

DG2016-21

Microsampling (2)
Investigation of technical problems

Katsunori Ieki
Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.

Microsampling

◆ Definition of microsampling

- Method to collect a very small amount of blood (typically $\leq 50 \mu\text{L}$) to measure TK parameters 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

Background

◆ Publishing the draft Q&A document of ICH S3A (toxicokinetics)

Pharmaceutical institutes and CROs in Japan have become more interested in microsampling.

◆ Revealing implementation problems of microsampling

Last year DG2015-17 members discussed the operational issues of microsampling and revealed implementation problems.

DG2016-21 Objective

We have discussed countermeasures to the technical problems on microsampling in order to transmit useful information for implementation .



DG2016-21 Members

Members

- | | |
|-------------------|--|
| Katsunori Ieki | <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i> |
| Tomotaka Harada | <i>LSI Medience Corporation</i> |
| Takuro Hasegawa | <i>BoZo Research Center Inc.</i> |
| Naoyuki Kinoshita | <i>Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.</i> |
| Youko Kouhei | <i>Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.</i> |
| Eitaro Nanba | <i>Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.</i> |
| Yoichiro Nishii | <i>Shionogi & Co., Ltd.</i> |
| Kozo Omichi | <i>Kowa Company, Ltd.</i> |
| Shinichi Yamane | <i>Sekisui Medical Co., Ltd.</i> |

Observers

- | | |
|---------------|--|
| Keiko Nakai | <i>LSI Medience Corporation</i> |
| Yoshiro Saito | <i>National Institute of Health Sciences</i> |

<http://bioanalysisforum.jp/>

DG2016-21 Activities

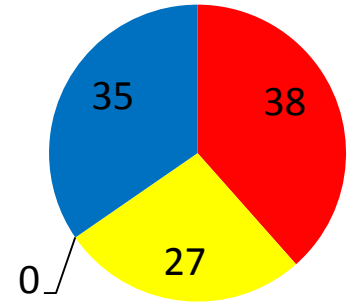
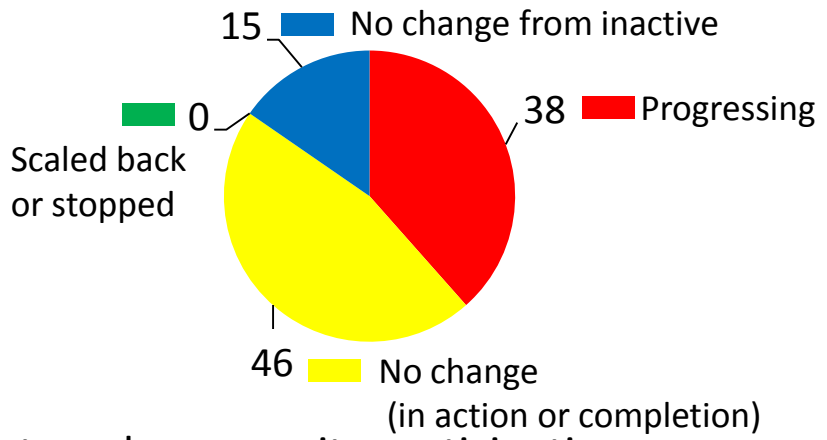
- ◆ We had 10 meetings via TC system
- ◆ We performed two questionnaire surveys in order to focus the discussion points (1st survey: for attitude and changes in activity, 2nd survey : for technical problems) .

Survey Results

Changes in activities of microsampling in Japanese companies (compared to Oct 2015)

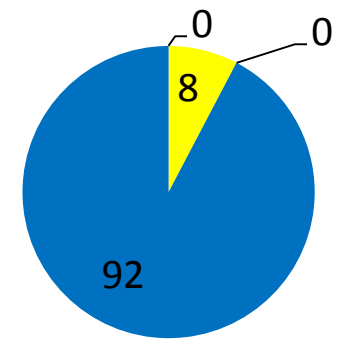
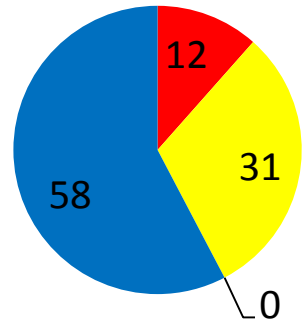
• Information gathering

• Investigation of technical problems



• External community participation (working group and collaborative research etc)

• Preparation of SOP



26 responses
Survey results
on Sep 2016

Activity Report

We will report survey and conference results in the poster session.

- Merits and demerits of microsampling methods and devices
- Effects on PK data by differences in blood sampling sites and physiological effects of blood sampling
- Improvement of analytical method sensitivity
- Additional validation when analyzing samples derived from microsampling
- Factors affecting accuracy and precision in quantitative analysis.

**Please join our poster session
and let's have a time of beneficial discussion.**

DG2016-21

マイクロサンプリング (2)
-技術的課題の検討-

Microsampling (2)
Investigation of technical problems

活動の目的

マイクロサンプリングについては、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案が公表され、実践に向けて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。昨年度、DG2015-17を立上げ、マイクロサンプリングの運用上の問題点や留意点について議論し、実践に向けた課題が明らかになった。今年度は、DG2016-21として継続し、マイクロサンプリングを実践するための有用な情報を提供するために、技術的な課題対策について議論することを目的とした。

<http://bioanalysisforum.jp/>

活動内容

■ アンケート調査

- アンケート①： 2016年9月20日～9月30日
マイクロサンプリングに関する意識や活動状況， 新たな課題， 使用デバイスについて調査
- アンケート②： 2016年11月10日～11月25日
マイクロサンプリングに伴う追加バリデーション， ピペットの真度・精度， 分析法の高感度化について調査

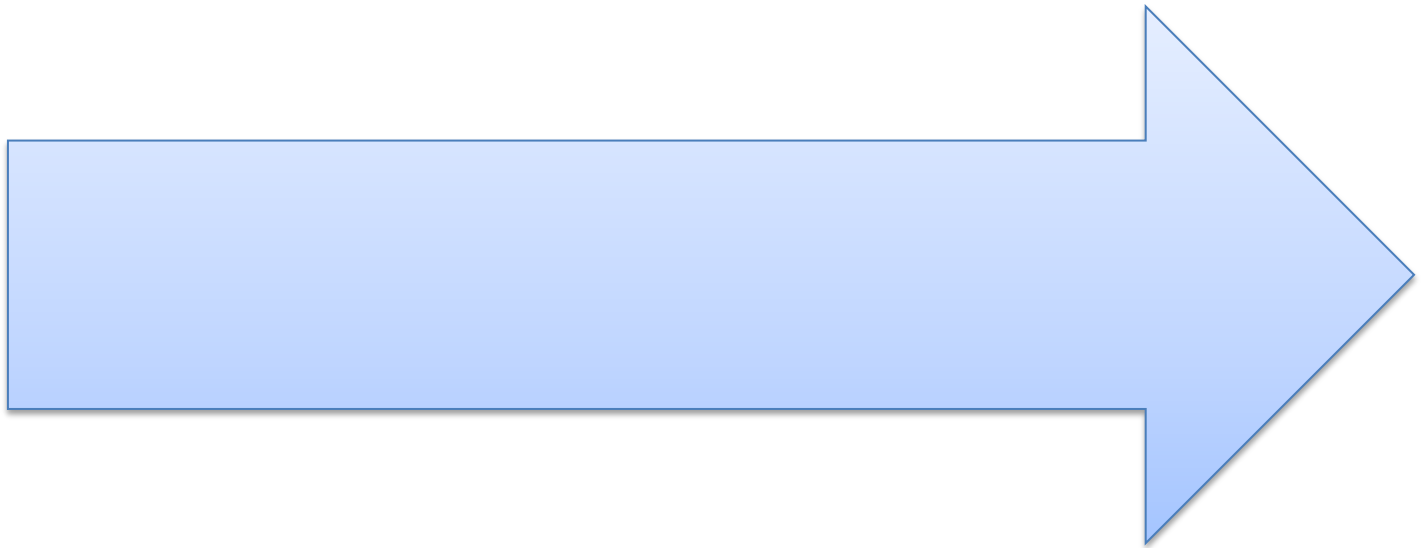
■ 議論

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。

- 採血方法や用いるデバイスのメリット・デメリット
- 投与部位の違いによるPKデータの差， 採血による生理学的な影響
- マイクロサンプリングに伴う追加バリデーション
- 分析法の高感度化
- 分析の真度・精度に与える要因

第1回アンケート調査と結果

マイクロサンプリングに関する意識や活動状況, 新たな課題, 使用デバイスについて調査



アンケート調査の概要

○調査実施期間と調査対象

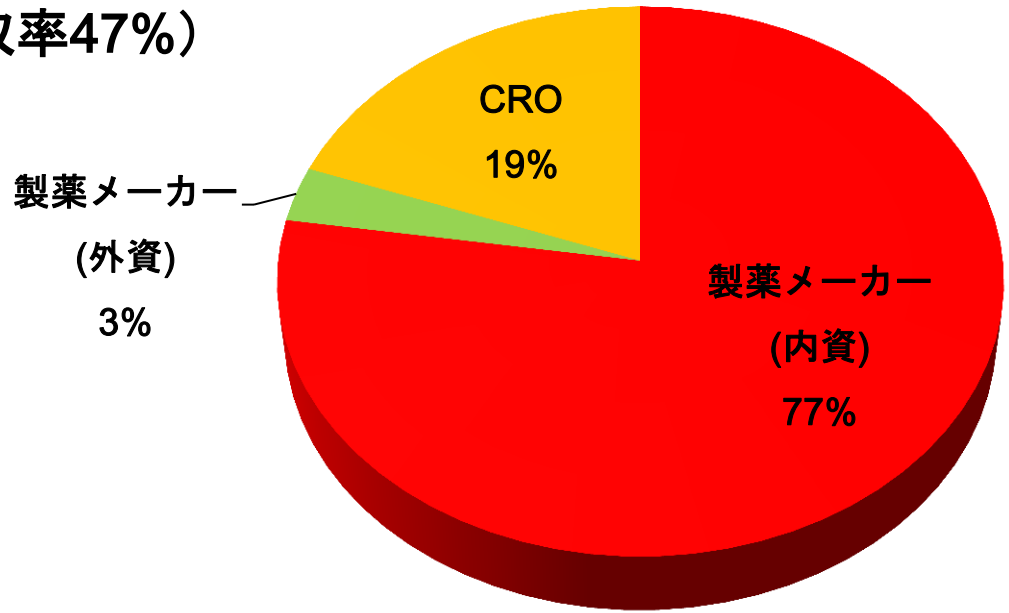
2016年9月20日～9月30日 : JBFパートナー 38社
DGサポーター 28社

○集計結果

回答 : 31社 / 66社 (回収率47%)

Q1-1

御社はいずれに
該当しますか？



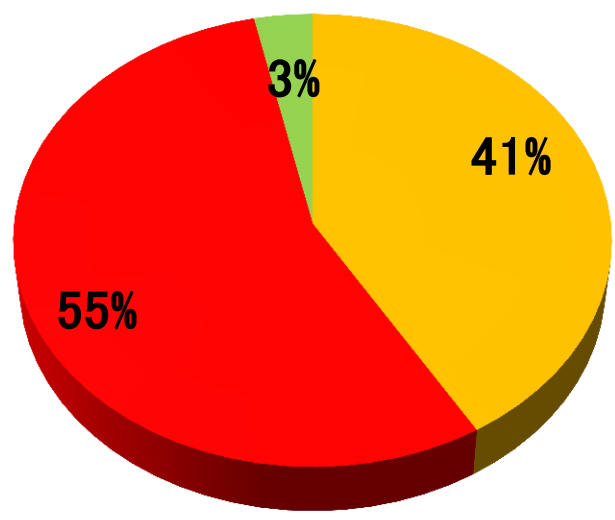
有効回答数 : 31

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q1-2

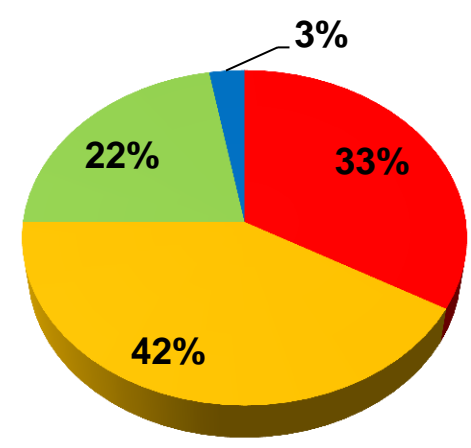
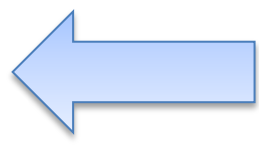
2015年10月に実施したアンケートにおいて、マイクロサンプリングに対する取り組みを尋ねたところ、〈参考：2015年10月時のアンケート結果〉との回答を得ました。当時と比較して、御社のマイクロサンプリングの取り組みに対する「意識」はどう変化しましたか？ Q4-6で実際の「行動」に関する設問がありますので、ここでは「意識」としての変化に注目してご回答ください。

