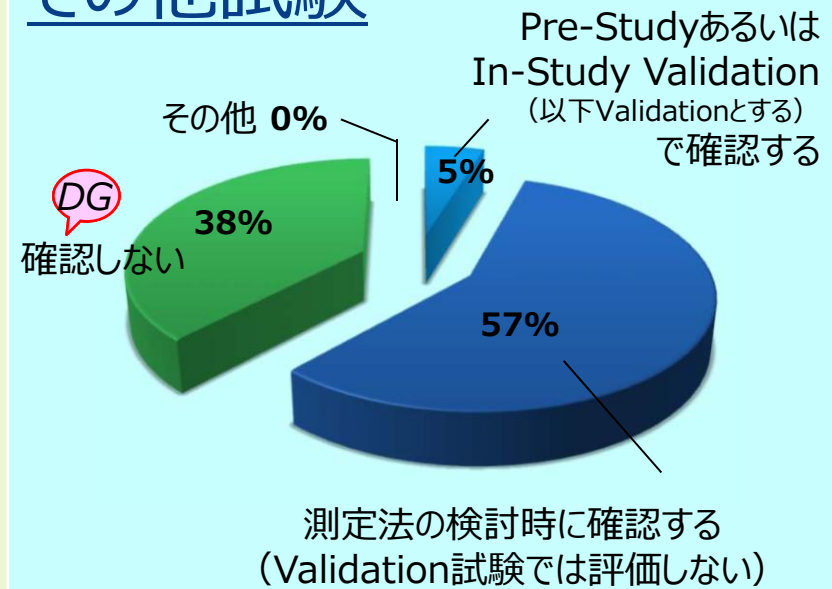


DG Recommendation

蛋白結合試験



その他試験



蛋白結合試験
その他試験

どちらも

測定法の検討時に確認する
(Validationでは評価しない)

一方、DG BMVガイドラインで不要となっていることから確認は不要とした



<http://bioanalysisforum.jp/>



9. 回収率

(2/2)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験 共通

- 【Validation時】
- 血漿中濃度は実施した方が良い。
 - 上清やろ液は回収できない要素がないので不要。(蛋白結合試験)
- 【測定法検討時】
- BMVガイドラインで不要となっているため、試験内では確認しない。
 - SVなのでバリデーションでの評価は不要。
- 【確認しない】
- 委託者による要望がない。検量線、QCが判定基準を満たしていれば、定量値に問題ないため(そのために予備検討で定量範囲内に入るように検量線レンジを変更して、定量値を確認している)。TKバリデーションで確認しており、緩衝液画分や超遠心の上清では、血漿より回収率が上昇する傾向を多く経験しているため。
 - QCが正確に測定できればよいと考える。
 - 除タンパク法ではPBS溶液からの回収は100%と想定。
 - 事前検討で回収されることを確認し、試験内では確認しない。
 - BMVガイドラインで不要となっているため、試験内では確認しない(2/8)
 - 多くの場合、回収されるので改めて確認の必要なし。方法開発の段階でバラつきが多い等問題があれば、問題解決のために確認する。

<http://bioanalysisforum.jp/>



10. キャリーオーバー

(1/2)

