

イメージング質量顕微鏡  
ICP質量分析計  
MSイメージングデータ解析ソフトウェア

## 心筋梗塞マウスにおける ガドフルオリンPの相補的バイオイメージング

Rebecca Buchholz<sup>1</sup>, Fabian Lohöfer<sup>2</sup>, Michael Sperling<sup>1,3</sup>, Moritz Wildgruber<sup>4</sup>, Uwe Karst<sup>1</sup>, 奥田 晃士<sup>5</sup>

### ユーザーベネフィット

- ◆ MALDI-MSでの分子イメージングとLA-ICP-MSでの金属イメージングにより、新たな観点からの試料評価が可能です。
- ◆ ICP-MSの定量性を活かし、生体試料内での金属元素の濃度分布を可視化することが可能です。
- ◆ 両手法で取得されたデータはMSイメージングデータ解析ソフトウェアIMAGEREVEAL™ MSを使って解析可能です。

### ■はじめに

磁気共鳴イメージング (MRI) は日常の臨床診療において広く使用されているイメージング技術です。MRI検査画像のコントラストを高めるため、MRIで使用される造影剤には、5個または7個の対電子によって優れた常磁性を有する $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ または $\text{Gd}^{3+}$ が多く用いられています。 $\text{Gd}^{3+}$ は遊離型では毒性があるため、 $\text{Gd}^{3+}$ を用いた造影剤では、 $\text{Gd}^{3+}$ はアミノカルボン酸との複合体として投与されます。多くのガドリニウム造影剤 (GBCA) は全身に分布しますが、標的特異的なGBCAも研究が進められており、その1つがガドフルオリンP (図1) です。ガドフルオリンPは、心筋梗塞 (MI) の場合に分泌されるコラーゲンに富む細胞外マトリックス (ECM) に対して高い親和性を示します。

本稿では、2つのバイオイメージング技術を相補的に組み合わせ、ガドフルオリンPの蓄積を可視化した結果を報告します。また、レーザーアブレーション-誘導結合プラズマ質量分析 (LA-ICP-MS) では、マトリックスマッチングした検量線を作成し、Gdの定量も行いましたので合わせて報告します。

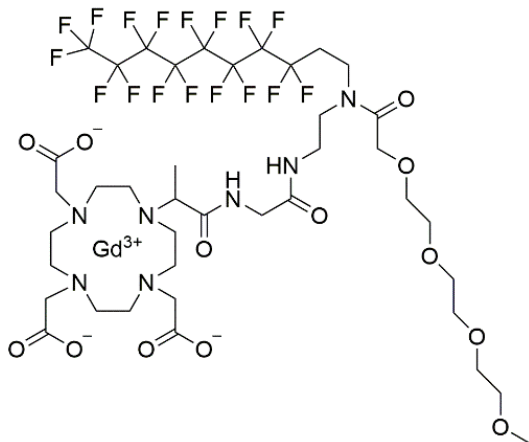


図1: ガドフルオリンPの構造

### ■材料および方法

#### 動物実験

動物実験は臨床放射線医学研究所 (ミュンスター大学病院) のMoritz Wildgruber教授の研究グループで行われました。MI誘発6週間後のマウスに造影剤としてガドフルオリンP溶液を注射し、MRI検査を行いました。このマウスを屠殺し、心臓を摘出し瞬間凍結した後、クリオマイクロームを用いて厚さ10  $\mu\text{m}$ の切片を作成しました。

#### 標準試料作製

LA-ICP-MSでの定量分析のために、ゼラチンをベースとした検量線試料を調製しました。ゼラチン (10% w/w) に対して、0から5000  $\mu\text{g/g}$  の範囲でGdを添加し、9種類の検量線試料を調製後、実試料と同様に厚さ10  $\mu\text{m}$ の切片を作成しました。

#### 試料前処理

MALDI-MSIのために、実試料の切片を酸化インジウムスズでコーティングされたスライドガラス上に載せました。マトリックスとして $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) を、マトリックス蒸着装置iMLayer™を用いてスライドガラス上に20分間蒸着法で塗布した後、500  $\mu\text{L}$ の水と50  $\mu\text{L}$ のメタノールを用いて2.5分間、再結晶化させました。

1. Institute of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Münster  
2. Institute of Radiology, TU Munich  
3. European Virtual Institute for Speciation Analysis (EVISA), Münster  
4. Institute of Clinical Radiology, University Hospital Münster  
5. 株式会社島津製作所グローバルアプリケーション開発センター

