

# マイクロサンプリングのご紹介

---

株式会社LSIM安全科学研究所  
安全性研究部 高橋 一彰

P-144 : マイクロサンプリング法のマウスの生体及び毒性評価への影響検討

私たちは高い倫理観を持ち、動物実験に臨んでいます。

- 環境エンリッチメントの強化
- 動物の飼育環境の改善
- AAALAC認証取得（2012年～）



さらなる動物のウェルビーイングの向上  
→ マイクロサンプリングの導入

## 検討内容のご紹介

---

- ✓ マイクロサンプリングとは
- ✓ 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による生体への影響
- ✓ まとめ

# 検討内容のご紹介

---

## ✓ マイクロサンプリングとは

### ✓ 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による生体への影響

### ✓ まとめ

## マイクロサンプリングとは・・・

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、ごく微量の血液を採取する手法

採血量：50  $\mu$ L以下

対象マトリックス：血液、血漿、血清

対象動物：毒性評価群のラット（マウスは検討中）



詳細は、2019年に発出されたICH S3A「トキシコキネティクス（毒性試験における全体的暴露の評価）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）により規定されております。

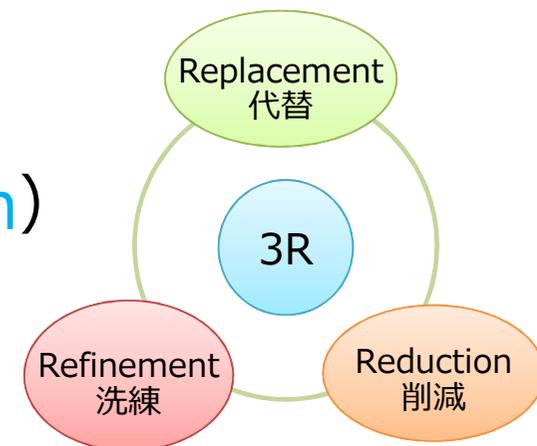
# マイクロサンプリングの利点

採血量最小化による動物福祉（3R）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）

→ 被験物質量の削減による試験コストの圧縮



【例】ラット反復2週予備試験

従来法

用量	毒性評価群		TK群	
	雄	雌	雄	雌
0 mg/kg	5	5	4	4
250 mg/kg	5	5	4	4
500 mg/kg	5	5	4	4
1000 mg/kg	5	5	4	4

被験物質量\*

92g→51g

44.6%減

マイクロサンプリング適用

用量	毒性評価群		TK群	
	雄	雌	雄	雌
0 mg/kg	5	5	0	0
250 mg/kg	5	5	0	0
500 mg/kg	5	5	0	0
1000 mg/kg	5	5	0	0

