

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K17919

研究課題名(和文) 金属ナノ薄膜を利用した新規レーザー脱離イオン化法の開発および評価

研究課題名(英文) Development of novel laser desorption ionization with metal film

研究代表者

大坂 一生 (Osaka, Issey)

富山県立大学・工学部・准教授

研究者番号：90550244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、金属ナノ薄膜と脱離イオン化質量分析技術を組み合わせた新しいイオン化法 金属薄膜を利用した表面支援レーザー脱離イオン化(MF-SALDI)法を開発して、生体分子の一斉分析に有効なMF-SALDI法を構築してその最適条件とイオン化特性を解明し、MF-SALDI/MSを用いて脂質代謝と疾患の関連性の評価を行うための分析法の開発研究を行った。金属薄膜としてZrやPt, Agを用いることで、脂質や薬物を高感度に検出することが可能となった。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)とMF-SALDIを組み合わせた手法によって、それら化合物を高感度に検出できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来のMALDI/MSでは検出が困難である脂質を簡便に検出できるMF-SALDI/MS法を開発した。MALDI/MSで細胞組織切片上の成分をイメージングする場合は、試料調製時にMALDIのためのUV吸収性低分子有機化合物のマトリックス溶液を噴霧または塗布する必要がある。一般的なスプレー法ではスプレー中に滲むことで試料成分の位置が移動する場合もあり技術が必要とされていたが、本手法ではその問題がなく、脂質だけでなく薬物も高感度に検出できた。本手法は生物、医薬、工業系の様々な分野の分析に適用できる有効な手法であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated a novel ionization method for mass spectrometry (MS). We developed metal-film surface-assisted desorption/ionization (MF-SALDI) and elucidated the ionization properties. Lipids and drugs were analyzed using MF-SALDI/MS imaging. A hybrid ionization mass spectrometry method of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) and the SALDI allowed high sensitive detection of their compounds. The hybrid method, where a matrix was formed by sputtering Zr to form a thin nanoparticle layer before depositing MALDI organic matrix comprising CHCA by sublimation, resulted in a most high sensitive detection. In MS imaging, delocalization problems such as migration of analytes observed after matrix spraying and washing with aqueous solutions as sample pretreatment are not expected. The hybrid method is a novel sample pretreatment method that can improve the sensitivity of analytes while maintaining high spatial resolution in MALDI MSI.

研究分野：質量分析

キーワード：レーザー脱離イオン化法 質量分析 イメージング 脂質 薬物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

金属ナノ薄膜と脱離イオン化質量分析技術を組み合わせた新しいイオン化法スパッタ蒸着金属薄膜を利用した表面支援レーザー脱離イオン化法(Metal Film(MF)-SALDI)を開発して、様々な生体内物質を一度に検出してそれらの局在を明らかにした。ホルモンや生体内代謝物の脂質、また薬物の解析においては従来法よりも極めて有効であった。本手法のイオン化特性や最適な金属薄膜はまだ解明されていない。本申請では生体分子の一斉分析に最も有効な MF-SALDI 法を構築してその最適条件とイオン化特性を解明して、MF-SALDI 質量分析法を用いた脂質や薬物の代謝と疾患の関連性の評価を行うための手法を確立する。

2. 研究の目的

本研究では、従来の MALDI/MS では検出が困難である脂質を簡便に検出できる MF-SALDI/MS 法を開発する。MALDI/MS で細胞組織切片上の成分をイメージングする場合は、試料調製時に MALDI のための UV 吸収性低分子有機化合物のマトリックス溶液を噴霧または塗布する。一般的なスプレー法ではスプレー中に滲むことで試料成分の位置が移動する場合もあり技術が必要とされている。また MALDI では検出が困難な化合物も存在する。それらの化合物を検出するために、MF-SALDI/MS 法の研究を行う。MF-SALDI/MS のために用いる金属フィルムとしては、これまでは高価なプラチナ(Pt)について検証を行ってきたが、より安価な Zirconium (Zr)を用いて検証を行う。

3. 研究の方法

MALDI のための有機マトリックスには α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)を用いた。試料切片への MALDI マトリックス溶液の噴霧は、ImagePrep (Bruker Daltonics Inc.) を使用して行った。また、試料切片への CHCA の蒸着は、自作の蒸着装置を用いて行った。金属薄膜調製にはスパッタリング法を用い、3 nm の厚さになるよう Ar ガス圧やスパッタリング時間等を調整した。MALDI や ME-SALDI/MS による質量分析イメージング分析は、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計の FT-ICR MS (Solarix, Bruker Daltonics)を用いて正イオンモードで行い、データを取得した。

