

USP <1225/1226>
ICH Q2(R1)
GxPcGMP
PIC/S SOP
ISO 17025
QA/QC
LOD/LOQ
API EP
FDA
OECD
GCP

入門書



分析メソッドの
バリデーション



Agilent Technologies

分析メソッドの バリデーション

Ludwig Huber

目次

序文	III
1. はじめに	2
1.1 文書の概要	3
1.2 用語: バリデーションとベリフィケーション	4
1.3 ラボにおけるデータ品質の要素	4
2. 規制と品質基準	7
2.1 米国食品医薬品局 (FDA)	8
2.2 医薬品製造査察の相互認証に関する協定 (PIC/S) と欧州	9
2.3 医薬品規制調和国際会議 (ICH)	10
2.4 米国薬局方 (USP)	11
2.5 ISO/IEC 17025	11
3. メソッドバリデーションのパラメータとテスト	13
3.1 特異性/選択性	15
3.2 精度	18
3.3 正確さと回収率	19
3.4 直線性と検量線	20
3.5 範囲	22
3.6 検出限界	23
3.7 定量限界	24
3.8 堅牢性	26
3.9 耐久性	26
3.10 安定性	26

4. メソッドバリデーションプロセス	29
4.1 ライフサイクルのコンセプト	30
4.2 バリデーションプラン	31
4.3 範囲とメソッド仕様	32
4.4 バリデーションパラメータおよび限界値の選定	33
4.5 性能特性のテスト：準備と実施	36
4.6 ルーチン分析用の品質管理プランの策定	38
4.7 バリデーションレポートとその他の文書	39
5. メソッドの調整、変更、再バリデーション、 標準メソッドおよび公定書メソッドのベリフィケーション	41
5.1 メソッドの調整	42
5.2 再バリデーション	46
5.3 標準メソッドおよび公定書メソッドのベリフィケーション	46
6. 分析メソッドの移動	51
6.1 移動手順	52
6.2 メソッド移動のステップ	53
7. 生物分析メソッドのバリデーション	55
7.1 各種協会およびFDAのバリデーションガイドライン	56
7.2 バリデーションパラメータ	58
7.3 ルーチン生物分析の品質管理	60
参考文献	61
用語集	65

序文

この入門書の目的は、(生物) 医薬品、食品、化学、環境などの規制の厳しいラボの管理者や研究者を対象に、分析メソッドのバリデーションをあらゆる側面から説明することです。関連する規制や品質基準、ガイドラインを幅広くとりあげているため、品質管理者やスタッフ、規制関連の専門家にも役立つはずでです。この入門書では、組織内で開発した新たなメソッドのバリデーションや、公定書および標準メソッドのベリフィケーションに関する戦略や具体的な推奨事項を紹介しています。

この入門書を読めば、以下のことをすぐに理解できます。

- 規制および品質基準の要件の概要
- 参考文献の概要
- 導入の戦略
- テストパラメータ、許容基準、テスト条件に関する情報
- 生物分析メソッドのバリデーション、公定書メソッドのベリフィケーション、分析メソッドの移動など、特別なアプリケーションに関する推奨事項

本書で紹介するコンセプトやアイディアは、かならずしもアジレントや Labcompliance のポリシーを反映したものではありません。

本書に記載された一部の文章や図表は、出版元である INFORMA HEALTHCARE (ニューヨーク) の許可を得て、Ludwig Hube 博士の参考文献から引用しています。

- L. Huber, Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Interpharm, Informa Healthcare, New York, USA, 2007

文章および図表の著作権は、出版元に属します。

規制や品質基準は常に変化し、数年ごとに更新されています。現在の最新技術が今後も最新であるとは限らないため、規制当局や業界のタスクフォースが策定した導入ガイドラインが頻繁に公開されています。

すべての情報を適時更新することが重要です。それにはインターネットなどのオンライン情報ツールの使用が欠かせません。そのため、以下の Web サイトを推奨します。これらのサイトでは、ラボの品質基準に関する情報が定期的に更新されています。

<http://www.fda.gov>

分析メソッドおよび手順のバリデーションに関する規則と個別ガイドライン

<http://www.agilent.com/chem/pharmaqaqc>

毎月更新されるニュースレターを掲載しているアジレントの製薬 QA/QC サイト

<http://www.labcompliance.com>

ラボにおける品質およびコンプライアンスに関するチュートリアルや参考文献などが定期的に更新されている Web サイト

Ludwig Huber 博士

グローバル FDA コンプライアンス、チーフアドバイザー

Labcompliance

ludwig_huber@labcompliance.com

はじめに

分析的測定の目的は、信頼性と精度の高い一貫したデータを採取することにあります。この目的を達成するには、分析メソッドのバリデーションを実施することが重要となります。メソッドバリデーションの結果から、分析結果の品質、信頼性、一貫性を判断することができます。この過程は、優れた分析の実施には欠かせない手順です。分析メソッドのバリデーションは、ラボに影響を与えるほとんどの規制や品質基準でも求められています。

分析メソッドは、以下のような場合に、バリデーション、ペリフィケーション、または再バリデーションを実施する必要があります。

- ルーチンテストで最初に使用する前
- 別のラボに移動した場合
- バリデーションしたメソッドの条件やメソッドパラメータが変更され (異なる特性を持つ機器や、異なるマトリックスのサンプルなど)、その変更が当初のメソッド範囲から外れている場合

業界の各委員会や規制当局の発行する文書でも、メソッドバリデーションに大きな重点が置かれています。この章では、メソッドバリデーションにより優れたデータ品質が実現することを説明します (その他の要素もあります。これについてはのちほど説明します)。

1.1 文書の概要

この入門書の目的は、メソッドバリデーションの実施に関するコンセプトや戦略を提案することです。メソッドバリデーションの詳細については説明していません。ただし、タスクフォースや各研究者により実施された研究の結果として、幅広い情報やガイドラインが公開されています。この章では、その概要を紹介します。分析メソッドの移動や特定のパラメータなど、特定の点に関する情報が記載されたその他の参考文献については、関連する各章で紹介しています。

- 英国政府化学者研究所 (LGC) は、内部メソッドバリデーションに関する指針を策定しています¹。この指針には、関連するラボ認定要件に関する説明も含まれています。
- 米国食品医薬品局は、2つの業界ガイドラインを策定しています (分析メソッドのバリデーション用²と生物分析メソッドのバリデーション用³)。
- ICH は 2 つのメソッドバリデーションガイドラインを公開しています。Q2A⁴では、バリデーションの際に考慮すべき 8 つのバリデーションパラメータに関する用語と定義が説明されています。Q2B⁵では、方法論が説明されています。ただし、「各自の製品にもっとも適したバリデーション手順およびプロトコルは、利用者の責任において選択されるものとする」との記述により、柔軟性が認められています。
- IUPAC⁶は、「単一ラボにおける分析メソッドバリデーションの統一ガイドライン (Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis)」を公開しています。
- EURACHEM⁷は、メソッドバリデーションに関する詳細な指針を公開しています。メソッドバリデーションの理論と実践がもっとも詳しく説明されている公式ガイドです。当初は ISO/IEC 認定ラボ向けに策定されたものですが、その内容の充実度により、(生物) 薬剤研究ラボにとっても優れた情報源となっています。
- Huber⁸のまとめた分析ラボ向けのバリデーション参考書では、メソッドバリデーションの解説に 1 章が割かれています。
- AOAC⁹は、ISO 17025 認定における分析メソッドのベリフィケーションに関する技術文書を公開しています。
- Viswanathan ら¹⁰は、生物分析メソッドのバリデーションに関する要約をまとめています。

1.2 用語: バリデーションと ベリフィケーション

分析メソッドのバリデーションおよびベリフィケーションという用語については、複数の解説がなされています。この2つの用語は、ほとんど同じ意味で使われています。この2つの違いは、USP チャプター<1225> と <1226> でもっともわかりやすく示されています。チャプター<1225>¹¹は、「公定書メソッドのバリデーション」と題されています。このチャプターでは、分析メソッドのバリデーションが、すべてのバリデーションパラメータとともにはじめから解説されています。これにより、特定サンプルのメソッドバリデーションが可能になっています。この手順は、内部で開発されたメソッドのバリデーションに推奨されます。

チャプター<1226>¹²は、「公定書メソッドのベリフィケーション」と題されています。このチャプターでは、ラボのメソッド実行能力を示す公定書メソッドの推奨事項が説明されています。メソッド移行の際にも、受け入れラボによりメソッドのベリフィケーションが行われます。公定書メソッドのベリフィケーションとメソッド移行については、のちほど本文書でも説明します。

1.3 ラボにおけるデータ品質の要素

分析手順のバリデーションの目的は、「意図される目的への適合性」を示すことにあります。分析的測定の間意図は、正確で信頼性の高いデータを生成することです。メソッドバリデーションは、それだけではこの意図を保証できませんが、分析的測定に関する品質保証の一部として組み込む必要があります。この点は、分析機器の適格性確認に関する USP のチャプター<1058>で明確に説明されています¹³。このチャプターの冒頭では、ラボにおけるデータ品質の各種要素の重要性が説明されています。また、システム適合性テストや品質管理チャートの分析だけでは、分析結果の有効性を十分に保証できない理由も説明されています。機器の適格性確認とメソッドのバリデーションは同じくらい重要です。

図1には、データ品質の各要素(分析機器の適格性確認、分析メソッドのバリデーション、システム適合性テスト、品質管理サンプルによる品質管理確認)を示しています。

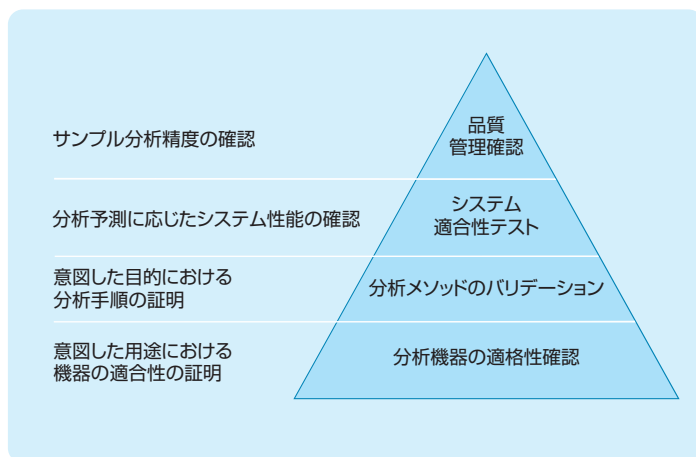


図 1
分析データ品質の各要素

機器の適格性確認とは、バリデーション対象のメソッドに適合するように機器仕様を定義、テスト、および確認することを意味します。その後、適格性が確認された機器で分析メソッドのバリデーションを実施し、メソッドが意図したとおりに機能することを証明します。このバリデーションは、各機器で独立したものです。別のベンダーの機器でメソッドを使用する場合は、その機器でもメソッドをバリデーションする必要があります。

その後、個別の機器と個別のメソッドを組み合わせ、システム適合性テストを実施します。システム適合性パラメータは、メソッドバリデーションの際に選択する必要があります。システム適合性テストに合格すれば、各テストの条件において、システム全体が分析実施者の期待に適合していることが保証されます。

最高レベルのテストが、品質管理サンプルの分析です。標準物質または既知量のサンプルを分析し、結果を既知のものと比較します。

メソッドバリデーションは、分析機器の適格性確認とシステム適合性テストの間に実施され、他のすべての品質要素と結びつきます。メソッドのバリデーションには、適格性が確認された機器を使用します。メソッドのバリデーションを行う際には、システム適合性テストと品質管理確認のパラメータおよび許容基準を定義する必要があります。

規制と品質基準

分析室に影響を与える規制と品質基準では、分析メソッドのバリデーションが求められています。規制では「バリデーション」という言葉がそのまま使われていることもあれば、特定のパラメータが列記されていることもあります。また、「分析メソッドは意図される用途に適合していなければならない」といった記述で暗示的にバリデーションが求められていることもあります。この章では、もっとも重要な規制や品質基準、公的なガイドラインを見ていきます。各組織の提示するバリデーション要件のガイドラインの範囲はさまざまですが、バリデーションの目的は常に、分析結果の有効性を確認することにあります。該当する分析メソッドを使用して測定する製品の品質や安全性を確保するためには、こうした確認が重要となります。

2.1 米国食品医薬品局 (FDA)

分析メソッドのバリデーションは、医薬品適正製造基準 (cGMP)¹⁴ や医薬品の非臨床試験の実施に関する基準 (GLP) といった規制を遵守するうえでは不可欠です。米国 cGMPs では、セクション 211.165 (e) と 211.194 でバリデーション要件が詳細に述べられています。