〈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/

Q1-3

Q1-2で回答された理由や根拠をご回答ください。

●回答理由

<当時より意識が高まった>

- 学会出張等でマイクロサンプリングに関する情報を取得してくるケースが増えた。
- 社内でワーキンググループが結成された。
- 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。
- ICHのS3AガイダンスのQ&Aとしての指針が進められるなど、世の中の的にもマイクロサンプリングに関する意識が高まってきたため。
- S3A-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の意識が高まった。
- 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。
- 行動するようになった。
- マイクロサンプリングでの実験数が増加したため。
- ICH S3A Q&Aドラフトが発出されたことによる、当局・業界の動向を受けて。また、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。

<当時より意識が低くなった>

- 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。

http://bioanalysisforum.jp/

Q1-3

Q1-2で回答された理由や根拠をご回答ください（続き）

● 回答理由

<当時と変わらない>

- 社内方針が定まっていないため。
- 切迫した状況ではないこともなり、意識に特段変化はない。
- 分析CROとして準備はしているが、動物試験本体の取り組み次第という状況。
- 既にマイクロサンプリングを実施していたため。
- 社内でマイクロサンプリングに対する取り組みが議題に挙がらない。
- 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はすべてをまかなうのが難しいため。
- 現状、あまり必要性を感じていないため（小動物を用いる試験が少ない）。
- マイクロサンプリングは分析だけでなく毒性評価の観点からの議論が必要だが、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る。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。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る。

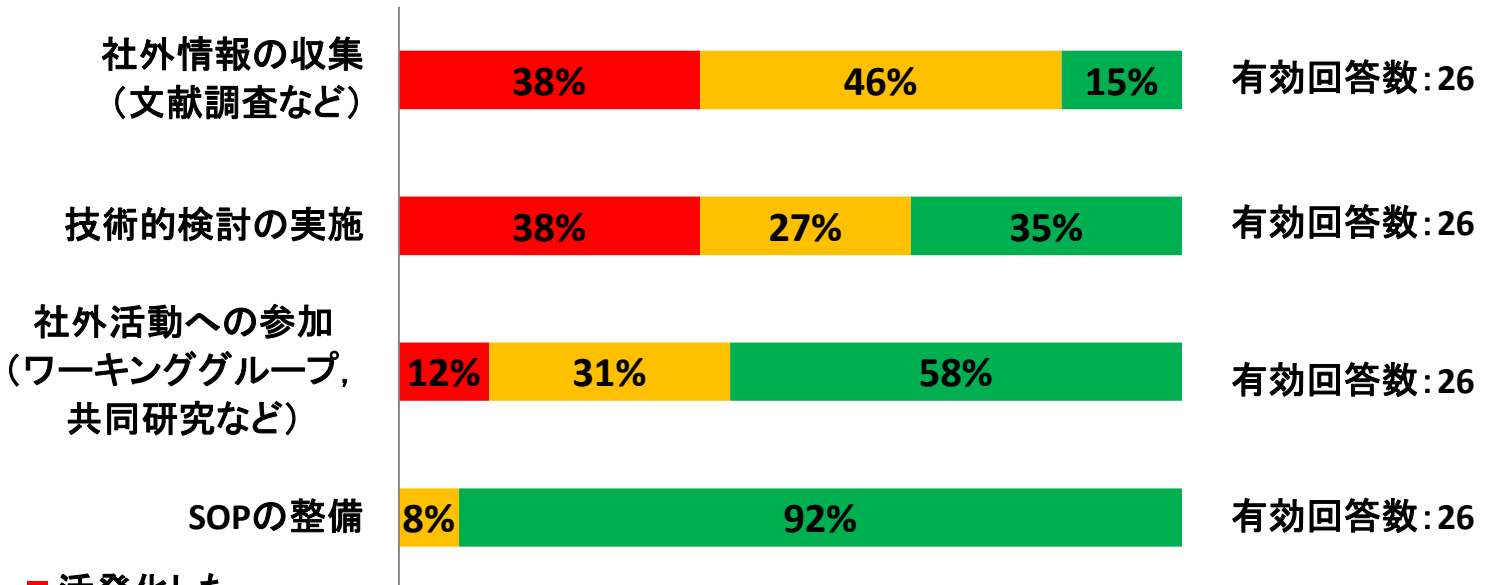
DGまとめ:

Q&A案の発出により、意識が高まったとの意見が多かった。

一方、差し迫った状況ではないことや動物実験を実施する側の状況には変化がないことから、変わらなかったとの意見もあった

Q1-5

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。



- 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

- その他:
- ・ 社内のワーキンググループができた。
 - ・ 安全性研究部門との議論が多く行われた。

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。

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q1-6

Q1-4で「いいえ」と回答された方に対する質問です。マイクロサンプリングに関連する活動が活発化しなかった理由があれば記載してください。

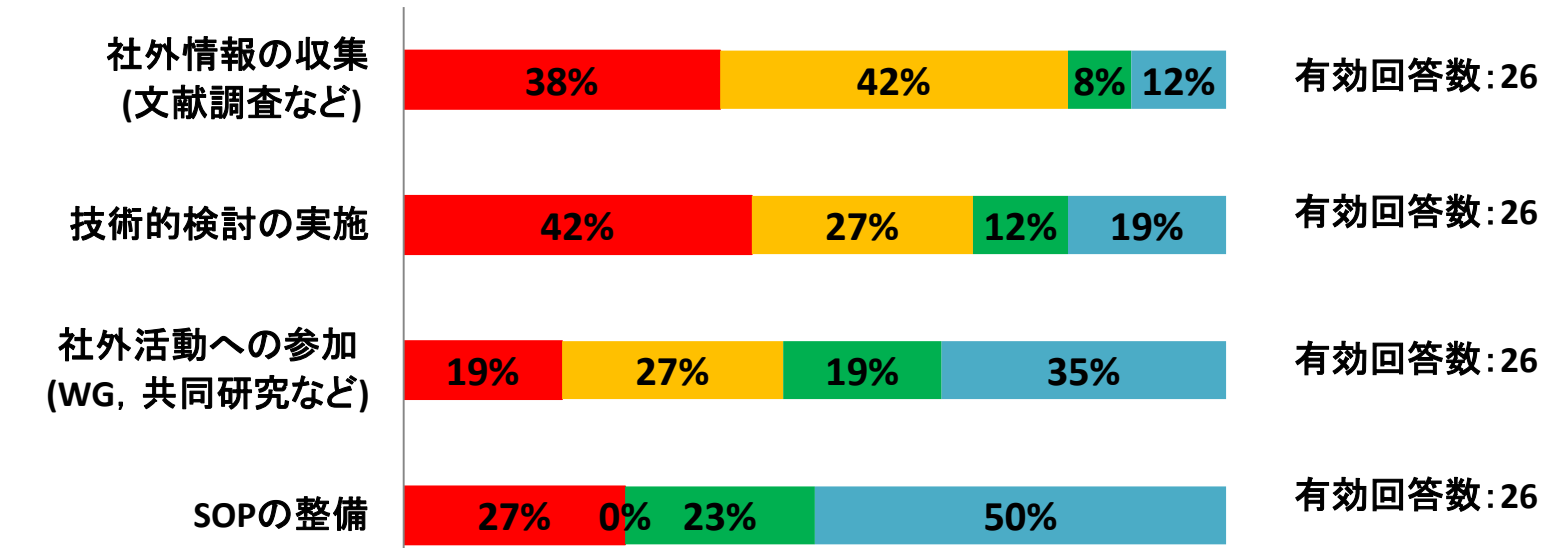
- 通知がGDではなくQ&Aであるため。
- 大動物では動物削減に寄与しないため。
- 小動物では毒性評価に及ぼす影響が払拭できないため。
- 採血の技術が確立していないため。担当者の興味が低い。
- マイクロサンプリングにフィットする測定系が稼働していなかった（ターゲット濃度に対する感度の不足）。
- 試験内容的に必要性を求められないため。
- 自社での測定が難しい。
- 外部委託するにしても情報がバリデートされていない。

- もともと必要性がある試験が少なかったから。
- 実施のメリットが少ない。
- 技術的に時期尚早であることが明確になった。
- 実施しなくて良い理由を読み取ることができた。
- 分析担当者としては、マイクロサンプリングに対しては既にやるべきことはやっておき、マイクロサンプリングに対する準備は整っているという認識。
- 毒性評価側が積極的に取り入れないと活動は活発化しないと思う。

DGまとめ：
 行動が活発化していない理由としては必要性を感じていないとの意見が多かった。その背景には技術的な課題や動物に対する影響の懸念を解決してまで行うメリットが見いだせていないことが考えられる。

Q1-7

今後1~2年以内に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活動を変える予定がありますか？現時点と比較して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。以下の項目に当てはまらない内容は「その他」の欄に項目を記載し、ご回答ください。



- 活発化する
- 実施中(あるいは実施済み)で、変えない
- 抑制する、あるいは停止する
- 実施しておらず、変えない
- わからない

その他:
 ・CROとの技術すり合わせ
 ・実際のTK測定への応用

DGまとめ:SOPの整備の回答が27%と、導入や実施に力を入れる企業が増える一方で、わからないとの回答も50%と多く、今後どのような状況になるのか判断できないと考える企業も多い。

http://bioanalysisforum.jp/

Q1-8

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。

検討内容	具体的な点
適用範囲	<ul style="list-style-type: none"> ➤ マイクロサンプリングの強制性 ➤ 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あるのかが疑問. 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む. ➤ 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だが，通常の採血でも良いのではないかと思っている（体重/循環血液量に対する採血量の割合が少ないため. また，針刺しによるストレスは変わらないのではないかと考える）.
主群からの採血	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 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へ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	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 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る. 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，古くはガスリー法や新生児マ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.

http://bioanalysisforum.jp/

Q1-8



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。

検討内容	具体的な点
検討事項	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 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して記載されているが, 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). ➤ これらの課題への対応は, マイクロサンプリングを実施する, しないに関わらず, 検討が必要である.
ISR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ISRが困難になる. ➤ ISR用サンプル(予備サンプルも含む)の確保.
採血	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 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. ➤ 採血手技の統一.
保存	<ul style="list-style-type: none"> ➤ どの状態のサンプルであれば許容されるか (希釈したものはOKか?) .
器具	<ul style="list-style-type: none"> ➤ マイクロサンプリング実施のための器具の候補が海外に比べて少ないと感じる. ➤ 採血用ディスクの信頼性及び容量の正確性.

