

眼球組織の質量イメージング -SIMSによる網膜断面の高空間分解能観察-

眼球組織は皮膚組織などと並んで薬物を直接投与する機会が多い組織である。特に網膜は微細な積層構造を有するため、薬剤が目標部位に正確に到達しているかどうかの確認には空間分解能の高いMSイメージング手法であるSIMSが有効である。

1. 二次イオン質量分析(SIMS)の特徴

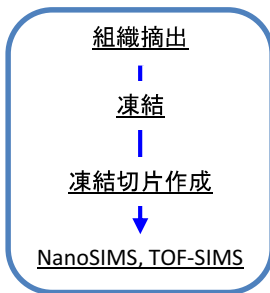


NanoSIMS 50L
(AMETEK社ご提供)

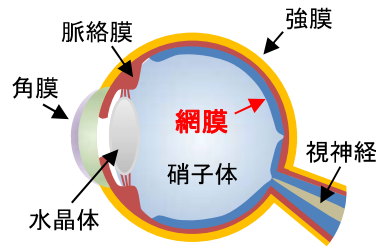
測定手法	プローブ	空間分解能	得られる情報
NanoSIMS	イオンビーム	50 nm	元素(同位体) ※有機物は標識必要
TOF-SIMS	イオンビーム	0.3 ~ 3 μm※	元素・分子(脂質など、低分子化合物)
MALDI-TOF-MS	レーザー	10 μm	分子(脂質、ペプチド、タンパク質など)

※空間分解能が高い条件では質量分解能が低下する。

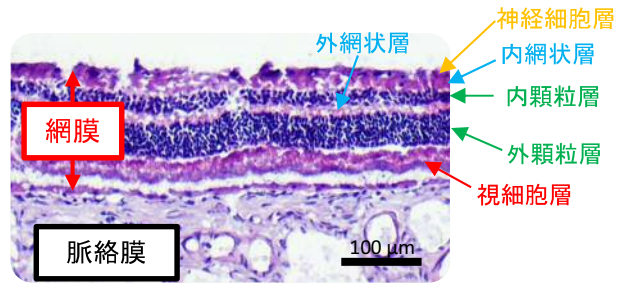
2. ウサギ眼球組織(網膜)のNanoSIMSイメージング



※組織切片の作成から対応可能



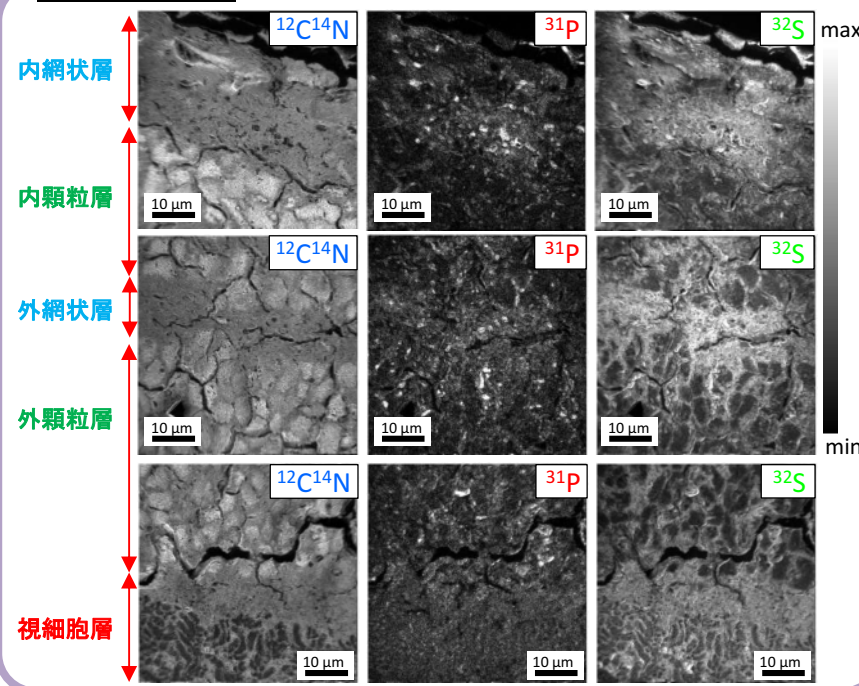
眼球断面の模式図



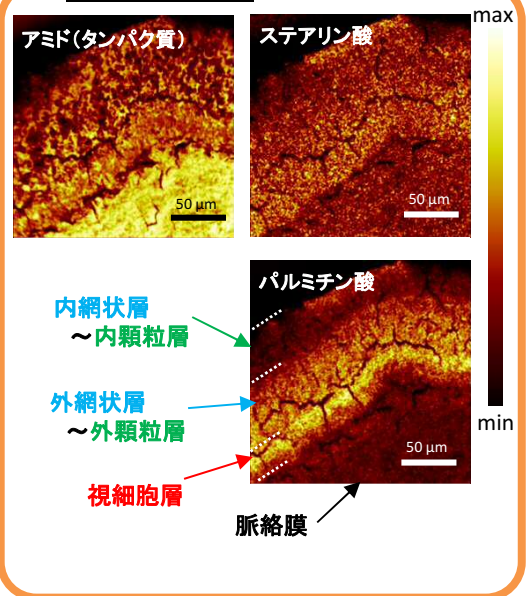
ウサギ網膜のHE染色画像

※ 株式会社鎌倉テクノサイエンスにて凍結組織切片の作製およびHE染色画像の撮影を実施した。

【NanoSIMS】



【TOF-SIMS】



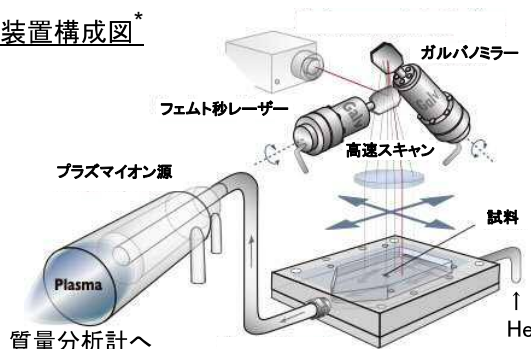
SIMSイメージングは生体組織中の元素・低分子化合物の分布を詳細に観察可能である。東レリサーチセンターは特徴的な元素(安定同位体など)で標識を行う独自の技術を保有しており、薬物の細胞レベルイメージングも可能である。

fsLA-ICP-MSによるマウス脊髄中の微量元素定量イメージング

フェムト秒LA-ICP-MS (fsLA-ICP-MS) は、大気圧雰囲気での測定により他のイメージング手法では困難な含水試料が分析できる。更に、サンプリングとイオン化が独立していることにより共存成分の影響を排除した高感度・高精度な元素定量イメージングが可能となる。

fsLA-ICP-MSの原理

装置構成図*



fsLA-ICP-MSの特長 (他イメージング手法との比較)

