

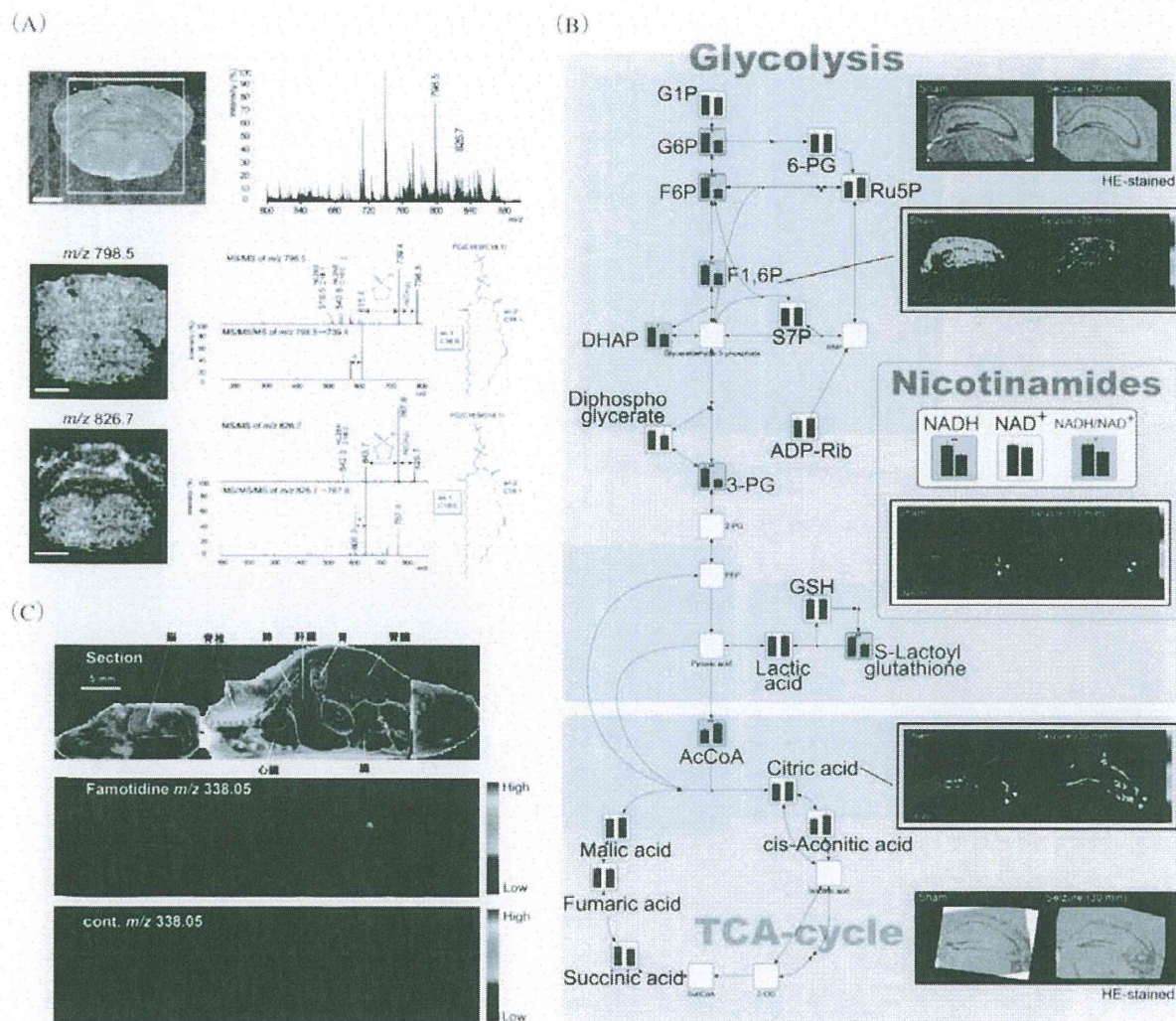


図2 イメージング質量分析による可視化分子種の例

- A. マウス脳切片における脂質の可視化 (Shimma S, et al.: Mass imaging and identification of biomolecules with MALDI-QIT-TOF-based system. Anal Chem 80: 878-85, 2008 より引用)
- B. マウス脳切片における解糖系〜クエン酸回路の代謝物の可視化 (Sugiura Y, et al.: Visualization of Spatiotemporal Energy Dynamics of Hippocampal Neurons by Mass Spectrometry during a Kainate-induced Seizure. PLoS ONE 6: e17952, 2011 より引用)
- C. ファモチジンのマウス全身における組織分布の可視化 (齋藤祐介, ほか: 高解像度質量顕微鏡を用いた薬物動態の解析. J Mass Spectrom Soc Jpn 59: 79-84, 2011 より引用)

くつかのがん種の増殖に関与することが報告されている。そこで SCD1 の発現を免疫染色により調べたところ、確かに UFA を多く含む部位において SCD1 の高発現が認められ、このことから不飽和脂肪酸比率の上昇は SCD1 の活性増強を反映していることが示唆された。一方、乳がんのサブセット分類に用いられる指標マーカーと MUFA/SFA 比の相関を調べたところ、エストロゲン受容体陽性群において一部の不飽和脂肪酸の高値が認められた。他のマーカー陽性群との比較から、既存の定義により分類されるサブセットのなかに、MUFA/SFA 比の高低によりさらに分類可能な症例群の存在が示唆された。以上の

結果から、MUFA/SFA 比の測定が乳がんの層別化の新たな指標となり、不飽和脂肪酸高値症例に対する新しい治療戦略として、脂質代謝経路が有望なターゲットとなる可能性が示された。

(2) 肝細胞がん

肝細胞がん (hepatocellular carcinoma: HCC) は死因につながるがんとして世界で4番目に多く、ウイルス肝炎やアルコール性肝炎、非アルコール性脂肪肝がリスク要因として知られている。ウイルス感染による肝障害の減少と近年のメタボリックシンドロームへの関心の高まりから、非アルコール性脂肪肝と肝細胞がんとの関係が注目されており、実際に

