

- Nemes, P., Woods, A. S., & Vertes, A. (2010). Simultaneous imaging of small metabolites and lipids in rat brain tissues at atmospheric pressure by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *82*, 982–988.
- Nicholson, J. K., & Lindon, J. C. (2008). Systems biology: Metabonomics. *Nature*, *455*, 1054–1056.
- Northen, T. R., Yanes, O., Northen, M. T., Marrinucci, D., Uritboonthai, W., & Apon, J. (2007). Clathrate nanostructures for mass spectrometry. *Nature*, *449*, 1033–1036.
- Novartis, Basel, Switzerland. Retrieved from <http://www.maldi-msi.org>.
- Novotny, M. V., Soini, H. A., & Mechref, Y. (2008). Biochemical individuality reflected in chromatographic, electrophoretic and mass-spectrometric profiles. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies for the Biomedical and Life Sciences*, *866*, 26–47.
- Oresic, M., Hanninen, V. A., & Vidal-Puig, A. (2008). Lipidomics: A new window to biomedical frontiers. *Trends in Biotechnology*, *26*, 647–652.
- Patti, G. J., Shriver, L. P., Wassif, C. A., Woo, H. K., Uritboonthai, W., Apon, J., . . . Siuzdak, G. (2010). Nanostructure-initiator mass spectrometry (NIMS) imaging of brain cholesterol metabolites in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Neuroscience*, *170*, 858–864.
- Petkovic, M., Schiller, J., Muller, M., Benard, S., Reichl, S., Arnold, K., & Arnhold, J. (2001). Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: Phosphatidylcholine prevents the detection of further species. *Analytical Biochemistry*, *289*, 202–216.
- Piehowski, P. D., Carado, A. J., Kurczy, M. E., Ostrowski, S. G., Heien, M. L., Winograd, N., & Ewing, A. G. (2008). MS/MS methodology to improve subcellular mapping of cholesterol using TOF-SIMS. *Analytical Chemistry*, *80*, 8662–8667.
- Pol, J., Strohal, M., Havlicek, V., & Volny, M. (2010). Molecular mass spectrometry imaging in biomedical and life science research. *Histochemistry and Cell Biology*, *134*, 423–443.
- Pulfer, M., & Murphy, R. C. (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*, *22*, 332–364.
- Puolitaival, S. M., Burnum, K. E., Cornett, D. S., & Caprioli, R. M. (2008). Solvent-free matrix dry-coating for MALDI imaging of phospholipids. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *19*, 882–886.
- Reyzer, M. L., Hsieh, Y., Ng, K., Korfmacher, W. A., & Caprioli, R. M. (2003). Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, *38*, 1081–1092.
- Ronci, M., Bonanno, E., Colantoni, A., Pieroni, L., Di Ilio, C., Spagnoli, L. G., . . . Urbani, A. (2008). Protein unlocking procedures of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Application to MALDI-TOF imaging MS investigations. *Proteomics*, *8*, 3702–3714.
- Rubakhin, S. S., Jurchen, J. C., Monroe, E. B., & Sweedler, J. V. (2005). Imaging mass spectrometry: Fundamentals and applications to drug discovery. *Drug Discovery Today*, *10*, 823–837.
- Rujoi, M., Estrada, R., & Yappert, M. C. (2004). In situ MALDI-TOF MS regional analysis of neutral phospholipids in lens tissue. *Analytical Chemistry*, *76*, 1657–1663.
- Schiller, J., Arnhold, J., Benard, S., Muller, M., Reichl, S., & Arnold, K. (1999). Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach. *Analytical Biochemistry*, *267*, 46–56.
- Schmitz, G., & Ruebsaamen, K. (2010). Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, *208*, 10–18.
- Schwamborn, K., Krieg, R. C., Reska, M., Jakse, G., Knuechel, R., & Wellmann, A. (2007). Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging. *International Journal of Molecular Medicine*, *20*, 155–159.
- Schwartz, S. A., Reyzer, M. L., & Caprioli, R. M. (2003). Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Practical aspects of sample preparation. *Journal of Mass Spectrometry*, *38*, 699–708.

- Schwartz, J. C., Senko, M. W., & Syka, J. E. P. (2002). A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *13*, 659–669.
- Seeley, E. H., Oppenheimer, S. R., Mi, D., Chaurand, P., & Caprioli, R. M. (2008). Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *19*, 1069–1077.
- Setou, M., Hayasaka, T., Shimma, S., Sugiura, Y., & Matsumoto, M. (2008). Protein denaturation improves enzymatic digestion efficiency for direct tissue analysis using mass spectrometry. *Applied Surface Science*, *255*, 1555–1559.
- Setou, M., Shrivas, K., Sroyraya, M., Yang, H., Sugiura, Y., Moribe, J., . . . Konishi, Y. (2010). Developments and applications of mass microscopy. *Medical Molecular Morphology*, *43*, 1–5.
- Shimma, S., Sugiura, Y., Hayasaka, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., & Setou, M. (2007). MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *855*, 98–103.
- Shimma, S., Sugiura, Y., Hayasaka, T., Zaima, N., Matsumoto, M., & Setou, M. (2008). Mass imaging and identification of biomolecules with MALDI-QIT-TOF-based system. *Analytical Chemistry*, *80*, 878–885.
- Shrestha, B., Nemes, P., Nazarian, J., Hathoutn, Y., Hoffman, E. P., & Vertes, A. (2010). Direct analysis of lipids and small metabolites in mouse brain tissue by AP-IR-MALDI and reactive LAESI mass spectrometry. *Analyst*, *135*, 751–758.
- Shrivas, K., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Sugiura, Y., Zaima, N., & Setou, M. (2010). Ionic matrix for enhanced MALDI imaging mass spectrometry for identification of phospholipids in mouse liver and cerebellum tissue sections. *Analytical Chemistry*, *82*, 8800–8806.
- Shrivas, K., Hayasaka, T., Sugiura, Y., & Setou, M. (2011). Method for simultaneously imaging of low molecular metabolites in mouse brain using TiO₂ nanoparticles in nanoparticle assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *83*, 7283–7289.
- Slaveykova, V. I., Guignard, C., Eybe, T., Migeon, H. N., & Hoffmann, L. (2009). Dynamic NanoSIMS ion imaging of unicellular freshwater algae exposed to copper. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *393*, 583–589.
- Slodzian, G., Daigre, B., Girard, F., Boust, F., & Hillion, F. (1992). Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection. *Biology of the Cell*, *74*, 43–50.
- Snel, M. F., & Fuller, M. (2010). High-spatial resolution matrix-assisted laser desorption ionization imaging analysis of glucosylceramide in spleen sections from a mouse model of Gaucher disease. *Analytical Chemistry*, *82*, 3664–3670.
- Sripadi, P., Shrestha, B., Easley, R. L., Carpio, L., Kehn-Hall, K., Chevalier, S., . . . Vertes, A. (2010). Direct detection of diverse metabolic changes in virally transformed and tax-expressing cells by mass spectrometry. *PLoS ONE*, *5*, e12590.
- Stauber, J., MacAleese, L., Franck, J., Claude, E., Snel, M., Kaletas, B. K., . . . Heeren, R. M. (2010). On-tissue protein identification and imaging by MALDI-ion mobility mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *21*, 338–347.
- Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E., & Caprioli, R. M. (2001). Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nature Medicine*, *7*, 493–496.
- Stuebiger, G., & Belgacem, O. (2007). Analysis of lipids using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as a matrix for MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *79*, 3206–3213.
- Sugiura, Y., Konishi, Y., Zaima, N., Kajihara, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., & Setou, M. (2009). Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, *50*, 1776–1788.

- Sugiura, Y., Shimma, S., Konishi, Y., Yamada, M. K., & Setou, M. (2008). Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PLoS One*, 3, e3232.
- Sugiura, Y., Taguchi, R., & Setou, M. (2011). Visualization of spatiotemporal energy dynamics of hippocampal neurons by mass spectrometry during a kainate-induced seizure. *PLoS One*, 6, e17952.
- Sunner, J., Dratz, E., & Chen, Y. C. (1995). Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions. *Analytical Chemistry*, 67, 4335–4342.
- Taban, I. M., Altelaar, A. F., van der Burgt, Y. E., McDonnell, L. A., Heeren, R. M., Fuchser, J., & Baykut, G. (2007). Imaging of peptides in the rat brain using MALDI-FTICR mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18, 152–161.
- Taira, S., Sugiura, Y., Moritake, S., Shimma, S., Ichiyanagi, Y., & Setou, M. (2008). Nanoparticle-assisted laser desorption/ionization based mass imaging with cellular resolution. *Analytical Chemistry*, 80, 4761–4766.
- Takats, Z., Wiseman, J. M., Gologan, B., & Cooks, R. G. (2004). Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, 306, 471–473.
- Takizawa, Y., Mizuta, K., Hayasaka, T., Nakanishi, H., Okamura, J., Mineta, H., & Setou, M. (2010). Specific localization of five phosphatidylcholine species in the cochlea by mass microscopy. *Audiology and Neurotology*, 16, 315–322.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., & Yoshida, T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2, 151–153.
- Tanaka, H., Zaima, N., Yamamoto, N., Sagara, D., Suzuki, M., Nishiyama, M., ... Setou, M. (2010). Imaging mass spectrometry reveals unique lipid distribution in primary varicose veins. *European Journal of Vascular Endovascular surgery*, 40, 657–663.
- Teuber, K., Schiller, J., Fuchs, B., Karas, M., & Jaskolla, T. W. (2010). Significant sensitivity improvements by matrix optimization: A MALDI-TOF mass spectrometric study of lipids from hen egg yolk. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163, 552–560.
- Tholey, A., & Heinzle, E. (2006). Ionic (liquid) matrices for matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry applications and perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 24–37.
- Thomas R. L., Jr., Matsko, C. M., Lotze, M. T., & Amoscato, A. A. (1999). Mass spectrometric identification of increased C16 ceramide levels during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 30580–30588.
- Touboul, D., Roy, S., Germain, D. P., Chaminade, P., Brunelle, A., & Laprevote, O. (2007). MALDI-TOF and cluster-TOF-SIMS imaging of Fabry disease biomarkers. *International Journal of Mass Spectrometry*, 260, 158–165.
- Touchstone, J. C. (1995). Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 671, 169–195.
- Verbeck, G., Ruotolo, B., Sawyer, H., Gillig, K., & Russell, D. (2002). A fundamental introduction to ion mobility mass spectrometry applied to the analysis of biomolecules. *Journal of Biomolecular Techniques*, 13, 56–61.
- Verhaert, P. D., Pinkse, M. W., Strupat, K., & Conaway, M. C. (2010). Imaging of similar mass neuropeptides in neuronal tissue by enhanced resolution MALDI MS with an ion trap-Orbitrap hybrid instrument. *Methods in Molecular Biology*, 656, 433–449.
- Vidova, V., Novak, P., Strohal, M., Pol, J., Havlicek, V., & Volny, M. (2010). Laser desorption-ionization of lipid transfers: Tissue mass spectrometry imaging without MALDI matrix. *Analytical Chemistry*, 82, 4994–4997.
- Walch, A., Rauser, S., Deininger, S. O., & Hofler, H. (2008). MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: A new frontier for molecular histology. *Histochemistry and Cell Biology*, 130, 421–434.

