

DG2017-29

マイクロサンプリング (3)

-実施計画と方法の提案-



Microsampling (3)

-Proposals for planning and method-

Abstract



Since 2015, the JBF discussion group (DG) of microsampling revealed the opinions of companies and progress in Japan through surveys and clarified the concerns to be discussed or solved. As the draft Q&A document of ICH S3A (toxicokinetics) published in 2016 reached to Step 4 in November 2017, more practical information would be desired. Therefore, the DG2017-29 is continuing the activity in order to provide useful information including practical examples to Japanese companies that want to apply microsampling to their regulated bioanalysis. During the activity, we focused on issues that were continued from DG2016-21 or seemed to induce divided opinions.

Topics



- In this symposium, we will report the following issues, under the condition on analysis of wet samples (*e.g.* plasma) by LC/MS.
 1. Sample dilution with the appropriate solvents (buffer etc.)
 2. Sample storage
 3. Partial validation for changes to microsampling
 4. Ratio of anticoagulant to blood sample
 5. Accuracy and precision of liquid handling by pipetting

Microsampling



◆ Definition of microsampling

- ✓ Method to collect very small amount of blood (typically $\leq 50 \mu\text{L}$) to measure TK parameter of the drug and/or its metabolites
- ✓ Dry or wet microsampling technique

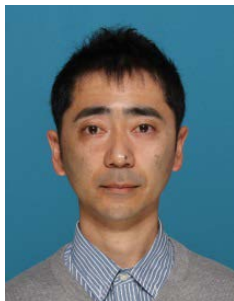
◆ Advantage of microsampling

- ✓ Improving the animal welfares (contribution to 3Rs)
- ✓ Direct evaluation of the relationship the safety data and drug exposure

メンバー



Member (5名)



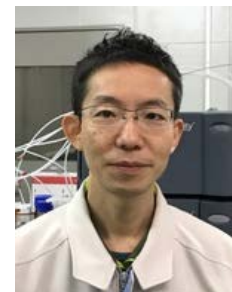
二橋 陽一郎
塩野義製薬株式会社



家木 克典
株式会社新日本科学



大道 浩三
興和株式会社



原田 智隆
株式会社LSIメディエンス



山本 鉄斎
中外製薬株式会社

Observer (2名)



中井 恵子
株式会社LSIメディエンス

斎藤 嘉朗
国立医薬品食品衛生研究所

活動の目的



マイクロサンプリングに関しては、2015年「DG2015-17: 実施状況と運用上の問題点」及び2016年「DG2016-21: 技術的課題の検討」の活動を通じて、日本国内の製薬企業及び医薬品開発業務受託機関（CRO）の現状を把握し、課題を整理するとともに、推進に向けて課題に関する議論を深めてきた。一方で、2016年に発出されたマイクロサンプリングに関する日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）S3A（トキシコキネティクス）Q&A案は、2017年11月にStep 4に到達し、今後はより実践的な情報が望まれるものと考えられる。そこで、規制下の試験にマイクロサンプリングの適用を考えている製薬企業やCROに向けて、具体的な対応例を含む情報を提供することを目的として、今年度もDG2017-29として活動を継続した。

活動内容



■ 議論

メール及び電話・Web会議にて下記テーマに沿って議論を進めた.

1. 試料の適切な希釈
 2. 試料の保管
 3. 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
 4. 抗凝固剤の影響
 5. ピペット操作による真度・精度に与える要因
- テーマ選定根拠
 - ✓ 「wet (血漿) 試料をLC/MSで分析する」ことを前提
 - ✓ 以前の活動からの継続議論が必要な項目あるいは意見が分かれそうな項目

■ 学会発表

- 第44回日本毒性学会学術年会 (2017/7/10-12)
- バイオメディカル分析科学シンポジウム (2017/8/28-29)
- EBF Open Symposium (2017/11/15-17)

トピックス



◆ 議論内容の紹介

1. 試料の適切な希釈
2. 試料の保管
3. マイクロサンプリングに変更することに伴うパーシャルバリデーション
4. 抗凝固剤の影響
5. ピペット操作による真度・精度に与える要因

◆ 第44回日本毒性学会学術年会 ポスター発表

◆ ICH S3A Q&As Final-Step 2からの変更点-

1. 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

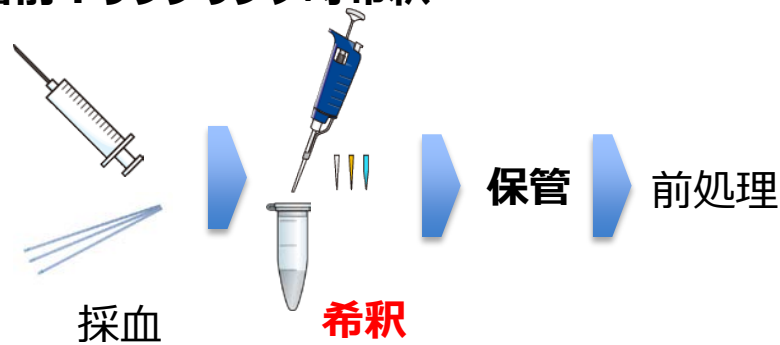
1. 分析**感度**が十分に得られること
2. 希釈による容器への**吸着**がないこと
3. 希釈試料による**バリデーション***が実施されること
4. Analyteの**溶解性**が担保できること
5. **正確な量**の試料が分取できること

