

図3 本法による乳がん組織の解析

a: HE染色像、b、c: IMSによるPC(32:1)およびPC(36:0)の分布像、d、e: がん部(d)および非がん部(e)で得られた質量スペクトル。

な創薬のターゲットであると考えられる。

2. 乳がん

乳がん組織切片に対し本法による解析を行ったところ、ヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin and eosin stain: HE)染色像(図3 a)中に黒線で示したがん部領域と白線で示した非がん部領域に相当する領域から得られた質量スペクトルのパターンは異なっていた(図3 d, 3 e)。⁹⁾ 分子イオンの分布像から、乳がん HE 像でのがん部と相同する局在を示す PC とがん部に集積していない PC が存在することが分かった(図3 b, 3 c)。これらの PC の検出強度をがん部と非がん部で比較したところ、PC(36:0)に対する PC(36:1)の相対的検出強度はがん部で有意に高い傾向であった。飽和脂肪酸の不飽和化を行う酵素であるステアリン酸 CoA 脱飽和酵素(stearoyl-CoA desaturase-1: SCD 1)の免疫染色を行ったところ、PC(36:1)の相対値と SCD 1 染色強度との間には正の相関関係が見られ、PC(36:1)の集積に SCD 1 が関与している可能性が示された。

エストロゲン受容体(estrogen receptor: ER)の発現別に1価不飽和脂肪酸を含む PC の相対値を調べたところ、PC(34:0)に比べ PC(34:1)を高度に有する乳がんは、ER 陽性群に有意に多いことが示された。つまり、1価不飽和脂肪酸を含む PC を高度に有する乳がんの重集団が存在することが判明した。

脂肪酸不飽和化を標的とする抗がん剤が開発された場合に、ER 陽性群でより高い効果が期待できると予想される。このように質量顕微鏡法の利用によ

り、新たな効果予測因子の発見と患者群の新しい層別化に成功した。

5 薬物動態解析

特定部位で機能することが期待されている医薬品を評価する際には、薬物が生体内でどのように分布しているかという情報を調べる必要がある。医薬品開発において動物実験などの前臨床試験が必須であり、放射性化合物を用いて標識した候補薬物を投与し、その薬物の体内分布、蓄積性、毒性などを評価するオートラジオグラフィという方法が一般的に用いられている。しかし、標識により薬の体内動態が変化しないように留意する必要があることや標識体の作成にコストや時間を費やすこと、実験者が被ばくする可能性があること、放射性廃棄物の処理に手間がかかることなどの問題を抱えている。そこで、これに替わるより安全で簡便な方法として、質量顕微鏡法を用いた薬物動態の解析を提案したい。その1例としてマウスに尾静脈内からヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬であるファモチジンを投与し、3分後の体内分布を本法により解析した結果を紹介する。

図4 aにはマウスの断面図を示している。^{10,11)} 全身の輪郭と主要な臓器(脳、脊椎、肺、肝臓、胃、腎臓、心臓、腸)を点線で囲んだ。この断面図と質量顕微鏡法データにおけるファモチジンの分子量に相当するシグナルを用いて作成したイオン分布像を

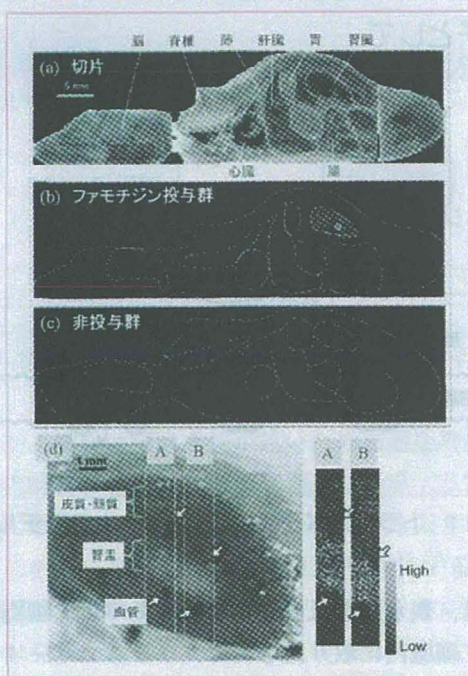


図4 本法による薬物の生体内分布の解析

- (a) マウス全身切片。
 (b) ファモチジン投与群のイオン分布像。
 (c) ファモチジン非投与群のイオン分布像。
 (d) 腎盂への局在。

比較したものが図4bであり、ファモチジンが強く腎臓に局在していることが分かる。さらに、肝臓においても蓄積している様子が確認された。生理食塩水のみを投与したマウスから得たイオン分布像(図4c)との違いと、多段階質量分析により検出された特徴的な断片化イオンのパターンから、このイオンがファモチジンであるということが確認された。

ファモチジンの薬物動態については、放射性医薬品で標識したファモチジンを投与し、5分後に全身オートラジオグラフィで測定した例がある。主に腎臓、次いで肝臓に未変化体で存在するという報告があり、質量顕微鏡法による結果と一致している。質量顕微鏡法を薬物動態に利用する利点として、更に高解像度で薬物動態を調べることが可能である点が挙げられる。その結果が図4dに示した腎臓内におけるファモチジンの局在を解析したものであり、腎臓の中心部にある腎盂に強く局在している様子が示されている。この腎盂における強い局在は、腎臓

