

# マイクロサンプリングを用いたTK評価 における留意点



JBF DG2015-17, DG2016-21, DG2017-29活動結果より

2018/2/6 9<sup>th</sup> JBF Symposium  
塩野義製薬株式会社  
二橋 陽一郎

# 背景と発表の目的



## 【背景】

- マイクロサンプリングの求められる背景や利点の理解が進んでいる
- ICH S3A Q&Aが最終合意に達し，薬物濃度測定に対するマイクロサンプリングの適用への関心はより高まっている
- 一方で依然として残る課題
  - ✓ マイクロサンプリングを実践する際の技術的な問題点や課題点は何か？
  - ✓ 分析担当者としては何をどこまで準備しておくべきか？

## 【発表の目的】

- **分析担当者**が直面するであろう課題について，解決案を含む知見を提供し，国内でのマイクロサンプリングの適用を推進したい

なお，本発表の内容は各年度DGに参加したメンバーによってまとめられたものであり，JBFの考えを代表するものではない

# 実践に向けた課題 -2016年アンケート結果より (抜粋)



「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	レギュレーションの変更による試験項目の追加.
ISR	ISR用サンプル(予備サンプルも含む) の確保.
保存	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	採血用ディスクの信頼性及び容量の正確性.

# 実践に向けた課題 -ICH S3A Q&As より



- ✓ 分析感度-マイクロサンプリングによってBLQ(定量下限以下)が大多数になることは許容されない (Q3)
- ✓ 分析法バリデーションの実施 (Q4)
- ✓ 採血法や希釈, 保管法 (Q5)
- ✓ 試料均一性の確保 (Q7)
- ✓ 少量試料の取り扱い (Q7)
- ✓ 抗凝固剤のボリュームの影響 (Q7)
- ✓ 保管中の容器への吸着の可能性 (Q7)
- ✓ 適切な保管状態の維持 (Q7)
- ✓ コンタミのリスク (Q7)
- ✓ ISR (incurred sample reanalysis) の実施のために必要な試料量の確保 (Q7)

