

見えないものを「みる」－質量顕微鏡の開発とその応用－



技術解説

新聞 秀一*

Seeing is believing

- Novel approach to in-situ analysis using mass spectrometry -

Key Words : imaging mass spectrometry, iMScope, MALDI, drug, steroids

はじめに

イメージング質量分析 (IMS: imaging mass spectrometry) は二次イオン質量分析法を用いた、材料を対象とする表面分析法を基にしており、1990年代半ばに LAMMA (laser microprobe mass analyzer) のコンセプトをマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization) に適用し R. M. Caprioli 氏や B. Spengler 氏らにより生体分子の可視化が初めて行われた [1, 2]。発表当初、質量分析法におけるタンパク質のイオン化でノーベル化学賞が受賞されたことから、多くの研究者がタンパク質のイメージングを目指したが、現在では生体内小分子 (代謝物や脂質) ならびに薬物などのイメージングが主流となっている。本稿では、まず IMS の方法について概説した後、日本における IMS 研究の先駆けとなる質量顕微鏡のコンセプトや開発エピソードについて取り上げ、生体組織における応用例について簡単に紹介したい。

イメージング質量分析とは

IMS は生体組織を直接質量分析することにより、組織表面の分子をイオン化し検出することで強度分布をマッピングする方法である。IMS のワークフローを図1に示した。質量分析は「破壊分析」であるため、IMS においてはどのような測定対象であ

っても試料採取が必要となる。例えば、ヒト試料を対象とする場合、手術検体や生検により採取され、動物試料であればマウスなどのげっ歯類から臓器や腫瘍組織を採取する。採取された試料は、迅速に液体窒素中で凍結される。本稿で紹介するような生体内小分子を測定対象とする場合、分子の拡散や流出を防ぐため通常化学固定などは行わない。凍結された組織は、クライオミクロトームを用いて厚さ 5-10 μm で凍結切片を作製し、導電性を有する透明なガラスプレートに載せられる。我々は通常ガラスプレートとして、インジウムスズ酸化物でコーティングされた ITO ガラスを用いている。その後、イオン化補助剤である「マトリックス」を試料表面に供給し、MALDI を用いてイオン化し質量分析を行う。分析に際し、組織表面にデータ取得点を設定し、各点でマススペ

クトルを取得し (MS/MS や MS/MS/MS の場合もある)、位置情報とともに保存する。なお、マススペクトルとは横軸が質量電荷比 (m/z)、縦軸がイオン強度で表されたグラフデータである。

全てのデータ点でスペクトルの取得が終了した後、得られたマススペクトルからイメージング対象の m/z に相当するピークを選択し、その強度分布を専用のソフトウェアで描くことによりイメージングデータとなる。この測定原理から容易に想像できるが、IMS では組織表面でイオン化し検出された全てのピークについて分布を描くことが可能であり、一度に様々な分子の分布情報が得られることから「マルチモーダル」なイメージング手法であるとも言える。一方、MS/MS や MS/MS/MS を組織上でを行い、測定対象を絞って構造情報を得ることにより、非常に特異性の高いイメージングデータを取得することも可能である。



* Shuichi SHIMMA

1978年8月生
総合研究大学院大学 生命科学研究科
生理科学専攻修了 (2007年)
現在、大阪大学大学院 工学研究科
准教授 博士 (理学) 質量分析機器開発
とその応用
TEL : 06-6879-7418
E-mail : sshimma@bio.eng.osaka-u.ac.jp

