

# マイクロサンプリングの技術的課題とその対策 (JBF DG2016-21によるアンケート調査及び文献調査より)



○大道 浩三<sup>1,2</sup>, 家木 克典<sup>1,3</sup>, 木下尚之<sup>1,3</sup>, 公平 陽子<sup>1,4</sup>, 斎藤 嘉朗<sup>5</sup>, 中井 恵子<sup>6</sup>, 難波 英太郎<sup>1,7</sup>, 二橋 陽一郎<sup>1,8</sup>, 長谷川 拓郎<sup>1,9</sup>, 原田 智隆<sup>1,6</sup>, 山根 真一<sup>1,10</sup>

1 バイオアナリシスフォーラム DG2016-21, 2 興和株式会社, 3 株式会社新日本科学, 4 株式会社住化分析センター, 5 国立医薬品食品衛生研究所, 6 株式会社LSIメディエンス, 7 中外製薬株式会社, 8 塩野義製薬株式会社, 9 株式会社ポリリサーチセンター, 10 積水メディカル株式会社

## 背景・目的

2016年5月に日米EU医薬品規制調和国際会議 (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) S3A「トキシコキネティクス(毒性試験における全身的暴露の評価)」に関するガイダンスQ&A案が公表され、マイクロサンプリングに対する国内の製薬企業や医薬品開発業務受託機関(CRO)の関心が高まってきている。Q&A案では、非臨床における生体試料中薬物濃度分析やバイオマーカー濃度分析を従来よりも少ない量(50μL以下)の試料で評価するマイクロサンプリング技術により、動物の苦痛の軽減、使用動物数の削減及び安全性に関するデータと薬物曝露との直接的な関連性の評価などの利点があると示された一方、従来のサンプリング手法との測定値の同等性や主試験群の動物からのサンプリングによる生理学的状態に及ぼす影響などの注意点が示されている。

バイオアナリシスフォーラム(JBF)のディスカッショングループ(DG2016-21)ではマイクロサンプリングを実践する際の問題点や課題に対する具体的な解決策を提示することを目的として、国内の製薬企業とCROに対するアンケート調査及びDGでの文献調査と議論を実施したが、今後も継続的に情報を収集し、対策を練る必要があると考えられた。

## 文献調査: 採血量が生理学的データに及ぼす影響

ICH S3AガイダンスのQ&A案の, 3.1主試験群における毒性データや動物福祉に対する採血の影響の評価方法は?の項目で、「頻回で繰り返しの採血が血液学的パラメータのような生理学的データに影響することが考えられる。」とあるため、採血量がラット及びマウスの生理学的データに及ぼす影響について、公表されている論文を調査し、検査項目とその結果をまとめた。なお、検索はPubmedを用い、「Microsampling」をキーワードとして抽出された論文のうち、生理学的データを取得している6報<sup>1)~6)</sup>を選択した。

1) Regul Toxicol Pharmacol. 2015 Aug;72(3):429-39. 2) Regul Toxicol Pharmacol. 2014 Aug;69(3):425-33. 3) Regul Toxicol Pharmacol. 2014 Apr;68(3):325-31. 4) Bioanalysis. 2012 Mar;4(6):661-74. 5) Toxicol Sci. 2016 Nov;154(1):69-77. 6) Bioanalysis. 2012 Dec;4(23):2775-9

## 調査した6報で実施されていた検査内容

検査項目	一般状態観察	体重	摂餌量	血液学的検査	血液化学検査	血液凝固能検査	組織重量	病理組織学的検査
ラット	3/5	5/5	3/5	5/5	5/5	1/5	4/5	4/5
マウス	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	1/1	0/1