4. 研究成果

MF-SALDI/MS のために用いる金属フィルムとして Pt や Zr を用いると、グリセロ脂質を検出することができたが、リン脂質を検出することができず、その分解物であるホスホコリンが検出された。MALDI/MS ではリン脂質を検出できるため、MALDI と MF-SALDI のハイブリッド法で分析を行った結果、グリセロ脂質とリン脂質、また薬物など様々な化合物を高感度に分析できた。MALDI と MF-SALDI のハイブリッド法(matrix-enhanced (ME)-SALDI)を高感度化するために、最適化の研究を行った。標準試薬としてオランザピン(図 1)を用いて、薄膜には Pt を用いて検証した。オランザピンをマウスに 8 mg/kg の割合で経口投与した。投与した 2 時間後に凍結してクライオトームで切り出して作成した全身切片(厚さ約 20 μ m)を測定試料とした。MALDI の有機マトリックスには CHCA を用いた。金属薄膜には Pt を用いて、ME-SALDI/MS による質量分析イメージングを行った。

ME-Pt-SALDI で取得したデータを解析すると、MALDI の結果と同様に、消化管に残存しているオランザピンが高濃度で検出された。また FTICRMS で得られた精密質量データを詳細に解析したところ、マトリックスを CHCA にした ME-Pt-SALDI では、オラ

ンザピン由来と思われるイオンが腎臓に分布していることを示す画像を得ることができた (図 2)。一方。マトリックスである CHCA のイオン強度分布は、管腔構造である消化管では強く、肝臓等の臓器・組織では弱かった。これらのイオンにイオン強度分布の偏りがあることが確認された。広いの m/z 100-1000 レンジで画像を解析した際には、それと逆の関係にあった。このことから、肝臓などでオランザピン由来のイオンが検出できていない原因の一つはイオン化抑制現象であることが推測された。また、Zr でも同様の結果が得られることが示された。

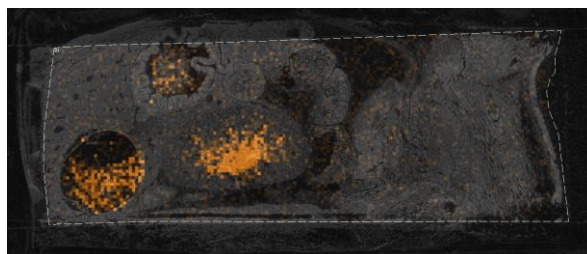
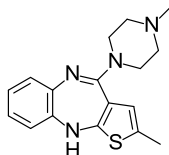


図 1 オランザピン

図 2 マウス全身切片上のオランザピンの局在分析。オランザピン投与後 2 時間の試料を ME-Pt-SALDI imaging MS で

上記の実験によって、胃内のオランザピンは検出されたものの肝臓等では検出されず、イオン化抑制の影響が原因であると考えられた。そのため、次にマウス肝ホモジネートにオランザピンを添加して凍結した後に切片としたものを試料として用い、利用する金属はリン脂質を吸着するとされているジルコニウム (Zr) に変更して MALDI と ME-SALDI の比較を行った。また、試料の前処理として水洗浄の効果についても検証した。コントロールマウス凍結肝を水で 2 倍にホモジネートした試料にオランザピンを添加混合し、凍結させた後に作製した切片を測定試料とした。有機マトリックスは CHCA を用いて、ImagePrep で試料切片上に塗布した。MALDI および Zr 薄膜を用いた ME-SALDI/MS イメージングを行った。肝ホモジネート切片におけるオランザピンのイオン強度を MALDI と ME-Zr-SALDI とで比較したところ、切片中のオランザピン濃度が 5 $\mu\text{g/mL}$ では ME-Zr-SALDI の方が約 3 倍イオン強度が高く、Zr 薄膜による感度向上効果が認められた。有機マトリックスを塗布する前に水で洗浄処理すると、CHCA の H^+ 付加体や Na^+ 付加体が増加すると共に、phosphocholine に相当するイオンがマススペクトル上で大きく増加した (図 3)。水洗浄により MALDI ではオランザピンのイオン強度が約 5 倍、ME-Zr-SALDI では約 2 倍高くなった。水洗浄処理が適さない試料では ME-Zr-SALDI は感度向上が期待できる有用な方法であることが示された。

