

14. 分析法バリデーション

分析法バリデーションとは、医薬品の試験法に用いる分析法が、分析法を使用する意図に合致していること、すなわち、分析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確率が許容できる程度であることを科学的に立証することである。分析法の能力は種々の分析能パラメータにより表される。提案する分析法の分析能パラメータが、試験法の規格値などを基にして設定する基準を充たしていることを実証することにより、分析法の妥当性を示すことができる。

本文に基づく分析法バリデーションは、日本薬局方に新たに収載する試験法を設定するとき、日本薬局方に収載されている試験法の改正を行うとき及び通則の規定に基づき日本薬局方に収載されている試験法に代る試験法を設定するとき、これらの試験法で用いる分析法について行う。

分析法を日本薬局方に収載するために必要な資料

(1) 概要

分析法の原理の簡潔な説明、その分析法の必要性、他の分析法と比較したときの利点、バリデーションの要約などを記載する。分析法を改正する場合には、既存の分析法の限界及び新たに提案する分析法によりもたらされる利点も記載する。

(2) 分析法

分析法を正しく評価できるように、また、必要ならば追試を行って評価できるように、分析法を詳細に記載する。分析法には、分析の手順、標準試料の調製法、試薬・試液の調製法、留意事項、分析システムが正しく作動していることを検証する方法（例えば、クロマトグラフ法における分離効率の検証）、分析結果を導くための式及び測定回数などが含まれる。また、日本薬局方に規定されていない装置又は器具を用いる場合には、それについても詳細に記載する。新たに標準品を規定する場合には、その物質の物理的、化学的又は生物学的な特性値を明らかにし、試験法を記載する。

(3) 分析法の妥当性を示す資料

分析法が妥当なものであることを立証する資料を示す。本資料は、分析能パラメータを求めるための実験計画、実験データ、計算結果及び検定結果を含む。

分析能パラメータ (Validation characteristics)

分析法の妥当性を示すために評価が必要な典型的な分析能パラメータの定義と評価方法の例を次に示す。

分析能パラメータに関する用語と定義は、分析法を適用する分野により異なる。本文における用語と定義は、日本薬局方の目的に添って一義的となるように定めたものである。評価方法の項では、分析能パラメータを評価する方法の概略を示した。分析能パラメータを決定する方法は、多数の方法が提唱されており、一般的に受け入れられている方法であれば、どのような方法を用いて分析能パラメータを決定しても差し支えない。しかし、分析能パラメータの値が決定方法に依存することもあるので、分析能パラメータを求めるための実験方法、実験データ及び計算方法は、可能な限り詳しく記述することが必要である。

頑健性 (Robustness) は、分析法バリデーションで検討する分析能パラメータには含まれないが、分析法の開発段階で頑

健性を検討することにより、分析法を改善し、検討結果を分析法の分析条件又は留意事項に反映させることができる。

(1) 真度 (Accuracy/Trueness)

定義：真度とは、分析法で得られる測定値の偏りの程度のこと、真の値と測定値の総平均との差で表される。

評価方法：分析法の真度の推定値は、室内再現精度又は室間再現精度を求めるときに得られる測定値の総平均と真の値との差として表される。標準品の認証値又は合意された値を真の値とする。製剤の分析法の場合には、標準溶液の測定値を合意された真の値とする。

また、特異性の高い分析法であることを示すことにより、分析法の偏りが小さいことを推論できる。

得られた真度の推定値と室間 (内) 再現精度から計算される標準誤差の値から、真度の 95 % 信頼区間を計算する。この区間が 0 を含んでいることを確認するか、又は同区間の上限値及び下限値が分析法に要求される真度の基準の値の範囲内であることを確認する。

(2) 精度 (Precision)

定義：精度とは、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し分析して得られる一連の測定値が、互いに一致する程度のことであり、測定値の分散、標準偏差又は相対標準偏差で表される。

