



LC/MS (/MS) 法による 組織内薬物濃度測定 of 留意点

DG2021-54

Points to Consider in Measuring Tissue Drug
Concentrations by LC/MS(/MS) Method

氏名	よみ	所属	備考
遠藤 忠	えんどう ただし	田辺三菱製薬株式会社	
高橋 紗悠里	たかはし さゆり	株式会社新日本科学	
鶴田 敦	つるた あつし	EAファーマ株式会社	
丸本 美穂	まるもと みほ	シミックファーマサイエンス株式会社	
八木 千尋	やぎ ちひろ	株式会社新日本科学	
八木 遼太郎	やぎ りょうたろう	東レ株式会社	
山中 洋幸	やまなか ひろゆき	科研製薬株式会社	
山本 裕佳子	やまもと ゆかこ	株式会社住化分析センター	
丹羽 誠	にわ まこと	日本新薬株式会社	リーダー※

※本ポスターに関するご質問はメールでmak.niwa@po.nippon-shinyaku.co.jpにお願いします。



JBF 背景 (1)

- 医薬品の開発過程において下記理由から組織内薬物濃度測定を実施する場合がある[1][2]。
 - 作用部位局所に投与する医薬品で作用部位の曝露を評価する場合
 - 安全性試験の曝露評価として組織内濃度を測定する場合
 - 薬物動態/薬力学(PK/PD)関係把握のために組織内濃度を明らかにする場合
 - 組織対血漿濃度比を(放射性標識体を用いることなく)把握する場合

[1] Timmerman, P. et al. Recommendations from the European Bioanalysis Forum on method establishment for tissue homogenates. *Bioanalysis* 6, 1647–1656 (2014).

[2] Timmerman, P. Towards a recommendation for tissue analysis. 5th EBF Open Symposium (2012) https://e-b-f.eu/wp-content/uploads/2018/05/bcn2012-S57.-4_timmerman.pdf

JBF 背景 (2)

- 組織ホモジネート調製後に薬物濃度を測定するときの留意点について、既にEuropean Bioanalysis Forumで検討されている状況[1]だが、いくつか課題が残されている。
 - 留意点(目的に応じた測定法の検証・ホモジナイズのタイミング・組織からの抽出・安定性の考え方)[1]が浸透しているか・活用されているか。
 - ホモジナイズ法・組織からの抽出法や、その他のハンドリングについて更なるノウハウの議論や、技術的進歩を踏まえた議論は必要ないか。
 - 高分子薬物での対応はどうか。

[1] Timmerman, P. et al. Recommendations from the European Bioanalysis Forum on method establishment for tissue homogenates. *Bioanalysis* 6, 1647–1656 (2014).

当DGでは、主に低分子LC/MS(/MS)での組織内濃度測定において、下記課題から留意点を洗い出し、標準的方法の設定可能性を検討した。

DGメンバーで挙げた課題

- 組織内薬物濃度測定の目的
- 低分子・高分子で考え方/対応の差異があるか
- 灌流/脱血の有無
- ホモジネート中及びホモジネート過程の安定性の評価有無
- ホモジナイズタイミング&方法&均一性確認&回収率評価有無
- 調製困難組織及びつぶれないときの対応法・破碎法使い分け
- 緩衝液の成分・緩衝液量(調製濃度)
- 器材及び装置選択

JBF 検討方法

アンケート実施し、各社での組織内薬物濃度測定の実績・考え方を調査
※国内で活動している製薬企業・CROの中から、JBFの諸活動への協力を賛同いただいた方々（JBFパートナー、1施設1人を配置）に対して調査実施



アンケート結果を纏めて組織内薬物濃度測定の実態を把握



組織内薬物濃度測定の標準的方法の設定可能性について協議

小括#	内容	小括頁
①	組織内薬物濃度の測定経験・目的 組織の採材方法(脱血有無、全部or一部)	32
②	ホモジナイズ作業の評価(回収率、均一性、ホモジナイズ操作中安定性) ホモジネート中濃度測定の妥当性(バリデーション有無)	33
③	ホモジナイズのタイミング	36
④	ホモジナイズ装置のメリット・デメリット	39
⑤	組織によるホモジナイズ法の使い分け	45
⑥	破碎困難時の対応	51
⑦	有機溶媒の使用、ホモジネート濃度、吸着防止、添加物の実態	58
⑧	低分子と高分子の違い、標準的なホモジネート方法設定可能性	62



活動実績 (1)

時期	活動概要	詳細
2021.7.5	Kick Off会議 (WebEx)	顔合わせ、具体的検討内容設定に向けた意識合わせ、レベル感とペース配分の意識合わせ
	各メンバー	具体的に検討したい課題の探索
2021.7.30	課題持ち寄り会議 (Teams Web会議)	具体的に検討したい課題を持ち寄り共有
	各メンバー	課題の詳細化、他者の課題についての確認事項抽出
2021.8.25	課題検討会議 (Teams Web会議)	挙げた課題について不明点を相互確認、アンケートで投げかける課題を確定、アンケート作成方法を確定
	3つのサブグループ	アンケート原案の作成
2021.9.28	アンケート原案確認 (Teams Web会議)	アンケート原案の相互確認、重複の整理
	3つのサブグループ	アンケート案の修正
2021.10.20	アンケート最終確認 (Teams Web会議)	アンケート案の最終確認
	SurveyMonkey使用	アンケート実施



活動実績 (2)

時期	活動概要	詳細
2021.12.7	アンケート結果と今後 (Teams Web会議)	アンケート結果の所感共有、まとめ作業の意識合わせ(ポスター化しながら纏める)、ポスター書式の意識合わせ
	3つのサブグループ	ポスター案の作成
2021.12.23	3つのサブグループ	ポスター案の共有
	各メンバー	ポスターの見せ方ブラッシュアップ案、アンケート結果解釈の心づもり
2022.1.12	ポスター案確認会議 (Teams Web会議)	ポスター内容の確認、ブラッシュアップ案の共有、アンケート結果解釈の予備討議
	3つのサブグループ	アンケート結果の解釈、まとめ、ポスター反映
2022.1.26	ポスター確認会議 (Teams Web会議)	アンケート結果の解釈を含むポスター案の確認
	各メンバー	ポスター内容ブラッシュアップ案の抽出
2022.2.17	ポスター最終確認会議 (Teams Web会議)	ポスター最終確認
2022.2.28-3.2		ポスター発表

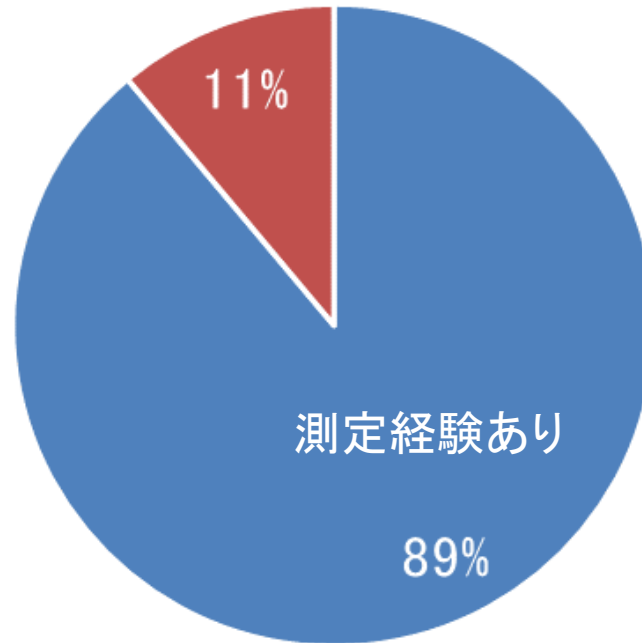


アンケート調査

アンケート実施状況

- 時期：2021年11月15日～26日
- 方法：SurveyMonkeyによるWeb上の収集
- 配信先：JBFパートナー 49名
- 回答数：36名（回答率 73%）

