

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業
(英語) Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices

研究開発課題名： (日本語) 医薬品を対象とした高精度定量イメージング質量分析法に関する研究
(英語) Development of highly accurate quantitative imaging mass spectrometry
for drug visualization

研究開発担当者 (日本語) 大学院工学研究科 准教授 新聞 秀一

所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, Osaka University. Associate Professor.
Shuichi Shimma

実施期間： 平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 質量分析を用いた手法の構築と SOP の提案

開発課題名： (英語) Development of methodology and standard operation procedure for
quantitative imaging mass spectrometry.

研究開発分担者 (日本語) 大学院工学研究科 准教授 新聞 秀一

所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Engineering, Osaka University. Associate Professor.
Shuichi Shimma

II. 成果の概要（総括研究報告）

【和文報告】

本研究テーマでは、医薬品を対象とした高精度定量イメージング質量分析法の確立において、試料前処理時のパラメーターの検討および定量精度検討用モデル試料の作製とそのモデル試料を用いた定量精度の検討を軸として研究を進めてきた。

本年度は、「定量精度の評価」、「日内および日間変動の評価」、「SOP の作成」という3つのテーマで研究を進めた。定量精度の評価と日間・日内変動の評価は平成 27 年度に確立した模擬組織を作製し検討を行った。この模擬組織は、実験動物から採取した凍結ブロックの臓器をマルチビーズショッカーにて粉碎する。粉碎の前に濃度の異なる標準品をスパイクすることで粉碎後均一になった臓器粉末を得ることができる。得られた粉末状の凍結臓器を型に充填し溶解後、再凍結により得られた試料内に均一に標準品が分布した試料を得ることができる。このように、対象となる医薬品が濃度既知で均一に分布した組織であり、様々な評価を行うにあたり実試料を用いるより適している。得られた模擬組織から抽出方法の評価、および測定の実験性を評価したところ、抽出方法が異なっても同様のイオン強度が得られることがわかり、14枚の連続切片を用いた実験においてもほぼ一定のイオン強度を得ることができた。これより、本手法は定量精度評価を行うにあたり、非常に再現性の高い試料であると言える。また、この実験により日内変動は非常に少ないことも確認された。続いて、本模擬試料を用いて1ヶ月間の日間変動の評価も行った。その結果、保管2日目の結果で10%程度CV値に差が見られたが、それ以外の日では28日目までほぼ一定の傾向を示すことがわかった。本研究により、1ヶ月以内では経時変化が見られないことを示すことができた。その評価に模擬試料が有益であると示すことができた。

定量精度評価については、レーザーマイクロダイセクション（LMD法）による回収組織からLC-MS/MSによる定量結果とイメージング質量分析から得られる薬物濃度推定値を比較することを行っていた。この際、LMD法ではレーザー照射による断端の状態により定量結果がずれる傾向があった。この傾向は一定の傾向を示したため系統的な誤差と解釈できるため、数理的なアプローチで再検討を行った。その結果、本研究で提案した連続切片を用いた濃度推定手法は非常に精度が高いことを示すことができた。本研究で用いている装置はイオントラップを搭載した質量分析計であるため、定量のダイナミックレンジは一般的に用いられる四重極型質量分析計と比較して2.5桁程度である。しかし、この範囲であれば濃度推定を行うことは妥当であると示した。

一連の手法についてSOP作成も開始した。SOP作成においては、本手法論文の出版を一つの評価として設定した。定量手法に関する論文が和文誌に掲載された一方、英文誌にはH28年度中に論文出版が完了しなかったため、現在も継続して論文修正に努めているところである。なお、定量的イメージング質量分析法については本研究終了後も製薬企業との共同研究を通じて継続することになっている。

【英文報告】

In this research, there are three main topics (1) sample preparation methodology, (2) model specimen production for quantitative evaluation, and (3) evaluation of accuracy in quantitative imaging mass spectrometry (q-IMS) using model tissues.

In FY2016, two evaluations in “accuracy of quantification” and “intra- and inter-day variation” were conducted, and standard operation procedure (SOP) was ongoing. Intra- and inter-day evaluation was performed using model tissues established in FY2015. The model tissues contained target molecules spiked standard samples homogeneously inside the tissues, therefore it was feasible for evaluation of methodological qualities in different parameters. The homogeneity was confirmed using 14 consecutive tissues as intra-day evaluation. On the other hand, the tissue provided equivalent target peak intensities within 10% CV in a month as inter-day evaluation. For the evaluation of accuracy of quantification, comparison of estimated concentration using imaging MS results with experimental values in LC-MS/MS using laser micro-dissected tissues. However, the edge condition due to the laser irradiation in the dissected tissues provided systematic errors in the concentration. Therefore, mathematical approach was introduced. According to this approach, the proposed methodology provided high accuracy. Since the instrument used in this research was a tandem mass spectrometer in combination with ion trap and time-of-flight. The dynamic range in quantification was 2.5 orders of magnitude. This dynamic range was rather narrow compared with quadrupole mass spectrometers generally used in drug quantification. However in tissue analysis, 2.5 orders of magnitude was feasible for drug estimation *in situ*.