*：スライド30参照

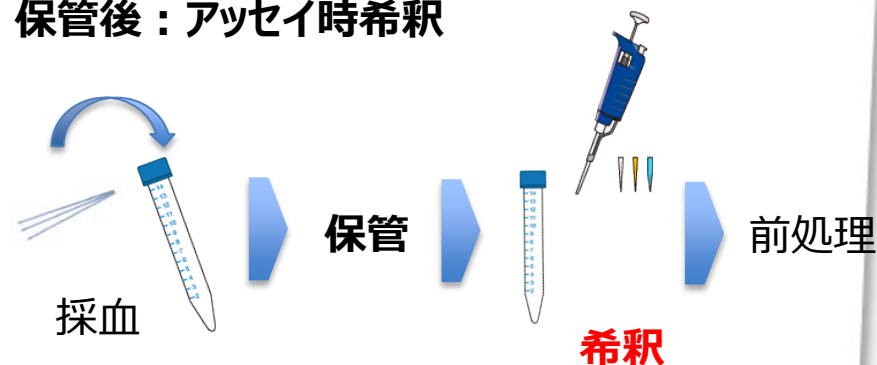
希釈のタイミング

| タイミング | 希釈担当者 | 考慮すべきポイント |
|-------------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 保管前： サンプリング時 (at sample time) | 動物実験者 | <ul style="list-style-type: none"> 分析に不慣れな実験者によるピペティングの精度（ただし、規定量の血漿（全血）を採取できるデバイスであれば問題なし） |
| | 分析実験者 | <ul style="list-style-type: none"> 試料の受け渡しや分析実験者の作業スペースなど、動物実験者との連携 |
| 保管後： アッセイ時 (at assay time) | 分析実験者 | <ul style="list-style-type: none"> アッセイ時の操作の増加 保管前後でのマトリックス組成の変化 |

保管前：サンプリング時希釈



保管後：アッセイ時希釈



希釈のタイミングの違いによって得られる血漿（全血）中濃度には差がないと考えられる

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 TM)* | 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 |

* : スライド21, 50参照

いずれの手法でも可能. 希釈の均質性に留意すること.

何で希釈するか



| 試料 | 考慮すべき点 |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 当該動物のブランク血漿 | <ul style="list-style-type: none">3Rsの観点から、使用を避けるほうがよい |
| 代替マトリックス (次頁参照) | <ul style="list-style-type: none">「分析対象の実試料にできるだけ近いものを使用する」(ガイドライン) |

- 希釈溶液がコンタミすると、測定値がすべて採用できなくなることに注意
- 吸着の防止に、内標準物質 (安定同位体標識) が効果的な場合がある

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://bcn201211.europeanbioanalysisforum.eu/wp-content/uploads/2016/03/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

希釈倍率



例：1回のassayに使用するマトリックス量を25 μ Lとした場合の採取可能回数

| 採取 マトリックス量 | 希釈倍率 | | | |
|---------------|--------|---------|---------|----------|
| | x2 | x5 | x10 | x20 |
| 5 μ L | 0 (10) | 0 (25) | 1 (50) | 3 (100) |
| 10 μ L | 0 (20) | 1 (50) | 3 (100) | 7 (200) |
| 20 μ L | 1 (40) | 3 (100) | 7 (200) | 15 (400) |

※ ()内はトータル試料量 (μ L)

再測定及びISRを考慮すると、最低限3回の採取が必要
(DG2015-17アンケート結果)

⇒ 10 μ Lのマトリックスを10倍希釈し、25 μ L使用する
20 μ Lのマトリックスを5倍希釈し、25 μ L使用する
などの手法が考えられる。

分析感度を損なわないことを前提に、採取できるマトリックス量とアッセイに使用するマトリックス量を考慮して希釈倍率を決定する必要がある

検量線濃度範囲を超過した試料の取り扱い

- 希釈試料が検量線濃度範囲を超過した場合、さらに希釈が必要となる。
 - 希釈溶媒もしくは、試料と同じ比率で混合されたブランクマトリックス + 希釈溶媒を用いて希釈する
 - ✓ 希釈再現性を確認する。安定性は必須ではない。
 - もし希釈溶媒に内標準物質が含まれていた場合は、内標準物質を含む希釈溶媒とブランクマトリックスを混合したものをを用いて希釈する

2. 試料の保管

保管に関する課題



① マイクロサンプリングDG (DG2015-17) のアンケート結果 (Q17-27) より.

1. 乾燥による定量値への影響
2. 適切な容器
3. 安定性への影響
4. 吸着 (少量のため影響を受けやすい)
5. 少量のため、ハンドリング時に融解しやすい

