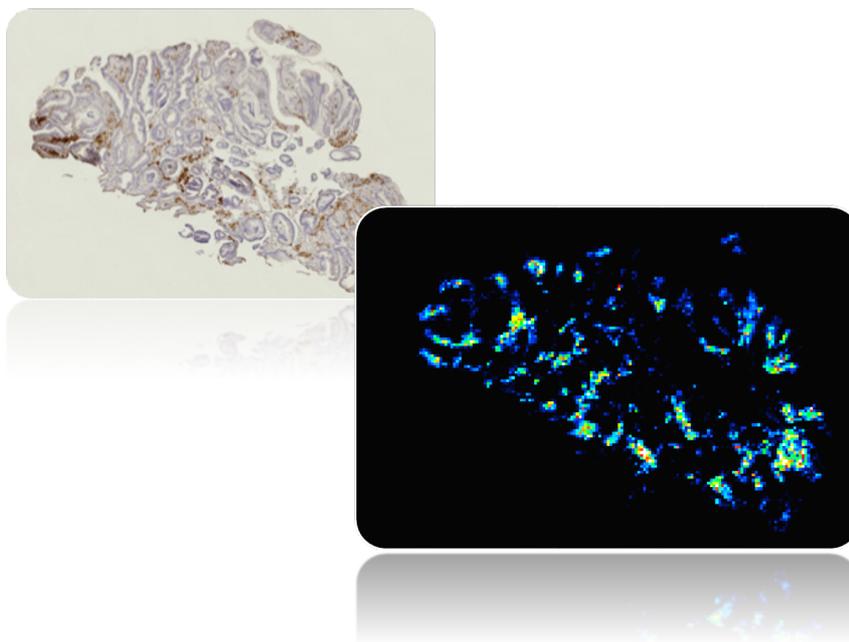


レーザーアブレーション誘導結合プラズマ 質量分析イメージングを用いた 胃組織へのランタン沈着物の可視化

新聞 秀一*1、*2、*3、奥田 晃士*4



■ 要旨

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) を用いた質量分析イメージング (MSイメージング) は、生体中の金属をイメージングする方法として近年さまざまな応用が報告されています。その中でも、金属を含む医薬品の薬物動態解析や毒性評価に多く用いられています。本アプリケーションノートでは、炭酸ランタンを服用し胃炎を発症した検体を用いて、胃組織におけるランタンの分布をLA-ICP-MSで可視化した結果を報告します。

1. はじめに

近年、LA-ICP-MSを用いた金属の質量分析イメージングは、基礎生物学や毒物学などの多くの研究分野で注目されています。LA-ICP-MSによるイメージングの最大の特長は、組織表面に存在する様々な元素を一度に効率よくイオン化できるため、広いダイナミックレンジで高い定量性を提供できることにあります。

そのため、LA-ICP-MSを用いた金属イメージングについては、動物やヒトの組織における内因性金属の分布^{1)~3)}、カドミウムのラット胎児への毒性研究⁴⁾、ジブチルスズのラット胎盤・胎児毒性への影響⁵⁾、水鳥の鉛中毒の研究⁶⁾など、様々な報告がなされています。

このような研究と共に、金属含有医薬品の薬物動態や毒物学的研究もLA-ICP-MSイメージングの重要な応用分野です^{7)~11)}。医薬品の開発では、アルカリ金属、アルカリ土類金属、遷移金属が利用されています。LA-ICP-MSを用いた医薬品のMSイメージングでは、特にDNA合成を阻害する白金を用いた抗がん剤 (シスプラチンなど) に関する報告が多くされています。その中でもプラチナ製剤と腎毒性に関する研究は多く、腎臓組織内の白金の分布が可視化されています。これまでは、主に動物モデルを用いたものが多く報告されており、ヒトの臨床サンプルとLA-ICP-MSを用いた金属の可視化に関する報告はまだ多くありません¹²⁾。