Q1. 組織内薬物濃度の測定経験



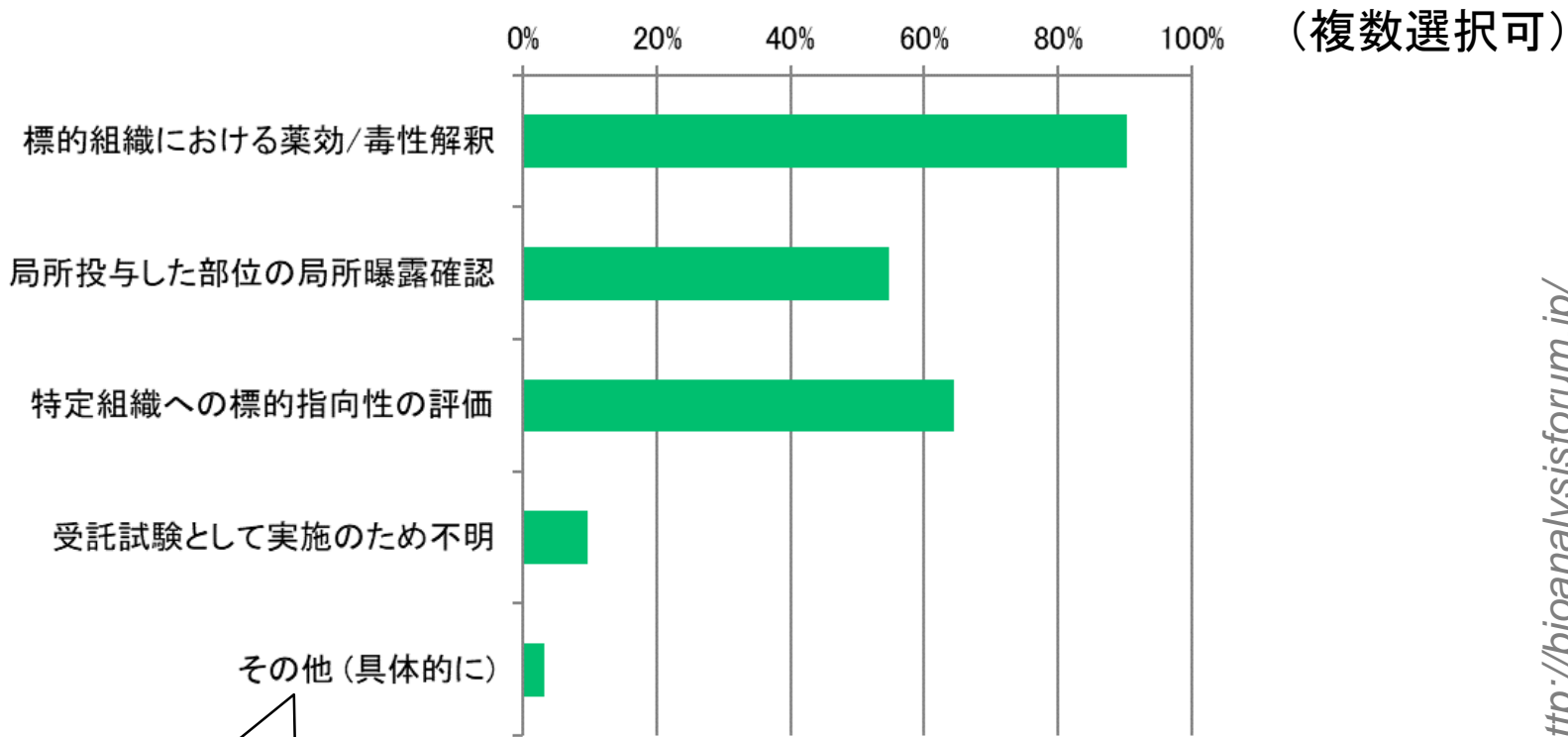
■ ある ■ ない

回答施設数(N) = 36

組織内薬物濃度は約9割の施設で測定経験がある。



Q2. 組織内薬物濃度の測定目的



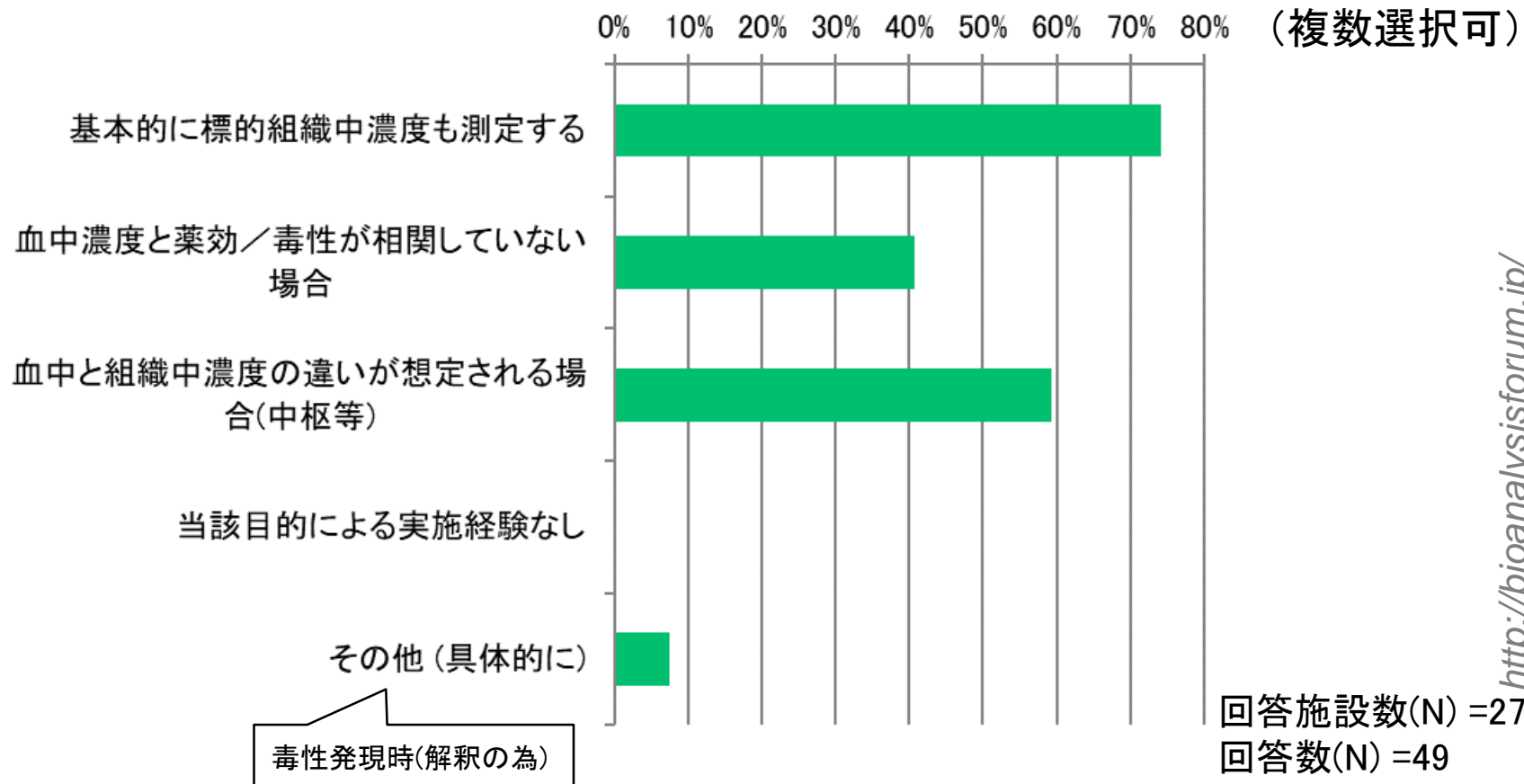
その他(具体的に)
 毒性発現懸念のある組織の曝露確認

回答施設数(N) = 31
 回答数(N) = 69

<http://bioanalysisforum.jp/>

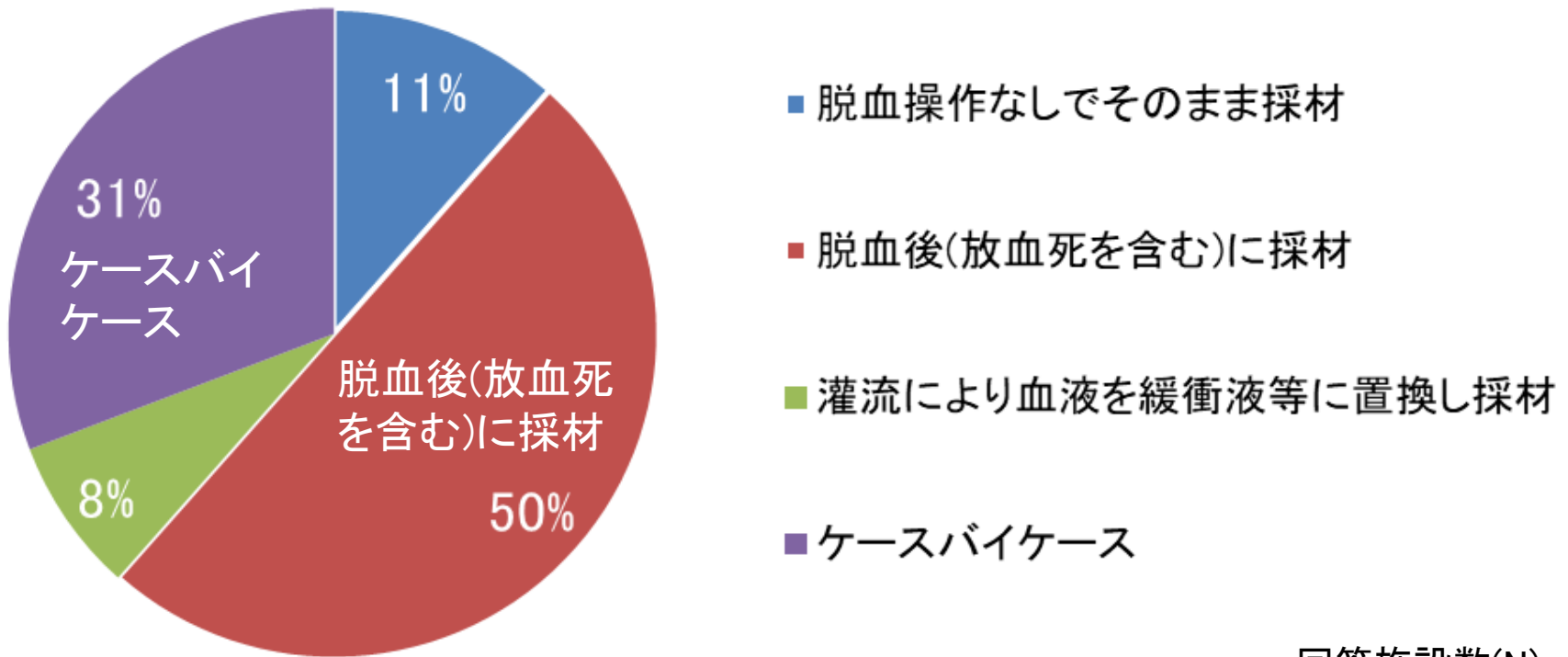
・測定目的の多くは標的組織における薬効/毒性解釈。
 ・上記目的に加え、約半数の施設で局所投与した部位の局所曝露の確認、特定組織への標的指向性の評価を目的とした測定が実施されている。

Q3. 標的組織における薬効/毒性解釈において組織内濃度を測定するケース



血中濃度に加え『基本的に標的組織内濃度も測定する』が7割以上と最も多かったものの、『血中濃度と相関しない場合や血中と組織内濃度の違いが想定される場合に測定する』との回答も多い。

Q4. 組織採材時の脱血・かん流の実施状況



回答施設数(N) = 26

半数の施設において脱血後に採材を実施している。
選択理由を次ページに記載する。

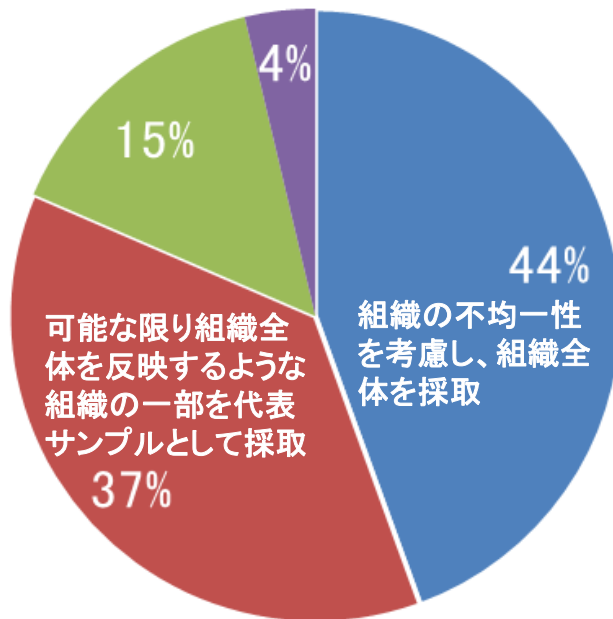
Q4. 組織採材時の脱血・かん流の実施状況

回答	回答の選択理由
脱血操作なしでそのまま採材	ほとんどは脱血せずに採材するが、化合物の特性やその後の組織の取り扱いなどで脱血する場合もあり。
脱血後(放血死を含む)に採材	血液中化合物濃度の影響を極力排除したいため、脱血後に採材している。灌流すると、 組織内化合物が灌流液中に移行する可能性がある ので、灌流処置はしていない。 サンプル数と採取時間(にかけられる時間)との兼ね合いで
ケースバイケース	計画解剖であれば放血致死(脱血)させるが、毒性試験での途中死亡の場合はそのまま採材するケースもあり。灌流までするケースは経験なし。 血液コンタミのインパクトがある場合 は灌流して採取する 脳移行性が低い化合物で 血液の影響が考えられる場合 には灌流してから採材することがあります。 脱血無しで実施するケースがほとんどですが、 サンプル処理の都合 などで脱血するケースもまれにあります。 半定量的に傾向を検討するとき、脱血が完全に出来たことにして組織移行性を解析するときには脱血する(結果、脱血することがほとんど)。全身オートラジオグラム(WARG)との整合を期待するとき、血液量を定量的に補正する計画のとき、 バイオプシー的に血流停止せず急速凍結が必要な ときは脱血操作なし。

<http://bioanalysisforum.jp/>

血液中薬物濃度の影響を受けないように脱血・灌流する場合もあるが、施設毎で化合物特性や実験都合等によりケースバイケースの対応をしている。

Q5. 組織全体の平均濃度を捉える際の組織採材方法



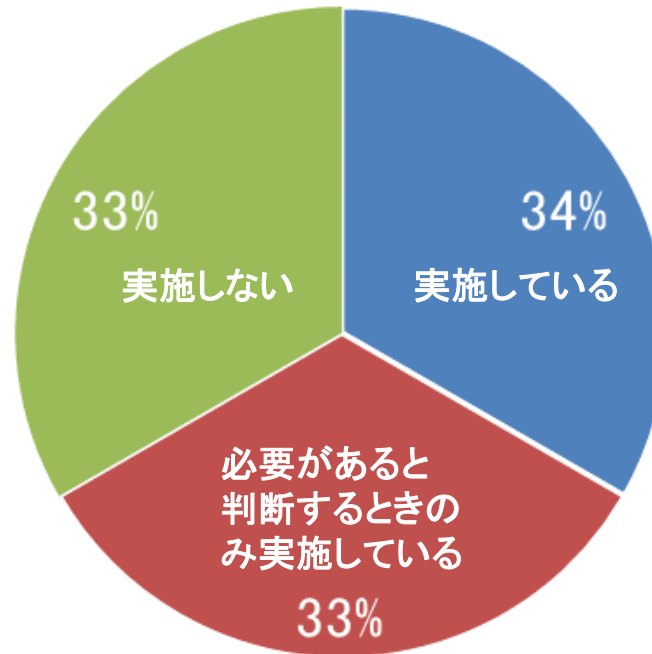
- 組織の不均一性を考慮し、組織全体を採取している
- 組織構造を考慮して、可能な限り組織全体を反映するような組織の一部を代表サンプルとして採取している
- 組織構造を考慮せずに組織の一部を代表サンプルとして採取している
- その他 (具体的に)

ケースバイケース

回答施設数(N) = 27

組織の不均一性を考慮して組織全体を採取する施設が約半数、組織の一部を代表サンプルとして採取する施設が約半数であった。

Q6. 組織の不均一性を考慮した評価目的で、 組織の一部を分取した濃度測定の実施状況



回答施設数(N) = 27

- 実施している ■ 必要があると判断するときのみ実施している ■ 実施しない

必要であると判断し、実施している施設が約7割であった。
必要性の判断基準を次ページに記載する。

Q7. 組織の不均一性を考慮した採材の要否判断

回答

評価すべき組織の部位が明確である場合 (3件)

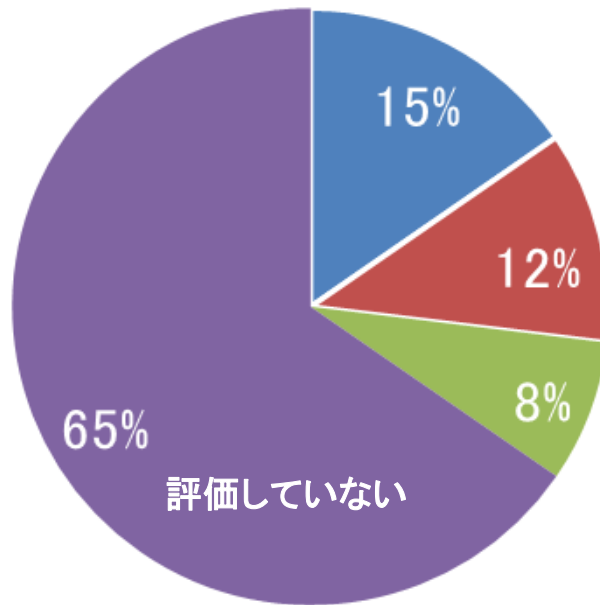
薬効・毒性から組織内での不均一性が想定される場合 (3件)

毒性/薬効の解釈に影響を与える場合 (3件)

組織全体を採取するのが困難な場合やコンタミが懸念される場合

評価すべき組織の部位が明確である場合や毒性/薬効の評価に影響を与える場合、また手技的な理由から組織の一部を採材しているという回答が得られた。

Q8. 測定対象物質の回収率（組織からホモジネート調製時）の評価状況



- 信頼性基準での評価のみ回収率を算出している
- 探索評価のみ回収率を算出している
- 探索評価、信頼性基準評価ともに回収率を算出している
- 評価していない

回答施設数(N) = 26

組織をホモジナイズ時の回収率は評価していない施設が多い。また、評価している施設の多くでは、試験のグレードで実施の要否を判断している。

Q9. 測定対象物質の回収率（組織からホモジネート調製時）の評価方法

回答

RI化合物を用いて放射能測定で評価する。(2件)

組織に標準溶液を添加してからホモジネートする。(4件)

確実に測定対象物質の濃度が上昇している試料を用意して評価する。

回収率の評価法として、標準溶液を組織に添加して評価する方法や標識体を用いた評価が挙げられた。

Q10. 測定対象物質の回収率（組織からホモジネート調製時）を評価していない理由

回答

探索段階のため。(4件)

妥当な評価方法がないため。(8件)

必要でないため。

最善を尽くした状態（他の物質が抽出できる条件）で、抽出できるものが、実際に生体内でも意義があると考えている。

適切な評価方法がないこと、また、探索ステージでの測定であることから組織からホモジネート調製時の回収率を評価していない施設が多い。

Q11. 測定対象物質の回収率（組織からホモジネート調製時）が低くなった経験

回答

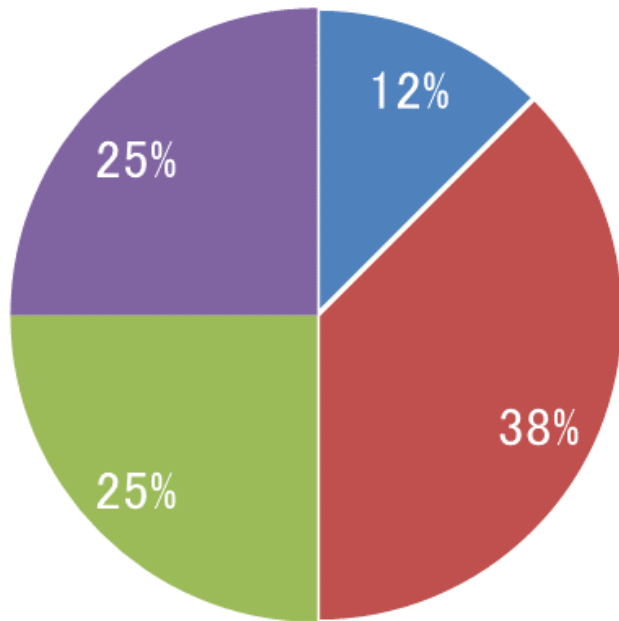
経験なし（前処理の最適化で改善も含む）。（6件）

血球移行性の高い化合物の血球画分からの抽出。

回収率が低かった経験はあるが、傾向は特定できていない。

回収率が低い経験を有する会社は少ないが、回収率が低い事例や前処理で回収率を改善した事例など、回収率を評価する意義も認められる。

Q12. ホモジネートの均一性評価に対する考え方・評価状況



- 均一性を評価する必要があると考え、実施している
- 均一性を評価する必要があると考えるが、妥当と考えられる評価方法がない(又は知らない)ため、実施していない
- 均一性を評価するのが理想的と考え妥当と思われる方法も把握しているが、評価の手間に見合うほどの重要性を感じないため、実施していない
- 均一性の評価は不要と考えるため、実施していない

