

テクニカルノート（5）

「試験法に関する妥当性の評価」

JCLAマネジメントシステム文書

JCLA PR-24（5）

2000年 2月 1日 制 定

2006年10月 3日 改訂2版



この文書はJCLAが作成したものです、許可無く転載及び引用を禁じます。

日本化学試験所認定機構（JCLA）

テクニカルノート（5） 試験法に関する妥当性の評価

1. 適用範囲

ISO/IEC 17025 の 5.4.2 項では、出来る限り国家又は国際規格、定評有る機関の刊行物又は関連の科学技術文献に公表された、いわゆる公的試験法を用いる事を要求している。このような公的試験法が適用出来ない時、規格として確立していない方法（いわゆるインハウスメソッド）を適用する事になるが、この場合、妥当性確認を行うことを求めている。

本技術ノートでは、公定法以外の試験法について試験所認定をうける場合に、その試験法に対し実施すべき試験法の妥当性評価について、いくつかの既存の指針を参考にして取りまとめた。なお、この文書は試験法の妥当性評価の以下のような指針として取りまとめられているので、上記の目的に対しては対象とする試験法に合わせて実施の範囲を決定することが必要である。

(1) 公的試験法以外の方法又は試験所が設計・開発した方法

十分な妥当性確認が、この試験法について実施されていることが必要となる事例である。

この時、妥当性確認の結果に対し合目的性が有るかどうかは、審査チームが先ず判断する事となるが、判断が困難な場合は JCLA 技術委員会で審査する。

更に、この委員会での審査で判断が出来ない場合は、原則認定の対象と出来ない。

(2) 公的試験法の一部変更

この場合、変更の内容により妥当性評価の幅と深さが異なる。試験法を変更した部分について該当する妥当性確認を行う必要が有るが、妥当性確認の内容及び深さは変更の内容により異なる。同時にもとの公的試験法との使用する範囲における対応試験も妥当性確認の一環として実施する。この場合、もとの公的試験法の標記を認定の試験法の標記として使用する事は出来ない。

(1)、(2)のどちらの場合においても、依頼者の同意が必要であり、依頼者の要求内容を満足するもので有ることが必要である。

なお、実際には種々のケースが考えられ、ここに示す内容の限りではない。これらについては必要に応じて、都度 JCLA 技術委員会にて検討する。

2. 参照文書

(1) Eurachem Guide(1998)

“The Fitness for Purpose of Analytical Methods”

(2) NATA Technical Note 17 (1997)

“Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Test Method”

- (3) Helmut Gunzler : "Accreditation and Quality Assurance in Analytical Chemistry" (Springer)
- (4) 薬審第755号
「分析法バリデーションに関するテキスト」
- (5) 島津製作所 技術資料「分析法の頑健性評価とバリデーション」
- (6) 日立製作所 技術資料「分析法バリデーションに対応して」
- (7) 荒木 恵美子 : 食衛誌 Vol.38 No.4(1997)「食品検査データの信頼性確保」
- (8) GLP 入門 (横河アナリティカルシステムズ株式会社)
- (9) AOAC International: "AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures"
- (10) AOAC International: "AOAC Official Methods Program , Associate Referee's Manual on Development, Study, Review, and Approval Process."
- (11) JIS Z8402 :1999 「測定法及び測定結果の精確さ」

3. 用語の定義

用語の定義は、Eurachem Guide にあるものはこれに従い、これに記載されていないものは、関連する文献から引用した。

- | | |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1)特異性、選択性
(Specificity)
(Selectivity) | 一定のテスト条件下において、サンプルマトリックス中の他成分中から目的の分析対象成分を正確に出す分析法の能力。 [NATA Tech Note #13]
意図した測定のみを測定する方法に関する能力。
(AOAC) |
| (2)正確さ
(Accuracy) | 試験結果と容認された標準値にいかに密接に合致するかの度合。 (ISO 3534-1) |
| (3)真度
(Trueness) | 多数の試験結果から得られた平均値と認証された参照値との間の一致の程度。 |
| (4)精度
(Precision) | 規定の条件の下で独立に行われた試験結果間の合致度。(ISO 3534-1) |
| (5)併行精度
(Repeatability) | 併行精度の条件つまり、独立したテスト結果が同じ方法で、同じテスト項目について、同じ試験所内で同じオペレーターが同じ機器を短い期間に使用することで得られる条件下の精度。(ISO 3534-1) |
| (6)室内再現精度
(中間精度)
(Intermediate Precision) | 異なる日、異なる分析者、異なる機器等による試験所内での精度。(ICH Q2A ,CPMP/ICH/381/195) |

