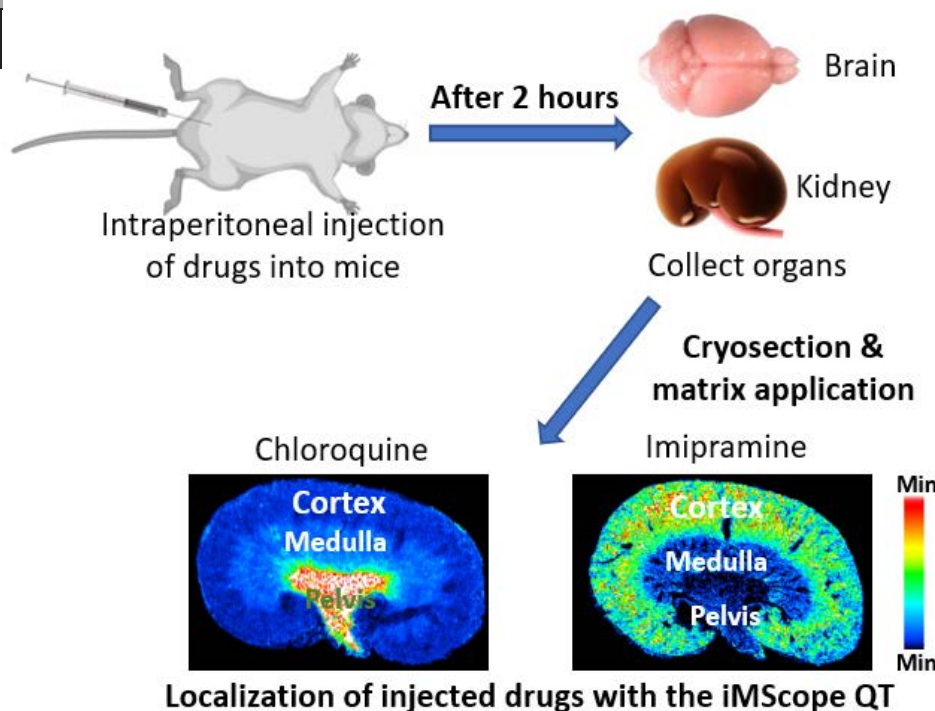


iMScope™ QTによるマウス腎臓および脳における薬剤とその代謝物の迅速マッピング

Ariful Islam¹、坂本 匠¹、Qing Zhai¹、Muedur Rahman¹、Al Mamun¹、高橋 豊^{1,2}、華表 友暁^{1,2}、山本 卓志³、瀬藤 光利^{1,2}



■ 要旨

質量分析イメージング (Mass Spectrometry Imaging : MSI) は非標識で生体試料中の成分を可視化する技術としてよく知られています。本研究では、C57BL/6雄野生型マウスにおけるイミプラミン、クロロキンおよびそれらの代謝物の迅速マッピング (32ピクセル/秒) に、大気圧マトリックス支援レーザー脱離イオン化 - MSIとして知られる新たに開発されたiMScope QTを用いました。マウスの腎臓と脳における薬剤とその代謝物の領域特異的局在を明らかにしました。本研究で観察されたこれらの薬剤とその代謝物の詳細な局在情報は、これらの薬剤の臨床的に関連する特性、有効性および潜在的な副作用を理解するのに役立ちます。また、本研究は、生体試料中に存在する低分子医薬品とその代謝物の迅速なマッピングに対するiMScope QTの可能性を明らかにしました。

1. はじめに

MSIの技術は、生物学的研究だけでなく、創薬、開発およびデリバリーを含む様々な分野で注目されています。MSI装置は、試料表面に存在する成分の詳細な分子組成と空間分布の組み合わせ情報を得ることにより、試料の特徴づけを

幅広く行うことが可能です¹⁾。MSI機器の中でも、大気圧マトリックス支援レーザー脱離イオン化MSI (AP - MALDI - MSI) による高分解能イメージングへの関心が高まっています。他の生体分子に加えて、揮発性成分をより高い空間分解能で分析することも可能です²⁾。また、従来のMALDI-MSIで使用される高真空下で昇華してしまうマトリックスを用いてもサンプルの成分を可視化することが可能です³⁾。イメージング質量顕微鏡 (iMScope) は、島津製作所が開発したAP - MALDI - MSI装置で、光学顕微鏡を内蔵しています。優れた分析速度と高い空間分解能 (最高空間分解能5 μm) が認知されています²⁾。近年、島津製作所は、より高速で高感度・高解像度のイメージングが可能なiMScope QTというAP-MALDI-MSI装置を開発しました。

