

生体内薬物分布の測定を目的とした  
定量的質量分析イメージング法の開発に関する研究

2014

高井 希望

## 目次

緒言	.....	1
第1章 質量分析イメージング法による低分子薬物の全身分布解析	.....	4
1-1 実験方法	.....	5
1-2 結果	.....	9
1-3 考察	.....	17
第2章 質量分析イメージング法によるペプチド薬物の組織内分布解析	.....	19
2-1 実験方法	.....	19
2-2 結果	.....	23
2-3 考察	.....	31
第3章 質量分析イメージング法による組織内薬物濃度定量法の開発	.....	33
3-1 実験方法	.....	34
3-2 結果	.....	38
3-3 考察	.....	48
結語	.....	50
論文目録	.....	51
引用文献	.....	52
謝辞	.....	58

## 緒言

創薬研究において、投与された薬物の生体内分布を把握することは、その薬物の薬効や毒性の発現メカニズムを考察し、優れた薬物動態プロファイルを持つ新薬候補化合物を選定する上で非常に重要である (1-3)。現在の創薬研究では、この解析には動物を用いたオートラジオグラフィーが一般的に利用されている。オートラジオグラフィーでは、対象とする薬物の放射標識体を投与した動物の組織切片上で、その放射能の空間的分布情報が得られるだけでなく、各組織内の放射能濃度を定量することができる。しかし、評価するすべての薬物について放射標識体を合成することは、多大な時間とコストを必要とする。また、オートラジオグラフィーは放射能を情報源としているため、生体内で代謝される薬物の場合、オートラジオグラフィーで得られる空間的分布情報や定量値には放射性代謝物に由来するものも含まれ、薬物単独の性質を把握することは困難である。一方、液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) は、放射標識体を必要とすることなく、対象の薬物を高感度かつ高選択的に定量することが可能であるため、組織中の薬物濃度測定に汎用されている。しかし、LC/MS/MS で測定される組織はあらかじめホモジネートとして調製される必要があるため、組織内での薬物の空間的分布情報は失われてしまう。

近年開発された質量分析イメージング法 (imaging mass spectrometry, IMS) は質量分析法により組織切片上の分子の分布状態を測定するもので、オートラジオグラフィーとは異なって放射標識体を必要としないこと、質量分析の特性を利用して薬物とその代謝物の分布をそれぞれ選択的に可視化できることから、病理組織解析や薬物分布解析への応用が期待されている (4, 5)。IMS では目的分子を効率よくイオン化させるためにマトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) が用いられているが、マトリクス化合物は組織切片上で不均一な結晶を生成し目的分子のイオン化効率をばらつかせるため、定量的な解析の妨げとなる。また、IMS によって薬物濃度を絶対的に定量するためには組織切片からの目的分子の抽出過程を模した検量線用標準試料を調製する必要がある。しかし、

これらの課題を克服した定量解析法は存在せず、その開発が強く望まれている。そこで本研究では、IMS による組織切片上の特定分子の定量的イメージング法を構築するとともに、その薬物分布解析法としての有効性について検討することを計画した。

これまでに IMS によって薬物の全身分布をイメージングすることは可能となっているが、その分布を定量的に解析することはできていなかった (6)。そこで、低分子薬物であるドパミン D2 受容体選択的アンタゴニスト、ラクロプリド (7, 8) を対象として、その全身分布を IMS によって定量的に解析する手法の構築とその有効性を検討することを計画した。定量的な解析のためにはマトリクス化合物の結晶化に由来するイオン化効率のばらつきを補正する必要があると考え、ラクロプリドのイオン強度をマトリクス化合物のイオン強度によって標準化することとした。また、組織切片上でラクロプリドを選択的に検出するために、多段階質量分析 (MS/MS) によって得られるイオンを測定することとした。これらの手法を用いて、ラクロプリドを投与したマウスから得た凍結全身切片を IMS によって測定した結果、各臓器において、IMS によって得られたイオン強度は LC/MS/MS によって定量したラクロプリド濃度と良好に相関することを認めた。したがって、本法が低分子薬物の全身分布を定量的に解析するために有効であることを明らかにした。

次に、IMS によってペプチド薬物の組織内分布を定量的に解析する手法の構築を試みることにした。ペプチド薬物としてはソマトスタチンの類縁ペプチドであるオクトレオチドを用いた (9)。ペプチド薬物を定量的に解析するための要件として、十分な検出感度と選択性を確保することが必要であると考え、オクトレオチドを効率よくイオン化させるためのマトリクスとして 2,5-ジヒドロキシ安息香酸を選択することとした。また、MS/MS によって得られるイオンの中から  $b_7^+$  イオンを測定することによって、様々な生体内分子が存在する組織切片上でオクトレオチドを選択的に検出できることを見出した。さらに、この手法を用いて、オクトレオチドを投与したマウスから摘出した肝臓と腎臓の凍結切片を測定した結果、IMS によって得られたイオン強度は、LC/MS/MS によって定量したオクトレオチド濃度と良好に相関していることを認めた。これらの結果から、本手法によって組織内に分布したペプチド薬物を高感度、高選択的、定量的に解

析できることが示された。

薬効発現や毒性回避の観点から理想的な組織分布プロファイルをもつ薬物を選定するためには、各薬物の組織内濃度を測定し候補薬物間で比較することが重要である。しかし、これまで、IMS では特定の薬物のイオン強度を組織間で相対的に比較するにとどまっており、IMS によって薬物の組織内濃度の絶対値を求めるという方法は確立されていない。そこで、IMS によって薬物の組織内濃度を定量する手法を構築するために、組織切片から薬物を抽出する過程を模した標準試料を調製し検量線として利用することが必要であると考え、肝臓ホモジネートに種々の濃度の薬物を添加した試料の凍結切片を用いて検量線を作成することとした。また、組織切片上での薬物のイオン化効率のばらつきを補正するために、その薬物の構造類縁体を内部標準物質として組織切片に塗布することとした。これらの方法をカンナビノイド 2 受容体選択的アゴニストである S-777469 (1-((6-ethyl-1-(4-fluorobenzyl)-5-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonyl)amino)-cyclohexanecarboxylic acid) (10)およびラクロプリドに適用した結果、測定の再現性、検量線の直線性が良好であることを認めた。さらに、S-777469 およびラクロプリドを投与したマウスから摘出した各組織切片中の各薬物の濃度を本法によって測定した結果、LC/MS/MS によって定量した値とよく一致することを認めた。これらの結果から、本法が IMS によって組織内の薬物濃度を定量するための汎用的な手法として利用できることが示された。

以上、本研究は IMS によって薬物の組織内分布を定量的に解析する手法の開発に成果を収めたものであり、これらの知見は、今後の創薬研究、特に創薬探索段階の薬物動態研究に有益な情報を与えるものと考えられる。

以下において、これらの結果を詳述する。

## 第 1 章

### 質量分析イメージング法による低分子薬物の全身分布解析

創薬研究において、投与された薬物の生体内分布を定量的に解析することは、優れた薬物動態プロファイルを持つ新薬候補化合物を選定する上で非常に重要である。特に、全身における薬物分布を解析することによって、予想されていない組織への薬物あるいはその代謝物の蓄積を検出することができるため、薬物に由来する毒性を考察するための有用な情報が得られる (1-3)。現在の創薬研究では、この解析には動物を用いた定量的全身オートラジオグラフィ法 (quantitative wholebody autoradiography, QWBA) が一般的に利用されている (11-14)。QWBA では、対象とする薬物の放射標識体を投与した動物の全身切片上で、その放射能の空間的分布情報が得られるだけでなく、各組織内の放射能濃度を定量することができる。しかし、特に創薬探索段階では非常に多くの化合物を評価することが求められるため、それぞれの化合物について放射標識体を合成することは、多大な時間とコストを必要とする。また、QWBA は放射能を情報源としているため、生体内で代謝される薬物の場合、QWBA で得られる空間的分布情報や定量値には放射性代謝物に由来するものも含まれ、薬物単独の性質を把握することは困難である。

一方、質量分析イメージング法 (imaging mass spectrometry, IMS) は近年開発された方法であり、これは質量分析法により組織切片上の分子の分布状態を測定するもので、病理組織における生体内分子の解析に利用されている (4)。また、QWBA とは異なって放射標識体を必要としないこと、質量分析の特性を利用して薬物とその代謝物の分布をそれぞれ選択的に可視化できることから、薬物分布解析への応用も期待されている (6, 15, 16)。

IMS では、イオン化法として、低分子や高分子を効率良くイオン化する技術であるマトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) が利用されることが多い (17-21)。しかしながら、低分子化合物を MALDI で解析する際には、以下の

ような課題がある。まず、MALDI 用マトリクス化合物や生体内分子の分子量が標的とする薬物の分子量と近接している場合、質量スペクトルから薬物由来のシグナルを解析することが困難となる。これを解決するためには、イオントラップ型質量分析計などを用いた多段階質量分析 (MS/MS) によって、薬物の構造に特異的なプロダクトイオンを測定することが有効と考えられる。もう一つの課題は、MALDI による質量分析ではサンプルとマトリクス化合物から形成される共結晶の不均一性が定量的な解析を妨げることである (22)。IMS においても、マトリクス化合物を組織切片上に均一に塗布することができなければ、定量的な解析は困難となる。また、IMS では、組織切片に含まれる生体内分子と目的の薬物が MALDI イオン源内で同時にイオン化されるため、目的の薬物のイオン化が抑制される可能性がある。したがって、IMS によって動物の全身切片上の薬物分布を定量的に解析することはさらに困難である。

これまで IMS によって特定の臓器に分布した薬物を定量的に解析した例はいくつか報告されているが (23–25)、全身切片上の多臓器における薬物分布を定量的に解析した例はない。そこで、低分子薬物であるドパミン D2 受容体選択的アゴニスト、ラクロプリド (7, 8) を対象として、その全身分布を IMS によって定量的に解析する手法の構築とその有効性を検討することを計画した。

## 1-1 実験方法

### 試薬

ラクロプリド酒石酸塩、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) は、シグマアルドリッチ社より MALDI-MS 用のものを購入した。<sup>3</sup>H 標識ラクロプリド (8.0 GBq/mg; 37 MBq/mL ethanol) は、パーキンエルマー社より購入した。高速液体クロマトグラフィー用メタノール、アセトニトリル、イソプロパノール、及び特級ギ酸は、関東化学株式会社より購入した。トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid, TFA) は、和光純薬工業株式会社より購入した。イソフルランは、アボットジャパン株式会社より購入した。カルボキシメチルセルロースナトリウムは、ナ

カライテスク株式会社より購入した。水は、Millipore 社製超純水製造装置で精製したものを  
いた。

### **動物投与用検体の調製**

IMS とオートラジオグラフィーを同一個体で実施するために、ラクロプリドと  $^3\text{H}$  標識ラクロプリドの混合溶液を以下のように調製した。 $^3\text{H}$  標識ラクロプリドエタノール溶液 (0.2 mL, 7.4 MBq) を、ラクロプリド生理食塩水溶液 (15 mg/14.8 mL) と混合し、動物投与用検体とした (7.4 MBq/15 mg/15 mL)。なお、この検体中に含まれるラクロプリドのうち、99.9%以上は非標識体である。

### **動物実験**

動物実験は、塩野義製薬株式会社動物実験委員会の承認を受け施行した。日本エスエルシー株式会社より購入した、8 週齢の雄性 ddY マウス 18 匹 (体重 35–40 g) を、液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) 群と IMS/オートラジオグラフィー群に 9 匹ずつ分類した。すべてのマウスの尾静脈内にラクロプリド  $^3\text{H}$  標識ラクロプリド混合溶液を、10 mg/kg (4.9 MBq/10 mL/kg) で投与した。LC/MS/MS 群のマウスは、投与 10、30、60 分後 (n = 3) にイソフルラン麻酔下で下大静脈より全採血することによって安楽死させた後、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓を摘出した。摘出した各臓器の重量を測定し、その 4 倍量の水を加え、IKA Works 社製 Ultra-Turrax T10 を用いてホモジナイズした。血液は 3000 rpm、4°C で 10 分間遠心することにより、血漿を得た。得られた組織ホモジネートと血漿は、測定まで -80°C で保存した。IMS/オートラジオグラフィー群のマウスは、投与 10、30、60 分後 (n = 3) にイソフルラン麻酔下で安楽死させた後、液体窒素下で急速に凍結させ、カルボキシメチルセルロースナトリウムに包埋した。

## LC/MS/MS 測定

LC/MS/MS システムには、Waters 社製 Acquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC) システムと AB Sciex 社製三連四重極型質量分析計 API 4000™ を用いて、Waters 社製 Masslynx 4.1 ソフトウェアと AB Sciex 社製 Analyst 1.4.2 ソフトウェアによってそれぞれ制御した。各試料中のラクロプリド濃度は以下の方法で測定した。組織ホモジネート及び血漿試料 10 µL にアセトニトリル 500 µL を加えて数分間攪拌した後、5000 rpm、10°C で 5 分間遠心し、得られた上清 2 µL を LC/MS/MS システムに注入した。クロマトグラフィー用カラムには Waters 社製 Acquity UPLC™ BEH C18 column (50×2.1 mm i.d., 1.7 µm) を 40°C で用いた。オートサンプラ内は 10°C に保ち、洗浄液にはイソプロパノールと水/アセトニトリル (9:1) を用いた。移動相には A 0.1%ギ酸含アセトニトリル及び B 0.1%ギ酸含水を用いて、ラクロプリドは流速 750 µL/min、B 15–95% のグラジエントで溶出させ、質量分析計に導入した。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) のポジティブイオンモードによって行い、ラクロプリドのプロトン付加イオン ( $m/z$  347) から 35 eV の衝突エネルギーで得られた  $m/z$  112 を selected reaction monitoring (SRM) モードで検出した。別途、ブランク組織ホモジネートあるいはブランク血漿を用いて調製したラクロプリドの標準試料から検量線を作成し、Analyst ソフトウェアによって試料中のラクロプリド濃度を計算した。

## IMS 測定用試料の調製

Leica 社製 Leica CM3600 を用いて、マウスの矢状全身切片を厚さ 20 µm で作製し、Thermo Fisher Scientific 社製 Superfrost スライドグラスに載せた後、測定まで -80°C で保存した。測定の前に、切片を真空デシケータ内、室温で 15 分間乾燥させ、Hewlett-Packard 社製 Scanjet G4050 を用いて光学画像を得た。MALDI 用マトリクス溶液として、0.2% TFA 含水/メタノール (1:1) に DHB を 30 mg/mL で溶解させた。調製したマトリクス溶液は、Bruker Daltonics 社製 ImagePrep™ を用いて切片に塗布した。

## IMS 測定

全身切片の測定には、MALDI イオン源搭載リニアイオントラップ型質量分析計である、Thermo Fisher Scientific 社製 MALDI LTQ XL を用いた。レーザーには窒素レーザー (337 nm、60 Hz) を用い、エネルギーは 32  $\mu$ J、照射間隔は 250  $\mu$ m に設定した。定量的な解析を実施するために、イオントラップ内のイオン量を調節する Auto gain control 機能は使用せず、1 部位あたりのレーザー照射回数を 2 回と定めた。1 回のレーザー照射 (0.5 秒) でラクロプリドを、もう 1 回のレーザー照射で DHB を検出するために、それぞれポジティブイオンモードで各イオン (ラクロプリド  $m/z$  347;  $[M+H]^+$ 、DHB  $m/z$  273;  $[2(M-H_2O)+H]^+$ ) のプロダクトイオンスキキャンを行った。衝突エネルギーは規定値の 40% に設定した (26)。測定時間は 1 部位あたり 1 秒で、全身切片 1 枚につき約 40000 部位を測定した。得られた質量スペクトルデータは、Thermo Fisher Scientific 社製 ImageQuest 1.0.1 ソフトウェアを用いて画像データに変換した。画像データからの定量的解析は、ImageQuest ソフトウェアを用いて、全身切片の光学画像上で各臓器全体に関心領域を設定し、その領域内のラクロプリド ( $m/z$  347 $\rightarrow$ 129) 及び DHB ( $m/z$  273 $\rightarrow$ 137) の平均イオン強度を計算した。

## オートラジオグラフィ

$^3\text{H}$  標識ラクロプリドのオートラジオグラムを得るために、マウスの矢状全身切片を厚さ 20  $\mu$ m で作製し、3M 社製 Scotch テープに載せた後、Fujifilm 社製 Fuji BAS-TR イメージングプレートに 160 時間露光させ、Molecular Dynamics 社製 STORM820 及び ImageQuant ソフトウェアを用いて画像解析した。

## 1-2 結果

### LC/MS/MSによるマウス臓器中ラクロプリド濃度の測定

Table 1 に、ラクロプリドをマウスに静脈内投与した後の各臓器中ラクロプリド濃度を示す。投与 10 分後において、ラクロプリドの分布は肝臓及び肺に高く認められ(肝臓  $27.3 \pm 4.3 \mu\text{g/g}$ 、肺  $10.5 \pm 0.9 \mu\text{g/g}$ )、心臓及び脾臓に低く認められた(心臓  $3.40 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$ 、脾臓  $4.01 \pm 0.82 \mu\text{g/g}$ )。脳では、血漿と同等の濃度が認められた(脳  $6.68 \pm 0.33 \mu\text{g/g}$ 、血漿  $7.76 \pm 0.67 \mu\text{g/g}$ )。また、各臓器中ラクロプリド濃度の継時的な変化に関しては、血漿からは投与 10 分後から 60 分後にかけて速やかに消失し、その他の各臓器からの消失も速やかであった。これらの結果は、血漿に関しては過去のラットにおける薬物動態に関する報告 (27)、またその他の臓器に関しては  $^{11}\text{C}$  標識ラクロプリドを用いたヒトにおける陽電子放出断層撮像法 (positron emission tomography, PET) での検討結果 (28, 29)と同様であった。

Table 1. Concentrations of raclopride in each organ of mice after intravenous administration of raclopride (10 mg/kg), determined by LC/MS/MS.