② 今回のDGで新たに挙げられた課題

6. フィブリン塊の析出

本DGにおける論点



1. 試料の乾燥を防ぐにはどうするか？

1-1 最新の保管容器について情報収集

1-2 希釈保管の是非

- ・溶媒は何か？
- ・化合物の溶解性は？
- ・吸着は？

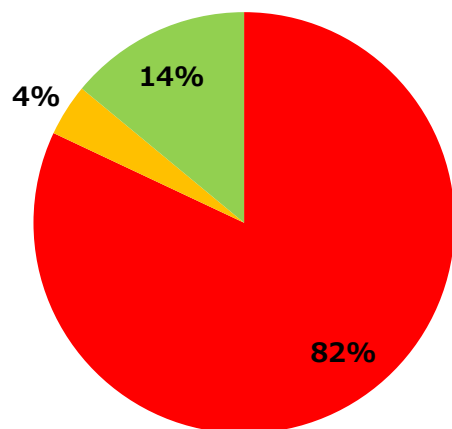
希釈の項にて議論

2. フィブリン塊への対処

1. 保管容器と保管条件



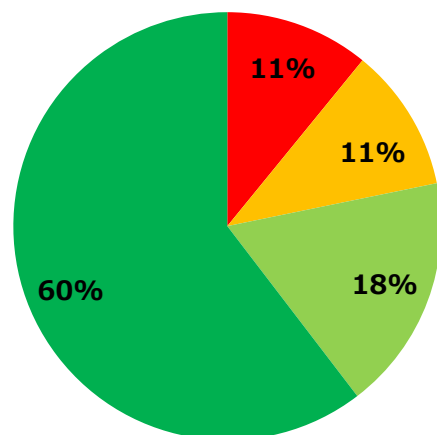
試料の保管容器は？



- チューブ (PP, PEなど)
- キャピラリー
- DBSろ紙

⇒ チューブを用いた保管が主流

保管温度は？



- 室温 (DBSのみ)
- 冷蔵 (4℃前後)
- 冷凍 (-20℃前後)
- 冷凍 (-70℃以下)

⇒ -70℃以下の冷凍が主流

DG2015-17のアンケート結果より

<http://bioanalysisforum.jp/>

1. 保管容器と保管条件 (つづき)



| 名称 | 特徴 | 写真 | メーカー名 | URL |
|------------------------------------------------|--------------------------------|----|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lub Stuff PCR チューブ (0.2 mL) | 自動分注装置にて 分注が可能 ラベルが貼りにくい | | FCR&Bio CO.,LTD. | http://www.labstuff.jp/product/page0307.html |
| Specialty Microcentrifuge Tubes (0.4 mL) | ふたが開きやすい | | Thermo Fisher Scientific Inc. | http://www.qsptips.com/products/product.aspx?id=128&c=28 |
| MSW ² Type Udck TM | 2.8 μ Lの血漿を分離 そのまま保管可能 | | 株式会社 島津ジーエルシー | https://solutions.shimadzu.co.jp/cgi/ac?cmd=1&url=/glc/shopping/spe/level2/k13.html |
| Micronic tube | グラクソスミスクライン社の 血漿マイクロサンプリング | | 不明 | https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/NMSS_42_SmallMolec_Spooner.pdf |
| カットしたキャピラリー中で 保管 | アストラゼネカ社の 血漿マイクロサンプリング | | 不明 | http://focus201206.europeanbioanalysisforum.eu/wp-content/uploads/2016/04/14-3-3-Ove-Jonsson.pdf |

保管容器変更にとまなうパーシャルバリデーションについてはスライド27参照

2. フィブリン塊への対処



微量の血漿試料中にフィブリン塊を認めた場合、適切なサンプリングは可能なのか？
対処法を議論した。

| 対処案 | コメント |
|----------------|------------------------|
| フィブリンを避けて分取する。 | 可能であれば、最も適切な対処法 |
| 遠心して除く。 | 試料よりフィブリンを除去することの影響が不明 |
| 分注して保管，1本使い切り | 作業量が増加 |
| あらかじめ希釈して保管 | マトリックス変更，フルバリデーションが必要* |
| キャピラリーで保管 | 実際に適切な対処か否かの実績なし |
| 血清を使用する。 | 当該化合物の評価方法に依存 |

*：スライド30参照



**現状，最適な対処法は議論の範疇を出ない。
今後の実績より評価する必要がある。**

3. マイクロサンプリングに変更することに 伴うパーシャルバリデーション

はじめに

DG2016-21で実施したアンケート調査の結果から、採血量や取り扱う試料容量が微量になることによって、注意すべき点はあるものの、液体試料のマイクロサンプリング特有のバリデーション項目はないと考えられた^{1) 2)}。

一方で、従来法があってマイクロサンプリングに変更する際、当然分析法に変更が生じることが予想される。

本DGでは、マイクロサンプリング適用に伴う分析法の変更点を洗い出し、パーシャルバリデーションの必要性について議論した内容を発表する。

議論は、マイクロサンプリング特有の変更点にスコープを当てた。

- 1) マイクロサンプリング(2)技術的課題の検討、JBFシンポジウム、2017
- 2) 医薬品開発におけるマイクロサンプリングの技術的課題と対策について
(JBF DG2016-21研究活動結果報告より)、BMAS、2017

