REVIEW

質量顕微鏡法の開発とその応用

Development and Application of Imaging Mass Spectrometry

瀬藤光利^{1,2}

Mitsutoshi SETOU

¹ 国際マスイメージングセンター *International Mass Imaging Center*² 浜松医科大学細胞分子解剖学講座 *Department of Molecular & Cellular Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, JAPAN*

For the Incentive Award of the Mass Spectrometry Society of Japan Incentive Award, this review will over view the works of mass spectrometry from Setou lab. Mainly, papers 2002–2010 are about development of imaging mass spectrometry. Papers 2010–2015 are mainly the application of imaging mass spectrometry for clinical samples. Recently, several papers are about the applications of secondary ion mass spectrometry. Most significant findings are that various lipid species have their own tissue distribution pattern in tissues and cells through these studies.

DOI:10.5702/massspec.16-75

(Received February 10, 2016; Accepted July 6, 2016)

このたびは質量分析学会の奨励賞をいただきたいへん光栄なことである。私に何か賞に値するものがあるとすればそれは企業、先輩方、学生といったたくさんの方々を中心とした皆さまとの共同研究の成果でありこの場を借りて改めて御礼を申し上げる。東大時代に本郷に初めて導入されたマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 質量分析装置の選定を担当するなど質量分析に従事したが、質量分析学会に本格的にかかわるようになったのは2002年に独立して以来である。はや13年その間150本ほどの関連する原著論文を発表させていただいた。総説をということもあり、ここではその中で質量分析に関連が特に深いものについて簡単ではあるが紹介説明させていただければと思う。

特にこれまで執筆したMALDI-IMS解析に関する原著論文について、表1は対象分子種ごとに、表2は質量電荷比 (m/z) ごとに、表3はヒト検体における症例ごとに、それぞれまとめた。同じ物質においても m/z 値の相違が存在する理由は、検出された際の付加体の違いや質量分析装置の精度の違いである。今でこそタンデム分析 (MS/MS) によるプロダクトイオンにおける m/z 値を比較したり精密質量分析装置による推定がIMSにおいても可能となってきたが、ほんの10年前にはそれは夢物語で、精度の低いプ

リカーサーイオンから推定するのが世界的にも精一杯であった。そのため古い原著論文については現代の目から見ると推定に正確さに欠ける部分もあるが、このような背景を踏まえてご容赦のうえこれらの表で示した生体内物質の m/z 値を参照していただければ幸いである。

全体を改めて見直すと、2005年頃にプロテオーム解析、その頃からMALDIによるイメージング質量分析 (MALDI-IMS) への応用、2010年頃からMALDI-IMSの臨床検体への応用、そして最近は二次イオン質量分析 (TOF-SIMS)、が中心になっている。またそれで何が新しくわかったのかということを一言で申し上げると、医学生物学的には「脂質分子種が組織内細胞内でそれぞれ独特の分布をもっていることを世界で初めて明らかにしてきた」ということであろう。以下、年を追って見ていく。

1. 2006年度

2006年度はMALDI-IMSの研究に関する論文が出た最初の年である。MALDI-IMSに際して組織切片における厚さが及ぼす影響を調べた研究では、2~40 μm における検出感度を比較することにより、10 μm 以下での切片のときに高感度を示し、特にタンパク質などの高分子物質の検出にはより薄い切片で有効であることがわかった¹⁾。組織切片上のプロテオーム解析を行うための新規方法を開発した研究では、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンへの組織切片の転写、メンブレンの酵素消化、ケミカルプリンタによるマトリックス塗布を行い、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)、ヒストンH2A、チューブリンb4などのタンパク質を検出することができた²⁾。MALDI-IMSにおけ

Correspondence to: Mitsutoshi SETOU, Department of Molecular & Cellular Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, JAPAN, e-mail: setou@hama-med.ac.jp
瀬藤光利, 浜松医科大学細胞分子解剖学講座, 〒431-3192 静岡県浜松市東区半田山1-20-1
本研究は2012年度日本質量分析学会奨励賞を受賞した。

表1. 生体内分子を対象とした MALDI-IMS 解析

対象分子	m/z	結果	生物種	組織, モデル	文献
低分子代謝物質					
GABA	104.1	種子	植物	ナス果実での局在	36
アセチルコリン	146	海馬	ラット	中枢神経系での局在	19
ジヒドロウラシル	153	↓	ヒト	毛髪 (若年および老化)	73
O-EAP	164	↑	ヒト	毛髪 (若年および老化)	73
モノテルペン	191.1	脂肪滴	植物	ショウガでの局在	13
アセチルカルニチン	204	遅筋	マウス	骨格筋での局在	22
3,4-DEM	207	↓	ヒト	毛髪 (若年および老化)	73
L-グルタチオン	306.7	間質	マウス	精細管での局在	41
6-ギンゲロール	333.1	脂肪滴	植物	ショウガでの局在	13
AMP	346	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
ADP	426	↓	マウス	カイニン酸投与モデル	16
ADP	426	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
α-トコフェノール	431.4	胚芽	植物	米での局在	90
ATP	506	↓	マウス	カイニン酸投与モデル	16
ATP	506	↓	マウス	パーキンソン病モデル	21
ATP	506	↓	マウス	横紋筋収縮モデル	43
γ-オリザノール	601.9	ふすま	植物	米での局在	90
UDP-HexNAc	606	↑	マウス	転移がんモデル	17
UDP-HexNAc	606	間質	マウス	精細管での局在	41
酸化型グルタチオン	611.1	↓	マウス	転移がんモデル	17
ヘム B	616	↑	ヒト	転移肝臓がん組織	15
ヘム B	616	↓	ヒト	腹部大動脈瘤	20
多糖類					
アミロペクチン	527	同定*	ヒト	腸閉塞未消化物の解析	18
ペプチド					
FMRF	1022.5	脳	エビ	全身組織内の局在	93
TRP	862.4	眼神経節	エビ	全身組織内の局在	93
リン脂質					
LPC (16:0)	496	↑	ヒト	下肢静脈瘤	67
LPC (16:0)	496	↑	ヒト	動静脈瘤	69
LPC (16:0)	496	↑	ヒト	下肢静脈瘤	72
LPC (16:0)	496.3	腸	マウス	胚での局在	30
LPC (16:0)	496.3	↑	ラット	局所脳虚血モデル	33
LPC (16:0)	496.3	↑	ヒト	歯周病患者の歯組織	79
LPC (16:0)	496.3	↓	ヒト	胃がん	83
PC (14:0/p16:0)	688	内層	マウス	精細管での局在	41
PC (16:0/16:1)	754.4	コルチ器	モルモット	蝸牛での局在	34
PC (16:0/16:0)	756.7	↓**	ラット	脳浮腫治療モデル	37
PC (16:0/16:1)	770.5	↓	ヒト	口腔扁平上皮がん	78
PC (16:0/16:1)	770.5	↑	ヒト	直腸結腸がん	80
PC (16:0/16:0)	772.5	↑	ヒト	ワルチン腫瘍	81
PC (16:0/16:0)	772.5	肺胞上皮	ヒト	正常肺での局在	77
PC (34:2)	780	↑	マウス	NASH モデル	27
PC (36:4)	782	↑	ヒト	下肢静脈瘤	67
PC (16:0/22:6)	782	↑	マウス	INAD モデル	39
PC (16:0/20:4)	782.5	↓	ヒト	多発性骨髄腫	85
PC (16:0/18:1)	782.5	蝸牛神経	モルモット	蝸牛での局在	34
PC (O-16:0/22:6)	792.7	↑	マウス	IgA 腎症モデル	40
PC (16:0/18:2)	795.6	↑	マウス	骨格筋運動モデル	48
PC (16:0/18:2)	796	細胞側	ラット	神経細胞軸索での局在	42
PC (16:0/18:2)	796.5	上皮層	マウス	舌での局在	35
PC (16:0/18:2)	796.5	↑	ヒト	甲状腺乳頭がん	74
PC (34:2)	796.5	↑	マウス	部分肝切除モデル	36
PC (16:0/18:1)	798.5	内顆粒層	マウス	網膜での局在	25
PC (16:0/18:1)	798.5	↓	ラット	局所脳虚血モデル	33
PC (16:0/18:1)	798.5	↑**	マウス	SCI への治療モデル	49
PC (16:0/18:1)	798.5	↑	ヒト	胃がん	83
PC (16:0/16:1)	798.5	↑	ヒト	肝細胞がん	46
PC (16:0/18:1)	798.5	脳	マウス	胚での局在	30
PC (16:0/18:1)	798.5	↓	ラット	C6 グリオーマモデル	31
PC (16:0/18:1)	798.5	↑	ヒト	甲状腺乳頭がん	74
PC (36:5)	802.5	↑	マウス	部分肝切除モデル	36
(次項に続く)					

表1. 生体内分子を対象とした MALDI-IMS 解析 (続き)

対象分子	m/z	結果	生物種	組織, モデル	文献
PC (16:0/20:4)	804	↑	ヒト	下肢静脈瘤	72
PC (16:0/20:4)	804	↑	ヒト	動静脈瘻	69
PC (16:0/20:4)	804.5	↑	マウス	動脈硬化症モデル	38
PC (16:0/20:4)	804.7	末端絨毛	ヒト	胎盤での局在	32
PC (18:1/20:4)	808	外層	マウス	精細管での局在	41
PC (16:0/20:4)	820.5	↑	ヒト	統合失調症	70
PC (18:0/18:1)	826.5	白質	マウス	脳での局在	28
PC (36:1)	826.5	↑	ヒト	乳がん	76
PC (O-18:1/22:6)	840.6	↑	マウス	IgA 腎症モデル	40
PC (16:0/22:6)	844.5	↓	マウス	ALS モデル	50
PC (16:0/22:6)	844.5	↑	マウス	SCI モデル	44
PC (16:0/22:6)	844.5	↑**	マウス	SCI への治療モデル	49
PC (18:1/20:4)	846.5	海馬	マウス	脳での局在	28
PC (18:1/20:4)	846.5	↑	ヒト	口腔扁平上皮がん	78
PC (18:0/20:4)	848	先端側	ラット	神経細胞軸索での局在	42
PC (38:4)	848	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
PC (18:0/20:4)	848.5	可視化	マウス	脳での局在	28
PC (18:0/22:6)	856.4	外節	マウス	網膜での局在	25
PC (18:0/22:6)	856.5	↑	マウス	骨格筋運動モデル	48
PC (18:1/22:6)	870.6	↓	マウス	ALS モデル	50
PC (18:0/22:6)	872	↓	ヒト	AD	84
PC (18:0/22:6)	872.6	小脳	マウス	脳での局在	28
PC (18:0/22:6)	872.6	↓	マウス	ALS モデル	50
PC (18:0/22:6)	872.6	↑	マウス	SCI モデル	44
PE (16:0/20:4)	806	↑	マウス	INAD モデル	39
PI (18:0/20:4)	885	間質	マウス	精細管での局在	41
PS (22:2/20:4)	862.3	顆粒層	ラット	海馬歯状回での局在	26
SM (d18:1/16:0)	725	↑	ヒト	肝臓がん組織	23
SM (d18:1/16:0)	725.6	幹絨毛	ヒト	胎盤での局在	32
SM (d18:1/16:0)	726	↑	ヒト	下肢静脈瘤	67
SM (d18:1/16:0)	741.4	↑	ラット	C6 グリオーマモデル	31
SM (d18:1/16:0)	741.5	上皮層	マウス	舌での局在	35
SM (d18:0/16:1)	741.5	↑(間質)	ヒト	甲状腺乳頭がん	74
SM (d18:1/20:0)	797.6	↑	ヒト	統合失調症	70
中性脂質					
DAG (18:1/20:0)	685	↓	マウス	横紋筋収縮モデル	43
TAG (52:3)	879	↓	ラット	脳虚血治療モデル	47
TAG (52:3)	879	↑	ヒト	腹部大動脈瘤	86
TAG	879.7	↑	ヒト	糖尿病患者の心筋	82
TAG (52:2)	881	↓**	ラット	脳虚血治療モデル	47
TAG (52:2)	881	↑	ヒト	下肢静脈瘤	72
TAG (52:2)	881	↑	ヒト	腹部大動脈瘤	86
TAG (16:0/18:2/18:1)	895.7	↑	ヒト	Dorfman-Chanarin 症候群	75
TAG (18:0/18:1/18:2)	907.7	↑	マウス	動脈硬化症モデル	38
TAG (16:0/20:3/18:1)	921.7	肝臓	マウス	胚での局在	30
糖脂質					
ST (d18:1/16:0)	778	内-中層	マウス	精細管での局在	41
ST (d18:1/18:0)	806.5	↑	マウス	GAD モデル	45
ST (d18:1/18:0 (OH))	822.5	↑	マウス	GAD モデル	45
ST (d18:1/24:1)	888	白質	ヒト	AD 患者脳での局在	71
ST (d18:1/h24:1)	904	白質	ヒト	AD 患者脳での局在	71
ST (d18:1/20:4)	906.3	分子層	ラット	海馬歯状回での局在	26
Gb3 C18:0	782.5	↑	ヒト	ファブリー病 (心筋)	68
Gb3 C20:0	1074	↑	ヒト	ファブリー病 (心筋)	68
GD1 (18:0/d18:1)	1874	前脳	マウス	中枢神経系での局在	24
GD1 (18:0/d20:1)	1902	嗅皮質	マウス	中枢神経系での局在	24
AcylCer (d18:1/34:0)	1048	↓	ヒト	Dorfman-Chanarin 症候群	75
セミノリピド (14:0/16:0)	767	精母細胞	マウス	精巣での局在	29
セミノリピド (16:0/16:1)	793	内層	マウス	精細管での局在	41
セミノリピド (17:0/16:0)	809	精子細胞	マウス	精巣での局在	29
セミノリピド (17:0/18:0)	837	管腔	マウス	精細管での局在	41
ステロール					
CE (18:1)	637.6	↑	マウス	動脈硬化症モデル	38
(次項に続く)					