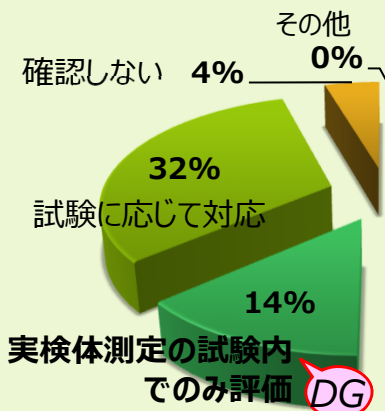


アンケート集計結果

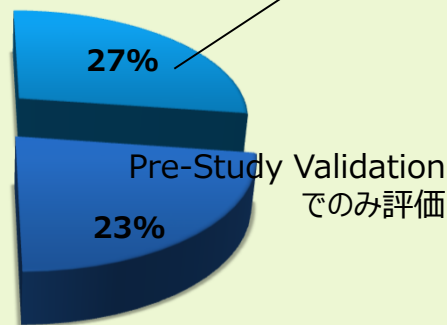


DG Recommendation

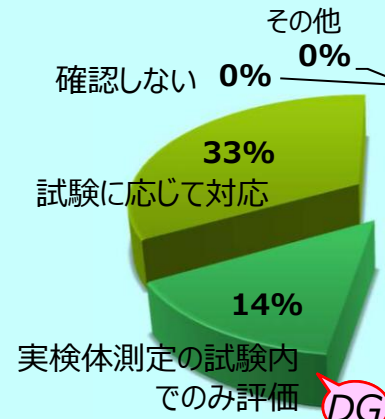
蛋白結合試験



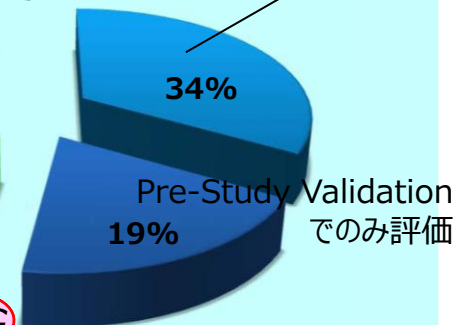
Pre-Study Validation
または
実検体測定の試験内で
評価する



その他試験



Pre-Study Validation
または
実検体測定の試験内で
評価する



蛋白結合試験
その他試験

どちらも 実施タイミングならびに方法はそれぞれだが
実測定の実施までには確認する

<評価基準> ULOQの検量線用標準試料を測定後のブランク試料のレスポンスが、LLOQにおける分析対象物質 20%以下かつ内標準物質の 5%以下 (意見全数 両試験とも)

一方、DG 実検体測定の試験内で評価できるため、SVとしての実施は不要と考えた



http://bioanalysisforum.jp/

会場のご意見をお聞かせください。



10. キャリーオーバー

(2/2)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験 共通

【Validation
+ 実測】

- TKバリデーションと前処理方法が変わるため。
(基本的に固相抽出から除タンパクになる)(その他試験)
- バリデーションでは、簡単に評価する。
(検量線の直後にブランクを入れて、n=1で評価)

【試験に応じて】

- 予備検討で懸念がある場合は、その時点で測定系を再検討する。(2/5)
- バリデーションで問題なければ、実測定では確認しない
- 基本的には実検体測定の直前でバリデーション試験を実施し、バリデーションにてキャリーオーバーの懸念があった場合は実検体測定の試験内でも確認する。
- バリデーションで評価することも、実検体測定の試験内で確認することもある。

【確認せず】

- TKバリデーションの一部改変のみのため。
予備実験の時にULOQの後にWash試料を測定し、確認しているため。
(蛋白結合試験)

<http://bioanalysisforum.jp/>



11. マトリックス効果

(1/3)

