

# 投影型イメージング質量分析装置の開発

技術解説

間 久直\*, 粟津 邦男\*\*

Development of a stigmatic imaging mass spectrometer

Key Words : Imaging mass spectrometry, Mass microscope, Stigmatic imaging mass spectrometry, Matrix-assisted laser desorption/ionization, Multi-turn time-of-flight mass spectrometer

## 1. はじめに

生体内には核酸、タンパク質、糖、脂質など様々な分子が存在しており、これらの分子が相互作用することで生命活動が営まれている。これまで、生命活動の理解のためにDNA (Deoxyribonucleic Acid) の塩基配列を網羅的に解析するゲノム解析や、タンパク質を網羅的に解析するプロテオーム解析が盛んに行われてきた。近年では、これらに加えて、代謝物質の網羅的解析であるメタボローム解析が重要視されてきている。そして、病理研究や創薬など様々な分野において、生体内におけるタンパク質や代謝物質など様々な分子、およびそこへ導入された薬剤分子などの空間分布を網羅的かつ細胞スケールの高空間分解能で測定する技術が求められている。光学顕微鏡では試料の形状を観察することはできるが、試料の組成や化学構造に関する情報を得ることはで

きない。光学顕微鏡で特定の分子の分布を観察するために免疫染色が広く用いられているが、免疫染色では予め予想される物質のみしか観察することができず、その物質が周囲のどのような物質と相互作用しているかを網羅的に調べることはできない。

そこで、近年、質量分析による成分分析に成分毎の空間分布を測定する機能を付加したイメージング質量分析 (Imaging Mass Spectrometry; IMS) の研究が盛んに行われている<sup>1,2)</sup>。図1にIMSの概念図を示す。IMSは質量で分離した物質毎の空間分布を同時に測定するものであり、予め想定される物質だけではなく、イオン化が可能であれば存在する全ての物質を網羅的に検出することができるため、プロテオーム解析やメタボローム解析などの研究に適したイメージング手法と言える。

また、創薬における薬物動態の評価には<sup>14</sup>Cなどの放射性同位体で標識した薬剤候補化合物をラットなどの動物に投与し、その動物から採取した組織切片の内部における標識化合物の分布を放射線写真法 (オートラジオグラフィ) で撮影する手法が一般的に用いられている<sup>3)</sup>。しかし、放射性同位体による標識化合物の合成には多額の費用や時間を



\*Hisanao HAZAMA

1972年8月生  
東京理科大学大学院理工学研究科電気工学専攻修了 (2001年)  
現在、大阪大学 大学院工学研究科 附属高度人材育成センター 助教 工学博士 レーザー医工学  
TEL : 06-6879-4735  
FAX : 06-6879-7363  
E-mail : hazama@wakate.frc.eng.osaka-u.ac.jp



\*\*Kunio AWAZU

1958年11月生  
神戸大学大学院工学研究科システム工学専攻修了 (1984年)  
現在、大阪大学 大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 教授 工学博士・医学博士 レーザー医工学  
TEL : 06-6879-7885  
FAX : 06-6879-7363  
E-mail : awazu@see.eng.osaka-u.ac.jp

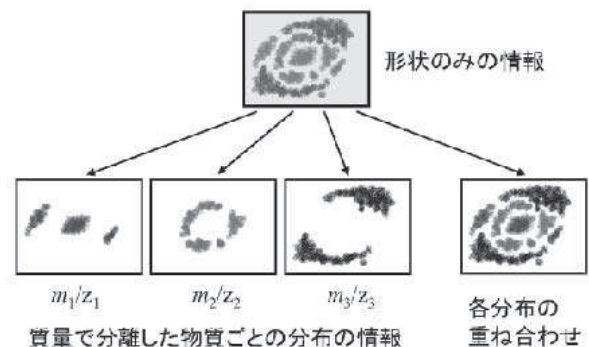


図1. イメージング質量分析の概念図。 $z_1, z_2, z_3$  はそれぞれ質量  $m_1, m_2, m_3$  のイオンの電荷数である。

要するため、非常に限られた化合物のみにしか適用できず、放射性同位体による標識を行うこと自体が困難な化合物もある。さらに、放射線写真法では薬剤分子そのもの（未変化体）と薬剤分子の代謝産物（変化体）とを区別できないことや、放射線写真の撮影には最低でも一日を要することなどが問題となっている。IMS では放射性同位体などによる標識が不要で、薬剤の未変化体と変化体の識別が可能であることに加え、放射線写真法よりも短時間で測定が期待できるため、近年ではIMS を用いた薬物動態測定の研究も活発に行われるようになっている<sup>4)</sup>。

