

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<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>。質量顕微鏡法

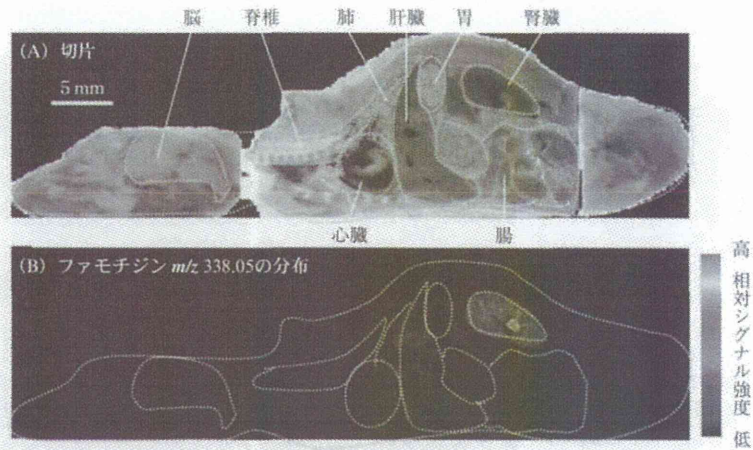


図3 マウス全身切片におけるファモチジンのイメージング像

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 TiO<sub>2</sub> 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

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

$$p = \alpha E$$

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

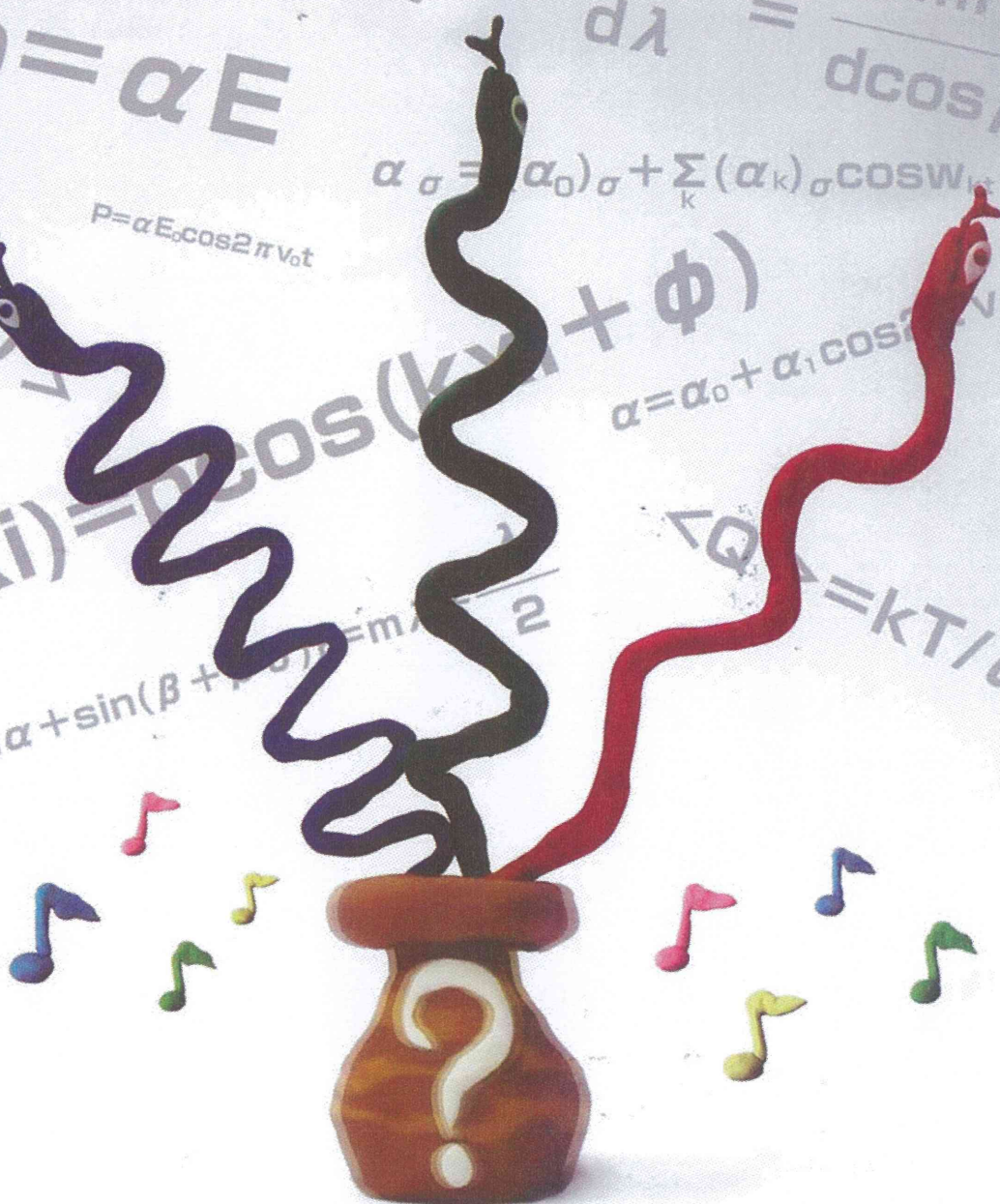
$$\frac{dx}{d\lambda} = \frac{fd\beta}{d\lambda} = \frac{mf}{d \cos \beta}$$

