

Application Note

No. 55

ライフサイエンス

質量分析イメージングによるショウジョウバエ成虫 脳内の GABA の可視化

榎本陽介*1、山口政光*2、福崎英一郎*1、新聞秀一*1○



Life Science

1. はじめに

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*、以下ショウジョウバエ) は生物学の様々な分野で用いられるモデル動物として知られています。モデル動物としての利点の例は、生活環が約 10 日と短いことや遺伝子組み換え手法が確立されていること、さらに飼育や新規モデル作製に費用がかからないこと、動物倫理的障壁が無いことなどが挙げられます。特に、遺伝学的知見と遺伝子組み換え手法が確立しているという利点に基づき、神経変性疾患のモデル生物としてアルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの疾患研究で広く用いられています¹⁾。

神経変性疾患では神経伝達物質が非常に重要な役割を果たします。例えば、 γ -アミノ酪酸 (GABA) は抑制性神経伝達物質として様々な生物学的行動や神経変性疾患に影響を与えることが知られています²⁾。脳内の GABA の濃度だけで

なく、脳内の局在を調べることは脳内における GABA の機能を知るうえで重要です。そのためショウジョウバエ頭部の GABA の局在情報は、様々な疾患モデルにおいて GABA の機能を理解するために重要だと我々は考えています。

ショウジョウバエ頭部の GABA の局在情報を調べる手法として免疫化学染色や蛍光標識を用いたイメージング手法がとられていました。しかしながら、これらの従来法では主に GABA 産生酵素である GAD1³⁾や GABA トランスポーター⁴⁾を可視化していることになり、間接的に GABA の分布を可視化していることとなります。すなわち、GABA そのものを直接見ていることにはなりません。そこで近年、質量分析で直接対象分子を検出するマトリックス支援レーザー脱離イオン化-質量分析イメージング (MALDI-MSI) が哺乳類以外のモデル生物での生体分子可視化で注目されています。

*1 大阪大学大学院 生命先端工学専攻

*2 京都工芸繊維大学 応用生物学系

○ 責任著者

図1にMALDI-MSIの流れを示しました。MALDI-MSIでは試料を薄切し、レーザーを照射することで試料切片中の分子を「マトリックス」と呼ばれるイオン化補助剤と共に脱離・イオン化し、質量分析により検出します。レーザーによる脱離・イオン化および質量分析の一連の流れを組織上で二次元的に行い、位置情報とマスペクトルから抽出した m/z の強度情報を組み合わせることで分子の分布を示す二次元画像を取得します。MALDI-MSIでは一般的に蛍光物質などの可視化タグを必要とせず、質量分析により分子そのものをイオン化・検出することから、MALDI-MSIはショウジョウバエ成虫頭部のGABAの直接可視化に有用であると考えられます。これまでにマウス脳内のGABAがMALDI-MSIを用いて可視化されています⁹⁾。

しかし、ショウジョウバエ成虫頭部のGABAを可視化するうえでいくつかの問題点があるために、これまでにMALDI-MSIが適用されていません。MALDI-MSI分析を行ううえで、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) のような固定化した試料を使用することは困難です。これは、FFPEを行う過程や、脱パラフィンを行う際、GABAのような小分子の代謝物が洗い流されるためです。さらに、ショウジョウバエ成虫頭部は1 mm³以下と極めて小さいので、MALDI-MSI分析において一般的に用いられる凍結切片を作製することも困難となります⁹⁾。試料のサイズに加えて、ショウジョウバエ頭部は硬いクチクラで覆われています。その硬いクチクラの中の脳細胞には中間径フィラメントがなく、哺乳類と比べて柔らかいため、頭部と脳の間で硬さが大きく異なります。

このような特徴から形態を維持したショウジョウバエ成虫頭部の切片作製は非常に困難となります。このような試料では一般に切片回収のためにクライオテープ (ライカ) が用いられますが、市販されているクライオテープは電気を通さないフィルム素材であるため、そのような支持体の上に乗せられた試料表面ではイオン強度が大きく下がる可能性があります。この原因は、絶縁物の存在による試料表面上のチャージアップや試料プレート上の電場の乱れであると考えられています。

また、GABAはMALDIでのイオン化効率が低く、ショウジョウバエ頭部でのGABAの存在量は、脳のサイズからも想像できるように哺乳類と比較すると少ないと考えられます。このような理由も、ショウジョウバエ脳内でのGABA分布可視化を困難にする原因であると考えられます。したがって、マウスやラットの脳でGABAそのものをイオン化しMALDI-MSIが可能であったとしても、ショウジョウバエ頭部で検出できるかどうかは自明ではありません。