イミプラミンは、うつ病、不安症、夜尿症の治療に使用される有名な薬剤です。クロロキンは、マラリア、ウイルス性疾患、自己免疫疾患の治療にもよく用いられます。これらの低分子薬は今日、医療現場で広く利用されていますが、両薬剤ともいくつかの副作用があります⁴⁾⁵⁾。投与された薬剤およびその代謝物の生体組織における局在情報は、それらの作用機序および毒性特性をよりよく理解するために最も重要です。しかし、異なる臓器におけるそれらの局在に関するデータはまだ不足しています。本研究では、iMScope QTを用いてマウス腎臓と脳におけるこれらの薬剤の分布を確認するために、これらの薬剤とその代謝物の迅速イメージングを初めて試みました。

1 浜松医科大学 細胞分子解剖学教室

2 浜松医科大学 国際マスマイメーキングセンター

3 株式会社島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

2. 実験

本研究は、C57BL/6JJ雄マウス（野生型、WT）脳および腎臓におけるイミプラミンとクロロキニンおよびそれらの代謝物の分布を可視化することを目的としました。イミプラミンとクロロキニン（30 mg/kg）の腹腔内注射の2時間後に、マウスを頸椎脱臼後に解剖し、腎臓と脳の組織を迅速に採取しました。その後すべての資料をドライアイスで急速冷凍しました。次に、凍結試料を-80℃で保存しました。マウスの腎臓と脳の矢状切片をCM1950 クライオスタット（ライカバイオシステムズ）を用いて既報の方法に従って調製しました⁶⁾。AP - MALDI - MSIのために、厚さ10 μmの切片を酸化インジウムスズ（ITO）スライドガラス（100 Ω、松浪硝子工業）上に貼り付けました。

マトリックスとして α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸（ α -CHCA、シグマ-アルドリッチ）を、図1のマトリックス蒸着装置iMLayer™（島津製作所）を用いて塗布しました。マトリックス蒸着中、iMLayerチャンバ内は真空状態に維持されました。マトリックス塗布後、イメージング質量顕微鏡iMScope QT（島津製作所）を用いてマウス腎臓と脳のMSIデータを取得し、薬剤標準品をコントロールマウス脳切片上に滴下しました（0.3 μL/スポット）。

イメージング質量顕微鏡iMScope QTは、大気圧マトリックス支援レーザー脱離イオン化（AP-MALDI）源とQ-TOF型質量分析計LCMS™-9030を組み合わせた装置です（図2）。マウス試料を測定する前に、iMScope QTのパラメータを2つの異なる分析速度（8ピクセル/秒と20ピクセル/秒）で薬剤標準品を用いて最適化しました。iMScope QTでデータ取得するために使用するパラメータを表1に示します。試料中の標的薬の検出を確認するために、薬剤標準品のMS/MSイメージングを行い、マウス試料をiMScope QTで分析しました。両薬剤のMS/MSイメージングでは、コリジョンエネルギーを35に設定し、すべて8ピクセル/秒の分析速度でデータ取得し、その他のパラメータはMSI分析パラメータに記載されているものと同じにしました（表1）。最後に、これらの薬剤とそれらの代謝物をより高い空間分解能（25 μmピッチ）で高速（32ピクセル/秒）で可視化することを試みました。MSI分析パラメータを表1に示します。



図1 マトリックス蒸着装置iMLayer™



図2 イメージング質量顕微鏡 iMScope™ QT

表1 MSI分析パラメータ

設定	8 ピクセル/秒	20 ピクセル/秒	32 ピクセル/秒
極性	Positive	Positive	Positive
質量範囲	150 - 550	150 - 550	150 - 550
質量分解能	32000	32000	32000
空間分解能 (X x Y)	50 μm x 50 μm	50 μm x 50 μm	25 μm x 25 μm
レーザー径設定値	2	2	2
レーザーパワー	65	65	60
レーザーショット数	100	100	20
繰り返し周波数 (Hz)	1000	10000	10000
検出器電圧 (kV)	2.4	2.4	2.4
DL 温度 (°C)	300	300	300

