走査型プローブエレクトロスプレーイオン化質量分析法の開発と 生体組織のラベルフリー質量イメージングへの応用[†]

大 塚 洋 一

大阪大学大学院理学研究科化学専攻 560-0043 大阪府豊中市待兼山町 1-1

(2016 年 3 月 7 日受付 ; 2016 年 4 月 7 日掲載決定)

Development of Scanning Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Label Free Mass Imaging of Biological Tissue Section

Yoichi OTSUKA

Department of Chemistry, Osaka University, 1-1 Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-0043

(Received March 7, 2016 ; Accepted April 7, 2016)

Understanding the spatial distribution of chemical components inside materials is essential to make advances in science and technology. Scanning probe electrospray ionization mass spectrometry (SPESI-MS) is an analytical technique to realize the ambient sampling and ionization. The fusion of the electrospray ionization technique in mass spectrometry and the technique used in scanning probe microscopy has given a birth to a new analytical method. The demonstration of a label-free mass imaging of biological tissue sections showed the possibility of bio-marker detection and/or discovery by SPESI-MS.

KEYWORDS : ambient sampling and ionization, scanning probe, chemical imaging, label-free imaging, biomarker

1. は じ め に

試料中の化学種の二次元分布計測技術は、ライフサイエンスやマテリアルサイエンスなど、幅広い研究分野において主要な分析技術の一つである。イメージング質量分析法 (mass spectrometry imaging, MSI) は、分子量の違いに基づいて、化学種の二次元分布を画像化する方法である。

MSI の主流は、真空環境で行うマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (matrix assisted laser desorption mass spectrometry, MALDI-MS) と、二次イオン質量分析法 (secondary ion mass spectrometry, SIMS) であるが、2000 年初頭から大気圧環境下でのイオン化法 (大気圧イオン化法) を用いた MSI が報告されるようになった。大気圧イオン化法は、真空装置への試料導入の

手間が不要なため、真空中での試料の乾燥に伴う構造や化学組成の変化を抑制しながら、迅速に分析を実施することができる。

これまでの大気圧イオン化法の大部分は、エレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) を応用している。ESI の特徴は、タンパク質や高分子材料など、大きな分子量の化学種を壊すことなくソフトにイオン化することができる点にある¹⁾。ESI を用いた質量分析では、試料が予め溶解した分子溶液に高電圧を印加することで、帯電した霧状の微小液滴を含むエレクトロスプレーを発生させる。帯電液滴の乾燥に伴ってイオン化した溶質が質量分析器に導入され、イオン種の信号強度分布を示す質量スペクトルが計測される。なお、ESI の発明者の J.B. Fenn 教授は、MALDI の発明者である田中耕一氏とともに、2002 年のノーベル化学賞を受賞した。

ESI を応用した大気圧イオン化法のうち、微量体積の溶媒を試料表面の局所領域に付与し、試料成分を溶媒中に溶解する工程 (サンプリング) と、試料成分が溶解し

[†] 第 35 回表面科学学術講演会 (2015 年 12 月 1 日~3 日) にて発表

E-mail : otsuka@chem.sci.osaka-u.ac.jp

Fig. 1. (color online). Schematic illustration of the tapping mode scanning probe electrospray ionization mass spectrometry. (Reproduced from Ref. 6 with permission from the Royal Society of Chemistry.)

た溶液に高電圧を印加して ESI を行う工程、のそれぞれを大気圧環境下で行う方法が報告されてきた。これまでの方法は、主に二つの方式に分類することができる。

一つは、サンプリングとイオン化を同一の場所・時間で行う方式である。代表的な方式である脱離エレクトロスプレーイオン化法 (desorption electrospray ionization, DESI) では、ESI で帯電した溶媒液滴を生成し、キャリアガス (窒素) とともに試料に吹き付ける。帯電した溶媒液滴が試料と接触することで試料のサンプリングとイオン化が生じる²⁾。高压のキャリアガスが必要であるが、DESI 法は 2004 年の発表後、幅広い分野で応用されている。

