

5 mm 以下では 9 分間 (例えば生検検体のような小さい組織) とする。凍結の際には、クリオモールド 2 号の下にボール紙もしくはプラスチックを敷き、直接庫内の金属に触れないようにする。

5. それぞれの時間が経過した後, 1 分間室温で静置し CMC 表面をわずかに融解させる。
6. 表面がわずかに融解していることを確認して, 凍結組織を冷却したピンセットでつまみ CMC 上に静置する。この際, 組織をピンセットで押して埋め込もうとしないこと。氷筈が出来てしまい, 切片操作が煩雑になる。
7. CMC 上に載せた組織を再び -80°C で 10 分以上保管し切片作製の試料とする。

【組織ホルダーへのマウント】 (以下の作業は全てクライオマイクロトーム庫内で行う)

1. 用いるクライオマイクロトームのホルダーに OCT コンパウンドを一滴載せる (500 μL -1mL 程度で溝から少し盛り上がるくらい)
2. スペーサー付きの凍結試料をクリオモールドから外す。この際, スペーサーから凍結組織が外れたり, クリオモールドから飛び出したりすることないように慎重かつ迅速に作業を行う。
3. OCT コンパウンドを載せたホルダーをマイクロトーム庫内に置き 1 分から 2 分程度温度を平衡化する。その後, クリオモールドから外した組織付きスペーサーを OCT コンパウンド上に載せ, ステージとスペーサーを密着させる (組織を直接接触することは無いので迅速に扱えるならスペーサーは手で扱ってよい)
4. OCT コンパウンドが凍結するまで, マイクロトーム庫内で 5 分程度静置する。

【凍結組織トリミング】

5. ホルダーをマイクロトームにセットする。
6. 切削の角度を調節し 35 μm から 50 μm の厚さでトリミングする。
7. トリミングで所望の大きさの面出しができたなら, 組織厚さを 8 μm に変更し, 5 枚程度切る。腫瘍もしくは病変部が含まれていることを確認するため, さらに 1 枚切片を作製し, 染色用スライドガラスに載せる。動物腫瘍組織では, 腫瘍部面積が壊死部面積の倍以上になっているかを確認するために HE 染色を行う。
8. スライドガラスは保管用チューブに入れ密閉する。
※保管用チューブ: 50 mL のコニカルチューブにシリカゲルを適量入れ, キムワイプを 1 枚詰めたものである。シリカゲルにより, チューブ内部が乾燥状態に保たれ, 庫内から室温に戻した際に組織表面に結露が起きなくなる。
9. HE 染色し顕微鏡で腫瘍や病変部が切片内に含まれているか確認する。含まれていな

ければ、病変部が露出するまでトリミングを行う。

10. 測定用切片を作製する際には、測定用の連続切片3枚のうち1枚は、組織内薬物定量用に0.5 mL チューブに回収、1枚はインジウムスズ酸化物皮膜付きスライドガラス (ITO ガラス, 松浪ガラス) の中央部に横長で (MS の視野部が横長長方形のため) 載せる。残りの1枚は、レーザーマイクロダイセクション (オブション) と LC-MS/MS での確認用に 2 μm PEN フィルムスライドガラス (11505158, Leica) にのせる。また、オブションとして染色用の切片を1枚追加で作製し、通常の病理染色用スライドガラスに載せる。

ITO ガラス : ITO コートスライド (SI0100N) , 松浪硝子

病理染色用スライドガラス : PLATINUM PRO PRO-01, 松浪ガラス

11. 通常、上記3枚の連続切片を1セットとする。特に、臨床検体の測定では再現性チェックの観点から、3ないし4セット準備する。
12. LC-MS/MS のための前処理法については付属書にて説明。

【切片の HE 染色法】

※ 溶液や水中で震とうする必要は無い。

※ 括弧内の時間は、病理染色用スライドガラス上の組織の場合。

1. (測定後試料のみ) 室温のアセトンに5秒浸漬し、マトリックスを除去後5分間真空乾燥。
2. ヘマトキシリン溶液への浸漬 1.5分 (1分)
3. 水洗 1.5分 (表面に付着したヘマトキシリンを落とす感じで。この時点で、赤紫が青紫に変わる)
4. エオシン溶液への浸漬 3秒 (5秒)
5. 水洗 1.5分 (表面のエオシン溶液を十分落とすように水を2,3回換えながら洗浄)
6. 100%エタノール (1槽目) 1分
7. 100%エタノール (2槽目) 1分
8. 100%エタノール (3槽目) 1分
9. 100%キシレン (1槽目) 1分
10. 100%キシレン (2槽目) 1分
11. ソフトマウントにて染色切片を封入 (ソフトマウントの量が多すぎないように)
12. 室温で一晩置き、翌日顕微鏡撮影を行う。