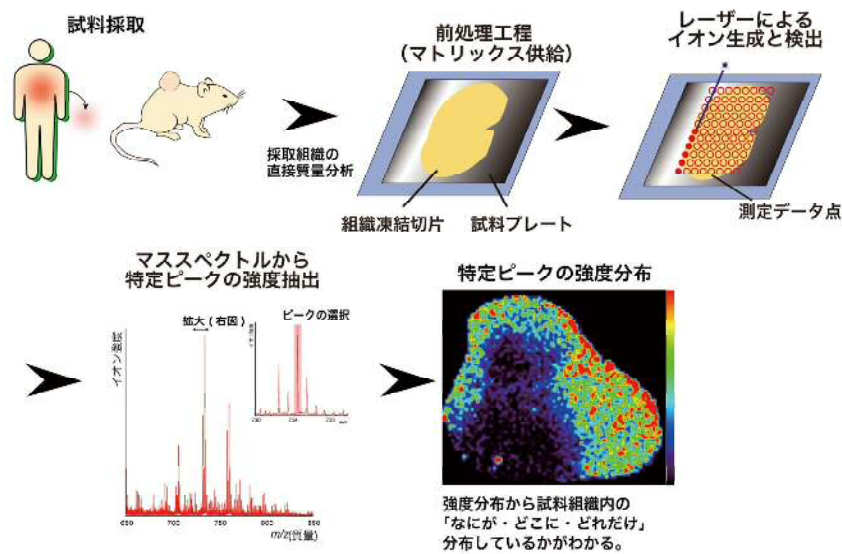


図1 イメージング質量分析 (IMS: imaging mass spectrometry) の原理。IMSでは採取された組織を凍結した後、切片を作りイオン化補助剤を表面に供給する。組織表面の直接質量分析後、イメージング対象となる m/z を持つピークを抽出し、ピーク強度分布を描くことで分布情報を得ることが可能である。

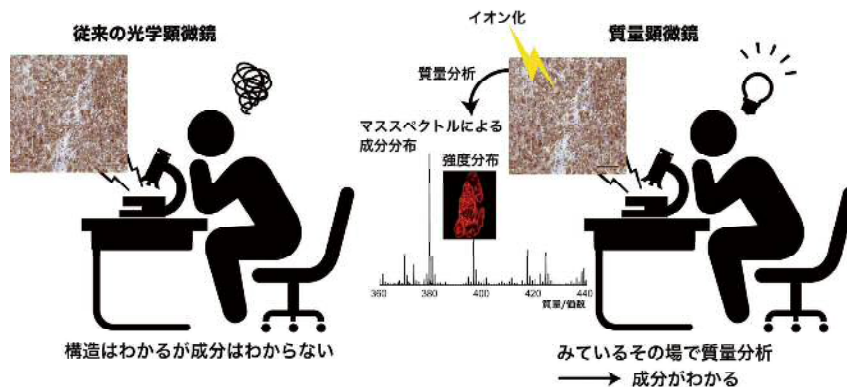


図2 質量顕微鏡の開発コンセプト。従来の光学顕微鏡では、覗くことで構造を知ることが可能であるが、詳細な成分を知ることが不可能である。質量顕微鏡では、光学顕微鏡での形態観察と質量分析での表面分析を組み合わせることで「どこに、なにが、どれだけ」あるか、わかる技術である。

質量顕微鏡の開発

本稿の冒頭で述べたように、IMS 研究は欧米で着手されていたが本邦における IMS 研究の開始は 2004 年である。筆者はその当時、三菱化学生命科学研究所に研究生として所属しており、当時のグループリーダーであった瀬藤光利先生（現浜松医科大学教授）から IMS 専用装置である「質量顕微鏡」を開発するためのプロジェクトメンバーに抜擢された。筆者が起用された背景として、筆者自身のバックグラウンドが素粒子物理学分野で半導体飛跡検出器などの計測機器を開発していたことも関係している。

質量顕微鏡のコンセプトを図2に示す。通常の顕微鏡では、レンズを覗けば様々な形態が目の前に広がり、どのような細胞がどこにいるのかわかることができる。しかし、見ているだけではその構造に由来する成分はわからない。質量顕微鏡では、顕微鏡下での観察と質量分析による試料表面での成分分析を組み合わせ、見ているその場で「どこに・なにが・どれだけ」いるかを知ることができる装置である。しかしながら 2004 年当時、この夢のような装置が本当に作れるのかどうか、筆者は雲をつかむような思いだったことを記憶している。

質量顕微鏡の開発に先立ち、開発予算獲得のため

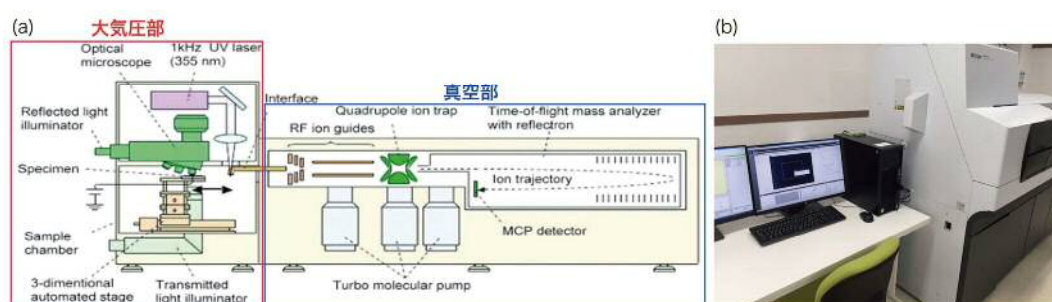


図3 iMScope 外観と構造。(a) iMScope 模式図および (b) システム写真。
iMScope は大気圧下での顕微鏡観察およびMALDIによるイオン化の後、生成したイオンは差動排気系を介してイオントラップと飛行時間型質量分析計からなる質量分離部へ搬送され質量分析が行われる。

