

(島津製作所¹ 東京工業大学² 浜松医科大学³)○高橋和輝¹、原田高宏¹、小河潔¹、吉田佳一¹、杉浦悠毅²、早坂孝宏³、瀬藤光利³

Quantitative evaluation of sensitivity for microscopic AP-MALDI-MS imaging in direct tissue analysis

OK.Takahashi¹, T.Harada¹, K.Ogawa¹, Y.Yoshida¹, Y.Sugiura², T.Hayasaka³, M.Setou³

Short Abstract

Recently MS imaging have become widely used for pharmaceutical research, biomarker discovery, and pathology research. To meet such use, we developed a novel imaging mass spectrometer including an optical microscope and an AP-MALDI-QIT-TOF system. The spatial resolution of this instrument is superior to 10 μ m. But the spatial resolution and sensitivity are generally contradicting. So we examined a sensitivity of our instrument in practical tissue analysis by using biological samples.

【はじめに】

我々は創薬やバイオマーカー探索、病理研究などへの利用を考えた新しい質量分析装置の開発を行っている。本装置は光学顕微鏡とQIT-TOF型分析器を組み合わせ、イオン化法として大気圧MALDIを採用している (Fig. 1)。

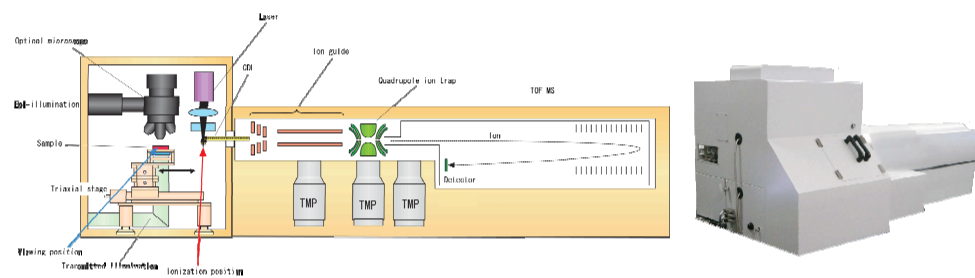


Fig.1 The device configuration of microscopic AP-MALDI-MS.

空間分解能は現時点で10 μ mを達成しており、本装置を用いることで、顕微鏡で試料を観察したその場で任意の局所領域のピンポイント分析や任意の領域の高空間分解能MSイメージング分析が可能である。Fig. 2は本装置にてマウス小脳を10 μ ピッチにてMSイメージングしたものである。

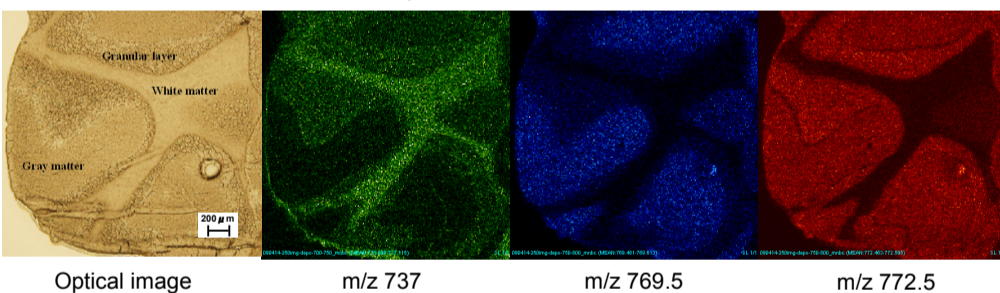


Fig.2 MS imaging of mouse brain by microscopic AP-MALDI-MS.

