

Technical Report

ドラッグイメージングにおける標準サンプルの分析 —SUSプレートでのドライドロップレット分析—

Standard sample analysis for Drug imaging.
— Dried droplet Method on SUS Plate —

古田 大¹、緒方 是嗣¹

Abstract:

大気圧MALDI法によるMSイメージングでは、期待されるアプリケーションのひとつにドラッグイメージングがあります。薬物の体内動態観察を、蛍光や同位体によるラベル化無しで実現できるMSイメージングは、DDS（ドラッグデリバリーシステム）や薬物の安全性評価などの分野で非常に興味をもたれています。薬物をできるだけ高い感度で検出するためにはマトリックスの選択が重要になります。

本レポートでは、ドラッグイメージングの分析フローを紹介するとともに、目的薬物のイオン化に最適なマトリックスの選択方法であるSUSプレートでのドライドロップレット分析の方法について報告します。

Keywords: MSイメージング、ドラッグイメージング、SUSプレート、ドライドロップレット

1. MSイメージングにおける ドラッグイメージングの期待

創薬の現場において、薬物動態の研究は欠かすことのできない工程です。従来は、臓器全体から目的物質を抽出し、LC-MSMSなどを使って、その量や性質を調べたり、ラジオアイソトープ (RI) による薬物のラベル化を行ってその局在を調べたりするのが一般的です。しかしながら、それぞれに問題を抱えており、LC-MSMSでは、その臓器の一部に少量しか存在しないケースなどで臓器内の局在を調べることができなかつたり、検出感度が足りないことがありました。薬剤をRIラベル化する場合にも、その合成コストや専用施設の問題、またRIラベル化する位置により、代謝された化合物の動態を確認できないなど、ドラッグイメージングに対する新たな解析技術への期待が高まっています。

大気圧MALDI法によるMSイメージングは、薬剤をラベル化することなしに検出することができ、かつ複数の代謝物も同時に見ることができる点で従来のイメージング法にない新しい技術として注目されています。またこのMSイメージングによって臓器内での局在を明らかにすることができ、その増減もシグナル強度やイメージング像全体におけるシグナル分布の密度などから推定ができるという点で、半定量という観点からもドラッグイメージングとしての有用性が期待されます。

2. MSイメージングの実践における問題点

このMSイメージングによるドラッグイメージングは、イメージング質量顕微鏡*iMScope TRIIO*により実現できます。この装置は、光学顕微鏡とMSイメージング技術を融合した、新しいコンセプトのイメージング専用装置です。本稿では、まだドラッグイメージングを行ったことのない・これからやってみみたい方を対象に、ワークフロー (Fig. 1) の8つの各ステップにおいて、注意すべき点を実際の分析結果を参照しながらご紹介します。本稿で紹介する結果は既に論文として国立がん研究センターから発表されたもの⁽¹⁾ですが、この結果を得るために必要なデータ取得のコツをまとめています。ステップ①～③は、標準サンプルをMALDI MSによって、分析する工程になります。ステップ④～⑦は、組織切片を使ってイメージングMSで分析する工程で、特に⑤⑦は先に紹介した*iMScope TRIIO*、⑥はオプション装置である*iMLayer*を使って行います。⑧は必要に応じて組織染色などを行う工程になります。

良くコントロールされた実験系を組むことができれば、Fig. 2のように、薬剤投与後に時間をおいて異なる個体から抽出したがん部 (マウス皮下移植癌) を対象に、量的な変化を観察することができるイメージング像を得ることができます。

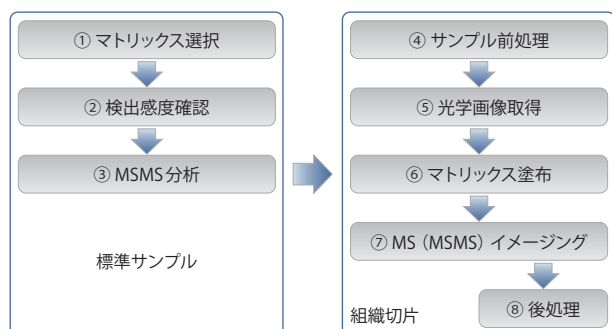


Fig. 1 ワークフロー

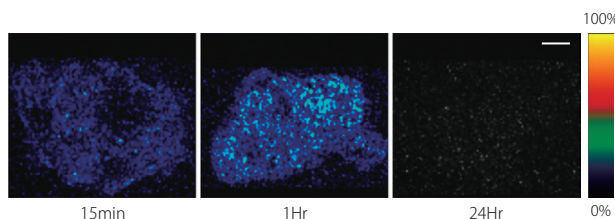


Fig. 2 抗がん剤バクリタキセルを投与したマウスのがん組織におけるドラッグイメージング (Bar: 1mm)