にJST先端計測分析技術・機器開発事業に申請し、第1期の採択課題となった。当時の研究チームは生理学研究所（瀬藤光利先生、永山國昭先生と大学院博士課程だった筆者）、島津製作所（吉田佳一さん）、大阪大学大学院理学研究科（交久瀬五雄先生）、がん研究会（星川裕先生）、理化学研究所（鈴木實先生）から構成されていた。

質量顕微鏡は図3(a)に示すように、顕微鏡とイオン化を行うためのレーザーならびに試料ステージは大気圧環境に置かれている。大気圧下で生成されたイオンは、インターフェースと差動排気系を介して真空部に輸送されイオントラップと飛行時間型質量分析計で質量分析が行われる。

質量顕微鏡の仕様を決定するにあたり、最もチャレンジングだった点の一つは、イオン源を真空MALDIにするか大気圧MALDIにするかという点だったと記憶している。当時大気圧MALDIは最新技術で報告がほとんど無く、大気圧MALDIを搭載することによる感度低下が予想されていた。しかしながら、「将来、生きているものをIMSでみたい」という考えもあり、敢えて困難な大気圧MALDIを採用した。結果的には、イオン取り込み口や搬送系の設計を工夫することにより、大気圧MALDIであっても生体分子の分析に十分耐える感度は確保できた。一方、すでに述べたように質量分析は「破壊分析」であるため、生きたものをそのままようという試みはほとんど進んでいない。大気圧MALDIで生きたものを観察することは今も行っていないが、大気圧MALDIを採用したことにより、試料交換時の真空引きや大気圧への開放にかかる時間が削減され、測定のスループットが大幅に改善するという副

次的な産物が得られたことは事実として述べておきたい。

質量顕微鏡は、2004年から5年間のプロジェクトでプロトタイプが製作され[3]、その後ソフトウェアの開発と製品化への改良においてさらに開発費用の一部支援を受け、開発開始から約10年後の2013年4月に島津製作所から“iMScope”という製品名で市場に投入された。さらに、その1年後には欧州においても“iMScope TRIO”という製品名で販売が開始された。現在においても、顕微鏡下でのIMSが行える装置は他にはなく、非常に独創的であり注目を集めている装置であると言える。

薬物送達可視化への応用

IMSの応用分野として最も注目されている分野の一つは、創薬分野であると考えられている。例えば前臨床研究であれば、投与薬物の代謝物由来の毒性評価に空間分布情報を付け加えることで、どこどのような副作用が起きているかが未変化体のみならず代謝物の分布を見ることで可能となる[4]。また臨床研究では、筆者は2015年3月まで独立行政法人（現国立研究開発法人）国立がん研究センター研究所においてiMScopeの臨床薬理学への応用に携わっていた。国立がん研究センターでは2011年からフェーズI (first-in human) 臨床試験体制を整え、Phase Iセンターの創設[5]から2012年9月の早期・探索臨床研究センター（現先端医療開発センター）の創設により[6]、新規抗がん剤のファーストインヒューマン試験を進めてきた。治験における医薬品評価の指標は、従来の薬物動態試験法のように、薬物の血中濃度変化を見ることが主流であった。しか

し近年では殺細胞性抗がん剤から、癌細胞が特異的に発現している分子を目印として細胞を攻撃する「分子標的薬」の開発が盛んであり、腫瘍の現場に医薬品が届いているかを「みる」技術が必要とされていた。筆者は、この課題に iMScope を適用する研究に従事してきた。

早期・探索臨床研究に iMScope を適用する意義は、これまで効果が見られなかった開発薬の原因が「目で見える」ことにある。血中濃度測定は、あくまでも循環血中の薬物濃度を計測するため、分子標的薬が本当に病変部位に到達しているのかという情報は得られない。効果が見られなかった医薬品について、病変部に届いているのか届いていないのかどうかすら情報が無かったが、iMScope を用いて、得られた検体中の薬物動態を可視化し「効果と分布」の相関情報を前臨床研究から早期の臨床研究で得ることが可能になると期待された。