- Wang, H. Y., Chu, X., Zhao, Z. X., He, X. S., & Guo, Y. L. (2011). Analysis of low molecular weight compounds by MALDI-FTICR-MS. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879, 1166–1179.
- Wei, J., Buriak, J. M., & Siuzdak, G. (1993). Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nature*, 399, 243–246.
- Wiseman, J. M., Ifa, D. R., Zhu, Y., Kissinger, C. B., Manicke, N. E., & Kissinger P. T. (2008). Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105, 18120–18125.
- Wisztorski, M., Franck, J., Salzet, M., & Fournier I. (2010). MALDI direct analysis and imaging of frozen versus FFPE tissues: What strategy for which sample? *Methods in Molecular Biology*, 656, 303–322.
- Woods, A. S., Ugarov, M., Jackson, S. N., Egan, T., Wang, H. Y., Murray, K. K., & Schultz, J. A. (2006). IR-MALDI-LDI combined with ion mobility orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 5, 1484–1487.
- Wu, L., Lu, X., Kulp, K. S., Knize, M. G., Berman, E. S., Nelson, E. J., . . . Wu, K. J. (2007). Imaging and differentiation of mouse embryo tissues by ToF-SIMS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 260, 137–145.
- Yanes, O., Woo, H. K., Northen, T. R., Oppenheimer, S. R., Shriver, L., Apon, A., . . . Siuzdak, G. (2009). Nanostructure initiator mass spectrometry: Tissue imaging and direct biofluid analysis. *Analytical Chemistry*, 81, 2969–2975.
- Yang, H. J., Sugiura, Y., Ishizaki, I., Sanada, N., Ikegami, K., Zaima, N., . . . Setou, M. (2010). Imaging of lipids in cultured mammalian neurons by matrix assisted laser/desorption ionization and secondary ion mass spectrometry. *Surface and Interface Analysis*, 42, 1606–1611.
- Yao, I., Sugiura, Y., Matsumoto, M., & Setou, M. (2008). In situ proteomics with imaging mass spectrometry and principal component analysis in the Scrapper-knockout mouse brain. *Proteomics*, 8, 3692–3701.
- Zaima, N., Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., & Setou, M. (2010). Application of imaging mass spectrometry for the analysis of *Oryza sativa* rice. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 24, 2723–2729.
- Zaima, N., Matsuyama, Y., & Setou, M. (2009). Principal component analyses of direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric data related metabolites of fatty liver. *Journal of Oleo Science*, 58, 267–273.
- Zhang, H., Cha, S., & Yeung, E. S. (2007). Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization MS and MSⁿ of small molecules. 1. Direct profiling and MS imaging of small metabolites from fruits. *Analytical Chemistry*, 79, 6575–6584.

医学・薬学分野における 質量顕微鏡法の利用



門脇 慎^{*1)}・稲見 勝朗^{*2)}・脇 紀彦^{*3)}
高橋 司^{*4)}・後藤 健介^{*5)}・瀬藤 光利^{*6)}

質量顕微鏡法は、位置情報を保ちつつ試料切片中の構成分子をイオン化し、イオンの質量電荷比の違いによって分離・検出し、任意の分子の分布を画像化する手法である。この方法は、標識を行うことなく、網羅的に生体分子の分布を可視化できる点で革新的である。現在、医学・薬学分野における利用が進められている。我々は、質量顕微鏡法を用いてアテローム性動脈硬化組織の脂質解析を行い、脂質分子の分子種を同定した。また、マウス全身切片を用いてファモチジンの薬物動態の解析を行い、質量顕微鏡法が有用な解析ツールとなり得ることを実証した。

1. はじめに

医学や薬学の分野で行われる研究では、薬物の動態や、病理組織特異的な代謝産物の分布を調べることがある。これらに共通しているのは、生体組織において、注目する分子の所在を調べることである。そのために従来は、放射性同位体により標識された薬物や、対象分子に特異的に結合する抗体によって分子の存在を可視化する方法が用いられてきた。

前者の手法では、観察の対象にできるのは既に特定されている分子のみであり、その上、実験者に健康リスクが生じる。また、後者の手法では、一度に多数の分子について解析を行うことができない。質量顕微鏡法は、これらの問題を解決した手法である。

本稿では質量顕微鏡法の原理と、医学・薬学分野における応用例を紹介する。

2. 原理

質量顕微鏡法は、質量分析法から得られる情報をひとつ上の次元に高めたものである。質量分析法とは、試料分子をイオン化し、イオンの質量電荷比 (m/z) によって分離し、分子量を測定する手法である。この質量分析の対象を2次元に拡大した、質量顕微鏡法の原理について述べてい

図1に質量顕微鏡法の一連の流れを示す。生体試料を薄い切片とし、その上をレーザーで2次元走査することにより構成分子のイオン化を行い、照射点ごとに生じたイオンを質量分析部で分離し、検出する。2次元平面上の各測定点について、検出したイオンの m/z を横軸に、イオンの相対検出量を縦軸にとったグラフが描ける。(これをマススペクトルという)。得られたマススペクトル群から注目するイオンのピークを抽出し、測定点ごとにそのイオンの検出強度を色調の情報に置き換

*浜松医科大学解剖学講座細胞生物学分野

¹⁾(かどわき・まこと) ²⁾(いなみ・かつあき) ³⁾(わき・みちひこ)

⁴⁾(たかはし・つかさ) ⁵⁾(ことう・けんすけ) ⁶⁾教授(せとう・みつとし)

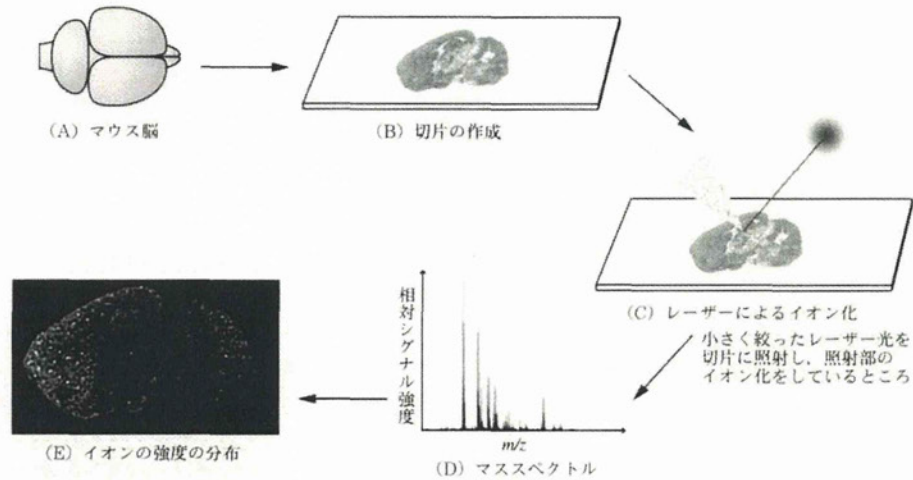


図1 質量顕微鏡法の流れ

マウス脳の解析を例として示した。作成した切片に小さく絞ったレーザー光を照射し、照射点のマススペクトルを得る。全照射点の情報を処理することにより、任意の m/z を持つイオンの検出強度の分布が画像化できる。

(文献1より)

えて示す。これにより、イオンの強度を分布図として画像化することにより、着目する分子の試料切片上の分布が可視化される¹⁾。

3. 医学・薬学分野における応用例

1) 医学分野における応用例

～病理組織の解析～

医学分野での応用の例として、アテローム性動脈硬化組織の脂質解析について述べる。脂質の解析を行う場合、一般的には組織化学染色が用いられる。しかしこの方法では、脂質分子の分子種を識別して可視化することはできない。これに対し、質量顕微鏡法では以下のような解析が可能である。

我々は、末梢性閉塞性疾患患者の大腿動脈から得たアテローム性動脈硬化組織について質量顕微鏡解析を行い、得られた分子の局在情報を、組織学的染色による細胞の位置情報と比較した²⁾。その結果、Lipid rich region や血管平滑筋細胞にいくつかの脂質分子が局在していることが明らかとなり、分子種の局在に基づき動脈硬化組織をいくつかの領域に分類できるようになった。

それらの分子について分子種を同定したとこ

ろ、Lipid rich region にはコレステロールエステル (18:1) や (18:2) が、血管平滑筋細胞にはホスファチジルコリン (ジアシル型 16:0/20:4) や (ジアシル型 18:0/20:4) が分布していた。(図2)。また、トリグリセリド (18:0/18:1/18:2) は Lipid rich region の細胞内の油滴と共局在しており、病変の形成に関係していると推測された。

2) 薬学分野における応用例

～生体内薬物動態の解析～

医薬品開発における前臨床試験で生体内の薬物を解析する際には、一般的に放射性化合物による標識と全身オートラジオグラフィによる評価が行われる。この方法には、標識のための時間的・人的コストや、放射性化合物を扱うリスクが伴う。しかし、質量顕微鏡法を用いると、これらの問題は生じない。

我々は質量顕微鏡法により、ファモチジンを投与したマウスの全身組織切片を解析した³⁾。ファモチジンは腎臓に最も多く分布しており、ほかにも肝臓・心臓・肺・消化管に分布していることが観察された。(図3)。

