

マイクロサンプリングに関わるトキシコキネティクス評価の分析技術における課題



JBF

(JBF DG2017-29活動結果報告より)

2018/7/18 第45回日本毒性学会学術年会

○二橋 陽一郎¹, 大道 浩三², 原田 智隆³, 山本 鉄斎⁴, 中井 恵子³,
斎藤 嘉朗⁵, 家木 克典⁶

(¹塩野義製薬株式会社, ²興和株式会社, ³株式会社LSIメディエンス,
⁴中外製薬株式会社, ⁵国立医薬品食品衛生研究所, ⁶株式会社新日本科学)

JBF DGとは



- JBF (Japan Bioanalysis Forum)
 - バイオアナリシスの発展と課題解決のために国内の産官学のバイオアナリシス関係者より構成された団体であり，その活動の一つとしてディスカッショングループ（DG）を運営し，国内の関係者にバイオアナリシスに関する諸問題を議論する場を提供している。

マイクロサンプリングDGの活動

年度	活動タイトル	活動内容	備考
2015	実施状況と運用上の問題点	問題点の洗い出し（アンケート調査） <ul style="list-style-type: none"> •各社の実施状況 •解決すべき課題 •実施例 	<ul style="list-style-type: none"> •9名で活動 •一部を日本毒性学会で発表
2016	技術的課題の検討	問題への対策について（アンケート調査） <ul style="list-style-type: none"> •採血方法や用いるデバイス •マイクロサンプリングに伴う追加バリデーション項目 •分析の真度・精度に与える要因 •分析法の高感度化 •採血部位の違いによる薬物動態への影響や頻回採血による生理学的データへの影響 	<ul style="list-style-type: none"> •S3A Q&A案が公表 •11名で活動 •一部を日本毒性学会で発表
2017	実施計画と方法の提案	マイクロサンプリングのガイダンスのステージアップに向けて，実践的な情報を提供し，日本国内での対応推進に貢献する <ul style="list-style-type: none"> •緩衝液等による希釈，試料保管，マイクロサンプリングへ変更することに伴うパーシャルバリデーション，全血試料中の抗凝固剤，ピペット操作による真度・精度に与える要因 	<ul style="list-style-type: none"> •5名で活動 •Q&Aが最終合意

背景と発表の目的



【背景】

- マイクロサンプリングの求められる背景や利点の理解が進んでいる
- ICH S3A Q&Aが2017年11月に最終合意に達し、マイクロサンプリングを実践レベルでTK評価に適用していく段階
- 依然として残る課題
 - ✓ マイクロサンプリングを実践する際の技術的な問題点や課題点は何か？
 - ✓ トキシコキネティクス評価側の準備はできているか？

【発表の目的】

- 毒性評価側にも関係する、トキシコキネティクス評価者が直面する課題について、解決案を含む知見を提供し、国内でのマイクロサンプリングの適用を推進したい

なお、本発表はDGに参加したメンバーによってまとめられた内容に演者の個人的な見解を加えたものであり、JBFの考えを代表するものではない

実践に向けた課題



• 安全性評価サイド

- ✓ 採血量が生理学的データに与える影響
- ✓ 採血部位の違いによる薬物動態への影響
- ✓ 採血の手技
- ✓ 失血の影響
- ✓ 抗凝固剤の添加方法
- ✓ 異なるマトリックス (血漿 vs 全血) を用いたときの適切なブリッジング

• トキシコキネティクス評価サイド

- ✓ 分析感度-マイクロサンプリングによってBLQ(定量下限以下)が大多数になることは許容されない
- ✓ 分析法バリデーションの実施
- ✓ 微量試料による取扱い上の問題 (例：保管中の乾燥，予期せぬ凍結融解)
- ✓ 抗凝固剤のボリュームの影響
- ✓ 保管中の容器への吸着の可能性
- ✓ コンタミのリスク
- ✓ ISR (incurred sample reanalysis) の実施のために必要な試料量の確保