このアプリケーションノートでは、我々のグループで報告したショウジョウバエ脳内のGABA分布可視化手法について解説しています⁷⁾。特に、上記の問題点を解決するためにショウジョウバエ成虫頭部の切片作製方法を検討し、直接組織切片を回収する手法を提案しました。また、GABAのイオン化効率を改善させる組織上誘導体化法について最適化を行いました。また、本アプリケーションノートでは現状の組織上誘導体化法についても特徴を含め解説しています。

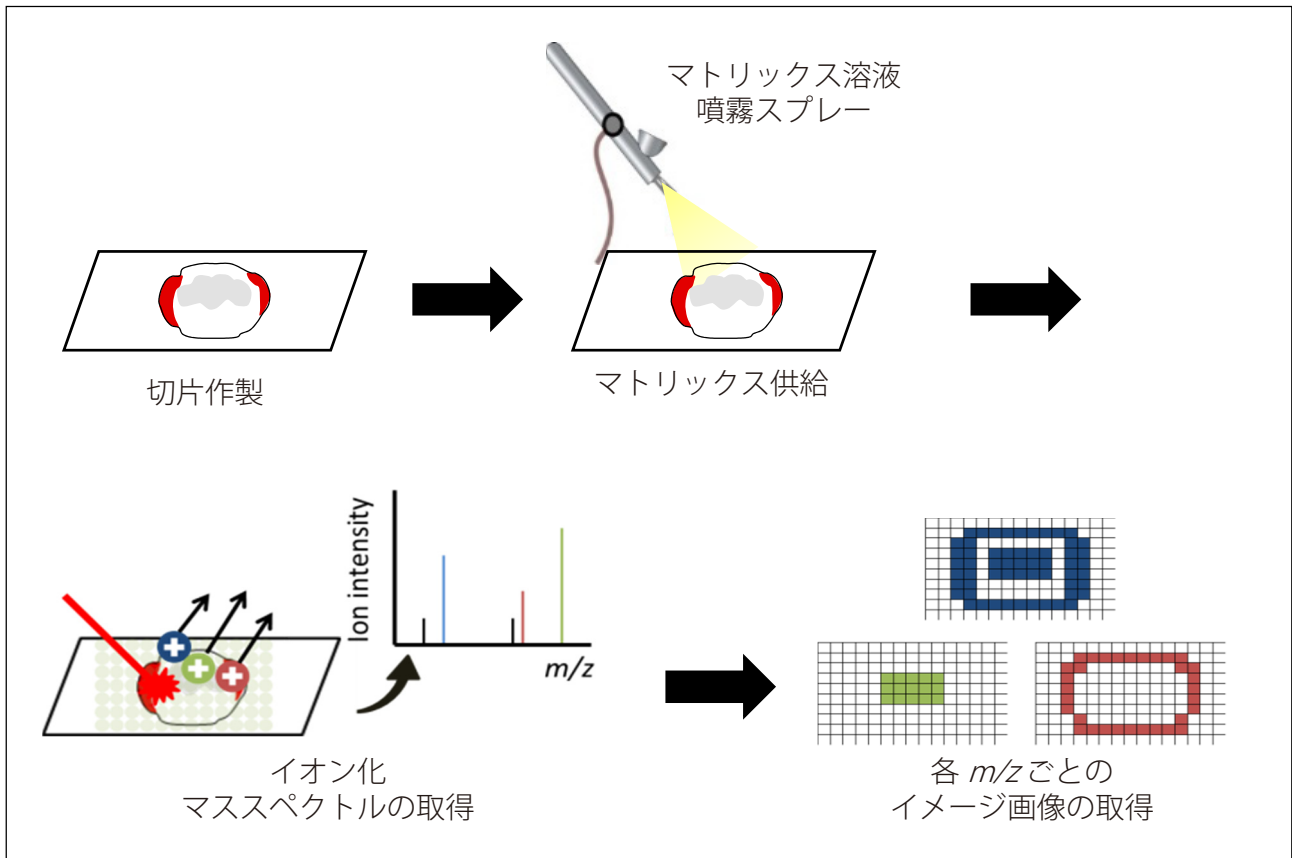


図1 MALDI-MSIの流れ

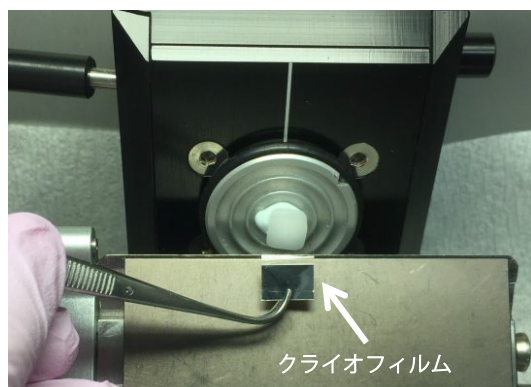
2. 前処理法

2-1. 切片作製

ショウジョウバエ頭部をピンセットを用いて解剖した後、速やかに70%エタノールに浸しました。その後、4%カルボキシメチルセルロース(4%CMC)で満たした使い捨てモールド(ベースモールド、アズワン)に頭部を包埋しました。包埋後はモールドをアルミホイルで包み、液体窒素を用いて急速凍結を行いました。凍結したサンプルは-20℃で1時間静置し、クライオスタット(CM1950、ライカ)を用いて15μmの厚さになるように切片作製を行いました。クライオスタットの庫内温度とサンプルホルダーの温度はそれぞれ-18℃と-16℃に設定しました。