臨床研究のデータは開示することができないため、図4では乳がん由来細胞をマウス皮下に移植して得られた腫瘍モデルマウスに、オラパリブと呼ばれる抗がん剤を腹腔投与（投与量：50 mg/kg）して IMS を行った例を示した [7]。オラパリブ投与後 30 分で採取した腫瘍組織内でのオラパリブ分布を得たところ、オラパリブは腫瘍の全体に広がっている一方、

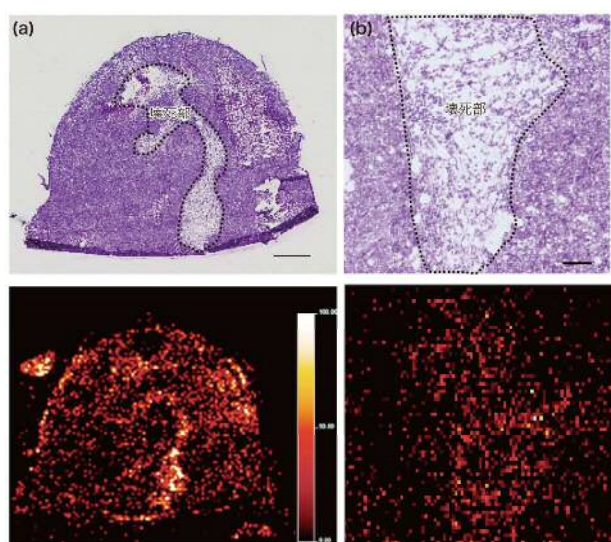


図4 マウス腫瘍モデルを用いたオラパリブの組織内分布。
 (a) 腫瘍組織へマトキシリン・エオシン染色像と同組織内におけるオラパリブ分布
 (スケールバー：1 mm、ピクセルサイズ：60 μm)
 (b) 高解像度オラパリブ分布
 (スケールバー：100 μm 、ピクセルサイズ：10 μm)。
 オラパリブは腫瘍組織内に蓄積すると同時に、壊死部への蓄積が認められる。

壊死部への高い蓄積が見られた（図4a）。高解像度での IMS においても、オラパリブは壊死部に蓄積している様子が見える（図4b）。本データはマウスでの測定例であるが、ヒト針生検試料でも同様の測定を行っており、薬物の組織内分布と効果に相関が見られている（データ非開示）。

ステロイドホルモン可視化への応用

これまでの IMS ではイオン化効率の低さから見ることはできなかった分子も、試料前処理法の工夫により可視化が行えるようになりつつある。その一例として、ステロイドホルモンの可視化について説明する。ステロイドホルモンは、生殖腺や副腎においてコレステロールを前駆体として生合成されるが、その極性の低さからイオン化効率が非常に低いため、一般に液体クロマトグラフ質量分析計を用いて分析を行う際には誘導体化を行う [8]。この誘導体化法は、組織上でも適用可能であることが示されている。図5aはステロイドホルモンのイメージングで最もよく用いられるジラル試薬 T (GT: Girard's reagent T) による誘導体化法である。GTはトリメチルアミンを有し、テストステロンにおいては3位のケトン基と反応し、分子量が約 114 Da 増加した誘導体化テストステロンが生成される。誘導体化テストステロンを MALDI でイオン化すると、 m/z 402.31 (M^+ で検出) にピークが認められ、 m/z 402.31 の MS/MS スペクトルでは、トリメチルアミンが脱離した m/z 343.24 に強いピークが見られる。なお、トリメチルアミン側のピークは、イオントラップでは low-mass cut-off (LMCO) の影響により検出されない。

誘導体化を IMS に適用するには、GT 試薬溶液 (20 %酢酸で 10 mg/mL の濃度で調整) を組織上に噴霧するだけでよい。噴霧後、テストステロンと GT は室温 (23 $^{\circ}\text{C}$) で迅速に反応し、反応後マトリックス溶液を供給することで高感度に測定することが可能になる。図5b (ピクセルサイズ：15 μm) と図5c (ピクセルサイズ：7 μm) はマウスに人ゴナドトロピン (hCG) を投与した後に採取した精巣内部でのテストステロンの分布を示している。図5bでは hCG による刺激でテストステロンが分泌され、精巣内部に局在している様子が見える。また図5cでの高解像度イメージングにおいては、テストステロンが精巣内部のライディッヒ細胞周辺に局在して