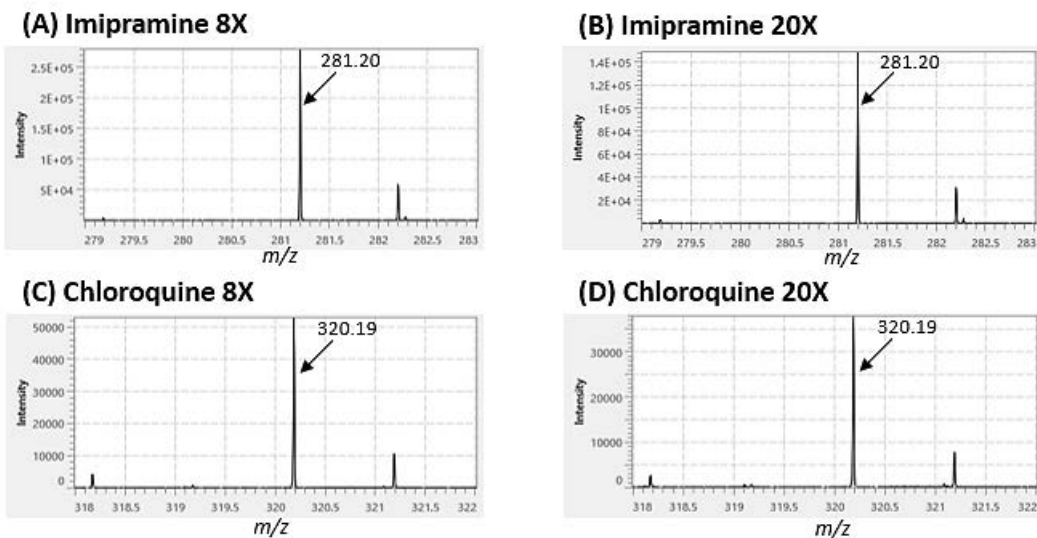


図3 イミプラミン (A-B) 及びクロロキン (C-D) に対するiMScope QTの感度に及ぼす分析速度の影響

Detection of drugs at different data acquisition speeds by iMScope QT

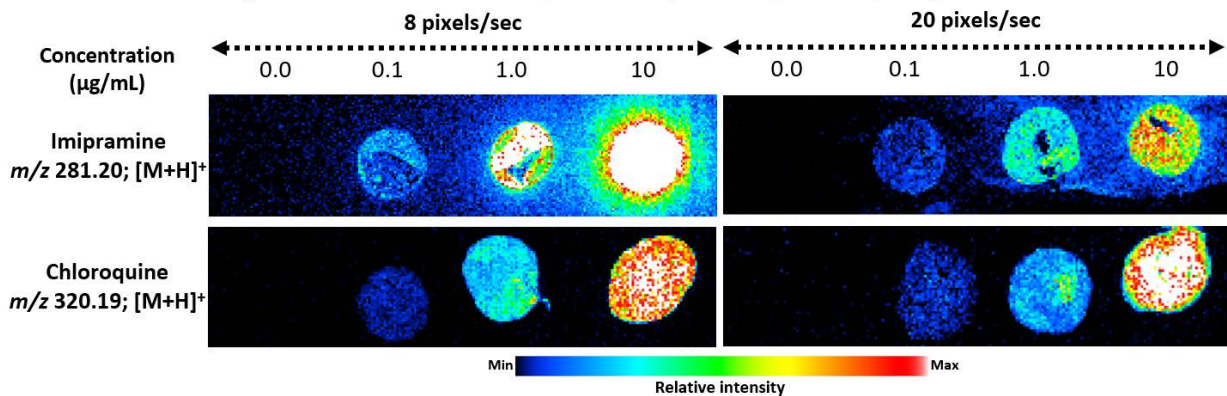


図4 iMScope QTを用いた異なる分析速度でのイミプラミンとクロロキンのイオン像

3. 結果・考察

iMScope QTのパラメータを最適化し、コントロールマウス脳切片 (0.3 μ L/スポット) に滴下した薬剤標準品から正イオンモードでAP - MALDI - MSIデータを8ピクセル/秒と20ピクセル/秒の二つの異なる分析速度でデータを取得しました。iMScope QTでは、両データの分析速度で0.1 μ g/mLの濃度で両薬剤を検出しました (図3)。興味深いことに、分析速度は両薬剤のシグナル強度に劇的な影響を与えませんでした (図3, 4)。

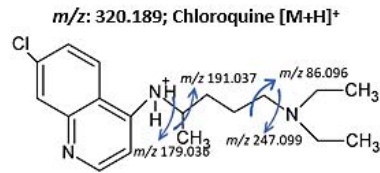
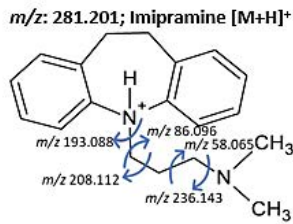
我々は最近の研究において、これらの薬剤が脱離エレクトロスプレーイオン化MSI (DESI - MSI) によっても検出可能であり、分析速度 (2ピクセル/秒) で最も高い感度で検出される一方、高い分析速度で分析を実施すると劇的に感度低下の影響が出ることを報告しました⁷⁾。MALDI-MSIデータは、3つの異なるマトリックスと異なる方法を用いて、7T SolariX FT-ICRを用いた正イオンモードでもデータ取得を試みましたが、この実験ではこれらの薬剤は検出できませんでした⁷⁾。

