

201451014A

厚生労働科学研究委託費

医薬品等規制調和・評価研究委託事業

医薬品を対象としたイメージング質量分析手法標準化に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 新聞 秀一

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の医薬品等規制調和・評価研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立がん研究センターが実施した平成26年度「医薬品を対象としたイメージング質量分析手法標準化に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
医薬品を対象としたイメージング質量分析手法標準化に関する研究	1
新聞秀一	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 試料サンプリング法に関する研究と保管条件の検討	4
新聞秀一	
2. 試料前処理法の最適化に関する研究	6
新聞秀一	
3. 定量法の構築に関する研究	8
新聞秀一	
4. 画像処理とデータ提示手法の最適化に関する研究	9
新聞秀一	
(資料) 標準手順書	11
III. 学会等発表実績	29

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究委託事業）

委託業務成果報告（総括）

医薬品を対象としたイメージング質量分析法手法標準化に関する研究

業務主任者：新聞 秀一 国立がん研究センター研究所 研究員

研究要旨

新しい測定手法で得られたデータから新しい知見を得るためには、それを正しく評価し判断するための再現性が重要である。本委託業務では、医薬品開発過程で普遍的に実施可能なイメージング質量分析手法整備を目的とする。業務主任者は、これまで前臨床研究ならびに実地医療において、様々な形態の臨床検体を数多く取り扱った経験から、組織採取から前処理および定量測定・データ処理の手法標準化が必須であると考えに至った。したがって、本事業では量の変化を伴う可能性がある工程の標準化と定量手法の構築を重点的に行う。

1. 試料サンプリング法の確立と保管条件の検討
2. 試料前処理法の最適化
3. 定量法の構築
4. 画像処理とデータ提示手法の最適化

担当責任者：新聞 秀一

所属研究機関名：

国立がん研究センター研究所

職名：研究員

A. 研究目的

国立がん研究センター（以下、国がん）では、薬物動態・薬力学の新評価手法として、イメージング質量分析（以下、イメージング MS）装置である質量顕微鏡（島津製作所）を導入し、医療現場での応用を開始した。しかし、イメージング MS の手法標準化は整備途上の状態であり、医薬品開発の迅速化や日常臨床への貢献のために、早急に真に利用可能な技術へ仕上げる必要がある。本業務では、医薬品開発過程で普遍的に実施可能なイメージング MS 手法整備を目的とする。高い再現性と定量情報を併せ持つイメージング MS の確立を目指し、GLP 準拠可能な SOP 作成の基礎となる標準手法を提案する。特に、試料採取法、試料の長期保管の影響、定量法の構築そしてデータ処理法の検討を行う。定量法のバリデーションとして、試料切片内部をレーザーマイクロダイセクションで切り分け抽出した薬剤を、既存法である液体クロマトグラフトンデム

質量分析法（LC-MS/MS）により確認する。

B. 研究方法

1. 試料サンプリング法の確立と保管条件の検討

10%中性緩衝ホルマリン液での組織固定が IMS 結果に与える影響を確認する。通常、組織は未固定で急速凍結されるが、ホルマリン固定が可能であるなら、通常の病理検査と同様の手順で組織回収が可能となり、臨床現場における作業がスムーズになると期待される。

組織検体中に含まれる薬物の長期保存の影響について評価する。モデル薬物（疎水性薬物：エルロチニブ）投与した腫瘍移植マウスの腫瘍組織を採取し、保存条件の違いによるイオン強度の経時の変化を評価する。

2. 試料前処理法の最適化

本業務ではイメージング MS で最適な試料前処理法、特にイオン化補助剤であるマトリックス供給法について検討を行う。今回は、業務主任者が開発したマトリックス蒸着とマトリックス噴霧を組み合わせた二段階マトリックス供給法について、想定されるパラメーターと得られるシグナル強度の関連を調べる。調査するパラメーターとして、腫瘍モデルマウスに投与されたエルロチニブシグナルの (a) 蒸着時間依存性、(b) 初回スプレー噴霧時間依存性、(c) 噴霧溶媒量依存性である。

3. 定量法の構築

連続切片を作製し、隣接切片より薬剤を抽

出し測定する。得られた切片1枚当たりの薬物総量をイメージング MS で得られた全シグナル強度に等しいと仮定し、シグナル強度に従って比例分配する方法を考案した。既存手法と新規手法の融合であるため、非常に高い堅牢性があると期待される。

4. 画像処理とデータ提示手法の最適化

得られた定量イメージング MS 法の妥当性を評価するために、イメージング結果から推定される薬物量と、連続切片からレーザーマイクロダイセクションを用いて採取した組織の一部に含まれる薬物量を比較し、手法評価を行う。また経時的な腫瘍内部薬物動態を可視化し、多検体間での比較が可能であるか検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は、実験動物に対して組織内濃度の推移を評価することから、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に則り研究計画書を作成し、動物愛護の観点に配慮した科学的根拠に基づく適正な動物実験を実施する。

また、ヒトの血中薬物濃度測定を含む臨床研究を含むため、ヘルシンキ宣言を尊重して計画された臨床試験計画に基づいて実施する。本研究での臨床試験は、厚生労働省「臨床研究倫理指針」に基づいた研究計画書を作成する。研究計画書、インフォームド・コンセント用紙、患者説明書について各医療施設の生命倫理委員会の承認を得るとともに、臨床試験対象者の書面によるインフォームド・コンセントを得ることとする。ガイドラインに従い、採取された患者の検査結果について守秘義務を守ること、研究成果の発表に際しては、個人が特定されない方法でのみ行うことを遵守する。

