

レーザー脱離イオン化を用いた投影型質量顕微鏡の開発

間 久直・栗津 邦男

Development of a Stigmatic Mass Microscope Using Laser Desorption/Ionization

Hisanao HAZAMA and Kunio AWAZU

A novel stigmatic mass microscope using laser desorption/ionization and a multi-turn time-of-flight mass spectrometer, MULTUM-IMG, has been developed. The estimated spatial resolution was about 3 μm in the linear mode with a 20-fold ion optical magnification. Section of an eye of a mouse stained with dyes were observed in the linear mode, and the stigmatic ion images of dyes agreed well with the optical photomicrographs of the same section.

Key words: mass spectrometry imaging, stigmatic mass microscope, laser desorption/ionization, multi-turn time-of-flight mass spectrometer

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) を用いた一般的な質量分析イメージング (mass spectrometry imaging; MSI) は、集光したレーザーを試料上で走査しながら各点における質量スペクトルを順次測定し、それらの質量スペクトルを統合して各質量電荷比におけるイオン信号強度の空間分布を画像化するものである。MSIが広く行われるようになる前から用いられていた質量分析装置をほぼそのまま使用できる反面、精細なイメージを得るためには膨大な点数を走査する必要があるため、測定に数～数10時間を要するという問題がある。現在では市販の装置でも10～100 μm 程度の空間分解能が得られているが、細胞スケールのイメージングは困難であり、現状では組織スケールでのイメージングにのみ利用されている。

これに対して、近年、試料全面に均一な強度分布でレーザーを照射して試料をイオン化させる投影型MSIが提案されている¹⁻⁵⁾。投影型MSIでは、生成したイオンの空間分布を静電イオンレンズで拡大し、イオンの位置と飛行時間の両者を同時に測定できる検出器に投影して測定する。走査型と異なり空間分解能がレーザーの集光径に制約されないため、空間分解能の向上が期待でき、多くの点を走査する必要がないため、短時間での測定が可能である。投影

型MSIでは装置や分析手法に関する開発要素が多く、まだ実用レベルに達しているとはいえず、世界的にも数グループから研究結果が報告されているのみである。しかし、投影型MSIによる高速かつ高空間分解能でのイメージングは、薬物動態測定の高速度による新薬開発の期間短縮やコスト削減をはじめとし、さまざまな分野での応用が期待されており、実用化へ向けた開発が進められている。本稿では、筆者らが開発を進めている投影型MSI装置 (質量顕微鏡) の概略を述べる。

1. 投影型質量顕微鏡

図1に投影型質量顕微鏡の概略図を示す。QスイッチNd:YAGレーザー (SLMQ1S-10, Spectron Laser Systems Ltd., England) の第三高調波 (波長355 nm) を試料プレートに対して入射角20°、ビーム直径約0.8 mm、繰り返し周波数10 Hzで照射して試料をイオン化させる。生成したイオンはイオン源内で20 kVの高電圧で加速され、試料プレート表面におけるイオンの空間分布がアインツェルレンズによって拡大され、マイクロチャンネルプレート (micro-channel plate; MCP) と蛍光板を組み合わせたイオン検出器 (F2223-21PGFX, Hamamatsu Photonics K. K., Japan) のMCP表面に結像させられている。MCP表面におけるイオ

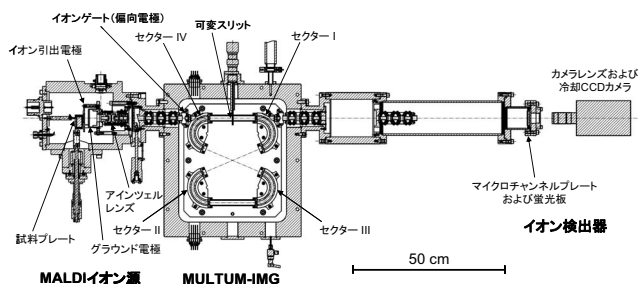


図1 レーザー脱離イオン化を用いた投影型質量顕微鏡の概略図。

ンの空間分布を蛍光板で光に変換し、カメラレンズ (MLM-3XMP, CBC Co., Ltd., Japan) と冷却 CCD カメラ (Cool SNAP HQ², Roper Scientific, Inc., USA) で撮影している。MCP に接続された高周波通過フィルター、およびデジタルオシロスコープ (WaveMaster 8600A, LeCroy, USA) で MCP 全面にわたって平均された飛行時間スペクトルを測定している。投影型 MSI を行うにはイオンの位置と飛行時間の両者を同時に測定できる検出器が必要となるが、現状では筆者らの知る限り投影型 MSI に対して十分な位置分解能と時間分解能とを兼ね備えたイオン検出器が存在しない。このため、ここで使用しているイオン検出器はあらゆる質量のイオンを積算したイオン像、またはイオンゲートで選択した特定の質量のイオンに対するイオン像のみしか測定することができない。本稿で示す実験結果では、イオンゲートを用いずに、あらゆる質量のイオンを積算したイオン像を示している。

