
The Use of SCAP for the Quantitative Bioanalysis of Drugs

S. Kanda, A.Sakurai
*Pharmacokinetics Research Laboratories
Toray Research Center, Inc.*

H.Hike
AMR, Inc.



World wideにおけるDBS実施状況

欧州のメガファーマやCROが中心となって医薬品開発の各ステージ（探索，前臨床，臨床，市販後）にDBSを導入し始めている。

GSK, Sanofi-Aventis, Pfizer, Novartis, Astra Zeneca, BMS, Abbott, Covance, Harlanなど。

EBF Community (26社)でのアンケート結果

| | 26社中 | 探索 | 非GLP 前臨床 | GLP 前臨床 | Phase I | Phase II 以降 |
|--------------|------|----|-------------|------------|---------|----------------|
| DBSをすでに実施 | 7 | 4 | 4 | 2 | 3 | 4 |
| DBSを実施する計画あり | 15 | 9 | 13 | 5 | 3 | 9 |

EBF DBS workshop (Brussels), Jun 2010. J&J P.Timmerman氏の報告から引用

- ✓ GSKでは薬物濃度測定を原則としてDBS法に移行することを決定
- ✓ 5～10年後には25～50%がDBS法で実施されるであろう。(Alturas Analytics)
- ✓ 英国医薬品庁(UK MHRA)はDBSの有用性を認識し推奨している。

DBSのメリット

- ✓ 少ない採血量: 10~80 μ L/時点/匹 (血漿使用時の5~10分の1程度)
 - 動物数削減やサテライト群の省略が可能 (倫理, 3R, 低コスト)
 - げっ歯類からの多点経時採血が可能 (有用なデータの取得)
 - 小児・幼若動物を用いる試験が可能 (有用なデータの取得)
 - 患者への負担が小さい (リクルートが容易)
- ✓ 血漿分離操作(遠心分離, 移し替え)が不要 (簡便, 低リスク)
- ✓ 室温での輸送や保存が可能 (低コスト)
- ✓ 細胞溶解・ウィルスの不活性化 (企業倫理, バイオハザード対策)
- ✓ 非感染性物質として輸送できる (バイオハザード対策)
- ✓ 凍結融解による薬物への影響を回避 (高品質なデータの取得)
- ✓ 血液中の酵素による薬物変換を回避 (代謝物測定に有用)
- ✓ 前処理操作の簡便化・時間短縮 (低リスク, 低コスト)
- ✓ 全血以外の希少なマトリックスへの適用も可 (有用なデータの取得)
- ✓ 定量値が溶血の影響を受けない (高品質なデータの取得)

Replacement(代替)
Reduction(削減)
Refinement(改善)

バイオハザード対策としてのDBS (1)

DBSを用いたバイオハザード対策

■カード(ろ紙)上で血液を乾燥させると、乾燥に弱いHIVやHCVなどは死滅する。

■DBSカードに塗布された薬剤によって、細胞が溶解し、タンパクが変性する。

→ **ウイルスや多くのバクテリアを不活化する。**

✓HIV, HBVを不活化する(Covance資料)

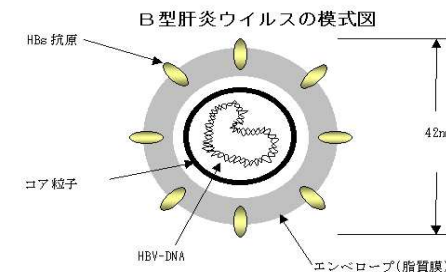
✓HIV, HCVを不活化する(Alturas analytics資料)

✓HIVやHSV-1(ヒト単純ヘルペス)を不活化する(GE Healthcare資料)。
[HSV-1はCHV-1(サルBウイルス)と同類のウイルス。]

✓酵母や大腸菌なども2-6 log減少して不活化する(GE Healthcare資料)。

✓アデノウイルス, HAV, ロタウイルス, 手足口病ウイルス…などを不活化する(文献あり)。

DBSによりこれらの病原体が不活化されるため、血漿などをそのまま取扱う従来法よりも、作業者の安全性が高まると考えられる。



バイオハザード対策としてのDBS (2)

「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス 2009-2010年版」

世界保健機関(WHO) WHO/HSE/EPR/2008.10

国立感染性研究所 翻訳

感染性物質 (Infectious substances)

輸送でいう感染性物質の定義…病原体を含むことがわかっているか、またはそれが合理的に予測できる物質。
病原体の定義…ヒトあるいは動物に疾病を引き起こすことができる微生物(細菌, ウィルス, リケッチア, 寄生虫, 真菌を含む)

これらの定義は明らかに除外されているものを除く, あらゆる試料に適用される。感染性物質は2つのカテゴリー(カテゴリーAとカテゴリーB)に分類される。

カテゴリーA…その物質への曝露によって, 健康なヒトまたは動物に恒久的な障害や, 生命を脅かす様な, あるいは致命的な疾病を, 引き起こす可能性のある状態で輸送される感染性物質をいう。

患者検体(血液)は一般的にはカテゴリーB。HBVやHCVを培養・増殖した試料はカテゴリーA。

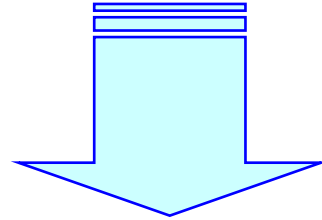
適用除外: 危害が低いいため危険物に関する要件と規則の適用対象から除外する。

- ✓ 感染性物質を含まない物質, またはヒトや動物の疾病原因とならない物質
- ✓ 中に含まれる病原体が中和または不活性化され, 健康へのリスクを喪失した状態にある物質
- ✓ 大きな感染リスクがあるとは考えられない環境検体(食品や水の試料を含む)
- ✓ **乾燥ろ紙血液(注釈: 検査のためにろ紙などへ滴下し, 乾燥させた血液)**および便鮮血検査の試料
[英文では, [Dried blood spots](#)と記載されている]
- ✓ 除染済みの医療廃棄物または臨床廃棄物
- ✓ (一部省略)



医薬品開発の観点から

輸送規制の適用除外



国際共同治験に対しても有用

アジア共同治験

大規模な臨床試験や症例が集まりにくい試験では、日本国内だけでは症例数が足りない場合に、人種差の比較的少ないアジア各国との国際共同治験が有効である。

多くの症例数を集めることによって、データの信頼性を高めることは非常に有用であると考えられる。

また、中国、韓国などアジアでは、日本よりも比較的安く治験を実施できるのでコスト面からも魅力的である。

DBSのデメリットと課題

- ✓ 使用できるサンプル量が限られるため、従来法に比べて感度面で不利
→ 10~20 μ L/spot
- ✓ 前処理作業の自動化が遅れている
→ 手技誤差(カードからのパンチアウト位置)
- ✓ DBSカードの発売元が一社のみでコスト高 約 ¥70,000/100枚
(固相抽出の約2倍)
- ✓ 採血施設でのスポット作業が必要(要教育)
- ✓ 一部の不安定な化合物には適用できない可能性がある(安定化剤を加えることが困難)
- ✓ ヘマトクリット値(血液中の血球の割合)に異常がある場合に、定量値に影響を及ぼす可能性がある
- ✓ 分析時の全血の調達, 取り扱い, 保存