	10 min	30 min	60 min
Brain	$6.68 \pm 0.33$	$1.92 \pm 0.24$	$0.755 \pm 0.308$
Kidney (Left)	$5.77 \pm 0.75$	$1.60 \pm 0.30$	$0.777 \pm 0.379$
Kidney (Right)	$5.45 \pm 1.20$	$1.62 \pm 0.17$	$0.730 \pm 0.410$
Liver	$27.3 \pm 4.3$	$20.9 \pm 2.9$	$8.75 \pm 2.78$
Lung	$10.5 \pm 0.9$	$3.23 \pm 0.72$	$1.18 \pm 0.60$
Heart	$3.40 \pm 0.29$	$0.902 \pm 0.085$	$0.413 \pm 0.247$
Spleen	$4.01 \pm 0.82$	$1.13 \pm 0.02$	$0.437 \pm 0.222$
Plasma	$7.76 \pm 0.67$	$2.01 \pm 0.43$	$0.703 \pm 0.213$

Data are represented as the mean  $\pm$  SD ( $\mu\text{g/g}$  or  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 3$ ) at each post-dose time point.

## IMS によるマウス全身切片の測定

全身切片の IMS 測定の前に、ラクロプリド標準溶液を用いた検討を行った。まず、ラクロプリド標準溶液 (2  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2% TFA 含水/メタノール(1:1)) に対して、等量の DHB 溶液 (60  $\text{mg/mL}$ 、0.2% TFA 含水/メタノール(1:1)) を混合し、MALDI 測定用ステンレスプレートに滴下し乾燥させた後、MS スペクトルを得たところ、ラクロプリドのプロトン付加イオン ( $m/z$  347) 及び DHB の  $[2(\text{M}-\text{H}_2\text{O}) + \text{H}]^+$  イオン ( $m/z$  273) が検出された (Figure 1)。次に、ブランクのマウス脳切片にラクロプリド標準溶液 (1  $\mu\text{g/mL}$ 、水/メタノール(1:1)) を滴下し乾燥させた後、ImagePrep を用いて DHB 溶液 (30  $\text{mg/mL}$ ) を塗布し、MALDI LTQ XL で測定することによってラクロプリドのプロトン付加イオン ( $m/z$  347) 及び DHB の  $[2(\text{M}-\text{H}_2\text{O}) + \text{H}]^+$  イオン ( $m/z$  273) の MS/MS スペクトルをそれぞれ得た (Figure 2)。

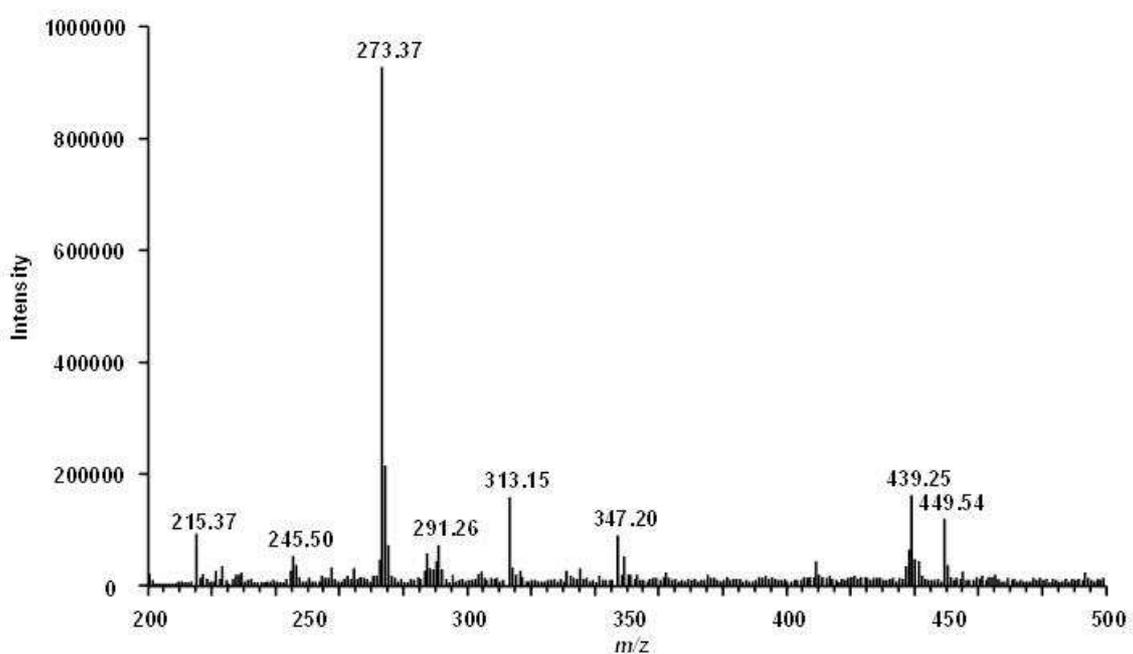


Figure 1. MS spectrum from a standard solution of raclopride mixed with DHB.

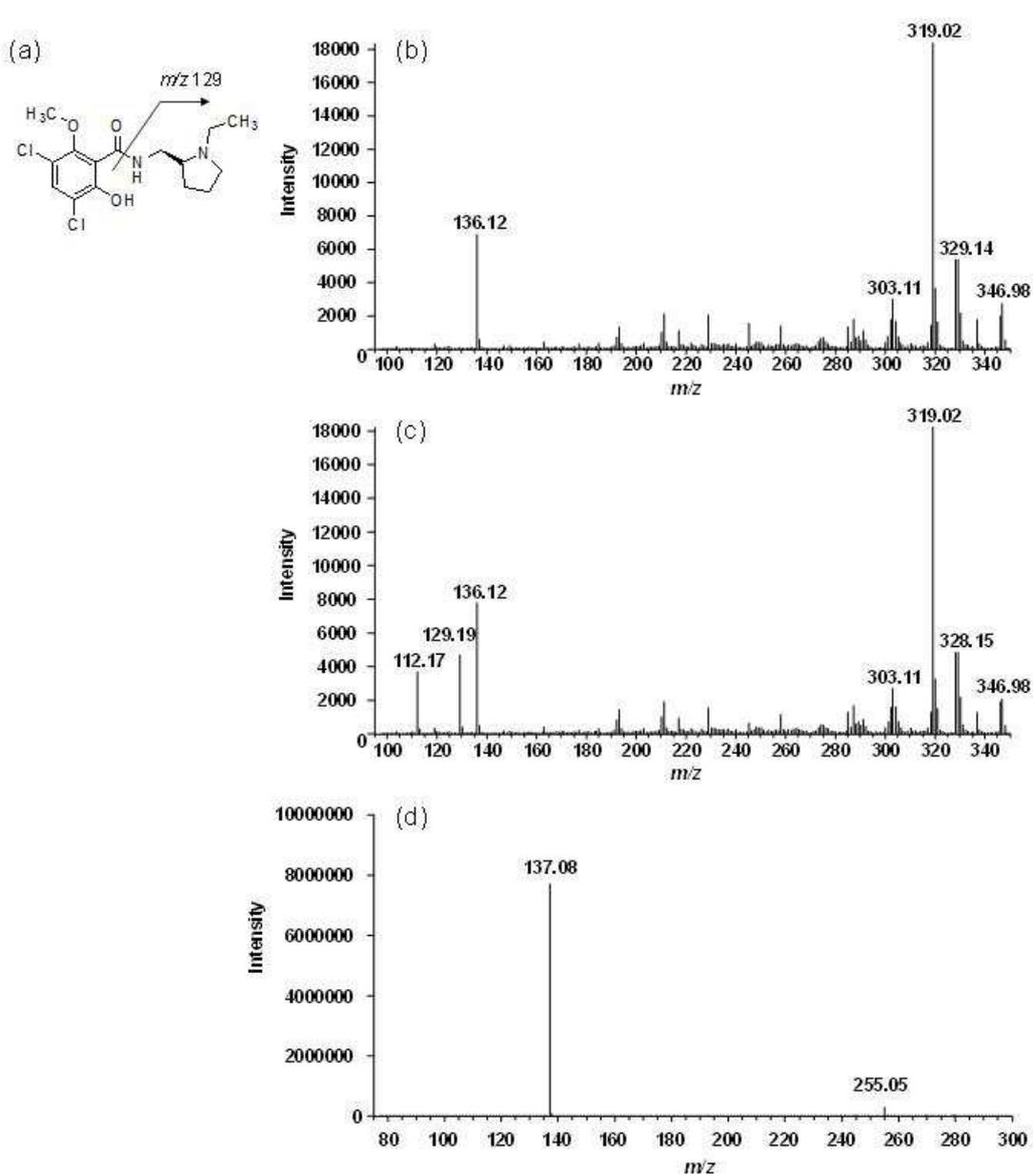


Figure 2. Chemical structure of raclopride (a), MS/MS spectra of  $m/z$  347 from brain sections of non-dosed mice, spotted with a blank solution (b) or a standard solution of raclopride (c) and MS/MS spectrum of  $m/z$  273 from mouse brain section coated with DHB (d).

ラクロプリド標準溶液の MS/MS スペクトルにおいて、 $m/z$  129 のプロダクトイオンが観察された (Figure 2(c))。これは、ブランク溶液の MS/MS スペクトルでは観察されなかったことから (Figure 2(b))、ラクロプリドの構造特異的なイオン、すなわち、アミド結合の開裂によって生じたプロダクトイオンと考えられるため、以降の検討では  $m/z$  347→129 を測定することによって、ラクロプリドの選択的な検出を試みた。また、DHB の MS/MS スペクトルでは、 $m/z$  137 のプロダクトイオンが高いイオン強度で観察された (Figure 2(d))。

マウスにおけるラクロプリドの全身分布を IMS によって測定した結果を Figure 3 に示す。投与 10 分後において、肝臓、肺、脳、腎臓へのラクロプリドの分布を認めた (Figure 3(a))。肝臓への分布は、投与 30 分後及び 60 分後においても明瞭に描出された (Figure 3(b), 3(c))。投与 60 分後においては、ヒトにおける PET での検討結果 (28, 29)と同様に、胆嚢へのラクロプリドの分布が確認された (Figure 3(c))。さらに、いずれの時点においても胃内容物へのラクロプリドの分布が明瞭に確認された。

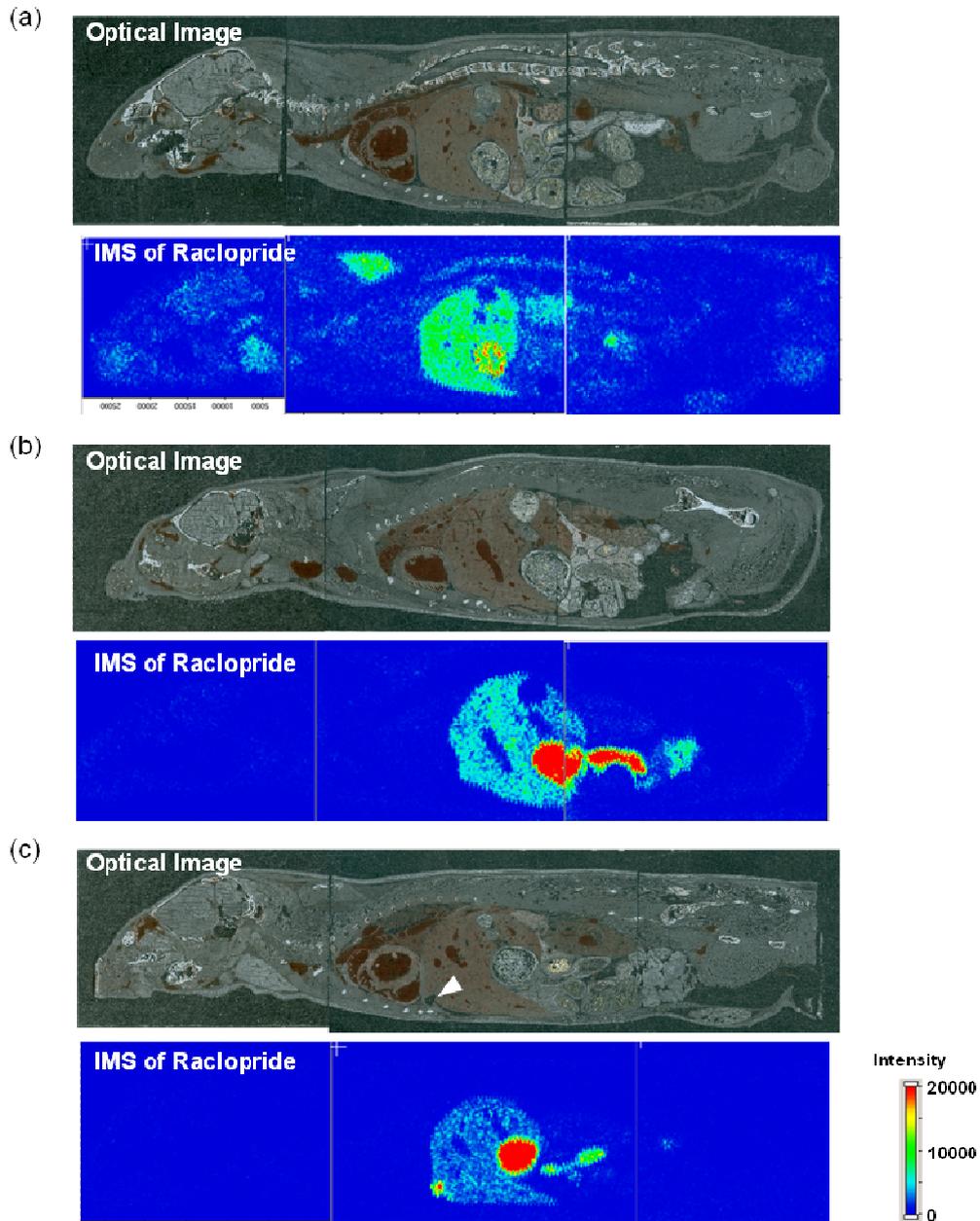


Figure 3. Typical images of sagittal whole-body sections of mice (Optical Image) and IMS of raclopride by extracting  $m/z$  347→129 at (a) 10 min, (b) 30 min, and (c) 60 min post-dose. An arrowhead in (c) indicates the gallbladder.