表1. 生体内分子を対象としたMALDI-IMS解析 (続き)

対象分子	m/z	結果	生物種	組織, モデル	文献
CE 脂肪酸	673.6	↑	ヒト	糖尿病患者の心筋	82
PA	255	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
ALA	277.4	↑	マウス	亜麻仁油投与モデル	51
SA	283	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
EPA	301.4	↑	マウス	亜麻仁油投与モデル	51

GABA: γ -アミノ酪酸, EAP: ホスフォエタノールアミン, DEM: ジヒドロマロン酸, AMP: アデノシン-1-リン酸, ADP: アデノシン-2-リン酸, ATP: アデノシン-3-リン酸, UDP-HexNAc: ウリジン-2-リン酸-N-アセチルヘキソサミン, FMRP: FMRFアミド, TRP: タキキニン関連ペプチド, LPC: リゾホスファチジルコリン, PC: ホスファチジルコリン, PE: ホスファチジルエタノールアミン, PI: ホスファチジルイノシトール, PS: ホスファチジルセリン, SM: スフィンゴミエリン, DAG: ジアシルグリセロール, TAG: トリアシルグリセロール, ST: スルファチド, Gb3: グロボトリオシルセラミド, GD1: ガンクリオシド GD1, AcylCer: アシルセラミド, CE (コレステロールエステル), PA: パルミチン酸, ALA: α -リノレン酸, SA: ステアリン酸, EPA: エイコタペンタエン酸, NASH: 非アルコール性脂肪性肝炎, INAD: 乳児型神経軸索ジストロフィー, SCI: 脊髄損傷, ALS: 筋萎縮性側索硬化症, GAD: Gracile axonal dystrophy, AD: アルツハイマー病

* 検出されたフラグメントの一つ.

** 病態モデルに対して治療処置を行った後の動態変化.

表2. MALDI-IMS解析で検出された分子の質量電荷比

m/z	対象分子	結果	生物種	組織, モデル	文献
104.1	GABA	種子	植物	ナス果実での局在	89
146	アセチルコリン	海馬	ラット	中枢神経系での局在	19
153	ジヒドロウラシル	↓	ヒト	毛髪 (若年および老化)	73
164	O-EAP	↑	ヒト	毛髪 (若年および老化)	73
191.1	モノテルペン	脂肪滴	植物	ショウガでの局在	13
204	アセチルカルニチン	遅筋	マウス	骨格筋での局在	22
207	3,4-DEM	↓	ヒト	毛髪 (若年および老化)	73
255	PA	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
277.4	ALA	↑	マウス	亜麻仁油投与モデル	51
283	SA	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
301.4	EPA	↑	マウス	亜麻仁油投与モデル	51
306.7	L-グルタチオン	間質	マウス	精細管での局在	41
333.1	6-ギンゲロール	脂肪滴	植物	ショウガでの局在	13
346	AMP	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
426	ADP	↓	マウス	カイニン酸投与モデル	16
426	ADP	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
431.4	α -トコフェノール	胚芽	植物	米での局在	90
496	LPC (16:0)	↑	ヒト	下肢静脈瘤	67
496	LPC (16:0)	↑	ヒト	動静脈瘤	69
496	LPC (16:0)	↑	ヒト	下肢静脈瘤	72
496.3	LPC (16:0)	腸	マウス	胚での局在	30
496.3	LPC (16:0)	↑	ラット	局所脳虚血モデル	33
496.3	LPC (16:0)	↑	ヒト	歯周病患者的歯組織	79
496.3	LPC (16:0)	↓	ヒト	胃がん	83
506	ATP	↓	マウス	カイニン酸投与モデル	16
506	ATP	↓	マウス	パーキンソン病モデル	21
506	ATP	↓	マウス	横紋筋収縮モデル	43
527	アミロペクチン	同定*	ヒト	腸閉塞未消化物の解析	18
601.9	γ -オリザノール	ふすま	植物	米での局在	90
606	UDP-HexNAc	↑	マウス	転移がんモデル	17
606	UDP-HexNAc	間質	マウス	精細管での局在	41
611.1	酸化型グルタチオン	↓	マウス	転移がんモデル	17
616	ヘム B	↑	ヒト	転移肝臓がん組織	15
616	ヘム B	↓	ヒト	腹部大動脈瘤	20
637.6	CE (18:1)	↑	マウス	動脈硬化症モデル	38
673.6	CE	↑	ヒト	糖尿病患者の心筋	82
685	DAG (18:1/20:0)	↓	マウス	横紋筋収縮モデル	43
688	PC (14:0/p16:0)	内層	マウス	精細管での局在	41
725	SM (d18:1/16:0)	↑	ヒト	肝臓がん組織	23
725.6	SM (d18:1/16:0)	幹絨毛	ヒト	胎盤での局在	32
726	SM (d18:1/16:0)	↑	ヒト	下肢静脈瘤	67
741.4	SM (d18:1/16:0)	↑	ラット	C6 グリオーマモデル	31
741.5	SM (d18:1/16:0)	上皮層	マウス	舌での局在	35

(次項に続く)

表2. MALDI-IMS解析で検出された分子の質量電荷比(続き)

m/z	対象分子	結果	生物種	組織, モデル	文献
741.5	SM (d18:0/16:1)	↑(間質)	ヒト	甲状腺乳頭がん	74
754.4	PC (16:0/16:1)	コルチ器	モルモット	蝸牛での局在	34
756.7	PC (16:0/16:0)	↓**	ラット	脳浮腫治療モデル	37
767	セミノリピド (14:0/16:0)	精母細胞	マウス	精巣での局在	29
770.5	PC (16:0/16:1)	↓	ヒト	口腔扁平上皮がん	78
770.5	PC (16:0/16:1)	↑	ヒト	直腸結腸がん	80
772.5	PC (16:0/16:0)	↑	ヒト	ワルチン腫瘍	81
772.5	PC (16:0/16:0)	肺胞上皮	ヒト	正常肺での局在	77
778	ST (d18:1/16:0)	内-中層	マウス	精細管での局在	41
780	PC (34:2)	↑	マウス	NASH モデル	27
782	PC (36:4)	↑	ヒト	下肢静脈瘤	67
782	PC (16:0/22:6)	↑	マウス	INAD モデル	39
782.5	PC (16:0/20:4)	↓	ヒト	多発性骨髄腫	85
782.5	PC (16:0/18:1)	蝸牛神経	モルモット	蝸牛での局在	34
782.5	Gb3 C18:0	↑	ヒト	ファブリー病 (心筋)	68
792.7	PC (O-16:0/22:6)	↑	マウス	IgA腎症モデル	40
793	セミノリピド (16:0/16:1)	内層	マウス	精細管での局在	41
795.6	PC (16:0/18:2)	↑	マウス	骨格筋運動モデル	48
796	PC (16:0/18:2)	細胞側	ラット	神経細胞軸索での局在	42
796.5	PC (16:0/18:2)	上皮層	マウス	舌での局在	35
796.5	PC (16:0/18:2)	↑	ヒト	甲状腺乳頭がん	74
796.5	PC (34:2)	↑	マウス	部分肝切除モデル	36
797.6	SM (d18:1/20:0)	↑	ヒト	統合失調症	70
798.5	PC (16:0/18:1)	内顆粒層	マウス	網膜での局在	25
798.5	PC (16:0/18:1)	↓	ラット	局所脳虚血モデル	33
798.5	PC (16:0/18:1)	↑**	マウス	SCIへの治療モデル	49
798.5	PC (16:0/18:1)	↑	ヒト	胃がん	83
798.5	PC (16:0/16:1)	↑	ヒト	肝細胞がん	46
798.5	PC (16:0/18:1)	脳	マウス	胚での局在	30
798.5	PC (16:0/18:1)	↓	ラット	C6グリオーマモデル	31
798.5	PC (16:0/18:1)	↑	ヒト	甲状腺乳頭がん	74
802.5	PC (36:5)	↑	マウス	部分肝切除モデル	36
804	PC (16:0/20:4)	↑	ヒト	下肢静脈瘤	72
804	PC (16:0/20:4)	↑	ヒト	動静脈瘻	69
804.5	PC (16:0/20:4)	↑	マウス	動脈硬化症モデル	38
804.7	PC (16:0/20:4)	末端絨毛	ヒト	胎盤での局在	32
806	PE (16:0/20:4)	↑	マウス	INAD モデル	39
806.5	ST (d18:1/18:0)	↑	マウス	GAD モデル	45
808	PC (18:1/20:4)	外層	マウス	精細管での局在	41
809	セミノリピド (17:0/16:0)	精子細胞	マウス	精巣での局在	29
820.5	PC (16:0/20:4)	↑	ヒト	統合失調症	70
822.5	ST (d18:1/18:0 (OH))	↑	マウス	GAD モデル	45
826.5	PC (18:0/18:1)	白質	マウス	脳での局在	28
826.5	PC (36:1)	↑	ヒト	乳がん	76
837	セミノリピド (17:0/18:0)	管腔	マウス	精細管での局在	41
840.6	PC (O-18:1/22:6)	↓	マウス	IgA腎症モデル	40
844.5	PC (16:0/22:6)	↓	マウス	ALS モデル	50
844.5	PC (16:0/22:6)	↑	マウス	SCIモデル	44
844.5	PC (16:0/22:6)	↑**	マウス	SCIへの治療モデル	49
846.5	PC (18:1/20:4)	海馬	マウス	脳での局在	28
846.5	PC (18:1/20:4)	↑	ヒト	口腔扁平上皮がん	78
848	PC (18:0/20:4)	先端側	ラット	神経細胞軸索での局在	42
848	PC (38:4)	↑	マウス	横紋筋収縮モデル	43
848.5	PC (18:0/20:4)	可視化	マウス	脳での局在	28
856.4	PC (18:0/22:6)	外節	マウス	網膜での局在	25
856.5	PC (18:0/22:6)	↑	マウス	骨格筋運動モデル	48
862.3	PS (22:2/20:4)	顆粒層	ラット	海馬歯状回での局在	26
862.4	TRP	眼神経節	エビ	全身組織内の局在	93
870.6	PC (18:1/22:6)	↓	マウス	ALS モデル	50
872	PC (18:0/22:6)	↓	ヒト	AD	84
872.6	PC (18:0/22:6)	小脳	マウス	脳での局在	28
872.6	PC (18:0/22:6)	↓	マウス	ALS モデル	50
872.6	PC (18:0/22:6)	↑	マウス	SCIモデル	44