## 2. IMS の手法 — 走査型と投影型 —

質量分析を行うためには試料をイオン化させることが必要であり、試料の性質に応じて様々なイオン化法が用いられているが、ペプチド、タンパク質や薬剤分子などに対するIMS で現在最も広く使用されているイオン化法はマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization; MALDI) である<sup>5)</sup>。質量分離にも様々な手法があるが、タンパク質などの高分子の分析には、イオンの損失が少ないために高感度であり、原理上は測定可能な質量に上限が無い飛行時間型質量分析 (Time-of-Flight Mass Spectrometry; TOFMS) が適している。MALDI-TOFMS を用いたIMS の手法としては図2 に示したように走査型と投影型の二種があり、以下にそれぞれの特徴を述べる。

走査型IMS とは、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、それらの結果から各  $m/z$  におけるイオン信号強度の空間分布を画像として構築するものである。IMS が広く行われるようになる以前から用いられていた MALDI-TOFMS 装置をほぼそのまま使用できるため、現在 MALDI-TOFMS を用いて行われているIMS のほとんどは走査型である。現在では市販の装置でも  $10 \sim 100 \mu\text{m}$  程度の空間分解能が得られており、測定の自動化も行われている。また、マウスの脳を  $200 \mu\text{m}$  間隔で多数の切片に分割し、各切片毎にIMS を行った結果を統合して、3次元でのIMS を行った例もある<sup>6,7)</sup>。

実際の測定例として、市販の MALDI-TOFMS 装置 (Voyager-DE PRO, AB SCIEX, USA) を用い、走査型IMS によってマウス脳切片内の脂質の分布を測定した結果を図3 に示す<sup>8)</sup>。同じ脂質であっても種類が異なると生体組織内での分布が全く異なることがわかる。

しかし、走査型IMS で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〜数十時間を要するという問題がある。さらに、走査型IMS の空間分解能はレーザーの集光径によって制限されるため、 $10 \mu\text{m}$  程度が限界となる。細胞の大きさは  $10 \sim 10 \mu\text{m}$  程度のもので多いため、走査型 MALDI-IMS は組織スケールでの分析にのみ利用されている。

これに対して、試料全面に均一な強度分布でレーザーを照射してイオン化させ、生成したイオンの空間分布を静電イオンレンズによって拡大し、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する、投影型IMS (図2(b)) が提案されて