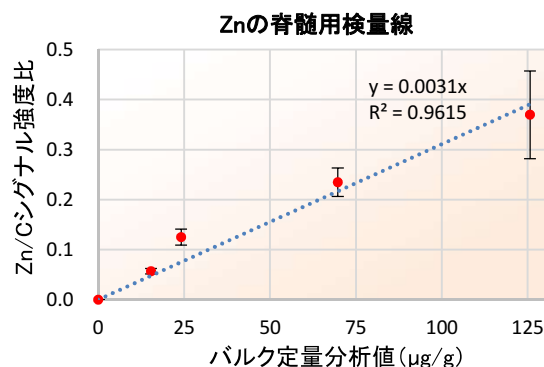
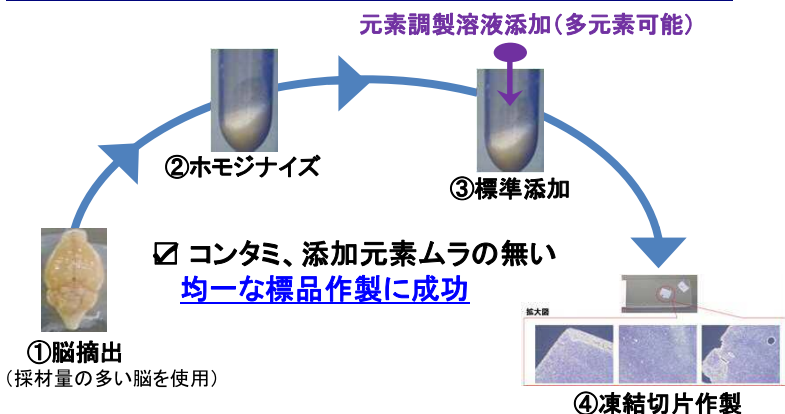
	fsLA-ICP-MS	NanoSIMS	TOF-SIMS
感度	ppb~サブppm	ppm	ppm
空間分解能	10 μm	50 nm	300 nm
測定雰囲気	He, 大気圧 (水分を含む試料も可)	超高真空 ($< 1E-7$ Pa)	超高真空 ($1 \sim 10E-7$ Pa)
測定領域	数mm~2cm	10 μm~50 μm	10 μm~5cm
深さ	~50 μm程度	< 数10 nm	< 3 nm

☑ レーザーを試料に照射し、生じたエアロゾル (微粒子) をプラズマ (ICP) へ導入してイオン化し、質量分析計 (MS) で定性・定量を実施

☑ fsLA-ICP-MSは組織中の超高感度元素イメージングが可能
☑ サンプリングとイオン化が独立しているため定量性の高い測定が可能 (共存成分の影響が少ない)

* 東京大学大学院理学研究科・平田教授より提供

マウス脳ホモネート標品の作製 → 検量線作成

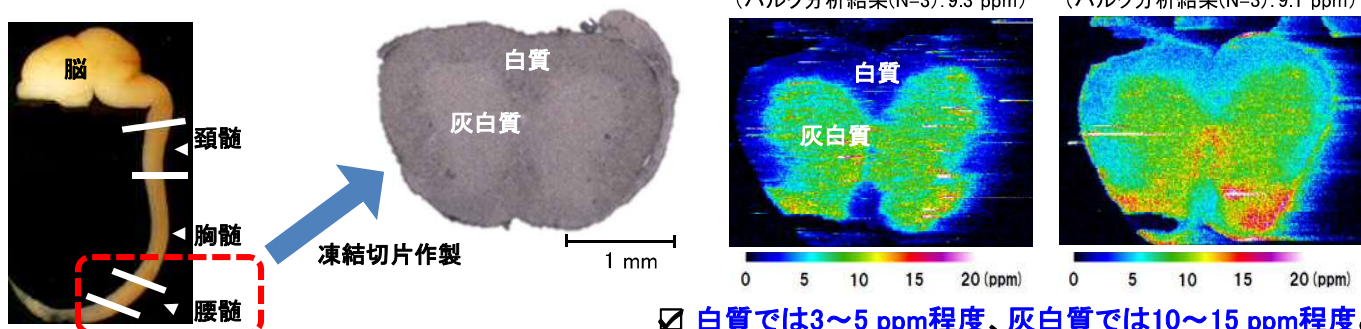


⑤ 脊髄用の検量線作成

Step1: ③のバルク分析 + ④のfsLA-ICP-MS測定
Step2: 脳と脊髄のC量比率からマトリクス補正

☑ 狙い通りの濃度標品が作製可能

マウス腰髄中のFe, Zn定量的イメージ



☑ 白質では3~5 ppm程度、灰白質では10~15 ppm程度と灰白質に高濃度で分布していることがわかる

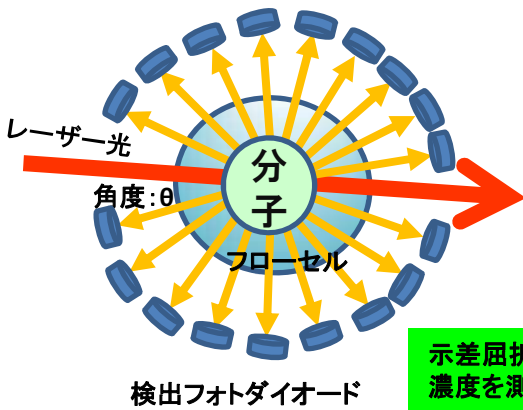
fsLA-ICP-MS + 標品作製は高感度・高精度な信頼性の高い元素定量イメージングが可能

➔ 薬効評価や病態メカニズムの解明に有用な方法として期待

GMP体制下のSEC-MALS分析－凝集体の分子量評価

抗体医薬品の品質評価においては、凝集体の有無を確認することは重要である。SEC-MALSはポリエチレンオキシド、プルランなどの標準品による校正曲線を用いずに、高分子化合物の絶対分子量分布および重量平均分子量及び回転半径を求める手法である。
ここでは抗体(ヒトIgG)および加熱して調製した凝集体をSEC-MALSで測定し、その分子量を評価した。