本研究で採取される血液および組織は、通常の臨床検査で行う範囲であり、患者に著しい苦痛を与えるものでないことから、患者に不利益及び危険性は伴わないと考えられる。本研究に参加する研究者は、実験動物ならびに臨床検体を用いた薬物動態研究を数多く経験しており、検体の管理方法などの具体的手法に熟知している。

本研究では、これらの動物実験計画および臨床研究計画について、既に国立がん研

究センターより承認された研究計画内で得た、動物組織ならびにヒト臨床検体を用いて手法の標準化を行う。

C. 研究結果

1. 試料サンプリング法の確立と保管条件の検討

水溶性薬物を投与した場合、ホルマリン溶液への浸漬により薬物が70%程度流出することは既に申請書に記載をしていたため、脂溶性薬物であるエルロチニブについて検討を行った。組織を固定の際に70%エタノールを用いたが、組織内薬物濃度は大きく変化しなかった。70%エタノールに浸漬後、10秒間10%酢酸アンモニウム溶液に浸漬したところ、薬物が組織内から60%~80%ほど流出することが確認された。したがって、医薬品のIMSを行う場合、組織を水溶液に浸漬することは、薬物流出の観点から望ましくないことがわかった。したがって、採取組織は常に新鮮凍結することを標準手順とした。また、医療現場での試料採取に際し、化学固定を行わないため、採取した試料はPBSに浸漬したガーゼをのせた60mmディッシュに回収することとした。

エルロチニブ投与されたマウス腫瘍組織切片を用いて、エルロチニブ強度変化をモニターすることで保管条件に対する検討を行った。エルロチニブでは、切片作製後3ヶ月間の長期保管においてもピークが検出されることが確認された。また、エルロチニブ以外の薬剤としてラルテグラビルについても最長1ヶ月の保管にて検討を行ったが、シグナルが検出不可能になる状況は確認されず、組織内分布も切片作製直後と変化がないことを確認した。

2. 試料前処理法の最適化

IMSで最適な試料前処理法、特にイオン化補助剤であるマトリックス供給法について検討を行った。今回は、マトリックス蒸着とマトリックス噴霧を組み合わせた二段階マトリックス供給法について、想定されるパラメーターと得られるシグナル強度の関連を調べた。腫瘍モデルマウスに投与されたエルロチニブシグナルの(a)蒸着時間依存性、(b)初回スプレー噴霧時間依存性、(c)噴霧溶媒量依存性を検討した。得られ

たデータより蒸着時間依存性は見られず、最終的に得られる結果に最も大きな寄与をするものは、(b)に示した初回スプレー時のマトリックス供給量であることがわかった。

3. 定量法の構築

本業務で最も重要であった定量イメージング MS 法の構築は、IMS により得られた空間分布情報と既存方法である LC-MS/MS を用いた定量を組み合わせることで解決した。したがって、イメージング MS 用切片と隣接する切片を定量用試料として追加採取し、追加で得られた組織から薬剤を抽出し前処理した試料を LC-MS/MS で定量することで、切片 1 枚当たりに含まれる薬剤量を求めた。その後、得られた全薬剤量をイメージングで得られた各ピクセルのピーク強度にしたがって比例分配することで定量イメージングマスタデータを提供することとした。

4. 画像処理とデータ提示手法の最適化

上記定量イメージング方法は非常にシンプルであるが手法の妥当性評価が必要である。本事業では、上記方法で得た定量イメージング結果から推定される薬物量（推定値）と連続切片からレーザーマイクロダイセクションで採取した組織から測定した薬物量（測定値）を比較することで妥当性を評価した。評価は、腫瘍モデル組織およびヒト臨床検体で行った。得られた結果から測定値と推定値はほぼ一致することが確認された（論文準備中）。

D. 考察

本業務において、イメージング MS における作業手順を検討した結果、再現性に最も重要な影響を与える工程はマトリックス供給工程の中でも、初回スプレー条件であることが分かった。これは、初回スプレーが組織内部から測定対象薬物を抽出する工程として、重要であることを意味している。したがって、初回スプレー条件が一定でない限り、マトリックス噴霧を繰り返したとしても再現性が得られないと考えられる。

E. 結論

本事業の遂行により、医薬品における定量イメージング MS 法の標準手順書が完成した。今後、本手法の実用化には、更なる再

現性の向上を目指した試料前処理装置開発が必須となる。そのような装置が完成した後、多施設での手法検討が可能となり得られた知見から、製薬協や CRO 等の業界団体ならびに規制当局、さらにアカデミア（大学等）を交えた議論が開始されることとなる。平成 26 年 12 月 11 日に日本製薬協主催の「第一回新技術検討会」が開催され IMS について講演および議論をしたが、本技術は日本がリードできる技術の一つであるため、この流れをさらに加速させ、世界に先駆けて実用化を目指したいという考えで一致した。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

該当事項なし。

H. 知的財産権の出願・登録情報

該当事項なし。

試料サンプリング法に関する研究と保管条件の検討

担当責任者 新聞 秀一 国立がん研究センター研究所 研究員

研究要旨

イメージング MS において不適切な試料採取により目的イオンシグナルが得られないことがある。その結果、正確な対象物質の分布情報を得ることが不可能になるため、最適な試料採取法は非常に重要な検討項目となる。また、採取組織から凍結切片を作製する際には、分析対象の妨害ピークを生成し得る包埋材等を使用せずに、組織切片を作製することが望ましい。採取された組織中の薬物安定性についても、これまで長期保存の影響を検討した結果はない。本業務では、臨床検体の最適な試料調整を目的とした試料採取法および切片作製法、-80 度における長期保存でのエルロチニブシグナル強度変化について検討を行った。