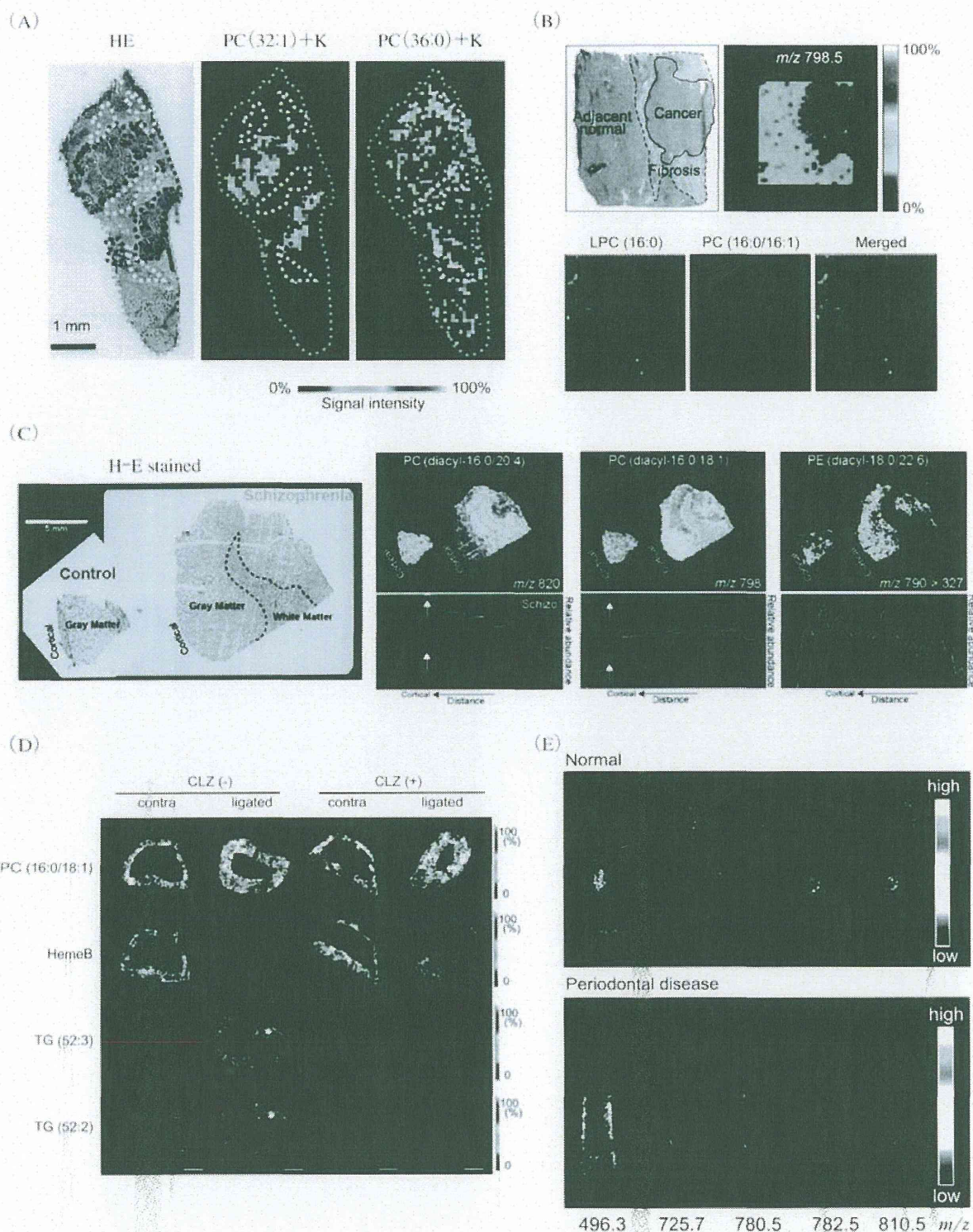


図3 疾患のイメージング質量分析の例

- A. 乳がんにおける LPA および SEA-PC の可視化 (Ide Y, et al.: Human Breast Cancer Tissues Contain Abundant Phosphatidylcholine (36:1) with High Stearoyl-CoA Desaturase-1 Expression, PLoS ONE 8 : e61204, 2013 より引用)
- B. 肝細胞がんにおける PC の可視化 (Morita Y, et al.: Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression, J Hepatol 59 : 292-299, 2013 より引用)
- C. 統合失調症患者死後脳における PC の可視化 (Matsumoto J, et al.: Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry, Anal Bioanal Chem 400 : 1933-1943, 2011 より引用)
- D. 頸動脈結紮による TG およびヘムの変化と CLZ 投与の影響 (Tanaka H, et al.: Cilostazol inhibits accumulation of triglycerides in a rat model of carotid artery ligation, J Vasc Surg 58 : 1366-1374, 2013 より引用)
- E. 歯周病の歯における代謝物の可視化 (Hirano H, et al.: Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry revealed traces of dental problem associated with dental structure, Anal Bioanal Chem 2013 Jun 2 [Epub ahead of print] より引用)

HCCにおける脂質合成の異常が報告されている。そこでHCCにおける脂質の変化をIMSにより詳細に解析したところ、周辺正常組織と比較してHCCにおいてPC (16:0/16:1) が非常に豊富に存在していた(図3-B)⁵⁾。この脂質変化の原因を探るため、アシル CoA の脂肪酸をリゾリン脂質 (lyso-PC, LPC) に結合させることでPCの産生に寄与するLPC アシルトランスフェラーゼ (LPCAT) ファミリーの発現量を調べたところ、LPCAT1 の発現が高いHCC症例が多く認められた。そこで肝細胞がん培養細胞HuH7 およびHepG2においてRNA干渉によりLPCAT1 の発現を抑えたところ、PC群の組成比率が変化しPC (16:0/16:1) の低下が認められた。さらにLPCAT1 の発現を抑制した場合には細胞増殖の低下に加え、細胞の遊走および浸潤も低下していた。一方、これらの細胞株にLPCAT1 を過剰発現させたところ、逆に増殖・浸潤の増加が認められた。これらの結果は、LPCAT1 がHCCの悪性度を左右する重要な因子であることを示唆し、LPCAT1 がHCC治療戦略の新たな標的になると期待される。

(3) 統合失調症

統合失調症は古くから知られる代表的な精神疾患である。近年では脂質、特に不飽和脂肪酸の関与が注目されているが、ヒト疾患サンプルの解析は困難であることからほとんど進んでいない。そこで福島県立医科大学ブレインバンクに保管されている統合失調症患者死後脳の脂質組成を、IMSにより部位別に詳細に解析した⁶⁾。脳切片についてイメージング解析を行う前に、健常者死後脳サンプルから抽出した脂質成分をliquid chromatograph (LC)/electrospray ionization (ESI)-MS/MSでニュートラルロススキャン解析し、PC、スフィンゴミエリン、ホスファチジルエタノールアミンそれぞれに特徴的な分子骨格に分類して測定することで、得られる m/z シグナルピークがどの脂質分子に帰属されるかを検討した。その後、それぞれのピークに着目して健常者および患者由来脳組織切片のイメージング解析を行ったところ、疾患脳においてPC (16:0/20:4) の増加やPC (16:0/18:1) の減少をはじめ、さまざまな脂質分子について含有量の顕著な違いが認められた(図3-C)。これらのイメージ像が示すように、サン