(次項に続く)

表2. MALDI-IMS解析で検出された分子の質量電荷比(続き)

<i>m/z</i>	対象分子	結果	生物種	組織, モデル	文献
879	TAG (52:3)	↓	ラット	脳虚血治療モデル	47
879	TAG (52:3)	↑	ヒト	腹部大動脈瘤	86
879.7	TAG	↑	ヒト	糖尿病患者の心筋	82
881	TAG (52:2)	↓**	ラット	脳虚血治療モデル	47
881	TAG (52:2)	↑	ヒト	下肢静脈瘤	72
881	TAG (52:2)	↑	ヒト	腹部大動脈瘤	86
885	PI (18:0/20:4)	間質	マウス	精細管での局在	41
888	ST (d18:1/24:1)	白質	ヒト	AD患者脳での局在	71
895.7	TAG (16:0/18:2/18:1)	↑	ヒト	Dorfman-Chanarin 症候群	75
904	ST (d18:1/h24:1)	白質	ヒト	AD患者脳での局在	71
906.3	ST (d18:1/20:4)	分子層	ラット	海馬歯状回での局在	26
921.7	TAG (16:0/20:3/18:1)	肝臓	マウス	胚での局在	30
1022.5	FMRF	脳	エビ	全身組織内の局在	93
1048	AcylCer (d18:1/34:0)	↓	ヒト	Dorfman-Chanarin 症候群	75
1074	Gb3 C20:0	↑	ヒト	ファブリー病 (心筋)	68
1874	GD1 (18:0/d18:1)	前脳	マウス	中枢神経系での局在	24
1902	GD1 (18:0/d20:1)	嗅皮質	マウス	中枢神経系での局在	24

GABA: γ -アミノ酪酸, EAP: ホスフォエタノールアミン, DEM: ジヒドロマロン酸, AMP: アデノシン-1-リン酸, ADP: アデノシン-2-リン酸, ATP: アデノシン-3-リン酸, UDP-HexNAc: ウリジン-2-リン酸-*N*-アセチルヘキソサミン, FMRF: FMRFアミド, TRP: タキニン関連ペプチド, LPC: リゾホスファチジルコリン, PC: ホスファチジルコリン, PE: ホスファチジルエタノールアミン, PI: ホスファチジルイノシトール, PS: ホスファチジルセリン, SM: スフィンゴミエリン, DAG: ジアシルグリセロール, TAG: トリアシルグリセロール, ST: スルファチド, Gb3: グロボトリオシルセラミド, GD1: ガンクリオシド GD1, AcylCer: アシルセラミド, CE (コレステロールエステル), PA: パルミチン酸, ALA: α -リノレン酸, SA: ステアリン酸, EPA: エイコタペンタエン酸, NASH: 非アルコール性脂肪性肝炎, INAD: 乳児型神経軸索ジストロフィー, SCI: 脊髄損傷, ALS: 筋萎縮性側索硬化症, GAD: Gracile axonal dystrophy, AD: アルツハイマー病

* 検出されたフラグメントの一つ.

** 病態モデルに対して治療処置を行った後の動態変化.

表3. ヒト検体を用いた MALDI-IMS解析

組織, 疾患	<i>m/z</i>	分子	結果	文献
頭部疾患				
歯周病患者の歯組織	496.3	LPC (16:0)	↑	79
ワルチン腫瘍	772.5	PC (16:0/16:0)	↑	81
神経疾患				
統合失調症	820.5	PC (16:0/20:4)	↑	70
統合失調症	797.6	SM (d18:1/20:0)	↑	70
AD患者脳での局在	888	ST (d18:1/24:1)	白質	71
AD患者脳での局在	904	ST (d18:1/h24:1)	白質	71
AD	872	PC (18:0/22:6)	↓	84
循環器疾患				
下肢静脈瘤	496	LPC (16:0)	↑	67
下肢静脈瘤	726	SM (d18:1/16:0)	↑	67
下肢静脈瘤	782	PC (36:4)	↑	67
下肢静脈瘤	496	LPC (16:0)	↑	72
下肢静脈瘤	804	PC (16:0/20:4)	↑	72
下肢静脈瘤	881	TAG (52:2)	↑	72
動静脈瘻	496	LPC (16:0)	↑	69
動静脈瘻	804	PC (16:0/20:4)	↑	69
腹部大動脈瘤	616	ヘム B	↓	20
腹部大動脈瘤	879	TAG (52:3)	↑	86
腹部大動脈瘤	881	TAG (52:2)	↑	86
心疾患				
ファブリー病 (心筋)	782.5	Gb3 C18:0	↑	68
ファブリー病 (心筋)	1074	Gb3 C20:0	↑	68
糖尿病患者の心筋	673.6	CE	↑	82
糖尿病患者の心筋	879.7	TAG	↑	82
がん				
口腔扁平上皮がん	770.5	PC (16:0/16:1)	↓	78
口腔扁平上皮がん	846.5	PC (18:1/20:4)	↑	78
胃がん	496.3	LPC (16:0)	↓	83
(次項に続く)				

表3. ヒト検体を用いた MALDI-IMS 解析 (続き)

組織, 疾患	<i>m/z</i>	分子	結果	文献
胃がん	798.5	PC (16:0/18:1)	↑	83
肝細胞がん	798.5	PC (16:0/16:1)	↑	46
肝臓がん組織	725	SM (d18:1/16:0)	↑	23
転移肝臓がん組織	616	ヘム B	↑	15
直腸結腸がん	770.5	PC (16:0/16:1)	↑	80
甲状腺乳頭がん	741.5	SM (d18:0/16:1)	↑ (間質)	74
甲状腺乳頭がん	796.5	PC (16:0/18:2)	↑	74
甲状腺乳頭がん	798.5	PC (16:0/18:1)	↑	74
多発性骨髄腫	782.5	PC (16:0/20:4)	↓	85
乳がん	826.5	PC (36:1)	↑	76
その他疾患				
腸閉塞未消化物の解析	527	アミロペクチン	同定*	18
Dorfman-Chanarin 症候群	895.7	TAG (16:0/18:2/18:1)	↑	75
Dorfman-Chanarin 症候群	1048	AcylCer (d18:1/34:0)	↓	75
正常組織				
毛髪 (若年および老化)	153	ジヒドロウラシル	↓	73
毛髪 (若年および老化)	164	O-EAP	↑	73
毛髪 (若年および老化)	207	3,4-DEM	↓	73
胎盤での局在	804.7	PC (16:0/20:4)	末端絨毛	32
胎盤での局在	725.6	SM (d18:1/16:0)	幹絨毛	32
正常肺での局在	772.5	PC(16:0/16:0)	肺胞上皮	77

LPC: リゾホスファチジルコリン, PC: ホスファチジルコリン, SM: スフィンゴミエリン, ST: スルファチド, TAG: トリアシルグリセロール, Gb3: グロボトリオシルセラミド, CE (コレステロールエステル), AcylCer: アシルセラミド, EAP: ホスフォエタノールアミン, DEM: ジヒドロマロン酸, AD: アルツハイマー病

* 検出されたフラグメントの一つ。

る効果的なマトリックス塗布法を開発した研究では, 1段階目に加湿器による塗布, 2段階目に等間隔になるように少量のマトリックス液を滴下する方法を行い, 最高30.6倍まで感度を上昇させることができた³⁾. 組織切片に対して直接的に酵素消化を行う新規方法を開発した研究では, ケミカルプリンタを用いて酵素液を滴下することにより, 組織切片における MBP と γ -チューブリンが検出できた⁴⁾.

2. 2007 年度

2007 年度はヒト検体を用いた解析を行う機会を得たため, 構築した技術を駆使して解析を行った. 大腸がんから転移した肝臓がん組織における MALDI-IMS 解析でがん組織における *m/z* 616 の分子を検出し, タンデム解析によってこの分子がヘム B であることを明らかにした⁵⁾. また, 同じ組織を用いた別の研究では, がん組織において *m/z* 725 の分子が検出され, MS/MS 解析を行った結果, この分子が [スフィンゴミエリン (SM) (16:0) + Na]⁺ であることがわかった⁶⁾. この報告は世界で初めて組織切片における脂質分子種の特異的な可視化に成功した研究の一つであった.

3. 2008 年度

2008 年度は主にタンパク質と脂質の可視化を目指す新規方法を開発した論文を執筆した. IMS における酵素消化法の改良した研究では, ドテシル硫酸ナトリウム (SDS) によるタンパク質変性とトリブシンによる酵素消化を組み合わせた新規方法の開発によって, マウス小脳におけるチューブリン, ニューロフィラメント, シナプトソーム関

連タンパク質 25 などの多くの分子の可視化に成功した⁷⁾. 神経変性疾患を示すスクラッパーノックアウト (KO) マウスを用いた脳内タンパク質のプロテオミクス解析では, 二次元電気泳動と MALDI-IMS データを用いた主成分分析 (PCA) との組み合わせによって, 明確な組織内分布の変化を示すタンパク質が複数見つかった⁸⁾ (図 1). 脂質分子の IMS の応用として, 既存の生化学的解析法と組み合わせた新規方法の開発も行った. スフィンゴ糖脂質の新規解析法を開発した研究では, PVDF メンブレンに滴下した糖脂質の一種であるガングリオシド GM1 の標準試薬を MS/MS により解析することでスフィンゴシン基と脂肪酸の検出に成功し, この方法は既知の検出濃度よりも約 10 倍の高感度であることが示された⁹⁾. MALDI-IMS における解像度低下の問題を解決する研究では, 新たなナノ粒子支援レーザー脱離イオン化 (nano PALDI)-IMS 法を開発し, この方法により解像度 15 μm での脂質およびペプチドのイメージングに成功した¹⁰⁾. 質量分析イメージングにおける外部標準による標準化を検討し, この方法によりマウス脳切片におけるホスファチジルコリン (PC) 分子種のイメージングの改善に成功した¹¹⁾.