私たちは、クライオフィルムを用いた手法とアンチロールバーを用いた手法の2種類の切片作製方法を検討しました(図2)。それぞれの手法で作製した切片は透明導電性金属酸化物であるインジウムスズ酸化物(ITO)を蒸着したスライドガラス(ITOコートガラス、松浪ガラス)に貼り付け、インキュベータを用いて40℃、5分間の条件で乾燥させました。クライオフィルムを用いた切片においては導電性両面テープ(3M)を用いてITOコートガラスに貼り付けました。

クライオフィルムを用いた手法



アンチロールバーを用いた手法



図2 切片作製方法

2-2. 組織上誘導体化

誘導体化試薬として2,4-diphenylpyranilium tetrafluoroborate (DPP-TFB)⁸⁾とGABAの構造異性体と区別するために4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (CA)も用いました⁹⁾。DPP-TFBはメタノールを溶媒として10mg/mLで調製した溶液をストック溶液とし、使用するまで-30℃で保存しました。DPP-TFB溶液は、600μLの超純水、900μLのメタノール、1μLのトリエチルアミンを混合したものを溶媒として、ストック溶液と69:6の比率になるように混合し使用しました。DPP-TFB溶液はエアブラシ(プロコンBOY PS270、クレオス)を用いてスプレー噴霧を行いました。スプレー噴霧は組織表面とノズルの距離を15cmに保ちながら行き、一切片あたり50μLずつ噴霧しました。スプレー噴霧後、誘導体化反応を促進するために、試料を50%メタノール蒸気で満たされたチャンバー内で60分間静置し、誘導体化反応を行いました。誘導体化反応後、組織を酸性化させるために10%酢酸を一切片あたり20μLずつ噴霧しました。

CA溶液はメタノールを溶媒として11.5mg/mL CA、4.25mg/mL *trans*-Ferulic acid (*trans*-FA)で調製しました⁹⁾。CA溶液もDPP溶液と同様にエアブラシを用いてスプレー噴霧を行いました。スプレー噴霧後は室温で10分間静置し、誘導体化反応を行いました。

2-3. マトリックス供給

ショウジョウバエの頭部のように非常に小さい試料に含まれる生体分子をMALDI-MSIで可視化するには、マトリックス供給法が非常に重要になります。なぜなら、組織上におけるマトリックス結晶の凝集は、アーチファクトとなるからです。これを解決するために、iMLayerTM(図3)によるマトリックス蒸着とマトリックス溶液のスプレーを組み合わせた二段階供給法を実施しました¹⁰⁾。誘導体化反応後、 α -シアノ-4ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)をiMLayerを用いて組織表面に0.5μmの厚さで蒸着しました。蒸着の際、マトリックス粉末を入れるポート温度は250℃に設定しました。iMLayerでの蒸着完了後、2段階目はエアブラシを用いてCHCA溶液を一切片あたり50μLずつ噴霧しました。CHCA溶液は、60%超純水、30%アセトニトリル、10%2-プロパノールに0.1%のギ酸を混合したものを溶媒として、10mg/mLに調製したものを使用しました。



図3 マトリックス蒸着に用いたiMLayerTM

2-4. MSI 分析条件

質量分析イメージングは iMScope TRIO™ を使用しました (図 4)。ショウジョウバエの頭部のように非常に小さい試料をイメージングするには、顕微鏡下での光学画像撮影と MSI の組み合わせが非常に重要となります。したがって、そのような用途には iMScope TRIO が威力を発揮します。MALDI に用いるレーザーは Nd : YAG (波長 355 nm、周波数 1 kHz) を使用し、照射回数は 200 回、積算回数は 1 ピクセルあたり 1 回に設定しました。レーザー照射径は 1 (約 15 μm 程度)、レーザー強度は 25 に設定し、レーザー照射間隔は 20 μm としました。サンプル電圧と検出器電圧はそれぞれ 3.5 kV と 2.1 kV に設定しました。DPP 誘導体化試料及び CA 誘導体化試料はそれぞれ m/z 範囲 100-330 と 140-270 と設定し正イオンモードで MS/MS 分析を行いました。DPP-GABA 及び CA-GABA はそれぞれ m/z 318.15 と 264.12 をプリカーサイオンとして設定しました。



