

組織ダイレクト解析： 四塩化炭素誘発肝障害における脂質変動の解析

On-Tissue Direct Analysis: Analysis of Changes on An Amount of Lipids in Murine Hepatopathy Model Induced by An Administration of Carbon Tetrachloride (CCl₄)

近年MALDI法による質量分析を用いて生体組織切片から直接、対象とする生体分子（低分子代謝産物、脂質、ペプチドやタンパク質など）を解析する方法が注目を集めており、疾病部位におけるバイオマーカー探索への応用が期待されています。一般に解析に用いられる組織切片としては凍結切片が使われており、MALDI法を行うためのマトリックス溶液はスポッター（CHIP-1000）などを用いて組織切片上に均一に塗布されます。マトリックスを塗布した後、MALDI-TOF MSによる組織切片上での解析を行い、対象となる生体分子の m/z を検出します。また疾患バイオマーカー探索においては病変部位と正常部位間でのMSピークの変動を比較して、バイオマーカーとしての特徴的なMSピークの探索が行われます。

ここでは、四塩化炭素投与によって誘導された肝障害

モデルのマウス肝臓組織切片を試料として、四塩化炭素投与後の経過時間によるリン脂質の変動をMALDI-TOF MSを用いて直接組織切片上で検出した例を示します。

Fig.1は5週齢ICRマウス（ ）に四塩化炭素（1.0 mL/kg）の腹腔内投与を行い、処置後15分および48時間後に解剖し、それぞれの肝臓のH&E染色を行った結果を示します。Fig.1に示されるように48時間後の肝臓では、中心静脈周辺部に壊死、細胞浸潤が認められます。次にそれぞれの肝臓に対してケミカルプリンタ（CHIP-1000）を用いてマトリックス溶液、5 mg/mL α -cyano-4-hydroxycinnamic acid（60% AcCN, 0.1% TFA）を500 pLずつ25回にわたって300 μ m間隔で分注しました。Fig.2はそれぞれの肝臓と分注したマトリックスを示します。

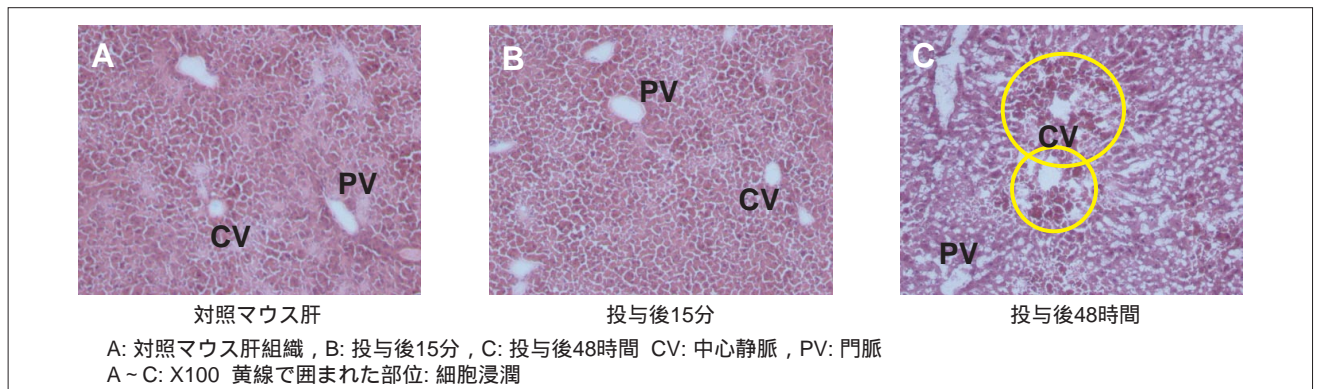


Fig.1 四塩化炭素投与後の組織切片のH&E染色画像
H&E staining of murine liver with hepatic damage induced by an administration of carbon tetrachloride (CCl₄)

