

## DART-MS を用いた迅速分析法の検討

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部・第二室長  
阿部 裕

### 【はじめに】

私は、令和4年10月に食添部第二室長を拝命するまで、食添部第三室において、食品用器具・容器包装に含有される化学物質の残存量や溶出量の調査、これらの分析法の開発やその性能評価に関する研究を行ってきた。食添部内の配置換えではあるが、業務内容や立場がガラッと変わり、行政対応に追われる毎日を過ごしている。そのため第二室に異動して約1年経過したが、当室の業務に関連した研究は本格稼働しているとはいいがたい。そこで本発表では、これまで第三室において実施してきた器具・容器包装に関する研究の中から、大気圧イオン化法の一つである DART-MS を用いた二つの迅速分析法について紹介したい。少し前の研究となってしまう大変恐縮ではあるが、個人的にとっても面白い装置だと思っており、誰かの次の研究のヒントになれば幸いと考え取り上げることとした。

また、今回の発表にあたり当部の杉本部長より、研究紹介も良いけど阿部さん自身を衛研の皆さんに知ってもらおうような発表にしてほしいな、という想定外の要望が出された。正直困惑した。しかし指摘はもっともで、食品系の各部、生活衛生化学部、有機化学部などの先生方とは普段から話す機会があるが、薬品系やセンターの先生方との接点は同期を除けばほとんどない。この発表は私を知ってもらう良い機会であるとも考え、私が衛研でやってみたいと思ったことなども少し紹介したい。

ちょうど夏季休暇が近いこの時期である。気軽に聞いてもらえたら幸いである。

### 【DART-MS について】

Direct Analysis in Real Time (DART) イオン化法は大気圧化で直接イオン化する、いわゆるアンビエントイオン化法の一つである。DART イオン源でヘリウムがプラズマ化され、これに接触した化学物質は一瞬でイオン化される。DART イオン源を質量分析計に接続させた DART-MS (図1) では、イオン源と質量分析計の間をプラズマ化したヘリウムが流れており、これに試料を接触させると試料の表面または試料中の化学物質がイオン化し、その後すみやかに MS に導入されマススペクトルが得られる。マススペクトルから検出された化学物質の分子量がわかり、その結果から試料中または試料表面の化学物質を推定することが可能である(図2)。固体、液体、粉体といった幅広い試料へ適用できるが、クロマトグラフィーによる分離を行わないため、得られたマススペクトルはその時イオン化した全ての化学物質に由来するものである。また、MS に導入されるイオン量を制御することが困難なため定量分析にはあまり向かない。



図1 衛研で所有する DART-MS

赤丸が DART イオン源で、MS には オービトラップ型 MS の Q Exactive (Thermo 社製) が接続できる。  
他に、TOFMS の JMS-T100 (JEOL 社製) が接続されているものもある。

### 【DART-MS を用いた軟質ポリ塩化ビニル (PVC) 製品中の可塑剤の迅速同定<sup>1)</sup>】

軟質 PVC はヒーローものの人形、風呂用のアヒル、ボールなどの材質として汎用されるポリマーで、柔軟性を付与するため、可塑剤が 20~40% 程度使用されている。可塑剤にはフタル酸エステル類、アジピン酸エステル類など多種多様なものがあり、一部のフタル酸エステル類は食品衛生法において乳幼児用玩具への使用が規制されている。

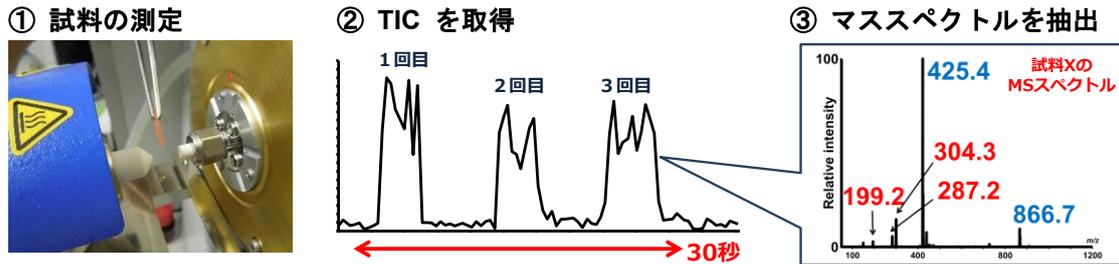


図2 DART-MS による測定およびデータ取得の流れ

- ① 測定はイオン源とMSの間に試料をかざすだけ
- ② 一瞬でイオン化されTICが得られる。3回繰り返しても分析時間はわずかに30秒程度
- ③ TICからMSスペクトルを抽出し、試料中または試料表面の(複数の)化学物質の分子量がわかる。