本アプリケーションノートでは、レーザーアブレーションシステムと島津製作所製ICPMS-2030を組み合わせ、ヒト胃生検組織におけるランタン (¹³⁹La) の可視化を行いました。ランタンは、高リン血症の治療薬であるホスレノール (炭酸ランタン水和物) に含まれており、ホスレノールによる消化器への主な副作用として出血性胃炎が報告されています。ここでは¹³⁹Laの可視化を行い、免疫組織化学 (immunohistochemistry : IHC) の観察結果と比較しました。その結果、抗CD68抗体を用いて可視化したマクロファージ陽性領域に、¹³⁹Laが高集積していることが確認されました。

*1 大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻
*2 大阪大学・島津分析イノベーション協働研究所
*3 大阪大学先導的学際研究機構
*4 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

2. 実験と手法

試薬

Anti-CD68抗体、1×Tris Buffered Saline with Tween® 20、SignalStain® Antibody Diluent、SignalStain® Boost IHC Detection Reagents、SignalStain® DAB Substrate KitはCell Signaling Technology社 (Danvers, MA, USA) から購入しました。キシレン、封入剤、Mayer'sヘマトキシリン溶液、1% エオシンY溶液は富士フィルム和光純薬 (大阪、日本) から購入しました。ヤギ血清はメルク (Darmstadt, Germany) から購入しました。

臨床検体

試料は、出血性胃炎の症状があり、岡病院 (埼玉県本庄市) において胃生検で採取されたものです。書面によるインフォームド・コンセントを行い、患者から包括同意を得た上で、得られた検査検体を本研究に利用しました。サンプルは匿名化されており、採取された組織ホルマリン固定後、パラフィン包埋組織 (FFPEブロック) として保存しました。

切片作成

FFPEブロックは、ロータリーマイクローム (RM2145、Leica, Wetzlar, Germany) を用いて8µmの厚みで切片化し、40℃のウォーターバスで通常のスライドガラス (松浪ガラス、大阪、日本) に回収しました。回収後、スライドガラスはホットプレート (サクラファインテックジャパン、東京、日本) 上に静置し、37℃で一晩乾燥と固定を行いました。また、本研究では、連続切片を作成し、IHC染色、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE染色) およびLA-ICP-MSによるMSイメージングにそれぞれ使用しました。

脱パラフィン処理

脱パラフィンは、キシレンでの3回の洗浄 (25℃、5分) で行いました。LA-ICP-MS分析のためのサンプルは、キシレンでの洗浄のみ実施し乾燥させました。IHCまたはHE染色用のサンプルは、さらに100%エタノール (10分、2回)、95%エタノール (10分、2回)、水 (5分、2回) で洗浄しました。洗浄後、各染色を行いました。

定量用試料の作成

定量分析を行うにあたり、検量線の作成はLohöferらの方法に従いました¹³⁾。ランタン標準品 (塩化ランタン七水和物、99.9%、126-03352、富士フィルム和光純薬株式会社) をゼラチン (077-03155、富士フィルム和光純薬株式会社) で、終濃度90、450、900および3600µg/gになるように調製しました。ランタンを含むゼラチン溶液は、クリオモルド2号 (サクラファインテックジャパン、東京、日本) に注ぎ、-80℃で凍結させました。凍結後、得られた凍結ブロックをクライオマイクローム (CM1950S、Leica, Wetzlar, Germany) で8µmの厚みで切片を作成し、図2(a)下に示す通りスライドガラスの上に乗せました。

LA-ICP-MSイメージング実験と解析

本研究では、図1(a)に示すようにICP-MSとして島津製作所製ICPMS-2030を用い、レーザーアブレーションシステムとしてTeledyne CETAC Technologies製LSX-213 G2+を用いました。図1(b)に示すシステム概略図の通り、レーザーアブレーションシステムによって分解された試料は、ICPに直接導入され、質量分析計で測定されます。ICP-MSとレーザーアブレーションの条件を表1に示します。データの表示および定量解析は、島津製作所製MSイメージングデータ解析ソフトウェアIMAGEREVEAL™ MSを用いました。

