[TECHNOLOGY BRIEF]

同一の組織切片からの異なる空間分解能での連続DESIイメージング

Emmanuelle Claude and Emrys Jones
Waters Corporation, Wilmslow, UK

目的

非破壊イメージング技術である脱離エレクトロスプレーイオン化（DESI）は、迅速に複数回の連続分析が可能であり、異なる空間分解能で同一の組織切片を測定可能であることを実証します。

背景

エレクトロスプレープローブを組み込んだ表面分析技術であるDESIは、幅広い範囲の試料のイメージング技術として利用することができます。試料のイメージングは、高精度のX、Yステージを用いてイオン化された溶媒スプレーの下の試料表面を走査することによって行われます。エレクトロスプレーの液滴が試料表面に衝突し、化学成分が脱離され、質量分析計の大気圧注入口へ運ばれます。様々な分析対象物のイオン化は、液滴に付加された電荷によって行われます。マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）のようなその他の質量分析ベースのイメージング技術とは異なり、試料のイメージングのためにマトリックスの塗布といった前処理を必要としません。

DESIによってイメージングを行う場合、試料から分析対象物の分子を脱離するために使用されるイオン化された溶媒スプレーの特性が空間分解能に影響を与えます。イメージングの空間分解能は、必要に応じて高くも低くも設定できます。

DESIイメージングは、同一の組織切片からの異なる空間解像度で複数回の分析が可能です。

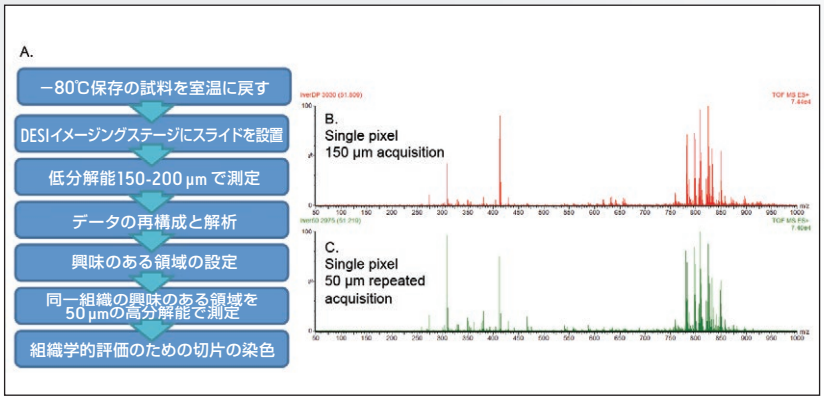

図 1
A：異なる空間分解能での複数のDESIイメージングのワークフロー
B：事前分析なしのブタ肝臓切片の空間分解能 150 µm のマススペクトル
C：DESIイメージング実行後のブタ肝臓切片の空間分解能 50 µm のマススペクトル

さらにDESIで使用する条件を調整することによって、イメージング測定時の試料表面の崩壊の程度を試料が破壊されないように厳密に制御することができます。DESIイメージングでは利用する多数のパラメーターを制御および操作できるため、同一の試料を異なる実験条件または技術で複数回測定することが可能となります。（すなわち、低い空間解像度のイメージングの後に、さらに興味のある領域の特徴付けを行うために、より高い空間分解能でイメージングを行うことが可能です）さらに、DESIイメージングに続けて、同じ試料をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色や別の染色または別のイメージング技術を用いた再測定に柔軟に対応することができます。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ソリューション

本研究では、強化された DESI イオン源を搭載した SYNAPT® G2-S*i* 質量分析計を用いて多数の組織試料を分析しました。データ取得および画像解析は MassLynx® と HDI® v1.3 ソフトウェアを用いて行いました。

ブタおよびヒト肝臓の新鮮な凍結組織は、クライオマイクロトームで厚さ 15 µm に切断し、通常のガラススライド上に解凍、マウントしました。必要に応じて、試料は −80℃で保存しました。分析の直前に試料を室温に戻し、さらなる前処理なしにステージ上に置き、強化された DESI イオン源を持つ SYNAPT G2-S*i* HDMS で分析しました。スプレー条件は、溶媒 90：10 = MeOH：水、流速 1.5 µL/ 分、N_2 ガス圧 100 psi、電圧 両極とも 5 kV に設定しました。X 軸方向の画素数はステージの移動速度とマススペクトルのスキャン時間で決定されます。Y 軸方向の画素数は、データを取得する 2 つの線の間隔によって定義されます。

