別添２　動物用医薬品等の承認申請資料のためのガイドライン等

目　　次

１　分析法バリデーションに関するテキスト
（１）分析法バリデーション：定義及び用語に関するテキスト（VICH GL1）
（２）分析法バリデーション：方法論に関するテキスト（VICH GL2）
２　動物用医薬品の不純物等に関するガイドライン
２－１　新動物用医薬品の原薬中の不純物（VICH GL10R）
２－２　新動物用医薬品の製剤中の不純物（VICH GL11R）
２－３　不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒（VICH GL18R）
３　規格及び検査方法の設定に関するガイドライン
３－１　新動物用医薬品の原薬及び製剤の規格及び検査方法の設定：化学物質に関するガイドライン（VICH GL39）
３－２　新動物用生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品)の規格及び検査方法の設定（VICH GL40）
４　食用動物に使用する新動物用医薬品の承認に必要となる抗菌剤耐性に関する承認前試験指針（VICH GL27）
５　動物用生物学的製剤の検査法に関するガイドライン
５－１　ホルムアルデヒド定量試験（VICH GL25）
５－２　含湿度試験（VICH GL26）
５－３　マイコプラズマ否定試験（VICH GL34）
５－４　動物用不活化ワクチンの対象動物バッチ安全試験省略要件（VICH GL50）
６　動物用生物学的製剤基準一般試験法の異常毒性否定試験法及び毒性限度確認試験法の取扱いについて
７　動物用生物学的製剤の承認申請に必要となる試験に関するガイドライン
７－１　ワクチン接種対象動物における動物用生ワクチンの病原性復帰否定試験について
７－２　鶏コクシジウム感染症生ワクチン株の薬剤感受性評価指針
８　安定性に関する試験
８－１　動物用新原薬及び製剤の安定性試験（VICH GL3R）
８－２　新剤形動物用医薬品の安定性試験（VICH GL4）
８－３　新動物用医薬品の原薬及び製剤の光安定性試験（VICH GL5）
８－４　動物用飼料添加剤の安定性試験（VICH GL8）
８－５　新動物用生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品)の安定性試験　（VICH GL17）
８－６　動物用医薬品新原薬及び製剤の安定性試験へのブラケッティング法及びマトリキシング法の適用に関するガイドライン（VICH GL45）
８－７　安定性データの統計学的評価に関するガイドライン（VICH GL51）

８－８　安定性に関する試験
９　動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン
９－１　ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験
（１）試験への一般的アプローチ（VICH GL33）
（２）反復投与（90日）毒性試験（VICH GL31）
（３）反復投与（慢性）毒性試験（VICH GL37）
（４）生殖毒性試験（VICH GL22）
（５）発生毒性試験（VICH GL32）
（６）遺伝毒性試験（VICH GL23R）
（７）がん原性試験（VICH GL28R）
（８）微生物学的一日摂取許容量（ADI）設定の一般的アプローチ（VICH GL36）
（９）急性参照用量（ARfD）設定の一般的アプローチ（VICH GL54）
９－２　食用に供する動物を対象としない動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン
（１）急性毒性試験、亜急性毒性試験及び慢性毒性試験
（２）生殖・発生毒性試験
（３）変異原性試験
（４）がん原性試験
10　動物用医薬品のための安全性試験法ガイドライン
10－１　動物用生物学的製剤を除く動物用医薬品の対象動物安全性試験（VICH GL43）
10－２　動物用生及び不活化ワクチンの対象動物安全性試験（VICH GL44）
11　生物学的同等性試験ガイドライン
11－１　後発動物用医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン
11－２　血中濃度を用いた生物学的同等性試験ガイドライン
11－２－１　生物学的同等性：血中濃度を用いた生物学的同等性試験（VICH GL52）
11－２－２　生物学的同等性：血中濃度を用いた生物学的同等性試験（VICH GL52）の統計学的考え方（補足的例示）
11－３　動物用医薬品溶出試験法ガイドライン
12　動物用医薬品の臨床評価に関する一般指針
12－１　動物用抗菌性物質製剤の臨床試験における有効性評価指針
12－２　第一次選択薬による治療が無効であった動物に対する新キノロン系等製剤の臨床試験ガイドライン
12－３　マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症不活化ワクチンの臨床評価ガイドライン
13　駆虫薬有効性評価ガイドライン
13－１　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン（VICH GL7）
13－２　駆虫剤の有効性評価基準：牛ガイドライン（VICH GL12）
13－３　駆虫剤の有効性評価基準：羊ガイドライン（VICH GL13）
13－４　駆虫剤の有効性評価基準：山羊ガイドライン（VICH GL14）

13－５　駆虫剤の有効性評価基準：馬ガイドライン（VICH GL15）
13－６　駆虫剤の有効性評価基準：豚ガイドライン（VICH GL16）
13－７　駆虫剤の有効性評価基準：犬ガイドライン（VICH GL19）
13－８　駆虫剤の有効性評価基準：猫ガイドライン（VICH GL20）
13－９　駆虫剤の有効性評価基準：鶏ガイドライン（VICH GL21）
14　動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン
14－１　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：残留物の定性及び定量のための代謝試験（VICH GL46）
14－２　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：実験動物による比較代謝試験（VICH GL47）
14－３　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：製剤の休薬期間確立のための指標残留減衰試験（その１）（VICH GL48R）
14－４　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：製剤の休薬期間確立のための指標残留減衰試験（その２）
14－５　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：残留試験において使用される分析方法のバリデーション（VICH GL49R）
14－６　動物用医薬品の休薬期間設定のための統計学的解析

15　内因性感染症に適用するワクチンの製造販売承認申請に際して添付すべき資料について
16　水産動物への使用を目的とする動物用医薬品の製造販売承認申請のための各試験の実施細則
17　犬及び猫に使用実績のある人用医薬品を愛玩動物用医薬品として特例で承認申請する場合の添付資料
18　動物用体外診断用医薬品の性能試験及び臨床試験の実施方法等のガイドライン
19　放射線滅菌された動物用医薬品の製造販売承認申請に必要な資料について
20　遺伝子組換え生物等又はそれを使用して製造されるものを成分として含む動物用医薬品の承認申請に必要な資料及び取扱いについて
21　犬及び猫の皮膚滴下剤の使用者等に対するリスク評価のガイドライン
21－１　犬及び猫の皮膚滴下剤の使用者等に対するリスク評価における暴露量の推定のシナリオと計算式の例示
21－２　犬及び猫の皮膚滴下剤の使用者等に対するリスク評価における暴露量の推定に関する具体的な手順の例示

1　分析法バリデーションに関するテキスト

（1）分析法バリデーション：定義及び用語に関するテキスト（VICH GL1）

ア　はじめに

本テキストは、日本、アメリカ合衆国（以下「米国」という。）及び欧州連合（以下「EU」という。）の三極内における動物用医薬品（体外診断用医薬品を除く。以下同じ。）の承認申請に含まれる分析法について、バリデーションを行う際に検討が必要な分析能パラメータについて記載したものである。三極以外の地域における動物用医薬品の承認又はそれらの地域への動物用医薬品の輸出に必要とされる試験には、必ずしも本テキストの適用を求めるものではない。また、本テキストは、用語及び定義集であり、分析法バリデーションを行う方法を示唆するものではない。ここに示した用語及び定義によって、日本、米国及びEUの種々の公式文書や規制の間にしばしば存在する相違が埋められることが期待される。

分析法バリデーションの目的は、動物用医薬品の試験に用いる分析法が、使用される意図にふさわしいことを立証することにある。確認試験、純度試験及び定量法において評価が必要な分析能パラメータは、表にまとめられている。本テキストに上記以外の分析法を追加することについては今後の課題である。

イ　バリデーションを行うべき分析法のタイプ

本テキストでは、通常最もよく行われる次の四つのタイプの試験法に用いられる分析法を対象としている。

①　確認試験
②　純度試験における不純物の定量試験
③　純度試験における不純物の限度試験
④　動物用医薬品原薬若しくは動物用医薬品製剤中の有効成分又は動物用医薬品製剤中の特定成分の定量法

上記以外にも、例えば、動物用医薬品製剤の溶出試験や動物用医薬品原薬の粒子径の測定等のような試験があるが、分析法バリデーションに関する最初のテキストである本テキストではこれらの試験は扱われていない。これらは、本テキストに収められた試験に劣らず重要なものであり、将来考慮の対象となると考えられる。

本テキストで対象としている各タイプの試験法について、その目的などを簡単に次に示す。

①　確認試験は、試料中の分析対象物をその特性に基づいて確認することを目的としている。通常、試料の特性（スペクトル、クロマトグラフィーにおける挙動、化学的反応性等）を標準物質のそれと比較することにより行われる。
②　純度試験は、試料中の不純物の存在の程度を正しく把握することを目的としており、定量試験と限度試験がある。定量試験と限度試験では評価の必要な分析能パラメータが異なる。

③　定量法は、試料中に存在する分析対象物の量を正確に測定することを目的としており、動物用医薬品原薬の場合には主要成分を、また、動物用医薬品製剤の場合には有効成分又は特定成分を定量することを意味する。両者とも評価の必要な分析能パラメータは同じである。

その他の定量的試験法（例えば、溶出試験）に用いられる分析法についても評価が必要な分析能パラメータは同じとして差し支えない。

評価が必要な分析能パラメータを決定するためには、分析法の目的が十分に理解されていなければならない。典型的な分析能パラメータは、次のとおりである。

真度（Accuracy）
精度（Precision）
　併行精度（Repeatability）
　室内再現精度（Intermediate Precision）
特異性（Specificity）
検出限界（Detection Limit）
定量限界（Quantitation Limit）
直線性（Linearity）
範囲（Range）

各分析能パラメータは、「ウ　用語解説」の中で定義されている。それぞれのタイプの試験法に用いられる分析法のバリデーションにとって最も重要な分析能パラメータが表に示されている。この表は、典型的な場合について示したものであり、一律に適用することを求めるものではなく、必要に応じて変更しても差し支えない。

表１には頑健性（Robustness）が記載されていないが、頑健性は、分析法の開発段階で検討する必要がある。

次のような場合には再バリデーションが必要である。

①　動物用医薬品原薬の製造方法を変更する場合
②　動物用医薬品製剤の組成を変更する場合
③　分析法を変更する場合

再バリデーションの方法は、どのような変更を行うかで決められる。上記以外の変更でも再バリデーションが必要な場合もある。

ウ　用語解説

（ア）分析法（Analytical Procedure）

分析法とは、分析を行うために必要な、詳細に記述された一連の手順のことである。手順の中には、例えば次のようなものが挙げられる：試料、試薬及び標準物質の調製法、機器の使用、検量線の作成法、測定値を得るための計算式等

（イ）特異性（Specificity）

特異性とは、共存が予想される不純物、分解物、配合成分等の存在下で、分析対象物を正確に測定できる能力のことである。

個々の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。

各試験法において、特異性とは、次のようなことを意味する。

確認試験：分析対象物を誤りなく確認できる能力

純度試験：試料中の不純物、即ち、類縁物質、重金属、残留溶媒等の含量を正確に示す能力

定量法（含量又は力価）：試料中の分析対象物の含量又は力価を正確に示す能力

（ウ）真度（Accuracy）

分析法の真度は、真値として認証又は合意された値と実測値との間の一致の程度のことである。Truenessともいう。

（エ）精度（Precision）

分析法の精度は、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）のことである。精度には、併行精度、室内再現精度及び室間再現精度の三つのレベルがある。

精度は、信頼できる均質な検体を用いて評価されなければならない。均質な検体が入手困難な場合には、均質とみなせるように調製した検体（訳注：例えば、大量の錠剤を粉砕し均質とみなせるまで混合して調製した検体）又は溶液を用いても差し支えない。

精度は、通常、一連の測定値の分散、標準偏差又は変動係数（相対標準偏差）で表わされる。

① 併行精度（Repeatability）

併行精度とは、短時間の間に同一条件下で測定する場合の精度のことである。Intra-assay precisionともいう。

② 室内再現精度（Intermediate precision）

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のことである。

③ 室間再現精度（Reproducibility）

室間再現精度とは、異なった施設間で測定する場合の精度のことである（通常、分析法を標準化する際の共同研究において評価が必要とされる。）。

（オ）検出限界（Detection Limit）

分析法の検出限界とは、試料中に存在する分析対象物の検出可能な最低の量のことである。ただし、このとき必ずしも定量できる必要はない。

（カ）定量限界（Quantitation Limit）

分析法の定量限界とは、適切な精度と真度を伴って定量できる、試料中に存在する分析対象物の最低の量のことである。定量限界は、試料中に存在する低濃度の物質を定量する場合の分析能パラメータであり、特に、不純物や分解生成物の定量において評価される。

（キ）直線性（Linearity）

分析法の直線性とは、(一定の範囲内で) 試料中の分析対象物の濃度 (量) と直線関係にある測定値を与える能力のことである。

（ク）範囲（Range）

分析法の範囲とは、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折対象物の上限及び下限の濃度（量）の間隔のことである（上限値及び下限値は、範囲に含まれる。）。

（ケ）頑健性（Robustness）

分析法の頑健性とは、分析法の条件を小さい範囲で故意に変動させたときに、測定値が影響を受けにくい能力のことであり、通常の作業状態における分析法の信頼性の指標となる。

（２）分析法バリデーション：方法論に関するテキスト（VICH GL2）

ア　はじめに

本テキストは、分析法のバリデーションを行うときに検討が必要となる分析法の諸特性について記載した「（１）分析法バリデーション：定義及び用語に関するテキスト（以下「基本テキスト」という。）」（VICH　GL1）を補完するものである。このテキストの目的は、個々の分析法に関連する様々な分析法パラメータを検討する方法について、その指針を示すことにある。場合によっては、例えば、特異性を立証するときなどのように、動物用医薬品の原薬又は製剤の品質を保証するために組み合わせた幾つかの分析法について、その総合的な能力を検討することもある。また、このテキストでは、新動物用医薬品の承認申請書の添付資料（以下「添付資料」という。）に記載が必要なデータについても示すこととする。

バリデーションの過程で得られた全ての関連データ及び分析能パラメータを算出するために用いた計算式を添付資料に記載し、適当な考察を加えることが求められる。

このテキストに示すバリデーションの手法とは異なる方法を用いてもよい。対象となる動物用医薬品に最も適したバリデーションの方法とプロトコールを選択することは、承認申請者の責任である。しかしながら、このとき、動物用医薬品の試験に用いる分析法が意図した目的にかなう方法であることを立証するという分析法バリデーションの目的を念頭に置いておくことが重要である。動物用生物学的製剤及びバイオテクノロジー応用動物用医薬品に用いられる分析法に対しては、動物用医薬品の性質が複雑であるために、このテキストに示す手法とは異なる手法が適用されることもある。

バリデーションにおいては、添付の書類に純度が明記されており、十分に特性が明らかな標準物質を用いる必要がある。どの程度の純度の標準物質が必要であるかは、分析法の使用目的による。

このテキストでは、理解しやすいように、基本テキストに合わせて分析能パラメータごとに項目を分けて論じることにする。各項目は、分析法が開発され、評価される過程を考慮して配列されている。

通常、例えば、特異性、直線性、範囲、真度及び精度のような、幾つかの適当な分析能パラメータを同時に検討し、分析法の能力に関する総合的で信頼性の高い情報が得られるような実験計画を組むことができる。

イ　特異性（Specificity）

確認試験、不純物の定量試験及び有効成分の定量法に用いる分析法のバリデーションでは、特異性の検討を行う。特異性を立証するための手法は、分析法が適用される目的に依存するであろう。

ある分析法が特定の分析対象物に対して特異的であり、完璧な識別性を有することを立証することは、必ずしも可能とは限らない。このような場合には、二つ以上の分析法を組み合わせることによって、動物用医薬品の試験に必要な識別能力の水準を達成することが推奨される。

（ア）確認試験（Identification）

確認試験としては、共存する可能性のある構造的に類似した化合物どうしを識別できる方法が適している。分析法の識別能力は、分析対象物を含む試料を用いて（多くの場合には、既知の標準物質についての結果と比較することにより）求めた陽性の結果と分析対象物を含まない試料を用いて求めた陰性の結果とを得、比較することによって確認できる。分析対象物と構造的に類似する物質又は分析対象物に密接に関連する物質に確認試験を適用して、陽性の反応が得られないことを確認してもよい。特異性を検討するときには、分析法を実施する上で起こり得る妨害について考察し、適切な科学的判断に基づいて、上記のような妨害を引き起こす可能性のある物質を選択する必要がある。

（イ）定量法と純度試験

クロマトグラフィーでは､代表的なクロマトグラムを示すことによって、特異性を立証する。クロマトグラムの個々のピークには、識別しやすいように適切な表示を施しておく。他の分離分析法についても、同様の配慮が必要である。

クロマトグラフィーでは、成分が互いに分離されていることを示す分離限界（Critical Separation）について、適当な濃度の試料を用いて検討する。特異性を示すために、互いに最も近接して溶離する二つの成分の分離度を用いて分離限界を表してもよい。

非特異的な定量法が分析対象物のみを定量していることを支持するような他の分析法のデータを添えて、総合的に特異性を立証する。例えば、動物用医薬品原薬の出荷試験で行う定量法に滴定法を採用する場合には、その定量法に適当な純度試験を組み合わせることによって、特異性が証明できよう。

特異性を立証するための手法は、定量法と純度試験とで同じである。

①　不純物を入手できるとき

定量法では、不純物又は医薬品添加物が存在する下で、分析対象物を識別できることを立証する。実際には、動物用医薬品の原薬又は製

剤に適当な濃度の不純物や医薬品添加物を添加したときの定量結果をこれらの物質が添加されていないときに得られる定量結果と比較し、これらの物質が共存していても定量結果が影響されないことを示すことによって特異性を立証できる。

純度試験では、動物用医薬品の原薬又は製剤に適当な濃度の不純物を添加し、これらの不純物が互いに分離していること、又はこれらの不純物が試料中に存在する他の成分から分離していることを示すことによって識別能力を立証できる。

② 不純物が入手できないとき

不純物又は分解生成物の標準品が入手できない場合には、不純物又は分解生成物を含む試料をバリデートしようとする分析法で測定した結果と別の分析能パラメータ既知の分析法で測定した結果とを比較することによって、特異性が立証できることもある。分析能パラメータ既知の分析法とは、例えば、薬局方に記載された方法又はそれ以外の既にバリデートされている分析法のことをいい、バリデートしようとする分析法とは全く別の分析法のことである。必要に応じて、不純物を含む試料として、起こり得る苛酷条件（光、熱、湿度、酸又は塩基加水分解及び酸化）の下でばく露した試料を検討に用いる。

・定量法では、二つの定量結果を比較する。
・純度試験では、不純物プロファイルを比較する。

クロマトグラム上の分析対象物のピークが複数の成分に由来していないことを示すためには、ダイオードアレイや質量分析計などを検出器として用いるクロマトグラフィーのピーク純度試験（ピーク単一性試験）が有用である。

ウ 直線性（Linearity）

「エ 範囲」に示す分析法の範囲の全域にわたって、直線性を確認する必要がある。希釈した標準液の系列を用いて動物用医薬品原薬の濃度に対して直接的に直線性を証明してもよいし、また、動物用医薬品製剤成分の混合物の重量に対して直接的に直線性を証明してもよい。後者は、範囲を検討する際に検討することができる。

シグナルを分析対象物の濃度又は含量の関数としてプロットした図を用いて視覚的に直線性を評価する。直線関係が認められる場合には、最小二乗法による回帰直線の計算などの統計学的手法を用いて測定結果を評価する。分析値と試料濃度との間の直線関係を得るために、回帰分析を行う前に、測定データを数学的に変換する必要があることもある。回帰直線から得られる情報は、直線性の程度を数学的に評価するときに役立つ。

相関係数、ｙ－切片、回帰直線の傾き及び残差平方和を添付資料に記載する。データをプロットした図も添付資料に含める。実測値と回帰直線上の予側値との差を濃度に対してプロットした図を解析することも直線性を評価する上で有用である。

イムノアッセイのような分析法は、いかなる変換を行っても直線性を示さない。このような場合にも、可能な限り、レスポンスを試料中の分析対象物の濃度（量）の適当な関数（理論式又は近似式）で表す。

直線性を立証するときには、少なくとも５水準の濃度を用いる。別の手法を用いるときには、その手法の妥当性の根拠を示す。

エ　範囲（Range）

規定すべき範囲は、通常、直線性を検討することによって導かれ、分析法が適用される目的に依存する。規定する範囲内又は範囲の両端の量の分析対象物を含む試料を用いて分析を行い、分析法の直線性、真度及び精度が容認できる程度であることを確認することによって、範囲を立証する。

規定すべき範囲として、少なくとも次に示す範囲を検討する。

（ア）動物用医薬品の原薬又は製剤の定量法

通常、試験濃度の80～120％

（イ）含量均一性試験

剤形の特性に基づいてもっと広い範囲を規定するのが適当である場合を除いて、試験濃度の少なくとも70～130％

（ウ）溶出試験

規格の全範囲の±20％

例えば、もし、放出制御製剤の規格の限度値が１時間後に20％、24時間後に90％と規定されているならば、バリデートすべき範囲は表示量の０～110％となるであろう。

（エ）不純物の定量試験

不純物の報告の閾値～規格の限度値の120％（不純物の報告の閾値については、「２－１　新動物用医薬品の原薬中の不純物」（VICH GL10R）及び「２－２　新動物用医薬品の製剤中の不純物」（VICH GL11R）を参照。）

作用が異常に強いことが知られている不純物又は毒性や予期せぬ薬理作用を示した不純物については、検出／定量限界は、その不純物が制御されるべき限度に見合っている必要がある（動物用医薬品の開発段階で行われる純度試験において用いられる分析法をバリデートする場合には、予測される限度値の周辺を範囲として検討しておく必要があろう。）。

（オ）有効成分の定量法と純度試験が一つの試験で同時に行われ、有効成分の表示量の100％を含む試料のみが標準として用いられる場合

不純物の報告の閾値～表示量の120％

オ　真度（Accuracy）

真度は、分析法の規定する範囲全域にわたって、立証される必要がある。

（ア）定量法

①　動物用医薬品原薬

真度を決定するために、幾つかの方法が利用できる。

a　真の値が既知の場合

純度既知の分析対象物（例えば、標準物質）に対してバリデー

トしようとする分析法を適用する。

b　真度既知の分析法が存在する場合

バリデートしようとする分析法による結果と真度既知の分析法（イ（イ）参照）による結果とを比較する。

c　真度は、精度、直線性及び特異性を立証することによって、推論できることがある。

② 動物用医薬品製剤

真度を決定するために、幾つかの方法が利用できる。

a　動物用医薬品製剤成分の混合物に分析しようとする動物用医薬品原薬の既知量を添加し、これにバリデートしようとする分析法を適用する。

b　入手するのが不可能な動物用医薬品製剤成分がある場合には、次のいずれの方法を用いても差し支えない。

（a）動物用医薬品製剤に既知量の分析対象物を添加する方法

（b）動物用医薬品製剤をバリデートしようとする分析法で測定した結果と真度既知の分析法（イ（イ）参照）で測定した結果とを比較する方法

c　真度は、精度、直線性及び特異性を立証することによって、推論できることがある。

（イ）不純物（定量試験）

真度は、既知量の不純物を添加した動物用医薬品の原薬又は製剤などの試料を定量することにより評価される。

特定の不純物又は分解生成物を得るのが不可能な場合には、バリデートしようとする分析法による結果を真度既知の分析法（イ（イ）参照）による結果と比較してもよい。動物用医薬品原薬の感度係数（response factor）を用いてもよい。

主要な分析対象物の全てにおいて、例えば、重量百分率による、あるいは面積百分率によるなど、個々の不純物の量又は不純物の総量の決め方を明記しておく必要がある。

（ウ）必要とされるデータ

真度は、規定する範囲を含む最低３濃度について、分析法の全操作を少なくとも９回繰り返して測定（例えば、３濃度について分析法の全操作を各濃度３回ずつ繰り返して測定）した結果から評価される。

真度は、既知量の分析対象物を添加した試料を定量する場合には回収率として表され、一方、真の値又は真の値として認証又は合意された値と比較する場合にはこれらの値と平均値との差として表される。いずれかの形で表した真度及び真度の信頼区間を添付資料に記載する。

カ　精度（Precision）

定量法及び不純物の定量試験のバリデーションを行うときは、精度の検討を行う。

（ア）併行精度（Repeatability）

併行精度は、次のいずれかの方法で評価する。

① 規定する範囲を含む濃度について、分析法の全操作を少なくとも９回繰り返して測定する（例えば、３濃度について分析法の全操作を各濃度３回ずつ繰り返して測定する。）。

② 試験濃度の100％に相当する濃度で、分析法の全操作を少なくとも６回繰り返して測定する。

（イ）室内再現精度（Intermediate precision）

室内再現精度の検討範囲は、分析法が使用される状況に応じて定まる。承認申請者は、分析法の精度に及ぼすランダムな事象の影響を確認する必要がある。検討が必要な代表的な変動要因は、試験日、試験者、装置などである。これらの影響を別々に検討する必要はなく、実験計画法を利用することを奨励する。

（ウ）室間再現精度（Reproducibility）

室間再現精度は、試験室間の共同実験によって評価される。例えば、薬局方に分析法を収載するなど、分析法を標準化する必要が生じた際に室間再現精度の検討が必要となる。室間再現精度に関するデータを添付資料に記載する必要はない。

（エ）必要とされるデータ

添付資料に、各タイプの精度ごとに、標準偏差、相対標準偏差（変動係数）及び標準偏差の信頼区間を記載する。

キ 検出限界（Detection limit）

検出限界を求めるためには幾つかの手法を利用でき、分析法が機器分析であるか否かによって異なる。ここに示す手法とは異なる手法を用いても差し支えない。

（ア）視覚的評価に基づく方法

機器を使わない分析法では、視覚的に評価を行うが、機器分析法についても視覚的に評価を行ってもよい。

検出限界は、既知濃度の分析対象物を含有する試料を分析し、分析対象物が確実に検出できる最低の濃度を確認することによって決められる。

（イ）シグナル対ノイズに基づく方法

この手法は、ベースラインノイズを伴う分析法にのみ適用できる。シグナル対ノイズ比は、分析対象物を既知の低濃度で含有する試料のシグナルをブランク試料のシグナルと比較することによって求めることができる。これを用いて分析対象物が確実に検出できる最低の濃度を求める。検出限界設定には、３～２：１のシグナル対ノイズ比が一般的に許容されている。

（ウ）レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法

検出限界（DL）を次式により決定することもできる。

$DL = 3.3\sigma / S$

ここで、σはレスポンスの標準偏差を、Sは検量線の傾きを表す。

傾きSは、分析対象物（不純物）の検量線から推定できる。標準偏差σについては、種々の推定方法があるが、以下はその例である。

① ブランクの標準偏差に基づく方法

適当な数のブランク試料を分析し、そのレスポンスの標準偏差を計算することによって、分析法のバックグラウンドの標準偏差の大きさを見積もる。

② 検量線に基づく方法

検出限界付近の濃度の分析対象物を含む試料を用いて、検量線を作成する。回帰直線の残差の標準偏差又は回帰直線から推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差を標準偏差σとして利用できる。

（エ）必要とされるデータ

検出限界及びそれを求めるときに用いた方法を添付資料に記載する。視覚的評価又はシグナル対ノイズ比によって検出限界を決定した場合には、その妥当性を示すために、関連するクロマトグラムを提示する。

計算又は外挿によって検出限界の推定値を得た場合には、更に、検出限界の濃度となるように調製した適当な数の試料又は濃度が検出限界付近であることが知られている適当な数の試料について、別途分析を行い、この推定値が妥当であることを示す。

ク 定量限界（Quantitation limit）

定量限界を求めるには幾つかの手法があり、分析法が機器分析であるか否かによって手法が異なる。ここに示す手法とは異なる手法を用いても差し支えない。

（ア）視覚的評価に基づく方法

機器を使わない分析法では、視覚的に評価を行うが、機器分析法についても視覚的に評価を行ってもよい。

定量限界は、既知濃度の分析対象物を含有する試料を分析し、分析対象物が許容できる真度と精度で定量できる最低の濃度を確認することによって決められる。

（イ）シグナル対ノイズに基づく方法

この手法は、ベースラインノイズを伴う分析法にのみ適用できる。シグナル対ノイズ比は、分析対象物を既知の低濃度で含有す試料のシグナルをブランク試料のシグナルと比較することによって求めることができる。これを用いて分析対象物が確実に定量できる最低の濃度を求める。定量限界設定のための標準的なシグナル対ノイズ比は、10：１である。

（ウ）レスポンスの標準偏差と検量線の傾きに基づく方法

定量限界（QL）を次式によって決定することもできる。

$QL = 10\sigma / S$

ここで、σはレスポンスの標準偏差を、Sは検量線の傾きを表す。

傾きSは、分析対象物の検量線から推定できる。標準偏差σについては、種々の推定方法があるが、以下はその例である。

① ブランクの標準偏差に基づく方法

適当な数のブランク試料を分析し、そのレスポンスの標準偏差を計算することによって、分析法のバックグラウンドの標準偏差の大きさを見積もる。

② 検量線に基づく方法

定量限界付近の濃度の分析対象物を含む試料を用いて、検量線を検討する。回帰直線の残差の標準偏差又は回帰直線から推定した濃度ゼロにおけるシグナルの標準偏差を標準偏差σとして利用できる。

（エ）必要とされるデータ

定量限界及びそれを求めるときに用いた方法を添付資料に記載する。

更に、定量限界の濃度となるように調製した適当な数の試料又は濃度が定量限界付近であることが知られている適当な数の試料について、別途分析することによって定量限界が妥当であることを示す。

ケ 頑健性（Robustness）

頑健性は、分析法を開発する段階において検討しておくべきであり、その評価方法は開発しようとする分析法のタイプに依存する。頑健性は、分析条件を故意に変動させたときの分析法の信頼性を表す。

もし、測定値が分析条件の変動の影響を受け易いようであれば、分析条件を適切に制御する方法を考慮するか、あるいは、そのことを分析法の中に注意事項として盛り込む必要がある。頑健性を評価することによってシステム適合性に関する一連のパラメータ（例えば、分離度）を確立することができよう。これらのパラメータを確認することによって、日常の分析において分析法の妥当性が維持されていることを保証できる。

代表的な変動因子は、次のとおりである。

（ア）種々の分析法に共通する変動因子

・試験溶液の安定性
・抽出時間

（イ）液体クロマトグラフィーの代表的な変動因子

・移動相のpHの変動の影響
・移動相の組成の変動の影響
・カラムの変更（異なるロット又は異なる銘柄）
・温度
・流速

（ウ）ガスクロマトグラフィーの代表的な変動因子

・カラムの変更（異なるロット又は異なる銘柄）
・温度
・流速

表１　分析法バリデーションで重要なパラメータ

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ない。
＋　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（用語解説を参照のこと。）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）　評価が必要な場合もある。

２　動物用医薬品の不純物等に関するガイドライン

２－１　新動物用医薬品の原薬中の不純物（VICH GL10R）

（１）はじめに

本ガイドラインは、化学的合成法で製造される新有効成分含有動物用医薬品の原薬（以下、「新原薬」という。）中の不純物の量及びその安全性の確認に関する承認申請に際しての指針を示している。適正な状況、規制又は両方を満たす方法（profile）であれば、代替法も可能である。本ガイドラインは、臨床試験段階で使用する新原薬の規制に適用することを意図したものではない。次に掲げるタイプの原薬は本ガイドラインの対象としない。：生物学的製剤／バイオテクノロジー応用医薬品、ペプチド、オリゴヌクレオチド、放射性医薬品、醗酵生成物、醗酵生成物を原料とした半合成医薬品、生薬（herbal　products）及び動植物由来の医薬品。

新原薬中の不純物は、次の二つの観点から取り扱われる。

化学的観点には、不純物の分類と構造決定、申請資の作成、規格の設定及び分析法の検討が含まれる。

安全性の観点には、安全性試験及び臨床試験に用いた新原薬のロット中に存在しなかったか、あるいはかなり低いレベルでしか存在しなかった不純物の安全性を確認するための指針が含まれる。

（２）不純物の分類

不純物は、次のように分類される：

◎　有機不純物（製造工程に由来する不純物及び原薬の保存中に生成する分解生成物）

◎　無機不純物

◎　残留溶媒

有機不純物は、新原薬の製造工程中や保存中に生じるものであり、構造既知のものもあれば未知のものもあるし、揮発性のものもあれば不揮発性のものもある。次に挙げるものが含まれる。

◎　出発原料

◎　副生成物

◎　中間体

◎　分解生成物

◎　試薬、配位子及び触媒

無機不純物は次に挙げるような、製造工程に由来するものであり、通常構造のよく知られた物質である。

◎　試薬、配位子及び触媒

◎　重金属又は他の残留金属

◎　無機塩類

◎　その他の物質（例えば、ろ過助剤、活性炭等）

溶媒は、新原薬の合成の際に溶液あるいは懸濁液を調整するための媒体として使用される有機又は無機の液体である。通常、その毒性は既知であるので、

これを適正に管理することは容易である。(「２－３　不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒」(VICH GL18))。

新原薬中に本来含まれるはずのない外部からの混入物質で GMP の問題として扱う方がより適切なもの、結晶多形、原薬の対掌体（エナンチオマー）である不純物は本ガイドラインの対象としない。

（３）不純物

ア　有機不純物

新原薬の合成、精製及び保存中に実際に生成するか生成する可能性が高い不純物について承認申請用添付資料（以下「添付資料」という。）に記載する。記載に際しては、合成過程の化学反応、新原薬の不純物プロファイルに影響を与える原料由来の不純物、及び生成する可能性のある分解生成物についての科学的な評価に基づいて要約を行う。化学反応及びその条件に関する知見から存在が予測される不純物について考察すればよい。

更に、新原薬中の不純物を検出するために実施した試験研究の要約を添付資料に記載する。この要約には、開発段階で製造したロット及び実生産を反映した工程で製造されたロットの試験結果、並びに保存中に生じる可能性のある不純物を明らかにするために行われた苛酷試験（「動物用新原薬及び製剤の安定性試験」 3R の結果を含むものとする。開発段階のロットの不純物プロファイルと、実生産を反映した工程で製造されたロットの不純物プロファイルを比較し、その相違について考察する。

新原薬中に別紙１に示す構造決定の必要な閾値を超える（＞）レベルで（例えば、原薬の感度係数を用いて計算した値として）存在する不純物の構造決定について添付資料に記載する。実生産を反映した工程で製造されたロット中に構造決定の必要な閾値を超えて（＞）存在する不純物については、構造決定を行う。安定性試験ガイドラインに記載された保存条件で行われた安定性試験において構造決定の必要な閾値を超えて（＞）認められた分解生成物についても同様に構造決定を行う。構造決定ができなかった不純物については、不成功に終わった研究の要約を添付資料に記載する。構造決定の必要な閾値以下（≦）のレベルの不純物の構造決定を試みた場合には、その結果を記載することも有用である。

見かけ上のレベルが構造決定の必要な閾値以下（≦）の不純物については、通例、構造決定を行う必要はない。しかし、作用が強く、構造決定の必要な閾値以下（≦）のレベルでも毒性又は薬理作用を示すと予測される不純物は、その不純物を分析し得る方法を開発する必要がある。全ての不純物について、後述の記載に従って安全性を確認する。

イ　無機不純物

無機不純物は、通常、日本薬局方等公定書（以下、「薬局方」という）収載の方法又は他の適切な方法で検出され、定量される。新原薬中への触媒の残留については、開発段階で評価する。新原薬の規格中に無機不純物を含めるか含めないかの必要性について考察する。判定基準は、薬局方の基準値又

は既知の安全性データに基づいて設定する。

ウ　残留溶媒

新原薬の製造工程で使用される溶媒の残留の管理について考察

（４）分析法

用いた分析法がバリデートされたものであり、不純物の検出や定量に適切であることを示すデータを添付資料に記載する（「１の（１）分析法バリデーション：定義と用語に関するテキスト」(1 及び「１の（２）分析法バリデーション：方法論に関するテキスト」(2)）。技術的な要因（例えば、製造工程の能力や管理の手法）も、実生産を反映した工程における製造の実績に基づいて妥当性を示すことができる場合には、別紙１と異なる閾値を採用する理由となり得る。閾値を小数第２位までの数値で示しているが、これは必ずしも日常の品質管理に用いられる分析法にこのレベルまでの精度を求めることを意味するものではない。妥当な理由があり、適切なバリデーションがなされている場合には、より精度の低い手法（例えば、薄層クロマトグラフィー）を用いることが可能である。開発段階で用いた分析法と承認申請書記載の分析法とが異なる場合は、その相違点について考察し、記載する。

。

有機不純物の含量は、種々の方法で測定することができるが、その一つとして、ある分析法における不純物のレスポンスを適切な標準物質又は新原薬自身のレスポンスと比較する方法がある。不純物の分析に用いる標準物質には、その使用目的に適し不純物の含量を見積もるために原薬を標準として用いてもよい。不純物の感度係数が原薬の感度係数に近い値を示さない場合であっても、補正係数が適用できるか、あるいは不純物が実際に存在する量よりも多めに見積もられるようであれば、原薬を標準として用いて不純物の含量を見積もってもよい。構造既知又は未知の不純物の判断基準及び分析法では、例えば、感度係数が等しい等の仮定をする場合が少なくないが、その場合にはその仮定の妥当性に関する考察を添付資料に記載する。

（５）ロット中の不純物量の報告

臨床試験、安全性試験及び安定性試験に使用された新原薬の全てのロット及び実生産を反映した工程で製造された代表的なロット中の不純物の分析結果を添付資料に記載する。定量的な試験の結果は数値で記載し、「適合」、「限度値以下」などのような一般的な表記により記載すべきではない。これらのロット中に報告の必要な閾値（別紙１参照）を超える（＞）レベルで認められた全ての不純物について、それぞれの量及びその合計量を用いた分析法とともに報告する。1.0 %未満の場合、結果は小数第２位まで（例えば、0.06 %、0.13 % のように）報告する；1.0 %以上の場合、結果は小数第１位まで（例えば、1.3 % のように）報告する。結果は通常の数値の丸め方のルールにより四捨五入する（別紙２参照)。これらのデータは表形式で示すことが望ましい。不純物は、コード番号あるいは保持時間等の適切な識別名を使って区別する。別紙１の報告の必要な閾値よりも高い閾値を用いる場合には、その妥当性を十分に説明す

る必要がある。報告の必要な閾値を超える（＞）レベルにある全ての不純物の量を合計し、不純物の総量として示す。

開発中に分析法を変更した場合は、試験結果を用いた分析法と関連づけて記載するとともに、用いた分析法が妥当な結果を与えるものであることを説明する。代表的なクロマトグラムを添付資料に添付する（例えば、不純物を添加した試料を用いて。）。不純物の分離能力や検出能力を実証する分析法バリデーションの試験やロットごとに行われる不純物試験で得られた代表的なロットのクロマトグラムは、その原薬の代表的な不純物プロファイルとして用いることができる。申請者は、個々のロットの不純物プロファイル（すなわち、クロマトグラム）を、要求されれば、提出できるようにしておく。

新原薬のどのロットがどの安全性試験や臨床試験に用いられたかを示す対照表を添付資料に記載する。

新原薬の各ロットについて、次に掲げる項目を添付資料に記載する。

◎　ロット番号及びその製造スケール
◎　製造年月日
◎　製造場所
◎　製造工程
◎　不純物含量（個々の不純物の含量及び不純物の総量）
◎　ロットの用途
◎　使用した分析法への参照

（６）規格に設定すべき不純物

新原薬の規格には個別の判断基準を設定する不純物をリストアップする。安定性試験、開発過程での化学的研究、及びロットごとに行われる分析などに基づいて、市販製品中に存在する可能性のある不純物を予測する。新原薬の規格に個別に判定基準を設定する不純物は、実生産工程を反映したロットにおいて認められた不純物に基づいて選択する。これらの個別に判定基準を設定する不純物を、本ガイドラインでは構造既知のものも未知のものも含め、「」という。

各不純物を規格に設定するか否かの判断根拠を示す。この根拠には、安全性試験及び臨床試験に用いられた開発段階のロットの不純物プロファイルについての考察とともに、実生産を反映した工程で製造されたロットの不純物プロファイルについての考察も記載する。別紙１に示す構造決定の必要な閾値を超える（＞）レベルで存在すると見積もられる構造未知の不純物も、構造既知の不純物と同様に個別規格設定不純物として規格に設定する。異常に作用が強いか、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。構造未知の不純物については、不純物の含量を見積もるために用いた分析法及び仮定を明記する。個別規格を設定する構造未知の不純物は、定性的な特性に基づく適切な識別名（例えば、「未知物質Ａ」、「相対保持時間 0.9 の未知物質」等）を用いて記載する。個別規格を設定しない不純物については、その一般的な判定基準を構造決定の必要な閾値（別

紙１）以下（≦）とする。不純物の総量についても判定基準を設定する。

判定基準は、安全性のデータから見て許容されるレベル以下で、かつ、製造工程や分析法の性能により達成できるレベルと相応のレベルに設定する。安全性について懸念がない場合には、不純物の判定基準は、実生産を反映した工程で製造されたロットで得られるデータに基づいて、通常の製造上及び分析上の変動、並びに保存中における変化に対応し得るような幅で設定する。製造工程においても通常一定の変動は起こり得るが、ロット間で不純物の含量にかなり大きな変動が起こる場合には、新原薬の製造工程が適切に管理運用されておらず、バリデートされていない可能性がある（「３－１　新動物用医薬品の原薬及び製剤の規格及び試験方法の設定：化学物質に関するガイドライン」（のフローチャート＃１：新原薬中の不純物の判定基準の設定を参照。）。閾値を小数第２位までの数値で示しているが、これは必ずしも個別規格設定不純物及び不純物総量に関して適否の判定を行う際にこのレベルまでの精度を求めることを意味するものではない。

以上をまとめると、新原薬の規格には、次の項目のうちの該当するものについて判定基準を設定する。

有機不純物

◎　構造既知の個別規格設定不純物

◎　構造未知の個別規格設定不純物

◎　個別規格を設定しない他のあらゆる不純物（それぞれの不純物の判定基準は構造決定の必要な閾値以下（≦）とする）

◎　不純物の総量

残留溶媒

無機不純物

（７）不純物の安全性の確認

安全性の確認とは、規格に設定された限度値のレベルでの個々の不純物又は不純物全体の安全性を立証するために必要なデータを集めて評価する作業のことである。不純物の判定基準の妥当性に関する安全性の側面からの考察を添付資料に記載する。既に安全性試験や臨床試験で十分安全であることが確かめられている新原薬中に存在している全ての不純物については、試験に用いられた試料中に存在するレベルまでは安全性が確認されたものと考えることができる。不純物が動物やヒトでの試験で認められた主要な代謝物と同一である場合についても、一般に安全性が確認されたものと考えることができる。安全性試験や臨床試験に用いられた新原薬のロット中に存在するよりも高いレベルの不純物を含む場合についても、既に行った安全性試験において実際に投与された不純物の量を求めこれに基づいて考察することにより安全性の確認を行うことができる。

ある不純物について、規格に設定しようとする判定基準のレベルにおける安全性を確認できるデータがなく、かつ、その判定基準が別紙１に示す安全性確認の必要な閾値を超える場合には、安全性を確認するための試験を行う必要が

あろう。

医薬品によっては、薬効分類別の薬理作用に関する知識や臨床経験を含む科学的な根拠及び安全性に関する懸念の度合いに基づいて、安全性の確認の必要な閾値をより高くしたり低くしたりするのが適切な場合もある。例えば、安全性の確認の対象となる不純物がある医薬品群又は類似薬効群の医薬品中に含まれていて、これまで動物の副作用に関与したという事実がある場合には、安全性の確認は特に重要であり、安全性の確認の必要な閾値をさらに低くするのが適切である。逆に、同様な考察（例えば投薬の対象となる動物種、薬効分類別の薬理作用に関する知識、臨床経験）から、安全性に関する懸念が通常の医薬品より低い場合には、安全性の確認の必要な閾値はより高くてもよい。技術的な要因（製造工程の性能や管理方法）も上記と異なる閾値を用いる理由となりうる。別紙１と異なる閾値を採用する場合には、その妥当性はケースバイケースで判断される。

「不純物の構造決定及び安全性確認のためのフローチャート」（別紙３）は、不純物の量が別紙１の閾値を超えた場合にその不純物の安全性の確認をどう行うかを示している。場合によっては、不純物の量を閾値以下に減らす方が、安全性データを作成するよりも簡単なこともある。あるいは、不純物の安全性を確認するために十分なデータが科学文献から得られることもある。いずれの方法によっても安全性の確認ができない場合には、安全性試験を追加して行うことを考慮する。不純物の安全性を確認するのにどのような試験が適切かは、投薬の対象となる動物種、一日当たりの投薬量、投与経路及び投与期間等、多くの要因に依存する。試験は、対象とする不純物を含む原薬を用いて行うが、単離した不純物を用いて行ってもよい。

本ガイドラインは、臨床試験段階で使用する新原薬に適用することを意図したものではないが、本ガイドラインに示した閾値は、開発の後期の段階において実生産を反映した工程で製造された原薬ロット中に認められた新たな不純物を評価する上でも有用である。開発の後期の段階において認められた新たな不純物についても、別紙１の構造決定が必要な閾値を超える（＞）レベルのものについては全て構造決定を行う必要がある（別紙３の不純物の構造決定及び安全性確認のためのフローチャート参照）。同様に、新たに認められた不純物のレベルが別紙１の安全性の確認が必要な閾値を超える（＞）場合には安全性の確認を行う必要がある。不純物の安全性を確認するための試験は、通常、代表的なレベルの新たな不純物を含んだロットと既に安全性が確認されたロットとを比較する形で行う。単離した不純物を用いて試験を行ってもよい。

（８）用語の定義

安全性確認の必要な閾値（Qualification Threshold）：不純物量がその値を超えると安全性の確認が必要とされる限度値

安全性の確認（Qualification）：規格に設定された限度値のレベルでの個々の不純物又は不純物全体の安全性を立証するために必要なデータを集めて評価する作業

開発過程での化学的研究（Chemical Development Studies）：新原薬の製造工程をスケールアップ、最適化及びバリデートするために実施される研究

外部からの混入物質（Extraneous Contaminant）：製造工程以外の源から発生する不純物

結晶多形（Polymorphic Forms）：同一の原薬に異なる結晶形が存在すること。溶媒和物あるいは水和物（偽結晶多形とも言われる）及び無晶形も含まれることがある。

構造既知の不純物（Identified Impurity）：構造決定された不純物

構造決定の必要な閾値（Identification Threshold）：不純物がその閾値を超える（＞）と構造決定が必要とされる限度値

構造未知の不純物（Unidentified Impurity）：構造決定されておらず、クロマトグラフィーの相対保持時間のような定性的特性によってのみ特定される不純物

個別規格を設定しない不純物（Unspecified Impurity）：新原薬の規格において、個別の判定基準が設定されず、一般的な判定基準により規制される不純物

個別規格設定不純物（Specified Impurity）： 新原薬の規格において、個別に判定基準が設定されて規制される不純物。個別規格設定不純物には構造既知のものも構造未知のものもある。

試薬（Reagent）：新原薬の製造において使用される、出発原料、中間体又は溶媒以外の物質

新原薬（New Drug Substance）：ある地域又は国において以前に動物用医薬品として承認されたことがない動物の医療用の物質（new molecular entity 又は new chemical entity ともいう。）。以前に承認された原薬の錯体、簡単なエステル体又は塩類であることもある。

出発原料（Starting Material）：新原薬の合成に使用され、中間体や原薬の構造に組み込まれる物質。出発原料は、通例、市販されており、化学的及び物理的性質及び構造が明らかなものである。

生薬（Herbal Products）：有効成分として、植物原料や植物性医薬品製剤のみを含む医薬品。伝統的に、無機物又は動物由来のものを含む場合もある。

存在する可能性のある不純物（Potential Impurity）：理論的に考えて、原薬の合成中あるいは保存中に生成する可能性のある不純物。これらは、新原薬中に実際に現れることもあるし、現れないこともある。

原薬の対掌体である不純物（Enantiomeric Impulity）：原薬と同じ分子式であるが、分子内の原子の立体配置が異なり、重なることのない鏡像体である化合物

中間体（Intermediate）：新原薬の合成過程で生成し、更に化学変化を起こして新原薬になる物質

配位子（Ligand）：金属イオンに強い親和性のある化学物質

不純物（Impurity）：新原薬中に含まれる新医薬品として定義された化合物

以外の成分

不純物プロファイル（Impurity　Profile）：新原薬中に存在する構造既知又は未知の不純物の全体像

分解生成物（Degradation　Product）：原薬の製造中あるいは保存中に、例えば光、温度、pH 又は水などの作用により化学変化を起こして生成した不純物

報告の必要な閾値（Reporting　Threshold）：不純物量がその値を超えると報告が必要とされる限度値。Reporting threshold は、VICH GL ２における reporting level と同じ意味をもつ用語である。

溶媒（Solvent）：新原薬の合成過程において、溶液又は懸濁液の調製のために使用される無機又は有機の液体

別紙１

新原薬中に含まれる不純物の閾値の要約

構造決定が必要とされる閾値[2)]	ICH と同じ*
	0.20 %**
報告が必要とされる閾値[1),2)]	ICH と同じ*
	0.10 %**
安全性の確認が必要とされる閾値[2)]	0.50 %

*　動物と人に用いられる医薬品の新原薬

**　動物にのみ用いられる医薬品の新原薬

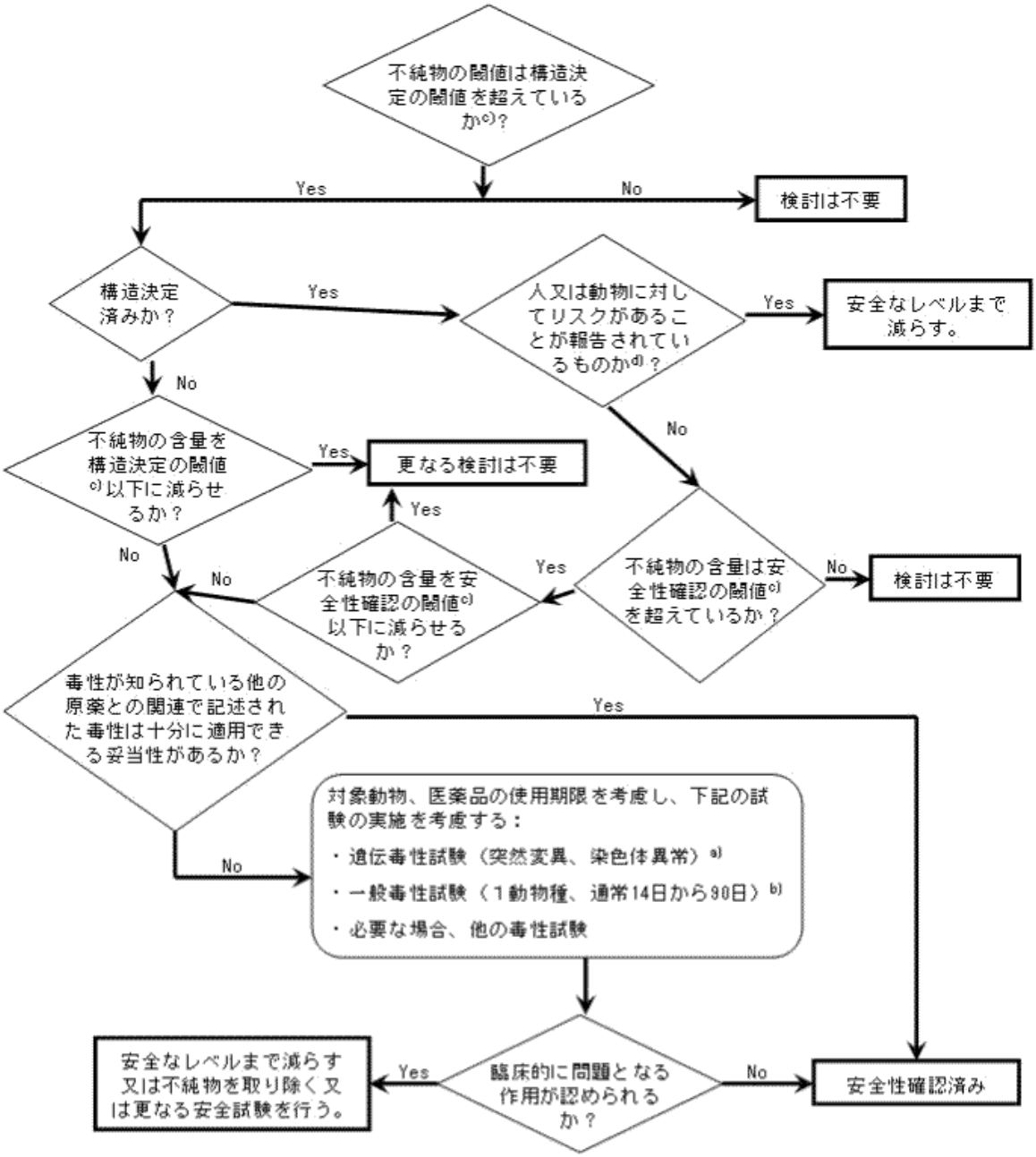
これらの閾値は人用医薬品の新原薬には適用されない。

別紙２：添付資料において構造決定及び安全性確認が必要かどうかを判断するために不純物量をどのように報告したかを示した例（動物用医薬品のみのための原薬（別紙１参照）；人用医薬品及び動物用医薬品のための原薬は対応するICHガイドラインも参照）

"生"データ（%）	報告データ（%）	判　　定	
		構造決定（閾値：0.20 %）	安全性の確認（閾値：0.5 %）
0.166	0.17	不要	不要
0.1963	0.20	不要	不要
0.22	0.22 *	要	不要
0.649	0.65 *	要	要*

＊　構造決定後に、その不純物の感度係数を求めたとき、その値が仮定した値とかなり違っている場合には、実際に存在する不純物の量を求め直し、安全性の確認が必要かどうかの判断をやり直すのが適切と考えられる（別紙１参照）。

別紙３　不純物の構造決定及び安全性確認のためのフローチャート



別紙３の注

ａ）必要に応じ、最小限のスクリーニング試験（例えば、遺伝毒性のための試験）を実施する。突然変異を検出する試験及び染色体異常を検出する試験は、いずれも *in vitro* の試験であるが、最小限のスクリーニング試験として差し支えない。

ｂ）一般毒性試験を実施する場合には、安全性未確認のものと安全性の確認済みのものの比較ができるような一つあるいはそれ以上の試験の計画を立てる。試験期間は入手できる関連情報に基づいて決定し、分解生成物の毒性を最も検出

しやすいと考えられる動物種で試験を実施する。ケースバイケースではあるが、特に単回投与医薬品の試験を行う場合には、単回投与試験も許容されよう。通例、最短 14 日間、最長 90 日間の試験期間が適切と考えられる。

c）毒性の非常に強い不純物については、これよりも低い閾値が適当な場合もある。

d）例えば、この不純物は、既知の安全性データあるいは化学構造から見て存在する濃度ではヒトや動物への安全性が懸念されることのないようなものかどうかを調べる。

２－２　新動物用医薬品の製剤中の不純物（VICH GL11R）

（１）はじめに

ア　ガイドラインの目的

本ガイドラインは、新有効成分含有動物用医薬品のうち、化学的合成法により製造される原薬（以下「新原薬」という。）を用いて製造される動物用医薬品の製剤（以下「新動物用医薬品製剤」という。）中の不純物の量及びその安全性の確認に関する承認申請に際しての指針を示している。適正な状況、規制又は両方の要件を満たす方法（profile）であれば、代替法も可能である。

イ　背景

本ガイドラインは、「２－１　新動物用医薬品の原薬中の不純物」（VICH GL10R）をものであり、基本的な考え方に関してはガイドラインを参照すること。必要に応じて、「２－３　不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒」（VICH GL18）も参照すること。

ウ　ガイドラインの適用範囲

本ガイドラインは、動物用医薬品製剤中の不純物のうち原薬の分解生成物又は有効成分と医薬品添加物若しくは直接容器／施栓系との反応による生成物（以下、両者を合わせて「分解生成物」という。）のみを対象としている。新原薬中に存在する不純物は、その不純物が分解生成物でなければ本ガイドラインの対象として個別規格を設定する必要はない（「３－１　新動物用原薬及び製剤の規格及び試験方法の設定：化学物質に関するガイドライン」（VICH GL39））。

新動物用医薬品製剤中に認められる医薬品添加物由来の不純物、あるいは容器／施栓系から溶出する不純物については、本ガイドラインの対象とはしない。また、本ガイドラインは、臨床試験段階で使用する新動物用医薬品製剤に適用することを意図したものではない。以下に挙げるタイプの製剤も本ガイドラインの対象としない：生物学的製剤、バイオテクノロジー応用医薬品、ペプチド、オリゴヌクレオチド、放射性医薬品、醗酵生成物、醗酵生成物を原料とした半合成医薬品、生薬及び動植物由来の医薬品。更に、①新動物用医薬品製剤中に本来含まれるはずのない外部からの混入物質で GMP の問題として扱う方がより適切なもの、②結晶多形及び③原薬の対掌体（エナンチオマー）である不純物も本ガイドラインの対象としない。

（２）分解生成物管理の根拠となるデータの記載

動物用製剤の製造中あるいは安定性試験中に認められた分解生成物に関する要約を添付資料に記載する。記載に際しては、動物用医薬品製剤中での原薬の推定される分解経路及び医薬品添加物や直接容器／施栓系との相互作用から生じる不純物についての科学的な評価に基づいて要約を行う。更に、動物用医薬品製剤中の分解生成物を検出するために実施した試験研究の要約を添付資料に記載する。この要約には、開発段階で製造されたロット及び実生産を反映した工程で製造された代表的ロットの試験結果を含むものとする。分解生成物でな

い不純物、例えば、原薬に由来する不純物並びに医薬品添加物に起因する不純物をこの報告の対象から除外する場合は、その根拠を記載する。開発段階のロットの不純物プロファイルと実生産を反映した工程で製造された代表的ロットのプロファイルとを比較し、それらの相違について考察する。

承認申請書に貯蔵方法として記載される保存条件で行われた安定性試験において認められた分解生成物が、別紙１に示す 1.0 %の構造決定が必要な閾値を超えて（>）存在する場合は、その構造決定を行う。構造決定ができなかった分解生成物については、不成功に終わった研究の要約を添付資料に記載する。

構造決定が必要な 1.0 %の閾値のレベルの分解生成物については、通例、構造決定する必要はない。しかしながら、作用が異常に強く、別紙１に示された 1.0 %の閾値のレベルでも毒性又は薬理作用を示すことが懸念される分解生成物については、その分解生成物を分析し得る方法を開発する必要がある。技術的な要因（例えば、製造能力の高さ、医薬品添加物に対する原薬の比率が低い場合、又は動物若しくは植物基原の未精製の物質を医薬品添加物として使用している場合）も、実生産を反映した工程での製造の経験を基にして別紙１と異なる閾値を選択する理由となりうる。

（３）分析法

承認申請書に記載する分析法がバリデートされたものであり、分解生成物の検出や定量に適切であることを示すデータを添付資料に記載する（「１の（１）分析法バリデーション：定義と用語に関するテキスト」及び「１の（２）分析法バリデーション：方法論に関するテキスト」(12) を参照のこと。）。分析法のバリデーションにおいては、特に、分解生成物を、個別規格を設定するものも個別規格を設定しないものも、特異的に分析できることを示す必要がある。このバリデーションには、光、熱、湿度、酸／塩基による加水分解及び酸化のうち、その製剤に適切な苛酷条件に曝した試料を用いる。分析の結果、分解生成物のピーク以外にもピーク（例えば、原薬、原薬の合成の際に生じた不純物、医薬品添加物とそれに由来する不純物のピーク）が認められたときには、クロマトグラム中においてそのピークに識別名を付けるとともに、添付資料の分析法バリデーションに関する記載の中でその由来について考察する必要がある。

分析法の定量限界は、報告の必要な閾値以下（≦）である必要がある（別紙１参照）。

（４）ロット中のの報告

臨床試験、安全性試験及び安定性試験に使用された新動物用製剤の関連する全てのロット及び実生産工程を反映した代表的なロットについての分析結果を添付資料に記載する。定量的な試験の結果は数値で記載し、「適合」、「限度値以下」などのような一般的な表記により記載すべきではない。これらのロット中に報告の必要な 0.3 %の閾値（別紙１参照）を超える（>）レベルで認められた全ての分解生成物について、それぞれの量及びその総量を、用いた分析法とともに報告する。結果は通常の数値の丸め方の ルールにより四捨五入する。これらのデータは表形式で示すことが望ましい。分解生成物は、コード番号あ

るいは保持時間等の適切な識別名を使って区別する。別紙１の報告の必要な閾値よりも高い閾値を用いる場合には､その妥当性を十分に説明する必要がある。報告の必要な 0.3 ％の閾値を超える（＞）レベルにある全ての分解生成物の量を合計し、分解生成物総量として示す。

各ピークに識別名を付けた代表的なロットのクロマトグラム（クロマトグラフィー以外の分析法が用いられた場合には、これと同等のデータ）を分析法バリデーションを行った際の試験や長期保存試験及び加速試験のクロマトグラムとともに、添付資料に記載する。申請者は、個々のロットの分解生成物プロファイル（例えば、クロマトグラム）を、要求されれば、提出できるようにしておく。

添付資料で取り上げた新動物用医薬品製剤の各ロットについて、次に掲げる項目を記載する。

ア　ロット番号、有効成分の配合量及び製造スケール
イ　製造年月日
ウ　製造場所
工　製造工程
オ　直接容器／施栓系
カ　分解生成物含量（個々の分解生成物含量及び分解生成物の総量）
キ　ロットの用途（例えば、臨床試験、安定性試験）
ク　使用した分析法への参照
ケ　新動物用製剤の製造に用いた原薬のロット番号
コ　安定性試験の保存条件

（５）規格に設定すべき分解生成物

新動物用製剤の規格には、市販製品の製造中及び承認申請書に貯蔵方法として記載された保存条件において生成すると考えられる分解生成物をリストアップする。安定性試験、分解経路に関する知見、製剤の開発研究及びロット分析の結果などに基づいて、分解生成物のプロファイルを明らかにする。新動物用医薬品製剤の規格に個別に判定基準を設定する分解生成物は、実生産を反映した工程で製造されたロットにおいて認められた分解生成物に基づいて選択する。これらの個別に判定基準を設定する分解生成物を、本ガイドラインでは構造既知のものも未知のものも含め、「個別規格設定分解生成物」という。各分解生成物に個別規格を設定するか否かの判断根拠を示す。この根拠には、安全性試験及び臨床試験に用いられた開発段階のロット並びに安定性試験において認められた分解生成物プロファイルに関する考察とともに、実生産を反映した工程で製造されたロットの分解生成物プロファイルに関する考察も記載する。別紙１に示す構造決定の必要な 1.0 ％の閾値を超える（＞）レベルで存在すると見積もられる構造未知の分解生成物も、構造既知の分解生成物と同様に、個別規格設定分解生成物として規格に設定する。作用が異常に強いか、あるいは毒性又は予期せぬ薬理作用のあることが知られている分解生成物については、その分解生成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。構造未知の分解生成物については、分解生成物の含量を見積もるためにどのような分析法を用いたか、また、どのような仮定を置いたかを明確に示す。個別規格を設定する構造未知の分解生成物は、定性的な特性に基づく適切な識別名（例えば、「未知物質Ａ」、「相対保持時間 0.9 の未知物質」等）を用いて記載する。個別規格を設定しない分解生成物については、その一般的な判定基準を構造決定の必要な 1.0 ％の閾値（別紙１）以下（≦）とする。分解生成物の総量についても判定基準を設定する。分解生成物の判定基準は、原薬中における当該物質の判定基準（該当する場合）、安全性が確認されたレベル、安定性試験中における増加量、並びに新動物用製剤の承認申請において設定しようとしている保存条件及び有効期間を考慮に入れて設定する。また、各判定基準はその分解生成物に関して安全性が確認されたレベルよりも高く設定することがあってはならない。安全性について懸念がない場合には、分解生成物の判定基準は、実生産を反映した工程で製造された新動物用製剤のロットについて得られるデータに基づいて、通常の製造上及び分析上の変動、並びに保存中における変化に対応し得るような幅で設定する。製造工程においても、通常、一定の変動は起こり得るが、ロット間で分解生成物の含量にかなり大きな変動が起こる場合には、新動物用製剤の製造工程が適切に管理運用されておらず、バリデートされていない可能性がある（３－１　新動物用医薬品の原薬及び製剤の規格及び試験方法の設定：化学物質に関するガイドライン () の“フローチャート＃２：新製剤中の分解生成物の判定基準の設定”を参照のこと。）。

以上をまとめると、新動物用製剤の規格には、次に掲げる項目のうちの該当するものについて判定基準を設定する。

◎　構造既知の各個別規格設定分解生成物

◎　構造未知の各個別規格設定分解生成物

◎　個別規格を設定しない他のあらゆる分解生成物（それぞれの分解生成物の判定基準は構造決定の必要な 1.0 ％（別紙１参照）の閾値以下（≦）とする。）

◎　分解生成物の総量

（６）分解生成物の安全性の確認

安全性の確認とは、規格に設定された限度値のレベルでの個々の分解生成物又は分解生成物全体の安全性を立証するために必要なデータを集めて評価する作業のことである。設定した分解生成物の判定基準の妥当性について、安全性の側面からの考察を含めて、添付資料に記載する。既に安全性試験や臨床試験で十分安全であることが確かめられている新動物用医薬品製剤に関しては、その中に存在している全ての分解生成物について、試験に用いられた試料中に存在するレベルまでは安全性が確認されたものと考えることができる。このため、安全性試験や臨床試験に用いられた時点における当該ロット中の分解生成物の実際の含量に関する情報が得られているような場合には、その情報を添付資料に記載することは分解生成物の安全性を確認する上で有用である。分解生成物

が､動物やヒトの試験で認められた主要な代謝物と同一である場合についても、一般に安全性安全性試験や臨床試験に用いられた新動物用医薬品製剤のロット中に存在するよりも高いレベルの分解生成物を含む場合についても、その安全性試験において実際に投与された分解生成物の量と新動物用製剤の規定された用量において実際に投与される分解生成物の量との比較に基づいて考察することにより、安全性を確認することが可能である。そうした高いレベルの分解生成物を含んでいても問題がないことを論証する際には、次のような諸要因を踏まえて考察を行う必要がある：①既に行われた安全性試験や臨床試験で投与され、安全であることが確かめられている分解生成物の量；②分解生成物の増加量；及び③その他の安全性に関連する要因（該当する場合)。その判定基準が別紙１に示す安全性確認の必要な 1.0 %の閾値を超えているにもかかわらず、規格に設定しようとする判定基準のレベルにおける安全性を確認できるデータがない場合には、安全性を確認するための追加の試験を行う必要があろう（別紙参照)。動物用医薬品製剤によっては、薬効分類別の薬理作用に関する知識や臨床経験を含む科学的な根拠及び安全性に関する懸念の度合いに基づいて、安全性の確認の必要な閾値をより高くしたり低くしたりするのが適切な場合もある。例えば、安全性確認の対象となる分解生成物が、ある動物用医薬品群あるいは類似薬効群の製剤中に含まれていて、これまでに動物あるいは人に副作用を引き起こしたことがある場合には、安全性の確認は特に重要であり、安全性の確認の必要な閾値をより低くするのが適切である。逆に、同様な考察（例えば、投薬の対象となる動物種、薬効分類別の薬理作用に関する知識、及び臨床経験）から安全性に関する懸念が通常の医薬品より低い場合には、安全性確認の必要な閾値はより高くてもよい。異なる閾値が用いられる場合には、その妥当性はケースバイケースで判断される。

「分解生成物の構造決定及び安全性確認のためのフローチャート」（別紙２）は、分解生成物の量が別紙１の閾値以上の場合に、その分解生成物の安全性の確認をどう行うかを示している。場合によっては、分解生成物の量を閾値以下（≦）に減らすこと（例えば、より保護的な容器／施栓系を用いる、あるいは保存条件を変更することによって）の方が、安全性データを作成するよりも簡単なこともある。あるいは、分解生成物の安全性を確認するために十分なデータが科学文献から得られることもある。分解生成物の安全性を確認するのにどのような試験が適切かは、投薬の対象となる動物種、一日当たりの投薬量、投与経路及び投与期間など、多くの要因に依存する。試験は、通常、対象となる分解生成物を含む新動物用医薬品製剤（あるいは新動物用医薬品原薬）を用いて行うが、単離した分解生成物を用いて行うのが適切な場合もある。

本ガイドラインは、臨床試験段階で使用する新動物用製剤に適用することを意図したものではないが、本ガイドラインに示した閾値は、開発の後期の段階において実生産を反映した工程で製造された新製剤のロット中に認められた新たな分解生成物を評価する上でも有用である。開発の後期の段階において認められた新たな分解生成物についても、別紙１の構造決定が必要な 1.0 %の閾値

を超える（＞）レベルのものについては全て構造決定を行う必要がある（別紙の「分解生成物の構造決定及び安全性確認のためのフローチャート」を参照のこと）。同様に、新たに認められた分解生成物のレベルが別紙１の安全性の確認が必要な 1.0 %の閾値を超える（＞）場合には安全性の確認を行う必要がある。

分解生成物の安全性を確認するための試験は、通常、代表的なレベルの新たな分解生成物を含んだ新動物用製剤（あるいは新原薬）のロットと既に安全性が確認されたロットとを比較する形で行う。単離した分解生成物を用いて試験を行ってもよい。

（７）用語の定義

安全性確認の必要な閾値（Qualification Threshold）： 分解生成物の量がその値を超える（＞）と安全性の確認が必要とされる限度値

安全性の確認（Qualification）：規格に設定された限度値のレベルでの個々の分解生成物又は分解生成物全体の安全性を立証するために必要なデータを集めて評価する作業

構造既知の分解生成物（Identified Degradation Product）： 構造決定された分解生成物

構造決定の必要な閾値（Identification Threshold）： 分解生成物の量がその値を超える（＞）と構造の決定が必要とされる限度値

構造未知の分解生成物（Unidentified Degradation Product）：構造決定できず、クロマトグラフィーの相対保持時間のような定性的特性によってのみ特定される分解生成物

個別規格を設定しない分解生成物（Unspecified Degradation Product）：新動物用医薬品製剤の規格において、独自の判定基準が設定されて個別にリストアップされるのではなく、一般的な判定基準により規制される分解生成物

個別規格設定分解生成物（Specified Degradation Product）：新動物用医薬品製剤の規格において､独自の判定基準が設定されて個別にリストアップされ､規制される分解生成物。規格設定分解生成物には、構造が既知のものも、未知のものもある。

新原薬（New Drug Substance）：ある地域又は国において以前に動物用医薬品として承認されたことがない動物の医療用の物質。new molecular entity 又は new chemical entity ともいう。以前に承認された原薬の錯体、簡単なエステル体又は塩類であることもある。

新製剤の関発研究（Development Studies）：動物用医薬品製剤の製造工程をスケールアップし、最適化し、バリデートするために行われる研究

不純物（Impurity）：新動物用医薬品製剤に含まれる物質のうち、原薬又は医薬品添加物以外の成分

不純物プロファイル（Impurity Profile）：動物用医薬品製剤中に存在する構造既知又は未知の不純物の全体像

分解生成物（Degradation Product）：光、熱、pH 及び水の作用により、ある

いは添加物や直接容器／施栓系との反応により、新動物用医薬品製剤の製造中あるいは保存中に原薬が化学変化を起こして精製した不純物

分解生成物のプロファイル（Degradation　Profile）：原薬又は動物用医薬品製剤中に認められる分解生成物の全体像

報告の必要な閾値（Reporting　Threshold）：　分解生成物の量がその値を超える（＞）と報告が必要とされる限度値

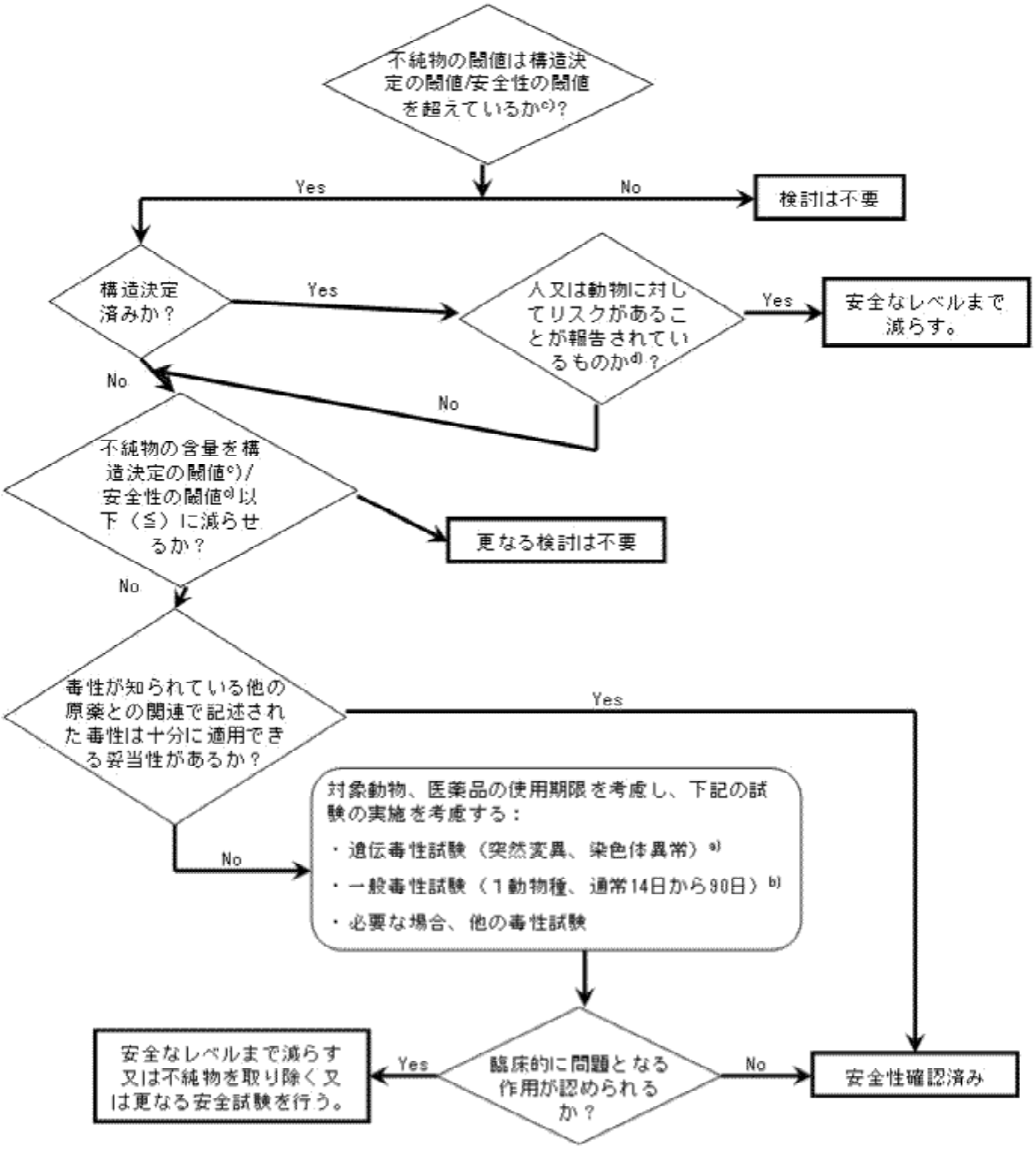
別紙１

新動物用医薬品製剤中の分解生成物の閾値

構造決定が必要とされる閾値[1]	1.0 %
報告が必要とされる閾値[1]	0.3 %
安全性の確認が必要とされる閾値[1]	1.0 %

注１：これより高い閾値を用いる場合は、その科学的妥当性を示すこと。

別紙２　不純物の構造決定及び安全性確認のためのフローチャート



別紙２の注

ａ）必要に応じ、最小限のスクリーニング試験（例えば、遺伝毒性のための試験）を実施する。突然変異を検出する試験及び染色体異常を検出する試験は、いずれも *in vitro* の試験であるが、最小限のスクリーニング試験として差し支えない。

ｂ）一般毒性試験を実施する場合には、安全性未確認のものと安全性の確認済みのものの比較ができるような一つあるいはそれ以上の試験の計画を立てる。試験期間は入手できる関連情報に基づいて決定し、分解生成物の毒性を最も検出しやすいと考えられる動物種で試験を実施する。ケースバイケースではあるが、

特に単回投与医薬品の試験を行う場合には、単回投与試験も許容されよう。通例、最短 14 日間、最長 90 日間の試験期間が適切と考えられる。

c）毒性の非常に強い不純物については、これよりも低い閾値が適当な場合もある。

d）例えば、この不純物は、既知の安全性データあるいは化学構造から見て存在する濃度ではヒト又は動物への安全性が懸念されることのないようなものかどうかを調べる。

２－３　不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒（VICH GL18R）

（１）序文

本ガイドラインの目的は、対象動物の安全と同じように食品生産動物由来の生産物中の残留物の安全のために医薬品中の残留溶媒の許容量を勧告することにある。本ガイドラインは、低毒性溶媒の使用を推奨し、毒性学上許容できると考えられる残留溶媒の限度値を記述するものである。

医薬品中の残留溶媒は、原薬又は添加剤の製造若しくは製剤の製造において使用又は生成される揮発性有機化学物質、と定義付けられる。それらの溶媒は、実生産工程で用いられている技術では完全に除去されない。原薬の製造において適切な溶媒を選定することにより、収率の向上又は結晶形、純度、溶解性といった物性の決定が成され得る。したがって、溶媒は、時として製造工程における決定的なパラメータであるといえる。本ガイドラインは、添加剤として用いられる溶媒及び溶媒和物は対象としない。しかし、そのような製剤では、製剤中の溶媒の含量を、評価し、正当化すべきである。

残留溶媒から治療上の恩恵を受けることは全くないため、すべての残留溶媒は、製品規格や GMP 又は他の品質上の要求に適合するよう、可能な限り除去すべきである。製剤中においては、安全性データによって保証されるレベルよりも高いレベルの残留溶媒を含んではならない。許容できない種類の毒性を引き起こすことが知られている幾つかの溶媒（クラス１、表１）は、リスクーベネフィットの観点から評価し、強く正当化されない限り、原薬、添加剤又は製剤の製造においては使用を避けるべきである。あまり重篤でない毒性に関係する溶媒（クラス２、表２）については、潜在する副作用から対象動物及び消費者を守るために制限すべきである。理想的には、低毒性溶媒（クラス３、表３）をできるだけ用いるべきである。本ガイドラインに含まれる全ての溶媒のリストを付属書１に示す。

このリストは、完全なものではなく、これ以外の溶媒を使用することは可能であり、後で本リストに追加されることもあり得る。クラス１及び２に属する溶媒の勧告限度値あるいは溶媒のクラス分けについては、新しい安全性データの入手に伴い変更の可能性もあり得る。新しい溶媒を含む新製剤の申請における安全性のサポーティングデータは、本ガイドライン又は原薬ガイドライン（「２－１　新動物用医薬品の原薬中の不純物」（VICH GL10R））、製剤ガイドライン（「２－２　新動物用医薬品の製剤中の不純物」（VICH GL11R））、あるいはそれら３ガイドライン全てに表現されている不純物の安全性の確認に関する概念に基づくものである。

（２）ガイドラインの範囲

原薬、添加剤及び製剤中の残留溶媒は、本ガイドラインの範囲に含まれる。したがって、製造又は精製工程においてそれらの溶媒が結果として含有され得る場合には、残留溶媒の試験を行うべきである。原薬、添加剤若しくは製剤の製造又は精製で使用された又は生じた溶媒のみの試験が必要である。医薬品メ

ーカーは、製剤での試験を選択してもよいが、製剤の製造に用いた各成分中の値から製剤中の残留溶媒レベルを累積的に計算する方法を用いることもできる。もし計算値が本ガイドラインで勧告した値以下の場合には製剤中の残留溶媒の試験は一切考慮する必要はない。しかしながら、もし計算値が勧告値を超える場合には、溶媒のレベルが製剤工程で許容量以下に減少したかどうかを確認するために、製剤の試験を行うべきである。また溶媒が、製剤の製造中に用いられている場合にも試験を行わなければならない。

本ガイドラインは、新原薬、新添加剤又は新製剤として開発中のもので、臨床研究段階で使用されるものには適用しない。既存の製剤にも適用しない。

本ガイドラインは、すべての剤形及び投与経路に適用される。短期間投与（30日以下）あるいは局所投与のような一定のケースでは、より高い残留溶媒のレベルが許容され得る。これらのレベルの正当性は、ケースバイケースで判断されるべきである。

残留溶媒に関するその他の背景・情報を付属書２に示す。

（３）一般原則

ア　リスクアセスメントによる残留溶媒の分類

〝耐容一日摂取量〟 tolerable daily intake（TDI）という用語は国際化学物質安全性計画（IPCS）において毒性化学物質のばく露限度値を表すために用いられており、また〝一日摂取許容量〟 acceptable daily intake（ADI）は、世界保健機関（WHO）及び他の各国及び国際的な保健担当部局並びに関連団体などによって用いられている。新しい用語である〝一日ばく露許容量〟 permitted daily exposure（PDE）は、同じ物質であるにもかかわらず ADI 値が異なるというような混乱を避けるため、本ガイドラインにおいて残留溶媒の医薬上の摂取許容量を表現するものとして定義されている。

本ガイドラインにおいて評価された残留溶媒の一般名と構造式を付属書１に列挙する。これらの溶媒はヒトの健康に対して起こりうるリスクの評価を行った上で、以下の様に三つのクラスのいずれかにあてはめた。

クラス１溶媒：避けるべき溶媒

ヒトにおける発がん性が知られているもの、ヒトにおける発がん性が強く疑われるもの、及び環境有害物質。

クラス２溶媒：制限すべき溶媒

遺伝毒性は示さないが動物実験で発がん性を示した物質、又は神経毒性や催奇形性など他の不可逆的毒性の原因となる可能性を有する物質。

他の重大ではあるが可逆的である毒性の疑われる溶媒。

クラス３溶媒：低毒性溶媒

ヒトに対して低毒性であると考えられる溶媒：健康上の理由からはばく露限度値を設定する必要のないもの。クラス３溶媒は一日当たり 50mg 以上の PDE 値を有する。

イ　ばく露限度値の設定法

残留溶媒の一日ばく露許容量の評価に用いられる方法は、付属書３に示されている。限度値の評価に用いられた毒性データの要約は、Pharmeuropa、Vol.9、No.1、Supplement、April 1997 及び不純物についての ICH ガイドライン：医薬品の残留溶媒ガイドライン（Q3C(R4))の Part Ⅱ及び Part Ⅲで公表されている。

ウ　クラス２溶媒の限度値記述のためのオプション

クラス２溶媒の限度値を設定する場合には三つのオプションが利用できる。

オプション１：表２中の ppm で表された濃度限度値を用いることができる。それらの値は１日の製剤投与量を 10g と仮定して式（１）を用いて計算された。

$$\text{濃度（ppm）} = \frac{1{,}000 \times \text{PDE}}{\text{用　量}} \qquad （１）$$

式中、PDE は mg/day で表され、用量は g/day で示される。

これらの限度値は、全ての原薬、添加剤又は製剤中の残留溶媒として受け入れられる。したがって、１日用量が不明であるか未定の場合にはこのオプションが適用し得る。製剤中の全ての添加剤及び原薬が、オプション１で与えられた限度値に適合する場合には、各成分はどのような比率ででも使用できる。１日用量が 10g を超えなければ、それ以上の計算は必要ない。１日に 10g を超えて投与される製剤は、オプション２に基づいて考慮されるべきである。

オプション２：オプション１で得られる限度値に適合する製剤中の残留溶媒は、考慮する必要はない。表２に示された mg/day で表される PDE 値と実際の１日最大用量から、上式（１）を用いて製剤中に許容される残留溶媒の濃度が算出できる。もし、残留溶媒を実際に可能な最小限にまで減じてきたことが実証されるならば、それらの限度値は許容されるであろう。その限度値は、分析の精度、製造上の能力、製造工程における妥当な変動に関して現実的なものであり、かつ、現在の医薬品製造の標準的なレベルを反映しているべきである。

オプション２は、製剤の各成分中に存在する残留溶媒量を加算することによって適用されうる。１日当たりの溶媒量の合計は PDE 値未満でなければならない。

オプション１とオプション２の使用例として、製剤中のアセトニトリルへの適用を考慮してみる。アセトニトリルの１日ばく露許容量は 4.1mg/day、即ちオプション１の限度値は 410ppm である。この製剤の１日最大投与量は 5.0g であり、２種の添加剤を含んでいる。製剤の組成と計算上の最大残留アセトニトリル量を以下の表に記す。

成分	組成	アセトニトリル含量	一日ばく露量

原薬	0.3g	800ppm	0.24mg
添加剤１	0.9g	400ppm	0.36mg
添加剤２	3.8g	800ppm	3.04mg
製剤	5.0g	728ppm	3.64mg

添加剤１はオプション１の限度値に適合しているが、原薬、添加剤２及び製剤は適合していない。しかしながら、この製剤はオプション２の限度値 4.1mg/day には適合しており、したがって本ガイドラインの勧告値に適合していることになる。

残留溶媒としてアセトニトリルを用いた他の例を挙げる。この製剤の１日最大投与量は 5.0g であり、二種の添加剤を含んでいる。製剤の組成と計算上の最大残留アセトニトリル量を以下の表に記す。

成分	組成	アセトニトリル含量	一日ばく露量
原薬	0.3g	800ppm	0.24mg
添加剤１	0.9g	2,000ppm	1.80mg
添加剤２	3.8g	800ppm	3.04mg
製剤	5.0g	1,016ppm	5.08mg

この例においては、この製剤はオプション１及びオプション２双方の限度値に適合していない。もし製剤化工程でアセトニトリルが減少するかどうか、製造者は製剤中の定量試験により調べることができる。もしアセトニトリルのレベルが製剤化工程中に許容限度値まで減少しないならば、製剤の製造者は製剤中のアセトニトリルを滅ずるための他の工程を考慮するか又はオプション３を考慮すべきである。

オプション３：申請者は、実際の１日投与量、実際の対象動物種並びに関連した毒性データ及び考慮すべき消費者の安全性を考慮して、より高い PDE 値及び濃度限度値を正当化してもよい。このオプションは、次のように適用されるだろう。

３ａ－申請者は、適切な実際の対象動物種のための体重及び／又は実際の投与量を用意し、ICH の式及び ICH がサポートする毒性データから PDE 値及び／又は濃度限度値を再計算することができる。

３ｂ－申請者は、新しい毒性データ（実際の対象動物及び／又は投与量の情報を用いなくてもよい。）を用意し、ICH の式から PDE 値及び濃度限度値を再計算することができる。

これらすべての方法を試みても、残留溶媒量を減少できなかった場合には、例外的なケースに限られるが、製造業者はガイドライン値に適合させるべく

溶媒量を減じる努力をしてきたことについての要約と、その製剤がガイドライン値を超える残留溶媒を含むことの妥当性をサポートするリスクーベネフィットの観点からの分析内容を提出することができる。

エ　分析方法

残留溶媒の測定法としては、ガスクロマトグラフィーのようなクロマトグラフィーが一般的に用いられる。もし実行できるのであれば、薬局方に記述されている、残留溶媒レベルの測定に関するいずれかのハーモナイズされた方法を用いるべきである。その他、個別のケースにおいては、製造者は最も適切なバリデートされた分析方法を自由に選択できよう。もしクラス３溶媒しか存在しない場合には、乾燥減量等の非特異的方法を用いてもよい。

残留溶媒の分析方法のバリデーションは「１の（１）分析法バリデーション：定義及び用語に関するテキスト」（VICH　GL1）及び「１の（２）分析法バリデーション：方法論に関するテキスト」（VICH　GL2）に従うべきである。

オ　残留溶媒の報告レベル

製剤の製造業者は、本ガイドラインの基準に適合させるために、添加剤又は原薬の残留溶媒の含量について、正確な情報を必要としている。以下の記述は、添加剤又は原薬の供給業者が、製剤の製造業者に提供すべき情報の例である。供給業者は、以下から適切な一つを選択することができる。:

- クラス３の溶媒のみが存在するような場合
  乾燥減量が 0.5 %未満であること
- クラス２溶媒Ｘ、Ｙ … のみが存在するような場合
  全てが、オプション１の限度値未満であること（ここでは、供給業者は、Ｘ、Ｙ … で表されたクラス２溶媒の名称を示す。）
- クラス２溶媒Ｘ、Ｙ … 及びクラス３の溶媒のみが存在するような場合
  クラス２溶媒の全てが、オプション１の限度値未満、かつ、クラス３溶媒の残留量が 0.5 %未満

クラス１溶媒が存在すると考えられる場合には、それらの溶媒は、同定され、定量されるべきである。

「存在すると考えられる」とは、最終製造工程で用いた溶媒及び初期の製造工程で用いられ、バリデートされた工程によっていつも取り除けるとは限らない溶媒をさす。

もし、クラス２又はクラス３の溶媒が、それぞれオプション１の限度値又は 0.5 %を超えて存在する場合、それらの溶媒は、同定され、定量されるべきである。

（４）残留溶媒の限度値

ア　避けるべき溶媒

クラス１の溶媒は、許容できない毒性あるいは環境への有害効果などの理由から、原薬や添加剤及び製剤の製造には用いるべきでない。しかしながら、

もし著しい治療上の利点をもたらす製剤の製造のために使用が避けられない場合には、特に正当な理由がない限り、表１に示したレベルに制限されるべきである。1,1,1-トリクロロエタンについては環境有害物質であるため、表１に含めておく。提示された限度値 1,500ppm は、安全性データの検討を基にしている。

表１　医薬品中のクラス１溶媒（避けるべき溶媒）

溶媒	濃度限度値（ppm）	事柄
ベンゼン	2	発がん性物質
四塩化炭素	4	毒性物質、環境有害物質
1,2-ジクロロエタン	5	毒性物質
1,1-ジクロロエテン	8	毒性物質
1,1,1-トリクロロエタン	1,500	環境有害物質

イ　制限すべき溶媒

表２に示した溶媒は、それら固有の毒性のため、医薬品中において制限すべき溶媒である。PDE 値を 0.1mg/day 単位で、濃度を 10ppm 単位まで表す。示された値は、測定時に必要な分析精度を反映するものではない。精度は、方法のバリデーションの一部として決定されるべきである。

表２　医薬品中のクラス２溶媒

溶媒	PDE（mg/day）	濃度限度値（ppm）
アセトニトリル	4.1	410
クロロベンゼン	3.6	360
クロロホルム	0.6	60
シクロヘキサン	38.8	3,880
1.2-ジクロロエテン	18.7	1,870
ジクロロメタン	6.0	600
1.2-ジメトキシエタン	1.0	100
N,N-ジメチルアセトアミド	10.9	1,090
N,N-ジメチルホルムアミド	8.8	880
1,4-ジオキサン	3.8	380
2-エトキシエタノール	1.6	160
エチレングリコール	6.2	620
ホルムアミド	2.2	220
ヘキサン	2.9	290
メタノール	30.0	3,000
2-メトキシエタノール	0.5	50
メチルブチルケトン	0.5	50

メチルシクロヘキサン	11.8	1,180
N-メチルピロリドン	5.3	530
ニトロメタン	0.5	50
ピリジン	2.0	200
スルホラン	1.6	160
テトラヒドロフラン	7.2	720
テトラリン	1.0	100
トルエン	8.9	890
1,1,2-トリクロロエテン	0.8	80
キシレン*	21.7	2,170

＊　通常 60％ m-キシレン、14％の p-キシレン、９％の o-キシレン及び 17％のエチルベンゼンの混合物

ウ　低毒性溶媒

クラス３の溶媒（表３に示す）は、低毒性であり、対象動物及び消費者の健康に及ぼすリスクもより低いとみなされる。通常許容される医薬品中のレベルにおいて、ヒトの健康に対する有害物質となることが知られている溶媒は、クラス３には全く含まれない。しかしながら、多くのクラス３溶媒に関する長期毒性試験又は発がん性試験は全く行われていない。実際に入手可能なデータによれば、これらの溶媒は、急性毒性試験又は短期毒性試験において低毒性であり、遺伝毒性試験も陰性であることが示されている。これらの残留溶媒の量が 50mg/day（オプション１で 5,000ppm、即ち 0.5 ％に相当）以下であるならば、なんら正当化することなく許容されると考えられる。これより多い量については、製造上の能力あるいは GMP 遂行上の必要性からみて適当と考えられるならば許容されるであろう。

表３　GMP 又は他の品質上の要求により制限されるクラス３溶媒

酢酸	ヘプタン
アセトン	酢酸イソブチル
アニソール	酢酸イソプロピル
1-ブタノール	酢酸メチル
2-ブタノール	3-メチル-1-ブタノール
酢酸ブチル	メチルエチルケトン
t-ブチルメチルエーテル	メチルイソブチルケトン
クメン	2-メチル-1-プロパノール
ジメチルスルホキシド	ペンタン
エタノール	1-ペンタノール
酢酸エチル	1-プロパノール
エチルエーテル	2-プロパノール
ギ酸エチル	酢酸プロピル
ギ酸	

エ　適切な毒性データが見当たらない溶媒

以下の溶媒（表４）は、添加剤、原薬あるいは製剤の製造業者にとって関心のある溶媒である。しかしながら、PDE 算出の基本となるべき適当な毒性データは見当たらない。製造業者は、医薬品中のこれらの溶媒及び製剤に用いられるために PDE が評価されていない溶媒が残留することの妥当性についての理由を供給すべきである。

表４　適当な毒性データが見当たらない溶媒

1,1-ジエトキシプロパン	メチルイソプロピルケトン
1,1-ジメトキシメタン	メチルテトラヒドロフラン
2,2-ジメキシプロパン	石油エーテル
イソオクタン	トリクロロ酢酸
イソプロピルエーテル	トリフルオロ酢酸

（５）用語の定義

genotoxic carcinogens：遺伝子又は染色体に作用してがんを発生させる発がん物質

LOEL：lowest-observed effect level（最少作用量）の略

lowest-observed effect level（最少作用量）：ばく露を受けたヒト又は動物における何らかの作用の発現頻度又は程度が、生物学的に有意に増加した最小の投与量

modifying factor（修正係数）：毒性学者の専門的判断により決定され、実験のデータをヒトの安全性に外挿するための係数

neurotoxicity（神経毒性）：神経系に有害な作用を引き起こすような性質

NOEL：no-observed-effect level（最大無作用量）の略

no-observed-effect level（最大無作用量）：ばく露を受けたヒト又は動物において、いかなる作用についてもその発生頻度又は程度が生物学的に有意な増加を示さなかった最大の投与量

PDE：Permitted daily exposure（一日ばく露許容量）の略

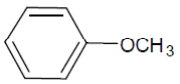
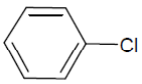
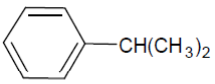
Permitted daily exposure（一日ばく露許容量）：医薬品中に残留する溶媒の一日当たりに摂取が許容される最大量

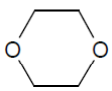
reversible toxicity（可逆的毒性）：ある物質へのばく露により発現し、ばく露停止後には消失するような有害作用

strongly suspected human carcinogen（ヒトにおける発がん性が強く疑われる物質）：ヒトでの発がん性に関する疫学的証拠は無いものの、遺伝毒性は陽性で、げっ歯類（又は他の動物種）での発がん性に関する明確な証拠がある物質

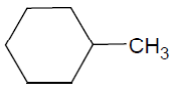
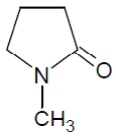
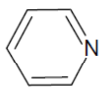
teratogenicity（催奇形性）：妊娠中に投与した場合に、胎子に形態学的な先天異常を引き起こす性質

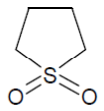
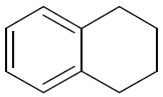
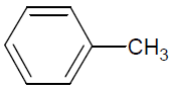
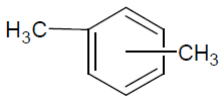
付属書１：本ガイドラインに含まれる溶媒のリスト

溶媒名	別名	化学構造	クラス
Acetic acid（酢酸）	Ethanoic acid	CH_3COOH	Class 3
Acetone（ｱｾﾄﾝ）	2-Propanone Propan-2-one	CH_3COCH_3	Class 3
Acetonitrile（ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ）		CH_3CN	Class 2
Anisole（ｱﾆｿｰﾙ）	Methoxybenzene		Class 3
Benzene（ﾍﾞﾝｾﾞﾝ）	Benzol		Class 1
1-Butanol（1-ﾌﾞﾀﾉｰﾙ）	*n*-Butyl alcohol Butan-1-ol	$CH_3(CH_2)_3OH$	Class 3
2-Butanol（2-ﾌﾞﾀﾉｰﾙ）	*sec*-Butyl alcohol Butan-2-ol	$CH_3CH_2CH(OH)CH_3$	Class 3
Butyl acetate （酢酸ブチル）	Acetic acid butyl ester	$CH_3COO(CH_2)_3CH_3$	Class 3
tert-Butylmethyl ether （t-ﾌﾞﾁﾙﾒﾁﾙｴｰﾃﾙ）	2-Methoxy-2-methyl-propane	$(CH_3)_3COCH_3$	Class 3
Carbon tetrachloride （四塩化炭素）	Tetrachloromethane	CCl_4	Class 1
Chlorobenzene （ｸﾛﾛﾍﾞﾝｾﾞﾝ）			Class 2
Chloroform（ｸﾛﾛﾎﾙﾑ）	Trichloromethane	$CHCl_3$	Class 2
Cumene（ｸﾒﾝ）	Isopropylbenzene (1-Methyl)ethylbenzene		Class 3

Cyclohexane（ｼｸﾛﾍｷｻﾝ）			Class 2
1,2-Dichloroethane （1,2-ｼﾞｸﾛﾛｴﾀﾝ）	*sym*-Dichloroethane Ethylene dichloride Ethylene chloride	CH_2ClCH_2Cl	Class 1
1,1-Dichloroethene （1,1-ｼﾞｸﾛﾛｴﾃﾝ）	1,1-Dichloroethylene Vinylidene chloride	$H_2C=CCl_2$	Class 1
1,2-Dichloroethene （1,2-ｼﾞｸﾛﾛｴﾃﾝ）	1,2-Dichloroethylene Acetylene dichloride	$ClHC=CHCl$	Class 2
Dichloromethane （ｼﾞｸﾛﾛﾒﾀﾝ）	Methylene chloride	CH_2Cl_2	Class 2
1,2-Dimethoxyethane （1,2-ｼﾞﾒﾄｷｼｴﾀﾝ）	Ethyleneglycol dimethyl ether Monoglyme Dimethyl Cellosolve	$H_3COCH_2CH_2OCH_3$	Class 2
N,N-Dimethylacetamide （N,N-ｼﾞﾒﾁﾙｱｾﾄｱﾐﾄﾞ）	DMA	$CH_3CON(CH_3)_2$	Class 2
N,N-Dimethylformamide （N,N-ｼﾞﾒﾁﾙﾎﾙﾑｱﾐﾄﾞ）	DMF	$HCON(CH_3)_2$	Class 2
Dimethyl sulfoxide （ｼﾞﾒﾁﾙｽﾙﾎｷｼﾄﾞ）	Methylsulfinylmethane Methyl sulfoxide DMSO	$(CH_3)_2SO$	Class 3
1,4-Dioxane （1,4-ｼﾞｵｷｻﾝ）	*p*-Dioxane [1,4]Dioxane		Class 2
Ethanol（ｴﾀﾉｰﾙ）	Ethyl alcohol	CH_3CH_2OH	Class 3
2-Ethoxyethanol （2-ｴﾄｷｼｴﾀﾉｰﾙ）	Cellosolve	$CH_3CH_2OCH_2CH_2OH$	Class 2
Ethyl acetate（酢酸ｴﾁﾙ）	Acetic acid ethyl ester	$CH_3COOCH_2CH_3$	Class 3

Ethyleneglycol (エチレングリコール)	1,2-Dihydroxyethane 1,2-Ethanediol	$HOCH_2CH_2OH$	Class 2
Ethyl ether（エチルエーテル）	Diethyl ether Ethoxyethane 1,1’-Oxybisethane	$CH_3CH_2OCH_2CH_3$	Class 3
Ethyl formate（ギ酸エチル）	Formic acid ethyl ester	$HCOOCH_2CH_3$	Class 3
Formamide（ホルムアミド）	Methanamide	$HCONH_2$	Class 2
Formic acid（ギ酸）		$HCOOH$	Class 3
Heptane（ヘプタン）	*n*-Heptane	$CH_3(CH_2)_5CH_3$	Class 3
Hexane（ヘキサン）	*n*-Hexane	$CH_3(CH_2)_4CH_3$	Class 2
Isobutyl acetate (酢酸イソブチル)	Acetic acid isobutyl ester	$CH_3COOCH_2CH(CH_3)_2$	Class 3
Isopropyl acetate (酢酸イソプロピル)	Acetic acid isopropyl ester	$CH_3COOCH(CH_3)_2$	Class 3
Methanol（メタノール）	Methyl alcohol	CH_3OH	Class 2
2-Methoxyethanol (2-メトキシエタノール)	Methyl Cellosolve	$CH_3OCH_2CH_2OH$	Class 2
Methyl acetate (酢酸メチル)	Acetic acid methyl ester	CH_3COOCH_3	Class 3
3-Methyl-1-butanol (3-メチル-1-ブタノール)	Isoamyl alcohol Isopentyl alcohol 3-Methylbutan-1-ol	$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$	Class 3
Methylbutyl ketone (メチルブチルケトン)	2-Hexanone Hexan-2-one	$CH_3(CH_2)_3COCH_3$	Class 2

Methylcyclohexane (メチルシクロヘキサン)	Cyclohexylmethane		Class 2
Methylethyl ketone (メチルエチルケトン)	2-Butanone MEK Butan-2-one	$CH_3CH_2COCH_3$	Class 3
Methylisobutyl ketone (メチルイソブチルケトン)	4-Methylpentan-2-one 4-Methyl-2-pentanone MIBK	$CH_3COCH_2CH(CH_3)_2$	Class 3
2-Methyl-1-propanol (2-メチル-1-プロパノール)	Isobutyl alcohol 2-Methylpropan-1-ol	$(CH_3)_2CHCH_2OH$	Class 3
N-Methylpyrrolidone (N-メチルピロリドン)	1-Methylpyrrolidin-2-one 1-Methyl-2-pyrrolidinone		Class 2
Nitromethane（ニトロメタン）		CH_3NO_2	Class 2
Pentane（ペンタン）	*n*-Pentane	$CH_3(CH_2)_3CH_3$	Class 3
1-Pentanol (1-ペンタノール)	Amyl alcohol Pentan-1-ol Pentyl alcohol	$CH_3(CH_2)_3CH_2OH$	Class 3
1-Propanol (1-プロパノール)	Propan-1-ol Propyl alcohol	$CH_3CH_2CH_2OH$	Class 3
2-Propanol (2-プロパノール)	Propan-2-ol Isopropyl alcohol	$(CH_3)_2CHOH$	Class 3
Propyl acetate (酢酸プロピル)	Acetic acid propyl ester	$CH_3COOCH_2CH_2CH_3$	Class 3
Pyridine（ピリジン）			Class 2

Sulfonane（ｽﾙﾎﾗﾝ）	Tetrahydrothiophene 1,1-dioxide		Class 2
Tetrahydrofuran （ﾃﾄﾗﾋﾄﾞﾛﾌﾗﾝ）	Tetramethylene oxide Oxacyclopentane		Class 2
Tetralin（ﾃﾄﾗﾘﾝ）	1,2,3,4-Tetrahydro-naphthalene		Class 2
Toluene（ﾄﾙｴﾝ）	Methylbenzene		Class 2
1,1,1-Trichloroethane （1,1,1-ﾄﾘｸﾛﾛｴﾀﾝ）	Methylchlororoform	CH_3CCl_3	Class 1
1,1,2-Trichloroethene （1,1,2-ﾄﾘｸﾛﾛｴﾃﾝ）	Trichloroethene	$HClC=CCl_2$	Class 2
Xylene*（ｷｼﾚﾝ）	Dimethybenzene Xylol		Class 2

＊　通常、*m*-キシレン 60 %、*p*-キシレン 14 %、*o*-キシレン９%、エチルベンゼン 17 %の混合物

付属書２　背景（付属ガイダンス）

A2-1　揮発性有機溶媒の環境規制

医薬品製造にしばしば用いられる残留溶媒の幾つかは、環境保健クライテリア（EHC）モノグラフや総合リスク情報システム（IRIS）中に毒性化学物質としてリストアップされている。国際化学物質安全性計画（IPCS)、米国環境保護庁（USEPA)、米国食品医薬品局（USFDA）などのグループの目的の中には、許容ばく露レベルを決定することも含まれている。その最終目標は、化学物質の長期間に渡るばく露環境によって引き起こされる有害作用からヒトの健康を守り、環境保全を維持することにある。最大安全ばく露限度値の評価方法は通常長期毒性試験の結果に基づいている。長期試験のデータがない場合には、より大きな安全係数を用いるなど、方法に修正を加えた上で、より短い期間の毒性試験データを用いることができる。それらの文書中に記述されているアプローチ方法は、主として、環境、すなわち、大気、食品、飲料水並びに他の媒体における一般人の長期間又は一生涯のばく露に関係している。

A2-2　医薬品中の残留溶媒

本ガイドラインにおけるばく露限度値は、EHC 及び IRIS モノグラフに記述されている方法論と毒性データにより設定されている。しかしながら、医薬品の合成又は製剤化で用いられている残留溶媒に関する幾つかの特殊な仮定は、ばく露限度値を設定する上で考慮しなければならない。すなわち、

１）患畜（通常の動物集団ではない）は医薬品を、病気の治療あるいは感染や疾病の予防のために与えられる。しかし、動物集団中の感染や疾病の存在とは関係なく農業生産を助けるために用いられるような製剤もある。

２）患畜への一生のばく露という仮定は大部分の医薬品にとっての必要条件ではなく、製剤が投与された食用動物の可食部位を消費するヒトの一生のばく露という仮定が、ヒトの健康に対するリスクを低減させるための作業仮説として適当なものである。

３）残留溶媒は、医薬品の製造プロセスにおいて避け難い成分であり、しばしば製剤の一部となりうるものである。

４）残留溶媒は例外的な状況の場合を除き、勧告されたレベルを超えてはならず、その場合には正当化されるべきである。

５）残留溶媒の許容レベルを決定するのに使用される毒性試験データは、OECD、EPA あるいは FDA Red Book に記述されているものに限定する必要はないが、それらを含む適切なプロトコールを用いて出されるべきである。

付属書３　ばく露限度値の設定法

クラス１の発がん性溶媒のリスク評価方法としては、Gaylor-Kodell の方法が適当である（Gaylor, D. W. and Kodell, R. L. Linear Interpolation algorithm for low dose assessment of toxic substance. J. Environ. Pathology, 4305, 1980）。信頼すべき発がん性データがある場合にのみ、数学的モデルを用いた外挿を、ばく露限度値の設定に適用すべきである。クラス１溶媒のばく露限度値は、最大無作用量（NOEL）に関して大きな安全係数（即ち、10,000 ないし 100,000）を用いることにより決定され得る。これらの溶媒の検出・定量は、最新の分析技術によるべきである。

本ガイドラインにおけるクラス２溶媒の許容ばく露レベルは、医薬品中のばく露限度値設定の手順（Pharmacopeial Forum, Nov-Dec 1989）及び、有害化学物質評価のための国際化学物質安全性計画（IPCS）（環境保健クライテリア 170、WHO、1994）において採用された方法に従い、PDE 値を計算することによって設定された。これらの方法は USEPA（IRIS）や USFDA（Red Book）他で用いられているものと同様の方法である。PDE 値の由来をよりよく理解するために、ここで本方法の概略を述べる。本文中、（４）の表にある PDE 値を使用する場合には、これらの計算を実施する必要はない。

PDE 値は、以下のとおり、最も信頼性の高い動物試験における最大無作用量（NOEL）又は最少作用量（LOEL）から導かれる。

$$PDE = \frac{NOEL \times 体重補正}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5} \qquad （１）$$

PDE 値は NOEL から求める方が好ましい。もし、NOEL が無い場合には LOEL を用いても構わない。ここに提示された修正係数は、データをヒトに関連づけるためのものであり、環境保健クライテリア（Environmental Health Criteria 170, World Health Organization, Geneva, 1994）で用いられている〝不確定係数〟や薬局方フォーラム中の〝修正係数〟又は〝安全係数〟と同種のものである。100 %全身ばく露されるという仮定は、投与ルートにかかわらず、全ての計算において用いられる。

修正係数は、以下のとおりである。

Ｆ１＝種間の外挿を説明するための係数

Ｆ１＝ラットからヒトへの外挿には５

Ｆ１＝マウスからヒトへの外挿には 12

Ｆ１＝イヌからヒトへの外挿には２

Ｆ１＝ウサギからヒトへの外挿には 2.5

Ｆ１＝サルからヒトへの外挿には３

Ｆ１＝他の動物からヒトへの外挿には 10

Ｆ１は、考慮する種と人の表面積：体重の比を比較し、考慮している。表面積（S）は、次のように計算される。

$$S = kM^{0.67}$$

式中、M ＝体重、定数 k は 10 をとる。式で用いられた体重は、表 A3-1 に示す。

Ｆ２＝個体間の変動を説明するための係数 10

係数 10 は、通常、全ての有機溶媒に適用し、本ガイドラインでは、常に用いる。

Ｆ３＝短期間ばく露の毒性試験を説明するための変数

Ｆ３＝寿命の 1/2（げっ歯類又はウサギでは１年：猫、犬及び猿では７年）以上の期間の試験には１

Ｆ３＝全ての期間をカバーする生殖毒性試験には１

Ｆ３＝げっ歯類で６か月の試験又は非げっ歯類で 3.5 年の試験には２

Ｆ３＝げっ歯類で３か月の試験又は非げっ歯類で２年の試験には５

Ｆ３＝より短期間の試験には 10

全ての事例において、中間の期間での試験には、より高い係数が用いられる。例えば、げっ歯類で９か月の試験には２

Ｆ４＝重篤な毒性、たとえば、遺伝毒性を伴わない発がん性、神経毒性又は催奇形性の場合に適用される係数。生殖毒性試験の場合には以下の係数が用いられる。

Ｆ４＝母体毒性を伴う胎児毒性には１

Ｆ４＝母体毒性を伴わない胎児毒性には５

Ｆ４＝母体毒性を伴う催奇形性には５

Ｆ４＝母体毒性を伴わない催奇形性には 10

Ｆ５＝最大無作用量が確立していない場合に適用される変数

LOEL しか得られない場合、毒性試験の重篤度により、最大 10 の係数が用いられる。

体重補正では、男女とも成人の体重は、50 ㎏と仮定している。この比較的低い体重は、この手の計算によく用いられる 60 ㎏又は 70 ㎏の標準体重に、付加的な安全性係数を与える。50 ㎏未満の成人患者がいることは認められている。：これらの患者は、PDE を決定するために用いられたもともと含まれている安全係数によって適合すると考えられる。

この方程式の適用例として、Pharmeuropa、Vol.9、No.1、Supplement、April 1997、page S24 に要約されているアセトニトリルのマウスの毒性試験について考察する。NOEL は計算の結果 50.7 ㎎ ㎏$^{-1}$ day^{-1} である。この試験におけるアセトニトリルの PDE 値は以下のように計算される。

$$\text{PDE} \quad \frac{50.7\ \text{mg kg}^{-1}\ \text{day}^{-1} \times 50\ \text{kg}}{12 \times 10 \times 5 \times 1 \times 1} = 4.22\ \text{mg day}^{-1}$$

この例においては、

Ｆ１＝マウスからヒトへの外挿を説明するため 12

Ｆ２＝ヒトの個体差を説明するため 10

Ｆ３＝試験期間が 13 週間であるため５

Ｆ４＝重篤な毒性が見られないため１

Ｆ５＝最大無作用量が得られているため１

表 A3-1　本文中の計算において用いられている値

ラットの体重	425g	マウスの呼吸量	43L/day
妊娠ラットの体重	330g	ウサギの呼吸量	1,440L/day
マウスの体重	28g	モルモットの呼吸量	430L/day
妊娠マウスの体重	30g	ヒトの呼吸量	28,800L/day
モルモットの体重	500g	イヌの呼吸量	9,000L/day
アカゲザルの体重	2.5 ㎏	サルの呼吸量	1,150L/day
ウサギの体重（妊娠・非妊娠）	4 ㎏	マウスの摂水量	5mL/day
ビーグル犬の体重	11.5 ㎏	ラットの摂水量	30mL/day
ラットの呼吸量	290L/day	ラットの摂餌量	30g/day

吸入試験におけるガスの濃度を ppm の単位から㎎/L 又は㎎/m3 単位へ変換するために、理想気体の状態方程式（PV ＝ nRT）が用いられる。Pharmeuropa、Vol.9、No.1、Supplement、April 1997、page S9 に要約されている四塩化炭素（分子量 153.84）の吸入による生殖毒性試験を例として以下に考察する。

$$\frac{n}{V} = \frac{P}{RT} = \frac{300\times10^{-6}\text{atm}\times153840\ \text{㎎}\ \ \text{mol}^{-1}}{0.082\text{L atm K}^{-1}\text{mol}^{-1}\times298\text{K}} = \frac{46.15\ \text{㎎}}{24.45\text{L}} = 1.89\ \text{㎎/L}$$

1000L ＝ 1 m^3 の関係が㎎/m^3 への変換に用いられている。

3　規格及び検査方法の設定に関するガイドライン

3－1　新動物用医薬品の原薬及び製剤の規格及び検査方法の設定：化学物質に関するガイドライン（VICH GL39）

（1）序文

ア　本ガイドラインの目的

本ガイドラインは、新動物用原薬と新製剤について、世界規模での単一の規格及び検査方法（以下、「規格」という。）の設定を促進することを目的としている。本ガイドラインは、米国、EU 又は日本においてこれまでに承認されていない化学合成の新原薬とそれを用いて製造される新製剤に関して、規格値／判定基準（以下、「判定基準」という。）の設定、その妥当性の立証並びに試験方法の選択のための指針を与えるものである。

イ　背景

規格とは、試験方法、その試験に用いる分析法に関する記載、並びにその方法で試験したときの適否の判定基準（限度値、許容範囲あるいはその他の基準）から成るリストと定義される。原薬又は製剤が意図した用途にふさわしいものであるために適合すべき一組の基準である。また、「規格に適合する」とは、規定された方法に従って試験するとき、原薬や製剤がリストにある全ての判定基準に適合することを意味する。規格は、医薬品の製造業者がその妥当性を示す資料を添付して申請し、行政当局によりその医薬品を製造するための条件として承認された遵守すべき（critical）品質の基準である。

規格は、製品の品質並びに恒常性を確保するために用いられる原薬や製剤を管理するための方策の一つである。この方策としては、この他にも規格を設定する際の基礎とすべき開発段階における徹底的な製品特性の解析、GMP の遵守（例えば、適切な施設、バリデートされた製造工程、バリデートされた試験方法、原料の試験、工程内試験、安定性試験など）がある。

規格の各項目は、原薬及び製剤の特性を遍く示すことよりも、それらの品質が適切なことを確認するために選ばれるものであり、原薬及び製剤の安全性や有効性を確保する上で有用な特性に焦点を絞るべきである。

ウ　本ガイドラインの適用範囲

原薬及び製剤の品質は、その設計、開発、工程内管理、GMP 管理及び製造工程のバリデーションにより、また、開発から実際に製造されるまでの間に設定される規格により決まる。本ガイドラインは、出荷時並びに有効期間中の新動物用原薬及び新製剤の品質を保証するのに主要な役割を果たす規格、すなわち、試験方法、分析法並びにその判定基準を対象としている。規格は、品質保証の重要な要素ではあるが、その唯一の要素というわけではない。前述の全ての要素が、品質の高い原薬や製剤の恒常的な製造を保証していくのに必要である。

本ガイドラインは、新製剤（配合剤を含む）及び、適用が必要な地域では、新原薬の製造承認を対象としたものであり、医薬品開発の臨床試験段階にある原薬及び製剤は対象としない。本ガイドラインは、合成並びに半合成の抗

生物質及び低分子量の合成ペプチドにも適用可能である。しかしながら、高分子量のペプチド、ポリペプチド及びバイオテクノロジー応用医薬品／生物学的製剤の規格を適切に取り扱うのには十分とは言えない。新動物用生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び検査方法については、他の VICH ガイドラインで取り扱われている。放射性医薬品、醗酵製品、オリゴヌクレオチド、植物製剤（herbal　product）及び動植物由来の生薬製剤も対象としない。

全ての新原薬及び新製剤に設定すべき試験方法と判定基準、並びに原薬や製剤の各剤形の特性に応じて設定すべき試験方法と判定基準に関する指針が示されている。本ガイドラインは、作成された時点での技術のレベルを反映したものであり、全てを網羅したものと考えるべきではない。新しい分析技術の開発や既存の分析技術の改良は絶えず行われており、妥当性が示されるならば、そうした技術を採用してもよい。

本ガイドラインでは、経口固形製剤、粉末、経口液状製剤及び注射剤（小容量及び大容量）の三つの剤形について触れている。このことは、本ガイドラインの適用をこれらの剤形だけに限定することを意味するものではない。これらの剤形はモデルとして示したものであり、触れなかった他の剤形、例えば、局所適用の製剤（プアオン、スポットオン、クリーム、軟膏剤、ゲル）に対しても､本ガイドラインの考え方を拡張して適用することが推奨される。

（２）一般的な概念

調和された規格の開発と設定においては、下記のような概念が重要である。これらの概念は、どこにでも適用できるというものではなく、それぞれ特定の状況において考慮されるべきものである。本ガイドラインでは、各概念の簡単な定義及びそれらがどのような状況の下で適用され得るかを示す。これらの概念の適用に当たっては、申請者は、その妥当性を示した資料を関係する行政当局に提出し、その承認を得なければならない。

ア　定期的試験／スキップ試験（Periodic/skip testing）

定期的試験やスキップ試験は、試験されなかったロットであっても、その製品について設定された全ての判定基準に適合していなければならないことをよく理解した上で、出荷時の特定の試験を、ロットごとではなく、あらかじめ定められたロット数ごとにあるいはあらかじめ定められた期間ごとに行うことである。この概念を適用した場合には、全てのロットについて試験する場合よりも試験する数が少なくて済むが、事前に行政当局にその妥当性を示し承認を受ける必要がある。この概念は、例えば、経口固形製剤における残留溶媒の試験及び微生物学的試験に適用できるであろう。承認申請時には限られたデータだけしか得られていないこともある（（２）のオ参照）ので、この概念は、通常、承認後に適用されるものである。試験を行った場合に、定期的試験を行うに当たって設定された判定基準に適合しないようなことがあれば、どのような不適合であっても、それを適切な形で行政当局に報告する必要がある。これらのデータから、ルーチン試験に戻すことが必要と判断

される場合には、ロットごとの出荷試験を再開すべきである。

イ　出荷のための判定基準と有効期間を考慮した判定基準（Release vs. shelf-life acceptance criteria）

出荷時の規格と有効期間を考慮した規格とでは異なった判定基準を適用すべきであるという概念で、製剤だけに適用される。この概念によれば、製剤の出荷のための規格には、有効期間を考慮した規格よりも厳しい判定基準を設定するのが適切とされる。この概念は、例えば、定量値や不純物（分解生成物）の限度値に適用し得る。ある国／地域においては、行政当局は、出荷のための規格を承認申請に必要な規格として設定することを要求しておらず、各製薬企業がそれぞれ社内規格として設定している。したがって、これらの地域においては、承認申請に必要な判定基準は有効期間を考慮した判定基準のみであり、出荷の時点から有効期間の終わりまでずっと同じ判定基準が適用されることになる。しかしながら、申請者は、自社の製品が有効期間を通して承認された判定基準に適合することをよりよく保証するために、より厳しい判定基準を有する社内規格を出荷の際に適用する道を選んでもよい。一方、EU においては、行政当局は、出荷時と有効期間を考慮した場合とで異なった規格の設定が適切な場合、両者を承認申請に必要な規格として設定することを要求している。

ウ　工程内試験（In-process tests）

工程内試験は、本ガイドラインに示されたように、出荷の際に行われる一連の正式な試験の一部としてではなく、原薬や製剤の製造工程において実施される試験のことである。製造工程の作動状態の指標となるパラメータ群を適切な範囲内に収めることを目的としてのみ行われる工程内試験、例えば、コーティングを施される前の素錠の段階での硬度や摩損度の試験並びに個々の錠剤の質量の試験は規格に含めない。

ある試験項目について出荷の際に要求されるのと同等のあるいはそれより厳しい判定基準の下で製造工程中に行われるある種の試験（例えば、溶液の pH の試験）のデータは、その試験項目が規格に含まれている場合には、出荷の際に規格要件を満たしているかどうかを判定するのに用いてもよいであろう。しかしながら、このアプローチを採用するには、試験結果や製剤の機能特性が工程内の段階から最終製品に至るまで変化しないことを示すバリデーションデータが必要である。

エ　設計時及び開発段階のデータの考慮（Design and development considerations）

新原薬あるいは新製剤の開発段階で蓄積された経験とデータは、規格を設定するための基礎とすべきものである。これらに基づいて、ある種の試験を削除したり、別の試験に代えたりすることが可能である。次のような例が挙げられている。:

- 開発段階において微生物の増殖や成長がないことが示された原薬や固形製剤の微生物学的試験（フローチャート#6 及び#8 参照）
- 製剤中に容器からの溶出物が認められないか、認められたとしても安

全性の基準値以下にあることが再現性良く示されている場合の製剤容器からの溶出物の試験

- 粒子径の試験もこの範疇に入ると考えられるが、製品の機能との関連により、工程内試験として行われることもあるし、出荷試験として行われることもある。
- 非常に水に溶け易い原薬から成る即放性の経口固形製剤の場合、常に速やかな溶出を示すことが開発段階において確かめられていれば、溶出試験を崩壊試験に代えてもよい（フローチャート#7（1）と#7（2）参照）。

オ　承認申請時に得られているデータには限りがあること（Limited data available at filing）

承認申請時に得られているデータには限りがあり、それが判定基準を設定するのに影響を及ぼし得ることを考慮する必要がある。このため、その原薬や製剤が実生産されるようになって、多くのデータが得られるようになったときには、判定基準の変更が必要となることがある（例：特定の不純物の許容限度値）。承認申請時の判定基準は、基本的には安全性と有効性に焦点を当てて設定する必要がある。

当初に限られたデータしか得られなかった場合には、より多くの経験やデータが得られた時点で、当初に承認された試験方法と判定基準について可能な変更を行うという観点で見直す必要がある。この見直しには、状況に応じて、判定基準を厳しくすることも、緩くすることも含まれる。

カ　パラメトリックリリース（Parametric release）

製剤については、行政当局により承認された場合には、出荷試験を型にはまった形で行う代わりに、パラメトリックリリースを行ってもよい。最終段階で滅菌を行う製剤の無菌試験がその一つの例である。この場合、各ロットの出荷は、製剤製造の最終滅菌段階での特定のパラメータ、例えば、温度、圧力及び時間が満足しうる値を示していることを確認した上で行う。これらのパラメータは、一般に、正確に測定し管理することができるので、製品の無菌性を保証する上では、限られた数の最終製品について無菌試験を行うよりも、これらのパラメータを用いたパラメトリックリリースの方が信頼性が高い。パラメトリックリリースによる出荷のプログラムには、適切な試験（例えば、化学的あるいは物理的指標を用いるもの）が含まれることもあろう。パラメトリックリリースの採用を申請するには、製品の滅菌工程が適切にバリデートされていることが前提となること、並びに定められた期間ごとに再バリデーションを行って、バリデートされた状態が維持されていることを示す必要があることに留意しなければならない。パラメトリックリリースが実施される場合にも、それによって間接的に管理されている属性（例えば、無菌性）については、その試験方法とともに、規格に設定されている必要がある。

キ　代替法（Alternative procedures）

別の測定法によって、原薬又は製剤のある属性を承認申請書記載の方法と

同等あるいはそれ以上によく管理できるようであれば、その方法を代替法として用いてもよい。

ク　薬局方の一般試験法とその判定基準（Pharmacopoeial tests and acceptance criteria）

日、米及び EU の薬局方には、種々の一般試験法が収載されている。適切なものがあれば、新医薬品の承認申請においても薬局方の一般試験法を利用すべきである。日、米及び EU の薬局方の間には、規定されている一般試験法やその判定基準に違いがあるため、承認申請書に記載された試験方法と判定基準を三極の行政当局がいずれも受け入れる場合にだけ、調和した規格となる。

本ガイドラインが十分に活用されるものとなるかどうかは、新原薬又は新製剤の規格に設定されることの多い幾つかの属性に関連する薬局方の一般試験法の調和がうまく行くかどうかにかかっている。欧州薬局方（EP）、日本薬局方（JP）及び米国薬局方（USP）の三者から構成される薬局方検討会議（PDG）は、時宜にかなった形で一般試験法の調和を成し遂げることを公約した。

調和が達成された一般試験法とその判定基準については、それを用いることを適切な形で示すことにより、三極のいずれにおいても受け入れられるであろう。例えば、無菌試験法の調和が達成された後には、日本薬局方の方法を用いて得られたデータは、日本薬局方の方法それ自体及びその判定基準と同様に、三極のいずれにおける承認申請においても受け入れられるであろう。一般試験法の調和が達成されたことを示すため、各薬局方は、日、米及び EU の三薬局方に収載された当該一般試験法とその判定基準は同等であり、したがって、そのいずれを用いてもよい旨の記載をそれぞれの薬局方に適切な形で取り入れることに合意した。

本ガイドラインの全体としての価値は、日、米及び EU 三薬局方の一般試験法とその判定基準の調和の度合いと結びついたものであるため、三薬局方のいずれであろうとも調和が達成された各条や一般試験法を勝手に変更すべきでない。調和の達成された各条並びに一般試験法の改定に関する薬局方検討会議（PDG）の取決めにおいても、「調和した旨の署名がなされた後、あるいは調和した各条や一般試験法が公布された後には、いかなる薬局方も各条や一般試験法を勝手に変更してはならない」とされている。

ケ　技術の進展（Evolving technologies）

新しい分析技術の開発や既存の分析技術の改良は絶え間なく行われている。そうした技術の導入によって品質がこれまでよりもよく保証できると考えられる場合やその他の理由で妥当性が示される場合には、それらの技術を用いてもよい。

コ　製剤の規格に対する原薬の影響（Impact of drug substance on medicinal product specifications）

一般に、原薬に特に関係する属性については、製剤では試験を行う必要は

ない。例えば、原薬で管理されており、分解生成物でないことが示された化学合成医薬品中の不純物については、通常、製剤で試験を行う必要はないと考えられる。詳細については、「２－２　新動物用医薬品の製剤中の不純物」（VICH GL11R）を参照のこと。

サ　標準品（Reference standard）

標準品あるいは標準物質は、定量、確認試験又は純度試験において基準として用いるために調製された物質であり、その用途に適した品質を有する必要がある。標準品は、しばしばルーチンの試験においては余り使われないような試験法をも用いて、その特性が解析され、意図した目的に適ったものかどうかが評価される。定量法において使用される新原薬の標準品については、どのような不純物が含まれるかが明らかにされ、それらの不純物が管理されている必要がある。また、その純度については、定量的方法により測定される必要がある。

（３）ガイドライン

ア　規格：その定義と妥当性の立証

（ア）規格の定義

規格とは、試験方法、その試験に用いる分析法に関する記載、並びに規定した方法で試験したときの適否の判定基準（限度値、許容範囲あるいはその他の基準）から成るリストと定義される。原薬又は製剤が意図した用途にふさわしいものであるために適合すべき一組の基準である。また、「規格に適合する」とは、規定された方法に従って試験するとき、原薬や製剤がリストにある全ての判定基準に適合することを意味する。規格は、医薬品の製造業者がその妥当性を示す資料を添付して申請し、行政当局によりその医薬品を製造するための条件として承認された遵守すべき（critical）品質の基準である。

規格には、出荷試験として行う試験に加えて、（２）のウに規定された工程内試験、定期的試験あるいはスキップ試験並びにロットごとにいつも行うわけではないその他の試験を規定してもよい。このような場合には、申請者は、どの試験はロットごとに実施し、どの試験はロットごとには実施しないのかを、後者の場合に実際に行う試験の頻度とそうした頻度で行うことの妥当性に関する考察とともに、承認申請書添付資料に示す必要がある。なお、そのような場合にも、原薬や製剤は、試験を行えば、規定された判定基準に適合するものでなければならない。承認後の規格の変更には、行政当局の承認が必要なことに留意すべきである。

（イ）規格の妥当性の立証

規格に設定する試験方法と判定基準については、その妥当性を示す必要がある。この妥当性は、開発段階における関連するデータ、薬局方記載の基準、毒性試験や残留試験（適切な場合）や臨床試験に用いられた原薬及び製剤のロットの試験データ、加速試験及び長期安定性試験の結果などに基づいて立証する必要がある。更に、分析並びに製造の際に起こり得るば

らつきについて、その妥当な範囲を考察すべきである。上記の点の全てについて考察することが重要である。

本ガイドラインに記載されている以外のアプローチを行ってもよい。そうしたアプローチを採用したときには、申請者はその妥当性を示す必要がある。そのような場合にも、新原薬の合成工程や新製剤の製造工程において得られたデータに基づいて、妥当性を立証する必要がある。その際には、申請された判定基準について理論的な許容幅を考察してもよいが、どのようなアプローチを用いようとも、実測データをまず第一の基本におくべきである。

申請書に記載の保存条件で行われた安定性試験やスケールアップ／バリデーションに用いられたロット、特に、基本となる安定性試験に用いたロット（primary stability batches）の試験結果についても、規格の設定とその妥当性の立証の際に考慮に入れるべきである。多数の工場での製造が計画されている場合には、当初に試験方法と判定基準を設定する際に、それらの工場でのデータを考慮に入れるようにするとよい。この点は、初期の原薬や製剤の製造の経験がどの工場においてもまだ少ないときには、特に重要である。また、代表的な一つの工場でのデータだけに基づいて試験方法と判定基準が設定される場合でも、設定された判定基準には全ての工場で製造された原薬や製剤が適合する必要がある。

試験結果をグラフに表わすのは、特に定量値や不純物含量に関する判定基準の妥当性を示すのに役立つであろう。開発段階でのデータは、実生産工程を反映した新原薬及び新製剤のロットに関する安定性試験のデータとともに、そうした形式により記載するとよい。ある試験を規格から除外することを提案する場合には、開発段階のデータ及びプロセスバリデーションのデータに基づいて、その妥当性を示す必要がある。

イ　規格に必ず設定すべき試験方法と判定基準

以下の２項（（３）のイとウ）に記載された勧告の実施に当たっては、「１の（１）分析法バリデーション：定義と用語に関するガイドライン」（VICH GL1）及び「１の（２）分析法バリデーション：方法論に関するガイドライン」（VICH GL2）を考慮に入れる必要がある。

（ア）新原薬

次に挙げる試験方法と判定基準は、概ね全ての新原薬に適用し得ると考えられる。

ａ）性状（Description）

新原薬の形状（例えば、固体、液体）及び色についての定性的な記述が必要である。保存中にこれらの特性が変化する場合には、その変化について検討を行い、適切な規格を設定すべきである。

ｂ）確認試験（Identification）

確認試験は、存在すると考えられる非常に類似した構造をもつ化合物同士を識別できるようなものであることが望ましい。赤外吸収スペ

クトル法（IR 法）のように、その原薬を特異的に確認できる方法とすべきである。単一条件のクロマトグラフィーの相対保持時間だけで確認する方法は特異的とはみなせないが、異なった原理に基づいて成分の分離を行う二つの条件のクロマトグラフィーを用いるものやHPLC/UV-diode array、HPLC/MS あるいは GC/MS のように複数の方法を組み合わせて単一の分析法としているものは、一般的に用いてもよいであろう。確認すべき新原薬が塩である場合には、個々のイオンに特異的な確認試験を設定する必要がある。塩そのものに特異的な確認試験でもよい。確認試験は規格及び試験方法には記載されるべきだが、安定性試験の間における検査は、確認試験が安定性を示す指標でないのであれば、不要である。

光学活性な新原薬についても、光学特異的な確認試験を設定するか、あるいは光学特異的な定量法を用いる必要がある。この点に関する詳細な議論は、本ガイドラインの（３）のウの（ア）のｄ）を参照のこと。

ｃ）定量法（Assay）

新原薬の定量法には、保存中に出現する分解生成物によって妨害されることのない特異的な分析法（specific, stability-indicating assay）を設定する必要がある。多くの場合、原薬の定量と不純物の含量測定に同じ方法（例えば、HPLC 法）を採用することができる。他の試験により補完されて、規格全体としてその原薬に特異的なものとなっている場合には、非特異的な定量法を用いてもよい。例えば、滴定法を定量法に採用するには、適切な不純物の試験を併せて設定する必要がある。

ｄ）純度試験（Impurities）

有機・無機不純物及び残留溶媒がこの範疇に含まれる。詳しくは、「２－１　新動物用医薬品の原薬中の不純物」（VICH　GL10R）及び「２－３　不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒」（VICH GL18）を参照のこと。

フローチャート#1 は、開発段階で得られたデータに基づいて、不純物について適切な限度値を設定するための指針を示したものである。承認申請時には、製造工程の恒常性を評価するのに十分なだけのデータが得られていることはあまりない。したがって、承認申請時のロットの実測値から厳しい判定基準を設定するのは不適切と考えられる（（２）のオ参照）。

（イ）新製剤（New medicinal products）

次に挙げる試験方法と判定基準は、概ね全ての新製剤に適用し得ると考えられる。

ａ）性状（Description）

剤形についての定性的な記述（例えば、大きさ、形状、及び色）が

必要である。製造工程で又は保存中にこれらの特性が変化する場合には、その変化について検討を行い、適切な措置を取るべきである。どのような性状であれば許容し得るかを、判定基準として設定する必要がある。保存中に色が変化する場合には、定量的な方法を用いて設定するのが適切であろう。

b）確認試験（Identification）

確認試験は、新製剤中の原薬を確認するものであり、存在すると考えられる非常に類似した構造をもつ化合物同士を識別できるようなものとすべきである。赤外吸収スペクトル法（IR 法）のように、原薬を特異的に確認できる方法とすべきである。単一条件のクロマトグラフィーの相対保持時間だけを用いて確認する方法は特異的とは見なせないが、異なった原理に基づいて成分の分離を行う二つの条件のクロマトグラフィーを用いるものや HPLC/UV- diode array、HPLC/MS あるいは GC/MS のように複数の方法を組み合わせて単一の分析法としているものは一般的に用いてもよいであろう。確認試験は規格及び試験方法には記載されるべきだが、安定性試験の間における検査は、確認試験が安定性を示す指標でないのであれば、不要である。

c）定量法（Assay）

新製剤の定量法には、保存中に出現する分解生成物によって妨害されることのない特異的な原薬含量の測定法（specific, stability-indicating assay）を設定する必要がある。多くの場合、原薬の定量と不純物の含量測定に同じ方法（例えば、HPLC 法）を採用することができる。含量均一性試験に用いられる方法が定量法としても適切な場合には、含量均一性試験の結果から製剤中の原薬の含量を求めてもよい。

他の試験により補完されて、規格全体として原薬に特異的なものとなっている場合には、非特異的な定量法を用いてもよい。例えば、適切な不純物の試験を併せて設定することにより、滴定法を出荷の際の原薬含量の測定に採用することが可能である。非特異的な定量法が医薬品添加剤による妨害を受ける場合には、特異的な方法を用いる必要がある。

d）純度試験（Impurities）

有機・無機不純物（分解生成物）及び残留溶媒がこの範疇に含まれる。詳しくは、「２－２　新動物用医薬品の製剤中の不純物」（VICH GL11R）並びに「２－３　不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒」（VICH GL18）を参照のこと。

新原薬が分解して生成する有機不純物や製剤の製造過程において生成する不純物については、新製剤において管理されるべきである。個別規格を設定する分解生成物（構造が既知のものも未知のものもある）の量並びに分解生成物総量について、判定基準を設定する必要がある。新原薬の合成工程に由来する不純物については、通常、原薬を試験す