この結果は、過去に報告されたオートラジオグ

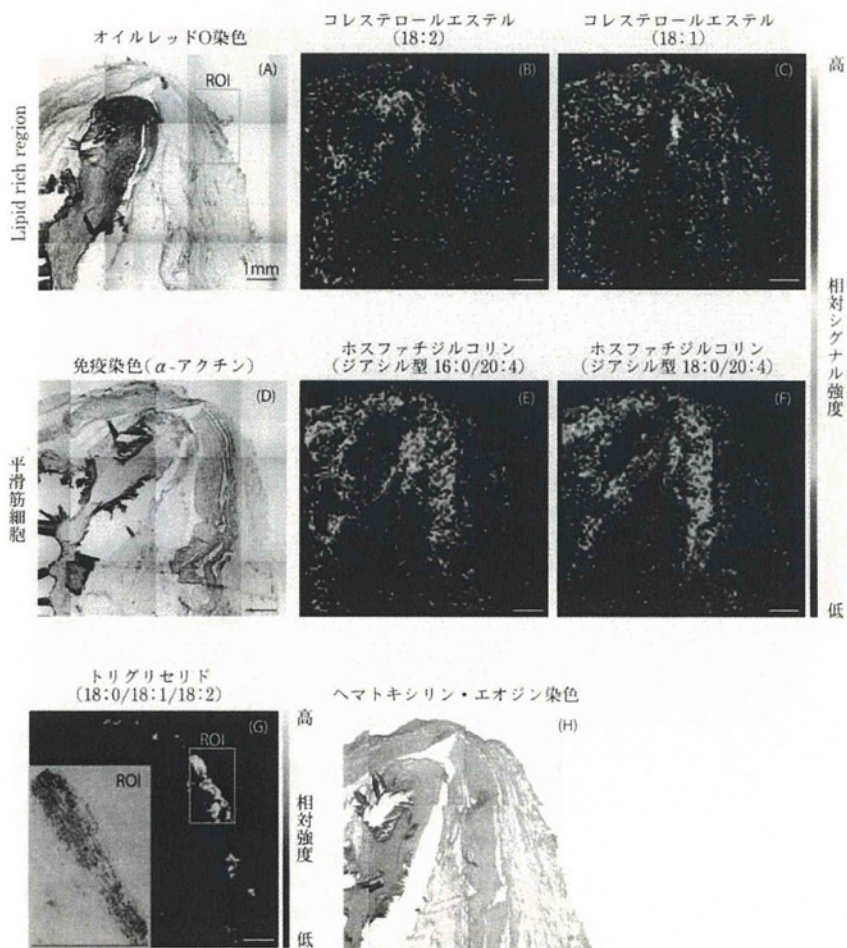


図2 ヒト動脈硬化病変における分子のイメージング像

上段：オイルレッドO染色による脂肪の分布 (A) と質量顕微鏡法による2種類のコレステロールエステル (B, C) との比較。

中段：免疫染色による平滑筋細胞の分布 (D) と質量顕微鏡法による2種類のホスファチジルコリンの分布 (E, F) との比較。

下段：(A)における関心領域 (ROI) と質量顕微鏡法によるトリグリセリドの分布の比較 (G)、解析領域のヘマトキシリン・エオジンによる染色像 (H)。

(文献2より)

ラフィーの結果と一致しており、質量顕微鏡法が薬物動態を解析するためのツールとして有用であることを示している。

4. おわりに

上記のように、質量顕微鏡法は、組織切片上に

おける任意の分子の位置と相対量を知ることができるという特徴が活かされ、医学薬学分野で応用されている。本稿で紹介した例のほかにも、生体組織中のバイオマーカー探索⁴⁾を始めとして、さまざまな研究に利用されている。質量顕微鏡法自体の改良も日々進められている⁵⁾。質量顕微鏡法

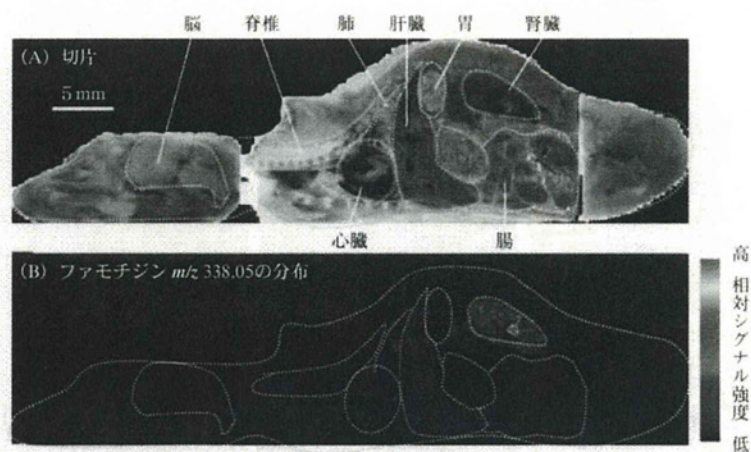


図3 マウス全身切片におけるファモチジンのイメージング像

マウス組織切片の光学像(A)と注射3分後のマウス組織切片におけるファモチジン (m/z 338.05) の質量顕微鏡像(B)を示す。

(文献3より)

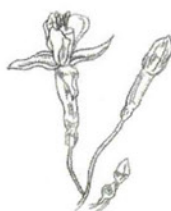
による分子イメージングを利用した研究は、今後ますます盛んになるだろう。引き続き応用拡大と技術革新が進み、質量顕微鏡法が医学・薬学分野の発展に貢献することを期待する。

【謝辞】

本研究は、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業、科学研究費助成事業(基盤研究(C))、JSTプロトタイプ実証・実用化プログラムの援助を受けて行われた。

文 献

- 1) 瀬藤光利: “質量顕微鏡法: イメージングマスマスペクトロメトリー実験プロトコール” 瀬藤光利 編. シュプリンガー・ジャパン. 東京. p.19, 2008.
- 2) Zaima N, et al: Imaging mass spectrometry-based histopathologic examination of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **217** (2): 427-432, 2011.
- 3) Saito Y, et al: Pharmacokinetic Analysis Using a High Spatial-Resolution Mass Microscope. *J. Mass Spectrom. Soc Jpn* **59** (4): 79-84, 2011.
- 4) Waki ML, et al: Investigation by imaging mass spectrometry of biomarker candidates for aging in the hair cortex. *PLoS One* **6** (10): e26721, 2011.
- 5) Shrivastava K, et al: Method for Simultaneous Imaging of Endogenous Low Molecular Weight Metabolites in mouse brain using TiO₂ nanoparticle in nanoparticle-assisted laser desorption/ionization-imaging Mass spectrometry. *Anal Chem* **83** (19): 7283-7289, 2011.



ぶんせき

9

Bunseki 2012

The Japan Society for Analytical Chemistry

$E = E_0 \cos 2\pi \nu t$

$\frac{dx}{d\lambda} = \frac{fd\beta}{d\lambda} = \frac{mf}{d \cos \beta}$

$p = \alpha E$

$\alpha_\sigma = \alpha_0)_\sigma + \sum_k (\alpha_k)_\sigma \cos w_k$

$\alpha = \alpha_0 + \alpha_1 \cos 2\pi \nu t$

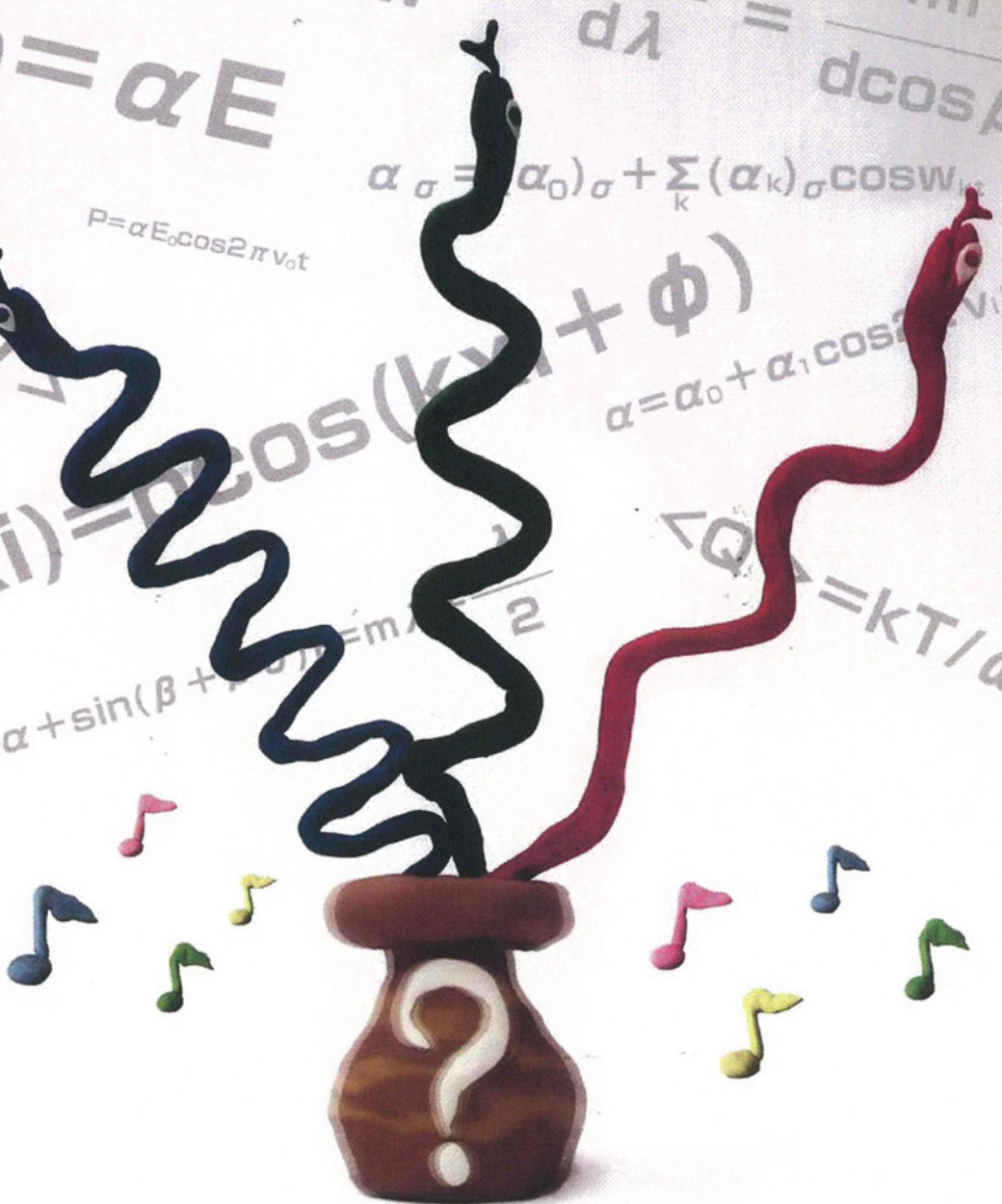
$u(x_i) = p \cos(ky_i + \phi)$

$\Delta Q = kT / \omega^2$

$\frac{1}{\sigma} \frac{\sigma \alpha}{\sigma Q} \frac{\sigma \alpha}{\sigma Q} \frac{\sigma \alpha}{\sigma Q}$