その後、iMScope QT (8ピクセル/秒) を用いてマウス腎臓切片のAP-MALDI-MSIデータを取得しました。iMScope QTでは、両薬剤は標準物質だけでなく薬剤投与マウス試料中にプロトン化イオンとして検出されました。これらのピークが薬剤由来であることを確認するために、iMScope QTを用いて、イミプラミンとクロロキン由来のピークをプリカーサイオンとしたタンデム質量分析 (MS/MS) イメージングを行いました (図5)。

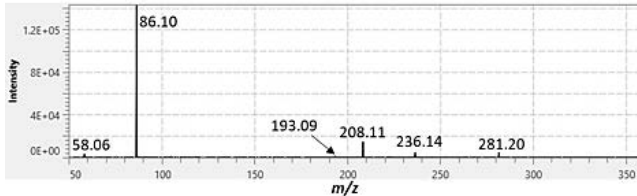
iMScope QTは、薬剤投与マウスの腎臓における両薬剤とその代謝物の分布を初めて明らかにしました。著者らは、イミプラミンが腎皮質に高濃度で蓄積し、その代謝物であるデンプラミンと2-ヒドロキシ-イミプラミンが薬剤投与マウスの外腎髄質と腎盂に蓄積することに注目しました (図6A)。また、クロロキン、デスエチルクロロキン、およびクロロキン-M (-N (C₂H₅)₂) が主に骨盤に蓄積し、薬剤投与マウスの腎臓の内髄質にも少量蓄積することを観察しました (図6B)。腎皮質は血管とネフロンをつないでおり、赤血球の産生に関与しています。腎髄質は腎錐体からなり、腎の機能単位であるネフロンの密なネットワークとなっています。腎盂は腎錐体から尿を集めます。腎臓のこれらの部位はすべて、血液をろ過し、電解質バランスを維持し、体内の老廃物を除去するために不可欠な役割を果たしています。腎臓は血液中に存在する薬剤およびその代謝物に一般的に曝露されるため、腎臓における薬剤誘発性毒性は世界的によく知られています⁸⁾。著者らの研究で観察された腎臓における蓄積イミプラミンとその代謝物は、糸球体腎炎と炎症細胞浸潤を誘発することにより毒性作用を示します⁹⁾。

さらに、本研究で観察されたクロロキンおよびその代謝物は、脂質過酸化の増加および抗酸化酵素活性の低下によって腎障害と関連している可能性があります¹⁰⁾。しかし、これらの蓄積された薬剤とそれらの代謝物の観察された特定の腎臓領域における詳細な毒性作用を調査するためには更なる研究が必要です。

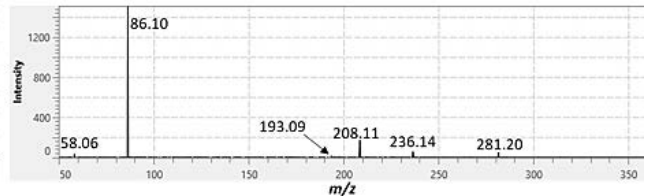
(A) Imipramine, chloroquine, and their possible fragmentation patterns



