



DG2019-41

非結合型薬物濃度測定

Bioanalysis of Unbound Drug

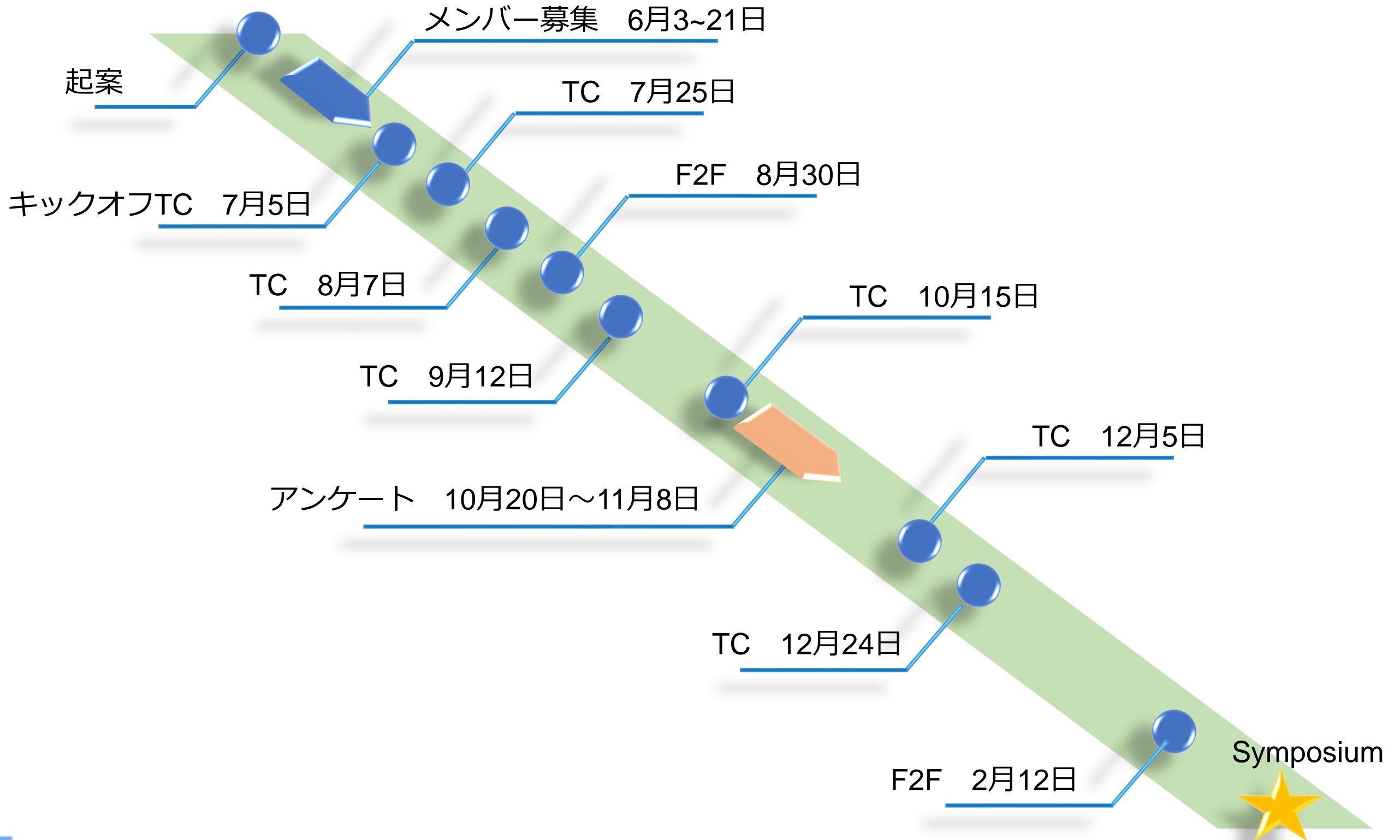


DG2019-41の活動

氏名 Name	所属 Affiliation
新井 浩司 Koji Arai	株式会社 L S I メディエンス LSI Medience Corporation
井手 亮佑 / リーダー Ryosuke Ide / Leader	田辺三菱製薬株式会社 Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation
佐々木 佳寛 Yoshihiro Sasaki	日本新薬株式会社 Nippon Shinyaku Co., Ltd.
重山 拓摩 Takuma Shigeyama	株式会社住化分析センター Sumika Chemical Analysis Service, Ltd.
野田 巧 / オブザーバー Takumi Noda / Observer	小野薬品工業株式会社 Ono Pharmaceutical Co., Ltd.
吉松 宏倫 Hiromichi Yoshimatsu	科研製薬株式会社 Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.



活動実績



<http://bioanalysisforum.jp/>

背景および目的

タンパク結合評価等における**非結合型薬物濃度の測定**は、薬物の体内動態、薬効や毒性を正しく理解するうえで重要なツールであり、本評価に**バイオアナリシスが果たす役割は大きい**と言える。

しかし、試験手法や試験条件について公的に**要件が定められておらず**、各施設・担当で疑問に思いながら試験を実施している場合や、実施内容に過不足が生じている場合もあると考えられる。



背景および目的

本DGでは、試験手法や試験条件について施設横断的な**アンケート調査**を行い、現状を調査した。



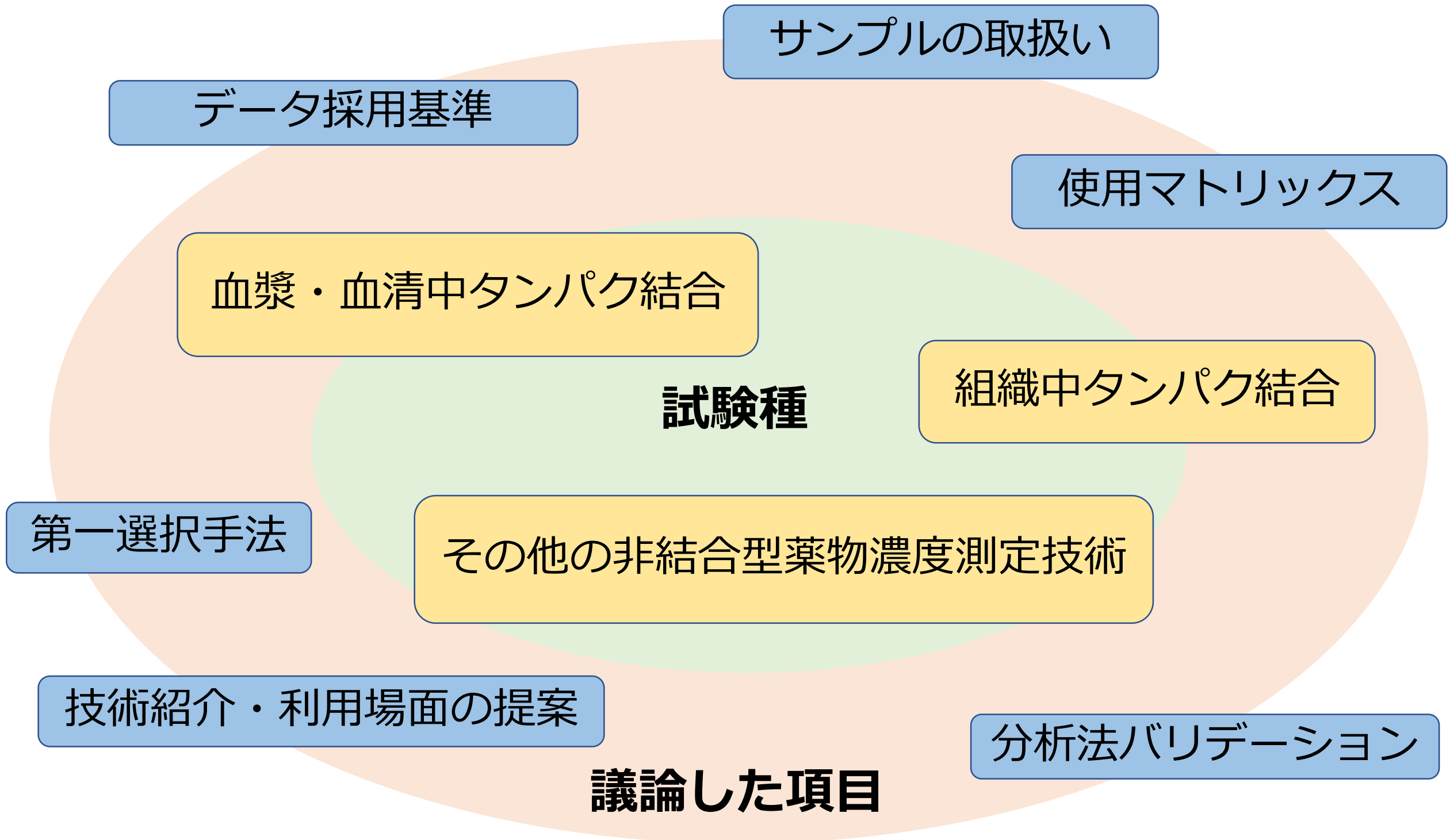
本発表においてアンケート結果や試験実施時に考慮すべきポイント等を示し、実務において参考となる**標準的な方法・考え方**を提案したい。また、非結合型薬物濃度を測定するための技術についてもいくつか紹介する。



なお、本発表内容はDGメンバー個人の考えに基づいて議論されたものであり、所属企業の考え方を示すものではありません。



議論の内容



<http://bioanalysisforum.jp/>



概論

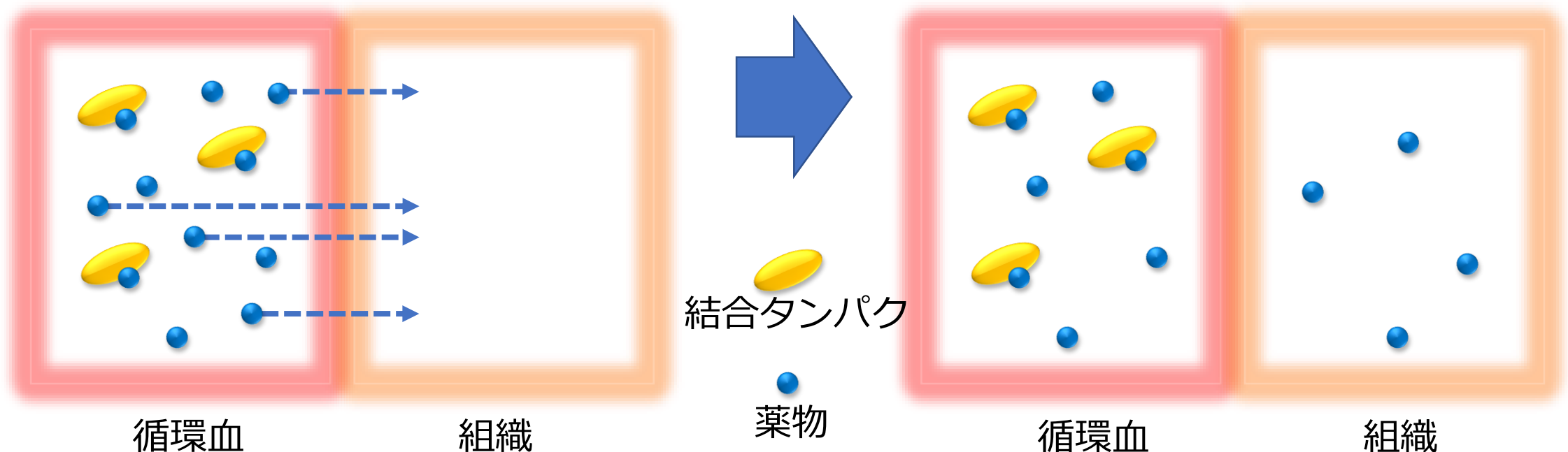
非結合型濃度測定の意味

血漿（血清）中タンパク結合率評価の意味

～薬物動態的プロファイル～

薬効および毒性は、循環血中から組織中に分布した薬物により発現する。循環血から細胞膜で隔てられた組織に移行できるのは、タンパク質に結合していない非結合型薬物である。

血漿（血清）タンパク結合率は、血漿（血清）中トータル濃度から組織中の薬物濃度を見積もるための重要なパラメータとして、創薬において広く用いられている。



非結合型濃度測定の意味

結合タンパク種評価の意味

タンパク結合率の高い薬物を他の薬剤と併用した場合、タンパク結合の競合が生じ、一方の非結合型薬物濃度が上昇することがある。競合は結合タンパクおよびその結合サイトの奪い合いによって生じるため、結合タンパク種および結合サイトを同定することは重要

主な結合タンパク	アルブミン		α1酸性糖タンパク	
分子量	66.5 kDa		41~43 kDa	
血漿中濃度	600 μM		20 μM	
結合特異性	高脂溶性酸性化合物		塩基性化合物	
結合部位と主な結合薬物	サイトI	ワルファリン フェニトイン	塩基性薬物 結合部位	プロプラノロール
	サイトII	イブプロフェン ジアゼパム	酸性薬物 結合部位	ワルファリン
	サイトIII	ジギトキシン	ステロイドホルモン 結合部位	プロゲステロン

金芳堂 創薬研究のストラテジー 上巻 (2011)

非結合型濃度測定の意味

病態下におけるタンパク結合率評価の意味

肝障害や腎障害等の一部の病態下では血中タンパク濃度の変動を生じる。特に病態下で非結合型濃度が著しく上昇する場合は、慎重投与の必要性も生じるため、臨床試験における評価が必要と考えられる。

病態	非結合型分率 (f_u) の変動
肝疾患	↑ (アルブミン濃度の低下) ↑ (α 1酸性糖タンパク濃度の低下) ↑ (高ビリルビン血症による競合)
腎疾患	↑ (濾過機能の低下に伴う血中アルブミン濃度低下) ↑ (アシドーシスに伴う血中タンパクの構造変化) ↓ (α 1酸性糖タンパク濃度の上昇)
心疾患	↑ (アルブミン濃度の低下) ↓ (α 1酸性糖タンパク濃度の上昇)
炎症・外傷	↓ (α 1酸性糖タンパク濃度の上昇)

非結合型濃度測定の意味

病態下におけるタンパク結合率評価の意味

必要性については、FDAおよびEMAの以下のガイダンス/ガイドラインでも述べられている。

FDA

- Guidance for Industry. Pharmacokinetics in Patients with Impaired Hepatic Function: Study Design, Data Analysis, and Impact on Dosing and Labeling (May 2003)
- Guidance for Industry. Pharmacokinetics in Patients with Impaired Renal Function — Study Design, Data Analysis, and Impact on Dosing and Labeling (May 1998)

EMA

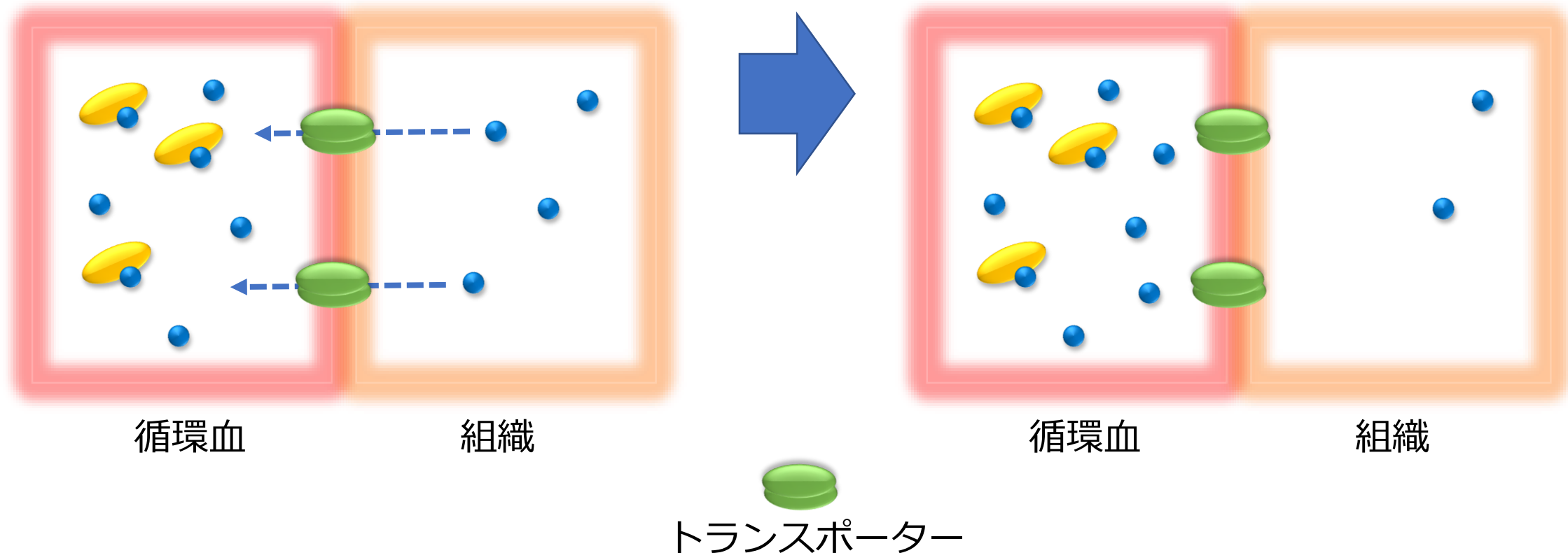
- Guideline on the Evaluation of the Pharmacokinetics of Medicinal Products in Patients with Impaired Hepatic Function (August 2005)
- Guideline on the evaluation of the pharmacokinetics of medicinal products in patients with decreased renal function (July 2016)

非結合型濃度測定の意味

組織中タンパク結合率評価の意味

脳などトランスポーターなどの能動輸送系が関与する場合、組織中の非結合型薬物濃度は血中より低くなることもある。

このような場合は組織中の非結合型薬物濃度を見積もる必要があり、組織中タンパク結合率の評価も必要となる。



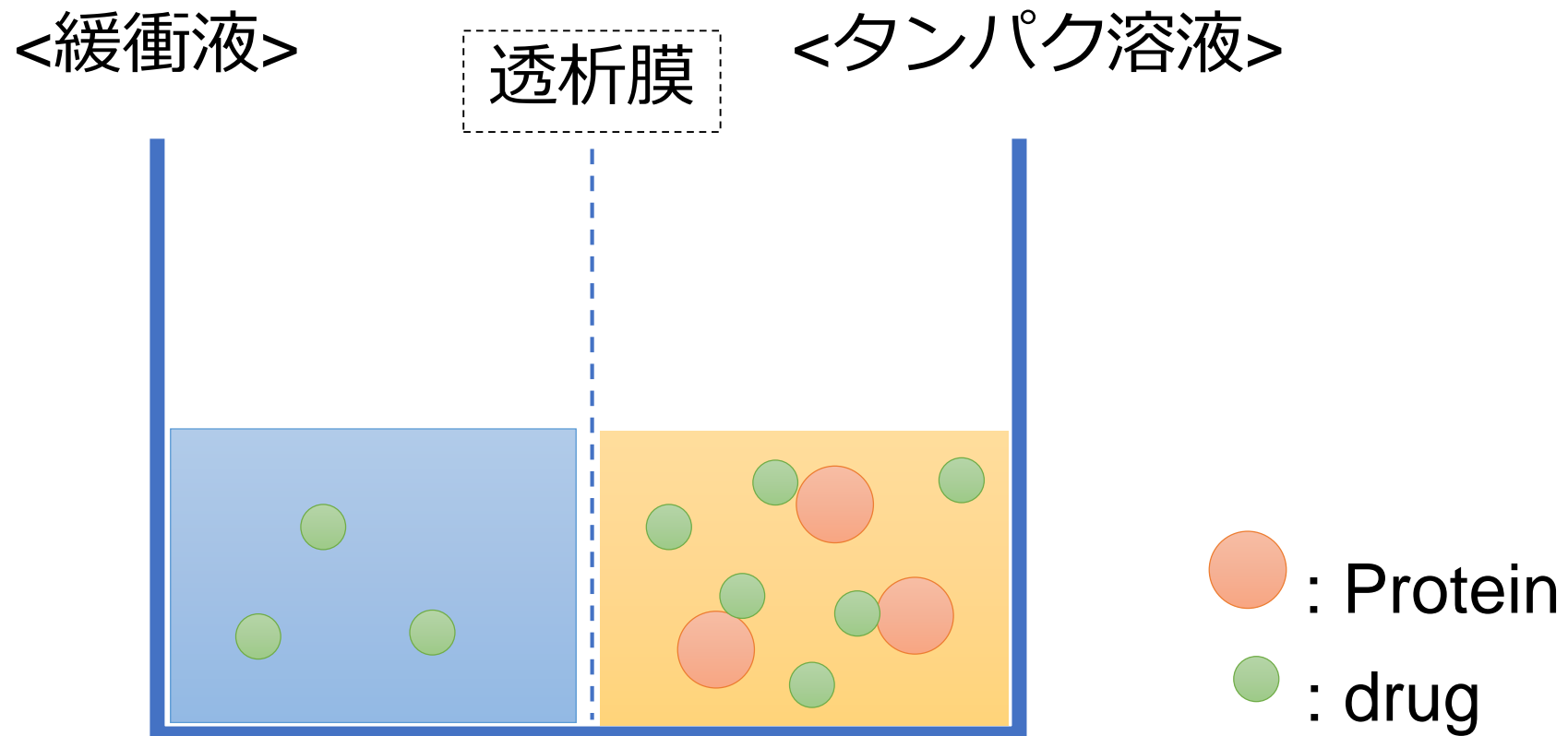
対象となる主なマトリックス

技術・評価種	マトリックス	特徴
血中タンパク結合	血漿	取扱いは簡便. 緩衝能を持つ抗凝固剤の選択によりpHが安定する.
	血清	凍結融解によりpHが変化しやすい
組織中タンパク結合	組織ホモジネート	取扱いが簡便, かつ血漿や血清と同様に結合率を測定することができる.
	組織スライス	組織構造を維持するため, トランスポーターの機能を含めた組織中濃度を評価することができる.
マイクロダイアリシス	組織灌流液	生きた個体の生体試料中濃度を測定することができる
マイクロ固相抽出	循環血 (<i>in vivo/ex vivo</i>)	
	組織 (<i>in vivo/ex vivo</i>)	

主なタンパク結合評価手法

平衡透析法

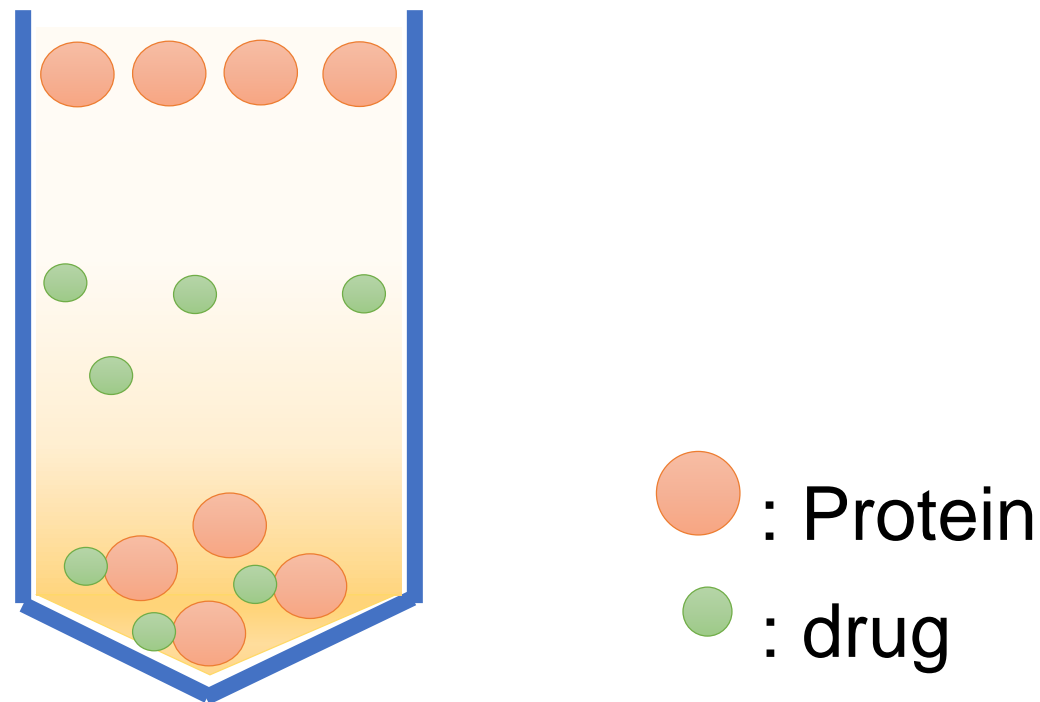
タンパク溶液と緩衝液を透析膜で区切り、浸透を続けると系は平衡に到達する。この時、両画分内の非結合型薬物濃度は等しくなる。緩衝液側とタンパク溶液側を測定することでタンパク結合率が求まる。



主なタンパク結合評価手法

超遠心法

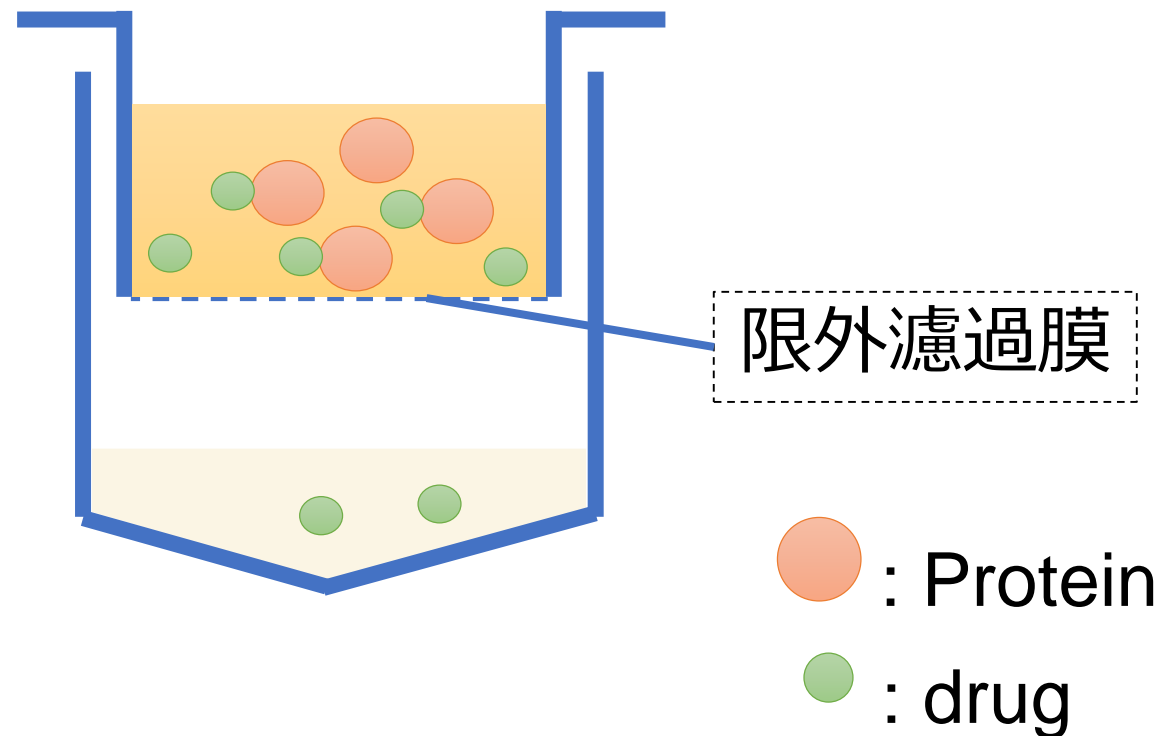
薬物を添加したタンパク溶液を超遠心すると、結合型薬物はタンパク質と共に沈殿し、非結合型薬物は中間層に存在する。中間層と超遠心していないタンパク溶液を測定することでタンパク結合率が求まる。
※上層部にはカイロミクロンやVLDLなどのリポタンパク質が浮遊しているため、サンプル採取場所に注意が必要。