3. 各工程におけるキーファクタ

3-1. 標準サンプルを使った 検討ステップ ①～③

3-1-1. マトリックス選択

本工程は、ドラッグイメージングを行う際に最も重要な工程になるかもしれません。生体サンプルの内在性物質については、他の文献を参考にすることで適当なマトリックスを選択することができます。しかしながら、薬剤の場合、多くは新規の化合物であり、そのイオン化に適したマトリックスについては、複数試した結果から選択することが必要になります。ここでは、導電性の良いステンレスプレート上に、マトリックス溶液（エタノール）と混合した薬剤を載せる（ドライドロップレット）(Fig. 3) 方法を紹介します。DHB、CHCA、9-AAの3種類のマトリックスを用いたドライドロップレットを分析することで、検出感度を比較しました。この検討には、SUSプレート上に分注位置のマーク（18×6ウェル分）をつけたエッチング有SUSプレート（Fig. 4）が、有効です。このプレートを使用することで分注位置とサンプル情報を簡単に紐付けることが可能になります。新規マトリックスについては、近年数多くの報告がなされており、これらの中に適したものがあるかもしれません。SUSプレートは、分注できる場所がなくなるまで、繰り返し使用できますので、以降の感度確認やMSMS分析などにも使用できます。

パクリタキセル（PTX）は、3種のマトリックスで比較した結果、2,5-ジヒドロキシ安息香酸（DHB）で最もイオン化効率が高いことが確認されましたので、以降の実験はDHBを使用して行いました。

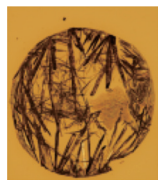


Fig. 3 ドライドロップレット（DHB）



Fig. 4 エッチング有SUSプレート

3-1-2. 検出感度確認

マトリックスを選択した後で、その薬剤がどの程度の濃度まで検出できるか確認します。ここで確認された濃度の薬剤が生体サンプル上でそのまま検出できるわけではありませんが、他の薬剤との比較は可能です。ここでは100fmol/spotから100pmol/spotまで希釈したパクリタキセルをDHBと混合し、SUSプレート上にドライドロップレットを形成したものをサンプルとしました。

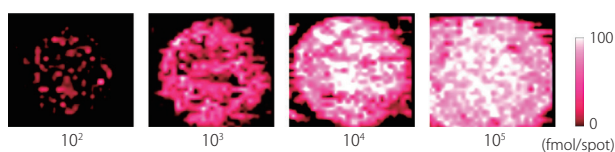
生体サンプルのドラッグイメージングでは、ナトリウム（Na）やカリウム（K）の付加体で薬剤が検出されることが多く、事前の予備的なイメージング試験でも、K付加体 [M+K] m/z 892.3が優位に高く検出されることが確認されていたので、各濃度に調整した標準溶液を含む、10mg DHB in 50%アセトニトリル、0.05% TFA、2mM 酢酸カリウム、1 μ LをSUSプレート上で混合して、ドライドロップレットサンプルを作製しました。

各スポットに対し、スポット全体をカバーするように30×30ポイント（計900ポイント）を測定し、パクリタキセル（[M+K] m/z 892.3）のシグナル強度をイメージング（Fig. 5A）しました。イメージングの結果から、1pmol/spotまでは各ピクセルでよく検出されている様子が観察されています。

各濃度のドロップレットを同条件で測定し、各ドロップレットごとに積算した m/z 892.3のシグナル強度の平均をプロットしました（Fig. 5B）。濃度の上昇に従い、シグナル強度が上がっていることが確認できます。

この結果には、DHBなど他の要素由来のシグナルがベースラインとして残っていることが予想されます。ここでは示していませんが、マトリックスのみのドロップレット測定による、ベースラインの引き算などにより、検出感度がより明確にできる場合があります。実際のドラッグイメージングの際には、このドライドロップレットの分析とは異なり、導電性の低いスライドガラス上にある生体サンプル中の薬物を検出するので、30×30ポイントの分析でシグナルが観察されない濃度の薬物を検出することは難しいと考えられます。