プル間で含有量に差が見られる分子種は、組織全体ではなく限られた部分において明確に違いを生じていた。このことは組織部位を含めた形で情報が取得可能になることで、採取部位の違いに由来する測定値のバラツキの軽減や、広範囲の測定では見逃してしまう局所変化の検出につながり、IMSが疾患組織の微小変化解析に有効であることを示している。

(4) 血管障害モデル

高脂血症は心血管疾患の代表的なリスクファクターとして知られている。近年の研究からトリグリセリド (TG) が疾患心血管において蓄積し、コレステロール (CHO) などの他の脂質とは独立したリスクファクターであることが示唆されている。しかし、その分子メカニズムはほとんどわかっていない。一方、シロスタゾール (CLZ) はホスホジエステラーゼ3の選択的阻害薬であり、血小板凝集の抑制や末梢血管を拡張するため、動脈梗塞に伴う間欠性跛行の虚血障害や脳梗塞の再発防止に用いられる。最近の統計解析においてCLZがアテローム性動脈硬化症の予防と血清脂質の改善を促すことが示唆されているため、CLZのTG集積抑制効果を組織レベルで解析した⁷⁾。ラットの頸動脈を片側性に結紮し、4週後に脂質量を解析したところ、血中のTG、CHO、PCについてはCLZの投与による有意な変化は認められなかった。一方、結紮動脈組織中においては、結紮によるTGの増加がCLZ投与により有意に抑制された(図3-D)。さらに詳しく検証するため、動脈組織中におけるTGの分布をIMSにより解析したところ、コントロールにおいては m/z 879, 881のシグナルでそれぞれ示されるTG (52:3), TG (52:2) が結紮により著明に増加していたが、CLZの投与群ではこれらのTG分子の増加が抑えられていた。興味深いことに、CLZは結紮によるヘムBの低下も抑制しており、組織学的解析において内皮・中皮の新生も抑えられていた。この結果はCLZの血管拡張作用が結紮により起こる低酸素状態を緩和することで、病状の悪化を抑えている可能性を示唆している。脂質に限らずヘムのような低分子を同一サンプル中において同時検出可能であるIMSの利点が活かされた例である。

(5) 歯周病

歯周病は自然回復することがなく歯の喪失につながる場合もあるため、歯科領域における最も深刻な問題の一つである。歯周病における歯肉などの周辺組織の炎症については調べられているが、歯そのものに対する炎症の影響についてはよくわかっていない。そこで歯周病における歯と炎症の関係についてIMSを用いて解析を行った⁸⁾。まず健常者の歯をIMS解析すると、エナメル質、象牙質、歯髄についてそれぞれ特徴的なシグナルピークが観察された。次に歯槽骨の骨吸収や歯石の蓄積が認められる歯周病患者の歯（中切歯、側切歯、小臼歯）について解析したところ、全体としては健常者の歯と同様のシグナルが観察されたが、歯根膜の顕著な減少が認められた。さらに m/z 496.3 のピークを示す分子が歯根表面に集積していた（図3-E）。これまでの研究においてわれわれは、炎症部位のLPCが m/z 496.3を示すことを見出しており、今回検出したシグナルピークも歯周病菌による炎症で蓄積したLPCであると予想している。得られたイメージングデータは、歯周病において周辺組織のみならず歯根部でも炎症が起こっており、病態に影響していることを示唆している。本研究ではこれ以外にも現時点でデータベースに登録されていない代謝物ピークを複数検出しており、今後これらの分子が同定されることで、口腔領域に特徴的な生理現象や関連疾患の分子情報が明らかになるだろう。

展 望

以上のように当研究室ではこれまでIMSの開発からスタートし、生体試料の解析方法の確立、ヒト疾患解析への応用を進めてきた。IMSが可能にした解析技術は、近年の代謝に注目した医学生物学研究や医療応用を強く意識した基礎開発研究において大

きな注目を集め、実際のIMS使用例も爆発的に増加している。現在われわれはIMSをさらに有効に利用できるようにするため、解析技術の向上をはかるだけでなく解析装置の共通利用システムの構築も進めている。IMSを用いた本方法論が、疾患のイメージングをはじめさまざまな分野において広く応用されることで、医療の発展につながることを強く願っている。

▶ 文 献 ◀

- 1) Shimma S, et al.: Mass imaging and identification of biomolecules with MALDI-QIT-TOF-based system. *Anal Chem* 80: 878–885, 2008
- 2) Sugiura Y, et al.: Visualization of Spatiotemporal Energy Dynamics of Hippocampal Neurons by Mass Spectrometry during a Kainate-induced Seizure. *PLoS ONE* 6: e17952, 2011
- 3) 齋藤祐介, ほか: 高解像度質量顕微鏡を用いた薬物動態の解析. *J Mass Spectrom Soc Jpn* 59: 79–84, 2011
- 4) Ide Y, et al.: Human Breast Cancer Tissues Contain Abundant Phosphatidylcholine (36:1) with High Stearoyl-CoA Desaturase-1 Expression. *PLoS ONE* 8: e61204, 2013
- 5) Morita Y, et al.: Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 altered phospholipid composition and regulated hepatoma progression. *J Hepatol* 59: 292–299, 2013
- 6) Matsumoto J, et al.: Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 400: 1933–1943, 2011
- 7) Tanaka H, et al.: Cilostazol inhibits accumulation of triglycerides in a rat model of carotid artery ligation. *J Vasc Surg* 58: 1366–1374, 2013
- 8) Hirano H, et al.: Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry revealed traces of dental problem associated with dental structure. *Anal Bioanal Chem* 2013 Jun 2 [Epub ahead of print]

▶ 参考文献 ◀

- ・瀬藤光利（編）：質量顕微鏡法 イメージングマスマスペクトロメトリ実験プロトコル。シュプリンガー・ジャパン、2008
- ・Setou M（Ed）：Imaging Mass Spectrometry: Protocols for Mass Microscopy. Springer, 2010

- ・本書の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権（送信可能化権を含む）は株式会社診断と治療社が保有します。
- ・JCOPY（社出版者著作権管理機構 委託出版物）
本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。
複写される場合は、そのつど事前に、社出版者著作権管理機構
（電話 03-3513-6969, FAX03-3513-6979, e-mail: info@jcopy.or.jp）
の許諾を得てください。