$P = \alpha E_0 \cos 2\pi \nu t$

$d(\sin \alpha + \sin(\beta + \dots)) = m \dots$



日本分析化学会

<http://www.jsac.jp>

質量顕微鏡法の展望

質量顕微鏡法は、質量分析法を応用することにより開発された。1回の解析で数万に及ぶ分子の分布を定量的に解析することが可能であり、解析対象となる分子種を選ばないことから幅広い分野への応用が試みられている。本稿ではこれまでの同法開発の道のりとともに、医療現場や医学研究の需要に合わせて今後どのように改良されていくことが想定されるかを述べたい。

後藤 健介, 高橋 司, 脇 紀彦, 瀬藤 光利

1 はじめに

分析化学は生体分子の挙動を明らかにすることで医学を飛躍的に進歩させてきた。キャピラリー電気泳動法により高速度でのDNA配列の解読は実現し、多くの疾患で遺伝子の異常が発見された¹⁾²⁾。また、X線結晶構造解析や核磁気共鳴法によりタンパク質の高次構造解析は達成され、タンパク質の立体情報を基に薬が開発されてきた³⁾⁴⁾。

質量顕微鏡法は、質量分析法を応用することにより組織内での分子の分布情報を網羅的に取得することを可能にした技術である⁵⁾。本稿ではこれまでの同法開発の道のりとともに、現在医学研究においてどのような需要があり、将来医療の場においてどのような利用法が想定されるかを述べたい。

2 質量顕微鏡法登場の背景

ヒト生体組織は多種の細胞から成る複合体であり、多くの病態でその解剖学的性状、位置関係に異常が生じる。生体分子の組織内分布を知るために免疫組織化学染色や緑色蛍光タンパク質 (GFP) 融合遺伝子法等の方法が広く用いられ、これまでに膨大な量の知見をもたらしてきた。しかし、これらの手法は、一つの組織切片上で分子を網羅的に解析することができないという限界を抱えていた。前者では抗原性のない分子や抗体による弁別が不可能な分子を解析することはできず、後者では未知の分子に関して解析を行うことはできなかった。これらの問題を解決可能な新たな分析手法は長い間待たれ続けた。

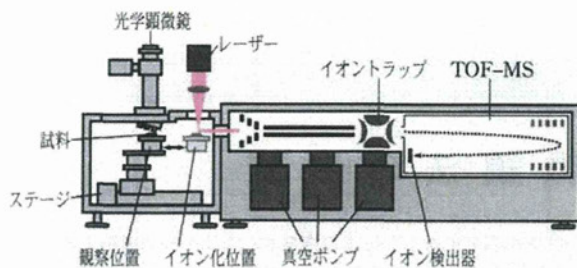
抗原性のない分子や未知分子を解析するための代表的な手法として質量分析法がある。開発された当初、質量分析法は低分子量化合物の解析に用いられていた。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix assisted

laser desorption/ionization; MALDI) が開発されたことにより分子量が大きい生体分子も解析対象となった。その結果、生体分子を包括的に理解しようという気運が生まれ、医学研究を始め様々な分野で質量分析法を用いた研究が行われてきた。医学研究では、特にバイオマーカーの発見等に質量分析法は貢献してきた⁶⁾。しかし、生体試料を質量分析法で解析する際には、試料を破砕し測定対象分子を抽出する必要があるため、分子の二次元平面における分布情報を得ることは不可能であった。

このような背景の基でイメージング質量分析法が開発されてきた⁷⁾。イメージング質量分析法とは、固体試料から直接、レーザーで二次元走査しながら分子のイオン化を行うことで、位置情報を保持しながら質量分析を行う技術である。半世紀以上昔に二次イオン質量分析法を用いたイメージング質量分析法が開発された。生体分子はイオン化される際に分解されてしまうため、この時点での医学研究での汎用性は高くなかった。1997年に初めてMALDIによるイメージング質量分析法を用いた研究が報告された⁸⁾。以来解像度の向上が進められ、現在では顕微鏡レベルと言ってよい解像度が達成されている。肉眼解像度 (100 μm) を超える解像度を持つイメージング質量分析法を、特に質量顕微鏡法と呼ぶ。筆者らはこの質量顕微鏡法に関する技術開発に取り組んできた。質量顕微鏡法が開発されたことにより、生体組織におけるタンパク質、ペプチド、脂質などの分布情報を解析することが可能になり、様々な医学研究分野への応用が報告されるようになってきている⁹⁾¹⁰⁾。

3 質量顕微鏡法とは

MALDIは、2,5-ジヒドロキシ安息香酸や α -シアノ-4-ヒドロキシベンズ酸といった有機化合物に代表されるイオン化補助剤のマトリックスを観察試料に塗布して結晶を作り、その後レーザー照射することで物質をイオン化する方法であり、幅広い生体分子の分析と構造解析に適している¹¹⁾。生体組織切片上の測定領域を微小徑



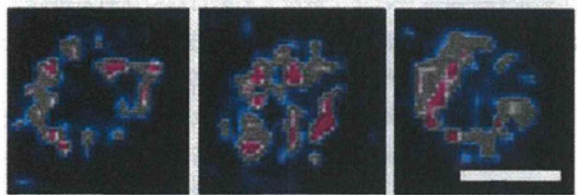
ステージに乗せられた試料は、観察位置において光学顕微鏡により観察されイオン化位置においてレーザーを照射される。イオン化された分子は質量分析部分へ送られる。質量分析部分はイオントラップやTOF-MSにより構成される。

図1 質量顕微鏡の概略図

従来の顕微鏡



質量顕微鏡法



下の図は質量顕微鏡法により可視化されたアミノアクリル酸の分布を示している。文献12)より改変して転用。スケールバー: 100 μm

図2 ヒト毛髪の光学顕微鏡像と質量顕微鏡法による分子分布

のレーザーで二次元走査することによって各点でイオン化を行う。切片上で直接イオン化された分子は飛行時間型質量分析計 (time of flight mass spectrometer; TOF-MS) に送られる (図1)。TOF-MSではイオン化された試料を電場によって加速し一定距離飛行させ、その飛行時間から質量と電荷の比 (質量/電荷: m/z) を算出する。こうして得られた各点の質量スペクトル情報を専用のソフトウェアで二次元マッピングし、任意の m/z のシグナル強度を二次元画像として表現する (図2)。

切片上で検出される分子を同定するために、同一の機体において多段階質量分析を行うこともできる。多段階質量分析とは、MALDIによりイオン化された前駆体分子にレーザーを照射し分子の解裂を引き起こし、解裂により生じたイオンの m/z を測定することで前駆体イオンの構造を調べる方法である。イオントラップ型質量分析計を搭載した質量顕微鏡を用いて多段階質量分析を行い、生体組織中の分子の混合物から特定のリン脂質、糖脂質、トリプシン消化したタンパク質等の生体分子を可

視化・同定したという報告がある¹³⁾。

4 今後の展望

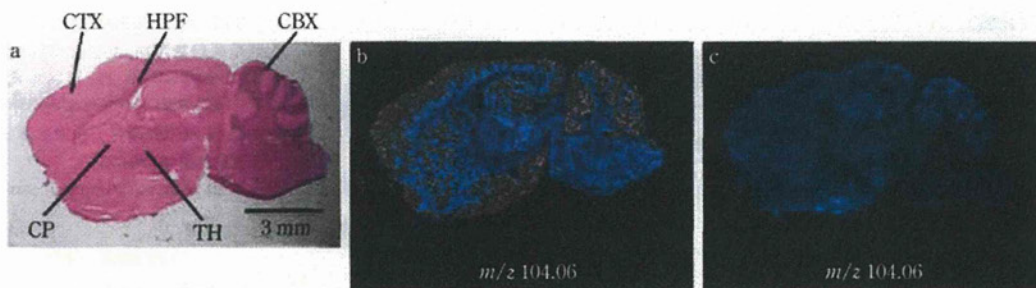
4.1 医学研究の要請に応えた質量顕微鏡法の改良

近年、測定技術の向上により単一細胞を対象とした医学研究が盛んに行われている。単一細胞のゲノム解析などが行われ細胞ごとの性質の違いが明らかにされつつある。タンパク質、脂質、糖質などに着目して単一細胞を解析するためには一般にフローサイトメトリーや免疫細胞化学染色が用いられる。しかし、これらの手法では分子に関して網羅的な解析を行うことは困難である。質量顕微鏡法を用いて単一細胞を観察することにより、個々の細胞における分子の網羅的な解析を行うことが可能となった¹⁴⁾。質量顕微鏡法の解像度はレーザー照射径の大きさに強く依存する。現在の質量顕微鏡法の解像度は10 μm を達成している。今後更にレーザー照射径を低減させることにより、質量顕微鏡法の空間解像度が向上することが期待される。

医学研究においてはあらゆる分子が研究対象となりうる。これまでの質量顕微鏡法では前述のような有機化合物がマトリックスとして広く用いられ、それぞれのマトリックスごとに異なるイオン化傾向を示すことが知られている⁷⁾。近年では、これまで検出されてこなかった分子種を観察するために、新しいマトリックスの開発が望まれている。新たに開発されたマトリックスの一つにナノ粒子イオン化支援剤がある。このナノ粒子は直径3~4 nmの銀や酸化チタンで構成される粒子であり、イオン化効率を高めることによってこれまでに検出できなかった分子の検出を可能にする。ナノ粒子イオン化支援剤を用いてラット小脳を質量顕微鏡法で解析した報告では、従来の有機マトリックス化合物では測定できなかった低分子量の代謝物が測定されている¹⁵⁾ (図3)。

病理学分野ではホルマリン固定パラフィン包埋切片が利用されることが多い。病理学分野における質量顕微鏡法の汎用性を高めるためにはパラフィン包埋切片を用いた解析が可能であることが望まれる。しかし、これまで質量顕微鏡法の試料としては主に凍結切片が使用されてきた。これは、ホルマリン固定パラフィン包埋切片に含まれる固定化剤がイオン化への影響を持つために質量顕微鏡法解析に適していないと考えられてきたためである。最近の報告では、抽出や精製といった操作を行わずにパラフィン包埋切片から直接タンパク質を可視化することに成功しており、質量顕微鏡法の対象試料としてパラフィン包埋切片を用いることが示されている¹⁶⁾。今後、病理学分野において質量顕微鏡法がより活躍することが期待される。

臨床検体を試料として用いる場合は、検体数や入手時期を事前に予想できないことが多々ある。したがって、すべての試料を同時に解析することは困難であることが



(a) ヘマトキシリン・エオジン染色像。CBX：小脳皮質、CP：線条体、CTX 大脳皮質、HPF：海馬体、TH：視床。(b) 新規に開発された酸化チタンナノ粒子を用いた質量顕微鏡像。(c) 従来の有機マトリックス (2,5-ジヒドロキシ安息香酸) を用いた質量顕微鏡像。文献 15) より改変して転用。