A



B

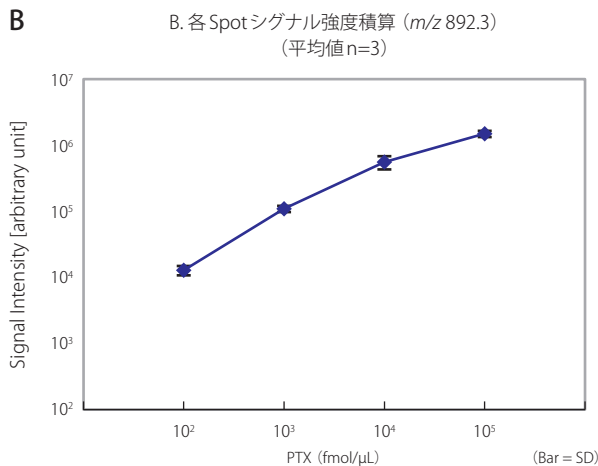


Fig. 5 検出感度確認

3-1-3. MSMS 分析

生体に投与された薬物の分析では、投与サンプルと未投与サンプルを複数点分析し、Imaging MS Solutionのデータ編集とROI解析を使って解析することで、両試験群での比較により薬剤由来のピークを見つけることができます⁽²⁾。しかしながら、事前の検討で選択したピークの近傍に存在する生体由来成分、もしくはマトリックスと生体成分の混合物の影響により、必ずしも薬剤のみをイメージングすることが難しい場合もあります。特に低濃度の薬剤を検出する際には、検出感度のみならず、高いS/Nが必要となります。このため、しばしばMSMS分析によって、薬剤のみを選択的にイメージングすることが行われます。これにより、薬物由来のピークを選択的に抽出し、ノイズ成分の少ないきれいなイメージ像を得ることができます。

このため、生体サンプルのイメージングの前に、先ほどのドライドロップレットサンプルと薬剤を含んだ生体サンプルを使った標的分子に対し、それぞれをプリカーサイオンとしたMSMS分析を行います。そこで得られるマススペクトルから、MSMSイメージングに用いるピークを選択する、事前検討を行うことを推奨します。

パクリタキセルのカリウム付加体と予想される ($[M+K]^+$ m/z 892.3) のピークをプリカーサイオンとして、MSMS分析を行いました (Fig. 6A)。

MSMSのピークパターンは、機種やコリジョンエネルギー、衝突時間などによって大きく異なります。このため、DBに登録されている他の装置でのピークリストを使うことはできません。MassBank (<http://massbank.jp/index.html?lang=en>) などのDBでMSMSのDB検索を行う場合には、LC-ESI-ITTOFなどを選択してMSMS DBを使う必要があります。

しかしながら、実際にはiMScope TRIOで分析する場合、大気圧MALDIによるイオン化とIT-TOF MSによる検出になるため、標準品との比較により、標的物質由来であることを特定することが一般的です。PTX投与後30分後にがん部を摘出したマウスサンプルで、 m/z 892.3をプリカーサイオンとしてMSMS分析を行った結果 (Fig. 6B)、標準品とのMSMS分析で検出された、 m/z 607.19のピークが、組織上からも検出され、かつ近傍のピークとの分離も良いことが確認されました。

組織上のMSMS分析で、標準品では検出されない複数のピークが多く検出されたことから、今回イメージングに用いた、 m/z 892.3の近傍に多くの生体由来、もしくはマトリックスと結合した生体物質 (いわゆるノイズ成分) が存在していることが示唆されました。

ここでは示しません、薬剤投与マウスに加え未投与マウスを使ったMSMSイメージングにより、局所的な数点の強いシグナルや、組織外に存在するシグナルを検出しました。そのため、 m/z 892.3のシグナルががん部全体に存在している結果 (Fig. 2) が妥当であるかを確認するため、さきほどのMSMS分析から選択された m/z 892.3→607.19でのイメージング (Fig. 7) を行ったところ、当該ピークは m/z 892.3と同様にがん全体へのシグナル分布パターンを示しました。このことから、この m/z 607.19と m/z 892.3のピークのいずれを用いても薬剤の分布を示していることは間違いないと判断しました。

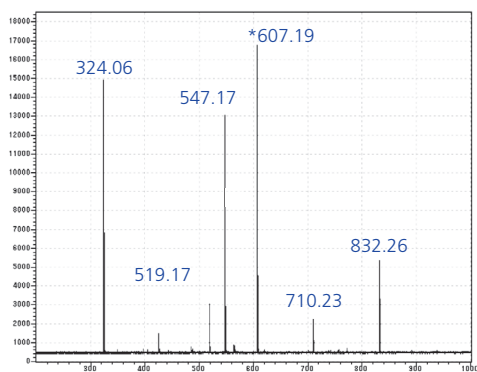


Fig. 6A MSMSスペクトル 標準品 (SUSプレート上)

