

小動物試験におけるマイクロブラッドサンプリング (MBS) 法の薬物濃度測定への影響について

○水落 正慶¹, 岩波 智徳², 小松弘幸², 小山 亜紀¹, 秋江靖樹², 関口 金雄¹

1, Bioanalysis Research Department, CMIC Pharma Science Co., Ltd.
2, Bioresearch Center, CMIC Pharma Science Co., Ltd.

CMIC Pharma Science Co., Ltd.

Osaka Office
Shin-Osaka Dai-ichi Seimei Bldg. 7th Floor, 3-5-24, Miyahara, Yodogawa-ku, Osaka 532-0003, Japan
TEL: +81-6-6151-6800, FAX: +81-6-6151-6707

Nishiwaki Laboratory
17-18, Nakahatacho, Nishiwaki, Hyogo 677-0032, Japan
TEL: +81-795-23-5725, FAX: +81-795-23-4756

Purpose : 目的

近年、非臨床試験においては、動物愛護の観点から被験動物数を削減及び動物への苦痛の軽減が強く求められている。これに応える形で、TK試験におけるマイクロサンプリング手法の利用が提唱されており、ICHにおいても検討が進んでいる。

また、生体試料中濃度測定に使用する分析機器の高感度化により、より少量の試料で目的とする化合物の定量下限を達成できるようになってきた。

今回、マイクロブラッドサンプリング (MBS) 法による薬物濃度測定法の諸条件の検討、並びにクラリスロマイシンを被験物質としたラットの単回投与試験における従来採血法の比較と濃度測定法の妥当性を確認することを目的として生体試料中薬物濃度測定を実施した。

Methods : 方法

1. 動物試験

- 動物種 / 系統: rat / CrI:CD(SD)
- 性 / 週齢: 雄 / 6 週齢 (投与時)
- 被験物質: クラリスロマイシン
- 投与量: 200 mg/kg (単回経口投与)
- 摂餌条件: 絶食下
- 血液学検査及び血液生化学検査の項目:
血液学検査: RBC, WBC, Ht, Hb, MCH, MCV, MCHC, Plt, Ret, PT, APTT, Baso, Eosi, Neut, Lymp, Mono, Eosi, Neut
血液生化学検査: AST, ALT, ALP, LDH, γ -GTP, Glu., T.Cho., TG, PL, TP, Alb., A/G, BUN, Crea., T.Bil., Na, K, Cl, P, Ca
- 採血時点: 投与前, 投与1, 2, 4, 8 及び 24 時間後
- 採血方法

マイクロサンプリング法による採血(n=6*): 頸静脈より翼付採血針とヘパリン塗布されたプラスチック製キャピラリーを用いて血液 30 μ Lを採取した。採血後、キャピラリーの両端をパテで封をし、遠心分離により血漿を分離した後、凍結保存した。

従来法による採血 (n=9*): 予め、ヘパリンナトリウムを入れたディスポーザブルシリンジ及び注射針を用いて、無麻酔下で頸静脈から各時点、血液約0.2 mLを採取した。マイクロチューブに移し、遠心分離により血漿を分離した後、凍結保存した。

*: 各群の3匹については同一動物に対して同時に、両方の方法により採血を実施した。

2. サンプルの送付

MBS法により得られたサンプル (キャピラリー) については輸送中の破損を防止するため個々にプラスチック製の試験管に入れた。サンプルはドライアイスで凍結した状態で測定施設に送付した。

2. LC-MS/MS measurement

- LC: UPLC (Waters), MS/MS: API-5000 (AB Sciex)
- サンプル前処理法:

- 測定施設でサンプル受領後、MBS法で得られたキャピラリーサンプル中の血漿はPP製マイクロチューブに全量移し、保存中の乾燥を防ぐためリン酸緩衝液 (PBS) で5倍に希釈して保存した。血漿の容量は重量を測定し比重により算出した (下図参照)。従来法により得られた血漿サンプルは前処理前に5倍希釈して処理に供した (血漿10 μ LとPBS40 μ Lを混合)。
- 全希釈試料(12.5 μ L, 血漿量として2.5 μ L) (t-Butyl methyl etherを使用した液々抽出により処理した。処理後試料の溶液量は150 μ Lとした。
- 処理後試料15 μ LをLC-MS/MSに注入した。