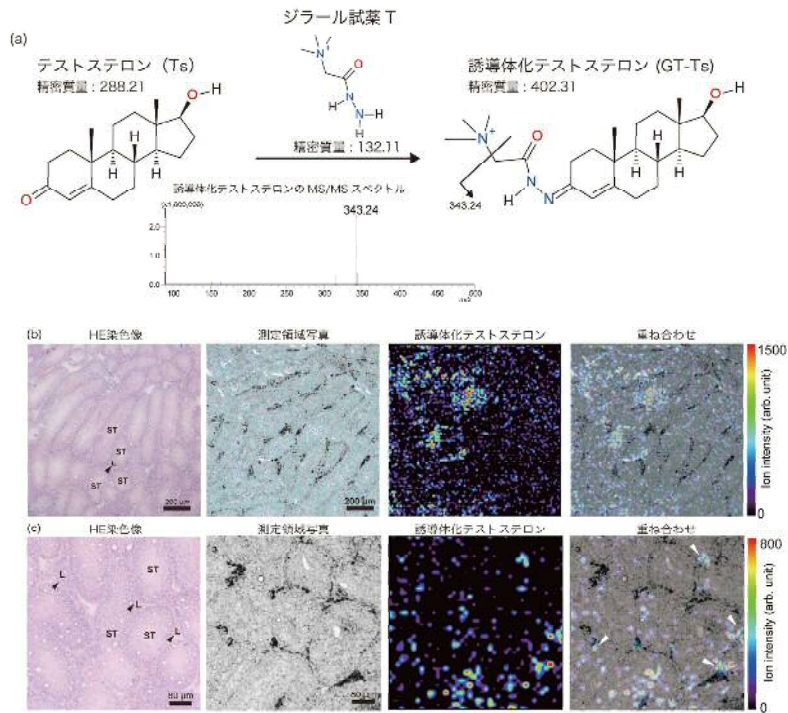


図5 (a) ジラール試薬Tによるテストステロンの誘導体化および誘導体化テストステロンのMS/MSスペクトル。
 (b) マウス精巣におけるテストステロンイメージング結果 (スケールバー: 200 μm 、ピクセルサイズ: 15 μm)
 (c) 高解像度テストステロンイメージング結果 (スケールバー: 80 μm 、ピクセルサイズ: 7 μm)。
 iMScope と組織上誘導体化法を組み合わせることで、顕微鏡下においても高感度でテストステロンの組織内分布を可視化し、精巣のライディッヒ細胞へのテストステロンの蓄積を観察することが可能になる。ST: 精細管、L: ライディッヒ細胞。