1(a)

ICP-MS
(ICPMS-2030)



Laser ablation system
(LSX-213 G2+)



1(b)

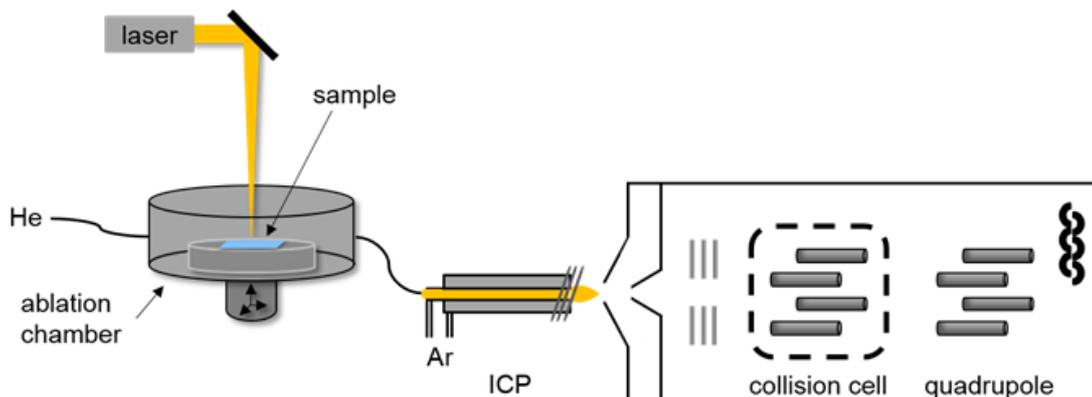


図1 本実験で用いた装置とシステム概要
(a) ICPMS-2030とレーザーアブレーションシステムLSX-213 G2+
(b) システム概要図

表1 ICPMS-2030およびLSX-213 G2+の実験条件

ICP-MS (ICPMS-2030)	
RF power (kW)	: 1.2
Sampling Depth (mm)	: 5.0
Plasma Gas (L/min)	: 9.0
Auxiliary Gas (L/min)	: 0.70
Carrier Gas (L/min)	: 0.40
Chamber Temperature (°C)	: 5
Peristaltic Pump Rotation Speed (r.p.m.)	: 20
Laser (LSX-213 G2+, Teledyne CETAC Technologies)	
Repetition frequency (Hz)	: 20
Spot size (μm)	: 15
Scan speed (μm/s)	: 15
He carrier gas (L/min)	: 0.8

3. 結果

ランタン分布とCD68を用いたIHC染色像の比較

図2(a)に連続切片を用いた抗CD68抗体によるIHCの観察結果を、図2(b)にMSイメージングで得られたランタンの分布を示します。CD68陽性箇所（茶色で示される領域）は組織全体に分布するのではなく、局在していることがわかります。

一方、ランタンは組織全体に顆粒状に分布することがわかります。両者を比較するとランタンの蓄積部位とCD68陽性部位は一致します。すなわち、ランタンの蓄積部位では炎症が惹起され、胃炎とランタンの蓄積に関連があると考えられます。

またLA-ICP-MSでは様々な元素を一度に測定することが可能であり、本実験では図2(c)に示す通り、リンの分布も同時に可視化しました。図2(d)には、得られたランタンの分布とリンの分布を重ね合わせた結果を示します。この結果からランタンが局在している部位でリンが局在していることが明確になりました（白色部分は共局在部位）。

高リン血症の治療薬であるホスレノール(炭酸ランタン水和物)は、腸管内において食事由来のリンと結合し、リン酸ランタンとなり体外へ排泄されます。

(<https://pharma-navi.bayer.jp/fosrenol/product/moa>)

