



〈総説〉

質量分析の臨床検査への応用 — その現状と課題並びに将来の展望 —

蜂須賀大輔¹⁾、中西豊文¹⁾

Applications of mass spectrometry to clinical laboratory testing — Current status, issues and future prospects —

Daisuke Hachisuka¹⁾, Toyofumi Nakanishi¹⁾

Summary “Medical applications” of mass spectrometry (MS) have expanded with the development of electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI). Not only the complete decoding of the human genome sequence but also the development of these soft-ionization mass spectrometry dramatically have been accelerated the elucidation of the “Mysteries of Life Science”. Moreover, the MALDI-mass imaging (IMS) visualizes the localization of target molecules in tissue sections using the m/z index of ionized target molecules by the MALDI technique. This IMS is a new and powerful tool to identify target molecule in tissue section, and has the potential to replace the immunohistological and histopathological techniques using specific staining or specific antibodies. The tool are still many problems to be solved for clinical applications, but the visualization of the intra-tissue localization and expression levels of the target molecule provides a useful information that is directly linked to diagnosis and elucidation of pathology of disease. In this review, we would like to explain the future prospects of “MS technology” for “clinical laboratory testing” including our long-term achievements.

Key words: Soft-ionization, MALDI-imaging, Nicotine level, Kappa/lambda-chain, Abnormal hemoglobin, Amyloidogenic molecule

I. 緒言

質量分析 (MS) 技術の「医学応用」は、2002 年のノーベル化学賞受賞対象となったエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 並びにマトリクス支

援レーザー脱離イオン化 (MALDI) の開発により飛躍的に拡大し、従来のハードイオン化では不可能であったタンパク質・核酸など高分子量化合物のイオン化が可能となった。また、カリフォルニア大学サンタクルス校の Robert L

¹⁾ 修文大学 医療科学部 臨床検査学科
〒491-0938 愛知県一宮市日光町6

¹⁾ Faculty of Medical Sciences, Shubun University
6 Nikko-cho, Ichinomiya-city, Aichi 491-0938, Japan

連絡先：中西豊文
修文大学 医療科学部 臨床検査学科
Tel: +81-586-45-2101
E-mail: nakanishi.t@shubun.ac.jp

受付日：2023年1月23日
採択日：2023年2月1日

Sinsheimerらにより立案された「ヒトゲノム計画」によってヒト遺伝子(約22,000)の完全解読が2003年4月に完了した事を受け、MS技術による「生命の謎解き」が一気に進展した。

一方、バンダービルト大学のRichard M Caprioliにより考案・開発された質量イメージング(IMS)法は、MALDI法によってイオン化された標的分子のm/zを指標にした組織切片内局在の可視化であり、従来の特異染色あるいは特異抗体を用いた免疫組織学的・病理組織学的解析法に取って代わる可能性を有する新解析法である¹⁾。解析対象は、医薬品・有機化合物の他、生体内の神経伝達物質・糖質・脂質・ペプチドなどの低分子や、タンパク質・核酸などの高分子まであらゆる分子に拡大している。その標的分子の組織内局在や発現量の可視化は、診断・病態解明に直結する有用な情報となるが、診断・病態解明に寄与するバイオマーカーなど生理活性を有する生体高分子の解析に関しては、臨床応用するにはまだまだ解決すべき問題が山積しており、国内外のIMS解析グループが継続検討中である。その中で、*on-tissue*酵素消化IMS解析やデータベース検索による標的分子の同定法²⁾が汎用され一定の成果も得られているが、簡便性・迅速性に欠ける。近年のハード・ソフト両面でのMS技術革新によって、空間分解能が飛躍的に上昇し1個の細胞内分子動態も解析可能となった。更に、イオン化法も「MALDI」以外に「DESI (Desorption electrospray ionization: 脱離エレクトロスプレーイオン化)」や「(Nano) SI (Secondary ion: 2次イオン)」などを適応したIMS解析例が多数紹介されており、今後の更なる適用範囲の拡大が期待される³⁾。