体重, 血液学的検査, 血液化学検査を実施した報告が多かった。

## 試験系及び検査結果のまとめ

動物種	系統	雌雄	日齢, 週齢	体重(g)**	採血量(μL)		採取日	検査日	部位	検査項目及び結果					
					量 × 回数	割合(%)***				血液学的検査			血液化学	組織重量	病理組織
										RBC	HEM	Hct			
ラット	SD	♀	8W	200	50 × 6	300	2.3	D1	D2	伏在静脈	-	-	-	-	
					100 × 6	600	4.7	D1	D2	伏在静脈	-	-	-	-	
					200 × 6	1200	9.4	D1	D2	伏在静脈	11-15%減	1.6倍に増	-	-	
ラット	Wistar (Han)	♀	19D, 37D	40, 95	32 × 3	96	3.8	D1	D2	尾静脈	-	-	-	-	
					32 × 3	96	1.6	D1	D2	尾静脈	有意に低下だが、標準範囲内	-	-	-	-
					200 × 6	1200	9.4	D1	D2	尾静脈	D1: 経時的に減, D2: 11-15%減	1.5倍に増	-	-	
ラット	Wistar (Han)	♂ ♀	10 W	♂ 250, ♀ 180	32 × 6	192	♂ 1.2, ♀ 1.7	D1, D14	D15	尾静脈	-	-	-	-	
					200 × 6	1200	♂ 8, ♀ 10	D1, D14	D15	尾静脈	減	増(GLDHも)	雄・肝減	-	
					250 × 5	750	♂ 0.7, ♀ 1	D1	D3	尾静脈	8-14%減	-	-	-	
ラット	Wistar (Han)	♂ ♀	?	♂ 339, ♀ 231	25 × 3 + 70	145	♂ 0.7, ♀ 1	D1	D3	尾静脈	-	-	-	-	
					250 × 5	750	♂ 6, ♀ 9	D1	D3	尾静脈	-	-	-	-	
					32 × 2	64	10	D1	D7	頸静脈	-	-	-	-	
ラット	Wistar (Han)	♂ ♀	4D	♂ 10, ♀ 10	32 × 3	96	15	D1	D7	頸静脈	-	10%減	-	-	
					32 × 3	96	6.3	D1	D2	頸静脈	-	20%減	-	-	
					32 × 3	96	6.3	D1	D7	頸静脈	-	-	-	-	
ラット	Wistar (Han)	♂ ♀	10D	♂ 24, ♀ 24	32 × 3	96	6.3	D1	D2	頸静脈	-	-	-	-	
					32 × 3	96	4	D1	D2	頸・尾・頸静脈	10-18%減	20%減	15-20%減	-	
					32 × 3	96	4	D1	D7	頸・尾・頸静脈	-	-	-	-	
マウス	?	?	?	10 × 8	80	?	?	不明	不明	尾静脈	- (減であったが、有意差なし)	-	- (肝のみ)	-	

\*\*Charles riverのSDラット長期モニタリングデータ, Charles riverのWistar Hanのグラフ, あるいは文献値を記載

\*\*\*全血液量は体重の6.4%として計算

血液学的検査の値が、採血の影響に対して最も高感度に反応するパラメータである。  
採血量が翌日の血液学的検査で生理学的データに影響を及ぼし始めるのは4%以上であった。

## アンケート調査: 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

調査方法は、JBFの活動に関与している製薬企業及び委託研究機関の計66社に対し、WEB上のアンケートサイトに各社の代表者1名が回答するよう依頼した。調査期間は2016年9月20日～9月30日で、回答数(回答率)は31社(47%)であった。なお、内訳は、内資の製薬メーカー77%、外資3%、CRO19%であった。

## 2015年10月と比較して、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?



**意識が高まった**

- Q&A案が出て、求められていることが具体化されたため。
- 毒性部門における認知度が以前よりも高まったため。
- S3AガイダンスのQ&Aとしての指針が進められるなど、世の中的にも意識が高まってきている。
- S3AガイダンスのQ&Aの検討が進んだこと、その推進にレギュレーターのインプットが得られたことで、そろそろ検討していいのではという意識が高まった。
- 多くの企業が取り組みを行っていることがわかったため。
- マイクロサンプリングでの実験数が増えたため。
- 従来より自社で行っていたDBS法に特有の課題が抽出され、血漿マイクロサンプリング法の導入を検討しているため。

**意識が変わらない**

- 社内方針が定まっていなかったため。
- 切迫した状況ではなく、意識に特段変化はない。
- 分析CROとして準備はしていますが、動物試験本体の取り組み次第。
- 既に実施済であるため。
- 具体的な取り組みに進展がないため。
- 臨床検査においては微量試料ですべてを賄うのが難しいため。
- 小動物を用いる試験が少なくあまり必要性を感じていないため。
- 分析だけでなく毒性評価の観点からの議論が必要ですが、社内では毒性評価側の意識が従来と変わっていないと考えられます。
- 日本では毒性評価動物から採血しなくても、TKサテライト群を設定した方がトラブルが少ない、という考え方で、もう少しバックグラウンドデータが蓄積しないと、意識が変わらないと感じます。