回答施設数(N) = 24

ホモジネートの均一性に関して評価が望ましいと考える施設は多いものの、実際には約9割の施設では均一性の評価を実施していない。選択理由を次ページに記載する。

Q12. ホモジネートの均一性評価に対する考え方・評価状況（選択理由）

回答	選択理由
均一性を評価する必要があると考え、実施している	<p>同じ組織でもサンプリング場所によって評価に影響があるほど、濃度に違いがあることがあったため、確認するようにしている。</p> <p>代表値として平均的な濃度を測定したいため。</p>
均一性を評価する必要があると考えるが、妥当と考えられる評価方法がない（又は知らない）ため、実施していない	<p>均一となるよう、測定に供する直前に十分混和を実施している。</p> <p>ホモジネートは均一という前提で実施しており、評価方法もないため。（2件）</p> <p>目視で均一性を評価する程度しか、評価方法を把握していないことに加え、組織内濃度はざっくりとした組織全体の平均濃度と割り切って用いており、細かな均一性の追求について、必要性をあまり感じないため。</p>
均一性を評価するのが理想的と考え妥当と思われる方法も把握しているが、評価の手に見合うほどの重要性を感じないため、実施していない	<p>ビーズ破碎機で処理したホモジネート懸濁液から、サンプルを採取している。基本的に、攪拌後、採取しているので、均一性に大きな問題ないと考えている。比重の異なる複数の組織を含む場合などで、問題が生じた場合、ケースバイケースで対応する。</p> <p>均一性は大事だと思っはいるが、組織からの回収率のばらつきを加味すると、大きな点ではないと感じている。（バリデーション時に再現性をもちろん取るが、ISRをするといったことはしていない）</p> <p>スクリーニング評価が多くスピードを重視して均一性の評価は実施していない。（3件）</p> <p>探索ステージでのTK/TD考察の参考用として実施するケースが多いため、均一性まで評価しない。</p>
均一性の評価は不要と考えるため、実施していない	<p>探索評価で小スケールの試験であり、攪拌を十分することで問題ないと考えているため。（2件）</p> <p>完全に均一にすることは難しいと考えており、均一化を出来る限り実施し、出来る限り均一と思われる状態で採取する（沈殿が分散した状態で採取し溶媒抽出に持って行く）ようにしている。</p>

評価を実施しない施設では、ホモジネートの均一性を重要視していない（問題ないと考ええる）ことや探索ステージ（スピード重視）での評価であることが理由として挙げられた。

Q13. ホモジネートの均一性評価における評価手法

回答

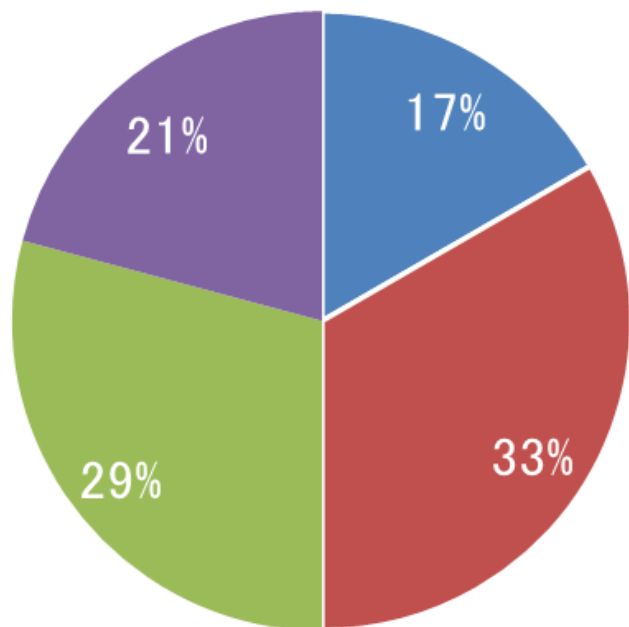
組織がホモジナイズされているかを目視で確認

n数をとってバラつきを確認

特に実施していない。

ホモジネートの均一性の評価手法として、目視での確認又は複数回のサンプリングでのバラつき評価が挙げられた。

Q14. ホモジナイズ操作中の安定性評価に対する考え方・評価状況



- 安定性を評価する必要があると考え、実施している
- 安定性を評価する必要があると考えるが、妥当と考えられる評価方法がない(又は知らない)ため、実施していない
- 安定性を評価することが理想的と考え妥当と思われる評価方法も把握しているが、評価の手間に見合うほどの重要性を感じないため、実施していない
- 安定性の評価は不要と考えるため、実施していない

回答施設数(N) = 24

ホモジナイズ操作中の安定性に関して評価が望ましいと考える施設は多いものの、実際には約8割の施設では安定性評価を実施していない。選択理由を次ページに記載する。

Q14. ホモジナイズ操作中の安定性評価に対する考え方・評価状況（選択理由）

回答	選択理由
安定性を評価する必要があると考え、実施している	<p>安定性が悪かった経験もあるため、行っている。</p> <p>測定値が妥当であることを確認するため。</p> <p>ホモジネート中での分解を防ぐため、氷冷下又は低温に設定し実施している。</p> <p>ホモジナイズの破碎エネルギーによる影響やビーズでの破碎の場合、ビーズ素材への吸着などの影響を受けた経験があるため、必要に応じ実施している。</p> <p>ホモジネート中の 短期及び長期安定性結果を代用できるのではないかと考えている。</p>
安定性を評価する必要があると考えるが、妥当と考えられる評価方法がない(又は知らない)ため、実施していない	<p>安定であろうと考えられる方法で実施している。</p> <p>氷冷下で実施する以外特に対応無。</p> <p>同じ操作なら差は出ないと考えていたが、試験間比較では特に重要かもしれない。</p>
安定性を評価することが理想的と考え妥当と思われる評価方法も把握しているが、評価の手間に見合うほどの重要性を感じないため、実施していない	<p>探索ステージでの実施が多いため、on iceでの操作を前提とし、安定性まで評価しない。</p> <p>中枢移行性評価のケースが多く、中枢組織での代謝は想定していない。また、冷却状態でホモジナイズしているため、サンプル中の局所的な温度上昇による化合物の分解も想定していない。</p> <p>評価のスループットを優先しているため。氷冷下、短時間で行う等、安定性が問題になる可能性が低い条件で操作しているため。</p> <p>なるべく氷冷などを施して安定性を確保しながら試料数を稼ぐ(処理が遅いと分解の可能性も高まると考える)。</p> <p>試験グレードや安定性の懸念が事前に分かっている場合などケースバイケースであるが、分解に配慮したプロトコール(温度コントロール)でホモジナイズ実施するため、基本的には実施していない。</p>
安定性の評価は不要と考えるため、実施していない	<p>ホモジ中安定性評価で操作中の安定性も賄えていると考えている。</p> <p>ホモジは氷冷下で実施しており、安定を仮定しているため。</p> <p>探索段階で評価することが多く、ここまで評価するのはやりすぎと感じる。</p>

探索ステージでの評価のため実施しない、また、低温で短時間で実施されることから、安定性に問題ない可能性が高いと考える施設が多い。

Q15. ホモジナイズ操作中の安定性評価における評価手法

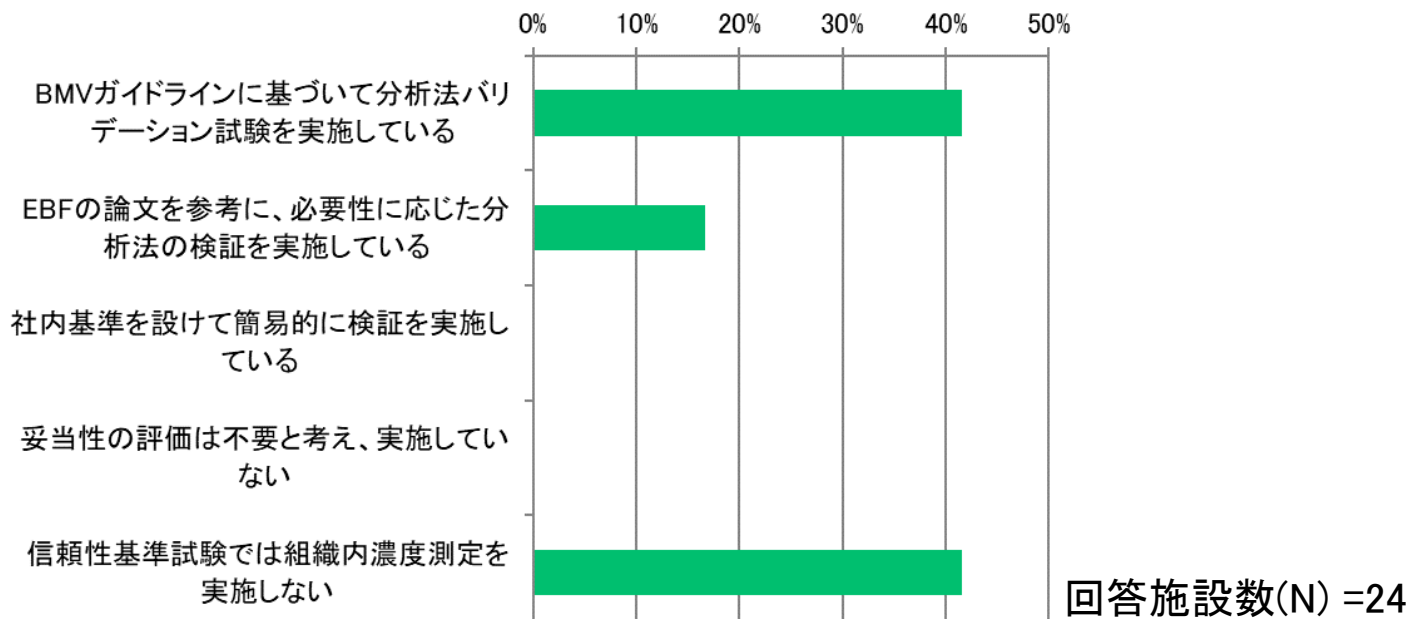
回答

対象物質の溶液(組織ホモジネートを含まない)を所定のホモジナイズ操作して、操作前後の濃度を比較する。

組織に標準溶液を添加し、ホモジナイズ処理を行い、遠心分離上清回収。その上清をrecoveryとする。ブランク組織をホモジナイズ処理し、遠心分離、上清を回収し、そこに標準溶液を添加してreferenceとして評価している。

ホモジナイズ操作中の安定性評価として、組織に標準溶液を添加し、評価する方法や組織を用いずにホモジナイズ操作自体による影響を評価する方法が挙げられた。

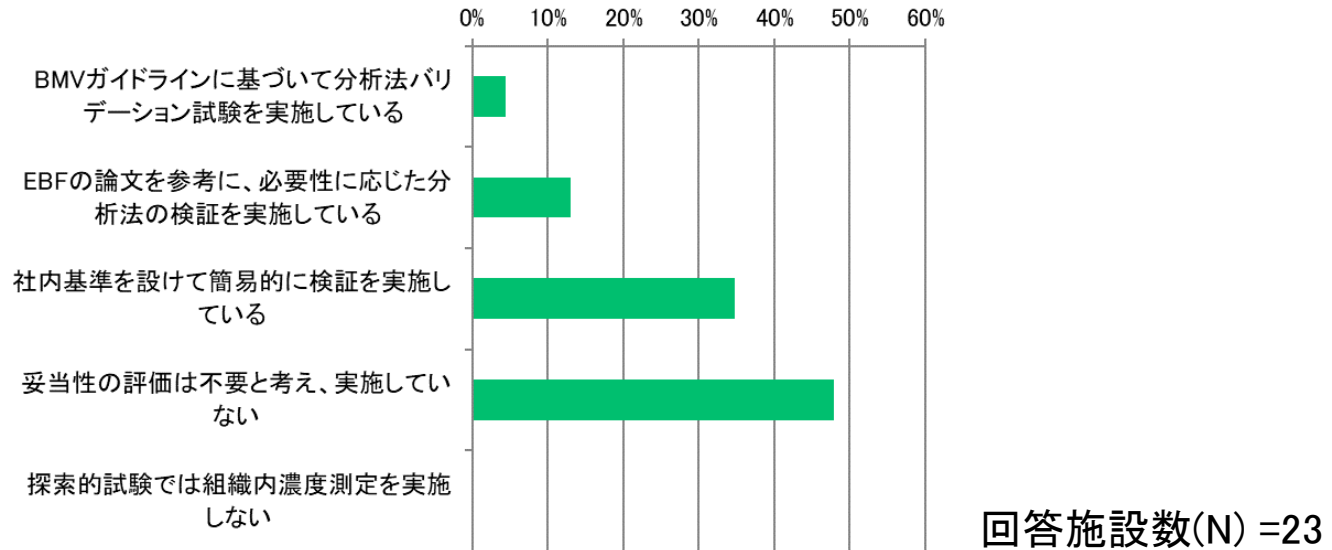
Q16. 信頼性基準試験における組織ホモジネート中濃度測定の妥当性評価



回答	選択した理由
BMVガイドラインに基づいて分析法バリデーション試験を実施している	BMVガイドラインをベースに、測定系に応じて $+\alpha$ で設定する 共通の認識があるため できる限りガイドラインやガイダンスの基準に合わせて評価している 申請用試験では標準的に行う。SOPもある。 定量するならばバリデーションは必要と考えるため
EBFの論文を参考に、必要性に応じた分析法の検証を実施している	ケースバイケースで考えて対応する。Coldの組織内化合物濃度を評価する 信頼性保証試験の経験はない。

信頼性基準試験では測定しない施設も多いが、測定する場合はBMVガイドラインに基づいて分析バリデーションを実施する施設が多い。

Q17. 探索的試験における組織ホモジネート中濃度測定の妥当性評価



回答	選択した理由
EBFの論文を参考に、必要性に応じた分析法の検証を実施している	ケースバイケースで考えて対応する。
社内基準を設けて簡易的に検証を実施している	BMVガイドラインに従うが、探索的試験の場合は、必要最小限の項目としている。測定値の妥当性を確認するため。 必要に応じて組織ホモジネートへのスパイクQC等で妥当性評価を実施する 簡易バリで足りる/事前に検量線を確認する程度で十分 と考えているため。(2件) 受託施設のため、委託者と相談し、簡易的な検証をしている。
妥当性の評価は不要と考え、実施していない	評価の スループット/速さを優先 しているため。 探索段階では 分析方法を固定 しているため。