## IMS によるラクロプリド全身分布の定量的解析

IMS による定量的解析のために、各臓器全体に関心領域を設定し、その領域内のラクロプリド ( $m/z$  347→129) の平均イオン強度を、同領域内の DHB ( $m/z$  273→137) の平均イオン強度で除した値を、ラクロプリドの標準化イオン強度として算出した。この値を、LC/MS/MS によって測定した各臓器中ラクロプリド濃度と比較した結果を Figure 4 に示す。

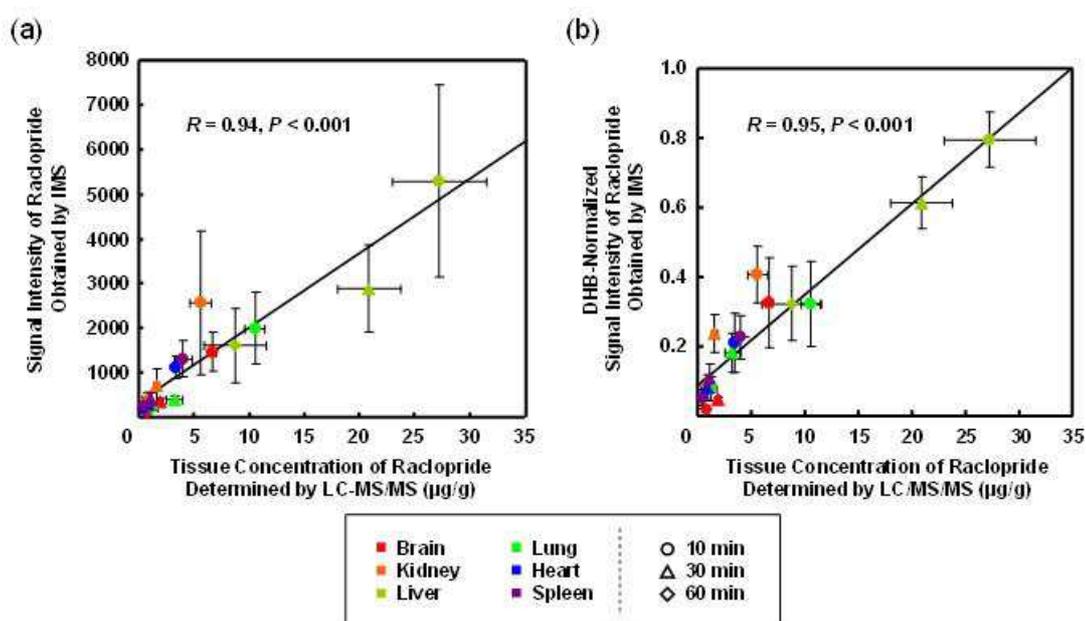


Figure 4. Correlation between the tissue concentrations of raclopride determined by LC/MS/MS and the signal intensities of raclopride (a) or the DHB-normalized signal intensities of raclopride (b) obtained by IMS. Each plot is represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Colors and shapes of the symbols indicate organs and post-dose time points, respectively.

各臓器において IMS によって得られたラクロプリドのイオン強度あるいは標準化イオン強度と、LC/MS/MS によって測定した各臓器中ラクロプリド濃度との関係において、標準化イオン強度を用いた場合に比較的高い相関が認められた ( $R = 0.94$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 4(a) versus  $R = 0.95$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 4(b))。また、各臓器において IMS によって得られたラクロプリドのイオ

ン強度の相対標準偏差(n = 3)は 21.0–63.2%であったのに対して、標準化イオン強度の相対標準偏差(n = 3)は 10.0–47.4%であった。

### **IMS とオートラジオグラフィーの比較**

IMS によって得られたラクロプリドの全身分布において、その空間的分布情報の妥当性を検証するために、隣接した全身切片を用いて  $^3\text{H}$  標識ラクロプリドのオートラジオグラムを得た。その結果を Figure 5 に示す。

投与 10 分後において、IMS によって得られたラクロプリドの分布像は、オートラジオグラムとよく一致しており、特に肝臓、胃内容物、肺において顕著であった (Figure 5(a))。また、投与 30 分後においても同様であり、特に肝臓、胃内容物、腎臓においてよく一致していた (Figure 5(b))。

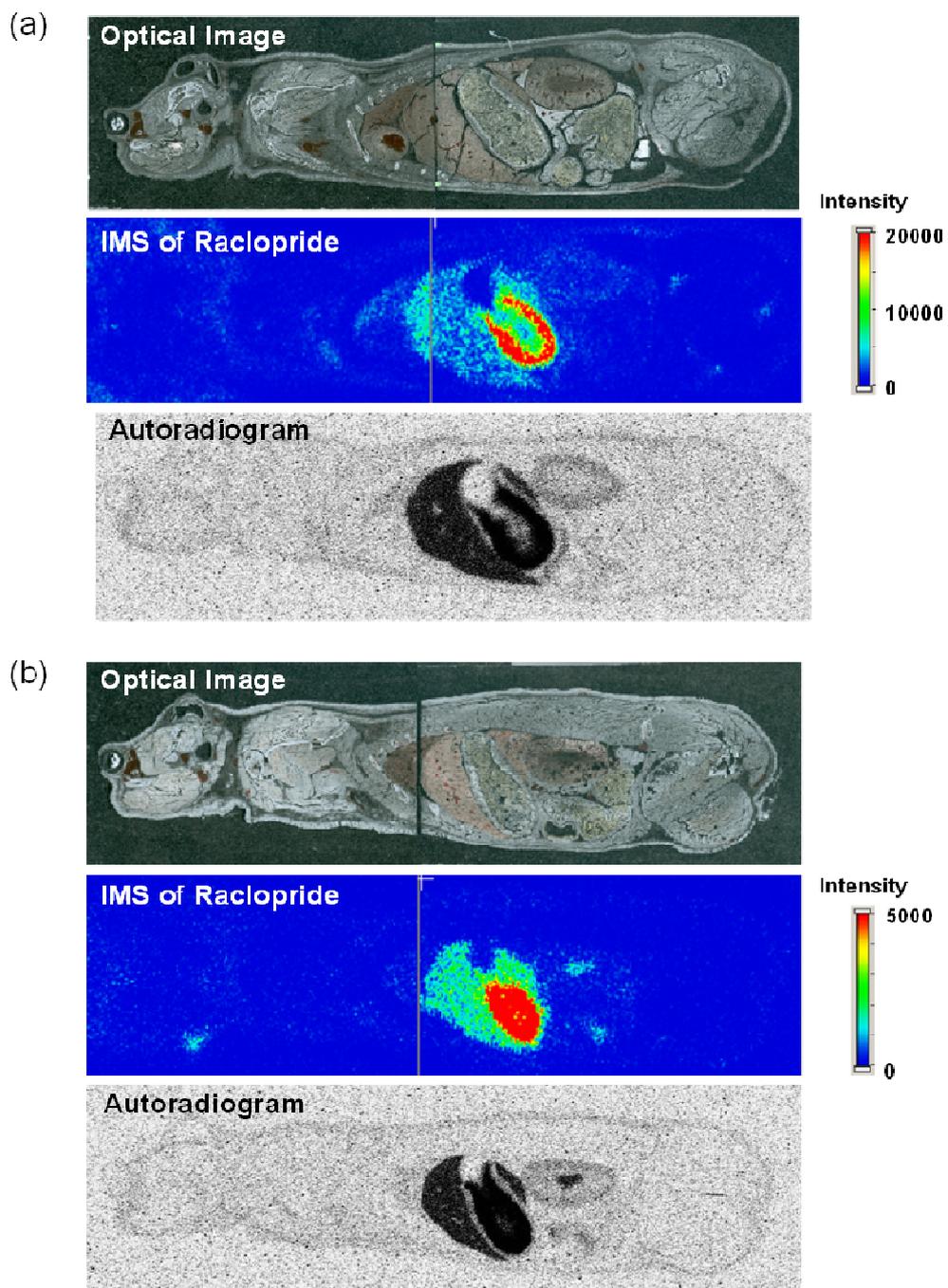


Figure 5. Comparison of MS images of raclopride by extracting  $m/z$  347 $\rightarrow$ 129 and autoradiograms of [ $^3\text{H}$ ]-raclopride at (a) 10 min and (b) 30 min post-dose.

### 1-3 考察

本章では、低分子薬物であるラクロプリドを対象として、その全身分布を IMS によって定量的に解析する手法の構築とその有効性を検討した。

定量的な解析のためには、様々な生体内分子やマトリクス化合物が存在する組織切片上から目的の薬物を選択的に検出する必要がある。そのためには、ラクロプリドの構造特異的なイオンを MS/MS によって検出することが有効であると考え、ラクロプリド標準溶液を組織切片上に滴下した際の MS/MS スペクトルから、 $m/z$  347→129 の測定によってラクロプリドを選択的に検出することを試みた。

また、MALDI による質量分析では、サンプルとマトリクス化合物の共結晶の形成ぐあいが、目的分子のイオン化に大きく影響する。全身切片での薬物分布を対象とした IMS においても、塗布されたマトリクス溶液の不均一性や臓器ごとの組織成分の違いによって目的の薬物のイオン化が変動し、定量的な解析が困難であると考えられる。そこで本章では、ラクロプリドのイオン強度を、マトリクス化合物である DHB のイオン強度によって標準化することによって、定量的な解析を試みた。その結果、各臓器において IMS によって得られたラクロプリドの標準化イオン強度と、LC/MS/MS によって測定した各臓器中ラクロプリド濃度との間には高い相関が認められ、さらに標準化による精度の向上が認められた (Figure 4) ことから、マトリクス化合物のイオン強度による標準化が薬物の全身分布を定量的に解析するために有効であると考えられる。また、MALDI を利用した IMS では、マトリクス化合物を用いることは必須であるため、マトリクス化合物のイオン強度による標準化は汎用性の高い手法と考えられる。

本章では、IMS によって得られたラクロプリドの全身分布において、その情報の妥当性についても検証した。その結果、IMS によって得られたラクロプリドの分布像は、オートラジオグラムとよく一致していた (Figure 5)。したがって、IMS によってオートラジオグラフィと同等の空間分解能で薬物分布を評価できることが示された。同時に、マトリクス溶液の塗布や MALDI イオン源内への導入の過程において、薬物の空間的分布情報が失われないことが示

された。

ラクロプリドの全身分布を **IMS** で測定した結果、胃内容物及び小腸内容物へのラクロプリドの分布が明瞭に確認された。これは、過去のヒトにおけるPETでの検討結果 (28, 29)では明らかになっていなかったため、**IMS** による全身切片の測定で初めて明らかになった貴重な知見である。同条件でラクロプリドをマウスに投与し、胃内容物中ラクロプリド濃度を **LC/MS/MS** で測定した結果、投与 10、30、60 分後でそれぞれ、 $21.0 \pm 4.0 \mu\text{g/g}$ ,  $32.3 \pm 7.5 \mu\text{g/g}$ ,  $25.2 \pm 5.4 \mu\text{g/g}$  と高い濃度であったことから、**IMS** で認められた胃内容物への分布が妥当であることが確認された。**IMS** での測定結果より、ラクロプリドは静脈内投与後に速やかに胃へ分布し、胃内腔へ分泌された後、胃内容物と共に小腸へ移行したと考えられる。このような予想されていない組織への薬物の蓄積は、重大な毒性を引き起こす恐れがあるため、非臨床研究でそれを評価することは創薬研究において重要な意味をもつ (3)。したがって、**IMS** によって薬物の全身分布を測定することで、創薬探索段階から薬物の組織蓄積性を検出できる可能性があり、新薬開発の成功確率の向上に貢献できると考えられる。

以上のように、本研究では**IMS**を用いて、ラクロプリドを対象として、組織切片上での高選択的な検出とイオン強度の標準化により全身分布の定量的な解析を可能とする方法を構築し、それが低分子薬物の全身分布を定量的に解析する方法として有効であることを示した。

## 第 2 章

### 質量分析イメージング法によるペプチド薬物の組織内分布解析

近年、ペプチドや抗体といった分子を新薬として開発することが増えている (30, 31)。したがって、低分子薬物と同様に、ペプチドや抗体を母体とした薬物の生体内分布を定量的に解析できる手法が必要とされており、実際 LC/MS/MS によってペプチドや抗体を母体とした薬物の生体試料中濃度を測定した例が報告されている (32–35)。

一方、IMS の場合には Stoeckli らがペプチドを投与したマウスの全身切片での測定例を報告しているが (36)、ペプチド薬物の組織内分布を定量的に解析した例はこれまで報告されていない。その理由は、生体内由来のペプチドやタンパクが豊富に存在する組織切片上から目的のペプチド薬物を高感度かつ高選択的に検出する必要があり、その検出条件を最適化することが難しいことにある。そこで、本研究では、ペプチド薬物であるソマトスタチン類縁ペプチド、オクトレオチド (9) を対象として、その組織内分布を IMS によって定量的に解析する手法の構築とその有効性を検討することを計画した。

#### 2-1 実験方法

##### 試薬

オクトレオチドは、American Peptide Company 社より購入した。Figure 6 にオクトレオチドの化学構造を示す。 $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)、DHB は、シグマアルドリッチ社より MALDI-MS 用のものを購入した。高速液体クロマトグラフィー用メタノール、アセトニトリル、イソプロパノール、及び特級ギ酸は、関東化学株式会社より購入した。TFA は、和光純薬工業株式会社より購入した。イソフルランは、アボットジャパン株式会社より購入した。水は、Millipore 社製超純水製造装置で精製したものを用いた。

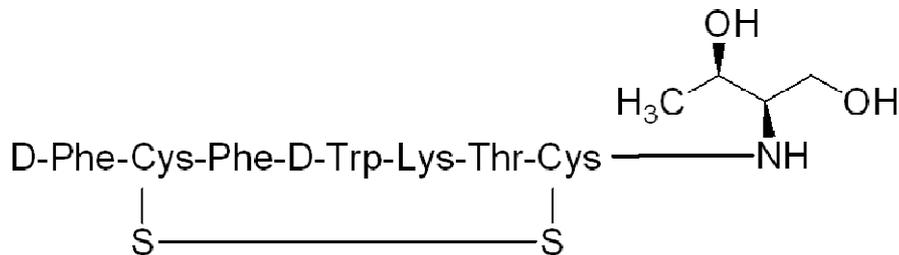


Figure 6. Chemical structure of octreotide.

