COMMENTARY

創薬のすきま産業を目指して —GLP (Good Laboratory Practice) フリーラボは バイオアナリシスで生き残れるか?—

Application of Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry to Bioanalysis Services —Role of the “GLP (Good Laboratory Practice)-Free” Laboratory—

埴崎靖子・中野英彦・千田直人*

Yasuko TSUKAZAKI, Hidehiko NAKANO, and Naoto SENDA*

三菱化学メディエンス株式会社分析技術開発センター *Analytical Development Center, Mitsubishi Chemical Medience Corporation, Tsukuba, IBARAKI, JAPAN*

Our GLP (Good Laboratory Practice)-free laboratory continues to develop state-of-the-art technologies that will provide a cutting-edge service to our clients.

- We will respond to client requests promptly.
- We will have a good relationship with clients from the early stage of new drug development. Our GLP-free laboratory can supply many technologies for application to GLP laboratories.

(Received January 5, 2009; Accepted February 19, 2009)

1. はじめに

現在、医薬品の開発支援を請負う受託分析ラボ（コントラクト・ラボ）は、そのほとんどが GLP (Good Laboratory Practice) 適合性調査による評価通知を受けています。一昔前は、医薬品機構 [現 医薬品医療機器総合機構; PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency)] が発行する GLP 適合性確認書をもつことが受託分析ラボの格付けの一つでもあり、コントラクト・ラボはこぞってトレーサビリティの質の向上に努め、試験の信頼性をアピールしました。

他方、民間企業の宿命である利益の追求は、コントラクト・ラボにとっても大きな課題の一つです。いかに多くのクライアントをもち、受注量を増やしながらも信頼性を維持し、さらにその納期に対応していくかという課題は常に付きまといまふ。したがってコントラクト・ラボの多くは“マスプロダクト”へと必然的に変化していきました。

製薬メーカーがコントラクト・ラボを選択する際、その特徴が加味されることはほとんどありません。これはコントラクト・ラボ側の問題ですが、受託側に目立った特徴がないため、過去の実績や価格が判断基準となっている事例がほとんどです。

それゆえ、コントラクト・ラボとしての明確な特徴をもち、製薬メーカーへのカッティング・エッジとしての機能を有するためには、GLP ラボであるコントラクト・ラボに GLP フリーのラボで培った技術を移転し、その技術水準を向上させることが必要です。

この目的を達成させるための必要条件は、いうまでもなく GLP フリーラボが常に最新の技術力をもち続けることです。また単に最新技術を模倣するのではなく、これを GLP ラボが応用できる形に消化することも必要です。文字にいたしますとたかが 2~3 行程度のものですが、実際の苦労は皆様にもご理解いただけるものと思います。他方、最新技術の情報入手やこれらの実践には、ハードメーカーはもとより試薬や部材メーカーとの連携・協力も不可欠です。

本稿では筆者らが各メーカーならびにクライアントのご協力をもって身につけましたいくつかの事例、技術についてご紹介します。

本稿は第 35 回 BMS コンファレンスでの講演内容を著したものです。

* Correspondence to: Naoto SENDA, *Analytical Development Center, Mitsubishi Chemical Medience Corporation, 2-1-6 Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-0047, JAPAN*, e-mail: Senda.Naoto@me.medience.co.jp

千田直人, 三菱化学メディエンス株式会社分析技術開発センター, 〒305-0047 茨城県つくば市千現 2-1-6

Table 1. 各社から販売されている溶媒の種類

グレード	価格	特徴
特級	安い	普通の溶媒
HPLC 用	やや高い	UV 吸収が少ない
LC/MS 用	高い	精製度が特級よりも高い
電子材料用	少量 (500 mL) 購入の場合、とても高い	精製度がほぼ 100%

Fig. 1. Comparison of the sensitivity by methanol of each chemical reagent grade.

EL: 電子材料用, GR: 特級

2. 高感度化への挑戦

2.1 有機溶媒の選択

感度競争は、コントラクト・ラボにおいて避けては通れない課題の一つです。LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry) では、移動相をターゲットとする化合物のイオン化の最適化と、HPLC (high-performance liquid chromatography) からの溶出を鑑みながら決定していきます。ここで移動相に使う有機溶媒を選択されることは、皆様ご経験のことと思います。単純な例としては「メタノールにするかアセトニトリルにするか」が挙げられます。しかしこの一般的な有機溶媒，“メタノールとアセトニトリル”にも少々、癖があります。Table 1 は、試薬メーカー各社が販売している有機溶媒のグレードです。近年では「LC/MS 用」という、精製度を上げた高い有機溶媒も販売されています。Fig. 1 は、各社グレードのメタノールを用いて感度（イオン強度）の比較を行った結果です。やはり精製度が高く、販売単位に小分けするときにも細心の注意が払われている A 社の電子材料用が最も高い感度を示しました。しかし意外にも、同じ A 社の特級品が電子材料用に続き、D 社の LC/MS 用有機溶媒よりも高価な感度を示しました。この結果はすべての化合物に適用されるとは限りませんが、もう少し感度が必要なときに有機溶媒のメーカーやグレードも一考され

