

分析法バリデーションの実際 —室内再現精度の具体的な評価手順と留意点—

医薬事業本部 ファーマ事業所 畑田 幸栄

1 はじめに^{1), 2)}

医薬品の品質、有効性および安全性を保証することは、企業の果たすべき社会的責任であることは言うまでもない。医薬品の品質は、物理的、化学的分析法により保証されるため、設定した分析法が実際に使用される意図にふさわしいことを科学的な根拠に基づき検証する（即ちバリデーション）ことが必要となる。

日米欧三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議（ICH）で協議された分析法バリデーションの「実施項目」および「実施方法」に関する2つのテキストは、既にステップ5に達しており、共に平成10年4月1日から施行されている。「実施項目」に関するテキストには、試験法のタイプ別の重要な分析能パラメータ（表1）とその用語解説が示されており、「実施方法」に関するテキストには、新医薬品の承認申請書の添付資料に記載が必要なデータとその求め方が示されている。しかし、当該テキストには具体的な評価手順は記載されていないため、分析法バリデーションを実施する場合は、試験法のタイプや試験の目的に応じて、各自工夫して科学的に妥当な方法で評価しているのが現状である。

表1 試験法のタイプと評価が必要な分析能パラメータ

試験法のタイプ 分析能パラメータ	確認試験	純度試験		定量法 ○含量/力価 ○溶出試験 (分析のみ)
		定量試験	限度試験	
真度	-	+	-	+
精度	-	+	-	+
併行精度	-	+	-	+
室内再現精度	-	+(1)	-	+(1)
特異性 ⁽²⁾	+	+	+	+
検出限界	-	-(3)	+	-
定量限界	-	+	-	-
直線性	-	+	-	+
範囲	-	+	-	+

- このパラメータは通常評価する必要がある。

+ このパラメータは通常評価する必要がある。

(1) 室間再現精度を評価する場合には、室内再現精度の評価は必要ない。

(2) 分析法が特異性に欠ける場合には、関連する他の分析法によって補うことができる。

(3) 評価が必要な場合がある。

(ICHの「分析法バリデーションのテキスト（実施項目）」⁽³⁾より引用)

本稿では、分析法バリデーションにおける分析能パラメータの中で、重要であり且つ判断を誤る危険性が高い「室内再現精度」の具体的な評価手順と留意点について述べる。

2 室内再現精度の具体的な評価手順と留意点^{3), 4), 5), 6)}

2.1 室内再現精度の評価手順

室内再現精度とは、同一施設内において、試験日、試験実施者、器具、機器等を変えて測定する場合の精度である。

室内再現精度の評価方法の1つとして、実験計画法に基づく方法が小嶋により推奨されている³⁾。この方法は、試験日を6として、試験者、装

置、カラム等の3要因（各2水準）をランダム化されるように割り付けて、試験日毎に2回測定し、測定結果を各要因の影響を分離せずに、一元配置分散分析で評価する方法である。この評価手順は次の通りである。

<手順1>

実験計画法に基づき実験を割り付ける。

<手順2>

6試験日の測定値を得る。

<手順3>

統計解析を行う

（一元配置分散分析）。

<手順4>

室内再現精度を評価する。

以下、HPLCによる類縁物質試験

法を事例として、手順の詳細と留意点について述べる。

2.2 <手順1> 実験計画法に基づき実験を割り付ける。

2.2.1 変動要因および水準

検討する変動要因を3要因選定する。変動要因は、その試験が実施される状況や品質保証の内容などに照らし合わせて選定する。クロマトグラフ法の場合、試験者、装置およびカラム（新品のカラムと使い込んだカラム）の3要因が一般的である。これらの3つの要因が選定できない場合（例えば装置が一台しか準備できない場合）には、次に影響があると思われる要因を選定する。

水準は各変動要因について2水準とする。

2.2.2 試験日

試験日は6日とする。当該通知²⁾で精度の評価における自由度は5以上を規定していると解釈できるので、試験日を6日とすることにより水準間（室内再現精度成分）の自由度を5とする。この場合、機器を一旦オフにするなど、試験日が変わったかのような操作に従うのであれば、別の試験日とみなすことができる。

2.2.3 繰り返し数

各試験日において2測定行えばよい。これにより水準内（誤差成分）

の自由度が6となる。

2.2.4 実験の割り付け

図1に示す通り、ランダム化されるように実験を割り付ける。

2.3 <手順2> 6試験日の測定値を得る。

6試験日で測定した結果の事例を表2に示す（この場合、試料のクロマトグラム中に類縁物質ピークが検出されなかったため、添加回収試験

を行い、添加回収率を算出した）。

2.4 <手順3> 統計解析を行う（一元配置分散分析）。

得られた一元配置分散分析表を表3に示す。

水準間と水準内の分散比は、 F_0 (V_A / V_E) = 1.972 < $F(5, 6, 0.05)$ = 4.39であり、分散比の検定結果は、「有意水準5%において室内再現精度成分の分散に有意差があるとは言えない」であった。

