

**医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関する
リフレクションペーパー（案）**

目次

1. 序文	2
2. 適用範囲	2
3. 質量分析イメージング技術の利用に関する考察.....	3
3.1. 組織分布試験法における質量分析イメージング技術の位置付け.....	3
3.2. 医薬品開発における質量分析イメージング技術の利用.....	4
3.3. 質量分析イメージング技術による分析時の留意点.....	4
3.3.1. 分析法の妥当性の確認.....	4
3.3.2. 分析条件の設定.....	5
3.3.3. 定量	6
3.3.4. 画像データ処理.....	7
4. 結論	7
用語解説	8
関連ガイドライン等	9
参考文献	10

1. 序文

薬物が薬理作用を示すためには、薬物が標的とする臓器・組織に移行し、標的分子近傍の薬物濃度が薬効発現に必要な濃度に達する必要がある一方で、必要以上の高濃度での分布や標的としていない臓器・組織への分布は毒性の発現につながりうる。したがって、適切な手法によって得られた組織分布データは、薬物の有効性及び安全性を予測、評価する上で有用な情報であり、薬物分布をより正確に把握することは、効率的な医薬品開発の一助となると考えられる。

現在、薬物分布の検討においては、放射性同位元素標識体を用いたオートラジオグラフィー法、摘出した臓器・組織のホモジネート中濃度を液体クロマトグラフィー質量分析法（Liquid Chromatography - Mass Spectrometry、以下、「LC-MS」という。）や液体シンチレーションカウンター等で測定する方法（以下、「組織中濃度測定法」という。）が主に用いられている。また、これらの他に、分子イメージング技術の一つである陽電子放出断層撮影（Positron Emission Tomography、以下、「PET」という。）等が利用されることもある。

近年、新たな分子イメージング技術として、質量分析イメージング（Mass Spectrometry Imaging）技術が注目されている。本技術は、薄切された組織切片のような平面状の試料の表面上において、試料表面の位置関係を保持しつつ連続的に質量分析を行い、検出された任意のイオンのシグナル強度について二次元画像化を行うことにより、試料表面における物質の分布を可視化するものである。薬物投与後の個体から採取、調製した組織切片を試料として、質量分析により薬物のイオンを測定すれば薬物分布を可視化できることから、新たな組織分布試験法として医薬品開発への応用が期待されている。

本文書は、医薬品開発において質量分析イメージング技術を組織分布試験法として利用する際の留意点等を提供するものである。本文書は、質量分析イメージング技術を用いた組織分布試験の実施やその分析法バリデーション等について特定の方策を規定することを目的としていないため、関連するガイドライン等と照らし合わせて読むことを推奨する。

2. 適用範囲

質量分析イメージング技術は様々な用途に応用可能な技術であるが、本文書では、上述のとおり当該技術を組織分布試験法として利用する場合の留意点等について記載する。

現在、質量分析イメージング技術では分析対象物質のイオン化法として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization、以下、「MALDI 法」という。）、二次イオン質量分析（Secondary Ion Mass Spectrometry）、脱離エレクトロスプレーイオン化（Desorption Electrospray Ionization）等が用いられているが、本文書では、実用レベルで要求される特性を備えており、医薬品研究及び基礎研究において研究が進められている MALDI 法による質量分析イメージング技術を中心に記載する。

対象とする薬物は低分子化合物とするが、適用可能な場合には、核酸、ペプチド、タンパク質等に対しても参考としてもよい。

3. 質量分析イメージング技術の利用に関する考察

3.1. 組織分布試験法における質量分析イメージング技術の位置付け

質量分析イメージング技術は、質量分析法を原理としているため、試験実施にあたって放射性同位元素標識体が不要であり、また、未変化体及び代謝物ごとに測定可能である。さらに、組織切片上における薬物の分布を二次元画像化することができる。