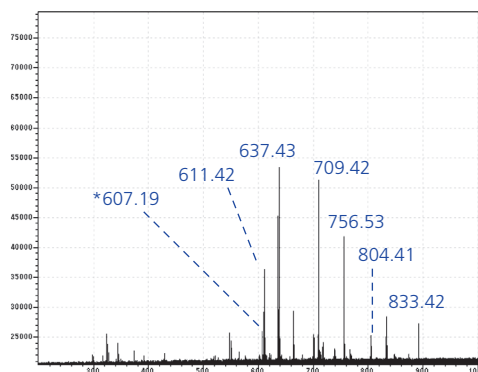


Fig. 6B MSMSスペクトル PTX投与組織

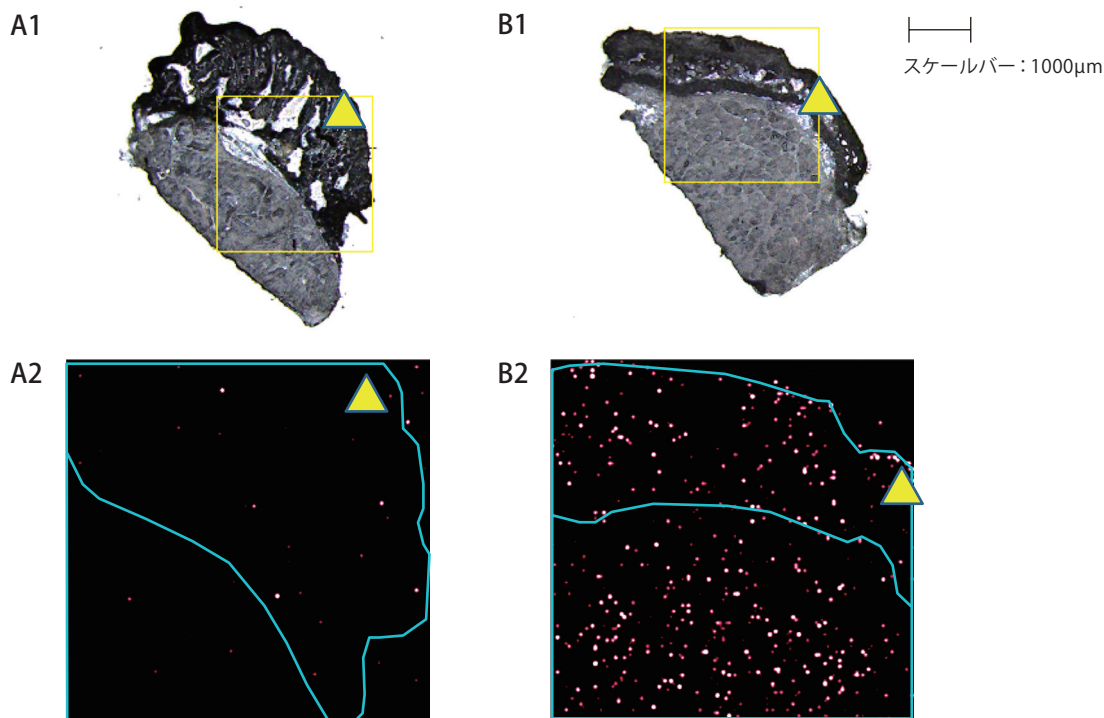


Fig. 7 MSMSイメージング 上段:光学画像 分析領域 下段: m/z 892.3 > 607.19 MSMSイメージング
A: コントロール未投与 B: PTX 50mg/kg投与後30分
下段 実線は組織の境界を示す △壊死部

3-2. 組織切片を使ったイメージング実験のステップ④～⑦

3-2-1. サンプル前処理

MSイメージングのための組織切片標本は凍結させた組織をクリオスタットで薄切し、導電性の高いスライドガラス (ITOガラス) に載せたものになります。サンプルはできるだけ凍結した組織をそのまま薄切します。やむを得ず、包埋剤を使用する場合には、測定 m/z レンジにノイズを生じる Optimal Cutting Temperature (OCT) 化合物などの樹脂系包埋剤を使わずに、2% carboxymethyl cellulose (CMC) の使用を推奨します。切片の厚さは $10\mu\text{m}$ ($\pm 5\mu\text{m}$) に、一般にサンプルは薄いほど高感度の分析が期待できますが、薄すぎるとレーザーの繰り返し照射中に、組織がなくなってしまうなど、ターゲット分子の総量が少なくなる問題が発生します。切片作製後はすみやかに -80°C で保存してください。切片を載せる前に、ITOガラスの導電面を確認してください。比較試験の場合には、対象区の検体を同一のスライドガラス上に載せるなどして、分析のばらつきを最小限にする工夫が必要です。