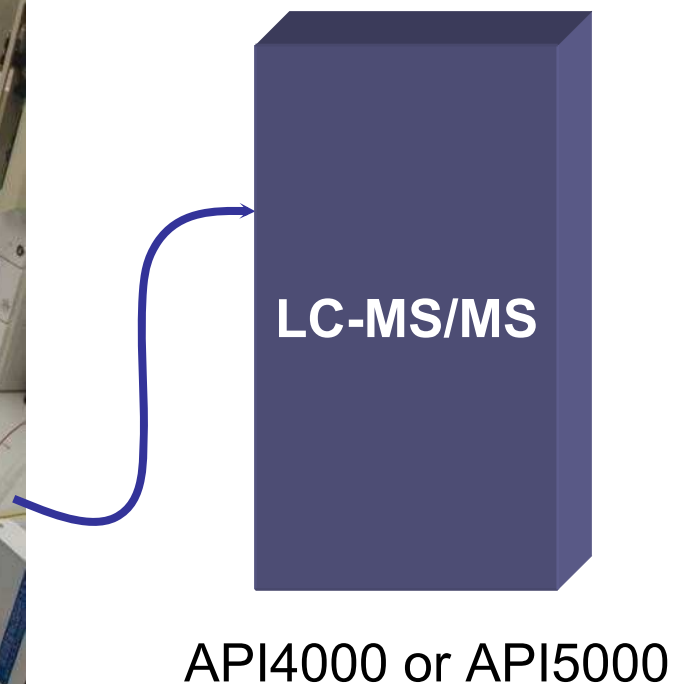
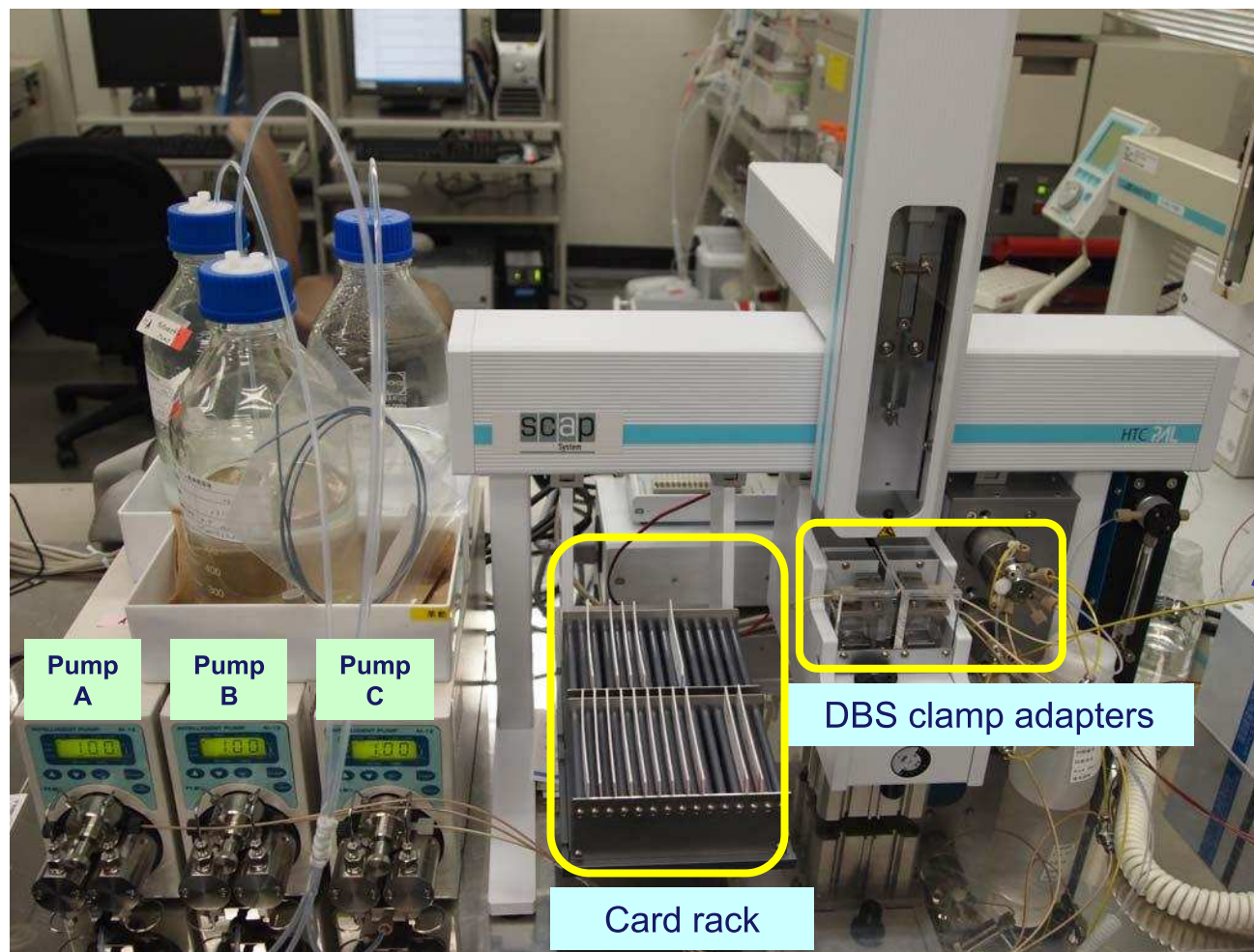
自動化の有用性が高い

SCAPを用いたDBS法の自動化分析



SCAP システム

SCAP (Sample Cartridge and Prep System)



SCAP使用における利点

- 高感度化（感度面のデメリット解消）
抽出後の測定対象物をオンライン濃縮し全量測定するため、
大幅な感度向上が期待
- データ品質の向上（手技誤差の低減）
前処理の自動化による再現性の向上
- 業務の効率化
分析データの生産性の向上
- バイオハザードリスクの低減
研究者や実験担当者の安全を保障