For SOP establishment, one research paper was published in Japanese, however another paper was not able to publish in English journal. Therefore it was still under preparation. Except for publications, the discussion of q-IMS will continue as a collaboration work with pharmaceutical companies.

活動総括概要

平成 27 年度は、マトリックス噴霧条件の検討を行い、当初の予想通り初回のマトリックス溶液噴霧が得られるデータに非常に大きな影響を与えることを示した。定量精度を保証するためには、評価用の試料が必須となるがマウス肝臓など解剖学的に比較的均質であると考えられる臓器においても薬物濃度は均質ではない。したがって評価用試料としては不十分であると考え、本試験用に用いる模擬組織の開発を行った。この模擬組織は、薬物を投与していない野生型の凍結マウス肝臓や脳組織を購入し、凍結組織を粉碎後に得られるホモジネートに医薬品標準品を添加し、既知濃度の医薬品を含むホモジネートを作製したものである。ここで得られたホモジネートを再凍結することで、既知濃度の医薬品が均一に分布したモデル試料を作製する手法を完成させた。また、本研究では、肝臓ホモジネートと脳ホモジネートを作製し、上記手法で既知濃度のエルロチニブを含むモデル試料を作製し、検量線の精度の評価も行った。本研究より、臓器によるマトリックス効果の違いが顕著に見られ、定量を行う際は臓器ごとにホモジネートを準備し検量線を準備する必要があることが示された。

平成 28 年度は、「定量精度の評価」、「日内および日間変動の評価」、「SOP の作成」という 3 つのテーマで研究計画を立てた。定量精度の評価と日間・日内変動の評価は模擬組織を準備し検討を行った。得られた模擬組織から抽出方法の評価および測定の実現性を評価したところ、抽出方法が異なっても同様のイオン強度が得られることがわかった。これより、本手法は定量精度評価を行うにあたり、非常に再現性の高い試料であると改めて示すことができた。本模擬試料を用いて 1 ヶ月に渡る日内変動を評価したところ、保管 2 日目で 10% のズレが見られたが、1 ヶ月以内では経時変化が見られないことを示すことができた。定量精度評価については、数理的なアプローチで検討を行い、本研究で行っている連続切片を用いた濃度推定手法は非常に精度が高いことを示すことができた。SOP 作成について、本手法論文の出版を一つの評価として設定していた。定量手法に関する論文が和文誌に掲載された一方、英文誌には H28 年度中に論文を出版することができなかった。したがって現在も継続して論文修正に努めているところである。また、本研究を進めたことにより、手法標準化について製薬メーカーと共同研究により、H29 年度以降も議論を継続していく予定である。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 0 件）

1. 新聞秀一, 竹尾映美, 福崎英一郎. イメージング質量分析における定量手法. 分析化学. 2016, 65, 745-750.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. イメージング質量分析の医療への貢献, 口頭 (招待講演), 新聞秀一, 第 76 回分析化学討論会 (岐阜), 2016/5/28-29, 国内.
2. Seeing is believing -Nobel approach to in-situ analysis using Mass Microscope-, oral(invited), Shuichi Shimma, Osaka University x Shimadzu Workshop (Jakarta), 2016/8/10, 国外.
3. 質量顕微鏡で薬物動態を「みる」!, 口頭 (招待講演), 新聞秀一, 京都バイオ計測センターシンポジウム (京都), 2016/8/2, 国内.
4. Quantitative imaging mass spectrometry (q-IMS) of tyrosine kinase inhibitor in mouse tissues, poster, Shuichi Shimma, International Mass Spectrometry Conference 2016 (Toronto), 2016/8/20-26, 国外.
5. 見えないものを「みる」! 質量顕微鏡の開発とその応用, 口頭 (招待講演), 新聞秀一, SIMS 研究会 8 (東京), 2016/8/29, 国内.
6. 組織内薬物分布可視化のためのイメージング質量分析 -試料前処理法と定量法の工夫-, 口頭 (招待講演), 新聞秀一, 第 29 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (京都), 2016/9/2-3, 国内.
7. イメージング質量顕微鏡によるマルチモーダルイメージング, 口頭 (招待講演), 新聞秀一, 第 89 回日本生化学会シンポジウム「プロテオーム大規模解析が切り開く新たな生化学研究」(仙台), 2016/9/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし