

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710271

研究課題名（和文） 投影型イメージング質量分析による薬物動態高速測定技術の開発

 研究課題名（英文） Development of high-throughput measurement techniques
of pharmacokinetics using stigmatic imaging mass spectrometry

研究代表者

間 久直 (HAZAMA HISANAO)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70437375

研究成果の概要（和文）：マトリックス支援レーザー脱離イオン化を用いた投影型イメージング質量分析で薬物動態を高スループットで測定するための技術開発を行った。薬物のイオン化条件の最適化、および試料を高真空中で移動させるための試料移動機構の製作を行った。イオン化条件の検討結果、および本研究で改良を加えたイメージング質量分析装置を用いて、薬物を投与したマウスの脳内における薬物の分布を測定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Technical developments were performed for high-throughput measurement of pharmacokinetics using stigmatic imaging mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization. Optimum ionization conditions for the drug were investigated, and a sample translation device operating under high vacuum was developed. The spatial distribution of the drug in a brain of a mouse was successfully observed by using the investigated ionization conditions and the improved mass spectrometer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：分子イメージング、薬物動態、イメージング質量分析、投影型、マトリックス支援レーザー脱離イオン化

1. 研究開始当初の背景

医薬品業界では主力医薬品の特許が 2010 年前後に一斉に失効することに伴い、同じ成分で価格が安い後発医薬品（ジェネリック医薬品）にシェアを奪われる「2010 年問題」が経営に深刻な影響を及ぼし始めている。このため、製薬企業にとっては画期的な新規医薬品をより短期間に低コストで開発することが急務となっている。また、より長期的にみれば医薬品開発のコストや期間を減らすことは患者数の少ない希少疾患の治療薬や個人の体質に合わせたテーラーメイド医薬品を開発できる可能性にもつながる。

医薬品の開発において欠かせないものの一つに薬物動態の評価が挙げられる。これは、

薬物を生体内に投与した後の吸収、分布、代謝、排泄の過程を調べるものであり、医薬品の安全性・有効性を評価する上で最も重要な過程の一つである。一般に、薬物動態の評価には¹⁴C などの放射性同位体で標識した薬劑候補化合物をラットなどの動物に投与し、その動物から採取した組織切片の内部における標識化合物の分布を放射線写真法（オートラジオグラフィ）で撮影する手法が用いられている。しかし、放射性同位体による標識化合物の合成には多額の費用や時間を要するため、非常に限られた化合物のみにしか適用できず、放射性同位体による標識を行うこと自体が困難な化合物もある。さらに、放射線写真の撮影には最低でも一日を要するこ

とや、放射線写真法では薬剤分子そのもの（未変化体）と薬剤分子の代謝産物（変化体）とを区別できないことなどが問題となっている。

一方で、近年、質量分析を用いて質量毎に分離した様々な物質の空間分布を同時に測定するイメージング質量分析（imaging mass spectrometry; IMS）が様々な分野で注目を集めている。質量分析とは、試料をイオン化させ、そのイオンを真空中で飛行あるいは運動させ、電場や磁場を用いてその質量 m と電荷数 z の比 m/z に応じて分離し、測定した質量に関する情報から原子・分子の同定や構造解析を行う手法である。標的分子の標識を必要とせず、極微量の物質でも検出できることに加えて、薬剤の未変化体と変化体とを容易に識別できるという利点がある。タンパク質などの生体分子や薬剤分子の分析で現在最も広く使用されているイオン化法はマトリックス支援レーザー脱離イオン化（matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI）法である。また、質量分離法にはイオンの損失が少ないために検出感度が高い飛行時間型質量分析計（time-of-flight mass spectrometer; TOFMS）を用いることが多い。通常の IMS は走査型 IMS と呼ばれ、厚さ 10 μm 程度の組織切片上にレーザーを集光し、ある点のみをイオン化させ、質量スペクトルを測定する。一定の間隔でレーザーの集光点を移動させて各点における質量スペクトルを順次測定していき、試料全面から得られた質量スペクトルを統合して各 m/z におけるイオン信号強度の分布を画像化する。これは、IMS が広く利用されるようになる前から用いられていた装置をほぼそのまま使用できるためであり、現在では市販の装置も販売されている。しかし、走査型 IMS では膨大な点数を走査する必要があるため、測定に数～数十時間という非常に長い時間を要するという問題がある。