てはいかがでしょうか？ ちなみに HPLC 用有機溶媒は UV (ultraviolet) カット剤の影響からか、芳しい結果は得られませんでした。またメタノール中には安定化剤としてクロロホルムが少量添加されているようです。

2.2 旧型機種による高感度化

近年の LC-MS/MS は「誰でも高感度化」をうたい文句に、飛躍的な発展を遂げています。特に ESI (electrospray ionization) イオン源での cationized molecule の発生低減（皆無ではありませんが）には、驚かされた記憶があります。他方、旧型の ESI イオン源ではいくつかの cationized molecule が発生しますが、ある種の化合物ではこれを利用し、最新鋭の LC-MS/MS よりも高感度化が可能になった例¹⁾があります。

Fig. 2 はビタミン D3 誘導体、カルシポトリオールを 2000QTRAP（イオン源は Turbo Ion SprayTM）でとったマススペクトルと、その化学構造です。通常ですとネガティブ ESI の $[M-H]^-$ で SRM (selected reaction monitoring) のチャンネルを構築します。やはりポジティブ ESI では $[M+Na]^+$ が強く観察されていますが、ほんの少しアンモニアを溶媒に添加することで $[M+NH_4]^+$ も見えています。この $[M+NH_4]^+$ をプリカーサーとしてプロダクトイオンスキャンを行った結果が Fig. 2 の下段のスペクトルです。

この結果を元に、SRM イオンチャンネルを 480→395

Fig. 2. Chemical structure and MS (mass spectrometry) spectra of calcipotriol. (Upper MS spectrum: Q1 scan, Lower MS spectrum: product scan)

Fig. 3. Comparison of the sensitivity of calcipotriol from human plasma extract (10 pg/mL) by each ion source.

とし、SRM測定で高感度機API 5000と比較した結果をFig. 3に示します。測定にはTurbo Ion Spray™を装着した2000QTRAP、カラムはODS-3 (2.1 mm i.d.×100 mm L., 5 μm)、移動相にはメタノール: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (85/15, v/v)を使用しました。なお、[M+Na]⁺と[M+NH₄]⁺のイオン強度の比較はSIRのピーク面積値で行いました。その結果、MRM (multiple reaction monitoring)ではAPI 5000と同等の感度が2000QTRAPでも得られました。ちなみにFig. 3の最下段のクロマトグラムは、同一の測定条件でAPI 5000のイ

オン源、向かって右側のヒーターを断線させて測定したものです。[M+NH₄]⁺のイオン強度が飛躍的に増加していますが、その要因はわれわれユーザーでは解釈できませんでした。またこの手法は残念ながら、信頼性保証の観点からGLPラボでは扱うことはできないと考えています。

2.3 固相抽出の検討

さまざまな固相カラムの開発により、固相抽出法はここ数年、飛躍的な発展を遂げました。特にWaters社から発売されたOASIS HLB®は、負荷時の展開溶媒や洗浄時の有機溶媒の濃度、溶出時の溶媒 (pH や有機溶媒の種類) を

Fig. 4. Influence on recovery of M0, M1, and M1-glucuronide when plasma is diluted with various solvents. A: 1% formic acid aqueous solution, B: 1% ammonium aqueous solution, C: water

Fig. 5. Influence of an added volume of standard solution on recovery of M0, M1, and M1-glucuronide.

Fig. 6. Influence on recovery of M0, M1, and M1-glucuronide when washed with various solvents. TEA: triethylamine

Fig. 7. Extraction procedure of M0, M1 and M1-glucuronide from human plasma.

■ iTRAQ®: sequence tag reagent for proteome

Fig. 8. The principle of iTRAQ™ for amino acid analysis.