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q1-9, 10






御社で実際にマイクロサンプリングに使用された経験のあるものについて、商品名あるいはメーカー名、サイズが複数存在する場合はそのサイズなど差し支えのない範囲で構いませんので記載いただき、その使用感についてご回答ください。

用途	器具	デバイス(Q1-9)	使用感(Q1-10)	写真	
採血	シリンジ	マイJECTター29G 0.5 mL, テルモ	問題なく使用できているが、針が固定されており短いため、ラットの頸静脈採血ではもう少し針の長いものが欲しい		
		マイJECTター 0.5mL, テルモ	問題なし		①
		マイJECTター 29G 0.5mL, テルモ	1mLシリンジよりも引きやすく使いやすい		
		マイJECTター29G	問題なし		
		マイショット 30G, 0.5mL, NIPRO	針の向きが一定でないため、使い始めは違和感があった	②	
		BDロードーズ, 1/2mL 30G x 8mm, BD	1mLシリンジよりも引きやすく使いやすい。若干感触が固いが問題ない	③	

<http://bioanalysisforum.jp/>





Q1-9, 10

(続き)

用途	器具	デバイス(Q1-9)	使用感(Q1-10)	写真
採血	キャピラリー	ガラスキャピラリー	問題なし	
		Drummond 75mm Hematocrit tubes (キャピラリー)	スポイト様の器具で血液をチューブに押し出さなくてはならず時間がかかる	
		Hematocrit Tube, Heparinized / Mylar Clad 75mm	問題なし	
		Plasticrit Plastic 75mm Hematocrit Tubes (ドラumont)	破損の心配が少ない	
		Microvette CB300	コツが必要	
	シール用パテ (テルモ)	遠心により抜けてしまうことがある		
	その他	実験動物用翼付採血針(クレア)	問題なし	
		ゲルローディングチップ, 10μL, ビーエム機器	注射筒の先端にも差し込めるサイズで血液を採取しやすい	

http://bioanalysisforum.jp/

Q1-9, 10 (続き)


用途	器具	デバイス(Q1-9)	使用感(Q1-10)	写真
保存	チューブ	Lub Stuff 0.2mL ノンキャップ (DNA-02NC) および 0.2 mL 8連キャップ	自動分注装置での分注が可能	⑨ 
		0.4 ml Microcentrifuge Tube, Thermo Fisher Scientific Inc.	蓋が開きやすい	⑩ 
		0.5 mL PCRチューブ	問題なし	-
	DBS	キャピジェクト CJ-AL,, テルモ	-	⑪ 
FTA DMPK-Aカード (Whatman)		血液スポットが滲みづらく, 良い	⑫ 	

- ① <https://www.terumo.co.jp/medical/equipment/me10.html>
- ② <https://www.vetswan.com/shop/item/id/A26023>
- ③ <http://www.bdj.co.jp/diabetes/products/1f3pro000005c5wa.html>
- ④ <http://www.funakoshi.co.jp/contents/1565>
- ⑤ <https://www.sarstedt.com/en/products/diagnostic/capillary-blood/tubes/product/16444/>
- ⑥ <https://vet.feed.jp/catalog/vet/page/240/product/906008180.html>
- ⑦ http://www.clea-japan.com/catalog1/160212_wingneedle.html
- ⑧ http://www.bmbio.com/product_detail.php?itemid=119
- ⑨ <http://www.labstuff.jp/product/page0307.html>
- ⑩ <http://www.qsptips.com/products/product.aspx?id=128&c=28>
- ⑪ <https://www.terumo.co.jp/medical/equipment/me78.html>
- ⑫ <http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/1633.html>

http://bioanalysisforum.jp/

Q1-11, 12

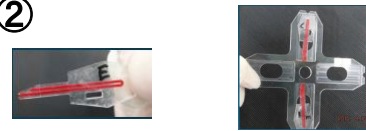

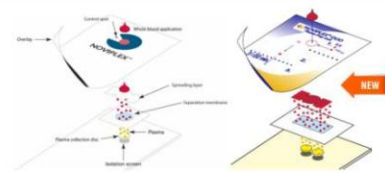
Q1-9, 10に関連して，現在は使用していないが，今後使用したいと考えているマイクロサンプリングに関するデバイスがあれば，理由と共に記載してください。

デバイス名称(Q1-11)	理由(Q1-12)	写真
小容量のキャピラリー (抗凝固処理なし)	遠心分離した後の血漿の分取に， マイクロピペットの代替として使用 できないか検討したい	-
動物実験用翼付採血針 (日本クレア株式会社)	余分な出血を防ぎつつ， 尾部から採血したい	<p>①</p> 

http://bioanalysisforum.jp/

① http://www.clea-japan.com/catalog1/160212_wingneedle.html

Q1-11, 12 (続き)

デバイス名称(Q1-11)	理由(Q1-12)	写真
Microsampling Wings and Windmill (株式会社島津製作所)	採血後の血漿分離が簡便. 血漿を定量的に分取可能な 利便性	②  Wing Windmill
Mitra Microsampling Device (Neoteryx, LLC.)	血液の定量的な採取が簡単	③ 
Noviplex Cards (Novilytic, L.L.C.)	血漿の定量的な採取が簡単	④ 

② http://bcn2015.europeanbioanalysisforum.eu/wp-content/uploads/2015/12/os-2015-D2A3_2-Shinobu-Kudoh.pdf

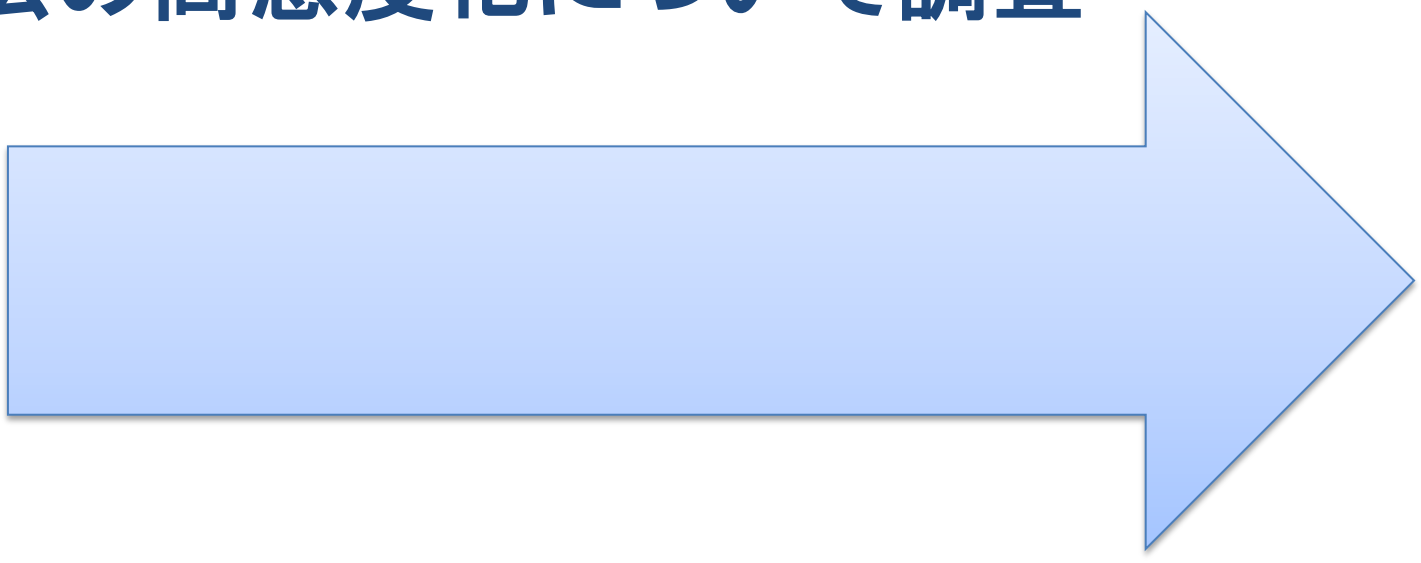
③ <https://www.neoteryx.com/products/mitra-microsampling>

④ <http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=noviplex>

http://bioanalysisforum.jp/

第2回アンケート調査と結果

マイクロサンプリングに伴う追加バリデーション, ピペットの真度・精度, 分析法の高感度化について調査



アンケート調査の概要

○調査実施期間と調査対象

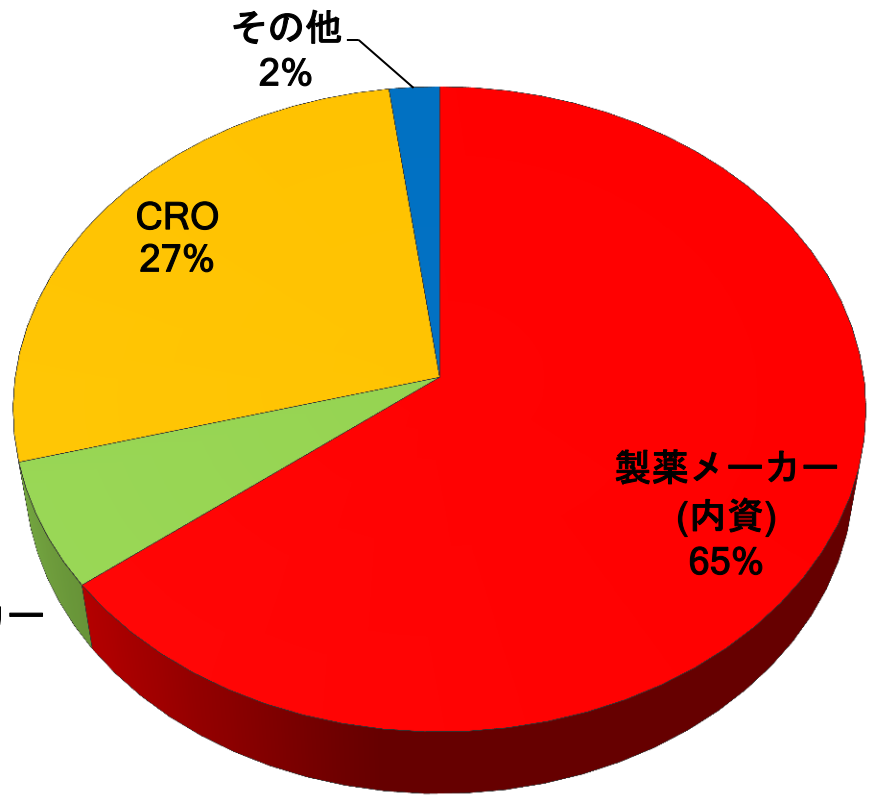
2016年11月10日～11月25日： DGサポーター

○集計結果

回答：48名

Q2-1

あなたの御所属はいずれに該当しますか？



<http://bioanalysisforum.jp/>

バリデーション追加項目（液体試料）

Q2-2～20はマイクロサンプリングにおけるバリデーション追加項目の必要性に関する設問です。

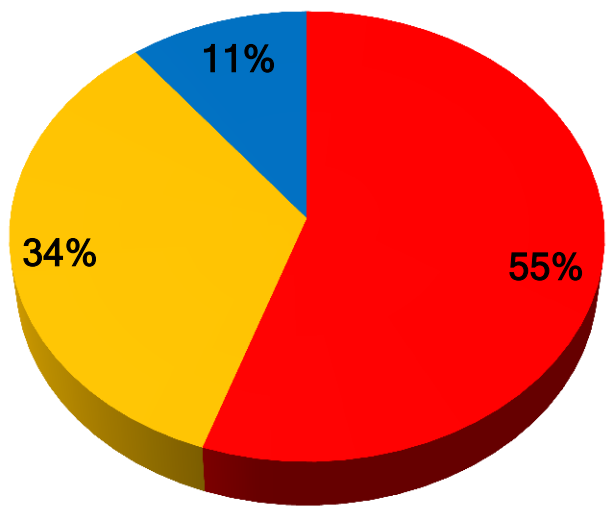
Q2-2～12

マイクロサンプリングにより取得された**液体試料 (血漿及び血清)**を用いる際、生体試料中薬物濃度分析法ガイドラインで示された項目以外に、以下の項目を追加でバリデートする必要があると考えますか？

Q2-2

バリデーション追加項目 (試料の均一性)

試料の均一性の確認 (ICH S3A Q&A案より)



- 何もしない 有効回答数 : 38
- 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない (手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
- バリデーションとしてデータを残す
- 自社で経験がないため、判断がつかない

- 「何もしない」理由
 - 均一に取り扱えると考えられるため [類似回答12]
 - ISRを実施するなら追加項目は不要, 試料量を減らしてもISRをするのであれば意味が半減
- 「予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない」理由
 - キャピラリ採血の場合は均一性が問題視されているため, 何かの時のために予備的に評価する
- 具体的な方法
 - 分注したQC試料で評価する [類似回答3]
 - 少量 (15μL程度) で保存して, 検証
 - 検量線やQC試料で, 再現性が取れば問題ないとする

● DGコメント

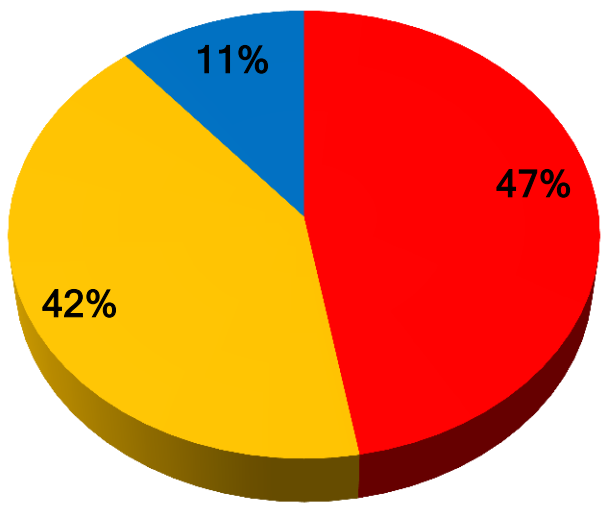
- 「バリデーションとしてデータを残す」意見はなかった
- 「何もしない」が55%であり, 理由の殆どは試料の均一性に問題がないという意見であった
- 一方で, 「予備的に検討する」という意見が34%あった

http://bioanalysisforum.jp/

Q2-3

バリデーション追加項目（凍結融解）

試料保存中の試料の凍結乾燥による濃縮（ICH S3A Q&A案より）



- 有効回答数：38
- 何もしない
 - 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない
(手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
 - バリデーションとしてデータを残す
 - 自社で経験がないため、判断がつかない