主なタンパク結合評価手法

限外濾過法

薬物を添加した溶液を限外濾過膜を用いて濾過する。濾液には非結合型薬物のみが含まれる。濾液と限外濾過していないタンパク溶液を測定することでタンパク結合率が求まる。



各手法の特徴・比較

	メリット（上段）/デメリット（下段）
平衡透析法	<ul style="list-style-type: none"> ・ 平衡到達時、吸着が結果に影響を与えづらい ・ 多検体評価に優れる（96well device & ロボット化）
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 膜への吸着が生じる ・ タンパク質の漏出が生じるリスクがある ・ 試験時間が長い（4～6hr以上）
超遠心法	<ul style="list-style-type: none"> ・ 吸着の影響を受けにくい ・ 非生理的溶液（PBS*等）を用いない
	<ul style="list-style-type: none"> ・ スループット性が低い ・ サンプルング時の手技の影響が大きい ・ 試験時間が長い（3hr）
限外濾過法	<ul style="list-style-type: none"> ・ 試験時間が短い（10min） ・ 非生理的溶液（PBS等）を用いない
	<ul style="list-style-type: none"> ・ 吸着の影響を受けやすい ・ タンパク質の漏出が生じるリスクがある

*PBS : Phosphate Buffered Saline



サンプル測定手法

	Cold定量法	Hot定量法
分析対象	放射性非標識体	放射性標識体
主な分析手法	LC/MS法	LSC法 (液体シンチレーションカウンタ)
メリット デメリット	<ul style="list-style-type: none"> ・ 複数化合物の同時測定が可能 ・ 高選択性 ・ 低コスト ・ 分析法バリデーションが必要 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 分析法バリデーションが不要 ・ 高感度 ・ 高コスト ・ 専用施設が必要

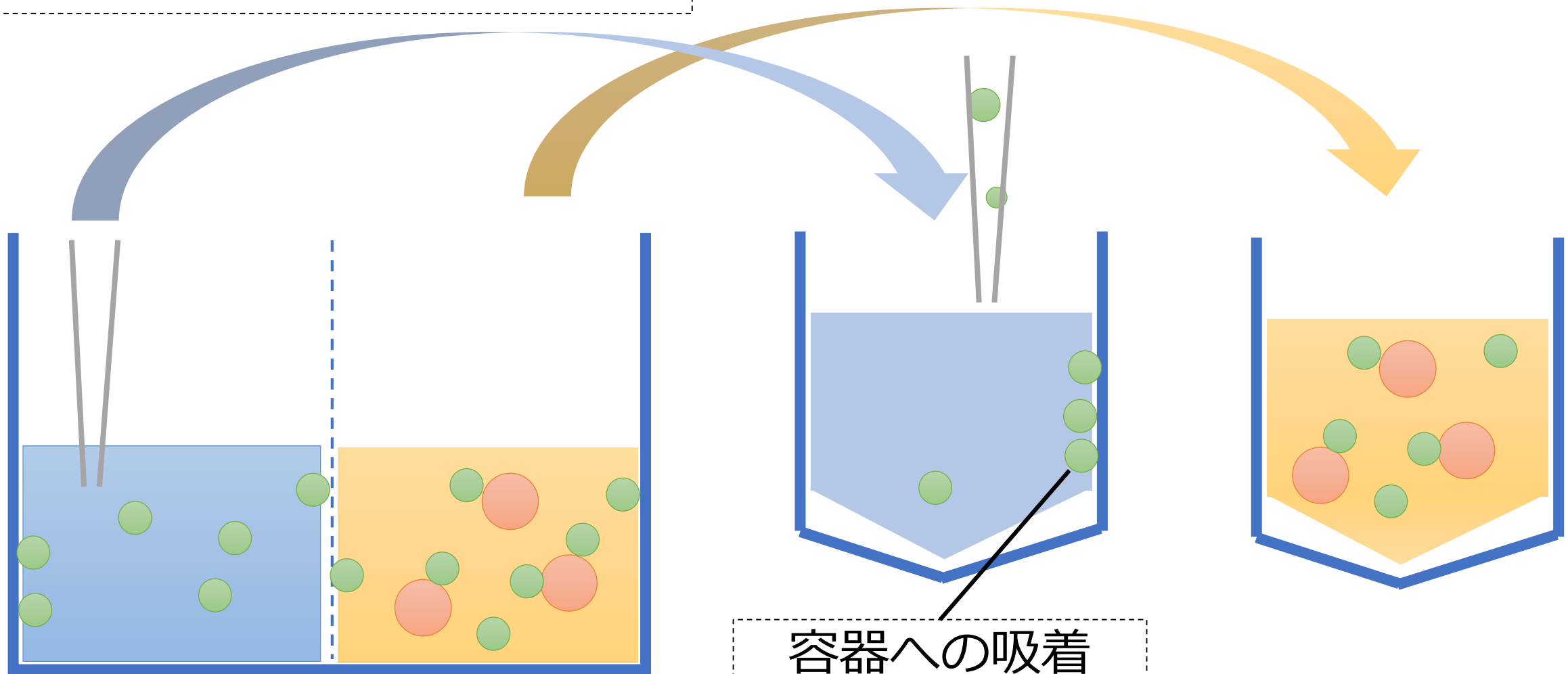
本DGではCold定量法を使用した薬物濃度測定について議論した



タンパク結合試験における非特異的吸着

<例：平衡透析法>

試料採取時のチップへの吸着



<PBS>

<Plasma>

● : Protein

● : Analyte

**PBS試料と血漿試料で
吸着の影響が異なることが問題**

非特異的吸着の確認方法

使用マトリックス	確認方法	確認濃度
PBS (可能なら透析液や 限外ろ過液等実際に 使用するマトリック スが理想)	<u>方法1</u> 容器を3~5回移し替えて測定 値の減少度合いを確認 あるいは結合試験と同じ操作 をしてエリア比を比較	低濃度の QCサンプル濃度
	<u>方法2</u> 段階希釈で直線性を確認	使用する検量線濃度

DGメンバー内の議論では、段階希釈で直線性を確認し、うまくいかなかった場合に、原因究明や吸着回避方法の検討で容器の移し替えを実施すると効率的なのではという意見でまとまった。

非特異的吸着の回避方法

回避方法	材質や種類	Pros	Cons
チューブやチップの材質を変える	ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラス 低吸着が謳われている チューブやチップ シリコナイズ処理したもの	メソッドの変更が不要	色々試しても結局回避できない場合がある 一度吸着してしまっただけでは回収できない
吸着防止試薬を添加	有機溶媒：MeOHやMeCN等 有機溶媒以外ではTweenやCHAPS* ¹ 等の界面活性剤の添加、BSA* ² の添加も効果的な場合あり	吸着防止としては高い効果が期待できる 一度吸着してしまっただけでも回収可能（有機溶媒）	メソッドの変更が必要になる 結合試験の手法によっては使いにくい？

*1 CHAPS:3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonate, *2 BSA: Bovine Serum Albumin

- ・材質変更で済むならばその方がベター
- ・メソッド変更が最低限で済むならば吸着防止剤添加が確実

手法ごとの非特異的吸着の回避方法

評価手法	回収率低下の原因	対処法
平衡透析法*	<ul style="list-style-type: none"> 容器壁面への吸着 平衡化中で不安定 	<ul style="list-style-type: none"> 低吸着容器、チップの使用 採取容器に溶媒やマトリックスを添加 高タンパク結合率が問題の場合はpresaturation法を用いることも可能
限外ろ過法	<ul style="list-style-type: none"> ろ過膜への吸着 捕集容器への吸着 	<ul style="list-style-type: none"> ろ過膜の吸着抑制に、界面活性剤を浸潤させる 低吸着容器、チップの使用 採取容器に溶媒やマトリックスを添加（捕集容器への吸着はろ液量が一定とならないと対応が難しい）
超遠心法	<ul style="list-style-type: none"> 遠心容器への吸着 容器壁面への吸着 	<ul style="list-style-type: none"> 低吸着容器、チップの使用 採取容器に溶媒やマトリックスを添加（溶媒等の添加ができないため、遠心容器への吸着対策は難しい）

*平衡透析法は、透析膜や平衡時の容器への吸着はタンパク結合率の結果に影響がないことが大きな利点

Journal of Pharmaceutical Science, Vol.101, No.3, March 2012

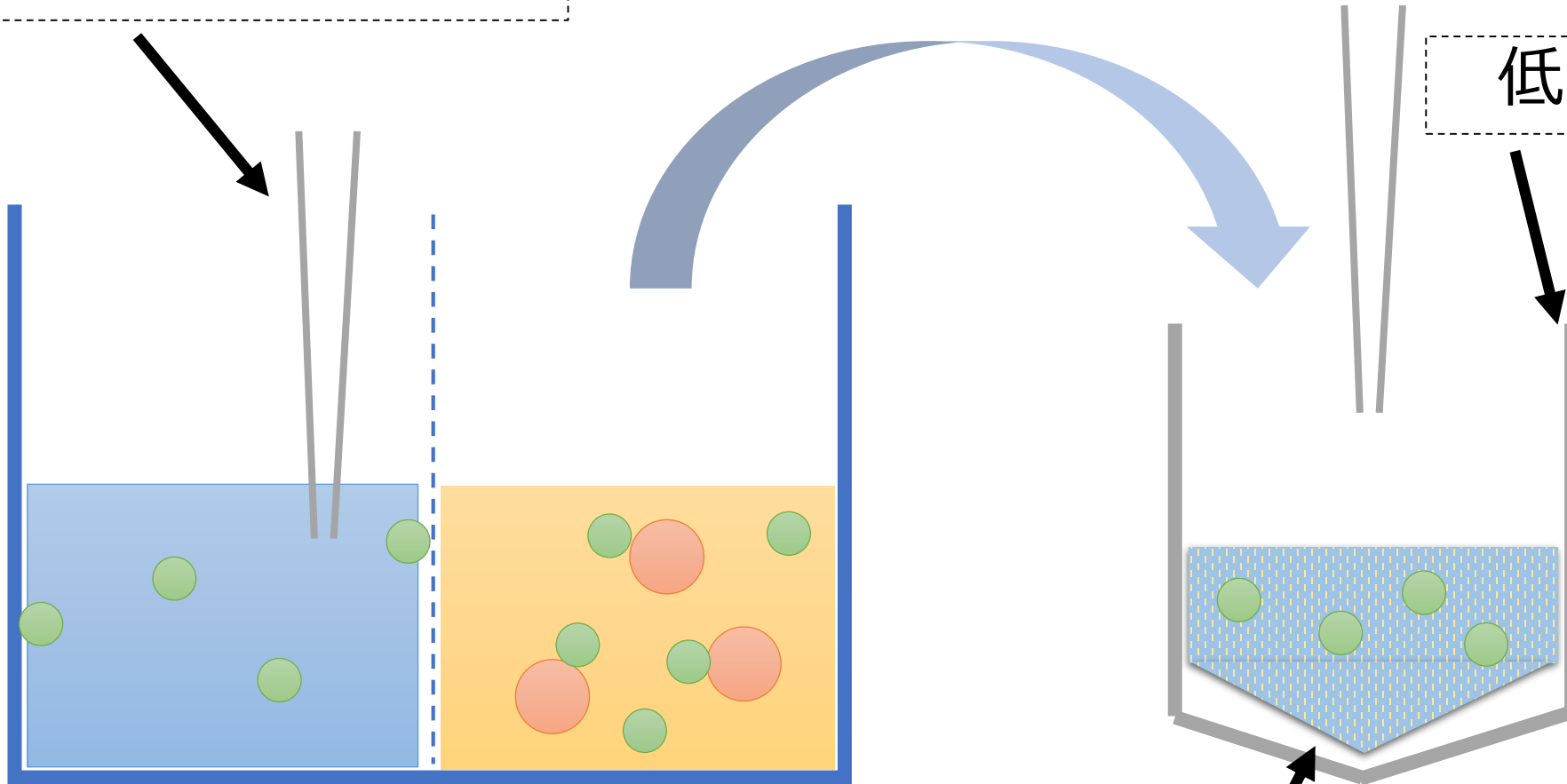


非マトリックス試料の吸着回避方法

低吸着チップの使用

移しかえ

低吸着容器の使用



有機溶媒

界面活性剤

血漿/血清

or

or

吸着防止剤の添加

<http://bioanalysisforum.jp/>



実施方法に関するアンケート

アンケート概要

DGメンバー内の議論を通して、さらに実態調査が必要と考えられた項目について、アンケートを実施した。

アンケート概要：

対象： JBFパートナー各社（非個人）

実施期間： 2019年10月21日 ～ 11月8日

回答率： 73.9%

設問数： 39問

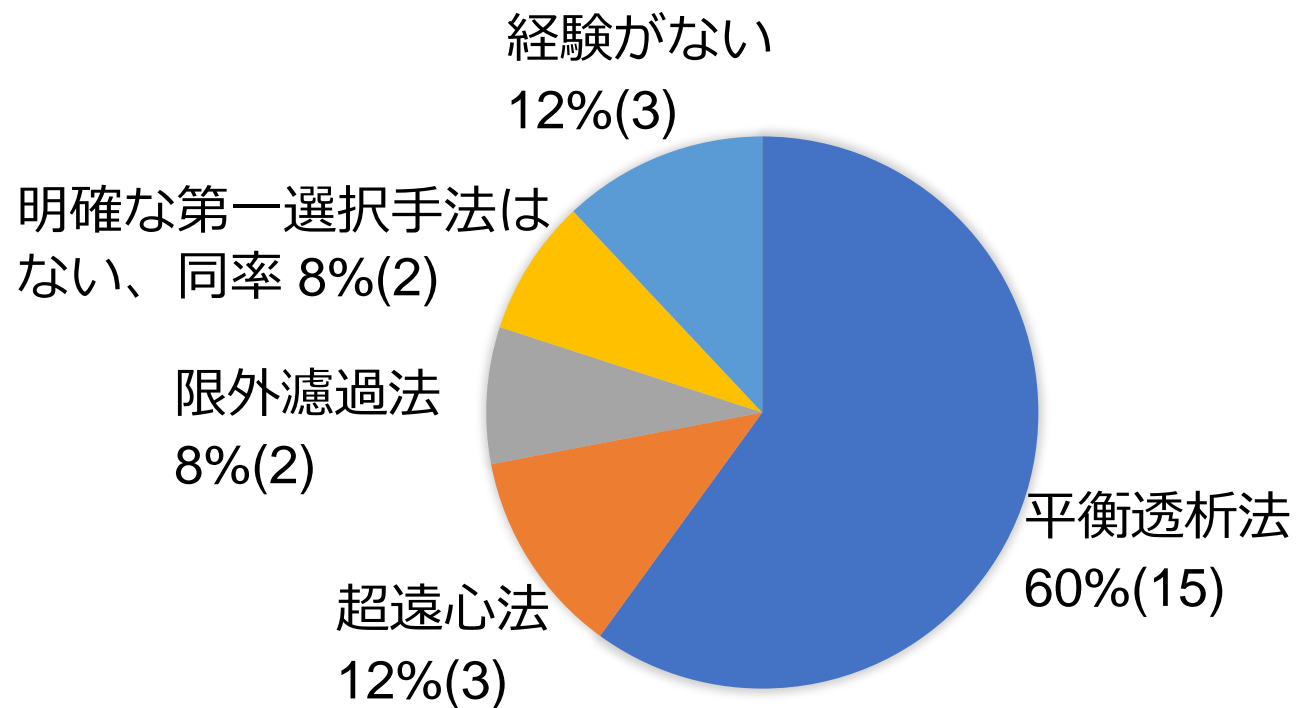
設問内容：

- ・ 各開発ステージにおけるタンパク結合率評価の第一選択手法
- ・ ニューモダリティー（低分子以外）への対応
- ・ 測定試料の調製方法
- ・ バリデーション項目とクライテリア
- ・ 使用マトリックス 血漿 or 血清, 凍結 or 非凍結,
- ・ データ採用基準

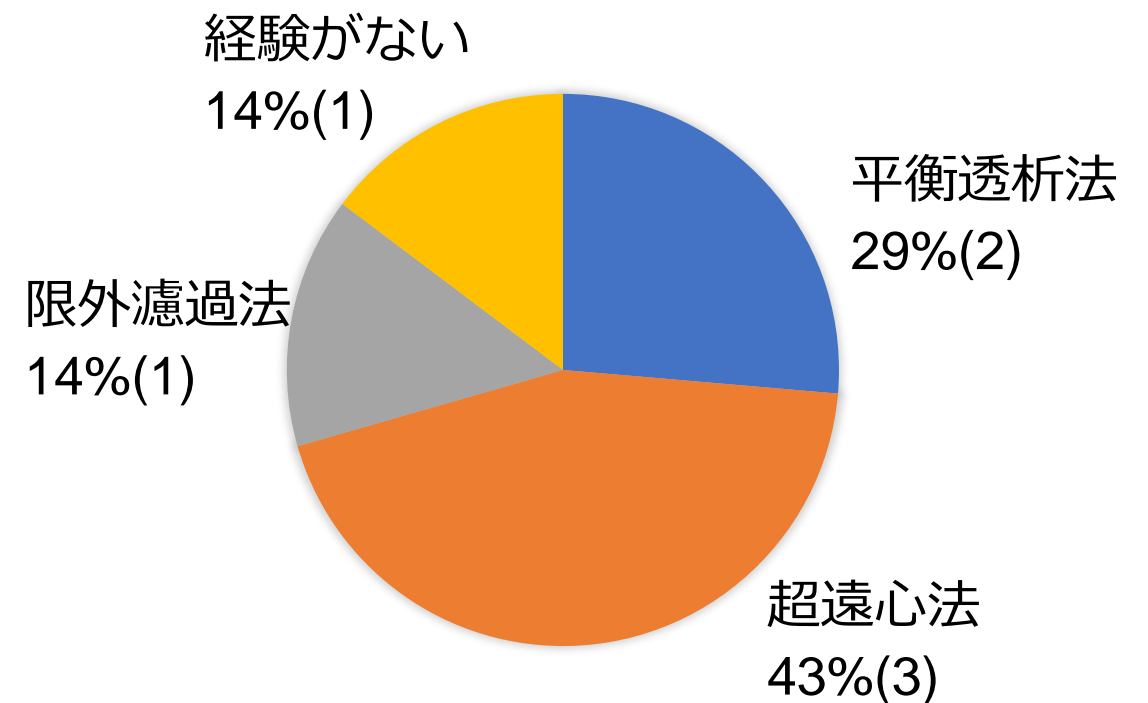
【アンケート】 スクリーニング段階での第一選択手法

Q.スクリーニング段階での第一選択手法または最も経験のある手法は？

製薬メーカー



CRO



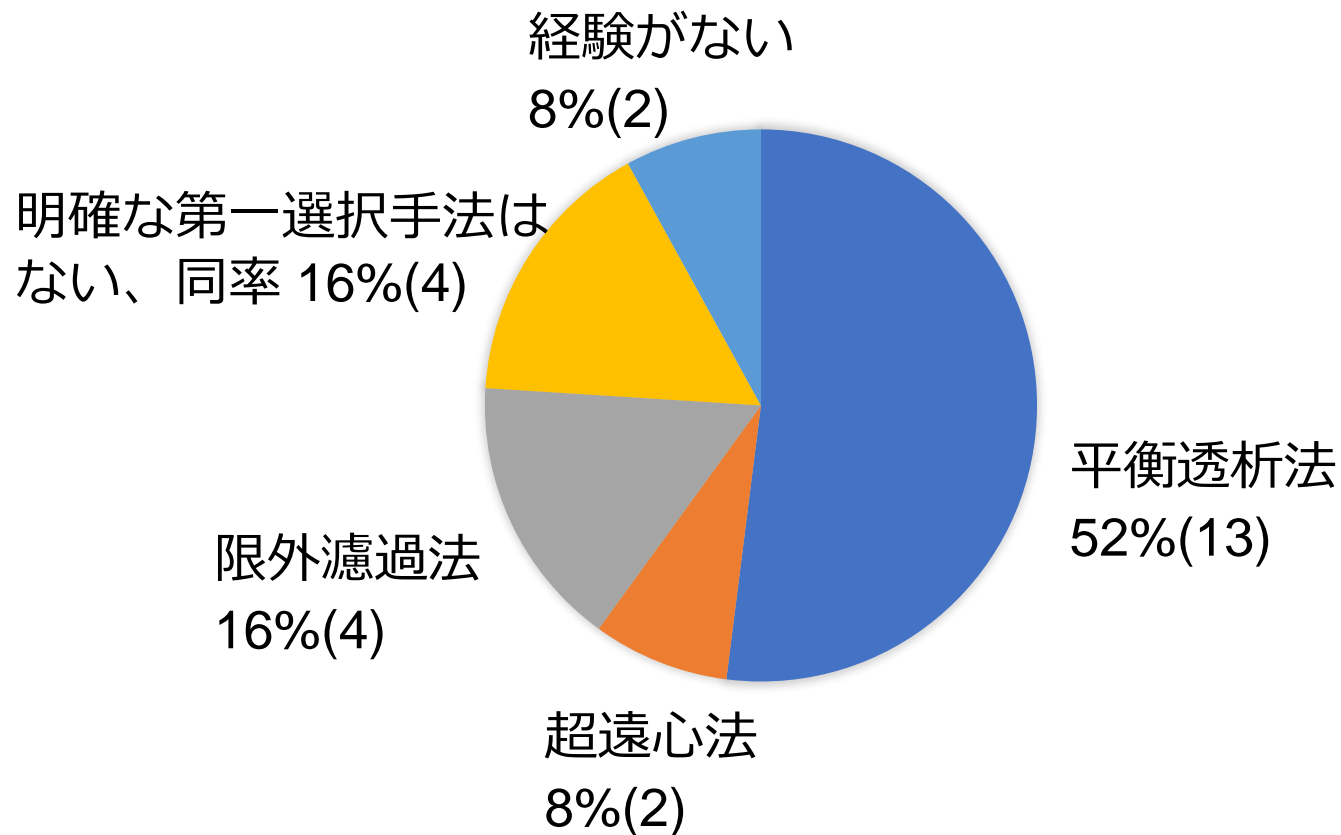
スループットの高い平衡透析法を半数以上が選択していた。
→多検体評価に優れる点が理由の一つとして考えられる。

- ・ 96well型プレート
- ・ 自動分注機による自動化

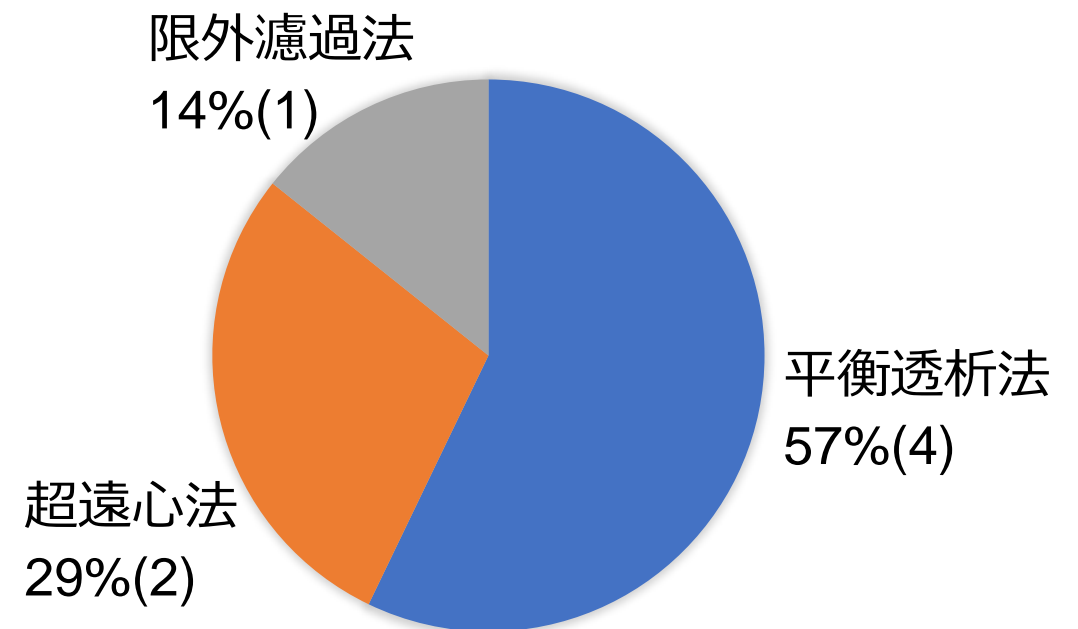
【アンケート】 承認申請段階での第一選択手法

Q.承認申請段階での第一選択手法または最も経験のある手法は？

製薬メーカー



CRO

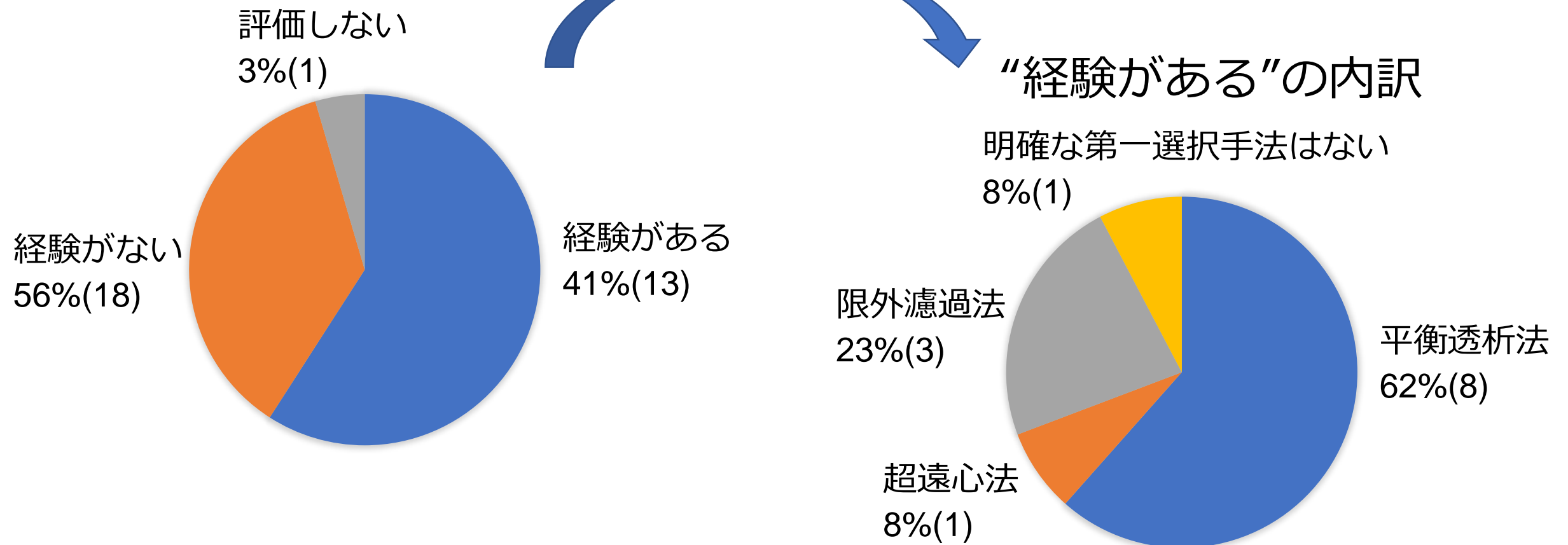


半数の企業が平衡透析法を選択していた。
手法の選択比率はスクリーニング段階での比率と類似していた。
理由として、スクリーニングで使用した方法の踏襲や平衡透析法が吸着の影響を受けづらいことが考えられる。