Results : 結果

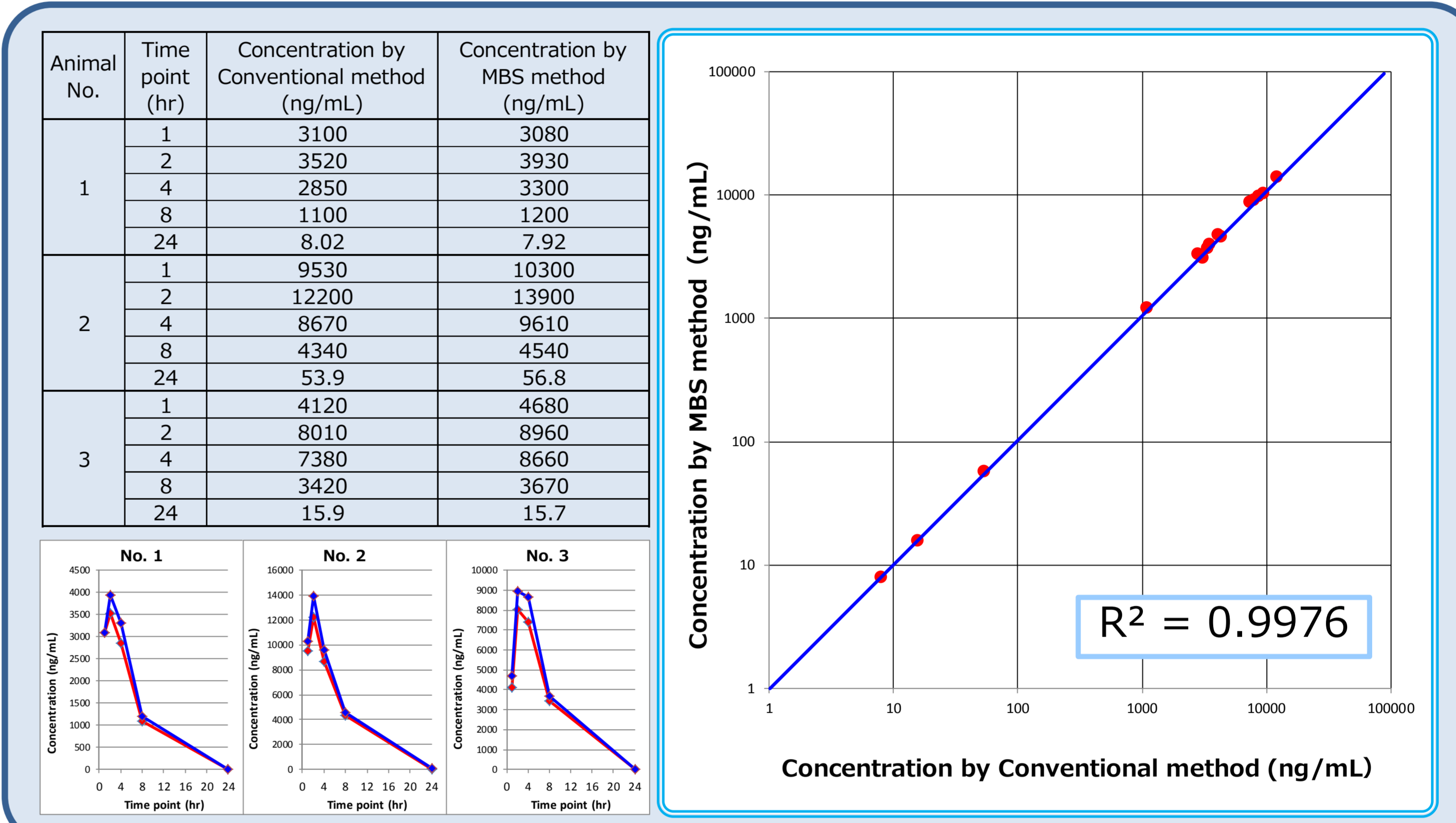
1. 分析法メソッドバリデーションパラメータ <真度及び精度>

No.	LLQC (1 ng/mL)	LQC (3 ng/mL)	MQC (50 ng/mL)	HQC (800 ng/mL)	Dilution QC (2000 ng/mL) 10-fold	Dilution QC (2000 ng/mL) 100-fold
1	1.03	2.88	51.2	815	2200	2220
2	1.04	2.90	51.6	804	2150	2280
3	0.994	2.83	51.3	804	2190	2370
4	1.02	2.85	51.1	817	2200	2260
5	1.00	3.08	51.3	803	2160	2270
Mean (ng/mL)	1.02	2.91	51.3	809	2180	2280
SD	0.02	0.10	0.2	7	20	60
CV (%)	2.0	3.4	0.4	0.9	0.9	2.6
Accuracy (%)	102.0	97.0	102.6	101.1	109.0	114.0