●「何もしない」理由

- 既にある保存安定性の項目で濃縮も評価可能と考える [類似回答10]
- 濃縮しない保存方法にする [類似回答2]
- 長期間の保存を考えていないため
- 全量使用または希釈後の使用となるため、特に問題となる差が出るとは考えにくいから

●「予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない」理由

- 想定される保存血漿量と保存容器で濃縮が無い事を予め確認するから

●具体的な方法

- 少量（5～15μL程度）で保存して、安定性を実施

●DGコメント

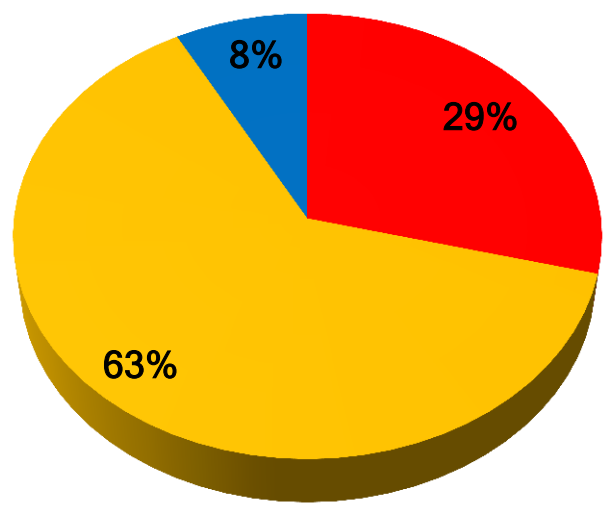
- 「バリデーションとしてデータを残す」意見はなかった
- 「何もしない」が47%であり、何らかの状況で濃縮の影響が確認できるという意見が多かった
- 一方で、「予備的に確認する」という意見が42%あった

http://bioanalysisforum.jp/

Q2-4

バリデーション追加項目（凍結融解）

採血量が少ないことから、通常より容易に融解しやすいと考えられますが、バリデーションにおいて凍結融解の回数を増やすことを考慮されますか？
(ICH S3A Q&A案より)



- 回数が増やす
 - 回数が増やさない
 - 自社で経験がないため、判断がつかない
- 有効回答数：38

●「回数を増やさない」理由

- 従来回数で十分であるため [類似回答16]
- 試料量が少なく、そもそも回数が限られているため [類似回答4]
- 容器を分けるため [類似回答2]
- 融解のし易さと凍結融解の回数は別の問題と考えられるため

●「回数が増やす」理由

- ISRを実施する試験を考慮した際に回数が増やすことと同様の考えでよいと思う

●DGコメント

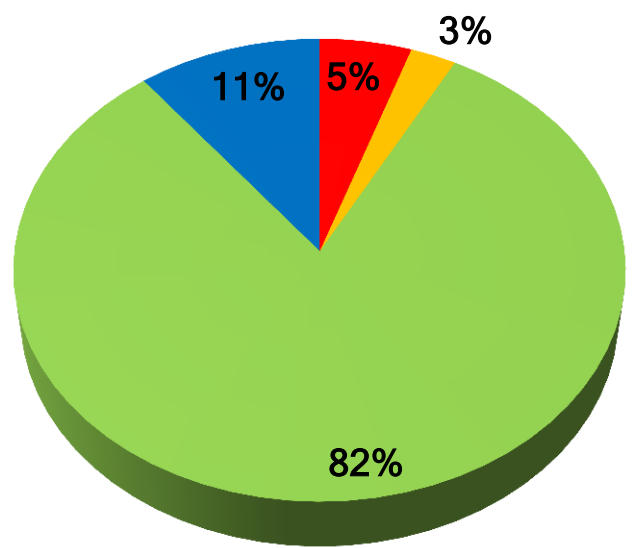
- 63%が増やさないという回答であった
- マイクロサンプリングの実施が凍結融解の回数を増やす理由にはならないと考えられる

http://bioanalysisforum.jp/

Q2-6

バリデーション追加項目 (希釈)

ブランクマトリックス以外の溶液 (緩衝液等) で希釈して保存する場合、希釈後の安定性



- 何もしない
 - 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない (手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
 - バリデーションとしてデータを残す
 - 自社で経験がないため、判断がつかない
- 有効回答数 : 38

● 「バリデーションとしてデータを残す」理由

- マトリックス中と希釈媒体中では安定性は別に考えるため [類似回答5]
- 実サンプルでも同じ操作をするため
- 特殊な保存条件 (防腐剤, 安定化剤, 酵素阻害剤添加) などと同じシチュエーションだと思われるので、バリデーションで検証する必要がある

● 具体的な方法

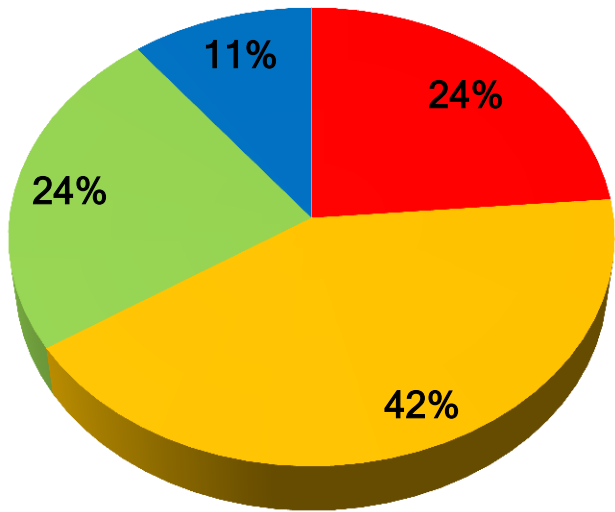
- 希釈後の安定性として実施 [類似回答5]

http://bioanalysisforum.jp/

Q2-7

バリデーション追加項目 (希釈)

ブランクマトリックス以外の溶液 (緩衝液等) で希釈して保存する場合、溶解性・吸着の有無の検討



- 何もしない
 - 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない (手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
 - バリデーションとしてデータを残す
 - 自社で経験がないため、判断がつかない
- 有効回答数 : 38

- 「何もしない」理由
 - バリデーションの結果で判断できるため [類似回答8]
 - タンパクが含まれており、吸着の懸念は少ないと考えられるため

- 「予備的に検討するが、
バリデーション項目としては評価しない」理由
 - 溶解性や吸着に問題ないことを予め確認するが、バリデーションとしての評価は不要

- 「バリデーションとしてデータを残す」理由
 - 薄くなる分吸着の影響が大きいと思うため

- 具体的な方法
 - 安定性で評価する [類似回答3]
 - 溶解性・吸着に問題ない溶媒を用いる

http://bioanalysisforum.jp/

バリデーション追加項目（希釈）

Q2-6, 7

ブランクマトリックス以外の溶液（緩衝液等）で希釈して保存する場合、希釈後の安定性と溶解性・吸着の有無の検討

●DGコメント

- 希釈して保存する場合、希釈後の安定性は「バリデーションとしてデータを残す」とする意見は82%（Q2-6）であったが、希釈後の溶解性・吸着の有無の検討については24%（Q2-7）に留まった
- サンプルの安定性はサンプルの状態（この場合は希釈媒体）ごとに確認したい意見が多く、「バリデーションとしてデータを残す」とする意見が多かった（Q2-6）が、溶解性・吸着の有無は他のバリデーション項目で評価できるという考えのため、追加項目として「バリデーションとしてデータを残す」とするまで必要としている意見は少なかったと考えられる

バリデーション追加項目 (希釈)

Q2-8

Q2-1 からQ2-7までに挙げられた以外に、
必要と思われる項目があればご回答ください

予備的な検討として必要と思われる項目

- 抗凝固剤の検討
- 前処理を使用する度に保存量が減るため、保存量に応じた安定性（吸着）の検討
- 採血部位による試料中濃度に差が出るか否か。デバイスからの試料の取り出し。 など

バリデーションとしてデータを残す必要があると思われる項目

- 採取量（例：5 μ L）が少ないので、再現性は必要と思う

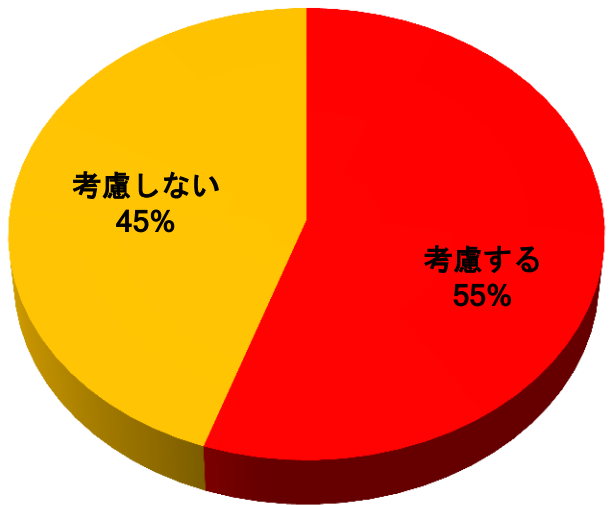
<http://bioanalysisforum.jp/>

Q2-9

バリデーション追加項目 (抗凝固剤)

ICH S3A Q&A案で

「微量容器/キャピラリーへの抗凝固剤添加による試料希釈の影響」がバリデーションの際に考慮すべき点として挙げられていますが、液体の抗凝固剤を添加する場合、希釈による濃度補正を考慮しますか？



有効回答数 : 38

●「考慮しない」理由

- 検量線, QC, 未知試料全て同じ添加量にするため [類似回答5]
- 乾燥タイプの抗凝固剤を使用するため [類似回答4]
- 影響のない添加量に設定するため [類似回答4]
- 影響があるとは考えられないため [類似回答2]
- 抗凝固剤の量を規定するのが困難

●DGコメント

- 意見が半数に割れた
- 考慮しない理由には、影響のない手法に設定する意見が見られた
- 一方で、影響が無いと考える意見も僅かに見られた

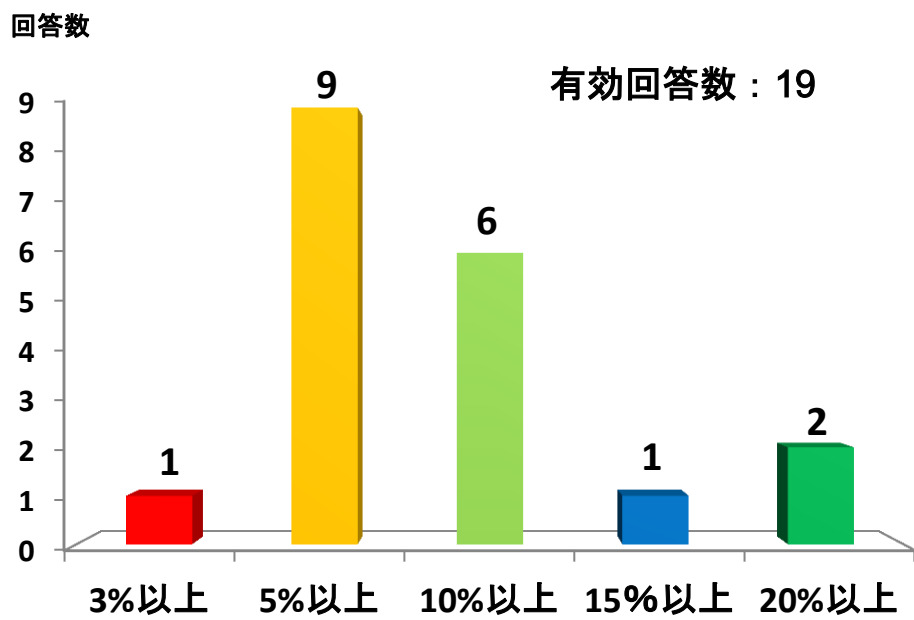
http://bioanalysisforum.jp/

Q2-10

バリデーション追加項目 (抗凝固剤)