本発表で取り扱うトピックス



1. ピペット操作による真度・精度に与える要因
2. 試料の適切な希釈
3. 抗凝固剤の影響

非臨床試験で得られた血漿 (wet) 試料中薬物濃度をLC/MSで分析することを前提とする

1. ピペット操作による真度・精度に与える要因

採血量50 μL が分析に与える影響



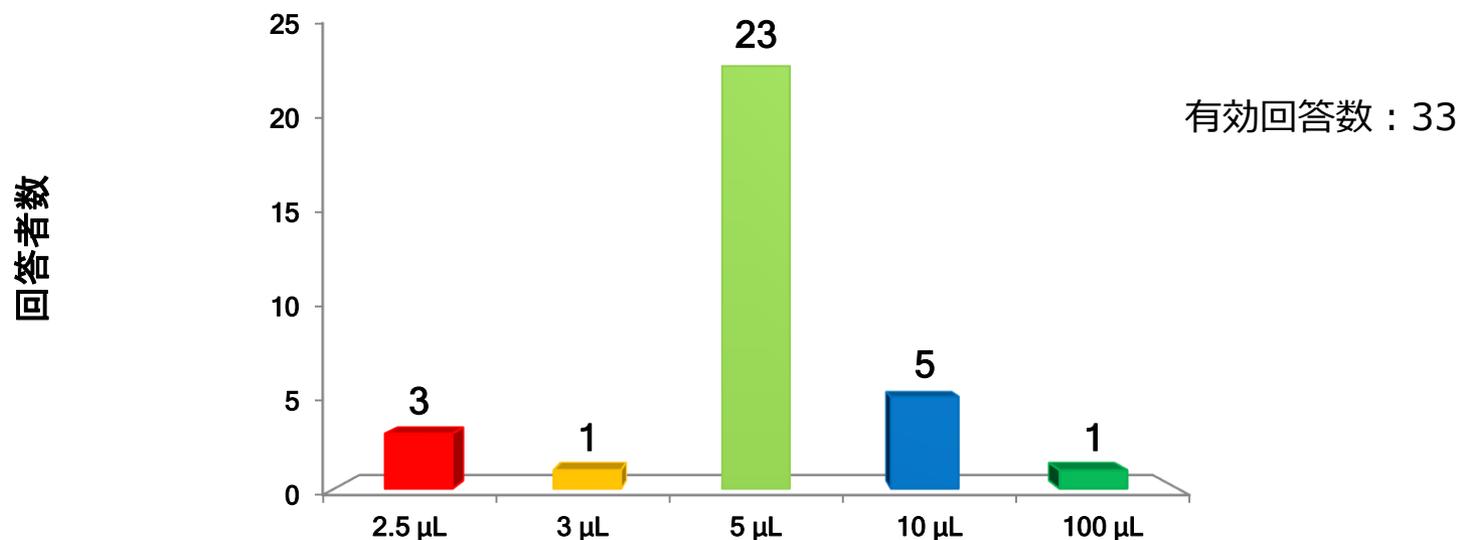
- 採血量 50 μL
 - ⇒ 遠心分離により得られる血漿量 約20 μL
- トキシコキネティクス評価では、1試料3~4回の測定を想定
 - 初回測定
 - 再測定 (1回目, 2回目)
 - ISR
- **1測定あたりの使用可能量は5 μL 以下**
(=20 μL \div 4回分)

採血量 50 μL 以下のとき、トキシコキネティクス評価側が1回の測定に使用できる血漿量は 5 μL 以下.

何 μL まで正確に分注可能か？



Q：ピペットで最小何 μL まで正確に液体試料を分注可能と考えますか？
申請に用いる試験を想定して，数字（単位： μL ）でご回答ください。
(DG2016-21 アンケート結果)



アンケート結果では，70%の方が**5 μL の分注が可能**と回答

⇒ 5 μL 以上であれば，通常使用しているピペットの精度で十分である可能性が高いと考えられる。

新しいデバイス



- 今後は、より少量のサンプリングが要求される可能性もあり、さらに精度の高いデバイスが期待される。
- さらなる低容量分取用マイクロピペット
- 特殊なデバイス（Microsampling Wing™やそれに続くデバイス）
 - ◆ Microsampling Wing™は容量が2.8 μL または5.6 μL 固定だが、血漿を高精度に採取できるかもしれない（次スライドにデータ）。

Microsampling Wing™

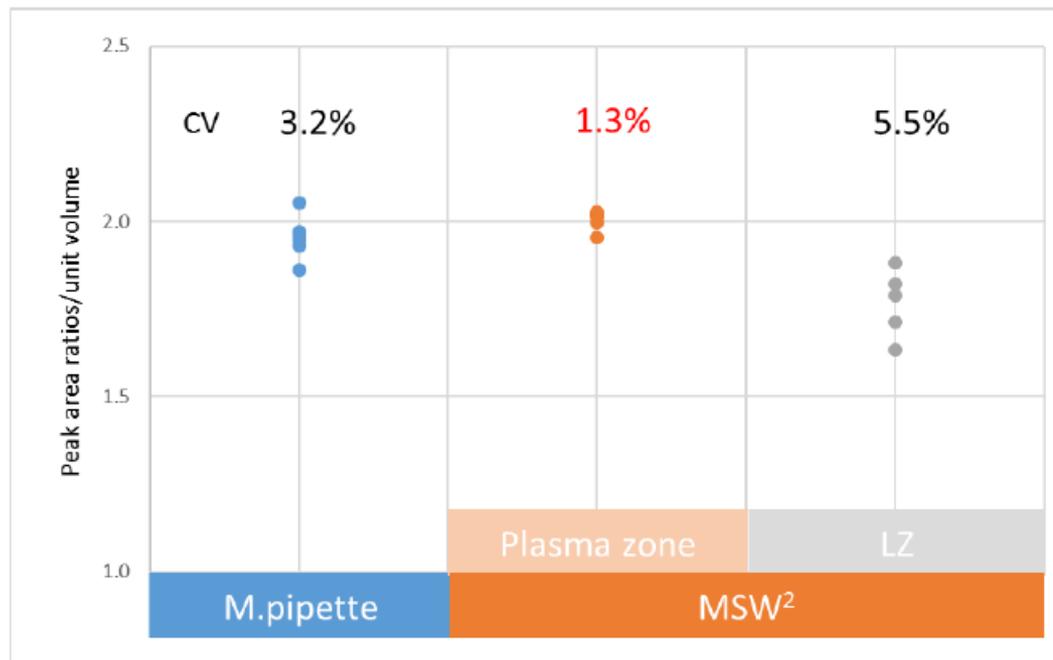
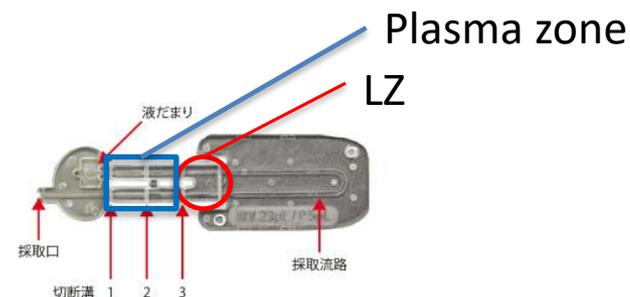