いようしつりょうぶんせき
医用質量分析ガイドブック

ISBN978-4-7878-2073-0

2013 年 12 月 25 日 初版第 1 刷発行

編 集 丹羽利充、野村文夫

発 行 者 藤実彰一

発 行 所 株式会社 診断と治療社

〒100-0014 東京都千代田区永田町 2-14-2 山王グランドビル 4 階

TEL: 03-3580-2750(編集) 03-3580-2770(営業)

FAX: 03-3580-2776

E-mail: hen@shindan.co.jp(編集)

cigyobu@shindan.co.jp(営業)

URL: <http://www.shindan.co.jp/>

印刷・製本 三報社印刷株式会社

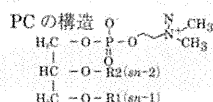
©Toshimitsu NIWA, Fumio NOMURA, 2013. Printed in Japan.

【検印省略】

乱丁・落丁の場合はお取り替えいたします。

第23章

イメージング



23.1 はじめに

質量分析によるイメージング法は、生化学的情報と位置の情報を同時に明らかにすることができる分析手法である¹⁾。この手法は、質量分析イメージング、イメージング質量分析、イメージングマスマスペクトロメトリー、マスマスペクトロメトリックイメージング、質量顕微鏡法、顕微質量分析、質量分析顕微鏡などと呼ばれている。基本的な原理としては、何らかの方法で局所イオン化し質量分析を行い、その局所を少しずつ二次元的にずらしながら多くの回数質量分析を行いスペクトルデータを得る。位置座標と対応したスペクトルデータすなわち3軸のデータが得られる。後に任意の m/z 値に対応した強度を疑似カラーやグレースケールを用いて位置座標上に表示して二次元イメージとするものである。古くから二次イオン質量分析法 (secondary ion mass spectrometry: SIMS) として、おもに金属の表面分析に応用されてきた (SIMS の項参照)。マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI) 法が発明されると (MALDI の項参照)、1990年代にはイメージングにも応用されるようになった²⁾。その後、レーザー収束技術の進展や質量検出部の感度向上などに伴い、肉眼解像度を超え顕微鏡レベルの解像度で生体分子を可視化することが可能になり顕微鏡技術との融合が進み、質量顕微鏡法ともよばれている³⁾。さらに近年ではバイオインフォマティクスの進歩や試料前処理技術の向上に伴って高速化や比較定量の点において進歩し、病理試料へ適用した例も報告されるようになってきている⁴⁾。

局所でのイオン化が可能であればイオン化法は問わない。上記の二つのほかに

も、マトリックスを用いないレーザー脱離イオン化法⁵⁾、ナノ構造基板を用いる方法⁶⁾、脱離エレクトロスプレーイオン化 (desorption electrospray ionization: DESI) 法、探針を用いる手法⁷⁾などのさまざまなイオン化法が用いられてきており、また現在も開発されつつある。対象の性質、必要とするイメージング解像度、解析対象となる質量範囲、多段階質量分析による分子同定技術などによって使い分けられているが、本章では現在最も広く使われている MALDI を用いたイメージング法に関する応用を中心に解説することとする。

23.2 試料の作製

対象になる試料は工業製品からバイオメディカル分野まで多岐に渡り、対象は自由に選択できる。ただし、質量分析イメージングは試料から脱離したイオンを分析部に導入する必要があるため、複数回探針でのサンプリングを行う探針法を除いて今のところほとんどすべての方式で表面分析である。とくに MALDI イメージングはマトリックスの塗布の工程があるため深さ方向の分析能力はきわめて低いと考えられる。そのため、表面以外の深い部位を分析したいと考えた場合には、切片作

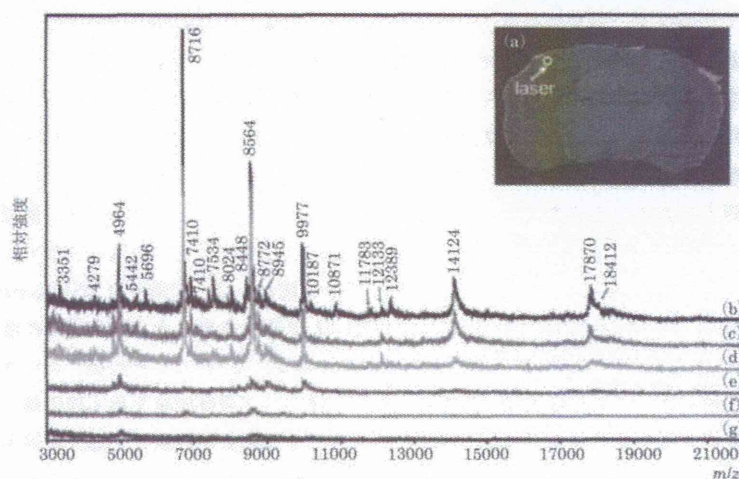


図23.1 異なる厚さの切片から取得されるマスペクトル

(a) マウス脳切片の光学写真とレーザー照射位置。(b) 2 μm 。(c) 5 μm 。(d) 10 μm 。(e) 15 μm 。(f) 30 μm 。(g) 40 μm の厚さから取得されたマスペクトル。(文献9より引用)

製などの試料前処理が必要になってくる。

試料切片化にはさまざまな手法があるが、とくに MALDI イメージングの応用が広がっているバイオ試料においては、凍結マイクロームによる切片作製法が広く用いられている。この切片作製方法では、構造を保つためにあらかじめ包埋することが多い。包埋に用いる化合物はカルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose: CMC) が推奨される⁸⁾。ほかの一般的な市販のポリマーで構成される化合物は、非常にイオン化しやすいために切片上からの生体分子のイオン化を抑制し、検出されるほとんどがポリマーのシグナルになってしまうため包埋には使用しない⁹⁾。高効率イオン化を実現するには 2 μm から 20 μm の厚さで作製されることが多い。高分子量タンパク質の測定において、切片の厚さを 10 μm 以下にすることで高効率イオン化と低ノイズによって良好な S/N 比が達成されることが報告されている (図 23.1)⁹⁾。作製した組織切片は支持素材上にのせられ、融解することによって貼り付けられる。表面が酸化インジウムスズ (indium-tin-oxide: ITO) などの導電性を有する素材で処理したスライドガラスやフィルムシートが支持素材として利用される。