- 165 (e) : 企業が採用する試験メソッドの真度、感度、選択性、室間再現精度は、確立および文書化されていなければならない。そうしたバリデーションおよび文書化は、194 (a)(2) に従って実施されるものとする。
- 194 (a)(2) : 分析室の記録には、サンプル分析に使用する各メソッドの記述が含まれていなければならない。この記述では、サンプル分析に使用するメソッドが、分析対象製品に応じた適切な真度および信頼性基準を満たしていることを立証するデータの保管場所を示さなければならない。使用するすべての分析メソッドの適合性は、正確な使用条件のもとで確認されなければならない。
- 194 (b) : 分析に使用された、確立済のメソッドに加えられたあらゆる修正を、完全に記録しなければならない。そうした記録には、修正の理由や、修正後も確立済のメソッドと同等以上の真度と信頼性が得られることを検証したデータが含まれるものとする。
- FDA GLP 規制 21 CFR パート 58¹⁵ では、バリデーションという言葉は直接記載されていませんが、パート 58.113 を根拠に、査察の際にはバリデーション試験が求められます。パート 58.113 には、「試験は適切

な分析メソッドにより実施するものとする」と記載されています。この「適切に」という言葉がバリデーションを示唆しています。生体分析メソッドのバリデーションに関する FDA ガイダンス³でも、前臨床毒性がその範囲の一部として定義されています。

- 生物学的利用性および生物学的同等性用件に対する FDA の規制 21 CFR 320¹⁶ では、セクション 29 に記載されています。
(a) in vivo での生物学的利用性試験において、生体液または排泄物に含まれる薬剤有効成分 (Active drug ingredient) や治療部分 (therapeutic moiety)、またはその代謝物の濃度を測定するのに使用されるメソッドや、急性の薬理作用の測定に用いられるメソッドは、体内に到達する薬剤有効成分や治療部分、またはその代謝物の実際の濃度を測定するだけの正確で十分な測定感度が、適切な正確さとともに得られることが立証されたものでなければならない。

2.2 製薬査察共同体 (PIC/S) と欧州

製薬査察共同体 (PIC/S) の使命は、「医薬品分野における統一された医薬品適正製造基準 (GMP) による査察団の品質システムの国際的な策定、実践、維持を先導すること」にあります。

この使命を達成するために、統一された GMP 基準およびガイダンス文書の策定と普及、規制当局 (特に査察官) のトレーニング、査察団の評価 (および再評価)、規制当局と国際組織の協力およびネットワーク構築の促進などが実施されています。2009 年 11 月現在、PIC/S には欧州連合の全加盟国を含む 36 の規制当局が参加しており、米国 FDA など、さらに多くの国の規制当局が PIC/S への加盟を申請しています。独自の GMP 基準を持たない新規加盟国は、PIC/S GMP¹⁷ を適用するものと考えられます。PIC/S GMP は、EU GMP 指針¹⁸にきわめてよく似ています。

たとえば、分析メソッドのバリデーションに関する要件は、どちらの文書でもパート 6.1.5 に記載され、その文章も同じです。

- 分析メソッドについては、バリデーションを実施しなければならない。製造認可に記述されたすべての分析操作は、承認されたメソッドに従って実施されなければならない。

査察官の期待の詳細は、PIC/S ラボ査察ガイドのセクション 8.7¹⁹ に規定されています。このガイドでは、品質管理ラボの査察時に査察官が訊ねるべき質問が列記されています。質問には、以下のものがあります。

- メソッドバリデーションがバリデーションマスタープランの一部になっていますか？
- メソッドバリデーションに関する全般的な SOP が利用可能になっていますか？バリデーションレポートは正式に承認されていますか？
- バリデーションの目的は明記されていますか？
- ICH⁵ で定義されたパラメータについて、各プロトコルでバリデーションを完了および文書化していますか？
- 各プロトコルで判定基準を定義し、それを満たしていますか？
- 分析メソッドの移行に関する SOP はありますか？

2.3 日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH)

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) は、欧州、日本、米国の規制当局や、3 地域の製薬業界の専門家を一堂に集め、医薬品登録に関する科学的小および技術的側面を話し合うための場として、1990 年に立ち上げられました。

ICH の公開したガイドラインには、加盟国 (欧州各国など) で法律として施行されているものもあれば、米国 FDA などの各国の規制当局によりガイドラインとして推奨されているものもあります。

もっとも重要な ICH の文書の 1 つが、医薬品有効成分に関する GMP ガイドです²⁰。チャプター 12 では、メソッドバリデーションの要件が規定されています。

- 使用するメソッドが関連する薬局方または広く認められている標準参考文献に含まれている場合を除き、分析メソッドのバリデーションを実施すること。使用するすべての分析メソッドの適合性は、実際の使用条件のもとで確認し、文書化すること。
- 実施する分析バリデーションの程度は、分析の目的および API 製造プロセスの段階を反映したものとすること。
- 分析機器の適格性評価は、分析メソッドのバリデーションを開始する前に行うこと。

2.4 米国薬局方 (USP)

米国薬局方 (USP) は、FDA の規制対象となる業界の各種の分析的側面について、具体的なアプリケーションや一般試験法 (ジェネラルチャプター) を策定しています。米連邦食品薬品化粧品法の 501 条では、USP の定めた方法が法的基準となると定められています。USP はこれまでに、メソッドバリデーションに関連する 2 件のジェネラルチャプターと、再バリデーションなしで行うことが認められているメソッド変更に関する情報を含む 1 件のジェネラルチャプターを策定しています。

- 「分析法バリデーション (Validation of Compendial Methods)」に関するチャプター <1225>¹¹。このチャプターでは、新規メソッドのバリデーションに使用されるパラメータが解説されています。推奨事項は、製薬分析室の開発したメソッドバリデーションに使用できます。
- 「分析法のベリフィケーション (Verification of Compendial Methods)」に関するチャプター <1226>¹²。このチャプターは、分析メソッドおよび標準メソッドを採用する分析室のために書かれています。この推奨事項は、他の分析室からバリデーション済みのメソッドを採用する場合にも役立ちます。
- 「クロマトグラフィー」に関するチャプター <621>²¹。このチャプターには、再バリデーションなしで GC と HPLC メソッドを調整および変更できる範囲について、有益な推奨事項が記載されています。

2.5 ISO/IEC 17025

ISO/IEC 17025 は、分析室にもっとも関係の深い ISO 標準で²²、これは試験、校正、またはその両方を実施するための能力に関する一般的な要件を規定しています。この標準は、環境、食品、化学、臨床といった分野の試験室で、品質システムとして広く利用され、認可を求めるラボの評価にも用いられます。

この標準では、本書の話題に関連する多くの要件が規定されています。もっとも重要な要件は、チャプター 5.4.5 に記載されています。

- 分析室は、非標準メソッド、分析室が設計および開発したメソッド、意図された範囲外で使用する標準メソッド、標準メソッドの拡大や修正についてバリデーションを実施し、そのメソッドが意図される用途に適合することを確認すること。
- 分析室は、試験または校正を始める前に、標準メソッドを適切に実行する能力を有することを確認すること。

- バリデーション済みの非標準メソッドに変更を加える場合は、そうした変更の影響を文書化し、必要に応じて新たなバリデーションを実施すること。
- 特定のサンプル試験において標準メソッドを利用できる場合は、最新のものを使用すること。
- バリデーションには、要求仕様、メソッド特性の決定、メソッド使用による要件遵守の確認、有効性の表明が含まれる。
- 内部で開発したメソッドのバリデーションについては、以下のパラメータを考慮すること：検出限界、定量限界、真度、選択性、併行精度または室間再現精度、堅牢性、直線性

他の規則とは異なり、この標準はきわめて具体的です。現在のところ、製薬分析室にはあまり普及していませんが、バリデーションの専門家は、メソッドバリデーションプロセスを開発する際にこの標準を参考にし、特定のアプリケーションに適した推奨事項を採用することを勧めています。

メソッドバリデーションの パラメータとテスト

USP <1225> では、分析メソッドのバリデーションは、ラボの試験により実施しなければならないと定められています。「分析手順のバリデーションは、ラボの試験により、手順の性能特性が意図される分析アプリケーションの要件を満たしていることを立証するプロセスです」。メソッドバリデーションで求められる試験は、各国の委員会や国際委員会の各種ワーキンググループで定義され、文献で解説されています。

残念ながら、一部の定義は、組織によってさまざまに異なります。そのため、ラボでは定義集を備え、それぞれの用語を理解する必要があります。ICH では、定義を標準化するために、米国、欧州、日本の業界および規制当局の代表者により、分析メソッドバリデーションのパラメータや要件、方法が定義されています。ICH や他の組織および研究者により定義されたパラメータを図 2 にまとめています。以下のパラグラフでは、これらの定義を簡単に説明します。

パラメータ	コメント
特異性	USP、ICH
選択性	ISO 17025
精度	USP、ICH
併行精度	ICH、ISO 17025
室内再現精度	ICH
室間再現精度	ICH、USP および ISO 17025 では耐久性として定義
正確性	USP、ICH、ISO 17025
直線性	USP、ICH、ISO 17025
範囲	USP、ICH
検出限界	USP、ICH、ISO 17025
定量限界	USP、ICH、ISO 17025
頑健性	USP、ICH にはメソッド開発アクティビティとして含まれる、ISO
堅牢性	USP、ICH では室間再現精度として定義

図 2
ICH、USP、ISO 17025 に記載されているメソッドバリデーションのパラメータ

3.1 特異性/選択性

ICH は特異性を「存在が予想される成分が存在する状況において、測定成分を正確に分析できる能力。通常、存在が予想される成分には、不純物、分解物、マトリックスなどが含まれる」と定義しています。USP <1225> でも同様の定義がなされていますが、IUPAC や AOAC といった他の信頼できる組織では、「選択性」という用語が同じ意味で用いられていることも言及されています。この場合、「特異性」という語は、単一の測定成分のみへの反応を伴う手順に用いられます。ISO/IEC もほぼ同じ見解で、メソッドには特異性という言葉を用いず、「選択性」を用いるよう求めています。ここでの目標は、他のすべての化合物のレスポンスのなかから、測定成分のレスポンスを識別し、定量化することです。

特異性のバリデーションには、存在する可能性のあるすべての化合物が含まれる状況で測定成分のレスポンスを測定できる分析法を使用する必要があります。1 つの分析手順で特定の測定成分の特異性を証明することが不可能な場合もあります。この場合、必要なレベルの識別能を得るために、複数の分析手順を組み合わせることを推奨します。製薬ラボでは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) がよく用いられます。ガスクロマトグラフィー (GC) も使用されることがあります。実際の手順では、測定成分と予想されるすべての化合物を含むテスト用混合試料を調製します。得られた結果を、測定成分のレスポンスと比較します。テスト用混合試料には、成分は合成中間生成物、賦形剤、分解生成物が含まれます。分解生成物の生成は、高温や高湿度、光などのストレス条件下にサンプルを置くと加速することがあります。

液体クロマトグラフィーの特異性は、最適なカラムを選択し、移動相組成やカラム温度、検出器波長といったクロマトグラフィー条件を設定することで得られます。クロマトグラフィー分離のほか、最高の選択性を得るために、サンプル前処理手順を最適化することもあります。

クロマトグラフィーでは、サンプルのクロマトグラムピークが純粋なものか、複数の物質で構成されているものかを識別するのは困難です。サンプル中に何種類の化合物が存在するのかわかる必要がありますが、常にそれが可能であるとは限りません。そのため、測定成分のピークの純度を評価する必要があります。

以前は、移動相組成やカラムなどのクロマトグラフィーのパラメータが修正されていましたが、現在では、クロマトグラフィーと質量分析計をオンラインで接続して用いられています。フォトダイオードアレイ検出器や質量分析計を用いて、オンラインでクロマトグラム全体のスペクトルを採取します。その後、ピーク溶出中に採取されたスペクトルを比較します。スペクトルが異なる場合は、ピークは複数の化合物で構成されていると考えられます。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とフォトダイオードアレイ検出器を用いた特異性評価の例を図 3 に示します。この図では、特異性のあるクロマトグラフィーメソッドと、特異性のないメソッドの例を示しています。2つのピークはよく似ています。ピーク形状からは、ピークが1つの化合物のものなのか、複数の化合物で構成されているのかは判断できません。

どちらの例でも、ピークの前半部と後半部で UV スペクトルを採取し、正規化および比較しています。左の例では、2つのスペクトルはほぼ一致しています。これは、ピークが1つの化合物で構成されている、つまりこのピークはスペクトルの観点からは純粋であることを示しています。右の例では、2つの UV スペクトルが異なっており、ピークが純粋ではないことが明らかに示されています。最先端のダイオードアレイ検出器では、スペクトルを自動的に比較し、各ピークのマッチファクターを