### *in vitro* MALDI-MS 分析

オクトレオチド標準溶液 (2  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2% TFA 含水/アセトニトリル(1:1)あるいは0.2% TFA 含水/メタノール(1:1)) に対して、等量の CHCA 溶液 (10  $\text{mg/mL}$ 、0.2% TFA 含水/アセトニトリル(1:1)) あるいは DHB 溶液 (60  $\text{mg/mL}$ 、0.2% TFA 含水/メタノール(1:1)) を混合し、MALDI 測定用ステンレスプレートに滴下し乾燥させた後、Thermo Fisher Scientific 社製 MALDI LTQ XL を用いてオクトレオチドの MS スペクトル及び MS/MS スペクトルを下記のように得た。レーザーには窒素レーザー (337 nm、60 Hz) を用い、エネルギーはそれぞれ、CHCA サンプルに対して 10  $\mu\text{J}$ 、DHB サンプルに対して 32  $\mu\text{J}$  に設定した。イオントラップ内のイオン量を調節する Auto gain control 機能は使用せず、1 部位あたりのレーザー照射回数を 1 回 (0.5 秒) と定め、1 サンプルあたり 20 部位を測定して得られた MS スペクトルあるいは MS/MS スペクトルを積算した。MS/MS スペクトルは、ポジティブイオンモードでプロトン付加イオン ( $m/z$  1019) のプロダクトイオンスキャンにより得た。

### 動物実験

動物実験は、塩野義製薬株式会社動物実験委員会の承認を受け施行した。日本クレア株式会社より購入した、8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (体重 約 22 g) を用いて、尾静脈内にオクトレオチド生理食塩水溶液を、3  $\text{mg}/10 \text{ mL/kg}$  で投与した。なお、コントロール群のマウスに

は、生理食塩水を 10 mL/kg で投与した。投与 15、60 分後 (n = 3) にイソフルラン麻酔下で下大静脈より全採血することによって安楽死させた後、肝臓及び腎臓を摘出した。摘出した肝臓は二分し、一方を LC/MS/MS 測定用、もう一方を IMS 測定用とした。また、摘出した腎臓のうち、右腎を LC/MS/MS 測定用、左腎を IMS 測定用とした。LC/MS/MS 測定用の各臓器の重量を測定し、その 4 倍量の水を加え、IKA Works 社製 Ultra-Turrax T10 を用いてホモジナイズした後、測定まで -80°C で保存した。IMS 測定用の各臓器は、液体窒素下で急速に凍結させた。

### **LC/MS/MS 測定**

LC/MS/MS システムには、Waters 社製 Acquity UPLC システムと AB Sciex 社製三連四重極型質量分析計 API 5000™ を用いて、Waters 社製 Masslynx 4.1 ソフトウェアと AB Sciex 社製 Analyst 1.4.2 ソフトウェアによってそれぞれ制御した。各試料中のオクトレオチド濃度は以下の方法で測定した。組織ホモジネート試料 100 µL にアセトニトリル 500 µL を加えて数分間攪拌した後、5000 rpm、10°C で 5 分間遠心し、得られた上清 2 µL を LC/MS/MS システムに注入した。クロマトグラフィー用カラムには Waters 社製 Acquity UPLC™ BEH C18 column (50×2.1 mm i.d., 1.7 µm) を 40°C で用いた。オートサンプリング内は 10°C に保ち、洗浄液には水/アセトニトリル/メタノール/イソプロパノール (1:1:1:1) と水/アセトニトリル (9:1) を用いた。移動相には 0.1%ギ酸含水/アセトニトリル (79:21) を用いて、オクトレオチドは流速 750 µL/min で溶出させ、質量分析計に導入した。イオン化は ESI のポジティブイオンモードによって行い、オクトレオチドの二価のプロトン付加イオン ( $m/z$  510.5) から 37 eV の衝突エネルギーで得られた  $m/z$  120.1 を SRM モードで検出した (37, 38)。別途、ブランク組織ホモジネートを用いて調製したオクトレオチドの標準試料から検量線を作成し、Analyst ソフトウェアによって試料中のオクトレオチド濃度を計算した。

## IMS 測定用試料の調製

Leica 社製 Leica CM3050S を用いて、肝臓及び腎臓試料より切片を厚さ 10  $\mu\text{m}$  で作製し、Thermo Fisher Scientific 社製 Superfrost スライドグラスに載せた後、測定まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。測定の前に、切片を真空デシケータ内、室温で 15 分間乾燥させ、Hewlett-Packard 社製 Scanjet G4050 を用いて光学画像を得た。MALDI 用マトリクス溶液として、0.2% TFA 含水/メタノール(1:1)に DHB を 30 mg/mL で溶解させた。調製したマトリクス溶液は、Bruker Daltonics 社製 ImagePrep™を用いて切片に塗布した。

## IMS 測定

組織切片の測定には、Thermo Fisher Scientific 社製 MALDI LTQ XL を用いた。レーザーには窒素レーザー(337 nm、60 Hz)を用い、エネルギーは 32  $\mu\text{J}$ 、照射間隔は 150  $\mu\text{m}$  に設定した。定量的な解析を実施するために、イオントラップ内のイオン量を調節する Auto gain control 機能は使用せず、1 部位あたりのレーザー照射回数を 2 回と定めた。1 回のレーザー照射(0.5 秒)でオクトレオチドを、もう 1 回のレーザー照射で DHB を検出するために、それぞれポジティブイオンモードで各イオン(オクトレオチド  $m/z$  1019;  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、DHB  $m/z$  273;  $[\text{2}(\text{M}-\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$ )のプロダクトイオンスキャンを行った。衝突エネルギーはそれぞれ、オクトレオチドに対して規定値の 30%、DHB に対して規定値の 40%、に設定した (26)。測定時間は 1 部位あたり 1 秒で、組織切片 1 枚につき約 3000 部位を測定した。得られた質量スペクトルデータは、Thermo Fisher Scientific 社製 ImageQuest 1.0.1 ソフトウェアを用いて画像データに変換した。画像データからの定量的解析は、ImageQuest ソフトウェアを用いて、組織切片の光学画像上で各臓器全体に関心領域を設定し、その領域内のオクトレオチド( $m/z$  1019 $\rightarrow$ 914)及び DHB ( $m/z$  273 $\rightarrow$ 137)の平均イオン強度を計算した。

## 2-2 結果

### MALDI-MS におけるオクトレオチド測定用マトリクス化合物の選択

CHCA あるいは DHB を MALDI 用マトリクス化合物として用いた際の、オクトレオチド標準溶液の MS スペクトルを Figure 7 に示す。

MS スペクトルにおいて、オクトレオチドのプロトン付加イオン ( $m/z$  1019) は、CHCA を用いた場合 (Figure 7(a)) よりも、DHB を用いた場合 (Figure 7(b)) において、高いイオン強度で検出された。したがって、MALDI においてオクトレオチドを高感度に検出するマトリクス化合物として DHB を選択した。

### MALDI-MS におけるオクトレオチドの MS/MS 分析

DHB をマトリクス化合物として用いた際の、オクトレオチド標準溶液におけるプロトン付加イオン ( $m/z$  1019) の MS/MS スペクトルを Figure 8 に示す。

MS/MS スペクトルにおいて、 $m/z$  914 と  $m/z$  1001 のプロダクトイオンが高いイオン強度で観察された (Figure 8(b))。これは、ブランク溶液の MS/MS スペクトルでは観察されなかったことから (Figure 8(a))、オクトレオチドの構造特異的なイオン、すなわち、 $m/z$  914 は Cys7-Thr8 のペプチド結合の開裂 ( $b_7^+$ イオン) によって、 $m/z$  1001 は分子内脱水によって、それぞれ生じたプロダクトイオンと考えられる。

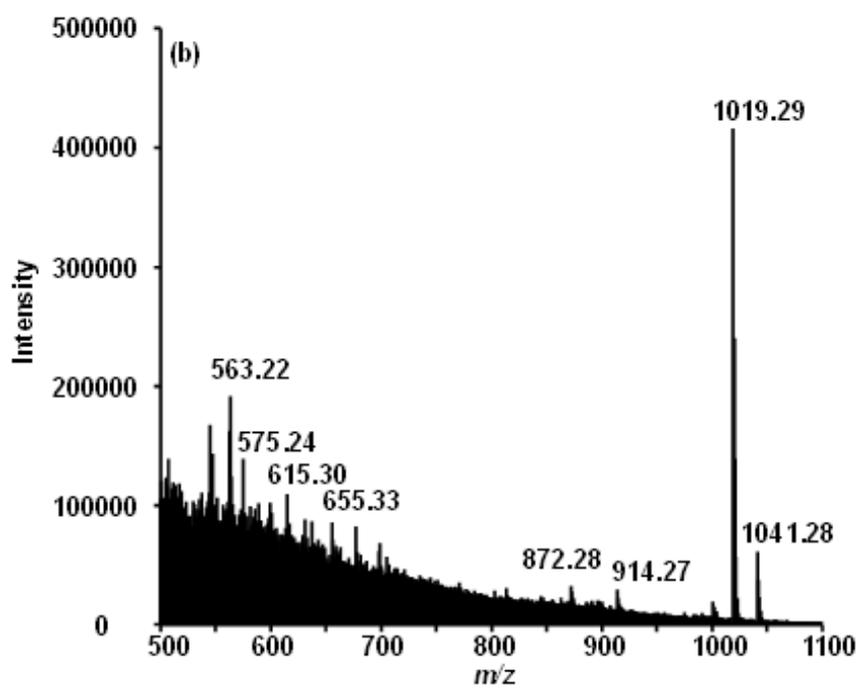
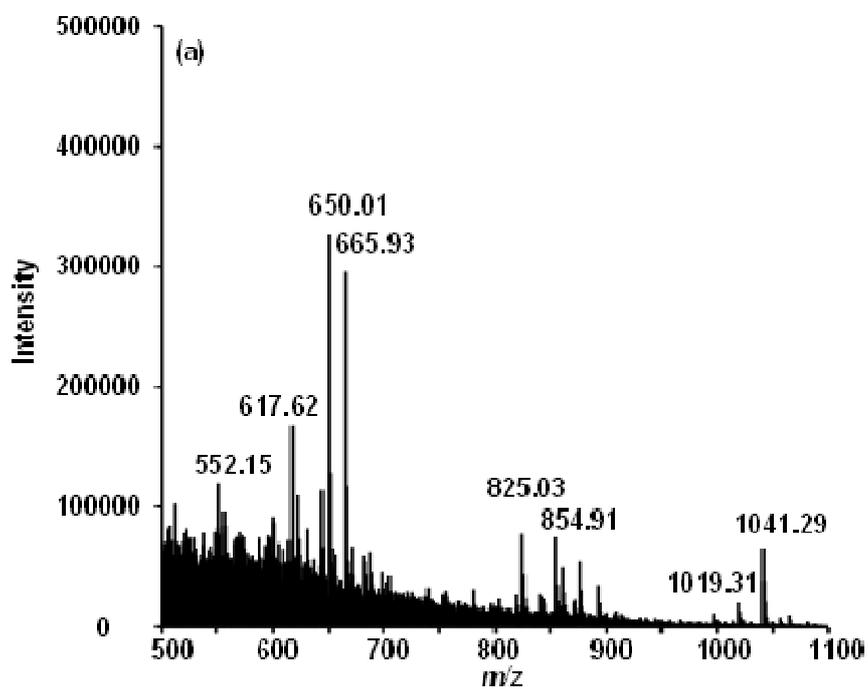


Figure 7. MALDI-MS spectra from a standard solution of octreotide mixed with (a) CHCA or (b) DHB.

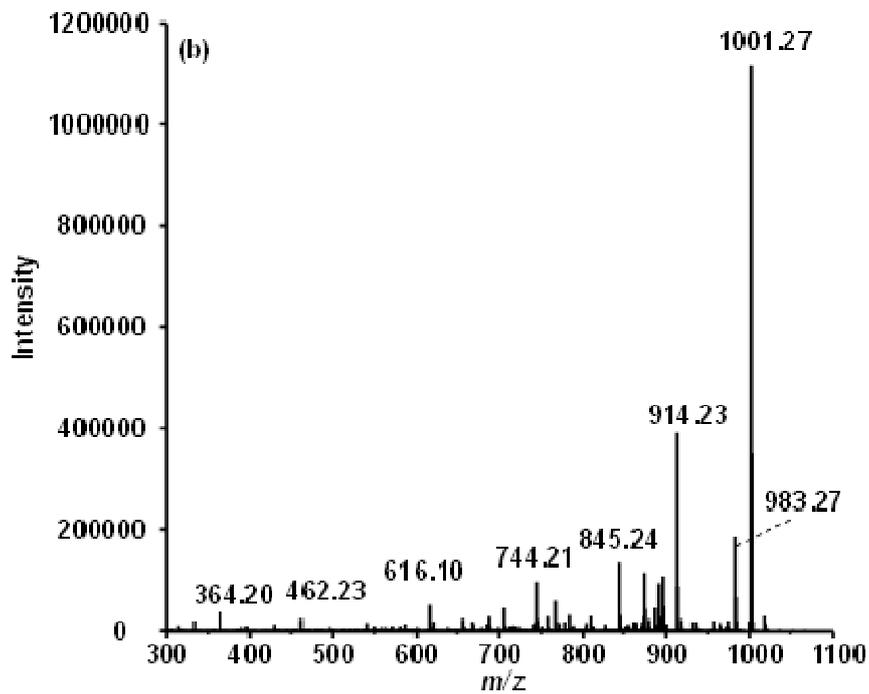
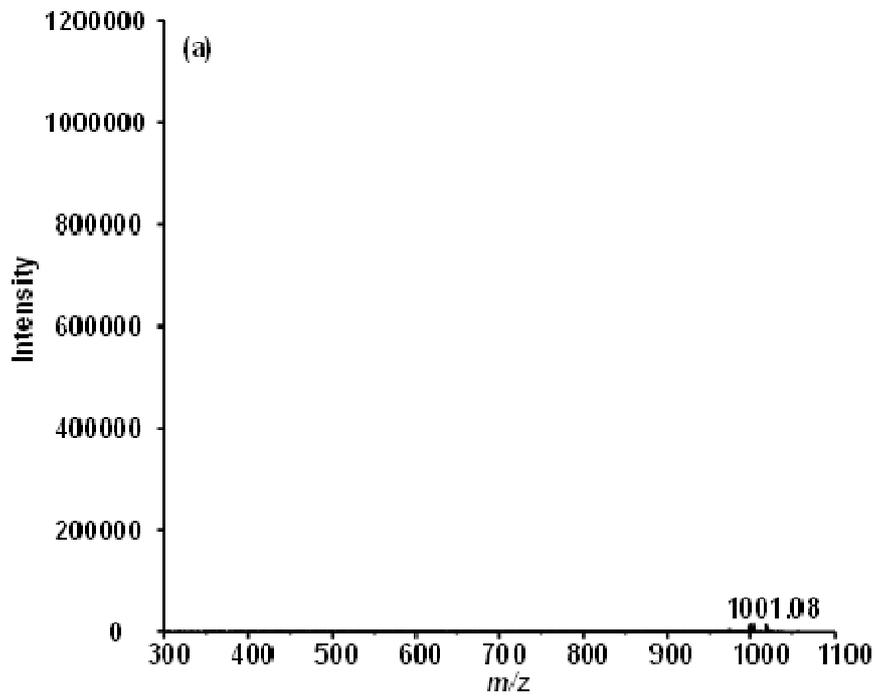


Figure 8. Product ion spectra of  $m/z$  1019 from (a) a blank solution or (b) a standard solution of octreotide, mixed with DHB.

### MALDI-MS におけるオクトレオチド測定用イオンの選択

組織切片上でオクトレオチドを選択的に検出するために、オクトレオチド標準溶液(1 µg/mL、水/メタノール(1:1))を用いた検討を行った。ブランクのマウス肝臓切片にオクトレオチド標準溶液を滴下し乾燥させた後、ImagePrep を用いて DHB 溶液(30 mg/mL)を塗布し、MALDI LTQ XL で測定することによって、オクトレオチドに関連するイオンのイオン強度を測定した (Table 2)。なお、各イオン強度は、標準溶液を滴下した領域内の平均イオン強度を、Thermo Fisher Scientific 社製 MALDI Quan 2.5.0 を用いて計算した。

Table 2. The signal intensities on blank liver sections spotted with a standard solution of octreotide, measured by monitoring  $m/z$  1019, 1019→1001, and 1019→914.

	MS		MS/MS		
	$m/z$ 1019		$m/z$ 1019→1001		$m/z$ 1019→914
Blank solution		33366		34885	1675
		25798		29531	1189
		26679		28563	1314
	mean ± SD	28614 ± 4139	30993 ± 3405	1392 ± 252	
1 µg/mL solution		33424		41401	5082
		31214		42897	6044
		34906		40450	5224
	mean ± SD	33181 ± 1858	41583 ± 1234	5450 ± 519	
Signal-to-noise ratio †		1.2		1.3	3.9

† Calculated by dividing the mean signal intensity of 1 µg/ml solution of octreotide by that of blank solution.