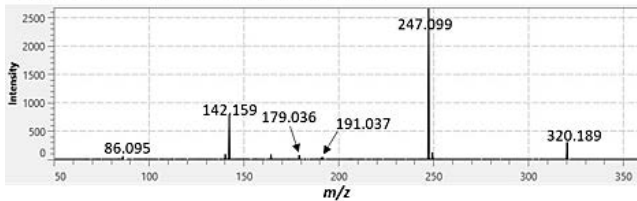
(B) MS² spectra of standard imipramine



(C) MS² spectra of imipramine detected from the mouse kidneys



(D) MS² spectra of standard chloroquine



(E) MS² spectra of chloroquine detected from the mouse kidneys

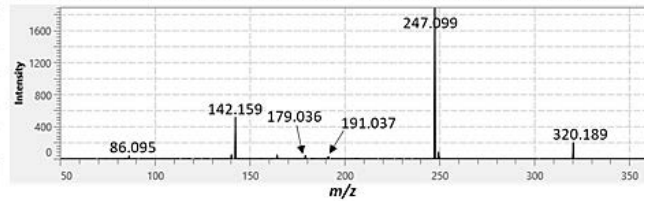
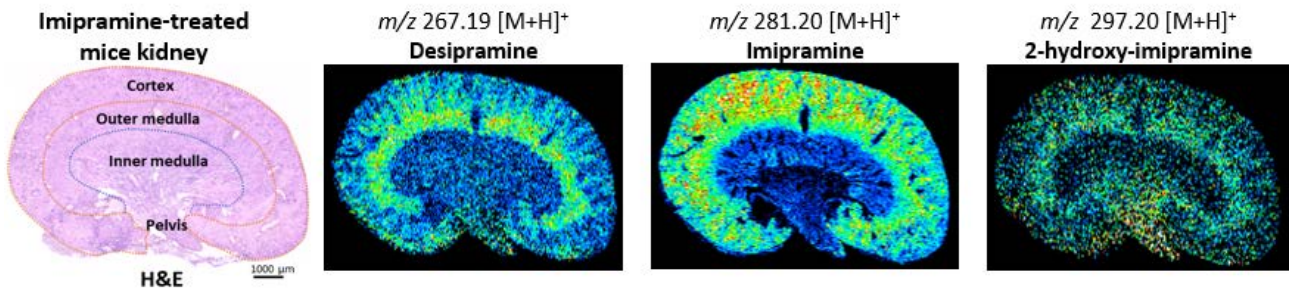


図5 iMScope QTを用いた薬剤標準品および薬剤投与マウス腎臓で検出されたイミプラミンおよびクロロキンのMS/MSスペクトル

- (A) イミプラミンとクロロキンの断片化パターンの可能性
- (B-C) 薬剤標準品および薬剤投与マウス腎臓から検出したイミプラミンのMS/MSスペクトル
- (D-E) 薬剤標準品および薬剤投与マウス腎臓から検出したクロロキンのMS/MSスペクトル

(A) Imipramine and its metabolites detected in the mouse kidneys



(B) Chloroquine and its metabolites detected in the mouse kidneys

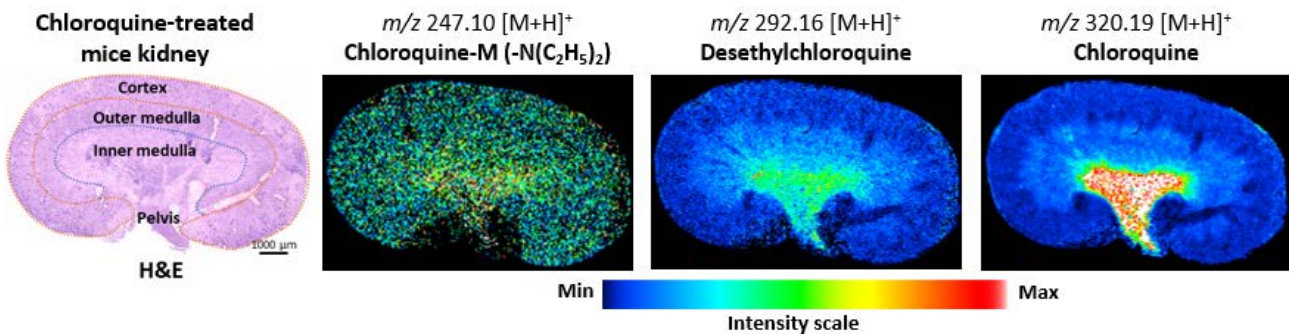
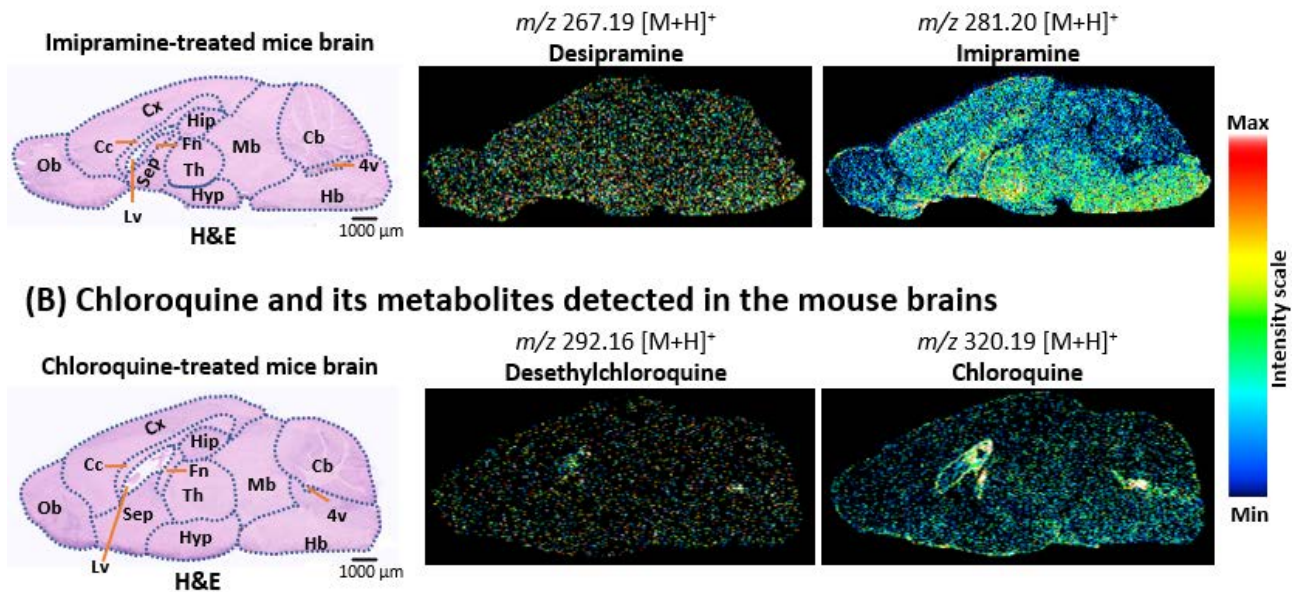