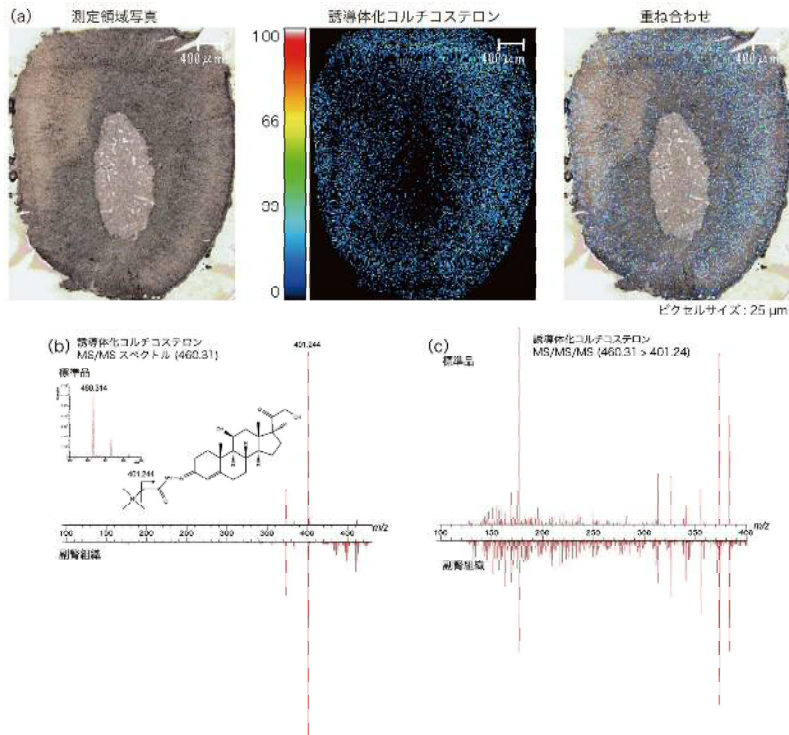


図6 マウス副腎組織におけるコルチコステロンのイメージング結果。
 (a) 誘導体化コルチコステロンの分布。
 (b) 副腎組織上で得られた誘導体化コルチコステロンのMS/MSスペクトルと誘導体化標準物質のMS/MSスペクトルの比較。
 (c) 同試料のMS/MS/MMSスペクトルの比較。MSⁿ (n > 2) を組織上で行うことによりステロイドホルモンの構造異性体の判別を行うことが可能である。

いる様子が見られ、解剖学的に知られている現象をIMSを用いて直接確認することができた。

一方、図6に示すように副腎もステロイドホルモン産生組織としてIMSを用いたイメージング材料として好適である。図6aはラット副腎組織上でGTによるコルチコステロンの誘導体化を行い、誘導体化コルチコステロンのIMSを行った例である。コルチコステロンとGTの反応はテストステロンと同様であり、誘導体化コルチコステロンは m/z 460.31 (M^+)として検出される。 m/z 460.31のMS/MSスペクトルを図6bに示すが、トリメチルアミンが脱離して m/z 401.24に強いピークが検出される。図6bはラット副腎組織上で得られたMS/MSスペクトルとコルチコステロン標準品を誘導体化して得たMS/MSスペクトルを比較しており、組織上であっても非常に高いシグナルノイズ比でピークが得られていることがわかる。ここで得られた m/z 401.24のピークの強度分布を描かせたところ図6aに示すように副腎組織の束状帯と呼ばれる部位に局在している様子が見られた。またiMScopeはLMCOの影響がある一方、 MS^n ($n > 2$)が可能であり、ステロイドホルモンの検出で MS^n を利用すれば構造異性体の確認まで可能である。図6cは、組織上と標準品のそれぞれから得た m/z 460.31のMS/MS/MSスペクトルである (m/z 460.31 $>$ 401.24)。両者を比較するとピークパターンはほぼ一致しており、図6aで得られた分布はコルチコステロン由来であることを確認できる。

おわりに

本稿では、IMSとその専用装置である質量顕微鏡 (iMScope) について医薬品の生体内可視化ならびにステロイドホルモンの可視化例とともに概説した。すでに述べたように、IMSは様々な分子の可視化が可能であるため、本技術は医薬品や動物組織に限らず、食品や植物など様々な試料に適用可能であり応用分野は非常に広い。その一方で、見たいも

のを見るためには、装置のみならず試料前処理について組織上誘導体化をはじめとする様々な工夫が必要となる [9,10]。私が現在主導している研究チームでは、様々な測定対象に対して実用に十分耐えうる感度と再現性が得られる手法開発を行っている。今後、これらの成果により質量顕微鏡が様々な分野で用いられる日が来ることを望んでいる。

謝辞

本稿で紹介した測定データについて、テストステロンは伊藤誠二先生 (関西医科大学) および矢尾育子先生 (浜松医科大学) との共同研究で行い、コルチコステロンは杉浦悠毅先生 (慶應義塾大学) および東達也先生 (東京理科大学) との共同研究で行った。また、測定は大阪大学と株式会社島津製作所との共同研究講座である、「大阪大学・島津分析イノベーション共同研究講座」に設置されているiMScopeを用いて行った。この場を借りて、関係者各位に御礼を申し上げたい。

参考文献

1. Caprioli R.M. et al., *Anal. Chem.*, 69, 4751 (1997).
2. Spengler B. et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 13, 735 (2002).
3. Harada T. et al., *Anal. Chem.*, 81, 9153 (2009).
4. Groseclose M. R. et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 26, 887 (2015).
5. <http://bit.ly/1NjJw9>
6. 国立研究開発法人国立がん研究センター先端医療開発センター <http://epoc.ncc.go.jp/>
7. Shimma S. et al., *J. Mass Spectrom.*, 48, 1285 (2013).
8. Higashi T. et al., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, (in press).
9. Shimma S., *Mass Spectrometry*, 3, S0029 (2014).
10. Shimma S., *Mass Spectrom. Lett.*, 6, 21 (2015).