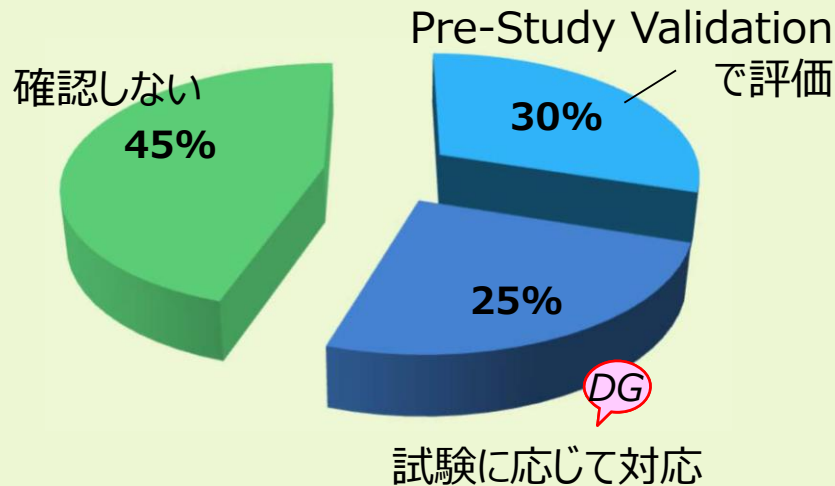


アンケート集計結果

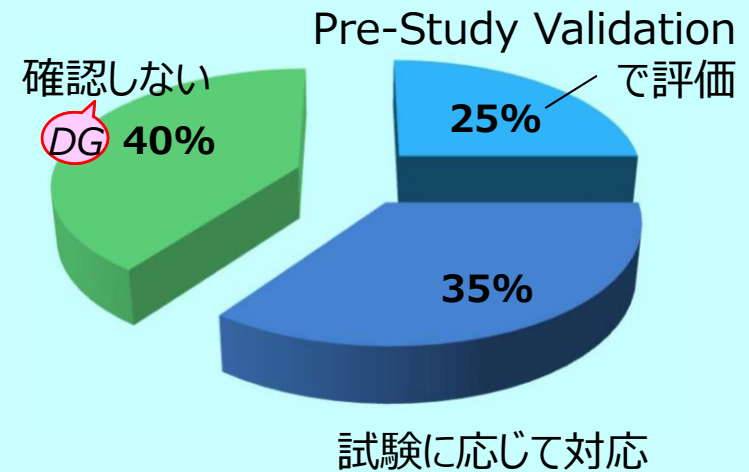


DG Recommendation

蛋白結合試験



その他試験



<http://bioanalysisforum.jp/>



蛋白結合試験
その他試験

どちらも

アンケート回答は「評価する」約3割
「確認しない」4-5割で意見が分かれた。

一方、**DG** マトリックスが異なることが明らかな一部の蛋白結合試験のみ
「評価が必要」とした



11. マトリックス効果

(2/3)



アンケートコメント

蛋白結合試験

- 【評価する】
- LC-MS (ESI) 法を使用する限り避けて通れない。
 - 基本的にマトリックスマッチングであるが、マッチした状態でのマトリックス効果が顕著でないことを確認する。
 - 血清のみ評価。
- 【試験毎】
- マトリックスが異なる場合は必要。
 - 超遠心で血清と上清の2本の検量線を作成しない場合、検量線と異なるマトリックスでのマトリックス効果を確認する。
- 【確認せず】
- 実検体と同一のマトリックスで調製したQCが正確に測定できればよい。
 - ISに標識体を使用するため。
 - プールしたマトリックスで検討するためMFのばらつきは小さいと考えられる。
 - 血清とろ液, 動物種ごとにQCを確認しているので, 項目として実施しなくても, 効果があれば分かると思います。
 - 血清でマトリックス効果を確認しており, 測定に問題なければ, 血清成分の一部をマトリックスにしているため, その影響は小さくなる傾向を多く経験しているため。

<http://bioanalysisforum.jp/>



11. マトリックス効果

(3/3)



アンケートコメント

その他試験

- 【評価する】
- 既存のTKバリとマトリックスが大きく異なるため。
 - LC-MS (ESI) 法を使用する限りMEは避けては通れない。
 - 出来上がったサンプルの状態でのマトリックス効果が顕著でないことを確認する。
- 【試験毎】
- BSA添加の有無等があれば検討する。
 - 試料種中の内因性成分量やその画一性で要否を判断。
 - 測定サンプルが細胞抽出液となる場合は、検量線と実サンプルが厳密には同一とならないため、確認する。
 - 酵素源を含む反応液と有機溶媒などで調製した標準試料を比較して確認したことがあります。
- 【確認せず】
- マトリックス効果がある試験系であることがほぼないので実施しない。
 - ISに標識体を使用するため。
 - 検量線と実検体で同一のマトリックスを使用するため不要。
 - 実検体と同一のマトリックスで調製したQCが正確に測定できればよいと考える。

<http://bioanalysisforum.jp/>



12. 希釈の妥当性

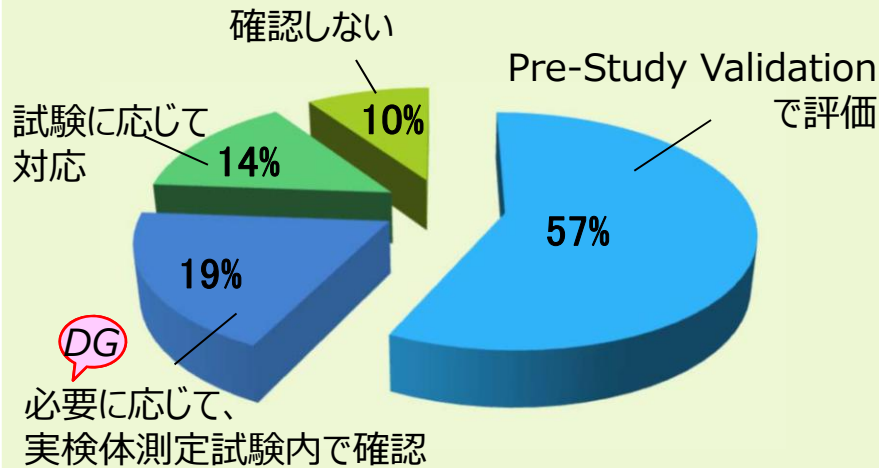
(1/2)