図 4 分析に用いた iMScope TRIO™

3. 結果と考察

3-1. 切片作製法の検討

形態を維持したショウジョウバエ成虫の頭部の切片作製は試料が微小であることや、頭部外皮と脳で硬さが大きく異なることから非常に困難であると述べました。MSI において形態を維持した切片作製は、神経伝達物質の可視化に限らず、分子の正確な局在情報を得る上で非常に重要な工程となります。これまでに低分子の MALDI-MSI に適したショウジョウバエ成虫頭部の切片作製法の報告がなかったため、MALDI-MSI に適した切片作製法の検討を行いました。

ショウジョウバエのような微小な試料の組織切片作製において、一般的に試料を包埋凍結し切片作製を行います。しかしながら、ショウジョウバエの体表を覆う毛が包埋剤をはじくことで、試料と包埋剤との間隙が生じ安定した切片作製が出来ないという問題点がありました。そこで、試料を 70% エタノールに浸した後、4% CMC に包埋したところ、試料と包埋剤との間が密着した状態で包埋できることが確認されました。これは、表皮のクチクラが 70% エタノールによって濡れることで包埋剤をはじくことなく包埋されたためであると考えられます。また、氷晶形成による組織の損傷を避けるために、包埋試料を液体窒素を用いて急速凍結を行いました。その後、アンチロールバーを用いた手法とクライオフィルムを用いた手法の 2 種類の切片作製法を用いてショウジョウバエ成虫頭部の切片作製を行い比較検討を行いました。クライオスタットの庫内温度とサンプルホルダーの温度を最適化することでどちらの手法においても形態を維持した組織切片を作製することに成功しました (図 5A、B)。特にクライオフィルムを用いた手法では、クライオフィルムが試料に張り付き支持体として働くために、より容易に形態を維持した切片を作製することが可能です。しかし、図 5C に示す強度比較の結果から分かる通り、クライオフィルムを用いた試料では DPP-GABA 由来のピーク強度が有意に低くなることが分かりました。

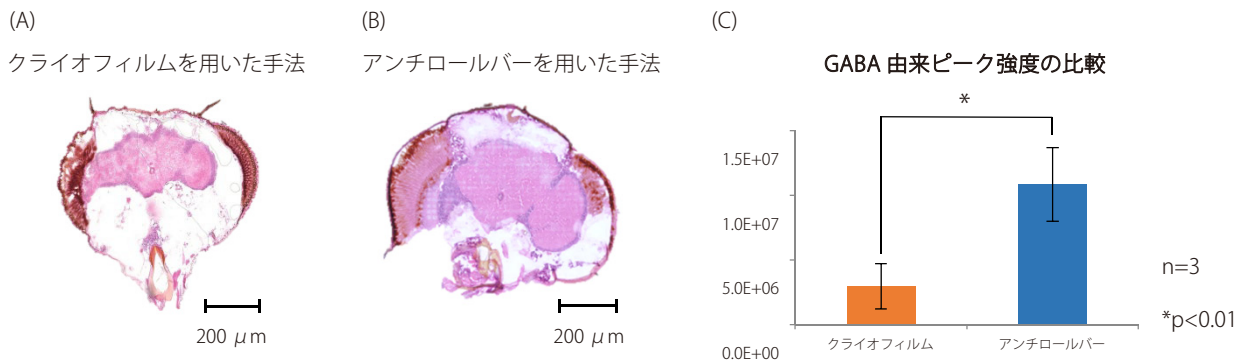


図 5 切片作製方法による形態評価および GABA 由来のピーク強度の評価
(A) クライオフィルムを用いた手法で得られたショウジョウバエ頭部切片
(B) アンチロールバーを用いた手法で得られたショウジョウバエ頭部切片
(C) 両手法を用いたときに得られる GABA 由来ピーク強度の比較

これは、すでに述べたとおりクライオフィルムが絶縁物であるためにチャージアップが発生することと、生成したイオンを質量分離部へ導入するための電場が乱れるためであると考えられます。これらの結果から、アンチローバーを用いた手法が、ショウジョウバエ成虫頭部の MALDI-MSI 分析により適した切片作製法であると結論づけ、以下の実験で用いました。

3-2. DPP 誘導体化を用いたショウジョウバエ成虫頭部および脳の GABA の可視化

MALDI-MSI によるショウジョウバエ頭部における GABA の分析は、GABA の量が少ないことや脱離/イオン化を支援するマトリックス由来のピークによる影響やイオン化効率が低いことから一般に困難であると考えられます。この問題を解決するために、組織上誘導体化によるイオン化効率の向上を図るべく、GABA の標準品を用いて DPP で誘導体化された GABA (DPP-GABA) の MALDI-MSI 分析方法の確立を試みました。調製済みの DPP をショウジョウバエ頭部切片に噴霧し、室温で 60 分間の誘導体化反応を行なった後、マトリックスを供給して DPP-GABA を可視化しようとしたが、マウスでの例とは異なり、ショウジョウバエでは十分なイオン強度を得ることが出来ませんでした。この一つの理由として、ショウジョウバエ成虫脳中に多く含まれる脂質が誘導体化反応やイオン化に影響したためであると考えられます。すなわち、微量な GABA を検出するためにはさらなる最適化が必要であると言えます。