【実験試料・方法】

生体切片には、分析位置による影響を受けにくいようにマウス脳のホモジネートサンプルを使用し、脳切片上にはほとんど存在しない脂質であるPC(22:0/22:0)を標準試料として使用した。

評価試料の作成は、まず標準試料の濃度をメタノールを用いて2.5fmol/ μ lに調整し、これをケミカルプリンタ(CHIP-1000、島津製作所)を用いて切片上に滴下して行った。マトリックスにはDHB(40mg/ml in 70%methanol, 30%H₂O containing 0.1% TFA and K)を使用し、スプレーで吹き付けてコーティングを行なった。レーザー照射はドロプレットを含む矩形領域内を7 μ m間隔で隙間無く行った。さらに比較として、ITOガラス上に直接脂質の溶液を滴下した場合についても、評価を行った。以下に本実験過程の概略図を示す(Fig.3)。

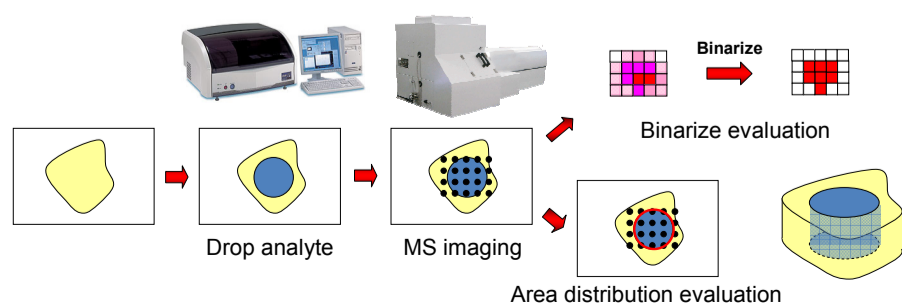


Fig.3 Experiment process and evaluating method.

【結果】

以下にホモジネートサンプル上で得られたMSイメージング結果とスペクトルを示す (Fig. 4)。

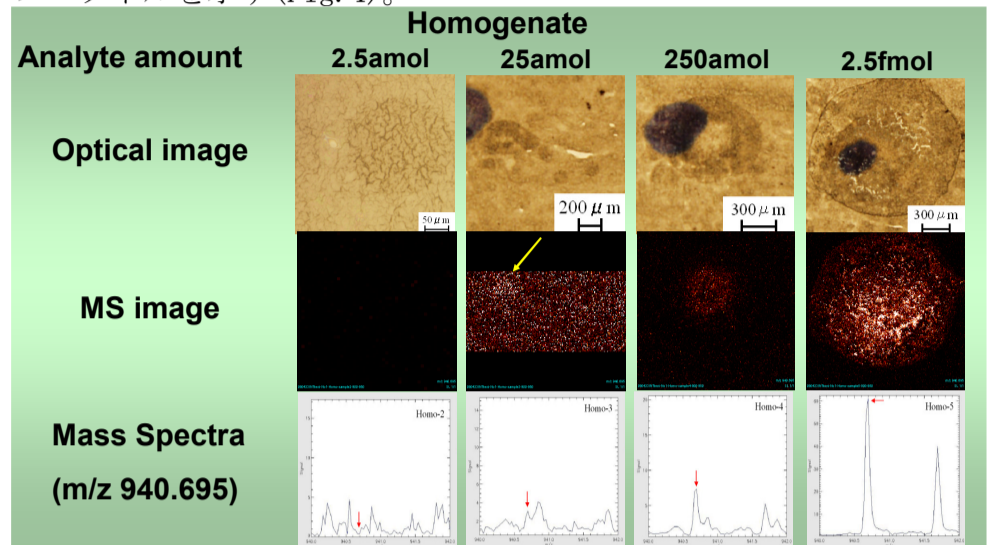


Fig.4 The optical images and MS images of the homogenate sample, and spectra of the target peak.