図3 酸化チタンナノ粒子を用いたマウス脳の質量顕微鏡解析の結果

多い。異なる測定で得られたデータには測定間誤差によるばらつきが存在する。そこで、測定間誤差がシグナル強度に及ぼす影響を低減するために、イオン総量、シグナル強度の中央値及び内部標準物質のシグナル強度を用いた標準化手法が確立されてきている¹⁷⁾。

4・2 将来の医学の変容と質量顕微鏡法の展望

日進月歩で進む医学研究と医療活動は、20年、30年後には現在よりもさらに細分化されるだろう。そのような時代において、質量顕微鏡法に要求される機能は分野ごとに大きく異なっている。例えば、実験医学の分野では空間解像度の改良や測定可能な分子種の拡大、医療現場では迅速さと簡便さが求められる。ただし、それらすべてが満たされた質量顕微鏡の開発は実際に困難であり、そのため、それぞれ異なる特徴をもった質量顕微鏡が用途に合わせて登場するに違いない。

実験医学の分野では細胞内小器官レベルでの解析が主流になっているだろう。脂質や糖質等の分布の違いを細胞内の構造単位で解析するためには、解像度が大幅に改良される必要がある。異分野間の境界領域での研究がより盛んになり、その結果として異なる分子種間の相互作用を網羅解析することも必要となってくる。核酸、タンパク質、糖質、脂質などを一つのサンプルから同時に網羅的に検出しその分布を可視化することが可能となれば、新たな生体分子ネットワークの発見につながる。

質量顕微鏡法を含めた様々なイメージング技術により、病理組織における多くの分子の局在異常が明らかにされている。これらの知見が臨床検査に応用される将来、質量顕微鏡法が医療現場の検査機器として活躍することを期待する。しかし、医療現場では迅速さと簡便さ及び低価格への要求が高く、機能が単純化され操作も簡易化された安価な機体を開発する必要がある。具体的には、組織切片の作製、ピーク抽出及びデータベース照合などを全自動化する。このような質量顕微鏡は、市井の医療機関でCTやPET、MRIと並んで活躍するだろう。

製薬企業においては既に、実験動物に投与された医薬

品候補化合物の薬物動態や薬理作用を解析するために質量顕微鏡法が用いられている。しかし、数多くの化合物の中から有効な分子を選別することが必要な創薬分野では、多検体を同時に並行処理する必要がある。そのため、近い将来、一度の解析で百や千の単位の検体数を測定可能な機体が開発されるだろう。

分析化学から生まれ出でて今まさに育ちつつある質量顕微鏡法が、医学研究を飛躍的に加速させる存在となり、医療の質を更に高めることを期待する。

謝辞 本講座における質量顕微鏡の開発はJST研究成果展開事業 (先端計測分析技術・機器開発プログラム) プロトタイプ実証・実用化タイプ「顕微質量分析装置の実用化開発」の支援を受けて実施された。

文 献

- 1) H. Drossman, J. A. Luckey, A. J. Kostichka, J. D'Cunha, L. M. Smith: *Anal. Chem.*, **62**, 900 (1990).
- 2) H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, P. A. Futreal: *Nature*, **417**, 949 (2002).
- 3) J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, D. C. Phillips: *Nature*, **181**, 662 (1958).
- 4) R. Capdeville, E. Buchdunger, J. Zimmermann, A. Matter: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 493 (2002).
- 5) 倉部誠也, 近藤 明, 西尾朋久, 瀬藤光利: *ぶんせき*, **2010**, 381.
- 6) E. P. Diamandis: *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 367 (2004).
- 7) 瀬藤光利編: "質量顕微鏡法", (2008), (シュプリンガー・ジャパン).
- 8) R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile: *Anal. Chem.*, **69**,

4751 (1997).

- 9) H. Tanaka, N. Zaima, T. Sasaki, N. Yamamoto, M. Sano, H. Konno, M. Setou, N. Unno : *J. Vasc. Surg.*, in press.
- 10) Y. Morita, 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 Sci. Jpn.*, **101**, 267 (2009).
- 11) M. Setou, N. Kurabe : *J. Electron Microsc (Tokyo)*, **60**, 47 (2010).
- 12) M. L. Waki, 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).
- 13) S. Shimma, Y. Sugiura, T. Hayasaka, N. Zaima, M. Matsumoto, M. Setou : *Anal. Chem.*, **80**, 878 (2008).
- 14) H. J. Yang, Y. Sugiura, K. Ikegami, Y. Konishi, M. Setou : *J. Biol. Chem.*, **287**, 5290 (2012).
- 15) K. Shrivastava, T. Hayasaka, Y. Sugiura, M. Setou : *Anal. Chem.*, **83**, 7283 (2011).
- 16) R. Casadonte, R. M. Caprioli : *Nat. Protoc.*, **6**, 1695 (2011).
- 17) J. M. Fonville, C. Carter, O. Cloarec, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, J. Bunch, E. Holmes : *Anal. Chem.*, **84**, 1310 (2012).



後藤健介 (Kensuke Goto)

浜松医科大学解剖学講座細胞生物学分野
(〒431-3192 浜松市東区半田山1-20-1)。
浜松医科大学医学部在学中。〈現在の研究テーマ〉
寿命と老化の制御機構の研究。

E-mail : kensuke.goto1214@gmail.com



高橋 司 (Tsukasa TAKAHASHI)

浜松医科大学解剖学講座細胞生物学分野
(〒431-3192 浜松市東区半田山1-20-1)。
浜松医科大学医学部在学中。修士(工学)。
〈現在の研究テーマ〉非アルコール性脂肪性肝炎の研究。

E-mail : signal0730@gmail.com



脇 紀彦 (Michihiko WAKI)

浜松医科大学解剖学講座細胞生物学分野
(〒431-3192 浜松市東区半田山1-20-1)。
浜松医科大学医学部在学中。博士(薬学)。
〈現在の研究テーマ〉循環腫瘍細胞の質量顕微鏡解析。

E-mail : wakimichihiko@gmail.com



瀬藤光利 (Mitsutoshi SETOU)

浜松医科大学解剖学講座細胞生物学分野
(〒431-3192 浜松市東区半田山1-20-1)。
東京大学大学院医学系研究科(細胞生物解剖学)修了。医師・医学博士。〈現在の研究テーマ〉不老長寿。〈主な著書〉
“質量顕微鏡法—イメージングマスマスベクトロメトリー実験プロトコール”(シュプリンガー・ジャパン)

E-mail : setou@hama-med.ac.jp

新刊紹介

試料分析講座

アミノ酸・生体アミン分析

日本分析化学会 編

アミノ酸は、タンパク質の構成原料であることからどこにも豊富に存在しており、役割として情報伝達などの多彩な生理機能をもつ。一方、生体アミンは、中枢神経系に多く分布し、極微量で神経伝達物質や神経ホルモンとして様々な生理機能の調節にかかわっている。このように存在様式と役割がこれほど

似て異なる存在であるアミノ酸と生体アミンの分析には、極めて高感度な分析法が求められてきた。本書は、「アミノ酸・生体アミン一斉分析」(第1章)と「生体アミン分析法」(第2章)の二つの項目から構成され、それぞれの項目で、誘導体化、蛍光、化学発光などを駆使した高感度検出法や、キャピラリー電気泳動や質量分析を用いた網羅的検出法、生体アミンのリアルタイム分析等についての詳細な解説が書かれている。特に、試料前処理から測定に至る過程を具体的に記載した実施例・実験例が多数盛り込まれており、これから実験を開始する研究者にとって嬉しい内容となっている。新生命機能解析への新たな出発点となりえるだけでなく、分析に関する様々な知識を得るのに非常に役立つ一冊と言える。

(ISBN 978-4-621-08534-9・A5判・205ページ・4,500円+税・2012年刊・丸善出版)

質量顕微鏡：電子顕微鏡との接点

Mass Spectrometry Meets Electron Microscopy

瀬藤光利

SETOU, M.

緒 言

イメージングマススペクトロメトリー (IMS; imaging mass spectrometry) とは、質量分析を用いて物質の分布を可視化する手法であり、その中でも肉眼以上の解像度を持つものを特に質量顕微鏡法と呼ぶ¹⁾。質量分析とは、原子や分子をイオン化し、その質量と電荷の比を利用して分子量を分析する手法である。生体物質の質量分析に適用可能な様々なイオン化法が開発されているが、質量顕微鏡では、気体を除く広範な試料を解析可能で汎用性の高いマトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI; Matrix-assisted laser desorption/ionization) を用いるのが一般的である。解析対象となる組織は、急速凍結させてから10 μ m以下の厚さに薄切し、支持体に乗せる。解析時のレーザー照射によって生じた余剰電荷を逃がすため、支持体は導電性素材で、かつ顕微鏡法としての用途を満たすため透明である必要がある。一般にこの2つの条件を満たす素材として、有機EL ディスプレイにも用いられる酸化インジウムスズ (ITO; indium tin oxide) を表面にコートしたスライドガラスが用いられることが多い。MALDIを用いた従来の質量分析では試料とマトリクスを予め混合するが、質量顕微鏡法では組織切片の物質の局在情報の攪乱を防ぐため、微量のマトリクスを切片上に均一に散布する必要がある。そのため、エアスプレーでマトリクスを切片上に噴霧するスプレーコーティング法や、インクジェットプリンタの要領で、微量のマトリクスを切片上に滴下するドロップレット法、昇華による蒸着法などが開発されている。

イオン化された分子の分析には飛行時間型質量分析計 (TOF-MS; time of flight mass spectrometry) を用いる。TOF-MS では、イオン化された分子に高電圧をかけ、検出器に向かって一定の距離を飛行させる。電荷が同じ分子イオンは質量の小さいものほど検出器に早く到達するため、質量と電荷の比 (質量電荷比; m/z) によって分離される。測定された分子イオンの m/z を横軸に、縦軸にイオン強度をとったものをマススペクトルと呼ぶ。 m/z は物質ごとに異なるため、既知物質であればマススペクトルからの同定が可能であり、分子種によってはそのためのデータベースも作成されている。また、質量分析装置内で試料のイオンと希ガス原子を衝突させ、分解した試料イオン断片の分子量から構造解析を行う (MS/MS解析) ことも可能で