もう一つの方式は、サンプリングとイオン化を異なる位置と時間で行う方法である。ガラスキャピラリー等を通じて溶媒を試料表面に付与することでサンプリングを行い、その後に試料成分を含む溶媒を質量分析器のイオン取り込み口に輸送し、イオン化を行う。代表的な方法である、液架橋表面サンプリングプローブ法 (liquid microjunction surface sampling probe, LMJ/SSP) では二重管のキャピラリーを使用する。内側のキャピラリーを通じて溶媒を試料に付与した後に、外側のキャピラリーで試料成分が溶解した溶媒を吸い上げ、質量分析装置に搬送した後で ESI を行う³⁾。ほかにも、液体抽出表面分析法⁴⁾ (liquid extraction surface analysis, LESA) やナノスプレー脱離エレクトロスプレーイオン化法⁵⁾ (nanospray desorption electrospray ionization, nano-DESI) がある。溶媒の付与方法が異なるものの、サンプリングとイオン化の工程が時空間的に分離されている点で共通である。これらの方式では、サンプリングからイオン化までの時間が必要であること、またイオン化装置の構造が複雑化することが課題であった。

2. SPESI の原理と装置構成

タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法 (tapping mode scanning probe electrospray ionization, t-SPESI) は、走査型プローブ顕微鏡法と質量分析法が融合された分析方法である。振動する単一のキャピラリープローブ (以下、プローブとする) を通じて、溶媒を試料表面の局所領域に付与し、プローブ先端部で試料成分のサンプリングとイオン化 (ESI) を実施する⁶⁾。先述の方法とは異なり、サンプリングとイオン化の間隔がミリ秒オーダーと短く、装置構成が簡略化できる点が特徴である。

Fig. 1 に装置の概要図を示す。市販のプローブに、シリカキャピラリーを介して溶媒が導入される。送液にはナノフローポンプやシリンジポンプを使用する。シリカキャピラリーは高電圧が印加されたステンレス製のユニオンを中継し、溶媒に高電圧 (一般的には 3~5 kV) が印加される。プローブの根本と接触したピエゾアクチュエータを使って、プローブを共振周波数で励振する。プローブ先端部が試料と断続的に接触するように試料位置が調整される。プローブが試料と近接すると、溶媒が試料表面とプローブの間を溶媒が橋渡しした、液架橋 (liquid bridge) が形成される。ここで、試料中の化学成分が溶媒に溶解し、サンプリングが行われる。次に、プローブが試料から離れ、プローブと対向するイオン引き出し管に近接すると、ESI が生じる。溶媒に印加された電圧の極性に対応して正または負のイオンが発生する。発生したイオンは、イオン引き出し管を経由して質量分析装置へと導入され、質量スペクトルが計測される。イオン引き出し管は溶媒への印加電圧と同極性の電圧 (数十 V) が印加されており、溶媒との間に電位差が生じるように設定されている。また、ESI により生じた帯電液滴の脱

溶媒とイオン化の促進のために、管は加熱されている。

イオンの計測は、飛行時間型質量分析装置に外部から接続された時間-デジタル変換器 (time to digital converter, TDC) を使用した。試料は自動ステージ上にマウントされ、プローブに対して二次元方向に走査される。計測位置 (X・Y 方向) と計測位置ごとの質量スペクトル (Z 方向) の三次元データから、任意のイオン種の信号強度を抽出し、二次元平面でマッピングすることで、特定のイオン種の二次元分布を画像化することができる。プローブの振動制御、試料ステージの位置制御、質量スペクトルの計測、およびデータの解析には独自に開発したプログラムを使用した⁶⁾。

t-SPESI では振動する単一のプローブを活用することで、サンプリングとイオン化を時空間的に分離できる点の特徴である。また、清浄な溶媒が常にプローブ先端部に供給され、サンプリングとイオン化を経て溶媒が消費されるため、プローブの先端部分でのコンタミによるキャリーオーバーを抑制しながら連続的なサンプリングとイオン化を行うことができる。