A. 研究目的

生検で得られた臨床検体は、10 mM リン酸緩衝生理食塩水を含ませたガーゼの上に落とし、迅速にクライオチューブに回収し、未固定のまま液体窒素で凍結される（図 1）。

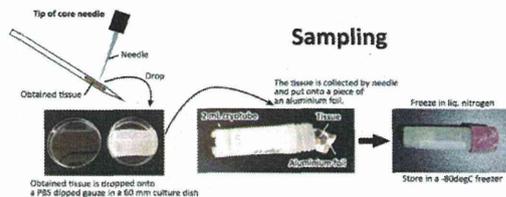


図 1. 針生検検体採取法

ここで 10%中性緩衝ホルマリン液での組織固定が可能であるなら、通常の病理検査と同様の手順で組織回収が可能となり、臨床現場における作業がスムーズになると期待される。しかし、薬物のイメージング MS においてホルマリン固定の影響を系統的に検討された例はない。これまで、水溶性薬物であるジェムシタピンの場合、固定液への浸漬により、組織内濃度が 1/5 程度、また代謝物である dFdU も 1/4 程度になるため、未固定で回収しなければならないと判断している。本業務では、脂溶性薬物であるエルロチニブを例に、化学固定の適用可否について判断する。もし、ホルマリン固定が可能であるなら、通常の病理検査と同様の手順で組織回収が可能となり、臨床現場における作業がスムーズになると期待される。また、採取した組織を無包埋で薄切するための方法を開発する。また、作成された切

片を用いて-80 度での長期保管を実施し、シグナル強度が減少するかどうかについて検討を行う。

B. 研究方法

脂溶性薬物を投与した組織から作製した新鮮凍結組織から、8 μ m の厚みで切片を作製し、組織に損傷を与えない溶媒である 70% エタノールおよび酢酸アンモニウム含有溶媒中に 10 秒間浸漬することで薬物が洗い流されるかどうかを検討した。ここで洗い流されないことが確認されたならば、10% 中性緩衝ホルマリン溶液での組織固定が可能であるか検討する。採取組織を無包埋で薄切するために、イオン化の際に夾雑シグナルを生じない氷上に、組織を固定し薄切する方法について組織サイズに応じて再現性の高い条件を検討した。長期保管については、1 枚の試料プレート上に 2 枚の切片を載せる。そのプレートを複数枚準備し、各試料の-80 度における保管期間を 0 週、1 ヶ月および 3 ヶ月とし、保管期間終了後に得られるシグナル強度を検討した。保管に際し、試料プレートはシリカゲル入りの 50 mL ディスポーザブルチューブに密封して保管した。

C. 研究結果

水溶性薬物を投与した場合、ホルマリン溶液への浸漬により薬物が 70%程度流出することは既に確認していた。脂溶性薬物であるエルロチニブについて、組織固定を兼ねて 70%エタノールで洗浄を 10 秒間施しイオ

ン強度を確認したところ、未洗浄の試料に比べピーク強度がわずかに低下していることが確認されたが、大きな変化は見られなかった。70%エタノールによる洗浄に引き続き 10 mM の醋酸アンモニウム水溶液で洗浄を行ったところ、強度が劇的に低下した。溶媒組成を考慮するとホルマリン溶液でもイオン強度が低下することが考えられる。組織の溶媒への浸漬により、薬物が流出することが確認されたため、医薬品の IMS を行う場合、組織は化学固定すること無く新鮮凍結されることが望ましいことが分かった。

組織採取で得られた未固定凍結組織は、2%カルボキシメチルセルロースで作成したスぺーサー上に固定し、切片を作成することが最も適していることを確認した。

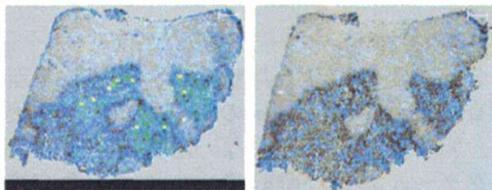


図 2. エルロチニブシグナルの溶媒洗浄による減少

Tissue mounting for sectioning



図 3. 2%カルボキシメチルセルローススぺーサー上に固定された凍結組織検体。

1.5 mm 角のディスプレイ用ディッシュに 2%カルボキシメチルセルロースを 1.2 mL 注ぎ、 -80 度で静置し完全に凍結する直前に室温に取り出し、表面がわずかに融解した状態で組織を乗せ再び -80 度で静置することで切片作成に十分な固定能を得ることができた。組織の大きさにより、初回凍結時間を変えることで、一定の組織マウンティ

ングが可能であることがわかった。今回の検討により、組織の大きさが 5 mm 角を境とし、それより小さいものは -80 度で 9 分凍結、大きいものは 5 分凍結とし、融解表面と組織の接触面積を変えることが必要であることがわかった。

エルロチニブ投与されたマウス腫瘍組織切片を用いて、エルロチニブ強度変化をモニターすることで保管条件に対する検討を行った。エルロチニブでは、切片作製後 3 ヶ月間の長期保管においてもピークが検出されることが確認された。得られたエルロチニブピーク強度の平均値は、任意単位で 0 ヶ月 $1,923 \times 10^3$ 、1 ヶ月 $2,315 \times 10^3$ 、3 ヶ月 $1,904 \times 10^3$ であり、長期保存であっても同じ測定を行う限り 20%以内の変動で収まることがわかった。また、エルロチニブ以外の薬剤としてラルテグラビルについても最長 1 ヶ月の保管にて検討を行ったが、シグナルが検出不可能になる状況は確認されず、組織内分布も切片作製直後と変化がないことを確認した。