Fig 1 Sampling reproducibility



全体容量 : 23 µL

Plasma zone: 5.6 µL

LZ: 2.5 µL

LZ: Lucky zone

→

ヘマトクリット値 (≦50%) や
遠心環境により血漿になる領域

マニュアルピペットと同レベルの精度での薬物濃度評価の可能性

2. 試料の適切な希釈

希釈の必要性



- マイクロサンプリングで微量（全血として $\leq 50 \mu\text{L}$ ）血漿を取り扱う際、『希釈（dilution）』は有用な手段になる

【希釈の利点】

1. 微量の血漿の取り扱い（操作・保管）を容易にする
2. 再測定（再分析）・ISRに十分なサンプル量を確保できる
3. 採血量をさらに少なくできる

※ただし、以下の条件が満たされること

1. 分析感度が十分に得られること
2. 希釈による容器への吸着がないこと
3. 希釈試料によるバリデーションが実施されること
4. Analyteの溶解性が担保できること
5. 正確な量の試料が分取できること

採血手法による希釈方法の違い



採血法	方法
規定量の血漿 (全血) が採取できるデバイス (e.g. キャピラリー, MSW™)	デバイスを別チューブに入れ, 規定量の希釈マトリックスを添加する (washout)
規定量の血漿 (全血) が採取できないデバイス (e.g. キャピラリー, シリンジ)	マイクロチューブに血漿 (全血) を移した後, 規定量の希釈マトリックスの入ったマイクロチューブに, 規定量の血漿 (全血) を取る

いずれの手法でも可能. 希釈の均質性に留意すること.

希釈を含むサンプリング例



AZ approach to capillary plasma microsampling

http://www.e-b-f.eu/wp-content/uploads/2018/06/bcn2017-Amanda-Wilson_AZ.pdf

代替マトリックス及び添加剤



水溶液 ¹⁾	【利点】 入手しやすい
生理食塩水 (Saline), リン酸緩衝液, リン酸緩衝食塩水 (PBS) (pH 7.4)	
水溶液への添加剤	【利点】 吸着の防止
ウシ血清アルブミン (BSA)	PBS with BSA ¹⁾ , 2% BSA solution ²⁾
界面活性剤	非イオン性界面活性剤 (Tween20など)
有機溶媒との混液	【利点】 キャピラリー等からのwashout, IS添加, 吸着の防止
25%アセトニトリル in 水 ³⁾	全血15 μ L+135 μ L (10倍希釈) \Rightarrow 25 μ L/assay
Low %メタノール in 水 ⁴⁾	ペプチドがanalyteのとき吸着防止
代替血清	【利点】 実試料に近い
市販の凍結プール血清	L-コンセーラ「ニッスイ」 ⁵⁾

- 1) http://www.e-b-f.eu/wp-content/uploads/2018/05/bcn2012-S27.-3_sangster.pdf
- 2) [https://cdn2.hubspot.net/hubfs/1806452/Content/Microsampling%20eBook%20Final%20\(1\).pdf?t=1490048661187](https://cdn2.hubspot.net/hubfs/1806452/Content/Microsampling%20eBook%20Final%20(1).pdf?t=1490048661187)
- 3) Yongyi Luo, Bioanalysis, 7, 18 (2015)
- 4) Lars B Nilsson, Bioanalysis, 5, 6, (2013)
- 5) https://www.nissui-pharm.co.jp/products/clinical_diagnostics/quality_control.html

希釈のための代替マトリックスは化合物, 分析手法などによって選択・最適化する

3. 抗凝固剤の影響

補正の有無と抗凝固剤の添加

			ブランクマトリックスの抗凝固剤		
			固体	液体	
				2.5%未満	2.5%以上
実試料の 抗凝固剤	風乾		不要	不要	
	液体	2.5%未満	不要	不要	
		2.5%以上	要補正	要補正	同じ比率なら 不要

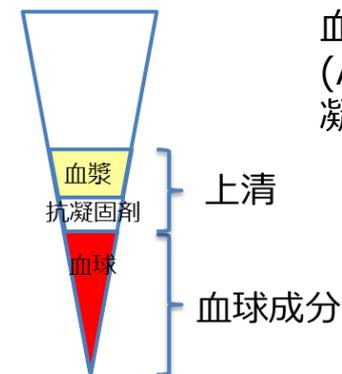
- 固体又は液体で抗凝固剤を添加
 - 昨年度のDG2016-21より、血漿に対する添加量の割合
 - 5%未満：補正なし
 - 5%以上：補正を考慮
- ただし、血液に添加した抗凝固剤は全て血漿成分となる