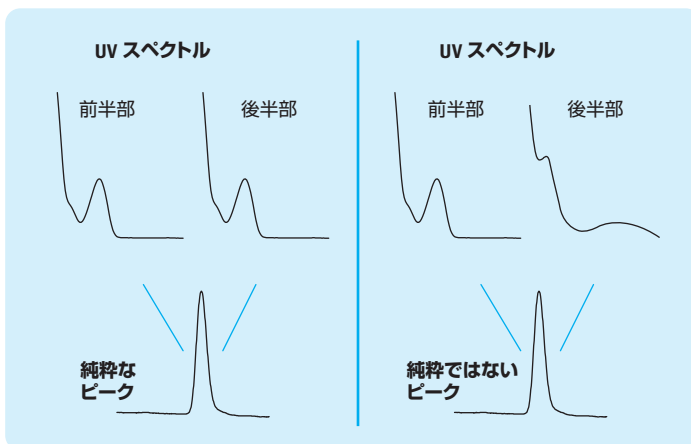


図 3

同一のスペクトルは、ピークが純粋であることを示しています (左)。
異なるスペクトルは、ピークが純粋ではないことを示しています (右)。

出力することが可能です。これをグラフによる視覚化と組み合わせれば、作業的な負担を増さずに選択性を評価することができます。

代謝物と親化合物を比較する場合など、共溶出する化合物のスペクトルがきわめてよく似ている場合は、フォトダイオードアレイ検出器による分析に限界が生じます。こうしたケースには、HPLC と質量分析計の組み合わせが適しています。一般に、質量スペクトルは UV スペクトルよりも特異性が高く、クロマトグラフィーの選択性の評価に用いられます。HPLC と質量分析計を組み合わせた使用例を図 4 に示しています。4.86 分のピークの複数セクションで採取された質量スペクトルが異なっていることから、ピークが純粋ではないことがわかります。

選択性の検討では、尿、血液、土壌、水、食品などのマトリックスにより生じる可能性のある干渉を評価する必要もあります。サンプル前処理手順を最適化することにより、マトリックス成分の大半を除去することができます。定量メソッドのマトリックス干渉については、最低 5 種類の独立したソースのコントロールマトリックスの分析により、干渉が存在しないことを証明する必要があります。

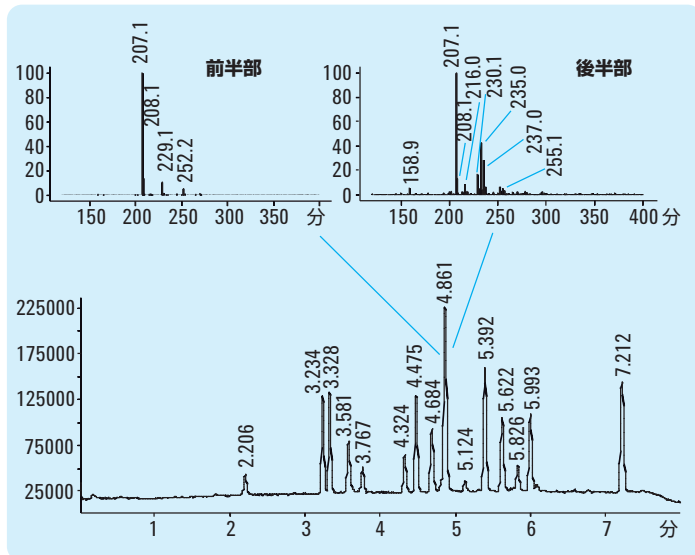


図 4

4.86 分のピークの複数セクションで採取した質量スペクトルにより、ピークが純粋ではないことが示されています。

3.2 精度

ICH の定義では、分析手順の精度は、規定条件下で均質なサンプルを複数回サンプリングして得られた一連の分析において、近似した結果 (散布度) が得られることとされています。精度は、併行精度、室内再現精度、室間再現精度という 3 つのレベルで考慮されます。

- **併行精度**は、短期間における同一操作条件下での精度を表します。併行精度は、アッセイ内精度とも呼ばれます。
- **室内再現精度**は、異なる日、異なる分析、異なる機器などの施設内での変動を表します。
- **室間再現精度**は、施設間での精度を表します (おもに手法の標準化に適用される共同研究)。

ICH⁵ では、ターゲット濃度の 100 % の濃度で少なくとも 6 回繰り返し分析する、または規定された範囲全体をカバーする濃度で少なくとも 9 回繰り返し分析することにより、併行精度を評価することが求められています。たとえば、3 種類の濃度を、各濃度 3 回ずつ注入することで、評価することができます。

室内再現精度は、何日かにわたって同一の施設内でメソッドを実行した結果を比較することで得られます。メソッドの室内再現精度では、以下に起因する結果の不一致が反映されることがあります。

- 操作者の違い
- 作業手順の一貫性のなさ
- 機器の違い
- 標準物質および試薬の供給元の違い
- カラムバッチの違い
- 上記の組み合わせ

室内再現精度のバリデーションは、同一の施設において、メソッド開発段階完了後に当該メソッドにより同一の結果が得られることを証明するために行われます。

室間再現精度は、異なる施設において、該当メソッドにより同一の結果が得られることを証明するために行われます。分析メソッドの室間再現精度は、異なる施設において同質ロットのサンプルを、異なる分析者により分析することで評価されます。また、メソッドの規定パラ

メータとは異なる (ただし規定範囲内で) 操作条件および環境条件の一般的な変動値が用いられることもあります。メソッドを異なる施設で使用する場合は、室間再現精度のバリデーションが重要となります。室間再現精度に影響を与える可能性のある要因としては、室温や湿度の違い、HPLC システムのディレイボリュームなどの機器特性の違い、カラムの供給元やバッチの違い、操作者の経験や綿密さの違いなどがあります。

3.3 正確さと回収率

ICH の定義では、分析手順の正確さは、一般的な真の値または許容される参照値と近似する測定値が得られることとされています。

正確さは、メソッドにより得られる分析結果と真の値との一致度と説明することもできます。

正確さの評価に使用する真の値は、複数の方法で入手できます。メソッドで得られた結果を、確立されている参照メソッドで得られた結果と比較するという方法もあります。このアプローチは、参照メソッドの不確実性が既知であることが前提となります。

また、既知濃度のサンプル (コントロールサンプルや認定参照物質など) を分析し、真の値と測定値を比較する方法でも、正確さを評価することができます。認定参照物質やコントロールサンプルが手に入らない場合は、ブランクサンプルマトリックスに既知の濃度の測定成分を添加することも可能です。

マトリックスから測定成分を抽出し、分析機器に注入したのちに、抽出物のレスポンスと純粋な溶媒に溶解した参照物質のレスポンスを比較することにより、回収率を測定することができます。この方法による正確さの評価では、サンプル前処理の効率が測定されるため、実際のサンプル前処理手順をできるかぎり慎重に再現する必要があります。バリデーションが適切に行われた場合は、異なる濃度について測定された回収率を用いて、最終結果を校正することができます。

使用する濃度は、分析対象範囲をカバーする必要があります。また、定量限界に近い濃度、範囲の中間点の濃度、検量線の最高端の濃度を含める必要もあります。そのほか、正確さがもっとも高くなる濃度ポイントである決定値を使用する方法もあります。

バリデーション手法に関する ICH 文書では、規定範囲をカバーする最低 3 種類の濃度を用いて、最低 9 回の測定を行う手法 (たとえば、3 種類の濃度を各 3 回) により正確性を評価することが推奨されています。正確さは、既知量を添加したサンプル中の測定成分の分析で得られた回収率か、平均値と認可されている真の値との差異という形式で、信頼区間とともに報告する必要があります。

3.4 直線性と検量線

ICH の定義では、分析手順の直線性は、サンプル中の測定成分濃度 (量) に直接比例する分析結果を (与えられた範囲内で) 得られることとされています。

直線性は、測定成分 (標準原液の希釈により得られるもの) の直接測定か、分析サンプル成分を個別に計量して調製した混合サンプル測定により評価することができます。

直線性は、5 種類以上の標準溶液を 5~6 回注入して測定します。この標準溶液の濃度は、予想される濃度範囲の 80~120 % です。ここで得られるレスポンスは、分析対象物の濃度に直接比例するか、確立された数学的計算により比例関係が得られる必要があります。分析結果に適用される直線回帰方程式の切片は、ゼロから大きくはズレてはいけません。ゼロから大きくはズレた切片が得られた場合は、これがメソッドの正確さに影響を与えないことを示す必要があります。

多くの場合、数学的評価の代わりに、または数学的評価と併用して、グラフにより直線性が評価されます。こうした評価は、シグナル高さやピーク面積を分析対象物濃度の関数としてプロットした図を視覚的に調べることで行われます。直線からの逸脱は発見が困難なことが多いため、2 つの補助的なグラフ手順を用いることもあります。1 つ目は、回帰直線からの逸脱を、濃度または濃度の対数 (濃度範囲が複数桁にわたる場合) に対してプロットする方法です。直線範囲では、逸脱は正と負の値の間で均等に分布していなければなりません。

もう一つは、シグナルをそれぞれの濃度で除算し、相対レスポンスを求める方法です。Y軸に相対レスポンスを、X軸に対応する濃度を対数尺度でプロットし、グラフを作成します。得られた直線は、全直線範囲で水平になっている必要があります。一般に、高濃度では直線から負の方向へ逸脱します。水平の平行線を、たとえば水平線の95～105 %などの範囲でグラフ上に描きます。プロットした相対レスポンスのラインが95 %のラインと交わる点までが、メソッドの直線性の範囲となります。図5では、HPLCを用いた2つのグラフ評価手法を比較しています。

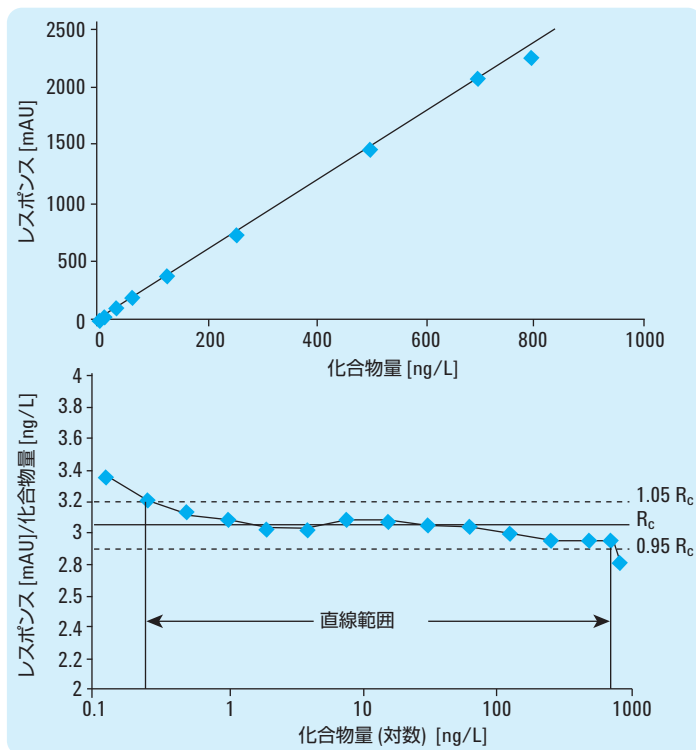


図5
HPLCを用いた直線性プロットのグラフ

感度 (レスポンス/化合物量) をプロットすれば、直線範囲を明確に示すことができます。直線範囲が広い場合には、化合物量を対数尺度でプロットする方法が有効です。Rc は一定レスポンスのラインを示しています。

ICH では、直線性を示す検量線の相関係数、Y 軸切片、回帰直線の傾き、残差平方和により正確性を報告することが推奨されています。レポートにはデータのプロットを含める必要があります。また、実際のデータポイントの回帰直線からの逸脱を分析しても、直線性の評価に役立ちます。免疫測定などの一部の分析手順では、どのような変換を行っても直線性を示せないことがあります。こうしたケースでは、サンプルに含まれる分析対象物の濃度 (量) の適切な関数として分析レスポンスを表す必要があります。直線性を立証するためには、最低 5 種類の濃度を使うことが推奨されます。他のアプローチについては、正当性を示す必要があります。

3.5 範囲

ICH の定義では、分析手順の範囲は、適切なレベルの精度、正確さ、直線性が得られることが示されているサンプル中測定成分濃度 (量) の上端から下端までの間隔 (上端と下端の濃度も含む) とされています。

分析メソッドの範囲は、該当メソッドを用いて適切な精度、正確性、直線性で測定できることが示されている値の上端から下端までの間隔 (上端と下端の値も含む) となります。範囲は通常、該当する分析メソッドにより得られる分析結果と同じ単位 (パーセンテージ、ppm など) で表されます。