# 本発表で取り扱うトピックス

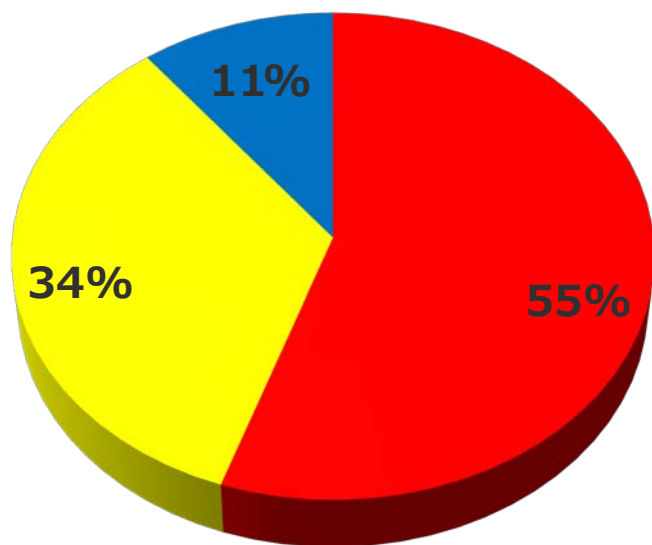


1. マイクロサンプリングに特有のバリデーション項目
2. 試料の適切な希釈
3. 抗凝固剤の影響

Wet試料をLC/MSで分析することを前提とする

# 1. マイクロサンプリングに特有のバリデーション項目

# 試料の均一性の確認



■ 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

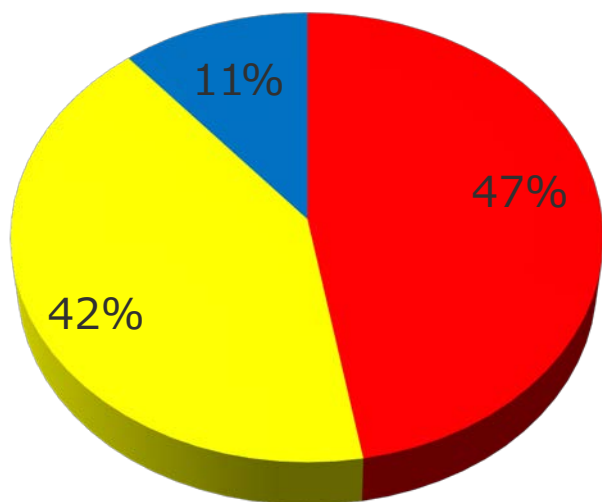
## ●具体的な方法

- 分注したQC試料で評価する [類似回答3]
- 少量 (15 $\mu$ L程度) で保存して、検証
- 検量線やQC試料で、再現性が取れれば問題ないと思う

## ●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

# 保存中試料の凍結乾燥による濃縮



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 (5~15 $\mu$ L程度) で保存して、安定性を実施

## ●DGコメント

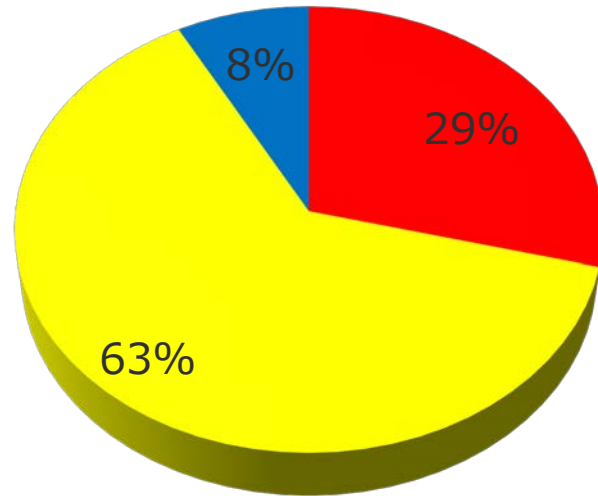
- 「バリデーションとしてデータを残す」意見はなかった
- 「何もしない」が47%であり、何らかの状況で濃縮の影響が確認できるという意見が多かった
- 一方で、「予備的に確認する」という意見が42%あった



# 凍結融解の回数を増やすか？



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？



■ 回数を増やす

■ 回数を増やさない

■ 自社で経験がないため、判断がつかない

## ●「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

## ●「回数を増やす」理由

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

## ●DGコメント

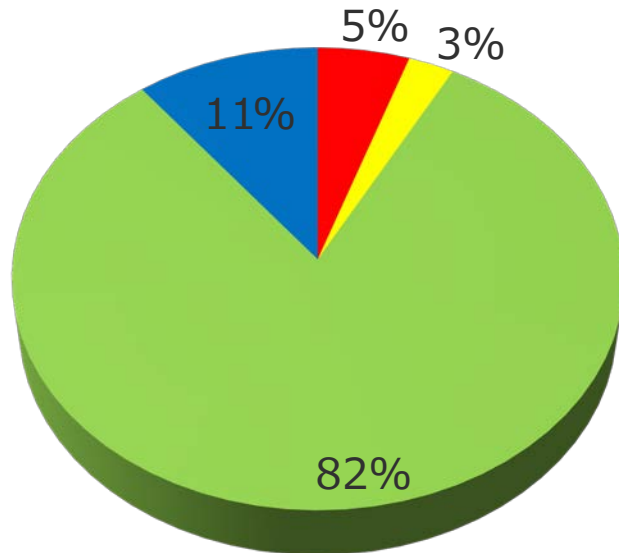
- 63%が増やさないという回答であった
- マイクロサンプリングの実施が凍結融解の回数を増やす理由にはならないと考えられる

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、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

