OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	がん細胞への薬剤取込評価に向けたレーザーイオン化質量分析イメージング法の開発
Author(s)	閑念, 弘樹
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88067
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士学位論文

がん細胞への薬剤取込評価に向けた レーザーイオン化質量分析イメージング法の開発

Development of Laser Ionization Mass Spectrometry Imaging for Drugs Administered in Cancer Cells

閑念　弘樹

2022 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻
量子ビーム応用工学領域（粟津研究室）
28H18811

主査：粟津邦男　教授（量子ビーム応用工学領域）

副査：村田勲　教授（量子反応工学領域）

副査：間久直　准教授（量子ビーム応用工学領域）

要旨

抗がん剤治療、および光線力学的治療の集学的治療による治療効果を検討するために、それぞれの治療で用いる薬剤の細胞への取込評価が求められている。本研究では、複数の薬剤の分布測定が可能な質量分析イメージング (MSI) 手法の検討を行った。抗がん剤ドセタキセルに対する耐性を獲得させた PC-3-DR 細胞に対して、ドセタキセル、および光感受性薬剤であるプロトポルフィリン IX (PpIX) を浸漬させ、質量分析イメージングを行った。本研究で開発した 6-アザ-2-チオチミンのゼオライトマトリックスを用いた場合、ドセタキセルは PC-3-DR 細胞からは検出されなかったのに対し、PpIX はドセタキセルの耐性細胞においても検出され、PC-3-DR 細胞にも PpIX が集積することが分かった。次に細胞単体のスケールで薬剤の取込を評価するために、高空間分解能化を目指し、大阪大学において開発された投影型の高空間分解能質量分析イメージング装置を用いて、細胞スケールでイオン像を取得するためのサンプル調整方法を検討した。質量分析イメージングに適用できる細胞の固定方法を検討し、その結果色素で染色した細胞から細胞スケールでイオン像を取得することに成功した。またイオン像の妥当性を評価するために、同一サンプルにて蛍光イメージングも取得できるサンプル調整手法を開発した。より鮮明なイオン像を得るためにはイオン化効率の改善が必要であったため、高空間分解能 MSI に向けて、結晶サイズが比較的大きいとされる有機マトリックスを微細な結晶サイズで塗布するための手法、および結晶サイズが有機マトリックスに比べて小さいとされる金属ナノ粒子の検討を行い、ともにイオン化補助剤の結晶サイズを小さくしつつ、薬剤の検出感度を高めることに成功した。今後、現在開発中の検出器システムを用いることで、細胞スケールでの薬剤の分布測定の可能性になると期待される。

Abstract

The combined therapy using chemotherapy and photodynamic therapy (PDT) has been proposed for anticancer drug resistant cancer cells. For this reason, the distributions of each drug administered in cancer cells are important. However, in conventional mass spectrometry imaging (MSI), the detection sensibility was too low and the spatial resolution is limited to about 10 μm. Therefore, cellular scale MSI and ionization condition for multiple drugs have been investigated. Firstly, detection of multiple drugs was investigated and ion images of each drugs administered in prostate cancer cells PC-3 and its anticancer drug resistant cells PC-3-DR were obtained simultaneously using zeolite matrix, which was developed in this study. Secondly, sample preparation method for the evaluation of the distribution obtained high spatial resolution MSI with fluorescent imaging was investigated. Then, the method for cellular scale imaging of stained cell kept its form was developed and ion was detected only from stained cells. Since it was necessary to improve the ionization efficiency in order to obtain clearer ion images, the method with applying an organic matrix and ionization method using NPs for the fine crystal size were investigated. In both methods, signal intensity of PpIX was increased while reducing the crystal size of the ionization reagent. In the future, it is expected that MSI on cellar scale will be achieved using the new detector system currently under development.

目次

第 1 章 序論 1
1.1 光線力学療法と抗がん剤治療の複合によるがん治療効果の向上 1
1.2 前立腺がんに対する集学的治療の必要性 2
1.3 複数の薬剤の可視化における質量分析イメージングの利点 3
1.4 新規質量分析イメージング計による空間分解能の向上 4
1.5 新規イオン化手法による検出感度の向上 5
1.6 薬剤の新規質量分析イメージング手法の開発によって期待される他の恩恵 5
1.7 本研究における目的、および実験工程 6
第 2 章　測定原理 7
2.1 マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 7
2.2 飛行時間型質量分析法 8
2.3 遅延引き出し法 9
2.4 イオンリフレクター 11
2.5 マイクロチャンネルプレート 12
2.6 走査型質量分析イメージング 13
2.7 投影型質量分析イメージング 14
2.7.1 アインツェルレンズ 15
2.7.2 引き出し後差動加速イオン引き出し法 16
2.7.3 ディレイライン検出器 17
第 3 章　実験装置、および試料 18
3.1 実験装置 18
3.1.1 走査型質量分析イメージング装置 18
3.1.2 投影型質量分析イメージング装置 20
3.2 測定試料 21
3.2.1 抗がん剤、ドセタキセル 21
3.2.2 光感受性物質、プロトプルフィリン IX 22
3.3 倒立型光学顕微鏡 23
3.4 抗がん剤耐性ヒト前立腺がん細胞 24
3.5 イオン化補助剤 25
3.5.1 有機マトリックス 25
3.5.2 無機マトリックス 26
3.5.3 ゼオライトマトリックス 26
3.6 イオン化補助剤の塗布装置 27
3.6.1 スプレー塗布装置 27
3.6.2 真空蒸着塗布装置 28

第 4 章　ドセタキセルの検出感度の向上に向けた新規イオン化補助剤の開発 29
4.1 ドセタキセルのイオン化に適切なイオン化補助剤の検討 29
4.1.1 実験方法 29
4.1.2 実験結果 29
4.2 ナトリウムイオン、カリウムイオンの添加によるドセタキセルの検出感度の向上..... 32
4.2.1 実験方法 32
4.2.2 実験結果 32
4.3 ゼオライトマトリックスによる検出感度の向上 34
4.3.1 実験方法 34
4.3.2 実験結果 34
4.4 ゼオライトマトリックスによるドセタキセル、および PpIX の同時検出 37
4.4.1 実験方法 37
4.4.2 実験結果 37
4.5 ゼオライトマトリックスの調整条件が検出感度に与える影響 38
4.5.1 ゼオライトマトリックスの濃度と検出感度の関係 38
4.5.2 ゼオライトとマトリックスの混合比と検出感度の関係 41
4.5.3 ゼオライトマトリックスの溶媒と検出感度の関係 42
第 5 章　ゼオライトマトリックスによる細胞に取り込まれたドセタキセルの検出 43
5.1 PC-3 細胞に取り込まれたドセタキセルの検出 43
5.1.1 実験方法 43
5.1.2 実験結果 43
5.2 細胞に取り込まれたドセタキセルの検出感度に関する考察 45
第 6 章　走査型 MSI による PC-3、および PC-3-DR 細胞における薬剤取込の評価 48
6.1 細胞に取り込まれた薬剤の検出に適したイオン化補助剤の検討 48
6.1.1 実験方法 48
6.1.2 実験結果 48
6.2 同一細胞懸濁液サンプルにおけるドセタキセル、および PpIX の複数回数イメージング 50
6.2.1 実験方法 50
6.2.2 実験結果 50
6.3 同一細胞におけるドセタキセル、および PpIX の同時イメージング 52
6.3.1 実験方法 52
6.3.2 実験結果 52
6.4 ヒト、および実験動物の前立腺組織に取り込まれたドセタキセルの検出におけるゼオライトマトリックスの有効性の考察 54
第 7 章　投影型 MSI における薬剤分布の評価に向けた同一サンプルでの MSI、および蛍光イメージングが可能なサンプル調整手法の開発 56
7.1 細胞に取り込まれた PpIX の MSI、および蛍光イメージング 56

