

Volumetric Absorptive Microsampling 技術の薬物動態試験への活用 に関する研究

Studies on the Application of Volumetric Absorptive Microsampling Technology to Pharmacokinetic Studies

令和 5 年度 論文博士申請者 喜多 健二 (Kita, Kenji)

マイクロサンプリングは、薬物やその代謝物の濃度を測定して薬物動態パラメータを算出するためにごく微量（50 μ L 以下）の血液などの生体試料を採取する手法のことであり、非臨床・臨床試験において有用な技術である。Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) は 2014 年に開発されたマイクロサンプリング技術であり、専用の濾紙に血液を採取する Dried Blood Spot (DBS) と同様に微量な血液を得る技術である。DBS は 1960 年代から使用されており、薬物や内因性物質の分析に多く用いられている。DBS 試料の分析では、血液をスポットした濾紙の中央部を円形に切り抜いて分析に用いる。しかし、DBS では、ヘマトクリット (Ht) が血液スポットの拡散性に影響を与えるため、切り抜いた濾紙に含まれる試料量が Ht により変動し、分析値の精度が低下する課題がある。

そこで、本研究では VAMS が DBS の課題である Ht の影響を改善できるかについて調査し、今後の非臨床・臨床試験における薬物動態 (PK) 試験に VAMS を役立てることができるか検証した。

第一章：VAMS 試料分析の Ht の影響評価及び前処理法の確立 ^{1, 2)}

VAMS は Neoteryx 社が開発した Mitra[®]を用いて実行するもので

あり、最小 10 μ L の血液を正確に採取可能である。VAMS 試料分析において Ht の分析値への影響を評価した報告は少なく、Ht の影響を最小化する試料の前処理法に関する報告はなかった。そこで、エーザイ株式会社が創製した E6005 及びその代謝物 (M11) をモデル化合物として、Ht が VAMS 試料の分析値に与える影響を評価するとともに、VAMS 試料の前処理法の最適化を実施した。最初の検討として、前処理に使用する抽出溶媒の最適化を実施した。分析対象物質を添加したヒト血液を浸透・乾燥させた VAMS 試料に抽出溶媒と内部標準物質 (IS) を加えてボルテックスミキサーを用いた攪拌による抽出処理を行った。その後、抽出液を液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) で分析した。検討した抽出溶媒 (50%アセトニトリル、アセトニトリル、アセトニトリル/メタノール混液 (1:1, v/v)) の中で 50%アセトニトリルが分析対象物質の回収率が最も高かったため (80%以上)、50%アセトニトリルを抽出溶媒として選択した (Fig. 1)。100%有機溶媒で回収率が十分に得られなかったことより、VAMS 試料の抽出溶媒には水を含むことが分析対象物質の抽出に有効であることが示唆された。また、VAMS デバイスの試料吸引部は親水性の高い材質で構成されていることから、抽出溶媒の選択には溶媒の極性が重要な要素となる可能性が考えられた。

しかし、最適化した抽出溶媒 (50%アセトニトリル) を用いて Ht を調整した VAMS 試料 (Ht 20, 45, 70%) を攪拌で抽出して分析した結果、E6005 及び M11 の分析値は Ht 間で偏りが認められた (Fig. 2A)。こ

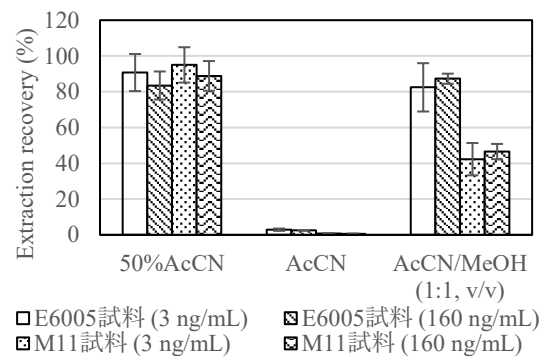


Fig. 1. VAMS 試料における抽出溶媒の検討
 平均値 \pm 標準偏差 (n=3)