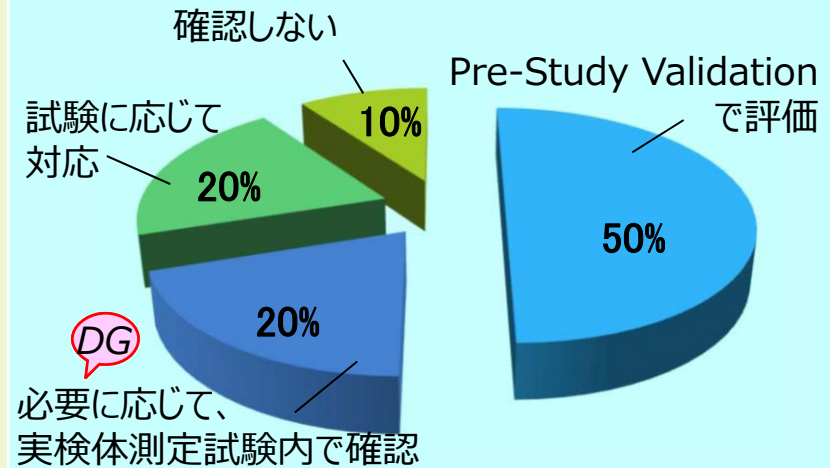
アンケート集計結果

DG DG Recommendation

蛋白結合試験



その他試験



<http://bioanalysisforum.jp/>



蛋白結合試験
その他試験

どちらも

必要性が明らかであれば
「Pre-Study Validationで評価する」
との回答が多数を占めた

一方、**DG** 必要に応じて実検体測定の試験内で評価すればよいと考えた



会場のご意見をお聞かせください。



12. 希釈の妥当性

(2/2)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験 共通

- 【評価する】
- 希釈測定が必要な試験のみ確認する。
 - 希釈操作が入るのであればバリデーションは必要。
 - 超遠心前後の濃度を測定するため、濃度範囲が広く、希釈が必要になる場合が多い。(蛋白結合試験)
 - 必要性が生じた場合、実検体測定の試験内で確認する。(その他試験)
- 【試験毎】
- 予備検討で希釈が必要か確認してから、バリデーション項目に入れるかどうかを決めているため、必要又は不要は事前に明らかになる。
 - 分析上の制限で検量線範囲を狭く設定する場合は希釈込のメソッドとしあらかじめ確認する。
 - 希釈が不要な濃度範囲で実施するため、確認しない。
 - 非結合型濃度のみを測定する場合、希釈が不要なケースも。(その他試験)
- 【確認しない】
- 濃度範囲が既知だから。
 - 操作が適切であれば理論値どおりに希釈されたと解釈する。

<http://bioanalysisforum.jp/>



13. 安定性

1. 評価項目

(1/3)