精度は、繰り返し条件が異なる三つのレベルで表され、それぞれ、併行精度、室内再現精度及び室間再現精度という。

(i) 併行精度 (Repeatability/Intra-assay precision)

併行精度とは、試験室、試験者、装置、器具及び試薬のロットなどの分析条件を変えずに、均質な検体から採取した複数の試料を短時間内に繰り返し分析するとき (併行条件) の精度である。

(ii) 室内再現精度 (Intermediate precision)

室内再現精度とは、同一試験室内で、試験者、試験日時、装置、器具及び試薬のロットなどの一部又はすべての分析条件を変えて、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し分析するとき (室内再現条件) の精度である。

(iii) 室間再現精度 (Reproducibility)

室間再現精度とは、試験室を変えて、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し分析するとき (室間再現条件) の精度である。

評価方法：はじめに、精度を検討するのじゅうぶんな量の均質な検体を確保する。溶液は均質な検体である。均質な検体が得られないときには、例えば、大量の製剤を均質とみなせるまで混合粉碎した検体、又は製剤の配合成分を均質とみなせるまで混合した検体を、均質な検体として用いる。

2 つ以上のレベルの精度を同時に評価するためには、一元配置などのような適当な実験計画法の下に実験を行うとよい。このとき、分析法の精度を正しく推定するために、じゅうぶんな数の繰り返し数、分析条件の水準数及び試験室数を揃える。バリデートしようとする分析法で、考えられる可能な限りの分析の変動要因について検討する。

各レベルの精度の分散、標準偏差、相対標準偏差、分散の 90 % 信頼区間及びこれに対応する標準偏差の区間を示す。分析法に要求される精度の基準の値に照し合せ、分析法を採用してもよいことを示す。通例、室間 (内) 再現精度の値から分析法の採否を決定する。

(3) 特異性 (Specificity)

定義：特異性とは、試料中に共存すると考えられる物質の存在下で、分析対象物を正確に測定する能力のことで、分析法の識別能力を表す。個々の分析法が特異性に欠ける場合には、別の試験法によりこれを補うこともできる。

評価方法：分析法を適用する試験法の目的に応じて、分析法が確実に分析対象物を確認できること、又は分析対象物の量又は濃度を正確に測定できることを確認する。特異性は、例えば、分析対象物のみを含む試料、製剤の配合成分、類縁物質若しくは分解産物を含む検体に分析対象物を添加した試料及び分析対象物は含まず、製剤の配合成分、類縁物質若しくは分解産物のみを含む試料などの分析結果を比較することにより評価できる。不純物の標準品が得られない場合には、不純物を含有すると考えられる試料、例えば、経時変化した試料などを用いることもできる。

(4) 検出限界 (Detection limit)

定義：検出限界とは、試料に含まれる分析対象物の検出可能な最低の量又は濃度のことであり、検出限界では定量できるとは限らない。

評価方法：通例、検出限界における消費者及び生産者の危険率が 5 % 以下となるように検出限界を定める。検出限界は、ブランク試料又は検出限界付近の分析対象物を含む試料の測定値の標準偏差及び検出限界付近の検量線の傾きから算出される。例えば、検出限界は、測定値が正規分布し連続な場合には、検出限界付近の検量線の傾き及びブランク試料の測定値の標準偏差から、次式により求めることができる。

$$DL = 3.3 \sigma / slope$$

DL：検出限界

σ ：ブランク試料の測定値の標準偏差

slope：検出限界付近の検量線の傾き

クロマトグラフ法の場合には、測定値の標準偏差の代わりにノイズ・レベルを用いることができる。

分析法の検出限界が試験の規格値よりも小さいことを確認する。

(5) 定量限界 (Quantitation limit)

定義：定量限界とは、試料に含まれる分析対象物の定量が可能な最低の量又は濃度のことであり、定量限界の分析対象物を含む試料の測定値の精度は、通例、相対標準偏差で表して 10 % である。

