質量分析イメージングの創薬研究への展開

早坂 孝宏

Application of Imaging Mass Spectrometry for Drug Discovery

Takahiro Hayasaka

Hokkaido University; Kita 12, Nishi 5, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan.

(Received August 5, 2015)

Imaging mass spectrometry (IMS) can reveal the distribution of biomolecules on tissue sections. In this process, the biomolecules are directly ionized within tissue sections using matrix-assisted laser desorption/ionization, and then their distribution is visualized by pseudo-color based on the relative signal intensity. The biomolecules, such as fatty acids, phospholipids, glycolipids, peptides, proteins, and neurotransmitters, have been analyzed at a spatial resolution of 5 μm . A special instrument for IMS analysis was developed by Shimadzu. The IMS analysis does not require the labeling of biomolecules and is capable of analyzing all the ionized biomolecules. Interest in this method has expanded to many research fields, including biology, agriculture, medicine, and pharmacology. The technique is especially relevant to the drug discovery process. As practiced currently, drug discovery is expensive and time consuming, requiring the preparation of probes for each drug and its metabolites, followed by systematic probe tracking in animal models. The IMS technique is expected to overcome these drawbacks by revealing the distribution of drugs and their metabolites using only a single analysis. In this symposium, I introduced the methodology and applications of IMS and discussed the feasibility of its application to drug discovery in the near future.

Key words—imaging mass spectrometry; drug discovery; lipid; fatty acid

1. はじめに

質量分析計の感度向上に伴い多くの物質を一度に検出することが可能になった。1990年代に入ると初めて質量分析イメージングが試みられるようになった。質量分析イメージングという用語はいまだその呼称が統一されておらず、世界的にもイメージング質量分析や質量分析法 (mass spectrometry) の略語である MS を用いて MS イメージングなどとも呼ばれている。日本においてもそれらとともに質量顕微鏡という呼称が作られている。¹⁾ この質量顕微鏡という呼称は、われわれ日本人の感覚から言うとなじみやすく表現した言葉なのかもしれない。なぜなら質量分析イメージングは、質量分析法と顕微鏡法が合わさった手法だからである。これらの2つの手法のよい点を取り入れた手法が質量分析イメージングと言える。質量分析法では、試料から精製し

た分子を多段階質量分析することにより分子構造を解析することが可能であり、その威力を発揮してきた。一方で試料中における分子の位置情報が失われるという欠点があった。また顕微鏡法では、既知分子の構造情報を基にした抗体などを標識することにより、その分布を高解像度で観察することが可能である。その反面、構造情報が明らかになっている分子に観察が限定される課題が残されたままである。質量分析イメージングでは、試料中における分子の位置情報を明らかにし、その分子の構造解析を行うことが可能である。特に一度の解析によりイオン化し検出されたイオン群のすべてが解析対象となるという利点がある。

2. 質量分析イメージングの流れ

質量分析イメージングの流れについて説明する。¹⁾ 解析対象となるのは細胞や組織切片である。これらをスライドガラス上に貼り付けることが最初の作業となる。一般的なスライドガラスや導電性素材をコーティングした特殊なスライドガラスなどが利用され、解析に用いる装置によって使い分けるこ

北海道大学 (〒060-0812 札幌市北区北 12 条西 5 丁目)
e-mail: thaya@hs.hokudai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 135 年会シンポジウム S50 で発表した内容を中心に記述したものである。

とになる。質量分析イメージングに用いられるイオン化法の主流は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) である。MALDI ではマトリックスと呼ばれる有機化合物と分子の共結晶を形成し、そこにレーザーを照射することによりイオン化させる手法である。質量分析イメージングでは試料に対して均一にマトリックスを塗布する必要がある。マトリックスと分子の比はイオン化に大きく影響を与えるためである。その塗布方法として、これまではマトリックス溶液を手動若しくは市販の装置を用いて自動的に塗布する方法が採用されてきた。近年になりマトリックス粉末を真空中で昇華させることにより、上面に設置した試料に対して均一に塗布する蒸着法も頻繁に利用されるようになってきた。均一にマトリックスを塗布された試料は質量分析計に導入され、測定する試料領域が決定される。この際に測定点の間隔を設定することで、合計の測定点が決定される。測定点が多いほどデータ容量は膨大になる。また測定する質量範囲の広さもスペクトルを形成するデータポイント数に関係するため、広い質量範囲を設定すれば、それだけデータ容量を大きくする要因となる。このデータ容量が 1 GB を超えることもあり、経験のない研究者には驚かれることもしばしばである。また合計の測定点が多くなれば、測定に要する時間も長くなり、10 時間を超えることもある。このようにして取得されたデータは、測定点毎のマススペクトルという質量情報で構成される。専用のソフトウェアを用いてマススペクトル中の任意のシグナルを選択することによって、そのシグナルの各測定点におけるシグナル強度が比較され、その相対比に応じた疑似色によって試料上におけるシグナルの分布が示される。それらのシグナルの構造情報を明らかにすることも非常に重要な作業である。質量分析イメージングで取得されるシグナルは、通常の質量分析法と同様に複数の分子が混在する試料を測定した場合に基本的には多く存在する分子が強いシグナルとして検出される。これを組織上で考えた場合には、組織を構成する主要な分子が検出されることになり、一般的な試料であれば既知の分子が検出されることになる。よってそれらの分子に関する構造情報はデータベースや論文で報告されているものばかりである。組織上で検出された任