\*: ロス分を含まない理論値

# 検討内容のご紹介

---

✓ マイクロサンプリングとは

✓ 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による生体への影響

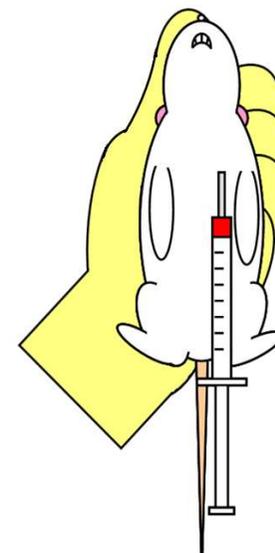
✓ まとめ

# 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・・・

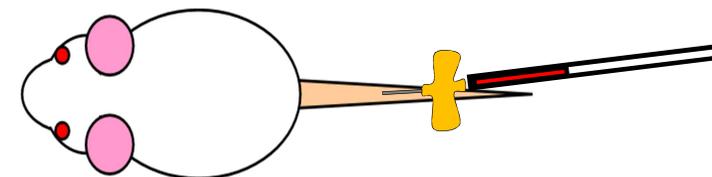
## • 頸静脈（鎖骨下静脈）

- メリット： 採血量を確保しやすい
- デメリット： 高度な採血技術が必要  
止血が不確実（目視で確認できない）  
胸筋を介するため組織への影響が懸念



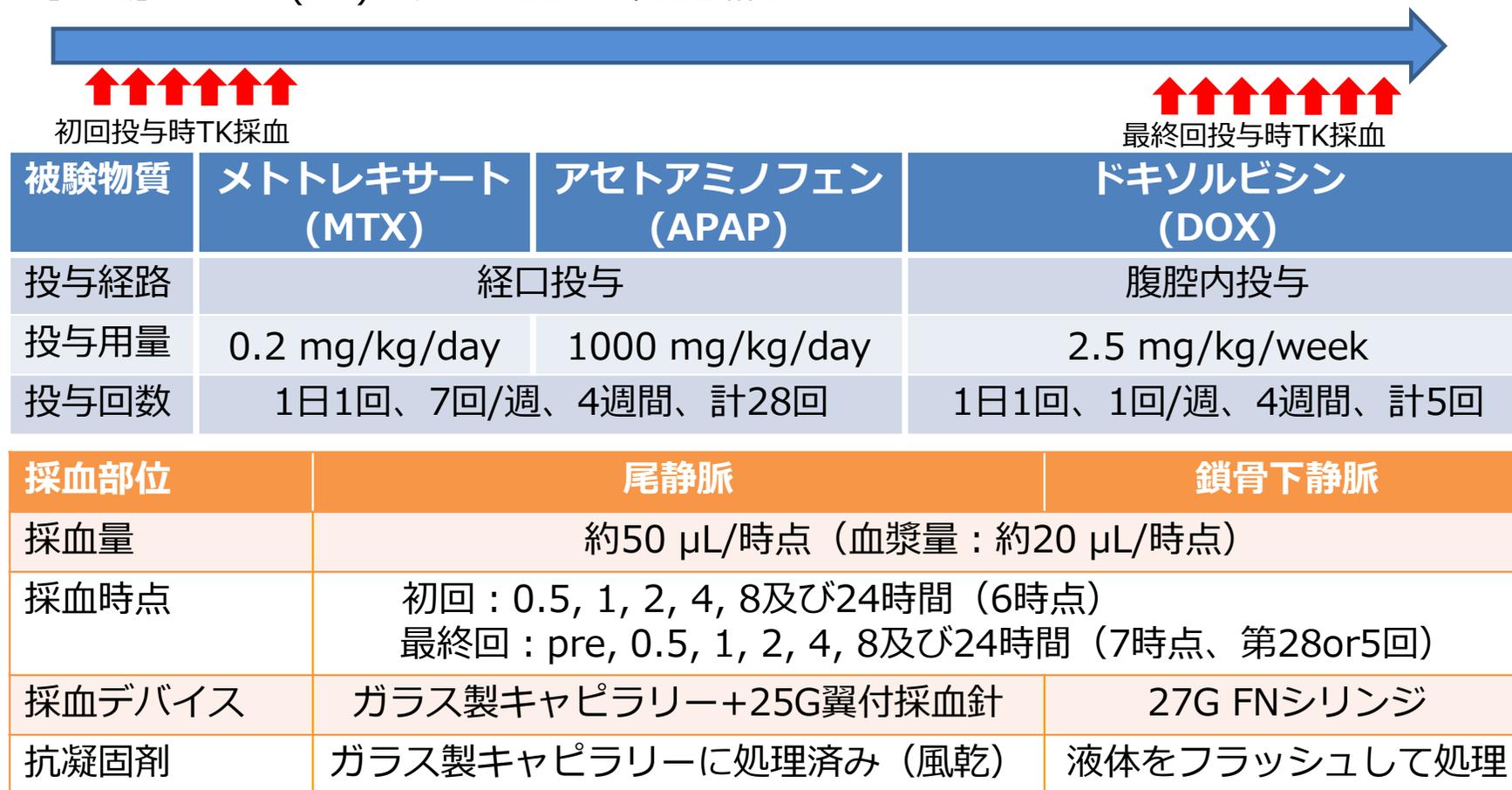
## • 外側尾静脈

- メリット： 採血が容易  
止血が容易  
尾が多少損傷するが組織への影響は限定的
- デメリット： 採血量の確保が難しい（血流が弱い）  
外側尾静脈投与時は不適（被験物質のコンタミ）