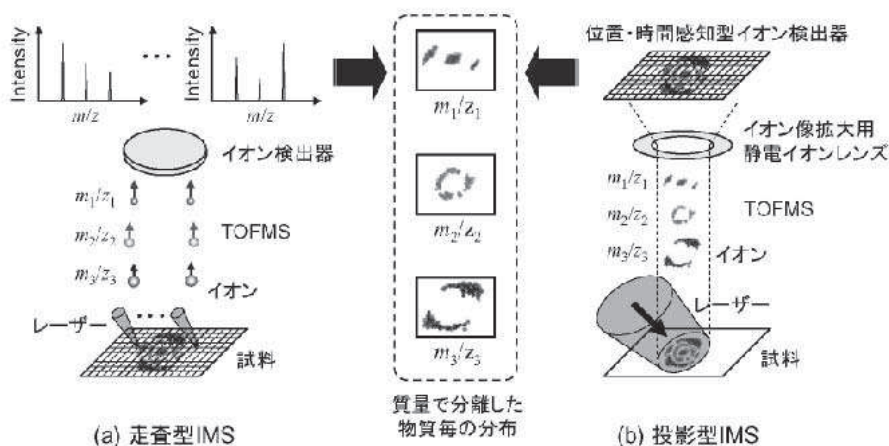


図2. MALDI-TOFMS を用いたイメージング質量分析における測定手法

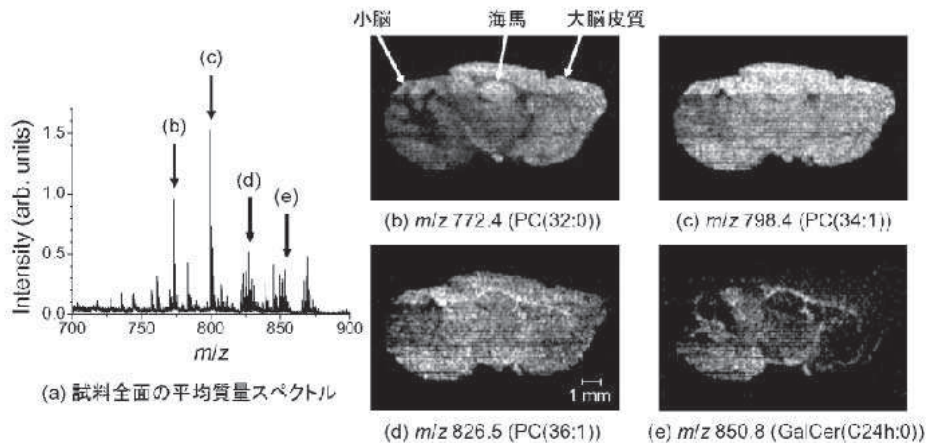


図3. MALDI-TOFMSを用いた走査型イメージング質量分析によってマウス脳切片内の脂質の分布を測定した結果の例<sup>8)</sup>。ただし、PCはPhosphatidylcholine, GalCerはGalactosylceramideを表す。マトリックスには2,5-ジヒドロキシ安息香酸、イオン化には窒素レーザーを用いた。(b-e)の各イオンは脂質分子にカリウムイオン( $K^+$ )が付加した1価の正イオンとして検出されている。

いる<sup>8-14)</sup>。空間分解能がレーザーの集光径に制約されないため、イオン光学系の倍率を高めることで空間分解能を向上させることができる。さらに、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。ただし、走査型IMSが従来のMALDI-TOFMS装置をそのまま使用できるのに対して、投影型IMSでは装置や分析手法に関する開発要素が多く、未だ実用レベルに達しているとは言えず、世界的に見て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。しかしながら、投影型IMS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化による新薬開発の期間短縮やコスト削減、病院における迅速な病理診断などへ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。

MALDIでIMSを行う際は試料表面にスプレーでマトリックス溶液を噴霧するなどの手法が用いられているが、一般にマトリックス結晶は不均一になりやすく、イメージングの際に信号強度の不均一さや空間分解能の低下につながる。そこで、マトリックスの代わりに直径数nmの微粒子を用いるナノ粒子支援レーザー脱離イオン化(Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization; nano-PALDI)が提案されている<sup>15,16)</sup>。Tairaらはnano-PALDIを用いてラットの小脳に対して走査型IMSを行い、空間分解能 $15\mu\text{m}$ を達成している<sup>15)</sup>。

### 3. 投影型IMS実験装置

以下に筆者らが開発した投影型IMS装置の概要、および同装置での実験結果について述べる。

図4はMALDIイオン源、および多重周回飛行時間型質量分析計を備えた投影型IMS装置の概略図である。 $Q$ スイッチNd:YAGレーザー(SLMQ1S-10, Spectron Laser Systems Ltd., Warwickshire, England)の第3高調波(波長355nm)をイオン源内に入射し、サンプルプレートに対して入射角 $20^\circ$ 、ビーム直径約0.8mm、繰り返し周波数10Hzで照射して試料をイオン化させた。生成したイオンはイオン源内で加速され、サンプルプレート表面におけるイオンの空間分布をアインツェルレンズによって拡大し、マイクロチャンネルプレート(microchannel 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., Shizuoka, Japan)のMCP表面に結像させた。MCP表面におけるイオンの空間分布を蛍光板における蛍光強度分布に変換し、カメラレンズ(MLM-3XMP, CBC Co., Ltd., Tokyo, Japan)、および冷却CCDカメラ(CoolSNAP HQ<sup>2</sup>, Roper Scientific, Inc., Tucson, AZ, USA)で撮影した。MCPに接続された高周波デカップラー、およびデジタルオシロスコープ(WaveMaster 8600A, LeCroy, Chestnut Ridge, NY, USA)を用いてMCP全面に渡って平均された飛行時間スペクトルを測定した。