# 希釈後の安定性



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

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

## ●「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

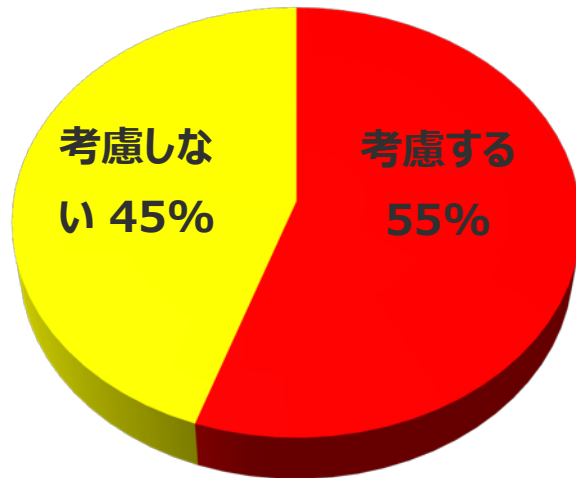
## ●具体的な方法

- 希釈後の安定性として実施 [類似回答5]

# 抗凝固剤の影響による濃度補正

JBF

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

## 考慮が必要なケース

- 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
- 抗凝固剤による試料希釈の影響が考えられる場合

# 従来法⇒マイクロサンプリング



- 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。
- 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。
- DG2017-29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。

# 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

# 抗凝固剤の添加量（割合）の増加



## ケース

従来法では500  $\mu$ Lの血液に5  $\mu$ 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  $\mu$ Lにした（抗凝固剤の添加量は5  $\mu$ 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

\*：後述

## 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

## 2. 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



# 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™)	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

いずれの手法でも可能. 希釈の均質性に留意すること.

# 希釈を含むサンプリング例



[http://bcn2017.europeanbioanalysisforum.eu/wp-content/uploads/2017/11/Amanda-Wilson\\_AZ.pdf](http://bcn2017.europeanbioanalysisforum.eu/wp-content/uploads/2017/11/Amanda-Wilson_AZ.pdf)

# 代替マトリックス及び添加剤



<b>水溶液 <sup>1)</sup></b>	<b>【利点】 入手しやすい</b>
生理食塩水 (Saline), リン酸緩衝液, リン酸緩衝食塩水 (PBS) (pH 7.4)	
<b>水溶液への添加剤</b>	<b>【利点】 吸着の防止</b>
ウシ血清アルブミン (BSA)	PBS with BSA <sup>1)</sup> , 2% BSA solution <sup>2)</sup>
界面活性剤	非イオン性界面活性剤 (Tween20など)
<b>有機溶媒との混液</b>	<b>【利点】 キャピラリー等からのwashout, IS添加, 吸着の防止</b>
25%アセトニトリル in 水 <sup>3)</sup>	全血15 $\mu$ L+135 $\mu$ L (10倍希釈) $\Rightarrow$ 25 $\mu$ L/assay
Low %メタノール in 水 <sup>4)</sup>	ペプチドがanalyteのとき吸着防止
<b>代替血清</b>	<b>【利点】 実試料に近い</b>
市販の凍結プール血清	L-コンセーラ「ニッスイ」 <sup>5)</sup>

- 1) [http://bcn201211.europeanbioanalysisforum.eu/wp-content/uploads/2016/03/S27.-3\\_sangster.pdf](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](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**

### 3. 抗凝固剤の影響

# 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

- 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50 $\mu$ Lに対して2.5% (=1.25 $\mu$ L) 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 $\mu$ L程度）、そのまま採血
シリンジ	採血チューブに予め1 $\mu$ Lの抗凝固剤をとり、全血50 $\mu$ Lを添加してよく混和

\*Dead volumeの無いシリンジ（マイジェクトなど）

- 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 $\mu$ Lの抗凝固剤をとり、全血50 $\mu$ Lを添加してよく混和
シリンジ	採血チューブに予め25 $\mu$ Lの抗凝固剤をとり、全血50 $\mu$ Lを添加