- (7)室間再現精度
(Reproducibility) 再現精度の測定条件下、即ち試験結果が、同一試験項目について、同一の分析方法で異なる試験所で、異なるオペレーターが異なる機器を使用して得られる条件下での精度 (ISO 3534-1)
- (8)検出限界
(Detection Limit) 妥当な統計的不確かさを持って測定される最少の含有量。(AOAC)
サンプル中に検出され得る分析対象物の最少濃度、しかし必ずしも試験の規定条件下で計量されなくともよい。
[NATA TECH Note#13]
- (9)定量限界
(Quantitation Limit) 検量線上の最低濃度点よりも大、若しくはそれに等しい含有量 (AOAC)
一定の条件下における試験で、容認される精度(併行精度)と正確さで測定され得る分析対象成分の最低の濃度。
[NATA Tech Note #13]
- (10)直線性
(Linearity) 分析対象物の濃度に比例する試験結果を得るための分析方法の能力
[注] 直線性範囲は方法が、分析対象成分濃度に比例する試験結果を与える分析対象成分の濃度範囲の推定値。
[AOAC-PVMC]
- (11)範囲
(Range) 測定装置の誤差が特定限界内にある測定対象の一对の数値 [IUPAC 'Orange' Book]
- (12)頑健性、堅牢性
(Robustness or Ruggedness) 分析法のパラメータを、微少ではあるが意図的に変化させてみた時の、影響を受けない能力の尺度。
通常の使用における信頼性の表示となる。
(ICH Q2A, CPMP/ICH/381/95)
異なる試験環境で起こりがちな、環境及び／又は作業条件の僅かな変化を生じさせたときの、分析過程の挙動を調べる試験所間の検討試験。この堅牢性試験によって僅かな変化の影響についての情報が素早く系統的に得られる。(AOAC)

又、上記した定義以外に、関連する文献に記載されている言葉の定義を参考までに以下に示す。

- (1)特異性、選択性
(Specificity)
(Selectivity) 共存が予想される不純物、分解物、配合成分等の存在下で、分析対象成分を正確に測定出来る能力。
各試験法に於ける特異性とは、次の様な事を意味する。
確認試験；分析対象成分を誤り無く確認出来る能力。
純度試験；試料中の不純物、即ち類縁物質、重金属、残留溶媒等の濃度を正確に示す能力。

- 定量法；試料中の分析対象物の濃度又は力価を正確に示す能力。（薬審第755号）
- (2)精度
(Precision) 均質な検体から多数回採取して得られた複数の試料について、記載された条件に従って測定して得られた一連の測定値間の一致の程度。（又はばらつきの程度）
(薬審第755号)
- (3)併行精度
(Repeatability) 短時間の間に同一条件下で測定する場合の精度
(薬審第755号)
- (4)室内再現精度
(中間精度)
(Intermediate Precision) 同一施設内で、試験日、試験実施者、器具、機器等を替えて測定する精度。（薬審第755号）
併行精度と室間再現精度の間にくるもので、特定の試験室内、又は試験室間共同実験によって確定する。
(JIS Z8402-3)
- (5)室間再現精度
(Reproducibility) 異なった施設間で測定する場合の精度。
(薬審第755号)
- (6)検出限界
(Detection Limit) 試料中に存在する分析対象成分の検出可能な最低の量。
(薬審第755号)
- (7)定量限界
(Quantitation Limit) 適切な精度と真度を伴って定量出来る、試料中に存在する分析対象成分の最低の量。（薬審第755号）
- (8)範囲
(Range) 分析法が適切な精度、真度及び直線性を与える試料中の分析対象成分の上限及び下限の濃度（量）の間隔。
(薬審第755号)