採血器具の変更

ケース

従来法では採血にシリンジを使用していたが、マイクロサンプリング適用に伴いキャピラリーに変更した。

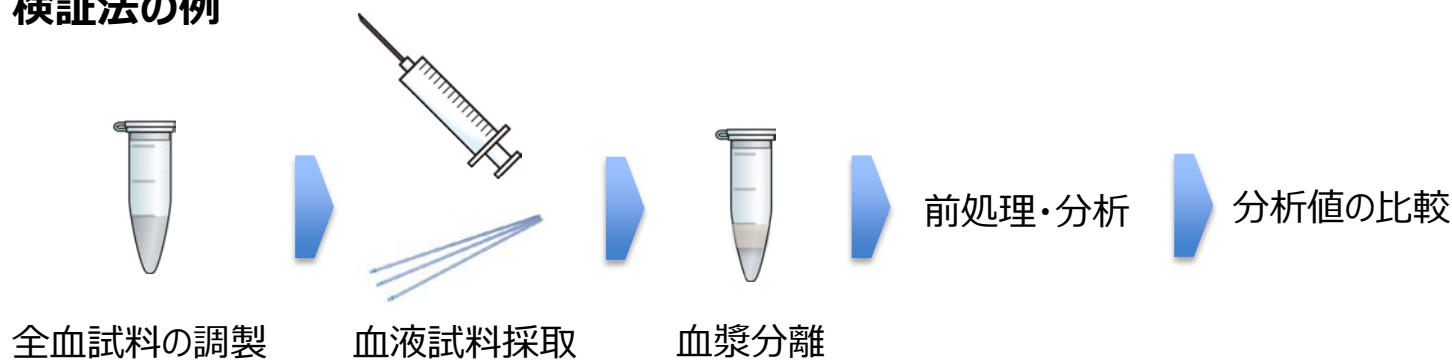
留意点

材質の変化に伴う吸着の影響が考えられる。

PVの実施

不要
材質変化による吸着が懸念される場合は、事前に影響を検証する。

検証法の例



抗凝固剤の添加量（割合）の増加



ケース

従来法では500 μ Lの血液に5 μ Lの抗凝固剤を添加している。
マイクロサンプリング適用に伴い採血量を50 μ Lにした（抗凝固剤の添加量は5 μ Lのままとした）。
抗凝固剤の割合が1%から10%に増加

留意点

濃度補正が必要なレベル*の増加量

*：「4. 抗凝固剤の影響」の項参照

PVの実施

必要（濃度補正が不要なレベルであればバリデーション不要）。

| 選択性 | 検量線 | 真度・精度 (分析内) | 真度・精度 (分析間) | マトリックス 効果 | 回収率 | キャリーオーバー | 安定性 |
|-----|-----|----------------|----------------|--------------|-----|----------|-----|
| × | ○ | ○ | × | × | × | × | △ |

試料中の血漿成分量は僅かに減少するが、原則、**マトリックスは変化していない**と考える。ただし、濃度補正が必要な場合、少なくとも検量線と真度・精度（分析内）は確認しておく必要がある。

吸着の懸念がなければ安定性は不要と考える。

○：実施

△：必要に応じて実施

×：不要

9th JBF symposium DG2017-29

保存容器の変更



ケース

サンプル量の削減に伴い、1.5 mLのマイクロチューブから0.2 mLのマイクロチューブに変更

マイクロチューブからキャピラリーに変更する

留意点

材質の変化に伴う吸着の影響が考えられる。

PVの実施

不要

材質変化による吸着が懸念される場合は、事前に影響を検証する。

保存する血漿量の変更



ケース

保存量が200 μ Lから20 μ Lに変更

留意点

フィブリンの析出、保存容器との接触する面積が変化し吸着の影響が変化する
長期保存において、試料が乾燥し濃縮する

PVの実施

不要
吸着が懸念される場合は、事前に影響を検証する。
また、フィブリンの析出や乾燥による試料濃縮を回避するには、予め必要量分注することや予め試料を希釈する等の対策が考えられる。

分析試料採取容量と方法の変更



ケース

前処理に供する血漿量を50 μ Lから5 μ Lに変更

前処理に供する血漿分取をピペットからキャピラリーに変更
(キャピラリーから直接薬物を抽出)

留意点

プロセス試料の濃度が変化する。
回収率が変化する。

PVの実施

必要

| 選択性 | 検量線 | 真度・精度 (分析内) | 真度・精度 (分析間) | マトリックス 効果 | 回収率 | キャリーオーバー | 安定性 |
|-----|-----|----------------|----------------|--------------|-----|----------|-----|
| ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | △ |

試料が希釈され前処理後試料のマトリックス量が減少するため、前処理後試料安定性は必要と考える。

○ : 実施

△ : 必要に応じて実施

予め試料を希釈



ケース

試料容量をかさあげするために予め緩衝液を加えて分析試料とする

留意点

マトリックスが変更になる

PVの実施

必要（フルバリデーションが必要になる）

| 選択性 | 検量線 | 真度・精度 (分析内) | 真度・精度 (分析間) | マトリックス 効果 | 回収率 | キャリーオーバー | 安定性 |
|-----|-----|----------------|----------------|--------------|-----|----------|-----|
| ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

○：実施

△：必要に応じて実施

4. 抗凝固剤の影響

抗凝固剤の種類



| 種類 | 機序 | 必要量（1mLあたり） |
|-----------|---------------------------------|--------------------------|
| EDTA | 凝固に必要な血漿中のカルシウムイオンをキレート | 1mg～1.5mg |
| ヘパリン | アンチトロンビンと結合して複合体を形成し、トロンビン活性を阻害 | 0.01mg～0.1mg |
| クエン酸ナトリウム | 凝固に必要な血漿中のカルシウムイオンに結合 | 109mmol/L液を0.11mL(1/10容) |
| フッ化ナトリウム | 凝固に必要な血漿中のカルシウムイオンに結合 | 5mg～10mg |