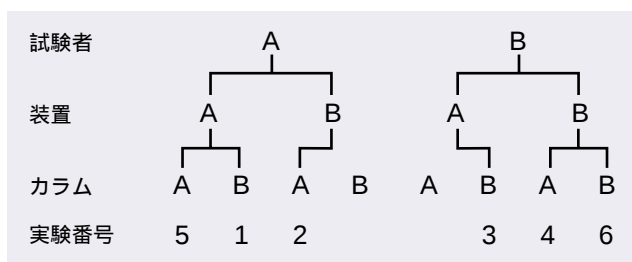


図1 実験の割り付け

表2 室内再現精度の6試験日のデータ

実験番号	添加回収率(%)		割り付け方(各要因2水準)		
	1回目	2回目	試験者	装置	カラム
1	99.3	99.2	A	A	B
2	97.7	100.4	A	B	A
3	100.6	99.4	B	A	B
4	99.9	99.0	B	B	A
5	99.1	102.6	A	A	A
6	96.8	96.9	B	B	B
平均値	99.2				
標準偏差	1.62				
相対標準偏差	1.6				

表3 一元配置分散分析

要因	平方和 S	自由度 ϕ	分散 V	分散比 F_0
A(水準間:室内再現精度成分)	17.924	5	3.585	1.972
E(水準内:併行精度成分)	10.905	6	1.818	
T	28.829	11		

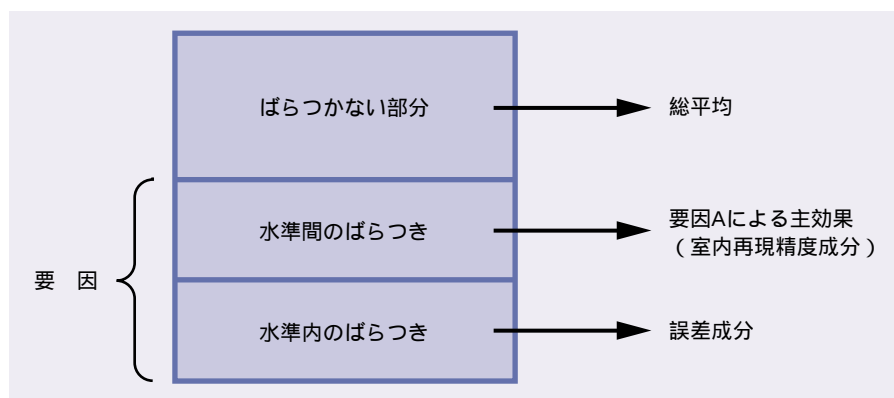


図2 一元配置による測定値の構成

一元配置分散分析において、測定値は、ばらつかない部分（総平均）、水準間のばらつき（要因による主効果：室内再現精度成分）および水準内のばらつき（誤差成分）に分解することができる（図2）。この測定値の構成は次式の通りとなる。

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

ここで、 X_{ij} はA水準のj番目の測定値、 μ は総平均、 α_i ：要因Aの主効果、および ε_{ij} はA水準のj番目の誤差成分である。この式は、「誤差成分は平均0、標準偏差 σ の正規分布に従うこと」および「要因Aの主効果の総和が0であること」が成り立つことが前提である。

2. 4. 1 分散分析による評価について

「分散分析」という名称や、F検定を用いることから、分散分析は、ばらつきを評価する統計学的手法であると誤解しがちであるが、そうではない。分散分析の帰無仮説 H_0 は、「要因Aの効果はない」（即ち「各試

験日の母平均は等しい」）、対立仮説 H_1 は、「要因Aの効果はある」（即ち「各試験日の母平均は等しくない」）である。試験日毎の母平均の差が有意か否かを、水準内（誤差成分）に対する水準間（室内再現精度成分）の分散比の検定により評価していることとなる。

2. 4. 2 分散分析における分散比の検定の必要性について

分散比を検定した結果が「有意差あり」となった場合は、対立仮説 H_1 ：「要因Aの効果がある」が成り立ち、誤差成分のばらつきと比較し、室内再現精度成分のばらつきに意味のある差が生じていることとなる。しかし、通常、誤差成分のばらつきよりも、室内再現精度成分のばらつきが大きいことはあり得るため、「有意差あり」となったとしても室内再現精度の結果を不適合とする必要は無い（分散比の結果は参考値扱いとして差し支えない）。