今回のテーマに関して、我々グループ(清水章:大阪医科大学名誉教授)の長年の成果⁴⁾を交えて今後の「MS技術」の「臨床検査」への展望について解説したい。

II. ソフトイオン化MSを用いた 臨床生化学検査項目の解析

1. 異常ヘモグロビン(Hb)および糖化ヘモグロビン解析

1949年Linus C. Pauling等により「タンパク質の構造異常→機能異常→病気の発症」(分子

病概念)が提唱され、その代表的例として鎌形赤血球症(Sickle cell anemia)患者より見出された構造異常Hb(HbS)の発見を契機に異常Hb研究は分子病理学の発展に貢献をした。これまでに発見された異常Hb症は、チアノーゼ、多血症、溶血性貧血等、血色素異常症に認められる典型的な検査所見を呈する症例と臨床的に無症状で、糖化Hb(HbA1c)溶出パターン異常により偶然発見される症例に大別される。実例として、空腹時血糖値とHbA1c値の乖離例、HPLC法とラテックス凝集法によるHbA1c値の乖離例、並びに正常HbA1c溶出位置とは異なる位置に余剰成分のピークが認められる場合は、異常Hbの共存の可能性が推察される。特に、糖化Hb測定が健康診断の検査項目に採用されて以降は、HPLC溶出パターン異常により見出される例が著増しており、統計的には日本人2500~4000人に1人の頻度で見出される可能性を有する。更に、近年の地球規模でのグローバル化により「人の流れ」が活発化した結果、医療現場においても疾病の国際化など、これまで日本社会では未知、あるいは非常に稀な特定地域のみで発生する風土病に遭遇する機会が増えている。異常Hb症に関しても、日本人には非常に稀なHb遺伝子の点変異も報告されており、日頃から検査結果と臨床所見との乖離に注目し、的確に対処出来なければ誤診や疾病の見落としに繋がる。

Fig. 1に、過去に我々が経験した代表的な異常Hb症例とHPLC法によるHbA1c溶出パターンを示す。 β 鎖Hbを支配する遺伝子は1ヶ所であり、ヘテロ接合体では正常と異常鎖の存在比は1:1であるため、構造異常が糖化率に影響を及ぼさない場合、糖化成分の比率も同様となり、見掛け上HbA1c真値の約50%となり、日常検査法でも検出可能である。一方、 α 鎖Hbでは2ヶ所($\alpha 1$ と $\alpha 2$)であり、ヘテロ型では正常と異常鎖の存在比は3:1であり、真のHbA1c値の25%程度の低下であり、異常鎖の存在を見落とす危険性が β 鎖より高く、注意を要する。

一方、サラセミアの場合はHbの合成障害であり、小球性低色素性貧血を呈するためHbA1cは低値を示す。また、鉄欠乏性貧血と誤診されるため鑑別の上でも異常Hb解析が重要である。ホモ接合体の場合は α 鎖、 β 鎖いずれかのグロ

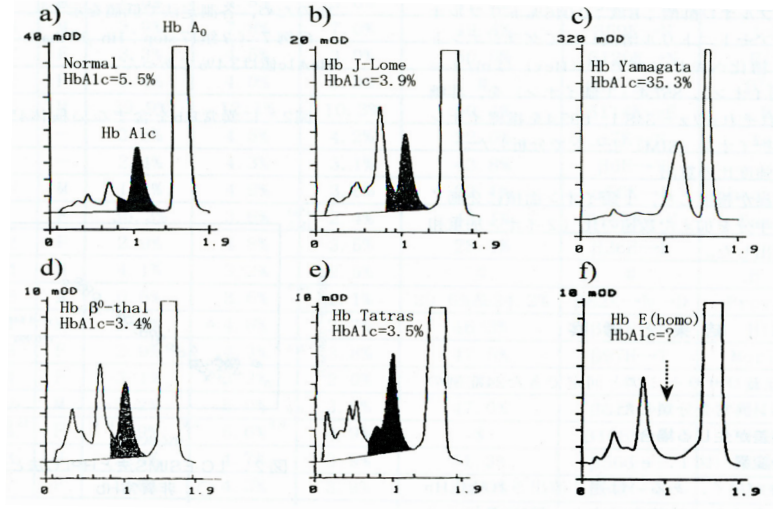


Fig. 1 異常Hb症患者血液の糖化Hb溶出パターン
 a) 健常者
 b) 異常Hb β 鎖例: Hb J-Lome 糖化成分が2分される
 c) 異常Hb β 鎖がHbA1c溶出位置に重なる例(Hb Yamagata/Hb Mito)
 d) β-サラセミア
 e) 異常Hb α 鎖例: Hb Tatra
 f) 異常Hb β 鎖例: ホモ接合体 HbE

異常ヘモグロビン(Hb)