そこで、研究代表者らは試料全面に均一な強度分布のレーザーを照射して試料全面をイオン化させ、生成したイオンの空間分布を静電イオンレンズによって拡大し、イオンの位置と飛行時間の両者を同時に測定し得る検出器に投影する投影型 IMS 装置の開発を行ってきた。投影型 IMS の利点は、走査型 IMS と比べて短時間での測定が可能であること、および高い空間分解能を得られることである。投影型 IMS は走査型 IMS と比べると実用化のための開発課題が多いため、世界的にも投影型 IMS 装置の開発を行っているのは数グループのみであり、極めて新規性、独創性の高い手法であると言える。そして、研究代表者らはこれまでに走査型 IMS よりも高い空間分解能（ $\sim 1 \mu\text{m}$ ）での測定を可能とする装置の開発に成功した。

2. 研究の目的

本研究の目的は研究代表者らが開発した投影型 IMS 装置を用いて薬物動態の測定を行うための手法を確立するとともに、投影型 IMS の実用化に必要な技術的課題を解決することである。具体的な目標として以下の 4 点を挙げた。

- (1) 生体内の薬剤濃度が組織 1 g あたり 10 ng でも検出可能な感度の実現
- (2) 試料の移動、および画像の取得の自動制御化による測定の高速度・省力化
- (3) 試料の交換を短時間（数分以内）で行うための試料導入機構の設計・製作
- (4) イオン光学系の拡大倍率を電圧制御のみで変更できるズーム光学系の設計・製作

3. 研究の方法

- (1) 生体組織内の薬剤分子のイオン化条件の最適化

通常の質量分析では精製などの前処理を行ってから測定を行うため fmol \sim amol (10^{-15} \sim 10^{-18} mol) の極微量の物質でも容易に検出することができる。しかし、IMS の場合、試料内に存在する物質の分布を変化させてしまうような複雑な前処理を行うことができないため、測定したい分子のイオン化を妨げる様々な物質が含まれた状態で測定を行う必要がある。このため、本研究ではまず MALDI で用いるマトリックス（イオン化補助剤）の選定や、その濃度、組織試料表面への塗布方法、塗布量などの最適化を行い、最も効率の良いイオン化条件を検討した。評価に用いる薬剤としてブスピロン（抗不安薬）を用いた。

- (2) 試料移動機構、および試料導入機構の設計・製作

研究開始当時の投影型 IMS 装置は原理実証のための試作機であり、薬物動態の評価など様々な応用研究を進めていくためには装置の改良を行う必要があった。まず、試料を手動で移動させて測定を行っていたことに加え、試料の可動範囲が 2 mm \times 25 mm と限られていたことが問題となっていた。例えば、ラットの場合、脳だけでも 10 mm \times 15 mm 程度の大きさがあるため、試料移動機構には最低でも 25 mm \times 25 mm 程度の可動範囲が必要であった。そこで、試料を電動ステージで移動できるように改良した。また、一般に質量分析装置内は高真空（ $\sim 10^{-5}$ Pa）に保たれているが、研究開始当時の投影型 IMS 装置では試料を装置内へ導入するために試料およびイオン光学レンズ系を含む装置の大部分の真空を大気圧に戻さなければならない構造になっていたため、試料交換後再び測定可能な真空を得るまでに 1 時間以上を要していた。そこで、装置内の高真空を維持したまま試料の交換を可能とするロードロック機構を設

計・製作した。

(3) イオン光学式ズーム光学系の設計・製作

研究開始当時の投影型 IMS 装置ではイオン光学系の拡大倍率を最も低い 20 倍に設定した状態で視野が 400 μm 程度であった。しかし、今後は測定する試料の大きさに応じて様々な倍率で測定することが求められるようになる予想され、その度に装置内のレンズ電極の交換などを行ってイオン光学系の倍率を変更していたのでは効率が悪い。そこで、レンズ電極はそのままで電極に印加する電圧を変化させるだけでイオン光学系の倍率を連続的に変えることができるズーム光学系の設計・製作を行った。これにより、通常の光学顕微鏡などのように、まずは低倍率で測定を行い、その中から関心のある部分を拡大して高空間分解能で測定するといった使い分けが容易に行えるようにした。