7.1.1 実験方法 56
7.1.2 実験方法 57
7.2 金のコーティング手順が MSI の検出感度に与える影響に関する考察 58
第 8 章　細胞スケールでの MSI に向けたサンプル調整手法の検討 59
8.1 細胞に取り込まれた PpIX の MSI、および蛍光イメージング 59
8.1.1 実験方法 59
8.1.2 実験結果 59
8.2 高空間分解能イメージングに向けたイオン化補助剤塗布方法の検討 61
8.1.1 実験方法 61
8.1.2 実験結果 61
第 9 章　細胞スケールでの MSI に向けた新規イオン化補助剤の検討 63
9.1 PpIX の検出に適した金属ナノ粒子の検討 63
9.1.1 実験方法 63
9.1.2 実験結果 63
9.2 金属ナノ粒子の調整における有機溶媒の比率の最適化 65
9.2.1 実験方法 65
9.2.2 実験結果 65
9.3 金属ナノ粒子の結晶サイズによるイオン化効率の違い 67
9.3.1 実験方法 67
9.3.2 実験結果 67
9.4 金属ナノ粒子の滴下順によるイオン化効率の違い 69
9.4.1 実験方法 69
9.4.2 実験結果 69
9.5 カチオン化剤添加によるイオン化効率の向上 71
9.5.1 実験方法 71
9.5.2 実験結果 71
第 10 章　細胞スケールでの投影型 MSI 72
10.1 投影型質量分析イメージング計による染色細胞の観察 72
10.1.1 実験方法 72
10.1.2 実験結果 72
10.2 投影型質量分析イメージング計におけるイオン像の乱れに関する考察 74
10.3 MULTUM における PpIX の検出 76
10.3.1 実験方法 76
10.3.2 実験結果 76
10.4 走査型 MSI、および投影型 MSI における検出感度の違いに関する考察 78
第 11 章　結論 80
参考文献 82
謝辞 86

第 1 章 序論

1.1 光線力学療法と抗がん剤治療の複合によるがん治療効果の向上

1981 年に脳血管疾患を抜いて日本の死因第一位となりその後も罹患率は急激に増加傾向にある[1]。がんの三大療法として、手術により腫瘍部分を摘出する外科療法、放射線を患部に照射してがん細胞を死滅させる放射線療法、化学物質を投与してがんの進行を抑制する化学療法が確立されている。多くの場合で、がんの再発率を下げ、また患者への負担を軽減するために、これらの治療を適切に複数組み合わせる集学的治療が行われる[2, 3]。例えば外科治療前に化学療法を行うことで外科治療を行う範囲が縮小され、手術による患者の負担の軽減、および外科治療のみでは治療しきれずに再発の原因となるがん組織の治療が期待できる。近年、光線力学療法(photodynamic therapy; PDT) と抗がん剤治療による新たながんの集学的治療が注目されている[4, 5, 6]。Fig. 1-1 に示すように、PDT では腫瘍集積性のある光感受性物質を体内に投与し、レーザーなどの光源を使用することで薬剤を励起させ、活性酸素を周辺に発生させる。これにより、局所的にがん細胞を死滅させる治療法であり[7]、現在、早期の肺がん、胃がん、食道がん、子宮頸がんなどに対して治療が行われている[8]。PDT のメリットとして、正常組織への影響が小さく、治療後の QOL が確保でき、また放射線治療とは異なり、複数回の治療が可能であることが挙げられる。しかし、PDT では治療範囲がレーザー光の届く深さの数 mm 程に制限されるため[9]、深さ方向に大きながんには治療効果が期待できない。そのため、現在主に検討されている治療対象が早期のがんのみである。一方、抗がん剤治療における問題点として、薬剤耐性を持ったがん細胞が挙げられる。この薬剤耐性がん細胞への治療法の確立が早急に求められており、近年、新規治療法の開発が数多く研究されている。抗がん剤耐性がん細胞を PDT にて死滅させるができれば、抗がん剤治療、および PDT の集学的治療法による安全、かつより効果的ながん治療を確立することができる。

