

非臨床安全性試験における マイクロサンプリング導入に向けた取り組み

Efforts to introduce microsampling in the non-clinical safety study

株式会社 L S I メディエンス 創薬支援事業本部
試験研究センター 鹿島安全性第1研究部
赤川 唯

はじめに：マイクロサンプリングとは・・・

ラットからの繰り返し採血技術

- ✓ 1990年代後半、鎖骨下・頸静脈・尾静脈採血技術が確立、1匹から1日7回程度の採血が可能

従来の特キシコキネティクス（TK）評価

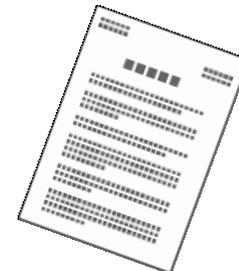
- ✓ 従来法では、200 μ L以上の採血が必要！！
- ✓ げっ歯類を用いた毒性試験でTK測定を実施する場合、サテライト動物から採血する必要があった（血液学的検査への影響）



近年、微量試料の取扱い及び測定機器の分析感度が向上することで、**マイクロサンプリング**技術をTK評価に利用することが可能となった

マイクロサンプリングの定義

ICH S3A「トキシコキネティクス（毒性試験における全身的暴露の評価）に関するガイダンス」におけるマイクロサンプリング手法の利用に関する質疑応答集（Q & A）（2019年3月発出）によると・・・



マイクロサンプリングの定義

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

（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）

非血液由来マトリックスはICH S3A Q&A文書の適用範囲外

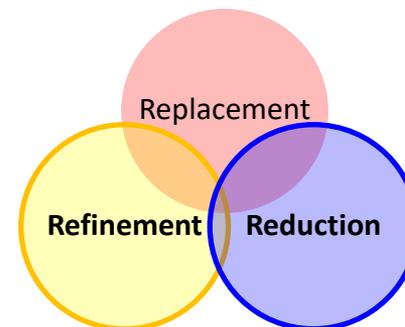
対象動物

げっ歯類、非げっ歯類

マイクロサンプリングの利点

1) 採血量最小化による動物福祉への貢献

- ✓ 動物の痛みや苦痛の軽減 (refinement)
- ✓ TKサテライト群の動物数を削減・無くす (reduction) ことができる



- 特に通常採血量では、サテライト群の動物数が多く必要であったマウスで有用。

例) 対照群+3用量 各時点n=3 7時点

採血従来法 (200 μL/時点, 1時点/匹)

	主試験群		TKサテライト群	
	♂	♀	♂	♀
動物数(匹)				
対照群	10	10	3	3
低用量群	10	10	21	21
中用量群	10	10	21	21
高用量群	10	10	21	21
総数	212			

マイクロサンプリング (50 μL/時点, 2~3時点/匹)

	主試験群		TKサテライト群	
	♂	♀	♂	♀
動物数(匹)				
対照群	10	10	3	3
低用量群	10	10	9	9
中用量群	10	10	9	9
高用量群	10	10	9	9
総数	140			

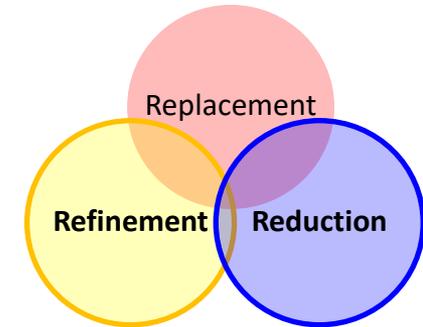
従来の1/3の動物数を削減可能

マイクロサンプリングの利点

1) 採血量最小化による動物福祉への貢献

- ✓ 動物の痛みや苦痛の軽減 (refinement)
- ✓ TKサテライト群の動物数を削減・無くす (reduction) ことができる

- 特に通常採血量では、サテライト群の動物数が多く必要であったマウスで有用。



2) 主試験群でTK用の採血実施

- ✓ 毒性と薬物曝露データとの関連を同じ動物で直接評価可能
 - 毒性評価の質の向上

マイクロサンプリング導入のために・・・

マイクロサンプリング法を毒性試験に導入するためには・・・

- ✓ 従来のサンプリング法との同等性は？
- ✓ 採血による毒性評価への影響は？
- ✓ 採血部位、手技、器材（デバイス）、血液処理法などは？



情報が十分とは言えない

**我々がマイクロサンプリング法を導入するために、
これまで実施してきた検討実験を紹介する。**

本日の内容

- ✓ **マイクロサンプリングに用いる**
 - **採血部位**
 - **デバイス**

- ✓ **マイクロサンプリングが及ぼす**
 - **生体（正常ラット）への影響**
 - **単回毒性評価への影響**
 - **反復毒性評価への影響**

- ✓ **今後の課題・展望**

本日の内容

✓ マイクロサンプリングに用いる

➤ 採血部位

➤ デバイス

✓ マイクロサンプリングが及ぼす

➤ 生体（正常ラット）への影響

➤ 単回毒性評価への影響

➤ 反復毒性評価への影響

✓ 今後の課題・展望

マイクロサンプリングに用いる採血部位

無麻酔下で反復採血が可能な採血部位・・・

✓ 頸静脈（鎖骨下静脈）

メリット： 採血量が確保しやすい

デメリット： 止血が不確実（目視で確認できない）

高度な採血技術が必要

胸筋を介するため組織への影響が懸念される

✓ 外側尾静脈

メリット： 採血が容易（投与でも実施するため）

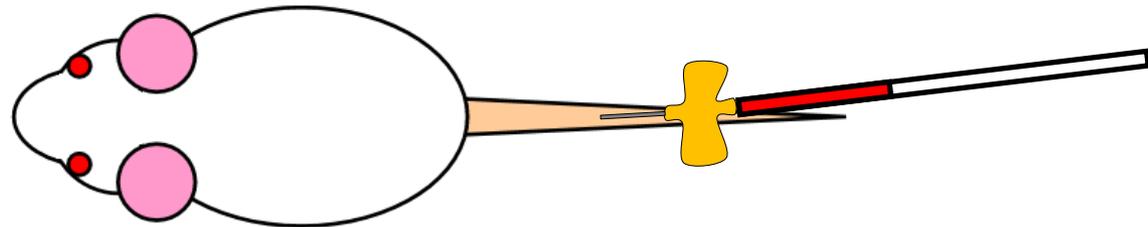
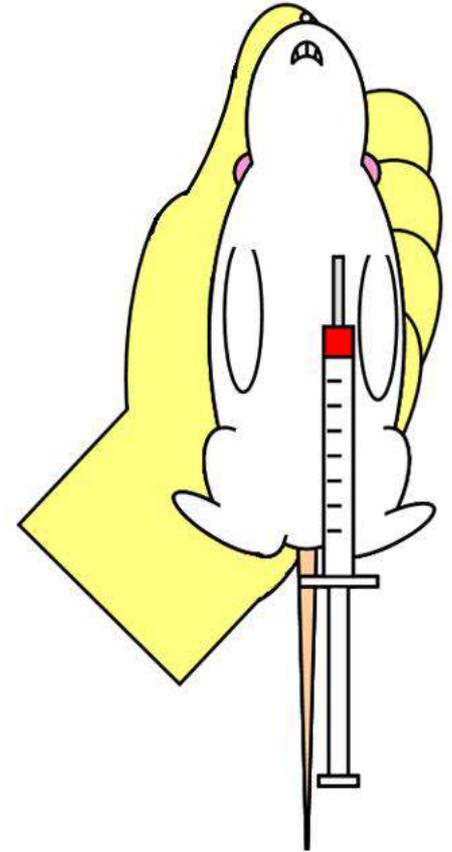
止血が容易

尾の多少の損傷のため組織への影響が少ない

デメリット： 採血量の確保が難しい（血流が弱い）

静脈内投与時は採血部位として選択できない

（コンタミネーションのリスク）



採血部位の違いによるTKパラメータへの影響

【方法】 Crl:CD(SD)ラット7週齢，雌雄各群3または5匹

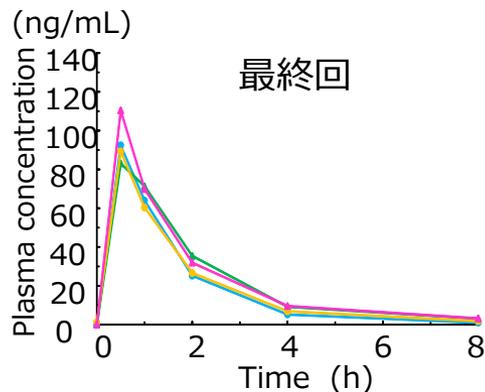
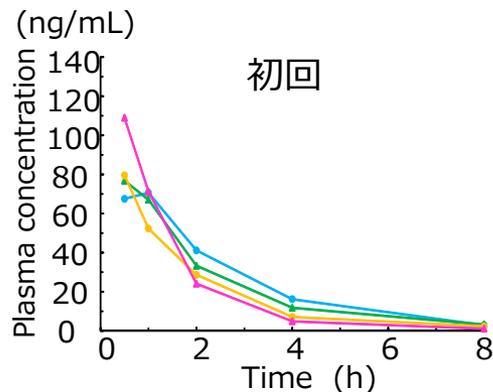


化合物	メトトレキサート (MTX)	アセトアミノフェン (APAP)	ドキシソルビシン (DOX)
投与経路	経口投与		腹腔内投与
投与用量	0.2mg/kg/day	1000mg/kg/day	2.5mg/kg/week
投与回数	1日1回，7回/週，4週間，計28回		1日1回，1回/週，4週間，計5回

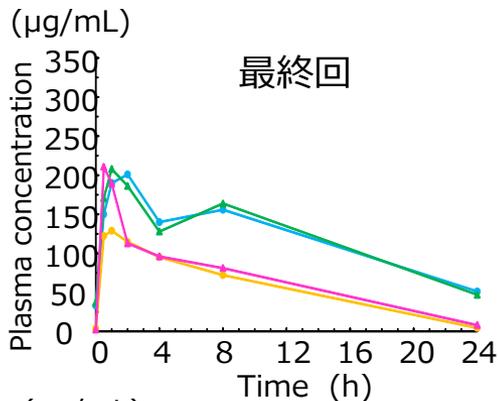
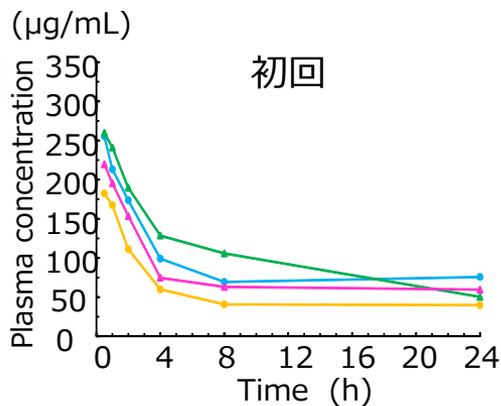
採血部位	尾静脈	鎖骨下静脈
採血量	約50 μ L/時点 (血漿量：約20 μ L/時点)	
採血時点	初回：0.5, 1, 2, 4, 8及び24時間 (6時点) 最終回 (第28or5回)：pre, 0.5, 1, 2, 4, 8及び24時間 (7時点)	
採血デバイス	キャピラリー+25G翼付採血針	27G FNシリンジ
抗凝固剤	キャピラリーに処理済み (風乾)	液体をフラッシュして処理