# 補正の方法（適応例）

- 採血：50 $\mu$ L（血漿量25 $\mu$ Lと仮定）
- 抗凝固剤：25 $\mu$ L添加
- 測定：5 $\mu$ 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

<b>補正の方法1</b> 測定結果に対して 補正係数をかける	<b>補正の方法2</b> 検量線の設定濃度を 補正する	<b>補正の方法3</b> 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 $\mu$ Lにする

# 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、50 $\mu$ L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 $\mu$ L	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L
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 $\mu$ L	25 $\mu$ L	50 $\mu$ 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 $\mu$ Lの添加は誤差 $\pm$ 3%以内と意外に小さいが、50 $\mu$ 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**

# まとめ



## 1. マイクロサンプリングに特有のバリデーション項目

- ✓ 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る
- ✓ ただし、以下の場合は考慮が必要
  - 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
  - 抗凝固剤による試料希釈の影響が考えられる場合

## 2. 試料の適切な希釈

- ✓ 利点および注意点を理解し、適切な方法を適用する

## 3. 抗凝固剤の影響

- ✓ 添加割合により、TK試料濃度の補正が必要な場合がある
- ✓ ヘマトクリットの変動を考慮すると、補正を必要としない抗凝固剤の添加方法が推奨される

# 最後に



- 実験データや実践例を元にした議論が活発化し、マイクロサンプリングが国内外で推進されることを期待する
- 非臨床TKへの適用だけでなく、臨床での応用（特に乾燥血液試料）の動きも注目される

# お知らせ



- DG2017-29「マイクロサンプリング (3) – 実施計画と方法の提案」では、以下の内容でポスター発表します。会場でのディスカッションを楽しみにしています。
- ◆ 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-
- ◆ EBF 10<sup>th</sup> Open Symposium ポスター発表資料 <別掲>

※過去のDG活動成果は以下のHPIに掲載されています。ぜひご参照ください。

[http://bioanalysisforum.jp/images/2016\\_DG/DG2016-21\\_update.pdf](http://bioanalysisforum.jp/images/2016_DG/DG2016-21_update.pdf)

[http://bioanalysisforum.jp/images/2016\\_7thJBFS/05\\_DG2015-17\\_HP\\_J.pdf](http://bioanalysisforum.jp/images/2016_7thJBFS/05_DG2015-17_HP_J.pdf)