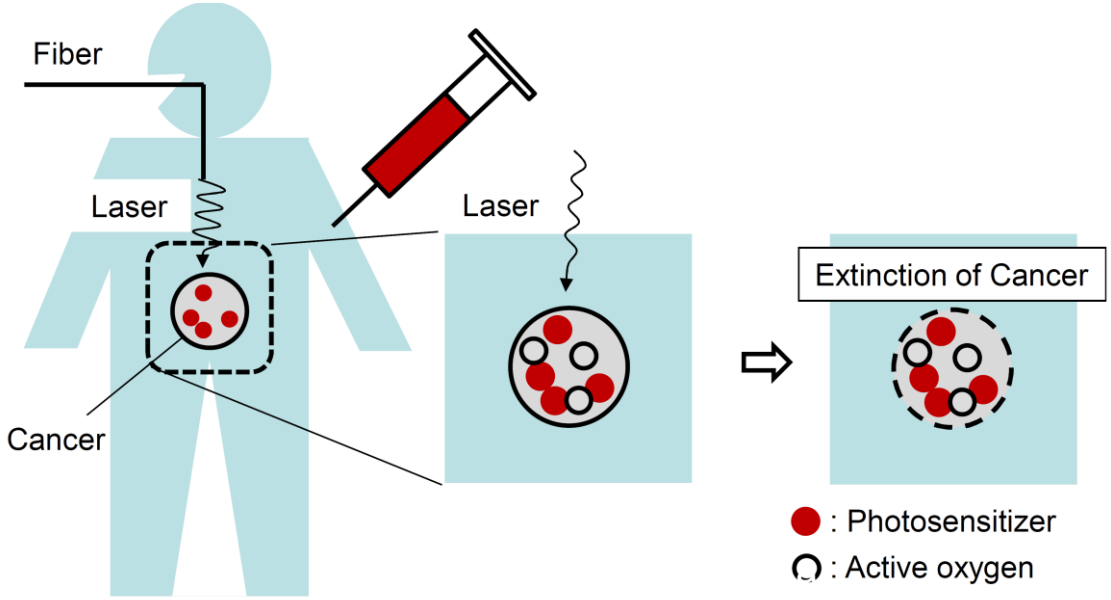


Fig. 1-1 Mechanism of action in PDT

1.2 前立腺がんに対する集学的治療の必要性

抗がん剤治療と PDT による集学的治療が有効と考えられるがんの一つとして前立腺がんが挙げられる。前立腺がんは 2012 年、米国では、男性悪性腫瘍における罹患率が第一位、死亡率が二位で約 9% を占めている [10]。食生活の欧米化などの生活習慣により日本においても増加傾向にある。前立腺がんは高齢になるにつれて罹患率が急増するため、今後の我が国における高齢化社会において、患者数がさらに増加すると考えられている [11]。高齢者の前立腺がん治療において、外科治療では身体的負担が大きいため、局所的に治療ができ負担の少ない放射線治療や、女性ホルモンの投与などにより男性ホルモンの一種であるテストステロンの分泌を抑え、前立腺がんの活動を抑制するホルモン治療が一般的である。しかし、放射線治療は再発すると治療が困難であり、ホルモン治療においても、長期間継続すると徐々にホルモン治療に抵抗性を示す去勢抵抗性がん細胞が増え、治療効果が消失してしまうという課題がある [12]。放射線治療やホルモン治療が困難となった前立腺がんに対する有効な治療法はないという状況の中、日本では 2008 年にタキサン系の抗がん剤ドセタキセル(商品名: タキソテール、サノフィ・アベンティス株式会社) が登場した。ドセタキセルは当時の標準療法と比較して、前立腺がんを 20～24 %減少させることができることが示され、ホルモン治療が効かなくなった去勢抵抗性前立腺がんへの新たな治療選択肢となった [13]。このドセタキセルという抗がん剤はがん細胞の分裂に必要な微小管（チューブリン） に結合して、その働きを阻害する。しかし、近年の研究結果で、ドセタキセルに対して耐性を持つがん細胞の存在が示唆されている。これらのがん細胞は P 糖タンパク質(Permeability-glycoprotein; P-gp) と呼ばれる、細胞膜上に存在し細胞毒性を有する化合物などの細胞外排出を行う機能が高いため、細胞内に集積しにくく、耐性を獲得しており、ドセタキセルの治療効果を低下させる要因の一つとれている [14, 15, 16]。そこでこのドセタキセル耐性ヒト前立腺がん細胞を標的とした新規治療法の確立が求められており、抗がん剤ドセタキセルと PDT による低侵襲な集学的治療が期待されている。

1.3 複数の薬剤の可視化における質量分析イメージングの利点

抗がん剤治療と PDT の集学的治療の実用化に向け、治療効果の評価が必要である。抗がん剤治療、PDT の治療効果を示す一つの指標として、がん細胞への薬剤の集積が挙げられる。そのため、がん細胞における抗がん剤と光感受性物質の取込を評価する必要がある。Fig. 1-2 に示すように抗がん剤が集積しにくく、耐性を持ったがん細胞に光感受性物質が集積することを証明することで、集学的治療による治療効果の向上を示すことができる。このような背景から、本研究において求められるイメージングの性能として、複数の薬剤が検出可能であること、また細胞スケール（10 μm 以下）で薬剤の分布を得ることが挙げられる。

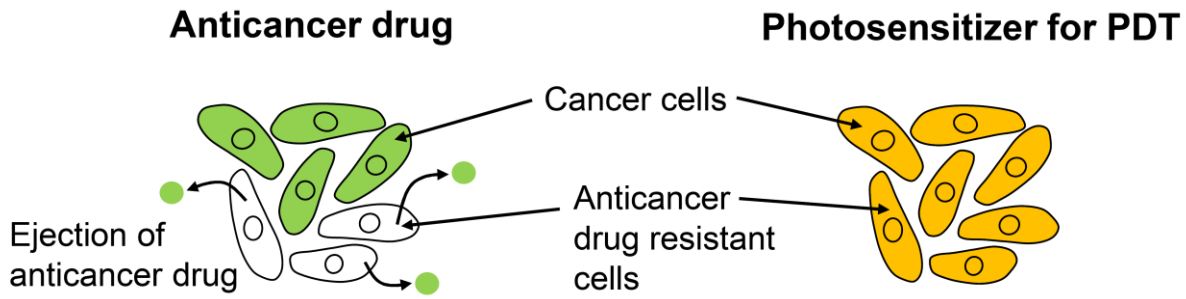


Fig. 1-2 Ideal distributions of an anticancer drug and a photosensitizer.

現在最も一般的に行われている薬物動態解析の手法は、オートラジオグラフィ(autoradiography;AR) によるイメージングである。AR は、放射線が写真乳剤を感光させる性質(写真効果) を利用し、試料中の放射性核種の位置や分布、および濃度を直接写真感光剤に記録、測定する方法である。実際の薬物動態試験においては、3H や 14C などの放射性同位体元素で標識した薬剤を実験動物に投与した後、乳剤の粒子径が大きく粒子密度が比較的低い高感度の X 線フィルムにより、薬剤の分布像を得る [17, 18] 。しかし、放射性同位体による標識には多額の費用がかかり、標識可能である物質も限られる。さらに、測定対象が複数存在する場合は、同時に測定することができない。そこで、抗がん剤と光感受性物質という複数の薬剤を同時に測定する手法として、質量分析イメージング法に着目した。質量分析イメージング(mass spectrometry imaging; MSI) とは、様々な物質を一度にイオン化、検出し、各質量スペクトルを元に質量が異なる物質毎の分布画像を構築する手法である [19, 20] 。この手法を用いるメリットとして情報量の多さが挙げられる。従来の ARG とは異なり、MSI は、同時に複数の薬剤の分布画像を得ることが可能である。また、MSI による薬物動態解析では標識化合物を合成する手間を省くことができる上、それらの薬剤の代謝物との区別も可能である。一方、MSI の問題点として検出感度や空間分解能の低さ、また測定にかかる所要時間などが挙げられる。検出感度の点では、オートラジオグラフィで nM レベルの感度が得られる一方、MSI では μM レベルであり、ポジトロン断層法（positron emission tomography; PET）など、他の分子イメージング法と比較しても低感度である [21, 22] 。したがって、MSI による薬物動態解析では、薬剤の検出感度や空間分解能の向上、また測定にかかる所要時間が重要な課題である。以上の主要なイメージング技術の検出感度、標識化、測定時間、および情報量についての比較を Table1-1 に示す。

Table 1-1 Comparison of molecular imaging methods.