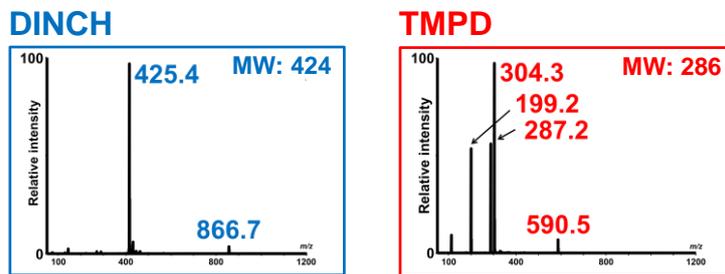


図3 DART-MS によって得られた可塑剤標準品 (DINCH と TMPD) のマススペクトル

軟質 PVC 製品中の可塑剤の分析法は、細切した試料から有機溶媒を用いて一晚抽出し、その上清を GC-MS で測定するものである。試験操作はシンプルだが、時間を要し、さらに大量の可塑剤や PVC 由来のオリゴマーなどによって GC-MS を汚染しやすい。そこで軟質 PVC 製品中の可塑剤分析に DART-MS が適用可能かどうかを検討した。

我々が所有する約 40 種類の可塑剤標準品を DART-MS で測定しマススペクトルを取得した結果、大部分の可塑剤でベースイオン (最も高強度で検出されたイオン) として検出されたのはそれぞれの  $[M+H]^+$  に由来するイオンであった (図3 DINCH)。一部はフラグメントイオンや  $[M+NH_4]^+$  も検出される場合もあったが (図3 TMPD)、いずれもそれぞれの可塑剤に由来するイオンであったことから、ほぼ全ての可塑剤を DART-MS で検出し同定可能であった。続いて、あらかじめ GC-MS により含有可塑剤 (DINCH と TMPD) が判明している軟質 PVC 製品を DART-MS で測定した (図2 ③試料 X)。その結果、DINCH と TMPD に由来するイオンを含むマススペクトルが得られたことから、DART-MS を用いて軟質 PVC 製品中の可塑剤を前処理なし、迅速、簡単に同定できることが示された。

次に、軟質 PVC 製玩具 25 検体の GC-MS と DART-MS の可塑剤の検出結果を比較し DART-MS による可塑剤の検出精度を評価した。その結果、GC-MS によって含有量 0.01% 以上で検出された可塑剤 101 件のうち、DART-MS では 86 件が正しく検出された (検出精度: 約 85%)。含有量が 0.2% 未満の可塑剤の一部で DART-MS で不検出となったものがあったが、含有量が 1% 以上の可塑剤の検出精度は 100% であった。したがって、DART-MS は軟質 PVC 製品に主に使用されている可塑剤を 1 分足らずで確認できる強力なツールであることが示された。一方で、DART-MS では GC-MS で 0.01% 未満となったものでも“検出”と判定される場合があった。これは単純に GC-MS と DART-MS の装置感度の差によると考えられたが、今後は正解率の向上に向けた検討も必要であると考えられる。

#### 【DART-MS を用いたポリアミドの迅速材質判別<sup>2)</sup>】

ポリアミド (PA) はアミド結合を有するポリマーの総称で、ナイロンとも呼ばれる。高い耐熱性や耐摩擦性を有していることから、ヘラなどの調理器具として汎用される。食品衛生