ICH では、アッセイテストの最小規定範囲がテスト濃度の 80~120 % となることが求められています。また、不純物の測定範囲については、定量限界または各不純物規定値の 50 % のうちで大きいほうの値から、規定値の 120 % までとすることが求められています。図 6 に、直線性および範囲のグラフ定義を示します。

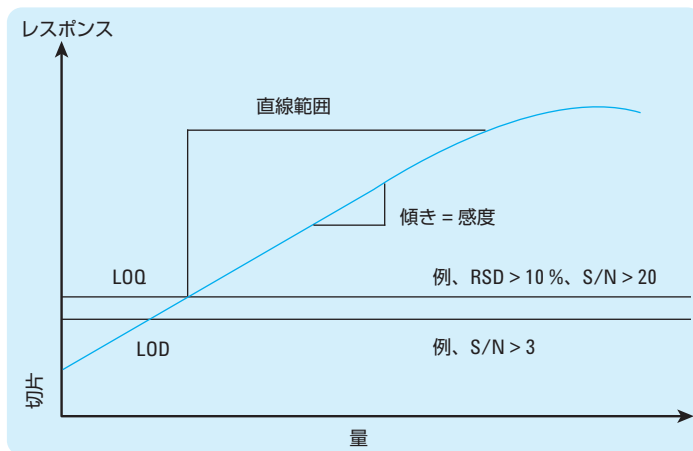


図 6
直線性および範囲の定義

3.6 検出限界

ICH の定義では、各分析手順の検出限界は、正確な値で検出できるサンプル中測定成分の最小量とされています。ただし、かならずしも定量できる必要はありません。

検出限界 (LOD) は、測定が不確実になる値よりも測定値が大きくなる濃度を指します。サンプル中の測定成分を検出できる最小濃度にあたりますが、かならずしも定量できる必要はありません。検出限界は、メソッドの感度と混同されがちです。分析メソッドの感度は、測定成分の濃度または質量の小さな違いを識別する能力のことです。実用的な定義で説明すれば、感度とは、測定成分の濃度または質量に対してレスポンスをプロットして得られた検量線の傾きにあたります。

クロマトグラフィーでは、検出限界は、ベースラインノイズレベルの最低 2~3 倍の高さでピークが生成される注入量を指します。このシグナル/ノイズによる評価手法に加えて、ICH⁵ ではさらに 3 つの方法が説明されています。

視覚的評価に基づいた方法： 既知濃度の測定成分を含むサンプルの分析や、確実に検出できる測定成分の最小濃度の証明により、検出限界が測定されます。

ブランクの標準偏差にもとづいた方法：適切な数のブランクサンプルの分析と、それらのレスポンスの標準偏差の計算により、分析バックグラウンドレスポンスの大きさが見積もられます。

レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づいた方法：検出限界付近の濃度で測定成分を含むサンプルを用いて、特定の検量線进行评估します。回帰直線の残差の標準偏差、または回帰直線のY切片の標準偏差を標準偏差として用いることもできます。図7に、シグナル/ノイズ比によるLODおよびLOQのグラフ評価の例を示しています。

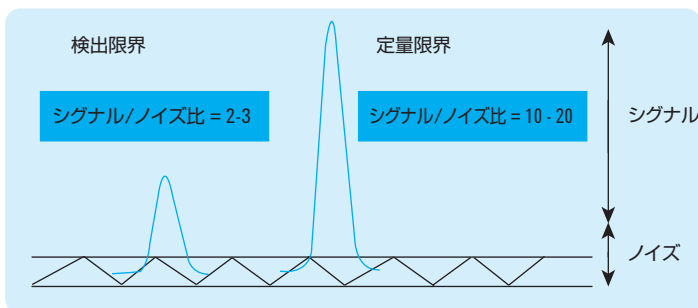


図7
シグナル/ノイズ比による検出限界と定量限界の評価

3.7 定量限界

ICHの定義では、分析手順の定量限界 (LOQ) は、サンプル中の測定成分を適切な精度および正確さで定量的に測定できる最小量とされています。定量限界は、サンプルマトリックスに含まれる微量化合物の定量アッセイのパラメータで、特に不純物または分解生成物の測定に用いられます。

定量限界は一般に、既知濃度の測定成分の測定や、許容される精度および正確さで測定できる測定成分の最小濃度の証明により決定されます。定量限界において求められるメソッドの精度が規定されている場合は、測定成分の量を順次減らしながら、5または6サンプルを6回注入します。測定成分の量の範囲は、前述の方法で測定された既知のLODから、LODの20倍までです。

6 回繰り返し注入精度の相対標準偏差 (RSD) % の計算値を、測定成分の量に対してプロットします。あらかじめ決められている必要な精度に対応する量が、定量限界に相当します。このテストでは、純粋な標準物質だけでなく、未知サンプルに近い状態のマトリックスも使用することが重要です。図 8 に、必要な実験手順と一般的なグラフを示しています。

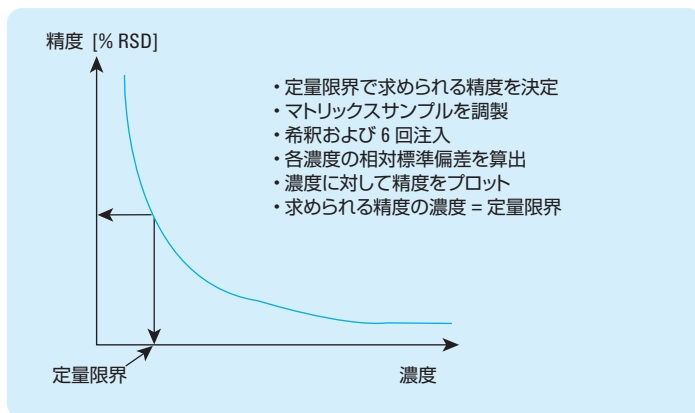


図 8
選択した精度から定量限界を求める例

クロマトグラフィーメソッドの場合、LOQ は既知濃度の微量測定成分を含むサンプルの測定シグナルと、ブランクサンプルの測定シグナルを比較する方法でも求めることができます。この方法は、確実に定量できる測定成分の最小濃度を証明するものです。一般的なシグナル/ノイズ比は 10:1 です。

検出限界および定量限界測定のテスト結果は、2 つの範囲にわたる濃度で測定成分を含むサンプルの実験的分析により確認しなければなりません。検出限界および定量限界に近い値における精度、再現性、正確さなどの他のメソッドバリデーションパラメータを評価することも、同じくらい重要となります。図 6 には、定量限界を示しています (検出限界、範囲、直線性と同じ図)。図 7 には、シグナル/ノイズ比から求めた検出限界と定量限界を示しています。

3.8 堅牢性

堅牢性は、ICH の文書^{4,5}では言及されていません。代わりに、同じ意味の「室間再現性」として定義されています。USP の定義では、異なる施設、分析者、機器、環境条件、操作者、物質といった異なる条件下において得られる結果の再現性の度合いとされています。堅牢性は、通常の予想される操作条件下での施設間、および分析者間における分析結果の再現性の尺度といえます。堅牢性は、複数施設における適量の同質ロットの分析により決定されます。

3.9 頑健性

ICH の定義では、分析手順の頑健性は、メソッドパラメータの意図的な若干の変更に影響を受けずに性能を維持できる度合いとされています。頑健性は、通常の使用における手順の信頼性を示すものです。

頑健性のテストでは、分析結果における操作パラメータの影響が調査されます。メソッドの頑健性を決定する際には、pH、流速、カラム温度、注入量、検出波長、移動相組成といった多くのメソッドパラメータを実際的な範囲内で変更し、変更したパラメータの定量的な影響を測定します。パラメータの影響があらかじめ規定された許容範囲内であれば、そのパラメータはメソッドの頑健性範囲内にあるといえます。

こうした影響に関するデータを採取すれば、パラメータが変更された際に、再バリデーション (たとえば、経時的なカラム性能の補正など) が必要かどうかを判断するうえで役立ちます。ICH 文書⁵では、メソッド開発段階でメソッドの頑健性を評価し、メソッドにおいて重要となるすべての結果を文書化することが推奨されています。

3.10 Stability

化合物はクロマトグラフィー分析より前に分解されることがあります。たとえば、サンプル溶液の前処理、抽出、精製、相の変換、調整済みバイアルの保管 (冷蔵庫またはオートサンブラでの保管) などの際に分解が生じます。こうした状況では、メソッド開発において測定成分との安定性を調査する必要があります。安定性は、あらかじめ決められた期間 (たとえば、1 時間ごと、最大 46 時間) に、単一の溶液から得られた分析結果の偏りを示す基準となります。

安定性テストは、サンプル採取からサンプル分析までの許容期間を推定するうえで重要となります。また、分解生成物の存在する条件下で製剤を分析する性能を評価するうえでも重要です。原薬の安定性は、保管条件、製剤の化学特性、マトリックス、コンテナシステムの安定性に応じて変化するため、実験は実際のサンプル保管条件下で行う必要があります。安定性実験では、長期保管 (所定の保管温度での凍結時)、短期保管 (室温での一連のサンプル分析時) といった一般的な保管シナリオや、凍結および融解サイクルを経たサンプル採取および処理における測定成分の安定性を評価する必要があります。安定性実験で使用する条件は、実際のサンプル処理、保管、分析時に生じる可能性のある状況を反映したものとします。

安定性の測定では必ず、測定成分や干渉物の存在しない適切なマトリックスを用いて新たに作成した測定成分原液から、一連のサンプルを調製する必要があります。安定性評価に用いる測定成分原液は、適切な溶媒を用いて既知濃度で調製します。

標準原液および内部標準原液の安定性は、最低 6 時間にわたって室温で評価する必要があります。適切な保管時間を経たのち、新たに調製した溶液の機器レスポンスと比較し、安定性をテストします。システムの安定性は、サンプル溶液を繰り返し分析し、レスポンスの相対標準偏差を算出して決定します。相対標準偏差が対応する短期システム精度の値の 20 % を超えていなければ、システム安定性は適切であるといえます。値がそれよりも高くなる場合は、時間に対してアッセイ結果をプロットすることにより、サンプル溶液の最大使用期間を計算することが可能です。

ICH⁴ では、高温や高湿度、光などの条件下で分解を促進するストレス実験を実施し、分解生成物が存在する場合のアッセイの特異性を立証することも推奨しています。この実験の目的は、生成が予想される一般的な分解物を生じさせることです。一般には、ストレス条件として、原薬の 5~20 % が分解される条件を選択します。

また、複数の凍結融解サイクルにおいて、長期および短期の安定性を測定することも推奨されています。生物分析³に推奨されている条件例を以下に示しています。正確な条件は、アプリケーションに特化した保管条件に左右されます。

凍結融解安定性

3 回の凍結および融解サイクルののちに、測定成分の安定性を測定します。低濃度と高濃度で一定分量各 3 サンプル以上を所定の保管温度で 24 時間保管し、室温で自然融解します。

短期保存安定性

低濃度と高濃度の一定分量各 3 サンプルを室温で解凍し、4～24 時間 (意図される実験においてサンプルが室温で維持されることが予想される期間) 同じ温度で維持したのち、分析します。

長期保存安定性

長期保管安定性試験における保管時間は、最初にサンプルを採取する日から最後にサンプルを分析する日までの期間を超えるものとします。長期安定性は、低濃度と高濃度の一定分量各 3 サンプルをサンプル分析時と同じ条件で保管して測定します。すべての安定性試験サンプルの濃度を、長期安定性試験初日における適切な濃度の標準物質の逆算値の平均値と比較します。

実測試料安定性

オートサンプルでの滞留時間を含めた処理済みサンプルの安定性を測定する必要があります。最初の較正用標準物質をもとに濃度を測定し、バリデーションサンプルのバッチサイズに相当する分析時間にわたって、原薬および内部標準の安定性を評価します。

メソッドバリデーション プロセス

特定メソッドの有効性は、日常的に分析される未知サンプルと同様のサンプルまたは標準試料を用いて、ラボ実験により証明する必要があります。分析の準備と実施は、バリデーションプロトコルに従わなければいけません。なるべくなら、ステップごとの指示がある形式で書かれたプロトコルに従います。この章では、標準外の分析手順およびメソッドのバリデーションに関するアプローチとステップを解説します。ここで示す手順は、適切な種類の機器が選択され、メソッドが開発されていることを前提としています。また、使いやすさ、自動化およびコンピュータシステムによる制御への対応、一試料当たりの費用、試料処理能力、分析時間、環境や健康、および安全性に関する要件などの基準を満たすものです。