採血部位の違いによるTKパラメータへの影響

MTX

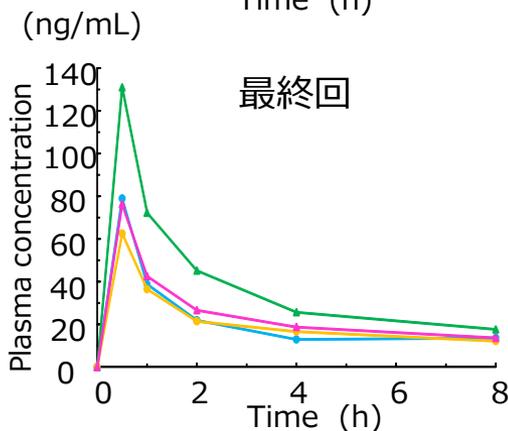
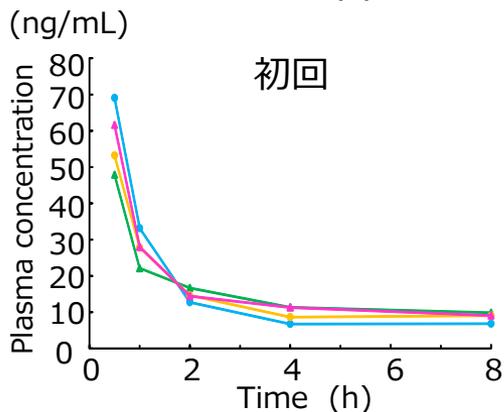


APAP



採血部位の違いによる
血漿中薬物濃度推移に
明確な差は認められなかった

DOX



- : 尾静脈♂
- ▲ : 鎖骨下♂
- : 尾静脈♀
- ◆ : 鎖骨下♀

本日の内容

✓ マイクロサンプリングに用いる

➤ 採血部位

➤ デバイス

✓ マイクロサンプリングが及ぼす

➤ 生体（正常ラット）への影響

➤ 単回毒性評価への影響

➤ 反復毒性評価への影響

✓ 今後の課題・展望

採血用デバイス

- ①FNシリンジまたはマイジェクター（針植込式シリンジ）
（27,29G）（テルモ株式会社）
- ②BD ロードーズ™ インスリン皮下投与用針付注射筒（29,30G）
（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）



➡ ①②：鎖骨下静脈採血で使用

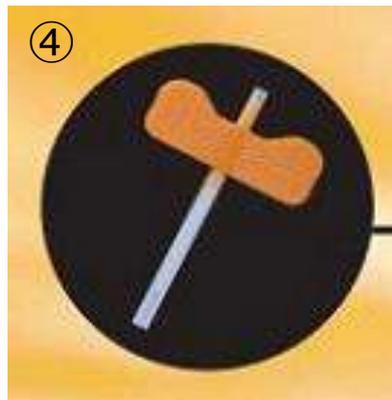
- ③マイクロサンプリングデバイス MSW2™ Type Udck™
（株式会社島津製作所）
- ④動物実験用翼付採血針（25G） + ヘマトクリット毛細管
（日本クリア株式会社）（種々取扱会社あり）



➡ ③④：外側尾静脈採血で使用



Microsampling Wing™

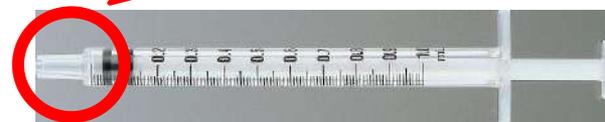


採血用デバイス：鎖骨下静脈採血時

- ①FNシリンジまたはマイジェクター（針植込式シリンジ）
（27, 29G）（テルモ株式会社）

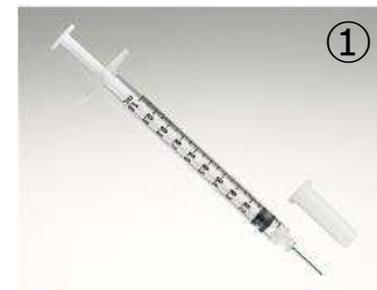
弊社では従来のTK採血で使用。使い慣れている。
容量が1mLであるため、正確に50 μ L採取するのが難しい。

シリンジ+注射針では
デッドボリュームが生じる



- ②BD ロードーズ™ インスリン皮下投与用針付注射筒
（29, 30G）（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）

①より針が細く、止血しやすい。
容量が0.5及び0.3mLであるため、①より正確に50 μ L採取可能。



☆抗凝固処理が必要。
液体の抗凝固剤を使用する際、血液に対して2.5%以上であれば、補正を考慮する必要がある。

実試料の 抗凝固剤	風乾		不要
	液体	2.5%未満	不要
2.5%以上		要補正	

（JBF DG2017 – 29活動結果報告より抜粋）

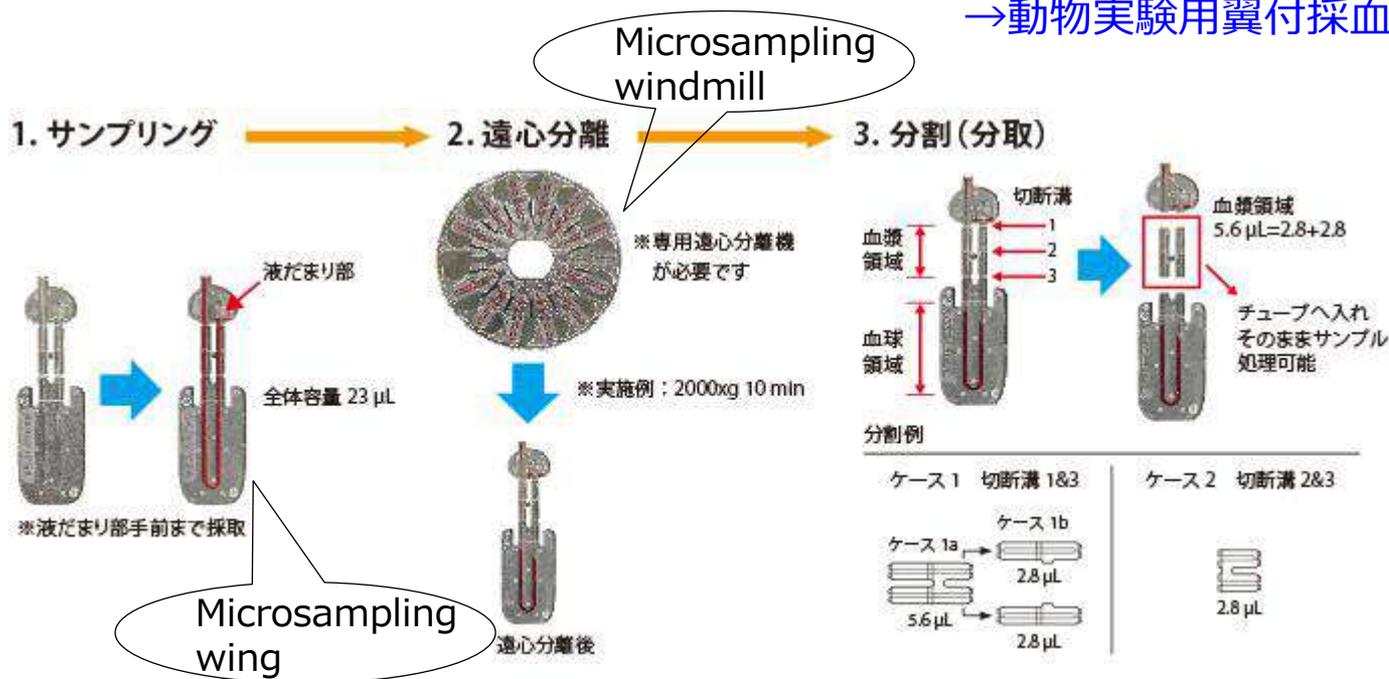


採血用デバイス：尾静脈採血時

③ マイクロサンプリングデバイス MSW2™ Type Udck™ (株式会社島津製作所)

全体容量	23μL
血漿量	5.6μL (2.8μL+2.8μL)
抗凝固剤	EDTA-2Na

専用の遠心機または遠心用のチューブが必要。
通常血漿5.6μLを採取可能。
毛細管現象を利用するために
尾を傷つけてから採血するのは、
動物愛護上推奨されていない。
→動物実験用翼付採血針を使用する



採血用デバイス：尾静脈採血時

- ④動物実験用翼付採血針（25G）＋ヘマトクリット毛細管（キャピラリー）
（日本クレア株式会社） （種々取扱会社あり）

☆抗凝固処理済みのキャピラリーを使用すれば、補正の必要はない。



実試料の 抗凝固剤	風乾		不要
	液体	2.5%未満	不要
	2.5%以上	要補正	

（JBF DG2017-29活動結果報告より抜粋）

キャピラリーの種類： 樹脂製・ガラス製・ポリカーボネート製

抗凝固剤： 未処理・ヘパリン・EDTA-2K

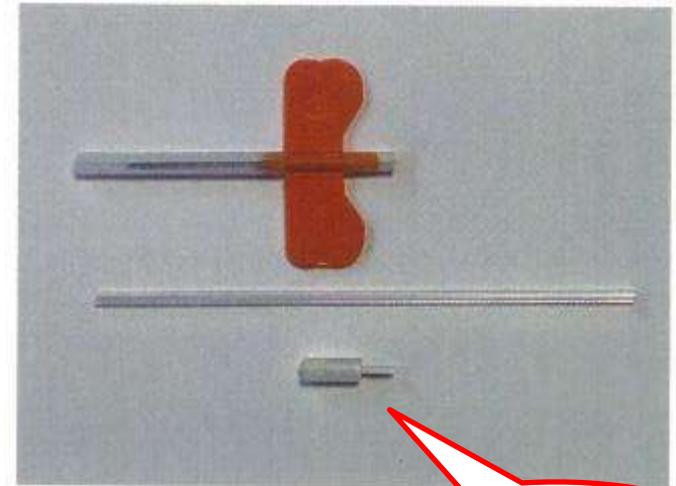
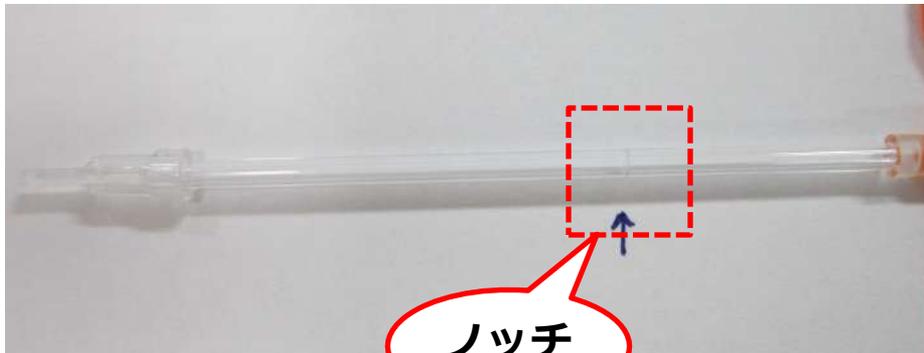