ある。この場合、例え対象が未知の化合物であっても、その構造を決定することが可能である。IMSでは組織切片などの二次元試料上の多数の点でMALDI-TOF-MSによる質量分析を行うことで、多数の分子の位置情報を含む質量スペクトル群を得る。測定されたスペクトル群のうち、注目する分子のマススペクトルを抽出し、各測定点でのシグナル強度を色分布で表現することで、任意物質の二次元試料上における分布を可視化することができる。この手法によりタンパク質、ペプチド、および脂質をはじめとする低分子代謝産物を、生体組織上で位置情報を保持したまま解析することが可能となった。

MALDI-TOF-MSを用いたIMSの応用

従来のイメージング技術を超える利点から、IMSによる投与薬剤とその代謝産物のマッピングは多くの注目を集めている。この領域では、抗精神病薬、抗がん剤、抗鬱剤、および催眠薬に関する多数の研究が報告されている²⁾。投与した薬剤がどのように体内に分布・代謝されるかというのは重要な情報である。生体内での薬物分布を知るための従来の一般的な手法では、実験動物に放射性同位体で標識した薬物を投与し、その切片を用いて全身オートラジオグラフィ (WBA; whole-body autoradiography) を行う。また、薬物の代謝に関する情報は、各組織からの抽出液を分析することで取得する。従って、薬物動態を解析するためには、別個に得た局在と代謝のデータの両方が必要である。

一方IMSは標識化合物の合成を必要とせず、薬効をもつインタクティブな化合物と、代謝され薬効を失った化合物を区別してイメージングすることができる、といった利点があり、時間やコストの面でも優れている。例えば齋藤らは島津製作所等と共同開発した最高水準の空間分解能を持つ質量顕微鏡を用いて、マウスに投与したファモチジンの体内動態の解析を行った³⁾。ファモチジンはヒスタミンH₂受容体拮抗剤として臨床や市販薬として広く用いられており、投与後の動態がよく調べられているため、IMSの方法論を立証し評価する上で有用である。尾静脈内投与したファモチジンの全身での分布をIMSを用いて解析した結果、腎臓、肝臓、心臓、肺、および消化管への分布を可視化することができた。これは過去のオートラジオグラフィの報告と一致しており、また50 μ mの解像度で腎臓内のファ

Key Words: imaging mass spectrometry (IMS), matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), time-of-flight (TOF), secondary ion mass spectrometry (SIMS)

Department of Cell Biology and Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine
(浜松医科大学解剖学講座細胞生物学分野)

モチジン分布を詳細に解析した結果、腎盂への集積が示され、薬物動態の解析における本手法の有用性を示すことに成功している。

質量顕微鏡法は低分子代謝産物、特に脂質の局在解析を得意とし、これは既存の手法では代替できない。例えば杉浦らは糖リン脂質を可視化する手法を確立し、マウス脳切片中の異なる脂肪酸組成を持つ複数のリン脂質種が特徴的な局在を示し(図1)、さらにこの分布が発生の中のニューロンの成熟の間に形成されることを初めて明らかにしている⁴⁾。

二次イオン質量分析法を用いた 質量電子顕微鏡の開発

工学分野では、MALDIとは異なるイオン化法である二次イオン質量分析法(SIMS;secondary ion mass spectrometry)を用いたIMSが実用化されており、半導体産業や鉄鋼産業で使用されている。SIMSでは、まず試料表面に向けて一次イオンのエネルギービームを照射する。続いて一次イオンとの衝突により試料表面から放出された二次イオンを質量分析することにより、試料表面の化学組成を分析する。SIMSを用いたIMSは高い位置分解能を持つが、大きな質量(分子量2,000Da以上)をもった分子のイオン化に適さず、またMS/MS分析による構造決定が困難であるという問題点があり、これまで生物学的試料の解

析への応用はあまり進んでこなかった。しかし現在IMS分野の成熟により高解像度のニーズが出てきたため、現在著者らはこれらの問題点を克服し、SIMSの生物学的試料に応用すべく、SIMSと走査型電子顕微鏡を融合した質量電子顕微鏡を作るおよび解析ソフトウェアの開発に着手している。既存の質量顕微鏡法は組織レベルの薬物動態を追跡する等の用途には非常に適しているが、現在最高の解像度を持つものでも解像度は5 μm程度であり、細胞内外、核内外の物質分布といった議論には解像度が不十分である。一方SIMSの解像度はサブマイクロメートルのオーダーに到達するため、生物学的試料に適したSIMSの開発によって初めて、例えば薬物や放射性物質がDNAに直接アプローチしているかどうかを明らかにできると期待される。

引用文献

- 1) 瀬藤光利他. (2008). 質量顕微鏡法 (瀬藤光利編)、シュプリンガー・ジャパン、東京.
- 2) Sugiura, Y., Setou, M., (2010). J. Neuroimmune. Pharmacol. 5 : 31.
- 3) 瀬藤祐介, 早坂孝宏, 他 (2011). J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 59 : 79.
- 4) Sugiura, Y., Konishi, Y., et al. (2009). J. Lipid Res. 50 : 1776.

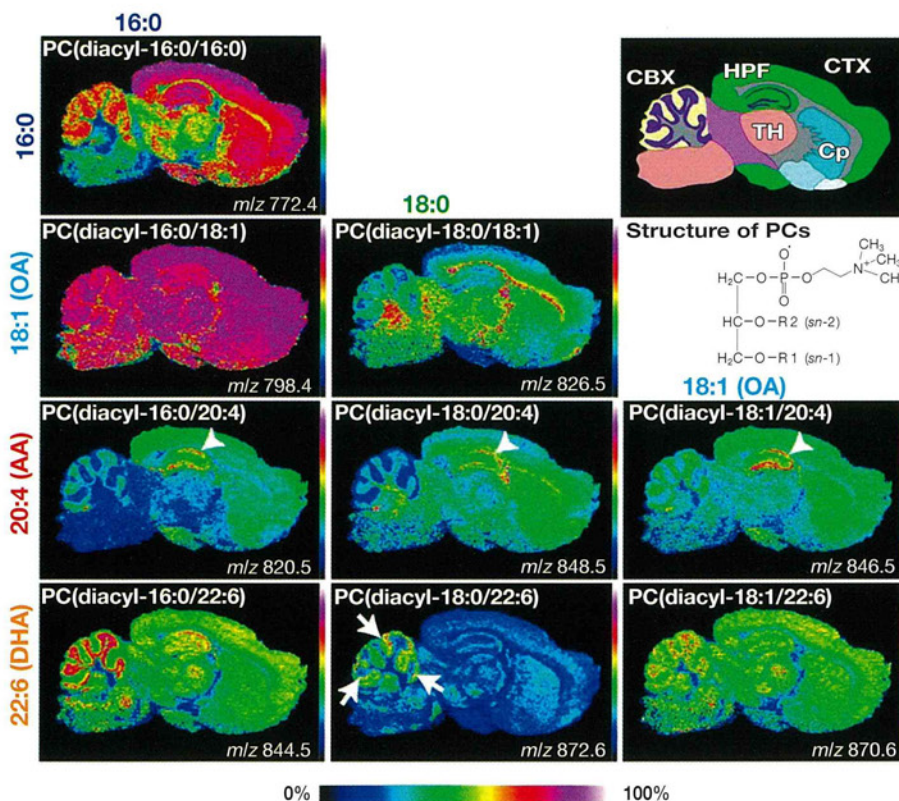


図1.マウス脳矢状切片における異なるフォスファチジルコリン(PC)分子種の分布のMALDI-IMSによる可視化。脂肪酸(FA)組成の異なる複数のフォスファチジルコリン分子種が不均一な分布を示すことが明らかになった。CBX, 小脳皮質; CP, 線条体; CTX, 大脳皮質; HPF, 海馬体; TH, 視床。This research was originally published in Journal of Lipid Research. Sugiura Y, Konishi Y, Zaima N, Kajihara S, Nakanishi H, Taguchi R, Setou M. Title. Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry. 2009; Vol. 50: pp1776-1788. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

質量顕微鏡法

瀬藤 光利

Imaging Mass Spectrometry

Mitsutoshi Setou

Department of Cell Biology and Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine; 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan.

(Received December 2, 2011)

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-imaging mass spectrometry (IMS) enables the visualization of the distribution of a range of biomolecules that have varied structures in the cells and tissue sections. This emerging imaging technique was initially developed as a tool for protein imaging, but recently it is increasingly being used for the imaging of small organic molecules. IMS is an effective technique for the imaging of small metabolites, including endogenous metabolites such as lipids and exogenous drugs because of the following advantages: First, IMS does not require any specific labels or probes. Second, IMS is a non-targeted imaging method. Finally, the simultaneous imaging of many types of metabolite molecules is possible, and all these features are necessary for the assessment of metabolite localization. In this review, we discuss the capability of current IMS techniques for imaging small molecules, and introduce representative studies on imaging of endogenous and exogenous metabolites. In addition, the limitations and problems of the technique are also discussed, and reports of progress toward solving the problems with this technique are also introduced.

Key words—imaging mass spectrometry; kinetics; visualization for biomolecule

1. はじめに

質量分析によって得られる生化学的情報と、従来の顕微鏡による構造解析から得られる形態学的情報を同時に知ることを可能にしたのが、質量顕微鏡法である。これまでの光を検出する光学顕微鏡や、電子を検出する電子顕微鏡と異なり、質量顕微鏡法は生体分子の質量を検出することで可視化を行う。1990年代にスタートした初期の質量分析を用いたイメージングの解像度は0.1–1 mm程度と肉眼解像度であり、顕微鏡とは呼べなかったが、21世紀に入り肉眼解像度を超えるようになり、質量顕微鏡法が誕生した。疾病に由来する病理標本からは様々な形態異常が観察され、その機能を知ることができれば、病因の解明や治療標的の同定につながると考えられる。質量顕微鏡法は、未知の物質に対してその

局在情報を失わずに形態を直接観察でき、また同時に生化学的な情報を得ることができる。

2. 質量分析の原理

質量分析 (mass spectrometry; MS) とは、原子・分子・クラスターなどの粒子を気体状にイオン化し、それらの質量と電荷の比 (質量/電荷; m/z) に応じて分離・検出し、分子量を分析する手法である。質量分析ではいくつかのイオン化法が用いられてきた。^{1,2)} 質量顕微鏡法では、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) による質量分析が一般的である。MALDIは、ソフトレーザー脱離イオン化法を提案し2002年にノーベル化学賞を受賞された田中氏³⁾と、Hillenkamp, Karas⁴⁾らによって開発され、分子量数十万までのタンパク質やDNAなどの高分子量物質を結晶マトリックスに包み込み、パルスレーザーを照射することにより、イオン化したタンパク質やDNAを真空中に放出させる方法である。MALDIは、従来のイオン化法では壊れ易かったタンパク質などの生体分子までイオン化するこ