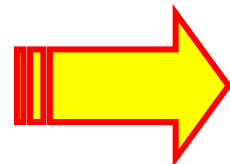
抽出後のDBSカード

オフライン処理

SCAPによる抽出



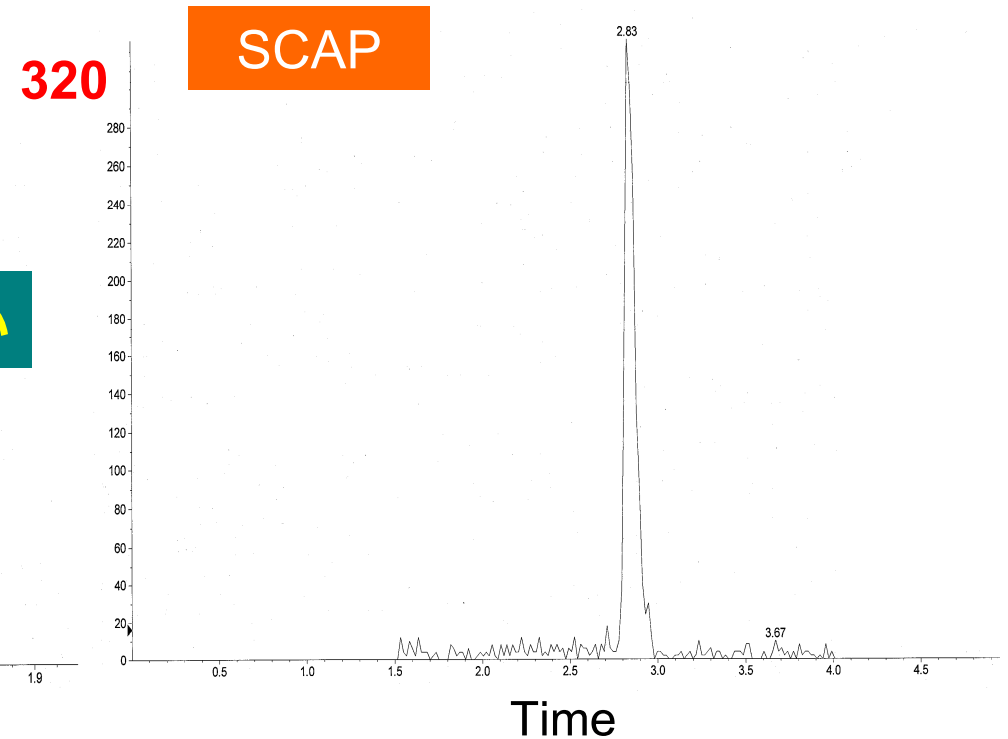
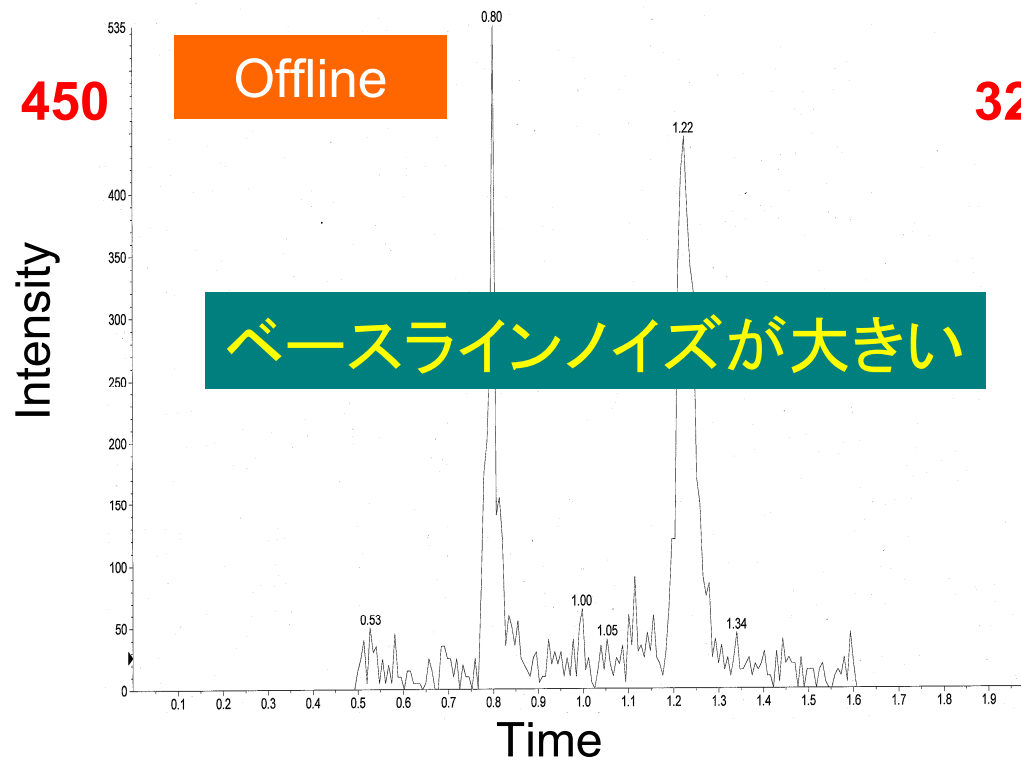
パンチアウト及びSCAP抽出後のサークルの大きさがほぼ等しい。



感度の比較を実施

SCAPとオフライン処理での感度比較

ラット全血中Valsartan (10 ng/mL)の測定結果



質量分析計:API5000

質量分析計:API4000

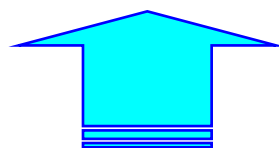


性能評価

■ SCAPの性能確認について、以下の2つの実験から評価を実施した。

スクリーニング (DBSカードとの適合性)