23.3 マトリックスの選択

マトリックス化合物にはさまざまな種類が存在し、測定する分子種によって使い分けられている (本書の MALDI 法に関する章も参照のこと)。マトリックスとしての特性はイメージング法においても通常の MALDI とくに違いはないと通常考えられるが、後述する塗布工程が可能な化合物でなくてはならない。

タンパク質にはシナピン酸 (sinapinic acid: SA) がおもに用いられるが、高分子タンパク質は満足なシグナル強度を得られないことも多い。そこでタンパク質はトリプシン消化によって断片化し、ペプチドとして検出しさらに MS/MS で構造解析することもよく行われる¹⁰⁾。

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-ヒドロキシケイ皮酸 (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid: CHCA) が脂質やペプチドなどの低分子の測定に広く用いられる。また 9-アミノアクリジン (9-aminoacridine: 9-AA) はマトリックス由来のシグナルが少なく、とくに脂質のネガティブイオンの検出に優れていることが最近報告されている⁵⁾。また、共結晶化が必要ないために空間解像度において有利な、金属核を有するナノ粒子もイメージング法へ応用されている¹¹⁾。

これらのマトリックスは広く網羅的にプロテオーム、メタボローム、リビドームを可視化しようという目的で使われている。一方、特定の物質を高効率にイオン化しようという試みも近年盛んである。金属ナノ粒子を修飾する方法¹¹⁾、抗体を用いる方法などがある。

23.4 マトリックス塗布

マトリックスはイオン化補助剤であり、試料中の分子に対するマトリックス量によってイオン化効率に変化する。そのため試料中の分子を同じ条件でイオン化するためには、マトリックスを均一に塗布しなければならない。

最もよく利用されているのはスプレー法である。有機溶媒によって溶かしたマトリックス溶液を工作用スプレーのボトルタンクに充填し、コンプレッサーから出力される空気圧とボトルタンク中のマトリックス溶液の放出量を調節することによって、試料上において最適なマトリックス層を形成することが可能である。試料とスプレーノズルは10 cm から15 cm の距離で固定する。空気圧は最大を維持し、放出したマトリックス溶液が試料表面に到着した際に有機溶媒を急速に揮発させる。この操作によって、試料表面にマトリックス溶液が溜まることで発生する結晶の巨大化を防ぐことができる。検出されるシグナル強度は、試料中の分子数とマトリックスの比率に依存するため、塗布するマトリックス量については、対象に応じた検討が必要である。マトリックス溶液の濃度を50 mg/mL に設定し、塗布する溶液量を振ることによって最適なマトリックス塗布量を検討するとよい。このようにスプレー法は短時間で簡単にマトリックス塗布を終えることができることから、多くの研究者に利用されてきた。一方で、スプレー操作は習得するまでに時間を要する。また測定ごとに同一のマトリックス層を形成することが難しいことも問題である。

そうした点を克服するため自動化された塗布装置も各メーカーから販売されている。ImagePrep (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) は窒素雰囲気下のチャンバー内に試料を置き、マトリックス溶液を噴霧する装置である。マトリックスの噴霧時間とインキュベート時間を装置本体に内蔵されたコンピュータ上で設定することによって研究者独自の方法を編集・登録することも可能である。また ImagePrep では、マトリックス層の厚さを測定することができる。この機能を用いて常に同一条件のマトリックス層を試料に対して適用することにより、測定間の誤差を抑制することが可能である。ChIP-1000 (島津製作所, 京都, 日本) は溶液を微量滴下することが可能な装置である。最小の滴下液量は100 pL であり、コンピュータ上で液

量だけでなく、インキュベート時間を設定することが可能である。液滴としてマトリックスを塗布することで、イメージングする際の空間分解能はやや落ちるものの、効率的なインキュベートを行えるため分子のイオン化効率を高めることが可能である。

近年になって開発が進められているのが蒸着法である¹²⁾。蒸着法ではマトリックスを溶液にすることなく、粉末のまま使用する。マトリックスを乗せた金属製容器に対して電流を流し、容器の温度を上昇させることによってマトリックスを昇華させる。チャンバー内をロータリーポンプで真空状態にすることにより、容器から昇華したマトリックスが上部に位置する試料に対して均一に蒸着される。この蒸着法では適当量のマトリックスを容器にのせ、マトリックスを昇華させる温度と蒸着時間を制御することによって、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。

23.5 データ取得と解析

マトリックス塗布された試料を装置へ導入したあとに測定する組織領域を設定し、レーザーを照射することで各測定点からデータを取得する。全測定領域から統合されるデータセットは、イオン化した分子に関する質量と電荷数の比 m/z とシグナル強度で表現されるマススペクトルに二次元座標情報を付加した三次元の形式をもつ。データセットから各分子の二次元イオンイメージの表示変換には専用のソフトウェアを用いて行う。現時点で各社の装置で出力されるオリジナルのデータフォーマットは統一されていないが、BioMap (<http://maldi-msi.org/>) がフリーソフトウェアとして無償配布されていることもあり、多くは Analyze7.5 への変換が可能である。データセット内に比較したい領域が複数存在する場合には、領域を選択することで各領域のマススペクトルを表示することもできる。また各社が用意しているソフトウェアの多くでは、これらのピークのシグナル強度に基づいた統計解析によって特異的に発現している分子を自動抽出することが可能である。試料に含まれる主要な成分が既知の場合、検出されたピークの m/z 値から分子が推定されることも多いが、必要に応じてイオンの断片化を行い、標準試料からの断片化ピークと照合することや、すでにエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization: ESI) -MS などで明らかにされている断片化パターンと照合することによってさらに推定の精度を高めることも行われる。

23.6 測定の実例

23.6.1 脂肪酸の測定

脂肪酸の測定には銀ナノ粒子が有用であることが示されている。その側鎖にはナノ粒子の溶解性や安定性を維持することを目的とした適切な脂肪酸が配位される。この銀ナノ粒子はヘキサンに溶解しやすく、高い分散性を示すことから、スプレーにより塗布する際に詰りなどの問題を生じない。側鎖に配位する脂肪酸種により、分散性は変化してくる。前述のようにスプレー法はマトリックス溶液の放出量や空気を調整することが初心者には難しい。しかし銀ナノ粒子は非常に揮発性の高いヘキサンに溶解されるため、試料表面に届く時点でヘキサンが揮発する。また銀ナノ粒子を塗布した際に色の変化を捉えやすく、試料表面へ液体を溜めることによるマトリックスの塗布斑を生じることなく均一なマトリックス層を容易に形成できる。銀ナノ粒子をマトリックスとして利用する本手法においては、リン脂質に結合する脂肪酸を断片化し、もともと脂肪酸として存在した分子とともにイオン化するという特性をもつ。