	AR	PET	MSI
Detection sensitivity	nM	pM	μM
Labeling	Required	Required	Not required
Measurement of metabolite	Impossible	Impossible	Possible
Spatial resolution	10 μm	2 mm	1 μm
Measurement time	Days	Hours	Hours

1.4 新規質量分析イメージング計による空間分解能の向上

現在、レーザーやイオンビームを一定間隔で走査しながら測定を行い、測定点ごとのスペクトルをもとに画像を構築する走査型 MSI が主流である。しかし、この方式では空間分解能がレーザー集光径に左右されるため、空間分解能が 1 μm 程度に制限される[23]。また測定点ごとにスペクトルを取得するため、測定における所要時間が長くなる、高空間分解能のイメージングではイオン量が減少するという問題点が指摘されている。このような背景から空間分解能、および測定時間を向上させる目的で、近年大阪大学において新規投影型質量分析イメージング装置が開発された。投影型 MSI では大口径のレーザーを用い、一度に分布を保った状態でイオン化、分離、検出を行うことができ、先行研究において、空間分解能 1 μm を達成している[24]。また一度にイオンを像として検出するため、測定における所要時間においても大幅な短縮が可能である。Fig. 1-3 に走査方式、および投影方式の概略図を示す。以上のことから投影方式質量分析イメージング計を用いることで、細胞スケールでの薬剤取込の評価が可能になると考えられる。

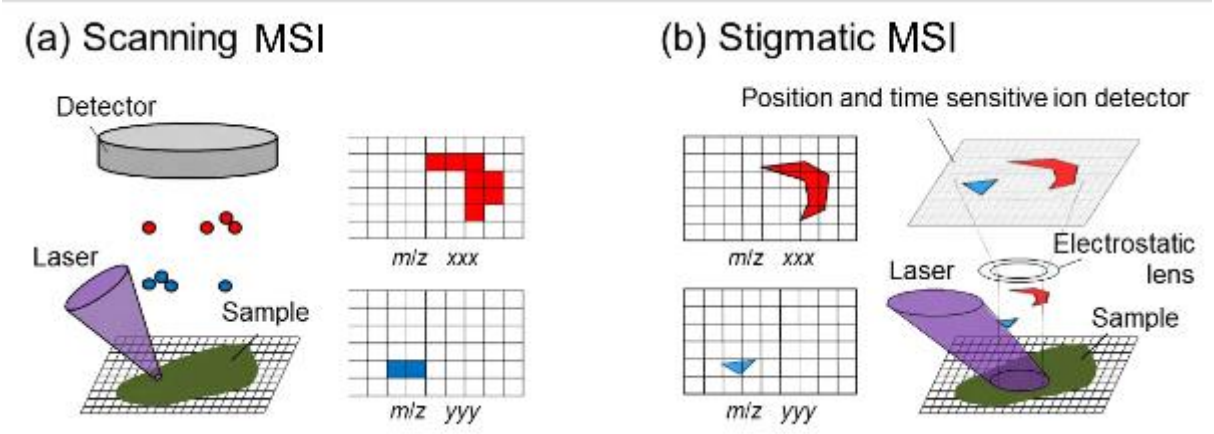


Fig. 1-3 Comparison of (a) scanning and (b) stigmatic MSI

1.5 新規イオン化手法による検出感度の向上

現在の MSI において、検出感度が低いことが指摘されている。検出感度に寄与するパラメータとして、測定試料のイオン化効率の向上や測定装置の性能の向上が挙げられる。その中でもイオン化効率は試料に混合させるイオン化補助剤によって左右される。MSI で最も多く用いられるイオン化法であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization; MALDI) では、光吸収性の高いマトリックスと呼ばれる有機化合物をイオン化補助剤として用いる。マトリックスによってイオン化効率が左右されるため、良好な測定結果を得るためには、測定物質に適したマトリックスを選択しなければならない。本研究では、薬剤の検出感度に向けた新規イオン化補助剤の開発を行い、細胞に取り込まれた複数の薬剤のイオン化への有効性を検討した。

1.6 薬剤の新規質量分析イメージング手法の開発によって期待される他の恩恵

薬剤の新規質量分析イメージング計、および新規イオン化手法の開発がもたらす他の恩恵の一つとして、薬剤のスクリーニングの高速化が挙げられる。スクリーニングとは、創薬の初期段階において膨大な数の候補物質から標的とする1つの物質を見つけ出すプロセスである。一般に1つの新薬を開発するためには約 10000 以上の候補物質が存在し、このため研究開発期間は 10～15 年、費用は平均で 8 億ドル以上と言われている [25)] 。このような現状を改善するためには新薬開発の生産性を向上させる必要があり、開発初期段階からその薬効、安全性、薬物動態などを総合的に評価できるハイスループットスクリーニングが重要となる [26, 27, 28)] 。現在薬剤のスクリーニングで最も用いられている手法は AR であるが、標識化することによるコストや測定に要する時間の増大、また代謝物の同時測定が不可能などの問題点が挙げられる。一方、現状の MSI では標識化を必要としないため、コストや測定に要する時間の面で優位である。しかし、検出感度が低いため、可視化が困難な物質が存在すること、また走査型 MSI では測定時間がかかることが欠点として挙げられる。以上のことより、新規 MSI を薬剤のスクリーニングで用いた場合、従来の MSI の利点を生かしつつ、測定時間の高速化、および検出感度の向上による汎用性の拡大が可能になると考えられる。このように本研究での成果は、医療だけでなく創薬の分野においても非常に有益である。

1.7 本研究における目的、および実験工程

本研究では新規がん治療の効果評価に向け、抗がん剤、および光感受性物質の細胞ごとの薬剤取込をレーザーイオン化質量分析イメージング手法にて解析した。そのために、抗がん剤、および光感受性物質の検出感度を向上させる新規イオン化補助剤を用いたイオン化手法を検討した。また細胞スケールで薬剤のイメージングが可能な投影型 MSI の手法の開発を行い、近年増加傾向にある前立腺がんにおいて特に悪性度の高い抗がん剤耐性前立腺がんへの PDT の効果の評価を行った。本研究の実験工程は、新規イオン化補助剤の開発、および薬剤のイメージングにおけるその有効性の検討（第 4 章～第 6 章)、および高速、高空間分解能質量分析イメージング手法の開発（第 7 章～第 10 章）に分類される。第 4 章では新規イオン化補助剤の開発、および薬剤の検出における有効性、第 5 章では前立腺がん細胞に取り込まれた抗がん剤の検出について検討を行い、第 6 章では複数の薬剤を検出するためのイオン化手法を開発した。第 7 章では投影型 MSI における薬剤の分布測定の正確性を評価するために、MSI と同一サンプルにて蛍光イメージングが可能な手法の開発、第 8 章において細胞スケールで薬剤を評価するためのマトリックス塗布手法の検討を行った。第 9 章では微細なマトリックス結晶を生成することが期待できる無機マトリックスの検討を行った。第 10 章では細胞スケールでの投影型 MSI における染色細胞の観察を行った。

