

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26505011

研究課題名(和文) 新規なイオン化法を利用したイメージング質量分析の開発

研究課題名(英文) New Methods for Mass Spectrometry Imaging using SALDI and ESI Ionization

研究代表者

荒川 隆一 (Arakawa, Ryuichi)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：00127177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らが新しく考案した2種類のイオン化法である1) 白金スパッタ蒸着法を利用したレーザー脱離イオン化(Pt-SALDI)と2) タッピング型走査プローブエレクトロスプレーイオン化(t-SPESI)を利用して、新規なイメージング質量分析(IMS)法の開発を行った。Pt-SALDI-IMSにおいて、浸透性農薬を投与した植物の葉を試料として、植物内における農薬の分布の経時変化を追跡した。一方、内径150 nmのキャピラリーを持つナノピペットを用いたt-SPESIにおいて、OHPフィルム上に描いた赤色インクパターンの質量分析イメージングの結果、従来を超える10 μm以下の空間分解能を達成できた。

研究成果の概要(英文)：The important requirements for mass spectrometry (MS) imaging include achieving desorption/ionization of target samples on a surface as locally as possible. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) has been applied as a powerful ionization technique for MS imaging. However, since MALDI is operated under vacuum conditions, the sample preparation is less convenient for MS imaging. Recently, a number of ambient ionization methods such as desorption electrospray ionization (DESI) have been developed to allow MS imaging for the direct examination of unmodified samples. Here, we demonstrate new methods for MS imaging; one is platinum vapor deposition surface-assisted laser desorption/ionization (Pt-SALDI) and the other is tapping-mode scanning probe electrospray ionization (t-SPESI). These two methods were compared with the conventional methods of MALDI-MS and ambient ESI-MS to be evaluated in terms of simplicity of preparation and spatial resolution.

研究分野：質量分析化学

キーワード：白金スパッタ蒸着 レーザー脱離イオン化 タッピング走査プローブ エレクトロスプレー イメージング質量分析 葉の農薬分布 ナノピペット

1. 研究開始当初の背景

イメージング質量分析法(IMS)は、試料表面の分子の分布が見える手法として、その応用が急速に拡大している。測定対象も、生体分子を始め合成高分子などの有機分子から、金属原子などの無機物まで幅広い化学種の可視化が求められている。

(1) 白金スパッタ蒸着レーザー脱離イオン化(Pt-SALDI)

IMSを行う上で重要な条件は、試料表面を局所的に脱離イオン化することである。マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)は、UV吸収を有するマトリックスと呼ばれる有機化合物を用いてイオン化を行う。これを利用したMALDI-IMSは、生体試料中の脂質、代謝物、薬物等の分布解析に最も広く用いられている技術である。しかし、この手法には、マトリックスの塗布時に溶媒による試料の拡散、非導電性の試料に対して感度が低い、そのために試料の薄切片化の処理が必要などの問題点がある。2012年、研究代表者らは白金スパッタ蒸着法を利用した表面支援レーザー脱離イオン化法(Pt-SALDI)が低分子を高感度にイオン化できることを見いだした。白金スパッタ蒸着法(図1)の最大の利点は、試料に導電性を付与できるので肉厚のある試料の表面のイオン化が可能である。さらに、スパッタ法は、マトリックスの均一塗布を必要とするMALDI法に比べて、圧倒的に簡便で均一な蒸着が可能である。特に白金ナノ粒子は、薬物などの低分子化合物のイオン化が得意であるので、非導電性の葉、プラスチックフィルム表面に存在する農薬、添加剤のMSイメージングの実現化に期待できる。

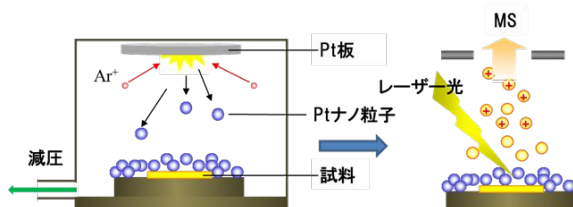


図1. 白金スパッタ蒸着法によるSALDI-MS

(2) タッピング型走査プローブエレクトロスプレーイオン化(t-SPESI)

最近、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)を利用した大気圧IMSの研究が非常に盛んである。2004年の脱離エレクトロスプレーイオン化法(DESI)の報告後、Nano-DESI、Liquid micro junction-surface sampling probe (LMJ/SSP)、liquid extract surface analysis (LESA)、平岡らの探針ESI法(PESI)などが報告されている。