これまでの検討の中で、タッピングモードとコンタクトモードの二つのイオン化モードを見いだした⁷⁾。プローブが振動する場合をタッピングモード、プローブが静止し試料が振動する場合をコンタクトモードと呼ぶ。コンタクトモードではプローブが常時試料と接触していることから、生体組織などの柔らかい試料ではプローブの引きずりなどによる試料構造の変形を生じる可能性がある。一方で、タッピングモードはプローブを振動させることで、プローブと試料の相互作用を小さくすることができ、プローブによる試料の変形を抑制することができる。

3. 生体組織のラベルフリー質量イメージング

次に、生体組織中の t-SPESI によるラベルフリー質量イメージングの結果を紹介する。試料作製は、未固定の凍結組織をクライオミクロトームで 20~30 μm に薄切し、スライドガラス上にマウントした。これを乾燥させ、前処理を行うことなく、大気圧環境下において実験を行った。

3.1 マウス脳組織の質量イメージング⁷⁾

脳組織はイオン化しやすい脂質や脂肪酸が含まれており、生体組織の質量イメージングの標準的試料として用いられている。溶媒には (N,N-ジメチルホルムアミド/エタノール=50/50) を利用し、負イオンモードでの計測を行った。t-SPESI では、目的に応じて溶媒を自由に選択することが可能である。ここで用いた溶媒は、生体組織の構造変化を防ぎながら、成分を抽出・イオン化す

Fig. 2. (color online). Imaging mass spectrometry of a mouse brain section by negative ion mode t-SPESI. (a) Optical image of a brain section. (b) Diagram delineates the major brain anatomical regions. (c) Selected ion images of specific molecules. (d) An overlaid image of 4 images in (c). (e) SPESI mass spectra of six ROI that is shown in (d). The ions derived from the brain sections are shown as the red line in the mass spectrum of area 1. Scale bar: 1 mm.

ることができ、組織の質量イメージングを行った後に、同一の組織に染色を施し、光学顕微鏡で観察することも可能である。Fig. 2 に t-SPESI によるマウス脳切片の質量イメージングの結果を示す。

Fig. 2 (a) は試料の光学顕微鏡像を、Fig. 2 (b) は脳の領域を示す模式図である。脳アトラスを参照することにより、各領域が脳梁 (corpus callosum, CC)、大脳皮質 (cerebral cortex, Cbc)、新線条体 (caudate putamen, CPu)、外側中隔 (lateral septum, LS)、側脳室 (lateral ventricle, LV)、帯状皮質 (cingulate cortex; Cg) と帰属した。Fig. 2 (c) に特徴的な空間分布を示す、四種の成分の質量イメージを示す。脂肪酸や脂質の成分ごとに異なる分布をもつことが明瞭に分かる。これらのオーバーレイ画像 Fig. 2 (d) を Fig. 2 (b) と比較することで、脳の機能的構造に対応する形で成分が分布していることがわかる。Fig. 2 (d) の 1~6 で示されている ROI (Regions of interest) の質量スペクトルを Fig. 2 (e) に示す。質量スペクトルは横軸が分子量をイオンの電荷数で割った質量電荷比 (m/z) を、縦軸がイオンの信号強度を示す。 m/z

Fig. 3. (color online). Imaging mass spectrometry of a mouse pancreas cancer section by positive ion mode t-SPESI. (a) Optical image of the stained tissue section. The cancerous (I), non-cancerous (II) and adhered small intestine (III) regions were determined by pathological analysis. (b) Optical image of the non-stained tissue section that is used for SPESI-MS. (c) Segmentation of tissue section in (b). Red, blue and green areas correspond to regions (I)-(III), respectively. (d)-(e) Representative SPESI-MS ion images. Scale bar : 500 μ m. (f) Mass spectra of regions (I) and (II). Triangles, circles and diamonds indicate the ions whose signal intensities are strongly distributed inside cancerous region, non-cancerous region and overall area, respectively. Closed patterns and opened patterns indicate the tentatively assigned and not assigned ion peaks, respectively. (Reproduced from Ref. 9)