- ・サルタン(6剤)及びスタチン(2剤)に対するDBS法適用に関する検討

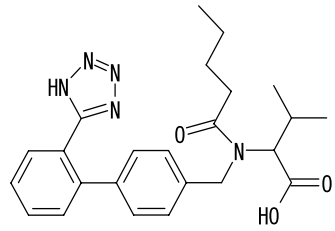


開発化合物の2～3割はDBS法が適用できないケースあり。
構造の似た化合物の測定結果から共通性が見出せるか？

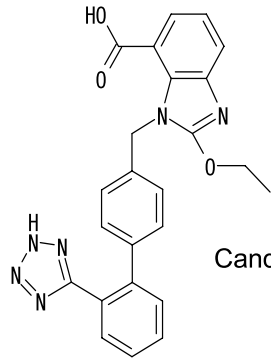
定量分析

- ・ラット血漿中Valsartanの検量線及び同時再現性

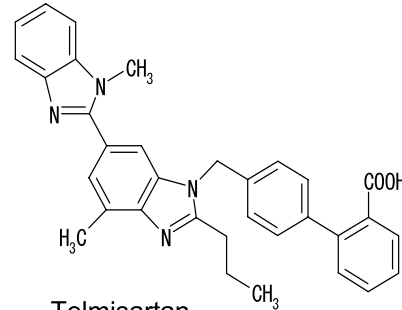
測定対象物質の構造式



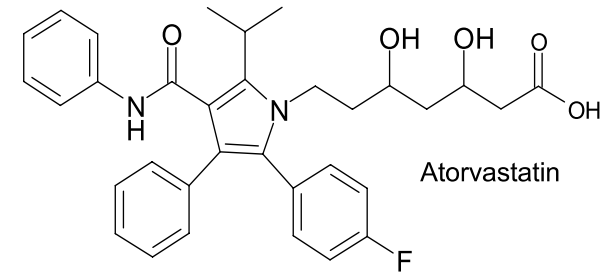
Valsartan



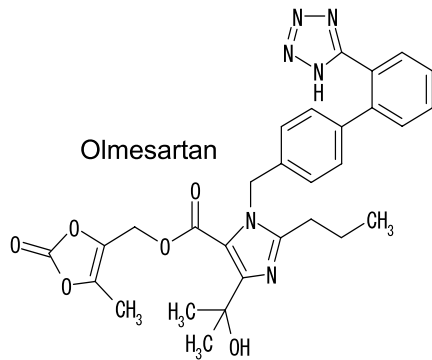
Candesartan



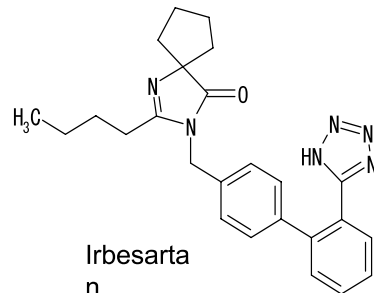
Telmisartan



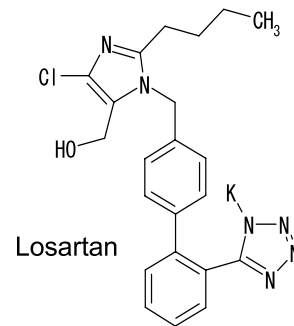
Atorvastatin



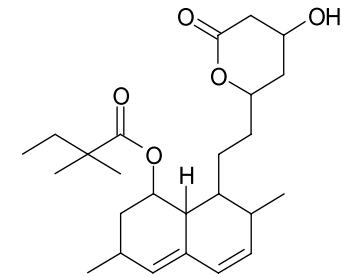
Olmesartan



Irbesartan



Losartan



Simvastatin

DBSカードとの適合性 (Sartan)

3種のDBSカードに対する適合性評価については、10 ng/mLの標準溶液をカードにスポットして適宜乾燥させた後、SCAPにて抽出した被験物質を測定したイオン強度を基に判断した。

| Compound name | A card | B card | C card |
|---------------|--------|--------|--------|
| Valsartan | △ | △ | ◎ |
| Telmisartan | ○ | ○ | ◎ |
| Olmesartan | × | △ | ◎ |
| Irbesartan | ○ | ○ | ◎ |
| Losartan | ○ | ◎ | ○ |
| Candesartan | ○ | ◎ | ○ |

× : Not detected

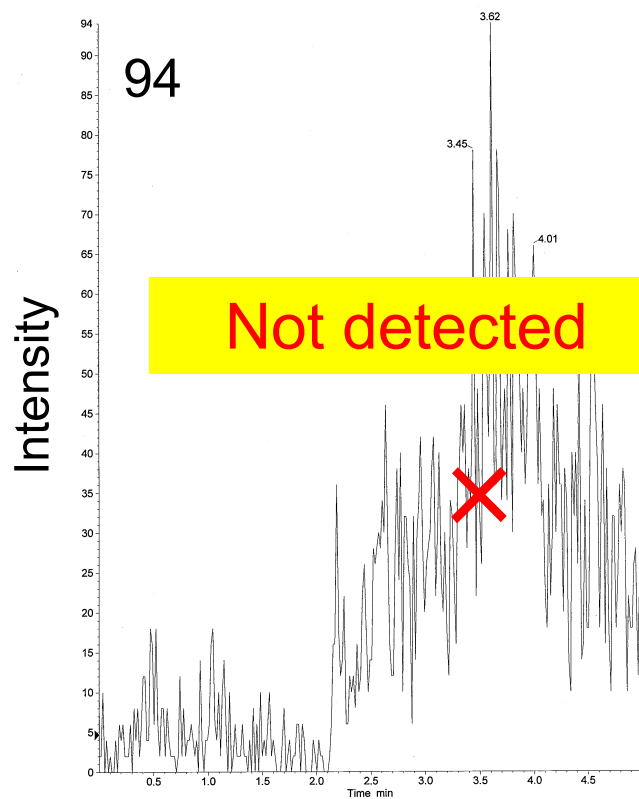
△ : S/N >3

○ : Good peak shape

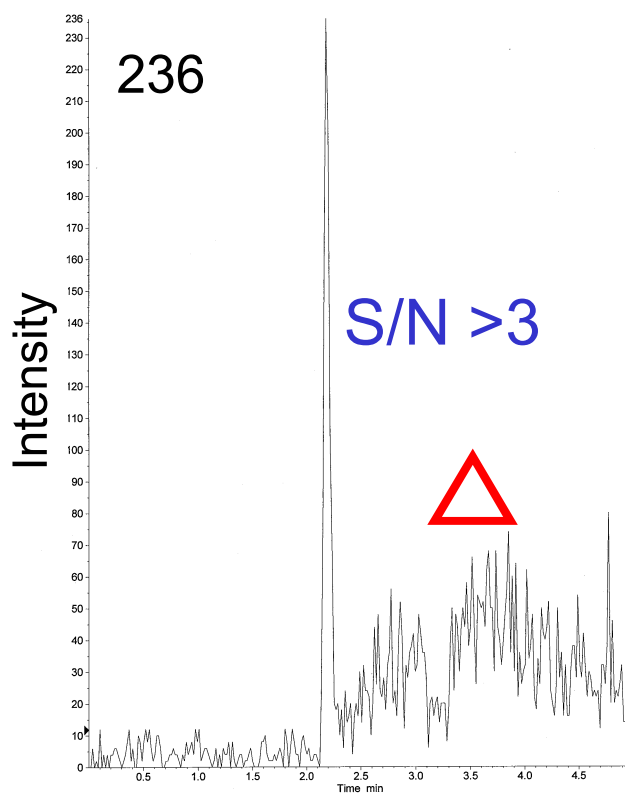
◎ : Strongest intensity

クロマトグラム (Olmesartan: 10 ng/mL)