【アンケート】

肝・腎障害臨床試料での第一選択手法

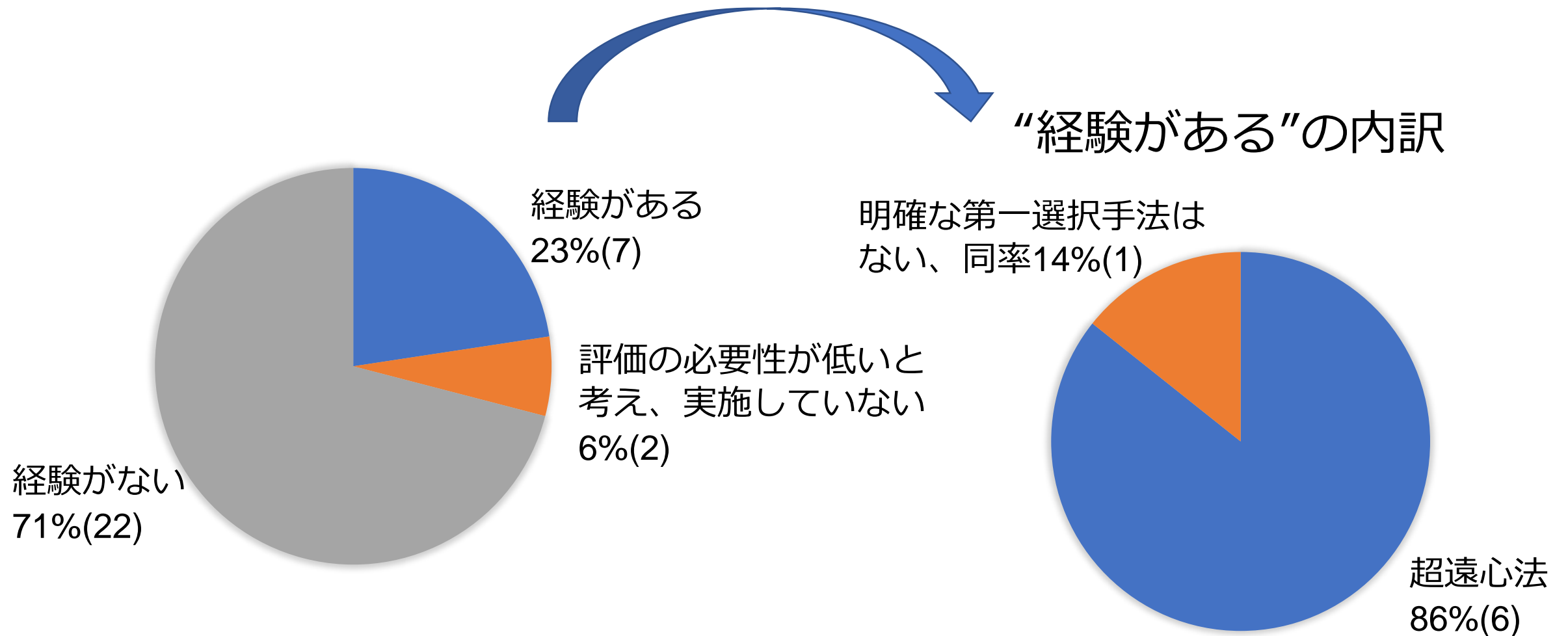
Q.肝・腎障害臨床試料での第一選択手法または最も経験のある手法は？



実施経験がない企業が半数を超えていた。
経験がある企業では平衡透析法が多く、スクリーニング・承認申請段階における選択比率と同程度だった。

【アンケート】 ニューモダリティの第一選択手法

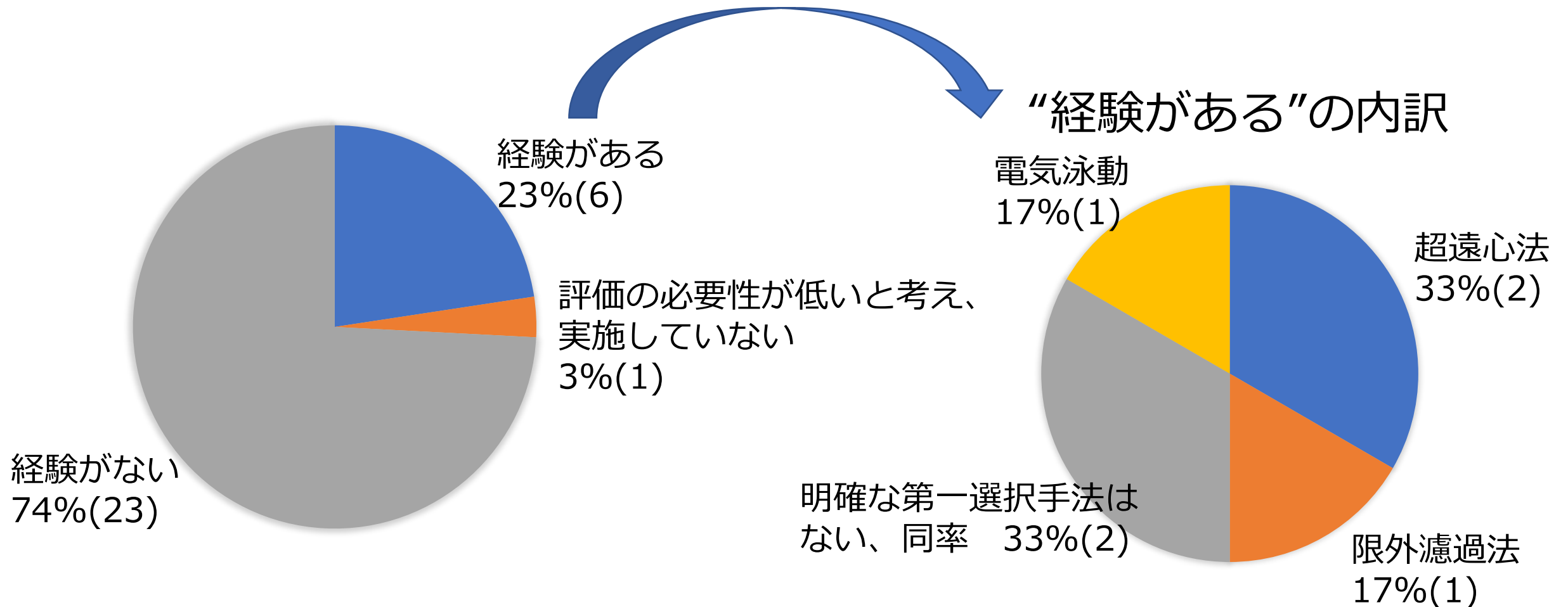
Q.ペプチド医薬品の第一選択手法または最も経験のある手法は？



実施経験がない企業が半数を超えていた。
ペプチド医薬品は分子量の大きさから平衡透析法が選択
されていないと考える。

【アンケート】 ニューモダリティの第一選択手法

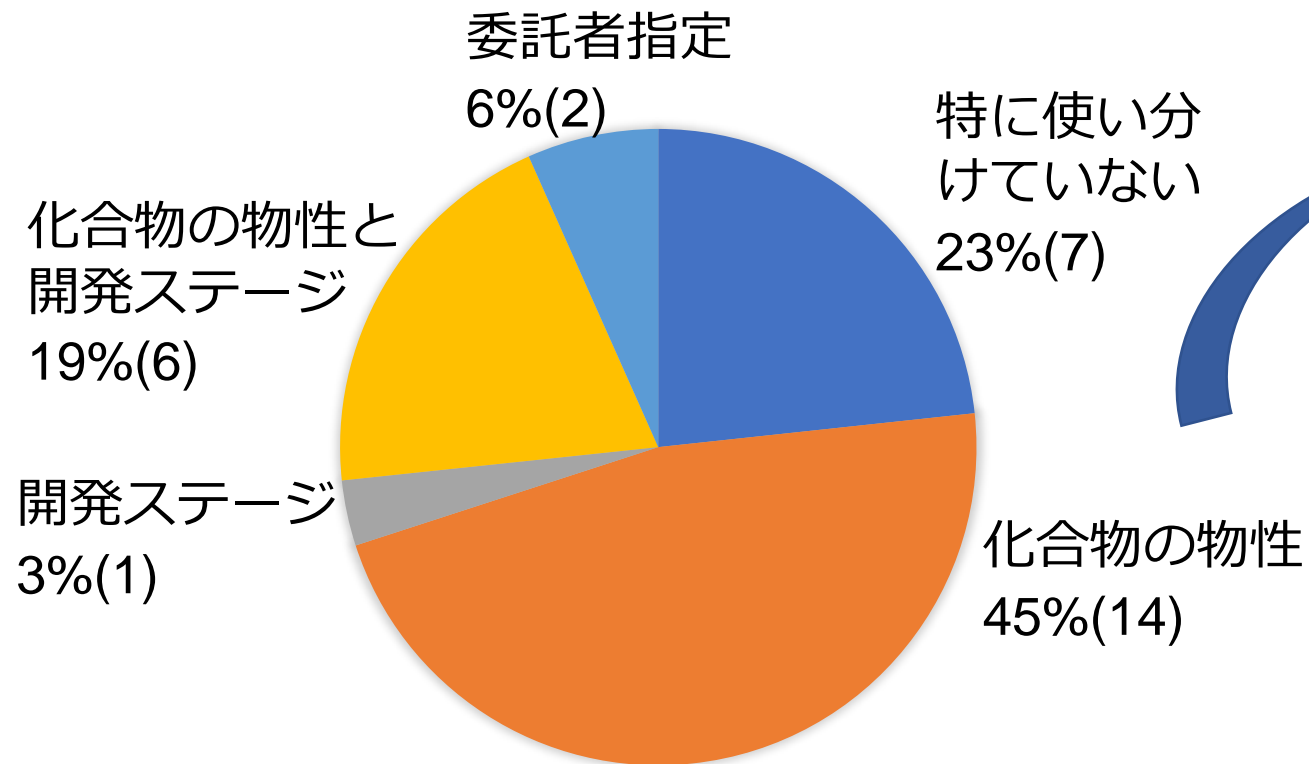
Q.核酸医薬品の第一選択手法または最も経験のある手法は？



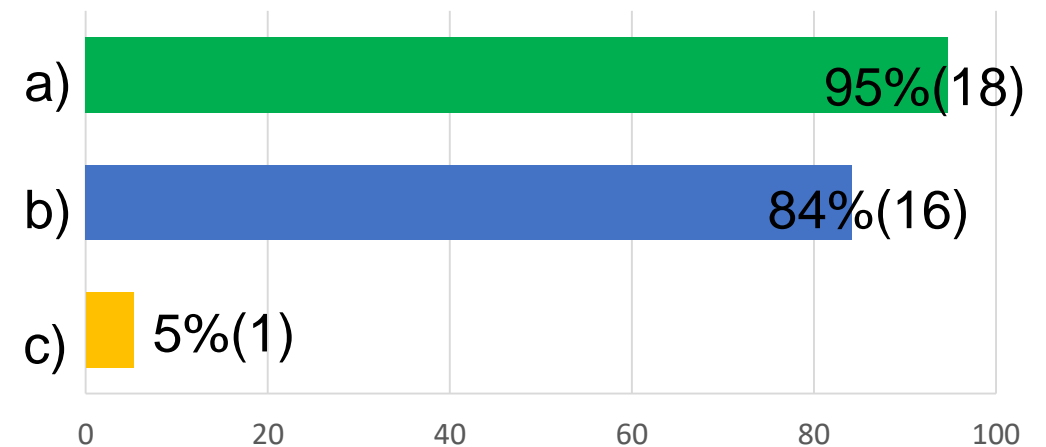
実施経験がない企業が大半だった。
核酸医薬品は骨格や修飾によって物性が大きく異なるので、
最適手法を一概に選択するのは難しい印象。物性として非特異的吸着
が大きい場合があるため、前述の回避法やDG2018-36（LC-MSによ
る核酸医薬品の定量）などを参考にして頂きたい。

【アンケート】 試験方法の使い分け

Q. 血中タンパク結合試験の評価手法をどのように使い分けていますか？



考慮する物性は？



吸着と血漿（血清）中安定性は多くの企業が注意しており、中には抗凝固剤とpHを考慮している企業もいた。
※pHは別でアンケートを実施。

- a) 容器やデバイスへの非特異的吸着
- b) 血漿（血清）中安定性
- c) その他（pH、抗凝固剤）

血漿中不安定な薬物の評価方法

血漿中不安定な薬物のタンパク結合率を評価する場合、以下の方法で代謝酵素の活性を抑えるのが有用である。

- ①代謝酵素の阻害剤添加
- ②低温条件下

代謝酵素の阻害剤を添加する場合に必要な項目

- ・代謝酵素の特定
- ・阻害剤濃度の検討
- ・阻害剤が試験化合物のタンパク結合に影響を及ぼすか

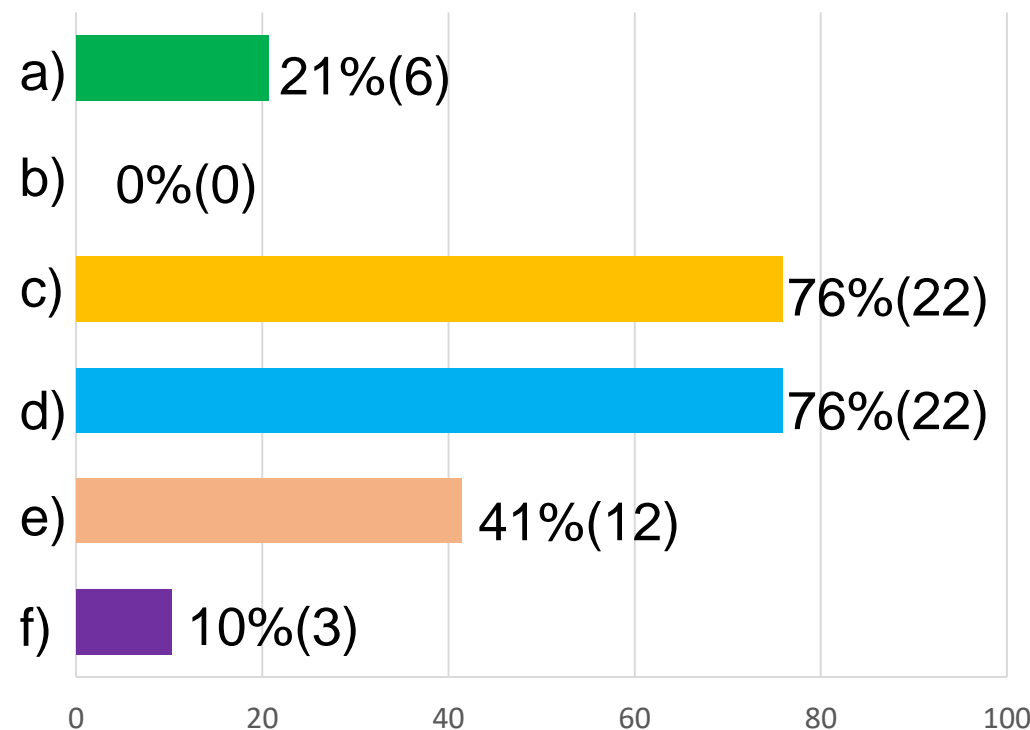
低温条件下での試験

- ・阻害剤添加より簡便に試験できる
- ・平衡透析法の場合、平衡に達する時間が長くなる。

【アンケート】

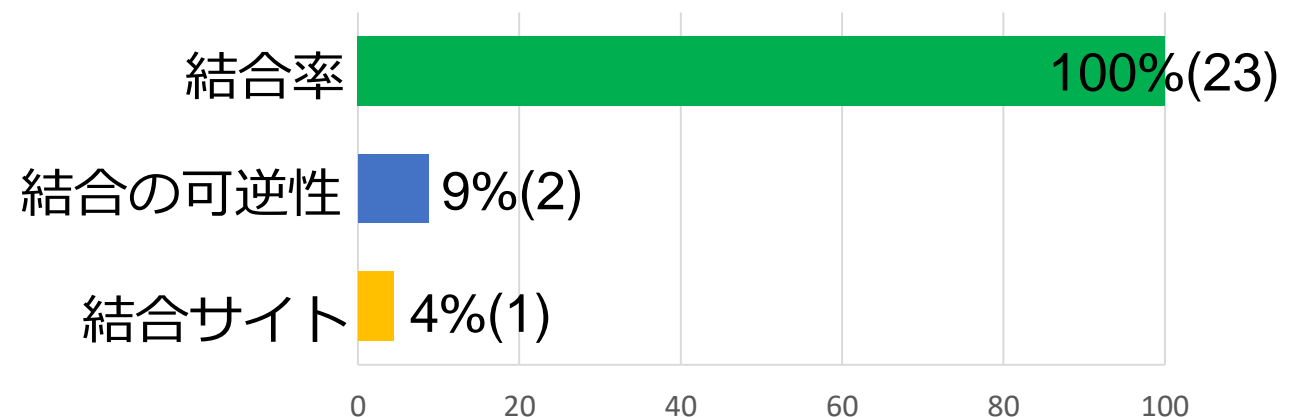
承認申請において評価する血漿タンパク質

Q.承認申請段階において、結合率が高い場合どのようなタンパク質との結合を評価しますか？



- a) 結合タンパク種の評価経験がない
 b) 物性値から推測し、実データは取得しない
 c) ヒト血清アルブミン
 d) α1酸性糖タンパク質 (AGP)
 e) γグロブリン
 f) その他 (リポタンパク質)

結合タンパク種の評価内容は？



血漿タンパク質を評価する場合、ほとんどの企業でアルブミンとAGPを試験しており、結合率の算出を行っていた。アルブミンは血中に多量に存在するため、AGPは塩基性薬物の開発が多いためだと考えられる。

タンパク結合時の評価濃度範囲

DGメンバーでの議論

Q.タンパク結合評価時の設定濃度範囲をどうしているか？

DGメンバー内では...

ヒト予測 C_{max} を含む公比10の3点で実施しているケースが多かった。
毒性試験の濃度域まで試験しているケースもあった。

Q.動物種間で設定濃度範囲は揃えているか？

DGメンバー内では・・・

動物種間で設定濃度範囲は揃えているという意見で一致した。

測定試料の調製方法

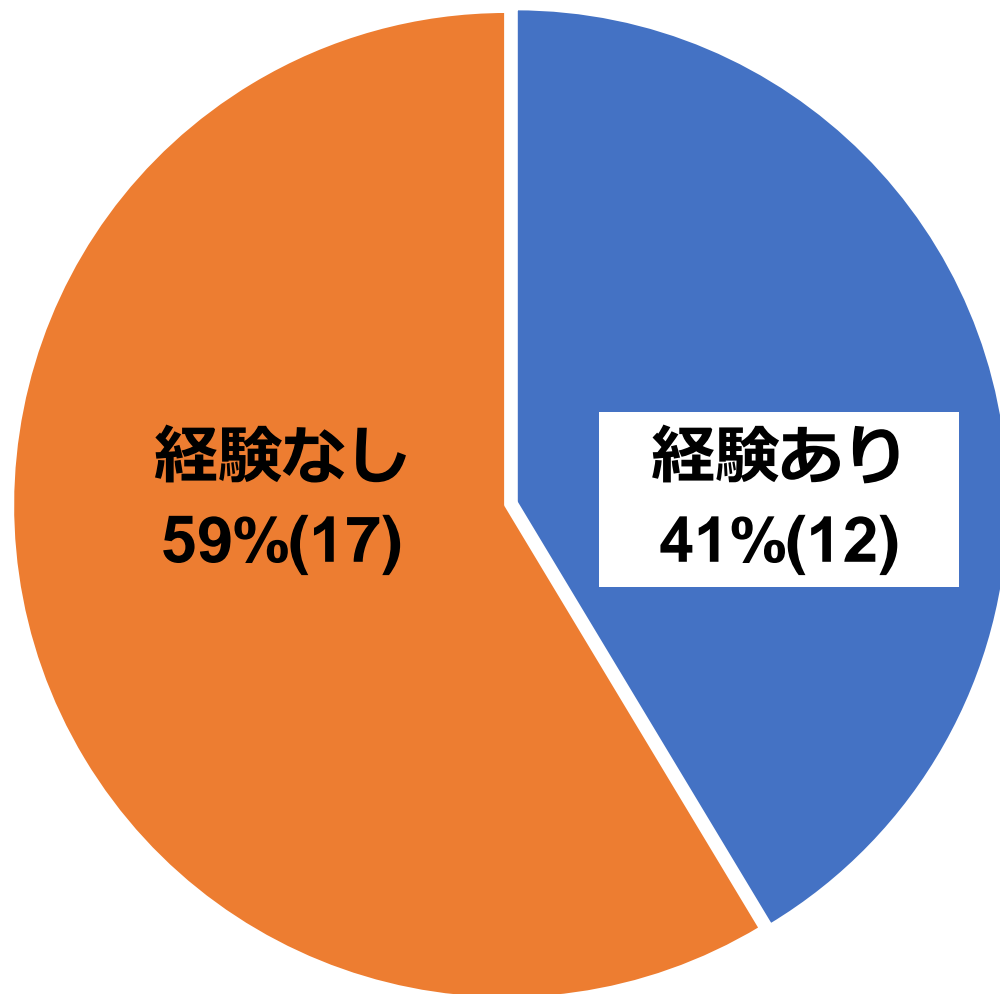
「フリーフラクション」及び「トータルフラクション」という用語は以下の意図で使用しています。

フラクション名	サンプル名
フリー フラクション試料	<ul style="list-style-type: none"> • PBS • バッファーチャンバー試料（平衡透析法） • 遠心上清試料（超遠心法） • 濾液試料（限外濾過法）
トータル フラクション試料	<ul style="list-style-type: none"> • ブランク血漿，血清等 • サンプルチャンバー試料（平衡透析法） • 遠心前試料（超遠心法） • 濾過前試料（限外濾過法）