動物組織における生体内分子を可視化した研究も推進した. 四重極イオントラップ飛行時間型質量分析装置 (QIT-TOF) をベースとするイメージングシステムを構築した研究では, 高感度 MS/MS 解析とイメージング解析との統合により, マウス小脳におけるリン脂質, 糖脂質, トリブシン消化タンパク質のイメージングに成功した¹²⁾. ガングリオシド分子種における脳内分布について MALDI-IMS 解析を行った研究では 2 種のガングリオシド GD1 分子種で

図1. 野生型マウス (WT) とスクラッパー KO マウス (SCR KO) における MALDI-IMS による比較解析 (文献8より引用転載)。

ある GD1 (18:0/d18:1) と GD1 (18:0/d20:1) が同定でき、GD1 (18:0/d18:1) は前脳で、GD1 (18:0/d20:1) は嗅内皮質-海馬の連絡部における分子層と歯状回に局在した¹³⁾。GD1 (18:0/d20:1) は発達に応じて分子層と歯状回に蓄積した¹³⁾。MALDI-QIT-TOF-IMS解析によりマウス網膜におけるリン脂質の同定と可視化を行った研究では、内顆粒層と外網状層における PC (16:0/18:1)、外顆粒層と視細胞外節における PC (16:0/16:0)、視細胞外節と色素上皮細胞層における PC (16:0/22:6) と PC (18:0/22:6) の局在をそれぞれ可視化することに成功した¹⁴⁾。

4. 2009年度

2009年度は新規装置の開発に着手した論文のいくつかがまとまった。マルチターン飛行時間型質量分析計の開発においては、時間収束性と位相空間での軌道安定条件を考慮した新しいイオン光学系を採用した。2000周 (飛行距離1949 m) における質量分解能100万を達成した新規装置

“IRIS”を報告した¹⁵⁾。また株式会社島津製作所との共同により、新たなIMS装置である「質量顕微鏡」の開発を報告したのもこの年である¹⁶⁾。質量顕微鏡は大気圧MALDIとQIT-TOFのほか、光学顕微鏡を装備することにより、IMS解析前での詳細な組織像確認を行うことができる。加えて、3重レンズを装備した紫外線レーザーにより高解像度を実現するほか、大気圧イオン源チャンバーは新鮮な標本における水分や揮発性成分のロスを抑える。本装置を用いショウガ組織における6-ギングロールとモノテルペンの可視化に成功し、これら成分は脂肪滴に存在することを示したほか、これら物質における大気圧レーザー脱離イオン化によるMS/MS解析にも成功した¹⁶⁾。本装置は株式会社島津製作所より「iMScope」という名称で製品化され、解像度5 μm に及ぶ顕微鏡レベルでのイメージング像を取得できる装置として、日本国内だけでなく欧州などの海外に向けても販売されている。

生物試料を用いた研究では、さまざまな種類の標本を用いたMALDI-IMS解析に着手した。胃がん組織のホルマリ

ン固定パラフィン包埋組織の組織アレイ標本を用いたMALDI-IMS解析では、がん組織において発現変化を示す54のタンパク質分子が検出でき、タンデム解析からそれらのうちの一つがヒストンH4として同定できた¹⁷⁾。nano PALDI-IMS法によりラット海馬内のスルファチド (ST) の分布を解析した研究では、STは歯状回の分子層中層において、顆粒層や分子層内層よりも顕著に高く発現していることが明らかになった¹⁸⁾。非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) における脂質動態をMALDI-IMSにより解析した研究では、NASH肝において有意に動態変化を示す脂質が15種検出でき、それらのうちの3分子種において、 m/z 780はPC (34:2), m/z 808はPC (36:2), m/z 802はPC (36:5) としてそれぞれ同定することができた¹⁹⁾。マウス脳における多価不飽和脂肪酸 (PUFA) 含リン脂質をMALDI-IMSにより解析した研究では、PUFA含有PCは細胞選択的であり、特にアラキドン酸含有PCは海馬神経細胞に、ドコサヘキサエン酸含有PCは小脳プルキンエ細胞に局在していることを明らかにした²⁰⁾。マウス精巣におけるセミノリピド分子種の同定をMALDI-IMSにより解析した研究では、セミノリピド (16:0/16:0) は精管全体に、セミノリピド (16:0/14:0) とセミノリピド (14:0/16:0) は精母細胞に、セミノリピド (17:0/16:0) は精細胞と精子にそれぞれ局在していることが明らかとなった²¹⁾。マウス胚におけるリゾホスファチジルコリン (LPC) とトリアシルグリセロール (TAG) をMALDI-IMSにより解析した研究では $[LPC(16:0)+H]^+$, $[LPC(18:0)+H]^+$, $[TAG(16:0/18:2/18:1)+Na]^+$, $[TAG(16:0/18:1/18:1)+Na]^+$, $[TAG(16:0/20:3/18:1)+K]^+$ といった5種類の分子が検出できたほか、胎生17.5日においてLPCは胚全体に、TAGは周囲の褐色脂肪組織と肝臓にそれぞれ局在していることが明らかとなった²²⁾。メダカにおける生体内分子のMALDI-IMS解析では、眼、脳、肝臓において、それぞれ特異的な分布を示す6種の分子が可視化され、特に m/z 796の分子はMS/MS解析よりPC (34:2) と同定された²³⁾。

この年もまた、IMS解析に関する新規方法に関する研究も遂行した。薄層クロマトグラフィー (TLC) とIMSを組み合わせた新規方法としてTLC-Blot-MALDI-IMSの開発を行い、この方法はすべての脂質分子種において既存の方法よりも1桁以上の高感度で検出でき、そのときの精度も高いことを示すことができた²⁴⁾。レーザー脱離イオン化 (LDI) の補助となる磁気ナノ粒子を用いた新規方法の開発では、永久磁石を用いて培養細胞へ無傷な状態で磁気粒子を取り込ませることにより、細胞内のリン脂質の検出に成功した²⁵⁾。脂質分子へのMALDI-IMS解析に適したマトリックス溶液の組成を探索した研究では、カリウム塩の添加が脂質付加イオンを集約することを示し、この方法を用いてラット腎臓におけるPCとTAGに対するより選択的な解析に成功した²⁶⁾。

5. 2010年度

2010年度は病態モデル動物およびヒト検体を用いたIMS研究に関する論文を執筆した。ラットC6グリオーマモデルを用いた脳内における脂質発現のMALDI-IMS解析では、 m/z 798.5である $[PC(16:0/18:1)+K]^+$ の減少と、 m/z 703.4である $[SM(d18:1/16:0)+H]^+$ の増加がそれぞれ明らかとなり、PC (16:0/18:1) は正常組織に、SM (d18:1/16:0) は腫瘍細胞に由来する分子であると推察できた²⁷⁾。局所脳虚血ラットモデルを用いたMALDI-IMSによる脂質発現解析では、虚血24時間後後の虚血部位においてPC (16:0/18:1) が減少し、LPC (16:0) が増加していることが示され、このLPC (16:0) は虚血時にPC (16:0/18:1) からホスホオリパーゼA₂ (PLA₂) によって産生されることが示唆された²⁸⁾。静脈瘤における脂質組成のMALDI-IMS解析では、静脈瘤10検体と正常の静脈6検体との比較により、静脈瘤組織におけるLPC (16:0), PC (36:4) とSM (d18:1/16:0) の局在が示された²⁹⁾。ファブリー病患者の心筋組織を用いた脂質組成のMALDI-IMS解析では、グロボトリアオシルセラミド (Gb3s) に相当する4種の分子種が正常心筋細胞に比べて顕著に増加していることが示された³⁰⁾。ヒト胎盤におけるリン脂質の発現をMALDI-IMSにより解析した研究では、SM (d18:1/16:0) とPC (16:0/20:4) は幹絨毛と末端絨毛でそれぞれ異なる分布を示すことが明らかとなり、末端絨毛に存在するPC (16:0/20:4) はエイコサノイドによる生理機能、および胎生発達障害や胎生低酸素症などの病理に関与している可能性が示唆された³¹⁾。

新規方法の開発として、マトリックスの開発を行った論文も執筆した。組織内の脂肪酸を可視化する新規方法として銀ナノ粒子を用いたnano PALDI-IMSの開発を行い、この方法によってマウス肝における遊離脂肪酸と脂質から切り出された脂肪酸の両方の検出に成功したほか、網膜において各脂肪酸が網膜各層で異なる分布を示していることを明らかにした³²⁾。脳内の糖脂質の解析を行う新規方法として、金ナノ粒子を新規マトリックスとして用いた方法を新規開発し、金ナノ粒子が従来の2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) よりも約20倍感度の向上を示したほか、マウス脳組織における糖脂質の可視化を行うことに成功した³³⁾。新規のマトリックスである α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮ブチルアミン (CHCAB) とDHBブチルアミン (DHBB) におけるMALDI-IMS解析への有用性を探索した研究では、他のマトリックスとの比較によって、CHCABはいくつかのホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルセリン (PS), PC分子種において検出感度を向上させることが示され、特に小脳における脂質の検出感度が既存のDHBよりも向上していたことから、この方法はMALDI-IMSにおいて感度向上のための有用な方法であることが示された³⁴⁾。

この年はまた、実験動物やヒト検体以外の試料を用いた研究も遂行した。タイワンガザミ (*Portunus pelagicus*) における複眼と眼杯における脂質分子のIMS解析では21の

図2. MALDI-IMS解析による米のイメージング (文献37より引用転載)。

分子種が検出でき、特に5種の分子においては、複眼と眼杯における7層を明確に示す分布が示された³⁵⁾。ナスにおける γ -アミノ酪酸 (GABA) を対象としたIMS解析では、ナスの種子におけるGABAの局在が示され、その他の生体内分子においても既知の解析よりも高解像度での可視化に成功した³⁶⁾。米における脂質分子のIMS解析では、胚乳におけるLPC、ふすまにおけるPC、 γ -オリザノールとフィチン酸、胚芽における α -トコフェノールの局在がそれぞれ示され (図2)、さらにはLPC (16:0) などの4種のLPC分子種と、PC (16:0/18:2) などの5種のPC分子種が同定されたほか、それぞれの成分比が算出された³⁷⁾。

TOF-SIMS解析を行った研究を報告したのも、この年であった。培養神経細胞の細胞突起におけるリン脂質を対象としたTOF-SIMS解析では、陽イオンモードではリン脂質の親水基フラグメントであるホスホコリンとグリセロホスホコリンが、陰イオンモードでは主に脂肪酸がそれぞれ検出され、各分子種における神経突起でのそれぞれの特徴的な分布が示された³⁸⁾。さらに、培養神経細胞における脂質の発現をTOF-SIMS解析とMALDI-IMS解析に組み合わせて行った研究では、TOF-SIMS解析で検出した脂質フラグメントの分布がMALDI-IMS解析で検出したPC分子種の分布に一致していることを示すことができた³⁹⁾。

図3. ラット海馬におけるカイニン酸誘導興奮毒性におけるエネルギー代謝物質のイメージング（文献47より引用転載）。

6. 2011年度

この年には、IMSの結果を効率よく解析を行う新規ソフトウェアとして「IMS Convolution with regions of interest」を発表した⁴⁰⁾。このソフトウェアは任意に設定したエリアにおいて自動的に意義のあるシグナルを抽出する自動解析を可能とするほか、関心領域（ROI）解析では設定したエリアでの分子種を抽出することができ、マウス眼球においても16分子種のPC分子種が検出できた。以上から、本ソフトウェアは未経験の研究者たちにとっても同等に、膨大なIMSデータから意義のあるピークの抽出を可能とすることを示した⁴⁰⁾。また、低分子代謝物質に対する解析のために酸化チタン（TiO₂）ナノ粒子を用いた nano PALDI-IMSを開発した研究においては、既存のマトリックスであるDHBと比較することで、TiO₂ナノ粒子では179種の分子を新たに検出することができ、TiO₂ナノ粒子はより高感度での低分子代謝物質の検出を可能とすることが示された⁴¹⁾。

また、この年はTLC-Blot-MALDI-IMSに関する複数の研究も行った。TLC-Blotにおける感度向上とPVDFメンブレンの適用可能を目指した研究として、TLC-BlotとMALDI-QIT-TOFを組み合わせたTLC-Blot and MALDI-QIT-TOF MS法を開発した⁴²⁾。この方法によってヒト脳を用いたST分子種の解析を行った結果、アルツハイマー病