各イオンについて、ブランク溶液におけるイオン強度に対するオクトレオチド標準溶液におけるイオン強度の比を、シグナル/ノイズ比として算出したところ、 $m/z$  1019、 $m/z$  1019→1001、 $m/z$  1019→914 でそれぞれ、1.2、1.3、3.9 であった。したがって、組織切片上でオクトレオチドを選択的に検出するためには、 $m/z$  1019→914 を測定することが最適であると判断した。

### LC/MS/MS によるマウス臓器中オクトレオチド濃度の測定

Table 3 に、オクトレオチドをマウスに静脈内投与した後の各臓器中オクトレオチド濃度を示す。投与 15 分後において、オクトレオチドの分布は肝臓よりも腎臓に高く認められたが(腎臓  $13.3 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$ 、肝臓  $3.25 \pm 0.84 \mu\text{g/g}$ )、この結果はラジオイムノアッセイを用いて測定されたラットにおける薬物動態に関する報告 (39)と同様の結果であった。

Table 3. Concentrations of octreotide in each organ of mice after intravenous administration of octreotide (3 mg/kg), determined by LC/MS/MS.

	Mouse	15 min	60 min
Liver	#1	4.20	1.34
	#2	2.65	1.10
	#3	2.89	1.33
	mean $\pm$ SD	3.25 $\pm$ 0.84	1.26 $\pm$ 0.14
Kidney	#1	12.8	4.70
	#2	12.5	4.19
	#3	14.5	4.67
	mean $\pm$ SD	13.3 $\pm$ 1.1	4.52 $\pm$ 0.29

(unit;  $\mu\text{g/g}$ )

### IMS によるマウス組織切片の測定

マウスの肝臓及び腎臓におけるオクトレオチドの分布を IMS によって測定した結果を Figure 9、Figure 10 に示す。投与 15 分後において、コントロール群のマウスではシグナルがほとんど認められなかった (Figure 9(b), Figure 10(b)) のに対して、オクトレオチド投与群のマウスでは肝臓、腎臓へのオクトレオチドの分布が明瞭に認められた (Figure 9(d), Figure 10(d))。オクトレオチドのシグナル強度は、肝臓よりも腎臓において高く、腎盂や腎乳頭を含む領域で特に高く認められた。

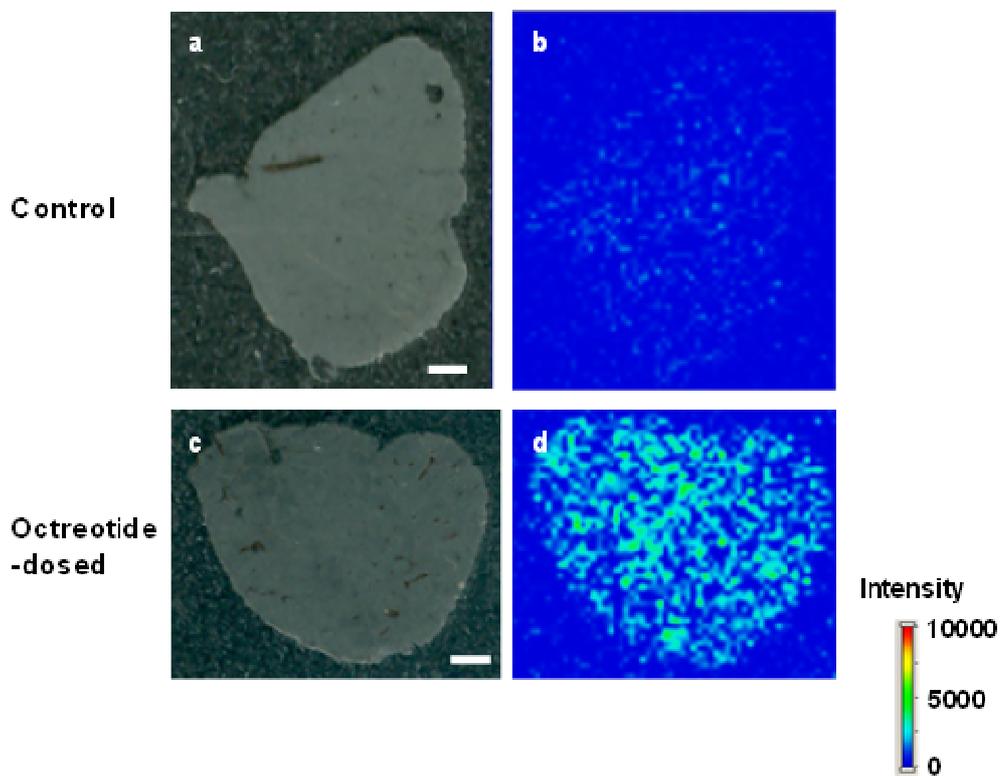


Figure 9. Typical images of the liver sections of mice (optical image, a and c) and IMS of octreotide by extracting  $m/z$  1019→914 (b and d) at 15 min post-dose. Bar = 1 mm.

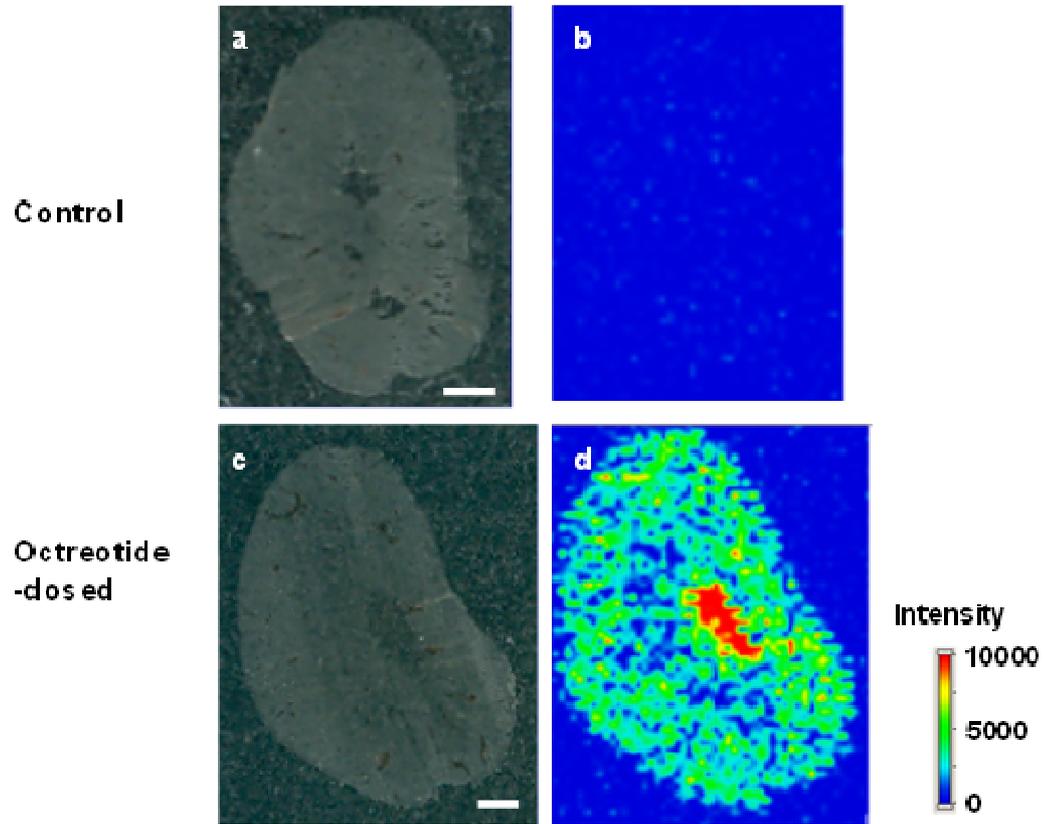


Figure 10. Typical images of the kidney sections of mice (optical image, a and c) and IMS of octreotide by extracting  $m/z$  1019→914 (b and d) at 15 min post-dose. Bar = 1 mm.

### IMSによるオクトレオチド組織内分布の定量的解析

IMSによる定量的解析のために、各臓器全体に関心領域を設定し、その領域内のオクトレオチド( $m/z$  1019→914)の平均イオン強度を、同領域内のDHB( $m/z$  273→137)の平均イオン強度で除した値を、オクトレオチドの標準化イオン強度として算出した。オクトレオチドのイオン強度あるいは標準化イオン強度を、LC/MS/MSによって測定した各臓器中オクトレオチド濃度と比較した結果をFigure 11に示す。

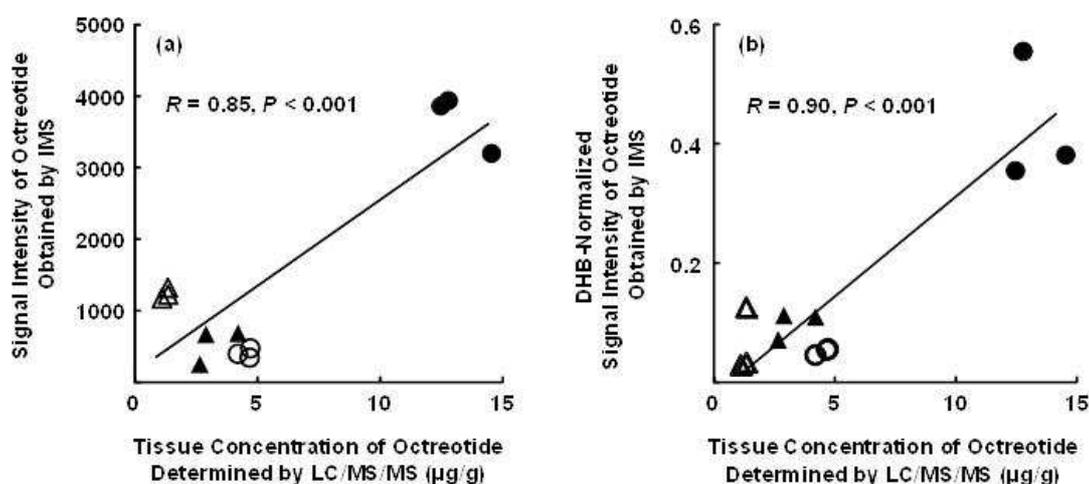


Figure 11. Correlation between the tissue concentrations of octreotide determined by LC/MS/MS and the signal intensities of octreotide (a) or the DHB-normalized signal intensities of octreotide (b) obtained by IMS. Each plot represents individual mouse. ●; 15 min, kidney, ○; 60 min, kidney, ▲; 15 min, liver, △; 60 min, liver.

各臓器においてIMSによって得られたオクトレオチドのイオン強度あるいは標準化イオン強度と、LC/MS/MSによって測定した各臓器中オクトレオチド濃度との関係において、標準化イオン強度を用いた場合に比較的高い相関が認められた( $R = 0.85$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 11(a) versus  $R = 0.90$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 11(b))。

## 2-3 考察

本章では、ペプチド薬物であるオクトレオチドを対象として、その組織内分布を IMS によって定量的に解析する手法の構築とその有効性を検討した。

ペプチド薬物を IMS によって定量的に解析するためには、生体内由来のペプチドやタンパクが豊富に存在する組織切片上から目的のペプチド薬物を高感度かつ高選択的に検出する必要があり、その検出条件を最適化することが重要である。

まず、ペプチド薬物を高感度に検出するためには、最適なマトリクス化合物を選択することが必要であると考え、MALDI において汎用されている CHCA と DHB をそれぞれマトリクス化合物として用いた場合のオクトレオチドのプロトン付加イオンのイオン強度を比較した (Figure 7)。その結果、オクトレオチドを MALDI によって効率よくイオン化させるためのマトリクス化合物として DHB が CHCA より優れていることを認めた。

また、ペプチド薬物を高選択的に検出するためには、組織切片上で良好なシグナル/ノイズ比を示すイオンを測定する必要があると考え、MS 分析で得られるプロトン付加イオン ( $m/z$  1019)、MS/MS 分析で得られる脱水イオン ( $m/z$  1019→1001) 及び  $b_7^+$  イオン ( $m/z$  1019→914) について比較した。その結果、 $m/z$  1019 及び  $m/z$  1019→1001 では、シグナル/ノイズ比がそれぞれ 1.2、1.3 と低い値を示した。これは、オクトレオチドに類似した分子量や構造を持つ分子が組織切片上に含まれるためと考えられる。一方、 $m/z$  1019→914 ではシグナル/ノイズ比が 3.9 と高い値を示し、このイオンがオクトレオチドを組織切片上で高選択的に検出するためには最も適していることを見出した (Table 2)。

このように最適化された検出条件においてオクトレオチドの組織内分布を IMS で測定した結果、腎臓への高い分布、特に腎盂や腎乳頭を含む領域への高い分布が認められた (Figure 10)。この結果はオクトレオチドが投与早期に未変化体として尿中に排泄されることを示していると考えられ、これは既に報告されている  $^{111}\text{In}$  標識オクトレオチドのマウスにおける実験結果 (40) と一致していた。

第 1 章と同様に、IMS による定量的解析のためには、マトリクス化合物の結晶化に由来するイオン化効率のばらつきを補正する必要があると考え、オクトレオチドのイオン強度を、マトリクス化合物である DHB のイオン強度によって標準化することとした。その結果、各臓器において IMS によって得られたオクトレオチドの標準化イオン強度と、LC/MS/MS によって測定した各臓器中オクトレオチド濃度との間には高い相関が認められた (Figure 11)。したがって、マトリクス化合物のイオン強度による標準化は、ペプチド薬物の体内分布の定量的解析についても有効であり、その汎用性が示された。

以上のように、オクトレオチドを対象として、IMS を用いて組織切片上での高感度かつ高選択的な検出を可能とした解析法を構築し、本法がペプチド薬物の組織内分布を定量的に解析する手法として有効であることが示された。

### 第3章

#### 質量分析イメージング法による組織内薬物濃度定量法の開発

創薬研究において、薬効発現や毒性回避の観点から理想的な組織分布プロファイルをもつ薬物を選定するためには、各薬物の組織内濃度を測定し候補薬物間で比較することが重要である。しかし、これまでのIMSでは特定の薬物のイオン強度を組織間で相対的に比較するにとどまっている。そこで、IMSについて、各薬物間での体内・組織内分布の比較などのために、組織内の薬物の絶対量を求めるという方法の確立が望まれている。

IMSによって組織内薬物濃度を定量する試みはこれまでも行われているが、その際検量線を作成するために用いられた標準試料は、ブランクの組織切片に既知濃度の薬物を含有する溶液を滴下したものであり、それには組織内に分布した薬物を抽出する過程は考慮されていない(41-43)。そこで著者は、組織切片から薬物を抽出する過程を模した標準試料を検量線作成のために利用することを考え、肝臓ホモジネートに種々の濃度の薬物を添加した試料の凍結切片を用いて検量線を作成することとした。また、組織切片上での薬物のイオン化効率のばらつきを高精度に補正するために、その薬物の構造類縁体を内部標準物質として組織切片に塗布することとした。そして本章では、これらの方法をカンナビノイド2受容体選択的アゴニストである S-777469 (1-((6-ethyl-1-(4-fluorobenzyl)-5-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonyl) amino)-cyclohexanecarboxylic acid) (10)およびラクロプリドに適用し、組織内薬物濃度定量法としての本法の有効性を検討することを計画した。

### 3-1 実験方法

#### 試薬

S-777469、重水素標識 S-777469 (S-777469- $d_{10}$ ) は、塩野義製薬株式会社において合成した。ラクロプリド酒石酸塩、スルピリド、DHB (MALDI-MS 用) は、シグマアルドリッチ社より購入した。高速液体クロマトグラフィー用メタノール、アセトニトリル、イソプロパノール、及び特級ギ酸は、関東化学株式会社より購入した。ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) は、ナカライテスク株式会社より購入した。N,N-ジメチルアセトアミド (N,N-dimethylacetamide, DMA)、プロピレングリコール (propylene glycol, PG)、TFA は、和光純薬工業株式会社より購入した。イソフルランは、アボットジャパン株式会社より購入した。水は、Millipore 社製超純水製造装置で精製したものをを用いた。