4.1 ライフサイクルのコンセプト

機器の適格性確認やコンピュータシステムのバリデーションと同様、メソッドのバリデーションは、1回で終わる事象ではありません。ラボで新たなメソッドを導入したいと考えたときにはじまり、そのメソッドが使用されなくなったときに終わります。期間が長く複雑なため、バ

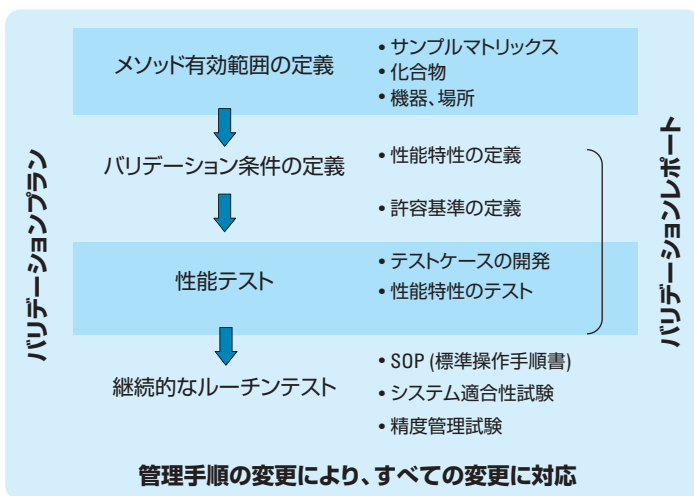


図 9
バリデーションの各段階

リデーションプロセスは複数の段階に分けられます。プロセスを図 9 に示しています。

所有者、責任、提出書類などを含むバリデーションプランを策定します。最初のステップは、メソッド有効範囲の定義です。これには、化合物や濃度範囲、サンプルマトリックス、使用する特定の機器、サンプル分析の際にメソッドを実行する場所などが含まれます。分析対象が特定されたら、性能特性、性能テスト、許容基準を定義します。その後、すべての実験の詳細を盛り込んだテストプロトコルを作成し、そのプロトコルに従ってテストを実施します。得られたテスト結果を許容基準と比較します。最後に、分析時に継続的なシステム性能を確認するためのルーチンメソッド手順を開発します。このテストには、システム適合性試験や品質管理サンプルの分析などが含まれることもあります。すべての実験条件とバリデーション結果をバリデーションレポートとして文書化します。

4.2 バリデーションプラン

バリデーションを成功させるためには、規制関連、品質保証、品質管理、分析開発などの組織の複数部署が協力する必要があります。そのため、そのプロセスは、明確に定義された分析メソッドのためのバリデーションマスタープランに従うことが重要です。このマスタープランは、メソッドバリデーションに関する会社のアプローチや対策を文書化するもので、2つの目的があります。適切に導入されれば、マスタープランは効率的で一貫したバリデーションプロジェクトを実施することができます。また、分析メソッドバリデーションのあらゆる側面における会社のアプローチに関して、査察者の質問に答えるものにもなります。さらに、メソッドバリデーションに関係するすべての従業員にとっては、理想的なトレーニングツールにもなります。マスタープランは、以下の要素で構成されます。

1. 目的と有効範囲
2. 用語
3. ユーザー担当部署、管理、QA などの責任
4. メソッド性能特性およびテストのアプローチ
5. メソッドバリデーションの各ステップ

6. テストおよび許容基準の選定
7. システム適合性試験のアプローチとパラメータ
8. メソッドの修正と再バリデーション
9. 公定書メソッドおよび標準メソッドのベリフィケーション
10. 分析メソッドの移行
11. 必要な標準操作手順書のリスト
12. 認可プロセス、文書化、アーカイブ化
13. プロジェクトプラン、テストプロトコル、バリデーションレポートのテンプレート

各バリデーションプロジェクトについて、プロジェクトプランを策定する必要があります。プロジェクトプランでは、特定のメソッドまたは手順のバリデーション実施のためにすべきことをまとめます。このプランは、マスタープランから派生するものです。プロジェクトプランには、特定の役割、提出書類、所有者などを盛り込んだタイムテーブルを含みます。

4.3 有効範囲とメソッド仕様

プロセスの初期に、メソッドの有効範囲とバリデーション基準を定義します。有効範囲の定義は、ビジネス開発、分析開発、品質管理、品質保証といった複数の部署が協力して行います。この段階では、以下のような疑問を検討します。

- 分析するサンプルは？
- 測定する分析対象物は？
- 予想される濃度レベルは？
- サンプルマトリックスは？
- 干渉物質の存在は予想されるか？ 予想される場合、その物質を検出および定量すべきか？
- 特定の法的要件や規制要件は存在するか？
- 情報は定量的とすべきか、定性的とすべきか？

- 必要な検出限界と定量限界は？
- 予想される濃度範囲は？
- 求められる精度と正確さは？
- メソッドに求められる頑健性の程度は？
- どのような機器を使用すべきか？1つの特定機器のためのメソッドか、それとも同じタイプのすべての機器で使用されるメソッドか？
- 1つの特定ラボで使用されるメソッドか、それとも特定分野のすべてのラボあるいは世界中で適用されるメソッドか？
- メソッドの使用者に求められるスキルレベルは？

メソッド有効範囲の定義は、テストの労力を最適化するうえで重要です。たとえば、複数ベンダーの機器を範囲に含めるとテストの労力は増しますが、ルーチン分析で複数の機器を使用する柔軟性が得られません。特定の機器のみで使用するメソッドの場合は、バリデーション実験で他のベンダーの機器を使用する必要はありません。このように、本当に必要なものだけにバリデーション実験を限定することができます。同様に、バリデーション実験に複数の場所を含めるとテストの労力は増しますが、バリデーション実験に含まれた場所へのメソッドの移行が容易になります。

4.4 バリデーションパラメータ および限界値の選定

効率の良いバリデーションプロセスには、適切なバリデーションパラメータおよび許容基準の選定が欠かせません。メソッドの性能パラメータと限界値は、意図されるメソッドの用途をもとに決定します。かならずしも、特定のテクニックにおけるすべての分析パラメータをバリデーションする必要はありません。たとえば、メソッドを微量定性分析に使用する場合は、定量限界や、機器のダイナミックレンジ全体における直線性をテストおよびバリデーションする必要はありません。パラメータが多くなるほど、バリデーションに要する時間は長くなります。かならずしもすべての分析性能パラメータをバリデーションする必要はありませんが、必要なパラメータを定義する必要があります。バリデーションパラメータと許容基準の選定は、ビジネスや規制、および顧客の要件にもとづいて、妥当性を立証および文書化します。

分析タスク	同定	不純物テスト		アッセイ
		定量	限度テスト	
正確さ	不要	要	不要	要
精度				
併行精度	不要	要	不要	要
室内再現精度	不要	要	不要	要
室間再現精度	不要	要	不要	要
特異性	要	要	要	要
検出限界	不要	不要	要	不要
定量限界	不要	要	不要	不要
直線性	不要	要	不要	要
範囲	不要	要	不要	要

図 10
ICH バリデーション特性

分析タスク	アッセイカテゴリ 2 (不純物)				アッセイ カテゴリ 3 (性能特性)
	アッセイ カテゴリ 1 (主成分の定量)	定量	限度 テスト		
正確さ	要	要	*	*	
精度	要	要	不要	要	
特異性	要	要	要	*	
検出限界	不要	不要	要	*	
定量限界	不要	要	不要	*	
直線性	要	要	不要	*	
範囲	要	要	*	*	
頑健性	要	要	要	*	

*各テストの性質により、必要となる場合あり

図 11
USP バリデーション特性

USP (参考文献 11) と ICH (参考文献 4) にはいずれも、各種の分析タスクでバリデーションすべきパラメータに関するチャプターが含まれています (図 10 および 11)。ICH では、バリデーションすべき分析手順として、以下の分析タイプが定義されています。

- 同定分析
- 不純物成分の定量分析
- 不純物管理のための限度試験
- 薬剤の有効成分または他の主成分の定量分析

ICH では、分析タスクが同定を目的としている場合は、正確さ、精度、検出限界、定量限界のバリデーションは求められていません。USP カテゴリー 1 のアッセイの場合、測定する主成分や有効成分は通常、高い濃度で存在しているため、検出限界と定量限界のバリデーションは必要とされていません。

各仕様の許容基準は、意図されるメソッドの用途により決定されます。たとえば、生物分析メソッドバリデーションに関する FDA ガイダンス (3) では、生物学サンプルの定量限界における精度の許容基準を 20 % RSD とすることが示されています。それに対して、ルーチン品質管理における薬剤原料の精度は、2 % RSD 以下が求められています。

薬剤の検出限界と定量限界については、薬剤開発時に採取されたデータや製品リリース仕様、在庫商品の有効期限に関する許容基準、薬局方テストをもとに、各成分に関する一連の仕様と許容基準を決定します。製品製造時にさらに確実な情報が得られるため、必要に応じて仕様と許容基準を再検証および更新します。

ICH ガイドラインでは、検出および定量の仕様および下限の設定に関する推奨事項が提供されています。たとえば、不純物に関する ICH Q3A(R) ガイドライン (参考文献 23) では、以下のように述べられています。「異常に作用が強い、又は毒性若しくは予期せぬ薬理作用のあることが知られている不純物については、その不純物をコントロールすべきレベルまで分析可能な定量限界/検出限界を持つ分析法を用いる必要がある。許容基準と管理限界値の設定については、仕様に関する ICH Q6A ガイドラインを参照することとされています²⁴。すべての判断について、妥当性を証明し、文書化する必要があります。

委託分析の場合、メソッドの性能仕様と許容基準は、クライアントと受託ラボとの正式な契約書に含まれる条件となります。

4.5 性能特性のテスト： 準備と実施

テストと許容基準が定義されたら、バリデーションプロトコルに従ってテストのための実験を入念に準備し、実施および文書化します。

準備

実験を効率よく実施するためには、適切な準備が重要となります。もっとも重要なのは、適格な材料、適格な機器、訓練を受けた人、明確に文書化された手順を用いることです。

- 試薬や標準試料など、重要なバリデーションパラメータの測定に用いる化学物質は、十分な量を用意する必要があります。また、正確に同定し、十分な安定性を確保し、仕様に従って正確な組成や純度を確認する必要があります。
- クロマトグラフィーカラムなどの他の材料や消耗品については、カラムなどの性能基準を満たす新しいものを使用します。これにより、1組の消耗品をほとんどの実験に使用できるようになり、メソッドバリデーション時に不測の事態が起きるのを避けることができます。
- 分析機器については、明確に定義し、特性を把握し、適格性の確認や校正により、分析メソッドで求められる機能上および性能上の仕様を確実に満たすようにします。最高の性能を持つ機器よりもむしろ、平均的な性能の機器を選択します。そうでないと、室内再現精度や室間再現精度の実験時に、異なる機器で許容基準を満たすうえで問題が生じることがあります。
- 分析技術や機器に十分習熟した操作者を選ぶ必要があります。これにより、不測の問題を特定および診断しやすくなり、プロセス全体をより効率的に実施することが可能になります。

メソッドの性能特性に関する情報がほとんど、あるいはまったくない場合は、メソッド開発時または最初のバリデーション実験時のいずれかに、意図される用途におけるメソッドの適合性を証明することを推奨します。その場合には、おおよその精度、動作範囲、検出限界を調べます。この予備的なバリデーションで妥当なデータが得られない場合は、メソッドそのもの、仕様、機器、または分析テクニックを変更する必要があります。そのため、メソッド開発とバリデーションは、対話形式的なプロセスといえます。たとえば、液体クロマトグラフィーの場合、選択性は移動相組成の選定により得られます。定量分析の場合は、2つのピークの分離係数を2以上にする必要があります。この値が得られない場合は、移動相組成のさらなる最適化が必要となります。こうした調査がメソッド開発やメソッド最適化の際に行われなかった場合には、pH、移動相組成、流速などの動作パラメータのメソッドの性能における影響を、この段階で評価する必要があります。

テスト実施

バリデーションテストのシーケンスについては、公式なガイドラインはありません。最適なシーケンスは、メソッドそのものにより異なります。著者の経験から言えば、液体クロマトグラフィーメソッドの場合は、以下のシーケンスが有効です。

1. 特異性/選択性
2. リテンションタイムとピーク面積の併行精度
3. 直線性、定量限界、検出限界、範囲
4. 複数濃度での正確さ
5. 室内再現精度
6. 室間再現精度

室内再現精度や室間再現精度など、時間のかかる実験は、最後のほうに実施します。ポイント 2~4 に記載したような一部のパラメータは、複合実験で測定することもできます。たとえば、ピーク面積の精度を全濃度範囲で測定し、データを直線性のバリデーションに使用することが可能です。