採血用デバイス：尾静脈採血時

動物実験用翼付採血針（25G） + ヘマトクリット毛細管（キャピラリー）
（日本クリア株式会社） （種々取扱会社あり）



マイクロサンプリング用に簡便で扱いやすいように新規デバイスを開発中
（株式会社シン・コーポレイション）

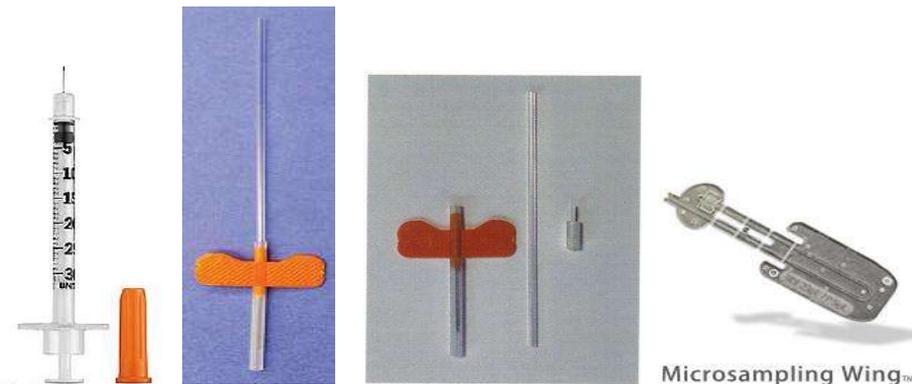


樹脂製のキャピラリーを採血量50 μ Lの長さに設定し、ヘマトクリット値を40%としてキャピラリーにブレイクポイント（ノッチ）を加工する。専用のキャピラリーキャップを装着。遠心分離後、ノッチ部分でキャピラリーを折り、血漿を採取（約20 μ L採取可能）。

デバイスの違いがTKパラメータに及ぼす影響

デバイスの違いがTKパラメータに及ぼす影響は・・・

アセタゾラミド(60または200mg/kg)を雄性ラット(6w、各群n=3)に単回経口投与後、各種デバイスを用いてマイクロサンプリング法により採血。血漿中薬物濃度をLC-MS/MS法で測定。TKパラメータを算出・比較。

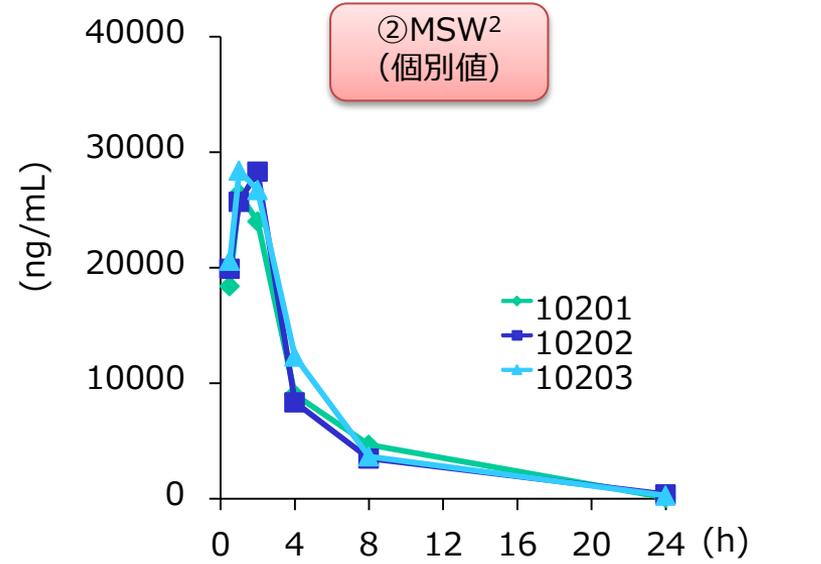
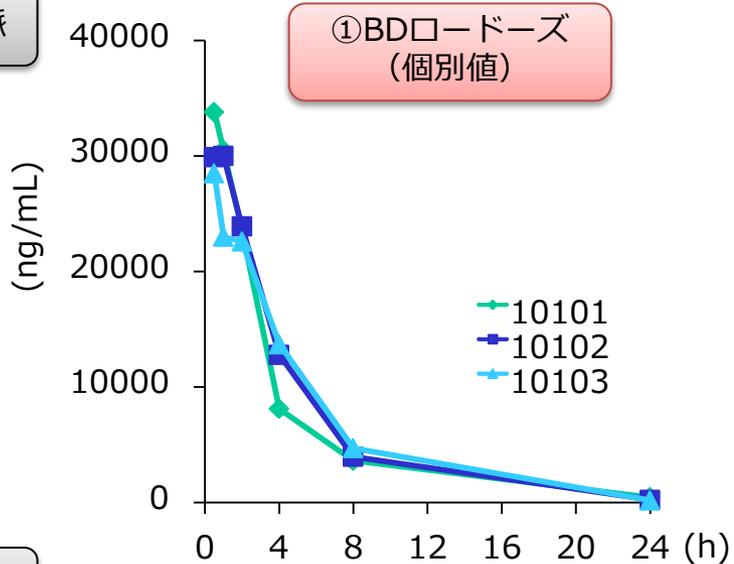


アセタゾラミド：血球移行率が高い。マイクロサンプリングによる繰り返し採血の影響を受ける可能性がある。

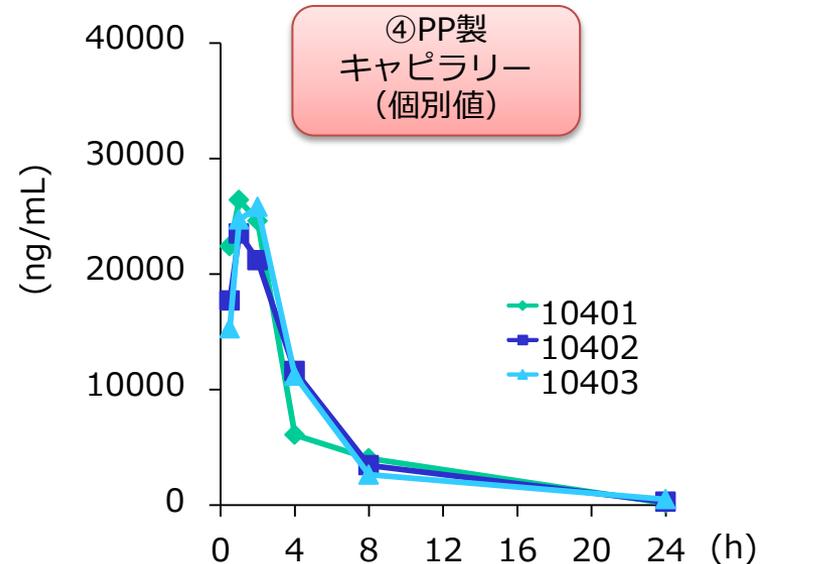
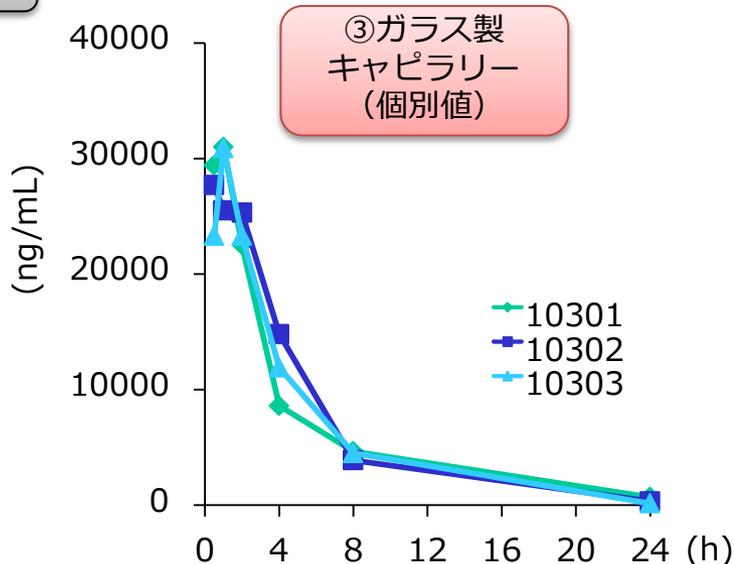
採血デバイス	BDロードーズ™ インスリン皮下 投与用針付注射筒 (29G)	ガラス製 キャピラリー	PP製 キャピラリー	マイクロサンプリング デバイス MSW ² ™ Type Udck™
	+ 動物実験用翼付採血針 (25G)			
採血部位	鎖骨下静脈	外側尾静脈		
採血量	約50μL/時点			約23μL/時点
抗凝固剤	ヘパリンNa			EDTA- 2 Na
採血時点	投与後0.5, 1, 2, 4, 8及び24時間 (6時点)			

血漿中薬物濃度推移 (60 mg/kg, 個別別)