発見の端緒

糖化Hb (HbA1c) 値と他の糖尿病モニター検査値との乖離

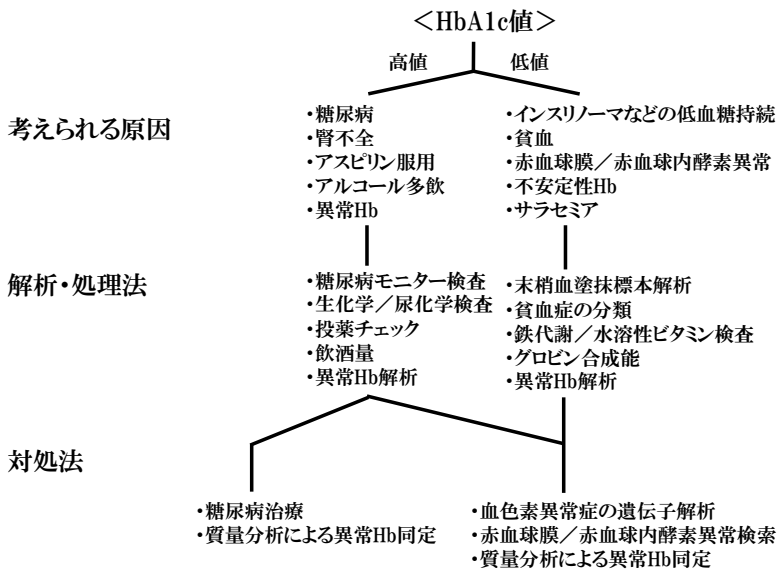


Fig. 2 色素異常症の解析フローチャート

ピン鎖が両方とも変異が存在するため、正常なHbA1c分画位置に溶出されず、日常検査法では測定不可となる。

これまでに国内医療機関より依頼を受け、患者溶血液のグロビンを解析試料に、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESIMS) にて異常Hb症と診断し得た症例数は、計130症例を数えた。その殆どは、血糖値とHbA1c値の乖離現象を契機に発見される症例であり^{5,6)}、我々の確立した血色素異常症の解析フローチャート (Fig. 2) に従って異常Hb構造解析を実施した。

2. 尿中モノクローナル免疫グロブリン軽鎖 (kappa & lambda 鎖) の鑑別⁷⁾

従来、モノクローナル性免疫グロブリン (M-Ig) の同定には、セ・ア膜電気泳動での α_2 ~ γ 領域のシャープなピーク検出、各種特異抗血清を用いた免疫電気泳動によるM-bowの検出、免疫固定法によるM-Igの検出等により日常検査法として実施されている。一方、MS法によるタンパク質・核酸など生体高分子量化合物の解析は、1981年和田等が世界に先駆け電界脱離質量分析法 (FDMS) による異常ヘモグロビンの解析に始まり、更にESIやMALDIなどソフトイオン化法の登場によって加速された。臨床検査領域においては、2018年「MALDI-TOF MSによる感染症起因菌同定」への保険適用を契機に、MS法による検査項目の計測の試みが加速している。今回、簡便な前処理法を組み合わせたMALDI-TOF MS法による尿中M-Ig軽鎖 (M-Ig L)

迅速かつ分別解析法を確立し、M-Ig異常症患者尿に応用した。

多発性骨髄腫 (MM) 患者尿を用い、MALDI-TOF MS法 (Autoflex speed : Bruker Daltonics) 並びにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 / ウエスタンブロット / 増強化学発光検出法 (SDS-PAGE / WB / ECL法) にて尿中M-Ig Lプロファイルを明らかにした。患者尿は、脱塩および濃縮を目的にUltrasel™-3K (Merck社製) にて処理し、MS解析に供した。また、尿タンパク陽性例は予めAffi-Gel™ (Bio Rad社製) にてアルブミンを除去した後、同様の前処理操作を行った。実際のプロトコールをFig. 3に示す。

MALDI-TOFMS解析は、イオン化試薬にシナピン酸 (Nacalai Tasque社製) を用い、リニアモードにて実施した。一方、電気泳動はマルチゲルIIミニ (Cosmo Bio社製) を用い、分離した尿中タンパク質をPVDF膜に転写後、1次抗体にはヒトベンス・ジョーンズ蛋白 (BJP) 由来抗 κ (sc-52338 : Santa Cruz Biotech社製) 及び λ 鎖モノクローナル抗体 (sc-52339)、2次抗体はHRP標識抗体を用い、ECL™ Prime WB検出試薬 (Merck社) にて抗 κ / λ 鎖抗体陽性バンドの検出、その泳動位置より単量体、2量体及び多量体を同定した。

精製M-Ig λ 鎖8例を用いたMALDI-TOF MS解析では、単量体由来の分子イオン[M*]がm/z 22460+/-155Da、2量体イオン[2M*]がm/z 45039+/-337Da、3量体イオン[3M*]がm/z