ご清聴ありがとうございました



# Appendix

# DG2015-17 アンケート結果

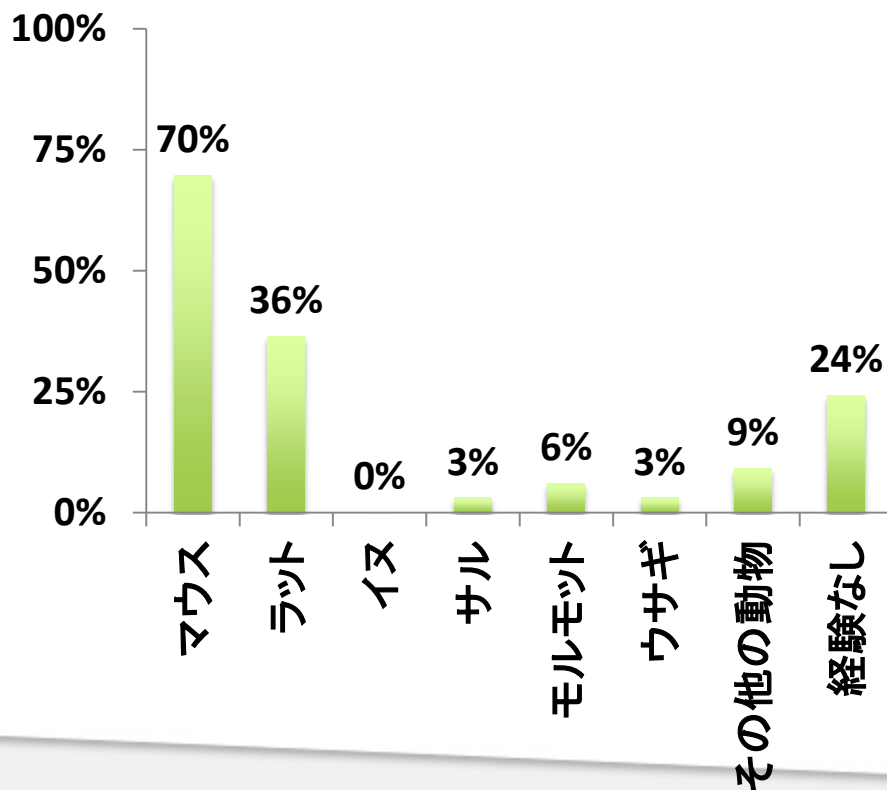


Q6

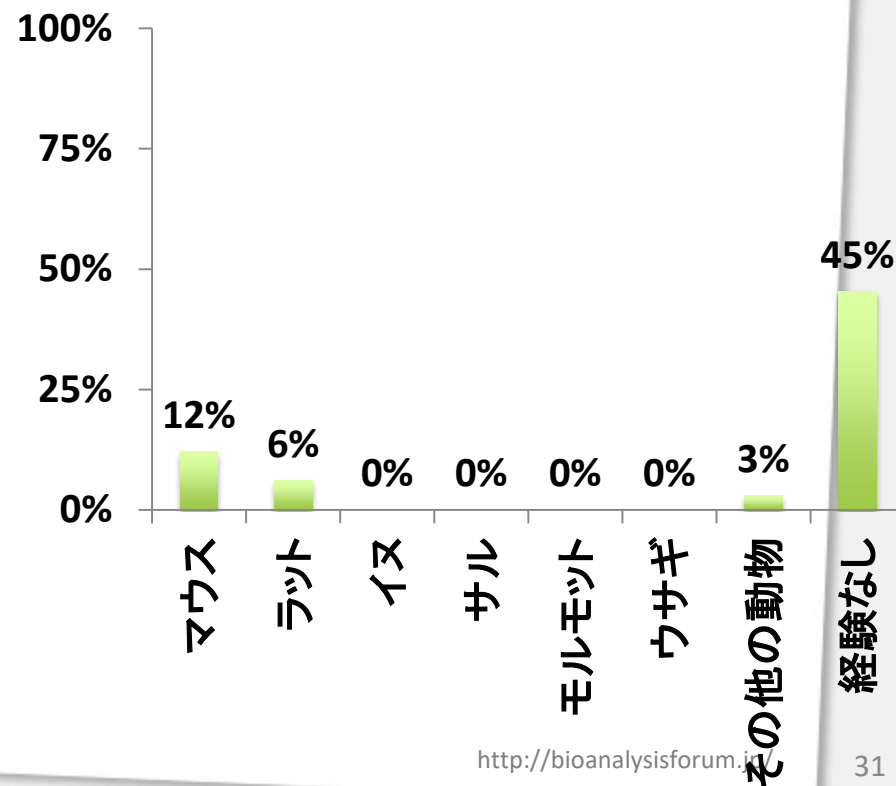
マイクロサンプリング意識調査

御社では非臨床試験において試験グレードに関わらず50  $\mu$ L/point以下の採血の経験はありますか？(DBSを除く, 複数回答可)

