

# 不安定な分析対象物質

DG2020-46

第12回JBFシンポジウム(2021年3月)ではDGポスターの現地発表が出来なかったため、メールでご質問・ご意見をお寄せいただければDGにてメールベースで検討し回答するようにします(2022年3月まで)。ご質問・ご意見はメールでmak.niwa@po.nippon-shinyaku.co.jpにお願いします。

## メンバーリスト

氏名	よみ	所属	備考
近藤 綾香	こんどう あやか	塩野義製薬株式会社	
澁谷 映美	しぶたに えみ	キョーリンリメディオ株式会社	
島田 英一	しまだ えいいち	小野薬品工業株式会社	
鶴田 敦	つるた あつし	EAファーマ株式会社	
西田 裕	にしだ ひろし	グラクソ・スミスクライン株式会社	
丹羽 誠	にわ まこと	日本新薬株式会社	リーダー※
平田 沙綾	ひらた さあや	日本新薬株式会社	
藤野 直子	ふじの なおこ	大鵬薬品工業株式会社	
丸山 詩央	まるやま しお	田辺三菱製薬株式会社	
八木 遼太郎	やぎ りょうたろう	東レ株式会社	
吉松 宏倫	よしまつ ひろみち	科研製薬株式会社	

※ご質問はメールでmak.niwa@po.nippon-shinyaku.co.jpにお願いします。

- 血中で不安定な分析対象物質(薬物・代謝物を想定)について最近の環境変化で議論する意義が高まってきた。
  - 安定化手法が出そろってきた。急速冷却、急速凍結、酵素阻害剤添加、pH調整、DBS、誘導體化、など。
  - そろそろ、網羅的なまとめが欲しくなっている。
  - 後発品についても(だからこそ)安定性の関心が高まっている。
  - ICH-M10ドラフトで開発品の個別相談の位置づけが高まり、ベストプラクティス探求と個別案件の利害を切り離し可能になった。



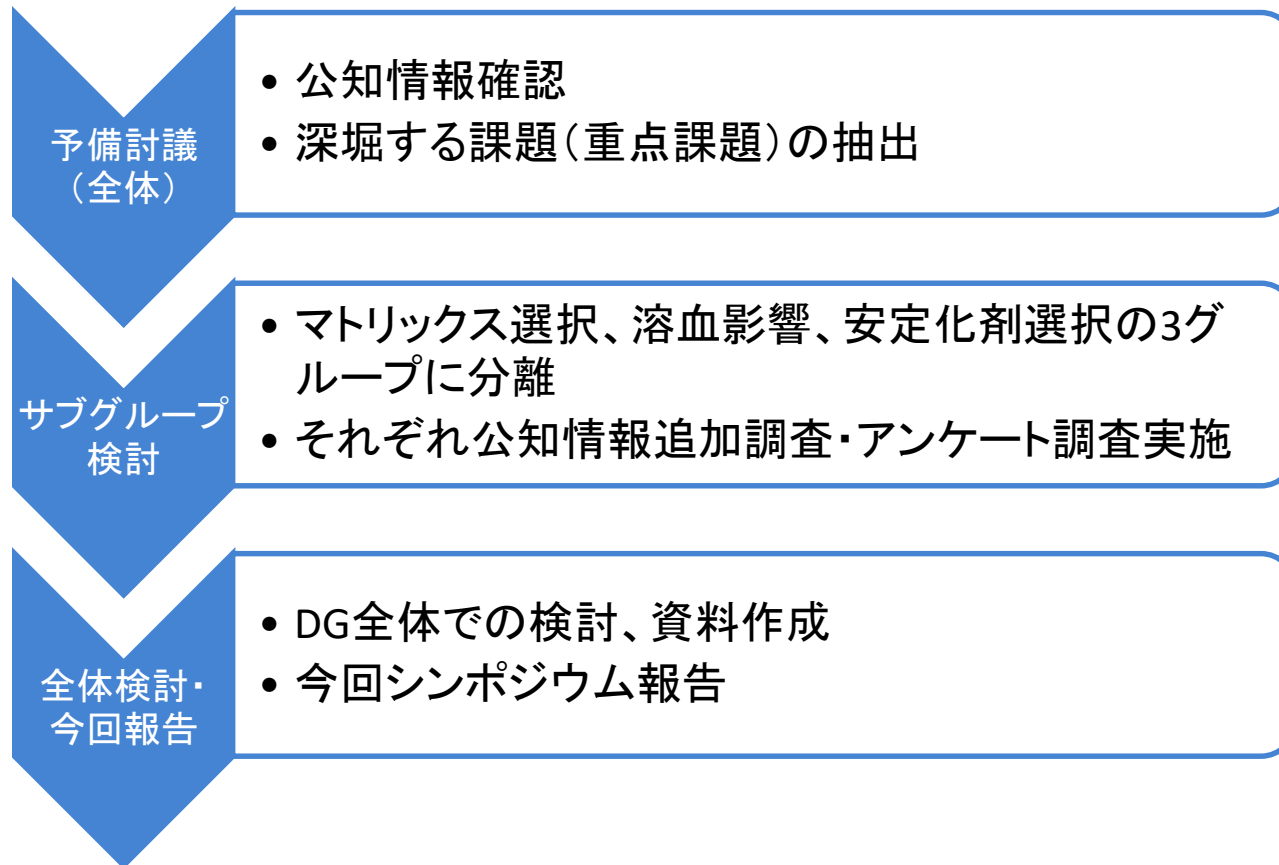
不安定な分析対象物質に対する、現在の安定化方法を総合的に考察、ベストプラクティスを探求する。

# スコープ・アプローチ

- 大きなテーマ: 不安定な分析対象物質への対処について、ベストプラクティス確立(提案)を目指す。
- スコープ: 規制下における、低分子薬物(代謝物)濃度測定(クロマトグラフィ法)。先発・後発医薬品とも。低分子、クロマトグラフィ法。
- アプローチ方法:
  - ① 公知情報を収集、整理することで現在までの技術動向をつかむ。
  - ② JBFパートナーをエキスパートパネルとみなしてアンケート実施、その調査結果を活用し、総合的に考察する。

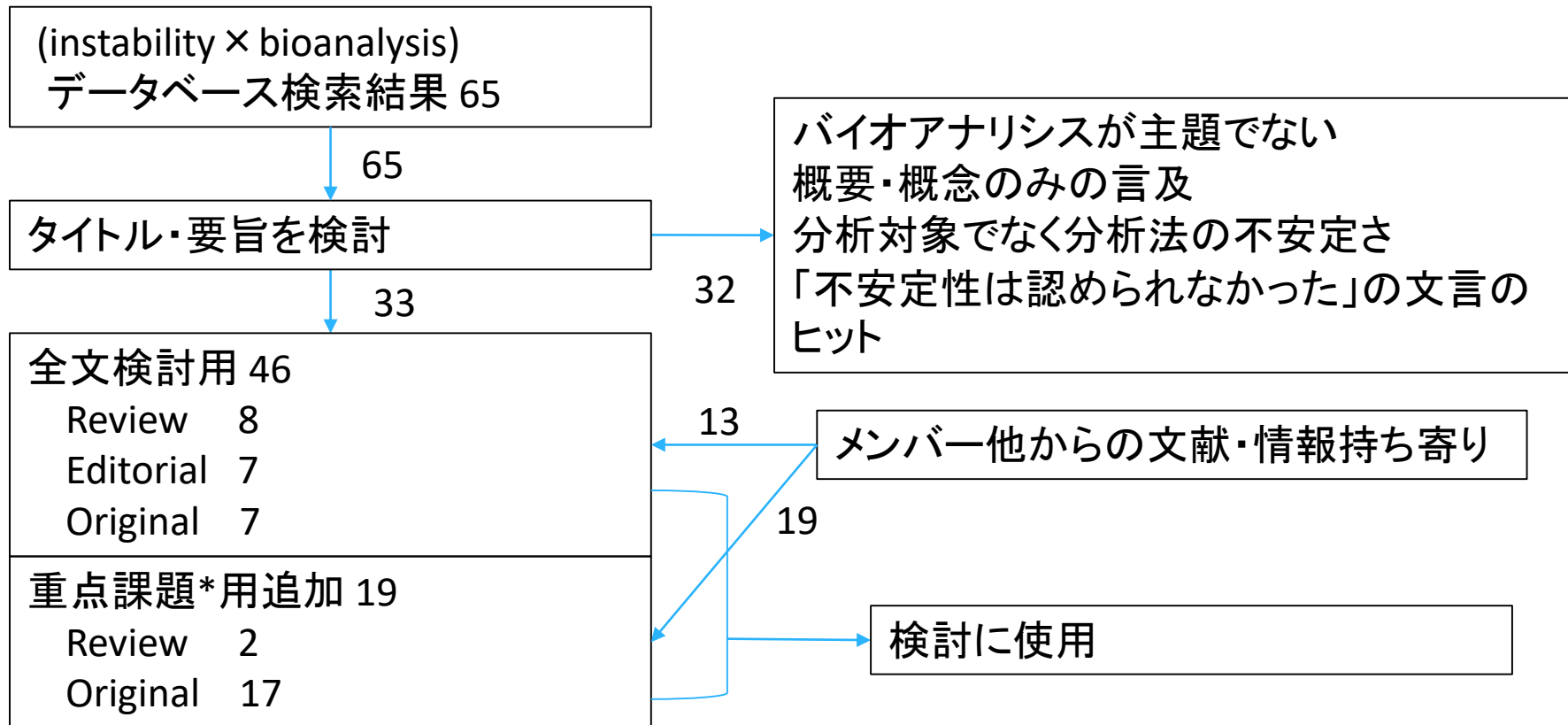
# 活動状況と今回報告内容

- 2020年7月から活動→今回2021年3月報告



# 公知情報の整理

- ①文献データベースの検索
  - PubMed、Web of Science 使用
- ②メンバー他からの情報提供による追加



# 重点課題の抽出

- 文献情報の整理後、DGで討議を行い、以下3つの重点検討テーマを設定した。
  - 1) 分析対象物質の不安定性のためにマトリックス選択に配慮することがあるか調査する。
  - 2) 分析対象物質が溶血時に特に不安定となる場合、その検出や対策への配慮をまとめる。
  - 3) 安定化剤の1種であるエステラーゼ阻害剤の選択・使用方法について体系的にまとめる。
- それぞれ、追加の公知情報の取得、アンケート調査を実施した。

# 検討・実行状況まとめ

**【目標】**不安定な分析対象物質に対する、現在の安定化方法を総合的に考察、ベストプラクティスを探求する。

## 【重点項目】

- 1) 不安定性に関係したマトリックス選択への配慮
- 2) 溶血時に特に不安定となる場合の検出や対策
- 3) エステラーゼ阻害剤の選択・使用方法

## 【アプローチ方法】重点項目ごとに

- 1) 公知情報を収集、整理することで現在までの技術動向をつかむ。
- 2) JBFパートナーをエキスパートパネルとみなしてアンケート実施、その調査結果を活用し、総合的に考察する。

**【結論】**重点項目ごとに推奨できる取り組みを設定  
(ポスター末尾の全体まとめ参照)





# マトリックス選択

---

## 不安定な分析対象物質とマトリックス選択

EDTA血漿で不安定（酸添加が無効）だが血清で安定であるとする文献があった（1件のみ）。



安定性に配慮してマトリックスを選択することがあるのか？



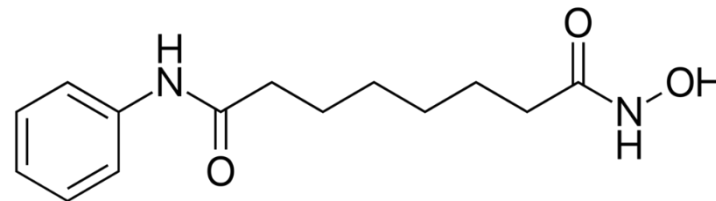
- ① 公知情報、メンバー経験からマトリックスが不安定な分析対象物質に及ぼすインパクトを考察。
- ② マトリックス選択に影響を与える要素も考察。
- ③ JBFパートナーにアンケート実施し、Expert Opinionを収集、更に考察。



# 公知情報・DG内検討

## マトリックスが不安定な分析対象物質に及ぼすインパクト

- Vorinostat (右図) について
  - ・ EDTA血漿で不安定
  - ・ 酸添加が無効
  - ・ 血清で安定 であるとする文献があった。



L Du, DG Musson, AQ Wang. J Pharm Biomed Anal . 2006 Nov 16;42(5):556-64.

文献中ではフィブリノーゲンが関係する可能性を考察

- フィブリノーゲンは血漿中に2~6mg/mL存在し無視は出来ないが、その影響がありそうとの理由づけはメンバーではできなかった。

HJ Kim, MR Kim, EJ So, CW Kim. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 2007, 70, 619-625.

- 「血清の方が血漿より安定な場合がある」というFindingを一般化できるか、メンバーで検討した。

血清の方が血漿より安定である経験はなかった。

アンケートでも確認する。

# 一般にマトリックス選択に影響を与える要素

- アンケートに反映するため、マトリックス選択に影響する要素をメンバーで検討した。
  - 安定性について：
    - 安定性からしても、基本的には冷やして血球から離したいので血漿を使いたい。
  - 安定性以外の要素について：
    - 薬理試験とマトリックスを共用する場合、薬理試験に合わせる場合がある。
- 1) 抗凝固剤が炎症マーカー IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ に影響する  
エンドキシンで汚染したヘパリンは回避すべき。  
P Riches et al., J Immunological Methods 1992. 153, 125-131.
  - 2) 抗凝固剤が血清ホルモンに影響する  
[Arg<sup>8</sup>]-Vasopressin Peptide はEDTA血漿以外で不安定。冷却は重要。  
MJ Evans et al., Clin Biochem 2001, 34, 107-112.



# アンケート調査

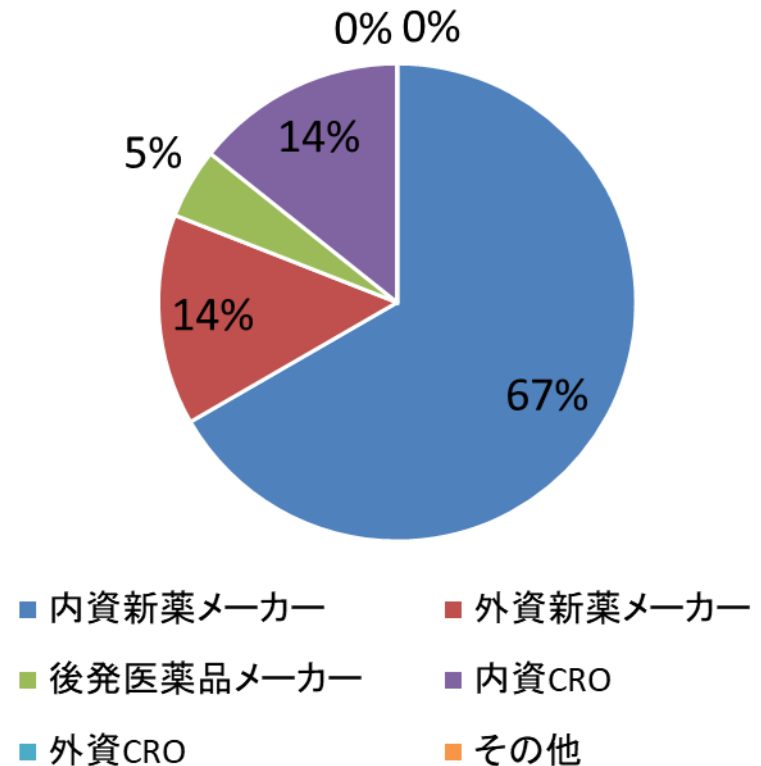
# マトリックス選択についてのアンケート

- 課題意識:
- マトリックス選択時に、分析対象物質の安定性に配慮することがあるのか？（配慮したほうがいいのか？）
  - 血清の方が安定な事例があったため
- 実際、どのマトリックスがどのような考え方で選ばれているのか？



- Webアンケート実施
  - 対象: JBFパートナー (n=48)
  - 時期: 2020年10月29日～11月13日
  - 回答数21 (回答率44%)

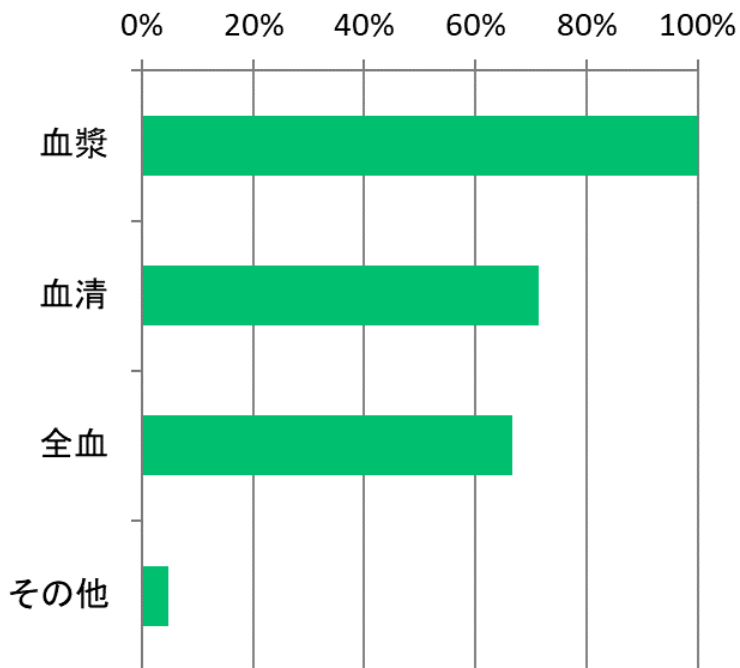
Q1 所属組織の業態



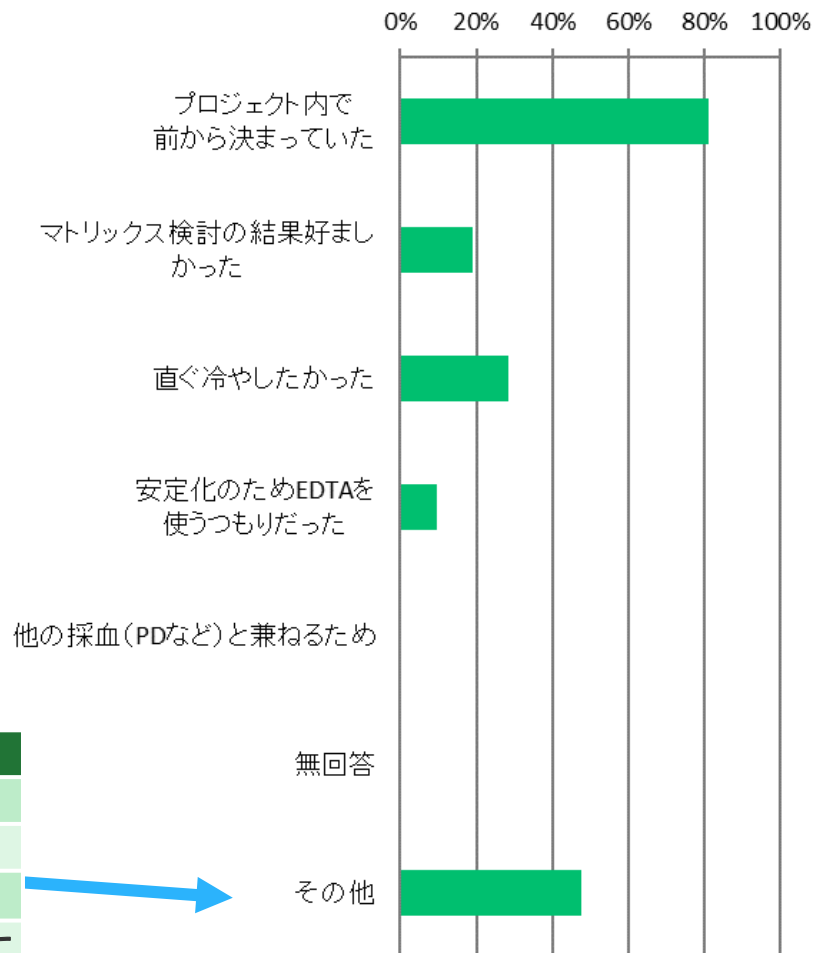


# マトリックス選択（実績） 使用経験・血漿選択理由

Q2 血中濃度測定で実際に使ったことのあるマトリックス



Q3 血漿を選択した理由



**その他（血漿を選択した理由）**  
 分析CROのため委託者指定(2名)。  
 血清に比べて多く回収できる。  
 扱いやすい(2名)。調製が容易。  
**第一選択が血漿(3名)**。Discoveryで血漿を使用し、特に問題がなければそのまま使用。