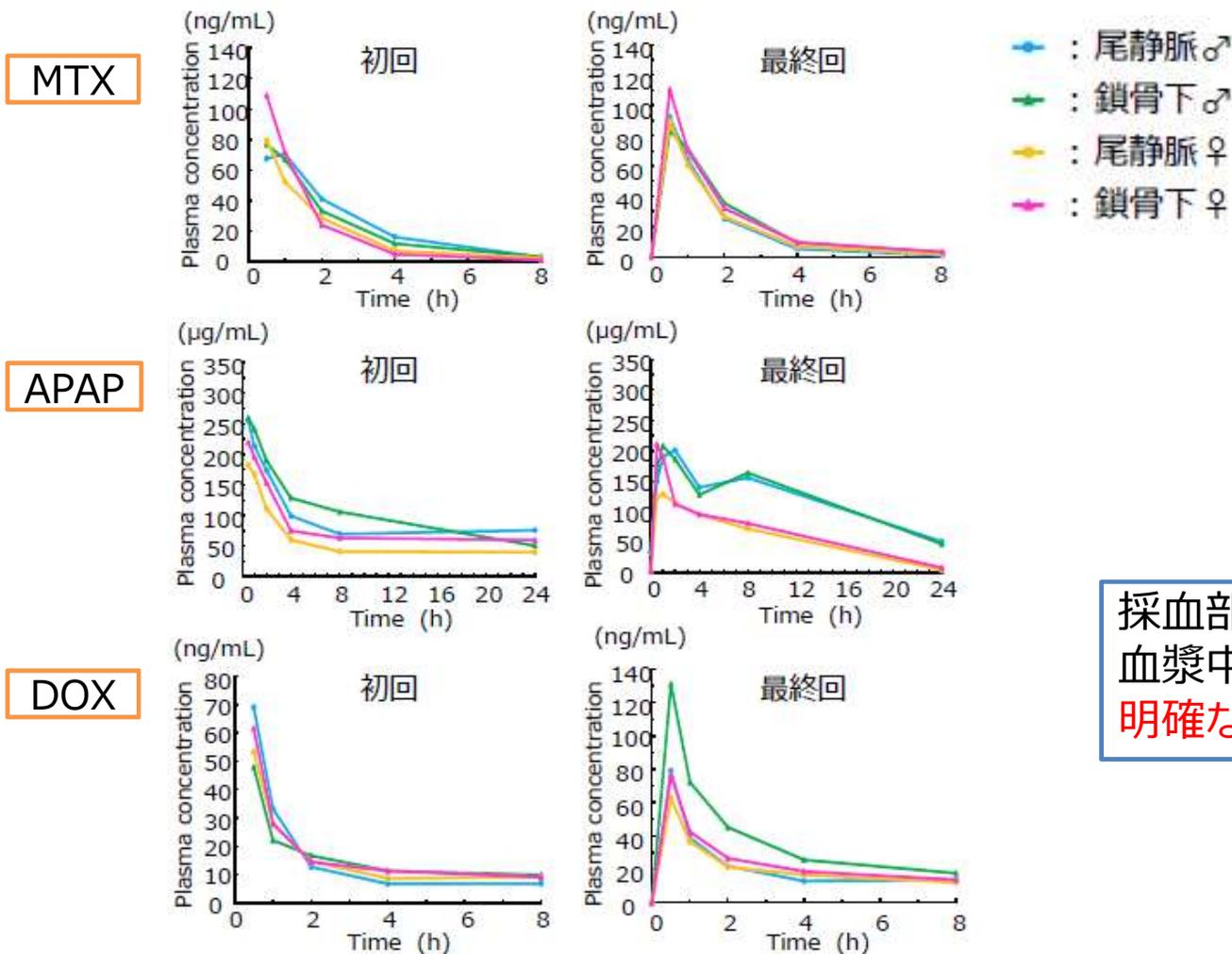


# 採血部位の違いによるTKパラメータへの影響

【方法】 Crl:CD(SD)ラット7週齢、雌雄各群3または5匹



# 採血部位の違いによるTKパラメータへの影響



採血部位の違いにより  
血漿中薬物濃度推移に  
明確な差は認められなかった。

# 検討内容のご紹介

---

✓ マイクロサンプリングとは

✓ 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による生体への影響