**意識が低くなった**

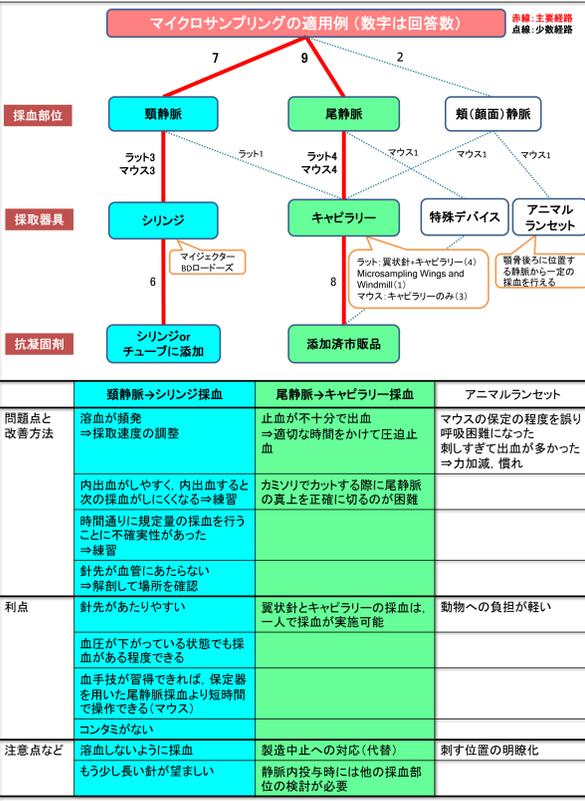
- マイクロサンプリングの課題が明確となり、組み込むことのリスクが実施のメリットを超えることが分かったため。

## Q&A案発出により、マイクロサンプリングについて新たに浮上した懸念や課題があればご回答ください

項目	懸念や課題
適用範囲	毒性試験におけるマイクロサンプリングの強制力がどれだけのかが疑問です。国・地域による温度差があるという話もあるので、マイクロサンプリングを適用するかどうかの判断が悩みます。 マイクロサンプリングの対象動物に大動物(イヌ・サル)も含まれるようなのですが、通常の採血でも良いのではないかと感じています。
主群からの採血	毒性が発現した個体の血漿中濃度を測定することが望ましい、というFDAの見解に対応するには全例での採血が必要なのではないかという懸念がある。主試験群から採血する場合に採血が毒性評価に影響しないことの証明方法や、従来法との比較に関する具体的な対応方法。
ガイドライン	もしも各局のGL等に反映するならば、非臨床TK試験における現実的な課題に向き合って、予め解決する必要があります。安全性試験の目的や意義に少しの懸念も無く実施できるように、科学的実験データを提示した上でもう一度議論が必要と思われる。 非臨床TK試験以外への拡張を意識したかのような記載が随所に読み取れなくもないが、古くはガスリ法や新生児マウススクリーニングなど、臨床現場に根付いた技術に混乱をもたらさない様に、課題が片付くまでTKのなかだけの話に留めておくことを希望する。
検討事項	レギュレーションの変更による試験項目の追加。 Q&A案ではマイクロサンプリングを導入するために検討、確認すべき事項が追加記載されているが、これまで問題視されていなかった従来法にも共通の課題が含まれている(採血部位の変更など)。
採血	溶血する頻度が通常法より高いが問題にならないか、自社では、探索段階で用いているため無視しているが、他の施設でどのように対応しているのか。

## 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

調査方法は、マイクロサンプリングの経験がある方に対し、WEB上のアンケートサイトに採血部位、採血器具、抗凝固剤の添加方法、問題点と改善方法、利点や注意点を回答するよう依頼した。その中から成功例を集計し、スキームとした。調査期間は2016年11月10日～11月25日とした。



問題点と改善方法	頸静脈→シリンジ採血	尾静脈→キャピラリー採血	アニマルランセット
溶血が頻発 →採取速度の調整	内出血がやすく、内出血すると次の採血がしにくくなる→練習	止血が不十分で出血 呼吸困難になった 刺すたびに出血が多かった →力加減、慣れ	マウスの保定の程度を誤り 呼吸困難になった 刺すたびに出血が多かった →力加減、慣れ
時間通りに規定量の採血を行う ことに不確実性があった →練習	針先が血管にあたらぬ →解剖して場所を確認	翼状針とキャピラリーの採血は、 一人で採血が可能	動物への負担が軽い
溶血しないように採血 もう少し長い針が望ましい	製造中止への対応(代替) 静脈内投与時には他の採血部位 の検討が必要	刺す位置の明確化	