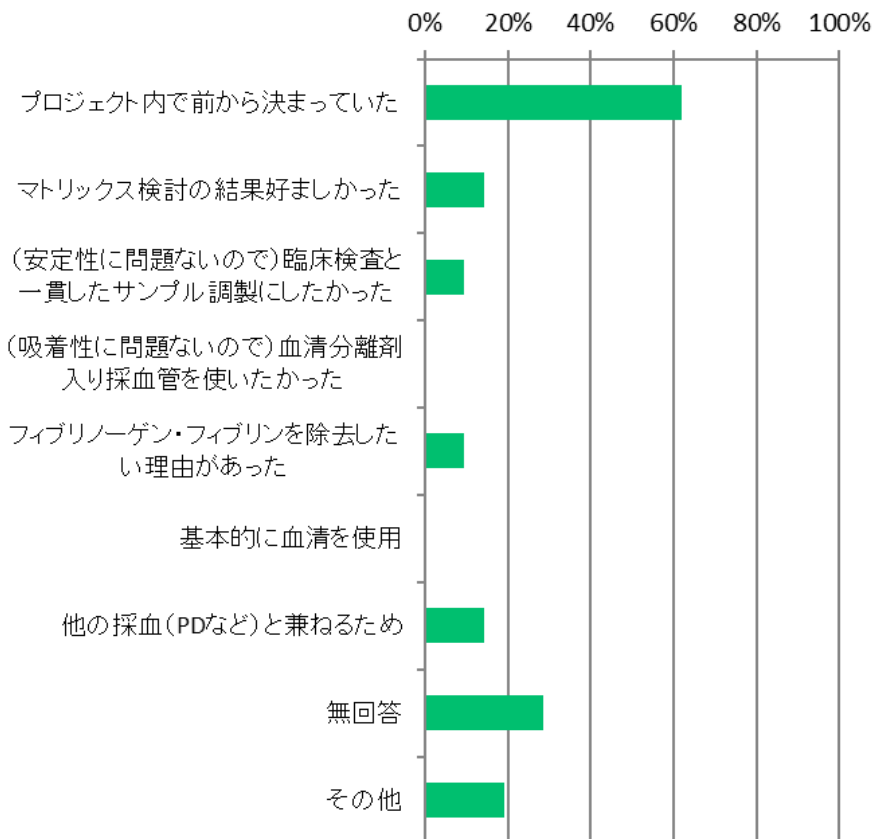
http://bioanalysisforum.jp/



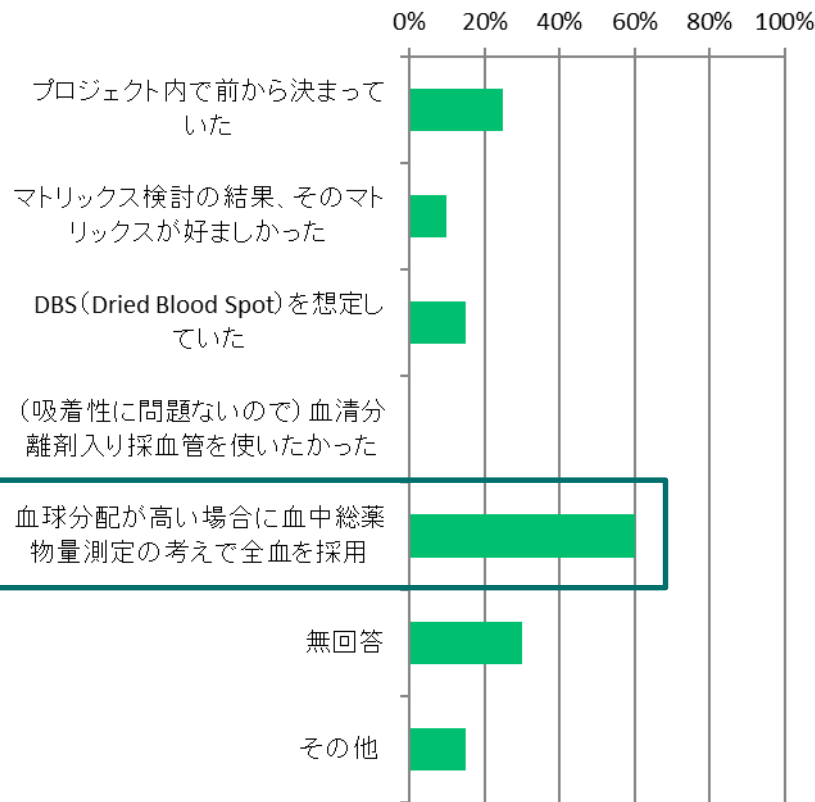


# マトリックス選択（実績） 血清・全血選択理由

Q4 血清を選択した理由



Q5 全血を選択した理由



**その他(血清を選択した理由)**

分析CROのため委託者指定(2名)。  
市販測定キットで血清が推奨。  
低分子では稀だが、血清を使用することもある。

**その他(全血を選択した理由)**

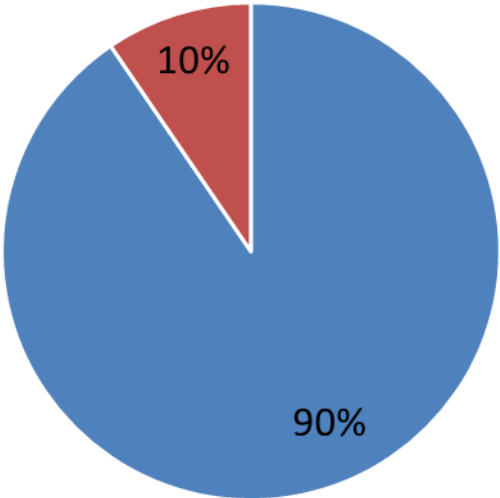
委託者が全血での安定性の確認を指示  
血漿(血液)中で不安定なため採血直後に安定化剤を添加・有機溶媒で失活処理(2名)

http://bioanalysisforum.jp/



# マトリックス選択 (実績) 血清・全血選択理由

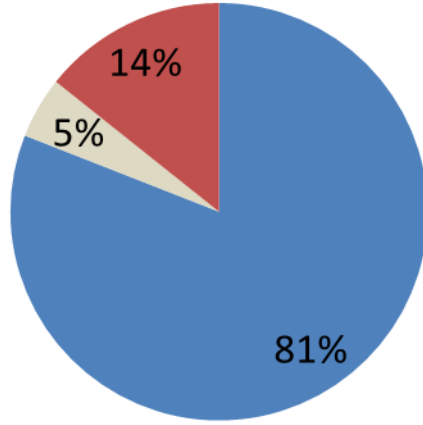
Q6 血清を血漿より優先的に使うことがあった(分析対象物質との関係・特に安定性)



■ なかった ■ あった(理由をコメント欄に記載)

**あった(優先した理由)**  
データの蓄積があったため。

Q7 測定法の開発中・運用中に、不具合があってマトリックスを変更したことがある



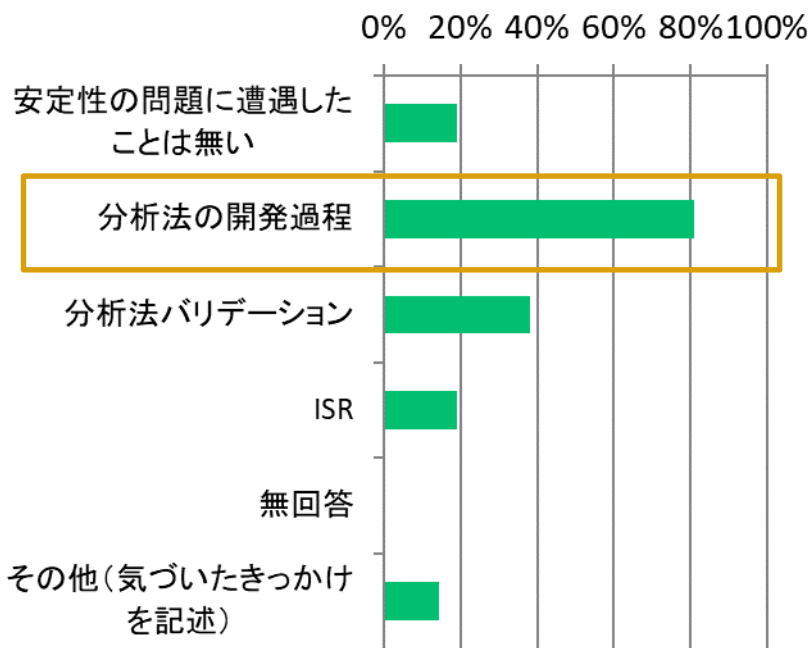
■ 不具合があつてマトリックスを変更したことは無い  
■ 無回答  
■ 不具合があつてマトリックスを変更したことがある(不具合を記述欄に)

**不具合でマトリックス変更(どのような不具合か)**  
保存安定性が取れない。  
バックグラウンドノイズ。  
血漿を調製する間にも分解が進む(全血に変更)。

http://bioanalysisforum.jp/

# マトリックス選択（実績） 不安定性の認識時期・小括

Q8 分析対象物質（未変化体・代謝物）の安定性の問題に気づいた段階



● その他(気づいたタイミング、きっかけ)

● 実試料(投与後試料)の再注入。

● ベンチトップ安定性予備検討(遮光の有無)。

● エステルなどは当初から構造でわかっている。

## 【マトリックス選択・実績 小括】

### ● マトリックス選択:

- ・ プロジェクト・委託元で決まっている実態がある。
- ・ **血漿が基本**という見解多い。
- ・ 血漿は**調製の容易性**・**すぐ冷やせる**・**多く回収できる点**が評価されている。
- ・ 全血は**血球分配が高い**ときに**選択**されている。**採血直後**に安定化剤を添加・直ちに失活処理する場合にも**選択**される。

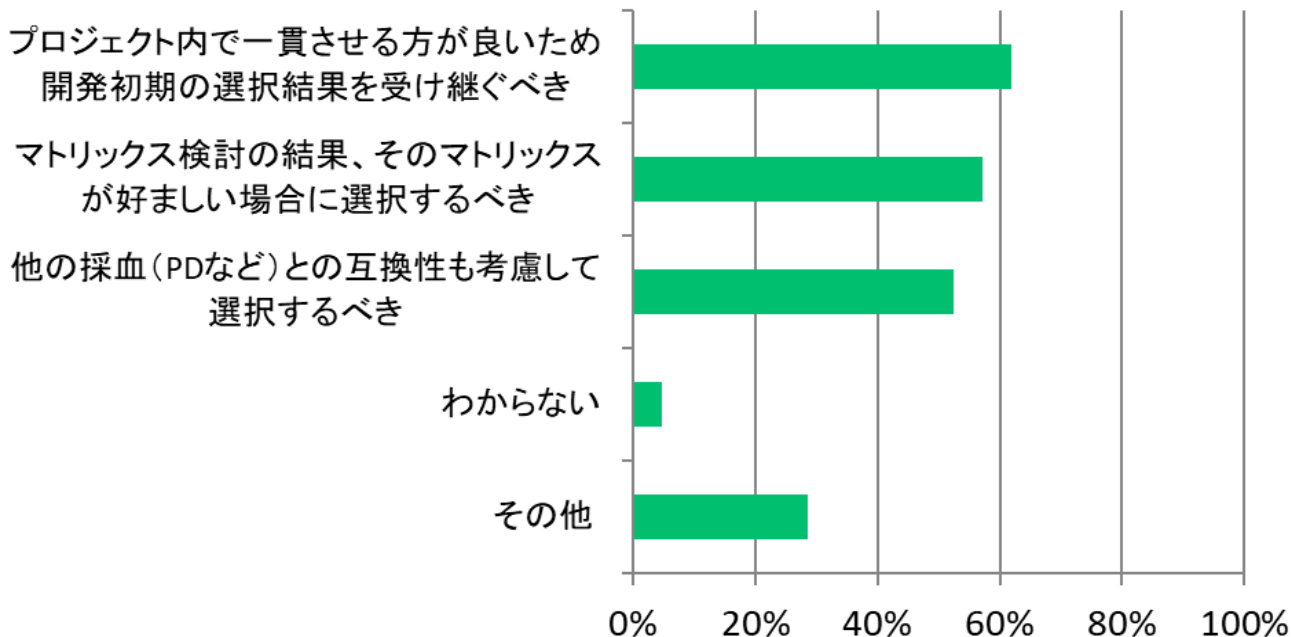
### ● 問題の検出・対処

- ・ **分析法の開発過程**で気づくことが多い。

<http://bioanalysisforum.jp/>

# マトリックス選択（意見） 全体的な考え方

## Q9 マトリックス選択の全体的な考え方



### その他（マトリックス選択の考え方）

薬物の有効性、安全性を評価するために必要なマトリックスを選択している。

分析法開発や実施量測定で問題が懸念された場合、バーチャルバリデーションを実施し、適切なマトリックスを選択する(3名)。

経験上、血漿と血清の分析・測定で違いは出たことがないため、マトリックス選択のための比較検討は必要ないと考え、その他の事情で選択してもよいと考える。

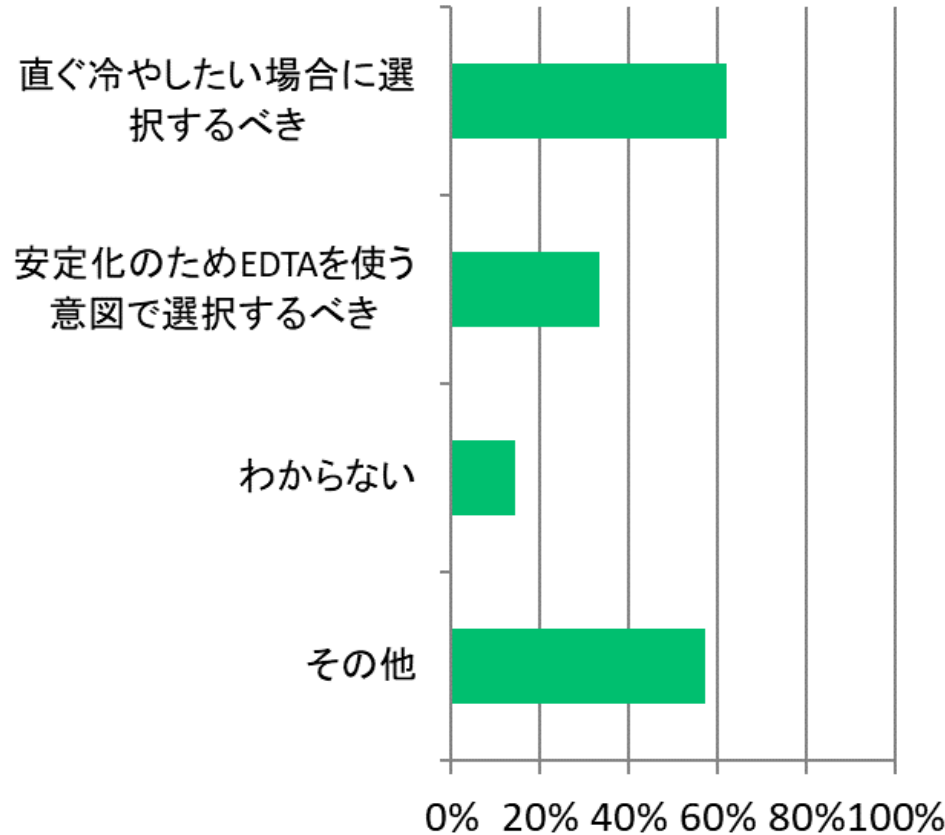
採血後の処理や回収量の多さなどを考慮し、安定性に問題がない限り血漿を第一選択とする(2名)。

分析CROのため委託者指定。

# マトリックス選択（意見）

## 血漿を選択すべき理由

### Q10 血漿を選択すべき理由

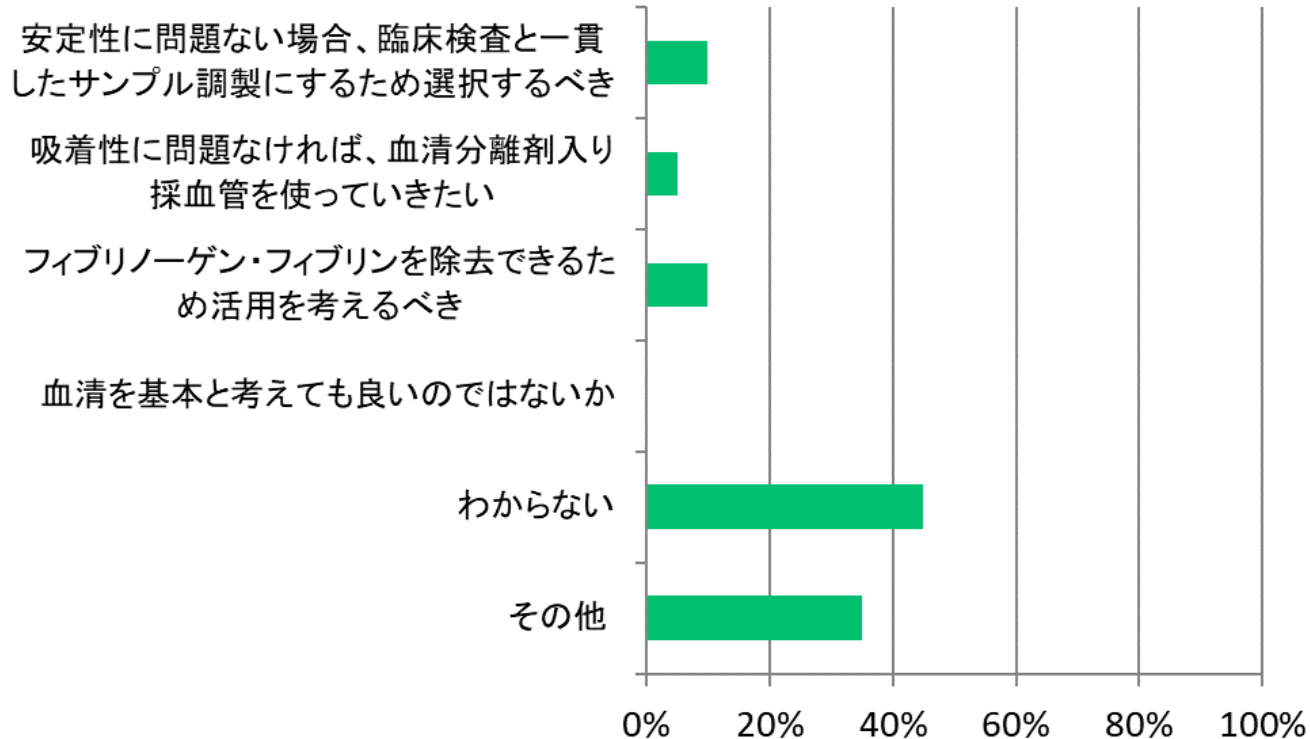


#### その他（血漿を選択すべき理由）

ハンドリングの容易さ、回収量、凝固成分を含有していること、また、開発初期における不安定な代謝物に対する情報の少なさと言った面から**血漿を第一選択**とすべきだと考える(10名)。

# マトリックス選択（意見） 血清を選択すべき理由

## Q11 血清を選択すべき理由



### その他（血清を選択すべき理由）

血漿で問題がある場合に選択(4名)。

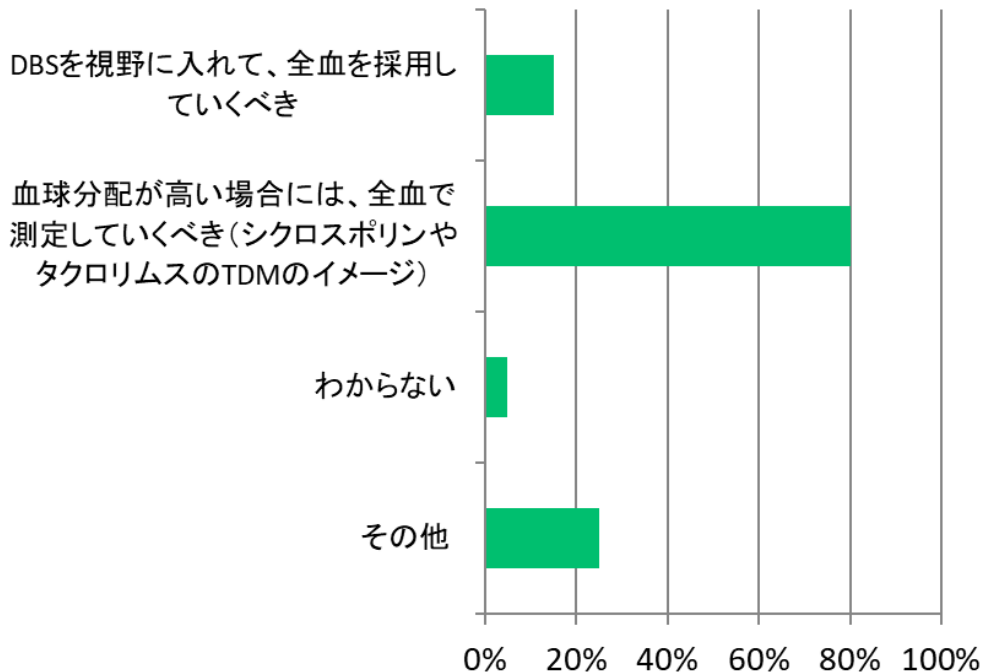
測定対象により検討する。

臨床現場環境によっては血清の方がハンドリングが容易な場合がある。ただし、安定性・吸着性などへの考慮が必要。

# マトリックス選択（意見）

## 全血を選択すべき理由

Q12 全血について



### その他（全血を選択すべき理由）

安定化剤などの添加が必要な場合や、血漿分離時に分解してしまう化合物を扱う際に選択する(2名)。

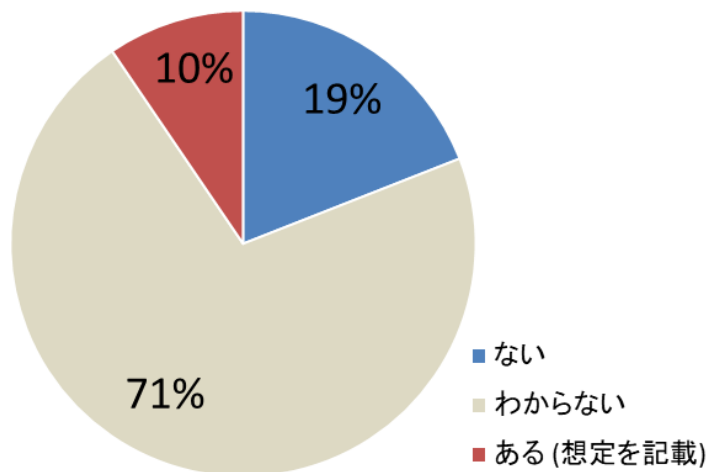
クリアランスの議論では血流量との比較が必要となるため、全血中濃度基準のクリアランス算出が必要となる。全血-血漿(血清)中薬物濃度比の測定をせずに直接議論できる全血での測定の有用性もあると考える(2名)。