法では PA 製器具・容器包装に対して PA6 の原料モノマーであるカプロラクタム (CPL) の溶出量を制限している。PA はその構成モノマーの違いにより多くの種類が存在するが、実際に食品用器具・容器包装に使用される PA の半分以上は CPL を含まない。つまり、あらかじめ CPL が含まれないことが分かれば大部分の製品は溶出試験を行う必要はない。しかし、見た目では判断することは不可能で、さらにほぼ全ての製品に原料モノマーの表示はない。そのため、あらかじめ CPL を含む PA かどうかを知ることは不可能である。一般に原料モノマーの同定には赤外分光法 (IR) や熱分解 (Py) -GC-MS などを用いるが、PA の IR スペクトルは種類が違っていてもほぼ同じであるためこれらの判別は困難であり、Py-GC-MS は装置を汚染しやすいなどの問題点がある。また、いずれも試料調製等が必要となる。そこで、PA 中の CPL の検出と PA の材質判別に DART-MS を適用可能か検討した。

器具・容器包装に使用される PA 製品は PA6、PA66 またはこれらの混合ポリマー (PA6/PA66) 製であることから、これらの標準サンプルを入手し DART-MS で測定した。その結果、PA6 および PA6/PA66 からは CPL に由来する  $m/z$  114 のイオンが検出し、それ以外にもその環状ダイマー～環状ヘキサマーに由来する複数のイオンが検出された。一方 PA66 からは、モノマーのヘキサメチレンジアミン (HMDA) とアジピン酸 (AA) の環状モノマーと環状ダイマーに由来するイオンが検出したが、CPL に由来するイオンは検出しなかった (図 4)。したがって、DART-MS を用いて CPL を含有する PA 製品を容易に選抜できることが示された。さらに、他の PA 類も入手し DART-MS による判別が可能かどうか検討したが、いずれもそれぞれのモノマーに由来するマススペクトルが得られたことから、これらについては容易に材質判別が可能であった。しかし、PA6、PA66 と PA6/PA66 は類似したマススペクトルが得られたため完全には判別することはできなかった。そこで、PA6 の環状ダイマーと PA66 の環状モノマーに由来する  $m/z$  227 のイオンをプリカーサーイオンとして得られたマスマススペクトルを比較した結果、PA6 と PA66 から異なるマスマススペクトルが得られ、PA6/PA66 からはこれらを組み合わせたマスマススペクトルが得られた (図 4)。以上のことから、DART-MS を用いて PA の迅速な材質判別も可能であることが示された。

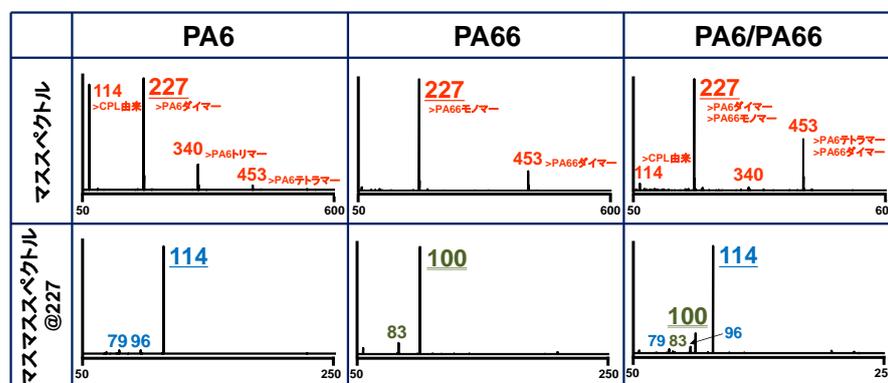


図 4 DART-MS による 3 種の PA のマススペクトル (上段) とマスマススペクトル@227 (下段)

### 【最後に】

本発表では DART-MS を用いた二つの迅速分析法について紹介した。私自身もこの装置をもっと活用したいと考えているが、前処理が不要、測定が迅速・簡単という特徴を活かして他分野へのさらなる応用を期待したい。また今後も引き続き、ちょっとした気づきが大きな成果につながるよう、常に意識して業務および研究を進めていきたい。