信頼性基準試験とは異なり、探索的試験では妥当性の評価は不要又は実施する場合も簡易的な検証のみとする施設が多い。

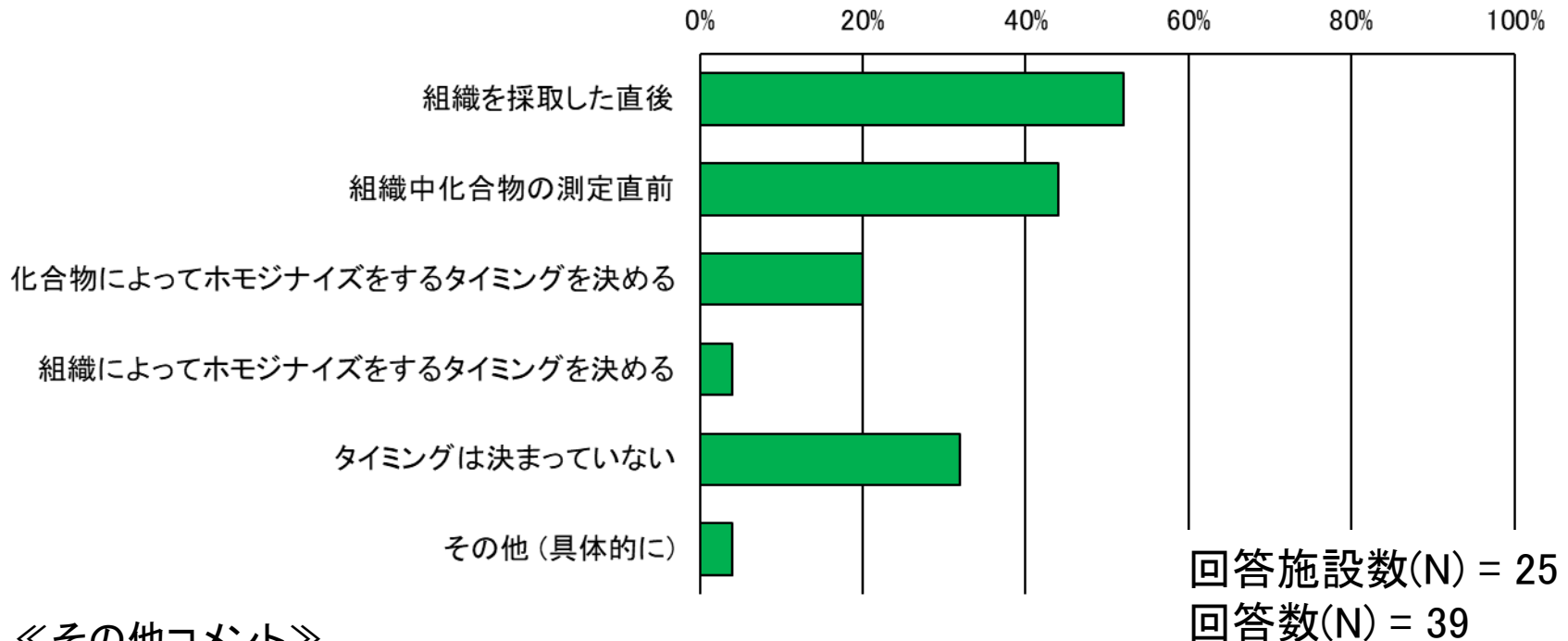
測定経験・目的、組織の採材方法

- 測定経験・目的：
 - 組織内薬物濃度は多くのJBFパートナー施設で測定されており、その測定目的の多くは標的組織における薬効/毒性解釈。
 - 標的組織における薬効/毒性解釈の際、基本的に標的組織内濃度も測定する施設と血中濃度と相関しない/血中と組織内濃度の違いなどが想定されるケースでのみ測定する施設があり、意見が分かれている。
- 組織の採材方法：
 - 血中濃度による影響軽減のため、半数の施設では脱血後に採材されているが、化合物特性や実験都合等によりケースバイケースの対応をしている。
 - 組織全体の濃度を捉える際、組織全体を採取している施設は約半数であり、残りの約半数は組織の一部を代表サンプルとして採取している。
 - 組織の構造上の不均一性を考慮した評価を行う際、組織の一部を分取する必要があると考えられている。組織の一部を分取するケースとして、評価すべき組織の部位が明確である場合や毒性/薬効の評価に影響を与える場合などが挙げられた。

- ホモジナイズ作業の評価：
 - 適切な評価方法がないこと、また、探索ステージでの測定であることから組織からホモジネート調製時の回収率を評価していない施設が多い。
 - 半数の施設でホモジネートの均一性やホモジナイズ操作中の安定性評価が必要と考えているものの、多くの施設では評価していない。実施しない理由として、探索ステージでの評価であり、スループット性を重視する施設が多い。
- ホモジネート中濃度測定の妥当性：
 - 信頼性基準試験ではBMVガイドラインに基づいて分析バリデーション試験を実施している施設が多い。
 - 一方、探索試験では約半数の施設で濃度測定の妥当性を評価は不要と考えており、評価を実施している施設においても簡易的な検証で対応している割合が高い。

Q18. 組織のホモジナイズを実施したタイミング

(複数選択可)



《その他コメント》

施設内で組織採取をおこなっていないため、組織採取施設から組織を受領後にホモジナイズを実施。もしくは、試料採取施設にて、採取直後にホモジナイズされたものを入手。

ホモジナイズの実施のタイミングはばらつきがある。

Q19. ホモジナイズのタイミングを決定する観点 (安定性、採取施設、測定機器の設備環境など)

組織を採取した直後

- ✓ 安定性。ホモジネート中の安定性評価は可能であるが、組織内の安定性の妥当な評価方法がないため、可能な限り組織採取直後にホモジナイズされるように提案する(3件)
- ✓ 採取施設で行う

組織内化合物の測定直前

- ✓ 探索ステージ・社内での実施が多いため、安定性等は厳密に問わず、通常は測定直前にホモジナイズする
- ✓ 安定性を重視し、ホモジナイズ後は可能な限り早期に測定できるようにしている(2件)

化合物によってタイミングを決定

- ✓ 主に安定性を考慮

タイミングは決まっていない

- ✓ 採取施設で行う
- ✓ 作業効率の観点から決定している
- ✓ 特にタイミングは決めておりません(探索試験のケース)
- ✓ 安定性(2件)、試験スケジュールなど

組織を採取した直後 & 組織内化合物の測定直前

- ✓ 安定性、測定機器の設備環境
- ✓ 凍結融解時の凝集性の回避
- ✓ 探索的試験では測定前に再融解させるのを避けるために測定日にホモジネート調製することが多い。信頼性基準下試験ではホモジネート中の安定性や凍結再融解の評価を行っているため、採材直後に実施するケースが多いように感じる
- ✓ 動物実験施設の側でホモジネートまで実施してくれるかどうかによる
- ✓ 探索試験では時間があるときに実施しているのが実態。結果的に測定直前になる。信頼性基準試験では測定直前が推奨されている認識(ホモジナイズ前の安定性は検討しない前提で)だが、採取直後にホモジナイズし、ホモジネート中安定性を確認する考え方をとっていた

組織を採取した直後 & 化合物によってホモジナイズをするタイミングを決定

- ✓ スケジュール

組織内化合物の測定直前 & タイミングは決まっていない

- ✓ 長期保存安定性が不明なので、採取後、凍結した後、数日以内に(機器や要員が確保できれば速やかに)測定する

組織を採取した直後 & 化合物によってホモジナイズをするタイミングを決定 & 組織によってタイミングを決定

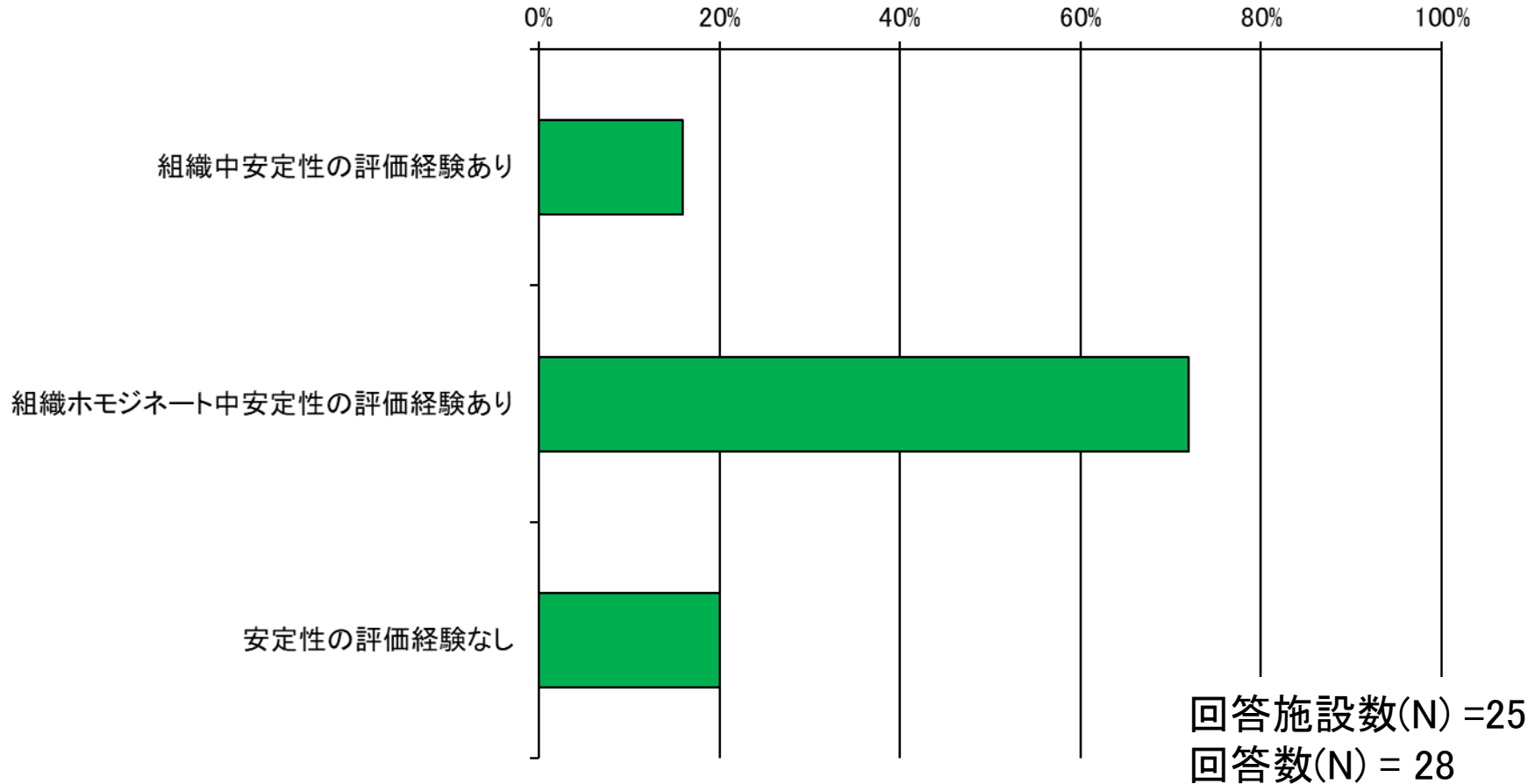
- ✓ 生体試料での代謝などを考慮して、できるだけ早くホモジナイズをして有機溶媒を加えるなどをしてほしい

- ホモジナイズ実施のタイミングはバラつきがある
- 化合物の「安定性」に対する考え方の相違
 - ・ホモジネート中安定性は評価しないためホモジネートで保存しない
 - ・ホモジネート中安定性を確認して安定性を担保すべきであるから、ホモジネート調製のタイミングとして「組織採取直後」と「化合物測定の前」が定まっていない
- 機器設備、作業効率、スケジュールなどによりホモジナイズのタイミングを決定している場合がある

安定性の情報がある場合は考慮し、作業効率や設備等の状況を踏まえ、ホモジナイズのタイミングを決定することが重要である

Q20. ホモジナイズ前、あるいはホモジナイズ後 における安定性評価の有無

(複数選択可)

<http://bioanalysisforum.jp/>

ホモジナイズ後の安定性評価経験は多いが、ホモジナイズ前の安定性評価の経験は少ない。

Q21. 組織内安定性およびホモジネート中安定性 についての意見等

(自由記載)

例①: 〇〇の組織でISS (Incurred Sample Stability)の実施経験あり。

例②: 組織内安定性はホモジネート中安定性を転用している、等)

意見

- ✓ 組織内での安定性懸念があったケースで、ラット肝臓でISSを評価した経験がある
- ✓ 膀胱上皮の組織でISSの実施経験あり
- ✓ ISSが妥当と考えるが、実際には(核酸化合物等では)ホモジネート中安定性で判断している組織内の均一性を考えると、臓器によってはISSも実施困難なことがあるのではないか
- ✓ 組織内の安定性を評価することは困難(3件)
- ✓ 組織内安定性はホモジネート中安定性を転用している(3件)
- ✓ 臨床に進んでいるようなプロジェクトは、ISSを含め、過去のデータと齟齬のないことを確認しつつ進めている
- ✓ ホモジネート中安定性のみ取得している
- ✓ 組織、ホモジネートのそれぞれについて、保存条件ごとに安定性を評価している
- ✓ 組織への結合率をホモジネートを利用して評価する際に安定性を評価することがある
- ✓ 化合物を分解する酵素を意識するケースなど