(資料)

第3部 マトリックス蒸着法

文責：新聞秀一

2014年3月11日（初版）

2015年2月12日（2版）

無断転載や無断使用を禁ずる。

【準備】

- ・ 真空蒸着装置 (SVC-700TMSG, サンヨー電子)
- ・ マトリックス粉末 (99% α -CHCA, 476870-10G, シグマアルドリッチ)
- ・ マトリックス溶液 (α -CHCA, 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)
- ・ キャリブレーション用スポット (正イオン: 0.1% PEG 400, 負イオン: 0.1% PEG sulfate, キャリブレーションサンプルとマトリックス溶液を 1:1 で混合したもの)
- ・ マトリックススポット (ブランクスポット)

【試料の事前撮影】

マトリックス供給後は、組織が不鮮明になるため蒸着前に測定領域の写真を撮影しておく。撮影の際には対物レンズ倍率を 40 倍にし、焦点を合わせた後、所望の倍率に設定する。測定の際にはホワイトバランスを ON にし、色調を調整しておく。

【マトリックス蒸着法】

真空蒸着装置を用いて組織表面へマトリックス膜を形成する。

1. MS のホルダにセットしたスライドガラスを上部に設置する (蒸着面は下になることに注意)
2. 蒸着面を制限する窓の開き具合を調節する
3. 真空蒸着装置へマトリックス粉末をすり切りいっぱいにする (約 40 mg 程度だが、マトリックスポートが粉末で満たされるように表面を平らにする。少ないと蒸着の条件が変わるので注意する)
4. マトリックスポートにカバーをかぶせ、クリップで固定する。クリップがポート以外の部品に触れないように気をつける。
5. シャッターが閉まっていることを確認し、蒸着装置のカバーを載せる。
6. 真空引き開始 (5 分~10 分)

7. ヒーター電源が ON になったら、240°C に設定し昇温させる（ α -CHCA の場合）。
8. 240°C に達したら 250°C まで昇温（用いるマトリックスの融点に設定）。
9. 250°C に達した後、30 秒程度待つてシャッターを開け蒸着を開始する。
10. 8 分間蒸着し、終了後大気解放する。

蒸着条件は、マトリックスにより異なるため α -CHCA 以外を用いる場合は条件検討が必要である。なお、 α -CHCA の場合、マトリックスと試料表面距離は 8 cm とする。

参考文献

Shimma S. et al. J Mass Spectrom. 2013, 48, 1285-90.

【キャリブレーションスポットとブランクスポットの作製】

1. キャリブレーションサンプル：0.1% PEG400(正イオン)，0.1% PEG-sulphate(負イオン)とする。
2. キャリブレーションサンプルとマトリックスを 1:1 に混合する。
3. 組織外に混合溶液 0.1 μ L を 3 点作製し乾燥させる。

【キャリブレーション用スペクトルの取得】

1. 予めプレート上に載せておいたキャリブレーション用スポットを測定する。
2. 10×10 の領域をスポット内に作製する。
3. 正イオンではメソッドを“cal_pos”，負イオンでは“cal_neg”を読み込ませる。
4. スペクトルを取得し、定められた方法でキャリブレーション済みのチューニングファイルを作製する。
5. 作成したチューニングファイルを読み込み、キャリブレーション用スポットを半ピクセルずらして再測定する。
6. 再測定結果でキャリブレーションが成功（ずれが 1ppm 程度）していることを確認する。

【ブランクスポットでのスペクトル取得（任意）】

1. ブランクスポット内に 5×5 の測定領域を作製し、実際に測定を行う薬剤のメソッドを読み込ませ、バックグラウンドのスペクトルを取得しておく。

(資料)