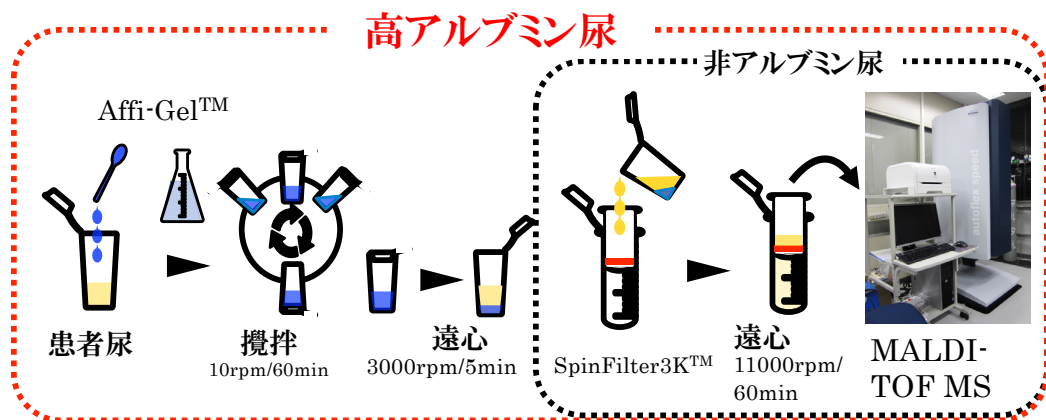


Fig. 3 MALDI-TOF MSによる尿中モノクローナル免疫グロブリン軽鎖解析の為の前処理手順

67889±801Da、4量体イオン[4M⁺]がm/z 89144±3086Daにそれぞれ検出され、分子イオン強度より[2M⁺]/[M⁺]比を算出すると1.16±0.56であった。

一方、MM患者尿では、[M⁺]がm/z 23483±980Da、[2M⁺]がm/z 46356±1400Da、[3M⁺]がm/z 68562±2356Da、[4M⁺]がm/z 92529±3484Daに検出された。患者尿の[2M⁺]/[M⁺]比は、κ型BJP (IEFにて同定)では、0.06±0.07、λ型BJPは0.39±0.34であった。またMALDI-マスパターンから、前者は単量体単独型が大多数を占め、後者は2量体優位型および両者共存型で、単量体単独型は皆無であった。その結果をFig. 4に示す。MALDI-TOF MS法による[2M⁺]/[M⁺]比は、SDS-PAGE / WB / ECL法と一致しない例も若干認められたが、κ型とλ型の鑑別が可能であった。また、n>3多量体[nM⁺]の検出も可能であった。本MALDI-TOFMS法はスピнкаラムにて脱塩・濃縮するだけの前処理操作でM-IgLを検出し得る迅速簡便なスクリーニング法として有用と考える。

今後、κ/λ鎖の比率を算出し得る定量解析の確立が望まれる。

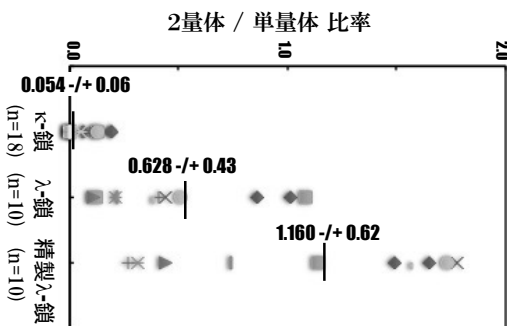


Fig. 4 免疫電気泳動によるタイピングされた多発性骨髄腫患者尿中の[ca 45kDa]/[ca 23kDa]のイオン強度比の散布図

3. MALDI-TOF MS による感染症起因菌の迅速同定

従来の臨床検査室での感染症起因菌の同定法は、グラム染色や培養コロニーの形態学的検査、生化学的検査が主流であり、解析結果が得られるまで少なくとも2~3日間を要した。また、標的微生物のグループ区分(グラム陽性球菌、グラ

ム陰性桿菌、嫌気性菌、酵母、糸状菌など)ごとに異なるプロトコルや生化学的同定キットを用いる必要があり、煩雑な手作業や高い専門性が求められる。一方、医療現場では、感染症に対する治療方針の確定、感染症の拡散防止の為、信頼性が高くかつ迅速な感染症起因菌の同定報告が求められている。

そこで、MALDI-TOF MS装置を用い、微生物特有のリボソーム構成タンパク質(16Sリボソームタンパク質)を標的に得られた16Sリボソームタンパク質プロファイルと既知標準菌株ライブラリー中のパターンを比較照合し、目的菌種を同定する新法が開発された。MALDI-TOF MS法は、日常検査法に比して特異性・迅速性に優れている。2018年、MS法による微生物同定検査が健康保健適用となったのを契機に、全国各医療施設に次々に導入された。本法を用いた迅速同定プロトコルを従来法と比較し、血液培養陽性サンプルを用いた解析結果をFig. 5に示す。