現在、組織分布試験はほとんどが非臨床において実施されており、主にオートラジオグラフィ法又は組織中濃度測定法が実施されている。オートラジオグラフィ法は放射性同位元素標識体が必要であり、未変化体及び代謝物ごとの組織分布データを得ることもできない。また、組織中濃度測定法は採取した臓器・組織をホモジネートするため、二次元的な分布情報を得ることができない。したがって、これらの点に関しては、質量分析イメージング技術は優れている。一方で、質量分析イメージング技術は、現時点では、オートラジオグラフィ法ほどの検出感度は有しておらず、また、後述するように定量分析を行う際には注意が必要である（3.3.3 項参照）。各試験法の特徴を下表に示す。

表 薬物分布試験法の比較

	オートラジオグラフィ法	組織中濃度測定法 (LC-MS 等)	質量分析イメージング技術
放射性同位元素標識体	必要	LC-MS 等で測定する場合は不要	不要
測定対象試料	動物の組織（全身）切片	動物又はヒト組織等	動物又はヒトの組織切片
組織分布イメージング	可	不可(ホモジネートにより破壊)	可
未変化体及び代謝物ごとの測定	不可	LC-MS 等で測定する場合は可	可
定量	可	可	3.3.3 項参照

なお、組織分布の検討にあたっては、PET が用いられることもある。PET は、同一個体での薬物分布の経時的变化を評価することが可能であり、また、臨床応用も可能である等の利点を有する。ただし、陽電子放出核種の製造及び同核種による標識体の合成が必要であり、臨床での実施にあたっては放射線被曝を考慮する必要がある。また、未変化体及び代謝物ごとの分布情報を得ることはできない。

以上のように、質量分析イメージング技術は、既存の組織分布試験法と比較していくつかの優れた面を有している。しかしながら、現時点では、再現性及び定量性に関して発展途上の面もあるため、質量分析イメージング技術を用いる場合には、その特徴を十分理解した上で、必要に応じて他の試験法と相補的に使用することが適切であると考えられる。

3.2. 医薬品開発における質量分析イメージング技術の利用

質量分析イメージング技術は、オートラジオグラフィー法及び組織中濃度測定法と同様に主に非臨床試験で用いられると考えられるが、組織等が採取可能な場合には臨床試験においてもその活用が想定される。医薬品開発において質量分析イメージング技術を利用する利点としては、例えば以下のような点が考えられる。

- 標的組織における未変化体及び代謝物（代謝物が薬理作用を有する場合には活性代謝物）ごとの組織分布データは、薬理試験等の結果を解釈する上で有用であり、薬物の有効性をよりの確に評価できるようになると考えられる。また、質量分析イメージング技術によって組織中薬物濃度を定量的に測定することができれば、これまで評価が困難であった組織内の薬物分布を明確にできる可能性がある。
- 毒性所見が認められた臓器・組織における未変化体及び代謝物の組織分布データは、毒性に寄与する化合物の特定や、発現機序に関する考察等を行う上で有用であると考えられる。
- 特に、特定の臓器・組織への薬物送達を目指したドラッグデリバリーシステム製剤においては、その Proof of Concept の確認を行う上で、質量分析イメージング技術により得られる組織分布データは有用であると考えられる。
- 解剖学的に複雑な臓器・組織（例えば、脳、腎臓等）における薬物分布の検討を行う上で有用と考えられる。

質量分析イメージング技術は、特に、標的組織（又は細胞）が明確な薬剤（抗悪性腫瘍剤、抗菌剤、中枢神経系用薬等）の開発において活用が期待される。また、本技術を用いた報告は年々増加しており、今後、医薬品開発における本技術の利用について、知見が蓄積していくものと考えられる（参考文献を参照）。

