平成 22 年度『大阪大学工業会賞』受賞研究

生体組織内分子のイメージングに向けた レーザーイオン化顕微質量分析技術の開発

大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 粟津研究室

1. 緒論

生体内には核酸・たんぱく質・脂質などが存在し、 これらの物質が複雑に相互作用している。生命活動を 理解する上でこのような相互作用を解明することは重 要であり、現在、たんぱく質の網羅的解析であるプロ テオーム解析、代謝物の網羅的解析であるメタボロー ム解析の研究が盛んに行われている。特に、病理研究 や薬物動態の研究において、生体内に存在する物質の 分布を細胞レベルで網羅的に可視化できる技術が求め られている。

形状のみの情報を得るのであれば、光学顕微鏡を用 いれば細胞の観察を行うことはできる。また、免疫染 色を行うことにより、光学顕微鏡で特定の物質の分布 を観察できるようになる。しかしながら、免疫染色で はあらかじめ存在することが予期できる物質しか観察 できず、生体内の物質が周囲のどのような物質と相互 作用をしているかを知るには限界がある。

生体組織の切片などにおけるたんぱく質等の二次元 分布を計測することができる質量顕微鏡は、プロテ オーム解析やメタボローム解析、薬物動態の研究など への応用が期待されている¹⁻³⁾。質量顕微鏡により物 質分布を可視化する質量分析の手法はイメージング質 量分析(imaging mass spectrometry; IMS)と呼ばれ る。Fig.1 は既存のイメージング技術と IMS の関係を 模式的に示したものである。IMS ではあらかじめ存 在することが予期されている物質だけでなく試料に存 在するイオン化可能なすべての物質を調べることがで き、数百種という物質の分布を一度に得られることが できる。また、質量に基づいた情報をもとに分子の同 定や構造解析を行うので解析が容易である。これによ り、今まで免疫染色などでは分からなかった、生体内 における分子同士の相互作用を詳しく調べることがで きるようになると期待されている。しかし、現状で IMS の空間分解能は組織スケールであり、細胞レベ ルでの観察をすることは難しい。また、測定に数時間



Fig.1. Comparison of IMS with other existing imaging techniques. Vertical and horizontal axis indicates the amount of information and spatial scale of observation, respectively. Imaging mass spectrometry have the ability to simultaneously obtain images from multiple molecules.

を要するといった問題もある。IMS による生体内分子の分布を細胞スケールで網羅的に観察する実用的シ ステムを構築するためには、IMS の手法を改良し、 高空間分解能化、高速化しなければならない。

本研究では、IMSの高速化(数十分程度)、高空間 分解能化(<1µm)に向け、通常のIMSで用いられ るレーザーを走査する方法とは違い、新しいIMSの 手法である投影型のIMS技術の開発を行い、人口的 に作成したメッシュパターンサンプルを用いた空間分 解能の評価を行った。また、生体試料を測定するため の手法の開発を行い、走査型IMSと投影型IMSで測 定時間の比較を行った。

2. イメージング質量分析の原理

従来の IMS は試料表面上に集光させたレーザーを 試料表面上で走査することで測定を行っており、その 概念図を Fig.2 (a) に示す。レーザーを走査しなが ら各点で発生したイオンを質量分析計で分析し、全領 域を走査した後、得られた質量スペクトルのデータを 組み合わせ、質量(m)と電荷(z)の比である質量 電荷比(m/z)毎の分布像を構築する。通常の質量分 析装置をそのままソフトウェアの変更だけで IMS に 応用できることから、現状の IMS はほとんどこの走 査型の手法で行われている。しかしながら、現状の IMS にはいくつかの課題がある。まず、レーザーイ オン化を用いた IMS では空間分解能がレーザーの集 光径(10μm)程度に制限される。細胞一つの大きさ が 10-50μm であるので、現状の IMS で、光学顕微鏡 の代わりとして細胞の観察を行うことはできない。ま た、IMS にはレーザーを組織上で走査するために測 定に時間を要するという欠点もある。一般的な IMS