多重周回飛行時間型質量分析計 MULTUM-IMG は大阪大学で独自に開発された装置であり、4つの扇形電極を用いて8の字型の周回軌道を構成している³⁻⁶。MULTUM-IMG のイオン光学系は完全空間・時間収束条件を満たしているため、MULTUM-IMG 内でのイオンの周回数を増やすことでイオンの空間分布を保持したまま質量分解能を高くすることができる。筆者らは MULTUM-IMG を用いてペプチド (angiotensin II) のプロトン付加イオン (m/z 1046.5) を測定し、MULTUM-IMG を 500 周した後に質量分解能 $m/\Delta m \sim 130000$ を得ることに成功した⁴⁾。ここで、 m および Δm は質量数および質量スペクトルにおけるピークの半値全幅である。試料プレートから MCP までの直線飛行距離は 1.46 m、MULTUM-IMG 内多重周回部の飛行距離は 1 周あたり 1.308 m である。

2. 材料と方法

開発した投影型質量顕微鏡の性能を評価するために、まず、マトリックスを用いずに紫外レーザー照射のみでイオン化させることができる色素を用いて作製した人工的なパ

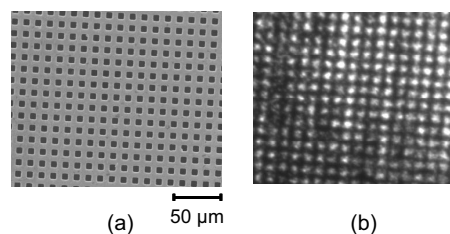


図2 ピッチ 12.7 μm のメッシュを (a) 走査型電子顕微鏡、および (b) 投影型質量顕微鏡で観察した結果。

ターンを観察した。クリスタルバイオレット (crystal violet; CV) の水溶液 2 μL をステンレス製の試料プレート上に滴下し、乾燥させた。その上にピッチ 12.7 μm 、線幅 5 μm のニッケル製メッシュ (G2000HS, Gilder Grids, England) をマスクとして貼り付けたものを試料とした。

また、麻酔下のマウス (C57BL/6J, 6 週齢) から眼球を摘出し、粉末状のドライアイスで速やかに凍結させ、 -80°C で保管した。その後、眼球をクライオマイクローム (CM1850, Leica Microsystems, Germany) を用いて -20°C で厚さ 2 μm の切片にし、ITO (indium tin oxide) による透明な導電性コーティングを施したスライドガラスに貼り付けた。70% エタノール水溶液に CV とメチレンブルー (methylene blue; MB) をおのおの 0.5wt% で溶解させた溶液で切片を染色し、蒸留水で洗浄した後、イオンパターン (E-1010, Hitachi High-Technologies Corp., Japan) を用いて、金で厚さ 4~8 nm のコーティングを行った。本実験は大阪大学動物実験委員会の承認を得ており、大阪大学動物実験規程に準じて実施した。

3. 結果と考察

図 2 (a) に走査型電子顕微鏡 (JCM-5700, JEOL Ltd., Japan) で観察したメッシュの像を、図 2 (b) に同メッシュを用いた試料を投影型質量顕微鏡の多重周回部を周回させないリニアモードで観察して得られたイオン像を示す。ここでは CV から Cl^- が解離して生成した正イオン [$\text{CV} - \text{Cl}$]⁺ が検出されている。イオン光学系の拡大倍率は約 20 倍で、メッシュのパターンが明瞭に観察されている。イオン像内におけるメッシュのエッジ部分においてイオン信号強度が最大値の 20% から 80% に変化するまでの距離を用いて空間分解能を評価した結果、空間分解能は約 3 μm と求められた。

図 3 は CV と MB で染色したマウス眼球切片内における角膜を同様の条件で観察した結果である。図 3 (c) の通り、CV および MB から Cl^- が解離して生成したイオンが検出されているが、CV 由来のイオンのみが強く検出された。図 3 (b) より、投影型 MSI によって角膜組織内の微

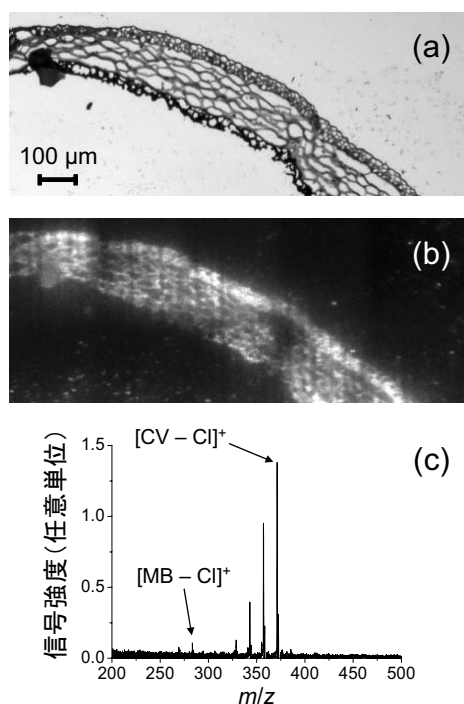


図3 色素染色したマウス角膜切片を (a) 光学顕微鏡, および (b) 質量顕微鏡で観察した結果と, 同切片から得られた (c) 質量スペクトル.