- 1) 阿部 裕、山口未来、六鹿元雄、平原嘉親、河村麻衣子、花尻(木倉)瑠理、合田幸広、河村葉子、DART-TOF/MS を用いたポリ塩化ビニル中の可塑剤の検索およびフタル酸エステルのスクリーニング法の検討、*食品衛生学雑誌*, **51**, 160-169 (2010)
- 2) Yutaka Abe, Luke K. Ackerman, Motoh Mutsuga, Kyoko Sato, Timothy H. Begley: Rapid identification of polyamides using direct analysis in real time mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **34**, e8707 (2020)



## 医療機器の安全性・有効性評価のための非臨床研究

国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・主任研究官

坪子 侑佑

### 【はじめに】

新規機器開発において、特に高クラスの機器になると開発・評価にかかるコスト増大や長期化は大きな問題であり、それを解決するうえで動物実験や臨床試験を低減・代替しうる非臨床試験は非常に大きな意味を持つ。筆者はこれまで医療機器開発・評価に関する研究に携わり、その中でいくつかの機器を対象とした非臨床プロジェクトを経験してきた。

本発表では、主に循環器領域を対象とした、植込み型治療機器の開発・評価のための大動物実験、ヒト病変の形態・機能を模擬する生体外評価試験、そして市販後不具合の調査研究といった、ドライからウェットまで幅広く行ってきたレギュラトリーサイエンス研究の経験を紹介させていただきたい。

### 【医療機器の大動物評価：ステントグラフト留置後の左室拡張能への影響の検討】

ステントグラフト内挿術（**EVAR**: endovascular aortic repair）は、高齢大動脈瘤患者に対する低侵襲治療として推奨されている。一方、脈波を用いた検討により、EVAR後の反射波の増大と、その反射増大が左室の拡張不全や運動耐用能低下をもたらし、予後と関連するという報告がなされている。しかしながら、EVAR後の反射波増大に関連する因子は未だ不明な点が多い。そこで、EVAR後の反射波増大と大動脈径との関連を実験的に検討した。

7頭の健常ヤギに対して胸部大動脈にEVARを施行した（図1）。血行動態指標として、心拍数、大動脈圧及び心拍出量を測定し、上行大動脈における血圧（P）と血流速度（U）を用いて wave intensity（ $WI = dP \cdot dU$ 、心血管連関の血行力学的指標）を算出しEVAR前後で比較した。さらに、血管エコーによるステントグラフト留置部位の大動脈径（最大/最小径、一心拍における径変化率）（図2）、および stiffness parameter  $\beta$  [stiffness parameter  $\beta = \ln(\text{収縮期血圧}/\text{拡張期血圧})/\text{大動脈径変化率}$ 、血管弾性の指標] の変化を比較した。また、反射波の指標である negative wave intensity（NW：末梢から心臓への後進脈波成分の peak 値）と各パラメータとの関連を検討した。

EVAR後に血管径変化率（EVAR前 vs EVAR後； $6.9 \pm 4.9$  vs  $2.7 \pm 0.4$  %， $p = 0.018$ ）は有意に減少し、stiffness parameter  $\beta$ （ $3.5 \pm 0.3$  vs  $15.9 \pm 4.7$ ， $p = 0.018$ ）は有意に増加した。図2に示すよ