第 2 章　測定原理

一般に質量分析計は試料をイオン化するイオン化部、質量電荷比によってイオンを分離する分離部、および飛来したイオンを検出する検出部から構成され、質量分析法を応用した質量分析イメージング計もこれらから構成される。本研究では、薬剤の分布画像を取得する手法として、走査型 MSI、および投影型 MSI を用いた。ここでは、二つの手法に共通する測定原理ついて触れた後、それぞれの手法で異なる原理、およびその詳細について述べる。

2.1 マトリックス支援レーザー脱離イオン化法

試料にパルスレーザーを照射してイオン化させる、レーザー脱離イオン化 (laser desorptiion/ionization; LDI) 法は、1960 年代後半に開発され、古くから行われてきたイオン化法の一つである [29, 30]。LDI での測定は、測定対象が低質量の有機塩やレーザー光を吸収する有機化合物などに限られていた。そんな中、マトリックスと呼ばれる光吸収性のある物質をイオン化補助剤として試料に混ぜ合わせる MALDI 法が 1980 年代後半に創案された [31]。これにより、本来レーザー光を吸収しにくい試料や生体分子などの高分子もイオン化が可能になり、生体分子の解析など広い分野で用いられるようになった。本研究においても試料分子のイオン化に汎用性の高い MALDI 法を採用した。Fig. 2-1 に MALDI 法の概念図を示す。

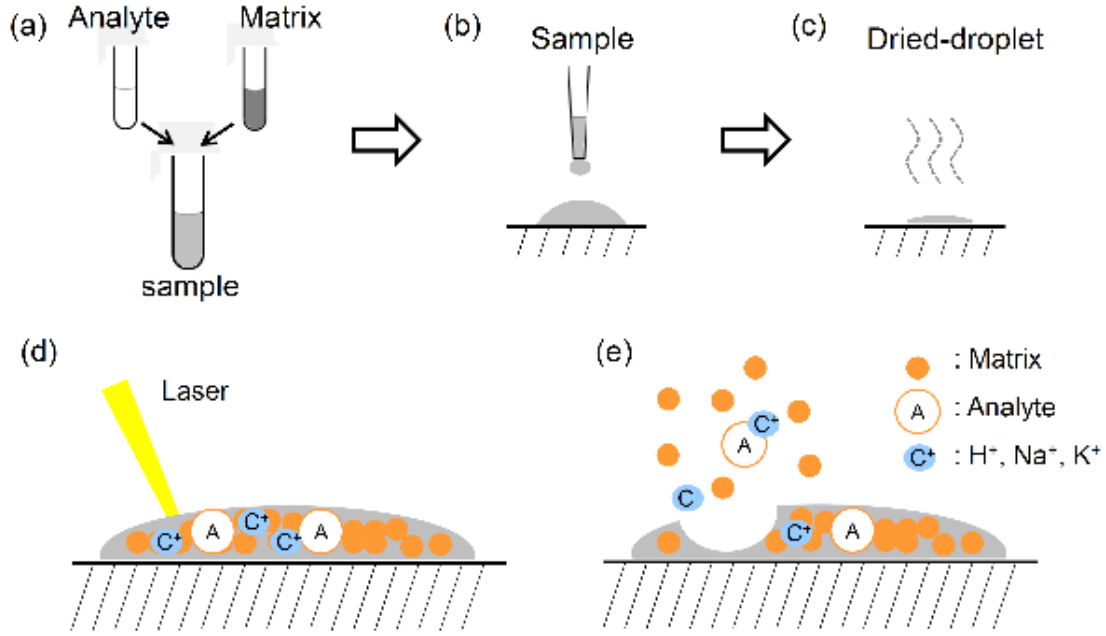


Fig. 2-1 Schematic of MALDI method. (a) Analyte and matrix solutions are mixed, (b) and mixed solution is spotted on the sample plate, (c) then the sample is dried. (d) When a dried droplet is irradiated with a laser, (e) the analyte is ionized as a protonated or cationized ion through the interactions with matrix.

MALDI 法で使用するレーザーは主に N2 レーザー (波長 337 nm) や Nd:YAG レーザーの第三高調波 (波長 355 nm) などの紫外レーザーであるため、マトリックスは紫外域に吸収ピークを持つ芳香族化合物が用いられる。試料とマトリックスを混合した溶液 0.5–2 μL 程度を、サンプルプレート表面上に滴下し、乾燥させる。生成した結晶に紫外レーザーを照射することで、マトリックスがレーザーのエネルギーを吸収し、試料分子の気化とイオン化が生じる。通常、試料のプロトン付加分子が多く観測されるが、測定試料の化学的性質によって Na^+ や K^+ などのイオン存在下において、それらが付加したカチオン付加分子も観測される。MSI では試料とマトリックスを混合する代わりに、マトリックス溶液を霧状にして組織切片へ噴霧するスプレーコーティング法や、マトリックスの微量溶液を試料表面に滴下するドロップレット法、固体のマトリックスを高温で昇華させ試料表面で急激に冷却されることで塗布する蒸着法などが用いられる[32, 33]。

2.2 飛行時間型質量分析法

イオンを *m*/*z* によって分離する質量分離部には様々な種類が存在し、イオン化法との組み合わせにより装置の特性が決まる。イオン化にパルスレーザーを用いる MALDI 法は、原理上イオン群をパルス化する必要のある飛行時間 (time of flight; TOF) 型質量分析装置との組み合わせが多い。素電荷量 e と電荷数 z の積である電荷 ez を持つ質量 m のイオンが、電圧 V により速さ v まで加速されるとき、エネルギー保存の法則より

$$ezV = \frac{1}{2}mv^2$$

の関係が成り立つ。すなわち、イオンの速さ v は

$$v = \sqrt{\frac{2ezV}{m}}$$

と表される。速さ v、自由飛行距離 L、および飛行時間 T の関係は、加速領域での飛行時間が自由空間での飛行時間に比べて十分に短いとすると

$$T = \frac{L}{v}$$

と近似できるので、

$$T = L\sqrt{\frac{1}{2ez}\frac{m}{z}}$$

となる。したがって、イオンの電荷数 z が等しいとき、飛行時間 T は質量 m の平行根に比例する。実際の測定では、生成するイオンの正確な *m*/*z* 値が分かっている標準物質の測定を行い、飛行時間 T と *m*/*z* の較正曲線を求めて質量較正を行う。これは、実験室の室温や装置の電気的変化、真空容器内の残存気体分子との衝突などによって、計算で求めた飛行時間 T と測定結果の間に誤差が生じるためである。Fig. 2-2 に TOF 型質量分析法において最も基本的な測定法であるリニア TOF 型質量分析法の概念図を示す。