Zr は Pt と同様に高い融点を持ち、熱伝導性が低いため SALDI に適していると考えた。Zr 薄膜と MALDI の有機マトリックスを組み合わせ

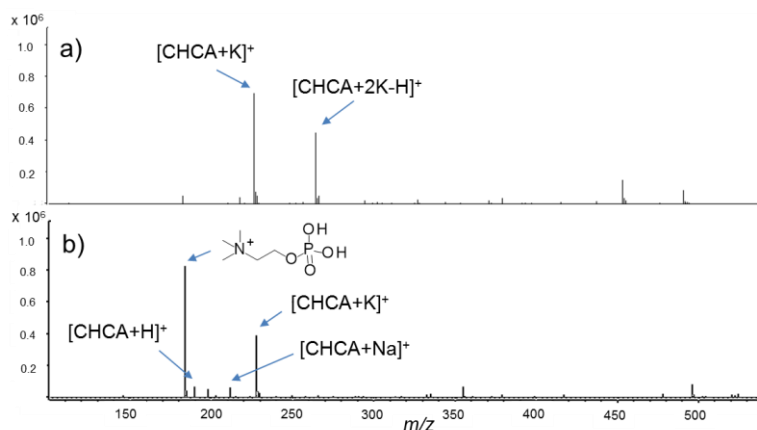


図 3 マウスの肝ホモジネートの a)前処理なし、b)前処理あり試料の MALDI/MS スペクトル

マトリックスエンハンスド SALDI (ME-SALDI)の試料調製条件を検討した。MALDI ではスプレー法と蒸着法、SALDI ではスパッタリングについて検証し、それらの前処理順による検出感度への影響を評価した(図 4)。その結果を図 5 に示す。

	前処理1	前処理2
A	Zr スパッタ	—
B	CHCA 蒸着	—
C	CHCA 蒸着	Zr スパッタ
D	Zr スパッタ	CHCA 蒸着
E	CHCA スプレー	—
F	CHCA スプレー	Zr スパッタ
G	Zr スパッタ	CHCA スプレー

図4 ME-SALDIのための試料前処理条件の検討

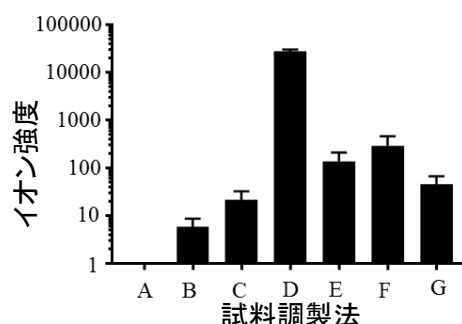


図5 試料調製法と検出感度の関係

Zr 薄膜を用いて SALDI/MS を行った結果、オランザピンの Na⁺や K⁺付加体を僅かしか検出できず、またプロトン付加体を検出できなかった。Zr スパッタリングの後に CHCA を蒸着して ME-SALDI/MS を行うと、CHCA を蒸着するだけの MALDI の 1700 倍のイオン強度でオランザピンのプロトン付加体が検出された。また、MALDI では検出が困難であるジアシルグリセロール C16:0-DAG および C18:1-DAG の K⁺付加体も同様に高いイオン強度で検出された。一方、CHCA 蒸着後に Zr スパッタリングをした試料の ME-SALDI の結果は、CHCA 蒸着のみの MALDI の場合と同程度のイオン強度しか得られなかった。Zr をナノレベルでスパッタした後に CHCA を蒸着した SALDI の場合、他の前処理方法に比べて CHCA のプロトン付加体の割合が高かった。化合物分子のイオン化にはマトリックス分子からのプロトン移動が関与しているため、このことがオランザピンのプロトン付加体の感度が向上した要因であると考えられる。Zr スパッタ後に有機マトリックスを蒸着させる方法でマウス肝切片のオランザピンの ME-SALDI/MSI を行った。その結果、上記と同様にオランザピンの検出感度上昇が確認された。前処理 D によるオランザピンの ME-SALDI/MS イメージングの結果を図 5 に示す。ランザピンはマウス肝臓組織切片上で均一に分散していることが示され、また高感度に検出できることが示された。モデル薬物のオランザピンだけでなく、グルタチオンのような内因性物質に関しても効果が認められた。この結果より、本手法は薬物分析への応用が期待される。