意のシグナルを選択し、そのイオンだけを断片化させ、その断片化パターンから分子構造を明らかにすることが可能である。ここまでの話からすると、顕微鏡法が得意としている既知の分子を標識することと変わらないと思われるかもしれない。しかし質量分析イメージングが注目を集めるようになった 1 つの要因として、脂質を解析対象とすることが挙げられる。脂質には生体膜を構成する主要成分であるリン脂質に代表されるように複数の脂肪酸で構成され、その組成によって生体での働きが変わるといったことが知られてきている。そのような脂肪酸組成の違いまで解析可能な手法は今のところ質量分析イメージングのほかには存在しないのである。また解析対象には脂質だけでなく、タンパク質、アミノ酸、糖、脂肪酸、薬物といった様々な分子がある点も大きな特徴と言える。

3. 質量分析イメージングが可能な装置

イオン化法に MALDI を採用した最近の装置は、その多くが質量分析イメージングを実施することが可能となっている。Shimadzu, JEOL, Thermo Scientific, Bruker Daltonics, Waters, AB SCIEX など、それぞれ独自の装置を開発し、市販している。質量分析計の構成は装置によって様々である。MALDI によってイオン化されると分子イオンは検出器へ到達するまでに、様々な手法によって分離することが可能である。一般的な分離方法としては飛行時間型質量分析計 (time-of-flight MS; TOF-MS) が存在する。分子イオンは電圧によって加速され真空中を飛行する際、その重さによって速度が異なるため、検出器への到達時間が変わる。小さい分子イオンは早く検出器へ到達し、大きい分子イオンはゆっくりと検出器へ到達するといった具合である。これらの時間を質量電荷比 (m/z) へ変換することによって分子イオンの重さとして表すことができる。この TOF の前に四重極やイオントラップを設置する場合もある。四重極は分子イオンが通過する際に直流電圧と交流電圧を印加することによって電場を発生させ、目的の分子イオンだけを通過させることができる。イオントラップも同様にして目的の分子イオンだけを通過させることもできるが、さらにイオントラップ内で分子イオンの開裂を引き起こさせ、断片化したイオンを検出器で測定することも可能である。オールマイティな装置は今のところ存

在しておらず、研究者の目的に応じた装置をチョイスすることになる。価格は数千万円から1億円を超えるものまで存在するため簡単な買い物ではない。しかしながら購入することを目的とした場合には、各社のラボでデモンストレーションをしてもらえることが多いので問い合わせてみることも1つの手と考えられる。

4. iMScope の開発

筆者が質量分析イメージングに取り組み始めたのは、2007年からである。当初はマトリックス塗布を自動で行えるような装置もなく、プラモデル製作に用いられるカラーリング用の手動スプレーヤーを利用していた。それと同時に島津製作所、がん研究会、慶應義塾大学らとの共同研究により質量分析イメージング用の質量分析計の開発にも携わっていた。その装置は無事に完成し、2014年春にiMScopeという商品として販売が開始された。iMScopeのコンセプトは顕微鏡で観察した箇所を質量分析し、そこに存在する分子群の局在を可視化するというものであった。MALDIチャンバーを大気圧に設定することにより光学顕微鏡を配置し、40倍までの対物レンズを可変することができる。²⁾ここで観察した試料から測定領域を始めた測定条件を設定し、隣のレーザー照射部へ試料を運搬する。レーザー照射が行われると、試料表面で分子がイオン化され試料導入部、イオンガイドを通過し、四重極イオントラップによって分子イオンが捕獲される。直流電圧と交流電圧の調節により目的の分子イオンだけが残された後、TOFで分離された各分子イオンのシグナル強度が検出器によって測定されるという流れである。この装置ではレーザー照射部を5 μm まで収束させたことによる高解像度、四重極イオントラップによる飛行開始点のリセットによる高分解能測定が可能になった。よって微小な試料領域でも細かなピクセルによって高解像度の分子分布を描くことができ、わずかな m/z 値の差を持つ分子を分けることによって、より固有の分子分布を描くことに近づくことを可能にしている。