選択することによって、さまざまな化合物（またはその代謝物との一斉抽出）に威力を発揮します²⁾。しかしこれらの条件変更では回収が改善せず、場合によっては隘路に陥ることもまれにあります。このあたりのことを化学的・理論的に整理がつけられれば、より皆様のお役に立てると思われませんが、今回は事象のみの紹介でご容赦ください。

紹介するケースは、ヒト血漿中の未変化体(M0)、脱アルキル化体(M1)と脱アルキル化体にグルクロン酸が抱合した代謝物(M1-glucuronide)です。Fig. 4にWaters社が推奨する、いわゆるジェネラルメソッドによる回収率を示します。変化させた因子は、固相に負荷する時の血漿への添加溶媒のpHと、その容量(50~400 μ L)です。結果から、血漿に添加する溶媒は精製水(Milli Q水)が好結果を与えていますが、化合物によって回収がまちまちであり検

討の余地を大きく残しています。次いで血漿への標準溶液（標準物質をブランク血漿に添加する溶液、溶媒として25%メタノール水溶液を使用）の容量(5~50 μ L)を変化させた結果をFig. 5に示します。血漿への添加容量を減らすことで、M0ならびにその代謝物(M1, M1-glucuronide)の回収がFig. 4に比べ、落ちてくようになりました。さらにFig. 6に、化合物ごとに洗浄溶媒を検討した結果を示します。検討項目はメタノールの含量と、洗浄溶媒のpH(酢酸、トリエチルアンモニウム、精製水)で、溶出にはメタノールを使用しています。結果としていずれの化合物もメタノール水溶液での洗浄に効果がありました。

以上の結果をまとめた固相抽出のスキームをFig. 7に示します。結果として何の変哲もないスキームですが、回収率は85~92%と良好な結果でした。測定にはAPI 5000、カ

Fig. 9. Procedure of iTRAQ™ for amino acid analysis from biological samples.

Table 2. Amino Acid Concentration of Sports Drink Using iTRAQ™ Reagent

Amino acid	Amino acid concentration (nmol/mL)			
	Sports drink-A		Sports drink-B	
	Observed	Indicated	Observed	Indicated
Arg	1,468	1,437	3,646	3,621
Val	88	85	3,343	3,162
Ile	77	76	3,400	3,435
Leu	39	38	4,416	4,198

ラムは XR-ODS (2 i.d.×30 mm (L), 2 μm, 島津製作所製), 移動相には 1 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルのグラジエントを使用しています。またこの現象はタンパク質結合によるものではないかとのご指導を固相メーカーの方からいただきましたが、残念ながらタンパク質結合を解消させるリン酸の添加では解決しませんでした。

3. 市販ソフトの改良・応用

3.1 誘導体化試薬～アミノ酸分析～

通常、アミノ酸分析には、イオン交換クロマトグラフィーとニンヒドリン反応を利用したアミノ酸分析計が使われています。しかしこの方法ですと測定時間が長いこと

Table 3. Amino Acid Concentration of “MISO” Using iTRAQ™ Reagent

Amino acid	Amino acid concentration (mg/mL)	
	Observed	Indicated
	Observed	Indicated
Glu	1,016	1,148
Ala	7,103	7,101
Leu	6,308	N/A
Arg	4,846	5,098
Lys	4,622	3,876
Val	4,477	4,117
Ser	4,337	4,312
Pro	4,276	3,676
Ile	3,999	6,156
Phe	3,847	3,556
Thr	3,202	3,111
Asp	1,470	2,456
His	1,445	1,379
Met	1,143	1,137
Tyr	682	785
Cys	0	0

(メーカー側は 75 分、実際は 110 分+平衡化時間として 30 分の合計 140 分が 1 測定)、定量分析がなかなか難しいのが現状です。近年、LC-MS/MS でもアミノ酸分析を可

能とした誘導体化試薬が数社から販売されています。ここでは Applied Biosystems 社 から 販 売 さ れ て い る iTRAQ™ を用いた測定方法をご紹介します。

Fig. 8 に iTRAQ™ の原理を、Fig. 9 に弊社で実施しているアミノ酸分析のスキームを示します。この方法では、1 回の LC-MS/MS への注入で定性と定量を同時に行うことが最大の特徴です³⁾。この試薬はキット化されており、試薬の蓋が色分けされてたいへん使いやすいのですが一つ難点があります。それは HPLC の測定条件で、なぜか流速が毎分 1 mL となっています（付属のカラムも内径 4.6 mm です）。メーカー推奨の方法は、「Turbo V-Spray 以外