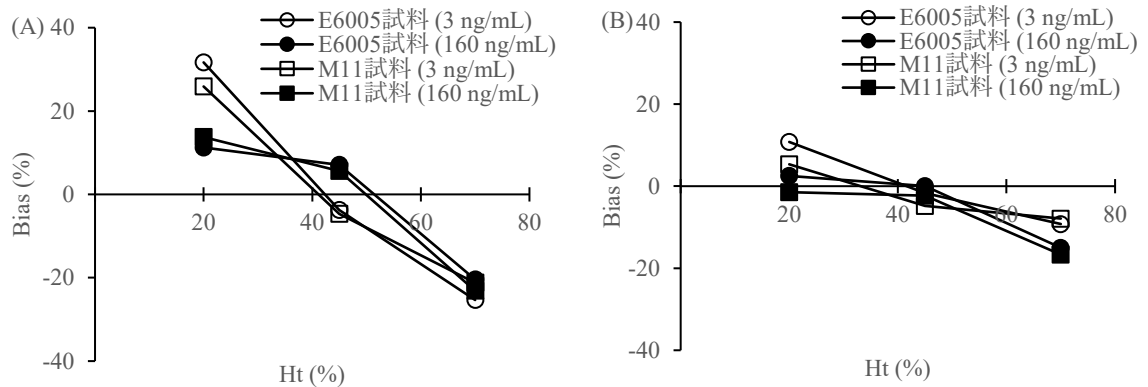


Fig. 2. 50%アセトニトリル溶液を用いた攪拌抽出 (A) 及び攪拌に超音波処理を加えた抽出時 (B) に Ht が分析値に与える影響
データは平均値で示す (n=3)

れは分析対象物の回収率が Ht 間で異なることが原因と考えられた。

そこで、抽出処理としてボルテックスミキサーを用いた攪拌に超音波処理を追加した手順を検討した。超音波処理を追加した抽出手順では、Ht 間での分析対象物質の回収率の差が小さくなり、分析値の偏りが抑制された (Fig. 2B)。

以上より、VAMS 試料分析において、DBS 同様に Ht が測定値に影響を及ぼすことを明らかにした。また、ヘマトクリットの影響の改善には、VAMS 試料の前処理に超音波を用いることが有効であることを本研究で初めて確認し、新たな知見となった。

第二章：VAMS を用いたラット PK 試験の実施³⁾

E6005 及び M11 は血球分配率の低い物質であったため、本章では血球分配率が高いと報告されているタクロリムス (Tac) をモデル薬物として、VAMS を用いた PK 試験を実施した。ラット (Cr1:CD (SD)) に 10 mg/kg の Tac を単回経口投与し、頸静脈より PK データ比較用の全血試料とともに VAMS にて血液を経時的に採取した。

VAMS 試料の前処理は、Ht 20~65%の試料において Tac を一律に高回収できることを確認した 50%メタノールを抽出溶媒として VAMS 試料に添加して、IS 添加後にボルテックスミキサーを用いた

攪拌と超音波処理による抽出操作を実施した。その後、抽出液を LC-MS/MS で分析した。ラット PK 試料測定にあたりラット VAMS 試料中の Tac の分析法の適格性を検証した。定量下限 0.2 ng/mL から定量上限 250 ng/mL の範囲において重み付き最小二乗法により検量線を作成したときの検量線試料 (n=1/濃度/run、4 runs) の平均真度 (%RE) は±6.2%以内で、精度 (%RSD) は 10.0%以内であった。日内再現性 (n=5/濃度 (定量下限のみ n=3/濃度)、4 濃度) の平均真度 (%RE) は±14.2%以内で、精度 (%RSD) は 15.6%以内であった。選択性評価は、ラット個体別ブランク試料 (6 個体) のクロマトグラムで Tac の保持時間に認められた妨害ピーク面積は定量下限試料のピーク面積に対して 12.4~29.7%であった。

ラット全血試料の前処理は IS 添加後に 2M 硫酸亜鉛/水/メタノール (5:25:70、v/v/v) を用いた除タンパク法にて実施し、得られた上清を LC-MS/MS で分析した。ラット全血試料中の Tac の分析法についても定量範囲を 0.2~250 ng/mL に設定し、検量線、日内再現性、選択性を評価して分析法の適格性を確認した。

ラットに 10 mg/kg の Tac を単回経口投与した PK 試験の Tac の血中濃度推移及び PK パラメータを Fig. 3 及び Table 1 に示した。VAMS 及び全血試料中の各時点の Tac 濃度はおおよそ一致し、PK パラメータもほぼ同等であった。

以上より、VAMS を用いた Tac のラット PK 試験は実施可能であることを示し

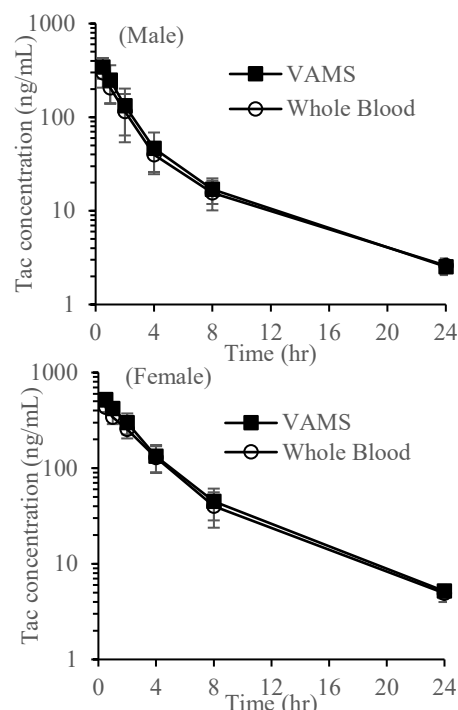


Fig. 3. Tac 10 mg/kg をラットに単回経口投与した後のラット血中 Tac 濃度推移 平均値±標準偏差 (n=3)