ることにより管理されているので、新製剤の規格には不純物総量の限度値を設定する必要はない。しかしながら、合成工程由来の不純物であっても、それが分解生成物でもある場合には、その存在レベルを把握し、分解生成物総量に加える必要がある。適切な分析法を用いることにより、承認申請書記載の処方と保存条件の下で、原薬が分解を起こさないことが明確に示された場合には､行政当局の了承を得た上で、分解生成物の試験を削減あるいは削除してもよい。

フローチャート#2 は、開発段階で得られたデータに基づいて、分解生成物について適切な限度値を設定するための指針を示したものである。承認申請時には、製造工程の恒常性を評価するのに十分なだけのデータが得られていることは余りない。したがって、承認申請時のロットの実測値から厳しい判定基準を設定するのは不適切と考えられる（(２）のオ参照)。

ウ　原薬や製剤の各剤形の特性に応じて設定すべき試験方法と判定基準

上述の規格に必ず設定すべき試験の他に、下記のような試験を規格に設定することをケースバイケースで考慮する。原薬や製剤の品質をロットごとに管理していく上で重要な試験については、その試験方法と判定基準を規格に設定する必要がある。下記以外の試験についても、場合によっては、あるいは新しい知見が得られるようになったときには、設定が必要となることがあろう。

（ア）新原薬（New Drug Substances）

ａ）物理的化学的性質（Physicochemical properties）

水溶液の pH、融点又は融解範囲、屈折率のような性質を指す。これらの性質の測定に用いられている方法は、通常、独特のものではあるが、例えば、毛細管による融点測定やアッベ屈折計などのように、その測定にはそれほど習熟を必要としない。この範疇において、どのような試験を設定するかは、新原薬の物理的性質とそれをどのような用途に使おうとしているかを考慮して、決める必要がある。

ｂ）粒子径（Particle size）

固形又は懸濁形の製剤に使われる新原薬では､その粒子径が溶出率、バイオアベイラビリティ、適切な場合は残留期間（residue depletion）及び安定性に著しい影響を及ぼすことがある。このような場合には、適切な粒子径分布の試験方法と判定基準を規格に設定する必要がある。

フローチャート#3 は、粒子径の試験を規格に設定するかどうかを考察するときの指針を示したものである。

ｃ）結晶多形（Polymorphic forms）

新原薬の中には、物理的性質の異なる二つ以上の結晶形で存在するものがある。結晶多形には、溶媒和物あるいは水和物（擬多形とも呼ばれる）や無晶形も含まれる。こうした固体状態の違いが、新製剤の

品質や機能に影響を及ぼすことがある。そうした違いが、製剤機能、バイオアベイラビリティ、適切な場合は残留期間又は安定性に影響を及ぼすような場合には、新原薬の規格に適切な存在形を規定すべきである。

結晶多形が存在するかどうかを調べるのには、通常、物理化学的な測定技術が用いられる。そうした方法の例としては、ホットステージ顕微鏡法を含む融点測定、固体状態での IR 測定、粉末X線回折法、（DSC、TGA、DTA のような）熱分析法、ラマンスペクトル法、光学顕微鏡法及び固体状態の NMR 測定が挙げられる。

フローチャート#4（1）～#4（3）は、どういったときに、どのようにして、結晶形を規格に設定して管理する必要があるかについての指針を示したものである。

注：これらのフローチャートは、順序立てて用いるべきである。

まず、フローチャート#4（1）と#4（2）は、原薬に結晶多形が存在するかどうか、また、結晶形の違いが製剤機能に影響を与え得るかどうかを検討するものである。次に、フローチャート#4（3)。このフローチャートは、製剤中において結晶形間で変化が起こる可能性、及びそうした変化が製剤機能に影響を与えるかどうかを検討するためのものである。

一般に、製剤中において結晶形間で変化が起こっているかどうかを調べるのは技術的に非常に難しい。ゆえに、一般に、その代替となる試験（例えば、溶出試験）（フローチャート#4（3）参照）が製剤機能を管理するために用いられている。代替法が使用できない場合には、結晶形の含量を直接測定する。

d）光学活性な新原薬の試験（Tests for chiral new drug substances）

新原薬がほぼ対掌体の一方だけから成る場合であっても、もう一方の対掌体（原薬の鏡像体）は、「２－１　新動物用医薬品の原薬中の不純物」（VICH　GL10R）及び「２－２　新動物用医薬品の製剤中の不純物」（VICH　GL11R）に規定された安全性の確認並びに構造決定の閾値の対象とされていない。その理由は、それらのレベルにおけるそうした対掌体の不純物含量の測定が実際上難しいためである。しかしながら、測定が可能な場合には、光学活性な新原薬及びそれを用いて製造される新製剤中に含まれるキラルな不純物については、これら二つのガイドラインに規定された原則に従って取り扱われるべきである。

フローチャート#5 は、下記の観点に立って、どんなときにどんな光学特異的な確認試験や定量法並びにキラルな不純物の試験が必要とされるかについての指針を、新原薬と新製剤の両者についてまとめたものである。

《原薬》

純度試験（不純物）：対掌体の一方をキラルな医薬品として開発する場合には、その鏡像体を通常の不純物の場合と同様の考え方で管理する必要があるが、技術的な限界から、その含量測定や安全性の確認を通常の不純物と同じレベルで行うことができないこともある。出発物質あるいは中間について適切な試験を行うことにより、そうした不純物を管理してもよいが、そうした場合には、その妥当性を示す必要がある。

定量法：原薬である対掌体を選択的に定量できる方法を規格に設定する。それには、光学特異的な定量法を用いてもよいし、光学特異的でない定量法と原薬の鏡像体を適切に管理し得る方法とを組合せて用いてもよい。

確認試験：対掌体の一方を医薬品として開発する場合には、対掌体同士及びそのラセミ体を識別できる確認試験を設定する必要がある。原薬がラセミ体の場合でも、下記の二つのケースでは、出荷や適否判定の際の試験には立体特異的な確認試験が適切と考えられる：（１）ラセミ体に代わって対掌体が用いられようになる可能性がかなり大きい場合、又は、（２）結晶化により、非ラセミ的な混合物が図らずもできてしまう可能性を示す証拠がある場合

《製剤》

純度試験（分解生成物）：製剤の製造過程や保存中におけるラセミ化が問題にならないことが示されない限り、製剤中に含まれる原薬の鏡像体の量を管理する必要があると考えられる。

定量法：製剤の製造過程や保存中におけるラセミ化が問題にならない場合には､光学特異的でない定量法を用いてもよいと思われる。ラセミ化が問題になる場合には、光学特異的な定量法を用いる必要があるが、光学特異的でない定量法と原薬の鏡像体を適切に管理し得るバリデートされた方法とを組合せて用いてもよい。

確認試験：製剤の出荷規格には、通常、立体特異的な確認試験は必要とされない。製剤の製造過程や保存中におけるラセミ化が問題にならない場合には、原薬の規格に光学特異的な確認試験が設定してあればよいと考えられる。また、製剤中でのラセミ化が懸念される場合にも、製剤の光学特異的な定量法、あるいはキラルな不純物試験により原薬の同一性を立証することができる。

ｅ）水分含量（Water content）

新原薬が吸湿性である場合、水分により分解される場合又は原薬が化学量論的な水和物である場合には、水分含量の試験が重要である。その判定基準については、水和や水分の吸収が原薬に及ぼす影響を考慮して、妥当なレベルに設定するとよい。試験方法としては、乾燥減量試験法でもよい場合もあるが、水分を特異的に測定する方法（例えば、カールフィッシャー法）が望ましい。

ｆ）無機不純物（Inorganic impurities）

無機の不純物（例えば、触媒）についての試験方法と判定基準を規格に含めるかどうかは、開発段階において、製造工程に関する知識を基に検討する。強熱残分試験の方法と判定基準については、薬局方の方法に従う。妥当性がある場合には、無機不純物は、他の適切な方法、例えば、原子吸光スペクトル法を用いて測定してもよい。

ｇ）微生物限度（Microbial limits）

好気性菌の総数、かびと酵母の総数、及び特定の好ましからざる細菌（例えば、黄色ブドウ球菌、大腸菌、サルモネラ、緑膿菌）が存在しないことを規格に設定する必要があろう。これらは、薬局方の方法により測定できる。どのような微生物試験法と判定基準を設定するかは、原薬の性質、製剤の製造方法、及びその製剤をどのような用途に使おうとしているかに基づいて決める必要がある。例えば、無菌的に製造されている原薬には、無菌試験が適当であろうし、注射剤を製造するのに用いられる原薬には、エンドトキシン試験が適当であろう。フローチャート#6 は、微生物の限度を設定する場合の指針を示したものである。

（イ）新製剤（New medicinal products）

新製剤には、一般に、その剤形の特性に応じて、幾つかの項目について試験方法と判定基準を追加設定する必要がある。種々の剤形の中から、経口固形製剤、経口液状製剤並びに注射剤（小容量及び大容量）の三つの剤形を代表例として選び、それらにふさわしい項目の試験方法と判定基準を以下に示した。他の剤形に対しても、本ガイドラインの考え方を拡張して適用することが推奨される。製剤における光学活性な原薬並びに固体状態での存在形の取扱いについては、（３）のウの（ア）を参照のこと。

ア）経口固形製剤（Solid oral medicinal products）

下記の試験は、錠剤（素錠、コーティング錠）と硬カプセル剤に適用し得る。このうちの幾つかは軟カプセル剤、粉剤及び顆粒剤にも適用し得ると思われる。

ａ）溶出性（Dissolution）

経口固形製剤の規格には、通常、製剤からの薬物の放出性を測定する試験が含まれる。即放性製剤（immediate-release dosage forms）には、通常、１時点での溶出率の測定が適当と考えられる。放出調節製剤（modified-release dosage forms）には、適切な試験条件及びサンプリング法を設定する必要がある。例えば、徐放性製剤（extended-release dosage forms）については、複数時点でサンプリングする必要があるし、放出遅延製剤（delayed-release dosage forms）では、２段階試験（一つの試料について２種の試験液で続けて試験する、又は、二つの試料について別々の試験液で試験するのいずれか適切な方法による）が適当であろう。場合

によっては、溶出試験の代わりに崩壊試験を用いてもよい（(３）のウの（イ）のア）のｂ)）崩壊性の項並びにフローチャート#7（1）参照)。

溶出速度の変化がバイオアベイラビリティに著しい影響を与えることが示された即放性製剤については、許容できないバイオアベイラビリティを示すロットを識別し得る試験条件を設定することが望ましい。また、製剤処方の変化あるいは製造工程の種々の因子の変化が溶出性に著しい影響を与え、そうした変化が規格の他の項目によってコントロールし得ない場合にも、それらの変化を識別できる溶出試験の条件を採用するのが適当であろう（フローチャート#7（2）参照)。

溶出性がバイオアベイラビリティに著しい影響を与える場合、許容できないバイオアベイラビリティを示すロットを排除し得るような試験条件と判定基準を設定する必要がある。溶出性がバイオアベイラビリティに影響しないならば、臨床上、許容可能なロットが適合するような試験条件と判定基準を設定すべきである（フローチャート#7（2）参照)。

徐放性製剤については、異なった溶出速度を示す製剤のバイオアベイラビリティのデータがあれば、*in vitro*/*in vivo* 相関に基づいて判定基準を設定することが可能である。そうしたデータがなく、かつ、薬物の放出が *in vitro* の試験条件に依存しないとは言い切れないときには、得られている実測データに基づいて判定基準を設定する必要がある。各測定時点における平均溶出率の変動の許容範囲は、通常、特に広くても問題がないことを示す生物学的同等性試験のデータがない限り、表示量の± 10 % 以内（全許容範囲として 20 %）とすべきである（例えば、50 ± 10 %との規定は 40 ～ 60 %の許容範囲を意味する)（フローチャート#7 (3) 参照)。

ｂ）崩壊性（Disintegration）

生理学的範囲の全 pH 領域で高い溶解度を示す（pH1.2 ～ 6.8 又は特殊な動物種に適切な pH の範囲で、１回投与量／薬物の溶解度の比が 250mL 以下）薬物を含み、速やかな溶出を示す（pH1.2、4.0、及び 6.8 又は特殊な動物種に適切な pH における 15 分後の溶出率が 80 %を超える）製剤では、溶出試験の代わりに崩壊試験を用いてもよいと思われる。崩壊性と溶出性の間に関連が認められる場合、又は崩壊試験の方が溶出試験よりも製剤間の差の識別性が優れている場合には、崩壊試験の方が適している。こうした場合には、溶出試験を適用する必要はないと思われる。処方や製造工程の変動によって製剤からの薬物の溶出が影響を受けない場合には、溶出試験でなく崩壊試験で十分であろう。このことは、

製剤の開発過程で得られた情報に基づいて決めることができよう（フローチャート#7（1）参照）。

c）硬度／摩損度（Hardness ／ friability）

硬度や摩損度の試験については、通常、工程内試験（（２）のウ参照）として実施するのが適当であり、規格に設定する必要はない。しかしながら、例えば、かみ砕き錠（chewable tablet）の場合のように、硬度や摩損度が製剤の品質に大きな影響を及ぼす場合には、判定基準を規格に設定する必要がある。

d）投与単位の均一性（Uniformity of dosage units）

本項目には、製剤の質量及び製剤中の有効成分の含量の両者が含まれる。試験は、薬局方の方法を用いて行う必要がある。一般に、これらのいずれかが規格に設定されるが、両方とも設定する必要はない。これらの試験は、そうするのが適切な場合には、工程内試験として実施してもよいが、その場合にも判定基準を規格に設定しておく必要がある。含量が質量偏差試験により均一性を試験することが許容される薬局方などで定めた閾値を超えている新製剤に質量偏差試験を適用しようとする場合においても、申請者は、その医薬品の開発段階において、その製剤が十分均質であることを確かめておく必要がある。

e）水分含量（Water content）

水分含量の試験については、必要な場合に設定する。その判定基準については、水和や水分の吸収が製剤に及ぼす影響を考慮して、妥当なレベルに設定するとよい。試験方法としては、乾燥減量試験法でもよい場合もあるが、水分を特異的に測定する方法（例えば、カールフィッシャー法）が望ましい。

f）微生物限度（Microbial limits）

微生物限度試験は、品質保証にかかわる属性であるのと同時に、GMP にかかわる属性でもある。一般に、各製造原料について微生物の試験が行われており、かつ、製剤の製造工程において微生物による汚染や増殖が起きないことが確かめられている場合を除いて、最終製剤について本試験を行う必要がある。本ガイドラインは、医薬品添加剤を直接対象とするものではないが、ここで述べた原則は、新製剤だけでなく医薬品添加剤にも適用できよう。なお、許容される場合には、新製剤と医薬品添加剤のいずれにおいても、本試験をスキップ試験として取り扱うことができよう（医薬品添加剤の微生物試験については、フローチャート#6 を参照のこと）。

好気性菌の総数、かびと酵母の総数、及び特定の好ましからざる細菌（例えば、大腸菌とサルモネラ；薬局方の要件（Pharmacopoeial requirements）に従って更なる微生物の試験が必

要とされる場合がある）が存在しないことを判定基準として規格に設定する必要がある。試験は、薬局方の方法を用い、経験とデータを基に適切に設定された頻度あるいは時点で検体を採取することにより、適切に行われなければならない。どのような微生物試験法と判定基準を設定するかは、原薬の性質、製剤の製造方法、並びにその製剤をどのような用途に使おうとしているかに基づいて決める必要がある。科学的に妥当と考えられる理由があれば、経口固形製剤の微生物限度試験は設定しないでもよい。

フローチャート#8 は、微生物の限度を設定する場合の指針を示したものである。

イ）経口液状製剤（Oral liquids）

通常、次の試験の幾つかは、経口液状製剤及び経口液状製剤調製用の粉末製剤に、その特性に応じて適用される。

a ）投与単位の均一性（Uniformity of dosage units）

本項目には、製剤の質量及び製剤中の有効成分の含量の両者が含まれる。試験は、薬局方の方法を用いて行う必要がある。一般に、これらのいずれかが規格に設定されるが、両方とも設定する必要はない。含量が質量偏差試験により均一性を試験することが許容される薬局方などで定めた閾値を超えている新製剤に質量偏差試験を適用しようとする場合においても、申請者は、その医薬品の開発段階において、その製剤が十分均質であることを確かめておく必要がある。

これらの試験は、そうするのが適切な場合には、工程内試験として実施してもよいが、その場合にも判定基準を規格に設定しておく必要がある。この概念は、単回投与の包装のものにも、多回に分けて投与する包装のものにも適用されよう。

投与単位としては、投与される動物への代表的な投与量を与える。実際の投与単位が別途管理されている場合には、その量を直接測定するか、又は医薬品の総投与量（容量又は質量）を投与回数で割り、計算により求める。点滴器や瓶に付属の点滴チップのような投薬分配用具（dispensing equipment）が使用され、それが投薬上重要な役割を果す場合には、その分配用具を用いて投与量を測定すべきである。さもなければ、標準計量器を用いる必要がある。どのような投薬分配用具を用いるのがよいかは、通常、開発段階で検討されて決められる。

経口液状製剤調製用の粉末製剤には、一般に、質量均一性（質量偏差）試験を適用することでよいと思われる。

b ）pH

必要な場合には、pH の許容範囲を設定し、その妥当性を示す必要がある。

c）微生物限度（Microbial limits）

微生物限度試験は、品質保証にかかわる属性であるのと同時に、GMP にかかわる属性でもある。一般に、各製造原料について微生物の試験が行われており、かつ、製剤の製造工程において微生物による汚染や増殖が起きないことが確かめられている場合を除いて、最終製剤について本試験を行う必要がある。本ガイドラインは、医薬品添加剤を直接対象とするものではないが、ここで述べた原則は、新製剤だけでなく医薬品添加剤にも適用できよう。なお、許容される場合には、新製剤と医薬品添加剤のいずれにおいても、本試験をスキップ試験として取り扱うことができよう。科学的に妥当と考えられる理由があれば、経口液状製剤調製用の粉末製剤の微生物限度試験は設定しないでもよいと思われる。好気性菌の総数、かびと酵母の総数、並びに特定の好ましからざる細菌（例えば、大腸菌とサルモネラ；薬局方の要件（Pharmacopoeial requirements）に従って更なる微生物の試験が必要とされる場合がある）が存在しないことを判定基準として規格に設定する必要がある。試験は、薬局方の方法を用い、経験とデータを基に適切に設定された頻度又は時点で検体を採取することにより、適切に行われなければならない。

フローチャート#8 は、微生物の限度を設定する場合の指針を示したものである。

d）抗菌性保存剤含量（Antimicrobial preservative content）

抗菌性保存剤の添加が必要な経口液状製剤には、保存剤含量の判定基準の設定が必要である。保存剤含量の判定基準は、申請された使用法と有効期間のいずれの段階においても製剤の微生物学的品質を維持し得る抗菌性保存剤のレベルに基づいて設定すべきである。薬局方の保存効力試験法により、抗菌性保存剤の下限値濃度においても、微生物の繁殖抑制に効果的であることを確認しておく必要がある。

抗菌性保存剤含量の試験は、通常、出荷時に行う必要があるが、場合によっては、出荷試験の代わりに工程内試験として行うことも可能である。そのような場合にも、判定基準は規格に設定しておくべきである。

通常、保存剤含量の化学試験が規格に設定されるが、開発の過程でも、また、有効期間や使用期間を通じて（例えば、安定性試験において〔「８－１　動物用新原薬及び製剤の安定性試験」（VICH　GL3R）参照〕）、微生物に対する効力があることを示す必要がある。

e）抗酸化保存剤含量（Antioxidant preservative content）

抗酸化剤含量の試験は、通常、出荷試験として行われるが、開

発段階や安定性試験のデータから妥当と判断される場合には、有効期間中の含量を保証する試験は不必要である。また、許容される場合には、出荷試験の代わりに工程内試験として行ってもよいが、そのような場合にも、判定基準は規格に設定しておく必要がある。出荷試験だけを行うことにした場合、製造方法あるいは容器（被包）を変更しようとするときには、有効期間中の含量を保証する試験を省いたままでよいか検討し直す必要がある。

f）溶出物（Extractables）

一般に、開発段階や安定性試験のデータから、容器（被包）からの溶出物が安全性の観点から許容しうるレベルよりも常に低いレベルにあると評価できる場合には、本試験は、通常、規格に設定する必要はないと思われる。容器（被包）、あるいは製剤の処方を変更するときには、本試験が必要ないか検討し直す必要がある。

本試験を必要とするデータがある場合には、容器（被包）の構成物（例えば、ゴム栓、キャップの裏蓋、プラスチック瓶など）からの溶出物について、試験方法と判定基準を設定する必要がある。本試験は、ガラス以外の素材でできた容器又はガラス以外の素材でできた栓を付けたガラス製の容器に入った経口液状製剤の場合に設定を考える必要がある。容器の構成物をリストアップしておき、開発のできるだけ早い段階でこれらの構成物に関するデータを集めておくべきである。

g）溶出性（Dissolution）

上記の各項目に加えて、難溶性の原薬を含む経口の懸濁剤及び懸濁用の乾燥粉末製剤には、溶出試験とその判定基準を設定する必要がある場合がある。溶出試験は出荷時に行う必要があるが、製品の開発段階でのデータによりその妥当性が示される場合には、本試験は工程内試験として行ってもよい。溶出試験の装置、試験液及び試験条件は、薬局方の方法に従うことが望ましい。それ以外の方法を用いる場合には、妥当性を示す必要がある。溶出試験の方法については、薬局方記載の装置や条件を用いた場合であれ、それ以外の装置や条件を用いた場合であれ、バリデートされる必要がある。

即放性製剤（immediate-release dosage forms）には、通常、１時点での溶出率の測定が適当と考えられる。放出調節製剤（modified-release dosage forms）については、適切な間隔をおいて複数時点でサンプリングを行う必要がある。判定基準は、観測された溶出の変動範囲に基づき、*in vivo* で許容される挙動を示すロットの溶出プロファイルを考慮して、設定される必要がある。溶出試験と粒子径分布（粒度）の試験のいずれを設定すべきかは、

開発段階でのデータを参考にして決めるべきである。

h）粒子径分布（粒度）（Particle size distribution）

経口の懸濁剤には、粒子径分布（粒度）を測定する試験方法と定量的な判定基準を設定する必要があろう。溶出試験と粒子径分布（粒度）の試験のいずれを設定するかは、開発段階でのデータを参考にして決めるべきである。

粒子径分布（粒度）の試験は出荷時に行う必要があるが、製品の開発段階でのデータにより妥当性が示される場合には、本試験は工程内試験として行ってもよい。開発段階において、速やかな溶出を示すことが明らかにされている製剤については、粒子径分布（粒度）の試験を規格に設定しなくてもよいであろう。粒子径分布（粒度）の試験は、妥当性が示されるならば、溶出試験の代わりに用いることができる。

判定基準には、規定された粒子径の範囲内にある粒子数の百分率として粒子径分布（粒度）の許容範囲を設定する。粒子径の平均、上限及び／又は下限について、それぞれ限度値を設定する必要がある。判定基準は、観測された変動範囲に基づき、*in vivo* で許容される挙動を示すロットの溶出プロファイルを考慮して、設定する必要がある。粒子の成長の可能性については、開発段階で検討しておき、その結果を考慮に入れて判定基準を設定する。

i）再分散性（Redispersibility）

保存中に液が澄んでくる（粒子が沈殿する）経口の懸濁剤については、再分散性について判定基準を設定する必要があろう。再分散性の試験としては､振とうするのが適していると思われるが､その方法（機械的振とう法又は手で振とうする方法）及び再分散に要する時間を規定する必要がある。開発段階のデータから妥当性が示される場合には、本試験をスキップ試験とすることや規格に設定しないことも可能である。

j）流動学的性質（Rheological properties）

粘稠な液状製剤又は懸濁剤には、流動学的性質（粘度／比重）の試験方法とその判定基準を規格に設定する必要がある。開発段階のデータから妥当性が示される場合には、本試験をスキップ試験とすることや規格に設定しないことも可能である。

k）再調製時間（Reconstitution time）

経口液状製剤調製用の乾燥粉末製剤には、再調製時間の判定基準を設定する必要がある。希釈剤については、その選択の妥当性を示すべきである。開発段階のデータにより妥当性があると考えられる場合には、本試験をスキップ試験とすることや規格に設定しないことも可能である。

l）水分含量（Water content）

経口液状製剤調製用の粉末製剤には、必要に応じて水分含量の試験方法と判定基準を設定する必要がある。製品開発段階で、吸着水と水和水の影響が明らかにされているならば、一般には乾燥減量試験法で十分と思われるが、水分を特異的に測定する方法（例えば、カールフィッシャー滴定法）が望ましい場合がある。

ウ）注射剤（Parenteral medicinal products）

次のような試験が注射剤に適用される。

ａ）投与単位の均一性（Uniformity of dosage units）

本項目には、製剤の質量及び製剤中の有効成分の含量の両者が含まれる。試験は、薬局方の方法を用いて行う必要がある。一般に、これらのいずれかが規格に設定されるが、両方とも設定する必要はない。本規格は、注射剤調整用の粉末に適用し得る。含量が質量偏差試験により均一性を試験することが許容される薬局方などで定めた閾値を超えている新製剤に質量偏差試験を適用しようとする場合においても、申請者は、その医薬品の開発段階において、その製剤が十分均質であることを確かめておく必要がある。

これらの試験は、そうするのが適切な場合（（２）のウ参照）には、工程内試験として実施してもよいが、その場合にも判定基準を規格に設定しておく必要がある。この概念は、単回投与の包装のものにも、多回に分けて投与する包装のものにも適用されよう。注射剤調製用の粉末製剤には、一般に、質量均一性（質量偏差）試験を適用することでよいと思われる。

ｂ）pH

必要な場合には、pH の許容範囲を設定し、その妥当性を示す必要がある。

ｃ）無菌性（Sterility）

全ての注射剤には、その無菌性を評価するための試験方法と判定基準を設定する必要がある。開発段階のデータや滅菌工程のバリデーションデータにより、その妥当性が示される場合には、最終的に滅菌される製剤にパラメトリックリリースを適用することが可能である（（２）のカ参照）。

ｄ）エンドトキシン／発熱性物質（Endotoxins/Pyrogens）

申請する地域の要件に従って、リムルス試験のような方法を用いて、エンドトキシンの試験方法と判定基準を規格に設定する必要がある。妥当性が示されるならば、エンドトキシン試験の代わりに発熱性物質試験を設定してもよい。

ｅ）不溶性微粒子（Particulate matter）

注射剤には、不溶性微粒子についての適切な判定基準を設定する必要がある。この判定基準には、通常、目に見えない微粒子（sub-visible　particulates）の判定基準とともに、目に見える微粒

子（visible　particulates）や溶液の澄明度の判定基準のうちの適切なものが含まれる。

ｆ）水分含量（Water content）

非水性の注射剤及び注射剤調製用の粉末製剤については、必要に応じて水分含量の試験方法と判定基準を設定する必要がある。製品開発段階で、吸着水と水和水の影響が明らかにされているならば、一般には乾燥減量試験法で十分と思われるが、水分を特異的に測定する方法（例えば、カールフィッシャー滴定法）が望ましい場合がある。

ｇ）抗菌性保存剤含量（Antimicrobial preservative content）

抗菌性保存剤の添加が必要な注射剤には、保存剤含量の判定基準の設定が必要である。保存剤含量の判定基準は、申請された使用法と有効期間のいずれの段階においても製剤の微生物学的品質を維持し得る抗菌性保存剤のレベルに基づいて設定すべきである。薬局方の保存効力試験法により、抗菌性保存剤の下限値濃度においても、微生物の繁殖抑制に効果的であることを確認しておく必要がある。

抗菌性保存剤含量の試験は、通常、出荷時に行う必要があるが、場合によっては、出荷試験の代わりに工程内試験として行うことも可能である。そのような場合にも、判定基準は規格に設定しておくべきである。

通常、保存剤含量の化学試験が規格に設定されるが、開発の過程でも、また、有効期間や使用期間を通じて（例えば、安定性試験において〔「８－１　動物用新原薬及び製剤の安定性試験」（VICH　GL3R）参照〕）、微生物に対する効力があることを示す必要がある。

ｈ）抗酸化保存剤含量（Antioxidant preservative content）

抗酸化保存剤含量の試験は、通常、出荷試験として行われ、開発段階や安定性試験のデータから妥当と判断される場合には、有効期間中の含量を保証する試験は不必要である。また、許容される場合には、出荷試験の代わりに工程内試験として行ってもよいが、そのような場合にも、判定基準は規格に設定しておく必要がある。出荷試験だけを行うことにした場合、製造方法あるいは容器（被包）を変更しようとするときには、有効期間中の含量を保証する試験を省いたままでよいか検討し直す必要がある。

ｉ）溶出物（Extractables）

注射剤の場合、容器（被包）からの溶出物を管理することは、経口液状製剤の場合よりもずっと大切である。しかしながら、開発段階や安定性試験のデータから、容器や栓からの溶出物が安全性の観点から許容しうるレベルよりも常に低いレベルにあると評

価できる場合には、本試験は、通常、規格に設定する必要はないと思われる。容器（被包）、あるいは製剤の処方を変更するときには、本試験が必要ないか検討し直す必要がある。

本試験を必要とするデータがある場合には、容器（被包）の構成物からの溶出物について、試験方法と判定基準を設定する必要がある。本試験は、ガラス以外の素材でできた容器あるいはゴム栓を付けたガラス製の容器に入った注射剤の場合に設定を考える必要がある。開発段階で得られたデータにより妥当性が示されている場合には、出荷時にだけ試験を行えばよい。容器の構成物（例えば、ゴム栓など）をリストアップしておき、開発のできるだけ早い段階でこれらの構成物に関するデータを集めておくべきである。

j）投与システムの機能性試験（Functionality testing of delivery system）

あらかじめ薬液を入れた注射筒、自己注射用カートリッジ、又はそれらと同等のものに充填された注射剤には、投与システムの機能性についての試験方法と判定基準を設定する必要がある。この判定基準には、注射筒の操作性、圧力、密閉性（漏れ）とともに tip cap removal force（チップとキャップの脱離強度）、piston release force（ピストンの初動抵抗）、piston travel force（ピストンの摺動抵抗）及び power injector function force のようなパラメータの管理も含まれる。場合によっては、これらの試験は工程内試験として行うことができる。開発段階のデータから妥当性が示される場合には、本試験をスキップ試験とすることや幾つかあるいは全ての項目を規格に設定しないことも可能である。

k）浸透圧（Osmolality）

等張性をラベルに表示する製品には、その浸透圧を適切に管理する必要がある。開発段階のデータにより妥当性があると考えられる場合には、試験を工程内試験、スキップ試験又は直接計算により本属性を求めることにより行うことが可能である。

l）粒子径分布（粒度）（Particle size distribution）

注射用の懸濁剤には、粒子径分布（粒度）を測定する試験方法と定量的な判定基準を設定する必要があろう。溶出試験と粒子径分布（粒度）の試験のいずれを設定するかは、開発段階でのデータを参考にして決めるべきである。粒子径分布（粒度）の試験は出荷時に行う必要があるが、製品の開発段階でのデータにより妥当性が示される場合には、本試験は工程内試験として行ってもよい。開発段階において、速やかな溶出を示すことが明らかにされている製剤については、粒子径分布（粒度）の試験を規格に設定しなくてもよいであろう。

開発段階において、粒子径が薬物放出性に影響を与える重要な因子であることが明らかにされている場合には、その妥当性を示した上で、粒子径分布（粒度）の試験を溶出試験の代わりに用いることができる。判定基準には、規定された粒子径の範囲内にある粒子数の百分率として粒子径分布（粒度）の許容範囲を設定する。粒子径の平均、上限及び／又は下限について、それぞれ限度値を設定する必要がある。

判定基準は、観測された変動範囲に基づき、*in vivo* で許容される挙動を示すロットの溶出プロファイル及びその製剤をどのような用途に使おうとしているかを考慮して設定する必要がある。粒子の成長の可能性については、開発段階で検討しておき、その結果を考慮に入れて判定基準を設定する。

ｍ）再分散性（Redispersibility）

保存中に液が澄んでくる（粒子が沈殿する）注射用の懸濁剤については、再分散性について判定基準を設定する必要があろう。再分散性の試験としては、振とうするのが適していると思われるが、その方法（機械的振とう法又は手で振とうする方法）並びに再分散に要する時間を規定する必要がある。開発段階のデータから妥当性が示される場合には、本試験をスキップ試験とすることや規格に設定しないことも可能である。

ｎ）再調製時間（Reconstitution time）

全ての注射剤調製用の乾燥粉末製剤には、再調製時間の判定基準を設定する必要がある。希釈剤については、その選択の妥当性を示すべきである。製品開発並びに製造工程のバリデーションの段階のデータから妥当性があると考えられる場合には、本試験をスキップ試験とすることや速やかな溶出を示す製剤については、規格に設定しないことが可能である。

（４）用語集

規格値／判定基準（Acceptance　criteria）：試験の結果が受入れられるかどうかを判定するための限度値、許容範囲、その他の適切な基準

キラル（Chiral）：分子、立体配位、あるいは（結晶のような）巨視的物体において、自身の鏡像と重ね合わせられないこと。この用語は、キラルな分子構造をもつものには、それがラセミ体となっていても拡張して使われている。

配合剤（Combination product）：２種以上の原薬を含む製剤

分解生成物（Degradation product）：経時的に、又は光、熱、pH、水分などの作用により、又は医薬品添加剤や直接容器（被包）との反応により、引き起こされた薬物分子の化学的変化から生じる分子のこと。Decomposition product とも呼ばれる。

放出遅延（Delayed release）：経口投与の直後ではなく、時間が経ってから薬

物の放出を示すこと。

対掌体（Enantiomers）：同じ分子式をもつが、分子内の原子の空間的配列が異なっていて、重ね合わすことのできない鏡像関係にある二つの化合物を指す。

徐放性（Extended release）：製剤的な工夫により、投与後、長時間にわたって薬物が体内で利用されるような放出性

非常に水に溶け易い薬物（Highly water soluble drugs）：pH1.2 ～ 6.8 又は特殊な動物種に適切な pH を含む全 pH 領域で、１回投与量／薬物の溶解度の比が 250mL 以下の薬物（例：化合物Ａは、pH6.8、37±0.5 ℃において 1.0mg/mL という最も低い溶解度を示し、100mg、200mg、400mg の含量の製剤があるとする。この薬物は、１回投与量／薬物の溶解度の比が 400mg/1.0mg/mL ＝ 400mL となって、250mL よりも大となるため、溶解度の低い薬物とみなされる。）

即放性（Immediate release）：薬物の溶出や吸収を意図的に遅延させたり延長させたりしていない製剤からの消化管内における薬物の放出性

不純物（Impurity）：

１　新原薬として規定された化学物質以外の新原薬の構成成分

２　原薬として規定された化学物質あるいは医薬品添加剤以外の製剤の構成成分

構造決定された不純物（Identified impurity）：化学構造を決定することができた不純物

工程内試験（In-process tests）：出荷の際に行われる一連の正式な試験の一部としてではなく、原薬や製剤の製造工程において実施される試験のこと。

放出調節（Modified release）：溶液や即放性製剤のような通常の剤形では得られない治療上又は利便上の目的が達成できるように、製剤からの薬物の放出－時間プロファイル及び／又は放出部位を制御すること。放出調節経口固形製剤には、放出遅延製剤と徐放性製剤が含まれる。

新動物用製剤（New veterinary medicinal product）：これまである地域又はメンバーとなっている国で承認されたことがない医薬品製剤（錠剤、カプセル、液状製剤、クリームなど）、これは新又は既存医薬品成分を含有しており、一般的には１種の医薬品成分を含有している。医薬品添加剤は含まれないこともある。

新動物用原薬（New veterinary drug substance）：これまである地域又はメンバーとなっている国で承認されたことがなく、新しく承認されるに当たって適応症の定められた動物のための疾病治療用の物質で、new molecular entity 又は new chemical entity とも呼ばれる。既に承認された原薬の錯体、エステル、塩である場合もある。

結晶多形（Polymorphism）：同じ原薬に異なった結晶形が存在すること。本ガイドラインでは、溶媒和物や水和物（擬多形とも呼ばれる）や無晶形も含めて取り扱う。

品質（Quality）：原薬又は製剤の意図した用途への適切さのこと。同一性、含量、物質の純度のような特性を指すこともある。

ラセミ体（Racemate）：対掌体分子同士の等モルの複合物（固体、液体、気体の状態で、あるいは溶液中において）のこと。光学活性を示さない。

速やかな溶出を示す製剤（Rapidly dissolving products）：原薬の表示量の 80％以上が、(1) pH1.2、(2) pH4.0、(3) pH6.8 又は特殊な動物種の適切な pH のいずれの試験液中においても 15 分以内に溶出するとき、即放性の経口固形製剤は速やかな溶出を示す製剤とみなされる。

試薬（Reagent）：新原薬の製造に使用された出発物質及び溶媒以外の物質

溶媒（Solvent）：新原薬の合成又は新製剤の製造において、溶液又は懸濁液を調製するための媒体として使用される無機又は有機の液体

規格及び検査方法（Specification）：試験方法、その試験に用いる分析法に関する記載、並びにその方法で試験したときの適否の判定基準（限度値、許容範囲あるいはその他の基準）から成るリスト。原薬又は製剤が意図した用途にふさわしいものであるために適合すべき一組の基準である。また、規格に適合するとは、規定された方法に従って試験するとき、原薬や製剤がリストにある全ての判定基準に適合することを意味する。規格は、医薬品の製造業者がその妥当性を示す資料を添付して申請し、行政当局によりその医薬品を製造するための条件として承認された遵守すべき（critical）品質の基準である。

原薬や製剤の各剤形の特性に応じて設定すべき試験（Specific test）：新原薬又は新製剤の各剤形に、その特性や用途に応じて適用し得ると考えられる試験のこと。

個別規格設定不純物（Specified impurity）：新原薬又は新製剤の品質を保証するために、その限度値が個別に規格に設定された構造既知あるいは構造未知の不純物のこと。

構造未知の不純物（Unidentified impurity）：定性的な分析的指標、例えば、クロマトグラフィーの相対保持時間によってのみ規定される不純物

規格に必ず設定すべき試験（Universal test）：全ての新原薬又は全ての新製剤の規格に設定すべき試験、例えば、性状、確認試験、定量法及び純度試験のこと。

（５）参考（(　) 内は本通知における番号）

VICH GL10R：「新動物用医薬品の原薬中の不純物」（２－１）

VICH GL11R：「新動物用医薬品の製剤中の不純物」（２－２）

VICH GL3R：「動物用新原薬及び製剤の安定性試験」（８－１）

VICH GL1：「分析法バリデーション：定義と用語に関するガイドライン」（１の（１））

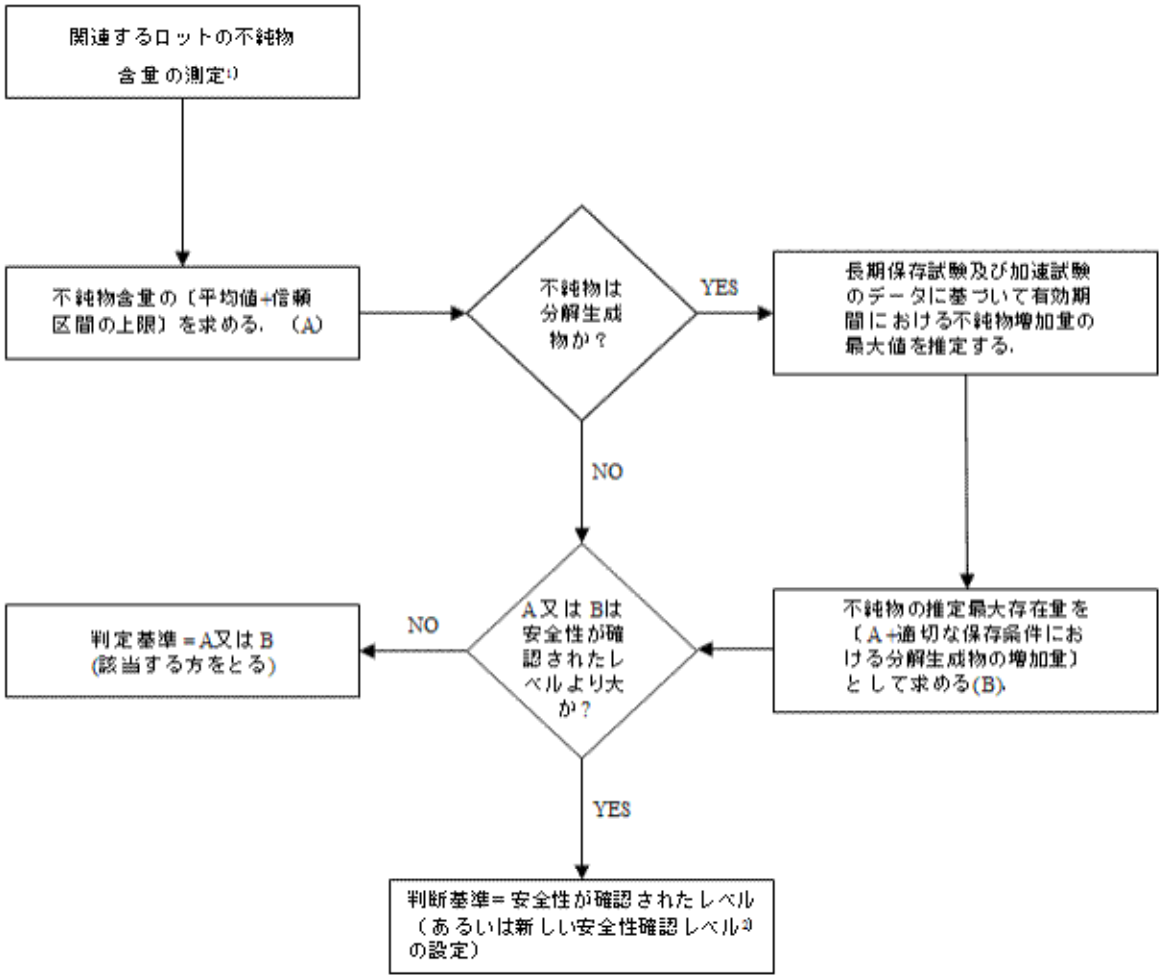
VICH GL2：「分析法バリデーション：方法論に関するガイドライン」（１の（２））

VICH GL18：「不純物：新動物用医薬品、有効成分及び添加物中の残留溶媒」

（６）添付文書：フローチャート#1 ～#8

本ガイドライン中で引用したフローチャートについては、以下のページを参照のこと。

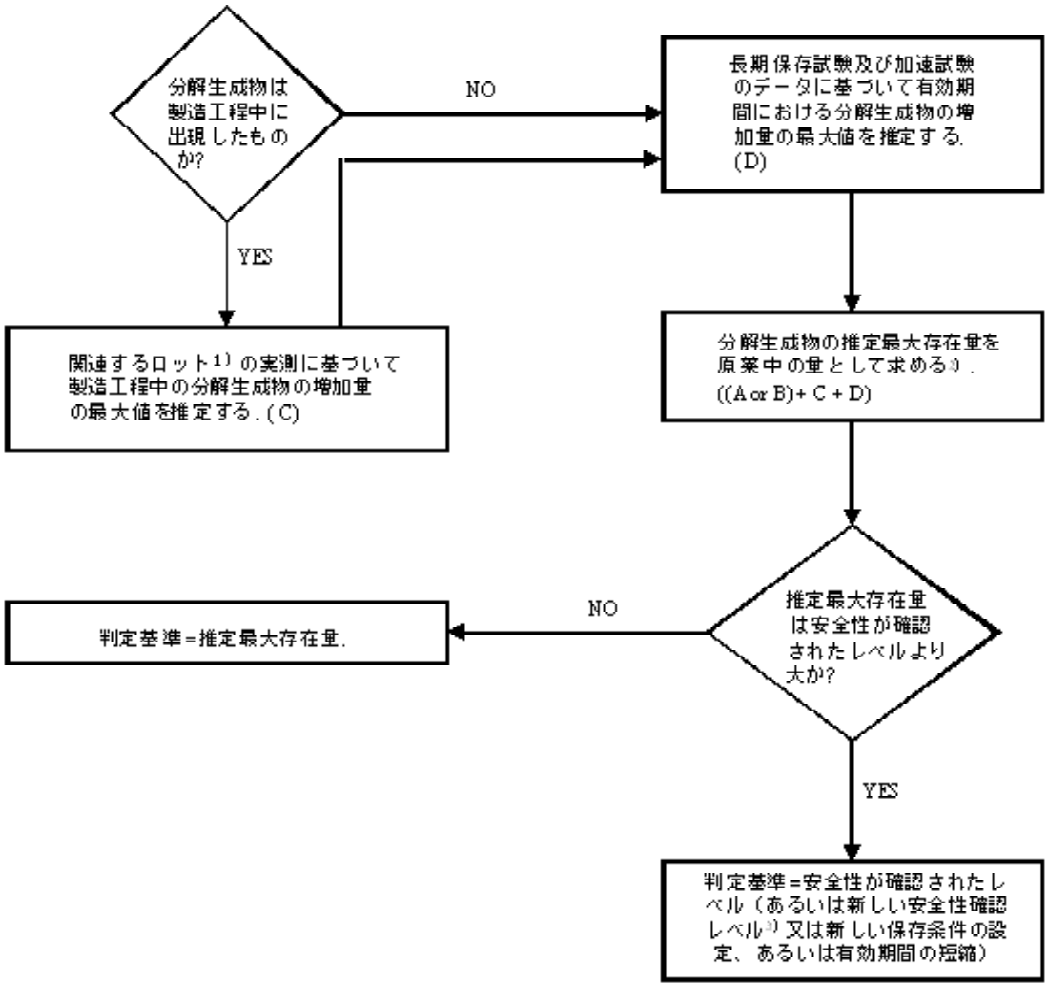
フローチャート＃１：新原薬中の不純物の判定基準の設定



1）関連するロットとは、開発段階、パイロットスケールの段階、ならびにスケールアップの段階のロットのことである。
2）新原薬の不純物のための VICH ガイドライン（１０）を参照のこと。

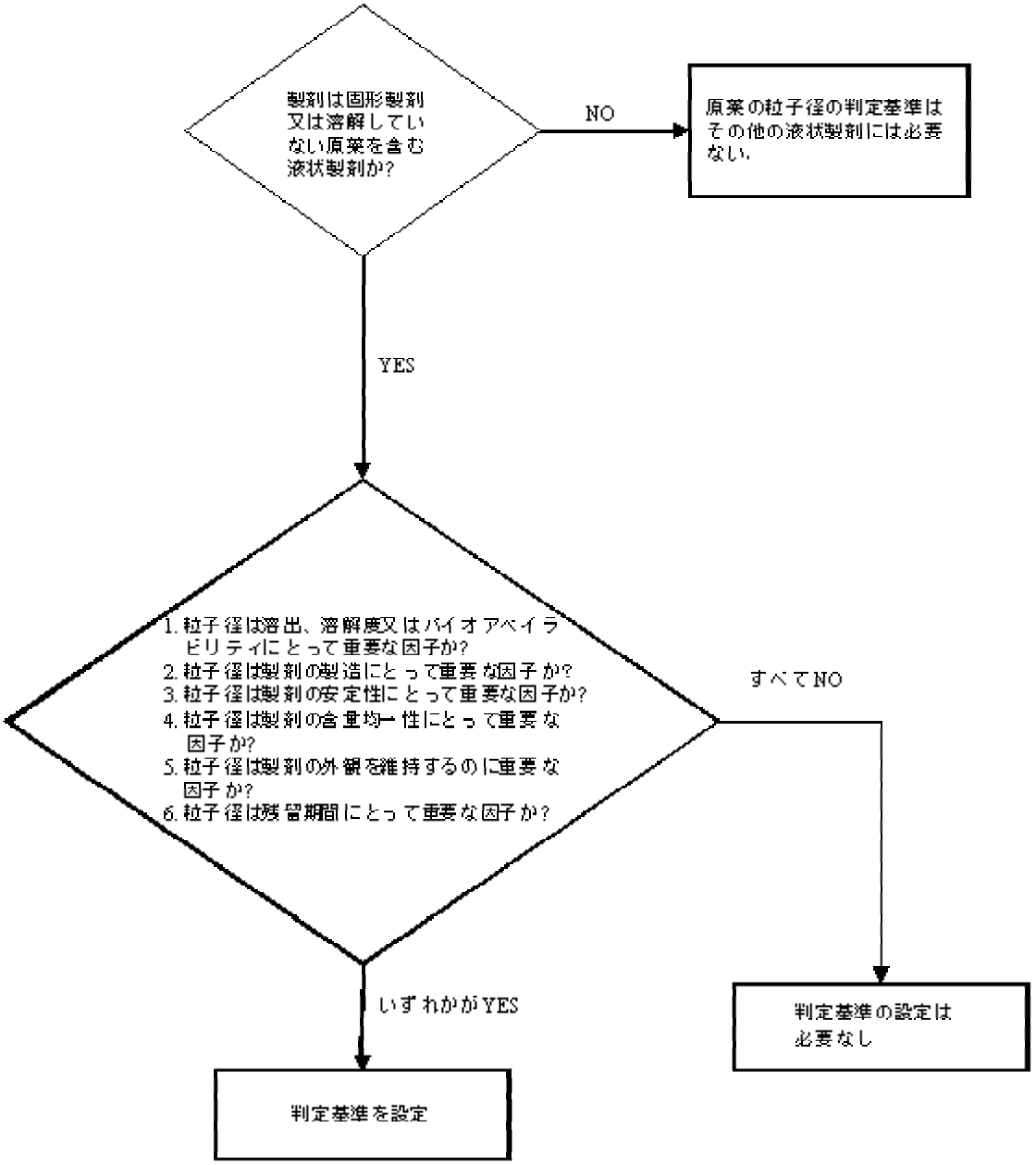
定義: 信頼区間の上限 =ロット分析データの標準偏差の３倍

フローチャート＃２：新製剤中の分解生成物の判定基準の設定



1）関連するロットとは、開発段階、パイロットスケールの段階、ならびにスケールアップの段階のロットのことである。
2）A と B に関する情報については、フローチャート＃１を参照のこと。
3）新製剤の不純物のための VICH ガイドライン（１１）を参照のこと。

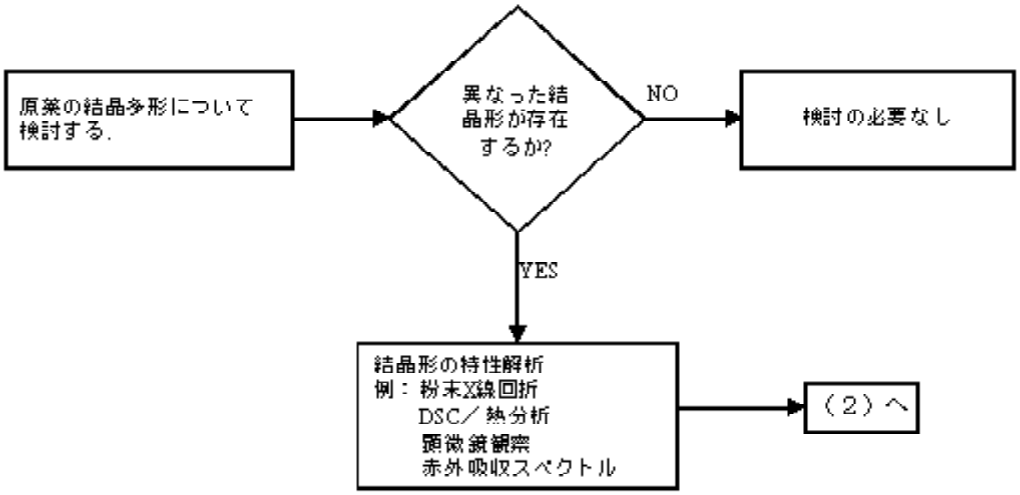
フローチャート＃３：原薬の粒子径分布の判定基準の設定



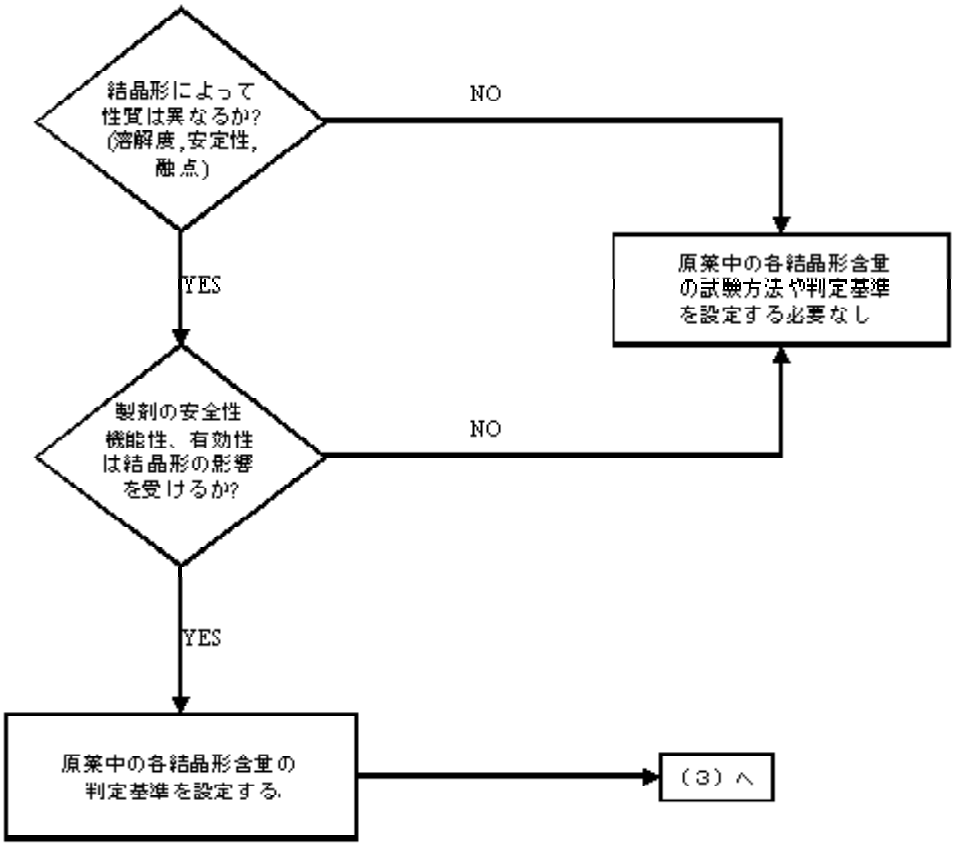
フローチャート＃４：原薬および製剤における結晶多形の判定基準の設定の必要性の検討

原薬

（１）



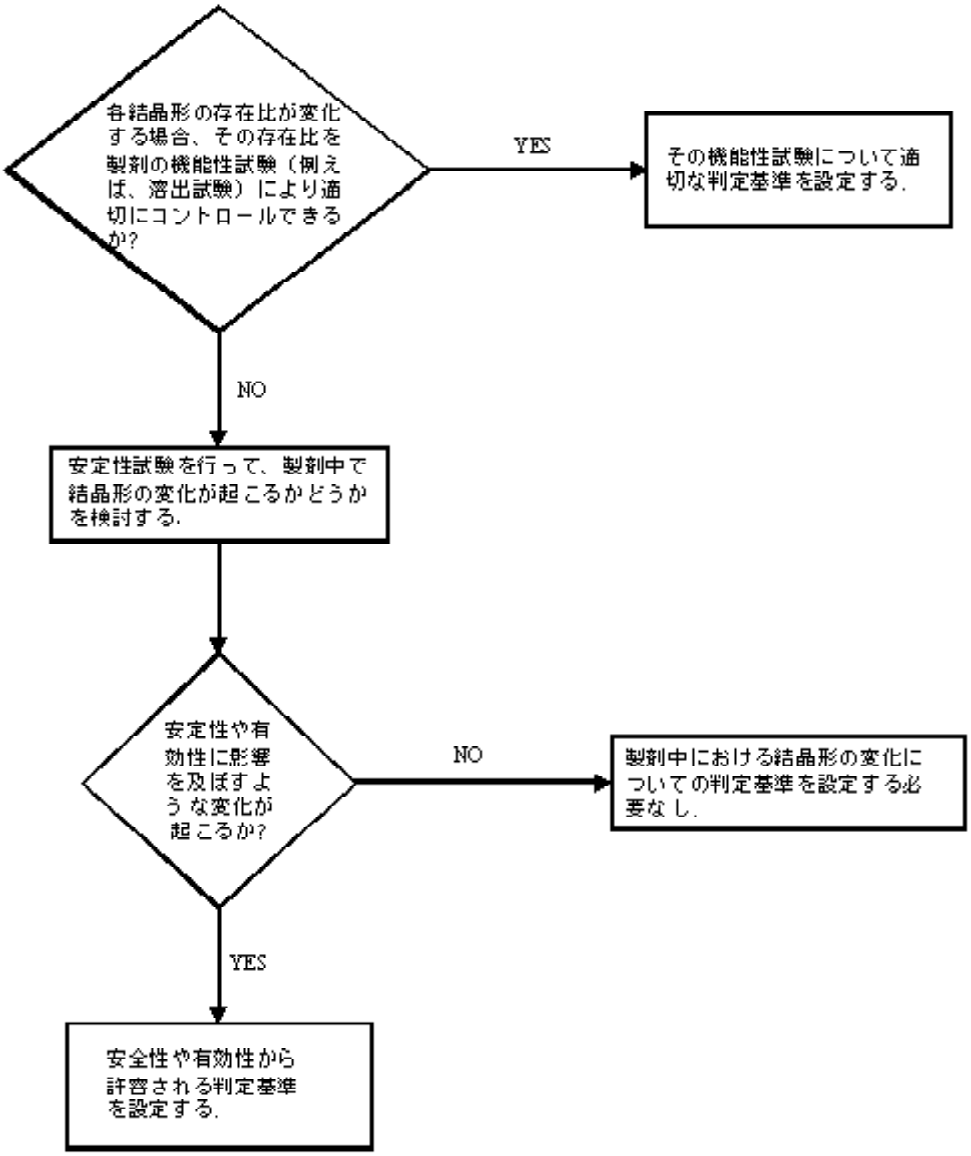
（２）



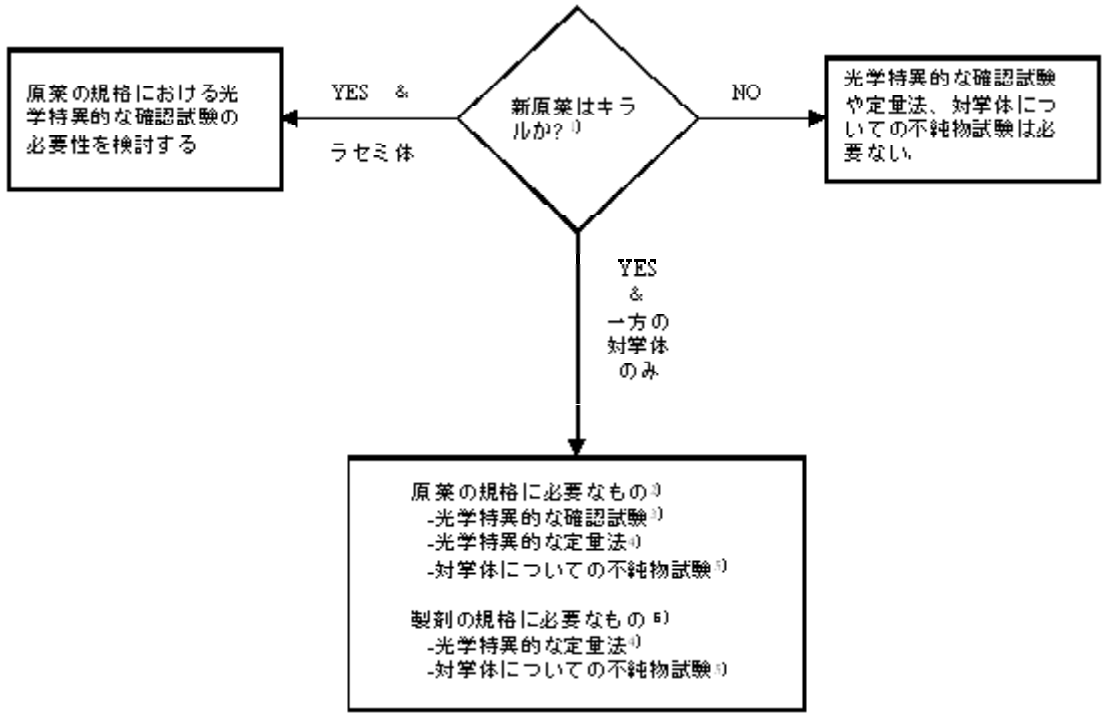
製　剤－固形製剤又は溶解していない原薬を含む液状製剤

注意：製剤中の各結晶形の量を測定することが技術的に可能な場合にのみ、次の検討を行う。

（３）

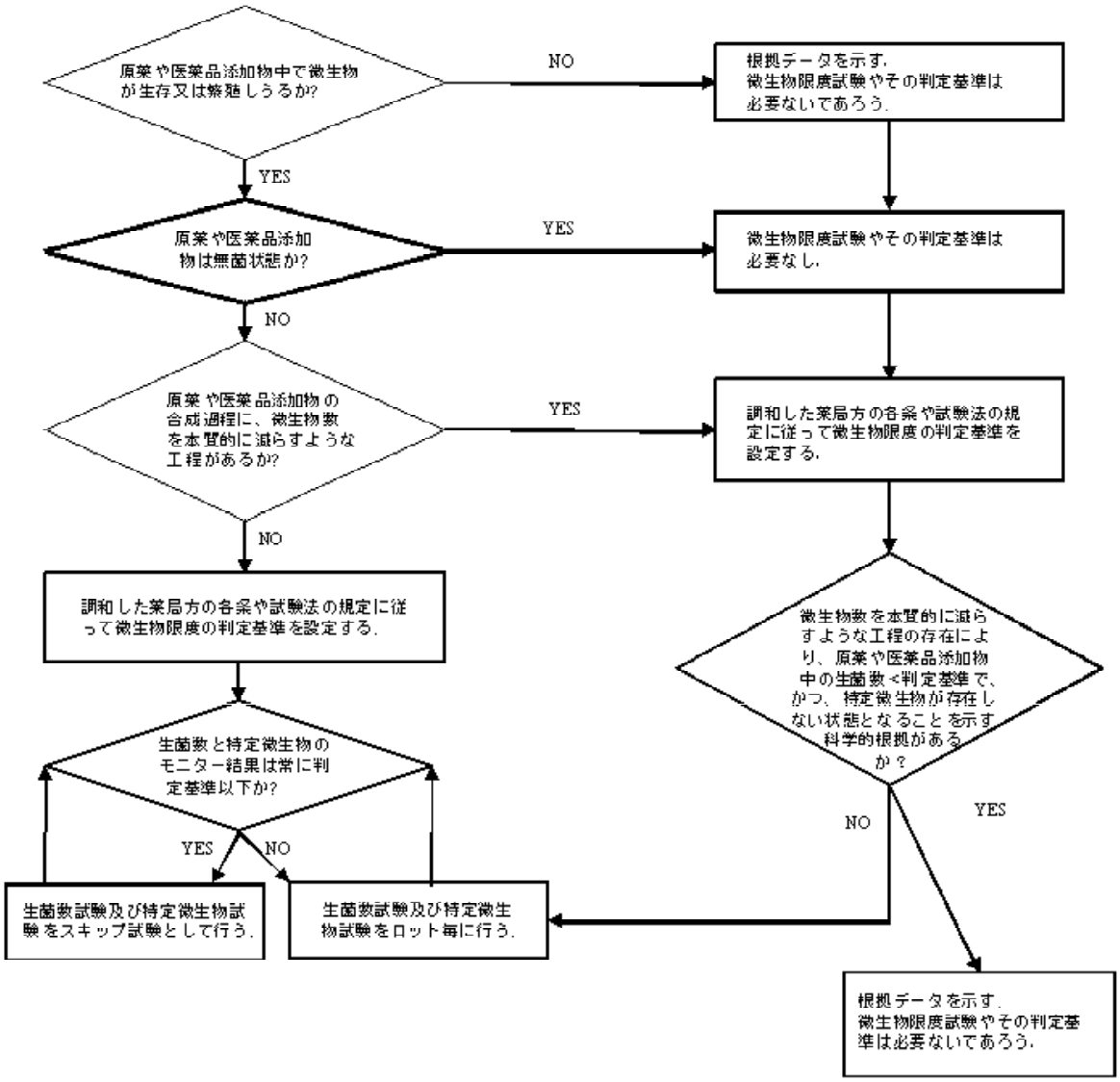


フローチャート＃５：キラルな原薬及びキラルな原薬を含む新製剤における確認試験、定量法ならびに対掌体についての不純物試験の設定



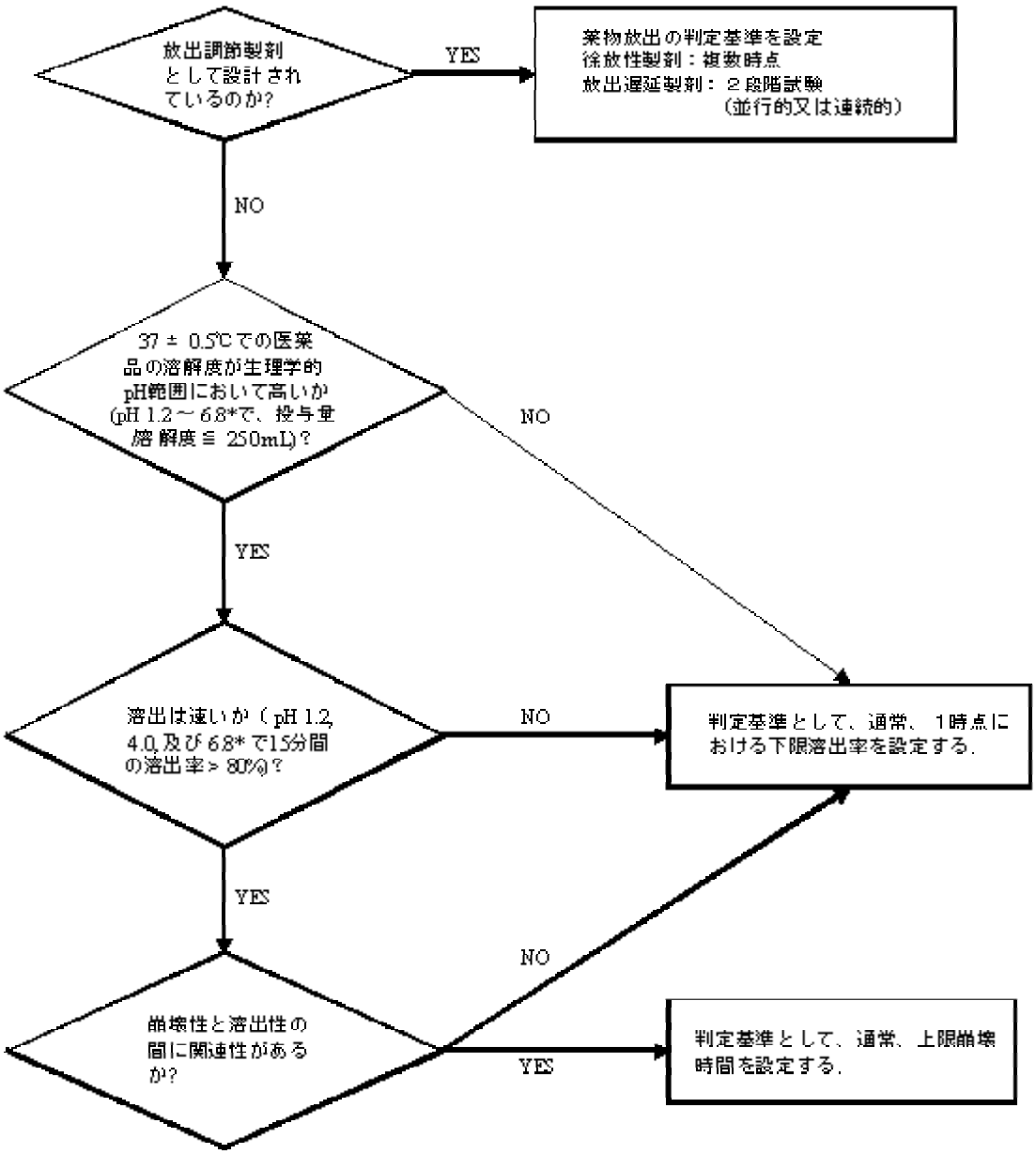
1）天然物由来のキラルな化合物はこのガイドラインの対象としない。
2）原薬の合成工程で使用された原料に由来する他の不純物と同様、開発段階での検討により妥当性が示されている場合には、原薬に対してではなく、適切な出発物質又は中間体に対して限度値を設定することによって、キラルな品質を管理することが可能である。これにあてはまるのは、多数の不斉中心（例えば、三つあるいはそれ以上）を持つものの場合や原薬生産の最終ステップよりも前の段階で管理することが望ましい場合である。
3）光学特異的な定量法や対掌体についての不純物試験は、光学特異的な確認試験の代わりに用いてもよいであろう。
4）光学特異的でない定量法であっても、原薬でない方の対掌体を管理する方法と一緒に用いる場合には、光学特異的な定量法の代わりに用いてもよいであろう。
5）原薬でない方の対掌体の存在レベルは、光学特異的な定量法のデータを利用して求めることもできるし、それとは別個に対掌体についての不純物試験を行って求めることもできる。
6）製剤の製造中あるいは保存中にラセミ化がほとんど起こらないというデータが得られてい　る場合には、製剤については立体特異的な試験を行う必要はないであろう。

フローチャート＃６：原薬及び医薬品添加物の微生物学的試験



フローチャート ＃７：製剤の溶出試験の設定

（1）どのタイプの判定基準を設定すべきか？

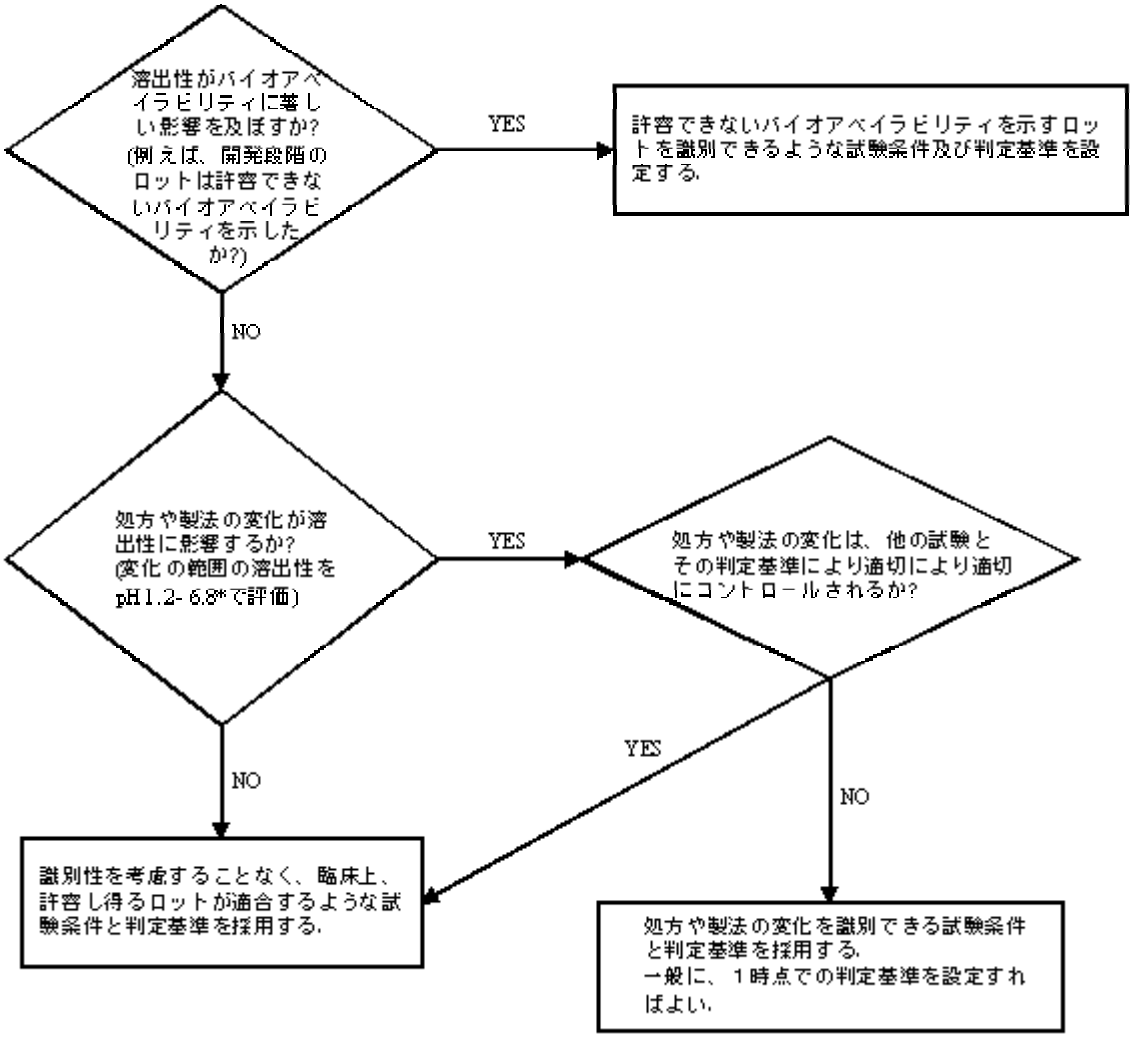


＊動物種に適した pH を選択する。

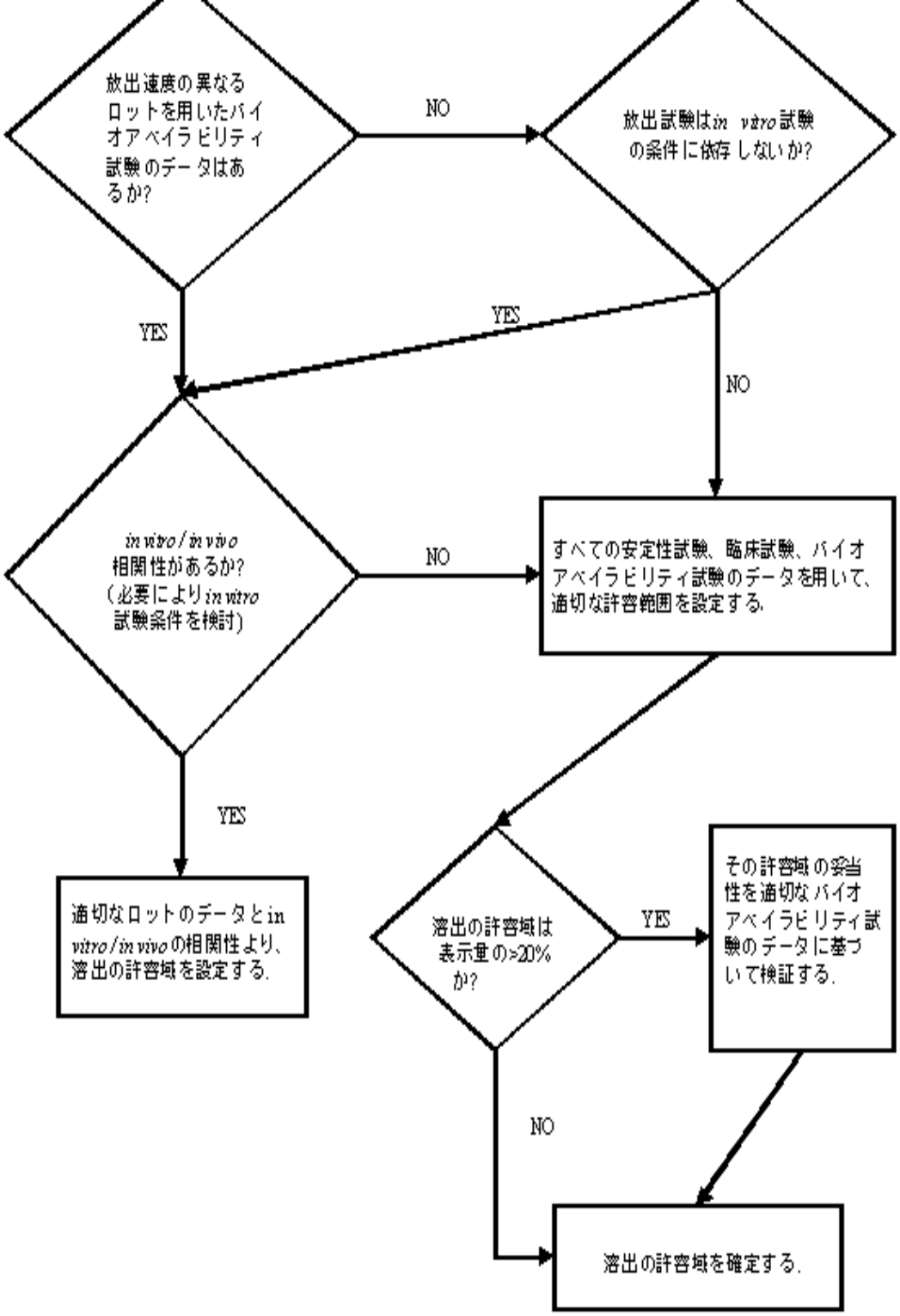
次項へ続く

フローチャート ＃７：製剤の溶出試験の設定

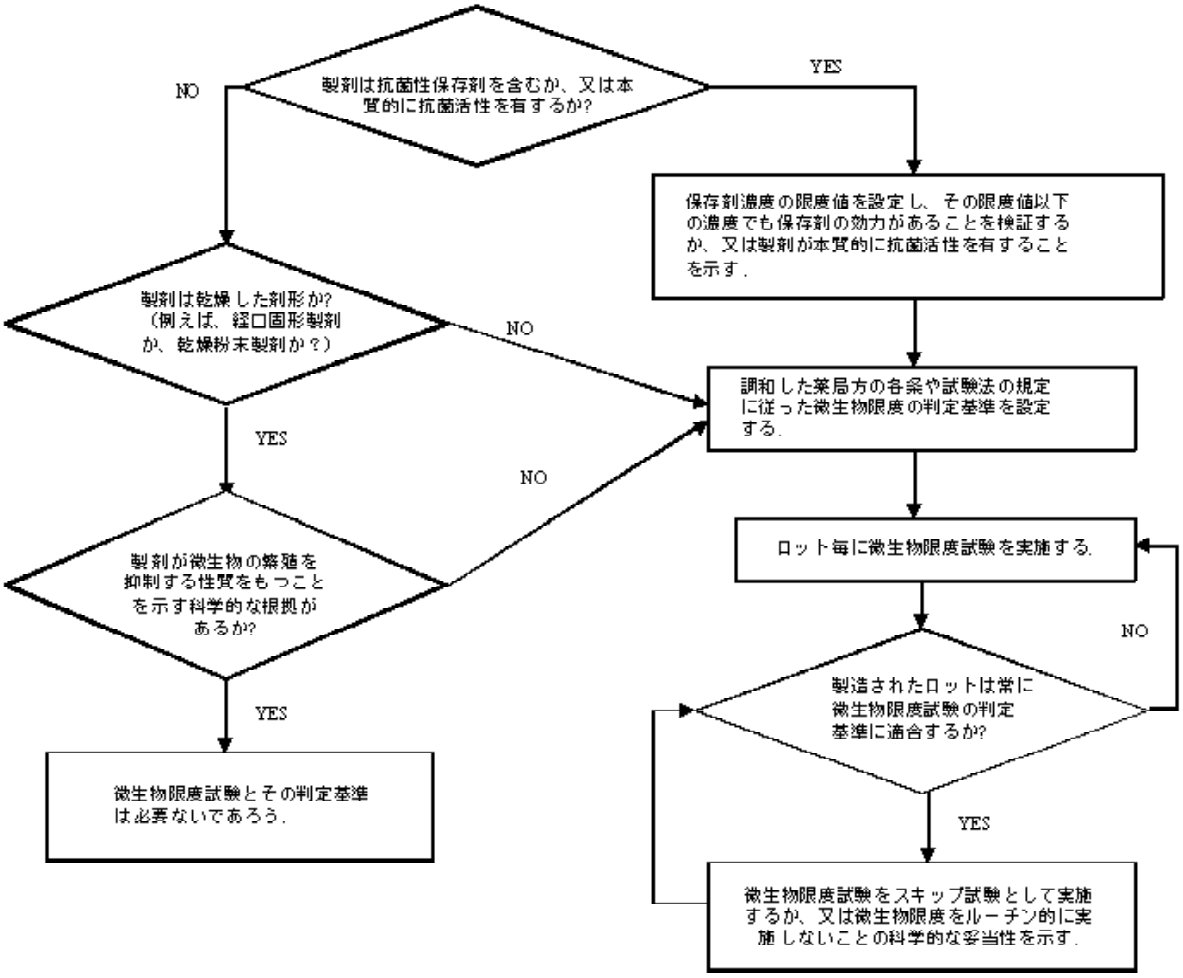
（2）即放性製剤の試験条件と判定基準



＊動物種に適した pH を選択する。


放出速度の異なるロットを用いたバイオアベイラビリティ試験のデータはあるか?
NO
放出試験はin vitro試験の条件に依存しないか?
YES
YES
NO
in vitro/in vivo相関性があるか?(必要によりin vitro試験条件を検討)
NO
すべての安定性試験、臨床試験、バイオアベイラビリティ試験のデータを用いて、適切な許容範囲を設定する.
YES
適切なロットのデータとin vitro/in vivoの相関性より、溶出の許容域を設定する.
溶出の許容域は表示量の±20%か?
YES
その許容域の妥当性を適切なバイオアベイラビリティ試験のデータに基づいて検証する.
NO
溶出の許容域を確定する.

フローチャート＃８：非無菌製剤の微生物学的試験



３－２　新動物用生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品)の規格及び検査方法の設定（VICH GL40）

（１）緒言

ア　目的

本ガイドラインは、新動物用生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）を新たに承認申請し、上市を目指すに当たって、規格及び検査方法の設定並びにその根拠を可能な限り国際的に整合性のあるものとするための一般的な原則について、明らかにしたものである。

イ　背景

「規格及び検査方法」とは、試験項目、用いる分析方法、及びその方法で試験したときの規格値／適否の判定基準（数値で表した限度値又は範囲、あるいはその他の基準）を示したものとして定義される。規格及び検査方法は、原薬、製剤又はこれらの製造工程における中間体が、それぞれの使用目的にかなっていると判定するために必要な要素をセットにして定めたものである。「規格及び検査方法に適合する」とは、原薬及び製剤について、示された各分析方法に従って試験するときに全ての規格値／適否の判定基準に適合するということである。規格及び検査方法は、承認申請時に、その設定理由とともに製造業者から提示され、規制当局により承認のための必須条件とされるもので、医薬品の品質確保上、極めて重要な規制基準である。

規格及び検査方法は、医薬品の品質及びその恒常性の確保を図ろうとする方策全体の要素の一つである。他の要素としては、開発段階での医薬品の十分な特性解析（規格及び検査方法の多くは、これが基盤になる）、GMP の遵守、製造工程の評価／検証、原材料の試験、工程内管理試験及び安定性試験等が挙げられる。

規格及び検査方法では、原薬及び製剤の特性を徹底的に解析することを目的とするというより、むしろ品質を確認することを目的として、試験項目、試験方法及び規格値／適否の判定基準を選択する。また、医薬品の安全性及び有効性を確保するために有用な分子特性及び生物学的な特性に焦点を当てる必要がある。

ウ　適用対象

本文書において取り扱い、解説する指針は、組織、体液、細胞培養から単離され、又は組換えデオキシリボ核酸（r-DNA）技術により生産され、十分に特性解析がなされたタンパク質、ポリペプチド類及びそれらの誘導体に適用する。したがって、本文書は、サイトカイン類、成長ホルモン類及び成長因子類、インスリン類及びモノクローナル抗体等の製剤のための規格の作成と承認申請について書かれている。本文書は、抗生物質類、ヘパリン類、ビタミン類、細胞の代謝産物類、DNA 産物類、アレルゲン抽出物類、ワクチン類、細胞類、並びに全血及び血液の細胞成分には適用されない。

化学合成薬品については、「３－１　新動物用医薬品の原薬及び製剤の規格及び検査方法の設定：化学物質に関するガイドライン」（VICH GL39）で、

規格及び試験方法並びにその他の基準を示す。

本文書は、特定の試験方法や特定の規格値／適否の判定基準を推奨するものではなく、また、非臨床試験や臨床試験のための検体の規制に適用されるものでもない。

（２）規格及び検査方法の設定において考慮すべき基本的事項

ア　特性解析

適切な分析技術を用いた生物薬品の特性解析（物理的化学的性質、生物活性、免疫化学的性質、純度及び不純物に関する解析など）は、適切な規格及び試験方法を設定するために必要となるものである。規格値／適否の判定基準は、非臨床試験や臨床試験に用いたロットから得られたデータ、製造の一定性を示すために用いたロットから得られたデータ､及び安定性試験データ、並びに医薬品開発段階で得られた適切なデータに基づいて設定し、その根拠を示す必要がある。

開発段階では広範かつ詳細な特性解析を行う。また、重要と考えられる工程変更があった場合にも、必要に応じ、詳細な特性解析を行う。承認申請時までに、適切な標準品が入手可能であれば、当該医薬品と標準品との比較検討を行っておく必要がある。対応する天然品との比較検討については、実施可能でかつ適切と考えられる場合に実施すること。また､承認申請時までに、製造業者は、生産ロットの生物学的試験（バイオアッセイ）及び理化学試験に供するために、適切に特性解析した自家標準物質を確立していなければならない。新しい分析技術の開発や既存の技術の改良は日進月歩で進んでいるので、適時取り入れるべきである。

（ア）物理的化学的性質

目的物質の物理的化学的特性の解析計画には、通常、組成分析、物理的性質及び一次構造の決定を含める。目的物質の高次構造に関する情報が適切な理化学的手法により得られる場合もある。なお、目的の高次構造を形成していることに関する確証は、通常、その生物活性から得られる。

タンパク質性医薬品においては、生体による生合成過程を生産に利用していることから、分子構造上不均一なものが産生される可能性が本質的に存在する。したがって、翻訳後修飾が想定されるケースでは、目的物質は、例えば糖タンパク質におけるグリコフォームのように、翻訳後修飾を受けた多様な分子種の混合物となることもある。これらの分子種には生物活性があり、その存在が医薬品の安全性及び有効性に悪影響を及ぼさないこともある（（２）のアの（エ）参照)。製造業者は、目的物質がどのような不均一性のパターンを示すかを明らかにし、これが非臨床試験及び臨床試験に用いたロットにおけるパターンに一致していることを示しておく必要がある。製品の不均一性のパターンに恒常性があることが立証されれば、個々の分子種の生物活性、有効性及び安全性（免疫原性を含む）を評価する必要は必ずしもない。

不均一性は、培養工程以降の原薬又は製剤の製造中や保存中にも生じる

可能性がある。これらの不均一性は医薬品の品質を規定するものであるので、不均一性の程度及びプロファイルを特性解析し、ロット間での恒常性を保証する必要がある。目的物質に由来する物質のうち、生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質のそれに匹敵する性質を持つものは、「目的物質関連物質」として考える。製造工程の変更や分解物・変化物の生成により、製品における不均一性のパターンが非臨床試験及び臨床試験に用いた製品でみられていたパターンと異なるものとなった場合には、その変化がどのような意味を持つかについて評価する必要がある。

物理的化学的性質を明らかにするための分析方法を、付録（６）のアに例示する。新しい分析技術の開発や既存の技術の改良は日進月歩で進んでいるので、適時取り入れるべきである。

ロットごとの規格及び検査方法（（４）参照）には、これらの方法のうち適切なものの組合せを選定するとともに、その妥当性を明らかにする必要がある。

（イ）生物活性

生物学的性質の評価も、完全な特性解析プロファイルを確立する上で、物理的化学的性質の評価と同様に必要不可欠なものである。重要な生物学的性質の一つとして、特定の生物学的効果を発揮するための特異的な機能やその程度を表す「生物活性」が挙げられる。

生物活性を測定するためにどのような生物学的試験（バイオアッセイ）が有用であるかは、製造業者が提示する必要がある。生物活性の測定に用いられる方法の例としては、以下のようなものが挙げられる。

- 動物を用いるバイオアッセイ。これは、製品に対する生体の生物学的応答を測定する。
- 培養細胞を用いるバイオアッセイ。これは、細胞レベルでの生化学的又は生理学的応答を測定する。
- 生化学的試験。これには、酵素反応速度の解析による生物活性の測定や、免疫学的相互作用により引き起こされる生物学的応答を測定することなどが含まれる。

その他、リガンドーレセプター結合試験のような試験方法が活用できる場合もある。

「力価」とは、当該医薬品の（生物学的性質に関連する）特性に基づく生物活性を定量的に表す尺度であり、「単位」で表される。これに対して、「物質量」とは、タンパク質量に関する理化学的尺度であり、質量で表される。力価測定に用いられる生物活性が臨床上期待される作用と同様あるいは類似のものである必要は必ずしもない。臨床上期待する作用と生物学的試験における活性との相関は、薬力学試験又は臨床試験において確認しておく必要がある。

生物学的試験の結果は、「国際標準品」又は「国内標準品」が入手可能で、かつ当該試験に適切である場合には、標準品を基に検定した活性の単

位で表す。そのような標準品が存在しない場合は、特性解析した「自家標準物質」を確立しておき、製造ロットの試験結果は自家単位で報告することとする。

複雑な分子では、物理的化学的情報が広範にあったとしても、それにより高次構造を確定することはできないが、生物活性から高次構造が正しく形成されていることを推定できることが多い。このような場合には、信頼区間が比較的広い生物学的試験であっても、特異的な定量法による測定と組み合わせれば、用いてよいこともある。重要なことは、以下のような場合にのみ、製品の生物活性を測定する生物学的試験を理化学的試験法に置き換えてもよいであろうということである。

・　当該理化学的方法により、高次構造に関する情報を含めて、当該医薬品に関する十分な物理的化学的情報があますところなく得られ、かつ生物活性との適切な相関が証明されていること。

更に

・　十分に確立された製造実績があること。

理化学的試験のみを、（適切な相関に基づいて）生物活性の定量法として用いる場合には、結果は質量で表す。

製造業者は、ロットごとの規格及び試験方法（（４）参照）に、適切な定量試験（生物学的又は理化学的方法、あるいは両者）を選定するとともに、その妥当性を明らかにする必要がある。

（ウ）免疫化学的性質

抗体が目的物質の場合には、その免疫学的性質を十分に特性解析すること。精製抗原及び抗原の特定の領域と抗体との結合試験を行い、可能な限り、アフィニティ（１価の抗原結合部位と１価のエピトープ（抗原決定基）との間での結合の強さ）、アビディティ（多価抗体と多価抗原との結合の強さ）、免疫反応性（交差反応性を含む）を決定する。更に、関連するエピトープを有する標的分子を生化学的に明らかにし、可能ならばエピトープ自身も明確にする。

（目的物質が抗体以外の場合であっても）原薬又は製剤において、タンパク質分子の様々なエピトープを認識する抗体を用いた免疫化学的方法（例えば、ELISA、ウエスタンブロット）を利用して、タンパク質分子を検査しようとする場合がある。タンパク質の免疫化学的性質は、その同一性、均一性や純度を確認するのに利用できるほか、定量法に活用できることもある。

免疫化学的性質に関する試験をロットごとの規格及び試験方法の一つとして利用している場合には、抗体に関する全ての関連情報を提供できるようにしておく必要がある。

（エ）純度、不純物、混入汚染物質

・　純度

純度に関して、絶対的な純度はもとより、相対的な純度を決定しよ

うとすることは、分析上の大きな挑戦である。また、得られた結果は用いた試験方法に大きく依存することになる。従来から、生物起源由来医薬品の相対的純度は比活性（医薬品 mg 当たりの生物活性単位）として表されてきたが、その比活性も用いた試験方法に大きく依存している。結局、原薬及び製剤の純度は、各種の分析方法の組合せにより評価することになる。

生物薬品には、生体の合成系を利用した製造工程により生産されるという特徴と、独特な分子特性がある。そのため、原薬が数種類の分子種あるいは分子変化体を含んでいることがある。これらの分子種が、しかるべき翻訳後修飾から期待されるものであれば、それらは目的物質とする。目的物質の分子変化体が製造中や保存中に生成することがあるが、それらが目的物質に匹敵する同等・同質の特性を持つ場合は、それらを目的物質関連物質と考え、不純物とはしない（（２）のアの（ア）参照）。

目的物質関連物質については、それぞれ個別の又は総量での規格値を適切に設定する必要がある。

ロットごとの規格及び検査方法（（４）参照）には、純度を測定する試験として数種類の方法を適切に組み合わせたものを選定するとともに、その妥当性を明らかにする必要がある。

・　不純物

目的物質及び複数の目的物質関連物質から構成される原薬及び製剤の純度面からみた評価に加えて、含有する可能性のある不純物に関しても評価を行う必要がある。不純物として想定されるものには、製造工程に由来するものもあれば目的物質に由来するものもある。これら不純物には、構造が明らかにできるもの、部分的に特性解析できるもの、同定できないものなどがある。不純物がそれなりの量、生成する場合には、必要な範囲でそれらの特性解析を行う必要がある。適切ならば生物活性についても評価する必要がある。

「製造工程由来不純物」の範疇には、製造各工程に由来する以下に列挙するものが含まれる。すなわち、細胞基材に由来するもの（例えば、宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA）、細胞培養液に由来するもの（例えば、インデューサー、抗生物質、培地成分）、又は細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するものなどがある（付録（６）のイの（ア）参照）。「目的物質由来不純物」（例えば、前駆体、ある種の分解物・変化物）は、製造中や保存中に生成する分子変化体であって、かつ生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質に匹敵する特性を持たないものである。

不純物に関する規格値は、非臨床試験及び臨床試験で用いたロット及び製造の一定性を評価する試験におけるロットから得られたデータに基づいて設定する必要がある。

不純物（製造工程由来不純物及び目的物質由来不純物）に関する規格値は、それぞれ個別に又は総量で適切に設定する必要がある。不純物のうちのあるものについては、適切なプロセスコントロールを行うことにより、規格値を必ずしも設定する必要がなくなるものもある（（２）のウ参照）。

不純物に関する試験に用いられる分析方法を、付録（６）のイに例示する。新しい分析技術の開発や既存の技術の改良は日進月歩で進んでいるので、適時取り入れるべきである。

ロットごとの規格及び検査方法（（４）参照）には、これらの方法を適切に組み合わせたものを選定するとともに、その妥当性を明らかにする必要がある。

・　混入汚染物質

医薬品中の「混入汚染物質」とは、製造工程には本来存在しないはずのもので、外来性の化学物質や生化学的な物質（例えば、微生物由来プロテアーゼ）又は微生物類のようなもの全てを指す。汚染物質の混入は厳に避けるべきであり、適切な工程内管理試験の規格値／適否の判定基準や処置基準値又は原薬及び製剤の規格及び試験方法により適正に管理する必要がある（（２）のウ参照）。外来性ウイルス又はマイコプラズマの汚染に関しては、特別な例として、処置基準値の概念は適用しない。この件に関しては、ICH ガイドライン Q5A「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」及び ICH ガイドライン Q5D「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」に提示されている方策を考慮してもよい。

（オ）物質量

物質量は、通常、タンパク質量として測定される生物薬品にとって重要な要素であるので、適切な試験法（通例、理化学的な原理を持つ方法）を用いて測定すること。物質量に基づく定量値が、生物学的試験法を用いて得られた値と直接関連していることを証明できる場合もある。このような相関があれば、製造工程のうち充填のような工程では、生物活性よりも、むしろ物質量を尺度として用いる方が適切な場合もある。

イ　分析上の留意事項

（ア）標準品及び標準物質

新有効成分含有医薬品を承認申請する際には、国際標準品又は国内標準品が利用できる場合はほとんどない。承認申請時までに、製造業者は、代表的な製造ロットでかつ臨床試験に用いた検体を代表するロットから調製し、適切に特性解析した「自家一次標準物質」を確立しておく必要がある。生産ロットの試験に用いる「自家常用標準物質」は、この一次標準物質を基に検定する。国際標準品又は国内標準品が利用でき、かつ適切であれば、これを基に標準物質を検定する必要がある。生物学的試験及び理化学試験

の両方に同一の標準物質を使用することが望ましいが、別々の標準物質が必要な場合もある。また、目的物質関連物質、目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物に対して、それぞれの標準物質を個別に確立する必要がある場合もある。適宜、承認申請書中に、標準物質の調製や精製に関する記述を入れておくこと。標準物質の特性解析、保存条件、及び安定化のための製剤設計についても、資料を作成し、提出すること。

（イ）分析法バリデーション

規制当局に承認申請するときには、申請者は、規格及び試験方法に採用した分析方法について、「１の（１）分析法バリデーション：定義と用語に関するガイドライン」（VICH　GL1）及び「１の（２）分析法バリデーション：方法論に関するガイドライン」（VICH　GL2）に従ったバリデーションを完了していなければならない。ただし、生物薬品の分析に用いられる試験の特殊性に起因する特別な問題がある場合は、この限りではない。

ウ　プロセスコントロール

（ア）工程に関連する留意事項

製造工程を適切に設計すること及び工程が有する能力を把握しておくことは、その管理や再現性の確保が可能で、かつ規格及び試験方法に適合する原薬あるいは製剤を製造することができる製造工程を確立するために必要な方策の一部である。このような観点から、各種の管理基準値については、開発初期から実生産規模の製造に至る間の全ての過程で得られた情報のうち、特に重要なものを基に、その妥当性が明らかにされることになる。

不純物のうち、あるものについては、効果的なプロセスコントロールにより許容できるレベル内に収まっているか、又は容認できるレベル以下まで効率的に除去できることを適切な検討によって実証していれば、原薬や製剤を対象とする試験は必ずしも必要ではなく、かつ規格及び検査方法に含めなくてもよい場合がある。本件に関する検討については実生産規模での確認が必要なこともある。それについては、各国／地域の規制に従うこと。承認申請時にはごく限られたデータしか得られていないこともあると認識されている。したがって、上に述べた考え方は、各国／地域での規制に従って、販売が認められた後に実行に移されることもある。

（イ）工程内管理試験における規格値／適否の判定基準及び処置基準値

工程内管理試験は、極めて重要な意志決定を必要とする段階、及びその他の段階でも原薬又は製剤の製造工程が常に一定に保たれていることを確認できるデータが得られる段階において実施する。工程内管理試験の結果は、「処置基準値」として社内記録の扱いにするか、「規格値／適否の判定基準」として公的な報告の対象とするか、いずれかになる。工程内管理試験を実施することにより、原薬や製剤の段階で試験を実施する必要がなくなる可能性がある（（２）のウの（ア）参照）。細胞培養の終了時に行う感染性物質についての工程内管理試験は、規格値／適否の判定基準を設定する必要がある試験の一例である。

重要度が相対的に低い製造段階といえども、製造業者が社内での処置基準値を用いて製造工程が一定に保持されていることを評価することは重要である。医薬品開発段階及びバリデーションの段階で得たデータを根拠にして、製造工程に対して設定すべき暫定的処置基準値が得られるはずである。これらの処置基準値は、製造業者が責任を負うものであり、工程に関する調査やその後の対応を開始するかどうかを判断するために用いられる。この基準値は、医薬品製造販売承認後に製造経験及びデータが蓄積されるにつれて、更に適切に見直していくべきものである。

（ウ）原材料及び添加剤の規格及び試験方法

原薬（又は製剤）の製造に使用する原材料の品質は、その使用目的にかなった基準を満たす必要がある。生物学的原材料又は試薬に関しては、慎重な評価を行って有害な内在性感染性物質又は外来性感染性物質の有無を確認しなければならない場合がある。工程中でアフィニティクロマトグラフィー（例えば、モノクローナル抗体を用いたクロマトグラフィー）を使用する場合には、抗体を作製する過程及びクロマトグラフィー用担体として使用する際に生成する可能性がある製造工程由来不純物や、混入する可能性がある汚染物質が当該原薬や製剤の品質及び安全性を損なわないことを担保できるよう、適切な方策を講じておく必要がある。製造業者は、使用する抗体に関する適切な情報を提供できるようにしておく必要がある。

製剤化の際に（場合によっては、原薬に）使用する添加剤及び容器／施栓系の品質は、薬局方に規格及び試験方法があり、かつそれが適切である場合には、薬局方の基準を満たす必要がある。薬局方に収載されていない添加剤に関しては、適切な規格及び試験方法を設定する必要がある。

エ　薬局方の規格及び試験方法

薬局方には、原薬又は製剤の品質評価方法として利用できる試験方法及び規格値／適否の判定基準に関する重要な事項が収載されている。生物薬品に適用できる試験項目としては、一般に、無菌試験、エンドトキシン試験、微生物限度試験、実容量試験、質量偏差試験／含量均一性試験、並びに不溶性微粒子試験及び不溶性異物検査が挙げられるが、これらに限られる訳ではない。薬局方の試験方法及び規格値／適否の判定基準の利用という面からみた場合、本ガイドラインの価値は、ひとえに日、米及び EU 各薬局方間での分析方法のハーモナイゼーションの進捗状況に依存している。薬局方には、薬局方間で同一の、又は方法論的に同等の試験操作及び規格値／適否の判定基準を設定していくことを付託している。

オ　出荷規格及び有効期間内規格

出荷時の規格と有効期間を考慮した規格とでは異なった判定基準を適用すべきであるという概念で、製剤だけに適用される。この概念によれば、製剤の出荷のための規格には、有効期間を考慮した規格よりも厳しい判定基準を設定するのが適切とされる。この概念は、例えば、定量値や不純物（分解生成物）の限度値に適用し得る。ある国／地域においては、行政当局は、出荷

のための規格を承認申請に必要な規格として設定することを要求しておらず、各製薬企業がそれぞれ社内規格として設定している。したがって、これらの地域においては、承認申請に必要な判定基準は有効期間を考慮した判定基準のみであり、出荷の時点から有効期間の終わりまでずっと同じ判定基準が適用されることになる。しかしながら、申請者は、自社の製品が有効期間を通して承認された判定基準に適合することをよりよく保証するために、より厳しい判定基準を有する社内規格を出荷の際に適用する道を選んでもよい。一方、EU においては、行政当局は、出荷時と有効期間を考慮した場合とで異なった規格の設定が適切な場合、両者を承認申請に必要な規格として設定することを要求している。

カ　統計的な考え方

データが定量的に取り扱える場合には、必要に応じて、適切な統計解析を適用する必要がある。解析方法について、その方法を採用した根拠及びその妥当性も含めて、申請資料中に詳細に記載すること。資料中に提示されている結果を、規制当局が改めて計算して確認できるよう、十分明確に記載しておくこと。

（3）規格及び検査方法の設定根拠

原薬及び製剤の規格及び検査方法の設定は、原材料及び添加剤の管理、工程内管理試験、工程の評価／検証、GMP の遵守、安定性試験、ロット間での恒常性を確認するための試験などとともに、品質確保にかかわる方策全体の要素の一つである。これらの要素を全て組み合わせると、医薬品の適切な品質が保証されるということである。規格及び検査方法の項目は、医薬品の特性解析を目的として選択するというより、むしろ品質の確認を旨として選択する。したがって、規格及び検査方法として特定の品質特性についての試験を採択したり除外したりする根拠及びその妥当性を明確にする必要がある。科学的に妥当性のある規格及び検査方法を設定するに当たっては、以下の点を考慮する必要がある。

・　規格及び検査方法の設定には製造工程を勘案すること。

規格及び検査方法は、製造の一定性を立証するために使用したロットから得られたデータに基づいて設定される必要がある。規格及び検査方法を製造工程と関連付けて考えることは重要なことであり、特に、目的物質関連物質、目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物については重要である。製造工程の変更や保存中の分解物・変化物の生成により、不均一性パターンが非臨床試験及び臨床試験に用いた製品でのパターンと異なってしまうことがある。その場合には、その変化がどのような意味を持つかについて評価する必要がある。

・　規格及び検査方法の設定には原薬及び製剤の安定性を勘案すること。

原薬及び製剤の分解・変化は、保存中に生じる可能性があるが、規格及び検査方法を設定する際には、これらについて考慮する必要がある。

生物薬品は本質的に複雑な分子であるため、安定性面での特性をそれ

だけで明らかにすることができるような安定性評価試験法やパラメータはない。したがって、製造業者は、当該医薬品の同一性、純度及び力価の変化などを総合的に捉えることができる安定性評価指標を定め、提示する必要がある。そして、この安定性評価指標に基づいて実施した試験の結果により、医薬品の品質の変化を確実に捉えられることが保証されることになる。どのような試験項目を含めるかは、医薬品ごとに異なる。本件については、「８－５　新動物用生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の安定性試験」（VICH GL17）を参照すること。

・　規格及び検査方法の設定には非臨床試験及び臨床試験のデータを勘案すること。

規格及び検査方法は、非臨床試験及び臨床試験に使用したロットから得られたデータに基づいている必要がある。実生産規模で製造される医薬品の品質は、非臨床試験及び臨床試験に使用したロットの品質に相当するものである必要がある。

・　規格及び検査方法の設定には分析法を勘案すること。

生物薬品における極めて重要な品質特性には、力価、並びに目的物質関連物質、目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物の種類や存在量などがある。このような特性は、様々な分析法により評価できるが、分析法が違えば結果も異なる。医薬品開発の過程においては、医薬品の開発状況と平行して分析法が発達していくことも希ではない。このため、開発中に得られたデータが、承認・許可の時点で提出したデータと相関していることを確認することが重要である。

（４）規格及び検査方法

規格及び検査方法に採用する項目及び試験法の選択は、製品により異なる。規格値／適否の判定基準の適合範囲の設定根拠を明らかにする必要がある。規格値／適否の判定基準は、非臨床試験や臨床試験に用いたロットから得られたデータ、製造の一定性を示すために用いたロットから得られたデータ、及び安定性試験データ、並びに製品の開発段階で得られた適切なデータに基づいて設定し、その根拠を示す必要がある。

原薬又は製剤の段階で試験を実施するより、むしろ製造段階で試験を実施する方が適切で、かつ受け入れられる場合もある。その場合、試験結果は、工程内管理試験の規格値／適否の判定基準の対象と考えるべきである。各国／地域の規制当局の要件によっては、原薬又は製剤の規格及び検査方法に含める必要がある。

ア　原薬の規格及び検査方法

以下の試験及び規格値／適否の判定基準にかかわる項目は、通例、全ての原薬において設定されるものである（分析方法については（２）のイの（イ）参照）。原薬では、適宜、薬局方の試験（例えば、エンドトキシン試験）を行う。これらに加えて、原薬ごとに必要とされる特有の規格値／適否の判定

基準が設定されることになる。

（ア）外観・性状

原薬の物理的状態（例えば、固体、液体）及び色を定性的に規定する。

（イ）確認試験

確認試験は、その原薬に極めて特異的である必要がある。また、分子構造上の特徴やその他の特有の性質に基づいて設定する必要がある。同一性を確認するためには、２種類以上の試験（理化学試験、生物学的試験、免疫化学的試験）が必要となろう。確認試験は定性的なものでもよい。確認試験には、（２）のア及び付録（６）のアに記載されているような製品の特性解析のためによく用いられる試験法のうちの幾つかが、そのまま、又は目的に沿うよう改変して用いられる。

（ウ）純度と不純物

生物薬品の絶対的な純度を決定するのは困難であり、また、得られた結果は用いた試験方法に依存する（（２）のアの（エ）参照）。このため、原薬の純度は、通例、複数の分析方法の組合せにより評価される。分析方法を選択し、最適化する際には、目的物質、目的物質関連物質及び不純物を相互に分離することに重点を置くべきである。

生物薬品中に存在する不純物は、製造工程由来不純物及び目的物質由来不純物に分類される。

- 原薬中の製造工程由来不純物（（２）のアの（エ）参照）には、培地、宿主細胞由来タンパク質、DNA、精製に用いられるモノクローナル抗体やクロマトグラフィー用担体の構成成分、溶媒、緩衝液成分等がある。製造工程の適切な管理により、これらの不純物は最小限にする必要がある。
- 原薬中の目的物質由来不純物（（２）のアの（エ）参照）は、製造中や保存中に生成し、目的物質とは異なる性質を有する分子変化体のことである。

不純物に関する試験方法の選択及び最適化に際しては、目的物質及び目的物質関連物質を不純物から分離することに重点を置くべきである。不純物に関する規格値は、それぞれ個別に若しくは総量で適切に設定する必要がある。不純物のうちのあるものについては、適切なプロセスコントロールを行うことで、規格値を必ずしも設定する必要がないものもある（（２）のウ参照）。

（エ）力価

生物薬品の原薬の規格及び検査方法には、適切な、バリデーションされた力価試験（（２）のアの（イ）参照）が必要である。しかし、適切な力価試験を製剤について設定していれば（（４）のイの（エ）参照）、原薬の段階での定量的な評価には、代替試験法（理化学的試験法や生物学的試験法）でも十分な場合がある。また、比活性の測定により、更に有用な情報が得られる場合もある。

（オ）物質量

通例タンパク質量（質量）で表される原薬の物質量は、適切な定量法を用いて測定する。物質量（タンパク質量）の測定には標準品・標準物質を必要としない場合もある。製品の製造が力価に基づいて行われる場合には、別途あえて物質量（タンパク質量）の測定をする必要はない。

イ　製剤の規格及び試験方法

以下の試験及び規格値／適否の判定基準にかかわる項目は、通例、全ての製剤において設定されるものである。（４）のイの（ア）～（４）のイの（オ）の各項目は、それぞれ原薬の（４）のアの（ア）～（４）のアの（オ）の各項目に対応する。剤形について薬局方に関連する規定がある場合、それらの規定が適用される。薬局方に収載されている代表的な試験法には、無菌試験、微生物限度試験、実容量試験、不溶性微粒子試験及び不溶性異物検査、質量偏差試験／含量均一性試験、並びに凍結乾燥製剤に対する含湿度試験があるが、これらの試験に限られる訳ではない。質量偏差試験／含量均一性試験は工程内管理試験として実施し、規格値を設定することでもよい。

（ア）外観・性状

製剤の物理的状態（例えば、固体、液体）、色及び澄明度を定性的に規定する。

（イ）確認試験

確認試験は、その製剤に極めて特異的である必要がある。また、分子構造上の特徴やその他の特有の性質に基づいて設定する必要がある。確認試験は定性的なものでもよい。ほとんどの場合、１種類の試験で十分であると考えられるが、製品によっては同一性を確認するために２種類以上の試験（理化学試験、生物学的試験、免疫化学的試験）が必要となる場合もある。確認試験には、（２）のア及び付録（６）のアに記載されているような製品の特性解析のためによく用いられる試験法のうちの幾つかが、そのまま、又は目的に沿うよう改変して用いられる。

（ウ）純度と不純物

不純物は、製剤の製造の際又は保存中に、生成したり増加したりする可能性がある。これらの不純物は、原薬に元々存在する目的物質由来不純物や製造工程由来不純物と同じものか、製剤化中又は製剤の保存中に特異的に生成する分解物・変化物のいずれかである。もし不純物が定性的にも定量的にも（すなわち、相対量又は濃度で）原薬中のものと同じであるということであれば、試験項目として設定する必要はない。新たに不純物が製剤の製造中あるいは保存中に生じることが判明している場合には、これらの不純物のレベルを測定し、規格値を設定する必要がある。

規格値と分析方法は、製剤についてのそれまでの経験に基づき、製剤の製造中又は保存中の原薬の変化を測定できるよう設定し、かつその設定根拠及び妥当性を示す必要がある。

試験方法の選択及び最適化に際しては、目的物質及び目的物質関連物質

を、分解物・変化物を含めた不純物及び添加剤から分離することに重点を置くべきである。

（エ）力価

生物薬品の製剤の規格及び検査方法には、適切な、バリデーションされた力価試験（（２）のアの（イ）参照）が必要である。しかし、適切な力価試験を原薬について設定していれば、製剤の段階での定量的な評価には、代替試験法（理化学的試験法や生物学的試験法）でも十分な場合がある。ただし、そのような設定を行う場合には、その妥当性を示すこと。

（オ）物質量

製剤中の原薬の量は、通例、タンパク質量（質量）で表し、適切な定量法を用いて測定する。製品の製造が力価に基づいて行われる場合には、別途あえて物質量（タンパク質量）の測定をする必要はない。

（カ）その他の一般的試験項目

製剤の機能を評価する上で、物理的性質及び他の品質特性の測定が重要となる場合が多い。このような試験の例としては、pH、浸透圧がある。

（キ）特殊な剤形のための追加試験項目

剤形によっては、その特殊性に鑑み、上記の試験項目の他に、試験項目の追加が必要となる場合もあることを考えておく必要がある。

（５）用語集

規格値／適否の判定基準（Acceptance Criteria）

所定の分析方法に従い試験した結果の適合基準となる数値で表した限度値又は範囲、あるいはその他の適切な基準

処置基準値（Action Limits）

重要度が比較的低い製造工程の一定性を評価するときに用いる製造業者が自家で定めた基準値

生物活性（Biological Activity）

特定の生物学的効果を発揮するための製品の特異的な機能やその程度。「力価」は、生物活性を定量的に表す尺度である。

混入汚染物質（Contaminants）

原薬及び製剤の製造工程には本来存在しないはずのもので、外来性の物質（例えば、化学物質、生化学的な物質、微生物類など）全てを指す。

分解物・変化物（Degradation Products）

目的物質や目的物質関連物質から、経時的に、又は光、温度、pH、水分等の作用、又は添加剤若しくは直接接触する容器／施栓系との反応により、生成する分子変化体のこと。このような変化（例えば、脱アミド化、酸化、凝集、プロテアーゼによる分解）は、製造中又は保存中に生じる可能性がある。分解物・変化物は、目的物質関連物質であることもあるし、目的物質由来不純物であることもある。

目的物質（Desired Product）

①予期した構造を有するタンパク質、② DNA 塩基配列から期待されるタ

ンパク質、③しかるべき翻訳後修飾（グリコフォームの生成を含む）から期待されるタンパク質、及び④生物活性分子を生産するのに必要な、意図的な加工・修飾操作から期待されるタンパク質

製剤（Drug product, Dosage Form, Finished Product）

臨床に供される医薬品の製品形態で、一般に原薬に加えて添加剤を含む。

添加剤（Excipient）

原薬や製剤に意図的に添加する成分で、そこで使用される量では薬理学的作用を持たないもの

不純物（Impurity）

①新原薬として規定された化学物質以外の新原薬の構成成分

②原薬として規定された化学物質あるいは医薬品添加剤以外の製剤の構成成分

自家一次標準物質（In-House Primary Reference Material）

製造業者が生産ロットの生物学的試験（バイオアッセイ）及び理化学試験に使用する目的で、代表的な生産ロットから調製し、適切な特性解析を行ったもの。これを基準として自家常用標準物質の検定を行う。

自家常用標準物質（In-House Working Reference Material）

自家一次標準物質と同様に調製され、ある特定の製品特性について、各生産ロットを評価、管理するために、確立されたもの。通例、自家一次標準物質を基準として検定される。

新原薬（New Drug Substance）

これまである地域又はメンバーとなっている国で承認されたことがなく、新しく承認されるに当って適応症の定められた疾病治療用の物質で、new molecular entity 又は new chemical entity とも呼ばれる。既に承認された原薬の錯体、エステル、塩である場合もある。

力価（Potency）

当該医薬品の生物学的性質に関連する特性に基づいて、適切で定量的な生物学的試験（「力価試験」又は「バイオアッセイ」ともいう。）により測定され、生物活性を定量的に表す尺度

製造工程由来不純物（Process-Related Impurities）

製造工程に由来する不純物。これらには、細胞基材に由来するもの（例えば、宿主細胞由来タンパク質、宿主細胞由来 DNA）、細胞培養液に由来するもの（例えば、インデューサー、抗生物質、培地成分）、又は細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するもの（例えば、細胞培養以降の工程に用いられる試薬・試液類、クロマトグラフィー用担体からの漏出物）がある。

目的物質由来不純物（Product-Related Impurities）

目的物質の分子変化体（例えば、前駆体、製造中や保存中に生成する分解物・変化物）で、生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質に匹敵する特性を持たないもの

目的物質関連物質（Product-Related Substances）

製造中や保存中に生成する目的物質の分子変化体で、生物活性があり、製品の安全性及び有効性に悪影響を及ぼさないもの。これらの分子変化体は目的物質に匹敵する特性を備えており、不純物とは考えない。

標準品（Reference Standards）

国際標準品又は国内標準品を指す。

規格及び検査方法（Specification）

「規格及び検査方法」とは、試験項目、用いる分析方法、及びその方法で試験したときの規格値／適否の判定基準（数値で表した限度値又は範囲、あるいはその他の基準）を示したものとして定義される。規格及び試験方法は、原薬、製剤又はこれらの製造工程における中間体が、それぞれの使用目的にかなっていると判定するために必要な要素をセットにして定めたものである。「規格及び検査方法に適合する」とは、原薬及び製剤について、示された各分析方法に従って試験するときに全ての規格値／適否の判定基準に適合するということである。規格及び検査方法は、承認申請時に、その設定理由とともに製造業者から提示され、規制当局により承認のための必須条件とされるもので、医薬品の品質確保上、極めて重要な規制基準である。

（６）付録

ア　物理的化学的特性解析に関する付録

本付録は、目的物質、原薬又は製剤の構造解析や構造確認及び物理的化学的性質の評価に際して技術的にどのようにアプローチしていけばよいかという例を示している。製品ごとに用いるアプローチは異なるであろうし、本付録に示す方法以外のものが適切な場合も多い。新しい分析技術の開発や既存の技術の改良は日進月歩で進んでいるので、適時取り入れるべきである。

（ア）構造解析・構造確認

ａ）アミノ酸配列

目的物質のアミノ酸配列は、ｂ）からｅ）の項に記載したような方法によりできる限り決定し、目的物質をコードする遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列と比較する。

ｂ）アミノ酸組成

全アミノ酸組成は、種々の加水分解法及び分析方法により決定し、目的物質をコードする遺伝子配列から推定されるアミノ酸組成と比較する。必要に応じて、対応する天然型タンパク質のアミノ酸組成と比較する。ペプチドや低分子量のタンパク質については、アミノ酸組成分析により有用な構造情報が得られることが多いが、高分子量のタンパク質については、必ずしも一般的にそうとはいえない。定量的なアミノ酸分析のデータは、タンパク質量の定量にも利用できる場合が多い。

ｃ）末端アミノ酸配列

末端アミノ酸分析は、アミノ末端（N 末端）及びカルボキシ末端（C

末端）アミノ酸の種類及び均一性を確認するために行う。目的物質が末端アミノ酸に関して不均一であることが認められた場合には、各分子変化体の相対量を適切な分析方法により測定する。末端アミノ酸配列は、目的物質をコードする遺伝子配列から推定される末端アミノ酸配列と比較する。

ｄ）ペプチドマップ

目的物質を適当な酵素又は化学物質を用いて個々のペプチドに選択的に断片化し、得られたペプチド断片を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）又は他の適切な方法により分析する。これらのペプチド断片は、アミノ酸組成分析、N 末端アミノ酸配列分析又は質量分析などの方法により、可能な範囲で同定する。適切にバリデーションされた分析法による原薬や製剤のペプチドマッピングは、ロットごとの規格及び試験方法において、目的物質の構造確認にしばしば用いられる試験法となる。

ｅ）スルフヒドリル基及びジスルフィド結合

目的物質をコードする遺伝子配列からシステイン残基があるとされる場合には、全ての遊離スルフヒドリル基あるいはジスルフィド結合の数及び位置を可能な範囲で決定する。ペプチドマッピング（還元条件下及び非還元条件下）、質量分析、又は他の適切な分析法を用いて評価する。

ｆ）糖組成・糖鎖構造

糖タンパク質の場合には、糖含量（中性糖、アミノ糖、シアル酸）を決定する。更に、糖鎖構造、オリゴ糖パターン（枝分かれ構造についてのプロファイル）及びポリペプチド鎖の糖鎖結合部位をできる限り分析する。

（イ）物理的化学的性質

ａ）分子量・分子サイズ

分子量（又はサイズ）を、サイズ排除クロマトグラフィー、ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE、還元条件下あるいは非還元条件下）、質量分析又は他の適切な分析法により決定する。

ｂ）アイソフォームパターン

アイソフォームパターンを、等電点電気泳動又は他の適切な分析法により決定する。

ｃ）比吸光度（又はモル吸光係数）

特定の紫外可視領域での波長（例えば、280nm）における目的物質の比吸光度（又はモル吸光係数）を決定することが望ましい場合が多い。比吸光度は、アミノ酸組成分析又は窒素定量法等の方法により測定した既知のタンパク質濃度の溶液を試料として、紫外可視分光光度法により決定する。紫外吸収をタンパク質量測定に用いる場合は、当

該目的物質の比吸光度を用いる。

d）電気泳動パターン

電気泳動パターン、並びに同一性、均一性及び純度に関するデータを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、SDS-PAGE、ウエスタンブロット、キャピラリー電気泳動、又は他の適切な方法により測定する。

e）液体クロマトグラフィーパターン

クロマトグラフィーパターン、並びに同一性、均一性及び純度に関するデータを、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、イオン交換液体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、その他の適切な方法により測定する。

f）分光学的性質

紫外可視吸収スペクトルを、必要に応じて測定する。目的物質の高次構造を、円偏光二色性、核磁気共鳴（NMR）、その他の適切な分析法により必要に応じて検討する。

イ　不純物に関する付録

本付録では、混在する可能性のある不純物について例示し、その由来及び適切な検出方法の例を示す。個々の不純物及びそれらを検出する方法は、物理的化学的特性解析の場合と同様に、製品ごとに異なるであろうし、本付録に示されていない方法が適切な場合も多い。新しい分析技術の開発や既存の技術の改良は日進月歩で進んでいるので、適時取り入れるべきである。

（ア）製造工程由来不純物及び混入汚染物質

製造工程に由来する不純物（（２）のアの（エ）参照）は、細胞基材に由来するもの、細胞培養液に由来するもの、及び細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するものの三つの範疇に大別される。

a）細胞基材に由来する不純物には、例えば、宿主細胞由来タンパク質、核酸（宿主ゲノム由来、ベクター由来、総 DNA）等がある。宿主細胞由来タンパク質に対しては、広範なタンパク質性不純物を検出することができる高感度な分析法、例えばイムノアッセイが一般に用いられる。イムノアッセイの場合、試験に用いるポリクローナル抗体は、産生細胞から目的物質をコードする遺伝子を除いた細胞から調製した標品、細胞融合の相手となる細胞から調製した標品、又は他の適当な細胞株から調製した標品等を免疫することにより得られる。宿主細胞由来の DNA は、（ハイブリダイゼーション法などにより）製品を直接測定することにより検出される。実験室スケールでの添加回収実験等による不純物クリアランス試験は、核酸や宿主細胞由来タンパク質のような細胞基材に由来する不純物が除去されていることを示すためのものであるが、クリアランス試験をこれらの不純物について規格値を設定しない根拠にできることもある。

b）細胞培養液に由来する不純物には、例えば、インデューサー、抗生物質、血清、その他の培地成分などがある。

c）細胞培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来する不純物には、例えば、酵素、化学的・生化学的試薬（例えば、臭化シアン、グアニジン、酸化剤及び還元剤）、無機塩（例えば、重金属、ヒ素及び非金属イオン）、溶媒、クロマトグラフィー用担体、アフィニティクロマトグラフィー用担体のリガンド（例えば、モノクローナル抗体）、その他の漏出物などがある。

製造工程中で意図的に添加したウイルス、内在性のウイルス、及び製造工程に迷入する可能性のあるウイルスについては、製造工程のウイルス除去／不活化の能力を示す必要がある。この点については、ICH ガイドライン Q5A「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」を参照すること。

（イ）目的物質由来不純物（分解物・変化物を含む）

目的物質の分子変化体の最も代表的な例を以下に挙げ、それらを評価するための適切な方法を例示する。分子変化体がどのような修飾を蒙ったものであるかを明らかにするための変化体の単離及び特性解析には、かなりの努力を必要とすることもある。分解物・変化物のうち、製造中又は保存中にそれなりの量が生成するものについては、適切に設定した規格値の範囲内にあることを試験する必要がある。

a）切断体：加水分解酵素や化学物質がペプチド結合の開裂を触媒することがある。切断体の検出には、HPLC や SDS-PAGE が有用である。ペプチドマッピングも分子変化体の特性によっては有用な方法である。

b）切断体以外の分子変化体：脱アミド体、異性体、ジスルフィド結合ミスマッチ体、酸化体、又は複合タンパク質（例えば、糖鎖付加、リン酸化したタンパク質）の分子変化体等については、クロマトグラフィー（例えば、HPLC）、電気泳動（例えば、キャピラリー電気泳動）、又は他の適切な分析法（例えば、質量分析、円偏光二色性）により検出及び特性解析ができる。

c）凝集物：凝集物の範疇には、目的物質の二量体や多量体が含まれる。通常、これらは適切な分析法（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー又はキャピラリー電気泳動）により、目的物質及び目的物質関連物質から分離され、定量される。

4　食用動物に使用する新動物用医薬品の承認に必要となる抗菌剤耐性に関する承認前試験指針（VICH GL27）

はじめに

ヒト、動物又は植物分野における抗菌剤の使用は、結果的に耐性選択を誘導する可能性がある。非チフス性サルモネラ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌（O157）のような人獣共通病原体は、一般的な定義によれば動物からヒトへの伝播が可能である。したがって、当然人獣共通病原体の抗菌剤耐性もヒトへ伝播され得る。抗菌剤耐性を示す非人獣共通病原体又はそれらの耐性遺伝子が、食物連鎖を介して動物からヒトへ伝播することも可能である。しかし、そのような伝播がいかに重大、重要であるのかを裏付けるデータ及び汚染食肉の摂取を介しての伝播あるいは動物の排泄物で汚染された飲水、野菜を介した伝播が、実際に起こっているのかどうかを証明するデータは限られている。[1,2,3] ヒトも抗菌剤耐性菌の潜在的源のひとつである。[4,5]

食用動物が、ヒトでの抗菌剤耐性菌のばく露にどの程度の範囲でかかわっているのかを特定することは困難である。しかし、食用動物に抗菌剤を使用することの安全性を評価するとき、規制当局もそのような製剤による抗菌剤耐性菌の選択の潜在的可能性を考慮すべきである。それゆえ、医薬品の承認申請者（以下「申請者」という。）にとっては、認可機関へ提出すべき情報の種類に関しての指針が必要である。この情報は、抗菌剤の使用が人の健康上、懸念される抗菌剤耐性菌を選択させる潜在的可能性を調べる手助けとなるべきである。その提供された情報は、ヒトの健康に与える潜在的影響の全体的な評価に使用すべきである。

目的

この指針の目的は、食用動物に使用する抗菌剤の承認に必要であり、抗菌性物質が与えられることによって、ヒトの健康上、懸念される耐性菌が選択される潜在的可能性を調べるために役立つ EU、日本及び米国での統一的な技術的指針を提供することである。

更に説明を加えれば、本指針は、その製剤を申請された用法で食用動物に投薬するときに起こる潜在的な耐性出現を調べるために推奨される試験及びデータの種類を概説する。この指針は原薬や製剤の特性、耐性の性質及び対象動物の腸管内細菌叢における潜在的ばく露についての情報も含む。また、本指針は、人の健康に潜在的に影響を与える食品加工過程あるいは家庭調理衛生のような動物のと殺後の要因は考慮していない。

本指針の中には病原体負荷試験、環境毒性試験、危険度評価の過程及び一日摂取許容量（ADI）の確立及び抗菌剤残留問題を含めていない。

水産用医薬品については、生産システム、細菌集団及び潜在的な人獣共通感染症としての公衆衛生上の脅威に基本的な違いがあるので、特別な取扱いをすることが妥当であろう。

データの要件：

これ以降の項目における情報を、基礎的データと付加的データの２種類に分けた。その情報が基礎的データである場合は、申請者はそのような情報を提供する

ことが推奨される。

一方、その情報が付加的データである場合は、それらのデータの一部又は全てを含めるかどうかを選択してもよい。その製剤の申請された用法、動物の腸管内細菌叢の抗菌性物質へのばく露の可能性、生じた耐性菌又は耐性遺伝子のヒトへのばく露の可能性及びその抗菌性物質（又は関連物質）のヒト医療における重要性などは、付加的データを提供する際の要因となる。

（１）基礎的情報

ア　抗生物質の系統

当該情報は、原薬成分の化学構造、特許情報及びこれ以後の項目で取り扱われる関連の情報に基づく。例えば、一般的名称、化学名、CAS（化学分野の要約サービス）登録番号、化学構造及び製造コード番号／類義語が推奨される。

イ　作用機序と作用型

当該情報は、特許に関する文献情報又は申請者により実施された特異的作用機構に関する試験から推論できる。また、この項には、その作用が殺菌的又は静菌的であるのか等の特徴付けを含めるべきである。

ウ　抗菌スペクトル活性

（ア）一般データ

抗菌性物質に関する当該情報は申請者により提供されなければならず、抗菌スペクトル活性の全体を決定するために、その中には広範な細菌を用いて実施した MIC（最小発育阻止濃度）試験から得られたデータ又は文献情報から得られたデータを含めるべきである。MIC 値を測定する際には、供試菌株の収集は微生物株保存機関、疾病診断センター、その他の菌株保管施設から行うことになるだろう。

可能ならば、MIC 値は米国臨床検査標準委員会（NCCLS）の文書（eg.,M31-A, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals, Approved Standards）のようなバリデートされ、精度管理された方法により測定すべきである。

（イ）適用対象動物の病原菌（製品ラベル上）の MIC

これらのデータは、本指針の目的においても、裏付けになると考えられる。適用対象動物の病原菌の MIC 値は、申請資料の「効力を裏付ける試験」から得られる。

（ウ）食品媒介性病原菌及び共生細菌の MIC

食品媒介性病原細菌及び共生細菌の MIC 値はデータとして示されるべきである。この情報は、公表データ又は申請者により実施された試験に基づく。そのスペクトル活性にもよるが、食品媒介性病原細菌及び食品媒介性共生細菌として適当な細菌は以下のようになる。

食品媒介性病原細菌：

サルモネラ

カンピロバクター属菌

食品媒介性共生細菌：

大腸菌

腸球菌

可能ならば、以下の推奨事項に従って供試菌株を選定すべきである。

・　関係する細菌種／血清型の菌株については、申請の適用対象動物から分離されるべきである。広い動物種を適用対象として申請する場合には牛、豚及び鶏などの主要な食用動物から分離された菌株を供試すべきである。

・　望ましくは、最近の分離株を含めるべきである。

供試菌株に関する情報には以下の事項を含めるべきである。

・　少なくとも菌種レベルまでの同定

・　分離株の起源、由来及び分離年月日

エ　耐性機序及び耐性遺伝学

可能ならば、抗菌性物質に対する耐性機構に関する情報及び耐性の分子遺伝学的原理に関する情報は提示されるべきである。当該情報は、文献情報又は申請者により実施された試験に基づく。原薬成分に関するデータがない場合には、同系統類縁物質での情報が利用できる。

オ　耐性遺伝子の存在及び耐性遺伝子の伝達頻度

耐性遺伝子の存在又は欠如及び伝達頻度に関する情報は提示されるべきである。当該情報は、文献情報あるいは申請者により実施された試験に基づく。耐性伝達の出現を評価するのであれば、その具体的研究の実施に当たっては、「Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed., V. Lorian, ed. 1996. William and Wilkins, Baltimore, Maryland」に収載されているプロトコールを参考にすべきである。本試験には、対象動物病原菌、関連の食品媒介性病原細菌及び関連の共生細菌を供試することを考慮してもよい。原薬成分に関するデータがない場合には、同系統類縁物質に関する情報も利用できる。

カ　交差耐性の発現

抗菌性物質に対する交差耐性情報は提示されるべきである。当該情報は、文献情報又は申請者により実施された試験に基づく。この情報には表現型の記述、及び更に有用であれば、遺伝形質の記述を含めるべきである。

キ　共耐性の発現

当該抗菌性物質とその他の成分との共耐性に関しての情報は、文献情報又は申請者により実施された試験に基づき提示されるべきである。この情報には、表現型の記述、及び更に有用であれば、遺伝形質の記述も含めるべきである。

ク　薬物動態データ

薬物動態データは、腸管内の抗菌活性を予期するために承認申請資料における他の資料区分から得られる。データとしては、次のようなものが含まれる。

・　血清／血漿濃度比対時間データ

・ 最高濃度（Cmax）
・ 最高濃度到達時間（Tmax）
・ 分布容（VD）
・ クリアランス（Cl）
・ 濃度－時間曲線下面積（AUC）
・ 生物学的利用能
・ 蛋白結合能

（２）付加的情報

申請者は、以下に示す情報の中の一部又は全てを含ませるかどうかを選択できる。

ア *in vitro* 変異頻度試験

in vitro 変異頻度試験は、被検菌種も含めて「Antimicrobials in Laboratory Medicine, 4th ed., V. Lorian, ed. 1996. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland」の中に示されたようなプロトコールに従う。

イ 腸管内における抗菌活性

有用であるならば、その製剤が申請用法に従って投薬されるとき、腸管内容物あるいは糞便中の細菌学的活性成分の濃度に関する詳細データが提示される。ここで問題となる活性は、親化合物あるいは活性代謝産物によるものである。そのようなデータが有用でない場合には、詳細データは腸管に関連した代謝試験により提示される。その代謝試験データは、承認申請資料における他の資料区分から得られる。

ウ その他の動物試験

申請者は、その製剤の申請用法による投薬に関連した耐性出現の範囲及び耐性出現の頻度を調べる手助けとするために、実施されたその他の動物試験からの情報を含めるかどうかを選べる。この情報には、承認申請資料中のその他の資料区分を支持するために実施された臨床試験からのデータも含む。そのような試験成績の将来的価値については、未だ耐性出現との関連では明確にはなっていない。したがって、そのような試験成績は、本指針の中で述べられているその他全ての承認前情報の文脈の中で解釈されるべきである。

エ 補助情報

有用かつ関連がある場合には、文献からの背景情報若しくはその製剤又は類縁製剤が過去に承認された際の試験データを提示できる。

（３）考察

申請者は、当該製剤の使用によりヒトの健康に関係した抗菌剤耐性菌が選択される潜在的な可能性を調べなければならない。このことを達成するため、動物用医薬品がその申請用法に従って投薬された後、対象動物における食品媒介性病原細菌及び共生細菌の細菌学的活性物質に対するばく露について、前述の項目で提供された情報に基づき考察すべきである。

用語集

○抗菌性物質又は抗菌剤：抗菌活性（他の微生物を殺したり、その発育を抑制す

る活性）を示す天然物質、半合成又は合成された物質

○食用動物：牛、鶏及び豚を食用動物として考える。食用動物の概念については、各国間での認識の違いがあるため、ある国では、その他の動物種も食用動物とみなされる可能性がある。

○対象動物病原細菌：動物用抗菌剤の製品ラベルに示された適用用法上の対象動物において感染症を引き起こす病原性を有する細菌種

○食品媒介性病原細菌：動物がその腸管内容物中に保菌する人獣共通病原菌種であり、食物連鎖によりヒトにそれが伝播され、その後にヒトに食中毒を引き起こす細菌

○食品媒介性共生細菌：動物の腸管内容物中に生息する非人獣共通病原細菌で、食物連鎖を介して動物からヒトへ伝播されることもありうるが、ヒトには通常、食品媒介性感染症を引き起こさない細菌

参考文献

１．Ministry of Agriculture Fisheries and Food. A Review of Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Technical Report for MAFF. July 1988.

２．European Commission. Opinion of the Scientific Steering Committee on Antimicrobial Resistance. May 1999.

３．Commonwealth Department of Health and Aged Care and the Commonwealth Department of Agriculture, Fisheries and Forestry-Australian. The use of antibiotic in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans. Report of the Joint Expert Advisory Committee on Antibiotic Resistance （JECFAR）. September 1999.

４．H. Kinde, et al. Sewage Effluent: Likely Source of Salmonella enteritidis, Phage Type 4 Infection in a Commercial Chicken Layer Flock in Southern California. Avian Diseases 40:672-679, 1996.

５．H. Kinde, et al. Prevalence of Salmonella in Municipal Sewage Treatment Plant Effluents in Southern Calofornia. Avian Diseases 41:392-398, 1997.