臨床検体(血液、尿、糞便、喀痰等)から培養で発育した細菌や酵母様真菌の培地上のコロニーを対象に微生物同定を実施しているが、菌血症・敗血症等の起因菌を検出・同定検出する場合は、培養コロニーではなく、血液培養陽性培養液から直接同定し得る前処理法を確立し、臨床サンプルについてMS解析した結果、グラム陰性桿菌については100%、陽性球菌については28%の同定率であった。解析結果が示す様にグラム陽性菌に関しては、まだ改善の余地を残している。同定ソフトウェアは、約4000株の標準菌株のマススペクトルパターンと、それをパターン化処理したMSP(MainSpectra)ライブラリーを備えている。更に、真菌(40属110菌種)および抗酸菌(90種)の同定ライブラリーが備わり、院内感染対策上重要な菌種の同定率が向上した。

MALDI-TOF MS法の利点として、以下が挙げられる。

- 1) 同定時間の短縮→感染症の治療方針の早期決定
- 2) MS測定の処理能力が極めて高い→多数サンプルを短時間に同定可能
- 3) 測定ランニングコストの安価化
- 4) 好気性一般細菌、嫌気性菌、酵母様真菌に

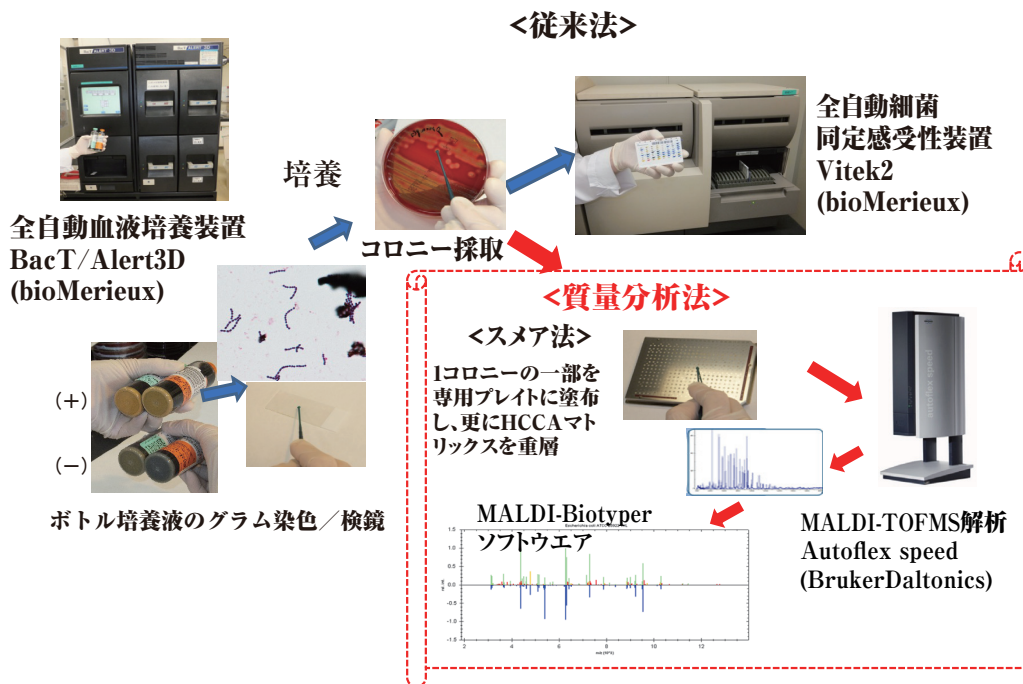


Fig. 5 血液培養陽性サンプルのMALDI-TOF MS 解析結果
Mycotoxins, 63 (2), 209-216 (2013) より一部改変

関係なく、基本的手技が同様→検査効率向上および検査試薬の無駄削減

- 5) マスペクトルパターンは菌株特異的→複数株のグルーピングが可能→パルスフィールドゲル電気泳動法に代わる菌株識別法として院内感染対策の有用
- 一方、問題点としては、以下のとおりである。
- 1) 現状では、薬剤感受性試験への応用は困難。
 - 2) 糸状菌や抗酸菌などは、まだ最適な前処理法が確立していない菌種については、同定は不確実。
 - 3) 遺伝子学的に相違のない菌種間（大腸菌と赤痢菌など）は区別が不可能。
 - 4) 複数菌種が混在している試料の場合、新規導入された同定ソフトウェアでは2菌種の同定が可能