4. メソッドバリデーションの概要と定義

分析方法はあらゆる分野における試験や研究の基本である。分析方法に信頼がおけないければ、試験や研究は成り立たないであろう。

また、同一の試料を繰り返し測定しても、必ずしも同一の分析結果を得ることが出来ないことは、よく知られていることである。というのは、分析には必ず誤差が伴い、分析結果が変動するからである。

分析結果を変動する要因には、分析者が制御できるファクターと制御できないファクターとに分類することが出来る。

分析者が制御できる要因の例として、HPLC 法におけるカラム温度、流量、移動相の組成等がある。(安定で感度のよい分析方法を目指す時、このような要因と分析結果との関係が検討される)

分析者が制御できない要因の例として、機器によっては制御しきれない上記条件の微小の変動が上げられる。

これは試験実施時間が変わることによる変動とも考えられ、試験日(時間)による変動ということもある。同様に、分析者、カラムの銘柄やロット、分析装置が変わることによっても分析値は異なり、これらを制御することは難しい。

このような要因によって生じる誤差をランダムな誤差という。

開発が終了した分析方法またはある試験方法を採用するときには、ランダムな誤差の大きさを見積もっておく必要がある。この作業はメソッドバリデーションの一部である。

メソッドバリデーションを行うため、表—2の「分析のパラメータ」表から必要なパラメータを選定し、妥当性の評価を行うことになる。

すなわち、従来、分析者は併行精度を推定してそれで良しとする傾向にあった。しかし分析法が日々繰り返し使用されていく間には、試験日、試薬のロットや銘柄、カラムのロット、分析者、分析装置、試験室などは変わっていくのである。

メソッドバリデーションは日常の状態における分析結果のばらつきを推定することが目的となる。従って、分析法にはそれぞれの特性があり、また、適用される目的にも多様性があるので、一般的な方法を鵜呑みするのではなく、分析法の特性や適用目的にあわせて妥当と考えられる方法で実施することが重要となる

分析法が分析化学的および統計学的にきちんと評価されてはじめて、分析法の開発者はその有用性をアピールすることができ、一方、特定の試験法にある分析法を採用してもよいかどうかを決定することができる。

また、すでにある分析法を別の分析法に変えようとするときには、新分析法が旧分析法よりも勝るとも劣らないことを証明するために、メソッドバリデーションが必要となる。

表—2の「分析のパラメータ」を用いることにより、はじめて体系の異なる分析法を比較することが出来る。このことから、技術審査員は試験方法の評価としてメソッドバリデーションが重要となる。

次に、バリデーションの定義について明確にしておくとして、ISO 8402:1994 では「定められた用途に対する特有の要求事項が満たされていることを客観的証拠の調査及び提出によって確認すること。」とある。

また、Eurachem Guide(1)ではメソッドバリデーションについて次の様に定義している。

1. 分析法の性能特性と限界を確定するプロセス及びこれらの特性を変化させる影響因子とその程度を同定すること。それがどのマトリックス共存下で、どんな妨害下において、どの分析対象成分を定量できるか？これらの条件においてどの程度の精度と真度が得られるか？
2. 分析法の合目的性を検証するプロセス。つまり特定の分析的問題の解決に使用できることの検証。

[注] 1は分析法が特に問題がなく開発される場合に適用される。2は分析法が特定の目的のために開発される場合に適用される。分析化学において、他にバリデーションという用語が用いられるのは機器使用の場合においてである。機器のバリデーションという用語は、機器がある瞬間その仕様通りに働く能力があることを確かめるプロセスを記述するために使用される。このプロセスは校正又は性能点検などによって達成される。