鎖骨下静脈

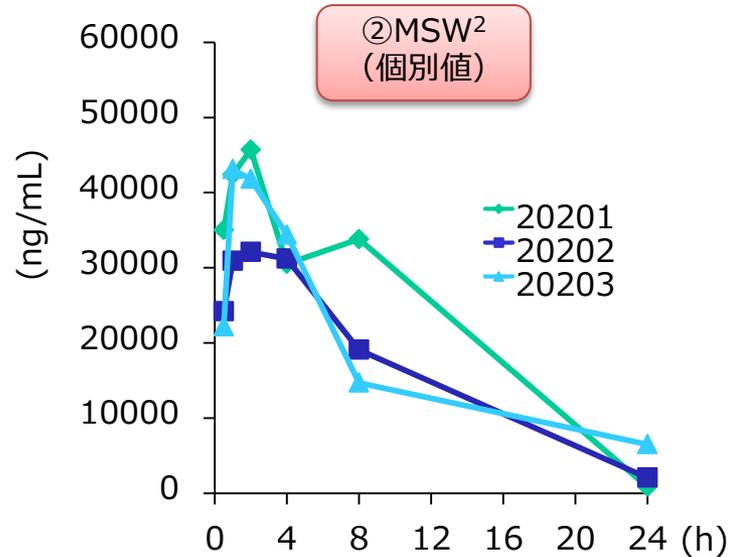
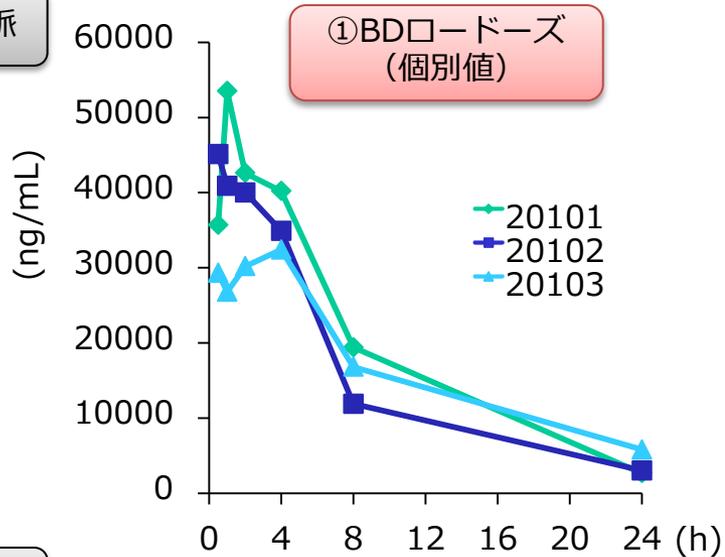


外側尾静脈

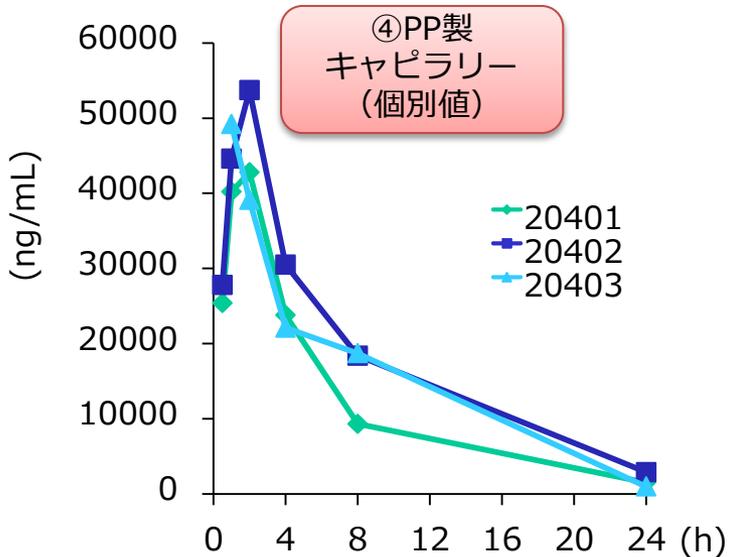
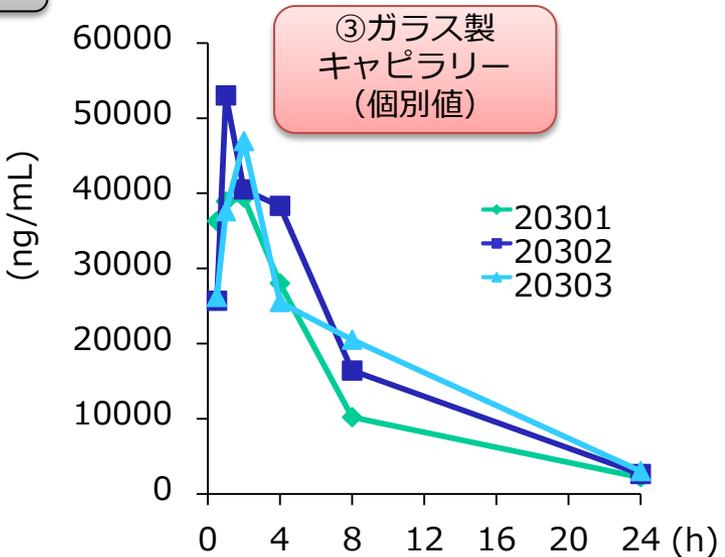


血漿中薬物濃度推移 (200 mg/kg, 個別別)

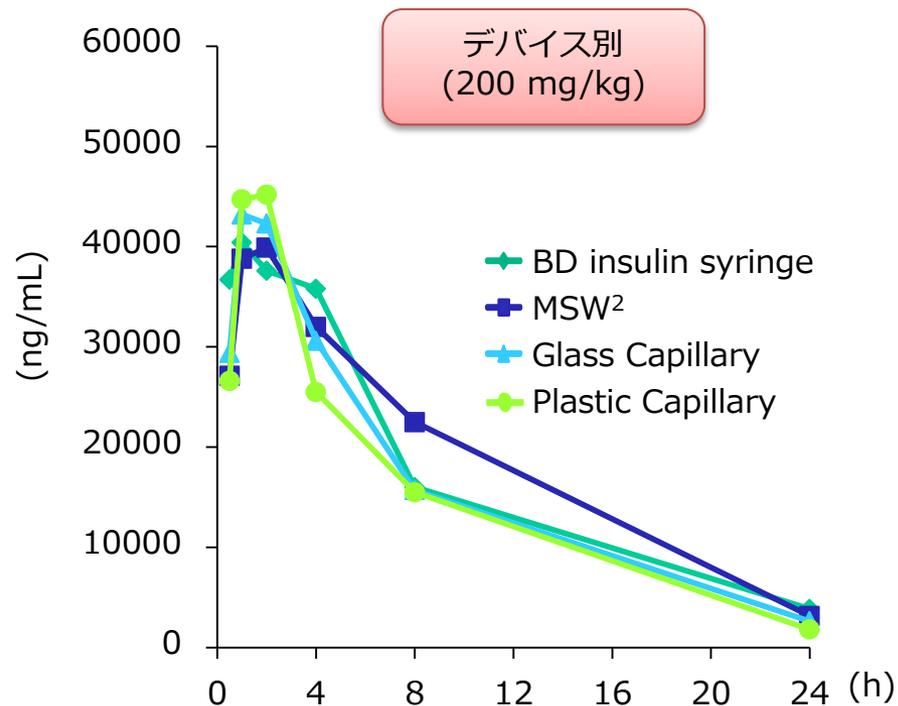
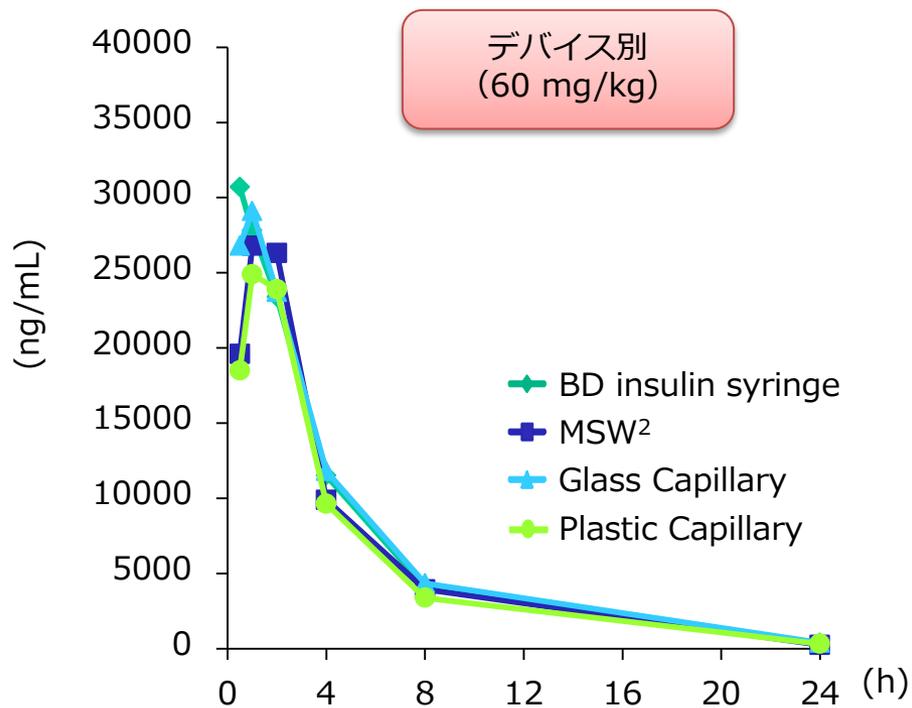
鎖骨下静脈



外側尾静脈



血漿中薬物濃度推移 (デバイス別)



薬物動態パラメータ

採血部位	デバイス	60 mg/kg		200 mg/kg	
		C_{\max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	C_{\max} (ng/mL)	AUC_{0-24h} (ng·h/mL)
鎖骨下静脈	①BDロードーズ	30,800 ±2,700	149,000 ±9,000	43,700 ±10,600	404,000 ±50,000
外側尾静脈	②MSW ²	27,700 ±1,100	140,000 ±6,000	40,300 ±7,200	449,000 ±92,000
	③ガラス製キャピラリー	29,900 ±1,900	153,000 ±4,000	46,400 ±6,800	380,000 ±61,000
	④PP製キャピラリー	25,200 ±1,500	129,000 ±1,000	48,600 ±5,500	360,000 ±72,000
① vs ②、③、④ (採血部位比較)		0.82~ 0.98倍	0.87~ 1.03倍	0.92~ 1.11倍	0.89~ 1.11倍
③ vs ②、④ (デバイス比較)		0.84~ 0.93倍	0.84~ 0.92倍	0.87~ 1.05倍	0.95~ 1.18倍

採血部位の違い（鎖骨下静脈 or 外側尾静脈）による薬物動態パラメータへの影響はみられなかった（ C_{\max} ：0.82~1.11倍、 AUC_{0-24h} ：0.87~1.11倍）。また、外側尾静脈採血において、デバイスの違いによる薬物動態パラメータへの影響もみられなかった（ C_{\max} ：0.84~1.05倍、 AUC_{0-24h} ：0.84~1.18倍）。