DESI法において、ネブライザーガスで噴霧された電荷溶媒液滴が試料に向かって噴霧され、局所的な試料のイオン化が起こる。そのために、IMSの空間分解能が数100 μmと低い欠点をもつ。2012年、研究代表者らはタッピング型走査プローブエレクトロスプレ

レイイオン化(t-SPESI)を報告した。t-SPESIは大気圧下でキャピラリープローブを試料表面と質量分析装置の導入部の間で振動させサンプリング/イオン化を行う(図2)。プローブ内に高電圧を印加した溶媒を流し、プローブの先端が試料の微小領域に接触し架橋を形成し、試料分子はプローブ先端の溶媒に溶解する(図2a)。溶解した試料はMS導入部付近でテイラーコーンが形成されエレクトロスプレーイオン化される(図2b)。

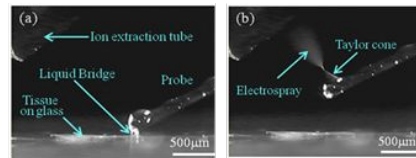


図2a

図2b

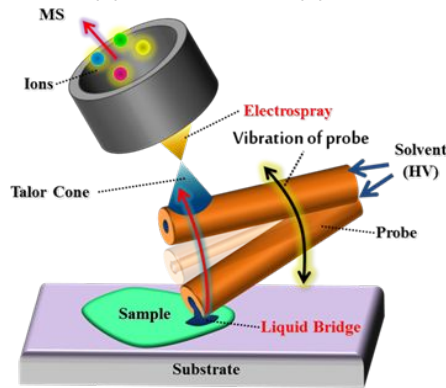


図2. タッピング型走査プローブエレクトロスプレーイオン化(t-SPESI)

2. 研究の目的

本研究の目的は、試料表面上に存在する低分子量の環境化学物質、薬物、工業材料の添加剤などの分布を簡便に計測するためのイメージング質量分析(IMS)法を開発することである。このIMS法を実現するために、研究代表者らが新しく考案した2種類のイオン化法である、

(1) 白金スパッタ蒸着法を利用したレーザー脱離イオン化法(Pt-SALDI)

(2) タッピング型走査プローブエレクトロスプレーイオン化法(t-SPESI)を利用して、新規なイメージング質量分析法の実現をはかることである。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者が考案した2種類の新規イオン化法であるスパッタ蒸着法とタッピングプローブESI法を利用して、前処理の少ない簡便・迅速なIMSの実現をはかる。

スパッタ蒸着法では、(1)各種金属、酸化物スパッタ蒸着のSALDI効果、(2)ナノ粒子表面で起こる分子のレーザー脱離イオン化過程のメカニズム、(3)MALDI法では困難な植物の葉などの絶縁体表面の農薬分布および材料表面中の添加物分布の解析を行う。

タッピングプローブESI法では、新しく導入した高質量分解能の飛行時間型質量分析

装置を改造して、質量分析イメージングにおける従来の最高空間分解を超える性能を持つシステムの開発を計画した。

#### 4. 研究成果

本研究では、(1) 白金スパッタ蒸着レーザー脱離イオン化法(Pt-SALDI)と(2) タッピング型走査プローブエレクトロスプレーイオン化法(t-SPESI)による新規イメージング質量分析法について、従来のイメージング技術と異なる優位性の検証を報告する。

##### (1) Pt-SALDI のイメージング質量分析(IMS) 脂質のイメージング

リン脂質の MALDI-IMS 分析は多数報告されている。脂質は哺乳類の細胞を構成する基本的な成分であり、生体機能において様々な役割を担っている重要な物質である。また、リン脂質の phosphatidylcholine(PC)とグリセロ脂質の diacylglycerol(DAG)はアルツハイマー病や癌に関係している。そのため、リポミクス分析において脳細胞中のリン脂質(PC)とグリセロ脂質(DAG)の同時分析は非常に重要である。しかし、MALDI-MSI では、PC の過剰なイオン収量が原因でイオンサプレッション効果が起こり、DAG を検出することができない問題点があった。

そこで、標準試料の PC と DAG を用いて、MALDI と Pt-SALDI のイオン化の比較を行った。その結果、MALDI では PC のみが観測され、一方、Pt-SALDI では DAG のみが検出された。PC と DAG の両方を同時に分析するために、MALDI と Pt-SALDI を組み合わせた ME(マトリックスエンハンスト)-Pt-SALDI 法を開発した。ME-Pt-SALDI 法では、DAG と PC を同時に検出できることがわかった。