MALSの原理

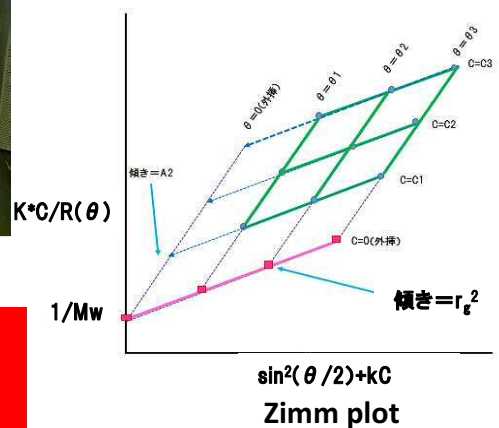


多角度光散乱検出器(MALS)
18個の検出器で散乱光を測定

濃度(RI)と散乱強度(MALS)から重量平均分子量(M_w)及び回転半径(r_g)を算出

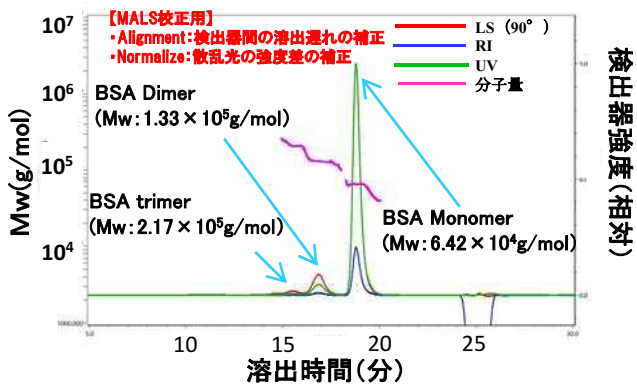
$$\frac{K^*C}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3M_w \lambda_0^2} \langle r_g^2 \rangle \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

示差屈折計(RI)
濃度を測定

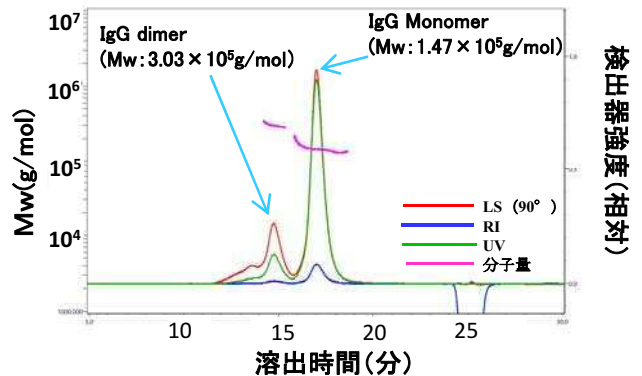


日本の受託分析機関で初めて
GMPでのSEC-MALS運用。医薬品の
承認申請用データにお使いいただけます。

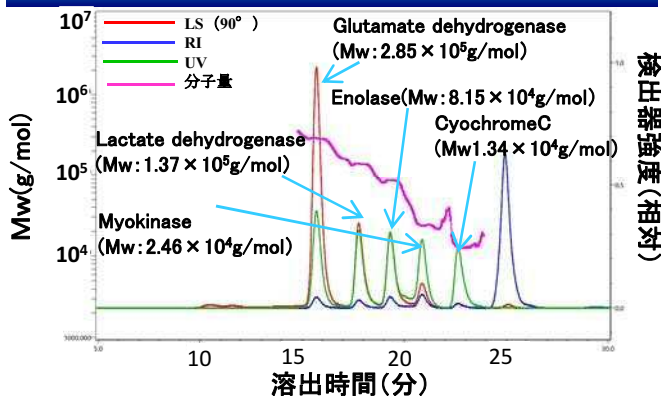
BSAの分析(MALS校正用)



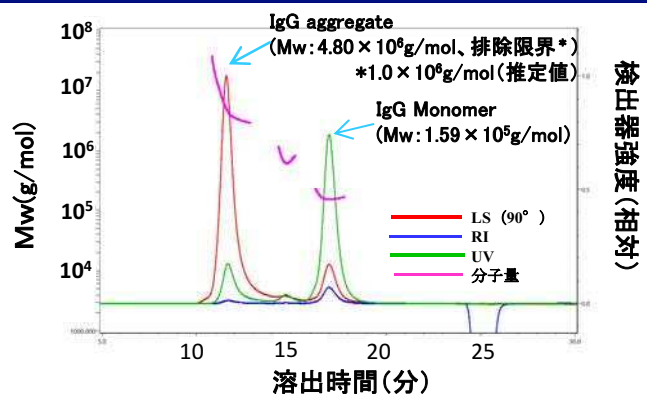
抗体の分析



分子量マーカーの分析



抗体凝集体の分析



GMP体制下のGC/MS分析 - 核酸中不純物の高感度分析 -

核酸医薬品は、従来の低分子医薬品に比べて分析に使用するための量を確保し難い。特に、不純物分析においては、貴重な医薬品をできるだけ使用しないような高感度分析が望まれる。今回、市販の核酸について、ヘッドスペース-GC/MSを用いた残留溶媒の高感度分析を行ったので紹介する。

1. 核酸医薬品の品質評価項目

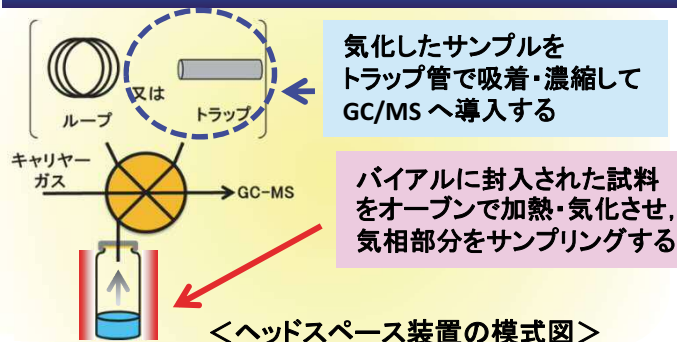
ガイドラインの要求事項*	東レリサーチセンターの機能
<規格及び試験方法>	
(1) 性状	性状観察等
(2) 確認試験	UHPLC, UV分光光度計
(3) 純度試験	
① オリゴヌクレオチド類縁物質	UHPLC, キャピラリー電気泳動
② 有機低分子不純物	LC-MS/MS, GC/MS, MS, NMR, UHPLC
③ 残留溶媒	GC/MS, GC
④ 元素不純物	ICP-OES, ICP-MS
(4) 定量法 (含量)	UHPLC, UV分光光度計
(5) 生物学的活性試験	セルベースアッセイ, ELISA