における排泄過程でファモチジンが濃縮され、周りの髓質、皮質よりも高い濃度になっているためと考えられる。

このように、質量顕微鏡法は高い解像度で薬物の分布を検出することができ、医薬品開発における活用が期待される。

6 おわりに

質量顕微鏡法は組織切片上の位置情報を保持し、分子を可視化することができる手法である。また標識を行う必要がなく、測定質量範囲に含まれるイオン分子は原理的にはすべて解析対象となるため、未知の化合物や代謝物を含めた網羅的な測定が可能である。このような特徴を持つ可視化手法はこれまでに存在しなかったことから、疾患に特徴的な分子組成変化の解明や薬物動態研究に多大な貢献ができるものと考えられる。顕微鏡レベルの空間解像度での解析は、これまで見過ごされてきたような微細領域で生じる薬理作用・メカニズムの解明をもたらさるう。

近年、質量分析技術の向上に伴い、より高感度な検出や定量解析のための取り組みが盛んに行われている。今後は、これまで難しかった微量創薬標的の簡易探索および位置情報を保持した定量的な解析研究の発展により、安心・安全な治療を目指す医薬領域の更なる進展が期待される。

参考文献

- 1) 瀬藤光利編, “質量顕微鏡法 イメージングマスマススペ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, 東京, 2008, pp. 1-184.
- 2) 田中宏樹ほか, 蛋白質 核酸 酵素, 54, 224-229(2009).
- 3) 大畑健次ほか, 生物物理, 50, 80-83(2010).
- 4) 瀬藤光利, YAKUGAKU ZASSHI, 132, 499-506(2012).
- 5) Hayasaka T. et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 3415-3426 (2008).
- 6) Sugiura Y. et al., *J. Lipid Res.*, 50, 1776-1788(2009).
- 7) Sugiura Y. et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 403, 1851-1861(2012).
- 8) Morita Y. et al., *J. Hepatol.*, 59, 292-299(2013).
- 9) Ide Y. et al., *PLoS One*, 8, e61204(2013).
- 10) Saito Y. et al., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 59, 79-84(2011).
- 11) Saito Y. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 1417-1424(2012).

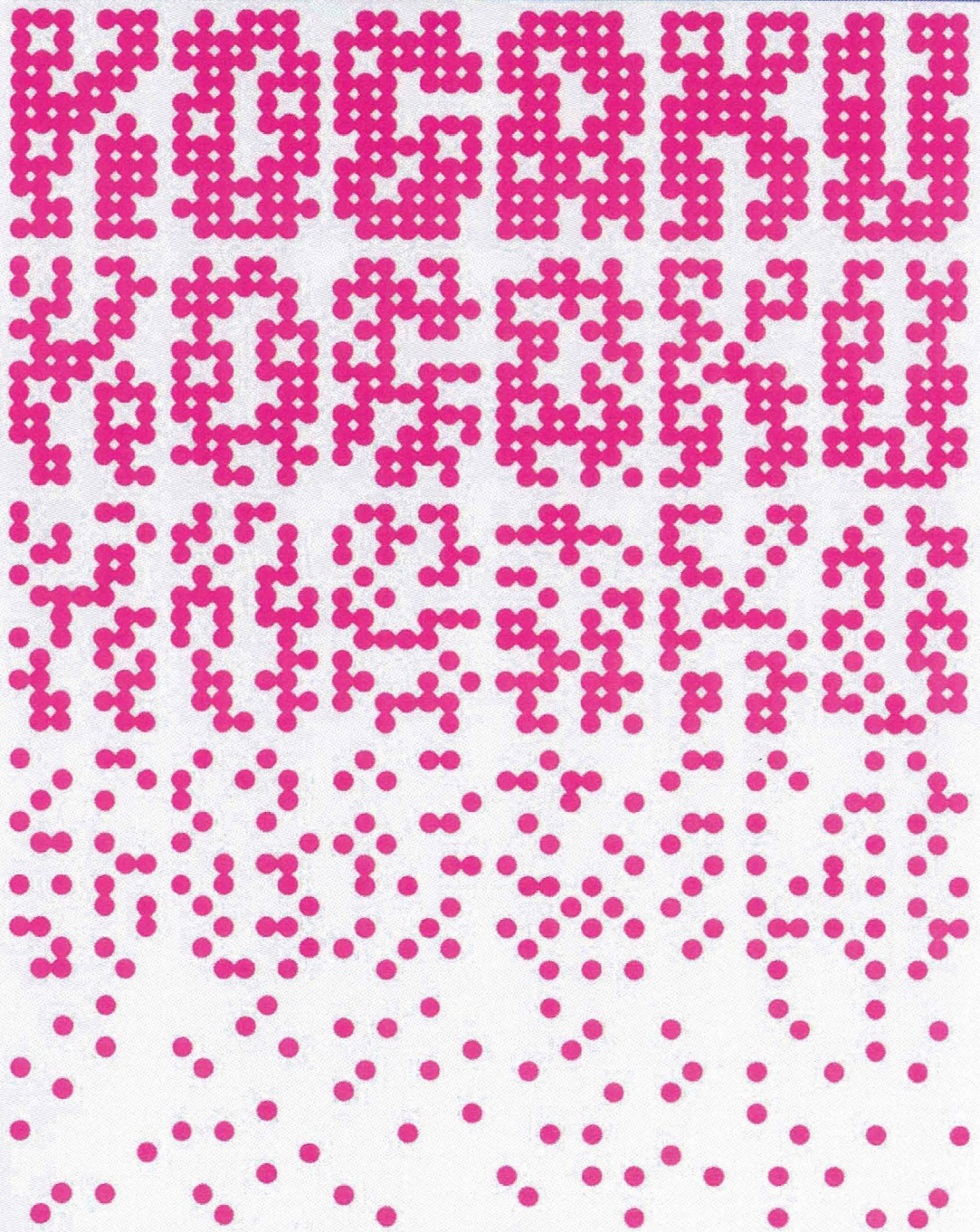
光学

KODENKI

JAPANESE JOURNAL OF OPTICS



A PUBLICATION OF THE OPTICAL SOCIETY OF JAPAN,
THE JAPAN SOCIETY OF APPLIED PHYSICS.