イオン源内の加速領域はサンプルプレート、引出

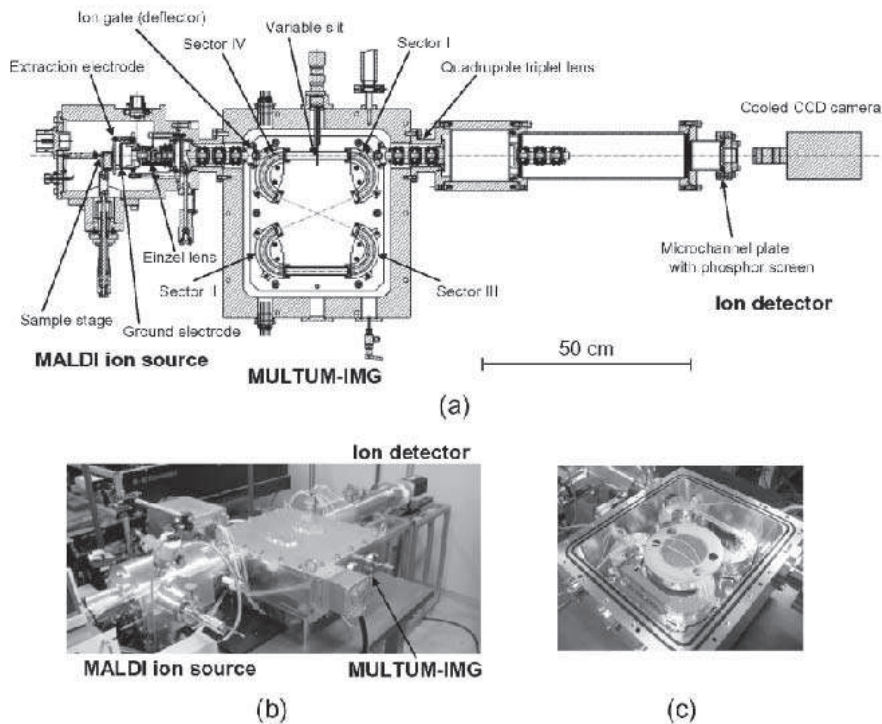


図4. 投影型イメージング質量分析装置の (a) 概略図と (b) 外観写真、および (c) MULTUM-IMG の内部写真

電極、およびグラウンド電極で構成され、引き出し電極、およびグラウンド電極には中心に直径4 mmの円形開口を持つ平板電極を用いた。サンプルプレートと引出電極との間隔は2.5 mm、引出電極とグラウンド電極との間隔は17 mmとした。サンプルプレートには最大20 kVの加速電圧を印加した。

多重周回飛行時間型質量分析計 MULTUM-IMG は大阪大学で開発されたもので、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<sup>17,18)</sup>。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おり、周回の前後でイオンの空間分布と時間的な分散が等しくなる。このため、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。我々は、MULTUM-IMGを用いてペプチドのイオン (angiotensin II,  $m/z$  1046.5) を測定し、MULTUM-IMGを500周した後に質量分解能  $m/\Delta m \sim 130,000$  を得ることに成功した<sup>13)</sup>。ここで、 $m$  および  $\Delta m$  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。MALDI イオン源から MLUTUM-IMG にイオンを導入する際は、セクター I へ電圧を印加し、セクター IV への印加電圧を遮断する。セクター II、およびセクター III

へは常に電圧を印加しておく。MLUTUM-IMG へのイオンの導入が終わった後にセクター IV に電圧を印加するとイオンは8の字型の閉軌道内を周回する。セクター I へ印加した電圧を遮断する時間を制御することで、MLUTUM-IMG 内におけるイオンの周回数を任意に制御することができる。また、本装置はセクター I およびセクター IV へ印加する電圧を常に遮断しておくことで、直線飛行型の質量分析計として用いることもできる (リニアモード)。セクター IV に隣接して設置された偏向電極に高電圧パルス印加する時間を制御することで、特定の飛行時間のイオンのみを通過させるイオンゲートとして用いた。

サンプルプレートから MCP までの直線飛行距離は1.46 m または 0.96 m で、MULTUM-IMG 内多重周回部の飛行距離は1周あたり 1.308 m であった。イオン源、および MULTUM-IMG 内の圧力は  $3 \times 10^{-5}$  Pa であった。Nd:YAG レーザー、セクター I、セクター IV、イオンゲート、およびオシロスコープへ入力するためのトリガ信号はデジタルパルス発生器 (Model 555, Berkeley Nucleonics, Richmond, CA, USA) を用いて発生させた。

## 4. 材料と方法

### 4. 1 人工的なパターン

開発した投影型IMS装置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を照射するのみでイオン化させることができる色素を用いて作成した人工的なパターンを観察した。クリスタルバイオレット (crystal violet; CV) の水溶液  $2\mu\text{L}$  をステンレス製のサンプルプレート上に滴下し、乾燥させた。その上にピッチ  $12.7\mu\text{m}$ 、線幅  $5\mu\text{m}$  のニッケル製メッシュ (G2000HS, Gilder Grids, Lincolnshire, England) をマスクとして貼り付けたものを試料として用いた。

また、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上に直径  $5-100\mu\text{m}$ 、ピッチ  $10-150\mu\text{m}$  で色素の微小液滴を用いて描いたマイクロドットパターンも使用した。まず、微小液滴塗布装置を用いてローダミンB水溶液で直径  $5\mu\text{m}$ 、ピッチ  $10\mu\text{m}$  のマイクロドットパターンを作成した<sup>19,20)</sup>。さらに、針状プローブ接触法を用いてCV、およびメチレンブルー (methylene blue; MB) で直径  $15-100\mu\text{m}$ 、ピッチ  $15-150\mu\text{m}$  のマイクロドットパターンを作成した<sup>21)</sup>。