3-2-2. iMScope TRIOでの分析1⑤～⑥

組織切片を搭載したITOガラスをサンプルホルダにセットします (Fig. 8)。この時に表裏を正しくセットしてください。あとは、iMScope TRIOのマニュアルに従って、切片の写真を撮ります (⑤)。この写真を撮る前に、最大倍率 (40倍) にセットしてピントを正確に合わせてください。レーザーはサンプルに対して斜めに照射されます。そのため、高さが正しくセットされていないと、設定した場所を正確に分析することができません。また、直接分析結果には影響しませんが、光学画像を撮る際には、あとで m/z イメージ像と重ね合わせることを考え、ホワイトバランスや画像の明るさなどを調整しておくときれいな重ね合わせイメージを取得することができます。

光学画像を撮り終えたら、一度取り外してマトリクス塗布を行います (⑥)。自動の蒸着装置 (iMLayer) が有効です。マトリクス塗布後は、先ほど取得した光学画像を使って、分析領域を設定します。サンプルホルダにあるふたつの目印を参照し、位置決めをしますので、サンプルホルダにセットしたスライドガラスが動かないように、取り扱いに注意してください。



Fig. 8 サンプルホルダへのスライドガラスのセット

iMScope TRIOは、医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。治療診断目的にはご使用になれません。研究用途のみ使用可能です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

3-2-3. iMScope TRIOでの分析2⑦

マトリクスを塗布したサンプルホルダを装置に戻します。ウィザードに従い、位置決めマークを装置に認識させ、先ほど取得した光学画像を呼び出せば、マトリクス塗布前の組織切片の画像をもとに分析領域を設定できます。こちらについても詳細はマニュアルを参照ください。ソフトの画面上に「撮影位置に移動」のボタンがあります。マトリクス塗布後のサンプルの状態を確認することができます。マトリクス塗布の状態は、分析結果に大きく影響するため、塗布後の写真を撮っておくことで分析手法を評価することができるかもしれません。マトリクス塗布後に顕微鏡観察することで、マトリクス層の均一性やスライドガラスのずれなどを確認できます。

マトリクス塗布の状態とサンプルの種類によって、最適なレーザー強度など大きく変わります。イメージングに使用しない領域を撮像し、その画像上で「レーザーの試し撃ち」を行い、最適な条件検討を行ってください。スライドガラスごとに実施することを強く推奨します。方法については、マニュアルを参照ください。

またこれらの実験では、最初からイメージングを行うのではなく、例えば 20×20 ポイントほどのデータ取得を投与群と非投与群と比較試験を行い、薬剤のイメージングができそうかどうか、確認したほうが良いでしょう。その場合には、データ編集とROI比較の機能が有効です。検出感度により、分析する m/z レンジを狭めたり、ターゲットの m/z のみを分析する Single ion monitoring (SIM) などで感度アップを図ることもできます。また、非常に微小な領域のイメージングを行うのであれば、レーザー径を少し大きくして検出感度を上げるなどの検討を行ってください。

レーザー径、エネルギー強度、 m/z 範囲などを調整して、分析条件を決定したら、いよいよイメージングです。必要に応じて、投与群と非投与群、各最大 250×250 ポイントの分析をセットしてください。翌朝、標的の薬剤のイメージング像 (例 Fig. 2) が得られているはずです。

4. おわりに

今回のように、先に3種のマトリクスをドライドロップレットで検討し、いずれかでイオン化したとしても、iMLayerなどを使用した蒸着法では検出できない場合があります。蒸着でマトリクスを塗布する際に溶媒を含んでいないため、溶出の効果がないことが影響していると考えられます。この場合のひとつの解決策として、マトリクスを蒸着後、さらにマトリクス溶液や溶媒を重層噴霧して再結晶化を図ることで感度を向上させる方法が知られています (3)。

MSイメージングによるドラッグイメージングは、従来法では得られなかった、薬剤の分布や代謝の情報を同時に得られるという点で大きなアドバンテージを持っています。イメージング質量顕微鏡 iMScope TRIO と全自動蒸着装置 iMLayer により、この新しいイメージング技術を実現します。

謝辞

本データの取得にあたり、国立がん研究センター東病院臨床開発センター 松村保広先生、安永正浩先生には、多大なご指導およびご協力をいただきました。

参考文献

- 1) *Scientific Reports*, 3, 3050 (2013)
- 2) 島津評論, 70, 99-108 (2014)
- 3) *J. Mass. Spectrom.*, 48, 1285-1290 (2013)

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2014年8月
© Shimadzu Corporation, 2014