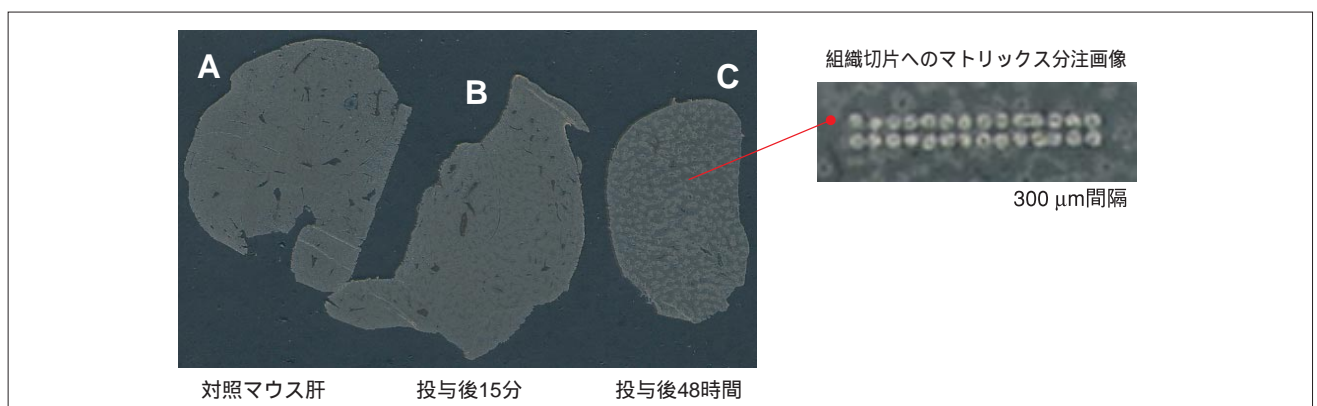


Fig.2 肝臓組織切片へのマトリックス分注
Matrix deposition onto tissue sections of murine liver

Fig.3は四塩化炭素投与後のそれぞれの組織切片上でダイレクトにMALDI-MS分析を行った結果得られた典型的なMSスペクトルを示します。Fig.3の結果より48時間経過後のMSスペクトルにおいて、特徴的な6つのMSピークの増減が確認できました。これら6つのMSピークはその m/z の値とMS/MS解析の結果より、ホスファチジルコリン(PC)のPC 32:0, PC 34:2, PC 34:1のプロトン付加分子およびカリウムイオン付加分子であることが決定されました。

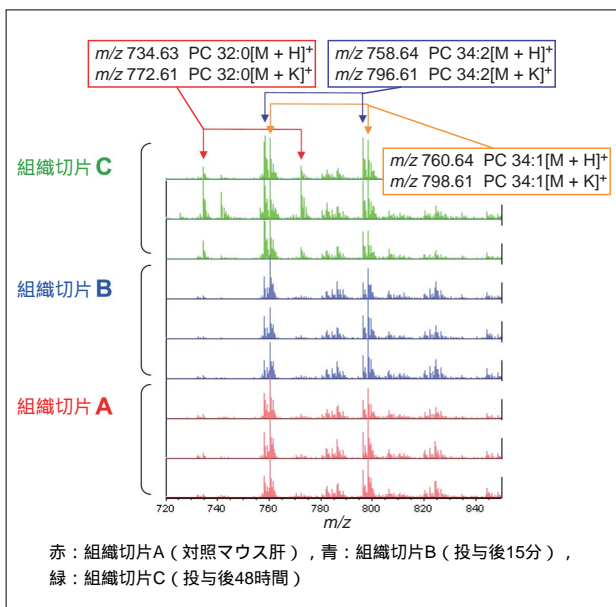


Fig.3 それぞれの組織切片のMSスペクトル
MS spectrum from each tissue

次に増減が確認できた3種類のPCに対してより詳細な解析を行うために、それぞれの組織切片から10点ずつ測定を行い、得られたMSスペクトルを基にしてそれぞれのリン脂質 ($[M + H]^+$) に対する相対比較を行いました。リン脂質の相対値=対象とするMSピーク面積/全てのMSピーク面積積算値として、それぞれの組織切片におけるリン脂質の相対値をプロットしたものがFig.4です。