各種デバイスの使用感

デバイス	長所	懸念事項
①BD ロードーズ	<ul style="list-style-type: none"> ☆従来とほぼ同じ操作のため教育が不要 ☆保定器や尾を温める器材が不要 	<ul style="list-style-type: none"> ★必要量以上の血液を採取してしまう可能性がある ★針が柔らかく1回では入らない場合あり ★内筒が短い、押し子の突起部分の距離が短く内筒が引きづらい ★抗凝固処理が必要（パラメータ補正の有無を考慮する必要あり）
②MSW ²	<ul style="list-style-type: none"> ☆規定量の血液のみを採取可能 ☆抗凝固処理が不要（EDTA-2Naのみ） 	<ul style="list-style-type: none"> ★キット内の血漿採取時に遠心を行う必要あり ★採血時、針を外さないと規定量をオーバーする ★針の接続時にキットが折れる事がある ★血漿に血球が混じる事がある
③ガラス製 キャピラリー	<ul style="list-style-type: none"> ☆規定量の血液のみを採取可能 ☆抗凝固処理が不要（種々の抗凝固剤あり） ☆血漿を無駄なく採取可能 	<ul style="list-style-type: none"> ★ガラス切りが危険（ケガの恐れあり） ★キャピラリーの栓（粘土）が外れる恐れあり ★粘土を詰める際にコンタミネーションの恐れあり
④PP製 キャピラリー	<ul style="list-style-type: none"> ☆規定量の血液のみを採取可能 ☆抗凝固処理が不要（種々の抗凝固剤あり） ☆針とキャピラリーの脱着が簡単 ☆キャピラリーを折る時安全 	<ul style="list-style-type: none"> ★1度だけ遠心中に折れた（ノッチが原因→改良中） ★血漿に無駄が出る（ノッチから折るため→改良中）

マイクロサンプリング実施に際し、どの採血部位・デバイスを選択するかは、被験物質の投与経路・抗凝固剤の種類などそれぞれの試験条件や被験物質の特性などを考慮する必要がある。

本日の内容

- ✓ マイクロサンプリングに用いる
 - 採血部位
 - デバイス
- ✓ **マイクロサンプリングが及ぼす**
 - **生体（正常ラット）への影響**
 - 単回毒性評価への影響
 - 反復毒性評価への影響
- ✓ 今後の課題・展望

マイクロサンプリングによる生体への影響

【方法】注射用水を単回経口投与（CrI:CD(SD)ラット6週齢，雌雄各3匹）



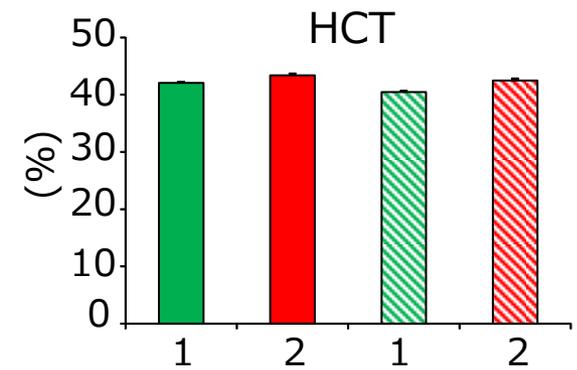
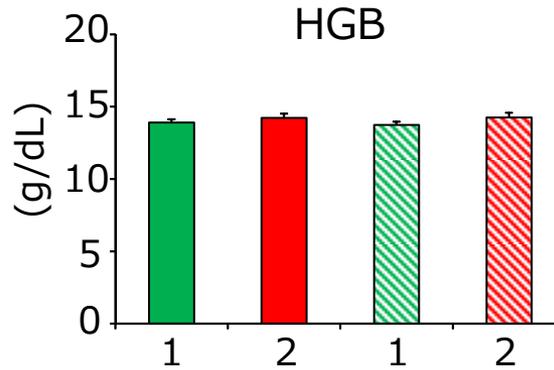
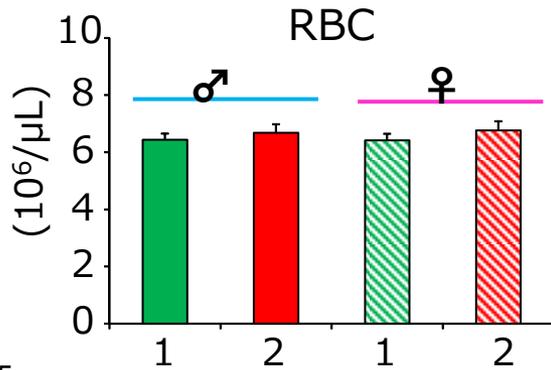
尾静脈から50 μ L \times 6時点(投与後0.5, 1, 2, 4, 8及び24時間)で採血
 (採血量：♂2.1%，♀2.9%[循環血液量に対して])

24時間採血の翌日解剖

解剖時検査項目：血液学的検査・血液生化学的検査・剖検

	♂			♀		
	RBC (10 ⁶ / μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC (10 ⁶ / μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)
1.尾静脈	6.43	13.9	42.0	6.41	13.7	40.4
2.背景値	6.68 \pm 0.30	14.21 \pm 0.68	43.37 \pm 2.07	6.76 \pm 0.32	14.25 \pm 0.54	42.48 \pm 1.76

【結果】
 全てのデータについて、
 背景値(Mean \pm 2S.D.)の範囲
 であることを確認した。
 (赤血球系の項目を抜粋)



マイクロサンプリングによる生体への影響

【方法】注射用水を単回経口投与（CrI:CD(SD)ラット6週齢，雌雄各3匹）

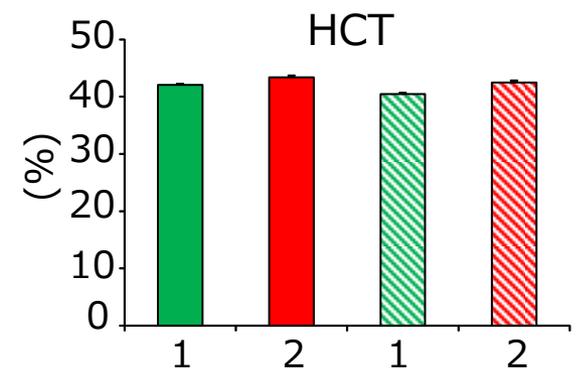
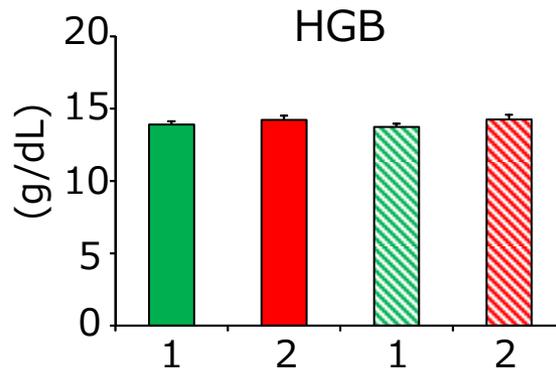
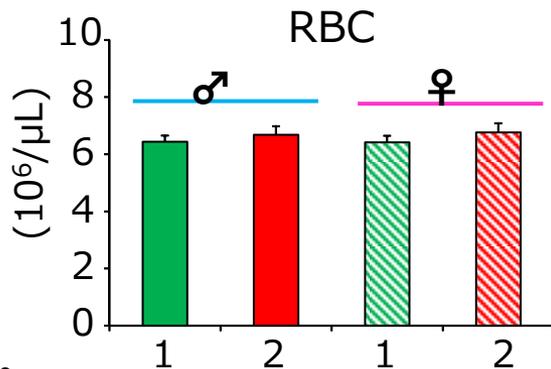


尾静脈から50 μ L \times 6時点(投与後0.5, 1, 2, 4, 8及び24時間)で採血
 (採血量：♂2.1%，♀2.9%[循環血液量に対して])

24時間採血の翌日解剖

解剖時検査項目：血液学的検査・血液生化学的検査・剖検

経時採血で循環血液量の3%未満であれば、採血翌日以降に解剖を実施することにより、採血の影響は回復していた。

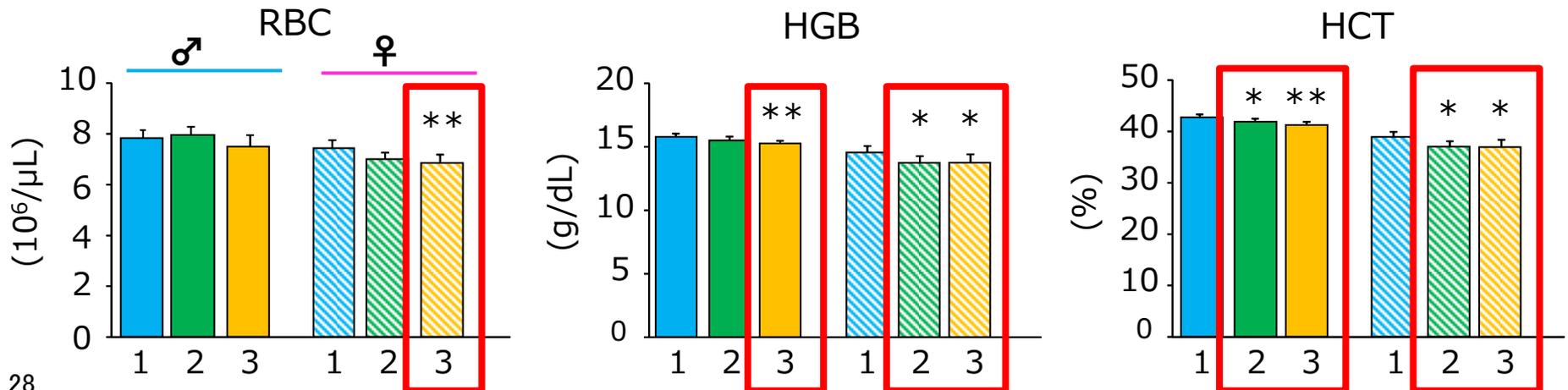


マイクロサンプリングによる生体への影響

- ① 血液学的検査において、採血群の赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクット値が低値を示した。これ以外に明確な差は認められなかった。
- ② 尾静脈と鎖骨下静脈との明確な差は認められなかった。

*:P<0.05, **:P<0.01, vs 1群

	♂			♀		
	RBC (10 ⁶ /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC (10 ⁶ /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)
1.無処置	7.833	15.77	42.73	7.432	14.55	38.90
2.尾静脈	7.963 (101.7%)	15.50 (98.3%)	41.87 * (98.0%)	7.007 (94.3%)	13.73 * (94.4%)	37.03 * (95.2%)
3.鎖骨下静脈	7.502 (95.8%)	15.27 ** (96.8%)	41.23 ** (96.5%)	6.852 ** (92.2%)	13.75 * (94.5%)	36.93 * (94.9%)

