

ICH S3A マイクロサンプリングに 関するQ&A について

斎藤嘉朗

国立衛研・医薬安全科学部

(ICH S3A Q&A IWG ラポーター)

本発表に含まれるQ&Aの日本語訳は、個人的な仮訳である。また意見は厚労省や国衛研としての意見ではなく、個人の意見である。

2018年2月6日

第9回JBF シンポジウム「非臨床毒性試験におけるマイクロサンプリングの適切な実施に向けて」

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
 - – 2014年12月 IWGメンバーの決定

Q&A作成の目的

ICH S3A: Toxicokinetics (TK) evaluation

- TK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
 - 製薬企業に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&A作成：Concept paperに記載の項目

1. 各マイクロサンプリング方法の比較 (Dried blood spotとCapillary microsampling等)
2. 測定法の検証 (GLPへの対応等)
3. 繰返し測定に関する検討 (Incurred sample reanalysisへの対応等)
4. 主群動物に対する繰返し採血による毒性評価への影響

これらの項目を含めて、Q&A案を作成

S3A Q&A (Step 4文書)の目次(仮訳)

序文

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&AとICH S3Aガイドライン各項との対応

Step 4文書の内容(1)

前文

S3Aガイドラインは1994年に発行された。しかし近年、分析法の感度が改善されたことで、マイクロサンプリング技術をトキシコキネティクス(TK)評価において広く使用することが可能となった。本Q&A文書は、TK試験にマイクロサンプリング法を導入するにあたって留意すべき点に焦点をあて、主試験群の動物でTK評価を行うことの利点及び幾つかの限界、ならびに必要なTKサテライト動物数を減らす、あるいは無くすことによる3Rs(代替法の利用、使用動物数の削減及び苦痛の軽減)への全体的に重要な寄与について述べたものである。

Step 4文書の内容(Q1)

Q1: マイクロサンプリングの定義は何か？

A1.

定義:

薬物やその代謝物の濃度を測定し、TKパラメータを算出するためにごく微量の血液(一般的には50 μ L以下)を採取する手法。

対象マトリックス:

血液、血漿、血清

非血液由来マトリックスは本Q&A文書の適用範囲外

- 液体または乾燥状態で輸送、保管され、それに続く測定に使用。

対象動物:

げっ歯類、非げっ歯類(S3Aなので、ヒトは対象外)。

Step 4文書の内容(Q2)

Q2: マイクロサンプリングのベネフィット/利点は何か？

A2.

1) 採血量を最小化

- ➡ 動物の痛みや苦痛を軽減： 動物福祉 (refinement) に貢献
- ➡ TKサテライト群の動物数を削減・無くす (reduction)。特に通常採血量ではサテライト群の動物数が多く必要なマウスで有用。

2) 主試験群でTK用の採血実施

- ➡ 毒性データと薬物曝露データとの関連を同じ動物で直接評価可能。

Step 4文書の内容(Q3)

Q3: どのような種類の医薬品及びどのような種類の安全性試験にマイクロサンプリングを利用できるか？

A3.

医薬品の種類: バイオ医薬品を含む医薬品の大部分

但し、マイクロサンプリングによって利用可能な少量の試料でも、測定方法の感度が適切であるかを、個々の事例で検討。

安全性試験の種類: 種々の毒性試験

例: 単回及び反復投与毒性試験、ならびに他の毒性試験(例えばがん原性試験、幼若動物を用いる毒性試験や生殖発生毒性試験)

代表するサブグループ動物からのサンプリングが許容可能

薬物濃度が低く、大部分あるいは全ての試料が定量限界未満の場合、マイクロサンプリングは容認されない。しかし、マイクロサンプリングのための生体試料中薬物濃度分析法が、従来の試料量の場合と同じ定量下限を有する場合には、マイクロサンプリングを使用することができる。

Step 4文書の内容(Q4)

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？

A4.

生体試料中薬物濃度分析法:

分析結果の信頼性を保証しうる開発及び適格化(あるいは、各地域の規制ガイドライン/ガイダンスに従ったGLP試験のためのバリデーション)がなされるべき。

評価すべき項目: LLOQ、真度、精度、保存前に希釈に用いるマトリックスの効果、及び試料採取、保存及び前処理の全ての期間における生体マトリックス中の分析対象物質の安定性などの分析上の特性。

Step 4文書の内容(Q4)続き

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？

A4(続き).