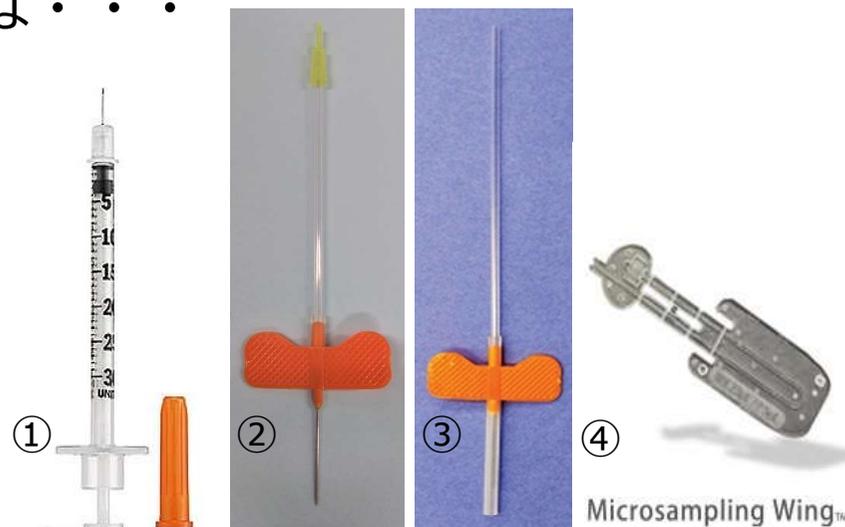
✓ まとめ

# 採血用デバイスの比較検討

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200 mg/kg)を雄性ラット(6週齢、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法で測定し、TKパラメータを算出・比較。

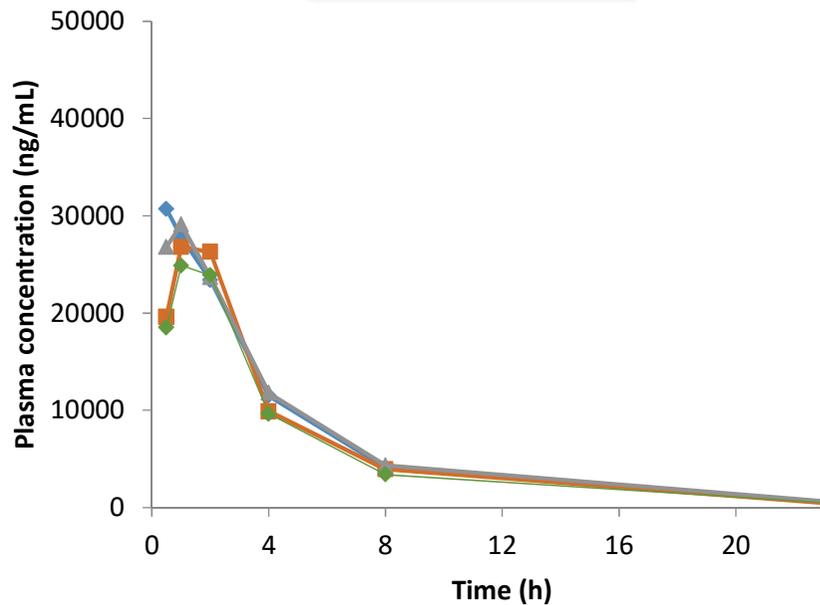
アセタゾラミド：血球移行率が高いため、マイクロサンプリングによる反復採血の影響を受ける可能性がある。