第4部 マトリックス噴霧法

文責：新聞秀一

2014年3月11日（初版）

2015年2月12日（2版）

無断転載や無断使用を禁ずる。

【準備】

- ・ エアブラシ（プロコンボーイ PS-270, クレオス社）
- ・ コンプレッサー（クレオス社, 現在使用している機種は最大 0.12 MPa, 定格 0.1 MPa）
- ・ マトリックス粉末（ α -CHCA）
- ・ マトリックス溶液（ α -CHCA, 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）
- ・ 内部標準物質（マトリックス溶液への添加量はテスト組織で検討する）
- ・ ITO ガラスに載せた生体試料
- ・ 2%フッ素樹脂溶液（旭硝子製 CYTOP CTL-107MK, 7%溶液, 希釈液 AC6000）
- ・ micro90（実験器具洗浄用界面活性剤）

【エアブラシのフッ素コーティング法】

フッ素樹脂をなじませる工程を3回行い、その後、高温で焼く工程を1回行う。

1. 購入したエアブラシは全て分解し、10% micro90 にて 15 分間超音波洗浄を行う。水道蛇口からの熱湯で界面活性剤による洗浄を2回行う。
2. ニードルの先端が曲がらないよう、取り扱いには細心の注意を払う。
3. 洗浄後、お湯で部品をリンスし、お湯のみで 15 分間超音波洗浄を2回行う。
4. オープンで乾燥させ、乾燥後 O-リングとバネ以外を組み立てる。
5. 組み立てたエアブラシを 180°C のオープンにいれ加温し、2%フッ素樹脂溶液を 0.5mL 注ぐ。作業中はマスクをし、ドラフト内で行うこと。
6. この作業を3回程度繰り返すと、カップ内壁に白濁した膜が張る。
7. ニードルを抜き、ボディとニードルを分離した状態で、180°C オープンで 60 分間インキュベートし室温へ戻す。
8. “フッ素コーティング済みのエアブラシ” とする。
9. 1 回のフッ素コートでどれくらいの期間使用可能かは不明であるが、少なくとも2ヶ月程度は継続使用の経験有り。内壁の変色等が見られたら、再度コーティングを施すか、

