経皮吸収物質の体内動態のイメージング質量分析による解析

福井県立大学生物資源学部生物資源学科

平修

This research should be of interest to a broad readership, particularly those whose research involves the mass spectrometric analysis of localization of xenobiotics. Because the present study describes emerging evidence suggested environmental factors as causative agent such as methyl 2-octynoate (2-OAm). Not only does 2-OAm have potential to cause visceral disease but importantly is used in environment such as lipsticks, hair dye, perfumes and food flavorings.

However, its disposition after percutaneous application is not revealed. We report the disposition and effect, visually, by nano-PALDI-based imaging mass spectrometry. Generally, small molecule like 2-OAm cannot be detected by LDI-based mass spectrometry (MS) due to the interference of organic matrix signal. Previously, we have reported nano-PALDI MS realize detection of small and high molecules (Anal. Chem. 2008, 2011. Analyst 2012, 2015).

The ionization ability of the nano-PALDI for 2-OAm was confirmed. 2-OAm was applied to mice skin and it permeated through the skin and accumulated in the liver. In livers of single dose mice, 2-OAm was delivered to the liver for 6 hours and excreted from the liver for 24 hours. On the other hand, in livers of long apply mice, 2-OAm was retained in the liver. Furthermore, we could be revealed that 2-OAm was accumulated in bile ducts by analyzing at a high resolution. In addition, CD8 staining indicated that an inflamed bile duct was observed. 2-OAm triggered the inflammation due to a coincident localization of 2-OAm and bile duct. This imaging approach is a promising technique for rapid quality evaluation of xenobiotics¹⁾.

1. 緒 言

我々は、日常より多くの生体異物(Xenobiotics)に囲ま れて生活している。もちろん、病気になった際に治療薬と して使用される薬剤もあるが、それ以外に意図せずに摂食・ 摂取している物質、Xenobioticsがある。その中には「毒物」 「薬」といった扱いをされていない物質も多い。個々の物質 は厳密な安全性試験をクリアしているが、それらが体内の どこに蓄積され、種々の代謝を受けた場合、どのような影 響を受けるのかについては十分に分かっていない。

通常、こういった分析は生検材料、外科手術で摘出され た種々の臓器を用いて、ヘマトキシリン&エオジン(HE) 染色などによる形態診断が基本である。しかし、

- 1. 経皮吸収後の標的物質自体の体内動態を視覚的に表 すのは困難。
- 2. 標的物質と疾病との直接の因果関係を科学的に見る のは困難。

以上のことから、検査に3日以上を要することになる。そ こで、新しい技術や手法の導入が求められている(図1)。

もし、肌に直接塗布する化粧品類に含まれる化学物質が、 経皮吸収されているのか、吸収されたならば「どこ」の「ど



Liver disease risk of xenobiotics due to percutaneous absorption revealed by Nano-PALDI imaging mass spectrometry¹⁾ Shu Taira

Fukui Prefectural University, Department of Bioscience

のような」形で移動し生体に影響を及ぼすのか視覚的に表 すことができれば、安全性の知見を与えることができる。

1.1. 化粧品類に含まれる化学物質の体内動態の可視 化と生体への影響

最近、食品添加物や化粧品などに含まれる成分の中に自 己免疫疾患に関与していることが報告され、Xenobiotics として注目されている。例えば、中年女性に好発する自 己免疫性の肝臓の炎症では、ミトコンドリアに対する自 己抗体が100%の症例に出現するが、その対応抗原(ミト コンドリア内膜の呼吸酵素であるPDC-E2)と極めて類似 する構造を有する Xenobiotics が複数存在し、患者血清の 多くがそれらXenobioticsと反応することが報告されてい る。共同研究者の常山らは、これらの Xenobiotics の1つ である、2オクチン酸メチル (2-OAm:分子量 154) をマウ スの腹腔内に連続投与し、抗ミトコンドリア抗体の出現と ともに、PBCに特異的な胆管障害像が出現したことから、 2-OAmへの持続的な曝露がPBC発症のトリガーとなって いる可能性を報告している²⁾。2-OAmは化粧品や食品添 加物に含有されており、2-OAmの皮膚から肝臓への移行、 蓄積と、それを標的にした免疫異常が起きている可能性が 示唆されるが、2-OAmなどの低分子 Xenobiotics は、特異 抗体が存在しないため、その体内での局在についてはこれ までまったく解析がなされていないのが現状である。