そこで、誘導体化反応条件を以下の通り改変しました。50%メタノール蒸気で満たされたチャンバー内で誘導体化反応を行うことで誘導体化反応を促進させました。さらに、誘導体化後 10%酢酸を組織上に噴霧することで組織を酸性化させ、誘導体化した GABA が正イオンを帯びた状態を維持しやすくしました。

これらの手法を用いることで、DPP-GABA 由来のピークである m/z 232.11 のピークを明瞭に確認することが出来ました (図 6 A)。また、ショウジョウバエ成虫脳内 (図 6 B) および頭部 (図 6 C) の DPP-GABA 由来ピークの局在を MALDI-MSI 分析で可視化することに成功しました。図 6 の結果から、DPP-GABA 由来シグナルはショウジョウバエ脳全体に分布していることが分かりました。

ショウジョウバエにおいて、GABA はグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) から生成されるとともに、GAD は脳全体に分布していることが知られています。さらに、頭部全体を分析したところ、脳だけでなく、脳の周囲の組織にも局在していることが分かりました。ショウジョウバエの脳は多くのエネルギーや酸素を必要とするため、血管系や気管系に支えられています¹¹⁾。過去の研究では、ショウジョウバエ幼虫において GABA が循環血リンパで分泌されることが示唆されています¹²⁾。この現象が成虫においても起こっているため、頭部全体に GABA が局在していたと推測されます。

3-3. CA 誘導体化によるショウジョウバエ成虫脳内および頭部の GABA の可視化

DPP 誘導体化を用いる事で GABA 由来シグナルの可視化を行うことができたことと述べました。しかし、この結果だけでは GABA 単独の分布を見ているかどうかは結論づけられません。なぜなら、GABA には、2-アミノ酪酸や 2-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸などの構造異性体が存在するからです。DPP 誘導体化を用いた場合、MS/MS 分析で検出しているピークの m/z 232.11 は、DPP 由来のフラグメントイオンとなります (図 6 A)。したがって、上記の構造異性体を区別して検出することは出来ません。Manier らの報告によると、CA を誘導体化試薬として用いることで GABA と GABA の構造異性体を区別して検出することが出来ると述べられています⁹⁾。

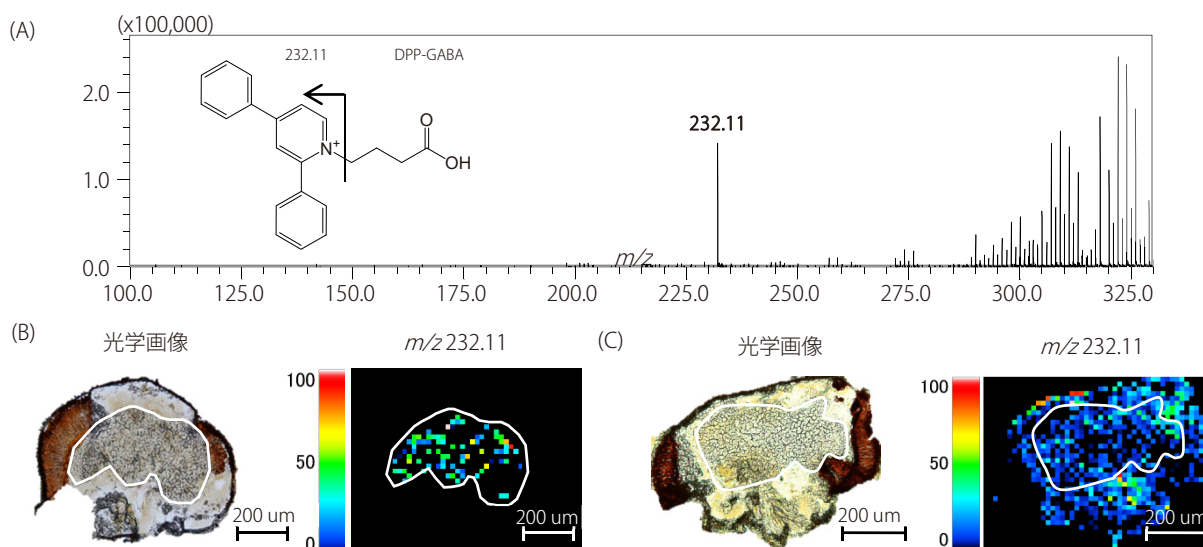


図 6 DPP 誘導体化によるショウジョウバエ脳内および頭部の GABA の質量分析イメージング結果
 (A) m/z 318.15 をプリカーサーイオンとして脳内から得られたプロダクトイオンスペクトル
 (B) ショウジョウバエ脳内の DPP-GABA (m/z 318.15 > 232.11) の局在
 (C) ショウジョウバエ頭部の DPP-GABA の局在 スケールバー: 200 μ m