エアブラシ自体を新品にするか判断すること。

【マトリックススプレー法】

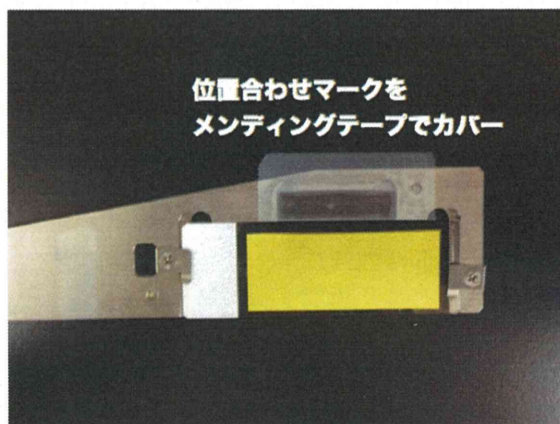
現在、自動噴霧機の試作を考えているので、実用化された後、本稿は改訂予定。

注1) 本プロトコルは蒸着済みの CHCA もしくはシナピン酸で実施可能である。DHB や 9AA では本プロトコルは使用不可（不成功）。

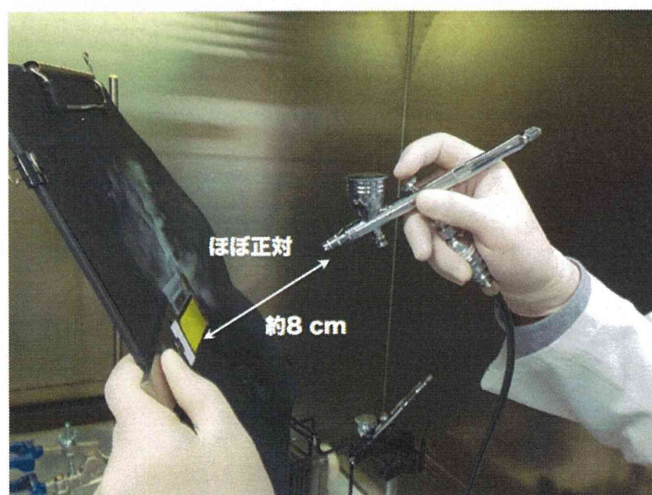
注2) 本プロトコルは試料サイズが小さい場合を想定している。

注3) 蒸着後のマトリックス噴霧では、最初のスプレーで成否が決まるので、そこを注意すれば再現性が得られる。

1. プレーートの準備



2. スプレー先端とサンプルの位置関係：以下に示す通り、サンプルとスプレー先端は正対させる。距離はおよそ 8 cm を保つ。



3. マトリックススプレーの調整：現在、流量はコントロールせず、コンプレッサーとエア

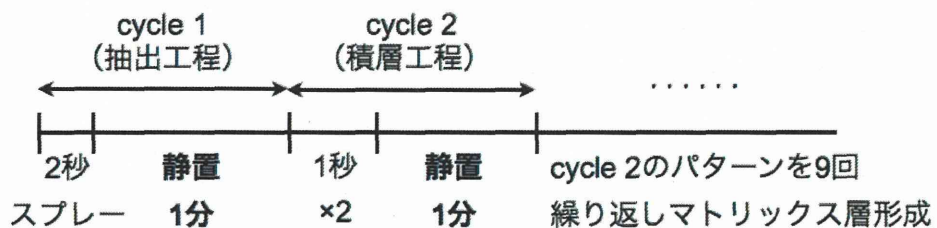
ブラシを1/8インチナットで直接つなぐ。

スプレーは強すぎても弱すぎても不可である。通常、以下に示す通り、上記距離で1.5秒間噴霧した際にプレート表面でのスプレー直径が8mm程度になるようにエアブラシを調整する。

※ およそ試料全体をスプレーが覆う程度なので、試料サイズによって距離とスプレー強度を変更する。我々が用いる試料は通常（縦×横）：5mm×5mm以下なのでこの条件で固定している。



- 調整後、マトリックス溶液を組織表面に噴霧する。初回のスプレーは抽出工程であるため2秒程度とする（全体を濡らし目にする。これにより組織から薬剤が抽出される）。1分程度大気雰囲気下に置き、乾燥させる。初回のスプレー塗布量が条件検討項目になる。
- 2回目以降はマトリックス積層工程であるため、パルス状にスプレー（1秒×2回）する。各サイクルスプレー後、大気中に1分間静置する。合計10回程度スプレーを繰り返す、完全に乾燥した時点で作業完了とする。



(資料)

第 5 部 試料測定法

文責：新聞秀一

2014 年 3 月 11 日（初版）

2015 年 2 月 12 日（2 版）

無断転載や無断使用を禁ずる。

本プロトコルは装置を扱うためのマニュアルではないため、装置の細かい操作法は割愛する。

【準備】

- ・ マトリックス噴霧済み試料スライドガラス

【試料導入】

1. 噴霧後の試料プレートを装置に導入し、予め撮影した画像を読み込む。
2. 位置合わせを行い、測定試料へ移動する。
3. 念のため 40 倍で焦点を合わせておく。

【試料の測定】

1. 組織上に測定領域を作製し、解像度を設定する。データ点数のオーバーフローにならないように、ソフトウェアを立ち上げた初回の測定では、小さな領域で解像度を設定したあと、所望の測定領域を設定する。
2. 大きな組織の場合、ピッチ 80 μm ~100 μm とする。針生検等の臨床検体では検体の大きさによって、ピッチ 20 μm ~40 μm で設定する。ただし、このパラメーターはあくまで目安である。
3. イメージングを行う薬剤のメソッドを読み込む。
4. ピクセル移動機能を用いて、45° ずらした領域を作製し、内部標準物質の測定メソッドを読み込む。
5. 測定開始（実際の測定時間は、矩形であれば機器が示す時間通りである。多角形であれば、機器が示す時間よりも短くなる）。

（注 1）ルーチン測定の場合、薬剤と内部標準物質のイメージングをセットで行うこと。

（注 2）まずは組織全体のイメージをとってから、興味ある領域を拡大して高解像度イメージングを行う方が良い。

(資料)

第 6 部 データ解析法

文責：新聞秀一

2015 年 2 月 12 日（初版）

無断転載や無断使用を禁ずる。

本データ解析法は、得られたイメージング生データを BioMap 形式に変換し、解析を行うためのマニュアルである。異なるソフトウェアを用いた場合には適用されない。

【準備】

- ・ データフォーマット変換済みデータ
(img ファイルもしくは imzML ファイルに変換すること)
- ・ 連続切片から得た薬剤量情報
- ・ (オプション) レーザーマイクロダイセクションで得た組織片に含まれる薬剤情報
- ・ BioMap
- ・ 薬剤推定量計算エクセルシート (calculation table.xlsx)