銀ナノ粒子をマウス網膜切片上へ塗布し、イメージング法により解析した例を示

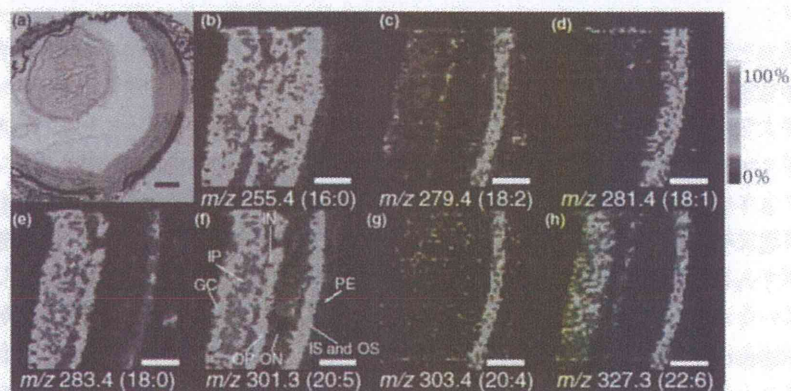


図23.2 マウス網膜上における脂肪酸分布

(a) マウス網膜の顕微鏡写真。右側の灰色部分が測定領域。スケールバー：200 μm 。(b) パルミチン酸、(c) リノール酸、(d) オレイン酸、(e) ステアリン酸、(f) エイコサペンタエン酸、(g) アラキドン酸、(h) ドコサヘキサエン酸の分布。スケールバー：100 μm 。(f)に記した各構造の名称：GC：ガングリオン細胞（神経節細胞）、IP：内網状層、IN：内顆粒層、OP：外網状層、ON：外顆粒層、IS：内節膜、OS：外節膜、PE：網膜色素上皮層。（文献11より引用）

す(図23.2)¹¹⁾。網膜は200 μm の微小領域内に10層もの膜構造を有している。この試料に対して銀ナノ粒子溶液をスプレー法により塗布し、ネガティブイオンモードで測定した。解像度は25 μm とした。その結果、組織切片上から多数のシグナルを検出し、ソフトウェアを用いて m/z 255.4, m/z 279.4, m/z 281.4, m/z 283.4, m/z 301.3, m/z 303.4, m/z 327.3のシグナルのイオンイメージを構築した。これらのシグナルはパルミチン酸(16:0)、リノール酸(18:2)、オレイン酸(18:1)、ステアリン酸(18:0)、エイコサペンタエン酸(20:5)、アラキドン酸(20:4)、ドコサヘキサエン酸(22:6)に相当する。ドコサヘキサエン酸については、網膜の内外節層において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かわりが多い多くの研究により報告されてきた。本解析においてドコサヘキサエン酸が内外節層に多く分布することが証明された。

23.6.2 脂質の測定

質量分析のシグナルは、各分子の存在量とイオン化効率に依存する。リン脂質は細胞中の二重膜を構成する主要成分であって生体内で最も量が多く、さらにイオン化効率の面でも優れていることから、質量分析イメージングに適している。

リン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)などに分類される。

中性脂質も臓器やその状態によって、存在量が多い場合があり、そうした試料に対しては特別な処理を必要とせず、マトリックスを均一に塗布したうえでレーザー照射することによってシグナルを検出することが可能である。中性脂質はコレステロールエステル(cholesterol ester:CE)、トリアシルグリセロール(triacylglycerol: TG)などに分類される。

それらの構造がもつ官能基の違いでプロトンの付加もしくは放出を生じる傾向があり、測定もポジティブイオンモードとネガティブイオンモードに分ける必要がある。上記の脂質を分類するとPC,SM,CE,TGはポジティブイオンモード、PE,PS,PIはネガティブイオンモードで測定することが可能である。

マトリックスとしては2,5-DHBが多く利用されている。2,5-DHBは両イオンモードでの測定に対応しているため、試料へのマトリックス塗布後に同一試料を用いてポジティブおよびネガティブの両イオンの検出を試みることも可能である。最近になってネガティブイオンの検出に対して9-AAが有用であることも報告され

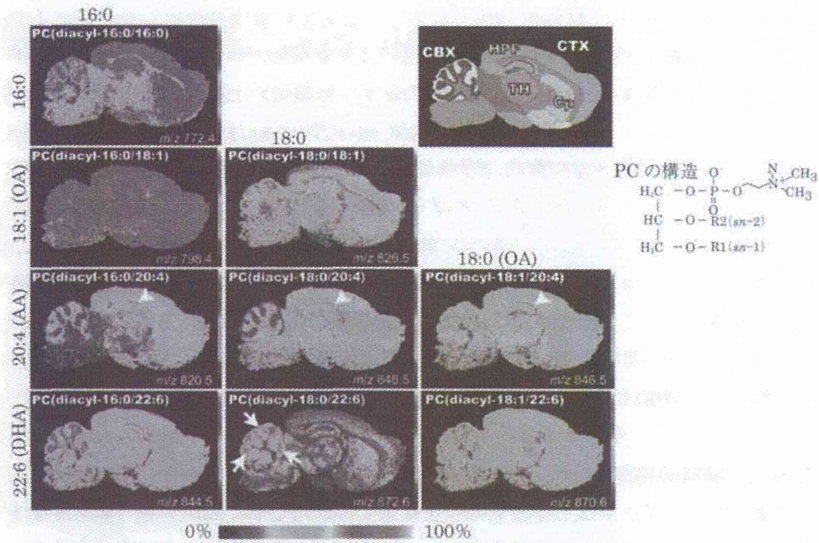


図23.3 マウス脳内における PC の分布

右上に脳の模式図を示した。CBX: cerebellar cortex (小脳皮質), CP: corpus striatum (線条体), CTX: cerebral cortex (大脳皮質), HPF: hippocampal formation (海馬体), TH: thalamus (視床)。横方向に *sn*-1, 縦方向に *sn*-2 の脂肪酸を含む PC のイオンイメージを配置した。(文献14より引用)

ている^{5,13)}。9-AA を用いることにより検出されるシグナル強度が上昇するだけでなく、2,5-DHB を利用する際に検出されていた低分子 *m/z* 領域におけるマトリックス由来のシグナルが少ないことも利点としてあげられる。