D. 考察

薬物投与した生体組織を溶媒に浸漬することにより、短時間であったとしても組織内部から薬物が抽出されてしまう。ここで薬剤ごとに溶媒組成を検討してまで、化学固定を行う利点を見出すことは非常に困難であると考えられる。

E. 結論

医薬品のイメージング MS において、タンパク質などの生体高分子と大きく異なり、組織固定は薬物の流出を伴うため、脂溶性および水溶性薬物においても実施することをお勧めすべきであることが確認できた。組織の長期保存もエルロチニブ投与組織とラルテグラビル投与組織について可能であることが確認できた。しかしながら、長期保存については、今回検討していない薬剤についても必ず安定性を検討する必要があると考えられる。本業務では、その評価法としての実験系を確立できた。

試料前処理法の最適化に関する研究

担当責任者 新聞 秀一 国立がん研究センター研究所 研究員

研究要旨

試料前処理において、特に重要かつ再現性を得ることが困難な工程は、イオン化補助剤であるマトリックスの組織表面への供給である。本事業ではマトリックス供給法としてマトリックス結晶の蒸着とマトリックス溶液の噴霧を組み合わせた「二段階供給法」において、実験条件を検討した結果、マトリックス溶液噴霧時の溶液噴霧量が最も重要なパラメータであることが見出された。

A. 研究目的

イメージングMS法におけるマトリックス供給は、得られるデータの再現性を左右する非常に重要な工程であり、数多くのパラメータが考えられる。研究主任者はこれまでに、マトリックス結晶蒸着とマトリックス溶液噴霧を組み合わせた「二段階法」を考案し既に報告済みである（Shimma S et al. JMS 2013）。本手法を用いることで、生体組織からのイオン化効率が最大40倍向上するなど、イメージングMSの前処理におけるブレークスルーとなりうる様々な利点が見出されてきた。しかしながら、これまでのところ二段階法で考えられる前処理パラメータとイオン強度との関係は未知であるために、本事業で検討を行うこととした。

B. 研究方法

二段階法における主なパラメータは、蒸着時間、マトリックス溶液噴霧量、マトリックス溶媒量があげられる。ここでは、これら3点について、エルロチニブ投与マウス腫瘍組織を用いてイオン強度のパラメータ依存性について調べた。マトリックス蒸着は、5分、8分、16分、20分とした。マトリックス溶液量については、液量を測定することが困難であるため、噴霧時間をパラメータとした（0.5秒-6.0秒）。一方、溶媒自身の量を検討するために、噴霧時間を変更することで対応した。このとき、最終的に試料上に供給されるマトリックス量を一定とするために、0.5秒では10 mg/mL、

1.0秒では5 mg/mL、2.0秒では2.5 mg/mLのマトリックス溶液を準備し噴霧した。

C. 研究結果

蒸着時間依存性は図1(a)に示した。蒸着時間が長いほど、供給されるマトリックス量が増加するために、マトリックス自身によるイオン化抑制が起きると予想したが、20分までの蒸着時間ではほとんど変化見られないことが確認された。一方、長時間のマトリックス蒸着によりイオン強度が増加する傾向も見られなかったため、試料前処理のスループット向上の観点から蒸着時間は10分以内で問題ないと考えられる。10 mg/mLで調整したマトリックスを噴霧する時間とイオン強度の依存性は図1(b)に示した。噴霧時間が延びるほど、組織表面上のマトリックス量は増加し、溶媒量も増えることから組織内部からの抽出効率も向上すると予想された。しかしながら、2秒間のスプレー以降、ピーク強度が顕著に減少する傾向が見られた。また、上記の場合、マトリックス量と溶媒量が共に変化するために、溶媒量のみを検討する目的で異なるマトリックス濃度の溶液を調整し噴霧時間を変化させた。結果を図1(c)に示した。また、コントロールとして溶媒のみを噴霧した試料も測定した。得られたデータから、マトリックス溶媒自身の増加はイオン強度を低下させることがわかった。

D. 考察

当初、マトリックス溶媒の増加は組織内部からの薬剤抽出量を増加させる効果があり、

イオン強度は増加すると予想していた。しかしながら、得られた結果はそれとは全く異なる結果であった。この理由については、過剰なマトリックス溶媒は、組織からの薬物抽出量を増加させる一方で、共結晶条件が変化してしまい得られるマトリックス結晶の質が低下しているのではなかと考えられる。

E. 結論

試料前処理におけるマトリックス溶液噴霧では、低濃度のマトリックス溶液を大量に噴霧するより、高濃度のマトリックス溶液を短時間で供給することで、イオン強度が増加する傾向が認められる。