ホモジナイズ前後の安定性評価

- 『組織ホモジネート中』の安定性評価経験ありの割合は多い一方で、『組織』中安定性評価経験は少ない

組織内の安定性評価が困難である
という意見が複数寄せられた。

『組織内』安定性の評価経験がありの意見では…

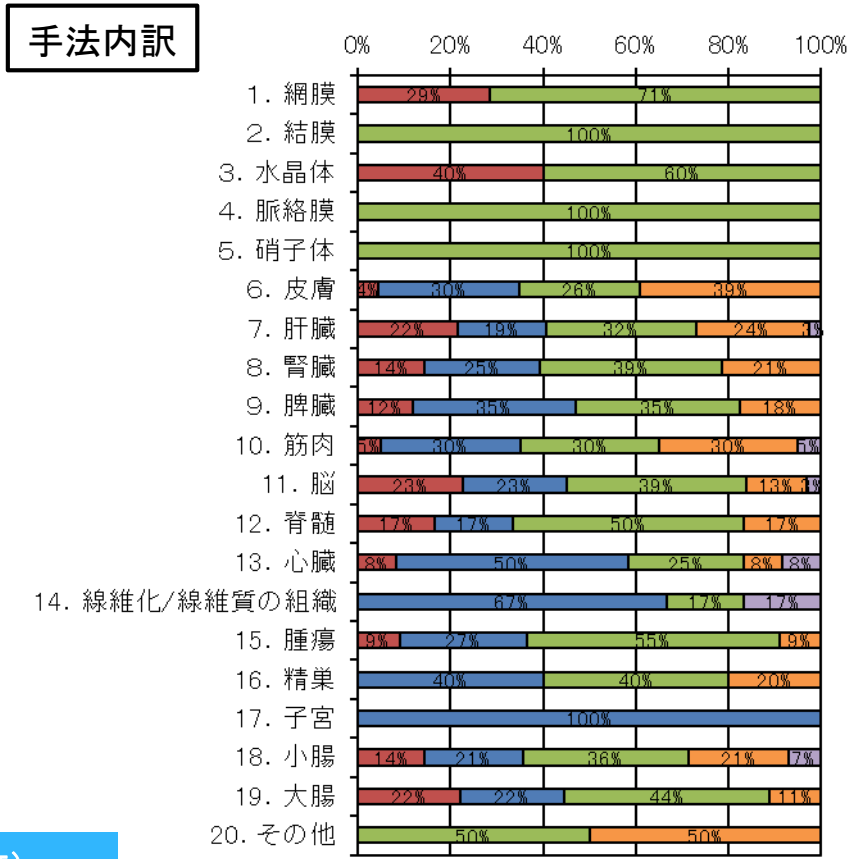
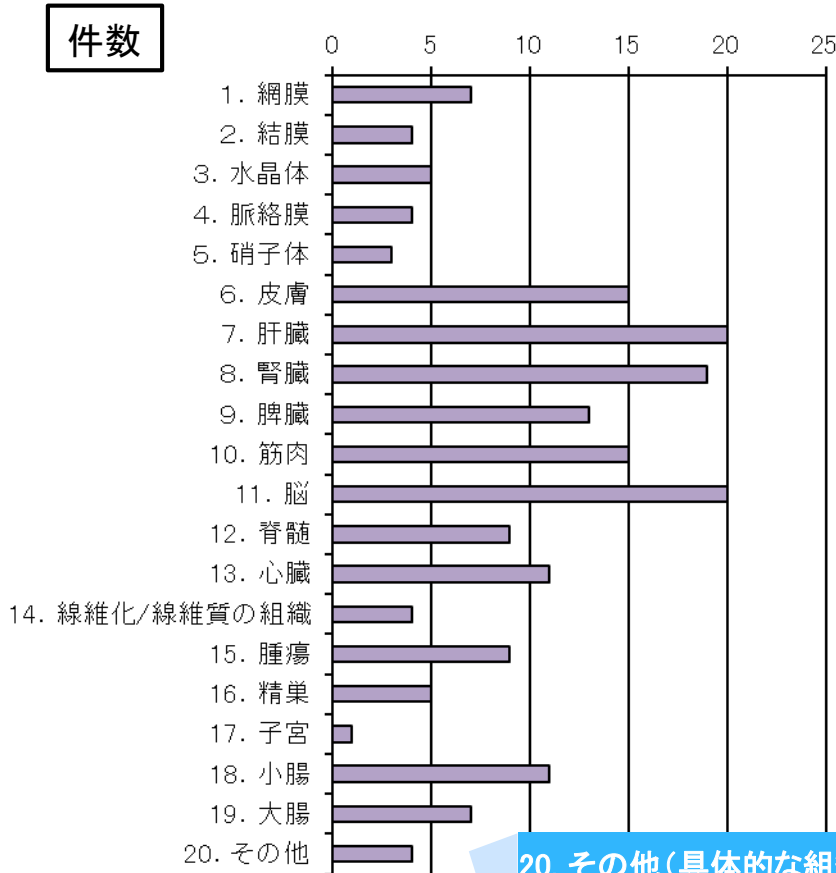
- ホモジネート中安定性を転用している
- ISSを実施している

- ・ 組織内の安定性の評価は困難という意見が多数得られたが、評価法としてホモジネート中の安定性を転用する場合がある。
- ・ ISSの実施経験ありのコメントもあるが、均一性等を考慮すると臓器により困難な可能性もある。



Q22. これまでに経験のある組織およびホモジナイズ法

回答施設数(N) = 22



20. その他(具体的な組織名称)
 肺(2名)、脾臓、骨髄(2名)、結膜※1、2、
 角膜※2、脂肪組織、
 骨髄、胸腺、リンパ節

<ホモジナイズ法>

※1 水酸化ナトリウムで溶解
 ※2 ハサミで小片に切断後、超音波照射

- :ポッター型
- :凍結破砕(マルチビーズショッカー等)
- :ビーズ式破砕(シェイクマスター等)
- :回転刃式(ポリロン等)
- :超音波式

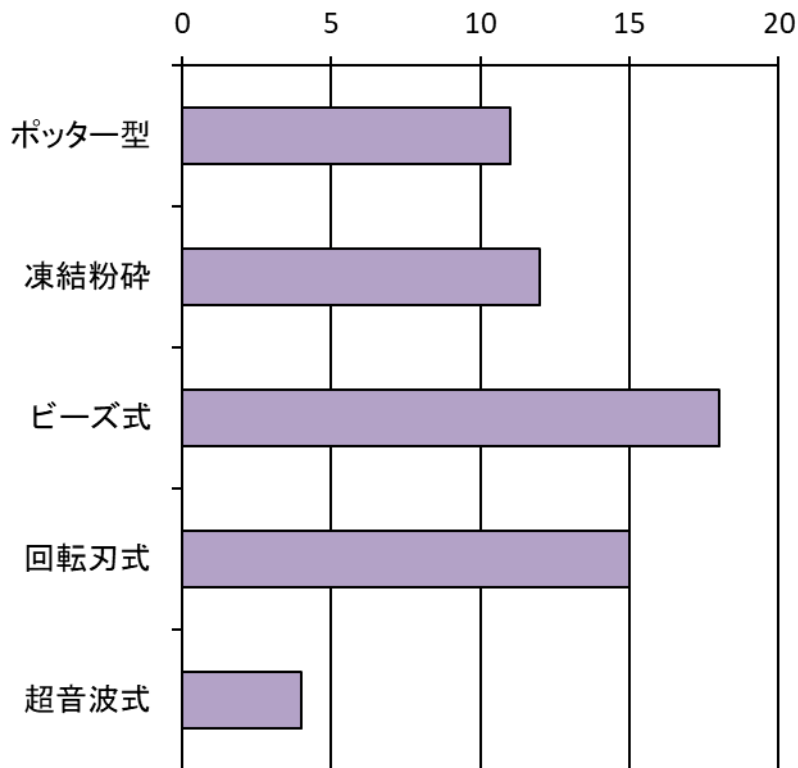
http://bioanalysisforum.jp/



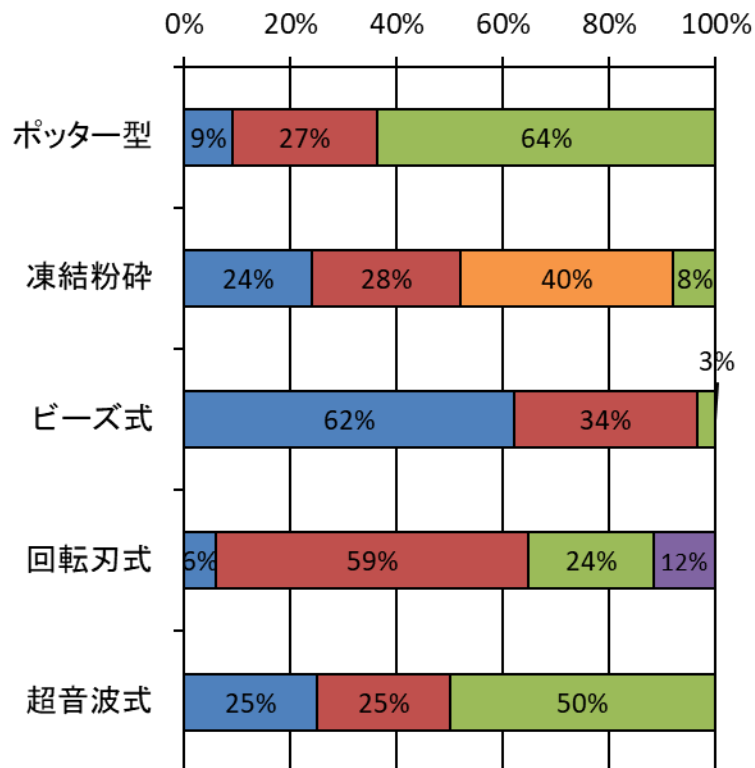
Q23. 使用実績のある装置に関する使用しているメリット

回答施設数(N) = 22

使用実績



メリット内訳



《その他コメント(回転刃式)》

✓. 組織塊の大きな検体を処理できる。

- 多検体を効率よくホモジナイズできる
- 破碎しやすい、均一にホモジナイズしやすい
- 凍結したまま粉碎するため
- 所有している装置が限られており、特に理由はない
- その他(コメント欄に具体的に記載)

http://bioanalysisforum.jp/

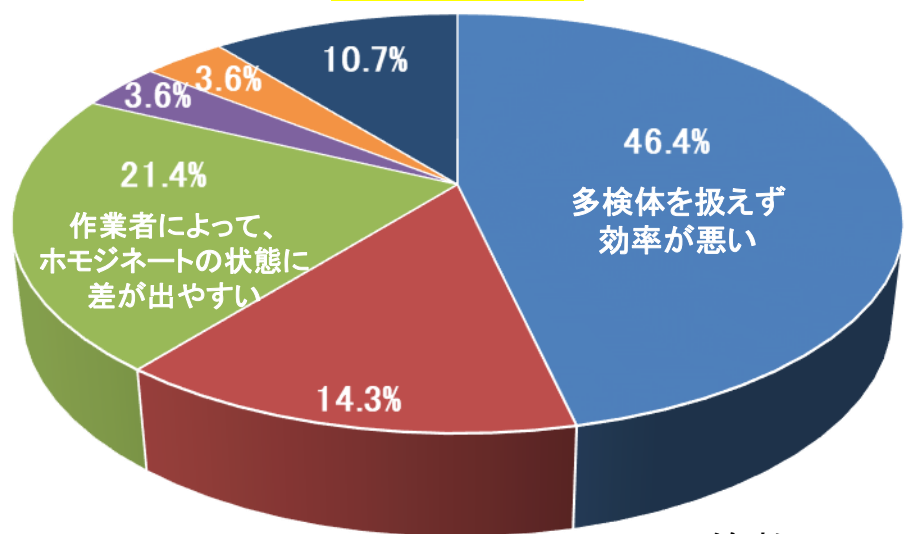


Q24. それぞれの装置のデメリット

回答施設数(N) = 22

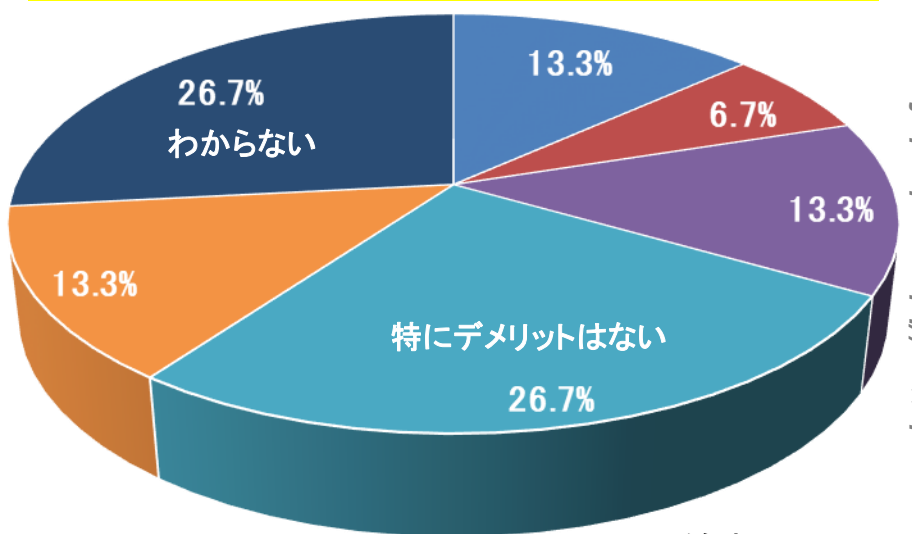
- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| ■ : 多検体を扱えず効率が悪い | ■ : 破碎しにくい、均一にホモジナイズしにくい |
| ■ : 作業者によって、ホモジネートの状態に差が出やすい | ■ : 実施するホモジナイズ条件が限定されてしまう |
| ■ : 特にデメリットはない | ■ : その他 |
| | ■ : わからない |

ポッター型



回答数(N) = 28

凍結破碎(マルチビーズショッカーなど)



回答数(N) = 15

《その他コメント》

- ✓ 吸着
- ✓ コンタミ

《その他コメント》

- ✓ 吸着
- ✓ コンタミ
- ✓ 容器破損
- ✓ 凍結の手間
- ✓ 組織の溶解
- ✓ 組織重量の調整

http://bioanalysisforum.jp/

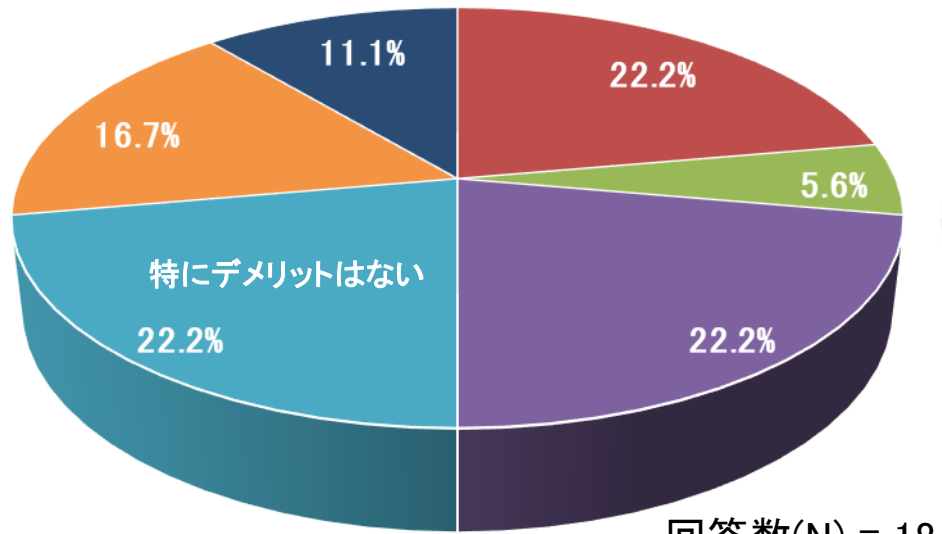


Q24. それぞれの装置のデメリット

回答施設数(N) = 22

■ : 多検体を扱えず効率が悪い	■ : 破碎しにくい、均一にホモジナイズしにくい
■ : 作業者によって、ホモジネートの状態に差が出やすい	■ : 実施するホモジナイズ条件が限定されてしまう
■ : 特にデメリットはない	■ : その他
	■ : わからない

