

- Sunner, J., E. Dratz and Y.C. Chen. 1995. Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions. *Anal. Chem.* 67: 4335–4342.
- Taira, S., S. Moritake, T. Hatanaka, Y. Ichyanagi and M. Setou. 2009. Functionalized Magnetic Nanoparticles as an *In Vivo* Delivery System pp. 571–587. *In: J.W. Lee and R.S. Foote. [eds.] Micro and Nano Technologies in Bioanalysis: Methods and Protocols, Methods Mol. Biol.* 544. Humana press. New York.
- Taira, S., Y. Sugiura, S. Moritake, S. Shimma, Y. Ichyanagi and M. Setou. 2008. Nanoparticle-assisted laser desorption/ionization based mass imaging with cellular resolution. *Anal. Chem.* 80: 4761–4766.
- Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida and T. Matsuo. 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2: 151–153.
- Watanabe, T., K. Okumura, H. Kawasaki and R. Arakawa. 2009. Effect of urea surface modification and photocatalytic cleaning on surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry with amorphous TiO_2 nanoparticles. *J. Mass Spectrom.* 44: 1443–1451.
- Wu, H.P., C.J. Yu, C.Y. Lin, Y.H. Lin and W.L. Tseng. 2009. Gold nanoparticles as assisted matrices for the detection of biomolecules in a high-salt solution through laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 20: 875–882.
- Yanagisawa, K., Y. Shyr, B.J. Xu, P.P. Massion, P.H. Larsen, B.C. White, J.R. Roberts, M. Edgerton, A. Gonzalez and S. Nadaf. 2003. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet* 362: 433–439.
- Yang, H.J., I. Ishizaki, N. Sanada, N. Zaima, Y. Sugiura, I. Yao, K. Ikegami and M. Setou. 2010. Detection of characteristic distributions of phospholipid head groups and fatty acids on neurite surface by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Med. Mol. Morphol.* 43: 158–164.

第1章 技術編

8. 質量顕微鏡

永田泰之・井手佳美・瀬藤光利

質量顕微鏡は、質量分析によって得られる生化学情報と顕微鏡観察による形態情報を融合させる新しい技術である。近年、生体内における脂質および脂質代謝物の多様な機能が注目されている。質量顕微鏡により組成の異なる脂質の網羅的な解析が可能となり、未知の物質においても局在情報を失わずに観察することができるようになった。この技術により生体内の脂質および脂質代謝物の機能的な解析が進み、医学分野での発展が期待される。

はじめに

これまで生体分子を可視化する方法として、抗体や緑色蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) を用いる方法が行われてきた。しかし、この方法で可視化しているものは抗体や GFP であり、間接的な観察法であるといえる。こうした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 (imaging mass spectrometry: IMS) は生体分子の質量を検出することで可視化を行う。スライドガラスに載せた組織切片上で位置情報を保持しながら二次元走査的に質量分析 (mass spectrometry: MS) ¹⁾ を行うことで、物質の質量とその分布とを同時に知ることができる。さらに多段階質量分析 ²⁾ を行うことで物質の質量だけでなく構造の同定が可能である。つまり、質量顕微鏡では物質を標識せず直接検出することができ、網羅的な検出が可能であるばかりでなく、未知の分子をも検出しうる可能性をもつ。

生体内において脂質は、生体膜の主要構成成分であるだけでなくシグナル分子や脂質メディアエー

ターとして機能的な役割も有する。従来、質量分析で分析されてきたが、観察対象分子の分離・精製が必要であり、その過程で対象分子の位置情報が失われてしまうという欠点が残されていた。脂質の多様性が細胞個々の形態や働きの違いと関係すると考えられるため、その局在情報を保持したままの解析が有用である。質量顕微鏡は対象の分離・精製を必要とせず、位置情報を保ちながら測定でき、未知の物質に対してもその位置情報を失わずに生化学的情報を得ることができる。質量顕微鏡の開発により生体内での位置情報を残したままでの脂質の解析が可能となり、異なる分子種の分布を画像化できるようになった。

以下、質量顕微鏡の原理や構造、実際の測定の流れ、脂質解析への応用について解説する。

I. 質量顕微鏡とは

1. 質量顕微鏡の原理と構造

質量顕微鏡は、イオンを生成・加速するイオン源と、イオンを分離する質量分析部、分離されたイオンの検出計、質量分析部の制御とデータ処理を行うコンピュータで構成される (図1)。組織

key words

質量顕微鏡 (IMS)、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI)、ガングリオシド、二次イオン質量分析法 (SIMS)、マトリクス、薄層クロマトグラフィー、リン脂質

ており、感度向上に思われる。高材料からの測定が可能取り扱いはさらなるようになってくるのである。この研究室では、エ脂質代謝物に対するングを行うための。最新の三連四重面成分の一斉検出析での課題はデータはコンピュータ、検量線による膨大なデータに対して合わせるためには、ピーク検出パラメータが必要となる。えるようになったれるかどうかは、存する。本稿がそ