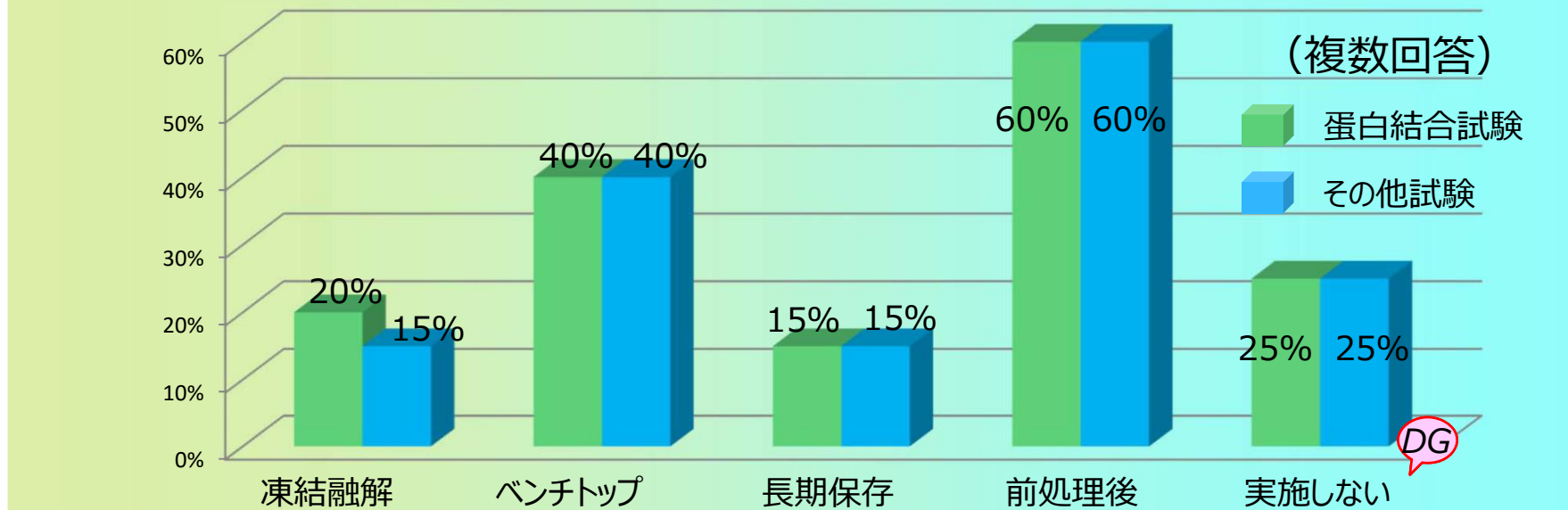


アンケート集計結果



DG Recommendation

蛋白結合試験・その他試験


<http://bioanalysisforum.jp/>


前処理後とベンチトップの安定性を確認する例が多いが、全く実施しないとの回答も20%以上あった。

一方、**DG** 調製直後に測定し、保存しない場合が多いと考えられることから基本的には「不要」とした。



会場のご意見をお聞かせください。



13. 安定性 1. 評価項目

(2/3)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験 共通 (1/2)

- 【凍結融解】
 - 誘導評価や阻害評価など、測定サンプル数が多い試験では測定までに時間を要するため、基本的には凍結融解・ベンチトップ・前処理後の安定性を確認する。再測定の可能性もある場合は、長期保存安定性も確認する（その他試験）
- 【ベンチトップ】
 - 測定に時間を要する可能性があるため実施。
 - 長期保存はしないため、ベンチトップの安定性のみ。前処理後の安定性は、実試料測定の前後のQCで判断できるため、実施しない。
 - 試験日に測定するため、凍結融解・長期保存は不要。
 - 実際のサンプルの取扱に応じて設定する。
 - 前処理時間は短時間ではあるが、念のためベンチトップ、前処理後の安定性は実施する。（その他試験）
- 【長期保存】
 - 結合試験と測定日が異なる場合があるため。（蛋白結合試験）
 - 酵素反応と測定日が異なる場合があるため。（その他試験）
 - 基本的にサンプル発生日に測定するが、再測定の可能性を鑑み、1回凍結融解＋（長期）保存＋ベンチトップを合わせた評価として、長期保存安定性を評価する。

<http://bioanalysisforum.jp/>



13. 安定性

1. 評価項目

(3/3)



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験 共通 (2/2)

【前処理後】

- 落雷等の機器トラブルにも対応するため。(その他試験)
- 凍結保存はせず、即座に前処理を行うためベンチトップも実施しない。
- 測定が実験の翌日になることが多いため、48時間ぐらいの凍結保存安定性、オートサンプラー内安定性はとります。
- 再注入の可能性を考慮して、前処理後のみ実施する。(その他試験)