## 分析条件

LA-ICP-MSでの分析のために、島津ICP質量分析計ICPMS-2030を213 nmのNd:YAGレーザーを備えたレーザーアブレーションシステムLSX-213 G2+ (Teledyne CETAC Technologies) に接続しました。それぞれの分析条件を表1に示します。ICP-MSはニッケルサンプリングコーンとスキマーコーンを使用しました。<sup>31</sup>P、<sup>57</sup>Fe、<sup>66</sup>Zn、<sup>158</sup>Gd、および<sup>160</sup>Gdをコリジョンモードで測定しました。各元素の積分時間は100 msとしました。検量線作成のため、各検量線試料も実試料と同じ条件で測定しました。MALDI-MSでの分析にはiMScope™ TRIOを用い、*m/z* 700~1200の質量範囲において正イオンモードで分析を行いました。その他の分析条件を表2に示します。

表1: LA-ICP-MS分析条件

レーザーアブレーション	LSX-213 G2+
レーザー径	15 μm
スキャン速度	30 μm/s
繰り返し周波数	20 Hz
セルガス (He) 流量	0.8 L/min
ICP質量分析計	ICPMS-2030
高周波出力	1.2 kW
サンプリング深さ	5.0 mm
プラズマガス (Ar) 流量	9.0 L/min
補助ガス (Ar) 流量	1.10 L/min
キャリアガス (Ar) 流量	0.45 L/min
セルガス (He) 流量	6.0 mL/min
セル電圧	-21 V

表2: MALDI-MS分析条件

MALDI-MS	iMScope TRIO
レーザー径	40 μm
サンプル電圧	3.5 kV
検出器電圧	1.9 kV
積算回数	3 回
レーザー照射数	500ショット
繰り返し周波数	1000 Hz

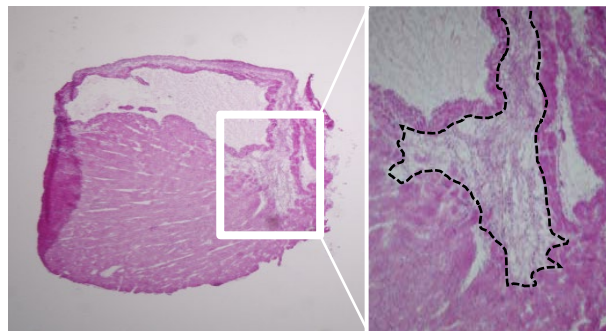


図2:マウスの心臓組織のHE染色結果

## ■ 結果

ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE染色) を実施し検出された切片上のMI領域を、図2において黒い点線で示します。

5000 μg/gまでの濃度範囲で作成した検量線の相関係数は0.997であり、レーザー径15 μmでの検出限界 (LOD) は43 ng/g Gd (<sup>158</sup>Gd)、定量下限 (LOQ) は140 ng/g Gd (Boumans<sup>1)</sup> に基づく計算) でした。図3に、LA-ICP-MSとMALDI-MSによるMSイメージング結果を示します。LA-ICP-MSによるイメージング結果 (図3c) から、健康な心筋においてはGdは濃度が50 μg/g程度で、均一に分布しています。一方、MI領域でのGd濃度は、約110 μg/gと健康な心筋に比べて倍以上であり、370 μg/gと高い値を示す部位もあります。また、心室でも高濃度のGdが分布していますが、これは造影剤の静脈内投与によるものと考えられます。

Gdの分布はMALDI-MSIによっても検証できます。MALDI-MSIでは、ガドフルオリンPの代わりにガドフルオリンPのプロトン化配位子を測定対象としました (図3e)。メインピーク (*m/z* 1168.39) でのMSイメージ (図3d) は、LA-ICP-MSで得られたGdのMSイメージと良好な相関を示し、MI領域と心室領域では高い強度を、健康な心筋では均一で低い強度を示しました。