科卒業
究科修士課程修了
修了、博士 (医学)
癌細胞情報学教室

院科リビドミクス

切片を測定対象とする質量顕微鏡では、イオン化法の異なるマトリクス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI[®])と二次イオン質量分析法(secondary ion mass spectrometry: SIMS[®])が主に使われている。

イオン化された分子は電場内で加速され、質量に反比例し電荷に比例した速度を得るので、検出器に到達するまでの飛行時間に差が生じる。この差によりイオンを分離し質量を測定する分析計が飛行時間型(time-of-flight: TOF)質量分析計である。TOFは、低分子量化合物から高分子量タンパク質まで幅広い分子を測定対象とすることができ、感度が高く汎用性に優れる。TOFでは質量分解能が飛行時間に比例するため、イオンを周回飛行させることで装置を大型化せずに分解能を上げる多重周回飛行時間型(multi-turn TOF: mTOF)質量分析計が開発された。

従来の質量顕微鏡では、標本は真空中でイオン化されるため、揮発しやすい物質は酸化により組織形態が変化してしまう危険性がある。これを避けるためには、イオン化までの工程を大気圧下で行うことが望ましいと考えられる。そこで筆者らは、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、かん研究会、理化学研究所、三菱化学生命科学研究所、および大阪大学との

産学連携により、イオン化までを大気圧下で行うAP-MALDI(atmospheric pressure MALDI)を開発した。これにより、「生のまま試料を観察する」ことを可能とし、より迅速な解析や診断、治療法に貢献できる可能性を開拓した。

組織切片での位置情報を伴った質量スペクトルの数は1つの試料の測定でも数万以上になり、その情報量は膨大となるため、これを効率的に高速に解析するソフトウェアが開発されている。

2. 質量顕微鏡の分解能

われわれが開発したAP-MALDIでは、デジタルイオントラップ(DIT)を搭載することで効率的にイオンを集め、mTOFを用いて質量分解能を向上させた¹⁾。また、観察光軸とレーザー光軸を別々に制御することにより、レーザー照準精度を1 μ m以下、照射スポット直径を5 μ mに抑えることができた。しかし、マトリクス²⁾内部でのエネルギー伝播により、実際のイオン生成部位は照射スポット径よりもかなり広がるため、空間分解能はマトリクスの結晶サイズに大きく影響される。観察試料内での詳細な位置情報の取得には高い空間分解能が必要であるが、有機化合物のマトリクスを使うかぎり空間分解能15 μ mを超えることはできなかった。このため、直径数nmの微細な金属ナノ粒子をマトリクスとして使用するnano-PALDI(nanoparticle-assisted laser desorption/ionization)法が

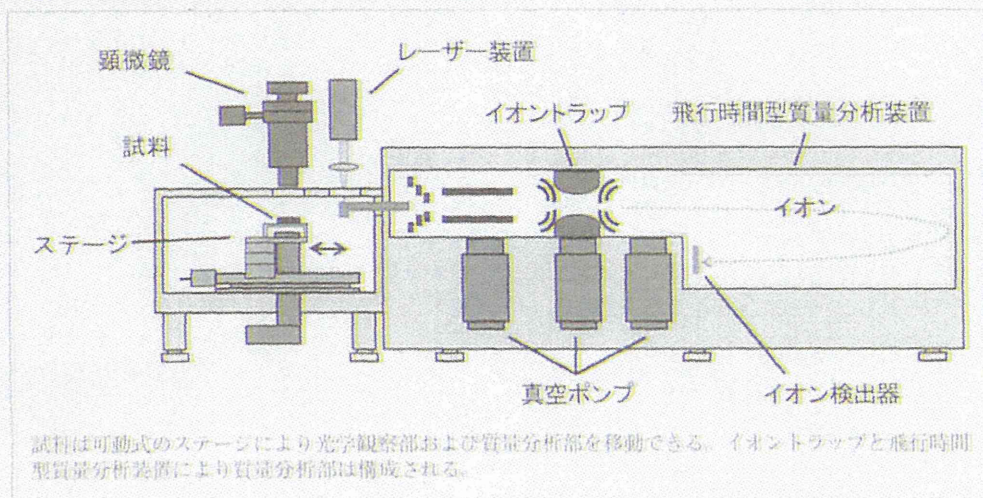
開発され、空間分解能が100nm以下に向上した³⁾。

SIMSで使用されるUVレーザーよりも短波長なレーザーを用いることで、一般的に100nmの空間分解能を実現するよりも高い空間分解能を実現する。ただし、SIMSでは単一細胞に子孫の細胞内分布を調べることは難しく、SIMSでイオン化できず、脂質や糖質などの分析は一般的にSIMSでは行えない。また、一般的にSIMSでは分子の質量を測定するが、SIMSでは分子の構造を解析できない。したがって、SIMSとMALDIを組み合わせて、分子の構造を解析し、分子の質量を測定する。SIMSとMALDIを組み合わせて、分子の構造を解析し、分子の質量を測定する。