(4) イメージング質量分析実験

イオン化条件の検討結果、および本研究で改良を加えたイメージング質量分析装置を用いて、薬剤を投与したマウス脳内における薬剤分子の分布を測定した。

4. 研究成果

(1) 生体組織内の薬剤分子のイオン化条件の最適化

生体内薬剤分子のイオン化条件の検討を行った結果、モデル薬剤として用いたブスピロンのイオン化には一般的に用いられているマトリックス（イオン化補助剤）の中でも α シアノ 4 ヒドロキシ桂皮酸を用いると、最もイオン化の効率を高くできることがわかった。さらに、通常のマトリックスにゼオライトを混合することでイオン化効率を 1.5 倍程度に高められることがわかった。

MALDI を用いたイメージング質量分析ではマトリックス溶液を試料表面にスプレーで塗布して測定を行う。マトリックス溶液の塗布には一般に金属製のスプレーが用いられているが、金属製のスプレーではスプレー自体がマトリックス溶液中に溶出し、イオン化効率を低下させることを明らかにした。そこで、マトリックス溶液の塗布にガラス製のスプレーを用いたところ、金属製スプレーを用いた場合と比べてイオン化効率を著しく向上させることができた。

(2) 試料移動機構、および試料導入機構の設計・製作

高スループットでの薬物動態測定を実現するために、試料を高真空中で自動かつ高精度で移動させるための試料移動機構の製作を行った。その結果、試料を当初目標としていた可動範囲 25 mm \times 25 mm よりも広い 50 mm \times 50 mm の範囲において絶対位置精度 $\pm 1 \mu\text{m}$ で移動させることができる移動機構を実現することができた。光学顕微鏡でも同

一の試料を観察できるようにするため、試料ホルダーはスライドガラスをそのまま装着できる構造とした。ただし、イオンを加速し検出器に投影する電場を生成するために、スライドガラスには ITO (indium tin oxide) による透明な導電性コーティングを施したものを用いた。これにより測定の自動化、高速化が可能となった。

(3) イオン光学式ズーム光学系の設計・製作

イオン光学式ズーム光学系の設計・製作を行い、電圧制御のみでイオン光学系の拡大倍率を 20 倍から 60 倍まで連続的に変化させるズーム光学系を実現することができた。

(4) イメージング質量分析実験

イオン化条件の検討結果、および本研究で改良を加えたイメージング質量分析装置を用いて、薬剤を投与したマウス脳内における薬剤分子の分布を測定することに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Hisanao Hazama, Satoshi Furukawa, and Kunio Awazu: "Effect of solvent on ionization efficiency in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides," *Chemical Physics*, in press, DOI: 10.1016/j.chemphys.2013.03.004 (2013) 査読有.
- ② Makoto Hatakeyama, Takako Mashiko, Hisanao Hazama, Kunio Awazu, and Masanori Tachikawa: "Theoretical analysis of correlation between ionization threshold fluence in IR-MALDI and IR absorption spectrum of matrix molecules," *International Journal of Quantum Chemistry* **113**(2), 125–129 (2013) DOI: 10.1002/qua.24296, 査読有.
- ③ 閑念弘樹, 守口直樹, 間久直, 波多野浩士, 金田安史, 藤野竜也, 栗津邦男: "がん治療薬剤の動態解析に向けたレーザーイオン化イメージング質量分析手法の開発," 電気学会 光・量子デバイス研究会資料 (バイオメディカルフォトンクス応用), OQD-13-017, 27–32 (2013) 査読無.
- ④ 守口直輝, 間久直, 藤野竜也, 栗津邦男: "薬剤のレーザーイオン化質量分析イメージングにおけるゼオライトのイオン化補助効果," 電気学会 光・量子デバイス研究会資料 (バイオメディカルフォトンクス応用), OQD-12-027, 11–15 (2012) 査読無.
- ⑤ Hisanao Hazama, Tomonori Hamanaka, and Kunio Awazu: "Development of a stigmatic mass microscope for high-throughput molecular imaging," *Proceedings of*

Conference on Laser Surgery and Medicine 2012, pp. 80–81 (2012) 査読無.