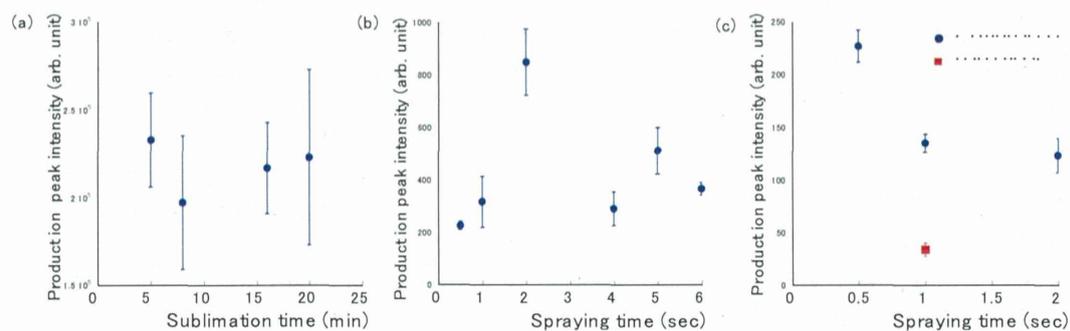


図 1. (a)蒸着時間依存性, (b) 10 mg/mL マトリックス溶液噴霧時間依存性, (c)マトリックス溶媒噴霧時間依存性

定量法の構築に関する研究

担当責任者 新聞 秀一 国立がん研究センター研究所 研究員

研究要旨

イメージング MS における定量情報の付加は、これまでブランク組織上への既知濃度試料の滴下による検量線作成し、得られた検量線から濃度推定をする方法などが報告されている。しかし、この方法では、滴下位置によるイオン化サプレッションの影響や組織内部からの薬物抽出効率を考慮していない等、様々な問題点が指摘されている。ここでは、イメージング MS と既存手法である LC-MS/MS による組織内薬剤濃度定量結果を統合した、定量イメージング手法を提案する。

A. 研究目的

これまで、イメージング MS では様々な定量法が報告されている。一例として、コントロール切片上に既知濃度薬物を滴下し検量線を作成する定量法がある。しかし、この方法はコントロール組織が手に入りにくい臨床検体には応用できない。また、滴下場所によりイオン強度が一定とならない上、抽出効率を考慮していないため誤った結果を導くと考えられる。本業務では、連続切片を作製し、隣接切片より薬剤を抽出し、LC-MS/MS を用いて薬剤量を測定し、イメージング MS データと統合する方法を構築する。

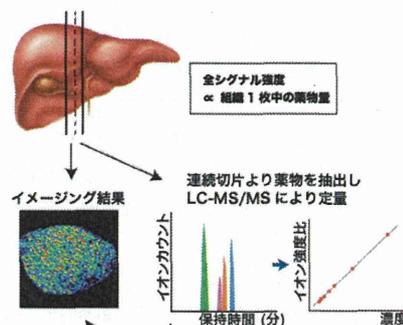
B. 提案する定量法

本業務では、定量イメージング MS 法の構築は図 1 に示す方法を採用した。本方法は、イメージング MS により得られた空間分布情報と既存方法である LC-MS/MS を用いた定量情報を組み合わせている。この手法を実施するにあたり、イメージング MS 用切片と隣接する切片を定量用試料として追加採取する。追加で得られた組織から薬剤を抽出し、前処理した試料を LC-MS/MS で定量することで、切片 1 枚あたりに含まれる薬剤量を求める。その後、得られた全薬剤量をイメージング MS で得られた各ピクセルのピーク強度にしたがって比例分配を行う。

C. 考察

本手法では、原点を通る一次曲線を検量線とする方法と考えられる。非常に単純な方法である故、コンセプトの評価を行うこと

が必須となる。しかしながら、一度手法の精度が確認されれば、バリデーションを取ることが可能な LC-MS/MS にて薬剤量を測定し、その量に従って画像階調を設定しているため、非常に堅牢な方法であると考えられる。また、どのような検体間でも薬剤量情報があれば比較可能なイメージング MS データを提供可能である。



LC-MS/MS により得られた切片 1 枚中の薬物量 (ng/tissue or pg/tissue) をシグナル強度にしたがって分配。

図 1. LC-MS/MS による定量情報を組み合わせた定量イメージング MS 法

E. 結論

LC-MS/MS で得られた定量情報とイメージング MS で得られた薬物の空間分布情報を統合することは、現時点で最も精度が高く妥当な方法であると考えられる。

画像処理とデータ提示手法の最適化に関する研究

担当責任者 新聞 秀一 国立がん研究センター研究所 研究員

研究要旨

本業務で提案された定量イメージング MS データは、分布情報可視化データと隣接切片から抽出した薬剤の LC-MS/MS による定量情報を統合することで問題を解決している。概念としては非常に簡潔であり、新規技術と非常に堅牢な情報を提供する既存技術の組み合わせであることから有望な方法であると考えられるが、手法評価が必要である。ここでは、提案の方法で得られた定量イメージングデータを用いて推定される薬物量と連続切片を用いてレーザーマイクロダイセクションにより切り出した該当部位から抽出した薬剤量を定量した実験値を比較することで評価を行った。

A. 研究目的

定量法の構築における業務において、LC-MS/MS による定量データとイメージング MS データの統合方法を提案した。本方法の妥当性を評価するために、得られた定量データの精度を検討する。

B. 研究方法

提案の定量イメージング MS 法に従えば、シグナル強度に従って薬剤量が比例分配されるために、画像濃淡は直接薬剤量に変換することが可能である。従って、得られた定量イメージングデータ内において、任意の興味領域 (ROI) を作成し、その領域に含まれる薬剤推定量を計算する。

一方、イメージング MS で用いる試料の連続切片を作成しておくことで、薬剤推定を行った領域と同領域をレーザーマイクロダイセクションシステムで採取し、得られた組織中の薬物量を測定することが可能である。本業務では、動物検体ならびに臨床検体において、薬剤推定量と測定量を比較し定量イメージング精度を検討する。

C. 研究結果

まず、本実験手法の確認のために、動物検体を用いて検討を行った。図 1 はエルロチニブ投与マウスの腫瘍モデル組織内部における薬剤分布である。また、測定薬物量と推定薬物量について表にまとめた。実験は 2 枚の連続切片をもちいて再現性を含めて確認した。本実験で用いた組織には腫瘍部と壊死部が混在しているため、腫瘍部 2 ヶ

所 (R1, R2), 壊死部 1 ヶ所 (R3), 腫瘍部と壊死部を両方含む部位を 1 ヶ所 (R4) において推定を行った。推定場所に対応する部位をレーザーマイクロダイセクションで採取後の組織写真も示した。得られた結果から、2 回の実験における再現性は 15% 以内の精度で、推定値の精度は測定結果と比較し 20% 程度の精度が得られることがわかった。

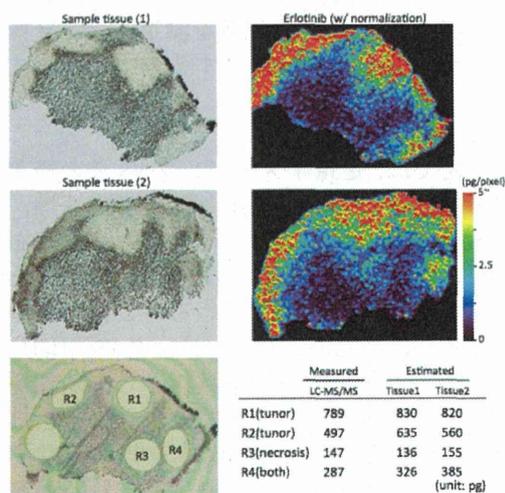


図 1. 動物腫瘍組織を用いた定量イメージング MS 法評価実験。

本確認実験から、20% 程度の精度を得られることが確認できたので、本手法を腫瘍内薬物動態解析に応用した。本実験では、マウス腫瘍モデル組織を用い、エルロチニブ投

与後、30分、60分、300分で組織を採取し定量イメージング並びにLC-MS/MSを用いた確認実験を行った。図2に得られた結果を示す。提案の定量イメージングMS手法により、エルロチニブが投与後30分で腫瘍内部に蓄積し、300分では消失する様子が見て取れる。また、壊死部においては、300分において薬物が蓄積する傾向が見られた。得られたイメージングデータから推定した薬物量と連続切片からの測定量を比較したところ、どのタイムポイントにおいても20%以内の精度を確保できることがわかった。

動物検体で定量イメージングMS法の十分な精度が示されたため、投与量の非常に少ないヒト臨床検体へも適用し、性能が得られることを確認した（論文準備中）。

D. 考察

本業務における結果で、非常に高い精度で薬物推定量を提供できることを示したが、

これには、前処理時に供給するマトリックス溶液中に内部標準物質を添加することが望ましい。内部標準物質の分布を用いた画像補正により、マトリックス効果を打ち消す効果があり、推定精度が向上するものと考えられる。本業務では、エルロチニブを対象としたため、内部標準は安定同位体標識されたd6-エルロチニブを用いているが、この内部標準の選択が結果に与える影響については未検討であり、今後の課題であると考えている。

E. 結論

提案の定量イメージングMS法による薬物推定値と連続切片からのLMD採取組織を用いて得た実験値の間には、精度として20%程度の非常に良い一致が見られた。本手法は定量イメージングデータ提供のために十分な性能を持っていることが示された。

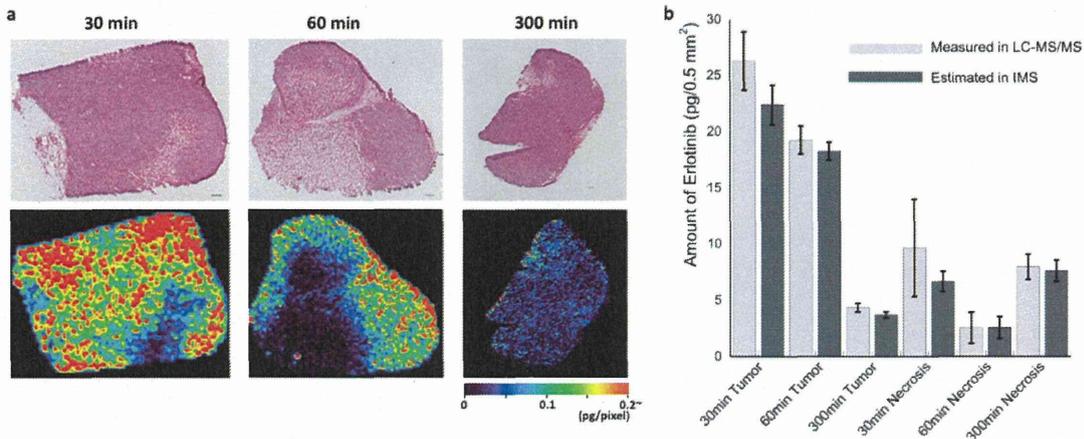


図2. エルロチニブ投与マウス腫瘍モデル組織を用いた、組織内薬物動態可視化実験。(a) 投与後30分で腫瘍内部に薬物が蓄積し、300分では消失する様子が可視化された。また、300分では壊死部に薬物が蓄積する様子が見えた。(b)得られた画像から得た薬物推定値と連続切片から測定した薬物量を比較したところ、エラーバーの範囲内(95%信頼区間)で一致することが確認された。

資料

(資料)