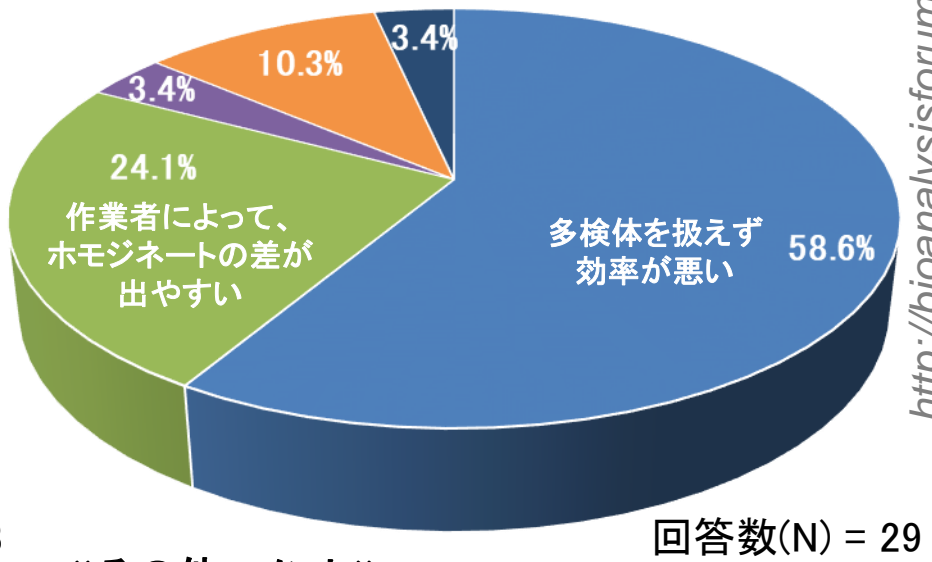
ビーズ式 (シェイクマスターなど)



《その他コメント》

- ✓ 使用するチューブの容積が比較的小さいため、大きな塊の組織を扱えない(組織体積の制限)
- ✓ 吸着
- ✓ コンタミ
- ✓ 温度制御が掛けられない
- ✓ 回転数が低い

回転刃式 (ポリトロンなど)



《その他コメント》

- ✓ 1本ずつ手作業でホモジナイズ作業を進めるため作業効率が悪い
- ✓ 破碎が十分でない場合がある
- ✓ サンプル容量による
- ✓ 処理中に温度が上がりやすい
- ✓ 洗浄が面倒

http://bioanalysisforum.jp/

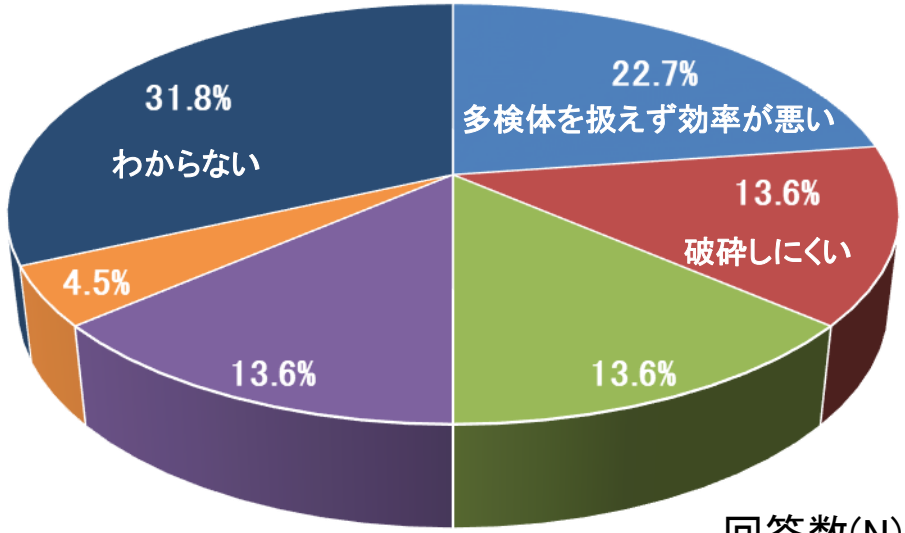


Q24. それぞれの装置のデメリット

回答施設数(N) = 22

- : 多検体を扱えず効率が悪い
- : 作業者によって、ホモジネートの状態に差が出やすい
- : 特にデメリットはない
- : 破碎しにくい、均一にホモジナイズしにくい
- : 実施するホモジナイズ条件が限定されてしまう
- : その他
- : わからない

超音波式



回答数(N) = 22

《その他コメント》
 ✓ 細胞レベルに限定される

http://bioanalysisforum.jp/

ホモジナイズ装置のメリット・デメリット

ホモジナイザー	メリット	デメリット	その他
ポッター型		<ul style="list-style-type: none"> ✓ 多検体を扱えず効率が悪い ✓ 作業者による手技の差が出やすい 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 所持している企業が多い
凍結破砕	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 凍結したまま粉砕できる ✓ 凍結することにより、組織が破砕されやすく、均一にホモジナイズできる 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 凍結の手間 	
ビーズ式	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 多検体を効率よくホモジナイズできる 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ チューブサイズにより扱える組織や組織量が限定される ✓ 組織により破砕しにくいものも存在する 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 使用実績が最も多い
回転刃式	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 破砕しやすい 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 多検体を扱えず効率が悪い ✓ 作業者による手技の差が出やすい 	
超音波式		<ul style="list-style-type: none"> ✓ 破砕しにくい 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 使用実績が最も少ない

効率を重視する場合は『ビーズ式』

Q25. これまでにホモジネート調製が難しく感じた組織

回答施設数(N) = 21

組織名称	難しく感じた人数	難しく感じた人数 /有効回答数(%)	ホモジ経験ありの人数 (Q22参照)	難しく感じた人数/ホモジ経験ありの人数(%)
1. 網膜	1	2.8	7	14.3
2. 結膜	0	0.0	4	0.0
3. 水晶体	2	5.6	5	40.0
4. 脈絡膜	0	0.0	4	0.0
5. 硝子体	0	0.0	3	0.0
6. 皮膚	9	25.0 	15	60.0 
7. 肝臓	0	0.0	20	0.0
8. 腎臓	0	0.0	19	0.0
9. 脾臓	0	0.0	13	0.0
10. 筋肉	5	13.9 	15	33.3
11. 脳	1	2.8	20	5.0
12. 脊髄	1	2.8	9	11.1
13. 心臓	4	11.1 	11	36.3
14. 線維化/線維質の組織	4	11.1 	4	100 
15. 腫瘍	3	8.3	9	33.3
16. 精巣	0	0.0	5	0.0
17. 子宮	0	0.0	1	0.0
18. 小腸	3	8.3	11	27.3
19. 大腸	3	8.3	7	42.9 

20. その他

- ✓ 脂肪組織
- ✓ 肺
- ✓ 骨髄
- ✓ 眼球強膜

有効回答数(N) = 36

Q26. ホモジネート調製が難しく感じた理由

(自由記載)

回答施設数(N) = 17

Q25(難しく感じた組織)で選択した組織	理由
皮膚	線維質が多く、ホモジネートしにくいと感じた
皮膚、線維化した組織/線維質の組織	組織が小さい、あるいは線維化しているため破碎しにくい
皮膚、線維化した組織/線維質の組織、筋肉	均一にホモジシにくい
皮膚、筋肉	弾性があるため破碎されにくい(皮膚)、線維質が残りやすい(筋肉)
皮膚、筋肉、脂肪	線維質が残り、破碎が十分か、均一になっているか、気になる場合がある
皮膚、筋肉、心臓	不均一になる
皮膚、腫瘍、小腸、大腸	線維質のものは破碎しにくい。弾力がある組織はビーズでは破碎が困難
皮膚、水晶体、心臓	組織が硬質であるため破碎が十分にできない場合がある
皮膚、脊髄	堅い、線維質
線維化した組織/線維質の組織、腫瘍、小腸、大腸	大きな組織片が残り、破碎しきれなかった。腫瘍は株によって性状が異なるため、同一プロトコルで操作できない
線維化した組織/線維質の組織、腫瘍、心臓	硬いもの(腫瘍、線維化した組織)について、マルチビーズショッカーでは最初に砕けないと磨り潰すことも出来ない。ちぎれにくいもの(心臓)については、ポッター式ではつぶれてもすり潰すまでいかない
筋肉、水晶体	弾力があるため
筋肉、心臓	均一にホモジネートできない
肺	線維質が多い
骨髄	油分が多い、骨化している部分が固い
小腸、大腸	筋層が含まれる腸管組織は丁寧なミンスを実施する必要性を感じているため
眼球強膜	組織が固くなかなか砕けない

Q27. 組織の状態に応じた推奨するホモジナイズ法

例：線維が多い組織はミンスしてからホモジナイズを行った方が良い (自由記載)

回答施設数(N) = 14

《ミンスしたほうが良い》(13件)

- ✓. 組織によっては、ミンスしてからホモジナイズしたほうが良いと考えている
- ✓. 組織、線維が多い組織はあらかじめミンスする
- ✓. 筋肉などはハサミで事前に細かくする
- ✓. 硬い組織はミンスしてからホモジナイズする

《凍結粉碎したほうが良い》(3件)

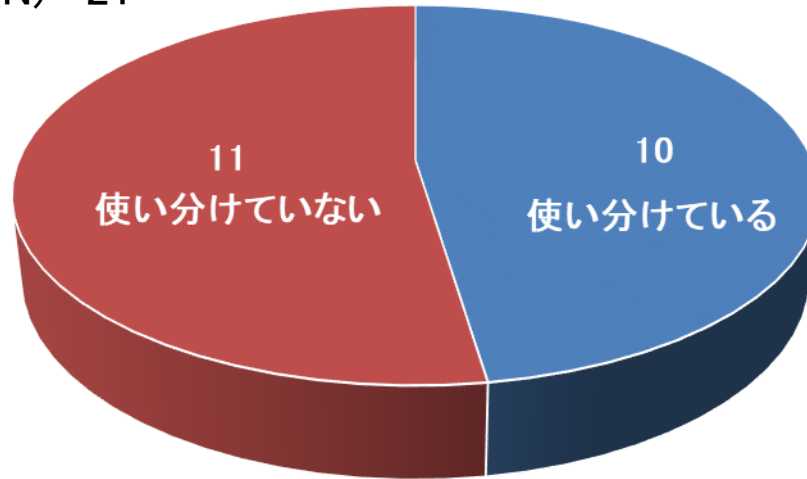
- ✓. ミンス、もしくは凍結粉碎後にホモジナイズする
- ✓. 線維が多い組織はビーズショッカーによる凍結破碎をしている
- ✓. ビーズで破碎できないときは凍結破碎する

【結果まとめ】

- | | | |
|---|------------|--------|
| ✓ | ミンスをする/すべき | 13/14名 |
| ✓ | 凍結破碎する | 3/14名 |

Q28/29. 組織による装置の使い分けおよび使い分けが必要となる特徴

回答施設数(N) = 21



Q29. 使い分けが必要となる特徴

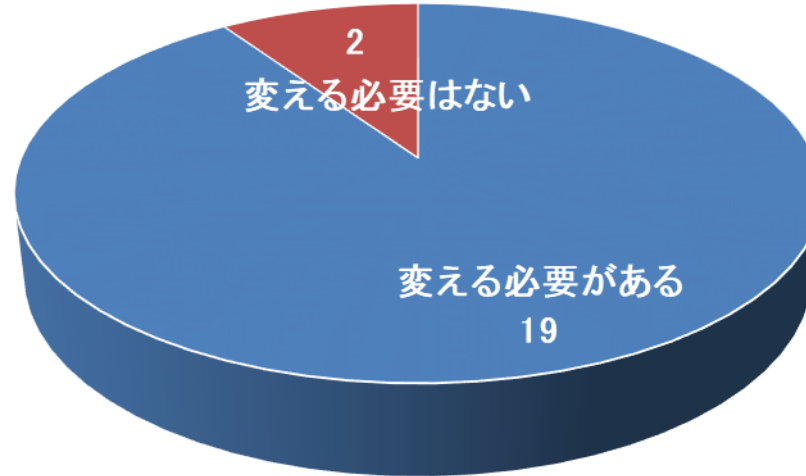
✓ 大きさ	2名
✓ 線維質か否か	2名
✓ 硬さ	2名
✓ 弾力性	1名
✓ 伸縮性	1名

《使い分けている(具体例)》

- ✓ 硬い組織はシェイクマスターよりもさらに破砕力の強いビーズショッカーを用いている
- ✓ 通常、ビーズ破砕機を使用している。サンプル塊が大きく、ビーズ破砕用チューブに入らない場合、ポリトロンを選択する
- ✓ 筋肉系で特に均一にホモジシにくいもののみ、凍結粉碎や超音波式を使用する
- ✓ 装置に適した組織量や硬さ/弾力性に応じて使い分けている
- ✓ 硬い組織は凍結粉碎等を実施している
- ✓ スループットの高い装置から検討し、調製が難しい場合は違う装置を使用するため、結果的に組織によって使い分けている
- ✓ 粉碎しづらい組織は回転式を使用している
- ✓ 網膜ではポッター型、肝臓・腎臓・腫瘍ではマルチビーズショッカーを使用している
- ✓ 組織に適したホモジナイズ方法を選択し、組織重量なども考慮している
- ✓ 線維が多い組織はビーズショッカーによる凍結破砕をしている