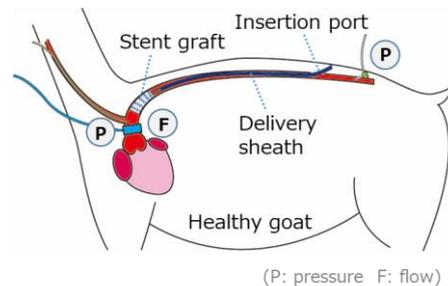


図1 成ヤギへのステントグラフト留置



図2 血管エコーによるステントグラフト留置後の大動脈径計測

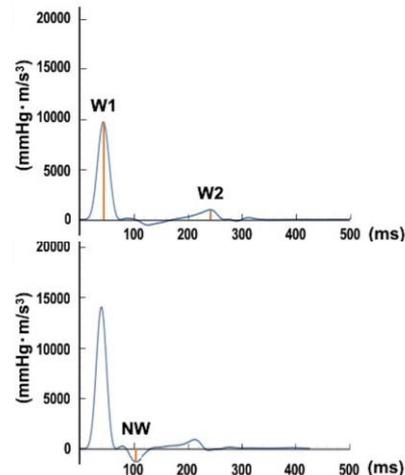


図2 ステントグラフト留置前(上) 後(下)の Wave Intensity 波形

うに、WIにおいて、収縮期の前進波成分である Wave 1 は、EVAR 前と比べて EVAR 後に有意に増加し ( $9700 \pm 460$  vs  $-16200 \pm 2480$  mmHg·m/sec<sup>3</sup>、 $p=0.018$ )、NW は有意に低下した ( $-600 \pm 140$  vs  $-1200 \pm 300$  mmHg·m/sec<sup>3</sup>、 $p=0.043$ )。また、EVAR 後に NW は最大大動脈径 ( $p=0.038$ ) および最小大動脈径 ( $p=0.033$ ) と有意な相関を示し、血管径が細くなるほど NW は増大した。

EVAR 後に大動脈末梢から心臓への反射波が増大し、その反射波増大はステントグラフト留置部位の大動脈径に関連していた。EVAR を施行される患者の大動脈径が小さい場合、術後に左室機能障害が惹起される可能性を考慮することは重要であり、経過観察期間における慎重な拡張機能の評価が必要である。また、上記結果は治療に使用するデバイスの材質によっても異なることが示唆され、術前の心機能に対して適切な性状の機器を選択することで術後左室機能の維持・改善につながりうるという知見が得られた。

### 【市販後不具合報告の分析：頭蓋内ステントを対象とした網羅的文献調査】

近年、先進的治療機器を迅速に患者に届けるための行政施策の 1 つとして、市販前と市販後の一貫した安全性の評価、適正使用指針の作成と段階的な実践が重要となっている。

症候性頭蓋内動脈狭窄に対するステント治療機器として、本邦で唯一承認を受けているデバイス Wingspan があるが、本機器は 2011 年に報告された SAMMPRIS 試験において積極的内科治療群に対する優位性が否定され、適応変更がなされた。現在第 1 選択の治療ではないが、動脈解離時の血管閉塞の緊急治療用等で唯一使用できるデバイスであることも踏まえ、本機器の適応変更前後の臨床成績を詳細に調査し、より安全で有効な治療、適正使用に資する情報を分析することを目的とした。

Wingspan の臨床成績を文献検索データベース (PubMed、Web of Science、Cochrane Library、EMBASE) を利用して分析した。各データベースより Review 論文、動脈硬化性狭窄症以外への使用、非英語文献、他デバイスの使用報告を除外した研究報告を抽出した (図 3)。SAMMPRIS 試験の前後で報告された、Wingspan ステントの適用変更前後での治療成績 (30 日以内の脳卒中、死亡) を、ファンネルプロットで可視化して適用変更の効果を分析し、また、対象血管毎の治療成績の分類を試み、より効果的な使用方法に関する示唆を得ることとした。また、治療成績と 4 つの病変血管 (内頸動脈 (ICA)、中大脳動脈 (MCA)、脳底動脈 (BA)、椎骨動脈 (VA)) との関連についても検討した。

結果として 30 件の研究 (SAMMPRIS 前 15 件、SAMMPRIS 後 15 件) が抽出され、2071 例の患者が登録された。SAMMPRIS 後の研究群では、SAMMPRIS 前の研究群と比