➤ いくつかの試験で既に従来法を使用していて、マイクロサンプリングを他の試験に適用する場合:

➡ マイクロサンプリングと従来法との間の曝露量に関する類似性が、当該マトリックスについて、必要となるかもしれない。
この曝露量の比較は、試料の提供状態が大きく異なる場合(マイクロサンプリングによる乾燥試料と、従来法による液体試料の比較等)、特に重要である。類似性評価は、適切な濃度範囲で評価され、2種の方法間でパラメータが比較されえる場合、AUCやC_{max}を評価する独立した薬物動態(PK)試験により評価。比較のための独立したPK試験は、例えば同じ部位から採取された血液、血漿または血清を同様の分析条件にて測定する場合など、個々の状況に応じて、適切な科学的正当性が認められる場合に省略できる。

Step 4文書の内容(Q4)続き

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？

A4(続き).

➤ 曝露の比較のため、理想的には、TK試験を通して、さらに臨床試験を通じて、同じマトリックスを使用すべき。

異なる試験において異なるマトリックスが使用される場合:

➡ マトリックス間の薬物濃度の相関は、血液学的パラメータ、血漿タンパク結合率、血液/血漿(又は血清)薬物濃度比のような種々の要因を考慮して明らかにされるべきであり、それにより、異なるマトリックスを用いたそれぞれの測定から全身曝露を適切に評価することが可能。

Step 4文書の内容(Q5)

Q5: マイクロサンプリングでは、どのような血液採取法が使用できるか？

A5.

血液は、キャピラリーチューブや他の適切な微量採取器具を用いて、尾静脈や伏在静脈などから採取することができる。採取された血液や血液由来の血漿や血清は、液体または乾燥状態で、薬物濃度の測定に用いることができる。

液体試料法の場合： 保存や輸送、そしてそれに続く分析の前に、適切な溶媒やブランクマトリックスで希釈可能な場合もある。

Step 4文書の内容(Q5)続き

Q5: マイクロサンプリングでは、どのような血液採取法が使用できるか？

A5(続き).

乾燥試料法の場合: 試料を通常、セルロース基剤あるいは他の種類の基材に直接塗布して乾燥させる方法
カード/デバイス上の一部である一定の直径範囲の打ち抜き、あるいはスポット全体が抽出及び分析に用いられる。近年及び現在も続いている技術進歩により、正確な量の血液を採取することができ、追加の容量測定を行わずに、試料全体を分析に使用するマイクロサンプリング法もある。

加えて、**新規に開発された技術も、十分なバリデーションを行うことで利用を検討可能。**

Step 4文書の内容(Q6)

Q6: 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？

A6. 動物の生理学的状態に及ぼす血液採取の影響を考慮

➤ 考慮すべき主な因子:

- 一定期間中における採血量と採血回数
- 被験薬物の特性(赤血球への影響や抗凝固剤としての性質等)
- 試験系(例えば、動物種、週齢、体重、総血液量)
- 採血部位

頻回で繰り返しの採血は、血液学的パラメータなどの生理学的データに影響を及ぼす可能性があるため、マイクロサンプリングであっても、試料採取(採血)のプロトコールは適切に設定すべきである。

Step 4文書の内容(Q6)続き

Q6: 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？

A6(続き).

➤ 記録を推奨される動物データ

- 体重
- 摂餌量
- 血液学的パラメータ(例えば、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均血球容積、電解質、総タンパク質)
- 採血部位への影響(例えば、組織の損傷や炎症)等

Step 4文書の内容(Q6)続き

Q6: 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？

A6(続き).