申請資料として用いない試験



申請資料として用いる試験

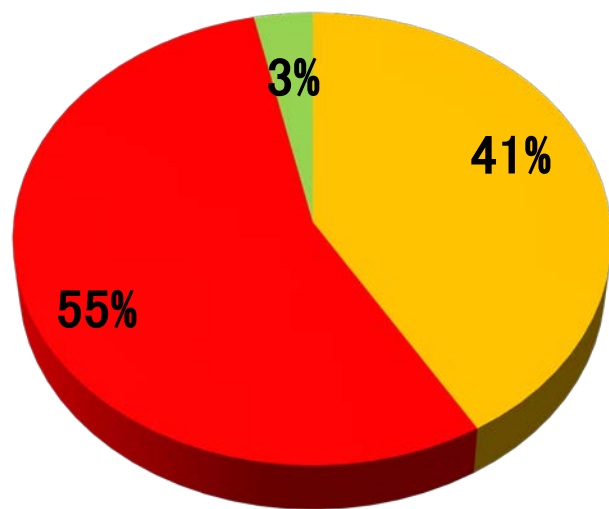


# DG2016-21 アンケート結果

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。

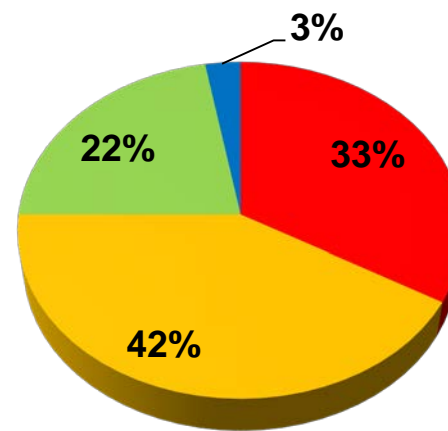
Q1-2

〈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

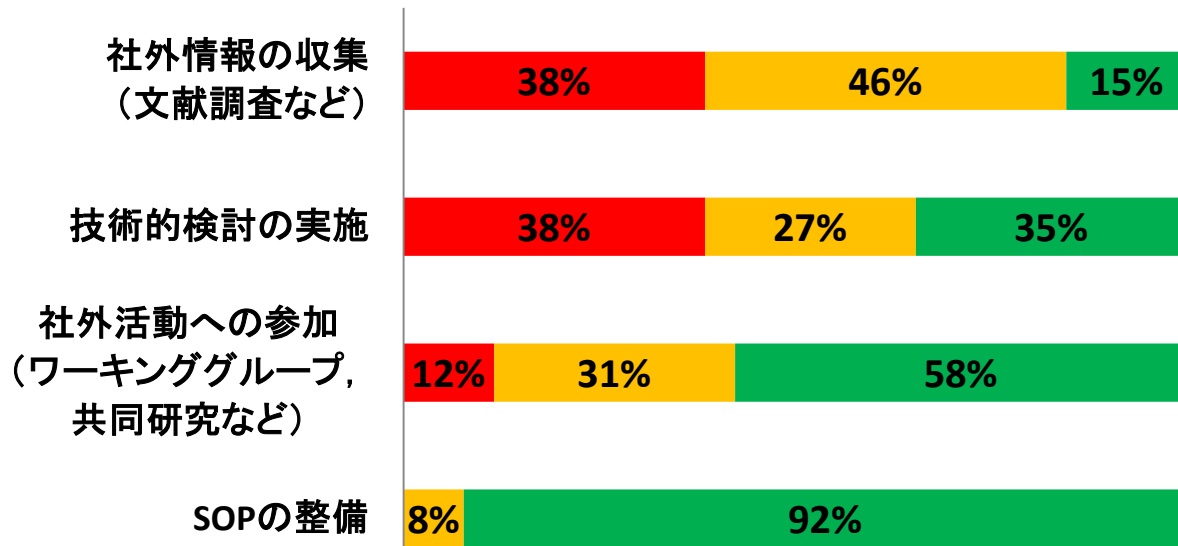
<http://bioanalysisforum.jp/>



# DG2016-21 アンケート結果

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。

Q1-5



- 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

## 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。

# DG2016-21 アンケート結果



Q2-21~34

デバイスのメリット, デメリット

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

マイクロサンプリングへの適用例

赤線: 主要経路  
点線: 少数経路