5　動物用生物学的製剤の検査法に関するガイドライン

5－1　ホルムアルデヒド定量試験（VICH GL25）

1）緒言

ア　目的

多くの動物用不活化ワクチン、特に細菌ワクチンには残留ホルムアルデヒドが含まれている。残留ホルムアルデヒド定量試験の目的は、

（ア）製品の安全性を保証し、

（イ）当該製品が、同時に使用される他の製品を不活化しないことを保証し、

（ウ）保存期間中、当該製品の活性が持続することを保証し、

（エ）クロストリジウムトキソイドが抗原性を有し、かつ、安全であることを保証することである。

本ガイドラインはホルムアルデヒド試験のための一般要件に関するガイドラインを提供するものである。本ガイドラインは対象物質の特性や特定の科学的状況に基づいた他の試験方法を否定するものではないが、他の試験方法を採用する場合には、承認申請書中に明記され、本ガイドラインに基づいて試験を行った場合と比較して同等のデータを有するものでなければならない。

イ　適用範囲

本ガイドラインは、ホルムアルデヒドを含む全ての新動物用ワクチンの最終製品に適用される。

ウ　背景

不活化ワクチン中の残留遊離ホルムアルデヒドの測定には、アセチルアセトン法、塩化鉄法、塩基性フクシン法等の幾つかの測定法が使用されているが、亜硫酸水素ナトリウムで中和された製品にも使用できることが示された[1]ため、塩化鉄法が採用された。

残留ホルムアルデヒドは g/L として記録され、換算表は表 1 のとおりである。

エ　一般原理

総ホルムアルデヒドは、ホルムアルデヒドとメチルベンゾチアゾロンヒドラゾン塩酸塩（MBTH）との反応に基づいて定量される。

この反応は以下のとおりである。

（ア）MBTH とホルムアルデヒドが結合し、一つの化合物を生成する。

（イ）過剰の MBTH が酸化し、もう一つの化合物を生成する。

（ウ）これらの二つの化合物が結合し、628nm で測定される青色発色団を生成する。

（2）塩化鉄法

ア　試薬

（ア）塩化鉄（Ⅲ）－アミド硫酸試薬

塩化鉄（Ⅲ）10g 及びアミド硫酸 16g に水を加えて溶解し、１ L とした溶液

（イ）MBTH 試薬（MW233.7）［CAS149022-15-1］

3-メチルベンゾチアゾール-2（3H）オンヒドラゾン塩酸塩一水和物（白色又は黄色の結晶性粉末。融点：約 270 ℃）。この試薬は、0.5g/L の MBTH 溶液である（注意：この溶液は不安定なので毎日新しいものを調製すること。）。

a　アルデヒド検出のための適切性

アルデヒドを含有しないメタノール２ mL に、アルデヒドを含有しないメタノール１ L 中にプロピオンアルデヒド１ L を含む溶液 60μL、及び４ g/L MBTH 溶液を５ mL を加え、混和し、30 分間放置する。

また、プロピオンアルデヒド溶液を含まない対照液も用意する。試験液と対照液にそれぞれ２ g/L の塩化鉄（Ⅲ）溶液を 25.0mL ずつ加え、アセトンで 100mL とし混和する。１㎝セルで 660nm における試験液の吸光度を対照液を補正液として測定する。試験液の吸光度は 0.62 以上でなければならない。

（ウ）ホルムアルデヒド溶液

ホルムアルデヒドを 34.5w/v %以上 38.0w/v %以下含むもの

（エ）その他の試薬

分析用のもの

イ　試料及び標準溶液の調製

（ア）ホルムアルデヒド溶液を水で正確に希釈し、0.25、0.50、1.00 及び 2.00g/L のホルムアルデヒド標準液を調製する。

（イ）ワクチンがオイルエマルジョンの場合は、適切な方法でエマルジョンを分離し、水相のホルムアルデヒド濃度を測定すること。

以下の分離方法は適切であることが示されている。

a　ワクチン 1.0mL にミリスチン酸イソプロピル 1.0mL を加えて混和する。この混合液に１ mol/ L 塩酸試液 1.3mL、クロロホルム 2.0mL 及び９ g/L 塩化ナトリウム溶液 2.7mL を加える。完全に混和した後、15,000 *G*で 60 分間遠心する。水相を 10mL のメスフラスコに移し、水で 10mL に希釈する。この希釈液をホルムアルデヒド試験に用いる。

以上の方法で上清を分離できない場合は、塩化ナトリウム溶液に 100g/L のポリソルベート 20 を加え、同じ操作を繰り返す。ただし、遠心は 22,500 *G*で行う。

b　ワクチン 1.0mL に 100g/L 塩化ナトリウム 1.0mL を加え、混和した後、1,000 *G*で 15 分間遠心する。水相を 10mL のメスフラスコに移し、水で 10mL に希釈する。この希釈液をホルムアルデヒド試験に用いる。

c　ワクチン 1.0mL に 100g/L 塩化ナトリウム溶液 2.0mL とクロロホルム 3.0mL を加え混和した後、1,000 *G*で５分間遠心する。水相を 10mL のフラスコに移し、水で 10mL に希釈する。この希釈液をホルムアルデヒド試験に用いる。

注：エマルジョンを分離するために用いた容量は例示である。抽出

操作で用いる他の試薬の容量と試料との比率が例示と同じであれば、容量が異なってもよい。

ウ　試験方法

（ア）200 倍に希釈したワクチン 0.5mL（エマルジョンの場合は、希釈後の水相を 20 倍に希釈して、その 0.5mL を使用する。）、及び 200 倍に希釈した各濃度のホルムアルデヒド標準液 0.5mL それぞれに MBTH 試薬を 5.0mL ずつ加える。試験管に密栓をして、振とう後 60 分間放置する。

（イ）塩化鉄（Ⅲ）－アミド硫酸試薬 1 mL を加え、15 分間放置する。

（ウ）補正液として試薬対照液を用い、ワクチン及び標準液の 1 cm セルにおける 628nm 付近の吸収極大の波長における吸光度を測定する。

エ　計算と解釈

線形回帰を用いて、標準曲線から総ホルムアルデヒド濃度（g/L）を算出する（許容できる相関係数［r］は 0.97 以上）。

表 1

ホルムアルデヒドレベル換算表

ホルムアルデヒド（g/L）	ホルムアルデヒド（w/v %）	ホルムアルデヒド溶液*（vol %）	ホルムアルデヒド（ppm）
2.0	0.2	0.5	2000
0.8	0.08	0.2	800
0.5	0.05	0.125	500
0.4	0.04	0.1	400
0.05	0.005	0.0125	50
0.04	0.004	0.01	40

*：40 %ホルムアルデヒド溶液を基本とする。

参照文献

1．Chandler, M.D. & G.N. Frerichs, Journal of Biological Standardization （1980） 8. 145-149

2．Knight, H, & Tennant R.W.G. Laboratory Practice, （1973） 22,169-173

５－２　含湿度試験（VICH GL26）

（１）緒言

ア　目的

凍結乾燥した動物用ワクチンは残留水分として知られている水分を常に含んでいる。含湿度試験の目的は、適切な保存期間及び製造業者の凍結乾燥工程が正しく管理されたことを保証することである。

本ガイドラインは含湿度試験のための一般要件に関するガイドラインを提供するものである。本ガイドラインは対象物質の特性や特定の科学的状況に基づいた他の試験方法を否定するものではないが、他の試験方法を採用する場合には、承認申請書中に明記され、本ガイドラインに基づいて試験を行った場合と比較して同等のデータを有するものでなければならない。ただし、代替試験法の限度が重量法と異なる可能性があることは容認される。

イ　適用範囲

本ガイドラインは全ての新しい動物用凍結乾燥ワクチンの最終製品試験に適用される。

ウ　背景

含湿度を測定するために以下の三つの一般的な方法が広く認められている。

- 滴定法（カールフィッシャー法）
- 共沸法
- 重量法

EU 及び米国農務省では、含湿度試験において特定の試験法を規定していない。米国連邦規制基準（9CFR113.29）では、「含湿度測定に適当とされる方法は、動植物衛生検査部によって申請書類として承認された製品概要書に記載されなければならない。」と規定されている。EU 指令／ガイドラインでは、製品の各バッチごとに含湿度を測定し、「必要に応じて、水分量測定によって凍結乾燥工程をチェックし、当該製品の規定された限度内であることを示す。」と規定されている。日本の動生剤基準においては、「乾燥減量法」が規定されている。

エ　一般原理

含湿度は以下に示す重量法によって測定される。減圧下で加熱することによって試験品から残留水分が放出され、試験品の含湿度（％として）は、乾燥によって減量した製品の重量に基づいて算出される。

（２）重量法

ア　材料と装置

（ア）円筒形の秤量瓶

気密性のガラス栓付で、番号が個々に付されたもの

（イ）減圧乾燥器

バリデートされた温度計とサーモスタットを備えたもの。適当な空気乾燥装置が注入バルブに取り付けられていること。

（ウ）天秤

0.1 ㎎まで読み取り可能なもの（精度：± 0.1 ㎎）

（エ）デシケーター

酸化リン（Ⅴ）、シリカゲル又は同等物を用いる。

（オ）試料

密閉したバイアル中の動物用乾燥ワクチン

イ　試験のための準備

（ア）試験のための準備－環境

相対湿度 45 ％未満の環境にて全ての操作を行う。

（イ）試験のための準備－秤量瓶

試料用の秤量瓶にラベルを貼る。秤量瓶は完全に清浄にしておく。秤量瓶の上部に一定角度で栓を置き、減圧（<2.5kPa）下、60 ± 3℃で最低 30 分間乾燥する。熱いうちに、速やかに秤量瓶と栓をデシケーター内へ移動させる。室温まで放冷後栓をし、重量を量り、その重量を「Ａ」として記録する。秤量瓶はデシケーターに戻す。

（ウ）試料の準備

使用時まで室温で、気密容器中に試料を保管する。作業の準備が整うまでは開封しないこと。

ウ　試験の実行

（ア）手順

ａ　試料容器を開封する。薬匙を用いて乾燥した製品を粉砕し、あらかじめ重量を量っておいた秤量瓶に速やかに移す（最低 100 ㎎若しくは精密な測定に要する下限量、又は必要であれば１バイアル（１用量）以上使用すること。）。栓をして、速やかに重量を量る。その重量を「Ｂ」として記録する。

ｂ　減圧乾燥器内で、秤量瓶に栓を傾けて置く。2.5kPa 未満まで減圧し、温度は 60 ± 3℃に設定する。

ｃ　最低３時間後、減圧ポンプを止め、乾燥器の内圧が常圧となるまで乾燥器へ乾燥した空気を注入する。

ｄ　秤量瓶が温かいうちに、栓をしてデシケータへ入れ、室温まで放冷する（最低２時間又は一定重量を得られることが確認された時間）。重量を量り、その重量を「Ｃ」として記録する。

エ　計算と結果

（（Ｂ－Ｃ）／（Ｂ－Ａ））×100 で含湿度（％）を算出する。

Ａ：秤量瓶の風袋重量

５－３　マイコプラズマ否定試験（VICH GL34）

１　緒言

（１）ガイドラインの目的

この「動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力」（以下「VICH」という。）ガイドラインは、動物用医薬品の新製品認可のハーモナイゼーションを促進することを目的としている。動物用生物学的製剤は、連続した製造と最終製品の安全性を確保するために、マイコプラズマに汚染されていないことが重要である。マイコプラズマ汚染は、細胞培養及び卵由来の生物学的製剤においてはマスターシード、マスターセルシード（ストック）、動物由来の出発材料を介して、並びに生物学的材料の加工工程においては継代及び製品組立の間にもたらされる可能性がある。そのため、試験を実施して、最終製品、ワーキングシード、ワーキングセル及びハーベスト、並びにマスターシード、マスターセルシード及び動物由来成分などの出発材料に、試験法の検出限界の範囲内においてマイコプラズマが存在しないことを示す必要がある。本ガイドラインは、マイコプラズマ汚染の存在を検出するために試験を実施すべき製造工程と試験法を定めるものである。本ガイドラインは関係規制当局による試験資料の相互承認を促進する統一基準となる。科学的に認められた基準により本ガイドラインに示された方法と同等であると証明された方法の利用も認められる。

（２）背景

マイコプラズマ汚染に対する現行の試験法は、日本の「動物用生物学的製剤基準(2002)」、欧州薬局方(第 7 版 2011, 2.6.7.)、米国連邦規則(9 CFR 113.28)に記載されている。これらの基準は全て液体培地及び寒天培地を用いる方法によりマイコプラズマ汚染を試験することを求めているという点で類似している。しかし、これらの試験法は、マイコプラズマ汚染の検出に用いることが要求又は承認されている他の代替試験法と同様に、液体培地及び寒天培地を用いる試験法の細部に違いがある。

（３）ガイドラインの範囲

本ガイドラインでは、マイコプラズマ汚染がないことを確実にするために、細胞培養及び卵由来の動物用生物学的製剤におけるマイコプラズマ汚染を検出するために実施する試験方法について記載する。マスターシード、マスターセルシード（ストック）、ワーキングシード、ワーキングセル、動物由来成分、生ワクチンのためのハーベスト、生ワクチンの最終製品及び不活化製品のためのハーベストに対する試験が含まれる。マイコプラズマ試験培地で増える細菌製剤及びバリデートされたマイコプラズマ不活化処置によりマイコプラズマ汚染のリスクに対処している製剤については、本ガイドラインの適用対象外とみなされる。鶏群に対する適切な試験の実施により、製造に使用される卵がマイコプラズマに汚染されていないことを確認しているが、これについては本ガイドラインの対象外である。

（４）試験法

本ガイドラインでは二つの試験法を記載する。

1) 液体培地で増殖し、寒天栄養培地上のコロニー形成により検出する方法
2) 細胞培養で増殖し、特徴的なデオキシリボ核酸（DNA）蛍光染色（培養できない株の検出が可能な技術）により検出する方法

第 3 の試験法として、核酸増幅法（NAT）が広く認知されているが，本ガイドラインには含まれていない。バリデートされた NAT 法の利用は、検出、

確認及び株の同定のためのより迅速な方法として、現在、規制当局により承認又は検討が行われている。もし本ガイドラインに記載されている試験法に対して、少なくとも検出限界が同等であることが証明されるならば、適切にバリデートされたNAT法は、液体/寒天培地法あるいは指示細胞培養法の代替法として利用してもよい。NAT 法で陽性と判定されたサンプルは、使用に不適当であると直ちに判断してよい。もし試験用材料の中に生存しているマイコプラズマの存在の確定が必要ならば、液体/寒天培地法又は指示細胞培養法を実施すべきである。NAT法使用の評価は、試験法を更に発展させ、比較し、正確なものにするための並行試験として推奨されており、本ガイドラインの今後の改訂版に含まれる可能性がある。

2　マイコプラズマ汚染の試験のためのガイドライン

（1）マイコプラズマ汚染検出のための一般試験法

液体培地及び寒天培地を用いた培養法は、マイコプラズマを検出するための基本的な試験法である。固体培地と液体培地を用いる培養法は、ワクチンのハーベスト又は最終バッチ及び動物由来成分を試験する際には、固体培地と液体培地を用いる培養法を用いなければならない。マスターシード、マスターセルシード（ストック）、ワーキングシード及びセルロットは、固体培地及び液体培地を用いる培養法と DNA 染色による指示細胞培養法を併用して試験しなければならない。いずれかの方法による試験結果がマイコプラズマに対して陽性を示す場合、サンプルは陽性とみなされ、使用には不適当である。

材料	液体及び寒天培地による培養	DNA 染色
マスターシード及び マスターセルシード	必要	必要
ワーキングシード及び ワーキングセルシード	必要	必要
動物由来成分[1,2]	必要	
ハーベスト	試験を必要とする場合[3]	
最終製品	試験を必要とする場合[3]	

[1] 卵を除く。

[2] バリデートされたマイコプラズマ不活化処置が適用された場合を除く。

[3] 所管官庁はハーベストと最終製品の組合せが異なる場合に試験を要求する。

（2）培養試験システムのバリデーション

試験施設のマイコプラズマ検出法の検出限界をバリデートするためには培養を実施しなければならない。次の５株のマイコプラズマについて低濃度の増殖を確実にするため、固体培地及び液体培地の両方を十分な数用いなければならない。

Acholeplasma laidlawii
Mycoplasma hyorhinis
Mycoplasma orale
Mycoplasma synoviae
Mycoplasma fermentans

これらの菌は、(試験におけるマイコプラズマ増殖の抑制を検出するために)抗生物質感受性の（実用的な数値内での）幅、培養条件の複雑さ、増殖の速さ、汚染菌となる頻度の高さ、及び鳥類又はターゲットとなる哺乳動物に対

する病原性を考慮して選択された。*Acholeplasma laidlawii* は細胞培養でよくみられる汚染菌で、動物由来であり、場合によっては環境由来も考えられる。*Mycoplasma hyorhinis* は培養条件が複雑な菌で、細胞培養でよくみられる動物由来の汚染菌であり、哺乳動物の病原体である。*Mycoplasma orale* は抗生物質に感受性があり、細胞培養でよくみられるヒト由来の汚染菌である。*Mycoplasma synoviae* は培養条件が複雑な菌で（ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチド（DPN、NAD）とシステインを必要とする)、鳥類の病原体である。*Mycoplasma fermentans* は増殖が遅い菌で、細胞培養でよくみられるヒト由来の汚染菌である。

試験施設のマイコプラズマ汚染培養試験システムのバリデートに用いられるこれらの菌の参照株は、継代数が低く（15 代以内)、基準培養株の分離菌と同系であると認められたものでなければならない（参照株に関する情報については本ガイドラインの３の（２）参照)。培養試験システムのバリデートに用いられる参照株は、試験対象製品（表参照）に対して適切なものとなる。*M. synoviae* についてのバリデーションは、鳥類由来の材料が開発及び製造のどこかの段階で用いられる場合に必要とされる。*M. hyorhinis* と *A. laidlawii* についてのバリデーションは、哺乳動物由来の材料が開発及び製造のどこかの段階で用いられる場合に必要とされる。*M. orale* についてのバリデーションは抗生物質が開発及び製造のどこかの段階で用いられる場合に必要とされる。作製された参照株は液体培地及び寒天培地の各作製ロットをバリデートするために用いられなければならない。試験ごとに少なくとも参照株 1 本を対照菌として用いなければならない。

製剤タイプ、試験法、抗生物質含有の有無別に必要とされる参照株

ワクチンのタイプ 抗生物質含有の有無 試験方法	*A. laidlawii*	*M. orale*	*M. hyorhinis*	*M. synoviae*	*M. fermentans*
鳥類の卵由来 ワクチン 抗生物質　無 液体/寒天培養法				X	X
鳥類の卵由来 ワクチン 抗生物質　有 液体/寒天培養法		X		X	X
鳥類の細胞培養由来 ワクチン 抗生物質　無 液体/寒天培養法	X			X	X
鳥類の細胞培養由来 ワクチン 抗生物質　有 液体/寒天培養法	X	X		X	X
哺乳動物の細胞培養 由来ワクチン 抗生物質　無 液体/寒天培養法	X		X		X
哺乳動物の細胞培養 由来ワクチン 抗生物質　有 液体/寒天培養法	X	X	X		X
抗生物質を含まない ワクチン DNA 染色法		X	X		
抗生物質を含む ワクチン DNA 染色法		X	X		

（３）培養法

ア　培養条件

密栓された容器に入った液体培地を大気中で培養する。寒天培地は全て微好気条件下（CO_2 を 5-10%含む窒素ガス）で培養する。固体培地については寒天表面の乾燥を防ぐために十分な湿度のある空気環境を維持すること。

イ　培地の新しいバッチの栄養性状

培地は新しいロット（バッチ）ごとに栄養性状について試験が行われなければならない。その際本ガイドラインの２の（２）に規定された参照株を用いる。各試験機関は低濃度（100CFU（Colony Forming Units）以下）の各参照株から接種するものを決定しなければならない。固体培地に対しては 60mm プレートにつき、液体培地に対しては 100mL の容器当たり、それぞれ低濃度（100CFU 以下）になるように接種する。各参照株につき、少なくとも寒天平板 1 枚と液体培地 1 個を使用する。寒天及び液体培地を培養し、規定された間隔で液体培地から寒天培地へ継代培養する。指定された全ての参照株について、得られる増殖が、接種に関して算出される値から 5 倍以上の差がないならば、その寒天培地のバッチは栄養性状に関する試験に適合していることとなる。指定された各参照株について、液体培地から寒天培地へ継代培養されたマイコプラズマの増殖が同様に達成されれば、その液体培地は栄養性状に関する試験に適合していることとなる。有効と判明した培地の組成は本ガイドラインの３の（１）に記載されている。

ウ　抑制物質

栄養性状に対する試験は、承認前の段階及びマイコプラズマ検出に影響する可能性があるような製造方法の変更があるときには必ず、試験対象製剤を含む場合と含まない場合の両方において実施しなければならない。もし参照株が試験対象製剤を含まない培地の方で製剤を含む培地よりも 1 継代以上早く増殖するなら、あるいは試験対象製剤を含むプレートへ直接接種された場合のコロニー形成が製剤を含まないプレートの 1/5 未満であるなら、試験対象製剤には抑制物質が含まれている。マイコプラズマ汚染試験を実施する前に、これらの物質を中和するか、又はその影響を打ち消す対策をとる必要がある。それには、例えば、抑制物質を含まない培地で継代するか、大量の培地で希釈する方法がある。希釈する方法としては、培地量を増やして用いるか接種量を複数の 100mL フラスコに分割することができる。中和又はその他の方法の有効性は、中和後に抑制物質に対する試験を繰り返すことで確認できる。

エ　試験法

①　それぞれの固体培地のプレートごとの接種量は試験対象製剤 0.2mL である。マイコプラズマ検査がマスターシード、ワーキングシード、マスターセル、ワーキングセル、及び動物由来成分に関するものであるときには、10mL 以上の未希釈の試料を各液体培地中で試験しなければならない。各液体培地中で試験されるべき最終製品の量は、販売承認を与える規制当局によって定められたとおりとする。それらは現在のところ日本と米国では 1mL 以上、EU では 10mL 以上となっている。寒天培地のプレートは、35 ～ 38 ℃の微好気条件下で、表面の乾燥を防ぐために十分な湿度を保った空気環境下で 10 ～ 14 日間培養する。液体培地は、密栓された容器に入った状態で 35 ～ 38 ℃の大気中で 20 ～ 21 日間培養する。同時に、液体培地及び寒天培地のプレートについて、

非接種の 100mL を陰性対照として培養する。もし試験対象製剤の添加により著しい pH の変化が生じた場合（これは承認前の段階で判定されるべきであるが)、その液体培地に水酸化ナトリウム又は塩酸の溶液を加えることにより元の pH に戻さなければならない。接種後第 2 日～第 4 日の間で、それぞれの液体培養から 0.2mL を、少なくとも各固体培地の 1 枚に接種する方法で継代培養し、その後 35 ～ 38 ℃の微好気条件下で 10 ～ 14 日間培養する。この操作を試験の第 6 日～第 8 日の間、第 13 日～第 15 日の間、第 19 日～第 21 日の間に、それぞれ繰り返す。第 19 日、第 20 日又は第 21 日に接種された寒天培地のプレートは 7 日間培養する。液体培地は 2 日又は 3 日ごとに観察し、もし色が変化したら継代培養する。変色の検出にはフェノールレッドを培地に加える必要がある。

② もし液体培地に細菌又はカビによる汚染が認められた場合には、試験を反復する。各接種日につき最低 1 枚のプレートの判定ができない場合には、試験を反復しなければならない。

③ 試験には、寒天培地のプレート上及び液体培地中に少なくとも 1 種の参照株を低濃度（100CFU 以下）で接種することによって作製された陽性対照を含める。試験が繰り返し実施される場合には、この対照株は定期的に交替しなければならない。この対照株は、本ガイドラインの２の（２）に示されたように、試験を行う製剤のタイプによって定められたワーキング参照株を用いてバリデートされた培地を用いて行われる各試験に用いなければならない。

オ 培養法の判定

培養期間の終了時に、接種が行われた全ての固体培地を顕微鏡で検査し、マイコプラズマコロニーの存在を確認する。もし接種を行ったどの固体培地にもマイコプラズマコロニーが発育しない場合、試験対象製剤はマイコプラズマ汚染について陰性である。もし固体培地のどれかに典型的なマイコプラズマコロニーが発育した場合、この試験及び試験対象製剤はマイコプラズマ陽性とみなされる。もし陽性対照が、1 枚でも継代培養プレートでマイコプラズマの発育を示さない場合、又は陰性対照がマイコプラズマ汚染について陽性である場合には、この試験は無効となる。もしいずれの対照も無効となった場合は、試験を反復しなければならない。もし疑わしいコロニーが観察された場合、適切かつバリデートされた方法を用いてマイコプラズマ汚染を確認してもよい。

（４）指示細胞培養法

培養細胞を DNA に結合する蛍光色素で染色する。細胞表面に現れる蛍光色の特徴的な粒子状又は糸状模様によってマイコプラズマが検出され、マイコプラズマ汚染が重度であれば周辺領域にも模様が認められる。細胞質のミトコンドリアも染色されることがあるが、マイコプラズマによる染色との識別はできるだろう。

ア 指示細胞培養法のバリデーション

Vero 細胞又は同等の能力を有する他の指示細胞を用い、100CFU 以下の菌数の適切な *M. hyorhinis* 及び *M. orale* の参照株を接種することによりこの検査法のバリデーションを行う。試験終了時に DNA 染色により染色されていた場合、これらの参照株は共に陽性である。

仮にウイルス培養上清のように、結果の判定が細胞変性効果の影響を受け

る場合、マイコプラズマに対する抑制作用を持たない特異抗血清を用いることによってウイルスを中和するか、又はウイルスが増殖できない別の細胞培養を用いることができる。血清が抑制作用を持たないことを示すには、中和作用がある抗血清が存在する状況で陽性対照試験を実施する。抗血清の効力判定は使用の都度実施するのではなく一度実施すればよい。

イ　試験法

① 指示細胞培養は、25cm^2 以上の細胞培養容器に、培養 3 日後に密生状態となるような濃度で（例： 2×10^4 ～ 2×10^5 個/mL、4×10^3 ～ 2.5×10^4 個/cm^2）播種する。指示細胞培養は、使用する前に抗生物質を用いずに継代培養されたものでなければならない。試験対象サンプルの 1mL を細胞培養容器に接種し、35 ～ 38 ℃で培養する。

② 少なくとも 3 日間培養後、細胞が密生状態まで増殖したら、適当な容器に入れたカバーグラス上、又はこの試験方法に適した他の培養表面（チャンバースライド）上に継代培養する。第 2 継代培養では、培養後 3 ～ 5 日後に 50%の密生度に達する程度の低密度で細胞を播種する。染色後のマイコプラズマの観察が困難になるため、完全な密生状態は避けなければならない。

③ カバーグラス又はチャンバースライドから培養液を取り除く。指示細胞の単層細胞をリン酸緩衝食塩液（PBS）で洗浄し、氷酢酸/メタノール液（1:3）又は他の適当な固定液を用いて固定する。

④ 固定液を取り除いて捨てる。固定液を滅菌水で洗浄し、もし 1 時間以上後に染色を行う場合は、スライドを完全に乾燥させる。

⑤ DNA と結合する適当な蛍光色素、例えば bisbenzimide 染色液（ヘキスト 33258, bisbenzimidazole, 5 μ g/L）を加え、適切な時間染色する。

⑥ 染色液を取り除き、単層細胞を水で洗浄する。必要な場合には、カバーグラスをかぶせ、スライドグラスを蛍光顕微鏡により 400 倍又はそれ以上の倍率で検査する（bisbenzimide 染色を行った場合には、330nm/380nm の励起フィルター、LP440nm の遮光フィルターを用いる。）。

⑦ 試験培養の顕微鏡像と陰性対照及び参照株の顕微鏡像を比較し、核外蛍光を調べる。マイコプラズマは、指示細胞の細胞質を覆う微粒子状又は糸状の物質を産生する。また、マイコプラズマは細胞質においても微粒子状及び糸状の物質を産生することがある。複数の顕微鏡視野について（バリデーションで求められているとおり）検査を行わなければならない。

ウ　指示細胞培養法の判定

微粒子状又はフィラメント状の核外蛍光の形跡が認められなければ、試験対象製剤はマイコプラズマ汚染について陰性である。もし製剤が接種されたスライドに微粒子状又はフィラメント状の形跡つまりマイコプラズマを示す核外蛍光の形跡が認められた場合は、この試験及び試験対象製剤はマイコプラズマ汚染について陽性であると考えられる。陽性対照が参照菌に特有の核外蛍光を示さないか、又は陰性対照が核外蛍光を示す場合は、この試験は無効である。対照のいずれかが無効となった場合、試験を反復しなければならない。

3　付録

（1）地域ごとの適切な液体培地及び寒天培地の組成

9 CFR マイコプラズマ液体培地

ハートインフュージョンブイヨン	62.5 g
プロテオースペプトン #3	25.0 g
酵母エキス	12.5 mL
1 % 酢酸タリウム	62.5 mL
1 % 塩化テトラゾリウム	13.75 mL
ペニシリン (100,000 単位/mL)	12.5 mL
加熱非働化馬血清	250 mL
水	2425 mL

全ての成分をよく混和し、10mol/L 水酸化ナトリウムにより pH を 7.9 に調整する。
0.2 μ フィルターでろ過滅菌して、滅菌済み試験容器に分注する。
使用前に DPN/L-システイン溶液を、培地 100mL 当たり 2mL 加える。

9 CFR マイコプラズマ寒天培地

ハートインフュージョン寒天	25 g
ハートインフュージョンブイヨン	10 g
プロテオースペプトン #3	10 g
1% 酢酸タリウム	25 mL
水	995 mL
加熱非働化馬血清	126 mL
酵母エキス	5 mL
ペニシリン (100,000 単位/mL)	5.2 mL
DPN/L-システイン	21 mL

ハートインフュージョン寒天及びハートインフュージョンブイヨン、プロテオースペプトン#3、酢酸タリウム及び水を混合し、沸騰するまで加熱後、冷却する。10mol/L 水酸化ナトリウムにより pH を 7.9 に調整する。121º C で 20 分間高圧滅菌する。その後、恒温槽で 56º C に冷却する。
無菌的に、馬血清、酵母エキス、ペニシリン及び DPN/L-システインを加える。
15×60 mm の滅菌シャーレに 12mL ずつを分注する。

DPN/L-システイン溶液

ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチド(DPN, NAD)	5 g
水	総量 500 mL とする。

L-システイン	5 g
水	総量 500 mL とする。

各々の化学物質は別々に溶解する。
二つの溶液を混合し、ろ過滅菌する。

日本　マイコプラズマ用液体培地

基礎培地

1,000m L 中

50 w/v %牛心筋抽出物	100 mL
獣肉製ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	5 g
ブドウ糖	1 g
L-グルタミン酸ナトリウム	0.1 g
L-アルギニン－塩酸塩	1 g
水	残量

0.22 μ m メンブランフィルターでろ過滅菌するか、121º C で 15 分間高圧滅菌する。
滅菌後の培地の pH を 7.2 ～ 7.4 に調整する。

基礎培地 77 mL に次の各成分を添加する。

馬血清	10 mL
非働化豚血清	5 mL
25 w/v %新鮮酵母抽出液	5 mL
1 w/v %β－ニコチアミドアデニンヌクレオチド[酸化型]	1 mL
1 w/v %L－システイン塩酸塩試液	1 mL
0.2 w/v %フェノールレッド液	1 mL

滅菌した基礎培地に、あらかじめろ過滅菌しておいた各添加物を無菌的に加える。
なお、添加物のうち高圧滅菌可能なものは、高圧滅菌してもよい。
さらに、ベンジルペニシリンカリウムを培地 1mL 中に 500 単位及び酢酸タリウムを培地中の濃度が 0.02 w/v%となるように加えてもよい。

日本　マイコプラズマ用寒天培地

基礎培地	78 mL
寒天	1 g

121ºC で 15 分間高圧滅菌する。

添加物：

馬血清	10 mL
非働化豚血清	5 mL
25 w/v %新鮮酵母抽出液	5 mL
1 w/v %β－ニコチアミドアデニンヌクレオチド[酸化型]	1 mL
1 w/v %L-システイン塩酸塩試液	1 mL

ベンジルペニシリンカリウムを培地 1mL 中に 500 単位及び酢酸タリウムを培地中の濃度が 0.02 w/v%となるように加えてもよい。
加温溶解した基礎/寒天培地に添加物を無菌的に加え、45 ～ 55　mm 滅菌シャーレに分注し、冷却し、凝固させる。

EP 推奨の ヘイフリック培地 (マイコプラズマの一般的な検出用培地)
液体培地：

牛ハートインフュージョンブイヨン (注 1)	90 mL
馬血清(非加熱)	20 mL
酵母エキス (250 g/L)	10 mL
酢酸タリウム (10 g/L 溶液)	1 mL
フェノールレッド (0.6 g/L 溶液)	5 mL
ペニシリン (20,000 I.U. /mL)	0.25 mL
デオキシリボ核酸 (2 g/L 溶液)	1.2 mL

pH を 7.8 に調整する。

固体培地：
上記の液体培地と同様に作製し、牛ハートインフュージョンブイヨンの代わりに 15 g/L の寒天を含む牛ハートインフュージョン寒天を使用する。

EP 推奨のフライ培地 (*M. synoviae* 検出用培地)
液体培地：

牛ハートインフュージョンブイヨン (注 1)	90 mL
必須ビタミン (注 2)	0.025 mL
グルコース一水和物 (500 g/L 溶液)	2 mL
豚血清 (56ºC、30 分間で非働化)	12 mL
β-ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチド(10 g/L 溶液)	1 mL
塩酸システイン (10 g/L 溶液)	1 mL
フェノールレッド (0.6 g/L 溶液)	5 mL
ペニシリン (20,000 I.U. /mL)	0.25 mL

β-ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチドと塩酸システインの溶液を混合し、10 分後、他の添加物を追加する。pH を 7.8 に調整する。

固体培地：

牛ハートインフュージョンブイヨン (注 1)	90 mL
イオン寒天 (注 3)	1.4 g

pH を 7.8 に調整し、高圧滅菌後、以下を添加する。

必須ビタミン (注 2)	0.025 mL
グルコース一水和物(500 g/L 溶液)	2 mL
豚血清(非加熱)	12 mL
β-ニコチンアミド-アデニン-ジヌクレオチド(10g/L 溶液)	1 mL
塩酸システイン (10 g/L 溶液)	1 mL
フェノールレッド (0.6 g/L 溶液)	5 mL
ペニシリン (20,000 I.U. /mL)	0.25 mL

EP 推奨のフリース培地 (非鳥類由来マイコプラズマ検出用培地)
液体培地：

ハンクス氏液 (改良) (注 4)	800 mL
水	67 mL
ブレインハートインフュージョン(注 5)	135 mL

PPLO 培養液	248 mL
酵母エキス (170 g/L)	60 mL
バシトラシン	250 mg
メチシリン	250 mg
フェノールレッド(5 g/L)	4.5 mL
馬血清	165 mL
豚血清	165 mL

pH を 7.40 ～ 7.45 に調整する。

固体培地：

ハンクス氏液 (改良) (注 4)	200 mL
DEAE-デキストラン	200 mg
イオン寒天(3)	15.65 g

よく混和し、高圧滅菌した後、100º C に冷却し、上記の液体培地 1740 mL に添加する。

EP 培地付記

(注 1) 牛ハートインフュージョンブイヨン

牛心臓 (インフュージョン作製用)	500 g
ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	5 g
水	総量 1000 mL とする

高圧滅菌する。

(注 2) 必須ビタミン

ビオチン	100 mg
パントテン酸カルシウム	100 mg
塩化コリン	100 mg
葉酸	100 mg
i-イノシトール	200 mg
ニコチンアミド	100 mg
塩酸ピリドキサール	100 mg
リボフラビン	10 mg
塩酸チアミン	100 mg
水	総量 1000 mL とする

(注 3) イオン寒天

純度、透明度、ゲル強度に優れた製品を作製するイオン交換法により準備された、微生物学及び免疫学分野において使用する高度に精製された寒天である。

本品が含む成分はおよそ、以下のとおり：

水	12.2 %
灰	1.5 %

酸に不溶性の灰	0.2 %
塩素	0.0 %
リン酸 (P_2O_5 として)	0.3 %
総チッ素	0.3 %
銅	8 ppm
鉄	170 ppm
カルシウム	0.28 %
マグネシウム	0.32 %

(注 4) ハンクス氏液 (改良)

塩化ナトリウム	6.4 g
塩酸カリウム	0.32 g
硫酸マグネシウム・7 水和物	0.08 g
塩化マグネシウム・6 水和物	0.08 g
無水塩化カルシウム	0.112 g
リン酸二水素ナトリウム・2 水和物	0.0596 g
無水リン酸カリウム	0.048 g
水	総量 800 mL とする

(注 5) ブレインハートインフュージョン

子牛ブレインインフュージョン	200 g
牛ハートインフュージョン	250 g
プロテオースペプトン	10 g
グルコース	2 g
塩化ナトリウム	5 g
無水リン酸水素二ナトリウム	2.5 g
水	総量 1000 mL とする

(注 6) PPLO ブイヨン

牛ハートインフュージョン	50 g
ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	5 g
水	総量 1000 mL とする

DNA 染色用 Bisbenzimide 染色液

ヘキスト 33258 (bisbenzimidazole), 緩衝水溶液 1 リットル中 5 μg を含む。
注意：本溶液は遮光すること。

（2）マイコプラズマ参照株

試験施設間又は地域間の試験法の標準化は、地域内又は地域間で共通の参照株を用いることにより強化されるだろう。ただし、現在は、凍結乾燥した参照バッチの安定的な作製が困難であること及び凍結参照株の輸送の問題により、非現実的であることが示されている。それゆえ、各地域又は試験施設では、それぞれ自前の参照株が、継代数が少なく（15 回以下）、培養分離株の型との比較で同定され、安定で、本ガイドラインの内容に応じて、使用するのにおよそ適切とバリデートされた場合、自前の参照株を用いてもよい。国

際的な承認のためには、EDQM 参照株（後述）との比較を、検出限界のバリデーションの中に含めることを強く勧告する。各地域又は試験施設は、それぞれのバリデートされた参照株を作製してもよいし、あるいは以下に示すように EDQM によって作製され、ほぼバリデートされた参照株が、通常利用可能であるので、それを入手してもよい。

本ガイドラインの２の（２）にリストされた 5 株のマイコプラズマは、欧州連合の研究所が分離し、欧州薬局方委員会（the European Department of the Quality of Medicines and HealthCare（EDQM））に提供された。EDQM は、本 VICH マイコプラズマ・ワーキンググループの 3 地域（日本、EU 及び米国）の規制当局の試験施設へ配布するのに十分な量のこれらの凍結参照株を作製し、地域内の EU バリデーション/安定性試験を実施した（C. Milne, A. Daas. Establishment of European Pharmacopoeia Mycoplasma Reference Strains. Pharmeuropa Bio 2006(1):57-72）。更なるバリデーション試験が、日本、アメリカ合衆国及びカナダの規制当局及び企業により完了し、それらの株が本ガイドラインの現状に照らして、非常に適切であることが確認された（VICH Collaborative Study on the Ph. Eur. Mycoplasma Reference Strains: EDQM Report Compiling and Analyzing the Data Set for the VICH Collaborative Study on the European Pharmacopoeia Mycoplasma Reference Strains, EDQM Administrator Representative, C. Milne, 2010.)。生物学的製剤検査法作業部会（BQMEWG）は、これらの素晴らしい参照株を作製し、バリデートした EDQM のスタッフの労力と根気強さを高く賞賛する。

DNA 染色のバリデーションについては、次の株も有用となるかもしれない。

M. hyorhinis -- ATCC 29052

M. orale -- ATCC 23714

（３）用語解説

動物由来の出発材料のバッチ（ロット、シリアル）（Batch (lot, serial) of starting material of animal origin）

固有の連続番号によって識別された均一な材料（例えば細胞、血清）の総量。

セルシードシステム（Cell-seed system）

同一のマスターセルシード由来の細胞で培養することによってある製品の最終ロット（バッチ）が製造されるシステム。ワーキングセルシードを作製するためにマスターセルシードから分注された多数の容器が用いられる。

細胞株（Cell lines）

原材料から 10 代以上の継代を行った細胞培養で、*in vitro* での高い増殖能力をもつもの。

最終製品、バッチ、ロット又はシリアル（Final product, batch, lot, or serial）

密閉された最終容器又はその他の最終用量単位の集まりで、均一であり、最終製剤の分注又は調製の間の汚染リスクに関して同等であることが期待されるもの。用量単位は同一の最終バルクワクチンから分注されるか、もしそうでなければ調製され、同時に凍結乾燥され（該当する場合には）、一連の作業行程の間に密閉されたものである。それぞれ最終ロット（バッチ、シリアル）を示す固有の番号又はコードが表示される。最終バルクワクチンの分注と凍結乾燥の両方又はいずれか一方が幾つかの別々の工程で行われる場合、1 組の関連がある最終ロット（バッチ、シ

リアル）が作られることになり、それらは固有の番号又はコードの一部に共通部分を用いることによって識別されることが通例である。これらの関連する最終ロット（バッチ、シリアル）はサブバッチ、サブシリアル、サブロット又は充填ロットと呼ばれることもある。マイコプラズマ試験の実施に関しては 1 つのサブバッチはそのバッチ全体を代表するものとみなしてよい。

ハーベスト（Harvests）

同一のワーキングシードのロットを接種された単一の製造用培養から 1 回以上の回数採取された材料（単一ハーベスト）、又は、混合された材料で微生物若しくは抗原の単一の株若しくは型を含んだもので、同時に処理が行なわれる多数の卵、細胞培養容器等から得られたもの（一価の混合されたハーベスト）。

マスターセルシード（ストック）（Master cell seed (stock)）

製剤の調製に用いられる単一継代レベルの細胞（初代培養又は細胞株）の小分けの一まとまりで、1 回限りの操作で容器に分注され、均一性と安定性を確実にし汚染を防ぐように同時に処理と保存が行われる。マスターセルシードは通常－ 70 ℃又はそれ以下の温度で保存される。

マスターシード（Master seed）

目的とする動物用生物学的製剤の全てのバッチの製造に用いられる単一継代レベルの微生物の培養が密閉された容器の集まりで、均一性と安定性を確実にし汚染を防ぐように 1 回限りの操作で単一のバルクから容器への分注と処理が同時に行われる。

微好気条件（Microaerophilic condition）

5 ～ 10%の二酸化炭素と寒天プレートの乾燥を防ぐのに十分な湿度を含む窒素ガスの環境。

継代（Passage）

該当する細胞又は微生物に通常用いられる培養期間によって細胞又は微生物が 1 回植え継がれること。

初代培養細胞の培養（Primary cell cultures）

採取された動物の組織に存在している状態から基本的に変化がない細胞の培養で、動物組織から最初に調製されたときから試験レベル時まで *in vitro* での継代が 10 回以下しか行われていないもの。最初の *in vitro* での培養は第 1 代とみなされる。

シードロットシステム（Seed-lot system）

ある製品の連続したバッチが同一のマスターシードウイルスから得られるシステム。ルーチンの製造のために、マスターシードウイルスからワーキングシードウイルスを作製することができる。

ワーキングセルシード（ストック）（Working cell seed (stock)）

マスターセルシード由来の細胞の小分けの一まとまりで、継代レベルで製造用細胞培養の調製に用いられる。ワーキングセルシードは容器に分注され、マスターセルシードの項の記述と同様に処理及び保存される。プロダクションセルシードを含む。

ワーキング参照株（Working References）

試験を実施する施設で対照株として用いるために本文書で規定された参照株としての要件を満たすようにマイコプラズマの参照株を継代して作製されたもの。

ワーキングシード（Working seed）

マスターシードウイルス由来の微生物の小分けの一まとまりで、製品の製造に用いられる継代レベルのもの。ワーキングシードウイルスは容器に分注され、マスターシードウイルスの項の記述と同様に保存される。プロダクションシードを含む。

５－４　動物用不活化ワクチンの対象動物バッチ安全試験省略要件（VICH GL50）

１　序言

VICH の参加地域における免疫学的な動物用医薬品(IVMP)のバッチ販売のためには、対象動物又は実験動物を用いたバッチ安全試験データの提出が必要とされている。VICH 運営委員会は、異なる国の規制当局に対し個々に試験を実施する必要性を最小限にするために、地域全体のバッチ安全試験の統一化を目指すことを決定している。しかし、地域間の要求事項に大きな相違があるため、第一段階として、安全試験が要求される地域の不活化ワクチンに対する対象動物バッチ安全試験（TABST）を省略するために要求される資料の基準を統一化するという段階的取組を採用するとの結論を下した。

このガイドラインは、VICH の原則の下で作成され、TABST の省略を受け入れる政府規制当局のために統一基準を提示する。地域限定の流通製品に対して類似の取組をするためには、この VICH ガイドラインの使用が強く奨励されるが、あくまで地域の規制当局の判断による。さらに、代替法を実施する科学的に正当な理由があるときは、このガイドラインに必ずしも従う必要はない。

世界的に TABST を省略することで、通常のバッチ販売のために供試される動物数が減少するため、奨励されるべきである。

（１）ガイドラインの目的

このガイドラインの目的は、安全試験が要求される地域の不活化 IVMP の TABST を省略するために要求される資料の基準に対して国際的に協調した勧告を与えることである。

ア　背景

実験動物及び/又は対象動物を用いる最終製品に対する大半のバッチ安全試験は、一般安全試験として考えることができる。これは幅広い IVMP のグループに適用され、製品が対象動物に対して安全であるという一定の保証を与える。すなわち「異常な局所又は全身性反応」(欧州薬局方)、「生物学的製剤に起因する好ましくない反応」(9CFR（米国）)又は「異常な変化がないこと」(動物用生物学的製剤基準（日本)) を検出する。

この 20 年にわたって、バッチ安全試験の妥当性は、規制当局及びワクチン製造業者によって疑問視されている(Sheffield and Knight, 1986 年；van der Kamp, 1994 年；Roberts and Licken, 1996 年；Zeegers ら, 1997 年；Pastoret ら, 1997 年；Cussler, 1999 年；Cussler ら, 2000 年；AGAATI, 2002 年；Cooper, 2008 年)。特に、GMP 及び GLP (OECD, 1998 年)、又はワクチン製造に関する地域の要求に適合した同様の品質保証システムの導入が、バッチ製造の一貫性を非常に高め、それによって、これらの安全性と品質を非常に向上させている。また、これは IVMP に対する(主に *in vivo* 試験に基づく)従来のバッチ管理から、主に *in vitro* 技術に基づく製造の一貫性に重点を置く方向へと、品質管理に対する考え方に影響を与えている(Lucken, 2000 年；Hendriksen ら, 2008 年；de Mattia ら, 2011)。

異なる VICH 地域において要求される資料及び第 21 回 VICH 運営委員会に

おけるコメントを調査したところ、バッチ安全試験に対する取組方及び結果として要求される試験手順が地域間で著しく異なることが明らかになった。このことで、試験の要求事項及び試験性能の統一化が困難かつ時間を要する仕事となる。

したがって、地域全体の対象動物バッチ安全試験を省路するための基準統一化のための第一段階として、不活化 IVMP の VICH ガイドラインの作成を開始することが決定された。

２　ガイドライン

（１）範囲

このガイドラインは、不活化 IVMP の TABST を省略するために要求される事項に関する基準に限定される。

（２）地域の要求事項

ア　一般バッチ安全試験

現在、以下の試験手順(表 1)がこのガイドラインで対象となる不活化 IVMP のバッチ安全試験のために要求されている。

表 1:

VICH 地域	要求事項	備考
ヨーロッパ: 2013 年 3 月 31 日まで - 欧州薬局方:通則 5.2.9.章 動物用ワクチン及び免疫血清のバッチの安全性 - 動物用ワクチンに関する一般モノグラフ（0062）及び各条モノグラフ 2013 年 4 月 1 日から 対象動物バッチ安全試験は削除される。	対象動物種(2 頭の哺乳動物、10 匹の魚類、10 羽の鳥類)、2 倍量、推奨される投与経路、最低 14 日間の観察	別々の最終バルクからの少なくとも 10 の連続バッチが試験され、製品が試験に適合するならば、省略することができる。 -欧州薬局方：通則 -動物用ワクチンに関する一般モノグラフ(0062)に附則が追加される。 附則：個別な状況（例えば製造工程の変更、野外における想定外の副作用発生の報告があった場合あるいは申請時と同等のデータが得られない場合など）には、当局との合意の上又は当局の要求により安全試験を特別に実施する必要がある。
米国: - 9CFR - 不活化細菌ワクチ	マウス(113.33)	

ンに関する一般要求事項（113.100）	又は － マウスに本質的に致命的である場合はモルモット（113.38） － 家禽ワクチンである場合は家禽 － 魚類ワクチン又は他の水生種である場合は魚類 － 爬虫類ワクチンである場合は爬虫類 113.38 － 2 匹のモルモット、2mL　筋肉内又は皮下接種、7 日間の観察	
不活化ウイルスワクチンに関する一般 要求事項（113.200）	モルモット（113.38） マウス（113.33） 113.38 － 2 匹のモルモット、2mL　筋肉内又は皮下接種、7 日間の観察 113.33a　－　8 匹のマウス、0.03mL 脳内接種、7 日間の観察 ; 8 匹のマウス、0.5mL　腹腔内接種、7 日間の観察	家禽ワクチンに関しては適用されない。
日本 : 動物用生物学的製剤基準	a）対象動物 哺乳動物 : 2 ～ 4 頭の動物、1 ～ 5 倍量、承認された投与経路、10 ～ 14 日間の観察 鳥類 : 10 羽、1 倍量、承認された投与経路、2 ～ 5 週間の観察 魚類 : 15 ～ 120 尾、1 倍量、承認された投与経路、2 ～ 3 週間の観察 b）異常毒性否定試験 モルモット : 2 匹、5mL 腹腔内接種、7 日間観察 マウス : 10 匹、0.5mL 腹腔内接種、7 ～ 10 日間の観察 c)毒性限度確認試験 マウス : 10 匹、0.5mL 腹腔内	

	接種、7 日間観察 モルモット：5 匹、5mL 腹腔内接種、7 日間観察	

イ　その他の関連した要求事項

①　品質システム

GMP 及び同様の品質システムは、動物用医薬品を含む医薬品の製造と検査を管理するために VICH に参加する国･地域で確立されている。これらの品質システムは、市販される製品が一貫した適切な方法で製造されていることを保証する。

②　医薬品安全性監視

VICH の中で獣医学分野における医薬品安全性監視(医薬品の市販後調査)並びに要求事項及び方法の統一化を徐々に進めている。これは、野外における低品質ワクチンに関連する安全性に関わる問題の早期の発見につながる。したがって、医薬品安全性監視は、製剤の TABST で常に得られるとは限らない安全性について、特別の情報を提供する。

（3）対象動物バッチ安全試験の省略のための要求資料

ア　緒言

TABST は、十分な数の連続したバッチが生産され、試験への適合が明らかにされ、製造工程の一貫性が実証された場合、規制当局により免除されることができる。

一般的には、追加の補助試験を必要とすることなく、通常のバッチ品質管理及び医薬品安全性監視データから入手できる既存の情報を評価することで十分である。TABST の省略を申請する製造業者が添付すべきデータを以下に示す。しかし、これを完全なリストとして捉えるべきでない。全ての場合、TABST を省略するための申請は、製剤の安全性が維持されていることを保証する全てのデータの要約とその結論が添付されるべきである。

例外的なケースとして、製造工程の重要な変更は、製品の安全性分析の一貫性を再構築するために、TABST の再実施が要求されるかもしれない。TABST の実施により避けることができていた、予期されていなかった副作用の発生やその他の医薬品安全性監視上の問題が発生した場合は、TABST の再実施となるかもしれない。安全性の点で危険性を内在する製剤は、各バッチでの TABST を実施し続ける必要があるかもしれない。

①　製品及びその製造の特徴

製造業者は、製品が品質原則に従って製造されること、すなわち製品が一貫した適切な方法で製造されていることを実証しなければならない。

in vivo バッチ試験が安全試験以外（例えば、力価試験）のために対象動物を用いて実施される状況であって、それらの試験が安全性情報（例えば、死亡率）の収集を含むものである場合には、製造業者が対象動物種におけるワクチンの安全性の追加データを得るためにこれらの試験を使用す

ることが推奨される。

② 現行のバッチ安全試験に関して入手できる情報

製造業者は、安全性と一貫した製造が確立されていることを実証するため、十分な数のバッチの実施記録を提出すべきである。当該製剤の利用できる情報から規制当局が偏見を持たずに判断するには、多くの製剤で 10 の連続したバッチの試験資料で十分であるように思われる。製造業者は、TABST の成績で観察された局所及び全身反応の変動性、並びにこれら反応の性質を、製品の登録又は承認申請時に提出された開発試験で観察されたものと関連させて精査すべきである。製造業者は、所見のまとめとその考察を準備すべきである。

TABST の実施は、試験が実施された時点での地域の要求事項に従うべきである。合意された数の連続バッチが試験された期間に、TABST に不適合であるいずれのバッチも詳細に検査すべきである。この情報は、不適合の理由についての説明とともに、規制当局に提出すべきである。

③ 医薬品安全性監視データ

VICH ガイドラインに従った医薬品安全性監視システムは、利用できる地域においては､当該データが提出されるバッチが販売されていた期間中、機能していることが必要である。

医薬品安全性監視及び TABST からの安全性情報は、根本的に異なる性質のものであるが、互いに補完的である。

野外におけるワクチンの一貫した安全性能を実証するために利用可能な医薬品安全性監視データは、当該期間の最新の定期的安全性報告に従って提出されなければならない。

イ TABST を省略するための手順

報告は、製品の安全性の一貫性を総合的に評価したものであって、製造したバッチ数、製品の販売年数、販売数量、対象動物種での全ての副反応の頻度及び重大性、並びにこれら現象を説明しうる原因の調査が含められるべきである。

3 用語集

GLP (Good Laboratory Practices)

非臨床試験のデザイン、実施、モニタリング、記録、監査、解析及び報告の基準。この基準を遵守することで、データ及び報告された結果が完全で、正しくかつ正確であり、試験動物の福祉と試験に関わる試験担当者の安全性が確保され、環境並びに人間及び動物のフードチェーンが保護されることが保証される (OECD, 1998)。

GMP (Good Manufacturing Practices)

動物用医薬品を含む医薬品の製造と試験を含む品質システムの一部である。GMP は、医薬品の生産中の生産プロセス及び生産の環境の質を保証する、製品の品質に影響する製造及び試験について概略した指針である。

免疫学的な動物用医薬品(IVMP、Immunological veterinary medicinal product)

動物に投与して、能動又は受動免疫を惹起させるか、免疫の状態を診断するための全ての動物用医薬品。

生産バッチ（Production Batch）

均一であると予期し得る1回のプロセス又は連続したプロセスで加工された出発材料、包装資材又は製品の規定量。

注記　特定の製造段階を完了するために、バッチを多くのサブバッチに分割することが必要となり得るが、これらは最終的に均一なバッチにするために後でまとめられる。連続製造の場合、バッチは、意図した均一性により特徴付けられる、生産の規定された画分と一致していなければならない。

TABST（Target Animal Batch Safety Test）

対象動物バッチ安全試験；全てのIVMP又は製品群(例えば、不活化ウイルスワクチン)に対するルーチンの最終製品バッチ試験として実施される対象動物における安全試験。

対象動物（Target Animal）

IVMPの使用が意図される動物である特定の動物種、クラス及び品種。

4　参考文献

AGAATI (2002) The Target Animal Safety Test - Is it Still Relevant? Biologicals 30, 277-287

Cooper J (2008). Batch safety testing of veterinary vaccines - potential welfare implications of injection volumes. ATLA 36, 685-694

Cussler (1999) A 4R concept for the safety testing of immunobiologicals. Dev. Biol. Standard. 101, 121-126

Cussler K, van der Kamp MDO & Possnecker A (2000) Evaluation of the relevance of the target animal safety test. In: Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation, pp. 809-816. Eds M Balls, A-M van Zeller and ME Halder. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V.

De Mattia et al (2011). The consistency approach for quality control of vaccines e A strategy to improve quality control and implement 3Rs. Biologicals 39, 59-65.

Hendriksen C.F.M. et al. (2008). The consistency approach for the quality control of vaccines. Biologicals 36, 73-77

Lucken R (2000). Eliminating vaccine testing in animals - more action, less talk. Developments in Animal and Veterinary Sciences 31, 941-944

OECD (1998). Document ENV/MC/CHEM(98)17: Principles on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring

http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

Pastoret PP, Blancou J, Vannier P, Verschueren C. (1997) Veterinary Vaccinology. Amsterdam, Elsevier Science B.V.

Roberts B, Lucken RN (1996). Reducing the use of the target animal batch

safety test for veterinary vaccines. In: Brown F, Cussler K, Hendriksen C (eds) Replacement, reduction and refinement of animal experiments in the development and control of biological products. Basel, S. Karger, AG, pp. 97-102.

Sheffield FW, Knight PA (1986). Round table discussion on abnormal toxicity and safety tests. Dev. Biol. Standard. 64, 309

Van der Kamp M. (1994). Ways of replacing, reducing and refining the use of animals in the quality control of veterinary vaccines. Institute of Animal Science and Health, Lelystad.

Zeegers JJW, de Vries WF, Remie R. (1997) Reducing the use of animals by abolishment of the safety test as routine batch control test on veterinary vaccines. In: Van Zutphen LFM, Balls M (eds) Animal Alternatives, Welfare and Ethics. Amsterdam, Elsevier Science B.V., pp. 1003-1005.

6　動物用生物学的製剤基準一般試験法の異常毒性否定試験法及び毒性限度確認試験法の取扱いについて

（1）異常毒性否定試験法について

異常毒性否定試験法は、その有効成分、アジュバント等に特に問題となる毒性を示す物質が含まれない製剤に適用する。

（2）毒性限度確認試験法について

毒性限度確認試験法は、その有効成分、アジュバント等に何らかの毒性を示す物質が含まれ、異常毒性否定試験法では適切に規格を設定できない製剤に適用する。

7　動物用生物学的製剤の承認申請に必要となる試験に関するガイドライン

7－1　ワクチン接種対象動物における動物用生ワクチンの病原性復帰否定試験について

牛、馬、めん羊、山羊、豚、犬、猫及び家きん（鶏及び七面鳥）を対象とする動物用生ワクチン（ベクターワクチンの場合は、対象動物種で増殖するベクターワクチン株のみを対象とする。）の承認申請のための病原性復帰否定試験は、動物用生物学的製剤基準（平成１４年１０月３日農林水産省告示第１５６７号。以下「動生剤基準」という。）の一般試験法に規定する病原性復帰確認試験法（以下「病原性復帰確認試験法」という。）に基づき実施することが望ましい。この場合、動生剤基準の規格の部のシードロット規格に適合しない動物用生ワクチンでは、病原性復帰確認試験法の 1.1 の「マスターシード」を「原株」に、「ワーキングシード」を「原種」に読み替える。

微生物株の弱毒化が、よく知られている特定のマーカー又は遺伝子変化に起因する場合には、ワクチン株の弱毒マーカーの遺伝学的安定性を確認するために、初回接種微生物株と最終継代から回収された微生物株について、適切な分子生物学的手法により比較する試験を追加実施しなければならない。

また、既知のデータ又は評価により、供試微生物株の病原性が復帰又は増強する可能性が十分あることが示唆されている場合には、供試微生物株に関する更なる情報を得るために追加試験が必要となるかもしれない。

なお、科学的に正当な理由がある場合には、必ずしもこの方法に従う必要はなく、他の適当な方法を用いても良い。

７－２　鶏コクシジウム感染症生ワクチン株の薬剤感受性評価指針

この指針は、鶏コクシジウム感染症生ワクチン株を SPF 鶏ヒナへ投与し、オーシスト排泄数及び腸病変指数の２項目について、薬剤の影響を調べることにより、当該ワクチン株が供試薬剤に対して感受性又は耐性であるのかを評価することを目的とする。

試験方法及び判定基準は、本指針に従うものとし、試験成績に客観性を持たせるため、当該試験は、２箇所以上の施設で同様の系を用いて行わなければならない。

（１）供試材料

ア　ワクチン株

原則として、鶏コクシジウム感染症生ワクチンの有効成分として含まれる各ワクチン株の原株又は種オーシストを使用する（ただし、対象が混合製剤であり、製剤自体を用いた試験を行い、全ての株が感受性であると判断される場合には、各ワクチン株を供試しなくても差し支えない。）。

・投与方法：強制経口投与

・投与量：薬剤投与によるオーシストの排泄数の変化が十分に確認できる量（投与量と排泄数に強い相関が認められる範囲）、及び当該株の増殖による病変の観察が可能である量

イ　抗コクシジウム剤等（サルファ剤等の動物用医薬品及びポリエーテル系等の飼料添加物）

供試抗コクシジウム剤等については、国内の使用実態を勘案して選択する。なお、ポリエーテル系からは少なくとも１種類、サルファ剤から１種類、及び必要に応じてその他１種類を供試する。

供試抗コクシジウム剤等が動物用医薬品の場合にあっては、承認された用法及び用量、また、飼料添加物の場合にあっては、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和５１年農林省令第３５号）別表第１の１の（１）のウの表に掲げる対象飼料が含むことができる飼料添加物の量の範囲に従って、それぞれ使用することとする。

（２）実施方法

オーシスト排泄試験と腸病変の観察を同時に行う場合は、原則として以下の方法に従う。ただし、腸病変に関する試験を別に設定する場合は、その科学的妥当性を明確にした上で、同等の試験設計を行って差し支えない。

ア　SPF 鶏ヒナ（８日齢前後）を用いる（SPF の要件については別紙に定める。）。

イ　ヒナを１群５羽とし、１群ずつ金網ケージに配分する。

ウ　各ワクチン株につき、薬剤ごとにワクチン投与群１群を用いるとともに、それとは別に薬剤非投与対照群１群を設定する（表１参照）。

エ　材料を投与後、不断給餌とする。なお、評価対象となる抗コクシジウム剤等以外の、本試験結果に影響を与えるような成分を含む餌は使用しない。

オ　投与２日後から８日後の糞便を採取する。

カ　鶏群ごとに１日分の糞便を混合し、１グラム当たりのオーシスト数（OPG）を計測する。

キ　糞便採取期間終了後に剖検を行い、腸病変を観察しJohnson and Reidの方法により＋４（重度）～０（病変なし）のスコアリングを行う（Johnson J and Reid WM, Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiment. Exp. Parasitol., 61:38-45, 1970）。

表１　試験設計例

ワクチン株	薬剤	鶏群名（各５羽）	投与後日数のオーシスト排泄数（OPG）							肉眼腸病変指数該当羽数					
			２日	３日	４日	５日	６日	７日	８日	＋４	＋３	＋２	＋１	０	平均
株１	薬剤１	群1-1													
	薬剤２	群1-2													
	薬剤３	群1-3													
	薬剤４	群1-4													
	なし	群1-0（薬剤非投与対照群）													
株２	同上		同上												
株３ ・ 株ｎ	同上 ・ 同上		同上 ・ 同上												
なし	なし	群0-0（非感染対照群）	同上												

（３）試験の評価及び判定

ア　薬剤投与後のオーシスト排泄数

次の２段階にクラス分けする。

多：「少」に該当しない場合

少：原則として、いずれの日にもオーシストの排泄が観察されない場合。ただし、オーシストは排泄されるが、その数が薬剤非投与対照群に比べて明らかに少ないと認められた場合を含むこともある*。

*「明らかに少ない」と判断するための基準

薬剤によって効果に違いがあるため、減少率の閾値に関しては、薬剤の種類ごとに設定する。感受性株と判断するためには、本来ならばオーシスト排泄数が1/1,000以下に減少すべきである。しかしながら、ポリエーテル系薬剤は効果が緩慢であり、試験結果に変動が生じやすいため、閾値を「90 %以上の減少」と低めに設定せざるを得ない。サルファ剤は、効果が強いため「99.9 %以上の減少」により感受性と判断する。

イ　薬剤投与による腸病変指数の減少

ワクチンによる腸病変が、薬剤投与によりどの程度減るかを観察する。

次の３段階にクラス分けする（McDougald の方法（McDougald LR, Fuller L and Solis J, Drug-sensitivity of 99 isolates of coccidia from broiler farms. Avian Disease, 30: 690-694, 1986）を準用する。）。

・病変指数の減少が 30 %以下のもの
・病変指数の減少が 31-49 %のもの
・病変指数の減少が 50 %以上のもの

ウ　前項ア及びイの評価結果について、表２により総合的に判定する。

エ　図１に示した順序によりワクチン株の抗コクシジウム剤に対する薬剤耐性を評価する。

表２　判定の基準

			イ　薬剤投与による腸病変指数の減少 より耐性 ⟷ より感受性		
			30%以下	31-49%	50%以上
ア　薬剤投与後のオーシスト排泄数	より耐性 ↕ より感受性	多	×	×	△
		少	△	○	○

○：　感受性

△：　低感受性

×：　耐性

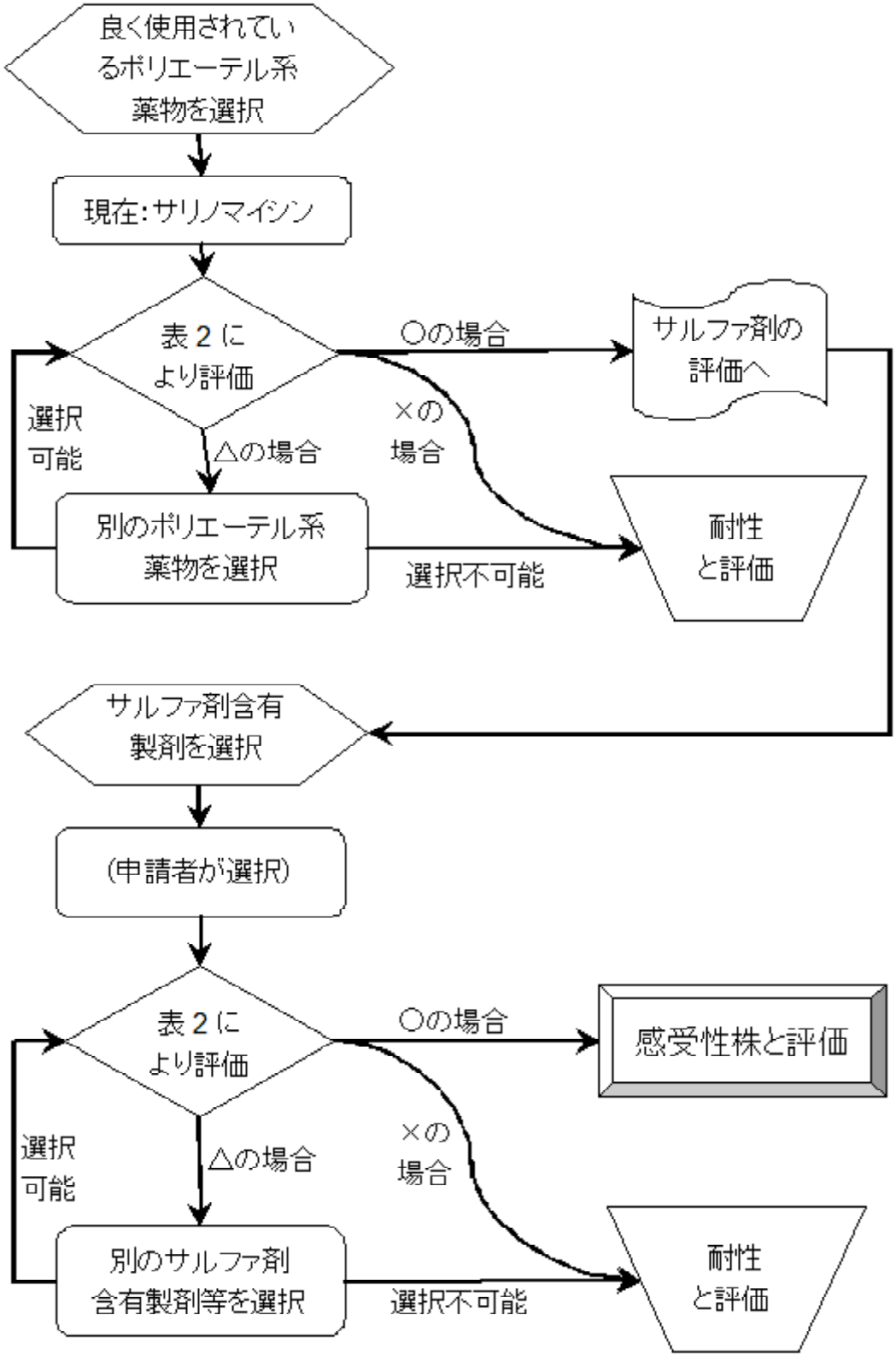


図１　薬剤耐性評価のためのディシジョンツリー

別紙　SPF 鶏の要件

下記の病原体の感染のないことが確認された SPF 鶏群由来、又は動物用生物学的製剤基準（平成１４年１０月３日農林水産省告示第１５６７号）の生ワクチン製造用材料の 1.1 に適合した発育鶏卵由来の鶏とする。

ニューカッスル病ウイルス、鶏伝染性気管支炎ウイルス、鶏白血病ウイルス、鶏脳脊髄炎ウイルス、鶏腎炎ウイルス、鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス、細網内皮症ウイルス、マレック病ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス、トリレオウイルス、トリアデノウイルス、EDS-76 ウイルス、トリインフルエンザウイルス、鶏貧血ウイルス、七面鳥鼻気管炎ウイルス、トリパラミクソウイルス、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型、ヘモフィルス・パラガリナルム C 型、ひな白痢菌、マイコプラズマ・ガリセプチカム、マイコプラズマ・シノビエ、サルモネラ（ひな白痢菌を除く。）、鶏痘ウイルス

８　安定性に関する試験

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される安定性試験について、標準的な実施方法を示したものである。8-1 は、新有効成分含有動物用医薬品（8-8 が適用されるものを除く。以下「8　安定性に関する試験」において同じ。）の原薬及び製剤に適用する。8-2 ～ 8-7 は、8-1 に付属するガイドラインであり、8-1 と共に利用するものである。8-2 ～ 8-7 を適用される動物用医薬品の範囲は各ガイドライン中に示されている。8-8 は、8-1 ～ 8-7 が適用されない動物用医薬品に適用する。

８－１　動物用新原薬及び製剤の安定性試験（VICH GL3R）

（１）緒言

ア　ガイドラインの目的

本ガイドラインは、EU、日本及び米国三極内において、新有効成分含有医薬品の原薬及び製剤の承認申請を行うときに必要な安定性試験成績を示したものであり、三極以外の地域における承認申請や当該地域への輸出のための承認申請のための試験を対象とすることを必ずしも目的としているものではない。本ガイドラインは、新有効成分含有医薬品の原薬及び製剤の安定性試験成績の主要部分を示したものであるが、試験対象となる物質の特性や特殊な科学的理由のために実際に直面しうる状況に対して柔軟に対応する必要がある。科学的に妥当な理由がある場合には、本ガイドライン以外の適切な実施方法を用いてもよい。

イ　ガイドラインの適用範囲

本ガイドラインの適用対象は、動物用医薬品のうちの新有効成分含有医薬品である。本ガイドラインは、現時点において、それ以外の申請区分の申請のために提出すべき試験を対象としていない。特定の製剤等に対する検体の採取及び試験方法についての詳細は、本ガイドラインの対象としていない。新剤形、飼料添加剤及び生物薬品（バイオテクノロジー応用製品／生物起源由来製品）についてのガイダンスは「８－２　新剤形動物用医薬品の安定性試験」（VICH GL4）、「８－４　動物用飼料添加剤の安定性試験」（VICH GL8）及び「８－５　新動物用生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の安定性試験」（VICH　GL17）にそれぞれ記載されている。製剤の初回使用時以降の安定性（例えばバイアルの初回開封後）は、このガイドラインには含まれてはいない。

ウ　一般原理

医薬品の承認申請における安定性試験は、温度、湿度、光等の様々な環境要因の影響の下での品質の経時的変化を評価し、原薬のリテスト期間、製剤の有効期間及び医薬品の貯蔵条件の設定に必要な情報を得るために行う試験である。

本ガイドラインに定義されている試験条件は EU、日本及び米国の三極における気象条件の影響を分析した結果に基づいて選択されている。世界各地の平均キネティック温度は気候データから求めることができ、そして世界を四つの気候区域Ⅰ－Ⅳに分けることができる。本ガイドラインは気候区域ⅠとⅡを対象にしている。本ガイドラインに従って実施され、かつ、表示が国内/地域の基準に合っている場合には、EU、日本及び米国の三極のいずれか一地域で行われた安定性に関する試験の成績は、原則として、他の二つの地域においても添付資料として使用できることとされている。

（２）ガイドライン

ア　原薬

（ア）一般的事項

原薬の安定性に関する資料は、その医薬品の安定性を系統的に評価するために欠くことのできないものである。

（イ）苛酷試験

原薬の苛酷試験は、生成の可能性がある分解生成物を同定するのに役立ち、それによって分解経路や医薬品本来の安定性を明らかにしたり、安定性試験に用いる分析方法の適合性を確認することができる。個々の原薬及び製剤の種類により、苛酷試験の内容は決まる。

苛酷試験は、通常１ロットの原薬について行い、加速試験の温度条件よりも 10 ℃ずつ高くなっていく温度（例えば、50 ℃、60 ℃、…）、適切な湿度（例えば、75 % RH　以上）、酸化及び光分解による影響を検討する。更に、溶液又は懸濁液中では、広い範囲の pH 領域における加水分解に対する反応性を検討する。光安定性試験は苛酷試験のうち、不可欠な構成要素である。光安定性試験のための標準条件は、「８－３　新動物用医薬品の原薬及び製剤の光安定性試験」（以下「VICH　GL5」という。）に述べられている。

苛酷条件下での分解生成物を調査することは、分解経路を確立したり、適切な分析方法の開発並びに適合性の確認に役立つ。しかし加速試験又は長期保存試験で生成しないことが示されれば、その分解生成物について特に検討する必要はない。これらの試験成績は、行政当局に提出される資料として必要となる。

（ウ）ロットの選択

正式な安定性試験（長期保存試験及び加速試験）は、３ロット以上の基準ロットについて実施する。検体は、パイロットスケール以上で製造されたロットとし、生産ロットで適用される最終的な方法を反映する製造方法及び製造工程で製造されたものとする。

安定性試験に使用するロットの品質は、実生産スケールで製造されるものの品質を反映するものである。

他の安定性試験成績は参考資料として提出できる。

（エ）容器施栓系

検体の容器施栓系は、申請するものと同一のもの又はそれに準ずるものとする。

（オ）規格

規格、即ち測定項目、分析方法及び判定基準は、「３－１　新動物用医薬品の原薬及び製剤の規格及び試験方法の設定：化学物質関するガイドライン」及び「３－２　新動物用生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定」（以下「VICH GL39」及び「VICH　GL40」という。）に記載されている。原薬中の分解生成物の規格は、「２－１　新動物用医薬品の原薬中の不純物」（VICH　GL10R）で論議されている。

安定性試験は、保存により影響を受け易い測定項目及び品質、安全性又

は有効性に影響を与えるような測定項目を選定する。試験には、原薬の物理的、化学的、生物学的及び微生物学的測定項目を適切に含める。測定方法としては、安定性試験に用いる方法として適合性が検証された分析方法を採用する。測定の繰り返しの必要性及び回数は、バリデーション試験の結果に基づき決定する。

（カ）測定時期

長期保存試験における測定時期は、原薬の安定性の特性を十分に把握できるように、１年以上のリテスト期間を設定する原薬については、通常、１年目は３か月ごと、２年目は６か月ごと、その後はリテスト期間をとおして１年ごととする。

また、加速試験にあっては試験開始時と終了時を含めて、６か月の試験につき３回以上（例えば、０、３、６か月）行うことが望ましい。開発時の経験に基づいて、加速試験の結果に品質の明確な変化が示されることが予想される場合には､測定終了時において検体数を増やして試験を行うか、又は試験計画に４番目の測定時点を加えることにより、増強した試験を行う。

加速試験において品質の明確な変化が示されたために、中間的な条件での試験が必要になった場合には、試験開始時と終了時を含めて、12 か月の試験につき４回以上（例えば、０、６、９、12 か月）行うことが望ましい。

（キ）保存条件

一般に、原薬の安定性は、熱安定性と必要であれば湿度に対する安定性が試験できるような適切な保存条件において評価されるべきである。保存条件及び試験期間は、貯蔵、流通及びそれに続く使用を十分考慮にいれたものとする。

長期保存試験は、申請時において、試験の途中であっても３ロット以上の基準ロットの 12 か月以上の期間の試験成績をもって承認申請して差し支えないが、申請されるリテスト期間を保証する十分な期間継続する。承認申請後引き続き実施した成績は、行政当局の求めに応じて提出する。加速試験成績又は必要に応じて中間的な保存条件で試験された成績は、輸送中に起こりうる貯蔵方法からの短期的な逸脱の影響を評価するために利用される。

原薬の長期保存試験の保存条件、加速試験の保存条件及び必要な場合の中間的試験の保存条件の詳細は、下記に示す。後続の項に該当しない原薬は、一般的な原薬として取り扱う。根拠があれば、他の保存条件を採用することができる。

①　一般的な原薬

試験の種類	保存条件	申請時点での最小試験期間
長期保存試験*	25 ℃ ±2 ℃／ 60 % RH±5 % RH 又は 30 ℃ ±2 ℃／ 65 % RH±5 % RH	12 か月

中間的試験**	30 ℃ ±2 ℃／ 65 % RH±5 % RH	6 か月
加速試験	40 ℃ ±2 ℃／ 75 % RH±5 % RH	6 か月

*申請者は、長期保存試験として 25 ℃ ±2 ℃／ 60 % RH±5 % RH 又は 30 ℃ ±2 ℃／ 65 % RH±5 % RH どちらの条件で行うかを決定する。

** 30 ℃ ±2 ℃／ 65 % RH±5 % RH が長期保存条件の場合は、中間的条件はない。25 ℃ ±2 ℃／ 60 % RH±5 % RH で長期保存試験を行い、加速試験において、6 か月の試験のいずれかの時点で、「明確な品質の変化」が認められた場合、中間的な条件で追加の試験を実施し、「明確な品質の変化」の基準に対して評価しなければならない。中間的試験は、別に何か根拠がない限り全ての試験を実施する。承認申請時には、中間的な条件で実施される 12 か月の試験より、6 か月以上の試験成績を提出する。

以下、原薬についての「明確な品質の変化」とは、規格からの逸脱が認められた場合をいう。

② 冷蔵庫での保存の場合

試験の種類	保存条件	申請時点での最小試験期間
長期保存試験	5 ℃ ±3 ℃	12 か月
加速試験	25 ℃ ±2 ℃／ 60 % RH±5 % RH	6 か月

冷蔵庫での保存の場合の試験成績は、以下に示された場合以外は、本ガイドラインの「評価」の項に従って評価する。

加速試験において、測定開始後 3 か月から 6 か月の間に「明確な品質の変化」が認められた場合、リテスト期間は長期保存試験から得られる試験成績（リアルタイムのデータ）に基づいて設定する。

加速試験において、測定開始後 3 か月以内に「明確な品質の変化」が認められた場合、輸送中や取扱い中等における貯蔵方法からの短期的な逸脱の影響に関する試験成績を用意する。この場合、適切ならば、1 ロットの原薬につき 3 か月より短期間に、通常より多い測定時点で追加試験を行うことにより説明してもよい。測定開始後 3 か月以内に「明確な品質の変化」が認められた場合、あえて 6 か月まで試験を継続する必要はない。

③ 冷凍庫での保存の場合

試験の種類	保存条件	申請時点での最小試験期間
長期保存試験	－ 20 ℃ ±5 ℃	2 か月

冷凍庫での保存の場合のリテスト期間は、長期保存試験で得られる試験成績（リアルタイムのデータ）に基づいて設定する。冷凍庫での保存の場合は、加速試験がないので、輸送中や取扱い中等における貯蔵方法からの短期的な逸脱の影響を説明するため、上昇させた温度（例えば、5 ℃ ± 3 ℃又は 25 ℃ ± 2 ℃）で適切な期間にわたる試験を 1 ロットについて実施する。

④ － 20 ℃以下での保存の場合

－ 20 ℃以下で保存される原薬は、個別に妥当な保存条件の下で試験を実施する。

（ク）安定性試験の確認のための試験の実施（コミットメント）

原薬の承認の時点で、基準ロットの長期保存試験成績が、リテスト期間を保証する期間まで得られていない場合には、申請されたリテスト期間を確認するために、承認後、長期保存試験を継続する。

実生産スケールで製造された３ロットを用いて実施され、リテスト期間を通して実施された長期保存試験成績に基づいて申請される場合には、承認後に長期保存試験を実施する（コミットメント）必要はない。その他の場合にあっては、以下に掲げるもののうち、一つの試験を実施する。

① 添付資料として実生産スケールで製造された３ロット以上のロットの安定性試験の成績に基づき申請される場合には、リテスト期間中試験を継続し、安定性を確認する（コミットメント）必要がある。

② 添付資料として実生産スケールで製造された３ロット未満のロットを用いた安定性試験の成績に基づき申請される場合には、当該試験をリテスト期間中継続する（コミットメント）必要がある。また、実生産スケールで製造されたロット数の合計が３以上になるよう、実生産スケールで製造されたロットを追加し、リテスト期間を通じて長期保存試験を実施し、安定性を確認する（コミットメント）必要がある。

③ 添付資料として実生産スケールで製造されたロットを用いた安定性試験の成績が提出されない場合は、実生産スケールで製造される最初の３ロットについて、リテスト期間を通じて長期保存試験を実施し、安定性を確認する（コミットメント）必要がある。コミットメントとして、安定性の確認のために実施される長期保存試験は、科学的に妥当性がない限り、承認申請時（基準ロット）と同一の安定性試験プロトコールを使用して実施する。

（ケ）評価

安定性試験は、３ロット以上の原薬について実施し、必要な物理的、化学的、生物学的及び微生物学的試験等で得られる安定性の情報を適正に評価することにより、同様の条件で製造される全てのロットに適用できるリテスト期間を設定するものである。将来生産されるロットがリテスト期間を通じて規格に適合する確かさは、各ロットのばらつきの程度に影響される。

得られたデータから原薬がリテスト期間中ほとんど分解せず、変動もほとんどないことが示され、申請するリテスト期間が十分保証される場合は、通常、正式な統計解析を実施する必要はないが、解析を省略する正当性を記載する。

経時的に変化する定量的測定項目のデータからリテスト期間を求める場合、母平均の曲線の 95 %片側信頼限界が判定基準と交差する時期をもって決定する。ロット間の変動が小さいことが統計解析から明らかな場合は、

全ロットのデータを一括して評価し、全体として一つのリテスト期間を求めるのが有益な方法である。この解析は、個々のロットの回帰直線の傾き及び縦軸切片に対して適切な統計解析を適用することによって行うことができる（例えば、棄却の有意水準として 0.25 より大きいｐ値を用いる）。また、全ロットのデータを一括して評価することが不適切な場合は、個々のロットのリテスト期間のうちの最短の期間をリテスト期間とする。

直線回帰分析のためにデータを変換する必要があるかどうかは、分解曲線の形によって決まる。通常、分解曲線は算術目盛あるいは対数目盛で時間の一次、二次又は三次関数によって表わされる。個々のロットのデータ又は全ロットを一括したデータが、推定された分解直線又は曲線に適合するかどうかは統計解析により検定する。

正当化できれば、承認時に、長期保存試験の成績を外挿することにより、実測範囲以上にリテスト期間を限られた範囲で延長することができる。分解機構について明らかになっていること、加速試験の成績、数式モデルの適合性、ロットサイズ、参考資料の存在等に基づいて正当化することができる。ただし、この外挿は実測期間を超えても同一の分解曲線が継続するとの仮定に基づいている。

含量のみならず、分解生成物の量やその他の適切な測定項目についても評価する必要がある。

（コ）取扱い上の注意／表示

貯蔵方法は、関連する国内／地域の基準に従った表示をするために、原薬の安定性評価に基づいて決めなければならない。必要に応じ、個別の指示が付される。凍結してはならない原薬については特に注意を要する。「成り行き温度」、「室温」等の用語の使用は避ける。

リテスト期間は安定性試験成績に基づいて定められる。再試験日は容器ラベルに適切に表示する。

イ　製剤

（ア）一般的事項

製剤の正式な安定性試験は、原薬の挙動及び特性、原薬の安定性試験の成績並びに治験薬の処方検討から得られる経験を十分考慮に入れて計画する。保存中に生ずると予測される変化及び正式な安定性試験の対象となる測定項目の選定根拠を添付資料に記載する。

（イ）光安定性試験

光安定性試験は、必要に応じ、製剤の一つ以上の基準ロットについて行う。光安定性試験のための標準条件は、VICH GL5 に定められている。

（ウ）ロットの選択

長期保存試験及び加速試験は、３ロット以上の基準ロットについて実施する。基準ロットは市販予定製剤と同一処方、同一容器施栓系の包装にする。基準ロットの製造工程は生産ロットで適用される方法を反映するものとし、市販予定製剤と同等な品質でかつ同じ品質規格を満たすものとなる

ようにする。３ロットのうちの２ロットはパイロットプラントスケール以上とし、他の１ロットは、正当化できれば小規模でも差し支えない。可能ならば、製剤の各ロットは、異なる原薬ロットを使用して製造する。

ブラケッティング法やマトリキシング法を適用しない限り、各含量、各包装それぞれについて安定性試験を行う。

上記以外の参考資料も提出できる。

（エ）容器施栓系

検体は、申請する容器施栓系で包装されたものとする（必要ならば二次包装及び容器ラベルを含める）。幾つかの場合は、申請する実際の容器施栓系を模倣したより小型の容器施栓系も使用できるかもしれない。このような例では、小型の容器施栓系を使用する妥当性を説明する必要がある。直接容器に容れられていない製剤についての試験成績は苛酷試験の一部として、また他の包装材料で包装された製剤についての試験成績は参考情報として利用できる。

（オ）規格

規格、即ち測定項目、分析方法及び判定基準は、出荷判定時の規格と有効期間中の規格の異なった判定基準の考え方を含めて、VICH GL39 及び 40 に記載されている。製剤中の分解物の規格は、「２－２　新動物用医薬品の製剤中の不純物」（VICH GL11R）に記載されている。

安定性試験には、保存により影響を受け易い測定項目及び品質、安全性又は有効性に影響を与えるような測定項目を選定する。試験には、物理的、化学的、生物学的及び微生物学的測定項目、保存剤含量（例えば、抗酸化剤、抗菌剤）、並びに機能性試験（例えば、一回当りの投与量）を適切に含める。分析方法は、安定性試験に用いる方法として適合性が十分に検証された方法を採用する。測定の繰り返しの必要性及び回数は、分析法バリデーションの結果に基づき決定する。

有効期間の判定基準は、得られる全ての安定性試験の成績を考察して決定する。有効期間の規格は、安定性評価及び保存中に観察された変化に基づき、妥当な理由がある場合には、出荷判定の判定基準と異なることもある。保存剤含量試験において、出荷判定の判定基準と有効期間の判定基準の間に差がある場合は、有効期間の規格に従って、保存効力を示す最小許容量が含まれた処方で人為的に作成したロットの保存効力を証明したデータにより説明する。保存剤含量試験における出荷判定と有効期間の判定基準の違いの有無に係らず、一つの基準ロットの製剤を用い、有効期間の最終時点において、保存剤含量試験に加え、保存効力試験を行い、確認する。

（カ）測定時期

長期保存試験における測定時期は、製剤の安定性の特性を十分に把握できるように、１年以上の有効期間を設定する製剤については、通常、１年目は３か月ごと、２年目は６か月ごと、その後は有効期間を通じて１年ごととする。

また、加速試験にあっては試験開始時と終了時を含めて、６か月の試験につき３回以上（例えば、０、３、６か月）行うことが望ましい。開発時の経験に基づいて、加速試験の結果に品質の明確な変化が示されることが予想される場合には､測定終了時において検体数を増やして試験を行うか、又は試験計画に４番目の測定時点を加えることにより、増強した試験を行う。

加速試験において、品質の明確な変化が示されたために中間的な条件での試験が必要になった場合には、試験開始時と終了時を含めて、12 か月の試験につき４回以上（例えば、０、６、９、12 か月）行うことが望ましい。

妥当であれば、マトリキシング法やブラケッティング法等、測定時点を減らす減数試験、あるいはある要因の組合せの製剤については全く試験を行わない減数試験を適用することができる。

（キ）保存条件

一般に、製剤の安定性は、熱安定性、必要であれば、湿度に対する安定性、また溶媒の損失の可能性について試験できる保存条件において評価されるべきである。保存条件及び試験期間は、貯蔵、流通及びそれに続く使用を十分考慮にいれたものとする。

溶解又は希釈後の製剤の安定性についても、調製方法、保存条件並びに溶解又は希釈後の使用期間についての表示のための情報を提供するために必要に応じて実施する。この試験は試験開始時と最終時点において正式な安定性試験の一部として、基準ロットの製剤について溶解又は希釈後に使用期間まで行う。申請前に有効期間までの長期保存試験成績が得られていない場合は、12 か月又はデータの得られる最終時点で行う。一般的に、この試験はコミットメントロットについて繰り返す必要はない。

長期保存試験は、申請時において、試験の途中であっても、３ロット以上の基準ロットの６か月以上の期間の試験成績をもって承認申請して差し支えないが、申請される有効期間を保証する十分な期間継続する。承認申請後引き続き実施した成績は、行政当局の求めに応じて提出する。加速試験成績又は必要に応じて中間的な保存条件で試験された成績は、輸送中に起こりうる貯蔵方法からの短期的な逸脱の影響を評価するために利用される。

製剤の長期保存試験の保存条件、加速試験の保存条件及び必要な場合の中間的試験の保存条件の詳細は、下記に示す。後続の項に該当しない製剤は、一般的な製剤として取り扱う。根拠があれば、他の保存条件を採用することができる。

①　一般的な製剤

試験の種類	保存条件	申請時点での最小試験期間
長期保存試験*	25 ℃ ±2 ℃／ 60 % RH±5 % RH 又は 30 ℃ ±2 ℃／ 65 % RH±5 % RH	６か月

中間的試験**	30 ℃ ±2 ℃／ 65 % RH±5 % RH	6 か月
加速試験	40 ℃ ±2 ℃／ 75 % RH±5 % RH	6 か月

*申請者は、長期保存試験として 25 ℃ ±2 ℃／ 60 % RH±5 % RH 又は 30 ℃ ±2 ℃／ 65 % RH±5 % RH どちらの条件で行うかを決定する。

** 30 ℃ ±2 ℃／ 65 % RH±5 % RH が長期保存条件の場合は、中間的条件はない。25 ℃ ±2 ℃／ 60 % RH±5 % RH で長期保存試験を行い、加速試験において、6 か月の試験のいずれかの時点で、「明確な品質の変化」が認められた場合、中間的な条件で追加の試験を実施し、「明確な品質の変化」の基準に対して評価しなければならない。承認申請時には、中間的な条件で実施された 12 か月の試験より、6 か月以上の試験成績を提出する。

一般に、製剤に関する「明確な品質の変化」とは、次に掲げる場合である。

a　試験開始時から含量が５％以上変化した場合、生物学的又は免疫学的方法を用いる時は、力価が判定基準から逸脱した場合

b　特定の分解生成物が判定基準を超えた場合

c　外観、物理的項目及び機能性試験が判定基準から逸脱した場合（例えば、色、相分離、再懸濁性、ケーキング、硬度）、しかし、加速試験条件下では、物理的特性の変化（例えば、坐剤の軟化、クリームの融解）が予想されることもある。

さらに、剤形により必要に応じて

d　pH が判定基準を逸脱した場合

e　溶出試験（12 投与単位）で判定基準を逸脱した場合

② 不透過性の容器に包装された製剤

水分及び溶媒が透過しない不透過性の容器に入れられた製剤については、湿度に対する安定性や溶媒の損失の可能性についての検討の必要はない。したがって、不透過性の容器に容れられ貯蔵される製剤についての安定性試験については、相対湿度を調整する必要はない。

③ 半透過性の容器に包装された製剤

水を基剤とする製剤で半透過性の容器に容れられたものについては、物理的、化学的、生物学的及び微生物学的安定性に加えて、予想される水分の損失についても評価する。

この評価は下記のように、低い相対湿度条件下で行われる。最終的には、半透過性の容器に容れられた水を基剤とする製剤は、低い相対湿度条件における貯蔵に耐えることを示す必要がある。非水溶媒を基剤とした製剤については、同様の方法を開発し、報告する。

試験の種類	保存条件	申請時点での最小試験期間
長期保存試験*	25 ℃ ±2 ℃／ 40 % RH±5 % RH 又は 30 ℃ ±2 ℃／ 35 % RH±5 % RH	6 か月
中間的試験**	30 ℃ ±2 ℃／ 65 % RH±5 % RH	6 か月

加速試験　　40 ℃ ±2 ℃／ 25 ％ RH 以下　　6 か月

*申請者は、長期保存試験として 25 ℃ ±2 ℃／ 40 ％ RH±5 ％ RH 又は 30 ℃ ±2 ℃／ 35 ％ RH±5 ％ RH どちらの条件で行うかを決定する。

** 30 ℃ ±2 ℃／ 35 ％ RH±5 ％ RH が長期保存条件の場合は、中間的条件はない。25 ℃ ±2 ℃／ 40 ％ RH±5 ％ RH の長期保存試験においては、加速試験において、６か月の試験で水分損失以外に、「明確な品質の変化」が認められた場合、30 ℃で温度の影響を評価するため、一般的な製剤に記載している中間的な条件で追加の試験を実施する。加速試験において、水分の損失のみに「明確な品質の変化」が認められる場合は、中間的な条件における試験は必要とされない。しかし、製剤を 25 ℃で 40 ％の参照相対湿度条件下で保存した場合に、申請される有効期間を通じて水分の損失に係る「明確な品質の変化」を認めないことを示さなければならない。

半透過性の容器に容れられた製剤についての水分の損失に係る「明確な品質の変化」とは、40 ℃相対湿度 25 ％以下、３か月間に相当する保存の後に、５％の水分の損失が認められた場合である。しかし、小容器（１ mL 以下）又は、単回投与製剤については、根拠があれば、40 ℃相対湿度 25 ％以下、３か月間に相当する保存の後に、５％以上の水分損失があっても認められることがある。

上記の表（長期保存試験、加速試験のいずれも）で推奨されている参照相対湿度に保存する方法の代わりに、比較的高い相対湿度下で安定性試験を行い、参照相対湿度下での水分の損失を計算により求める方法も採用することができる。容器施栓系における透過係数を実験的に求める方法や、以下の例に示すように、同一温度における二つの湿度条件下で水分の損失の比率を実験的に求める方法もある。容器施栓系における透過係数は、申請する製剤の中で最も透過性の高い系（例えば、一連の濃度の製剤の最も希釈された製剤）について実験的に求めてもよい。

水分の損失率を求める方法の例

ある容器施栓系、容器サイズ及び容れ目の製剤ついて、参照相対湿度における水分の損失率を算出する適正な方法は、同一温度の任意の相対湿度において測定された水分損失率に下表に示す水分損失の比率を乗じることである。ここで、任意の相対湿度における水分の損失率が保存期間を通じて直線的に増加することを示す必要がある。

例えば、40 ℃相対湿度 25 ％以下で保存した後の水分損失率は、40 ℃相対湿度 75 ％で保存した後の水分損失率に、対応する水分損失の比率 3.0 を乗じることにより計算できる。

任意な相対湿度	参照相対湿度	一定温度における水分損失の比率
60 % RH	25 % RH	1.9
60 % RH	40 % RH	1.5
65 % RH	35 % RH	1.9
75 % RH	25 % RH	3.0

上表に示されている以外の相対湿度条件における水分損失の比率も、妥当であれば使用することができる。

④　冷蔵庫での保存の製剤

試験の種類	保存条件	申請時点での最小試験期間
長期保存試験	5 ℃ ±3 ℃	6 か月
加速試験	25 ℃ ±2 ℃／ 60 % RH±5 % RH	6 か月

半透過性容器に包装された製剤の場合、水分損失の程度を評価できる適切な情報を提出する。

冷蔵庫での保存の場合の試験成績は、以下に該当する場合以外は、本ガイドラインの「評価」の項に従って評価する。

加速試験において、測定開始後３か月から６か月の間に「明確な品質の変化」が認められた場合、有効期間は長期保存試験から得られる試験成績（リアルタイムのデータ）に基づいて申請する。

加速試験において、測定開始後３か月以内に「明確な品質の変化」が認められた場合、輸送中や取扱い中等における貯蔵方法からの短期的な逸脱の影響に関する試験成績を用意する。この場合、適切ならば、１ロットの製剤につき３か月より短期間に、通常より多い測定時点で追加試験を行うことにより説明してもよい。測定開始後３か月以内に「明確な品質の変化」が認められた場合、あえて６か月まで試験を継続する必要はない。

⑤　冷凍庫での保存の製剤

試験の種類	保存条件	申請時点での最小試験期間
長期保存試験	－ 20 ℃ ±5 ℃	6 か月

冷凍庫での保存の場合の有効期間は、長期保存試験で得られる試験成績（リアルタイムのデータ）に基づいて申請する。冷凍庫での保存の場合は、加速試験がないため、貯蔵方法からの短期的な逸脱の影響を説明するため、上昇させた温度（例えば、５℃ ± ３℃又は 25 ℃ ± ２℃）で適切な期間にわたる試験を１ロットについて実施する。

⑥　－ 20 ℃以下での保存の場合

－ 20 ℃以下で保存される製剤は、個別に妥当な保存条件の下で試験を実施する。

（ク）安定性試験の確認のための試験の実施（コミットメント）

製剤の承認の時点で、基準ロットの長期保存試験成績が、有効期間を保

証する期間まで得られてない場合には、申請された有効期間を確認するために、承認後、長期保存試験を継続する。

実生産スケールで製造された３ロットを用いて実施され、有効期間を通して実施された長期保存試験成績に基づいて申請される場合には、承認後に長期保存試験を実施する（コミットメント）必要はない。その他の場合にあっては、以下に掲げるもののうち、一つの試験を実施する。

① 添付資料として実生産スケールで製造された３ロット以上のロットの安定性試験の成績に基づき申請される場合には、有効期間中試験を継続し、安定性を確認する（コミットメント）必要がある。

② 添付資料として実生産スケールで製造された３ロット未満のロットを用いた安定性試験の成績に基づき申請される場合には、当該試験を有効期間中継続する（コミットメント）必要がある。また、実生産スケールで製造されたロット数の合計が３以上になるよう、実生産スケールで製造されたロットを追加し､有効期間を通じて長期保存試験を、また６か月間を通じて加速試験を実施し、安定性を確認する（コミットメント）必要がある。

③ 添付資料として実生産スケールで製造されたロットを用いた安定性試験の成績が提出されない場合は、実生産スケールで製造される最初の３ロットについて、有効期間を通じて長期保存試験及び６か月間を通じて加速試験を実施し、安定性を確認する（コミットメント）必要がある。

コミットメントとして、安定性の確認のために実施される長期保存試験は、科学的に妥当性がない限り、承認申請時（基準ロット）と同一の安定性試験プロトコールを使用して実施する。

「明確な品質の変化」が基準ロットの加速試験で認められた場合には、コミットメントロットでの試験は、加速試験の保存条件か中間的試験の保存条件のいずれかで実施する。しかし、コミットメントロットの加速試験で「明確な品質の変化」が認められた場合には、中間的試験を実施する。

（ケ）評価

製剤の安定性に関する情報は、物理的、化学的、生物学的及び微生物学的試験結果、更には剤形に特有な項目（例えば、経口固形製剤の溶出時間）を適切に含めて、系統的に記載し、評価しなければならない。

安定性試験は、３ロット以上の製剤に基づき、同様の条件で将来にわたって製造及び包装される全てのロットに適用できる有効期間及び取扱い上の注意を設定するものである。将来生産されるロットが有効期間を通じて規格に適合する確かさは、各ロットのばらつきの程度に影響される。

得られたデータから製剤が有効期間中ほとんど分解せず、変動もほとんどないことが示され、申請する有効期間が十分保証される場合は、通常、正式な統計解析を実施する必要はないが、解析を省略する正当性を記載す

る。

経時的に変化する定量的測定項目のデータから有効期間を求める場合、母平均の曲線の 95 %片側信頼限界が判定基準と交差する時期をもって決定する。ロット間の変動が小さいことが統計解析から明らかな場合は、全ロットのデータを一括して評価し、全体として一つの有効期間を求めるのが有益な方法である。この解析は、個々のロットの回帰直線の傾き及び縦軸切片に対して適切な統計解析を適用することによって行うことができる（例えば、棄却の有意水準として 0.25 より大きい p 値を用いる）。また、全ロットのデータを一括して評価することが不適切な場合は、個々のロットの有効期間のうちの最短の期間を有効期間とする。

直線回帰分析のためにデータを変換する必要があるかどうかは、分解曲線の形によって決まる。通常、分解曲線は算術目盛あるいは対数目盛で時間の１次、２次又は３次関数によって表わされる。個々のロットのデータ又は全ロットを一括したデータが、推定された分解直線又は曲線に適合するかどうかは統計解析により検定する。

正当化できれば、承認時に、長期保存試験の成績を外挿することにより、実測範囲以上に有効期間を限られた範囲で延長することができる。分解機構について明らかになっていること、加速試験の成績、数式モデルの適合性、ロットサイズ、参考資料の存在等に基づいて正当化することができる。ただし、この外挿は実測期間を超えても同一の分解曲線が継続するとの仮定に基づいている。

含量のみならず、分解生成物の量やその他の適切な測定項目についても評価する必要がある。必要に応じて、物質収支の妥当性や異なる分解挙動についても注意を払うべきである。

（コ）取扱い上の注意／表示

貯蔵方法は、関連する国内／地域の基準に従った表示をするために、製剤の安定性評価に基づいて決めなければならない。必要に応じ、個別の指示が付される。凍結してはならない製剤については特に注意を要する。「成り行き温度」、「室温」等の用語の使用は避ける。

製剤の貯蔵方法の表示は、試験で示された製剤の安定性を直接反映させる。使用期限は容器ラベルに適切に表示する。

（３）用語の定義

医薬品添加剤（Excipient）

製剤中の原薬以外の成分

苛酷試験（原薬）（Stress testing drug substance）

原薬の本質的な安定性を明らかにするために行われる試験。苛酷試験は開発段階で行う試験の一部であり、通常、加速試験よりも苛酷な保存条件を用いて行われる。

苛酷試験（製剤）（Stress testing medicinal product）

製剤について苛酷条件の影響を評価するために行われる試験。光安定性試

験（VICH GL5 参照）や特定の製剤についての特殊試験（例えば、計量吸入剤、クリーム、エマルジョン、冷蔵の水性液剤）が含まれる。

加速試験（Accelerated testing）

正式な安定性試験の一部として、原薬又は製剤の化学的変化又は物理的変化を促進する保存条件を用いて行う試験である。加速試験の成績は、長期保存試験成績とともに、申請する貯蔵方法で長期間保存した場合の化学的影響を評価するのに利用できる。同時に、輸送中に起こり得る貯蔵方法からの短期的な逸脱の影響の評価にも利用できる。なお、加速試験の結果が物理的変化の予測に適用できるとは限らない。

規格（Specification）

VICH GL39 及び VICH GL40 を参照

気候区域（Climatic zones ）

平均的な年間の気候条件により区分した世界の４つの区域。これは W.Grimm によって記述された考え方に基づいている（ *Drugs Made in Germany* ， 28:196-202,1985 ， 29:39-47,1986）。

基準ロット（Primary batch）

正式な安定性試験に用いられる原薬又は製剤のロットであり、それらを用いて実施される安定性試験成績は、リテスト期間又は有効期間を設定する目的で、承認申請の添付資料として提出される。原薬の基準となるロットは、パイロットスケールロット以上でなくてはならない。製剤の場合、３ロットのうち、２ロットはパイロットスケールロット以上で、１ロットは重要な製造工程が反映されているならば小規模でも差し支えない。勿論、基準ロットは、生産スケールロットでもよい。

原薬（Drug substance）

未処方の医薬品有効成分であり、製剤を製造するためには添加剤とともに処方されうるもの

コミットメントロット（Commitment batches）

原薬又は製剤の実生産スケールにより製造されるロットであって、承認申請時におけるコミットメント（担保）に基づき、承認後に安定性試験を開始又は終了するもの

剤形（Dosage form）

医薬品製剤の種類をいう（ 例えば、錠剤、カプセル剤、溶液、クリーム等）。一般に、原薬と添加剤を含有するが、必ずしも添加剤が含まれるとは限らない。

参考資料（Supporting data）

申請時に提出される正式な安定性試験以外のデータで、分析方法、申請されたリテスト期間又は有効期間及びラベルに表示される貯蔵方法の正当性を支持するデータ。（１）初期の合成経路による原薬のロット、小規模のロット、市場に出荷されない試験的な処方及び関連した処方、市場に出荷される容器/栓システム以外の容器/栓システムに入れられた製剤等について行われ

た安定性試験成績、（２）容器についての試験成績に関する情報及び（３）その他の科学的な根拠等を含む。

実生産スケールロット（Production batch）

承認・許可の申請に係る製造施設において、実際の製造設備を用い、実生産スケールで製造された原薬又は製剤のロット

出荷判定の規格（Specification - Release）

製剤の出荷時に、適合性を判定するための一連の物理的、化学的、生物学的、微生物学的試験法及び判定基準

新規成分（New molecular entity（new drug substance））

国内又は地域の当局により、今までに登録されたいかなる製剤にも含有されていない薬物。既承認原薬の新しい塩、エステル及び、非原子価結合誘導体は、このガイドラインの安定性試験の目的では新規成分と考える。

製剤（Medicinal（drug） product）

剤形に処方され、市販される形の最終的な直接包装に容れられた医薬品

正式な安定性試験（Formal stability studies）

原薬のリテスト期間や製剤の有効期間を決定し、確認するために、定められた安定性試験プロトコールに従って基準ロット又はコミットメントロットについて実施される長期保存試験及び加速試験（及び中間的試験）

中間的試験（Intermediate testing）

30 ℃/65 % RH で行い、25 ℃において長期間貯蔵する原薬や製剤について化学的分解や物理的変化を緩やかに加速するように計画された試験

長期保存試験（Long term testing）

申請（又は承認）されるリテスト期間又は有効期間を設定するために、ラベルに表示される貯蔵条件下で行う安定性試験

パイロットスケールロット（Pilot scale batch）

実生産に適用される製造方法、製造工程を十分に反映して製造された原薬又は製剤のロットのこと。経口固形製剤では、通常、少なくとも実生産スケールの 10 分の 1 をパイロットスケールとする。

半透過性容器（Semi -permeable containers）

溶質の損失を防ぐが、溶媒（通常は水）が透過する容器。溶媒の移行は、容器表面への吸着、容器材料内における拡散、反対側の表面からの脱着の機構によって起こる。移行は分圧の勾配によって起こる。半透過性容器の例としては、大用量輸液（LVPs）用のプラスチックバッグやセミリジッド低密度ポリエチレン（LDPE）ポーチ、更に LDPE のアンプル、ビン及びバイアルなどがある。

物質収支（Mass balance）

分析法の精度を適切に考慮に入れて、有効成分の定量値と分解生成物の量の総和がどの程度まで初期値の 100 %に近い値になるかについての検討

不透過性容器（Impermeable containers）

永久的に気体や溶媒を透過しない容器。例えば、半固形製剤における密封

アルミチューブ、液剤における密封ガラスアンプル

ブラケッティング法（Bracketing）

全数試験において設定する全測定時点において、含量や容器サイズ等の試験要因の両極端のものを検体とする安定性試験の手法である。この手法は、中間的な水準にある検体の安定性は、両極端の検体の安定性により示されるとの仮定に基づいている。一連の異なる含量の製剤が試験される場合、製剤の成分が同一であるか類似しているならば、ブラケッティング法が適用できる（例：同様の組成の原料顆粒を使用して製造した含量違いの錠剤、異なるサイズのカプセルに異なる量の同一組成の成形粉末を充填して製造したカプセル剤）。

ブラケッティング法は同じ包装仕様で異なるサイズの容器もしくは容れ目違いにおいても適用できる。

保存条件の許容限度（Storage condition tolerances）

正式な安定性試験を行うための保存設備について、温度及び相対湿度の許容される変動。設備は、本ガイドラインで指定されている範囲内で保存条件を制御できるものでなければならない。実際の温度及び湿度（制御されている時）は、安定性試験の期間を通してモニターしなければならない。保存設備のドアの開閉による短期の逸脱は不可避として認められるが、設備の故障などによる逸脱は安定性試験成績への影響を判断し、影響がある場合には報告する。24 時間を超える逸脱は安定性試験資料に記載しその影響を評価する。

平均キネティック温度（Mean kinetic temperature）

原薬又は製剤が、ある一定の期間を通じて高温及び低温に変動する温度条件の下で影響をうけた場合と同じ変化を与えうる一定温度。平均キネティック温度は、アレニウス式を考慮に入れているので算術平均温度よりも高い。ある一定期間の平均キネティック温度は Haynes の式を用いて計算される（*J.Pharm.Sci*. 60, 927-929, 1971）。

マトリキシング法（Matrixing）

ある特定の時点で全ての要因の組合せの全検体のうち選択された部分集合を測定する安定性試験の手法である。連続する二つの測定時点では、全ての要因の組合せのうちの異なる部分集合を測定する。この手法は、ある時点における全検体の安定性は各部分集合の安定性により代表されているという仮定に基づいている。したがって、同じ品目の試料間で見られる差が何に起因する差であるかを明らかにする必要がある。例えば、ロットの違い、含量の違い、同じ容器／栓システムのサイズの違い、また、場合によっては異なる容器／栓システムの違いに　起因するのかを明らかにする必要がある。

使用期間（Shelf -life）

製剤が、容器ラベルに表示された条件下で貯蔵されたときに、承認された有効期間の規格を満たしていることが想定される期間

有効期間の規格（Specification　Shelf-life）

原薬はリテスト期間を通じて、又は製剤は有効期間を通じて、適合性を判定するための一連の物理的、化学的、生物学的、微生物学的試験法及び判定基準

有効期限（Expiration date）

あるロットの製剤が、定められた条件の下で貯蔵されたときに、その日まで、承認された有効期間の規格を満たすことを示す容器ラベルに記される日付であり、その後は使用することができない日付

容器施栓系（Container closure system）

製剤を収容し保護する包装の構成要素の全体。直接包装を指すが、二次包装によって更に製剤を保護する場合は、二次包装も含まれる。

リテスト期日（Re-test date）

当該日付以後は、原薬が依然として規格に適合し、製剤の製造に使用できることを確認するために、当該原薬の検体を用いて試験検査しなければならないことを示す日付

リテスト期間（Re-test period）

原薬が、定められた条件の下で保存された場合に、その品質が規格内にとどまると想定される期間であり、当該原薬が製剤の製造に使用できる期間。この期間を超えて保存された原薬のロットを製剤の製造に使用する場合は、規格への適合性を再試験し、速やかに使用する。原薬のロットは複数回再試験することが出来る。使用された残りの原薬は、規格に適合し続ける限り、再試験後に使用できる。不安定であることが知られているほとんどのバイオテクノロジー応用製品／生物起源由来製品の原薬に関しては、リテスト期間より有効期間を設定するほうが適切である。同じことがある種の抗生物質についてもいえる。

（４）参考

VICH ガイドライン（（　）内は本通知における番号）

４：「新剤形動物用医薬品の安定性試験」（８－２）

５：「新動物用医薬品の原薬及び製剤の光安定性試験」（８－３）

８：「動物用飼料添加剤の安定性試験」（８－４）

10R：「新動物用医薬品の原薬中の不純物」（２－１）

11R：「新動物用医薬品の製剤中の不純物」（２－２）

17：「新動物用生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の安定性試験」（８－５）

39：「新動物用医薬品の原薬及び製剤の規格及び試験方法の設定：化学物質に関するガイドライン」（３－１）

40：「新動物用生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定」（３－２）

８－２　新剤形動物用医薬品の安定性試験（VICH GL4）

（１）緒言

本ガイドラインは、VICH の安定性の親ガイドライン（８－１　動物用新原薬及び製剤の安定性試験（VICH GL3R））に付属するものであり、新有効成分の原薬又は製剤の最初の承認申請後、当該承認の申請者又は取得者が、新剤形について承認申請する際の安定性試験成績の取扱いを示すものである。

（２）新剤形

新剤形とは、既承認の動物用医薬品に含まれているものと同じ有効成分を含むが、異なった剤形であるものとして定義される。

異なった剤形とは、既承認の動物用医薬品と投与経路の異なる製剤（例：経口から注射への変更）、新しい特殊な機能性又は送達システムを有する製剤（例：即時放出錠から放出制御錠への変更）及び既承認の動物用医薬品と同一の投与経路であるが剤形が異なる製剤（例：カプセル剤から錠剤への変更、液剤から懸濁剤への変更）をいう。

新剤形動物用医薬品の安定性試験は、原則として親ガイドラインに従って行われるべきであるが、正当な理由があれば、安定性試験成績を減らして承認申請することができる。

８－３　新動物用医薬品の原薬及び製剤の光安定性試験（VICH GL5）

（１）一般的事項

「８－１　動物用新原薬及び製剤の安定性試験」（VICH GL3R。以下「親ガイドライン」という。）は光線に対する試験が苛酷試験の必須の部分であると記載されている。本資料は親ガイドラインの付属書として、推奨される光安定性試験の要件を示したものである。

ア　序文

新動物用医薬品の原薬及び製剤については、適切な量の曝光により許容できない変化が起こらないことを示すために、新原薬及び製剤が本来有する光に対する特性を評価しなければならない。

通例、親ガイドラインのロットの選定の項に示されたとおりに選ばれた１ロットについて光安定性試験を実施する。承認事項の一部変更申請（例えば、処方、容器包装等）の場合には、光安定性試験を再度実施しなければならないこともある。試験を繰り返すかどうかは、最初の申請時に明らかにされた光に対する特性及び変更の種類と程度による。

本ガイドラインは、主に新化合物とその関連する製剤を承認申請する際に必要とされる光安定性に関する情報を示すものである。本ガイドラインは、申請後（例えば、現状で使用されている）の医薬品の光安定性をカバーするものではなく、また、これらの適用は親ガイドラインによってもカバーされない。

科学的な根拠により妥当性が明示される場合には、他の方法を採用してもよい。

光安定性試験は、下記のような適切な試験により、系統的に行うことが望ましい。

ア）原薬についての試験

イ）直接包装を除いたむき出しの製剤についての試験

ウ）必要ならば、直接包装形態での製剤についての試験

エ）必要ならば、市販包装形態の製剤についての試験

製剤の試験をどこまで行うかは、「製剤の光安定性試験結果の判定フローチャート」に沿って、曝光試験による変化が許容できるかどうかを評価して決める。許容できる変化とは申請者によって妥当性が示された限度内の変化をいう。

光の影響を受け易い原薬及び製剤の表示については、各国又は各地域の規定に従う。

イ　光源

光安定性試験には以下に示されている光源を用いることができる。申請者は妥当な理由がある場合以外は、局所的な温度変化の影響を最小にするために、適切な温度管理を行うか、或いは同じ条件下に遮光した対照試料を置いた試験を行わなければならない。

医薬品製造者／申請者は、オプション１及び２のいずれの光源についても、

その波長分布特性の規格は光源の製造業者が示すものを受け入れてよい。

オプション１

D65 ないしは ID65 の放射基準に類似の出力を示すように設計された光源、例えば、可視光と紫外放射の両方の出力を示す昼光色蛍光ランプ、キセノンランプ又はメタルハライドランプなどがある。D65 は、IS0　10977（1993）に規定されている屋外の昼光の標準として国際的に認められたものである。ID65 は、それと同等の屋内の間接的な昼光の標準である。

320nm 以下に有意な放射エネルギーを持つ光源については、適切なフィルターを用いてそのような放射エネルギーを除去してもよい。

オプション２

オプション２では、同じ試料が白色蛍光ランプと近紫外ランプの両方で照射されなければならない。

（ア）IS0　10977（1993）に規定されたものと同様な出力をもつように投計された白色蛍光ランプ

及び

（イ）350 ～ 370nm に放射エネルギーの極大を持ち、320 ～ 400nm にスペクトル分布を持つ近紫外蛍光ランプを使用する。; 320 ～ 360nm 及び 360 ～ 400nm の波長域のそれぞれに十分な放射エネルギーを示すものであること

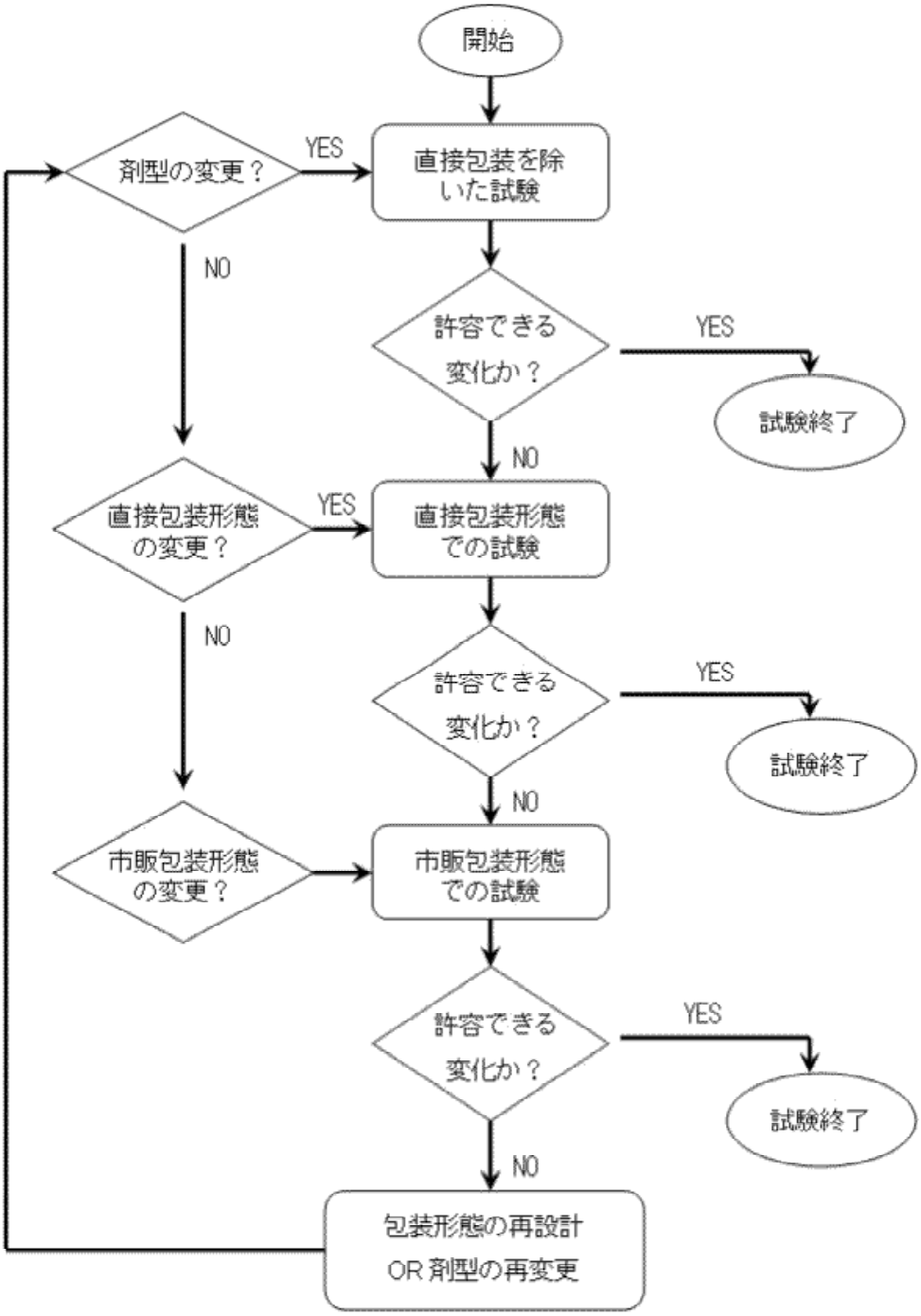
ウ　手順

光安定性を確証するための試験（以下、「確証試験」という）では、原薬と製剤の結果を対比できるように、試料は総照度として 120 万 Lux･hrs 以上及び総近紫外線エネルギーとして 200　W･hrs/m^2 以上の光に曝されねばならない。

規定された曝光量が得られていることを保証するために、試料はバリデートされた化学光量計と並べて曝光するか、或いは検定済みの放射計ないしは照度計を用いた曝光量測定結果により設定された適切な期間、曝光してもよい。化学光量計による方法の例が付属書に示されている。

もし、全ての見掛けの変化に対して温度の影響による変化を評価するために、遮光された試料（例えば、アルミホイルで包んだ試料）を使用するなら、測定試料と並べておくべきである。

製剤の光安定性試験結果の判定フローチャート



（２）原薬

原薬の光安定性試験は、強制分解試験と確証試験の二つの部分からなっている。

強制分解試験の目的は、分析法を開発したり、分解経路を解明するためにその物質の全般的な光感受性を評価することである。分析方法のバリデーションのためには、原薬自体の他、単純な溶液／懸濁液を用いて強制劣化試験を行う。これらの試験では、透明で化学的に不活性な容器に入れるべきである。強制分解試験では、原薬の光感受性や使用する光源の強度に応じていろいろな曝光条件を用いることができる。分折法の開発やバリデーションの目的であるなら、分解がかなりみられたときには曝光を打ち切って、試験を終了してもよい。光に対して安定な物質については、適切な量の曝光を行ったらその時点で試験を終了してよい。これらの実験計画は、申請者の自由裁量に任されるが、曝光量の妥当性を明示する必要がある。

強制的な条件下においては、確証試験の条件では、生成する可能性の少ない分解物が観察されることがある。この情報は適切な分析法を開発しバリデートするのに役立つ。もし、確証試験において、これらの分解物が生成されないことが実際に示されている場合には、それ以上の検討は必要ない。

確証試験は、取扱い、包装、表示に必要な情報を得るために行われる（これらの試験計画については、（１）のウ「手順」及び（２）のア「試料の配置」を参照)。

通例、開発段階の間に１ロットの原薬を試験し、その後、その医薬品が光に対して明らかに安定であるか、或いは明らかに不安定である場合には親ガイドラインに従って選定した１ロットについて、光に対する特性を確認する。確証試験の結果が明確でない場合には更に最大２ロットまで追加して試験を行うべきである。試料は親ガイドラインに従って選定する。

ア　試料の配置

試験試料の物理的な特性を考慮して試験をするように注意を払い、昇華、蒸発、融解などの物理的状態の変化による影響が最少になるように、試料を冷却したり、密封した容器に入れるなどの努力をしなければならない。試験される試料の曝光をできるだけ妨げないように注意しなければならない。容器として用いられる物質や試料保護のために用いる物質などと試料との間に起こり得る相互作用についても考慮し、試験に適さない場合には原因となるものを除去しなければならない。

試料が固体原薬の場合には、適切な量の試料を採り、適切なガラス又はプラスチック製の皿状容器に入れ、必要な場合には適切な透明カバーで覆う。固体原薬は一般的には３ mm 以下の厚さになるよう容器中に広げる。液状の原薬は化学的に不活性で透明な容器に入れて曝光される。

イ　試料の分析

曝光終了時に、試料の物理的な性質（例えば、外観、溶状等）の変化を検討するとともに、光分解過程で生じうる分解物について適切にバリデートさ

れた方法を用いて含量及び分解物の量を測定する。

固体原薬の場合には、サンプリングは、それぞれの試験の試料として全体を反映する部分が用いられるように行う。固体以外の原薬についても、ばく光後の試料が均一でない可能性がある場合には、同様に試料全体を均一化した後、サンプリングを行う。対照として遮光した試料を用いる場合には、それを曝光された試料と同時に分析すべきである。

ウ　結果の判定

強制分解試験は、確証試験で用いられる分析法を開発し、バリデートするための適切な情報が得られるように計画されなければならない。これらの分析法は、確証試験において生成される光分解物を分離して検出できるものでなければならない。強制分解試験の結果を評価するときには、これらは苛酷試験の一部であり、光による変化について定性的或いは定量的な限度値を設定するためのものでないことを念頭に置くことが重要である。

確証試験は、原薬の製造や製剤化において必要な注意事項を確認でき、また、遮光包装の必要性を確認できるものでなければならない。確証試験の結果から、曝光による変化が許容できるものであるがを判定するときには、使用時点において原薬が規格に適合する品質であることを保証できるように、光安定性試験以外の通常行われる安定性試験の結果を併せて考察する必要がある（関連する ICH 安定性試験ガイドライン及び不純物ガイドラインを参照）。

（３）製剤

製剤についての試験は、通例、まず完全にむき出しにした製剤での試験から始め、次に必要に応じて直接包装の製剤、更に市販される容器包装（市販包装）の製剤での試験を行うように逐次的に進めるべきである。その製剤が曝光の影響を受けないことを実証できるまで試験を進めなければならない。製剤は、（１）のウ「手順」の項に記載されている条件で曝光しなければならない。

通例、開発段階の間に１ロットの原薬を試験した後、その医薬品が光に対して明らかに安定であるか、或いは明らかに不安定である場合には、親ガイドラインに従って選定した１ロットについて光に対する特性を確認する。確証試験の結果が明確でない場合には、更に最大２ロットまで追加して試験を行うべきである。

直接包装がアルミニウムチューブや缶のように光を完全に通さないものであり、そのままの形で患者に投薬される製剤については、通例、容器包装なしのむき出しの製剤についてのみ試験を行えばよい。

輸液や皮膚用クリーム等の製剤については、用時の光安定性を保証するための試験を行う方がよい。この試験をどの程度行うかは用法によって決まるものであり、申請者の判断に任される。

試験に用いる分析法は、適切にバリデートされていなければならない。

ア　試料の配置

試験試料の物理的な特性を考慮して試験をするように注意を払い、昇華、

蒸発、融解などの物理的状態の変化による影響が最少になるように、試料を冷却したり、密封した容器に入れるなどの努力をしなければならない。試験試料の曝光をできるだけ妨げないように注意しなければならない。容器として用いられる物質や試料保護のために用いる物質などと試料との間に起こり得る相互作用についても考慮し、試験に適さない場合には原因となるものを除去しなければならない。

直接包装から取り出した製剤について試験をすることが実際的である場合には、原薬について述べた条件と同じ方法で試料を配置する。試料は、光源に曝される面積が最大になるように配置する。例えば、錠剤、カプセル剤等は単一の層になるように広げて配置する。

直接曝光するのが実際的でない場合には(例えば､製剤が酸化されるため)、適切に保護できる不活性で透明な容器（例えば、石英）に試料を入れる。

直接包装に入れた製剤或いは市販包装の製剤についての試験が必要な場合には、曝光が最も均一になるように、試料を水平に或いは光路に対して直角になるように配置する。容積の大きな容器の製剤（例えば、調剤用の包装）を試験するときには、試験条件を調節することが必要な場合もある。

イ　試料の分析

曝光終了時に、試料の物理的な性質（例えば、外観、溶状、溶出性又は崩壊性等）の変化を検討するとともに、光分解過程で生じうる分解物について適切にバリデートされた方法を用いて含量及び分解物の量を測定する。

散剤の場合には、サンプリングは、それぞれの試験の試料として全体を反映する部分が用いられるように行う。固形の経口剤の試験には適切な個数、例えば、20 錠又は 20 カプセルを用いる。その他の製剤（例えば、クリーム、軟膏、懸濁剤等）についても曝光後の試料が均一でない可能性がある場合には、同様に試料全体を均一化或いは溶解した後、サンプリングを行う。対照として遮光試料を用いた場合には、それを曝光された試料と同時に分析すべきである。

ウ　結果の判定

変化の程度によって、曝光の影響を軽減するための特別な表示や容器包装が必要とされることもある。確証試験の結果から、曝光による変化が許容できるものであるかどうかを判定するときには、有効期間を通じて製剤が申請を予定している規格に適合する品質であることを保証できるように、光安定性試験以外の通常行われる安定性試験の結果を合わせて考察する必要がある（関連の ICH 安定性試験ガイドライン及び不純物ガイドラインを参照)。

付属書

キニーネの化学光量法（Quinine　Chemical　Actinometry）

近紫外蛍光ランプ（FDA/National Institute of Standards and Technology の研究に基づいて）に対する曝光量を測定するための化学光量法の詳細を以下に示す。他の光源／光量法についても、同様の手順が用いられるが、しかし、それぞれの化

学光量計は使用する光源に対して、校正しておかなければならない。

塩酸キニーネ（Quinine monohydrochloride dihydrate）の２ w/v %水溶液（必要ならば加熱して溶かす）を調製する。

オプション１

この液 10mL を 20-mL 容量の無色アンプル１）に入れ、密封し、測定試料とする。

別に、この液 10mL を 20-mL 容量の無色アンプル１）に入れ、密封し、完全に遮光するために、アルミホイルで包み、対照試料とする。

測定試料及び対照試料を適切な時間曝光する。その後、測定試料及び対照試料中の溶液につき、層長１ cm のセルを用いて、400nm における吸光度（AT 及び AO）を測定し、吸光度の差 ΔA ＝ AT － AO を求める。曝光時間は吸光度の変化（ΔA）が少なくとも 0.9 になるようにする。

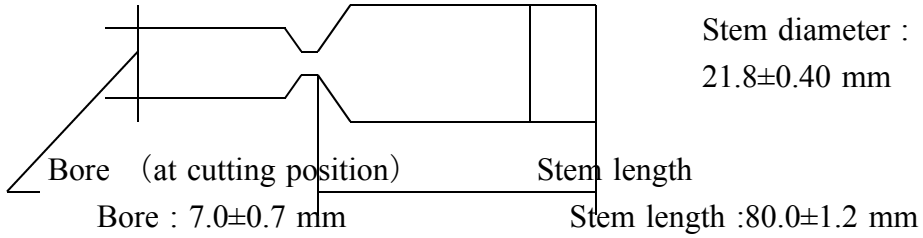
オプション２

塩酸キニーネ（Quinine monohydrochloride dihydrate）の２ w/v %水溶液（必要ならば加熱して溶かす）を１ cm の石英セルに満たし、測定試料とする。別に、この液を１ cm の石英セルに満たし、完全に遮光するために、アルミホイルで覆い、対照試料とする。

測定試料及び対照試料に適切な時間曝光する。その後、測定試料及び対照試料について、400nm における吸光度（AT 及び AO）を測定する。吸光度の差 ΔA ＝ AT － AO を求める。曝光時間は、吸光度の変化（ΔA）が少なくとも 0.5 になるようにする。

適切にバリデートされている場合には、他の容器も用いることができる。その他のバリデートされた化学的光量計を使用しても差し支えない。

（ア）形及び寸法（Shape and Dimensions）（JIS R3512（1974）参照）



用語集

直接包装（一時包装）：原薬又は製剤が直接接触している容器又は包装で適切なラベルを含む。

市販包装：直接容器及び紙箱などの直接包装以外の包装を合わせた全体をいう。

強制分解試験（Forced Test）：試料を意図的に分解させるために行う試験である。この試験は、通例、原薬について開発段階で行われ、分析法を開発したり、分解経路を解明するために､その物質の全般的な光感受性を評価するために行う。

確証試験：標準化された条件下における光に対する特性を明らかにするだめに行う試験である。この試験は原薬の製造や製剤化において必要な注意事項を確認

し、また、曝光の影響を軽減するために遮光包装や特別な表示が必要かどうかを明らかにするために行う。この確証試験のために、親ガイドラインに記載されている長期試験及び加速試験のロットの選定に従って選択ずべきである。

参考文献

Quioine Actinometry as a method for calibration ultraviolet radiation intensity in lightstability tesing of pharmaceuticals.
Yoshioka et al ; Drug Developmnent and Industrial Pharmacy, 20（13）, 2049-2062（1994）.