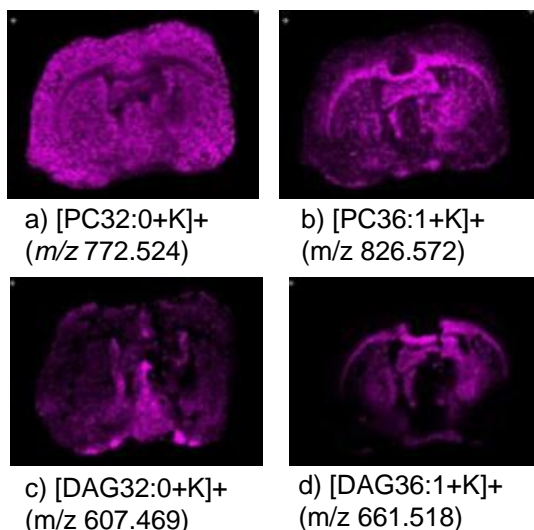


図 3. ラット脳の ME-Pt-SALDI-MSI

この知見をもとに、実際のラット脳細胞切片で MS イメージングした結果、MALDI-MS イメージングでは PC のみの分布を、Pt-SALDI-MS イメージングでは DAG の分布

しか観測できなかったが、ME-Pt-SALDI-MS イメージングでは、PC と DAG の局所分布の同時解析に成功した(図 3)。

##### 葉に浸透した農薬の局在分析

植物中の農薬の分布の研究は、MALDI-MS は葉の表面の殺虫剤の検出には適していないため、これまではラジオアイソトープ(RI)を含む農薬を用いて RI イメージングで分析されてきた。RI の取扱いは知識・専用施設・許可が必要であり、簡単に実験することはできない。MALDI-MS では、非導電性の葉表面でチャージアップが起こり、イオン化された成分が脱離されないため検出が困難である。

そこで、Pt-SALDI 法を用いて植物の葉の表面に浸透した農薬成分の直接分析を行った。その結果、Pt-SALDI はマトリックスの白金薄膜が葉に導電性を付与し、かつマトリックス効果による Pt-SALDI-MS によって、農薬の分布の可視化イメージングに成功した(図 4)。

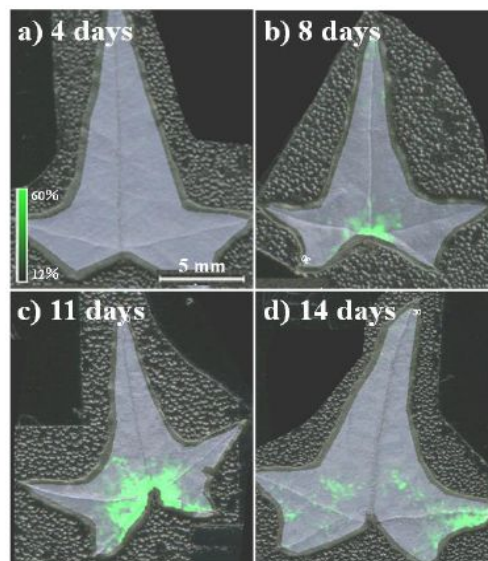


図 4. Pt-SALDI-MSI による葉に浸透した浸透性農薬アセフェートの局在分布

以上をまとめると、Pt-SALDI 法を用いた質量分析により、従来の MALDI や SALDI では困難であった化合物の分析や、非導電性材料の MS イメージングが可能となった。この手法は非導電性の厚い切片などを含むあらゆる材料の MS イメージングを簡便・迅速にできる可能性を持つため、その有用性は高いと考えられる。

##### (2) t-SPESI のイメージング質量分析(IMS)

t-SPESI 装置の概要図を図 1 に示す。キャピラリープローブは、市販のシリカチップエミッター(10  $\mu\text{m}$  i.d. 20  $\mu\text{m}$  o.d.)と自作のナノピペットを使用した。ナノピペットは、PE-22(Narishige, Japan)のプラー装置を用いて、ガラス管を加熱、伸長することで作製した。その内径は、140 nm であった。ナノピペット先端部の SEM 像を図 5 に示す。

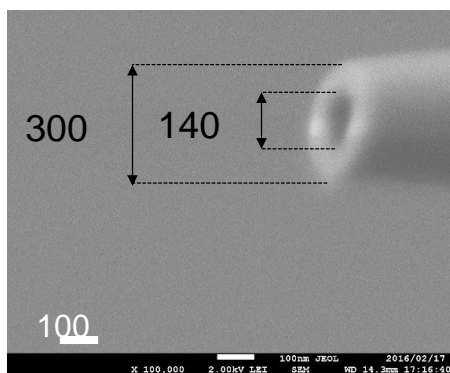


図 5. Nano pipette の SEM 像

このナノピペットを用いて、PEG やロードミン B の t-SPESI-MS の測定を行った。その結果、内径 10  $\mu\text{m}$  のシリカチップエミッター同様に、ナノピペットでも十分にイオンを検出することができた。