*核酸医薬品の品質の担保と評価において考慮すべき事項(薬生薬審発0927第3号 平成30年9月27日 別添)より抜粋



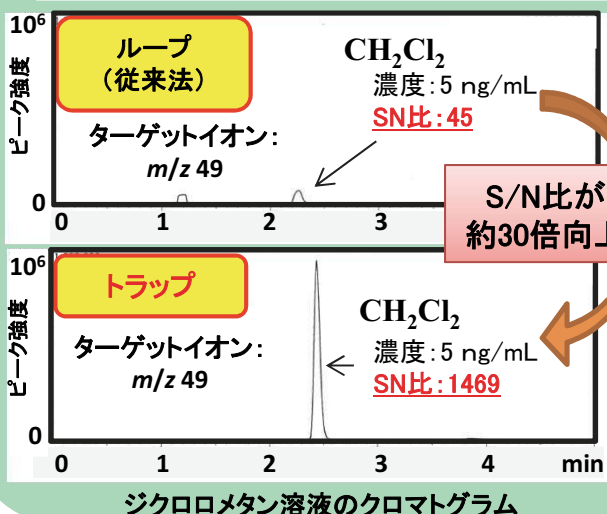
SOP番号: NME18500

2. 核酸中の残留溶媒測定(ヘッドスペース-GC/MS)



<ヘッドスペース装置の模式図>

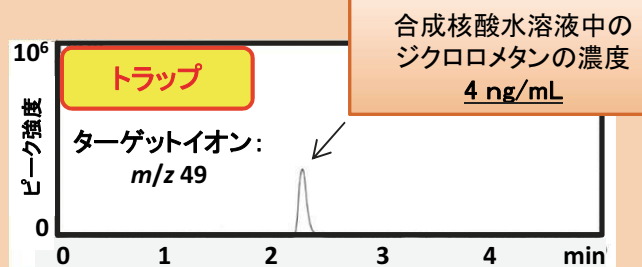
核酸合成に用いられる代表的な溶媒であるジクロロメタンの検出能力の向上を試みた



ジクロロメタン溶液のクロマトグラム

トラップモードを適用して、人工的に合成された核酸に残留するジクロロメタンを定量した。

試料: 合成核酸 (C-Myc antisense DNA, S化)
配列: CACGTTGAGGGGCAT
濃度: 1 mg/mL



合成核酸水溶液中のジクロロメタンの濃度 4 ng/mL

トラップモードによる合成核酸水溶液のクロマトグラム

合成核酸に対する含量 4 ppm 相当の微量のジクロロメタンを検出した。

- ヘッドスペース-GC/MSにおいて、トラップモードによりジクロロメタンのS/N比が約30倍向上した。
- 核酸1mg という極めて少量の試料で、ジクロロメタンの定量が可能であった。

培地中のアミノ酸・代謝成分・緩衝剤の網羅的分析

細胞や微生物を培養する「培地」には低分子の栄養物質と平衡塩類および緩衝剤が含まれており、これらはキャピラリー電気泳動法(CE)で定量することができる。多様な分離条件を適用することで、緩衝剤として多用されるHEPES、細胞培養において管理が重要なグルタミン等のアミノ酸を網羅的に分析可能である。

I. 培地に含まれるイオン成分の種類

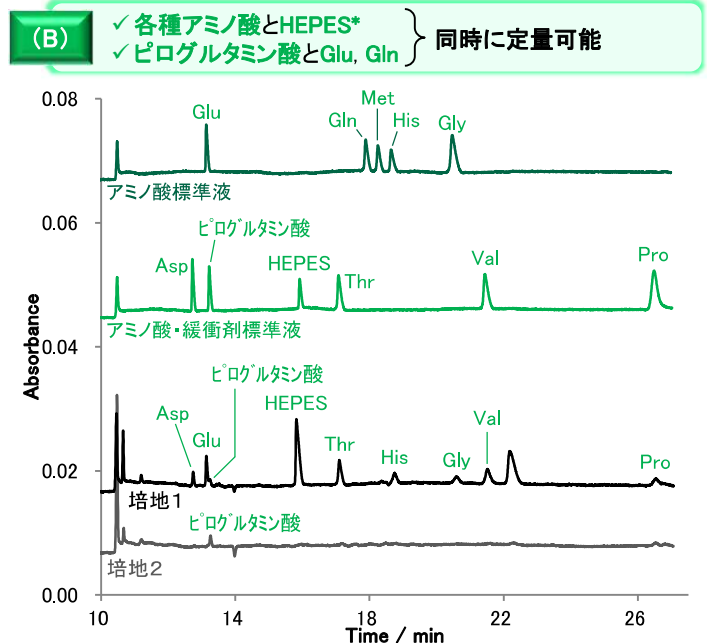
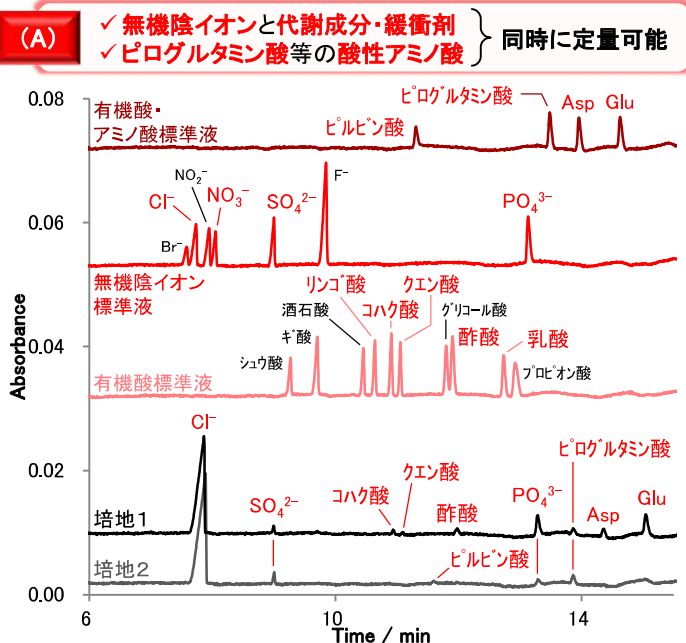
評価可能なイオン成分の例 (文字の色(赤、緑、青、紫)はⅡ項のA, B, C, Dに対応)