- これらパラメータの評価において、被験薬群と同じ回数及び量の試料を採取された対照動物との比較を行うことは、その試験での疑わしい影響が被験薬に起因するものか、あるいは試験手順によるものかを明らかにするために重要
- 以前の試験において、頻回の血液採取によって血液学的パラメータの悪化が被験薬に関連する変化として示された場合、あるいは被験薬の薬理学的作用がこのような影響を引き起こすことが疑われる場合には、マイクロサンプリング技術を使用するとしても、TK評価の目的のためにサテライト群の動物を使用する必要がある。
- あるいはその代替として、科学的に妥当であるならば、マイクロサンプリングと共にスパスサンプリング(少数回の試料採取)*を用いることも可能である。

Step 4文書の内容(Q6)続き

Q6: 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？

A6(続き).

➤ スパスサンプリングの説明(注)

TK試験におけるスパスサンプリングでは、通常、投与群の各動物から、少数の定められた時点で血液採取が行われる。採血は異なる動物に対して異なる時点に割り当てられ、反復されることも多く、その後、被験物質の濃度-時間挙動について統計学的な推論が行われる。適切な試験デザインを用いることで、試験担当者は動物の健康状態に影響を及ぼさないように試料数と採血量を抑えつつ、試験における通常のトキシコキネティクス試験の目的を達成することができる。

Step 4文書の内容(Q7)

Q7: 液体または乾燥試料の処理に関する生体試料中薬物濃度分析法開発やバリデーションにおいて考慮すべき点は何か？

A7.

各規制地域の生体試料中薬物濃度分析法ガイドライン/ガイダンスに規定された分析法バリデーションを行うこと。

加えて、以下の事項を考慮するべき

- 液体試料:**
- 1) 試料の均一性の**確保(ピペッティングなどによる)**
 - 2) 少量試料の取扱い(保存中の潜在的凍結・乾燥効果や凍結融解影響)
 - 3) 試料量の制限によるLLOQの上昇の可能性
 - 4) 微量容器/キャピラリーへの抗凝固剤の添加による試料希釈の影響
 - 5) **採取容器への分析対象物質の吸収増加の可能性**
 - 6) **試料の適切な保存状態の維持**
 - 7) **数種の採取方法における汚染のリスク及び反復的な試料採取の困難性**

Step 4文書の内容(Q7)続き

Q7: 液体または乾燥試料の処理に関する生体試料中薬物濃度分析法開発やバリデーションにおいて考慮すべき点は何か？

A7(続き).

乾燥試料: セルロース/非セルロースカード、ポリマーマトリックスなどへのスポット等

- 薬物の回収率が十分で再現性があり、薬物の検出時にマトリックスによる妨害効果が十分小さい方法を選択することが重要
- 乾燥スポットの一部を打ち抜く方法を用いる場合、特に低分子の薬物では、分析対象物質の検出がヘマトクリット値の違いにより影響を受けないことが重要である。ヘマトクリットによる分析対象物質の検出への影響は、ヘマトクリット値が異なる血液を使用し、既知濃度の被験薬を添加して測定することにより評価可能である。同一のスポットから打ち抜いた複数の試料の分析対象物質の値を評価することで、あるいは例えば放射性標識体を用いた評価により、スポットの均一性を確認することも重要である。正確な量の血液をデバイス上に採取し、その後試料全体を分析に使用することで、これらの問題は最小限にすることができる。

Step 4文書の内容(Q7)続き

Q7: 液体または乾燥試料の処理に関する生体試料中薬物濃度分析法開発やバリデーションにおいて考慮すべき点は何か？

A7(続き).

Incurred sample reanalysis (ISR):

各々の地域のガイドライン／ガイダンスに記載がある場合、これらに従って実施すべき

実施する場合には、十分な試料量または複製数(スポット、容器、またはチップ等)がISR用に確保されるよう注意

今後の予定

日本におけるStep 5のための

- 1) 日本語訳の作成と確認
- 2) パブリックコメント回答の作成と確認

AMED共同研究

マイクロサンプリングの円滑な導入と運用のため、AMED(HS)・企業研究費を基盤としたWet共同研究を実施中(下記は実施中・予定の項目)

- ・毒性影響評価(ラット、マウス)
- ・採血部位の違いによるPKデータの差の検討
- ・マイクロサンプリングデバイスの比較
- ・凍結前希釈(特に代替マトリックス)の影響の検討
- ・技術指針案の作成