⇒血液50 μ Lに対して2.5% (=1.25 μ L) が補正を考慮するライン

補正の方法（適応例）

- 採血：50 μL （血漿量25 μL と仮定）
- 抗凝固剤：25 μL 添加
- 測定：5 μL 使用
- 定量範囲：1～1000 ng/mL
- 検量線用標準試料は血漿のみで調製

遠心分離後の
チューブ



血漿試料に一定割合
(A%: 今回は50%)の抗
凝固剤が含まれると仮定

$$\frac{1}{(1 - A/100)}$$

補正係数

補正の方法1 測定結果に対して 補正係数をかける	補正の方法2 検量線の傾きに 補正係数をかける	補正の方法3 試料分取量に 補正係数をかける
測定結果を2倍する	定量範囲を 2～2000 ng/mL	測定に使用する血漿量 を10 μL にする

ヘマトクリットの考慮について

- 血漿中濃度を100ng/mLと仮定し、50 μ Lの血液に以下の量の抗凝固剤を加えた時、ヘマトクリット値の違いにより**希釈後の血漿中濃度 (ng/mL)***は以下のように変動する。

ヘマトクリット値	抗凝固剤添加量		
	10 μ L	25 μ L	50 μ L
35%	76.5	56.5	39.4
40%	75.0	54.5	37.5
45%	73.3	52.4	35.5
50%	71.4	50.0	33.3
55%	69.2	47.4	31.0

*Rb値（血液血漿濃度比）の変動の影響は考慮しない

$$\text{希釈後の血漿中濃度} = 100\text{ng/mL} \times \frac{(50\mu\text{L} \times (100\% - \text{Hct}\%) / 100\%)}{(50\mu\text{L} \times (100\% - \text{Hct}\%) / 100\% + \text{添加量})}$$

ヘマトクリットの考慮について

- 希釈後の血漿中濃度を逆補正する場合、各試料のヘマトクリット値ではなく、平均値(45%)を使うと想定される。45%として**逆補正した元の血漿中濃度(ng/mL)**は以下になる。(真値：100 ng/mL)

ヘマトクリット値	抗凝固剤添加量		
	10 μ L	25 μ L	50 μ L
35%	104.3	107.9	111.0
40%	102.3	104.1	105.7
45%	100.0	100.0	100.0
50%	97.4	95.5	93.9
55%	94.4	90.4	87.5

通常の変動幅である40～50%で見ると、10 μ L添加では誤差 \pm 3%以内と意外に小さいが、50 μ L添加では \pm 6%程度まで変動している。さらに、

- 採血量と抗凝固剤の添加量を正確にコントロールする必要あり
- 血液の希釈によるRb値の変動が評価できていない

補正を考慮しないような抗凝固剤の添加を推奨

まとめ

1. ピペット操作による真度・精度に与える要因

- ✓ 血漿5 μL 以上の分注は，通常使用しているマイクロピペットの精度で十分である可能性が高い
- ✓ より少量のサンプリングを可能とする精度の高いデバイス，ハンドリングのしやすいデバイスの登場が期待される