最初の DESI イメージングでは、走査パターンを組織切片全体に定義し、解像度をブタ肝臓では 150 µm、ヒト肝臓では 200 µm に設定しました。2 回目のイメージングでは、同一の組織切片の特定の領域に対して両方の試料で解像度を 50 µm に設定し、実験を行いました。図 1A にこれらの実験のワークフローを示しました。

図 1B と 1C は組織切片の DESI イメージングから得られた脂質と内在性の代謝産物のマススペクトルです。それぞれのスペクトルは同一の組織から 150 µm と 50 µm の異なる 2 つの解像度でブタ組織切片上の一点から得られました。脂質のシグナルの相対感度はいずれの空間分解能でも同等でした。

図 2 に組織試料から得られたイメージングの例を示します。図 2A と 2B に *m/z* 927.7 のホスファチジルグリセロール (PG) のイオンイメージを示します。A) は最初に解像度 150 µm で、B) は解像度 150 µm のイメージングの直後に同一の組織切片を解像度 50 µm で測定したものです。

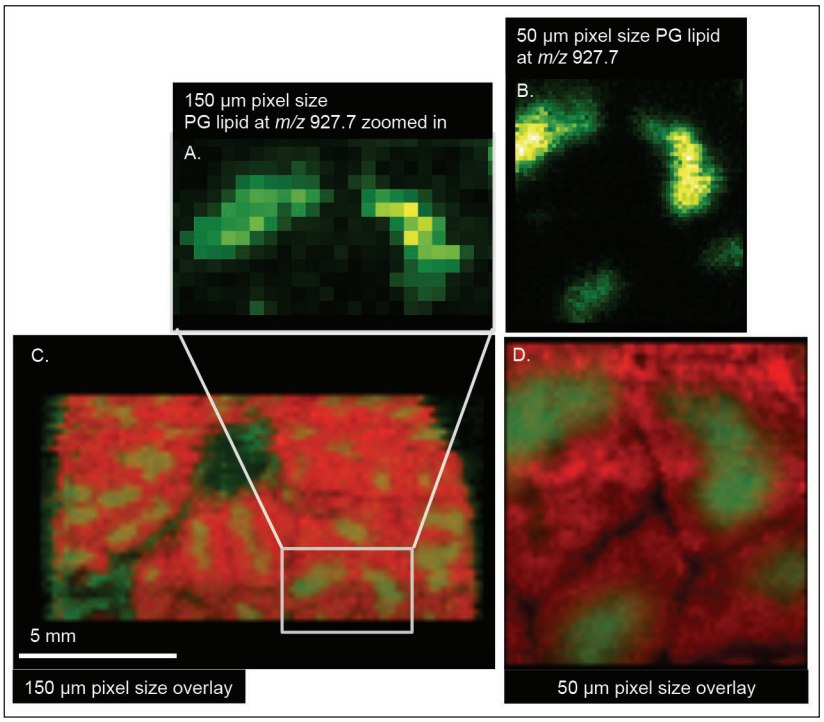

図 2 ブタ肝臓のポジティブイオンモードでの DESI イメージング
A と B) m/z 927.7
A) 事前分析なしで空間分解能 150 µm で測定
B) イメージング実行後に空間分解能 50 µm で測定
C と D) m/z 848.55 (PC (38：4) K +) (赤) と m/z 927.7 (緑) の重ね描き
C) 事前分析なしで空間分解能 150 µm で測定
D) イメージング実行後に空間分解能 50 µm で測定