- ⑥ 浜中智紀, 間久直, 栗津邦男: “レーザーイオン化質量分析での薬剤イメージングに向けた試料作製条件と画像処理法の検討,” 電気学会 光・量子デバイス研究会資料 (バイオメディカルフォトンクス応用), OQD-12-022, 15–20 (2012) 査読無.
- ⑦ Kunio Awazu, Hisanao Hazama, Tomonori Hamanaka, Jun Aoki, Michisato Toyoda, and Yasuhide Naito: “Tissue imaging with a stigmatic mass microscope using laser desorption/ionization,” *Proceedings of SPIE* **8225**, 82252E (2012)
DOI: 10.1117/12.909898, 査読無.
- ⑧ 間久直, 栗津邦男: “投影型イメージング質量分析装置の開発,” 生産と技術 **63**(4), 43–51 (2011) 査読無.

[学会発表] (計 19 件)

- ① Takaya Satoh, Ayumi Kubo, Jun Tamura, Carlos Chiu, Naoki Moriguchi, Hisanao Hazama, Kunio Awazu, and Michisato Toyoda: “Imaging mass spectrometry of pharmaceutical drugs using a high mass resolution MALDI-SpiralTOF,” 4th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference and 10th Taiwan Society for Mass Spectrometry Annual Conference, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan (10–12 Jul. 2013) 発表確定.
- ② Jun Aoki, Hisanao Hazama, Kunio Awazu, and Michisato Toyoda: “Development of new stigmatic imaging mass spectrometer and its application to metal cation distribution in fish,” 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Minneapolis Convention Center, Minneapolis, MN, USA (13 Jun. 2013) 発表確定.
- ③ Ayumi Kubo, Takaya Satoh, Robert A. DiPasquale, Naoki Moriguchi, Hisanao Hazama, Kunio Awazu, and Michisato Toyoda: “Imaging mass spectrometry of pharmaceutical drugs using a high mass resolution MALDI-SpiralTOF-TOF,” 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Minneapolis Convention Center, Minneapolis, MN, USA (12 Jun. 2013) 発表確定.
- ④ 間久直, 青木順, 豊田岐聡, 内藤康秀, 栗津邦男: “投影型顕微イメージング質量分析装置による生体試料の観察,” 電気学会 第 1 回量子ビームによるナノバイオサイエンス技術調査専門委員会, 大阪大学産業科学研究所, 大阪府吹田市 (2013 年 5 月 8 日) 招待講演.
- ⑤ 閑念弘樹, 守口直樹, 間久直, 波多野浩士,

金田安史, 藤野竜也, 栗津邦男: “がん治療薬剤の動態解析に向けたレーザーイオン化イメージング質量分析手法の開発,” 電気学会 光・量子デバイス研究会 (バイオメディカルフォトンクス応用), 東北大学東京分室, 東京都千代田区 (2013 年 3 月 4 日).

- ⑥ 守口直輝, 間久直, 藤野竜也, 栗津邦男: “レーザーイオン化質量分析装置を用いた薬剤イメージングにおけるゼオライトのイオン化補助効果の検討,” レーザー学会 学術講演会第 33 回年次大会, 姫路商工会議所, 兵庫県姫路市 (2013 年 1 月 30 日).
- ⑦ Hisanao Hazama and Kunio Awazu: “Novel stigmatic mass microscope using laser ionization,” International Joint Symposium on Single-Cell Analysis (The 6th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis & The 8th International Forum on Post-Genome Technologies), Kyoto Research Park, Kyoto, Japan (27 Nov. 2012) 招待講演.
- ⑧ 守口直輝, 間久直, 藤野竜也, 栗津邦男: “薬剤のレーザーイオン化質量分析イメージングにおけるゼオライトのイオン化補助効果,” 電気学会 光・量子デバイス研究会 (バイオメディカルフォトンクス応用), 東北大学 東京分室, 東京都千代田区 (2012 年 9 月 24 日).
- ⑨ Jun Aoki, Hisanao Hazama, Kunio Awazu, and Michisato Toyoda: “Development and applications of new stigmatic mass microscope with high mass and spatial resolving power using multi-turn time-of-flight mass spectrometer,” 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2012), Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan (19 Sep. 2012).
- ⑩ Shuichi Shimma, Ayumi Kubo, Takaya Satoh, Hisanao Hazama, Kunio Awazu, and Michisato Toyoda: “Imaging mass spectrometry and structural analysis of lipids directly on tissue specimens using a high resolution MALDI-TOF-TOF tandem mass spectrometer,” 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2012), Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan (19 Sep. 2012).
- ⑪ Naoki Moriguchi, Hisanao Hazama, Tatsuya Fujino, and Kunio Awazu: “Investigation of zeolite matrix for analysis of pharmacokinetics using imaging mass spectrometry with laser desorption/ionization,” 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2012), Kyoto International Conference Center,