炭酸ランタンは、pHに依存することなく高いリン除去率を示すことも知られ、胃内においてもリンと結合しリン酸ランタンになると考えられます。

以上より、胃炎が起きている部位では炭酸ランタンが蓄積しているのではなく、リン酸ランタンとして蓄積していると言えます。

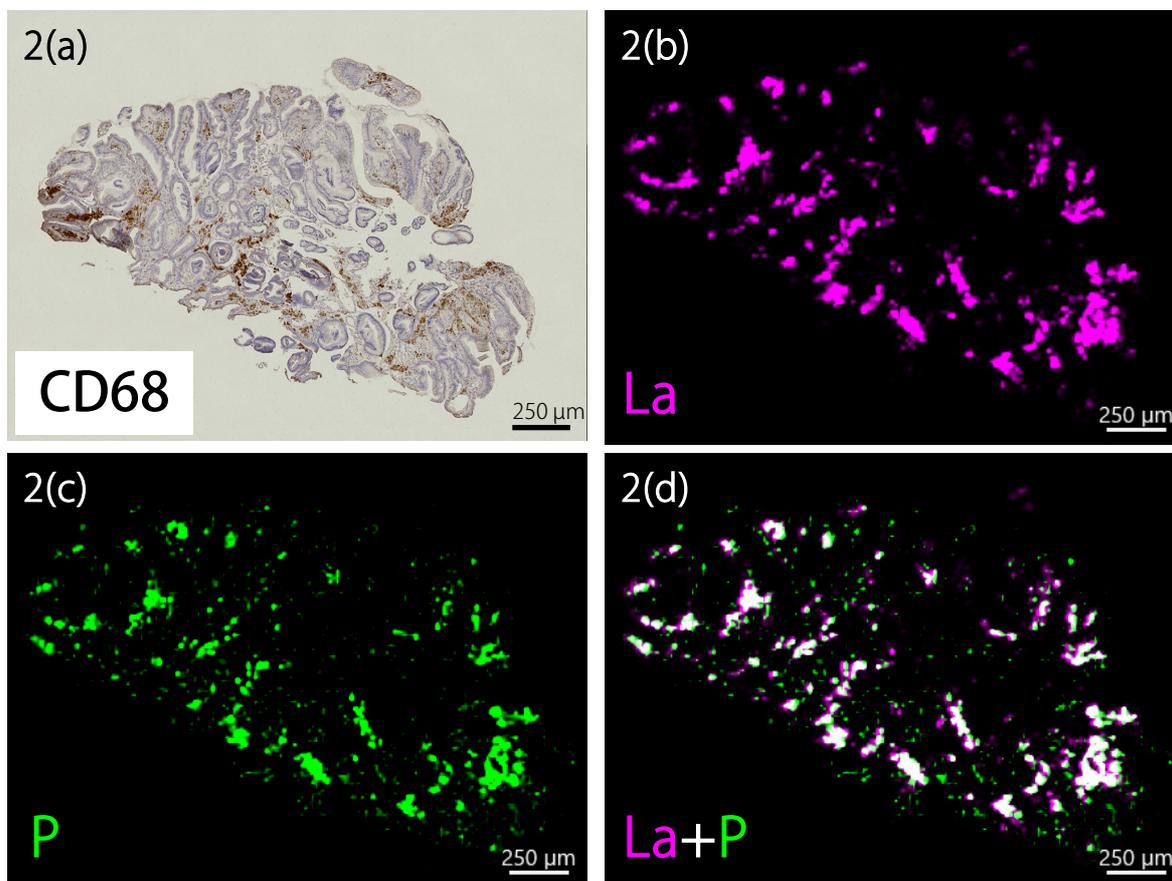


図2 抗CD68抗体によるIHCの観察結果とイメージング結果
(a) 抗CD68抗体によるIHCの観察結果
(b)-(d) ランタンとリンのイメージング結果ならびにその重ね合わせ

検量線の検討

図3(a)に示す方法で作製した検量線用サンプルは、組織切片の分析と同様に表1の条件で測定しました。得られたデータからIMAGEREVEAL MSを用いて、横軸を濃度、縦軸を強度として検量線を作成しました。図3(b)に検量線のグラフを示します。