血球分配がある程度高くても、タンパク結合率と同様にPK/PDの補正解析は可能と考える。血漿/血清の方が正確な量をハンドリングしやすく、分析の知見も多いので、通常、血液を対象マトリックスにはしない。(社内には異なる意見もある)

# マトリックス選択（意見）

## 安定性との関係

Q13 公知文献で安定性から血清が推奨される例が1例ありましたが、同様に血清を優先的に使うべき状況があると思いますか。

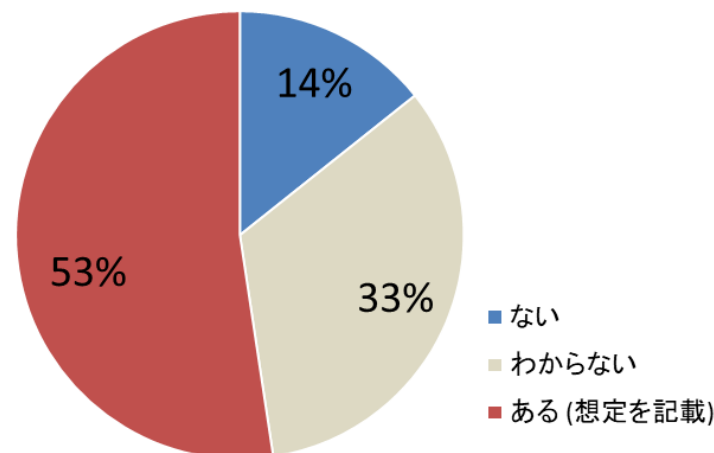


### ある(血清を優先使用する想定)

分析結果に影響がある場合。

血漿に比べ血清の方がよりきれいであり、後の長期臨床試験の際に検体の取り扱い(液体ハンドリングロボット等)がより楽である場合があると思う。

Q14 安定性の課題(分析対象物質との組み合わせによる不安定性など)でマトリックスを選択する状況があると思いますか。



### ある(安定性によるマトリックス選択の想定)

作業時間を含めて安定性を考慮し、マトリックス選択する場合。ただし、安定化剤の添加や操作手順の工夫でマトリックス変更を回避する場合もある(3名)。

採血直後から冷却したい場合は血漿を選択する(2名)。

迅速に安定化剤を添加する必要がある場合、より安定なマトリックスを選択する。

血漿・血清処理段階で代謝が進んでしまう場合は全血を選択し、速やかに失活処理する。



## 【マトリックス選択・意見 小括】

## ●マトリックスごとの選択理由：

- ・ 1<sup>st</sup> choiceは血漿
- ・ 血漿で不具合があったとき血清を検討することがある
- ・ 全血は血球移行性が高いときに考慮する

## ●血清の優先可能性

- ・ 血漿優先
- ・ PDのマトリックスを兼ねる時は血清も考慮される
- ・ 安定性から血清を選択する考え（公知文献事例）を支持する意見はなかった

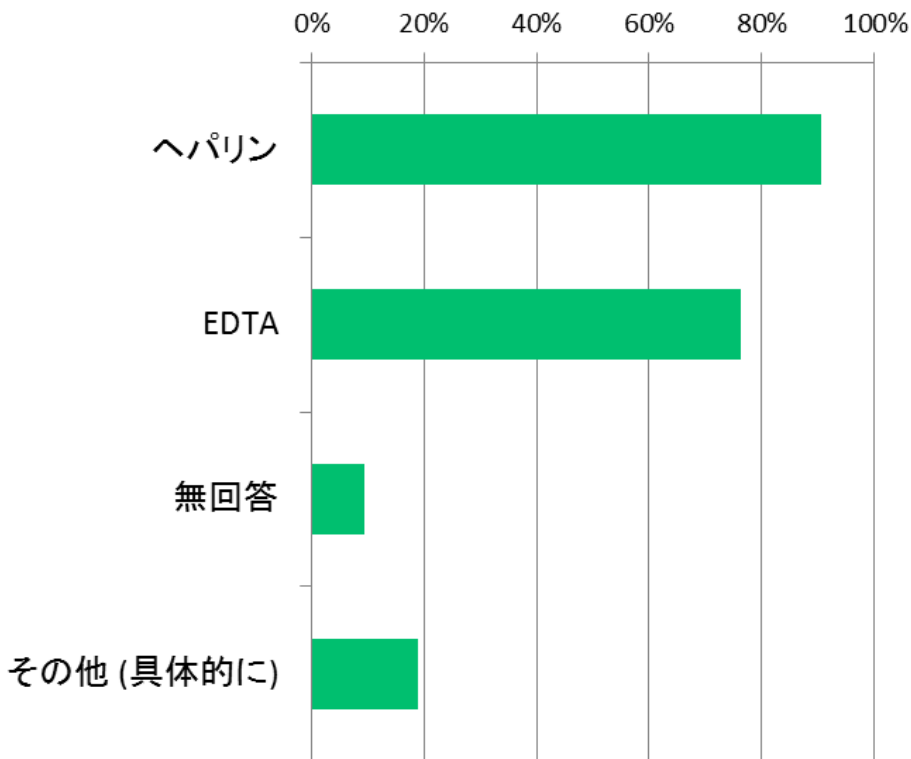
## ●マトリックス選択と安定性

- ・ 安定性によって選択することはありうる
- ・ 冷却の必要性（血漿）、安定化剤添加に適しているか



# 抗凝固剤選択（実績） 非臨床・使用実績

Q15 非臨床試験の血中濃度測定で実際に使ったことのある抗凝固剤（カウンターイオンは別）



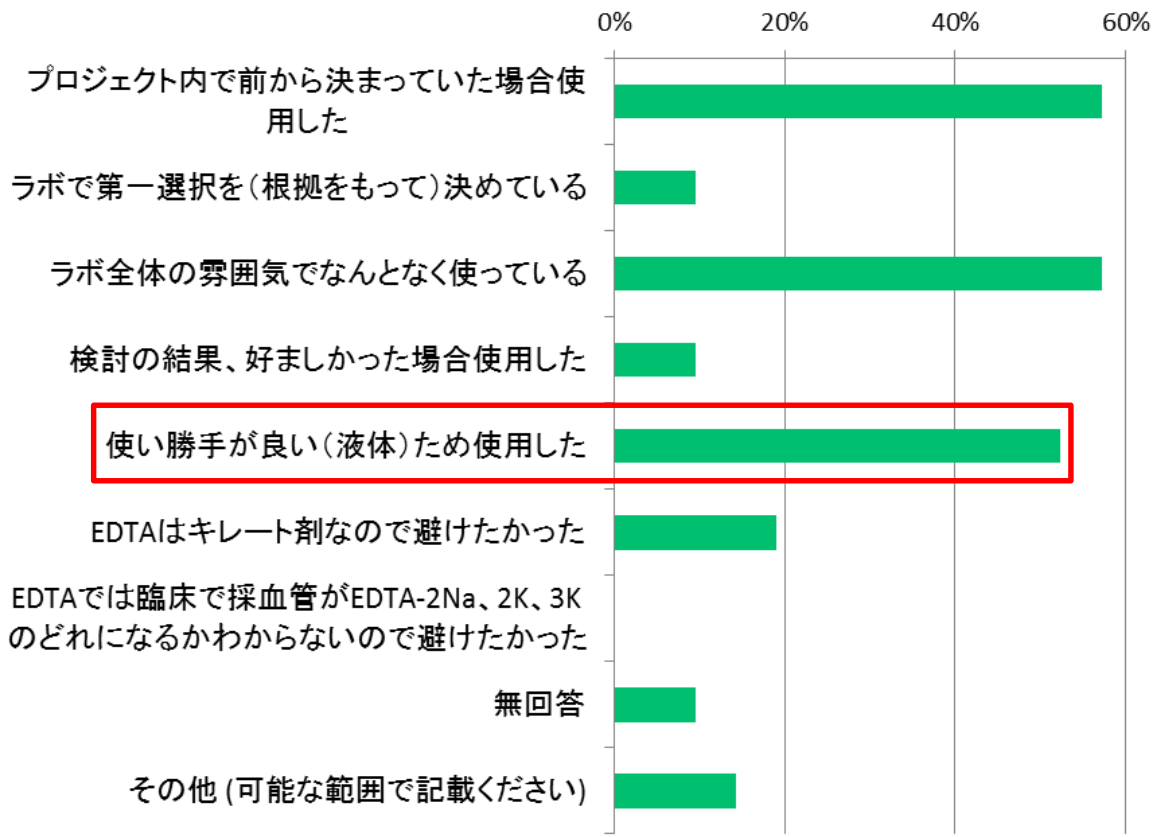
**その他 (抗凝固剤使用実績)**  
クエン酸 (ナトリウム) (4名)  
フッ化ナトリウム (2名)

<http://bioanalysisforum.jp/>



# 抗凝固剤選択（実績） 非臨床・ヘパリン選択理由

Q16 ヘパリンを選択した理由（非臨床）



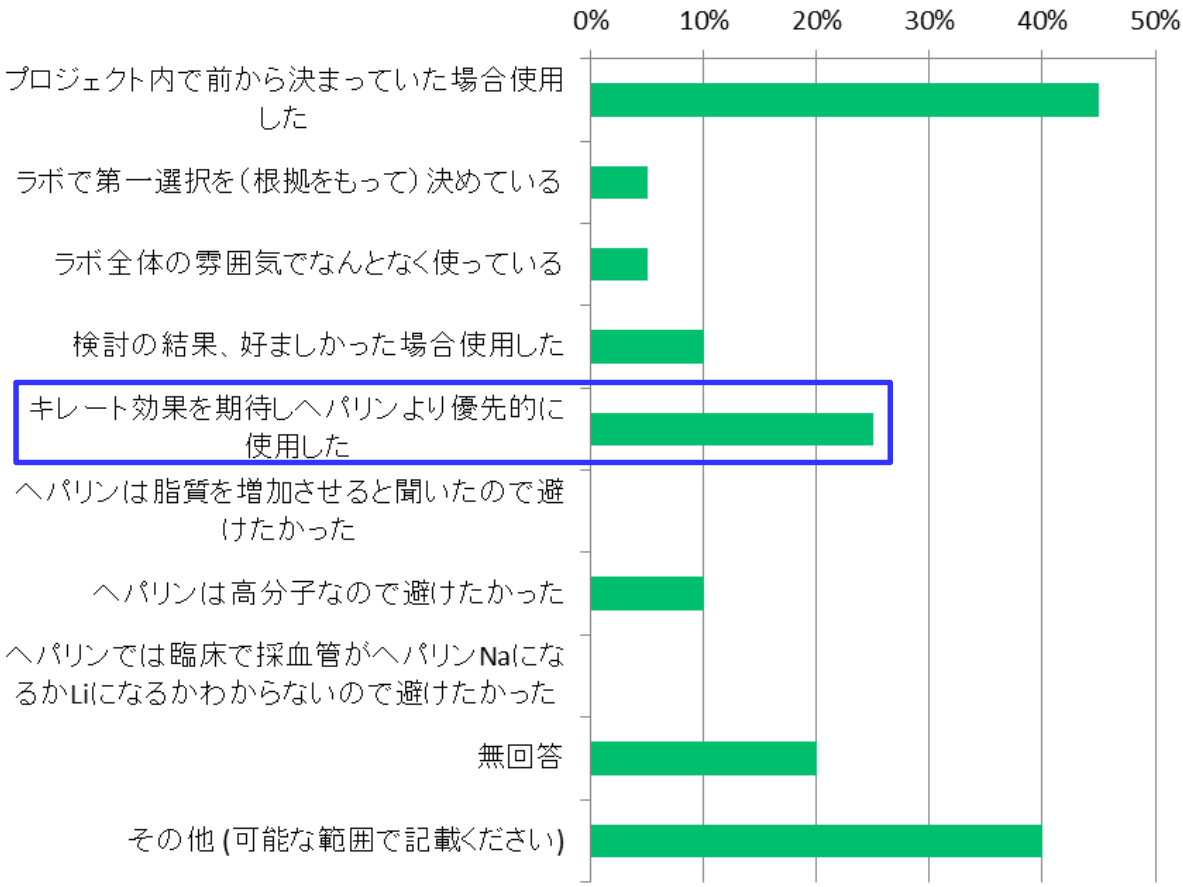
- その他(ヘパリンを選択した理由)**
- 汎用性が高い
  - 委託者の指定
  - 添加量の少なさ
  - pHへの影響の低さ
  - 参考にした文献に倣った
  - 特に懸念点が無ければヘパリンが一般的

<http://bioanalysisforum.jp/>



# 抗凝固剤選択（実績） 非臨床・EDTA選択理由

Q17 EDTAを選択した理由（非臨床）



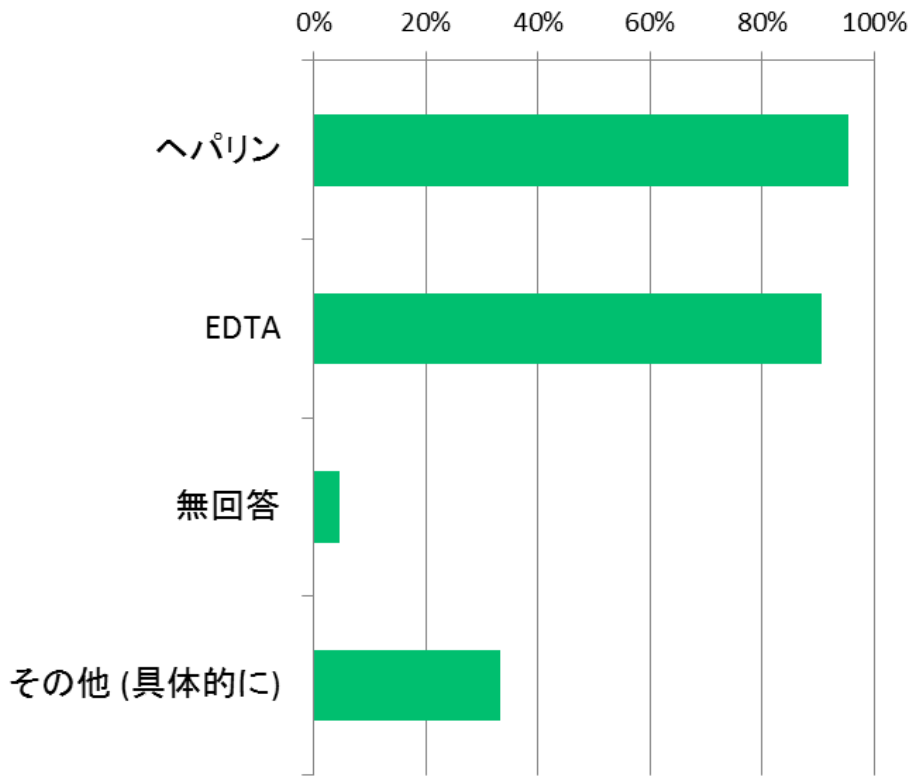
- その他（EDTAを選択した理由）**
- ヘパリンはフィブリンが多いので避けた(3名)
  - 文献情報などから採用(2名)
  - 酵素阻害を期待
  - 他の測定項目との兼ね合い、委託者の指定
  - 臨床試験に合わせた

http://bioanalysisforum.jp/



# 抗凝固剤選択（実績） 臨床・使用実績

Q18 臨床試験の血中濃度測定で実際に使ったことのある抗凝固剤（カウンターイオンは別）



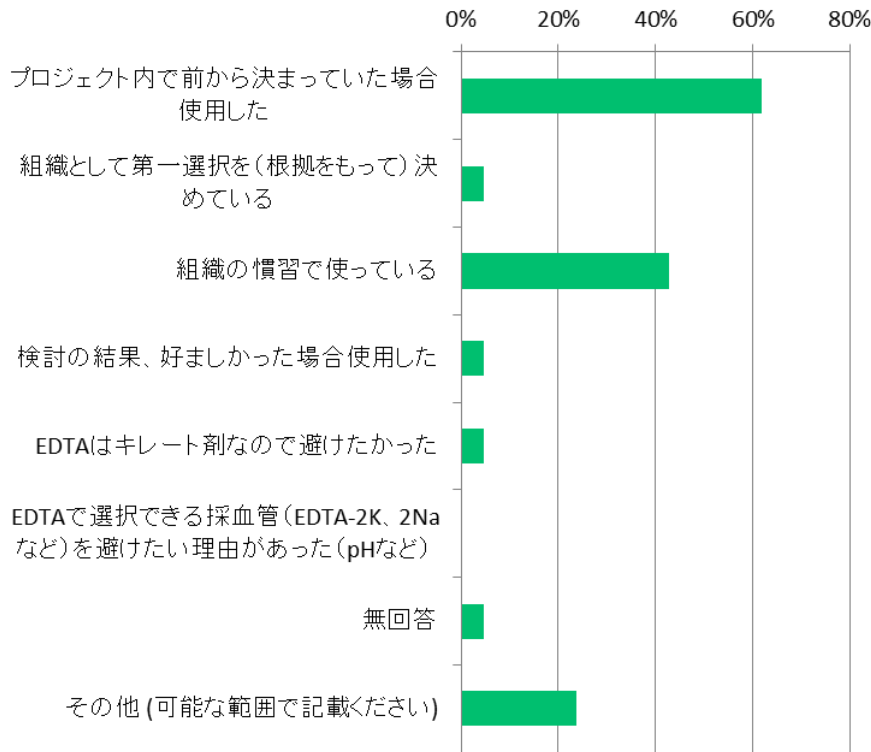
- その他(抗凝固剤使用実績)
- クエン酸(ナトリウム)(6名)
- ACD (クエン酸含有液)(1名)
- フッ化ナトリウム(3名)

<http://bioanalysisforum.jp/>

# 抗凝固剤選択（実績）

## 臨床・ヘパリン/EDTA選択理由

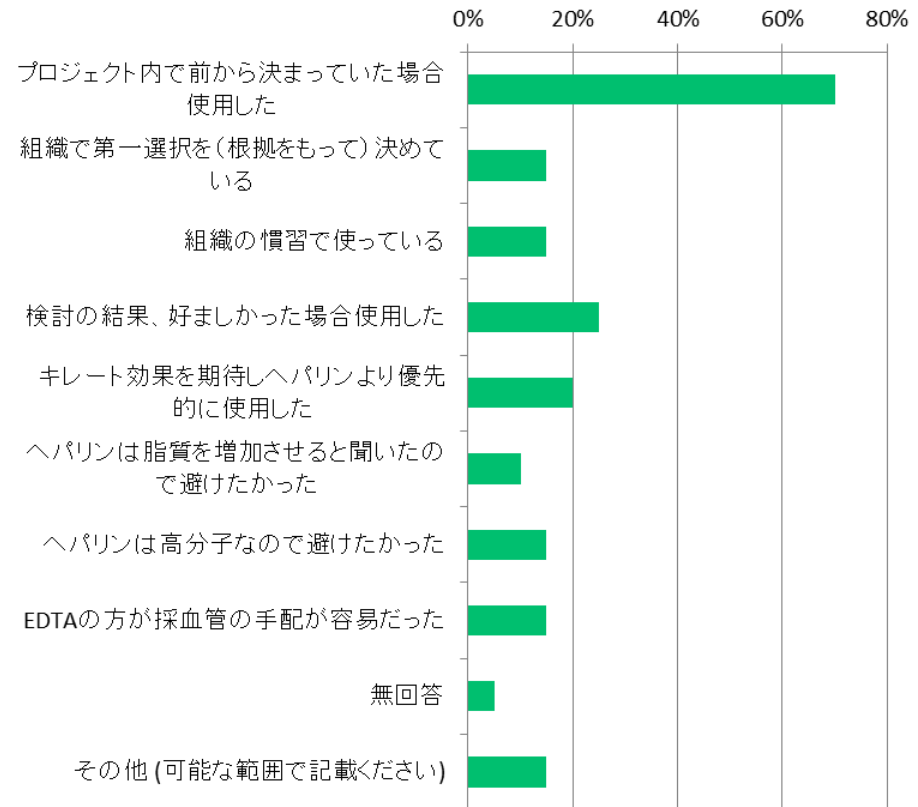
Q19 ヘパリンを選択した理由（臨床）



### その他

他に添加する安定剤との兼ね合いで決定  
汎用性が高い、委託者の指定  
非臨床と合わせた  
参考にした文献に倣った  
組織の慣習で使用していたが現在はEDTAに統一