浜松医科大学医学部医学科解剖学講座細胞生物学分野
(〒431-3192 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号)
e-mail: setou@hama-med.ac.jp

本総説は、日本薬学会第131年会シンポジウムS16で発表したものを中心に記述したものである。

とができる。³⁾ 結晶低分子マトリックスとして、2,5-ジヒドロキシ安息香酸などいくつかあり、⁴⁾ 試料に適したマトリックスの選択が、よいマススペクトルを得るために重要である。⁵⁻⁷⁾ 質量分析部は、イオン飛行中の他の気体分子による散乱を防ぐため、質量分析部内部をターボ分子ポンプや拡散ポンプで高真空にする。筆者らは、最も一般的な飛行時間型質量分析計 (time-of-flight mass spectrometer; TOF MS) を使用している。パルス状に生成したイオンは真空の分析管を通過する間に質量によって検出器に到達するまでの飛行時間が異なることを利用して重さとして計測される。特定のイオン化した分子のみを選択し、その分子に希ガスなどを衝突させることで分解・断片化し、生成した断片イオンの質量数パターンから構造を特定することで構造解析が可能である。この構造解析は MS を複数回行うことから MSⁿ 解析と呼ばれる。化合物の質量数や構造解析で得られた断片イオンの質量数を用いて、データと既存のデータベースを参照することで化合物の同定が可能である。タンパク質のような大きな分子でも、酵素処理により断片化したペプチドやアミノ酸の構成を解析対象とすることで、分子を同定することができる。

3. 質量顕微鏡法の原理

質量顕微鏡法は、二次元平面上で位置情報を保つ

たまま前述の質量分析を行う手法である。通常、質量分析は分離・精製した溶液中の生体分子を対象とするが、質量顕微鏡法では主に生体組織切片を対象とする。生体組織切片を観察し、着目した部位に正確に微小径のレーザー光を照射し、微小領域のイオン化を行う。Figure 1 に質量顕微鏡法の一連の流れを示す。⁸⁾ 凍結させた生体組織から凍結マイクロームにより組織切片を作製する。作製した凍結切片を導電性の素材で表面をコートされた支持素材に載せ、融解させることで組織を接着する。解析を目的とする分子種に応じて適切な前処理を施し、マトリックス溶液を組織切片上に塗布し、質量分析計で各測定点におけるマススペクトルを検出する。測定領域は任意の間隔によって測定点を設定可能であるが、現在ではレーザー収束技術と装置制御能の向上により 10 μm 以下の間隔を設定することが可能になっている。測定点をレーザーで二次元走査することによって、測定点毎のマススペクトルが取得される。⁹⁾ そのマススペクトルの中から任意の分子情報を選択的に抽出して、測定点毎のシグナル強度比に応じて対象分子の組織切片における分布を可視化する。マススペクトルの数は1つの試料において測定点数に応じて数万以上にもなり、その情報量は膨大になるため、効率よく高速に解析するソフトウェアが開発されている。得られたスペクトルから生体分

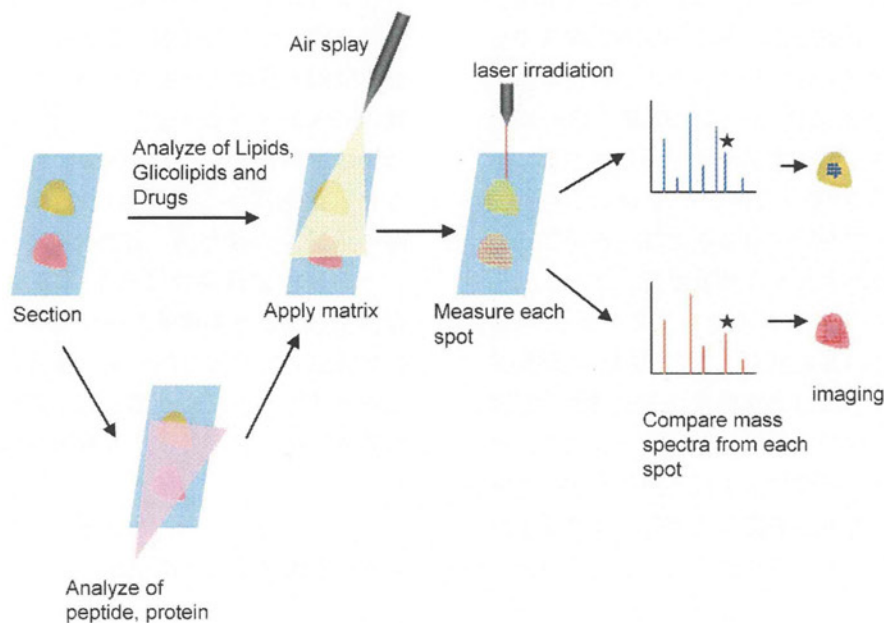


Fig. 1. Steps Involved in Profiling and Imaging MS of Tissue Slice Samples

子の存在量を色の濃淡で表現し、分子分布の可視化を行う。

4. 質量顕微鏡法の実際

細胞内の生体分子の分布を測定するとき、1つの細胞内にある生体分子の量は極めて微量である。このような超微量分子を検出するためには、効率よく各段階にイオンを移行させなければならない。試料の適切な前処理法と装置の高感度化が必要である。高効率イオン化を実現する試料前処理の1つに、最適な厚さの生体組織が10 μm 以下となったときに高効率イオン化と低ノイズを示す測定結果が得られる。¹⁰⁾ 切片を接着する導電性を有する支持素材には、酸化インジウムスズ (indium-tin-oxide; ITO) を表面にコートした ITO スライドガラスが用いられることが多い。一般的に、生体分子の位置情報を保持したうえで分子同定のための試料前処理法が必要になる。例えばタンパク質の場合、組織上におい

て試料の拡散を最小限に抑えるタンパク質変性法、酵素消化法が施される。これを on-tissue digestion 法という。¹¹⁻¹³⁾ 組織内タンパク質を変性させた後に、ケミカルインクジェットプリンター (島津製作所) を用いて微量のトリプシン溶液を分注し、タンパク質を消化することにより、分子量が大きく、そのままではイオンとして検出され難いタンパク質もトリプシン消化産物として検出できる。¹⁴⁾ 一方、リン脂質やコレステロールのような中性脂質、さらに糖脂質のような低分子量有機化合物の測定では、組織切片上で位置情報が失われ易いため切片の洗浄工程は行わない。マトリックス溶液の組織切片上への塗布は、マトリックスの結晶が均一かつ微細に生成されることが測定感度の向上のために重要である。霧状にして組織切片上へ噴霧するスプレーコーティング法や、組織切片上のあらかじめ定められた領域に正確な量のマトリックスを滴下するドロップ

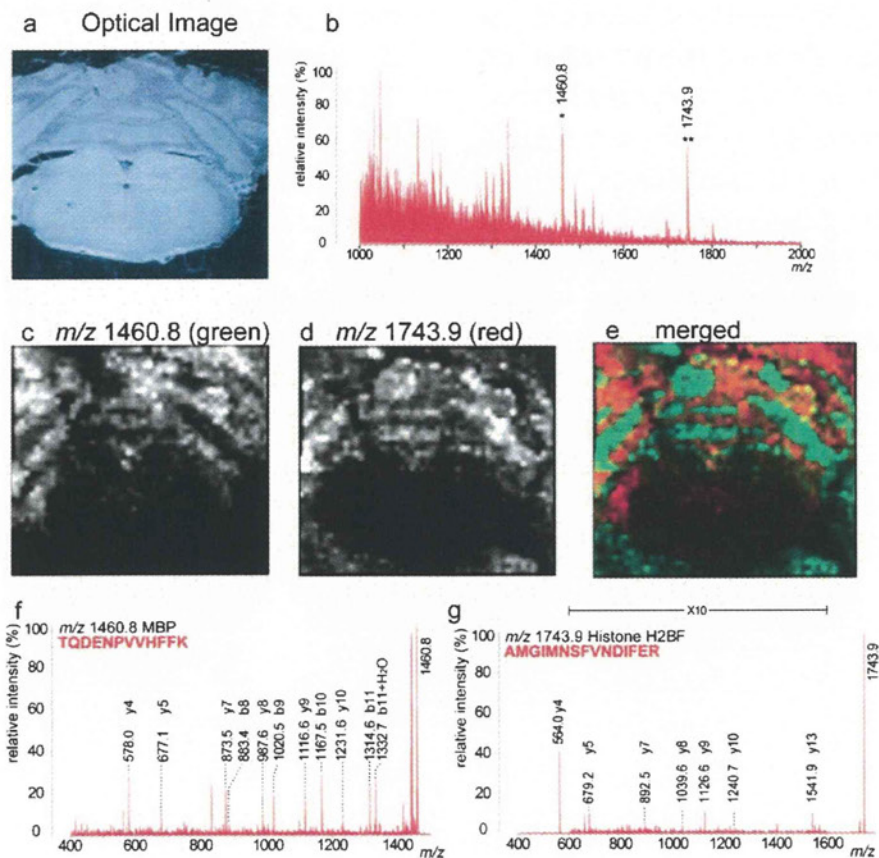


Fig. 2. Example of Tryptic-digested Protein Imaging and Precursor Ion Mass Spectra with Positive Ion Detection Mode

(a) Optical image of imaging region and (b) accumulated mass spectrum from imaging region. (c) and (d) are imaging results of m/z 1460.8 and 1743.9, which are labeled by asterisks in (b). Merged image (red, m/z 1460.8; and green, m/z 1743.9) is shown in (e). These peaks were identified by direct MSⁿ and were identified as the fragment ions of myelin basic protein (MBP) (f) and histone H2B (g). Partially adapted from Ref. 13.