８－４　動物用飼料添加剤の安定性試験（VICH GL8）

（１）概略

飼料添加剤のために、VICH 三極間で調和した「８－１　動物用新原薬及び製剤の安定性試験」（VICH　GL3R。以下「親ガイドライン」という。）に付則を設ける。本ガイドラインは、親ガイドラインの付則であり、動物用飼料添加剤の製剤の安定性試験のための要件として位置づけられる。親ガイドラインは、製剤で作成される安定性情報の一般的指針を規定するものであるが、飼料添加剤のための付則は、評価される製剤の特有の性質により、多様な実際的・科学的に考慮すべき事項があるので、十分な柔軟性を残している。調製とペレット化に関係する安定性のような非常に重要と考えられるような他の安定性試験、分離試験及び均質試験は、本ガイドラインの対象ではない。

（２）緒言

本ガイドラインは、原則として、新化合物を含有する飼料添加剤の製剤のための承認申請において、受け入れ可能な安定性情報作成のためのものである。飼料添加剤は、動物の飼料に混合されて経口投与されるものである。本ガイドラインは、飼料添加剤のみに適用され、飼料添加剤から製造されるものには適用されない。飼料添加剤で実施される安定性試験は、親ガイドラインに従わなければならない。一方、親ガイドラインの応用は、幾つかの事例に限定されるかもしれない。したがって、このガイドラインは、飼料添加剤のための安定性試験資料において親ガイドラインと異なる点について記述している。

（３）保存条件

飼料添加剤は、25 ℃ ± ２℃／ 60 ％ RH± ５％（長期保存試験）及び 40 ℃ ± ２℃／ 75 ％ RH± ５％（加速試験）で、親ガイドラインの製剤と同じ試験間隔で試験されるべきである。正当であれば、他の保存条件が認められる。加速試験によって「規格からの逸脱」が生じた場合、中間的条件、例えば、30 ℃ ± ２℃／ 60 ％ RH± ５％での追加試験が実施されるべきである。加速試験における「規格からの逸脱」は、規格値に適合しないことと定義される。飼料に配合する前の飼料添加剤の安定性を立証するために証拠が必要である。飼料添加剤の有効期間の規格値は、全ての安定性を示す試験項目を含むべきである。

（４）包装材質

試験は、可能であれば、市販のために申請した最終包装で実施すべきである。実際の市販包装をシュミレートした比較可能な縮小容器の使用は、認められる。

（５）用語解説

キャリア：飼料に均一に混合しやすくするために、原薬に加えられる可食のもの。

飼料添加剤（Type A 治療用物質）：飼料添加剤は、飼料と混合して、動物への医薬品の経口投与を容易になるように調製した一種類以上の原薬と、通常、キャリアとの混合物である。

追加の規定は、地域のガイダンス及び規制を参照されたい。

８－５　新動物用生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品)の安定性試験（VICH GL17）

（１）緒言

VICH 調和三極ガイドライン「８－１　動物用新原薬及び製剤の安定性試験」（VICH　GL3R）におけるガイダンスは、一般に新生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）にも適用することとする。しかし、生物薬品は、通常の化学物質とは異なる特性を有しているので、これらの医薬品が安定に維持できる保存条件及び期間を定めるために行われる安定性試験の実施要領は、その特性に十分配慮したものである必要がある。生物薬品の場合、その有効成分は､十分に特性解析がなされたタンパク質やポリペプチドであり、分子の高次構造（コンホメーション）の維持や、それを基盤とする生物学的活性の維持は､共有結合はもとより非共有結合に依存している。また､温度変化、酸化、光、イオン強度、せん断のような環境因子に特に敏感である。生物学的活性を維持し、分解等を回避するには、一般に厳密な保存条件を必要とする。

安定性評価には様々な分析手段を複合的に組み合わせることが必要である。生物学的活性の測定が適用できる場合には、これを安定性試験の重要な項目とすべきである。製品の純度や特性からみて適切な物理的化学的手法、生化学的手法及び免疫化学的手法が適用できる場合には、それらも分子レベルでの分析や分解物・変化物の定量手段として、安定性試験計画に盛り込まれるべきである。

申請者は、これらのことを勘案した上で、新生物薬品の安定性を保証する適切なデータを作成するとともに、製品の力価、純度及び品質に影響を及ぼす様々な外的条件がどのようなものであるかを考察する必要がある。原薬又は製剤のいずれの貯法を申請する際にも、その根拠となる第一義的なデータは、実保存期間、実保存条件での長期保存試験により得られるデータである。したがって、適切な長期保存試験計画の立案は、製品開発の成否に極めて重要である。本文書の目的は、申請者に対し、承認申請に当たって実施すべき安定性試験及び承認申請書に添付する必要がある安定性試験データに関するガイダンスを示すことにある。なお、審査期間中に、引き続き実施して得られた長期保存試験データを提出できることになっている。

（２）適用対象範囲

本文書に述べられたガイダンスの適用対象となる物質は、組織、体液あるいは細胞培養液から単離・精製され、あるいは組換え DNA 技術を用いて生産され、十分に特性解析がなされたタンパク質、ポリペプチド類及びそれらの誘導体を構成成分とする製品である。したがって、本文書は、サイトカイン類、成長ホルモン類、成長因子類、インスリン類、モノクローナル抗体類、十分に特性解析がなされたタンパク質又は化学合成されたポリペプチド類を構成成分とするワクチン類のような製品についての安定性データの作成と申請のためのものである。

なお､本文書は､抗生物質類､ヘパリン類､ビタミン類､細胞代謝産物類､DNA

産物類、アレルゲン抽出物類、従来型ワクチン類、細胞類、全血製剤及び血液の細胞成分には適用されない。

（３）用語

本文書で使用している用語のうち基本的なものの定義については、「８－１動物用新原薬及び製品の安定性試験」（VICH GL3R）の用語集を参照すること。しかし、生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の製造業者は時に伝統的用語を用いることから、便宜上、伝統的用語を括弧書きで並記する。付録の用語集にも、生物薬品の製造に際して用いられる用語の幾つかを挙げ、定義したものが含まれている。

（４）バッチの選定

ア　原薬（バルク）

原薬が製造後､製剤化工程又は最終工程の前の段階で保存される場合には、実生産スケールを反映する３バッチ以上の試料について安定性試験成績を提出する必要がある。６か月以上の有効期間を予定しているものについては承認申請時に最低６か月の試験データを提出する。６か月未満の有効期間を予定しているものの場合、当初の申請に最低限どの程度のデータが必要かについてはケースバイケースで決定されるであろう。培養工程及び精製工程をスケールダウンして製造した原薬についてのデータ、いわゆるパイロットプラントスケールで得たバッチのデータを承認申請用として提出することは可能である。ただし、承認後実生産スケールで製造された最初の３バッチについて長期保存試験を実施する旨の約定を規制当局と交しておく必要がある。

安定性試験に使用するバッチの品質は、非臨床試験及び臨床試験で使用するものの品質や実生産スケールで製造されるものの品質を体現するものである必要がある。加えて、パイロットプラントスケールで製造された原薬は、その製造工程や保存条件が、実生産スケールに適用される製造工程及び保存条件をともに反映したものである必要がある。原薬の安定性試験に使用する容器は、実生産の製造工程で実際に用いられる容器を適切に体現できるものを用いる必要がある。実際の製造に通常使用されるものと同じ材質及び同じタイプの容器／栓であればサイズ的に小さな容器を用いて安定性試験を実施しても差し支えない。

イ　中間製品

生物薬品の製造において、ある特定の中間製品の品質とその管理が最終製品の製造に重要となる場合がある。その場合、製造業者は開発された製造工程中において、該当する中間製品を定め、自家試験データを取得し、その安定性を保証する工程管理限度値を設定することが一般的に求められる。パイロットプラントスケールでのデータも利用できるが、実生産スケールの製造工程でそうしたデータの妥当性を確立しておくべきである。

ウ　製剤（最終製品）

実生産スケールを反映する３バッチ以上の製剤（最終製品）について安定性試験成績を提出する。可能ならば、安定性試験に用いる製剤（最終製品）

の各バッチは、異なる原薬バッチを使用して製造したものとする。６か月以上の有効期間を予定しているものについては承認申請時に最低６か月の試験データを提出する。６か月未満の有効期間を予定しているものの場合、当初の申請に最低限どの程度のデータが必要かについてはケースバイケースで審査されることになるであろう。製品の有効期間は申請に際して根拠として提出された実際の試験データに基づく。有効期間の設定は、審査用に提出された実保存期間、実保存温度における長期保存試験の成績に基づいて行われることになるので、審査期間中にその後引き続き実施した試験の成績により、当初データでの期間が更新／延長されることになる。安定性試験に用いられる最終製品の品質は、非臨床試験及び臨床試験に用いられる製品の品質を体現するものである必要がある。承認後、実生産スケールで製造された最初の３バッチで長期保存試験を行う旨の約定があれば、パイロットプラントスケールでのデータを承認申請用資料として提出することも認められる。パイロットプラントスケールで製造されたバッチを使用した安定性試験により製品の有効期間を設定したものの、実生産スケールで製造された製品が長期保存試験でその有効期間内で規格に適合しなかったり、又は非臨床試験及び臨床試験で使用されたものの品質を反映したものではなく、同等とはいえないような事態が生じたときには、申請者は当該規制当局に連絡し、適切な指導を受ける必要がある。

エ　検体の選定

製剤に一連の容量違い（例えば、１ mL、２ mL、10mL）、単位違い（例えば、10 単位、20 単位、50 単位）、質量違い（例えば、１㎎、２㎎、５㎎）のバッチがある場合には、安定性試験に供する試料は、マトリキシング法又はブラケット法により選定することもありえる。

マトリキシング法とは、安定性試験を統計学的にデザインした方式の一つで、各測定時点で採取され試験に供されるのは全試料のうちの一部であるという方式である。本方式は、試験に供された試料の安定性が全試料の安定性を代表することを確証する適切な文書が提出されたときにのみ適用されるべきである。同一製剤での試料の違いのうちには、例えば、バッチの違い、含量違い、同一の栓でサイズ違い、あるいは可能性としては、容器／栓が異なる場合などが含まれている。マトリキシング法は、例えば含量の違い、容器／栓の違いなどが安定性に影響を及ぼす可能性があるような試料で、それらの製剤が保存条件下で同じように反応することを確かめることができない場合には、適用すべきではない。

成分組成において同一でかつ容器は全く同じタイプのものを使用しているが充填量においては異なる三種以上の製剤の場合、製造業者は容器サイズの最も小さいものと最も大きいもの（充填量の最も小さいものと最も大きいもの）のみを安定性試験の試料とすることができる。これがブラケット法である。ブラケット法をとり入れたプロトコールのデザインでは、中間的な充填量の試料の安定性は両極の充填量の試料の安定性により代表されるとの仮定

に基づいている。場合によっては、両極の充填量の試料で集められたデータが全試料の安定性を適正に表わしていることを示すデータを提出する必要があるかもしれない。

オ　容器／栓

生物薬品において、製剤と容器や栓との相互作用によって製品の品質変化が起こる可能性がある。アンプル製品以外の液体の製品で、使用される容器や栓との相互作用が明らかになっていない場合については、正立の状態だけでなく容器を倒立又は横倒しさせた状態も含めた（すなわち栓と接触した状態で）安定性試験を実施し、栓が製品の品質に影響を及ぼさないか検討する必要がある。市販予定の全ての容器／栓の組合せについてのデータが必要である。

（５）安定性評価

一般的に、生物薬品の安定性面での特性をそれだけで明らかにすることができるような安定性評価試験法あるいはパラメーターはない。したがって、製造業者は当該医薬品の同一性、純度及び力価の変化を捉えることができる総合的な安定性評価指針を考案し、提示する必要がある。

この安定性評価指針に含まれる試験方法は申請者によりバリデートされたものであって、これに関する資料は申請時点において提出できる状態にしておくべきである。どのような試験項目を採用するかは、製品の特徴に応じて決められる。以下の各項に示されている項目は、医薬品の安定性を適切に示そうとする際に、通常、資料作りが必要であろう代表的な特性項目を例示したものであり、全てを包含しているものではない。

ア　安定性試験実施計画書／結果報告書

承認申請資料には、原薬（適応可能な場合）及び製剤について、申請する貯法及び有効期間の妥当性を示す詳細な安定性試験実施計画書／結果報告書を添付する必要がある。この実施計画書／結果報告書には、適切に定められた規格や試験実施間隔等を含め、承認を得ようとする有効期間中をとおして生物薬品が安定であることを示すために必要な情報が全て記載されている必要がある。統計学的手法は安定性に関する三極調和ガイドラインに記載されている方法を用いること。

イ　力価

製品の臨床効果と、定義可能でかつ測定可能な生物学的活性とが関連性を有している場合には、力価試験は安定性評価の一部であるべきである。本文書に述べられている製品の安定性試験において力価とは、目的とする効果を発揮するための特殊な能力のことをさす。力価は、製品のある特性を測定することを基盤としており、適切な定量性のある *in vivo* 又は *in vitro* での方法により検定される。一般に、異なる試験室において測定された生物薬品の力価は、適切な標準物質の力価に関係づけて表わされる場合のみ、意味あるものとして比較することができる。その目的のために、可能であれば国内標準品又は国際標準品に対して直接的又は間接的に検定された標準物質を力価測

定に用いるべきである。

力価の経時的変化に関する検討は、安定性試験実施計画書に従って適切な間隔で実施される必要がある。また、その結果は、可能な限り、国内又は国際的に認定された標準品を基準として検定された生物学的活性単位で報告される必要がある。国内標準品又は国際標準品がない場合、試験結果を、適切な特性解析がなされた自家標準物質を用いて得られた自家単位でのデータにより報告してもよい。

生物薬品の中には、力価が有効成分と第二の成分とのコンジュゲーションあるいはアジュバントとの結合に依存しているものがある。コンジュゲートあるいはアジュバントとして用いられたキャリアーからの有効成分の離脱については、流通過程で遭遇する条件も含め、実保存期間、実保存温度で検討する必要がある。この種の製品にあっては、*in vitro* の生物学的活性試験や物理的化学的特性分析が実施不可能かあるいは正確性に欠く結果を与えるため、安定性評価が困難な場合がある。このような *in vitro* 試験における不十分さを補完するために、適切な方策（例えば、コンジュゲーションや結合前の製品についての試験、第二成分から有効成分の離脱の評価、*in vivo* による力価試験）を考えたり、又は適切な代替試験の活用を考慮する必要がある。既に評価確立された *in vivo* による力価試験では、有効成分の著しい離脱は認められないことが多くの場合示されている。

ウ　純度及び分子特性の解析

本文書中で述べられている製品の安定性試験において、純度とは相対的な用語である。生物薬品には、糖鎖付加、脱アミド化、あるいはその他の不均一性などがあるため､その絶対的な純度を決定することは極めて困難である。したがって、生物薬品の純度は、一般的に複数の方法により評価されるべきである。得られる純度は試験方法に依存したものになる。安定性試験の目的をふまえると、その純度試験は分解物・変化物を測定することに焦点を合わせるべきである。

安定性試験に供された生物薬品に関しては、純度はもとより、その分解物・変化物について、個々の量及び総量を可能及び必要な限り報告し、説明資料を作成する必要がある。分解物・変化物の許容限界量は、非臨床及び臨床試験に用いた原薬及び製剤の分析結果に基づくべきである。

適切な理化学的分析手法、生化学的手法及び免疫化学的分析手法を用いれば、原薬及び（又は）製剤について広範囲な特性解析（例えば、分子量、荷電、親水性）を行うことができ、保存中の脱アミド化、酸化、スルホキシド化、凝集又は断片化等による物質変化を的確に検出することが可能となる。これに有用な分析方法の例としては、電気泳動法（SDS-PAGE、免疫電気泳動法、ウエスタンブロット、等電点電気泳動法等）、高分離能クロマトグラフィー（例えば逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過、イオン交換、アフィニティクロマトグラフィー）及びペプチドマッピングがある。

長期保存試験、加速試験及び（又は）苛酷試験において、分解物・変化物

の生成を示す有意な質的又は量的変化が検出された場合には、計画に沿って実施された長期保存試験中に生成する分解物・変化物が安全性上問題となる可能性につき検討・考察する必要がある。また、それらの特性解析と定量的把握が必要かどうかにつき検討・考察すべきである。許容限度値については、非臨床及び臨床試験に用いた原薬及び（又は）製剤で検出された水準を勘案して設定し、その妥当性の根拠を示す必要がある。

通常の分析法では適切に特性解析ができない物質又はルーチンに用いられる分析手法では正確な純度の測定が不可能な製品の場合、申請者は代替試験法を設定し、その妥当性の根拠を示す必要がある。

エ　その他の製品特性

生物薬品に特に限られた項目ではないが、下記の製品特性について最終包装形態でモニターし、報告する必要がある。

製剤の外観（溶液／懸濁液の色及び濁度、粉末の色、形状及び溶解時間）；溶液のものはそのままの状態で、粉末及び凍結乾燥品を溶解剤で溶解するものについては溶解後に、肉眼で観察される微粒子の有無；pH；粉末及び凍結乾燥品の含湿度。

無菌試験又はそれに代わる試験（例えば、容器／栓の完全性試験）は少なくとも試験開始時及び申請する有効期間の最終時に実施すること。

添加剤（例えば安定剤、保存剤、賦形剤等）が製剤の保存中に変化・分解する可能性もある。予備安定性試験において、これらの添加剤における化学反応や分解が製剤の品質に悪影響を与える徴候がみられた場合には、安定性試験においてこれらの項目をモニターすべきであろう。

容器／栓は、製品に悪影響を及ぼす可能性があるため、注意深く評価する必要がある。

（6）保存条件

ア　温度

生物薬品の多くは保存温度を厳密に限定する必要があるため、実保存温度、実保存期間で実施される安定性試験の保存条件は、通常、申請する保存温度に限定される。

イ　湿度

生物薬品は、通常、防湿性の容器に入れられ、流通される。したがって、申請しようとする容器（及び申請しようとする保存条件）が、高湿度及び低湿度に対して十分な防湿効果を有することを証明できる場合、各種の相対湿度条件下での安定性試験は一般に省略することができる。防湿性の容器を使用しない場合には、適切な安定性のデータを提出する。

ウ　加速及び苛酷条件

前述したように、有効期間は実保存温度、実保存期間で実施された試験成績に基づいて設定されるべきである。しかし、原薬及び製剤について加速及び苛酷条件での試験も実施することが強く望まれる。

加速試験は、①有効期間の設定上有用な補足情報を提供する②将来の製品

開発（例えば、製剤処方変更、スケールアップ等のような製法変更を申請する際の予備的評価）に資する当該物質の安定性面での情報を提供する③安定性試験に用いられる分析方法のバリデーションを行う際に役立つ④原薬又は製剤の変化の様相（分解特性）の解明に役立つ情報をもたらす、などの可能性がある。

苛酷試験は、①製品が申請する保存条件以外の条件に偶発的に曝された場合（例えば、輸送中）、製品に悪影響があるかどうかを判断する②どのような特異的試験パラメーターが製品の安定性指標として最適かを評価する、ことなどに有用である可能性がある。また、③極端な条件下に原薬又は製剤を曝すことで､変化・分解のパターンを明らかにするのに役立つ可能性がある。仮に変化・分解のパターンが明らかとなるのであれば、同様な変化が申請しようとしている保存条件下で起きるかどうかをモニターする必要がある。安定性に関する三極調和ガイドライン中に加速及び苛酷試験の条件についての記載があるが、これらは生物薬品には適切でない場合があることに留意すべきである。条件についてはケースバイケースで慎重に選択する必要がある。

エ　光

申請者は試験の方針を決めるに際して、ケースバイケースで当該規制当局に相談すること。

（７）使用条件

ア　凍結乾燥品の開栓後あるいは溶解後の安定性

凍結乾燥品の溶解後の安定性についは、容器、包装、添付文書などに記載された条件及び最長保存期間での安定性を検討する必要がある。この表示法は各国／地域の基準に準じることとなっている。

イ　マルチプルドースバイアル

また、通常の単回使用バイアルに必要な標準的なデータに加えて、注射針などを何度も栓から入れて繰り返し抜き取り使用するマルチプルドースバイアルの場合は、容器、包装、添付文書などに記載する使用手引に規定された最長使用期間中、栓がそうした条件に耐え、製品の力価、純度、品質が保持されていることを示す必要がある。使用手引の表示法は各国／地域の基準に準じることとなっている。

（８）試験頻度／期間

生物薬品の有効期間は、何日という単位から数年と幅が広いので、全ての製品に一律にあてはまる安定性試験の期間や試験頻度を定めることは難しい。しかし、少数の例外を除き、現存の製品あるいは将来開発される可能性がある製品の有効期間は半年から５年の範囲と考えられる。そこで本文書では、この範囲に有効期間が想定されるものとして以下のような指針を定めた。これには生物薬品における変化・分解というものが、長期保存期間中の時間経過の中の各時間間隔において、経過した時間としては同じであっても、時点が異なれば必ずしも同じ内容／程度の変化にならない場合が多いことなどを考慮している。すなわち、１年未満の有効期間を予定している場合では、長期保存試験は最初

の３か月は１か月ごと、その後は３か月ごとに試験する。１年以上の有効期間を予定している場合は、最初の１年目は３か月ごと、２年目は６か月ごと、それ以降は１年ごとに試験することとする。

上記の試験間隔は承認前や許可前の段階において妥当であろうとされているものである。しかし、製品の承認／許可後であって、既に製品の安定性に関して適切なデータがあり、問題がないことが示された場合には、試験の一部を省略しても差し支えないであろう。製品の安定性が損なわれないことを示すデータがある場合には、申請者が、承認／許可後の長期保存試験の計画書としてある特定の時点での試験（例えば９か月の試験）の省略を裏付けるような試験計画書を積極的に提出することが望まれる。*in vivo* による力価試験が安定性試験計画書に含まれている場合には、ある一定時点でのこれらの試験の省略について裏付けをしなくてはならない。

（９）規格

生物薬品では、保存中に活性の有意な低下、物理的化学的な変化又は分解が起こる可能性があるが、出荷規格と有効期間の終了時点での規格（有効期間内規格）については、各国の基準や国際的な基準の中ではほとんど触れられていない。申請有効期間中の活性低下の最大許容範囲や物理的化学的変化（分解）の限度については、生物薬品の個々のタイプやグループごとでの勧告はなされておらず、ケースバイケースで考えられている。それぞれの製品は、その有効期間を通して安全性、純度、力価などにおいて定められた限度値内に規格が維持されている必要がある。この規格や限度値は、適切な統計学的手法を利用した情報に基づいて定められる必要がある。もし異なった出荷規格と有効期間内規格を用いようとする場合には、安定性に関する三極調和ガイドラインで述べられているように臨床効果に影響しないことを示す十分なデータによる裏付けが必要である。

(10) ラベル表示

ほとんどの生物薬品の原薬、製剤には正確に定められた保存温度が推奨される。とりわけ凍結させてはならない原薬、製剤については、特別な勧告を記載する必要がある。これらの条件のほか、必要ならば光や湿度から保護すべき旨の勧告なども容器、包装及び添付文書などに記載する必要がある。この表示法は各国／地域の基準に準じることとなっている。

(11) 用語の定義

・コンジュゲート製品

コンジュゲート製品とは､製品の有効性や安定性を改良する目的のために、有効成分（例えばペプチド、炭水化物）を共有結合あるいは非共有結合によりキャリアー（例えばタンパク質、ペプチド、無機鉱物）と結合して調製したものである。

・分解物・変化物

製品が経時的に変化して生成する物質である。このような変化（例えば、脱アミド化、酸化、凝集、プロテアーゼによる分解）は製造工程中又は保存

中に起きる可能性がある。生物薬品の場合、分解物・変化物によっては活性を有するものがある。

・不純物

原薬（バルク）又は製剤（最終製品）中の有効成分、添加剤として定義される物質以外のもの

・中間製品

生物薬品製造工程の中間過程で得られるもので、原薬や製剤ではないが、それらの製造が原薬又は製剤の製造を成功させるために非常に重要なもの。一般に、中間製品とは定量的に取り扱えるもので、工程を更に先へ進める前にそれまでの製造工程が成功裡に完了したか否かを判定するための規格が設定されるものである。中間製品には、更に分子構造上の修飾を受けるもの、あるいは次の工程まで一定期間以上保存されるものも含まれる。

・実生産スケールでの生産

市場へ供給する製品の製造のために、施設内で通常に行われる生産

・パイロットプラントスケールでの生産

実生産に適用される製造方法、製造工程を十分に反映し、シュミレートした方法／工程で行われる原薬又は製剤の製造。細胞の増殖／培養、ハーベスト及び精製方法は、製造規模を除き、同一でなければならない。

８－６　動物用医薬品新原薬及び製剤の安定性試験へのブラケッティング法及びマトリキシング法の適用に関するガイドライン（VICH GL45）

（１）緒言

ア　目的

本ガイドラインの目的は、日米 EU 動物用医薬品規制調和ガイドラインの新有効成分含有の動物用医薬品原薬及び製剤の安定性試験ガイドライン（VICHGL3、以後、親ガイドラインと呼ぶ)に示された原則に従って実施される安定性試験に、ブラケッティング法(bracketing)及びマトリキシング法(matrixing)を適用するときに推奨される事項を示すことにある。

イ　背景

親ガイドラインにおいては、その妥当性を示すことにより、ブラケッティング法及びマトリキシング法を新有効成分含有の動物用医薬品原薬及び製剤の安定性試験に適用できることを示しているが、それ以上の詳細については述べられていない。

ウ　範囲

本ガイドラインは、ブラケッティング法及びマトリキシング法の試験計画についての指針を示す。本ガイドラインでは、ブラケッティング法又はマトリキシング法が適用できる場合の原則を定めている。試験計画例は説明のために示したものであり、全てのケースにおいてこの手法が唯一の試験計画、又は最も適切な試験計画と考えるべきではない。

（２）ガイドライン

ア　一般的事項

全数試験とは、全測定時点において全ての試験要因の組合せについて検体を測定する方法である。これに対し、減数試験とは、測定時点の一部について測定を省略する、あるいは要因の組合せの一部について測定を省略する方法である。複数の試験要因がある場合には、減数試験は全数試験の適切な代替手段となり得る。ただし、いかなる減数試験もリテスト期間又は有効期間を適切に予測できるようにすべきである。したがって、減数試験を計画する前には、その使用の適否を評価し、妥当性を示すべきである。また減数試験によって得られるデータ数が減少するために、全数試験の結果から設定し得る有効期間より短いリテスト期間又は有効期間が設定される危険性があることも認識すべきである。

減数試験の途中において、全数試験又は当初の計画より測定の省略度の少ない試験計画への変更を検討することができるが、その場合には妥当性を示し、全数試験及び減数試験の原理に従わなければならない。しかし、変更によってサンプル数が増えることを考慮して、可能ならば統計解析法を適切に調整すべきである。ただし、いったん変更した場合は、安定性試験の残りの時点についても変更後の試験計画で続行すべきである。

イ　減数試験の適用について

減数試験は、ほとんどのタイプの動物用医薬品製剤の正式な安定性試験に適

用可能である。ただし、薬物とデバイス間に様々な相互作用が起こり得る複雑な薬物送達システムなどにおいては、更に十分な妥当性を示すべきである。原薬の安定性試験に関しては、マトリキシング法が適用できるケースは限られており、ブラケッティング法は一般的に適用できない。

ブラケッティング法又はマトリキシング法が適用できるかどうかは、後に詳しく述べるように、その状況によって決まる。いかなる減数試験においてもその妥当性を示すべきである。本ガイドラインに示されている条件が、減数試験を使用することの妥当な理由になる場合もあるが、更に十分な妥当性を示さなくてはならない場合もある。いずれの場合においても、どの様な妥当性をどの程度示すかは、各々の製剤に関して得られている参考資料によって決まる。マトリキシング法を適用する場合には、参考資料によって示されるデータの変動性と製剤の安定性の程度を考慮すべきである。

ブラケッティング法とマトリキシング法は異なった概念に基づく減数試験である。したがって、一つの安定性試験でブラケッティング法とマトリキシング法を同時に適用する場合には、前もって注意深く考察し、科学的に妥当性を示さなければならない。

ウ　ブラケッティング法

親ガイドラインの用語集に定義されているように、ブラケッティング法は、全数試験と同様に全測定時点において、例えば、含量、容器サイズ又は容れ目等の試験要因について両極端の検体についてのみ測定する安定性試験の手法である。この手法は、中間的な水準にある検体の安定性は試験された両極端の安定性により示されるとの仮定に基づいている。

ブラケッティング法は、試験するために選択された含量、容器サイズ又は容れ目等が、安定性の面からみた実質的な両極端であることが示されなければ適用することはできない。

（ア）試験要因

試験要因とは、安定性試験において製剤の安定性への影響を評価すべき変数（例えば、含量、容器サイズ又は容れ目等）である。

①　含量

ブラケッティング法は、製剤の処方が同一か、若しくは極めて類似している含量違いの場合に適用することができる。例えば、（１）異なるサイズのカプセルに同一の混合末を充填して製造した含量違いのカプセル剤、（２）同一の顆粒で量を変えて製造した含量違いの錠剤、（３）着色剤や香料といったようなマイナーな添加剤の処方のみが異なる含量違いの経口液剤などである。

ブラケッティング法は、製剤処方中の動物用医薬品原薬と添加剤の比率を変化させた複数の含量違いの場合には、その妥当性を示すことによって適用することができる。臨床又は開発ロットの安定性プロファイルが含量間で同等であることを示すことなどによってその妥当性を証明することができる。

なお、異なる添加剤を使用した含量違いの製剤については、一般にブラケッティング法を適用すべきではない。

② 容器サイズないし容れ目

ブラケッティング法は、他の条件が一定で容器サイズ若しくは容れ目だけが異なる同じ容器施栓系に適用することができる。しかしながら、容器サイズと容れ目の両方が異なる場合について同時にブラケッティング法を適用しようとした場合、最も大きい容器と最も小さい容器が全ての包装仕様の両極端であると推測すべきではない。両極端を選択する際には、特に注意が必要であり、製品の安定性に影響すると考えられる容器施栓系の様々な特性を比較して行われるべきである。この特性としては、容器の壁の厚さ、施栓の構造、 容量対表面積率、容量対空隙率、単位投与量又は単位容れ目量当たりの透湿速度、又は酸素透過速度等を必要に応じて考慮すべきである。

ブラケッティング法は、同じ容器で施栓が異なっている場合には、その妥当性を示すことにより適用することができる。その妥当性は、ブラケッティング法により省略した容器施栓系の相対透過速度について説明することによって示すことができる。

（イ）試験計画で考慮すべき点と潜在的なリスク

安定性試験を開始した後に、両極端の一つを市販する予定がなくなった場合においても、省略された中間的な水準の検体の安定性を保証するために試験を継続して差し支えない。ただし、承認後に、市販する動物用医薬品製剤の両極端の安定性試験を行うことを、明記しなければならない。

ブラケッティング法を適用する前に、リテスト期間又は有効期間の予測への影響は評価しておくべきである。両極端の安定性が異なった場合、中間のものは最も安定性の悪いものより安定性が良いとみなすことはできず、中間のものの有効期間は最も安定性の悪いものの有効期間を超えて設定することはできない。

（ウ）試験計画の例

ブラケッティング法の試験計画の例を表 1 に示す。この例では、三つの異なる含量と三つの異なる容器サイズの製品について考える。この例においては、15mL と 500mL 容量の高密度ポリエチレンの容器サイズが真に両極端であることを示さなければならない。試験のために選ばれた組合せのロットは、全数試験と同様にそれぞれ全測定時点で試験する。

表１　ブラケッティング法の試験計画例

含量		50mg			75mg			100mg		
ロット		１	２	３	１	２	３	１	２	３
容器サイズ	15mL	T	T	T				T	T	T
	100mL									
	500mL	T	T	T				T	T	T

T：試験サンプル

エ　マトリキシング法

親ガイドラインの用語集に定義されているように、マトリキシング法はある特定の測定時点で全ての要因の組合せの全検体のうち選択された部分集合を測定する安定性試験の手法である。連続する二つの測定時点では、全ての要因の組合せのうちの異なる部分集合を測定する。この手法は、ある測定時点における全検体の安定性は各部分集合の安定性により代表されているという仮定に基づいている。したがって、同じ品目の試料間で安定性に差が見られる場合には、その差が何に起因するのかを明らかにする必要がある。例えば、ロットの違い、含量の違い、同じ容器施栓系のサイズの違い、また、場合によっては容器施栓系の違いに起因するのかを明らかにする必要がある。

二次包装が動物用医薬品製剤の安定性に寄与する場合には、複数の二次包装についてマトリキシング法を適用することができる。

保存条件が異なる場合は、それぞれ別々のマトリキシング法試験計画を適用しなければならない。マトリキシング法は試験項目間に適用してはならない。しかし、妥当性を示すことができれば、異なる試験項目について別々にマトリキシング法を適用することができる。

（ア）試験要因

マトリキシング法は、同一又は極めて類似した動物用医薬品製剤処方間での含量違いの評価に適用することができる。例えば、（１）異なるサイズのカプセルに同一の混合末を充填して製造した含量違いのカプセル剤、（２）同一の顆粒で量を変えて製造した含量違いの錠剤、（３）着色剤や香料といったようなマイナーな添加物の処方のみが異なる含量違いの経口液剤などである。

適用できる他の例として、同一の製法と設備で製造されたロット間、同一の容器施栓系のサイズ又は容れ目違いなどがある。

例えば、動物用医薬品原薬と添加剤の比率が異なる含量違い、添加剤の種類が異なる含量違い、又は容器施栓系の違いなどについてマトリキシング法を適用する場合には、その妥当性を述べる必要がある。妥当性の証明は一般的に参考資料に基づいて行われるべきである。例えば、二つの 異なる施栓又は容器施栓系間での安定性試験にマトリキシング法を適用する場合には、透湿性の比較や両包装とも同様の遮光性を持つことを示すことにより参考資料とすることができる。又は別にその動物用医薬品製剤が酸素、湿度又は光

によって影響されないという参考資料を示すことも良いであろう。

（イ）試験計画で考慮すべき点

全試験期間にわたって、また申請前の最終時点までの期間にわたって、各要因の組合せの測定回数ができるだけ偏らないようにマトリキシング法を計画するべきである。しかし、以下に述べるように、ある時点は全数試験が推奨されることから、測定時点をマトリキシングにより省略する試験計画において、完全に偏りをなくすことは難しいかもしれない。

マトリキシングにより測定時点を省略した安定性試験計画においては、中間時点は指定した組合せについて適当な間隔で測定するが、開始時点と最終時点は全ての要因について測定すべきである。予定される有効期間までの長期保存試験の全データが承認の前までに提出できない場合は、ロット、含量、容器サイズ、容れ目違いなどの全ての組合せの検体について 12 か月時点又は申請前の最終時点のデータを取得すべきである。更に、各検体とも最初の 12 か月間は、各々の組合せについて、開始時点を含む少なくとも 3 時点のデータが必要である。加速試験や中間的条件での試験にマトリキシング法を適用する場合には、各検体とも開始時点と最終時点を含む最低限 3 時点のデータを取得するようにすべきである。

試験要因を省略するマトリキシング法を適用するときは、含量、容器サイズ又は容れ目違いの組み合わせの中の一つを市販する予定がなくなった場合においても他の含量、容器サイズ又は容れ目違いの検体の安定性を保証するためにその安定性試験を継続して差し支えない。

（ウ）試験計画の例

含量の異なる２種の動物用医薬品製剤(S1 及び S2)について、マトリキシング法によって測定時点を省略した試験計画の例を表２に示す。1/2 省略(one half reduction)及び 1/3 省略(one third reduction)は、通常行われている全数試験に対する測定の省略方法を示すものである。 例えば、全数試験に対して、1/2 省略は全測定時点の連続した２時点のうちの１時点を、1/3 省略は３時点のうちの１時点の測定を省略するものである。表２に示した例では、実際には 2.4.2 で論じたとおり、全検体を測定する時点が存在するため省略される測定数は 1/2 又は 1/3 よりも少ない。これらの例では開始時と最終時に加えて 12 か月時点における全検体測定を含んでいるからである。したがって、実際の省略は最終的には 1/2(24/48)又は 1/3(16/48)よりも少なく、15/48 又は 10/48 となる。

表２　含量の異なる２種の動物用医薬品製剤に適用する試験計画の例

「測定時点を 1/2 省略したマトリキシング法」

測定時点（月）			0	3	6	9	12	18	24	36
含量	S1	ロット１	T	T		T	T		T	T
		ロット２	T	T		T	T	T		T
		ロット３	T		T		T	T		T
	S2	ロット１	T		T		T		T	T
		ロット２	T	T		T	T	T		T
		ロット３	T		T		T		T	T

Ｔ：試験サンプル

「測定時点を 1/3 省略したマトリキシング法」

測定時点（月）			0	3	6	9	12	18	24	36
含量	S1	ロット１	T	T		T	T		T	T
		ロット２	T	T	T		T	T		T
		ロット３	T		T	T	T	T	T	T
	S2	ロット１	T		T	T	T	T	T	T
		ロット２	T	T		T	T		T	T
		ロット３	T	T	T		T	T		T

Ｔ：試験サンプル

３種の含量違い及び３種の容器サイズ違いの動物用医薬品製剤に適用する試験計画の例を表３ａ及び表３ｂに示す。表３ａは測定時点のみを省略したマトリキシング法を、表３ｂは測定時点と要因の双方を省略したマトリキシング法を示す。表３ａでは、ロット、含量及び容器サイズの全ての組合せについて測定されるが、表３ｂでは、測定されないロット、含量及び容器サイズの組合せが存在する。

表３ａ、表３ｂ　３種の含量違い及び３種の容器サイズ違いの動物用医薬品製剤に適用する試験計画の例

表３ａ　測定時点を省略したマトリキシング法

含量	S1				S2				S3		
容器サイズ	A	B	C		A	B	C		A	B	C
ロット１	T1	T2	T3		T2	T3	T1		T3	T1	T2
ロット２	T2	T3	T1		T3	T1	T2		T1	T2	T3
ロット３	T3	T1	T2		T1	T2	T3		T2	T3	T1

表３ｂ　測定時点と要因の双方を省略したマトリキシング法

含量	S1				S2				S3		
容器サイズ	A	B	C		A	B	C		A	B	C
ロット１	T1	T2			T2		T1			T1	T2
ロット２		T3	T1		T3	T1			T1		T3
ロット３	T3		T2			T2	T3		T2	T3	

測定時点(月)	0	3	6	9	12	18	24	36
T1	T		T	T	T	T	T	T
T2	T	T		T	T		T	T
T3	T	T	T		T	T		T

S1-S3：含量違い、A-C：容器サイズ違い　T ：試験サンプル

（エ）適用性と減数の度合い

マトリキシング法を計画する際には、下記の点などを考慮すべきである。

・データの変動性に関する知見
・動物用医薬品製剤の想定される安定性
・参考資料の有無
・動物用医薬品製剤の要因内又は要因間の安定性の差
・試験における要因の組合せの数

一般にマトリキシング法は参考資料によって動物用医薬品製剤の安定性が予測できることが示された場合に適用できる。参考資料によって変動性が小さいことが示された場合は、マトリキシング法を適用できる。参考資料によって中程度の変動があることが示された場合は、統計的処理によりマトリキシング法の妥当性を確認すべきである。参考資料によって変動性が大きいことが示された場合にはマトリキシング法を適用すべきではない。

選択したマトリキシング法の統計的処理による妥当性の確認は、要因間における分解速度の差に対する検出力、又は有効期間推定の精度を評価することによって行うことができる。

マトリキシング法を適用しうると考えられる場合、全数試験からの省略の度合いは、評価する要因の組合せの数に依存する。製剤に関する要因が多ければ多いほど、そしてそれぞれの要因における種類（水準）が多ければ多いほど、省略できる度合いも大きくすることができる。しかし、いかなる減数計画も製剤の有効期間を適切に予測できるものでなければならない。

（オ）マトリキシング法の潜在的なリスク

測定時点以外の要因についてマトリキシング法を適用した場合は、省略することによって測定データが減少するため、一般に有効期間を推定する精度が低く、全数試験で求められる有効期間よりも有効期間は短くなる。更に、

このようなマトリキシング法は主効果又は交互作用に対する検出力が不十分な場合があり、そのために有効期間の推定において異なる試験要因から得られるデータを不当に一つにまとめてしまうことになる。要因の組合せ数を省略し過ぎて、各組合せから得られるデータを一つにまとめて共通に適用できる有効期間を推定することができない場合には、省略した要因の組合せの有効期間を推定することが不可能である。

測定時点のみをマトリキシングにより省略した試験計画は、要因間の変化率の差に対する検出力が全数測定と同程度であり、信頼できる有効期間が得られる。この場合は、データに直線性が成立すると推測されること、更に、全要因の組合せの全検体測定が開始時点及び申請前の最終時点で行われることが前提となる。

オ　データの評価

減数試験による安定性データは、全数試験から得られたデータと同様に取り扱われる。

８－７　安定性データの統計学的評価に関するガイドライン（VICH GL51）

（１）序論

ア　ガイドラインの目的

本ガイドラインは、「動物用新原薬及び製剤の安定性試験」（VICH　GL3R。以下「親ガイドライン」という。）に記載された原理に従って得られた安定性データを承認申請においてどのように利用してリテスト期間又は有効期間を提示したらよいかを示したものである。本ガイドラインには、長期保存条件での安定性試験により得られたデータ（以下「長期データ」という。）がカバーする期間を超えた原薬のリテスト期間又は製剤の有効期間を提示する場合に、どのような状況で、またどの程度まで外挿することができるかを記載する。このガイドラインの適用は全く任意であり、要求されたリテスト期間／有効期間について統計分析を使うかどうかを決めるのは申請者である。

イ　背景

安定性データの評価及び統計的解析に関する指針は、親ガイドラインには、簡潔に記載されているにすぎず、その適用範囲も限られている。親ガイドラインでは、リテスト期間又は有効期間を推定するために定量的な安定性データを解析するための方法として回帰分析が認められており、全ロットを一括して評価できるか否かに関する統計的検定を有意水準 0.25 で実施することが推奨されている。しかし、親ガイドラインには、その詳細はほとんど記載されておらず、また、全数試験や減数試験に複数の要因が含まれる場合についての記載もない。

このガイドラインは、親ガイドラインの評価の項の拡大版である。

ウ　ガイドラインの適用範囲

本ガイドラインは、新有効成分含有動物用医薬品の原薬及び製剤の承認申請において提出すべき安定性データの評価について記載する。本ガイドラインでは、「室温」*又は「室温」以下で保存される原薬及び製剤のリテスト期間及び有効期間を設定するための方法が推奨されている。また、本ガイドラインは、単一又は複数の要因の全数又は減数試験計画を用いた安定性試験で得られたデータの評価についても記載する。

*注：「室温」とは、一般的な慣例上の環境をいう。ラベル表示の貯蔵方法の意味ではない。

判定基準の設定及び根拠に関する指針は、「新動物用医薬品の原薬及び製剤の規格及び検査方法の設定：化学物質に関するガイドライン」(VICH GL39)及び「新動物用生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び検査方法の設定」（VICH GL40）に記載されている。減数試験の適用については、「動物用医薬品新原薬及び製剤の安定性試験へのブラケッティング法及びマトリキシング法の適用に関するガイドライン」（VICH GL45)に記載されている。

（２）ガイドライン

ア　一般的な原理

正式な安定性試験は、親ガイドラインに記載された原理に従って計画し、実施する。安定性試験の目的は、3 ロット以上の原薬又は製剤について行う試験によって、将来にわたって同じ状況で製造、包装される全てのロットに適用できるリテスト期間又は有効期間、さらに、貯蔵方法のラベル表示を設定することである。個々のロットの変動の度合いによっては、将来、生産されるロットがリテスト期間又は有効期間を通じて判定基準内に留まると確信できなくなる。

製造や分析時に、正常な範囲内での変動が起こりうるが、出荷判定時に含量が表示量の 100 %になるように処方することが重要である。承認申請資料に用いられるロットの含量が製造と分析の変動を考慮した結果、出荷判定時に表示量の 100 %より高くなる場合には、申請において提示する有効期間として長すぎる有効期間を推定しかねない。一方、ロットの含量が出荷判定時に表示量の 100 %より低い場合には、提示した有効期間より前に判定基準の下限以下になる可能性がある。

安定性に関する情報は、系統的に記載し、評価しなければならない。安定性に関する情報には、ある剤形に特殊な項目（例えば、経口固形製剤については溶出速度）に関するものも含めて、必要に応じて物理的、化学的、生物学的及び微生物学的試験結果を入れる。物質収支の妥当性を評価し、物質収支が明らかに合わない場合には、その原因となる要因を考察しなければならない（例えば、分解機構、分析方法の安定性評価への適用性、さらに分析方法自体の変動性など。）。

安定性データ評価の基本的な考え方は、単一要因の試験、複数要因の試験を問わず、また、全数試験、減数試験を問わず、いずれも同じである。正式な安定性試験のデータ及び必要なら参考資料を評価して、原薬又は製剤の品質及び性能に影響を与えやすい重要な品質項目を決める。各項目は別々に評価し、それぞれの評価結果に基づいてリテスト期間又は有効期間を提示するために全体的な評価を行う。リテスト期間又は有効期間は、個々の項目に対して予測した期間を超えて提示してはならない。

（３）の付録 A のフローチャートに、リテスト期間又は有効期間を提示するために、安定性データ評価を段階的に進める方法及びどの程度の外挿を考慮できるかについての概略を示す。（３）の付録 B には①複数要因の全数試験又は減数試験から得られた定量的な試験項目の長期データをいかに解析するかに関する情報、②リテスト期間又は有効期間を推定する際の回帰分析の適用方法に関する情報、③異なるロット又は異なる他の要因から得たデータを一括して評価できるか否かを判断するための統計的方法の例を示す。その他の指針はリスト化された参考文献にある。しかし、記載された統計的方法の例及び参考文献は適用可能な統計的方法を網羅しているわけではない。

一般的に、原薬又は製剤のある種の定量的な化学的項目（例えば、含量、分解生成物、保存剤含量）は、長期保存において、ゼロ次速度論に従うと仮定することができる [1]。したがって、これらの項目のデータには、直線回帰

及び一括して評価できるかどうかに関する検定など（３）の付録Ｂに示されている統計解析を適用することができる。他の定量的な項目（例えば、pH、溶出）の速度論は一般に明らかではないが、適当であれば、同じ統計解析を適用することができる。定性的な項目や微生物学的項目はこの種の統計解析を適用することはできない。

本ガイドラインは、統計的に評価することが必要でないとみなせる場合にも統計的評価を行うことを推奨するわけではない。しかし、統計解析は、リテスト期間又は有効期間の外挿をサポートする際に有用な場合もあり、また、リテスト期間又は有効期間を検証するために要求される場合もある。

イ　データの記載

申請の際には、全項目のデータを適切なフォーマット（例えば、表、図、記述）で示し、これらのデータについての評価を加える。定量的な試験項目の値は、全時点の実測値で報告する（例えば、含量は表示量に対する％として。）。統計解析を実施する場合、用いる手順及びモデルの基礎をなす仮定を記載し、それらの妥当性を示す。統計解析結果を要約した表及び／又は長期データの図を含める。

ウ　外挿

外挿とは、既知のデータセットを用いて、将来のデータに関する情報を推論することである。特に加速条件で「明確な品質の変化」が認められない場合には、長期データがカバーする期間を超えてリテスト期間又は有効期間を延長するための外挿を申請時に提案できる。安定性データの外挿が適切かどうかは、変化のパターンに関する理解度、数学モデルの適合度及び関連する参考資料の存在によって決まる。外挿は、延長されたリテスト期間又は有効期間が出荷判定基準に近い試験結果で出荷される将来のロットに対しても適用できるように行う。

安定性データの外挿では、長期データがカバーする期間を超えても同じ変化のパターンが継続することが仮定されている。外挿を行おうとする場合には、仮定した変化のパターンが正しいことが非常に重要である。長期データにフィットする回帰直線又は曲線を推定するときは、仮定した変化のパターンが正しいかどうかをデータそのものによってチェックでき、さらに、仮定した直線又は曲線へのデータの適合度を統計的方法によって検定することができるが、長期データがカバーする期間を超えて回帰する場合にはそのようなチェックを行うことができない。したがって、外挿に基づいて得たリテスト期間又は有効期間は、長期保存試験の追加のデータが得られ次第、それらのデータによって常に検証しなければならない。コミットメントロットのプロトコールには、外挿して求めたリテスト期間又は有効期間の終点に相当する測定時点を含めるようにする。

エ　「室温」保存の原薬又は製剤のリテスト期間又は有効期間推定のためのデータ評価

正式な安定性試験から得たデータの評価は、本項に示すように系統的に行

う。各項目の安定性データは、逐次的に評価する。「室温」保存の原薬又は製剤についての評価は、加速条件、必要なら中間的条件で「明確な品質の変化」が認められるか否かの評価からはじまり、長期データが変化の傾向や変動を示すかどうかの評価へと進める。長期データがカバーする期間を超えたリテスト期間又は有効期間の外挿が適切であるとみなせる条件について記述されている。参考としてフローチャートを（３）の付録Ａに示す。

（ア）加速条件で「明確な品質の変化」を認めない場合

加速条件で「明確な品質の変化」を認めない場合、リテスト期間又は有効期間の設定は長期保存試験及び加速試験データの性格によることになる。

ａ　長期データ及び加速データが経時的な変化及び変動をほとんど示さない場合

ある項目の長期データ及び加速データが経時的な変化及び変動をほとんど示さない場合には、原薬又は製剤が提示したリテスト期間又は有効期間にわたって、その項目の判定基準内に十分留まることは明白であると考えられる。このような状況では、通常、統計解析を行う必要はないと考えられるが、統計解析を省略することの妥当性を示さなければならない。妥当であるとみなす根拠としては、変化がみられるかどうか、変化がみられる場合にはそのパターン、加速データとの関連、物質収支などについての議論及び／又は親ガイドラインに定義されている参考資料等がある。長期データがカバーする期間を超えたリテスト期間又は有効期間の外挿を提示することができる。長期データがカバーする期間の 2 倍までのリテスト期間又は有効期間を提示できるが、長期データがカバーする期間より 12 か月を超えてはならない。

ｂ　長期データ又は加速データが経時的な変化及び／又は変動を示す場合

ある項目の長期データ又は加速データが経時的な変化を示す場合及び／又は要因内又は要因間変動を示す場合には、長期データの統計解析がリテスト期間又は有効期間を設定する上で有用である。ロット間又は他の要因間（例えば、含量、容器サイズ及び／又は容れ目）、あるいは要因の組合せ（例えば、容器サイズ及び／又は容れ目ごとの含量）の間に安定性に差があり、データを一括できない場合には、リテスト期間又は有効期間として、最も安定性の悪いロット、要因又は要因の組合せの期間を超えて提示してはならない。あるいは、ある要因（例えば、含量）に差が起因することが明らかな場合は、その要因内の他の水準（例えば、他の含量違い）に対して異なる有効期間を割り当てることができる。差を生じる原因を検討し、そのような差が製品に及ぼす全体的な意味合いについて考察する。長期データがカバーする期間を超えて外挿することはできるが、外挿の程度は、その項目の長期データに統計解析を適用できるか否かによって決まる。

(a) 統計解析を適用できないデータ

長期データに統計解析を適用できない場合でも、関連する参考資料がある場合には、長期データがカバーする期間の 1.5 倍までのリテスト期間又は有効期間を提示できるが、長期データがカバーする期間より 6 か月を超えてはならない。関連する参考資料とは、①基準ロットに近い処方で製造された開発ロット、②基準ロットよりも小さなスケールで製造された開発ロット、③基準ロットと類似の容器施栓系で包装された開発ロットで得られた十分長期のデータをいう。

(b) 統計解析を適用できるデータ

長期データに統計解析を適用できるが､統計解析を実施しない場合、外挿の程度は、統計解析を適用できないデータの場合と同じである。一方、統計解析を実施し、その統計解析の結果及び関連する参考資料で裏付けられる場合は、長期データがカバーする期間の 2 倍までのリテスト期間又は有効期間を提示できるが、長期データがカバーする期間より 12 か月を超えてはならない。

(イ) 加速条件で「明確な品質の変化」が認められる場合

加速条件で「明確な品質の変化」*が認められる場合、リテスト期間又は有効期間は、中間的試験及び長期保存試験の結果によることになる。

*注：以下に示すような物理的な変化は、加速条件において認められることがあるが、他の項目に「明確な品質の変化」がない場合には、これらは中間的試験が要求される「明確な品質の変化」とはみなされない。

・融点が明確に示されている場合に、37 ℃で溶けるよう設計された坐剤の軟化

・「明確な品質の変化」の原因が架橋によることが明らかである場合に、ゼラチンカプセル又はゲルコーティング錠の 12 個に対して溶出が判定基準を満たさないこと。

しかし、加速条件で半固形製剤が相分離を起こす場合は、中間的試験を行わなければならない。さらに、他の項目に「明確な品質の変化」がないことを確認する際には、他の項目がこれらの物理的な変化の影響を受ける可能性についても考慮しなければならない。

a 中間的条件で「明確な品質の変化」が認められない場合

中間的条件で「明確な品質の変化」が認められない場合、長期データがカバーする期間を超える外挿を提示できる。しかし、外挿の程度は、その項目の長期データに統計解析を適用できるか否かによる。

(a) 統計解析を適用できないデータ

ある項目の長期データが統計解析を適用できない場合、関連する参考資料により裏付けられるなら、リテスト期間又は有効期間を長期データがカバーする期間を超えて提示できるが、3 か月を超えてはならない。

(b) 統計解析を適用できるデータ

統計解析を適用できる項目の長期データについて統計解析を実施し

ない場合には、外挿の程度は統計解析を適用できないデータの時と同じである。一方、統計解析を実施し、その結果及び関連する参考資料によって裏付けられる場合は、長期データがカバーする期間の 1.5 倍までのリテスト期間又は有効期間を提示できるが、長期データがカバーする期間より 6 か月を超えてはならない。

b　中間的条件で「明確な品質の変化」が認められた場合

中間的条件で「明確な品質の変化」が認められた場合には、長期データがカバーする期間を超えるリテスト期間又は有効期間を提示してはならない。また、長期データがカバーする期間より短いリテスト期間又は有効期間を要求されることもある。

オ　「室温」以下で保存の原薬又は製剤のリテスト期間又は有効期間推定のためのデータ評価

（ア）冷蔵庫保存の原薬又は製剤

冷蔵庫保存の原薬又は製剤から得られたデータは、「室温」保存の原薬又は製剤に関する（２）のエと同じ原理に従って評価する。ただし、以下の項に明確に記載されている場合はこの限りでない。参考として、（３）の付録 A のフローチャートを利用できる。

a　加速条件で「明確な品質の変化」が認められない場合

加速条件で「明確な品質の変化」が認められない場合、（２）のエの（ア）に概説する原理に基づき、長期データがカバーする期間を超えるリテスト期間又は有効期間を提示することができる。ただし、外挿の範囲は、「室温」保存の原薬又は製剤の場合より限定される。

長期データ及び加速データが経時的な変化及び変動をほとんど示さない場合には、通常、統計解析の裏付けがなくても、長期データがカバーする期間の 1.5 倍までのリテスト期間又は有効期間を提示できるが、長期データがカバーする期間より 6 か月を超えてはならない。

長期データ又は加速データが経時的な変化及び／又は変動を示す場合で、①長期データが統計解析を適用できるが統計解析を行わない場合、又は②長期データが統計解析を適用できないが関連する参考資料により裏付けられる場合には、長期データがカバーする期間を超えるリテスト期間又は有効期間を提示できるが、長期データがカバーする期間より 3 か月を超えてはならない。

長期データ又は加速データが経時的な変化及び／又は変動を示す場合で、①統計解析を適用できる長期データについて統計解析を行い、かつ②解析結果並びに関連する参考資料により裏付けられる場合には、長期データがカバーする期間の 1.5 倍までのリテスト期間又は有効期間を提示できるが、長期データがカバーする期間より 6 か月を超えてはならない。

b　加速条件で「明確な品質の変化」が認められる場合

加速条件において、測定開始後 3 か月から 6 か月までの間に「明確な

品質の変化」が認められた場合、リテスト期間又は有効期間は、長期データに基づいて提示する。外挿は適切でないとみなされる。さらに、長期データがカバーする期間より短いリテスト期間又は有効期間を要求されることもある。長期データが変動を示す場合は、リテスト期間又は有効期間を統計解析によって検証することが適切である。

加速条件において、測定開始後 3 か月以内に「明確な品質の変化」が認められた場合は、リテスト期間又は有効期間は長期データに基づいて提示する。外挿は適切でないとみなされる。長期データがカバーする期間より短いリテスト期間又は有効期間を要求されることもある。長期データが変動を示す場合は、リテスト期間又は有効期間を統計解析によって検証することが適切である。さらに、輸送中や取扱い中等においてラベルに表示される貯蔵方法から短期的に逸脱した場合の影響を考察しなければならない。必要に応じて、原薬又は製剤の１ロットにつき加速条件で 3 か月より短い期間で追加試験を行うことにより考察することもできる。

（イ）冷凍庫保存の原薬又は製剤

冷凍庫保存の原薬又は製剤については、リテスト期間又は有効期間は長期データに基づいて提示する。冷凍庫保存の原薬又は製剤についての加速保存条件はないので、上昇させた温度（例えば、5 ℃± 3 ℃又は 25 ℃± 2 ℃）で適切な期間にわたる試験を１ロットについて実施し、輸送中や取扱い中等においてラベルに表示される貯蔵方法から短期的に逸脱した場合の影響を説明する。

（ウ）－ 20 ℃以下で保存される原薬又は製剤

－ 20 ℃以下で保存される原薬又は製剤については、リテスト期間又は有効期間は長期データに基づいて提示しなければならず、事例毎に適切な方法で評価する。

カ　一般的な統計的方法

統計解析が適用できる場合には、新規申請における長期保存試験データを適切な統計的方法を用いて解析しなければならない。この解析は、将来同じように製造され、包装され、貯蔵される全てのロットについて、ある定量的な項目が判定基準内にとどまる期間をリテスト期間又は有効期間として高い信頼性において設定することが目的である。

経時的な変化及び／又は変動がみられた長期データを評価するために統計解析を適用した場合には、最初に承認されたリテスト期間又は有効期間を検証又は延長するためのコミットメントロットのデータ解析にも同じ統計的方法を適用する。

定量的な項目の安定性データを評価し、リテスト期間又は有効期間を設定するには、回帰分析が適切な方法である。直線回帰分析のためにデータを変換する必要があるかどうかは、項目と時間の関係の形によって決まる。その関係は、算術目盛又は対数目盛で直線又は非線形関数によって表される。と

きには、非線形回帰の方が真の関係をより適切に表す場合がある。

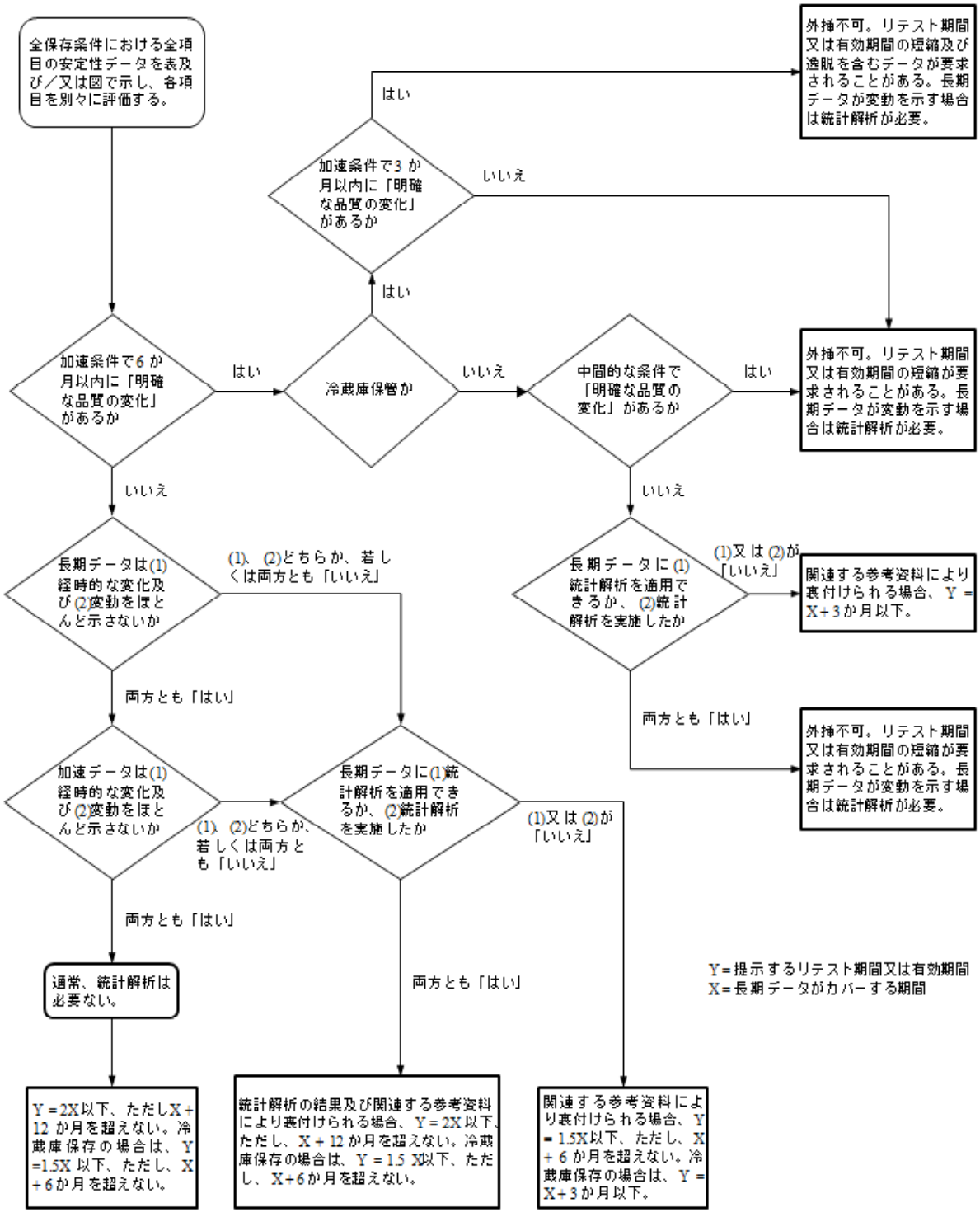
リテスト期間又は有効期間を推定するための適切な方法は、定量的な項目(例えば、含量、分解物)を分析して、母平均の 95 %信頼限界が判定基準と交差する最も早い時間を決定することである。

経時的に減少することが既知の項目については、下方の片側 95 %信頼限界を判定基準と比較する。経時的に増加することが分かっている項目については、上方の片側 95 %信頼限界を判定基準と比較する。増加も減少もできる項目や、変化の方向が分からない項目については、両側 95 %信頼限界を計算し、判定基準の上限及び下限と比較する。

データ解析に用いる統計的方法は、リテスト期間又は有効期間の推定値の統計的推論を適切に行えるよう安定性試験の計画を考慮した方法でなければならない。単一ロットのリテスト期間又は有効期間及び統計的検定を適切に行った後に一括される複数のロットのリテスト期間又は有効期間を推定するために、上記の方法を使用できる。単一又は複数要因の全数試験又は減数試験による安定性データを解析するための統計的方法の例を（３）の付録 B に記載する。現時点での参考文献を（３）の付録 B のカに示す。

（３）付録

付録 A：原薬又は製剤のリテスト期間又は有効期間の推定のためのデータ評価のフローチャート（冷凍庫で保存される製剤を除く）



付録 B：安定性データ解析の統計的方法の例

以下に記載する直線回帰、一括評価に関する検定及び統計モデルの構築は、定量的な項目（統計解析が適用でき、判定基準のあるもの）の安定性データの解析に利

用できる統計的方法及び手順の例である。

ア　単一ロットのデータ解析

一般的に、項目と時間の関係は直線であると仮定できる[1]。図１は、判定基準の上限及び下限がそれぞれラベル表示の 105 %及び 95 %である製剤について、12 か月の長期データで 24 か月の有効期間を申請する場合の含量の回帰直線を示す。この例では、含量が経時的に増加するか減少するか前もって分からないため、母平均の両側 95 %信頼限界を適用する(例えば、半透過性容器に包装された水性基材の製剤の場合)。下側 95 %信頼限界は、30 か月において判定基準の下限と交差する。一方、上側信頼限界は、30 か月より以前には判定基準の上限と交差することはない。したがって、（２）のエ及び（２）のオの記載に従えば、24 か月までの有効期間が含量の統計解析によって裏付けられる。

判定基準が上限あるいは下限のいずれか一方のみの項目についてデータを解析する場合には、対応する側の母平均の片側 95 %信頼限界が推奨される。図２は 12 か月の長期データで 24 か月の有効期間を申請する製剤の分解生成物の回帰直線であり、判定基準は 1.4 %以下の場合である。母平均についての上方の片側 95 %信頼限界は、31 か月において判定基準と交差する。したがって、（２）のエ及び（２）のオの記載に従えば、24 か月の有効期間が分解生成物データの統計解析によって裏付けられる。

上記の方法を用いれば、定量的な項目（例えば、含量、分解生成物）の母平均は、95 %の信頼水準でリテスト期間又は有効期間の最後まで判定基準内に留まると予想できる。

上記の方法を用いて、単一ロット、複数のロットがある場合の個々のロット又は以下のイからオまでに記載された適切な統計的検定後に一括する場合の複数のロットについてのリテスト期間又は有効期間を推定できる。

イ　単一要因の全数試験におけるデータ解析

単一含量及び単一容器サイズ及び／又は容れ目で供される原薬又は製剤について、リテスト期間又は有効期間は、一般的に 3 ロット以上から得た安定性データに基づいて推定する。このようなロットのみを単一要因とする全数試験のデータを解析する際には、2 通りの統計的取組方がある。

- 第一の取組方は、全てのロットのデータが提示するリテスト期間又は有効期間を支持するか否かを判断するために行う。
- 第二の取組方、すなわち一括評価に関する検定は、異なるロットに由来するデータを一括して、全体に対して単一のリテスト期間又は有効期間を推定できるか否かを判断するために行う。

（ア）全てのロットが提示したリテスト期間又は有効期間を支持するか否かの評価

本方法は、全てのロットから推定したリテスト期間又は有効期間が、提示したリテスト期間又は有効期間より長いか否かを評価するために行う。まず、個々のロットのリテスト期間又は有効期間を、個々の縦軸切片、個

々の傾き及び全てのデータから計算した平均二乗誤差を用いて、（３）の付録Ｂのアに記載された手順に従って推定する。各ロットのリテスト期間又は有効期間の推定値が提示したものより長い場合には、一般的に、（２）のエ及び（２）のオの外挿に関する指針に従えば、提示したリテスト期間又は有効期間は適切であると考えられる。ここでは一般的に、一括評価に関する検定を実施したり、最減数モデルを確認する必要はない。しかし、提示した期間より短いリテスト期間又は有効期間が一つでも推定された場合は、一括評価に関する検定を実施することによって、ロットを一括し、より長いリテスト期間又は有効期間を推定することができるか否かを判断できる。

また、上記方法は、以下の（イ）に記載された一括評価に関する検定のプロセスで使うこともできる。ロットの回帰直線が共通の傾きを持ち、共通の傾きと個々の縦軸切片に基づいて推定したリテスト期間又は有効期間が提示したリテスト期間又は有効期間よりも長い場合には、一般的に、一括評価が可能であるか否かについて縦軸切片の検定を継続する必要はない。

（イ）ロットの一括評価に関する検定

ａ　共分散分析

リテスト期間又は有効期間を推定するために幾つかのロット由来のデータを一括する前に、予備的な統計的検定を実施して、異なるロットの回帰直線の傾きと時間ゼロ時の縦軸切片が共通であるかどうかを判断する。時間を共変量とみなす共分散分析（ANCOVA）によってロット間の回帰直線の傾き及び縦軸切片の差を検定できる。通常、正式な安定性試験では検体サイズが比較的小さく、検出力が低いことが予想されるので、それを補償するために、有意水準は 0.25 として各検定を行う。

傾きが等しいとする仮説が検定で棄却された場合（すなわち、ロット間に傾きの有意差が存在する場合）、全ロットのデータを一括することは不適切とみなされる。安定性試験を行っている個々のロットのリテスト期間又は有効期間は、個々の縦軸切片及び個々の傾き並びに全てのロットから計算した平均二乗誤差を用いて、（３）の付録 B のアに記載された方法を適用して推定することができる。全ロットのリテスト期間又は有効期間として、個々のロットの推定値のうち最も短いものを選ぶ。

縦軸切片が等しいとする仮説が検定で棄却されるが、傾きが等しいことを棄却できない場合（すなわち、ロット間で縦軸切片には有意差があるが、傾きには有意差がない場合）、データを一括して共通の傾きを求めることができる。安定性試験における個々のロットに対するリテスト期間又は有効期間は、共通の傾き及び個々の縦軸切片を用いて（３）の付録Ｂのアに記載された方法を適用して推定する。全ロットのリテスト期間又は有効期間として、個々のロットの推定値のうち最も短いものを選ぶ。

傾きが等しいとする仮説及び縦軸切片が等しいとする仮説が有意水準 0.25 で棄却されない場合（すなわち、ロット間で傾き及び縦軸切片に有意差がない場合)、全ロットのデータを一括して評価できる。（３）の付録Ｂのアに記載された方法によって一括したデータから単一のリテスト期間又は有効期間を推定し、それを全ロットに適用できる。ロットを一括することによってデータ量が増加するに従って母平均の信頼限界の幅が狭くなるので、通常、一括したデータから推定したリテスト期間又は有効期間は、個々のロットから求めたものよりも長くなる。

上記の一括評価に関する検定は、縦軸切片の項の前に傾きの項を検定するように適切な順番で実施する。項の数を最も減らしたモデル（最減数モデル）（すなわち、個々の傾きをもつモデル、個々の縦軸切片で共通の傾きをもつモデル又は共通の縦軸切片と共通の傾きをもつモデルのうち、適宜）を選んでリテスト期間又は有効期間を推定する。

b　その他の方法

上に記載した以外の統計的手順 [2-6] を用いてリテスト期間又は有効期間を推定することもできる。例えば、ロット間で傾きや平均リテスト期間又は平均有効期間の差としてどの程度許容できるかを前もって決めることができる場合には、傾きや平均リテスト期間又は平均有効期間の同等性を評価するための適切な手順を用いてデータの一括評価の可能性を判断できる。しかし、このような手順については前もって定義し、評価し、その妥当性を示さなければならない。さらに、必要に応じて規制当局と相談しなければならない。適用できる場合は、選択した代替法の統計的特性が適切であることを明らかにするために、シミュレーションによる検討が有用なこともある [7]。

ウ　複数要因の全数試験におけるデータ解析

複数要因の全数試験では、製剤の異なる要因の組合せ間である程度安定性が異なる可能性がある。このようなデータを解析する際には、2 通りの取組方が考えられる。

・第一の取組方は、全ての要因の組合せから得られたデータが提示する有効期間を支持するか否かを判断するために行う。
・二番目の取組方、すなわち一括評価に関する検定は、異なる要因の組合せから求めたデータを一括して、全体に対して単一の有効期間を推定できるか否かを判断するために行う。

（ア）全ての要因の組合せが提示する有効期間を支持するか否かの評価

本方法は、全ての要因の組合せから推定した有効期間が、提示する有効期間より長いか否かを評価するために行う。（３）付録Ｂのウの（イ）のｂの（a）に記載するように、統計的モデルを構築して各要因及び要因の組合せの各水準の有効期間を推定する。

最初のモデルにより推定した全ての有効期間の推定値が提示した有効期間より長い場合は、それ以上モデルを構築しなおす必要はないとみなされ、

（２）のエ及び（２）のオの指針に従う限り、一般的に、提示した有効期間は適切であると考えられる。有効期間の推定値のうち提示した有効期間より短いものがある場合は、（３）付録Ｂのウの（イ）のｂの（a）に記載するようにモデルを再構築することができる。しかし、一般的に最終モデルを確認しないでも、データが提示する有効期間を支持するか否か評価することができる。有効期間は、モデル構築過程の各段階で推定することができ、いずれの段階においても全ての有効期間が提示したものより長い場合には、それ以上モデルを縮小する試みは必要でないとみなされる。

この方法によって、複雑な複数要因の安定性試験のデータ解析を（３）付録 B のウの（イ）のｂの（a）に記載するデータ解析に比べて簡単に行うことができる。

（イ）一括評価に関する検定

一括評価に関する統計的検定によって裏付けられない限り、異なる要因の組合せから求めた安定性データを一括して評価することはできない。

ａ　ロット要因のみについての一括評価に関する検定

各要因の組合せを別々に検討する場合は、安定性データはロットについてのみ一括評価に関する検定を行うことができ、ロット以外の要因の組合せの有効期間は、（３）付録 B のイに記載された手順を用いて別々に推定することができる。例えば、2 種類の含量及び 4 種類の容器サイズがある製剤については、2 × 4 の含量－サイズの組合せから得られた 8 セットのデータを解析し、8 つの別々の有効期間を推定する。単一の有効期間が望ましい場合は、全ての要因の組合せのうち最も短い有効期間の推定値が当該製品の有効期間となる。しかし、この方法は全ての要因の組合せから得られたデータを利用していないので、一般的に（３）付録 B のウの（イ）のｂの（a）の方法で得られるものより短い有効期間が得られる。

ｂ　全要因及び要因の組合せについての一括評価に関する検定

全要因及び要因の組合せの一括評価について安定性データを検定し、その結果がデータを一括評価できることを示す場合には、一般に、個々の要因の組合せについて推定した有効期間より長い単一の有効期間を得ることができる。ロット、含量、容器サイズ及び／又は容れ目等を一括することによってデータ量が増加するに従って、母平均の信頼限界の幅は狭くなるので、得られる有効期間は長くなる。

(a) 共分散分析

共分散分析によって、要因及び要因の組合せ間の回帰直線の傾きと縦軸切片の差を検定することができる[7, 8]。この方法は、複数の要因の組合せから得られたデータを一括して単一の有効期間を推定できるか否かを判断するための方法である。

統計的フルモデルには、全ての主効果及び交互作用の縦軸切片及び傾きの項並びに測定のランダム誤差を反映する項が含まれなければな

らない。高次の交互作用が極めて小さいことが正当化される場合は、一般的にモデルにこれらの項を含める必要はない。最初の測定時点の分析結果が包装前の最終剤形から得られた場合は、分析結果は種々の容器サイズ及び／又は容れ目間で共通であるので、容器の縦軸切片項をフルモデルから削除できる。

要因及び要因の組合せ間に統計的な有意差があるか否かを判断するために、一括評価に関する検定の方法を特定する。一般的に、一括評価に関する検定は、傾きの項を縦軸切片の項より前に、また、交互作用を主効果の前に検定するように、適切な順番で実施する。例えば、高次交互作用の傾きの項から検定を開始し、次に縦軸切片の項を検定し、さらに単純な主効果の傾きの項、そして縦軸切片の項へと進むべきである。全ての残りの項が統計的に有意であることが明らかな場合に得られる最減数モデルを利用して有効期間を推定することができる。

全ての検定は適切な有意水準を用いて行う。ロットが関わる項には 0.25 の有意水準を用い、ロットが関わらない項には 0.05 の有意水準を用いることが推奨される。一括評価に関する検定によって、異なる要因の組合せから求めたデータを一括評価できることが示された場合には、一括したデータを用いて（３）付録 B のアに記載された手順に従って有効期間を推定できる。

一括評価に関する検定によって特定の要因又は要因の組合せから得たデータを一括すべきではないと示された場合には、次の 2 つのうちいずれかを適用できる。①モデルに残っている要因及び要因の組合せの各水準に対し、別々の有効期間を推定する。又は②モデルに残っている要因及び要因の組合せの全水準のうち最も短い有効期間の推定値に基づいて、単一の有効期間を推定する。

(b) その他の方法

上に記載した以外の統計的手順[2-6]も適用することができる。例えば、傾き又は平均有効期間の同等性を評価するための適切な手順を用いて、データの一括評価の可能性を判断できる。しかし、このような手順については前もって定義し、評価し、その妥当性を示さなければならない。さらに、必要に応じて規制当局と相談しなければならない。適用できる場合は、選択した代替法の統計的特性が適切であることを明らかにするために、シミュレーションによる検討が有用なこともある[7]。

エ　ブラケッティング法のデータ解析

ブラケッティング法で得られた安定性データの解析にも、（３）付録 B のウに記載した統計的手順が適用できる。例えば、3 種類の含量（S1、S2 及び S3）及び 3 種類の容器サイズ（P1、P2 及び P3）があり、容器サイズの両極端（P1 及び P3）のみを試験するブラケッティング法に従って試験された製剤につ

いては、3 × 2 の含量－サイズの組合せから 6 組のデータが得られる。そのデータは、6 つの組合せのそれぞれについて、（３）付録 B のウの（イ）の a に従って別々に解析し、有効期間を推定するか又は（３）付録 B のウの（イ）の b に従って一括評価に関する検定を行ってから有効期間を推定することができる。

ブラケッティング法では、中間の含量又はサイズの安定性は両極端の安定性で表されることを仮定している。統計解析の結果、両極端の含量又はサイズの安定性が異なることが示された場合は、中間の含量又はサイズは最も安定性の低い両極端のものより安定であるとみなしてはならない。例えば、上記のブラケッティング法の P1 が P3 より安定性が低いことが分かったときは、P2 の有効期間は P1 の有効期間を超えてはならない。P1 と P3 間の内挿を行うことはできない。

オ　マトリキシング法のデータ解析

マトリキシング法では、ある特定の測定時点で全検体の一部だけを試験する。したがって、有効期間の推定に影響を与える可能性のある全ての要因及び要因の組合せが適切に試験されているかどうかを確かめることが重要である。試験結果の解釈及び有効期間の推定を合理的に行うためには、一定の仮定をし、それを正当化することが必要である。例えば、試験した検体の安定性が全検体の安定性を表すという仮定が正しくなければならない。さらに、試験のバランスがとれていない場合には、一部の要因や要因間交互作用を推定することができないことがある。さらに、要因の組合せの異なる水準を一括評価できるようにするには、より高次の要因間交互作用は無視できると仮定しなければならない。より高次の項が無視できるという仮定を統計的に検定することは、通常不可能なので、マトリキシング法は、これらの交互作用が極めて小さいと仮定することが参考資料から妥当と考えられる場合にのみ適用することができる。

（３）付録 B のウに記載した統計的手順を、マトリキシング法で得られた安定性データの解析に適用できる。統計解析では、使用する手順と仮定を明確に示さなければならない。例えば、モデルの基礎をなす仮定、すなわち交互作用の項を無視できるという仮定を述べなければならない。モデルから要因間交互作用を除くために予備的な検定を実施する場合は、用いる手順を示し、その正当性を示す。有効期間の推定に用いた最終モデルを記載する。モデルに残っている項のそれぞれについて、有効期間の推定を行う。マトリキシング法を使うことによって、全数試験のときより短い有効期間の推定値が得られることがある。

一つの試験にブラケッティング法とマトリキシング法を組み合せる場合には、（３）付録 B のウに記載した統計的手順が適用される。

カ　参考文献

1. Carstensen, J.T., ″Stability and Dating of Solid Dosage Forms″ Pharmaceutics of Solids and Solid Dosage Forms, Wiley-Interscience,

182-185, 1977
2. Ruberg, S.J. and Stegeman, J.W., "Pooling Data for Stability Studies: Testing the Equality of Batch Degradation Slopes" Biometrics, 47:1059-1069, 1991
3. Ruberg, S.J. and Hsu, J.C., "Multiple Comparison Procedures for Pooling Batches in Stability Studies" Technometrics, 34:465-472, 1992
4. Shao, J. and Chow, S.C., "Statistical Inference in Stability Analysis" Biometrics, 50:753-763, 1994
5. Murphy, J.R. and Weisman, D., "Using Random Slopes for Estimating Shelf-life" Proceedings of American Statistical Association of the Biopharmaceutical Section, 196-200, 1990
6. Yoshioka, S., Aso, Y, and Kojima, S., "Assessment of Shelf-life Equivalence of Pharmaceutical Products" Chem. Pharm. Bull., 45:1482-1484, 1997
7. Chen, J.J., Ahn, H., and Tsong, Y., "Shelf-life Estimation for Multifactor Stability Studies" Drug Inf. Journal, 31:573-587, 1997
8. Fairweather, W., Lin, T.D., and Kelly, R., "Regulatory, Design, and Analysis Aspects of Complex Stability Studies" J. Pharm. Sci., 84:1322-1326, 1995

キ　図

図１

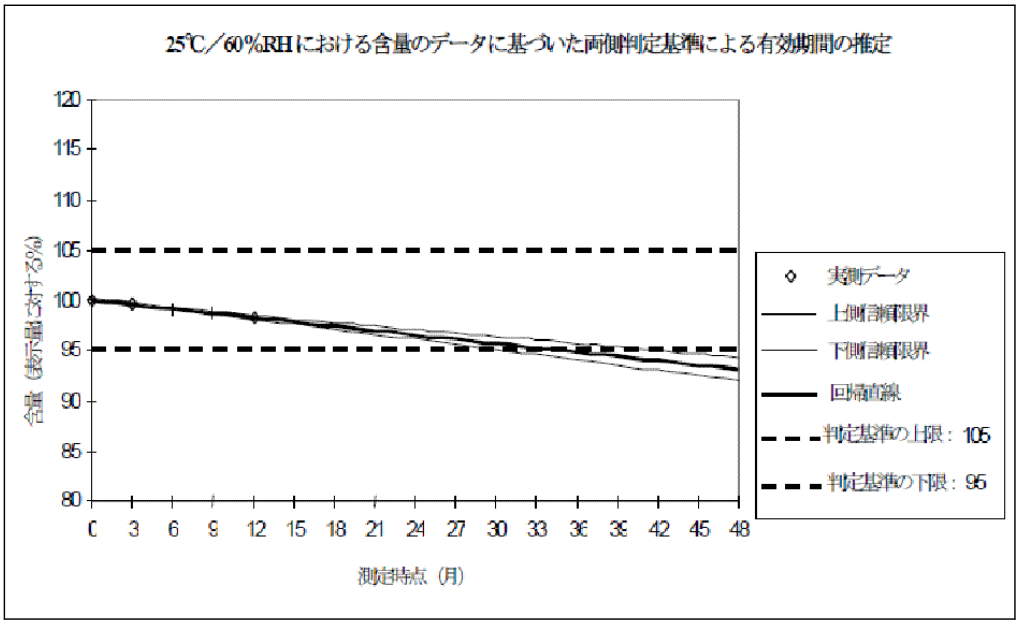
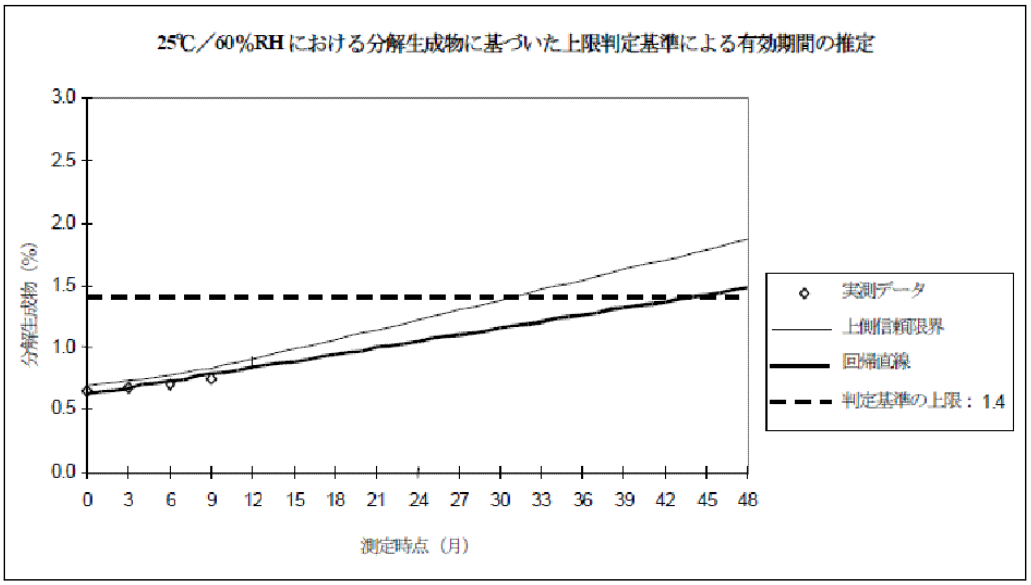


図２


25℃／60%RHにおける分解生成物に基づいた上限判定基準による有効期間の推定
分解生成物（%）
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
36
39
42
45
48
測定時点（月）
実測データ
上側信頼限界
回帰直線
判定基準の上限：1.4

８－８　安定性に関する試験

（１）安定性に関する試験の添付資料の提出範囲

本ガイドラインにおいて提出するものとする安定性試験資料は、「８－１動物用新原薬及び製剤の安定性試験」（VICH GL3R）及びその付属文書（８－２～８－７）の試験資料をもって代えることができるものとする。

ア　「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて」（平成１２年３月３１日付け１２畜Ａ第７２９号農林水産省畜産局長通知。以下「局長通知」という。）の別紙３の別表第三及び別表第四の区分の３又は５に該当する医薬品（同区分の３に該当する医薬品にあっては、剤形が既に承認されているものと同類のもの以外のものに限る。）については、（２）のアの長期保存試験及びウの苛酷試験の試験成績を提出するものとする。

イ　局長通知第３の２別表第三及び別表第四の区分の７（安定性試験法ガイドライン８－１及び８－５が適用されるものを除く。）、８、９、10、11 又は 12（同区分の９、10、11 又は 12 に該当する生物学的製剤にあっては、菌（ウイルス）株、組成及び剤形が既に承認されているものと同類のもの以外のものに限る。）に該当する医薬品については、（２）のアの長期保存試験の試験成績を提出するものとする。

ウ　局長通知第３の２別表第三及び別表第四の区分の３、４、６、９、10、11、12 又は 13 に該当する医薬品（同区分の３に該当する医薬品にあっては剤形が、同区分の９、10、11 又は 12 に該当する生物学的製剤にあっては菌（ウイルス）株、組成及び剤形が既に承認されているものと同類のものに限る。）については、（２）のアの長期保存試験の試験成績を提出するものとするが、品質を短期間で推定するには不適当と判断される場合又は３年を超えて安定であることを確認しようとする場合を除き、（２）のイの加速試験の試験成績で差し支えないものとする。

エ　なお、局長通知第３の２別表第三及び別表第四の区分の２に該当する医薬品のうち、国内において人用として承認され、かつ再審査が終了しているものと同じ成分、組成、剤形（形状、容量及び重量を含む。）、規格（原料規格を含む。）、製造方法、貯法、容器及び有効期間が当該人用医薬品と同じ場合において、人用の製造販売承認申請で添付された製剤の安定性試験成績を用いることで差し支えないこととする（原薬の安定性試験を添付する必要はない。）。

ただし、人用医薬品と主剤が同一であっても、安定剤、賦形剤等の種類又は量が異なる場合、あるいは安定性が異なると考えられる場合は、安定性試験法ガイドライン８－１～８－７が適用される。

人用医薬品の安定性試験成績を添付する場合、当該資料の本文末尾等の余白部分に、人用医薬品の製造販売承認申請の際に使用された資料である旨の申請者等の陳述及び署名を記さなければならない。

オ　また、有効期間の欄に同期間として１年以上を設定し、承認申請を行う場

合にあっては、（２）のアの長期保存試験の途中であっても、１年以上の期間の試験成績をもって承認申請して差し支えない。この場合、申請者は承認申請書の参考事項の欄に安定性試験を継続中であることを記載し、承認時までにその後引き続き実施した試験の成績を提出することとする。

カ　また、有効期間の欄に同期間として１年以上を設定し、承認申請を行う場合にあっては、（２）のアの長期保存試験の途中であっても、１年以上（生物学的製剤の場合、試験開始時を含め３時点の安定性試験成績があれば、６か月以上）の期間の試験成績をもって承認申請して差し支えない。この場合、申請者は承認申請書の参考事項の欄に安定性試験を継続中であることを記載し、承認時までにその後引き続き実施した試験の成績を提出することとする。

なお、生物学的製剤において、同一の製造販売業者で製造販売し、再審査が終了している既承認製剤とその有効成分の種は同一で製造用株のみが異なり、その他の成分及び分量、及び製造方法が同一である製剤を既承認製剤を製造している製造業者で製造する場合、承認申請時に安定性試験成績の添付を要しないこととし、既承認製剤と同じ保存条件下において暫定的に既承認製剤と同じ有効期間を設定して差し支えないこととする。安定性試験成績は、承認後に提出することとし、暫定的に定めた有効期間が担保できない場合は、安定性が確認できる期間まで短縮することとする。

（２）安定性に関する試験方法

ア　長期保存試験

検体：原則として最終製品

ただし、安定性が保証できれば、分包品又は内袋品を用いて差し支えない。また、包装材質及び包装単位が複数ある場合は、その中で最も経時変化しやすいと推定される容量、材質及び包装単位のものを検体とする。

検体数：３ロット、１ロット１検体以上（注１）

測定の繰り返し回数：測定法の精度や再現性に基づき適切に決定する。（注２）

保存条件：室温（承認申請書に貯蔵方法として特別な条件を設定している場合には当該条件）

試験期間：承認申請する医薬品の有効期間、貯蔵方法、流通形態及び使用方法等を十分考慮に入れた期間とする。

測定時点：試験開始時、開始後２年目までは６か月を超えない範囲内で、その後は１年を超えない範囲内で定期的に行う。

測定項目：原則として承認申請書の規格及び検査方法欄に設定した全項目

ただし、経時的に変化しないことが明らかな項目については、期間の途中における測定を省略できる。

イ　加速試験

検体：原則として最終製品

ただし、安定性が保証できれば、分包品又は内袋品を用いて差し支

えない。また、包装材質及び包装単位が複数ある場合は、その中で最も経時変化しやすいと推定される容量、材質及び包装単位のものを検体とする。

検体数：３ロット、１ロット１検体以上

測定の繰り返し回数：測定法の精度や再現性に基づき適切に決定する。

保存条件：原則として 40 ℃± 2 ℃、75 % RH ± 5 %

ただし、水溶液剤又は密封容器の製品については、湿度条件を除外してよい。

試験期間：６か月間以上（事項変更承認申請の場合で変更前の最終製品と比較して試験する場合にあっては、３か月間以上）

測定時点：原則として試験開始時を含め４時点以上

測定項目：原則として承認申請書の規格及び検査方法欄に設定した全項目

ただし、経時的に変化しないことが明らかな項目については、期間の途中における測定を省略できる。

ウ　苛酷試験

検体：原則として最終製品から包装を除いたもの（局長通知第３の２別表第三及び別表第四の区分の１に該当する医薬品にあっては、原薬及び最終製品から包装を除いたもの）また、必要に応じて包装をした形態のものをあわせて用いる。

検体数：１ロット、１ロット１検体以上

保存条件：光、極端な温度変動や湿度変動及び凍結によって品質の変化が予想される製剤については、その影響を検出できる条件を設定する。

試験期間：原則として１か月間程度

測定時点：原則として試験開始時を含め４時点以上

測定項目：少なくとも承認申請書の規格及び検査方法欄に設定した全項目並びにその他分解生成物の検索及び品質管理上必要と判断される項目

ただし、経時的に変化しないことが明らかな項目については、期間の途中を省略できる。

（注１）検体とは、安定性試験を行うために選定したロットから採取し保存する原薬又は製剤をいう。

（注２）測定の繰り返し回数とは、各検体から測定用に試料を採取する段階から測定を実施、終了するまでの全過程を繰り返す回数をいう。

9　動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される毒性試験について、標準的な実施方法を示したものである。９－１は、食用に供する動物を対象とする動物用医薬品に適用し、動物用医薬品が残留する食品を摂取したヒトの安全性を確保するために実施する毒性試験の標準的な方法を定める。９－２は、食用に供する動物を対象としない動物用医薬品及び食用動物を対象とする動物用医薬品の急性毒性試験に適用する。

しかし、本来、全ての動物用医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的ではなく、また、試験の進展に応じて新たな実験を追加する必要が起こることも少なくない。したがって、得られた所見が臨床上の安全性評価に資することができるものである限り必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものでない。

９－１　ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験

（１）試験への一般的アプローチ（VICH GL33）

ア　緒言

（ア）目的

このガイドラインは、動物用医薬品を投与した動物に由来する食品を摂取したヒトにおける食品の安全性を確保するに当たっての試験へのアプローチを概説する。これらの試験は、試験に用いる動物の数を少なくし、かつ、資源を保護しながらヒト食品の安全性を確保するに十分な量の毒性学的データを提供するはずである。

VICH は、3R の原則に基づき、被験動物を最小とするよう努める。3R の原則とは、研究に使用する動物の代替（動物を使用しない試験系又はより生物系統発生的に低い種で代替する）、改善（動物の苦痛を減少又は消失させる）、及び削減（必要な試験動物数を削減する）である。VICH が表明する目標の一つは、動物用医薬品の承認のための規制の要求の調和を通じて不必要な試験及びその繰り返しをなくす努力をすることであり、製品の開発及び承認のために使用される動物数の減少に確かに通じる目標である。可能な限り、柔軟性、最少の動物数並びに *in vivo* 及び *in vitro* 代替試験が推奨される。

以下に推奨する試験を計画及び実施する際には、被験動物の福祉のためのしかるべき配慮がなされることが推奨される。以下に述べる試験における動物の使用は、これらのプロトコールに忠実に、一般的な倫理規範及び実験動物の使用と保護に関する国の基準に従ってなされるべきである。

代替試験のプロトコールのバリデーションは VICH に付託されていないが、VICH は、その国際的な地位と影響力がバリデートされた代替法の使用を奨励する独特の機会を提供することを認識している。この目的のために、動物実験を含むこれらのガイドラインを作成した安全性専門家作業部会は、動物福祉、特に動物試験の代替、改善、削減を考慮するという責務を果たす。

VICH は、バリデートされた代替試験法のプロトコールの開発を考慮に入れるために、ガイドラインを定期的に見直し、適切であれば、最近開発された代替試験法に合うようにガイドラインを改正する。

（イ）背景

残留動物用医薬品を含む食品の摂取に伴う危険性は、一般には動物用医薬品を投与した実験動物で評価される。試験要因の国際的調和は、価値の高い動物用医薬品の開発と登録を最大限の効率で達成されることを確実なものにすることを目指している。承認手続の効率化は、資源の消費、発見から新製品承認までの期間及び革新的薬剤の市場への導入に影響する。

動物用医薬品についての現行の毒性試験要件は、ヒト医薬品、食品添加物及び農薬の毒性学的試験に基づいている。このガイドラインは、動物用

医薬品に有害作用が観察されないレベル（no-observable adverse effect level；NOAEL、無毒性量）の識別に、特に関連する試験を示すものである。

ヒトの食品の安全性を評価する目的で行う試験の適切さは、ヒトにおける有害作用を予見する能力によって決まる。簡潔で適切な試験の選択が主要な懸念であり、広範囲な歴史的データの考察と広く受け入れられているプロトコールを再調査した後で、最少数の試験を基に要件は選定された。潜在的有害作用を識別する機会を増加させるため、この試験のアプローチにはげっ歯類と非げっ歯類モデルの両方が含まれている。ヒト腸内細菌叢に及ぼす影響試験のような追加試験は、化合物に特異的なエンドポイントを評価するのに使えるかもしれない。試験のアプローチは、有害作用をもたらす用量及び NOAEL として識別される用量を明らかにすることを意図している。NOAEL は、ヒトが生涯にわたって安全に摂取できる１日用量を表しているヒトの一日摂取許容量（acceptable daily intake；ADI）の設定に用いられる。

（ウ）適用範囲

このガイドラインの範囲は、１）ヒト食品中に存在する残留薬物の安全性を評価するに当たり、食用動物に使用される全ての新動物用医薬品に要求される基本的試験、２）その薬物の化学構造、系統、作用機序に関連する特定の毒性学的懸念に基づいて要求されるであろう追加試験、及び３）基本的試験又は追加試験で得られたデータの解釈を助けるであろう特殊試験を含んでいる。

基本的及び選択した追加試験についてのプロトコールの設計に関する指針は、別の VICH ガイドラインに規定される。特殊試験とその他の試験の選択及びプロトコール設計は、それぞれの規制当局及び／又はスポンサーの自由裁量とされることになろう。

イ　ガイドライン

試験には、全身毒性、生殖毒性、発生毒性、遺伝毒性、がん原性、及びヒト腸内細菌叢に及ぼす影響が含まれる。一般に、経口投与が *in　vivo* 試験での選択すべき経路である。このガイドラインは、どうしてこのようなデータを提出する必要がないかという科学的な理由を含めて、安全性を同等に保証するであろう代替アプローチの可能性を排除するものではない。

このガイドラインに記載されている試験は国内スタンダード及び／又は GLP 対応を受けるべきである。

（ア）基本的試験

①　反復投与毒性試験（VICH GL31 及び VICH GL37）

反復投与毒性試験は、ａ）その化合物及び／又はその代謝物に対する反復及び／又は蓄積ばく露による毒性作用、ｂ）ばく露の用量及び／又は期間と影響の出現率及び重度との関連性、ｃ）毒性及び生物応答を伴う用量、及びｄ）NOAEL を明らかにするために実施する。

②　生殖毒性試験（VICH GL22）

哺乳動物の生殖に及ぼすあらゆる影響を検出するために、多世代生殖試験が計画される。この試験には、雌雄の生殖能、交尾、受胎、着床、妊娠維持期間、分娩、哺乳、生存、出産から哺乳までの子の成長と発育、性的成熟及びその後の成熟動物としての子の生殖機能に及ぼす影響が含まれる。

③　発生毒性試験（VICH GL32）

発生毒性試験の目的は、着床から妊娠全期間を通して帝王切開前日までばく露した後の妊娠雌及び胚と胎子の発生に及ぼすあらゆる有害作用を検出することにある。このような有害作用には、非妊娠雌に観察される毒性に対応する毒性の増加、胚－胎子死、胎子成長の変化及び胎子の構造的変化が含まれる。

④　遺伝毒性試験（VICH GL23）

遺伝毒性試験の組合せは、細胞内の遺伝的情報損傷能を有する物質を識別するために用いられる。遺伝毒性があると考えられる物質は、潜在的がん原性物質とみなされる。初期胚細胞に遺伝的損傷をもたらす物質は、生殖／発生にも影響を及ぼす可能性がある。

（イ）追加試験

これらの試験は、化合物の構造、系統、作用機序に基づく安全性の懸念に対応するために要求される。これらの試験の例を以下に示す。

①　ヒト腸内細菌叢に及ぼす影響試験（VICH GL36）

抗菌活性のある化合物については、残留薬剤のヒト腸内細菌叢に及ぼす影響を明らかにするための情報が要求される。

②　薬理作用試験

一部の動物用医薬品は、毒性応答がなくとも、又は毒性を誘発するのに必要な容量よりも低い用量で薬理作用を引き起こす。薬理学的 NOAEL は識別され、薬剤の ADI 設定に取り入れられるべきである。

③　免疫毒性試験

β －ラクタム抗生物質のような一部の系統の薬剤については、感受性個体においてアレルギー反応を誘発する可能性を調査すべきである。その他の動物用医薬品についても、他の試験の成績が免疫学的ハザードの可能性を示している場合には、免疫毒性試験が要求されることがある。

④　神経毒性試験

反復投与毒性試験において神経毒性の可能性が認められることがあり、さらなる試験、例えば、OECD テストガイドライン 424 "Neurotoxicity Study in Rodents" に従った試験が行われるきっかけになる場合がある。

⑤　がん原性試験（VICH GL28）

潜在的がん原性物質と考えられる化合物については、経口投与によるがん原性試験が要求される。がん原性試験を要するとの判断は、遺

伝毒性試験成績、構造活性相関（SAR）の情報、並びに反復投与及び成績を含む、あらゆる入手可能なデータに基づく。がん原性試験は、がん原性バイオアッセイを用いて実施することが勧められる。しかしながら、がん原性と慢性毒性を組み合わせた情報も受け入れられよう。

（ウ）特殊試験

特殊試験とは、その薬物の作用機序を理解するために実施され、基本的及び／又は追加試験で得られたデータの関連性の説明、又は評価を助けるために行われる試験を指している。

（エ）引用文献

1. OECD. 1997. Test Guideline 424. Neurotoxicity Study in Rodents. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

（２）反復投与（90 日）毒性試験（VICH GL31）

ア　緒言

（ア）目的

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するに当たって、様々な毒性学的評価が実施される。このガイドラインの目的は、国際的に調和した 90 日反復投与試験についての勧告を確立することにある。

（イ）背景と適用範囲

このガイドラインは、ヒト食品中残留動物用医薬品の一日摂取許容量（acceptable daily intake ; ADI）の決定に必要な安全性データの相互受け入れを促進するために作成した一連のガイドラインの一つである。このガイドラインは、EU、日本、米国、オーストラリア、ニュージーランド及びカナダにおけるヒト食品中動物用医薬品を評価するための現行の方法を考慮して作成された。

このガイドラインは動物用医薬品の 90 日毒性試験についての枠組みを勧告するが、試験の設計には柔軟性をもたせることが重要である。このガイドラインの内容については、化合物を 90 日間投与した後に毒性の用量反応性と NOAEL（no-observable adverse effect level、無毒性量）を適切に確立できるように、試験を組み立てるべきである。

（ウ）一般原則

親化合物及び／又は代謝物に対する反復ばく露の影響について評価するには、十分な毒性試験が不可欠である。毒性を示さない用量も確かめるべきである。他のタイプの毒性試験と同様に、その化合物に関する入手可能な情報を、試験設計において利用すべきである。反復毒性試験は、感受性の／適切な動物種で実施すべきである。動物種の選択には、必ずヒトの代謝、薬物動態及び薬力学を考慮に入れるべきであるが、一般に受け入れられている標準的な動物種はラットと犬である。ばく露は、試験動物の成長相を包含させるために、生涯の早い時期に開始すべきである。一般に、毒

性を引き起こす十分な用量を最高用量とすべきである。この試験から得たデータは、動物用医薬品についての NOAEL 設定に用いられることがある。

イ　ガイドライン

（ア）反復投与（90 日）毒性試験

①　目的

反復投与（90 日）性試験は、ａ）標的器官及び毒性学的エンドポイントを識別するため、ｂ）反復投与（慢性）毒性試験に使用する用量レベルの設定を助ける情報を提供するため、及び場合によってはｃ）続いて行う反復投与（慢性）毒性試験に最も適切な動物種を識別するために、げっ歯類１種と非げっ歯類１種で実施すべきである。それぞれの反復投与（90 日）毒性試験の成績から、NOAEL を識別すべきである。

②　90 日毒性試験の実験設計

反復投与（90 日）性試験は、OECD テストガイドライン 408 "Repeated Dose 90-Days Oral Toxicity Study in Rodents" 及び 409 "Repeated Dose 90-Days Oral Toxicity Study in Non-rodents"に従って実施すべきである。

ａ　病理的検査

剖検と病理組織学的検査は、OECD テストガイドライン 408 及び 409 に従って実施すべきであるが、非げっ歯類については、全ての群の全ての動物の標準的な組織セットと肉眼病巣について病理組織学的評価を行う。

（３）反復投与（慢性）毒性試験（VICH GL37）

ア　緒言

（ア）目的

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するに当たって、様々な毒性学的評価が実施される。このガイドラインの目的は、国際的に調和した反復投与慢性毒性試験についての勧告を設定することにある。

（イ）背景と適用範囲

このガイドラインは、ヒト食品中残留動物用医薬品の一日摂取許容量（ADI）の決定に必要な安全性データの相互受け入れを促進するために作成した一連のガイドラインの一つである。このガイドラインは、EU、日本、米国、オーストラリア、ニュージーランド及びカナダにおけるヒト食品中残留動物用医薬品を評価する現行の方法を考慮して作成された。また、亜慢性及び慢性毒性試験から得られるデータも考慮した。

このガイドラインは、動物用医薬品の慢性毒性試験の枠組みを勧告するが、この試験の設計には融通性が残されている点が重要である。このガイドラインは、なぜ慢性毒性試験を提出する必要がないかについての科学的根拠を含めて、同等に安全性を保証するであろう代替法の可能性を排除するものではない。このガイドラインにおいては、慢性投与によって見られ

る毒性について有害な影響が観察されないレベル（NOAEL；no-observed adverse effect level; 無毒性量）の用量反応関係を十分に確立するように試験を組み立てるべきである。

（ウ）一般原則

適切な毒性試験は、親化合物及び／又は代謝物に対する長期ばく露の影響を評価するため、慢性ばく露による化合物の毒性作用を明らかにするため、及び毒性をもたらさない最高用量を確認するために、反復投与する必要がある。慢性毒性試験の設計には、その化合物に関する入手可能な情報を利用すべきである。この試験で得られるデータは、動物用医薬品のNOAELを設定するために使用されることがある。

イ　ガイドライン

（ア）反復投与（慢性）毒性試験

①　目的

慢性毒性試験は、ａ）化合物及び／又はその代謝物に対する長期ばく露による毒性作用を明らかにするため、ｂ）ばく露の用量及び／又は期間に関連する標的器官及び毒性学的エンドポイントを識別するため、ｃ）毒性的及び生物学的反応を伴う用量を明らかにするため、及びｄ）NOAELを設立するために実施される。

②　試験動物種の選択

動物種の選択には、必ずヒトにおける代謝、薬物動態及び薬力学を考慮すべきである。一般に受け入れられる標準的なげっ歯類はラット、標準的な非げっ歯類は犬である。

各種化合物に関する入手可能なデータのレビューは、慢性毒性試験に必要な動物種の数の選択に関して結論を出せなかった。更にデータを分析すれば、この問題を明確にできるかもしれない。日本では、２種による慢性毒性試験が要求される。しかし、適切な科学的妥当性の説明があれば、慢性毒性試験は１種だけで実施できるかもしれない。EU及び米国では、少なくとも１種の試験動物を用いるべきである。慢性試験は、90 日試験を含め、入手可能な全ての科学的データに基づいて選択した、最も適切な動物種で実施する必要がある。受け入れられる標準的な動物種はラットである。

③　実験設計

慢性毒性試験は OECD テストガイドライン 452“Chronic Toxicity Studies”[1] に従って実施すべきである。

④　病理学的検査

肉眼的剖検及び病理組織学的検査を、以下の改訂を加えて、OECD テストガイドライン 408 （“Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents”[2]） 及び 409（“Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Non-rodents”[3]）に従って実施すべきである。

○　以下の組織も検査する必要がある骨（胸骨、大腿骨及び関節）、

陰核腺及び包皮腺（げっ歯類のみ）、ハーダー腺、涙腺、喉頭、鼻腔、視神経、咽頭、及びジンバル腺（げっ歯類のみ）

○　非げっ歯類については、病理組織学的検査は全ての動物の上述の全ての組織と肉眼病巣について実施する。

ウ　引用文献

１．OECD. 1981. Test Guideline 452. Chronic Toxicity Studies. In :OECD Guidelines for the testing of chemicals Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

２．OECD.1998. Test Guideline 408. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. In : OECD Guidelines for the testing of chemicals. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.

（４）生殖毒性試験（VICH GL22）

ア　緒言

（ア）目的

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するに当たり、生殖に対するあらゆるリスク評価を含めての多数の毒性学的評価が要求される。このガイドラインの目的は、食品中残留動物用医薬品の存在によって起こるかもしれない長期、低用量ばく露に起因する生殖に対するリスクを評価するのに適切な生殖試験の国際的ハーモナイゼーションを確立することにある。

（イ）背景

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性の確立に使われている EU、日本及び米国の生殖及び発生毒性試験には、かなりの重複がある。それぞれの地域ごとに、細部に幾つかの相違があるが、いずれも少なくともげっ歯類１種を用いる多世代試験を要求し、最初の親（P_0）から始めて少なくともその後２代（F_1 及び F_2）にわたって継続投与される。３地域いずれにおいても、発生毒性（催奇形性）試験も要求している。発生毒性試験は、別のガイドラインの課題であり、多世代試験の一部として発生毒性相を含めることを推奨しないという注記を除いて、ここではこれ以上述べない。

動物用医薬品の生殖及び発生毒性試験に対するこのアプローチは、幾つかの点で International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use （ICH） が採用したそれとは異なる。ICH ガイドラインは、投与期間を短くして、親の受精から初期胚の発生、出生前後の発生並びに胚ー胎児発生から成る三つの試験の組合せを推奨している。このようなアプローチは大多数のヒト用医薬品には適当と考えられるが、ヒト食品中残留動物用医薬品に対するばく露は、生涯にわたるばく露を含んでの長期間に及ぶことがある。長期間、低用量ばく露には、投与を１世代を超えて延長する多世代試験がより適切と考えられる。このガイドラインは、ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性評価のための多世代試験の中軸要件についてハーモナイズされた指針を提供す

る。

このガイドラインは、関連規制当局によってヒト食品中残留動物用医薬品の一日摂取許容量（ADI）の決定に必要とされる安全性データの相互受け入れを促進するために作成される一連のガイドラインの一つである。このガイドラインは、「９－１　ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験」の「（１）試験への一般的アプローチ」（VICH　GL33）と一緒に読むべきである。このガイドラインは、ヒトに使用する医薬品のための既存の ICH ガイドライン “Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products” とその追加である “Toxicity to Male Fertility”、並びに EU、日本、米国、オーストラリア、ニュージーランド及びカナダにおけるヒト食品中残留動物用医薬品を評価する現行の方法を考慮して作成した。

（ウ）適用範囲

この文書は、ヒト食品中に残留する動物用医薬品についての多世代試験の中軸要件に関する指針を提供する。しかしながら、生殖機能に関してヒト食品中残留物の安全性を確立するために実施されるであろう試験を制限することを意図するものではない。また、なぜこのようなデータを提出する必要がないかとの科学的理由を含めて、安全性を同等に保証するであろう代替法の可能性を排除するものではない。このガイドラインは、対象動物種における生殖に関しての動物用医薬品の安全性を確立するために要求されるかもしれない情報を含めることは意図していない。

（エ）一般原則

多世代生殖毒性試験の目的は、哺乳動物の生殖に対する親化合物又はその代謝物のあらゆる影響を検出することにある。これらには、雌雄の性職能、交尾、妊娠、着床、妊娠を最後まで維持する能力、分娩、泌乳、生存、産子の出生から離乳までの成長と発達、性成熟及び産子の親としての生殖機能が含まれる。奇形の産子が出生子に母動物によって殺されることがあるので、多世代試験は特に発生異常を検出するように設計されてはいないが、このような試験は、出生子の同腹子数、出生子体重又は出生後最初の数日の生存が減少すれば、発生毒性の指標を提供することがある。

１世代を超える試験は、親の生殖に対する影響だけでなく、子宮内又は出生直後のばく露によるその後の世代に対する影響の検出も可能にする。成熟後の生殖能力に影響する発生の重要な局面は、出生前及び出生直後に生じる。この重要な時期に投与された性ホルモン及びその類似体が雌雄の生殖器の発達及び機能に及ぼす有害な影響はよく知られている。最近では、内分泌崩壊能を有する他の化学物質の試験で、発生初期のばく露が成熟後の生殖機能に重大な役割を担っていることが明らかにされている。このため、最初の親の世代に比較して、それに続く後の世代の生殖能力に対する影響の方がずっと大きくなり得る。１世代を超える試験は、試験物質の生物蓄積による生殖に対する影響も検出できることがある。発生途中の生殖

器に対する生物蓄積の干渉は、連続する世代における有害影響の程度又は重度の増加として現れることがある。

この試験の設計は、生殖に対するあらゆる影響が検出され、その用量と有害影響を起こさない用量を明確に識別できるようにすべきである。観察によっては、応答の性質又は用量－反応関係の性質を十分特徴付けるために、さらなる試験を必要とすることがある。

イ　ガイドライン

（ア）動物種の数

１動物種による多世代試験で通常十分である。現実には、全ての系統の化合物について多世代試験は大多数がラットで実施されており、ラットは疑いなく将来のほとんどの試験に選択され続ける動物種となるであろう。多産な系統を用いれば、ラットは一般にマウスよりも一定した生殖能力を示す。また、ラットにははるかに大量の歴史的データベースがある。必要ならば、その化合物の全体的な試験バッテリーの中で、ラットによる動態、代謝及び毒性試験の成績を参照することができる。しかし、最初は別の目的に用いられていて、後になって動物用医薬品に提案された化合物の試験は、歴史的な理由で時にマウスで実施されている。あるいはマウスで試験を実施する科学的理由（例えば、代謝がヒトのそれと類似していることが既知）があるかもしれない。生殖能力が満足できれば、マウスを受け入れ可能な動物種にすべきではないという一般的理由はない。

一般的には、１種のげっ歯類、望ましくはラットで試験を実施することが勧告される。

（イ）世代数

１世代だけの試験がヒト用医薬品についての通常の試験要件であるが、この場合には、主な懸念が短期投与期間中のばく露である。しかし、食品添加物並びに農薬や動物用医薬品の残留のような食品汚染物についての通常の要件は、古くから２又は３世代の多世代試験であった。最初の産子の世代が離乳するときに投薬を終了する１世代試験では、性成熟まで出生前に試験物質にばく露された動物の生殖能力に及ぼす影響まで評価できない。したがって、１世代を超える試験が必要と考えられる。

１世代を超える試験は、第１代に見られたあらゆる影響の確認、又は試験のいずれかの時期に見られたあいまいな影響の明確化をも可能にする。また、生物蓄積による影響の指標となることがある。

明確、かつ説明可能な成績を得るのに必要な最少の世代数は、大多数の例で２世代と考えられる。初期の多世代試験プロトコールは、一部の系統の化学物質について３世代を要求したことがあるが、現在は３世代で明瞭になる影響は２世代でも十分検出できると考えられている。

したがって、２世代の試験の実施が勧告される。

（ウ）世代当たりの腹数

全く影響がないこと、又は明確な無毒性レベルが存在する有害影響のあ

ることを試験成績が明確に示すならば、世代当たり１腹の試験で十分であろう。しかし、場合によっては、２腹目を作るように試験を拡大することが適当であろうし、必要に応じて、このような判断ができるように、試験成績はよく監視されることが推奨される。２腹目の価値は、処置の結果、又は偶然､あるいは処置とは無関係な生殖能力の悪さによるかもしれない、１腹目においての何らかの明らかに用量に相関した、又はあいまいな影響の意義を明瞭にする助けになるかもしれないことにある。対照における生殖能力の悪さは、親（P_0）世代の体重のばらつきが大きすぎないようにすることにより栄養問題及びその他の障害を避けることによって、また、若すぎたり高齢すぎる動物を交尾させないことによって最小限にできる。

したがって､一般に世代当たり１腹の試験を実施することが勧告される。上述の事情がある場合には、２腹目を作って試験を拡大する必要があるかもしれない。

（エ）推奨される試験プロトコール

OECD テストガイドライン 416“Two-Generation Reproduction Toxicity Study” が、ヒト食品中の全ての残留動物用医薬品の安全性を確立するに当たっての多世代試験の適切な参照とされる試験法である。この OECD テストガイドラインは、ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価するための動物用医薬品の試験に関連のある、試験動物の選定、用量の選定、処置開始のタイミング、交尾のタイミング、観察と成績の報告についての考察を全て含んでいる。このテストガイドラインは現在更新されつつある。1983 年のテストガイドライン 416 に従って実施される多世代試験に含まれる通常の観察項目に加えて、Revised Draft Guideline 416（1999 et seq.）は、成熟動物の精子のパラメーター、産子の性成熟及び産子の機能的調査の評価も含んでいる。これらの追加パラメーターの導入は、動物用医薬品を現在の基準で試験するのに適切と考えられる。

（５）発生毒性試験（VICH GL32）

ア　緒言

（ア）目的

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するに当たり、出生前の発生に対する影響の識別を含む多数の毒性学的評価が要求される。このガイドラインの目的は、国際的に調和されたガイドラインに従って、発生毒性の評価が行われることを保証する点にある。このガイドラインは、妊娠動物及び出生前ばく露を受けた発生中の組織体に及ぼす作用に関する情報提供をするために設計された試験法について述べている。

（イ）背景

発生毒性の可能性の評価は、ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性の評価で考慮すべき重要領域の一つとして認識されている。

動物用医薬品の生殖及び発生毒性試験の方法は International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals

for Human Use（ICH） が採択したそれとは異なる。ICH ガイドラインは、交尾前から受胎、受胎から着床、着床から硬口蓋の閉鎖、硬口蓋の閉鎖から妊娠の終わり、出生から離乳、離乳から性的成熟までを含む多くの段階にわたる三つの試験の組合せを推奨している。このような方法はほとんどのヒト医薬品には適当と考えられるが、ヒト食品中残留動物用医薬品へのばく露は長期、恐らく生涯にわたることがある。このため、このガイドラインは、「９－１の（４）生殖毒性試験」（VICH　GL22）とならんで、ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価するのにふさわしいと考えられる。このガイドラインは、着床から妊娠期間を通して帝王切開の前日までの、ばく露の可能性のある時期に焦点をあてている。このガイドラインは、ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性評価のための発生毒性試験の実施に関する調和指針を提供するものであり、中核要件でもある。

このガイドラインは、ヒト食品中残留動物用医薬品の一日摂取許容量（acceptable daily intake ; ADI）を決定するのに必要な安全性データの相互受け入れを促進するために作成される一連のガイドラインの一つである。このガイドラインは、「９－１　ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する試験」の「（１）試験への一般的アプローチ」（VICH　GL33）と合わせて読むべきである。このガイドラインは、ヒト医薬品の既存の ICH ガイドライン “Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products” 並びに EU、日本、米国、オーストラリア、ニュージーランド及びカナダにおけるヒト食品中残留動物用医薬品の安全性評価の現行の方法を考慮して作成した。

（ウ）適用範囲

この文書は、食用動物に使用する動物用医薬品についての発生毒性試験の指針を提供する。しかしながら、発生毒性に関するヒト食品中残留物の安全性を確立するために実施されるであろう試験法を制限するものではない。このガイドラインは、なぜ発生毒性データを提出する必要がないと考えられるかという科学的理由を含めて、安全性を同等に保証するであろう代替法の可能性を排除するものではない。

（エ）一般原則

発生毒性試験の目的は、雌動物が着床から妊娠全期間を通して帝王切開の前日までばく露されたことによって、妊娠雌動物並びに胚及び胎子の発生に及ぼす有害な影響を検出することにある。このような有害作用には、非妊娠動物に観察されるそれと比較して毒性が増加すること、胚－胎子死亡、胎子成長の変化及び胎子における構造的変化が含まれる。このガイドラインの目的として、催奇形性とは、生存が可能か否かにかかわらず、動物に有害と考えられる胎子における構造的変化を起こす能力と定義する。

試験設計は、発生に及ぼすいかなる有害作用も検出され、その用量及び有害作用を起こさない用量が明瞭に識別できるように行うべきである。試験成績によって、応答又は用量－反応関係の性状を完全に特徴付けるため

に、さらなる試験が必要になることもある。

伝統的に、発生毒性試験には２種の動物、１種のげっ歯類と１種の非げっ歯類が使用されている。２種の動物は、今でもヒト医薬品についての発生毒性試験として ICH ガイドラインの下で勧告されている。

しかしながら、動物用医薬品の広範囲なデータベースを見直した結果、層別アプローチにおいて、動物用医薬品の発生毒性を評価するに十分なデータが得られ、試験に用いる動物数を減らせることが認められた。食用動物に用いられる動物用医薬品の発生毒性試験についての層別戦略は、EU 動物用医薬品委員会の要約報告及び食品中残留動物用医薬品に関する FAO/WHO 添加物委員会報告書を基に作成された。これらのデータは以下のことを示した：ａ）試験動物種間のかなりの一致：ｂ）常に感受性が高いという１種類の動物種はなかった：ｃ）ウサギがラットよりも感受性が高かった場合、感受性の違いは種間のばらつきの考慮に使われる安全係数 10 倍以内であった。

この試験法を以下に記載する。

イ　ガイドライン

（ア）動物種の数

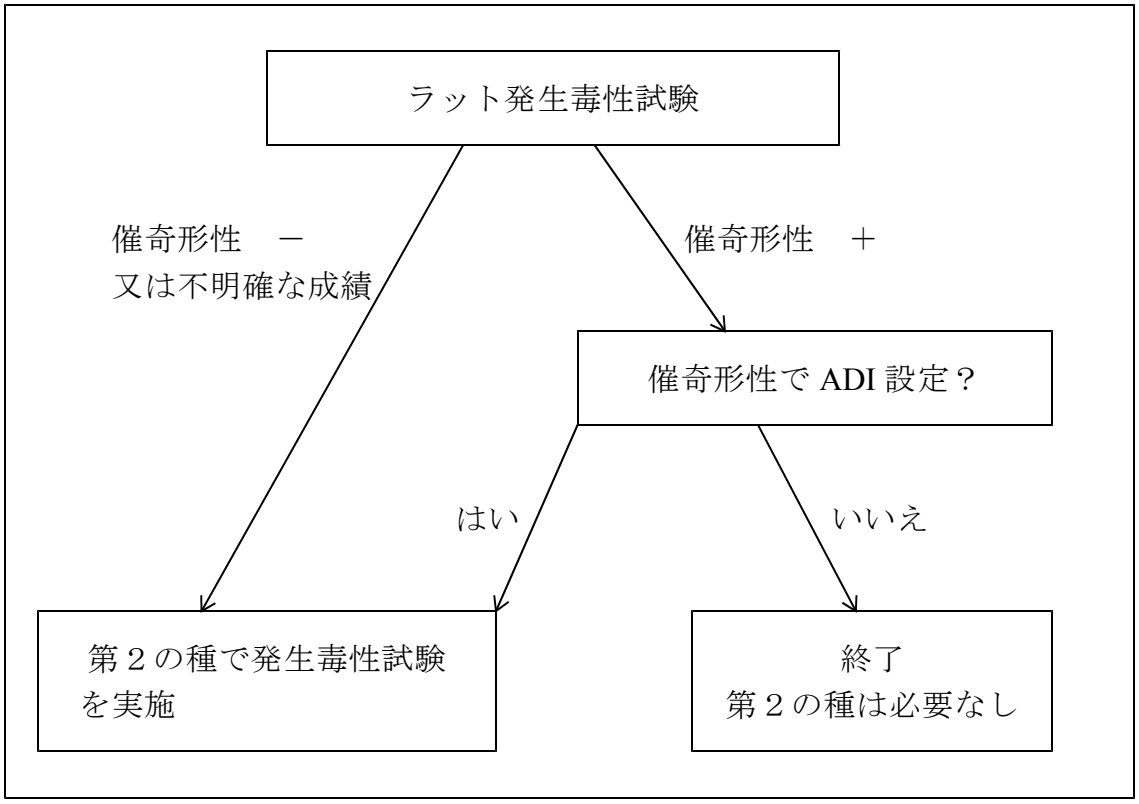
層別アプローチ（図１参照）はラットの発生毒性試験から開始する。母動物に対する毒性にかかわらず、催奇形性の明瞭な証拠が観察されれば、次に述べる事情を除いて、第２種で試験をする必要はないであろう。ラットに観察される催奇形性が陰性又は不明確であれば、第２の動物種、望ましくはウサギで発生毒性試験を実施すべきである。ラットで催奇形性が認められない場合には、例えラットにおいて他の発生毒性の徴候（例えば胎子毒性又は胚死亡）が認められても、第２種における発生毒性試験が必要であろう。

中核試験の全てを検討した結果、ADI がラットに生じた催奇形性試験に基づくことが明白な場合には、第２の動物種が発生毒性に高い感受性を示すかどうかを調べるため、他の動物種を用いて発生毒性試験を実施すべきである。したがって、ラットによる試験から開始する層別アプローチが勧告される。最初の試験の結果が、第２の動物種による発生毒性試験が必要かどうかを示すことになる。

（イ）勧告される試験プロトコール

OECD テストガイドライン 414“Prenatal Developmental Toxicity Study”は、食用動物に使用する動物用医薬品のヒト食品安全性を確立するための発生毒性試験として適切な参照法である。この試験ガイドラインは、試験動物数、投与期間、用量の選択、母動物の観察、胎子の検査及び成績の報告についての考察を含んでいる。

図１



（６）遺伝毒性試験（VICH GL23R）

ア　緒言

（ア）目的

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するに当たり、遺伝毒性作用による潜在的危険性の検討を含めて､多くの毒性学的評価が勧告される。多くのがん原性物質及び/又は変異原性物質には遺伝毒性的な作用機序があり、これはそうではないという信頼できる証拠がない限り、遺伝毒性物質は潜在的がん原性物質とみなすのが賢明である。加えて、繁殖及び／又は発生毒性を起こさせる物質は、遺伝毒性学的メカニズムを含む作用機序を有していることがある。遺伝毒性試験の成績は、一日摂取許容量（ADI）の数値に影響しないのが普通であるが、ADI を設定できるかどうかの判断に影響することがある。

このガイドラインの目的は、遺伝毒性試験法の国際的ハーモナイゼーションを確実にすることである。

（イ）背景

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するための EU、日本及び米国の遺伝毒性試験の要件には相違がある。

このガイドラインは、ヒト食品中残留動物用医薬品の ADI 設定に必要な安全性データを、関連する規制当局が相互に受け入れることを促進するために作成される一連の VICH ガイドラインの一つである。これは「９－１　ヒト食品中残留動物用医薬品を評価する試験」の「（１）試験への一

般的アプローチ」（VICH　GL33）とあわせて読むべきである。このガイドラインは、ヒト用医薬品の ICH ガイドライン：“Genotoxicity:　A　Standard Battery of Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals” 及び “Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals” を検討した後に作成された。OECD Guidelines for Testing of Chemicals 並びに EU、日本、米国、オーストラリア、ニュージーランド及びカナダにおける各国／地域のガイドライン及びヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を評価する現行の方法も考慮した。

（ウ）適用範囲

このガイドラインは、動物用医薬品の遺伝毒性の評価に使用できる標準的な試験の組合せを勧告する。ほとんどの場合において、試験成績は試験物質に遺伝毒性があるか否かを明確に指摘する。しかし、試験の標準的な組合せは、特定の系統の動物用医薬品には適当でない。例えば、一部の抗菌薬は、細菌の遺伝子突然変異試験に使用する試験菌株に対して毒性を示すことがある。このガイドラインは、このような薬物の試験に必要な、試験の基本的組合せの修正を助言する。試験の標準的又は修正組合せの成績が不明確又はあいまいな場合があれば、成績の評価及び解釈について助言する。ある場合には追加試験を要求されることがあり、例えば異数性の可能性を示す及び／又は生殖細胞に影響がある可能性を示す物質がそうである。

ほとんどの場合において、試験されるのは親化合物であるが、時には食品中に残留する一つ又はそれ以上の主要代謝物も試験する必要があるであろう。おそらく代謝物を試験する必要があるであろう例として、代謝物が親化合物の分子構造に存在しない構造的な警告を示す場合、及び食品中残留物が主として親化合物と基本的に異なる分子構造をもつ代謝物の場合がある。塩、エステル、包合体及び結合型の残留物は、逆のことが証明されない限り、通常、親化合物と同じ遺伝毒性があると仮定される。

イ　試験の標準的組合せ

三つの試験から成る以下の組合せを動物用医薬品の遺伝毒性のスクリーニングに使うことが勧告される。

Ⅰ．細菌の遺伝子突然変異試験

細菌の遺伝子突然変異試験として、*Salmonella　typhimurium* と *Escherichia　coli* の菌株を用いた遺伝子突然変異を調べる細菌復帰突然変異試験の非常に膨大なデータベースが構築されている。最もよくバリデートされている菌株は *Salmonella　typhimurium*　TA1535、TA1537（又は TA97 又は TA97a）、TA98 及び TA100 である。これらの菌株は、一部の酸化的変異原性物質及び架橋形成物質を検出できないことがあり、これを修正するために、*Escherichia coli* WP2（pKM101）、WP2*uvr*A（pKM101）又は *Salmonella typhimurium*　TA102 も細菌試験に使用すべきである。しかしながら、細菌の遺伝子突然変異試験は、遺伝子突然変異を誘発する

固有の可能性を持つ化合物を検出する効果的な一次スクリーニングではあるが、潜在的変異原性を持つ全ての化合物を検出するわけではない。一部の染色体（構造）異常誘発物質はサルモネラ試験で突然変異を起こさない（例えば無機の砒素化合物）。

Ⅱ．染色体損傷を調べるための細胞遺伝学的試験（*In vitro* 分裂中期染色体異常試験又は *in vitro* 小核試験）若しくは *in vitro* マウスリンフォーマ tk 遺伝子突然変異試験

第二の試験は化合物が染色体異常を誘発する可能性を評価すべきものである。これは、次の三試験のいずれかを用いて評価することができる。

①染色体（構造）異常誘発能と異数性の両方を検出する分裂中期の解析を用いる *in vitro* の染色体異常試験

②染色体（構造）異常誘発と異数性の活性を検出する *in vitro* の哺乳類細胞を用いる小核試験

③遺伝子突然変異と染色体損傷の両方を検出できるよう修正されたマウスリンフォーマ試験

Ⅲ．*In vivo* げっ歯類造血細胞染色体異常試験

第三の試験は、試験の標準的組合せが全ての潜在的変異原性物質を検出するということを更に確実にするために、試験の標準的組合せに追加されている。VICH は幾つかの系統の化合物の試験に、幾つかの当局が最初に *in vitro* 試験だけから成る突然変異試験の組合せを使用し、*in vitro* の組合せで陽性又はあいまいな成績が出たときにだけ *in vivo* 試験を必要とする方法を勧告していることを知っている。VICH はこのアプローチを考慮したが、ヒト用医薬品の遺伝毒性を試験するための ICH の要件と調和させるために、試験の基本組合せに *in vivo* 試験を含めることを選んだ。この試験は小核試験又は細胞遺伝学的試験のいずれかとすることができる。

ウ　標準的組合せの部分的修正

ほとんどの物質は試験の標準的組合せで十分なはずであるが、試験法の選択又は個々の試験のプロトコールの修正が必要な場合があるであろう。物質の物理化学的性質（例えば、揮発性、pH、溶解性、安定性など）が時に標準的な試験条件を不適当にする。試験を実施する前にこのことを考慮することが不可欠である。標準的な条件が偽陰性の結果をもたらすことが明らかな場合には、修正したプロトコールを用いるべきである。遺伝毒性試験のための OECD Guidelines for Testing of Chemicals には、試験物質の物理的特性による個々の試験法の感受性について助言があり、採用する余地のある補正手段についての助言もある。遺伝毒性試験の代替組合せを用いて試験する薬剤は、ケースバイケースに考慮される。試験の標準的組合せを用いない場合には、科学的妥当性を説明すべきである。

（ア）抗菌性物質

一部の抗菌性物質は細菌に対して過剰な毒性を示すため、細菌試験で試

験をすることが困難である。この場合には、細胞毒性を示す限度までの濃度で細菌試験を実施し、哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異をみる *in vitro* 試験で細菌試験を補うことが適当であろう。

（イ）代謝活性化

代謝活性系の存在下と非存在下で i*n vitro* 試験を実施すべきである。最も汎用されている代謝活性系は、酵素誘導剤（ Aroclor 1254 のみ 、又はフェノバルビタールと β －ナフトフラボンの組合せ）を投与したラットの肝臓から採取した S9mix である。代替の代謝活性系を選択する場合には、科学的根拠を説明すべきである。

エ　試験の実施

（ア）細菌突然変異試験

細菌の復帰変異原性試験は、OECD テストガイドライン 471[1] に設定されているプロトコールに従って実施すべきである。

（イ）*In vitro* 哺乳類細胞染色体異常試験

染色体異常試験は、OECD テストガイドライン 473[2] に従って実施すべきである。これらの細胞遺伝学的試験は染色体（構造）異常誘発能を検出するはずであり、異数性も検出することがある。倍数性の誘発を検出するには、より長時間の連続処理（例えば、正常細胞周期の３倍）を行うことにより、感受性を高めることができる。細胞遺伝学的試験における高倍数性と倍数性の発生率及び／又は分裂指数の変化を記録することで、異数性誘発能の潜在性に関する限られた情報が得られる。異数性誘発能の指標（例えば、倍数性の誘発）があれば、FISH （fluorescence *in situ* hybridization）又は染色体ペインティングのような適当な染色法を用いて、これを確認すべきである。染色体の明らかな消失が人為的に起こることがあるので、高倍数性だけを異数性誘発の明確な指標とみなすべきである。

In vitro の哺乳類細胞を用いる小核試験（OECD テストガイドライン 487[6]）は、OECD テストガイドライン 473[2] に記載されている染色体異常試験の代替法として、遺伝毒性試験の最初の組み合わせの一部として実施してもよい。*In vitro* の哺乳類細胞を用いる小核試験は、染色体（構造）異常誘発能と異数性誘発能の両方を検出でき、そして同時に分裂の遅延、アポトーシス、染色体切断及び染色体の損失を検出できる。

マウスリンフォーマ tk 法を実施する場合、小コロニーと大コロニーの両方の測定を含めるようにプロトコールを修正すべきである。プロトコールは OECD テストガイドライン 476[5] に設定されている基準に合わせるべきで、適切な陽性対照（染色体（構造）異常誘発物質）を使用すべきである。

（ウ）*In vitro* 哺乳類細胞遺伝子突然変異試験

In vitro 哺乳類細胞遺伝子突然変異試験を用いる場合には、OECD テストガイドライン 476[5] に従って実施すべきである。

（エ）*In vivo* 染色体異常試験

哺乳類赤血球小核試験（OECD テストガイドライン 474[3]）又は哺乳類骨髄染色体異常試験（OECD テストガイドライン 475[4]）を遺伝毒性試験の最初の組合せの一部として実施するのがよいであろう。哺乳類赤血球小核試験は骨髄あるいは末梢血のいずれかの分析で実施できよう。末梢血を用いて実施する場合、試験動物種はラットではなく、マウスにすべきである。これはラットでは脾臓において循環血液中の小核赤血球が除去されるからである。

これらの試験は、物質が *in vivo* で遺伝毒性を現すかどうかという質問に定性的回答を与えるために設計されるもので、無影響量を確立するためではない。

オ　試験成績の解釈

化合物の潜在的遺伝毒性の評価は、知見を総合的に考慮し、*in vitro* 及び *in vivo* 試験の両方の固有値及び限界を認識した上で行うべきである。

試験の標準的な組合せに含まれる一連の遺伝毒性試験で、明らかな陰性結果が得られれば、通常、遺伝毒性がないことの十分な証拠とされる。

In vitro では明らかな遺伝陽性結果を示すが、骨髄を用いて実施する *in vivo* 遺伝毒性試験では明らかに陰性を示す物質は、骨髄以外の標的組織を用いる他の *in vivo* 遺伝毒性試験によって、遺伝毒性の有無を確認する必要がある。最も適切な試験法をケースバイケースで選択する必要がある。

試験の標準的組合せでその他の陽性又はあいまいな成績が出た場合には、更なる試験の必要性をケースバイケースで判断すべきである。

カ　用語集

異数性誘発能（Aneugenicity）：異数性を起こさせる能力

異数性（Aneuploidy）：染色体の完全なセットの数の増加又は減少以外の、細胞又は生物種に固有な染色体基本数からの逸脱

染色体（構造）異常誘発物質（Clastogen）：通常、光学顕微鏡検査で検出可能な染色体の構造的変化を起こさせる物質

染色体（構造）異常誘発能（Clastgenicity）：染色体の構造的変化（染色体異常）を起こさせる能力

細胞遺伝学（Cytogenetics）：染色体が凝縮されて染色すると光学顕微鏡で見える時期に、通常、分裂細胞で実施される細胞の染色体分析

遺伝子突然変異（Gene mutation）：単一遺伝子又はその制御連鎖内の検出可能な永久的変化。変化には点突然変異、挿入、欠失などがある。

遺伝毒性（Genotoxicity）：変化を誘発した機序にかかわらず、遺伝物質の全ての有害な変化をいう広義な用語

異数性（Heteroploidy）：細胞又は生物内の染色体の数の異常。これは倍数性、異数性、高数性などを含む一般的用語

高倍数性（Hyperploidy）：細胞又は生物の染色体の正常数を超える異常

小核（Micronucleus）：顕微鏡的に検出可能な核 DNA を含む細胞内小粒子：染色体全体あるいは染色体の動原体部分の断片又は無動原体部分の断

片を含むことがある。小核の大きさは通常、主核の１/５未満で、１/20以上と定義される。

変異原性（Mutagenicity）：生物又は細胞の特性の変化をもたらすことのある生物又は細胞内遺伝物質の量又は構造の永久的変化を起こさせる能力。この変化には核酸内の塩基の連鎖の変化（遺伝子突然変異）、染色体の構造的変化（染色体（構造）異常誘発能）及び／又は細胞内の染色体の数の変化（異数性又は倍数性）を含むことがある。

倍数性（Polyploidy）：染色体の完全なセットの数の増加又は減少

キ　引用文献

1. OECD. 1997. Test Guideline 471. Bacterial Reverse Mutation Test. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals. Paris, Organization for Economic Cooperation and Development.
2. OECD. 1997. Test Guideline 473. *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals.Paris, Organization for Economic Cooperation and Development.
3. OECD. 1997. Test Guideline 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals. Paris, Organization for Economic Cooperation and Development.
4. OECD. 1997. Test Guideline 475. Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals. Paris, Organization for Economic Cooperation and Development.
5. OECD. 1997. Test Guideline 476. *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals. Paris, Organization for Economic Cooperation and Development.
6. OECD. 2010. Test Guideline 487. *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. In: OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, Organization for Economic Cooperation and Development.