Ⅲ. 病理組織切片中の疾患関連タンパク質のMSイメージング (IMS) 解析

新鮮凍結組織の作成には、液体窒素・ドライアイス・冷溶媒などそれぞれの方法を採用され

ているが、冷n-ヘキサン法（1分間浸漬）がIMS解析・色素特異染色・免疫抗体染色等に最適であった。一方、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 処理に関しては、浸漬時間の長短に拘らず完全タンパク質分子のMSスペクトルは検出できなかった。この事実は、タンパク質をはじめとした生体高分子解析法として致命的欠点であり、多くのIMS研究者が解析対象をタンパク質から低分子に移行した最大の理由である。IMSシグナル強度に関しても、現行のMALDI法では、20kDaを超える分子ではイオン強度が極端に低下する。イオン化効率の上昇を目的に、ガラススライド上に重金属類（金、白金等）を蒸着させ組織切片をマウントし、IMS解析した結果、明らかな感度上昇が認められる。

1. FFPE 肺組織切片中のアミロイド原性タンパク質分子のIMS解析

病理組織診断にてアミロイドーシスと診断されたFFPE肺組織標本のIMS解析の機会を得た。KMnO₄処理後のコンゴレッド染色での染色性の保持および簡易偏光によるコンゴレッド陽性

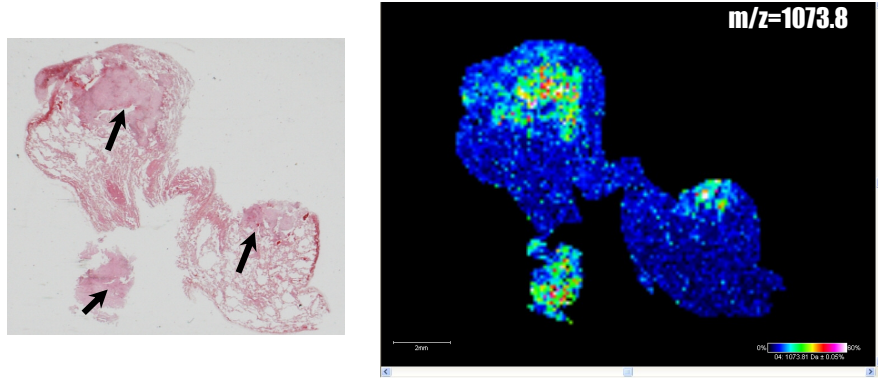


Fig. 6 肺アミロイド症組織切片のHE染色像（左側：ロウ様無構造）とon-tissueトリプシン消化によって生成したペプチド、 $m/z = 1073.5$ のヒートマップ画像（右側）

部位に一致したアップルグリーン偏光像を認めた事からAL型アミロイドの存在を確認し、更に電子顕微鏡所見では10nm針状アミロイド線維の伸展を認めた。脱パラ処理したFFPE肺組織切片上にTPCK-トリプシン溶液を噴霧し37℃ / 2時間にて断片化後、CHCA（ペプチド類の専用イオン化試薬）溶液を更に噴霧後、IMS（MS / MS）解析した。コンゴレッド陽性部位に局在する断片化ペプチドの分子イオンをMS / MS解析した結果、アミロイド関連成分の断片化ペプチドの分子イオン（ $MH^+ = 1923$ ）を検出した。この $m/z = 1923$ のヒートマップでは、コンゴレッド染色陽性部位と一致した（Fig. 6）。更に、TOF / TOF解析データベース検索した結果、免疫グロブリンG軽鎖（ λ ）の48^{aa}~56^{aa}のアミノ酸配列に一致したスペクトルを得た。これら結果より、AL型アミロイドーシスと診断した⁸⁾。

2. 質量イメージング（IMS）法による鑑識科学 / 薬物動態解析

大阪府警科学捜査研究所および大阪医科薬科大学法医学と共同研究をスタートさせた。非侵襲的 / 経時的に試料採取が可能である「毛髪」の縦断面を解析対象とし、その断面上を連続走査するIMS法を医薬品・麻薬・覚せい剤などの薬歴追跡法を世界に先駆け確立した（特願2012-198042：「毛髪中に含まれる生理活性物質の解析方法」）。従来法では数十本の毛髪が解析試料として必要であり、毛髪からの標的分子の抽出や誘導体化など前処理操作が煩雑で、かつ毛髪

表面の汚染や単毛髪で過去に反復または単発に摂取した薬物や嗜好品などの体内蓄積量の経時的变化（3時間毎に2~3ヶ月間）を連続的にかつ定量的に追跡出来る新手法である。既に、鑑識科学の現場で用いられ、薬物動態や法中毒学領域の新しい解析技術として実用化された⁹⁾。

更に、本法の定量法の確立を目的に、長期喫煙者毛髪中のニコチン量の測定に応用した¹⁰⁾。Fig. 7に示す様に、喫煙者より2 cm単毛髪を採取し、SDS溶液にて毛髪表面に共存する物質を洗浄後、マイクロトームにて毛髪表面のキューティクルを切開し、毛髪髓質を露出させる。次に、内部標準として¹³C₃-ニコチンをマトリックス溶液と共に噴霧し、3時間毎の毛髪内ニコチン量の変動を明らかにした。本法は、受動喫煙等毛髪表面の汚染や脱色操作によるニコチン消失を回避出来る方法として今後、毛髪中に存在する医薬品等の定量法として実用化可能と考える。