### 4. 2 生体試料

ジエチルエーテルによる麻酔下でマウス (C57BL/6J、6週齢) から脳、および眼球を摘出し、粉末状のドライアイスで速やかに凍結させ、 $-80^\circ\text{C}$  で保管した。その後、脳、および眼球をクライオマイクローム (CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて $-20^\circ\text{C}$  で厚さ  $10\mu\text{m}$  の切片にし、ITOコート付きの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MBを各々0.5wt%で溶解させた溶液で各切片を染色し、蒸留水で洗浄した。染色後、イオンビームスパッター (E-1010, Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan) を用いて、金で厚さ  $8\text{nm}$  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。

## 5. 結果と考察

### 5. 1 リニアモードでの人工的なパターンの観察

図5は走査型電子顕微鏡 (JCM-5700, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) で観察したメッシュ、および投影型

IMS装置のリニアモードで観察したイオン像である。ここでは、CVから $\text{Cl}^-$ 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。図5(c)に示したイオン信号強度プロファイルより、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 $3\mu\text{m}$ と求められた。

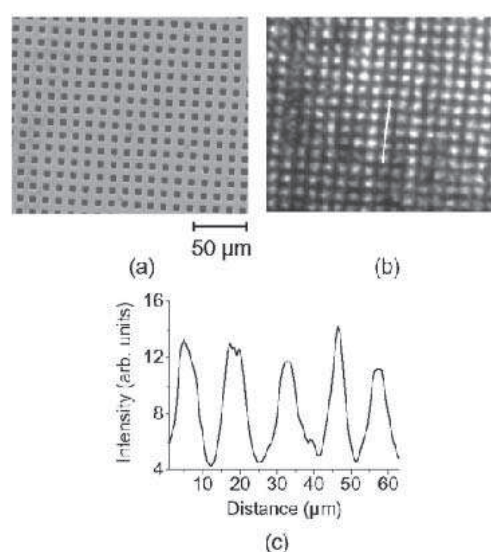


図5. (a) メッシュの走査型電子顕微鏡像、(b) CV溶液を滴下して乾燥させた上にメッシュでマスクした試料から得られたイオン像、および(c) イオン像内の白線上におけるイオン信号強度プロファイル。

図6はローダミンBで作成したマイクロドットパターンを投影型IMS装置によって観察した結果である。光学顕微鏡像と形状が一致したイオン像が得られており、直径 $5\mu\text{m}$ 、ピッチ $10\mu\text{m}$ のドットパターンがはっきりと分解されて観察できていることがわかる。

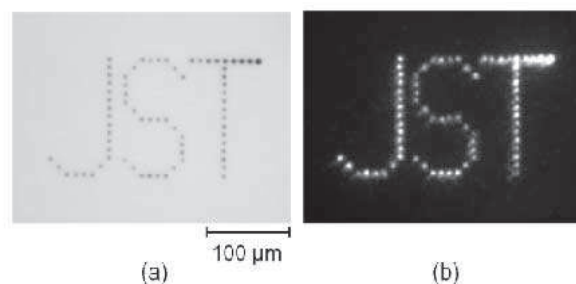


図6. (a) ローダミンBで作成したマイクロドットパターンの光学顕微鏡像、および(b) イオン像。

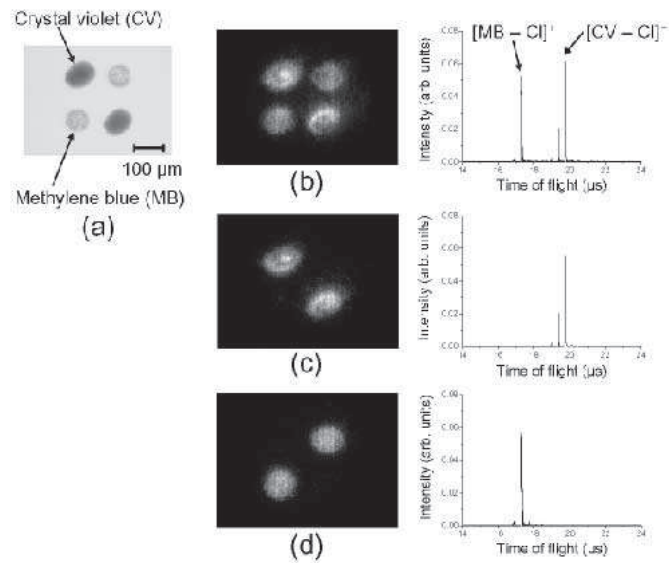


図7. (a) CVとMBで作成したマイクロドットパターン (a) 光学顕微鏡像と、(b-d) 同試料から得られたイオン像、および飛行時間スペクトル。(b) CVとMBの両者のイオンを検出した場合、およびイオンゲートで(c) CVのみ、(d) MBのみのイオンを通過させた場合。