- 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50μLに対して2.5%（=1.25μL）が補正を考慮するライン

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JECT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 |

補正の考慮について

- ブランクマトリックス中の抗凝固剤の割合と実試料中の抗凝固剤の割合

- 同じ⇒補正の必要なし
- 異なる⇒補正の必要あり

例：血液のヘマトクリット値が50%と仮定し、抗凝固剤を50%含むブランクマトリックスを使用する場合

- 検量線用標準試料

ブランクマトリックス10 μ Lに標準溶液 5 μ Lを添加

- 実試料

血液50 μ L + 抗凝固剤25 μ Lを添加し、遠心分離後上清10 μ Lを分注
溶媒5 μ Lを添加

⇒ 試料中はいずれも血漿5 μ L + 抗凝固剤5 μ Lとなり、補正の必要はなくなる

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 |

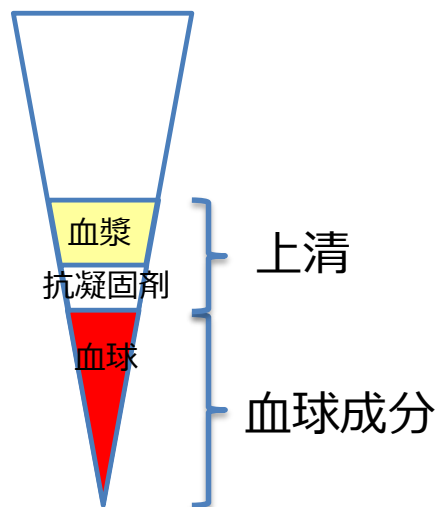
血漿のみを用いたブランクマトリックスで検量線標準試料を調製する場合，次から示すような補正が必要になる

補正の方法 1

- 測定結果に対して補正係数をかける

遠心分離後の上清はすでに抗凝固剤で希釈されている
⇒試料に一定割合(A%)の抗凝固剤が含まれると仮定

遠心分離後
のチューブ



求める定量値は算出された値を $1 - \frac{A}{100}$ で割る必要がある

$$\text{定量値} \times \frac{1}{\left(1 - \frac{A}{100}\right)}$$

補正係数

補正の方法 2

- 検量線の設定濃度を補正する

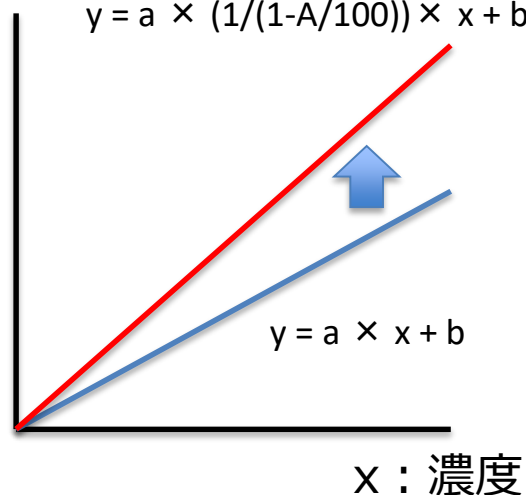
y: ratio、a:傾き、b:切片 $\text{定量値} = \left(\frac{y - b}{a} \right)$

試料に一定割合(A%)の抗凝固剤が含まれると仮定すると求める結果は先ほどの式より、

$$\text{定量値} \times \frac{1}{\left(1 - \frac{A}{100}\right)}$$

y: ratio

$$y = a \times \left(\frac{1}{1 - A/100} \right) \times x + b$$



上の2式を合わせると、

$$\text{定量値} = \frac{y - b}{a \times \frac{1}{1 - \frac{A}{100}}}$$

傾き (= 設定濃度) に $1 / (1 - A/100)$ を乗じた検量線を用いる

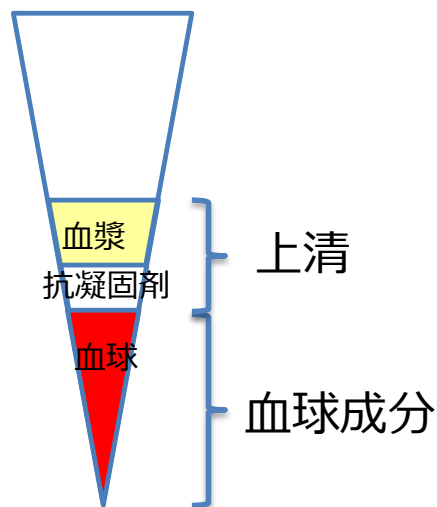
補正の方法 3

- 試料分取時に、補正後の量を分取する

遠心分離後の上清はすでに抗凝固剤で希釈されている
⇒試料に一定割合(A%)の抗凝固剤が含まれると仮定

遠心分離後
のチューブ

1 回の測定試料量に希釈前の血漿量を含むように補正する



$$1 \text{ 回} \text{ の分取量} \times \frac{1}{\left(1 - \frac{A}{100}\right)}$$

補正の方法（適応例）

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

| 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 検量線の設定濃度を 補正する | 補正の方法3 試料分取時に、補正 後の量を分取する |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 測定結果を2倍する | 定量範囲を 2～2000ng/mL | 測定に使用する血漿量 を10 μ Lにする |