4.6 ルーチン分析用の品質管理 プランの策定

分析メソッドのバリデーションの目的は、メソッド使用の初期段階だけではなく、使用期限全体にわたる分析データの有効性を確保することにあります。日常的なサンプル分析に適切なチェックを盛り込み、サンプル分析時にメソッドやシステムが当初の規定どおりに機能していることを確認する必要があります。チェックにはすべての初期テストを含める必要はありません。重要性の高い性能特性、特に時間とともに変化する可能性のある特性に重点を置きます。そうしたチェックの実施手順を、メソッドバリデーションプロセスの一環として開発および文書化する必要があります。これは、バリデーションプロセスの際に、重要な要素に関する情報を得られる可能性がもっとも高くなるためです。

一般的な継続試験は、システム適合性試験 (SST) と品質管理サンプルの分析です。クロマトグラフィーメソッドについては、薬局方 (参考文献 21,25) でシステム適合性試験が解説されています。このテストには通常、2つのピークの分離度、ピーク面積の併行精度、テーリングファクター、理論段数などが含まれます。システム適合性試験は、クロマトグラフの分析技術だけでなく、あらゆる分析手順に組み込むことが推奨されています。たとえば、滴定ベースの分析手順には、常にブランク値の評価を含める必要があります。

品質管理サンプルの分析は、ISO/IEC 17025 といった品質および認定標準により実施が求められています。この分析の基準は、メソッドやシステムが統計的管理の範囲を超えたことを示すものとなります。品質管理サンプル分析の目的は、実験を最適化し、最小限の管理分析により、メソッド有効範囲で定められた目的を長期的に満たすようにメソッドと分析システム全体を維持することです。未知サンプル数に対する品質管理サンプルの割合は、サンプルの重要性やシステムの安定性により異なります。通常は 5~20 % です。各種の規制や品質基準では、具体的な回数は規定されていませんが、各企業の手順に従って頻度を定義し、その妥当性を証明し、文書化することが求められています。品質管理チェックの頻度が定義されたら、適切な基準に従って実施されているどうかを査察者が確認します。手順には、許容基準が満たされない場合の対策に関する指示も含める必要があります。

4.7 バリデーションレポートと その他の文書

メソッドの開発とバリデーションが完了したら、バリデーションレポートを作成します。レポートには、経験のある分析者がバリデーション研究を再現できるだけの情報を記載します。通常は、以下の内容が含まれます。

- メソッドの目的と有効範囲 (必要に応じて、種類)
- 手法の概要
- 責任
- 化合物とマトリックスの種類
- すべての化合物、試薬、標準試料、QC サンプルと、それぞれの純度、グレード、供給元、前処理に関する詳細な指示
- 使用する標準試料および化学物質の品質チェック手順
- 安全に関する注意
- メソッド開発ラボからルーチン分析へのメソッド導入に関するプランと手順
- 頑健性テストで得られた重要パラメータ
- サンプル前処理やメソッドパラメータを含めた実験の実施方法に関する詳細なパラメータおよび条件
- 統計的手順と典型的な計算
- システム適合性試験など、ルーチン分析における QC 手順
- クロマトグラム、スペクトル、検量線など、生データを含む典型的なグラフ
- メソッド許容限界のパフォーマンスデータ
- 測定結果の予測される不確定性
- 再バリデーションの基準
- メソッドの開発およびバリデーションを実施した者の資格記録
- 参考分析 (必要に応じて)

- バリデーションプランおよびプロトコルからの逸脱
- 概要とまとめ
- 承認、および分析テスト手順の検証と承認で責任を負う者の氏名、役職、承認日、署名

メソッドの調整、変更、 再バリデーション、 標準メソッドおよび 公定書メソッドの ベリフィケーション

ほとんどの分析メソッドは、有効期限の間に変更や調整の必要が生じます。たとえば、メソッドが性能要件を満たさなくなった場合は、メソッドパラメータを修正して元の仕様に戻す必要があります。新たなターゲット化合物の追加やサンプルマトリックスの変更など、メソッドの範囲を変更する場合も、メソッドの改訂が必要となります。この章では、どのような場合にメソッドの再バリデーションが必要なのか、それをどのように文書化していくかについて、論じます。

5.1 メソッドの調整

バリデーションを実施した分析メソッドでも、予期したとおりのパフォーマンスが得られないことがしばしばあります。たとえば、クロマトグラフ法でピークが予測されたとおりに分離できない場合などが、それにあたります。こうしたことは、以下のような場合に生じます。

- メソッド開発ラボからルーチンラボへ、または複数のルーチンラボの間でメソッドを移行させる場合
- 公定メソッドまたは標準メソッドをラボに導入する場合
- 同一または異なるベンダーの提供する、異なる特性を持つ異なる機器モデルを使用する場合 (ディレイボリ्यूムの異なる HPLC など)
- 耐用年限の間にカラム性能が変化する場合
- 異なる特性を持つ新たなバッチのカラムを使用する場合
- 新たな技術を導入して分析を最適化する場合 : たとえば、分析コストの削減、カラム内径の縮小による移動相消費量の削減、粒子サイズの縮小による分析時間の短縮など

通常は、移動相組成、カラム温度、流速などのメソッドパラメータを修正して性能を元の仕様に戻す方法が試みられます。問題となるのは、この種の変更の後にメソッドの再バリデーションを実施する必要があるかどうかです。

クロマトグラフィーメソッドについては、欧州 (参考文献 25) および米国 (参考文献 21) の薬局方で、この疑問に対する答えが述べられています。各章では、システム適合性試験のパラメータが基準を満たしている限りにおいて、変更しても再バリデーションが必要とはならない液体およびガスクロマトグラフィーの性能特性が記載されています。

HPLC および GC に関する USP と EP の推奨事項を、図 12 にまとめています。USP と EP の推奨事項は、同じか類似しています。たとえば、カラムに関するパラメータは、USP と EP でまったく同じです。

高速液体クロマトグラフィー		
	USP	EP
カラム長	± 70 %	± 70 %
内径	線速度を一定に保てる 場合は調整可能である こと	± 25 %
充填剤の粒径	50 % の縮小、 増加は不可	50 % の縮小、 増加は不可
流速	± 50 % 線速度を一定に保てる 場合はそれ以上も可	± 50 %
カラム温度	± 10 °C	± 10 % 最高 60 °C
注入量	減少可能 (LOD と繰り返し 精度に問題がない場合)	減少可能 (LOD と繰り返し 精度に問題がない場合)
pH	± 0.2 単位	± 0.2 (中性物質は ± 1 %)
UV 波長	調整不可	調整不可
バッファ中塩濃度	± 10 %	± 10 %
移動相組成	微量成分 (< 50 %) 相対値で ± 30 % または絶対値で 10 %、 いずれか小さいほう	微量成分 相対値で ± 30 %、 または絶対値で ± 2 %、 いずれか大きいほう
ガスクロマトグラフィー		
	USP	EP
カラム長	± 70 %	± 70 %
カラム内径	± 50 %	± 50 %
充填剤の粒径	変更可 SST を満たす必要あり	-50 %、増加は不可
膜厚	-50 to +100 %	-50 to +100 %
流速	± 50 %	± 50 %
オープン温度	± 10 %	± 10 %
注入量	減少可能 (LOD と繰り返し 精度に問題がない 場合)	減少可能 (LOD と繰り返し 精度に問題がない 場合)

図 12
HPLC および GC で許可されている修正

ここでは限界値が記載されていますが、すべての性能特性を満たしていればあらゆるメソッドを限界値まで変更できるというわけではありません。修正を施した際には、システム適合性試験を実施することが推奨されています。すべてのシステム適合性基準が満たされているれば、再バリデーションの必要はありません。言い換えれば、メソッドの性能を確認する必要がありますが、再バリデーションは必要ないということです。常に基準となるのは、メソッドを変更する前の最後のパラメータではなく、最後に再バリデーションを実施した際の値です。たとえば、初期バリデーションでの流速が 1.0 分だった場合、最初の修正 (40 %) で 1.4 に、次の修正で 1.7 (直前の変更からは 20 % ですが、基準点からは 70 %) に変更するなら、システム適合性テスト (SST) に合格しても再バリデーションを実施する必要があります。図 13 に、クロマトグラフ法のメソッドで修正が必要となった場合に参考にできるフローチャートを示しています。

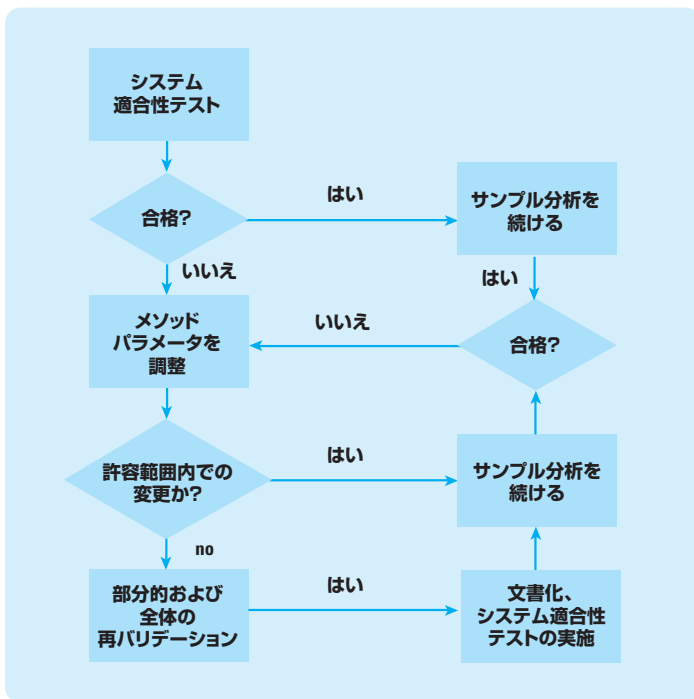


図 13
メソッド修正のフローチャート

USP では当初、HPLC の内径については、EP と同じ変更幅 (±25 %) が定義されていましたが、USP 32 第 2 回追補 (2009 年 12 月 1 日) に伴い、この値が変更されました。線速度が一定に保たれている場合には、カラム内径の変更が認められています。線速度の計算は、以下の公式に従います。

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2}$$

F、l、d は、それぞれ変更前 (下付き文字 1) および変更後 (下付き文字 2) の流速、カラム長、カラム内径です。

これにより、新たに導入された条件下でメソッドの性能が確認されている限りにおいて、カラム内径と流速を減らして移動相消費量を削減することが可能になっています。

それ以外の文献などで示されているカラムの変更については、USP のチャプターでは認められていません。たとえば、異なる粒子サイズや寸法を持つカラムに変更すれば、同等のクロマトグラフィー性能を保ったまま分離を高速化できる場合があります。しかし、現在ではいずれの変更についても、再バリデーションが求められています。USP はこの点を認識しており、これに対応するために要件が改訂される可能性もあります。USP の H. Pappa 氏がリーダーを務める委員会は、問題を提起する論文を薬局方フォーラムで発表しました²⁶。この論文では、分離品質を維持しながら、カラムの粒子サイズを現状の 2 分の 1 未満に変更できるようにする新たなアプローチが提案されています。この提案の目的は、クロマトグラフィー性能を維持できる限りにおいては、分析者が再バリデーションを実施せずに分析時間を短縮できるようにすることにあります。

5.2 再バリデーション

以下の場合には、分析メソッドの再バリデーションが必要です。

- 当初のパフォーマンスを維持するためにメソッドパラメータの変更が必要で、その変更が USP の定める許容範囲から外れる場合
- そのメソッドで当初分析することになっていなかった新たな化合物を分析する場合
- サンプルマトリックスを変更する場合

こうした修正を行う場合は、変更管理手順に従って文書化し、メソッドの再バリデーションを実施する必要があります。手順の一環として、変更の理由を定義し、変更内容を周知徹底して、文書化します。性能テストの妥当性を立証して文書化したのちに、変更を正式に導入します。

5.3 標準メソッドおよび 公定メソッドの ベリフィケーション

規制の掛かっている環境や品質基準環境で分析を行うラボについては、EPA、米国材料試験協会 (ASTM)、AOAC、ISO、USP といった組織の開発した公式メソッドを使用することが推奨されています。たとえば、米国食品医薬品化粧品法では、FDA の規制対象となる業界に対して、公定メソッドを使用するか、同等性を実証することが求められています。ISO/IEC 17025 では、「国際規格、地域規格、国内規格で公開されたメソッドを使うことが望ましい」と述べられています。こうしたメソッドは、すでにバリデーションが実施されています。そのため、ラボでさらなるバリデーションやベリフィケーション、テストを実施せずにそのまま使用できると誤解されることも少なくありません。21 CFR 211.194 (a)(2) の米国 FDA cGMP 規則では、次のように述べられています。「導入するメソッドが、米国薬局方メソッドの現行版に含まれる、他の公認標準メソッドに含まれる、または承認された新しい薬剤アプリケーションで詳述されている場合で、かつその参照メソッドが修正されていない場合は、メソッドと参照元を述べるだけかまわない。実際の使用条件下で、使用するすべてのテストメソッドの適合性について、ベリフィケーションを実施するものとする」。ISO/IEC 17025 でも、Par. 5.4.2 で同様の要件が規定されています。「試験施設は、試験または校正を導入する前に、標準メソッドを適切に実行できることを確認しなければならない。標準メソッドが変更された場合は、再度確認を実施しなければならない」。