本報告では、マウスを用いて2-OAmをXenobioticsとし て経皮的に投与し、臓器中への移行と蓄積の有無について 検討する。また、臓器移行が確認された際には、長期経皮 曝露を行い、Xenobioticsの蓄積の有無を検討した。 経皮的に曝露されたXenobioticsが、どの細胞に蓄積し、 周囲にどのような炎症が惹起されているか、という二次元 情報が極めて重要である。これまで経皮吸収の評価は投与 皮膚、内臓サンプルを磨りつぶした後、クロマト手法で得 た結果と併せて、浸透イメージを想像してきた。本研究で は、2つの技術をハイブリッドすることで、組織標本上の Xenobioticsの経皮吸収による体内動態の解析を目指した。 以下に、その本研究の核となる技術を簡単に記述した。

1.2. Xenobiotics (低分子物質)の新規検出法

一般的にガスクロマトグラフィー(GC)や、液体クロ マトグラフィー(LC)を組み合わせた質量分析法(GC-MS、 LC-MS)は、定量性に優れていることから、化学物質の 分析法として頻用される。通常、生体物質は複数の物質 から構成されており、検出する際には、標的物質である Xenobioticsを抽出するための前処理を行う必要がある。 物質毎の特性によって前処理条件も異なり、複数の処理工 程を要するため煩雑である。マトリクス支援型レーザー脱 離イオン化(MALDI)質量分析(MS)法は、混合物でも高率 に検出が行えるため本研究に適している。ここで、一つ問 題がある。MALDIで用いるイオン化支援剤は、一般的に 有機物が多用される。この有機物マトリクス自身がイオン 化することで、低分子領域にシグナルとして検出され、標 的物質がバックグラウンドに埋もれてしまい解析が困難に なる場合が多い。近年、低分子検出、イメージングを目的 に、ナノ微粒子をイオン化支援剤とするナノ微粒子支援型 レーザー脱離イオン化 (Nano-Particle Laser Desorption/ Ionization: Nano-PALDI) MS法³⁻⁶⁾が開発されている。本 法は、直径数ナノメートルの金属酸化物粒子に表面修飾な どを施した物質で、レーザーエネルギーを受け取ると、ナ ノ微粒子自体はイオン化せず、近接する物質のみをイオン 化する特性を示す。例として、農薬(カルベンダジム:分 子量:191)をイオン化した場合の両者のMSスペクトルを 図2に示す。Nano-PALDI法(図2a)ではサンプルのみイ オン化しているのが分かる。ナノ微粒子自体はイオン化 せず (図 2b)、サンプルも自己イオン化していない条件(図 2c) である。MALDI法では(この場合、有機マトリクスと してCHCA (Mw: 189) を使用)、有機マトリクス自体が イオン化し、様々な付加体としてシグナルが低分子領域に 現れ、目的物質が検出できない(図2d)。従来、MALDI法 は高分子解析に用いる手法であり、Nano-PALDI法と使 い分けることで低~高分子までの広範囲な検出が可能に なる。 さて、Xenobioticsは低分子量(>500)のものが多く、 今回の標的物質の2-OAm(分子量:154)も例外ではない ため、検出法としてNano-PALDI法を採用した。

1.3. イメージング質量分析 (IMS)^{7,8)}

イメージング技術は、生物(例:免疫染色による神経細 胞成長観察)、化学(赤外分光イメージングによる基板上の 異物検出)、物理学(トンネル顕微鏡による薄膜解析)と多



- 97 -

くの分野で用いられる手法である。

近年、組織切片上を2次元的にMSし、多数のMSスペ クトルか注目するシグナル(標的物質)のみを抽出し、2次 元画像とすることで標的物質の局在解析を行う、「IMS」法 (図3)が開発された。利点として、一度の測定で、一枚の 切片から抗体や染色材を必要とせず、複数の標的物質の局 在を解析できることが挙げられる。また、特に特殊なMS 装置を必要とせず、MALDI MS装置と専用ソフトがあれ ばよい。主に、医学、生理学分野での研究例⁹⁻¹²⁾が多いが、 最近では工、農学分野でも注目されている技術である¹³⁻¹⁸⁾。 IMS法で農産物内の農薬の解析することは特殊な前処理 も必要とせず、得られたMSスペクトルから標的物質の質 量を選択するだけで、局在情報も得られることから簡便で、 有用である。今回、標的物質である Xenobiotics、2-OAm は、 低分子イメージングに相当するため、Nano-PALDI IMS 法を採用した。