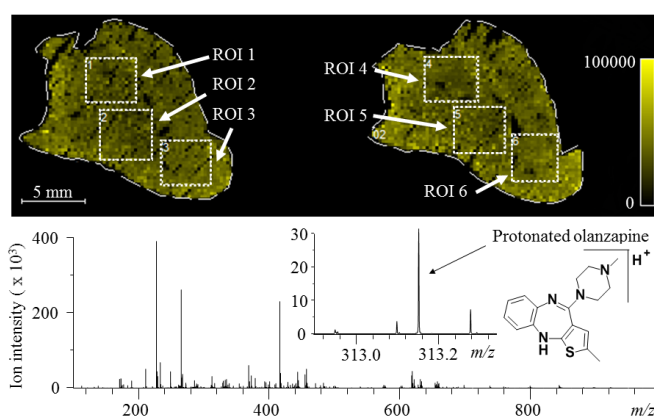


図6 前処理Dによるオランザピンの ME-SALDI/MSイメージング

以上より、ME-SALDI/MS イメージング法のイオン化特性と特徴が確認され、その最適化が達成された。本手法を用いて、様々な脂質や薬物を一度に検出することが可能となった。様々な化合物を同時に高感度に検出することで、疾患等の解析に有用であることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroshi Moriwaki, Takumi Otsuka, Yukari Kawabe, Issey Osaka, Akio Miyazato, Junpei Maruo, Osamu Yamada	4. 巻 428
2. 論文標題 Application of porous TiC ceramic powder as a substrate for the surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry to detection environmental pollutants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Ozawa, I. Osaka(corresponding), S. Hamada, T. Murakami, A. Miyazato, H. Kawasaki, R. Arakawa(corresponding)	4. 巻 32
2. 論文標題 Direct Imaging Mass Spectrometry of Plant Leaves Using Surface-assisted Laser Desorption/Ionization with Sputter-deposited Platinum Film	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Analytical Science	6. 最初と最後の頁 587-591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kazuyoshi Nozaki, Yuji Nakabayashi, Tatsuya Murakami, Akio Miyazato, Issey Osaka	4. 巻 54
2. 論文標題 Novel approach to enhance sensitivity in surface assisted laser desorption/ionization mass	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Mass Spectrom.	6. 最初と最後の頁 612-619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大坂一生	4. 巻 6
2. 論文標題 レーザー照射によるイオン化の原理	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Plasma Fusion Res	6. 最初と最後の頁 258-261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大坂一生	4. 巻 4
2. 論文標題 表面支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 117-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大坂一生
2. 発表標題 金属薄膜表面支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法による薬物の分析
3. 学会等名 平成30年度トメックス(富山医薬品化学研究会)第17回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大坂一生
2. 発表標題 質量分析法を用いた生体分子や薬物の局在分析法
3. 学会等名 富山薬窓会富山・石川合同支部の秋の交流会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大坂一生
2. 発表標題 金属薄膜を利用した表面支援レーザー脱離イオン化
3. 学会等名 第11回北陸合同バイオシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野崎和吉、大坂一生
2. 発表標題 有機マトリックスを共存させた金属薄膜表面支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析法によるマウス肝ホモジネート切片中のオランザピンの検出
3. 学会等名 日本質量分析学会 第65回質量分析総合討論会 2017 つくば
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小澤 智行、大坂 一生、川崎 英也、荒川 隆
2. 発表標題 Pt蒸着支援脱離イオン化を用いた様々な表面のMSイメージング解析
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大坂 一生、仲林 裕司、宮里 朗夫
2. 発表標題 金属薄膜を利用する表面支援レーザー脱離イオン化法による生体組織の質量分析イメージング
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大坂一生
2. 発表標題 薬学・農学・化学のための質量分析イメージング法
3. 学会等名 文科省ナノテクノロジープラットフォーム 地域セミナー in 帯広畜産大学 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 I. Osaka
2. 発表標題 Direct analysis of systemic insecticides in leaf using SALDI imaging mass spectrometry with sputter-deposited metal film
3. 学会等名 7th SETAC World Congress/ SETAC North America 37th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大坂一生
2. 発表標題 質量分析イメージング法を用いた生体分子の局在解析
3. 学会等名 文科省ナノテクノロジープラットフォーム カラダを見る～全身まるごと観察～(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 加藤雄太, 大坂一生, 川崎英也, 荒川隆一
2. 発表標題 合金スパッタリング法を利用した表面支援レーザー脱離イオン化による 質量分析イメージング
3. 学会等名 第64回質量分析総合討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 野崎和吉, 中田直之, 佐藤公也, 早田錦矢, 川崎英也, 荒川隆一, 大坂一生
2. 発表標題 有機マトリックスを共存させた表面支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析法によるマウス組織切片中の薬物検出
3. 学会等名 第64回質量分析総合討論会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大坂一生
2. 発表標題 ジルコニウム薄膜を利用したマトリックスエンハンスド表面支援レーザー脱離イオン化質量分析法によるオランザピンの高感度検出
3. 学会等名 日本質量分析学会 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考