のイオン源ではスプリットするように」と記載されています。当初は 2000QTRAP でスポーツドリンク、味噌ならびにみりん中のアミノ酸含量の測定を行いました。その結果をそれぞれ Table 2, 3 と 4 に示します。ほぼ含量記載に一致する結果が得られました。次いで生体試料中のアミノ酸分析を試みるにあたり、HPLC の流速を一般的な毎分 0.2 mL で行う方法を模索しました。Table 5 に流速 0.2 mL/min の HPLC 条件、Table 6 にヒト血漿ならびに尿中アミノ酸含量をアミノ酸分析計と比較した結果を示しま

Table 4. Amino Acid Concentration of “MIRIN” Using iTRAQ™ Reagent

Amino acid	Amino acid concentration (mg/L)	
	Observed	Indicated
Ala	139	N/A
Leu	174	
Ser	132	
Val	122	
Ile	83	
Tyr	122	
Glu	282	
Asp	190	
Arg	97	
His	23	
Thr	71	
Cys	0	
Phe	112	
Pro	85	
Lys	46	
Met	28	
Total	1,706	667 to 3,330

Table 6. Amino Acid Concentration of Human Plasma and Urine Using iTRAQ™ Reagent

Amino acid	Amino acid concentration (nmol/mL)			
	Plasma		Urine	
	Observed (mean, n=5)	Reference	Observed (mean, n=5)	Reference
Ser	414.5	180~710	165	98.0~142.4
Gly	819.2	690~2,320	212	181.1~268.9
His	872.5	770~2,140	96.6	67.4~98.6
Asp	13.2	< 35	2.4	< 3.3
MOx	2.9	ND	5.6	ND
Thr	136.7	49~360	175.8	122.5~181.1
Ala	182.1	56~530	450.6	321.9~479.9
Glu	11.3	11~49	46.6	22.8~45.4
Arg	82.9	33~99	86.4	64.6~97.8
Pro	5.6	< 22	238	165.6~243.6
Cys	79.9	30~88	33.8	29.8~49.0
Lys	144.4	11~380	208.6	142.5~208.3
Val	36.4	19~69	262.2	224.1~276.3
Met	26.7	8~34	22.4	26.4~36.0
Tyr	67.3	59~220	65.6	54.6~75.2
Ile	18.2	14~48	83.8	63.4~88.0
Leu	26.6	24~78	131.8	107.3~144.1
Phe	45.6	27~110	72.6	57.1~68.7

Table 5. Analytical Method for iTRAQ™-labeling Amino Acid Using Series Joint Column Condition

Unit	Shimadzu LC20A UFLC Prominence			
Column	Inertsil ODS-3, 2.1 mm (ID)×50 mm (L), 5 μm Inertsil Ph-3, 2.1 mm (ID)×150 mm (L), 5 μm			
Column temp.	Set at 45°C			
Injection volume	5 μL			
Mobile phase	A; 0.1% FA/0.005% HFBA/H ₂ O B; 0.1% FA/0.005% HFBA/MeCN			
Stepwise program	Time (min)	Flow rate (mL/min)	A (%)	B (%)
	0	0.2	100	0
	12	0.2	72	28
	17	0.2	72	28
	17.1	0.2	0	100
	22	0.2	0	100
	22.1	0.2	100	0
	30	0.2	100	0

Table 7. The Classification of the *in Vitro* Sample

Sample identifier	for Hepatocyte		for Microsome		
	Compound	Hepatocyte	Compound	Microsome	NADPH generating
Probe	+	+	+	+	+
Compound blank	—	+	—	+	+
Tissue blank	+	—	+	—	+
All blank	—	—	—	—	—
Energy blank	N/A	N/A	+	+	—

Table 8. Result of Metabolite ID™ for Evaluation of Compound A Metabolite

Retention time	Transformation name	Mass	XIC peak height	Confirmed pattern	Mass accuracy (ppm)	Cluster error (%)
16.55	Demethylation	545.2115	1.60E+03	yes	6.886	6.20%
16.76	Demethylation	542.2114	9.89E+04	yes	6.438	8.20%
17.44	Parent mass	559.2311	5.30E+02	yes	1.092	8.60%
19.22	Oxidation	575.4945	4.13E+04	yes	1.846	7.50%

Fig. 10. Metabolite stability of compound A in human liver microsome.