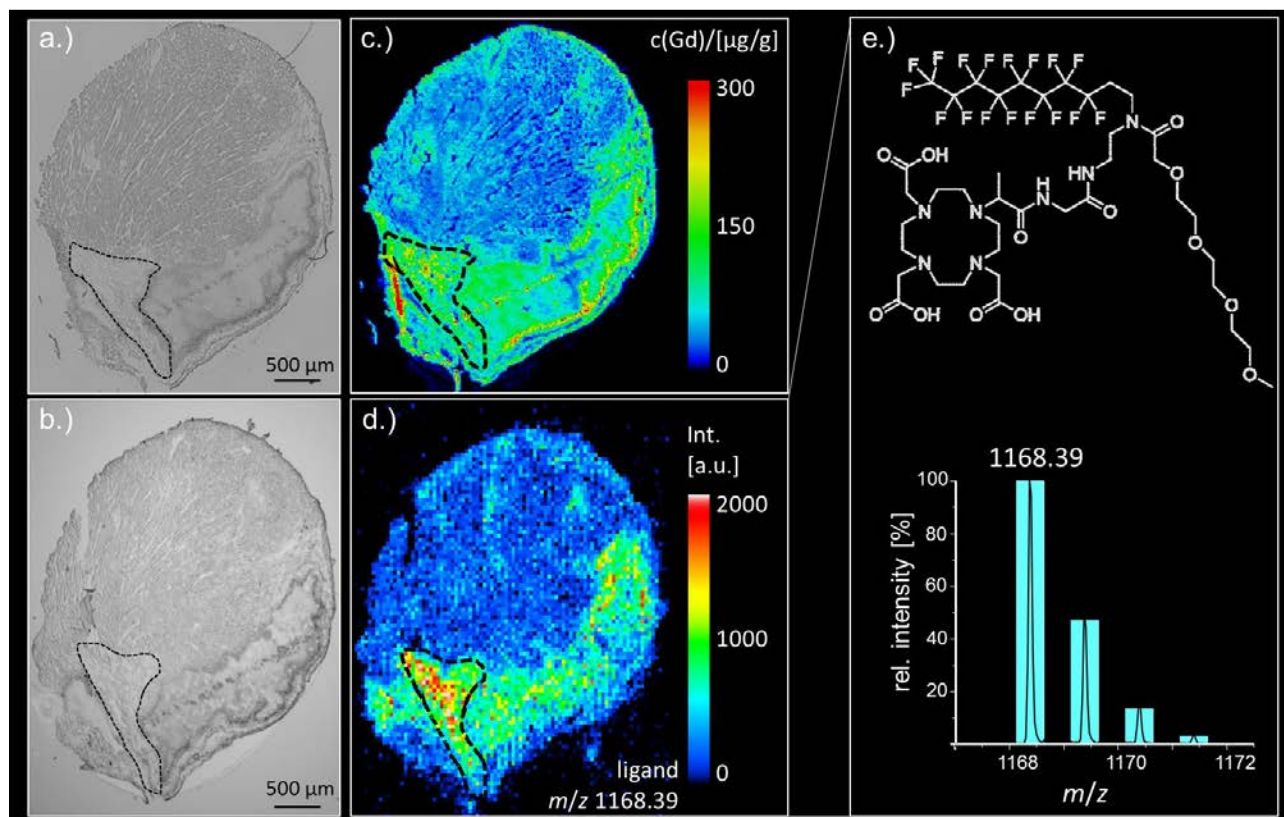


図3: LA-ICP-MSとMALDI-MSによるMSイメージング結果

- a), b.) 連続切片の顕微鏡画像
- c.) LA-ICP-MSで得られたGdのMSイメージ
- d.) MALDI-MSで得られたガドフルオリンPのプロトン化配位子 ( $m/z$ 1168.39) のMSイメージ
- e.) 配位子の構造と理論スペクトル (棒グラフ)、MALDI-MSで測定したスペクトル (黒線)

## ■まとめ

本稿では、LA-ICP-MSによる元素イメージングとMALDI-MSによる分子イメージングを組み合わせることで、心筋梗塞マウスの心臓組織における標的特異的なGdベース造影剤の分布を可視化し、定量することができました。

LA-ICP-MSで得たデータを使用しての定量解析や、LA-ICP-MSとMALDI-MSの両手法で得た分布情報の比較は、MSイメージングデータ解析ソフトウェアIMAGEREVEAL MSで行うことが可能です。

## 参考文献

- 1) P.W.J.M. Boumans, Spectrochimica Acta 1991, 46 B, 641-665.

IMAGEREVEAL、iMLayer、iMScopeは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

05-SCA-116-005-JP 初版発行：2022年 3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。  
本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。  
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。  
最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm>

会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただけますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。  
新規登録は、<https://solutions.shimadzu.co.jp/> よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022