



23動薬第3324号  
平成24年1月30日

社団法人 日本動物用医薬品協会理事長 殿

農林水産省動物医薬品検査所長



「薬事法関係事務の取扱いについて」の一部改正について

薬事法（昭和35年法律第145号）第83条第1項の規定により読み替えて適用される同法第14条第1項に基づく動物用医薬品等の製造販売承認申請の際に添付すべき資料を作成するための試験法のガイドライン等（以下「ガイドライン等」という。）については、「薬事法関係事務の取扱いについて」（平成12年3月31日付け12動薬A第418号農林水産省動物医薬品検査所長通知）の別添8により定めているところです。

今般、「動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力」（International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Resistration of Veterinary Medicinal Products。以下「VICH」という。）において合意した下記のガイドラインの追加を行うため、本通知の別添8の一部を別紙新旧対照表のとおり改正しましたので、貴会会員への周知方よろしくお願いします。

なお、今般追加するガイドラインは平成25年1月30日以降に開始される新有効成分を含有する動物用医薬品を対象とする残留性に関する試験に適用されます。

#### 記

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）

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）

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（VICH GL48）

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 GL49）

(別紙)

薬事法関係事務の取扱いについて（平成 12 年 3 月 31 日付け 12 動薬 A 第 418 号農林水産省動物医薬品検査所長通知）

改正案	現 行
<p>別添 8 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</p> <p>目 次</p> <p>1～13 (略)</p> <p>1.4 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン</p> <p>1.4-1 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：<u>残留物の定性及び定量のための代謝試験 (VICH GL46)</u></p> <p>1.4-2 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：<u>実験動物による比較代謝試験 (VICH GL47)</u></p> <p>1.4-3 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：<u>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 GL48)</u></p> <p>1.4-4 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：<u>製剤の休薬期間確立のための指標残留減衰試験 (その 2)</u></p> <p>1.4-5 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：<u>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 GL49)</u></p> <p>1.4-6 動物用医薬品の休薬期間設定のための統計学的解析</p> <p>1.5～1.6 (略)</p> <p>1 分析法バリデーションに関するテキスト (略)</p> <p>1.4 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン</p> <p>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。</p> <p>しかし、本来、<u>全ての</u>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あることも少なくない。<u>従って</u>、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。</p>	<p>別添 8 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</p> <p>目 次</p> <p>1～13 (略)</p> <p>1.4 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン</p> <p>1.5～1.6 (略)</p> <p>1 分析法バリデーションに関するテキスト (略)</p> <p>1.4 動物用医薬品のための残留試験法ガイドライン</p> <p>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。</p> <p>しかし、本来、<u>すべての</u>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あることも少なくない。<u>したがって</u>、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</p>

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か所以上の施設であって少なくとも1か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か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。

分析方法（14-3及び14-4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。

#### 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。

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か所以上の施設であって少なくとも1か所は国内施設で実施すること。

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）アプローチも可能である。

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 ( $^{14}\text{C}$ ) が第一に選択される標識体であって、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、リン 32 ( $^{32}\text{P}$ )、窒素 15 ( $^{15}\text{N}$ ) 又は硫黄 35 ( $^{35}\text{S}$ ) 等の他の同位体も適切である場合がある。 $^3\text{H}$  について

は、<sup>3</sup>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か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、条件を整えば、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から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ればならない。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) 薬剤の剤型

薬剤の成分及び分量、剤型、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）であって、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 食用動物中の動物用医薬品の代謝及び残留動態の評価のための試験：休業期間確立のための指標残留減衰試験（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（ $\mu$  g/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  $\mu$  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

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 ( $\mu$  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  $100 \mu$  g/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。

## 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曝露されていれば、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）を使用することができる。*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（放射性同位元素標識化合物を用いない方法）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、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。しかしながら、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、マイクロソームと 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。
- 肝マイクロソーム、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の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) 薬剤の剤型

薬剤の成分及び分量、剤型、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型は、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マランスの確認を実施しない。総放射能を測定する場合、1 4 - 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、1 4 - 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。1 4 - 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ぬ。

