特集：イメージング

MALDI イメージング質量分析は「結晶」が命！

Importance of Matrix Crystal Morphology in Imaging Mass Spectrometry

新聞秀一

Shuichi SHIMMA

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻

1. はじめに

マトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization) を用いたイメージング質量分析 (IMS: imaging mass spectrometry) を始めようと思う方が、最初に頭を悩ませることの一つは装置のオペレーションもさることながら MALDI-IMS 用試料調製であると思われる。もちろんスペクトル解釈を含むデータ解析も困難な点の一つであることは言うまでもないが、そこに到達するまでには安定したデータ取得ができるようにならないといけない。

「試料前処理なしで IMS できたらいいのに」、「試料前処理をロボットがやってくれたらいいのに」と心から願う方も多いと思う。実際、本特集号の著者である木原さん（資生堂）が扱っている脱離エレクトロスプレーイオン化 (DESI: desorption electro-spray ionization) を用いた前処理フリーのイオン源や、田中さん（塩野義製薬）が扱っている ImagePrep（Bruker Daltonics 社）のようなマトリックス自動噴霧装置も現在は入手可能にはなっている。しかし、これらがどこのラボで誰がやってもオールマイティに機能するというわけではなく、やはりノウハウが必要である現実に変わりはないと筆者は感じている。

2. マトリックス供給での知られざるトラブル

これまで蓄積されたノウハウから、由来組織や測定対象物質に最適な試料前処理法を予測するツールが近い将来生まれるかもしれないが、本稿では現在のノウハウについて紹介したいと思う。その前に、既存手法での問題点を明らかにしておきたい。

MALDI-IMS で必要となるマトリックスを供給するための既存手法は、溶液となったマトリックスを直接組織表面に噴霧することが一般的である。しかし、この方法を試みた経験がある人はマトリックス結晶が組織表面でなかなか形成されないという経験をしたことがあるかもしれない。もしくは、試料組織に亀裂が入ってしまい、さらに亀裂に

沿って組織が収縮しガラス表面がむき出しになることを経験したことがあるかもしれない。このような試料を測定すると、ガラス部分からのみシグナルが検出され、一体何のイメージングを行っているのかわからないという結末が待っている。

以下で紹介するのは、このトラブルを回避するためのマトリックス供給法のノウハウである。この方法自体は、いろいろな測定対象に応用でき、いろいろな人が使えるようになる技術であると思っている。ただし、技術習得のために指導を受けるほうが効果的であることは事実である。実際、筆者のラボメンバーは IMS を行うときには必ずマトリックス供給法のトレーニングを受けることになる。

3. マトリックス供給法の工夫

以上のような多くの人が一度は経験するが、決して論文には記述されないトラブルを解消する手法が、本稿で紹介する「二段階マトリックス供給手法（以下、二段階法）」である^{1)~3)}。図1は二段階法の概要と得られる効果についてまとめられているが、まずは方法論について解説したい。

二段階法では、マトリックス粉末の蒸着とマトリックス溶液の噴霧を組み合わせている。一段階目で、マトリックスの真空蒸着を行う。この工程は、試料組織表面に結晶成長のための微小な結晶核を供給することに相当する。真空蒸着でマトリックスにかかる温度は、用いるマトリックスの融点に設定すればよい。したがって、 α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸 (α -CHCA) の場合は 250°C となる。

二段階目では組織表面を蒸着後、大気中に取り出し一段階目と同じマトリックスの溶液を噴霧する。筆者は通常エアブラシを用いて噴霧している。原理的には、蒸着と噴霧を組み合わせればいいため、マトリックス自動噴霧装置も使うことが可能である。噴霧を行うとすでに組織表面に供給されている結晶核により、一瞬にして組織表面にマトリックス結晶が成長する。

図1に示すように噴霧により得られる結晶は、非常に微細で密になるため組織保護膜の効果も得られる。すなわち二段階法では組織の収縮は、既存法と比較してほとんど観

図1. 二段階マトリックス法概要と得られる効果について。

察されないという特徴がある。また、二段階法ではIMSでしばしば問題になる分子の移動（われわれはモレキュラーマイグレーション“molecular migration”と呼んでいる）が非常に少ないことも確認している。この理由については、筆者自身で詳細に原因を調べたいと考えている。以下では二段階法における他の顕著な効果として、ピーク強度の増大と高解像度IMSへの貢献について触れておきたい。