（AD）患者の海馬灰白質におけるST（d18:1/24:1）とST（d18:1/h24:1）の発現変化を明確に検出することができ、本法は神経伝達、記憶、学習といった神経機能に関する分子種の機能解明に有効であることが示された⁴²⁾。精巣および精巣上体において精子の表面の成熟を検出するモノクローナル抗体（MC121）を作製した研究では、MC121を結合させる脂質配列としてIV³GalNAcβ-nLc₄Cer²がTLC-Blot-MALDI-IMS解析によって同定された⁴³⁾。ヒト海馬の白質における糖脂質とリン脂質を二次元-TLC-Blot-MALDI-IMSにより解析した研究では、TLCにより分離された個々の脂質が明確に可視化でき、かつ個々のリン脂質と糖脂質分子種がそれぞれ同定できた⁴⁴⁾。TLC-Blot-MALDI-IMSを応用した研究として、タイセイヨウクロマグロ（*Thunnus thynnus*）における脂質分子の解析を行った。その結果、PE、ホスファチジルイノシトール（PI）、PS、PCやSMのような各種脂質が検出され、それぞれの分子種が同定された⁴⁵⁾。さらに牛肉産地の信憑性評価に応用した研究では、牛肉から抽出した脂質の解析から異なるそれぞれの産地に対する信憑性の高い結果を得ることができ、同位体解析の前の簡単な信憑性評価として有用であることが示された⁴⁶⁾。

動物を用いたMALDI-IMS研究として、実験動物や病態モデル動物のほか、自然生物を用いた解析も行った。マウス海馬におけるエネルギー代謝物質を解析した研究では、

MALDI-IMSとキャピラリー電気泳動法の組み合わせによってアデノシン-3-リン酸 (ATP)、アデノシン-2-リン酸 (ADP) とアデノシン-1-リン酸 (AMP) の可視化に成功したほか、カイニン酸誘導興奮毒性に際した各代謝物質の時空間的代謝を質的、および量的の両方で示すことができた⁴⁷⁾(図3)。肝臓からの転移がんモデルマウスを用いたエネルギー代謝物質の解析では、肝臓と転移部位におけるATP活性とエネルギー代謝の上昇と、転移部位でのウリジン-2-リン酸-N-アセチルヘキソサミンの顕著な上昇および酸化型グルタチオンの減少を示すことができた⁴⁸⁾。蝸牛組織におけるリン脂質の発現をMALDI-IMSにより解析した研究では、PC (16:0/18:1) はコルチ器と血管条に、PC (16:0/18:2) はラセン靱帯に、PC (16:0/16:1) はコルチ器にそれぞれ局在していることが明らかとなった⁴⁹⁾。マウス舌におけるリン脂質の発現をMALDI-IMSにより解析した研究では、筋組織におけるドコサヘキサエン酸含有PC分子種の局在、結合組織におけるLPC分子種の局在、層状上皮におけるリノール酸含有PC分子種とSM (d18:1/16:0) の局在、末梢神経におけるオレイン酸含有PC分子種の局在がそれぞれ明らかとなった⁵⁰⁾。部分肝切除マウスモデルを用いて脂質の蓄積を解析した研究では、TLCによって19のTG分子種と13種のリン脂質分子種が検出できたほか、MALDI-IMS解析によってPC分子種が肝小葉にそったグラジエントの分布を示していることが示された⁵¹⁾。アテローム性動脈硬化症における特異的マーカーの同定を目的とし、アポリポタンパク質E KOマウスの動脈、および末梢動脈閉塞性疾患患者のヒト大腿骨を用いた脂質のMALDI-IMS解析を行った結果、特異的分子としてコレステロールエステル (CE) (18:2) とCE (18:1) が同定できたほか、TAG分子種の蓄積、さらには平滑筋細胞に分布するPC (16:0/20:4) とPC (18:0/20:4) がそれぞれ検出された⁵²⁾。乳児型神経軸索ジストロフィー (INAD) のモデルであるカルシウムイオン非依存PLA₂ β KOマウスを用いた解析では、ドコサヘキサエン酸含有PCがKOマウスの灰白質で増加していることが明らかとなり、INADにおける軸索の退縮は脂質代謝の異常によって生じるミトコンドリアの異常な崩壊や不十分なりモデリングに起因していることが示唆された⁵³⁾。IgA腎症モデル (HIGA) マウスにおける脂質動態をMALDI-QIT-TOFにより解析した研究では、HIGAマウス特異的に発現する脂質としてPC (O-16:0/22:6) とPC (O-18:1/22:6) が同定できたほか、*m/z* 854.6, *m/z* 856.6, *m/z* 880.6, *m/z* 882.6の各分子もHIGAモデルで特異的に発現していることが明らかとなった⁵⁴⁾。メキシコサンショウウオ (*Ambystoma mexicanum*) の網膜における脂質分子のIMS解析では、網膜の層構造に応じた脂質分子の分布、特に内および外網状層におけるPC (32:0), PC (32:1), PC (34:1) の局在と、視細胞の内節および外節におけるPC (36:4), PC (38:6), PC (40:6) のようなPUFA含有リン脂質の局在がそれぞれ示された⁵⁵⁾。

ヒト検体を用いた解析においても、複数の研究を遂行し

た。動静脈瘻 (AVF) における脂質分子のMALDI-IMS解析では、LPC (16:0) とPC (16:0/20:4) がAVFでのオイルレッドO染色と一致するように蓄積しており、この蓄積はAVFにおけるリン脂質代謝の異常に起因することが示唆された⁵⁶⁾。統合失調症患者におけるヒト剖検脳を用いた脂質発現のMALDI-IMS解析では、前頭葉皮質においてリン脂質分子種の異常発現が発見され、液体クロマトグラフィー (LC)-MS/MSによりそれら分子種がより詳細に同定された⁵⁷⁾。ヒト大脳皮質におけるSTを対象としたMALDI-IMS解析では、ヒト脳組織における14のST分子種が同定されたほか、白質と灰白質における非ヒドロキシル化ST/ヒドロキシル化STの比率の違い、特に灰白質ではヒドロキシル化STの比率が高いことが明らかとなった⁵⁸⁾。老化メカニズムの解明を目的とした年齢の異なるヒト毛髪でのMALDI-IMS解析では31の分子がヒト毛髪特異的な分子として検出され、特にジヒドロウラルシルと3,4-ヒドロキシシマロン酸が若年群で、O-ホスホエタノールアミンが老年群でそれぞれ高発現を示していることが示された⁵⁹⁾。

7. 2012年度

2012年度は、生体内分子の機能的意義を追究した研究を行った。細胞質型カルボキシペプチターゼ (CCP) 1におけるポリグルタミン酸化チューブリンへのグルタミン酸鎖の切断活性を解析した研究では、MALDI-IMSによる翻訳後修飾解析によって、CCP1における α -および β -チューブリンのグルタミン酸側鎖への切断活性が明らかにされたほか、新たなフォームである $\Delta 3$ -チューブリンが発見された⁶⁰⁾。ラット海馬におけるアセチルコリンを対象としたMALDI-IMS解析では、MS/MSイメージングと*in situ*フリージング法との組み合わせにより、高感度かつ広い検出幅でアセチルコリンを可視化することができた⁶¹⁾。さまざまな発達段階であるマウス精巣を用いたMALDI-IMS解析では、複数のPC分子種やセミノリピド分子種などが発達段階特異的に精巣で発現しているのが示され、これら分子種は精巣の成熟においてそれぞれ異なる機能を有していることが示唆された⁶²⁾。培養神経細胞におけるPC分子種の分布をMALDI-IMSにより解析した研究では、各PCがアシル鎖とsn-2位の違いによってそれぞれ特異的な分布を示し、特にアラキドン酸含有PCは軸索に多く、遠位から近位の距離に応じたグラジエントを示すことが明らかとなった⁶³⁾(図4)。筋における脂質組成と筋収縮との関係の解明を目的とし、横紋筋における脂質のMALDI-IMS解析を行った結果、筋収縮に際したジアシルグリセロール (DAG) とTAGの減少や、筋収縮に応じたPC分子種の蓄積といった複数の脂質分子種の局在変化が示され、このような脂質組成の変化は各部位における代謝活性の変化に起因することが示唆された⁶⁴⁾。

モデル動物を用いた実験では、主に中枢神経における病態モデルを用いた。人工脳脊髄液アートセレブをラット脳内へ継続的に4時間灌流するモデルを用いて、脳組織の脂質の変化をMALDI-IMSにより解析した研究では、生理食

図4. 培養神経細胞の軸索におけるPC分子種イメージング (文献63より引用転載)。

塩水を灌流した群では浮腫に付随する結果としてPC (16:0/16:0) の増加が示されたほか、アートセレブを灌流した群ではPC (16:0/16:0) が生理食塩水を灌流した群より有意に低い結果が示され、アートセレブは脳損傷に際した浮腫の形成を最小限に抑える効果があることが示された⁶⁵⁾。脊髄損傷 (SCI) モデルにおけるPC分子種の発現をMALDI-IMSにより解析した研究では、脊髄後角におけるアラキドン酸含有PCが損傷7日後以降に発現上昇を示すことが示され、この動態はプロスタグランジン (PG) E₂の発現パターンと一致していたことから、SCI後1~2週間にかけて免疫細胞が流入し、アラキドン酸含有PCやPGE₂の発現が誘導されることが示唆された⁶⁶⁾。

この年はヒト検体を用いた複数の研究を遂行した。腸閉塞において存在した未消化物の成分をMALDI-IMSにより解析した研究では、 m/z 1013~1985の間において162 Daでの等間隔のピークが検出され、MS/MS解析からこの物質は炭水化物の1種であるアミロペクチンであると同定できた⁶⁷⁾。静脈瘤静脈 (VV) における脂質分子の解析では、VVの血管壁におけるリン脂質とTAGの高濃度での含有、特にLPC (16:0) とPC (16:0/20:4) が内膜と中膜に、TAGが外膜に局在していることが示された⁶⁸⁾。甲状腺乳頭がんにおける脂質発現のMALDI-IMS解析では、PC (16:0/18:1)、PC (16:0/18:2) とSM (d18:0/16:1) ががん組織内で高発現を示していることが明らかにされた⁶⁹⁾。セラミド (Cer) の可視化を目指したMALDI-IMS解析では正常組織を用いてCerを可視化できる条件を決定できたほか、Dorfman-Chanarin症候群における中性脂質の蓄積とアシルセラミド (AcylCer) (d18:1/34:0) の発現低下が可視化できた⁷⁰⁾。

自然生物を対象としたIMS解析では、主に甲殻類と植物を対象とした。エビ類の一種 (*Penaeus monodon*) のパ

ラフィン包埋組織を用いた眼柄、脳、胸郭神経節におけるニューロペプチドのMALDI-IMS解析では、FMRFアミド、SIFアミド、甲殻類血糖上昇ホルモン、オルコキニン関連ペプチド、タキキニン関連ペプチド、アラトスタチンAを含む29分子が検出され、LC-MS/MSによってそれぞれの配列が確認された⁷¹⁾。ラビットアイブルーベリー (*Vaccinium ashei*) におけるアントシアニンを対象としたMALDI-IMS解析では、アントシアニン分子種が果皮と内果皮で異なる分布を示し、それぞれのアントシアニン分子種は近縁の分子種とより近い分布パターンを示すことが明らかとなった⁷²⁾。バナナエビ (*Penaeus merguensis*) の卵巣における脂質分子のMALDI-IMS解析では、PC分子種とTAG分子種が卵細胞の成熟に伴って、それぞれ上昇および減少を示すことが明らかとなった⁷³⁾。

8. 2013年度

2013年度における実験動物を用いたIMS解析では、主に病態モデルにおける脂質代謝と微小管の翻訳後修飾に関する研究を行った。CCP5の酵素活性を解析した研究では、MALDI-IMSによる翻訳後修飾解析によって、CCP5が脱グルタミン酸化と、チューブリンからの α -および γ -結合グルタミン酸の切除の両方の機能を有することが示された⁷⁴⁾。パーキンソン病モデルマウスを用いた解析では、ドーパミンニューロンにおけるATP貯蔵の枯渇によってポリADPリボースポリメラーゼ-1 (PARP-1) とAMP-活性化型プロテインキナーゼを活性化させることをMALDI-IMSによって示し、その結果としてドーパミンニューロンにおける神経変性疾患を防ぐことを明らかにした⁷⁵⁾。Gracile axonal dystrophyモデルマウスを用いた、延髄における脂質のMALDI-IMS解析では、延髄背側中部におけるST (C18:0) とST (C18:0 (OH)) の蓄積が示され、この蓄積部位がT細胞小