また、ISO/IEC 17025 では、試験方法の妥当性確認について、以下の様に要求している。

5.4.5 方法の妥当性確認

5.4.5.1 妥当性確認とは、意図する特定の用途に対して個々の要求事項が満たされていることを調査によって確認し、有効な証拠を用意する事である。

5.4.5.2 試験所・校正機関は、規格外の方法、試験所・校正機関が開発した方法、意図された範囲外で使用する規格の方法、及び規格の方法の拡張及び変更について、それらの方法が意図する用途に適する事を確認するために妥当性確認を行うこと。妥当性確認は、当該適用対象又は適用分野のニーズを満たすのに必要な程度まで幅広く行うこと。試験所・校正機関は、得られた結果、妥当性に用いた手順及びその方法が意図する用途に適するか否かの表明をすること。

5.4.5.3 妥当性確認された方法によって得られる値の範囲及び正確さ（例えば、結果の不確かさ、検出限界、選択性、直線性、併行精度及び／又は室間再現精度、頑健性、及び／又は試料・試験対象の母材からの勧奨に対する相関感度）は、意図する用途に対する評価において依頼者のニーズに適すること。

5. メソッドバリデーションの実施

試験法の妥当性確認としては、基本的には公的機関若しくは権威有る機関が呈示した方法に従って行う。これらによる妥当性評価の方法として、試験の分野毎に表-1 に示すように分類される。

表-1 妥当性確認ガイドライン

試験の分野	公的若しくは権威ある機関が設定した妥当性確認のガイドライン	参考となる文献
化学試験	Eurachem Guide (1) NATA Technical Note (2) JIS Z 8402 -1991	Helmut Gunzler : “Accreditation and Quality Assurance in Analytical Chemistry” (3) 島津製作所技術資料 (5) 日立製作所技術資料 (6)
食品試験	AOAC International : “AOAC Official Method Program” AOAC International : “AOAC Peer-Verified Methods Program”	
医薬品分野	薬審第 7 5 5 号 (4)	

化学試験分野の試験法に関する妥当性確認の方法として、Eurachem Guide (1) 或いは NATA Technical Note (2) が審査のガイドラインとして参考となる。JCLA の認定審査においては Eurachem Guide (1) を妥当性確認のガイドラインとして用いる事とする。尚、本参照文書の詳細は添付の資料 (Eurachem Guide の翻訳) に示した。

また、公的試験法の一部を変形して使用する場合、或いはこれを別の試験項目の試験法として使用する場合も含めて、試験法の妥当性確認に必要なパラメータとして表-2 に示すが、ここに示す分析パラメーターの該当するものについて実施することとなる。

表－２　メソッドバリデーションの適用範囲

有用な分析結果を得るために、設定した分析法が適切であるか否か判断する手段として、下記の分析のパラメータを使用してその手順を評価する。

分析パラメータ	定性分析の場合	定量分析 1 (0.1%以上)	定量分析 2 (ppm グレード 以下の測定)
特異性、選択性	+	+	+
正確さ		+	+
真度	－	+	+
精度		+	+
併行精度	－	+	+
室内再現精度	－	+	+
室間再現精度		+	+
検出限界	－＋	－	+
定量限界	－	+	+
直線性	－	+	+
範囲	－	+	+
頑健性・堅牢性	+	+	+

注) 定量分析 1 : 主要成分 (純度分析) 及び少量成分の分析を想定 (%オーダーの含量測定)

定量分析 2 : 微量分析を想定 (ppm グレード以下の測定)

＋ : 通常実施すべき項目

－ : 通常実施する必要の無い項目

6. パラメータ実施手順の例示

詳細な実施手順は、本文書で取りあげた文献類に従う事とし、ここでは概略を紹介する。また、バリデーションは目的に適合させる必要があり、特にマトリックスの影響は考慮されるべきで、理想的にはマトリックスに合わせたものでなければならない。

(1) 特異性／選択性(Specificity/Selectivity)

選択性と特異性という言葉は、しばしば混同されて使用されている。特異性とは他の影響を受けないで特異的に、そのみを測定する方法（1成分のみを検出できる方法の場合）であり、一方、選択性とは、分離されているいないに関らず多くの成分を検出できる方法（即ち、試料中に存在すると思われる夾雑物の影響を受ける事なく正確に目的成分を測定出来る能力）の場合にいう。