（７）がん原性試験（VICH GL28R）

ア　緒言

（ア）目的

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するに当たり、腫瘍を誘発する可能性の評価を含む多数の毒性学的評価が要求される。このガイドラインの目的は、ヒト食品中残留動物用医薬品に対するヒトのばく露に適切な潜在的がん原性の評価を確実にすることにある。

（イ）背景

潜在的がん原性の評価は、ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性評価に考慮すべき重要な領域の一つと認識されている。残留動物用医薬品のばく露は、極めて低レベルで起こるのが普通であるが、長期間、恐らく生涯にわたる可能性がある。適切なばく露レベルで潜在的がん原性を発揮できる物質の十分な評価を保証するには、遺伝毒性、代謝運命、動物種差及び細

胞の変化を含む多数の問題を考慮する必要がある。

（ウ）適用範囲

このガイドラインは、がん原性試験実施の必要性を決定するに当たり、データに基づく判断経路を決定することにある。更に、がん原性試験の実施に関する指針を提供する。

イ　がん原性評価

（ア）全体的アプローチ

がん原性試験実施の必要性を判断するには、ａ）遺伝毒性試験の成績、ｂ）構造活性相関、及びｃ）長期試験における腫瘍に関連するかもしれない全身毒性試験の所見を考慮すべきである。試験動物種、対象動物種及び及びヒト間の代謝の違いも考慮すべきである。

（イ）遺伝毒性化合物

多くのがん原性物質には遺伝毒性による作用機序があることから、そうでないという信頼できる証拠がない限り、遺伝毒性物質はがん原性物質とみるのが賢明である。遺伝毒性試験の成績が明らかに陰性であれば、遺伝毒性機序による潜在的がん原性がないことの十分な証拠とされるのが通例である。

（ウ）非遺伝毒性化合物

一般に、非遺伝毒性化合物ががん原性を発揮するには閾値用量があり、残留動物用医薬品のヒトへのばく露は低度であると考えられていることから、非遺伝毒性物質はルーチンにがん原性試験を行う必要はない。しかし、例えば１）その化合物が動物又はヒトのがん原性物質であることが知られている化合物に類する、２）入手可能な全身毒性試験でその化合物に恐らく前腫瘍性病変又は腫瘍を示す所見が認められている、あるいは３）その化合物の全身毒性試験でヒトに関連するがん原性のエピジェネティック（DNA の塩基配列の変化を伴わず細胞分裂後も継承される遺伝子機能）の機序につながることが知られている作用が認められた場合には、このような試験が必要であろう。

（エ）*in vivo* がん原性試験

①　既存の関連ガイドライン

OECD テストガイドライン 451“Carcinogenicity Studies” に実験動物を使用するがん原性試験のための試験プロトコールガイドラインと試験化合物へのアプローチが含まれている。この文書は、以下のパラグラフに示す説明とともに動物薬のがん原性試験の基礎になる。

注：がん原性と慢性毒性を合わせた試験（OECD テストガイドライン 453“Combined Chronic Toxity/Carcinogenicity Studies”）も受け入れられよう。

②　長期がん原性試験のための動物種の選択

一般に２年のラット試験と 18 か月のマウス試験から成るがん原性バイオアッセイが必要とされる。適切な科学的妥当性の説明があれば、

げっ歯類１種、望ましくはラットでがん原性試験を実施してもよい。いずれかの試験動物種に陽性応答があれば、潜在的がん原性の指標と考えられる。

③　動物数と投与経路

OECD テストガイドライン 451 及び一般に行われている方法と同じく、がん原性試験には雌雄それぞれ少なくともラット及び／又はマウス 50 匹／用量（同時対照を含む）が適切である。ヒト食品中残留動物用医薬品のがん原性試験の投与経路は経口、望ましくは飼料添加である。その他の投与経路は、ヒト食品中残留動物用医薬品のリスク評価に当たっては一般に適切ではない。

④　がん原性試験のための用量の選択

ａ　全般

定型的なげっ歯類のがん原性試験には、少なくとも３用量レベルの他に同時対照群を使用することが推奨される。

ｂ　用量の選択

高用量は、がん原性以外の作用によって生存性に影響を及ぼすことなしに最小限の毒性作用を示すように設定すべきである。がん原性試験において生存率あるいは生理的恒常性に影響を及ぼすことなく何らかの毒性作用が認められた場合は、動物が十分に被検物質にばく露され、陰性結果に信頼性があったことを保証するものである。

その他の用量を設定するに当たり考慮すべき要因には、薬物動態の直線性、代謝経路の飽和、予測されるヒトのばく露レベル、試験動物種における薬力学、試験動物種における閾値効果の可能性、利用可能な機序情報及び短期げっ歯類試験で観察される予測できない毒性の進行が含まれる。最少用量設定が困難な場合には、最少用量は明らかな毒性を誘発しない量であり、かつその用量が最高用量の 10 %以下に設定しないという方法が最も一般的に受け入れられている。

（オ）生存中観察と病理検査

動物用医薬品のがん原性試験には OECD テストガイドライン 451 による生存中観察と病理検査が適当である。臨床病理検査（血液検査、尿検査及び臨床科学）は、腫瘍原性エンドポイントの評価に必要又は寄与するとは考えられない。

（８）微生物学的一日摂取許容量（ADI）設定の一般的アプローチ（VICH GL36R）

ア　緒言

（ア）目的

ヒト食品中残留動物用医薬品の安全性を確立するために、様々な毒性学的評価が行われる。動物用抗菌剤について調べる必要のある課題として、ヒト腸内菌叢に対する残留物の安全性がある。このガイドラインの目的は、

ａ）微生物学的一日摂取許容量（ADI）設定の必要性を決定するステップを概説すること、ｂ）健康上の懸念に対するエンドポイントを決定するための有害な影響が観察されない濃度（NOAEC；non-observable adverse effect concentration、無毒性濃度）と有害な影響が観察されないレベル（NOAEL；no-observable adverse effect level 無毒性量）を決める試験系と方法を勧告すること、及びｃ）微生物学的 ADI を決定する手順を勧告することである。別の試験が有用かもしれないことも認められる。勧告する試験から得られた経験によって、いずれこのガイドラインとその勧告が変更されることがある。

（イ）背景

腸内菌叢は、個体の健康の維持と保護に重要な役割を果たしている。この菌叢は、宿主に対してａ）内因性及び外因性化合物並びに食餌成分の代謝、ｂ）後で吸収される化合物の生産、及びｃ）病原性微生物の侵入とコロニー形成に対する防御などの重要な機能を提供している。

摂取された抗菌剤は、腸内菌叢の生態を変化させる可能性がある。これらは吸収不完全なために、あるいは吸収され、体内を循環した後で胆汁中に排泄されるか又は腸粘膜から分泌されて、結腸に到達することがある。

微生物学的 ADI を設定する場合に考慮すべき、現在の公衆衛生上の懸念となる微生物学的エンドポイントは以下のとおりである：

定着障壁の崩壊：定着障壁（colonization barrier）とは、外来微生物の結腸における定着並びに内因性の潜在性病原菌の過剰増殖を制限する正常腸内菌叢の機能である。一部の抗菌剤がこの障壁を崩壊させる能力はよく明らかにされており、ヒトの健康に影響することが知られている。

耐性菌のポピュレーション増加：このガイドラインの目的から、耐性を試験薬又は他の抗菌剤に非感受性である腸管内細菌のポピュレーションの増加と定義する。この影響は、以前は感受性であった微生物による耐性の獲得、又はその薬剤に既に感受性が低くなっている微生物のポピュレーションの相対的増加によるらしい。

広範囲に文献をレビューしたが、正常なヒト腸内菌叢における抗菌剤耐性菌の比率が変化した結果として生じるヒトの健康に対する影響(例えば、抗菌剤治療の延長、入院日数の延長、感染し易さ、治療の失敗など）の報告は見られなかった。しかし、しかし、微生物の生態学についての見解に基づけば、このような影響を除外することはできない。

食品中残留抗菌剤のヒト腸内菌叢に及ぼす影響は、長年にわたって懸念されていたが、この菌叢に有害な妨害をもたらすであろう閾値用量を定める統一的なアプローチはなかった。国際規制機関は、ヒト腸内細菌に対する最小発育阻止濃度（MIC）に基づいて、微生物学的 ADI を数式で出す方法を用いてきた。腸内菌叢の複雑さのために、この数式には伝統的に不確定係数が取り込まれてきた。しかし、これらの不確定係数の使用は、控

え目な推定値をもたらすので、これらの係数を用いずに微生物学的 ADI のもっと実際的な推定を可能にするより適切な試験系が考えられた。

このガイドラインは、ヒト腸内菌叢の複雑さに対応して、微生物学的 ADI を決定する際の不確定さを減らす試みである。このガイドラインは、微生物学的 ADI の必要性を決定するための過程を概説し、ヒト腸内菌叢の複雑さを考慮に入れた試験系について考察する。これらの試験系は、規制の目的でヒト腸内菌叢に及ぼす残留抗菌剤の影響を取り扱うために用いることができる。

このガイドラインで考察する全ての試験系の信頼性と確実性を確認するには、さらなる研究が必要であるからことから（付記Ａ参照）、このガイドラインはいずれか一つの試験系を規制目的の意思決定のために用いることを推奨しない。このガイドラインは、そうではなく、微生物学的 ADI を設定するためのハーモナイズした方法を勧告し、試験法を特定せずに試験の選択肢を提起する。

（ウ）適用範囲

この文書は、ヒト腸内菌叢に及ぼす影響に関して、ヒト食品中残留動物用抗菌剤の安全性を評価するためのガイダンスを提供する。しかし、ヒト腸内菌叢に及ぼす有害作用に関するヒト食品中残留物の安全性を確立するために実施されるであろう試験をこれらに限定するものではない。このガイダンスは、なぜ微生物学的試験を提出する必要がないと考えるかという科学的根拠に基づく理由も含めて、安全性を同等に保証するであろう代替アプローチの可能性を排除するものではない。

イ　ガイドライン

食料生産動物に使用する抗菌活性を有する薬剤の試験は、それらの残留物の安全性に対処すべきである。微生物学的 ADI の算出は、残留物がヒトの結腸に到達し、微生物学的活性がある場合にのみ必要である。

（ア）微生物学的 ADI の必要性を決定するステップ

微生物学的 ADI の必要性を決定する場合には、以下の一連のステップによることが勧められる。データは実験的に、又は公表された文献のような適切な情報源から得られるかもしれない。

ステップ１．薬剤及び（又は）その代謝物の残留物は、ヒト腸内菌叢の代表的細菌に対して微生物学的に活性があるか。

・推奨されるデータ：

- 以下の腸内細菌に関連する属（*E. coli,* 及び *Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Enterococcus, Eubacterium*（*Collinsella*）, *Fusobacterium, Lactobacillus, Peptostreptococcus/Peptococcus* の菌種）について得られた標準的試験法による MIC データ

- これらの細菌の相対的重要性の理解は不完全であり、これらの細菌の分類学的位置が変わり得ることが認められている。細菌の選択には最新の科学的知識を考慮すべきである。

・情報が入手できない時には、その化合物及び（又は）その代謝物は微生物学的に活性があると仮定する。

ステップ２．残留物はヒトの結腸に入るか。

・推奨されるデータ：

－吸収、分布、代謝、排泄（ADME）、生物学的利用能（bioavailability）、又は関連するデータが、結腸内に入ることになる摂取された残留物のパーセンテージに関する情報を提供することがある。

・ヒトにおける情報が入手できなければ、適切な動物のデータを利用する。情報を入手できない場合には、摂取された残留物の 100 %が結腸内に入ると仮定すべきである。

ステップ３．ヒト結腸内に入る残留物に、微生物学的活性が残っているか。

・推奨されるデータ：

－糞便と一緒に培養する薬剤の *in vitro* 不活化試験から微生物学活性の消失を示すデータあるいは動物の糞便又は結腸内容物中の薬物の微生物学的活性を評価する *in vivo* 試験からのデータ。

１、２、又は３のステップのいずれかの質問に対する回答が“いいえ”であれば、ADI は微生物学的エンドポイントに基づかないので、以下のステップに対応する必要はない。

ステップ４．懸念のエンドポイントのいずれか一つ又は両方を試験する必要性を排除する科学的妥当性があるかどうかを調べる。定着障壁の崩壊及びその薬剤に対する耐性出現に関する入手可能な情報を考慮する。入手可能な情報によって判断ができなければ、両方のエンドポイントを調べる必要がある。

ステップ５．ステップ４で定められた懸念のエンドポイントの NOAECs/NOAELs を決定する。最も適切な NOAEC/NOAEL を微生物学的 ADI の決定に用いる。

（イ）懸念のエンドポイントの NOAECs 及び NOAELs を決定するための勧告

①　定着障壁の崩壊

a　定着障壁崩壊の検出

細菌のポピュレーションの変化は、定着障壁が崩壊する可能性の間接的指標である。これらの変化は、様々な試験系の様々な計数手法によって監視できる。障壁崩壊のもっと直接的な指標は、病原体による腸内生態系の定着又は過剰増殖である。*in vivo* 試験系又は複雑な *in vitro* 試験系（例えばフェッドーバッチ、連続又は半連続培養システム）は、試験系に添加した攻撃菌の定着によって認められる障壁崩壊を評価することができる。

攻撃菌（例えば *Salmonella, Clostridium*）は、試験薬に非感受性の菌株にすべきである。攻撃菌の接種計画には、薬剤処置に関連する攻撃のタイミング、攻撃量当たりの菌数、及び試験系を攻撃

する回数を考慮すべきである。

b　試験系と試験設計

（ａ）*in vitro* 試験

ある薬剤が定着障壁を崩壊させる可能性を評価するのにMICs を用いる方法は、ヒト腸内菌叢の複雑性を考慮していない。したがって、その薬剤が活性を示す最も適切な属の MIC_{50}（イの（ア）参照）は、定着障壁の崩壊を示すNOAECの控え目な推定値になる。この NOAEC の推定値は、他にも理由があるが、特に接種菌量の桁数が腸管内の細菌のポピュレーションより低いことによって、控えめになる[1)]。したがって、これはADI設定の選択肢の一つと考える程度のものであろう。分離菌株は複数の健康なヒトから、イの（ア）に示した属のそれぞれについて少なくとも10株を含むようにすべきである。

適切なある分離菌株の純培養について調べたそれぞれのMIC 検査は、一菌種の単一菌株についてのデータを提供する。その他の *in vitro* 試験系は、各糞便接種材料の数百の菌種（菌数＞10^8/g）についての情報を提供する。各接種材料は、処置の影響を明らかにするために反復して試験できる。上記の全てに基づいて、糞便バッチ培養を用いる *in vitro* 系はMIC検査系よりも本質的に頑健であり、適切である。

以下に述べる他の試験系は、腸内菌叢をよくモデル化しており、より適切な NOAEC と恐らくより高い ADI をもたらすであろう。

糞便スラリーは、薬剤に短期ばく露後の定着障壁崩壊のNOAEC を算出するための単純な試験系となるものであり、用量検出（dose-titration）試験には適当であろう。これらのスラリーで、細菌ポピュレーションと短鎖脂肪酸（SCFA）生産の変化を監視することができる。これら二つの応答変数を一緒に監視すれば、障壁崩壊の間接的指標として使うことができる。この試験系から算出したNOAECは、障壁崩壊の控え目な推定値であることが証明されるかもしれない。

糞便を接種して行う半連続、連続及びフェッドー バッチ培養は、その薬剤に長期ばく露後の定着障壁の崩壊を評価するには適切であろう。しかしながら、連続及び半連続培養を用いた探索研究では、プロトコールに違いがあったために、障壁崩壊について様々なNOAECs値を示した。したがって、試験設計には付記Ａに提起した問題点を考慮すべきである。

糞便スラリー、糞便材料の半連続及び連続培養、並びにフェッドーバッチ培養の場合、接種糞便（個体差及び性差）の影響、希釈率、薬剤ばく露の期間及び試験の再現性のような未解

決の問題がある。

（ｂ）*in vivo* 試験

ヒト菌叢定着（human flora-associated；HFA）及び普通（conventional）実験動物を用いる in vivo 試験系は、定着障壁の崩壊を評価するには適当かもしれない。普通実験動物と比較すると、HFA 動物の腸内菌叢は細菌ポピュレーションの範囲と代謝活性の両方でずっとヒトの腸内菌叢に近い。しかし、ヒト由来の腸内菌叢は HFA 動物体内で安定しないことがある。移植菌叢の安定性、及びその菌叢の個々の組成の相対的重要性は不明である。技術的な理由から、普通実験動物は多数で試験ができ、結果についてより頑健な統計的分析が可能である。

試験設計には動物種、性別、提供者からの接種材料のばらつき、動物数/群、食餌、処置群の無作為化、糞食の最小化／排除、アイソレーター内の動物の囲い、アイソレーター内の相互汚染及び投与経路（例えば強制経口、飲水添加）のような因子を考慮すべきである。無菌動物に、まず *Bacteroides fragilis* を１株接種し、次いで糞便を接種すべきである。

② ヒト結腸内耐性菌ポピュレーションの増加（アの（イ）で定義）

以下のガイダンスには、このエンドポイントを求める際に考慮が必要なことを特記する。

ａ 耐性菌ポピュレーションの変化の検出

耐性出現を評価する試験では、腸管内において懸念される微生物とその系統の抗菌剤に認められている耐性機序を考慮すべきである。ヒト腸内菌叢においての耐性の趨勢に関する予備的情報、例えば各個体の日間変動や個体間の変動が、耐性出現を評価するための基準の作成に有益なことがある。懸念される感受性及び既知の耐性菌の MIC 分布は、糞便サンプル中の耐性菌を計数するため、どの程度の薬剤濃度を選択寒天培地に使用すべきかを決定するに当たっての基礎に用いることができる。微生物に対する薬剤の活性は試験条件によって異なるので、選択培地上に発育する微生物の MIC は標準法（例えば National Committee for Clinical Laboratory Standard[NCCLS][2]）によって測定した MIC と比較すべきである。処置前、処置の間及び処置後における耐性菌ポピュレーションの変化は、表現型法及び分子的方法を用いて、抗菌剤を含む培地と含まない培地における計数手法で評価できる。

抗菌剤耐性の変化は、薬剤ばく露以外の因子（例えば動物のストレス）に影響されることがあるので、動物試験系ではそれを考慮すべきである。

ｂ 試験系と試験設計

（ａ）*in vitro* 試験

細菌のポピュレーションにおいて耐性が出現するために要するばく露期間は、薬剤、耐性機序の性質、細菌が本来どのように進化するか（例えば、細胞間の遺伝子伝達による、遺伝子突然変異によるなど）に依存する。これらの理由から、エンドポイントを評価するための純粋培養の急性試験は適当とは思われない。したがって、耐性ポピュレーションの増加についてのNOAECを決定するのに、MIC試験は使えない。

限定培養（defined culture）が、一つの分離菌株における突然変異及び／又は分離菌株間の遺伝子伝達による耐性ポピュレーションの発現の可能性を明らかにする有益な情報を提供することがある。しかし、これらの試験系は耐性ポピュレーションの変化を評価するようには設計されておらず、したがって推奨されない。

糞便スラリーを薬剤に短期ばく露する試験系は、試験期間が耐性ポピュレーションの変化を評価するには不適当なことから、耐性出現試験には推奨されない。

糞便を接種する連続及び半連続培養並びにフェッドーバッチ培養は、細菌の長期薬剤ばく露を評価するのに有益な手段を提供する。試験の実施及びデータの評価において配慮しなければならない事項は付記Ａを参照されたい。

（ｂ）*in vivo* 試験

耐性ポピュレーションの変化は HFA げっ歯動物で評価できる。一般的な試験設計とそれを支持するプロトコールはイの（イ）の①のｂの（ｂ）で述べた勧告に従うべきである。この試験系には複雑な菌叢が入っており、遺伝的耐性決定因子の起源になるであろう。この系は、連続又は半連続培養系より多くの繰り返しに適合するが､フェッドーバッチ培養よりは少ない。HFA げっ歯動物試験のばらつきは評価されていないが、性差を識別するために有用である。普通実験動物で耐性試験を実施することにも幾つかの実際的な利点がある。

HFA げっ歯動物及び普通実験動物は、試験薬に対する細菌の長期ばく露による耐性出現の可能性を評価する手段を提供する。試験の実施及びデータの評価において配慮しなければならない事項は付記Ａを参照されたい。

（ウ）一般的勧告

・ヒト提供者からの糞便サンプル又は分離菌株は、少なくとも３か月間は抗菌剤のばく露を受けたことのないことが分かっている健康者から入手すべきである。

・*in vivo* 試験の場合には、ａ）最大限の独立した繰り返し、ｂ）分析のために十分な量の糞便の採取、及びｃ）最小限の糞食、を可能にする試

験動物種を選択すべきである。１つの性が適切であるということを示すデータがない場合には両性の評価を検討すべきである。

・残留抗菌剤の試験を設計する際に統計的手法が明記される必要がある（付記Ｂを参照）。

・OECD が 1996 年[3]から開発しているようなプレーバリデーション及びバリデーションの過程は、ヒト腸内菌叢に及ぼす抗菌剤の影響を評価する試験系のその後のバリデーションのために考慮されるべきである。その手順はバリデートされる試験系に従ってこれを使用するために適合され、改変されるべきである。

・試験計画は、保存及び培養の条件が糞便接種に及ぼす影響という未解決の問題を考慮に入れるべきである。

（エ）微生物学的 ADI の算出

微生物学的 ADI について二つ以上の値が算出された場合には、以下に考察する方法に従って、（ヒトに対して）最も適切な値を使用すべきである。

①　定着障壁の崩壊

a　*in vitro* データからの ADI の算出

もし、懸念されるエンドポイントが定着障壁の崩壊であれば、ADI は MIC データ、糞便スラリー、半連続、連続及びフェッドーバッチ培養試験系から算出できるかもしれない。

MIC データからの ADI 算出：

$$ADI = \frac{MIC_{calc} \times \text{結腸内容物の量（220 g／日）}}{\text{微生物が利用可能な経口用量の分画} \times \text{60 kg のヒト}}$$

MICcalc：付記 C に示すように、MICcalc は、試験薬に活性のある最も関連のある属の平均 MIC50 の 90 %信頼限界の下限値から導く。

その他の *in vitro* 試験系からの ADI 算出：

$$ADI = \frac{NOAEC \times \text{結腸内容物の量（220 g／日）}}{\text{微生物が利用可能な経口用量の分画} \times \text{60 kg のヒト}}$$

NOAEC：NOAEC は、*in vitro* 試験系の平均 NOAEC の 90 %信頼限界の下限値から導き、データのばらつきの説明に使用すべきである。したがって、この式には、微生物学的 ADI を算出するための不確定係数は一般には必要とされない。

結腸内容物の量：220 g という数字は、事故の犠牲者について測定した結腸内容物に基づいている。

微生物が利用する経口用量分画：結腸内微生物が利用する経口用量の分画は、薬剤を経口投与した後の *in vivo* 測定値に基づくべきである。さもなければ、十分なデータがある場合には、結腸内微生物菌が利用する用量分

画を、１－尿中に排泄された（経口投与量の）分画として計算できる。ヒトのデータが好ましいが、もしなければ、２種以上の反芻動物以外の動物のデータでもよい。代謝物の抗菌活性を否定できるデータがない場合には、代謝物は親化合物と等しい抗菌活性を持つと仮定する。申請者が腸管通過中にその薬剤が不活化されることを示す定量的な *in vitro* 又は *in vivo* データを提出すれば、この分画を少なくすることができよう。

b　*in vivo* データからの ADI 算出

微生物学的 ADI は NOAEL を不確定係数で除して算出する。

in vivo 試験での不確定係数は、化合物の系統、プロトコール、提供者の数、及び測定した結果変数の感度を考慮して、適切に設定すべきである。

② 耐性菌ポピュレーションの増加

a　*in vitro* データからの ADI 算出

懸念されるエンドポイントが耐性菌ポピュレーションの増加であれば、半連続、連続及びフェッドーバッチ培養試験系から算出した NOAECs を微生物学的 ADI の設定に使用できよう。

$$\text{ADI} = \frac{\text{NOAEC} \times \text{結腸内容物の量（220 g／日）}}{\text{微生物が利用可能な経口用量の分画} \times 60\ \text{kg のヒト}}$$

NOAEC：*in vitro* 系から求めた NOAEC の 90 %信頼限界の下限値から得た NOAEC を、データのばらつきの説明に使用すべきである。したがって、この数式には、微生物学的 ADI を算出するための不確定係数は一般には必要とされない。しかし、NOAEC の計算に用いた *in vitro* データの質又は量が不十分なことから懸念が生じる場合には、不確定係数を組み込む必要があるかもしれない。

b　*in vivo* データからの ADI 算出

微生物学的 ADI は NOAEL を不確定係数で除して算出する。

in vivo 試験での不確定係数は、化合物の系統、プロトコール、提供者の数、及び測定した結果変数の感度を考慮して、適切に設定すべきである。

ウ　用語集

この用語集には本文だけでなく付記中の用語を含む。

一日摂取許容量 [Acceptable Daily Intake]（ADI）：健康に対して感知できるリスクなしに、生涯にわたって毎日摂取できる物質の量の推定値で、体重ベースとして表す。

抗菌活性 [Antimicrobial Activity]：細菌のポピュレーションに及ぼす抗菌剤の作用

抗菌剤［Antimicrobial　Agent］：生物学的又は化学的に作られた主たる効果が抗菌活性である薬剤

釣合いのとれた設計[Balanced　Design]：設計に含まれる全ての因子（処置因子、性別のような重要な因子、あるいは妨害因子）の値又はレベルの組合せが同じ実験単位又は繰り返しであれば、統計的設計は釣合いがとれている。部分的に釣合いのとれている設計は、釣合いがとれてはいないが、処置とその他の因子の組合せが規則的に生じるので、分析が比較的簡単である。

バッチ培養[Batch　Culture]：培養が終わるまで基質も、老廃物も除去されない培養で、通常は短期間培養であり、一般には 24 時間までである。

妨害因子[Blocking　Factor]：類似する又は類似の応答をすると予測できる実験単位群の値又はレベルを規定する実験因子。妨害の中の体系的変動は統計的分析における過誤の推定から除去することができ、精度が上がる。実験単位である数頭の動物を含むケージ、あるいは数個のケージを含むアイソレーターがその例である。

攻撃菌[Challenge　organism]：定着障壁の崩壊を評価するために試験系に実験的に添加する細菌

定着[Colonization]：腸管内に微生物が定着すること。

定着障壁[Colonization　Barrier]：外来細菌による結腸内定着並びに内因性の潜在性病原細菌の過剰増殖を制限する正常腸内菌叢の機能

完全設計[Complete　Design]：設計における因子又はグループの全ての組合せが少なくとも 1 回見られる統計的設計は完全である。不完全設計は一部の因子の組合せが見られないものである。

連続培養[Continuous　Culture]：栄養素の供給と使用済み培地の除去を同時に行って微生物の連続的発育を維持し、一定の培養容量内に一定の微生物負荷を維持する培養法

普通実験動物[Conventional Laboratory Animal]：自然の固有腸内菌叢を持つ動物

糞食[Coprophagy]：糞便の摂食

限定培養[Defined Culture]：全ての菌種が既知である微生物培養

希釈速度（流速）[Dilution（Flow）　Rate]：連続培養系における培地供給と除去の速度。希釈速度は連続培養系内の微生物の発育速度をコントロールする。

提供者（糞便）接種材料[Donor（Fecal）　Inocula]：ヒトボランティアから採取し、試験系に接種するために用いる糞便菌叢。腸内菌叢に等しいと考えられる。

残留薬剤[Drug　Residue]：食品内又は食品上に残存する全ての誘導体、代謝物及び分解産物を含めた薬剤

実験単位[Experimental Unit]：処置を行い、測定を行う標準的実験対象。動物全体、又は特定の臓器又は組織、数頭の動物が入っているケージ、細

胞培養が例としてあげられる。

因子設計[Factorial　Design]：処置因子を含む、それぞれ２つ以上の値又はレベルを有する多くの因子の組合せを含む実験設計。その他の因子として層化因子（例えば性別）あるいは阻害因子（例えばケージ）が含まれることがある。典型的には、結果変数は、様々な因子をそれぞれの組合せレベルとする実験単位の数を基に測定される。データの統計的分析は、多因子分散分析による。

糞便スラリー[Fecal　Slurry]：嫌気性緩衝液で最小限希釈されたヒト糞便又は糞便固形物

フェッドーバッチ培養[Fed-Batch Culture]：栄養培地を連続的又は半連続的に供給するバッチ培養。フェッドーバッチ培養の一部をあらかじめ定めた間隔で取り出すことができる。一定の培養容量は維持できない。

ヒト菌叢定着（HFA）動物[Human Flora-Associated（HFA）　Animal]：ヒト糞便菌叢を移植した無菌動物

交互作用の影響[Interaction　Effect]：他の因子の存在によって修飾される処置の影響。例えば、処置の影響が雌より雄の方が大きい又は小さいことがあり、あるいは時間とともに変化することがある。

腸内菌叢[Intestinal flora]：結腸内の正常微生物叢

最少発育阻止濃度（MIC）[Minimum Inhibitory Concentration（MIC）]：標準化された試験法によって測定される、試験微生物の発育を阻止する抗菌剤の最少濃度

50 %最少発育阻止濃度[MIC_{50}]：適切な属の試験分離菌の 50 %の株の発育を阻止する抗菌剤の濃度

微生物学的 ADI[Microbiological ADI]：微生物学的データに基づいて設定される ADI

無毒性濃度（NOAEC）[No-Observable Adverse Effect Concentration（NOAEC）]：特定の試験において、いかなる有害な影響も観察されない最高濃度

無毒性量（NOAEL）[No-Observable Adverse Effect Level（NOAEL）]：特定の試験において、いかなる有害な影響も観察されない最高投与量

結果変数[Outcome　Variable]：実験において測定される特定のパラメーター。特定の結果変数は、プロトコールの一部として規定されなければならず、試験において実際に測定される。

半連続培養[Semi-continuous Culture]：基質及び/又は老廃物を半連続的に添加及び/又は除去して、一定の培養容量を維持する培養法

短鎖脂肪酸[Short chain Fatty Acid]：腸内菌叢が生産する炭素原子 2 － 6 個を含む揮発性脂肪酸。主要な酸は、酢酸、プロピオン酸及び酪酸である。

固形相[Solid Phase]：*in vitro* 試験系内の粒子状物質

体系的ばらつき[Systematic Variation]：結果変数に影響する因子。このようなばらつきは確かに存在する影響を表していることから、体系的である。体系的変動は予測不可能なランダムなばらつきと区別される。体系的ば

らつきは性別のような関心の対象である因子に起因することもあり、特定のアイソレーターのようなそうでない因子に起因することもある。

試験系[Test System]：ヒト腸内菌叢に及ぼす抗菌性残留物の影響を明らかにするために用いる方法

エ　引用文献

1. Cerniglia, C.E., and Kotarski, S. 1999. Evaluation of Veterinary Drug Residues in Food for their Potential to Affect Human Intestinal Microflora. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 29, 231-261.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Anaerobically; Approved Standard ? Sixth Edition. NCCLS document M11-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, USA.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard ? Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA,USA.
4. OECD. 2001. Series of Testing and Assessment No. 34, Environment, Health and Safety Publications. Draft Guidance Document on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Internationally Acceptable Test Methods and Hazard Assessment. Paris.

付記Ａ　試験系開発及びデータの解釈において検討が必要な問題点

１．実験条件

連続流動、半連続流動及びフェッドーバッチ試験から生じるデータは、発育条件（例えば、発育培地、pH、希釈速度）の影響を受ける。菌種によっては、試験系に用いる実験条件下において発育速度が異なる。培養物の希釈速度がある菌種の発育速度を越えると、この菌種は最終的に試験培地から消失する。試験系は各種の細菌が最大限に滞留し、最初の接種材料の複雑さが維持されるように設計すべきである。

試験抗菌剤が様々な細菌グループの発育速度に影響することがある。発育速度が試験系に用いる希釈速度より低くなると、菌叢の構成細菌の一部が混合培養から洗い出されることがある。この問題は、希釈速度を下げる試験条件を開発することによって最小限になろう。

抗菌剤感受性はばく露される細菌の菌体の物理的な状態に左右され、試験系で用いる発育条件に左右されよう。このことに基づけば、コロニー形成バリア崩壊及び耐性菌ポピュレーションの増加の NOAECs に及ぼす発育条件の

影響を明らかにする検討が更に必要である。

in vivo 試験系のプロトコールにおいては多くの因子を考慮すべきである。これらの試験の複雑さと無菌的アイソレーター内で動物試験を実施するに当たっては、交差汚染が主要な問題となる。交差汚染を最小限にするようにプロトコールを設計すべきである。

２．接種材料

腸内菌叢の構成は、個体間で細菌グループ及び耐性菌については違いがあろう。細菌のポピュレーションは単一個体内では比較的安定しているが、耐性菌グループでは必ずしもそうではない。

個体間の菌叢の違いを説明するには、複数の提供者を用いるべきである。プールした接種材料は、個体間の菌叢の違いを説明できない。試験成績を解釈する場合には、提供者の接種材料の構成を考慮すべきである。腸内菌叢に及ぼす残留抗菌剤の影響を明らかにするデータは、個体別に提供者から採取した糞便接種材料を用いる試験系から得ることが好ましい。さらに、試験結果を解釈する際には、提供者の接種材料の組成を考慮にすべきである。

３．試験期間

糞便バッチ培養における細菌ポピュレーションの変化を監視するための最適な培養時間を明らかにする必要がある。同様に、複雑な長期 *in vitro* 又は *in vivo* 試験系の場合には、腸内菌叢の統合性と複雑性が安定に維持される期間を明らかにすることが重要である。

付記Ｂ　抗菌性残留物の試験を設計するときに考慮すべき統計的問題

現在公衆衛生上の懸念とされている二つの一般的なエンドポイントとして、コロニー形成バリアの崩壊と耐性菌ポピュレーションの増加が知られている。実験設計は、これらのどちらを対象にするかによらなければならず、特定の結果変数を考慮すべきである。これらの試験系の設計のパラダイムには、試験系の選択、処置の適用及び試験系の経時的追跡が含まれる。試験系の選択は、その試験系により表されなければならないヒトの消化管の性質に依存する。MIC 試験は設計が単純であるから、以下に考察する問題の多くはこの方法には当てはまらない。

設計の中心要素は実験単位の定義である。例えば、*in vivo* 試験系では、この単位は個々の動物あるいはケージまるごとのことがある。アイソレーターの中でケージをグループ分けするとすれば、各アイソレーター内の異なるケージに一部又は全部の処置を適用することができる。この場合、同じアイソレーター内のケージは同様な仕方で応答すると予想されるから、アイソレーターが妨害因子になる。妨害因子の使用は体系的ばらつきを減らす重要なツールである。関連する質問は、性別のような、含めなければならない他の体系的因子がないか、すなわち因子設計をしなければならないかということである。複数の因子がある場合には、設計に因子のどういう組合せを含めるべきかの選択を入れる。これは出来

上がった設計が釣合いのとれているように行うことが重要である。完全な、釣合いのとれた設計では、全ての組合せがあって、それらが同じ回数生じる。不完全な設計並びに様々な種類の部分的釣合いによることも可能である。このような設計では、ばらつきの分析が必要かもしれないが、例えば実験資源が限定されている場合には有用なことがある。不完全設計の例は標準的な２期間交差設計である。

実験単位にいかなる処置を適用すべきかを決定しなければならない。薬剤処置と細菌攻撃を含む 2 段階処置が必要な場合もある。少なくとも三つの薬剤処置群に加えて適切な対照群を加えるべきである。抗菌剤処置レベルの選択は希望する用量範囲によるが、影響のあるレベルと無影響レベルの両方を含めるべきである。薬剤投与の期間と方法は試験系による。一部の試験で重要な点は経時的な影響の増進であり、結果変数を繰り返し測定する必要があるかもしれない。一般的問題は測定のタイミングと間隔及び欠損データに起因するバイアスである。

生物学的ばらつきと測定誤差によるランダムなばらつきのコントロールは、実験単位の数とサンプル数による。この数は、可能であれば過去の経験から、又はサンプルサイズのコンピューター計算による、その試験系の以前の知識及び結果変数を用いて、決定できる。処置の影響と適切な相互作用、例えば処置の影響の経時的な変化、を正確に測定するために、十分な繰り返しを含めるべきである。試験によっては、このような相互作用を統計的分析の一部として調べることが重要かもしれない。繰り返しの別の形は一つのケージ内の動物からの糞便サンプルのプール又は異なる提供者からの糞便サンプルのプールである。いずれも平均化の利点はあるが、繰り返し間のばらつきを推定する能力がない。プールは（処置及び／又は接種材料）の個々の影響をあいまいにすることがあり、したがってその使用は試験の目的に応じて考慮しなければならない。

付記Ｃ　MIC_{calc} の計算

薬剤がその菌に対して活性を有する最も関連のある属の平均 MIC_{50} の 90 %信頼限界の下限値から、MIC_{calc} を算出する。90 %信頼限界の下限値は、対数変換データから計算する。したがって、平均値と標準偏差は、対数変換した MIC_{50} 値を用いることにより計算される。このことはまた、正確な値を得るためには、90 %信頼限界の下限値を指数変換する必要のあることを意味している。信頼限界の計算式は以下のとおりである:

90 %信頼限界の下限＝平均 MIC_{50} － Std Dev/$\sqrt{n}$ ×$t_{0.10,df}$

ただし: 平均 MIC_{50} は、対数変換した MIC_{50} 値の平均、

Std Dev は、対数変換した MIC_{50} 値の標準偏差、

n は、計算に用いた MIC_{50} の数、

$t_{0.10,df}$は、自由度 df の t- 分布の中心から 90 %の値、df = n-1

適切な属の MIC_{50} を調べる（イの（ア）参照)。MIC_{calc} は、その化合物に対して本来耐性でない適切な属について得られた値に基づく。したがって、MIC_{calc} はその化合物が活性であるそれらの属の MIC_{50} に基づくことになる。MIC_{calc} の計算に用いる　には、全ての MIC_{50} 値に不等号が入っていないことを確かめる。

計算の例

いかなる MIC_{50} 値の対数変換した底も使用することができる。しかし、薬剤を二倍希釈することにより MIC 試験が行われている場合には、二を底とした対数変換は計算を行うに当たって整数になるので便利である。以下の例では、次のように MIC_{50} 値を変換した：

Log_2（MIC_{50}）－ Log_2（最小（MIC_{50}）／２）

MIC_{calc} の計算例								
Bifidobacterium	*Eubacterium*	*Clostridium*	*Bacteroides*	*Fusobacterium*	*Enterococcus*	*Escherichia coli*	*Peptococcus/Peptostreptococcus*	*Lactobacillus*
0.03125	0.25	0.25	8.0	32	2.0	>128	0.25	1.0
平均（Log_2（MIC_{50}）　-Log_2（0.03125/2))								
1	4	4	9	11	7	R*	4	6
平均（Log_2（MIC_{50}）　-Log_2（0.03125/2)) ＝ 5.75 標準偏差（Log_2（MIC_{50}）　-Log_2（0.03125/2)) ＝ 3.196 $t_{0.10,7}$ ＝ 1.415 90 %信頼限界の下限＝ 5.75-3.196 /sqrt（8）*1.415 =4.15 MIC_{calc} に指数変数＝ $2^{(4.15+\log2\ (0.03125/2))}$ ＝ 0.277 MIC_{calc} ＝ 0.277 ＊本来耐性である属の MIC_{50} 値は計算に含まれない　。								

付記Ｄ　微生物が利用可能な経口用量の分画の決定に関する「イ　ガイドライン」の項の追補

1.　緒言

2005 年以降、本ガイドライン（VICH GL36）が施行されてきた。ガイドラインに基づく作業のなかで経験を重ねた結果、VICH 地域の全ての規制当局が、微生物が利用可能な経口用量の分画を決定するための in vivo 及び in vitro の両試験方法について追加的なガイダンス及び明瞭さが必要であるとの意見

で合意した。本付記は、新規のデータ、科学文献及びスポンサー（承認申請者）からの公表された提出書類に記載される情報のレビューに基づいて作成したものである。

本付記は、「微生物が利用可能な経口用量の分画の評価のための試験系を例示した表」、「例示した試験系の実施に当たっての方法論に関する一般的考慮事項」及び「微生物が利用可能な経口用量の分画の決定における試験系の使用方法の解説」の3節から構成される。

2. 微生物が利用可能な経口用量の分画の評価のための試験系の例

微生物が利用可能な経口用量の分画の決定にあたり、様々なin vitro試験及びin vivo試験系を、単独で又は組み合わせて使用できる。以下の表では、このような試験系と得られるデータの種類のほか、その使用に関連する考慮事項を例として示す。

微生物が利用可能な経口用量の分画の評価に用いる試験系及び分析方法の例		
試験系	得られるデータの種類	考慮事項
In Vivo 試験系		
ヒト及び（又は）動物の吸収、分布、代謝、排泄に関する（ADME）試験	- 尿中及び（又は）糞便中の投与薬物（及び代謝物）の濃度 - 尿中及び（又は）糞便中の投与薬物の代謝物プロファイル - 結腸内に入る投与薬物の割合	- 経口投与経路から得られるデータを使用すること。 - 動物に投与された経口投与量及び投与期間を考慮する場合がある。 - 同一クラスの類似薬を経口投与したヒトから得られたデータは、裏付けとなる情報をもたらすことが考えられるが、申請予定の薬物に関するデータの方が望ましい。 - ヒトの ADME データが入手できない場合は、動物の ADME データを使用することが可能である。 - 対象動物種の残留物消失試験を実施することにより、糞便中の代謝物プロファイル及び（又は）結腸内微生物が利用可能な薬物に関する情報が得られる場合がある。 - 微生物が利用可能な経口用量の割合の決定のための微生物学的測定法から得られるデータは、化学分析又は放射性標識化合物分析のデータを補完する場合がある。
結腸内微生物が利	- 微生物学的測定法及び（又は）化学分析	- 動物に投与された経口投与量及び投与期間を考慮する場合がある。

用可能な薬物を決定するために実験動物に薬物を経口投与する方法	によって決定された糞便中又は腸内内容物中の薬物濃度 - 糞便中又は腸内内容物中の代謝物プロファイル	- ヒト腸内細菌叢を定着させたげっ歯類及び普通の動物を考慮する場合がある。 - 反すう動物種及び鳥類は適さない。
In Vitro 試験系		
微生物が利用する薬物の分画を決定するために糞便スラリーに薬物を添加する方法	- 試験系中の遊離薬物濃度（単位体積当たりの質量） - 添加した薬物の結合率 - 糞便スラリー中で代謝される添加薬物量	- 試験計画には､インキュベーション、薬物動態を調べるためのサンプル採取時点、試験対象薬物の濃度、非滅菌糞便と滅菌糞便などの糞便パラメータや、他の試験条件の考慮事項を組み込むこと。 - 分析には、薬物の微生物学的活性の定量と化学分析の両方が挙げられる（「微生物学的測定方法及び化学分析法」参照)。 - 非滅菌糞便スラリーをインキュベーションして、薬物の分解性を明らかにすることができる。
微生物学的測定法		
糞便サンプル中又は糞便スラリー培養物中における薬物濃度の微生物学的活性を評価する微生物学的測定法	- 遊離薬物濃度測定のための微生物発育又は発育阻止の定量	- 定量的な微生物学的測定のためには、指標細菌の菌株選択において、用いる方法及び薬物の抗菌スペクトルを考慮に入れなければならない。 - 試験には、例えば、細菌計数、MIC、死滅曲線、最確数、最小破壊濃度の検出、指標代謝物質の検出、分子的方法などが挙げられる。
化学分析法		
糞便サンプル中又は糞便スラリー培	- 総薬物濃度及び遊離薬物濃度の定量 - 薬物及び代謝物の定量	- 糞便スラリー中の薬物及び代謝物と思われるものを検出及び定量するには、化学分析法（例えばガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグ

養物中における薬物濃度の化学分析法、放射性同位体分析法及び(又は)免疫学的分析法		ラフィー（HPLC)、HPLC －質量分析法)、放射性同位体分析法及び（又は）免疫学的分析法を用いることができる。
*本表は、試験系選択肢の総覧ではない。微生物が利用可能な経口用量の分画を求めるには、その薬物に適した試験系を1種以上用いる。		

3.　試験系の方法論的側面

本節では、微生物が利用可能な経口用量の分画を決定する試験の計画及び実施に用いられる試験条件に関する概論を述べる。

（1）　投与量及び薬物濃度：

ア　試験系で設定する投与量及び薬物濃度の範囲のほか、試験目的の正当性を示さなければならない。

イ　試験の投与量及び薬物濃度には、ヒトが残留物を摂取することにより予測される抗菌剤のレベルのほか、それよりもさらに高いレベルも設定しなければならない。

（2）　糞便パラメータ

ア　糞便サンプルの供給元及びサンプル数：

（ア）糞便提供者は、健康であり、少なくとも糞便採取前の 3 ヵ月間は抗菌剤に曝露されたことが知られていないこと（ガイドラインのイの（ウ）一般的勧告の項参照)。

（イ）糞便提供者間でばらつき（例えば、年齢、性別、食事）があるのは本来の姿であるから、実験計画には糞便提供者のばらつきがもたらす影響を考慮に入れるべきである。糞便提供者数は実験の目的に基づいて決定すべきであるが、6名以上が望ましい（図1)。

（ウ）新鮮なサンプル（その日の初回の糞便）をその日のうちに処理することが推奨される。冷蔵庫内温度で最大72時間、嫌気性の環境で貯蔵することは許容できる。

イ　糞便サンプルの物理的特性（例えば、糞便の粘性、水分量、pH、固形成分含有量）を測定することが推奨される。この情報は、次に実施する試験の成績のばらつきの解釈に有用であると考えられる。

ウ　糞便濃度：

（ア）少なくとも糞便濃度 1 濃度について検討すること。結腸内容物を代

表するものとして、25 %の糞便調製物（糞便サンプル１＋希釈液３）が推奨される。

エ　糞便スラリー調製に用いる希釈液：

（ア）糞便物質の希釈に用いる化学成分については、標準化してばらつきを最小限に抑えること。

（イ）最小限の塩類を含む嫌気性菌用の緩衝液を使用すること。

オ　糞便のインキュベーション：

（ア）適切なプロトコールを決定するには、2 名以上の提供者のサンプルを用いて初期実験を検討する。これには、薬物動態に関連する計算ができるよう、適切な範囲の残留物濃度、インキュベーション時間及び多くの時点のサンプリングを含めること。

（イ）微生物が利用可能な経口用量の分画の最終決定には、6 名以上の糞便提供者から得られたデータを用いること。

カ　非滅菌又は滅菌糞便サンプルの使用：

（ア）化学分析を用いた初期試験では、糞便の滅菌処理が薬物と糞便懸濁液との結合に及ぼす影響を考慮する。

（イ）In vitro での薬物結合試験及び不活性化試験を実施する際には、可能であれば非滅菌糞便を使用すること。薬物との結合性において非滅菌糞便懸濁液と滅菌済み糞便懸濁液との間の差がわずかであれば、その後の試験は滅菌糞便のみでよい可能性がある。

（３）微生物が利用可能な微生物学的に活性な薬物の分画の定量法

ア　一連の試験では、微生物学的測定法か化学分析のいずれかを用いる場合があるが、特定の分析法を実施する正当性を示すべきである。化学分析を採用する場合、その分析が微生物学的活性につながるものであるべきである。

イ　薬物の抗菌スペクトルに基づいて、指標細菌の菌種を選定すること。

ウ　分析の感度及び再現性を考慮すること。

エ　試験対照については、用いる試験系に応じて検討すること。

（４）観察された薬物結合の可逆性

ア　薬物結合が可逆的である可能性を明らかにできる時間経過をみるアプローチが推奨される。

イ　さらに作業を進めて結合機構を明らかにすることは、微生物が利用可能な経口用量の分画を定めるという目的に必須のものではない。

4.　微生物が利用可能な経口用量の分画の決定の試験系の使用方法の解説

微生物が利用可能な経口用量の分画の決定に適切であると判断したさまざまな試験系を用いて、in vivo 及び in vitro のアプローチを特定し、レビューした。この分画を導き出すのにこれらの試験系を応用する概念的アプローチの概要を以下にまとめ、図１に示した。

アプローチ１：In vivo 試験系　動物に薬物を投与し、その後、次の選択肢の１つを実施する。

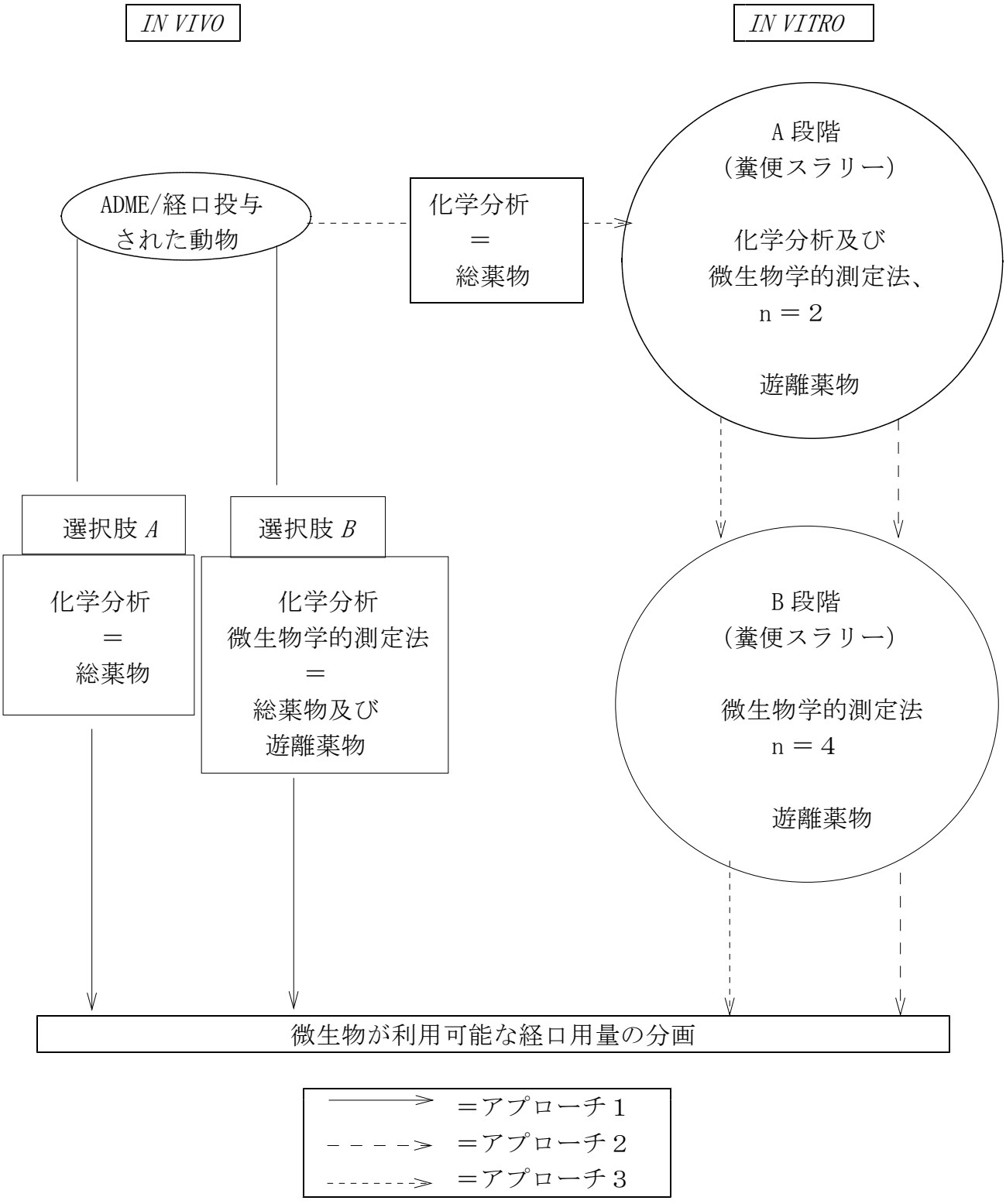
（１）選択肢 A：腸内内容物及び（又は）糞便から抽出して化学分析を行い、総薬物濃度を決定し、微生物が利用可能な経口用量の分画を定める。

（２）選択肢 B：投与した動物の腸内内容物及び（又は）糞便に対して化学分析及び微生物学的活性測定法を実施し、微生物が利用可能な経口用量の分画を定める。

アプローチ 2：In vitro 試験系　このアプローチは 2 段階(A 段階及び B 段階)から構成され、in vitro での糞便スラリー試験系を用いる（図 1 参照)。A 段階は初期試験であり、2 名の提供者の糞便サンプルを用いて、多くの時点でサンプリングした場合の添加薬物の適切な濃度範囲及びインキュベーション時間について明らかにする。この段階では化学分析と微生物学的測定法の両方を実施する。B 段階は A 段階の結果に基づいて実施し、さらに 4 名の提供者のサンプルを追加し、微生物学的測定法を実施する。微生物が利用可能な経口用量の分画の最終決定には、全 6 名のデータを用いる。

アプローチ 3：アプローチ 1（選択肢 A）＋アプローチ 2　このアプローチでは、in vivo 試験と in vitro 試験を組み合わせる。

図 1. 微生物が利用する経口用量の分画を決定する試験系の概略図



（９）急性参照用量（ARfD）設定の一般的アプローチ（VICH GL54）

ア　緒言

（ア）目的

本ガイドラインは、残留動物用医薬品の急性参照用量（ARfD）の設定に有用なデータの性質と種類、そのようなデータを得るための試験及びこれらのデータからどのようにARfDを算出するのかについて述べている。

（イ）背景

ヒト食品中の残留動物用医薬品の安全性は、最も一般的には、無毒性量（NOAEL）[1]設定のための実験動物を用いた毒性試験の結果に適切な安全係数又は不確実係数（UF(s)）[2]を適用して決定されるADIによって示されている。通常μg又はmg/kg体重/日の単位で表現されるADIは、一生涯にわたり摂取しても摂取者の健康に有害作用がないと思われる一日の摂取量として定義される（用語集参照）。

残留動物用医薬品の中には、一回の食事でヒトに有害作用を生じる可能性のあるものがあることが認識されてきた。ADI は、このような一回の食事や一日の暴露により急性の有害作用を引き起こす濃度を規定するのに適切な数値ではない。ARfD を設定することは、この問題に対する適切な手法である。

ARfD アプローチは、農薬及び動物用医薬品を含むその他の化学物質の使用により、食品を大量に摂取する人々が急性又は短期間に暴露された結果として有害作用を引き起こすほどの高濃度でそれらの物質が食品中に残留する場合の指標となる値を定めるために開発されてきた。このことは、食品中の残留物への慢性的又は長期間の暴露の結果として生じる潜在的な有害事象に対応するために設定されているADIとは対照的である。

ARfD アプローチを記載している様々な刊行物がある。2005 年、国際連合食糧農業機関(FAO)/世界保健機構(WHO)合同残留農薬専門家会議(JMPR)の委員らは、農薬の急性健康リスク評価のために、ARfD の手法に関する文書を公表した（Solecki et al., 2005)。経済開発協力機構（OECD）は、主に農薬､殺生物剤及び動物用医薬品のために､ガイダンス第124号､｢ARfDの導出のためのガイダンス」をまとめた（IOMC, 2010)。OECDガイダンス第 124 号には、利用可能なデータを最大限に使用し、ARfD の導出に特化した試験の必要性を最小限にすることを目的とした段階的設定方法が記載されている。この手法は、動物用医薬品の開発における動物の使用を最小限にしようとする3-Rsの原則（Replacement（代替法の利用)、Refinement（苦痛の軽減)、Reduction（使用数の削減))とも合致している。さらに、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）は、「ある種の物質・・・例えば、一部の金属、マイコトキシン又は残留動物用医薬品が急性のリスクを示す可能性があり、言い換えれば、ADI や TDI [3]を超えるレベルで短期間に摂取することにより、急性の健康影響を及ぼす懸念がある。」と述べている。JECFA では、「JMPR により作成されたガイダンス及びその経験に

基づき設定すること・・・ARfD 設定の必要性は、事例ごとに検討されるべきであり、その毒性プロファイル、その発生や摂取パターンに基づき、その物質が 24 時間以内の暴露により急性の健康リスクを引き起こしそうな場合には、考慮されるべきである。」旨が同意された（JECFA, 2005)。さらに、JECFA 及び JMPR は、動物用医薬品が投与された動物の可食部位における残留動物用医薬品の許容濃度を設定するために用いる最大残留限度値（MRL)、トレランス（tolerance）並びに各国又は地域で決めているその他の基準への ARfD の適用について述べている国際化学物質安全計画（IPCS）の環境保健クライテリア(EHC)240 の作成に貢献した（IPCS, 2009)。2016 年には、JECFA は、動物用医薬品における ARfD の使用と解説についてのモノグラフ作成者に向けたガイダンス案を公表した。この文書はまだ作成中である。

（ウ）本ガイドラインの適用範囲

本ガイドラインは、ARfD の設定に有用なデータの性質及び種類、そのようなデータを作成するための試験並びにこれらデータから ARfD を算出する方法について利用できる。本ガイドラインは、毒性学的及び薬理学的エンドポイントのみの利用に限定して残留動物用医薬品に関する特別な考察を提供しており、農薬、汚染物質及び動物用医薬品以外の化学物質へのヒトの暴露に対する ARfD の利用及び導出に関する既存のガイドライン及びガイダンスとは対照的である。本ガイドラインは、動物用医薬品の承認のための国際的に調和された技術的な要件を ARfD について提供する。ARfD の導出のための詳細なガイダンスは、OECD ガイダンス第 124 号（IOMC, 2010）にある。

このガイドラインは、非常に広義な用語を除いて、以下については取り扱わない。

- 国又は地域の行政当局の懸案事項に対応するために ARfD を適用できる場合又はできない場合
- ARfD の決定につながり得る特殊な薬理学的及び毒性学的な有害事象の評価
- MRL、トレランス又は食品中の残留動物用医薬品の許容濃度を精緻化する際に使用される各国及び地域のその他の手段の設定において、ARfD と合わせて使用するヒトの食品暴露の適切なデータ
- 急性のヒト健康リスク評価のための暴露の計算法の精緻化
- 経口以外の動物用医薬品のヒトへの暴露経路

抗菌性の動物用医薬品の残留物の急性的なヒトへの暴露後に、ヒトの腸内細菌叢に急性的な影響を及ぼす可能性についての国際的な取り組みについては認識しているが、本ガイドラインは現時点では毒性学的な ARfD についての調和したアプローチを提供するのみである。

最後に、このガイドラインは、急性毒性に関するヒト食品中の残留物の安全性を確立するために実施可能な試験を限定することを求めるものでは

ない。また、それらのデータがなぜ必要でないかについての科学的根拠に基づく理由も含めて、安全性を同等に保証できる代替アプローチの可能性を排除するものではない。

イ　ARfD のガイダンス

（ア）段階的手法

急性の薬理作用及び毒性のエンドポイントを検討し、試験を計画する前に、3-Rs の原則に注意して熟慮すべきである。したがって急性毒性試験を実施する前に以下の段階的アプローチを推奨する。付記１のフローチャートも参照すること。

ステップ１　急性エンドポイント（投薬の最初の 24 時間に起因する）を設定する目的で適切に処理されているかどうかについて、反復投与毒性試験のデータを含む既存の薬理学的及び毒性学的データ並びに情報を評価する。

ステップ２　追加の急性毒性情報が必要な場合は、例えば、計画された標準的毒性試験における急性エンドポイントに関連した観察／検査を統合することにより、3-Rs の原則を考慮すべきである。

ステップ３　ステップ１及びステップ２により急性エンドポイントについての適切な情報が得られない場合には、特別に設計された新たな毒性試験を検討することができる。

（イ）ARfD 設定のための情報及び試験

最初に考慮すべきことは、動物用医薬品の物理的、化学的、薬理学的及び毒性学的特質についての既存のデータや情報の検討である。この情報は、VICH　GL33 のとおりヒトの食品安全を担保するために提出されたデータ又は査読を受けた公表文献から得られる。加えて、安全性を担保するために VICH　GL33 に従って実施された試験により、ARfD の設定を裏付ける急性毒性のエンドポイントの評価のために有用な情報を得られるかもしれない。化学物質特有の ARfD の導出において、特定の動物用医薬品に関する全てのデータを考慮することが推奨される。

ａ　従来の反復投与毒性試験の利用

急性毒性の可能性に関する情報を評価する場合には、以下の事項が考慮すべき重要な点である。

・　相反するデータがない場合、反復投与毒性試験において観察される急性の有害な薬理学的及び毒性学的作用に関連する全ての所見は、ARfD 設定において価値がある可能性がある。

・　反復投与毒性試験の開始時点における観察や検査に特に重点を置くべきである。

標準的な毒性試験において、可能性のある急性毒性のエンドポイントの例として、OECD ガイダンス第 124 号（段落 36 ～ 59 参照）及び EHC240（5.2.9.5 参照）の記載がある。エンドポイントには、臨床所見はもちろん血液毒性、免疫毒性、神経毒性、肝毒性、腎毒性、発生への影響、

生殖への影響、薬理学的な影響及び消化器官への直接的な影響が含まれるが、それらに限定されるものではない。試験への使用動物数を減らす目標をふまえつつ、場合によっては、試験の本来の目的について譲歩することなく ARfD の評価のためにより有用な情報が得られるよう標準的な毒性試験の計画を修正することは可能であると考えられる。例えば、動物用医薬品が急性の血液学的変化を引き起こしうると予想される場合において、このエンドポイントが単回又は数回の投薬後に起こるかどうかを評価するために、ラットの反復経口投与毒性試験の計画を、投薬の初日から２週目まで対照動物及び投薬動物から採血するというサテライト群を含むように変更することが可能である。もし、高用量群で何の影響も観察されない場合は､採取した検体をそれ以上評価する必要はない。さらに、この例では、起こりうる急性毒性の下限がその試験の高用量に基づいて設定されるかもしれない。EHC240 に示されているエンドポイントに加えて、試験開始時に観察される有害作用も考慮すべきである。

既存の試験計画の修正の前に、想定される作用機序（MOA）を含む動物用医薬品の物理的、化学的、薬理学的及び毒性学的性質に関する既知のデータと情報が考慮されるべきである。ARfD の評価に適切な投与は急性の投与（単回投与又は一日以内の投与）になると想定される一方、影響の測定時期はその動物用医薬品の利用可能な薬物動態学及び薬力学の理解に基づくべきである。特に、急性毒性の可能性を明らかにするには、反復投与毒性試験の開始時における観察及び検査に重点を置くべきである。これまでのガイダンス文書に記載されている以外の急性毒性評価のために選択されたエンドポイントを含めることは、個別に検討すべきである。

投与量の選択、動物数及びサテライト群の使用についての考慮が必要である。反復投与毒性試験プロトコールにおける高用量群は、ヒトへの急性暴露に関する懸念と関連しており、ARfD 設定の情報となり得る。OECD ガイダンス第 124 号の付記２に記載されている試験デザインの要素を既存の反復投与毒性試験に組み入れることは、可能である。投与量の選択は、ARfD の導出のために出発点（POD）を決定するときにも重要である。ヒトの食品の安全性に関係する適切なエンドポイントのうち、最も適切な種の最も鋭敏なエンドポイントの POD を使用すべきである。

b　急性試験

場合によっては、ARfD を決定するために適切な POD が既存の情報から得られないことがある。慢性毒性に関する試験によっては、適切な ARfD の設定を可能とするための頑健な情報を得ることができないかもしれない。そのような場合、目的とする動物用医薬品の ARfD 設定のために特別に設計された単回暴露試験が必要かもしれない。全ての場合において、ARfD を設定するための特別な急性影響試験の設計には、利用可能な物理的、化学的、薬理学的及び毒性学的情報の全てを考慮するこ

とが推奨され、また、関連する（特に薬理活性物質についての）MOA も考慮すべきである。

単回暴露試験を実施するための特別なガイダンスは、OECD ガイダンス第 124 号の付記２に示されている。

（ウ）ARfD の導出方法

ARfD の導出の基本的なアプローチは、懸念のある薬理学的又は毒性学的エンドポイントの適切な POD 又は閾値の特定に基づく。これは、一般的に、NOAEL 又はベンチマークドーズ信頼限界下限値（BMDL）として特定される。ARfD は、この POD を適切な UF(s)で除して求められる。ARfD は、一人当たり又は体重当たりの物質の量として表される（例：mg/ヒト又は mg/kg 体重)。

$$\mathrm{ARfD} = \frac{\mathrm{POD}}{\mathrm{UF}}$$

ただし、POD は、薬理学的影響又は毒性学的影響が懸念される出発点の値又は閾値である（用語集参照)。

UF は、不確実係数、安全係数、動物の個体差、種間の外挿、データの質、影響の重篤度等のような一般的に考慮される一連の係数である（用語集参照)。化学物質特有の評価係数のような適切な不確実係数の選定に関しては、OECD ガイダンス第 124 号（IOMC, 2010）の適切な ARfD 導出のための段階的導出アプローチのステップ１において、更に推奨されている。

不確実係数の検討には OECD ガイダンス第 124 号（21 ページ参照）及び EHC240（5.2.3 参照）を考慮すべきである。種差及びヒトの個体差に対する適切な UFs の選定は、利用可能なデータに基づいて検討されるべきである。化学物質の毒性動態学／毒性力学における差を定量的に考慮し、種差として 10 倍及びヒトの個体差として 10 倍をデフォルト値として使用できる。一つ以上の特定の変動要因に基づく化学物質特有の UFs が利用可能な場合は、種差及びヒトの個体差のための副因子を調整するために、デフォルト値と置き換えることができる。もし化学物質特有の毒性動態学及び毒性力学的データが UFs に基づくデータの正当性を十分に証明できないならば、不確実性の減少又は増加を示しうる全ての情報（例えば、密接に関連する化合物の定量的構造活性相関（QSAR）又は MOA）を考慮する必要がある。

ARfD が毒性学的／薬理学的エンドポイントに基づき決定可能な場合、その ARfD は、公衆衛生保護のため最も適切なエンドポイントに基づくべきである。

ウ　用語集

本ガイドラインにおいては、次の定義を適用する。

3-Rs［3-Rs］：代替法の利用（Replacement)、苦痛の軽減（Refinement)、使用数の削減（Reduction)。VICH では、科学的な基準を維持しながら、

実験動物の使用を削減し、苦痛を軽減し又は代替法を利用する（3-Rs）アプローチをコミット（commit）している。3-Rs の原則が初めて紹介されたのは、Russell 及び Burch の 1959 年の書籍'The principles of humane experimental technique'である。

ADI［Acceptable Daily Intake］：一日摂取許容量（ADI）は、摂取者の健康に有害影響や障害をきたすことなく一生涯毎日摂取できると思われる量である。ADI は、通常、薬物の毒性学的、微生物学的あるいは薬理学的性質に基づいて設定される。ADI は、通常、その物質の μg/kg 体重/日又は mg/kg 体重/日として示される。

ARfD［Acute Reference Dose］：急性参照用量。摂取者の健康に有害作用や障害をきたすことなく、24 時間以内に摂取することができる体重当たりの残留物の推定量。

BMD［Benchmark Dose］：ベンチマークドーズ。通常、健康への影響が 1-10％の範囲にある特定の低い反応頻度と関連する物質の用量又は特定の測定値や生物学的反応の変化と関連する用量。ベンチマークドーズソフトウエア（BMDS）（US Environmental Protection Agency, 2015）と PROAST（National Institute for public Health and the Environment(RIVM),2014）を参照。

BMDL［Benchmark Dose Lower Confidence Limit］： ベンチマークドーズ信頼限界下限値。適切なエンドポイントの利用可能なデータを当てはめた線から外挿した 95 ％片側信頼区間の下限値に基づき定義された適切かつ低く測定可能な反応を示す用量。

EHC［Environmental Health Criteria］：環境保健クライテリア。物理的作用物質及び生物学的作用物質と同様に、動物用医薬品を含む化学物質及び化学物質の組合せによるヒトの健康及び環境への影響に関する国際的評価を示した IPCS（International Program on Chemical Safety）の文書。

IPCS［International Program on Chemical Safety］：国際化学物質安全性計画。世界保健機構、国際労働機関及び国際連合環境計画の共同プログラム。

MOA［Mode of Action］： 作用機序。観測された影響をもたらす主要な事象の生物学的に妥当な連なり（シークエンス）であって、頑健な実験観測及びメカニズムのデータにより支持されたもの。作用機序は、観察された影響にとって必須かつ測定可能な細胞学的及び生化学的重要事象を理論的な枠組みの中で説明する。

NOEL［No Observed Effect Level］：無影響量。ある試験において、何ら作用を示さない最高投与量。

NOAEL［No Observed Adverse Effect Level］： 無毒性量。ある試験において、有害作用を示さない最高投与量。

OECD［Organization for Economic Co-operation and Development］： 経済

協力開発機構。OECD は、様々な国の政府と共に、持続可能な経済成長を支え、雇用を促進し、生活水準を向上させ、財政の安定を維持し、他国の経済発展を支援し、国際貿易に寄与する。

POD［Point of Departure］：出発点。危害要因判定の参照点。一般的には、用量反応曲線において、懸念される毒性学的又は薬理学的な影響を示す反応が最初に現れる点。NOEL、NOAEL 又は BMDL として分類されることが多い。

QSAR［Quantitative Structure Activity Relationship］：定量的構造活性相関。生物活性(例えば毒性)と１つ以上の分子構造の記述との量的相関であり、活性を予測するために使用される。

サテライト群［Satellite Groups］：投与試験計画の全て又は一部に従い処置された後に主たる実験グループとは異なるエンドポイントのために試験される追加の動物群又は異なる処理が行われる追加の動物群。例えば、処置群毎に少数の動物に限定して、全ての処置を受けたラットをサテライト群として薬物動態学/毒性動態学の測定に使用できる。あるいは、全処置群に単回投与のみ受けたサテライト群を置き、亜急性の反復投与毒性試験における急性影響を検討するために使用してもよい。

UF［Uncertainty Factors］：不確実係数。典型的な UFs は、動物データのヒトへの外挿（種間変動）、ヒトの個体間の感受性の変動（個体間変動）、データの性質、影響の重篤度又はその他の懸念における不確実性を計算するためにあり、UF を精緻化することを目的として、変動に関する情報源を、例えば毒性動態学、毒性力学、QSAR、MOA 及び密接に関連した化合物についての情報といった化学物質特有の情報に置き替えることができる。

注１：NOEL（無影響量）及び NOAEL（無毒性量）のどちらの用語も歴史的に ADI を設定するために使用されている。実際に、NOEL 及び NOAEL は、この目的で使用される場合、類似の意味を持つ。

注２：一方の規制当局が「安全係数」という用語を使用し、他の規制当局が「不確実係数」という用語を使用する場合、グループ間（例えば、動物モデルから人へ）とグループ内（例えば、動物から動物へ又は人から人へ）の変動を意味するこれらの用語の適用に一般的な合意が存在する。この文書の目的では、UFs は、安全係数又は不確実係数のいずれかを意味して使用される。

注３：TDI（tolerable daily intake）耐容一日摂取量

エ　引用文献

US Environmental Protection Agency (EPA). Benchmark dose software(BMDS) and User's Manual. Available from: http://www.epa.gov/NCEA/bmds/index

European Food Safety Agency (EFSA). Guidance of the ScientificCommittee on a request from EFSA on the use of the benchmark dose approachin risk assessment. The EFSA Journal. 2009.1150:1-72.

Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals(IOMC). 2010. OECD Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. Series on Testing and Assessment. No. 124. Guidancefor the Derivation of an Acute Reference Dose. Env/JM/MONO(2010)15.

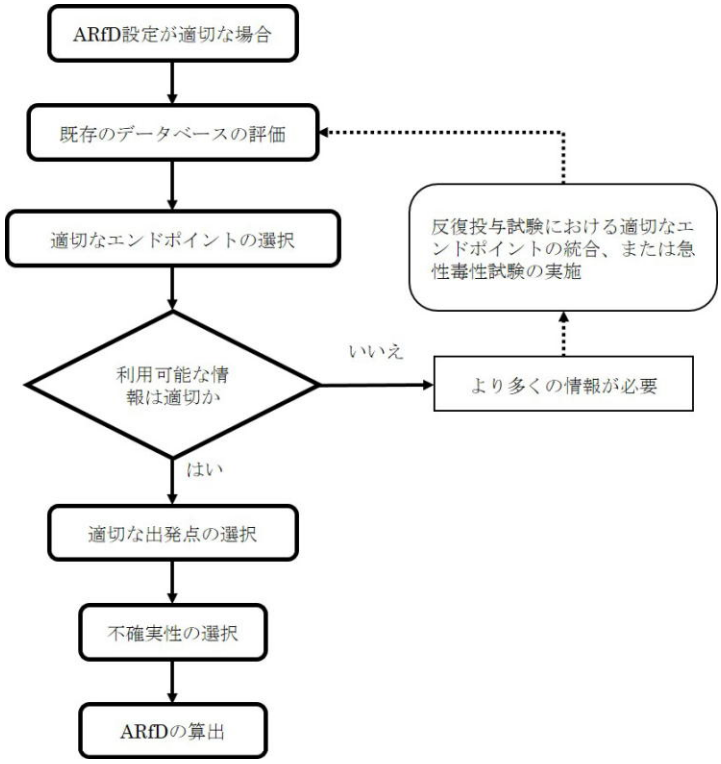
Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Sixty-fourth meeting. Rome, 8-17 February 2005. Summary and Conclusions. Available from: ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf)

International Programme on Chemical Safety. 2009. Environmental Health Criteria 240. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.

Solecki, R, Davies L, Dellarco V, Dewhurst I, van Raaij M, and Tritscher A. 2005. Guidance on setting of acute reference dose (ARfD) for pesticides. Food and Chemical Toxicology 43:1569-1593.

VICH. 2009. VICH Guideline 33, Safety Studies for Veterinary Drug Residues in Human Food: General Approach to Testing.

付記Ａ 適切な ARfD の導出手順



９－２　食用に供する動物を対象としない動物用医薬品のための毒性試験法ガイドライン

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される毒性試験について、標準的な実施方法を示し、動物用医薬品の安全性の適正な評価に資することを目的とする。

しかし、本来、全ての動物用医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的ではなく、また、試験の進展に応じて新たな実験を追加する必要が起こることも少なくない。したがって、得られた所見が臨床上の安全性評価に資することができるものである限り必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものでない。

（１）急性毒性試験、亜急性毒性試験及び慢性毒性試験

原則として全ての新動物用医薬品について、小動物を用いて試験を実施すること。

ただし、亜急性毒性試験については次の①から③までの全てを、慢性毒性試験については次の①から③までの全てを又は③及び④を満たす場合は、当該試験を省略しても差し支えない。

①　「10 －１　動物用生物学的製剤を除く動物用医薬品の対象動物安全性試験（VICH GL43)」に従って対象動物の安全性試験を実施していること

②　使用者が長期間曝露されるおそれがない場合等当該試験を実施しなくても使用者に対する安全性を十分に評価できること

③　既に毒薬又は劇薬の指定の要否に関する審査が終了している動物用医薬品であること

④　投与期間が２週間未満であること

ア　試験動物

（ア）種及び系統の選択に当たっては、寿命、各種自然発生疾患の発生頻度、毒性が既知の物質に対する感受性等を考慮する。

（イ）同一検体について急性毒性試験、亜急性毒性試験及び慢性毒性試験を実施する場合には、同一の種及び系統の動物を使用することが望ましい。

イ　試験方法

（ア）急性毒性試験

①　動物

１種以上の順調に発育した動物とする。通常、未経産で非妊娠のラットの雌が用いられる。

②　動物数

試験の目的に合致する適当な数とする。

③　投与経路

原則として、経口投与とする。臨床適用経路が非経口の場合には、当該臨床適用経路についても実施する。なお、臨床適用経路が特殊で動物での実験が不可能な場合には他の適切な経路とする。

また、経口投与は原則として強制経口投与とし、この場合には、通常検体投与前に一定時間動物を絶食させるものとする。

④　用量段階

用量－反応関係及びおおよその 50 %致死量（LD_{50}）を求めるに足る用量段階を設定する。なお、通常、投与上限量は 2,000mg/kg とする。

⑤　投与回数

原則として1回とする。

⑥　観察期間

原則として 14 日間とする。

⑦　検索方法

a　全例について、少なくとも投与後 30 分以内に1回、24 時間までは定期的に、その後は毎日、一般状態を観察する。

b　体重は投与直前と、少なくとも週に1回以上測定する。

c　観察期間終了時（又は死亡時）に全例を剖検し、全部の器官・組織を肉眼的に観察し、所見を記録する。

（イ）亜急性毒性試験

①　動物

1種以上の同一週齢で、順調に発育した雌雄の動物とする。

一般には、小動物としてラット又はマウスが用いられる。

②　動物数

雌雄各々について、1群5匹以上とする。

動物に大きな負担を与える特殊検査、中途と殺又は回復試験を実施する場合にはそれに要する動物数をあらかじめ追加する。

③　投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制投与又は飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法がある。

④　用量段階

雌雄各々について、3段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

急性毒性試験又は予備的な短期間の連続投与試験の結果を参考に、有害反応の種類と強度を明らかにし、中毒量、最小中毒量及び無毒性量（No Observable Adverse Effect Level : NOAEL）を求め得る投与量及び群数とする。なお、中毒量は、一部の動物を致死させるか又ははっきりした毒性変化が現れる量とし、最小中毒量は何らかの毒性変化が現れる量とする。また、無毒性量（NOAEL）は、いずれの動物にも毒性変化が現れない量とする。

飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、摂餌量又は飲水量から検体摂取量を算出する。

⑤　対照群

陰性対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、それのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。

⑥　投与期間

３週間以上とし、投与は週７日とする。

⑦　検索方法

ａ　各群の全例について、一般状態を詳細に毎日観察し、体重を週１回以上測定する。

ｂ　投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量を週１回以上測定する。

ｃ　投与期間中、各群の全部又は一部の例について、１回以上尿検査、眼科的検査を行う。なお、検体の化学構造、薬理作用及び一般状態から類推して、適切な臨床検査を加えることが望ましい。

ｄ　投与期間中の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観繁を行う。

ｅ　投与期間中に死期の迫った例については､速やかにと殺剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。

なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行うことが望ましい。

ｆ　投与終了時の生存例については、24 時間後にと殺剖検し、全例について器官・組織の肉眼的観察を行う。なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行う。検査の項目は、できる限り多項目にわたることが望ましく、各項目の測定には、それぞれ国際的に繁用されている方法及び測定単位を採用する。

また、筋肉、脂肪、肝臓、腎臓等について検体等の残留量を測定することが望ましい。

（ウ）慢性毒性試験

①　動物

１種以上の同一週齢で、順調に発育した雌雄の動物とする。

一般には、小動物としてラット又はマウスが用いられる。

②　動物数

雌雄各々について、原則として１群 10 匹以上とする。

動物に大きな負担を与える特殊検査、中途と殺又は回復試験を実施する場合にはそれに要する動物数をあらかじめ追加する。

③　投与経路

臨床適用経路又は経口投与とする。

経口投与の場合には、飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法又は強制投与による方法がある。

④　用量段階

雌雄各々について、３段階以上の試験群を設定するとともに、別に

対照群を置く。

亜急性毒性試験の結果を参考に、何らかの毒性変化が現れる量及び無毒性量（NOAEL）を求め得る投与量及び群数を決定する。

飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、摂餌量又は飲水量から検体摂取量を算出する。

⑤　対照群

陰性対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、それのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。

⑥　投与期間

３か月以上とし、投与は週７日とする。

⑦　検索方法

ａ　各群の全例について、一般状態を毎日観察し、体重を投与開始後３か月間は週１回以上、その後は４週に１回以上測定する。

ｂ　投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量を投与開始後３ヵ月間は週１回以上、その後は４週に１回以上測定する。

ｃ　投与期間中、各群ごとに一定数の例を任意に選び、１回以上尿検査、眼科的検査を行う。なお、必要があればその他の臨床検査を実施する。

ｄ　投与期間の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察、重量の測定及び病理組織学的検索を行う。

病理組織学的検索の対象となる器官・組織は次のとおりであるが、肉眼所見等からその必要性が認められないと判断される場合には、その一部を省略できる。

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨（骨髄を含む。）、胸腺、気管・肺及び気管支、心臓＊、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃及び十二指腸、小腸、大腸、肝臓＊、膵臓、脾臓＊、腎臓＊、副腎＊、膀胱、精嚢、前立腺＊、精巣＊、卵巣＊、子宮、膣、脳＊、下垂体＊、脊髄、眼球、ハーダー腺、その他肉眼で変化が認められた器官・組織

上記の器官・組織のうち＊印を付したものについては、その重量を測定する。

ｅ　投与期間中に死期の迫った例については､速やかにと殺剖検し、ｄのとおり器官・組織の肉眼的観察、重量の測定及び病理組織学的検索を行う。

なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行うことが望ましい。

ｆ　投与終了時の生存例については、と殺剖検し、ｄのとおり各群の全例について器官・組織の肉眼的観察及び重量の測定を行う。

病理組織学的検索は、原則として対照群及び最高用量群の全例について行うが、他の試験群において、肉眼で変化が認められた器官・組織がある場合又は最高用量群で観察された変化から考えて必要性のある場合には、他の試験群の全例についても当該器官・組織の病理組織学的検索を行う。なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行う。検査の項目は、できる限り多項目にわたることが望ましく、各項目の測定には、それぞれ国際的に繁用されている方法及び測定単位を採用する。

（２）生殖・発生毒性試験

原則として新動物用医薬品について、「（ア）催奇形性試験」を実施すること。

本試験の成績により必要と考えられる場合又は別に知られている知見等から雌雄動物の生殖能力や分娩など生殖の過程に対して悪影響を及ぼすことが疑われる動物用医薬品については、「（イ）一世代生殖毒性試験」を実施すること。ただし、使用者等に対するリスクアセスメントの結果、使用者等が暴露するおそれがほとんどない場合で、かつ、繁殖用動物（繁殖に供する雄動物、妊娠の予定がある動物、妊娠の可能性がある動物並びに妊娠中及び授乳中の動物）に使用しない場合には、「（イ）一世代生殖毒性試験」を省略しても差し支えない。試験を省略した場合には、概要書において試験を省略することの妥当性についてリスクアセスメントの結果を含め記載するとともに、使用上の注意に、繁殖用動物に使用しない旨、その理由等を記載すること。なお、試験を省略する場合には、予め動物医薬品検査所に相談することが望ましい。妊娠前から離乳期までにわたる生殖過程の期間を３区分し、それぞれを投与期間として、「（ア）妊娠前及び妊娠初期投与試験」、「（イ）胎仔の器官形成期投与試験」及び「（ウ）周産期及び授乳期投与試験」を実施することにより、生殖・発生への悪影響を正確に把握できるように配慮した試験法を採用しても差し支えない。

ア　試験動物

（ア）種及び系統の選択に当たっては、受胎能などの生殖に関する知見、自然発生奇形の発生頻度、生殖・発生に悪影響を及ぼすことが明らかにされている物質に対する感受性等を考慮する。

（イ）奇形子の自然発現率の低い種及び系統を選択することが望ましい。

（ウ）（イ）及び（ウ）の試験に共通して用いられる動物においては、種及び系統が同一であることが望ましい。

イ　試験方法

（ア）催奇形性試験

①　動物

ラット又はマウスなどのげっ歯類及びウサギなどの非げっ歯類からそれぞれ選んだ各１種以上の雌動物とする。

一般には、試験が比較的容易にでき、かつ、一般的な代謝様式等が

比較的知られている動物種が用いられる。

② 動物数

ラット又はマウスでは１群 20 匹以上、ウサギでは１群８匹以上とする。

動物数は、妊娠が成立した個体の数を意味する。

ラット、マウス又はウサギ以外の動物種を用いる場合には、原則として評価に耐える知見が得られると期待される動物数とする。

③ 投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制経口投与を原則とする。

強制投与法は、確実に一定量を投与できる点などで飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法に勝っている。

臨床適用経路を採用し難い場合には、他の経路をもって代えてもよい。

④ 用量段階

３段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

最高用量は摂餌量の低下、体重増加の抑制など何らかの明らかな毒性徴候が現れる量とする。技術的に投与できる最大量においても毒性徴候が現れない場合には、その量を最高用量とする。最低用量は、母動物及び胎仔の両方ともに障害が現れない量とする。中間用量（複数のこともある。）は、原則として最高用量と最低用量の等比中項とする。用量段階のうちには、当該使用動物で薬理効果が現れる量又は推定臨床常用量と著しく掛け離れていない用量が含まれることが望ましい。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。なお、必要に応じて陽性対照又は比較対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、原則としてそれのみを与える群とする。なお、陽性対照には催奇形性を有することが明らかにされている物質を、比較対照には、化学構造又は薬効が類似する既存薬物を用いる。

⑥ 投与期間

胎子の器官形成期の間連日投与を行う。

⑦ 検索方法

a 試験期間中、母動物については、各群の全例についてその生死及び一般状態を観察し、体重及び摂餌量を測定する。

b 母動物は全例を妊娠末期に剖検し、妊娠の成立、胎子の死亡の有無を検索し、かつ、生存胎子については体重などの測定及びその形態学的検索を行う。死亡胎子については、できる限り死亡時期を推定する根拠となる所見を記録する。また、母動物については、器官・組織の肉眼的観察を行う。

（イ）一世代生殖毒性試験

① 動物

げっ歯類から選んだ１種以上の雌雄の動物とする。

一般的にはラット又はマウスが用いられる。

② 動物数

１群 20 匹以上の雄と妊娠末期において原則として１群 20 匹以上の妊娠動物を確保するために必要な雌とする。

③ 投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制投与又は飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法がある。臨床適用経路を採用し難い場合には、他の経路をもって代えてもよい。

④ 用量段階

３段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

最高用量は摂餌量の低下、体重増加の抑制など何らかの明らかな毒性徴候が現れる量とする。技術的に投与できる最大量においても毒性徴候が現れない場合には、その量を最高用量とする。最低用量は、親動物、胎子又は出生子のいずれにも障害が現れない量とする。中間用量（複数のこともある。）は、原則として最高用量と最低用量の等比中項とする。

用量段階のうちには、当該使用動物で薬理効果が現れる量又は推定臨床常用量と著しく掛け離れていない用量が含まれることが望ましい。

⑤ 対照群

陰性対照を置く。なお、必要に応じて陽性対照又は比較対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、原則としてそれのみを与える群とする。なお、陽性対照には生殖に悪影響を及ぼすことが明らかにされている物質を、比較対照には、化学構造又は薬効が類似する既存薬物を用いる。

⑥ 投与期間

雌雄とも８週齢時から８週間以上連日投与してから交配に当てる。

交配は３週間を限度として同一の雄と雌を１対１で同居させる。

雄については、交配期間中も連続投与し、雌については、交配期間中、妊娠期間中及び分娩後３週間における新生子の離乳までの期間投与を続ける。

⑦ 検索方法

ａ 試験期間中、各群の全例についてその生死及び一般状態を観察し、母動物については、体重及び摂餌量を測定する。

ｂ 交配期間の終了した雄はと殺剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。交尾が成立しなかった雌雄についてはその原因を調査す

る。

交尾率及び受胎率を求める。

これらは、通常次の算出法による。

交尾率＝（交尾動物／同居動物）×100

受胎率＝（受胎動物／交尾動物）×100

c　各群の全例を分娩哺育させる。

分娩に際しては、分娩の障害や遅延の徴候などについて観察する。

出産率を求める。

これは、通常次の算出法による。

出産率＝（生子出産雌数／妊娠雌数）×100

d　新生子については、産子数、その生死、性別及び外表における変化などを検索し、体重を測定する。

同腹生子数を調整する場合には、生後比較的早い時期に、１母体当たり雄と雌がほぼ同数から成る一定匹数を無作為に採り、余分な子を淘汰する。ラット又はマウスでは、通常生後４日齢で８匹程度にする。

e　出生子については、成長及び発達並びに特異な症状の有無や行動の異状などに関する検索を行う。

出生子に異常所見が見いだされた場合には、必要に応じて、新たに乳母哺育試験などを行って生後のいずれの時期における影響によるかを分析すべきである。

成長及び発達については、形態、機能及び行動に関する検索を行う。

また、必要に応じて更に長期間の観察を行う。出生から離乳までの間に出生率、生存率及び離乳率を求める。

これらは通常の算出法による。

出生率＝（出産生子数／着床頭数）×100

４日生子率＝（生後４日の生子数／出産子数）×100

離乳率＝（離乳時生子数／生後４日の生子数又は淘汰直後の生子数）×100

f　処置された母動物については、適当な時期に剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行う。なお、必要に応じて検体の投与を続けて多世代に関する検索を行う。

（３）変異原性試験

原則として新動物用医薬品について、遺伝子突然変異誘発性を指標とする「(ア) 細菌を用いる復帰変異試験」及び染色体異常誘発性を指標とする「(イ) 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験」を実施すること。ただし、(ア) 又は（イ）の試験の結果、変異原性が疑われる場合には「(ウ) マウスを用いる小核試験」を実施すること。

なお、以上の試験及び他の毒性試験の結果並びに薬理作用に関する試験の結果から必要と認められる場合には、その他の変異原性試験を追加して行うことが望ましい。

試験方法

（ア）細菌を用いる復帰変異試験

① 菌株

ネズミチフス菌（*S. typhimurium*）の TA1535、TA1537、TA98、TA100 など及び大腸菌（*E. coli*）の WP2uvrA などの数菌株とする。

② 用量段階

５～６段階の試験用量を設定するとともに、別に対照を置く。

最高用量は原則として５ mg/プレートを限度とし、抗菌性を示す薬物では抗菌性を示す用量とする。

③ 対照

陰性及び陽性対照を置く。

陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知変異原物質（S9 mix を必要としない物質と必要とする物質）を用いる。

④ 代謝活性化

S9 mix を加えた試験と加えない試験とを平行して行う。哺乳類（通常ラット）に適切な薬物代謝酵素系の誘導剤を投与した後、肝臓から S9 を調製する。この S9 に補酵素などを加えた S9 mix を用いる。

⑤ 試験方法

プレインキュベーション法又はプレート法のいずれかとする。

抗生物質など特に強い抗菌性を示す薬物については、試験に用いる菌とインキュベートした後洗浄し、更に、菌を再び懸濁して突然変異誘発数と生存菌数とから突然変異誘発頻度を求めることが望ましい。

⑥ 結果

復帰変異コロニー数の実測値とその平均を表示（図を含む。）する。

（イ）哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

① 細胞

哺乳類の初代又は継代培養細胞を用いる。

チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞（CHL、CHO）など、できるだけ感受性の高いものを使用することが望ましい。

② 用量段階

３段階以上の試験用量を設定する。

最高用量は細胞増殖（又は分裂）が 50 %抑制される濃度を指標とし、その前後の用量を用いる。

細胞毒性が認められない場合は、0.01mol/L 相当又は 5 mg/mL の濃度を限度とする。

③ 対照

陰性及び陽性対照を置く。

陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知染色体異常誘発物質を用いる。

④　代謝活性化

適切な代謝活性化法を併用することが望ましい。

哺乳類（通常ラット）に適切な薬物代謝酵素系の誘導剤を投与した後、肝臓から S9 を調製する。この S9 に補酵素などを加えた S9　mix を用いる。

⑤　検索方法

検体処理後、適切な時期に染色体標本を作製する。

原則として、用量当たり２系列の培養を用いる。

１系列当たり 100 個の分裂中期像について、染色体の形態異常及び倍数性細胞について検索する。

形態異常では染色分体又は染色体に見られる構造異常の種類を明記する。

⑥　結果

染色体異常を持つ細胞の出現頻度又は細胞当たりの染色体異常頻度を表示（図を含む。）する。

（ウ）マウスを用いる小核試験

げっ歯類の骨髄細胞を用いる染色体異常試験で代行してもよい。

①　動物

原則として純系又は均一の雄を用いる。

②　動物数

１群５匹以上とする。

③　投与経路

腹腔内投与又は経口投与とする。

経口投与は、原則として強制投与とする。

④　用量段階

３段階以上の試験群を設定する。

最高用量は、体重増加の抑制など何らかの毒性徴候が現れる用量とする。毒性徴候が現れない場合には、2,000mg/kg を最高用量とする。

⑤　対照群

陰性及び陽性対照を置く。

陰性対照は、原則として溶媒対照とする。陽性対照としては、既知小核誘発物質を用いる。

⑥　投与回数

単回及び４～５回の連続投与を行う。ただし、連続投与する場合には適切な単一用量を設定する。

⑦　検索方法

a　検体投与後、適切な時期に各群の全例をと殺し、骨髄塗抹標本を作製する。

標本の作製は検体投与後、18 ～ 30 時間目に行うことが望ましい。

b　原則として個体当たり 1,000 個の多染性赤血球について、小核の有無を検索する。同時に全赤血球に対する多染性赤血球の出現頻度を求める。多染性赤血球の代わりに網〔状〕赤血球の頻度を求めてもよい。

⑧　結果

小核を有する多染性赤血球の出現頻度及び全赤血球に対する多染性赤血球の出現頻度を表示する。

陽性結果が得られた場合には、用量依存性について図示する。

（４）がん原性試験

原則として次のいずれかによりがん原性が疑われる場合には、がん原性試験を実施すること。

（イ）化学構造又は薬理作用

（ロ）毒性試験の結果

（ハ）その他

ア　試験動物

①　種及び系統の選択に当たっては、感染性疾患に対する抵抗性、寿命、自然発生腫瘍の発生頻度､既知がん原性物質に対する感受性を考慮する。

②　同一検体についてがん原性予備試験及びがん原性試験を実施する場合には、同一の種及び系統の動物を使用する。

イ　試験方法

①　動物

２種以上の雌雄の動物とする。なお、同一週齢で、順調に発育した６週齢までの動物を用いることが望ましい。

現在のところ、一般には、ラット、マウス又はハムスターが用いられる。

離乳後できるだけ早い時期に開始することが望ましい。

②　動物数

雌雄各々について、１群 50 匹以上とする。各群への動物の割付けには、体重層別等による適切な無作為抽出法を用いる。

③　投与経路

原則として臨床適用経路とする。

経口投与の場合には、強制投与又は飼料若しくは飲料水に混入して自由に摂取させる方法がある。

検体を飼料に混入して投与する場合には、飼料中の検体濃度は最高５％までとする。

④　用量段階

雌雄各々について、３段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

最高用量は予備試験の亜急性毒性試験で定めた量とし、最低用量として当該使用動物種で薬理効果が現れる量又は推定臨床常用量を勘案して設定する。中間用量は、最高用量と最低用量との等比中項をとることが望ましい。

一般には、最低用量は、最高用量の 10 %以上であることが望ましい。ただし最低用量と推定臨床常用量とが著しく掛け離れている場合には、最高用量の 10 %未満の用量を別途設けてもよい。

検体を飼料又は飲料水に混入して投与する場合には、投与期間中、個別又は群ごとに摂餌量又は飲水量を投与開始後３か月間は週１回以上、その後は３か月に１回以上測定し、検体摂取量を算出する。なお、試験開始前及び試験中に適宜検体の純度、安定性及び夾雑物を可能な限り定性的又は定量的に分析する。

⑤　対照群

陰性対照を置く。

陰性対照は、検体投与に当たり各種溶媒、乳化剤等を必要とする場合には、それのみを与える群とする。また、その他に無処置対照群を置くことが望ましい。

⑥　投与期間

ラットでは 24 か月以上 30 か月以内、マウス及びハムスターでは 18 か月以上 24 か月以内とし、投与は原則として週７日とする。

強制投与の場合､実務的な見地から週５日以上の投与でも容認される。

⑦　試験期間

投与終了時又は投与終了後１～３か月までとする。ただし、試験の最長期間は､ラットでは 30 か月､マウス及びハムスターでは 24 か月とし、最低用量群又は対照群の累積死亡率が 75 %になった場合には、その時点で生存例をと殺し、試験を終了する。

腫瘍以外の原因による死亡率が、投与開始後ラットでは 24 か月、マウス及びハムスターでは 18 か月の時点で 50 %以上であることを要する。

いずれの群においても、動物の 10 %以上が自己融解、共食い又は飼育上の問題で失われないこと。

したがって、試験期間中に衰弱動物や死期の迫った動物が見いだされた場合には、隔離又はと殺解剖等の配慮が必要である。

⑧　検索方法

ａ　各群の全例について、一般状態を毎日観察し、体重を投与開始後３か月間は週１回以上、その後は４週に１回以上測定する。

ｂ　試験期間中の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検索を行う。

病理組織学的検査は、次の器官・組織について行う。

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、椎骨又は大腿骨（骨髄を含む。）、胸腺、気管・肺及び気管支、心臓、甲状腺及び上皮小体、舌、食道、胃及び十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精嚢、前立腺、精巣、卵巣、子宮、膣、眼球、脳、下垂体、脊髄、その他肉眼で腫瘍性病変が認められた器官・組織。

腫瘍性病変の記載に際しては、腫瘍発生に至る各種変化（前がん病変）の所見も付け加える必要がある。

c　試験期間中に死期の迫った例については、速やかに隔離又はと殺剖検し、ｂのとおり器官・組織の肉眼的観察及び病理組織学的検索を行う。

なお、と殺時、必要に応じて血液を採取し、末梢血の赤血球数及び白血球数を測定するとともに、塗抹標本を作成し、貧血、リンパ節・肝臓・脾臓の腫大等血液疾患を予想させる例については塗抹標本を検索する。

d　試験終了時の生存例については、速やかに剖検し、各群の全例について、ｂのとおり器官・組織の肉眼的観察を行う。

病理組織学的検索は､原則として試験群及び対照群について行う。

なお、と殺時、必要に応じて血液を採取し、末梢血の赤血球数及び白血球数を測定するとともに、塗抹標本を作成し、貧血、リンパ節・肝臓・脾臓の腫大等血液疾患を予想させる例については塗抹標本を検索する。

10　動物用医薬品のための安全性試験法ガイドライン

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される安全性試験について、標準的な実施方法を示し、動物用医薬品の安全性の適正な評価に資することを目的とする。

しかし、本来、全ての動物用医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的ではなく、また、試験の進展に応じて新たな実験を追加する必要が起こることも少なくない。したがって、得られた所見が臨床上の安全性評価に資することができるものである限り必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものでない。

原則として全ての新動物用医薬品について、対象動物を用いて試験を実施すること。

（１）動物

ア　検体の適用を予定している対象動物（養殖水産動物を含む。）であって、飼料及び動物用医薬品の使用歴並びに試験開始前における飼養方法等が明らかなものを用いる。

養殖水産動物にあっては、試験期間中の飼育水温は、それぞれの試験動物ごとに、次の範囲内であることを基準とする。

ぶり、まだい、こい、うなぎ：22 ～ 28 ℃

にじます　　：12 ～ 18 ℃

あゆ　　：19 ～ 25 ℃

イ　動物用生物学的製剤のうちワクチン、血清及び動物に直接使用する診断液（以下「ワクチン等」という。）にあっては、アの要件に加え、次の要件に適合する対象動物を用いる。なお、妊娠動物に対する使用を予定しているワクチン等にあっては、非妊娠動物及び妊娠動物の両方を用いる。

（ア）適用を予定している日齢のうち障害が最も強く発現する日齢の対象動物

（イ）品種、系統及び規格（SPF 等）並びに保有している抗体の種類及びその量について確認した対象動物

（２）動物数

各用量群について、哺乳動物にあっては３例以上、鶏にあっては 10 羽以上及び養殖水産動物にあっては 20 尾以上を用いる。

（３）投与経路

原則として臨床適用経路とするが、複数ある場合には障害が最も強く発現する経路で実施して差し支えない。ただし、アジュバントを含有するワクチンについては、臨床適用経路が複数ある場合であっても、全ての臨床適用経路で実施する。

（４）用量段階

ア　２段階以上の試験群を設定するとともに、別に対照群を置く。

イ　試験群の投与量は、副作用が現われる量（又は投与可能最高量）及び無影響量とする。この場合、ワクチン等の投与可能最高量とは次の量を目安とし、物理的な障害を動物に与えないよう必要に応じ分割して投与する。

（ア）生ワクチンであって投与時に調整するもの：100 用量分

（イ）（ア）以外のもの：10 用量分

（５）投与期間

ア　ワクチン等以外の検体にあっては、臨床適用の最長投与期間以上とする。臨床適用が１～２日に限られている場合にあっても３日以上の投与が必要である。ただし、臨床適用の期間が長期の場合には、投与期間を短縮して差し支えない。

イ

（ア）ワクチンにあっては、その適用を予定している投与期間及び投与回数の投与を行った後、更に２か月間隔で１回以上の投与を行う。ただし、生涯投与回数が２回以内に限定されるものについては、適用を予定している投与期間及び投与回数の投与のみを行うこととしても差し支えない。

（イ）血清及び動物に直接使用する診断液にあっては、２か月間隔で２回以上投与する。

（６）観察事項

ア　試験群の全例について、一般状態を多元的に毎日観察し、必要により全部又は一部について、血清学的検査及び生化学的検査（血液生化学的検査、尿検査等）を実施する。

イ　試験期間中の死亡例については、速やかに剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行い、必要に応じて重量の測定及び病理組織学的検索を行う。

ウ　試験期間中に死期の迫った例については、速やかにと殺剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行い、必要に応じて重量の測定及び病理組織学的検索を行う。

　なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行う。

エ　試験終了後の生存例については、全部又は一部についてと殺剖検し（ただし、局所作用剤又は最高投与量で、一般状態及び臨床検査成績に異常が認められない場合は除く。）器官・組織の肉眼的観察、重量の測定及び病理組織学的検索（アジュバントを含有するワクチンにあっては、接種部位を含む。）を行う。

　なお、と殺時に血液を採取して、血液学的検査及び血液生化学的検査を行う。

オ　妊娠動物に対する使用を予定しているワクチン等にあっては、試験に用いた妊娠動物の産子についても、試験群に準じて観察を行う。

10 －１　動物用生物学的製剤を除く動物用医薬品の対象動物安全性試験（VICH GL43）

（１）緒言

対象動物安全性(以下「TAS」という。)試験のデータは、VICH 参加地域における動物用医薬品の承認申請のために必要である。基本的な TAS 試験方法の国際的な調和は、データの適正化を促し、各国の規制当局が別々の試験を行う必要性を最小限にする。適切な国際的な基準は、各地域において同様の試験が行われることを最小限にすることで研究開発経費を軽減する。また、試験に使用される動物数が減少することから、動物福祉に貢献することができる。この VICH TAS ガイドラインは、VICH に係わる承認審査機関が相互に受け入れ可能な TAS 試験の計画に役立つように､国際的に調和された基準として作成された。国内販売に限定された製剤の承認を得るためにおいても、この VICH ガイドラインに準じて試験を実施することは強く推奨されるが、その適用は各国の承認審査機関の判断による。

ア　目的

この国際的に調和されたガイドラインの目的は、動物用生物学的製剤を除く開発中の動物用医薬品(Investigational Veterinary Pharmaceutical Product；以下「IVPP」という。) に係る TAS 試験資料が、試験に適当と考えられる最低限の動物数を用い、安全域の確認及び可能であれば標的器官の特定を含めた対象動物における IVPP の安全性を明らかにするために推奨される適切な試験方法を示すことにある。

イ　背景

VICH 参加地域における、IVPP の承認申請に必要な要件を概説した国際的に調和されたガイドラインを作成するために TAS 専門家会議において本ガイドラインの検討が開始された。当然、ガイドラインは全ての可能性を扱うことはできない。TAS 専門家会議は、TAS 試験の計画と実施を助け、臨床試験において起こり得る有害事象のモニタリングを支援するために、このガイドラインに含まれる一般原則を作成した。より具体的な勧告としては、事前検討が可能な国にあっては、試験開始前に承認審査機関による試験プロトコールの確認を受けることが推奨される。

代替法がより適切であると思われる特別な場合には、申請者がその判断根拠を整理し、作業開始前に承認審査機関と相談することが推奨される。

ウ　範囲

このガイドラインは、牛、羊、山羊、猫、犬、豚、馬及び家きん（鶏及び七面鳥）に使用される全ての IVPP を対象とする。希少種への使用及び希少疾病への使用は、国内での承認申請の際にはこの要件から除外される可能性がある。このガイドラインは、水産動物を含むその他の動物種の TAS 試験設計のための情報は提供しない。その他の動物種については、各国のガイドラインに従って TAS 試験を設計すべきである。

このガイドラインは IVPP の評価に用いる試験方法の国際的な調和に寄与

する。このガイドラインは、承認申請者が実験室条件及び臨床条件下で TAS 試験を準備し、実施するのを支援するために作成されている。この文書中の全ての要件が全ての IVPP に必要とは限らない。他の IVPP では、対象動物の安全性を示すためにこの文書中では規定されていない追加の情報が必要となる可能性がある。

（２）安全域試験

TAS 試験の目的は、設定される使用条件下で、対象とする動物種における IVPP の安全性に関する情報を提供することである。安全域の試験は IVPP の承認申請に不可欠である。更に、可能であれば、IVPP の過量投与及び投与期間の延長に伴う有害作用も明らかにすべきである。IVPP の有効性を確認するために実施される用量確認試験及び臨床試験は、対象動物種における安全性について更なる情報を提供する。IVPP に既知又は疑わしい特性がある場合には、毒性試験又は特殊な試験を追加設定することが必要となる可能性がある。

予定される投与期間及び投与期間を延長した場合において、常用量群及び高用量群の両方が試験群として設定されていれば、安全域を証明することができる。常用量、高用量レベル及び投与期間の選定に際しては、製剤の予定される用法及び薬理活性成分（Active Pharmaceutical Ingredient；以下 10 － 1 において「API」という。）の既知の薬理学的及び毒性学的性質を考慮して、申請者が常に妥当性を正当化すべきである。用法又は剤形が高リスク又は過量投与につながる場合、IVPP に対して、別の試験又は安全域試験において、より高用量レベルを含めた試験を行うことが推奨される。これには飼料へ添加する時に小数点の付け違いをするなどの用量の計算間違いを起こしやすい場合などが含まれると考えられる。

TAS 評価の試験設計と対象動物で起こる可能性のある有害作用の予測は、対象動物及び実験動物試験における薬物動態学、薬力学及び毒性学を含む公表論文及び予備試験のデータを参照すべきである。IVPP の安全性を評価するために必要な具体的情報には、予定される用法及び用量、薬剤の種類、化学及び製造法の考察、効能、類似製剤の以前の使用歴、乳牛か肉牛か等の動物のクラス(注；用語集参照)及び系統を含む動物種等の要因がある。IVPP の潜在的有害作用を検出するために、適切な観察、身体検査、臨床病理検査(血液学、血液生化学、尿検査、糞便検査など)、剖検及び病理組織学的検査を実施すべきである。

新しい塩又は新しい剤形の API に対しては、一般に安全域試験が必要である。安全域試験を実施しない場合は、例えば、API の毒性及び対象動物安全性におけるプロファイルが既知であり、既承認製剤が臨床的に汎用されていて、かつ／又は新しい製品の全身又は局所曝露（該当する場合）が既承認製剤のそれと同等又はそれより少ないこと等に基づいて、妥当性を説明しなければならない。

API への全身暴露が無視できる程度であり、既存の薬理学及び毒性学的知見に基づいて安全性に問題がない場合には、安全域試験は必要ない可能性がある。しかし、このことについては申請者が妥当性を説明すべきであり、投与部位の安全性試験（（３）のア～エ参照）の実施が推奨される。

ア　基準

安全域試験及びその他の実験室内安全性試験はGLPの原則に適合するように実施しなければならない。IVPPは最新のGMP（current GMP；以下「cGMP」という。）の原則に適合するように製造しなければならない。

イ　動物

一般にTAS試験にはIVPPが使用される予定の動物種及びクラスを代表する健康な動物を使用すべきである。動物の年齢は、充分に考慮すべきである。製剤を幼若動物に使用することが予定されている場合には、TAS試験における動物は、一般に承認予定の最も若い年齢とする。それ以外では、健康で若い成熟動物を用いるべきである。投与予定の対象集団中に潜在的に感受性の高い群が存在する場合には、そのような動物による追加試験が必要であろう。

動物を試験条件に馴化させることが推奨される。投与動物と対照動物は同じ管理をすべきであり、予防的処置は、可能であれば、試験のベースライン期間前に完了しておく。試験中における他製剤の併用療法は、IVPPによる安全性の問題の特定をより困難にさせる懸念があり、推奨されない。試験は、使用する動物数を最小限にする一方で、十分な情報が得られるように注意深く設計すべきである。飼育施設及び飼育管理は、各地域の動物福祉に関する規定を遵守するとともに試験目的に適合させるべきである。飼育環境、飼料及び飲水は、動物種、生理学的発育段階及び年齢に適合するように、試験期間を通して調整すべきである。飼料及び飲水の品質及び組成は、試験期間を通してモニタリングすることが推奨される。試験中は苦痛の軽減又は排除が不可欠である。また、瀕死動物の安楽死及び剖検が推奨される。

ウ　IVPPと投与経路

評価するIVPPは、市販を予定している製品を用いるべきである。市販する製品を使わない場合には、比較（ブリッジ）試験を必要とする可能性がある。例えば、IVPPの一つの処方に関するTASデータと他の処方のそれとの関連性は、これら２つの処方間の生物学的同等性データ又は両処方間の他のデータを用いて証明することができる。IVPPは、プラセボ（例えば生理食塩水）又は無投与対照との比較によって評価すべきである。処方の詳細、一般名又は商品名及びバッチ番号を明記すべきである。IVPPの調整方法、取扱い及び保管条件の詳細について明記し、試験プロトコールに基づいて使用すべきである。投与部位を明確にし、薬剤の投与は製品で予定される使用条件で行うべきである。飼料がAPIの生物学的利用能に影響する場合には、有害作用を示す可能性が最も高くなるように、投与前に動物に給餌するか絶食させるかを選択すべきである。容量又は嗜好性が制限要因となって高用量の投与ができない場合には、代替法(例えば、複数部位への投与、胃カテーテル投与、頻回投与)を考慮してもよい。複数の投与経路を申請者が提案する場合には、最も有害作用を生じやすい経路を選択すべきである。局所での寛容性に関する追加試験（（３）のア又はイ参照）を必要に応じて実施すべきである。

エ　投与量、投与回数及び投与期間

安全域試験の一般的設計は、IVPP の予定される用量と投与期間の複数倍を用いる。TAS 試験に用いる特別な投与量、回数及び期間の組み合わせは、IVPP の薬理及び毒性に基づいて選択し妥当性を示すべきである。

API の薬理学的・毒性学的性状と製剤の提案する用法によって別途妥当性が示されない限り、安全域試験の試験設計は、陰性対照群、最高常用量群（１×）及びこの用量の複数倍の２段階群(多くの場合３倍（３×）及び５倍（５×）)を含め、予定される最長の投与期間を超える期間とすべきである。最高常用量（１×）は、製品で予定されている実際に最も多い投与量と定義される。最高用量は、不連続な用量形態（例えば、単位用量、錠剤の組み合わせ等）が推奨される API において、一定分量に対して許容される動物の体重域の中で、最も体重の少ない動物における用量と考えることができるかもしれない。ある地域においては、薬理学及び毒性学に基づいた別の試験設計、例えば、最高常用量（１×）のみで予定される最長の投与期間を超える期間に製剤を投与するような試験設計も受け入れられる可能性がある。試験設計に関わりなく、陰性対照を常に設定しなければならない。

一般に、各群には予定される投与期間の少なくとも３倍、最長 90 日まで投与すべきである（例えば、単回投与が提案されている IVPP であれば、IVPP の薬理学的特性から決定した３回連続投与；７日間毎日投与が予定されていれば 21 日間連続投与)。短期間の間欠投与が意図されている場合には、推奨する間隔で３回投与すべきである（例えば、週１回投与が予定されている場合、週１回で３週連続)。各動物に３か月間以上連続投与を予定している製剤の場合は、薬理学及び毒性学によって、最長６か月までの長期間投与試験、あるいは適切であればそれ以上の期間（例えば、薬物蓄積が長期投与で増加するかもしれない場合、あるいは１用量投与による薬物活性の期間が２か月間を超える場合）が必要かもしれない。

オ　試験設計

試験における偏りを避けるための最も重要な手法は、無作為化とマスキング（盲検化）である。無作為化は、動物を投薬群に配分する際に用いるべきである。各処置群間のバランスを保つために、性別、年齢、泌乳の時期あるいは体重のような１つ又は２つの最も重要な因子の分布をできるだけ調整するように群分けされることがある。

TAS 試験は、一般的に比較的少数の実験単位（一般に、１処置群当たり８頭のみ）を用い、多数の変数を評価する。製剤を一方の性別のみで使用することを予定しない限り、雄（１処置群当たり４頭）と雌（１処置群当たり４頭）を用いるべきである。一般に、医学的、動物福祉面及び統計学的観点から、潜在的な安全性を評価するために用いる動物の総数が決定される。動物の中間時での剖検あるいは離脱が他の理由で想定される場合には、それに応じて実験単位数を増加すべきである。試験群間に差がないとする帰無仮説を強く考慮しなければならないものの、試験設計の束縛がこれらの試験の統計

学的（帰無仮説を棄却する。）検出力及び解析能力を制限する。これらの条件下では、統計解析のみで、潜在的な有害作用を検出して安全性の保証を行うことはできない。成績は、生物学的意義と信憑性を考慮した医学的、毒性学的及び統計学的原則の組み合わせに基づいて評価し、解釈すべきである。

適切な動物福祉環境及び実験条件を設定するために群飼の必要がある場合には、下痢、嘔吐、摂餌量又は飲水量のような特定の変数を、個体ごとに測定することは困難であると考えられる。更に、同一のケージあるいは房中の個体ごとに正確に測定された各測定値においても、同一群内の他の動物の存在による影響を受ける可能性がある。例えば、房内において優位な動物の存在は、同一房内における他の動物の体重減少の一因となるかもしれない。統計解析を用いない場合であっても、試験結果から製剤の影響を解釈する際には、群飼の潜在的な影響を考慮すべきである。この考えを考慮しない場合には、IVPP の作用について間違った結論を導き出す可能性がある。

各変数の測定予定時点を試験プロトコールに記載すべきである。多くの場合、このスケジュールには、試験期間を通して実施される毎日の動物観察事項に加え、試験の開始と終了を含めた数時点における、より詳細な測定事項が含まれる。ベースラインの値を確認するために投与前の測定を行うべきである。IVPP の予定される投与期間中の測定が、潜在的な安全性上の問題の時間経過の特徴を知るための助けとなることがある。等間隔で測定すると統計学的モデル化が容易になるかもしれない。長期試験では、予め決められた期間ごとに、異なる頻度でデータ収集を行うように計画することがある。

データは偏りを最小限にする方法で収集すべきである。例えば、各投与群からのサブグループについて検査が必要な時には、試験開始前に動物を無作為に指定しておくべきである。死後の様々な検査を含めたデータを収集する担当者には、投与群に関する情報を与えずにおくべきである。病理組織学的データは、認められた方法によって評価すべきである（例えば、Crissmann et al.,Toxicologic Pathology, 32(1), 126-131, 2004)。

カ　変数

試験中に多くの変数が測定される。安全性のための観察、検査あるいは試験の種類は、IVPP の性状、予定される用法、対象動物及び有害作用の可能性によって決定する。一般に、安全域試験で考慮すべき変数は４つのタイプがある。即ち、身体検査及び観察、臨床病理検査、剖検及び病理組織検査である。また、これに加え、薬剤暴露時の毒性学的動態評価（例えば、予想される、ピーク及びトラフ濃度に至る時間前後における、若干のサンプリング）といった他の種類の変数についても考慮すべきである。ただし、追加のサンプリングは、安全性本来のエンドポイントへの影響を避けるため、最小限に止めるように注意しなければならない。

（ア）身体検査及び観察

資格のある担当者(一般的に獣医師)による詳細な身体検査は、試験の最初と最後を含めて、試験中に数時点で実施すべきである。その他の変数の

ベースラインの観察は、試験の開始時に資格のある担当者が行うべきである。訓練を受けた担当者（一般的に獣医師ではない。）による一般健康状態や行動に関する観察は、全ての動物について週に７日間毎日、又は試験目的に応じてあらかじめ設定した間隔で全期間にわたって記録すべきである。摂餌量と飲水量を適切な間隔でモニタリングすべきである。体重は、試験の開始時と終了時及びそれ以外の適切な数時点で測定すべきである。

一般に、IVPP の性状及び予定されるポピュレーションに基づいて以下の事項を考慮し、測定すべきである。

① 一般身体検査(一般的に獣医師が実施すべきである。)

視覚系、神経系、筋骨格系、外皮系、心臓血管系、呼吸器系、生殖器系、泌尿器系、リンパ系、消化器系、行動

② 注射／適用部位の特別な検査（可能であれば、準定量的評価法あるいは定量的評価法を用いるべきである。）

外観（例えば、紅斑、痂皮形成、脱毛、フケ、色素沈着)、腫脹、疼痛、熱感

③ 観察(適切に訓練された担当者が実施すべきである。)

摂餌量、飲水量、体重、行動、体温、病気の徴候、糞便の状態（軟度、色及び粘液、血液）

(イ) 臨床病理検査(血液学、血液生化学、尿検査)

血液学、血液生化学及び尿検査を、試験の最初と最後を含めて、試験中の数時点で実施すべきである。IVPP に応じて、適切な生理的指標をモニターするために他の特殊検査が適切な場合がある。試料採取前には標準化した給餌スケジュールに従うべきである。検査は全ての動物又は１群８個体以上の場合（例えば、家きん)、試験開始時点において、予め、試験用として無作為に選定した部分集合の動物について実施すべきである。これらの試験は、給餌又は断餌、鎮静又は麻酔のような試料採取時の条件によって影響を受けやすいので、試料は、同時期の陰性対照群及び投与群の動物から同じ方法で採取することが重要である。複数の動物からの血液試料はプールすべきではない。有害事象を示した動物は、原因究明のために追加の臨床病理検査又は他の診断試験が必要となるであろう。投与前に臨床病理データの収集を２回行うことで、より信頼性のあるベースラインデータを提供することができ、試験結果の解釈に役立つはずである。測定する変数には、IVPP の性状及び予定されるポピュレーションに基づき、以下のものが挙げられる（単位は、わが国で通常用いられる単位とする。)。

① 血液学

赤血球（総数及び適用可能であれば網状赤血球数)、白血球（総数及び鑑別数)、充填赤血球容積(PCV)、平均赤血球容積(MCV)、平均血球ヘモグロビン量(MCH)及び平均血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、ヘモグロビン、プロトロンビン時間、血小板数、活性化部分トロンボプラスチン時間、頬粘膜出血時間、全血凝固時間、フィブリノーゲン、急

性期タンパク質

② 血液生化学

ナトリウム、尿素窒素、カリウム、クレアチニン、クロライド、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、カルシウム、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、リン酸、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、マグネシウム、γ - グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、総蛋白、アルカリフォスファターゼ(AP)、アルブミン、クレアチンキナーゼ(CK)、グロブリン、総胆汁酸、グルコース、コレステロール、アミラーゼ

③ 尿検査

色、蛋白、pH、ケトン体、比重（例えば、屈折計による。)、ビリルビン、グルコース、ウロビリノーゲン、沈渣の鏡検(結晶、円柱、赤血球、白血球及び上皮細胞)

（ウ）剖検及び病理組織検査

全ての用量群の動物の組織について、肉眼的に検査するとともに、鏡検用に試料を保存すべきである。新規 API を含有する IVPP については、使用実績が乏しく、対象動物における他の安全性情報が一般的に不足していることから、全ての用量群の組織について肉眼的及び顕微鏡的検査を行うことを推奨する。その他の製品については、少なくとも、陰性対照群及び最高用量投与群の全ての動物の組織について顕微鏡的検査を実施すべきである（推奨方法は、Crissman et al.,Toxicologic Pathology, 32(1), 126-131, 2004 参照)。最高用量投与群由来のいずれかの組織に病変が認められた場合には､有害作用が観察されない用量レベルが明らかになるまで、次に低い IVPP 用量の動物の試料を顕微鏡的に検査すべきである。更に、全身的臨床徴候又は臨床病理学的な異常所見を示した動物については全て、標準的に肉眼的及び顕微鏡的検査を行うべきである。IVPP の毒性が比較的高いことが危惧される場合、又は以前の試験において、既に毒性に関する情報がある場合には、全ての動物又は試験開始時点において、あらかじめ、試験用として無作為に選定した部分集合の動物について、肉眼的及び顕微鏡的検査を含めた異なる剖検方法が推奨されるであろう。比較薬物動態学的及び比較代謝に関するデータがあり、また、それ以外の成績についてもよく調べられている安全域の広い IVPP については、全身的臨床徴候又は臨床病理学的な異常所見が認められなかった場合には、その旨が適切に正当化され、試験プロトコールに予め記載されている場合には、死後検査については行う必要がない場合がある。

肉眼病変及び可能であれば器官重量を記録すべきである。肉眼的及び顕微鏡的検査のために選定される臓器は、動物種及び標的組織によって異なる。病理組織検査は、肉眼病変を示した臓器／組織に特に注目し、該当する場合には注射部位を含めて各種臓器／組織について実施すべきである。一般に、以下の臓器／組織の肉眼的及び顕微鏡的検査を適切に考慮するこ

とが推奨される。

下垂体、脳、骨及び骨髄、甲状腺、脊髄、骨髄塗抹、上皮小体、眼、脾臓、副腎、肺、胃、膵臓、筋肉、十二指腸、卵巣、乳腺、空腸、子宮、肝臓、回腸、睾丸、胆嚢、結腸、前立腺、腎臓、盲腸、副睾丸、膀胱、胸腺、心臓、リンパ節、注射部位（筋肉及び皮下組織）、そ嚢、腺胃、ファブリキウス嚢、筋胃、皮膚

キ　統計分析

多くの試験では、安全性の成績は、記述統計手法をデータに適用することによって最も良く説明される。表や解説はデータ要約のための通常の方法であるが、有害作用のパターンが試験群間や動物個体間の両者で示されるような図の使用も有用である。統計モデルの一般的様式やモデルに含まれる要因の選択は､解析される反応の変数の特性や試験設計によって変わるであろう。選択した方法に関わらず、あらゆる統計学的評価の実施に用いる手順と段階を記載すべきである。潜在的な安全性の問題の評価を容易するために、データ分析の結果は明確に表示すべきである。成績を明確にし、解釈を促すために、用語と表現の方法を選ぶべきである。

個々の動物からのデータ及び試験群からの統計量の概略を示すために表を用いてもよい。定量的変数についての、有用な記述統計には、各群の動物数、中央値、平均値、標準偏差、最大値、最小値及び認知された参照範囲外の値を持つ症例の数と百分率が含まれる。いくつかの定量的変数については、異なる範囲内の値を示す動物に分類することが、パターンを識別する助けになることがある。定性的変数についての有用な記述統計には、評価した動物の総数と各反応分類に入る実験単位の数と百分率が含まれる。有害事象、死亡率及び早期終了のような他の事象も表にするとよい。

グラフは、可能性のある用量傾向、時間に関連したパターンや参照範囲外の値を含めて、データを描写し、潜在的な安全性の懸念を検出するのに非常に有用であろう。各動物群間及び各個体間の両者における試験期間中の反応を示すプロットは、動物、性別、年齢又は用量レベル間の応答の一貫性を示すことがある。これらのグラフは投与の有害作用における傾向や時間に関連したパターンを示すことがある。

統計モデルは試験設計を表すべきである。動物が個別に収容されている場合、及び全ての試験群の動物が一緒に収容されている場合には、個々の動物が実験単位と考えられるだろう。一緒に収容されている動物が全て同じ試験群に割り付けられている場合には、一般的に収容単位が実験単位である。収容単位、環境状況、性別及び前処置のような共変動因子が実験単位間で異なる場合には、それが適切なら、それらの要因が均衡化するように計画し、また、解析の際に考慮すべきである。有用なアプローチは、安全性データを生み出した基礎的過程を適切に代表する最少数の項目を含めること及び（該当する場合には）長期的な計画（繰り返し測定）を示すことである。モデル様式の選定は、解析する反応変数の性質によって行われるべきである。何らか

のデータが欠落した場合の結果に及ぼす潜在的な影響を考慮するべきである。

統計モデルからの分析結果には、モデルに含まれる項目の有意差レベルの記述が含まれる。ｐ値の算出は、注意すべき点の特別な差異を評価するための手助けとして、あるいは更に注意すべき差異を浮かび上がらせ、より多くの安全性変数に適用させるための「目印」として、しばしば有用である。これは、他の方法では適切に要約できないような臨床病理データにおいて特に有用である。処理群の平均値の評価のような定量的解析と、ある閾値以上又は以下の計数値が算出されるような定性的解析の両者を臨床病理データに適用することが推奨される。ｐ値は臨床評価を受けるべき本質的な差の一指標であるが、小規模の安全性試験では、認められたｐ値に関係なく臨床判断が全ての差異を評価するのに用いられなければならない。統計学的有意差のある試験が、必ずしも安全性上の懸念があるとは限らない。同様に、有意差のない試験も、必ずしも安全性上の懸念がないとは限らない。多重性の統計学的補正は安全性の考察にはかえって役に立たないこともある。結果の重要性と信憑性は、IVPP についてあらかじめ有している薬理学的知識に依存するであろうし、この評価は、結果の生物学的関連性を解釈することについて適切な経験及び訓練を積んだ臨床家又は科学者によって行われるべきである。

ク　試験報告書

試験報告書は TAS 試験の目的、材料及び方法、プロトコールの全ての改訂及び逸脱、成績(動物個体データ、データの要約と分析を含む。)及び結論を記述した文書である。生データの追加提出が必要な場合がある可能性がある。

（３）その他の実験室安全性試験の設計

特別な IVPP には、IVPP の性状と使用条件に応じて、追加の安全性試験を行うことが適当な場合がある。このような試験は、安全域の評価及び食用動物では、残留性試験と組み合わせて行うとよい。これらの特殊試験は、以下に概要を示す一般原則に従って設計し、わが国の公的ガイドラインに従って行う。特殊試験の計画は申請者と承認審査機関との間で協議して決めることが推奨される。

ア　注射部位安全性試験

基本的な試験設計は最高常用量（１×)、投与期間、投与経路、基剤及び最大注射液量を考慮すべきである。試験にはその IVPP の完全な最終製剤と同じ液量の生理食塩水投与群を対照として含めるべきである。非液性 IVPP の場合は、他の適切な陰性対照を用いるべきである。消失時点の決定を容易にするために、各注射の部位と接種のタイミングに特に注意すべきである。この試験は、注射器又はその他の投与器によって、静脈内、皮内、筋肉内及び／又は皮下に投与されることで生じるかもしれない局所的な病変を考慮すべきである。血管内投与が予定される唯一の投与経路である場合には、その IVPP の血管外投与の影響を考慮すべきである。血管内投与が意図されていなくても、予期せず血管内に注射してしまうリスク（例えば、耳の皮下に投

与してしまう場合）が想定される製剤については、血管内注射をした際の安全性について考慮すべきである。

注射部位試験からの安全性データの評価には以下の変数が含まれると考えられる。

- 行動又は運動の変化を含む臨床徴候
- 注射部位の外観、炎症、浮腫又はその他の変化
- クレアチンキナーゼとアスパラギン酸トランスアミナーゼのレベルの測定
- 適切な時点における病変部の肉眼検査と病理組織検査

注射部位に炎症があって、計画した試験の終了まで視診又は触診で消退が確認できなかった場合には、注射部位が臨床的に許容可能な状態に戻るのに必要な時間を明らかにすべきである。臨床症状から、明らかに注射部位への影響があると考えられる場合には、病変部の病理組織検査を実施する必要があるであろう。

イ　経皮投与外用製剤の投与部位安全性試験

外用する IVPP による局所の有害作用は、その製品の薬理学及び毒性学から複数の用量及び／又は投与期間を妥当とする根拠がない限り、一般に、１群８頭を用い、予定される用量で評価すべきである。全身に吸収される外用 IVPP は、外用部位の評価を全身的 TAS 試験の結果に含めることが推奨される。一般に、外用部位については、腫脹、疼痛、熱感、紅斑及びその他の臨床徴候を調査するべきである。動物の動きと行動の変化に注意すべきである。外用部位に炎症又はその他の臨床徴候があり、計画した試験の終了時までに視診又は触診によって解消されていなければ、外用部位における臨床的に許容可能な状態に戻るのに必要な時間を明らかにすべきである。投与部位反応を示唆する臨床徴候が認められた場合には、病変部の病理組織検査が必要かもしれない。

投与後に偶然に経口摂取することが起こる可能性がある場合(例えば、舐める場合)、IVPP の安全性を調べるために、通常、外用製剤の最高推奨用量を経口投与することが推奨される。薬理学及び毒性学に基づいて、経口暴露に関して安全性の懸念がない場合には、本試験を免除するのが適当と考えられる。

ウ　繁殖安全性試験

繁殖用動物に使うことを意図する全身的に吸収される API には、繁殖安全性試験が必要である。繁殖安全性試験の目標は、雄又は雌の繁殖能又は産子の生育性における IVPP の有害作用を明らかにすることにある。これらの試験においては、他の器官系における安全性データも収集されるであろうが、一般に繁殖変数に焦点を当てるものとする。これらの試験においては、API の薬理及び毒性に基づいて、可能性のある影響、例えば性成熟、が特別にない限り、産子の出生後の生育性についてまでは、通常、考慮する必要はない。

その薬剤を使用するであろう動物種、年齢及びクラスを代表する、健康で、

中性化しておらず、生殖能力が正常な雄と雌を選定すべきである。一般に、一処置群につき、性別毎に８頭の動物を含めることが推奨される。雄と雌は、同一あるいは別々の試験で評価してもよい。投与量、投与経路、投与回数及び投与期間は、IVPP の薬理及び毒性、予定される用法に基づいて選定し妥当性を説明しなければならず、また、試験間隔期間中を通じた、継続暴露を確認すべきである。一般に、雄では、陰性対照動物を置き、IVPP の予定される最高常用量の３倍用量を、少なくとも１精子形成周期中に渡って投与すべきである。一般に、雌では、陰性対照動物を置き、IVPP の予定される最高常用量の３倍用量を、交配前(繁殖時の卵胞期を含める。)、全妊娠期間(胚相、胎子相、及び出生相を含める。)、及び産子の初期の発育及び運動機能を評価するために十分な分娩後の期間をカバーする適切な時期に投与すべきである。IVPP が特に分娩時又は分娩前後に使用されるものでない限り、その時期に IVPP を投与する必要はない。

繁殖安全性試験は、それが適切なら、以下を評価すべきである。

- 雄では、精子形成、精液の品質及び交尾行動
- 雌では、発情周期、交尾行動、受胎率、妊娠期間、分娩及び泌乳
- 投与雄及び／又は雌からの産子では、発達毒性(催奇形性、胎子毒性を含む。)、胎子発達、産子数、生育性と成長、離乳までの健康と発達
- 家きんでは、卵重、殻の厚さ、産卵数、卵の有精率、孵化率及びヒナの生育性

理想的には、繁殖安全性試験は対象動物種で実施すべきであるが、実験動物における API の薬物動態学的プロファイルが IVPP の使用を意図する全ての動物種においてそれと同等であれば、実験動物における生殖試験から得たデータも考慮できる。このような評価を行った際には、その成績に応じて、適切な情報を製品に記載する注意事項に含めるべきである。しかし、繁殖安全性試験を対象動物種で実施していない場合には、これを製品に記載する注意事項に反映させ、繁殖用動物、妊娠動物、泌乳動物又はその産子においては安全性が明らかにされていないと記載すべきである。

エ　乳腺安全性試験

乳腺安全性試験は、泌乳期動物又は乾乳期動物の乳房内に使用することを意図する IVPP の安全性を評価するために実施すべきである。これらの試験においては、潜在性乳房炎、臨床型乳房炎のいずれも陰性の動物を用いるべきである。IVPP は、最高推奨用量分を各乳頭に投与すべきである。使用条件、最高推奨用量及び投与頻度は、予定されている用法どおりにすべきである。代わりの方法を用いる場合は承認申請者が妥当性を説明すべきである。

泌乳期の雌動物に使用することを意図する IVPP の安全性評価には、泌乳初期ないし中期の泌乳期動物を用いた急性炎症反応の客観的評価（GLP 原則に適合するように収集されたデータ）が含まれることが推奨される。乾乳期の動物に使用することを意図する IVPP の安全性評価には、泌乳期動物を用いた急性炎症反応の客観的評価（GLP 原則に適合するように収集されたデー

タ）及び、乾乳期動物を用いた慢性炎症反応の臨床評価（Good Clinical Practice (GCP)又はGLP原則に適合するように収集されたデータ）の両者が含まれることが推奨される。

泌乳期用及び乾乳期用製剤のいずれの用法を取得しようとする場合にも、１つの群で、各動物における投与前と投与後の値の同一性を評価するために比較可能な試験系を用いることが望まれる。投与動物と陰性対照動物を比較する２群設計も使用できると考えられる。泌乳期用、乾乳期用のいずれの用法を取得する場合にも、初産の動物４頭を含む、通常８頭の泌乳動物を各試験系の各群に割り付けるべきである。

全ての試験動物について触診を含む身体検査を実施し、腫脹、紅斑、疼痛又は熱感を明らかにすべきである。泌乳動物を用いたいずれの試験系においても(泌乳期用及び乾乳期用のいずれの用法を取得しようとする場合にも)、組織刺激及び乳汁生産に関連する全ての変数に関するデータを、投薬前、投薬中及び投薬後対照値に戻るまで収集すべきである。投薬後の観察期間は、変数の値が投与前の値に戻ると推定される期間を基に、事前に定めておくべきである。定量的体細胞数(SCC)及び細菌培養のための試料は搾乳前に各乳頭から採取すべきである。１日当たりの乳量、組成(例えば、脂肪、蛋白、乳糖、及び非脂肪固形物)及び外観を記録すべきである。安全性評価に重要な変数は、一般に乳腺刺激の徴候、SCC の上昇及び泌乳量の変化である。投薬後の非常に高いSCCの出現及び高SCC状態が続く場合は受け入れられないことがあり、承認申請者によって説明がなされるべきである。

（４）臨床試験から収集される対象動物安全性データ

臨床試験は IVPP の有効性を評価することを意図するが、また予定される用法で基本的なTASデータも提供する。これらの試験はGCPの原則に従って実施すべきである。

臨床試験は、一般的に IVPP の対象となる動物種及びタイプの全ての対象動物を代表する条件下で実施され、より多くの動物頭数における予定される用量での潜在的な有害作用の評価を提供する。臨床試験は、IVPP の対象となる動物種及びタイプの罹患動物を含む対象動物を用いる。地域間での疾病及び飼育状況が類似していれば、承認を得ようとする地域で受け入れられるデータの最小の割合をその地域内で作成すれば、国際的なデータを臨床試験として使用できるであろう。試験に比較的多数の動物が含まれていれば、比較的頻度の低い有害事象を検出する能力が向上する。供試動物は IVPP の使用を意図する年齢範囲、クラス、系統及び性別の代表とすべきである。適切な対照群を含むように試験を設計すべきである。各試験は、適切にマスキング（盲検化）された担当者によって、投与前、投与中及び投与後に、潜在的な有害作用を見極めるための特定の検査（例えば、身体検査及び臨床病理検査）で健康観察が実施されるべきである。評価のための適切な変数は、実験動物における薬力学の結果又は対象動物種における試験の結果に基づくであろう。有害事象は報告書に記載し、有害事象の原因究明を試みるべきである。

（５）動物の安全性評価におけるリスクアセスメント

実験室内及び臨床試験データのみでは、IVPP の有用性に関して許容可能な安全性のプロファイルがあるかどうかを決めるための十分な情報を得られないIVPP　があるかもしれない。このような状況下では、リスクアセスメントの方法が TAS の評価を補足又は補強する手段になろう。リスクアセスメントは、有害作用の重篤さ(危害)、元に戻る可能性及びそれが生じる確率を検討するために入手可能な多くの証拠を使用する。

（６）用語集

薬理活性成分（Active Pharmaceutical Ingredient；API)又は薬剤物質(Drug Substance)

薬剤（医薬品）を製造するために用いられる全ての物質又は物質の混合物であり、薬剤の製造用に用いられた場合には、薬剤の活性成分となるもの。物質の持つ薬理学的活性又は他の直接的効果により、病気の診断、治療（cure)、症状の緩和、措置（treatment)、疾病の予防、又は身体の構造及び機能に影響を及ぼすことが期待されるもの。

有害作用(Adverse Effect)

IVPP に関連すると想定される有害事象

有害事象(Adverse Event)

IVPP の使用後に動物に起こる、望ましくない、意図されていない所見で、製品との関連性は問わない。

ベースライン・データ(Baseline Data)

馴化期間の後かつ IVPP の投与前に収集された情報

繁殖用動物(Breeding Animal)

能動的に繁殖に供される、繁殖を意図する又は妊娠している全ての動物

クラス(Class)

繁殖及び／又は用途のような要因によって特徴づけられる対象動物種の部分集合（乳牛と肉牛、肉用鶏と産卵鶏）

最新の GMP（current Good Manufacturing Practices; cGMP)

製品が斉一的に生産され、品質基準によって管理されていることを確認するための製品の品質管理システムの一部

実験単位(Experimental Unit)

試験中に異なる処置を施される最小の独立した動物群で、割り付けの方法と処置によって作成される。

GCP(Good Clinical Practice; GCP)

臨床試験の設計、実施、モニタリング、記録、査察、分析及び報告の基準。この基準を遵守することで、臨床試験のデータと報告された成績が完全で、正しくかつ正確であり、試験動物の福祉と試験担当者の安全性が確保され、環境とヒト及び食品連鎖が保護されたことが保証される。

GLP(Good Laboratory Practice; GLP)

非臨床試験の設計、実施、モニタリング、記録、査察、分析及び報告の

基準。この基準を遵守することで、非臨床試験のデータと報告された成績が完全で、正しくかつ正確であり、試験動物の福祉と試験担当者の安全性が確保され、環境とヒト及び食品連鎖が保護されたことが保証される。

開発中の動物用医薬品(Investigational Veterinary Pharmaceutical Product; IVPP)

動物に投与又は外用した時の予防、治療、診断又は生理的作用を検討するために、臨床試験又は非臨床試験で評価される１つ以上の API を含む動物用医薬品として開発中の薬剤で、動物用生物学的製剤を除くもの

安全域試験(Margin of Safety Study)

IVPP が、投与予定の対象動物に対して安全であることを示すために計画された良くコントロールされた試験

陰性対照（Negative Control）

プラセボ（偽薬）の投与を受けた、又は未処置の供試動物

マスキング／盲検化（Masking/Blinding)

指名された試験担当者に投与群の割り付けを知らせないことにより、起こり得る試験の潜在的偏りを減らす方法

参照範囲（臨床病理又は血液化学）(Reference range(Clinical pathology or blood chemistry))

各クラスの健康な動物で認められる通常値の範囲

対象動物(Target Animal)

IVPP の使用を意図している動物と認められる、特定の動物種、クラス及び系統

10 － 2　動物用生及び不活化ワクチンの対象動物安全性試験（VICH GL44）

（１）緒言

VICH 参加地域において動物用生ワクチン及び不活化ワクチンの承認を得るためには、対象動物（下記（１）のウ.参照）に対する安全性（以下「TAS」という。)試験の成績を提出する必要がある。試験基準を国際的に調和することができれば、各国の規制当局が別々に試験を要求する必要性が最小限に止められる。国際基準が適切に定められた場合は、それが可能な場合には TAS 試験を重複して実施することが避けられ､研究開発に要する費用と時間が軽減される。また、各地域における同様の試験の重複が避けられることにより、供試動物数が減り、動物福祉に貢献することができる。