ヘマトクリットの考慮について

- 各動物種のヘマトクリット値について調査した。

| 動物種 | 系統 | 齢 | ヘマトクリット値 (%) | |
|--------------------------------|---------------|--------|--------------|----------|
| | | | Male | Female |
| Mouse ¹ | Crlj:CD1(ICR) | 11週 | 45.3±2.5 | 43.6±2.3 |
| Rat ¹ | Crl:CD(SD) | 11週 | 46.0±1.4 | 45.2±2.9 |
| Rabbit ² | Slc:JW | 20週 | 36.4±1.2 | 36.6±1.3 |
| Dog ³ | Beagle | 9カ月 | 46.7±6.4 | 47.2±4.4 |
| Cynomolgus monkey ⁴ | - | 3 - 4年 | 43.7±3.2 | 42.5±3.1 |

1日本チャールス・リバーHPより

2日本エスエルシーHPより

3 Lab Anim Res 2011: 27(4), 283-291

4 Exp. Anim. 1986. 35(4), 443-447

多くの動物種は平均が約45%で、標準偏差が2～3%程度であるため、
個体のヘマトクリット値は40%～50%が通常の変動範囲となる

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、50μL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 | 添加量 | | |
|----------|-------|-------|-------|
| | 10 μL | 25 μL | 50 μL |
| 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：100ng/mL)

| ヘマトクリット値 | 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の添加は誤差 \pm 3%以内と意外に小さいが、50 μ L添加は \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

5. ピペット操作による真度・精度に 与える要因

何 μL まで正確に分注可能か？ 1

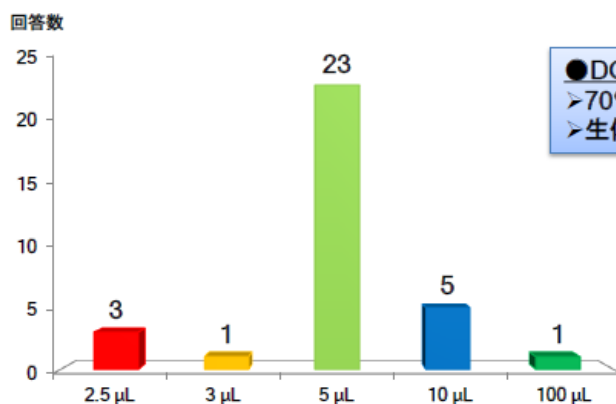


Japan Bioanalysis Forum

Q2-35

ピペッティングの精度

あなたが生体試料分析を担当する場合、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。実際に経験がない容量でも構いません。(※昨年のアンケートでは52%の方が5 μL 以下、24%の方が5.1 - 10 μL と回答されました)



有効回答数：33

●DGコメント

- 70%の方が5 μL まで分注可能と回答
- 生体試料の物性及び経験上からの回答と考えられた

<http://bioanalysisforum.jp/>8th JBF Symposium, DG2016-21

53

DG2016-21のアンケート結果より

何 μ Lまで正確に分注可能か？ 2



- マイクロサンプリング (2) DG (DG2016-21) のアンケート結果 (Q2-35) では, 70%の方が5 μ Lまで分注可能と回答。
 - 5 μ L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。
 - 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** (エアーディスプレイメント方式のマイクロピペットをリバース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 | エアーディスプレイメント方式 | フォワード法 | |
| | | リバース法 | <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 |

ポジティブディスプレイスメント方式



- 一般的に粘性の高い液体の取り扱いに適していると言われる。
- 水では差が出ないが、血漿（及び全血）を採取する場合はエアディスプレイスメント方式のマイクロピペットよりもポジティブディスプレイスメント方式のマイクロピペットの方が真度が良い場合がある（次スライドにデータ）。
- 50 μ L採取のデータではあるが、血漿のピペッティングでは真度に差が出ており、少量のサンプルを取り扱う場合はポジティブディスプレイスメント方式を推奨する。

マイクロピペットの吸引方式の比較

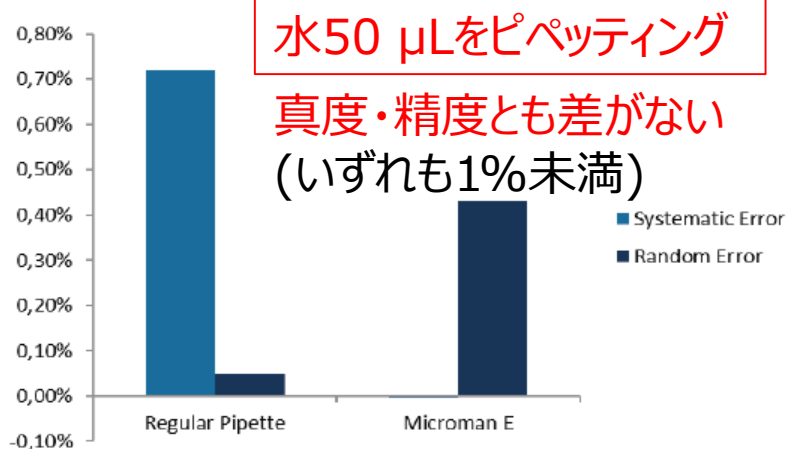


Figure 3

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
(フォーワード法)
右側 : MICROMAN E = ポジティブディスプレイメント