2. 4. 3 3要因の測定値の一元配置

分散分析による評価について

得られた測定値は、3要因の割り付けによるものなので、その構成は、次式の通りとなり、測定値は本来三元配置分散分析で評価されるべきである。

$$X_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

ここで、 μ は総平均、 α は試験者による主効果、 β は装置による主効果、 γ はカラムによる主効果、 ε は誤差成分、その他は交互作用の主効果である。この式は、「誤差成分は平均0、標準偏差 σ の正規分布に従うこと」、「各要因の主効果の総和が、それぞれ0であること」および「各交互作用の主効果の総和が、それぞれ0であること」が成り立つことが前提である。この測定値を一元配置分散分析で評価する場合、 α 、 β 、 γ 、2要因の交互作用および3要因の交互作用の総和を、「室内再現精度成分」とみなしていることとなる。これを図示すると図3の通りとなる。得られた測定値を一元配置分散分析で評価する場合、3要因および交互作用の要因をまとめて評価するため、個々の要因の効果が相殺される危険性があることを十分考慮し、考察する必要がある。

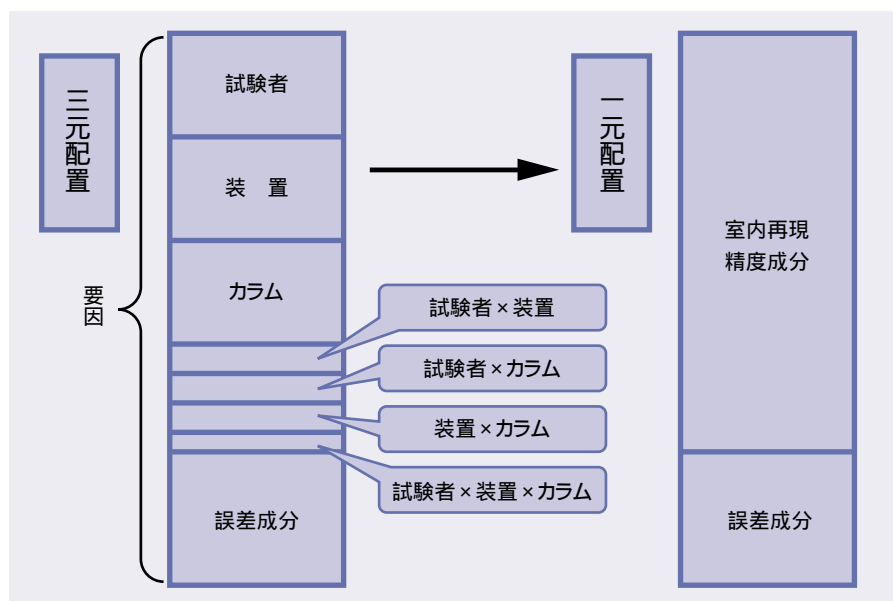


図3 測定値の要因の構成（三元配置及び一元配置）

文 献

- 1) 厚生省薬務局審査課長通知，分析法バリデーションに関するテキスト（実施項目）について，平成7年7月20日薬審第755号
- 2) 厚生省医薬安全局審査課長通知，分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）について，平成9年10月28日医薬審第388号
- 3) 小嶋茂雄，医薬品の品質保証に関する国際調和 - ICHガイドラインを中心として - ，PDA Journal of GMP and Validation in Japan, Vol.1, No.1, 1999
- 4) 鹿庭なほ子，医薬品の分析法バリデーション，林純葉，2003
- 5) 畑田幸栄ら，実務担当者のQ&Aをもとにした分析法バリデーション - 試験別ノウハウと統計・各パラメータ実務対策，技術情報協会，2004
- 6) 永田靖，入門統計法，日科技連，1999

表4 標準偏差，相対標準偏差及び標準偏差の90%信頼区間

	標準偏差	相対標準偏差	標準偏差の90%信頼区間	
			上限	下限
A（室内再現精度成分）	1.893	1.9	3.957	1.272
E（誤差成分）	1.348	1.4	2.583	0.931
T（全体）	1.619	1.6	2.512	1.210

2. 5 <手順4> 室内再現精度を評価する．

算出した室内再現精度成分，誤差成分および全体における，標準偏差，相対標準偏差および標準偏差の90%信頼区間を表4に示す．

室内再現精度は，分散分析により分解する前の測定値のばらつきなので，評価すべき標準偏差，相対標準偏差および標準偏差の90%信頼区間は，本来，表4における「T（全体）」である．

の具体的な評価手順は，現行の通知や関連文献を把握した上で，いかに科学的に妥当であり且つ効率の良い実験計画とその手順を構築するかが，重要なポイントとなる．我々は，分析法バリデーションを受託するにあたり，顧客から指定された方法通りに試験するばかりでなく，今までの豊富な経験を活かし，顧客のニーズにあったデータパッケージを御提案させていただきたいと考えている．



畑田 幸栄
（はただ こうえい）
医薬事業本部
ファーマ事業所

3 おわりに

本稿では，室内再現精度に限定して述べたが，分析法バリデーション