このガイドラインは、VICH の原則に基づいて作成されたものであり、関連当局による TAS データの相互受け入れを促進するために各国の承認審査機関に統一基準を提供するものである。国内販売に限定される製剤の承認を得る際には、この VICH ガイドラインを適用することが強く推奨されるものの、その適用の有無については各国の承認審査機関の判断に委ねられる。また、科学的に正当な理由がある場合には、必ずしもこの方法に従う必要はなく、他の適切な方法を用いてもよい。

ア　目的

このガイドラインの目的は、対象動物に対して市販される予定の動物用生ワクチン及び不活化ワクチンの最終製剤（開発中の動物用ワクチン。以下「IVVs」という。）の安全性評価試験を実施するための統一基準及び推奨方法を示すことにある。

イ　背景

VICH TAS 専門家作業部会は、VICH 参加地域において、IVVs の承認申請に必要な要件を満たすための推奨法として、国際的に調和されたガイドラインを作成するために設置された。当然ながら、このガイドラインは最大限の可能性を論ずるものの、全てではない。このガイドラインには、TAS 試験のプロトコール作成の助けとするために一般原則が含まれている。

データの国際的受け入れが VICH の基本原則であることをここに再度強調しておく。

ウ　適用範囲

このガイドラインは、牛、馬、めん羊、山羊、豚、犬、猫及び家きん（鶏及び七面鳥）に使用することを目的とした、遺伝子組換え製剤を含む全ての IVVs の安全性試験に適用される。このガイドラインは、承認取得後に課せられる規格及び検査方法に基づく品質確保のための安全試験に適用されるものではない。希少動物種への使用及び希少疾病への使用は、国内承認の際にこの要件から除外されることがある。このガイドラインは、水産動物を含む他の動物種における TAS 試験設計のための情報を提供するものではない。他の動物種に関する TAS 試験は、各国の指針に基づいて設計すべきである承認を得ようとする地域によっては、遺伝子組換え製剤に対して追加的要件が課

されることがある。免疫調節因子は、このガイドラインでは考慮しない。製剤の開発段階において、対象動物への安全性は対象動物を用いて評価すべきである。この評価の目的は、承認を得ようとするワクチンの安全な用量を決めることである。したがって、このガイドラインの目的は、対象動物の健康及び福祉に限定される。人の健康に及ぼす影響を含め、食品の安全性や環境への安全性に関する評価は含まれていない。

このガイドラインは、IVVs の対象動物安全性評価に用いる試験方法の国際的な調和及び基準化に寄与する。このガイドラインは、実験室条件下及び関連する野外試験下（多数の動物が使用される条件下）において、承認申請者が TAS 試験のプロトコールを作成する際の手助けとなるものである。全ての試験が必要とは限らない。また、特定の IVVs については、ワクチンの対象動物における特別な安全上の懸念を検討するために、このガイドラインでは規定されていないが、追加試験が必要な場合がある。したがって、ガイドラインで規定されていない特別な追加情報については、承認申請者と承認審査機関との協議によって決められることになるであろう。

病原性復帰に関しては、別のガイドライン（７　ワクチン接種対象動物における動物用生ワクチンの病原性復帰否定試験について（VICH GL 41））で取り扱う。

エ　一般原則

IVV の対象動物における安全性を証明するために必要な情報は、予定する用法及び用量、IVV の種類、アジュバントの性質、賦形剤、効能、類似製剤の過去の使用歴、動物種、動物のクラス及び品種と言った要因によって異なる。

一般に、混合ワクチンの安全性試験のデータは、抗原及び／又はアジュバント構成成分が少ないワクチンで､その他の構成成分がいずれも同一であり、抗原数及び／又はアジュバントの数だけが少ないワクチンである場合に、当該ワクチンの安全性を示すために用いてもよい。ただし、地域によっては、この方式は野外安全性試験に適用されないかもしれない。その場合には、申請予定の最終製剤と抗原及びアジュバント組成が同じものを試験に用いなければならない。

有害事象は最終報告書に記載され、包含されていなければならず、また、有害事象の原因究明に努めなければならない。

（ア）基準

実験室条件下で実施される TAS 試験は、経済協力開発機構（OECD）等が規定しているような非臨床試験の実施の基準（GLP）の原則に従って実施及び管理されるべきであり、野外安全性試験は VICH の臨床試験の実施の基準（GCP）の原則に従って実施されるべきである。

（イ）供試動物

供試動物は、IVV の使用予定対象動物種、年齢及びクラスを考慮し、試験の目的に適したものを用いるべきである。ワクチン投与動物と対照動物

（用いる場合に限る。）は、同様に管理する。両群の飼育環境条件は、できる限り同様にすべきである。動物飼育施設及び飼育管理は、試験の目的に適しているべきで、各国の動物福祉規定を遵守すべきである。供試動物は、試験環境に適切に馴化させるべきである。適切な疾病予防処置は、試験開始前までに完了させるべきである。試験期間中の苦痛の軽減又は除去は不可欠である。瀕死動物については安楽死及び剖検を行うことが推奨される。

(ウ) IVV 及び投与経路

IVV、投与経路及び投与方法は、この文書で後述するように、それぞれの試験の種類に適しているべきである。

(エ) 試験計画

承認申請者がこの文書で規定した試験と異なる試験を実施する場合には、文献検索を行い、文献情報と全ての予備実験の成績とを組み合わせて、代替 TAS 試験計画の妥当性を説明することができる。ワクチンの安全性を評価するための基本的なパラメーターは、投与部位の反応及び消長、並びに動物の臨床観察を含むワクチン投与に伴う局所及び全身反応である。ワクチンの繁殖機能に及ぼす影響についても、適切とされる場合には評価すべきである。

血液学的検査、血液生化学的検査、剖検又は病理組織検査のような特別な検査が必要なことがある。これらの検査を動物群の一部で実施する際には、他に妥当性が説明されない限り、偏りを避けるために試験開始前に動物を適切な抽出率で無作為に選定しておく必要がある。予期しない反応又は結果が得られた場合は、可能なら原因究明のために試料を適切に選択すべきである。

先入観を最小限にするために、試験のデータを収集する担当者には、可能な限り投与群をマスキング(盲検化)すべきである。病理担当者には、IVV の種類及び起こり得る臨床影響をマスキングする必要はないが、投与群についてはマスキングすべきである。病理組織学的データは、認められた方法で評価すべきである（例えば、Crissmann et al., Toxicologic Pathology, 32(1), 126-131, 2004)。

(オ) 統計解析

実験室内試験には、安全性データに記述統計学的手法を適用して処理するのが最も適当である。表及び説明文は、データ要約のための一般的方法であるが、有害事象のパターンを試験群間及び動物個体間の両方で示す図解を使用することも有用なことがある。野外試験に適用可能なら、統計モデルの一般様式及びそのモデルに含まれる因子の選択は、解析される応答変数（従属変数）の性質及び試験設計に依存する。選択した統計手法に関わらず、統計学的評価を行うために用いた過程及び手段は全て記載すべきである。安全性に関する潜在的な問題点の評価を容易にするために、データ解析の結果は明確に提示すべきである。成績を明確にし、解釈を促すた

めに、提示する用語及び方法を選択すべきである。

試験群間に差がないとする帰無仮説に関心があるかもしれないが、試験設計の制約がこれらの試験の統計学的（帰無仮説を棄却する）検出力及び解析能を制限する。そのような状況では、統計解析のみでは潜在的な有害作用が検出できず、安全性が保証できないことがある。有意差のない試験が、必ずしも安全性上の懸念がないことを示すとは限らない。したがって、試験成績は、統計学的原則に基づいて評価されるものの、最終的には獣医学的な考察によって解釈すべきである。

（2）ガイドライン

IVV の対象動物安全性は、実験室内試験と野外試験によって評価する。生ワクチンか不活化ワクチンかを問わず、IVV の開発過程で実施された試験から IVV の安全性に関連するデータが収集された場合には、全て報告すべきである。これらのデータは、TAS 実験室内試験を設計する際の参考になり、検査すべき臨床パラメーターを確認する場合にも利用できると考えられる。

実験室内安全性試験は、対象動物の安全性を評価するための第一段階となるように設計される試験で、野外試験を始める前に基本的な情報を提供するものである。実験室内安全性試験の設計は、供試ワクチンの種類や予定する用法によって異なる。

ア　実験室内安全性試験

（ア）生ワクチンの高用量試験

その疾病に特徴的な症状又は病変を誘発して、残存病原性を示す生ワクチンは、その微生物株のワクチン株としての許容性に関するリスク解析の一部として、生ワクチン成分の高用量試験を実施すべきである。この試験は、パイロットバッチ又は製造バッチのいずれかを用いて実施すべきである。承認申請予定の出荷時最大量（マキシマム・リリース・タイター）に基づく 10 倍量を接種すべきである。承認される出荷時最大量が規定されていない場合には、適切な安全域を確認する必要があることを考慮し、出荷時最小量（ミニマム・リリース・タイター）の妥当性のある複数倍の量で試験を実施すべきである。例外は、その妥当性を科学的に説明する必要がある。妥当な理由がなければ、一般に１群当たり８頭を用いるべきである。生ワクチンの溶解液中にアジュバントや他の成分が含まれている場合には、承認申請書に記載されている１用量中のそれらの量及び濃度を用いるべきである。10 倍量の抗原を１用量分の溶解用液中に溶解できない場合には、２倍量又はその他の溶解可能な最少量の溶解用液を用いるべきである。接種は、必要接種用量又は対象動物種から妥当であれば、複数箇所に分けて注射してもよい。

一般に、その他のワクチンは高用量試験を必要としない。

一般に、それぞれの対象動物のうちで、予定される最も感受性の高いクラス、年(月)齢及び性別の動物を試験に用いるべきである。抗体陰性動物を用いるべきである。抗体陰性動物が正当な理由で用いられない場合には、

代替法の妥当性を説明すべきである。複数の接種経路や接種方法をその製品に予定する場合には、全ての経路による接種が推奨される。１つの接種経路が最も強い影響を引き起こすことが示されている場合には、その経路だけを選択して試験を実施してもよい。安全性試験に用いたバッチの含有量又は力価は、それが適切なら、特に高用量試験の場合に、承認後の出荷時最大量又は出荷時最大力価（マキシマム・リリース・ポテンシー）を設定する際の根拠となるであろう。

（イ）１用量及び反復投与試験

生涯でただ１回接種するワクチン又は初回に一連のワクチン接種を要するワクチンの場合には、供試ワクチンの用法用量に従った試験を行うべきである。初回１回の投与又は初回一連のワクチン投与の後にブースター投与が必要なワクチンの場合は、供試ワクチンの用法用量に従った投与に加え、1 回の追加投与をすべきである。便宜上、ワクチンの推奨投与間隔は、14 日間隔まで短くできる。

１用量及び反復投与試験は、出荷時最大力価又は承認される出荷時最大力価が規定されていない場合には、出荷時最小力価（ミニマム・リリース・ポテンシー）の妥当性のある複数倍の用量を含むパイロットバッチ又は製造バッチの IVV を用いるべきである。

通常、妥当な理由がなければ、１群当たり、一般に８頭を用いるべきである。一般に、それぞれの対象動物のうち、予定される最も感受性の高いクラス、年(月)齢及び性別の動物を試験に用いるべきである。生ワクチンには抗体陰性動物を用いるべきである。抗体陰性動物が正当な理由で用いられない場合には、代替法の妥当性を説明すべきである。

複数の投与経路や投与方法をその製品に予定する場合には、全ての経路による投与が推奨される。１つの投与経路が最も強い影響を引き起こすことが示されている場合には、その経路だけを選択して試験を実施してもよい。

（ウ）データの収集

IVV の種類及び動物種ごとに適切な一般臨床観察項目を、ワクチン投与後 14 日間、毎日観察すべきである。これに加えて、観察期間中に、直腸温（哺乳動物の場合）又は行動観察のようなその他の特徴となるような項目を、適切な頻度で記録すべきである。全ての観察は全試験期間に渡って記録すべきである。注射部位は、視診及び触診により、ワクチン投与後少なくとも 14 日間、毎日又はその他の妥当性を説明できる間隔で検査すべきである。14 日間の観察期間終了時においても注射部位に有害反応が認められる場合には、臨床的に許容できる程度に病変が消失するまで、又はそれが適当と考えられる場合には、動物を安楽死させ病理組織学的検査に供するまで観察期間を延長すべきである。

イ　繁殖安全性試験

製品が由来する材料にリスク要因が存在するかもしれないことがデータで

示唆される場合には、繁殖動物における繁殖性についての試験の実施を考慮しなければならない。繁殖動物におけるワクチンの使用を支持するには、野外安全性試験（ウで詳述）と併せて実験室内安全性試験が必要である。繁殖安全性試験を実施しない場合には、繁殖用動物に IVV を使用しても危険性がないことを科学的に説明できる場合を除いて、使用上の注意等に繁殖動物に対する使用を除外する旨の記載を行わなければならない。実験室内及び野外安全性試験の試験設計及び範囲は、製剤中の微生物の種類、ワクチンの種類、投与時期及び経路並びに対象動物種に基づいて設計される。

繁殖安全性の検査には、試験の目的に適切な動物にワクチンの用法に従って、少なくとも推奨投与用量以上を投与する。その製品が複数の投与経路や投与方法を予定している場合には、全ての経路による投与が推奨される。１つの投与経路が最も強い影響を引き起こすことが示されている場合には、その経路だけを選択して試験をしてもよい。通常は、他の点で正当化されない限り、１群当たり一般に８頭を用い、パイロットバッチ又は製造バッチで試験を行うべきである。動物は、繁殖安全性が評価できるまでの期間、（２）のアの（ウ）に記載した毎日の安全性関連の観察事項を含めて観察されるべきである。例外はその妥当性を説明すべきである。対照群を設定すべきである。

妊娠動物に使用することを推奨するワクチンは、用法及び用量又は効能又は効果に表示が予定される推奨使用時期にあたる特定の妊娠期間に、上述の試験を実施しなければならない。試験を実施しない妊娠期間は、その期間を除外する旨を使用上の注意等に表示する必要がある。観察期間は、妊娠期間中の又は子供における有害作用を調べるために、分娩時まで延長しなければならない。例外はその妥当性を説明すべきである。

科学的な根拠があれば、IVV の精液に対する影響を、ワクチンに含まれる活性微生物の精液中への排泄を含めて検討するために追加の試験が必要になることがある。観察期間は試験の目的に応じて適切な期間とすべきである。

産卵用候補鶏及び産卵鶏における使用を推奨する IVV は、ワクチンを投与する雌鶏のクラスに適したパラメーターの評価を試験設計に含めるべきである。

ウ　野外安全性試験

VICH 参加地域間で発生疾病及び飼育管理が類似している場合は、承認申請する予定の地域で、その国の承認審査機関が受入可能とする最低限のデータを収集すれば、国際データが野外試験成績として使用できることがある。申請者は、自らの責任において野外試験が承認申請する地域を代表する飼育管理条件の下で実施されていることを保証しなければならない。試験実施前に地域の規制当局の許可を得なければならない。試験の実施に先立って、地域の規制当局に試験設計を相談することが推奨される。

繁殖動物に使用することを用法及び用量又は効能又は効果に表示する場合には、野外条件下での IVV の安全性を示すために適切な野外安全性試験を実

施する必要がある。

（ア）供試動物

供試動物は、予定される対象動物の年齢範囲及びクラスにすべきである。血清学的状況を考慮すべきかもしれない。可能な限り、陰性又は陽性対照群を含める。

ワクチン投与動物及び対照動物は同様に管理する。動物飼育施設及び飼育管理は試験の目的に適しているべきで、各国の動物福祉規定を遵守すべきである。

（イ）試験場所及びワクチン投与

２箇所以上の、地理的に異なる場所における試験が推奨される。

ワクチン投与は推奨する用量及び投与経路で実施すべきである。

IVV の代表的バッチを使用して実施すべきである。地域によっては、臨床安全性試験を２バッチ以上の製剤を用いて実施することが必要かもしれない。

（ウ）データ収集

観察はその IVV に適切と考えられる全ての試験期間に渡って行い、有害事象は最終報告書に記載されるべきである。有害事象の原因究明のために適切な調査が行われるべきである。

（３）用語集

副作用(Adverse Effect)

IVV に関連すると想定される有害事象

有害事象(Adverse Event)

IVV の使用後に起こる、望ましくない、意図しない所見で、製品との関連性は問わない。

クラス(Class)

繁殖状態や用途のような要因によって特徴づけられるワクチン投与対象動物種の群をいう（例えば、乳牛と肉牛、肉用鶏と産卵鶏)。

用量(Dosage)

ワクチンの接種用量(mL)又は力価、投与頻度及び投与期間を含めた IVV の投与量

野外試験(Field Safety Study)

IVV の有効性及び／又は安全性を評価するために、IVV を実際の野外使用条件下で予定される用法及び用量に従って使用して実施する臨床試験

臨床試験の実施の基準(Good Clinical Practice; GCP)

臨床試験の設計、実施、モニタリング、記録、査察、分析及び報告の基準。この基準を遵守することで、臨床試験のデータ及び報告された成績が完全で、正しくかつ正確であり、試験動物の福祉及び試験担当者の安全が確保され、環境及びヒトと動物の食物連鎖が保護されることが保証される。

非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice; GLP)

非臨床試験の設計、実施、モニタリング、記録、査察、分析及び報告の基

準。この基準を遵守することで、非臨床試験のデータ及び報告された成績が完全で、正しくかつ正確であり、試験動物の福祉及び試験担当者の安全が確保され、環境及びヒトと動物の食物連鎖が保護されたことが保証される。

開発中の動物用ワクチン(Investigational Veterinary Vaccine; IVV)

動物に投与又は適用（外用）した際の予防、治療、診断又は生理的効果を検討するために、臨床試験又は非臨床試験において評価される開発中の生ワクチン又は不活化ワクチン

マスキング／盲検化(Masking/Blinding)

指名された試験担当者に投与群の割付けを知らせないことにより、先入観による偏りを減らすための手順

出荷時最大力価(Maximum Release Potency)

出荷される時点でワクチンに許容される予定最高抗原量で、IVV に適切な単位で表される。

出荷時最大量(Maximum Release Titer)

出荷される時点でワクチン１用量中に許容される活性微生物の予定最高数で、安全性試験によって規定される。

出荷時最小力価(Minimum Release Potency)

出荷される時点でワクチンに許容される予定最低抗原量で、IVV に適切な単位で表される。

出荷時最小量(Minimum Release Titer)

出荷される時点でワクチンの１用量中に必要とされる活性微生物の予定最低数で、有効性試験及び安定性試験によって規定される。

陰性対照(Negative Control)

無処置又は基剤、偽ワクチン又は偽投与を受ける健康動物

パイロット・バッチ(Pilot Batch)

製造スケールで適用される手順を十分に代表し、模擬できる方法によって製造された IVV のバッチ。細胞増殖、回収及び製品の精製方法は、製造規模を除いて同一である。

陽性対照(Positive Control)

試験を実施する国で既に承認されている標準的な類似ワクチンを接種される健康動物。当該ワクチンは、IVV が対象とする対象疾病及び対象動物に対するもので、申請者が選択する。

製造バッチ(Production Batch)

製造予定施設で申請書に記載された方法により製造された IVV のバッチ

プロトコール(Protocol)

試験の目的、設計、方法、統計的考察及び試験を実施する組織を十分に記述した文書。この文書には臨床試験の治験担当者（investigator）(GLP 試験では試験責任者（study director）)及び申請者が署名し、日付を記入する。プロトコールに試験の背景と理論的根拠を記載してもよいが、それらの事項は他の試験プロトコール参照文書に記載してもよい。この用語には、全

てのプロトコール改訂版も含まれる。

残存病原性(Residual Pathogenicity)

　特定の対象動物種及び特定の接種経路で弱毒化されたウイルス又は細菌が保有する潜在的能力で、臨床症状又は病変の誘発、あるいはワクチンを接種した動物体内での微生物株の持続／潜伏感染を引き起こす。

11　生物学定同等性試験ガイドライン

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される生物学的同等性試験に関する標準的な実施方法を示したものである。11-１、11 －２及び 11 －３を適用する動物用医薬品、試験の種類及び動物種の範囲は、各ガイドライン中に示されている。なお、VICH　GL52 では適用範囲に含まれていない飼料添加剤の血中濃度を用いた生物学的同等性試験についても 11 －２のガイドラインを適用する。

11－1　後発動物用医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン

（1）緒言

本ガイドラインは、後発動物用医薬品の生物学的同等性試験の実施方法の原則を示したものである。生物学的同等性試験を行う目的は、先発動物用医薬品に対する後発動物用医薬品の治療学的な同等性を保証することにある。生物学的同等性試験では、 通常、先発動物用医薬品と後発動物用医薬品のバイオアベイラビリティを比較する。それが困難な場合又は、バイオアベイラビリティの測定が治療効果の指標とならない動物用医薬品の場合には、原則として、先発動物用医薬品と後発動物用医薬品との間で、効力を裏付ける薬理作用又は主要効能に対する治療効果を比較する（以下、これらの比較試験をそれぞれ「薬力学的試験」及び「臨床試験」という)。また、経口製剤では、溶出挙動が生物学的同等性に関する重要な情報を与えるので、腸溶性製剤や経口徐放性製剤等の特殊な剤形の製剤では、溶出試験を併せて実施する。さらに、食用動物に使用する製剤については、原則として残留確認試験を実施する。先発動物用医薬品の「効能又は効果」又は「用法及び用量」の欄に記載された対象動物が複数の場合には、原則として、全ての動物種について生物学的同等性試験を行わなければならない。対象動物種が家畜、愛玩動物及び魚類等多岐にわたる場合は、家畜（メジャー動物に該当するもの)、家畜（マイナー動物に該当するもの)、愛玩動物及び魚介類の区分毎に申請することができる。なお、蜜蜂用、水産用及び観賞魚用の動物用医薬品は、1 個体から経時的に採血ができないことから、このガイドラインは適用しない。

（2）用語

本ガイドラインで使用する用語は、以下の意味で用いる。

バイオアベイラビリティ：有効成分（以下 11－1 及び 11－2－1 において「API」という。）又はその活性代謝物が全身循環に入る速度及び量。

生物学的同等性：適切に設計された試験計画において、同様の条件下で同じモル用量で API を投与したとき、作用部位での API 又はその代謝物のバイオアベイラビリティについて、(あらかじめ定めた許容基準内で) 差がないこと。

治療学的に同等な製剤：治療効果が同等である製剤。

先発動物用医薬品：新動物用医薬品として承認を与えられた又はそれに準じる動物用医薬品。

後発動物用医薬品：先発動物用医薬品と同一の有効成分を同一量含む同一剤形の製剤で、「用法及び用量」も等しい動物用医薬品。

メジャー動物：牛、馬、豚、犬、猫、鶏及びうずら。

マイナー動物：メジャー動物以外の動物 (めん羊、山羊、猪、七面鳥など)。

（3）試験

ア　経口通常製剤及び腸溶性製剤

（ア）標準製剤と試験製剤

原則として、先発動物用医薬品の３ロットにつき、以下の①又は②の

試験液で溶出試験を行い、中間の溶出性を示すロットの製剤を標準製剤とする。試験液以外の試験条件は、（オ）による。ただし、回転数は、毎分 50 回転のみとする。

① 規格及び検査方法に溶出試験が設定されている場合には、その溶出試験液。

② （オ）に示した溶出試験条件の試験液の中で、少なくとも１ロットにおいて薬物が平均 85 %以上溶出する場合は溶出速度が最も遅い試験液。すべての試験液においていずれのロットも平均 85 %以上溶出しない場合は溶出速度が最も速い試験液。

上記の溶出試験により標準製剤を適切に選択できない動物用医薬品においては、製剤の特性に応じた適当な溶出（放出）試験又はそれに代わる物理化学的試験を行い、中間の特性を示したロットの製剤を標準製剤とする。また、有効成分が溶解した状態で投与される製剤は、溶出試験を行わずに、適当なロットを標準製剤としてよい。

後発動物用医薬品の試験製剤は、実生産ロットと同じスケールで製造された製剤であることが望ましいが、実生産ロットの 1/10 以上のスケールで製造された製剤でもよい。また、有効成分が溶解している均一な溶液製剤では、ロットの大きさはこれより小さくてもよい。なお、実生産ロットと同等性試験に用いるロットの製法は同じで、両者の品質及びバイオアベイラビリティは共に同等であるものとする。

標準製剤の含量又は力価は、なるべく表示量に近いものを用いる。また、試験製剤と標準製剤の含量又は力価の差が表示量の５%以内であることが望ましい。

（イ）血中濃度を用いた生物学的同等性試験

11 －２－１　生物学的同等性：血中濃度を用いた生物学的同等性試験（VICH GL52）による。

（ウ）薬力学的試験

本試験は、動物における薬理効果を指標に、治療学的同等性を証明する試験である。血中又は尿中の未変化体又は活性代謝物の定量的測定が困難な動物用医薬品、及びバイオアベイラビリティの測定が治療効果の指標とならない動物用医薬品に対して適用される。本試験においては、併せて溶出試験を実施する。薬力学的試験においては、薬理効果の時間的推移を比較することが望ましい。制酸剤及び消化酵素剤については、適当な *in vitro* 効力試験を用いることができる。

本試験の同等の許容域は、動物用医薬品の薬効を考慮し、個別に定められる。

（エ）臨床試験

本試験は臨床効果を指標に、治療学的同等性を証明する試験である。生物学的同等性及び薬力学的試験が困難である、あるいは適切でないときに適用される。本試験においては、併せて溶出試験を実施する。原則

として、先発動物用医薬品及び後発動物用医薬品投与群の臨床効果について比較する。陰性対照群を置くことが望ましい。

本試験の同等の許容域は、動物用医薬品の薬効の特性を考慮し、個別に定められる。

（オ）溶出試験

適当な方法でバリデーションを行った溶出試験法及び分析法を用いて試験を行う。以下に規定するほか、原則として、11 －３の動物用医薬品溶出試験法ガイドライン（以下「溶出試験法ガイドライン」という。）による。ただし、pH1.2 試験液を用いた場合の試験時間は、科学的に妥当であれば２時間とすることができる。

①　試験条件

a　難溶性薬物を含む製剤

難溶性薬物を含む製剤とは、 標準製剤を毎分 50 回転の回転数で試験を行うとき、溶出試験法ガイドラインに規定するすべての試験液（ただし、界面活性剤を含むものを除く。）において、平均溶出率が規定された試験時間までに 85 %に達しないものである。

以下の条件で試験を行う。

回転数（rpm）	pH	界面活性剤
50	① 1.2	無添加
	② 4.0	同上
	③ 6.8（6.8 ～ 8.0[a)]）	同上
	④水	同上
	⑤ 1.2	ポリソルベート 80 添加[b)]
	⑥ 4.0	同上
	⑦ 6.8（6.8 ～ 8.0[a)]）	同上
100	⑤、⑥、⑦のうちのいずれか一つ[a)]	ポリソルベート 80 添加[c)]

（）：反芻動物用製剤の場合の条件。

a）標準製剤が規定された試験時間内に平均 85 %以上溶出する条件のうち、溶出の遅い試験液を選択する。いずれの試験液においても、標準製剤が規定された試験時間以内に平均 85 %溶出しない場合には、最も速い試験液を選択する。

b）ポリソルベート 80 の濃度は 0.01、0.1、0.5 又は 1.0 %（W/V）を検討する。⑤、⑥又は⑦のうち少なくとも１つ以上の試験液で、標準製剤が規定された試験時間以内に平均 85 %以上溶出するのに必要なポリソルベート 80 の最低濃度を検討し、この濃度を⑤、⑥又は⑦の試験液に添加

する。いずれの試験液においても、標準製剤が規定された試験時間以内に平均 85 %溶出しない場合には、最も溶出の速い条件のポリソルベート 80 の濃度を選択する。

c）50rpm と同じ濃度。

b　腸溶性製剤

以下の条件で試験を行う。

なお、難溶性薬物を含む腸溶性製剤の場合には、毎分 50 回転の回転数では試験液②及び③に、また、毎分 100 回転の回転数では試験液②に、ポリソルベート 80 を添加した試験も行う。ポリソルベート 80 の添加濃度は、 a に従う。

回転数（rpm）	pH
50	① 1.2
	② 6.0
	③ 6.8
100	② 6.0

②　溶出挙動の類似性の判定

試験製剤の平均溶出率を、標準製剤の平均溶出率と比較する。標準製剤の溶出にラグ時間があるときには、溶出曲線を溶出ラグ時間で補正することができ（付録２）、以下の a ～ c の基準はラグ時間以降について適用する。なお、f2 関数により判定を行う場合の溶出率を比較する時点は、付録１の２による。

すべての溶出試験条件において、以下のいずれかの基準に適合するとき、溶出挙動が類似しているとする。ただし、少なくとも１つの溶出試験条件において規定する試験時間内に標準製剤の平均溶出率が 85 %以上に達しなければならない。また、標準製剤の溶出にラグ時間があるときには、試験製剤と標準製剤の平均溶出ラグ時間の差は 10 分以内でなければならない。本試験による類似性の判定は、生物学的に同等であることを意味するものではない。

a　標準製剤が 15 分以内に平均 85 %以上溶出する場合

試験製剤が 15 分以内に平均 85 %以上溶出するか、又は 15 分における試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± 15 %の範囲にあるとき。

b　標準製剤が 15 ～ 30 分に平均 85 %以上溶出する場合

標準製剤の平均溶出率が 60 %及び 85 %付近となる適当な２時点において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± 15 %の範囲にあるか、又は f2 関数の値が 42 以上であるとき。

c　標準製剤が 30 分以内に平均 85 %以上溶出しない場合

以下のいずれかの基準に適合するとき。

（ａ）規定された試験時間において標準製剤の平均溶出率が 85 ％以上となるとき、標準製剤の平均溶出率が 40 ％及び 85 ％付近の適当な２時点において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± 15 ％の範囲にあるか、又は f2 関数の値は 42 以上。

（ｂ）規定された試験時間において標準製剤の平均溶出率が 50 ％以上 85 ％未満のとき、標準製剤が規定された試験時間における平均溶出率の 1/2 の平均溶出率を示す適当な時点及び規定された試験時間において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± 12 ％の範囲にあるか、又は f2 関数の値が 46 以上。

（ｃ）規定された試験時間において、標準製剤の平均溶出率が 50 ％に達しないとき、標準製剤が規定された試験時間における平均溶出率の 1/2 の平均溶出率を示す適当な時点及び規定された試験時間において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± ９％の範囲にあるか、又は f2 関数の値が 53 以上。

（カ）残留確認試験

食用動物に対して使用する動物用医薬品については、原則として、残留確認試験を行う。残留確認試験は、休薬期間又は使用禁止期間を遵守した場合に薬剤の残留濃度が残留基準値以下であることを確認することを目的とする。残留確認試験は、「効能又は効果」又は「用法及び用量」の欄に記載された全ての動物において、動物種毎に３頭又は３群（１群の動物数は３検体の分析が可能となる数とする。）以上を用いて、休薬期間又は使用禁止期間経過時点（図１参照）における試料中の薬剤の残留濃度を定量する。動物、投与経路、用量段階、投与期間、試料の採取（採取時点を除く）及び分析は、１４－４の食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：製剤の休薬期間確立のための指標残留減衰試験（その２）の（１）、（３）、（４）、（５）並びに（６）のエ、オ及びカによる。なお、休薬期間又は使用禁止期間が日単位の場合には１日を 24 時間として試験を実施することとする。また、乳の残留確認試験を行う場合には、申請の用法及び用量に投与と搾乳の関係が規定されている場合を除き、原則として搾乳直後に投与することとする。

（キ）生物学的同等性試験結果の記載事項

①　試料

ａ　試験製剤のコード名等、並びに、試験に用いた製剤のロット番号及びロットの大きさ。標準製剤の銘柄名及びロット番号

ｂ　剤形の種類

ｃ　有効成分名

d　表示量
e　試験製剤及び標準製剤の含量又は力価の測定値と測定方法
f　薬物の溶解度（溶出試験に用いられる各 pH（水を含む。）での溶解度）
g　難溶性薬物を含む動物用医薬品の場合、原薬の粒子径又は比表面積及びそれらの測定方法
h　結晶多形がある場合、多形の種類と溶解性
i　他の特記事項（例えば、pKa、物理化学的安定性など）

② 試験結果
a　要旨
b　溶出試験
（a）試験条件の一覧表：装置、撹拌速度、試験液の種類と量
（b）分析法：方法の記述、バリデーションの要約
（c）溶出試験のバリデーションの要約
（d）結果
（i）標準製剤を選択するための試験の結果
表：各試験条件における個々の製剤の溶出率、各ロットの平均値と標準偏差
図：各試験条件における各ロットの平均溶出曲線を比較した図
（ii）試験液を選択するための試験の結果
（iii）標準製剤と試験製剤の比較結果
表：各試験条件における個々の製剤の溶出率、試験製剤及び標準製剤の平均値と標準偏差
図：各試験条件における試験製剤と標準製剤の平均溶出曲線を比較した図
c　血中濃度を用いた生物学的同等性試験
11－2－1　生物学的同等性：血中濃度を用いた生物学的同等性試験（VICH GL52）による。
d　薬力学的試験
本試験について、以下の項目について記載する。予試験については、本試験の試験法を設定するために必要とした項目を記載する。
（a）試験条件
（i）被験動物
年齢、性、体重、その他に臨床検査などで特筆すべき事項があれば記載する。
（ii）投与条件
絶食時間、投与時の水の量、投与後の摂餌時間。摂餌後投与のときは、餌の内容（蛋白、脂質、炭水化物、カロリーなど）、摂餌後から投与までの時間を記載する。

（ⅲ）投与製剤

投与される製剤中の有効成分含有量、又は混餌投与の場合には餌中の有効成分含有量を記載する。

（ⅳ）分析法：方法の記述、バリデーションの要約

（ｂ）結果

（ｉ）個々の被験動物のデータ

（ⅱ）平均値及び標準偏差

（ⅲ）統計解析及び同等性評価

（ⅳ）その他

脱落例の情報（データ、理由）、被験動物の観察記録

ｅ　臨床試験

ｄに準じる。

イ　経口徐放性製剤

（ア）標準製剤と試験製剤

原則として、先発動物用医薬品の３ロットにつき、以下の①又は②の試験液で溶出試験を行い、中間の溶出性を示すロットの製剤を標準製剤とする。試験液以外の試験条件は、（エ）による。ただし、試験は、パドル法のみで行い、回転数は、毎分 50 回転のみとする。

①　規格及び試験方法に溶出試験が設定されている場合には、その溶出試験液。

②　（エ）に示した溶出試験条件の試験液の中で、少なくとも１ロットにおいて薬物が平均 85 ％以上溶出する場合は溶出速度が最も遅い試験液。いずれのロットもすべての試験液において平均 85 ％以上溶出しない場合は溶出速度が最も速い試験液。

上記の溶出試験により標準製剤を適切に選択できない動物用医薬品においては、製剤の特性に応じた適当な溶出（放出）試験又はそれに代わる物理化学的試験を行い、中間の特性を示したロットの製剤を標準製剤とする。

後発動物用医薬品の試験製剤は、その大きさ、形状、比重及び放出機構が先発動物用医薬品のものと著しく異ならないものとする。試験製剤のロットの大きさ及び含量又は力価はアの（ア）による。試験製剤の溶出挙動は、標準製剤の溶出挙動と類似していなければならない。溶出挙動の類似性は、（エ）の④に従って判定する。

（イ）血中濃度を用いた生物学的同等性試験

11 －２－１　生物学的同等性：血中濃度を用いた生物学的同等性試験（VICH GL52）による。

（ウ）薬力学的試験及び臨床試験

生物学的同等性試験の実施が困難なときは、薬力学的試験又は臨床試験で同等性を評価する。試験はアの（ウ）又は（エ）に準じて行う。

（エ）溶出試験

適当な方法でバリデーションを行った溶出試験法及び分析法を用いて試験を行う。以下に規定するほか、原則として、溶出試験法ガイドラインによる。

試験時間は、通常、24 時間とするが、pH1.2 試験液を用いた場合の試験時間は、科学的に妥当であれば、2 時間とすることができる。また、標準製剤の平均溶出率が 85%を超えた時点で試験を終了することができる。

① 試験条件

以下の条件で試験を行うが、装置としてパドル法に加えて、回転バスケット法又は崩壊試験装置法のいずれか一つを選択し、選択した理由を明記する。崩壊試験装置法を実施する場合は、日本薬局方の崩壊試験法に準じる。

装置	回転数（rpm）	pH	その他
パドル	50	① 1.2	
		② 3.0 ～ 5.0 [a)]	
		③ 6.8 ～ 8.0 [a)]	
		④水	
		③ 6.8 ～ 8.0 [a)]	ポリソルベート 80、1.0%（W/V）添加
	100	③ 6.8 ～ 8.0 [a)]	
	200	③ 6.8 ～ 8.0 [a)]	
回転バスケット	100	③ 6.8 ～ 8.0 [a)]	
	200	③ 6.8 ～ 8.0 [a)]	
崩壊試験	30 [b)]	③ 6.8 ～ 8.0 [a)]	ディスク無し
	30 [b)]	③ 6.8 ～ 8.0 [a)]	ディスク有り

a) 24 時間で標準製剤の平均溶出率が 85 %以上溶出する条件のうち、溶出の遅い試験液を選択する。いずれの試験液においても、標準製剤が 24 時間までに平均 85 %溶出しない場合には、最も速い試験液を選択する。

b) ストローク／分。

② 溶出挙動の類似性及び同等性の判定

すべての溶出試験条件において、以下に示す a のいずれかの基準を満たすときに試験製剤の溶出挙動は標準製剤の溶出挙動に類似していると判定する。また、少なくとも 1 つの溶出試験条件において規定する試験時間内に標準製剤の平均溶出率が 80 %以上に達し、すべての溶出試験条件において、以下に示す b のいずれかの基準を満たすときに試験製剤の溶出挙動は標準製剤の溶出挙動と同等であると判定する。なお、f2 関数により判定を行う場合の溶出率を比較する時点は、

付録１の２による。本試験による類似性あるいは同等性の判定は、生物学的に同等であることを意味するものではない。

ａ　類似性

（ａ）規定された試験時間において標準製剤の平均溶出率が 80 %以上に達する場合

標準製剤の平均溶出率が 30 %、50 %、80 %付近の適当な３時点において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± 15 %の範囲にあるか、又は f2 関数の値が 42 以上であるとき。

（ｂ）規定された試験時間において標準製剤の平均溶出率が 50 %以上 80 %未満の場合

標準製剤が規定された試験時間における平均溶出率の 1/2 の平均溶出率を示す適当な時点及び規定された試験時間において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± 12 %の範囲にあるか、又は f2 関数の値が 46 以上であるとき。

（ｃ）規定された試験時間において標準製剤の平均溶出率が 50 %未満の場合

標準製剤が規定された試験時間における平均溶出率の 1/2 の平均溶出率を示す適当な時点及び規定された試験時間において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± ９%の範囲にあるか、又は f2 関数の値が 53 以上であるとき。

ｂ　同等性

（ａ）規定された試験時間において標準製剤の平均溶出率が 80 %以上の場合

標準製剤の平均溶出率が 30 %、50 %、80 %付近の適当な３時点において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± 10 %の範囲にあるか、又は f2 関数の値が 50 以上であるとき。

（ｂ）規定された試験時間において標準製剤の平均溶出率が 50 %以上 80 %未満の場合

標準製剤が規定された試験時間における平均溶出率の 1/2 の平均溶出率を示す適当な時点及び規定された試験時間において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± ８%の範囲にあるか、又は f2 関数の値が 55 以上であるとき。

（ｃ）規定された試験時間において標準製剤の平均溶出率が 50 %未満の場合

標準製剤が規定された試験時間における平均溶出率の 1/2 の平均溶出率を示す適当な時点及び規定された試験時間において、試験製剤の平均溶出率が標準製剤の平均溶出率の± ６%の範囲にあるか、又は f2 関数の値が 61 以上である。

（オ）残留確認試験

アの（カ）による。

（カ）生物学的同等性試験結果の記載事項

比重、大きさ、形状、放出機構が先発動物用医薬品と著しく異ならないことを示す記述を行う。その他は、アの（キ）に準じる。

ウ　非経口製剤（局所皮膚適用製剤を除く）

（ア）標準製剤と試験製剤

先発動物用医薬品の３ロットについて、製剤の特性に応じた適当な溶出（放出）試験又はそれに代わる物理化学的試験を行い、中間の特性を示したロットの製剤を標準製剤とする。

後発動物用医薬品の試験製剤のロットの大きさ及び有効成分の含量又は力価は、アの（ア）に準じる。

（イ）血中濃度を用いた生物学的同等性試験

11－２－１　生物学的同等性：血中濃度を用いた生物学的同等性試験（VICH GL52）による。

（ウ）薬力学的試験及び臨床試験

アの（ウ）又は（エ）に準じて試験を行う。薬力学的試験においては、薬理効果の時間的推移を比較することが望ましい。

（エ）溶出（放出）試験又は物理化学的試験

標準製剤と試験製剤を比較するために、製剤の特性に応じた適当な溶出（放出）試験又はそれに代わる物理化学的試験を行う。

（オ）残留確認試験

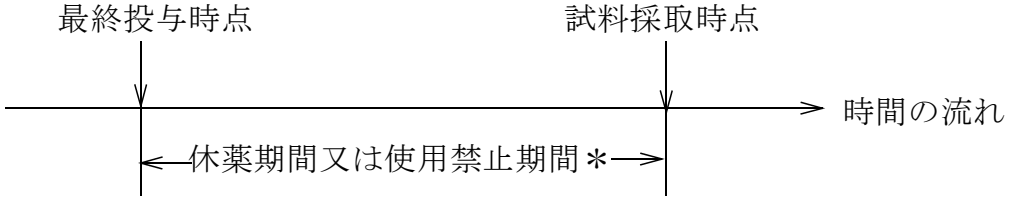
アの（カ）による。

（カ）生物学的同等性試験結果の記載事項

アの（キ）に準じる。ただし、被験動物の観察記録として、静脈内投与を除く注射剤の場合には、注射部位の反応の大きさ、持続時間及び疼痛の有無を記載し、経皮投与製剤の場合には、投与部位の毛や皮膚における反応を記載する。

エ　同等性試験（本ガイドラインで要求される全ての試験を指す。）が免除される製剤

使用時に水溶液である静脈注射用製剤。ただし、特別な製剤設計を施している製剤は除く。



＊休薬期間又は使用禁止期間が日単位の場合は、１日を 24 時間として試験を実施すること。

図１　残留確認試験における試料採取時点

付録１．f2 関数と溶出率比較時点

１．f2 関数の定義

f2 の値は、次の式で表す。

$$f_2 = 50\log\left[\frac{100}{\sqrt{1+\frac{\sum_{i=1}^{n}(Ti-Ri)^2}{n}}}\right]$$

ただし、Ti 及び Ri はそれぞれ各時点における試験製剤及び標準製剤の平均溶出率、n は平均溶出率を比較する時点の数である。

２．溶出率比較時点

（１）標準製剤が 15 分～ 30 分に平均溶出率が 85 %以上の場合

15 分、30 分、45 分。

（２）標準製剤が 30 分以降、規定された試験時間以内に平均溶出率が 85 %（徐放性製剤では 80 %）以上の場合

標準製剤の平均溶出率が約 85 %（徐放性製剤では 80 %）となる適当な時点を Ta とするとき、Ta/4、2Ta/4、3Ta/4、Ta。

（３）規定された試験時間において標準製剤の平均溶出率が 85 %（徐放性製剤では 80 %）未満の場合

規定された試験時間における標準製剤の平均溶出率の約 85 %（徐放性製剤では 80 %）となる適当な時点を Ta とするとき、Ta/4、2Ta/4、3Ta/4、Ta。

付録２．　ラグ時間による溶出曲線の補正方法

製剤から薬物が表示含量の５％溶出するまでに要する時間をラグ時間とする。ラグ時間は、製剤ごとに溶出曲線から内挿法により求める。

標準製剤の溶出にラグ時間がある場合には、試験製剤及び標準製剤について、製剤の溶出曲線ごとにラグ時間を差し引いた溶出曲線を求める。これに基づいて試験製剤及び標準製剤の平均溶出曲線を求め、得られた２つの平均溶出曲線についての類似性を評価する。

11－2　血中濃度を用いた生物学的同等性試験ガイドライン

11－2－1　生物学的同等性：血中濃度を用いた生物学的同等性試験（VICH GL52）

（1）緒言

ア　目的

本ガイドラインは、動物用医薬品の血中濃度を用いた *in vivo* の生物学的同等性（以下「BE」という。）に関連するデータの要求事項を調和することを意図している。この目的を達成するために、本ガイドラインは以下の項目を取り扱っている。

- 調和した BE の定義
- 科学的に妥当な血中濃度を用いた BE 試験設計時に考慮する必要がある要因／変数
- 血中濃度を用いた BE 試験の報告書に含まれるべき情報

VICH は、動物用医薬品の承認のための規制当局の要求事項を調和することを通して、試験の繰り返しや不必要な試験を排除するよう努力しており、その最終目的は疑いもなく製剤の開発や承認のために供試される動物数の削減である。

イ　背景

本ガイドラインにおいて、BE とは、適切に設計された試験において、同様の条件下で同一モル用量を投与したとき、作用部位での API 又はその代謝物のバイオアベイラビリティに、（あらかじめ定めた許容基準内で）差がないことと定義される。製剤の BE を示すために代理指標として血中薬物濃度を用いる場合、血中濃度を測定した場合の薬物吸収の速度と量が「同等な」２つの製剤ならば、治療上区別できず、そのため臨床現場において置き替えが可能であるということが基本的な前提となる。

動物における製剤の BE 測定には、多くの統計学的、論理的及び規制的な課題が存在する。これらの課題の取扱い及び製剤の BE の判断基準における国際的な違いが、データ交換の障害や科学的な混乱を招くことがある。したがって、国際的に調和したガイドラインを作成することにより、BE 判定の基礎となる基本的な薬物動態（以下「PK」という。）、試験設計の考慮事項及び統計学的原理に関する国際獣医社会の理解を統一させることができる。その性質上、ガイドラインは多くの可能性を網羅しているが、起こりうる全ての可能性を網羅しているわけではない。科学的に妥当であれば、代替法も用いることができる。

ウ　範囲

本ガイドラインは、動物用医薬品製剤の血中濃度を用いた *in vivo* の BE の測定に特有の試験設計と原則に焦点を当てている。以下の項目は、本ガイドラインの範囲外である。

- バイオウェイバー
- バイオマス
- 治療に用いるタンパク質又はペプチド

・　飼料添加剤
・　薬理学的エンドポイントを用いる試験
・　臨床的エンドポイントを用いる試験
・　*In vitro* の溶出試験
・　人の食品安全
・　血中薬物濃度が作用部位の薬物濃度の指標とならない製剤。例えば、外用剤、乳房注入剤、API を作用部位で直接放出するような複雑な薬物輸送システムの静脈内注射剤。
・　嗜好性試験又はリッキングテスト（licking test）のような補助的試験が必要となる可能性のあるもの（例えば経皮投与剤、薬剤添加ブロック）
・　複数回の採血が困難な動物種（例えば、魚やミツバチ等）

この BE ガイドラインの範囲外の事項を取り扱う場合には、各地域のガイダンスに従うことが適切である。

BE は、後発品（試験製剤）と標準製剤との比較だけでなく、製剤の開発においても重要である。例えば、BE 又は相対的バイオアベイラビリティの評価は、異なる処方間、剤形間、投与経路間及び主要な臨床試験と初期の臨床試験で使用された処方間の比較をブリッジ（bridge）するために使用され得る。

用語集は､本ガイドラインで使用される様々な用語の定義を記載しており、また各管轄地域のガイドラインにも利用可能な同義語を記載している。

付録は、ガイドラインに記載されている科学的及び統計学的概念に関する追加の説明として記載している。他の関連する VICH のガイドラインも調べるべきである。

標本数の見積もり、BE データの統計解析及び逐次解析の演習は、11 －２－２に記載している。これは、以下の URL において閲覧できる。

英語版：http://www.vichsec.org/
日本語版：http://www.maff.go.jp/nval/

補足資料中に示した例は、単に情報提供の目的を意図しており、ガイダンスとして理解すべきではない。

本ガイドライン中では、血液、血漿及び血清という用語は、互換性をもって使用されている。

（２）*IN VIVO* のプロトコールの作成

全ての BE 試験は、作成するデータの信頼性を保証できる方法で実施しなくてはならない。国際的に受け入れられるためには、BE 試験は非臨床試験の実施に関する基準（Good Laboratory Practice（GLP））に則って実施すべきである。

ア　製剤の選択

標準製剤の開発中に実施する BE 試験又は相対的バイオアベイラビリティ試験のための製剤の選択については規定していないが、後発動物用医薬品の承認を得るための BE 試験における製剤の選択には、以下の条件が一般的に適用される。

- BE 試験は、同一の API を含有する試験製剤と標準製剤を用いて実施する。
- 試験製剤は市販予定の製剤の最終処方を代表するものとすべきである。
- 標準製剤は、後発品の承認を得ようとしている管轄地域内において承認を得ている動物用医薬品と結びつけられるロットでなくてはならない。
- 試験製剤と標準製剤の API の含有量は、BE 試験の実施前に分析すべきである。国際的に受け入れられるためには注)、試験製剤と標準製剤のバッチの含量の分析値の差が±５％以下であることが推奨される。
- *in vivo* の BE 試験に用いる試験製剤は、特に妥当性が示されない限り、実生産スケールの少なくとも 1/10 スケールのバッチ由来のものであるべきである。
- 例えば、溶解性のような、API の重大な品質に関する特徴や規格は、BE が示された試験製剤のバッチで確立すべきである。

試験報告書には、標準製剤の名称、(定量試験成績も含む) 含量、剤形、バッチ番号、(利用可能であれば) 使用期限、購入した国を記載すべきである。試験製剤は、名称、(定量試験成績も含む) 含量、剤形、組成、バッチサイズ、バッチ番号、製造年月日、(利用可能であれば) 使用期限が記載されるべきである。

注) この表現が使用されている場合、ある管轄地域内では要求がそれほど厳しくないかもしれないということを意味している。もし、特定の地域内のみで製剤の販売をするために試験を提出する場合には、この違いが考慮されるだろう。

イ　用量の選択

血中濃度を用いた BE 試験では、動物への投与は、試験製剤と標準製剤のバッチの含量の定量値に基づくのではなく、表示された含量に従って行う。

血中濃度を用いた BE 試験は、一般に、標準製剤の承認されている最高表示用量（例えば、mg/kg）で実施すべきである。承認されている最高用量を用いれば、多くの場合、製剤間の有意な差がより容易に検出される。しかしながら、もし、標準製剤が用量の全範囲において線形の PK を示していることを実証できる場合、最高用量を使用できない理由について科学的妥当性が示されれば承認された用量範囲のいずれの用量も使用できるかもしれない。試験製剤との含量の定量値の差が５％未満の標準製剤が見つ

けられない場合、データについて用量の正規化（normalization）を実施することもできる。その場合、用量の正規化の手順は、プロトコールに事前に規定し、試験製剤と標準製剤の分析結果を含めることにより妥当性を示すべきである。

承認されている最高用量の数倍を投与しないと測定可能な血中濃度に達しない場合には、承認されている用量よりも高い用量で BE 試験を実施することが適切かもしれない。一般には、最高用量としては標準製剤の承認されている最高用量の３倍が限度であろう。この場合の標準製剤は、承認されている用量よりも高い用量においても十分な安全域があり、また線形 PK（すなわち、吸収過程又は排泄過程が飽和可能でないこと）を示すものであるべきである。この場合、用量の選択についての科学的妥当性を提示すべきである。

標準製剤に関して、治療用量の範囲で用量の増加に伴う血中薬物濃度－時間曲線下面積（以下「AUC」という。）の増加が用量の増加に比例する値より少ない場合（非線形 PK の場合）には、以下を考慮すべきである。

- 製剤の吸収が飽和可能な吸収過程によって制限されることを示す証拠が存在する場合、２つの製剤は表示用量の最高用量を投与した際には生物学的に同等であるように見えるが、表示用量の低用量を投与したときには生物学的同等性を示さないことがある。この状況を回避するために、既承認の最高用量よりも低い用量を使用することが望ましい。この場合、（用いた用量が線形 PK を示す用量の範囲であることを示して）用量の選択についての科学的妥当性を提示すべきである。
- 低溶解性のため治療用量の範囲で非線形である場合、表示用量の最高用量と最低用量（又は線形を示す範囲内の用量）で BE を証明すべきである。すなわち、この場合、BE 試験が２試験必要となる。

クロスオーバー試験においては、試験の全ての時期において、各動物への総投与量が同じであるようにすべきである。動物の体重の変化が大きいと予測されるような、稀な場合（例えば、個体内の比較でバイアスとなるような時期１と時期２の薬物の吸収、分布、代謝又は排泄の差のリスクがある成長が早い動物で実施する試験）の用量の調整は、個々の事例に基づいて考慮する必要がある。

妥当であれば、投与量は、固形の経口剤形では利用可能な含量に基づいて切り上げ、投薬器を使用する際には最も近い目盛に切り上げるべきである。

固形の経口剤形に関して、試験にバイアスをかけるような手技（例えば、等しい投与量とするために砕いたり、削ったりといった手技）を加えるべきではない。割線によって分割した錠剤が均一であることが製剤又は製造のデータから示されれば（例えば、半分に分割したものの含量が均一であること）、割線に沿って錠剤を分割することは許容されるかもしれない。製造又は製剤のデータが入手できない標準製剤に関しては、製剤のラベル

に記載している情報を、錠剤の取扱いの指針として用いることができる。

試験報告書には、試験の各時期の各供試動物に投与した表示用量を記載すべきである。

ウ　投与経路の選択

In vivo の BE 試験を実施する際には、特に妥当性がない限り、

- 試験製剤及び標準製剤は、同一の経路かつ同一の部位に投与すべきである。
- 標準製剤で承認された各投与経路について、それぞれの BE 試験を提出すべきである。

エ　試験設計に関する考慮事項

（ア）クロスオーバー試験設計と並行群間比較試験設計

薬物の吸収速度、クリアランス及び分布容積についての供試動物の個体間の差といった、試験における主要な変動要因を排除するため、血中濃度を用いた BE 試験には、通常、２期２群のクロスオーバー試験が用いられる。その試験設計は以下のとおりである。

	A群	B群
時期１	試験製剤	標準製剤
時期２	標準製剤	試験製剤

時期効果による潜在的な交絡を排除するために、２期クロスオーバー試験設計に２群を含めることが必要である。

クロスオーバー試験設計が無効になる可能性があるため、時期１の処置が時期２の処置に関連する PK に影響を与えるべきではない。そのため、ウォッシュアウト期間は、薬物とその代謝物が全く体内から消失すること及び時期２で投与された薬物の供試動物内での処理過程を変更してしまうような生理学的影響が残らないことを保証できる十分な期間に設定する必要がある。したがって、投与前に薬物がないことを証明するほか、キャリーオーバーのリスクを最小とするため、ウォッシュアウト期間の長さは、API の血中終末消失相の半減期の少なくとも５倍であることが推奨される（代謝物が時期２において親化合物の PK に影響を与えるという証拠がある場合には代謝物についても同様）。

内因性物質の場合、キャリーオーバー効果の存在を定量することは非常に困難である。したがって、ウォッシュアウト期間が確実に十分な長さとなるよう注意すべきである。ウォッシュアウト期間の長さは、あらかじめプロトコールに記載して、その妥当性を説明すべきである。内因性物質に関しては、時期１の投与前（ベースライン）の薬物濃度と時期２における投与前濃度は同程度であるべきである。

並行群間比較試験設計は、以下の状況においては望ましいであろう。

- 親化合物及び／又はその代謝物が、時期２に投与される製剤のバイオアベイラビリティに影響を与えるような生理学的変化(例えば、肝ミクロソームの酵素誘導や血流の変化）を動物に誘発する場合。
- 親化合物及び／又はその代謝物又は製剤が非常に長い終末消失相の半減期を有し（例えば、フリップ・フロップ動態)、時期２の投与時に動物の血中に薬物が残留するリスクがある場合（つまり、ウォッシュアウト期間が現実的でない)。
- ２期クロスオーバー試験のウォッシュアウト期間が非常に長く、供試動物に顕著な生理学的変化をもたらす場合。
- 動物の総血液量のために、１つの時期を超える血中濃度－時間プロファイルを得ることができない場合。

代替の試験設計も考えられる。例えば、

- 繰り返し試験設計（(２）のエの（イ）を参照)
- 逐次解析試験設計（(２）のエの（ウ）を参照)
- 各地域で承認されている製剤次第であるが、複数の地域で承認を得るために、２つの異なる標準製剤を使って１試験を実施する場合には、３処置のクロスオーバー試験設計又は複数の標準製剤を用いた並行群間比較試験設計が考えられるかもしれない。

代替の試験設計とそれに関連して提案される統計解析方法については、BE 試験の実施前に規制当局と議論することもできる。予備試験の成績又は文献をその代替試験設計を支持するものとして用いてもよい。

試験をどのように実施するかにかかわらず、その設計は事前にプロトコールに記載しておくべきである。

（イ）繰り返し試験設計

繰り返し試験設計は、処置の少なくとも一つを繰り返して行う試験である。

動物数を非常に多くしなければ従来のクロスオーバー試験設計は実行できないと判断した場合、各群内で３期（部分的繰り返し、例えば全供試動物で標準製剤の投与を繰り返す。）又は４期（全繰り返し、各供試動物が試験製剤と標準製剤を２回投与される。）の繰り返し試験設計が考えられる。ある管轄地域では、繰り返し試験設計は *in vivo* での標準製剤を基準とする BE の解析にも用いられ得る。他の統計解析法を用いようとする場合は、想定される統計上の考慮事項並びにそのような代替法が許容できるか否か及び許容されるための条件に関する付加的な情報について各地域の規制当局に確認すべきである。

（ウ）逐次解析試験設計

製剤の BE を示そうとするとき、逐次解析法の使用も認められる。逐次解析試験設計を用いるときは、最初の供試動物群に薬物を投与し、そのデータを解析することができる。もし、BE が示されなければ、追加

の群を補充し、両群の結果を最終解析において合わせて解析することができる。

このアプローチを採用するならば、試験の全体の第１種の過誤を保つために適切な段階を踏まなければならず、試験を終了する基準を試験開始前に明確に定めておくべきである。第一ステージのデータ解析は中間解析とし､(90%を超えるよう調節した確率を用いて修正した信頼区間で)調節した有意水準で両ステージの解析を行うべきである。二段階アプローチを採用する計画では、各ステージに含まれる動物数、各解析で使用する調節した有意水準を予めプロトコールに記載しなければならない。

（エ）単回投与試験設計と複数回投与試験設計

製剤から全身循環への API の放出の差を評価する点に関して、単回投与試験が一般的により感度が高い試験方法であることから、ほとんどの場合には即放性及び放出制御製剤のどちらにも単回投与試験が推奨される。

繰り返し投与を意図した徐放性製剤については、投与の間に蓄積があるならば BE は複数回投与試験で示すべきである（すなわち、定常状態において、少なくとも薬物濃度が単回投与後と比較して２倍以上に上昇する場合)。このような場合、最高血中濃度（以下「C_{max}」という。）と AUC に加えて、トラフ濃度（以下「C_{trough}」という。）が考慮すべき重要なパラメータであろう。ラグタイムがある製剤の場合、C_{trough} は最低血中濃度（以下「C_{min}」という。）に等しくないかもしれないことに注意すべきである。もし、蓄積がない又は無視できるほどである場合には、繰り返し投与を意図した徐放性製剤の場合でも単回投与の BE 試験のデータで十分であろう。

さらに、複数回投与試験は、以下の場合に適切かもしれない。

- 飽和可能な消失過程がある。
- 分析の感度が不十分で、単回投与後の AUC を十分に特徴付けるほどの薬物の定量ができない。(「（２）のケ　採血スケジュール」の項を参照。)

単回投与試験及び複数回投与試験のどちらも、クロスオーバー試験設計又は並行群間比較試験設計で実施され得る。試験期間が非常に長く複雑となるため、逐次解析試験設計及び繰り返し試験設計は。一般に複数回投与試験には推奨されない。

オ　供試動物及び動物種の選択

試験に供する動物は､その製剤が対象とする動物種でなければならない。BE 試験は、承認を得ようとする管轄地域において、承認されている標準製剤に表示されている各メジャー動物種について実施しなければならない。BE が確立されているメジャー動物種の試験結果をマイナー動物種へ外挿することは、それら動物種の解剖学、生理学及び API と製剤の性質を考慮し、科学的に妥当な根拠をこの外挿について示すことができれば許容

されるであろう。

供試動物には、BE 試験の *in vivo* の部分の開始前には薬物が残留していないようにすべきである。BE 試験のデータに影響を与える可能性のある潜在的及び生理学的なキャリーオーバー効果の原因となる薬剤の残留に関連付けて考えられる期間より長い無投薬期間が必要となる場合がある。

試験は、製剤の対象とする動物集団の代表的な健康動物を用いて実施するべきである。並行群間比較試験では、API の PK に影響すると知られているか影響すると予想される全ての変数、例えば年齢、体重、性別、栄養状態、生理的状態、(関連があれば) 生産レベルについて、動物及び処置群は均一かつ同等であるべきである。

動物は無作為化し、同じ動物数を各群(クロスオーバー試験設計の場合)又は各処置(並行群間比較試験設計の場合)に割り付けるべきである。

上述の情報に関する完全な説明を試験報告書に記載すべきである。

カ　食餌状態

全ての動物種に関して、食餌状態と給餌のタイミングは、動物福祉(例えば、反芻動物は絶食しない)と API の PK に関して合致するようにすべきである。

経口投与する犬用及び猫用の製剤の場合、標準製剤の承認された用法に給餌投与のみが推奨されている場合にはそれに従って試験を実施し、そうでない限り絶食状態で試験を実施すべきである。絶食は、少なくとも投薬の８時間前から投薬後４時間とすべきである。

非反芻動物に経口投与する放出制御製剤については、特に適切な妥当性の説明がない限り、BE は通常、給餌状態及び絶食状態の両方で確立する必要がある。

試験プロトコールと試験報告書において、給餌状態又は絶食状態下で BE 試験を実施することについての理論的根拠を説明し、試験で用いる飼料と給餌計画も記載すべきである。

キ　解析からのデータの除外

試験から動物のデータの全部又は一部を除去する必要が生じる状況は多くある。そのような場合、データの除去の適切な妥当性の説明を試験報告書に記載し、バイアスを避けるために、データの除去の決定は血液分析の前に行うべきである。

試験プロトコールに規定が求められるような、かなりの頻度で起こる事象もある。例えば、経口製剤の投薬量の全部又は一部を失う危険性があるので、嘔吐のために解析から試験動物のデータを除外する基準は、試験プロトコールに事前に規定することが期待される。そのような基準を設定する際に考慮すべき点は、以下のとおりである。

- 投薬と嘔吐の間の許容される時間(例えば、薬物の予想される胃排出時間、動物の食餌状態を考慮して)は、どれくらいか。
- 嘔吐物中に失われる物質の許容量はどれくらいと考えられるか。

さらに、嘔吐後の再投与が試験の選択肢として考えられる場合には、再投与に関する基準を事前に試験プロトコール中に規定しなくてはいけない。全ての利用可能なデータを統計解析に含めることが重要である。もし、例えば、動物が時期２から除外された場合、その動物の時期１のデータは統計学的評価から除外すべきでない。

起こりうるすべての統計学的な懸念が処理されたことを保証するため、BE の評価から除外された動物のデータがある場合とない場合の記述統計が示されるべきである。

ク　標本数の決定

重要な BE 試験の適切な標本数を求めるために、予備試験が有用である。

標本数の計算では、用いる推定値（例えば、投与群間の差及び分散）が将来の試験で現実になるであろうということを想定している。さらに、一般に、標本数は、それらの推定値が現実になったとした場合に BE を示すために必要な「最低数」として推定される。標本数の計算方法を説明する参考文献を示す。

BE 試験の標本数は、処置のばらつき及び／又は差が最も大きくなると予想される PK パラメータ（例えば、C_{max}）の BE を達成するために必要な供試動物数に基づくべきである。標本数を求める式と例を、付録に示す。

国際的に受け入れられる試験では、１処置あたり最低 12 頭の評価可能な動物が必要である。クロスオーバー試験では、１群あたり最低６頭となる（つまり、２期２群のクロスオーバー試験における供試動物数Ｎは 12 頭以上)。並行群間試験では、１処置あたり 12 頭以上が必要である（したがって、BE 試験に必要な動物の合計は 24 頭以上)。

供試動物が減るリスクを考えた場合、申請者は追加の動物を試験に加える設計を選択することもできる。そうすれば、試験の進行に伴い供試動物を（嘔吐、投薬ミス、又は死亡／傷害のために）除外した場合でも、試験に加えていた追加動物によって、適切な統計学的検出力を維持できるであろう。

標本数の選択については、事前に試験プロトコールにその妥当性を記載すべきである。

ケ　採血スケジュール

採血スケジュールは、信頼性の高い C_{max} の推定値が得られるように、最高血中濃度到達時間（以下「T_{max}」という。）付近で頻回に採取するように設定すべきである。静脈内注射以外の投与経路では、最初の採血時点が C_{max} に相当する時点とならないようにすべきである。採血期間は、信頼性のある薬物暴露量の推定値が得られるよう設定すべきであり、それは $AUC_{0\text{-}Last}$ が $AUC_{0\text{-}\infty}$の最低 80%になれば達せられる。消失速度定数（以下「k_e」という。）の信頼性の高い推定値及び $AUC_{0\text{-}\infty}$の正確な推定値を得るために、最終対数線形相中に少なくとも３回の採血時点が必要である。

最終消失相の半減期が長い API では、採血期間中に吸収相が終了してい

れば、BE は（C_{max} に加えて）総全身暴露の 80 %未満の AUC 値に基づいて判断してもよい。

複数回投与試験では、定常状態の一投与間隔に渡る AUC（AUC_{τ}）を正確に測定するために、投与前の採血は投与直前に行うべきであり、最後の採血はできる限り投与間隔の終わりに近い時点で行うことが推奨される。また、定常状態に達したことを示せるよう採血すべきである（すなわち、C_{trough} が安定するまでトラフ時の濃度は連続して調べるべきである）。

内因性物質の場合、投与前の採血スケジュールは、ベースライン濃度の補正の方法に一致させるべきである。（「（２）のコ　血中濃度を用いた BE 試験におけるパラメータ」の項を参照。）

各個体の採血時点の計画と実際の採血時点について、試験報告書に記載するべきである。

コ　血中濃度を用いた BE 試験におけるパラメータ

試験では、以下のパラメータを測定すべきである。これらのうち、幾つかのパラメータは、生物学的同等性の統計解析のパラメータには用いないであろう（「（２）のエ 試験設計に関する考慮事項」の項を参照）。

単回投与試験では、C_{max}、T_{max}、$AUC_{0\text{-}Last}$、$AUC_{0\text{-}\infty}$を測定すべきである。

複数回投与試験では、AUC_{τ}、定常状態の C_{max}（以下「$C_{max\ SS}$」という。）、定常状態の C_{trough}、定常状態の Tmax（$T_{max\ SS}$）を測定すべきである。意図的に放出を遅らせた剤形を含む場合は、試験製剤と参照製剤の C_{trough} 値の比較も適切であろう。

API が内因性物質の場合、BE パラメータの計算にはベースライン濃度の補正を含めるべきである。ベースライン濃度の補正の方法については、事前に試験プロトコールに規定し、その妥当性を記載すべきである。ベースライン濃度の補正に関する推奨方法は、連続する３日間の同一時刻について評価した投与前濃度から得られた内因性物質濃度の平均値を差し引くことである。もし、内因性物質濃度の日内変動が予測されるならば、その変動の特徴のプロファイルを調べることも適切であろう。

追加のパラメータとして報告書に記載することが適切と考えられるものには、k_e、最終消失相の半減期、ラグ時間（以下「T_{lag}」という。）が挙げられる。

BE 試験の PK パラメータの測定には、ノンコンパートメントモデルを用いるべきである。

試験報告書には、生データから PK パラメータを算出するために用いた方法を記載すべきである。

サ　分析対象物質の決定

原則として、BE の評価は、親化合物の測定濃度に基づいて実施すべきである。なぜなら、親化合物の C_{max} は通常、代謝物の C_{max} に比べて、製剤間 の
吸収速度の差について感度良く示すからである。一般に、製剤の BE は、API

の総濃度（遊離型とタンパク結合型の和）に基づいて判断されるだろう。

（ア）プロドラッグ

親化合物がプロドラッグであり、その血中濃度が無視できるほどでない限り、BE の証明は親化合物に基づくべきである。プロドラッグの循環血液中濃度が無視できるほどである場合には、活性代謝物（プロドラッグの吸収によって生成される化合物）を測定すべきである。申請者は、定量する成分についての科学的な根拠を試験報告書に記載すべきである。

（イ）エナンチオマー

多くの場合、製剤の生物学的同等性の評価にはアキラルな測定方法を使用することで十分であろう。しかしながら、以下の条件を全て満たす場合には、エナンチオマー特異的な分析方法の使用が必要であろう。

- エナンチオマーが異なる PK を示す。
- エナンチオマーの AUC 比が、各々の吸収速度の違いによって変わる。
- エナンチオマーが異なる薬力学的特性を持っている。

３つ全ての条件が満たされれば、キラル（立体特異的）な分析方法が必要であろう。さらに、試験製剤又は標準製剤が一つ又は両方のエナンチオマーの吸収を選択的に変化させ得るキラルな添加物を含んでいる場合には、キラルな分析方法が必要になるかもしれない。薬物が単一のエナンチオマーであり、*in vivo* でキラル変換を起こすような場合にもキラルな分析方法が必要であろう。

ス　生体試料の分析方法のバリデーション

BE 試験の生体試料の分析方法は、適切にバリデートされた方法でなければならない。生体試料の分析方法のバリデーションとその結果に関して、以下の点を試験報告書に要約すべきである（あるいは規制当局に適切であるとみなされる別な方法でも差し支えない。）。

- 濃度範囲と直線性
- マトリックスの影響
- 定量限界（LOQ）
- 特異性（選択性）
- 真度
- 精度
- 分析対象物質と内標準物質の安定性

実薬投与の試料を含んだ分析ランで得られる品質管理（QC）試料における以下のデータも記載すべきである。

- 精度
- 真度

再現性評価（以下「ISR」という。）が、生体資料の一部を独立した分析ランにより反復測定するものである場合は、分析方法のバリデーションの

要素としての実試料の再測定による ISR の必要性を規制当局に連絡すべきである。

（３）統計学的解析

BE の統計学的評価は、90 %信頼区間（すなわち、両側信頼区間法）を用いて、最もよく実施される。処置のパラメータの平均の比の両側信頼区間は、次のように特徴づけられる：“試験者が、多数の独立した無作為の試料から、繰り返してこの区間を計算すると、その区間の 90 %に真の母比率が正しく含まれる”。

対象とする各パラメータ、一般に AUC と C_{max} に、信頼区間法を適用すべきである（（２）のコを参照）。申請者は、統計解析の前に、パラメータの自然対数変換（以下「Ln 変換」という。）をすべきである。

ア　統計モデル

分散分析（ANOVA）に使用する正確なモデルには、応答変数に影響を与えると合理的に想定され得る変動の原因を考慮すべきである。

２期、２群、２処置のクロスオーバー試験では、モデルの項には通常、群（sequence）、群内の動物（animal within sequence）、時期（period）と処置（treatment）が含まれる（しかし、これらに限定されない。）。時期と処置の効果の検定には、変量効果よりも固定効果が使用されるべきである。並行群間比較試験を用いるときには、処置は一般的に、一元配置分散分析を使って比較される（つまり、処置が統計モデルによって検定される唯一の効果である。）。したがって、残差誤差（変量効果）が、試験製剤と標準製剤を統計学的に比較するために適切な誤差である。

試験設計次第で、他の統計モデルが適切な場合もあるかもしれない。

統計モデルと無作為化の過程は、事前に試験プロトコールに規定しておくべきである。

イ　Ln 変換

Ln 変換は、一般に、ANOVA の前提をより満たすことができるので、BE 評価に使用すべきである。この理由は、以下のとおりである。

- PK モデルが、加法性よりも乗法性である。
- Ln 変換によって分散が安定する。
- BE の比較は、一般に、差よりも比で表される。

他の種類のデータ変換では、解釈が困難になるであろう。

ウ　用量の正規化

用量の正規化は、「（２）のイ 用量の選択」の項で述べた場合以外は、適切でない。並行群間試験の場合で、薬剤が mg/kg ベースではなく mg ベースで投与されるまれな例では、体重の個体間の差は残差誤差の大きさをある程度増大させ得るので、検出力を維持するために供試動物数の大幅な増加が必要となる可能性がある。このような場合、用量の正規化を受容できるかどうかと関連するデータ分析の方法について、プロトコール作成の間に規制当局と話し合うべきである。

エ　信頼区間の許容基準

国際的に受け入れられる条件は、

・　AUC と C_{max} の信頼区間の許容基準が、0.80 から 1.25 であり、そして

・　徐放性製剤について複数回投与試験を実施し、薬物の蓄積がある場合には、この基準は Ctrough 値にも適用されるであろう。

申請者が、参照製剤のばらつきに基づいて許容基準に調整を加えるような他の試験設計を使用しようとする場合は、その地域の規制当局に適切な統計方法と試験設計について相談できるかもしれない。

オ　統計報告書

最低でも、試験報告書には、(各血中濃度プロファイルに関係する時期と処置を示している) 各試験期の各供試動物の濃度対時間データ、群への供試動物の配置、各パラメータの推定値、パラメータの推定に用いた方法、統計に関する要約及び統計解析の出力データ (例えば ANOVA) を記載すべきである。これらの記載によって、必要な場合には、規制当局が PK と統計の解析を実施することが可能になるであろう。

（4）用語集

・　許容基準 (acceptance criteria、同義語：confidence bounds)

製剤の BE を決定するために使用される 90 %信頼区間の上側と下側の限界 (境界)。

・　有効成分 (active pharmaceutical ingredient (API)、同義語：active substance)

薬理作用若しくは疾病の診断、治療、軽減、処置若しくは予防に直接的な効果又は体の生理機能の回復、矯正若しくは改善に直接的な効果を持つように意図して最終製剤に使用される物質。

注　例えば、異なる塩やエステルを考えた場合、どのようなものが「同じ API である」と考えるかの解釈には国際的な差があるため、その定義に関しては同意されていない。申請者は、各地域の規制当局に何が「同じ API」と考えられるかの解釈について相談すべきである。

・　血中薬物濃度－時間曲線下面積 (area under the curve (AUC))

薬物の血漿中濃度対時間曲線下面積のことであり、薬物の暴露量の目安となる。これには、異なる数種類の AUC の推定値が含まれる。

・　$AUC_{0\text{-}LAST}$：定量可能な薬物濃度を示す最後の採血時点までの AUC。定量可能な薬物濃度 (定量限界、LOQ) は、分析法の感度によって決まる。定量可能な血中薬物濃度の最終時点は、最終採血時点より前になる場合もある。

・　$AUC_{0\text{-}\infty}$：$AUC_{0\text{-}LAST}$ に、定量可能な血中薬物濃度を示す最終時点から時間を無限大まで外挿して求めた面積を加えたもの。最終定量可能時点から無限大時点までの終末の面積は C_{last}/λ_e として求められる。ここで、C_{last} は定量可能な血中薬物濃度を示す最終時点での濃度、λ_e は Ln 濃度－時間プロファイルの終末相の直線の傾きである。

・　AUC_{tau}（AUC_{τ}）：定常状態の１投与間隔の間の AUC。計算上は線形（非飽和）の PK ならば、初回投与時の $AUC_{0-\infty}$ と等しい。

・　含量（assay content）
検体中の分析対象物質の量。

・　バイオアベイラビリティ（bioavailability）
API 又はその活性代謝物が全身循環に入る速度と量。

・　生物学的同等性（bioequivalence（BE））
適切に設計された試験設計において、同様の条件下で同じモル用量で API を投与したとき、作用部位での API 又はその代謝物のバイオアベイラビリティについて、（予め定めた許容基準内で）差がないこと。

・　バイオマス（biomass）
抽出又は精製していない発酵の粗生成物のこと。この発酵の結果得られる混合物は、API と培養液を含んでおり、乾燥させて薬剤添加飼料や飼料添加物として用いる。

・　バイオウェイバー（biowaiver）
試験製剤と参照製剤間で *in vivo* 試験による BE を示す要件が免除されること。

・　血液（blood）
本ガイドラインでは、血液、血漿及び血清の用語は、互換性をもって記載している。

・　組成（composition）
製剤に含まれる成分とその絶対的な量。

・　最高血中濃度（C_{max}）
血中の API 又はその代謝物の最高（又はピークの）濃度。

・　最低血中濃度（C_{min}）
定常状態における API 又はその代謝物の最低濃度。投与間で測定できるほどのラグ時間がなければ、C_{min} は C_{trough} に等しい。

・　トラフ濃度（C_{trough}）
定常状態における次の投与の直前の血中の API 又はその代謝物の濃度

・　剤形（dosage form、同義語：pharmaceutical form）
錠剤、カプセル、ペースト剤、液剤、懸濁剤等の医薬品の投与の物理的形態。
注　「同じ剤形」という解釈には国際的な差があるため、ある管轄地域では「同じ剤形」と考えられるものが、他の地域では異なる剤形と考えられるかもしれない。申請者は、各地域の規制当局に何が「同じ剤形」と考えられるのかその解釈について相談すべきである。

・　製剤（drug product、同義語：medicinal product）
通常、１種類以上の添加物とともに API を含んでいる最終剤形のもの。

・　消失速度定数（elimination rate constant（k_e））
体内からの薬物の消失を表す一次速度定数。一次反応速度過程で消失す

る薬物の量はその濃度に比例して変化するが、消失する薬物の分画は一定である。したがって、消失速度定数は、単位時間に体内から除去される薬物の分画のことである。

・　エナンチオマー（enantiomer）

　１対のキラル（chiral）異性体（立体異性体）で、お互いに重ね合わせることのできない鏡像体である。薬物動態学におけるエナンチオマーの特異性は、薬物の吸収、分布、代謝及び排泄の一つ又はそれ以上の過程におけるエナンチオマーの選択性から生じる。

・　添加物（excipient、同義語：inactive ingredient）

　製造工程において添加され、安全性が適切に評価された治療効果の内 API 以外の物質である。また、安定性、バイオアベイラビリティ又は対象動物の摂取を容易にすることを維持し、補助し、又は、向上させることを目的としている。また、製剤の識別を補助し、又は、保管若しくは使用中の製剤における製剤全体の安全施及び有効性に関する特性を高めることを目的としている。

・　徐放性製剤（extended release formulation）

　即放性剤形で認められる API の放出速度と比較して、放出速度を意識的に長くなるように変更している剤形のもの。この用語は、「prolonged release dosage form」や「sustained release dosage form」と同義語である。

・　最終剤形（finished dosage form）

　動物への調剤又は投与を目的とし、包装と表示以外の製造や加工の工程をそれ以上必要としない API の剤形のこと。

・　非臨床試験の実施に関する基準（Good Laboratory Practices（GLP））

　非臨床の実験室内試験及び野外試験の実施に関する基準。各国の規制当局によりその地域の基準／規則が定められている。

・　最高表示用量（highest labeled dose）

　標準製剤のラベルに表示されている承認された最高用量（通常、体重当たりの含量として定められる。例えば、mg/kg として表される。）のこと。承認された用量に幅がある場合には、最高表示用量はその範囲での最高用量である。

・　線形薬物動態（linear pharmacokinetics）

　投与量の増加に比例して血中の API 又はその代謝物の濃度が高くなり、消失速度がその血中濃度に比例する場合、その薬物は線形薬物動態を示していると言う。このような薬物のクリアランスと分布容積は用量に依存しない。

・　放出制御製剤（modified release formulation）

　API の放出の速度及び／又は放出場所が、同一経路で投薬する即放性製剤とは異なる製剤。この意図的な制御は、特殊な処方設計及び／又は製造方法によってなされる。

・　飼料添加剤（medicated premix）
　市販するための承認を得ており、動物の飼料に混合して経口投与する動物用医薬品。飼料添加剤は、しばしば API、担体（carrier）と賦形剤で構成される。
・　非線形薬物動態（nonlinear pharmacokinetics）
　線形薬物動態とは反対に、血中の API 又は代謝物の濃度が投与量の増加に比例して増加しない。このような薬物のクリアランスと分布容積は用量依存性に変化する。非線形性は、吸収、分布及び／又は消失過程に関連しているかもしれない。
・　薬物動態（pharmacokinetics（PK））
　API 及び／又はその代謝物の吸収、分布、代謝及び排泄に関する研究。
・　標準製剤（reference product）
　試験製剤の *in vivo* 試験での BE、場合によっては *in vitro* 試験での同等性の比較対象となる製剤。
・　繰り返し試験設計（replicate study design）
　処置の少なくとも一つを繰り返して行う試験。
・　相対的バイオアベイラビリティ（relative bioavailability）
　同じ薬物を含有するが、血管外の経路で投与される他の製剤と比較した場合の製剤のバイオアベイラビリティ。
・　定常状態（steady state（ss））
　API のインプットの速度とアウトプット（消失）の速度が動的平衡にある状態のこと。
・　立体異性体（stereoisomer）
　原子の空間的な配置のみが異なる物質。
・　含量（strength）
　ある特定の測定単位で表される製剤中の API の量（例えば、10mg/mL、25mg/錠）。
・　試験製剤（test product）
　標準製剤との BE の比較に用いる製剤。
・　ラグ時間（T_{lag}）
　薬物の投与から全身循環に API が出現するまでの時間。
・　最高血中濃度到達時間（T_{max}）
　投与後から C_{max} に達するまでの時間。
・　経皮投与剤（transdermal product）
　皮膚を通して API を吸収して全身循環に到達させる目的で無傷の皮膚に適用するように設計している剤形。

（５）付録

　乗法モデルで変数が一つの場合、$\alpha = 0.05$ において検出力 80%を達成するために必要な標本数の例は、以下の表１に示している。BE の評価は２つの片側検定に基づいているので、標本数の計算は片側 $\alpha = 0.05$、言い換えれば 90%

信頼区間（２α＝0.10）に基づくこととなる。表に示している供試動物数（N）は、与えられた試験製剤／標準製剤の比に関して、２期クロスオーバー試験設計で求められる供試動物の総数である（Nは 2n であり、ｎは１群当たりの供試動物数である）。

表１：信頼限界（許容基準）が 0.80 ～ 1.25 の場合に、与えられた試験製剤と標準製剤の処置平均の比と供試動物の個体内変動に基づく標本数の推定値の例

	試験製剤と標準製剤の比							
% CV	0.85	0.9	0.95	1	1.05	1.1	1.15	1.2
12.5	56	16	10	8	10	14	30	118
15	78	22	12	10	12	20	42	170
17.5	106	30	16	14	16	26	58	230
20	138	38	20	16	18	32	74	300
22.5	172	48	24	20	24	40	92	378
25	212	58	28	24	28	50	114	466
27.5	256	70	34	28	34	60	138	>500
30	306	82	40	34	40	70	162	>500
35	414	112	54	44	52	96	220	>500
40	>500	146	70	58	68	124	288	>500
50	>500	226	108	88	104	192	446	>500

% CV は残差を反映し、統計モデルによらない変動の原因を含む。クロスオーバー試験の利点は、残差が供試動物の個体内変動の原因のみを含むことである。通常、並行群間試験ではより大きな残差を示すが、その理由は比較が個体内ではなく個体間で行われるからである。このように、残差は個体内及び個体間の誤差の原因を含む。

クロスオーバー試験を考慮する場合、例えば乗法モデルを用いると（供試動

物の個体内の％ CV が 20、試験製剤と標準製剤の比が 0.95)、式の結果として供試動物の総数が 20（第 1 群 10、第 2 群 10）の推定値を得ることとなる。しかし、この式を並行群間試験に適用すると、Ｎは処置あたりの供試動物数となる。すなわち、２×Ｎ＝総供試動物数＝Ｎ（試験群）＋Ｎ（参照群）である。

標本数の推定

Ln-変換したデータ（Hauschke ら（1992 年）の報告に基づく）

クロスオーバー試験において、名義的水準αで検出力１－βを達成するために必要な供試動物数をＮとし、Ｎ＝ 2n である。このとき、ｎは１群当たりに求められる供試動物数である。乗法モデルでは、供試動物の数を以下の方法により推測することができる：

$\theta = 1$ の場合： $n > [t(\alpha, 2n-2) + t(\beta/2, 2n-2)]^2 [CV/\ln 1.25]^2$

$1 < \theta < 1.25$ の場合： $n > [t(\alpha, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 [CV/(\ln 1.25 - \ln \theta)]^2$

$0.8 < \theta < 1$ の場合： $n > [t(\alpha, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 [CV/(\ln 0.8 - \ln \theta)]^2$

ここで、

n：１群当たりの供試動物数

$t(\alpha, 2n-2)$：推定した信頼区間に関連した t 値

α：第１種の過誤。片側検定では 0.05、両側検定では 0.10 である。例えば、両側検定（片側当たり $\alpha = 0.05$）で自由度 10 の場合、Ｔ分布表で該当する値は 1.812 になる。

2n － 2：信頼区間を推定するために用いる誤差の自由度

β：第 2 種の過誤（通常、0.20)。例えば、自由度 10 の場合、Ｔ分布表で該当する値は 0.879 になる。同様に、$\beta/2$（$\theta = 1$ のとき使用される）は 1.372 となる。

μ_T：試験製剤の予想される母平均（対数変換値）

μ_R：標準製剤の予想される母平均（対数変換値）

θ：($\mu_T - \mu_R$) のこと。

CV：変動係数。分散の平方根（つまり、標準誤差）を試験の全ての観測値の平均値で割ることによって得られる。

この同じ式は、クロスオーバー試験設計よりむしろ並行群間比較試験設計を用いた場合に適用できる。しかしながら、この式を並行群間比較試験に適用した場合、n は処置当たりの供試動物数となる。それゆえ、総供試動物数（Ｎ）は試験製剤群の数（ｎ）と標準製剤群の数（ｎ）を加えたものとなる。

注　これは、反復する式である。重要な試験を実施した際にはより大きな差と分散が生じる可能性があるため、処置の平均の比のより大きな変動や、より高い推定値と低い推定値の両方を用いて、標本数の推定を繰り返すことが賢明である。この追加情報に基づいて、利用可能な資源を用いて成功する機会が最も生じるように動物数を選択することができる。

参考文献

Hauschke D, Steinijans VW, Diletti E, and Burke M (1992). Sample size determination for bioequivalence assessment using a multiplicative model. J Pharmacokinet. Biopharm. 20: 557-561.

11 －２－２　生物学的同等性：血中濃度を用いた生物学的同等性試験(VICH　GL52)の統計学的考え方（補足的例示）

（１）標本数の推定の例

シナリオ：供試動物に試験製剤と標準製剤を単回投与する２期、２処置、２群のクロスオーバー試験設計で試験を実施する。このため、動物を識別番号（ID）によって分類し、完全に無作為に群１又は群２へ割り当てる。試験設計は、以下のとおりである。

群１：時期１では試験製剤、時期２では標準製剤

群２：時期１では標準製剤、時期２では試験製剤

試験に必要な被験動物の数を推定するために、クロスオーバー試験の予備試験を実施した。予想される試験製剤と標準製剤の平均の比は 1.05 である。また、予想される供試動物の個体内誤差の変動係数に対する割合（以下「％ CV」という。）が 15%である。供試動物数を推定するために使用する反復式は、以下のとおりである。

$\theta = 1$ の場合、$n > [t(\alpha, 2n-2) + t(\beta/2, 2n-2)]^2 [CV/\ln 1.25]^2$

$1 < \theta < 1.25$ の場合、$n > [t(\alpha, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 [CV/(\ln 1.25 - \ln \theta)]^2$

$0.8 < \theta < 1$ の場合、$n > [t(\alpha, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 [CV/(\ln 0.8 - \ln \theta)]^2$

ここで、$1-\beta$ は試験の検出力（80%）、α は 90%信頼区間の片側の第一種の誤差（0.05）、ｎは１群当たりの供試動物数（総被験動物数はＮとし、Ｎ＝２ｎ）、θ は予想される試験製剤と標準製剤の平均の比である。

この式と予備試験の結果に基づくと、標本数の推定の手順は、以下のとおりであった。

もし、ｎ＝５（Ｎ＝ 10）として標本数の推定を始めれば、式は次のようになる。

$5 > [1.860+0.889]^2 * [0.15/(\text{Ln } 1.25 - \text{Ln } 1.05)]^2 = 5.59$

これは、適正な記述ではないので、次の大きな数であるｎ＝６（Ｎ＝ 12）で再度試行する必要がある。この場合、計算は以下のとおりになる。

$6 > [1.812+0.879]^2 * [0.15/(\text{Ln } 1.25 - \text{Ln } 1.05)]^2 = 5.40$

ｎ＝６とすれば、暫定的な記述は正しくなる。したがって、標本数の推定値（１群当たりの供試動物数）は６となり、本試験に含める総供試動物数は 12 未満にすべきでない。

Ｎ＝ 12 とした生物学的同等性試験の模擬試験の成績は、（２）のとおりであ

る。

（２）生物学的同等性試験の成績の統計学的解析の例

シナリオ：供試動物に試験製剤と標準製剤を単回投与する２期、２処置、２群のクロスオーバー試験設計で試験を実施する。このため、動物を識別番号（ID）によって分類し、完全に無作為に群１又は群２へ割り当てる。試験設計は、以下のとおりである。

群１：時期１では試験製剤、時期２では標準製剤

群２：時期１では標準製剤、時期２では試験製剤

Ｎ＝ 12 とした模擬試験の成績は、次のとおりであった。（表１）

表１：生物学的同等性模擬試験のデータセット

動物	群	時期	処置	数値
1	1	2	標準製剤	86.76
2	1	2	標準製剤	72.23
3	1	2	標準製剤	102.10
4	1	2	標準製剤	138.42
5	1	2	標準製剤	120.67
6	1	2	標準製剤	81.83
7	2	1	標準製剤	84.91
8	2	1	標準製剤	92.84
9	2	1	標準製剤	114.42
10	2	1	標準製剤	119.48
11	2	1	標準製剤	95.32
12	2	1	標準製剤	105.77
1	1	1	試験製剤	93.38

2	1	1	試験製剤	78.81
3	1	1	試験製剤	108.81
4	1	1	試験製剤	154.68
5	1	1	試験製剤	131.96
6	1	1	試験製剤	71.30
7	2	2	試験製剤	75.80
8	2	2	試験製剤	96.98
9	2	2	試験製剤	129.46
10	2	2	試験製剤	131.24
11	2	2	試験製剤	91.27
12	2	2	試験製剤	90.47

解析前に、全てのデータを自然対数変換した。解析に用いた統計モデルは、固定効果として群、時期、処置を、変量効果として群にネストされた個体を含んでいた。使用可能なたくさんの統計プログラムとプログラムの仕様がある。全ての正しくプログラムされた解析データは、以下の結果になるだろう（表２及び表３）。

表２：固定効果の検定

効果	分子の自由度	分母の自由度	F値	F値を超える確率
群	1	10	<0.01	0.9527
時期	1	10	0.89	0.3667
処置	1	10	0.43	0.5274

表３：差と信頼区間

差	標準誤差	90 %信頼区間の下段	90 %信頼区間の上段
0.1958	0.02991	-0.0346	0.0738

この出力した統計的情報を用いて、信頼限界を計算した。

BE の下側の信頼限界：Exp(-0.0346) = 0.97

BE の上側の信頼限界：Exp(0.0738) = 1.08

もし、信頼限界の上限と下限の両方が 0.80 から 1.25 の間にあれば、その値を根拠として生物学的同等性があると言える。

（３）逐次解析の例

逐次解析を使用すると、データセットの中間解析ができるように有意水準αを変更することによって試験で認められた分散に基づいて標本数を再計算する機会が生じる。しかしながら、第１種の過誤を犯す確率の増大を避けるために、逐次解析は処置の平均の比に関する誤った仮定に基づいて標本数を調節できないことに注意することが重要である。

生物学的同等性試験に使用できる逐次解析の試験設計は数種類ある。以下に示しているものは、どのようにこの解析を実施するかを示した一つの例である。この例の記載にあたり用いた主要な参照文献は、Potvin et al., *Pharm Stat,* 7:245-262 である。このグループによる続報（Montague et al., 2012, *Pharm Stat,* 11:8-13）も考慮しても良い。

方法Ｂ

検出力に拘わらず、α=0.0294 として生物学的同等性について試験する。ステージ１では、試験全体に必要な標本数を再計算する。ステージ１及び２の両ステージにおいて、信頼区間を推定できる。逐次解析の方法Ｂ（Potvin et al., 2008 に基づく）のステップを示した概略図を図１に示す。

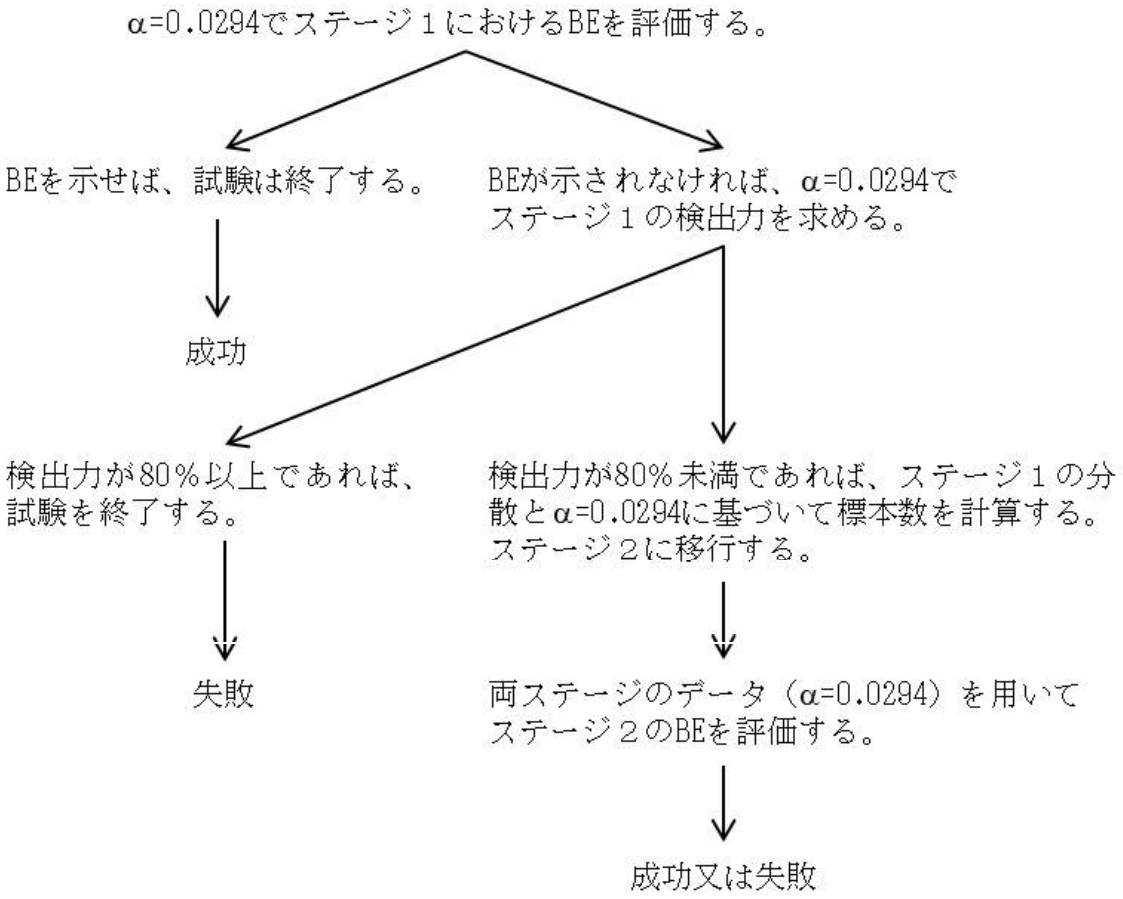


図１　逐次解析の方法Ｂに関連するステップの概略図

達成する検出力に拘わらず、α=0.0294 を用いて、ステージ１で BE を評価する。もし、BE の基準が満たされる、又は試験の検出力が 80%以上の場合には、供試動物を追加して試験する必要はない。逆に、もし BE 基準が満たされなければ、検出力が 80%となるのに必要な標本数を、ステージ１での情報に基づいて計算する。ステージ２では、ステージ１と２で得られたデータを使って、α=0.0294 で信頼区間を再計算する。

生物学同等性の評価は、結果に拘わらず、ステージ２で終了する。

シナリオ：この例のために、以下のステージ１の仮定を用いる。

・　残余誤差が 20 % CV、試験製剤の平均／標準製剤の比が 0.90 と推定する。

・　供試動物数が 20（１群当たり 10）でステージ１を実施する。

ステージ１で BE の許容基準の 0.80 ～ 1.25 を満たさなかった。逐次解析（方法Ｂ）の使用を事前に計画していたことによって、元々の供試動物 20 のデータとステージ１で追加した供試動物から得られたデータを合わせることができる。したがって、最初の疑問は、この状況において製品の BE を示すために総

計何頭の被験動物が必要であり、ステージ２で試験に追加する供試動物数は何頭であるか、ということである。

この疑問に答えるために、標本数の計算式にこれらの観測した数値を代入する必要がある。

標本数の計算式

もし $0.8 < \theta < 1$ ならば、$n > [t(\alpha, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 [CV/(\ln 0.8 - \ln \theta)]^2$

最初の推定値は、Ｎ＝ 40（１群当たり 20）である。この場合、ステージ１で計算した CV を用いると計算は以下のようになる（α=0.0294 であることに留意する)。

$t(\alpha, 2n-2) = 1.948$,　$t(\beta, 2n-2) = 0.851$,

$[t(\alpha, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 = 7.834$

$[CV/(\ln 0.8 - \ln \theta)]^2 = [0.2/(\ln 0.8 - \ln 0.90)]^2 = 2.883$

$n > [t(\alpha, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 [CV/(\ln 0.8 - \ln \theta)]^2 = 22.587$

今度は、ｎ＝ 23 を使って標本数の計算を繰り返す。対応するｔ値を式に代入すると、再び得られる結果は１群当たりの最低供試動物数ｎは 23 となる（つまり、収束が達成できている)。この結果に基づくと、α=0.0294、残余誤差が 20 % CV で試験製剤と標準製剤の平均の比 0.90 での BE の許容基準を満たすために必要な総供試動物数Ｎは 46 であると結論付けられる。既にステージ１でＮ＝ 20（即ち１群当たり 10）のデータが得られているので、修正した推定に基づけば、ステージ２では追加の供試動物数は１群当たり 13（Ｎ＝ 26）が必要となる。

比較のために、仮に、主要な BE 試験の実施前に予備試験を実施することを代わりに決定していたならば、現在の推定値の θ=0.90、CV=0.20（α=0.0294 ではなく、α=0.05）で必要とされたであろう総供試動物数（Ｎ）は 46 ではなく 38 となっていたであろう。

11－3　動物用医薬品溶出試験法ガイドライン

（1）適用範囲

経口投与剤のうち、有効成分の作用が緩和な製剤（ビタミン剤、消化管用剤等）で、先発医薬品とその処方が同一又はほぼ同一な医薬品とし、毒、劇薬等の安全域の狭い製剤、腸溶剤、徐放化製剤など特殊な製剤設計をした製剤、臨床投与量付近において非線形動態を示す製剤のほか薬物動態上特殊な製剤は除くものとする。

（2）溶出試験

ア　参照製剤及び試験製剤の選定

参照とする先発医薬品の３ロットについて、イに示す溶出試験により試験を行い、ロット間で溶出試験の差が最も大きくなる条件において、中間の溶出性を示したものを選定し、これを参照製剤とする。また、試験製剤は、実生産規模の製剤であることが望ましいが、製法が同じで実生産規模の品質を反映していることが他の試験において確かめられていれば実生産規模以外の製剤を用いてもよい。

イ　試験法

（ア）溶出試験に使用する製剤量等

１条件の溶出試験につき、原則として 30g を上限とする下表１の量を標準的な製剤使用量とし、６ベッセル以上の試験を行う。ただし、難溶性薬物を含有する製剤（界面活性剤を含まない全ての試験液で、参照製剤の平均溶出率が、６時間までに 85 %に達しないものをいう。以下同じ。）については薬物の溶解度の 30 %程度の量を使用製剤量とする。

試験時間は、最高６時間とする。ただし、参照製剤の平均溶出率が 85 %を越えた時点で試験を終了することができる。

表１　１条件の溶出試験に用いる標準的製剤使用量

適用動物種	使用製剤量
馬	体重 40 kg 当たりの臨床常用量
牛	体重　3 kg 当たりの臨床常用量
豚	体重 30 kg 当たりの臨床常用量
犬	体重 10 kg 当たりの臨床常用量
猫	体重 10 kg 当たりの臨床常用量
鶏	体重 20 kg 当たりの臨床常用量

注：数種類の動物について適応する製剤の場合を含め、最大の使用製剤量とする。また、錠剤等の場合は１個を単位とする。

（イ）試験条件

次の条件により試験を行う。

① 装置：パドル法
② 試験液の量：原則として 900 mL
③ 試験液：原則として、次の３種類の pH（規定値の ±0.05）に調整した試験液。なお、対象動物の生理的条件を包含する試験液を選択すること。
a pH 1.2 試験液
b pH 3.0-5.0 のうち最適な pH 試験液
c pH 6.8-8.0 のうち最適な pH 試験液
pH1.2 には日本薬局方（JP14）崩壊試験の第 1 液を、また、pH6.8 には同第２液を用いる。その他の pH の試験液は、0.05mol/L リン酸一水素ナトリウムと 0.025mol/L クエン酸を用いて pH を調整した McI-lvaine の緩衝液などを用いる。
なお、難溶性薬物を含有する製剤など、試験が不可能な場合に限り、試験液にポリソルベ―ト 80 等の界面活性剤を加えることができる。界面活性剤は原則としてポリソルベート 80 とし、これが使えない場合には他の界面活性剤とする。ただし、その場合においても界面活性剤の添加濃度は試験が可能な限り低い濃度とする。
④ 撹拌数：毎分 50 回転（± ４％）
⑤ 試験液の温度：37 ± 0.5 ℃

（３）溶出挙動の同等性の判定

参照製剤と試験製剤との平均溶出率を比較する。全ての溶出試験条件での成績が次のいずれかに適合するときは参照製剤と試験製剤との溶出挙動は同等と判定する。

ア 参照製剤の平均溶出率が規定時間内に 85 %に達する場合

（ア）参照製剤の溶出に明確なラグ時間がない場合

① 参照製剤が 15 分以内に平均 85 %以上溶出する場合には、試験製剤は 15 分以内に平均 85 %以上溶出するか、又は参照製剤の平均溶出率が 85 %付近の時点において、試験製剤の平均溶出率は参照製剤の平均溶出率の± 15 %の範囲にある。
② 参照製剤が 15 分～ 30 分に平均 85 %以上溶出する場合には、参照製剤の平均溶出率が 60 %及び 85 %付近の２時点において、試験製剤の平均溶出率は参照製剤の平均溶出率の± 15 %の範囲にある。

（イ）参照製剤の溶出にラグ時間があり、かつ、参照製剤と試験製剤のラグ時間の差が 10 分以内の場合

① 溶出ラグ時間以降 15 分以内に参照製剤が平均 85 %以上溶出する場合には、試験製剤は溶出ラグ時間以降 15 分以内に平均 85 %以上溶出するか、又は参照製剤の平均溶出率が 85 %付近の時点において、試験製剤の平均溶出率は参照製剤の平均溶出率の± 15 %の範囲にある。
② 溶出ラグ時間以降 15 分～ 30 分に参照製剤が平均 85 %以上溶出する場合には、参照製剤の平均溶出率が 60 %及び 85 %付近の２時点に

おいて、試験製剤の平均溶出率は参照製剤の平均溶出率の± 15 %の範囲にある。

前述のラグ時間は、便宜上薬物が５%溶出するまでの時間で表す。

（ウ）上記以外の場合

参照製剤の平均溶出率が 40 %及び 85 %付近の適当な２時点において、試験製剤の平均溶出率は参照製剤の平均溶出率の± 15 %の範囲にある。

イ　参照製剤の平均溶出率が規定された試験時間以内に 85 %に達しない場合

参照製剤が規定された試験時間における平均溶出率の１/２の平均溶出率を示す適当な時点、及び６時間目において、試験製剤の平均溶出率は参照製剤の平均溶出率の±８%の範囲にある。

（４）成績試験の取りまとめ

成績資料は次の項目に沿って取りまとめる。

ア　参照製剤並びに試験製剤の名称及び製造番号又は製造記号

イ　剤形

ウ　参照製剤の成分及びその分量並びに試験製剤の成分及び分量

エ　有効成分の定量法

オ　溶出試験

（ア）採用した溶出試験の条件及びその妥当性を示す根拠

①　原薬の最大溶解量

②　使用製剤量及び試験液の pH

③　参照製剤及び試験製剤の選定

（イ）成績

①　参照製剤及び試験製剤の成績

②　判定及び考察

カ　参考事項

pKa 及び物理化学的安定性、難溶性薬物にあっては原薬の粒子径あるいは比表面積及びそれらの測定法、結晶多形がある場合は多形の種類とその溶解性など、その他評価を行うに有用となる事項の概要

12　動物用医薬品の臨床評価に関する一般指針

（１）目的

この指針は、動物用医薬品の製造販売承認申請等の目的で実施される臨床試験について、標準的な実施方法を示し、当該医薬品の有効性及び安全性の適正な評価に資することを目的とする。

なお、本来、全ての動物用医薬品について一律の試験方法を定めることは科学的妥当性がなく、また、個々の試験の進展に応じて新たな試験を追加する必要が生じることもあり得る。したがって、動物用医薬品としての有効性及び安全性を評価するための十分な試験成績が得られるならば、本指針以外の方法によることもできるものとするが、その場合は、十分な科学的根拠を持って、その試験の妥当性を主張することが必要である。

（２）試験の進め方

ア　動物用医薬品の臨床試験の実施に関する基準の遵守

動物用医薬品の承認申請資料等の収集のための臨床試験の実施に当たっては、動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成９年農林水産省令第７５号。以下「GCP 省令」という。）を遵守すること。

イ　非臨床試験の実施

臨床試験の実施に当たっては、あらかじめ毒性試験、安全性試験、用量反応試験、残留試験等の非臨床試験を実施し、その結果から、薬効、毒性及び副作用の可能性などを十分に評価した上で、動物用医薬品としての有用性が期待できると判断された薬物のみを試験対象とすること。

ただし、臨床試験において最終の用量確認を行う場合には、用量反応試験は、あらかじめ基礎的な試験を行うことで差し支えないものとする。

ウ　治験実施計画書の作成

臨床試験の実施に当たっては、あらかじめ作成された治験実施計画書に沿って、適切に実施されることが必要である。したがって、治験実施計画書の作成に当たっては、それまでに集積された情報について十分な評価検討を行い、必要な項目について規定しておくこと。

なお、この際必要に応じ統計学的手法を用いることにより試験の客観的評価を確保すること。

エ　臨床試験の実施

臨床試験の実施に当たっては、試験群の適切な無作為化、記録の徹底等による客観性の確保を図り、科学的かつ倫理的な正当性を主張できるものであることを原則とし、定められた事項は治験実施計画書に明示しておくこと。

（ア）対象動物

臨床試験に用いる対象動物は､検体の適用を予定している動物であって、飼料及び医薬品の使用歴並びに検体の使用開始前における飼養方法等が明らかで、かつ、検体の有効性及び安全性を評価する上で適切なものを用いること。ただし、海外で実施された臨床試験の対象動物は、検体の適用が予定されている国内の現境にできるだけ類似した飼養条件下で飼育された

ものであること。

（イ）症例数

検体の有効性を評価する上で適切な統計処理が可能となる例数とすること（他に規定がない場合は、原則として、表１によるものとするが、臨床評価における妥当性が十分示される場合にはこの限りでない。）。

（ウ）試験群（対照群を含む）の選定

試験群の選定に当たっては、あらかじめ選定基準を設定し、その基準に従って選定し、試験実施計画書に規定された方法で無作為化すること。対照群としては、薬効領域に応じ陽性対照群及び陰性対照群又はそのいずれか一方をおくこと。ただし、投与群の試験結果のみで医薬品の有効性及び安全性が判断できる場合は、対照群を省略してもよい。

なお、陽性対照群に用いる薬剤は、原則として日本において承認された薬剤（又はこれと同等な薬剤）とする。

（エ）検体

検体は、原則として最終製品とし、適切を名称（記号等）を表示し、その取扱い、保管方法等を明示すること。

（オ）試験実施方法

①　投与方法

臨床適用する検体の投与方法（経路、投与回数等）を設定すること。

②　投与量

非臨床試験等の成績から、妥当な投与量の推定を行い、臨床適用する検体の量を設定すること。

③　投与期間

投与期間は、検体の臨床適用を予定している期間とする。投与期間に幅のある場合には、最短及び最長投与期間における有効性及び安全性が評価できる試験設計とすること。

また、投与期間を設定しない動物用医薬品については、当該医薬品の有効性及び安全性を客観的に評価するために十分な期間の試験計画の作成を行うこと。

④　併用療法

効果の判定に影響を及ぼす併用療法は行わないこととするが、やむを得ず、併用療法を行うことが想定される場合には、その試験結果に及ぼす影響を考慮し、試験動物の除外、試験の中止基準等に反映させること。

（カ）観察、測定又は評価項目とその方法及び期間

検体の有効性を主張するために必要な項目は、その評価方法について観察者の主観をできる限り排除し、より客観的な方法により評価されるよう具体的に設定しておくこと。

また、検体の安全性を適切に評価するための項目として、必要な臨床観察方法あるいは臨床検査方法をあらかじめ具体的に設定しておくこと。

更に、検体の有効性及び安全性を評価するために十分な観察期間を設定すること。

（キ）臨床効果の評価方法、その基準及びその記録方法

あらかじめ評価方法の妥当性について検討し、統一した判定基準を設定すること。また、評価に際しての記録方法を定めておくこと。

（ク）除外、脱落、中止等の基準

試験対象からの除外、試験中の脱落及び試験の中止等に関する基準をあらかじめ設定しておくとともに、基準に変更があった場合には、その理由を明記すること。

（ケ）評価に用いる統計解析方法

あらかじめ試験成績の統計解析方法の統計学的妥当性について検討し、当該検体に関する有効性等が適切に判断される方法を選択すること。

（コ）試験終了後の動物の取扱い

試験終了後の対象動物については、その処分方法についてあらかじめ決定しておくとともに、その記録を保存すること。

特に食用に供される場合には、休薬期間の遵守等が図られるよう配慮すること。

（サ）休薬期間

検体が食用に供される動物に投与される場合には、残留試験成績に基づき、十分な休薬期間を設定し、安全性を確保すること。また、設定した休薬期間については関係者への周知徹底を図ること。

（シ）試験施設の条件

試験は、検体の有効性等を評価するために十分な設備を有する２箇所以上の施設で行うこと。この場合、生物学的製剤及びフルオロキノロン系等製剤（フルオロキノロン系合成抗菌剤及び第３世代以降のセファロスポリン系の抗生物質を有効成分とする製剤、並びに人の医療上極めて重要視される抗菌性物質を有効成分とする製剤であってそれらと同様の取扱いが必要と判断されるものをいう。以下同じ。）に係る臨床試験にあっては、少なくとも１箇所以上は国内の施設であること。また、臨床試験を外国の施設で実施した場合であって、測定項目又は作用原理が全く新しいものであるとき、被検微生物の血清型が多様であるため当該試験成績を直ちに国内の対象動物に適用することが困難なとき又は通常の飼養条件下から著しくかけ離れた条件下で試験が行われたとき等にあっては、国内の施設（動物用体外診断薬を除く動物用医薬品に係る臨床試験にあっては国内の施設又は国内の試験条件に類似した試験施設）における臨床試験成績を補完データとして要求することがある。

表１　臨床試験の症例数

動　　物　　種	症　　例　　数
牛 馬 めん羊、山羊 豚 犬 猫　等	当該動物に対する効能につき 60 頭以上
家きんその他の動物	当該動物に対する効能につき 200 羽（頭）以上
乳房炎の治療を目的とする注入剤等の場合	40 頭 60 分房以上
養殖水産動物	養殖経営体における最小単位 （飼育面積 10 m^2程度の最も小さなサイズの養殖池いけす等で差し支えない。）

12 － 1　動物用抗菌性物質製剤の臨床試験における有効性評価指針

（1）目的

この指針は、動物用抗菌性物質製剤の製造販売承認申請等の目的で実施される臨床試験における有効性の評価方法を示し、対象疾病に対する当該製剤の有効性を適正に評価することを目的とする。

なお、本来、全ての動物用抗菌性物質製剤の臨床試験について、有効性の判定を一定の基準で行うことは合理的でなく、また、個々の試験の進展に応じて新たな試験を追加する必要が生じることもあり得る。したがって、有効性の評価方法は、本指針に定められたものに限らない。

（2）試験群（対照群を含む。）の選定

臨床試験の実施に当たっては、原則として、被験薬投与群の他に対照群として無投与対照群及び対照薬投与群又はそのいずれか一方を設定する。供試する対照薬は、日本において承認された薬剤（又はこれと同等な薬剤）であって、効能及び効果が被験薬と類似のものとする。

なお、上記以外の試験群の設定を行う場合は、その科学的妥当性を明確に示すこととする。

（3）臨床徴候の評価法

当該製剤の対象疾病に対する臨床上の有効性を評価するために必要かつ妥当な臨床徴候については、観察者の主観をできる限り排除し、より客観的な方法により評価されるよう、各臨床徴候ごとに具体的な評価基準を設定し、その評価基準に従って臨床徴候をスコア化する。その際、スコアの配点は正常状態を０、異常の程度により加算していくこととし、その配点の根拠を明確に示すこととする。また、死亡例のスコアの配点は、設定された各項目の最高スコアの合計点とする。

（4）各検体における有効性の判定

各検体における臨床上の有効性については、次の式により各検体のスコアから臨床スコア改善率を求め、臨床スコア改善率が 85 %以上となった場合を「著効」、85 %未満 70 %以上となった場合を「有効」、70 %未満となった場合を「無効」と判定することとする。

$$\text{臨床スコア改善率}=\frac{\text{投薬前スコア合計点}\quad-\quad\text{投薬後スコア合計点}}{\text{投薬前スコア合計点}}\times 100$$

（5）被験薬の有効性の判定

被験薬の有効性については、次の式により被験薬投与群の有効率を求め、アからエまでに従って判定する。

$$\text{被験薬投与群の有効率}=\frac{\text{著効例数}+\text{有効例数}}{\text{判定可能な例数}}\times 100$$

ア　無投与対照群及び対照薬投与群が設定されている場合

被験薬投与群の有効率が 70 %以上かつ対照薬投与群に比べ同等以上であって、無投与対照群との間で統計学的手法を用いて検定し、有意差が認められる場合は、有効と判定する。

イ　無投与対照群のみが設定されている場合

被験薬投与群の有効率が 70 %以上であって、かつ無投与対照群との間で統計学的手法を用いて検定し、有意差が認められる場合は、有効と判定する。

ウ　対照薬投与群のみが設定されている場合

被験薬投与群の有効率が 70 %以上であって、かつ被験薬投与群が対照薬投与群に比べ同等以上である場合は、有効と判定する。

エ　その他

上記以外の方法で有効性を評価する場合は、科学的根拠に基づき実証することとする。

（6）その他の有効性評価資料

当該製剤の対象疾病に対する臨床上の有効性を評価するための資料として、臨床試験資料には原則として次のものを添付することとする。

ア　剖検所見成績

効果判定の後に、供試した検体を用いて病変を検索した成績。

イ　菌分離成績

効果判定の後に、供試した検体から起因菌を分離し、その消長を検索した成績

ウ　薬剤感受性試験成績

臨床試験期間中に分離した起因菌について、当該製剤と他の抗菌性物質との薬剤感受性の比較をした成績

エ　転帰に関する成績

判定後の状態により、再発の有無を観察した成績

オ　その他

必要に応じて、経済効果、治癒の早さ等の検討を行った成績

12 －２　第一次選択薬による治療が無効であった動物に対するフルオロキノロン系等製剤の臨床試験ガイドライン

（１）目的

動物用抗菌性物質製剤のうちフルオロキノロン系等製剤の製造販売承認申請書に添付する臨床試験の試験成績に関する資料については、通常の臨床試験の資料に加え、第一次選択薬による治療が無効であった動物を用いて実施された資料が必要である。

本ガイドラインは、フルオロキノロン系等製剤の製造販売承認申請等の目的で実施される臨床試験のうち、第一次選択薬による治療が無効であった動物に対するフルオロキノロン系等製剤の有効性及び安全性等を適正に評価することを目的とする。

なお、第一次選択薬による治療が無効であった動物に対するフルオロキノロン系等製剤の有効性及び安全性を評価するために十分な臨床試験成績が得られるならば、本ガイドライン以外の方法によることができる。ただし、その場合、その試験方法等の科学的妥当性を明確に示すこと。

（２）定義

本ガイドラインにおいて使用される用語の定義は、以下のとおりである。

ア　第一次選択薬

フルオロキノロン系等製剤以外の全ての既承認の動物用抗菌性物質製剤とする。

イ　第一次選択薬による治療が無効であった動物

製造販売承認申請を予定する疾病（以下本ガイドラインにおいて「対象疾病」という。）に対する効能又は効果を有する第一次選択薬で治療を実施した結果、以下の①から③までのいずれかに該当すると判断された動物とする。

①　治療により症状の改善が認められなかった動物

②　治療により症状の悪化が認められた動物

③　①及び②には該当しないが、再発が認められた動物

（３）一般的事項

第一次選択薬による治療が無効であった動物に対するフルオロキノロン系等製剤の臨床試験は、本ガイドラインで規定する事項を除き、12 及び 12 －１に基づいて実施すること。

（４）対象動物

対象疾病に罹患した動物であって、第一次選択薬による治療が無効であった動物を選定する。

第一次選択薬による治療が無効であると判断した基準（判断を行う時期を含む。）及びその根拠を明確に示すこと。

また、第一次選択薬の投与終了後、フルオロキノロン系等製剤の投与開始までに適切な間隔を置き、その根拠を示すこと。フルオロキノロン系等製剤の投与開始後は、用法及び用量で規定する場合を除き、他の動物用抗菌性物質製剤の併用は認められない。

なお､対象疾病に対する効能又は効果を有する第一次選択薬がない場合には、動物医薬品検査所に相談されたい。

（５）症例数

原則として、被験薬投与群の症例数は、馬、牛、めん羊、山羊、豚、犬及び猫は 30 頭以上、家きんは 100 羽以上、乳房炎治療の乳房注入剤は 20 頭 30 分房以上とする。なお、対照薬投与群を設定する場合における、対照薬投与群の症例数は、有効性評価において使用することが予定されている統計学的手法が適用できる症例数とする。

試験は、２箇所以上の国内施設で実施する。

（６）試験群（対照群を含む。）の設定

原則として、被験薬投与群に加えて対照薬投与群又は無投与対照群の２群を設定する。対照薬には、対象疾病に対する効能又は効果を有する既承認のフルオロキノロン系等製剤を用いる。なお、対象疾病に対する効能又は効果を有するフルオロキノロン系等製剤がない場合には原則として無投与対照群を設定するが、やむを得ない場合には被験薬投与群のみを設定する。被検薬投与群のみを設定した場合及び上記以外の試験群の設定を行う場合は、その科学的妥当性を明確に示すこと。

原則として、対象動物は、被験薬投与群、対照薬投与群又は無投与対照群に無作為に割り付けること。効能又は効果の判定に影響を与えるおそれがある要因（施設、年齢、臨床徴候（重症度等）、前処置等）についても、試験群間に偏りが生じないように層別に無作為化すること。想定される複数の要因を全て層別に無作為化することが困難な場合には､重要な要因について事前に検討し、それに基づいて層別に無作為化することが望ましい。

臨床試験は盲検試験とすることが望ましい。

（７）有効性の評価方法

臨床徴候の評価法及び各検体における有効性の判定は、12 －１の（３）及び（４）に準じて行う。被験薬の有効性の判定については、次の式により被験薬投与群の有効率を求め、アからウまでに従って判定する。これら以外の方法で判定する場合は、対象疾病の重篤度、治療の難易度、対象個体の素因等を踏まえ､フルオロキノロン系等製剤の有用性を科学的根拠に基づき実証すること。

$$\text{被験薬投与群の有効率} = \frac{\text{著効例数＋有効例数}}{\text{判定可能な例数}} \times 100$$

ア　無投与対照群のみが設定されている場合

被験薬投与群の有効率が 50 %以上であって、かつ無投与対照群との間で統計学的手法を用いて検定し､有意差が認められる場合は､有効と判定する。

イ　対照薬投与群のみが設定されている場合

被験薬投与群の有効率が 50 %以上であって、かつ被験薬投与群が対照薬

投与群に比べ同等以上である場合は、有効と判定する。

ウ　被験薬投与群のみが設定されている場合

被験薬投与群の有効率が 50 %以上である場合は、有効と判定する。

（８）無効症例の解析

被験薬による治療が無効であった症例については、その原因について考察を加えること。

（９）安全性の評価方法

被験薬の安全性は、有害事象の内容及びその発現頻度から評価する。有害事象の内容について検討し、被験薬の投与との因果関係、有害事象の重篤度、有害事象の発現頻度等を踏まえて判断すること。

12 －３　マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症不活化ワクチンの臨床評価ガイドライン

（１）緒言

本ガイドラインは、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症不活化ワクチン（適用対象として繁殖母豚を除く。）の臨床試験の計画、実施及び評価手法等について、現時点で妥当と考えられる方法論と一般的な手順を述べたものである。マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症は、*Mycoplasma hyopneumoniae* を原因菌とする常在性の慢性呼吸器病であり、その罹患豚では発育不良を呈して飼料効率が低下し、養豚経営上、生産性阻害を伴う甚大な経済的被害をもたらす重要な疾病である。本病は、病気の発症に生体側の要因を含む多くの因子が関与し、感染・発症防御と特定の免疫との関連が未だ解明されていない「内因性感染症」の範疇に入る疾病であることからも、臨床試験において本病に適用するワクチンの有効性を適正に評価するためには、群単位の飼料効率、増体率等の生産性の改善効果を評価項目として設定することが必須である。

このガイドラインは、本ワクチンの製造販売承認申請等のために添付することが必要となる資料のひとつである臨床試験が効率的かつ的確に実施され、臨床試験の質の向上に資することを目的とするものである。なお、動物用医薬品としての有効性及び安全性を評価するための十分な臨床試験成績が得られるならば、本ガイドライン以外の方法によることも可能であるが、その場合には、十分な科学的根拠をもって、その試験の妥当性を主張することが必要である。

なお、本ガイドラインに基づいた治験を実施するに当たっては、動物用医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成９年農林水産省令第７５号）及び関係ガイドライン（「動物用医薬品の臨床評価に関する一般指針について」）などの規制要件を遵守しなければならない。

（２）被験薬

ア　被験薬は、原則として以下の非臨床試験成績及び資料により、その有用性が十分に期待できるものでなければならない。

（ア）豚に対する安全性試験
（イ）用法及び用量設定の根拠となった試験
（ウ）豚における有効性試験
（エ）規格及び検査方法の設定の根拠となった試験
（オ）製造用株に関する微生物学的安定性試験
（カ）自家試験

イ　被験薬の直接の容器又は直接の被包に、以下の事項を邦文で明瞭に記載しなくてはならない。

（ア）「治験用」の文字
（イ）治験依頼者の氏名及び住所
（ウ）識別記号
（エ）製造番号又は製造記号

（オ）貯蔵方法、有効期間等を定める必要のあるものについては、その内容

（３）治験実施機関等の選定

次の条件を満たす施設（農場）を被験動物飼育施設として選定する。

ア　被験豚飼育施設及びその周辺地域における豚の飼育管理・一般衛生管理状況、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症も含めた各種豚疾病の発生状況等が確認できる施設

イ　１箇所で試験群 30 頭以上とし、２箇所以上での被験薬投与合計症例数が 60 頭以上となる規模の施設

ウ　被験薬の有効性及び安全性について､精密かつ客観的な観察・考察ができ、その投与結果について統計学的な資料が得られる施設

エ　被験豚について、必要とする期間、追跡調査が行える体制が整っている施設

オ　各種ワクチネーションを含む衛生対策を実施し、伝染病の侵入を防止する体制が整っている施設

カ　ワクチネーションプログラム、他の薬剤の使用状況、消毒等の衛生管理に関する情報が得られる施設

（４）被験豚の選定

ア　選定基準

（ア）品種又は系統が明らかな健康な豚

（イ）母豚及び生年月日が明らかな豚（哺乳豚、肥育豚）

（ウ）治験実施前後の被験豚のワクチン歴（ワクチンの種類、株名等を含む。）、他の薬剤の使用歴、飼料の種類と給与歴、飼養方法（豚舎構造、飼養形態、給餌・給水方法）等が明らかな豚

イ　除外基準

（ア）発熱、呼吸器症状、消化器症状等の臨床上、異常が認められる豚

（イ）疾病の治療を継続中又は治癒後、間がない豚

（ウ）明らかな栄養障害又は発育不良が認められる豚

（エ）マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症不活化ワクチンを接種された豚

ウ　試験群

１施設当たり３０頭以上の豚を無作為に抽出して試験群とし、個体識別を行う。

エ　対照群

（ア）試験群と概ね同一の生年月日で統計処理の可能な頭数を無作為に抽出して対照群とし、個体識別を行い試験群と同一の施設に配置する。

（イ）原則として、陰性対照群とする。被験豚飼育施設が *Mycoplasma hyopneumoniae* の重度な浸潤・流行地である等やむを得ない場合には、陽性対照群を設定する。

（ウ）陽性対照群に用いるワクチン（陽性対照ワクチン）は、原則として日本において既に承認され、被験薬と同等の成分を含有するワクチンとする。

（５）被験薬の投与方法、投与量、投与期間、併用薬等

ア　投与方法、投与量及び投与期間

（ア）試験群

被験薬の記載事項、外観及び内容に異常がないことを確認した後、非臨床試験成績に基づき設定された用法及び用量に従って投与する。

（イ）対照群

原則として、陰性対照群を設定することとする。陽性対照ワクチンを用いる場合には、その用法及び用量に従って陽性対照群に投与する。

イ　併用薬

併用薬は、原則として用いない。ただし、必要とする場合は併用薬の名称、用法・用量及び使用の理由を記録する。

（６）観察・検査項目及びその方法

ア　一般臨床観察

（ア）被験薬の投与前及び投与後に、試験群及び対照群の全て又は一部（統計学的処理の可能な頭数）の個体について元気、食欲、呼吸器及び消化器症状等の一般臨床上の異常の有無を観察し、記録する。その観察において、試験期間中に異常が認められた個体は、異常の内容を記録する。

（イ）試験期間中、被験豚に異常が認められた場合には、その原因究明のために症状に対応したサンプリング（血液、鼻汁、糞便等）を行い、病理学的検査、微生物学的検査等を行う。また、被験豚に死亡が認められた場合には、その原因究明のために剖検を実施し、死亡豚の臓器、病理材料等について病理学的検査、微生物学的検査等を行う。

イ　投与局所の観察

投与局所における腫脹、硬結等の接種反応の有無を観察する。接種反応が認められた場合は、消失するまで観察し、記録する。

ウ　体重及び飼料摂取量の測定

（ア）投与前後での経時的な推移が明らかになるよう測定回数・間隔を設定する。測定間隔は原則として、試験期間が４か月以上の場合は、投与開始直後及びその後は４週間隔とし、体重及び飼料摂取量を一般的な出荷月齢である約６か月齢時まで測定する。

（イ）調査対象豚は、原則として試験群及び対照群の全数とする。体重測定は個体ごと、飼料摂取量は群ごとに測定し、増体重及び飼料効率を算出する。

エ　抗体応答

（ア）必要に応じて、試験群及び対照群の一部（統計学的処理の可能な頭数）について *Mycoplasma hyopneumoniae* に対する抗体測定を実施する。検査回数・間隔は経時的な推移が明らかとなるよう設定することとし、原則として、試験期間が４か月以上の場合は投与開始直後及びその後は４週間隔とし、試験群及び対照群の同一個体より採血する。

（イ）抗体価の測定方法については、酵素抗体法（ELISA）や補体結合反応（CF）などの客観的に評価できる方法であり、原則として薬効薬理試験に

おいて被験薬の有効性を評価するために科学的に妥当と判断される手法を用いて抗体価を測定する。

オ　剖検による肺病変スコアリング及び微生物分離

試験群及び対照群の一部（統計学的処理の可能な頭数）について剖検又はと畜場における観察・採材を行い、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症による肺炎病変の程度の確認（肺病変のスコアリング）、病変部からの*M. hyopneumoniae*の分離又はPCR検出等を実施する。また、必要に応じて、病変形成等に関与したと推察されるその他の微生物（*Actinobacillus pleuropneumoniae*、*Pasteurella multocida*、*Salmonella* Choleraesuis、*Haemophilus parasuis*、*Streptococcus suis*等）の分離・検出等を実施する。

カ　その他

被験薬の有効性及び安全性の評価が、上記の項目のみでは困難な場合は、他の科学的に妥当な項目を追加設定し、その観察又は検査方法を具体的に定めた上で実施する。

（７）安全性データの収集

ア　観察・検査項目及びその方法に従って、安全性評価に必要な項目の記録用紙を作成し、試験群及び対照群の全ての被験豚についてデータを収集する。

イ　その他、以下のデータについても収集する。

（ア）観察された副作用及び併発症状等の有害事象の発生時期、症状、頻度、経過及び転帰

（イ）被験薬投与前又は投与と同時並びに観察期間中に投与された動物用医薬品（被験薬以外のもの）の使用状況（名称、使用目的、使用日、使用期間、使用量等）

（８）中止・脱落基準

ア　中止基準

（ア）試験群又は対照群に、被験薬の対象とする疾病以外の家畜伝染病予防法（昭和２６年法律第１６６号）第２条第１項に規定されている伝染病（以下「家畜伝染病」という。）が発生した場合は、直ちに試験を中止し、法に基づく関係機関の処置に従う。

（イ）被験豚飼育施設の所在する農場の他の施設又はその周辺の他の農場で家畜伝染病が発生した場合は、管轄の家畜保健衛生所の指示に従う。

（ウ）試験群及び対照群が治験継続が不適当と判断されるような疾病に罹患した場合は、直ちに試験を中止し、適切な処置を行う。

（エ）試験群のみに臨床上、重度な異常が発生した場合は、試験を中止し、異常豚の鑑定殺も含めて検査材料を採取するとともに、病理学、細菌学又はウイルス学的検査等を実施し、その原因を究明する。

イ　脱落基準

（ア）試験期間中、飼育管理失宜により著しく衰弱した豚又は事故死した豚

（イ）被験薬投与に起因しない臨床上の異常を認め、回復の可能性がない豚

（ウ）同一個体でペア血清の採取ができなかった豚（抗体測定のみ）

（エ）同一個体で規定回数の体重測定ができなかった豚（体重測定のみ）
（オ）被験豚飼育施設の事情により廃用又は転売された豚
（カ）個体識別が不明になった豚

（９）統計解析方法

各試験農場ごとに、試験群における臨床症状発現数、体重測定値（平均一日増体重)、飼料効率（期間中の増体重を期間中の飼料摂取量で除す)、肺病変形成の程度（肺病変スコアリング)、抗体価測定、起因微生物の検出等の検査成績について、対照群との間の有意差検定を行う。また、全体成績の取りまとめについても、統計学的解析手法を用いて行う。その際、用いた有意差検定の方法及び有意差の程度（危険率５％の場合、危険率１％の場合）を明確にする。

なお、ひとつの例示として、農場別及び全体成績における統計学的解析手法を以下に示す。

ア　農場別

増体重については、一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には、Tukey の方法により試験群間の比較を実施する。肺病変面積については、Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意差が認められた場合には、Dunnett の方法により試験群間の比較を実施する。

イ　全体

増体重については、全ての治験実施農場の陰性対照群及び試験群をまとめて一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には、Tukey の方法により試験群間の比較を実施する。肺病変面積についても同様に、全体の群をまとめ、Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意差が認められた場合には、Dunnett の方法により試験群間の比較を実施する。

(10) 評価方法及びその基準

ア　有効性

次の場合、有効性が認められたと判断する。

（ア）臨床観察

各臨床所見項目のスコア基準を表１に示した。試験期間中、毎日観察して当該基準に基づいたスコアを記録し、有効性評価を行うこととする。

表１　臨床評価項目のスコア基準

項目	臨床評価スコア			
	0	1	2	3
呼吸状態	正常	やや速拍	速拍	困難
発咳	なし	散発	頻発	・
活力	正常	減退	消失	・
食欲	正常	やや不振	不振	廃絶
体温	38.0～39.5℃未満	39.5～40.5℃未満	37.0～38.0℃未満又は40.5～41.5℃未満	37.0℃未満又は41.5℃以上

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行（臨床症状、細菌学的検査等により流行の判定を行う）が認められたとき、

試験群における臨床評価スコアの程度は、原則として陰性対照群と比較して明らかに低くなければならない。また、陽性対照群を設定した場合には、試験群における臨床評価スコアの程度は、原則として陽性対照群と比較して同等以下でなければならない。

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められなかったとき、試験群における臨床評価スコアの程度は、原則として陰性対照群（又は陽性対照群）と比較して同等以下でなければならない。

（イ）体重測定及び飼料効率

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められたとき、試験群の増体重あるいは飼料効率は、陰性対照群と比較して明らかに大きくなければならない。また、陽性対照群を設定した場合には、試験群の増体重あるいは飼料効率は、陽性対照群と比較して同等以上でなければならない。

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められなかったとき、試験群の増体重あるいは飼料効率は、陰性対照群（又は陽性対照群）と比較して同等以上でなければならない。

（ウ）剖検による肺病変スコアリング

剖検時における豚マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の肺病変の各項目のスコア基準を図１に示した。（出典：豚マイコプラズマ肺炎に対する抗菌剤の臨床試験実施基準（動物用抗菌剤研究会報　No.18 p.44-46，1997））

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められたとき、試験群の病変陽性率及び病変スコアの程度は、陰性対照群と比較して明らかに低くなければならない。また、陽性対照群を設定した場合には、試験群の病変陽性率及び病変スコアの程度は、陽性対照群と比較して同等以下でなければならない。

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められなかったとき、試験群の病変陽性率及び病変スコアの程度は、陰性対照群（又は陽性対照群）と比較して同等以下でなければならない。

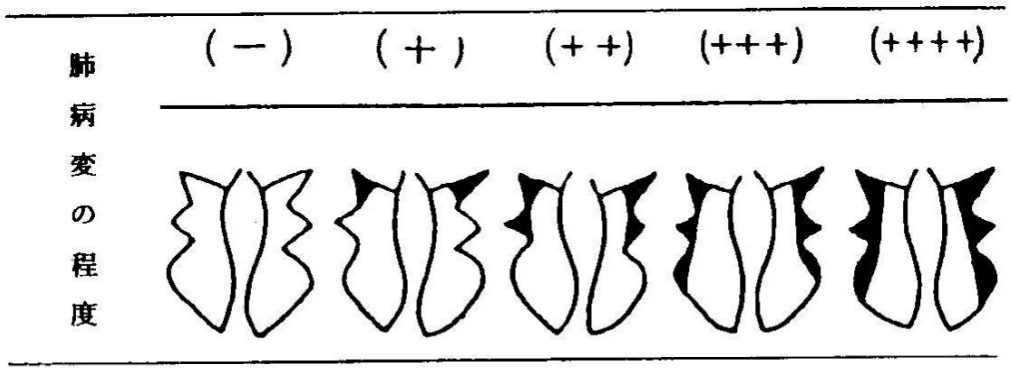


図１　肺の肉眼的病変の程度

（－）：肺のいずれの部位にも全く肝変化が認められない。

（＋）：肺の前葉の背面又は腹面の左右か一方に肝変化が認められる。

（＋＋）：肺の前葉と中葉の背面及び腹面の左右か一方に肝変化が認められる。

（＋＋＋）：肺の前葉と中葉及び後葉の背面及び腹面の左右か一方に肝変化が認められる。

（＋＋＋＋）：肺の前葉と中葉及び後葉の背面や及び腹面の大部分に亘り肝変化が認められる。

（エ）剖検時における肺病変からの微生物の分離・検出成績

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められたとき、試験群の *M. hyopneumoniae* の分離・検出率は、陰性対照群と比較して明らかに低くなければならない。また、陽性対照群を設定した場合には、試験群の本菌の分離・検出率は、陽性対照群と比較して同等以下でなければならない。