胞体タンパク質の蓄積部位に一致していたことから、ST (C18:0) の蓄積は延髄におけるユビキチン系の破綻に起因することが示唆された⁷⁶⁾。頸動脈結紮モデルにおける組織内でのTAGの蓄積とシロスタゾール (CLZ) の効果との関係を調べた研究では、結紮群におけるTAG蓄積量の増加とCLZ投与群におけるTAG蓄積量の減少が示されたほか、MALDI-IMS解析により両群での動脈壁全層におけるTGの蓄積とCLZ投与群におけるヘムBの減少が示され、CLZにおける血液動態と脂質代謝への効果が推察された⁷⁷⁾。長期運動モデルマウスと肥満モデルマウスを用いた骨格筋における脂質のMALDI-IMS解析を行った研究では、オレイン酸含有PCおよびSMのほか、ドコサヘキサエン酸含有PCが長期運動モデルで特異的に発現したほか、肥満モデルにおいてはアラキドン酸含有PC、PEおよびPIの特異的な発現、および長鎖脂肪酸含有SMの発現上昇が示され、これら分子はインスリン感受性やいくつかの代謝性疾患に寄与することが示唆された⁷⁸⁾。

ヒト検体を用いた研究では、主に脂質代謝と病態形成との関係を追究した。肝細胞がん (HCC) とリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (LPCAT) によるリン脂質の代謝変化との関係をMALDI-IMSにより解析した研究では、パルミトレイン酸もしくはオレイン酸含有PCの増加と、パルミトレイン酸含有LPCの減少が示されたほか、これら脂質の代謝に応じてLPCAT1ががん組織で発現亢進しているのが明らかとなり、LPCAT1はHCCにおける標的因子であることが示唆された⁷⁹⁾。腹部大動脈瘤 (AAA) における外膜の栄養血管の構造変化を解析した研究では、AAA本体や根本での血管壁において、ヘムBの減少を可視化することができた⁸⁰⁾。ヒト乳がん組織におけるPCとLPCを対象としたMALDI-IMS解析では4種のPC (PC (32:1), PC (34:1), PC (36:1), PC (34:0)) におけるがん組織への局在が示され、さらにはがん組織におけるステアロイルCoA 9-デサチュラーゼ-1 (SCD1) の強い発現も示されたことから、SCD1ががん組織における脂質代謝に寄与することが示唆された⁸¹⁾。ヒト肺組織を用いてサーファクタント成分を含む肺胞における脂質の組成をMALDI-IMSにより解析した研究では、サーファクタントの主成分であるPC (16:0/16:0) が検出でき、高倍像による解析からPC (16:0/16:0) が2型肺胞上皮細胞に局在していることが明らかとなった⁸²⁾。直腸結腸がん (CRC) において発現上昇を示すPCをMALDI-IMSにより解析した研究では、PC (16:0/16:1) とLPCAT4における病期の進行に応じた発現上昇が示され、CRCにおけるPC (16:0/16:1) の増加はLPCAT4の発現亢進に起因することが推察された⁸³⁾。

9. 2014年度

2014年度は実験動物を用い、正常時および病態時における生体内分子の機能的意義の追究を行った。プロテインキナーゼG (PKG)-Iにおけるチロシンのニトロ化部位を解析した研究では、トリプシン消化をしたペプチドフラグメ

ントのMALDI-IMSおよびLC-MS解析によって、6カ所でのチロシン (Y71, Y141, Y212, Y336, Y345, Y567) のニトロ化部位を検出することができた⁸⁴⁾。骨格筋におけるアセチルカルニチンの定量法を新規開発した研究では、アセチルカルニチンは遅筋において多くATPの豊富な部位では逆に少ない分布であることをMALDI-IMS解析により可視化し、その結果としてアセチルカルニチンと代謝活性との関係に起因する組織内分布であることを推察できた⁸⁵⁾。インターロイキン6受容体抗体MR16-1によるSCIの保護機能の解明を目指し、SCIモデルにおけるMR16-1投与後の脂質発現の変化をMALDI-IMSにより解析した研究では、MR16-1はSCIによるドコサヘキサエン酸含有PCの減少の抑制と、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) 発現の亢進を示し、MR16-1はSCIにおいてドコサヘキサエン酸含有PCの発現とアストロサイトの活性に寄与することが示唆された⁸⁶⁾。

この年は、MALDI-IMS解析に際した新規の両極性マトリックスを2種開発した。その一つとして、2,5-ジヒドロキシアセトフェノン (DHAP) の有用性を検討し、既知のDHBよりも多くの脂質分子が検出できることを明らかにしたほか、脂質分子の検出により有用な方法であることを示した⁸⁷⁾。大気圧下MALDI-IMSに適した両極性マトリックスとして*p*-ニトロアニリンの有用性を検討した研究では、溶液量2 mL、濃度30 mg/mLで100% methanolを溶媒としたときが最適条件であることを示し、この方法によってマウス小脳における陽イオンおよび陰イオンモードにおける脂質の可視化にそれぞれ成功することができた⁸⁸⁾。

この年は、さまざまなヒト検体を用いた論文を執筆できた年でもあった。口腔扁平上皮がんにおける脂質組成のMALDI-IMS解析では、PC (16:0/16:1) ががん組織に、PC (18:1/20:4) が間質組織にそれぞれ分布していることが明らかとなり、アラキドン酸含有PCの間質組織における蓄積はがん浸潤に対する炎症反応に起因していることが推察された⁸⁹⁾。ヒト歯を用いて正常の歯と歯周病の歯における比較解析した研究では、LPCの一種と思われる*m/z* 496.3の分子が歯周病の歯根の表面に蓄積しており、歯周病は歯肉の表面組織だけでなく、歯根の表面にまで影響を及ぼすことが示された⁹⁰⁾。唾液腺で頻発する良性腫瘍であるワルチン腫瘍 (War-T) の組織を用いてPCの発現をMALDI-IMSで解析した結果、[PC(16:0/16:0) + K]⁺をはじめとする5種の分子がWar-Tの腫瘍内部で増加しており、これら分子の局在はWar-Tにおける炎症反応に反映した結果であることが推察された⁹¹⁾。糖尿病 (DM) 患者の剖検組織を用いて心血管構造におけるMALDI-IMSで解析した研究では、DM群ではTAGが冠動脈内で蓄積しており、TAGの蓄積は冠動脈内の平滑筋細胞で局在することが明らかとなった⁹²⁾。ADに関連したPC分子種の発現をMALDI-IMSにより解析した研究では、AD患者の灰白質におけるPC (18:0/22:6) の減少 (図5) と、同部位におけるアミロイドβ (Aβ) の蓄積およびシナプス後肥厚タンパク質 (PSD95) の減少が明らかとなり、AD

図5. AD患者剖検脳における脂質分子のイメージング（文献93より引用転載）。

患者の脳組織においてはAβの蓄積、プレシナプスおよびポストシナプスの破綻、PC (18:0/22:6) の蓄積、神経細胞消失の順番でそれぞれ発生することが示唆された⁹³⁾。

この年はTOF-SIMS解析による1細胞レベルのIMS解析を試みた研究も行った。細胞標本へのTOF-SIMS解析に際した有効な前処理法を開発した研究では、0.25% グルタルアルデヒドによる固定と酢酸アンモニウム緩衝液による洗浄を組み合わせた新規方法によって5種類の脂肪酸が検出され、1細胞レベルでのTOF-SIMS解析への有用性が示された⁹⁴⁾。乳がんモデル細胞株であるSKBR-3細胞を用いたTOF-SIMS解析では、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸といった脂肪酸が検出され、TOF-SIMS解析が乳がん細胞の解析においても有用であることが示された⁹⁵⁾。がん幹細胞における脂肪酸組成の解析ではCD45陰性/CD44陽性/CD24陰性の細胞集団において4種の脂肪酸を可視化することができ、CD45陰性/CD44陰性/CD24陽性でソートされる非がん幹細胞と比べて、パルミトレイン酸の発現が顕著に減少していることが示された⁹⁶⁾。

10. 2015年度以降

2015年以降におけるIMS解析は脂質分子を主な対象とし、実験動物、ヒト検体、自然生物を用いた研究を報告している。筋萎縮性側索硬化症（ALS）モデルであるヒト

スーパーオキシドディスムターゼ1（SOD1（G93A））マウスを用いて脊髄における脂質の動態変化をMALDI-IMSにより解析した研究では、ドコサヘキサエン酸含有PC（PC（16:0/22:6）、PC（18:0/22:6）、PC（18:1/22:6））がALS発症の末期（22週齢）において、第5腰神経の前角での顕著な減少を示したことから、ALSモデルにおいて動態変化を示すPCはドコサヘキサエン酸含有PCのみで、かつ末期に局限されていることが明らかになった⁹⁷⁾。消化管内におけるα-リノレン酸の代謝を解析した研究では、亜麻仁油を投与したマウス（Linマウス）の小腸においてα-リノレン酸とその代謝物であるエイコサペンタエン酸（EPA）の増加をMALDI-IMS解析により可視化し、LC-MS/MS解析によるリピドミクス解析から、EPAから代謝される食物由来α-リノレン酸の代謝産物として、17,18-エポキシエイコサテトラエン酸（17,18-EpETE）が同定された⁹⁸⁾。ヒト胃がん組織における脂質組成のMALDI-IMS解析では、がん組織におけるPC（16:0/18:1）およびLPC（16:0）の減少と、LPCAT1の発現亢進が示され、LPCAT1発現が腫瘍の分化を亢進し、腫瘍の深さ方向への浸潤やリンパ管への転移には阻害することが推察された⁹⁹⁾。AAAにおける動脈瘤壁での脂質を対象としたMALDI-IMS解析では、動脈瘤嚢部の外膜におけるTAGの局在が可視化され、この局在は異所的に発生した脂肪由来幹細胞による結果であることが示唆された¹⁰⁰⁾。オニテナガエビ

図6. GCIB-TOF-SIMS解析を用いたマウス海馬における錐体細胞のイメージング (文献106より引用転載). a: シアン化物イオン (CN⁻), リン酸イオン (PO₃⁻), アデニンイオン (adenine) のイメージング, b: 各脂肪酸におけるイメージング

(*Macrobrachium rosenbergii*) における各種精細胞の脂質分子のMALDI-IMS解析では、精細管に相互作用する細胞集団においてPC分子種がそれぞれ独特の分布パターンを示し、生殖器での脂質変化が明らかにされた¹⁰¹⁾。淡水エビの一種 (*Macrobrachium rosenbergii*) における卵巣の成熟とPGE₂、シクロオキシゲナーゼ1およびPGE合成酵素との関係を解析した研究では、PGE₂が卵巣サイクルの短縮、卵巣重量指数の増加、卵母細胞の新生、血リンパにおけるピテロゲニン量の増加に関与することが示された¹⁰²⁾。線虫 (*Caenorhabditis elegans*) における脂質分子のMALDI-IMS解析法では、外骨格を除去するフリーズクラッキング法を改良した新規標本処理法を開発し、*fat-1*遺伝子の欠損によるPC (20:4/20:4) の増加とPC (20:5/20:5) の減少をそれぞれ検出することができた¹⁰³⁾。

2014年度に開発した一細胞レベルのIMS解析技術を活かし、多発性骨髄腫 (MM) における脂質動態の解析を行った。ヒト骨髄からフローサイトメトリーで単離したMM細胞を用い、脂肪酸組成をTOF-SIMSにより解析した研究では、MM細胞におけるパルミチン酸の発現低下、さらにはパルミチン酸が濃度依存的にMM細胞の細胞死を誘発することが明らかにされた¹⁰⁴⁾。MM細胞におけるリン脂質の発現を一細胞レベルでのMALDI-IMSにより解析した研究では、MM細胞におけるPC (16:0/20:4) の発現が正常形質細胞と比べて有意に減少することが示された¹⁰⁵⁾。