【実施しない】

- 保存しないため。
- 基本的には一連の操作で実験するため安定性は検討しない。
- 実試料時のQCを並行保存QCと見なし、その真度を以て間接的に保証する。

<http://bioanalysisforum.jp/>



13. 安定性

2. 標準原液の安定性評価

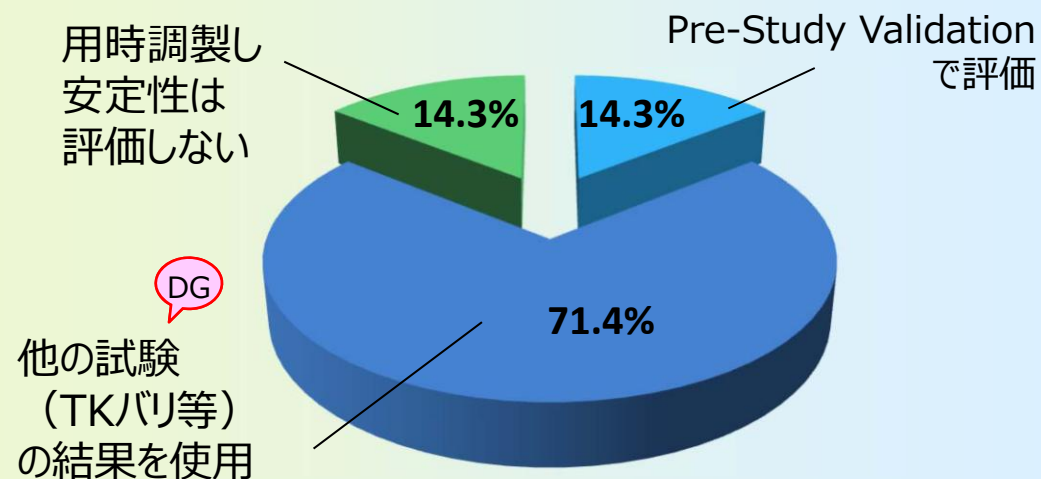


アンケート集計結果



アンケートコメント

蛋白結合試験・その他試験



【Validation内で評価】

- ・評価基準
5/10/15% (各n=1)

【他の試験
(TKバリ等) の結果を使用】

- ・左記の3つの選択肢
いずれも許容できると判断する



他の試験結果を使用する例が多いが、試験内で評価または用時調製との回答もあった。



14. まとめ



(1/7)

【アンケート集計結果】

1. 回答者背景

有効回答数 34

国内企業が90%以上、内CROが30%、海外企業の割合が低い。
回答者の経験年数分布は広範囲で、大きな偏りはない。

・実施タイミング

蛋白結合試験、その他試験どちらもPre-Study Validationで実施する。

2. COA

申請資料に使う以上COA (ROA) は必要。

一方、DGでは被検物質と標準物質とが同一であり、
純度の影響がキャンセルされるため、COA(ROA)は不要と考えた。

ご意見をお寄せください



3. 検量線

3-1 範囲

蛋白結合試験 : フレキシブルに設定する意見が3オーダーとほぼ同数であった。

その他試験 : 3オーダーとした意見が過半数を占めた。



14. まとめ



(2/7)

3. 検量線 (続き)

3-2 ポイント数

蛋白結合試験 : 回答者の9割近くが6ポイント以上と回答した。

その他試験 : 6ポイント以上と回答した割合が1割程度減少した。

3-3 採用基準

両試験とも, BMVガイドラインに従う意見 (15/20%) が過半数 (6割以上) を占めそれ以外の回答者は20/25%を選択した。

3-4 外挿

両試験とも, 何らかの形も含め「許容する」とした意見が過半数を占めた。

その一方, どんな形でも「許容しない」とする意見も約4割認められた。

4. 検量線・QC試料に使用するマトリックス

4-1 緩衝液を代替マトリックスとして使用する場合の評価

代替マトリックスを使用する場合, 約半数が評価試料に応じて妥当性を評価する。一方, 必ず妥当性を評価するとの回答も4割程度あり, 妥当性を評価すること自体への賛成は多かったが, その基準について意見は分かれた。



14. まとめ



(3/7)

4. 検量線・QC試料に使用するマトリックス (続き)