2013
11
VOL.42

日本光学会(応用物理学会)

<http://osj-jsap.jp>

ISSN 0389-6625

走査型レーザーイオン化による生体組織の質量イメージング

佐野 圭吾・瀬藤 光利

Imaging Mass Spectrometry for Biospecimen by Scanning Laser Ionization

Keigo SANO and Mitsutoshi SETOU

Imaging mass spectrometry is a technique to add spatial information by performing a three-dimensional or two-dimensional mass spectrometry. Instrument for the mass imaging consist of ionization unit, performing ionization of the sample by the method using electron, ionizing spray, light, etc., and mass spectrometer unit performing analysis. Laser beam is mainly used in the method of using light to ionization, and high efficient ionization of the large molecule can be by using matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI). There is a scanning and stigmatic type in the mass imaging of using laser. We introduce a bioimaging with the scanning laser ionization. The scanning mass imaging is widely used for analysis of physiological tissue since this imaging has the characteristics that can simultaneously visualize variety of molecules, including relatively high molecules, without labeling.

Key words: scanning laser ionization, imaging mass spectrometry, visualization for biomolecule, tissue section

走査型レーザーイオン化技術により、位置情報をもたない質量分析という解析技術に位置情報が与えることができる。本稿では、走査型レーザーによるマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix assisted laser desorption/ionization; MALDI) 質量イメージングについて解説するとともに、生体組織試料分析への応用と最先端について解説したい。

1. 質量イメージング装置

質量イメージング装置は、光学観察を行い MALDI 法により試料のイオン化を行う光学観察部と、質量分析のための装置からなる質量分析部によって構成される (図1)。質量イメージングを行うための装置は、日本では島津製作所や日本電子、海外では AB SCIEX 社や Bruker Daltonics 社などから発売されている。以下のサイトに性能を含めた一覧表が載っている (<http://www.maldi-msi.org>)。

1.1 マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法

2002年にノーベル化学賞を受賞した田中¹⁾と、Hillenkamp、

Karas²⁾らによってソフトイオン化法である MALDI 法が開発され、従来のイオン化法では壊れやすかった分子量 10 万以上のたんぱく質や DNA などの高分子生体物質の分析が可能となった。MALDI 法の詳細は本号の他の解説をご覧ください。走査型の MALDI 質量イメージングでは、この操作を細胞や組織切片上の 1 点 1 点に走査状に行い、それぞれ点で発生したイオンを分析して各点におけるシグナル強度の相対比から二次元イオンマップを構築することによりイメージングを行う³⁾。

1.2 イオン化部

光学顕微鏡と同様の機構を備え光学観察可能な装置を備えたものと、あらかじめ撮影した画像と位置情報を合わせるだけの簡便な観察装置を備えたものがあり、レーザー照射によるイオン化はこの部分で行う。

一般的な MALDI 法では試料を真空中に置いて観察するため、揮発しやすい物質は気化してしまい、組織形態が変化してしまうことがある。生体組織の微細な構造や生体分子の構造を保ち、観察で着目した部位を正確にイオン化さ

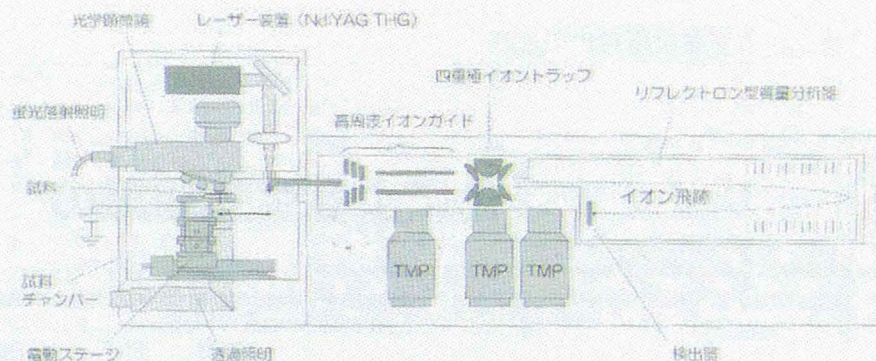


図1 質量イメージング装置 (iMScope) 概略図。可動式ステージに乗せられた試料は、光学観察時には顕微鏡下に、質量分析時にはMALDI法のレーザー照射位置にそれぞれ移動する。イオン化された分子はイオントラップを通った後、TOF-MSにより質量分析が行われる。島津製作所提供。

せるには、大気圧下MALDI法を採用している機器が望ましい。ただし、真空下と大気圧下では物質によってはイオン化の効率が同一とは限らず、真空下でイオン化しやすい物質や大気圧下でイオン化しやすい物質がある。