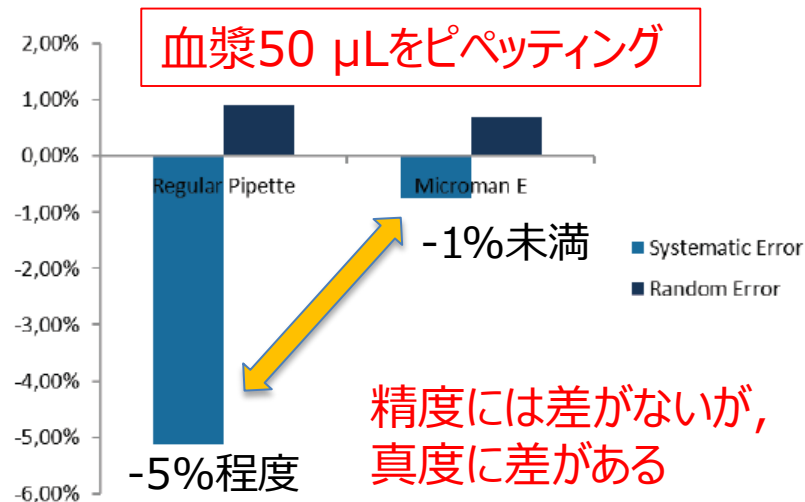


Figure 4

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.

Systematic error = (mean volume – nominal volume) x 100 / nominal volume

Random error = SD / mean x 100

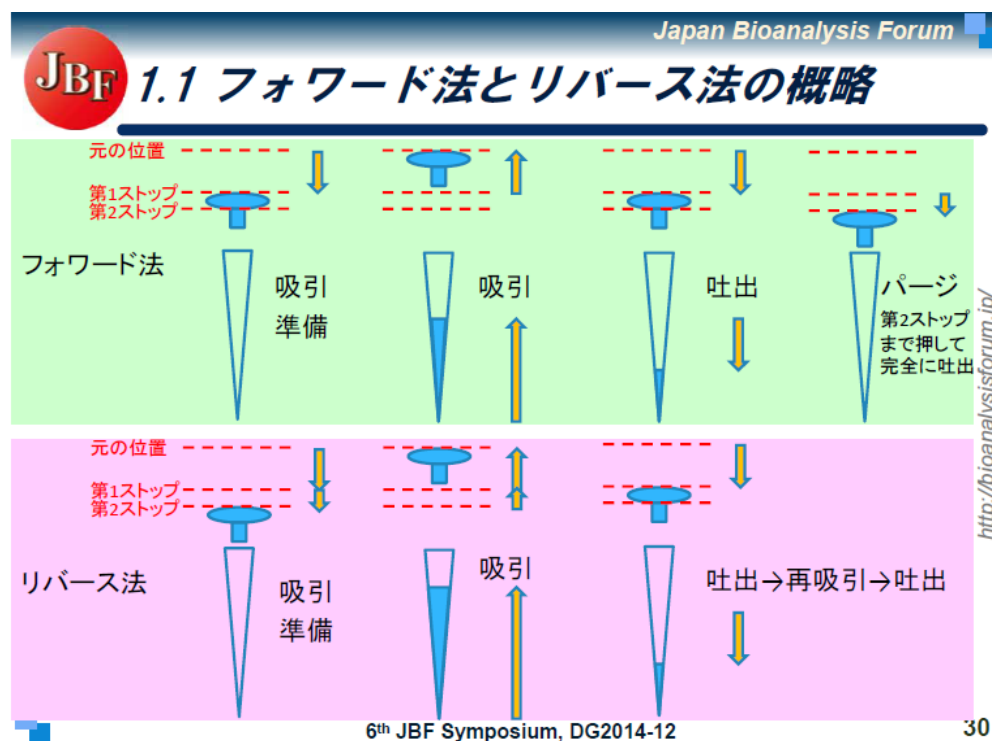
Gilsonのアプリケーションノートより

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

リバーズ法



- エアーディスプレイスメント方式のマイクロピペットを用いたサンプル採取方法の1つ。
- ピペットメーカーのHPでは粘性の高い液体を扱う方法として推奨していることがある。