Q30/31. 組織によるホモジネート調製法を変える必要性 およびその理由

回答施設数(N) = 21



《変える必要がある》

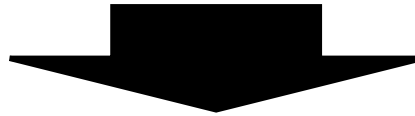
- ✓. 硬い組織や皮膚のように弾性のあるものは、適宜破碎力の強い装置や条件に変更する。凍結してから破碎するなど工夫が必要
- ✓. ケースバイケースで、安定性が悪いものや吸着があるものは溶媒は変えるべき
- ✓. 組織ごとに最適な調製法は異なると感じる場合があるため。処理効率も考慮して選定する必要があるため
- ✓. 均一にホモジネートできないため
- ✓. 組織の硬度や組成が異なるため
- ✓. 目視レベルで不均一である場合は、ホモジナイザーや調製条件を検討する必要があると考えるため
- ✓. 物理的にホモジネートできない検体があるため
- ✓. 組織の形状や形態、サイズによって変えるのが理想だとは思う
- ✓. 対象組織の性質(硬さ等)により適した装置を選択する必要があると考える
- ✓. 破碎されやすさや見た目の均一性が大きく異なるため。均一であればよいかどうかは不明である

《変える必要はない》

- ✓. 基本、ビーズ破碎機で全ての組織のホモジネートが可と考えている
- ✓. 凍結粉碎法で統一して問題はないと感じている

組織によるホモジナイズ法の使い分け

- 組織によってホモジネート調製法は**変える必要がある**
- ビーズ式は多くの組織で汎用的に用いられるが、組織の硬さや量によっては方法を変える必要がある



ビーズ式によるホモジナイズが困難な場合…

【組織に応じたホモジナイズ法の提案】

- ①線維質(筋肉、肺など): ミンス後に凍結破砕を用いる
- ②弾力性(心臓、皮膚、筋肉など): 回転刃や凍結破砕を用いる

Q32/33. ホモジナイズ不足時の対応（優先順位）

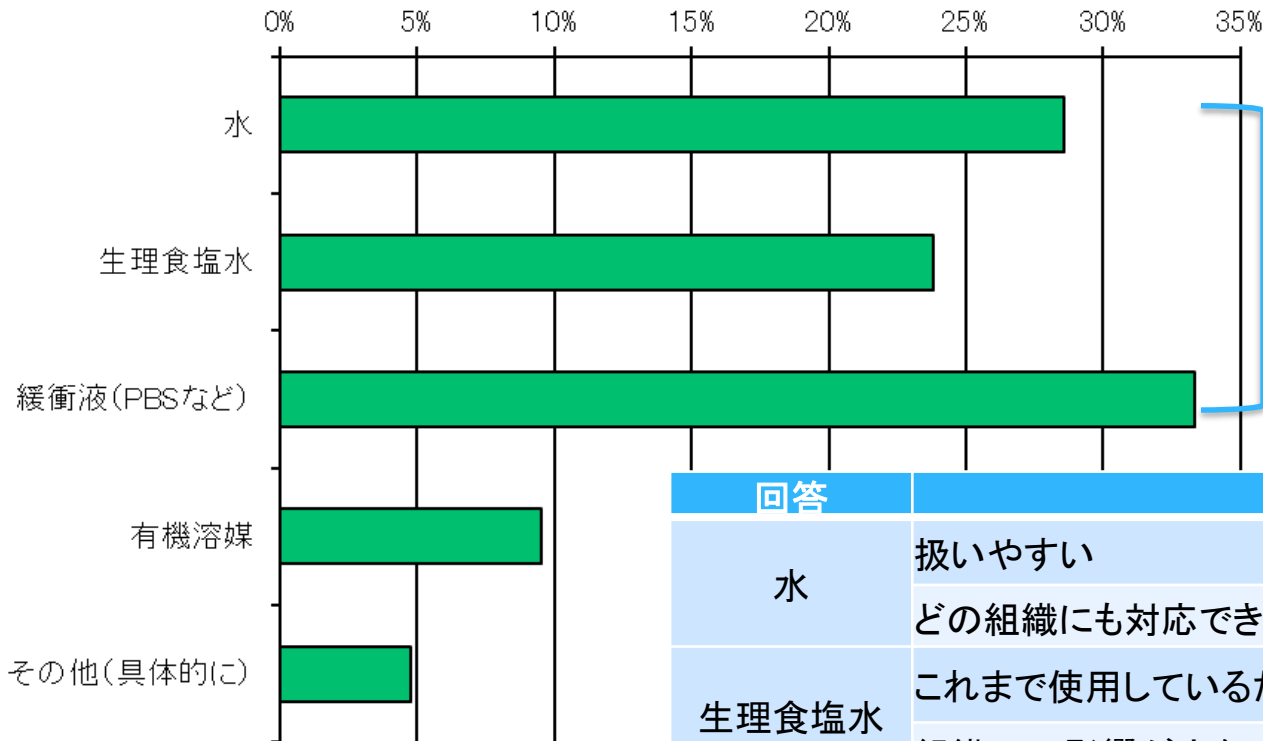
	優先順位							実施しない
	1	2	3	4	5	6	7	
同じ条件で時間を延長する	88%	0%	12%	0%	0%	0%	0%	0%
条件を強くする	13%	63%	13%	6%	0%	0%	0%	6%
溶媒量を増やす	0%	6%	18%	6%	0%	0%	0%	71%
組織を凍結させる(凍結粉碎法に変える)	5%	25%	10%	20%	0%	0%	0%	40%
組織を溶解させる(溶解法に変える)	5%	5%	11%	5%	21%	0%	0%	53%
別の破碎方法で検討(破碎原理を変更)	5%	11%	21%	26%	11%	5%	0%	21%
その他	0%	7%	0%	0%	0%	0%	7%	87%

回答	内容
その他	溶媒の種類を変える。ビーズの比重を大きいものに変える 組織サイズに合わせて容器を変更する

第一選択: 同じ条件で時間を延長する
 第二選択: 条件(回転数など)を強くする
 第三選択: 破碎法の変更(凍結粉碎法など)

回答施設数(N) = 22

Q34. 組織ホモジネートの調製時に第一選択として使用する溶媒とその理由

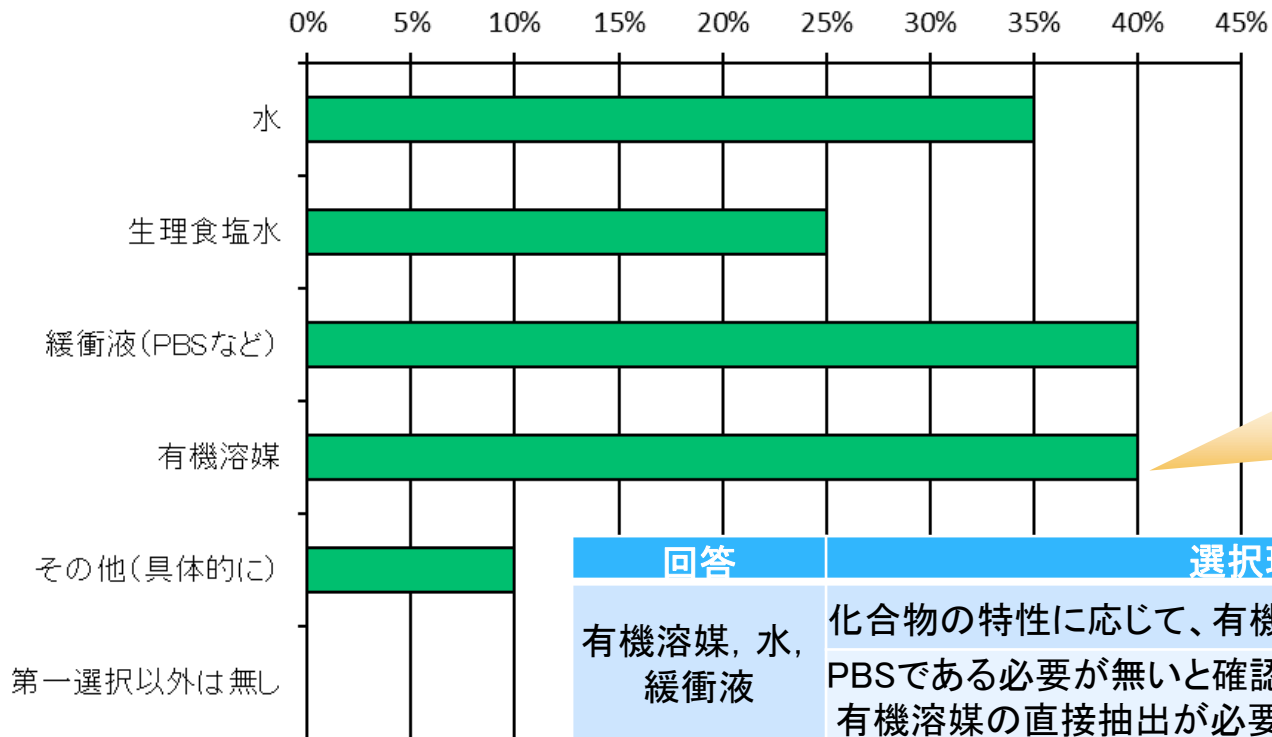


水/水溶液(生理食塩水、緩衝液)がホモジネート調製時の溶媒の第一選択

回答施設数(N) = 21

回答	選択理由
水	扱いやすい どの組織にも対応できる
生理食塩水	これまで使用しているため。特に理由はない(計2件) 組織への影響が少ないと考えるため
緩衝液 (PBSなど)	生体試料に対して等張で、緩衝作用でpHを一定にできる 生体条件に近いと考えるため
有機溶媒	除タンパクを兼ねる
その他	水/緩衝液と有機溶媒の混液。但し有機溶媒比が高いと組織が固くなり破碎困難となるため注意が必要

Q35. 前問の「第一選択」以外で組織ホモジネートの調製時に使用する溶媒とその理由（複数選択）



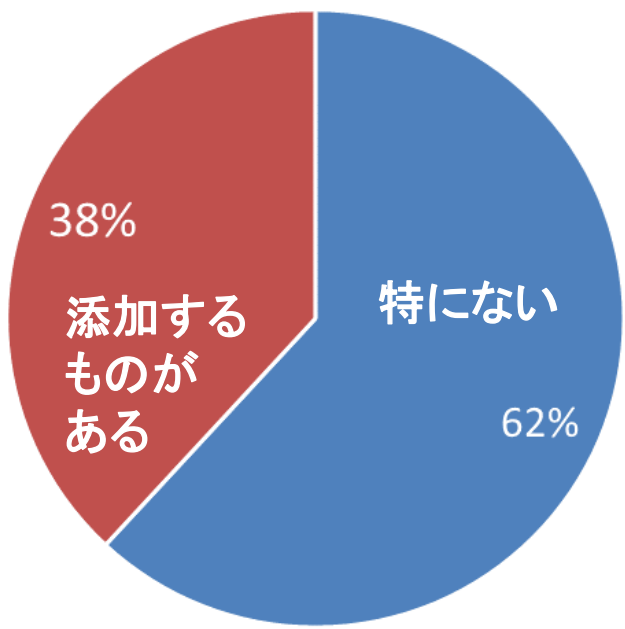
回答施設数(N) = 20

有機溶媒は第一選択とはなりにくいが、広く用いられている

回答	選択理由/詳細
有機溶媒, 水, 緩衝液	化合物の特性に応じて、有機溶媒比率を変更して使用 PBSである必要が無いと確認できたときに水か生理食塩水、 有機溶媒の直接抽出が必要と判明した時に有機溶媒
有機溶媒	25-50%有機溶媒入りの溶媒
有機溶媒, 緩衝液	化合物の溶解性を考慮する場合、適したpHの緩衝液や有機溶媒を使用
水, 緩衝液	明確に理由をもって使い分けてはいない
その他	Analyteの溶解度、安定性、吸着の影響などを考慮する



Q36/37. 使用する溶媒に何か添加するものがあるか



■ 特にない 回答施設数(N) =21

■ 添加するものがある(最も使うものを具体的に記載)

pH調整、吸着防止、酵素阻害、均質化に必要なもの(タンパク質溶解剤)を添加する場合がある。

「最も良く使用する添加物」を使用する理由

最も良く使用する添加物	使用する理由
pHを調整するための添加物 化合物の安定性に合わせ酸 などを添加(2)	安定性向上(3)
プロテアーゼインヒビター (カクテル)(2)	酵素阻害剤(2)
Proteinase Kなどの タンパク溶解剤、酸など	均一性向上
有機溶媒	吸着防止剤
ケースバイケース。酸やアル カリ、過塩素酸など	化合物の特性に応じて、必要 なものを各種添加

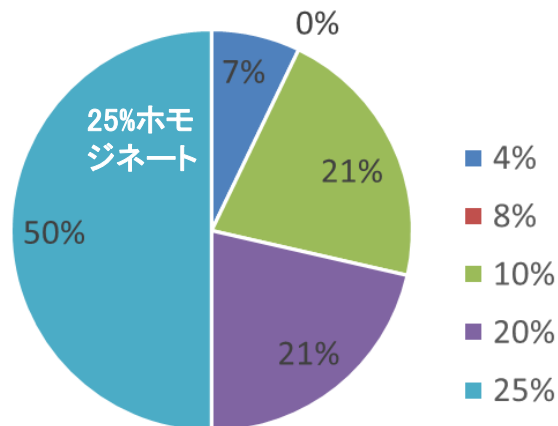
http://bioanalysisforum.jp/

(Q38~41で最頻使用以外の添加物を質問したが有効回答無し)