評価方法：定量限界は、ブランク試料又は定量限界付近の分析対象物を含む試料の測定値の標準偏差及び定量限界付近の検量線の傾きから算出される。例えば、定量限界は、測定値が正規分布し連続な場合には、定量限界付近の検量線の傾き及びブランク試料の測定値の標準偏差から、次式により求めることができる。

$$QL = 10 \sigma / slope$$

QL：定量限界

σ ：ブランク試料の測定値の標準偏差

slope：定量限界付近の検量線の傾き

クロマトグラフ法の場合には、測定値の標準偏差の代わりにノイズ・レベルを用いることができる。

分析法の定量限界が試験の規格値よりも小さいことを確認

する。

(6) 直線性 (Linearity)

定義：直線性とは、分析対象物の量又は濃度に対して直線関係にある測定値を与える分析法の能力のことであり、このとき、必要があれば、分析対象物の量、濃度又は測定値を正確に定義された数式により変換した値を用いてもよい。

評価方法：量（濃度）が異なる分析対象物を含有する試料を用意し、分析法に述べられている手順に従って各試料を繰り返し分析し、測定値を得る。回帰式及び相関係数から直線性を評価する。必要ならば、測定値の回帰式からの残差を分析対象物の量又は濃度に対してプロットし、特定の傾向が観察されないことを確認する。通例、5 種類の量（濃度）が異なる試料を用いる。

(7) 範囲 (Range)

定義：分析法バリデーションにおける範囲とは、適切な精度及び真度を与える、分析対象物の下限及び上限の量又は濃度に挟まれた領域のことであり、直線性のある分析法の場合には、適切な精度及び真度を与え、また、直線性が成り立つ分析対象物の下限及び上限の量又は濃度に挟まれた領域のことであり。

評価方法：通例、分析法バリデーションにおける範囲は、試験の規格値 $\pm 20\%$ 程度でよい。範囲の上限値、下限値及び範囲の中央付近の値の試料について、精度、真度及び直線性を検討する。

分析法を適用する試験法の分類

試験法は、その目的により以下に示すように大きく三つのタイプに分類することができる。各タイプの試験法に適用する分析法のバリデーションに、通例、要求される分析能パラメータを表に示す。これは原則であり、評価が必要な分析能パラメータは、分析法の特性や分析法を適用する試験法の目的に依存して変わる。

タイプ I 確認試験法。医薬品中の主成分などをその特性に基づいて確認するための試験法。

タイプ II 純度試験法。医薬品中に存在する不純物の量を測定するための試験法。

タイプ III 医薬品中の成分の量を測定するための試験法。（成分には、安定剤及び保存剤などの添加剤なども含まれる。）溶出試験法のように、有効性を測定する試験法。

表 試験法のタイプと検討が必要な分析能パラメータ

分析能 パラメータ	タイプ タイプ I	タイプ II		タイプ III
		定量試験	限度試験	
真度	—	+	—	+
精度				
併行精度	—	+	—	+
室内再現精度	—	—*	—	—*
室間再現精度	—	+*	—	+*
特異性**	+	+	+	+
検出限界	—	—	+	—
定量限界	—	+	—	—
直線性	—	+	—	+
範囲	—	+	—	+

— 通例評価する必要がない。

+ 通例評価する必要がある。

* 分析法及び試験法が実施される状況に応じて、室内再現精度又は室間再現精度のうち一方の評価を行う。日本薬局方に採用される分析法のバリデーションでは、通例、後者を評価する。

** 特異性の低い分析法の場合には、関連する他の分析法により補うこともできる。

分析法バリデーションで用いられる用語

頑健性 (Robustness)

頑健性とは、分析条件を小さい範囲で故意に変化させるときに、測定値が影響されにくい能力のことである。反応液の pH、反応の温度、反応時間又は試薬の量などの分析条件を適当な範囲で変化させ、測定値の安定性を検討する。測定値が分析条件に対して不安定な場合には、安定な測定値が得られるように分析法に改良を加える。また、頑健性の結果は、最終的な分析法において分析条件を示す数値の有効数字又は留意事項として反映させる。