3. 質量顕微鏡

組織切片を測定対象とする質量顕微鏡では、標本は真空中でイオン化されるため、揮発しやすい物質は酸化により組織形態が変化してしまう危険性がある。これを避けるためには、イオン化までの工程を大気圧下で行うことが望ましいと考えられる。そこで筆者らは、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、かん研究会、理化学研究所、三菱化学生命科学研究所、および大阪大学との産学連携により、イオン化までを大気圧下で行うAP-MALDI(atmospheric pressure MALDI)を開発した。これにより、「生のまま試料を観察する」ことを可能とし、より迅速な解析や診断、治療法に貢献できる可能性を開拓した。組織切片での位置情報を伴った質量スペクトルの数は1つの試料の測定でも数万以上になり、その情報量は膨大となるため、これを効率的に高速に解析するソフトウェアが開発されている。われわれが開発したAP-MALDIでは、デジタルイオントラップ(DIT)を搭載することで効率的にイオンを集め、mTOFを用いて質量分解能を向上させた¹⁾。また、観察光軸とレーザー光軸を別々に制御することにより、レーザー照準精度を1 μ m以下、照射スポット直径を5 μ mに抑えることができた。しかし、マトリクス²⁾内部でのエネルギー伝播により、実際のイオン生成部位は照射スポット径よりもかなり広がるため、空間分解能はマトリクスの結晶サイズに大きく影響される。観察試料内での詳細な位置情報の取得には高い空間分解能が必要であるが、有機化合物のマトリクスを使うかぎり空間分解能15 μ mを超えることはできなかった。このため、直径数nmの微細な金属ナノ粒子をマトリクスとして使用するnano-PALDI(nanoparticle-assisted laser desorption/ionization)法が開発され、空間分解能が100nm以下に向上した³⁾。SIMSで使用されるUVレーザーよりも短波長なレーザーを用いることで、一般的に100nmの空間分解能を実現するよりも高い空間分解能を実現する。ただし、SIMSでは単一細胞に子孫の細胞内分布を調べることは難しく、SIMSでイオン化できず、脂質や糖質などの分析は一般的にSIMSでは行えない。また、一般的にSIMSでは分子の質量を測定するが、SIMSでは分子の構造を解析できない。したがって、SIMSとMALDIを組み合わせて、分子の構造を解析し、分子の質量を測定する。SIMSとMALDIを組み合わせて、分子の構造を解析し、分子の質量を測定する。

図1 質量顕微鏡の構成の一例(大気圧下質量顕微鏡)



を大気圧下で行うMALDI)を開発し「材料を観察する」ことや「診断、治療法に

た質量スペクトル(万倍以上になり、それを効率よく高速で

DIでは、デジタルすることで効率的に質量分解能を向上させる。レーザー光軸を別々に照準精度を1 μ mに抑えることが可能で、内部でのエネルギー生成部位は照射する。空間分解能は大きく影響される。観測取得には高い空間分解能のマトリクスを越えることでは1 μ mの微細な金属膜を用いるnano-PALDI(nanofunctionalization)法が

開発され、空間分解能が向上し分析感度も改善した。

SIMSで使用されるイオンビームはMALDIのUVレーザーよりも細く照射することができる。一般的にはマトリクスを用いないため、数nmの空間分解能が実現できる。このため、SIMSでは単一細胞における細胞小器官の分析や生体分子の細胞内分布イメージングが可能である。しかし、SIMSでは大きな質量を持った分子はイオン化できず、脂質などの低分子しか測定できない。また、一般的にSIMSでは多段階質量分析が困難であり、分子の同定が困難である。

したがって、MALDIとSIMSを目的により使い分ける、もしくは併用することが有用である。MALDIにより高質量域を含めた質量の測定や構造解析を行い、SIMSでは高解像度の分析を行うことで詳細な局在情報が得られると期待される。

3. 質量顕微鏡の実際

組織切片を質量顕微鏡用の試料として用いる場合は、生体組織などを凍結させ凍結マイクロームにより薄切片を製作する。高効率なイオン化と低ノイズの結果を得るには、切片の厚さを10 μ m以下とする必要がある。薄切片を製作する際には、通常のoptimal cutting temperature (OCT)のような包埋剤が組織切片に付着・浸透することで質量分析時のシグナルの劣化を招くことが知られている。質量顕微鏡用の切片製作時にはOCTが測定用の組織切片に付着しないよう、組織ブロック支持のみにOCTを使用する。

質量顕微鏡では原則として導電性の素材で表面をコートした支持素材を用いる。優れた導電性をもちながら高い透明度をもつ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。作製した薄切片を支持素材に載せ、解凍させることで組織を接着する。細胞接着を容易にするためにPLL(poly-L-lysine)、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲルなどの細胞外基質を支持素材にコーティングすることがある。

組織切片中の生体試料には塩などのイオン化効率を著しく低下させる物質が含まれる。リン脂質

のような低分子量化合物を観察する場合、試料の洗浄を行うと目的の分子が消失もしくは移動してしまうため、通常は洗浄を行わない。一方、タンパク質やペプチドを対象とする場合には、試料表面上に多量に存在する脂質を有機溶剤で洗浄することで測定感度が向上する。