(1) レーザーの波長について：イオン化のための照射レーザーは窒素レーザー (337 nm) やNd:YAGレーザーの第三高調波 (355 nm) の紫外線レーザーを用い、マトリックスの多くがベンゼン環の紫外吸収を用いてイオン化を行っている。質量イメージングの研究の黎明期には自由電子レーザーや波長可変レーザーを用いた学会発表も散見されたが、紫外吸収マトリックスを使う限りにおいて紫外に比べて格段に有利な点はなかったようである。一方、マトリックスを使わないレーザー脱離イオン化 (laser desorption/ionization; LDI) であれば、生体試料に多く含まれる水の赤外吸収を用いるべく1000 nm以上の赤外線レーザーを使用することには意味があり、質量イメージングも報告されている¹⁴が、感度や解像度に劣り今のところ一般的ではない。赤外レーザーの低いイオン化効率については、フェムト秒レーザーを用いて光子エネルギーを上げることで改善することができる¹⁵との報告もある。

(2) レーザー照射径について：最新型の質量イメージング装置はレーザー径を約5 μmまで絞ることが可能となっており、質量イメージングの空間分解能も同様に最小5 μmとなっている。レーザー周波数は1000~2000 Hzでレーザー照射の連続安定性が保たれ、解析時間の大幅な短縮を実現している¹⁶。

(3) レーザーのビームプロファイルについて：ガウシアンタイプのビームプロファイルを機械的に分散させることにより、試料の消費の抑制やSN比の向上が可能である¹⁷。

1.3 質量分析部

質量イメージング装置では、飛行時間型質量分析 (time of flight mass spectrometry; TOF-MS) が多く採用されてい

る。その理由は、生成されたイオンを効率的に検出器に導くことができ、原理的に測定できる質量範囲に制限がないからである。また、物質の構造解析を行うためにタンデム質量分析 (MSⁿ) の装置を備えた質量イメージング装置もある。MALDI法によってイオン化した分子を分解・断片化し、断片化前の化合物の質量数や断片化した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により化合物の同定を行う。

2. 質量イメージングの実際

質量イメージングでは試料の調整が重要な要素となる。また、生命科学分野での質量分析では、薬物、代謝物、脂質、ペプチド、たんぱく質と幅広い分子種が解析対象とされており、低分子から高分子までの幅広い質量とさまざまな性質をもつ分子が対象となる。MALDI質量イメージングでは、解析対象分子に適したマトリックスを選択し、そのマトリックスと試料が緊密に混ざり合って結晶化され、解析対象分子のイオン化が行われやすい状況になっている必要がある。以下に、試料調製、前処理、マトリックス塗布、測定方法、データ解析、分子同定といった質量イメージングの実際について述べる。

2.1 試料調製

一般的に対象となるのは組織切片であり、生体から抽出した試料を速やかに凍結させて用いる。通常の凍結切片ブロック作製で用いられる包埋剤の多くは利用できない。これらの包埋剤の成分であるポリマー性の樹脂化合物はイオン化効率が非常によい場合が多く、目的とする生体分子のイオン化を抑制するためである。そこで、通常は凍結した試料の上層部においてのみ包埋剤を用いて凍結切片作製機の試料盤に固定する。試料が微小で包埋剤に埋もれてしまうような場合は、carboxymethyl celluloseのように生体分子のイオン化を抑制しない包埋剤を用いる。切片の厚さは

2 μm のような薄いものほどイオン化した生体分子のSN比が向上することが明らかになっている⁸⁾が、安定して切片を作製することを考慮すると8~12 μm 程度の厚さが一般的である。切片は原則として導電性素材でコートされた専用のスライドガラスの上に乗せる。導電性素材の酸化インジウムスズ(indium-tin-oxide; ITO)でコートされたスライドガラスが多く用いられる。これは、MALDI法のレーザー照射によって生じた余剰電荷を、試料台を通じて逃がすことにより、試料上での複数荷の荷電イオンの発生による試料イオンのロスを防ぐためである。

2.2 前処理法

特定の種類の物質の検出感度を上昇させる目的で、ガスクロマトグラフィー質量分析や液体クロマトグラフィー質量分析で行われている誘導体化が行われている。特定の官能基や化学構造を標的として、他の原子や原子団に置換することでイオン化効率を上昇させる方法である。1つの薬剤に対して複数の方法を試して検出効率を比較した報告⁹⁾や、ペプチドのスルホン化による誘導体化やN末端を誘導体化して効率的な検出を行った報告¹⁰⁾などがある。また、特異性をもったプローブや抗体などを用いた標的化質量イメージングも行われている。プローブや抗体などに光開裂性分子をリンカーとして既知の化合物を標識し、この複合体を組織切片に対して反応させる。MALDI法のレーザー照射によって既知の化合物が切り離され、イオン化されることによって解析対象物質の分布を解析する方法である¹¹⁾。標識化合物の種類を分けることによって複数の解析対象を同時に解析することが可能である。

2.3 マトリックス塗布

マトリックスは通常のMALDI法で用いられるものが使用可能であり、解析対象分子により最適なマトリックスを選択するが、後述する塗布工程が可能な化合物である必要がある。代表的なものとしては、たんぱく質の測定ではシナピン酸(sinapinic acid; SA)、脂質やペプチドの測定では2,5-ジヒドロキシ安息香酸(2,5-dihydroxybenzoic acid; 2,5-DHB)や α -シアノ-4-ヒドロキシシネイ皮酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA)、また脂質のネガティブイオン検出に関しては9-アミノアクリジン(9-aminoacridine; 9-AA)が用いられる。また、レーザー直接描画法(laser direct imaging)において行われているナノ粒子を用いた表面支援レーザー脱離イオン化(surface-assisted laser desorption/ionization; SALDI)を応用し、非晶質の機能性ナノ粒子をマトリックスとして使用する方法もある。