化学の分野の試験・分析では、一般的に言って、いろいろな化合物が試験試料に含まれていることが多く、これらの成分混合物の中から、目的とする成分を試験しようとする。試験法として、ある成分や、ある特性のみを特異的に検出して測定する試験もあるが、ガスクロマトグラフや液体クロマトグラフ、分光分析など、多成分を分離し、特定の成分の濃度や特性を測定する試験法が使われることが多く、これらの場合には、選択性が重視される。

たとえば、クロマトグラフの場合は、適当なカラムや、移動相の組成比やカラム温度、検出波長などの分離条件を選ぶことによって、選択性が得られる。一般的には、分析対象成分以外の成分をも含む試料と分析対象物のみの測定結果を比較することにより分析法の選択性を調べることができる。この2つの試料の定量結果の差が、分析結果の誤差となる。

ただし、ブランク測定における共存他成分の影響が実試料でも同じであるとは限らないため、ブランクを差し引いたデータが正確であることを保証できないこともあることに留意が必要である。

選択性をバリデーションする方法は幾つかある。

クロマト分析の場合は、例えば、

- ◎ ブランクの分析クロマトグラムについて分析対象ピークの確認。
- ◎ 検量線の外挿点が原点を大きく外れるか、外れないかによる確認。
- ◎ ピークが単一成分かどうかを分光検出器（使用可能であれば）などで確認するなどにより行う。
- ◎ 不純物が入手可能な時：試料に不純物を添加して定量した結果の分離状態を確認する。
- ◎ 不純物が入手出来ない場合：特性既知（バリデートされた）の別の分析法と比較する。

(2) 精度 (Precision)

分析法の精度とは、同一試料をくり返し分析した時の定量値の一致度をいう。

この精度は、標準試料を連続的に注入して測定する事が出来る。

もっとも一般的な精度の尺度は、併行精度 (repeatability) と室内再現精度 (Intermediate Precision) 及び室間再現精度 (reproducibility) がある。

イ. 併行精度(Repeatability)

短時間に同一条件下で測定した場合の精度のことで、併行条件下、即ち偶然誤差のみに基づく精度を意味する。

分析法の規定する範囲全般に亘って、少なくとも9回(例えば3濃度、3回繰り返し)の繰り返し測定か、規格値の100%濃度で少なくとも6回の繰り返し測定を行い、得られた測定値を統計処理して評価する。

統計処理に必要とされるデータは、標準偏差、相対標準偏差(変動係数)及び信頼区間です。

ロ. 室内再現精度(Intermediate Precision)

同一施設内で、試験日、試験実施者及び装置などを変えて試験したときの精度である。即ち、偶然誤差に加えて、試験室内における変動因子の影響による誤差を伴った精度である。これをどの程度まで確認するかは、その分析法が使用される状況による。変動因子の影響を的確に評価出来るように、実験計画法の利用を勧める。

ハ. 室間再現精度(Reproducibility)

同一の試験項目について、同一の分析法で、異なる試験所で異なる装置を使用して、異なる試験実施者により得られた試験の精度である。

室間再現精度は、複数の作業員、異なった装置の組み合わせに対しても適用される概念であり、これの標準偏差は、併行精度に比べて、通常、2倍から3倍ほど大きくなる。

(3) 直線性(Linearity)

直線性とは、一定の濃度範囲において、分析対象物の濃度(含量)と測定結果が比例関係にあることを示す能力のことである。一定の濃度範囲とは分析能パラメータとして規定した範囲の上下限を含む。

分析対象成分の濃度を関数としてシグナルをプロットしたものを視覚的に観察し、直線関係が認められる時は最小二乗法により回帰分析をして、 $y=ax+b$ の a, b を決定する。直線関係が認められない場合は、適当な関数として表す。直線性の評価には一般には5点以上の濃度点数を用いる。