3.3. 質量分析イメージング技術による分析時の留意点

本項では、現時点での知見等を踏まえて、MALDI 法を用いた質量分析イメージング技術による分析時の留意点等について考察する。

3.3.1. 分析法の妥当性の確認

他の生体試料中薬物濃度分析法と同様に、質量分析イメージング技術においても、一連の分析過程を通して妥当性が適切に確認され、十分な信頼性を有することが必要である。現時点では、質量分析イメージング技術における分析法バリデーション等について確立した指針等はないが、分析法の確立にあたっては、分析結果の信頼性について科学的根拠に基づいて説明ができるよう、分析の目的等を踏まえ、選択性、定量下限、定量上限、真度、精度、イオン化抑制効果、安定性等、必要な項目について検討を行うべきである。MALDI 法を用いた質量分析イメージング技術では、薬物のイオン化効率が生体成分（細胞、細胞外成分等）の影響を強く受けるため、分析法の妥当性の確認は、分析対象とする臓器・組織ごとに実施することが望ましい。

3.3.2. 分析条件の設定

組織標本は、一般的に、採取した組織をホルマリンにより固定したパラフィン包埋切片として、または Optimal Cutting Temperature（以下、「OCT」という。）コンパウンドを用いた凍結切片として作成される。しかしながら、質量分析イメージング技術により測定を行う場合は、ホルマリン固定中に薬物が組織から液相に溶出する可能性があること、及び OCT コンパウンドは薬物のイオン化を抑制する可能性があることに留意すべきである。なお、未包埋の凍結組織切片を用いることは、OCT コンパウンドの使用を回避できるため推奨される。

MALDI 法を用いた質量分析イメージング技術では、薬物のイオン化のために、組織切片（厚さ 5～20 μ m 程度）の表面にイオン化補助剤を供給する必要がある。イオン化補助剤の種類としては、現在、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸（ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid）、シナピン酸（sinapinic acid）、2,5-ジヒドロキシ安息香酸（2,5-dihydroxy benzoic acid）、9-アミノアクリジン（9-aminoacridine）等の有機酸が汎用されている。イオン化補助剤の選択にあたっては、分析対象薬物、生体成分及びイオン化補助剤の組み合わせにより、分析対象薬物のイオン化効率に変化することに留意すべきである。

イオン化補助剤の組織切片表面への供給は、一般的に、イオン化補助剤を溶媒に溶解し噴霧することにより行われるが、良好な測定結果を得るためには、溶媒による組織への影響（組織の微細構造の破壊等）を最小限にとどめること、及びイオン化補助剤を均一に噴霧することが重要である。また、その他の供給方法として、イオン化補助剤の昇華を利用した蒸着法も用いられる。

MALDI 法による質量分析においては、生体成分及びイオン化補助剤の存在下で、分析対象薬物のイオンを選択的に検出することが必要である。したがって、薬物未投与の個体から採取した生体試料を用いて、生体成分やイオン化補助剤が分析対象薬物の測定結果に影響を与えないことを確認すべきである。

上述のとおり、分析対象薬物のイオン化効率は生体成分の影響を受けるため、試料によって、あるいは同一の試料であっても質量分析を行う組織部位によって、イオン化効率が異なる可能性がある。例えば、腎臓や脳など、同一組織内でも不均一な細胞が様々な形質を呈するような組織においては、レーザーが照射される点（位置）によってイオン化効率が異なる可能性に留意すべきである。また、イオン化補助剤はできるだけ均一に組織切片表面へ供給すべきであるが、実際にはムラが生じてしまう可能性も考えられる。そのため、これらによる測定結果への影響を補正する方法として、分析対象薬物に構造の類似した物質や安定同位体で標識した物質を内標準物質としてイオン化補助剤に混和して測定し、得られた分析対象薬物のシグナル強度を内標準物質のシグナル強度で補正する方法等が考えられる。