MALDI法のマトリクスには特定のレーザー光を吸収する化合物を使う。マトリクスとしてよく用いられるのは、シナピン酸(sinapinic acid:SA)、 α -シアノ-4-ヒドロキシシネイ皮酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid:CHCA)、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(2,5-dihydroxybenzoic acid:DHB)などである。高分子量のタンパク質の測定にはSAやCHCA、ペプチドの測定にはCHCA、低分子量の脂質や有機化合物にはDHBが主に用いられている。

マトリクスの塗布法によっては、試料表面で物質が移動し本来の局在が失われるという問題が生じたり、マトリクスのむらが測定感度を悪化させたりすることがある。エアブラシによりマトリクス溶液を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、マトリクス溶液を組織切片上に滴下するドロップレット法、両者を組み合わせたスプレードロップレット法などが使われており、スプレードロップレット法はシグナル強度を高めノイズ減少を可能とした。固体マトリクスを高温で昇華させて組織表面に付着させる蒸着法は、脂質の移動を最小化し、組織上でマトリクスを平坦かつ薄くコーティングすることができ、結晶のサイズを小さくすることにより空間分解能が向上した。また、固体マトリクスを20 μ mのふるいを通して組織表面上に直接振りかけるドライコーティング法も、蒸着法と似て簡便で脂質分析において有効な方法である。

II. 質量顕微鏡による脂質の解析

1. 脂質解析における特徴

リン脂質は細胞膜の主要構成脂質であり、細胞膜の流動性など物理的性質や細胞内輸送、シグナル伝達、タンパク質局在化などに重要な役割をもつ。

析装置



と飛行時間

と飛行時間

生体組織を構成する様々な脂質は、その分子構造によってイオン化傾向が異なる。目的とする脂質が正と負のどちらに荷電しやすい分子かを確認しておく必要がある。塩基性官能基をもつホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) やスフィンゴミエリン (sphingomyelin: SM) は正に荷電されて陽イオンとして効率よく検出される。酸性官能基を含むガングリオシドやスルファチドは負に荷電されて陰イオンになりやすい。コレステロールやトリアシルグリセロールなどの中性の脂質は陽イオンとして検出される。

質量顕微鏡では組織切片を直接分析するため、陽イオン検出の場合には組織切片中に存在するナトリウム、カリウム塩の影響を受ける。特に脂質を対象とする場合は洗浄を行わないため、陽イオンとして H⁺, Na⁺, K⁺ の3種類の付加イオンが検出される。これに対しては、酢酸カリウムを添加

することで K⁺ 付加イオンにリ、酢酸アンモニウムを添加することで H⁺ 付加イオンに集約でき、解像度の向上が期待できる。

2. 脂質の解析例

以下に、質量顕微鏡を用いた脂質解析例を紹介したい。

マウス網膜は8層の複雑な構造をもっている。この試料に対して銀ナノ粒子をマトリクスとして質量顕微鏡による測定を行うと、各層ごとに異なる脂肪酸分布が得られた (図2)。網膜における PC 分子種の解析では、場所により結合している脂肪酸の種類が異なる。内側の層と外側の層に分布する PC には脂肪酸としてドコサヘキサエン酸 (DHA) が多く含まれていることをすでに報告しているが、今回 DHA が最外側の網膜色素上皮層においてより強く検出されることが判明した。DHA は視機能の発達や光受容体の生存において

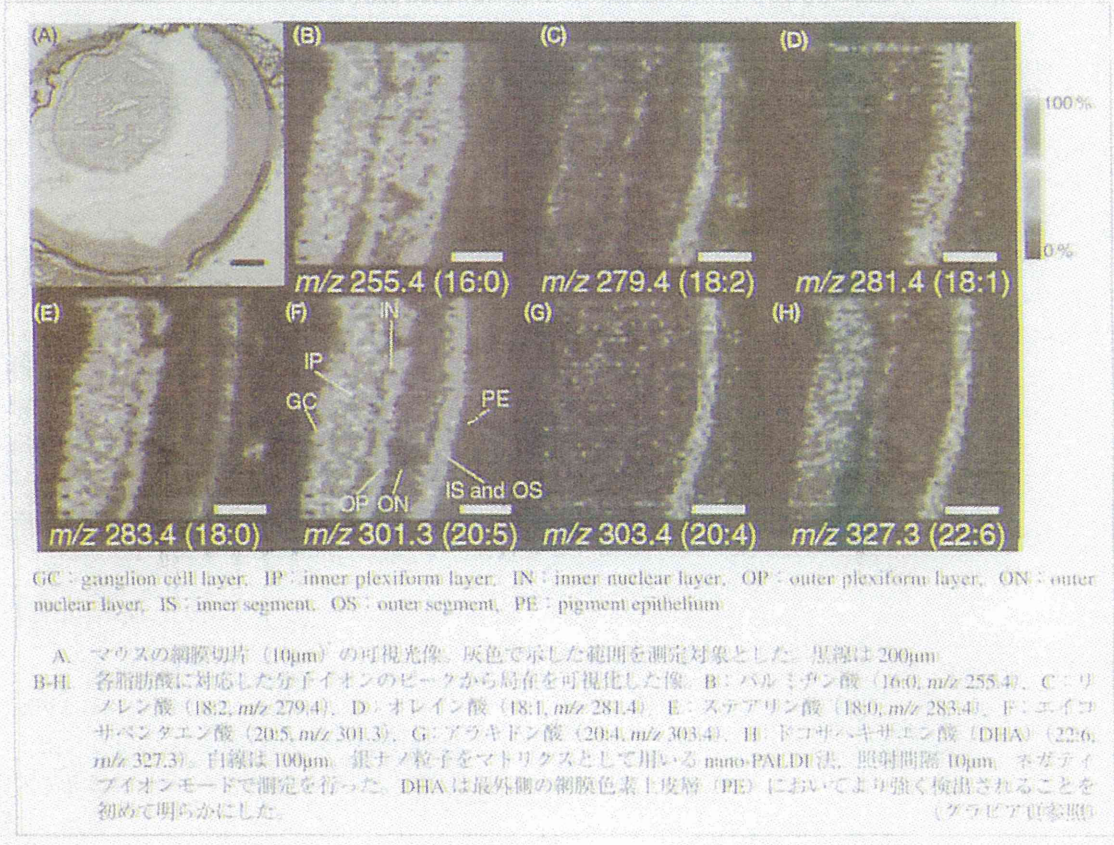
図3 TLC法を用いた脂質解析例 (文献18より)