2. 実 験

2.1. 2-OAm 単回塗布マウスの作成

4 週齢のICR(♀)マウスの背中に、2-OAm(0.1%)を 単回塗布し、1, 3, 6, 24 時間後に肝臓を採取した。

2.2. 2-OAm長期塗布マウスの作成

4週齢のICR(♀)マウスの背中に、2-OAm(0.1%)を、 1週間に1回のペースで塗布、これを19週連続で行った。 その後、肝臓を採取した。

2.3. Nano-PALDI法で用いるナノ微粒子の合成

本研究で用いるナノ微粒子は金属酸化物をコアとし、その表層をSi-Oが覆い、表面より水酸基とアミノ基が露出している構造である。以下、調製法を示す。3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)(信越化学)溶液(22 M)と、8種類の金属塩化物溶液(FeCl₂・4H₂O)(0.1 M)

 (東京化成)を混合し、室温にて60分間攪拌した。遠心 分離操作により未反応物を除去したのち、超純水で洗浄 し、沈殿物をナノ微粒子サンプルとして回収した。得られ たナノ微粒子について、赤外分光法(IR:Spectrum One; Perkin Elmer, USA)、透過型電子顕微鏡(TEM:H-7100; Hitachi, Japan)とX線回折(XRD:MiniFlex II; Rigaku, Japan)を用いて評価を行った。

2.4. Nano-PALDI MS

2-OAm (10 pmol) と酸化鉄ナノ微粒子 (1 mg/mL:メ タノール) と混合し、ターゲットプレートに滴下、乾燥さ せてから MS測定を行った。検出イオンはポジティブイオ ンとした。

2. 5. Nano-PALDI IMS

マウスの肝臓の凍結切片(厚さ:25µm)を導電性透明電 極であるインジウムチンオキサイド(ITO)ガラス上に作 成後、イオン化支援剤として、酸化鉄ナノ微粒子(1mg/ mL:メタノール、8mL)をスプレーヤーで塗布した。ポ ジティブモードでIMSを行った。切片上から2-OAmが検 出できるかを確認するために、コントロールマウスの切片 に2-OAmを滴下し、その部位をイメージングした。レー ザー照射間隔は70µmとした。

イメージングMSの画像解像度は、レーザー照射間隔に 依存しており、照射間隔が狭いほど画像が鮮明になる。通 常のMALDIでは有機マトリクスを使用する。有機マトリ クスが切片上で標的物質を抽出、共結晶(結晶の大きさ: 30-50 μm)を形成する。そのために共結晶以下のレーザ ー照射間隔を用いてイメージングしても正しい局在解析が できない場合がある。Nano-PALDI法は、標的物質と共 結晶を形成せずにイオン化を行う方法であり、高解像度イ メージングが可能になる(図4)。



2.6. 高解像度Nano-PALDI IMS

マウスの肝臓の凍結切片(厚さ:25 µm)を導電性透明電 極であるインジウムチンオキサイド(ITO)ガラス上に作 成後、イオン化支援剤として、酸化鉄ナノ微粒子(1 mg/ mL:メタノール、8mL)をスプレーヤーで塗布した。ポジ ティブモードでIMSを行った。レーザー照射間隔は25 µm とした。

3. 結果と考察

3.1. ナノ微粒子の特性評価

合成したナノ微粒子の物理化学的性質を調べた。

Feをコアとして合成したナノ微粒子(以下、Feナノ微 粒子)のデータを図4に示す。X線回折(XRD)により構造 解析を行った結果、2*θ*=35°と、63°に、ミラー指数(hkl)、(1 30)、(330)、(060)が観測され、データベースと照合 した結果、酸化鉄をコアとすることが分かった。また、鉱物に見られる、コランダム構造を単位とするマコーレート 様構造であると決定した(図5a)。IRスペクトル測定では、 O-H(3,400-3,100 cm⁻¹)、C-H(3,000-2,830 cm⁻¹)、N-H (1,640-1,560 cm⁻¹)および、Si-O(1,000-800 cm⁻¹: デー タ非表示)の伸縮振動ピークが検出され、表面に水酸基、ア ミノ基およびSi-O層が存在することが確認された(図5b)。 TEM 観察の結果、粒径は3.6±0.1 nmであり、単分散にナ ノ微粒子が合成されていることが分かった(図5c)。これ らの結果より、Feナノ微粒子は、鉄酸化物をコア成分とし、 その周りを水酸基およびアミノ基、シラノール基で被覆さ れたナノ微粒子であることが示された。

3.2.2-OAmの質量分析実験

標的物質がNano-PALDI MS法で検出されることを確





認するために、標準品を用いて実験を行った。[M+H]⁺ と [M+Na]⁺である *m*/*z*155.1, 177.1 が検出された。次に、 肝臓切片上に 2-OAmを滴下し、その部位を MS、IMS し たところ、滴下していない肝臓と比較すると、2-OAm滴 下肝臓からは *m*/*z*155.1, 177.1 が検出された。強度比は 1: 10 であった。