#### in vitro MALDI-MS 分析

S-777469 標準溶液 (2  $\mu\text{g/mL}$ 、0.2% TFA 含水/メタノール (1:1)) に対して、等量の DHB 溶液 (60  $\text{mg/mL}$ 、0.2% TFA 含水/メタノール (1:1)) を混合し、MALDI 測定用ステンレスプレートに滴下し乾燥させた後、Thermo Fisher Scientific 社製 MALDI LTQ XL を用いて S-777469 の MS スペクトル及び MS/MS スペクトルを下記のように得た。レーザーには窒素レーザー (337 nm、60 Hz) を用い、エネルギーは 15  $\mu\text{J}$  に設定した。イオントラップ内のイオン量を調節する Auto gain control 機能は使用せず、1 部位あたりのレーザー照射回数を 1 回 (0.5 秒) と定め、1 サンプルあたり 20 部位を測定して得られた MS スペクトルあるいは MS/MS スペクトルを積算した。S-777469 の MS/MS スペクトルは、ポジティブイオンモードでプロトン付加イオン ( $m/z$  415) のプロダクトイオンスキャンにより得た。

#### 動物実験

動物実験は、塩野義製薬株式会社動物実験委員会の承認を受け施行した。日本エスエル

シー株式会社より購入した、8 週齢の雄性 ddY マウス(体重 36–40 g)を用いて、尾静脈内に S-777469 DMA/PG (1:1) 溶液あるいはラクロプリド生理食塩水溶液を、10 mg/10 mL/kg で投与した。投与 10 分後 (n = 2) にイソフルラン麻酔下で下大静脈より全採血することによって安楽死させた後、肝臓、脳、肺、腎臓を摘出した。摘出した肝臓は二分し、一方を LC/MS/MS 測定用、もう一方を IMS 測定用とした。また、摘出した脳、肺、腎臓のうち、右側を LC/MS/MS 測定用、左側を IMS 測定用とした。LC/MS/MS 測定用の各臓器の重量を測定し、その 4 倍量の水を加え、IKA Works 社製 Ultra-Turrax T10 を用いてホモジナイズした後、測定まで -80°C で保存した。IMS 測定用の各臓器は、液体窒素下で急速に凍結させた。

### LC/MS/MS 測定

LC/MS/MS システムには、Waters 社製 Acquity UPLC システムと AB Sciex 社製三連四重極型質量分析計 API 5000™ を用いて、Waters 社製 Masslynx 4.1 ソフトウェアと AB Sciex 社製 Analyst 1.4.2 ソフトウェアによってそれぞれ制御した。各試料中の S-777469 濃度あるいはラクロプリド濃度は以下の方法で測定した。組織ホモジネート試料 40 µL にアセトニトリル 500 µL を加えて数分間攪拌した後、5000 rpm、10°C で 5 分間遠心した。得られた上清をアセトニトリルで 10 倍希釈し、2 µL を LC/MS/MS システムに注入した。クロマトグラフィー用カラムには Waters 社製 Acquity UPLC™ BEH C18 column (50×2.1 mm i.d., 1.7 µm) を 40°C で用いた。オートサンプラ内は 10°C に保ち、洗浄液にはイソプロパノールと水/アセトニトリル (9:1) を用いた。移動相には A 0.1% ギ酸含アセトニトリル及び B 0.1% ギ酸含水を用いて、S-777469 あるいはラクロプリドは流速 750 µL/min、B 10–95% のグラジエントで溶出させ、質量分析計に導入した。イオン化は ESI のポジティブイオンモードによって行い、S-777469 のプロトン付加イオン ( $m/z$  415) から 35 eV の衝突エネルギーで得られた  $m/z$  109 を、あるいはラクロプリドのプロトン付加イオン ( $m/z$  347) から 25 eV の衝突エネルギーで得られた  $m/z$  112 を、SRM モードで検出した。別途、ブランク組織ホモジネートを用いて調製した S-777469 あるいはラクロプリドの標準試料から検量線を作成し、Analyst ソフトウェアによって試料中の S-777469 あるいはラクロプリド

ド濃度を計算した。

### **IMS 検量線用標準試料の調製**

S-777469 あるいはラクロプリドを DMSO に溶解し、それぞれ 150 mg/mL、20 mg/mL とした。これを水/メタノール(1:1)で段階的に希釈し、それぞれの標準溶液(5 濃度)を得た(S-777469 0.1–15 mg/mL、ラクロプリド 0.1–2 mg/mL)。ブランクのマウス肝臓の重量を測定し、その 1/3 倍量(75%肝臓ホモジネート)あるいは等量(50%肝臓ホモジネート)の水を加え、Ultra-Turrax T10を用いてホモジナイズした後、S-777469 あるいはラクロプリドの標準溶液を容量で1%添加し、それぞれの標準試料として-80°C で保存した(S-777469 1–150 µg/g、ラクロプリド 1–20 µg/g)。

### **IMS 測定用試料の調製**

Leica 社製 Leica CM3050S を用いて、各臓器試料あるいは標準試料より切片を厚さ 20 µm で作製し、Thermo Fisher Scientific 社製 Superfrost スライドグラスに載せた後、測定まで-80°C で保存した。測定の前に、切片を真空デシケータ内、室温で 15 分間乾燥させ、Hewlett-Packard 社製 Scanjet G4050 を用いて光学画像を得た。S-777469 あるいはラクロプリドそれぞれに対する内部標準物質として、S-777469-*d*<sub>10</sub> あるいはスルピリドの水/メタノール(1:1) 溶液を 10 µg/mL で調製し、アネスト岩田社製 HP-TH エアブラシ(ノズル口径 0.5 mm)を用いて、切片上に均一に塗布した。塗布量は1スライドグラスあたり3 mLとし、塗布中はエアブラシのノズルからスライドグラスまでの水平距離を 40 cm に保った。その後、MALDI 用マトリクス溶液として、0.2% TFA 含水/メタノール(1:1)に 30 mg/mL で溶解させた DHB を、Bruker Daltonics 社製 ImagePrep™を用いて切片に塗布した。

### **IMS 測定**

組織切片の測定には、Thermo Fisher Scientific 社製 MALDI LTQ XL を用いた。レーザー

には窒素レーザー(337 nm、60 Hz)を用い、エネルギーは 32  $\mu$ J、照射間隔は 250  $\mu$ m に設定した。定量的な解析を実施するために、イオントラップ内のイオン量を調節する Auto gain control 機能は使用せず、1 部位あたりのレーザー照射回数を 2 回と定めた。1 回のレーザー照射(0.5 秒)で S-777469 あるいはラクロプリドを、もう 1 回のレーザー照射で S-777469- $d_{10}$  あるいはスルピリドを検出するために、ポジティブイオンモードでそれぞれのプロトン付加イオンのプロダクトイオンスキャンを行った。衝突エネルギーはそれぞれ、S-777469/S-777469- $d_{10}$  に対して規定値の 35%、ラクロプリド/スルピリドに対して規定値の 40%、に設定した (26)。測定時間は 1 部位あたり 1 秒で、組織切片 1 枚につき約 3000 部位を測定した。得られた質量スペクトルデータは、Thermo Fisher Scientific 社製 ImageQuest 1.0.1 ソフトウェアを用いて画像データに変換した。画像データからの定量的解析は、ImageQuest ソフトウェアを用いて、組織切片の光学画像上で各臓器全体に関心領域を設定し、その領域内の S-777469 ( $m/z$  415 $\rightarrow$ 369)、S-777469- $d_{10}$  ( $m/z$  425 $\rightarrow$ 379)、ラクロプリド ( $m/z$  347 $\rightarrow$ 129)、スルピリド ( $m/z$  342 $\rightarrow$ 112) の平均イオン強度を計算した。

## 3-2 結果

### MALDI-MS における S-777469 及びラクロプリド測定用イオンの選択

Figure 12 に S-777469 の化学構造を示す。

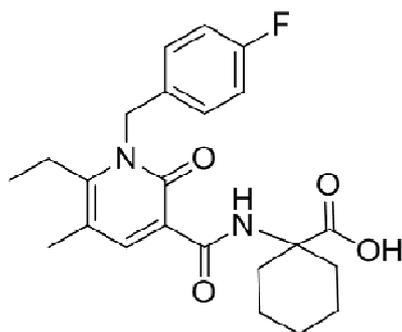


Figure 12. Chemical structure of S-777469.

S-777469 標準溶液の MS スペクトル及び MS/MS スペクトルを Figure 13 に示す。

MS スペクトルにおいて、S-777469 のプロトン付加イオン ( $m/z$  415) が検出された (Figure 13(a))。さらに、この  $m/z$  415 の MS/MS スペクトルにおいて、 $m/z$  369 のプロダクトイオンが高いイオン強度で観察された (Figure 13(b))。これは、S-777469 の構造においてカルボキシ基の脱離によって生じたイオンと考えられるため、以降の検討では  $m/z$  415→369 を測定することによって、S-777469 の選択的な検出を試みた。ラクロプリドの検出には、第 1 章で得られた結果を基に、 $m/z$  347→129 を測定した。

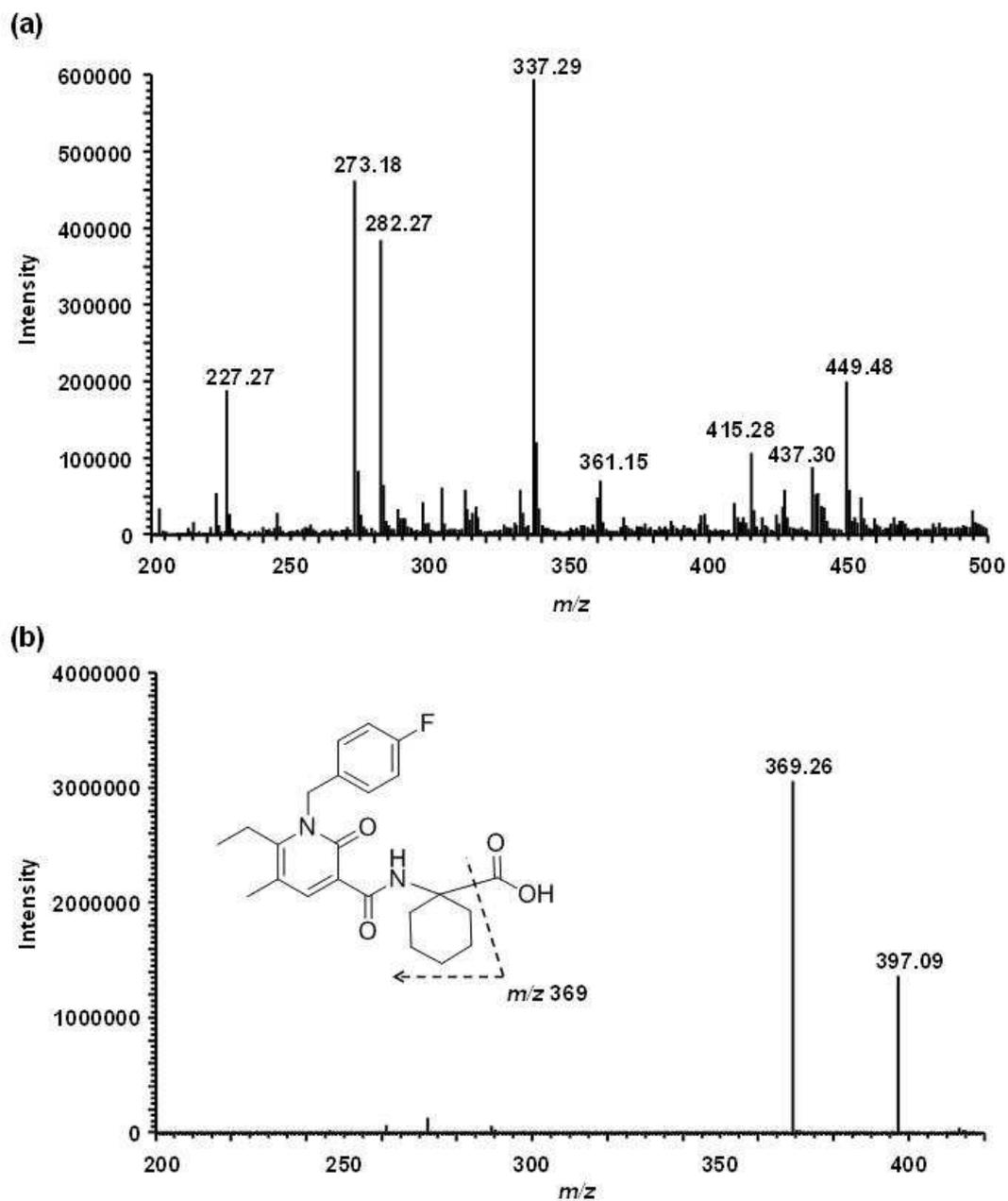


Figure 13. (a) MALDI-MS spectrum from a standard solution of S-777469 mixed with DHB in the positive-ion mode. (b) MALDI-MS/MS spectrum of  $m/z$  415 from a standard solution of S-777469 mixed with DHB. The cleavages by MS/MS analysis related with the detection for MALDI-IMS were also illustrated.

## IMS 検量線用標準試料の測定

S-777469あるいはラクロプリドの検量線用標準試料(75%肝臓ホモジネート)をIMSによって測定した結果を Figure 14、Figure 15 に示す。

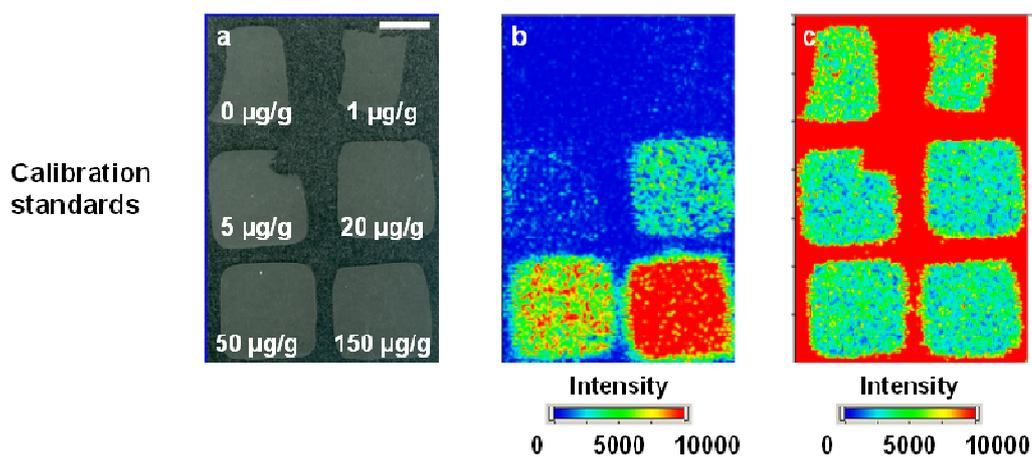


Figure 14. Representative optical images (a) and ion images of  $m/z$  415→369 (b) and  $m/z$  425→379 (c) on the sections of the calibration standards of S-777469. Bar = 5 mm.

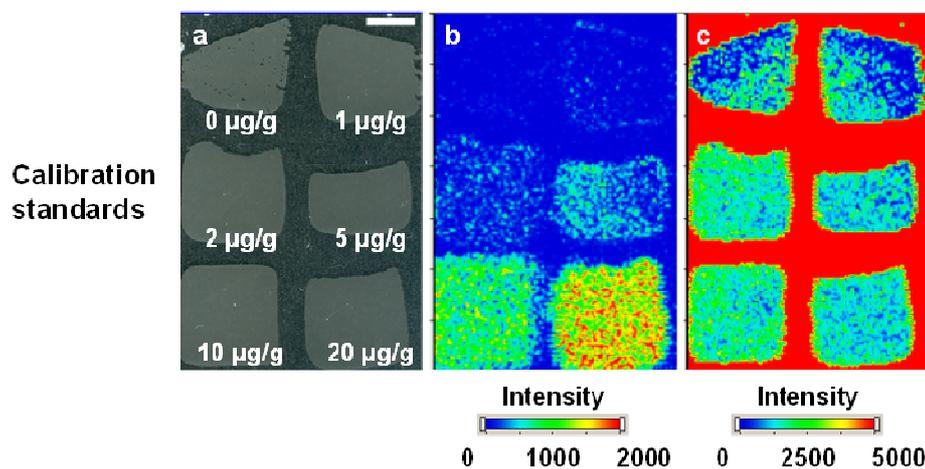


Figure 15. Representative optical images (a) and ion images of  $m/z$  347→129 (b) and  $m/z$  342→112 (c) on the sections of the calibration standards of raclopride. Bar = 5 mm.