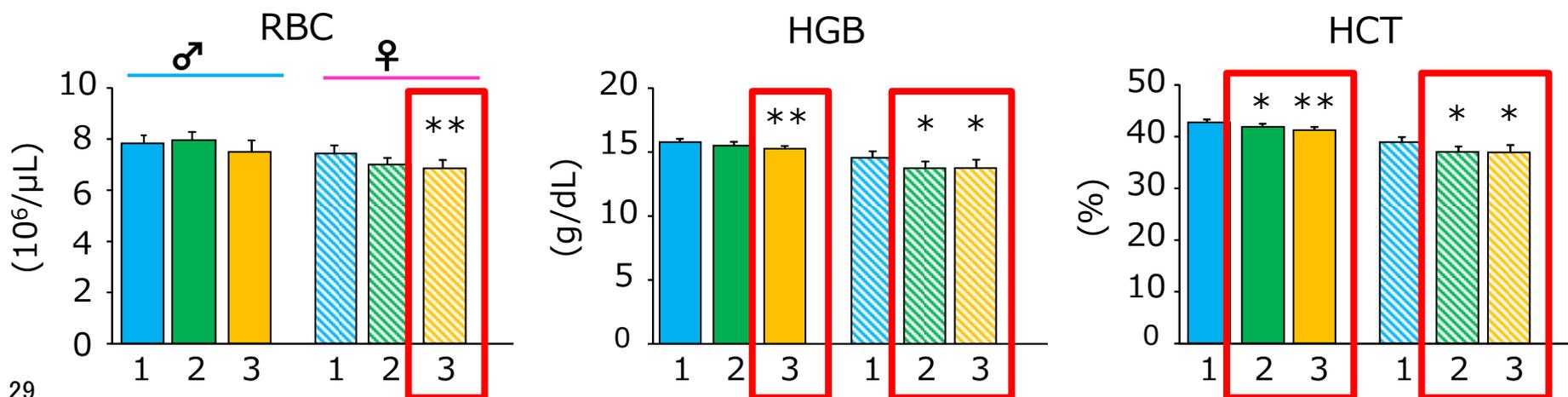


マイクロサンプリングによる生体への影響

- ① 血液学的検査において、採血群の赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクット値が低値を示した。これ以外に明確な差は認められなかった。

**24時間採血(初回採血量：♂2.1%, ♀3.1%,
4週時採血量：♂1.3%, ♀2.4%)当日午後から解剖を
実施すると血液学的検査で貧血傾向が認められた。
採血部位の違いによる明確な差は認められなかった。**

**→24時間採血の翌日以降に解剖を実施する
試験デザインを設定する。**

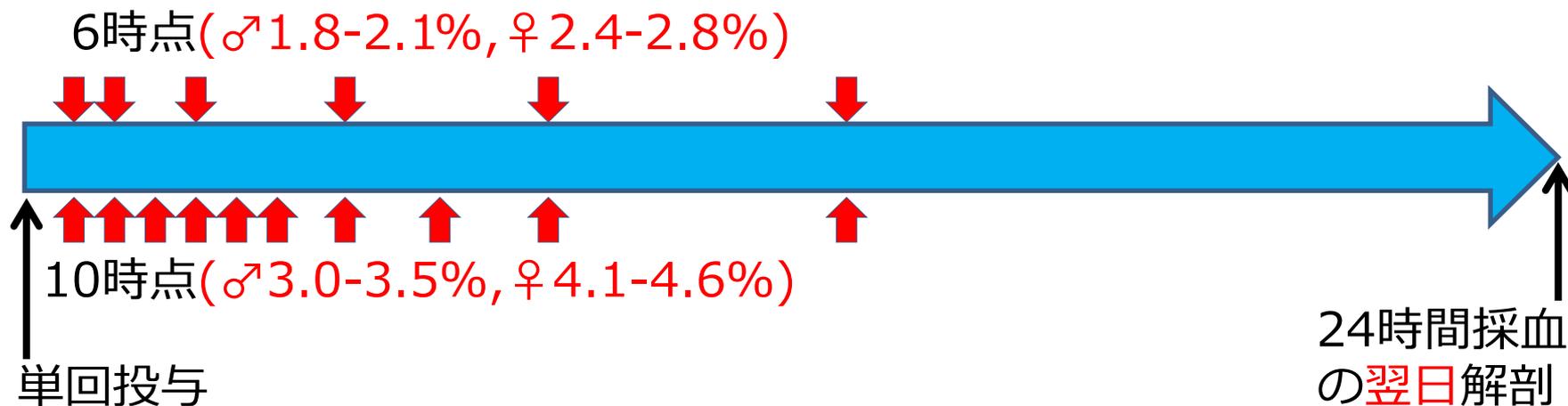


本日の内容

- ✓ マイクロサンプリングに用いる
 - 採血部位
 - デバイス
- ✓ **マイクロサンプリングが及ぼす**
 - 生体（正常ラット）への影響
 - **単回毒性評価への影響**
 - 反復毒性評価への影響
- ✓ 今後の課題・展望

単回投与毒性評価に及ぼす影響

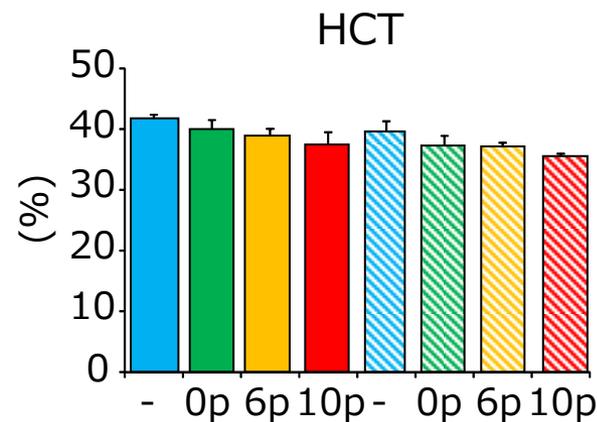
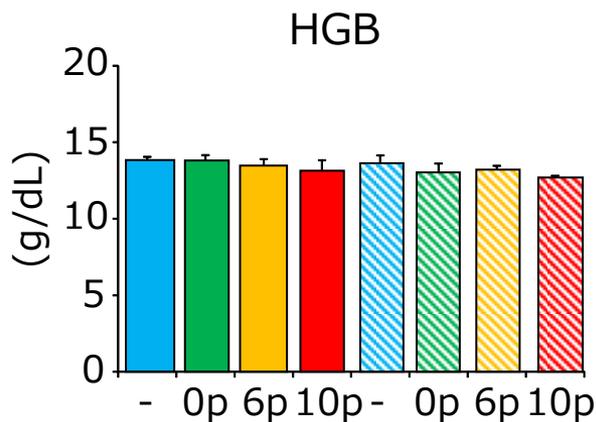
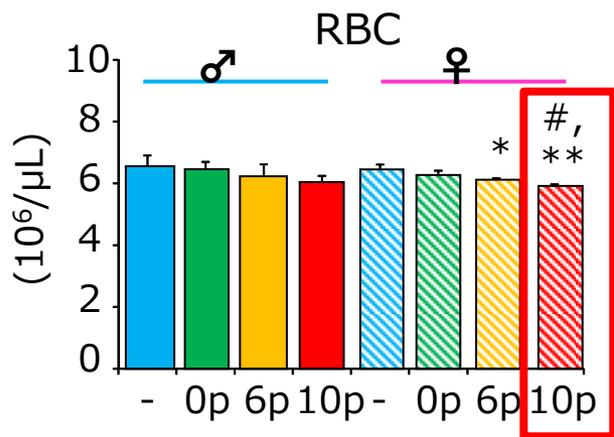
【方法】 Crl:CD(SD)ラット6週齢，雌雄各群3匹



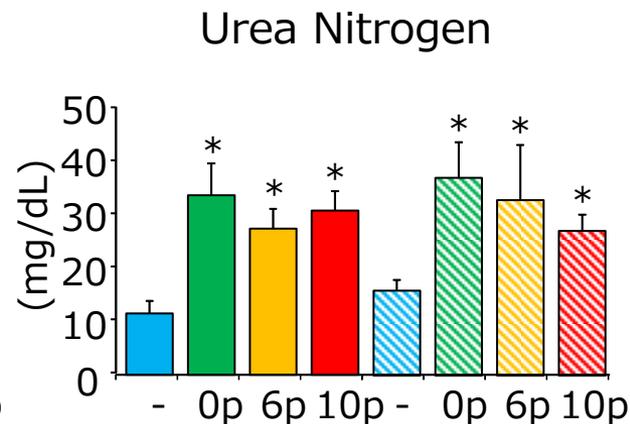
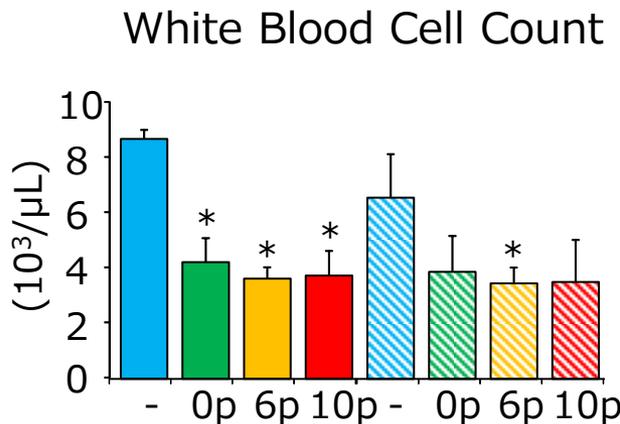
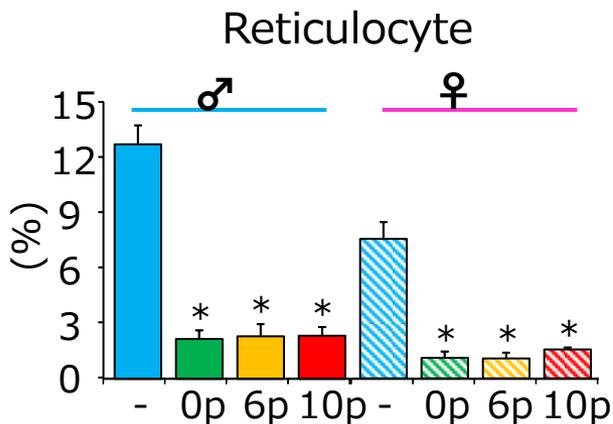
化合物	シスプラチン(CDDP)	イソチオシアン酸1-ナフチル(ANIT)
投与経路	腹腔内投与	経口投与
投与用量	8 mg/kg, 単回	50 mg/kg, 単回
採血部位	外側尾静脈 (キャピラリー使用)	
採血時点	0.5, 1, 2, 4, 8及び24時間 (6時点) 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8及び24時間 (10時点)	
検査項目	血液学的検査・血液生化学的検査・剖検・病理組織学的検査	
標的臓器	腎臓・骨髄	肝臓

