Imaging mass spectrometry reveals sodium lauryl sulfate-induced changes in skin lipoquality, principally affecting sphingomyelin

メタデータ	言語: en 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2019-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 齋藤, 祐介 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003564

博士（医学）　齋藤　祐介

論文題目

Imaging mass spectrometry reveals sodium lauryl sulfate-induced changes in skin lipoquality, principally affecting sphingomyelin

（質量顕微鏡法によるスフィンゴミエリンに影響を与えるラウリル硫酸ナトリウム誘発性の皮膚脂質の変化の解明）

論文の内容の要旨

［はじめに］

皮膚のバリア機能は、主に脂質の構成要素によって決まる。したがって、これらの表皮脂質の定性的および定量的バランスを維持することは非常に重要である。親水性洗剤のラウリル硫酸ナトリウム（SLS）は、洗剤や化粧品に広く使用されており、水溶液の表面張力を下げる界面活性物質として作用し、脂質膜を溶解することができる。界面活性剤を含んだスキンクレンザーの主な機能は、肌の表面から汚れを取り除くことであるが、有用な脂質の除去にもつながるため皮膚のバリア機能が低下してしまう。これまで、SLS による皮膚刺激について多くの研究が研究されているが、メカニズムに関与する特定の分子は未だ解明されていない。

質量顕微鏡法（IMS）は、1 回の測定で組織切片内の多数の分子を同時にマッピングできる強力なツールである。イメージング機器として質量分析計を使用するには、分光計に自動ラスタリング機能、自動データ収集システム、および可視化ソフトウェアを装備する必要がある。我々のグループは、島津製作所と共同で独自の装置を開発し、Imaging MS Solution（Shimadzu®）と呼ばれる可視化ソフトウェアを用いてマウスの脳、肝臓、精巣、網膜、ヒトの結腸癌などのさまざまな組織サンプルの分子プロファイリング技術を拡張した。本研究では IMS を使用して、皮膚バリア機能にとって重要である皮膚の脂質に対する SLS の効果を明らかにした。

［方法］

8 週齢 C57BL/6J 雄性マウスを飽水クロラールで麻酔下とし、足を 5% SLS 水溶液に 60 分間接触させることで SLS を皮膚に経皮投与した。無処置対象として生理食塩水を適用した。投与終了後は 10 分間生理食塩水に足を沈め洗浄した。さらに 5%トリパンブルー（TB）水溶液に 60 分間足浸漬後、生理食塩水で洗浄した。頸椎脱臼にて安楽死させ、液体窒素で凍結し、足の肉球周辺の皮膚をクライオスタットを用いて凍結切片を作成した。光学顕微鏡を用いて皮膚の断面の画像を撮影し、Adobe Photoshop ™ と ImageJ を用いて TB の浸漬状態を解析した。IMS の測定では同様に動物実験を行い、60 分間の 5% SLS 水溶液処理、10 分間の洗浄で投与を終了し凍結切片を作成した。マトリックスは 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)を使用した。IMS 測定時のレーザー照射間隔は 10 μ m とした。測定で得られたデータは Imaging MS Solution software (ver.1.01.02,

Shimadzu)を用いて解析した。

［結果］

生理食塩水または SLS で処理したマウスの足への TB の浸透を調べ、主に角質層の染色を観察した。SLS 適用群では均一な染色で、局所染色が生理食塩水群で見られた。それらの画像をソフトウェアを用いて数値化し比較したところ、浸透度合いは生理食塩水で処理した皮膚では SLS で処理した皮膚よりも有意に高かった。SLS の浸潤およびその皮膚への影響は、IMS を用いて評価した。マトリックス溶液と SLS を混合し、無処置のマウス切片上へ滴下しその領域を MS 測定すると、*m/z* 265.15 にピークが認められた。このピークをプリカーサーイオンとして MS/MS 測定を行ったところ、SLS が断片化して得られたイオンと考えられる *m/z* 96.96 にピークが認められたことから、*m/z* 265.15 は SLS であることが確認できた。5%SLS 水溶液に 60 分間浸漬したマウスの足の皮膚の断面の凍結切片を作成し、IMS で断面をイメージングしたところ、SLS が表皮から真皮まで達していることが明らかとなった。さらに、IMS によってマウス足皮膚の脂質に対する SLS の効果を分析すると、皮膚に存在する様々な脂質をイメージングすることができた。得られた画像のヒストグラムを作成して比較し、皮膚表面領域のスペクトル強度を数値化して比較したところ、スフィンゴミエリン（SM）に関連する *m/z* 817.71 が皮膚表面から有意に除去されている様子が観察された。

［考察］

皮膚に残っている薬物の測定は、一般にテープストリッピング法やオートラジオグラフィーを用いた定量分析によって行われるが、これらは高価な試薬を扱い、また手間がかかる。IMS を使用することにより、これらの問題に関係なく薬物を容易に視覚化することができる。IMS により SLS が皮膚表面上で高い強度を示し、そして真皮に達することがわかった。このようにして、皮膚に残っている物質を可視化することで、皮膚に対する物質の特性およびそれらの毒性の評価を容易にすることができる。可視化されたデータはそれぞれの位置情報とスペクトル強度を示しているので、各組織における標的物質の存在を確認し、ソフトウェアを用いて試料の任意の領域を選択して比較することが可能である。SLS は皮膚の上層から下層に段階的に浸潤するため、角質層のバリア機能が破壊され浸潤していたと考えられる。

IMS の測定で顕著な変化を示した *m/z* 817.71 は皮膚に多く存在する SM（d18: 0/ 24: 0）であると考えられた。これは皮膚表面に存在し、SLS の影響を受け易く界面活性剤特有の脂質抽出効果のために除去されたと考えられる。したがって、SM （d18: 0 / 24: 0）の皮膚バリア機能への関与が示唆される。

［結論］

本研究では、安全で安価、迅速な薬品評価方法として IMS を使用することによってその有用性を実証した。IMS は SLS の皮膚への浸潤が深部まで及んでいることを視覚化することを可能にした。また、皮膚脂質の変化を視覚化することもできた。