一般的なMALDI法質量分析では試料とマトリックスの混合液を滴下・乾燥後に解析を行うのに対し、質量イメー

ジングでは、マニュアルスプレー法、自動スプレー法、ドロップレット法、蒸着法といった方法を用いて、試料の位置情報を守りつつマトリックスの微細結晶によるコートを行う。マニュアルスプレー法では実験者自身がスプレイヤーを操作し、空気圧、マトリックス溶液供給量、スプレイヤーと組織間の距離を調整することにより、均一かつ微小なマトリックス結晶を形成することが可能である。使用するマトリックスの粘性や揮発性を考慮に入れて微調整が可能な反面、初心者には難易度が高く、鍛錬を必要とする。また試料ごとに同一のマトリックス層を形成することが難しい。自動スプレー法は、ImagePrep (Bruker Daltonics社)やTM-sprayer (HTX Imaging社)などの装置を使用する。機械化により作業者の技術力に依存せずに作業が安定するとともに、反応チャンバー内の環境を制御することにより環境安定性も増し、乾燥時間を調整することも可能である。ドロップレット法は、ケミカルインクジェットプリンターCHIP-1000(島津製作所)を用いて100 μl の微量液滴を滴下し、組織切片上で結晶化させる方法である。液滴は微量滴下ではあるものの、組織上で直径100~200 μm 程度に広がってしまうため、スポット内での位置情報は失われ、高解像イメージングには不向きである。一方で、同一スポットに対して複数回の滴下が行えるため、1回目ではたんぱく分解酵素などの前処理試薬を滴下し、2回目ではマトリックスを滴下して解析することが可能である。超高分子のたんぱく質解析や検出感度の低い分子種の高感度解析に力を発揮する¹²⁾。蒸着法は、iMLayer(島津製作所)を用いて粉末のままのマトリックスを真空チャンバー内で昇華させ、組織試料へと蒸着させる方法である。昇華させる温度と蒸着時間を制御することにより、マトリックス塗布量を厳密に制御することが可能である。蒸着によるマトリックス結晶は、他の方法による結晶と比較して最も微小であり、高解像解析に最も適した方法である。

2.4 測定方法

マトリックス塗布された試料を装置へと導入し、測定領域を設定、レーザーの強さやピッチを設定することにより、レーザー照射が開始されて各測定点からのデータを取得する。組織全体に対して高解像度イメージングを行い、幅広い質量電荷比(m/z)レンジで網羅的に解析することが理想的である。しかしこのような測定を行った場合、データが大量となり、解析も長時間となってしまう現実的ではない。MALDI質量イメージングによる解析は網羅的に行えることが利点ではあるが、目的に応じた測定条件を設定すべきである。例えば空間分解能は、分子の組織内分布を解析する場合などには広げて解析を行う。また、雑多

な物質を多く含む生体組織試料に対する直接イオン化では、目的物質由来のイオンの選別を行うことにより精密な質量の検出が行える。任意の m/z のイオンを分離させることが可能であるイオントラップを利用するか、目的外イオンを破棄することにより感度を上昇させる。これにより解析時間の短縮も行える。

2.5 データ解析

走査状に行われた質量分析の各測定点から取得されたマススペクトルから任意のシグナルを選択することで、そのシグナルに対応する分子の分布を可視化することが可能となる。この処理を行うソフトウェアは装置ごとに各メーカーが用意しているが、ノバルティス社によって BioMap というソフトウェアがフリーで提供されている (<http://www.malldi-msi.org>)。従来のソフトウェアはユーザーのマニュアル操作によって行われ、シグナルピークを一つ一つ選択して画像を構築するため、組織上における特異的なシグナルの検出などに多くの時間が必要であった。最近では、同様の組織内分布を示すシグナルの自動検出や、領域間のシグナル強度の有意差検定など、初心者でも容易に解析が行えるようなソフトウェアが装置に組み込まれてきている。

2.6 分子同定

質量イメージングで得られるデータは m/z とそのシグナル強度、そして位置情報である。これらの情報だけでは分子構造が推定できず、 MS^n 解析が必要となることがある。iMScope のようにイオントラップを備えている装置は、イオンの分解・断片化により断片化イオンの情報を検出することが可能である。こうして得られた分子情報は、MassBank (<http://www.massbank.jp>) をはじめとしたデータベースを照合に用いることにより、分子推定が可能となる。このとき、既知の分子であれば試薬メーカーから購入するか、東京大学創薬オープンイノベーションセンター (<http://www.ocdd.u-tokyo.ac.jp>) のような化合物ライブラリーから取り寄せるかして標準試料を取得し、 MS^n 解析を行って組織から得られたマススペクトルと比較することにより、分子推定の信頼性を向上させることも可能である。

3. 生体組織試料分析への応用

ここでは、これまでに筆者らが発表してきた質量イメージングの生体組織への応用研究を例に、異なる分子種の解析を紹介する。

3.1 たんぱく質・ペプチド解析

たんぱく質のような高分子はイオン化効率が悪く、そのまま検出することも装置的に難しい場合が多い。そこで、

前述したドロップレット法を用いて組織上において酵素消化を行い、高分子を断片化によってペプチドとした後に解析することが多い。また、生体中から検出する上で豊富に含まれる脂質は他分子のイオン化効率を抑制する。これを防ぐため、組織切片を有機溶媒に浸漬させて脂質を除去する方法も採られる。有機溶媒は、除去後の組織上におけるマトリックス結晶の形成も考慮に入れて選択される。ここではパラフィン包埋された胃癌の臨床検体を解析した例を紹介する。臨床検体は医療機関においては組織観察を目的としてパラフィン包埋された病理試料として処理されることが多い。このような試料の場合、シグナルの強度は低くなるものの、解析前にキシレンによる脱パラフィン処理を行うことによって解析が可能となる。脱パラフィンの後、トリプシンによる消化反応を行い、マトリックスとして DHB を塗布し、測定を行った。 m/z 2000 以下では十分なシグナルが得られ、低分化型胃癌の特異的シグナルとして m/z 1325.6、すべての型の胃癌特異的シグナルとして m/z 976.4 をそれぞれ同定し MS^2 解析を行ったところ、それぞれ Histone H4 および actin であることが判明し、胃癌の分化度を分けるマーカーを特定した¹³⁾ (図2)。