標準試料切片中の S-777469 の定量的解析のために、各切片全体に関心領域を設定し、その領域内の S-777469 ( $m/z$  415→369) の平均イオン強度を、同領域内の S-777469- $d_{10}$  ( $m/z$  425→379) の平均イオン強度で除した値を、S-777469 の標準化イオン強度として算出した。

ラクロプリドについても同様に、関心領域内のラクロプリド ( $m/z$  347→129) の平均イオン強度を、同領域内のスルピリド ( $m/z$  342→112) の平均イオン強度で除した値を、ラクロプリドの標準化イオン強度として算出した。

S-777469 とラクロプリドのそれぞれについて、得られた標準化イオン強度と標準試料中薬物濃度の関係から、組織内薬物濃度定量のための検量線を作成した。Figure 16、Figure 17 にそれぞれ S-777469 とラクロプリドについて得られた検量線を示す。S-777469 とラクロプリドのいずれの検量線においても、その直線性は非常に良好であった (S-777469  $R = 0.996$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 16、ラクロプリド  $R = 0.995$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 17)。

また、S-777469あるいはラクロプリドの検量線に用いた5濃度のうち、最低濃度、中濃度、最高濃度のそれぞれにおいて、標準化イオン強度の測定精度を検証した結果を Table 4 に示す。S-777469 とラクロプリドのそれぞれの相対標準偏差は、7.3–21.2%、4.4–16.8%と良好であった。

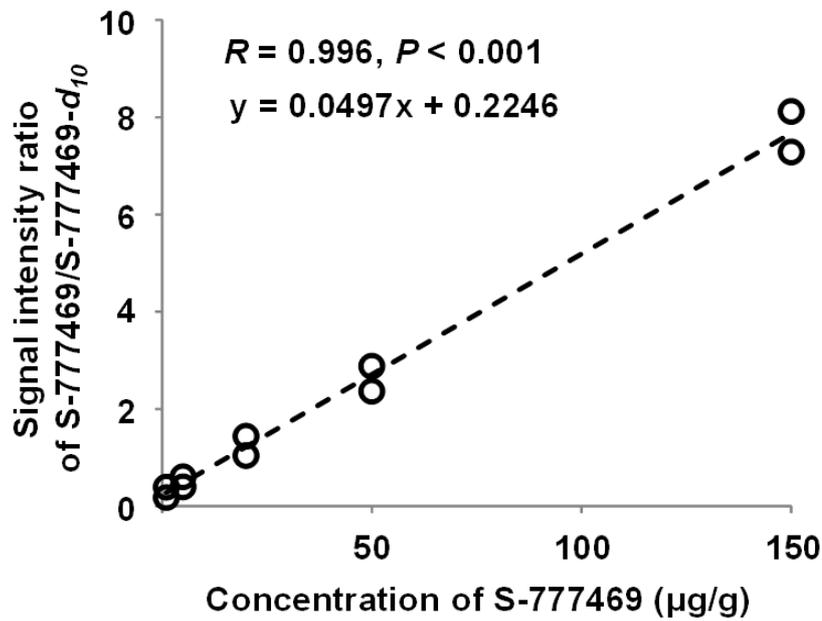


Figure 16. Correlation between the concentrations of S-777469 in the calibration standards and the signal intensity ratios of S-777469/S-777469- $d_{10}$  measured by IMS.

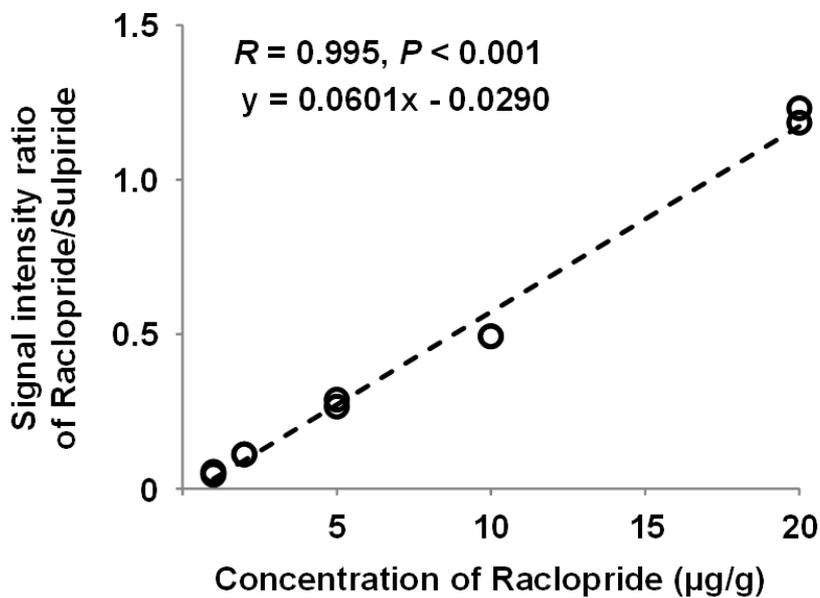


Figure 17. Correlation between the concentrations of raclopride in the calibration standards and the signal intensity ratios of raclopride/sulpiride measured by IMS.

Table 4. Reproducibility evaluation of the IMS-based quantification method using the surrogate tissue-based calibration standards.

Analyte	Analyte concentration (µg/g)	Signal intensity ratio of analyte/internal standard †			RSD (%)
S-777469	1	0.271	±	0.057	21.2
	20	1.26	±	0.15	12.1
	150	7.65	±	0.56	7.3
Raclopride	1	0.0499	±	0.0084	16.8
	5	0.306	±	0.031	10.1
	20	1.24	±	0.05	4.4

† mean ± SD, n = 3.

### IMS によるマウス組織切片の測定

マウスの腎臓及び肝臓における S-777469 の分布を IMS によって測定した結果を Figure 18 に示す。投与 10 分後において、腎臓及び肝臓への S-777469 の分布が明瞭に認められた。

Figure 19 には、マウスの脳、肺、腎臓、肝臓におけるラクロプリドの分布を IMS によって測定した結果を示す。投与 10 分後において、脳、肺、腎臓、肝臓へのラクロプリドの分布が認められ、特に肝臓において高く検出された。

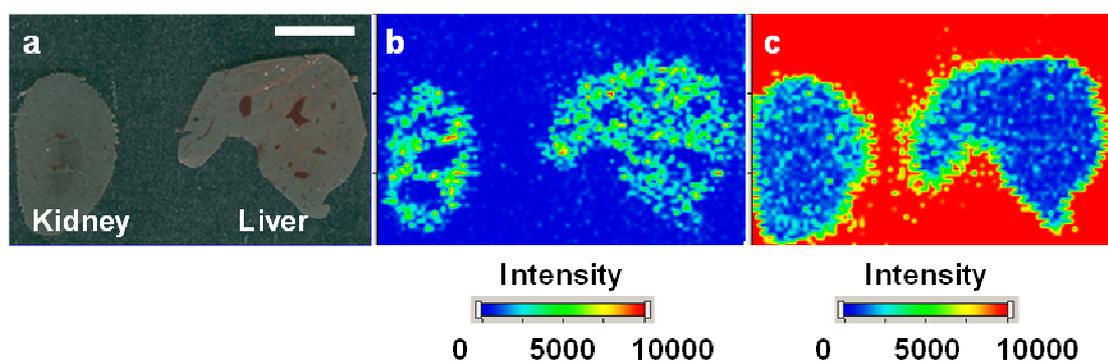


Figure 18. Representative optical images (a) and ion images of  $m/z$  415→369 (b) and  $m/z$  425→379 (c) on the tissue sections of mice at 10 min post-dose administration of S-777469. Bar = 5 mm.

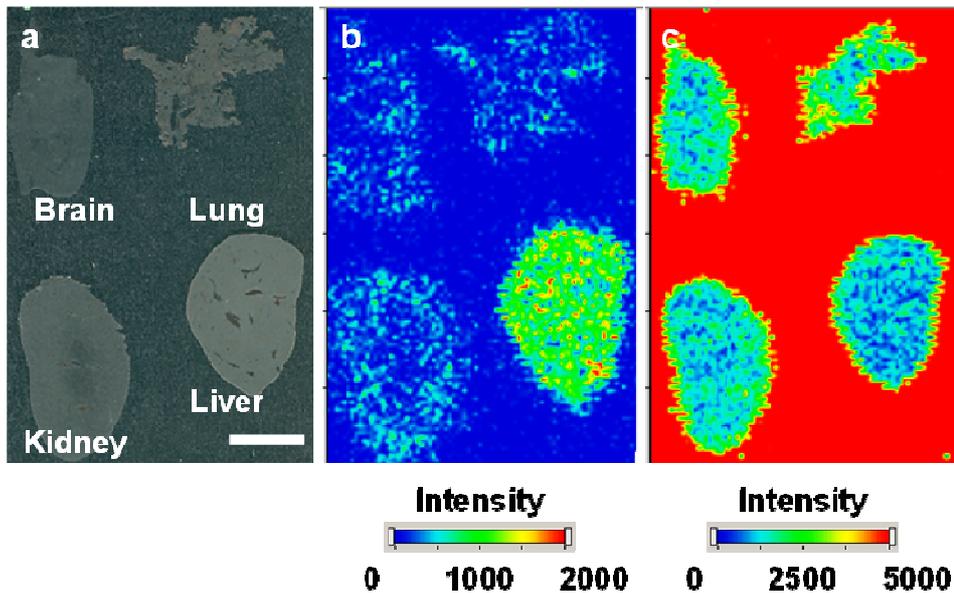


Figure 19. Representative optical images (a) and ion images of  $m/z$  347→129 (b) and  $m/z$  342→112 (c) on the tissue sections of mice at 10 min post-dose administration of raclopride. Bar = 5 mm.

### IMS によるマウス組織内薬物濃度の定量

S-777469 とラクロプリドのそれぞれについて、マウス組織切片において各臓器全体に関心領域を設定し、その領域内の薬物の平均イオン強度を、同領域内の内部標準物質の平均イオン強度で除した値を、薬物の標準化イオン強度として算出した。この標準化イオン強度を、それぞれの標準試料(75%肝臓ホモジネート)の測定から得られた検量線の式(S-777469  $y = 0.0497x + 0.2246$ 、ラクロプリド  $y = 0.0601x - 0.0290$ )の  $y$  に代入し、 $x$  の値を各臓器における組織内薬物濃度として求めた。この値を LC/MS/MS によって測定した各臓器中薬物濃度と比較した結果を Table 5 に示した。また、LC/MS/MS で得られた薬物濃度に対する IMS で得られた薬物濃度の比を Accuracy (%) とし、それを Table 5 に併せて示す。また、ゼラチン水溶液あるいは 50% 肝臓ホモジネートを用いて別途調製した標準試料の測定から得られた検量線より、同様に組織内薬物濃度を求めた結果をそれぞれ Table 6、Table 7 に示す。

Table 5. Comparison between the drug concentrations quantified by LC/MS/MS and those by IMS in each tissue of mice after administration of S-777469 or raclopride.

			LC/MS/MS quantification ( $\mu\text{g/g}$ )	IMS quantification ( $\mu\text{g/g}$ )	Accuracy (%)
S-777469 -dosed	Kidney	Mouse			
		#1	5.31	6.51	122
		#2	21.7	34.8	160
	Liver	Mouse			
		#1	45.0	36.9	82
		#2	39.5	45.4	115
Raclopride -dosed	Brain	Mouse			
		#1	2.25	2.33	104
		#2	1.59	2.50	157
	Lung	Mouse			
		#1	1.60	1.97	123
		#2	1.36	2.14	157
	Kidney	Mouse			
		#1	2.23	2.92	131
		#2	1.69	2.06	122
	Liver	Mouse			
		#1	13.4	16.1	120
		#2	9.04	10.3	113

Table 6. Comparison between the drug concentrations quantified by LC/MS/MS and those by IMS in each tissue of mice after raclopride with gelatin-based calibration standards.

		LC/MS/MS quantification ( $\mu\text{g/g}$ )	IMS quantification ( $\mu\text{g/g}$ )	Accuracy (%)
Raclopride -dosed	Brain	2.25	4.01	178
	Lung	1.60	4.33	271
	Kidney	2.23	4.34	195
	Liver	13.4	24.2	181

Table 7. Comparison between the drug concentrations quantified by LC/MS/MS and those by IMS in each tissue of mice after raclopride with 50% liver homogenate-based calibration standards.

		LC/MS/MS quantification ( $\mu\text{g/g}$ )	IMS quantification ( $\mu\text{g/g}$ )	Accuracy (%)
Raclopride -dosed	Brain	2.25	6.36	283
	Lung	1.60	3.79	237
	Kidney	2.23	5.76	258
	Liver	13.4	17.9	134

### 3-3 考察

本章では、S-777469 及びラクロプリドを対象として、IMS による組織内薬物濃度定量法の構築とその有効性を検討した。

薬物の組織内濃度を定量するためには、検量線を作成するための標準試料が必要である。質量分析によって生体試料中の薬物濃度を定量する際は、タンパクなどの生体内分子を含む試料から薬物を抽出する過程を考慮する必要があるため、測定する試料を模した標準試料を調製することが望まれる (44)。しかしながら、これまで IMS による組織内薬物濃度の定量に用いられてきた標準試料は、ブランクの組織切片に薬物の標準溶液を滴下したものであり (41-43)、上記のような要件を満たすためには更なる改善が必要であった。そこで、IMS における標準試料として、ブランクのマウス肝臓から作製した 75%ホモジネートに薬物を添加した試料を調製することとした。この標準試料を IMS によって測定した結果から検量線を作成したところ、良好な直線性と精度が得られたことから (Figure 14-17)、標準試料の調製に問題がないことが確認された。

また、第 1 章及び第 2 章では、組織切片上でのイオン化効率のばらつきを補正するために、IMS による測定で得られた薬物のイオン強度をマトリクス化合物のイオン強度によって標準化した。この手法は、MALDI において必須であるマトリクス化合物を利用するという点で汎用性が高いと考えられるが、薬物の組織内濃度を定量するためには、より高精度にイオン化効率のばらつきを補正する必要がある。そこで、目的の薬物の構造類縁体を内部標準物質としてあらかじめ組織切片に塗布し、IMS による測定で得られた薬物のイオン強度を、内部標準物質のイオン強度によって標準化することとした。具体的には、S-777469 に対しては S-777469- $d_{10}$  を、ラクロプリドに対してはスルピリドを (45)、それぞれ内部標準物質として選択した。

以上の手法を利用して、S-777469 あるいはラクロプリドを投与したマウスの組織内薬物濃度を IMS によって定量し、LC/MS/MS によって測定した各臓器中薬物濃度と比較した結果、両者はよく一致した (Table 5)。ただし、いくつかの試料において +50% 程度の乖離が認められ

た。この原因として、臓器内での薬物の空間的分布が不均一であるために、IMS に供した組織切片が各臓器全体を代表していないことが考えられる。今後、この課題を解決し、さらに高精度な薬物濃度定量を実現させるためには、臓器から作製した複数の切片を IMS によって測定し、得られた結果を 3 次元的な画像として構築し解析することのできる 3D-IMS などの技術が有効であると考えられる (46, 47)。また、標準試料の調製において、取扱いが簡便であるゼラチン水溶液を用いた場合、IMS によって定量した組織内薬物濃度と LC/MS/MS によって測定した臓器中薬物濃度は大きく乖離した (Table 6)。さらに、50% 肝臓ホモジネートを用いた場合においても両者は著しく乖離した (Table 7)。これらの結果から、IMS による組織内薬物濃度を定量するために適した標準試料は、生体内分子が過剰に希釈されることなく薬物と混和される必要があると考えられる。