マウス脳切片上へ2,5-DHB マトリックスを塗布し、イメージング法により解析した例を示す(図23.3)¹⁴⁾。脳切片に対して2,5-DHB マトリックス溶液をスプレー法により塗布した。ここでは2,5-DHB 溶液に対して酢酸カリウムも混合している。通常の質量分析法において、塩はイオン化効率を低下させる原因になる。しかしイメージング法で扱う生体試料中には内在性の塩が含まれており、一つの分子に対する付加イオンとしてプロトン、ナトリウム、カリウムの3種類が存在する。そのためマススペクトルが複雑になり、一つのピークが複数の分子によって構成される現象を招く。そこであらかじめカリウムを試料上に塗布することによって、付加イオンをカリウムに偏らせる手法が用いられている。

ポジティブイオンモードで測定を行った結果、マウス脳内での PC の分布が明らかになった。構築されたイオンイメージは各 PC がマウス脳全体や、大脳皮質、小

脳皮質、海馬体、線条体、視床に多く分布することを明らかにした。とくにアラキドン酸 (20:4) やドコサヘキサエン酸 (22:6) のような高級不飽和脂肪酸を含むPCの特異的な分布が描出されている。2位にアラキドン酸を含有するPC (diacyl-16:0/20:4)、PC (diacyl-18:0/20:4)、PC (diacyl-18:1/20:4) は、共通して海馬に多く分布している。また2位にドコサヘキサエン酸を含有するPC (diacyl-16:0/22:6) やPC (diacyl-18:1/22:6) は小脳の顆粒層に多く分布したのに対して、PC (diacyl-18:0/22:6) は顆粒層の外側だけに限定した分布を示している。現時点において脂質の脂肪酸の違いまで分布を識別できるのは、質量分析を用いたイメージング法のみであり、脂質生化学の分野では必須の可視化手段となっている。

23.6.3 タンパク質・ペプチドの測定

タンパク質は脂質に比べると生体内でのモル数が少ない。タンパク質をターゲットに考えるのであれば、脂質によるイオンサプレッションを押さえるために脂質をあらかじめ除去することが望ましい。脂質は有機溶媒に容易に溶解するためエタノール、イソプロパノール、酢酸などが利用され、その除去効率が検討されてきた¹⁰⁾。その中でもイソプロパノールを用いて試料を洗浄することにより効率的に脂質を除去できるだけでなく、試料上に形成されるマトリックス結晶の状態もよいことが明らかにされた。さらにSAを試料上に滴下して測定して比較したところ、イソプロパノールで処理した試料中から感度よくシグナルを検出できることが明らかになった。これらのシグナルは m/z 2500から m/z 20000程度の大きさの分子であり、さらに大きな分子は現時点ではなかなか困難である。これら高分子の測定に不向きな装置でもタンパク質をトリプシン消化によって断片化し、ペプチドとして検出することが可能である¹⁰⁾。またタンパク質のような高分子の場合に構造解析が困難であることを考えても、断片化したうえでの解析は非常に有用であるといえる。

古くから病理試料の多くは組織染色後に観察するため、パラフィン包埋することによって試料の保存状態を維持することが多い。解析前にキシレンによる脱パラフィンを行い、続けてエタノールによる脱脂後に、ChIP-1000を用いてトリプシンを滴下。その後、37℃の湿潤チャンバー内で一晩置くことによりトリプシンによる断片化が可能である。各分化度のがん部および正常部のさまざまなシグナルからイオンイメージを構築したところ、低分化度のがん試料において m/z 1325.6、すべてのがん試料において m/z 976.4の増加発現が発見され、さらに多段階質量分析による構造解析を行ったところ、 m/z 1325.6がヒストン H4、 m/z 976.4がアクチンで

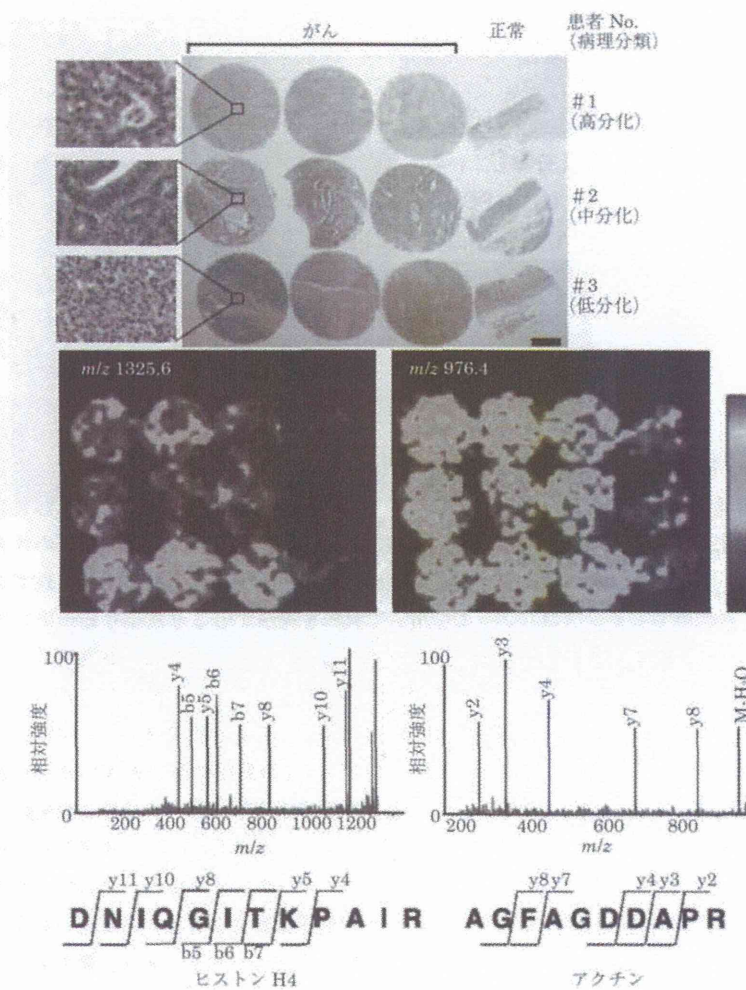


図23.4 異なる分化度の胃がんにおけるタンパク質の分布

各分化度のがん試料から切片を作製し、脱パラフィン、トリプシン消化後に解析した。低分化度のがん試料において m/z 1325.6, すべてのがん試料において m/z 976.4の増加発現が見られる。構造解析の結果、 m/z 1325.6はヒストン H4, m/z 976.4はアクチンと同定される。(文献16より引用)