アミノ酸	代謝成分	緩衝剤	無機塩類
グルタミン(Gln), グルタミン酸(Glu) ピログルタミン酸, グリシン(Gly) ヒスチジン(His), メチオニン(Met) アルギニン(Arg), リシン(Lys) etc.	ピルビン酸, 乳酸 クエン酸 リンゴ酸, コハク酸 コリン, カルニチン etc.	酢酸, PO_4^{3-} クエン酸, コハク酸 HEPES etc.	Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} NO_3^- , Na^+ , Ca^{2+} , K^+ Mg^{2+} , NH_4^+ etc.

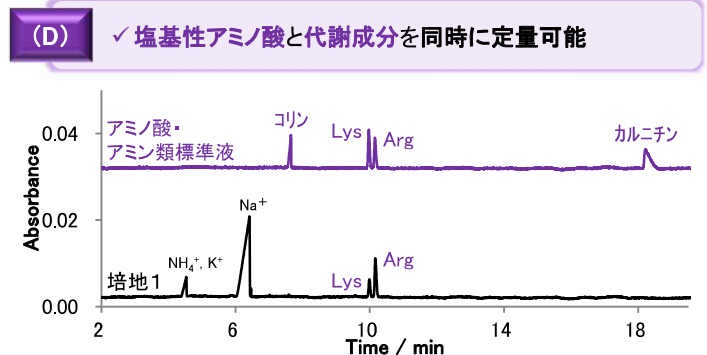
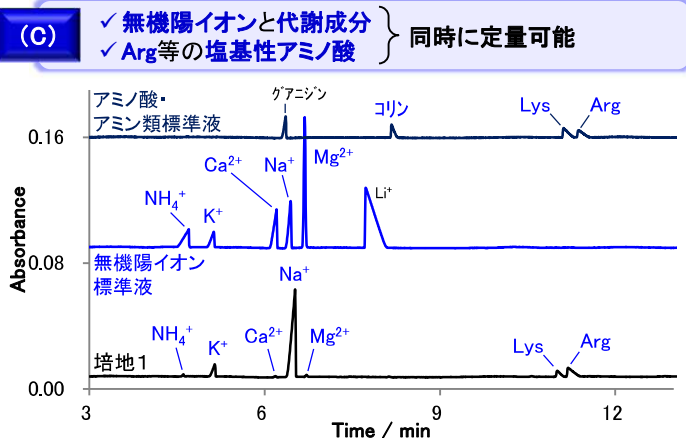
培地(例)

Ⅱ. 培地中のアミノ酸・代謝成分・緩衝剤・無機塩類の分析例

*HEPES: 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸



培地に含まれる無機陰イオン、代謝成分・緩衝剤としての有機酸に加え、栄養物質として重要なアミノ酸を分析できる



無機陽イオン、代謝成分としてのアミン類、LysやArgを分析できる

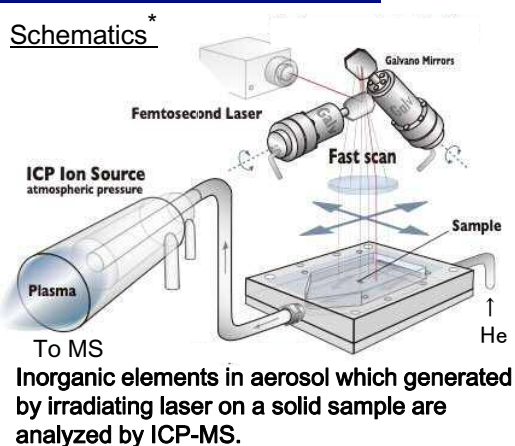
図 各種標準液および培地のエレクトロフェログラム (A), (B)陰イオン、(C), (D)陽イオン

最適化した測定条件に基づくCEにより、多くのイオン種を定量下限約0.5 mg/mL (mmol/Lオーダー)で評価できる

Quantitative Imaging of Trace Elements in Mouse Spinal Cord using fsLA-ICP-MS

Femtosecond (fs) LA-ICP-MS is a powerful technique for the trace element quantification in hydrous samples due to the under atmospheric pressure measurement. Moreover, isolated sampling and ionization processes, which eliminate the influence of coexisting component, are capable of high sensitivity and accuracy.

Principle of fsLA-ICP-MS



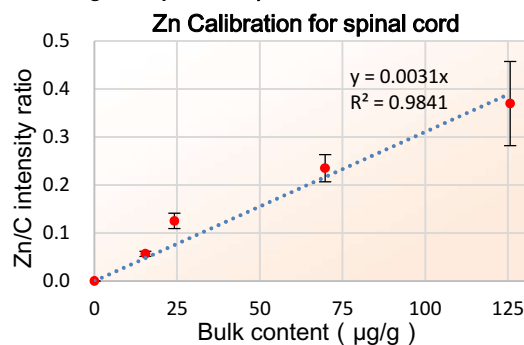
*) Courtesy of Prof. Hirata, University of Tokyo.