(a) Scanning Imaging Mass Spectrometry

では、一つの組織切片を測定するのに数~数十時間を 要する。

一方、試料全面にレーザーを照射し、生成したイオ ンを位置・時間感知型のイオン検出器に投影させる投 影型 IMS⁴⁻⁷⁾の概念図を Fig.2 (b) に示す。生成した イオンの空間分布は、静電イオンレンズにより拡大さ れ、検出面に結像される。この手法を用いると、空間 分解能はレーザーの集光径に制限されないので 1µm 以下の高い空間分解能が期待できる。また、レーザー を走査する必要もないので、短時間での測定が可能と



(b) Stigmatic Imaging Mass Spectrometry

Fig.2. Schematic of scanning and stigmatic mode imaging mass spectrometry. In scanning mode, a focused laser beam is used to analyze a small localized region, and the resulting mass spectrum is stored along with the spatial coordinates. This process is repeated until the entire sample area has been examined. In stigmatic mode, entire sample section is irradiated to with a homogenized or defocused laser and spatial origin of the ions generated at the sample surface is projected onto a position- and time-sensitive detector.

なる。ただし、走査型 IMS が通常の質量分析装置を そのまま用いて行えるのに対して、投影型 IMS は装 置や分析手法に関する開発が必要である。また、投影 型 IMS では発生したイオンの位置分布を検出器に投 影させ、それぞれのイオンはその飛行時間を測定する ことにより同定を行うので、位置・時間感知型のイオ ン検出器の開発も必要となる。このような理由から投 影型 IMS はまだ実用レベルに達していない。

3. 投影型イメージング質量分析装置

本研究で使用した投影型 IMS 装置の概略図を Fig.3

に示す。レーザー光は石英ウインドウと平凸の石英レ ンズ(08007-D, Edmund optics, USA)を通して真空 容器内へ導入され、試料台に垂直方向から 20°の角度 になるように入射される。試料台には加速電圧が印加 され、試料台より 2.5mm の位置にピンホール型の引 き出し電極が設置されている。試料台からグラウンド 電極の間で加速されたイオンは、質量分離部を飛行し ながらアインツェルレンズによって検出面に拡大、結 像される。このとき質量毎に異なる飛行時間の違いか ら物質を分離することができる。また、本装置は質量 分離部に大阪大学で開発された多重周回飛行時間型質 量分析計MULTUM-IMG⁷⁾を採用している。 MULTUM-IMGはイオンを8の字型に周回させ飛行 距離を延ばすことでイオンの選択能を高めることがで きる。飛行距離はMULTUM-IMGを周回させない場 合1.46mであるが、MULTUM-IMG内を一周するご とに1.308m加算される。また、MULTUM-IMGは 空間、飛行時間に関して周回後の状態が周回前と同じ (完全収束)であるので、原理的にMULTUM-IMG 周回後もイオンの位置情報が保存される。イオン検出 器には2段のマイクロチャンネルプレート (microchannel plate; MCP) に蛍光板と拡大レンズ (MLM-3XMP, CBC Co., Ltd., Japan)を接続した冷却 Charge-Coupled Device (CCD)カメラ (CoolSNAP *HQ*², Roper Scientific, Inc., USA)を組み合わせたも のを用いた。イオンが MCP に入射すると電子が発生 し、発生した電子が蛍光面を発光させ、その光を



Fig.3. Schematic of the stigmatic imaging mass spectrometer. The third harmonic wave of a Nd:YAG laser is used for ionization of samples. An acceleration voltage is applied to the sample plate, and generated ion is accelerated in ion source and detected with an ion detector after flying through field free region. The spatial origin on sample surface was magnified and projected with an einzel lens.