5. 前処理法の手法の開発

5-1. 脱塩処理 質量分析法ではイオンの測定を行うものであり、その荷電は分子構造に依存してプラスとマイナスに分かれる。MALDIの場合、そのイオン形式はマイナスの場合は単純にプロトンが

引き抜かれただけであるが、プラスの場合は試料中に含まれる塩が影響することでプロトン、ナトリウム、カリウムなどが付加した形式をとる。よってプラスチャージを測定するポジティブイオンモードでは、1つの分子につき少なくとも3種のイオン形式が存在することになり、そのスペクトルの解釈は難解である。そのため試料中の塩を取り除く脱塩操作が前処理に取り入れられてきた。筆者が行った脱塩は酢酸アンモニウムや超純水を用いたものであり、これらの溶液に切片を貼り付けたスライドガラスごと30秒から1分ほど浸すことによって脱塩を行った。サンプルとしてラット脳切片を脱塩した結果を示す (Fig. 1)。脱塩を行っていない切片からは多くの種類のシグナルを検出したものの、シグナル強度自体は低い結果となった。一方で酢酸アンモニウムや超純水で脱塩処理を行った切片からは、4倍ほどのシグナル強度の増加を示しただけでなく、 m/z 800前後のシグナルの数が減少する結果となった。脱塩を行っていない切片から検出されたシグナルのうち、 m/z 760.5、 m/z 782.5、 m/z 798.5は同一分子のプロトン付加、ナトリウム付加、カリウム付加であることが分かっている。脱塩処理した切片では、これらのシグナルがプロトン付加体である m/z 760.5に統一されていることが分かる。ナトリウム及びカリウム付加体として検出されていたシグナルがプロトン付加体へ移行したことによりシグナル強度が増加したことが分かる。以上のように酢酸アンモニウムや超純水を用いて脱塩を行うことにより、イオン形式をプロトン付加体に統一し、マススペクトルを単純化することが可能である。またシグナル強度が増加することから後に行う可能性がある多段階質量分析にも耐え得るシグナル強度を稼ぐことが可能である。また脱塩を行わない場合に起こり得る問題がもう1つ存在する。別々の分子のプロトン付加体やナトリウム付加体が同一の m/z 値を示すことがある場合である (Fig. 2)。このとき、その m/z 値を基準として分子分布を描くと、それぞれのシグナルが紛れ込んだイメージを表示することになり、1つの分子分布を表すことができない。このような場合も想定した場合に脱塩処理が有効な手段となる。塩を除く脱塩に対して、塩を加える処理も存在する。一般的なMALDIでも用いられる手法であるが、数10 mM程度の塩をあらかじめマトリック

Fig. 1. Mass Spectra from a Rat Brain Desalted by Ammonium Acetate and Pure Water

All ions were integrated to the ion form $M+H$ by treatment of a tissue section with ammonium acetate and pure water.

Fig. 2. Ion Images of Phospholipids in a Rat Brain Desalted by Ammonium Acetate and Pure Water

The contamination of ion signals was removed from the ion images by desalting.

スに混合し、試料に対して噴霧することによりイオンの付加体をその塩に偏らせる方法である。塩としては生体内に存在するナトリウムやカリウムであったり、生体内には存在しないリチウムが用いられる。検出される結果に応じて、これらの手法を組み合わせることにより、解析し易いデータを取得することが可能となる。