Q20 EDTAを選択した理由（臨床）

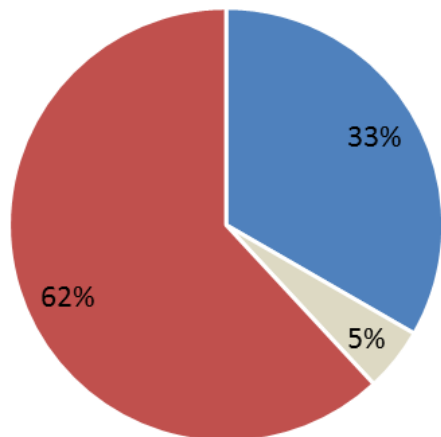


### その他

他の測定項目との兼ね合い、委託者の指定  
海外CROで臨床試験を行う際EDTAが第一選択で使用  
されていたため  
参考にした文献に倣った

# 抗凝固剤選択（実績） 使用経験のある抗凝固剤

Q21 ヘパリン、EDTA以外の抗凝固剤を  
使ったことがありますか



■ ない ■ 無回答 ■ ある (可能な範囲で記載ください)

## 「ある」場合の事例

クエン酸(ナトリウム)(7名)、ACD(1名)、フッ化ナトリウム(4名):フッ化ナトリウムを代謝阻害剤として

薬理試験にて血漿中のパラメータ測定のための採血にて使用されており、その血漿の一部を濃度測定試験に使用した

まれだが実績はあり(詳細な理由は不明)

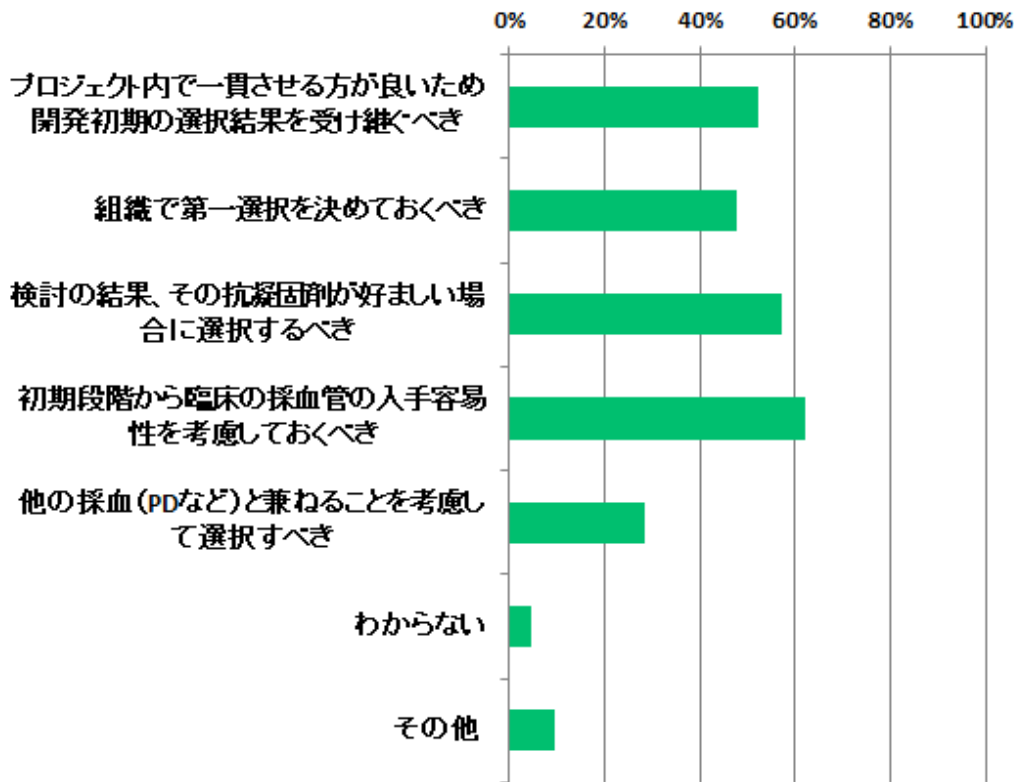
## 【抗凝固剤・実績 小括】

- ヘパリンがややEDTAより多い。
- 非臨床の方が臨床よりややヘパリン使用が多い。
- 非臨床のヘパリンは**使いやすさ(液体)**が、EDTAは**キレート効果**が評価されている。
- 各社で1st Choiceが決まっている印象。上手くいかないときに別のものにする。
- クエン酸、NaFも使用経験ありとの回答が多かった。



# 抗凝固剤選択（意見） 選択方法

Q22 抗凝固剤の選択方法



**その他**

必要な場合はパーシャルバリデーションをして変更する。  
海外などで用意できない場合もあった。ヘパリンNaを一般的に使用しているが塩も要注意。

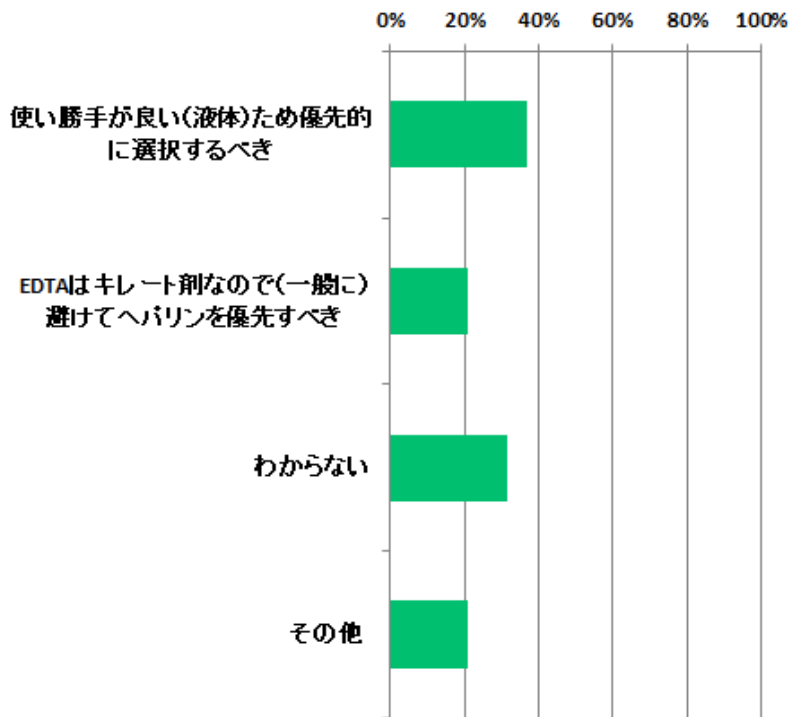
<http://bioanalysisforum.jp/>



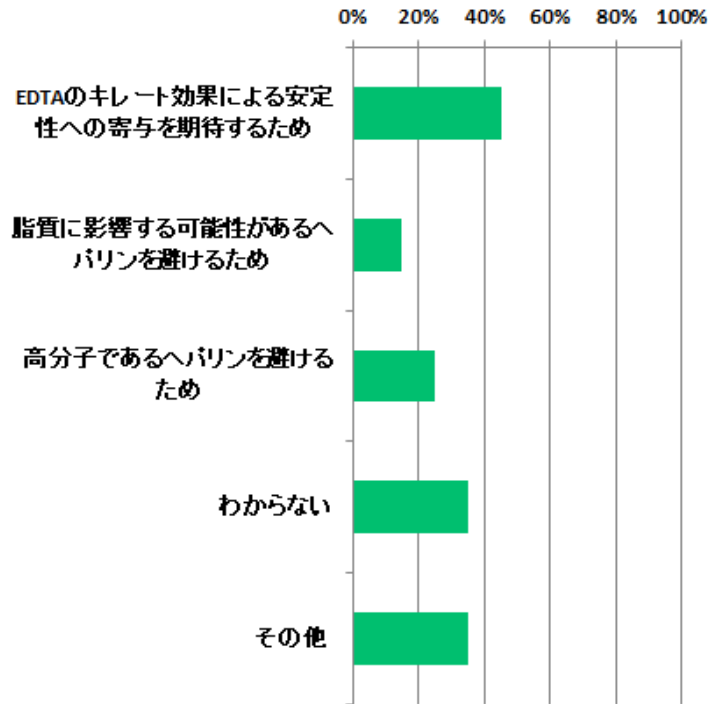


# 抗凝固剤選択（意見） ヘパリン/EDTA選択理由

Q23 ヘパリンを選択すべき理由



Q24 EDTAを選択すべき理由



**その他**

**汎用性が高い**(2名)

EDTAやクエン酸等が測定対象あるいは同時にモニタする血液パラメータに影響する場合。(2名)

**その他**

ヘパリンでは測定対象あるいは同時にモニタする血液パラメータに影響する場合。(2名)

採血管の**入手容易性**. 特に海外や臨床。(3名)

血漿の**pHを考慮する必要がある**場合。

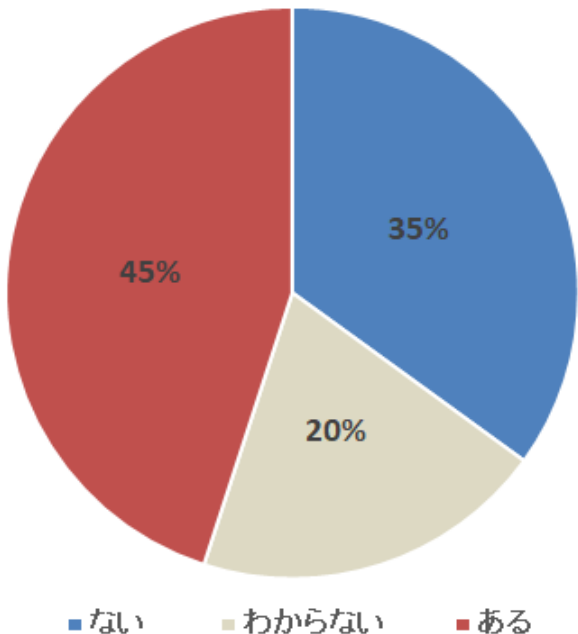
EDTAは添加量を決める必要がある点に留意する。また、溶液での添加の場合は希釈も考慮する。

http://bioanalysisforum.jp/

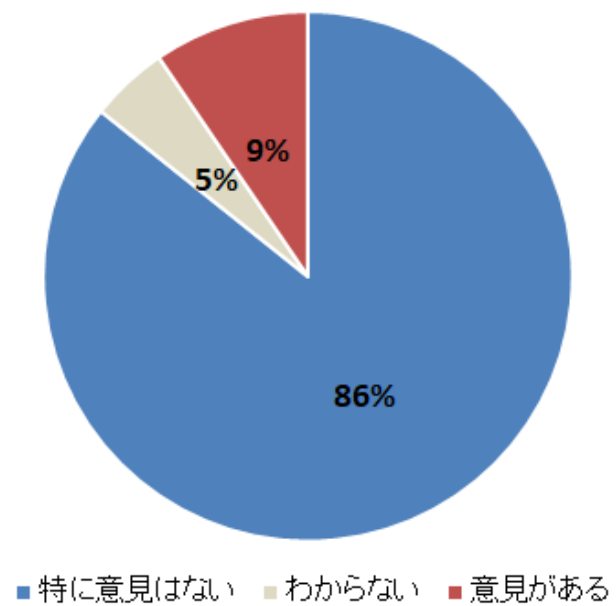


# 抗凝固剤選択（意見） 抗凝固剤の種類/カウンターイオン

Q25 ヘパリン、EDTA以外を使うべきと  
考えることがありますか



Q26 抗凝固剤のカウンターイオンの扱  
い方・捉え方について何か考えや意見  
がありますか。



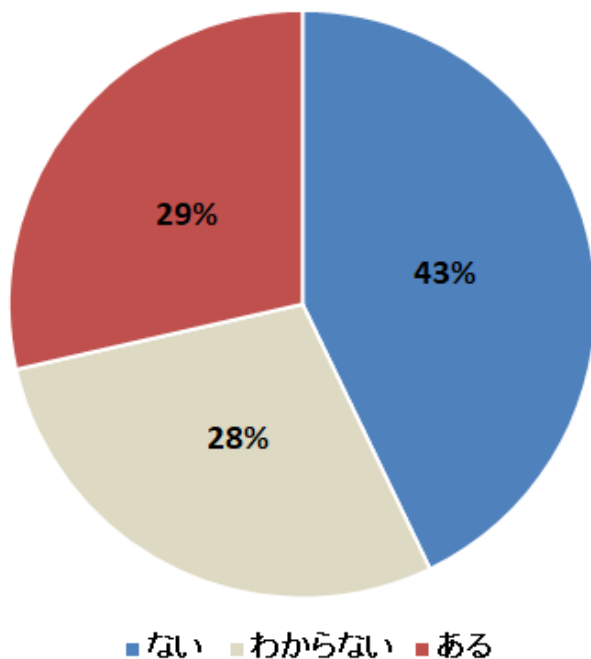
**ある (使いたいものとその理由)**  
クエン酸等の酸による安定化(5名)  
フッ化ナトリウム、化合物により選択  
安定性等、定量に影響する懸念がある場合(2名)  
一般的な抗凝固剤の注意点、使用法を参考に使用.

**意見がある (詳細)**  
EDTAのカウンターイオンにより**血漿pHが変わる**点に注意(2名)  
イオン交換系の固相使用時などは緩衝液の作用具合がヘパリン  
血漿と異なる恐れがある。  
代謝物としてアシルグルクロナイドがある場合にはpH低下効果  
のあるEDTA2Naを使用.

http://bioanalysisforum.jp/

# 抗凝固剤選択（意見） 安定性への配慮/小括

Q27 安定性への配慮で抗凝固剤の選択が影響されることがありますか



## 【抗凝固剤・意見 小括】

- PDとの共用、プロジェクト内一貫性は重要
- pHへの配慮が必要（弱酸性が安定な場合等、カウンターイオンにも注意）
- ヘパリン：使い勝手が良い、キレート剤を避ける時に選ばれる
- EDTA：キレート効果を期待、採血管の入手容易性で優れている

### ある (想定事例)

EDTAのキレート効果による分析対象物質の安定化(3名)

pHのコントロールが必要な場合はヘパリンを推奨.

代謝物安定化のためクエン酸(粉末)を添加したく、これを満たす採血管の抗凝固剤がEDTAに限られた.

代謝物としてアシルグルクロナイドがある場合にはpH低下効果のあるEDTA2Naを使用.

# アンケート結果のまとめ

## 各マトリックスの利点・欠点

マトリックス	血漿	血清	全血
使用実績*	高	低	極めて低
汎用性*	高(多くの回答でfirst choiceとされた)	低(血漿で問題があった場合)	低(血球移行性高い、即時安定化剤や酵素失活処理を行いたい場合)
Pros	<ul style="list-style-type: none"> <li>・回収量が多い</li> <li>・調製が容易</li> <li>・冷却可能</li> <li>・取り扱いが容易</li> <li>・抗凝固剤EDTAが安定剤を兼ねる場合がある</li> <li>・データの蓄積がある</li> <li>・血漿中濃度が一般的</li> <li>・血漿でPK/PD補正解析は可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・長期保存時はフィブリンがない分、前処理装置の詰まりの面で有利と考えられる</li> <li>・臨床の現場とあわせる場合有用</li> <li>・キットなどで推奨される場合有用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・回収量多い(血液そのもの)</li> <li>・冷却が可能</li> <li>・調製操作の必要がない</li> <li>・即時の安定剤添加・失活処理が可能</li> <li>・血球分配を含んでの量的把握が可能</li> <li>・体内動態は本当は全血基準、その有用性はある</li> </ul>
Cons	<ul style="list-style-type: none"> <li>・極めて不安定な化合物の場合、処理中にも分解してしまう</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・回収量が少ない</li> <li>・調製に時間がかかる</li> <li>・冷却不可能</li> <li>・安定剤の使用は基本的に不可</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・取り扱いが難しい(粘度高)</li> <li>・夾雑物が複雑</li> </ul>

\* アンケート実施時に非臨床・臨床の区別はしなかった。

# アンケート結果のまとめ 各抗凝固剤の利点・欠点

抗凝固剤	ヘパリン	EDTA	クエン酸	NaF
使用実績 (臨床／非臨床)	高	高	低 (使用経験は多数)	
汎用性 (非臨床)	高 (汎用性, 慣習, 参考文献)	高 (委託者指定, 慣習, 他の測定との兼ね合い)	低	低
汎用性 (臨床)	高 (慣習)	高 (キレート効果の期待, 入手の容易さ)	低	低
Pros	<ul style="list-style-type: none"> <li>液体のため使いやすい</li> <li>添加量が少ない</li> <li>pHの影響が低い</li> <li>キレート剤を避ける場合に使用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>キレート効果による安定性の向上</li> <li>酵素阻害効果</li> <li>採血管手配の容易性</li> <li>pHの調整が可能(アシルグルクロナイド等の安定性)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>酸による安定性の向上</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>代謝阻害剤として使用</li> </ul>
Cons	<ul style="list-style-type: none"> <li>フィブリンの生成が多い</li> <li>脂質を増加させる</li> <li>高分子</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>添加量, pHの考慮が必要(カウンターイオン)</li> </ul>	—	—

# マトリックス選択・総括

分析対象物質の不安定性と関係したマトリックス選択について、以下が推奨できる取り組みとして挙げられる。

## 分析対象物質の不安定性

化学構造から推察(エステル等)・分析法開発時に検出することを考慮

## 不安定性が見られた場合

分析法開発時の検討 → 不安定性の程度  
安定化方法を検討

## 推奨できる安定化方法検討の例

- EDTAの優先的使用 ……カウンターイオン選択によるpH調整：  
代謝物アシルグルクロナイドがある場合EDTA-2Na優先
- pH調整 ……抗凝固剤としてクエン酸の使用を含む
- マトリックスの再検討 ……全血で直ちに安定化剤添加・失活処理することを含む



# 溶血の影響

---

**【Bioanalysisに対する溶血の影響】**

- ①マトリックス効果
- ②血球移行性
- ③分析対象物質の安定性

**【DGの疑問】**

①と②はよく議論されており公知情報も豊富であるが、③はどうなのか？

**重点検討テーマ2**

分析対象物質が溶血時に特に不安定となる場合、その検出や対策への配慮をまとめる



公知情報の整理及びアンケートを行い、議論した



# アンケート調査の実施

## アンケートの実施

### 実施期間

2020年11月17日～2020年11月27日

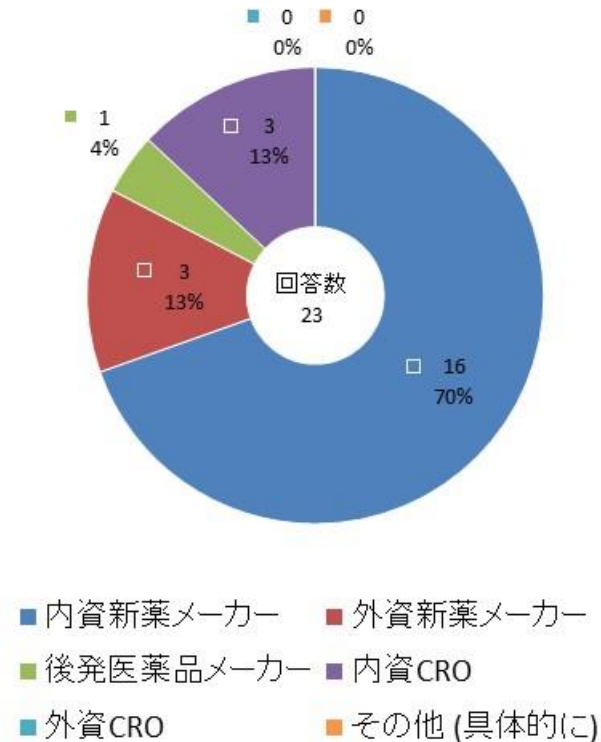
### 実施対象

JBFパートナー

### アンケート内容

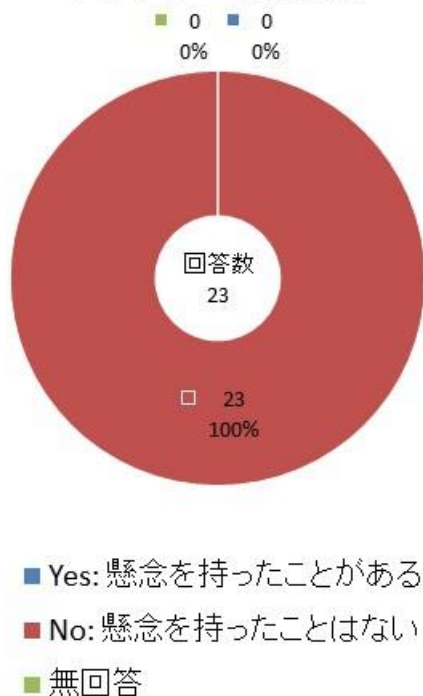
- (1) 安定性面から溶血に配慮されること  
がありうるか
- (2) 溶血による安定性影響の予見方法、  
評価方法は設定可能か

Q1 最初に、ご所属されている組織の  
業態をお知らせください



## 溶血が原因となる分析対象物質の不安定性

Q2 今までに、溶血が原因で分析対象物質の安定性に懸念を持ったことがありますか？(経験)。



Q2にて、「懸念を持ったことがある」の回答者がいなかったため、Q3の結果を省略した。

## 溶血と安定性に関連した文献検索

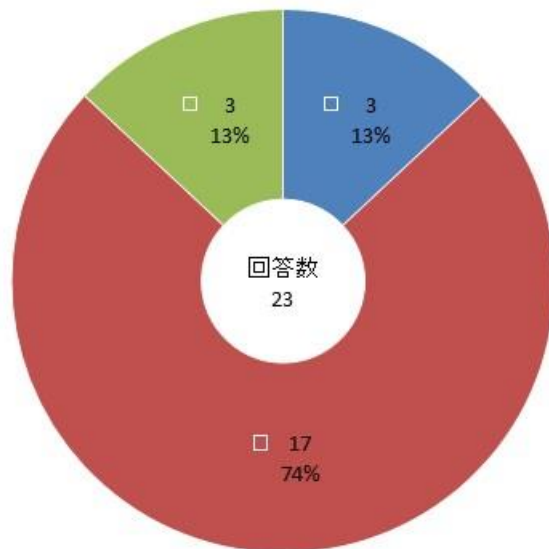
該当文献数: 11報(DG調べ)

- 1) ER Bérubé, MP Taillon, M Furtado, F Garofolo. *Bioanalysis*. 2011; 3(18):2097-2105.
- 2) ER Bérubé, MC Lacasse, M Furtado, F Garofolo. *Bioanalysis*. 2013; 5(12):1491-1499.
- 3) Z Miao, M Tan, E Wells, S Unger. *Bioanalysis*. 2019; 11(23):2133-2144.
- 4) S Summerfield, M Barfield, N Spooner, S White. *Bioanalysis* 2016; 8(24):2595-2604.
- 5) A Tan, S Gagné, IA Lévesque, S Lachance, N Boudreau, A Lévesque. *J Chromatogr B*. 2012; 901:79-84.
- 6) LK Sørensen, JB Hasselstrøm. *J Anal Toxicol*. 2019; 43(6):482-488.
- 7) D Tang, E Thomas. *Bioanalysis*. 2012; 4(22):2715-2724.
- 8) J Zhao, Q Kan, J Wen, Y Li, Y Sheng, L Yang, et al. *J Bioequiv Availab*. 2012; 4(6):082-085.
- 9) Y Wang, Y Wang, Y Sun. *Biomed Chromatogr*. 2020; 34(1):e4696.
- 10) DS Fisher, SJ Partridge, SA Handley, RJ Flanagan. *Forensic Sci Int Genet*. 2013; 229(1-3): 151-156.
- 11) D Goswami, A Saha, S Gurule, A Khuroo, T Monif, P Vats. *J Chromatogr B*. 2012; 902:132-136.