3.2 薬物動態解析

薬物動態解析においても質量イメージングを用いることができる。解析対象薬物に対して適切なマトリックスを選択する必要があるが、通常の薬物動態解析では対象ごとのプローブを作製する必要があることを考えれば大幅な低予算化および試験期間の短縮化が可能である。ここではマウスにヒスタミン H2 受容体拮抗薬であるファモチジンを投与し、その薬物動態解析を行った例を示す¹⁴⁾。ファモチジンを投与したマウスの全身切片を作製し、質量イメージングを行うと、ファモチジンのピークと考えられる m/z 338.05 が全身臓器のうち腎臓に一致する領域で相対的に高いシグナルが観測された (図3)。ファモチジンの腎臓への分布は、全身オートラジオグラフィーの結果と同様であり、質量イメージングが薬物動態解析にも有効であることが示された。さらに腎臓で高解像度解析を行うと、腎盂とよばれる構造で他の構造と比較して相対的に高いシグナルの分布が観測された。腎盂は尿の排泄過程で水分の再吸収による濃縮を受ける場所であるため、ファモチジンが排出過程で濃縮を受けている様子が観察されたと考えられる。

3.3 低分子代謝物解析

代謝物の網羅的解析 (メタボロミクス) は質量分析による代表的な解析である。質量イメージングにおいては、臓器摘出に注意を払うことによってイメージングが可能となる。これは代謝物の多くで死後分解による影響を大きく受

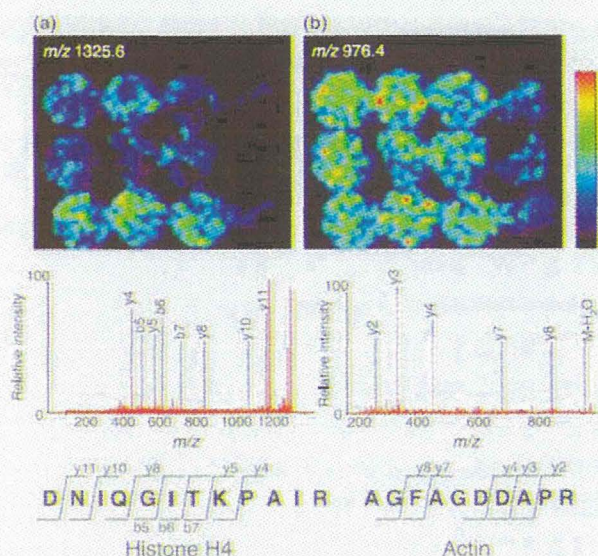


図2 パラフィン包埋済み病理試料から作製した胃癌切片の質量イメージング像。 m/z 1325.6 (a) と m/z 976.4 (b) のシグナル画像三段に置かれた円形の試料の上から中分化型癌組織、高分化型癌組織、低分化型癌組織。中段スペクトルはMS²解析の結果。下段はデータベースによるHistone H4とActinのC末端側領域のイオン断片化情報。文献(13)より改変して転載。

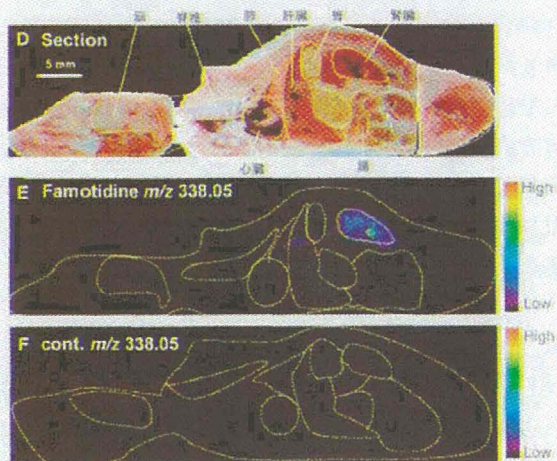


図3 マウス全身切片の質量イメージング像。ファモチジン投与個体 (E) ではファモチジン由来のシグナル (m/z 338.05) が胃臓の領域において検出された。未投与個体 (F) では同シグナルは検出されない。文献(14)より改変して転載。

けるためである。ここでは迅速摘出したマウス脳切片に9-AAを塗布し、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate; ATP)、アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate; ADP)、アデノシン一リン酸 (adenosine monophosphate; AMP) といったエネルギー代謝産物を検出した例を紹介する。カイニン酸を投与することによりてんかん発作を誘導させたマウス脳の切片を質量イメージングすると、カイ

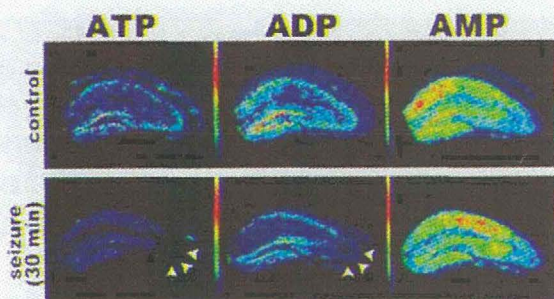


図4 マウス脳切片の質量イメージング像。上段はコントロール、下段はてんかん発作を誘導した脳。ATPとADPが海馬のCA3領域 (矢頭) で顕著に減少していることが示された。文献(15)より改変して転載。