2. 試料の適切な希釈

- ✓ 利点および注意点を理解し，適切な方法を適用する

3. 抗凝固剤の影響

- ✓ 添加割合により，TK試料濃度の補正が必要な場合がある
- ✓ ヘマトクリットの変動を考慮すると，補正を必要としない抗凝固剤の添加方法が推奨される

最後に



- 実験データや実践例を元にした議論や，毒性評価側とトキシコキネティクス評価側の議論が活発化し，マイクロサンプリングが国内外で推進されることを期待する

※過去のDG活動成果は以下のHPに掲載されています。ぜひご参照ください。

http://bioanalysisforum.jp/images/2018_9thJBFS/P2_DG2017-29.pdf

http://bioanalysisforum.jp/images/2016_DG/DG2016-21_update.pdf

http://bioanalysisforum.jp/images/2016_7thJBFS/05_DG2015-17_HP_J.pdf



ご清聴ありがとうございました



Appendix

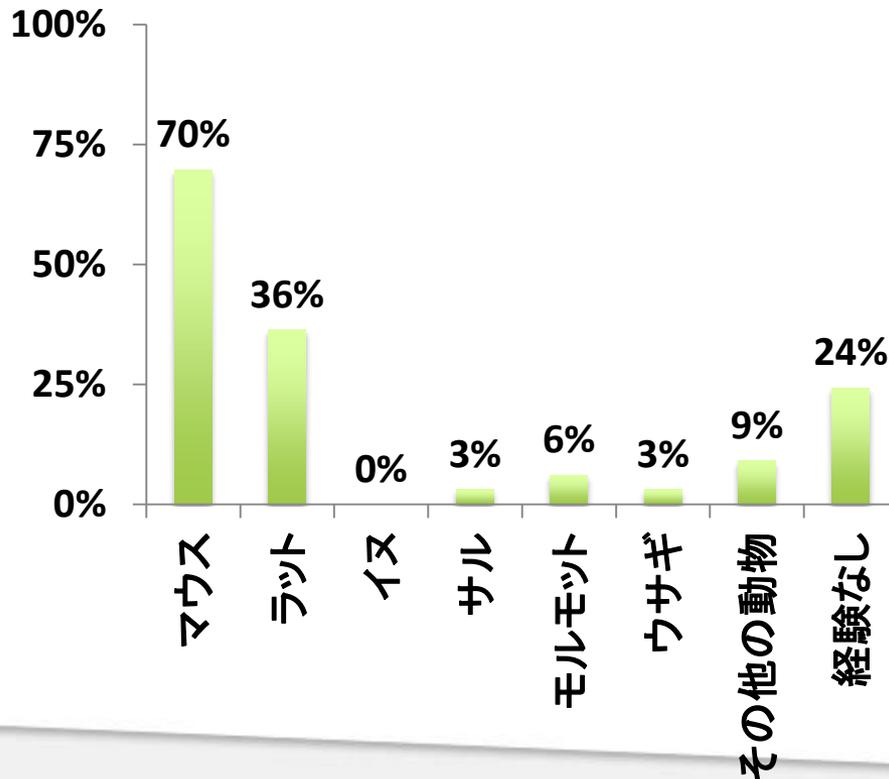
DG2015-17 アンケート結果

Q6

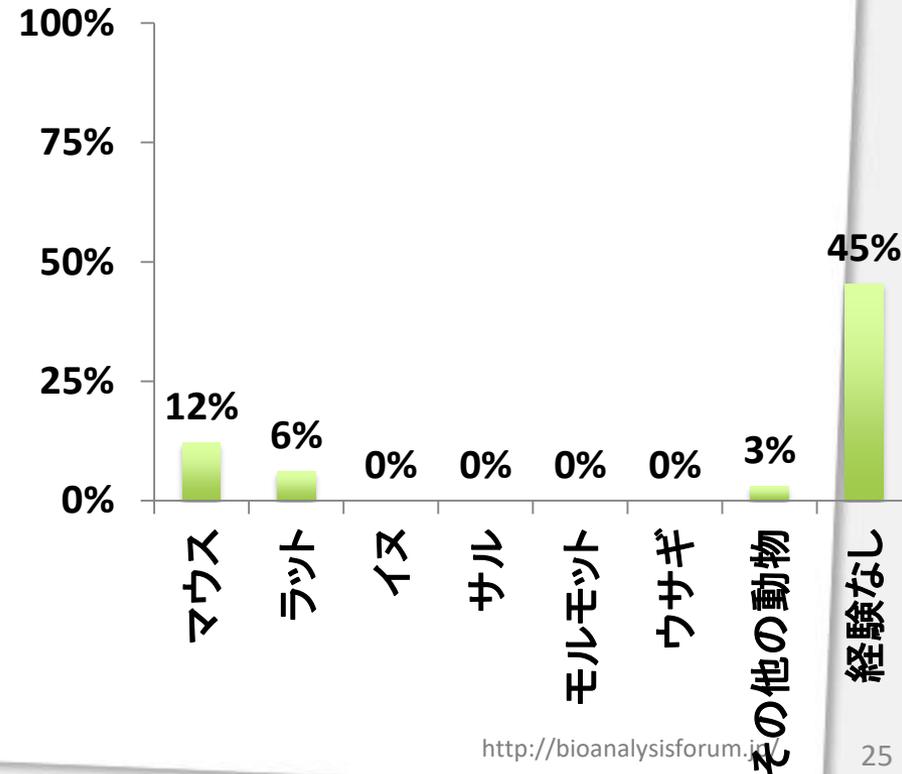
マイクロサンプリング意識調査

御社では非臨床試験において試験グレードに関わらず 50 μ L/point 以下の採血の経験はありますか？(DBSを除く, 複数回答可)

申請資料として用いない試験



申請資料として用いる試験



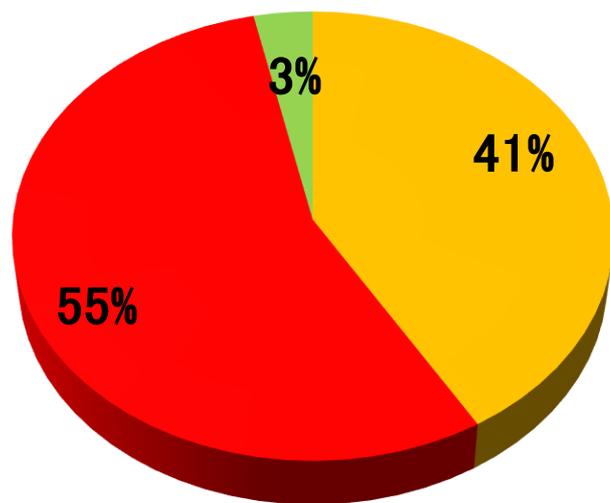
DG2016-21 アンケート結果



2015年10月に実施したアンケートにおいて、マイクロサンプリングに対する取り組みを尋ねたところ、〈参考：2015年10月時のアンケート結果〉との回答を得ました。当時と比較して、御社のマイクロサンプリングの取り組みに対する「意識」はどう変化しましたか？ Q4-6で実際の「行動」に関する設問がありますので、ここでは「意識」としての変化に注目してご回答ください。