IMSが登場して早15年を過ぎ、種々の検討から医療現場で使用可能かどうかを判断する時期に入ってきたと実感する。ただ、当初考えていた様なタンパク質などの生体高分子化合物の解析には大きな制約が有る。特に、医療現場で扱われるであろうFFPE組織中の病因分子のIMS解析は困難を伴う。実際、我々も経験したアミロイド分子の様な難~不溶性の沈着タンパク質の検出・同定には非常に有用な解析手段の1つとなるであろう。新鮮凍結切片を用いた解析では、既知のタンパク質（<20kDa）の組織内局在性はヒートマップ等で比較的容易に明らかにす

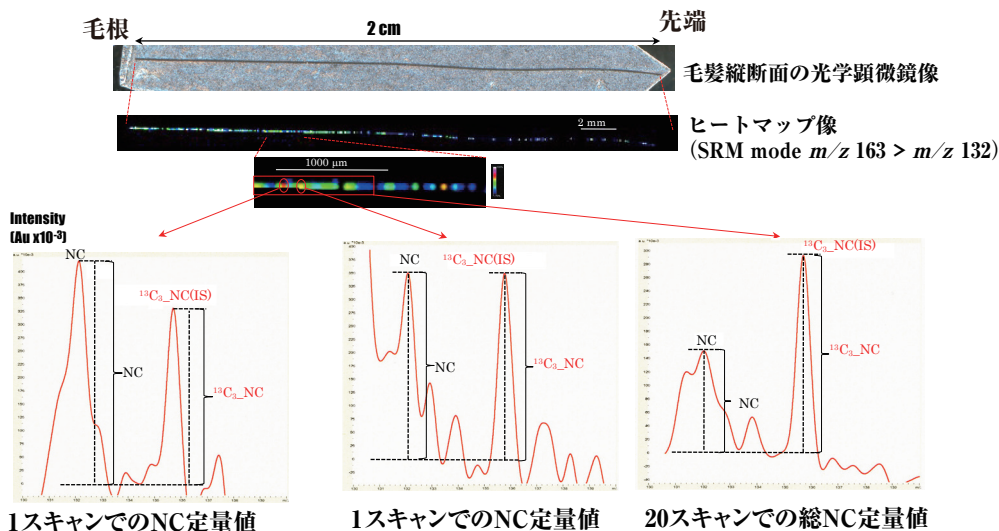


Fig. 7 定量MSイメージング法を用いた長期喫煙者単毛髪中のニコチン値測定

ることができる。一方、脂質・薬物・活性アミンなどの低分子のIMS解析は活発に実施されている。IMS法を用いて神経伝達物質であるアセチルコリンの脳内分布の可視化に初めて成功するなど目覚ましい成果を上げており、今後パーキンソン病、アルツハイマー病や認知症などの神経変性疾患の発症機序を解明する糸口となる事は間違いのないであろう。

IV. 二次イオン質量分析法 (NanoSIMS) による1細胞内の分子動態の解析

免疫組織化学 (IHC) は、大部分の固形組織悪性腫瘍の診断精密検査の一部として採用されているタンパク質発現を可視化するためのツールである。既存IHCメソッドは、発色色素を生成する蛍光体または酵素レポーターでタグ付けされた抗体を使用する。これらのレポーターは、同時に使用するとスペクトルと空間のオーバーラップを示すため、マルチプレックス IHC は臨床現場では日常的に使用されない。

SIMSは質量分析法の一種で、固体試料表面にセシウムや酸素のイオンビームを照射し、試料から発生する二次イオンを質量分析計によって検出する。水素 (H) からウラン (U) までの全元素の分析を高感度で行うことができ、特に同位体分析が可能であることはSIMSの利点と

言える。これまでSIMSは、鉱物内の微量元素や同位体の分析手法として、隕石分析など宇宙科学・地球科学分野で活用されて来た他、半導体などの材料内微量元素濃度分布の評価法として使用されて来た。近年では、生物体内での物質移動や代謝解析など生命科学分野への応用も増えており、M. Angelo³⁾等は、希土類元素でタグ付けされた2次抗体を用い、乳癌組織切片中の多種類の疾患マーカー分子の分別可視化する多重イオンビーム・イメージング法を開発し、乳がん組織切片中の9種の疾患マーカーの一斉解析に応用した。