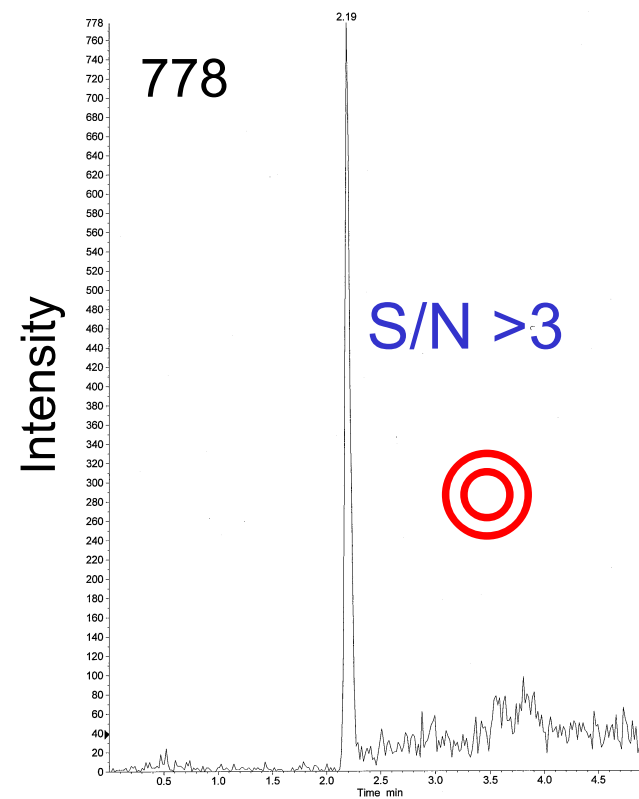
A cardが不適合であった例



A Card



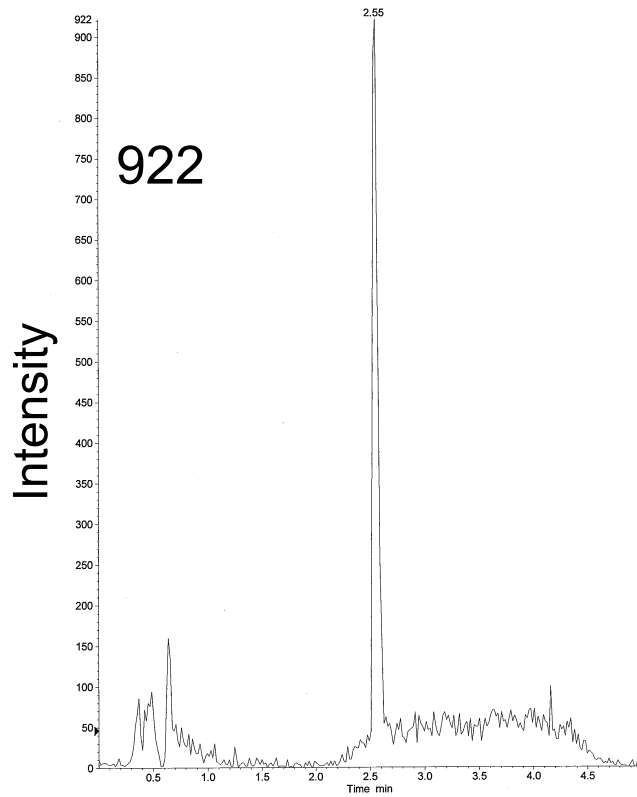
B Card



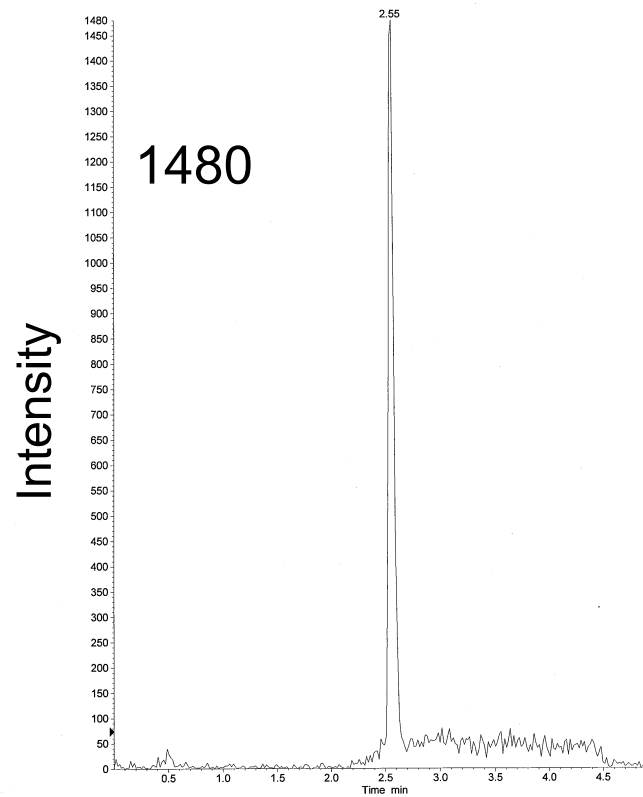
C Card

クロマトグラム (Losartan: 10 ng/mL)

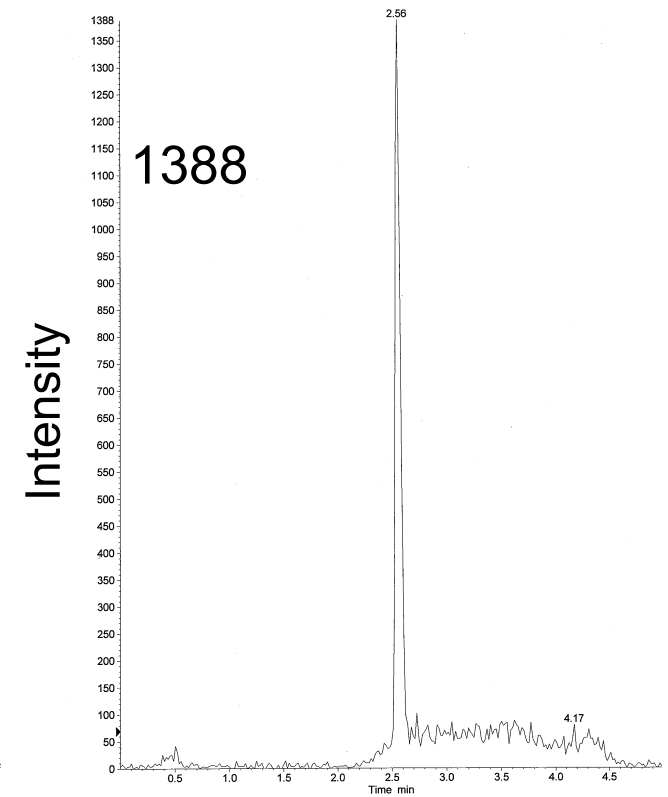
A cardで抽出可能であった化合物の例



A Card



B Card



C Card

DBSカードとの適合性 (Statin)

| Compound name | A card | B card | C card |
|---------------|--------|--------|--------|
| Atorvastatin | ○ | ◎ | △ |
| Simvastatin | × | × | × |