ICH S3A Q&A案で

「微量容器/キャピラリーへの抗凝固剤添加による試料希釈の影響」がバリデーションの際に考慮すべき点として挙げられていますが、血液に対して抗凝固剤添加量が何%以上だと、結果の補正が必要と考えますか？



●DGコメント

- 「抗凝固剤が5%以上の場合濃度補正する」意見が最も多く、全体の45%を占めた
- 続いて「抗凝固剤が10%以上の場合濃度補正する」が全体の30%を占めた

例：抗凝固剤添加量5%
血液50μLを採血する際に抗凝固剤2.5μLが添加されている微量容器/キャピラリーを用いることになる

注：5~10%以上という回答は10%以上として取り扱った

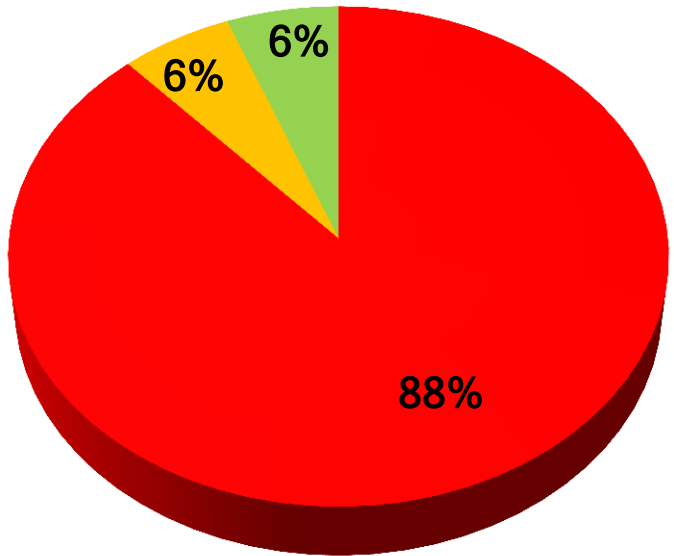
<http://bioanalysisforum.jp/>

バリデーション追加項目 (抗凝固剤)

Q2-11

ICH S3A Q&A案で

「微量容器/キャピラリーへの抗凝固剤添加による試料希釈の影響」がバリデーションの際に考慮すべき点として挙げられていますが、補正を行う場合、どのように行いますか？



有効回答数 : 17

●DGコメント
➤ 「測定結果に対して補正係数をかける」が殆どで、その内2名が、一般的なヘマトクリット値を考慮して補正すると回答した

- 測定結果に対して補正係数をかける
- 分析時の試料分取時に、補正後の量を分取する
- 検量線の濃度設定を補正する

http://bioanalysisforum.jp/

バリデーション追加項目 (DBS試料)

Q2-12~20

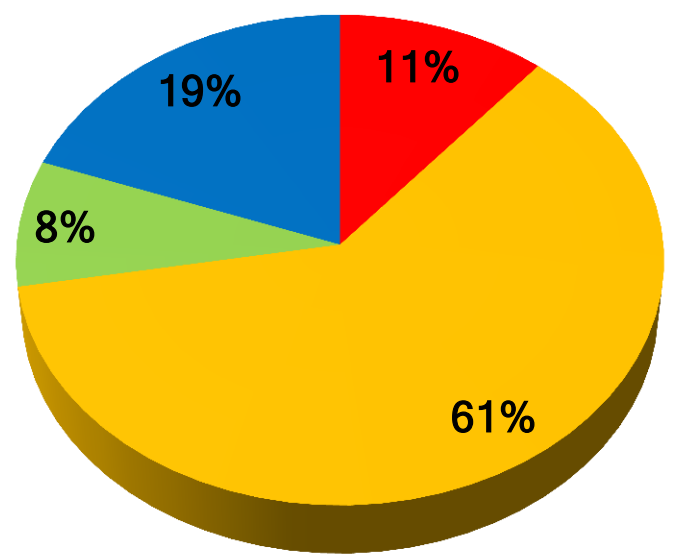
マイクロサンプリングにより取得された**試料乾燥技術を用いる際**を用いる際, 生体試料中薬物濃度分析法ガイドラインで示された項目以外に, 以下の項目を追加でバリデートする必要があると考えますか?

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q2-12

バリデーション追加項目 (DBS)

最も回収率の高いデバイスの選択



有効回答数 : 36

- 何もしない
- 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない
(手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
- バリデーションとしてデータを残す
- 実際に経験がないため、判断がつかない

●何もしない理由

- 保有しているデバイスで判定基準を満たすなら、デバイスを比較検討する必要はない
[類似回答2]

●予備的に検討するが、バリデーションしない理由

- 高回収のデバイスの方がより精度良く定量できるから
- 選択の理由は申請には必要ないから

●具体的な方法

- 複数のカード・複数の溶媒で回収率を検討する

●DGコメント

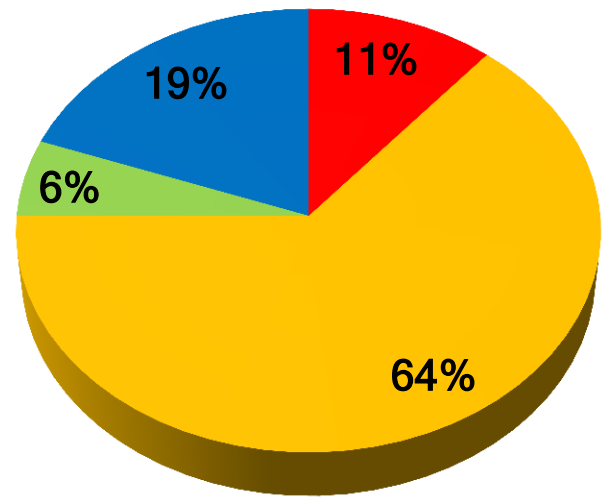
- 「予備的に検討するがバリデーションとして評価しない」が多かった
- 高回収のデバイスの方がより精度良く定量できるため、デバイス選定の検討をするが、デバイス選択の理由は申請に必要なためバリデーションとして評価しないと考えられる

http://bioanalysisforum.jp/

バリデーション追加項目 (DBS)

Q2-13

最もマトリックスによる妨害効果の低いデバイスの選択



■ 何もしない 有効回答数 : 36

■ 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない (手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)

■ バリデーションとしてデータを残す

■ 実際に経験がないため、判断がつかない

●何もしない理由

- 保有しているデバイスで判定基準を満たすなら、デバイスを比較検討する必要はない

[類似回答2]

●予備的に検討するが、バリデーションしない理由

- 選択の理由は申請には必要ないから

●具体的な方法

- 比較的回収率のよい複数のカード・複数の溶媒でマトリックス効果を検討する

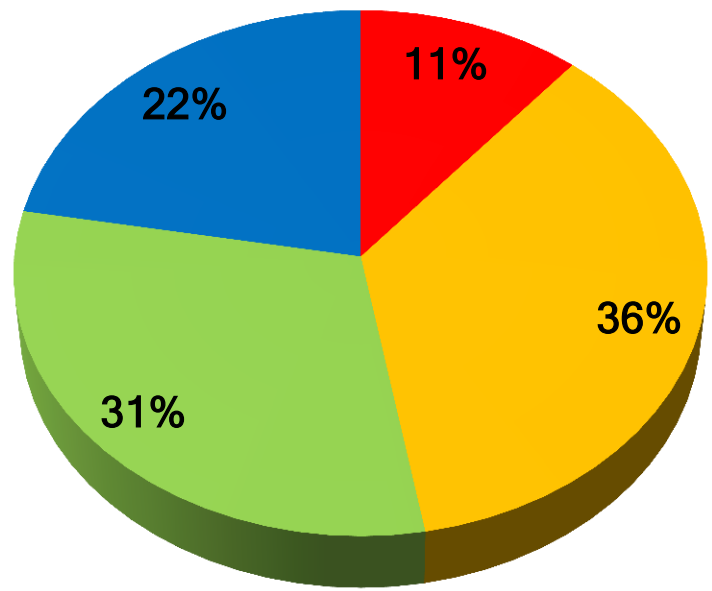
●DGコメント

- 「予備的に検討するがバリデーションとして評価しない」が多かった
- マトリックスによる妨害の低いデバイスの方がより精度良く定量できるため、デバイス選定の検討をするが、デバイス選択の理由は申請に必要なためバリデーションとして評価しないと考えられる

http://bioanalysisforum.jp/

Q2-14

異なるヘマトクリット値の影響



有効回答数 : 36

- 何もしない
- 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない (手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
- バリデーションとしてデータを残す
- 実際に経験がないため、判断がつかない

バリデーション追加項目 (DBS)

● 予備的に検討するが、バリデーションしない理由

- ヘマトクリットのバラツキも考慮したデータとしてバリデーションとして検証されるため

● バリデーションとしてデータを残す理由

- ヘマトクリットの影響が懸念される場合があるため
- スポットの拡散速度が変わり、打ち出し面積が同一でもマトリックス量が異なるため
- 溶血サンプルや高脂血症サンプルの影響確認と同レベル

● 具体的な方法

- 想定されるヘマトクリット3濃度 (25, 50, 75%) で、日内再現性、マトリックス効果、安定性を評価する [類似回答2]
- ヘマトクリットをあえて変えた試料でのバリデーションは不要とするが、ヘマトクリットが最大と最小のマトリックスをバリデーション試料に含める

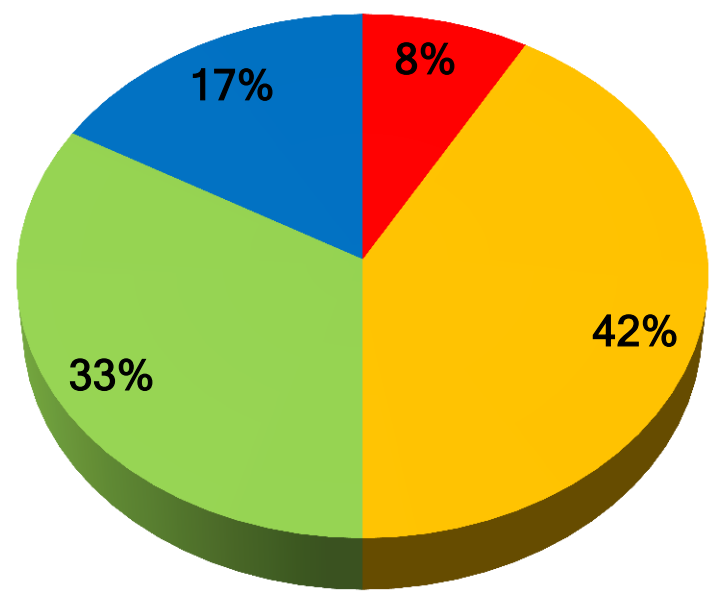
● DGコメント

- 異なるヘマトクリット値の影響を検証するという意見が67%を占めた
- 「予備的に検討するがバリデーションとして評価しない」と「バリデーションとしてデータを残す」の意見がほぼ半数に分かれた

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q2-15

スポットの均一性



有効回答数 : 36

- 何もしない
- 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない (手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
- バリデーションとしてデータを残す
- 実際に経験がないため、判断がつかない

バリデーション追加項目 (DBS)

- 何もしない理由
 - 精度・真度の検討によりある程度評価できると考えられるため
- 予備的に検討するが、バリデーションしない理由
 - 不均一でないという報告が出ている
 - スポット全部を試料とする、パンチを複数枚使用する、などの対策でスポットの均一性を補ったメソッドを構築するため
- バリデーションとしてデータを残す理由
 - クロマトグラフィック効果によって、不均一になることが考えられるから
 - 試料乾燥技術における大きな課題
- 具体的な方法
 - 異なる点から採取して抽出、濃度測定を行う
 - スポットの代表的な箇所 (中心, 周辺, その間) からサンプリングし、日内再現性・マトリックス効果・安定性を評価する

● DGコメント

- スポットの均一性を評価するという意見が75%を占めた
- 「予備的に検討するがバリデーションとして評価しない」と「バリデーションとしてデータを残す」に意見が分かれた

http://bioanalysisforum.jp/

バリデーション追加項目 (DBS)

Q2-16

輸送中の温度を想定した, 最高・最低の温度での安定性を確認する

●何もしない理由

- 通常のバリデーション時と同様な温度設定で安定性を確認する [類似回答4]