Fig.4に示すように、PC 32:0 $[M + H]^+$ =734.63は四塩化炭素投与後48時間経過時点で最も高い値を示しました (t検定による $P=0.0051$)。またPC 34:2 $[M + H]^+$ は48時間経過後に上昇することが確認されましたが、二重結合が一つ少ないPC 34:1 $[M + H]^+$ は48時間経過後に大きく減少しました (それぞれt検定による $P=0.036$, $P < 0.0001$)。

またそれぞれのリン脂質のカリウムイオン付加分子も同様の傾向を示すことが確認されました。

一般に四塩化炭素投与マウスの肝障害モデルは、急性期の肝細胞壊死から、やがて肝細胞分裂、肝再生へと経過することが知られています。このように組織切片からダイレクトに質量分析を行うことで、肝再生期に特徴のあるリン脂質の変動を組織切片から直接とらえることができました。

この結果より、ケミカルプリンタとMALDI-TOF MSとを用いた組織MALDI-MS解析法が生体内における代謝産物の変動解析や疾患バイオマーカー探索において、有用であることが示唆されました。

T. Nakanishi T. Yamamoto M. Furuta

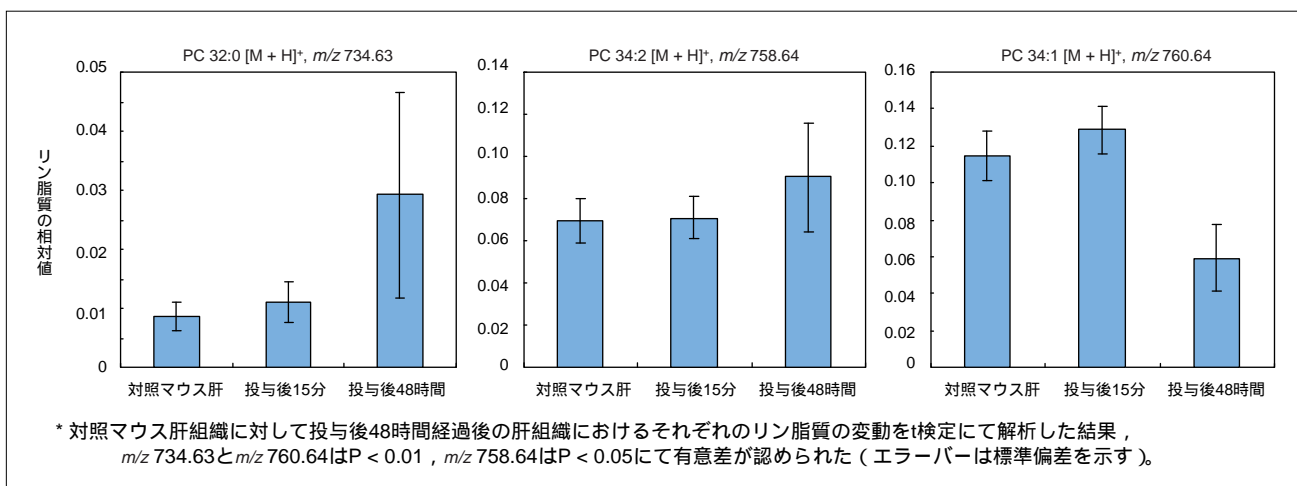


Fig.4 四塩化炭素投与後のリン脂質の変動
Changes of an amount of phospholipids by an administration of carbon tetrachloride (CCl₄)

京都府立医科大学・池川雅哉先生との共同研究

初版発行：2008年10月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

☎ 0120-131691(携帯電話不可)
● 携帯電話専用番号(075)813-1691

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。改訂版は下記の会員制Web Solutions Navigatorで閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>
会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。