単回投与毒性評価に及ぼす影響：シスプラチン

非採血群と比較して雌の10時点採血群で貧血傾向がみられた。



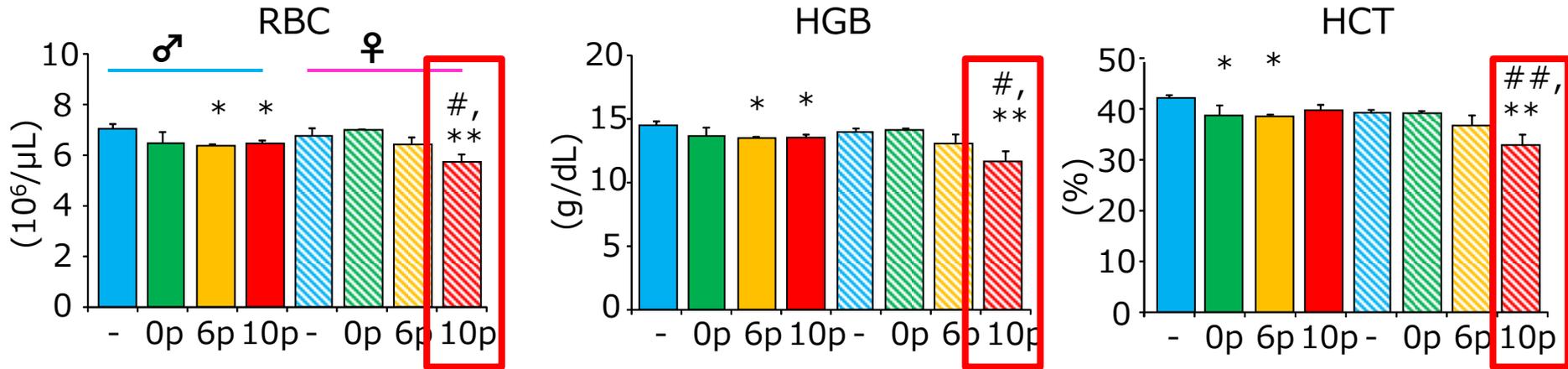
シスプラチン投与による腎障害及び骨髄抑制に関連した各種パラメータに有意な変化が認められたが、非採血群と頻回採血群との間には、それらの変化に有意な差は認められなかった。



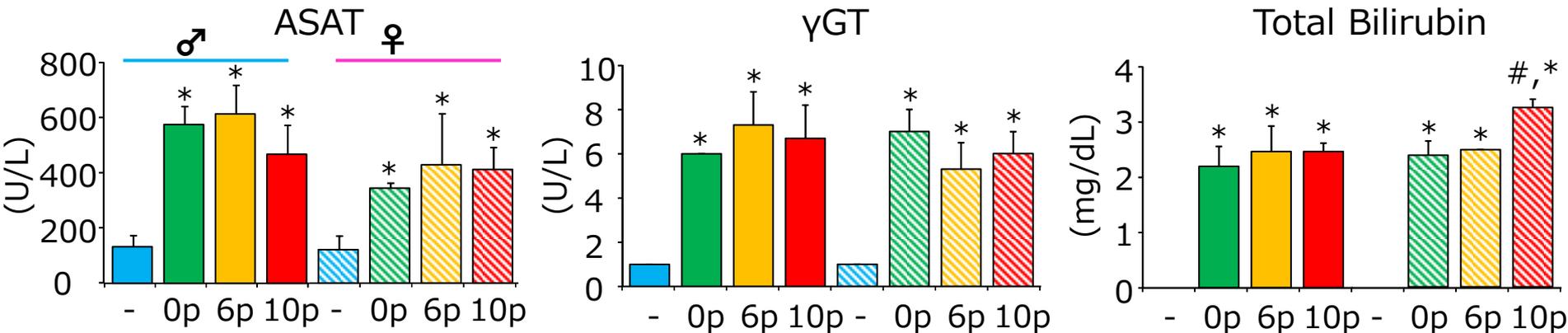
■ / ▨ : 一、媒体投与群 ■ / ▨ : 0p、0時点採血 ■ / ▨ : 6p、6時点採血 ■ / ▨ : 10p、10時点採血 (♂/♀)

単回投与毒性評価に及ぼす影響：ANIT

非採血群と比較して雌の10時点採血群で貧血傾向がみられた。



ANIT投与による肝障害に関連した各種パラメータに有意な変化が認められた。10時点採血群の雌において、非採血群と比較して、Total Bilirubin値にわずかな差が認められたが、その他のパラメータには非採血群と頻回採血群との間に、有意な差はみられなかった。



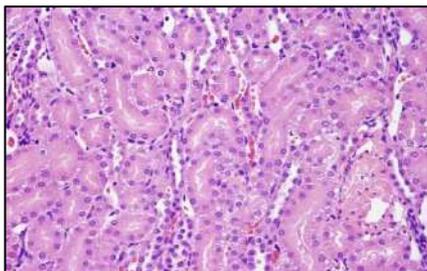
■ / ■ : -, 媒体投与群 ■ / ■ : 0p, 0時点採血 ■ / ■ : 6p, 6時点採血 ■ / ■ : 10p, 10時点採血 (♂/♀)

単回投与毒性評価に及ぼす影響

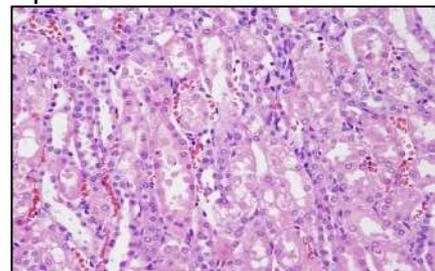
病理組織学的検査を実施した（対象臓器；シスプラチン群：腎臓、ANIT群：肝臓）

シスプラチン

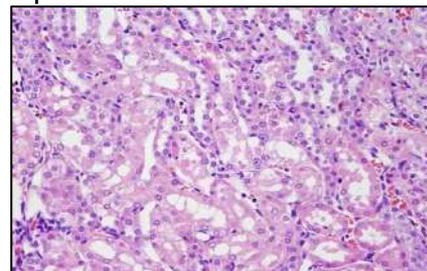
Vehicle



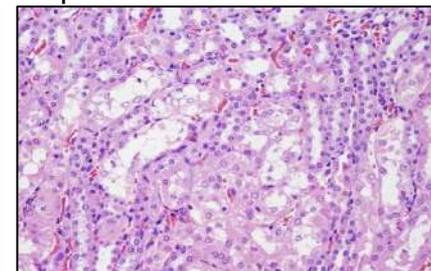
0point



6point



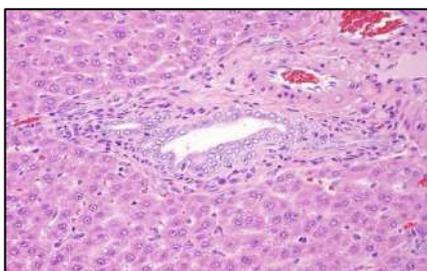
10point



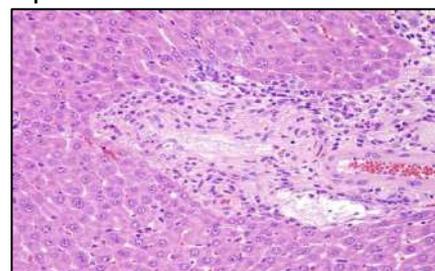
シスプラチン投与による軽度な尿細管上皮の腫大、空胞化及び壊死（脱落）が認められたが、非採血群と頻回採血群との間には、明確な差はみられなかった。

ANIT

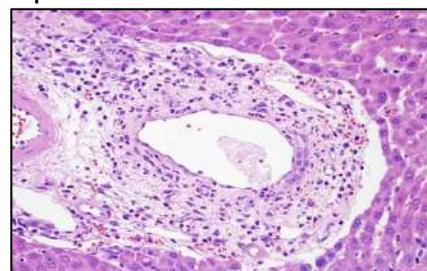
Vehicle



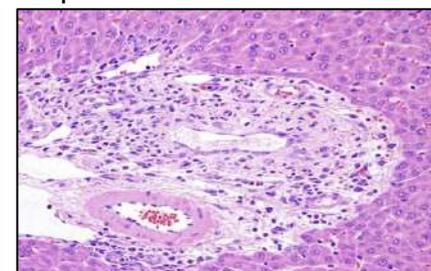
0point



6point



10point



ANIT投与による軽度な胆管の壊死、グリソン鞘における炎症性細胞浸潤及び限局性の肝細胞壊死が認められたが、非採血群と頻回採血群との間には、明確な差はみられなかった。

単回投与毒性評価に及ぼす影響

急性腎毒性（シスプラチン）及び肝毒性（ANIT）に起因した各種パラメータの変化に対する経時採血の影響はみられなかった

→化合物による毒性へマイクロサンプリングが影響を及ぼす可能性は低い

一方で赤血球パラメータに対して・・・

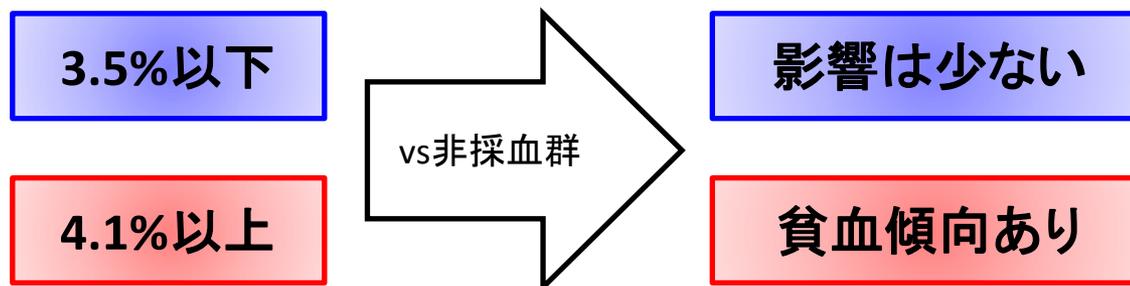
✓ 24時間まで50 μ L×6時点採血実施(♂1.8-2.1%、♀2.4-2.8%)