レット法が用いられる。この2つのマトリックス塗布法を組み合わせたスプレッドドロップレット法も使われる。¹⁴⁾ またナノ微粒子はその大きさが数ナノメートルオーダーであることから、その質量顕微鏡法への適用は、数十 μm 大の結晶を形成するマトリックスよりも高解像度で生体分子の分布を可視化するだけでなく、マトリックスではイオン化され難い生体分子のイオン化を可能にする。¹⁵⁾

5. ペプチドの解析

次に、筆者らが発表してきた質量顕微鏡法の生体組織への応用研究をいくつか紹介する。島津製作所が製造している AXIMA-QIT-TOF MS は、試料中の分子をイオン化する MALDI, イオン化された分子を溜めこむ四重極型イオントラップ (quadrupole ion trap; QIT) と、イオン化された分子を質量に応じて飛行分離を行う TOF から構成される。そのため、検出感度が高く、MS/MS 解析だけでなく MSⁿ 解析も可能である。この装置を用いてマウス小脳におけるリン脂質、糖脂質、トリプシン消化したペプチドの可視化を行った。¹³⁾ Figure 2 にペプチドの解析結果を示す。Figure 2(a) は小脳切片の光学写真、Fig. 2(b) はトリプシン消化処理を施したマウス小脳から得られた積算マススペクトルである。このマススペクトルから、イメージング画像描出のためのソフトウェアである BioMap (<http://www.mald-msi.org>) を用いて、任意の m/z における質量分布のイメージング画像を描出した。 m/z 1460.8 [Fig. 2(c)] と m/z 1743.9 [Fig. 2(d)] の2つの質量ピークのイメージを構成したところ、これらは相補的な関係にあることを見出した [Fig. 2(e)]. m/z 1460.8 は白質と延髄、 m/z 1743.9 は灰白質に局在していた。これらの質量の生体分子を特定するため、直接切片上で MS/MS 解析による構造解析を行ったところ、 m/z 1460.8 はミエリン塩基性タンパク質 (myelin basic protein; MBP) [Fig. 2(f)], m/z 1743.9 はヒストン H2B (histon H2B) [Fig. 2(g)] であることが明らかになった。

6. リン脂質の解析

マウス網膜の組織切片を対象として質量顕微鏡法により生体分子の局所的な分布を示した。¹⁶⁾ マウス網膜は幅 150 μm もの微小領域内に9層もの膜構造を有している。この試料に対して 50 μm の間隔で測定を行った。その結果、組織切片上から多数のシ

グナルが検出された。それらのシグナルについて MS/MS 解析を行ったところ、リン脂質の一種であるホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) と同定された。PC には2本の脂肪酸が結合しており、その脂肪酸の違いにより生体内での働きが異なることが知られている。網膜上における PC の分布を解析したところ、結合している脂肪酸の種類によって分布が異なることが示され、3つの層に分類・可視化することに成功した (Fig. 3)。特に網膜における光神経伝達に重要な役割を果たす膜タンパク質であるロドプシンと脂肪酸の一種であるドコサヘ

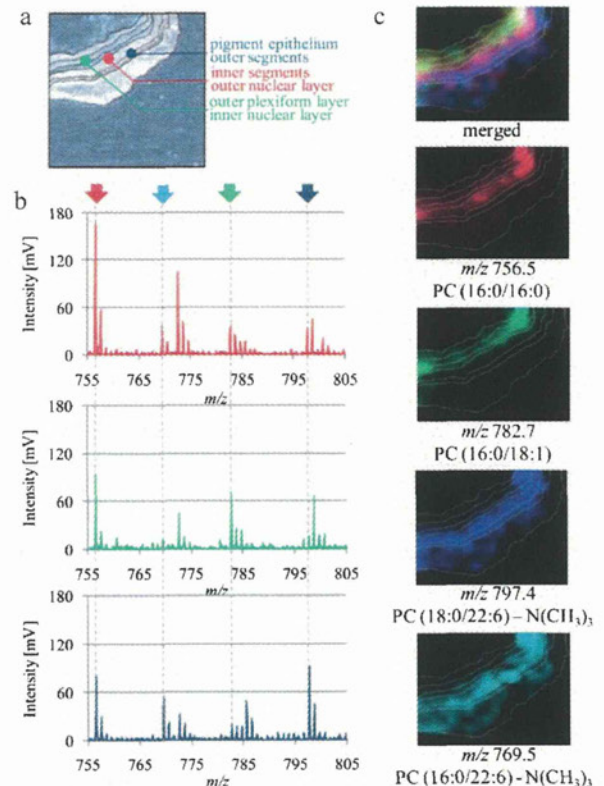


Fig. 3. Distribution of PC Molecular Species in a Mouse Retinal Section

(a) Each area can be roughly distinguished in this optical image of the mouse retinal section, and three colored dots are shown. (b) Three spectra between m/z 755 and 805 from the measurement areas at the red dot (outer nuclear layer and inner segment), green dot (inner nuclear layer and outer plexiform layer), and blue dot (outer segment and pigment epithelium) in the mouse retinal section are compared. The signal intensities at m/z 756.5 ([PC (diacyl-16:0/16:0)+Na]⁺) and m/z 782.7 ([PC (diacyl-16:0/18:1)+Na]⁺) were the highest in the red dot and in green dot, respectively. The signal intensities at m/z 797.4 ([PC (diacyl-18:0/22:6)+Na-N(CH₃)₃]⁺) and m/z 769 ([PC (diacyl-16:0/22:6)+Na-N(CH₃)₃]⁺) were the highest in the blue dot. (c) The ion image merged from [PC (diacyl-16:0/16:0)+Na]⁺ (red), [PC (diacyl-16:0/18:1)+Na]⁺ (green), and [PC (18:0/22:6)+Na-N(CH₃)₃]⁺ (blue) revealed the three-zone distribution of the retinal section. [PC (16:0/22:6)+Na-N(CH₃)₃]⁺ (light blue) was distributed in the same region as [PC (18:0/22:6)+Na-N(CH₃)₃]⁺. Reprinted with permission from Ref. 16.

キサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA) の係わりについては過去にも報告があるが, 本研究により両者の局在が一致したことから, 質量顕微鏡法の有用性を示すうえで非常に興味深い結果となった. 現在までのところ, このようなリン脂質の脂肪酸組成が異なる分子種の分布イメージングが可能なのは, 質量顕微鏡法だけである.

7. 高解像度質量顕微鏡の開発

既存の質量分析装置よりも微細な領域の高精度な分析と, より高い質量分析能の実現を目指し, 筆者らは JST 先端計測分析技術・機器開発事業の支援の下, 島津製作所, がん研究会, 理化学研究所, 三菱化学生命科学研究所, 及び大阪大学との産学連携で新たな質量顕微鏡を開発してきた.¹⁷⁾ 顕微質量分析装置 (質量顕微鏡) の最終プロト機では, 光学観察系は大気圧下 MALDI を採用し, デジタルイオントラップ (digital ion trap: DIT) を搭載することで高効率にイオンを集め, 高分解能マルチターン飛行時間型 (multi-turn TOF: mTOF) を用いて, 質量分解能を向上させることに成功した. $1\ \mu\text{m}$ 以下のレーザー照準精度, $5\ \mu\text{m}$ 以下のレーザースポット径, $10\ \mu\text{m}$ 以下の空間的分解能を実現し, 分析感度も改善された. 上述の技術のうち, 光学顕微鏡, 大気圧 MALDI, 四重極型イオントラップ, そして TOF で構成された質量顕微鏡が製造されており, 浜松医科大学に 1 号機が設置されている (Fig. 4).

8. 高解像度質量顕微鏡を用いた薬物動態の解析

生体の臓器は形状や機能によって組織学的に分類され, 各組織がそれぞれの役割を担っている. したがって, 組織特異的な分布を期待する医薬品を評価

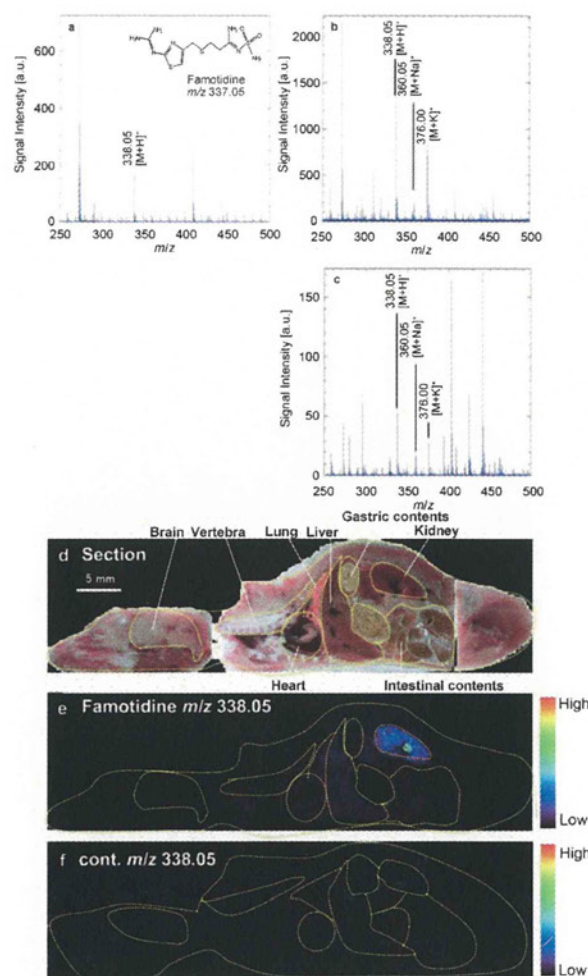


Fig. 5. Mass Spectrum of Famotidine and MS Ion Image on the Whole-body Section

(a) Structure and mass spectrum of Famotidine. (b) Mass spectrum of Famotidine detected on the tissue section. (c) Mass spectrum of Famotidine detected on the kidney in the tissue section. (d) Optical image of the mouse tissue section. (e) MS ion image of Famotidine (m/z 338.05) on the mouse tissue section at 3 min after injection. The Famotidine is observed to be distributed with significantly localization in the kidney. (f) MS ion image at m/z 338.05 on Control mouse tissue section. Partially adapted from Ref. 18.

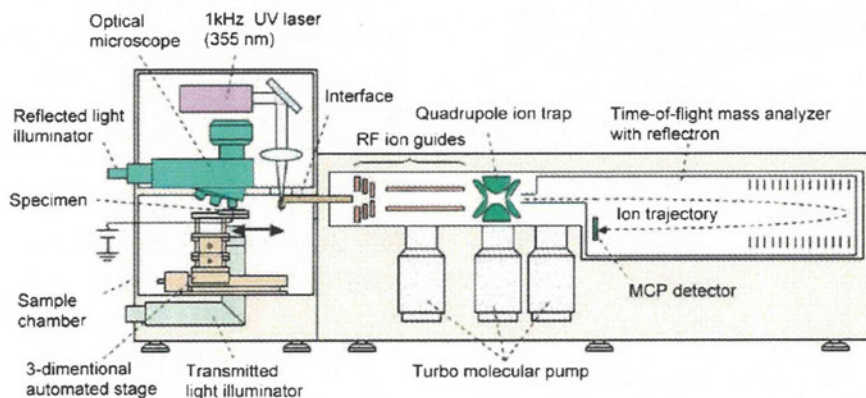


Fig. 4. Scheme of the Atmospheric-Pressure MALDI Mass Spectrometry Imager "Mass Microscope"
Reprinted with permission from Ref. 17.