イメージング質量分析のための標準手順書（詳細版）

文責：新聞秀一

2014年3月11日（初版）

2015年2月12日（2版 詳細版として加筆）

無断転載や無断使用を禁ずる。

標準的なイメージング質量分析を実施するために、各工程について標準手順書（詳細版）を制作した。手順書は、6部で構成され

第1部：測定メソッド設定法

第2部：凍結切片作製法

第3部：マトリックス蒸着法

第4部：マトリックス噴霧法

第5部：試料測定法

第6部：データ解析法

付属書：LC-MS/MSのための試料前処理法
から、構成される。

(資料)

第 1 部 測定メソッド設定法

文責：新聞秀一

2014 年 3 月 3 日（初版）

2014 年 3 月 7 日（修正）

2014 年 3 月 11 日（修正）

無断転載や無断使用を禁ずる。

【測定条件設定ワークフロー】

MS スペクトルおよび MS/MS スペクトルの確認

↓

マトリックス溶液中の酸の選択

↓

衝突エネルギー（以下，CE）条件の最適化

↓

レーザーパワー（以下，LP）条件の最適化

↓

検出限界の見積もり

（注 1）全工程は，開始から完了までおおよそ 3 時間程度を要する。

（注 2）条件検討開始する時点で，装置の質量校正（キャリブレーション）は終了していることとする。

【保存溶液の準備】

薬剤の溶解性に依存するのでインタビューフォームの溶解度を確認すること。DMSO で 1 mg/mL の濃度になるように調製することが多い。

【測定試料の調整】

保存溶液を 50%メタノール（酸は含まない）にて保存溶液を 10 μ g/mL の濃度に調製（以下，測定試料 1 とする）。

【 α -CHCA 溶液中の酸の選択法】

以下，2 種類の α -CHCA 溶液を準備する。

溶液 1：10 mg/mL in 30%アセトニトリル：10%イソプロパノール：0.1%ギ酸

溶液 2 : 10 mg/mL in 30%アセトニトリル : 10%イソプロパノール : 0.1%TFA

それぞれのマトリックス溶液と測定試料 1 を 1 : 1 で混合し、蒸着済みのサンプルプレート上に 0.1 μ L スポットする。各条件で 4 スポットずつ作製する。さらにスペクトル確認用スポットとして溶液 1 で調製したサンプルスポットを 4 点作製する。このときスポットを観察し、キレイなスポットができない場合は測定試料 1 の濃度を低くする（例えば、1 μ g/mL 等）。

【作製スポット測定の初期条件】

調整するパラメーターは、CE と LP である。また、検出器電圧も調整するパラメーターとなりうるが、最適化は行わない。初期条件として、(CE, LP, 検出器) = (45, 45, 2.0) とする。

【テストスポットによるスペクトル確認】

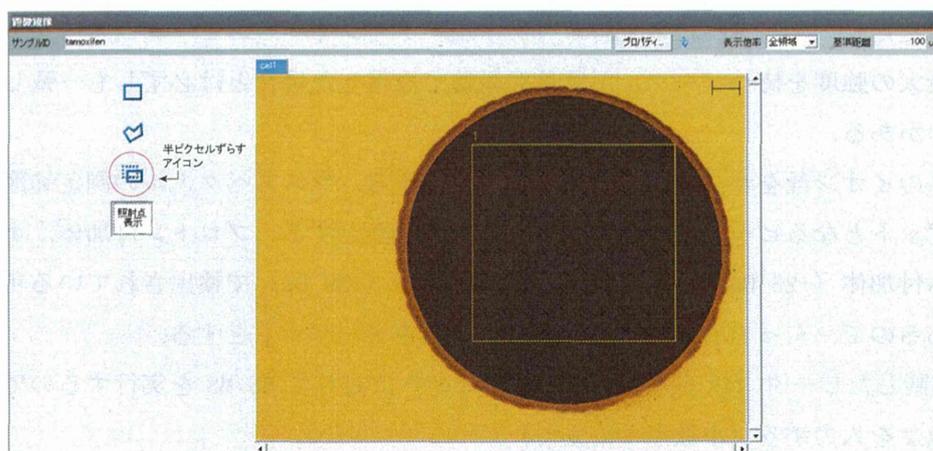
1. 測定薬剤の MS/MS スペクトルピークパターンはデータベースで予め調べておくこと。
データベース URL http://metlin.scripps.edu/metabo_search_alt2.php
(注) ただし、データベース上のスペクトルパターンやベースピーク（スペクトル内で最大の強度を持つピーク）が質量顕微鏡で取得した場合とは必ずしも一致しないことがある。
2. ピークのイオン種をマススペクトルにより確認する。マススペクトルの測定範囲はターゲットとなるピークの $m/z - 50$ から $m/z + 50$ とする。プロトン付加体、ナトリウム付加体 (+23 Da) もしくはカリウム付加体 (+39 Da) で検出されている可能性があるのもっとも強度の高いピークを測定ターゲットとする。
3. 1 で判断したピーク（以下、プリカーサイオン）に対して MS/MS を実行するので、その m/z を入力する（小数点 1 桁まで）。
4. スペクトル測定範囲を m/z 50 からプリカーサイオンの $m/z + 10$ とする。
5. 選択範囲（マスウィンドウ）には、1.5 を入力する
(注) ほとんどないが、ピーク強度が小さい場合、3.0 を入力し検討を行う。
6. 5×5 のデータ点を作成し、初期条件を設定しテストスポットを測定。
7. 目的のピークが検出されているかを確認。もし、イオンが飽和しているようなら検出器電圧を 1.8 kV もしくは 1.9 kV にする。検出器電圧を 0.1 kV 下げるとイオン強度は約半分になる。最適な検出器電圧を設定すること。