CCD カメラで撮影することで MCP に入射したイオ ンの分布を可視化できる。また、MCP の信号をデジ タルオシロスコープ (WaveMaster 8600A, LeCroy, USA) で取得し、イオンの飛行時間スペクトルを得 ることができる。

本実験ではイオン化用レーザー光源として Nd: YAG レーザー (SLMQ1S-10, Spectron Laser Systems Ltd., England)の第三高調波 (波長 355nm)を使用し、 繰り返し周波数 10Hz で発振させた。レーザーのス ポット径は約 1mm とし、加速電圧を 20kV、引き出 し電圧を加速電圧に対して – 800V に設定した。測定 はリニアモードで行い、アインツェルレンズを使って イオン像を約 20 倍に拡大した。

4. 実験方法

4.1. 人工サンプルを用いた空間分解能の評価

投影型 IMS 装置の性能を評価するためにレーザー 脱離イオン化が容易な色素を用いてメッシュパターン の試料を作成した。Crystal violet (以下 CV, M. W.=407.98, Wako, Japan)水溶液 2µL をステンレス製 サンプルプレート上に滴下し、乾燥後上から導電性 テープを用いて Ni 製の 12.5µm ピッチの金属メッシュ (Ni G2000HS; Nisshin EM, Japan)を被せ、投影型 IMS 装置で観察した。

4.2. 色素染色組織切片の観察

C57BL/6Jマウス(雄)にジエチルエーテル (nacalai tesque, Japan)を吸入麻酔させた後、脳組織を摘出し、 摘出した組織を直ちに凍結させた。凍結はパウダー状 に砕いたドライアイスで行い、組織表面が完全に凍結 したことを確認した後、-80℃環境下で保存した。ク ライオトーム (CM1850, Leica, Germany)を用いて、 - 20℃環境下にてマウスより得られた凍結組織から 10µmの組織切片を作成した。作成した試料を indium tin oxide (ITO) コート付スライドガラス (Bruker Daltonics, Germany) に貼り付けた。ITO コート付ス ライドガラスは導電性のスライドガラスであり光学顕 微鏡で組織の構造を観察した試料をそのまま質量分析



Fig.4. A scanning electron microscopy image (a) and a stigmatic ion image (b) of dried-droplets of CV solution covered by the grid with pitches of $12.5\mu m$ and an ion signal intensity profile along the line drawn in the ion image (c).

に用いることができる利点がある³⁾。染色液は CV と methylene blue (以下 MB, M. W.=319.85, Wako, Japan) をそれぞれ質量濃度 0.5%になるように 70%エタノー ル水溶液に溶解させた。組織切片の上からピペットを 用いて 1mL の染色液を滴下し、約1分間放置した後、 蒸留水で余分な染色液を洗い流した。

光学顕微鏡にて染色後の切片を確認した後、イオン スパッター(E-1010, HITACHI, Japan)で試料表面 上に金をコーティングした(膜厚約8nm)。ここで、 金をコーティングしたのはレーザーを照射した際に試 料表面が帯電することを避けるためである。その後、 投影型IMS装置に試料を導入し、観察を行った。なお、 本動物実験は大阪大学動物実験委員会の承認を得てお り、大阪大学動物実験規程に準じて実施した。

5. 実験結果

Fig.4 にメッシュを用いて作成した人工サンプルを 観察して得られたイオン像を示す。一定間隔で輝度の 強い部分が現れており、メッシュの形が確認できる。 試料表面で発生したイオンの位置情報を保持したまま 検出器に拡大して投影できていることが分かる。