Q42. ホモジネート調製時の希釈倍率ほどの程度か？

Q43. 使用している単位は何か？

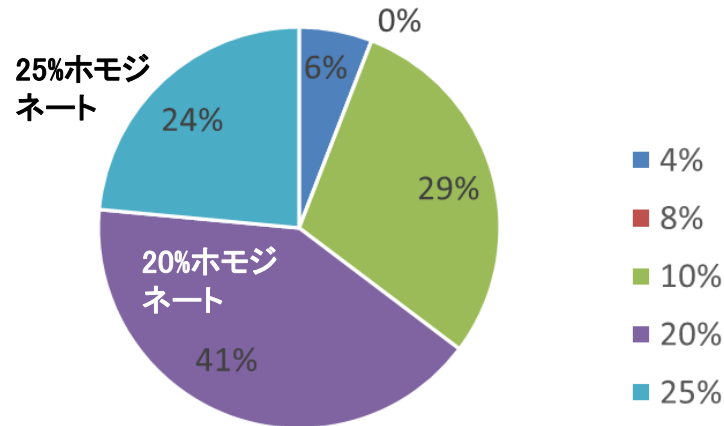
最低でも□%(組織重量/全体量)ホモジネートとする



回答施設数(N) = 14

20%ホモジネート

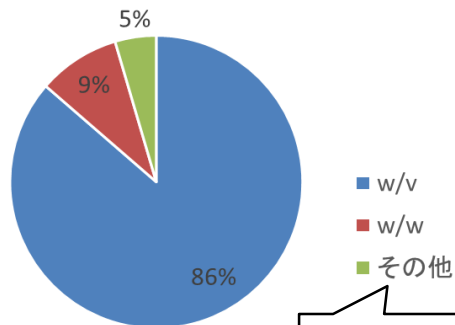
通常□%(組織重量/全体量)ホモジネートとする



回答施設数(N) = 18

※「最低でも」の最頻値が「通常」より高濃度側ですが、有効回答の違いによるものです。両者に顕著な差異はありませんでした。

ホモジネート調製濃度の基準がw/vかw/wか？



特に決めていない。
両方使っている。

回答施設数(N) = 22

Q42でその他(当てはまらない)を選択した人のコメント

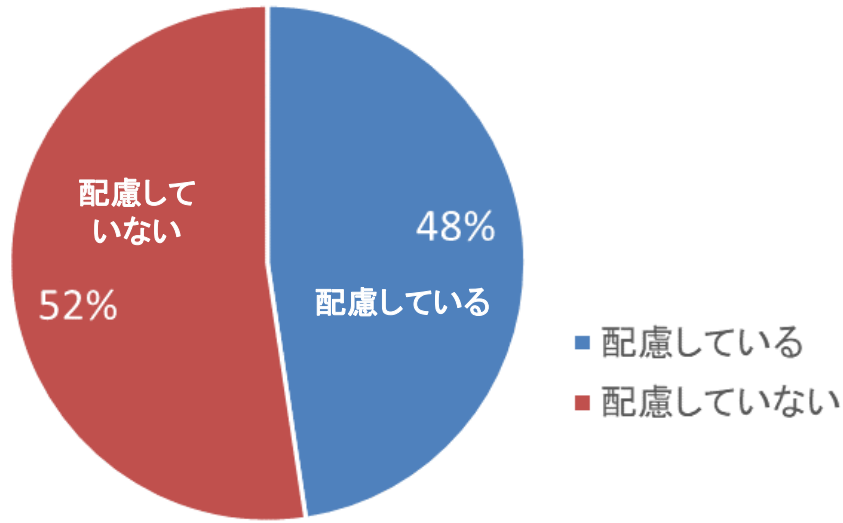
3~5倍程度が多い。高濃度と予想される場合は10~20倍もある。

粘性や懸濁時の密度を下げることで取り扱い易くなり、混和しやすく、試料分取時の均一性を維持しやすいと考える。
濃度測定のLLOQも考慮して、薄めすぎない程度で。さらに、計算しやすい。

5%が多いが、濃度による。

なるべく均一になるように組織ごとに変えている。

Q44/45. 調製中の吸着防止に配慮しているか？（破碎容器・ビーズ、ハンドリング用チューブ選択、その他の吸着防止法）



回答施設数(N) = 22

コメント

試薬	有機溶媒を添加する(2件)
器材	可能な限り低吸着素材のチューブを使用(2件)
	化合物の吸着性がわかっている場合には吸着しにくい素材のチューブ等を使用する
	ガラスとPPから吸着しない材質を選択する
	ビーズの種類による影響を考慮
	リン酸基を含むときはステンレスビーズを避けている(テフロン表面のビーズ等)
	割れにくい

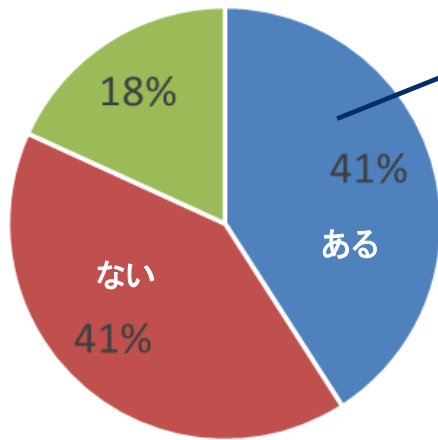
配慮はするが実際は万能なものはない、というコメントもあり

- ・半数の回答者が特別な配慮をしていない
- ・配慮する場合、低吸着素材(実験的検討を伴う)の利用、有機溶媒添加が検討されている

破碎困難時対応、実施方法のバリエーション

- ホモジナイズが不十分と感じた場合の対応
 - 破碎時間の延長および(回転数などの)破碎条件を強くするという選択の優先順位が高い結果が得られた
- ホモジネート調製時に使用する溶媒の選択
 - 生理食塩水, 緩衝液を含む水系溶媒を第一選択するという回答が大半
- 有機溶媒によるホモジネート調製
 - 第一選択にはなりにくいものの、化合物の物性などを考慮したうえで、第二選択以降として使用される
- ホモジネート濃度:
 - 予想される組織内濃度、均一性、サンプリングの操作性を考慮し、20~25%ホモジネートとすることが多い
- 吸着防止
 - 吸着防止対応を実施している回答者が半数程度
 - 有機溶媒の添加や使用するチューブ, ビーズの材質などに配慮しているという回答が得られた
- 添加物
 - ホモジナイズ時に必要に応じて(ケースバイケース)以下のものを添加する場合がある
 - ホモジナイズ時・ホモジネート中の安定性に配慮し、必要な添加物を検討することが重要と考えられる
 - 安定性配慮:pH調整(酸)、酵素阻害(プロテアーゼインヒビターカクテル)
 - 吸着防止:有機溶媒
 - 均質化(タンパク質溶解剤、酸)

Q46/47. 標準的なホモジネート調製方法はあると考えるか？



■ ある ■ ない ■ 回答しない

回答施設数(N) = 22

(あると答えた方に) 標準的なホモジネート調製方法は？

組織重量の5~10倍量の水系溶媒を添加後、ビーズ破砕機でホモジネートする

測定直前に(同一日)に調製し、25%ホモジネートとする

10%w/vホモジネート
ホモジナイザーと溶媒はケースバイケース

ビーズでのホモジネート調製

標準というかファーストチョイスという意味で基準を示せるのではないのでしょうか

調製法の選択には、測定対象物質の物性も考慮する必要性はあるかと思いますが、装置の第一選択や大まかな組織毎の破砕条件などは標準化が可能かと思います。

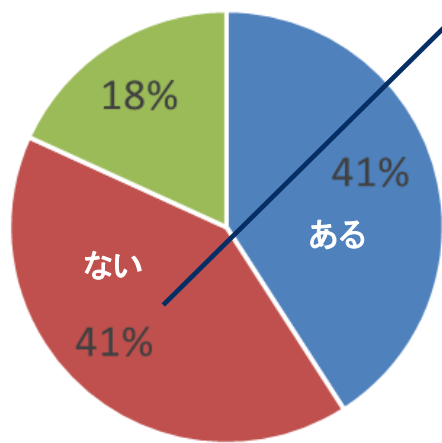
(探索的な段階では)ビーズとシェイクマスターを使用した方法は第一選択としては利用できる気がする

マルチビーズショッカーで粉碎後、25%w/vにPBSで合わせるというあたりで標準化できると感じている

- ・ ある／なしが半々
- ・ 第一選択という意味では想定可能という意見あり
- ・ ビーズ法は標準又は第一選択になりうるという意見複数

Q48. (標準的な方法が無いと考える方) 標準的な方法がないと考える理由は？

標準的なホモジネート調製方法はあると考えるか(Q46)？



■ ある ■ ない ■ 回答しない

回答施設数(N) = 22

(ないと答えた方に)標準的な方法がないと考える理由は？

臓器・組織次第, 目的次第, 研究ステージ次第のところがあり一概に言えない. 多くの人が採用するものを基本的手法として例示することは可能と思う

組織によって異なるのと測定対象物質によっても変わると思うため. 標準的なフローチャートみたいなものは作れる可能性はある.

試験の目的や組織の種類によって異なるため

測定対象に応じて、適切な調製方法があるため

方法は対象組織や化合物によって変わると考えるため

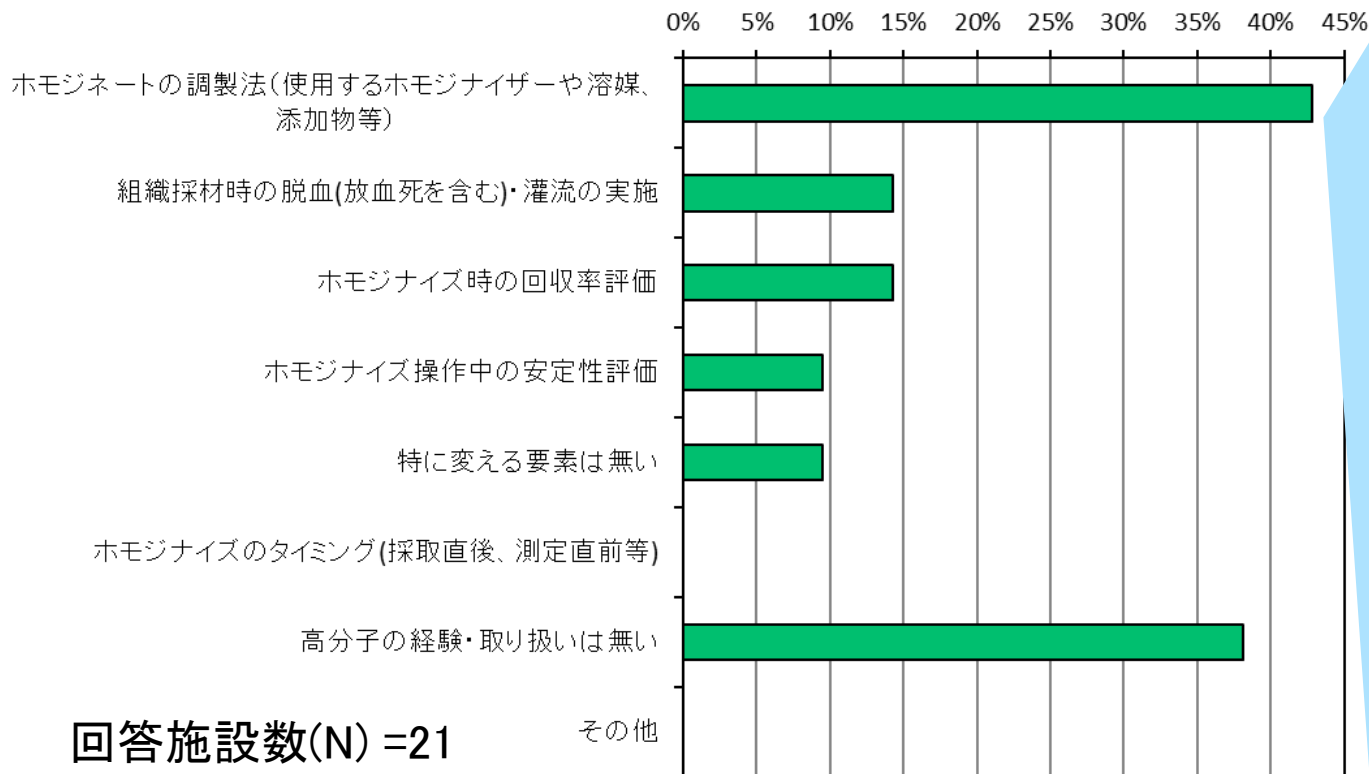
化合物の特性, 組織やサンプル数によって最適な方法が変わるため

組織や化合物によって異なるため

組織や化合物により最適な方法が様々であるため、一般的に考えるポイントとしてなどの材料提供ならよいと思うが、ジェネリックな方法は設定しにくいと考えるから

- ・ 目的、組織、化合物の特性、サンプル数によって変わるという見解が多い
- ・ 考えるポイントとしては良いが、ジェネリックメソッドは設定しにくいという意見あり
- ・ 方法選択フローチャートの作成は可能性ありという意見あり

Q49.低分子と、高分子（核酸医薬品又はタンパク質製剤） で実験上の対応を変えている項目はあるか？



対応を変えている内容

核酸の場合はヌクレアーゼ活性対策としてプロテイナーゼKやグアニジン入りのLysis bufferを用いる。

核酸の場合は安定性に注意する。

吸着や分解が予想される場合、対応策が必要。核酸について、記載例*のような安定化措置が必要で、RNaseフリーの状態にする。ペプチドの場合、必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加する。

細胞外マトリクスと結合性が高いタンパク質をLBAで測定したい場合、添加溶媒の塩濃度を変更して回収率を上げている。

評価対象の安定性に合わせた添加物を添加する。

タンパク質などの高分子を測定する場合にRIPA bufferを使用する。

<http://bioanalysisforum.jp/>

- 分析対象となる核酸やタンパク質の特性に応じて、安定性や吸着に配慮する。

* 記載例: 核酸の場合は、ステンレスのビーズだと吸着してしまうためジルコニアビーズを用いてホモジネートを調製する。また、核酸を分解するヌクレアーゼの活性を阻害するために、グアニジン含有のLysis bufferを用いている。等

低分子と高分子の違い、標準的なホモジネート方法設定可能性

- 標準的なホモジネート調製方法の有無については、ある／なしで同数の回答が得られた。
- 試験の目的、組織の種類やサンプル数、測定対象化合物の物性等を考慮する必要があり、すべてに使用できる標準的なホモジネート調製方法を設定することは難しいと考えられる。ただし、それぞれ考慮すべき点を踏まえて、第一選択は示すことができると考えられる。
- 低分子と高分子の対応の違いは、主に分析対象となる核酸やタンパク質の特性に応じて、安定性や吸着に配慮しているという回答が得られた。

- ホモジネート調製の実態
 - 組織の性質に応じた破碎方法が選択されている。
 - 安定性、吸着に配慮し溶媒は最適化検討がされている。
- 測定法・安定性検証の実態
 - ホモジネート均一性・ホモジネート回収率は確認されていない。
 - 実施される試験の多くが探索試験であることも影響(確認する意義が少ない)
 - 組織内の安定性の評価は困難
 - 化合物の「安定性」に対する考え方の相違からホモジネート調製のタイミング「組織採取直後」と「化合物測定の直前」が定まっていない。信頼性基準の測定法検証は、BMVガイドライン準拠の事例が多い。

- 標準的方法の設定可能性
 - 対象に応じて最適化することが重要で、本来は標準化する性質のものではない。
 - 破碎方法、安定性配慮、吸着配慮など
 - その中で、多くの人を採用するものを基本的手法(又は第一選択)として例示することは可能。
 - 以下の条件は使用率が高く第一選択になりうる。
 - 水/水溶液使用
 - 10~25% w/vホモジネート
 - ビーズでのホモジネート調製
 - 上記条件を第一選択とし、ビーズで破碎困難な場合(硬さ、組織量)、組織に応じたホモジナイズ法に変更するとよいと考える。
 - 線維質(筋肉、肺など): ミンス後に凍結破碎を用いる
 - 弾力性(心臓、皮膚、筋肉など): 回転刃や凍結破碎