SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

ICP質量分析計ICPMS-2030
MSイメージングデータ解析ソフトウェアIMAGEREVEAL™ MS

肺組織中Al_2O_3/ZrO_2/TiO_2ナノ粒子のイメージング

Jennifer-Christin Müller[1], Michael Sperling[1], Uwe Karst[1] ,奥田 晃士[2]
1.Institute of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Münster, Germany
2.島津製作所グローバルアプリケーション開発センター

ユーザーベネフィット

- ◆ LA-ICP-MSでのイメージングにより、生体試料内の金属元素の分布情報を得ることが可能です。
- ◆ 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。
- ◆ 本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

ナノテクノロジーは21世紀に発展した重要な領域の一つです。ナノテクノロジーで生み出されるナノ粒子は、工業、軍事および医療の広範な用途に使用されています。二酸化チタン（TiO_2）ナノ粒子は、UV遮断剤としての日焼け止めや抗菌性織物コーティングに頻繁に使用され、酸化アルミニウム（Al_2O_3）ナノ粒子は自動車産業において耐摩耗性コーティングとして使用されています。一方、研磨加工により発生する研磨くずにはAl_2O_3と二酸化ジルコニウム（ZrO_2）のナノ粒子が含まれる可能性があります。

ナノ粒子は直径が小さいため、肺から体内に入り、肺組織に炎症や細胞欠損を引き起こす危険性があります。ナノ粒子の長期毒性の評価には、影響を受けた臓器におけるナノ粒子の分布情報が重要な役割を果たします。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）による元素バイオイメージングは、組織切片中の種々の元素を分析するための有用なツールです。本稿では、LA-ICP-MSでのバイオイメージングによって、ラット肺組織におけるナノ粒子の分布情報を得た結果を報告します。

■材料および方法

動物実験

動物実験と臓器調製はIBE R&D gGmbHが行いました。使用したナノ粒子は酸化アルミニウム(III)（77 % w/w）、二酸化ジルコニウム(IV)（12 % w/w）及び二酸化チタン(IV)（11 % w/w）からなり、粒子径の中央値は約35 nmでした。ナノ粒子は、0.025 mg/mLレシチンを添加した0.9 %塩化ナトリウム溶液と共にラットの左肺に気管内投与しました。投与したナノ粒子量は、4.8 mgでした。投与3日後にラットを安楽死させました。臓器の虚脱を避けるために肺を包埋剤で満たした後、瞬間凍結しました。厚さ10 µmの組織切片をクライオトームを用いて作成し、続いてスライドガラス上に載せました。

検量線試料作製

肺におけるナノ粒子濃度を定量するために、マトリックスマッチングさせた検量線試料を用いて検量線を作成しました。異なるアルミニウム、チタンおよびジルコニウム濃度のナノ粒子分散液にゼラチン（10 % w/w）を添加し、標準試料を調製しました。その後、クライオトームを用いて組織試料と同じ厚さの切片を作成し、実試料と同じ条件で分析しました。