以下にITOガラス上で得られたMSイメージング結果とスペクトルを示す (Fig. 5)。

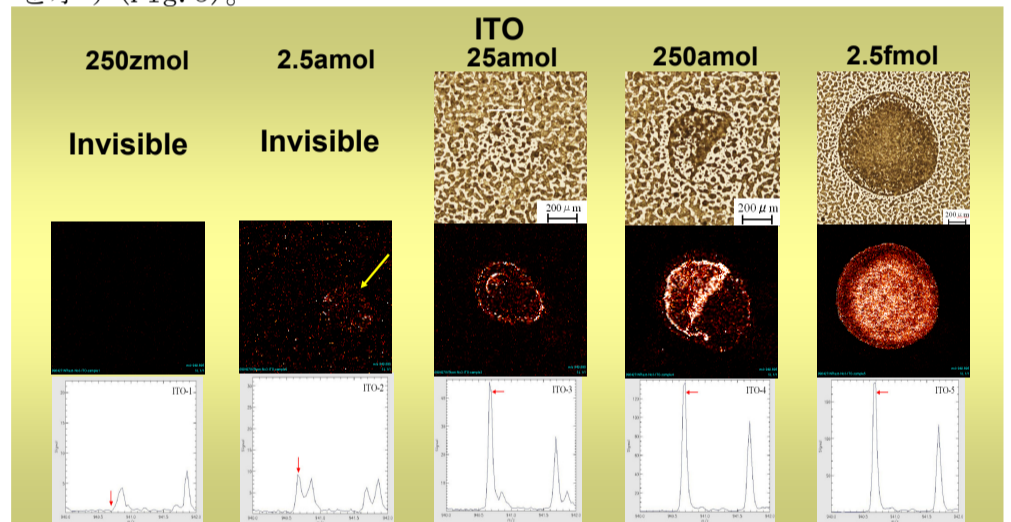


Fig.5 The optical images and MS images of the ITO glass sample, and spectra of the target peak.

【考察・まとめ】

1ピクセルあたりの測定下限の見積りはドロプレット全体のMSイメージング分析を行い、①標準試料滴下量を検出されたピクセル面積(一定の閾値でMSイメージングを2値化して算出)で割る方法(Binarize evaluation)、②標準試料滴下量を光学像より得られた面積で割る方法(Area distribution evaluation)の2種類で行った (Fig.6)。但し、光学像にて確認できない部分はMSイメージング像を基に評価した。その結果、評価①では生体試料上において標準試料が1ピクセルあたり少なくとも約20amol、ITOガラス上では約100zmol存在する結果となった。評価②では検出下限が生体試料上において1ピクセルあたり約3amol、ITOガラス上では約5zmol存在する結果となった。また、今回の生体試料ではITOガラスに比べ感度が200分の1以下に低下しているという結果が出た。これは主に生体切片由来のイオンにより、標準試料のイオン化がサプレッションを受けている影響によるものと考えられる。

評価②を用いて、滴下された標準試料が滴下部に均一に染み込んだと仮定すると、生体試料中に約200nM~600nMの濃度で存在する物質を観測可能である推察できる。

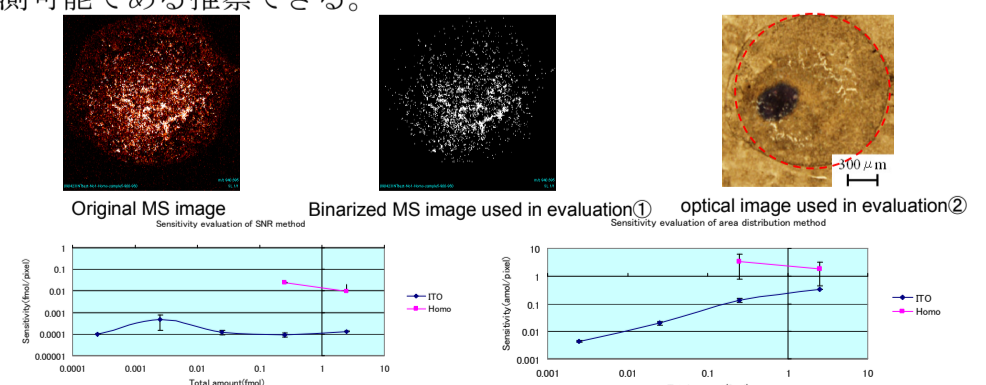


Fig.6 The sensitivity for MS imaging by the two evaluating methods. なお本研究は、独立行政法人科学技術振興機構の先端計測分析技術・機器開発事業「顕微質量分析装置の開発」にて実施している。