が100~1000の領域において、複数のイオン種のピークが認められ、ROIごとの強度分布に違いがあることがわかった。本結果をDESIによる脳組織の質量イメージングの結果と比較すると、 m/z が600~700の範囲においてイオン種の増加が認められた。この理由として、SPESIではDESIよりも微小体積の溶媒を用いることで、質量分析分野で利用されているナノESI⁸⁾と同様の、イオンサプレッション効果(塩などの試料中の夾雑物によりイオン化効率が低下すること)が軽減された可能性があると考えている。

Fig. 4. (color online). Imaging mass spectrometry of a mouse pancreas cancer section by positive ion mode t-SPESI for the visualization of high-molecular-weight components. (a) Mass spectra of the cancerous regions. The deconvoluted parent molecular masses and the number of charges for each ion peak are shown inside. (b) Representative ion peaks of the multiply charged molecules. (c) Ion images of the four multiply charged ion species. Scale bar : 500 μ m. (d) Comparison of signal intensities of four chemical components between the cancerous and the non-cancerous regions with a two-sample t-test. Right and left boxes in each plot correspond to result of the cancerous and the non-cancerous regions, respectively. $P < 0.001$ for all chemical components. O.C.T., optimal cutting temperature compound.

3.2 マウスすい臓がん組織の質量イメージング⁹⁾

生体組織中のがん領域やがん関連物質の検出/可視化技術は、バイオメディカル分野で強く求められている。次に、モデル動物のすい臓がん組織をt-SPESIで質量イメージングを行った結果を示す。試料は、免疫不全マウスにヒト由来すい臓がん細胞(SUIT-2)を移植することで作製した。溶媒には(水/エタノール/ギ酸=50/50/1)を利用し、正イオンモードでの計測を行った。

Fig. 3 (a), (b) に試料の光学顕微鏡観察結果を示す。未処理の組織切片(Fig. 3 (b))は透明であり、染色を施すことで細胞の形態を可視化することができる。病理診断でも用いられているヘマトキシリン・エオジン(HE)染色後の組織切片(a)から、がん部(I)・非がん部(II)が認められた。染色された組織切片と同時に作製された隣接組織切片(Fig. 3 (b))の質量イメージ

ングの結果を Fig. 3 (d), (e) に示す。m/z が 146.175, 203.225 の成分はそれぞれ、ポリアミンの一種であるスぺルミジンとスぺルミンとして推定された。m/z が 100~300 の質量スペクトル (Fig. 3 (f)) の解析から、この二つの成分に加えて、がん部と非がん部に局在した分布を示す化学種が複数計測された (黒色の三角・丸パターンで示されたピーク)。

さらに、がん部の質量スペクトル (m/z800~1500) の解析を行ったところ、一つの分子に複数のプロトンが付加した多価イオン ($[M+nH]^{n+}$) も計測された (Fig. 4 (a))。多価イオンでは、一つのプロトンが付加した一価イオン ($[M+H]^+$) と比べて広い半値幅のプロードなピークを示し、時にはイオン価数の逆数に比例した、微細にスプリットした同位体分布ピークを示す。代表的な四つの多価イオンのスペクトルを Fig. 4 (b) に示す。多価イオンは、同一の分子でも異なる数のプロトンが付与することで異なる質量電荷比のイオンピークを生じる。デコンボリューション法を用いて、複数の多価イオンピークの解析を行ったところ、分子量が 4936.6, 4963.6, 10090.6, 11072.1 Da の四つの成分が算出された。過去の文献やデータベースと参照し、それぞれがタンパク質である、thymosin beta10 (Tβ10), thymosin beta 4 (Tβ4), calyculin (S100-A6), calpactin I light chain (S100-A10) として推定された。なお、Tβ10 と Tβ4 はすい臓がんでの発現が、S100-A6 は今回用いたがん細胞での発現が、そして S100-A10 はヒト大腸がん細胞での発現が報告されている。Fig. 4 (c) の多価イオンの質量イメージは、四つのタンパク質ががん部に局在していることを示している。各成分のピーク強度の計測データを用いて二標本 t 検定を行ったところ、四成分すべての信号強度ががん部と非がん部で有意に異なることがわかり (p 値<0.001, Fig. 4 (d)), t-SPESI が半定量的評価にも利用できることがわかった。以上、t-SPESI で、がん部に多く発現したタンパク質を多価イオンとしてイオン化し、その二次元分布を可視化することに成功した。なお、大気圧イオン化法を用いた生体組織中のタンパク質の検出は、DESI では困難であり¹⁰⁾、LESA や nano-DESI では報告例がある^{11, 12)}。