試験室

試験室とは、試験を行う部屋、施設を意味する。本分析法バリデーションでは、試験室を変えろということ、試験者、装置及び試薬ロットなどの分析条件が変化することを意味する。

試験法

試験法とは、一般試験法及び医薬品各条における試験方法、例えば、純度試験、定量法などを意味する。試験法には、試料の採取方法、規格値、分析法などが含まれる。

生産者危険

規格を満たしている製品が、試験を行うことにより、誤って不合格と判断される確率のこと。通例、 α で表す。第 1 種の過誤とも言い、限度試験の場合には偽陽性率に相当する。

消費者危険

規格外の製品が、試験を行うことにより、誤って合格と判断される確率のこと。通例、 β で表す。第 2 種の過誤とも言い、限度試験の場合には偽陰性率に相当する。

測定回数

分析法の手順の中に含まれる回数。分析法の精度を上げるために、分析法の中であらかじめ測定回数を 2 回以上に指定することがある。分析法バリデーションでは、分析法の中で定められた測定回数も含めた分析法を評価する。

分析法の精度を評価するために繰り返し分析を行うときの繰

り返し数とは別のものである。

測定値

一回の分析により得られる一つの値。

分析法

本文が対象としている分析法は、試料中に存在する分析対象物の量又は濃度に依存する測定値を与える分析法及び確認試験に用いられる分析法である。本文における分析法とは、試験法の分析過程を意味する。

15. 保存効力試験法

本試験法は、製剤の保存効力を微生物学的に評価する試験方法である。製剤の中に試験の対象となる菌種を強制的に接種、混合し、経時的に試験菌の消長を追跡することにより、保存効力を評価する。

製剤の保存効力は、有効成分自体の作用によるものであれ、添加されたものであれ、多回投与容器中につめられたすべての注射剤で証明する。また、点眼剤及び点鼻・点耳剤などでも保存性を証明する。更に多回投与の制酸剤など経口剤でも保存性の証明が必要である。本試験の目的により、製剤を水溶性基剤で作られたものとそれ以外のものの 2 つのカテゴリーに分ける。前者は剤形により 4 群に細分類する。

本試験で使用する指定されている微生物菌種は、いずれも製剤の製造、使用若しくは保存中に環境から混入するおそれのあるものの代表である。これらの指定被検微生物に加えて、被検製剤の特殊性質や特定の製造工程から混入した、若しくは混入して増殖するおそれがある微生物を、保存効力を評価するための被検菌として使用することが可能である。なお、医薬品 GMP に対応するために、又は単に生菌数を抑制する目的のためだけに、保存剤を使用してはならない。保存剤は、それ自体毒性のある物質でもある。それ故、ヒトへの安全性がおよびやかされるような量を製剤に添加してはならない。保存剤の添加量を可能な限り少なくする配慮が必要である。

製剤とそのカテゴリー

本試験を行うために、製剤を 2 つのカテゴリーに分類する。カテゴリー I に含まれるものは水溶性基剤で作られたもの、カテゴリー II に含まれるものは非水溶性基剤で作られたものである。なお、水中油型乳剤 (oil-in-water emulsion) はカテゴリー I に、油中水型乳剤 (water-in-oil emulsion) はカテゴリー II に含まれる。カテゴリー I は、剤形によって 4 群に細分類する。

カテゴリー I A : 注射剤及び点耳・点眼剤を含む非経口剤。

カテゴリー I B : 粘膜に投与される外用剤で、点鼻用液剤や吸入剤などが含まれる。

カテゴリー I C : 制酸剤を除く経口液剤。

カテゴリー I D : 制酸剤 (溶解後投与される固形の制酸剤を含む)。

カテゴリー II : 非水溶性基剤で作られた製剤で、カテゴリー I に記載しているすべての剤形を含む。

被検菌株と培地

以下の菌株、若しくはこれらと同等と考えられる菌株を使用する。

Escherichia coli ATCC 8739, NCIMB 8545