あることが示されている (図23.4)¹⁶⁾。

23.6.4 薬物動態解析への応用

医薬品候補の薬物動態評価においてオートラジオグラフィーが用いられているが、プローブ作製費用や解析までに時間を要することが問題となっており、質量分析を用いた技術への期待が高まっている。

2006年にはアメリカの Caprioli のグループが抗精神病薬であるオランザピンをラットに投与し、全身切片から400 μm の解像度で薬物動態を調べた¹⁷⁾。この研究において投与2時間後にオランザピン (m/z 313) が肺、肝臓、腎臓、膀胱に分布していることが示されている。またオランザピンの MS/MS イメージングを行い、その代謝物である *N*-デスメチル代謝物 (*N*-desmethyl metabolite) (m/z 256) と 2-ヒドロキシメチル代謝物 (2-hydroxymethyl metabolite) (m/z 272) が同じ臓器に分布していることを示すことでオランザピンが分布する部位が示されている。さらに6時間後にはそれらの分布が腎臓に移行していることを明らかにすることで、オランザピンの代謝経路が示されている。

この解析から5年後の現在では装置開発が進み、レーザー収束技術や測定感度が向上している。ヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬であるファモチジンが投与後、皮質や髓質と比べて腎盂に多く分布していることが50 μm の解像度で示されている¹⁸⁾ (図23.5)。

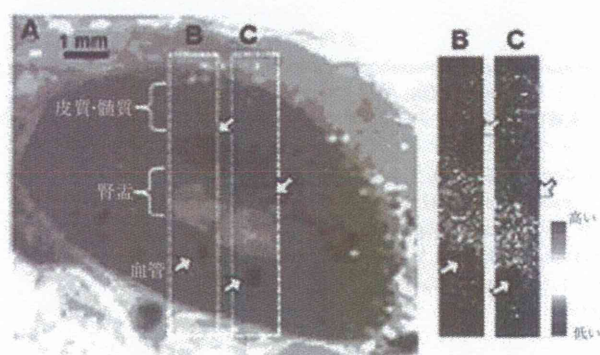


図23.5 ファモチジンの腎臓内分布

(A) 腎臓の皮質、髓質、腎盂、血管を測定領域を設定し、MS (B) と MS/MS (C) 解析を行った。 m/z 338.05 (B) と m/z 259.08 (C) はともに腎盂に強いシグナルを示し、血管 (矢印) ではまったくシグナルが検出されなかった。(文献18より引用)

薬物の開発段階において投与後の代謝経路は重要な情報であり、この情報が迅速に得られることにより薬物の血中濃度コントロールや副作用の軽減を目的とする改良につながる事が期待されている。

23.7 おわりに

質量分析を用いたイメージングはSIMSを用いた金属や半導体の表面分析からスタートして、近年では生体組織研究にも応用されるようになり、多くの成果をもたらしてきた。一度に数千から数万の分子の量的・位置的な挙動を、ターゲットを絞らずにモニターできる手法であることから、その応用分野は医学、薬学、農学、工学などさまざまな分野である。質量分析を用いたイメージングはいまだ開発段階にある。世界中の研究者がさまざまな試料に適用する一方で、目的とする分子を検出するために前処理方法も盛んに検討されているところである。またデータは膨大であり、一度に人間が把握できる量をはるかに超えている。二次元的に得られた質量スペクトルのデータの中からいかにして意味のある情報を抽出するかも重要な課題である。測定する試料によってシグナルの解析手法も変える必要があり、ユーザーの要望を反映させたソフトウェアの開発が現在の課題である。

以上のように、質量顕微鏡法の原理から測定例までを簡単に紹介してきた。実際に実験を行う際のさらに詳細な情報は、文献1などを参照していただきたい。

参考文献

- 1) M. Setou, "Imaging Mass Spectrometry — Protocols for Mass Microscopy," Springer (2010).
- 2) R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile, *Anal. Chem.*, **69**, 4751 (1997).
- 3) 瀬藤光利, 「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ル」, シュプリンガー・ジャパン (2008).
- 4) K. Onoue, N. Zaima, Y. Sugiura, T. Isojima, S. Okayama, M. Horii, Y. Akai, S. Uemura, G. Take-mura, H. Sakuraba, Y. Sakaguchi, M. Setou, Y. Saito, *Circ. J.*, **75**, 221 (2010).
- 5) T. Harada, A. Yuba-Kubo, Y. Sugiura, N. Zaima, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, M. Wakui, M. Sue-matsu, K. Takeshita, K. Ogawa, Y. Yoshida, M. Setou, *Anal. Chem.*, **81**, 9153 (2009).
- 6) H. Kawasaki, T. Sugitani, T. Watanabe, T. Yonezawa, H. Moriwaki, R. Arakawa, *Anal. Chem.*, **80**, 7524 (2008).
- 7) L. C. Chen, K. Yoshimura, Z. Yu, R. Iwata, H. Ito, H. Suzuki, K. Mori, O. Ariyada, S. Takeda, T. Kubota, K. Hiraoka, *J. Mass Spectrom.*, **44**, 1469 (2009).
- 8) M. Stoeckli, D. Straab, A. Schweitzer, J. Gardiner, D. Seebach, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 1921 (2007).
- 9) Y. Sugiura, S. Shimma, M. Setou, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 54 (2006).
- 10) S. Shimma, Y. Sugiura, T. Hayasaka, N. Zaima, M. Matsumoto, M. Setou, *Anal. Chem.*, **80**, 878

- (2008).
- 11) T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, K. Shrivasa, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto, M. Setou, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 1446 (2010).
 - 12) J. A. Hankin, R. M. Barkley, R. C. Murphy, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 1646 (2007).
 - 13) J. L. Edwards, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.*, **77**, 2201 (2005).
 - 14) Y. Sugiura, Y. Konishi, N. Zaima, S. Kajihara, H. Nakanishi, R. Taguchi, M. Setou, *J. Lipid Res.*, **50**, 1776 (2009).
 - 15) E. H. Seeley, S. R. Oppenheimer, D. Mi, P. Chaurand, R. M. Caprioli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19**, 1069 (2008).
 - 16) 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.*, **101**, 267 (2010).
 - 17) S. Khatib-Shahidi, M. Andersson, J. L. Herman, T. A. Gillespie, R. M. Caprioli, *Anal. Chem.*, **78**, 6448 (2006).
 - 18) Y. Saito, T. Hayasaka, K. Onoue, Y. Takizawa, S. Kajihara, K. Ogawa, M. Setou, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **59**, 79 (2011).