(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り、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 ( $\mu$ g) 又はミリグラム (mg) で表される。

本指針では、毒性学的 ADI に関する情報が適用される。

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 100 $\mu$ g/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。

### 1 4 - 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 GL48）

#### （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、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頭ずつを安楽死させた、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、より良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収集が必要である。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、ブアオン（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日目に頸部の右側に、4日目に頸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ため、他の組織の採材及び分析には不適當である。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

最終投与後、等間隔（例えば12時間ごと）の乳汁採材時点で、全ての動物から、乳汁試料を採材する。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、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（1時点での試験）

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、14-1（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れば、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。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。

- ・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
- ・乳汁：10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。しかし、搾乳動物の場合、1時点（ゼロ日）での乳汁濃度を特定するためには、10頭以上での試験が推奨される。医薬品の残留物の濃度が、常に、適切な濃度（例えば、MRL又はトレランス）以下の場合、通常、ゼロ休薬期間が考慮される。

採材手順に基づいて、1時点（例えば、12時間）で乳のゼロ休薬期間の指定が可能な場合であっても、残留性の十分な評価のために、他の時点における追加の試料（例えば1～4搾乳以上）の採材を実施すべきである。乳汁の試験では、採材のために試験終了時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。

#### 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、1 4 - 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り、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 ( $\mu$  g) 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で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物の濃度と既知の関係にある残留物のことであり、

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り、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り、

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り、

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り、

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り、

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り、

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：内容物を洗淨	複数の部位を合わせた 試料：内容物を洗淨	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。

#### 1.4-4 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

##### 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)～(5) (略)

(6) 試料の採取

ア (略)

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つては、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つては、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。

（削る。）

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。

（削る。）

(1)～(5) (略)

(6) 試料の採取

ア (略)

イ 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1欄に掲げるものを有効成分として含有する検体にあつては、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食品一般の成分規格の表中第3欄に定める量（以下「残留基準値」という。）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つては、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（血液、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 畜舎等に使用される検体で、畜・鶏体に吸収される可能性のあるものについては、血液、卵及び乳汁を採取する。この場合、残留が認められなければならない他の可食部位の採取を実施する必要はない。

カ 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。

キ 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) 分析

ア 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成17年1月24日付け食安発第0124001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）において個別試験法が定められている物質にあつては、当該試験法又はこれと同等以上の精度及び感度等を持つ試験法によること。

個別試験法が定められていない物質にあつては、相当の感度、精度及び再現性を有する分析法を確立すること。この場合における相当の感度、

精度及び再現性とは、定量限界は残留基準値が定められている物質にあってはその値以下、その他の物質にあっては推定される残留基準値以下であって、1～2 ppm の添加回収実験における回収率が 70～120 %、変動係数（標準偏差／平均値）× 100 が 10 %程度のものをいう。

イ 分析対象は、原則として検体の有効成分とする。ただし、代謝生成物が明らかで、かつ、残留のおそれがある場合には、これらについても分析対象とする。

ウ 添加回収実験における添加量は、残留基準値又は推定される残留基準値付近の濃度を用い、分析値からは対照値を差し引かずそのまま記載する。また、回収率の補正は行わない。

エ 検出限界 (a ppm) 以下の場合には「検出せず。」と記載せず「< a ppm」と記載する。

#### (7) 後発動物用医薬品の残留確認試験

ア 試験の目的は、先発動物用医薬品の休薬期間又は使用禁止期間を遵守した場合、残留基準値を超えた残留がないことを確認することである。

イ 試験は、(1)、(3)、(4)、(5)並びに(6)のエ、オ及びカによる。また、動物は検体の適用を予定している全ての対象動物を用いるものとし、動物数は動物種ごとに3頭又は3群以上とし、試料の採取時点は休薬期間又は使用禁止期間経過時点とする。

#### 1 4 - 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 GL49)

##### (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、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、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。