5.2. 金属ナノ粒子の応用 マトリックスとして一般的に用いられる有機化合物以外にもマトリックスとしての効果を有する物質が存在する。その中で金属ナノ粒子について紹介させて頂く。金属ナノ粒子は核に金属を有し、安定性を生み出すために核周囲を炭素差でカップリングした粒子である。われわれが用いてきた金属ナノ粒子は、銀と金を核にしたものである。これらをヘキサンに溶解することによって拡散性を有し、スプレーヤーでの塗布が可能になった。これらを組織切片へ塗布すると、銀ナノ粒子の場合には m/z 400 以下の質量領域で多くのシグナルを検出し、それらが脂肪酸であることが明らかになった。³⁾ これらの脂肪酸は遊離型ばかりではない。リン脂質を金属プレート上に滴下した上で銀ナノ粒子をコーティングしレーザー照射したところ、脂肪酸が検出された。つまりリン脂質を構成する脂肪酸がレーザー照射によって与えられたエネルギーによって断片化し検出されたことになる。当時の報告では脂肪酸のイメージングは初めてであった。その後、9-aminoacridine というマトリックスを用いることによって、上記の現象が起こることが分かっており、特殊な金属ナノ粒子の合成を要することなく脂肪酸のイメージングが行えるようになってきている。また金ナノ粒子がマウス脳切片を試料とした場合のマススペクトルが通常のマトリックスと比較された。その結果、多種のガングリオシドのイオン化効率を促進することが示され、これによって取得されたイメージングデータから鮮明な分布が示されるようになった。⁴⁾ これら銀や金以外にも酸化チタン⁵⁾ など、様々な金ナノ粒子が試されてきた。それらによって取得されたマススペクトルには分子同定が終わっていないシグナルも含まれており、まだまだ解析の余地があるところである。

5.3. マトリックス塗布方法の検討 質量分析イメージングの流れについて説明をした際にマトリックス塗布方法として蒸着法が行われるように

なってきたことに触れた。蒸着法は真空中のチャンバー内に置いたマトリックス粉末を加熱することによって昇華させ、上部に設置した組織切片に対してマトリックスを塗布する方法である。この塗布により、組織切片には均一なマトリックス層がコーティングされる。マトリックス粉末と組織切片の設置間隔を調節することにより、塗布範囲を調節することも可能である。この手法ではチャンバー内の圧力とマトリックスにかける加熱温度と時間を一定にすることにより、常に同じ厚さのマトリックス層を形成することが可能になる。最近ではメーカーから自動蒸着装置も市販されている。また電子顕微鏡観察を行ったことのある方であればご存知かもしれないが、薄膜形成用の蒸着装置でも応用が可能である。この蒸着法により形成されるマトリックス層は、マトリックスが大きな塊を作ることなく、微小な結晶が敷き詰められたような膜を形成する。近年の装置開発において MALDI のレーザー径も $5\ \mu\text{m}$ 程度まで収束されているように、スプレーヤーを用いた手動塗布では熟練者でも対応する微小なマトリックス結晶を作製することが難しい。よってマトリックス結晶の均一性や取得データの再現性を考慮すると、今後は蒸着法を主流として解析が進められるようになる可能性は十分にある。実際にスプレーヤーを用いた手動塗布と蒸着法により同一マトリックスを塗布した例をご紹介します。⁶⁾ 用いた試料はラット脳から作製した冠状面の組織切片である。上部に位置する脳の端を中心に脳内部と外部、つまりは組織が存在しない領域を測定した。塗布したマトリックスは 2,5-dihydroxyacetophenone であり、スプレーヤーを用いた手動塗布では 70% アセトニトリルと 70% エタノールで溶解した上で塗布を行った。これらの切片から m/z 1544 及び m/z 1572 の生体分子シグナルを対象として、蒸着法との比較解析を行った。この際のレーザー照射間隔は $10\ \mu\text{m}$ とした。その結果、手動塗布した試料から得られたシグナルの分布は組織内で集中しているものの、組織外にも多くのシグナルが検出されるといった結果になった。その傾向は 70% アセトニトリルを用いた方で顕著であった。アセトニトリルとエタノールの揮発性から考えると、エタノールは塗布後にすぐに揮発するもののアセトニトリルは揮発に時間がかかるため、組織中の分子を引き込んで、さらには組織外へ

漏れ出てしまうことが考えられた。一方で蒸着法によりマトリックスを塗布した試料では、組織外でほとんどシグナルを検出できなかった。以上のことから、マトリックスの塗布法として長く利用されてきた手動塗布法は十分にシグナルを検出が可能であるものの、10 μm もの高解像度イメージングを行うに当たっては、組織中からの分子移動の可能性を考慮しなくてはならない。70%アセトニトリルと70%エタノールでの結果が異なったように、このような分子移動を抑制するには溶媒の選択も非常に重要になる。また最も正確に分子分布を可視化したのは蒸着法であることから、蒸着法が高解像度イメージングに適していることは確かである。今後も装置開発が進みMALDIのレーザー径がさらに収束されていくことを考えると、蒸着法が塗布法の中で主流になる可能性は大いに考えられる。