【アンケート】

フリー・トータルフラクションの混合

Q:フリーフラクション試料とトータルフラクション試料を混合して測定した経験がありますか？

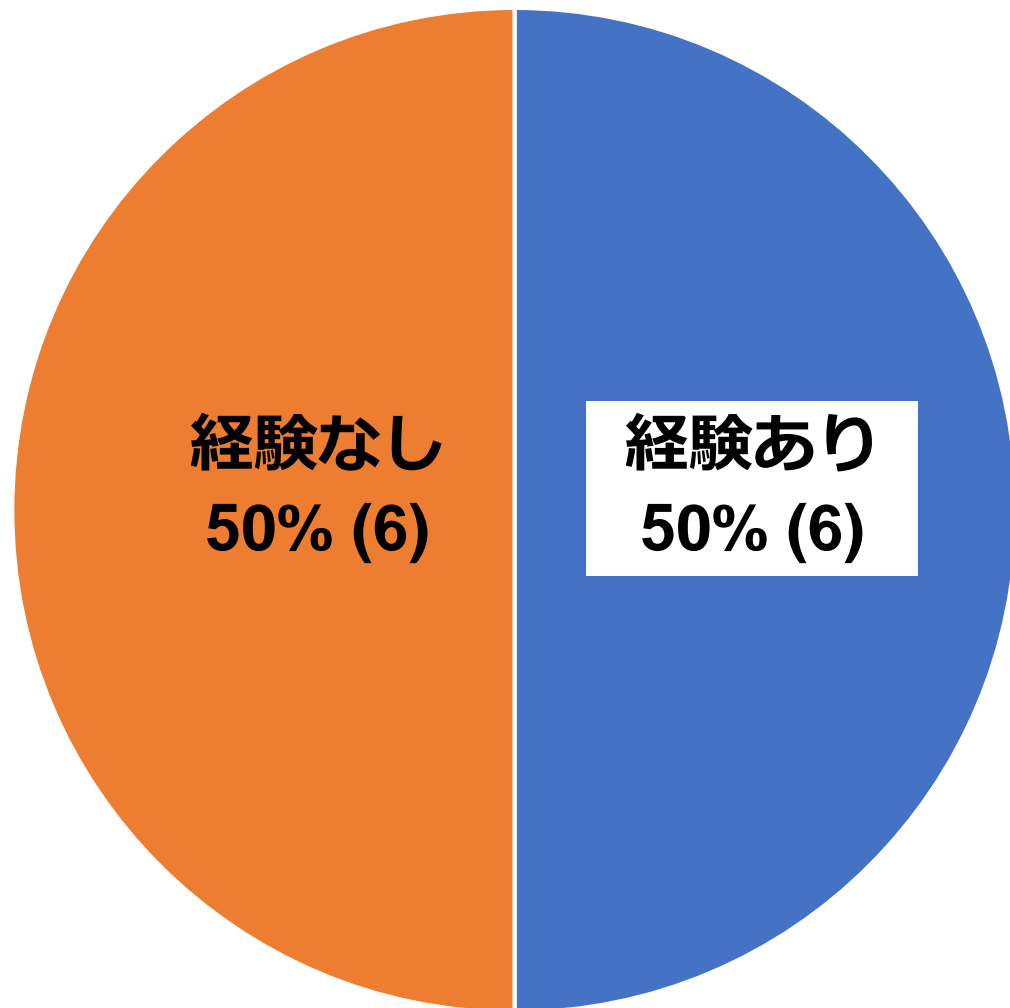


約60%の施設でフリーフラクション試料とトータルフラクション試料の混合経験なしという回答となった。

本DGではフリーフラクション試料とトータルフラクション試料を混合する方法についてのメリット、デメリットを交えながら紹介する。

【アンケート】 動物種間の混合

Q:複数の動物種・ヒト血漿（血清）のタンパク結合を同時に評価する場合、異なる動物種のマトリックスを混ぜて測定した経験がありますか？



フリーフラクション試料とトータルフラクション試料の経験あり(12)の施設のうち半数の施設で複数マトリックスを混合している回答となった。

複数マトリックスを混合することでバリデーションの省力化が期待できる。
任意の混合比で混合することで、定量値をコントロールすることが可能

【アンケート】 希釈に用いるマトリックス

Q:測定時に高濃度のサンプルを希釈する場合、どのように希釈していますか？

その他 11% (3)
(有機溶媒を混合(1), どちらの手法も使用(2))

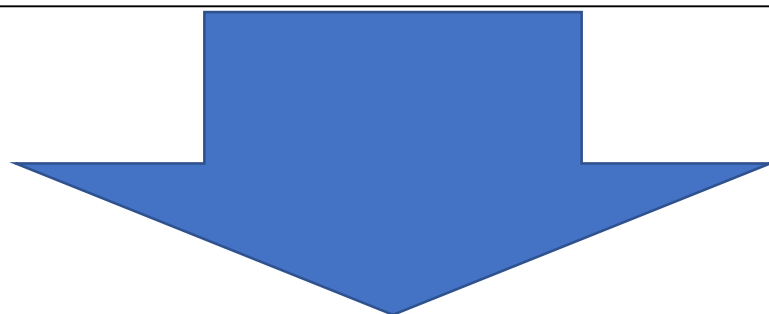
ブランクトータル,
ブランクフリー混液で希釈 32% (9)

フリーフラクション試料とトータルフラクション試料混液で希釈することで非特異的吸着を防止
有機溶媒を混合することも吸着防止に有効

トータル, フリー
それぞれで希釈
50% (14)

フリーフラクション試料とトータルフラクション試料を混合する例

分析手法	: 平衡透析法
分析対象マトリックス	: ヒト血漿, ラット血漿, イヌ血漿
タンパク結合率	: 88.9%
試料濃度	: 1000 ng/mL



平衡透析後試料をヒト血漿／ラット血漿／イヌ血漿／PBS
(1 : 1 : 1 : 3, v/v/v/v) [血漿 : PBS = 1 : 1]の比率になるよう混合

	混合なし		混合あり
トータルフラクション濃度	900 ng/mL	$\xrightarrow{1/6}$	150 ng/mL
フリーフラクション濃度	100 ng/mL	$\xrightarrow{1/2}$	50 ng/mL
必要定量範囲	50-1000 ng/mL	$\xrightarrow{\text{レンジ}1/2}$	20-200 ng/mL

フリーフラクション試料とトータルフラクション試料を混合する例

メリット

- フリーフラクション試料とトータルフラクション試料を混合かつ複数マトリックスを混合することで1~数マトリックスとして扱うことが可能となる。それにより、**バリデーション作業の大幅削減**が期待される。
- 複数マトリックスを任意の比率で混合することで、**幅広い検量線範囲が不要**となる。（希釈操作の削減が期待される）
- フリーフラクション試料はトータルフラクションと混合することで**非特異的吸着の防止**が期待できる。

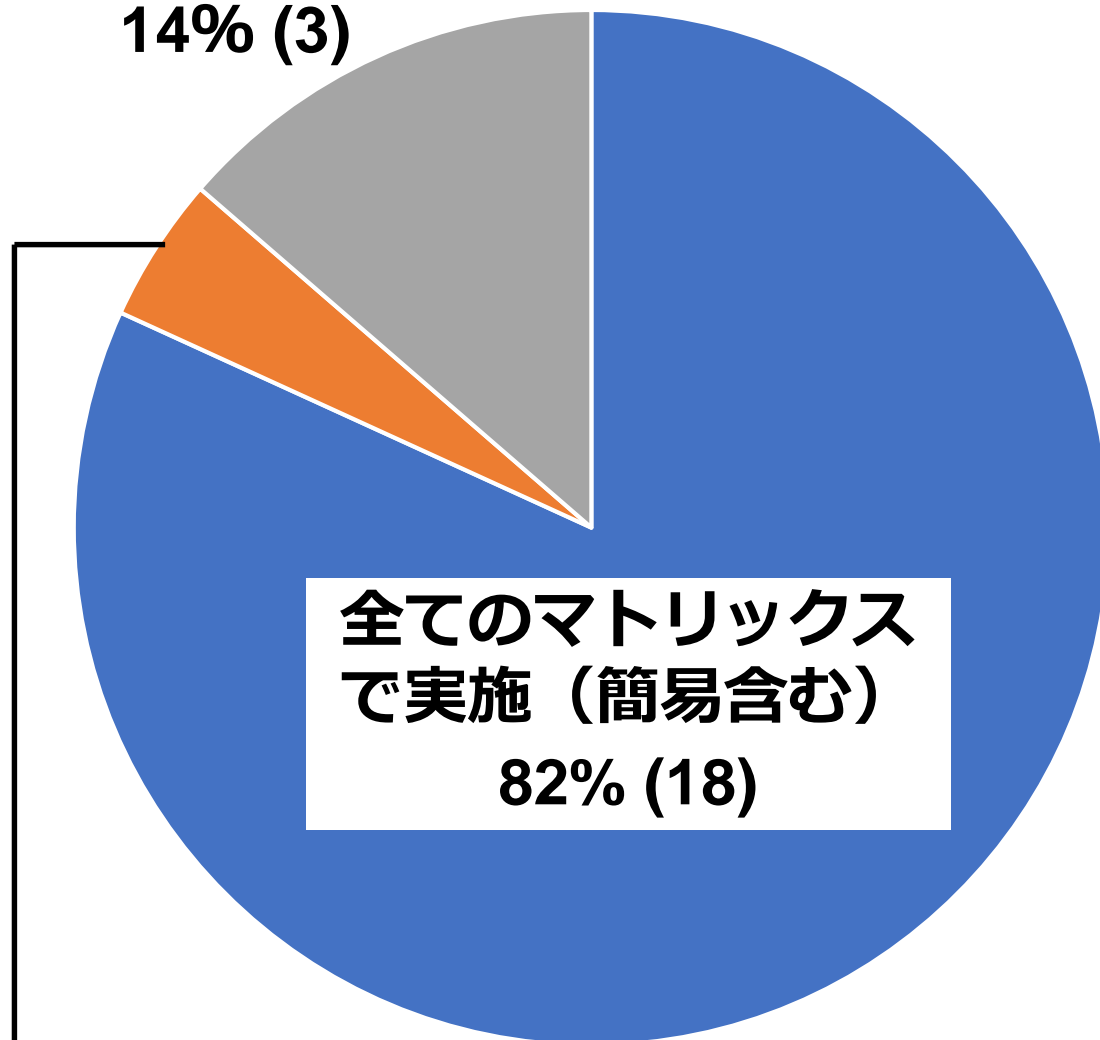
デメリット

- フリーフラクション試料とトータルフラクション試料を混合（複数マトリックスを混合）によりサンプルが希釈されるため、**特に結合率が高い化合物では分析法の高感度化が求められる**。
- 各種マトリックスの**使用量が増加**する。

【アンケート】 分析法バリデーションの実施

Q:承認申請試料への掲載を目的としたタンパク結合試験において、非放射性標識体を用いる際に分析法バリデーションを実施していますか？

実施していない
14% (3)



全てのマトリックス
で実施（簡易含む）
82% (18)

ヒト血漿（血清）のみ
実施している 5% (1)

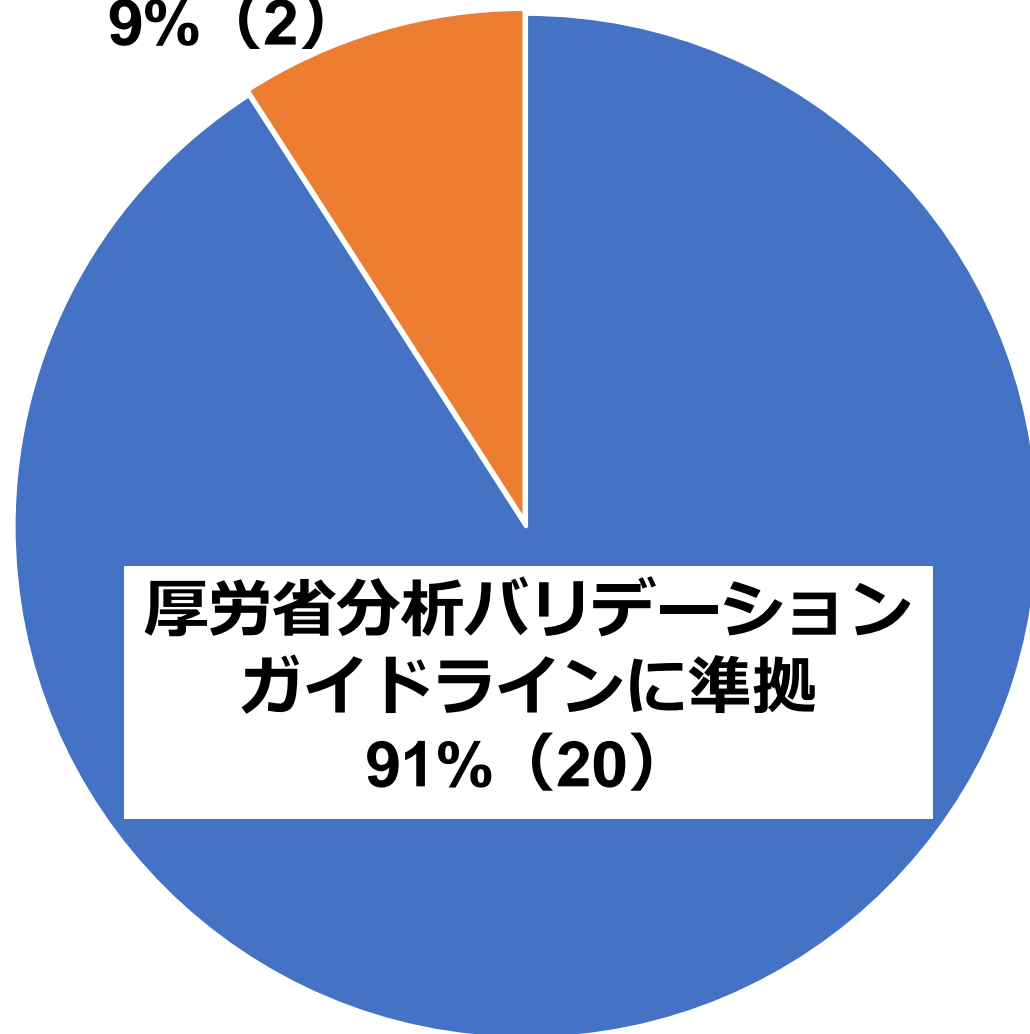
大多数の施設で分析法バリデーション（簡易を含む）を実施している結果となった。

タンパク結合試験においても分析法バリデーションは実施することが望ましい。

【アンケート】 分析法バリデーションのクライテリア

Q:バリデーションにクライテリアを設けていますか？

社内基準に準拠
9% (2)



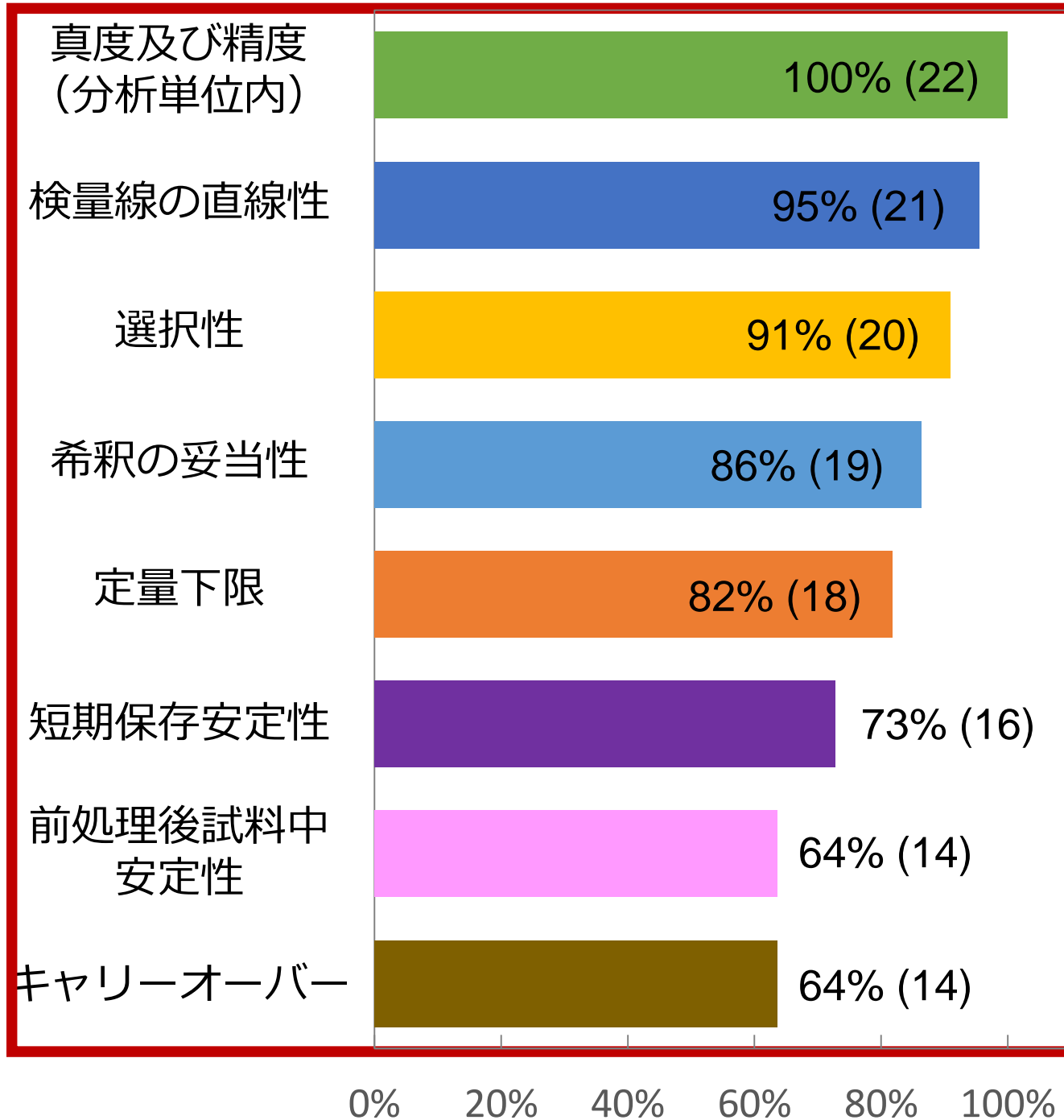
厚労省分析バリデーション
ガイドラインに準拠
91% (20)

大多数の施設で厚労省分析バリデーションガイドラインに準拠している結果となった。

特別な事情を除きガイドラインに準拠することが望ましい。

【アンケート】 バリデーション項目 (1)

Q : バリデーションで必要と思われる項目を選択してください【複数選択可】



真度及び精度 (分析単位内)

検量線の直線性, 選択性

希釈の妥当性, 定量下限

短期保存安定性

前処理後試料中安定性

キャリアオーバー

についてはバリデーション項目と

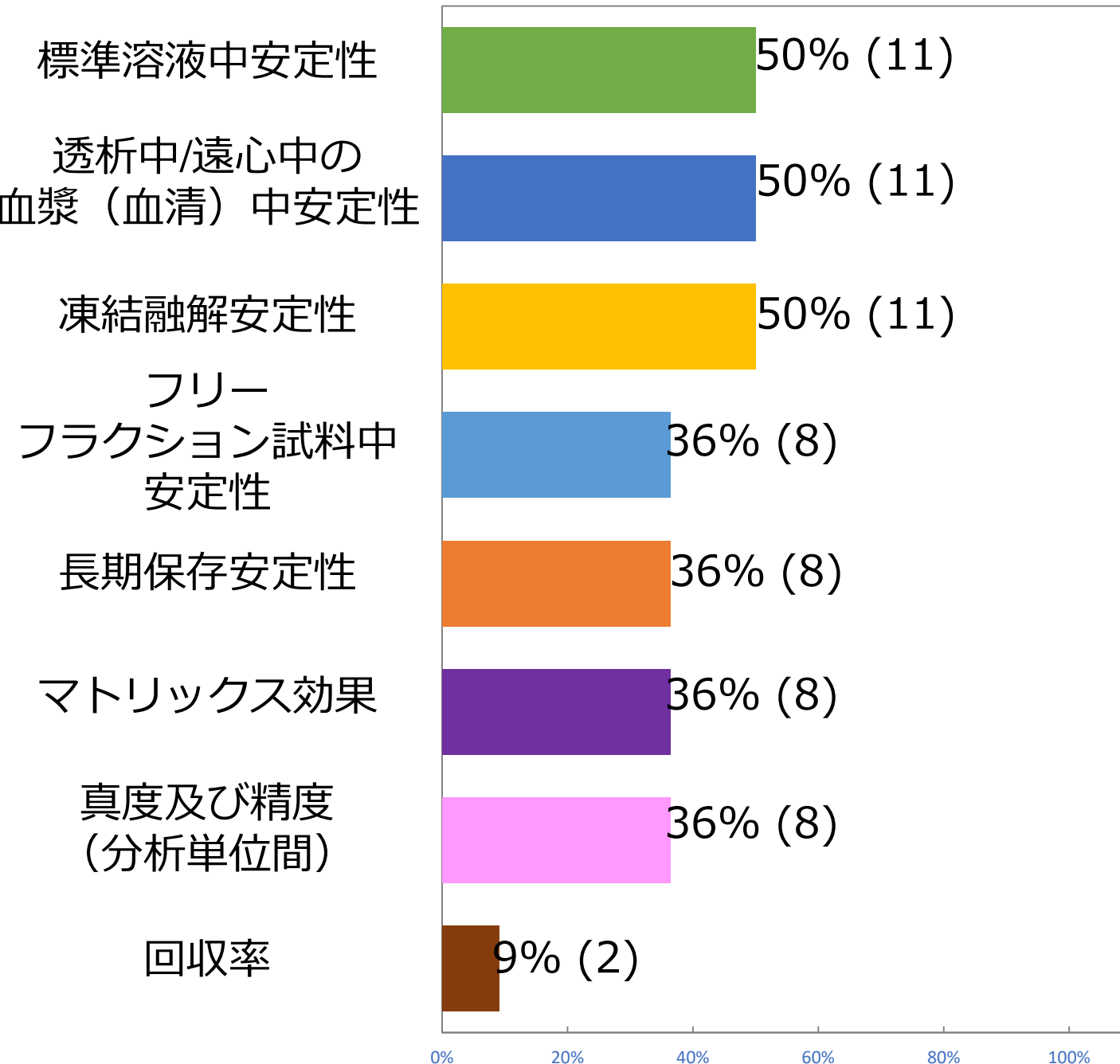
して実施することを推奨する。

その他の項目については必要に応

じて実施するのが望ましい。

【アンケート】 バリデーション項目 (2)

Q：バリデーションで必要と思われる項目を選択してください【複数選択可】



一部のバリデーション項目については、特定の条件下で省略可能と考えられる。

【定量下限】 定量値がQC-L以上になるようにサンプルを調製*

【キャリアオーバー】 サンプルを低濃度順に測定*

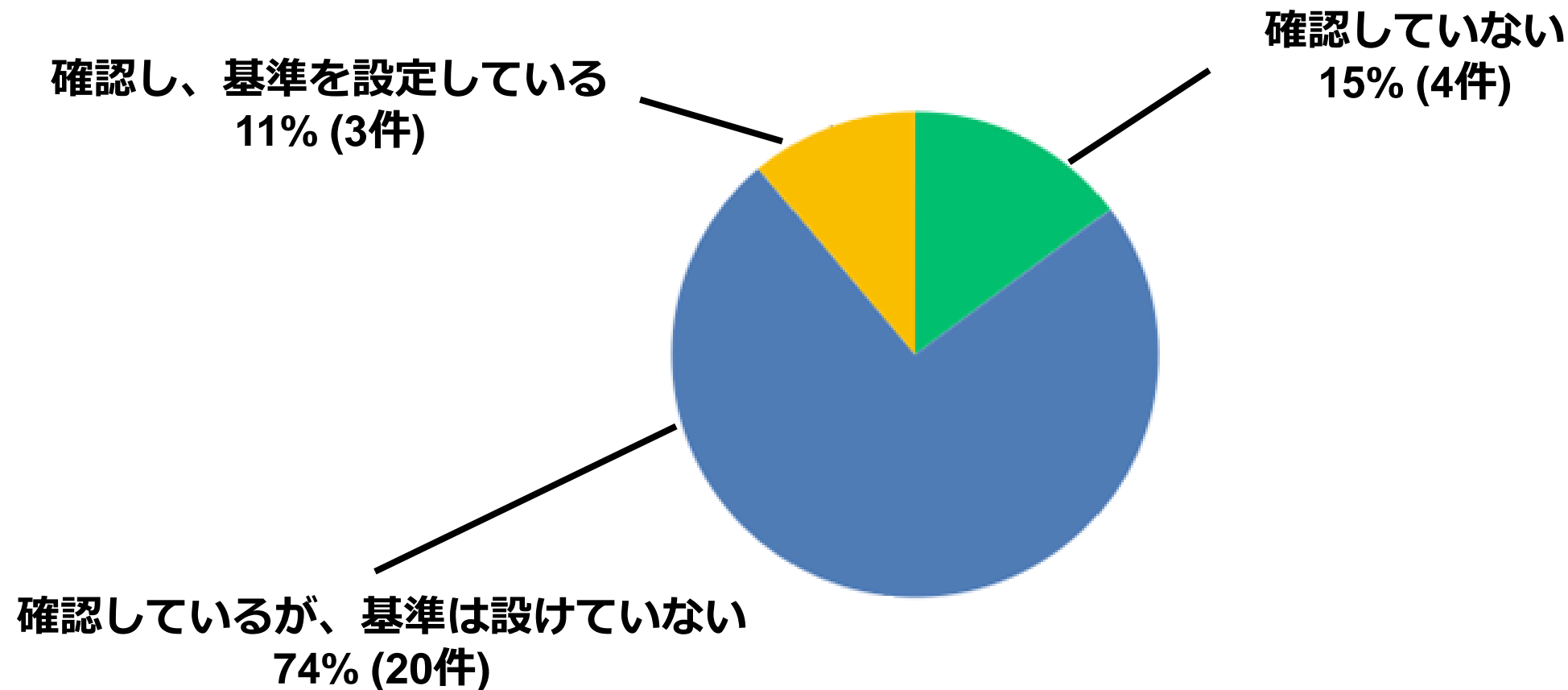
【各種安定性】 用時調製で実施

*タンパク結合率評価は結合率から定量値の予測が可能

【アンケート】

フリー試料の非特異的吸着の影響（回収率）確認

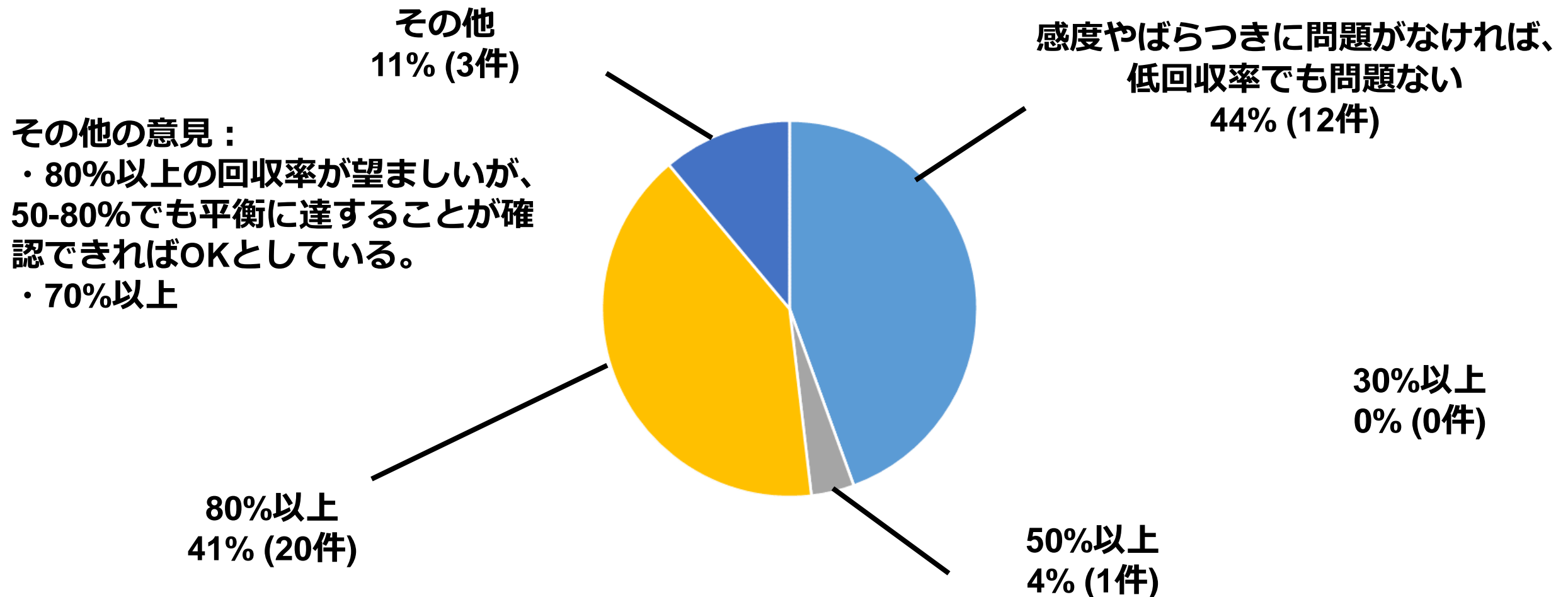
Q: タンパク結合試験において、フリー試料の非特異的吸着の影響確認（透析／遠心／濾過後試料中の被験物質回収率）についてどのように対応していますか？【択一】