調製した領域において、検量線は良好な直線性を示すことがわかります。本LA-ICP-MSシステムから得られるデータは、IMAGEREVEAL MSで直接読み込む形式で出力されるため、データ解析を非常に容易に行うことができます。

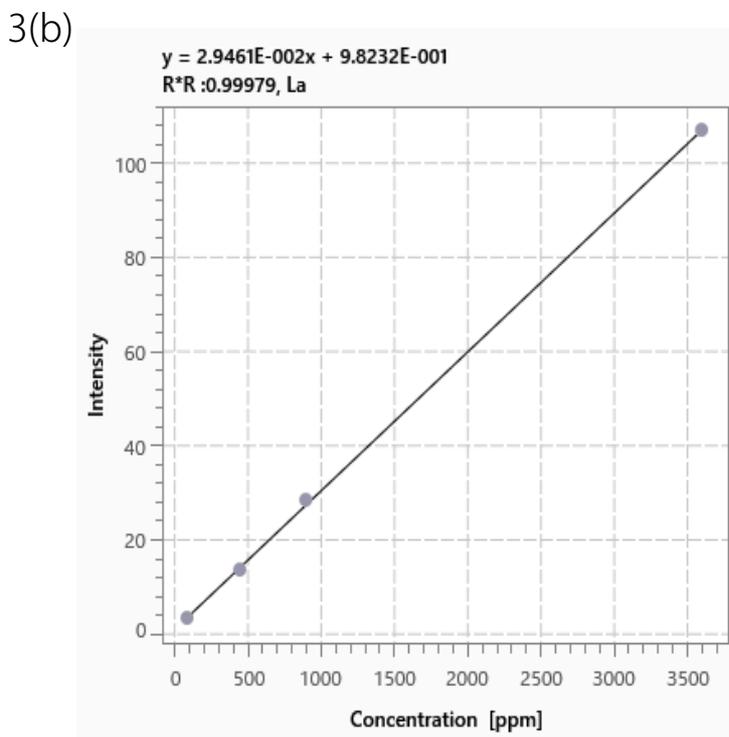
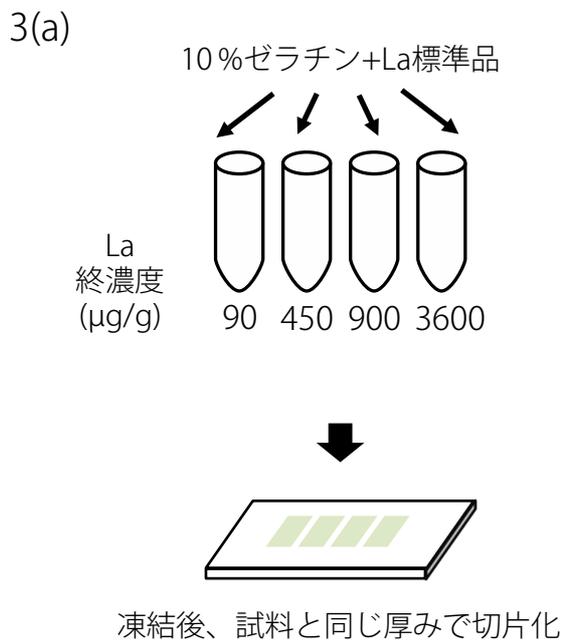


図3 本実験における検量線
(a) 検量線用サンプルの作成方法
(b) IMAGEREVEAL MSで作成した検量線
(c) データの出力から解析までの流れ

定量MSイメージング結果

図3(b)で得られた検量線を用いて、ランタン蓄積部位における蓄積量を調べました。IMAGEREVEAL MSを用いれば、検量線で得られた回帰式を実際の組織上での強度分布に適用することで、定量情報が付与されたイメージング画像を容易に作製することができます。得られた定量MSイメージング結果から、興味領域 (region of interest: ROI) を作製し、ROI内の定量値を知ることが可能です。ここでは図3(b)に示したランタン分布の中で、任意の蓄積箇所を図4(a)に示すROIとして設定し蓄積量を調べました。得られた定量結果を、図4(b)にドットプロットとして示します。ランタンの蓄積部位は約 3.0×10^4 ppmから 6.5×10^4 ppmの濃度範囲であり、平均すると $4.0 \times 10^4 \pm 0.9$ ppmでした。