図 6 は、OHP フィルム上のインクパターンの光学写真と  $m/z$  825 の MS イメージング図を示す。 $m/z$  825 は 44 Da 間隔をもつイオン群のひとつであったので、インクの乾燥防止剤に添加されるポリエチレングリコール由来の物質と推測した。光学写真と MS イメージング図が対応していることから、ナノピペットを用いた t-SPESI イメージングに成功した。

図 7 はロードミン B 色素膜の t-SPESI の走

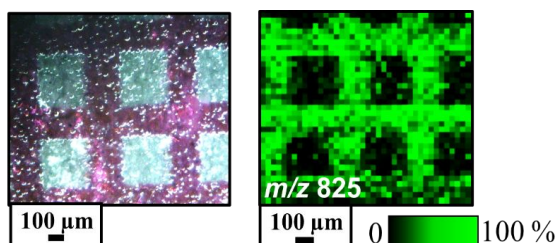


図 6. a) インクパターンの光学写真、  
b)  $m/z$  825 の MS イメージング図

査跡の光学写真である。内径 10  $\mu\text{m}$  のシリカチップエミッターではその幅は 15  $\mu\text{m}$  であり、一方ナノピペットでは 6  $\mu\text{m}$  であった。ESI 法による MS イメージングにおいて、現在の最高空間分解能は nano-DESI 法による 12  $\mu\text{m}$  で、その走査跡の幅は 8  $\mu\text{m}$  である。したがって、ナノピペットの空間分解能は nano-DESI よりも高く 12  $\mu\text{m}$  以下と推定できる。

t-SPESI 法によって、実試料であるラット脳や印刷シュリンクフィルムは、シリカチップエミッターを用いて MS イメージングに成功した。さらに内径の細い 0.14  $\mu\text{m}$  のナノピペットでも、OHP インクパターンのイメージングに成功し、空間分解能の向上を実現した。

今後の展開として、t-SPESI は表面とキャピラリーの液架橋界面における 化学反応の中間体の検出、ESI イオン化が困難な分子の誘導体化、タッピングによる深さ方

向の分析が可能なので、3 次元分布の測定の可能性が期待できる。ナノピペットの t-SPESI 法により、更なる高空間分解能の向上および MALDI-MS では不可能な凸凹表面の分析が実現できる。

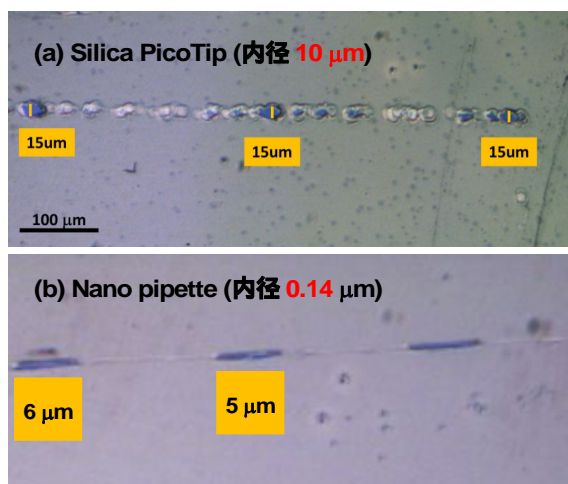


図 7. タッピング走査跡の顕微鏡観察

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

H. Kawasaki, M. Moriyama, and R. Arakawa, Aluminium foil suitable for Laser desorption/ionization mass spectrometry of fullerene, Science and Technology Reports of Kansai University, 査読無, 59, 33-38 (2017)

T. Kohigashi, Y. Otsuka, R. Shimazu, T. Matsumoto, F. Iwata, H. Kawasaki, and R. Arakawa, Reduced Sampling Size with Nanopipette for Tapping-Mode Scanning Probe Electro Spray Ionization Mass Spectrometry Imaging, Mass Spectrometry, 査読有, 5, S0054 (2016)

DOI: 10.5702/massspectrometry.S0054

M. Kurita, R. Arakawa and H. Kawasaki, Silver Nanoparticle Functionalized Glass Fibers for Combined Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy (SERS)/Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization (SALDI) Mass Spectrometry via Plasmonic/Thermal Hot Spots, Analyst, 査読有, 141, 5835–5841 (2016)  
DOI: 10.1039/c6an00511j