6. 質量分析イメージングの応用

6-1. 脂質 質量分析イメージングが最も威力を発揮してきたのは、脂質を対象とした解析においてである。2008年前後は装置に搭載されるレーザーの径が100 μm ほどであり、高解像度と呼べるようなイメージング解析を行うことができなかった。その頃はマウス脳全体等、比較的大きな組織構造を対象として解析が進められてきた。その中でマウス眼球中の網膜を対象とした解析は当時ではかなり微小の試料として扱われた。⁷⁾ 網膜は9層もの層構造を有し、生体にとっても非常に重要な器官を司る一部であり、加齢黄斑変性など網膜における疾患は大きな問題であり、最悪は失明の恐れさえある。マウス網膜の層構造は約200 μm ほどの幅があり、これを50 μm の解像度でイメージングを行った。ポジティブイオンモードで解析した結果、多くのシグナルはホスファチジルコリンであった。それらのシグナル1つ1つについて分布を調べたところ、その脂肪酸組成の違いにより異なる層に分布することが明らかになった。ただし、この脂肪酸組成の同定は簡単ではない事実がある。ポジティブイオンモードで脂質の多段階質量分析を行う際に、各リン脂質に特異的な断片化のパターンが観察されるのは事実である。しかし脂肪酸組成を示す断片化シグナルが検出され難いため、研究者の粘り強いデータ取得が必要となってくる。近年には海外の研究グループも網膜を対象とした研究を盛んに進めるようになり、

さらに高解像度のイメージング解析を導入し、またネガティブイオンモードを交えたリン脂質の網羅的な局在解析を進めるようになっていく。ネガティブイオンモードでの多段階質量分析は前述のポジティブイオンモードとは異なり、断片化した脂肪酸がそのままシグナルとして検出されるため、その脂肪酸組成を簡単に明らかにすることができる。近い将来、リン脂質の局在変動が及ぼす病理疾患への影響が本格的に議論されるようになると考えられる。

中性脂質のトリグリセリドはメタボリックシンドロームに代表される病態への関与が大きくとり上げられるようになり、近年では非常に注目されている脂質である。このトリグリセリドはマウス胎児の全身切片を解析した際に検出され、その脂肪酸組成が明らかにされた。⁸⁾ ホスファチジルコリンの解析では脂肪酸組成の同定が非常に困難であったが、トリグリセリドについては脂肪酸が外れた残りの構造がイオン化し易いことから、比較的簡単に同定することが可能であった。これらのシグナルでは1位と3位の脂肪酸が優先的に断片化し、2位の脂肪酸が断片化し難いという特徴が既に明らかにされている。これらのトリグリセリドは肝臓と褐色脂肪組織内に多く存在するという分布イメージが得られ、その貯蓄と合成への関与が示唆された。

6-2. タンパク質 MALDIによってタンパク質を検出することも可能である。しかしながら検出感度は脂質等と比較すると格段に落ち、また分子同定は非常に困難である。そこで組織切片上でトリプシン消化を行う手法が考えられてきた。組織上で還元アルキル化を行ったうえで均一にトリプシンを塗布し、8時間のインキュベーションを行う。この操作により組織上のタンパク質はペプチドとして断片化される。そこへマトリックスを塗布し、レーザー照射することによって m/z 1000から m/z 3000程度のイオンを検出することが可能になる。これらのシグナルについて多段階質量分析を行うことによってアミノ酸配列を示す断片化シグナルを検出することができ、MASCOTサーチへ情報を送ることによって同定結果が得られる。この手法を大腸がん組織の解析へ応用した。⁹⁾ その組織中のタンパク質を調べたところ、低、中、高と分化度の違いによって検出されるシグナルが異なった。すべてを同定するには至らなかったが、代表的なシグナルとしてヒス

トン H4 やアクチンが検出された。アクチンはすべての分化度の大腸がん組織に均等に存在し、ヒストン H4 は低分化度の大腸がん組織に多く存在することが明らかになった。このように大腸がんの進展に関与する分子が特定されたことから、そのタンパク質の合成と分解に関与する分子を他の手法を用いて調べることによって、その進展の詳細が明らかになる可能性がある。