図6 iMScope QTを用いた薬剤投与マウスの腎臓におけるイミプラミン、クロロキンおよびそれらの代謝物の局在確認

- (A) 薬剤投与マウス腎臓におけるイミプラミンとその代謝物の分布
 - (B) 薬剤投与マウス腎臓におけるクロロキンおよびその代謝物の分布
- 空間分解能は50 μm、分析速度は8ピクセル/秒

(A) Imipramine and its metabolites detected in the mouse brains



(B) Chloroquine and its metabolites detected in the mouse brains

図7 iMScope QTを用いて薬剤投与マウスの脳におけるイミプラミン、クロロキンおよびそれらの代謝物の局在確認

(A) 薬剤投与マウス脳におけるイミプラミンとその代謝物の分布

(B) 薬剤投与マウス脳におけるクロロキンおよびその代謝物の分布

空間分解能は50 μm、分析速度は8ピクセル/秒

Cb: cerebellum (小脳) ; Hb: hindbrain (後脳) ; Mb: midbrain (中脳) ; Hip: hippocampus (海馬) ;

Cx: cerebral cortex (大脳皮質) ; Th: thalamus (視床) ; Fn: fornix (脳弓) ; CC: corpus callosum (脳梁) ;

Ob: olfactory bulb (嗅球) ; Sep: septum (脳中隔) ; Hyp: hypothalamus (視床下部) ; Lv: lateral ventricle (側脳室) ;

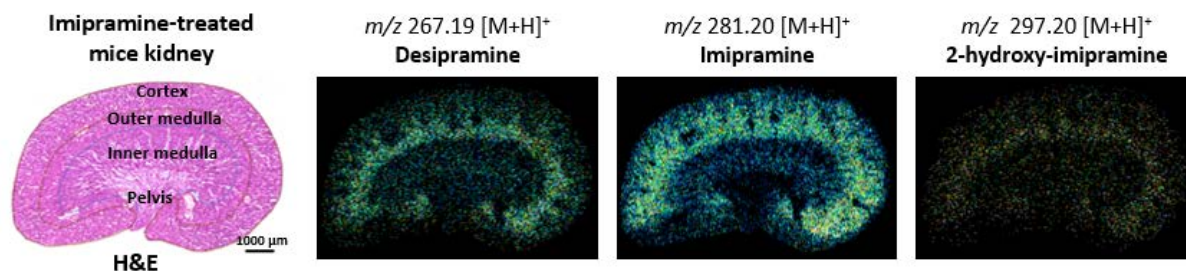
4v: 4th ventricle (第4脳室)

また、iMScope QTを用いて、マウス脳におけるイミプラミン、クロロキンおよびそれらの代謝物の局在を調べました。脳全体でイミプラミンとその代謝物を観察しましたが、薬剤投与マウスのthalamus (視床)、hypothalamus (視床下部)、septum (脳中隔) およびhindbrain (後脳) ではやや多い量のイミプラミンが観察されました (図7A)。イミプラミンは、不安や抑うつの治療によく用いられます。以前の報告によると、これらの脳領域に蓄積したイミプラミンは、セロトニンおよびノルアドレナリンの再取り込みを阻害し、不安および抑うつを緩和に役立つ可能性があります¹¹⁾。著者らの研究はまた、薬剤投与マウス脳のlateral ventricle (側脳室)、4th ventricle (第4脳室)、およびfornix (脳弓) におけるクロロキンとその代謝物の多量蓄積を確認しました (図7B)。lateral ventricle (側脳室) と4th ventricle (第4脳室) の脈絡叢は脳脊髄液を産生し、中枢神経系の恒常性維持に重要な役割を果たしています¹²⁾。