この実験において、 1.0×10^4 ppmを超えるような高濃度の検量線試料では、低濃度の検量線試料と同様の切片作成が困難でしたが、本実験で用いたICPMS-2030は4%のランタン濃度に相当する強度域でも直線性が十分に得られるため、検量線を外挿し定量値を算出しました。

ランタン蓄積部位における顕微鏡観察

リン酸ランタンは難溶性であるため、蓄積部位でリン酸ランタン由来の結晶が顕微鏡観察できる可能性があります。ここでは連続切片のHE染色を行い、ランタンの濃度が最も高い箇所の顕微鏡観察を行いました。観察場所を図5(a)に示します。当該部位における、顕微鏡観察像 (対物レンズ倍率40倍) を図5(b)に示します。図5(b)において四角で表示した内部に多くの褐色状の沈着物が観察されました。ここで示す部位以外にも、ランタンの蓄積箇所と同様の褐色状沈着物が確認されました。

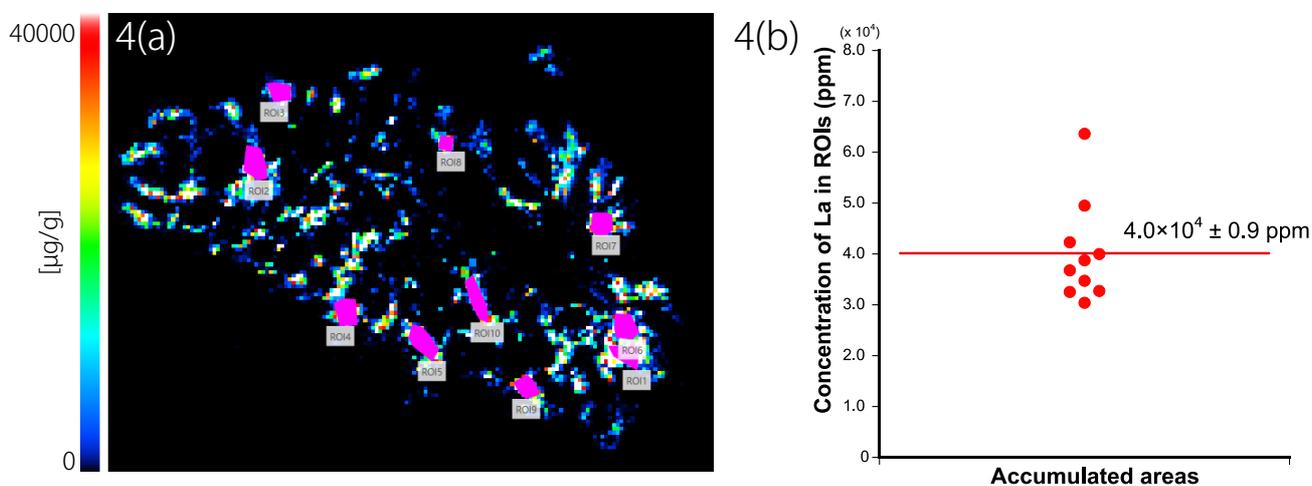


図4 定量分析結果
(a) IMAGEREVEAL MSで設定した得た定量イメージング結果上のROI
(b) ROIから計算されたランタン濃度のドットプロット

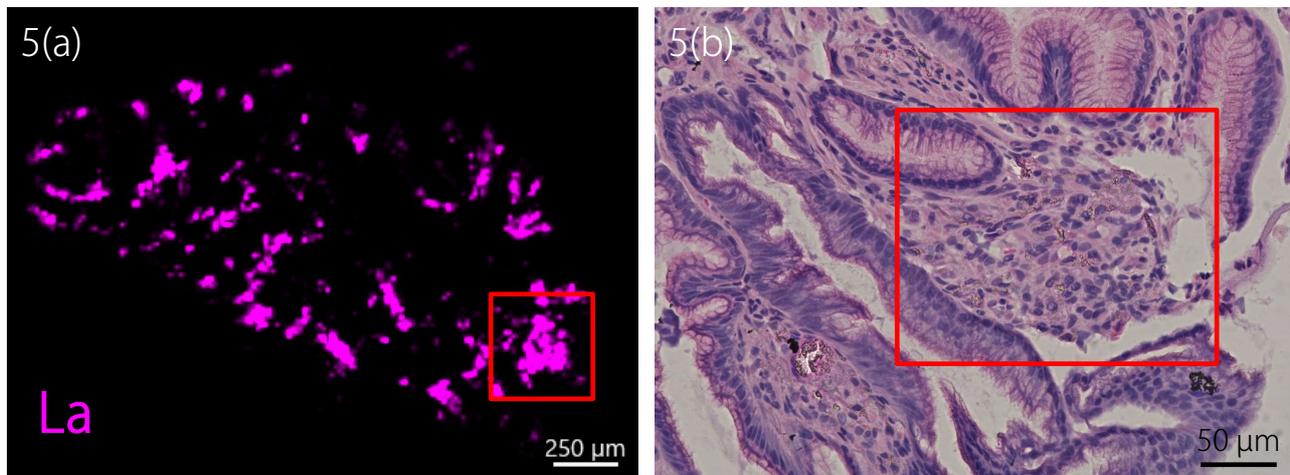


図5 局在部位におけるHE染色結果
(a) ランタンイメージング結果での観察部位 (赤四角内)
(b) (a)で設定した領域におけるHE染色切片の顕微鏡観察像

4. まとめ

本アプリケーションノートではICPMS-2030を用いたLA-ICP-MSで胃組織中のランタンを可視化しました。ランタンは平均して 4×10^4 ppmの濃度で蓄積しており、蓄積している場所にはリンが共局在していることからリン酸ランタンの形で沈着していると考えられます。マクロファージで発現するマーカーを検出する抗CD68抗体を用いたIHCと比較すると、局在場所でCD68陽性であることからランタン蓄積部位で炎症が起きていると考えられます。また、HE染色した組織でランタン蓄積部位を観察すると、結晶様の沈着物が観察されました。今後、病理染色だけでは得られない情報をLA-ICP-MSで取得するアプリケーションは、様々な金属製剤が開発されるにしたがって重要性が増すと期待されます。

謝辞

本実験を進めるにあたり、試料を提供いただいた小島和人医師（医療法人桂水会岡病院）ならびに試料作製を行っていただいた斉藤裕美氏（大阪大学大学院工学研究科特任研究員）にこの場を借りて御礼申し上げます。