× : Not detected

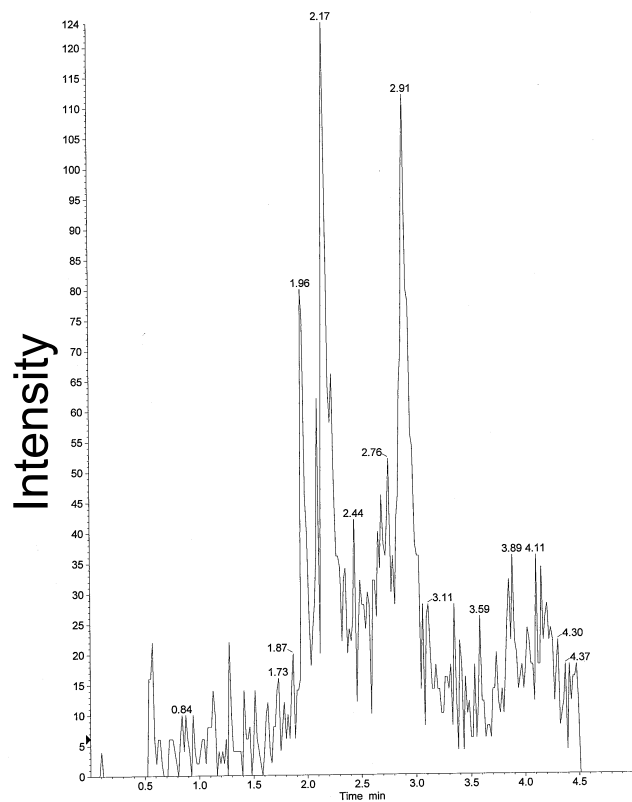
△ : S/N >3

○ : Good peak shape

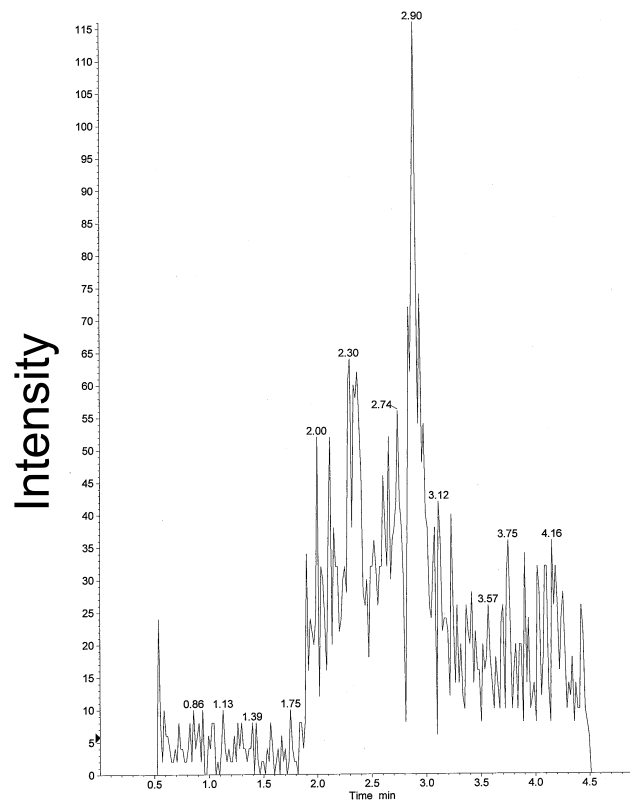
◎ : Strongest intensity

クロマトグラム (Simvastatin: 10 ng/mL)

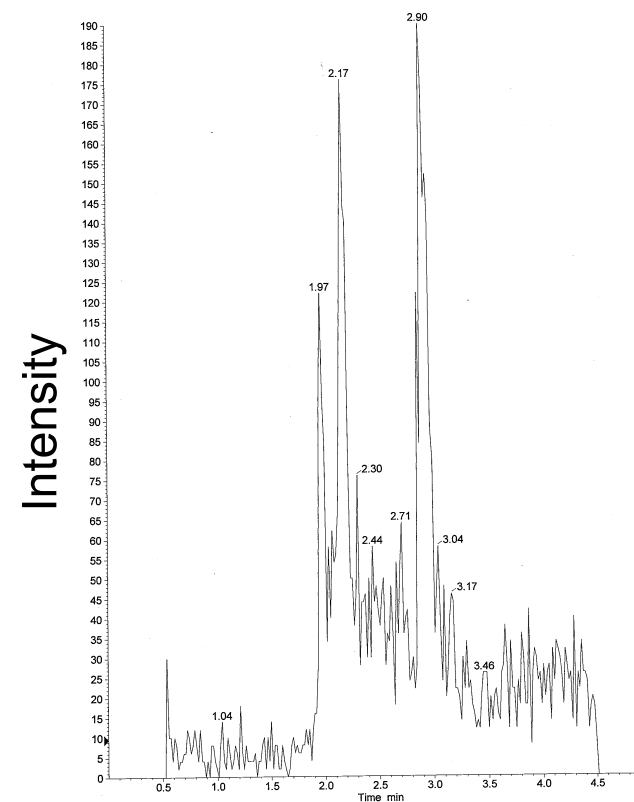
全てのカードについて不適合であった化合物の例



A Card



B Card



C Card

処理能力(オフラインとオンラインの比較)

1化合物あたりの所要時間

【実験概要】

- ・標準溶液調製: 2濃度 (Low/High)
- ・DBSカード: 3種 (DMPK1-A, -B, -C)

オフライン

| 作業内容 | 所要時間(h) |
|---------------|----------|
| 秤量及び溶液調製 | 1 |
| カードへのスポット及び乾燥 | 1 |
| 前処理 | 2 |
| LC/MS/MS 測定 | 1 |

計: 5時間

オンライン

| 作業内容 | 所要時間(h) |
|---------------|---------|
| 秤量及び溶液調製 | 1 |
| カードへのスポット及び乾燥 | 1 |
| LC/MS/MS 測定 | 1 |

計: 3時間

ラット全血中Valsartanの定量分析



毒性機関である(株)イナリサーチと、(株)東レリサーチセンターは業務提携を結んでおり、動物を使った、種々のモデル実験が可能。

分析パラメータ

- ✚マトリックス: 全血(ヘパリンNa処理)
- ✚動物種: ラット
- ✚カード上のスポット量: 15 μL
- ✚カード: Whatman FTA DMPK-Aカード (GE Healthcare)
- ✚検量線: 10~10000 ng/mL
- ✚再現性: 3濃度, n=5

検量線

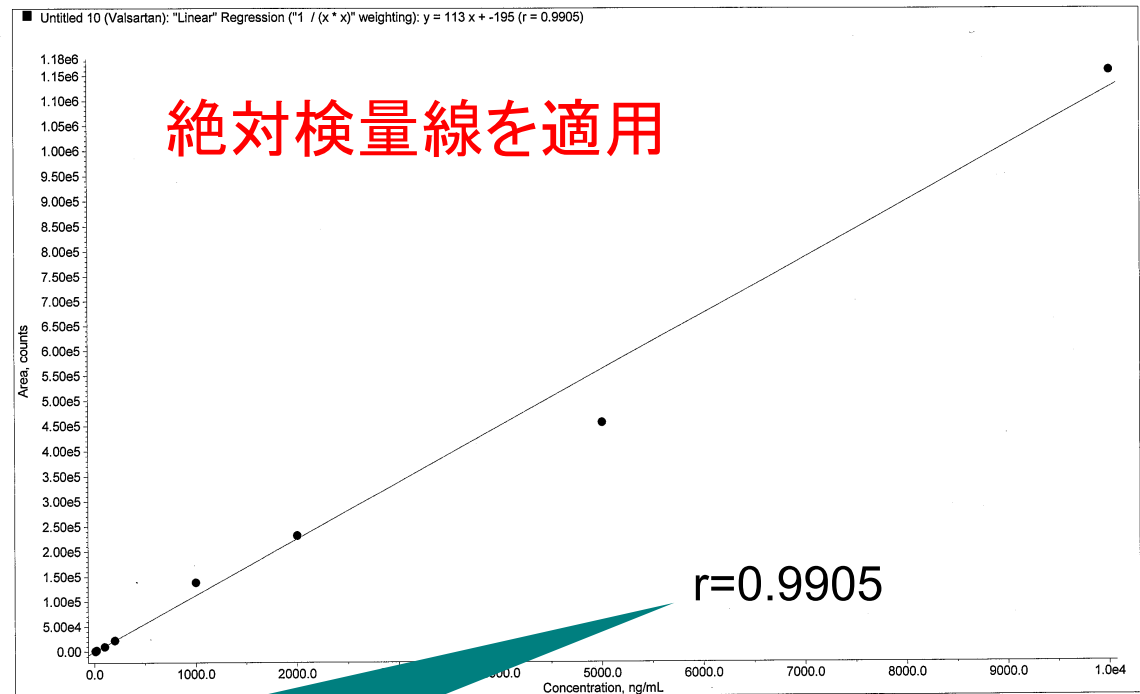
検量線範囲: 10 ng/mL ~ 10000 ng/mL

| Valsaran concentration (ng/mL) | | | | | | | |
|--------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|
| 10.0 | 20.0 | 100 | 200 | 1000 | 2000 | 5000 | 10000 |
| 9.87 | 21.0 | 86.6 | 200 | 1230 | 2060 | 4050 | 10300 |
| 98.7 | 105.0 | 86.6 | 100.0 | 123.0 | 103.0 | 81.0 | 103.0 |

Upper value: Found concentration (ng/mL)

Lower value: Accuracy (%Nominal)

Linear regression (1/x² weighting)



良好な直線性が確認された。

再現性

同時再現性:N=5

3濃度のQCサンプル(L: 20 ng/mL, M: 400 ng/mL, H: 8000 ng/mL)

| QC sample | Valsartan concentration (ng/mL) | | |
|------------------------|---------------------------------|-------|--------|
| | LQC | MQC | HQC |
| Nominal conc. (ng/mL) | 20.0 | 400 | 8000 |
| Observed conc. (ng/mL) | 24.3 | 456 | 9290 |
| | 21.3 | 420 | 8300 |
| | 26.4 | 412 | 9310 |
| | 25.7 | 488 | 10500 |
| | 25.2 | 399 | 7780 |
| Mean conc. (ng/mL) | 24.6 | 435 | 9040 |
| SD | 2.0 | 36.4 | 1049.1 |
| Accuracy (%Nominal) | 123.0 | 108.8 | 113.0 |
| Precision (%CV) | 8.1 | 8.4 | 11.6 |

自動分析による再現性の向上が確認された。

まとめ

- 複数の化合物(サルタン:6剤, スタチン:2剤)について, DBSカードとの適合性に関する情報を短時間で取得可能であった.
- ラット全血中Valsartan定量分析においては, 絶対検量線で良好な定量性を確認した.

◆ 今後の課題

- 高精度なIS添加法のシステムの構築
- キャリーオーバーの低減

バリデーション実施に向けて



予備検討

■ DBSによるTK測定実施例

DBS法を用いて、ラットTK測定試料の全血中濃度の測定を行った。
また、DBS法の結果と、全血を冷水で溶血させた後に固相抽出する従来法
(blood/water法)で得られた結果を比較した。

被験物質： バルサルタン

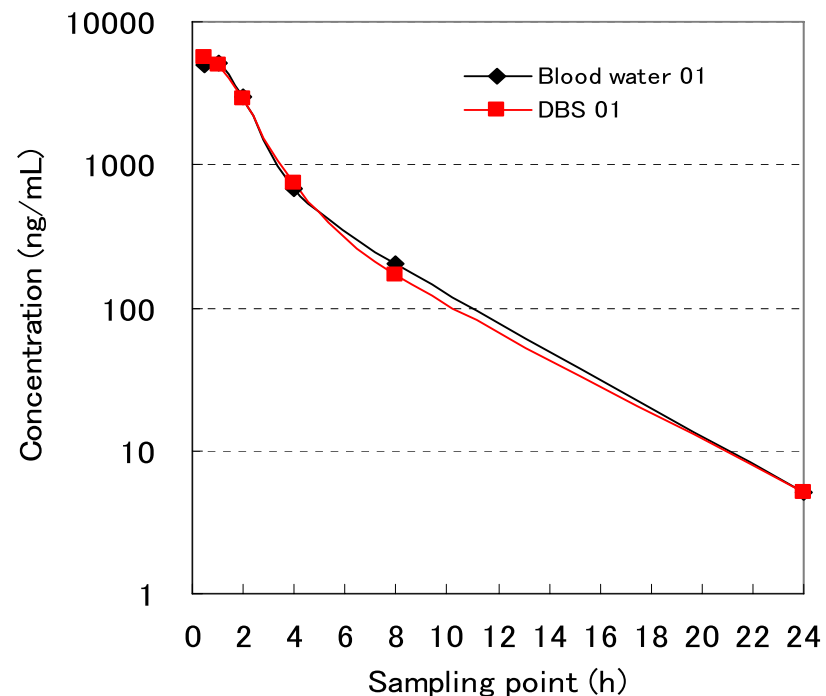
投与動物： ラット Crl:CD(SD)

