

質量分析イメージングとその社会実装への挑戦

大阪大学大学院工学研究科 生物工学専攻 准教授
株式会社ミリオン 最高技術責任者

新聞 秀一

1. はじめに

質量分析イメージング (MSI: mass spectrometry imaging) は、二次イオン質量分析法による材料科学の表面分析で用いられており、1990年代半ばにLAMMA (laser microprobe mass analyzer) のコンセプトをマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization) に適用し R. M. Caprioli 氏や B. Spengler 氏らにより生体有機分子の可視化が初めて行われました[1,2]。2002年に質量分析法を用いたタンパク質のイオン化でノーベル化学賞が受賞されたことから、多くの研究者がタンパク質の MSI を行っていますが、現在では生体内小分子 (代謝物や脂質) ならびに薬物などの MSI も活発に行われています。本稿では、まず MSI の方法について解説し、筆者が開発に携わった質量顕微鏡について取り上げます。また、スパイス中の二次代謝物可視化における応用例について簡単に紹介し、この MSI を社会実装する取り組みとして、筆者が立ち上げた大阪大学発ベンチャー企業について紹介したいと思います。

2. 質量分析イメージングとは

MSI は生体組織を直接質量分析することにより、組織表面の分子をイオン化し検出することで強度分布をマッ

ピングする方法です。MSI のワークフローを図 1 に示しました。質量分析法は、試料をイオン化することから「破壊分析」となるため、MSI を行うためには試料採取が必要となります。例えば、ヒト試料を対象とする場合には、手術検体や生検により採取され、動物試料であればマウスなどのげっ歯類から臓器や腫瘍組織を採取することになります。採取された試料は、一般に液体窒素などを用いて凍結されます。凍結に際し、生体内小分子を測定対象とする場合、分子の拡散や流出を防ぐため通常化学固定などは行いません。凍結された試料は、クライオミクロトームを用いて厚さ 10-20 μm で凍結切片を作製した後、導電性を有する透明なガラスプレートに載せられます。ここで用いるガラスプレートとして、通常インジウムスズ酸化物でコーティングされた ITO ガラスを用います。その後、イオン化補助剤である「マトリックス」を試料表面に供給し、MALDI を用いて分析を行います。分析に際し、組織表面にデータ取得点を設定し、その位置情報とともに各点でマススペクトルを取得します。なお、マススペクトルとは横軸が質量電荷比 (m/z)、縦軸がイオン強度で表されたグラフデータのことを指します。

全てのデータ点でマススペクトルを取得した後、得られたマススペクトルからイメージング対象となる成分の m/z に相当するピークを選択します。選択したピーク強度

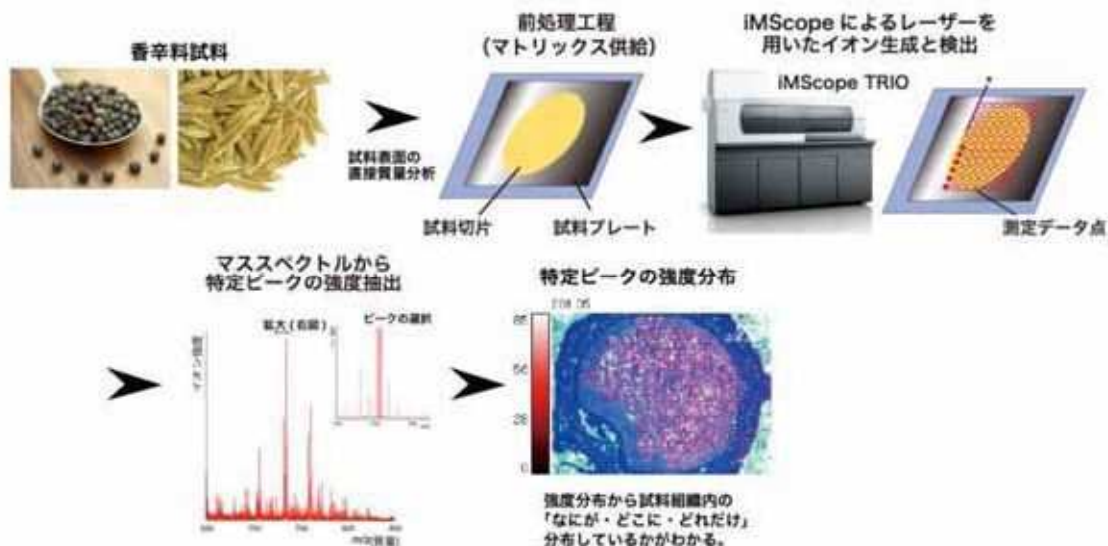


図 1 MSIの流れ



図2 質量顕微鏡概要

分布を専用のソフトウェアで描くことにより、MSIのイメージングデータとなります。この測定原理から、MSIの特徴は試料表面でイオン化し検出された全てのピークについて分布を描くことが可能であると言えます。すなわち、可視化のためのタグを使用することなく一度に様々な分子の分布情報が得られます。一方、質量分析法ではMS/MSやMS²/MS²/MSと呼ばれる分子の構造情報を得るためのタンデム質量分析法と呼ばれる測定法があります。タンデム質量分析を組織上で行うことで、測定対象を絞って構造情報を得ることにより、非常に特異性の高いイメージングデータを取得することも可能です。

3. 質量顕微鏡の開発

冒頭で述べたように、MSI研究は欧米で着手されていましたが日本におけるMSI研究の開始は2004年に遡ります。筆者はその当時、博士後期課程の学生という身分でしたが、素粒子物理学から生物学に研究テーマを転換し新たな装置開発に取り組みたいと考えていました。当時グループリーダーであった瀬藤光利先生（現浜松医科大学教授）のラボへ、MSI専用装置である「質量顕微鏡」を開発するためのプロジェクトメンバーとして参加しました。筆者自身のバックグラウンドが、素粒子物理学分野でも、特に、半導体飛跡検出器などの計測機器を開発していたことが幸いました。

質量顕微鏡の開発に先立ち、開発予算獲得のためにJST先端計測分析技術・機器開発事業に申請し、幸運にも第

1期の採択課題となりました。質量顕微鏡は図2に示すように、試料チャンバーには顕微鏡とイオン化を行うためのレーザーならびに試料ステージが設置されており、大気圧環境に置かれています。大気圧下で生成されたイオンは、インターフェースと差動排気系を介して真空部に輸送され、四重極イオントラップとリフレクトロン型飛行時間型質量分析計で質量分析が行われます。

質量顕微鏡は、2004年から5年間のプロジェクトでプロトタイプが製作され^[3]、その後ソフトウェアの開発と製品化への改良を経て、開発開始から約10年後の2013年4月に島津製作所から「iMScope」という名前で上市されました。さらに、その1年後には欧州においても「iMScope TRIO」という製品名で販売が開始されました。現在においても、顕微鏡下において高解像度でMSIが行える装置は他には存在せず、非常に独創的であり注目を集めている装置です。

4. スパイス中の二次代謝物可視化への応用

既に述べた通り、MSIでは成分を直接検出するため、他のイメージング方法では得ることができない分布情報を得ることが可能となります。この威力が最も発揮される場面は、代謝物などの小分子有機化合物の可視化です。代謝物などの分布は、タンパク質と異なり抗体を用いた可視化はできません。すなわち、代謝物そのものを検出するMSI以外に、分布情報を得ることはできません。その一つの例として、胡椒中の辛味成分であるピペリンの分

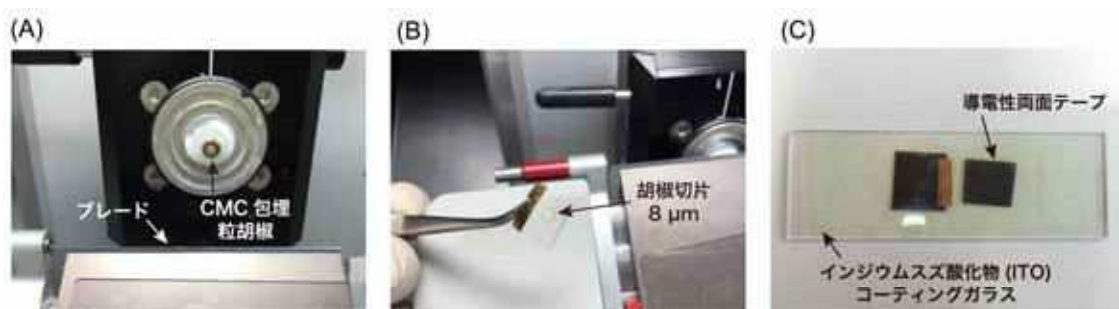


図3 胡椒切片の作成。(A) 包埋された胡椒試料、(B) クライオフィルム上に回収された胡椒切片、(C) ITOガラス上に固定された試料

布について取り上げたいと思います[4]。

胡椒は、既に知られている通り最も消費量の高いスパイスの一つです。胡椒中のピペリンを可視化するには、胡椒の切片を作る必要があります。しかし、胡椒は一般的に乾燥しているため、その切片を作ると形態を保つことなく粉末になってしまいます。図3に胡椒切片作製の写真を載せました。切片作製には通常クライオミクロトームと呼ばれる凍結切片作製装置を用います。クライオミクロトーム内部は -20°C 程度に保たれています。切片作製の際、胡椒は4%カルボキシメチルセルロースなどを用いて包埋されます(図3A)。「包埋」とは、言い換えれば水中に試料を埋めて切りやすくするための方法です。しかし、乾燥試料やもろい試料では包埋のみではMSIのための切片を作製する事はできません。完全な切片を回収するために、クライオフィルムと呼ばれる低温下でも粘着性をもつ素材を用いて回収します(図3B)。フィルム上に載せられた切片は、ITOガラス上に貼り付けMSIを行います(図3C)。

図4Aと図4Bにピペリンの化学構造式と実際に得られた胡椒内部での分布を示します。ピペリンは、胡椒全体に分布するのではなく中心部の果肉部分に局在する様子が初めて可視化されました。このような情報は、異なるフレーバーをもつスパイス製造プロセスの開発に役立つと期待されます。また図4Cに示す通り、実際に得られるマススペクトルは非常に複雑で、これらピークは様々な二次代謝物に由来していると考えられます。筆者がMSIの研究に携わり始めた当時は、一つ一つのピークを目視で抽出していましたが、現在では多変量解析を用いた方法で簡便に解析することが可能になっています。実際にそのような解析を行うと、胡椒切片内で非常にユニークな

分布を示す代謝物情報を得ることができます。図4Dは、得られたマススペクトルから多変量解析を行い、試料内の特徴的な部位を抽出し色分けした結果です。また、それぞれの領域の中で最も寄与率の高いピークを抽出し、その分布を描くことも可能です。このような解析により、どの二次代謝物がどこに局在するかという情報が容易に得られるようになりました。

5. 社会実装に向けた挑戦

—株式会社ミルイオンの設立—

筆者はこれまで15年にわたり、MSIの研究に従事しており様々な試料を分析し数多くのノウハウを蓄積し、前処理に関する特許も取得してきました。また、MSIもこの15年間で認知され様々な分野の研究者が「利用してみたい」というような状況になりました。その一方で、MSIの試料前処理は非常に難しく、誰でも簡単にデータが取れるという方法にはなっていないというのが現実です。もっと多くの人にMSIを使ってもらいたい、という思いがありました。その方法をなかなか実現できずにいました。そのような折、大阪大学産学共創本部より事業化グラントへの申請を打診されました。

このグラントは、「起業シーズ育成グラント(以下、シーズグラント)」と「起業プロジェクト育成グラント(以下、プロジェクトグラント)」の2段階で構成されており、1段階目のシーズグラントでは「事業化の検証(CEOの選定を含む)」を行います。2段階目のプロジェクトグラントは、募集要項の言葉を借りると「社会ニーズ・市場ニーズを解決する可能性をもつ革新的な本学の技術シーズについて、起業前段階からベンチャーキャピタルの事業化ノウハウ等を取り込むことで、市場や出口を見据え事業