V. 今後の展望

1. ソフトイオン化質量分析法は「生命科学の謎解き」には必須で有り、誰もが簡単に使えるアイテムとなった。但し、臨床検査項目に関しては未だ制約がある。その中で体液中の疾患マーカー解析は、次期保険適用の最有力候補となるであろう。
2. IMSの病理組織診断への応用に関して、まず、病理標本のホルマリン固定では、短時間であったとしてもメチレン架橋等による高次構造変化は回避出来ず、本法による完全タンパク質分子の解析は不可能であった。しかし、賦活化処理後、*on-tissue*トリプシン消化後の肺および心臓

組織切片を用い、IMS解析によって病理組織学的検索に一致する結果を得る事ができた。ただ、現状では、IMS解析と病理組織検索結果を合わせて総合的に診断する事が最適と思われる。

3. 解析対象としての毛髪は今後、有用なアイテムとなるであろう。ミクロトームを用いることによって、毛髪縦断面剥離は均一に、短時間で再現性よる作製可能となった。今回、ニコチン添加毛髪を用いた定量的質量イメージング(QIMS)解析は、再現性・回収率ともに最良であり、白髪長期喫煙者・脱色毛髪では、ニコチン値は低値傾向にあった。この事から、50 μm 毎(3時間伸張に相当)の毛髪中ニコチン量の推移を明らかにする事が出来る。本QIMS法は薬物動態等低分子物質の組織内定量法として、有用と思われる。

VI. 結語

MSイメージング、特にタンパク質解析の将来像は、病理医並びに主治医の理解・協力の下、質量分析技術を有する臨床検査技師(『医用質量分析認定士』有する)の方々の臨床及び研究の最前線で活躍する場面が、今後確実に増えていくものと確信する。

謝辞

本研究は、大阪医科薬科大学清水章名誉教授、田窪孝行前教授のご指導の下、当教室MS研究グループの研究成果である。共同研究では、大阪医科薬科大学医学部基礎系および臨床系諸教室、大阪府警科学捜査研究所、Bruker Daltonics社、島津製作所並びに日本電子株式会社の教室員・研究員の方々にご指導並びに試料提供を頂いた。*on-tissue*トリプシン消化/MALDI-TOF MSMS解析並びにFTMS解析ではブルカーダルトニクス株式会社カスタマー・サポートセンターの蕨澤崇博士に大変お世話になりました。また著者が、Texas大学およびVanderbilt大学留学時にご指導頂いたRichard M Caprioli教授とその教室員の方々に深謝致します。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

文献

- 1) Seeley EH and Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. Proc Natl Acad Soc USA, 1025: 18126-31, 2008.
- 2) Workflow manual for spatially resolved tryptic on-tissue digestion and matrix application using the ImagePrep (Version 1.2, Jun 2009) from Bruker Daltonics.
- 3) Angelo M, Bendall SC, Finck R, Hole MB et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumor. Nat Med, 20: 436-42, 2014.
- 4) Shimizu A, Nakanishi T, Miyazaki A. Detection and characterization of variant and modified structures of proteins in blood and tissues by mass spectrometry. Mass Spectrom.Rev, 25: 686-712, 2006.
- 5) Nakanishi T, Miyazaki A, Iguchi K, Shimizu A. Effect of hemoglobin variants on routine glycohemoglobin measurements assessed by a mass spectrometric method. Clin Chem, 46: 1689-92, 2000.
- 6) Nakanishi T, Miyazaki A, Shimizu A, Yamaguchi A, Nishimura S. Assessment of the effect of hemoglobin variants on routine HbA1c measurements by electrospray ionization mass spectrometry. Clin Chim Acta, 323: 89-101, 2002.
- 7) Asano S, Masutani R, Ueda K, Igarashi K, Nirasawa T et al. Application of MALDI-TOF MS analysis for rapid discrimination of free immunoglobulin light chains, kappa and lambda isotypes in patients with monoclonal immunoglobulin gammopathy. Medical Mass Spectrometry, 5: 47-54, 2021.
- 8) Nakanishi T, Ito M, Nirasawa T, Tsuji M and Takubo T. Topologies of amyloidogenic proteins in Congo red-positive sliced sections of formalin-fixed paraffin embedded tissues by MALDI-MS imaging coupled with on-tissue tryptic digestion. Clin. Biochem, 46: 1595-600, 2013.
- 9) Miki A, Katagi M, Kamata T, Zaitu K, Tatsuno M, Nakanishi T, et al. MALDI-TOF and MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of methamphetamine incorporated into hair. J.Mass Spectrom, 46: 411-6, 2011.
- 10) Nakanishi T, Nirasawa T, Takubo T. Quantitative mass barcode-like image of Nicotine in single longitudinally sliced hair sections from long-term smokers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry imaging. J Anal Toxicol, 38: 349-353, 2014.