

小動物マイクロサンプリング時の微量生体試料分析技術 —非臨床毒性試験での実施例—

大阪ラボラトリー 仁井 一夫・公平 陽子

1 はじめに

マイクロサンプリングは、薬物やその代謝物の薬物動態評価において、血液採取量をごく微量（一般的には50 µL以下）にすることで、評価動物への負担を大幅に軽減する手法です。毒性試験へのマイクロサンプリングの適用により、サテライト動物の3Rs [Reduction (削減), Refinement (改善), Replacement (代替)] への貢献とともに、同一個体での毒性と薬物暴露量評価を可能とし、より直接的な毒性評価への活用が期待されています。

現在、ICH S3A (トキシコキネティクスに関するガイダンス) においてマイクロサンプリングに関するQ&Aの作成が進められており、日米欧で本技術の活用が益々推進されています。

当社では、株式会社イナリサーチのご協力により、マイクロサンプリングで得られた微量血漿 (2.5 µL) を用いた薬物濃度分析の確立に取り組みました。本稿では、マイクロサンプリングを適用した毒性評価時の血漿中濃度分析事例を紹介致します。

2 マーモセットにおけるバルサルタンの血漿中薬物濃度分析

2.1 分析法の確立

マーモセット血漿にバルサルタンを添加した試料2.5 µLを用いて、図1に示したフローにより前処理を行い、LC-MS/MSにてバルサルタン濃度を定量しました。

選択性 (図2)、同時再現性 (表1) 共に良好な結果が得られました。

2.2 血漿中薬物濃度分析

マーモセットにバルサルタンを経口投与 (200 mg/kg/day) し、無麻酔下尾静脈から経時的に採血 (50 µL) 後 (株式会社イナ

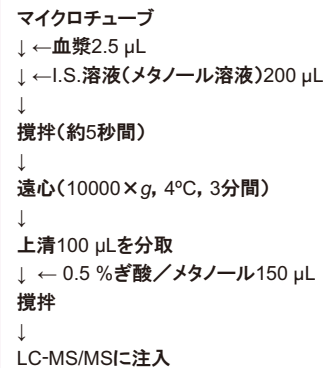
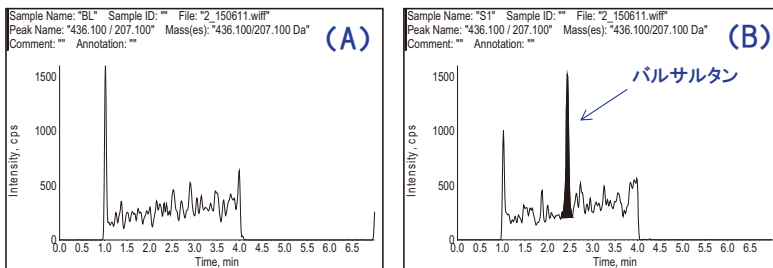


図1 試料前処理法



(A) ブランク血漿 (B) 添加血漿 (10 ng/mL)

図2 選択性の検証 (定量下限濃度のバルサルタンのクロマトグラム)

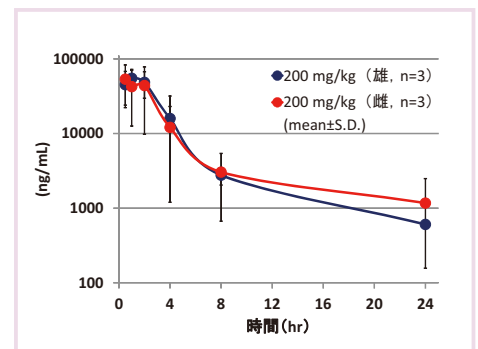


図3 マーモセットの血漿中濃度測定結果

表1 分析方法の同時再現性

添加濃度 (ng/mL)	真度 (%)	精度 (%)
10.0	108.5	10.4
20.0	104.3	6.9
1000	105.7	2.4
8000	89.7	1.0

定量範囲: 10 ~ 10000 ng/mL (n=3)

表2 長期保存安定性

凍結保存したマーモセットの検体で評価

動物番号	採血ポイント (h)	定量値 (ng/mL)		変化率 (%)
		初回測定	202日保存後	
2M01	24h	174	172	-1.1
2M02	24h	573	540	-5.8
2F01	8h	1560	1510	-3.2
2F02	8h	5780	6200	7.3
3M02	8h	7990	8860	10.9
3F02	8h	6130	6440	5.1

変化率 (%) = (保存後の定量値 - 初回測定の定量値) / 初回測定の定量値 × 100

表3 凍結融解安定性

5, 10及び15 µLで保存した検体で評価

保存期間	保存条件	容量 (µL)	定量値 (ng/mL)	定量値の平均値 (ng/mL)	変化率 (%)
Initial	—	—	21.3	21.1	—
			20.9		
凍結融解	1回	5	22.4	22.4	6.2
		10	23.2	21.9	3.8
			20.5		
	15	22.6	21.9	3.8	
	3回	5	23.1	23.1	9.5
		10	20.1	21.2	0.5
22.3					
15	20.6	21.4	1.4		
			22.1		