フリー試料の非特異的吸着の影響は、確認しているが基準は設けていない施設が多かった。気になるので確認はするが、基準の設定根拠がない、あるいは設定不要と考えているため、基準は設けていないと考えられる。

【アンケート】 非特異的吸着の影響（回収率）のクライテリア

Q:基準値,あるいは算出された結合率が採用可能と考えられる被験物質回収率を教えてください。【択一】

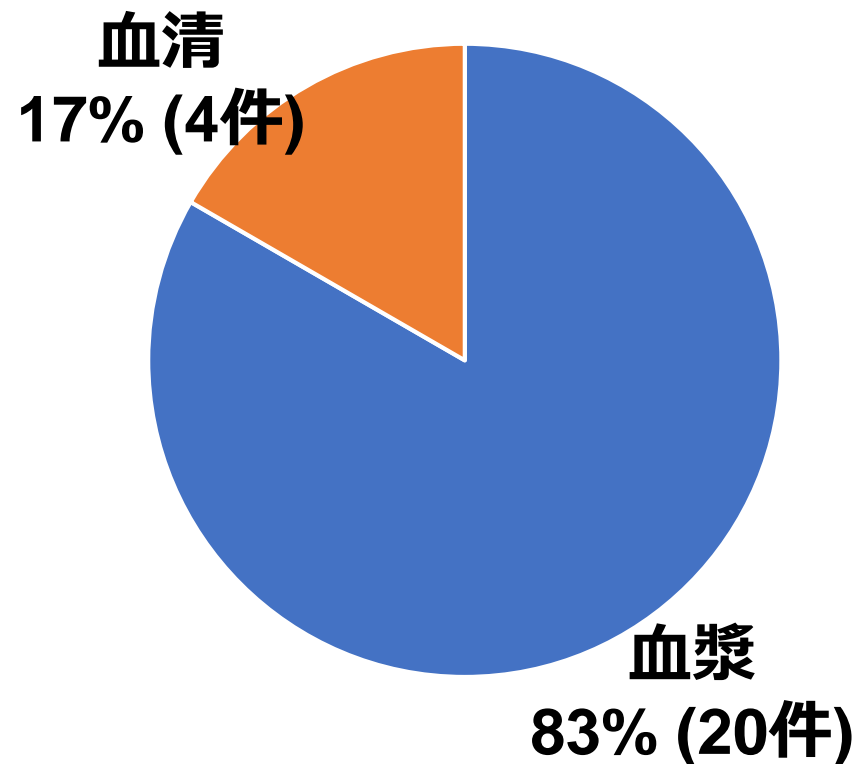


基準は設けないか、設けるなら80%以上としている施設が多かった。80%もおそらく根拠はなく、一般的な分析法開発時と同様に80%以上あれば安心という経験則的なものと考えられる。

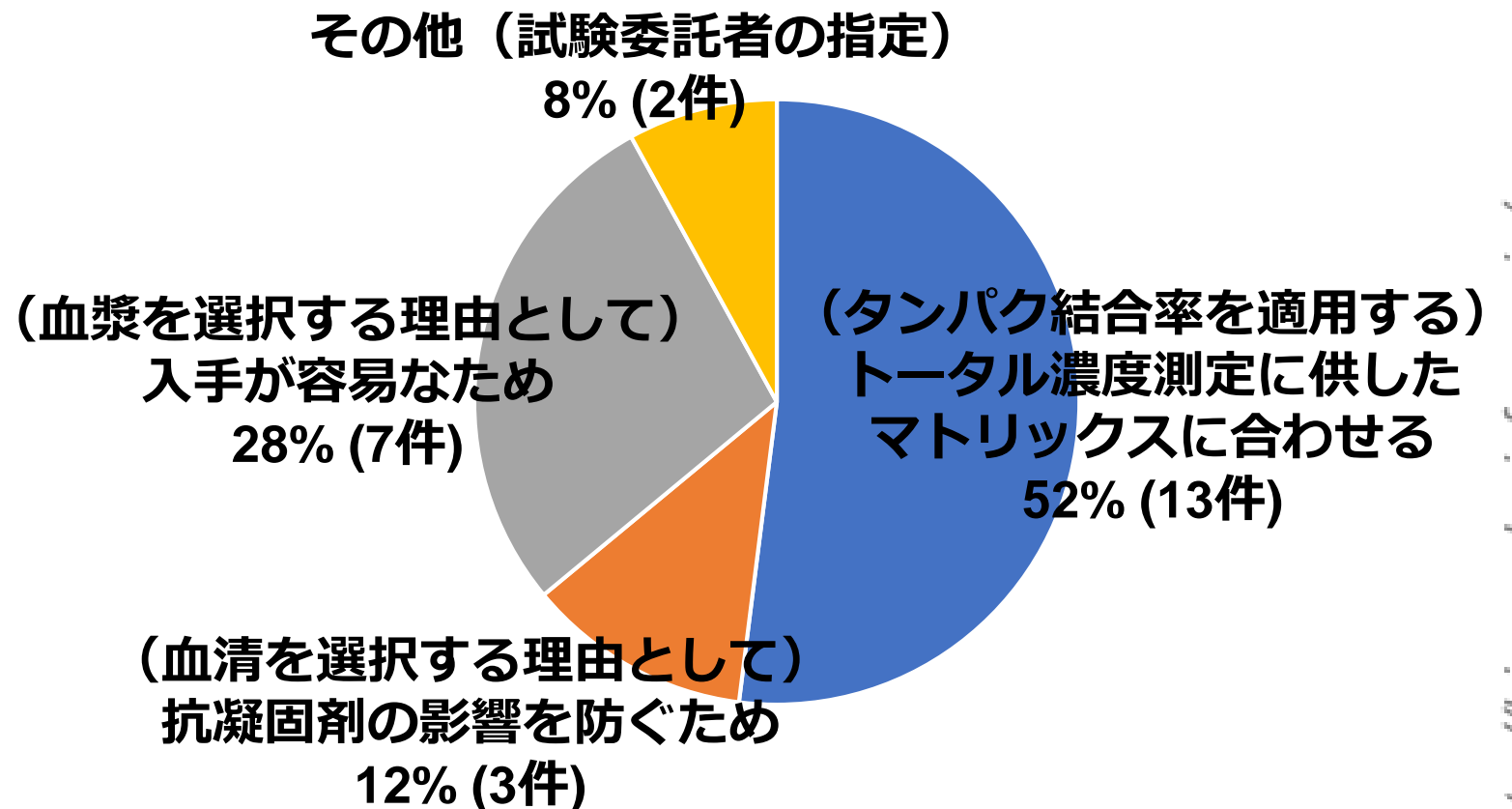
【アンケート】

血中タンパク結合率評価に使用するマトリックス

第一選択とするマトリックス



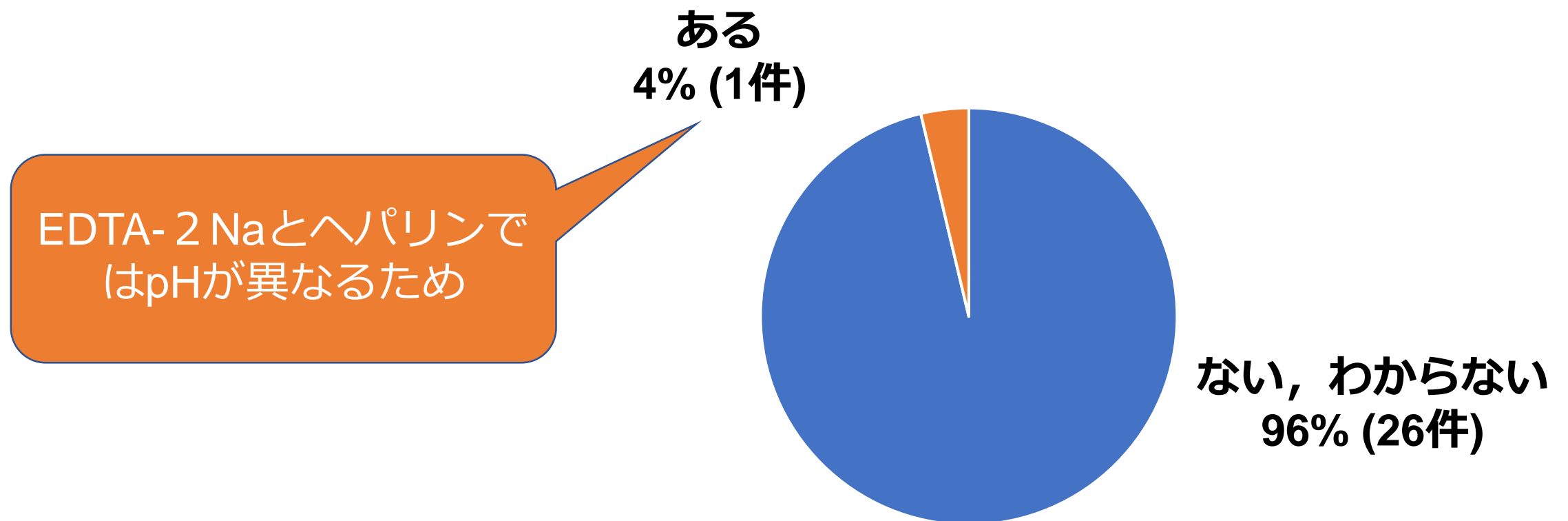
選択理由



トータル濃度測定に供したマトリックスに合わせて選択するという回答が多かった。取り扱いの容易さから一般的にトータル濃度の測定に血漿を用いられることが多いため、タンパク結合評価にも血漿を用いるという回答が多かったと考えられる。

【アンケート】 マトリックス中の抗凝固剤による影響

使用する抗凝固剤の種類によって血漿タンパク結合率が異なった経験がありますか？



EDTA等の抗凝固剤を含む血漿を用いる場合、pHの変動によりタンパク結合率の結果に影響したという回答があった。ヘパリンなどのpHへの影響の少ない抗凝固剤を選んだり、事前にpHを調整するなどのケアをすることが望ましいと考えられる。

血漿・血清間のタンパク結合率の差

Table 1. Protein Binding of Each Drug in Plasma and Serum

Drug	Concn, mg/L	Plasma		Serum	
		FF, % ^a	Leak, % ^b	FF, % ^c	Leak, %
Phenytoin	15	5.44 ± 0.65	0.16 ± 0.01	8.42 ± 0.35	0.15 ± 0.02
Carbamazepine	8	25.96 ± 2.37	0.15 ± 0.03	19.85 ± 1.53	0.16 ± 0.01
Sodium valproate	75	7.17 ± 0.65	0.16 ± 0.01	8.42 ± 0.35	0.15 ± 0.02
Phenobarbital	25	50.40 ± 8.70	0.15 ± 0.01	58.79 ± 2.49	0.17 ± 0.03
Theophylline	15	35.83 ± 1.14	0.16 ± 0.02	28.19 ± 1.72	0.18 ± 0.03

Each value is the mean ± SD (n = 10).

^a Free fraction. ^b Protein leakage through the membrane. ^c All values are significantly different ($P < 0.05$) from FF in plasma.

Table 2. Protein Content and Other Physiological Differences between Plasma and Serum

	Mean (SD) concn, g/L				
Albumin	α_1 -Acid glyco-protein	Trans-ferrin	Total protein	Free fatty acids, mmol/L	pH
Plasma					
47.25 (0.89)	0.587 (0.168)	3.10 (0.20)	95.20 (4.29)	0.50 (0.07)	7.95 (0.10)
Serum					
47.08 (0.67)	0.595 (0.235)	3.03 (0.45)	94.75 (0.86)	0.48 (0.02)	8.18 (0.10)

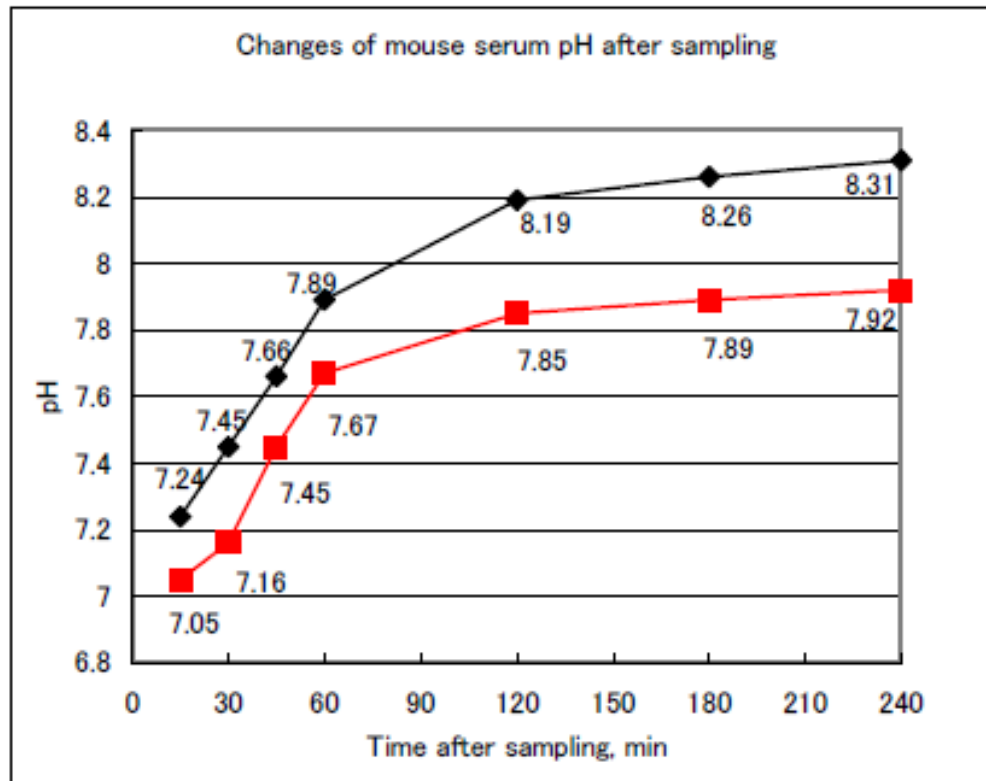
n = 5, each.

血漿と血清間で結合タンパクの組成は大きな差はない。

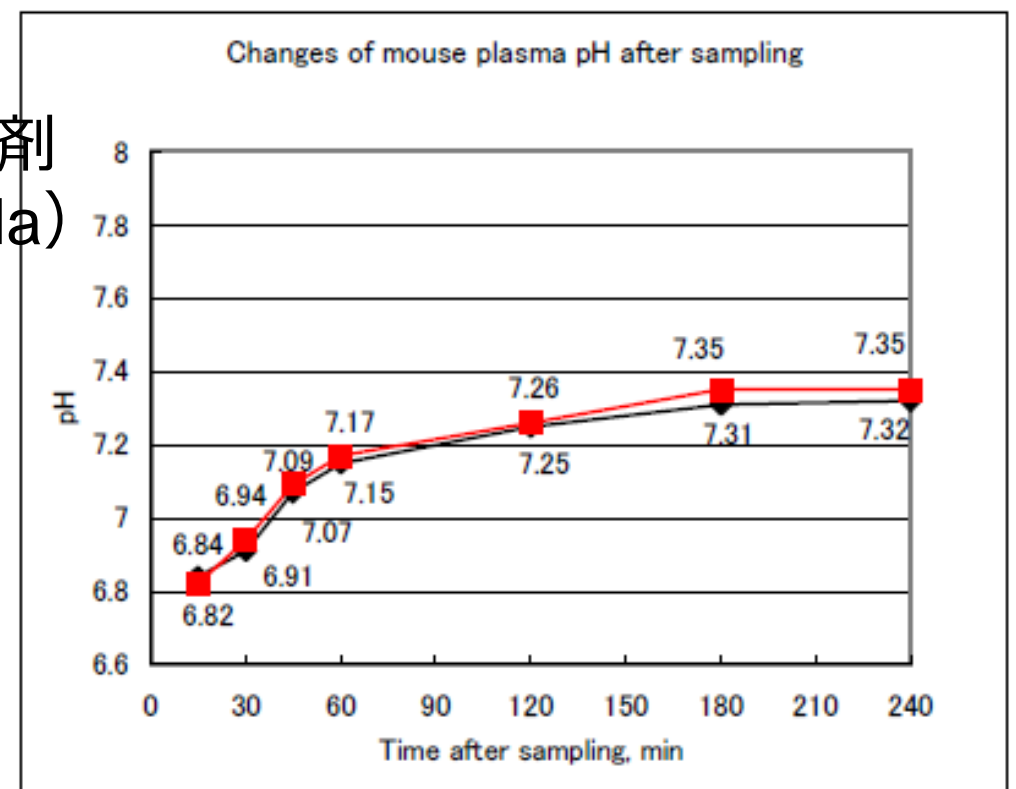
ただし一部の化合物においては血漿・血清間でタンパク結合率に差があり、その理由としてEDTAを抗凝固剤に使用した場合のpH差が挙げられている。

血漿・血清間のpHの差

血清



血漿

(抗凝固剤
EDTA-2Na)

上図は冷蔵・静置条件で大気中に放置した際のpH変化。
37°C・振盪条件下ではさらに炭酸ガスが失われ、pHが上昇しやすい。

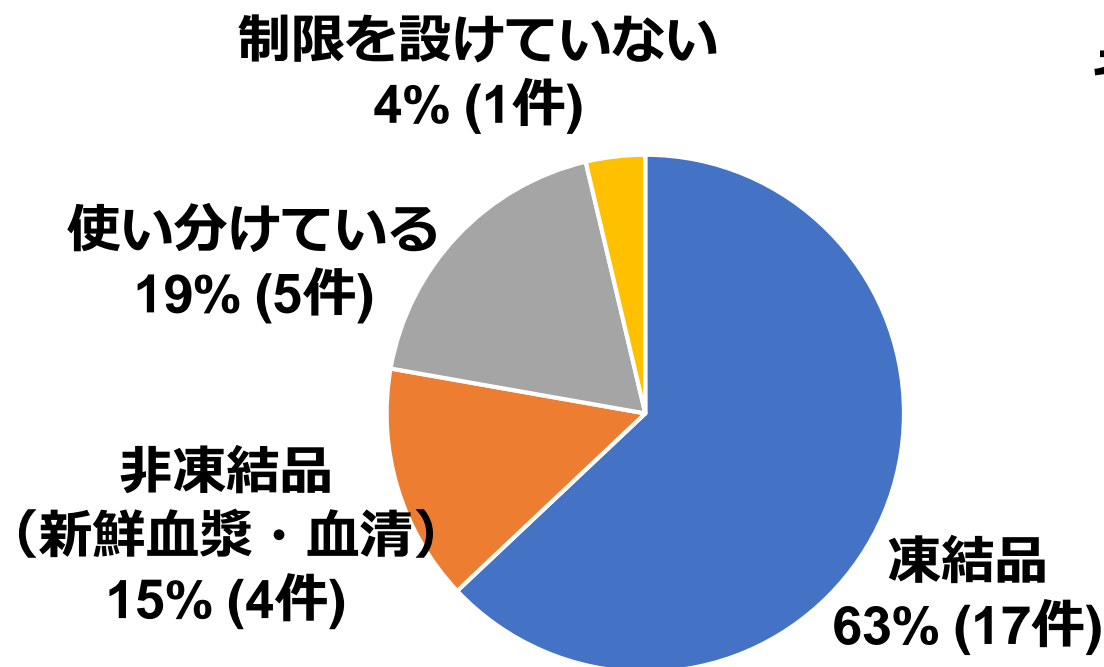
血漿はEDTA-2Naの緩衝作用により、血清と比較してpHが上昇しにくい。ヘパリンを使用した場合は血清と同様の変化になると考えられる。

富士フイルム ワコーシバヤギ株式会社 HP
(<http://シバヤギ.com/shibayagi/wp-content/uploads/2017/03/serumph.pdf>)

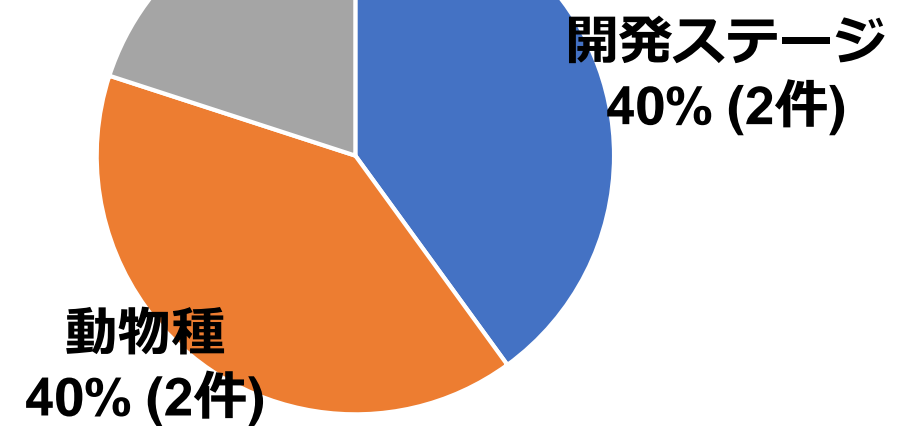
【アンケート】 マトリックスの凍結の有無

使用するマトリックスは凍結品,
非凍結品のどちらですか？

使い分けている場合,
どのように選択していますか？



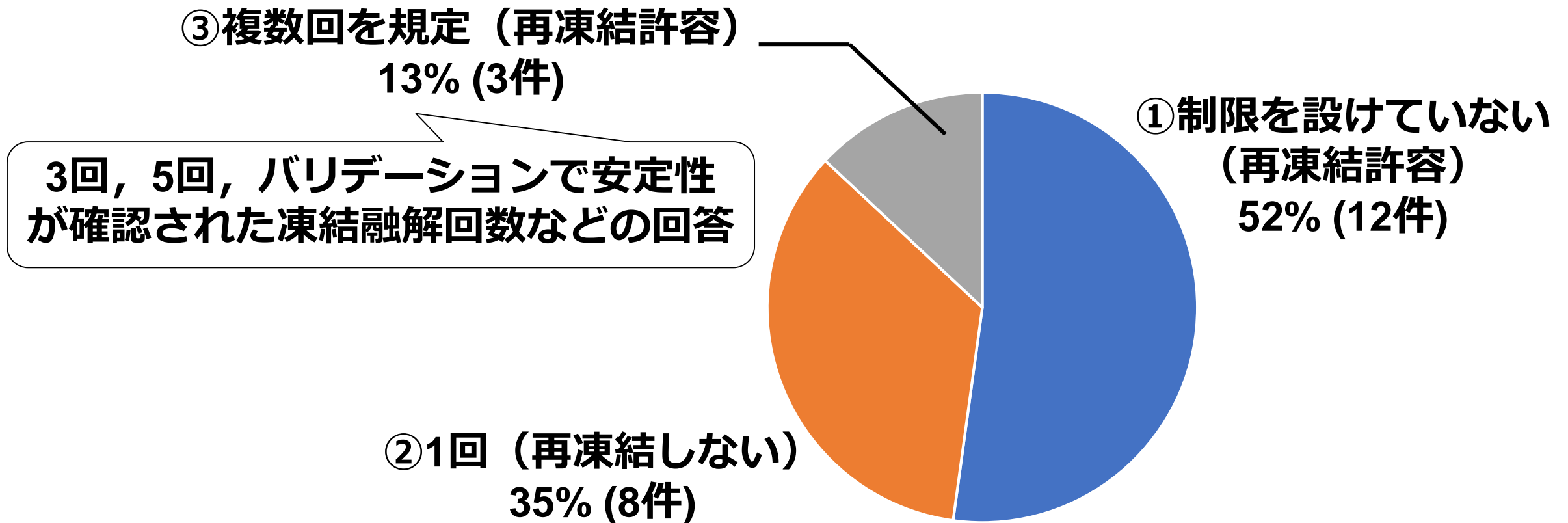
その他 (試験委託者の指定)
20% (1件)



凍結品を使用するという回答が多い。
ただし、マトリックス中タンパクの凍結融解の影響を考慮し、
新鮮血漿・血清を使用するという回答や、スクリーニング評価
時、ヒトを除く評価時は凍結品を使うなどの使い分けをする
という回答もあった。

【アンケート】 マトリックスの凍結融解回数の制限

凍結融解回数を制限している場合はどの程度が妥当と考えますか？



凍結融解の有無については、半数以上（①+③）が許容しているという回答だった。凍結融解回数の制限については、制限するという回答（②+③）と制限しない（①）という回答がほぼ同数だった。