Advantages of fsLA-ICP-MS

	fsLA-ICP-MS	NanoSIMS	TOF-SIMS
Sensitivity	ppb – sub ppm	ppm	ppm
Spatial Resolution	10 μ m	50 nm	300 nm
Atmosphere	Atmospheric pressure, He (Available for Hydrous Samples)	Ultra high vacuum (< 10^{-7} Pa)	Ultra high vacuum (10^{-6} – 10^{-7} Pa)
Sampling Area	~mm – 2 cm	10 – 50 μ m	10 μ m – 5 cm
Sampling Depth	~50 μ m	< 10 nm	< 3 nm

- Trace elemental imaging with **High Sensitivity** in **Biological Tissue**
- Quantitative analysis** with isolated sampling and detection region (Less influence of coexisting components)

Homogenized Biological Standard Preparation & Calibration

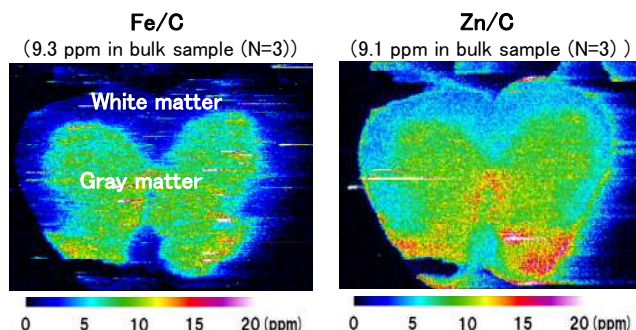
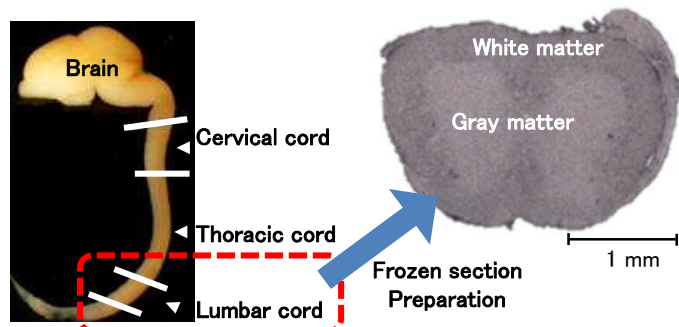


Calibration for Spinal Cord

- 1st : Fe/Zn concentrations of ③ determined by ICP-MS, Fe/Zn/C Intensities of ④ measured by fsLA-ICP-MS.
- 2nd : Matrix corrections between brain and spinal cord are provided on the basis of carbon concentrations.

- Standard with Targeted Concentration can be prepared.

Quantitative Imaging of Fe/Zn in Lumbar Cord



- Fe/Zn are more highly concentrated in **Gray matter** (10–15 ppm) than **White matter** (3–5 ppm).

fsLA-ICP-MS & reliable standard preparation make **Quantitative Element Imaging** possible with **High Sensitivity** and **Accuracy**.

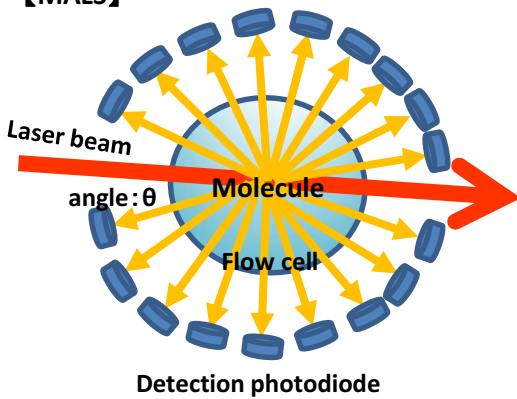
Candidate method for **Drug Efficacy Assessment**, **Pathological Mechanisms** analyses, etc.

SEC-MALS Analysis under GMP — Molecular Weight Determination of Aggregates —

Evaluation of aggregates is indispensable for the quality test of antibody drugs. Absolute molecular weight distribution, mean absolute molecular weight, and radius of gyration of macromolecules are determined by SEC-MALS without constructing a calibration curve. In this report, aggregates were prepared by heating the human IgG antibody, and the molecular weight of the aggregates was determined by SEC-MALS.

Principle of SEC-MALS

[MALS]



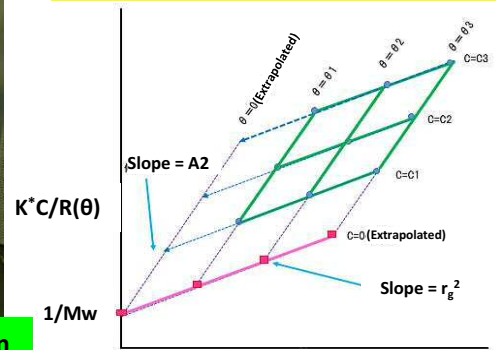
Multi Angle Light Scattering (MALS) detector:
Scattered light is detected by 18 photodiodes.



Refractive Index (RI) detector for measuring concentration

$$\frac{K^*C}{R(\theta)} = \frac{16\pi^2 n_0^2}{3M\lambda_0^2} < r_g^2 > \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + \frac{1}{Mw}$$

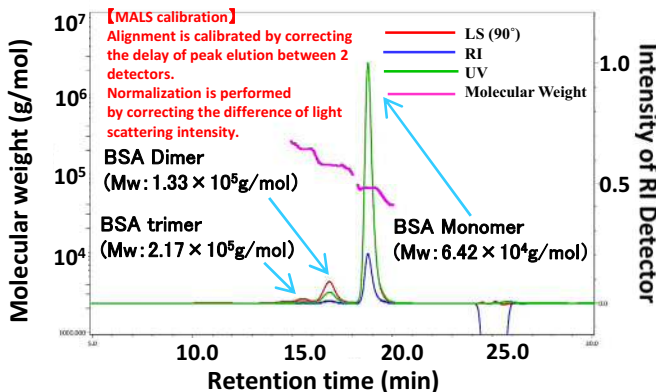
Mean absolute molecular weight (Mw) and radius of gyration (r_g) are calculated from concentration (measured by RI) and light scattering intensity (measured by MALS).



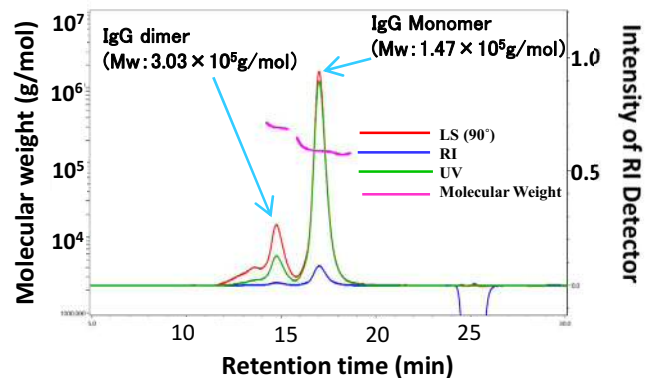
Zimm plot

We have introduced a SEC-MALS system administrated under GMP as a Japanese CRO for the first time. The acquired data are available for the New Drug Application.