Y. Shigeri, T. Kamimura, M. Ando, K. Uegaki, H. Sato, F. Tani, R. Arakawa and T. Kinumi, 2-Hydrazinoquinoline: a reactive matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry to detect gaseous carbonyl compounds, Eur J Mass Spectrom, 査読有, 22, 83-90 (2016)  
doi: 10.1255/ejms.1413

T. Ozawa, I. Osaka, S. Harada, T. Murakami, A. Miyazato, H. Kawasaki, and R. Arakawa, Direct Imaging Mass Spectrometry of Plant Leaves Using Surface-assisted Laser Desorption/Ionization with Sputter-deposited

Platinum Film, Ana. Sci., 査読有, 32(5), 587-591 (2016)

DOI: 10.2116/analsci.32.587

T. Ozawa, I. Osaka, T. Ihozaki, S. Hamada, Y. Kuroda, T. Murakami, A. Miyazato, H. Kawasaki and R. Arakawa, Simultaneous detection of phosphatidylcholines and glycerolipids using matrix-enhanced surface assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry with sputter-deposited platinum film, J. Mass Spectrom., 査読有, 50, 1264-1269 (2015)

DOI: 10.1002/jms.3700

Y. Shigeri, A. Yasuda, M. Sakai, S. Ikeda, R. Arakawa, H. Sato and T. Kinumi, Hydrazide and hydrazine reagents as reactive matrices for MALDI-MS to detect steroids with carbonyl groups, Eur. J. Mass Spectrom., 査読有, 21, 79-90 (2015)

doi: 10.1255/ejms.1336

S. Nitta, A. Yamamoto, M. Kurita, R. Arakawa, H. Kawasaki, Gold-Decorated Titania Nanotube Arrays as Dual-Functional Platform for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, ACS Appl Mater Interfaces, 査読有, 6, 8387-95 (2014)

doi: 10.1021/am501291d.

R. Shimazu, Y. Yamoto, T. Kosaka, H. Kawasaki, and R. Arakawa, Application of tapping-mode scanning probe electrospray ionization to mass spectrometry imaging of additives in polymer films, Mass Spectrometry, 査読有, 3, S0050 (2014) 7 pages

DOI: 10.5702/massspectrometry.S0050

K. Nakai, H. Kawasaki, A. Yamamoto, R. Arakawa, R. N. Grass, and W. J. Stark Sensitive Detection of Aromatic Hydrophobic Compounds in Water and Perfluorooctane Sulfonate in Human Serum by Surface-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) with Amine Functionalized Graphene-coated Cobalt Nanoparticles Mass Spectrometry, 査読有, 3, A0028 (2014) 5 pages

DOI: 10.5702/massspectrometry.A0028

Y. Otsuka, J. Naitoa, S. Satoha, M. Kyogakua, H. Hashimoto, and R. Arakawa, Imaging Mass Spectrometry of Mouse Brain by Tapping-mode Scanning Probe Electrospray Ionization, Analyst, 査読有, 139, 2336-2341 (2014)

DOI: 10.1039/c3an02340k.

〔学会発表〕(計5件)

小東 剛、嶋津 亮、大塚 洋一、松本 卓也、岩田 太、川崎英也、荒川隆二、タッピング型走査プローブエレクトロスプレーイオン化法によるフィルム印刷物の質量分析イメージング、第21回高分子分析討論会、2016年10月20日~21日、名古屋国際会議場(名古屋)

川崎英也・栗田匡拓・荒川隆二、金属ナノ粒子集積体の増強効果を利用したLDI-MSとラマン分光法との連携分析、第64回質量分析総合討論会、2016年5月18日~20日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪)

福田朋恭・大坂一生・川崎英也・荒川隆二、MALDI-MSを用いた2次元マッピング法による糖タンパク質の解析、第64回質量分析総合討論会、2016年5月18日~20日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪)

小東剛・嶋津亮・大塚洋一・松本卓也・岩田太・川崎英也・荒川隆二、ナノサイズビペットの利用によるタッピング型走査プローブエレクトロスプレーイオン化質量分析イメージングの空間分解能、第64回質量分析総合討論会、2016年5月18日~20日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪)

加藤雄太・大坂一生・川崎英也・荒川隆二、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、第64回質量分析総合討論会、2016年5月18日~20日、ホテル阪急エキスポパーク(大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kikibun.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒川 隆一(ARAKAWA, Ryuichi)  
関西大学・化学生命工学部・教授  
研究者番号：00127177

### (2) 研究分担者

川崎 英也(KAWASAKI, Hideya)  
関西大学・化学生命工学部・教授  
研究者番号：50322285