近年、私の研究室ではガスクラスターイオンビームTOF-SIMS (GCIB-TOF-SIMS) 法により、ラット海馬神経細胞に存在する分子の超解像レベルでの可視化を試みた。その結果、シアン化物イオン (CN⁻)、リン酸イオン (PO₃⁻)、アデニンイオンにおいては核の形態を示す分布が可視化でき、特にリン酸イオンとアデニンイオンにおいては3次元構築により、核内構造との共局在を示すことに成功した¹⁰⁶⁾。一方で、この研究はアラキドン酸を含む複数の脂肪酸イオンも検出できたが、明瞭な組織内分布は可

視化できなかった (図6)。この結果は、超解像レベルでの脂質分子の可視化には超微形態レベルでの形態保持が重要であることを示す結果であると、考えられる。現在、研究室では超微形態レベルでの脂質分子のIMSに適した標本作製法の検討を行っている。

以上、まだまだ浅学菲才な若輩者であるが今回奨励賞をいただいたのはこれからも質量分析学会の発展に尽くすようにという叱咤激励と思われる。皆さまのご期待に沿えるよう今後も精進してまいります。

謝 辞 こちらの総説をまとめるにあたりまして多大にご協力いただきました武井史郎博士には深く感謝いたします。

文 献

- 1) Y. Sugiura, S. Shimma, and M. Setou, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 45 (2006).
- 2) S. Shimma, M. Furuta, K. Ichimura, Y. Yoshida, and M. Setou, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 133 (2006).
- 3) Y. Sugiura, S. Shimma, and M. Setou, *Anal. Chem.*, **78**, 8227 (2006).
- 4) S. Shimma, M. Furuta, K. Ichimura, Y. Yoshida, and M. Setou, *Surf. Int. Anal.*, **38**, 1712 (2006).
- 5) S. Shimma and M. Setou, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 145 (2007).
- 6) S. Shimma, Y. Sugiura, T. Hayasaka, Y. Hoshikawa, T. Noda, and M. Setou, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **855**, 98 (2007).
- 7) M. Setou, T. Hayasaka, S. Shimma, Y. Sugiura, and M. Matsumoto, *Appl. Surf. Sci.*, **255**, 1555 (2008).
- 8) I. Yao, Y. Sugiura, M. Matsumoto, and M. Setou, *Proteomics*, **8**, 3692 (2008).
- 9) N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, Y. Sugiura, T. Taki, Y. T. Li, M. Matsumoto, and M. Setou, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **870**, 74 (2008).
- 10) S. Taira, Y. Sugiura, S. Moritake, S. Shimma, Y. Ichiyanagi, and M. Setou, *Anal. Chem.*, **80**, 4761 (2008).
- 11) N. Hosokawa, Y. Sugiura, and M. Setou, *J. Mass Spectrom. Soc.*

- Jpn.*, **56**, 77 (2008).
- 12) S. Shimma, Y. Sugiura, T. Hayasaka, N. Zaima, M. Matsumoto, and M. Setou, *Anal. Chem.*, **80**, 878 (2008).
 - 13) Y. Sugiura, S. Shimma, Y. Konishi, M. Yamada, and M. Setou, *PLoS ONE*, **3**, e3232 (2008).
 - 14) T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, Y. Sugiura, N. Zaima, H. Nakanishi, K. Ohishi, S. Nakanishi, T. Naito, R. Taguchi, and M. Setou, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3415 (2008).
 - 15) M. Nishiguchi, Y. Ueno, M. Toyoda, and M. Setou, *J. Mass Spectrom.*, **44**, 594 (2009).
 - 16) 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**, 9153 (2009).
 - 17) Y. Morita, K. Ikegami, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, N. Zaima, H. Tanaka, T. Uehara, T. Setoguchi, T. Sakaguchi, H. Igarashi, H. Sugimura, M. Setou, and H. Konno, *Cancer Sci.*, **101**, 267 (2009).
 - 18) H. Ageta, S. Asai, Y. Sugiura, N. Goto-Inoue, N. Zaima, and M. Setou, *Med. Mol. Morphol.*, **42**, 16 (2009).
 - 19) N. Zaima, Y. Matsuyama, and M. Setou, *J. Oleo. Sci.*, **58**, 267 (2009).
 - 20) Y. Sugiura, Y. Konishi, N. Zaima, S. Kajihara, H. Nakanishi, R. Taguchi, and M. Setou, *J. Lipid Res.*, **50**, 1776 (2009).
 - 21) N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, N. Zaima, and M. Setou, *Glycobiology*, **19**, 950 (2009).
 - 22) T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, Y. Kimura, and M. Setou, *Lipids*, **44**, 837 (2009).
 - 23) N. Zaima, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, and M. Setou, *J. Oleo. Sci.*, **58**, 415 (2009).
 - 24) N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, T. Taki, T. V. Gonzalez, and M. Setou, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 7096 (2009).
 - 25) S. Moritake, S. Taira, Y. Sugiura, M. Setou, and Y. Ichihyanagi, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **9**, 169 (2009).
 - 26) Y. Sugiura and M. Setou, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 3269 (2009).
 - 27) S. Koizumi, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, M. Setou, and H. Namba, *Progress in Computed Imaging*, **32**, 33 (2010).
 - 28) S. Koizumi, S. Yamamoto, T. Hayasaka, Y. Konishi, M. Yamaguchi-Okada, N. Goto-Inoue, Y. Sugiura, M. Setou, and H. Namba, *Neuroscience*, **168**, 219 (2010).
 - 29) H. Tanaka, N. Zaima, N. Yamamoto, D. Sagara, M. Suzuki, M. Nishiyama, Y. Mano, M. Sano, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, T. Sasaki, H. Konno, N. Unno, and M. Setou, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **40**, 657 (2010).
 - 30) K. Onoue, N. Zaima, Y. Sugiura, T. Isojima, S. Okayama, M. Horii, Y. Akai, S. Uemura, G. Takemura, H. Sakuraba, Y. Sakaguchi, M. Setou, and Y. Saito, *Circ. J.*, **75**, 221 (2010).
 - 31) Y. Kobayashi, T. Hayasaka, M. Setou, H. Itoh, and N. Kanyama, *Placenta*, **31**, 245 (2010).
 - 32) T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, K. Shrivasa, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto, and M. Setou, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 1446 (2010).
 - 33) N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, N. Zaima, Y. Kashiwagi, M. Yamamoto, M. Nakamoto, and M. Setou, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 1940 (2010).
 - 34) K. Shrivasa, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, and M. Setou, *Anal. Chem.*, **82**, 8800 (2010).
 - 35) M. Sroyraya, N. Goto-Inoue, N. Zaima, T. Hayasaka, P. Chansela, S. Tanasawet, K. Shrivasa, P. Sobhon, and M. Setou, *Surf. Interface Anal.*, **42**, 1589 (2010).
 - 36) N. Goto-Inoue, M. Setou, and N. Zaima, *Anal. Sci.*, **26**, 821 (2010).
 - 37) N. Zaima, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, and M. Setou, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 2723 (2010).
 - 38) H. J. Yang, I. Ishizaki, N. Sanada, N. Zaima, Y. Sugiura, I. Yao, K. Ikegami, and M. Setou, *Med. Mol. Morphol.*, **43**, 158 (2010).
 - 39) H. J. Yang, Y. Sugiura, I. Ishizaki, N. Sanada, K. Ikegami, N. Zaima, K. Shrivasa, and M. Setou, *Surf. Interface Anal.*, **42**, 1606 (2010).
 - 40) T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, M. Ushijima, I. Yao, A. Yuba-Kubo, M. Wakui, S. Kajihara, M. Matsuura, and M. Setou, *Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 183 (2011).
 - 41) K. Shrivasa, T. Hayasaka, Y. Sugiura, and M. Setou, *Anal. Chem.*, **83**, 7283 (2011).
 - 42) T. Valdes-Gonzalez, N. Goto-Inoue, W. Hirano, H. Ishiyama, T. Hayasaka, M. Setou, and T. Taki, *J. Neurochem.*, **116**, 678 (2011).
 - 43) Y. U. Katagiri, B. Sato, K. Yamatoya, T. Taki, N. Goto-Inoue, M. Setou, H. Okita, J. Fujimoto, C. Ito, K. Toshimori, and N. Kiyokawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **406**, 326 (2011).
 - 44) T. Valdes-Gonzalez, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, H. Ishiyama, M. Setou, and T. Taki, *J. Glycom. Lipidom.*, **1**, 104 (2011).
 - 45) N. Zaima, N. Goto-Inoue, and M. Setou, *J. Oleo. Sci.*, **60**, 93 (2011).
 - 46) N. Zaima, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, H. Enomoto, and M. Setou, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1865 (2011).
 - 47) Y. Sugiura, R. Taguchi, and M. Setou, *PLoS ONE*, **6**, e17952 (2011).
 - 48) A. Kubo, M. Ohmura, M. Wakui, T. Harada, S. Kajihara, K. Ogawa, H. Suemizu, M. Nakamura, M. Setou, and M. Suematsu, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1895 (2011).
 - 49) Y. Takizawa, K. Mizuta, T. Hayasaka, H. Nakanishi, J. Okamura, H. Mineta, and M. Setou, *Audiol. Neurotol.*, **16**, 315 (2011).
 - 50) H. Enomoto, Y. Sugiura, M. Setou, and N. Zaima, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1913 (2011).
 - 51) N. Miyamura, T. Nakamura, N. Goto-Inoue, N. Zaima, T. Hayasaka, T. Yamasaki, S. Terai, I. Sakaida, M. Setou, and H. Nishina, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 120 (2011).
 - 52) N. Zaima, T. Sasaki, T. Tanaka, X. W. Cheng, K. Onoue, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, H. Enomoto, N. Unno, M. Kuzuya, and M. Setou, *Atherosclerosis*, **217**, 427 (2011).
 - 53) G. Beck, Y. Sugiura, K. Shinzawa, S. Kato, M. Setou, S. Sakoda, and H. Sumi-Akamaru, *J. Neurosci.*, **31**, 11411 (2011).
 - 54) Y. Kaneko, Y. Obata, T. Nishino, H. Kakeya, Y. Miyazaki, T. Hayasaka, M. Setou, A. Furusu, and S. Kohno, *Exp. Mol. Pathol.*, **91**, 614 (2011).
 - 55) M. C. Roy, H. Nakanishi, K. Takahashi, S. Nakanishi, S. Kajihara, T. Hayasaka, M. Setou, K. Ogawa, R. Taguchi, and T. Naito, *J. Lipid Res.*, **52**, 463 (2011).
 - 56) H. Tanaka, N. Zaima, N. Yamamoto, M. Suzuki, Y. Mano, H. Konno, N. Unno, and M. Setou, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1873 (2011).
 - 57) J. Matsumoto, Y. Sugiura, D. Yuki, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Zaima, Y. Kunii, A. Wada, Q. Yang, K. Nishiura, H. Akatsu, A. Hori, Y. Hashizume, T. Yamamoto, K. Ikemoto, M. Setou, and S. I. Niwa, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1933 (2011).
 - 58) D. Yuki, Y. Sugiura, N. Zaima, H. Akatsu, Y. Hashizume, T. Yamamoto, M. Fujiwara, K. Sugiyama, and M. Setou, *Neuroscience*, **193**, 44 (2011).
 - 59) M. L. Waki, K. Onoue, T. Takahashi, K. Goto, Y. Saito, K. Inami, I. Makita, Y. Angata, T. Suzuki, M. Yamashita, N. Sato, S. Nakamura, D. Yuki, Y. Sugiura, N. Zaima, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, Y. Shimomura, and M. Setou, *PLoS ONE*, **6**, e26721 (2011).
 - 60) I. Berezniuk, H. T. Vu, P. J. Lyons, J. J. Sironi, H. Xiao, B. Burd, M. Setou, R. H. Angeletti, K. Ikegami, and L. D. Fricker, *J. Biol. Chem.*, **287**, 6503 (2012).
 - 61) Y. Sugiura, N. Zaima, M. Setou, S. Ito, and I. Yao, *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 1851 (2012).
 - 62) N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, N. Zaima, and M. Setou, *Surf. Interface Anal.*, **44**, 749 (2012).
 - 63) H. Yang, Y. Sugiura, K. Ikegami, Y. Konishi, and M. Setou, *J. Biol. Chem.*, **287**, 5290 (2012).
 - 64) N. Goto-Inoue, Y. Manabe, S. Miyatake, S. Ogino, A. Mori-