変化率 (%) = (凍結融解後の定量値 - Initialの定量値) / Initialの定量値 × 100

リサーチで実施), 血漿2.5 μLを用いて分析した結果, パルサルタンの経時的な全身的暴露を評価することができました(図3)。

血漿が微量であるため保存中及び使用中の乾燥による濃縮が懸念されましたが, 長期保存安定性(表2), 凍結融解安定性(表3), 室温保存安定性(表4)のいずれも変化率が±15.0%以内と良好な結果が得られました。また, ISR (Incurred Sample Reanalysis (定量値の再現性確認のため, 異なる日に別の分析単位で投与後試料を再分析すること)も実施し, ガイドラインの基準¹⁾(乖離度: ±20%以内)を満たすことができました(表5)。



測定機器 HPLC: Nexera X2システム(島津製作所)
MS: TripleQuad 6500 (AB Sciex)

3 ラット, マウスにおけるエリスロマイシンの血漿中薬物濃度分析

ラットおよびマウスにエリスロマイシンを経口投与(20, 60, 200 mg/kg)し, 無麻酔下尾静脈から採血(40 μL)後(株式会社イナリサーチで実施), その血漿(2.5 μL)を用いて分析しました。いずれの種, 用量においてもマイクロサンプリングと通常法(0.5 mL採血を使用)間で, 血漿中エリスロマイシン濃度は同等でした(表6)。

4 おわりに

マイクロサンプリング技術の活用は, 前述の3Rsへの寄与や同一個体における毒性-曝露評価はもとより, 医薬品開発, 特に探索段階における被験物質使用量の大幅な削減も期待できます。当社は本稿で紹介したマイクロサンプリングでの微量試料中薬物濃度分析サービスによりそのニーズにしっかりと応えてまいります。

表4 室温保存安定性

室温で24時間保存した検体で評価

動物番号	採血ポイント(h)	定量値 (ng/mL)		変化率 (%)
		初回測定	室温保存24時間後	
2M01	2	59900	53300	-11.0
	8	2450	2510	2.4
2M03	0.5	49100	46100	-6.1
	24	2030	2150	5.9
2F01	0.5	15200	13700	-9.9
	8	1890	1690	-10.6

変化率 (%) = (室温保存後の定量値 - 初回測定の定量値) / 初回測定の定量値 × 100

表5 ISR

定量値の再現性確認のため, 異なる日に投与後試料を再分析

投与群	動物番号	採血ポイント(h)	定量値 (ng/mL)		乖離度 (%)
			初回測定	ISR値	
200 mg/kg (Day 1)	2M03	0.5	69300	62900	-9.7
		8	1950	1900	-2.6
	2F02	0.5	84600	79600	-6.1
		24	2700	2540	-6.1

乖離度 (%) = (ISR値 - 初回値) / 初回値とISR値の平均値 × 100

文献

- 1) 薬食審査発0711第1号「医薬品開発における生体試料中濃度測定法のバリデーションに関するガイドライン」について(厚生労働省医薬食品局審査管理課, 平成25年7月11日)

表6 通常法とマイクロサンプリングの比較

通常法(0.5 mL採血)とマイクロサンプリング(40 μL採血)の比較

ラット					マウス				
投与量 (mg/kg)	動物No.	投与後4時間定量値 (ng/mL)		再現性 (%)	投与量 (mg/kg)	動物No.	投与後4時間定量値 (ng/mL)		再現性 (%)
		0.5 mL採血	40 μL採血				0.5 mL採血	40 μL採血	
20	CD1M04	5.99	6.45	7.4	20	CD4M10	1.18	1.21	2.5
	CD1M05	3.90	3.81	-2.3		CD4M11	0.438	0.418	-4.7
	CD1M06	8.22	7.91	-3.8		CD4M12	0.643	0.698	8.2
60	CD2M04	106	91.5	-14.7	60	CD5M10	14.0	12.4	-12.1
	CD2M05	55.4	63.1	13.0		CD5M11	2.37	2.00	-16.9
	CD2M06	38.4	37.3	-2.9		CD5M12	11.3	11.8	4.3
200	CD3M04	378	383	1.3	200	CD6M10	205	184	-10.8
	CD3M05	381	321	-17.1		CD6M11	98.1	100	1.9
	CD3M06	354	331	-6.7		CD6M12	161	169	4.8

再現性 (%) = (40 μL採血時定量値 - 0.5 mL採血時定量値) / 定量値の平均値 × 100



仁井 一夫
(にい かずお)
大阪ラボトリー



公平 陽子
(こうへい ようこ)
大阪ラボトリー