AD: Alzheimer's disease, GDIa: GDIa, ガン

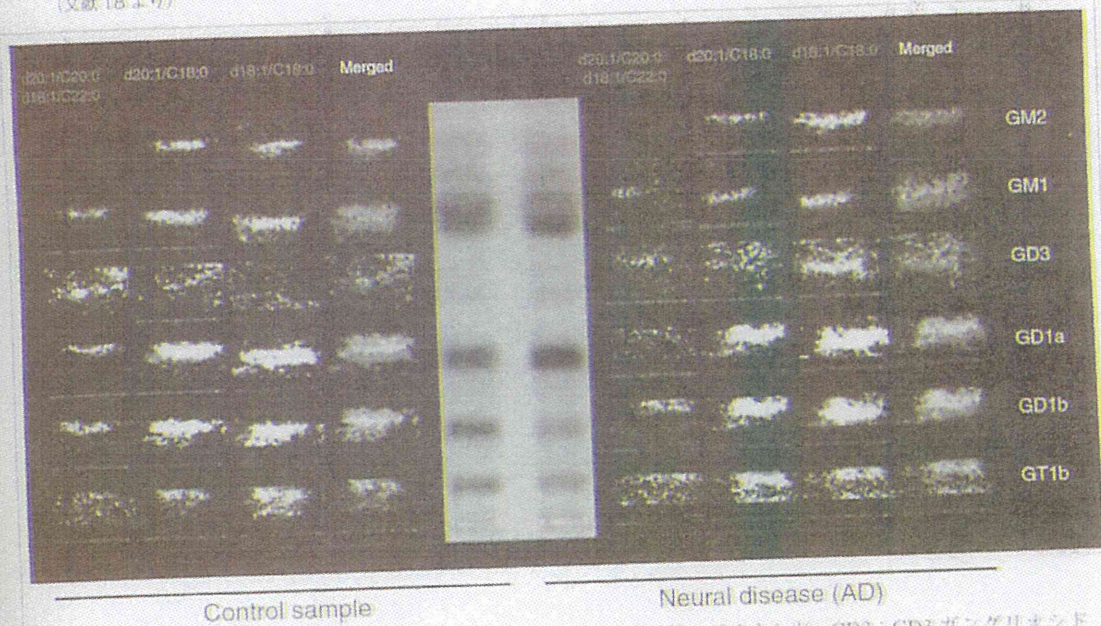
赤色は d18:1 スプレは d20:1/C20:0 をが従来より鮮明している。

図2 nano-PALDI法によるマウス網膜の脂質分析イメージング (文献15より)



重要であるとすった。
 糖脂質である糖鎖と疎水基とは抗体により免れているが、細胞は認識できず、をすることから量成分の検出が微量なガングリここで、従来の薄層 chromatography、その薄層クロマるポリフッ化ビ PVDF) 膜に転写する手法が開発

図3 TLC法を用いた質量顕微鏡によるアルツハイマー病患者および健常人の海馬灰白質でのガングリオシドの解析
(文献18より)



AD: Alzheimer's disease, GM1: GM1 ガングリオシド, GM2: GM2 ガングリオシド, GD3: GD3 ガングリオシド, GD1a: GD1a ガングリオシド, GD1b: GD1b ガングリオシド, GT1b: GT1b ガングリオシド

赤色は d18:1 スフィンゴシンを含むシグナル, 緑色は d20:1 スフィンゴシンを含むシグナル, 青色は d18:1/C22:0 または d20:1/C20:0 を含むシグナルを示している。アルツハイマー病患者では, GM2 と GD3 のガングリオシドのバンドが健常人より鮮明に見える。また, d18:1 スフィンゴシンを含むガングリオシドがアルツハイマー病患者では増加している。(グラビア真参照)