- shita, T. Hayasaka, N. Masaki, M. Setou, and L. N. Fujii, *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 1863 (2012).
- 65) S. Koizumi, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, K. Doi, M. Setou, and H. Namba, *World Neurosurg.*, **277**, 153 (2012).
 - 66) M. Hanada, Y. Sugiura, R. Shinjo, N. Masaki, S. Imagama, N. Ishiguro, Y. Matsuyama, and M. Setou, *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 1873 (2012).
 - 67) M. Yamada, I. Yao, T. Hayasaka, M. Ushijima, M. Matsuura, H. Takada, N. Shikata, M. Setou, K. H. Kwon, and S. Ito, *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**, 1921 (2012).
 - 68) H. Tanaka, N. Zaima, T. Sasaki, N. Yamamoto, M. Sano, H. Konno, M. Setou, and N. Unno, *J. Vasc. Surg.*, **55**, 1440 (2012).
 - 69) S. Ishikawa, I. Tateya, T. Hayasaka, N. Masaki, Y. Takizawa, S. Ohno, T. Kojima, Y. Kitani, M. Kitamura, S. Hirano, M. Setou, and J. Ito, *PLoS ONE*, **7**, e48873 (2012).
 - 70) N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, N. Zaima, K. Nakajima, W. M. Holleran, S. Sano, Y. Uchida, and M. Setou, *PLoS ONE*, **7**, e49519 (2012).
 - 71) P. Chansela, N. Goto-Inoue, N. Zaima, M. Sroyraya, P. Sobhon, and M. Setou, *Peptides*, **34**, 10 (2012).
 - 72) Y. Yoshimura, H. Enomoto, T. Moriyama, Y. Kawamura, M. Setou, and N. Zaima, *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 1885 (2012).
 - 73) P. Chansela, N. Goto-Inoue, N. Zaima, T. Hayasaka, M. Sroyraya, N. Kornthong, A. Engsusophon, M. Tamtin, C. Chaisri, P. Sobhon, and M. Setou, *PLoS ONE*, **7**, e33154 (2012).
 - 74) I. Bereznik, P. J. Lyons, J. J. Sironi, H. Xiao, M. Setou, R. H. Angeletti, K. Ikegami, and L. D. Fricker, *J. Biol. Chem.*, **288**, 30445 (2013).
 - 75) T. W. Kim, H. M. Cho, S. Y. Choi, Y. Sugui, T. Hayasaka, M. Setou, H. C. Koh, E. M. Hwang, J. Y. Park, S. J. Kang, H. S. Kim, H. Kim, and W. Sun, *Cell Death Dis.*, **4**, e919 (2013).
 - 76) S. Onishi, Y. Tatsumi, K. Wada, H. J. Yang, Y. Sugiura, M. Setou, and H. Yoshikawa, *Med. Mol. Morphol.*, **46**, 160 (2013).
 - 77) H. Tanaka, N. Zaima, H. Ito, K. Hattori, N. Yamamoto, H. Konno, M. Setou, and N. Unno, *J. Vasc. Surg.*, **58**, 1366 (2013).
 - 78) N. Goto-Inoue, K. Yamada, A. Inagaki, Y. Furuichi, S. Ogino, Y. Manabe, M. Setou, and N. L. Fujii, *Sci. Rep.*, **3**, 3267 (2013).
 - 79) Y. Morita, T. Sakaguchi, K. Ikegami, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, V. T. Hang, H. Tanaka, T. Harada, Y. Shibasaki, A. Suzuki, K. Inaba, M. Murakami, M. Setou, and H. Konno, *J. Hepatol.*, **59**, 292 (2013).
 - 80) H. Tanaka, N. Zaima, T. Sasaki, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, K. Onoue, K. Ikegami, Y. Morita, N. Yamamoto, Y. Mano, M. Sano, T. Saito, K. Sato, H. Konno, M. Setou, and N. Unno, *PLoS ONE*, **8**, e57398 (2013).
 - 81) Y. Ide, M. Waki, T. Hayasaka, T. Nishio, Y. Morita, H. Tanaka, T. Sasaki, K. Koizumi, R. Matsunuma, Y. Hosokawa, H. Ogura, N. Shiya, and M. Setou, *PLoS ONE*, **8**, e61204 (2013).
 - 82) N. Kurabe, T. Hayasaka, H. Igarashi, H. Mori, K. Sekihara, H. Tao, H. Yamada, T. Kahyo, I. Onishi, H. Tsukui, A. Kawase, S. Matsuura, Y. Inoue, K. Shinmura, K. Funai, M. Setou, and H. Sugimura, *Pathol. Int.*, **63**, 195 (2013).
 - 83) N. Kurabe, T. Hayasaka, M. Ogawa, N. Masaki, Y. Ide, M. Waki, T. Nakamura, K. Kurachi, T. Kahyo, K. Shinmura, Y. Midorikawa, Y. Sugiyama, M. Setou, and H. Sugimura, *Cancer Sci.*, **104**, 1295 (2013).
 - 84) J. Lu, I. Yao, M. Shimojo, T. Katano, H. Uchida, M. Setou, and S. Ito, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 1387 (2014).
 - 85) Y. Furuichi, N. Goto-Inoue, Y. Manabe, M. Setou, K. Masuda, and N. L. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1699 (2014).
 - 86) H. Arima, M. Hanada, T. Hayasaka, N. Masaki, T. Omura, D. Xu, T. Hasegawa, D. Togawa, Y. Yamato, S. Kobayashi, T. Yasuda, Y. Matsuyama, and M. Setou, *Neuroscience*, **269**, 1 (2014).
 - 87) T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, N. Masaki, K. Ikegami, and M. Setou, *Surf. Interface Anal.*, **46**, 1219 (2014).
 - 88) S. Matsushita, E. Sugiyama, T. Hayasaka, N. Masaki, and M. Setou, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **62**, 29 (2014).
 - 89) Y. Uchiyama, T. Hayasaka, N. Masaki, Y. Watanabe, K. Masumoto, T. Nagata, F. Katou, and M. Setou, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 1307 (2014).
 - 90) H. Hirano, N. Masaki, T. Hayasaka, Y. Watanabe, K. Masumoto, T. Nagata, F. Katou, and M. Setou, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 1355 (2014).
 - 91) Q. He, Y. Takizawa, T. Hayasaka, N. Masaki, Y. Kusama, J. Su, H. Mineta, and M. Setou, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 5815 (2014).
 - 92) Y. Ikeda, N. Zaima, K. Hirano, M. Mano, K. Kobayashi, S. Yamada, S. Yamaguchi, A. Suzuki, H. Kanzaki, T. Hamasaki, J. Kotani, S. Kato, H. Nagasaka, M. Setou, and H. Ishibashi-Ueda, *Pathol. Int.*, **64**, 325 (2014).
 - 93) D. Yuki, Y. Sugiura, N. Zaima, H. Akatsu, S. Takei, I. Yao, M. Maesako, A. Kinoshita, T. Yamamoto, R. Kon, K. Sugiyama, and M. Setou, *Sci. Rep.*, **4**, 7130 (2014).
 - 94) Y. Nagata, I. Ishizaki, M. Waki, Y. Ide, A. Hossen, K. Ohnishi, N. Sanada, and M. Setou, *Surf. Interface Anal.*, **46**(S1), 185 (2014).
 - 95) Y. Ide, M. Waki, I. Ishizaki, Y. Nagata, F. Yamazaki, T. Hayasaka, N. Masaki, K. Ikegami, T. Kondo, K. Shibata, H. Ogura, N. Sanada, and M. Setou, *Surf. Interface Anal.*, **46**(S1), 181 (2014).
 - 96) M. Waki, Y. Ide, I. Ishizaki, Y. Nagata, N. Masaki, E. Sugiyama, N. Kurabe, D. Nicolaescu, F. Yamazaki, T. Hayasaka, K. Ikegami, T. Kondo, K. Shibata, T. Hiraide, Y. Taki, H. Ogura, N. Shiya, N. Sanada, and M. Setou, *Biochimie*, **107**(Pt A), 73 (2014).
 - 97) H. Arima, T. Omura, T. Hayasaka, N. Masaki, M. Hanada, D. Xu, T. Banno, K. Kobayashi, H. Takeuchi, K. Kadomatsu, Y. Matsushita, and M. Setou, *Neuroscience*, **297**, 127 (2015).
 - 98) J. Kunisawa, M. Arita, T. Hayasaka, T. Harada, R. Iwamoto, R. Nagasawa, S. Shikata, T. Nagatake, H. Suzuki, E. Hashimoto, Y. Kurashima, Y. Suzuki, H. Arai, M. Setou, and H. Kiyono, *Sci. Rep.*, **5**, 9750 (2015).
 - 99) T. Uehara, H. Kikuchi, S. Miyazaki, I. Iino, T. Setoguchi, Y. Hiramatsu, M. Ohta, K. Kamiya, Y. Morita, H. Tanaka, S. Baba, T. Hayasaka, M. Setou, and H. Konno, *Ann. Surg. Oncol.*, **Suppl. 2**, 206 (2016).
 - 100) H. Tanaka, N. Zaima, T. Sasaki, N. Yamamoto, K. Inuzuka, M. Sano, T. Saito, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, K. Sato, H. Kugo, T. Moriyama, H. Konno, M. Setou, and N. Unno, *J. Vasc. Res.*, **52**, 127 (2015).
 - 101) T. Siangcham, P. Chansela, T. Hayasaka, N. Masaki, M. Sroyraya, J. Poljaroen, S. Suwansa-ard, A. Engsusophon, P. J. Hanna, P. Sobhon, and M. Setou, *PLoS ONE*, **10**, e0120412 (2015).
 - 102) C. Sumpownon, A. Engsusophon, T. Siangcham, E. Sugiyama, N. Soonklang, P. Meeratana, C. Wanichanon, P. J. Hanna, M. Setou, and P. Sobhon, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **223**, 129 (2015).
 - 103) S. Hameed, K. Ikegami, E. Sugiyama, S. Matsushita, Y. Kimura, T. Hayasaka, Y. Sugiura, N. Masaki, M. Waki, I. Ohta, M. A. Hossen, and M. Setou, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 7589 (2016).
 - 104) Y. Nagata, I. Ishizaki, M. Waki, Y. Ide, M. A. Hossen, K. Ohnishi, T. Miyayama, and M. Setou, *Leuk. Res.*, **39**, 638 (2015).
 - 105) M. A. Hossen, Y. Nagata, M. Waki, Y. Ide, S. Takei, H. Fukano, G. A. Romero-Perez, S. Tajima, I. Yao, K. Ohnishi, and M. Setou, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 5273 (2015).
 - 106) N. Masaki, I. Ishizaki, T. Hayasaka, G. L. Fisher, N. Sanada, H. Yokota, and M. Setou, *Sci. Rep.*, **5**, 10000 (2015).

Keywords: Imaging, Lipid