DG2014-12
LBAを用いる定量
(PK/Biomarker)
のポスターより引用

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

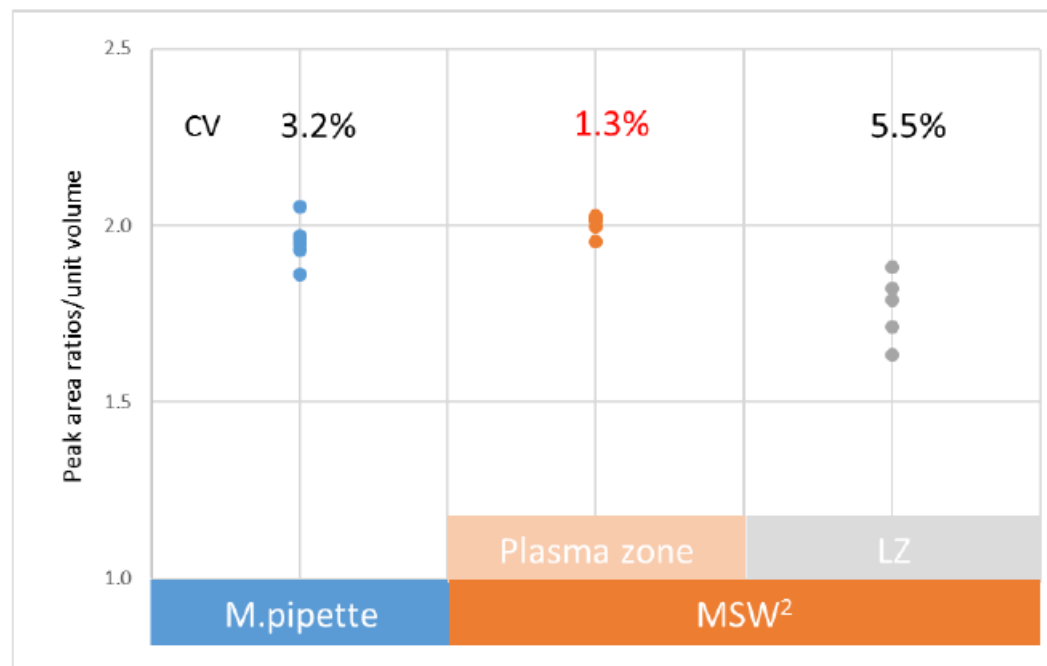
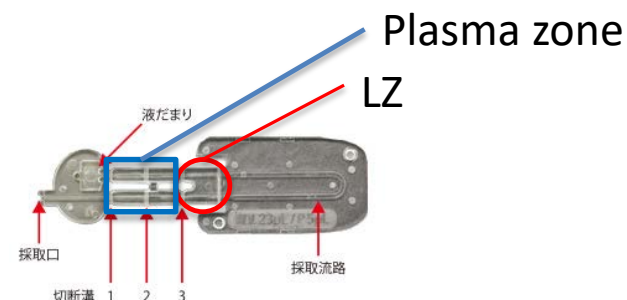


Fig 1 Sampling reproducibility



Plasma zone: 5.6 μ L

LZ: 2.5 μ L

LZ: Lucky zone

→

ヘマトクリット値 ($\leq 50\%$) や
遠心環境により血漿になる領域

島津製作所のテクニカルレポートより

<https://www.shimadzu.co.jp/products/opt/products/msw2/images/u815-1001.pdf>

マイクロピペットの検定時の注意点



- 予備検討段階で血漿（または全血）を用いて精度を確認した上で、規制下の検定ではSOPに従った方法で実施することが望ましいと考えられる。
 - 血漿（全血）を用いて重量法で検定する場合は、血漿（全血）を使用するときに毎回密度を測定する必要があり、手間が増える
 - 規制下での試験の場合は、血漿（全血）の使用はマイクロピペットのSOPとの整合性が懸念される
- 検定時に重量法で少量を測定する場合は、揮発の影響を抑えるために何らかの対策を取って測定した方が良いかもしれない。
 - 容器にふたをする
 - 何かに染み込ませる
 - 加湿する、あるいはあらかじめ一定量の水を入れた容器に追加で添加する

第44回日本毒性学会学術年会 ポスター発表

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 | 1 9 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 | 2 4 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，現状からは一歩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 |

DG2017-29 ー補足資料ー

ICH S3A Q&As Final -Step 2からの変更点-



背景



◆ トキシコキネティクス (TK) 評価 :

- 従来の測定方法では、200 μ L以上の採血が必要
- げっ歯類では、サテライト動物の使用が必要

◆ マイクロサンプリング手法が一般化 (機器分析感度の上昇により、50 μ L以下の採血量で評価が可能に)

1. サテライト動物でなく、メイン (毒性評価) 動物でTK評価
– 個体毎の毒性評価値とTK値との関連性解析が可能
2. サテライト動物数の削減 (全廃含む) による動物福祉への貢献
(3Rsのうち、Refinement, Reduction)

- – 2014年10月 ICH SCによりコンセプトペーパー承諾
- – 2016年5月 パブリックコメント募集 (Step 2b)
- – 2017年11月 最終文書公開

Q&As作成の目的



◆トキシコキネティクス評価におけるマイクロサンプ
リング手法の利用についてQ&Aを作成
⇒マイクロサンプリングの利用を促す

1. 同じ動物において、TK値と毒性評価との直接関連
2. TKサテライト動物数と採取試料量の削減

Q&Asの目次



前文

1. 緒言及び適用範囲 (Q1, Q2)
2. マイクロサンプリングの適用に関する基本原則 (Q3, Q4, Q5)
3. 安全性評価への影響 (Q6)
4. 生体試料中薬物濃度分析法に関する課題 (Q7)
5. 別紙: 本Q&AsのICH S3Aガイドライン各項との対応

文書はICH、PMDAホームページ等に掲載

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S3A/S3AIWG_Step4_2017_1116.pdf

<https://www.pmda.go.jp/files/000221581.pdf>

Step 2からの主な変更点



- 血液（血漿・血清）以外のマトリックスをScope外とすることを明確化（尿も明確にScope外に）
- 従来の採血法からマイクロサンプリングに移行する際の確認が必要なケースを大幅に緩和
- S3A GLに明記のように、一部の動物のみをTK評価して良いことを、本Q&Aにも記載
- Sparse samplingの説明を追加
- 液体試料取扱い留意点の「1）試料の均一性の確認」を「1）試料の均一性の確保」に修正、「5）容器への吸着、6）保存条件、7）コンタミネーションと繰り返し採血のリスク」について追加