●予備的に検討するが, バリデーションしない理由

- 並行保存QCで評価しても良い

●バリデーションとしてデータを残す理由

- 液体試料と同様, 採取から測定までの安定性を担保することは重要 [類似回答5]

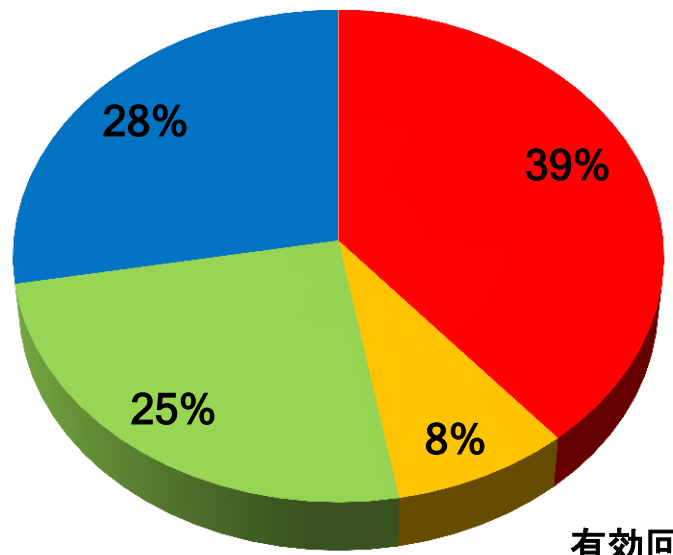
●具体的な方法

- 取り扱う温度条件の設定値で行う [類似回答2]
- 輸送中に30℃ (室温の上限) を超える可能性がある場合, 実試料の輸送冷蔵指定するか, 想定される高温の安定性を評価する

バリデーション追加項目 (DBS)

Q2-17

湿度により試料の状態が変化することを考慮し、考えられる最高・最低湿度で安定性を確認する



有効回答数 : 36

- 何もしない
- 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない
(手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
- バリデーションとしてデータを残す
- 実際に経験がないため、判断がつかない

- 何もしない理由
 - 保存・輸送条件を一定にするから (乾燥剤とともに保存) [類似回答4]
 - 輸送・保存中の湿度をモニターしないため
- バリデーションとしてデータを残す理由
 - 乾燥試料中での薬物の安定性に湿度が影響する可能性があるため
- 具体的な方法
 - 極端な湿度 (20%と80%等) で長期保存安定性を評価する

● DGコメント

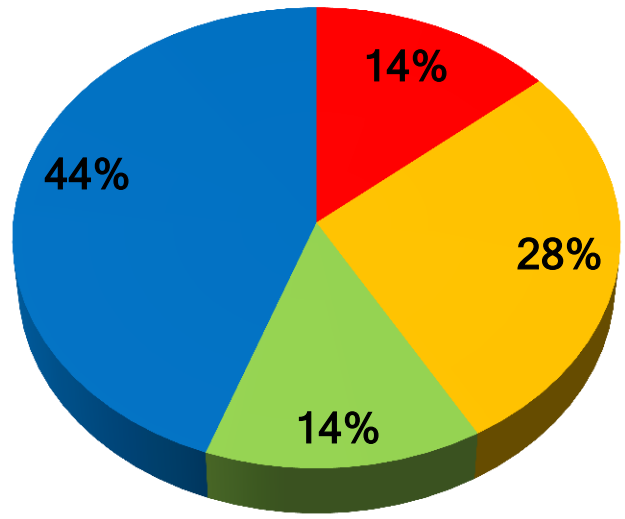
- 「何もしない」がもっとも多かったが、「バリデーションとしてデータを残す」や「判断がつかない」も多く、意見が割れた
- 湿度の影響に関する知見が少なく、湿度管理も難しいため意見が割れたと考えられる

http://bioanalysisforum.jp/

バリデーション追加項目 (DBS)

Q2-18

予想される試料濃度におけるRb値の変動



有効回答数 : 36

- 何もしない
- 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない (手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
- バリデーションとしてデータを残す
- 実際に経験がないため、判断がつかない

● 何もしない理由
 ➢ DBSだと全血中なので、個体の特性としてPK/TK変動に含めて考える

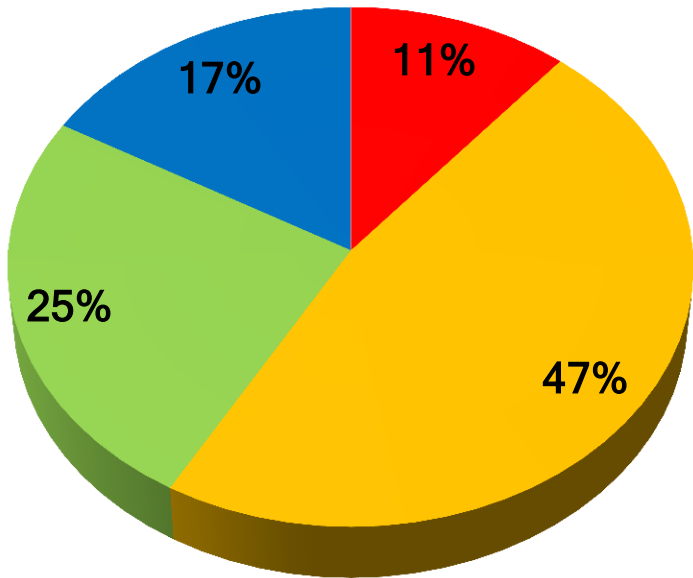
● 実際に経験がないため、判断がつかない理由
 ➢ 得られた濃度データを用いたPK/TK評価に関わる問題であり、分析法バリデーションの範疇ではない

● DGコメント
 ➢ 「実際に経験がないため判断がつかない」がもっとも多かった
 ➢ Rb値の変動が全血中濃度測定に与える影響について知見が少ないためと考えられる

http://bioanalysisforum.jp/

Q2-19

パンチする器具のキャリーオーバー



有効回答数 : 36

- 何もしない
- 予備的に検討するが、バリデーション項目としては評価しない (手持ちデータとしては存在するが、申請試料中には出てこない)
- バリデーションとしてデータを残す
- 実際に経験がないため、判断がつかない

バリデーション追加項目 (DBS)

- 何もしない理由
 - 毎回拭けばよい
 - 気にならない
- 予備的に検討するが、バリデーションしない理由
 - パンチャーのメンテナンス (洗浄方法等) をメソッドに反映させ、バリデーションでは確認しない [類似回答2]
 - システムスータビリティとして実測定等で確認する方がよい
- バリデーションとしてデータを残す理由
 - キャリーオーバー評価の一環
 - キャリーオーバーがある条件で分析法バリデーションを行う場合、その影響の程度や回避策、測定値への影響を考察する必要があるため、バリデーション試験内で評価が必要と考える
- 具体的な方法
 - ULOQの後にブランクをパンチして測定
 - パンチ器具を複数用意して1回毎に洗浄する

● DGコメント

➢ 「予備的に検討するがバリデーションとして評価しない」が47%と最も多かったが、「バリデーションとしてデータを残す」も25%であった

http://bioanalysisforum.jp/

バリデーション追加項目 (DBS)

Q2-20

Q2-12 から Q2-19までに挙げられた以外に、必要と思われる項目があればご回答ください

予備的な検討として必要と思われる項目

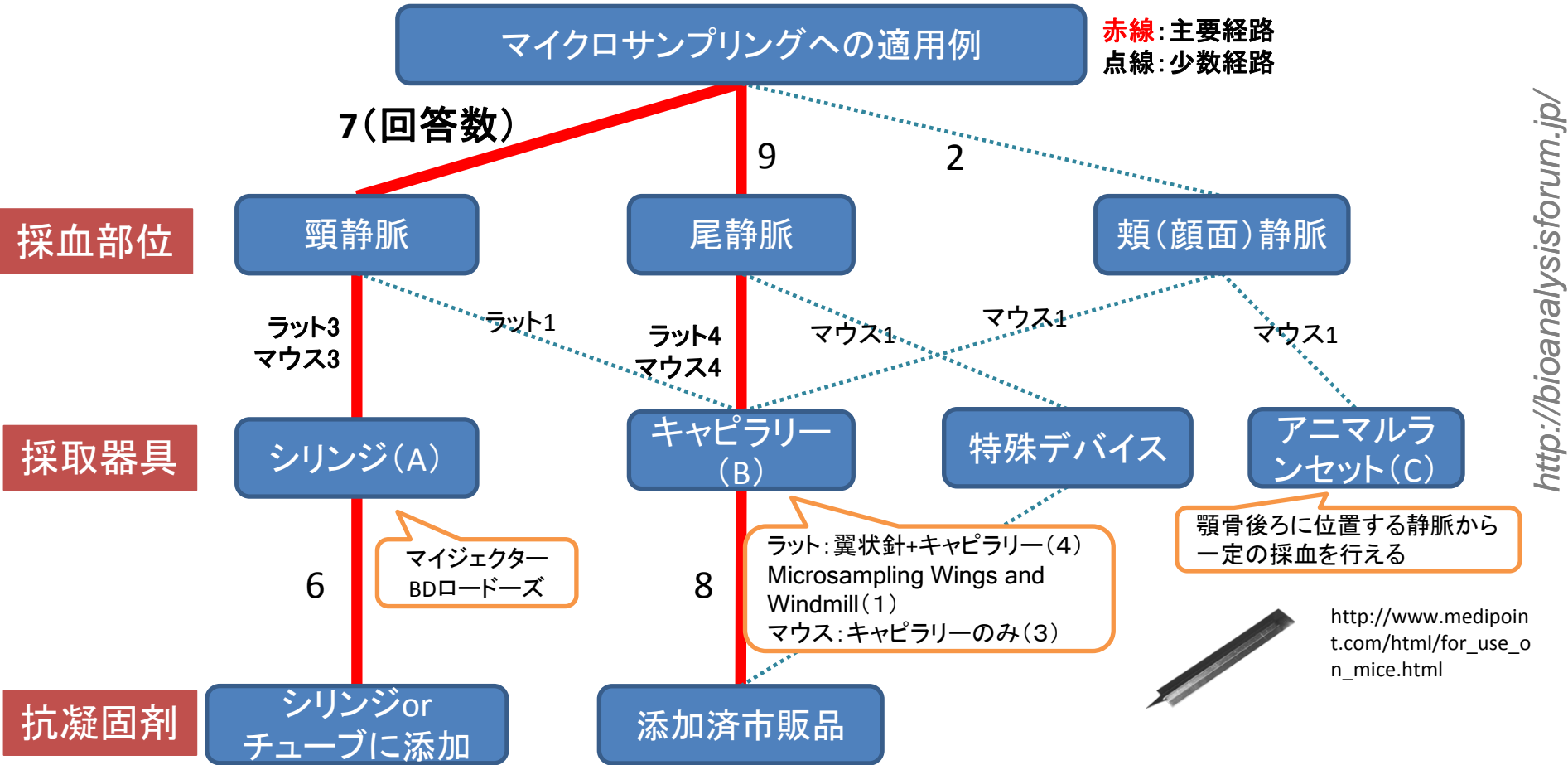
- 試料量, 乾燥条件, 性別の影響, パンチャーの繰返し精度と耐久性, 検討用全血の抗凝固剤の選択と影響

<http://bioanalysisforum.jp/>

デバイスのメリット, デメリット

Q2-21~34

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



デバイスのメリット, デメリット

Q2-21~34

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

	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
利点	針先があたりやすい	翼状針とキャピラリーの採血は、一人で採血が実施可能	動物への負担が軽い
	血圧が下がっている状態でも採血がある程度できる		
	血手技が習得できれば、保定器を用いた尾静脈採血より短時間で操作できる(マウス)		
	コンタミがない		
問題点と改善方法	溶血が頻発 ⇒採取速度の調整	止血が不十分で出血 ⇒適切な時間をかけて圧迫止血	マウスの保定の程度を誤り呼吸困難になった・刺しすぎて出血が多かった⇒力加減, 慣れ
	内出血がしやすく, 内出血すると次の採血がしにくくなる. ⇒練習	カミソリでカットする際に尾静脈の真上を正確に切るのが困難	
	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ない ⇒解剖して場所を確認		
改善点	溶血しないように採血	製造中止への対応(代替)	刺す位置の明瞭化
	もう少し長い針が望ましい。	静脈内投与時には他の採血部位の検討が必要	

http://bioanalysisforum.jp/

デバイスのメリット, デメリット

Q2-21~34

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

●DGコメント

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, デバイスに関しても通常と同様の器具を使用している例が多かった.