→非採血群と比較して明確な差はみられなかった

✓ 24時間まで50 μ L×10時点採血実施(♂3.0-3.5%、♀4.1-4.6%)

→非採血群と比較して雌で貧血傾向がみられた

循環血液量に対する総採血量が・・・

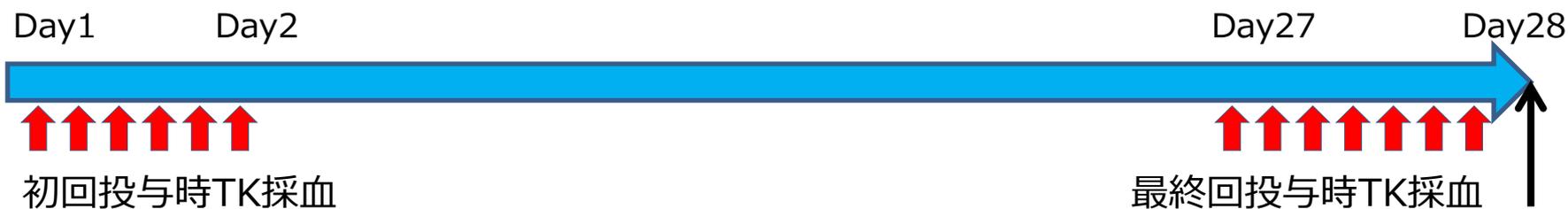


本日の内容

- ✓ マイクロサンプリングに用いる
 - 採血部位
 - デバイス
- ✓ **マイクロサンプリングが及ぼす**
 - 生体（正常ラット）への影響
 - 単回毒性評価への影響
 - **反復毒性評価への影響**
- ✓ 今後の課題・展望

反復投与毒性評価に及ぼす影響

【方法】 Crl:CD(SD)ラット7週齢，雌雄各群3または5匹



採血部位	尾静脈	鎖骨下静脈
採血量	約50μL/時点（血漿量：約20μL/時点）	
採血時点	初回：0.5, 1, 2, 4, 8及び24時間（6時点） 最終回：pre, 0.5, 1, 2, 4, 8及び24時間（7時点）	
採血デバイス	キャピラリー+25G翼付採血針	27G FNシリンジ

化合物	メトトレキサート (MTX)	アセトアミノフェン (APAP)	ドキシソルビシン (DOX)
投与経路	経口投与		腹腔内投与
投与用量	0.2mg/kg/day	1000mg/kg/day	2.5mg/kg/week
投与回数	1日1回，7回/週，4週間，計28回		1日1回，1回/週，4週間，計5回
標的臓器	骨髄	肝臓	心臓・骨髄・生殖

反復投与毒性評価に及ぼす影響

- 一般状態 →採血の影響なし 投与前及び投与後（1日2回）
- 体重 →採血の影響なし 週1回
- 血液学的検査 最終回投与翌日（解剖前）
- 血液生化学的検査 最終回投与翌日（解剖前）
- 器官重量 →採血の影響なし
- 病理組織学的検査
- 血漿中薬物濃度測定（TK測定） 初回投与時；6時点
最終回投与時；7時点

化合物	メトトレキサート (MTX)	アセトアミノフェン (APAP)	ドキシソルビシン (DOX)
投与経路	経口投与		腹腔内投与
投与用量	0.2mg/kg/day	1000mg/kg/day	2.5mg/kg/week
投与回数	1日1回, 7回/週, 4週間, 計28回		1日1回, 1回/週, 4週間, 計5回
標的臓器	骨髄	肝臓	心臓・骨髄・生殖

反復投与毒性評価に及ぼす影響

【採血による影響の有無】 — : 影響なし ○ : 影響あり

化合物	対象臓器	毒性作用	尾静脈	鎖骨下静脈
MTX	骨髄	骨髄抑制作用	—	—
		造血細胞減少	—	○
	肝臓	肝細胞障害性変化 (ASAT,ALAT高値・肝細胞壊死)	—	○
APAP	肝臓	肝細胞障害性変化(ASAT,ALAT高値)	○	○
DOX	骨髄	骨髄抑制作用	—	—
		造血細胞減少	—	—
	精巣	精原細胞減少	—	—
	肝臓	肝細胞障害性変化 (ASAT,ALAT高値・肝細胞壊死)	—	○
	胸腺	萎縮	○	○

反復投与毒性試験にマイクロサンプリングを組み込む場合は、その毒性学的特性を考慮する必要がある

本日の内容

- ✓ マイクロサンプリングに用いる
 - 採血部位
 - デバイス
- ✓ マイクロサンプリングが及ぼす
 - 生体（正常ラット）への影響
 - 単回毒性評価への影響
 - 反復毒性評価への影響
- ✓ **今後の課題・展望**

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-1 採血部位の選択

項目 \ 採血部位	尾静脈	鎖骨下静脈
①採血手技難易度	○	△

- ✓ 尾静脈は静脈内投与で使用するため標準的な手技
- ✓ 鎖骨下静脈は実験動物技術者1級実技試験で実施されるように比較的標準的な手技となりつつあるが静脈内投与ほどではない

⑥採血量	○	△
------	---	---

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-1 採血部位の選択

項目 \ 採血部位	尾静脈	鎖骨下静脈
①採血手技難易度	○	△
②採血時出血量	○	△
✓ 尾静脈は止血が容易で出血はほぼなし ✓ 鎖骨下静脈は内出血は目視では確認出来ない場合もあり		
⑥採血量	○	△

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-1 採血部位の選択

項目 \ 採血部位	尾静脈	鎖骨下静脈
①採血手技難易度	○	△
②採血時出血量	○	△
③血流	△	○

- ✓ 尾静脈は末端のため血流は悪い
循環が悪くなるような化合物では採血困難で欠損する可能性もある
- ✓ 鎖骨下静脈は採血への影響を受けにくい

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-1 採血部位の選択

項目 \ 採血部位	尾静脈	鎖骨下静脈
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 尾静脈は尾の多少の損傷のため問題なし ✓ 鎖骨下静脈は胸筋を介して採血するため、筋肉に多少の炎症が出る可能性もある 		
④ 組織への影響	○	△
⑤ コンタミネーション	△	○
⑥ 採血量	○	△

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-1 採血部位の選択

項目 \ 採血部位	尾静脈	鎖骨下静脈
①採血手技難易度	○	△
<p>✓ 尾静脈は静脈内投与部位となるため、静脈内投与の場合、コンタミネーションの可能性が高くなる</p> <p>✓ 鎖骨下静脈は問題なし</p>		
⑤コンタミネーション	△	○
⑥採血量	○	△

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-1 採血部位の選択

項目 \ 採血部位	尾静脈	鎖骨下静脈
①採血手技難易度	○	△
<p>✓ 尾静脈は血流量が弱いこともあり、正確な採血が可能</p> <p>✓ 鎖骨下静脈はシリンジで採血するため正確性を確保するのは困難</p>		
⑥採血量	○	△

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-1 採血部位の選択

項目 \ 採血部位	尾静脈	鎖骨下静脈
①採血手技難易度	○	△
②採血時出血量	○	△
③血流量	△	○
④組織への影響	○	△
⑤コンタミネーション	△	○
⑥採血量	○	△

現状では、それぞれの試験条件、化合物の特性などを考慮した上で採血部位を選択する必要がある

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-2 採血手技

これまでの検討結果から、
循環血液量の**3.5%まで**は、採血の影響はみられていない。

循環血液量の**4.1%**では、貧血傾向がみられた。
この差が**0.6%**となる。

- ✓ 体重200gラット（循環血液量：約12.8mL）を想定すると、 $12.8\text{mL} \times 0.6\% = 76.8\mu\text{L}$ となる
- ✓ つまり、7時点採血を実施した場合、1時点あたり10 μL 以上をロスすると貧血傾向が出現してしまう可能性がある

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-2 採血手技

これまでの検討結果から、
循環血液量の**3.5%まで**は、採血の影響はみられていない。

循環血液量の**4.1%**では、貧血傾向がみられた。
この差が**0.6%**となる。

- ✓ 10 μ L単位の正確な採取
- ✓ 施設間あるいは作業者間の技術の平準化を可能とする採血技術及びデバイスの検討が必要

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-3 デバイスの選択

項目\デバイス	FNシリンジ	BDロードーズ™ インスリン皮下 投与用針付注射筒	マイクロ サンプリング デバイスMSW2™ Type Udck™	キャピラリー
①抗凝固剤 の影響	△	△	○	○

- ✓ シリンジでは抗凝固剤（液体）の影響を考慮しなければならない（補正が必要）
- ✓ マイクロサンプリングデバイスやキャピラリーは補正の必要はない

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-3 デバイスの選択

項目\デバイス	FNシリンジ	BDロードーズ™ インスリン皮下 投与用針付注射筒	マイクロ サンプリング デバイスMSW2™ Type Udck™	キャピラリー
---------	--------	---------------------------------	---	--------

①抗凝固剤
の影響

△

△

○

○

②採血量
の正確性

△

△

○

○

- ✓ シリンジ目盛りでの採血では正確性に欠ける
(多く採取してしまう場合がある)
- ✓ マイクロサンプリングデバイスやキャピラリーは
決まった量の血液を採取可能
(多く採取してしまうことがない)

マイクロサンプリング導入に向けて

課題-3 デバイスの選択

項目\デバイス	FNシリンジ	BDロードーズ™ インスリン皮下 投与用針付注射筒	マイクロ サンプリング デバイスMSW2™ Type Udck™	キャピラリー
①抗凝固剤 の影響	△	△	○	○
②採血量 の正確性	△	△	○	○
③操作性	○	○	△	△

- ✓ シリンジは従来のTK採血で使用している操作性に問題なし
- ✓ マイクロサンプリングデバイスやヘマトクリット毛細管は実際に使用する前に練習が必要

マイクロサンプリング導入に向けて

1. マイクロサンプリングの導入は、動物福祉及び非臨床安全性試験の質の向上につながる
2. マイクロサンプリングの毒性評価に及ぼす影響
→様々な毒性で検討すべき
今後はマウスにおける検討も実施予定
3. マイクロサンプリングの導入による、動物室内作業に及ぼす影響も考慮すべき
4. マイクロサンプリングの本格的な導入に向け、製薬企業・CRO・大学・国の機関など産官学が協力すべき

マイクロサンプリング導入に向けて

1. マイクロサンプリングの導入は、動物福祉及び非臨床安全性試験の質の向上につながる

これまでに実施された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。
TK測定への適用だけでなく、臨床検査での応用も考えられる。

4. マイクロサンプリングの本格的な導入に向け、製薬企業・CRO・大学・国の機関など産官学が協力すべき

ご清聴ありがとうございました