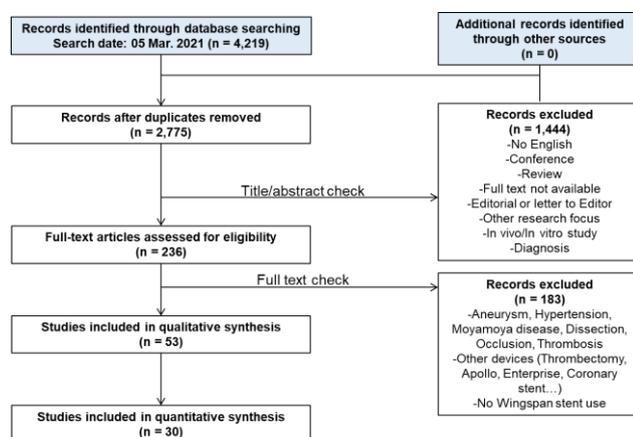


図 3 文献調査のフローチャート

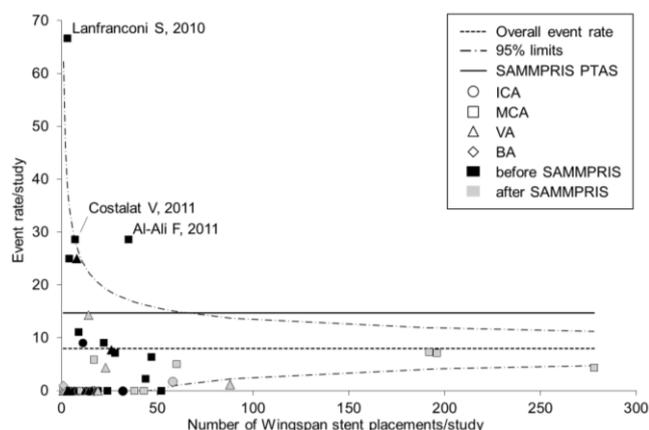


図 4 30 研究における治療対象血管ごとの 30-day stroke or death rate 分布を可視化したファンネルプロット

較して、30日脳卒中または死亡率が減少した(8.5% vs 5.6%、 $p=0.014$ )。SAMMPRIS試験前群と比較したSAMMPRIS試験後群の30日脳卒中または死亡のオッズ比は0.64(95% CI: 0.45-0.92、 $p=0.014$ )であった。

SAMMPRIS試験全体、SAMMPRIS試験前、SAMMPRIS試験後の平均30日脳卒中または死亡率はそれぞれ、ICAで1.1%、1.1%、1.1%、MCAで6.2%、8.8%、5.3%、VAで0.9%、6.0%、2.7%、BAで13.5%、15.1%、12.5%であった。SAMMPRIS試験後群では、MCAとVAの治療におけるイベント発生率がSAMMPRIS試験前群より有意に低値を示した(図4)。

本研究により、SAMMPRIS試験の結果に基づくWingspanステントの適応変更が30日脳卒中または死亡の減少に有効であったことが示された。また、ファンネルプロットを用いて、Wingspanの臨床文献報告からの臨床成績、機器不具合・患者有害事象の可視化の可能性を示した。ライフサイクルの短い医療機器において、改良や新医療技術開発につながるデータの抽出、迅速な安全対策につながるデータの抽出を効率的に行うため、今後のレジストリ等と連携した際の解析手法としての活用も期待できる。

#### 【まとめ】

多種多様な医療機器のうち、クラスIVに分類される患者にとって大きな福音にもリスクにもなりうる機器の安全かつ迅速な承認と市販後安全対策のため、各デバイスの機能・構造上の特徴を考慮した様々なアプローチによって評価研究を進めている。著者は2023年1月に着任したばかりではあるが、医療機器のレギュラトリーサイエンス研究における国立衛研のプレゼンスのさらなる向上に貢献していきたい。

#### 【文献】

1. Takano T, Takano M, Tsuboko Y, *et al.*, Reflected wave intensity increases based on aortic diameter after endovascular aortic therapy in a goat model, *Scientific Reports* 2021;11:3830
2. \*Yamaga H, \*Tsuboko Y, *et al.*, Comprehensive Risk Analysis of the Wingspan Stent in Relation to Target Vessels, *Journal of Neuroendovascular Therapy* 2022;16:458-466 (\*: Equally contributed)



## 重篤副作用を検出する血液中バイオマーカーの開発

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部

○荒川 憲昭

<はじめに>

医薬品の副作用は、早期の確定診断と服薬の中止・適切な治療を行い、重症化させないことが重要である。患者の病態を低侵襲的に評価できる血液中バイオマーカーは、医薬品の有効性確保および副作用回避においても重要な診断ツールとして注目されているが、本邦で発生頻度が高い薬剤性間質性肺炎 (DILD) や健康被害救済例が多い重症薬疹等に対しては、社会実装に至ったバイオマーカーはない。医薬安全科学部では、AMED・医薬品等規制調和・評価研究事業の一環として、国内十数施設の医療機関から、これら重篤副作用の患者試料を収集し、各種オミクス手法を用いて、副作用の早期検出・診断に役立つ血液バイオマーカーの開発を進めている。本例会では、DILD に対する新しいバイオマーカータンパク質について紹介する。