• バリデーションパラメータはバリデーションガイドライン中に示された*基準を満たした。

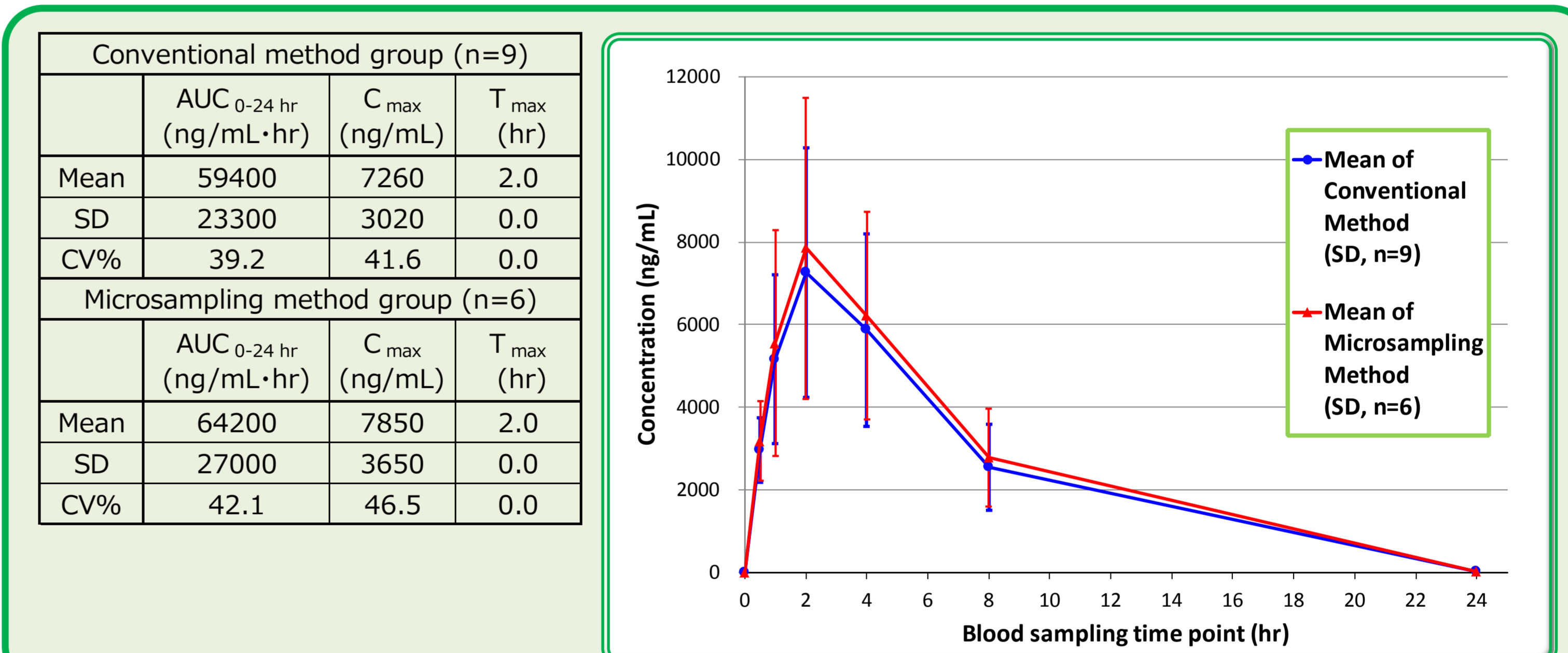
*:薬食審査発0711第1号, 平成25年7月11日, 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」

2. MBS法と従来法との定量値の相関



• 両方による同一動物からの同時採血において、各方法により得られた定量値はすべての採血時点において良好な相関を示した。

3. PKパラメータ



• AUC_{0-24 hr} と C_{max} について両方から得られた値を比較した結果、有意な差は認められなかった。

4. 血液学的検査及び血液生化学的検査パラメータ

Group	RBC (10 ⁴ / μ L)	Ht (%)	Hb (g/dL)
Non-blood collection group	mean (SD) 720 (30)	44.4 (2.0)	15.7 (0.8)
Conventional method group	mean (SD) 605 (36)	37.6 (2.1)	13.0 (0.8)
MBS method group	mean (SD) 684 (54)	42.6 (2.6)	15.0 (0.9)

• In a comparison between values of the MBS method and values of the conventional method, parameters that show the significant differences are shown in the above table.

- 赤血球に関するパラメータ (RBC, Ht及びHb) について、従来法により採血を実施した群は他の群より有意に低い値を示した。
- これらの値について、非採血群とMBS法による採血群の間に有意な差はなかった。

Conclusion : まとめ

同一動物から同時に両法で得られたサンプルの定量値について良好な相関が得られた。また、2つのグループ間のPKパラメータには有意な差は認められなかった。更に、赤血球に関する血液学的検査の結果からMBS法のグループのラットの状態は従来法のグループのラットに比べて良好であった。上記の結果より、小動物を用いた試験においてMBS法は十分に有用であると考えられた。



① 試験管に入れたキャピラリーサンプル (凍結状態) ② 試験管ケースから取り出したキャピラリーサンプル ③ はさみにより上部のパテを切断除去する ④ 血球成分の 2, 3mm 上部に切り込みを入れる ⑤ 切り込み部分からキャピラリーを折り切る ⑥ キャピラリーをマイクロキャピラリーベットの差込込む ⑦ マイクロチューブに血漿全量を吐出する ⑧ 重量測定により比重を用いて容量に換算する