- Kyoto, Japan (17 Sep. 2012).
- ⑫ Hisanao Hazama, Tomonori Hamanaka, and Kunio Awazu: “Development of a stigmatic mass microscope for high-throughput molecular imaging,” Conference on Laser Surgery and Medicine 2012 (CLSM 2012), Pacifico Yokohama, Kanagawa, Japan (27 Apr. 2012).
 - ⑬ 浜中智紀, 間久直, 栗津邦男: “レーザーイオン化質量分析での薬剤イメージングに向けた試料作製条件と画像処理法の検討,” 電気学会 光・量子デバイス研究会資料 (バイオメディカルフォトンクス応用), 東北大学 東京分室, 東京都千代田区 (2012年3月5日).
 - ⑭ Kunio Awazu, Hisanao Hazama, Tomonori Hamanaka, Jun Aoki, Michisato Toyoda, and Yasuhide Naito: “Tissue imaging with a stigmatic mass microscope using laser desorption/ionization,” SPIE Photonics West 2012, BIOS, The Moscone Center, San Francisco, CA, USA (23 Jan. 2012).
 - ⑮ 間久直, 栗津邦男: “レーザー技術が拓く新規バイオ・医療応用,” 第2回レーザー共同研究所成果報告会, 日本原子力研究開発機構敦賀本部, 福井県敦賀市 (2011年12月1日) 招待講演.
 - ⑯ 間久直, 浜中智紀, 青木順, 豊田岐聡, 内藤康秀, 栗津邦男: “レーザーイオン化投影型質量顕微鏡による生体組織切片の観察,” 第59回質量分析総合討論会, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪府吹田市 (2011年9月14日) ベストプレゼンテーション賞受賞.
 - ⑰ 青木順, 豊田岐聡, 間久直, 栗津邦男, 藤井研一, 内藤康秀: “高空間分解能・高質量分解能の投影式多重周回飛行時間型イメージング質量分析装置の開発,” 第59回質量分析総合討論会, ホテル阪急エキスポパーク, 大阪府吹田市 (2011年9月14日).
 - ⑱ Hisanao Hazama, Hidetoshi Yoshimura, Jun Aoki, Hirofumi Nagao, Yasuhide Naito, Michisato Toyoda, Katsuyoshi Masuda, Kenichi Fujii, Toshio Tashima, and Kunio Awazu, “Observation of tissue sections using a stigmatic mass microscope with a multi-turn time-of-flight mass spectrometer,” 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Colorado Convention Center, Denver, CO, USA (7 Jun. 2011).
 - ⑲ Jun Aoki, Hisanao Hazama, Michisato Toyoda, Kunio Awazu, Katsuyoshi Masuda, Kenichi Fujii, and Yasuhide Naito, “Development and evaluation of new stigmatic mass microscope with high mass and spatial resolving power using multi-turn time-of-flight mass spectrometer,” 59th

ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Colorado Convention Center, Denver, CO, USA (7 Jun. 2011).

〔図書〕 (計2件)

- ① 日本臨床プロテオーム研究会編, “臨床プロテオミクス—バイオマーカー探索から個別化医療へ—,” 間久直, 栗津邦男: 8-3 “新規MSイメージング技術,” pp. 299–308 金原出版 (2012).
- ② レーザー学会編, “先端固体レーザー,” 石井克典, 間久直, 栗津邦男: 第9章 “レーザー医用応用,” pp. 371–408, オーム社 (2011).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間久直 (HAZAMA HISANAO)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 70437375

(2) 研究協力者

守口 直輝 (MORIGUCHI NAOKI)
大阪大学・大学院工学研究科・博士前期課程

浜中 智紀 (HAMANAKA TOMONORI)
大阪大学・工学部

閑念 弘樹 (KANNEN HIROKI)
大阪大学・工学部