4. ま と め

本稿では、タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法 (t-SPESI) の開発と、生体組織のラベルフリー質量イメージングに関する研究結果を紹介した。t-SPESI は、振動するキャピラリプローブを通じて帯電した溶媒を試料に付与することで、試料成分の

サンプリングとイオン化を大気圧環境下で実施することができる。モデル動物のがん組織の質量イメージングの結果、低分子成分から分子量が 1 万を超えるタンパク質までの幅広い成分を検出することに成功し、バイオメディカル分野におけるバイオマーカーの検出や探索への応用の可能性を示す結果を得た。

t-SPESI による質量イメージングは、生体組織以外の材料分析にも応用することも可能であり、これまでに高分子材料の化学成分の可視化に適用された例が報告されている¹³⁾。今後は、プローブ先端部における、微小領域の固液界面場の化学種を捉えることができる特徴を活かして、触媒反応などの固液界面における動的な化学反応の計測技術への展開も考えている。

謝 辞

本研究成果は筆者がキヤノン株式会社に在籍時の公表成果を引用し、まとめたものである。当時の共同研究者である、橋本浩行博士、教學正文博士、佐藤秀哉博士、内藤順平博士 (以上、キヤノン株式会社)、弊小百合氏、荒川隆一教授 (以上、関西大学) に感謝致します。

文 献

- 1) J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong and C.M. Whitehouse : Science **246**, 64 (1989).
- 2) Z. Takats, J.M. Wiseman, B. Gologan and R.G. Cooks : Science **306**, 471 (2004).
- 3) T. Wachs and J. Henion : Anal. Chem. **73**, 632 (2001).
- 4) V. Kertesz and G.J. Van Berkel : J. Mass Spectrom. **45**, 252 (2010).
- 5) P.J. Roach, J. Laskin and A. Laskin : Analyst **135**, 2233 (2010).
- 6) Y. Otsuka, J. Naito, S. Satoh, M. Kyogaku, H. Hashimoto and R. Arakawa : Analyst **139**, 2336 (2014).
- 7) Y. Otsuka, S. Shide, J. Naito, M. Kyogaku, H. Hashimoto and R. Arakawa : Rapid Commun. Mass Spectrom. **26**, 2725 (2012).
- 8) A. Schmidt, M. Keras and T. Dulcks : J. Am. Soc. Mass Spectrom. **14**, 492 (2003).
- 9) Y. Otsuka, S. Satoh, J. Naito, M. Kyogaku and H. Hashimoto : J. Mass Spectrom. **50**, 1157 (2015).
- 10) L.S. Eberlin, X. Liu, C.R. Ferreira, S. Santagata, N.Y. R. Agar and R.G. Cooks : Anal. Chem. **83**, 8366 (2010).
- 11) C.C. Hsu, N.M. White, N. Hayashi, E.C. Lin, T. Poon, I. Banerjee, J. Chen, S.L. Pfaff, E.R. Macagno and P.C. Dorrestein : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **110**, 14855 (2013).
- 12) J. Sarsby, N.J. Martin, P.F. Lalor, J. Bunch and H.J. Cooper : J. Am. Soc. Mass Spectrom. **25**, 1953 (2014).
- 13) R. Shimazu, Y. Yamoto, T. Koaka, H. Kawasaki and R. Arakawa : Mass Spectrom. (Tokyo) **3**, S0050 (2014).