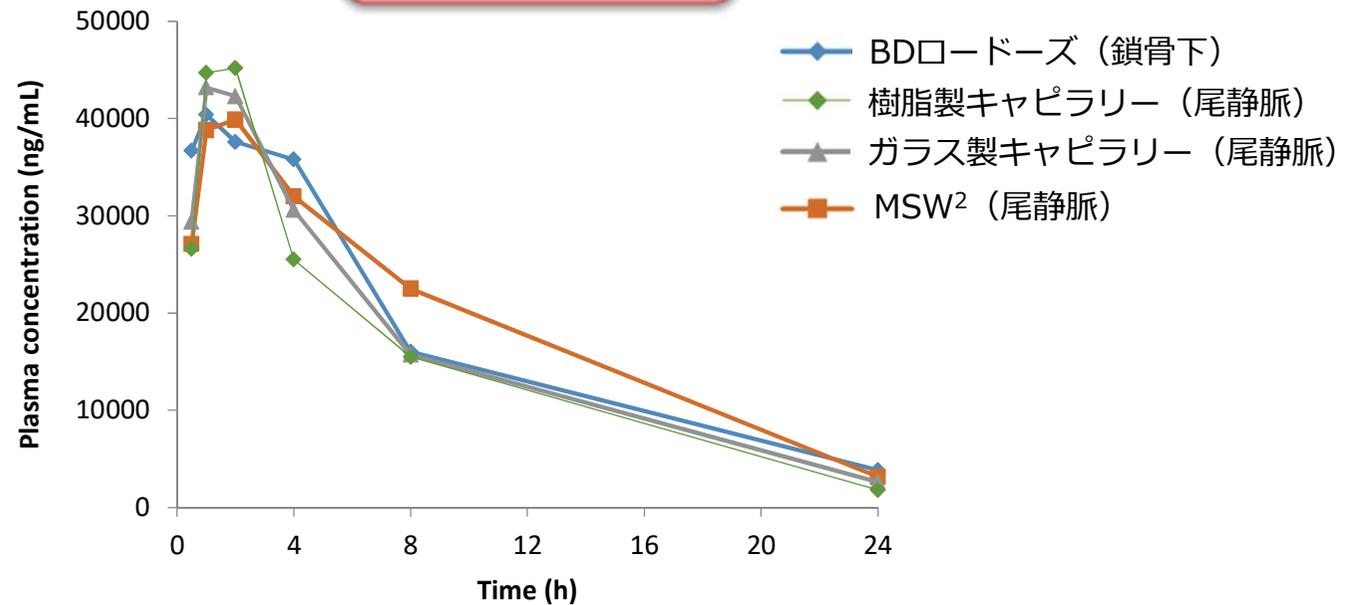
採血デバイス	①BDロードーズ™ インスリン皮下 投与用針付注射筒 (29G)	②樹脂製 キャピラリー	③ガラス製 キャピラリー	④MSW <sup>2</sup> ™ Type Udck™
		+ 動物実験用翼付採血針 (25G)		
採血部位	鎖骨下静脈	外側尾静脈		
採血量	約50 μL/時点			約23 μL/時点
採血時点	投与後0.5, 1, 2, 4, 8及び24時間 (6時点)			

# デバイス別血漿中薬物濃度推移

デバイス別  
(60 mg/kg)



デバイス別  
(200 mg/kg)



## 薬物動態パラメータ

採血部位	デバイス	60 mg/kg		200 mg/kg	
		C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>0-24h</sub> (ng·h/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>0-24h</sub> (ng·h/mL)
鎖骨下静脈	①BD口ドーズ	30,800 ±2,700	149,000 ±9,000	43,700 ±10,600	404,000 ±50,000
	②樹脂製キャピラリー	25,200 ±1,500	129,000 ±1,000	48,600 ±5,500	360,000 ±72,000
	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
	④MSW <sup>2</sup>	27,700 ±1,100	140,000 ±6,000	40,300 ±7,200	449,000 ±92,000
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
② vs ③、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<sub>max</sub> : 0.82~1.11倍、AUC<sub>0-24h</sub> : 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<sub>max</sub> : 0.84~1.05倍、AUC<sub>0-24h</sub> : 0.84~1.18倍

以上より、採血量を確保しやすい鎖骨下静脈からの採血が推奨されます。鎖骨下静脈採血には高度な技術が要求されますが、当社の熟練した技術者はこの問題をクリアしています。