脳および頭蓋腔の容積を調節し、老廃物代謝物 および不要物質を除去し、蛋白質、栄養素および薬剤を輸送します¹²⁾¹³⁾。白質の線維束であるfornix (脳弓) は、大脳辺縁系回路のいくつかのノードを接続することによって、認知機能において重要な役割を果たしています¹⁴⁾。イミプラミン及びその代謝物はミクログリアによる炎症性サイトカイン (IL 1-β及びTNF-α) および一酸化窒素の産生を増加させます⁵⁾。クロロキンおよびその代謝物は、精神病、発作、見当識障害、幻覚などの神経毒性作用でも知られています⁴⁾。

イミプラミンとクロロキンはいずれも神経毒性を引き起こす可能性があるため、本研究で観察された異なる脳領域におけるこれらの薬剤とその代謝物の蓄積が、これらの領域における神経毒性作用と機能の破壊に関与している可能性があります。これらの蓄積された薬剤および脳機能と健康に関連する薬剤代謝物の詳細な作用機序を探索するためには、さらなる研究が必要です。

(A) Rapid detection of imipramine and its metabolites in the mouse kidneys by iMScope QT



(B) Rapid detection of chloroquine and its metabolites in the mouse kidneys by iMScope QT

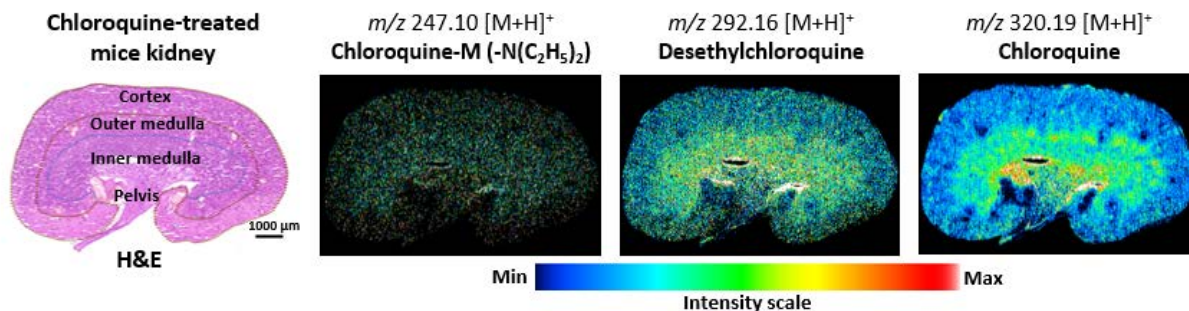


図8 iMScope QTを用いた空間分解能の高い薬剤投与マウスの腎臓におけるイミプラミン、クロロキンおよびそれらの代謝物の迅速な局在確認

(A) 高い分析速度で分析したマウス腎臓におけるイミプラミンとその代謝物の分布

(B) 高い分析速度で分析したマウス腎臓におけるクロロキンとその代謝物の分布

空間分解能は25 μm、分析速度は8ピクセル/秒

本研究では、新たに開発したiMScope QTによる高速（20ピクセル/秒）でのデータ取得が感度に大きな影響を及ぼさないことも観察しました。そこで、イミプラミン、クロロキンおよびそれらの代謝物を、iMScope QTを用いて、はるかに高い分析速度（32ピクセル/秒）および高い空間分解能（25 μm×25 μm）で可視化することを試みました。この分析速度と高空間分解能で、薬剤投与マウスの腎臓中の薬剤とその代謝物の大部分を明瞭な分布で検出しました（図8）。このMSI装置は、薬剤、代謝物、および他の分析成分を高空間分解能で迅速にイメージングするための良い選択肢となり得ると結論づけました。しかし、今回の実験ではイミプラミンとクロロキンの2剤のみの使用にすぎず、医薬品を含む他の化合物については、MALDI-MSIおよびDESI-MSIは、iMScope QTと比較して感度面で良好な可能性もあります。将来的には、高い空間分解能を有する様々な異なるMSIツールを用いることにより、他の化合物や薬剤の迅速画像化を試みます。