【画像濃淡の最大値計算】

4. データを BioMap に読み込み、ターゲットとなるピークの強度分布を表示する。
5. 得られた分布全体を矩形 ROI で囲み、統計情報を表示する。
6. ピークが得られなかったピクセル情報を除くために、"Exclude zero" にチェックを入れる。
7. エクセルシートを開き、"scale bar" タブを選択。連続切片から得られた薬剤量を入力し、BioMap の統計情報から、ピクセル数と平均強度を入力。
8. 濃淡の最大値となる薬剤量を入力 (数字は任意)
9. ここで計算されるピーク強度を画像の最大ピーク強度に設定すれば、薬物量を基準とした画像が得られる。 ※多検体の比較を行う際には、比較画像間で最大薬物量を統一する (スケールを合わせる)。

【IMS データからの薬物量推定】

1. 前項の薬物量、ピクセル数、平均強度の数値は"calculation" タブにも反映される。
2. calculation タブでは、任意の ROI に含まれるピクセル数、平均ピーク強度から推定薬物量を計算することが可能である。

- したがって、例えばレーザーマイクロダイセクションで切り出した領域とほぼ同じ領域の ROI を作成し、統計情報を抽出することで推定薬物量と LC-MS/MS で実際に計測した薬物量を比較することが可能である。
- 任意の部位で ROI を設定する場合、設定時の不定性があるため 3 回同じ部位でのサンプリングを行い、推定薬物量を求め平均したものを、その ROI での薬物推定量とする。

scale barタブ

Total weight of drug (pg/tissue)	(Note) From LC-MSMS data	
5085		連続切片内の薬物量
Total active pixel (BioMap)	Averaged intensity	
2459	197.8	切片全体の統計情報
Sum of Intensity	486390.2	
Desired maximum weight (pg)		スケールバー最大薬物量
5		
Maximum intensity in the scale bar	478.2597837	

calculationタブ

Total weight of drug (pg/tissue)	(Note) From LC-MSMS data		
5085			
Total active pixel (BioMap)	Averaged intensity		scale barタブと連動
2459	197.8		
Sum of Intensity	486390.2		
Resolution (um)	# of pixel in ROI		設定ROI面積計算
60	118		
Area in ROI (um ²)	424800 (Note) Only for check		
# of pixel wo null	Average intensity in ROI		ROI統計情報入力と推定薬物量
113	160.25		
	Weight of Drug in ROI (pg)	Estimated using MSI data	
	189.3139526		

(資料)

付属書 LC-MS/MS による組織内薬物定量前処理法

文責：新聞秀一

2015年2月24日（初版）

無断転載や無断使用を禁ずる。

本付属書は、連続切片もしくはレーザーマイクロダイセクション（LMD）により採取した組織片における定量試料前処理方法を説明する。

【準備】

- ・ 採取済み連続切片もしくはLMD組織片
- ・ 内部標準物質（原則、安定同位体標識体とする）
- ・ 固相抽出プレート（Oasis HLB 96穴プレート，粒子径 30 μm，30 mg solvent；Waters社）
- ・ フィルタープレート（MultiScreen Solvinert，0.45 μm，ミリポア）
- ・ 抽出溶媒（終濃度：30%アセトニトリル，10%イソプロパノール，0.1%ギ酸）

【薬剤抽出】

10. 抽出溶媒を 30 μL 添加し，ボルテックスミキサーで1分間攪拌する。
11. 攪拌後，4℃，12000gにて10分間遠心し，上清 20 μL を回収する。
12. 上清 20 μL に内部標準試料を 20 μL，2%リン酸 500 μL 添加し試料溶液とする。
13. 試料溶液に対し固相抽出を行う。固相抽出の作業中はサンプルを4℃に保つ。固相抽出の工程は以下の通りである。
 - (ア) コンディショニング：500 μL メタノール（220g 1分）
 - (イ) 平衡化：500 μL 水（220g 1分）
 - (ウ) サンプルローディング：3で調整した試料溶液全量（220g 3分）
 - (エ) 洗浄：500 μL 5%メタノール（500g 3分）
 - (オ) 溶出：150 μL 0.1%ギ酸含有メタノール（500g 3分）
 - (カ) ろ過：Multiscreen Solvinert を用いて 500g 5分
 - (キ) 希釈：150 μL ギ酸（この時点で全量は 300 μL になる）
14. 20 μL の精製試料を LC-MS/MS にて定量。インジェクション量は試料による。
15. 得られた濃度から，試料中に含まれる薬物量を計算する。

III. 学会等発表実績
該当事項無し.