マイクロサンプリングへの適用例では頸静脈→シリンジ、尾静脈→キャピラリーが主に用いられている手法であり、デバイスについても通常と同様の器具を使用している例が多かった。

デバイス名称	写真	URL
マイジェクター		https://www.tanumo.co.jp/medical/equipment/me10.html
BDロードーズ		http://www.bd.com/jp/diabetes/products/1f3pro000055wa.html
翼状針		http://www.elea-japan.com/catalog/160212_wingneedle.html
Microsampling Wings and Windmill		https://solutions.shimadzu.co.jp/cgi/ac?cmd=1&url=/glc/shopping/spe/level2/k13.html
アニマルランセット		http://www.medipoint.com/html/for_use_on_mice.html

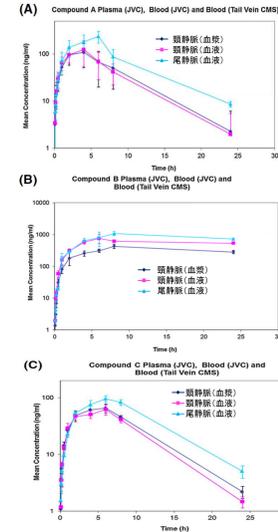
## 文献調査: 採血部位によるPKの違いについて

ICH S3AガイダンスのQ&A案の, 2.2 (Q4) TK試験にマイクロサンプリングを適用する場合の注意点は何か?の回答で、「従来法をいくつかの試験で既に使用して、マイクロサンプリングを他の試験に適用する際には、マイクロサンプリングと従来法との間の曝露量の測定値に関する同等性は、マイクロサンプリング手法を用いる前に、各々の動物種から得られるマトリックスについて確認するべきである。この比較のための独立PK試験は、例えば、同じ部位から採取された血液試料に関し、同じマトリックス及び同じ分析条件を用いる場合など、適切な科学的妥当性に基づき、個々の事例に応じて省略できる。」との記載があり、採血部位が異なる場合には、薬物動態が異なる可能性があることを示している。そのため、採血部位を変えた場合の薬物動態を確認した論文をpubmed及びgoogle検索にて調査した(げっ歯類のみ)。

結果、調査した5報の内、3報では差が無かったものの、2報では差が認められた。差が認められた1例を以下に掲載する。

## Utility of capillary microsampling for rat pharmacokinetic studies: Comparison of tail-vein bleed to jugular vein cannula sampling?

動物種(系統): ラット(SD)  
投与薬物: Compound A, B, C (化学構造非公開)  
投与経路: 強制経口投与  
採血部位: 頸静脈 (JVC, カニューレーション), 尾静脈 (Tail vein)



Parameter	採血部位	マトリックス	A (mean ± SD)			B (mean ± SD)			C (mean ± SD)		
			Plasma	Blood	Blood	Plasma	Blood	Blood	Plasma	Blood	Blood
C <sub>max</sub> (ng/mL)	頸静脈	Plasma	133 ± 47	428 ± 68	66.7 ± 10.9						
		Blood	140 ± 62	765 ± 229	63.3 ± 12						
		Blood	253 ± 47	1130 ± 93	95.7 ± 13						
AUC <sub>0-24</sub> (ng·h/mL)	頸静脈	Plasma	708 ± 346	7590 ± 1130	782 ± 62						
		Blood	727 ± 344	13100 ± 889	707 ± 61						
		Blood	1960 ± 280	19000 ± 1080	1230 ± 110						
t <sub>1/2</sub> (h)	頸静脈	Plasma	5.1 ± 1.8	ND	6.6						
		Blood	4.2 ± 1.1	ND	7.9						
		Blood	4.1 ± 0.1	ND	4.1						

化合物A, B: AUCにおいて 尾静脈>頸静脈  
化合物C: C<sub>max</sub>及びAUCにおいて 尾静脈>頸静脈  
通常採血からマイクロサンプリングに変更する際に、採血部位を変更する場合には、濃度推移を確認した方がよいと考えられた。