<背景>

DILD には様々な病型が存在する。中でもびまん性肺胞傷害 (DAD) 病型を呈する症例の予後は悪い。DAD は COVID-19 の重症化例や急性呼吸促迫症候群 (ARDS) に見られる代表的な病型でもあり、治療反応性に乏しく、回復しても線維化を残す。そのため、DILD が疑われる場合は、その病型が DAD であるか否かを早期に判別することが重要とされる。DILD の診断には胸部 CT (コンピューター断層撮影) など複数の検査が用いられるが、DAD 型か否かの判別は難しい。また現在、DILD の診断に用いられているバイオマーカーとして Surfactant protein (SP)-D や Krebs von den Lungen-6 (KL-6) が用いられているが、これらは間質性肺炎全般を検出するものであることから、DAD の特異的診断が可能な新しいバイオマーカーの開発が必要とされていた。

<方法・結果>

医薬安全科学部で収集した健常人および DILD 患者の急性期と回復期から採取された血液検体 (n = 95) を用いて、約 1,300 種のタンパク質をターゲットとするアプタマー (SomaScan 法) を用いたプロテオーム解析を実施した。各タンパク質の DILD 病型ごとの変動を比較した結果、DILD との関連性はおろか、血中動態の詳細さえも不明であったストラテフィン (SFN/14-3-3 $\sigma$ ) が、DAD 病型の患者血中で特徴的に増加することを見いだした。そこで SFN に対する独自の ELISA 測定系を構築し、その分析的妥当性を確認した上で DAD 診断性能を検証した結果、血清 SFN は DAD 患者の急性期と回復期の鑑別、他病型の DILD 患者との鑑別、細菌感染性肺炎などの肺疾患との鑑別において、既存の KL-6 や SP-D よりも優れた性能を有する可能性が示された[1]。また SFN は DILD だけでなく、特

発性肺線維症（IPF）の急性増悪例や COVID-19 肺炎の重症化例でも顕著な増加が認められたことから[2]、薬剤性だけでなく特発性やウイルス性の DAD の検出においても有用であると考えられた。病理部の協力の下、患者組織の病理組織学的解析を行った結果、DAD 肺を呈する DILD 患者の肺胞上皮や細気管支上皮における SFN の発現上昇を確認できた。また、培養細胞を用いた解析から、SFN は転写因子 p53 由来のアポトーシスを介して細胞外に放出されることがわかった。これらの結果は、血清 SFN が DAD 型の DILD に対する有用なバイオマーカーとなる可能性を示唆するものである。

DILD が疑われる患者に対して血清 SFN を測定することで、DAD か否かの診断に有用な情報が得られ、適切な治療の選択と患者の管理が可能となれば、DAD による死亡や後遺症の回避に役立つことが期待される。また、気管支肺胞洗浄検査や生検検査など、侵襲的な検査を減らすことができると考えられ、SFN は臨床や新薬開発の現場における DAD 診断や治療反応性のモニタリングにも有用なバイオマーカーとなることが期待される。我々は、厚労省が掲げる予測・予防型の副作用対策実現を目指して、SFN の PMDA ファーマコゲノミクス・バイオマーカー相談（適格性評価）を受けた。その結果、SFN 測定の有用性については一定の評価を得たものの、DILD 診断に関する適格性を示すためには、追加の前向き検証が必要であるとの指摘を受けた。今年度始まった新たな AMED プロジェクトにより、SFN の臨床的有用性を立証していく予定である。

- 1) Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Stratifin as a Novel Diagnostic Biomarker in Serum for Diffuse Alveolar Damage. *Nat Commun.* 2022,13,5854.
- 2) Arakawa N, Matsuyama S, Matsuoka M, Kitamura I, Miyashita K, Kitagawa Y, Imai K, Ogawa K, Maeda T, Saito Y, Hasegawa C. Serum stratifin and presepsin as candidate biomarkers for early detection of COVID-19 disease progression. *J Pharmacol Sci*,2022,150(1),21-30.