Table 1. Tac 10 mg/kg をラットに単回経口投与時の Tac の PK パラメータ

Parameters	Unit	Male		Female	
		VAMS	Whole blood	VAMS	Whole blood
$T_{1/2}$	h	5.1 ± 0.5	5.4 ± 0.3	4.6 ± 0.6	4.6 ± 0.6
T_{max}	h	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
C_{max}	ng/mL	343 ± 86	297 ± 90	523 ± 85	433 ± 47
AUC _{0-24h}	ng×h/mL	888 ± 349	772 ± 284	1913 ± 482	1682 ± 418
AUC _{0-inf}	ng×h/mL	907 ± 350	793 ± 287	1947 ± 482	1715 ± 417
CL _{tot} /F	mL/h/kg	12,034 ± 3937	13,609 ± 4138	5390 ± 1548	6111 ± 1727
V_{dss}/F	L/kg	90.7 ± 34.8	107.9 ± 37.9	36.4 ± 15.0	41.6 ± 17.4

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

た。これは小動物を用いた非臨床 PK 試験に VAMS を適用することで、一個体の小動物から連続的かつ複数回の採血が容易となることを表し、実験動物数の削減に VAMS が有効であることが示唆された。また、Tac のように高血球分配化合物の分析においても、超音波を用いた試料前処理法が有効であることを示した。

第三章：超音波前処理法を用いたヒト VAMS 試料分析法の確立⁴⁾

臨床 PK 試験では採血量を最小化するとともに侵襲的処置の苦痛を最小にする必要がある。そのため、VAMS による指先からの検体採取は臨床 PK 試験で有用であり、ヒト VAMS 試料の信頼性の高い分析法の確立が必要と考えられた。そこで、試料前処理に超音波を用いたヒト VAMS 試料中 Tac 濃度分析法を検討し、検討した分析法に対して「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」に準拠した分析法のバリデーションを実施して分析法の適格性及び信頼性を確認した。

ヒト VAMS 試料から Tac を抽出する溶媒を第一章の知見に基づいて最適化し、50%メタノールを抽出溶媒とした。抽出溶媒と IS を添加した後に、ボルテックスミキサーを用いた攪拌と超音波により前処理を実施した抽出液を LC-MS/MS で分析した。分析法バリデーションの結果は、定量範囲 1~250 ng/mL において、検量線試料(n=1/濃度/run、3 runs)の平均真度(%RE)は±3.5%以内で、精度(%RSD)

は 8.1%以内であった。日内再現性 (n=5/濃度、4 濃度) の平均真度 (%RE) は±6.6%以内で、精度 (%RSD) は 5.6%以内であり、バッチ間再現性 (n=5/濃度/run、4 濃度、3 runs) の平均真度 (%RE) は ±6.2%以内で、精度 (%RSD) は 11.9%以内であった。選択性評価では、3 個体のブランク試料において Tac の分析を妨害するピークは認められなかった。Ht 20%、45%、65%の血液で調製された試料の分析値 (各 n=5) の真度 (%RE) は 2.6~14.5%であり、Ht が分析値に与える影響は少なく、マトリックス効果も認められなかった。

以上より、ヒト VAMS 試料中 Tac 分析法の適格性を確認し、信頼性の高いヒト VAMS 試料の分析法を確立した。これは、規制当局の基準やガイドラインに対応した VAMS 試料の分析が可能であることを示し、臨床 PK 試験に VAMS を適用できる可能性が示唆された。

総括

本研究では、VAMS 試料分析において、Ht が分析値に影響を及ぼすことを明らかにする一方、超音波による前処理法は Ht の分析値への影響を改善し、分析対象物質の血球分配の程度に依存しない分析を可能とすることを示した。さらに、VAMS は非臨床・臨床 PK 試験に適用できる可能性を示した。本研究成果は、非臨床試験における実験動物の福祉向上 (動物実験の 3R 原則) に加え、臨床試験における患者の負担軽減に十分貢献できるものと考えられる。

《参考文献》

- 1) Kita K., Ishii T., Hotta K., Mano Y., *J Pharm Biomed Anal.*, **157**, 208-216 (2018).
- 2) Mano Y., Kita K., Kusano K., *Bioanalysis.*, **7**, 1821-1829 (2015).
- 3) Kita K., Noritake K., Mano Y., *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*, **44**, 91-102 (2019).
- 4) Kita K., Mano Y., *J Pharm Biomed Anal.*, **143**, 168-175 (2017).