(4) 検出限界

検出限界とは、分析対象成分の検出可能な最低の量のことである。検出限界を求める手法は分析法が機器分析であるか否かによって異なる。一般的には以下の方法

がある。

イ. 視覚的評価に基づく方法

ロ. シグナル対ノイズに基づく方法

2 : 1 または 3 : 1 が一般に用いられる。

ハ. レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法

$DL=3.3\sigma/a$ (σ : レスポンスの標準偏差、 a : 検量線の傾き)

・ σ の推定 ; ブランクの標準偏差に基づく方法

検量線に基づく方法 ・ 回帰直線の残差の標準偏差または
y 切片の標準偏差

シグナル対ノイズに基づく方法は簡便であり、最も一般的であるがグラジエント溶出法の様にベースラインが変動する場合や近傍に不純物ピークが認められる場合には適していない。 レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法は算出に当たって、多くのデータを必要とするが、どのような場合にも使用できるメリットがある。

(5) 定量限界

定量限界とは、定義に有るように適切な精度と真度を伴って定量出来る、試料中に存在する分析対象成分の最低の量の事である。

検出限界の求め方と同様に、3種類の方法がある。 S/N を用いる場合一般的には $10 : 1$ が用いられる。 また、レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法では、 $QL=10\sigma/a$ が用いられる。

定量限界や検出限界の評価には、何れの方法を用いてもよいが、用いた方法と算出結果を記録として残しておく必要がある。

(6) 頑健性 ・ 堅牢性

堅牢性の検査では、分析結果におよぼす操作上および環境上の条件を調査する。これは、様々な条件の下で同一の試料を分析して得られた試験結果のばらつきの程度を意味する。

堅牢性のある手法とは、典型的な誤操作に対して、あらかじめ安全対策の施されているものことである。様々な取り扱い状態に対処できるよう、様々な技術、設備、条件に対処できるようにしておく。

イ. 試験室間テスト

均質な同一ロットから採取した試料を、操作条件、環境条件が決められた分析条件の範囲内で異なる試験室で、異なる分析者により分析することで判定される。

ロ. 試験室内テスト

試験室内における分析法の堅牢性の調査とは、種々の分析パラメーター、たとえばクロマトグラフィーにおける流量、カラム温度、検出波長、移動相組成などを常識的な範囲内で変化させ、その影響を定量的に把握することある。あるパラメータを変化させた時の影響が、前もって定めてあった許容範囲内であれば、それは堅牢性の範囲

内であると言える。

ハ. 分離カラムの安定性

HPLCの場合で説明すれば、たとえばC18のように、同じ名前を持ったカラム間のカラム性能の差が、クロマトグラムの変動する最も一般的な原因である。カラム間の堅牢性をチェックするために、同一のカラム会社から供給された異なる3つのバッチそれぞれのカラムを少なくとも3本ずつ取り出して、選択性を検査する。別のカラム会社から出ている同じ名前のカラムについても、同様に評価する必要がある。また、長期使用によるカラムの劣化にもクロマトグラム変動の原因がある。同じ材質と、同じサイズのカラムでも、その性能と選択性には差がある。高速液体クロマトグラフィー用カラムについては、下記に示した項目を全て定義、検査することが提案されている。

- ・寸法（長さ、内在、充填剤の粒径、細孔径等）
- ・エンドフィッティングのタイプ（穴フィルター、孔径）
- ・選択性
- ・カラム効率
- ・ピークの非対称性
- ・最大許容圧力

電気泳動の例では、電気浸透流（EOF）の再現性とキャピラリー内での移動度は、キャピラリー内壁との表面電荷に起因する。一定の電気浸透流を得るためのキャピラリーの次のような規定は分析法開発と評価を行うための基本的なステップである。

- ・キャピラリー全長（L）
- ・有効長（I）
- ・内径（id）
- ・電気覆還流の速度（ μ EOF）
- ・エネルギー（電圧、電流、電力）

なお、カラムを実験室で充填する場合は、使用前に検査しなければならない。市販のカラムを購入する場合は、検査保証書を添付してもらう必要がある。