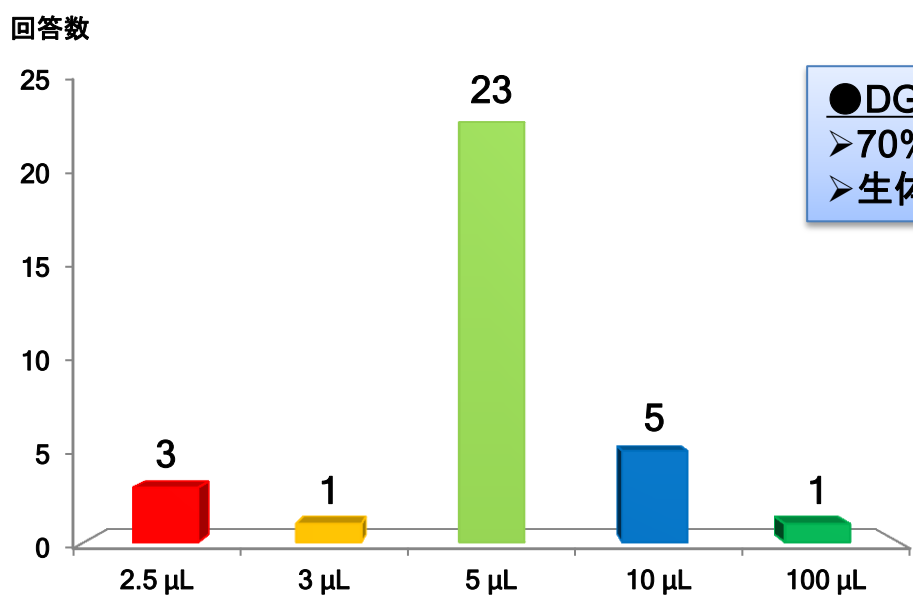
一方で手技の問題点も挙げられたが, 練習(解剖して血管の位置を確かめる)することで改善している例もあった.

また, マイクロサンプリング特有のデバイス(アニマルランセット, Microsampling Wings 及び Windmill)が使われた例もあった

ピペッティングの精度

Q2-35

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)



●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

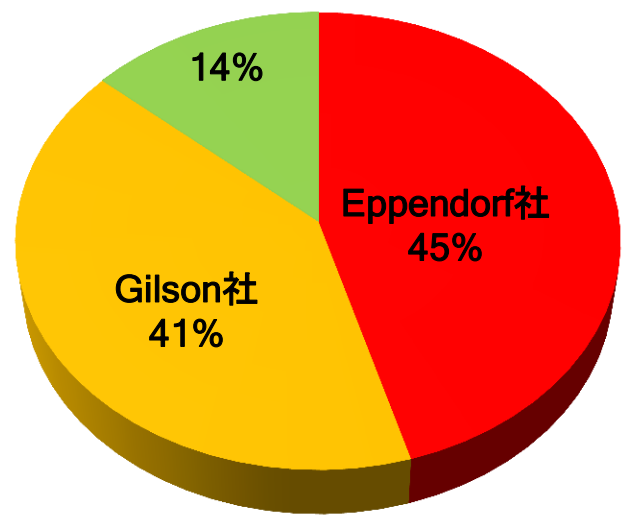
有効回答数：33

<http://bioanalysisforum.jp/>

Q2-36

ピペティングの精度

そのとき使用するピペット及びチップのメーカーと名称をご回答ください。使用する容量もわかるようにご回答ください



●DGコメント
 チップはいずれも使用ピペットと同じメーカーの見合ったサイズのものを使用している例が多い
 同一メーカーの組み合わせで採取精度が保証されているからと考えられた

- その他のメーカー
 - ◆ BIOHIT eLine 5-120 (チップ: レイニン LTS 100uL)
 - ◆ Finpipette 10μL (チップ: 回答なし)
 - ◆ メトラートレド (チップ: 同社)

- Eppendorf社、Refernce/その他、最大容量10 μLがメイン
- Gilson社、Microman/Pipette-man、最大容量10 μLがメイン
- その他のメーカー

有効回答数 : 22

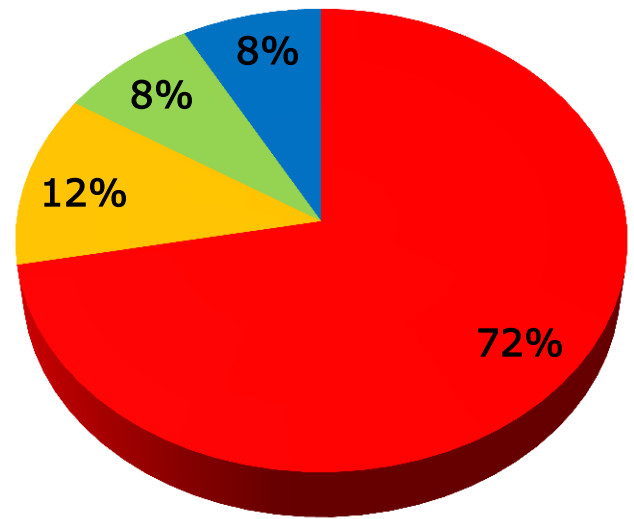
http://bioanalysisforum.jp/

ピペッティングの精度

Q2-37

そのときのピペッティングの精度をどのように確認しますか？方法を以下の項目についてご回答ください

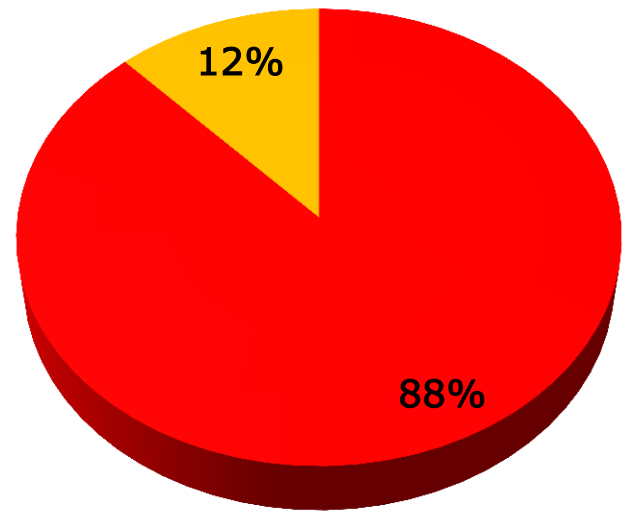
ピペット検定に使用するマトリックス



- 精製水
- 血漿 (測定マトリックス含む)
- 精製水と血漿を共に使用
- キャリブレーション用試薬

有効回答数 : 25

ピペット検定方法



- 重量法
- 色素法

有効回答数 : 25

●コメント

- 測定マトリックスに合わせる (動物種はできるだけ可)
- 試薬 : アキュマスタ (Labo Recycle Co., Ltd.)

●コメント

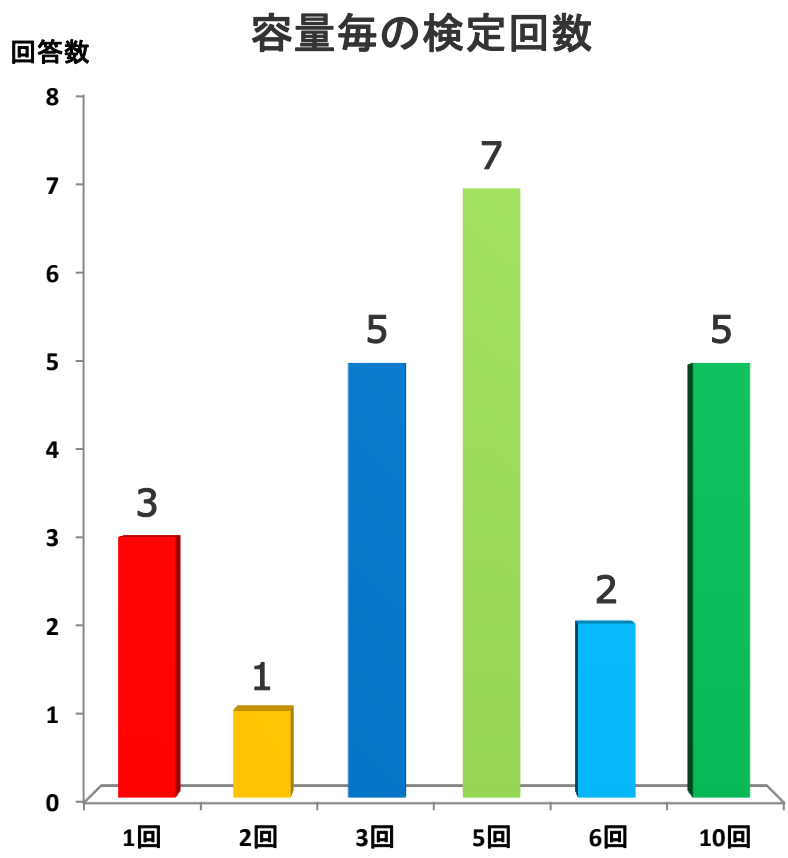
- 重量測定時の蒸発に気をつける
- リバース法を用いる

http://bioanalysisforum.jp/

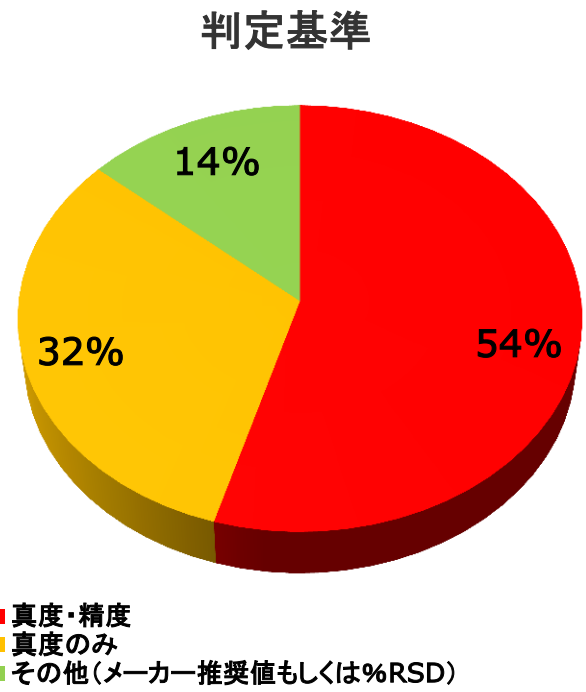
ピペッティングの精度

Q2-37

そのときのピペッティングの精度をどのように確認しますか？方法を以下の項目についてご回答ください



有効回答数：23



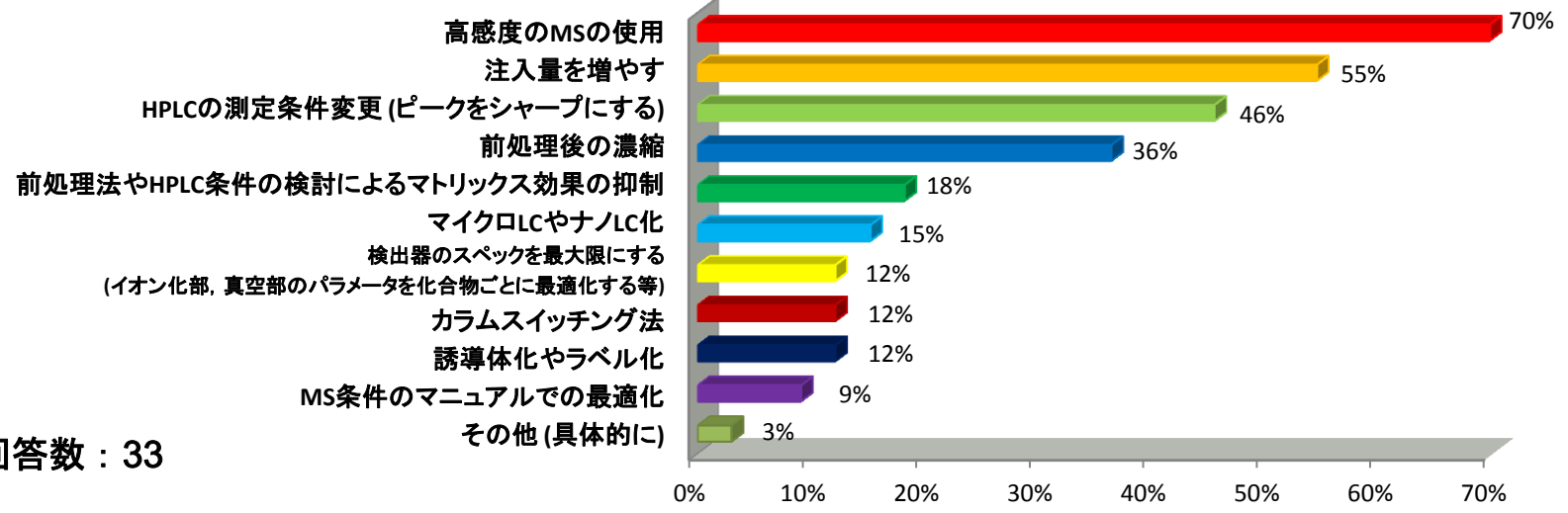
有効回答数：22

●DGコメント
 真度：±2～5%以内，精度：1～5%以下が多数

<http://bioanalysisforum.jp/>

マイクロサンプリングにより検出の高感度化が必要となるケースがあります。そのような場合、あなたが取るであろう方法を3つまでご回答ください。「その他」を選択された方は、その方法を記載してください。低分子化合物を想定して回答してください。