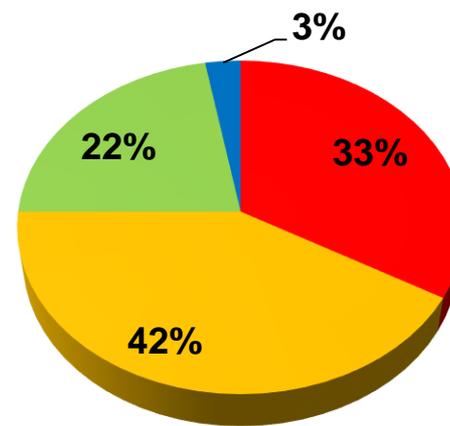
Q1-2

〈参考：2015年10月時のアンケート結果〉



- 当時より意識が高まった
- 当時と変わらない
- 当時より意識が低くなった

有効回答数：29



- 既にマイクロサンプリングを実施している
- マイクロサンプリング導入のための技術的検討を実施している
- 何も実施していない
- その他(具体的に)

有効回答数：36

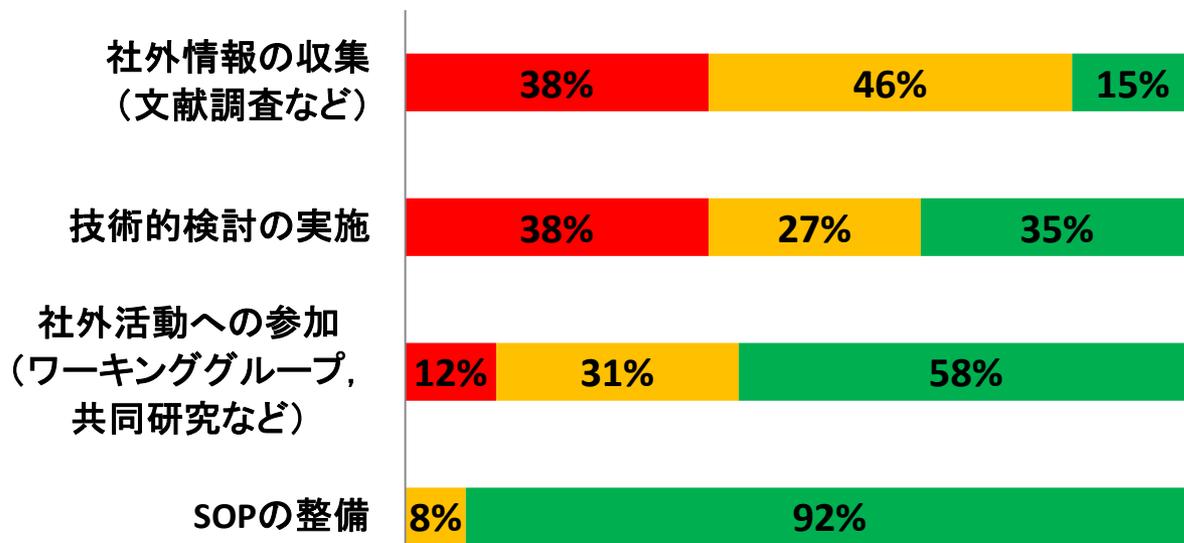
<http://bioanalysisforum.jp/>

DG2016-21 アンケート結果



前回アンケート回答時 (2015年10月) と比較して御社ではマイクロサンプリ
ングに関連した以下の各項目について具体的に「行動」はどう変化しました
か？各項目についてそれぞれあてはまるものをご回答ください。

Q1-5



- 活発化した
- 実施中(あるいは実施済み)で, 変わらなかった
- 抑制した, あるいは停止した
- 実施しておらず, 変わらなかった

DGまとめ:

「行動」が活発化した内容は情報収集や技術的検討についてである。SOPの整備まで至っている企業は未だ少ない状況であった。

DG2016-21 アンケート結果



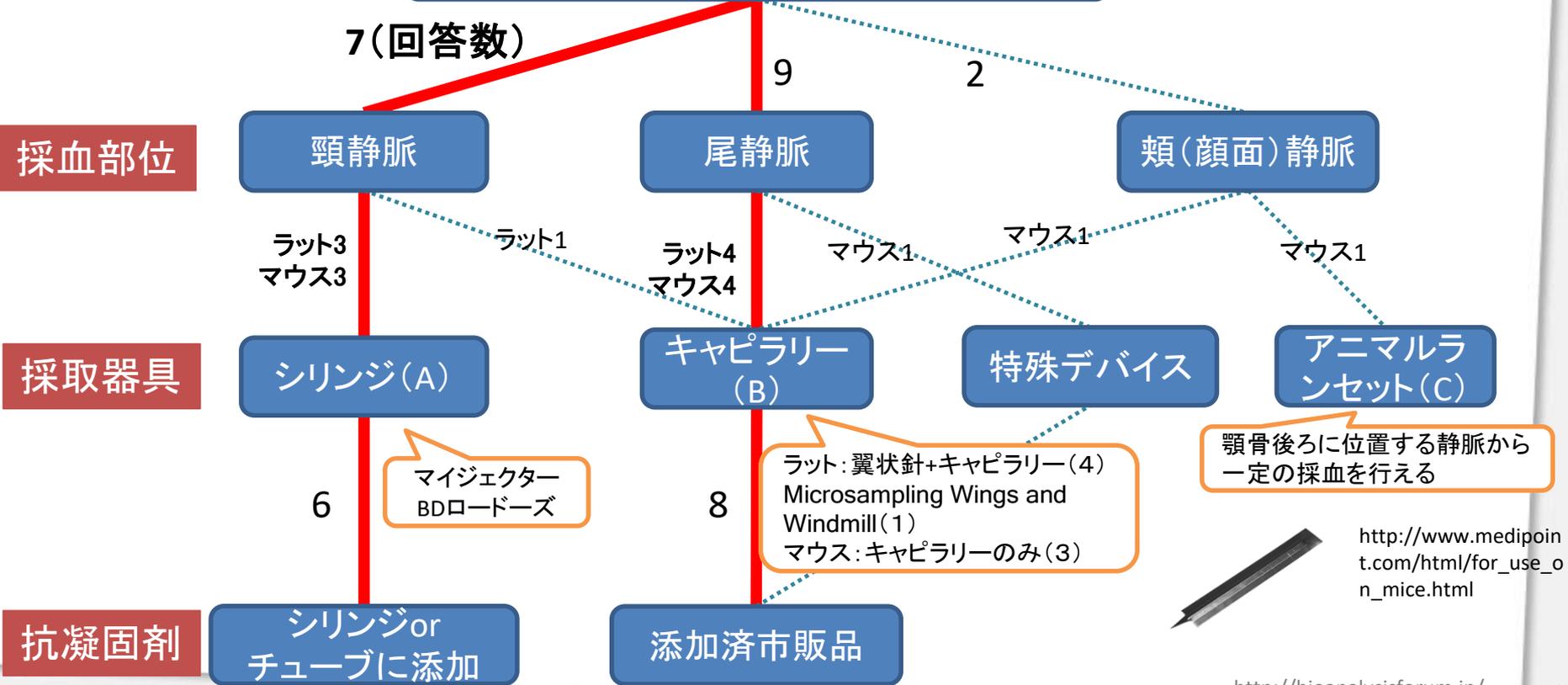
Q2-21~34

デバイスのメリット, デメリット

マイクロサンプリングを実施した時のデバイス（採血器具）の使用例について具体的にお聞かせください

マイクロサンプリングへの適用例

赤線: 主要経路
点線: 少数経路



http://www.medipoint.com/html/for_use_on_mice.html

補正の有無と抗凝固剤の添加例

- 補正の必要がない添加例

デバイス	添加方法
キャピラリー	処理済み市販品（ヘパリンNa、EDTA-2Na）を使用
シリンジ	シリンジ*に抗凝固剤を吸引吐出し、針先のみ残して（1 μ L程度）、そのまま採血
シリンジ	採血チューブに予め1 μ Lの抗凝固剤をとり、全血50 μ Lを添加してよく混和

*Dead volumeの無いシリンジ（マイジェクトなど）

- 補正を考慮する必要がある添加例

デバイス	添加方法
シリンジ	シリンジに予め10 μ Lの抗凝固剤をとり、全血50 μ Lを添加してよく混和
シリンジ	採血チューブに予め25 μ Lの抗凝固剤をとり、全血50 μ Lを添加

何 μ Lまで正確に分注可能か？ 2



- しかしながら，少量のサンプルの取り扱いには注意が必要であるため，粘性の高い液体の扱いに適している**ポジティブディスプレイメント方式のマイクロピペットの使用を推奨する**（**エアードisplayメント方式のマイクロピペットをリバーズ法で用いる方法も可**）。

デバイス	タイプ	モード	備考
マイクロピペット	エアードisplayメント方式	フォーワード法	
		リバーズ法	<ul style="list-style-type: none"> 粘性の高い液体に適している
	ポジティブディスプレイメント方式		<ul style="list-style-type: none"> 粘性の高い液体に適している チップの壁面に液が残りにくい ため，サンプルのロスがない

マイクロピペットの吸引方式の比較

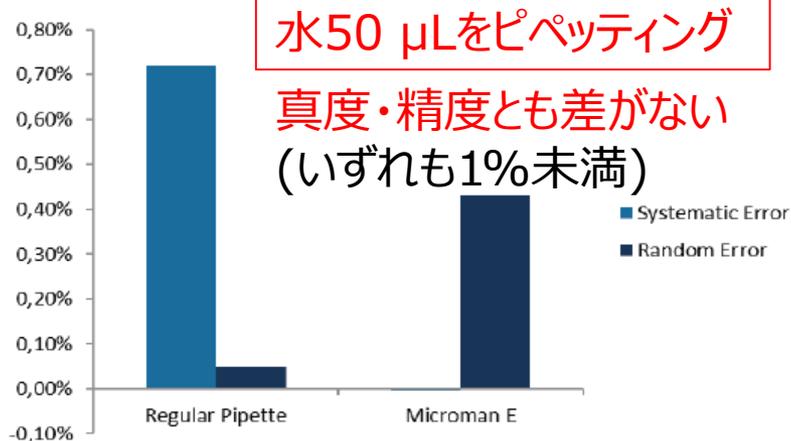


Figure 3

Systematic and random errors of water pipetting with MICROMAN® E versus standard pipette. Measurements were based on the average of ten gravimetric measurements per sample.