凍結融解によってサンプルに生じる主な変化として、**血漿（血清）タンパク質の変化**および**サンプルpHの上昇**が挙げられる。

血漿（血清）タンパク質の変化

アルブミン濃度は10回の凍結融解までは有意に変化しないという報告*があるが、一般的にタンパク質は凍結融解により構造変化する恐れがある。

Clin Chem Lab Med 2017; 55(7): 967–973

特にゆっくりとした凍結、速やかな融解は影響が大きいいため、結合率評価用のブランクマトリックスはディープフリーザー保管および室温以下での融解を推奨する。

血漿（血清）pHの変化

融解時にサンプル中の炭酸ガスが失われるため、凍結融解の繰り返しにより塩基性に傾いていく。

凍結品を使用する場合にもSOPや試験計画書等で許容する凍結融解回数を制限することが望ましいと考えられる。

【アンケート】

肝障害・腎障害患者におけるタンパク結合評価

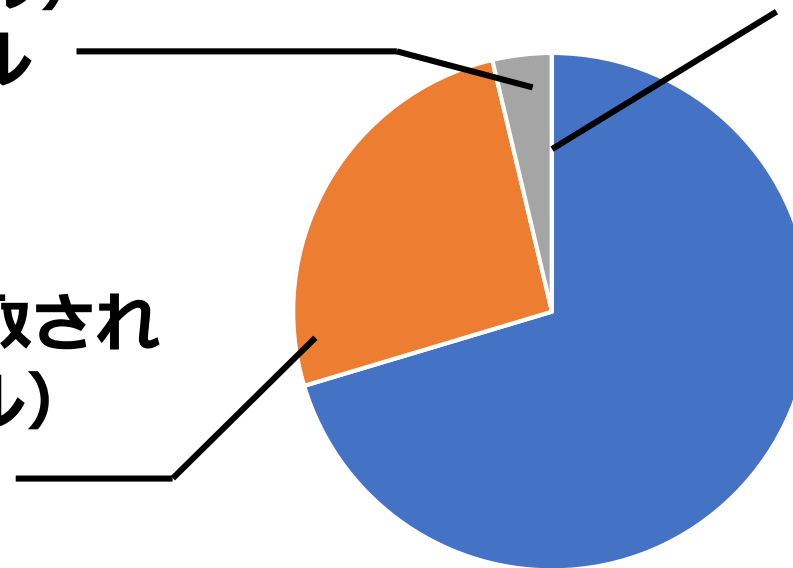
肝障害・腎障害患者由来ヒト血漿（血清）タンパク結合に使用するサンプル

サプライヤから購入した肝障害・腎障害患者由来マトリックスに被験物質を添加したサンプル
0% (0件)

薬剤投与前の被験者から採取されたマトリックス（pre-doseサンプル）に被験物質を添加したサンプル
4% (1件)

薬剤を投与した後の被験者から採取されたサンプル（post-doseサンプル）
26% (7件)

経験がない
70% (19件)



経験なしという回答が多数。経験ありの場合、post-doseサンプル（実薬投与後の検体）を用いるという回答が大多数。ガイドランス上、制限はないため安定性の懸念等がある場合は必要に応じてpre-doseサンプルを使用することも考慮するが望ましいと考えられる。

使用サンプルの違い

◆ Pre-doseサンプル

実薬投与前の検体。被験物質を添加して測定する。

特徴：個々の被験者の血漿・血清の状態を反映している。

- ・血中タンパク濃度（アルブミン等の産生や腎濾過機能の変動の影響）
- ・血中タンパクとの結合親和性（血液のpH変動に伴う薬剤の解離状態や結合タンパクの構造への影響）
- ・タンパク結合を阻害する生体物質の濃度（ビリルビン濃度等の変動の影響）

◆ Post-doseサンプル

実薬投与後の検体。主に T_{max} と T_{last} の検体を使用する。

特徴：上記に加え、投薬に起因する変化（主に代謝物の生成や血中成分の変動）を反映している。

◆ 市販の肝障害・腎障害患者由来ブランクサンプル

重篤度によるクラス分けは可能だが、個々の被験者の状態を反映していない。

Post-doseサンプル、またはPre-doseサンプルの使用が望ましい。

Pre-doseサンプルの使用を考慮する場面

海外製薬各社が連名で出した論文*では, pre-doseサンプル, post-doseサンプルのいずれを使用することも想定されている。ただし, 市販ブランク血漿の使用については言及されていない。

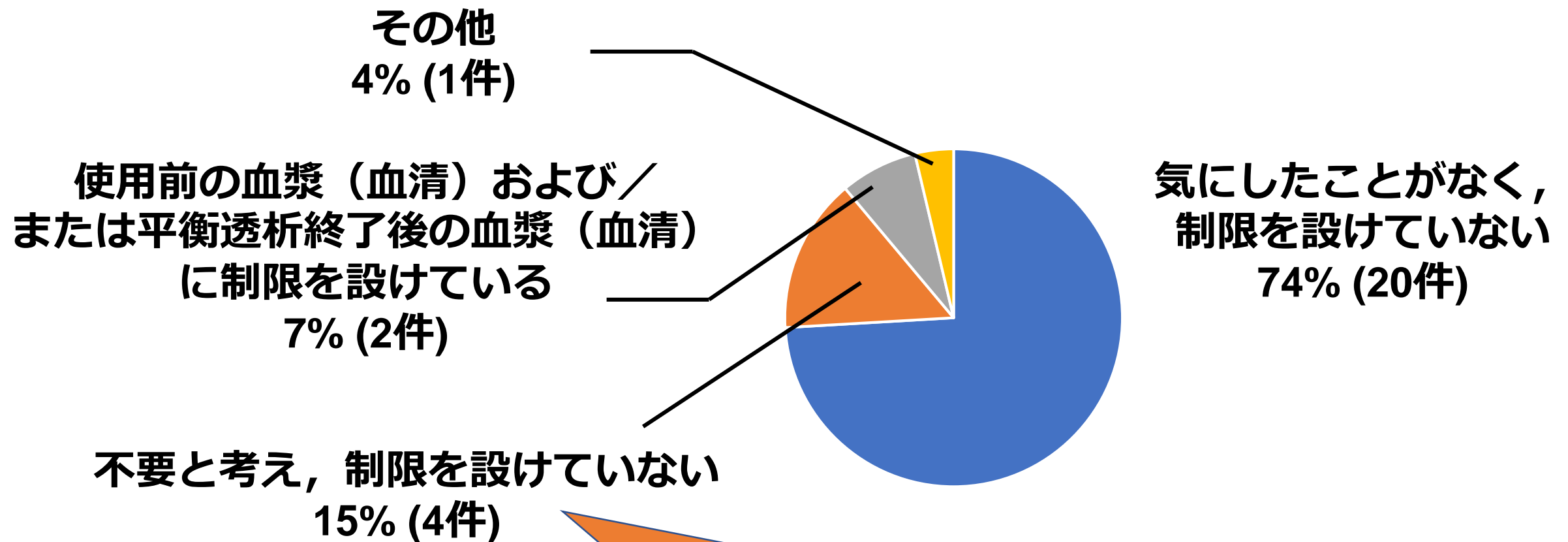
* Journal of Pharmaceutical Sciences 106 (2017) 3442-3452

以下の場面ではpre-doseサンプルの使用も考慮することを推奨したい。

- ◆ 添加剤がタンパク結合率に影響を及ぼす可能性がある場合
 - 酸添加によるサンプルのpH変動
 - 界面活性剤の添加による結合タンパクの変性
- ◆ タンパク結合を阻害する薬剤の併用により, 対象化合物のタンパク結合率を正しく評価できない場合。

【アンケート】 pHの影響

承認申請資料に掲載する試験において、血漿あるいは血清のpHに制限はありますか？



<http://bioanalysisforum.jp/>

不要と考える理由

- ・採血後短期間で試験実施しているため
- ・平衡透析時にガス透過性シールを用い、CO₂ インキュベータ内で振盪させているため

pHに制限を設けているという回答は少数

平衡透析中の血漿pHの変動

TABLE 1

Influence of a 6-h incubation in different atmospheric conditions on buffer and plasma pH in both capped and uncapped tubes

Δ denotes the pH change between preincubation and postincubation.

	Preincubation pH	Normal Atmosphere				5% CO ₂ Atmosphere				10% CO ₂ Atmosphere			
		Cap	Δ	No Cap	Δ	Cap	Δ	No Cap	Δ	Cap	Δ	No Cap	Δ
Buffer 1 (10 mM)	7.43	7.43	0.00	7.41	-0.02	7.28	-0.15	6.62	-0.81	7.13	-0.30	6.30	-1.13
Buffer 2 (100 mM)	7.00	7.00	0.00	6.99	-0.01	7.01	0.01	6.85	-0.15	6.99	-0.01	6.71	-0.29
Buffer 3 (100 mM)	7.39	7.40	0.01	7.40	0.01	7.40	0.01	7.08	-0.31	7.37	-0.02	6.90	-0.49
Buffer 4 (8.3 mM)	7.39	7.40	0.01	7.41	0.02	7.23	-0.16	6.47	-0.92	7.17	-0.22	6.13	-1.26
Human plasma	7.96	8.02	0.06	8.65	0.69	7.97	0.01	7.46	-0.50	7.92	-0.04	7.06	-0.90
Human plasma ^a	7.04	7.54	0.50	8.20	1.16	7.53	0.49	7.32	0.28	7.47	0.43	6.83	-0.21
Wistar rat plasma	7.44	7.46	0.02	8.29	0.85	7.47	0.03	7.42	-0.02	7.39	-0.05	7.09	-0.35
Wistar rat plasma	7.92	8.19	0.27	8.91	0.99	7.86	-0.06	7.51	-0.41	8.12	0.20	7.07	-0.80
Wistar rat plasma	7.14	7.74	0.60	8.72	1.58	7.86	0.72	7.53	0.39	7.68	0.54	7.06	-0.08

^a Donor of $n = 1$.

Buffers. The following four buffers were used in this study: buffer 1, 10 mM phosphate-buffered saline, 140 mM NaCl, and 2.7 mM KCl (predialysis pH 7.43; Sigma-Aldrich); buffer 2, 100 mM sodium phosphate and 150 mM NaCl (predialysis pH 7.00; Thermo Fisher Scientific); buffer 3, 100 mM sodium phosphate and 150 mM NaCl [made in-house to pH 7.40 (unless otherwise stated) as detailed below]; and buffer 4, 8.3 mM phosphate-buffered saline, 140 mM NaCl, and 2.7 mM KCl [made in-house to pH 7.40 as detailed below (used by Kochansky et al., 2008)].

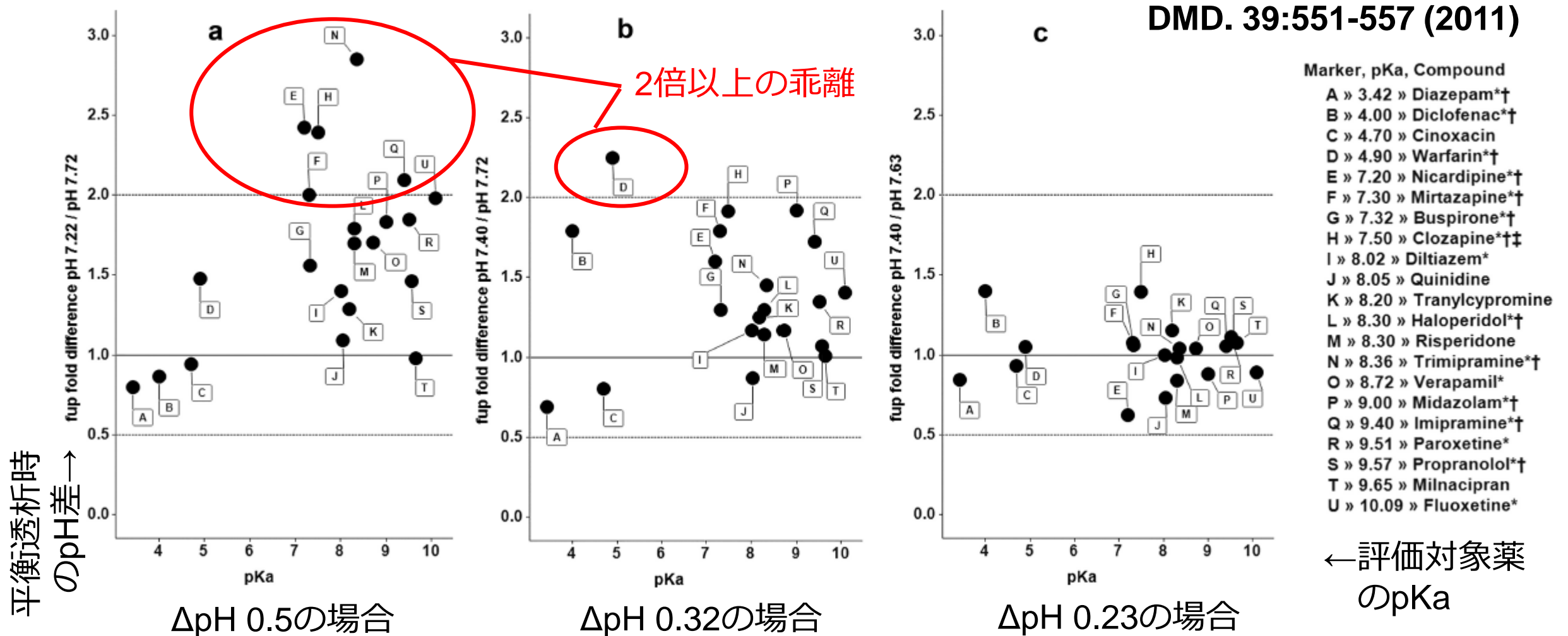
DMD. 39:551-557 (2011)

血漿のpHは大気中に放置することにより炭酸ガスが抜け、pHが上昇する。

炭酸ガスを曝露することにより、pHの上昇を防ぐことができる。



pHコントロールの重要性



平衡透析時の血漿pHの差により，fuに2倍以上の乖離が生まれることも。

再現性の高いデータを得るためにはpHをコントロールすることが重要。

平衡透析法：終了時点の血漿（血清）pH

超遠心法，限外濾過法：開始時点の血漿（血清）pH

【アンケート】 平衡透析時の結果採用基準

- ◆ 透析後のフリーチャンバー側試料に有機溶媒を添加し、白濁した場合は不採用とする。

回答者の**20%** (4/20) が実施

回答例：非常に蛋白結合率が高く、微量の漏れが結果に影響する可能性がある場合は、PBSにブランク血漿を添加し、有機溶媒と水を加えて白濁の比較対照試料を用いて判断します。

- ◆ 透析後のフリーチャンバー側試料のサンプル重量を測定し、透析前にデバイスに添加した重量から乖離がある場合は不採用とする。

回答者の**5%** (1/20) が実施

- ◆ フリーチャンバー試料のタンパク濃度を測定し、一定の濃度が検出された場合は不採用とする。

回答者の**10%** (2/20) が実施

基準値は50, 500 $\mu\text{g protein/mL}$ という回答があった。

【アンケート】 平衡透析時の結果採用基準

その他の基準

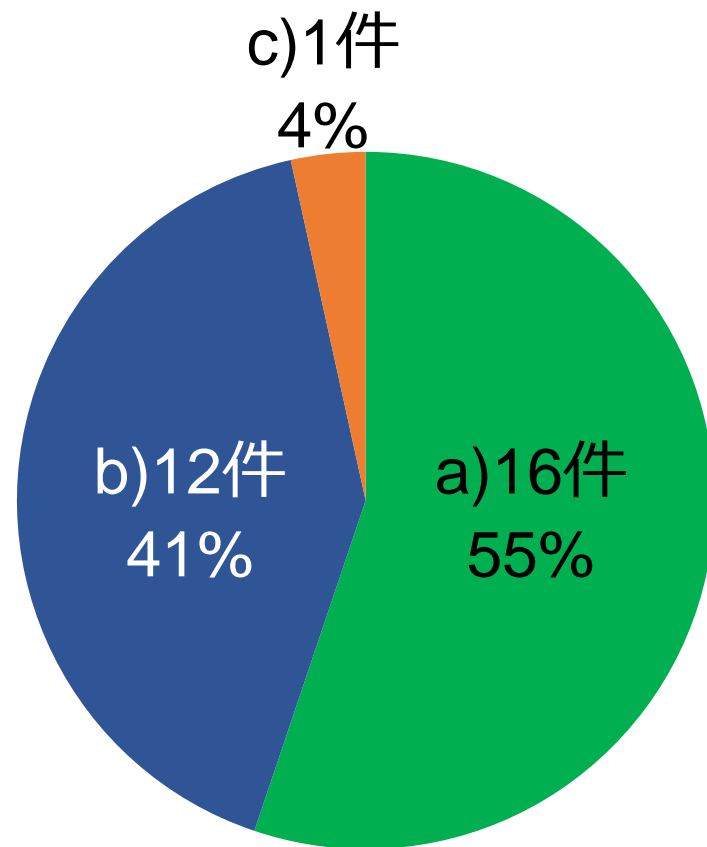
- ◆ ばらつきが大きい時は不採用を考慮する（回答数3件）
- ◆ 陽性対照の結合率が97%以上（回答数1件）
- ◆ 疑わしい結果が出たときのみ調査を行う（回答数1件）

平衡透析時のタンパクの漏れを評価している例は少ないが、白濁法を採用しているという回答が複数あった。簡便に判断する方法として有用と考えられる。

Replicate間のばらつきや陽性対照の結果を参照するという回答もあった。pHやタンパクの漏れを直接的に評価しないまでも、総合的に結果の妥当性を示せるようにすることを推奨する（特に承認申請資料に結果を使用する試験など）。

【アンケート】 組織結合評価の実施目的

Q: 組織結合評価の実施目的 (n = 29)



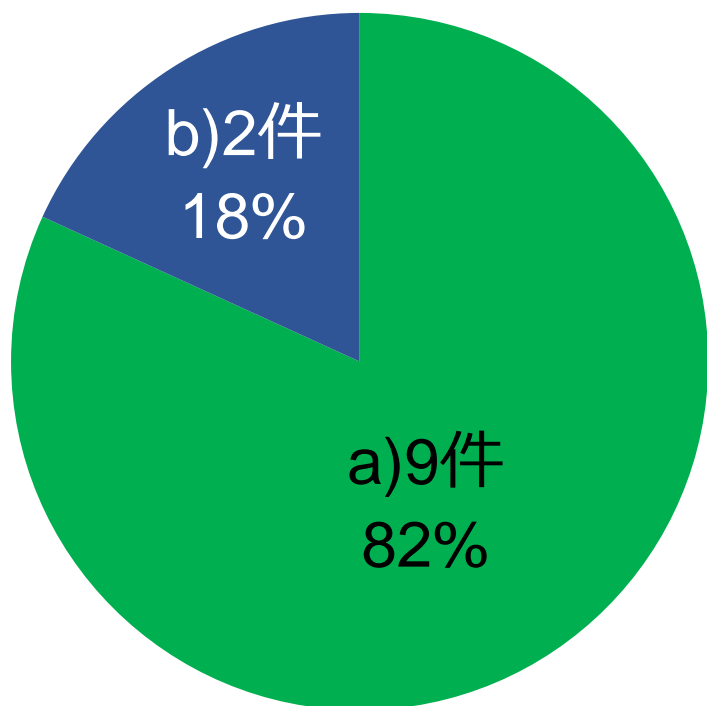
- (a) 実施していない (経験なし)
 (b) スクリーニング段階における開発化合物の絞り込み
 (c) 非臨床開発段階における承認申請資料への反映

(b)での事例：
 評価化合物が中枢組織を標的とする場合に脳組織での結合率を評価し、スクリーニング。
 (c)での事例：
 有色ラットの目における消失の考察の一助。

- 半数以上が実施なしで、実施する場合もスクリーニング目的が大多数。(今回の調査では、承認申請への反映は1件のみ)
- 薬効や毒性で標的又は関連する組織が定まっている場合に実施。

【アンケート】 組織結合評価の第一選択手法

Q: 評価時の第一選択手法 (n = 11、実施経験あり)



- (a) 平衡透析法
- (b) 超遠心法
- (c) 組織スライス法

➤ 平衡透析法が最多。



今回の組織結合評価に関する調査では、スクリーニング目的が大多数であり、血中タンパク結合評価時と同様に評価化合物の安定性に問題がなければ、平衡透析法が第一選択手法であった。

文献によっては、ホモジネートではなく、組織そのもの（組織スライス）を用いて評価した方が、組織中の非結合型濃度については、より精度高く評価し得るといった報告もある。

組織中非結合型濃度の評価手法

組織中非結合型分率の算出方法

1. 希釈法

ホモジネートの希釈系列における組織結合率を算出し、そこから外挿して算出

2. スライス法

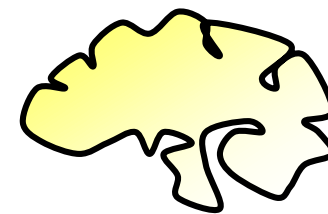
新鮮な組織スライスを作製後、薬液中でインキュベーションしその定常状態における分布容積の逆数から算出

$$f_{u, \text{brain}} = 1 / \left[\text{組織中薬物濃度 (ng/g brain)} / \text{薬液濃度 (ng/mL)} \right]$$

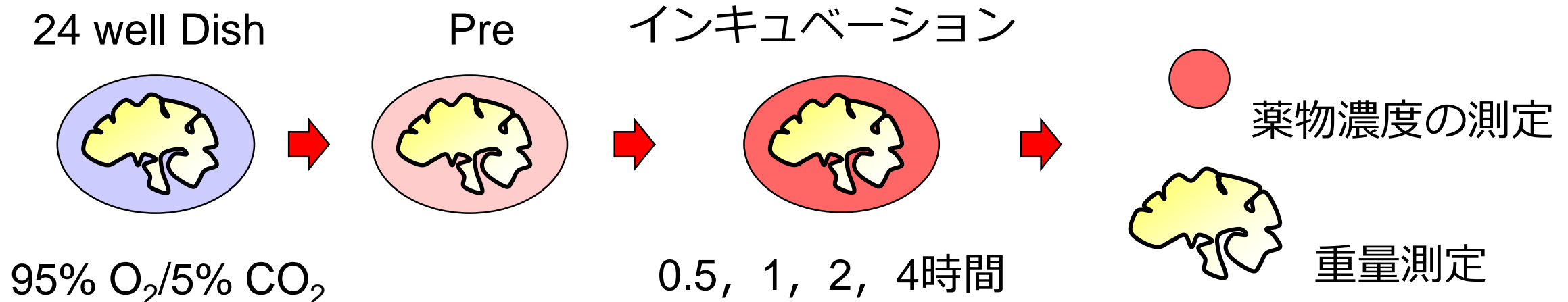
スライス法の実施方法

スライス法による評価法の概要（例：脳組織）

- 動物：評価対象動物の組織を採取
- 組織切片：300 μm （リニアスライサーなどを使用し作成）
- 薬物濃度：評価したい濃度を設定
- 反応時間：0.5, 1, 2, 4時間

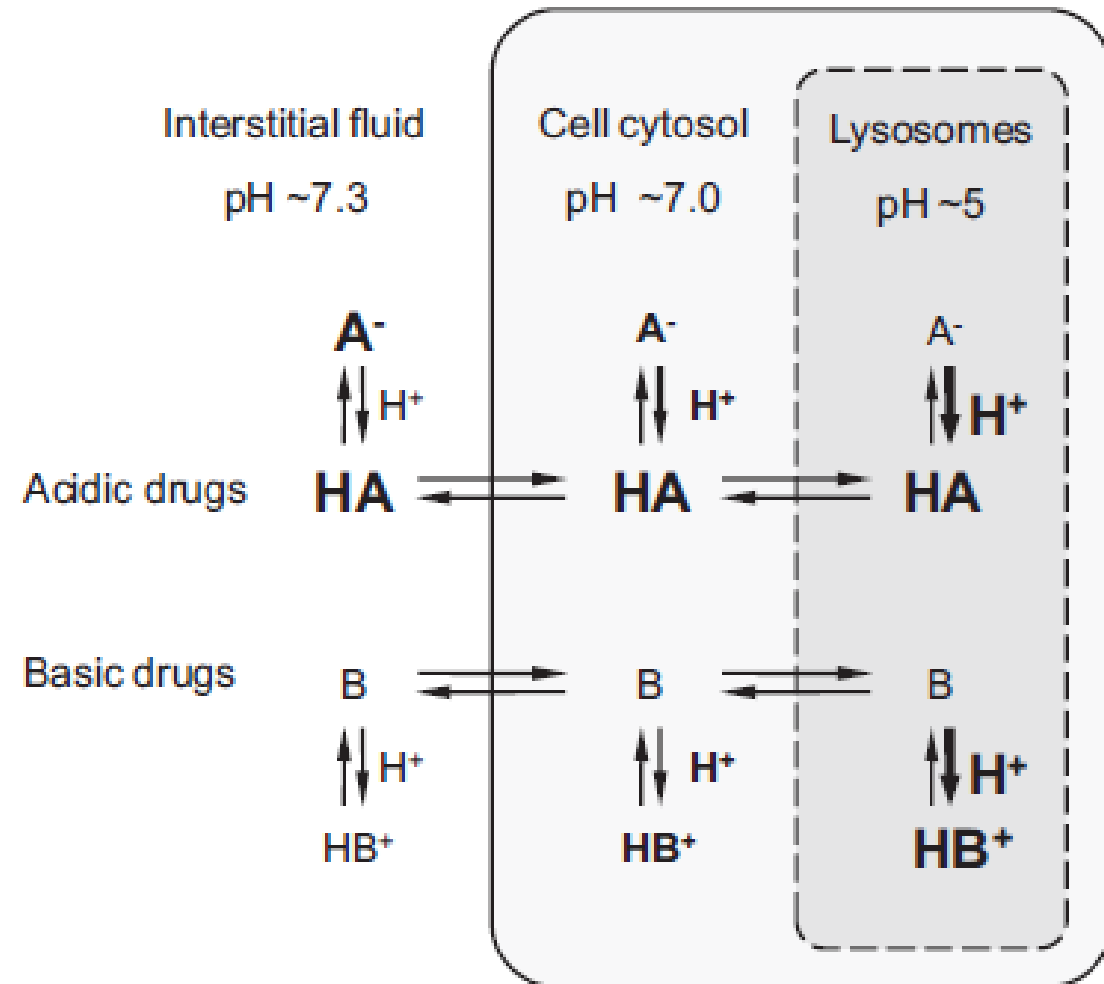
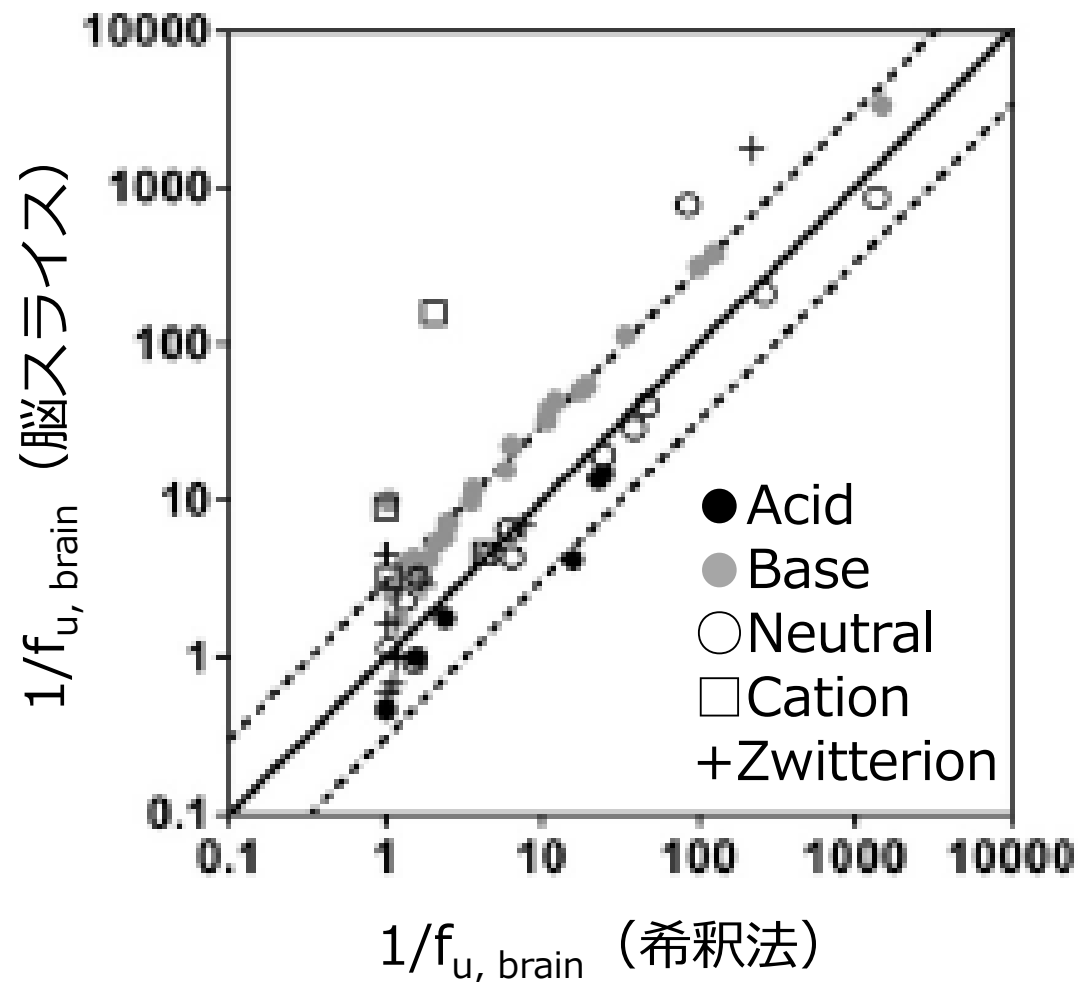