一方、図7はCVとMBで作成したマイクロドットパターンを投影型IMS装置で観察した結果である。イオンゲートを用いずにCVとMBの両イオンを観察すると4つのドットが観察されているが、イオンゲートを用いてCV、またはMBの一方のみのイオンを通過させると、イオン像においても飛行時間スペクトルにおいてもイオンゲートで通過させた色素のイオンのみが検出されていることがわかる。したがって、投影型IMS装置によってイオンの空間分布を観察できているだけではなく、イオンの空間分布を飛行時間、すなわち、質量電荷比に応じて分離して観察できていることがわかる。

### 5. 2 MULTUM-IMG 周回後の人工的パターンの観察

図8はCVで作成したマイクロドットパターンをリニアモード、およびMULTUM-IMGでの周回後に観察した結果である。ただし、ここでは、アイントゥエルレンズに加えて四重極レンズを用いており、イオン光学系の倍率は約10倍であった。リニアモードではマイクロドットパターンの像がはっきりと得られており、周回後も若干の歪みはあるが、マイクロドットパターンの像が観察できていることがわかる。ただし、多重周回部のイオン光学系は周回前後の結像倍率が-1であるため、1周毎に像の上下左右が反転している。CVのイオン $[CV - Cl]^+$  ( $m/z$  372.2) に対する質量分解能 $m/\Delta m$ はリニアモード

では150であったが、MULTUM-IMG内を10周させることで2,000まで向上させることができた。

本実験で使用した加速電圧5kVの場合、扇形電極内の外側、および内側の円筒面電極に印加する電圧は、理論上はそれぞれ1kV、および-1kVである。しかし、これらの電圧を各円筒面電極に印加した場合は周回後のイオン像を観察することができなかった。このため、各円筒面電極に印加する電圧は、周回後のイオン像の歪みが最も小さくなるように個別に最適化されており、理論値と最適化後の電圧との差は最大で10%程度であった。表面電荷法を用いた3次元でのイオン軌道シミュレーション<sup>22)</sup>を実施した結果、理論値と最適化後の電圧との違いは、イオン源内の電極とMULTUM-IMG内の電極との相対位置の精度が不十分であるためであることがわかった。

### 5. 3 リニアモードでの生体試料の観察

図9はCVとMBで染色した脳切片をリニアモード、イオン光学系倍率約20倍で観察した結果である。図9(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おり、脂質、ペプチド、タンパク質などの生体由来のイオンは検出されていない。イオン光学系倍率約20倍の場合、1回の測定で観察できる視野は直径約400  $\mu m$ の円形の領域である。図9(b)は、より広い領域を観察するために試料を一定の間隔250  $\mu m$ で移動させて各位

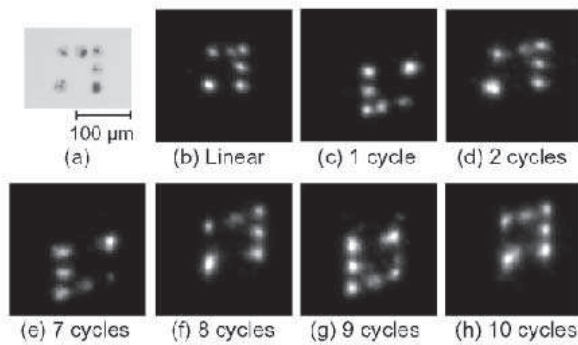


図8. (a) CVで作成したマイクロドットパターンの光学顕微鏡像、(b) リニアモードでのイオン像、および(c-h) MULTUM-IMG内を周回させた後のイオン像。

置でのイオン像を78枚 (= 13 × 6枚) 測定し、つなぎ合わせたもので、各画像の継ぎ目が滑らかなように画像処理を行っている。このようにして得た3.25 mm × 1.5 mmの領域におけるイオン像では、同じ領域における試料の光学顕微鏡像と一致した海馬の形状が明瞭に得られている。

図10はCVとMBで染色した網膜切片をリニアモード、イオン光学系倍率約20倍で観察した結果である。この場合も試料の光学顕微鏡像と一致した形状のイオン像が得られており、網膜内の層構造を観察することができている。

ここで、生体試料の観察においては、試料表面に金でコーティングを行わないと光学顕微鏡像と相関を持つようなイオン像を得ることができなかった。これは、試料表面に蓄積した電荷によって試料の電位が変化することによりイオン像が乱されたためと考えられる<sup>10)</sup>。イオンゲートを用いてCV、またはMBの一方のみのイオン像を観察した結果、どちらも有意な差は見られなかった。