重要であるとする報告¹⁸⁾とも一致する結果であった。

糖脂質であるガングリオシドは親水基としての糖鎖と疎水基としてのセラミドをもつ。糖鎖部分は抗体により免疫染色法によって局在解析がされているが、細胞膜内に存在する脂質部分は抗体では認識できず、脂質の違いによる分子種の区別をすることができなかつた。質量顕微鏡では微量成分の検出が困難であり、リン脂質と比べて微量なガングリオシドの分析は難しかった。そこで、従来の薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography: TLC) の手法により脂質を分離し、その薄層クロマトグラムを強誘電体ポリマーであるポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride: PVDF) 膜に転写してから質量顕微鏡により分析する手法が開発された。これによりガングリオシ

ドの分子種ごとの局在をイメージングすることができ、さらに多段階質量分析を行うことで詳細な構造解析が可能となった (図3)。

おわりに

質量顕微鏡の開発により生体内の様々な物質が網羅的に検出できるようになり、さらに構造解析や分布イメージングが可能となった。微量成分やイオン化されにくい分子の測定感度はまだ十分ではないが、質量顕微鏡の改良は進行中である。より高い分解能、精度の向上のために、ハード面のみならず試料の調整法やマトリクスの改良なども試みられている。今後、脂質および脂質代謝物の機能的解析が進み、疾患のバイオマーカーや病理診断への応用など医学分野での発展が期待される。

セニウム
きり、解

例を紹介

っている。
スとして
ごとに異
膜におけ
合してい
側の層に
キサエン
てに報告
色素上皮
明した。の
において

100%

0%

ON: outer

図4. (a)ラ
F: コイコ
44A) 22:6,
し、ネカデ
れることを
ニア(真参照)

用語解説

1. **質量分析**: 質量分析とは、原子、分子、クラスターなどの粒子を種々の方法でイオン化して、それを質量と電荷の比の違いを利用して分離し、分子量を分析する手法である。測定したイオンの質量は、統一原子質量単位で割り、さらにイオンの電荷数で割って得られる値と定義される m/z (すなわち質量電荷比) という無次元量で表される。
2. **多段階質量分析**: 試料から生成した特定質量のイオン (プレカーサーイオン) を選択して、さらに質量分析を行い、そのイオンが分解して生成したイオン (プロダクトイオン) の質量を測定するなどして、段階的に分析を行い、精度を高める分析法。プロダクトイオンを同定しプレカーサーイオンの構造解析を行うことができる。イオンの分離・分解を n 回繰り返すことから MS^{*n*} とも呼ばれる。
3. **MALDI**: 特定のレーザー光波長に吸収体をもつマトリクスと測定対象物質を混合して共結晶化し、そ

こに微小口径UVレーザーを照射する。これにより試料の一部が気化する過程でマトリクス分子と測定対象分子の間でプロトンの授受が行われ、主に1価のイオンを生じる。低分子量から高分子量まで測定可能な質量の範囲は広く、汎用性が高い。

4. **SIMS**: レーザーの代わりにイオンビーム (一次イオン) を試料に照射し、その際に放出される二次イオンを質量分析する方法。MALDIと比べて測定可能な質量は限定されるが、空間分解能が高く、単一細胞内での物質の分布イメージングが可能である。
5. **マトリクス**: 試料のイオン化を促し測定を完遂させるためのもの、すなわちイオン化に際してのプロトン授受の試薬、原子衝突やレーザー照射に対するエネルギー吸収・緩衝材、繰り返し測定や長時間測定を可能にする保持剤として使われる。目的に応じて有機化合物、粘性物体、金属粉、あるいはそれらの混合物が用いられる。

参考文献

- 1) Mitsuura M, Ushijima M, et al: Cancer Res. 72, 3963, 2012.
- 2) 湘藤光利: 薬学雑誌 132, 499-506, 2012.
- 3) Goto-Inoue N, Hayasaka T, et al: J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 870, 74-83, 2008.
- 4) Lanni EJ, Rubakhin SS, et al: Journal of Proteomics 75, 5036-5051, 2012.
- 5) Sugiura Y, Shimma S, et al: Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan 54, 45-48, 2006.
- 6) van Hove ERA, Smith DE, et al: J Chromatogr A 1217, 3946-3954, 2010.
- 7) Sugiura Y, Shimma S, et al: Anal Chem 78, 8227-8235, 2006.
- 8) Hankin JA, Barkley RM, et al: J Am Soc Mass Spectrom 18, 1646-1652, 2007.
- 9) Puolitaival SM, Burnum KE, et al: J Am Soc Mass Spectrom 19, 882-886, 2008.
- 10) Piomelli D, Astarita G, et al: Nat Rev Neurosci 8, 743-

- 754, 2007.
- 11) Posse de Chaves E, Sipione S: FEBS Lett 584, 1748-1759, 2010.
- 12) Sugiura Y, Setou M: Rapid Commun Mass Spectrom 23, 3269-3278, 2009.
- 13) Angel PM, Spraggins JM, et al: Anal Chem 84, 1557-1564, 2012.
- 14) Hayasaka T, Goto-Inoue N, et al: Rapid Commun Mass Spectrom 22, 3415-3426, 2008.
- 15) Hayasaka T, Goto-Inoue N, et al: J Am Soc Mass Spectrom 21, 1446-1454, 2010.
- 16) Rotstein NP, Aveldano ML, et al: J Neurochem 66, 1851-1859, 1996.
- 17) Alessandri JM, Goustard B, et al: Am J Clin Nutr 67, 377-385, 1998.
- 18) Valdes-Gonzalez T, Goto-Inoue N, et al: J Neurochem 116, 678-683, 2011.