該当する文献数が少なく、「懸念を持ったことはない」というアンケート結果と一致していた

# 溶血時安定性を検討する必要性

Q4 溶血試料の安定性評価が必要と  
思いますか？（意見）



■ Yes: 必要 ■ No: 不要 ■ 無回答

Q5 前問がYes(必要)の方は、検討が  
必要と考える理由を、No(不要)の方  
は、検討が不要と考える理由をご記  
載ください。（意見）

<検討が必要> 3名

- 血球中代謝酵素、血球成分との吸着/結合

<検討が不要> 13名

- 経験なし、理論/根拠が不明 8名
- 全血中安定性から推察できる 3名
- 実サンプルでの結果から検出できる 2名
- 溶血サンプルでの安定性結果の実サンプルへの外挿が困難 2名
- 規制なし 2名

# 溶血時安定性を検討する必要性

Q5 前問がYes(必要)の方は、検討が必要と考える理由を、No(不要)の方は、検討が不要と考える理由をご記載ください。(意見)

全回答 18名

<検討が必要> 3名+1名(Yes寄りの意見)

- 血球中代謝酵素、血球成分との吸着/結合

Yes: 検討が必要と考える理由

- 溶血によるマトリクス成分の変化が安定性に影響する可能性はあるため。
- 血球成分などの影響がゼロとは言えないから
- 血球移行性の高い化合物などは場合によっては必要と考える

Q4の回答はNoだが、Yes寄りの意見

- 血球移行率が高い物質は要注意。また、比較的不安定な物質や吸着性の強い物質についても、マトリクスの状態が変化することによる影響の有無は否定できない。

# 溶血時安定性を検討する必要性

No: 検討が不要と考える理由

<検討が不要> 13名

- 経験なし、理論/根拠が不明 8名
- 溶血サンプルでの安定性結果の実サンプルへの外挿が困難 2名
- 規制なし 2名

- これまでに**経験したことが無い**ことと、バリデーション試験の実施項目数が多くなりすぎるから
- 国内の臨床試験の検体では、**問題があると懸念される経験がない**ため。
- **影響のある事例は少ない**
- 血球内の酵素が薬物代謝に影響するという**知見を得ていない**ため。
- 明確に不要とまでは言いづらいが、**懸念を持ったことがない**ため、必要とまでは言えないと考える。
- 通常血漿で安定で、溶血血漿で不安定となるという懸念が**どのような科学的根拠に基づいているかわからない**から。
- これまでの各国**ガイドライン**で、特に**推奨していなかった**ことと、**溶血により化合物が不安定となる理論、根拠が乏しい**。
- **溶血が安定性に影響するとの報告は極少数**であり、仮に**極端な溶血条件で安定性を評価しても実試料の測定値への影響を考察できない**(実試料の溶血は多様なバリエーションがあり、また溶血の程度を試料毎にグレーディングすることは現実的に無理であることから、各試料の測定値にどのように影響しているか把握できない)。また、**規制要件にもなっていない**。
- **実試料の溶血度合いがそれぞれに異なる**ため

# 溶血時安定性を検討する必要性

No: 検討が不要と考える理由 (続き)

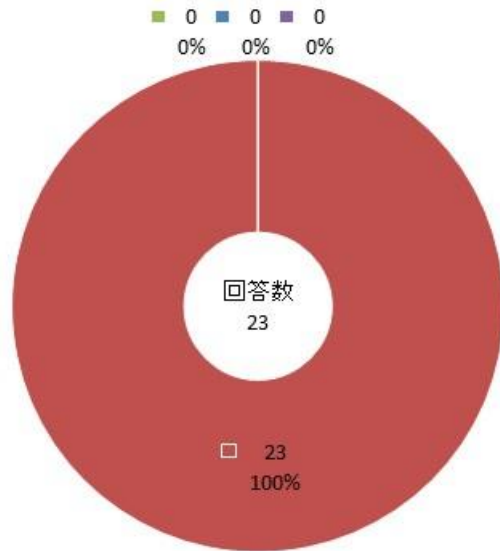
<検討が不要> 13名

- 全血中安定性から推察できる 3名
- 実サンプルでの結果から検出できる 2名

- 全血中の安定性評価から推定可能と考えられるため。
- 血液中での安定性に懸念のある化合物については、必要に応じて血液中安定性評価を実施するため。
- 候補化合物が絞られてくるまでに何度か血漿中濃度測定を実施する機会があり、試料の中には溶血しているものもあります。安定性に問題があれば、その段階で(問題)を検出できると考えており、その場合には検討が必要ですが、そうでなければ検討は不要と考えます。
- 必要に応じて確認が必要になる場面はあるかもしれませんが、そういう時にはISR(ISS)を利用することも考えられます。(ただし、当局の見解はわかりません)血球成分が薬物に影響するかどうかポイントだと思いますが、常に(どの化合物/分析法でも)実施する必要はないかと思います。溶血は主にマトリックス効果(イオン化)等に影響し、安定性への影響は限定的と考えているため。血液中安定性で推察できるのではと思います。また異常があれば、実サンプルの測定結果で判断できる可能性があると思います。溶血の定義があいまい。明らかに溶血した試料のデータは採用を検討するので不要。低分子対象のLC/MS/MS分析において、溶血が原因でanalyteが安定性に問題が出た経験がない。低分子で保存安定性で基準をクリアできない場合、その原因は化学的あるいは酵素的な分解・代謝や、容器への吸着である場合が多いと考えられ、特に溶血時にフォーカスした検討が必要とは思われない(通常の血漿中あるいは全血中安定性の確認し、必要な安定化策を採れば十分)
- 基本的には必要はないが、ケースバイケース。未変化体、構造既知の代謝物の構造により判断する

# 溶血時安定性を検討する必要性

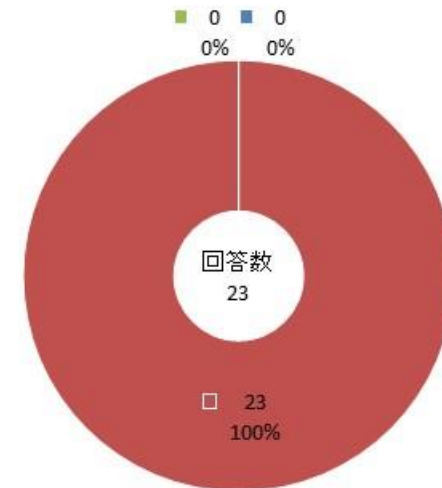
Q6 分析法開発の中で、溶血試料の安定性を検討していますか？



- いつも検討している
- 検討したことがある
- 検討したことがない
- 無回答

Q6にて、「いつも検討している」又は「検討したことがある」の回答者がいなかったため、Q7の結果を省略した。

Q8 溶血によって分析対象物質の安定性が変化したと根拠を持って明確に結論付けたことがありますか(経験)

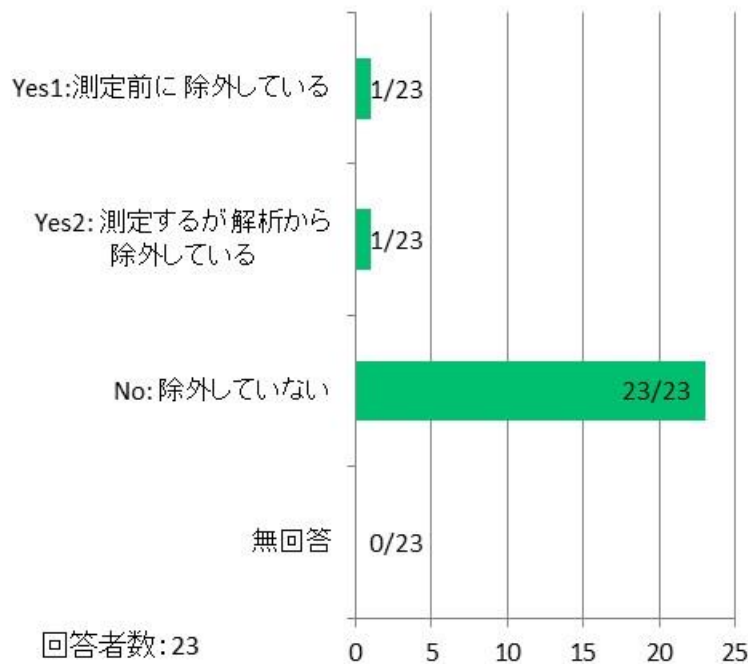


- Yes: 溶血で安定性が変化したと結論したことがある
- No: 溶血で安定性が変化したと結論したことはない
- 無回答

Q8にて、「溶血で安定性が変化したと結論したことがある」の回答者がいなかったためQ9及びQ10の結果を省略した。

## 溶血試料の測定及び解析における取り扱い

Q11 溶血試料をPK測定又は解析から除外していますか（現状をお答えください）（複数選択可）



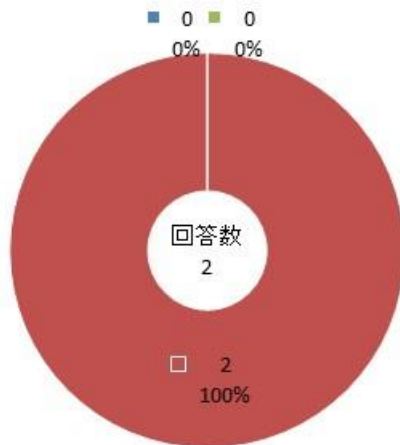
Q12 前問がYes（溶血試料を測定または解析から除外している）の方は、どのような除外基準を設けていますか。あるいは、除外方法をとっていますか。（支障のない限りで現状をお答えください）

Q11の回答	Q12の回答
Yes1:測定前に除外している	バリデーション試験で溶血試料の精度・再現性が基準外になった場合には、濃度測定試験で溶血試料を測定していない。実際に除外した経験はない。
Yes2:測定するが解析から除外している	溶血サンプル（血液を2%混ぜる）を比較対象として、見た目の色で判断する。



## 分析対象物質の安定性又は血球移行性と溶血評価

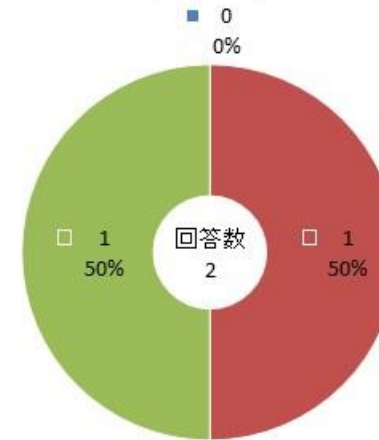
Q13 分析対象物質の安定性から、通常より溶血評価(溶血サンプルを除外する基準)を厳しくすることがありますか。



- Yes: 厳しくすることがある
- No: 厳しくしていない
- 無回答

Q13にて、「Yes:厳しくすることがある」の回答者がいなかったため、Q14の結果を省略した。

Q15 分析対象物質の血球移行性から、通常より溶血評価(溶血サンプルを除外する基準)を厳しくすることがありますか。



- Yes: 厳しくすることがある
- No: 厳しくしていない
- 無回答

Q15にて、「Yes:厳しくすることがある」の回答者がいなかったため、Q16の結果を省略した。

## 溶血時安定性に対する懸念と化合物プロファイル

Q17 どのような化合物プロファイルを有する場合、溶血時の安定性に懸念を持ちますか。(お考えを記載ください)  
 (例: 血球移行が高い=血球成分と相互作用がある場合、血球中の代謝酵素で代謝される場合など)  
 無回答の場合は、「無回答」と記入ください。

1. 血球移行が高い場合
2. 血球中の代謝酵素で代謝される場合 (4名)
3. 血球成分(血球由来の酵素を含む)と相互作用する場合
4. 全血中で不安定な場合
5. 血球移行率が高い場合。血球中に存在する酵素による代謝が懸念される場合 (2名)
6. 血球中の成分により代謝を受ける, あるいは血球中の成分と結合するなど考えられる場合。
7. 血球移行率が高い物質、吸着性が高い物質、不安定な物質
8. 血球への移行が高い、血球成分で代謝、血球成分と特異的に結合する場合。「溶血時の安定性」というより、血液中の安定性に懸念があれば溶血時の安定性にも懸念を持つ
9. 血漿よりも全血での安定性が低い場合(すなわち、血球中の酵素で代謝される可能性が否定できない場合)
10. 溶血成分により代謝や分解といった影響を受けることが考えられる場合。  
 血球移行性が著しく高く, かつ血球中の代謝酵素で分解するような場合. 一方だけでは安定性に懸念を持たない。  
 血球中の代謝酵素で代謝される場合は気になりますが, PK測定の前に知見が得られているかと思えます。  
 Analyteが血球中酵素で代謝を受ける場合
11. 無回答 (8名)

全回答 22名

- 血球移行が高い 6名
- 血球中の代謝酵素で代謝 10名
- 血球成分との吸着、結合 3名
- 全血中で不安定 2名

## 溶血により不安定となる化合物 (文献情報)

化合物	条件	原因	対策
Morphine <sup>1)</sup>	溶血血漿にて不安定(pH10、65時間)	メトヘモグロビンによるフェノール基のラジカル酸化分解	フェノール基のpKa未満のpHとする
Raloxifene <sup>1)</sup>	溶血血漿にて不安定(pH10、65時間)	メトヘモグロビンによるフェノール基のラジカル酸化分解	フェノール基のpKa未満のpHとする
N-desethyloxybutynin <sup>2)</sup>	溶血血漿にて不安定(-20°C22時間)	ヘム触媒酸化	-70°C保存又は抗酸化剤アスコルビン酸を添加する
Buprenorphine <sup>3)</sup> Norbuprenorphine	凍結全血にて不安定(-20°C、20週間)	溶血成分による影響	-80°C保存又は抗酸化剤アスコルビン酸を添加する
Artemisinin <sup>4)</sup>	~1.4%溶血血漿にて不安定(室温、30分)	溶血血漿中の鉄による過氧化物架橋の切断	酸性条件でメトヘモグロビン形成剤の亜硝酸ナトリウムを添加する

1) ER Bérubé, MC Lacasse, M Furtado, F Garofolo. Bioanalysis. 2013; 5(12):1491-1499.

2) Z Miao, M Tan, E Wells, S Unger. Bioanalysis. 2019; 11(23):2133-2144.

3) LK Sørensen, JB Hasselstrøm. J Anal Toxicol. 2019; 43(6):482-488.

4) Y Wang, Y Wang, Y Sun. Biomed Chromatogr. 2020; 34(1):e4696.

# 溶血時安定性の検討方法

Q18 溶血試料中での安定性を検討する場合、安定性試料の調製方法として、どのような方法が適切と考えますか。  
(お考えを記載ください)(例:血液に添加後溶血させるのか、溶血方法はどうか等)  
無回答の場合は、「無回答」と記入ください。

全22人 (内無回答7名)

## <評価化合物を添加するタイミング 全8名>

- ・血液に評価化合物を添加後に溶血させる。 2名
- ・溶血マトリクスを調整後に評価化合物を添加する。 5名
- ・溶血成分による安定性を確認するために評価化合物を添加するタイミングを変える。 1名

## <溶血マトリクスの調製法 全7名>

- ・血漿/血清に溶血血液を添加 5名
- ・マトリクスに血液を添加 2名

## <溶血血液の調製法>

1. 凍結融解 7名
2. シリンジでホモジナイズ 1名
3. ボルテックス 1名
4. 超音波破碎 1名

# 溶血時安定性の検討方法

Q18 溶血試料中での安定性を検討する場合、安定性試料の調製方法として、どのような方法が適切と考えますか。  
 (お考えを記載ください)(例:血液に添加後溶血させるのか、溶血方法はどうか等)  
 無回答の場合は、「無回答」と記入ください。

## <評価化合物を添加するタイミング 全8名>

### ・血液に評価化合物を添加後に溶血させる。 2名

1. 血液に添加後に血液を凍結融解により溶血させる。
2. フレッシュな溶血のない血液を使用し(一部遠心分離して血漿から溶血の有無や程度を確認), 血液に化合物を添加した後溶血させる。溶血方法については何が適切か難しい。

### ・溶血マトリクスを調整後に評価化合物を添加する。 5名

1. 血漿に血液を添加して凍結融解により溶血血漿を調製後にスパイクして調製。
2. 一定割合の溶血マトリクスを作成後に標準品を添加する。血球をシリンジでホモジナイズさせた試料を血漿と一定量混和させ、そこに標準溶液を添加する。溶血血液を血漿に添加,そこに標準溶液を添加する。全血を凍結融解・超音波破碎などで最大限溶血させた試料中にanalyteを添加して安定性を評価し,明確な影響があるかを確認する(実施したことはない)
3. 血漿に溶血血液を2-5%添加したマトリクスにAnalyteを添加して安定性試料を調製し評価する。
4. 安定性のみに着目するのであれば,溶血させた血液に後添加でも問題無いように思います。溶血方法は,ボルテックスや凍結融解等いくつか考えられると思いますが,どの程度溶血させる必要があるのかによって,採用する方法は変わってくるかと思えます。
5. 溶血試料と全血試料を区別して評価したい場合、血液を溶血させて、血漿にそれを添加してから薬物を添加する。

# 溶血時安定性の検討方法

Q18 溶血試料中での安定性を検討する場合、安定性試料の調製方法として、どのような方法が適切と考えますか。  
(お考えを記載ください)(例:血液に添加後溶血させるのか、溶血方法はどうか等)

無回答の場合は、「無回答」と記入ください。

## <評価化合物を添加するタイミング 全8名>(続き)

・溶血成分による安定性を確認するために評価化合物を添加するタイミングを変える。 1名

1. 溶血成分による安定性を確認するためには、**溶血した血漿**に標品を添加する。血球移行による安定性を確認するためには、血液に添加後溶血させ、初期値との比較とする。

## <溶血マトリックスの調製法 全7名>

・血漿/血清に溶血血液を添加 5名

1. 血液を**凍結融解して溶血**血液を調製し、血漿等のマトリックス(QC試料)に所定量(最大5%まで、実際に経験する試料からすると2%で十分)添加する。**経験的に凍結融解が完全に溶血**させやすいと思う。
2. **凍結融解後の全血2%**を血漿、もしくは血清に添加する。
3. 血液を**凍結融解等で溶血**させ、その一部を血漿に添加したものをマトリックスとして用いる。
4. 血漿に**溶血血液**を添加したものをマトリックスとする。
5. 2%の割合で**溶血血液**を血漿/血清に添加した試料でLLQ-QCを調製後、n=6で前処理。これを3バッチ行う。血漿/血清で調製したLLQ-QC結果と比較する。

・マトリックスに血液を添加 2名

1. **血液**を一定量添加し、その割合をいくつか設定し、添加率による差の有無を確認する。
2. 現実的にはマトリックスに**血液**を添加後の状態を溶血マトリックスとする。

## 溶血による不安定性に関する評価の実例

論文コンテンツ	溶血法及び不安定性の評価法
総説(EBFの推奨事項) <sup>1)</sup>	全血を複数回凍結融解させることを推奨
溶血血漿中におけるフェノール含有化合物の安定性 <sup>2)3)</sup>	Freshな血液を凍結融解し、総血漿量の7.5%をブランク血漿に添加。その後、溶血血漿に低及び高QC濃度となるように分析物を添加。各QCレベルで溶血サンプルn=3と通常血漿サンプルn=3で比較評価。
室温、凍結(-20, -50, -60, -70, -80°C)保存および凍結融解条件におけるN-desethyloxybutyninの溶血血漿中の安定性評価 <sup>4)</sup>	血漿に全血をスパイクし、混和及び2時間以上の凍結により溶血血漿を作製。その後、N-desethyloxybutyninを添加混合後、評価。
血漿中の分析化合物(*)濃度に対する溶血の影響 <sup>5)</sup> *Amlodipine, Budesonide, Capecitabine, Dodecyl Maltoside, Fexofenadine, Fluticasone, Indapamide, Methazolamide, Metoprolol	Freshな全血に分析化合物を添加し、3分間最大出力でボルテックス。30分間氷上でインキュベート後、遠心分離により溶血血漿(約2%、目視評価)を得る。その後、分析化合物の濃度を評価。

1) Benno Ingelse, Begona Barroso, et al. Bioanalysis. 2014; 6(23), 3113-3120.