次に、マウス脳組織より作成した色素染色後の切片 の海馬部分の光学顕微鏡像(1.50mm × 3.25mm の領 域)を Fig.5 (a)に示す。質量顕微鏡で 20 倍に拡大 してイオン像を得た場合、一回で観察できる視野は直 径約 400µm の円形領域であったので、海馬全体を観 察するために、マイクロメーターで測定位置を 250µm ずつ動かしながら 78 枚(6 × 13)のイオン像を撮影 した。78 枚のイオン像を自作ソフトで連結した画像 を Fig.5 (b)に示す。光学顕微鏡で見える海馬の形 がイオン像に反映されていることが分かる。また、 Fig.5 (c)に示すように、オシロスコープより得られ たスペクトルには methylene blue と crystal violet 由 来のイオンのピークが現れた。

6. 考察

2000lines/inch のメッシュサンプルを測定した結果 から投影型 IMS 装置の空間分解能を評価した。強度 プロファイルの輝度の最大値の80%となる位置から 20%となる位置までの距離から空間分解能は約3µm であると見積もられた。これは一般的な走査型の質量 顕微鏡で得られる空間分解能 10µm に比べて高い空間 分解能であるといえる。しかし、細胞内の物質の分布 を観察するのに必要な空間分解能(<1µm)はまだ得 られていない。空間分解能を制限する要因としては、 検出器の空間分解能、試料がイオン化した時の初期速 度の角度分散の影響などが考えられる。現在使用して いる検出器の空間分解能は少なくとも約 30um 程度で ある。これは、20倍で拡大した場合には投影型 IMS 装置の空間分解能は原理的に約1.5umとなる。よって、 さらに高い空間分解能を得るためにはイオン光学系の 拡大倍率を向上させる必要がある。

また、マウス脳切片の海馬部分を観察した結果、組 織切片上に存在する分子でも、試料上での分布を崩さ ずにイオン化し、イオン像として観察できることが分 かった。ただし、観察領域でイオン強度に不均一性が みられた。一つの原因としてレーザーの強度分布の不 均一性が挙げられる。これを確認するためには、レー ザー強度の条件を変化させてレーザー強度と生成する イオン量の関係を調べる必要がある。また、検出器に 入射するイオンフラックスとイオン像上での強度の関 係も調べる必要があり、これらの特性を調べたうえで、



Fig.5. Optical microphotograph of the hippocampus section stained with CV and MB (a), stigmatic total ion image of the hippocampus (b), and typical mass spectrum obtained from the hippocampus (c). For observing the entire hippocampus section, 78 ion images were combined.

レーザーの強度の不均一性がイオン像に与える影響の 低い領域の強度でレーザーを照射する、またはアパー チャー等によりそのような部分をビームから切り出せ ばイオン像に改善が見られると考えられる。また、将 来的には回折型ホモジナイザーやデフォーマブルミ ラーなどを用いてレーザーの強度均一化とビーム整形 を行うか、あるいは検出効率の不均一性を定量化し、 画像処理によって補正するシステムを構築することも できる。

本実験ではマウスの1.50mm × 3.25mmの領域を観 察するために78枚のイオン像を取得した。1枚当た りのイオン像の積算時間は10sなので10s×78 = 13minと概算できる。同領域を走査型の質量顕微鏡で 観察する場合、10µm 間隔で走査し1spotあたり 800shotのレーザーを400Hzで照射したとすると0.2s ×48750 = 2.7hの時間を要する²⁰。すなわち、特定 の分子のみのイオン像を観察する場合において、投影 型の質量顕微鏡を用いることによって、測定時間を走 査型に対して約0.08倍に短縮できたといえる。さらに、 今後改良を加え、電圧調節によりイオン像の拡大倍率 を自在に調節できるズーム機能を追加すれば、広範囲 の観察を行う場合でも走査の必要がなくなり、さらに 短時間での測定が期待できる。 短時間、かつ細胞スケールの空間分解能で網羅的に観 察するため、投影型イメージング質量分析技術の確立 を目指して、装置の性能評価と改良、さらに生体試料 を測定する際の試料作成法と測定手法の開発を行っ た。