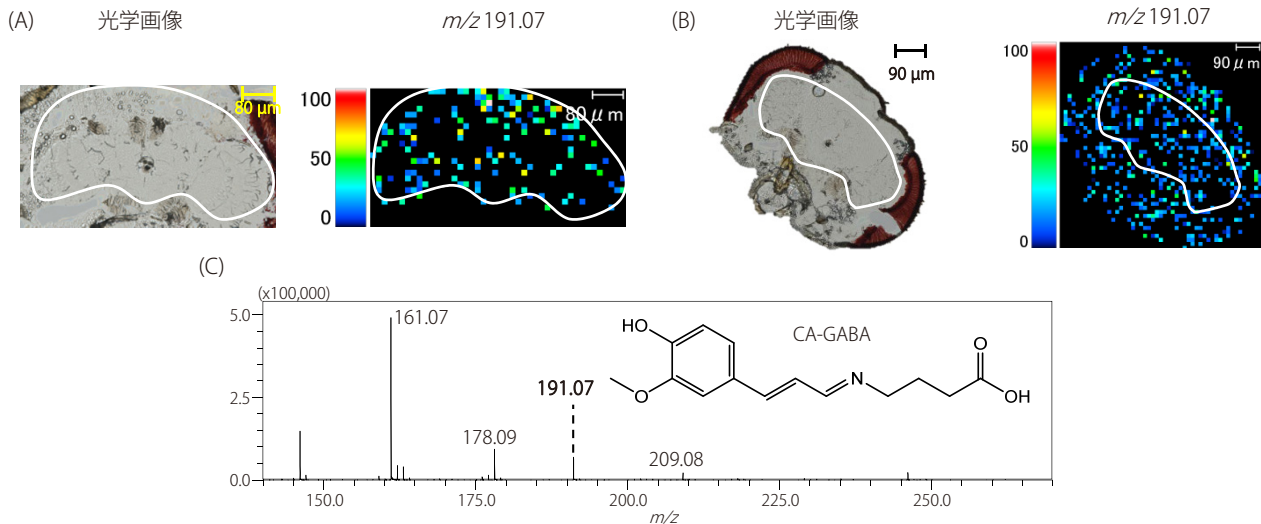


図7 CA誘導体化によるショウジョウバエ脳内および頭部のGABAの質量分析イメージング結果
(A) ショウジョウバエ脳内のCA-GABA (m/z 264.12>191.07)の局在。スケールバー：80 μ m
(B) ショウジョウバエ頭部のCA-GABAの局在。スケールバー：90 μ m
(C) m/z 264.12をプリカーサイオンとして脳内で得られたプロダクトイオンスペクトル
文献9で報告されている通り、 m/z 161, 178, 191, 209が検出されている

文献9では、 m/z 264.12をプリカーサイオンとして選択しMS/MS分析を行うと、 m/z 161、178、191および209というプロダクトイオンピークが検出されることが報告されています。この中で、 m/z 191と209はGABAの構造異性体と分離可能な特有のピークとなります。

そこで、本実験ではDPP誘導体化の結果に加え、CA誘導体化の結果も用いることで、DPP誘導体化の結果が妥当であるかを評価しました。CA-GABA分析で得られたプロダクトイオンスペクトルとショウジョウバエ成虫脳内および頭部の m/z 264.12>191.07の分布を図7に示しました。DPP誘導体化と同様にCA誘導体化においてもGABAが脳全体におよび、頭部にも局在していることが分かりました(図7AおよびB)。

さらにショウジョウバエ脳切片上で得られた m/z 264.12のプロダクトイオンスペクトルを検証しました。その結果、2-アミノ酪酸や2-アミノイソ酪酸由来とされる m/z 218.2や3-アミノ酪酸由来の m/z 190.09のピークは、本実験では全く検出されていませんでした。この結果から、2-アミノ酪酸や2-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸はショウジョウバエ成虫脳内において存在していないかiMScope TRIOの検出限界以下の極微量しか存在しないことが推定されます。

2-アミノ酪酸や2-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸がショウジョウバエ成虫脳内で検出されなかったことに加え、DPP-TFBおよびCAのいずれの分布も類似していたことから、本実験ではショウジョウバエ脳内GABAの分布を特異的に可視化することに成功したと考えられます。以上より、組織上誘導体化法はMALDI-MSIを用いたショウジョウバエ頭部のGABAの可視化に必須であることを確認することができました。