4-2 代替使用に際し妥当性評価が必要なマトリックス

血清・超遠心上清・限外ろ過液・懸濁したマトリックスなど。
全てのマトリックスとの妥当性を評価する例が多い。

4-3 マトリックスマッチング

探索的試験のみならず申請資料となる試験でも実施経験あり。
過半数 (60%以上) の方がマトリックスマッチングの経験あり。

5. QC試料の評価

5-1 LLOQの必要性

蛋白結合試験 : 必要なし

その他試験 : 必要

DGでは想定される定量値を考慮して、
蛋白結合試験ではLLOQの評価は不要、その他試験では必要と考えた。

ご意見をお寄せください





14. まとめ



(4/7)

5. QC試料の評価 (続き)

5-2 LLOQの評価時期 (SVで評価しない場合)

両試験とも、過半数(60%以上)が基本的にはLLOQを評価しないと回答。しかし、実測定における検量線のLLOQで評価するとの回答も30%程度あり。

5-3 試料の繰り返し数

両試験とも、過半数(70%以上)が $n = 3$ で実施。

5-4 評価基準

両試験とも、半数以上がBMVガイドライン(15/20%)の基準で実施。一方で、4割程度はより広い許容範囲(20/25%)を支持し、意見は分かれた。

6. 測定単位間再現性

両試験とも、85%以上が測定単位間再現性は評価しないと回答。



14. まとめ



(5/7)

7. 標準溶液

両試験とも、約半数がValidationでは同じストック溶液を使用すると回答。
Pre-study, In-study Validation共に「同じストック溶液を使用する」傾向が見られた一方で、In-study Validationにおいては「別々のストック溶液を使用する」との回答も35%あり。

8. 選択性

蛋白結合試験： 複数個体あるいはプールマトリックス
その他試験： プールマトリックス

評価基準はどちらもブランク試料のレスポンスが、LLOQにおける分析対象物質 20%以下かつ 内標準物質の 5%以下。

DGではIn vitro試験では均一なマトリックスを使用する場合も多いことから「1個体またはプールマトリックス」で十分と考えた。

ご意見をお寄せください



9. 回収率

両試験とも、測定法の検討時に確認すると回答。(Validationでは評価しない)
DGではBMVガイドラインで不要となっていることから確認は不要とした。

ご意見をお寄せください



156



14. まとめ



(6/7)

10. キャリーオーバー

両試験とも、実施タイミングならびに方法はそれぞれだが、実測定の実施までには確認すると回答。

評価基準はどちらもULOQの検量線用標準試料を測定後のブランク試料のレスポンスが、LLOQにおける分析対象物質 20%以下。

DGでは実検体測定の試験内で評価できるため、SVとしての実施は不要と考えた。

ご意見をお寄せください



11. マトリックス効果

両試験とも、「評価する／しない」で意見が分かれた。

DGではマトリックスが異なることが明らかな一部の蛋白結合試験のみ

「評価が必要」とした。

ご意見をお寄せください



12. 希釈の妥当性

両試験とも、必要性が明らかであればPre-Study Validationで評価するとの回答が多数を占めた。

DGでは必要に応じて実検体測定の試験内で評価すればよいと考えた。

ご意見をお寄せください





14. まとめ



(7/7)

13. 安定性

13-1 評価項目

両試験とも、前処理後とベンチトップの安定性を確認する例が多いが、全く実施しないとの回答も20%以上あった。

DGでは調製直後に測定し、保存しない場合が多いと考えられることから基本的には「不要」とした。

ご意見をお寄せください



13-2 標準原液の安定性評価

両試験とも、安定性が確認された溶液を使用する、または用時調製とする。



ご意見をお寄せください



アンケートでの回答多数のご意見とDGの推奨が異なる項目もあります。是非、会場からもご意見をお寄せください。





14. Summary



(1/7)

<Summary of questionnaire>

1. Backgrounds of respondents

34 effective responses

≥90% are Japanese companies, of which 30% are CROs.

A few responses are from foreign companies

Years of experiences vary with balanced distribution.

•When do you conduct assays?

Both Protein Binding Assay ("PBA") and other assays are conducted as part of pre-study validation.

2. COA

Many respondents: COA (ROA) is necessary as part of application documents.

DG : COA (ROA) is NOT necessary.

A test article and a reference standard have the same lot#;

effect of their purity does not need to be considered.

3. Calibration curve

Give us your inputs.



3-1 Range

PBA: the number of respondents who set the range flexibly is almost the same as the number of those who set 3 orders.