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められなかったとき、試験群における本菌の分離・検出率は、陰性対照群（又は陽性対照群）と比較して同等以下でなければならない。

（オ）抗体応答

被験薬投与時における試験群及び対照群のそれぞれの抗体価の分布は、原則として同程度でなければならない。

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められたとき、試験群の抗体応答は、陰性対照群の抗体応答と比較して、被験薬の有効性を裏付けるものでなければならない。

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められなかったとき、１回投与の場合は、被験薬投与時と投与後１～２か月目の同一試験豚の抗体価を比較し、２回以上投与の場合には、被験薬第１回投与時と最終投与後１～２か月目の同一試験豚の抗体価を比較する。原則として、被験薬第１回投与時の抗体価と同等以上あるいは有効性

評価において設定した抗体価以上に上昇した例を抗体応答陽性とし、下降した例を抗体応答陰性とする。試験群の抗体応答陽性率は、対照群の抗体応答陽性率と比較して明らかに高くなければならない。また、陽性対照群を設定した場合には、試験群の抗体応答陽性率は、陽性対照群と比較して同等以上でなければならない。

（カ）実験室内感染試験

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められなかった場合には、試験群及び対照群の一部（統計学的処理の可能な頭数）の豚を実験室内に搬送し、薬理試験等において科学的に妥当と判断される方法を用いて感染試験により、被験薬の有効性を評価しても良い。

（キ）その他

被験豚飼育施設にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症の流行が認められなかった場合には、上記ア～オの項目（必要に応じてカを含む）の成績に基づき、被験薬の有効性を総合的に評価する。

イ　安全性

次の場合、安全性が認められたと判断する。

（ア）臨床観察

試験群においては、原則として非臨床試験で確認された反応以上又はそれ以外の臨床症状を認めてはならない。また、試験群の臨床的異常の発現率及び程度は、陰性対照群（又は陽性対照群）と比較して著しい差を認めてはならない。

（イ）投与局所の観察

腫脹、硬結等の接種反応が認められないか、あるいは、認められても非臨床試験の１用量投与で認められた程度と同等以下の反応でなければならず、その消長期間も非臨床試験において設定された期間を超えてはならない。

（ウ）体重測定

試験群の増体重は、陰性対照群（又は陽性対照群）と比較して同等以上でなければならない。

ウ　その他

その他の妥当な項目を用いて有効性又は安全性の評価を行う場合は、原則として収集されたデータを公知の方法又は科学的に妥当な方法により評価し、判断する。

(11) 結果の解析及び結論

観察又は試験期間終了後、速やかに全施設の記録用紙を収集し、その記録内容を詳細に点検する。記入漏れ、誤記等の有無を再度観察・記録者に確認する。

ア　結果の解析

（ア）有効性

①　試験群及び対照群の臨床観察記録、体重測定値、飼料摂取量、剖検成

績及び微生物の分離・検出成績を取りまとめ､評価基準に基づき評価し、解析する。

② 被験薬投与時における試験群と対照群の抗体価、被験薬投与後の両群の抗体応答及びその推移を取りまとめ、評価基準に基づき評価し、解析する。

③ 中止・脱落例については、別にその結果を取りまとめる。

（イ）安全性

① 臨床観察記録、投与局所の観察記録、体重測定値の取りまとめ成績及び各有意差検定成績について、評価基準に基づき評価し、解析する。

② 異常豚について、その原因を究明するとともに、被験薬投与に起因するものか、あるいは、脱落基準に該当するものかを判定し、その経緯及び内容について解析する。

③ 試験期間中、脱落基準のア及びイに該当することが疑われる被験豚が認められた場合は、その原因について解析する。

④ 中止・脱落例については、別にその結果を取りまとめる。

イ 結論

（ア）全ての被験豚飼育施設における有効性及び安全性の評価が、それぞれの評価基準を満たしている場合は､全体的な結論に客観的な考察を加える。

(イ)各被験豚飼育施設ごとの有効性及び安全性の評価に差が認められる場合、又は評価基準を満たさない場合は、各々の評価結果を多面的な視点から十分に検討・解析した後に全体的な結論とし、客観的な考察を加える。

13　駆虫薬有効性評価ガイドライン

13－1　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン（VICH GL7）

（1）はじめに

承認取得のために用意されるデータセットにおいて、異なった資料が要求されることが減ったりなくなったりすることによって、研究開発経費は著しく減少し、製品の承認手続には前向きな影響を及ぼす。試験が不必要に重複されなくなることは、動物用駆虫薬の安全性と有効性を証明する試験に必要な動物の頭羽数を減らすことになり、動物の福祉にも役立つであろう。更に、稀少動物種の治療に用いる製品の承認を取得する場合にも資料が一組で足りるという利点が生じる。

政府規制当局も統一基準を受け入れることによって、承認手続の簡素化及び作業の合理化につながる。

この一般ガイドラインは、飼育動物における新駆虫剤及び後発品の評価に用いられる方法の標準化と簡素化に大きく貢献する。この一般ガイドラインは、牛、羊、山羊、馬、豚、犬、猫及び家禽の動物種別ガイドラインによって補足されている。これらの個別ガイドラインは、他種の動物には用いられない。

ガイドラインは、以下の条件を満たす。

ア　各国内で有効性の適正基準を作成する政府担当官にとって、モデルとなること。

イ　駆虫剤の有効性を効率的に証明するための基本計画を立てる研究者を助けること。

ウ　薬剤の試験回数と試験に用いる実験動物の頭羽数を最適化すること。これは、全体的な経費の削減に役立つだけでなく、重要な動物福祉への配慮でもある。

本ガイドラインの目的は、厳格な規制を課すものではなく、必要な最小限度の基準を明確に提示することである。本来、ガイドラインは、多数の項目を規定するものであるが、あらゆる状況を網羅しているわけではない。個々の事例についてそのメリットを考える必要があり、特別な状況において別の方法がより適当と思われたら、逸脱の合理的論拠を用意し、試験を開始する前に関係当局と話し合うべきである。公表されたデータも有効性の主張を裏付ける重要な証拠として利用できることがある。この代わりとなる方法については、あらかじめ関係規制当局と話し合っておくべきである。国際的データの受け入れが、VICH ガイドラインの重要な論点であることを強調する。

（2）一般ガイドライン

本ガイドラインは、一般的事項と特定の評価試験の二つの項目に分けれている。一般的事項の項目には、臨床試験の実施に関する基準（GCP）、有効性データの評価、感染のタイプと寄生虫株、製品の同等性、有効性の計算についての勧告、有効性の基準及び蠕虫の効能の定義が含まれる。特定の評価試験の項目には、用量決定、用量確認、野外有効性試験及び持続効果試験が含まれる。

ア　一般的事項

（ア）GCP

全ての臨床試験に GCP の原則を適用すべきであり、試験の依頼者は、GCP 勧告の原則の範囲内で行動すべきである。非 GCP 試験は、非中心的なものであり、補助的データとして用いてもよい。

（イ）有効性データの評価、自然感染又は人工感染の使用、実験室（蠕虫）株と野外株の定義

有効性データの評価は、用量決定及び用量確認試験では虫体数（成虫、幼虫）に基づいて行い、野外試験の有効性の評価では虫卵数又は幼虫の同定が望ましい方法である。用量決定及び用量確認試験は、いずれも対照を置いた試験と厳密試験が受け入れられる。しかし、対照を置いた試験が望ましく、厳密試験による試験を選択した場合には試験依頼者の説明によって裏付ける必要がある。

有効性の試験を行う場合に自然感染と人工感染のどちらを用いるかは、寄生虫のタイプ及び試験の依頼者が意図する効能によって決定される。稀少であるが家畜伝染病として重要な寄生虫の場合に、人工感染が唯一の方法である場合がある。

人工感染を行う場合には、一般に最近分離した野外株が望ましいが、実験室株を使用できる場合もある（用語集参照）。野外株は、自然界における寄生虫の現在の状況をより正確に反映すると考えられる。試験に使用する実験室株については、由来、維持方法、薬剤感受性、継代数及び対象宿主における予測定着率のような特性を、最終報告書に含めなければならない。野外分離株についても、由来、分離した日付、場所、過去の駆虫剤ばく露及び維持方法を含む特性を記載することが必要である。

（ウ）製品の同等性

製品の同等性の原則は、同じ既承認活性成分を含む２製品、例えば後発品が同じ用量、同じ投与経路で同じ宿主に用いられる場合に利用できる。同じ既承認成分で、対象となる寄生虫の好発部位だけでなく薬物の動態特性が変わらない既承認製品の処方変更には、製品の同等性を明らかにする試験法を用いるべきである。

血中濃度が測定可能で体内に吸収される薬物の場合、もしくは血中濃度が測定可能で薬物動態のパラメーターと有効性が相関している薬物の場合には、血中薬物濃度の生物学的同等性試験を用いることは可能である。特に薬物動態パラメーターが有効性と相関しない場合には、臨床的効能のために用量限定寄生虫を用いた２回の用量確認試験及び（又は）種ごとの効能を示す２回の持続効果試験が代わりに必要となる。

（エ）有効性の計算についての勧告

有効性を裏付ける寄生虫のデータの解析には、治療効果を反映すると考えられる糞便中虫卵数及び虫体数等の幾つかの寄生虫学的指標が用いられる。大多数の自然感染及びそれよりは少ないが人工感染において、同様に治療した動物のデータ値の間に大きなばらつきが認められる。このため、

例数を増やすための追加試験の実施が必要とされる場合もある。

① データ解析についての勧告

試験の統計的解析は、２段階の手順による。治療群と対照群の間に統計的有意差があること及び算出された有効率が 90 %であることが駆虫剤の承認のために必要である。

統計的解析の方法は、データ解析を行う以前のプロトコールの段階で試験依頼者が決定しておかなければならない。ノンパラメトリック法でもパラメトリック法でもよい。試験依頼者は、治療群と対照群の間に統計的有意差を証明できたら、次に幾何平均を用いて有効率（%）を計算する。製品が承認されるためには算出された有効率が少なくとも 90 %でなければならない（有効性の基準を参照）。

② 幾何平均か算術平均か

幾何平均と算術平均のどちらを用いるかによって、有効率に差がみられる場合がある。しかし、ハーモナイゼーションするために、平均値を計算するための唯一の方法を勧告する必要がある。対数変換した虫体数又は虫卵数は、対数変換しない場合よりも、正規分布に近付く傾向があるので、算術平均より幾何平均のほうが中心の傾向を推定するのに適しており、誤解の可能性が少ない。有効性の評価に算術平均を使用すると、製品の治療効果がより控え目に推定されるので、より厳しい基準と考えられていて、算術平均は特別な状況のみに用いられるかもしれない。

幾何平均による有効率の計算は、用量決定、用量確認、野外及び持続効果の各試験に必要である。算術平均の使用が受け入れられる状況もあり得る。

③ 動物の頭羽数（用量決定、用量確認及び持続効果試験）

各試験群に必要な動物の頭羽数は重要な点である。動物の頭羽数は、適切な統計的解析法に従ってデータを統計的に処理できなくてはならないが、各試験群に少なくとも６頭の動物を用いることを最低の条件とする。

④ データのプール

データのプールは、一定の基準に従った場合に認められる。データのプールを意図している試験依頼者は、用量確認、野外及び持続効果の各試験に適用する総括プロトコールが標準化されていることを確認する必要がある。動物又は動物群の数、寄生虫の数、動物のタイプ及び実験条件を同一にしなくてはならない。データをプールして用いる場合には、異常な結果について規制当局に説明しなければならない。

データのプールは、２回以上の試験を行い（イの（イ）以下に定義されたように）、そのほとんどの試験が 90 %以上の有効率である場合に用いることができるものとする。言い換えれば、最小３実験のうち２実験以上は 90 %以上の有効性がなければならない。プールされたデータの最終的な有効率は、90 %以上でなくてはならない。

稀少寄生虫については、別の方式を使わなければならない（すなわち、試験回数を増やす必要があるかもしれない）。

幾何平均は全ての対照値を用いて計算しなくてはならない。つまり、対照群の寄生虫数ゼロの個体とそれに対応する数の治療動物をデータから脱落させることは許されない。

⑤　感染の十分さ

感染の十分さについての普遍的な定義は、評価すべき蠕虫の属、種及び株が多岐にわたることから、明確にできない。更に、試験に供される株は、感染性と病原性がユニークな特性を持っていることがある。しかしながら、試験プロトコールの作成に当たっては感染の十分さについて記述すべきであり、特に個々の対照動物の感染レベル並びに感染が成立した対照動物数の統計的、寄生虫学的及び臨床的な適切さの点について記述されなければならない。対照動物における感染のレベルとその分布は、統計的及び生物学的な確信と信頼を満たす適切な基準に合致しなくてはならない。しかしながら、各蠕虫種が許容される最小限の感染に達していれば、複数種感染でもよい。

対照群全ての動物が感染している場合には、対照群の幾何平均虫体数の 95 %信頼限界の下限値を計算する統計的方法を用いることができる。この値が対照群の幾何平均虫体数の 10 %を越えていれば、感染は十分であるといえる。対照群の動物の一部が感染していない（虫体数ゼロ）場合には、幾何平均の代わりに中央値を用いるべきであり、95 %信頼限界は対照群の虫体数の中央値によるべきであろう。しかしながら、関連する各動物種のガイドラインに示されているように（少なくとも）6頭（羽）の動物は十分に感染している必要がある。

⑥　部分標本の大きさ

寄生虫数を計数するための部分標本の大きさは、少なくとも全体の２%にすべきである。部分標本の大きさをもっと小さくするときには、妥当性の説明が必要である。

（オ）有効性の基準

ある化合物の有効性を述べるためには、表示する各寄生虫に対する有効率がデータの幾何平均の計算によって 90 %以上であり、かつ対照動物と治療動物の寄生虫数の間に統計的有意差があることが必要である。しかしながら、特定の寄生虫感染の流行している地域ではもっと高い有効率を求める場合があり、特に薬剤の効能が牧野の汚染の防止を目的にしているときはその必要がある。これらについては動物種ごとのガイドラインに記載する。一方、承認を求める寄生虫に有効な治療法が全くない場合には、90 %未満の有効率でも認められることがある。

（カ）蠕虫の効能の定義

表示しようとする効能のタイプは、寄生虫の同定によって決まる。成虫については、種の効能が強く推奨される。しかし、未成熟虫については、その

属に２種以上の種がある場合に特定できないので、属の効能も受け入れるべきである。種の効能を取得する場合、それぞれの寄生虫種について２回の用量確認試験が必要である。

イ　特定の評価試験

全ての新しい駆虫剤の評価に、用量決定、用量確認及び野外有効性の３種類の評価試験が用いられる。駆虫剤の持続効果を明らかにするためには、そのための特別な試験が必要である。

（ア）用量決定試験

用量決定試験（以前は用量設定試験と呼ばれていた。）の目的は、個々の対象動物に推奨される用量を決定することである。この試験は、最終処方を用いて実施してもよく、そうでなくてもよい。しかし、最終処方を用いない場合には、処方変更の妥当性を科学的に説明しなければならない。一部の規制当局は、投与量を支持する代わりのデータがあれば、用量決定試験を要求しない場合がある。後発品については、活性成分の最適投与量が既に一般的に認められている場合には、用量決定試験は必要ない。

ある駆虫剤について広範囲な効能を取得する場合には、効能に含まれる用量限定種が浸潤率の高い種か低い（希少）種かとは無関係に、その用量限定種を用量決定試験に含めなくてはならない。試験依頼者は、家畜衛生に対する影響を考慮して寄生虫種を選択すべきである。効能を取得しようとする寄生虫種に対する有効性の確認は、用量確認試験においてなされる。

一種の寄生虫（例えば *Dirofiralia immitis*）だけを効能にする場合には、寄生虫種の数及び用量限定種についての考察は不要である。

用量決定試験には、少なくとも用量の異なる三つの治療群と、一つの無治療対照群を含めるべきであり、例えば、予期する用量の０、0.5、１及び２倍とする。用量の範囲は、予備試験に基づいておよその有効量を含むように選択すべきである。用量を選択した場合、その根拠を説明する必要がある。選定した各寄生虫について、治療群と無治療群は、少なくとも６頭の十分に感染した動物で構成すべきであるが、感染レベルに何らかの疑いがある場合には、適宜、動物数を増やすべきである（データ解析を参照）。

用量決定試験は、ある寄生虫の幼虫期が用量を決定するという情報が存在するあるいは効能が特定の寄生虫の幼虫期だけを標的にする（例えば、*Dirofiralia immitis*）場合を除いて、成虫を用いて実施すべきである。用量決定試験は、自然感染を用いて実施してもよいが、人工感染が望ましい。人工感染には実験室株でも、最近の野外分離株（用語集参照）でも使うことができる。

（イ）用量確認試験

本試験は、その薬剤の市販しようとする最終処方を用いて実施すべきであり、また、既知の薬剤耐性寄生虫株で実施すべきではない。成虫に対する有効性を調べる場合には、自然感染動物が望ましいが、１回の試験は、最近の野外分離株を用いる人工感染でもよい。稀少寄生虫種については、

実験室株を用いてもよく、その製品の承認を取得しようとする地域の外で試験を行ってもよい。幼虫期に対する用量確認試験は、人工感染を用いて行うべきである。試験依頼者は、この勧告から逸脱する場合は説明する必要がある。発育休止期に対しては、自然感染だけを用いることが勧められる。

個々の効能について少なくとも２回の対照を置いた、あるいは、そのほうが適当なら、厳密な用量確認試験が必要である（単独又は複数種感染)。異なった地域、気候、各畜産環境において行われた動物試験において、種々の寄生虫種に対する有効性を立証する２回の試験は最低限必要である。この試験のうち１回は、登録される適用地においてなされるべきであり、これらの試験は、承認を得ようとする地域の種々の条件を十分に反映した条件下で実施すべきである。特定の地域で寄生虫が特に希である場合には、２回の試験をその地域の外で実施してもよい。最終処方を用い、表示の推奨どおりに投与した用量決定試験は、用量確認試験の一つの代わりとすることができる。

各試験は、治療群に少なくとも６頭の十分に感染している動物で行うべきである。感染の十分さは、プロトコールの段階で規定しておくべきである。試験開始時にその寄生虫あるいはそのステージの幼虫に十分感染している動物を少なくとも六頭確保するためには、治療の前に十分な数の自然感染動物を検査すべきである（有効性の計算の勧告を参照)。

（ウ）野外有効性試験

本試験は、市販しようとする製品の最終処方を用いて、有効性と安全性を確認するために行われる。実施すべき野外試験の回数及び各試験に供する動物は、ａ）動物種、ｂ）適用地域及びｃ）国又は地域の状況によって異なる。対照、すなわち無治療動物又は効能既知の既承認の駆虫剤で治療する動物は、治療する動物数の少なくとも 25 ％と同等な頭数にすべきである。国又は地域とは、ある国及び（又は）その連合体の中で、気候及び（又は）飼養管理が似ている地域を意味する（用語集参照)。要求される頭数に到達するために、国／地域における多施設での分割試験を実施してもよい。試験及び（又は）動物数（動物福祉への配慮）の追加（又は減少）についての各国規制当局による要求は、妥当性を十分に説明する必要がある。製品の試験は、必ず製剤の表示に示した治療の対象となる動物の品種、年齢範囲、クラス、用途について実施すべきである。

（エ）持続効果試験

最近の広範囲抗寄生虫化合物は、治療動物体内に親化合物又は代謝物の残存効果があるために、持続有効性を示すことがある。これらの効能は、糞便１ｇ当たりの虫卵数によってではなく、実際の虫体の計数によってのみ明らかにできる。７日未満の活性は、持続効果と考えるべきではなく、持続効果を効能とする場合には、日数を明記すべきである。プロトコールのタイプは動物種によって異なるので、個々の対象動物種のガイドライン

で定める。

持続性の効能（期間と寄生虫種について）をいうためには、無治療群と治療群のそれぞれについて、虫体数計測による２回の試験を行うべきである。治療群には少なくとも６頭の十分に感染した動物を用いるべきである。持続性の効能は、種ごとに与えるべきであろう。

（３）用語集

十分な感染：投与動物と対照動物の寄生虫学的指標（例えば、虫体数）を比較したときに、薬剤の治療効果の評価が可能となる、試験プロトコールに規定された自然又は人工感染のレベル

部分標本の大きさ：寄生虫数を計数するために採取する消化管又はその他（肺など）の内容物の（既知量の）標本

効能：ある駆虫剤に感受性（90 %以上の有効率）が証明されて、表示に記載されている寄生虫種又は属（成虫及び（又は）幼虫）

対照を置いた試験：薬剤の有効性を試験する方法の一つ。十分に寄生している動物を各治療群と対照群に用いる。治療後に適当な期間をおいて動物を剖検し、寄生虫を計数し、同定する。化合物の有効率は、[(対照群の虫体数の幾何平均）－（治療動物の虫体数の幾何平均)]÷[対照群の虫体数の幾何平均]×100 ＝その寄生虫又は発育期幼虫に対する有効率（%)、で計算する。この試験は、最も広く使用されており、標本の大きさが同じであるときに用いることができる。

厳密試験：治療後の動物から回収された寄生虫数と剖検時に腸内にいた寄生虫数を加えて、治療時に動物体内にいた寄生虫の総数と考えることで行われる試験法。有効率は、[排出された虫体数]÷[(排出された虫体数）＋（残存していた虫体数)]×100 ＝個々の動物における有効率（%）で計算する。

用量確認試験：選定した用量の有効性を確認する *in vivo* 試験。実験室で実施してもよく、野外で実施してもよい。

用量決定試験：動物用医薬品の至適用量又は用量範囲を決定する *in vivo* 試験

用量限定寄生虫　：90 %の有効率を示す薬剤の用量を決定するための用量決定試験中に認識される寄生虫。その用量以下で宿主体内の他の寄生虫を十分治療できても（90 %以上の有効率)、用量限定寄生虫に対する有効率は 90 %を下回ることになる。

有効性：対照を置いた試験のプールしたデータの幾何平均の計算に基づいて、少なくとも 90 %の有効率を示す十分なデータで裏付けられ、メーカーがラベルに表示する効果の程度

野外有効性試験　：動物用医薬品の有効性と安全性を実際の使用条件下で明らかにするための大規模試験

GCP：試験データの質と妥当性を向上させることを意図した一連の勧告。組織編成の手順並びに試験を計画し、実施し、監視し、記録し、報告する条

件が含まれている。

後発医薬品：後発医薬品は、既承認の動物用医薬品と活性成分や投与量が同じで、既承認の動物用医薬品製剤と生物学的に同等であるということの証明により承認される。地域の既成条件に従って提出されなければならない。

適用地域：このガイドラインが施行されるであろう地域、例えば、日本、EU、米国、オーストラリア及びニュージーランド

野外分離株：野外から分離して 10 年未満の、薬剤の有効性試験を実施するための蠕虫の亜集団。これらの蠕虫は、野外における現在の寄生虫感染を代表すると考えられ、特性（由来、分離の日付、場所、以前の駆虫剤ばく露歴及び維持方法）が明らかにされているもの

実験室株：野外から分離されてから少なくとも 10 年を経過した蠕虫の亜集団で、実験室において特性が明らかにされ、特定の抗寄生虫化合物に対する耐性のような特殊な研究領域のために実験室に集められているもの

稀少寄生虫：浸潤率の低い寄生虫種で、明らかな罹患及び臨床症状をもたらすこともあり、そうでないこともあり、多くは特定の地域に限局して存在する。

地域：適用地域内における気象条件、対象動物の飼育管理及び耐性寄生虫の流行によって規定される区域

VICH：動物用医薬品規制のハーモナイゼーションに関する国際協力

13 － 2　駆虫剤の有効性評価基準：牛ガイドライン（VICH GL12）

（1）はじめに

牛についての本ガイドラインは、VICH 駆虫剤ガイドライン作業部会が作成した。本ガイドラインは、駆虫剤の有効性を証明する中心的データに関して全般的な見地から作成された「13 － 1　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン」（VICH　GL7。以下「一般ガイドライン」という。）と合わせて読むべきである。この文書は、両方の文書の読者が読み比べ易いように一般ガイドラインと同様の構成にしてある。

本ガイドラインは、一般ガイドラインを補足するものであり、ａ）一般ガイドラインでは考察しなかった牛に特有な幾つかの問題を詳しく述べ、ｂ）有効性データの要件における一般ガイドラインとの違いを明らかにし、ｃ）一般ガイドラインとの違いを説明することが目的である。

試験を行う上での技術的方法は、このガイドラインの目的ではないことに注意することも重要である。試験依頼者は、関連する方法について詳細に記述された他の公表資料、例えば WAAVP Second Edition of Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelimintics in Ruminants （Bovine, Ovine,Caprine）, Veterinary Parasitology58：181-213,1995 を参照することを勧める。

（2）一般的事項

ア　有効性データの評価

厳密試験は、一般に反芻動物では信頼性があるとは考えられないので、成虫／幼虫の虫体数に基づく対照を置いた試験だけが用量決定試験及び用量確認試験として認められる。虫卵測定／幼虫の同定は、野外有効性試験での有効性評価のために推奨される方法である。長時間作用製剤又は徐放製剤は、他の治療用駆虫剤と同じ評価手順に従う。寄生虫感染の十分さは、地域的な流行あるいは歴史的及び（又は）統計的データに応じて試験設計書の中に定義しておく。

イ　自然又は人工感染の使用

用量決定試験は、一般に実験室株又は最近野外から分離した株による人工感染を用いて実施すべきである。*Toxocara vitulorum*、条虫類及び *Dicrocoelium dendriticum* は、経験が少ないので、人工感染ではなく自然感染を行うのがよいかもしれない。

用量確認試験は、自然感染動物を用いるべきであるが、人工感染又は自然感染動物に既に感染している寄生虫に干渉しない寄生虫を更に人工感染させて実施することもできる。この方法は広範囲の寄生虫に対して許可される。四期子虫に対する効能は人工感染で行う。発育休止期の幼虫に対する効能には、自然感染を用いる。試験依頼者は、試験動物において対象とする特定の寄生虫種の発育休止期の幼虫が最大限に蓄積する時期を狙うべきである。これは地方又は地域によって異なるであろう。各地域での特徴の詳細については、ケースバイケースに専門家から情報を入手する。動物は、いずれの場合にも（再感染を避けるために）治療前少なくとも２週間は舎飼いする必要が

ある。

持続効果試験は、最近野外から分離した株の人工感染を用いる。

人工感染試験に使用した寄生虫の経歴を、最終報告書に含む。

ウ　人工感染に推奨される感染型寄生虫の数

用いる寄生虫数は、大まかなものであり、使用する分離株によっても異なってくる。感染に使用した幼虫の最終的な数を最終報告書に含まなくてはならない。感染モデルが存在する寄生虫種について、表１に推奨される数を示す。

表１　駆虫剤評価のために牛に十分な感染を起こさせる感染期虫体数

寄生虫	虫卵、虫体数
第四胃	
Haemonchus placei	5,000 － 10,000
Ostertagia ostertagi	10,000 － 30,000
Trichostrongylus axei	10,000 － 30,000
腸	
Cooperia oncophora	10,000 － 30,000
C. punctata	10,000 － 15,000
T. colubriformis	10,000 － 30,000
Nematodirus spathiger	3,000 － 10,000
N. helvetianus	3,000 － 10,000
N. battus	3,000 － 6,000
Oesophagostomum radiatum	1,000 － 2,500
O. venulosum	1,000 － 2,000
Chabertia ovina	500 － 1,500
Bunostomum phlebotomum	500 － 1,500
Strongyloides papillosus	1,000 － 200,000
Trichuris spp.	1,000
肺	
Dictyocaulus viviparus	500 － 6,000
肝	
Fasciola hepatica（メタセルカリア）	
成牛の場合	1,000
幼牛の場合	500 － 1,000

エ　有効性の計算についての勧告

（ア）効能を認める基準

効能を認めるためには、以下の中心的データが含まれる必要がある。

①　少なくとも６頭の十分に感染した非治療対照群と６頭の十分に感染した治療群をそれぞれ使用した２回の用量確認試験；

②　治療動物と対照動物の虫体数の差が統計的に有意（$p<0.05$）であること。

③　変換（幾何平均）データを用いて算出した有効率が 90 %以上であること；

④　試験に用いた動物の感染が歴史的及び寄生虫学的及び（又は）統計的基準に基づいて十分と考えられること。

有効性の基準（90 %以上）は、宿主動物から取り出した寄生虫数から計算する。しかし、胃腸内寄生虫の流行により牧場の汚染を予防する目的で駆虫剤を用いる場合は、より高い有効性基準を用いてもよい。試験依頼者は、試験開始前に規制当局と相談すべきである。

（イ）動物数（用量決定、用量確認及び持続性試験）

各実験群に必要な最少動物数は、重要な点である。動物数は、適切な統計的解析法によって統計的にデータを処理できる可能性にもよるが、ハーモナイゼーションを達成するために、各実験群に少なくとも 6 頭の動物を含めることを最低条件とする。

対照群に十分に感染した動物を 6 頭含んでいない幾つかの試験がある場合（例えば、重要な希少寄生虫）に、それらの試験で得られた成績を 12 頭分集めてプールし、統計的有意性を計算してもよい。差が有意であれば（$p<0.05$）、有効率が計算でき、感染が十分であると思われれば、効能が認められることがある。集団の成績を適切かつ意味のある推定と認めるためには、試験を行った実験室間の採材手技及び虫体数の評価を同じようにしておかねばならない。

（ウ）感染の十分さ

最少限の十分な数について、最終報告書を提出するときに統計的及び歴史的データ、文献検索あるいは専門家の証言に基づいて判断すべきであろう。効能を認めるのに十分と考えられている牛の蠕虫（成虫）数の範囲は種によって異なる。一般に十分と考えられる線虫の最少平均虫体数は 100 である。*Bunostomum* spp.、*Oesophagostomum* spp.、*Trichuris* spp.及び *Dictyocaulus* spp.についてはもっと少数でもよいと考えられる。*Fasciola* sp.. については、平均 20 の成虫で十分と考えられる。

（エ）効能表示

成虫の効能を取得するには、一般原則として、感染後 21 ～ 25 日未満で投薬すべきではなく、ほとんどの種は 28 ～ 32 日が最適である。主な例外は *Oesophagostomum* spp.（34 ～ 49 日）、*Bunostomum* spp.（52 ～ 56 日）、*Strongylode papillosus*（14 ～ 16 日）及び *Fasciola* spp.（８～ 12 週）である。

L4 の効能を取得するには、一般原則として、感染後以下の日数で治療を行うべきである；*Strongyloides papillosus*（３～４日）、*Haemonchus* spp と *Trichostrongylus* spp と *Cooperia* spp.（５～６日）、*Ostertagia* spp.と *Dictyocaulus viviparus*（７日）、*Nematodirus* spp.（８～ 10 日）、*Oesophagostomum* spp.（15 ～ 17 日）。*Fasciola* spp.においては、初期幼虫（１～５週）、後期幼虫（６～９週）とすべきである。

オ　治療法

製品の投与方法（経口、非経口、外用、徐放など)、処方及び活性の強さが試験計画を設計する上で重要である。外用剤の有効性については、天候や動物相互の関係を考慮することが望ましい。徐放剤については、例えば提案する治療期間の全ての時点で血中濃度が安定状態にあるというような情報が加わることで検査が不要であることが示されない限り、提案する有効期間の全体にわたって検査をすべきである。

治療経路。飲水中又はプレミックスに添加して投与される薬剤は、できる限り、表示どおりに行う。メディケーテッドプレミックスには嗜好性試験が必要な場合がある。薬剤を添加した水又は飼料から試料を採取して、薬剤濃度を確認する。各動物に投与した薬剤添加飲水または飼料の量を記録して、治療が表示どおりに行われていることを確認する。外用する製剤については、有効性の評価に天候（降雨、紫外線）及び被毛の長さの影響を含む。

カ　動物の選別、割り付け及び取扱い

試験動物は臨床的に健康で、効能を主張しようとする動物の年齢、性別及び類別を代表するものにすべきである。一般に、動物は、３か月齢以上の反芻をしている牛にする。動物は、無差別に各治療群に割り付ける。体重、性別、年齢及び（又は）寄生虫ばく露によるブロック化は、繰り返し試験においてばらつきを減らすのに役立つかもしれない。糞便中の虫卵／幼虫数も実験動物の割り付けに適当な方法である。

人工感染の場合には、蠕虫未感染の動物を用いることを推奨する。蠕虫がいない環境で飼育された動物でない場合には、化学的に試験製剤と相互関係のない既承認の駆虫剤で感染寄生虫を駆除し、糞便検査を行ってその動物に蠕虫がいないことを確認する。

畜舎、餌及び飼育は動物福祉に従うべきであり、動物は、各国の衛生基準に従ってワクチンを接種する必要がある。この情報は、最終報告書に記載する。少なくとも７日の順化期間をとることが勧められる。畜舎と飼料－水は、各地域に応じて適切なものにすべきである。動物は、毎日観察して副作用を明らかにする。

（３）特定の評価試験

ア　用量決定試験

動物種に特異的な事柄なし。

イ　用量確認試験

用量確認試験はそれぞれの効能を裏付ける必要がある。：成虫、幼虫及び、それが当てはまるなら、発育休止期の幼虫について。

ウ　野外有効性試験

動物種に特異的な事柄なし。

エ　持続有効性試験

持続有効性の効能を調べるために、二つの基本的試験設計が使用されている。一つは単回攻撃を用いるものであり、他方は治療後に毎日、複数回の攻

撃を行うものである。両方の方法のための標準化されたプロトコールは開発されていない。試験を行う場合、プロトコールの詳細を以下のような事柄の間に含む。: 試験期間中の子虫の生存、子虫攻撃の根拠、と殺時点の正当性。寄生虫に未感染の牛はこれらの試験に推奨される。試験のデザインは自然状態に最も近い複数回投与を推奨する。

持続性の効能を取得する最低限の要件は（それぞれの期間及び寄生虫について)、それぞれに非治療群と一つ以上の治療群を含む２回の試験（虫体数による）を行うことである。治療群には十分感染している動物が少なくとも６頭含まれているべきである。持続性の効能は、種ごとにしか認められない。

複数回攻撃法を用いる場合、各動物群に投薬し、その後７、14、21 日又はそれ以上にわたって毎日、自然又は人工的に攻撃にばく露し、最後（又はそれ以前の）の攻撃から約３週間後に動物の虫体数を調べる。攻撃の間隔と計画はより特効性の製剤の場合は変更される。

持続性の効能は、幾何平均による少なくとも 90 %の有効率で裏付けられるべきである。

13 － 3　駆虫剤の有効性評価基準：羊ガイドライン（VICH GL13）

（1）はじめに

羊についての本ガイドラインは、VICH 駆虫剤ガイドライン作業部会が作成した。本ガイドラインは、駆虫剤の有効性を証明する中心的データに関して全般的な見地から作成された「13 － 1　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン」（VICH　GL7。以下「一般ガイドライン」という。）と合わせて読むべきである。この文書は、両方の文書の読者が読み比べ易いように一般ガイドラインと同様の構成にしてある。

本ガイドラインは、一般ガイドラインを補足するものであり、ａ）一般ガイドラインでは考察しなかった羊に特有な幾つかの問題を詳しく述べ、ｂ）有効性データの要件における一般ガイドラインとの違いを明らかにし、ｃ）一般ガイドラインとの違いを説明することが目的である。

試験を行う上での技術的方法は、このガイドラインの目的ではないことに注意することも重要である。試験依頼者は、関連する方法について詳細に記述された他の公表資料、例えば WAAVP Second Edition of Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelimintics in Ruminants （Bovine, Ovine,Caprine）, Veterinary Parasitology 58：181-213,1995 を参照することを勧める。

（2）一般的事項

ア　有効性データの評価

厳密試験は、一般に反芻動物では信頼性があるとは考えられないので、成虫／幼虫の虫体数に基づく対照を置いた試験だけが用量決定試験及び用量確認試験として認められる。虫卵測定／幼虫の同定は、野外有効性試験での有効性評価のために推奨される方法である。長時間作用製剤又は徐放製剤は、他の治療用駆虫剤と同じ評価手順に従う。寄生虫感染の十分さは、地域的な流行あるいは歴史的及び（又は）統計的データに応じて試験設計書の中に定義しておく。

イ　自然又は人工感染の使用

用量決定試験は、一般に実験室株又は最近野外から分離した株による人工感染を用いて実施すべきである。感染モデルが存在しない寄生虫（*Protostorongylidea*、条虫類、*Dicrocoelium* spp.）の場合には、人工感染の代わりに自然感染を用いるのがよい。

用量確認試験は、自然感染動物を用いるべきであるが、人工感染又は自然感染動物に既に感染している寄生虫に干渉しない寄生虫を更に人工感染させて実施することもできる。この方法は広範囲の寄生虫に対して許可される。四期子虫に対する効能は人工感染で行う。発育休止期の幼虫に対する効能には、自然感染を用いる。試験依頼者は、試験動物において対象とする特定の寄生虫種の発育休止期の幼虫が最大限に蓄積する時期を狙うべきである。これは地方又は地域によって異なるであろう。各地域での特徴の詳細については、必要ならばケースバイケースに専門家から情報を入手する。動物は、いずれの場合にも（再感染を避けるために）治療前少なくとも２週間は舎飼い

する必要がある。

持続効果試験は、最近野外から分離した株の人工感染を用いる。

人工感染試験に使用した寄生虫の経歴を最終報告書に含む。

ウ　人工感染に推奨される感染型寄生虫の数

用いる寄生虫数は、大まかなものであり、使用する分離株によっても異なってくる。感染に使用した幼虫の最終的な数を最終報告書に含まなくてはならない。感染モデルが存在する寄生虫種について、表１に推奨される数を示す。

表１　駆虫剤評価のために羊に十分な感染を起こさせる感染期虫体数

寄生虫	虫卵、虫体数
第四胃	
Haemonchus contortus	400 － 4,000
Teladorsagia circumcincta	6,000 － 10,000
Trichostrongylus axei	3,000 － 6,000
腸	
Cooperia curticei	3,000 － 6,000
T. colubriformis & *T. vitrinus*	3,000 － 6,000
Nematodirus spp.	3,000 － 6,000
Oesophagostomum spp.	500 － 1,000
Chabertia ovina	800 － 1,000
Bunostomum trigonocephalum	500 － 1,000
Strongyloides papillosus	80,000
Gaigeria pachyscelis	400
Trichuris spp.	1,000
肺	
Dictyocaulus filaria	1,000 － 2,000
肝	
Fasciola　hepatica（メタセルカリア）	100 － 200（慢性） 1,000 － 1,500（急性）

エ　有効性の計算についての勧告

（ア）効能を認める基準

効能を認めるためには、以下の中心的データが含まれる必要がある。

①　少なくとも６頭の十分に感染した非治療動物（対照群）と６頭の十分に感染した治療動物（治療群）をそれぞれ使用した２回の用量確認試験

②　治療動物と対照動物の虫体数の差が統計的に有意（$p<0.05$）であること。

③　変換（幾何平均）データを用いて算出した有効率が 90 %以上であること。

④　試験に用いた動物の感染が歴史的及び寄生虫学的及び（又は）統計的基準に基づいて十分と考えられること。

有効性の基準（90 %以上）は、宿主動物から取り出した寄生虫数から計算する。しかし、胃腸内寄生虫の流行により牧場の汚染を予防する目的で駆虫剤を用いる場合は、より高い有効性基準を用いてもよい。試験依頼者は、試験開始前に規制当局と相談すべきである。

（イ）動物数（用量決定、用量確認及び持続性試験）

各実験群に必要な最少動物数は、重要な点である。動物数は、適切な統計的解析法によって統計的にデータを処理できる可能性にもよるが、ハーモナイゼーションを達成するために、各実験群に少なくとも６頭の動物を含めることを最低条件とする。

対照群に十分に感染した動物を６頭含んでいない幾つかの試験がある場合（例えば、重要な希少寄生虫）に、それらの試験で得られた成績を 12 頭分集めてプールし、統計的有意性を計算してもよい。差が有意であれば（$p<0.05$）、有効率が計算でき、感染が十分であると思われれば、効能が認められることがある。集団の成績を適切かつ意味のある推定と認めるためには、試験を行った実験室間の採材手技及び虫体数の評価を同じようにしておかねばならない。

（ウ）感染の十分さ

最少限の十分な数について、最終報告書を提出するときに統計的及び歴史的データ、文献検索あるいは専門家の証言に基づいて判断すべきであろう。効能を認めるのに十分と考えられている羊の蠕虫（成虫）数の範囲は種によって異なる。一般に十分と考えられる線虫の最少平均虫体数は 100 である。*Bunostomum* spp.、*Oesophagostomum* spp.、*Trichuris* spp.、*Gaigeria Pachyscelis* 及び *Dictyocaulus filaria* についてはもっと少数でもよいと考えられる。*Fasciola* sp.については、平均 20 の成虫で十分と考えられる。

（エ）効能表示

成虫の効能を取得するには、一般原則として、感染後 21 ～ 25 日未満で投薬すべきではなく、ほとんどの種は 28 ～ 32 日が最適である。主な例外は *Oesohagostomum* spp.（28 ～ 41 日）、*Bunostomum* spp.（52 ～ 56 日）、*Strongyloides papillosus*（14 ～ 16 日）及び *Fasciola* spp.（８～ 12 週）である。

L4 の効能を取得するには、一般原則として、感染後以下の日数で治療を行うべきである；*Strongyloides papillosus*（３～４日）、*Haemonchus* spp と *Trichostrongylus* spp と *Cooperia* spp.（５～６日）、*T.（O.） circumcincta*（７日）、*Nematodirus* spp.と *D. filaria*（８～ 10 日）、*Oesophagostomum* spp.（15 ～ 17 日）。未成熟という表示は認められない。*Fasciola* spp.においては、初期幼虫（１～４週）、後期幼虫（６～８週）とすべきである。

オ　治療法

製品の投与方法（経口、非経口、外用、徐放など）、処方及び活性の強さ

が試験計画を設計する上で重要である。外用剤の有効性については、天候や動物相互の関係を考慮することが望ましい。徐放剤については、例えば提案する治療期間の全ての時点で血中濃度が安定状態にあるというような情報が加わることで検査が不要であることが示されない限り、提案する有効期間の全体にわたって検査をすべきである。

治療経路。飲水中又はプレミックスに添加して投与される薬剤は、できる限り、表示どおりに行う。メディケーテッドプレミックスには嗜好性試験が必要な場合がある。薬剤を添加した水又は飼料から試料を採取して、薬剤濃度を確認する。各動物に投与した薬剤添加飲水又は飼料の量を記録して、治療が表示どおりに行われていることを確認する。外用する製剤については、有効性の評価に天候（降雨、紫外線）及び被毛の長さの影響を含む。

カ　動物の選別、割り付け及び取扱い

試験動物は臨床的に健康で、効能を主張しようとする動物の年齢、性別及び類別を代表するものにすべきである。一般に、動物は、３か月齢以上の反芻をしている羊にする。動物は、無差別に各治療群に割り付ける。体重、性別、年齢及び（又は）寄生虫ばく露によるブロック化は、繰り返し試験においてばらつきを減らすのに役立つかもしれない。糞便中の虫卵／幼虫数も実験動物の割り付けに適当な方法である。

人工感染の場合には、蠕虫未感染の動物を用いることを推奨する。蠕虫がいない環境で飼育された動物でない場合には、化学的に試験製剤と相互関係のない既承認の駆虫剤で感染寄生虫を駆除し、糞便検査を行ってその動物に蠕虫がいないことを確認する。

畜舎、餌及び飼育は動物福祉に従うべきであり、動物は、各国の衛生基準に従ってワクチンを接種する必要がある。この情報は、最終報告書に記載する。少なくとも７日の順化期間をとることが勧められる。畜舎と飼料－水は、各地域に応じて適切なものにすべきである。動物は、毎日観察して副作用を明らかにする。

（３）特定の評価試験

ア　用量決定試験

動物種に特異的な事柄なし。

イ　用量確認試験

用量確認試験はそれぞれの効能を裏付ける必要がある。：成虫、幼虫、及びそれが当てはまるなら、発育休止期の幼虫について。

ウ　野外有効性試験

動物種に特異的な事柄なし。

エ　持続有効性試験

持続有効性の効能を調べるために、二つの基本的試験設計が使用されている。一つは単回攻撃を用いるものであり、他方は治療後に毎日、複数回の攻撃を行うものである。両方の方法のための標準化されたプロトコールは開発されていない。試験を行う場合、プロトコールの詳細を以下のような事柄の

間に含む。: 試験期間中の子虫の生存、子虫攻撃の根拠、と殺時点の正当性。寄生虫に未感染の羊はこれらの試験に推奨される。試験のデザインは自然状態に最も近い複数回投与を推奨する。

持続性の効能を取得する最低限の要件は（それぞれの期間及び寄生虫について)、それぞれに非治療群と一つ以上の治療群を含む２回の試験（虫体数による）を行うことである。治療群には十分感染している動物が少なくとも６頭含まれるべきである。持続性の効能は、種ごとにしか認められない。

複数回攻撃法を用いる場合、各動物群に投薬し、その後７、14、21 日又はそれ以上にわたって毎日、自然又は人工的に攻撃にばく露し、最後（又はそれ以前の）の攻撃から約３週間後に動物の虫体数を調べる。攻撃の間隔と計画はより特効性の製剤の場合は変更される。

持続性の効能は、幾何平均による少なくとも 90 %の有効率で裏付けられるべきである。

13 －４　駆虫剤の有効性評価基準：山羊ガイドライン（VICH GL14）

（１）はじめに

山羊についての本ガイドラインは、VICH 駆虫剤ガイドライン作業部会が作成した。本ガイドラインは、駆虫剤の有効性を証明する中心的データに関して全般的な見地から作成された「13 －１　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン」（VICH　GL7。以下「一般ガイドライン」という。）と合わせて読むべきである。この文書は、両方の文書の読者が読み比べ易いように一般ガイドラインと同様の構成にしてある。

本ガイドラインは、一般ガイドラインを補足するものであり、ａ）一般ガイドラインでは考察しなかった山羊に特有な幾つかの問題を詳しく述べ、ｂ）有効性データの要件における一般ガイドラインとの違いを明らかにし、ｃ）一般ガイドラインとの違いを説明することが目的である。

試験を行う上での技術的方法は、このガイドラインの目的ではないことに注意することも重要である。試験依頼者は、関連する方法について詳細に記述された他の公表資料、例えば WAAVP Second Edition of Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelimintics in Ruminants （Bovine, Ovine,Caprine）, Veterinary Parasitology 58：181-213,1995 を参照することを勧める。

山羊は、希少動物種であるので、完全な駆虫剤開発計画に従った場合に要する開発資金が、山羊用駆虫剤の開発を阻害している。山羊の寄生虫種は、羊と同一でもあるので、承認を得るための試験計画の簡略化を考慮することを推奨する。

（２）一般的事項

ア　有効性データの評価

厳密試験は、一般に反芻動物では信頼性があるとは考えられないので、成虫／幼虫の虫体数に基づく対照を置いた試験だけが用量決定試験及び用量確認試験として認められる。虫卵測定／幼虫の同定は、野外有効性試験での有効性評価のために推奨される方法である。長時間作用製剤又は徐放製剤は、他の治療用駆虫剤と同じ評価手順に従う。寄生虫感染の十分さは、地域的な流行あるいは歴史的及び（又は）統計的データに応じて試験設計書の中に定義しておく。

イ　自然又は人工感染の使用

用量決定試験は、一般に実験室株又は最近野外から分離した株による人工感染を用いて実施すべきである。感染モデルが存在しない寄生虫（*Protostorongylidea*、条虫類、*Dicrocoelium* spp.）の場合には、人工感染の代わりに自然感染を用いるのがよい。

用量確認試験は、自然感染動物を用いるべきであるが、人工感染又は自然感染動物に既に感染している寄生虫に干渉しない寄生虫を更に人工感染させて実施することもできる。この方法は広範囲の寄生虫に対して許可される。四期子虫に対する効能は人工感染で行う。発育休止期の幼虫に対する効能には、自然感染を用いる。試験依頼者は、試験動物において対象とする特定の

寄生虫種の発育休止期の幼虫が最大限に蓄積する時期を狙うべきである。これは地方又は地域によって異なるであろう。各地域での特徴の詳細については、ケースバイケースに専門家から情報を入手する。動物は、いずれの場合にも（再感染を避けるために）治療前少なくとも２週間は舎飼いする必要がある。

持続効果試験は、最近野外から分離した株の人工感染を用いる。

人工感染試験に使用した寄生虫の経歴を最終報告書に含む。

ウ　人工感染に推奨される感染型寄生虫の数

用いる寄生虫数は、大まかなものであり、使用する分離株によっても異なってくる。感染に使用した幼虫の最終的な数を最終報告書に含まなくてはならない。感染モデルが存在する寄生虫種について、表１に推奨される数を示す。

表１　駆虫剤評価のために山羊に十分な感染を起こさせる感染期虫体数

寄生虫虫卵、	虫体数
第四胃	
Haemonchus contortus	400 － 4,000
Teladorsagia circumcincta	6,000 － 10,000
Trichostrongylus axei	3,000 － 6,000
腸	
Cooperia curticei	3,000 － 6,000
T. colubriformis & *T. vitrinus*	3,000 － 6,000
Nematodirus spp.	3,000 － 6,000
Oesophagostomum spp.	500 － 1,000
Chabertia ovina	800 － 1,000
Bunostomum trigonocephalum	500 － 1,000
Strongyloides papillosus	80,000
Gaigeria pachyscelis	400
Trichuris spp.	1,000
肺	
Dictyocaulus filaria	1,000 － 2,000
肝	
Fasciola　hepatica（メタセルカリア）	100 － 200（慢性） 1,000 － 1,500（急性）

エ　有効性の計算についての勧告

（ア）効能を認める基準

効能を認めるためには、以下の中心的データが含まれる必要がある。

①　少なくとも６頭の十分に感染した非治療動物（対照群）と６頭の十分に感染した治療動物（治療群）をそれぞれ使用した２回の用量確認

試験；

② 治療動物と対照動物の虫体数の差が統計的に有意（$p<0.05$）であること。

③ 変換（幾何平均）データを用いて算出した有効率が 90 %以上であること；

④ 試験に用いた動物の感染が歴史的及び寄生虫学的及び（又は）統計的基準に基づいて十分と考えられること。

有効性の基準（90 %以上）は、宿主動物から取り出した寄生虫数から計算する。しかし、胃腸内寄生虫の流行により牧場の汚染を予防する目的で駆虫剤を用いる場合は、より高い有効性基準を用いてもよい。試験依頼者は、試験開始前に規制当局と相談すべきである。

（イ）動物数（用量決定、用量確認及び持続性試験）

各実験群に必要な最少動物数は、重要な点である。動物数は、適切な統計的解析法によって統計的にデータを処理できる可能性にもよるが、ハーモナイゼーションを達成するために、各実験群に少なくとも６頭の動物を含めることを最低条件とする。

対照群に十分に感染した動物を６頭含んでいない幾つかの試験がある場合（例えば、重要な希少寄生虫）に、それらの試験で得られた成績を 12 頭分集めてプールし、統計的有意性を計算してもよい。差が有意であれば（$p<0.05$）、有効率が計算でき、感染が十分であると思われれば、効能が認められることがある。集団の成績を適切かつ意味のある推定と認めるためには、試験を行った実験室間の採材手技及び虫体数の評価を同じようにしておかねばならない。

（ウ）感染の十分さ

最少限の十分な数について、最終報告書を提出するときに統計的及び歴史的データ、文献検索あるいは専門家の証言に基づいて判断すべきであろう。効能を認めるのに十分と考えられている山羊の蠕虫（成虫）数の範囲は種によって異なる。一般に十分と考えられる線虫の最少平均虫体数は 100 である。*Bunostomum* spp.、*Oesophagostomum* spp.、*Trichuris* spp.、*Gaigeria pachyscelis* 及び *Dictyocaulus filaria* についてはもっと少数でもよいと考えられる。*Fasciola* sp..については、平均 20 の成虫で十分と考えられる。

（エ）効能表示

成虫の効能を取得するには、一般原則として、感染後 21 ～ 25 日未満で投薬すべきではなく、ほとんどの種は 28 ～ 32 日が最適である。主な例外は *Oesophagostomum* spp.（28 ～ 41 日）、*Bunostomum* spp.（52 ～ 56 日）、*Strongylodes papillosus*（14 ～ 16 日）及び *Fasciola* spp.（８～ 12 週）である。

L4 の効能を取得するには、一般原則として、感染後以下の日数で治療を行うべきである；*Strongyloides papillosus*（３～４日）、*Haemonchus* spp と *Trichostrongylus* spp と *Cooperia* spp.（５～６日）、*T.（O.）circumcincta*

（７日）、*Nematodirus* spp.と *D. filaria*（８～ 10 日）、*Oesophagostomu*m spp.（15 ～ 17 日）。未成熟という表示は認められない。*Fasciola* spp.においては、初期幼虫（１～４週）、後期幼虫（６～８週）とすべきである。

オ　治療法

製品の投与方法（経口、非経口、外用、徐放など）、処方及び活性の強さが試験計画を設計する上で重要である。外用剤の有効性については、天候や動物相互の関係を考慮することが望ましい。徐放剤については、例えば提案する治療期間の全ての時点で血中濃度が安定状態にあるというような情報が加わることで検査が不要であることが示されない限り、提案する有効期間の全体にわたって検査をすべきである。

治療経路。飲水中又はプレミックスに添加して投与される薬剤は、できる限り、表示どおりに行う。メディケーテッドプレミックスには嗜好性試験が必要な場合がある。薬剤を添加した水又は飼料から試料を採取して、薬剤濃度を確認する。各動物に投与した薬剤添加飲水または飼料の量を記録して、治療が表示どおりに行われていることを確認する。外用する製剤については、有効性の評価に天候（降雨、紫外線）及び被毛の長さの影響を含む。

カ　動物の選別、割り付け及び取扱い

試験動物は臨床的に健康で、効能を主張しようとする動物の年齢、性別及び類別を代表するものにすべきである。一般に動物は、３か月齢以上の反芻をしている山羊にする。動物は、無差別に各治療群に割り付ける。体重、性別、年齢及び（又は）寄生虫ばく露によるブロック化は、繰り返し試験においてばらつきを減らすのに役立つかもしれない。糞便中の虫卵／幼虫数も実験動物の割り付けに適当な方法である。

人工感染の場合には、蠕虫未感染の動物を用いることを推奨する。蠕虫がいない環境で飼育された動物でない場合には、化学的に試験製剤と相互関係のない既承認の駆虫剤で感染寄生虫を駆除し、糞便検査を行ってその動物に蠕虫がいないことを確認する。

畜舎、餌及び飼育は動物福祉に従うべきであり、動物は、各国の衛生基準に従ってワクチンを接種する必要がある。この情報は、最終報告書に記載する。少なくとも７日の順化期間をとることが勧められる。畜舎と飼料－水は、各地域に応じて適切なものにすべきである。動物は、毎日観察して副作用を明らかにする。

（３）特定の評価試験

ア　用量決定試験

選択された用量が山羊で有効かどうかについて、用量決定試験及び（又は）適切な場合に羊と山羊の比較薬物動態試験により証明される必要がある。

イ　用量確認試験

用量確認試験は、各試験で少なくとも用量限定蠕虫と用量限定時期において行う必要がある。試験した寄生虫について有効である場合には、羊で有効性の見られた全ての蠕虫種について有効とすることが可能である。

ウ　野外有効性試験

動物種に特異的な事柄なし。

エ　持続有効性試験

持続有効性の効能を調べるために、二つの基本的試験設計が使用されている。一つは単回攻撃を用いるものであり、他方は治療後に毎日、複数回の攻撃を行うものである。両方の方法のための標準化されたプロトコールは開発されていない。試験を行う場合、プロトコールの詳細を以下のような事柄の間に含む。: 試験期間中の子虫の生存、子虫攻撃の根拠、と殺時点の正当性。寄生虫に未感染の山羊はこれらの試験に推奨される。試験のデザインは自然状態に最も近い複数回投与を推奨する。

持続性の効能を取得する最低限の要件は（それぞれの期間及び寄生虫について)、それぞれに非治療群と一つ以上の治療群を含む２回の試験（虫体数による）を行うことである。治療群には十分感染している動物が少なくとも６頭含まれているべきである。持続性の効能は、種ごとにしか認められない。

複数回攻撃法を用いる場合、各動物群に投薬し、その後７、14、21 日又はそれ以上にわたって毎日、自然又は人工的に攻撃にばく露し、最後（又はそれ以前の）の攻撃から約３週間後に動物の虫体数を調べる。攻撃の間隔と計画はより特効性の製剤の場合は変更される。

持続性の効能は、幾何平均による少なくとも 90 %の有効率で裏付けられるべきである。

13 －５　駆虫剤の有効性評価基準：馬ガイドライン（VICH GL15）

（１）はじめに

馬についての本ガイドラインは、VICH 駆虫剤ガイドライン作業部会が作成した。このガイドラインは、駆虫剤の有効性を証明する中心的データに関して全般的な見地から作成された「13 －１　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン」（VICH　GL7。以下「一般ガイドライン」という。）と合わせて読むべきである。この文書は、両方の文書の読者が読み比べ易いように一般ガイドラインと同様の構成にしてある。

本ガイドラインは一般ガイドラインを補足するものであり、ａ）一般ガイドラインでは考察しなかった馬に特有な幾つかの問題を詳しく述べ、ｂ）有効性データの要件における一般ガイドラインとの違いを明らかにし、ｃ）一般ガイドラインとの違いを説明することが目的である。

試験を行う上での技術的方法は、このガイドラインの目的ではないことに注意することも重要である。試験依頼者は、関連のある方法について詳細に記述された他の公表資料、例えば WAAVP Guidelines for Evaluating the Efficacy of Equine Anthelimintics，Veterinary Parasitology 30:57-72, 1988 を参照することを勧める。

（２）一般的事項

ア　有効性データの評価

用量決定と用量確認試験には、対照をおいた試験が推奨される。厳密試験も、確かな成熟大線虫、例えば *Parascaris　equorum* や *Oxyuris　equi* では用いることができる。長時間作用形製剤や徐放製剤は、他の治療用駆虫剤と同様の評価手順に従う。寄生虫感染の十分さは、地域的な流行あるいは歴史的及び（又は）統計的データに応じて試験設定書の中に定義しておく。

Strongyloides　westeri の場合には、虫卵数に基づいて有効性データの評価をしてよい（少なくとも２回の野外試験において）。その理由は *S.　westeri* が主として幼若動物に観察され、この時期にはその他の蠕虫感染が非常に稀であり、虫卵が他の蠕虫種のそれと容易に鑑別できるからである。

イ　自然又は人工感染の使用

寄生虫のいない馬に人工感染をすることが困難なために、大多数の馬の試験は自然感染動物で実施してよい。用量決定試験は、一般に実験室株又は最近野外から分離した株による人工感染又は自然感染を用いて実施すべきである。

広範囲の寄生虫の成虫期に対する用量確認試験は、自然感染動物に前感染寄生虫と干渉しない最近野外から分離した株を人工的に重感染させて行うことができる。最近野外から分離した株による人工感染試験も可能である。発育期子虫（例えば４期幼虫）に対する効能には、最近の野外分離株による人工感染を用いる。発育休止幼虫（小円虫の３期初期幼虫）に対する効能には、自然感染のみを用いる。これらの場合には、再感染を避けるために、治療前少なくとも２週間は舎飼いする必要がある。

発育休止幼虫の数を決定するために、大腸の粘膜の消化（digestion）は必要であり、粘膜内の発育幼虫（小円虫の３期後期／４期幼虫）の数は、消化及びトランスイルミネーション技術により調査する。

持続効果試験は、最近野外から分離した株の人工感染を用いて、若い動物（例えば、12 か月齢より若い馬）で実施する。人工感染試験に使用した寄生虫の経歴を最終報告書に含む。

ウ　人工感染に推奨される感染型寄生虫の数

馬に人工感染を用いることは少なく（前述）、投与する感染幼虫数についてのデータは限られている。投与が推奨される感染幼虫／虫卵数を以下に示す。

寄生虫	虫卵、虫体数
Parascaris equorum	100 - 500
Trichostrongylus axei	10,000 - 50,000
Strongylus vulgaris	500 - 750
Small strongyles（*Cyanostomes*）	100,000 - 1,000,000

エ　有効性の計算についての勧告

（ア）効能を認める基準

効能を認めるためには以下の中心的データが含まれる必要がある。

①　少なくとも６頭の十分に感染した非治療動物（対照群）と６頭の十分に感染した治療動物（治療群）をそれぞれ使用した２回の用量確認試験；厳密試験を用いる場合には、各試験に６頭を使用し、これを対照及び試験動物とする。

②　治療動物と対照動物の虫体数の差が統計的に有意（$p<0.05$）であること。

③　変換（幾何平均）データを用いて算出した有効率が 90 %以上であること；

④　試験に用いた動物の感染が歴史的及び寄生虫学的及び（又は）統計的基準に基づいて十分と考えられること。

（イ）動物数（用量決定、用量確認及び持続性試験）

各実験群に必要な最少動物数は重要な点である。動物数は適切な統計的解析法によって統計的にデータを処理できる可能性によるが、ハーモナイゼーションを達成するために、各実験群に少なくとも６頭の動物を含めることを最低条件とする。

対照群に十分に感染した動物を６頭含んでいない幾つかの試験がある場合（例えば、重要な希少寄生虫）に、それらの試験で得られた成績を 12 頭分集めてプールし、統計的有意性を計算してもよい。差が有意であれば（$p<0.05$）、有意率が計算でき、感染が十分であると思われれば、効能が認められることがある。集団の成績を適切かつ意味のある推定と認めるためには、試験を行った実験室間の採材手技及び虫体数の評価を同じようにしておかねばならない。

（ウ）感染の十分さ

最少限の十分な数について、最終報告書を提出するときに統計的及び歴史的データ、文献検索あるいは専門家の証言に基づいて判断すべきであろう。効能を認めるのに十分と考えられている馬の蠕虫（成虫）数の範囲は種によって異なる。一般に十分と考えられる線虫の最小平均虫体数は 100 である。*Parascaris equorum*、*Dictyocaulus* spp.及び *Fasciola* spp.についてはもっと少数でもよいと考えられる。

（エ）効能表示

成虫又は３期／４期幼虫：「未成熟虫」という用語で表示することは、認められない。成虫と幼虫の効能を取得するには、効能の対象になる種に適当な生活環の時期に対応して治療を行うべきである。小円虫の場合には、（発育休止）３期初期幼虫、（発育）粘膜内４期幼虫、第一胃内４期幼虫と成虫の間が区別されなくてはならない。

寄生虫の識別は、表示したい効能のタイプにより決定する。原則として、種毎に効能を取得する必要がある。小円虫においては、この属に二つ以上の種があり、試験は混合幼虫集団について実施されたという一般的前提の下に、属に対する効能でもよい。

オ　治療法

製品の投与方法（経口、非経口、外用、徐放など）、処方及び活性の強さが試験計画を設計する上で重要である。外用剤の有効性については、天候や動物相互の関係を考慮することが望ましい。徐放剤については、例えば提案された治療期間の全ての時点で血中濃度が安定状態にあるというような情報が加わることで検査が不要であることが示唆されない限り、提案される有効期間の全体にわたって検査をすべきである。

飲水中又はプレミックスに添加して投与される薬剤は、できる限り、表示どおりに行う。メディケーテッドフィードには嗜好性試験が必要な場合がある。薬剤を添加した水又は飼料から試料を採取して、薬剤濃度を確認する。各動物に投与した薬剤添加飲水又は飼料の量を記録して、治療が表示どおりに行われていることを確認する。外用する製剤については、有効性の評価に天候（降雨、紫外線）及び被毛の長さの影響を含む。

カ　動物の選別、割り付け及び取扱い

試験動物は臨床的に健康で、効能を主張しようとする動物の年齢、性別及び類別を代表するものにすべきである。一般に、人工感染を用いる時には、既存の感染を除去するために隔離することができないので、寄生虫がいない場合が多い３～ 12 か月齢の動物にする。自然感染動物の場合には、12 ～ 24 か月齢が望ましく（*Strongylus　westeri* を除く）、虫体数の個体差を減らすために、同じ感染牧野に少なくとも５か月以上一緒に放牧することが勧められる。動物は無差別に各治療群に割り付ける。体重、性別、年齢及び（又は）寄生虫ばく露によるブロック化は、繰り返し試験においてばらつきを減らすのに役立つかもしれない。糞便中の虫卵／幼虫数も実験動物の割り付けに適

当な方法である。畜舎、餌及び飼育は動物福祉に従うべきであり、動物は各国の衛生基準に従ってワクチンを接種する必要がある。この情報は最終報告書に記載する。少なくとも７日の順化期間をとることが勧められる。畜舎と飼料－水は各地域に応じて適切なものにすべきである。動物は毎日観察して副作用を明らかにする。

（３）各種評価試験

ア　用量決定試験

動物種に特異的な事項なし。

イ　用量確認試験

用量確認試験はそれぞれの効能を裏付ける必要がある。: 成虫、幼虫及び、それが当てはまるなら、発育休止期の幼虫について。さらなる詳細は、EAGR を参照すること。

ウ　野外有効性試験

動物種に特異的な事項なし。

エ　持続有効性試験

この効能における有効性は、糞便中の１ g 中虫卵数ではなく、実際に虫体数を計数した場合にのみ明らかにされる。

持続性の効能を取得する最少限の要件は（それぞれの期間及び寄生虫について)、それぞれ非治療群と一つ又はそれ以上の治療群を含む（虫体数による）２回の試験を行うことである。対照群（同年齢）には十分感染している動物が少なくとも６頭含まれているべきである。持続有効性の効能は種ごとにしか認められないが、小円虫の場合には属ごとでもよい。

持続有効性の効能を調べるために、二つの基本的試験設計が使用される。一つは治療後に単回攻撃をもちいるものであり、他方は治療後に毎日、複数日の攻撃を行うものである。結果の解釈の一貫性のために、標準の試験デザインは、自然の状態に最も近い複数攻撃を推奨する。

複数回攻撃法を用いる場合、各動物群に投薬し、その後７、14、21 日又はそれ以上にわたって毎日、自然又は人工的攻撃にばく露し、最後（又はそれ以前）の攻撃から約３週間後に動物の虫体数を調べる。

持続性の効能は幾何平均による少なくとも 90 %の有効率で裏付けられるべきである。

オ　虫卵再発現期間（ERP）試験

ERP は、円虫にのみ用いる。ERP は、放牧地汚染の管理の手段であり、各動物の円虫負荷の測定に用いることを意図していない。放牧地の汚染管理において、群飼育に焦点を合わせた馬円虫管理のための新手法である。治療後の確実な期間虫卵を抑制する効能は、治療動物において治療前の虫卵数と比較して少なくとも 90 %抑制されている場合のみに十分といえる。これらの試験で、動物は感染牧野に留める。ERP を調べるために、少なくとも２回の試験が必要である。２回の試験のうち少なくとも１回は登録される適用地においてなされるべきである。これらの試験は、承認が予定される地域の

種々の条件を十分に反映して実施する。

13 －６　駆虫剤の有効性評価基準：豚ガイドライン（VICH GL16）

（１）はじめに

豚についてのこれらのガイドラインは VICH 駆虫剤ガイドライン作業部会が作成した。このガイドラインは、駆虫剤の有効性を証明する中心的データのために全般的な見地から作成した「13 －１　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン」（VICH　GL7。以下「一般ガイドライン」という。）と合わせて読むべきである。この文書は両方の文書の読者が読み比べ易いように一般ガイドラインと同様の構成にしてある。

本ガイドラインは一般ガイドラインを補足するものであり、ａ）一般ガイドラインでは考察しなかった豚に特有な幾つかの問題を詳しく述べ、ｂ）有効性データの要件における一般ガイドラインとの違いを明らかにし、ｃ）一般的ガイドラインとの違いを説明することが目的である。

試験を行う上での技術的方法は、このガイドラインの目的ではないことに注意することも重要である。試験依頼者は、関連ある方法について詳細に記述された他の公表された資料、例えば WAAVP Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelimintics in Swine, Veterinary Parasitology 21:69-82,1986 を参照することを勧める。

（２）一般的事項

ア　有効性データの評価

用量決定試験及び用量確認試験には､対照を置いた試験だけが認められる。厳密試験は一般に豚では信頼性があるとは考えられない。

長時間作用形製剤又は徐放製剤は、他の治療用駆虫剤と同じ評価手順に従う。寄生虫感染の十分さは、地域的な流行あるいは歴史的及び（又は）統計的データに応じて試験設計書の中に定義しておく。

イ　自然又は人工感染の使用

用量決定試験は、一般に実験室株又は最近野外から分離した株による人工感染を用いて実施すべきである。

用量確認試験は、自然感染動物を用いるべきである。最近野外から分離した株による人工感染を用いた試験も可能であり、自然感染動物に既に感染している寄生虫に干渉しない寄生虫を重感染させて実施してもよい。この方法は広範囲の寄生虫に対して許可される。

持続効果試験は、最近野外から分離した株の人工感染を用いる。

人工感染試験に使用した寄生虫の経歴を最終報告書に含む。

ウ　人工感染に推奨される感染型寄生虫の数

用いる寄生虫数は大まかであり､使用する分離株によっても異なってくる。感染に使用した幼虫又は虫卵の最終的な数を最終報告書に含まなくてはならない。表１に推奨される数を示す。

表１　駆虫剤評価のために豚に十分な感染を起こさせる３期幼虫又は虫卵の数

寄生虫	虫卵、虫体数
胃	

Ascarops strongylina	200
Hystrongylus rubidus	1,000 - 4,000
Physocephalus sexalatus	500
腸	
Ascaris suum *	250 - 2,500
Oesophagostomum spp.	2,000 - 15,000
Strongyloides ransomi	1,500 - 5,000
Trichuris suis	1,000 - 5,000
肺	
Metastrongylus spp.	1,000 - 2,500
腎	
Stephanurus dentanus	1,000 - 2,000

* 成虫の感染を増やすために、少数の虫卵を少しずつ感染させる。

エ 有効性の計算のための勧告

（ア）効能を認める基準

効能を認めるためには、以下の中心的データが含まれる必要がある。

① 少なくとも６頭の十分に感染した非投薬動物（対照群）と６頭の十分に感染した投薬動物（治療群）をそれぞれ使用した２回の用量確認試験；

② 治療動物と対照動物の虫体数の差が統計的に有意（$p<0.05$）であること。

③ 変換（幾何平均）データを用いて算出した有効率が 90 %以上であること；

④ 試験に用いた動物の感染が歴史的及び寄生虫学的及び（又は）統計的基準に基づいて十分と考えられること。

（イ）動物数（用量決定、用量確認及び持続性試験）

各実験群に必要な最少動物数は重要な点である。動物数は適切な統計的解析法によって統計的にデータを処理できる可能性によるが、ハーモナイゼーションを達成するために、各実験群に少なくとも６頭の動物を含めることを最低条件とする。

対照群に十分に感染した動物を６頭含んでいない幾つかの試験がある場合（例えば、重要な希少寄生虫）に、それらの試験で得られた成績を 12 頭分集めてプールし、統計的有意性を計算してもよい。差が有意であれば（$p<0.05$）、有効率が計算でき、感染が十分であると思われれば、効能が認められることがある。集団の成績を適切かつ意味のある推定と認めるためには、試験を行った実験室間の採材手技及び虫体数の推定を同じようにしておかねばならない。

（ウ）感染の十分さ

最少限の十分な数について、最終報告書を提出するときに統計的及び歴史的データ、文献検索あるいは専門家の証言に基づいて判断すべきであろ

う。効能を認めるのに十分と考えられている豚の寄生虫（成虫）の範囲は種によって異なる。一般に十分と考えられる線虫の最少平均虫体数は 100 である。*Ascaris suum*、*Ascarops strongylina*、*Physocephalus sexalatus*、*Stephanurus dentatus*、 *Metastrongylus* spp.及び *Fasciola* spp.はより少数でもよいと考えられる。

（エ）効能表示

未成熟虫という用語で表示することは認められない。成虫の効能を取得するには、一般原則として、*Ascarops strongylina* は 35 日未満、*Hyostrongylus rubidus* は 26 日未満、*Physocephalus sexalatus* は 55 日未満、*Ascaris suu*m は 65 日未満、*Strongyloides ransomi* は 10 日未満、*Oesophagostomum dentatum* と *Oesophagostomum quadrisponulatum* は 28 ～ 45 日未満、*Trichuris suis* は 50 日未満、*Metastrongylus* spp.は 35 日未満、*Stephanurus dentatus* は 10 か月未満で治療を行ってはならない。

４期幼虫の効能を取得するには、一般原則として、感染後７～９日に治療を行うべきであるが、例外として *S. ransomi* は３～４日、 *A. suum* は 11 ～ 15 日、*T. suis* は 16 ～ 20 日に治療を行う。

S. ransomi 移行幼虫の経乳垂直伝播に対する効能を取得するには、自然又は人工感染妊娠豚を分娩前の様々な時点で治療し、乳汁中の幼虫数と産まれた子豚の小腸内虫体数を数えて有効性を調べる。

オ　治療法

投与方法（経口、非経口など）、処方及び活性の強さが試験計画を設計する上で重要である。徐放剤については、例えば提案された治療期間の全ての時点で血中濃度が安定状態にあるというような情報が加わることで検査が不要であることが示されない限り、提案される有効期間の全体にわたって検査をすべきである。

飲水中又はプレミックスに添加して投与しようとる薬剤は、できる限り、表示どおりに行う。メディケーテッドフィードには嗜好性試験が必要な場合がある。薬剤を添加した水又は飼料から試料を採取して、薬剤濃度を確認する。各動物に与えた薬剤添加飲水又は飼料の量を記録して、治療が表示に合っていることを確認する。

カ　動物の選別、割り付け及び取扱い

試験動物は臨床的に健康で、効能を主張しようとする動物の年齢、性別及び類別を代表するものにすべきである。一般に、動物は２～６か月齢を用いる。動物は無差別に各治療群に割り付ける。体重、性別、年齢及び（又は）寄生虫ばく露によるブロック化は、繰り返し試験においてばらつきを減らすのに役立つかもしれない。糞便中の虫卵／幼虫数も実験動物の割り付けに適当な方法である。

人工感染の場合には、蠕虫未感染の動物を用いることを推奨する。蠕虫がいない環境で飼育された動物でない場合には、科学的に試験製剤と相互関係のない既承認の駆虫剤で感染寄生虫を駆除し、糞便検査を行ってその動物に

蠕虫がいないことを確認する。

畜舎、餌及び飼育は動物福祉に従うべきであり、動物は各国の衛生基準に従ってワクチンを接種する必要がある。この情報は最終報告書に記載する。少なくとも７日の順化期間をとることが勧められる。畜舎と飼料－水は各地域に応じて適切なものにすべきである。動物は毎日観察して副作用を明らかにする。

（３）各種評価試験

ア　用量決定試験

動物種に特異的な事柄なし。

イ　用量確認試験

用量確認試験はそれぞれの効能を裏付ける必要がある。: 成虫及び幼虫について。さらなる詳細は、EAGR を参照すること。

ウ　野外有効性試験

動物種に特異的な事柄なし。

エ　持続有効性試験

持続有効性の効能を調べるために、二つの基本的試験設計が使用されている。一つは治療後に単回攻撃を用いるものであり、他方は治療後に毎日、複数日の攻撃を行うものである。結果の解釈の一貫性のために、標準の試験デザインは、自然の状態に最も近い複数攻撃を推奨する。

持続性の効能を取得する最少限の要件は（それぞれの期間及び寄生虫について)、それぞれ非治療群と一つ又はそれ以上の治療群を含む（虫体数による）２回の試験を行うことである。対照群には十分感染している動物が少なくとも６頭含まれているべきである。持続性の効能は種ごとにしか認められない。

複数回攻撃法を用いる場合、各動物群に投薬し、その後７、14、21 日又はそれ以上にわたって毎日、自然又は人工的攻撃にばく露し、最後（又はそれ以前）の攻撃から約３週間後に動物の虫体数を調べる。

持続性の効能は幾何平均による少なくとも 90 %の有効率で裏付けられるべきである。

13 － 7　駆虫剤の有効性評価基準：犬ガイドライン（VICH GL19）

（1）はじめに

犬についての本ガイドラインは、VICH 駆虫剤ガイドライン作業部会が作成した。本ガイドラインは、駆虫剤の有効性を証明する中心的データのために全般的な見地から作成した「13 － 1　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン」（VICH　GL7。以下「一般ガイドライン」という。）と合わせて読むべきである。この文書は、両方の文書の読者が読み比べ易いように一般ガイドラインと同様の構成にしてある。

本ガイドラインは、一般ガイドラインを補足するものであり、ａ）一般ガイドラインでは考察しなかった犬に特有な幾つかの問題を詳しく述べ、ｂ）有効性データの要件における一般ガイドラインとの違いを明らかにし、ｃ）一般ガイドラインとの違いを説明することが目的である。

試験を行う上での技術的方法は、このガイドラインの目的ではないことに注意することも重要である。試験依頼者は、関連のある方法について詳細に記述された他の公表資料、例えば WAAVP Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelimintics for dogs and cats，Veterinary Parasitology 52:179-202,1994 を参照することを勧める。

（2）一般的事項

ア　有効性データの評価

有効性データの評価は、用量決定試験及び用量確認試験では虫体数（成虫、幼虫）に基づいて行い、野外試験での有効性評価のためには虫卵数／幼虫同定が望ましい方法である。

対照を置いた試験が、駆虫剤の評価に最も広く認められている試験手順である。しかし、一部の腸内寄生虫、例えば ascarids には厳密試験も適当かもしれない。十分な寄生虫感染は、地域的な流行あるいは歴史的及び（又は）統計的データに応じて試験設計書の中に定義しておく。

イ　自然又は人工感染の使用

用量決定試験は、一般に実験室株又は最近野外から分離した株による人工感染を用いて実施する。

用量確認試験は、自然又は人工感染動物を用いるべきであるが、少なくとも一つの試験は、表示する効能ごとに自然感染動物で実施すべきである。*Echinococcus* spp. と *Dirofilaria* spp.の試験は、エヒノコッカス症の公衆衛生上の配慮及び犬糸状虫の効能の複雑さのために、人工感染動物を用いて実施してよい。*Echinococcus* spp.が動物寄生虫上重要であることより、この感染試験は高度なバイオセキュリティー施設で行うことが必要である。

以下の寄生虫も、十分な数の感染動物の入手が困難なので、人工感染が製品の有効性を明らかにする唯一の方法かもしれない。: *Filaroides milksi*、*F. hirthi*、*Dicrtophyma renale*、*Capillaria aerophila*、*C. plica*、*Spirocerca lupi*、*Physaloptera* spp.、*Mesocestoides* spp.及び *Crenosoma vulpis*。幼虫期の試験は、人工感染のみで行ってよい。

人工感染試験に使用した寄生虫の経歴を、最終報告書に含む。

ウ　人工感染に推奨される感染型寄生虫の数

用いる寄生虫数は、大まかなものであり、使用する分離株によっても異なってくる。感染に使用した幼虫の最終的な数を最終報告書に含まなくてはならない。表１に推奨される数を示す。

表１　駆虫剤評価のために犬に十分な感染を起こさせる感染期虫体数

寄生虫	範囲
小腸	
Toxocara canis	100 － 500 *
Toxoscaris leonina	200 － 3,000
Ancylostoma caninum	100 － 300
Ancylostoma buraziliense	100 － 300
Uncinaria stenocephala	1,000 － 1,500
Strongyloides stercolaris	1,000 － 5,000
Echinococcus granulosus	20,000 － 40,000
Taenia spp.	5 － 15
大腸	
Trichuris vulpis	100 － 500
心臓	
Dirofilaria iimmitis	30 － 100 **

*　ほ乳犬又は 5 ヶ月齢以下の犬

**　成虫やミクロフィラリア試験のために、５－ 15 対の成虫を移植する。

エ　有効性の計算についての勧告

（ア）効能を認める基準

効能を認めるためには､以下の中心的データが含まれている必要がある。

①　少なくとも６頭の十分に感染した非投薬動物（対照群）と６頭の十分に感染した投薬動物（治療群）をそれぞれ使用した２回の用量確認試験；

②　治療動物と対照動物の虫体数の差が統計的に有意（$p<0.05$）であること。

③　変換（幾何平均）データを用いて算出した有効率が 90 %以上であること；*E. granulosus* と *D. immitis* は公衆動物の福祉と臨床の関連から、より高い有効性標準（すなわち 100 %と同等）が課される場合がある。製品を申請する地域の規制当局と相談すべきである。

④　試験に用いた動物の感染が歴史的及び寄生虫学的及び（又は）統計的基準に基づいて十分と考えられること。

⑤　寄生虫に対する有効性は、糞中又は血中の寄生虫構成要素の存否を求める試験で評価される。*Echinococcus* spp.は、公衆衛生の観点から、野外試験は不要である。

（イ）動物数（用量決定、用量確認及び持続性試験）

各実験群に必要な最少動物数は、重要な点である。動物数は、適切な統計的解析法によって統計的にデータを処理できる可能性によるが、ハーモナイゼーションを達成するために、各実験群に少なくとも６頭の動物を含めることを最低条件とする。

対照群に十分に感染した動物を６頭含んでいない幾つかの試験がある場合（例えば、重要な希少寄生虫）に、それらの試験で得られた成績を 12 頭分集めてプールし、統計的有意性を計算してもよい。差が有意であれば（$p<0.05$）、有効率が計算でき、感染が十分であると思われれば、効能が認められることがある。成績を集団に適切かつ意味のあるように外挿するためには、試験を行った実験室間の採材手技及び虫体数の推定を同じようにしておかねばならない。

（ウ）感染の十分さ

最小限の十分な寄生虫数に関しては、歴史的データ、文献検索又は専門家の証言に基づいて最後の報告書を提出するときに定義される。一般的に、猫における線虫の最小数は５から 20 で十分であると言われている。*A. caninum* と *U. stenocephala* では、より多く必要と考えられている。

（エ）効能表示

各寄生虫の発育期に対する有効性の表示には、それぞれ自然感染の場合はその段階、人工感染の場合には日齢を記載すべきである。表２に推奨される人工感染の治療時期について示す。

大多数の寄生虫は治療終了後剖検まで約７日で十分である。以下の寄生虫は例外である。:

- *Physaloptera* spp.、*S. lupi*、*C. plica*、*D. renale*、*E. granulosus*、*Taenia* spp.、*D. caninum*、*Mesocestodes* spp.：10-14 日
- *C. vulpis*:14 日
- *F. milksi*、*F. hirthi* ： 42 日
- *F. osleri* ：半数の動物は 14 日で、残りは 28 日
- *D. immitis* ： 試験デザインによる。

表２　-推奨される感染後の治療の期間

寄生虫	成虫期	発育期
S. stercoralis	5-9 日	
T. vulpis	84 日	
A. caninum	>21 日	6-8 日（L4）*
A. buraziliense	>21 日	6-8 日（L4）
U. stenocephala	>21 日	6-8 日（L4）
T. canis	49 日	3-5 日（L3/L4）及び 14-21 日（L4/L5）
T. leonina	70 日	35 日（L4）
D. immitis	180 日	2 日（L3）、20-40 日（L4） 70-120 日（L5）、220 日（ミクロフィラリア）
E. granulosus	>28 日	

Taenia spp.　　>35 日

*　移行幼虫のために、出産前２日以内に治療

注）L5: 5 期幼虫、L4: 4 期幼虫、L3: 3 期幼虫

T. canis 移行幼虫の経胎盤及び（又は）経乳垂直伝播に対する効能を取得するには、自然又は人工感染妊娠犬を分娩前の様々な時点で治療し、乳汁中の幼虫数と産まれた子犬の小腸内虫体数を数えて有効性を調べる。

オ　治療法

製品の投与方法（経口、非経口、外用など）、処方及び活性の強さが試験計画の設計に影響する。外用剤の有効性については、天候や動物間の関係を考慮することが望ましい。

経口投与剤では、嗜好性試験は製剤の有効性評価試験の場合には常に行われるべきである。外用する製剤については、有効性の評価に天候（降雨、紫外線）、入浴及び被毛の長さの影響を含む。

カ　動物の選別、割り付け及び取扱い

一般的には、約６か月齢の動物が有効性試験に適している。以下の場合は例外である。:

・*S. stercoralis*：６か月齢以下

・*A. caninum*、*A. braziliense*、*U. stenocephala*　：6-12 週齢

・*T. canis*、　*T. leonina*　：2-6 週齢

・*D. canimum*　：３か月齢又はそれ以上

・*Mesocestoides* spp.　：８週齢又はそれ以上

・*U. stenocephala*、*T. vulpis*　：より年取った犬も使用できる。

自然感染動物は、消化管内寄生虫については排泄虫卵又は排泄片節によって、また、*D.　immitis* については寄生虫学的及び（又は）免疫学的方法で選定する。これらを適切な方法を用いて各群に割り付け、繰り返しをすべきであり、その方法を最終報告書に記載する。繰り返しは、その製剤の有効性の最終的評価において影響するかもしれない要因をカバーするようにする。動物の収容、給餌及び管理は犬の福祉に関する厳しい要件に従って実施する。動物は、実験設備と担当者に少なくとも７日間順化させるべきである。動物は、毎日観察して副作用を明らかにする。

（３）特定の評価試験

ア　用量決定試験

動物種に特異的な事柄なし。

イ　用量確認試験

動物種に特異的な事柄なし。

ウ　野外有効性試験

野外（病院）試験は、原則として *Echinococcus*　spp.に感染した犬では行ってはいけない。

エ　持続有効性試験

犬において、寄生虫の生物学上の多様性やこれらの寄生虫に対する持続有

効性における経験の不足より、推奨される方法は記載しない。

13 －８　駆虫剤の有効性評価基準：猫ガイドライン（VICH GL20）

（１）はじめに

猫についての本ガイドラインは、VICH 駆虫剤ガイドライン作業部会が作成した。本ガイドラインは、駆虫剤の有効性を証明する中心的データのために全般的な見地から作成した「13 －１　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン」（VICH　GL7。以下「一般ガイドライン」という。）と合わせて読むべきである。この文書は、両方の文書の読者が読み比べ易いように一般ガイドラインと同様の構成にしてある。

本ガイドラインは、一般ガイドラインを補足するものであり、ａ）一般ガイドラインでは考察しなかった猫に特有な幾つかの問題を詳しく述べ、ｂ）有効性データの要件における一般ガイドラインとの違いを明らかにし、ｃ）一般ガイドラインとの違いを説明することが目的である。

試験を行う上での技術的方法は、このガイドラインの目的ではないことに注意することも重要である。試験依頼者は、関連する方法について詳細に記述された他の公表資料、例えばWAAVP Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelimintics for dogs and cats, Veterinary Parasitology 52：179-202, 1994 を参照することを勧める。

（２）一般的事項

ア　有効性データの評価

有効性データの評価は、用量決定試験及び用量確認試験では虫体数（成虫、幼虫）に基づいて行い、野外試験での有効性評価のためには虫卵数／幼虫同定が望ましい方法である。

対照を置いた試験が、駆虫剤の評価に最も広く認められている試験手順である。しかし、一部の腸内寄生虫、例えば ascarids には厳密試験も適当かもしれない。十分な寄生虫感染は、地域的な流行あるいは歴史的及び（又は）統計的データに応じて試験設計書の中に定義しておく。

イ　自然又は人工感染の使用

用量決定試験は、一般に実験室株又は最近野外から分離した株による人工感染を用いて実施する。

用量確認試験は、自然又は人工感染動物を用いる。一般に人工感染を用いる場合には、少なくとも一つの試験は、表示する効能ごとに、自然感染動物で実施すべきである。*Echinococcus multilocularis* と *Dirofilaria* sp.の試験は、エヒノコッカス症の公衆衛生上の配慮及び犬糸状虫の効能の複雑さのために、人工感染動物を用いて実施してよい。*Echinococcus multilocularis* が動物寄生虫上重要であることより、この感染試験は高度なバイオセキュリティー施設で行うことが必要である。

以下の寄生虫も、十分な数の感染の入手が困難なので、人工感染が製品の有効性を明らかにする唯一の方法かもしれない。：*Capillaria aerophila*、*Physaloptera* spp.及び *Crenosoma vulpis*。幼虫期の試験は人工感染のみで行ってよい。

人工感染試験に使用した寄生虫の経歴を、最終報告書に含む。

ウ　人工感染に推奨される感染型寄生虫の数

用いる寄生虫数は、大まかなものであり、使用する分離株によっても異なってくる。感染に使用した幼虫の最終的な数を最終報告書に含まなくてはならない。表１に推奨される数を示す。

表１　駆虫剤評価のために猫に十分な感染を起こさせる感染期虫体数

寄生虫	範囲
小腸	
Toxocara cati	100 － 500
Toxoscaris leonina	200 － 3,000
Ancylostoma tubaeforme	100 － 300
Ancylostoma buraziliense	100 － 300
Strongyloides stercolaris	1,000 － 5,000
Taenia taeniaeformis	5 － 15
大腸	
Trichris campanula	100 － 500
心臓	
Dirofilaria immitis	30 － 100*

*　成虫やミクロフィラリア試験のために、５－ 15 対の成虫を移植する。

エ　有効性の計算についての勧告

（ア）効能を認める基準

効能を認めるためには､以下の中心的データが含まれている必要がある。

①　少なくとも６頭の十分に感染した非投薬動物（対照群）と６頭の十分に感染した投薬動物（治療群）をそれぞれ使用した２回の用量確認試験；

②　治療動物と対照動物の虫体数の差が統計的に有意（$p<0.05$）であること。

③　変換（幾何平均）データを用いて算出した有効率が 90 ％以上であること；*Echinococcus multilocularis* と *D. immitis* 等幾つかの寄生虫には、公衆動物の福祉と臨床の関連から、より高い有効性標準（すなわち 100 ％と同等）が課される場合がある。製品を申請する地域の規制当局と相談すべきである。

④　試験に用いた動物の感染が歴史的及び寄生虫学的及び（又は）統計的基準に基づいて十分と考えられること。

⑤　寄生虫に対する有効性は、糞中又は血中での寄生虫構成部位の存否を明らかにする試験で評価する。*Echinococcus multilocularis* は、公衆衛生の観点から、野外試験は不要である。

（イ）動物数（用量決定、用量確認及び持続性試験）

各実験群に必要な最少動物数は、重要な点である。動物数は、適切な統計的解析法によって統計的にデータを処理できる可能性にもよるが、ハー

モナイゼーションを達成するために、各実験群に少なくとも６頭の動物を含めることを最低条件とする。

対照群に十分に感染した動物を６頭含んでいない幾つかの試験がある場合（例えば、重要な希少寄生虫）に、それらの試験で得られた成績を 12 頭分集めてプールし、統計的有意性を計算してもよい。差が有意であれば（$p<0.05$）、有効率が計算でき、感染が十分であると思われれば、効能が認められることがある。成績を集団に適切かつ意味のあるように外挿するためには、試験を行った実験室間の採材手技及び虫体数の推定を同じようにしておかねばならない。

（ウ）感染の十分さ

最小限の十分な寄生虫数に関しては、歴史的データ、文献検索又は専門家の証言に基づいて最後の報告書を提出するときに定義される。一般的に、猫における線虫の最小数は５から 20 で十分であると言われている。

A. tubaeforme では、より多く必要と考えられている。

（エ）効能表示

各寄生虫の発育期に対する有効性の表示にはそれぞれ自然感染の場合はその段階、人工感染の場合には日齢を記載すべきである。表２推奨される人工感染の治療時期について示す。

大多数の寄生虫は治療終了後剖検まで約７日で十分である。以下の寄生虫は例外である。:

- *Physaloptera* spp.、*C. aerophila*、*Echinococcus multilocularis*、*Taenia taeniaeformis*、*D. caninum*：10 ～ 14 日
- *C. vulpis*：14 日
- *D. immitis*：試験デザインによる。

表２　推奨される感染後の治療の期間

寄生虫	成虫期	発育期
S. stercoralis	5-9 日	
T. campanula	84 日	
A. tubaeforme	>21 日	6-8 日（L4）
A. buraziliense	>21 日	6-8 日（L4）
T. cati	60 日	3-5 日（L3 ／ L4）、28 日（L4 ／ L5）
T. reonina	70 日	35 日（L4）
D. immitis	180 日	2 日（L3）、20-40 日（L4） 70-120 日（L5）、220 日（ミクロフィラリア）
T.taeniaeformis	>35 日	

注）L5：５期幼虫、L4：４期幼虫、L3：３期幼虫

T. cati 移行幼虫の経乳垂直伝播に対する効能を取得するには、自然又は人工感染妊娠猫を分娩前の様々な時点で治療し、乳汁中の幼虫数と産まれた子猫の小腸内虫体数を数えて有効性を調べる。

オ　治療法

製品の投与方法（経口、非経口、外用など)、処方及び活性の強さが試験計画の設計に影響する。外用剤の有効性については、天候や動物間の関係を考慮することが望ましい。

経口投与剤では、嗜好性試験は製剤の有効性評価試験の場合には常に行われるべきである。外用する製剤については、有効性の評価に天候（降雨、紫外線)、入浴及び被毛の長さの影響を含む。

カ　動物の選別、割り付け及び取扱い

一般的には、約６か月齢の動物が対照を置いた試験に適しているが、より老いた又はより若い動物も用いることができる。以下の場合は例外である。：

・*S. stercoralis*：６か月齢以下
・*A. braziliense*、*A. tubaeforme*：６−16 週齢
・*T. cari*、*T. leonina*：４−16 週齢
・*D. canimum*：３か月齢又はそれ以上

自然感染動物は、消化管内寄生虫については排泄虫卵又は排泄片節によって、また、*D.　immitis* については寄生虫学的及び（又は）免疫学的方法で選定する。これらを適切な方法を用いて各群に割り付け、繰り返しをすべきであり、その方法を最終報告書に記載する。繰り返しは、その製剤の有効性の最終的評価において影響するかもしれない要因をカバーするようにする。動物の収容、給餌及び管理は猫の福祉に関する厳しい要件に従って実施する。動物は、実験設備と担当者に少なくとも７日間順化させるべきである。動物は、毎日観察して副作用を明らかにする。

（３）特定の評価試験

ア　用量決定試験

動物種に特異的な事柄なし。

イ　用量確認試験

動物種に特異的な事柄なし。

ウ　野外有効性試験

野外（病院）試験は、原則として *E.　multilocularis* と（*D.　immitis*）に感染した猫では行ってはいけない。

エ　持続有効性試験

猫において、寄生虫の生物学上の多様性やこれらの寄生虫に対する持続有効性における経験の不足より、推奨される方法は記載しない。

13 － 9　駆虫剤の有効性評価基準：鶏ガイドライン（VICH GL21）

（1）はじめに

鶏についての本ガイドラインは、VICH 駆虫剤ガイドライン作業部会が作成した。本ガイドラインは、駆虫剤の有効性を証明する中心的データのために全般的な見地から作成した「13 － 1　駆虫剤の有効性評価基準：一般ガイドライン」（VICH　GL7。以下「一般ガイドライン」という。）と合わせて読むべきである。この文書は、両方の文書の読者が読み比べ易いように一般ガイドラインと同様の構成にしてある。

本ガイドラインは、一般ガイドラインを補足するものであり、ａ）一般ガイドラインでは考察しなかった鶏に特有な幾つかの問題を詳しく述べ、ｂ）有効性データの要件における一般ガイドラインとの違いを明らかにし、ｃ）一般ガイドラインとの違いを説明することが目的である。しかし、技術的方法を記述するのは、このガイドラインの目的ではなく、適切な方法は現在まで報告されていないので幾つかの詳細のみ示す。

（2）一般的事項

ア　有効性データの評価

厳密試験は一般に鶏では信頼性があるとは考えられないので、成虫／幼虫の虫体数に基づく対照を置いた試験だけが用量決定試験及び用量確認試験として認められる。属の同定を伴う虫卵数測定は、野外有効性試験での有効性評価のために推奨される方法である。十分な寄生虫感染は、地域的な流行あるいは歴史的及び（又は）統計的データに応じて試験設計書の中に定義しておく。

イ　自然又は人工感染の使用

用量決定試験は、一般に実験室株又は最近野外から分離した株による人工感染を用いて実施すべきである。

用量確認試験は、自然感染動物に前感染寄生虫と干渉し合わない寄生虫を人工的に重感染させて実施してもよい。この方法は広範囲の寄生虫に対して可能であろう。また、１回の実験には、人工感染も認められる。幼虫期の試験は人工感染のみで行う。

人工感染試験に使用した寄生虫の経歴を最終報告書に含む。

ウ　人工感染に推奨される感染型寄生虫の数

表１に分離されるだろう虫卵と擬嚢尾虫（cysticercoids）の推奨される数を示した。感染に使用した擬嚢尾虫又は虫卵の最終的な数を最終報告書に含まなくてはならない。

表１　駆虫剤評価のために鶏に十分な感染を起こさせる感染期虫卵又は虫体数

寄生虫	虫卵、擬嚢尾虫体数
Ascaridia galli	200-500
Capillaria obsignata	100-300
Heterakis gallinarum	200-300
Raillitina cesticillus	50-100

Syngamus trachea　　200-600

鶏における人工感染の場合に考慮すべき 幾つかのファクター：

ａ）試験には、若い鶏を使用すべきである。

ｂ）最大限の感染を成立させるために、少数の感染期の虫体又は虫卵の使用が推奨される。

ｃ）ストレスは、寄生虫を感染させるのに必要ではない（例えば餌不足）。

ｄ）無用な感染を避ける住環境にする。

エ　有効性の計算についての勧告

（ア）効能を認める基準

効能を認めるためには､以下の中心的データが含まれている必要がある。

①　少なくとも６羽の十分に感染した非投薬動物（対照群）と６羽の十分に感染した投薬動物（治療群）をそれぞれ使用した２回の用量確認試験；

②　治療動物と対照動物の虫体数の差が統計的に有意（$p<0.05$）であること。

③　変換（幾何平均）データを用いて算出した有効率が 90 %以上であること；

④　試験に用いた動物の感染が歴史的及び寄生虫学的及び（又は）統計的基準に基づいて十分と考えられること。

（イ）動物数（用量決定、用量確認及び持続性試験）

各実験群に必要な最少動物数は、重要な点である。動物数は、適切な統計的解析法によって統計的にデータを処理できる可能性によるが、ハーモナイゼーションを達成するために、各実験群に少なくとも６羽の動物を含めることを最低条件とする。

（ウ）感染の十分さ

最少限の十分な数について、最終報告書を提出するときに統計的及び歴史的データ、文献検索あるいは専門家の証言に基づいて判断すべきであろう。効能を認めるのに十分と考えられている鶏の蠕虫（成虫）数の範囲は種によって異なる。一般に十分と考えられる *Ascaridia galli* 成虫の数は 20 匹である。*Heterakis gallinarum*、*Capillaria obsignata* 及び *Raillietina casticellus* では、より少数と考えられている。解剖は治療後 10 日以内に行う。

（エ）効能表示

成虫の効能を取得するには、一般原則として、感染後 28 日未満で投薬すべきではない。治療を開始する前に蠕虫の数と特徴を定めるために少なくとも６羽の確認鶏を含むことを推める。L4 の効能を取得するには、一般原則として、*A.galli* と *H. gallinarum* は感染後 16 日で、その他は感染後７日で治療を行う。

オ　治療法

製品の投与方法（経口、非経口、外用、徐放など)、処方及び活性の強さが試験計画の設計に影響する。

飲水中又はプレミックスに添加して投与しようとる薬剤は、できる限り、表示どおりに行うべきである。メディケーテッドプレミックスには嗜好性／消費試験が必要な場合がある。薬剤を添加した水又は飼料から試料を採取して、薬剤濃度を確認する。各動物に与えた薬剤添加飲水又は飼料の量を記録して、治療が表示に合っていることを確認する。

カ　動物の選別、割り付け及び取扱い

試験動物は臨床的に健康で、効能を主張しようとする動物の年齢、性別及び類別を代表するものにすべきである。一般に、若い動物を使用し、感染しやすい状態で育てる。動物はランダムに割り付ける。体重、性別、年齢及び（又は）寄生虫ばく露によるブロック化は繰り返し試験ごとのばらつきを減らすのに役立つかもしれない。糞便中の虫卵も実験動物の割り付けに適当な方法である。対照の鶏は治療群と同じ体重、年齢、飼養状況、性、及び履歴でなければならない。人工感染のためには、寄生虫に未感染な鶏の使用を推奨する。

畜舎、餌及び飼育は動物福祉に従うべきであり、動物は、各国の衛生基準に従ってワクチンを接種する必要がある。この情報は、最終報告書に記載する。少なくとも 10 日の順化期間をとることが勧められる。畜舎と飼料－水は、各地域に応じて適切なものにすべきである。動物は、毎日観察して副作用を明らかにすべきである。

（3）特定の評価試験

ア　用量決定試験

もし、治療に長期投与が必要ならば、有効性のための最短治療期間を決める１回又はより多い試験が必要である。

イ　用量確認試験

動物種に特異的な事柄なし。

ウ　野外有効性試験

商業上の制限によりこれらの試験の実験単位は例外なく小屋／畜舎単位であろう。一つの小屋／畜舎は一つの処理、例えば対照と治療を行う。

臨床観察、産卵の変化及び死亡記録は保存され、市販品で確立された歴史的データと比較する。試験動物の数が不明確な場合には、と殺検査結果は、最終報告書に含む。

14　動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン

本ガイドラインは、動物用医薬品の承認申請等の目的で実施される残留性に関する試験について、標準的な実施方法を示し、動物用医薬品の安全性の適正な評価に資することを目的とする。

しかし、本来、全ての動物用医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的ではなく、また、試験の進展に応じて新たな実験を追加する必要が起こることも少なくない。従って、得られた所見が臨床上の安全性評価に資することができるものである限り必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものでない。

原則として食用動物（養殖水産動物を含む。）に使用される新動物用医薬品（食品衛生法（昭和２２年法律第２３３号。以下「食衛法」という。）第１１条第３項の規定により人の健康を損なうおそれのないことが明らかであるものとして厚生労働大臣が定める物質を除く。）について、異なる２箇所以上の施設であって少なくとも１箇所は国内施設で実施すること。ただし、局長通知の記の第３の２の（２）のイに基づき、残留性に関する試験として１４－１、１４－２及び１４－３で示した試験を全て実施する場合は、１箇所の施設で国外の施設であっても差し支えない。また、後発動物用医薬品の残留確認試験を実施する場合は、１か所以上の国内施設で実施すること。

残留性に関する試験は、１４－１、１４－２及び１４－３で示した試験を全て実施されなければならない。しかしながら、水産用医薬品、蜜蜂用医薬品、畜体に直接使用しない消毒剤及び殺虫剤並びに新有効成分含有動物用医薬品（食用動物用として新有効成分を含有するものをいう。以下この項において同じ。）以外の動物用医薬品については、１４－４で示した試験に代えることができるものとする。

分析方法（１４－３及び１４－４（（７）を除く。）の試験のものに限る。）は、１４－５で示したバリデーションによるものとし、休薬期間の設定のための統計学的解析（１４－３及び１４－４（（７）を除く。）の試験のものに限る。）は、１４－６で示した方法によるものとする。

なお、１４－１、１４－２及び１４－３で示した試験を全て実施している場合には、吸収等試験の一部を残留性に関する試験の一部で代替することができる。

なお、１４－１、１４－２及び１４－３で示した試験を全て実施している場合には、吸収等試験の一部を残留性に関する試験の一部で代替することができる。

14 －１　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：残留物の定性及び定量のための代謝試験（VICH GL46）

（１）緒言

ア　目的

承認申請者は、食品中の動物用医薬品の安全性を証明するため、包括的な一連の代謝、残留消失及び薬物動態試験を実施しなければならない。本指針の目的は、食用動物における動物用医薬品の残留物の定性及び定量について試験するための国際的に調和された推奨試験手順を提供することである。

イ　背景

本指針は、食用動物において使用される動物用医薬品に関する残留化学データについて、国又は地域の規制当局による相互受け入れを促進するために作成された指針のうちの一つである。本指針は、EU、日本、米国、オーストラリア、ニュージーランド及びカナダにおいて動物用医薬品の残留を評価するための、現行の国又は地域の要件及び推奨を考慮して作成されたものである。

本指針では、推奨される代謝試験の枠組みを示しているものの、試験計画の柔軟性を確保することが重要であり、対象物の残留を十分に評価するためには、動物用医薬品の性質を踏まえた試験計画が推奨される。

（２）指針

ア　目的

動物用医薬品の食品の安全性評価は、投薬動物に由来する食品を人が摂取しても安全であることを担保することに役立つものであることから、データ収集の一部として、動物用医薬品の投与動物に由来する食品中の残留量及び残留物の性状を明らかにするための試験を実施しなければならない。これらの代謝試験は、①動物用医薬品投与後の複数の時点における投与動物の可食組織での対象物の残留の消失性、②可食組織中における対象物の残留を構成する個々の残留成分又は残留物、③残留基準値遵守の確認（すなわち動物用医薬品の適正使用に関するモニタリング）を目的とした分析法における指標物質となりうる残留物及び④国内又は地域のモニタリングのための標的組織の特定、に関するデータを提供する。

イ　適用範囲

食用動物における代謝試験は、多くの場合、放射性同位元素標識薬剤を使用して実施されるものであり、これらの試験では、被験物質の投与に起因する動物用医薬品由来の全ての残留物（すなわち「総残留」）をモニタリングすることができることから、総残留試験とも呼ばれる。本指針では、放射性同位元素標識薬剤を用いて実施される代謝試験の手順について規定する。

投与動物に由来する食品中の残留を特定する上で、代替の（すなわち放射性同位元素標識薬剤を使用しない）アプローチも可能かもしれない。

ただし、いずれの場合であっても、GLP を遵守して試験を実施しなければならない。

ウ　残留物の定性及び定量のための試験

（ア）被験物質

（ｉ）薬剤

化合物の特性（例えば、一般名、化学名、CAS 番号、構造式及び分子量を含む。）及び原薬の純度を記載し、化学名及び構造式には放射性同位元素による標識部位を示すものとする。放射性同位元素標識薬剤の取扱い及び廃棄については、関連する法又は規制を遵守しなければならない。

（ⅱ）放射性同位元素標識薬剤

ａ　性状と標識位置

分子間における交換が問題とならない炭素 14（^{14}C）が第一に選択される標識体であって、トリチウム（^{3}H)、リン 32（^{32}P)、窒素 15（^{15}N）又は硫黄 35（^{35}S）等の他の同位体も適切である場合がある。^{3}H については、^{3}H 標識の安定性が厳密に証明されている場合、例えば、水との交換量を評価し、それが５％以下である場合には適切と考えられる。

対象残留となりうる親化合物を適切に標識するため、１箇所以上の位置に放射性同位元素で標識する必要がある。また、代謝的に安定した位置に放射性同位元素で標識を行う。

ｂ　放射性同位元素標識化合物の純度

放射性同位元素標識化合物は、人為的な影響を最小限にするため、高純度（約 95%が望ましい。）のものでなければならず、適切な分析方法（例えば、２種類のクロマトグラフィー系の使用）で、放射化学的純度を確認しなければならない。

ｃ　比活性

放射性同位元素標識化合物の比活性を試験報告書に記載するものとし、比活性は、可食組織内における対象残留を追跡できるよう、十分高くなければならない。要求される感度は、薬剤の活性に基づいて決定する。

非標識化合物と放射性同位元素標識化合物を混合して比活性を調節することができる。分析を容易にし、放射性同位元素標識化合物を節約するため、投与後早い時点で安楽死させる動物には低い比活性の薬剤を投与し、投与後遅い時点で安楽死させる動物には高い比活性の薬剤を投与することができる。

（ⅲ）標準品

クロマトグラフィーでの残留物の特定のため、標準品として親化合物を用意する。また、可能であれば、推定代謝物についても用意する。

（イ）試験系

主要動物種と少数動物種の区分については、例えば七面鳥や羊のように国又は地域で違いがあるものがあり、これらの違いは、国又は地域による収集データの要求に影響する可能性がある。このため、条件が整えば、主

要動物種の医薬品の使用のための総残留及び代謝のデータを少数動物種に外挿できる。また、ある地域では主要動物種で、別の地域では少数動物種である動物種について、国又は地域の規制当局より代謝試験が要求される場合、本指針で示した内容の試験計画は受け入れられる。

（ｉ）動物

代謝試験で使用される動物は、商用品種を代表し、治療対象動物を代表するものとする。動物の入手先、品種、体重、健康状態、年齢及び性別を報告書に記載しなければならない。

通常、豚（概ね 40kg ～ 80kg）、羊（概ね 40kg ～ 60kg）及び家禽で、それぞれ一つの試験を実施する。牛の場合、乳用牛での試験を肉用牛（概ね 250 ～ 400kg）での１つの試験で代用することも可能であり、その逆も可能であるものとする。通常、牛及び羊の成体での代謝試験の結果を子牛及び子羊に外挿することができる。しかしながら、反芻前の動物が成体と大きく異なる代謝を示す可能性があると考えられる十分な理由がある場合には、反芻前の動物による別の試験が必要となることがある。また、搾乳牛の乳汁中の総残留の確認には、別の試験を実施する。

休薬期間設定に利用することを目的とした試験の場合、最悪の状況での試験条件（例えば、動物の体重及びその体重での最大注射容量）で、試験を実施する。

（ⅱ）動物の取扱い

動物の馴化期間を設定し、可能な限り通常の飼養管理基準で飼育する。これらの試験では、通常の飼養管理基準と異なり、代謝物を測定するための専用ケージが必要となる場合もある。しかし、代謝ケージは、尿及び排泄物又は他の試料の採取を目的とする試験の場合にのみ使用できる。健康で、望ましくは、投薬歴のない動物を使用する。動物に与える飼料及び飲水には、他の薬剤又は汚染物質が含まれていてはならない。また、動物福祉のため、国又は地域の規制に従った十分な環境条件を担保しなけらばならない。動物へのワクチン投与又は駆虫剤の投与等は認められる。いずれの場合も、投与した動物を供試する場合には、適切な休薬期間を置かなければならない。動物の薬剤投与歴について記録する。

放射性同位元素標識された薬剤を投与された動物及びその組織の取扱い及び廃棄については、関連する法及び規制を遵守しなければならない。

（ウ）試験手順

（ｉ）薬剤の剤形

薬剤の成分及び分量、剤形、投与薬剤の調製方法並びに投与期間中の製剤中の原薬の安定性を試験報告書に記載する。代謝試験は、最終製剤決定前に実施することもできるが、可能な限り、予定される最終製剤を供試動物に投与するものとする。代表的な製剤又は試作製剤も適切と考えることができる。

（ⅱ）投与経路

予定される投与経路（例：経口、経皮、筋肉内、皮下）で、薬剤を投与する。特に、飼料又は飲水添加による経口投与を予定する薬剤の場合、動物に投与量全量を摂取させ、環境上の懸念を最小限にするため、胃管投与又は強制経口投与とすることができる。経口投与及び非経口投与を予定する薬剤では、通常、別の代謝試験を実施しなければならない。通常、筋肉内、乳房内、皮下及び局所を含む全ての非経口経路を、１つの非経口経路の試験で代用できる。同様に、通常、全ての潜在的な経口製剤（例えば、飲水添加剤、飼料添加剤及び速溶錠）を、１つの経口投与での試験で代用できる。

（iii）用量

予定する臨床最高適用量（濃度）で、予定する臨床適用の最長投与期間又は残留物が可食組織中で定常状態に達するために必要な期間の投与とする。非標識化合物を動物へあらかじめ投与した後に放射性同位元素標識薬剤を投与してはならない。

連続投与する薬剤では、残留物が可食組織中で定常状態に達するまでの期間を決定するための別の試験が必要となる場合がある。また、ゼロ休薬期間を予定する単回投与の医薬品では、吸収相の終了を証明しなければならない。

飼料添加又は飲水添加投与の代替として胃管投与を行う場合、実際の使用条件に近づけるために、午前と午後に分けて投与する。

（iv）動物数及び安楽死時点数

雌雄両方に使用する予定の医薬品の場合、雌雄同数の少なくとも４群の動物を、適切な間隔で安楽死させる。

推奨される動物数は以下のとおりである。

・大・中動物（牛、豚、羊）：１安楽死時点につき３頭以上
・家禽：１安楽死時点につき３羽以上
・乳汁採材のための搾乳牛：高泌乳及び低泌乳を代表する経産牛８頭以上
・卵採材のための産卵鶏：10 個以上の卵を採材するのに十分な羽数

ゼロ休薬期間を予定する医薬品では、安楽死時点の設定において、動物をと畜場又は食鳥処理場までの地理的距離による輸送時間を考慮しなければならない。

実質ゼロ休薬となる典型的な時点は以下のとおりである。

・家　禽：０～２、３～４及び６時間
・大・中動物：０～３、６～８及び最高 12 時間
・乳　汁：最高 12 時間

バックグラウンド濃度及び燃焼効率を測定し、関連する分析法の試験に必要な十分な量の対照組織も用意する。

（v）動物の安楽死

適切な放血時間を確保できる商用の方法で動物を安楽死させる。対象

とする代謝物の分析に影響しなければ化学的安楽死を用いることも可能である。

（vi）可食組織の採材

安楽死後、十分な量の可食組織の試料を採材し、不要な組織を除き、重量を測定し、適量に分割する。直ちに分析できない場合、分析まで試料を冷凍保存する。試料を採材後に保存する場合、承認申請者は、保存期間中、放射性同位元素標識化合物が安定であることを証明しなければならない。

推奨される試料を表１に示す。

表１の組織を分析する他、指標残留減衰試験で分析する一つの追加組織の情報を得るために、追加の組織を採材し、分析する（14 －３ 食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：製剤の休薬期間確立のための指標残留減衰試験（その１）（VICH GL 48）参照)。適切な追加の組織として、心臓（牛、豚、羊及び家禽)、小腸（牛及び豚）及び筋胃（家禽）が含まれる。安全性評価に重要であると考えられる場合（例えば、残留濃度の高い又は残留消失が遅い組織)、動物種ごとに、他の可食組織を採材し、分析することとする。

（vii）排泄物及び血液の採材

通常、排泄物及び血液を採取する必要はない。しかし、これらの試料の分析はいくつかの観点から有用である（① 排泄物及び血液の分析により、試験の質の評価に有用な物質収支の推定が可能である。② 排泄物の試料は、代謝物の評価に適している。③ これら試料は、環境影響評価の実施に有用である。)。これらのデータを収集する場合には、毎日、各動物から尿及び排泄物を採取する。

血液試料は、安楽死時点を含む複数の時点で、選択された動物から採取する。血液中の総残留のデータから、有益な薬物動態学の情報を得ることができる。

（viii）総放射能の測定

試料の性質に応じ、確立された方法（例えば、燃焼後に液体シンチレーション法で測定、可溶化後に測定又は直接測定等）で試料中の総放射能を測定する。放射能の測定方法（分析試料の調製、機器、標準品、対照組織、薬剤添加組織、投与動物からの組織データを含む。）を詳細に記載する。また、対照組織に添加した放射能の添加回収率を記載する。

試料の放射能の分析結果は、試料の湿重量ベースで、薬剤重量/試料重量（μg/kg が望ましい）として報告する。cpm/重量又は dpm/重量から、薬剤重量/試料重量又は薬剤重量/試料容積への換算のための計算を試験報告書に記載する。

（エ）代謝物の分離及び確認

一般に用いられる分析方法（例えば、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー及び質量分析法を含む。）

により、全ての残留物から、各残留物の成分を分離し、薬剤に由来する残留物を特定することができる。

（ｉ）分析方法

試験報告書には、分析方法の詳細を記載する。その記載には、標準品、試薬、溶液及び分析用試料（残留物の抽出、分画、分離及び単離）の調製、使用機器並びに標準品、対照組織、薬剤添加組織及び薬剤投与動物から採材した組織のデータを含む。分析方法については、少なくとも回収率、検出限界及び変動性のバリデーションを行わなければならない。

（ⅱ）残留物特定の範囲及び主要代謝物

残留物の特定及び構造決定の範囲は、残留物の量、当該医薬品又は同系化合物の対象残留及び従前の知見又は経験から想定される残留物の重要性など、幾つかの因子に依存する。

一般に、主要代謝物の特定と構造決定は、クロマトグラフィーによる標準品との比較又は質量分析法を含む複数の分析法の組み合わせを用いて行う。評価の基準となる主要代謝物とは、最も早い安楽死の時点（又は定常状態に達した後若しくは連続投与する製剤では投与終了時又はその付近）で採材された試料中で 100 μ g/kg 又は総残留の 10%を構成するものをいう。主要代謝物について、明確な構造決定より、化学的性状特定が適切な場合（例えば、抱合体が存在する場合又は質量分析の情報が適当な生体内変換経路（例えば水酸化による分子量+16）を示す場合）がある。通常、主要代謝物以外の（すなわち、マイナーな代謝物の）残留に関する特定は、低濃度残留での懸念がなければ不要である。

（ⅲ）結合残留及び非抽出性残留の特性

結合残留に関する検討は、通常、任意である。しかし、その検討から得られた情報は、検討対象とする全ての残留物からある部分の残留物を差し引く根拠となる場合がある。

ａ　全般的なコメント

食用動物に使用された動物用医薬品の残留物には、水性溶媒又は有機溶媒による穏やかな抽出条件では組織から抽出されず、容易に特定ができないものがある。これらの残留物は、(a) 内因性化合物への薬剤残留物の取込み、(b) 親化合物若しくはその代謝物と高分子との化学反応（結合残留）、又は（c）組織基質中への放射性残留物の物理的な被包化若しくは取り込みに起因する。

薬剤構成要素の断片（通常、炭素が１つ又は２つの化合物）が、天然に存在する分子に取り込まれたことが明らかな非抽出性残留は、残留上の意義がない。

結合残留が総残留の主要な部分を構成する場合、又は結合残留の濃度がきわめて高く、その薬剤に現実的な休薬期間を設定できない（すなわち、結合残留のため、総残留が懸念とならない残留水準以下に減衰しない）場合には、動物用医薬品の結合残留の特定を行う。結合残

留に関するデータ収集の範囲は、結合残留の量、結合残留の特性及びADI 設定の根拠となる親化合物又は代謝物の活性を含む様々な要因を考慮して決定する。

b　結合残留の特定

結合残留の特定は、苛酷な抽出条件や酵素処理により、残留物の分解又は化合物の形成が生じる可能性があるため、多くの場合困難である。

しかし、食品中の動物用医薬品の残留物の生物学的意義は、通常、食品が摂取された時にそれらの残留物が吸収される程度に依存する。従って、結合残留を含む組織を実験動物に給与して得られる生物が利用可能な残留物の測定は、有用な特性の評価法であるといえる（Gallo-Torres の方法（*Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2: 827-845 （1977））は、生物学的利用率を特定するための適切な手順となるかもしれない。）。

（３）データの報告

総残留に対する指標残留の比、指標残留及び標的組織が、国又は地域の規制当局から要求される場合、これらを決定するためのデータを示さなければならない。各採材時点における各組織の総残留濃度を報告する。様々な処理（酵素、酸等）を用いて抽出される総残留の放射活性量（抽出率）も示す。標的組織は、対象動物中の総残留をモニターするために選択された可食組織である。標的組織は、必ずではないが、通常、残留消失が最も遅い組織である。

総残留濃度との比較のために、各採材時点における総残留の構成成分についても報告する。指標残留を選択するために、総残留の構成成分（親化合物及び代謝物）について検討する。指標残留は、通常、親化合物であるが、親化合物と代謝物との組み合わせ又は１つの誘導体若しくはフラグメント分子に化学的に変換した残留物の合計とする場合がある。

適切な指標残留には、以下の特徴がある。

①　対象組織において、指標残留と総残留の濃度の間に確立された既知の関係がある。

②　指標残留は、注目すべき時点（すなわち休薬期間時点付近）における残留性を分析するために適切でなければならない。

③　残留基準値の濃度で、指標残留を分析するための実用的な分析方法がある。

（４）用語集

以下の用語は、本指針の目的のために提供される。

化学物質の １日許容摂取量（Acceptable daily intake （ADI））とは、生涯にわたって毎日摂取しても、消費者の健康に明らかなリスクがないと考えられる１日の摂取量のことである。ADI は、最も多くの場合、医薬品の毒性学的、微生物学的又は薬理学的特性をもとに設定される。通常、体重１キログラム（kg）当たりの化学物質のマイクログラム（μ g）又はミリグ

ラム（mg）で表される。

結合残留（Bound residues）とは、親化合物若しくはその代謝物と食用動物中の巨大分子との共有結合によって形成される残留物のことである。

可食組織（Edible tissues）とは、フードチェーンに入ることのできる動物由来の組織のことであり、筋肉、注射部位筋肉、肝臓、腎臓、脂肪、自然な割合で脂肪を含む皮膚、全卵及び全乳を含むが、これらに限定されない。

動物用医薬品の非臨床試験の実施に関する基準（Good laboratory practice（GLP））とは、動物用医薬品に関する実験室での試験を計画し、実施し、モニタリングし、記録し、報告し、監査するための一定基準に従った過程及び要件のことである。GLP 下で実施される試験は、国又は地域の要求に基づき、試験及び関連データの信頼性及び完全性を保証するよう設計される。

主要代謝物（Major metabolites）とは、食用動物における代謝試験（１４－１　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：残留物の定性及び定量のための代謝試験（VICH GL46）（以下「１４－１（VICH GL46)」という。）によるもの。以下「TRR 試験」という。）において対象動物種から採材された試料中に 100 μg/kg 以上含まれる又は総残留の 10%以上を構成する代謝物のことである。

指標残留（Marker residue）とは、当該残留の濃度が可食組織中の総残留の濃度と既知の関係にある残留物のことである。

残留基準値（Maximum residue limit （MRL））とは、国又は地域の規制当局によって定められた、法的に許容され又は許容可能と判断される食品中又は食品上の動物用医薬品の最高残留濃度のことである。一部の国で使用される「トレランス」という用語は、多くの場合、MRL と同義である。日本では、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年 12 月 28 日厚生省告示第 370 号）第一食品の部Ａ 食品一般の成分規格の項の６の（１）の表（以下「食品一般の成分規格の表」という。）中第３欄に定める量をいう。

代謝（Metabolism）とは、本指針の目的においては、動物用医薬品に対して生体内で起こる全ての物理的及び化学的な過程のことである。代謝には、医薬品の体内への取込み、生体内での分布、医薬品の変化（生分解）並びに医薬品及びその代謝物の排泄が含まれる。

実質ゼロ休薬（Practical zero withdrawal）とは、（例えば農場での）医薬品の最終投与とと殺（と畜場又は食鳥処理場への輸送を含む。）の間の最も短い期間のことである。

残留物（Residue）とは、動物用医薬品（親化合物）及びその代謝物のことである。

対象残留（Residue of concern）とは、動物用医薬品について確立された ADI と関係する全ての残留のことである。

可食組織中の総残留（Total residue）とは、放射性同位元素標識薬剤を用いた試験又は他の同等の試験で検出される動物用医薬品（親化合物）及び

全代謝物の合計のことである。

湿重量ベース（Wet weight basis）とは、水分含有量を考慮せず、そのままの状態での試料分析を意味する。

表１　代謝試験において動物から採材する試料

可食組織の種類	動物種及び試料		
	牛及び羊	豚	家禽
筋肉	腰部	腰部	胸部
注射部位筋肉	注射部位筋肉の中心部~500 g 筋　注：直径 10 cm × 厚さ 6 cm 皮下注：直径 15 cm × 厚さ 2.5 cm	注射部位筋肉の中心部~500 g 筋　注：直径 10 cm × 厚さ 6 cm 皮下注：直径 15 cm × 厚さ 2.5 cm	注射部位全体(例えば、鶏の首全体、胸部全部、脚部全部）から試料を採材 大きな家禽では 500g を超えない
肝臓	各肝葉を横断した試料	各肝葉を横断した試料	全体
腎臓	両腎臓を合わせた試料	両腎臓を合わせた試料	両腎臓を合わせた試料
脂肪	腎臓周囲	NA	NA
皮膚	NA	自然な割合で脂肪を含む皮膚	自然な割合で脂肪を含む皮膚
乳汁	全乳	NA	NA
卵	NA	NA	卵黄と卵白を合わせる

NA：適用しない。

14 －２　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：実験動物による比較代謝試験（VICH GL47）

（１）緒言

ア　目的

本指針の目的は、実験動物が産生する動物用医薬品の代謝物を特定するため、国際的に調和された推奨試験手順を提供することである。比較代謝試験の目的は、食用動物由来産物中の残留物として人が暴露される代謝物に、毒性学的試験で用いられる実験動物が暴露されていたかを確定するために、毒性学的試験に用いられる実験動物の代謝物と食用動物の可食組織中の動物用医薬品の残留物を比較することである。

イ　背景

本指針は、食用動物において使用される動物用医薬品に関する残留化学データの相互受け入れを促進するために作成された指針のうちの一つである。本指針は、EU、日本、米国、オーストラリア、ニュージーランド及びカナダにおいて動物用医薬品の残留を評価するための、現行の手順を考慮して作成された。

（２）指針

ア　目的

動物用医薬品の残留に関する食品の安全性評価により、投薬された食用動物に由来する食品を人が摂取しても安全であることを担保する必要がある。データ収集過程の一つとして、動物用医薬品の毒性学的試験において、実験動物が自己曝露される代謝物を特定するための試験を実施する。本試験の目的は、対象となる食用動物の組織から人が摂取する代謝物が、毒性学的試験に用いられる実験動物の代謝で産生されるかを明らかにすることである。実験動物が食用動物と本質的に同様な代謝物を産生するのであれば、実験動物は、投薬した食用動物由来の組織から人が暴露されるのと同じ代謝物に自己曝露されていたことになる。

食用動物と本質的に同様な代謝物に実験動物が自己暴露されていれば、通常、毒性学的試験において代謝物の安全性が適切に評価された根拠となる。

イ　適用範囲

１つ以上の *in vitro* 試験又は一つの *in vivo* 試験で、実験動物の代謝物を証明できる。

対象となる食用動物の可食組織中に見いだされる代謝物を、関連する実験動物が産生することを証明するために、食用動物における代謝と比較するための１つ以上の *in vitro* の実験動物代謝試験（例えば、実験動物の肝スライスを用いた代謝）を使用できる。*in vitro* 試験の実施により、*in vivo* の実験動物試験の実施を避け、安楽死される動物数を減らし、比較代謝試験の経費を抑えることができる。*in vitro* 試験又は *in vivo* 試験において対象となる食用動物で産生される代謝物を証明できない場合、申請者は、他の方法により、食用動物の代謝物による消費者への安全性を示さなければならない。

in vitro 又は *in vivo* の代謝試験は、ほとんどの場合、放射性同位元素標識化合物を用いて行われる。これらの試験は、被験物質の投与による薬剤由来の残留物の全てを確認できる（注：通常、主要代謝物の同定のみ求められる）。従って、本指針では、放射性同位元素標識薬剤で実施する代謝試験の手法を示す。しかし、対象食用動物で可食組織中の残留物として産生される代謝物が、化学分析によって実験動物の尿又は組織から容易に同定される場合には、実験動物における代謝物を特定するための代替法（すなわち、放射性同位元素標識化合物を使わない）も認められる。

投薬された食用動物の組織から人が摂取する残留物の個々の主代謝物を実験動物が産生している場合、通常、自己暴露が十分に証明される。この場合、実験動物の代謝物に関する定性的情報を報告するものとする。実験動物の尿、体液又は組織中に認められる代謝物の定量は、通常、比較代謝試験の目的ではない。食用動物で残留物として見出される主要代謝物については、実験動物で同定されなければならない。食用動物では認められず、実験動物で認められる代謝物は、人が摂取する残留代謝物に、実験動物が自己暴露されることを保証するという目的からみて重要ではない。

比較代謝試験は、適用可能な非臨床試験の実施基準（GLP）に従って実施する。

ウ　実験動物における比較代謝試験

（ア）試験材料

（ｉ）薬剤

薬剤の化学的性状（例えば、一般名、化学名、CAS 番号、構造式、立体化学及び分子量を含む。）及び純度を報告書に記載する。被験薬剤は、市販製剤に使用される有効成分を代表するものでなければならない。

（ⅱ）放射性同位元素標識薬剤

放射性同位元素標識部位を報告書に記載する。比較代謝試験に使用する放射性同位元素標識薬剤の性状は、１４－１（VICH GL46）で示した性状（① 放射性同位元素標識の性状、② 被験薬剤の標識部位及び③ 放射性同位元素標識薬剤の純度及び比活性）に適合しなければならない。

（ⅲ）分析標準品

代謝物のクロマトグラムの比較のため、親化合物を用意する。また、可能であれば、既知の又は想定される代謝物の分析標準品を用意する。代謝物は、TRR 試験で得られる組織からも単離できる。

（イ）*in vitro* 試験系

in vivo の比較代謝試験の代替として、１つ以上の *in vitro* の代謝試験が用いられる。

比較代謝試験で用いられる実験動物種は、望ましくは、動物用医薬品の毒性学的な１日許容摂取量（ADI）を決定するための主要な試験で使用されたものと同じ動物種（齧歯類では同じ系統）とすべきである。動物の由来、体重、健康状態、年齢及び性別を報告書に記載するものとし、別の動物種

を用いる場合には、その選択の妥当性についての説明も記載するものとする。

様々な試験系が公表され、広く使用されている。*in vitro* 系の比較代謝試験には、初代培養肝細胞、肝ミクロソーム、S9 細胞成分画分、細胞基質（サイトゾル）、肝切片及び株化細胞が含まれる。これら *in vitro* 試験のプロトコールについては、（例えば、OECD で）標準化されていないので、これらの系の個々の利点と欠点を以下に示す。

・（新鮮な又は凍結保存）初代培養肝細胞：初代培養肝細胞は、第１相及び第２相の代謝を評価するのに有用で、さらに付加的な長所として膜輸送効果を考慮に入れることが可能な肝細胞である。懸濁培養、単層培養又はサンドイッチ培養により、これらの肝細胞を調製できる。サンドイッチ培養には、酵素活性をより長く維持できる利点がある。食用動物の残留代謝物が、初代培養肝細胞系で実証された場合、通常、比較代謝が証明される。実験動物種における代謝を証明するために、初代培養肝細胞系の試験を他の一つ以上の *in vitro* 系と併せて使用できる。

・肝ミクロソーム：肝ミクロソームは、第２相のグルクロン酸抱合のためのウリジン二リン酸-グルクロノシルトランスフェラーゼ（UDPGT）に加えて、第１相の代謝を評価するための、チトクローム P450（CYP）及びフラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO）系の活性の大部分を含む。食用動物の残留代謝物が、肝ミクロソーム系で実証された場合、通常、比較代謝が証明される。実験動物種における代謝を証明するために、肝ミクロソーム系の試験を他の一つ以上の *in vitro* 系と併せて使用できる。

・S9 細胞成分画分：S9 細胞成分画分は、例えば、スルホトランスフェラーゼや N-アセチルトランスフェラーゼのような追加的な系の他に、肝ミクロソームに存在する第１相及び第２相の酵素を含む。S9 細胞成分画分は、第１相及び第２相の代謝又は第２相の抱合が引き続いて起こる第１相の代謝の評価に適当である。食用動物の残留代謝物が、S9 細胞成分画分系で実証された場合、通常、比較代謝が証明される。実験動物種における代謝を証明するために、S9 細胞成分画分系の試験を他の一つ以上の *in vitro* 系と併せて使用できる。

・細胞基質液（サイトゾル）：細胞基質液は、ミクロソームの遠心後の上清である。いくつかの第２相の抱合系を含むが、代謝試験としてあまり完全なものではない。通常、細胞基質液系のみで、完全な比較代謝のプロファイルを得る可能性はないが、食用動物の残留代謝物が、細胞基質液系で実証された場合、通常、比較代謝が証明される。実験動物種における代謝を証明するために、細胞基質系の試験を他の一つ以上の *in vitro* 系と併せて使用できる。

・肝切片：代謝研究のために、手を加えない肝臓の切片を使用すること

は可能であるが、肝細胞の生存率及びこれに付随する酵素活性は、他の代替法に比べて急速に低下する。細胞生存率及び酵素活性を証明できなければ、肝切片法を用いた比較代謝試験の方法を使用すべきではない。しかし、食用動物の残留代謝物が、肝切片系で実証された場合、通常、比較代謝が証明される。実験動物種における代謝を証明するために、肝切片系の試験を他の一つ以上の *in vitro* 系と併せて使用できる。

・株化細胞：現時点では、株化細胞の酵素活性は一般的に低いので、その使用は推奨されない。しかし、食用動物の残留代謝物が、株化細胞系で実証された場合、通常、比較代謝が証明される。実験動物種における代謝を証明するために、株化細胞系の試験を他の１つ以上の *in vitro* 系と併せて使用できる。

通常、これらの *in vitro* 試験法の１つを用いて比較代謝の証明ができる。しかし、対象動物種の代謝のプロファイルから、第１相及び第２相両方の生体内変換の知見が得られた場合、申請者は、完全な代謝プロファイルを再現するために、複数のオプション（例えば、ミクロソームと S9）での試験を考慮する。

文献では、多くの試験条件が報告されているが、*in vitro* 比較代謝試験の実施のためのいくつかの一般的指針を以下に示す。:

・通常、被検薬剤を、37 ℃の *in vitro* 系でインキュベーションする。
・一般的には、被検薬剤の濃度を 100μmol/L 未満とする。
・対象物質の代謝率に基づき、インキュベーション時間を調整する。
・肝ミクロソーム、S9 の培養では、第１相代謝のための NADPH（NADPH 再生系）、グルクロン酸抱合のための UDPGA、硫酸化のための PAPS のような、第１相及び第２相の代謝の補助因子が必要である。

（ウ） *in vivo* 試験系

（ｉ）動物

比較代謝試験で用いられる実験動物種は、可能な限り、動物用医薬品の毒性学的な１日許容摂取量（ADI）を決定するための主要試験で使用されたものと同じ動物種（齧歯類では同じ系統）とすべきである。動物の由来、体重、健康状態、年齢及び性別を報告書に記載するものとし、別の動物種を用いる場合には、その選択の妥当性について説明も記載するものとする。

（ⅱ）動物の取扱い

動物は十分な期間、順化する。一般的な実験動物管理基準を適用する（注：代謝物を測定するための専用ケージを用いることができる）。健康で、望ましくは、投薬歴のない動物を使用する。しかし、動物へのワクチン投与や他の治療（例えば駆虫剤投与）は認められる。いずれの場合も、投与した動物を供試する場合には、適切な休薬期間を設定しなければならず、動物の薬剤投与歴について報告書に記載する。

また、放射標識物質を投与された動物及びその組織の取扱い及び廃棄については、適切な法及び規制を遵守する。

（iii）動物数

比較代謝試験では、分析に十分な量のプールした組織及び尿を得るために十分な数の動物に薬剤を投与する。１つの分析のために、複数動物からの同種の試料（尿等）をプールすることができる。比較代謝試験のための最少動物数の規定はないが、十分量の試料を得るために、多くの場合、雌雄各４頭の動物が用いられる（しかし、それ以下の動物数でもよい。）。通常、雌雄別の比較代謝の証明は行われないため、代謝に性差が存在する可能性がある場合、食用動物と本質的に同様な代謝物を証明する可能性を増すために、（性を無視して）同種の試料をプールすることができる。

（iv）薬剤の剤形

薬剤の成分及び分量、剤形、投与薬剤の調製方法及び投与期間における製剤中の被験薬の安定性について、報告書に記載する。比較代謝試験に用いる成分及び分量及び剤形は、最終製品と同じである必要はない。