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

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

$$d(\sin \alpha + \sin(\beta + \dots)) = m \lambda / 2$$

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



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<sup>1)2)</sup>。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<sup>3)4)</sup>。

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<sup>5)</sup>。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。

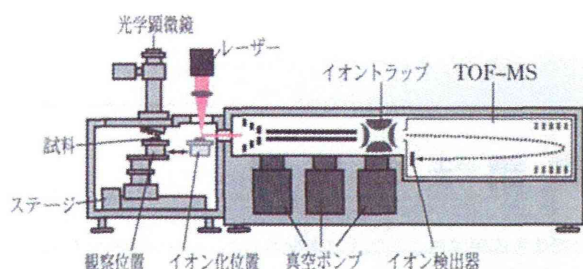
抗原性のない分子や未知分子を解析するための代表的な手法として質量分析法がある。開発された当初、質量分析法は低分子量化合物の解析に用いられていた。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix assisted

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<sup>6)</sup>。しかし、生体試料を質量分析法で解析する際には、試料を破碎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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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  $\mu\text{m}$ ) 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<sup>9)10)</sup>。

## 3 質量顕微鏡法とは

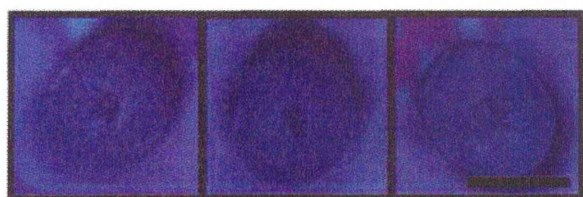
MALDIは、2,5-ジヒドロキシ安息香酸や $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸といった有機化合物に代表されるイオン化補助剤のマトリックスを観察試料に塗布して結晶を作り、その後レーザー照射することで物質をイオン化する方法であり、幅広い生体分子の分析と構造解析に適している<sup>11)</sup>。生体組織切片上の測定領域を微小径



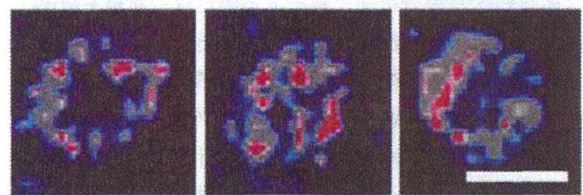
ステージに乗せられた試料は、観察位置において光学顕微鏡により観察されイオン化位置においてレーザーを照射される。イオン化された分子は質量分析部分へ送られる。質量分析部分はイオントラップやTOF-MSにより構成される。

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<sup>12)</sup>より改変して転用。スケールバー：100  $\mu\text{m}$