2) ER Bérubé, MC Lacasse, M Furtado, F Garofolo. Bioanalysis. 2013; 5(12):1491-1499

3) LK Sørensen, JB Hasselstrøm. J Anal Toxicol. 2019; 43(6):482-488.

4) Z Miao, M Tan, E Wells, S Unger. Bioanalysis. 2019; 11(23):2133-2144.

5) A Tan, S Gagne, I. A. Levesque, S Lachance, N Boudreau, A Levesque. J Chromatogr. B. 901 (2012) 79-84

# 血液中安定性の評価方法に関する留意点

Q19 血液中安定性の評価方法について、留意点を意見としてお持ちでしたらご記載ください。

(添加方法、血球移行の平衡化、評価時間をどうすべきか、これらの方法で調製・安定性評価中の溶血は避けられているのか)(お考えを記載ください)

無回答の場合は、「無回答」と記入ください。

## 留意点

- ・測定に用いるマトリックス
- ・Vivoを反映しているか
- ・血液の新鮮さ
- ・有機溶媒比率
- ・平衡化時間
- ・温度

- ・血球移行の平衡化の影響を考えると**測定は全血試料で行う**ことが良いのかもしれない。
- ・血球移行、血球親和性の高い化合物は基本的に**全血をもちいて定量を行っている**
- ・血球移行の平衡化が遅い化合物については、十分なインキュベーション時間を置いたり、血漿分離せずに**全血で測定する**ことがあります。
- ・添加方法、血球移行の平衡化、評価時間は予備試験で検討しておくこと。評価試料中の**有機溶媒比率を抑える**(2%以下)。**血球・血漿間で平衡に達するまでの時間を確保する**。特別な留意点はなし。臨床試験で実際に採血して保存する流れに準じて評価。**in vivo試験でのサンプリング時に極力近い条件で評価すべき**(血球移行性の評価結果; analyte濃度, 時間, 温度依存性なども考慮)。評価に事前採取あるいは購入した新鮮血を使う場合、完全に**溶血を防ぐことは難しい**が、それはPK/TK実測試料サンプリングにおいても同じことなので、少々の溶血込みの評価となることは問題ないと思う



# 血液中安定性の評価方法に関する留意点

Q19 血液中安定性の評価方法について、留意点を意見としてお持ちでしたらご記載ください。

(添加方法、血球移行の平衡化、評価時間をどうすべきか、これらの方法で調製・安定性評価中の溶血は避けられているのか)(お考えを記載ください)

無回答の場合は、「無回答」と記入ください。

- 血球移行の平衡化は30分程度は必要
- 全血中で37°Cにおける血球移行の平衡化時点の検討が必要, 水分の蒸発に留意, 酸素濃度, pHなどvivoを反映した系であるかに留意, 新鮮血の確保が大変. 全血を凍結すると溶血するので避けられない.
- 温度をどうするか。実試料に近づけるならプレインキュベーションと薬物添加後の平衡化は37度、保存期間は室温もしくは氷冷。しかし、実際には温度の影響で平衡がくずれ、おかしなデータになることも多いので、プレインキュベーションから保存期間まで同じ温度にすることが多い。血液の新鮮さも大事と思う。
- 有機溶媒の添加量はなるべく減らす。問題があればAnalyteを血漿に溶解し, Analyte含有血漿を全血に添加することで溶血を回避。平衡化はAnalyte次第。評価時間は医療機関での作業時間を想定して設定。
- 血球移行の平衡化時間、添加する有機溶媒量。
- 一定の方法を持ち、実施するのであれば統一した方法とすべき
- 濃度の設定に注意。
- 無回答(9/22)

# 血液中安定性の評価方法に関する留意点

Q19 血液中安定性の評価方法について、留意点を意見としてお持ちでしたらご記載ください。

(添加方法、血球移行の平衡化、評価時間をどうすべきか、これらの方法で調製・安定性評価中の溶血は避けられているのか)(お考えを記載ください)

無回答の場合は、「無回答」と記入ください。

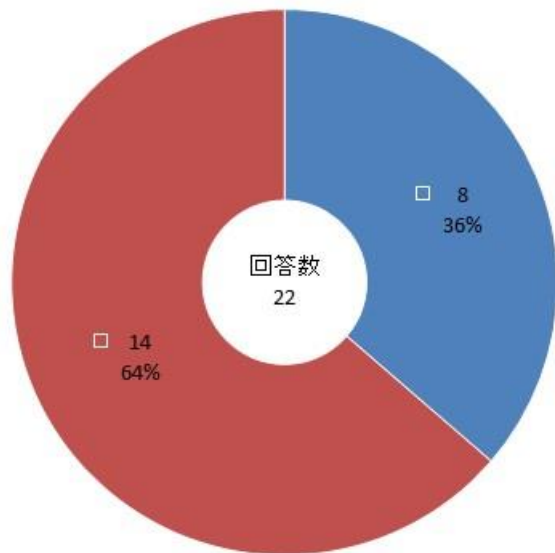
- 添加及び評価については、血漿と違いなく調製、処理しています。血球移行の平衡時間も考慮していません。**試料を調製する際に、有機溶媒を添加するため、血液中の安定性としては、その時点で血球の崩壊がある=溶血しているかは懸念点**と思いますし、溶血中の評価になっている可能性もあると思います。但し、血球移行性が高い薬物の、血漿中薬物濃度を評価する際には、溶血自体を考慮する必要があるかと思いますが、血液中の薬物濃度評価であれば、血漿中の安定性が悪くない場合、溶血の安定性の評価は考慮しなくても良いように思います
- 血液中安定性を評価する際、血液と血漿の両面から安定性を評価しています。軽く溶血してしまうことは多々あり(凍結させた血液を血漿に2%添加した場合よりかなり薄くはありますが)、完全に**溶血を避けられている**とは言い難いです。



血液中安定性評価時に溶血は避けられない

# 溶血時安定性と全血中安定性

Q20 全血中安定性で溶血時安定性をカバーできると考えますか。



■ Yes: カバーできる ■ No: カバーできない

Q21 前問の内容について、判断理由をご意見としてご記入ください。(異なる観察のためカバーできない、全血でも実際には一部溶血しているためカバーできる可能性がある等)

## 全血中安定性で溶血時安定性をカバーできる理由

- ・安定性に影響する原因(血球成分)が同じため 3名
- ・全血も一部溶血しているため 2名

## 全血中安定性で溶血時安定性をカバーできない理由

- ・マトリックスが異なるため 4名
- ・異なる観察のため 2名
- ・溶血度合いが異なるため 2名
- ・評価項目(時間)が異なるため 1名

# 溶血時安定性と全血中安定性

Q21 前問の内容について、判断理由をご意見としてご記入ください。

(異なる観察のためカバーできない、全血でも実際には一部溶血しているのでカバーできる可能性がある等)

Q20の回答 Yes:カバーできる(全回答:8名)

全血中安定性で溶血時安定性をカバーできる理由

- ・安定性に影響する原因(血球成分)が同じため 3名
- ・全血も一部溶血しているため 2名

- ・全血でも実際には一部溶血しているのでカバーできる可能性がある。(2名)
- ・全血中安定性実施の上、一時点の溶血の有無で評価を実施すればよい。(1名)
- ・全血の成分と溶血の成分は(濃度は異なるが)基本的に同じだから。(1名)
- ・溶血が安定性に影響する原因は血球由来成分と想定されるため、溶血で不安定ならば全血中でも不安定である可能性がある。(1名)
- ・全血と溶血血漿で異なるケースがあれば知りたい。そこまで考慮して対応していない。不安定な場合、よほどだと思うので阻害剤などで対応すると考える。(1名)
- ・血球内成分と触れることになるので、代謝や分解を「ある程度は」評価できると考えられる。低分子で保存安定性で基準をクリアできない場合、その原因は化学的あるいは酵素的な分解・代謝や、容器への吸着である場合が多いと考えられるため、「溶血時安定性を評価しない限り不安定であることが顕在化しない」ということは考えにくい(血球中酵素で著しい代謝を受けるが、全く血球に移行しないような場合は気付かないが、そのようなケースはレアであろう)。安定性に問題のあることが判明すれば、代謝酵素阻害剤や有機溶媒を添加する・すぐに凍結保存する・吸着しにくい容器を使用する等の対応策を採れるため、結果的に溶血中安定性を評価しなくても実害はないのではないかと。(1名)

# 溶血時安定性と全血中安定性

Q21 前問の内容について、判断理由をご意見としてご記入ください。

(異なる観察のためカバーできない、全血でも実際には一部溶血しているのでカバーできる可能性がある等)

Q20の回答 No:カバーできない(全回答:14名)

全血中安定性で溶血時安定性をカバーできない理由

- ・マトリックスが異なるため 4名
- ・異なる観察のため 2名
- ・溶血度合いが異なるため 2名
- ・評価項目(時間)が異なるため 1名

- ・ **マトリックスの状態が異なる**ので、必ずしもカバーできるとは限らない。(4名)
- ・ **異なる観察のため**カバーできない。(2名)
- ・ 必要とされる**溶血の度合い**が、必ずしも全血評価時と同じとは限らないから。(1名)
- ・ 実験条件としてコントロールされていない(溶血の程度が”成り行き”である)ため、実際の影響が判断できない。(1名)
- ・ 実試験においてサンプルがどの状態にあるかを想定して安定性を確認するので、もし実施するなら、それぞれ別物として扱うことが望ましい。分解の生じるコンパートメント数やコンパートメント内の代謝酵素濃度が変わるため、一方の結果から他方の結果を推察することはできない。(1名)
- ・ 全血中安定性と溶血時安定性では**評価項目**に違いがあるので、全てをカバーできない。(1名)
- ・ Q19でご説明したように、血漿に対して凍結血液を2%添加したものよりも薄い状況ではあるので、**溶血の程度としては軽い**。十分にカバーできているとは言い難いのではないか。(1名)
- ・ 血液(血球)中の安定性と溶血時安定性は異なるかもしれない(検討したことが無いので判断できない)。(1名)

# 溶血時安定性と全血中安定性

Q21 前問の内容について、判断理由をご意見としてご記入ください。

(異なる観察のためカバーできない、全血でも実際には一部溶血しているのでカバーできる可能性がある等)

Q20の回答 No:カバーできない(全回答:14名) (続き)

- 安定ときは溶血の影響はないと考えられるが、不安定なときに溶血の影響で不安定であることが判断が出来ない。(1名)
- 全血中安定性と血漿の保存安定性は評価する時間が異なるから(全血安定性は数時間、血漿の保存安定性は数日以上)。(1名)

# アンケートのまとめ

分析対象物質の安定性に対する溶血の影響

✓ 経験なし

溶血時安定性を検討する必要性

✓ 検討不要

✓ 血球成分の影響を受ける場合に懸念あり

✓ 全血中安定性から一部推察できる可能性あり



溶血時安定性について積極的な検討の必要性を感じていない。

# JBF 公知情報のまとめ

## 溶血の影響事例

- ✓ 文献数11報
- ✓ ほとんど影響する事例はない

## 化合物

- ✓ フェノール基を有する化合物
- ✓ 第1級アミン、第2級アミンを有する化合物

## 原因

- ✓ メトヘモグロビンなどの血球成分による酸化
- ✓ 血球代謝酵素による分解
- ✓ ヘム鉄による分解

## 安定化方法

- ✓ 安定化剤の添加(抗酸化剤など)
- ✓ -70°C以下での保存



# JBF 溶血・総括

溶血が原因となる安定性の問題を生じる頻度は低いとされており確認は必須ではないと考えられるが、**必要に応じて配慮すること**が望ましい。

溶血による分析対象物質の不安定性に対して、推奨できる取り組みを以下に示す。

評価対象物は...

全血中で不安定な化合物である

溶血による不安定性を懸念する化合物である

例)フェノール基、第1級アミン、第2級アミン、過酸化物を含む化合物

No

検討不要

Yes

溶血時安定性を検討する

1. 血液の凍結融解を繰り返し完全に溶血させる
2. 溶血成分が2%になるよう血漿/血清で希釈する
3. 評価対象物を溶血マトリックスに添加する(溶血QC試料)
4. 血漿/血清試料の長期保存安定性と同条件にて、溶血QC試料を保存し評価する

判断基準：溶血QC試料における平均濃度が理論値 $\pm$ 15%以内

Yes

溶血時においても安定である

No

安定化方法を検討する

例)  $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存and/or安定化剤を添加

全血中安定性の  
結果から対策をとる  
場合



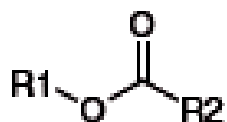
# エステラーゼ阻害剤

---

# JBF 背景及び目的

血漿などの生体試料中には各種エステラーゼ酵素が存在し、エステル結合などを有する化合物によっては、生体試料中で分解してしまい、バイオアナリシスに影響を及ぼす。その対応策の一つとしてエステラーゼ阻害剤を安定化剤として添加する方法がある。

しかし、エステラーゼ阻害剤の使用に関して体系的にまとめられたものは少ない。そこで、論文等の公知情報やアンケート調査により各社の公開可能な情報をまとめ、エステラーゼ阻害剤の使用に関して総合的にまとめる。



酵素による加水分解

エステラーゼ阻害剤の  
選択/使用は？



# エステラーゼ阻害剤に関する議論の内容

- 阻害剤の種類
- 選定方法
- 使用方法
- 問題点
- 阻害剤の検討を考慮する時期



# 公知情報

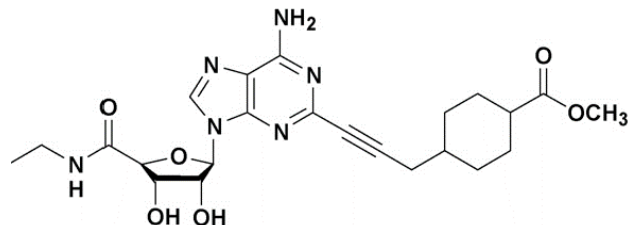
## 各種エステラーゼ阻害剤について

	非特異的	ホスホ ジエステ ラーゼ	セリンヒド ロラーゼ	セリンエス テラーゼ	アセチルコ リンエステ ラーゼ	カルボキ シエステ ラーゼ	ヒトブチリ ルコリンエ ステラーゼ	ヒト血液ア リルエステ ラーゼ
DFP				○		○	○	○
ジクロロボス					○	○	不明	
パラオクソン				○	○	○	○	
PMSF			○	○		○		○
BNPP		○				○		○
NaF	○	○				○	不明	
アセチルコリン					○		不明	
eserine					○		不明	
TTFA						○	不明	
ethopropazine	不明					○	○	○

# エステラーゼ阻害剤の主な使用方法

## 臨床測定での使用例

ヒト全血中での半減期が54分の化合物



### 阻害剤 選定

DFP、PMSF、Paraoxon、Eserine: ヒト血液(抗凝固剤:ヘパリン)で各10 mMとなるよう調製し、化合物を添加後4時間室温で放置。

化合物の残存率の結果より、安定剤としてDFPを選択。

### 対象種

ヒト血漿及び血液

### 方法

20 mMのDFPとなるように市販の6 mL容K<sub>2</sub>EDTA(固形形体)含有真空採血管に注射器でDFPを21 μL注入し、-30°Cで使用時まで保管。使用時は30分以上室温に戻した後、使用。注入したDFPは3ヵ月間安定。(なお、K<sub>3</sub>EDTAでは水系を含むためDFPの安定性に懸念。)

約6mLの血液を採取し、氷上で1時間放置後、4°C、1000 gで15分間遠心し、血漿を分離。

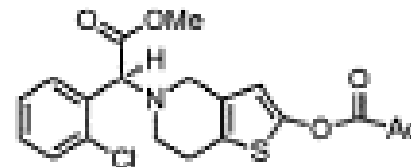
DFPにより血漿蛋白変性やマトリックス効果に影響があったため、0.1 N塩酸とmethyl-tert-butyl etherを添加し、液液抽出し、有機層を分離することでDFPの影響を軽減。

Zeng J, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 Jun 1;852(1-2):77-84.

# エステラーゼ阻害剤の主な使用方法

## ヒト測定に向けた検討例

ラット血漿で4°C、4時間後に1.5%未満しか残存しない化合物



阻害剤 選定	NaF: 水に溶解させ1、0.1、0.01 Mを調製
	PMSF、Dichlorvos、Eserine、Paraoxon: DMSOに溶解させ1、0.1、0.01 Mを調製
	上記各溶液でのヒト血漿中での安定性検討及び使用上の安全性の観点からNaFを選択。
対象種	ヒト血漿及び血液
方法	K <sub>2</sub> EDTA処理したチューブに1 μLの1 MのNaF溶液と2 μLの2.5 Mのクエン酸を添加し、そこへ氷上で0.1 mLの血液を採取 (NaFの終濃度10 mM、pH弱酸性)。4°C、4000 rpmで10分間遠心し、血漿を分離。 -80°Cで1ヵ月、4°Cで4時間まで安定であることを確認。

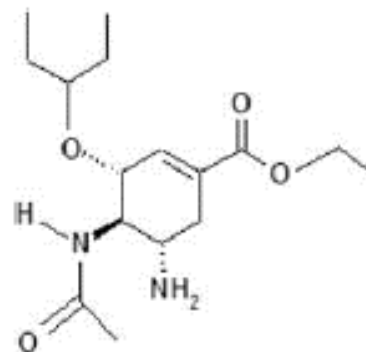
Tai T, J Pharm Biomed Anal. 2020 Feb 179:112955.



# エステラーゼ阻害剤の主な使用方法

## 非臨床測定での使用例

ラット血漿中での半減期が10分のエステルプロドラッグ



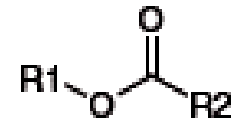
阻害剤	Dichlorvos
対象種	ラット血液
方法	Dichlorvosを生理食塩液に溶解させ8 mg/mLのDichlorvos溶液を調製。ヘパリン処理したチューブに2.5 $\mu$ LのDichlorvos溶液を添加し、そこへ室温で0.1 mLの血液を採取[Dichlorvos終濃度0.2 mg/mL(約1 mM)]。6000 rpmで5分間遠心し、血漿を分離。 -80°Cで2週間まで安定であることを確認。

Chang Q, Biomed Chromatogr. 2009 Aug;23(8):852-7.

# エステラーゼ阻害剤の主な使用方法

## 非臨床測定での使用例

ウサギ血漿中で室温1時間後に4%未満しか残存しない  
エステル含有添加剤

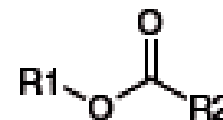


阻害剤	DFP
対象種	ウサギ血液
方法	DFPをヘパリンNa注射液に1vol%添加したDFP溶液を調製。 採血チューブに予めDFP溶液を採血量に対して約2vol%添加し、そこへ氷上で血液を採取(DFP終濃度約1 mM)。4°C、4000 rpmで10分間遠心し、血漿を分離。 -20°Cで3週間、氷上で7時間まで安定であることを確認。

# エステラーゼ阻害剤の主な使用方法

## 探索スクリーニングでの阻害剤選定例

ラット全血中での半減期が5分未満のエステルプロドラッグ



阻害剤	DFP、Dichlorvos: イソプロパノールに溶解させ1 Mを調製
	PMSF: DMSOに溶解させ1 Mを調製
	Paraoxon、Ach: DMSOに溶解させ0.5 Mを調製
	BNPP、Eserine: DMSOに溶解させ0.2 Mを調製
	NaF: 水に溶解させ1 Mを調製
	上記各ストック溶液をイソプロパノールで希釈し各0.01、0.1 Mを調製
対象種	ラット、ヒト血漿及び血液
方法	各血漿、血液に各阻害剤を終濃度0.1、1、10 mMとなるよう添加。 有効であった阻害剤を数種選択。 保管温度とpH[無処置とpH5に調整(1 Mクエン酸水溶液を終濃度20 mMとなるように添加)]について検討し、条件を最適化。

10 mMのDFP、Dichlorvos、Paraoxonでのラット全血(pH5)の溶血の程度はnot excessive  
Fung EN, Bioanalysis. 2010 Apr;2(4):733-43.