Other assays: Majority choose 3 orders.





14. Summary



(2/7)

3. Calibration curve (cont.)

3-2 How many points?

PBA: Nearly 90% choose ≥ 6 points.

Other assays: the number of respondents who choose ≥ 6 points is about 10% less than the above numbers.

3-3 Acceptance criteria

Majority ($\geq 60\%$) follow BMV guideline (15/20%) in both assays.

The other respondents choose 20/25%.

3-4 Do you use extrapolation?

Majority: applicable under certain conditions in both assays.

About 40%: NOT applicable under any condition.

4. Matrix for calibrators and QCs

4-1 Assay diluent used as surrogate matrix

About 50% evaluate equivalency between surrogate and authentic matrices on a sample-by-sample basis. Nearly 40% always investigate equivalency. Most are in favor of the evaluation. Opinions on the criteria are divided.



14. Summary



(3/7)

4. Matrix for calibrators and QCs (cont.)

4-2 What surrogate matrix needs to be proved equivalent?

Serum, ultracentrifuged supernatant, ultrafiltrate, suspension matrix, etc.
Many evaluate equivalency every time matrix is different.

4-3 Matrix matching

Respondents have used matrix matching not only in exploratory study but in studies for applications .
Majority ($\geq 60\%$) have used matrix matching.

5. Evaluation of QCs

5-1 Is LLOQ necessary?

PBA: NOT necessary

Other assays: necessary

DG: Considering expected concentrations, LLOQ is necessary not for PBA but for other assays

Give us your inputs.





14. Summary



(4/7)

5. Evaluation of QCs (cont.)

5-2 When do you evaluate LLOQ? (When SV is NOT used)

Majority ($\geq 60\%$) do not evaluate LLOQ in either assay, in principle. About 30% evaluate LLOQ calibrator in study sample analysis.

5-3 Number of replicates

Majority ($\geq 70\%$) conduct both assays in triplicate.

5-4 Acceptance criteria

$\geq 50\%$ use criteria of BMV Guidelines (15/20%) in both assays.
About 40% prefer less stringent criteria (20/25%).
Opinions are divided.

6. Inter-assay reproducibility

$\geq 85\%$ do not evaluate inter-assay reproducibility in either assay.



14. Summary



(5/7)

7. Standard working solutions

About 50% use the same stock solution in validation of both assays.
Many tend to use the same stock solution both in pre-study validation and in in-study validation. 35% use separate stock solutions in in-study Validation.

8. Selectivity

PBA: multiple individual lots of matrix or pooled matrix

Other assays: pooled matrix

Criteria: response of blank is $\leq 20\%$ of LLOQ for analyte and $\leq 5\%$ for IS.

DG : As homogeneous matrix is often used for in vitro study, one individual lot or pooled matrix works enough.

Give us your inputs.



9. Recovery

Majority evaluate recovery during preliminaries in both assays (not assessed in validation)

DG: NOT necessary because BMV guideline does not require assessment.

Give us your inputs.





14. Summary



(6/7)

10. Carryover

When and how do you evaluate carryover?

Timing are different for both assays. Assessment is completed no later than study sample analysis.

Criteria

Response of blank following ULOQ calibrator is $\leq 20\%$ of LLOQ for analyte in both assays.

DG : carryover does not need to be assessed in SV as it can be evaluated during study sample analysis.

Give us your inputs.



11. Matrix effects

Opinions are divided over whether to assess matrix effects or not for both assays.

DG : evaluation is necessary only for some of PBAs when matrix is different.

Give us your inputs.



12. Dilution integrity

Majority evaluate dilution integrity in pre-study validation if assessment is obviously necessary.

DG : evaluation should be done in study sample analysis, as necessary.

Give us your inputs.





14. Summary



(7/7)

13. Stability

13-1 What do you test?

Many investigate processed sample and bench top stability, but $\geq 20\%$ do not evaluate any stability in either assay.

DG: stability testing is NOT necessary in principle as samples are analyzed immediately after being prepared in many cases.

Give us your inputs.



13-2 Standard stock solution stability

Many use solutions whose stability is verified or freshly prepared solutions.



Give us your inputs.



Not all DG's recommendations match responses to questionnaire.
Please give us your inputs.