左側 : Regular pipette = エアーディスプレイメント
(フォワード法)
右側 : MICROMAN E = ポジティブディスプレイメント

Systematic error = $(\text{mean volume} - \text{nominal volume}) \times 100 / \text{nominal volume}$
Random error = $\text{SD} / \text{mean} \times 100$

Gilsonのアプリケーションノートより

http://www.gilson.com/Resources/AN0996_Exact_and_Secure_Pipetting_of_Plasma_and_Whole_Blood.pdf

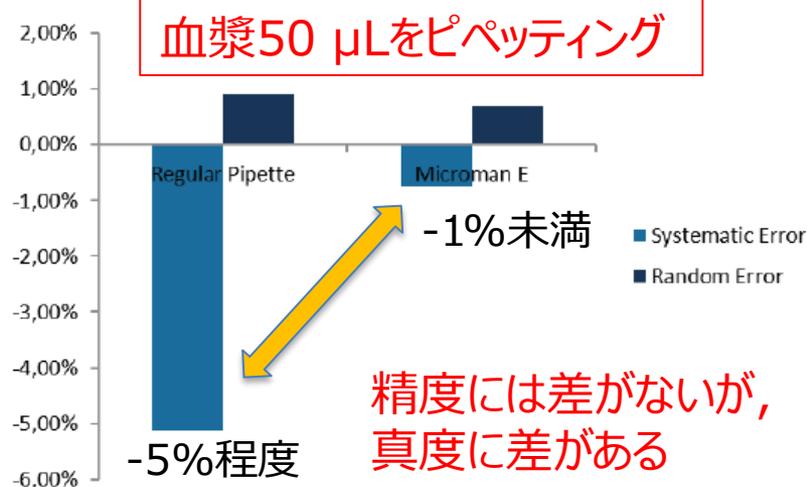


Figure 4

Systematic and random errors of plasma pipetting with MICROMAN® E versus standard pipette. Measurements were based on the average of ten gravimetric measurements per sample.

第44回日本毒性学会学術年会 ポスター発表



2017年7月に行われた日本毒性学会学術年会において、昨年度（DG2016-21）の活動内容から以下の項目を選択し、ポスター発表を行った。

➤ 文献調査

- 採血量が生理学的データに及ぼす影響
- 採血部位によるPKの違いについて

➤ JBFでのアンケート調査

- マイクロサンプリングの実施方法，デバイスとメリット・デメリットについて
- マイクロサンプリングに関する意識や新たな課題，使用デバイスについて

また，上記とは別に毒性学会の来場者の方に，毒性試験の中でTK動物をどのように設定するか，アンケートを行った。

毒性学会の来場者の方へのアンケート

質問内容

ICH S3AガイダンスのQ&A案の, 1.2 (Q2) マイクロサンプリングのベネフィット/利点は何か? で, 「マイクロサンプリングが主試験群で実施されるため, 安全性に関するデータと薬物曝露との関連を同じ動物で直接評価できることも主たる利点である。」との記載があります。

その上で, 以下の①, ②の場合に, TKをどのように評価するのが適切であると考えますか?

①採血量が毒性評価に影響を及ぼさない場合

毒性評価群から採血 (サテライト群をおかない)

全動物から
全ポイント採血

特定の数例
から採血

スパー
スサンプリ
ング

サテライト群
において, 採血

0名

19名

5名

2名

②採血量が毒性評価に影響を及ぼす場合

毒性評価群からのスパー
スサンプリ
ング

サテライト群において採血

2名

24名

- ・採血量が影響を及ぼさない場合, 毒性評価群の特定の数例から採血を行うとの回答が多かった
- ・採血量の影響の有無に関らず, スパー
スサンプリ
ングを実施する回答は少ない傾向にあった

来場者の方からのコメント

項目	コメント
全般	<ul style="list-style-type: none"> ・マイクロサンプリングには踏み切れない。過去データとの違いが出そう。特に採血部位の違いによって毒性の出方にも差が生じるのではないか。 ・ラットはできそうだが、マウスでできるかどうか問題ではないか ・自分たちの会社で率先して実施する勇気はない。周囲の状況が変わったり、データが蓄積されたりすれば踏み切れるかも ・代謝物の定量などが必要となる場合が多く、マイクロサンプリングを使う発想にない ・主群での毒性評価とTKの相関を考察することは、現状からは一步踏み込んだ考え方で先進的であるが、そこまで重要性が高いとは考えられない。群評価でよい ・薬物濃度測定以外の目的（バイオマーカーなど）で使用することもあり、マイクロサンプリングの実施を躊躇する ・毒性が出た動物のTKについて、それは特異な個体であり、またその選択方法自体が恣意的であるため、そこまで確認しようとは思わない
生理学的影響	<ul style="list-style-type: none"> ・採血による負荷が動物の毒性にどう表れるのかは、生化学的な数値の変化だけではなく、それ以外にもあると考えられる ・頸静脈採血でASTが上がる傾向がある
PKの違い	<ul style="list-style-type: none"> ・尾静脈採血と頸静脈採血とではPKが変わる印象を持っている ・採血部位によって異なるTKのプロファイルが得られてしまうと、どの濃度が妥当であるのか、ヒトへの外挿性など、やっかいな話になる
採血	<ul style="list-style-type: none"> ・ラットは頸静脈、マウスは尾静脈からとっていることが多い ・人によって採血の方法(頸静脈と尾静脈)が異なっている
アンケート	<ul style="list-style-type: none"> ・スパスサンプリングではTKプロファイルの個体差を検出することができない ・スパスサンプリングでは平均値とはいえ、異なる個体から得られたプロファイルを描くのが気持ち悪い