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<sup>13)</sup>。

#### 4 今後の展望

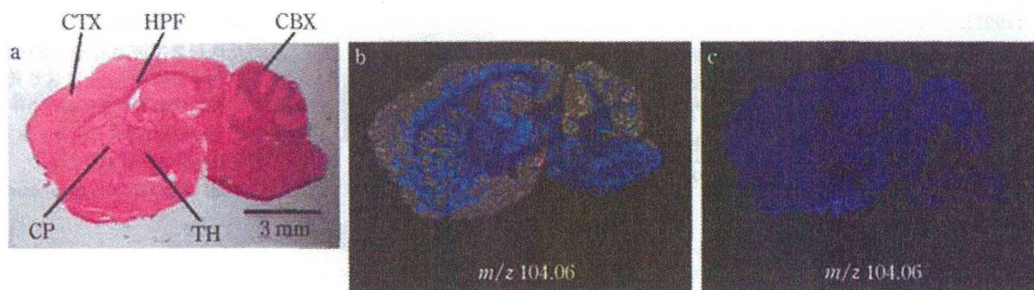
##### 4.1 医学研究の要請に応えた質量顕微鏡法の改良

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。単一細胞のゲノミクス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<sup>14)</sup>。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  $\mu\text{m}$ 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<sup>7)</sup>。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の銀や二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<sup>15)</sup> (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<sup>16)</sup>。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<sup>17)</sup>。

#### 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の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)  
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で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<sup>1)</sup>。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  $\mu$  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を用いた従来型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<sup>2)</sup>。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トな化合物と、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。例えば齋藤らは鳥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<sup>3)</sup>。ファモチジンはヒスタミンH<sub>2</sub>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  $\mu$  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間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<sup>4)</sup>。

### 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.

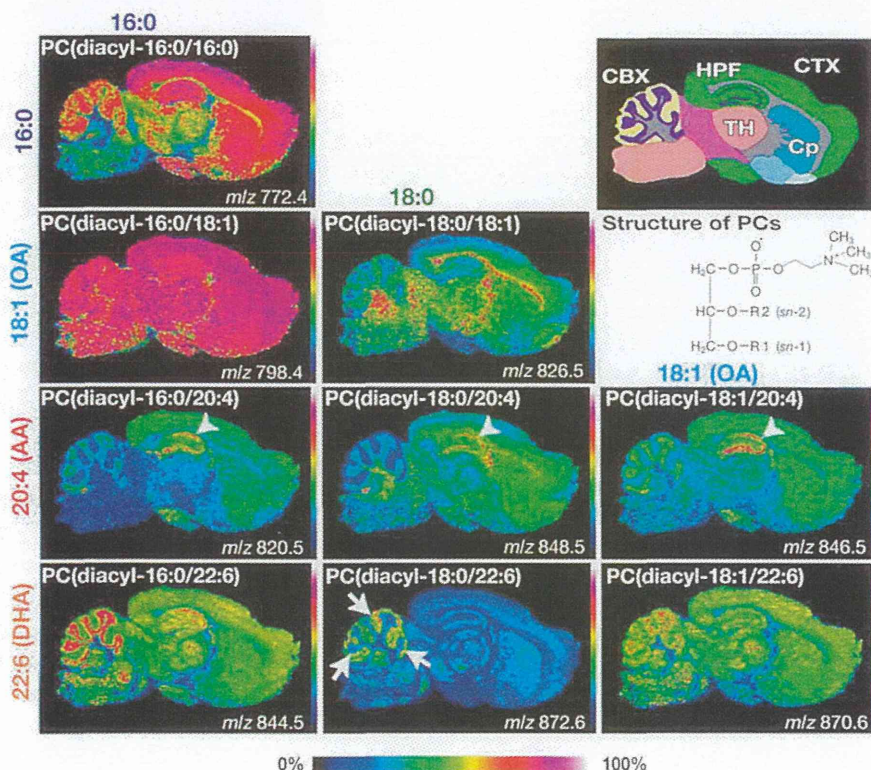


図1.マウス脳矢状切片における異なるフォスファチジルコリン(PC)分子種の分布のMALDI-IMSによる可視化。脂肪酸(FA)組成の異なる複数のフォスファチジルコリン分子種が不均一な分布を示すことが明らかになった。CBX, 小脳皮質; CP, 線条体; CTX, 大脳皮質; HPF, 海馬体; TH, 視床。This research was originally published in Journal of Lipid Research. Sugiura Y, Konishi Y, Zaima N, Kajihara S, Nakanishi H, Taguchi R, Setou M.. 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。<sup>1,2)</sup> 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<sup>3)</sup>と、Hillenkamp, Karas<sup>4)</sup>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。