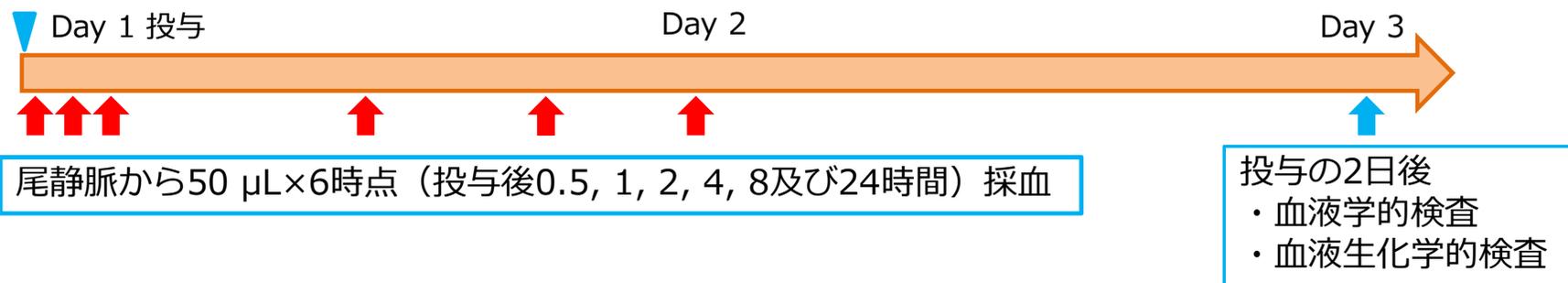
# 検討内容のご紹介

---

- ✓ マイクロサンプリングとは
- ✓ 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による生体への影響**
- ✓ まとめ

# 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）



【結果】

	♂			♀		
	RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	HGB (g/dL)	HCT (%)	RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	HGB (g/dL)	HCT (%)
1. 検査結果	6.43	13.9	42.0	6.41	13.7	40.4
2. 背景値 (Mean $\pm$ 2S.D.)	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

血液学的検査、血液生化学的検査全ての項目が、背景値の範囲内であることを確認した。  
(表は赤血球系の項目を抜粋)

# 検討内容のご紹介

---

- ✓ マイクロサンプリングとは
- ✓ 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による生体への影響
- ✓ **まとめ**

## まとめ

- マイクロサンプリングは、3RのRefinementとReductionを推進すると共に、**被験物質量の削減による試験コストの圧縮を可能にする技術である。**
- 分析技術の進歩により、少ない血漿量で問題なくTK測定は可能である。
- 採血部位あるいはデバイスの違いは、TK測定結果に影響を与えない。
- マイクロサンプリングは、ラットの生体に大きな影響を与えない。



### 課題

マイクロサンプリングは手技そのものでは生体に影響を与えないものの、被験物質を投与した動物への影響は、十分には解明されていないため、慎重に吟味して考察する必要がある。

# 当社の取り組み状況

## AMED創薬基盤推進研究事業への参画（2017年～現在）

- ・ Lack of toxicological influences by microsampling (50  $\mu$ L) from jugular vein of rats in a collaborative 28-day study (J. Toxicol. Sci., 2020)

## 第44回 日本毒性学会学術年会（2017年）

- ・ ラットを用いた尾静脈からのマイクロサンプリング技術の確立と毒性試験への応用に関する検討

## 第45回 日本毒性学会学術年会（2018年）

- ・ マイクロサンプリングの導入に関する国内CROの取り組み
- ・ ラットを用いた反復投与毒性試験における毒性評価及び薬物動態に及ぼすマイクロサンプリング法の影響

## 第46回 日本毒性学会学術年会（2019年）

- ・ ラットを用いたマイクロサンプリング法におけるデバイスの比較検討

## 第14回 非臨床血液コンファレンス（2019年）

- ・ 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

## 第48回 日本毒性学会学術年会（2021年）

- ・ マイクロサンプリング法のマウスの生体及び毒性評価への影響検討



## お問い合わせ

株式会社 L S I M 安全科学研究所 鹿島研究所  
茨城県神栖市砂山14番地1

担当：安全性研究部 高橋 一彰

TEL: 0479-46-7554

E-mail: [takahashi.kazuaki@mg.medience.co.jp](mailto:takahashi.kazuaki@mg.medience.co.jp)

HP: <https://www.ankaken.co.jp/index.html>

お気軽にお問い合わせ・ご相談ください。  
まずは2週間反復投与予備試験で試してみませんか？！