図9の測定では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、78枚のイオン像は約13分で測定できることになる。本実験で使用したNd:YAG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以上の固体レーザーを容易に利用できる。このため、繰り返し周波数1 kHzのレーザーを用いると仮定すると、78枚のイオン像を測定するために要する時間は約10 sまで短縮できると考えられる。一方、同じ3.25 mm × 1.5 mmの領域を最新の市販走査型IMS装置で測定しても、約1.4時間を要することになる。こ

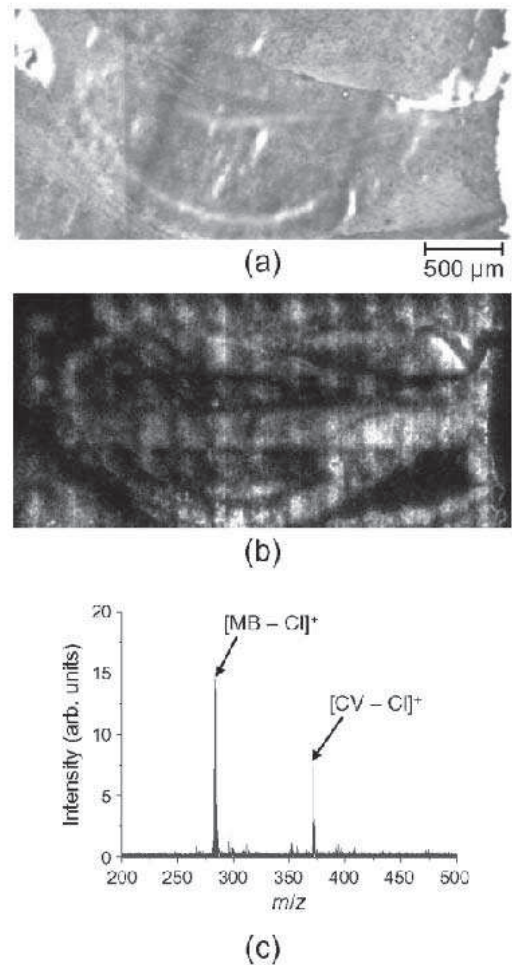


図9. (a) CV、およびMBで染色したマウス脳切片の光学顕微鏡像、(b) 同試料から得られたCVとMBのイオン像78枚を結合させたイオン像、および(c) 同試料から得られた質量スペクトル。

こで、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 μm、100ショット、1 kHzと仮定した<sup>1,2)</sup>。したがって、本研究で開発した投影型IMS装置は高空間分解能で高スループットのIMSに適していると考えられる。

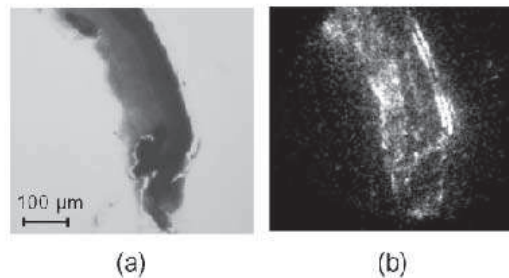


図10. (a) CV、およびMBで染色したマウス網膜切片の光学顕微鏡像、および(b) 同試料から得られたCVとMBのイオン像。

## 6. まとめ

本研究では、MALDI イオン源、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 IMS 装置の開発を行った。CV をピッチ 12.7  $\mu\text{m}$  のメッシュで覆った試料、およびローダミン B で作成した直径 5  $\mu\text{m}$ 、ピッチ 10  $\mu\text{m}$  のマイクロドットパターンのイオン像をリニアモードで明瞭に得ることに成功した。メッシュパターンのイオン像から、空間分解能は約 3  $\mu\text{m}$  と推定された。投影型 IMS 装置においてもイオン像を飛行時間、すなわち質量電荷比に応じて分離して測定することができることが確認された。さらに、CV で作成したマイクロドットパターンを MULTUM-IMG 内で周回させた後に観察した結果、MULTUM-IMG 内で 10 周させた後もマイクロドットパターンの像が保持されていることがわかった。CV 由来のイオン [CV-Cl]<sup>+</sup> ( $m/z$  372.2) に対する質量分解能  $m/\Delta m$  はリニアモードでは 150 であったが、MULTUM-IMG 内で 10 周させたことで 2,000 まで向上させることができた。また、CV と MB で染色したマウスの海馬、および網膜をリニアモードで観察した結果、同一試料の光学顕微鏡像と一致するイオン像を得ることに成功した。本研究で開発した投影型 IMS 装置は高空間分解能で高スループットの IMS に適していると考えられる。