# エステラーゼ阻害剤の使用方法

	マトリックス中濃度 (mM)					添加量 (%)		
	論文①	論文②	論文③	論文④	論文⑤	論文①	論文②	論文④
DFP	0.1~10→×		20	20		1~5		4
Dichlorvos		10				1~5	5	
Paraoxon	0.1~10→×		10	20		1~5		4
PMSF	0.1	10	10	20		1~5	5	4
BNPP	0.1~1	10			1 / 5	1~5	5	
NaF	0.1~10	10			10 / 100	1~5	5	
アセチルコリン	0.1~10					1~5		
エゼリン	0.1~10		10	20		1~5		4
TTFA		10		20				4
EDTA・2Na		10			20			
NaFとBNPP混合		5&5						

① Effective screening approach to select esterase inhibitors used for stabilizing ester-containing prodrug analyzed by LC-MS/MS

② Stabilization of zeylenone in rat plasma by the presence of esterase inhibitors and its LC-MS/MS assay for pharmacokinetic study

③ Simultaneous determination of a selective adenosine 2A agonist, BMS-068645,

and its acid metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry-evaluation of the esterase inhibitor, diisopropyl fluorophosphate, in the stabilization of a labile ester-containing drug

④ Esterase inhibitors as ester-containing drug stabilizers and their hydrolytic products : potential contributors to the matrix effects on bioanalysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry

⑤ Improving the ex vivo stability of drug ester compounds in rat and dog serum : inhibition of the specific esterase and implications on their identity

× : 論文事例で無効だったことを示す

# エステラーゼ阻害剤の使用法

	溶媒				補足情報
	論文①	論文②	論文③ (ヒト)	論文④ stock solution	論文④
DFP	DMSO		water	0.5M in IPA	
Dichlorvos	DMSO	water			
Paraoxon	DMSO		water	0.5M in DMSO	~70%enhancement
PMSF	DMSO	alcohol	DMSO	0.5M in EtOH	
BNPP	DMSO	water			
NaF	DMSO	water			
アセチルコリン	DMSO				
エゼリン	DMSO		DMSO	0.5M in DMSO	~10%suppression
TTFA		alcohol		1.0M in DMSO	
EDTA・2Na		water			
NaFとBNPP混合		water			

# 臨床施設における扱い易さ

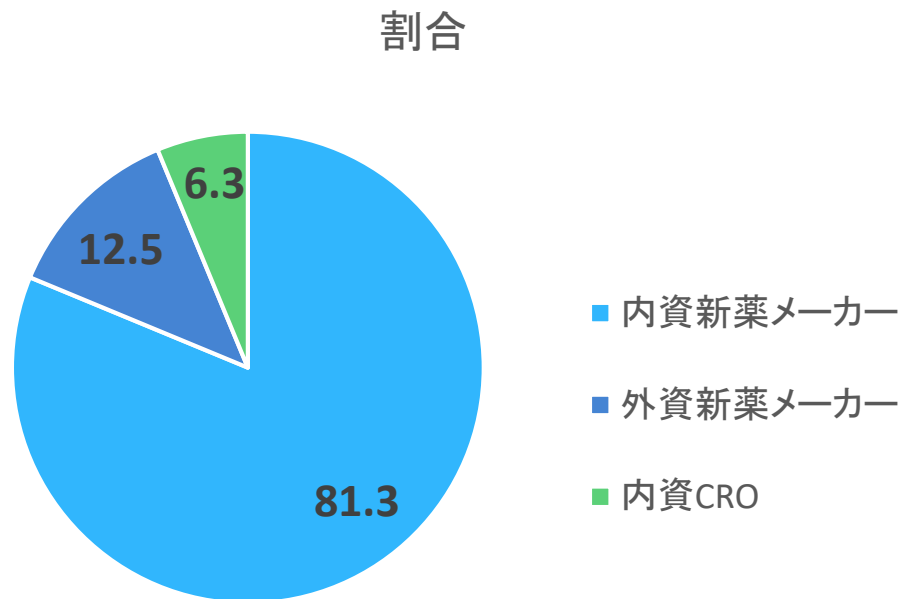
		DFP	Dichlorvos	Paraoxon	PMSF	BNPP	NaF	Acetylcholine	Eserine
法規制 (国内)	消防法	非該当	非該当	非該当	非該当	非該当	非該当	非該当	情報なし
	毒劇法	非該当	劇物	非該当	非該当	非該当	非該当	非該当	非該当
入手のし 易さ (国内)	市販品として購入	購入可能	購入可能	購入可能	購入可能	購入可能	購入可能	購入可能	購入可能
	採血管の 販売	なし	なし	なし	なし	なし	あり	なし	なし
危険性 (GHS分 類)	急性毒性 (経口/ 経皮)	区分1/ 区分2	区分2/ 区分2	区分1/ 区分1	区分3/ 非該当	区分2/ 非該当	区分3/ 非該当	非該当	区分2



# アンケート調査

# 所属組織について

Q: ご所属されている組織の業態に関して(16社回答)

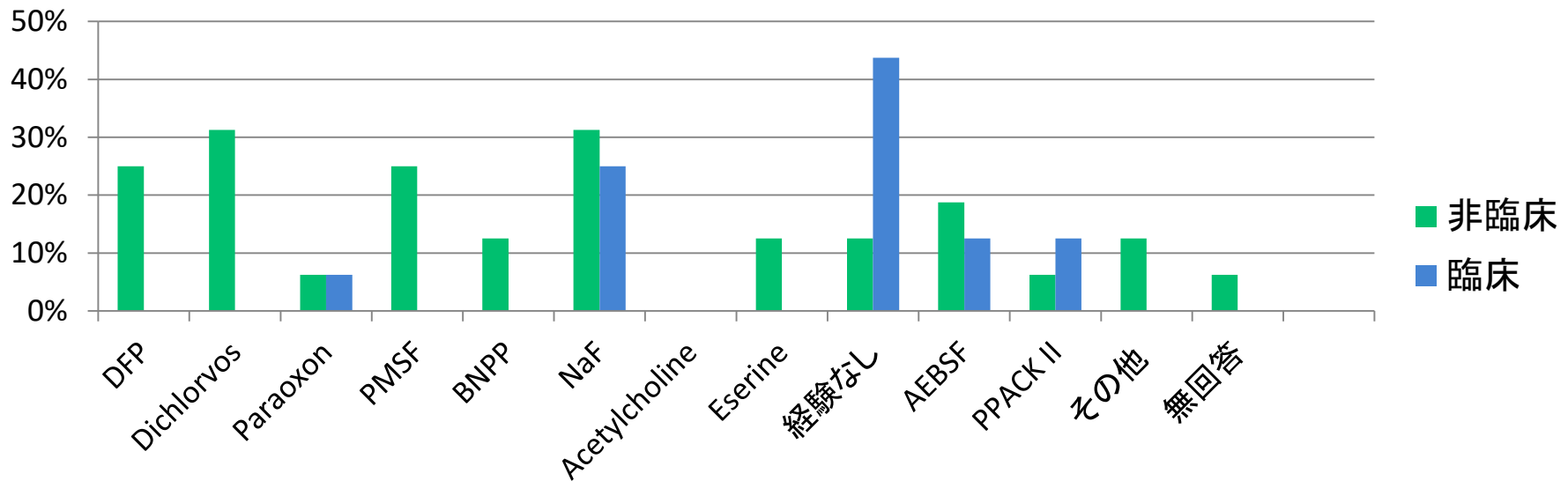




# 使用経験のある阻害剤について（非臨床/臨床）

Q: 使用経験のある阻害剤について以下の選択肢から複数選択(非臨床)(16社回答)

使用経験のある阻害剤について

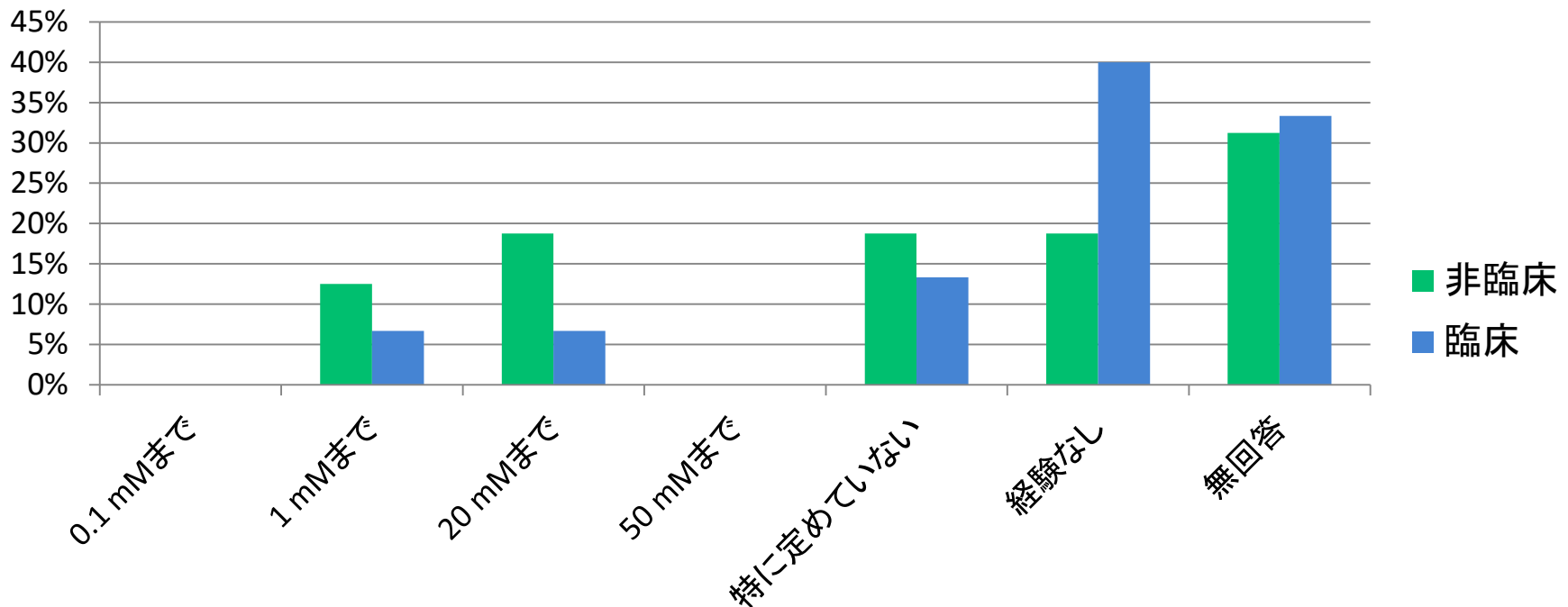


この回答のうち、非臨床、臨床共に使用経験が最も多い阻害剤は、NaFであった。その他として、市販の阻害剤カクテル等が挙がっていた。

## 阻害剤としての最終濃度について（非臨床/臨床）

Q: 最も使用経験のある阻害剤について、阻害剤としての最終濃度（非臨床/臨床）（回答は一つ）。（15社回答）

阻害剤としての最終濃度

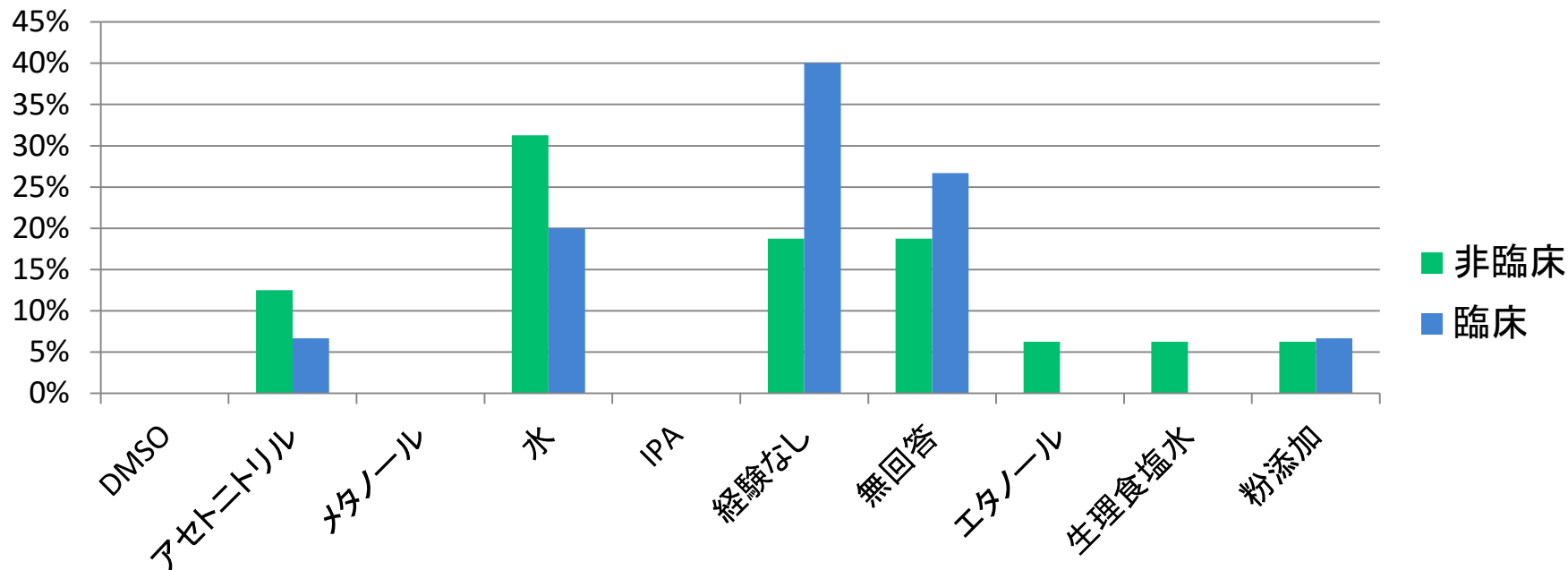


1～20mMが阻害剤の最終濃度として多い傾向にあった。

# 添加溶媒について（非臨床/臨床）

Q: 最も使用経験のある阻害剤について、最も頻度の高い添加溶媒（非臨床/臨床）（回答は一つ）。（16社回答）

最も頻度の高い添加溶媒

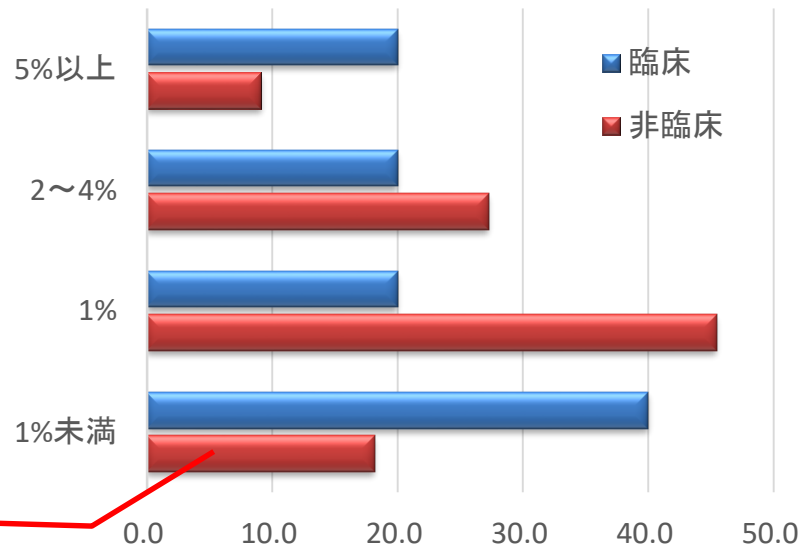


添加溶媒について、水が多い傾向にあった。

# 添加溶媒の最終添加量について

Q: 添加溶媒を添加する際の最終添加量について以下の選択肢から選択して下さい。(非臨床は16社、臨床は15社回答)

実施経験ありと回答中選択された項目  
(非臨床11社、臨床4社)

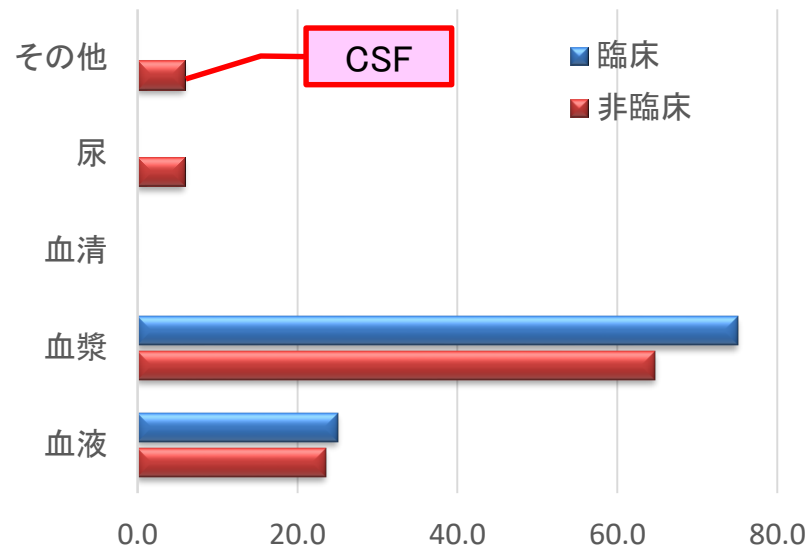


風乾による  
除去を含む

非臨床の使用においては1%、臨床においては1%未満での使用実績が最も多かった。最終添加量は1%以下としている施設が多い結果であるが、5%以上での使用実績もあることから、添加溶媒種により許容性が異なると思われる。

## 適用経験のあるマトリックスについて

Q: 最も使用経験のある阻害剤で適用経験のあるマトリックスについて以下の選択肢から選択して下さい。(非臨床は21社、臨床は15社回答)

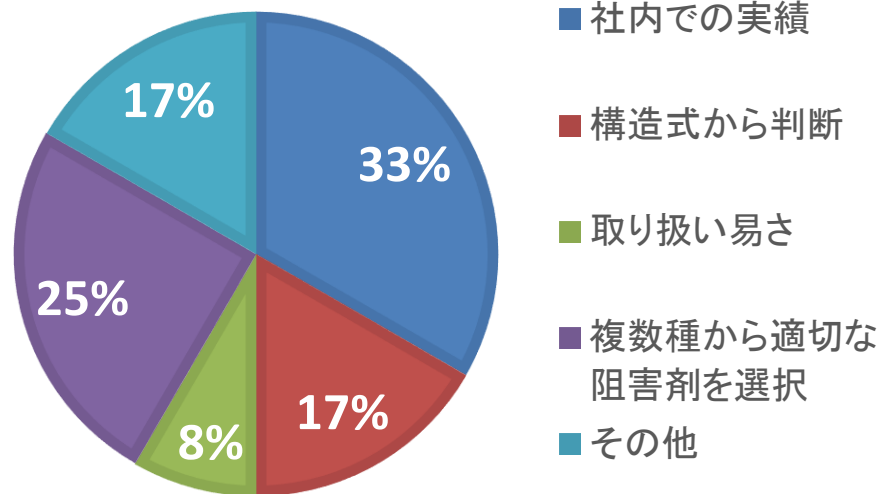


非臨床、臨床共に、血漿、血液への適用経験が大部分であり、エステラーゼによる分解が課題となるマトリックスは血漿がメインであることが改めて確認された。但し、非臨床において、尿やCSFへの適応例も確認されている。

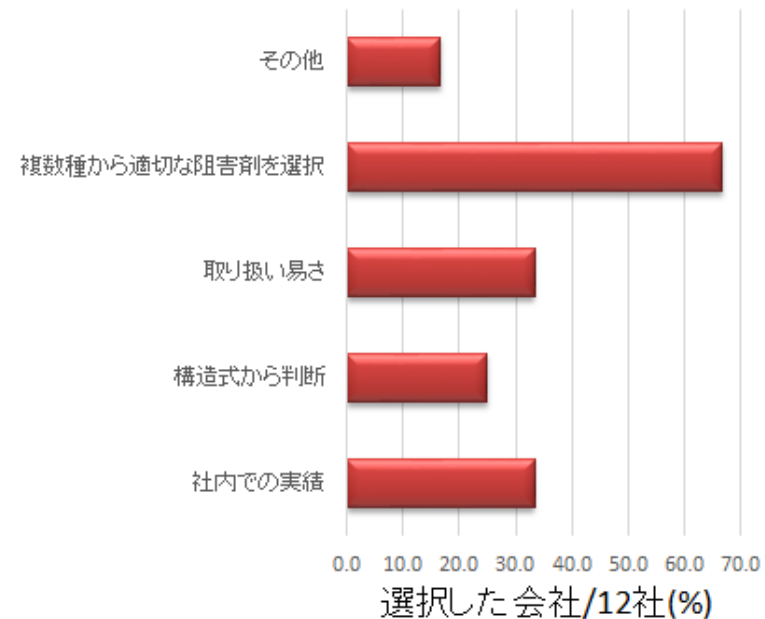
# 阻害剤の選定について

Q: 阻害剤を選定する際の第一選択の基準について以下の選択肢から優先順位を付けて選択して下さい。(12社回答)