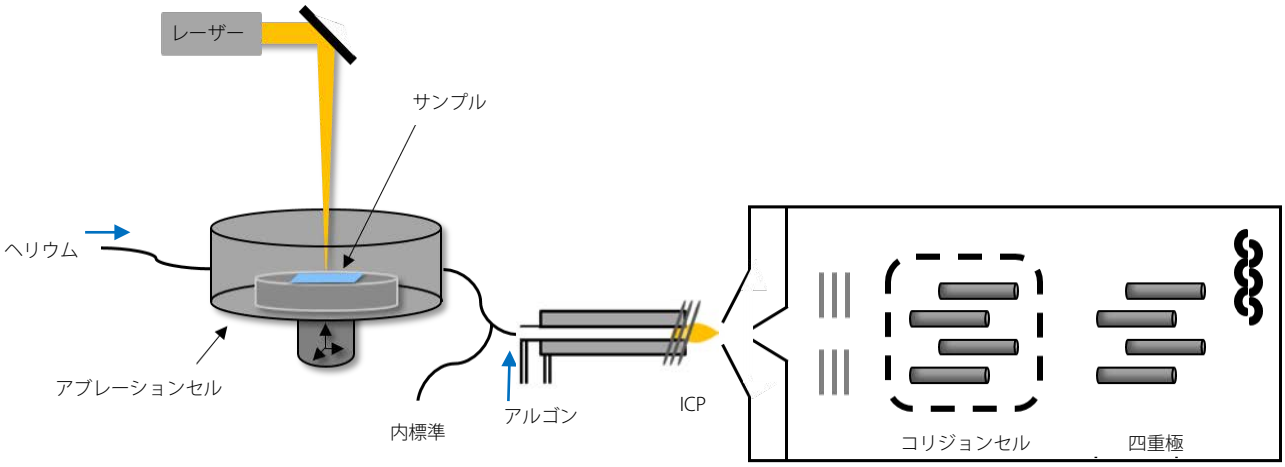

図1: 内標準導入を備えたLA-ICP-MSの模式図

分析条件

組織試料の元素バイオイメージングでは、LA-ICP-MSが最適な分析法です。本稿では、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。分析条件を表1に示します。2つの装置はTygon®チューブで接続されておりアブレーションセルには0.8 L/minのヘリウムを流しました。

プラズマの安定性をモニターするために、2 %硝酸中に1 ng/gのロジウムを含む内標準溶液をネブライザーから導入しました。使用した装置の模式図を図1に示します。ICP-MSでは銅製サンプリングコーンとスキマーコーンを使用しました。多原子イオンによる干渉を除去するために、ヘリウムをコリジョンガスとして用いてコリジョンモードで測定しました。^{27}Al、^{47}Ti、^{49}Ti、^{91}Zr、^{31}Pと^{103}Rhの積算時間を表2に示します。気管支や肺胞など組織構造を把握するため、リン脂質に存在するリン（^{31}P）を同時に測定しました。

表1: 分析条件

レーザーアブレーション	LSX-213 G2+
スポットサイズ	50 µm
スキャン速度	100 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	8.0 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: 各同位体の積算時間

同位体	積算時間
^{27}Al	0.1 s
^{47}Ti	0.1 s
^{49}Ti	0.1 s
^{91}Zr	0.1 s
^{31}P	0.05 s
^{103}Rh	0.05 s

■結果

内標準として用いたロジウムの強度は約4.4 %と低い%RSDであり、分析中のプラズマは安定していました。表3に、50 µm のレーザー径における検出限界（LOD）と定量下限（LOQ）の値を示します。肺組織において、投与されたナノ粒子の予想濃度よりも十分に低い値でした。

表3: 検出限界（LOD）と定量下限（LOQ）

同位体	LOD [µg/g]	LOQ [µg/g]
^{27}Al	65.1	217.0
^{47}Ti	1.4	4.8
^{49}Ti	1.6	5.2
^{91}Zr	1.4	4.6

図2にLA-ICP-MSで得られた^{31}P、^{27}Al、^{47}Ti、^{91}Zrの濃度分布を示します。アルミニウム、チタンおよびジルコニウムの分布は非常に類似しており、これらの元素として観測された信号強度は、実際に投与されたナノ粒子由来であると考えられます。マトリックスマッチングさせた検量線試料により、アルミニウムは2500 µg/gまでの濃度で分布していることが分かりました。一方、チタンの濃度は500 µg/gまで、ジルコニウムの濃度は750 µg/gまででした。これらの違いは混合した酸化物ナノ粒子の組成と一致していることから、ナノ粒子の分布は比較的均一であると考えられます。高濃度のホットスポットの中には、組織密度の高い肺領域にみられるものもあります。これらの領域は^{31}Pが高強度で分布している領域と相関します。一方、気管支および細気管支付近の組織におけるナノ粒子濃度ははるかに低く、肺の自浄作用が働いた可能性を示しています。