細構造が μm オーダーの空間分解能で観察できていることがわかる. 今回の条件における観察視野は直径約 $400 \mu\text{m}$ の円形の領域であるが, 図3 (b) は試料を一定の間隔 $250 \mu\text{m}$ で移動させて各位置でのイオン像を10枚 (= 5×2 枚) 測定し, つなぎ合わせたものである. 1回の測定でのCCDカメラの露光時間を10 s (100 レーザーパルス) としているため, 10枚のイオン像は約2分で測定できることになる. 本実験で使用したレーザーはフラッシュランプ励起のため繰り返し周波数が10 Hzであったが, 近年では繰り返し周波数1 kHz以上の半導体レーザー励起固体レーザーを容易に利用できる. 繰り返し周波数1 kHzのレーザーを用いると仮定すると, 10枚のイオン像の測定に要する時間は約1 sまで短縮できると考えられる. 一方, 同じ $1.25 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$ の領域を走査型MSI装置で測定すると, 約11分間を要することになる. ここでは, 走査のピッチ, 各点でのレーザー照射回数, および繰り返し周波数をそれぞれ $10 \mu\text{m}$, 100ショット, 1 kHzと仮定した⁵⁾.

MALDI イオン源と多重周回飛行時間型質量分析計MULTUM-IMGを組み合わせた投影型質量顕微鏡の概要

について述べた. 空間分解能は約 $3 \mu\text{m}$ と推定され, 人工的なパターンだけではなく, 色素で染色した生体組織切片からも試料の光学顕微鏡像と一致するイオン像を得ることができた. 本稿では誌面の都合から割愛したが, MULTUM-IMG 周回後もイオン像を保持したまま質量分解能が向上することが確認できている⁵⁾. 現状のイオン検出器ではあらゆる質量のイオンを積算したイオン像, またはイオンゲートで選択した特定の質量のイオンに対するイオン像のみしか測定することができないため, さまざまな分子に対するイオン像を同時に測定することはできない. しかしながら, 観察対象となる分子が明確であり, その分子の空間分布を非標識で迅速に観察したいというような用途には, 十分適用可能である. 例えば, 生体内における薬剤分子の動態を高空間分解能, かつ高スループットで測定したい場合などには, 投影型質量顕微鏡が有効な手段であると考えられる.

本開発は光産業創成大学院大学の内藤康秀准教授, 大阪大学大学院理学研究科の豊田岐聡教授, 青木順助教, 公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機化学研究所の益田勝吉主席研究員, および大阪工業大学情報科学部の藤井研一教授との共同で, JST, CRESTの支援により実施したものである.

文 献

- 1) S. L. Luxemburg, T. H. Mize, L. A. McDonnell and R. M. A. Heeren: "High-spatial resolution mass spectrometric imaging of peptide and protein distributions on a surface," *Anal. Chem.*, **76** (2004) 5339-5344.
- 2) A. F. M. Altelaar, S. L. Luxembourg, L. A. McDonnell, S. R. Piersma and R. M. A. Heeren: "Imaging mass spectrometry at cellular length scales," *Nat. Protoc.*, **2** (2007) 1185-1196.
- 3) 間 久直, 粟津邦男: "レーザー脱離イオン化技術を用いた顕微イメージング質量分析", *応用物理*, **77** (2008) 1425-1430.
- 4) H. Hazama, J. Aoki, H. Nagao, R. Suzuki, T. Tashima, K. Fujii, K. Masuda, K. Awazu, M. Toyoda and Y. Naito: "Construction of a novel stigmatic MALDI imaging mass spectrometer," *Appl. Surf. Sci.*, **255** (2008) 1257-1263.
- 5) H. Hazama, H. Yoshimura, J. Aoki, H. Nagao, M. Toyoda, K. Masuda, K. Fujii, T. Tashima, Y. Naito and K. Awazu: "Development of a stigmatic mass microscope using laser desorption/ionization and a multi-turn time-of-flight mass spectrometer," *J. Biomed. Opt.*, **16** (2011) 046007.
- 6) 豊田岐聡, 新間秀一, 青木 順, 石原盛男: "マルチターン飛行時間型質量分析計", *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **60** (2012) 87-102.

(2013年7月16日受理)