投与量・投与経路： 60 mg/kg・経口投与

採血時点： 投与後0.5, 1, 2, 4, 8, 24時間

<AUC (DBS vs. blood/water) >

| Sex | Animal | AUC _{0-24h} (ng·h/mL) | | (A)/(B) |
|--------|--------|-----------------------------------|--------------------|---------|
| | | DBS (A) | Blood/water (B) | |
| Male | 01 | 14856 | 14965 | 0.99 |
| | 02 | 20876 | 19171 | 1.09 |
| Female | 03 | 30476 | 31882 | 0.96 |
| | 04 | 14948 | 14970 | 1.00 |



Concentrations of valsartan in rat whole blood
(DBS vs. blood/water, Animal No.01)

バリデーションパラメータ

主要な評価項目

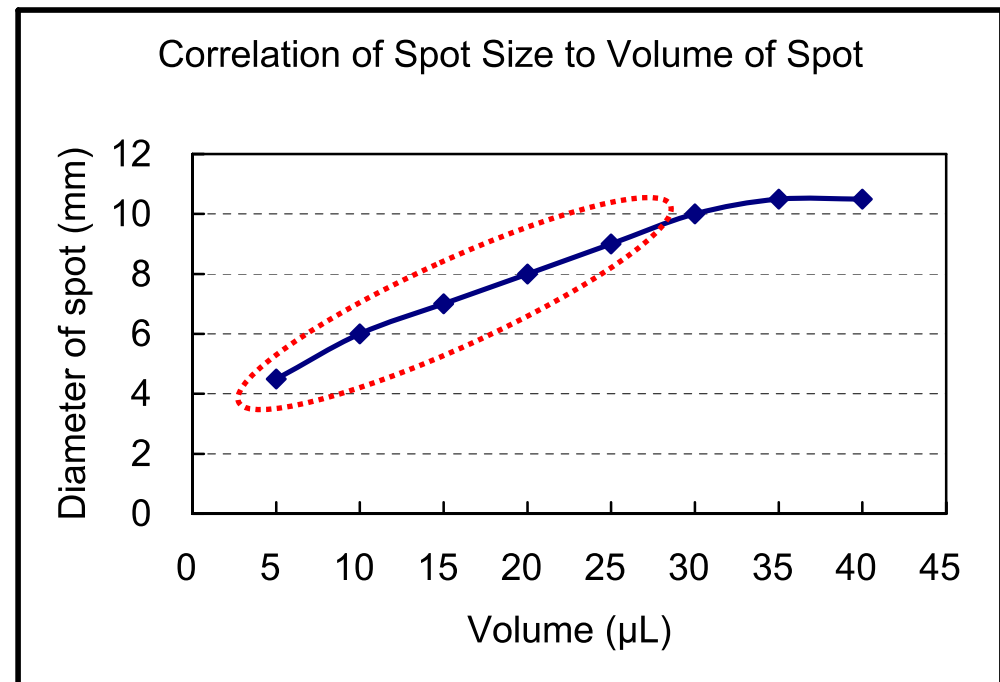
- ✦直線性
- ✦特異性
- ✦再現性
- ✦全血中安定性
- ✦カード上安定性(短期・長期)
- ✦マトリックスの影響
- ✦回収率
- ✦スポットサイズ
- ✦同スポットからの複数のパンチアウト
- ✦希釈再現性

スポットサイズの検討

DBS法で懸念されるスポット血液量による濃度誤差, 適正量の濃度誤差について検討を行った. (測定対象: Valsartan)

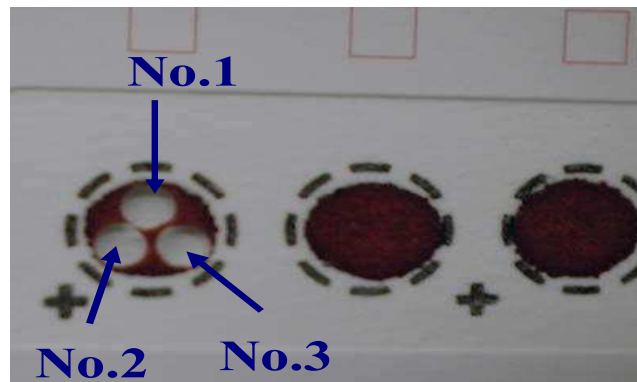
| Volume (μL) | Peak area Valsartan |
|----------------|---------------------|
| 5 | 37653 |
| | 37643 |
| | 36404 |
| Mean peak area | 37233 |
| 10 | 27300 |
| | 25787 |
| | 25698 |
| Mean peak area | 26262 |
| 15 | 27416 |
| | 26962 |
| | 25765 |
| Mean peak area | 26714 |
| 20 | 24056 |
| | 26268 |
| | 25664 |
| Mean peak area | 25329 |
| 25 | 23619 |
| | 23780 |
| | 23495 |
| Mean peak area | 23631 |

全血量: 5 ~ 40 μL /spot



同一点からの複数のパンチアウト

DBS法で懸念されるスポット血液量によるパンチ箇所濃度の誤差について検討を行った。(測定対象: Valsartan)



| Punch No. | Peak area LQC | | Peak area HQC | |
|-----------|---------------|-------|---------------|-------|
| | | (%) | | (%) |
| No.1 | 6602 | 101.5 | 2701440 | 97.2 |
| No.2 | 6227 | 95.7 | 2973467 | 107.0 |
| No.3 | 6687 | 102.8 | 2660048 | 95.7 |
| Mean | 6505 | | 2778318 | |
| CV | 3.8 | | 6.1 | |

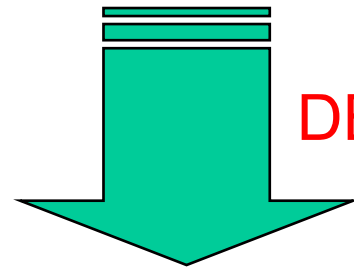
全血量: 20 μ L/spot (7.5~8 mm dia. on card)

パンチ: ϕ 3mm \times 3/spot

DBS法バリデーション実施に向けて

基本的な評価項目は血漿中薬物濃度測定と同じ

真度, 精度, 特異性, マトリックス効果, 回収率など



DBS法特有の課題

スポット乾燥時安定性, ヘマトクリットの割合, 希釈の妥当性,
カード内・カード間の変動, 血球分配率 など

各社で評価実施項目は多様であり, バリデーション実施の際は,
十分に試験デザインを協議の上, 評価項目を決定する必要がある。