前問の選択肢以外で考えられる高感度化の方法があれば、アイデアレベルでも結構ですのでその方法をできるだけ具体的にご回答ください



有効回答数 : 33

●コメント

- ベースラインの形状によってはイオンモビリティの使用
- LBAに変更する(ヨウ素標識RIA並びに酵素サイクリング, 化学発光, レーザー蛍光のELISA)
- PCRタグのELISAなど

●DGコメント

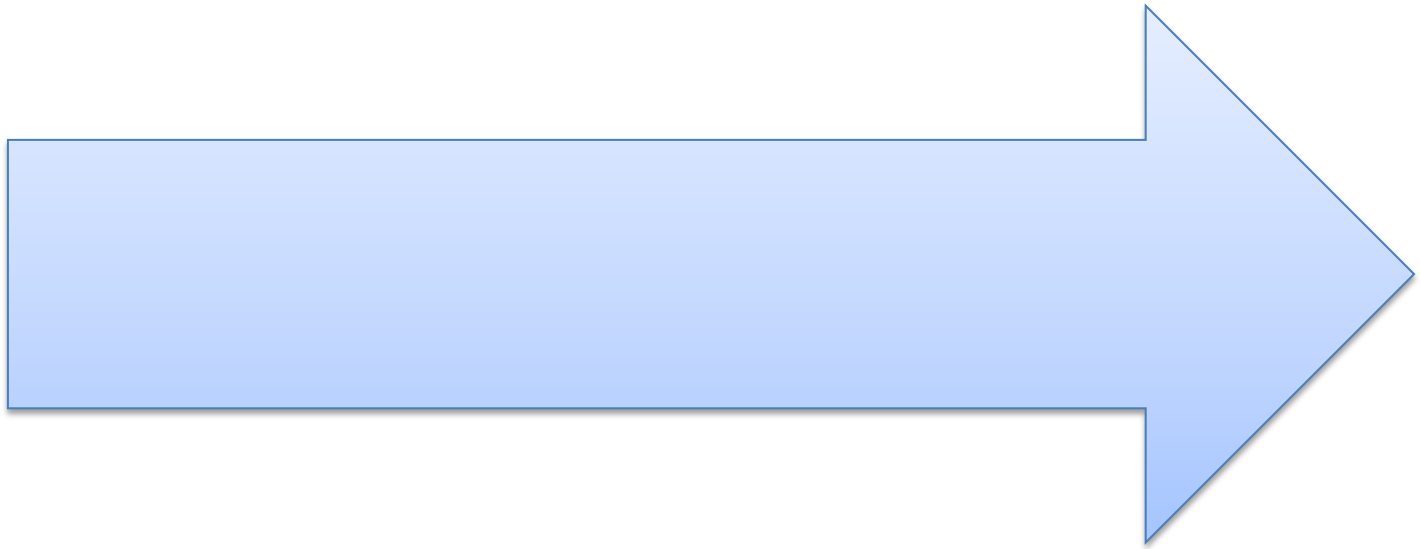
HPLCの測定条件変更では、カラムの変更, グラジエントの変更, UPLCへの変更(流速の上昇), 移動相の変更等の方策が考えられる

http://bioanalysisforum.jp/

文献調査のまとめ

- ・採血部位とPKの影響
- ・頻回採血による生理学的データへの影響

採血動物に関するアンケート調査



<http://bioanalysisforum.jp/>

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いて、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。この比較は、適切な濃度範囲で評価される独立した薬物動態（PK）試験で行うことができる。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。なお、対象はげっ歯類のみとした。

文献調査の結果、採血部位によってAUC, Cmax等のパラメータに差が認められる薬物があり、開発途中で採血部位を変える場合は注意が必要であると考えられた



文献 1 : Comparison of pharmacokinetics of Dapsone in male sprague dawley rats following retro orbital, jugular vein and saphenous vein blood sampling¹⁾

動物種 (系統) : ラット(SD)
投与薬物 : Dapsone
投与経路 : 静脈内投与, 強制経口投与
採血部位 : 眼窩静脈叢, 頸静脈, 伏在静脈

得られたパラメータに差は認められなかった

1) SOJ Pharm Pharm Sci. 2015, 2(1), 1-10



文献 2 : Cyclophosphamide Pharmacokinetics in Mice: A Comparison Between Retro Orbital Sampling Versus Serial Tail Vein Bleeding¹⁾

動物種: マウス

投与薬物 : Cyclophosphamide

投与経路 : 腹腔内投与

採血部位 : 眼窩静脈叢(Retro-orbital), 尾静脈(Tail-vein)

得られたパラメータに差は認められなかった

1) The Open Pharmacology Journal, 2007, 1, 30-35



文献 3 - 1 : Utility of capillary microsampling for rat pharmacokinetic studies:
Comparison of tail-vein bleed to jugular vein cannula sampling¹⁾

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, カニュレーション), 尾静脈(Tail vein)

以下の差が認められた
化合物A, B: AUCにおいて
尾静脈 > 頸静脈
化合物C: Cmax及びAUCにおいて
尾静脈 > 頸静脈

1) J Pharmacol Toxicol Methods. 2015, 76, 7-14



文献 3 - 2 : Utility of capillary microsampling for rat pharmacokinetic studies:
Comparison of tail-vein bleed to jugular vein cannula sampling¹⁾

動物種 (系統) : ラット(SD)

投与薬物 : Fluoxetine, Norfluoxetine

投与経路 : 強制経口投与

採血部位 : 頸静脈(JVC, カニュレーション), 尾静脈(Tail vein)

得られたパラメータに差は認められなかった

1) J Pharmacol Toxicol Methods. 2015, 76, 7–14



文献 4 : Pharmacokinetic comparison of tail-bleeding with cannula- or retro-orbital bleeding techniques in rats using six marketed drugs¹⁾

動物種 (系統) : ラット(SD)

投与薬物 : Fluoxetine, Glipizide, Gemfibrozil

投与経路 : 経静脈投与, 強制経口投与

採血部位 : 尾静脈(Tail), 眼窩静脈叢(Retro-orbital), 大腿動脈(Cannula)

Fluoxetineの経口投与
AUC₀₋₂₄, C_{max}において
眼窩静脈叢 > 尾静脈
t_{1/2}において
尾静脈 > 眼窩静脈叢
その他に差は認められなかった

1) J Pharmacol Toxicol Methods. 2007 Sep-Oct;56(2):256-64

Results are expressed as group means±SEM (n=3). All tests were based on two-sided t-tests at a 0.05 significant level. ND — not determined.
⁴ Tail-vein bleeding was significantly different from retro-orbital bleeding.

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から、生理学的データを取得している論文を選択した。

調査した6報^{1)~6)}で実施されていた検査内容

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

体重，血液学的検査，血液化学的検査を実施した報告が多かった

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

試験系及び検査結果のまとめ

試験系											検査項目及び結果						
動物種	系統	雌雄	日齢, 週齢	体重(g)**	採血量(uL)		採血量 割合(%)***	採取日	検査日	部位	血液学的検査			血液化学 AST	組織重量	病理組織	
					量×回数	合計					RBC	HEM	Hct				
ラット ¹⁾	SD	♀	8W	200	50×6	300	2.3	D1	D2	伏在静脈	-	-	-	-	-	-	
					100×6	600	4.7			伏在静脈	-	-	-	-			
					200×6	1200	9.4			伏在静脈	11-15%減			1.6倍に増	-	-	
			8W	200	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	-	-	
12W	250	200×6	1200	7.5	D1	D2	尾静脈	D1: 経時的に減, D2: 11-15%減			1.5倍に増	-	-				
ラット ²⁾	Wistar (Han)	♀	19D	40	32×3	96	3.8	D1	D2	尾静脈	有意に低下だが、標準範囲内			-	-	-	
			37D	95	32×3	96	1.6	D1	D2	尾静脈	-	-	-	脾臓増, 肝減	-		
ラット ³⁾	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
ラット ⁴⁾	Wistar	♂♀	?	♂339, ♀231	25×3+70	145	♂0.7, ♀1	D1	D3	尾静脈	-	-	-	-	-	-	
					250×5	750	♂6, ♀9			D1	D3	尾静脈	8-14%減			-	-
ラット ⁵⁾	Wistar (Han)	♂♀	4D	♂10, ♀10	32×2	64	10	D1	D7	頬静脈	-	-	-	-	-	-	
					32×3	96	15			D1	D7	頬静脈	-	10%減	-	-	-
			10D	♂24, ♀24	32×3	96	6.3	D1	D2	頬静脈	20%減			-	-	-	
					32×3	96	6.3			D1	D7	頬静脈	-	-	-	-	-
					32×3	96	4			D1	D2	頬・尾・頸静脈	10-18%減	20%減	15-20%減	-	-
32×3	96	4	D1	D7	頬・尾・頸静脈	-	-	-	-				-				
マウス ⁶⁾	?	?	?		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、採血量の増加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

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

http://bioanalysisforum.jp/

参考として, EFPIA(欧州連邦製薬工業協会), ECVAM(欧州代替法バリデーションセンター)より推奨されている¹⁾採血量を示す

Table 4. Limit volumes and recovery periods

Single sampling (e.g. toxicity study)		Multiple sampling (e.g. toxicokinetic study)	
% Circulatory blood volume removed	Approximate recovery period	% Circulatory blood volume removed in 24 h	Approximate recovery period
7.5%	1 week	7.5%	1 week
10%	2 weeks	10–15%	2 weeks
15%	4 weeks	20%	3 weeks

1) J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001) A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumesより抜粋

<http://bioanalysisforum.jp/>

第8回JBFシンポジウム会場で実施したアンケート調査

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。

げっ歯類の最初の毒性試験において毒性評価群から採血する場合、あなたはどのように採血するデザインを採用すべきだと考えますか？ コスト（費用や労力）、科学的な評価、動物福祉等の観点から総合的に判断して、該当する回答の欄にシールを貼ってお答えください。

但し、1例の動物から全ての採血時点で採血しても生理学的影響はないものとします。

第8回JBFシンポジウム会場で選択された件数

① 毒性評価群の全動物からそれぞれ全採血時点で採血する

② 毒性評価群の一部の動物（例：特定の3例）からそれぞれ全採血時点で採血する

③ 毒性評価群の全動物で採血量がほぼ均等になるように、採血時点ごとに動物を替えて採血する
(スパースサンプリング)

動物	採血時点 (h)					
	0.5	1	2	4	8	24
1	○	○	○	○	○	○
2	○	○	○	○	○	○
3	○	○	○	○	○	○
4	○	○	○	○	○	○
5	○	○	○	○	○	○
6	○	○	○	○	○	○
7	○	○	○	○	○	○
8	○	○	○	○	○	○
9	○	○	○	○	○	○
10	○	○	○	○	○	○
11	○	○	○	○	○	○
12	○	○	○	○	○	○

動物	採血時点 (h)					
	0.5	1	2	4	8	24
1	○	○	○	○	○	○
2	○	○	○	○	○	○
3	○	○	○	○	○	○
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						

動物	採血時点 (h)					
	0.5	1	2	4	8	24
1	○				○	
2	○				○	
3	○				○	
4		○				○
5		○				○
6		○				○
7			○			
8			○			
9			○			
10				○		
11				○		
12				○		

10件

17件

4件