Coronalで作成



$$f_{u,\text{brain}} = 1 / \left[\text{組織中薬物濃度 (ng/g brain)} / \text{薬液濃度 (ng/mL)} \right]$$

希釈法とスライス法の比較



引用文献 : DMD 39:353-362, 2011

脳中タンパク結合評価ではpHや取り込み輸送等が影響するため
ホモジネートとスライスで結合率に差が生じることがある。

希釈法とスライス法の利点・欠点

○希釈法

利点

- ・凍結保存している組織を使用できる。

欠点

- ・細胞膜への吸着が大きい化合物では組織ホモジネート中に含まれる組織部分によっては標的局所の結果がマスクされる可能性が有る。
- ・塩基性化合物や組織結合率が低い化合物では、組織中非結合型濃度を過大評価してしまう可能性が有る。

○スライス法

利点

- ・組織の形態を維持しているため、非結合型濃度を *ex vivo* で正確に評価できる。
- ・組織中の局所（特定の部位）での非結合型濃度を算出可能。

欠点

- ・新鮮な組織を使用する必要がある。



非結合型濃度を測定するための その他の技術



マイクロダイアリシス

マイクロダイアリシスの概略 (中枢評価の場合)

マイクロダイアリシスの概略



ガイドカニューレ

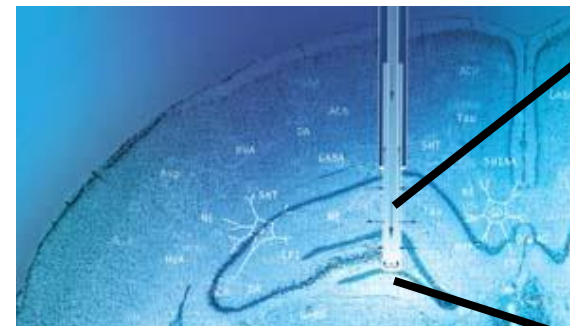
マイクロシリ
ンジポンプ

灌流液

回収
(透析液)

測定

プローブ

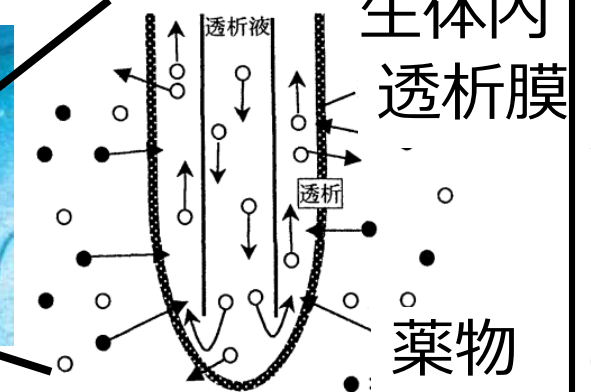


脳の断面図

透析液

生体内
透析膜

薬物



利点

- ・ 経時的に標的組織中濃度を定量評価可能.
- ・ 標的組織における非結合型薬物濃度を評価可能.

欠点

- ・ 透析膜を用いているため、薬物の回収率について考慮する必要がある.
- ・ スループット性が悪い.

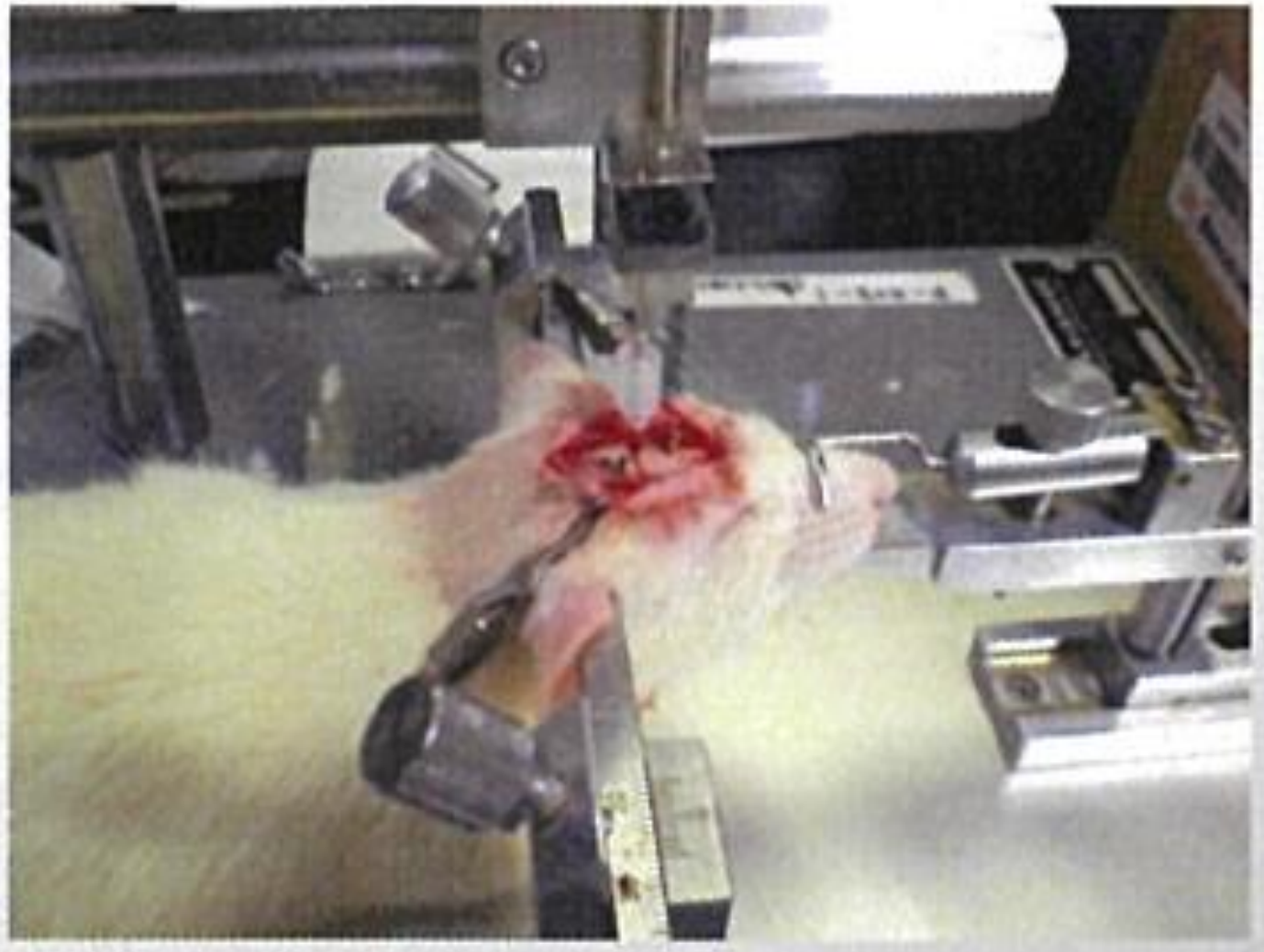


マイクロダイアリシス 施術例

マイクロダイアリシスの施術



小動物用脳固定器

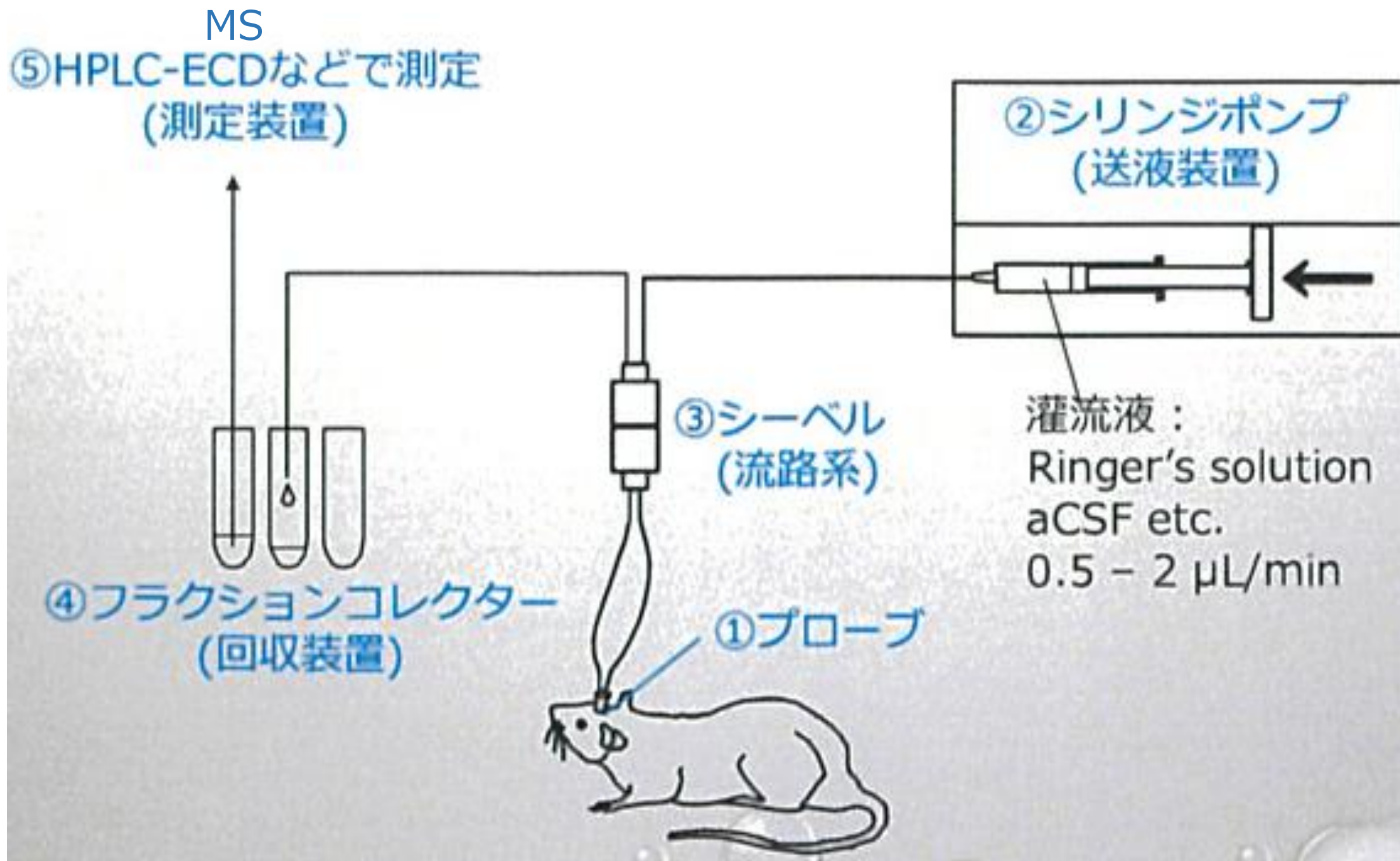


施術（ガイドカニューレの挿入固定）

<http://bioanalysisforum.jp/>

マイクロダイアリシス 使用方法

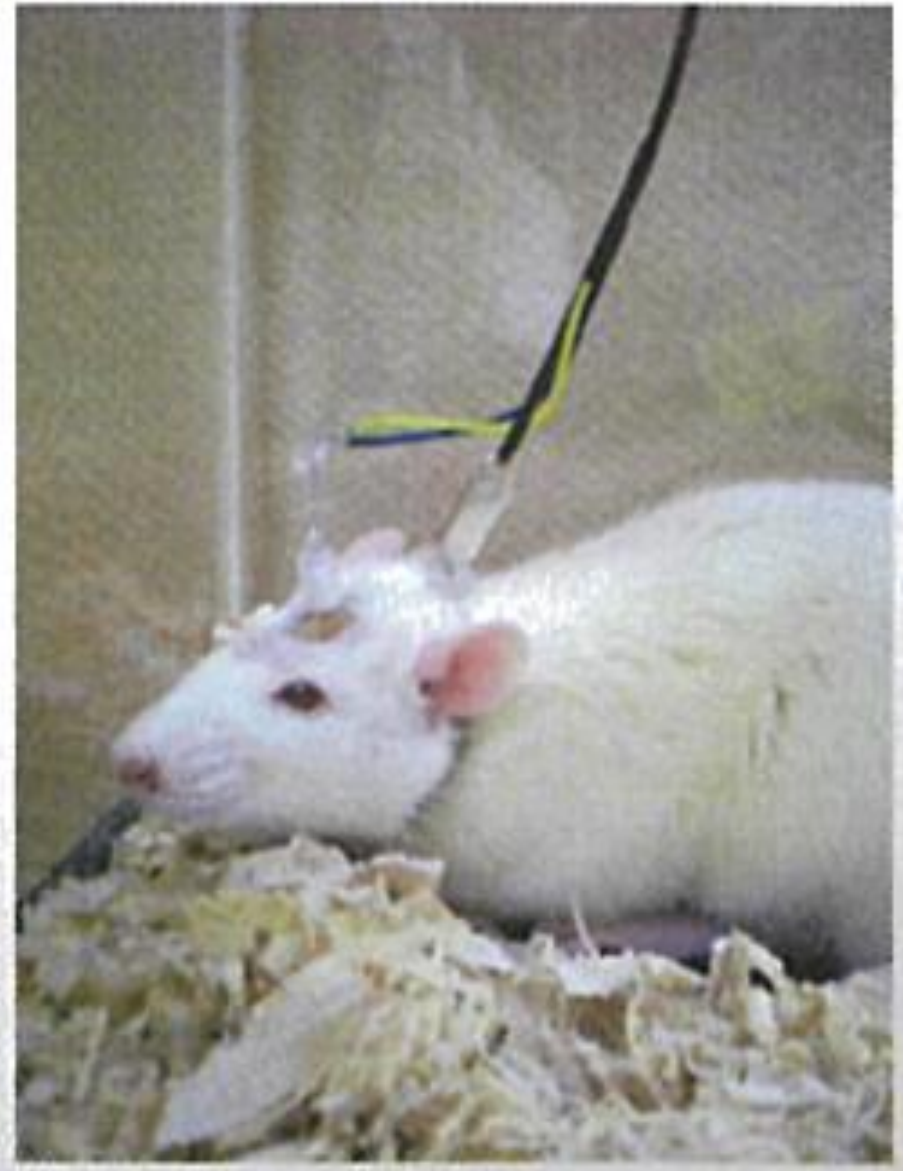
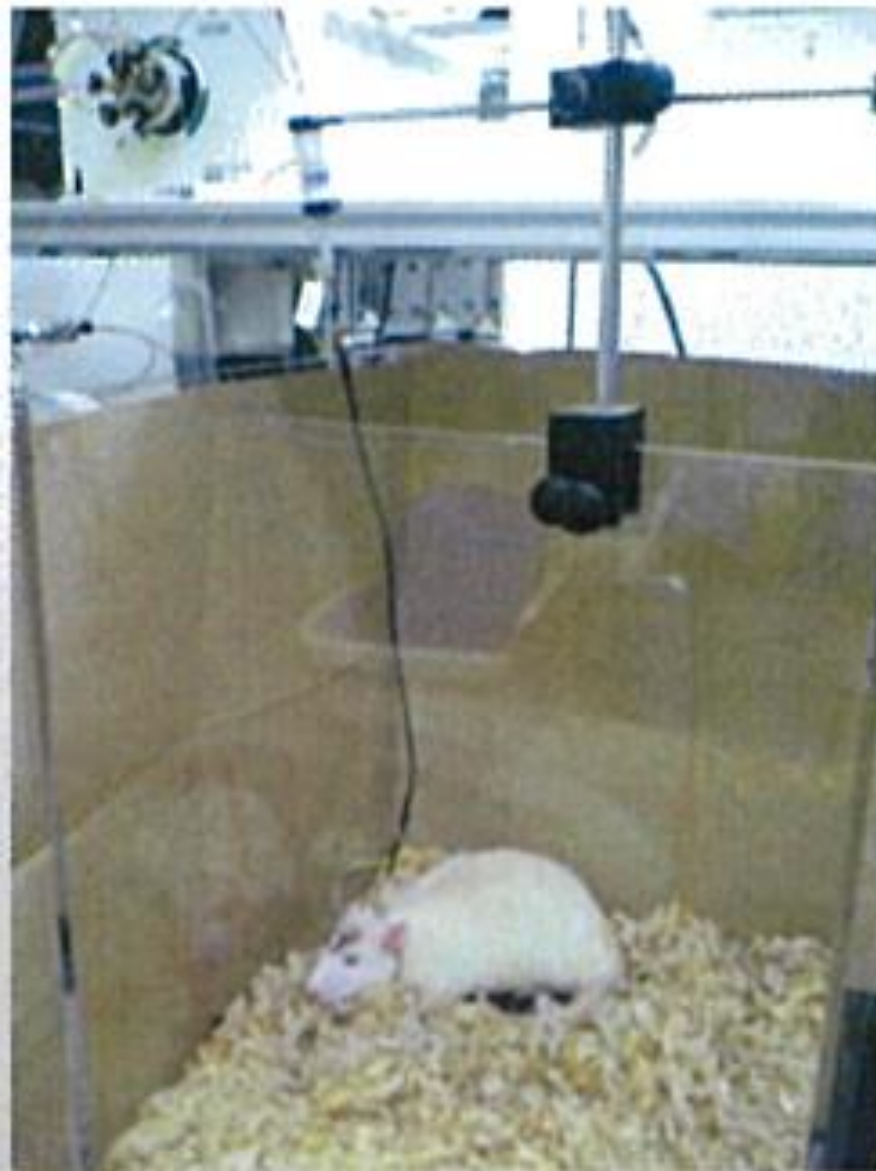
術後2-3日の回復期間の後にプローブを挿入し，開始。





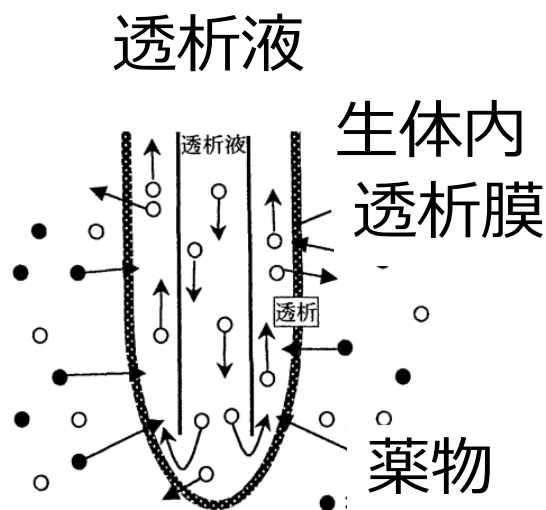
マイクロダイアリシス サンプルング例

マイクロダイアリシスサンプルング



無麻酔・無拘束でのサンプルング

マイクロダイアリシス 留意点



◆ 測定時のマトリックスに関して

回収した透析液は、透析膜を介した実試料のため、基本的には**流した灌流液をマトリックス**として測定。（但し、透過してきた生体内成分が測定対象物質に影響を及ぼす場合にはLCで分離するか、ブランクの透析液を準備した方がよい。）

◆ 回収率に関して

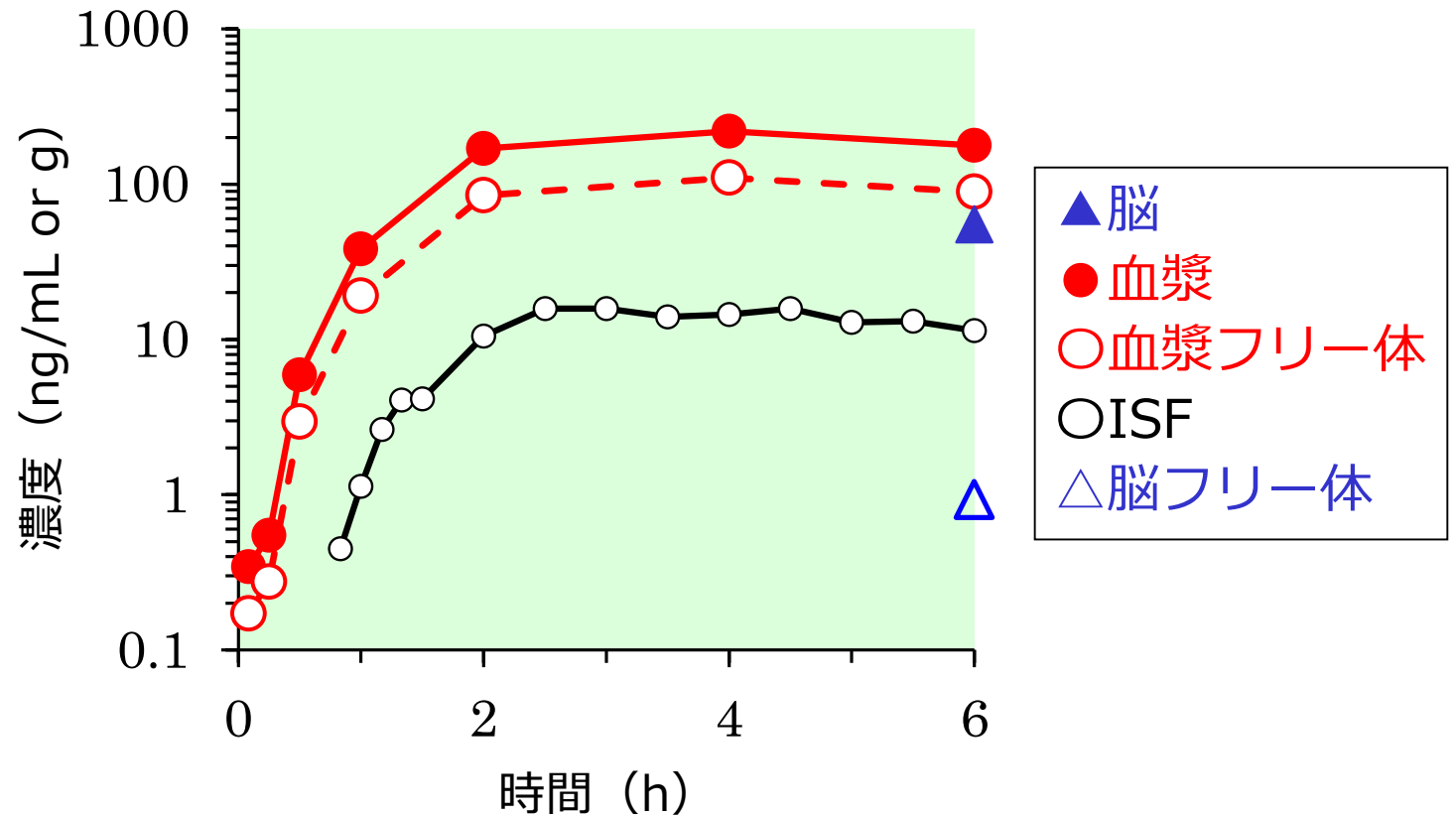
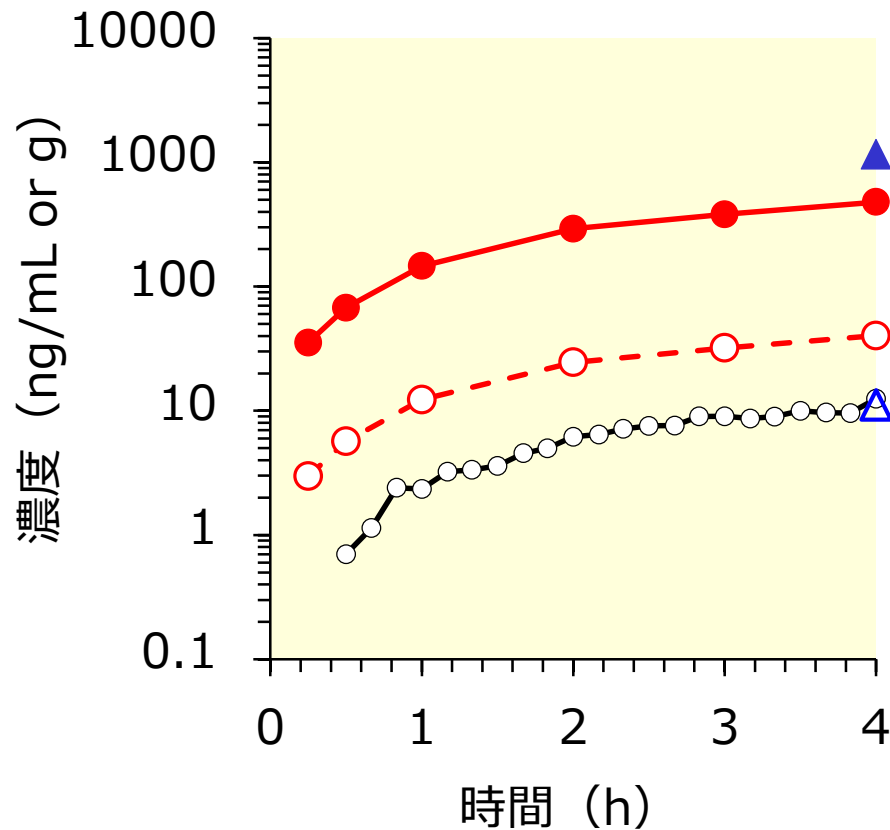
- 透析膜を用いているため、低流速とはいえ、平衡状態に達するまでの平衡時間を担保することは困難であり、**基本的に低回収率**となる。
- 組織中実濃度は透析液を**回収率で補正し算出**する必要があるため、回収率の算出が重要となる。様々な算出法が報告されているが、代表的な算出方法としては**アンチピリンをレファレンス化合物として用いる**方法が挙げられている（J Pharmacobiodyn 14:483-492, 1991）。
- 低回収率の場合には灌流液に**BSA**などを添加することで**改善**することも。



マイクロダイアリシス 結果例

化合物AをマウスにInfusion

化合物Bをラットに経口投与



脳中タンパク結合率 (%)	血漿中タンパク結合率 (%)	ISF/脳フリー体
99.0	91.6	1.1

脳中タンパク結合率 (%)	血漿中タンパク結合率 (%)	ISF/脳フリー体
98.3	49.9	0.08

- 非結合型濃度を経時的に評価でき, *in vitro*組織中結合の確認にも概ね使用可能.
- 一部, 結合率だけではマイクロダイアリシスの結果と一致せず判断が難しい部分も.