本研究では、内部標準物質として用いる化合物に化合物自身を用いる場合と構造類縁体を用いる場合の 2 つの場合について検討した。すなわち、S-777469 の場合には化合物自身の重水素標識体を用い、ラクロプリドの場合には構造類縁体であるスルピリドを用いた。その結果、どちらの場合においても良好な定量結果が得られ、構造類縁体を用いても本法が有効に機能することを認めた。もちろん、薬物のイオン化効率のばらつきを補正するための内部標準物質としては、その薬物の重水素標識体が理想的であるが (48)、非常に多くの化合物を評価することが求められる創薬探索段階において、それぞれの化合物について重水素標識体を合成することは時間とコストの面から困難である。本研究では、重水素標識体でない構造類縁体が IMS による薬物濃度定量に利用可能であるという知見が得られ、これは創薬研究における薬物分布評価の効率化に寄与するものと考えられる。

以上のように、S-777469 及びラクロプリドを対象として、組織切片から薬物を抽出する過程を模した検量線用標準試料を調製するとともに、イオン強度の高精度な標準化のために内部標準物質を利用することによって、IMS による組織内薬物濃度定量法を構築することに成功した。

## 結 語

本研究では、生体内薬物分布を解析するために、IMS による組織切片上での定量的薬物イメージング法を構築するとともに、薬物分布解析法としての有効性について評価を行い、以下の知見を得た。

1. ラクロプリドを対象として、組織切片上での高選択的な検出とイオン強度の標準化を可能とした解析法を構築し、IMS によって低分子薬物の全身分布を定量的に解析する手法としての有効性を示した。
2. オクトレオチドを対象として、組織切片上での高感度かつ高選択的な検出を可能とした解析法を構築し、IMS によってペプチド薬物の組織内分布を定量的に解析する手法としての有効性を示した。
3. S-777469 及びラクロプリドを対象として、組織切片から薬物を抽出する過程を模した検量線用標準試料を調製するとともに、イオン強度の高精度な標準化のために内部標準物質を利用することによって、IMS による組織内薬物濃度定量法を構築することに成功した。

以上、著者は IMS によって薬物の組織内分布を定量的に解析する手法を開発し、その有効性を明らかにした。本研究の成果は、今後の創薬研究、特に創薬探索段階の薬物動態研究に有益な情報を与えるものと考えられる。

## 論文目録

- (1) Nozomi Takai, Yukari Tanaka, Kazuhiro Inazawa and Hideo Saji  
Quantitative analysis of pharmaceutical drug distribution in multiple organs by imaging mass spectrometry.  
*Rapid Commun Mass Spectrom.* 26(13), 1549-1556 (2012).
- (2) Nozomi Takai, Yukari Tanaka, Ayahisa Watanabe and Hideo Saji  
Quantitative imaging of a therapeutic peptide in biological tissue sections by MALDI MS.  
*Bioanalysis.* 5(5), 603-612 (2013).
- (3) Nozomi Takai, Yukari Tanaka and Hideo Saji  
Quantification of small molecule drugs in biological tissue sections by imaging mass spectrometry using surrogate tissue-based calibration standards.  
*Mass Spectrometry.* 3(1), A0025 (2014).

## 引用文献

- (1) Monro AM. Are routine tissue distribution studies justifiable for approval of human drugs? *Drug Metab. Dispos.* 22(3), 341-342 (1994).
- (2) Campbell DB. Are we doing too many animal biodisposition investigations before phase I studies in man? A re-evaluation of the timing and extent of ADME studies. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 19(3), 283-293 (1994).
- (3) Mizojiri K, Shindo H, Ohno Y. The possibility of predicting tissue accumulation after repeated dosing using a single-dose tissue distribution study. *J. Toxicol. Sci.* 21(5), 523-527 (1996).
- (4) Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* 69(23), 4751-4760 (1997).
- (5) Reyzer ML, Hsieh Y, Ng K, Korfmacher WA, Caprioli RM. Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 38(10), 1081-1092 (2003).
- (6) Khatib-Shahidi S, Andersson M, Herman JL, Gillespie TA, Caprioli RM. Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78(18), 6448-6456 (2006).
- (7) Köhler C, Hall H, Ogren SO, Gawell L. Specific in vitro and in vivo binding of 3H-raclopride. A potent substituted benzamide drug with high affinity for dopamine D-2 receptors in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 34(13), 2251-2259 (1985).
- (8) Barth VN, Chernet E, Martin LJ, Need AB, Rash KS, Morin M, Phebus LA. Comparison of rat dopamine D2 receptor occupancy for a series of antipsychotic drugs measured using radiolabeled or nonlabeled raclopride tracer. *Life Sci.* 78(26), 3007-3012 (2006).
- (9) Astruc B, Marbach P, Bouterfa H, Denot C, Safari M, Vitaliti A, Sheppard M. Long-acting

- octreotide and prolonged-release lanreotide formulations have different pharmacokinetic profiles. *J. Clin. Pharmacol.* 45(7), 836-844 (2005).
- (10) Odan M, Ishizuka N, Hiramatsu Y, Inagaki M, Hashizume H, Fujii Y, Mitsumori S, Morioka Y, Soga M, Deguchi M, Yasui K, Arimura A. Discovery of S-777469: An orally available CB2 agonist as an antipruritic agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22(8), 2803-2806 (2012).
- (11) Steinke W, Archimbaud Y, Becka M, Binder R, Busch U, Dupont P, Maas J. Quantitative distribution studies in animals: cross-validation of radioluminography versus liquid-scintillation measurement. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31(2), S33-43 (2000).
- (12) d'Argy R, Sundwall A. Quantitative whole-body radioluminography-future strategy for balance and tissue distribution studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31(2), S57-62 (2000).
- (13) Solon EG, Kraus L. Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry: Survey results on study design, methods, and regulatory compliance. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 46(2), 73-81 (2002).
- (14) Inazawa K, Koike M, Yamaguchi T. Study on the practical use of quantitative whole-body auto-radioluminography. *Exp. Mol. Pathol.* 76(2), 153-165 (2004).
- (15) Atkinson SJ, Loadman PM, Sutton C, Patterson LH, Clench MR. Examination of the distribution of the bioreductive drug AQ4N and its active metabolite AQ4 in solid tumours by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21(7), 1271-1276 (2007).
- (16) Li F, Hsieh Y, Kang L, Sondey C, Lachowicz J, Korfmacher WA. MALDI-tandem mass spectrometry imaging of astemizole and its primary metabolite in rat brain sections. *Bioanalysis.* 1(2), 299-307 (2009).
- (17) Gobey J, Cole M, Janiszewski J, Covey T, Chau T, Kovarik P, Corr J. Characterization and performance of MALDI on a triple quadrupole mass spectrometer for analysis and

- quantification of small molecules. *Anal. Chem.* 77(17), 5643-5654 (2005).
- (18) Marto JA, White FM, Seldomridge S, Marshall AG. Structural characterization of phospholipids by matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* 67(21), 3979-3984 (1995).
- (19) Vaidyanathan S, Gaskell S, Goodacre R. Matrix-suppressed laser desorption/ionisation mass spectrometry and its suitability for metabolome analyses. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20(8), 1192-1198 (2006).
- (20) Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60(20), 2299-2301 (1988).
- (21) Hillenkamp F, Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* 193, 280-295 (1990).
- (22) Szájli E, Fehér T, Medzihradzky KF. Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS. *Mol. Cell Proteomics.* 7(12), 2410-2418 (2008).
- (23) Stoeckli M, Staab D, Schweitzer A. Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections. *Int. J. Mass Spectrom.* 260, 195-202 (2007).
- (24) Reich RF, Cudzilo K, Levisky JA, Yost RA. Quantitative MALDI-MS<sup>n</sup> analysis of cocaine in the autopsied brain of a human cocaine user employing a wide isolation window and internal standards. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21(4), 564-571 (2010).
- (25) Koeniger SL, Talaty N, Luo Y, Ready D, Voorbach M, Seifert T, Cepa S, Fagerland JA, Bouska J, Buck W, Johnson RW, Spanton S. A quantitation method for mass spectrometry imaging. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25(4), 503-510 (2011).
- (26) Lopez LL, Tiller PR, Senko MW, Schwartz JC. Automated strategies for obtaining standardized collisionally induced dissociation spectra on a benchtop ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13(8), 663-668 (1999).

- (27) Suresh PS, Punde RR, Gupta M, Dixit A, Giri S, Rajagopal S, Mullangi R. A highly sensitive LC-MS/MS method for the determination of S-raclopride in rat plasma: application to a pharmacokinetic study in rats. *Biomed Chromatogr.* 25(8), 930-937 (2011).
- (28) Ribeiro MJ, Ricard M, Bourgeois S, Lièvre MA, Bottlaender M, Gervais P, Dollé F, Syrota A. Biodistribution and radiation dosimetry of [<sup>11</sup>C]raclopride in healthy volunteers. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 32(8), 952-958 (2005).
- (29) Slifstein M, Hwang DR, Martinez D, Ekelund J, Huang Y, Hackett E, Abi-Dargham A, Laruelle M. Biodistribution and radiation dosimetry of the dopamine D2 ligand <sup>11</sup>C-raclopride determined from human whole-body PET. *J. Nucl. Med.* 47(2), 313-319 (2006).
- (30) Kafka AP, Kleffmann T, Rades T, McDowell A. The application of MALDI TOF MS in biopharmaceutical research. *Int. J. Pharm.* 417(1-2), 70-82 (2011).
- (31) Berkowitz SA, Engen JR, Mazzeo JR, Jones GB. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11(7), 527-540 (2012).
- (32) Murao N, Ishigai M, Yasuno H, Shimonaka Y, Aso Y. Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21(24), 4033-4038 (2007).
- (33) Kuuranne T, Thomas A, Leinonen A, Delahaut P, Bosseloir A, Schänzer W, Thevis M. Insulins in equine urine: qualitative analysis by immunoaffinity purification and liquid chromatography/tandem mass spectrometry for doping control purposes in horse-racing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22(3), 355-362 (2008).
- (34) Zhang H, Xin B, Caporuscio C, Olah TV. Bioanalytical strategies for developing highly sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry based methods for the peptide

- GLP-1 agonists in support of discovery PK/PD studies. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25(22), 3427-3435 (2011).
- (35) Li H, Ortiz R, Tran L, Hall M, Spahr C, Walker K, Laudemann J, Miller S, Salimi-Moosavi H, Lee JW. General LC-MS/MS method approach to quantify therapeutic monoclonal antibodies using a common whole antibody internal standard with application to preclinical studies. *Anal. Chem.* 84(3), 1267-1273 (2012).
- (36) Stoeckli M, Staab D, Schweitzer A, Gardiner J, Seebach D. Imaging of a beta-peptide distribution in whole-body mice sections by MALDI mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18(11), 1921-1924 (2007).
- (37) Jiang Y, Wang J, Wang Y, Du X, Zhang Y, Fawcett JP, Gu J. Determination of long-acting release octreotide, an octapeptide analogue of somatostatin, in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21(24), 3982-3986 (2007).
- (38) Ismaiel OA, Zhangb T, Jenkinsb R, Karnesc HT. Determination of octreotide and assessment of matrix effects in human plasma using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879(22), 2081-2088 (2011).
- (39) Lemaire M, Azria M, Dannecker R, Marbach P, Schweitzer A, Maurer G. Disposition of sandostatin, a new synthetic somatostatin analogue, in rats. *Drug Metab. Dispos.* 17(6), 699-703 (1989).
- (40) Akizawa H, Arano Y, Uezono T, Ono M, Fujioka Y, Uehara T, Yokoyama A, Akaji K, Kiso Y, Koizumi M, Saji H. Renal metabolism of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide in vivo. *Bioconjug. Chem.* 9(6), 662-670 (1998).
- (41) Nilsson A, Fehniger TE, Gustavsson L, Andersson M, Kenne K, Marko-Varga G, Andrén PE. Fine mapping the spatial distribution and concentration of unlabeled drugs within

- tissue micro-compartments using imaging mass spectrometry. *PLoS One*. 5(7), e11411 (2010).
- (42) Hamm G, Bonnel D, Legouffe R, Pamelard F, Delbos JM, Bouzom F, Stauber J. Quantitative mass spectrometry imaging of propranolol and olanzapine using tissue extinction calculation as normalization factor. *J. Proteomics*. 75(16), 4952-4961 (2012).
- (43) Sun N, Walch A. Qualitative and quantitative mass spectrometry imaging of drugs and metabolites in tissue at therapeutic levels. *Histochem. Cell Biol.* 140(2), 93-104 (2013).
- (44) Reimer MT, Wan X, Zhang J. A case study of validation and sample analysis for the determination of zotarolimus in various tissues. *Bioanalysis*. 5(7), 811-817 (2013).
- (45) Memo M, Lucchi L, Spano PF, Trabucchi M. Aging process affects a single class of dopamine receptors. *Brain Res*. 202(2), 488-492 (1980).
- (46) Seeley EH, Caprioli RM. 3D imaging by mass spectrometry: a new frontier. *Anal. Chem.* 84(5), 2105-2110 (2012).
- (47) Trede D, Schiffler S, Becker M, Wirtz S, Steinhorst K, Strehlow J, Aichler M, Kobarg JH, Oetjen J, Dyatlov A, Heldmann S, Walch A, Thiele H, Maass P, Alexandrov T. Exploring three-dimensional matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry data: three-dimensional spatial segmentation of mouse kidney. *Anal. Chem.* 84(14), 6079-6087 (2012).
- (48) Pirman DA, Reich RF, Kiss A, Heeren RM, Yost RA. Quantitative MALDI tandem mass spectrometric imaging of cocaine from brain tissue with a deuterated internal standard. *Anal. Chem.* 85(2), 1081-1089 (2013).

## 謝 辞

本研究の終わりに鑑み、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 佐治 英郎 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

同時に、本研究の遂行にあたり、懇切なる御指導と御協力を賜りました、塩野義製薬株式会社 田中 由香里 博士、渡邊 郁剛 博士、シオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社 稲沢 和博 氏に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、有益な御助言、御指導を戴きました、塩野義製薬株式会社 大川 友之 博士、岡林 義人 博士に深く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御助言、御指導を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 小野 正博 准教授、渡邊 裕之 助教、国立循環器病研究センター研究所 天満 敬 博士、京都大学環境安全保健機構 木村 寛之 助教、京都大学医学部附属病院 佐野 紘平 助教に深く感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、多大なる御協力と御助言を戴きました、塩野義製薬株式会社 紫垣 修平 博士、正木 悠紀子 氏、北出 美樹子 氏、岩本 裕佳 氏、佐藤 準人 氏、大西 秀一 博士、船木 智子 氏、井上 雄史 氏、松田 明大 博士、吉田 晋平 氏、小川 寛子 氏、有益な御助言を戴きました、塩野義製薬株式会社 小幡 篤史 博士、金川 直樹 博士、懇切なる御配慮を戴きました、塩野義製薬株式会社 加藤 育雄 氏、塩田 武司 博士、山口 嘉隆 博士、武本 浩 博士、長谷川 博司 博士、根笹 賢一 博士、阿部 浩司 博士にそれぞれ謹んで感謝致します。

さらに、質量分析技術に関して多大なる御協力と御助言を戴きました、サーモフィッシャー

サイエンティフィック株式会社 Maria C. Prieto Conaway 博士、高旗 誠 博士、五嶋 公大 氏、  
肥後 大輔 氏、杉本 恭 氏、ブルカーダルトニクス株式会社 葦澤 崇 博士、西田 富士雄  
氏にそれぞれ謹んで御礼申し上げます。