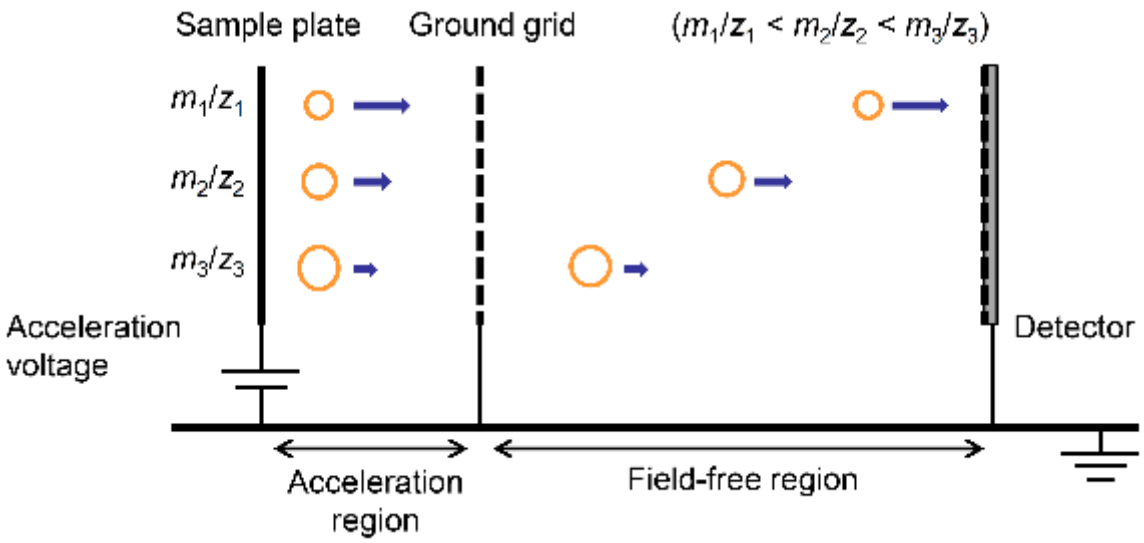


Fig. 2-2 Schematic of TOF mass spectrometry. The ions with smaller *m*/*z* have higher velocity and reach the detector earlier than ions with larger *m*/*z*.

2.3 遅延引き出し法

MALDI 法で生成したイオンは生成時に数十 eV の初期運動エネルギーを持ち、その大きさは質量と電荷数の比が等しいイオンの中でも異なる。この初期運動エネルギーは加速電圧によって獲得するエネルギーに上乗せされるため、イオンの発生から電圧を連続的に印加する連続引き出し法 (continuous extraction; CE) を用いた場合、飛行時間の違いが大きくなり、質量分解能の低下につながる。また発生時間の早いイオンほど検出器へ到達する時間が短くなる。このようなばらつきを抑えるため、遅延引き出し法 (delayed extraction; DE) が用いられる。遅延引き出し法の概念図を Fig. 2-4 に示す。遅延引き出し法では、引き出し電圧の印加を一定時間遅らせることで初速度の小さなイオンほど加速電圧によって大きなエネルギーが得られる。また、レーザーのパルス幅と遅延引き出し時間を同期することで、レーザー誘起反応が終結してから加速電圧が印加されるため、イオンの生成時刻の違いによる検出器までの到達時刻の差を小さくできる。したがって、同じ質量を持つイオンがほぼ同時に検出器に到達するため、質量分解能が向上する [34] 。

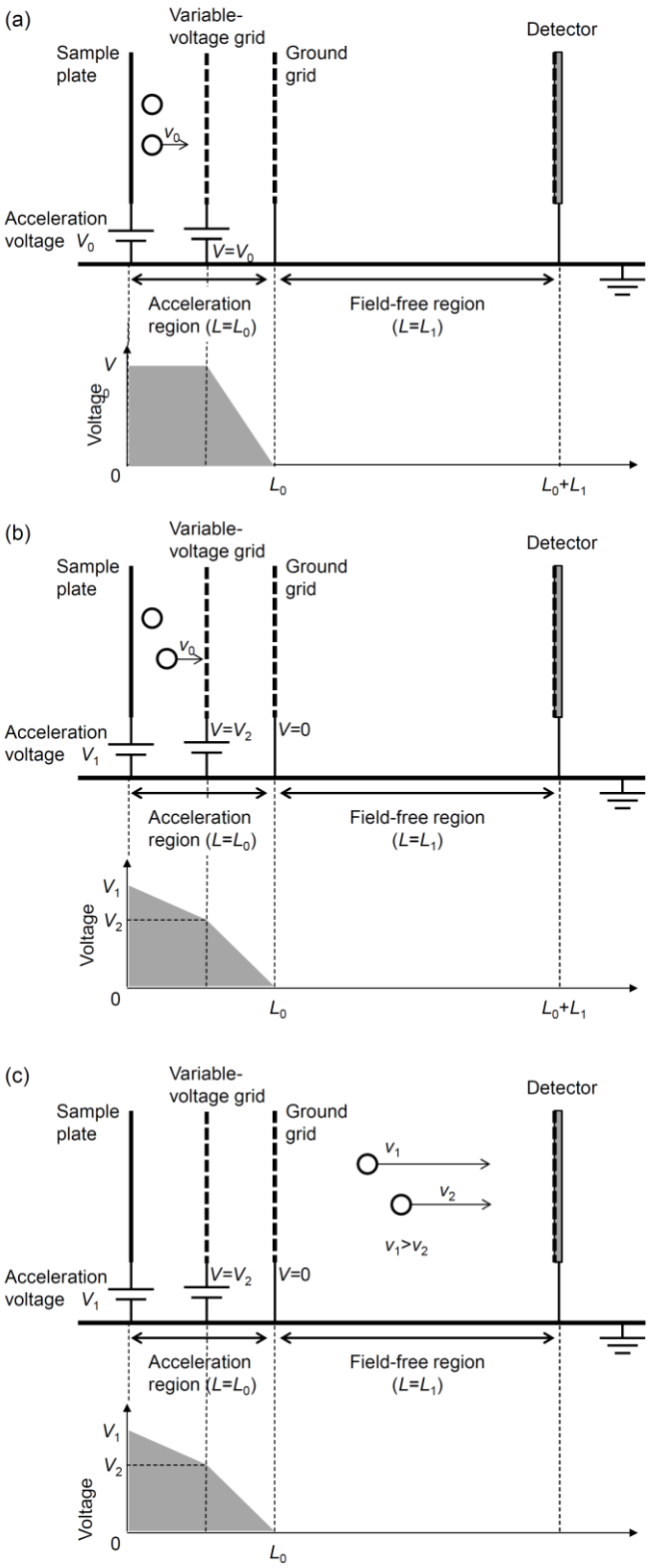


Fig. 2-3 Schematic diagram of DE method. (a) Ions with the same *m*/*z* have different initial velocity. (b) The ion with higher initial velocity takes the lead, but it gains less energy than the ion with lower initial velocity in electric field. (c) The ion with lower initial velocity gains sufficient energy such that it arrives at the detector at the same time as the ion with higher initial velocity.