本稿で述べた投影型 IMS の実験ではマトリックスを用いずに測定を行ったが、今後は、MALDI や nano-PALDI を用いて脂質、ペプチド、タンパク質などの生体分子や、生体内に投与された薬剤分子などの観察を行っていく予定である。また、今回使用したイオン検出器は全てのイオンを合計したイオン像、あるいはイオンゲートで選択した特定の分子に対するイオン像のみしか測定することができない。このため、ディレイライン検出器<sup>23)</sup>を用いることなどにより、イオンの位置と飛行時間の両者を同時に測定可能なイオン検出器の開発を行う予定である。

## 謝辞

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准教授、公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機科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、科学技術振興機

構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 (CREST) の支援により実施したものである。色素ドット試料を作成していただいた田嶋敏男博士、イオン光学系の数値解析を行っていただいた青木順博士、実験に協力していただいた長尾博文氏、鈴木れん氏、吉村英敏氏に深く感謝する。

## 参考文献

- 1) L. A. McDonnell and R. M. A. Heeren, *Mass Spectrom. Rev.* **26**, 606 (2007).
- 2) K. Chughtai and R. M. A. Heeren, *Chem. Rev.* **110**, 3237 (2010).
- 3) K. Inazawa, M. Koike and T. Yamaguchi, *Exp. Mol. Pathol.* **76**, 153 (2004).
- 4) S. Khatib-Shahidi, M. Andersson, J. L. Herman, T. A. Gillespie and R. M. Caprioli, *Anal. Chem.* **78**, 6448 (2006).
- 5) M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **60**, 2299 (1988).
- 6) A. C. Crecelius, D. S. Cornett, R. M. Caprioli, B. Williams, B. M. Dawant and B. Bodenheimer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1093 (2005).
- 7) M. Andersson, M. R. Groseclose, A. Y. Deutch and R. M. Caprioli, *Nature Methods* **5**, 101 (2008).
- 8) 吉村英敏, 生体組織内分子のイメージングに向けたレーザーイオン化顕微質量分析技術の開発, 大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻修士論文, pp. 31-39 (2011).
- 9) S. L. Luxemburg, T. H. Mize, L. A. McDonnell and R. M. A. Heeren, *Anal. Chem.* **76**, 5339 (2004).
- 10) A. F. M. Altelaar, I. Klinkert, K. Jalink, R. P. J. de Lange, R. A. H. Adan, R. M. A. Heeren and S. R. Piersma, *Anal. Chem.* **78**, 734 (2006).
- 11) A. F. M. Altelaar, S. L. Luxembourg, L. A. McDonnell, S. R. Piersma and R. M. A. Heeren, *Nature Protocols* **2**, 1185 (2007).
- 12) 間久直, 栗津邦男, *応用物理* **77**, 1425 (2008).
- 13) H. Hazama, J. Aoki, H. Nagao, R. Suzuki, T. Tashima, K. Fujii, K. Masuda, K. Awazu, M. Toyoda and Y. Naito, *Appl. Surf. Sci.* **255**, 1257 (2008).



- 14) H. Hazama, H. Yoshimura, J. Aoki, H. Nagao, M. Toyoda, K. Masuda, K. Fujii, T. Tashima, Y. Naito and K. Awazu, *J. Biomed. Opt.* **16**, 046007 (2011).
- 15) S. Taira, Y. Sugiura, S. Moritake, S. Shimma, Y. Ichiyanagi and M. Setou, *Anal. Chem.* **80**, 4761 (2008).
- 16) 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).
- 17) M. Toyoda, D. Okumura, M. Ishihara and I. Katakuse, *J. Mass Spectrom.* **38**, 1125 (2003).
- 18) M. Toyoda, *Eur. J. Mass. Spectrom.* **16**, 397 (2010).
- 19) O. Yogi, T. Kawakami, M. Yamauchi, J. Y. Ye and M. Ishikawa, *Anal. Chem.* **73**, 1896 (2001).
- 20) O. Yogi, T. Kawakami and A. Mizuno, *J. Electrostatics* **64**, 634 (2006).
- 21) T. Tashima, M. Toyoda, H. Hazama, K. Fujii, J. Aoki, K. Masuda, K. Awazu and Y. Naito, *Abstracts 57th Annu. Conf. Mass Spectrom. Jpn.*, pp. 176–177 (2009).
- 22) J. Aoki, A. Kubo, M. Ishihara and M. Toyoda, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* **600**, 466 (2009).
- 23) H. Yoshimura, H. Hazama, J. Aoki, M. Toyoda, Y. Naito and K. Awazu, *Jpn. J. Appl. Phys.* **50**, 056701 (2011).