4. まとめ

iMScope QTとして知られるAP - MALDI - MSI装置を使用することにより、マウス腎臓および脳におけるイミプラミン、クロロキンおよびそれらの代謝物の局在を初めて明らかにしました。著者らの知見は、これらの薬剤の作用機序および毒性特性を探索するのに役立つかもしれません。さらに、本研究は、生体試料中に存在する成分の迅速イメージングにおけるiMScope QTの能力を証明しました。

謝辞

iMScope QTに関するテクニカルサポートとご指導いただきました島津製作所の笠松郷志氏と緒方是嗣氏に心より感謝いたします。

<参考文献>

- 1) Buchberger, A.R.; DeLaney, K.; Johnson, J.; Li, L. Mass spectrometry imaging: a review of emerging advancements and future insights. *Analytical chemistry* 2018, 90, 240.
- 2) Harada, T.; Yuba-Kubo, A.; Sugiura, Y.; Zaima, N.; Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Wakui, M.; Suematsu, M.; Takeshita, K.; Ogawa, K. Visualization of volatile substances in different organelles with an atmospheric-pressure mass microscope. *Analytical chemistry* 2009, 81, 9153-9157.
- 3) Jackson, S.N.; Muller, L.; Roux, A.; Oktem, B.; Moskovets, E.; Doroshenko, V.M.; Woods, A.S. AP-MALDI mass spectrometry imaging of gangliosides using 2, 6-dihydroxyacetophenone. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 2018, 29, 1463-1472.
- 4) Doyno, C.; Sobieraj, D.M.; Baker, W.L. Toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine following therapeutic use or overdose. *Clinical Toxicology* 2021, 59, 12-23.
- 5) Obuchowicz, E.; Bielecka-Wajdman, A.; Zieliński, M.; Machnik, G.; Gołyszny, M.; Ludyga, T. Imipramine and venlafaxine differentially affect primary glial cultures of prenatally stressed rats. *Frontiers in Pharmacology* 2020, 10, 1687.
- 6) Islam, A.; Takeyama, E.; Mamun, M.A.; Sato, T.; Horikawa, M.; Takahashi, Y.; Kikushima, K.; Setou, M. Green nut oil or DHA supplementation restored decreased distribution levels of DHA containing phosphatidylcholines in the brain of a mouse model of dementia. *Metabolites* 2020, 10, 153.
- 7) Islam, A.; Sakamoto, T.; Zhai, Q.; Rahman, M.M.; Mamun, M.A.; Takahashi, Y.; Kahyo, T.; Setou, M. Application of AP-MALDI Imaging Mass Microscope for the Rapid Mapping of Imipramine, Chloroquine, and Their Metabolites in the Kidney and Brain of Wild-Type Mice. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 1314.
- 8) Pazhayattil, G.S.; Shirali, A.C. Drug-induced impairment of renal function. *International journal of nephrology and renovascular disease* 2014, 7, 457.
- 9) Chang, G.-R.; Hou, P.-H.; Wang, C.-M.; Lin, J.-W.; Lin, W.-L.; Lin, T.-C.; Liao, H.-J.; Chan, C.-H.; Wang, Y.-C. Imipramine Accelerates Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Renal Impairment, Diabetic Retinopathy, Insulin Resistance, and Urinary Chromium Loss in Obese Mice. *Veterinary sciences* 2021, 8, 189.
- 10) Murugavel, P.; Pari, L. Attenuation of Chloroquine - Induced Renal Damage by α - Lipoic Acid: Possible Antioxidant Mechanism. *Renal failure* 2004, 26, 517-524.
- 11) Yang, J.; Hellerstein, D.J.; Chen, Y.; McGrath, P.J.; Stewart, J.W.; Peterson, B.S.; Wang, Z. Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor antidepressant effects on regional connectivity of the thalamus in persistent depressive disorder: evidence from two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Brain communications* 2022, 4, fcac100.
- 12) Wichmann, T.O.; Damkier, H.H.; Pedersen, M. A Brief Overview of the Cerebrospinal Fluid System and Its Implications for Brain and Spinal Cord Diseases. *Frontiers in Human Neuroscience* 2021, 15.
- 13) Matsumae, M.; Sato, O.; Hirayama, A.; Hayashi, N.; Takizawa, K.; Atsumi, H.; Sorimachi, T. Research into the physiology of cerebrospinal fluid reaches a new horizon: intimate exchange between cerebrospinal fluid and interstitial fluid may contribute to maintenance of homeostasis in the central nervous system. *Neurologia medico-chirurgica* 2016, 56, 416-441.
- 14) Senova, S.; Fomenko, A.; Gondard, E.; Lozano, A.M. Anatomy and function of the fornix in the context of its potential as a therapeutic target. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2020, 91, 547-559.

iMLayer, iMScope、およびLCMS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
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2023年9月

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。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。