つまり、公式メソッドを導入する場合、メソッドを変更しない限りバリデーションの必要はありませんが、各試験施設はメソッドを問題なく実行する能力があることを示さなければならないということです。そのための最良の方法を決定する際には、いくつかの問題が生じます。一部またはすべてのバリデーション実験を繰り返す必要があるのか、システム適合性試験やコントロールサンプルの分析に合格すれば十分なのか、といった点を考える必要があります。

USP はチャプター <1226> 「公定メソッドのベリフィケーション¹²」でそうした疑問に答えています。ここで提示されている推奨事項は、公定書メソッドおよび標準メソッドを実行する時に適用されます。

おもな推奨事項は以下のとおりです。

- システム適合性試験により試験施設およびシステムの性能を証明すること
- メソッドの重要さおよび複雑さを評価すること
- メソッドのもっとも重要な性能特性を選定すること
- メソッドの重要さおよび複雑さに応じて、もっとも重要なバリデーション実験を 1～3 回繰り返すこと

施設内部で開発されたメソッドのバリデーションと同様、標準メソッドを評価したり、検討する場合は、バリデーション計画書や SOP などの文書化されたプロセスに従う必要があります。またその結果をバリデーションプロトコルに文書化すべきです。いずれの文書も、バリデーションレポートの主要な情報源となります。

公定および標準メソッドのベリフィケーションプロセスを図 14 に示しています。

1. ラボで実施する分析テストの範囲を定義します。
2. 公定手順および標準手順の範囲が、すでに定義した範囲と同じであることを確認します。
3. 定義した範囲と異なる場合は、既存のメソッドを修正するか新たなメソッドを開発し、同じではない特性についてバリデーションを行います。
4. メソッド範囲が同じ場合は、システム適合性試験を実行し、メソッドの重要性に応じて 1～3 回のバリデーション実験を実施します。テストで許容基準に合格した場合は、範囲、試験内容、試験結果を文書化し、メソッドが使用できることを明記します。

5. 試験結果が許容基準を満たしていない場合は、その理由や問題の原因を突き止めます。原因としては、機器や参照物質が不適切であることなどが考えられます。原因が明らかになったら、問題を是正して再び試験を実行します。このプロセスは、数回繰り返されることもあります。
6. 原因を明らかにできない場合は、メソッドに変更を加えるか、新たなメソッドを開発します。
7. 必要な変更の度合いが薬局方で定められた許容限度を超えている場合は、メソッドの再バリデーションが必要となります。

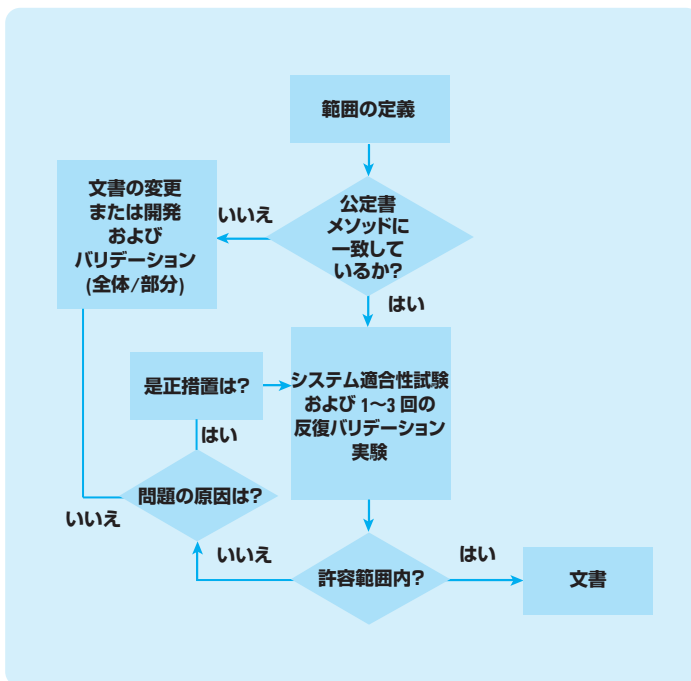


図 14
分析メソッドのバリフィケーションプロセス

選択するベリフィケーションテストは、アプリケーションによって決まります。図 15 には、特定の製薬アプリケーションに推奨されるベリフィケーションテストを示しています。

例 #	アプリケーション	推奨されるテスト
1	最終製剤または API に含まれる薬剤原料の主成分の定量	精度、特異性、直線性
2	医薬品原料中の不純物または最終製剤中の分解生成物の定量	精度、特異性、定量限界
3	医薬品原料中の不純物または最終製剤中の分解生成物の限界テスト	特異性、検出限界

図 15
USP <1226> で推奨される特定アプリケーションのベリフィケーションテスト

AOAC は、ISO/IEC 17025 において標準メソッドを導入する際のベリフィケーションに関する推奨事項を公開しています。各アプリケーションの例を図 16 に示しています。

例 #	アプリケーション	推奨されるテスト
1	同定確認	・ 特異性
2	低濃度での定量分析	・ 正確さ ・ 精度 ・ 特異性 ・ LOQ/LOD
3	分析対象物の存在量が 特定の濃度より高い または低い場合 (限界テスト)	・ 特異性 ・ LOD
4	高濃度での定量分析	・ 正確さ ・ 精度 ・ 特異性

図 16

AOAC の推奨する特定アプリケーションのベリフィケーションテスト (参照文献 9
の表 2~5 から抜粋)

分析メソッドの移行

バリデーション済みのメソッドをラボ間で移行させる場合、メソッドを受け入れるラボは、そのメソッドを問題なく実行できることを立証する必要があります。通常、メソッドの移行が生じるケースとしては、研究開発 (R&D) ラボから品質管理 (QC) ラボへの移行、製品ラインが移動した場合の A 地点から B 地点への移行、スポンサー企業から受託ラボへの移行、製品が他社に買収された場合の企業 X から企業 Y への移行などがあります。現在のところ、受け入れラボの性能立証の指針として利用できる公式文書はありません。もっともそれに近いのが、USP の H. Pappa 氏の指揮下で USP ジェネラルチャプター専門委員会が公開した提案論文「分析メソッドの移行——新たな概説のための提言 (Transfer of Analytical Methods - A Proposal for a New General Information)」²⁷です。この論文では、比較テスト、2つのラボまたは地点での共同バリデーション、全体または部分的なメソッドバリデーションおよび再バリデーション、正式な移行の省略 (移行の免除と呼ばれることもあります) など、メソッド移行の一般的な実施手順が説明されています。

6.1 移行手順

比較テスト

比較テストは、分析ラボでもっとも一般的なメソッド移行の形式です。移行元ラボと受け入れラボで、明確に特徴づけされた典型的なサンプルを分析します。メソッドを移行する前に、受け入れラボの作業者がメソッドと重要パラメータを十分に理解できるように注意を払う必要があります。詳細な移行プロトコル、メソッド導入に関する文書化された手順、移行元ラボと受け入れラボの綿密なコミュニケーションが重要となります。移行プロトコルでは、実施すべきテストと2つのラボの役割を説明し、移行に関する許容値を定義します。テスト結果があらかじめ定義された許容基準を満たしていることが確認できれば、そのメソッドを受け入れラボで使用することができます。分析すべきサンプルの数は、メソッドの重要性やメソッドの複雑性、および受け入れラボが同様の手法に慣れているか否かにより異なります。比較テストで考慮すべき点は、以下のとおりです。

- サンプル、ロット、バッチの数 (2～5 個など)
- 濃度の数 (1～3 種類など)
- 繰り返し分析/サンプルの数 (4～6 回など)

- 分析者の人数 (1～2 人など)
- 期間 (2～5 日など)
- 1 つまたは複数のメーカーの機器 (1～利用できるすべての機器)

複数ラボ間での共同バリデーション

比較テストに代わる方法が、受け入れラボを含めた移行メソッドのバリデーションです。たとえば、受け入れラボが耐久性に関するラボ間テストに参加するなどのケースがあります。原則として、この方法は特別な形態の比較テストと捉えられます。この方法の利点は、メソッドのバリデーションや移行に必要なリソースを分担できることです。ただし、この方法が有効となるのは、すべての参加ラボがほぼ同時期にメソッドを導入することを計画している場合のみです。あらかじめ承認されたプロトコルや定義された許容基準にもとづき、移行を正式に文書化する必要があります。

移行の免除

特定の条件においては、通常の移行適格性確認実験をすべて省略することができます。移行の免除が適用される場合、受け入れラボは、比較テストやバリデーションデータの採取を行わなくても、協議のもとで該当する分析メソッドを使用することができます。この選択肢については、十分な注意を払わなければなりません。これを選択する場合は、妥当性を証明し、文書化する必要があります。免除の妥当性は、きわめて類似するメソッドをすでに使用していて十分な経験があることや、移行元ラボから受け入れラボへ移行されるメソッドの当初の開発およびバリデーションを担当した者がいるなどの条件で証明することができます。

6.2 メソッド移行のステップ

分析メソッドの移行にあたっては、綿密に計画を立て、実行および文書化する必要があります。このセクションでは、比較テストによりメソッドの移行を問題なく行うのに必要となるステップを紹介します。

- 移行プランを作成します。このプランには、各種の活動、タイムスケジュール、所有者、提出書類などを盛り込みます。プランはプロジェクトごとに作成し、分析メソッドの移行に関する企業のアプローチを示すマスターポリシーに基づくものにします。

- 移行プロトコルを作成します。このプロトコルでは、移行の目的、範囲、移行元ラボおよび受け入れラボの責任、材料、機器、メソッドパラメータを記述します。また、テストの詳細、許容基準、テストの妥当性の証明、文書化に関する要件、クロマトグラムやスペクトルなどの参考資料も盛り込みます。プロトコルには、バッチ数、バッチあたりの繰り返し回数、注入シーケンス、逸脱への対応方法などに関する情報も記述します。
- テスト実施の SOP を作成します。SOP には、サンプルの前処理、参照物質、テスト結果の検証および文書化などを盛り込みます。
- 作業者のトレーニングを実施します。移行元のラボの作業者が、受け入れラボの分析者をトレーニングします。トレーニングには、プロトコルの詳細、手法、過去に生じたすべての問題を盛り込みます。
- 両方のラボでプロトコルを実行します。実際の結果を、期待値および許容基準と比較します。
- 問題があれば、その原因を突き止めます。許容基準を満たしていない場合は、原因を特定し、問題を解決します。
- プランで規定されている文書を作成します。規定どおりにすべての文書を作成し、移行元および受け入れ先のラボおよび QA 管理担当者が検証および署名します。

生物分析メソッドの バリデーション

生物分析メソッドは、血液、血清、血漿、尿などの生体物質に含まれる医薬品や代謝物の定量分析に用いられます。分析結果は医薬品の開発において重要な意味を持ち、生物学的利用性、生物学的同等性、薬物動態、毒物動態などの前臨床および臨床研究の評価と解析に用いられます。通常、こうした研究は、規制に応じた書類提出が求められます。

サンプルの性質上、生物分析メソッドは、製剤や医薬品原料の品質管理に用いられるメソッドに比べて、バリデーションが複雑で困難になります。これは、生物分析メソッドの場合、マトリックスが複雑で、代謝物起因のさまざまな干渉が生じる可能性があり、一般にサンプル量も少ないためです。また、生物分析データは、薬物や製剤の性能検証に欠かせない薬物動態パラメータの計算のような重要なアプリケーションに用いられるため、正確で信頼性の高いものでなければなりません。そのため、生物分析メソッドには、綿密なバリデーションが求められます。

この章では、生物分析メソッドのバリデーションに関する重要な参考文献、バリデーションパラメータ、許容基準、ルーチン分析の品質管理手順、必要な文書を解説します。この章で解説するバリデーションに関する推奨事項は、FDA ガイド³ および 2006 年の AAPS ワークショップレポート¹⁰に基づいています。