2.4 イオンリフレクター

高い質量分解能が求められる測定の際には、Fig. 2-2 で示したリニア TOF 型質量分析装置ではなく、リフレクターを用いた TOF 型質量分析装置が用いられる。Fig. 2-5 にリフレクターの概念図を示す。リフレクターTOF 型質量分析装置は、静電場ミラーを用いてイオンの運動する向きを反転させて検出を行う。大きな初期運動エネルギーを持つイオンは反転するまでの飛行距離が長くなるので、初期運動エネルギーの広がりによる飛行時間の差を抑えることができ、質量分解能が向上する。ただし、リフレクターTOF 型質量分析では飛行中に分解、あるいは中性化したイオンは検出できないため、リニア TOF 型質量分析と比べ検出感度は低下する [35] 。

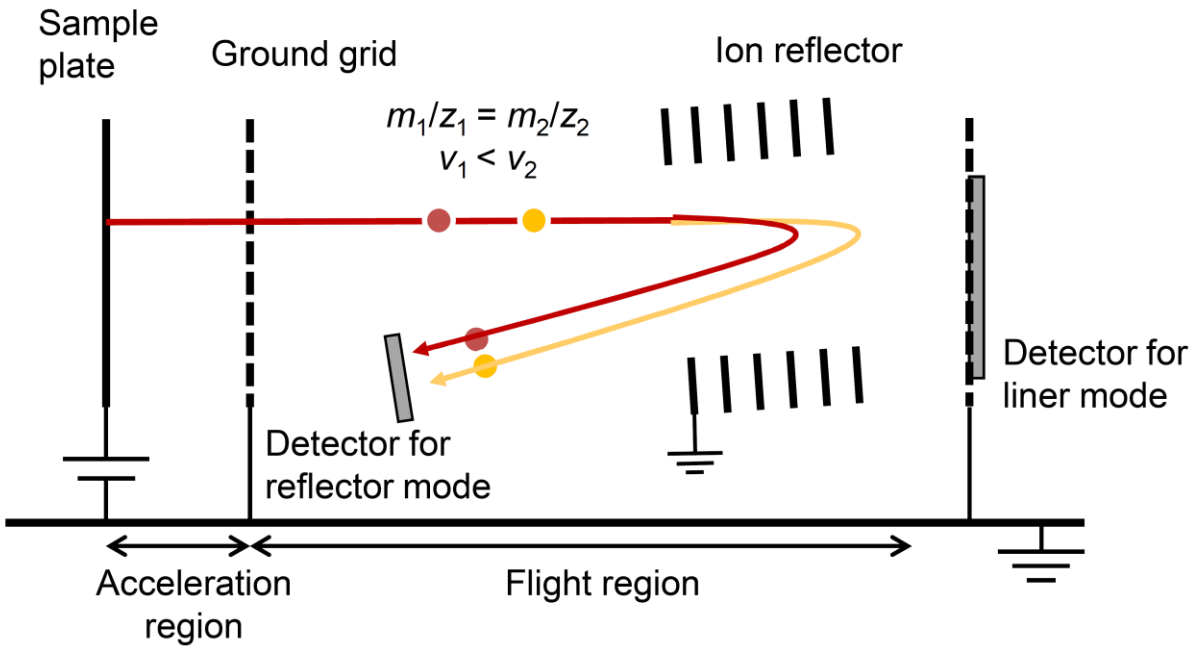


Fig. 2-4 Schematic of reflector TOF method. Ions with higher velocity fly longer distance. Therefore, ions with the same *m*/*z* reach the detector at almost the same time even if their velocities are different.

2.5 マイクロチャンネルプレート

イオン源で発生したイオンは分離部を通り、検出部へと到達する。一般に TOF 型質量分析計ではマイクロチャンネルプレート (microchannel plate; MCP) が使用される。Fig. 2-6 に MCP の概念図を示す。MCP とは内壁が抵抗体かつ 2 次電子放出体である内径 10 μm 程度の中空ガラス管を数百万本束ね固着させたものである。検出部へ到達したイオンはまず MCP の多数のチャンネルを通過する。十分なエネルギーをもつイオンが MCP に衝突すると、1 つまたは複数の電子が解離する。MCP の入力面と出力面に電位差が設けられており、これにより発生した電子は加速されながら再度側面に衝突を繰り返す。このような過程を経て MCP を出る時点では、進入した各イオンにつき、およそ 10^4 個の電子が発生する。2 段、および 3 段の MCP を重ねたものも市販されており、この場合電子は約 10^6～10^8 個程度になる [36]。発生した電子は様々な方法で検出される。シンチレータ、および光電子増倍管を用いた手法において、MCP を出る電子は再度加速されシンチレータに到達し、そこに電子が衝突すると、シンチレータは光子を放出する。シンチレータの放出した光子は、光電子増倍管によって光子の数を増幅し、光子の数に比例した電気信号を生成する [37]。