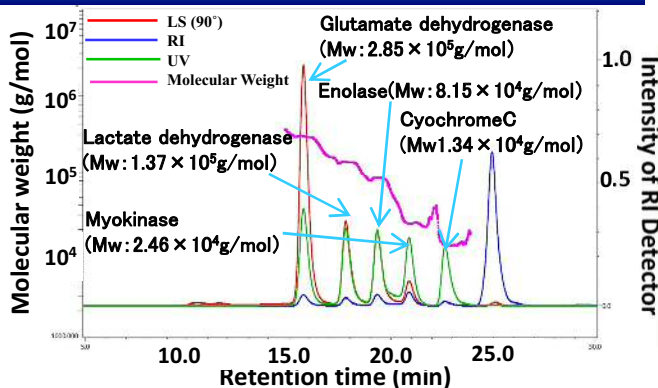
Analysis of BSA (For MALS calibration)



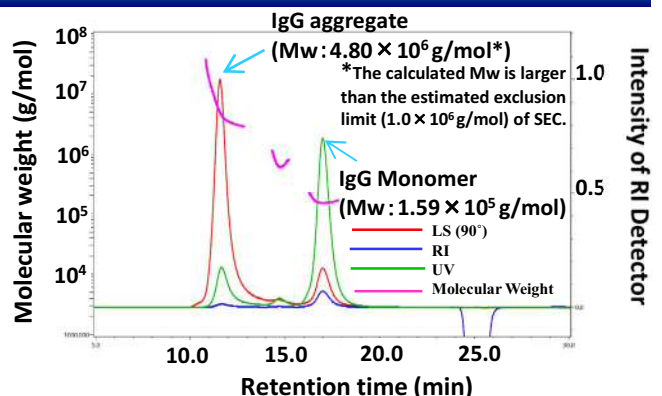
Analysis of Antibody



Analysis of Molecular Weight Markers



Analysis of Antibody Aggregates



GC/MS Analysis under GMP – Highly Sensitive Analysis for Impurities in Nucleic Acids

In the quality test of nucleic acid medicines, plenty of samples can not be used for analysis, unlike the case of small molecule drugs. Especially in the analysis for impurities, highly sensitive analysis is needed to perform the test using limited amount of valuable samples. In this report, the residual solvents contained in a commercially available nucleic acid sample were measured by highly sensitive headspace-GC/MS.

1. Quality Test Items for Nucleic Acid Medicines

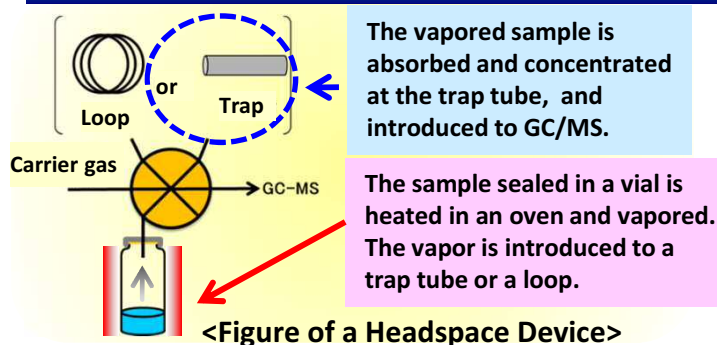
Requirement of guideline*	Available analysis at Toray Research Center
Specification: Test procedures	
(1) Appearance	Observation
(2) Identification	UHPLC, UV spectrophotometer
(3) Purity	
1. Oligonucleotide related substance	UHPLC, Capillary electrophoresis
2. Organic small molecular impurities	LC-MS/MS, GC-MS, MS, NMR, UHPLC
3. Residual solvents	GC-MS, GC
4. Inorganic impurities	ICP-OES, ICP-MS
(5) Assay	UHPLC, UV spectrophotometer
(6) Biological activity	Cell-based assay, ELISA

*Quoted from "Matters to be considered for assurance and evaluation of the quality of nucleic acid medicines" issued by MHLW, Japan on September 27, 2018



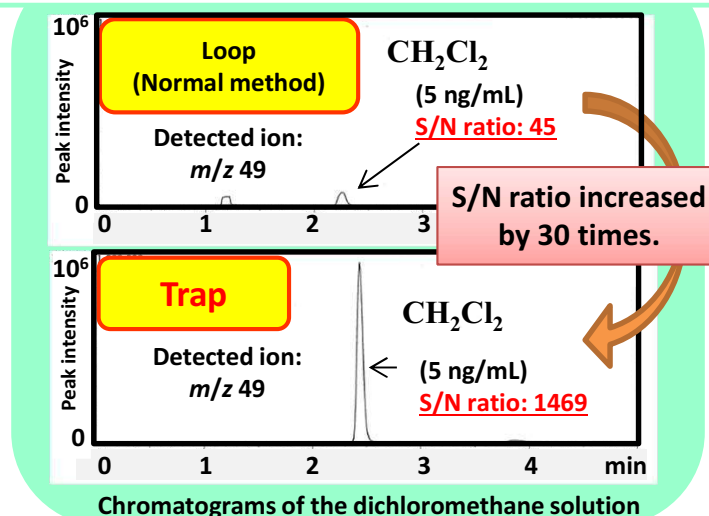
SOP: Operation and maintenance of headspace-GC/MS (SOP No. NME18500)

2. Measurement of Residual Solvents in the Nucleic Acid by Headspace-GC/MS



<Figure of a Headspace Device>

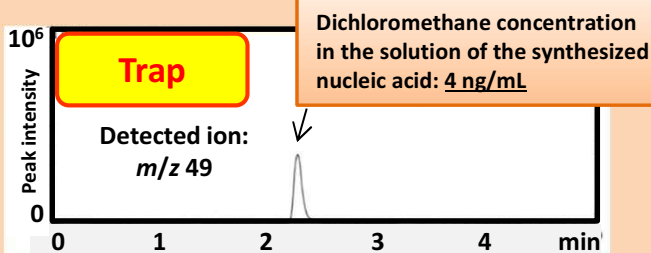
Improvement of detection capability for dichloromethane (a typical solvent used for nucleic acid synthesis)



Chromatograms of the dichloromethane solution

Residual dichloromethane in artificially synthesized nucleic acid was measured by the trap mode.

Sample: Artificially synthesized nucleic acid (C-Myc antisense DNA, sulfurized)
Sequence: CACGTTGAGGGGCAT
Sample concentration: 1 mg/mL



Chromatogram of the artificially synthesized nucleic acid by the trap mode

A trace amount of dichloromethane (4ppm for the synthesized nucleic acid) was detected.