優先順位が1番であった項目



選択された項目

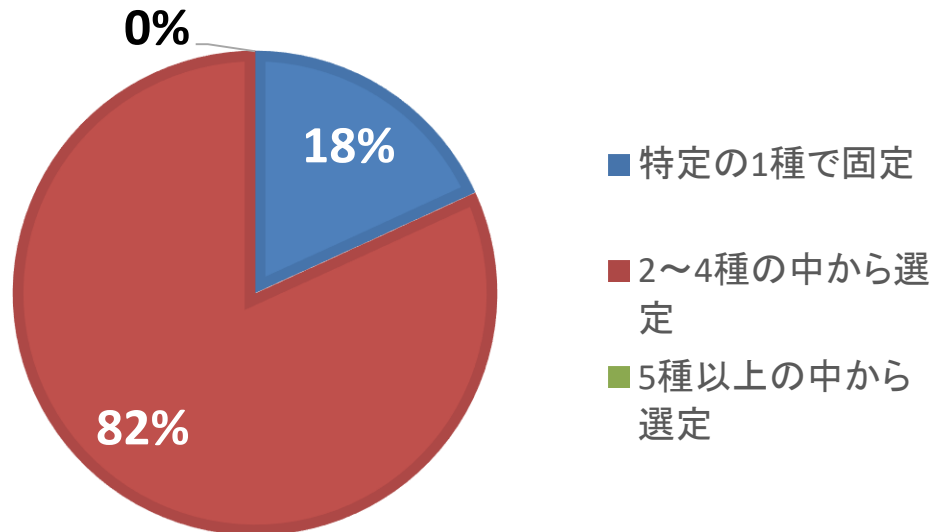


阻害剤選定の第一選択は社内での使用実績や構造式を優先して判断する施設が半数であった。一方、複数種から選択することを選択された回答が多く、第一選択の阻害剤に拘らず、同時に複数種から適切な阻害剤を選択する考えも多かった。

# 検討する阻害剤の数について

Q: 検討する阻害剤の数について選択してください。(15社回答)

実施経験ありと回答中選択された項目  
(11社回答)

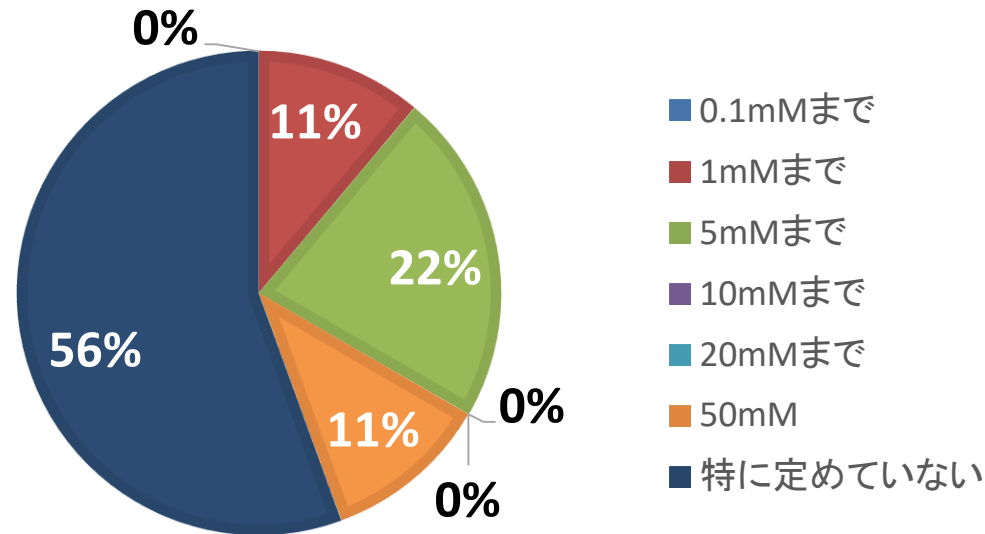


検討する阻害剤の数は、2~4種との回答が8割以上であった。

# 阻害剤の許容終濃度について

Q: 阻害剤選定を検討する際の阻害剤の許容終濃度について選択してください。(12社回答)

実施経験ありと回答中選択された項目  
(9社回答)



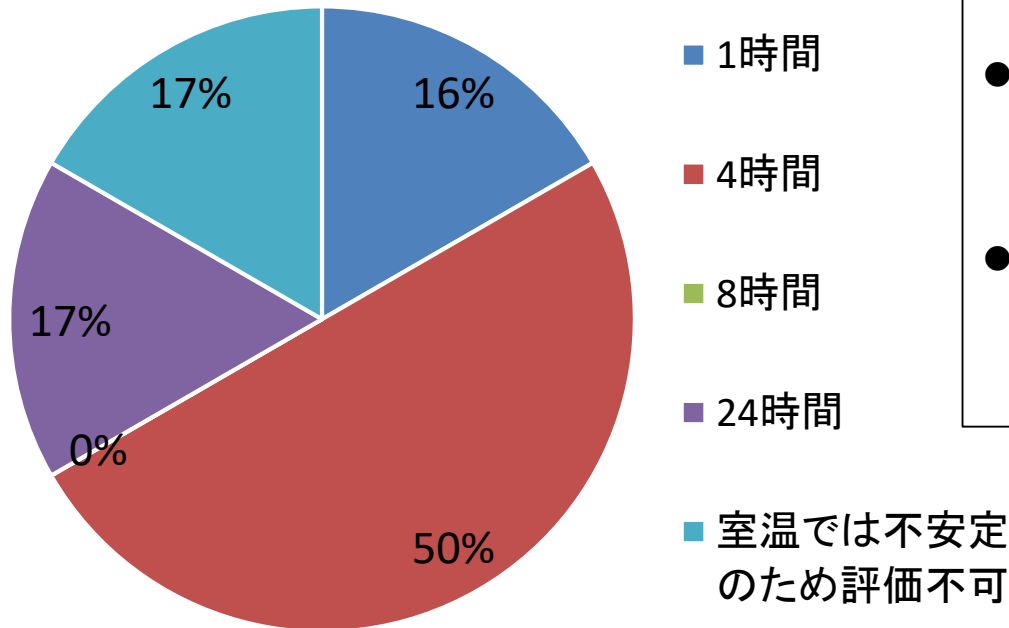
許容終濃度は半数以上の施設において特に定められていなかった。許容濃度を設定している施設では5mMまでとの回答が多かった。



# 安定性評価の検討項目について

Q: 阻害剤選定時における室温での安定性評価時間に関して(15社回答)

実施経験あり12社回答中



## 自由記載

- 室温で安定性が得られない場合は氷上も考慮する。4時間程度の安定性が確保できないと実用的ではない。
- 非臨床ではすぐ氷冷可能なため、未評価とする可能性あり。臨床では少なくとも1時間は必要と考えられる。

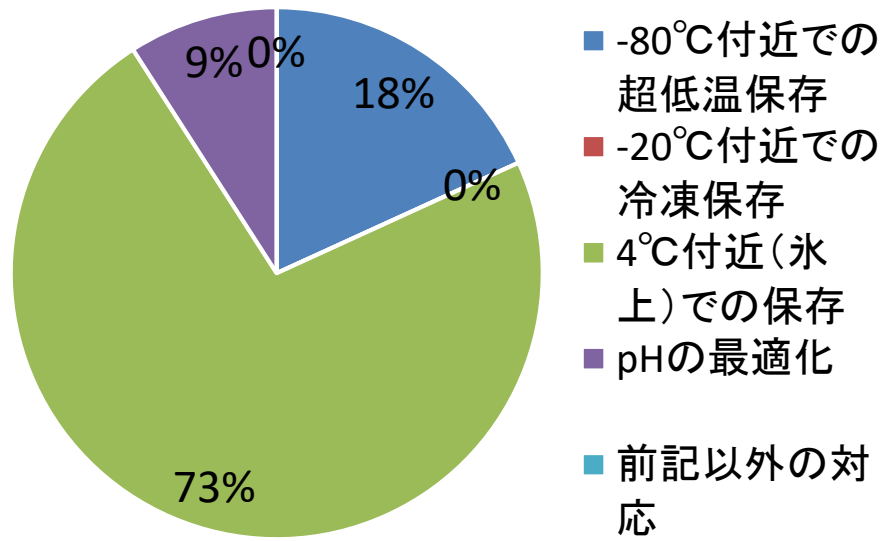
室温での評価時間としては、分析操作過程において実用的となる4時間を目安とするのが一番多く、担保できない場合は室温以外での方法を検討するという施設が多かった。



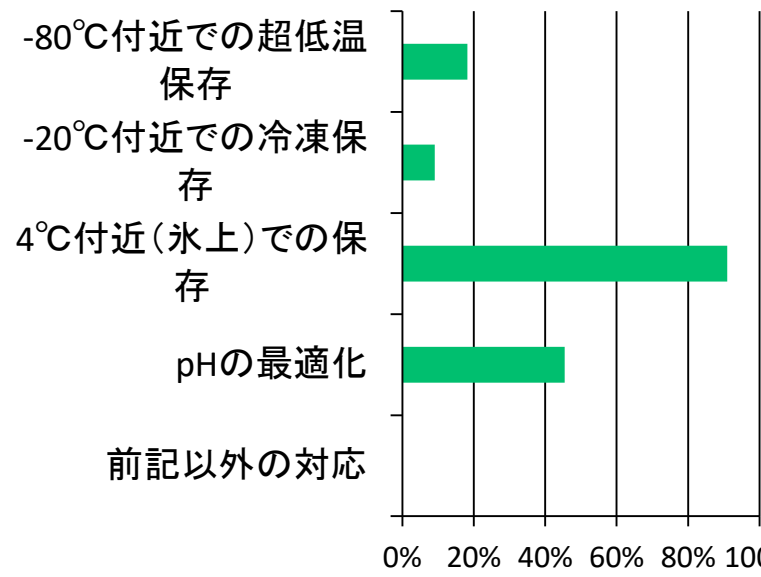
# 安定性評価の検討項目について

Q: 阻害剤添加しても室温で不安定であった場合の追加検討項目について以下の選択肢から優先順位を付けて選択(14社回答)

実施経験あり11社回答中  
優先順位が1番であった項目



実施経験あり11社回答中  
選択された項目



選択した会社/11社中

まずは分析操作において安定性に問題なく測定できるかを確認する目的で優先順位的に高い項目としては4°C付近(氷上)での検討が多かった。また、半数程度の施設においてpHの最適化検討も実施している傾向にあった。

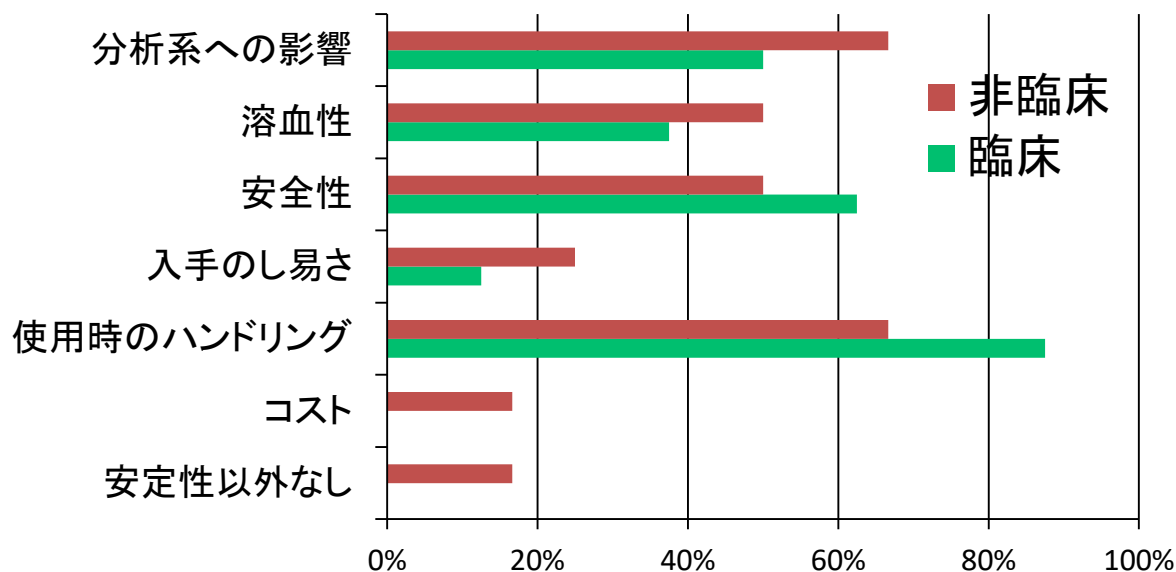
<http://bioanalysisforum.jp/>

# 阻害剤選定時に評価する選定項目について

Q: 阻害剤選定において、安定性効果以外で評価する選定項目について以下の選択肢から複数選択。(15社回答)

非臨床試験時  
実施経験あり12社回答中

臨床試験時  
実施経験あり8社回答中



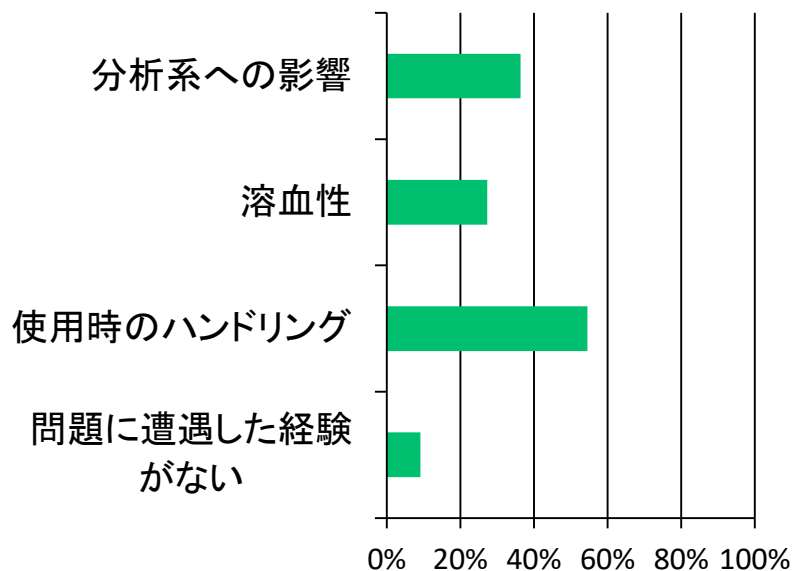
非臨床、臨床試験共に選定項目の評価として「分析系への影響」「使用時のハンドリング」が多く、「安全性」「溶血性」も選定評価項目に取り入れている施設は多い傾向にあった。

<http://bioanalysisforum.jp/>

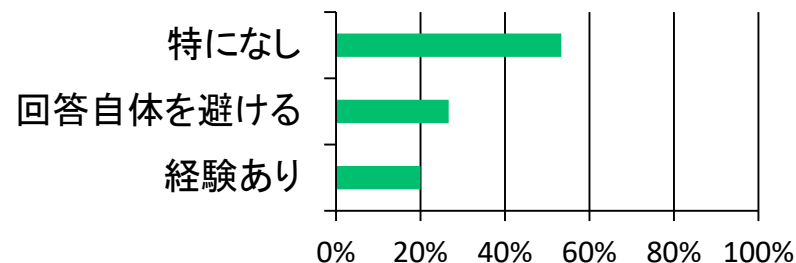
# 阻害剤使用時に直面した問題点について

Q: 阻害剤の使用で、安定性以外に直面する頻度が高い問題について以下の選択肢から複数選択。(14社回答)

実施経験あり11社回答中



Q: 阻害剤使用時における臨床測定での弊害について。(15社回答)



## 経験ありにおける記載コメント

- 使用時のハンドリング。
- 臨床施設で使用が許可されない。特別な対応が必要など。
- クエン酸とNaFが入った注射筒がアメリカで入手しにくい。

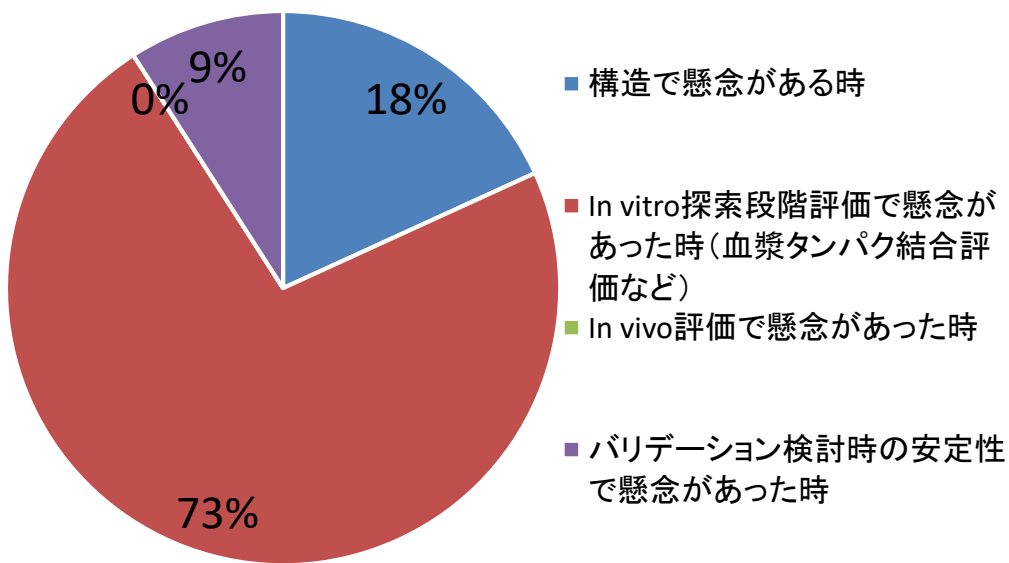
直面した問題点については阻害剤選定時の選定項目評価と同様に「分析系への影響」「使用時のハンドリング」が多く、臨床使用時の弊害としても使用に際してのハンドリングが挙げられている状況にあった。



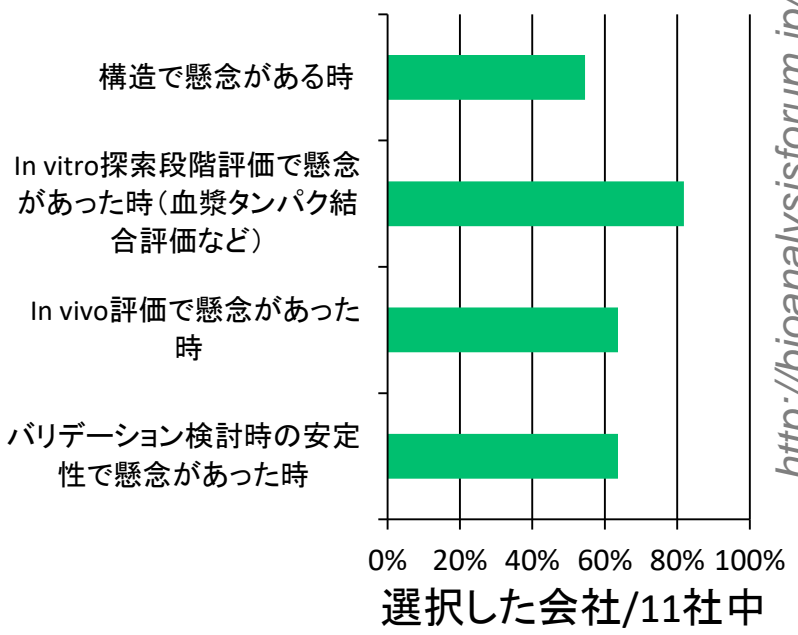
# 阻害剤の使用を検討する時期について

Q: プロドラッグ以外で阻害剤の使用を検討する時期について以下の選択肢から優先順位を付けて選択(14社回答)

実施経験あり11社回答中  
優先順位が1番であった項目



実施経験あり11社回答中  
選択された項目



<http://bioanalysisforum.jp/>

阻害剤の使用を検討する時期については、in vitro探索段階評価で懸念があった時が多く、基本的には不安定性の懸念が確認された段階で検討するという施設が多かった。

# エステラーゼ阻害剤のまとめ

## 使用検討時期

1. 探索段階での評価 (*in vitro* など) で懸念があった時
  2. 構造で懸念がある時
- 不安定性の懸念が確認された段階で検討

## 候補阻害剤

NaF	Dichlorvos	DFP	PMSF
AEBSF	BNPP	Eserine	Paraoxon
PPACK II			

## 選定項目

1. 安定性効果
2. 分析系への影響
3. 使用時のハンドリング
4. 添加時の溶血性、使用時の安全性

臨床試験時での使用では阻害剤によっては

- 臨床施設で使用が許可されない。特別な対応が必要。
- 国によっては入手し難いこともある。

# 阻害剤の選定/使用方法のまとめ

## 第一 選択

- 複数種の使用実績のある候補阻害剤を選択
  - 対象化合物の構造から候補阻害剤を選択
- 2~4種の阻害剤を選択し、選定評価

## 許容 終濃度

20 mM付近まで(文献/アンケート結果で多かった最大濃度)  
[10 mMのDFP、Dichlorvos、Paraoxonでの溶血の程度はnot excessive(文献情報)]

## 添加 溶媒

NaFなど該当阻害剤が水に溶解する場合は水が多いが、困難な場合、有機溶媒(MeCN、DMSOなど)も使用。最終添加量としては、1%程度が多い傾向。粉末の場合、使用せず。

## 安定性 評価

1. 室温又は氷上での安定性(概ね4時間を目安)評価
2. 1.で不安定であった場合、pH調整(弱酸性等)も実施
3. 各選定項目に対して許容できるか判断し阻害剤を選定

# 不安定な分析対象物質・全体まとめ

- 公知情報調査、JBFパートナーに対するアンケートから得た使用実態、必要性調査の結果から、以下の結論を得た。
  - マトリックス選択：血漿を第一選択とすることが適切（EDTA血漿がより推奨される）
  - 溶血影響：積極的に検討する必要性は乏しく、化学構造（血球成分による酸化・分解）や実験的に全血中安定性に懸念があった場合に検討することが適切
  - エステラーゼ阻害剤：不安定性の懸念が確認された段階で、化合物の構造から適切な阻害剤を複数選定、実績のある条件で実験的に検討し阻害剤選択することが適切
- 実務では、詳細な技術的留意点（各サブパートに記載）に沿って配慮・検討することが望まれる。
- 今後、DG2020-46の調査・議論活動は終了し、成果物作成（論文化）に進む予定。