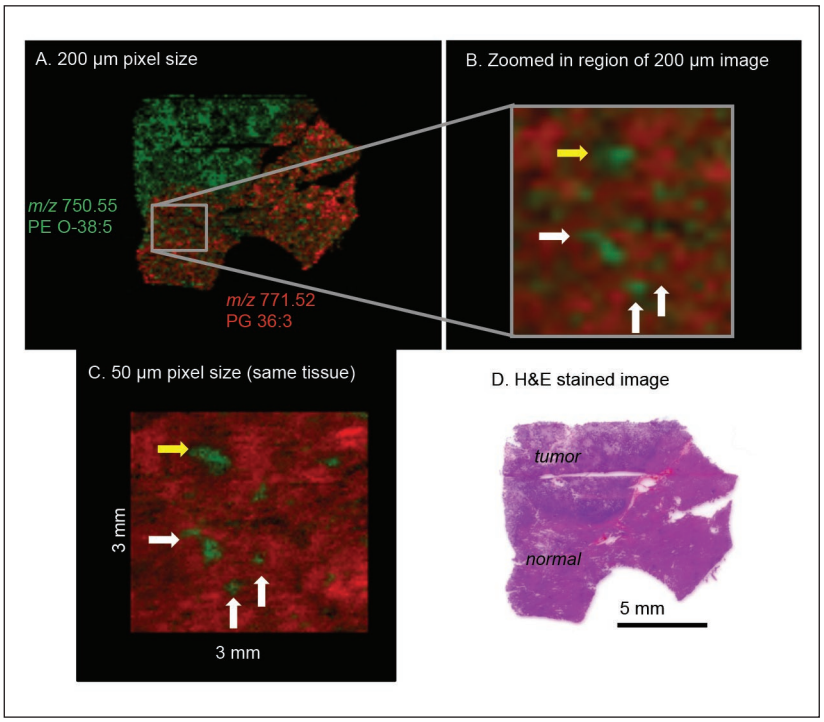

図 3. ヒト肝臓のネガティブイオンモードでの DESI イメージング
A) 事前分析なしの組織切片からの空間分解能 200 µm での m/z 771.52 (PG (36:3)) (赤) と m/z 750.55 (PE (O-38:5) (緑) の重ね描き
B) 「正常」組織の拡大図
C) イメージング実行後の組織切片からの空間分解能 50 µm での m/z 771.52 (PG (36:3)) (赤) と m/z 750.55 (PE (O-38:5) (緑) の重ね描き
D) 2 回の DESI イメージング後の組織切片の HE 染色イメージ

予想されるように、高い空間解像度では画質が著しく改善します。さらに同一の組織切片での 2 回目のイメージングでもイオンの顕著な非局在化が起こっていないことにも注目すべきです。MALDI のように試料に溶媒またはマトリックスの塗布が必要となる他のイメージング技術では、非局在化が問題となることがあります。

図 2C と 2D は *m/z* 848.55 のホスファチジルコリン（PC）（38：4）K＋（赤）と *m/z* 927.7 のホスファチジルグリセロール（PG）（緑）の重ね描きです。2 回目のイメージングで分解能 50 µm で取得された同一の脂質種のイオンイメージを図 2D に示しました。

同様のイメージングを正常な細胞と二次腫瘍の両方を含むヒト肝生検組織試料に対して行いました（図 3）。最初に解像度 200 µm で組織切片全体のイメージングを行いました。このイメージングから *m/z* 771.52 のホスファチジルグリセロール（PG）（36:3）（赤）と *m/z* 750.55 のホスファチジルエタノールアミン（PE）（O-38:5）（緑）が健常な組織と腫瘍組織のいずれかに特異的に局在し、同一切片の組織タイプの識別に利用できることがわかりました。50 µm の空間分解能で行った 2 回目のイメージングは、同じヒト肝臓組織切片の健常な組織と癌組織の境界領域に焦点を当てました（図 3B および 3C）。この空間分解能で得られた画像を詳細に確認すると、いくつかの腫瘍細胞が健常な肝臓組織の細胞間隙を通って侵襲的に移動し始めていることが示されています。

最終的に、細胞および組織形態と DESI イメージングの正確な相関を知るために DESI イメージング完了後に組織切片の HE 染色を行いました（図 3D）。

まとめ

DESI イメージングで、様々な組織試料の特に脂質および低分子の分布に関する重要な情報を提供できることが示されました。ここでは、DESI イメージングの可能性を様々な組織切片上で条件を最適化することによって高めることができることを示しています。具体的には、ガスおよび溶媒の流量ならびに電圧を制御することで 50 µm から 200 µm までの異なる空間分解能で効果的な DESI イメージングが可能です。

DESI イメージングは、比較的迅速に最初のスキャンを行い、続いてより高い解像度で関心のある領域の詳細なイメージングを行うことが可能です。さらに DESI イメージング完了後、形態解析のために組織切片を直接 HE 染色することが可能です。

DESI イメージングのメリット：

- 単一の試料で異なる空間分解能での複数回の測定が可能
- 同一の組織試料から迅速な最初のスキャンと、それに続く選択領域の詳細なスキャンが可能
- 組織を識別あるいは同定できるマーカー化合物の同定
- 最小限の試料調製でイメージングが実行可能
- 組織試料の DESI イメージングに続けて形態学的研究のための HE 染色が可能
- イメージングによる解析対象の化合物の非局在化が起こらない

謝辞

1. This study was carried out in conjunction with Imperial College London, UK. For the analysis of human samples, ethical approval was obtained from the National Research Ethics Service (NRES) Committee London – South East (Study ID 11/LO/0686). This work was supported by European Research Council under Starting Grant Scheme (Grant Agreement No: 210356) and the European Commission FP7 Intelligent Surgical Device project (contract no. 3054940).

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、SYNAPT、MassLynx、HDI および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年 5月 720005316JA PDF