- S/N ratio of dichloromethane increased by 30 times in measurement by trap mode headspace-GC/MS.
- Quantitation of dichloromethane was performed using very small amount (1 mg) of the nucleic acid.

Analysis of amino acids, metabolic and buffer constituents in a medium

A medium contains low molecular weight nutrients, balanced saline and buffer constituents, which can be quantified by means of capillary electrophoresis (CE). By applying diverse separation conditions, comprehensive analysis of ionic species, such as HEPES commonly used for a buffer and amino acids required to control for cell culture, in a medium can be achieved.

I. Ionic species in a medium

Examples of evaluable ionic species

The colors of letters (red, green, blue, purple) are corresponding to A, B, C, D in the section II.

Amino acids

Glutamine (Gln), Glutamate (Glu)
 Pyroglutamate, Glycine (Gly)
 Histidine (His), Methionine (Met)
 Arginine (Arg), Lysine (Lys)
 etc.

Metabolic constituents

Pyruvate, Lactate
 Citrate, Malate
 Succinate
 Choline, Carnitine
 etc.

Buffer constituents

Acetate, PO_4^{3-}
 Citrate, Succinate
 HEPES
 etc.

Minerals

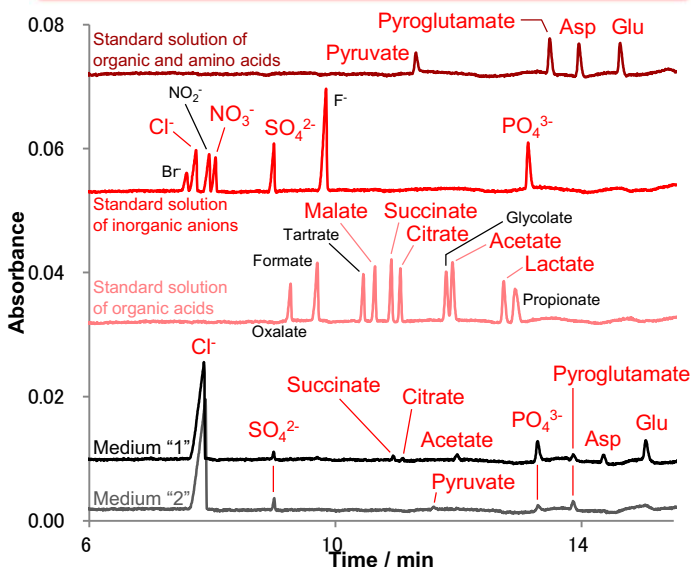
Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}
 NO_3^- , Na^+ , Ca^{2+}
 K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+
 etc.



Media

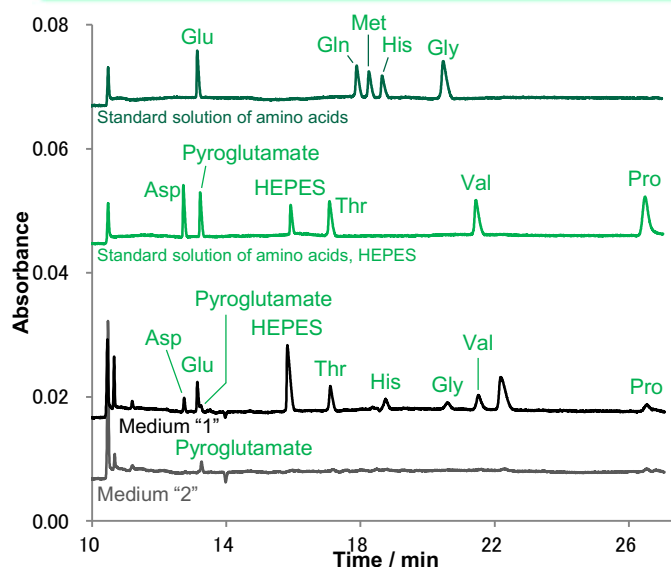
II. CE analyses of amino acids, metabolic and buffer constituents in media

(A) ✓ Inorganic anions, metabolic and buffer constituents
 ✓ Acidic amino acids like pyroglutamate



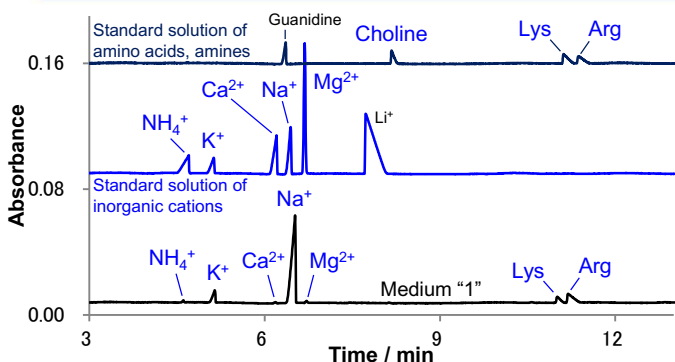
(B) ✓ Amino acids, HEPES*
 ✓ Pyroglutamate, Glu, Gln

*HEPES : 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonate

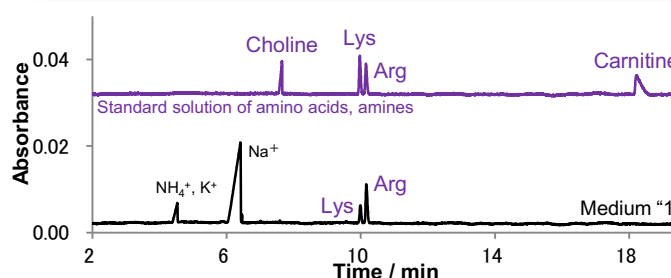


Amino acids for nutrients, as well as inorganic and organic anions as metabolic and buffer constituents, can be evaluated.

(C) ✓ Inorganic cations, metabolic constituents
 ✓ Basic amino acids like Arg



(D) ✓ Basic amino acids, metabolic constituents



Inorganic cations, amines and basic amino acids as metabolic constituents can be evaluated.

Fig. Electropherogram of ionic species in media (A), (B) anionic species (C), (D) cationic species

CE based on optimized conditions enables the evaluation of a lot of ionic species with the LOQ** 0.5 mg/mL.

**LOQ : limit of quantification