<参考文献>

- 1) Zoriy, M. V.; Dehnhardt, M.; Reifemberger, G.; Zilles, K.; Becker, J. S., Imaging of Cu, Zn, Pb and U in human brain tumor resections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 2006, 257 (1), 27-33.
- 2) Becker, J. S.; Zoriy, M.; Becker, J. S.; Dobrowolska, J.; Matusch, A., Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) in elemental imaging of biological tissues and in proteomics. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2007, 22 (7).
- 3) Becker, J. S.; Zoriy, M.; Matusch, A.; Wu, B.; Salber, D.; Palm, C.; Becker, J. S., Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Mass Spectrom. Rev.* 2010, 29 (1), 156-75.
- 4) Yamagishi, Y.; Furukawa, S.; Tanaka, A.; Kobayashi, Y.; Sugiyama, A., Histopathological localization of cadmium in rat placenta by LA-ICP-MS analysis. *J. Toxicol. Pathol.* 2016, 29 (4), 279-283.
- 5) Furukawa, S.; Tsuji, N.; Kobayashi, Y.; Yamagishi, Y.; Hayashi, S.; Abe, M.; Kuroda, Y.; Kimura, M.; Hayakawa, C.; Sugiyama, A., Effect of dibutyltin on placental and fetal toxicity in rat. *J. Toxicol. Sci.* 2017, 42 (6), 741-753.
- 6) Ishii, C.; Nakayama, S. M. M.; Kataba, A.; Ikenaka, Y.; Saito, K.; Watanabe, Y.; Makino, Y.; Matsukawa, T.; Kubota, A.; Yokoyama, K.; Mizukawa, H.; Hirata, T.; Ishizuka, M., Characterization and imaging of lead distribution in bones of lead-exposed birds by ICP-MS and LA-ICP-MS. *Chemosphere* 2018, 212, 994-1001.
- 7) Moreno-Gordaliza, E.; Giesen, C.; Lazaro, A.; Esteban-Fernandez, D.; Humanes, B.; Canas, B.; Panne, U.; Tejedor, A.; Jakubowski, N.; Gomez-Gomez, M. M., Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies. *Anal. Chem.* 2011, 83 (20), 7933-40.
- 8) Bonta, M.; Lohninger, H.; Laszlo, V.; Hegedus, B.; Limbeck, A., Quantitative LA-ICP-MS imaging of platinum in chemotherapy treated human malignant pleural mesothelioma samples using printed patterns as standard. *J. Anal. At. Spectrom.* 2014, 29 (11), 2159-2167.
- 9) Egger, A. E.; Theiner, S.; Kornauth, C.; Heffeter, P.; Berger, W.; Keppler, B. K.; Hartinger, C. G., Quantitative bioimaging by LA-ICP-MS: a methodological study on the distribution of Pt and Ru in viscera originating from cisplatin- and KP1339-treated mice. *Metallomics* 2014, 6 (9), 1616-25.
- 10) Schreiber-Brynzak, E.; Pichler, V.; Heffeter, P.; Hanson, B.; Theiner, S.; Lichtscheidl-Schultz, I.; Kornauth, C.; Bamonti, L.; Dhery, V.; Groza, D.; Berry, D.; Berger, W.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K., Behavior of platinum(IV) complexes in models of tumor hypoxia: cytotoxicity, compound distribution and accumulation. *Metallomics* 2016, 8 (4), 422-33.
- 11) Van Acker, T.; Van Malderen, S. J. M.; Van Heerden, M.; McDuffie, J. E.; Cuyckens, F.; Vanhaecke, F., High-resolution laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging of cisplatin-induced nephrotoxic side effects. *Anal. Chim. Acta* 2016, 945, 23-30.
- 12) Shimma, S.; Makino, Y.; Kojima, K.; Hirata, T., Quantitative Visualization of Lanthanum Accumulation in Lanthanum Carbonate-Administered Human Stomach Tissues Using Mass Spectrometry Imaging. *Mass Spectrom (Tokyo)* 2020, 9 (1), A0086.
- 13) Lohofer, F.; Buchholz, R.; Glinzer, A.; Huber, K.; Haas, H.; Kaissis, G.; Feuchtinger, A.; Aichler, M.; Sporns, P. B.; Holtke, C.; Stolting, M.; Schilling, F.; Botnar, R. M.; Kimm, M. A.; Faber, C.; Walch, A. K.; Zernecke, A.; Karst, U.; Wildgruber, M., Mass Spectrometry Imaging of atherosclerosis-affine Gadofluorine following Magnetic Resonance Imaging. *Sci. Rep.* 2020, 10 (1), 79.

IMAGEREVEAL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

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。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。本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著作者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。

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 にご登録いただきますと、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。

初版発行：2022年3月
© Shimadzu Corporation, 2022