4. 組織上誘導体化法の現状と特徴

元来、誘導体化とはGC、LCやGC-MS、LC-MSにおいて一般的に用いられる手法です。その目的は官能基の導入により測定対象物質の極性や揮発性を変化させる、もしくは蛍光を発する官能基を導入することで、分離の向上や検出感度の向上を目指すことです。MSIでは試料表面上で直接イオン化を行い、生成されたイオンはクロマトグラフィーのような化学的な分離を経ることなく、検出しています。この過程で生じる問題の一つは、イオン化しやすい分子によるイオン化抑制により、検出できる分子の種類が大幅に減少することです。今でも、多くの文献がリン脂質をMSIの検出対象としている理由の一つは、リン脂質の存在量とともに分子内部に電荷が固定された極性基を有するため、高感度で検出できるからであると考えられます。その一方、イオン化抑制を受ける、本稿で取り上げた神経伝達物質の他、アミノ酸や中極性であるステロイドホルモンを誘導体化することなくそのまま組織上から検出することは非常に困難です。この問題を解決するために、現在様々な組織上誘導体化法が報告されています。いくつかの代表的な誘導体化試薬について表1にまとめました。

まず、アミノ基を誘導体化する試薬として本稿で取り上げたDPPとCA以外にTAHSが挙げられます^{13), 14)}。TAHSは分子構造内にトリメチルアミンを含んでいるため、この固定された正電荷のためイオン化効率が向上します。文献14では、55℃の条件下で一晩インキュベートすることで誘導体化を行なっています。誘導体化後、2,5-ジヒドロキシ安息香酸を噴霧しMALDI-MSIを行なっています¹⁴⁾。

アミノ基以外の官能基に対して誘導体化を行うことも可能です。代表的な試薬の一つとして、ステロイドホルモンのMSIで用いるジラル試薬T (GirT)が挙げられます¹⁵⁾。

表 1 MSI で用いられる誘導体化試薬の例

構造	名称	略称	対象官能基	特徴・文献
	p-N,N,N-trimethylammonioanilyl N'-hydroxysuccinimidyl carbamate iodide	TAHS	アミノ基	高い反応性 構造異性体分離不可 非売品 (要委託合成) 文献 13、14
	2,4-diphenyl-pyranilium Tetrafluoroborate	DPP	アミノ基	高い反応性 構造異性体分離不可 販売中止 (要委託合成) 文献 8
	4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde	CA	アミノ基	構造異性体分離可能 文献 7
	Girard's reagent T	GirT	カルボニル基	主にステロイドホルモンの検出。C3位のカルボニルと反応性高い。 構造異性体分離可能 文献 15、16、17
	4-(anthracen-9-yl)-2-fluoro-1-methylpyridin-1-ium	略称未公表	フェノール性水酸基	2018年 アメリカ質量分析学会年会にて発表。2019年5月時点で論文発表なし。

GirT はステロイドホルモンの中でも C3 位にカルボニル基を持つ場合に反応性が高く、テストステロンやコルチコステロンなどの MSI で威力を発揮します¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。また、GirT の場合は MS/MS を行うとトリメチルアミンが脱離した[M-59]⁺が主に検出されます。このピークをさらに MS/MS (すなわち、MS/MS/MS) を行うことにより、構造異性体の分離も可

能となります (図 8)¹⁸⁾。その他の誘導体化官能基として、フェノール性水酸基を誘導体化する試薬も学会で発表されています。現時点で、論文発表はされていないため詳細は不明な点が多いですが、非常に高い反応性を持つ試薬であり、組織表面に供給後すぐに反応が完了すると報告されています。

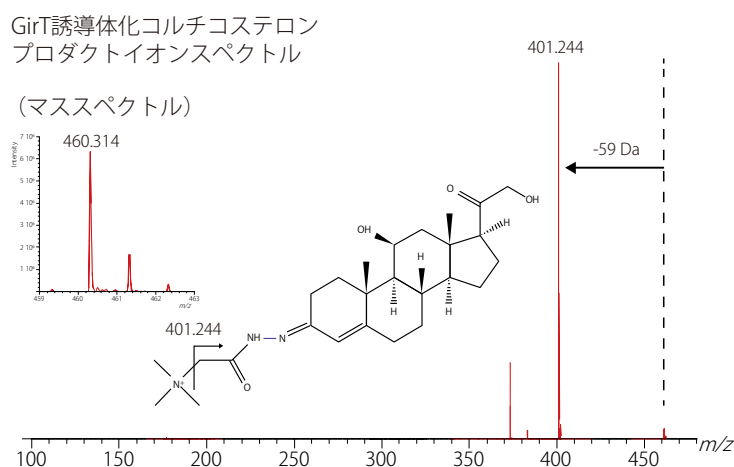


図 8 GirT 誘導体化によるコルチコステロンのプロダクトイオンスペクトル
M⁺としてマスペクトルでは検出され、MS/MSを行うことで
トリメチルアミン脱離由来の-59 Daのピークが得られる