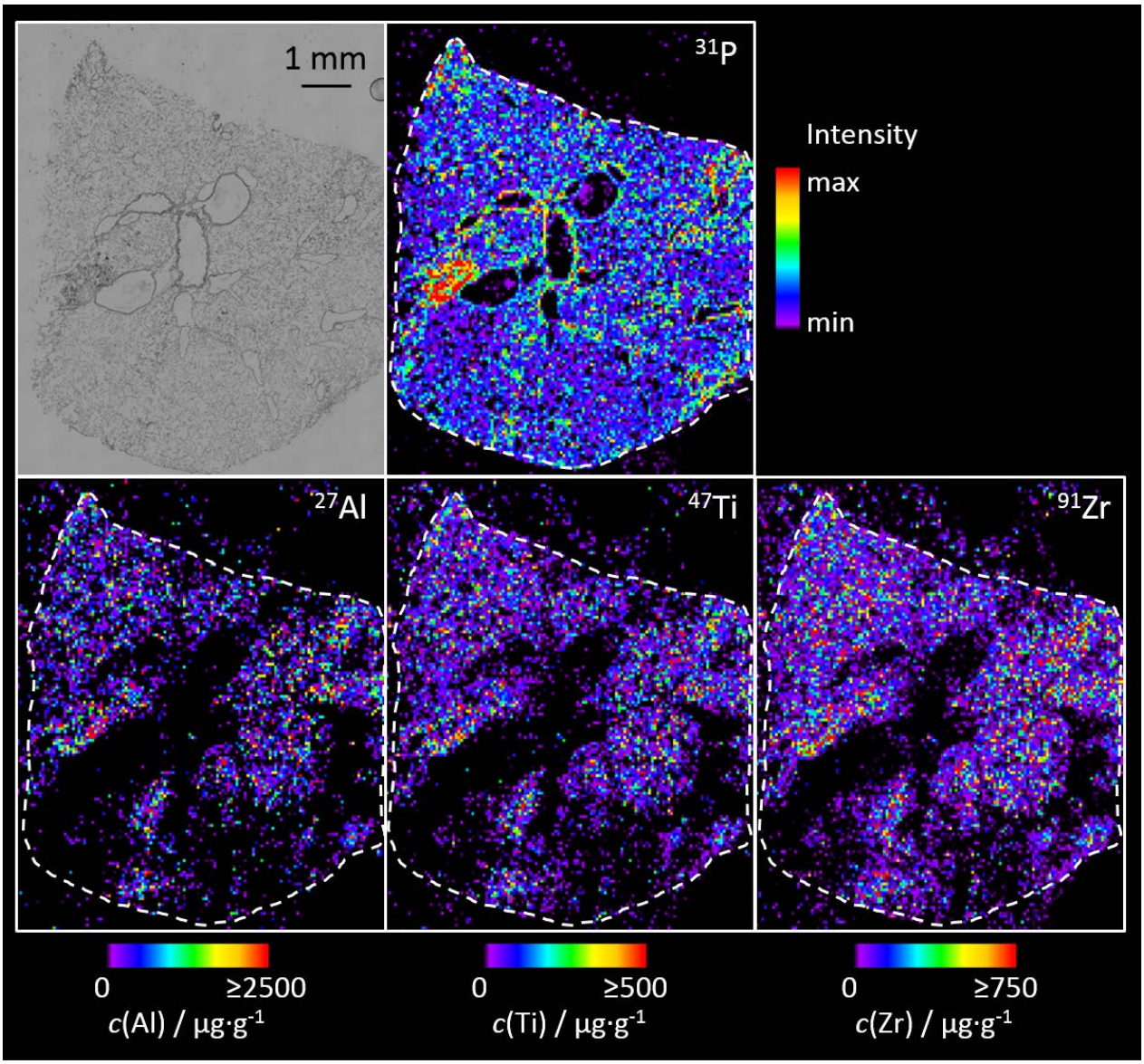

図2:ナノ粒子投与3日後の肺組織における顕微鏡画像 （左上） と^{31}P,^{27}Al,^{47}Ti,^{91}Zrの濃度分布
*白点線は組織切片の境界部を示します。

■ まとめ

LA-ICP-MSでのイメージングによりラット肺組織におけるナノ粒子を構成する金属元素の濃度分布を可視化し、アルミニウム、チタンおよびジルコニウムの3元素が共局在していることが分かりました。それぞれの元素の濃度は、マトリックスマッチングさせたゼラチン検量線試料から作成した検量線を用いて定量できました。得られた濃度から、投与されたナノ粒子が肺組織内に比較的均一に存在していると考えられます。また、同時に測定したリンの分布から肺組織の全体像を把握することも可能です。

謝辞

動物試験と試料調製を行っていただいたIBE R&D gGmbHのDr.Antje VennemannとProf.Martin Wiemannに感謝申し上げます。

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。
Tygonは、 Saint-Gobain Performance Plastics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-116-003-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。

© Shimadzu Corporation, 2022