MALDI 法を用いた質量分析イメージング技術において信頼性の高い分析法を確立するた

めには、上記の点も踏まえて十分に検討を行い、前処理の方法や機器による測定条件等について最適化を行うことが重要である。

3.3.3. 定量

LC-MS 等による生体試料中薬物濃度分析では、分析対象の実試料にできるだけ近い生体試料に標準物質を添加して検量線用標準試料を調製し、これを測定することによって得られる検量線を用いて定量を行う。一方、質量分析イメージング技術において、同様に検量線を作成する場合、検量線用標準試料として既知濃度の薬物が組織内に分布する組織切片が必要になるが、そのような試料を作成することは非常に困難である。したがって、質量分析イメージング技術においては、定量が課題の一つであり、現在、定量を行うための方策として、以下のような試みがなされている。

- 薬物未投与の個体から採取した組織のホモジネートに標準物質を添加し、凍結ブロックとした後、実試料と同様に前処理することにより、既知濃度の標準物質を含有する組織切片（標準試料）を作成する。この標準試料と実試料における分析対象薬物のシグナル強度を比較することにより、実試料における薬物濃度を定量する方法。本法においては、標準試料ではホモジネートにより組織が均質化されており、実試料と組織の状態が異なっている。したがって、標準試料と実試料では薬物のイオン化抑制効果等が異なると考えられるため、このことが定量結果に影響を及ぼしている可能性があることに留意する必要がある。
- 薬物未投与の個体から採取した組織から切片を作成し、その表面に既知濃度の標準物質を塗布する。これにイオン化補助剤を添加したものを標準試料とし、標準試料と実試料における分析対象薬物のシグナル強度を比較することにより、実試料における薬物濃度を定量する方法。本法においては、標準物質を塗布した生体試料上における、薬物のシグナル強度の変化に注意する必要がある。すなわち、測定する部位ごとに存在する生体成分が異なるため、標準物質を均一に塗付した試料であっても、測定部位によってシグナル強度が異なる可能性が考えられる。当該影響を補正する方法としては、内部標準物質の利用等が考えられる。また、標準試料では標準物質が切片表面に塗布されており、実試料とは薬物分布の状態が異なっている。したがって、標準試料と実試料では薬物のイオン化効率や組織からの抽出効率等が異なると考えられるため、このことが定量結果に影響を及ぼしている可能性があることに留意する必要がある。
- 質量分析イメージング技術で測定する組織切片（以下、「切片 A」とする。）と連続する切片（以下、「切片 B」とする。）を採取し、切片 B のホモジネート中薬物濃度を LC-MS 等を用いて定量する。切片 B の定量結果を基に、切片 A における質量分析イメージングのシグナル強度を濃度に換算して、実試料における薬物濃度を定量する方法。本法においては、質量分析イメージング技術とは別に、LC-MS 等による定量法を確立し、測定を行わなければならない点に留意が必要である。

現在、MALDI 法を用いた質量分析イメージング技術による定量については様々な検討が行われている段階にあると考えられるが、いずれの方法を採用する場合でも、定量を目的とした分析法の確立にあたっては、定量結果の信頼性を担保できるよう十分な検討を行うべきである。

3.3.4. 画像データ処理

質量分析イメージング技術では、質量分析により得られた分析対象薬物のイオンのシグナル強度について二次元画像化を行い、薬物分布の可視化を行う。その際、画像データ処理の手順については、作業者間でのバラツキ等を避けるため、あらかじめ計画書、手順書等に設定しておくべきである。

4. 結論

質量分析イメージング技術は、既存のオートラジオグラフィー法や組織中濃度測定法とは異なる特徴を有しており、新たな組織分布試験法として今後の発展が期待される新規技術である。一方で、他の生体試料中薬物濃度分析法と同様に、質量分析イメージング技術においても、十分な信頼性を有する分析法を確立する必要がある。今後、質量分析イメージング技術に関する知見が蓄積され、その分析法バリデーション等について一定の指針等が作成されることが望まれる。

以上纏めると、医薬品開発において質量分析イメージング技術が活用され、医薬品の有効性及び安全性に関する有用な情報が提供されることが期待される。

用語解説

1) 分子イメージング技術

生体内におけるバイオマーカー等の分子やその動きを画像化する手法であり、生体内の分子を観察できることを特徴とする。例として、PET イメージング、蛍光イメージング、コンピューター断層撮影法、核磁気共鳴画像法、超音波を用いた手法が知られている。

2) マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)

物質にレーザー光を照射すると、光電子移動が進行し、照射対象物質がイオン化される。これをレーザー脱離イオン化法と定義している。この手法を応用し、レーザー脱離しやすい物質としてイオン化補助剤を予め混合することにより、試料の開裂を抑えつつ、より高効率に目的イオンを得る手法を指す。

3) 二次イオン質量分析 (Secondary Ion Mass Spectrometry)

高エネルギーのイオンビームを試料表面に照射することにより、表面及び表面近傍の分子を攪拌させ、様々な粒子が真空中に放出される。この粒子を検出する手法を指す。

4) 脱離エレクトロスプレーイオン化 (Desorption Electrospray Ionization)

イオン化補助剤を使用せず、直接、分析対象物質のイオン化を行うための手法。イオン性溶媒をジェット噴射することにより、分子の気相脱離を促進する。

5) イオン化補助剤

MALDI 法を用いた質量分析において、目的試料の高効率かつ開裂抑制をしたまま、イオン化を行うための添加物の総称。レーザー光を吸収し、固体試料の脱離・イオン化を促進するために添加される。

関連ガイドライン等

- 1) 平成 10 年 6 月 26 日医薬審第 496 号「非臨床薬物動態試験ガイドラインについて」
- 2) 平成 13 年 6 月 1 日医薬審発第 796 号「医薬品の臨床薬物動態試験について」
- 3) 平成 8 年 7 月 2 日薬審第 442 号「反復投与組織分布試験ガイダンスについて」(ICH S3B)
- 4) 平成 8 年 7 月 2 日薬審第 443 号「トキシコキネティクス（毒性試験における全身的暴露の評価）に関するガイダンスについて」(ICH S3A)
- 5) 平成 22 年 2 月 19 日薬食審査発 0219 第 4 号「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンスについて」(ICH M3 (R2))
- 6) 平成 25 年 7 月 11 日薬食審査発 0711 第 1 号「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドラインについて」

参考文献

本リフレクションペーパーを取り纏める上で以下の文献を参考にした。

- 1) Aikawa H, Hayashi M, Ryu S, Yamashita M, Ohtsuka N, Nishidate M, Fujiwara Y, Hamada A. Visualizing spatial distribution of alectinib in murine brain using quantitative mass spectrometry imaging. *Sci Rep*. 2016 Mar 30;6:23749.
- 2) Nilsson A, Goodwin RJ, Shariatgorji M, Vallianatou T, Webborn PJ, Andr  n PE. Mass spectrometry imaging in drug development. *Anal Chem*. 2015 Feb 3;87(3):1437-55.
- 3) Cobice DF, Goodwin RJ, Andr  n PE, Nilsson A, Mackay CL, Andrew R. Future technology insight: mass spectrometry imaging as a tool in drug research and development. *Br J Pharmacol*. 2015 Jul;172(13):3266-83.
- 4) Spengler B. Mass spectrometry imaging of biomolecular information. *Anal Chem*. 2015 Jan 6;87(1):64-82.
- 5) Groseclose MR, Castellino S. A mimetic tissue model for the quantification of drug distributions by MALDI imaging mass spectrometry. *Anal Chem*. 2013 Nov 5;85(21):10099-106.
- 6) Prideaux B, Stoeckli M. Mass spectrometry imaging for drug distribution studies. *J Proteomics*. 2012 Aug 30;75(16):4999-5013.
- 7) Castellino S, Groseclose MR, Wagner D. MALDI imaging mass spectrometry: bridging biology and chemistry in drug development. *Bioanalysis*. 2011 Nov;3(21):2427-41.
- 8) Schwamborn K, Caprioli RM. Molecular imaging by mass spectrometry--looking beyond classical histology. *Nat Rev Cancer*. 2010 Sep;10(9):639-46.