Letter to the Editor

The 54th ASMS Conference レポート**QIT-TOF 型質量分析計を利用した顕微質量分析装置の開発**

出水秀明

Hideaki IZUMI

株式会社島津製作所 Shimadzu Corporation, Seika, Soraku-gun, KYOTO, JAPAN

編集長殿

我々は The 54th ASMS Conference において下記の演題を発表しました。

Development of Mass Microscope with QIT-TOF (WP323)Takahiro HARADA,¹ Hideaki IZUMI,¹ Sadao TAKEUCHI,¹ Kiyoshi OGAWA,¹ Yoshikazu YOSHIDA,¹Shuichi SHIMMA,² Mitsutoshi SETOU,² Yuki SUGIURA,³ Machiko SUGIYAMA,⁴ and Yutaka HOSHIKAWA⁴¹ Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan, ² The Graduate University for Advanced Studies, Okazaki, Japan,³ Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan, and ⁴ Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan**1. はじめに**

近年の医療技術の発達にもかかわらず、いまなお原因不明のさまざまな疾患に苦しむ人々は後を絶たない。このような疾患の原因の解明や治療のターゲットの同定を行うためには、生体高分子の機能や相互作用の解明を行うことが重要である。そのためには病理組織中のタンパク質や代謝物などの分子を同定し、その分布を知ることが有用である。

タンパク質などの大きな分子を壊さずイオン化できるマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) による質量分析 (mass spectrometry; MS) は、生体内分子の同定を行ううえで優れた手法であるが、通常生体内分子を測定するためには組織をすり潰して試験管内で抽出するなどの処理が必要であり、生体試料の分離・精製過程で構成分子の位置情報は失われてしまう。一方、顕微鏡により生体組織や細胞を観察すると、異常組織などではその形態変化や構造変化が如実に観察される。しかし、形態変化の観察だけでは、その変化がいったい何なのか、どのような成分で構成されているか、といったことを知ることはできない。我々はこれらの手法の橋渡しを行うためのツールとして、“顕微質量分析装置”の開発を行っている。本装置は、試料の顕微鏡観察直後にその場で、微小領域に含まれる分子の高精度の同定を行えることを特色とする。この装置により光学顕微鏡で形態学的に発見された病変部に対し、高い空間分解能で MALDI-MS イメージングを行い生体分子の分布を視覚化したり、新たに発見された未知の物質を多段階タンデム質量分析 (MSⁿ) により同定ができるようになり、生理学と形態学をつなぐ新しい手法として期待できる。

ここでは、製作した装置の概要と生体組織の分析結果例を報告する。

2. 顕微質量分析装置試作機の概要

今回、顕微質量分析の原理検証を行うために、以下のハードウェア構成・仕様をもつ試作機を開発した (Fig. 1)。

試作機は LCMS-IT-TOF ((株)島津製作所製) をベースに製作した。レーザー照準部は試料を 1 μm 程度の高い分解能で観察可能な対物 20 倍の光学顕微鏡、位置決め精度 1 μm の 3 軸自動精密ステージ、波長 355 nm・最大繰返し周波数 5 kHz の UV レーザー装置 (3 倍波 Nd:YAG レーザー) およびその微小集光システムから構成され、試料を高倍率で観察した後に、着目した微小領域にレーザー光を位置精度良く照射してイオン化することができる。イオン化補助のため試料には最大 ± 5 kV の電圧を加えることができる。またステージを走査することで高空間分解能での MS イメージングも行える。試料は最大 24 mm $\times$ 24 mm の領域でイメージング分析が可能である。また、試料室気圧を 1 Pa から大気圧の間で任意に制御するための気密試料チャンバーを装備する。分析部は四重極イオントラップ (quadrupole ion trap; QIT) と飛行時間 (time-of-flight; TOF) 型質量分析計を直列に配置した構成である。QIT による確実な解離と TOF 型分析部による優

(c) 装置の主な仕様

項目	仕様
試料保持部	試料室気圧
	1 Pa～大気圧, ガス置換
	印加電圧
試料移動機構	0～±5 kV
	試料プレート寸法
	76×26 mm
顕微鏡	照準精度
	<10 μm
	分析面積
レーザー	24×24 mm
	倍率
	対物20倍相当(可変)
分析	観察方法
	明視野観察、蛍光観察
	波長
検出器	355 nm
	繰返し周波数
	～5 kHz
質量範囲	感度
	1 fmol
質量範囲	m/z 50～10,000

Fig. 1. ハードウェアの構成と仕様

れた質量分解能を組み合わせることにより, MS^n による精度の高い物質同定を実現する。

またこの装置を統合制御する計測制御ソフトウェアについても開発した。光学顕微鏡観察画像の表示と分析位置の設定, イオン輸送部・イオントラップ・質量分析部の動作条件の設定, スペクトルや MS イメージング結果のレビューなどを行うことができる。

3. 実験・評価

製作した試作機を用いて基本性能および生体実試料での評価を行った。

感度評価は Angiotensin II 標準試料に α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) マトリックスを用いて行い, スポット内 1 fmol の試料の検出が可能であることを確認した。またナイフエッジ法によりレーザー集光径を評価したところ, 半値幅で $32\mu\text{m} \times 27\mu\text{m}$ の強度分布が得られた。空間分解能の評価のため, レーザー脱離イオン化法によって金属試料の分析を行った。イオン化スレッシュホールド付近までレーザーの強度を下げ, ステンレス製のスリットをピッチ $10\mu\text{m}$ で走査し, 特に強く得られた $m/z \sim 126$ の金属クラスターイオンについての MS イメージングを行った結果, 1 ピクセル幅のシャープな境界が観察された。この結果からこの分析での空間分解能は $10\mu\text{m}$ 以下であると考えられる。

生体組織の MALDI MS イメージングによる評価例として, ヒトの大腸癌が転移した肝組織試料に CHCA マトリックスをスプレッドドロップレット法¹⁾で塗布し, 大気圧下で MALDI MS を行った。良好な質量スペクトルが得られ, 癌部と正常部でそれぞれ固有のピークが得られた。また, それらの分布を示す MS イメージングを行い, 正常部固有の物質が局在している様子を可視化できた。

4. ま と め

我々は高い空間分解能をもつ MALDI 装置と QIT-TOF 型質量分析装置を組み合わせた顕微質量分析装置を開発した。この装置は高精度の MS および MS^n による生体分子の同定が可能である。

また生体内の典型的な細胞 1 個の分析が可能な大きさにレーザーを集光させることができている。さらに, ヒトの肝組織の MALDI MS イメージング結果から, 我々の装置により生体組織からの直接質量分析イメージングが可能であることが確認できた。今後集光性能をさらに向上させる予定である。

なお, 本研究は独立行政法人科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業の支援を受けて実施している。

5. 質疑応答・その他

イメージング MS は分野的に関心が高いこともあって特に人が集まっており, 我々のポスターの前にも多くの方が立ち止まり, 一時間半の発表時間のうち 15 名ほどの方から質問を受け, 60 名ほどの方からの資料請求があった。質問の内容は多岐にわたり, 技術的にはレーザーの集光径やイメージングの空間分解能, 分析可能なマスレンジ, イメージング測定速度, MS/MS , 光学顕微鏡の必要性, サンプル調製法などについて尋ねられた。また提案, 激励などもいただいて開発の励みとなり, 非常に有意義な経験であった。

文 献

- 1) Y. Sugiura, S. Shimma, T. Harada, and M. Setou, 54th ASMS Conference Poster ThP25 (2006).