参考ホームページ

- ・島津製作所
<http://www.an.shimadzu.co.jp/apl/imaging/invitro01002010.htm>
- ・浜松医科大学解剖学講座 細胞生物分析
<http://www.hama-med.ac.jp/mt/setou/ja/laboratory/>

永田泰之

2003年 浜松医科大学医学部卒業
同医学部附属病院
2004年 聖隷浜松病院内科
2009年 東京大学医科学研究所附属病院
2010年 浜松医科大学大学院医学系研究科
2012年 同分子解剖学研究室

9. 脂質質量

ESI (エレクトロニズドイオン) は全体の割合にすぎない。流例する。つまり、高なかぎり対象成分の感度化として「高イ

はじめに

近年の質量分析技術の項までに紹介されたように、網羅的かつ特異的に測定器の感度はおよそ5桁 (ピコモル) からzeptoモル (10⁻²¹モル) まで現できる装置も開発され、いまだ多くの脂溶性代謝物 (フェムトモル) からzeptoモル (10⁻²¹モル) まで、これは脂質分析が難しいかを示す感度で解析できるという。脂質の中でも存在量がチジルコリン (PC) 10¹ 濃度はおよそ数百アトモ (1より推定)。生理活性なれば、その量は数十ナノモル。実際のところ、開度域での解析は難しいとよくそれに近づくことは

key words

高イ

医用質量分析 ガイドブック

日本医用マススペクトル学会推薦

和文著書 47

[編集]

丹羽利充

名古屋大学大学院 医学系研究科 尿毒症病態代謝学 教授

野村文夫

千葉大学大学院 医学研究院 分子病態解析学 教授

11 疾患のイメージング質量分析

近藤 豪, 瀬藤 光利

Summary

イメージング質量分析 (imaging mass spectrometry: IMS) は対象の形態学的情報と生化学的情報を同時に取得する解析技術であり、脂質や代謝産物など、既存の方法では可視化がむずかしい分子のイメージングが可能である。医療分野では特に、病理解析や薬物動態解析への応用が進められ、がんをはじめとしたさまざまな疾患において脂質分子などの劇的な変化が捉えられている。解析手法の改良や共同利用の推進を通して、医療分野において今後ますます活躍することが期待される。

われわれが疾患を認識し理解するには、まず生体の異常を正常と見分けられなければならない。今日、臨床の現場で用いられる診断技術も、極論をいえばすべて疾患を見る(診る)ことに基づいている。しかし、われわれは疾患で起きているマイクロな変化を目で直接見ることができない。目の検出限界を超える小さな細胞や分子は顕微鏡などで拡大する必要がある。五感では直接知覚できない電磁波やイオンは、X線フィルムや質量分析器などで検出し、時に分離・整理して目に見える形にする必要がある。Malpighi や Hooke、Leeuwenhoek は顕微鏡で生命の詳細を観察し、また、Thomson や Aston、Dempster は質量分析器で正確な原子質量を検出することで、科学の発展に大きく貢献した。これらの技術は今日の医療においても欠くことのできないものになっている。

イメージング質量分析とは

IMS は二次元的に質量分析を行うことで、解析対象についての形態学的情報と生化学的情報を同時に取得する技術である。試料の各部位にイオン化レーザーを繰り返し照射することで、各点から生じる数百種類におよぶイオンを走査解析し、イメージ像として描写する。これにより通常の顕微鏡法では得られない分子組成情報と、通常の質量分析法では得られない組織学的情報とを関連付けて同時に取得することが可能になる。生体試料を顕微鏡解析する際に必要な抗体や蛍光タンパク質などによる標識が不要であるため、IMS はこれまで標識が困難であった代

謝物などの解析において特に威力を発揮する。

当研究室では島津製作所と協力して matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight mass spectrometer (TOF-MS) (質量分析の原理については、第1章参照) をベースに IMS の開発に取り組んできた (図1、2013年5月より iMScope として市販開始)。田中耕一らが考案した MALDI によるイオン化法は、比較的大きな分子種について分子構造を維持したままイオン化できるため、特に生体試料の解析に向いている。さらに iMScope では大気圧 MALDI チャンバーを採用することで、類似の分析装置ではむずかしい揮発性分子の解析を可能にしている。標識が要らないという IMS の利点は、解析対象の拡大と解析操作の簡便化を可能にするのみならず、あらかじめ解析対象分子を決めずに試料を俯瞰的網羅的に解析することも可能にし、試料間で異なる分子種を探索するといった研究戦略にも有効である。これらの利点から、ヒト疾患解析における IMS の応用に期待が高まるのは当然ともいえる。