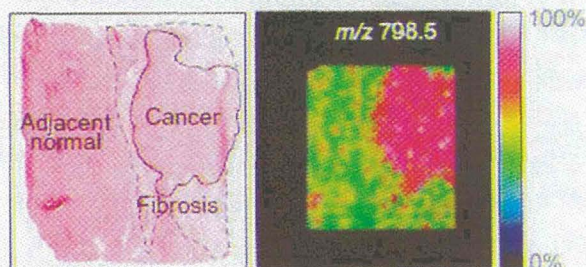


図5 ヒト肝臓組織切片の質量イメージング像。 m/z 798.5の、オレイン酸を構成要素に持つホスファチジルコリン (PC) (16:0/18:1) が癌部に分布することが示された。文献(16)より改変して転載。

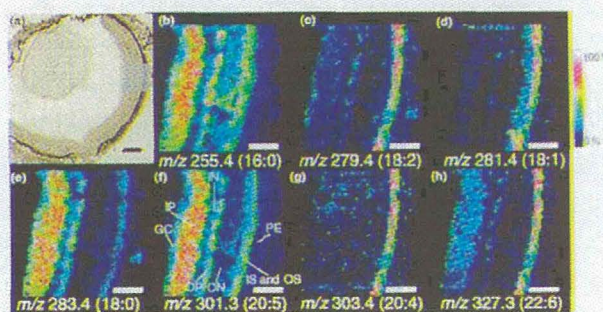


図6 マウス網膜切片の質量イメージング像。網膜の各層における脂肪酸分布が異なることが示された。パルミチン酸 (16:0, m/z 255.4)、リノレン酸 (18:2, m/z 279.4)、オレイン酸 (18:1, m/z 281.4)、ステアリン酸 (18:0, m/z 283.4)、eicosapentanoic acid (20:5, m/z 301.3)、アラキドン酸 (20:4, m/z 303.4)、ドコサヘキサエン酸 (22:6, m/z 327.3)。文献(18)より改変して転載。

ニン酸受容体が豊富な海馬CA3領域でATPとADPが顕著に減少していることが見いだされた⁽¹⁵⁾ (図4)。この結果により、てんかん発作による興奮毒性にさらされたCA3領域で選択的エネルギー代謝の存在が示唆された。

3.4 脂質解析

脂質は構造の違いから、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine; PC)、スフィンゴミエリン (sphingomyelin;

SM), ホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine; PE), ホスファチジルセリン (phosphatidylserine; PS), ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol; PI) 等に分類される。ここでは、組織切片にDHBを塗布し、リン脂質を検出した例を紹介する。ヒト肝癌組織切片にスプレーでマトリックスを塗布し質量イメージングを行うと、癌部にパルミトレイン酸やオレイン酸を2番目のアシル基にもつPCが強く分布していることが示された¹⁸⁾(図5)。リン脂質は細胞二重膜を構成する主要成分であり、生体中における存在量は非常に豊富である。近年、シグナル伝達に関与することが盛んに報告されており、癌では癌組織特異的な脂質代謝が知られている。質量イメージングではリン脂質の検出は簡便であり、脂肪酸の組成の違いによる分布を識別できるものの、他の方法では検出することも難しい。このため、質量イメージングを用いた解析では盛んに研究が行われており、本手法の発達により脂質イメージング分野は急速に開拓されてきている。

脂質を解析する際に、イオン化条件によっては脂質が分解されて構成成分である脂肪酸が検出されることがある。もともと遊離しているものもあるが、生体中の存在比から、おもにリン脂質に結合しているものが断片化され、検出されていると考えられる。そのことを逆手に取り、断片化をおこしやすいマトリックスとして銀ナノ粒子を用いることで脂肪酸のイメージングが可能である。銀ナノ粒子の側面には、溶解性や安定性維持のために最適な脂肪酸が配位合成される。銀ナノ粒子はスプレー法により塗布する。この銀ナノ粒子をマウス網膜切片へと塗布し、質量イメージングにより生体分子の局所的な分布をイメージングした例を紹介する。マウスの網膜は幅200~300 μm の微小領域内に9層もの膜構造を有している。ドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA, m/z 327.3) は、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の関わりが強く過去に報告されているが、その分布は明らかでなかった。この試料に対して10 μm の間隔で測定したところ、脂肪酸であるDHAの特徴的な分布がロドプシンの分布と重なる形で観察された¹⁷⁾(図6)。

質量イメージングは一度に数千から数万の分子の量的な変化を、位置情報を維持したまま観察できる手法である。また、標識されたプローブや抗体を新たに作製する必要がなく、ターゲットを絞らずに観察できる手法でもあることから、薬物投与や生体に操作を加えたときの反応を網羅的に解析することが可能である。この利点から、製薬メー