組織上の2-OAmがNano-PALDI MS法で検出可能なこ とを示した。また、Nano-PALDI法ではナトリウム付加 体を優先的にイオン化することが分かっている⁶⁾のでイメ ージする標的シグナルを*m/z*177.1とした。

3.3.2-OAm 単回塗布マウスの IMS

マウスの皮膚に2-OAmを塗布後、肝臓のNano-PALDI イメージングMSを行った。標的シグナルは2-OAmの ナトリウム付加体である*m/z*177.1である。その結果、 2-OAmを皮膚に塗布してから6時間後に肝臓に2-OAm が確認され、24時間後にはほぼ排出されていることが分 かった(図2A)。強度比は、コントロール:投与後1時間: 3時間:6時間:24時間=1:2:4:12:1 であった(図6)。 2-OAm長期塗布マウスのIMS

2-OAmを皮膚に長期間塗布したマウスの肝臓を用いて、 2-OAmの蓄積部位を検討した。その結果、2-OAmが単 回塗布と違い、体外へ排出されず肝臓に蓄積していること が視覚的に分かった(図7)。これは、化粧品や染毛剤など 長期に渡り使用している患者が肝臓疾患(炎症)を起こして いることに関係があることを示している。

2-OAm 長期塗布マウスの高解像度 IMS

2-OAmを皮膚に長期間塗布したマウスの肝臓をヘマト キシリン-エオジン(HE)染色したところ、コントロールで は胆管が観察できるのに対し、2-OAm群では胆管が潰れ ており観察が困難であった(図8)。

そこで、連続切片を用いて、炎症の有無を確認するため



図7 長期塗布のマウスの肝臓イメージング MS 像



図 8 HE staining of liver without (a) and with 2-OAm(b)

にCD8 染色を行った。その結果、胆管付近はCD8 陽性を 示し、炎症が強く引き起こされていることが分かった。そ の同一部分に対してIMS(レーザー照射間隔 25 μm)を行 った。炎症を起こしている部分に 2-OAmが局在している ことが明らかになった(図 9)。

別途、液体クロマトグラフィにより定量したところ、長 期塗布群のマウス肝臓からは8.32 µg/g-liverの2-OAmが 蓄積していた。

4. 総 括

4.1. 薬剤送達・炎症の機序の視覚的解明

本結果は非常に興味深い。2-OAmはミトコンドリア内 膜の呼吸酵素 (mitochondrial intima respiratory enzyme) の抗原として反応し、炎症を引き起こすことが知られてい るが¹⁹⁾、2-OAmが経皮吸収により内臓 (肝臓)に送達され ること、それが長期塗布により胆管付近に蓄積すること、 それにより炎症が引き起こされることを初めて視覚的に明 らかにした。

4.2. 間接的から直接的なデータ表示へ

これまでの薬剤の経皮吸収の浸透具合、体内動態は、標 本サンプルから抽出した溶液をHPLCなどクロマトグラフ ィカルなデータを基に浸透イメージ(想像)をコンピュータ ーグラフィックに直すことで表す間接的な手法とも言える。 イメージング質量分析で表すイメージはサンプル切片上 にある標的物質の局在を直接表した物であり、経皮吸収の 有無、浸透性、安全性の確保を一般消費者へ科学的根拠を 視覚的にアピールすることができる。

4.3. 基礎-、応用コスメトロジー両面の貢献へ

薬剤の経皮暴露による2-OAの肝臓へのダメージを視覚 的に表すことを通して、安全性、有効性を示すことを目指 す。得られた化粧品とはその殆どが皮膚への塗布であるか ら、本研究で得られた知見はコスメトロジー分野において 基礎的な情報(浸透性)と、生体への影響(応用)の両面に貢 献できる。

4.4. 新規評価法の提示

イメージング質量分析の化粧品学への応用は例が少なく、 今回の研究は特許取得可能であり、その普及は、国際競争 力を高めるだけでなく、国際標準化策定にも、一つの方 向性を示すことになる。また、本評価技術が確立できれば、 生物全般の幅広い分野に利用でき、イノベーションの創出



☑ 9 7 High-spatial resolution nano-PALDI IMS of 2-OAm from mouse liver for long period of application. HE (a) and CD8 (b) stained images of liver tissues of 2-OAm-apppled; MS spectra reconstructed as ion images of 2-OAm at 25 µm in mouse liver (c); merged CD8 and ion image(d). Scale bar is 200 µm.