7.1 各種協議会および FDA の バリデーションガイドライン

生物分析メソッドとそのバリデーションの重要性は、1980 年代後半から、各種の規制当局や業界および大学の科学者に認識されるようになりました。当時は、公式、非公式を問わず、生物分析に携わる科学者が生物分析メソッドのバリデーションに利用できるガイドラインはまったくありませんでした。以来、複数のワークショップや協議会が立ち上げられ、これらの協議会のレポートが初の実用的なバリデーションガイドラインとして機能するようになりました。もっとも重要な会議は、FDA の共同出資により、1990 年、2000 年、2006 年に米国薬学会 (AAPS) が組織したものです。

最初のワークショップ/協議会²⁸において、評価すべき生物分析メソッドパラメータについて合意が成立しました。正確さ、精度、選択性、感度、再現性、検出限界、安定性などの主要パラメータが定義されました。また、一部の許容基準についても合意に達しました。

2000年の第2回会議²⁹では、最初の会議以降の経験と進展が論じられました。ワークショップレポート「生物分析メソッドのバリデーション——10年の進展をもとに再考 (Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress)」は、2001年に公開されたFDAガイダンスに基づいています。

2006年に開催された第3回AAPS会議のおもな目的は、生物学的同等性研究、薬物動態研究、比較研究における定量分析に関する生物分析手順の範囲と適用性を検証することにあります。また、高分子のクロマトグラフィーおよびリガンドベースの定量的生物分析アッセイに関するバリデーションおよび導入要件を評価することも目的とされました。

本稿執筆時点でもっとも重要な参考文献は、生物分析メソッドのバリデーションに関するFDAガイダンス³と2006年会議のAAPSワークショップレポート「定量的生物分析メソッドのバリデーションと導入：クロマトグラフィーおよびリガンド結合アッセイのベストプラクティス (Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: Best practices for chromatographic and ligand binding assays)」¹⁰です。FDAガイダンスはおもに手法に重点が置かれており、現在でも有効です。AAPSレポートでは、生物分析の品質を高めるための説明やベストプラクティス案が提示されています。たとえば、ワークショップレポートでは、QCサンプルの配置、マトリックス効果の測定、安定性に関する考慮事項、内部標準の使用、システム適合性テストなどに関連する問題が説明されています。

また、このワークショップレポートでは、記録を保持すべきバリデーション実験に関する明確なガイドラインも示されています。メソッドバリデーションおよび研究用サンプル分析の間に得られた記録は重要な情報源となるので、メソッドの有効性を示すために保持する必要があります。たとえば、クロマトグラムや分析の前処理、抽出、分析サマリーシートなどは、ソースデータとみなされます。これには、サンプル分析のほか、失敗した分析も含まれます。また、再積分したクロマトグラムについては、明示的に特定する必要があります。再積分の理由と再積分モードは文書化する必要があります。オリジナルのクロマトグラムと再積分したクロマトグラムは電子記録として保持するのが理想的です。積分パラメータの変更を記録する電子監査証跡機能を無効にすることはできません。

7.2 バリデーションパラメータ

生物分析メソッドの基本的なバリデーションパラメータは、すでに述べたパラメータとそれほど違いはありません。パラメータとしては、選択性/特異性、精度、回収率、直線性、分析対象物の安定性などがあります。このセクションでは、生物分析メソッドのパラメータと、それぞれの推奨事項を説明します。安定性研究の原則は、「メソッドバリデーションのパラメータとテスト」の章で説明したものと同じなので、ここでは繰り返しません。

選択性/特異性

選択性/特異性の測定は、6 種類以上のソースから得た適切な生物マトリックスのブランクサンプルを分析します。各ブランクサンプルで干渉をテストし、定量限界下限値 (LL0Q) において選択性を確認します。

精度

ICH ガイドライン^{4,5}と同じく、精度は短期精度 (分析内およびバッチ内精度) と、経時的に精度を測定する中間精度 (分析間およびバッチ間) に分けられ、それぞれ異なる分析者、機器、試薬が関わることもあります。バッチ内精度は、濃度 1 種類あたり 5 回以上の分析により測定します。予想される濃度範囲において、最低 3 種類の濃度を分析することが推奨されます。各濃度レベルで測定される精度は、変動係数 (CV) の 15 % を超えてはいけません。ただし、LL0Q については、CV の 20 % が限界値となります。

バッチ間精度については、異なる分析者によるバッチ内実験を 4 日にわたって繰り返します。4 日間の実験の精度を、バッチ内精度と比較します。

正確さ

正確さは、既知量の分析対象物を含むサンプルを繰り返し分析して測定します。正確さの測定にあたっては、濃度 1 種類あたり 5 回以上の分析を実施します。予想される濃度範囲において、最低 3 種類の濃度を分析することが推奨されます。平均値が実際の値の 15 % 以内に収まらなくてはなりません。ただし、LL0Q については、20 % が偏差の限界値となります。真の値からの平均値の偏差が、正確さの測定結果となります。

回収率

回収率は正確さと同様ですが、分析メソッドの抽出効率が含まれます。分析対象物の回収率は 100 % となる必要はありませんが、分析対象物および内部標準の回収率は、一貫して正確で、再現性がなければいけません。回収実験は、3 種類の濃度 (低、中、高) における抽出サンプルの分析結果を、100 % の回収率を示す非抽出標準物質の結果と比較して実施します。

較正/検量線

このバリデーションパラメータに関する FDA ガイダンスの定義は、本書ですでに説明した直線性の定義と同じです。機器のレスポンスと既知濃度の分析対象物との関連性を調べます。検量線はサンプル中に含まれる各分析対象物について作成します。レスポンスは、分析対象物の濃度に比例します。

検量線は、目的とする研究で用いるサンプルと同じ生物マトリックスで作成します。この際、既知濃度の分析対象物をマトリックスに添加します。検量線は、ブランクサンプル (内部標準なしで処理したマトリックスサンプル)、ゼロサンプル (内部標準で処理したマトリックスサンプル)、LL0Q を含む予想濃度範囲に対応する 6~8 つの非ゼロサンプルで構成されます。分析対象物のレスポンスがブランクのレスポンスの 5 倍以上であり、分析対象物のレスポンスが精度 20 % および正確さ 80~120 % で同定および分離可能で、かつ再現性を有している場合には、検量線のもっとも低い標準サンプル濃度が定量限界として認められます。

濃度レスポンスを適切に説明できる、もっともシンプルなモデルを使用する必要があります。4~6 つ以上の非ゼロ標準サンプルについては、公称値からの偏差が 15 % 以内でなくてはなりません。ただし、LL0Q については、20 % が偏差の限界値となります。

定量限界下限値 (LL0Q)

LL0Q は、適切な精度および正確さで分析対象物を定量できる最小量の値です。LL0Q における推奨精度は、最低 20% です。LL0Q の測定については、複数のアプローチがあります。もっとも実用的なアプローチは、最低 20 % の精度と正確さが得られる量を測定することです。

7.3 ルーチン生物分析の品質管理

生物学サンプルは、精度と正確さの変動が常に許容限界値内に収まっている限りにおいて、適切にバリデーションされたメソッドを用いた1回の測定により分析することが可能です。許容限界値から外れる場合は、2回または3回の繰り返し分析を実施する必要があります。

ルーチン分析中の正確さと精度を監視し、最適な条件を維持するための手順を策定し、分析データの規定品質を確保する必要があります。以下の考慮事項が重要となります。

- 予想されるサンプルの濃度の最低値から最高値までの較正用標準物質により、複数レベルの較正を適用します。
- 検量線は、LL0Qの較正用サンプルも含め、予想される未知のサンプル濃度の範囲に対応するものとします。
- LL0Q未満または最高濃度の標準サンプルを上回る検量線の外挿による未知サンプルの濃度概算は推奨しません。それよりも望ましいのは、検量線の再定義か、高い濃度のサンプルを希釈して再分析する方法です。
- 各分析バッチには、ブランクマトリックス (内部標準なしのサンプル)、ゼロ標準サンプル (内部標準ありのマトリックス)、最低6つの非ゼロ較正用標準サンプルの分析が含まれます。
- サンプル総数に応じた間隔で、処理済テストサンプルと共に、複数のQCサンプル (分析対象物を添加したマトリックス) を分析します。
- QCサンプルの最小数は、サンプル分析総数の5%とします。
- QCサンプルは、3種類の濃度で複数回分析します。たとえば、LL0Qの3倍の濃度で1回、中程度の濃度で1回、範囲の上端に近い濃度で1回のように分析します。
- 6つのQCサンプルのうち少なくとも4つは各公称値の15%以内に収まらなくてははいけません。6つのQCサンプルのうち、2つは15%の範囲を外れてもかまいませんが、その2つが同じ濃度の場合は認められません。
- 生物分析メソッドの導入にあたっては、適格性が確認され、適切に維持された機器を使用します。システム適合性 (SST) パラメータ、許容基準、頻度を定義し、システムの適切な稼働を確保します。システム適合性テストは、QCサンプルで求められる分析許容基準の代わりにはなりません。

参考文献

1. LGC, In-House Method Validation: A Guide for Chemical Laboratories, **2003**
2. U.S. FDA – Guidance for Industry (draft): Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls and Documentation, **2000**
3. U.S. FDA – Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation **2001**
4. ICH Q2A, Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Geneva, **1995**, in 2005 incorporated in Q2(R1)
5. ICH Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, adopted in **1996**, Geneva Q2B, in 2005 incorporated in Q2(R1)
6. IUPAC Technical Report, Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, Pure Appl. Chem., 74 (5) 835/855, **2002**
7. Eurachem – The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, **1998**
8. L. Huber, Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Informa Healthcare, New York, USA, **2007**
9. AOAC, How to Meet ISO 17025 Requirements for Methods Verification, **2007**
10. C. T. Viswanathan et al., Workshop/Conference Report — Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. AAPS Journal; 9(1), E30-E42, **2007**
11. USP 32 – NF 27, General Chapter 1225, Validation of Compendial Methods, **2009**

12. USP 32 – NF 27, General Chapter 1226, Verification of Compendial Meth, **2009**
13. USP 32 – NF 27, General Chapter 1058, Analytical Instrument Qualification, **2009**
14. U.S. FDA, Title 21 of the U.S. Code of Federal Regulations: 21 CFR 211 Current good manufacturing practice for finished pharmaceuticals, Revised as of April 1, **2009**
15. U.S. FDA, Title 21 of the U.S. Code of Federal Regulations: 21 CFR 58 Good Laboratory Practice for Preclinical Studies, Revised as of April 1, **2009**
16. U.S. FDA, Title 21 of the U.S. Code of Federal Regulations: 21 CFR 320 Bioavailability and Bioequivalence Requirements, Revised as of April 1, **2009**
17. PIC/S Guide To Good Manufacturing Practice For Medicinal Products, **2004**
18. European commission: The rules governing medicinal products in the European Union, Volume 4: Good manufacturing practices Medicinal Products for Human and Veterinary Use, **2004**
19. PIC/S Guide: Inspection Of Pharmaceutical Quality Control Laboratories, **2005**
20. ICH Q7: Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients, update **2000**
21. USP 32 – NF 27, General Chapter 621, Chromatography, **2009**
22. ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, **2005**

23. ICH, Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances (Revised Guideline), **2006**
24. ICH, Q6A; Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, **1999**
25. European Pharmacopeia 5, Section 2.2.4, **2004**
26. USP Stimuli Paper: Transfer of HPLC Procedures to suitable Columns of Reduced Dimensions and Particle Sizes, Pharmacopeial Forum, Vol. 35 (6), **2009**
27. USP Stimuli Paper: Transfer of Analytical Procedures: A Proposal for a New general Information Chapter, Pharmacopeial Forum, Vol. 35 (6), **2009**
28. V. P. Shah et al., Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Eur. J. Drug Metabolism and Pharmacokinetics 16 (4):249–255 (1991) and Pharm. Res. 9:588–592, **1992**
29. V.P. Shah, et al., Bioanalytical Method Validation – a Revisit with a Decade of Progress. Pharm.Res. 17; 1551-1667, **2000**

用語集

AOAC	分析化学者協会
API	医薬品有効成分
ASTM	米国材料試験協会
CFR	連邦規則集
EP	欧州薬局方
EU	欧州連合
FDA	食品医薬品局
GC	ガスクロマトグラフィー
GCP	医薬品臨床試験実施基準
GLP	優良試験所基準
GMP	医薬品適正製造基準
HPLC	高性能液体クロマトグラフィー
ICH	医薬品規制調和国際会議
IEC	国際電気標準会議
ISO	国際標準化機構
IUPAC	国際純正・応用化学連合
LGC	英国政府化学者研究所
LOD	検出限界
LOQ	定量限界
NATA	全豪検査機関協会
PIC/S	医薬品製造査察の相互認証に関する協定
QA	品質保証
QC	品質管理
SOP	標準操作手順書
SST	システム適合性テスト
USP	米国薬局方

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2010, 2018
Published in Japan, April 25, 2018
Publication Number 5990-5140JAJP



Agilent Technologies