4. 微細結晶によるピーク強度の増大

MALDIを普段扱っている研究者からすれば、マトリックス結晶の大きさは得られるマスペクトルのシグナルノイズ比（S/N）に大きく影響することは周知の事実である。既存のMALDIで微細なマトリックス結晶を得る方法の一つとして、金属プレート上にアセトンなどを溶媒とした α -CHCAの薄膜を作り、その膜上にマトリックスとサンプルの混合物をスポットするThin layer法がよく知られている⁴⁾。

二段階法はこの原理を組織表面上で実現した手法であるといえる。すでに述べたとおり、あらかじめ供給された微細なマトリックス結晶核の存在により、スプレー噴霧後に得られる結晶は図1に示すとおり非常に微細である。得られる結晶が微細であることで、組織上のマトリックス表面積が増大しレーザー照射による脱離の効率が向上すると考えられる。これが通常の方法に比べてピーク強度が増大する要因と考えられる。図1には、オラパリブと呼ばれる薬物を投与したマウス肝臓上で得たプロダクトイオンスペクトルを示しており、既存法と比較しプロダクトイオン強度が10倍以上向上している。このような組織上でのイオン

強度の増大とS/Nの改善により高いコントラストをもつ鮮明なイオン分布像を得ることができるようになる。

5. 微細結晶による高解像度IMS

本特集号で平さん（福井県立大学）が述べているように、マトリックス結晶の大きさは高解像度IMSを行う際に大きな足かせとなる。これを回避するために無機マトリックスの利用が報告されている。この技術同様、MALDIにおいても微細なマトリックス結晶が得られれば非常に微細な構造まで可視化が可能になる。筆者のグループでは、二段階法を用いたイオン強度増加と同時に、マトリックス結晶の影響なくルーチンで20 μ m以下（最高5 μ m）で低分子化合物のIMSを行えるようになっている。

「MALDIでは高解像度の測定や低分子化合物の測定はマトリックスの影響により難しい」という話をよく聞かすが、二段階法を用いてMS/MSでイメージングを行えばMALDIであっても高感度・高解像度で低分子化合物のIMSが可能である。むしろ「MALDIであるから可能になることも多い」と筆者は感じている。

6. ま と め

現時点では、 α -CHCAとシナピン酸で二段階法の効果を確認している。一方、IMSで頻繁に用いられる他のマトリックスである2,5-ジヒドロキシ安息香酸（2,5-DHB）や9-アミノアクリジン（9-AA）の場合は、蒸着で結晶核を供給したとしても噴霧時に核が溶解してしまうため、二段階法を適用することができていない。しかし、例えば一段階目で α -CHCAの蒸着、二段階目で2,5-DHB噴霧で2,5-DHBの結晶サイズを変えることが可能であることを確認

している (α -CHCA および 9-AA の組み合わせはイオン化サプレッションが起きるため不可)。このように、溶解度が高いマトリックスでは二段階法を直接使うことができないが、蒸着で用いるマトリックスを工夫することでさらに改善するかもしれない。

一方、2,5-DHB や 9-AA では蒸着後に水蒸気やアルコール蒸気中に静置することで再結晶化を促しピーク強度を改善する手法も報告されている⁵⁾。このように測定対象および用いるマトリックスに応じてさまざまな前処理方法を試

みることで、「みたいものがみえる」技術にまた一歩近づくと思う。

文 献

- 1) S. Shimma, *Mass Spectrom. Lett.*, **6**, 21 (2015).
- 2) S. Shimma and Y. Sugiura, *Mass Spectrom.*, **3**, S0029 (2014).
- 3) S. Shimma *et al.*, *J. Mass Spectrom.*, **48**, 1285 (2013).
- 4) D. Fenyo *et al.*, *J. Vis. Exp.*, **3**, 192 (2007).
- 5) W. Bouschen *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 355 (2010).