につながる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、適切なご助言をしていただ いた徳島大学(医)、常山幸一先生、帝京大学(医)菊池先生 に心から感謝申し上げます。イメージング質量分析を行う に辺り、装置を使用させていただいた北陸先端科学技術大 学院大学・ナノテクプラットホーム事業とご担当いただい た宮里明夫先生に感謝いたします。

(引用文献)

- Taira, S.; N. Yamaguchi; S. Morimoto; Y. Tatsuta;
 H. Katano; Y. Ichiyanagi; K. Tsuneyama;K. Kikuchi International Journal of Recent Scientific Research, 7, 12589-12592. (2016)
- Wakabayashi, K.; Z.-X. Lian; P. S. C. Leung; Y. Moritoki; K. Tsuneyama; M. J. Kurth; K. S. Lam; K. Yoshida; G.-X. Yang; T. Hibi; A. A. Ansari; W. M. Ridgway; R. L. Coppel; I. R. Mackay; M. E. Gershwin *Hepatology*, 48, 531-540. (2008)
- Komori, H.; R. Hashizaki; I. Osaka; T. Hibi; H. Katano; S. Taira *Analyst*, 140, 8134-8137. (2015)
- Taira, S.; I. Osaka; S. Shimma; D. Kaneko; T. Hiroki;
 Y. Kawamura-Konishi; Y. Ichiyanagi *Analyst*, 137, 2006-2010. (2012)
- Taira, S.; Y. Sahashi; S. Shimma; T. Hiroki;Y. Ichiyanagi Anal. Chem., 83, 1370-1374. (2011)
- Taira, S.; Y. Sugiura; S. Moritake; S. Shimma; Y. Ichiyanagi; M. Setou *Anal. Chem.*, **80**, 4761-4766. (2008)
- Stoeckli, M.; P. Chaurand; D. E. Hallahan; R. M. Caprioli *Nat. Med.*, 7, 493-496. (2001)
- Caprioli, R. M.; T. B. Farmer; J. Gile Anal. Chem., 69, 4751-4760. (1997)
- 9) Waki, M. L.; K. Onoue; T. Takahashi; K. Goto; Y.

Saito; K. Inami; I. Makita; Y. Angata; T. Suzuki; M. Yamashita; N. Sato; S. Nakamura; D. Yuki; Y. Sugiura; N. Zaima; N. Goto-Inoue; T. Hayasaka; Y. Shimomura;M. Setou *PLoS ONE*, **6**, e26721. (2011)

- 10) Sugiura, Y.; R. Taguchi;M. Setou *PLoS One*, **6**, e17952. (2011)
- Morita, Y.; K. Ikegami; N. Goto-Inoue; T. Hayasaka;
 N. Zaima; H. Tanaka; T. Uehara; T. Setoguchi; T. Sakaguchi; H. Igarashi; H. Sugimura; M. Setou; H. Konno *Cancer Science*, 101, 267-273. (2010)
- 12) Taira, S.; M. Hashimoto; K. Saito; O. Shido *J. Biophys. Chem.*, **3**, 221-226. (2012)
- Zaima, N.; T. Hayasaka; N. Goto-Inoue;M. Setou International Journal of Molecular Sciences, 11, 5040-5055. (2010)
- 14) Zaima, N.; N. Goto-Inoue; T. Hayasaka;M. Setou Rapid Commun. Mass Spectrom., 24, 2723-2729. (2010)
- 15) Suzuki, T.; H. Fujiwake;K. Iwai *Plant Cell Physiol.*, 21, 839-853. (1980)
- 16) Yoshimura, Y.; H. Enomoto; T. Moriyama; Y. Kawamura; M. Setou;N. Zaima Analytical and Bioanalytical Chemistry, 1-11.
- 17) Taira, S.; D. Kaneko; K. Onuma; A. Miyazato;
 T. Hiroki; Y. Kawamura-Konishi;Y. Ichiyanagi International Journal of Inorganic Chemistry, 2012, 7. (2012)
- 18) Taira, S.; R. Ikeda; N. Yokota; I. Osaka; M. Sakamoto;
 M. Kato; Y. Sahashi Am. J. Chin. Med., 38, 485-493.
 (2010)
- 19) Amano, K.; P. S. C. Leung; R. Rieger; C. Quan; X. Wang; J. Marik; Y. F. Suen; M. J. Kurth; M. H. Nantz; A. A. Ansari; K. S. Lam; M. Zeniya; E. Matsuura; R. L. Coppel;M. E. Gershwin *The Journal of Immunology*, 174, 5874-5883. (2005)