6-3. 薬物 これまでの薬物動態解析にはラジオアイソトープが主に用いられてきた。そこには解析対象となる薬物や代謝物を検出するためのプローブを必要とすることで、莫大な予算を必要とする問題があった。質量分析イメージングの登場により、プローブを必要としない網羅的な解析が薬物動態解析へ応用されることが期待されている。筆者らはその応用として H2 ブロッカーとして知られるファモチジンの検出を試みた。¹⁰⁾ マウスに対してファモチジンを静脈から投与し、その全身切片を作製した。マトリックス塗布後に質量分析イメージングによって測定したところ、ファモチジンを示す m/z 338 のシグナルが腎臓を中心に存在することが明らかとなった。内因性分子が同じ m/z 値を示す可能性も大いに考えられる。そこで局在の確証を得るためにファモチジンのイオンを断片化させ、そのファモチジン特異的な断片化シグナルの局在を検証した。その結果、その分布イメージにおいても腎臓に存在することが示された。さらに腎臓内での高解像度イメージングを行ったところ、ファモチジンが腎盂に局在していることが示された。以上のように質量分析イメージングを用いることによって、その分布の詳細な情報を得ることができた。このような薬物動態解析への質量分析イメージングの応用は海外において特に活発に進められている。その背景には世界規模の製薬会社が積極的に共同研究を大学に持ちかけていることが窺え、現にそれらの研究者が発表した際の謝辞にはそれらの企業名が出されているという事実がある。今後、国内においても質量分析イメージングを採用する研究者が増えることにより、海外のような薬物動態研究の活発化が望まれるところである。

7. おわりに

質量分析イメージングが登場してから 10 年以上が経過した。その間に多くの研究者によって手法が

改良され、様々な分子の解析へ応用することが可能になってきている。そして今なおイオン化装置や質量分析計の開発も活発に進められ、その解像度や感度は向上する一方である。国内の研究機関においても装置を購入し、新たに質量分析イメージングを用いた解析を進めている機関が増えてきた。このような新しい分析技術の発展においては多分野の研究者の参入が不可欠であり、そこから多くの新しい技術や応用方法が生まれる可能性がある。そしてそれらの研究成果を積極的に外部配信することにより、質量分析イメージングの更なる発展が期待される。

謝辞 JST 研究成果展開事業（機器開発，実証実用化，ソフトウェア開発，開発成果の活用・普及促進）及び科学研究費補助金若手研究(B)の研究成果を発表したものです。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Setou M. "Imaging Mass Spectrometry—Protocols for Mass Microscopy," Springer, Tokyo, 2010.
- 2) Harada T., Yuba-Kubo A., Sugiura Y., Zaima N., Hayasaka T., Goto-Inoue N., Wakui M., Suematsu M., Takeshita K., Ogawa K., Yoshida Y., Setou M., *Anal. Chem.*, **81**, 9153–9157 (2009).
- 3) Hayasaka T., Goto-Inoue N., Zaima N., Shrivastava K., Kashiwagi Y., Yamamoto M., Nakamoto M., Setou M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 1446–1454 (2010).
- 4) Goto-Inoue N., Hayasaka T., Zaima N., Kashiwagi Y., Yamamoto M., Nakamoto M., Setou M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 1940–1943 (2010).
- 5) Shrivastava K., Hayasaka T., Sugiura Y., Setou M., *Anal. Chem.*, **83**, 7283–7289 (2011).
- 6) Hayasaka T., Goto-Inoue N., Masaki N., Ikegami K., Setou M., *Surf. Interface Anal.*, **46**, 1219–1222 (2014).
- 7) Hayasaka T., Goto-Inoue N., Sugiura Y., Zaima N., Nakanishi H., Ohishi K., Nakanishi S., Naito T., Taguchi R., Setou M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3415–3426 (2008).

-
- 8) Hayasaka T., Goto-Inoue N., Zaima N., Kimura Y., Setou M., *Lipids*, **44**, 837–848 (2009).
- 9) Morita Y., Ikegami K., Goto-Inoue N., Hayasaka T., Zaima N., Tanaka H., Uehara T., Setoguchi T., Sakaguchi T., Igarashi H., Sugimura H., Setou M., Konno H., *Cancer Sci.*, **101**, 267–273 (2010).
- 10) Saito Y., Hayasaka T., Onoue K., Takizawa Y., Kajihara S., Ogawa K., Setou M., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **59**, 79–84 (2011).