5. まとめ

我々のグループでは MALDI-MSI を用いたショウジョウバエ成虫頭部の GABA の可視化法を初めて確立しました。4% CMC を用いて解剖したショウジョウバエ成虫頭部を包埋し、液体窒素を用いて試料を急速凍結しました。また、アンチロールバーを用いることで形態を維持したショウジョウバエ成虫頭部の切片の作製に成功しました。また、イオン化が困難であった GABA を組織上誘導体化を用いることで、イオン化効率を向上させショウジョウバエ成虫頭部の GABA の可視化に成功しました。私たちは GABA がショウジョウバエ頭部全体に局在していることを確認しました。今後本手法を用いることで、神経変性疾患モデルのショウジョウバエの脳内の GABA レベルの可視化が行われることが期待されます。

また本稿では現在用いられている組織上誘導体化試薬についてもまとめました。このような新しい試料前処理方法が登場することにより、これまで見ることはできなかった新しい生体分子分布を可視化することが可能になっています。現在、MSI の分野ではマトリックスの開発とともに新しい誘導体化試薬の開発も盛んに行われています。今後、我々のグループにおいても新たな試料前処理法を構築し様々な分野の試料に適用していきたいと考えています。

<参考文献>

- 1) U. B. Pandey and C. D. Nichols, *Pharmacol. Rev.*, **2011**, *63*, 411.
- 2) J. W. Blaszczak, *Front. Neurosci.*, **2016**, *10*, 269.
- 3) A. C. Paulk, Y. Zhou, P. Stratton, L. Liu, and B. van Swinderen, *J. Neurophysiol.*, **2013**, *110*, 1703.
- 4) L. Enell, Y. Hamasaka, and A. Kolodziejczyk, *J. Comp. Neurol.*, **2007**, *505*, 5.
- 5) C. Esteve, E. A. Tolner, R. Shyti, A. M. J. M. van der Maagdenberg, and L. A. McDonnell, *Metabolomics*, **2016**, *12*, 1.
- 6) N. T. N. Phan, A. S. Mohammadi, M. D. Pour, and A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **2016**, *88*, 1734.
- 7) Y. Enomoto, P. Nt An, M. Yamaguchi, E. Fukusaki, and S. Shimma, *Anal. Sci.*, **2018**, *34*, 1055.
- 8) M. Shariatgorji, A. Nilsson, P. Källback, O. Karlsson, Z. Zhang, P. Svenningsson, and P.E. Andren, *Neuron*, **2014**, *84*, 697.
- 9) M. L. Manier, J.M. Spraggins, M.L. Reyzer, J. L. Norris, and R. M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.*, **2014**, *49*, 665.
- 10) S. Shimma, Y. Takashima, J. Hashimoto, K. Yonemori, K. Tamura, and A. Hamada, *J. Mass Spectrom.*, **2013**, *48*, 1285.
- 11) W. Peraanu, S. Spindler, L. Cruz, and V. Hartenstein, *Dev. Biol.*, **2007**, *302*, 169.
- 12) J. Shim, T. Mukherjee, B. C. Mondal, T. Liu, G. C. Young, D. P. Wijewarnasuriya, and U. Banerjee, *Cell*, **2013**, *155*, 1141.
- 13) K. Shimbo, A. Yahashi, K. Hirayama, M. Nakazawa, H. Miyano, *Anal. Chem.*, 2009, *81*, 5172.
- 14) S. Toue, Y. Sugiura, A. Kubo, M. Ohmura, S. Karakawa, T. Mizukoshi et al., *Proteomics*, **2014**, *14*, 810.
- 15) W.J. Griffiths, *Mass Spectrom. Rev.*, **2003**, *22*, 81.
- 16) S. Shimma, H. O. Kumada, H. Taniguchi, A. Konno, I. Yao, K. Furuta, T. Matsuda, S. Ito, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, *408*, 7607.
- 17) D.F. Cobice, D. E Livingstone, C. L. Mackay, R. J. Goodwin, L. B. Smith, B. R. Walker, R. Andrew, *Anal. Chem.*, **2016**, *88*, 10362.
- 18) 新聞秀一、杉浦悠毅、東達也 島津製作所テクニカルレポート「組織上誘導体化処理によるラット副腎組織上のコルチコステロン質量分析イメージング」

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

iMLayer および iMScope TRIO は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中には TM、®マークを明記していない場合があります。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2019年9月
© Shimadzu Corporation, 2019