す。定量結果の比較では、ほぼアミノ酸分析計と同等の結果が得られました。また、クロマトグラムのピーク分離と感度もほぼメーカー推奨の方法 (API3200) と同等な結果でした。現在、カラム接合部のデッドボリュームを排除するため、ODS-3 と PH-3 (ジーエルサイエンス社製) のゲルを混合またはグラジェントで充填したハイブリッドカラムをジーエルサイエンス (株) と協力し、市販化に向けて開発中です。

3.2 解析ソフトの応用…代謝物検索

これも各社・各様のデータ解析ソフトウェアがありますが、いずれも基本骨格を維持した代謝物、すなわち官能基の変化を追跡するものです。基本構造の開裂や脱離によっ

て生じた代謝物については、RI (radioisotope) を使ってその存在を確認し、HPLC で分取した後に構造を解析するスキームが一般的であり、かつ確実かもしれません。しかし当該ラボには RI 施設ではなく、仮に RI を用いて実験にあたるとしてもその合成には (当該ラボにとっては) 莫大な費用がかかります。

そこで何とかコールドで基本構造が変化した代謝物をトレースできないかと考え、主成分分析 (principal component analysis: PCA) 解析ツールを利用しました。ご存知のとおり、PCA 解析は主にバイオマーカーの探索に用いられています。ここでは化合物 A (分子量 559.2) とヒト肝ミクロゾームを用いて、基本構造に変化が生じた代謝物

Fig. 11 PCA analysis for compound A-metabolite.

検索の可否を試みました。なお、偽陽性を防止するため Table 7 のようにサンプルを構成し、測定を行いました。測定には quadrupole time-of-flight mass spectrometer を用い、カラムは ODS-SP (2.1 mm i.d.×150 mm (L), 5 mm, ジェールサイエンス社製), 移動相には 0.1% 酢酸水溶液とアセトニトリルのグラジエントを用いました。

Table 8 は、反応時間 20 分における化合物 A のヒト肝ミクロゾームによる代謝物を Metabolite ID™ で検索した結果です。二つの脱メチル化体と 1 種の水酸化体が確認できました。これを元に、化合物 A の代謝安定性を確認した結果が Fig. 10 です。化合物 A (Parent) の減少とともに脱メチル化体と水酸化体は増加する傾向にありますが、反応時間 40 分後には両代謝物共に減少しました。また 40 分の反応時間における Metabolite ID™ の結果は、代謝物は存在しないというものでした。

これらのデータを PCA 解析した結果が Fig. 11 です。図は左側が第 1 主成分と第 2 主成分の解析に Pareto のス

ケーリングを用いた Score プロット、右側はその Loading のプロットを表しています⁴⁾。Score プロットから、反応時間によって第 2 主成分（グラフ縦軸の PC2）の増加がうかがえます。他方、第 1 主成分（グラフ横軸の PC1）は反応時間に従った減少傾向を示しています。第 2 主成分の増加は、Loading プロット上で最も左斜め上方向へ伸びるポイントであることから、*m/z* 279.2, 315.3 と 333.3 のピークが原因であると考えられます。

さらにこの三つのピークを反応時間軸でプロットした結果が Fig. 11 の下図です。反応時間によって増加することがわかりました。

また NADPH-generating system の添加がない、Energy Blank サンプルは Score プロット上で 40 分のインキュベーションまで PC-2 がマイナス、80 分で PC2 がプラスに転ずるものの PC1 もプラス座標にあることから、この差は主に化合物 A が残留していることと、酵素反応以外で生成した化合物（分解物）は、代謝物とは化学構造が異

なることを示しています。

以上の結果から化合物 A は、ヒト肝ミクロゾームによっていったん官能基の修飾を受けた後、基本構造が開裂する代謝経路の可能性が示唆されました。

4. おわりに

以上、筆者らのつたない応用技術についてご紹介いたしました。なかにはすでにご承知のものもあったかと存じます。他方、これらは LC-MS/MS のユニットをお持ちであれば、どなたでも簡単に実施することができます。何かの機会に一度、お試しください。幸甚に存じます。

文 献

- 1) N. Murao, N. Ohishi, Y. Nabuchi, M. Ishigai, T. Kawanishi, and Y. Aso, *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **823**, 61 (2005).
- 2) Pharmaceutical Application Notebook, Waters Corporation (2001).
- 3) Applied Biosystems Amino Acid Analysis for Physiological Samples, iTRAQ™ Reagents Application Kit for Use with Applied Biosystems/MDS Sciex Amino Acid 45/32 Analyzer (2007).
- 4) Maker View™ ソフトウェアユーザーズマニュアル, アプライドバイオシステムズジャパン(株) (2005).

Keywords: GLP-free laboratory, Amino acid, iTRAQ, Maker View, LC-MS/MS