【マトリックス溶液内の酸の選択】

1. それぞれの酸を含むスポットに対し 10×10 点（スポット中央を正方形で）で測定を行う。
2. それぞれ 4 サンプルより測定したピーク強度について平均値を求める。
3. ギ酸と TFA で平均値を比較し、強度の強い酸を選択する。同程度であるならギ酸を採用する（LC-MS では通常移動相にはギ酸を添加することが多いため、揃えてしまうという考え方に基づく）。

【CE 条件の設定】

1. 選択した酸を含むマトリックス溶液で試料を調製し、改めて 8 点スポットを作製する。
2. CE 以外のパラメーターは固定する。1 スポット内に CE = (40, 45, 48, 50) の測定条件をつくり 10×10 で測定する。1 スポット内で複数の測定を行う場合は、図に示す半ピクセルずらすツール（横、下、斜め下）を用いて領域を設定する。
(注) CE 50 でプリカーサイオンが高い強度で検出されている場合は、CE50 以上で検討を行う。



3. さらに 3 スポットで同じ測定を繰り返し、ピーク強度の平均値（4 スポット分）を算出し CE_{max} とする。
4. CE_{max} を中心とし、さらに細かく CE の値を振る。
例えば ($CE_{max}-1$, CE_{max} , $CE_{max}+1$, $CE_{max}+2$) で測定を行う。
5. さらに 3 スポットで同じ測定を繰り返し、ピーク強度の平均値（4 スポット分）を計算し、最大強度を示す CE_{max} を $^{opt}CE_{max}$ とする。

【LP 条件の設定】

1. 蒸着済みのガラス上に改めて 8 点スポットを作製する。

2. ${}^{opt}CE_{max}$ とし LP を振る. 1 スポット内に LP = (42, 45, 48, 50) の測定条件をつくり 10×10 で測定する.
(注) 半ピクセルずらすアイコンを用いる.
3. さらに 3 スポットで同じ測定を繰り返し, ピーク強度の平均値 (4 スポット分) を算出し LP_{max} とする.
4. LP_{max} を中心とし, さらに細かく LP の値を振る.
例えば ($LP_{max}-1$, LP_{max} , $LP_{max}+1$, $LP_{max}+2$) で測定を行う.
5. さらに 3 スポットで同じ測定を繰り返し, ピーク強度の平均値 (4 スポット分) を計算し, 最大強度を示す LP_{max} を ${}^{opt}LP_{max}$ とする.

【検出限界の見積もり】

1. 前項までに ${}^{opt}CE_{max}$ と ${}^{opt}LP_{max}$ が決定されたので, 10 $\mu\text{g/mL}$ から 50%メタノールで 1 $\mu\text{g/mL}$, 100 ng/mL , 10 ng/mL , 1 ng/mL を調製する. それぞれの濃度の試料についてマトリックス溶液と 1:1 で混合し, 2 スポットずつ作製する (1 スポットは予備とする).
2. 各スポット最適化された条件で 1 回ずつ測定をする (10×10) .
3. ピークが検出されないスポットが現れたら, 検出器電圧を 2.1 kV にし予備用スポットにて再測定する.
4. 検出器電圧 2.1 kV でピークが検出されない濃度を検出限界とする. もし 1 ng/mL でも十分に検出される (S/N 10 程度) ことが確認された場合, 原則それ以下の濃度は検討せず打ち切りとする.

測定条件設定に関するその他の注意事項

1. 上記設定法は, 安定したピペット操作ができることを前提としている. スポット間変動が大きい場合は, 設定不可能なので均一なクオリティーのスポットが作れるようになること.
2. 最終的に設定された測定条件は” C/ImagingMSsolution/Data/Established_method フォルダ” 内に保存する. ファイル名は英語で一般名とする. 商品名で保存しないこと.
3. 経験上, 10 ng/mL の濃度でピークが検出できない場合, 組織イメージングはかなり難しいと考えられる.
4. これまでの経験上, ガラス上での標準品の検出限界よりワンオーダー上の濃度 (検出限界が 1 ng/mL ならば 10 ng/mL) が, 組織切片上での検出限界であることが多い.

(資料)

第 2 部 凍結切片作製法

文責：新聞秀一

2014 年 3 月 10 日（初版）

2015 年 2 月 12 日（2 版）

無断転載や無断使用を禁ずる。

【切片作製ワークフロー】

凍結組織の準備

↓

組織マウント用スペーサーの準備と組織のマウント

↓

組織ホルダーへのマウント

↓

凍結組織トリミング

↓

切片作製

↓

連続切片のヘマトキシリンエオシン染色（HE 染色）

（注 1）全工程は、開始から完了までおおよそ 45 分～1.5 時間程度を要する。

【凍結組織の準備】

凍結組織をハンマーで粗めに粉砕したドライアイス中に保管する。組織を取り扱うためのピンセットも同時にドライアイス中に保管する。

【組織マウント用スペーサーの準備と組織のマウント】

1. 2%カルボキシメチルセルロース水溶液（以下、CMC 溶液）を準備する（保存溶液は室温保管で良い）
2. スペーサー作製の型にはクリオモルド 2 号（サクラファインテック社）を用いる。クリオモルド 2 号に CMC 溶液を 1.2 mL をピペットで注ぎ、-80°C 庫内で凍結させる。
3. 組織の大きさにより、凍結時間を変更する。
4. 目安として

組織径と高さがそれぞれ 5 mm 以上では 5 分間（大きい組織、例えば手術検体や動物組織）