実際にヒト疾患の IMS 解析の例を紹介する前に、IMS のアプリケーションとしての可能性を示す基礎医学研究の例をいくつかあげておきたい。脂質は生体を構成する最も重要な成分の一つであるにも関わらず、抗体や蛍光分子で分子構造による細かな違いを区別して標識することが極めて困難であり、これまで形態学的情報に基づいた研究が遅れていた。MALDI による IMS は、ホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) をはじめとするリン脂質の解析に非常に適しており、生体組織切片上の脂質構成を

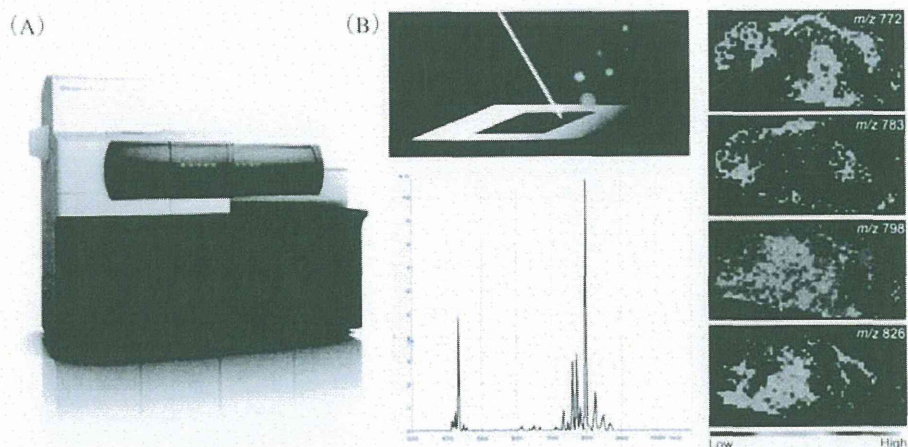


図1 イメージング質量分析の概要

A. 市販された iMScope の外観 (島津製作所提供)
 B. IMS の概略図. 組織切片上での MALDI によるイオン化とマススペクトル, 二次元像描写の例

炭素数や不飽和度情報まで含めた形で取得し、可視化することに成功している (図 2-A)¹⁾。後述するように、脂質情報の取得はヒト疾患の解析においても IMS の最も得意とするところである。

IMS の標識不要・多分子同時検出の利点を活かしてメタボローム解析も行われている。図 2-B はマウスのカニン酸誘発性てんかんモデルにおいて、糖代謝経路に関わる分子を網羅的に解析した例である²⁾。一度に網羅的に情報を取得することで、てんかん発作時の海馬 CA3 領域における代謝産物の増減がまさに一目瞭然となっている。この例ではさらに capillary electrophoresis (CE) / MS による解析を組み合わせることで、定量性を高めたデータを得ることに成功している。

創薬領域において体内の薬物動態は重要な評価項目の一つである。しかし、これまでは薬物自体を放射性同位体標識する必要から、多大な時間や労力、費用を要し、被曝のリスクも存在した。IMS は生体に投与された薬物、さらには薬物の前駆体や代謝産物を標識なしに検出し、組織への分布情報を得ることを可能にしている³⁾。図 2-C は消化性潰瘍の治療で頻用される H2 ブロッカー、ファモチジンのマウス全身における分布を標識操作なしに可視化した例であり、一般的な放射性同位体標識に匹敵する解像度を実現している。

以上の研究成果は、疾患における病態の解析とその情報に基づく治療薬開発において、IMS が大きく

貢献できる可能性を強く示している。以下には実際にわれわれがこれまで行ったヒト疾患解析例を紹介したい。なお紙面の都合上詳細な実験手順までは記載できないため、実際の解析にあたってのプロトコルについては参考文献を参照されたい。

疾患における組織イメージング質量分析の例

(1) 乳がん

乳がんは女性の死因として現在世界で最も多いがんである。最近の研究において脂質代謝と乳がんの関係性が示唆されているが、乳がん組織における空間的な脂質構成については知られていない。そこで IMS によりヒト乳がん組織を解析したところ、組織中のがんに相当する部位では周囲の非がん組織に比べ、不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acid: UFA) が多く含まれていた⁴⁾。そこで複数の一価不飽和脂肪酸 (mono-unsaturated fatty acid: MUFA)-PC について解析したところ、非がん組織と比べてがん組織では PC (32:1), PC (34:1), PC (36:1) といった分子 (カッコ内の数字は PC に含まれる 2 つのアシル基の総炭素数および不飽和結合数を示している) が総じて高く認められた (図 3-A)。特に PC (36:1) については、対応する飽和脂肪酸 (saturated fatty acid: SFA) である PC (36:0) に比して顕著に多く検出された。SFA から UFA を合成する酵素であるステアロイル-CoA デサチュラーゼ-1 (SCD1) は、い