（v）投与経路

薬剤は、経口投与する。確実に動物に全量を摂取させ、環境汚染を最小限にするため、胃管投与又は強制経口投与を用いることができる。

（vi）投与量

比較に必要な尿又は組織中の代謝物濃度を得るために、十分に高い用量を投与する。酵素誘導を含めた代謝関連の全ての事象が十分に起こるのに必要な期間、毎日、薬剤を投与する。対象代謝物の生成を確認するために長期間投与が示唆される場合を除き、通常、５日間の投与を行う。組織及び尿中における高濃度の対象代謝物を得るために、最小中毒量付近の用量を用いることができるが、それより低い用量を用いてもよい。

（vii）動物の安楽死

動物は人道的に安楽死させる。対象代謝物の分析に影響を与えなければ、化学的安楽死を用いてもよい。

代謝物の分析のために、単一時点（通常被験薬剤の最終投与後２～４時間）で動物を安楽死させる。数日に渡る投与により、時間経過に伴う親化合物の経時的な代謝から生じた代謝物が得られるため、追加の安楽死の時点は不要である。

（viii）試料の採材

分析用の尿、糞及び血液の採取は、安楽死前に行うことができる。試料は、直ちに分析又は分析まで凍結して保存する（凍結により対象代謝物の安定性に問題が生じる場合を除く。）。試料の凍結により、代謝プロファイルを変化させる微生物による代謝を抑制できる。採材後

に試料を保存する場合、申請者は、保存期間を通じて、放射性同位元素標識化合物が安定であることを証明しなければならない。

組織試料の採取は、安楽死後に行う。組織試料は直ちに分析するか、分析まで凍結して保存する（凍結により対象代謝物の安定性に問題が生じる場合を除く）。試料の凍結により、代謝プロファイルを変化させる微生物による代謝を抑制できる。採材後に試料を保存する場合、申請者は、保存期間を通じて、放射性同位元素標識化合物が安定であることを証明しなければならない。

比較代謝は、１つ以上の排泄物又は組織により証明される。代謝物の定性分析のために採取される試料には、血液・血液分画、排泄物、肝臓、胆汁、腎臓、脂肪又は他の組織を含む。分析のための試料又は分析のための複数動物からのプールした試料を得るために、各動物から十分量の各種の組織を採取する。

（ix）総放射能の測定

in vivo の比較代謝試験では、通常、試料中の総放射能の測定及び放射能のマスバランスの確認を実施しない。総放射能を測定する場合、１４－１（VICH GL46）で示した手順に従う。

（エ）代謝物の分離と比較

全ての残留物から各成分を分離し、薬剤由来の残留物と比較するために、通常、一般に用いられる分析方法（例えば、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー及び質量分析法を含む。）が用いられる。

（ｉ）分析方法

実験動物における *in vivo* 比較代謝試験では、１４－１（VICH GL46）で用いられる、クロマトグラフィー及び化学的な同定法と同様の方法を用いる。試料調製は異なるが、これらの方法は、*in vitro* 試験でも有用である。１４－１（VICH GL46）により、分析方法を報告書に記載する。分析方法において、保持時間の併行精度を示さなければならない。

（ii）特定する範囲及び主要代謝物

実験動物における対象代謝物の存在が、クロマトグラフの保持時間の比較により確認できれば、通常、比較代謝試験では、代謝物の特定及び構造決定並びに組織の抽出効率の証明は不要である。

（iii）非抽出性代謝物

通常、実験動物における比較代謝試験では、非抽出性代謝物の特定を行わない。容易に抽出可能な分画に、対象代謝物を特定するに十分な量がなく、非抽出性残留に対象代謝物が含まれる場合のみ、実験動物における動物用医薬品の共有結合残留代謝物を特定する。この場合、１４－１（VICH GL46）で示した手順に従う。

（３）用語集

以下の用語は、本指針の目的のために適用される。

化学物質の１日許容摂取量（Acceptable daily intake（ADI））とは、生涯にわたって毎日摂取しても、消費者の健康に明らかなリスクがないと考えられる１日の摂取量のことである。ADI は、最も多くの場合、医薬品の毒性学的、微生物学的又は薬理学的特性をもとに設定される。通常、体重１キログラム（kg）当たりのマイクログラム（μ g）又はミリグラム（mg）で表される。

本指針では、毒性学的 ADI に関した情報が適用される。

主要代謝物（Major metabolites）とは、TRR 試験において、対象動物種から採材された検体中に 100μg/kg 以上含まれる又は総残留の 10 %以上を構成する代謝物のことである。

非抽出性残留（Nonextractable residues）とは、水性又は有機溶媒による穏やかな抽出条件では組織から容易に抽出されない残留物のことである。これらの残留物は、①内因性化合物への薬剤残留物の取込み、②親化合物若しくはその代謝物と高分子との化学反応、又は③組織基質中への放射性残留物の物理的な被包化若しくは取込みに起因する。

代謝（Metabolism）とは、本指針の目的においては、動物用医薬品に対して生体内で生じる全ての物理的及び化学的な過程のことである。代謝には、医薬品の体内への取込み、生体内での分布、医薬品の変化（生分解）並びに医薬品及びそれらの代謝物の排泄が含まれる。

対象代謝物（Metabolites interest）とは、食用動物の可食組織で産生され、動物用医薬品の毒性学的 ADI の評価と関連する動物用医薬品（親化合物）及びその代謝物のことである。

残留物（Residue）とは、動物用医薬品（親化合物）及びその代謝物のことである。

14 －３　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：製剤の休薬期間確立のための指標残留減衰試験（その１）(VICH GL48R)

（１）緒言

ア　目的

食用動物用の動物用医薬品の承認課程の一貫として、国又は地域の規制当局は、肉、乳及び卵を含む可食組織の適切な休薬期間を決定するために、指標残留減衰試験を要求する。本指針の目標は、国又は地域の要求を満たし、得られた残留減衰データが広く受け入れられる推奨試験設計を提供することである。

イ　背景

本指針は、食用動物に使用される動物用医薬品の残留化学データの相互受け入れを促進するために作成された指針のうちの１つである。本指針は、VICH地域において動物用医薬品の残留を評価するための、現在の国又は地域の要求及び推奨を考慮して作成された。

（２）指針

ア　目的

本指針では、以下の目的のため、推奨される新動物用医薬品の承認に適用される対象動物での指標残留減衰試験を示す。

・薬剤投与後、指標残留が、規制の安全基準（例えば、残留基準値又はトレランス）まで減衰することを証明すること
・消費者の安全性の懸念に対処した適切な休薬期間及び使用禁止期間の設定にふさわしいデータを作成すること

イ　適用範囲

いずれかのVICH地域で行われた（動物種ごとに）１つの残留減衰試験は、食用動物からの特定畜産物について、適切な休薬期間の設定のための推奨データの要求を満たすことが意図される。

本指針には、最も一般的な動物種、すなわち牛、豚、羊、及び家禽が含まれるが、本指針の原則は、これらの動物種以外の類似の動物種（例えば、牛に対する全ての反芻動物）にも適用できる。本指針では、魚及び（蜂蜜の生産家畜としての）蜜蜂に対する推奨試験設計については言及しない。

GLPに関する適切な原則を遵守して試験を実施しなければならない。

ウ　指標残留減衰試験

（ア）検体

試験に用いる検体は、市販製剤を代表するものでなければならない。GMPに基づいて製造された最終製剤（パイロットプラントスケール又は実生産スケール）が、検体として適切である。しかし、GLPに基づく実験室スケールの製剤を用いることもできる。

（イ）動物及び動物の飼育管理

通常、豚、羊及び家禽で、それぞれ１つの（組織の）指標残留減衰試験を実施しなければならない。牛では、反芻している肉用牛を用いた一つの

試験を乳用牛にも適用できるし、その逆も可能である。しかし、対象動物種に反芻開始後と反芻前の動物が含まれるときは、反芻前後では生理的な違いがあるため、別々の試験の実施が推奨される。搾乳動物の乳汁又は採卵鶏の卵における残留減衰プロファイルを証明するためには、別の試験を実施する。

健康で、望ましくは、投薬歴のない動物を使用する。しかし、動物へのワクチン投与や例えば駆虫剤による試験前の治療は認められる。後者の場合、供試前に適切な休薬期間を置かなければならない。供試動物は、商用品種を代表し、治療対象動物を代表するものとする。動物の入手先、品種、体重、健康状態、年齢及び性別を報告書に記載する。

十分な動物の順化時間を設定し、可能な限り通常の管理基準で飼育する。動物に給与する飼料及び飲水には、他の薬剤又は汚染物質が含まれていてはならない。また、動物福祉のため、国及び地域の規制に従った十分な環境条件を担保しなければならない。

（ｉ）乳房内投与の試験

乳房注入剤の試験では、全ての動物の乳房は、慢性乳房炎の影響がなく、肉眼的に健康でなければならない。分娩前の試験では、分娩予定日が明らかな妊娠動物を、試験組入れ前に施設に導入する。

（ⅱ）他の要因

指標残留減衰試験では、試験計画及び実施における畜産物中の残留濃度の変動に寄与する可能性のある全ての要因を考慮する。ここでは、（ウ）で示した動物数を増やさずに、指標残留減衰試験を実施する動物で、これらの「他の要因」（例えば、動物の種類、身体的成熟など）を考慮することを意図している。例えば、乳汁の指標残留減衰試験の場合、20頭での試験が推奨されているので、個々の「他の要因」を考慮するために要因ごとにそれぞれ20頭を追加するのではなく、最初に選択する20頭の動物に全ての「他の要因」を含むものとする。

（ウ）供試動物数

供試動物数は、データを適切に評価するのに十分な数とする。統計学的な観点から、適切な間隔の４時点で、各時点４頭ずつ安楽死させた、少なくとも16頭の動物による残留データが推奨される。個体間の変動が大きいことが予想され、動物数を増やすことで、よりよい休薬期間設定の可能性があれば、動物数を増やすことを考慮する。実際の指標残留減衰試験において、（無処置の）対照動物を設定する必要はないが、関連する分析法の開発試験において十分量の対照試料を準備する。以下に、試験設計における動物数の一般指針を示す。

（ｉ）牛、豚、及び羊を用いた組織の残留試験

各安楽死時点で４頭以上（雄雌同数）。体重範囲の推奨は、豚で概ね40～80kg、羊で概ね40～60kg及び肉用牛で概ね250～400kgである。（イ）に示すように、搾乳していない乳牛を組織の残留試験に用いることがで

きる。

（ⅱ）搾乳動物を用いた乳汁の残留試験

搾乳動物では、全ての泌乳ステージを代表する群からランダムに選択した20頭以上の動物を用いる。泌乳初期の高泌乳動物及び泌乳末期の低泌乳動物を、試験群に含めなければならないが、それぞれの頭数については規定しない。

分娩前（すなわち乾乳牛）の試験では、少なくとも20頭が推奨される。試験には、商用酪農の牛群を代表するランダムに選択した牛を用いる。

（ⅲ）家禽

組織の残留試験では、各安楽死時点で少なくとも６試料を得るのに十分な数の家禽を用いる。

卵の残留試験では、各時点で10個以上の卵を採材するのに十分な数の家禽を用いる。

（エ）用量及び投与経路

（ⅰ）一般指針

予定される製剤の用法及び用量（注射剤では投与部位及び注射方法を含む。）に従って動物に投与する。複数回の注射投与では、動物の左右に交互に注射する。

予定される臨床最高適用量で、臨床適用の最長期間の投与を行う。予定される臨床適用期間が長期の場合には、最長投与期間の代わりに、標的組織内の残留濃度が定常状態に達するのに十分な期間の投与とすることができる。定常状態までの時間は、しばしばTRR試験から得られる。

（ⅱ）乳房内投与を意図する製剤の考慮事項

泌乳動物又は分娩前（すなわち乾乳牛への投与）の試験では、乳房注入剤を全ての分房（すなわち牛では通常４分房）に投与する。商用酪農での投与では、全ての分房に乳房注入剤を投与する可能性は低いが、残留試験のための本試験設計では、最悪の状況を想定している。

分娩前（すなわち乾乳期）の試験では、最終搾乳（乾乳）後に、分娩までの適切な期間を確保して投与する。乾乳牛の試験では、分娩後の乳汁中の残留物の減衰及び分娩前の適切な投与時期の決定を目的としている。残留データの変動を減少させるため、分娩までの期間を厳密に管理し､限られた期間内に十分な数の動物が分娩するよう試験を設計する(すなわち、実験における乾乳期間の差をできるだけ小さくする。)。例えば、分娩前30日での投与のためには、投与後20～30日の間に分娩した少なくとも20頭の乳牛からのデータ収集が必要である。また、分娩前60日での投与のためには、投与後40～60日の間に分娩した少なくとも20頭の乳牛からのデータ集収が必要である。このためには、乾乳及び分娩予定日に基づいて、検体を動物へ投与することが必要となる。

（ⅲ）複数の投与経路を意図する製剤の考慮事項

複数の非経口の投与経路（筋肉内（IM)、皮下（SC）又は静脈内（IV））

がある製剤の場合、投与経路ごとに指標残留減衰試験を実施する。ただし、IM又はSC投与による注射部位からの残留減衰に基づいて休薬期間が設定されることが明らかな場合で、かつ、SC又はIM投与と同じ休薬期間をIV投与に適用する場合には、同一用量でのIV投与の残留試験は不要である。

有効成分が同じ製剤を、異なる方法で皮膚投与（例えば、ディッピング（浸漬）、スプレー、プアオン（滴下））する場合、一つの指標残留減衰試験で実施して差し支えない。ただし、選択した試験の用法及び用量が、最大適用量となると判断した根拠を示さなければならない。この場合、承認される全ての皮膚投与経路に同じ休薬期間が適用される。投与方法ごとに異なる休薬期間を設定したい場合には、投与方法ごとに指標残留減衰試験を実施する。

（ⅳ）１頭の動物から複数の注射部位のデータを得る場合の考慮事項

注射部位の残留減衰に基づいて休薬期間が設定されることが明らかな場合、承認申請者は、通常、１頭から２つの注射部位のデータを収集し、休薬期間の設定において両部位のデータを用いることができる。この方法には、試験設計上、動物数を減らすという動物福祉の面での利点がある。この方法の例は、以下のとおりである。

・単回注射を用法及び用量とする製剤では、０日目に頚部の右側に、４日目に頚部の左側に投与する。最終投与後７日目に安楽死された動物から、休薬７日目（左側の注射部位（IJS））及び休薬11日目（右側のIJS）のデータが得られる。この場合、製剤の用法及び用量に従わない投与（２回注射と単回注射）であり、残留が極端に増加する可能性があるので、他の組織の採材及び分析には不適当である。このような投与は、注射部位の残留減衰特定のために特別に実施される。

（オ）動物の安楽死

適切な放血時間を確保できる商用の方法で、動物を安楽死させる。指標残留の分析に影響を与えなければ、化学的安楽死を用いてもよい。

（カ）採材

（ｉ）一般指針

安楽死後、十分な量の組織試料を採材し、不要な組織を除き、重量を測定し、適量に分割する。直ちに分析できない場合には、分析まで試料を冷凍保存する。試料を採材後に保存する場合、承認申請者は、通常、分析までの残留物の安定性を証明しなければならない。

組織の採材手順には、①全てのVICH地域での承認又は登録申請のために推奨される組織及び②特定の国又は地域の消費習慣又は法律的要求に対処するために採材される可能性のある追加組織の二つが含まれる。表１は全てのVICH地域で推奨される採材試料を示す。表２は推奨される追加の採材試料を示す。

この指針の目的のため、（動物種ごとに）表２から、分析のための追加組織の１つを、TRR試験の結果に基づいて選択する。通常、最も高濃度又は最も減衰の遅い組織を追加組織として選択する。採材する追加組織は一つだけであることを強調する。例えば、TRR試験において、牛の心臓が最も遅い減衰を示す場合、指標残留減衰試験の分析の追加の組織として心臓を選択すべきであるが、その場合、牛の小腸の残留データは不要である。同様に、家禽の筋胃が最も高濃度の残留を示す場合、家禽の心臓は不要である。追加組織の選択のためにTRRのデータが利用できない場合で、特定の国又は地域の消費習慣又は法律的要求がある場合、承認申請者は、必要な指標残留減衰試験を実施するために最適な方法を適切な国又は地域の当局と検討することが示唆される。

（ⅱ）注射部位

非経口投与（筋肉内又は皮下投与）では、注射部位の残留減衰のデータを報告書に記載しなければならない。注射部位の残留物は、投与局所に局在又は偏在している可能性のある局所の（すなわち全身に分布しない）残留物である。従って、承認申請者は、採材した組織に注射部位が実際に含まれていることを保証する適切な採材手順の管理を行う必要がある。承認申請者は、利用可能なデータ及び製剤の特徴を考慮した上で、管理のために用いたアプローチの妥当性を示さなければならない。以下に管理のためのアプローチ（広範な検討されたものではないが）を示す。いずれのアプローチを選択した場合でも、注射部位の試料として、500g±20％を採材することを目標とする。

- 注射部位の試料（500g±20％）及びその周囲の試料（300g±20％）の採材。500gの採材が不可能な小動物の試験では、通常、これらの組織の量を適用しない。その場合、最適な採材手順を個別に作成し、その妥当性を示さなければならないが、二つの試料（注射部位及びその周辺の試料）の採材は適切である。
- 注射痕及び炎症部位又はそのいずれかに沿った楕円（又は他の適切な形状）での採材。承認申請者は、用いた方法により注射部位の残留物を正確に採材できると判断した根拠を示さなければならない（例えば、採材部分の写真の添付）。
- TRR試験から得られた情報に基づく注射部位の残留物の移動の可能性に関するデータの提供。例えば、TRR試験との比較のため、円形（又は楕円）の注射部位及びその付近のいくつかの試料を、注射痕及び炎症部位又はそのいずれかに沿って採材する。この手順により適切な試料の採材方法を証明できるのであれば、指標残留減衰試験では、注射部位の試料のみを採材する。この試験では、（より長い休薬期間の）追加の時点を含めることが望ましい。
- 対象動物安全性試験から得られた情報（すなわち、注射部位の病理検査）に基づく注射部位の残留物の移動の可能性に関するデータの

提供。

・注射部位の残留物の移動の可能性を肉眼的に評価するため、上記の試験設計の一つで色素を用いた試験を実施。

最終注射部位（又は複数の部位）から適切に（(エ）の（ⅳ）を参照）試料を採材する。複数回の注射が必要な製剤では、左右交互に注射し、より注射回数の多い側が最後の注射部位となる試験設計とする。注射部位を円形に採材する場合、注射箇所を中心として、表１に示すように（大・中動物からの）注射部位の筋肉組織を採材する。

（ⅲ）他の考慮事項

・プアオン剤のように投与局所に残留が想定される剤形では、表１に示すものに加え、関連する組織（例えば、投与部位の筋肉、皮下脂肪又は自然な割合で脂肪を含む皮膚）を採材して分析する。

・自然な割合で脂肪を含む皮膚（豚及び家禽）のように、２つ以上の組織を合わせて定量する場合、皮膚及び脂肪を別々の試料として定量しなくてもよい。

・筋肉試料は、自然な割合で筋肉内脂肪を含む骨格（横紋）筋から採材できる。

（ⅳ）乳汁の採材

全ての動物から適切な間隔で乳汁試料を採材する。世界の商用酪農の飼養管理においては、12時間ごとの搾乳が一般的である。搾乳間隔は、６時間（１日４回）から24時間（１日１回）までの範囲にあるが、12時間以外の採材間隔を選択した場合には、申請者はその妥当性を示さなければならない。各時点で、個々の牛から、４分房からの混合乳汁を採材する。搾乳動物用の複数回投与の製剤では、乳房中の乳汁を搾りきった後に投与し、最終投与後に採材する。ただし、ゼロ休薬期間を提案する製剤では、投与期間中も採材しなければならない。標準的な採材回数はない。化学的な分析方法により検出される医薬品の残留物が、適切な濃度（例えば、MRL、トレランス又はLOQ）未満に低下するまで乳汁の採材を続けなければならない。

本ガイドラインの範囲外ではあるが、投薬された動物（すなわち母体）の乳汁（初乳を含む）を与えた動物（例えば子牛）を食用に供するために出荷する場合、承認申請者は、これらの動物の残留の評価を求められることがある。

（ⅴ）卵の採材

投与期間中及び最終投与後、全ての産卵時点で、10羽以上の産卵雌の卵を採材する。卵黄の発達を完了するのに必要な期間（通常、最高12日間）まで、卵を採材しなければならない。分析のために卵白と卵黄を合わせる。

（キ）ゼロ休薬期間を提案する製剤のための推奨

単回若しくは複数回（すなわち毎日３～５日間）投与される製剤又は残

留が定常状態に達する継続使用の製剤では、ゼロ休薬期間の設定のために１時点での試験を行うことができる。申請者は、１時点での試験を行うことの妥当性を示さなければならない。その際には、①１４－１（VICH GL46）で示した医薬品の総残留減衰特性が適切に得られている試験に用いた薬剤と最終製剤との関係及び生物学的利用能、並びに②公知の参考資料（例えば、各規制当局における規制の概要又は公表された科学文献）を考慮すること。適切なデータが得られた場合、以下に示した最小の動物数で実施した１時点での試験により、ゼロ休薬期間が認められる。

（ｉ）ゼロ休薬期間のための畜体の残留試験の試験計画

・家禽　：12羽（分析のために少なくとも６つの個々の試料を提供）

・大・中動物：６頭

本試験で選択した採材時間と、総残留減衰試験で認められた最大濃度、と畜場又は食鳥処理場までの最短の輸送時間（実質ゼロ休薬；例えば、少なくとも３時間）及びゼロ休薬期間とみなせる最長時間（例えば12時間）には整合性がなければならない。

通常、１時点での試験では、（ウ）で示した動物数より多くすることが望ましい。

（ⅱ）ゼロ休薬期間のための乳汁の残留試験の試験計画

採材時間は、最高濃度となる時間で、商用酪農に沿うものでなければならない。地域によって搾乳間隔が異なり、短い場合で６時間（１日４回）、長い場合で24時間（１日１回）とさまざまである。また、２時間ごとの搾乳（１日12回）は商用酪農では起こり得ない。全ての投与方法及び搾乳間隔を考慮した試験の実施を推奨することは、VICHの原則及び１つの共通試験計画を目指す方向性とは矛盾する。また、これまでの試験では大部分の搾乳間隔は１日２回である。しかし、１日２回の搾乳間隔の試験では、特に、乳汁の休薬期間（廃棄期間）をゼロとする場合には、全世界の規制上の懸念を解消するには不十分である。そのため、乳汁のゼロ休薬期間（投薬中も乳汁の廃棄なし）を提案する製剤については、以下の試験計画を推奨する。

・16頭以上で、３群とする。

試験群１：３頭

試験群２：３頭

試験群３:10頭

・全ての動物への投与は、容易に動物の処置ができるよう可能な限り朝（又は夕方）の搾乳直後に投与する。

・複数回（すなわち毎日３～５日間）投与される製剤では、投与期間中も承認申請者が妥当性を示した搾乳間隔で乳汁を採材する。

・試験群１（３頭）は、最終投与（又は投与中止）後約６時間で搾乳して絞りきり、最終投与（又は投与中止）後約12時間で再び搾乳する。

・試験群２（３頭）は、最終投与（又は投与中止）後約８時間で搾乳して絞りきり、最終投与（又は投与中止）後約12時間で再び搾乳する。ただし、この12時間後のデータは、搾乳間隔が短いため、使用しない。
・試験群３（10頭）は、最終投与（又は投与中止）後約12時間で搾乳して絞りきる。
・全ての試験群で、最終投与（又は投与中止）後約24時間で搾乳して絞りきり、以降約12時間間隔で搾乳し、乳汁中の残留濃度が増加しないことを確認する。

図１に、実験計画を示す。

最終投与（又は投与中止）後約12時間での搾乳はゼロ休薬期間のための試験計画では最長の搾乳間隔となる。

乳汁中のCmaxを特定するために十分な情報がある場合には、この試験計画で乳汁のゼロ休薬期間を提案することは可能であるが､最終投与(又は投与中止）後12時間での採材に引き続き、４時点以上で追加の試料を採材し、残留濃度が増加しないこと（ゼロ休薬期間を提案する製品では通常残留濃度が増加することはないと考えられる。）を確認すべきである。乳汁の試験では採材のための安楽死が不要であるので、この推奨の遵守は容易である。追加試料の採材の間隔は、約12時間又は承認申請者が妥当性を示した間隔とする。

残留減衰試験が上記の試験群１～３を含む試験計画により行われた場合、最終投与（又は投与中止）後約12時間のそれぞれの時点において残留濃度が継続して適切な濃度（例えば、MRL、トレランス）以下の場合、各VICH地域の適切なデータ解析手法に基づき、乳汁のゼロ休薬期間（廃棄期間）が認められる。すなわち、投与後のどの時点（例えば、６、８、12時間など）であっても、人の食用に供する目的で搾乳することができる。残留減衰試験が、中間の採材時点である最終投与（又は投与中止）後約６時間及び８時間である試験群１～２を含まず、最終投与（又は投与中止）後約12時間である試験群３のみで採材する試験計画により行われた場合、最終投与（又は投与中止）後12時間を経過すれば人の食用に供する目的で搾乳することができるが、12時間までに採取した乳は廃棄する必要があるだろう。

休薬期間を設定する必要がある場合（試験群３のみで採材する試験計画により行われた場合であって、最終投与（又は投与中止）後約12時間及び追加の採材時点のそれぞれの時点において、残留濃度が継続して適切な濃度（例えば、MRL、トレランス）以下の場合を除く。）は、上記の実験計画は不適当である。休薬期間を設定する必要がある場合は、(ウ)の（ⅱ）で示した20頭以上を用いた試験が必要である。

承認申請者がその妥当性を示すことができれば、上記とは別のゼロ休薬期間のための残留試験の試験計画が認められるかもしれない。

エ　指標残留の定量のための分析方法

残留減衰試験において可食組織（該当する場合には乳汁及び卵）から得られる試料中の指標残留の検出のために、承認申請者は、適切な分析方法を提出する。分析方法は、組織又は畜産物中の指標残留を、適切な濃度（すなわちMRL又はトレランス）で、確実に検出できる方法でなければならない。

分析方法のバリデーションに必要なパラメーターは、１４－４（VICH GL49）による。

（３）用語集

以下の用語は、本指針の目的のために提供される。

化学物質の１日許容摂取量（Acceptable daily intake （ADI））とは、生涯にわたって毎日摂取しても、消費者の健康に明らかなリスクがないと考えられる１日の摂取量のことである。ADIは、最も多くの場合、医薬品の毒性学的、微生物学的又は薬理学的特性をもとに設定される。通常、体重１キログラム（kg）当たりの化学物質のマイクログラム（μg）又はミリグラム（mg）で表される。

可食組織（Edible tissues）とは、フードチェーンに入ることのできる動物由来の組織のことであり、筋肉、注射部位筋肉、肝臓、腎臓、脂肪、自然な割合で脂肪を含む皮膚、全卵及び全乳を含むが、これらに限定されない。

指標残留（Marker residue）とは、当該残留物の濃度が可食組織中の総残留の濃度と既知の関係にある残留物のことである。

残留基準値（Maximum residue limit（MRL））とは、国又は地域の規制当局により定められた、法的に許容されるか又は許容可能と判断される食品中又は食品上の動物用医薬品の最高残留濃度のことである。一部の国で使用される「トレランス」という用語は、多くの場合、MRL と同義である。日本では、食品一般の成分規格の表中第３欄に定める量をいう。

実質ゼロ休薬（Practical zero withdrawal）とは、（例えば農場での）医薬品の最終投与とと殺（と畜場又は食鳥処理場への輸送を含む。）の間の最も短い期間のことである。

反芻前（pre-ruminant）とは、食肉となるルーメン機能が未発達な仔牛（乳用種を含む。）のことである。これらは、飼養管理、畜舎及びと畜までの期間の短かさから、哺乳牛とは別の区分とする。

残留物（Residue）とは、動物用医薬品（親化合物）及びその代謝物のことである。

対象残留物（Residue of concern）とは、動物用医薬品について確立されたADIと関係する全ての残留物のことである。

可食組織中の総残留（Total residue）とは、放射性同位元素標識薬剤を用いた試験又は他の同等の試験で検出される動物用医薬品（親化合物）及び全代謝物の合計のことである。

ゼロ休薬期間（Zero-day withdrawal）とは、最終投与後の時間に関係なく、フードチェーンに可食組織を出荷することを認める表示のことである。

表１．指標残留減衰試験で動物から採材される試料（全地域）

可食組織の種類	動物種及び試料		
	牛及び羊	豚	家禽
筋肉	腰部	腰部	胸部
注射部位筋肉	注射部位筋肉の中心部~500g 筋　注：直径 10 cm × 厚さ 6 cm 皮下注：直径 15 cm × 厚さ 2.5 cm	注射部位筋肉の中心部~500g 筋　注：直径 10 cm × 厚さ 6 cm 皮下注：直径 15 cm × 厚さ 2.5 cm	注射部位全体（例えば、鶏の首全体、胸部全部、脚部全部）から試料を採材 大きな家禽では 500g を超えない
肝臓	各肝葉を横断した試料	各肝葉を横断した試料	全体
腎臓	両腎臓を合わせた試料	両腎臓を合わせた試料	両腎臓を合わせた試料
脂肪	腎臓周囲	NA	NA
皮膚	NA	自然な割合で脂肪を含む皮膚	自然な割合で脂肪を含む皮膚
乳汁	全乳	NA	NA
卵	NA	NA	卵黄と卵白を合わせる

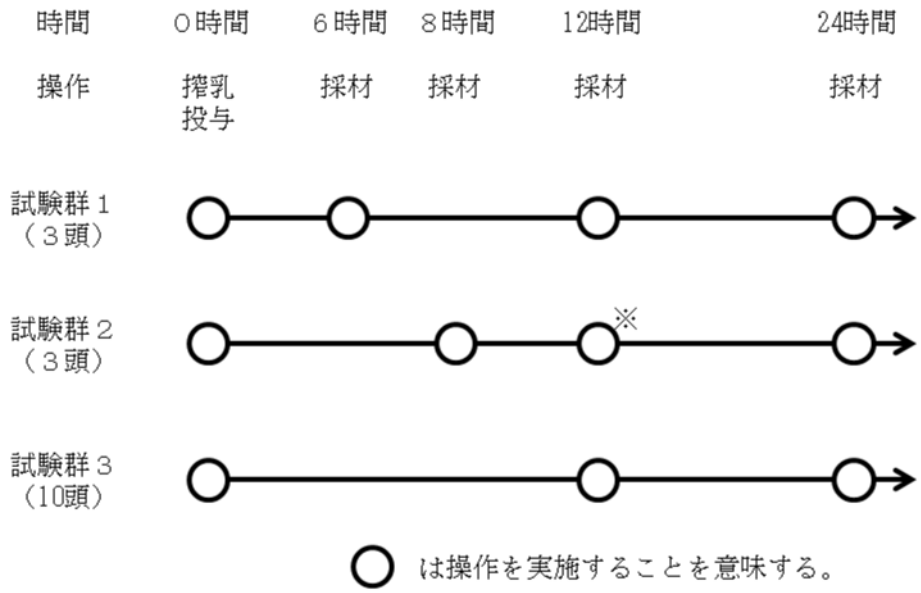
NA：適用しない。

表２．指標残留減衰試験で特定の国又は地域の消費習慣又は法律的懸念のために採材される追加の試料

可食組織の種類	動物種及び試料		
	牛及び羊	豚	家禽
筋胃	NA	NA	全体
心臓	横断	横断	全体
小腸	複数の部位を合わせた試料：内容物を洗浄	複数の部位を合わせた試料：内容物を洗浄	NA
他の内蔵	複数の部位を合わせた試料	複数の部位を合わせた試料	複数の部位を合わせた試料

NA：適用しない。

図1



※：分析不要（オプション）：この試料は、４時間の搾乳間隔で得られたものであり、分析するに値しない。この採材時点は、他の２群の 12 時間の搾乳間隔に合わせるために組み込む。

14 －４　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：製剤の休薬期間確立のための指標残留減衰試験（その２）

（１）動物

検体の適用を予定している対象動物（養殖水産動物を含む。）であって、飼料及び動物用医薬品の使用歴並びに試験開始前における飼養方法等が明らかなものを用いる。

養殖水産動物にあっては、試験期間中の飼育水温は、それぞれの試験動物ごとに、次の範囲内であることを基準とする。

ぶり、まだい、こい：18 ～ 24 ℃
うなぎ　　：20 ～ 28 ℃
にじます　　： 8 ～ 14 ℃
あゆ　　：15 ～ 21 ℃

（２）動物数

検体の消長を明らかにするために統計学的に適切な解析が実施可能な数とする。

（３）投与経路

原則として臨床適用経路とし、その経路が複数ある場合にはその経路を選択した根拠を明確にした上で、最長の残留期間が予想される経路で実施して差し支えない。

（４）用量段階

原則として臨床最高適用量とする。

（５）投与期間

臨床適用の最長投与期間とする。ただし臨床適用の期間が長期の場合には、残留量が一定値に到達することを推定できる期間まで投与期間を短縮して差し支えない。

（６）試料の採取

ア　検体の消長を明らかにするため、統計学的に適切な解析が実施可能な採取時点を設定する。ただし、原則としていずれの採取時点においても少なくとも３試料から分析対象が検出されるよう設定する。

イ　食品一般の成分規格の表中第１欄に掲げるものを有効成分として含有する検体にあっては、試験動物をと殺して得る試料の採取時点は、検体の投与終了後に消失期に入った時点と、器官又は組織中の残留濃度が残留基準値以下となる時点とその間に少なくとも一時点の採取時点を設定する。食品一般の成分規格の表中第１欄に掲げるもの以外を有効成分として含有する検体にあっては、必要に応じて農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課又は動物医薬品検査所に採取時点について相談されたい。

ウ　と殺を必要としないで得る試料（卵、乳汁など）の採取時期は、できる限り頻度を多く設定する。

エ　試料の採取部位は、原則として残留のおそれのある可食部位（筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、小腸、卵、乳汁、注射部位など）とする。

オ　試料の採取に当たっては、同一器官又は組織中であっても、採取部位により検体の残留濃度が異なる場合があるので、十分留意する。

カ　試料は、速やかに分析に供する。

なお、やむを得ず速やかに分析に供しない場合には、試料を凍結保存し、保存中及び凍結・解凍の過程で検体が分解しないよう留意すること。

（７）後発動物用医薬品の残留確認試験

11 －１の後発動物用医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインの（３）のアの（カ）による。

14 －５　食用動物における動物用医薬品の代謝及び残留動態を評価するための試験：残留試験において使用される分析方法のバリデーション（VICH GL49R）

（１）緒言

ア　目的

本指針の目的は、EU、日本、米国、オーストラリア、ニュージーランド及びカナダにおいて、動物用医薬品の残留減衰試験において使用される分析方法のバリデーションとして適切な基準の全般的な解説を提供することである。

イ　背景

残留減衰試験は、動物用医薬品の開発過程において、動物用医薬品を投与された動物の可食組織（組織、乳、卵又は蜂蜜）中に存在する１つ以上の残留物の濃度を測定するために実施される。この情報は、各国における残留規制に用いられる。残留規制のための分析方法（すなわち、承認後の残留モニタリングの分析方法）の提出及びそのバリデーションの要件については、通常、各国の規制当局によって適切に定められており、国又は地域の法律によって定められる場合もある。しかし、残留減衰試験は、通常、残留規制のための分析方法が確立される前に実施される。多くの場合、バリデートされた組織中の残留物の分析方法は、規制当局による残留モニタリングの分析方法の基礎となる。残留減衰試験で使用され、残留基準（MRL）及び休薬期間を裏付けるために規制当局に提出される分析方法のバリデーションの要件については、国際的に調和されなければならない。本指針の意図は、VICH 地域の規制当局が受け入れ可能な、残留減衰試験で使用するためのバリデーションの手順を提示することにある。このバリデートされた分析方法は、後に修正され「残留規制のための分析方法」となるかもしれないが、本ガイドラインではその段階の過程については記述しない。

分析方法に関する様々なバリデーションのガイドラインがあり、それらのバリデーションの手順の多くが、指針に取り入れられている（VICH GL1 （バリデーションの定義。1998 年 10 月）及び VICH GL2 （バリデーションの方法論。1998 年 10 月））。しかし、本指針で記述される動物用医薬品の残留分析方法に関するバリデーションの手順については、以前の指針では記述されていない。本指針では、特に動物用医薬品の残留分析方法のバリデーションについて記述することを意図している。

（２）指針

ア　目的

本指針の目的は、残留減衰試験で得られる組織試料の分析のために開発された分析方法のバリデーションに用いることができる手順の全般的な解説を提供することである。

本指針において、「許容」（acceptable）とは、記載されたバリデーションの項目に関する分析方法の科学的評価に基づく判断基準を指す。

イ　適用範囲

本指針では、動物用医薬品の残留分析方法（指標残留減衰試験で残留物を

検出するために開発された分析方法）に適用することのみを意図している。残留モニタリングの分析方法のバリデーションの要件を定めることは意図していない。

本指針では、通常、VICH 地域の規制当局によって受け入れられる残留物の分析方法の分析能パラメータを規定する。その意図は、本指針に従ってバリデートされた方法により、適切な休薬期間の設定において、規制当局に通常受け入れられる残留データを得ることである。

残留試験は妥当性が確認された方法を用いて GLP に準拠して実施しなければならないが、分析方法のバリデーションは GLP に準拠しなければならない範囲に含まれていない。しかしながら、分析方法のバリデーションによって得られた生データは、適切に保管し、かつ、規制当局から要求された場合には提出しなければならない。

（３）分析能パラメータ

通常、分析方法のバリデーションには、特定の分析能パラメータがある。それらの分析能パラメータは、以下のように定義される：

・直線性（Linearity）
・真度（Accuracy）
・精度（Precision）
・検出限界（Limit of Detection）
・定量限界（Limit of Quantification）
・選択性（Selectivity）
・基質中での安定性（Stability in Matrix）
・処理試料中の安定性（Process Sample Stability）
・頑健性（Robustness）

各パラメータは、動物用医薬品の残留減衰試験での使用を意図した分析方法のバリデーションに適用されるもので、以下のとおり規定される。

ア　直線性（Linearity）

予測される基質（組織、乳、卵又は蜂蜜）中濃度の範囲内で、直線関係を評価するための検量線を作成しなければならない。標準品の検量線は、溶媒又は緩衝液中の標準品、対照基質の抽出物に添加された標準品及び対照基質に添加され、抽出過程を経た標準品の３つの方法で作成することができる。直線性については、少なくとも５水準の濃度を使用し、既知濃度に対する反応を、線形、多項式又は他の（適切な）回帰プロットによって示す。重み係数の許容については、残渣がランダムに分布しているか確定するために、３回の分析による残差の評価によって決定しなければならない。残差の評価は、少なくとも独立した３回の分析で行う。

検量線の推奨許容基準は、検量線の算出方法に依存する。対照試料に添加され、前処理過程を経た標準品により作成された検量線では、試料と同じ許容基準が適用される（ウを参照）。溶媒又は緩衝液中の標準品又は対照基質の抽出物へ添加された標準品により作成された検量線では、より厳密な許容

基準（併行精度：全ての濃度で 15 %（LOQ 以下は 20 %）が要求される。

直線性を得るために、対数変換を必要とする定量法（例えば、微生物学的定量法）もあれば、用量－反応関係を確立するためにより複雑な関数を用いた計算を必要とする定量法（例：ELISA、RIA）もある。ここでも、選択した関数の「許容」については、その関数を使用した場合の残差の評価によって検証しなければならない。

イ　真度（Accuracy）

分析方法の真度とは、分析対象の濃度の真値と実験過程を経て得られる値の平均値との一致の程度のことである。真度は、系統誤差（分析方法による偏り）及び分析対象の回収率（回収率%として評価される）と密接な関係がある。残留分析方法の推奨される真度は、分析対象の濃度によって異なる。真度は、表１に示した範囲に適合しなければならない。:

ウ　精度（Precision）

分析方法の精度とは、同一の均質の被験物質から、規定された条件に従って測定して得られた、複数の試験結果の間の一致の程度のことである。異なる施設間の分析のばらつきを室間再現精度と定義し、施設内での反復分析によるばらつきを併行精度と定義する。単一施設のバリデーションの精度には、分析ラン内（併行精度）と分析ラン間の精度を含まなければならない。

バリデーションの過程の中で、分析方法の分析ラン内及び分析ラン間の精度を求めることができる。多くの場合、分析法を開発する施設と残留減衰試験の試料を分析する施設は同じであるため、通常、残留減衰試験を実施するために、室間再現精度（施設間の精度）を求める必要はない。分析方法の室間再現精度の代わりに、分析ラン内精度を求めることができる。分析ラン内及び分析ラン間精度は、バリデートしようとする範囲（LOQ を含む。）を含む３水準の濃度で、３日間で少なくとも３回ずつ繰り返した分析結果の評価により決定する。

残留分析方法のバリデーションでは、許容されるばらつきは、分析対象の濃度に依存する。精度は、表２に示した範囲に適合しなければならない。

エ　検出限界（Limit of Detection）

分析方法の検出限界（LOD）とは、許容される確かさで試験試料中の分析対象を検出可能な最低濃度のことである。LOD を求める科学的に妥当な方法は幾つかあるが、使用する方法の科学的妥当性を示すことができれば、いずれの方法を用いてもよい。付記１及び付記２として LOD を求めるプロトコールを、付記３として一つの試験で真度、精度、LOD、LOQ 及び選択性を求めるプロトコールを例示した。

オ　定量限界（Limit of Quantification）

分析方法の定量限界（LOQ）とは、規定された真度及び精度で測定可能な分析対象の最低濃度のことである。LOD と同様、LOQ を求める科学的に妥当な方法は幾つかあるが、使用する方法の科学的妥当性を示すことができれば、いずれの方法を用いてもよい。付記１及び付記２として LOQ を求めるプロトコ

ールを、付記３として一つの試験で真度、精度、LOD、LOQ 及び選択性を求めるプロトコールを例示した。

カ　選択性（Selectivity）

選択性とは、測定する分析対象と測定する試料に共存する他の物質を識別する分析方法の能力のことである。残留減衰試験で用いられる分析方法では、選択性は、主に測定する試料中の内因性物質について規定される。残留減衰試験は、十分に管理されており、その他の投与物質（すなわち、他の動物用医薬品又はワクチン）は予めわかっているか、試験中の投与が禁止されている。バリデートされた分析方法を残留規制の分析方法として提出する必要がある場合、試験実施者は、供試動物に使用される既知の物質について試験し、想定される分析への妨害の有無を確認するとよい。

分析方法の選択性の適切な尺度は、ブランク試料の反応である（オを参照）。対照試料の反応は、LOQ での反応の 20 %以下としなければならない。付記３として一つの試験で真度、精度、LOD、LOQ 及び選択性を求めるプロトコールを例示した。

キ　基質中での安定性（Stability Matrix）

残留減衰試験から採材した試料（組織、乳、卵又は蜂蜜）は、通常、分析するまで凍結保存する。予定される保存条件下で、過度の減少なしに試料を保存できる期間を、分析前に明らかにする必要がある。適切な保存条件（４℃、－ 20 ℃及び－ 70 ℃）及び分析前に試料を保存できる期間を明らかにするために、バリデーションの一部又は別の試験として、安定性試験を実施する必要がある。

試料に既知量の分析対象を添加し、適切な条件下で保存する。試料は規定した間隔（例：開始時、１週目、１か月目、３か月目）で分析する。試料を凍結する場合には、凍結融解試験（１日１回の凍結及び解凍の繰り返しを最低３回）を実施する。また、保存開始時の濃度を決定する初期試料として、投与動物試料を用いることができる。基質中での安定性の評価のため、バリデートされた範囲の最高と最低付近の２水準の濃度で分析を行うプロトコールが推奨される。規定した保存時点で得た平均濃度が、イで規定された真度の許容範囲以内で、保存開始時の試料の分析結果又はブランク試料に新たに分析対象を添加した試料の分析結果と一致する場合、基質中での安定性は許容される。

ク　処理試料の安定性(Processed Sample Stability)

試料処理の翌日に定量すること又は機器の故障のため何日か保存することはよくある。処理試料の保存条件下での安定性を明らかにするため、必要であれば、処理試料の抽出物中の分析対象の安定性を検討する。室温で４～ 24 時間及び４℃で 48 時間が、保存条件の例として考えられる。処理方法により、その他の保存条件を検討する。処理試料の安定性の評価のため、バリデートされた範囲の最高と最低付近の２水準の濃度で３回の分析を行うプロトコールが推奨される。規定した保存時点に得た平均濃度が、イで確立された真度

の許容範囲以内で、処理直後の試料の分析結果又はブランク試料に新たに分析対象を添加して処理した試料の分析結果と一致する場合、処理試料中での安定性は十分である。

ケ　頑健性（Robustness）

残留規制の分析方法では、頑健性の評価は重要である。通常、１つの施設で、同じ機器を使用して実施する残留分析方法では、頑健性の評価は重要ではない。しかし、特に、経時的に変更又は改定が行われる分析方法の要因については、頑健性を評価しなければならない。試薬のロット、インキュベーション温度、抽出溶媒の組成及び容量、抽出時間、抽出回数、固相抽出（SPE）カートリッジのメーカー及びロット、分析カラムのメーカー及びロット並びに高速液体クロマトグラフィー（HPLC）溶出溶媒の組成が、これらの要因に含まれる。分析方法の開発、バリデーション又は使用において、これらの要因のいずれか又は全てが分析方法に与える影響の程度を明らかにし、分析方法に影響を及ぼす可能性が最も高い条件での変動について評価しなければならない。

（４）用語集

分析手順の真度（Accuracy）とは、分析対象の濃度の真値と実験過程を経て得られる値の平均値との一致の程度のことである。通常、分析方法の真度は、回収率又は誤差率で示される。

ブランク試料（Control sample）とは、試験中の動物用医薬品を投与していない動物の組織、乳、卵又は蜂蜜のことである。

分析ラン間精度（Between-run Precision）とは、同一試験施設内の分析ラン間の変動である。

投与動物試料（Incurred sample）とは、動物用医薬品を投与し、分析対象が残留している動物の組織、乳、卵又は蜂蜜のことである。

個々の分析方法の検出限界（Limit of Detection）とは、必ずしも正確な数値で定量できないが、許容される確かさで検出できる試料中の分析対象の最低濃度のことである。

個々の分析方法の定量限界（Limit of Quantitation）とは、許容される精度及び真度で定量的に分析することができる試料中の分析対象の最低濃度のことである。

分析方法の直線性（Linearity）とは、（一定の範囲内で）試料中の分析対象の濃度（量）に対応する分析結果を得る能力のことである。

指標残留物（Marker residue）とは、当該残留物の濃度が可食組織中の総残留の濃度と既知の関係にある残留物のことである。

基質（Matrix）とは、対象残留物が残留するか又は残留する可能性のある基本的な可食の畜産物（組織、卵、乳又は蜂蜜）のことである。

分析方法の精度（Precision）とは、同一の均質な試料から、規定された条件に従って測定して得られた、複数の試験結果の間の一致の程度のことである。通常、分析方法の精度は、一連の測定値の分散、標準偏差又は変動

係数で示される。

処理試料（Processed Sample）とは、採取した試料の基質中から分析対象を得るために、抽出又は別の方法で処理した試料のことである。

併行精度（Repeatability）とは、短期間の同一の作業条件下での精度のことである。

室間再現精度（Reproducibility）とは、施設間の精度のことである。

残留物（Residue）とは、動物用医薬品（親化合物）及びその代謝物のことである。

分析方法の頑健性（Robustness）とは、分析方法の条件を小さい範囲で故意に変動させたときに測定値が影響を受けにくい能力の尺度のことである。

選択性（Selectivity）とは、試料中に存在する可能性のある成分（内因性物質、分解産物、他の動物用医薬品）の存在下で、分析対象を測定する能力のことである。

分析ラン内精度（Within-run Precision）とは、同一試験施設内の分析ラン内の変動のことである。

表１　真度の許容範囲

分析対象の濃度	真度の許容範囲
＜ 1 μg/kg	－ 50% ～ ＋ 20%
≧ 1 μg/kg ＜ 10 μg/kg	－ 40% ～ ＋ 20%
≧ 10 μg/kg ＜ 100 μg/kg	－ 30% ～ ＋ 10%
≧ 100 μg/kg	－ 20% ～ ＋ 10%

表２　精度の許容範囲

分析対象の濃度	許容される 分析ラン内精度 （併行精度） %CV	許容される 分析ラン間精度 %CV *
＜ 1 μg/kg	30%	45%
≧ 1 μg/kg ＜ 10 μg/kg	25%	32%
≧ 10 μg/kg ＜ 100 μg/kg	15%	23%
≧ 100 μg/kg	10%	16%

＊：Horwitz の式（$CV = 2^{(1-0.5 \log C)}$　C = 小数で表される濃度（例えば、1 μg/kg は、10^{-9} として表される。））により決定。

付記１　LOD 及び LOQ 決定のための方法例

一般に使用される方法の一つとして、IUPAC の定義[1]がある。その手法では、20 のブランク試料（少なくとも 6 の異なる動物由来のもの）の定量結果の平均値に平均値の標準偏差の 3 倍を加えたものを LOD として算出する。そのとき、同じ結果の平均値に平均値の標準偏差の 6 又は 10 倍を加えたものを LOQ とする。算出された LOQ の濃度での真度及び精度の試験により、LOQ 決定の最終的な根拠を得ることができる。算出された LOQ の濃度での併行精度測定値の変動係数%（%CV）が、真度及び精度の許容基準（（３）のイ及び（３）のウ）に適合するのであれば、算出された LOQ は許容される。

付記２　LOD 及び LOQ 決定のための米国環境保護庁の方法

以下の方法は、40 CFR Part 136, Appendix B [2]で公表された米国農務省の地域間プロジェクトの第４プログラムで用いられた方法を若干修正したものである。この修正された方法は、米国の環境保護庁の「人の健康食品暴露評価における不検出又は不定量の殺虫剤の残留 Assigning Values to Non-detected/Non-quantified Pesticide Residues in Human Health Food Exposure Assessments」の文書の Appendix 1 にある。組織標識残留物の分析方法の例として適当となるように若干修正した方法を以下に示す。

この方法では、基質中の分析対象の分析方法の LOD 及び LOQ の算出を、以下の２つの段階で行う。

・第１段階では、予備的な LOD 及び LOQ の算出並びに濃度と装置の反応の間の直線性の確認を行う。算出された予備的な LOD 及び LOQ は、それぞれ、IDL（装置検出限界）及び IQL（装置定量限界）と呼ばれる。実際の分析方法の LOD 及び LOQ の算出のため、次の段階で、対象基質に予備的な LOQ となる量を添加する。

・第２段階では、対象基質における分析方法の検出限界及び定量限界を評価するため、第１段階で決定された予備的な LOD 及び LOQ を使用する。

付記３　残留分析法バリデーションのプロトコール

選択性、LOD 及び LOQ は、いずれも相互に関係し、分析する基質中に存在する可能性のある内因性物質による影響を受ける。特に、液体クロマトグラフィー／質量分析（LC/MS）法では、多くの場合、ブランク試料では、分析対象の保持時間における反応が得られないことから、LOD を特定することは困難である。反応が得られなければ、標準偏差を計算することができないため、平均値＋平均値の標準偏差(SD)の３倍により LOD を決定することはできない。平均値＋平均値の SD の３倍で LOD を決定できる場合でも、LOD は、分析方法の検出限界より、むしろ機器の検出限界と関係することが多い。以下のプロトコールは、一つの試験で、特異性、LOD、LOQ、精度及び真度を決定するために設計されたものである（図１参照）。

１）６の異なる由来の動物から薬剤陰性の基質を採材し、分析対象への予想されるすべてのコンタミネーションを避ける。

２）０、(分析法の開発中に特定された）推定 LOD 量及び推定 LOD の３倍量（推定 LOQ 量）並びに予定の濃度範囲内の３水準の濃度となる量の分析対象を、各濃度３以上のブランク試料（全ての由来の基質が、３日間の試験で、各濃度に１回以上含まれるよう、６のブランク試料からランダムに選択する）に添加する（表１）。２日目及び３日目に、同様の添加過程を繰り返す。

３）18 の試料を毎日分析し、標準品の検量線に対する結果を評価する。

４)分析した３日間の全ての濃度に対する分析した濃度の結果をプロットする。これにより、日間のデータを標準化し、LOD 及び LOQ の決定に用いられる３回の分析ランのデータを取り込む。

５）確率α（偽陽性）に基づく上側信頼限界の線及び確率β（偽陰性）に基づく下側信頼限界の線により、重み付けした回帰直線を中心とする予測区間を計算し、検出限界を定める[4]。この時、検出限界（Y_C）は、上側信頼限界が Y 軸と交わる点となり、回帰直線から x 軸へ垂線をおろすことにより添加濃度（L_C）に換算することができる。L_C は、反応の 50%が事実である場合の臨界点となる。L_D（LOD）は、βの水準まで偽陰性率を低減する下側信頼限界の線βから濃度を算出することで決定できる。通常、α及びβの両方を５%と定める。

６）検出限界（Y_C）に３（LOD と LOQ の共通に受け入れられる比は３である。）を乗じ、定量限界（Y_Q）を定める。L_Q（LOQ）は、その時、βの水準まで LOQ 決定のための偽陰性率を低減する下側信頼限界β（通常 5 %）と Y_Q の交点から算出することで決定できる。

７）日内精度は、得られた個々の濃度の CV %を計算することで決定できる。真度は、得られた結果と添加濃度を比較することで決定できる。真度及び精度の許容基準は、それぞれ、（３）のイ及び（３）のウに記載されている。

本アプローチは、選択性、LOD 及び LOQ 間の相互関係を考慮に入れている。6 つの異なる由来の基質を使用して LOD 及び LOQ を決定することにより、基質に起因するばらつき及び定量法のばらつきを考慮できる。残留分析法の選択性は、基質の成分に影響されるため、本アプローチは、選択性の情報を提供するとともに、特定した LOD 及び LOQ における選択性が許容されることを保証する。本アプローチは、VICH GL2（バリデーション方法）ガイドラインにおいて規定した検出限界及び定量限界の測定に準ずるものである。

1　Codex Alimentarius Procedural Manual, 15th Ed., Twenty-eight Session of the Codex Alimentarius Commission, Rome, 2005, p 81

2　U.S. Code of Federal Regulations, Title 40: Protection of Environment , Part 136 - Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants, Appendix B to Part 136 - Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit - Revision 1.11.

3　U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, March 23, 2000, ″Assigning Values to Non-detected/Non-quantified Pesticide

Residue in Human Health Food Exposure Assessments″ Appendix 1, A-1 through A-8.

4 Zorn ME, Gibbons RD, Sonzogni WC. Weighted Least-Squares Approach to Calculating Limits of Detection and Quantification by Modeling Variability as a Function of Concentration, *Anal Chem* **1997,** 69, 3069-3075

14 － 6　動物用医薬品の休薬期間設定のための統計学的解析

（1）　休薬期間の設定には、適切な統計学的手法を用いること。

ア　組織等からの薬物最終排泄の数学モデルとしては、次の指数型減衰曲線が知られている。

$Ct= C_0e^{-vt}$ ・・・・・（a）

（a）式の Ct は t 時点の測定値で、その自然対数 $logeCt=logeC_0 - vt$ を $logeCt=Y(t)$、$logeC_0=a$、$v=-b$ と置き換えると、

$Y(t)=a + bt$・・・・・（b）

の直線回帰式に変換される。（b）式及び測定データは、図１及び表１のように表示される。

イ　直線回帰分析

（ア）から（ウ）に示した回帰仮説が正しいものであるとの確認を行うこと。

（ア）データを図にプロットし、各時点ごとのデータのばらつきや、全体の減衰直線傾向を観察する。著しくかけ離れたデータがあった場合は、試験設計、採材、薬物測定等の過程における異常を精査し、異常理由の明らかなものはそのことを申請資料に記述して、以後の解析から除外してよい。

しかし、これらのデータが全データの 10 %以上を占める場合は、試験をやり直さなければならない。

（イ）各時点の分散 Vi の等分散性を Cochran の検定又は Bartlett の検定で確認しておくこと。

（ウ）次の回帰による分散分析を行い、直線性の検定、回帰統計量の算出を行う（表２参照）。

直線性、曲線性の F 検定は、有意水準 P=0.025（2.5 %）で行い、直線性の有意性、曲線性の非有意性を確認してから、曲線性と残差の平方和を併合して、次のように直線の誤差分散（Ve）を求める。

$Ve=s^2=(S_{TL}+S_R)/(N - 2)$

次の回帰統計量を求める。

直線回帰係数　$b=Sty/Stt$

切片　$a=Y..- bt..$

（2）　休薬期間の評価方法

ア　特定の採材時間 ti における直線の最大許容濃度の上限は、次式によって推定する。

$Y(ti)=a+bt_I+ks$・・・・・（c）

ここで、s は直線の誤差分散 S^2 の平方根、k は k=h・t（N － 2,c）によって求められる統計量であり、

$h=[1/N+(t_I - t..)^2/Stt]^{1/2}$

$d=Zp/h$

p は、標準正規分布の上側 100（1 － p）%点の値であるが、ここでは、

p=0.01、上側 99 %点の値 Zp=2.3264 を用いる。

t（N － 2,c）は、自由度 N － 2 の非心度 d の t 分布における上側 100（1 － c）%点の値であるが、ここでは c=0.05 として最大許容濃度域 100（1 － c）=95 %点の値を用いることとする。非心度 d の t 分布は、常用されている中心（d=0）t 分布とは異なるので、Owen の統計数値表などにより求める。

等の求値によって計算する。

イ　任意の ti により求めた最大許容濃度の上限 Y（t_1）が、定められた残留基準値の対数値を超えているかどうかを調べる。もし超えていれば、より多い t_1 に変えて（ｃ）式の計算を反復する。Y（t_1）が定められた残留基準値の対数値を下回った最初の t_1 までを、休薬期間とし、$e^{Y(t)}$ の真数に変換して推定濃度を確認する。これは測定濃度Ｙが正規分布であることを前提に、（ｃ）式の Y（t_1）が残留基準値の自然対数を下回る確率が 99（1-0.01）%以上であることを 95（1-0.05）%以上の確率で保証したものであり、その上限値が最大許容濃度である。

（３）　なお、食衛法第１１条第１項及び第３項の基準値又は検出限界値及び吸収排泄等試験での検体の消長から、休薬期間の設定が不要であると推定される場合又は分析対象の消失が極めて速やかで、（１）及び（２）の統計学的解析が適用できない場合にあっては、（１）及び（２）の統計学的解析を行う必要はない。ただし、これらの場合には、他の適切な統計学的解析等の科学的根拠に基づき、休薬期間の設定を不要と推定したことの妥当性又は休薬期間の妥当性を示す必要がある。（また、後発動物用医薬品の試験の場合にあっては、原則として、実測値が残留基準値を超えていないことを確認すればよい。）

図１　残留試験の統計学的解析における直線回帰式

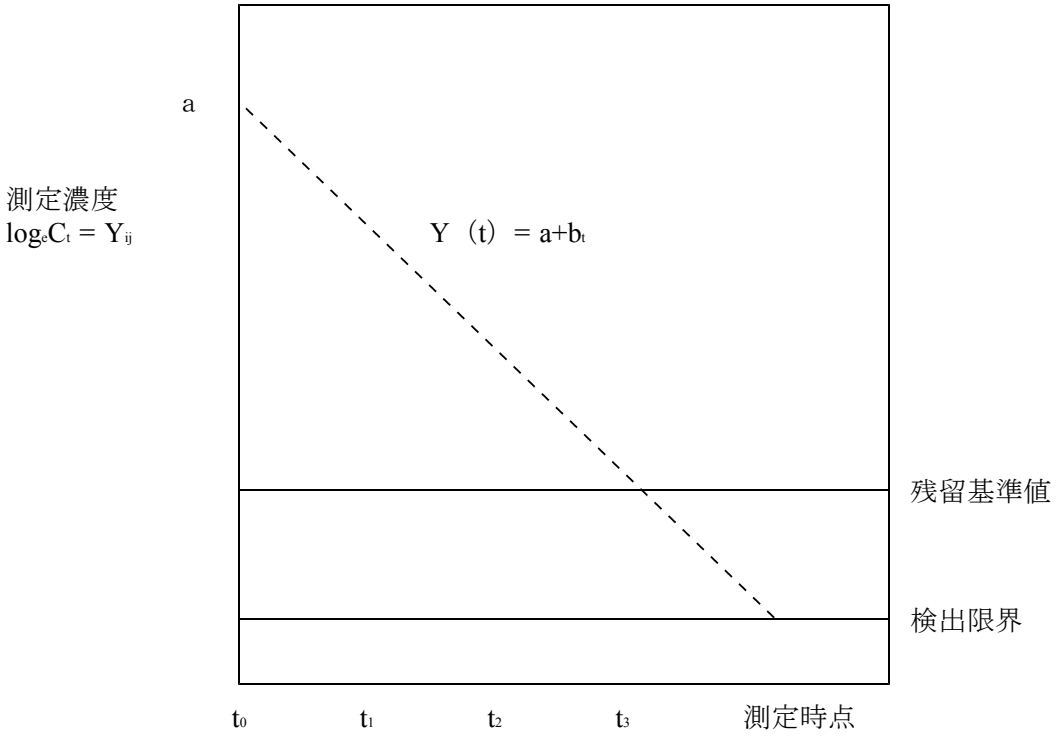


表１　残留試験の統計学的解析における測定データ

採材時点 t_i	測定濃度 C_{ij}	自然対数変換 $Y_{ij}=\log_e C_{ij}$	平均値	分散
t_1	C_{11}	Y_{11}	$Y_1=\Sigma\ Y_{1j}/n_1$	$V_1=\Sigma\ (Y_{1j}-Y_1)\ 2/(n_1-1)$
	C_{12}	Y_{12}		
	・	・		
	・	・		
	C_{1n2}	Y_{1n1}		
t_2	C_{21}	Y_{21}	$Y_2=\Sigma\ Y_{2j}/n_2$	$V_2=\Sigma\ (Y_{2j}-Y_2)\ 2/(n_2-1)$
	C_{22}	Y_{22}		
	・	・		
	・	・		
	C_{2n2}	Y_{2n2}		
・	・	・	・	・
・	・	・	・	・
t_m	C_{m1}	Y_{m1}	$Y_m=\Sigma\ Y_{mj}/n_m$	$V_m=\Sigma\ (Y_{mj}-Y_m)\ 2/(n_m-1)$
	C_{m2}	Y_{m2}		
	・	・		
	・	・		
	C_{mnm}	Y_{mnm}		

表２ 残留試験の統計学的解析における直線回帰分析

変動因 Fv	平方和 ss	自由度 df	不偏分散 Ms	分散比のＦ検定
直線性	S_L	1	$V_L=S_L/1$	$V_L/V_R \geqq F(1,N-m,.025)$
曲線性	S_{TL}	m-2	$V_{TL}=S_{TL}/m-2$	$V_{TL}/V_R < F(m-2,N-m,.025)$
残　差	S_R	N-m	$V_R=S_R/N-m$	

全データ数	$N=\Sigma\ ni$
採材時間の総平均	$t..=\Sigma\ \Sigma\ t_{ij}/N$
測定値の総平均	$Y..=\Sigma\ \Sigma\ Y_{ij}/N$
採材時間の偏差平方和	$S_{tt}=\Sigma\ \Sigma\ (t_{ij}-t..)^2$
測定値の偏差平方和	$S_{yy}=\Sigma\ \Sigma\ (Y_{ij}-Y..)^2$
積和	$S_{ty}=\Sigma\ \Sigma\ (t_{ij}-t..)(Y_{ij}-Y..)$
直線性の平方和	$S_L=(S_{ty})^2/S_{tt}$
採材時間の平方和	$S_T=\Sigma\ n1\ (Y_i-Y..)^2$
曲線性の平方和	$S_{TL}=S_T-S_L$
残差平方和	$S_R=S_{yy}-S_T$

15　内因性感染症に適用するワクチンの製造販売承認申請に際して添付すべき資料について

（１）物理的、化学的試験の資料

物理的、化学的試験の資料のうち規格及び検査方法設定資料について、ワクチンで通常用いられている免疫学的手法による力価試験の設定が困難な場合には、次のいずれかを力価試験とした資料を添付すること。

ア　生菌数試験、ウイルス含有量試験又は抗原定量試験

イ　他種の感染症の増悪を指標として当該内因性感染症に対する効果が間接的に判定できると考えられるものについては、他種の感染症の増悪防止に関する試験

ウ　ア及びイ以外の方法で、検体の力価を明らかにすることができると考えられる試験

（２）臨床試験の資料

検体投与群と非投与群について、検体の効果（飼料効率、増体率、産卵率の改善等）に関する統計学的処理を行い、両群の有意差を明らかにした資料を添付すること。

16　水産動物への使用を目的とする動物用医薬品の製造販売承認申請のための各試験の実施細則

この実施細則は、水産動物への使用を目的とする動物用医薬品（以下「水産用医薬品」という。）の製造販売承認等の目的で実施される試験のうち、水産動物や水産養殖業の特性を考慮することが必要な項目について 10 の「動物用医薬品のための安全性試験法ガイドライン」及び 14 の「動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン」に示した試験の実施方法に加える実施方法等の細部にわたる指針及び推奨事項を示すことを目的とする。

しかし、本来全ての水産用医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的でなく、また、試験の進展に応じて新たな実験を追加する必要が起きることも少なくない。したがって、医薬品の有用性が評価できるものである限り、必ずしもここに示した方法等を固守するよう求めるものではない。

（１）各試験の実施方法

ア　安定性試験

水産養殖業の特性を考慮して、自然環境に存在しない化学物質を有効成分とした飼料添加剤及び薬浴剤の場合は以下の試験を行う。

なお、観賞魚用医薬品であって、家庭内等で小規模に使用されることを想定としたものの場合は以下の試験を省略してよい。

（ア）海水中又は淡水中における分解性試験

対象とする養殖水産動物が海産の場合は海水、淡水産の場合には淡水に検体濃度が１～ 10μg/mL の範囲内となるように海水又は淡水に溶解又は懸濁後、２Ｌ容ビーカーに１Ｌ入れ、これを室温 25 ℃前後に保った室内において、以下の３条件の試験を行う。いずれの試験においても、蒸発による水の減量は蒸留水を補充することによって補正する。

なお、海水は人工海水を用いてもよい。

試験１：暗条件及び静止条件

試験２：キセノンランプ等による２万ルックスの明条件及びかくはん条件

試験３：検体溶解液に養殖場付近の砂泥を約 100g 添加し、試験２と同条件

いずれも開始 10 日、20 日、30 日後に、保存液中の検体濃度を求め、保存開始時の濃度に対する分解率を求める。

分析は、日本薬局方等の一般に公定されている方法を用いることが望ましいが、海水中又は淡水中における変化を知ることができる公知の分析方法を用いてもよい。

イ　安全性試験

（ア）動物

１か月以上抗菌性物質等試験に影響のある物質を投与していないものを用いることが望ましい。

飼育槽は、室内水槽、野外の池やいけす等、いずれでもよい。

試験前には予備飼育を行う。これにより、死亡のみられないこと及び摂餌、体色、遊泳等健康状態について異常のないことを確認するとともに試験環境に十分馴致することが望ましい。

予備飼育期間及び試験期間中は給餌する。給餌方法としては飽食を基本とし、残餌がなく試験動物がむらなく摂餌できるよう留意する。投与する飼料は当該養殖水産動物に用いられているものを使用し、原料及び配合割合を明らかにする。

ぶり、まだい、こい、うなぎ、にじます、あゆ以外の養殖水産動物を用いたときの飼育水温は、次の範囲内であることを基準とする。ただし、１６－１の「水産用ワクチンの属ごとの承認に必要な試験に関する指針」に基づき､やいとはた及びちゃいろまるはたを用いた試験を行う場合は除く。

にしん目魚類：12 ～ 18 ℃

こい目魚類、うなぎ目魚類、すずき目魚類、かじか目魚類、かれい目魚類、ふぐ目魚類、十脚目甲殻類：22 ～ 28 ℃

（イ）用量段階

試験群の投与量は、水産動物の場合、大量に投与しても副作用がみられないことが多いことから、臨床最高投与量 10 倍量を上限としてよい。

（ウ）観察事項

試験群の全例について、一般状態を多元的に毎日観察した結果、臨床最高投与量に比べ相当程度の水準の用量段階で摂餌、体色、遊泳等の異常といった外見上の副作用がみられず、医薬品の安全性が判断できる場合は、と殺剖検や血液の採取による各種検査はそれぞれの必要性に応じて全部又は一部を省略してよい。

ウ　薬理試験（効力を裏付ける試験資料）

（ア）対象病原菌を用いた感受性試験

本試験は抗菌性医薬品に限って実施する。対象病原菌の検体に対する感受性を測定し、検体の有効性を試験する。

①　供試菌株

当該養殖水産動物からの野外分離菌株おおむね 50 株以上を用いる。供試菌株は、１流行期１養殖場当たりの野外分離株を５株以内とするなど、採取時期、採取場所などに偏りのないよう広く収集することが望ましい。

②　方法

検体の各供試菌に対する最小発育阻止濃度を「日本化学療法学会標準法」に準じて、寒天平板希釈法により測定する。

③　その他

検体の投与により抗菌活性のある代謝生成物が認められる場合であって、代謝生成物の効果を標榜する場合には、その代謝生成物について上記の方法によって感受性試験を行い、対象病原菌等に対する抗菌活性を明らかにする。

（イ）用量設定試験

本試験は抗菌性医薬品の臨床試験及び安全性試験における投与量を設定することを目的とする。対象病原菌を試験動物に接種した後、検体を投与し効果を試験する。なお、臨床試験において投与量を設定する場合、又は他の資料によリ投与量が設定できる場合は、本試験は省略してよい。

①　動物

検体の適用を予定している養殖水産動物であって、飼料及び飼育歴並びに試験開始前における飼養方法等が明らかなものを用いる。１か月以上抗菌性物質等試験に影響のある物質を投与していないものを用いることが望ましい。

飼育槽は、病原体の拡散による環境への悪影響がない限り、室内水槽、野外の池やいけす等、いずれでもよい。

試験前には予備飼育を行う。これにより、死亡のみられないこと及び摂餌、体色、遊泳等健康状態について異常のないことを確認するとともに試験環境に十分馴致することが望ましい。

予備飼育期間及び試験期間中は給餌する。給餌方法としては飽食を基本とし、残餌がなく試験動物がむらなく摂餌できるよう留意する。投与する飼料は当該養殖水産動物に用いられているものを使用し、原料及び配合割合を明らかにする。

飼育水温は、当該疾病の発生が予想される水温範囲内とする。

②　動物数

各用量群について、おおむね 20 尾以上を用いる。

③　感染

人為的感染を実施する。

予備試験を行って供試菌株の LD_{50} を求め、これを基準に接種量を設定し、接種量を明記する。また本試験においては、無投与対照群の死亡率がおおむね 70 ％以上になるように接種量を設定し、最高投与群の有効率がおおむね 70 ％以上になるように用量群を設定する。

なお、この場合の有効率の算出方法は次のとおりとする。

有効率（％）＝（１－（投薬群死亡率／対照群死亡率））×100

ただし、既存医薬品投与群を対照群とする場合は、上記の死亡率及び有効率の基準にとらわれる必要はない。

④　投与経路

臨床適用経路とする。経口投与である場合には強制経口投与であってもよい。

⑤　投与開始時期

人為感染後２時間以内に１回目の投与を行う。

⑥　用量段階

臨床適用量の半量及び２倍量を含む３段階の試験群を設定するとともに、別に対照群を設ける。

⑦　観察事項

各試験群における死亡の有無を毎日観察する。死亡個体又は瀕死個体について、速やかに剖検し、必要に応じて細菌学的検査を行い病原体を検索して、当該病原菌によることを確認する。

エ　吸収等試験

（ア）新医薬品申請の場合の吸収排せつ試験

①　動物

検体の適用を予定している養殖水産動物であって、飼料及び飼育歴並びに試験開始前における飼養方法等が明らかなものを用いる。１か月以上抗菌性物質等試験に影響のある物質を投与していないものを用いることが望ましい。

飼育槽は、室内水槽、野外の池、いけす等のいずれでもよい。

試験前には予備飼育を行う。これにより、死亡のみられないこと及び摂餌、体色、遊泳等健康状態について異常のないことを確認するとともに試験環境に十分馴致することが望ましい。

予備飼育期間及び試験期間中は給餌する。給餌方法としては飽食を基本とし、残餌がなく試験動物がむらなく摂餌できるよう留意する。投与する飼料は当該養殖水産動物に用いられているものを使用し、原料及び配合割合を明らかにする。なお、検体を強制経口投与した後に動物が摂餌行動を示さなくなった場合は、給餌は中止してよい。

飼育水温は、当該疾病の発生が予想される水温範囲内とする。

②　動物数

１採取時点における採取尾数が３尾以上とする。

③　投与経路

臨床適用経路とする。経口投与である場合には強制経口投与であってもよい。

④　用量段階

臨床最高投与量の１段とする。

⑤　投与期間

１回投与とする。

⑥　試料の採取

試料の採取の時期は、血漿及び各臓器における検体の増加、減少の変化及び最高値が把握できるよう設定する。抗菌活性のある代謝生産物が検出される場合であって代謝生産物の効果を標榜する場合には、これについての経時的変化も同様に明らかにする。

試料は、魚類の場合は、血漿、筋肉、肝臓及び腎臓とし、甲殻類の場合は、筋肉及び中腸腺とする。

試料は個体別に分析するが、１個体から採取した試料が検体の検出に十分量でない場合は、複数個体分の混合試料であってもよい。この場合は、１採取時点で１試料としてもよい。

試料は速やかに分析に供する。なお長期保存する場合には、凍結保存とするが、凍結・解凍の過程で検体が分解しないよう注意するとともに、保存のために用いる器材などが分析値に影響を及ぼさないように留意する。

⑦　試料の採取方法

筋肉：魚類の場合は、左側第１背ビレ基部の側線より上部の筋肉で皮膚及び血合い肉を含まない。

血漿：背大動（静）脈、心臓又はキュビエ氏管から採血後速やかに遠心分離を行い血漿を分離する。血漿に代えて全血を分析試料としてもよい。

内臓：魚類の場合は、胆のうを傷つけないように目的とする臓器を採取する。胆のうを傷つけ、胆汁が漏れた場合には生理的食塩水等でよく洗浄し、その旨を備考欄に記入する。

⑧　分析

検体及び抗菌活性のある代謝生成物の生体内における経時的変化を明らかにできる方法で行う。

分析値は試料別に記載する。また、平均値も記載することとするが、検出限界以下の測定値が含まれているものについては平均値を記載しない。別に経時的変化を図示する。

（イ）後発医薬品申請の場合の生物学的同等性試験

①　試験動物

検体の適用を予定している養殖水産動物であって、試料及び飼育歴並びに試験開始前における使用方法等が明らかなものを用いる。１か月以上抗菌性物質等試験に影響のある物質を投与していないものを用いることが望ましい。

飼育槽は、室内水槽、野外の池やいけす等、いずれでもよい。

試験前には予備飼育を行う。これにより、死亡のみられないこと及び摂餌、体色、遊泳等健康状態について異常のないことを確認するとともに試験環境に十分馴致することが望ましい。

予備飼育期間及び試験期間中は給餌する。給餌方法としては飽食を基本とし、残餌がなく試験動物がむらなく摂餌できるよう留意する。投与する飼料は当該養殖水産動物に用いられているものを使用し、原料及び配合割合を明らかにする。なお、検体を強制経口投与した後に動物が摂餌行動を示さなくなった場合は、給餌は中止してよい。

飼育水温は、当該疾病の発生が予想される水温範囲内とする。

②　動物数

１採取時点における採取尾数が５尾以上とする。

③　投与経路

臨床適用経路とする。経口投与である場合には強制経口投与であってもよい。

④　用量段階

臨床最高投与量の１段とする。

⑤　投与期間

１回投与又は臨床的用の最長投与期間のいずれかとする。

⑥　試料の採取

試料の採取時期及び回数は、検体の濃度の増加過程に１回、最高値を示す時期の付近に２回、消失過程に３回以上の計６回以上とする。

試料は、魚類の場合は、血漿（又は全血）、甲殻類の場合は筋肉とする。

試料は個体別に分析するが、１個体から採取した試料が検体の検出に十分量でない場合は、複数個体分の混合試料であってもよい。この場合は、１採取時点で試料数が５試料以上とする。

採取方法は、吸収排せつ試験に準ずる。

オ　臨床試験

（ア）動物

検体の適用を予定している養殖水産動物であって、飼料及び飼育歴並びに試験開始前における飼養方法等が明らかなものを用いる。

給餌方法としては、養殖業において通常行われている方法による。投与する飼料は養殖業において試験動物に実際に用いられているものを使用し、原料及び配合割合を明らかにする。

（イ）動物数

養殖経営体における最小単位（飼育面積 $10m^2$ 程度の最も小さなサイズの養殖池、いけす等で差し支えない。）を１試験群とすることが望ましい。

（ウ）用量段階

臨床適用量の１段階とする。

臨床的用量に幅のある場合には最低用量投与群と最高用量投与群の２段階を設定する。

死亡数の推移等、投与群の試験結果のみで医薬品の有効性が判断できる場合は、対照群は省略してよい。

なお、投与量の根拠が全くない場合、又は薬理試験その他の資料において、臨床試験のための投与量の設定に幅のあるデータが得られた場合、臨床試験において複数の用量を設定した試験を行うことによって製造承認申請書に記載される用法、用量の設定根拠を明確にする。

（エ）投与期間

臨床適用を予定する投与期間とする。

臨床適用を予定する投与期間に幅のある場合には、最短及び最長投与群の２段階を設定する。

（オ）試験の設定数

用量段階、投与期間等の設定により、試験条件が１とおりのみの場合は、その条件の試験を２箇所で行うが、２とおり以上となった場合は、各条件

の試験は１箇所ずつでよい。

（カ）観察及び測定

各試験群における死亡の有無を毎日観察し、供試魚群の遊泳状況、摂餌状況、体色、症状等の変化に注目する。死亡個体のある場合には死亡原因が対象病原菌によることを確認するためにすみやかに剖検し、必要に応じて細菌学的検査を行う。

カ　残留性試験

人の健康に悪影響のない医薬品及び観賞魚用医薬品の場合は、本試験の実施は要しない。

（ア）試験動物

１か月以上抗菌性物質等試験に影響のある物質を投与していないものを用いることが望ましい。

飼育槽は、室内水槽、野外の池、いけす等のいずれでもよい。

試験前には予備飼育を行う。これにより、死亡のみられないこと及び摂餌、体色、遊泳等健康状態について異常のないことを確認するとともに試験環境に十分馴致することが望ましい。

予備飼育期間及び試験期間中は給餌する。給餌方法としては飽食を基本とし、残餌がなく試験動物がむらなく摂餌できるよう留意する。投与する飼料は当該養殖水産動物に用いられているものを使用し、原料及び配合割合を明らかにする。

ぶり、まだい、こい、うなぎ、にじます、あゆ以外の養殖水産動物を用いたときの飼育水温は、次の範囲内であることを基準とする。

にしん目魚類：８～14℃

こい目魚類、うなぎ目魚類、すずき目魚類、かじか目魚類、かれい目魚類、ふぐ目魚類、十脚目甲殻類：18～24℃

（イ）動物数

１採取時点における採取尾数が５尾以上とする。

（ウ）試料の採取

試料の採取回数は、３回以上とする。

試料の採取部位は、一般的な人の食習慣を考慮して次のとおりとする。

にしん目魚類（海水中で飼育するもの）、すずき目魚類、かれい目魚類、ふぐ目魚類：筋肉（皮膚を含まない。）、肝臓及び腎臓

あゆを除くにしん目魚類（淡水中で飼育するもの）、かじか目魚類：筋肉（皮膚を含む）、肝臓及び腎臓

あゆ、こい目魚類：筋肉（皮膚を含む。）、内臓（肝臓、腎臓、脾臓、胃、腸の混合）

うなぎ目魚類：筋肉（皮膚を含む。）、内臓（肝臓、胃、腸の混合）

十脚目甲殻類：筋肉（殻を含まない。）、中腸腺

筋肉とは魚類の場合、魚体の左側第１背ビレ基部で側線より上の血合肉を含めた筋肉とする。皮膚を含む場合は、筋肉の採取部分の外側を覆う皮

膚を全て含ませるようにし、試料によって皮膚の混合割合に大きなばらつきが出ないように留意する。内臓は対象とする臓器を採取後、混合させたものとする。複数の部位、臓器の混合試料の場合は、細切してミンチにし、完全に均一とした後、一定量を分析試料とする。試料は個体別に採取するが、１個体から採取した試料が検体の検出に十分量でない場合は、複数個体分の混合試料であってもよい。この場合も、１採取時点での試料数は３試料以上とする。

（２）試験対象魚の区分

ア　養殖水産動物用の抗菌性医薬品

安全性試験、薬理試験、吸収等試験、臨床試験及び残留性試験は、表１のＡ欄に掲げた動物に使用することを目的とするものは、対応するＢ欄の動物の試験資料により代表させることができる。この場合、安全性試験、薬理試験及び吸収等試験はいずれか１種について各１箇所、臨床試験及び残留性試験はいずれか１種について２箇所又はいずれか２種について各１箇所ずつ計２箇所とするが、にしん目魚類（淡水中で飼育するもの）の残留性試験は、にじます及びあゆについて各１箇所ずつとし、すずき目魚類の残留性試験は、ぶりについて１箇所以上含むこととする。

なお、薬理試験及び臨床試験については、効能、効果の対象とする病原菌が同じ場合に限る。

また、薬理試験の中の対象病原菌を用いた感受性試験については、効能、効果の対象とする病原菌が同じ場合、硬骨魚類全体について表１のＢ欄の分類学上の目の異なる複数の魚種を用いた試験資料により代表させることができる。

イ　養殖水産動物用の抗菌性でない医薬品（生物学的製剤を除く。）

魚類については、硬骨魚類全体について表１のＢ欄の分類学上の目の異なる複数の動物についての試験資料により代表させることができる。

甲殻類については、十脚目甲殻類全体についてくるまえびについての試験資料により代表させることができる。

ウ　観賞魚用の医薬品

観賞魚全体について分類学上の目の異なる複数の観賞魚についての試験資料により代表させることができる。

薬理試験及び吸収等試験については、他の脊椎動物（水産動物に限らない。）についての試験資料がある場合は、観賞魚についての試験資料の提出は要しない。

表１　試験対象魚の区分

A	B
にしん目魚類（海水中で飼育するもの） にしん目魚類（淡水中で飼育するもの） こい目魚類 うなぎ目魚類 すずき目魚類 かじか目魚類 かれい目魚類 ふぐ目魚類 十脚目甲殻類	ぎんざけ にじます、あゆ こい うなぎ ぶり、まだい、まあじ めばる、くろそい ひらめ とらふぐ くるまえび

注：にしん目魚類（淡水中で飼育するもの）はぎんざけ等の遡河性魚類の淡水飼育期のものを含む。

16－1　水産用ワクチンの属ごとの承認に必要な試験に関する指針

（1）基本的な考え方

次に掲げる属等（その交雑種を含む。）の養殖水産動物を対象としてワクチンの承認申請をする場合においては、我が国の養殖実態等を勘案して、試験に供する動物を当面の間次のとおりとする。

ア　ぶり属魚類

ぶり及びかんぱちの試験を中心に実施し、必要に応じて、ひらまさの試験を実施すること。

イ　まはた及びまはた属魚類

まはた、くえ、やいとはた及びちゃいろまるはたの試験を中心に実施し、必要に応じて、他のまはた属魚類の試験を実施すること。

（2）試験内容等

ア　物理的、化学的試験（資料区分２）

（ア）製造用株と野外分離株との性状比較

製造用株は、原則として、次に掲げる動物から分離された株の性状等と比較検討がなされていること。

①　ぶり属魚類

ぶり、かんぱち及びひらまさ

②　まはた及びまはた属魚類

まはた、くえ、やいとはた及びちゃいろまるはた

（イ）使用制限期間の設定に関する試験

局長通知の第３の２の（２）のクの（イ）のただし書に基づき、含有されるアジュバント等添加剤成分の一部又は全部が食品安全委員会による評価済み成分でないワクチンであって、かつ、当該成分の人に対する安全性に関する資料を添付することができない場合は、次に掲げる動物を用いて試験を実施すること。なお、観察終了時にアジュバントの残存が認められた場合には、アジュバントが消失するまでの期間を決める試験を臨床試験（資料区分 14）において実施することも可能とする。

①　ぶり属魚類

ぶり及びかんぱち

②　まはた及びまはた属魚類

まはた又はくえのいずれか一種、及びやいとはた又はちゃいろまるはたのいずれか一種の計二種

（ウ）「規格及び検査方法」の安全試験及び力価試験の設定に関する資料

承認申請をするワクチンの対象動物の中から一種を選定して安全試験及び力価試験を設定する場合には、選定した動物を用いた方法でワクチンの有効性及び安全性を評価できる科学的根拠を示す資料を添付すること。

なお、科学的根拠を示す資料とは、選定した動物を用いることで、承認申請をするワクチンの安全性及び力価に関して、科学的に妥当な品質管理ができること等を説明した資料である。

イ　安全性試験（資料区分９）

次に掲げる動物を用いて試験を実施すること。

（ア）ぶり属魚類

ぶり及びかんぱち

（イ）まはた及びまはた属魚類

まはた又はくえのいずれか一種、及びやいとはた又はちゃいろまるはたのいずれか一種の計二種

ウ　薬理試験（資料区分 10）

効果を裏付ける試験並びに用法及び用量の設定に係る試験については、それぞれ、次に掲げる動物を用いて試験を実施すること。

（ア）ぶり属魚類

ぶり及びかんぱち

（イ）まはた及びまはた属魚類

まはた又はくえのいずれか一種、及びやいとはた又はちゃいろまるはたのいずれか一種の計二種

エ　臨床試験（資料区分 14）

次に掲げる動物の養殖場において、それぞれ一カ所以上で有効性及び安全性を確認すること。

（ア）ぶり属魚類

ぶり及びかんぱち

（イ）まはた及びまはた属魚類

まはた又はくえのいずれか一種、及びやいとはた又はちゃいろまるはたのいずれか一種の計二種

オ　試験に際しての留意事項

（ア）①から③までに該当する等により、物理的、化学的試験のうち使用制限期間の設定に関する試験、安全性試験、薬理試験又は臨床試験において、選定した動物を用いるのでは適切な資料の作成等が困難である場合については、選定した動物以外の動物についても試験を実施すること。

①　ワクチンの対象疾病が、選定した動物以外の当該属魚類に特有である場合

②　ワクチンの反応性が動物間で著しく異なると判断される場合

③　野外分離株の性状が動物間で著しく異なる場合

また、まはた及びまはた属魚類を対象動物としたワクチンに係るこれらの試験は、全て同じ種類の動物を用いて実施すること。

（イ）安全性試験においては、試験期間中の飼育水温は、それぞれの動物ごとに次の範囲内であることを基準とする。

ぶり、かんぱち、まはた、くえ：22 ～ 28 ℃

やいとはた、ちゃいろまるはた：25 ～ 31 ℃

（ウ）臨床試験においては、可能な限り疾病の流行する時期（水温）及び場所において実施すること。また、承認申請書に添付する資料には、臨床試験

実施期間の水温についても記載すること。

カ　その他

（ア）本指針に基づき、まはた及びまはた属魚類を対象動物としてワクチンの承認申請をする場合は、申請書に記載する使用上の注意に試験を実施した動物の種類とその有効性及び安全性試験の結果を明記すること。

（イ）再審査期間中においては、安全性試験等で選定した動物以外の動物における有効性及び安全性に関する情報を積極的に収集し、副作用等の情報の把握に一層務めること。選定した動物以外の動物において新たな知見が得られた場合は、速やかに農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課水産安全室へ報告すること。

17　犬及び猫に使用実績のある人用医薬品を愛玩動物用医薬品として特例で承認申請する場合の添付資料

我が国の犬及び猫の獣医療現場において汎用されている人用医薬品であって我が国で承認されているもの（動物用医薬品として生物学的製剤及びフルオロキノロン系等製剤に該当するものを除く。）を、局長通知の別紙３の別表第四の注意の 10 により、区分２に該当する犬及び猫用の医薬品として特例で承認申請する場合、以下のア及びイの資料を添付し、有効性及び安全性が獣医学上公知であると判断される場合は、（１）及び（２）の資料を臨床試験の試験成績に関する資料に代えることができる。

（１）国内外の臨床経験に基づく文献情報

ア　起源又は開発の経緯の資料において、概ね 20 報以上の国内外の症例報告、論文、成書等を引用し、申請製剤の国内外での使用実態について論述すること。

イ　論文については、必ずしもその有用性について言及したものでなくてもよく、症例報告等において、その医薬品の使用の事実及び用法等が確認できるものとすること。

ウ　論文等を引用する場合には、過去の経緯も含め申請時点での最新の知見に加えて広く使用されていることがわかるように収集し、論述すること。

エ　文献リストを作成し、論文等については DOI（デジタルオブジェクト識別子)、出版物については ISBN（国際標準図書番号）又は ISSN（国際標準逐次刊行物番号）を記載すること。

（２）使用実態調査

ア　起源又は開発の経緯の資料として、獣医療上の使用実態を調査した資料を添付すること。

イ　使用実態調査は、調査対象とした人用医薬品が犬及び猫の獣医療現場で汎用されていることが説明でき、かつ、臨床試験の試験成績に関する資料に代わるものであることを踏まえ、有効性及び安全性を評価する上で適切な統計処理ができる十分な診療施設数及び頭数について行うこと。目安としては、100 診療施設で各診療施設複数症例とする。ただし、臨床評価における妥当性が十分示される場合、20 診療施設で各診療施設 10 症例程度でも差し支えないが、別途当該医薬品が汎用されていることを示す資料を添付すること。なお、使用実態調査の対象の診療施設については、診療施設の所在地や系列等に配慮し、当該調査を適正に実施するため、偏った選定とならないようにすること。

ウ　また、希少と考えられる疾病等に汎用されている人用医薬品については、疾病の発生件数に対する捕捉率として一般的な疾病における 100 診療施設と同等以上と認められる場合は、これ以下の診療施設数でも差し支えないが、診療施設数の妥当性に関する考察を付すこと。

エ　各診療施設における当該人用医薬品の使用事例（承認申請する用法・用量及び効能・効果以外の症例も含む。）を収集し、獣医療に使用された場合の

安全性・有効性を明らかにすること。

オ　使用実態調査の信頼性を確保するため、獣医師法（昭和 24 年法律第 186 号）第 21 条第１項に定める診療簿に基づく次に掲げる事項を記載した獣医師自らが作成した症例報告書（別添様式２－１）を添付すること。

①　調査対象施設に関する情報（獣医師名、獣医師免許番号、診療施設の住所及び開設番号等）

②　使用対象動物に関する情報（個体を識別できる番号（患畜名、診療簿の番号）、年齢、性別、品種、体重、生理的状態、病名、主症状及びりん告等）

③　使用医薬品に関する情報（商品名、用法・用量、投与期間、使用目的（効能）、併用医薬品の商品名等）

④　使用成績に関する情報（効果、有害反応（徴候又は疾病名）

⑤　症例報告書を作成した獣医師による自らが実施した診療に基づいて作成した報告書である旨の陳述、記名及びなつ印（又は署名）

カ　使用医薬品に関する情報のうち、用法、用量、投与期間並びに併用医薬品の商品名及び使用状況等については、獣医師が治療期間終了後に飼い主に確認した正確な情報を可能な限り記載すること。

キ　使用実態調査の結果については、起源又は開発の経緯の資料の中に取りまとめること（別添様式２－２）。取りまとめに当たっては、使用実態調査において判明した用法及び用量の実態が、臨床試験以外の試験成績等に基づき設定された用法及び用量と矛盾がないことを説明すること。

（３）なお、申請製剤が使用実態調査において調査対象となった人用医薬品と同一製剤ではない場合（申請製剤の剤形が、完全に溶解した水性静脈内投与製剤である場合を除く。）、吸収等試験として使用実態調査で調査対象となった人用医薬品を対照とした生物学的同等性試験を添付すること。また、本特例により人用医薬品を犬及び猫用の医薬品として承認申請する場合には、予め動物医薬品検査所企画連絡室に相談し、使用実態調査の方法等について相談することが望ましい。

18　動物用体外診断用医薬品の性能試験及び臨床試験の実施方法等のガイドライン

（１）緒言

本ガイドラインは、動物用の体外診断用医薬品の製造販売承認申請等の目的で実施される性能試験及び臨床試験の実施方法等についてをまとめたものである。

なお、体外診断用医薬品としての有用性を評価するための十分な試験成績が得られるならば、本ガイドライン以外の方法によることもできる。その場合は、十分な科学的根拠をもって、その妥当性を説明しなければならない。

（２）目的

ア　性能試験ガイドライン

所長通知の３の「動物用体外診断用医薬品の製造販売承認申請書添付資料の作成方法等について」に掲げる性能に関する資料の内容のうち、①「既存の測定法との比較成績」、②「判定基準の設定の根拠に関する資料」及び③「実験感染動物の抗体応答、抗原又は核酸検出等の試験成績」について、そのガイドラインを示すものである。

イ　臨床試験ガイドライン

所長通知の３の「動物用体外診断用医薬品の製造販売承認申請書添付資料の作成方法等について」に掲げる臨床試験の試験成績に関する資料の内容について、そのガイドラインを示すものである。また、体外診断用医薬品の臨床試験は、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和 35 年法律第 145 号。以下「法」という。）第 80 条の２及び GCP 省令の適用外であるが、GCP 省令の趣旨に則り、試験の信頼性の確保に留意し、また、治験の対象となる動物の福祉の確保に配慮して実施する必要があることから、その留意事項を示すものである。

（３）性能試験ガイドライン

ア　既存の測定法との比較試験

（ア）対照品目等の選定

a　既存の体外診断用医薬品（以下「既存品」）を対照とする場合であって、既存品が複数存在する場合

測定原理（測定法）が近似しているものを選定する。

（例：抗原検出用イムノクロマトキットの場合には、使用方法及び操作方法が近似しているもの等）

b　既存品がない場合又は既存品を対照としない場合

獣医学領域で世界的に又は日本で一般的に使用されている基準的方法を選定する。この場合、公的機関（国際獣疫事務局（OIE）等）、標準化機関（臨床検査標準協会（CLSI）等）又は関連学会等で採用している基準的な検出又は測定方法があれば、それを選択する。

（例：基準的方法として、例えば、抗体測定・検出の場合は中和試験法、間接蛍光抗体法等を用いたものが、抗原検出の場合は培養法によるウイルス・細菌分離法、検出感度が確認されている PCR 法等を用いたも

のがある。）

（イ）検体数と検体の選択方法

a　検出用の場合（陽性／陰性を定性的に判定するもの）

①　検体数は、陽性又は陰性の両者を統計学的に解析するのに十分な数とする（原則として総数を 40 検体以上とし、陽性又は陰性となるもののうち、少ない方の検体数が 20 検体以上とする。ただし、陽性検体がほとんど収集できないものについてはこの限りではない）。

②　検体は、臨床的基準値（最少検出感度、カットオフ値等）に近い検体を含めて選択する。

③　野外から収集された検体を組み入れても差し支えない。

④　検体として、検出対象物の濃度（含量）が広範囲にわたるものが収集できない場合には、参照品、標準物質等を希釈又は濃縮して陰性検体に添加することにより作成された調製検体を用いることができる。

b　測定用の場合（対象物質を定量するもの）

①　検体は、測定範囲全域にわたって分布させ、両測定法の相関係数を算出するに十分な検体数を用いる。

②　検体は、臨床的基準値（測定の下限値、カットオフ値等）に近い検体を含めて選択する。

③　野外から収集された検体を組み入れても差し支えない。

④　検体として、検出対象物の濃度（含量）が広範囲にわたるものが収集できない場合には、参照品又は標準物質等を希釈又は濃縮して陰性検体に添加することにより作成された調製検体を用いることができる。

（ウ）　試験成績の取りまとめ

a　検出用の場合

①　試験の結果を下記の２×２分割表に記入し、陰性一致率、陽性一致率、及び全体一致率を算出する。

陰性一致率＝（d／c＋d）×100

陽性一致率＝（a／a＋b）×100

全体一致率＝（a＋d／a＋b＋c＋d）×100

		対照		
		陽性	陰性	計
試験品	陽性	a	b	a+b
	陰性	c	d	c+d
	計	a+c	b+d	a+b+c+d

②　不一致検体に関する情報（検体の由来、検体の性状、不一致とな

った理由の考察等）を記載する。

b　測定用の場合

①　既存品の名称又は基準的方法を記載し、その測定方法についても記載する。

②　試験成績を統計学的に解析する。用いた統計解析方法、検体数、直線回帰式及び相関係数を記載するとともに、相関図を示す。

（エ）既存の測定法との相関性についての考察

既存品又は（イ）に示すような基準的方法との相関性（陽性一致率、陰性一致率等）についての考察を記載する。

イ　判定基準設定の根拠等に関する試験

（ア）判定基準設定の根拠に関する試験

a　試験材料

（a）検体

試験に用いる検体は、その種類（糞便、鼻腔スワブ、全血、血漿、血清等の別）、由来、保存条件、保存期間等が明確なものから選定する。

（b）検体数

c の解析を行うのに十分な数とする。

なお、複数種（例えば、抗凝固処理した全血、血漿又は血清等）の検体で検出又は測定する場合は、同時に採取した複数種の検体についても試験する。

b　試験方法

（a）試験品による検査

試験品に規定された使用方法で検査する。なお、検体が採取されてから検査までの期間、判定方法等を記載する。

（b）基準的方法による対象微生物・抗体等の検出又は測定

ⅰ　試験品が検出用である場合

検体中の対象微生物・抗体等の有無を検出する場合は、培養法、核酸検出法、顕微鏡法、中和試験法等で適切に検出できる方法を選択する。

ⅱ　試験品が測定用である場合

検体中の対象微生物・抗体等の量を測定する場合は、培養法、核酸検出法、顕微鏡法、中和試験法等で正確に測定できる方法を選択する。

（c）測定機器などの差異

測定に用いる機器（分光光度計等）が異なる等の要因により、判定に差が生じると考えられる場合は、当該要因について複数を規定した試験を行う。なお、臨床試験において、同一検体を複数の施設で測定する場合は、性能試験の中でこの試験を行う必要はない。

c　解析

（ａ）検体を検査した結果について、試験品による判定と基準的方法による判定について比較し、判定基準（使用方法で設定した検体の用量、反応時間の妥当性等）の設定根拠を示す。

（ｂ）カットオフ値等を設定する場合には、ROC 曲線（注）を用いた分析等、当該体外診断用医薬品に適切と考えられる方法を用いる。用いる解析方法については、予め試験の計画書等に記載する。

（注）ROC 曲線は、カットオフ値を変化させたときの感度と偽陽性度（１－特異度）との関係を図にしたもので、感度、特異度ともに１に近いカットオフ値を読み取るのに有用である。ROC 曲線下面積（AUC）値が大きいほど感度と特異性が優れた検査法であるといえる。このカットオフ値は、その疾病の性格、重要度により、感度、特異性のどちらを重視するかにより決定される。

（イ）交差反応性、妨害物質等に関する試験

ａ　交差反応性に関する試験

（ａ）試験材料及び方法

ｉ　試験材料

試験品が対象とする対象動物、疾病（感染症：下痢、呼吸器疾患等、代謝性疾患等）に応じて次のような材料を用いる。

（ｉ）感染症の体外診断用医薬品の場合

当該対象疾病の原因微生物と同じ分類学上の属に含まれる微生物であって、当該対象動物に感染することが報告されている微生物。ただし、我が国で発生が認められていない疾病の原因となる微生物は用いなくてもよい。

当該対象動物で、当該対象疾病と類症鑑別が必要な疾病の原因となる微生物（ウイルス、細菌、原虫等)。抗体を検出又は測定するものにあっては、当該対象動物で作成されたこれらの微生物に対する抗体、例えば、牛のロタウイルスによる下痢症の体外診断用医薬品の場合には、次のような微生物を用いる。

Escherichia coli　O157

Salmonella Typhimurium 、S. Enteritidis、S. Dublin

牛ウイルス性下痢－粘膜病 ウイルス、牛コロナウイルス

牛アデノウイルス　７型、３型

牛レオウイルス 1

クリプトスポリジウム　パルバム

（ⅱ）感染症以外の体外診断用医薬品の場合

検出又は測定しようとする検体に含有されることが想定される検出対象物と性状・構造が類似の物質等で、交差反応の可能性のあるもの

ⅱ　試験方法

試験品の規格及び検査方法の力価試験に準じて試験する。

使用する微生物の濃度（TCID50/mL、CFU/mL、個/mL）は、検体に含有されることが想定される量とする。

抗体については、当該対象動物で保有することが想定される抗体価に近いものとする。

感染症以外の体外診断用医薬品の場合にあっては、検体に含有される又は添加する量は、検体に含有されることが想定される量とする。

（b）結果及び考察

試験品で検体を検査した結果、交差反応の有無、交差反応が起きる場合は、原因となるものの種類、量等を記載する。

また、交差反応性を除去するために必要な検体の前処理法等について検討した場合にはその内容も記載する。

b　妨害物質等に関する試験

（a）試験材料及び方法

ⅰ　試験材料

試験品が検出又は測定の対象とするものに応じ、反応の妨害又は阻害されることが想定される次のような試料を用いる。

（例）

・抗凝固剤、移行抗体及び検出対象微生物の発育に影響を与える薬剤を含む全血、血漿又は血清等
・非働化した血清等
・粘液・血液を混じた下痢便等
・膿性鼻汁を含む鼻腔スワブ等
・血色素のある尿等

ⅱ　試験方法

試験品の規格及び検査方法の力価試験に準じて試験する。

検体に含有される又は添加する量は、検体に含有されることが想定される量の数段階とする。

（b）結果及び考察

試験品で検体を検査した結果、反応の妨害又は阻害の有無、妨害又は阻害が起きる場合は、当該微生物・物質等の種類、量等を記載する。

また、反応の妨害又は阻害を除去するために必要な検体の前処理法等について検討した場合にはその内容も記載する。

ウ　実験感染動物での検出等試験(非臨床試験による診断性能等に関する試験)

（ア）試験材料

a　試験動物

動物種、日齢、抗体の保有状況（初乳摂取の有無を含む）等を勘案の上選定する。

試験動物数は、当該体外診断用医薬品が対象とする疾病の感染又は発症から治癒に至る経過を示す動物が複数以上であり解析を行うのに十分

な数であること。

b　使用する微生物

微生物種、株名、由来が明確なものから選定する。なお、病原性等の情報も収集する。

（イ）試験方法

a　人工感染

使用する微生物をひろげるおそれのないように処置し、適切な接種量、接種方法（接種経路を含む）を選定する。

b　検体の採取及び保存

検体には採取する検体名、採取期間及び間隔を明記し、検体を保存する場合は適切な保存条件を選定する。

なお、複数種（例えば、抗凝固処理した全血、血漿又は血清等）の検体で検出又は測定する場合は、同時に複数種の検体についても採取する。

c　試験品による検査

試験品に規定された使用方法で検査する。なお、検体が採取されてから検査までの期間、判定方法等を記載する。

d　基準的方法による対象微生物・抗体等の検出又は測定

（a）試験品が検出用である場合

検体中の対象微生物・抗体等の有無を検出する場合は、培養法、核酸検出法、顕微鏡法、中和試験法等の基準となる適切な方法を選択する。

（b）試験品が測定用である場合

検体中の対象微生物・抗体等の量を測定する場合は、培養法、核酸検出法、顕微鏡法、中和試験法等で正確に測定できる基準的な方法から選択する。

（ウ）解析

検体を検査した結果について、試験品による判定と基準的方法による判定について比較し、試験品による対象微生物・抗体等の検出時期、検出感度等を検討する。

（4）臨床試験ガイドライン

ア　一般的事項

（ア）動物用医薬品の臨床試験の実施に関する基準への準拠

体外診断用医薬品の臨床試験は、法第 80 条の２及び GCP 省令の適用外であるが、GCP 省令の趣旨に則り、試験の信頼性の確保に留意して実施する。また、治験の対象となる動物の福祉の確保に配慮する。

（イ）被験薬に関する情報の確保

臨床試験の実施に当たっては、原則として、あらかじめ以下の被験薬に関する情報を収集する。

①　被験薬の成分又はその本質及びその含有量

②　外国での使用状況等に関する資料

③　物理的、化学的・生物学的性質、規格試験方法等に関する資料
④　開封後の安定性及び保管方法
⑤　外国における臨床試験（ある場合）

（ウ）治験の対象となる検体の所有者に対する説明

原則として、治験の対象となる検体の所有者に対して GCP 省令第 40 条の各号について説明する。

イ　治験実施計画書の作成

治験実施計画書は、GCP 省令第７条又は第 41 条の規定を参考にして作成し、以下に示した事項の具体的な記載内容について留意して記載する。

（ア）治験の目的

簡潔に治験目的を記述し、治験の対象となる動物及び評価する性能（感度及び特異性等）を明確に表現する。

（イ）治験の対象となる動物の選定に関する事項

治験の目的により、治験の対象となる動物の選定に関する基準を明らかにする。

a　組入れ基準
①　治験目的に適する治験の対象となる動物の選定基準を記載する。
②　治験の対象となる動物の年齢（日齢、週齢、月齢等）の規定を記載する。
③　治験の対象となる動物の性別の規定を記載する。
④　既往疾患及び併発疾患（臨床検査値の基準を含む。）に関する規定（必要があれば）を記載する。
⑤　治験の対象となる動物の背景因子（年齢、性別以外）及び飼育条件等に関する規定（必要があれば）を記載する。

b　除外基準
①　試験に組入れることができない動物に関する規定を記載する。
②　可能な限り、具体的な疾患や前処置を特定する。
③　症例としての適性を確認するための情報が不十分なもの。

（ウ）治験の方法

a　動物の頭羽数

２箇所以上で統計学的に解析が可能で臨床的に十分評価できる検体数を用いた試験成績

b　施設数

原則として２施設以上とする。

c　使用方法又は操作方法

使用方法又は操作方法を詳細に記載する。

d　治験中止基準

治験を中止する場合の具体的な事項（判断基準等）を記載する。

e　採取する検体及び採取時期

採取する検体及び採取時期について記載する。

f　性能の評価

得られた検査結果に基づく性能の評価方法及びその基準について記載する。

g　統計学的方法

被験薬の感度及び特異性等を評価するために用いようとする統計的方法と、有意水準等を記載する。

19　放射線滅菌された動物用医薬品の製造販売承認申請に必要な資料について

（１）緒言

本ガイドラインは、「局長通知」の第３の２の（２）のケに規定された放射線滅菌を施された動物用医薬品の安全性確保の観点から、その品質等を担保するために必要な場合に求められる製造販売承認申請書に添付する資料を具体的に定めるものである。なお、科学的に妥当な理由がある場合には、必ずしも本ガイドラインに依拠する必要はないが、資料の提出に当たってはその理由を明記すること。

（２）対象とする動物用医薬品

本ガイドラインの対象範囲は、最終製剤の製造工程又はその成分（製造販売承認申請書の成分及び分量欄で規定される有効成分及び添加剤。以下本ガイドラインにおいて「原材料」という。）の段階で放射線滅菌された動物用医薬品（後発動物用医薬品及び製造販売承認事項変更で放射線滅菌に変更しようとするものを含む。ただし、生物学的製剤及び体外診断用医薬品は除く。）とする。

なお、製造に用いられる物質のうち原材料に該当しない培地、培地用血清等の放射線滅菌されたものについては適用しない。

また、次の電離放射線により滅菌されたものを対象とする。

①　60Co 又は 137Cs の放射性核種から発生するガンマ線

②　５ MeV 以下のエネルギーのＸ線

③　10MeV 以下のエネルギーの電子線

（３）追加資料

放射線滅菌された動物用医薬品の製造販売承認申請（製造販売承認事項変更承認申請を含む。以下本ガイドラインにおいて同じ。）の際に追加で求める資料は、以下のとおりとする。

ア　最終製剤の製造工程の段階で放射線滅菌する場合

（ア）放射線滅菌による品質変化に関する資料

放射線滅菌の前後における品質変化（医薬品の性状、含量、不純物、徐放性（徐放化製剤に限る。）、小分け容器の性状等）が確認できる資料を物理的、化学的試験に関する資料の一部として提出する。資料の詳細は、以下によるものとする。

ａ　試料

最終製品の放射線滅菌にかかる前後の製品それぞれとする。滅菌済みの最終製剤は、滅菌方法バリデーションにおいて、最大吸収線量で滅菌されたものを使用する。

ｂ　照射線量

滅菌方法バリデーションにおける放射線滅菌に必要な最大吸収線量が得られる線量を照射する。最大吸収線量を超える線量の照射で顕著な品質変化が想定される場合には、最大吸収線量の数倍量となる線量での強制劣化試験も行うことが望ましい。

ｃ　分析方法

バリデートされた分析方法を用いて実施する。小分容器の試験については、日本薬局方の注射用ガラス容器試験法等による。

d　不純物

不純物に関する試験は、「動物用医薬品の不純物等に関するガイドライン」の「新動物用医薬品の製剤中の不純物（VICH　GL11R)」を参考に実施する。有効成分由来の不純物のほか、添加剤及び小分容器に由来する不純物についても検討する。

なお、添加剤のうち、含有量が１％未満のものについては、それ由来の不純物について検討することを要しない。ただし、照射後に生じると予測される不純物について、安全性に懸念がある情報等がある場合は、この限りではない。

e　徐放性

徐放化製剤については、薬剤の放出についても試験を実施する。

（イ）誘導放射能の有無に関する資料

放射線滅菌の前後における誘導放射能の有無が確認できる資料とし、物理的、化学的試験に関する資料として提出する。ただし、重金属など誘導放射能を生じやすい成分を含む等、誘導放射能を生じる可能性がある場合を除き、誘導放射能を測定しないことが科学的に妥当であることを示すことで差し支えない。

（ウ）最終製剤での急性毒性試験に関する資料

最終製剤の放射線滅菌にかかる前後の製品それぞれについて急性毒性試験を実施し、毒性試験に関する資料として提出する。ただし、滅菌後の最終製剤での安全性試験に代えることができる。

（エ）その他の毒性試験に関する資料

（ア）のｄの試験結果から、原材料又は小分容器に由来する不純物のいずれかで安全性の確認が必要と判断された場合、滅菌後の最終製剤を用いた反復投与毒性試験、変異原性試験等の毒性試験の実施をすること。

イ　原材料の段階で放射線滅菌する場合

（ア）放射線滅菌による品質変化に関する資料

放射線滅菌の前後における品質変化（原材料の性状、含量、不純物等）が確認できる資料を物理的、化学的試験に関する資料として提出する。資料の詳細は、以下によるものとする。

a　試料

未滅菌及び滅菌済みの原材料とする。滅菌済みの原材料は、滅菌方法バリデーションにおいて、最大吸収線量で滅菌されたものを使用する。

b　照射線量

滅菌方法バリデーションにおける放射線滅菌に必要な最大吸収線量が得られる線量を照射する。最大吸収線量を超える線量の照射で顕著な品質変化が想定される場合には、最大吸収線量の数倍量となる線量での強制劣化試験も行うことが望ましい。

ｃ　分析方法

バリデートされた分析方法を用いて実施する。

ｄ　不純物

不純物に関する試験は、「動物用医薬品の不純物等に関するガイドライン」の「新動物用医薬品の原薬中の不純物（VICH　GL10R)」を参考に実施する。

（イ）誘導放射能の有無に関する資料

アの（イ）を準用する。

（ウ）原材料での急性毒性試験に関する資料

放射線滅菌の前後の原材料での急性毒性試験を実施し、毒性試験に関する資料の一部として提出する。ただし、最終製剤での安全性試験に代えることができる。

（エ）原材料でのその他の毒性試験に関する資料

アの（エ）を準用する。ただし、「最終製剤」とあるのは「原材料又は最終製剤」と読み替えるものとする。

（４）任意追加資料

（３）の資料のほか、申請者の任意により、放射線滅菌の前後におけるラジカル濃度が確認できる資料を、物理的、化学的試験に関する資料として提出する。

（５）資料作成時の留意事項

放射線滅菌された動物用医薬品の製造販売承認申請の際、作成する資料は以下に留意する。

ア　滅菌方法に関する資料については、以下の資料を含むこと。

（ア）製造工程で実施する滅菌方法

照射装置（発生源の種類及び仕様を含む。)、吸収線量、照射時間、照射時の温度、照射雰囲気（真空中、空気中など)、滅菌対象の照射時の物性（固体、液体など)、滅菌対象の載荷形態、コンベア速度、吸収線量の確認方法等

（イ）滅菌方法バリデーションに関する資料

滅菌線量の決定手順（バイオバーデンを考慮すること。)、線量分布の測定方法、滅菌対象の載荷形態、滅菌対象の線量分布等

なお、資料の作成に当たっては「滅菌バリデーション基準の制定について」（平成 26 年 12 月 18 日付け薬食監麻発 1218 第 4 号厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長通知）によって制定された滅菌バリデーション基準を参考に実施すること。

イ　安定性試験、安全性試験、臨床試験及び生物学的同等性試験では、滅菌方法バリデーションにおいて、最大吸収線量の付近で滅菌したもので試験を実施すること。

ウ　安定性試験では、（３）のアの（ア）又はイの（ア）のｄの試験結果から、必要な不純物を純度試験の規格として設定し試験を実施すること。

20　遺伝子組換え生物等又はそれを使用して製造される物を成分として含む動物用医薬品等の製造販売承認申請書及び添付資料について

（１）緒言

本ガイドラインは、局長通知の第３の２の（２）のコに規定された遺伝子組換え生物等（一の細胞（細胞群を構成しているものを除く。）、細胞群、ウイルス又はウイロイドであって、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成 15 年法律第 97 号)第２条第２項各号に掲げる技術の利用により得られた核酸又はその複製物を有するものをいう。）又はそれを使用して製造される物（以下「遺伝子組換え成分」という。）を含む動物用医薬品等（以下「組換え医薬品」という。）の製造販売承認申請書（承認事項変更承認申請書を含む。以下同じ。）に添付する遺伝子組換え成分の製造方法に関する資料を具体的に定めるものである。

（２）対象となる動物用医薬品等

本ガイドラインの対象範囲は、遺伝子組換え成分（有効成分以外の成分も含む。以下同じ。）を含む動物用医薬品等とする。

（３）製造販売承認申請書への記載

製造販売承認申請書の参考事項に組換え医薬品である旨及び遺伝子組換え成分名を記載する。

（４）製造販売承認申請書の添付資料

局長通知の第３の２の（２）のコに規定された遺伝子組換え成分の製造方法に関する資料については、（５）に基づいて作成したものを添付する。ただし、当該遺伝子組換え成分が次の①から⑤までのいずれかの条件を満たす組換え医薬品である場合は、承認申請書の成分及び分量欄（別紙規格として記載する場合を含む。）又は製造方法欄にその根拠（当該遺伝子組換え成分の使用の承認に係る官報の写し又は農林水産省ホームページにおける掲載内容、当該成分を含有する組換え医薬品の品名、承認年月日及び承認番号等）を記載することで（５）に掲げる資料の添付を省略することができる。

①　飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号）第３条第１項に規定する基準及び規格又は食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）第 11 条第１項に規定する基準及び規格に適合する場合（これらの基準及び規格に適合する飼料又は食品から製造されるものを含む。）

②　既に承認されている組換え医薬品の承認審査等において評価されている場合

③　組換え医薬品に含まれる遺伝子組換え生物等を使用して製造されるものが、たん白質及び核酸を含まず、かつ、高度に精製されている場合

④　組換え医薬品に主剤以外の成分として含まれる遺伝子組換え成分（①、②又は③に該当するものを除く。）であって、その含有量が１％未満の場合

⑤　遺伝子組換え成分が遺伝子組換え生物等を直接の起源としない場合であって、遺伝子組換え生物等に由来する物が含まれない場合

（５）組換え医薬品の製造方法に関する資料

組換え医薬品に含まれる遺伝子組換え成分の製造方法に関する資料として、以下の事項を記載する。

なお、以下の事項が製造方法に関する資料以外の添付資料の中に記載されている場合は、概要書の製造方法に関する資料の項に当該箇所を記載することで、当該記載を添付資料の製造方法に関する資料に記載しなくてもよい。

また、以下の事項がカルタヘナ法第４条第２項に基づく第一種使用等に関する規定又は同法第 13 条第２項に基づく第二種使用等の確認に係る申請書（以下「カルタヘナ申請書」という。）に記載されている場合は、添付資料の製造方法に関する資料にカルタヘナ申請書の写しを添付し、概要書の製造方法に関する資料の項に当該箇所を記載することで差し支えない。

ア　宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

（ア）分類学上の位置付け

①　分類学上の位置、学名（属及び種）及び株名・品種名

②　宿主を誘導するために用いた遺伝的改変等の内容

（イ）生理学的及び生物学的特性

a　基本的特性

宿主の生物学的性状

b　病原性

宿主の病原性（発ガン性を含む。）に関し、次の点について記載する。

①　病原性について（使用対象動物等に対する病原性について記載する。）

②　病原性に関係ある外来因子の有無

c　有害物質の産生性

使用対象動物等に有害な影響を及ぼす生理活性物質等の産生性の有無を記載するとともに、産生する場合は、その名称並びに活性及び毒性の強さについて併せて記載する。また、薬理作用を有する物質の産生性等の主要な生理学的性質について記載する。

イ　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

（ア）供与核酸に関する情報

ベクターに挿入される配列である供与核酸について記載する。

a　構成及び構成要素の由来

目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの由来、塩基数及び塩基配列（発現カセット（一の目的遺伝子又は一の選抜マーカーとそれを調節するプロモーター、ターミネーター、局在化シグナル等の組合せをいう。）ごとに、配列順に記載する。）

b　構成要素の機能

①　目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

② 目的遺伝子及び選抜マーカーをコードする遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

③ 宿主の持つ代謝系を変化させるか否か、変化させる場合はその内容

（イ）ベクターに関する情報

供与核酸が挿入される直前の配列をベクターとして、次の点を記載する。

a 名称及び由来ベクターの名称及び由来する生物の分類学上の位置を記載する。

b 特性

① 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

② ベクターの感染性・病原性の有無及び感染性・病原性を有する場合はその宿主域に関する情報

③ 既知のベクターについて改造又は修飾を行い、新しいベクターを開発した場合は、改造又は修飾前のベクターに関する文献を添付し、改造又は修飾を行った部分についてその方法を具体的に説明する。

（ウ）遺伝子組換え生物等の調製方法

供与核酸のベクターへの挿入から、遺伝子組換え生物等ができあがるまでの過程について、記載する。

a 宿主内に移入された核酸全体の構成

① ベクター内での供与核酸の構成要素の位置及び方向について記載し、その要点を図示する。

② また、ベクターへの供与核酸の挿入方法について記載し、その要点を図示する。

b 宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、りん酸カルシウム法その他の核酸の移入方法について記載し、その要点を図示すること。

c 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① クローニングの方法について記載する。

② マスターシードの育成、選抜等の過程について記載する。

③ ベクター等の残存について記載する。

（エ）宿主内に移入した核酸の存在状態

① 宿主内に移入された核酸が宿主のどの染色体に組み込まれているか、プラスミドとして存在するか等について記載する。染色体に複数組み込まれている場合は、それぞれについて記載する。

② 宿主内に移入された核酸の配列及び近傍配列を確認し、構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位について記載し、その要点を図示する。

③ 宿主内に移入された核酸の配列及び近傍配列を確認し、オープンリーディングフレームの有無及び発現の可能性を記載する。

④ 宿主内に移入された核酸の配列及び近傍配列を確認し、有害塩基配

列の有無について記載する。

⑤　宿主内に移入された核酸が、宿主に内在する遺伝子を破壊する形で挿入されていないかどうかについて記載する。

（オ）宿主内に移入した核酸及び核酸による形質発現の安定性

①　移入された核酸の複製物のコピー数及び複数世代における伝達の安定性について記載する。

②　移入された核酸の生物等内での発現を確認し、個体間の差異、組織・ステージでの差異、培養・栽培条件の変化に対する発現の安定性等について記載する。

ウ　ワーキングシード及び形質発現に関する情報

（ア）ワーキングシードの作成

①　ワーキングシードの作成方法について記載する。

②　マスターシードとワーキングシードとの同等性を確認した結果について記載する。

（イ）形質発現

①　形質発現に用いる生物、細胞等及び形質発現をさせるための具体的方法並びに発現形質が生物、細胞等に及ぼす影響について記載する。

②　形質発現に用いる生物、細胞等の病原性、含まれる有害物質、病原性に関係する外来因子等について記載する。また、それらが組換え医薬品又は遺伝子組換え成分に含まれる程度及びその影響について記載する。

③　形質発現のための培養・栽培等において用いる化学物質（農薬、肥料等）についてその使用状況を記載する。

エ　抽出・精製・製剤化に関する情報

①　遺伝子組換え成分の抽出・精製方法及び精製度について記載する。

②　精製後の遺伝子組換え成分中の遺伝子組換え生物等の残存について記載する。

③　製剤化の具体的方法（工程、賦形剤、容器等）について記載する。

④　製剤中の抽出・精製に用いた溶媒等の化学物質の製剤中への残留について記載する。

21　犬及び猫の皮膚適下剤の使用者等に対するリスク評価のガイドライン

（１）緒言

犬及び猫を使用対象とする皮膚適下剤は、投与された犬及び猫の体表及びその居住環境に持続的に存在することから、当該製剤の使用者、犬及び猫の飼い主及びその家族等が長期間当該製剤の成分に暴露される可能性がある。本ガイドラインは、犬及び猫を使用対象とする皮膚適下剤の製造販売承認申請等の目的で実施される当該製剤の使用者等に対するリスク評価の実施方法等を示したものである。なお、科学的根拠により妥当性が明確に示される場合には、本ガイドライン以外の方法により当該製剤の使用者等に対するリスクを評価することができる。

（２）適用範囲

本ガイドラインは、局長通知の別紙３の別表第四の区分１～５に該当する犬及び猫の皮膚適下剤の使用者等に対するリスク評価に適用し、その資料は、資料番号１「起源又は発見（開発）の経緯に関する資料」とする。なお、同表の区分６に該当する皮膚適下剤については、原則として、本ガイドラインに準拠したリスク評価を求めないが、動物用医薬品として新規の添加物を含有するものについては、資料番号９「安全性に関する試験資料」として、当該添加物の使用者等へのリスクについての考察を求める。

（３）評価の原則

ア　評価は、化学物質について広く行われているリスク評価の手法に基づき実施し、以下の①～③を含む。

①　毒性評価

ハザードの特定（活性成分等）、毒性試験、及び毒性量の推定を要素として含む。

②　暴露評価

使用者等の選定、最悪のケースを想定した暴露のシナリオ、及び暴露量の推定を要素として含む。

③　毒性量と暴露量の比較によるリスク評価

基本的に以下の式で示す暴露マージン（MOE）の手法を用いるが、科学的妥当性を示すことができれば他の手法を用いることができる。

MOE ＝推定無毒性量／推定暴露量

イ　「使用者等」の定義

使用者等とは、製剤の有効成分等に暴露される可能性のある人である。暴露評価の中で製剤毎に暴露される可能性が高い人を選定する。

（４）毒性評価

ア　ハザードは製剤の有効成分等とする。

イ　毒性試験は以下の試験を含む。承認申請書に含まれる全ての毒性試験・安全性試験等を利用することができる。学術文献の成績も用いることができる。

①　有効成分等：

・　一般毒性：経口毒性（単回投与、反復投与）、経皮毒性

・　特殊毒性：変異原性、生殖・発生毒性、（あれば癌原性）、皮膚感作性など

② 製剤：経皮毒性（単回投与、必要に応じて反復投与）

ウ 毒性量の推定

試験成績・文献等から、有効成分等の推定無毒性量を決定する。推定無毒性量は、必要に応じて暴露経路（急性経口暴露、急性経皮暴露、慢性経口暴露及び慢性経皮暴露）について設定する。

（５）暴露評価

ア 使用者等の選定

製剤の「用法及び用量」及び使用上の注意に基づき、獣医師、ブリーダー、ペットの美容師（トリマー）、犬猫の飼い主、犬猫の飼い主の家族（特に子供）などから製剤毎に使用者等を選定する。

イ 暴露のシナリオとパラメーター

① 暴露経路としては、以下の経路が考えられる。それぞれについて暴露量が最大と想定されるシナリオ（最悪のケースのシナリオ）を設定することが、適切なリスク評価のためには重要と考えられる（21－１参照）。

シナリオＡ　投与時（経皮）
シナリオＢ　投与時（吸入）
シナリオＣ　投与後（直接接触による経皮）
シナリオＤ　投与後（直接接触による経皮→経口）
シナリオＥ　事故（経口）
シナリオＦ１　投与後（環境経由の経皮）
シナリオＦ２　投与後（環境経由の吸入）
シナリオＧ　投与後（環境経由の経皮→経口）

② 暴露のシナリオに含まれるパラメーターとしては、１回投与量、投与頻度、暴露期間（持続期間）、同時に接触する投与された動物の頭数、投与された動物からの有効成分等の放出量、放出された有効成分等の人への移行率などが想定される。

③ 放出量の推定は、投与した動物からの有効成分等の拭き取り試験によって推定できる。根拠を示せば、拭き取り試験を実施しないことも可能である。例えば、投与全量を放出したと見なす場合や体外放出がまったくない場合等である。

拭き取り試験は、製剤を申請の「用法及び用量」及び使用上の注意にしたがって対象動物に投与し、経時的に適切な器材を用いて拭き取り、有効成分等を適切な定量法により分析して拭き取り合計量を算出する試験である。最悪のケースを想定して作成された暴露のシナリオに沿って試験を設定する。

ウ 暴露量の推定

① アの使用者等のそれぞれについて、イに基づいて暴露のシナリオ（イの①のＡ～Ｇ）ごと、暴露期間（急性、慢性）ごとに暴露量を推定する。

② さらに、暴露期間（急性、慢性）ごと、暴露経路（経口、経皮、吸入）ごとに暴露量を合計する（例えば、慢性の経皮暴露なら、動物への直接接触による暴露と環境経由の暴露の和）。（21 － 2 参照）

③ 暴露量の推定のシナリオと計算式の例を 21 － 1 に示す。

（6）リスク評価

リスク評価は、原則として、暴露期間及び暴露経路ごとに算出した MOE に基づいて行う。なお、全ての暴露経路のリスクを勘案し、考察を行うべきである。（21 － 2 参照）

ア MOE ＞ 100（毒性試験の成績によっては、100 以外の値を用いることが妥当な場合がある）の場合にはリスクは許容できる。

イ MOE ≦ 100 の場合には、暴露量を少なくするような対策（「用法及び用量」の変更又は使用上の注意の追加設定等）を講じて MOE を再計算する。

21 －１　犬及び猫の皮膚滴下剤の使用者等に対するリスク評価における暴露量の推定のシナリオと計算式の例示

21 の（５）のイの①に掲げた各シナリオについて、暴露量の算出に用いるパラメーターとして次の（１）から（６）までを例示する。

（１）暴露のシナリオＡ及びＢ（投与時）

対象：獣医師、ブリーダー、飼い主等

暴露期間：１日

暴露経路：Ａ（経皮）、Ｂ（吸入）

暴露量＝Ｄ×Ｗ×Ｔ×Ｎ÷Ｈ

Ｄ：体重１ kg 当たりの用量（mg/kg）

Ｗ：動物の体重（kg）

Ｔ：投与時に人に移行する割合

Ｎ：１日の投与頭数

Ｈ：暴露した人の体重（kg）

（２）暴露のシナリオＣ（投与後の動物に直接接触）

対象：獣医師、ブリーダー、トリマー、飼い主、飼い主の子等

暴露期間：１日～長期間

暴露経路：経皮

暴露量＝Ｄ×Ｗ×Ｒ×Ｔ×Ｎ÷Ｈ

Ｄ：体重１ kg 当たりの用量（mg/kg）

Ｗ：動物の体重（kg）

Ｒ：接触による放出割合

Ｔ：人皮膚に移行する割合

Ｎ：１日当たりの接触頭数

Ｈ：暴露した人の体重（kg）

（３）暴露のシナリオＤ（投与後の動物に接触した子がその指を舐める）

対象：飼い主の子等

暴露期間：１日～長期間

暴露経路：経口

暴露量＝Ｄ×Ｗ×Ｒ×Ｔ×Ｍ×Ｎ÷Ｈ

Ｄ：体重１ kg 当たりの用量（mg/kg）

Ｗ：動物の体重（kg）

Ｒ：接触による放出割合

Ｔ：人皮膚に移行する割合

Ｍ：皮膚から口に移行する割合

Ｎ：１日当たりの接触頭数

Ｈ：暴露した人の体重（kg）

（４）暴露のシナリオＥ（事故）

対象：飼い主の子等

暴露期間：１日（１回）

暴露経路：経口
暴露量＝Ａ×Ｔ×Ｎ÷Ｈ
Ａ：最大容器１個中の全量（mg）
Ｔ：誤摂取により人に移行する割合
Ｎ：誤摂取個数
Ｈ：暴露した人の体重（kg）

（５）暴露のシナリオＦ（投与後に環境から）
対象：獣医師、ブリーダー、トリマー、飼い主、飼い主の子等
暴露期間：１日～長期間
暴露経路：Ｆ１（経皮）、Ｆ２（吸入）
暴露量＝Ｄ×Ｗ×Ｒ×Ｔ×Ｎ÷Ｈ
Ｄ：体重１ kg 当たりの用量（mg/kg）
Ｗ：動物の体重（kg）
Ｒ：接触による環境へ放出割合
Ｔ：環境から人の皮膚に移行する割合
Ｎ：１日当たりの接触頭数
Ｈ：暴露した人の体重（kg）

（６）暴露のシナリオＧ（投与後に環境に移行した医薬品に接触した指を舐める）
対象：飼い主の子等
暴露期間：１日～長期間
暴露経路：経口
暴露量＝Ｄ×Ｗ×Ｒ×Ｔ×Ｍ×Ｎ÷Ｈ
Ｄ：体重１ kg 当たりの用量（mg/kg）
Ｗ：動物の体重（kg）
Ｒ：接触による環境へ放出割合
Ｔ：環境から人の皮膚に移行する割合
Ｍ：皮膚から口に移行する割合
Ｎ：１日当たりの接触頭数
Ｈ：暴露した人の体重（kg）

21 －２　犬及び猫の皮膚滴下剤の使用者等に対するリスク評価における暴露量の推定に関する具体的な手順の例示

次の（１）から（３）までの手順で行う。また、全体の流れを図１に示す。

（１）暴露経路及び暴露期間ごとの推定無毒性量の推定

推定無毒性量は、表１に例示した毒性試験成績に基づいて推定する。なお、試験成績の代わりに文献等を用いることもできる。

表１　推定無毒性量の推定に用いる試験の例示

推定無毒性量	用いる試験・文献等の例
急性経口毒性	単回投与経口毒性試験等
急性経皮毒性	単回投与経皮毒性試験、対象動物安全性試験、有効成分の皮膚透過性に関する試験等
急性吸入毒性	単回投与吸入毒性試験、製剤からの有効成分の揮発性に関する試験、有効成分の物理化学的性質（揮発性）等
慢性経口毒性	反復投与経口毒性試験等
慢性経皮毒性	反復投与経皮毒性試験、対象動物安全性試験、有効成分の皮膚透過性に関する試験等
慢性吸入毒性	製剤からの有効成分の揮発性に関する試験、有効成分の物理化学的性質（揮発性）等

（２）暴露経路及び暴露時間ごとの合計暴露量の推定

合計暴露量の推定方法を表２に例示する。

表２　合計暴露量の推定に用いるシナリオの組み合わせに関する例示

暴露経路	暴露期間	暴露シナリオ*	合計暴露量
経口	１日	Ｄ＋Ｇ	経口１日暴露（１）
		Ｅ**	経口１日暴露（２）
経皮		Ａ＋Ｃ＋Ｆ１	経皮１日暴露
吸入		Ｂ＋Ｆ２	吸入１日暴露

経口	長期間	Ｄ＋Ｇ	経口長期暴露
経皮		Ｄ＋Ｆ１	経皮長期暴露
吸入		Ｆ２	吸入長期暴露

＊　シナリオは、21 －１を参照のこと。

＊＊　事故による誤飲であるため、通常の使用による経口暴露と分けて計算する。

（３）各合計暴露量と推定無毒性量の比較（MOE の算出）

以下の式に基づいて MOE を算出し、21 の（６）に基づいてリスクを評価する。

MOE ＝推定無毒性量／推定暴露量

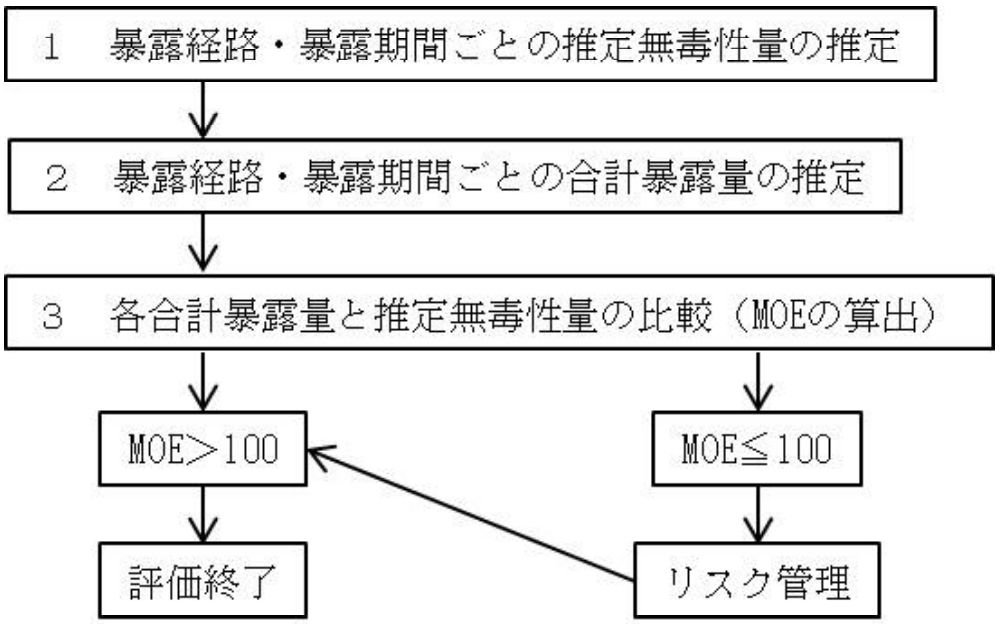


図１　リスク評価の流れ

別添様式２－１

愛玩動物に使用される人用医薬品の使用実態調査の症例報告書様式例

使用対象動物種：

１．調査施設
（１）獣医師名：
（２）診療施設の住所：
（３）開設番号：
２．使用対象動物
（１）診療年月日：
（２）個体を識別できる番号（患畜名、診療簿の番号）等：
（３）年齢・性別・品種・体重・生理的状態等：
（４）病名及び主症状・りん告：
３．使用医薬品
（１）医薬品名（商品名を記載）：
（２）用法・用量：
（３）投与期間：
（４）使用目的（効能）：
（５）併用医薬品名（商品名及び使用状況等を記載）：
４．使用成績
（１）効果：
（２）有害反応（微侯又は疾病名）：

本症例報告書は、自らが実施した診療に基づいて作成した報告書である。

獣医師免許番号：

獣医師名：〇〇　〇〇　　印

別添様式２－２

愛玩動物に使用される人用医薬品の使用実態調査取りまとめ様式例

対象動物　　投与対象期間　平成　　年　　月　　日～　　年　　月　　日

調査施設 ・獣医師名 ・住所 ・開設番号 等	対象動物				医薬品				有効性・安全性		備考
	診　療 年月日	個体を識別できる番号（患畜名、診療簿の番号等）等	年齢・性別 品種・体重 生理的状態 等	病名及び 主症状・ りん告	医薬品名 （商品名を記載する））	用法・用量・ 投与期間	使用目的 （効能を記載する）	併用医薬品 （商品名を記載する）	効果	有害反応 （徴候又は疾病名等を記載する）	

＊：・対象動物（犬、猫等）ごとに作成すること。
・「効果」は、「有効」、「無効」又は「判定不能」と記載すること。
・該当する製剤を使用した事例については、調査を実施した全ての事例を記載すること。なお、その他の事例において有効性又は安全性に関して特記すべき事項があれば、記載すること。
・なお、資料として、症例報告書の複写を添付すること。