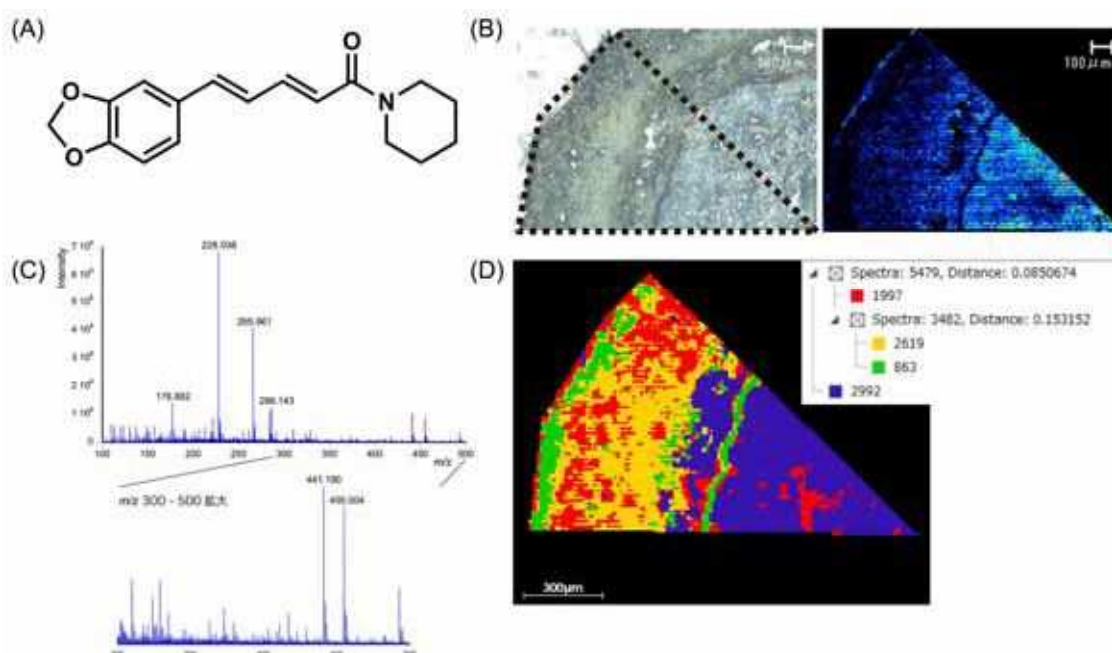


図4 (A) ピペリンの化学構造式と (B) 胡椒中での分布、(C) 試料表面から得られるマススペクトル、(D) 多変量解析による特異的部位の抽出

化を目指します」という性質を持っています。

大阪大学がこのような支援を行っている事は知ってはいましたが、実際声をかけられ申請を決断するまではかなり悩みました。起業は夢として持っていましたが、これまでずっとアカデミアで研究を行ってきており、会社に関する知識が全くない自分に何ができるのかという葛藤があったからです。その一方で、筆者自身はこれまで様々な研究分野で新しいことにチャレンジしてきたという自負もありました。40歳でまた新しい事にチャレンジしてもいいのではないかと考え、シーズグラントに申請するに至りました。幸いなことに、この申請にあたり、ベンチャー・事業化支援室シニア・リサーチ・マネージャーの中村和彦氏から多くの助言を受けることができ、2019年度はシーズグラントの支援を受けることになりました。

このグラント期間中に申請書に記載したビジネスモデルを実現するための協業先を検討・決定し、幸いなことにCEO候補も計画より前倒しで見つけることができました。そのCEO候補は工学部応用化学コースに在籍する学部学生で（小竹和樹君と言います）、偶然出会ったときにMSI技術に惚れ込み、「是非会社を経営してみたい」という強い思いを伝えられ、CEO候補として合意しました。その後、小竹君の類稀なるスピード感と突破力で、瞬間に会社設立の運びとなりました。会社名はいくつかの候補の中から「ミルイオン」と名付け、令和元年12月16日

に彩都に登記を行いました（図5）[5]。筆者自身は株式会社ミルイオンにCTOとして参画しています。恐らくシーズグラント受給中の起業は、前例がないと思います。本稿を執筆中の2020年1月現在は、シーズグラントを続けるとともに、イレギュラーではありますがプロジェクトグラントへの申請を行っています（通常は起業前に申請するため）。

プロジェクトグラント申請には、VCからの誓約書が必要であり、より具体的な市場性を問われます。筆者は既に起業をしているため、より厳しく数字を求められます。これまで、大学で研究しているだけでは考えることがないような「事業計画」、「将来の売り上げ見込みを含む市場性予測」などをCEOの小竹君と日々議論しています。

6. おわりに

本稿では、MSIの概要からその応用例を解説し社会実装の例として「株式会社ミルイオン」起業について説明しました。自分の持っている技術を社会実装するには様々な方法があると思います。その一つは起業で、それに躍動感を持つ若者が賛同してくれたことは本当に幸運だったと思います。筆者の会社は令和2年4月1日の営業開始を目指し、現在も引き続き準備をしているところです。不安になることも多いですが、CEOの小竹君の持ち前の明るさで一緒に歩んでいるところです。今後、株式会社ミルイオンは、先端科学を起点に新たな市場を作っていく所存です。どうか皆様、大阪大学発の新たな企業を応援いただければ幸いです。

References

1. Caprioli R.M. et al., Anal. Chem., 69, 4751 (1997).
2. Spengler B. et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 13, 735 (2002).
3. Harada T. et al., Anal. Chem., 81, 9153 (2009).
4. 新聞秀一、佐川岳人 第68回日本生物工学会大会 (2016)
5. <http://miruion.com/>会社概要

(筑波大 物理学 平成13年卒 15年修士
総研大 生理学 19年博士)



図5 株式会社ミルイオンロゴ