カーで広く使用されている。今後はさらなる高解像度化や高感度化により、一細胞単位や細胞内小器官を標的とした質量イメージングが進展していくと考えられる。

最後に、最近のMALDI質量イメージングにおける注目すべき新しい光学技術を紹介して本稿を終えたい。多くの質量イメージング装置ではイオン化分子を効率よく回収解析するため、垂直方向にイオン導入口が置かれ、レーザーを斜めから照射せざるを得ない。斜めから照射されたレーザーは強度を上げると、アブレーションの範囲が広がり、解像度の低下の要因となる。これを防ぐ方法として、試料が乗ったスライドガラスの裏からレーザーを照射するバックスキッター法が開発されている¹⁹⁾。また、MALDI法以外に生体試料をイオン化する方法として、レーザー照射によるアブレーションで生じる分子を含んだブルームに対してエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI) 法を行うLAESI (laser ablation ESI) も開発されており¹⁹⁾、それぞれ高解像度化を実現している。さらに、完全にマトリックスをアブレーションさせた後にレーザースポットをずらしてイオン化させることによってレーザー径以下の解像度を得ることが可能となるオーバーサンプリング法²⁰⁾のように、走査方法の開発による高解像度化も試みられている。質量イメージング全般においては、ビーム広がりやコヒーレンスなどのレーザーの性質と生体組織試料分析での適合性についての報告はあまりなく、今後の研究課題である。こうした光学技術の応用がさらに今後もMALDI質量イメージングの発展に寄与することが期待される。

文 献

- 1) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida: "Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2** (1988) 151-153.
- 2) K. Strupat, M. Karas and F. Hillenkamp: "2, 5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **III** (1991) 89-102.
- 3) R. L. Caldwell and R. M. Caprioli: "Tissue profiling by mass spectrometry: A review of methodology and applications," *Mol. Cell Proteomics*, **4** (2005) 394-401.
- 4) Y. Li, B. Shrestha and A. Vertes: "Atmospheric pressure infrared MALDI imaging mass spectrometry for plant metabolomics," *Anal. Chem.*, **80** (2008) 407-420.
- 5) Y. Coello, A. D. Jones, T. C. Gunaratne and M. Dantus: "Atmospheric pressure femtosecond laser imaging mass spectrometry," *Anal. Chem.*, **82** (2010) 2753-2758.
- 6) S. Khatib-Shahidi, M. Andersson, J. L. Herman, T. A. Gillespie and R. M. Caprioli: "Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry," *Anal. Chem.*, **78** (2006) 6448-6456.
- 7) A. Holle, A. Haase, M. Kayser and J. Hohndorf: "Optimizing UV

- laser focus profiles for improved MALDI performance," *J. Mass Spectrom.*, **41** (2006) 705-716.
- 8) Y. Sugiura, S. Shimma and M. Setou: "Thin sectioning improves the peak intensity and signal-to-noise ratio in direct tissue mass spectrometry," *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54** (2006) 45-48.
 - 9) M. L. Manier, M. L. Reyzer, A. Goh, V. Dartois, L. E. Via, C. E. Barry, 3rd and R. M. Caprioli: "Reagent precoated targets for rapid in-tissue derivatization of the anti-tuberculosis drug isoniazid followed by MALDI imaging mass spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **22** (2011) 1409-1419.
 - 10) J. Franck, M. Elayed, M. Wisztorski, M. Salzet and I. Fournier: "On-tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing protein identification in MALDI mass spectrometric imaging strategies," *Anal. Chem.*, **81** (2009) 8305-8317.
 - 11) R. Lemaire, J. Stauber, M. Wisztorski, C. Van Camp, A. Desmoris, M. Deschamps, G. Proess, I. Rudlof, A. S. Woods, R. Day, M. Salzet and I. Fournier: "Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag," *J. Proteome. Res.*, **6** (2007) 2057-2067.
 - 12) M. R. Groseclose, M. Andersson, W. M. Hardesty and R. M. Caprioli: "Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry," *J. Mass Spectrom.*, **42** (2007) 254-262.
 - 13) 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 and H. Konno: "Imaging mass spectrometry of gastric carcinoma in formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarray," *Cancer Sci.*, **101** (2010) 267-273.
 - 14) Y. Satio, T. Hayasaka, K. Onoue, Y. Takizawa, S. Kajihara, K. Ogawa and M. Setou: "Pharmacokinetic analysis using a high spatial-resolution mass microscope," *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **59** (2011) 79-84.
 - 15) Y. Sugiura, R. Taguchi and M. Setou: "Visualization of spatiotemporal energy dynamics of hippocampal neurons by mass spectrometry during a kainate-induced seizure," *PLoS One*, **6** (2011) e17952.
 - 16) Y. Morita, T. Sakaguchi, K. Ikegami, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, V. T. Hang, H. Tanaka, T. Harada, Y. Shibasaki, A. Suzuki, K. Fukumoto, K. Inaba, M. Murakami, M. Setou and H. Konno: "Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression," *J. Hepatol.*, **59** (2013) 292-299.
 - 17) T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, K. Shrivastava, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto and M. Setou: "Imaging mass spectrometry with silver nanoparticles reveals the distribution of fatty acids in mouse retinal sections," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21** (2010) 1446-1454.
 - 18) A. Zavalin, E. M. Todd, P. D. Rawhouser, J. Yang, J. L. Norris and R. M. Caprioli: "Direct imaging of single cells and tissue at sub-cellular spatial resolution using transmission geometry MALDI MS," *J. Mass Spectrom.*, **47** (2013) 1473-1481.
 - 19) P. Nemes, H. Huang and A. Vertes: "Internal energy deposition and ion fragmentation in atmospheric-pressure mid-infrared laser ablation electrospray ionization," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14** (2012) 2501-2507.
 - 20) J. C. Jurchen, S. S. Rubakhin and J. V. Sweedler: "MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16** (2005) 1654-1659.

(2013年8月7日受理)