## (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オンの精度には、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。

バリデーシオンの過程の中で、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）は予め分かっているか、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に何日か保存するこ  
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  
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。規定した保存時点で得た平均濃度が、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物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貫性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<sup>1</sup>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<sup>2</sup> 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/質量分析法 (LC/MS) 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 $\alpha$ (偽陽性)に基づく上側信頼限界の線及び確率 $\beta$ (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<sup>4</sup>。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。 $L_b$ (LOD)は、 $\beta$ の水準まで偽陰性率を低減する下側信頼限界の線 $\beta$ から濃度を算出することで決定できる。通常、 $\alpha$ 及び $\beta$ 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( $Y_0$ )を定める。 $L_0$ (LOQ)は、その時、 $\beta$ 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 $\beta$ (通常5%)と $Y_0$ 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

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

1 4 - 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。

$$C_t = C_0 e^{-vt} \cdots \cdots (a)$$

(a) 式の  $C_t$  は  $t$  時点の測定値で、その自然対数  $\log_e C_t = \log_e C_0 - vt$  を  $\log_e C_t = Y(t)$ 、 $\log_e C_0 = a$ 、 $v = -b$  と置き換えると、

$$Y(t) = a + bt \cdots \cdots (b)$$

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  $V_i$  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 ( $V_e$ ) を求める。

$$V_e = s^2 = (S_{TL} + S_R) / (N - 2)$$

次の回帰統計量を求める。

直線回帰係数  $b = S_{Ty} / S_{Tt}$

切片  $a = Y_{..} - bt_{..}$

(8) 統計学的解析

ア 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。

$$C_t = C_0 e^{-vt} \cdots \cdots (a)$$

(a) 式の  $C_t$  は  $t$  時点の測定値で、その自然対数  $\log_e C_t = \log_e C_0 - vt$  を  $\log_e C_t = Y(t)$ 、 $\log_e C_0 = a$ 、 $v = -b$  と置き換えると、

$$Y(t) = a + bt \cdots \cdots (b)$$

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

(i) から (iii) 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。

(i) 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。

(ii) 各時点の分散  $V_i$  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。

(iii) 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 ( $V_e$ ) を求める。

$$V_e = s^2 = (S_{TL} + S_R) / (N - 2)$$

次の回帰統計量を求める。

直線回帰係数  $b = S_{Ty} / S_{Tt}$

切片  $a = Y_{..} - bt_{..}$

(2) 休薬期間の評価方法

ア 特定の採材時間  $t_i$  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。

$$Y(t_i) = a + bt_i + ks \cdot \dots \cdot (c)$$

ここで、 $s$  は直線の誤差分散  $S^2$  の平方根、 $k$  は  $k = h \cdot t(N - 2, c)$  によって求められる統計量であり、

$$h = [1/N + (t_i - t_{..})^2 / Stt]^{1/2}$$

$$d = Z_p / h$$

$p$  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  $Z_p = 2.3264$  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  $t_i$  により求めた最大許容濃度の上限  $Y(t_i)$  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  $t_i$  に変えて (c) 式の計算を反復する。 $Y(t_i)$  が定められた残留基準値の対数値を下回った最初の  $t_i$  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  $Y(t_i)$  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 1 1 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つては、(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つては、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。)

イ 休薬期間の評価方法

(ア) 特定の採材時間  $t_i$  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。

$$Y(t_i) = a + bt_i + ks \cdot \dots \cdot (c)$$

ここで、 $s$  は直線の誤差分散  $S^2$  の平方根、 $k$  は  $k = h \cdot t(N - 2, c)$  によって求められる統計量であり、

$$h = [1/N + (t_i - t_{..})^2 / Stt]^{1/2}$$

$$d = Z_p / h$$

$p$  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  $Z_p = 2.3264$  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  $t_i$  により求めた最大許容濃度の上限  $Y(t_i)$  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  $t_i$  に変えて (c) 式の計算を反復する。 $Y(t_i)$  が定められた残留基準値の対数値を下回った最初の  $t_i$  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  $Y(t_i)$  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。

ウ なお、食衛法第 1 1 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及び分析対象の消失が極めて速やかである場合にあつては、統計学的解析を行う必要はない。