マイクロダイアリシスのメリット

メリット

- 無麻酔・無拘束でのモニタリング
- 一匹の動物から経時的情報が得られる
- 「細胞外」の目的物質の非結合型濃度のみが得られる
- 組織の部位別情報が得られる
- 小規模施設での実験が可能

マイクロダイアリシスのデメリット

デメリット

- 施術が必要であり、スループットにかける
- 膜回収率が100%ではなく、低回収率（数%の場合も）
- 高分子の回収率は特に低く、現状では不向き
- 連続サンプリングは2-3日まで



これらを考慮した上で実験を組み立てる必要がある



マイクロ固相抽出 (*Solid Phase Microextraction, SPME*)

<http://bioanalysisforum.jp/>

マイクロ固相抽出の概要

サンプル前処理法の一つで、**微量の固相を用いて非結合型薬物を抽出する方法の総称。**

これまではGC/MSの利用に限定されていたが、近年LC/MSでも使用できるデバイスが開発され、海外を中心にメガファーマやCROでも採用されつつある。

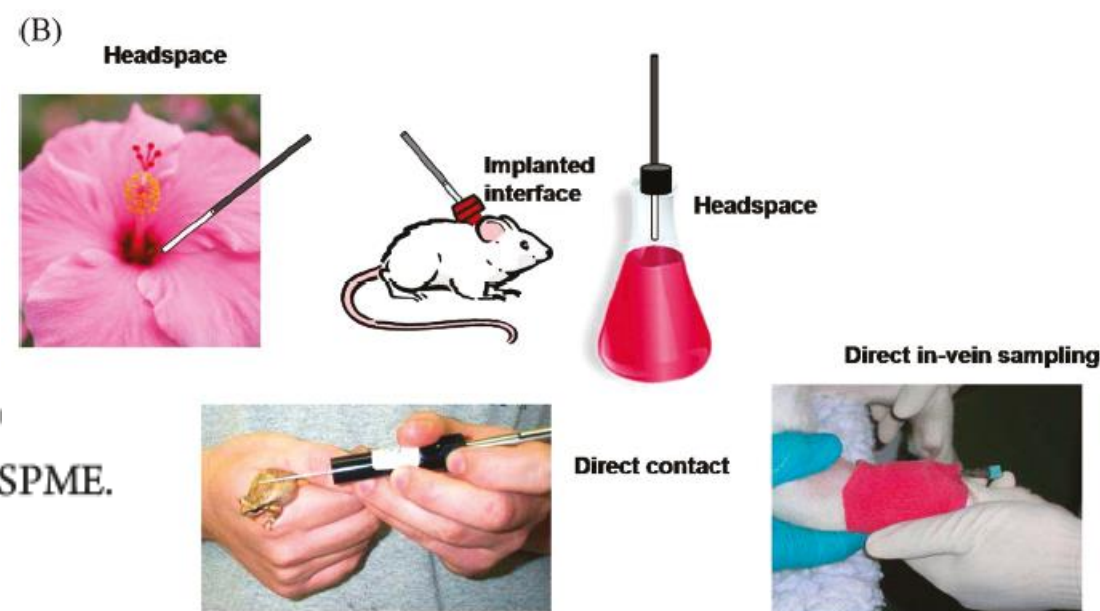
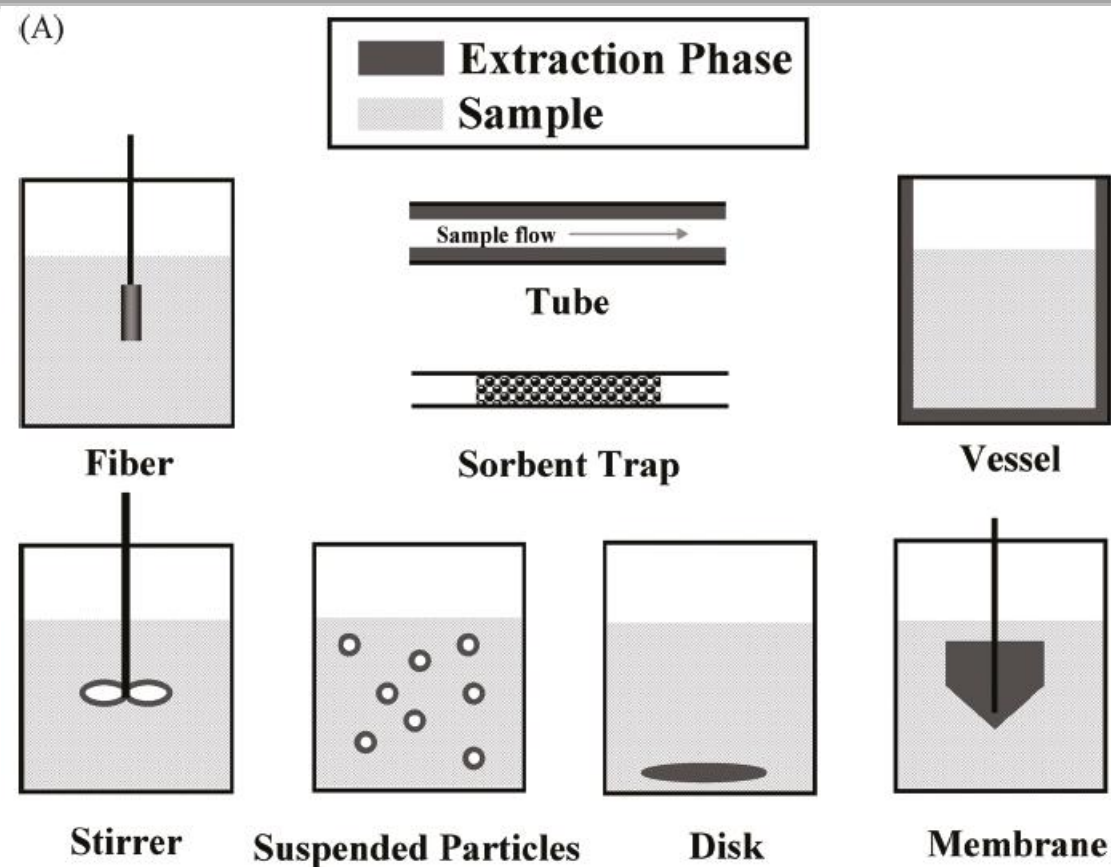


Figure 1. (A) Various configurations of solid-phase microextraction.

(B) Example illustrations of various modes of sampling using *in vivo* SPME.

Chem. Rev. 2011, 111, 4, 2784-2814

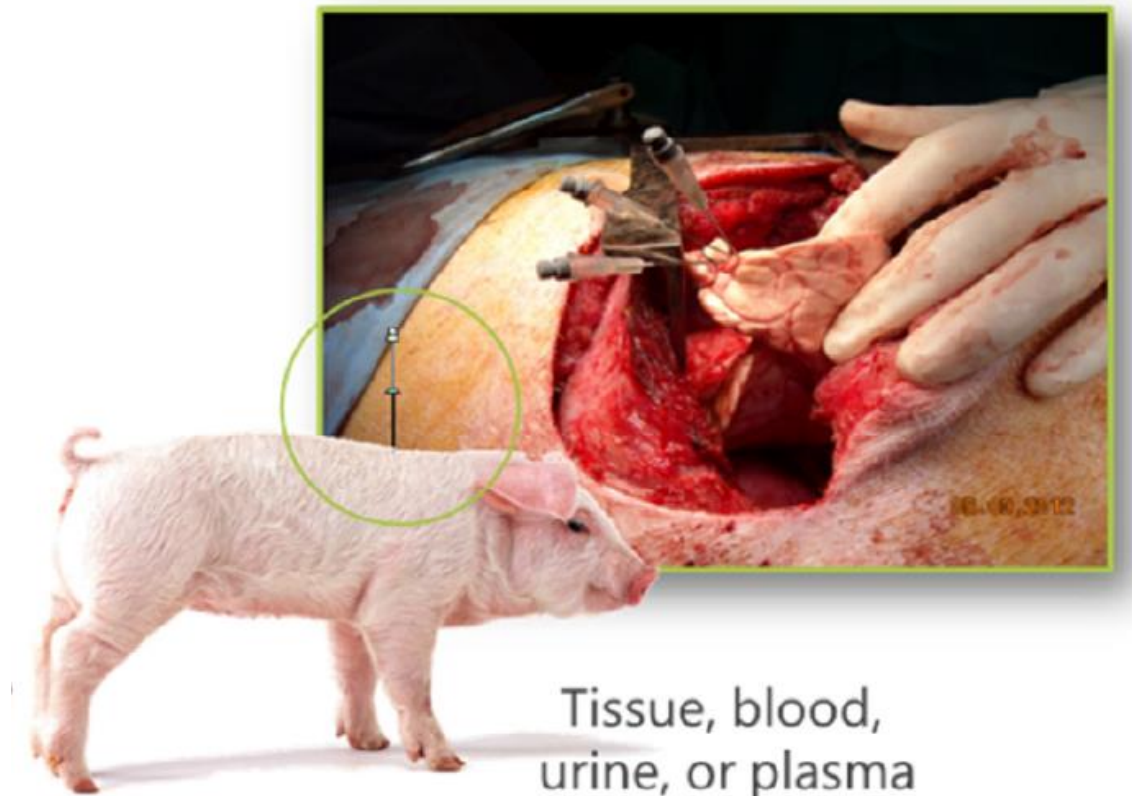
ファイバー型マイクロ固相の使用例

非結合型薬物を直接的に抽出できるという特性を利用して、タンパク結合や血球移行率の評価に活用した事例が報告されている。

生体に直接穿刺することができるデバイスも開発されており、採血・組織採材が不要であることから、**マイクロサンプリング**の新たな手法としても注目されている。



Sheelan Ahmad.
EBF Open Symposium 2016 Presentation



Trends in Analytical Chemistry 71 (2015) 249–264

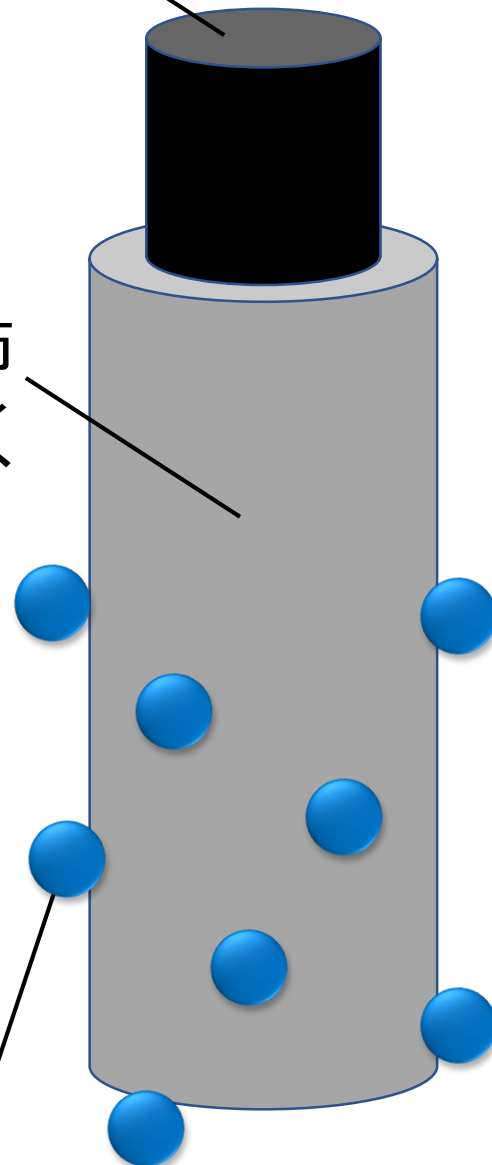


マイクロ固相の構造

金属芯

芯の周囲にC18修飾されたシリカが薄くコーティング

化合物を保持する



ニードル型

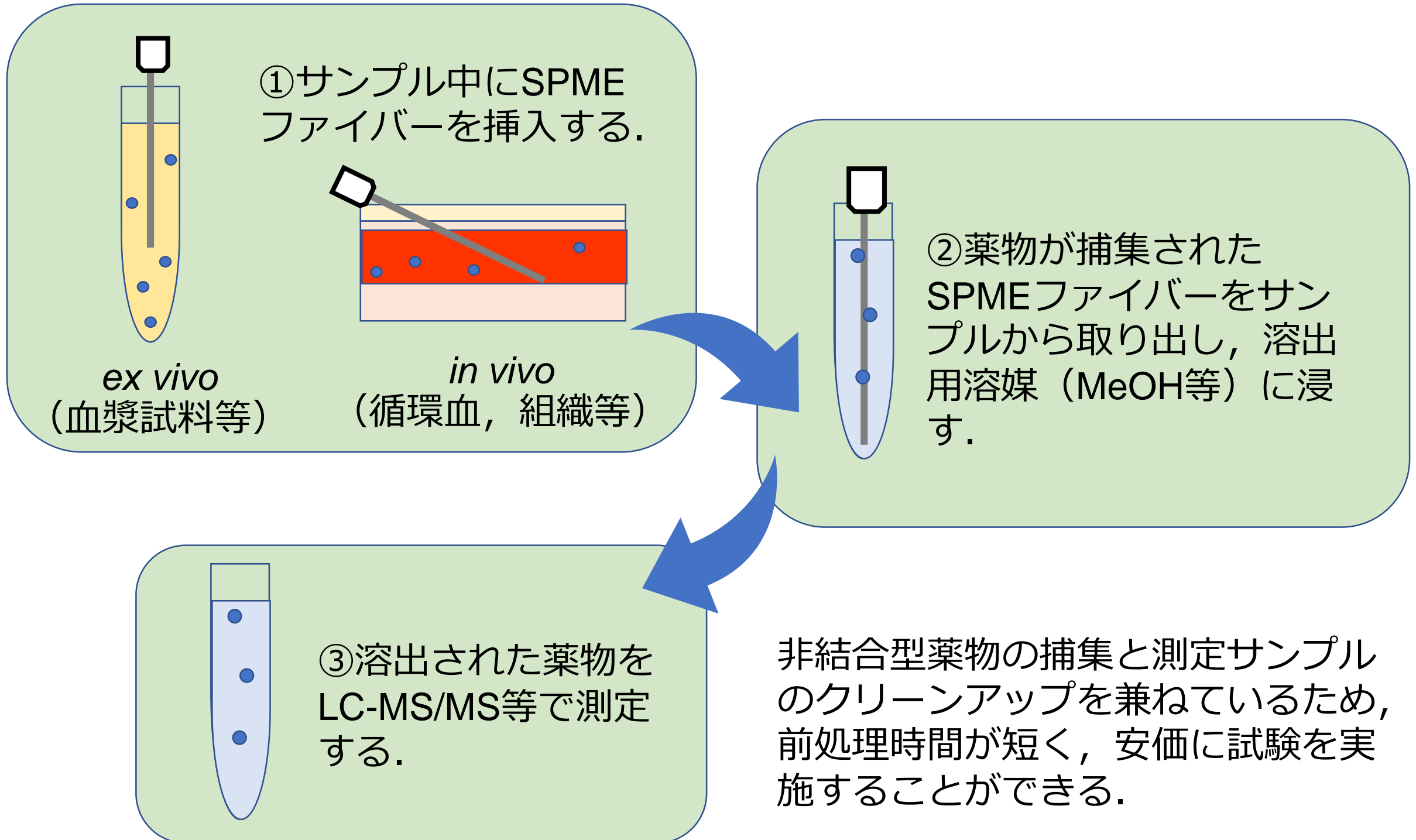


96ウェルフォーマット



<http://bioanalysisforum.jp/>

マイクロ固相抽出の実施方法

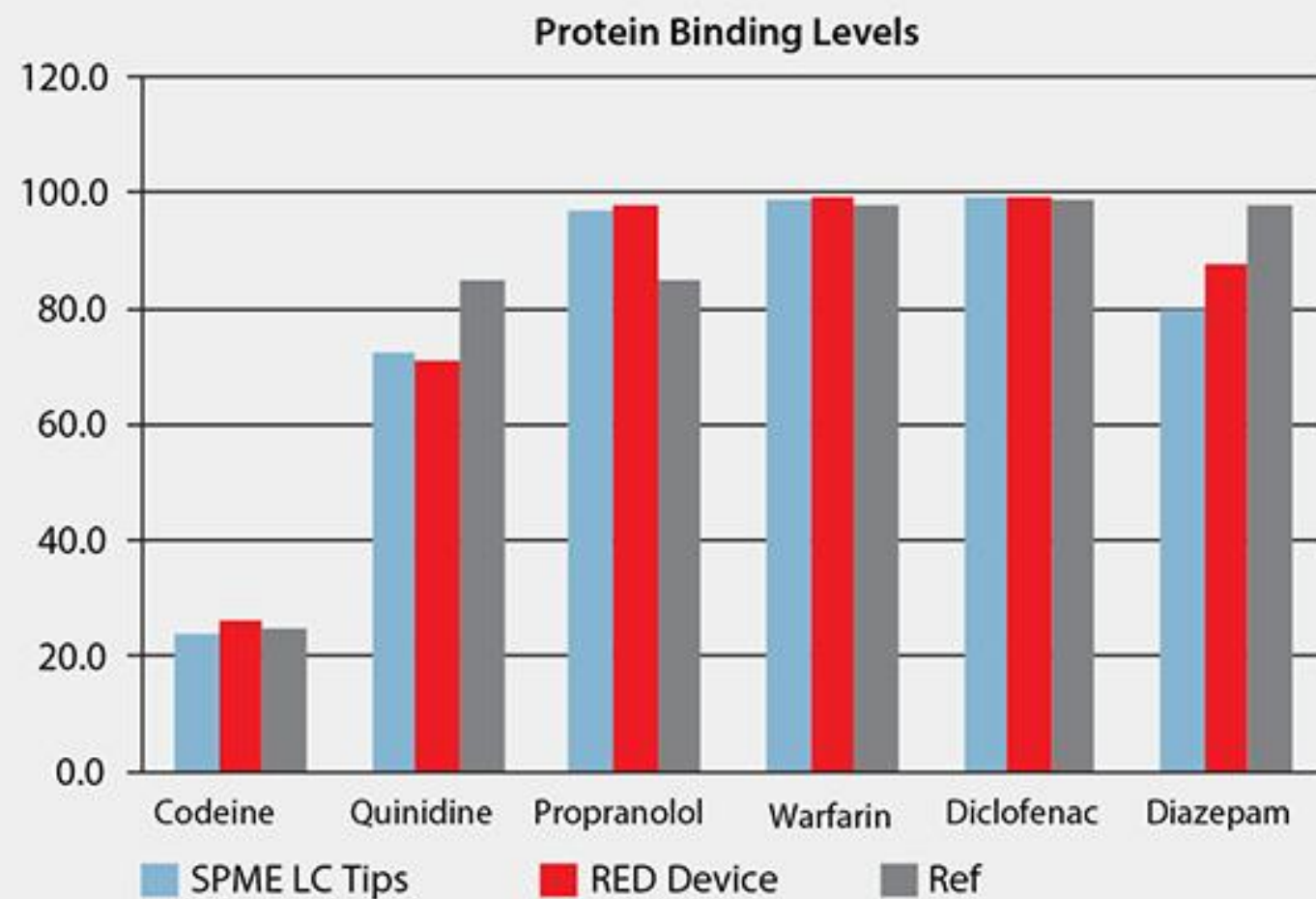


利用 ; タンパク結合率評価

タンパク結合率評価への活用を目的に、従来法とSPME法の比較に関して多数報告されている。

従来法と同等の結果を得ることができ、また短時間かつ安価で実施することができる。

Table 2. Binding Affinity Comparison



<http://bioanalysisforum.jp/>

$$\% \text{ protein bound} = \frac{(\text{concentration PBS} - \text{concentration plasma}) \times 100}{\text{concentration PBS}}$$

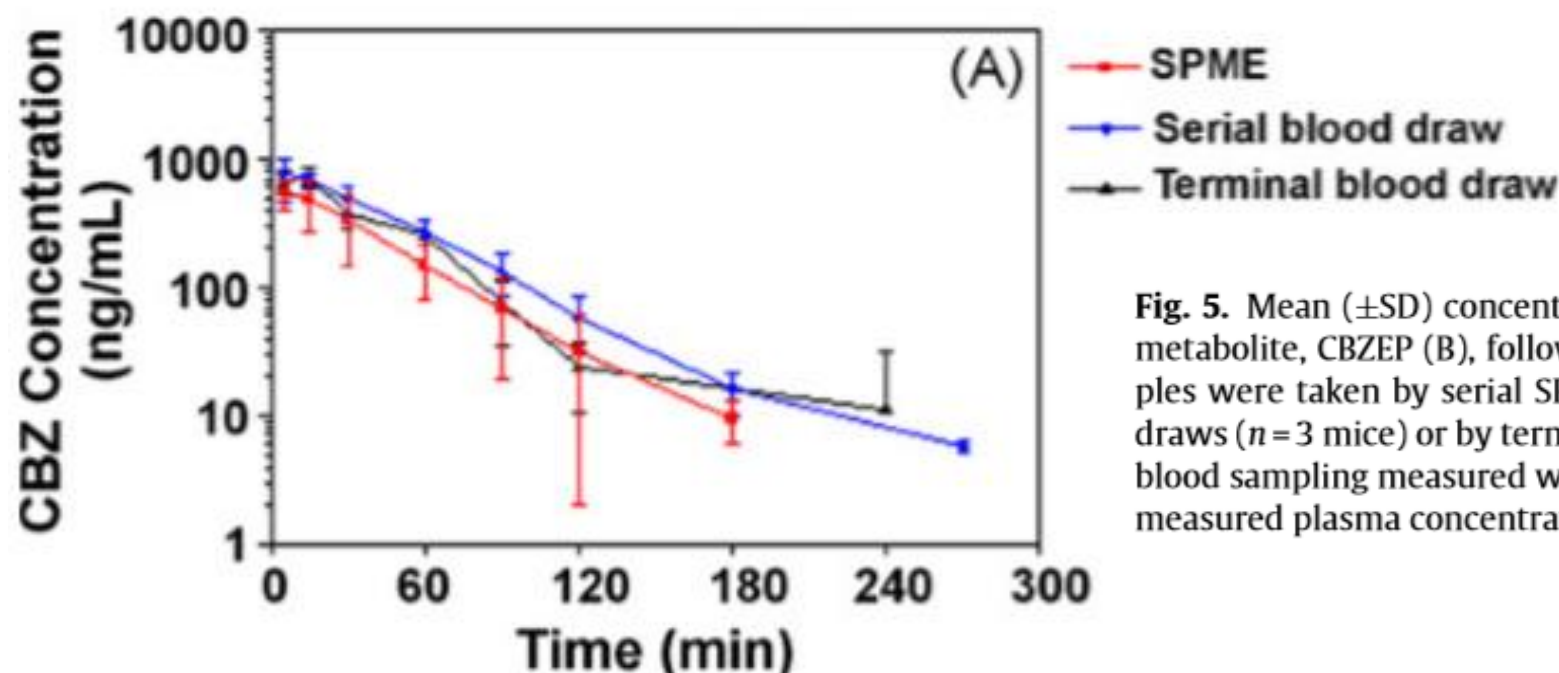
利用 ; *in vivo* PK評価

採血せずにSPMEを血管内に挿入することでサンプリングが可能。

サンプリング, サンプルの保管, 調整, 抽出過程の手間や時間を大幅に削減することができる。

マイクロサンプリングとしての側面では, 動物福祉に寄与するとともに, 薬理・毒性評価個体の曝露を確認することができる。

従来法との比較に関して多数報告されている。



J. Chromatogr.2010.07.060

Fig. 5. Mean (\pm SD) concentration versus time profiles of CBZ (A) and the formed metabolite, CBZEP (B), following 2 mg/kg i.v. administration of CBZ to mice. Samples were taken by serial SPME sampling ($n=7$ mice), by serial automated blood draws ($n=3$ mice) or by terminal blood draws (3 mice/time point). SPME and serial blood sampling measured whole blood concentrations whereas terminal sampling measured plasma concentrations.