平成 22 年度『大阪大学工業会賞』受賞研究

人工的に作成したメッシュパターンのサンプルを用 いた性能評価では空間分解能 3μm を達成することが できた。さらに、マウス脳組織切片の測定を行い、特 定の分子を観察する場合において測定時間を一般的な 走査型イメージング質量分析に対して約 0.08 倍に短 縮することができた。

このような分析は一般的な走査型イメージング質量 分析や他のイメージング手法では行うことができず、 投影型 IMS の優れた点といえる。今後、検出器の空 間分解能を上げるか、イオン光学系の拡大倍率を上げ ることでさらに空間分解能を高め、1µm 以下での測 定が可能となる。また、複数種のイオンを別々のイオ ン像として測定するために、現在イオンの位置と飛行 時間を同時に測定可能な検出器⁸⁾の開発も進められ ている。

投影型イメージング質量分析は現時点でまだ開発段 階にある技術であるが、本研究を通してプロテオミク スやメタボロミクスといった生化学分野への応用に飛 躍的に近づくことができたと言える。将来的には、癌 などの確定診断に用いる従来の光学顕微鏡による細胞 の形態観察にその疾患特有に発現する物質の分布画像

7. 結言

本研究では、生体内に含まれる多様な物質の分布を

を重ね合わせることで診断の精度を上げる新たなモダ リティとして、また製薬企業の創薬プロセスにおいて 臓器毎に異なる取り込み量や代謝経路を高速イメージ ングすることで迅速な候補物質のスクリーニングが行 えるツールとして展開していくことが期待される。

謝辞

本研究は、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研 究推進事業(CREST)の支援により実施したもので ある。

〈参考文献〉

- L. A. McDonnell, and R. M. A. Heeren : Mass Spectrom. Rev. 26 (2007) 606.
- T. Harada, A. Yuba-Kubo, Y. Sugiura, N. Zaima, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, M. Wakui, M. Suematsu, K. Takeshita, K. Ogawa, Y. Yoshida, and M. Setou : Anal. Chem. 81 (2009) 9153.
- P. Chaurand, S. A. Schwarts, and R. M. Caprioli : Anal. Chem. 76 (2004) A-pages.
- S. L. Luxembourg, T. H. Mize, L. A. McDonnell, and R. M. A. Heeren : Anal. Chem. 76 (2004) 5339.

- A. F. M. Altelaar, I. M. Taban, L. A. McDonnell, P. D. E. M. Verhaert, R. P. J. D. Lange, R. A. H. Adan, W. J. Mooi, R. M. A. Heeren, and S. R. Piersma int. J. Mass Spectrom. 260 (2007) 203.
- A.F. M. Altelaar, S. L. Luxembourg, L. A. McDonnell, S. R. Piersma, and R. M. A. Heeren: Nature Protocols 2 (2007) 1185.
- H. Hazama, J. Aoki, H. Nagao, R. Suzuki, T. Tashima, K. Fujii, K. Masuda, K. Awazu, M. Toyoda, and Y. Naito : Appl. Surf. Sci. 255 (2008) 1257.
- H. Yoshimura, H. Hazama, J. Aoki, M. Toyoda, Y. Naito, K. Awazu : Jpn. J. Appl. Phys. 50 (2011) in press.



現在、浜松ホトニクス株式会社に て、個体撮像素子の開発に従事。

(エネルギー量子 平成21年卒 環境エネルギー 23年前期)

第40回吹田祭 大阪大学工業会杯争奪綱引き大会

10月24日(月)~11月7日(月)、吹田キャンパスにおいて「第40回大阪大学吹田祭」 が開催され、大阪大学工業会のPR活動の一環として吹田祭に協賛し、『綱引き大会』 (10月26日)の入賞賞品を贈呈しました。

熱戦が繰り広げられ、優勝は「森研究室」(電気電子情報工学専攻)、第2位「武石 研究室」(機械工学専攻)、第3位「宇都宮研究室」(マテリアル生産科学専攻マテリアル 科学コース)でした。