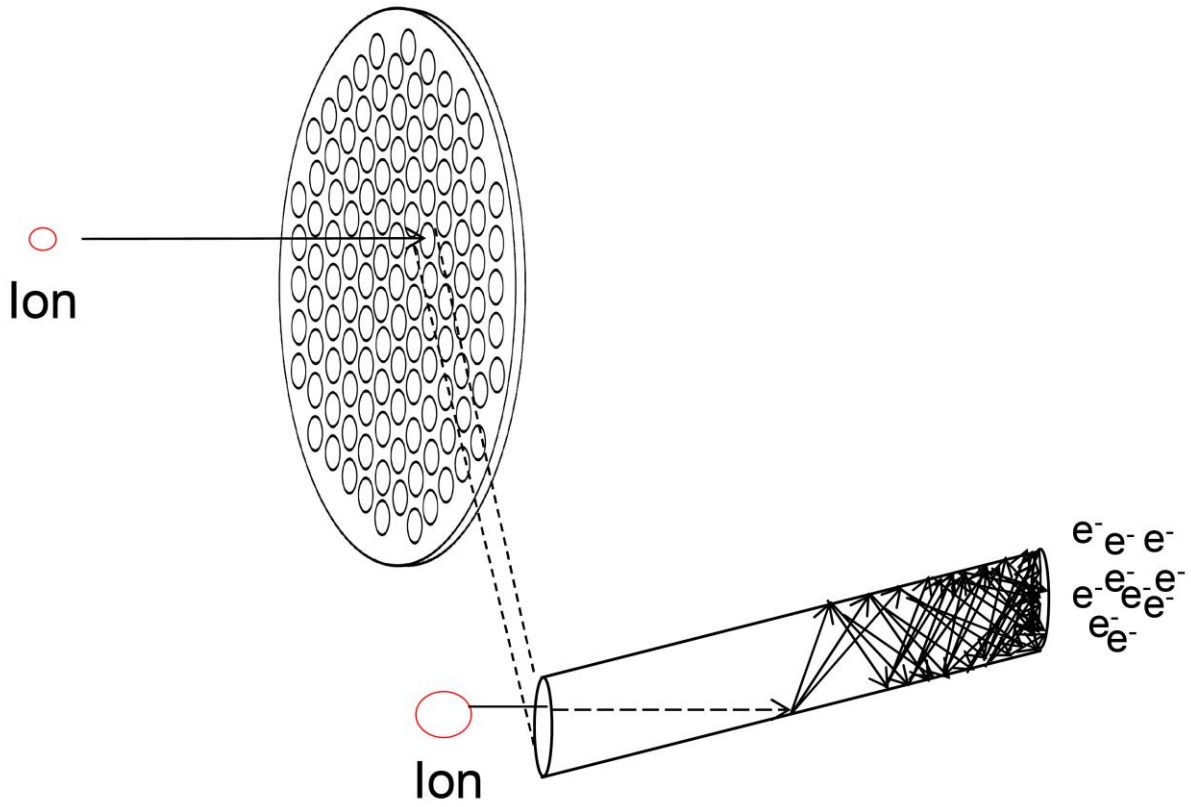


Fig. 2-5 Schematic of MCP. Ion generated in ion source enters MCP. The ion is amplified and altered electrons in the hollow glass tube.

2.6 走査型質量分析イメージング

走査型 MSI とは、MALDI 法や 2 次イオン質量分析 (secondary ion mass spectrometry: SIMS) 法で発生したイオンの質量スペクトルを取得し、試料内に含まれる原子、分子の同定や構造解析を行うと同時に、それらの位置情報から各物質の分布の画像化がする手法である。MSI の概念図を Fig. 2-3 に示す。レーザーやイオンビームを試料表面上に一定間隔で走査させて各点での質量スペクトルを測定し、全領域で得られた質量スペクトルから各質量電荷比におけるイオン信号強度の分布情報を画像化する。そのため、従来質量分析で用いていたイオン部、分離部および検出部をそのまま用いることができるという利点がある。また MSI では標識化を必要としないため、あらかじめ想定される物質だけでなく、存在する物質を網羅的に検出することができる。したがって、複数の物質の生体内局在の関係性、およびそれらの代謝物の同時観察が可能であり生体内分子の局在解析に大きく貢献している [38]。一方、走査型 MSI では、空間分解能はレーザーやイオンビームの集光径に制限されるため、MALDI では、数 μm、SIMS では数百 nm である [39]。

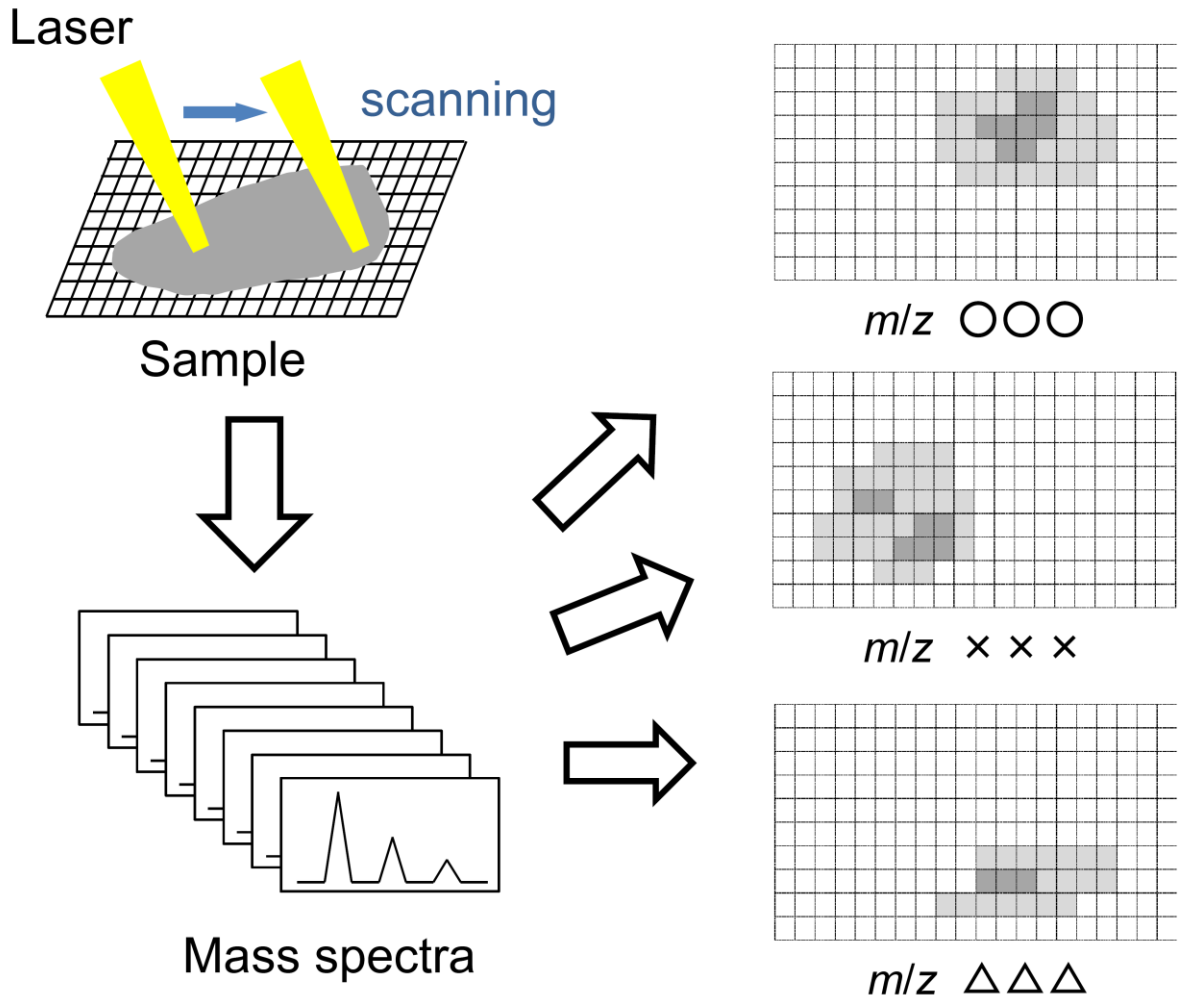


Fig. 2-6 Schematic of MSI. The laser or the ion beam are scanned and the resulting mass spectra are stored along with the spatial coordinates. The information is combined and specific ion imaging is obtained.

2.7 投影型質量分析イメージング

投影型 MSI では，直径 0.5～1 mm 程度の大口径のレーザーを試料の観測領域の全面に照射して一度にイオン化し、検出を行う。そのため空間分解能はレーザーの集光径に制限されないため、細胞スケールでの高空間分解能イメージングが可能である。Fig. 2-7 に投影型 MSI の概念図を示す。投影型 MSI ではイオン部、分離部、検出部の各部分で初期分布が保存されなければならないという大きな制約がある。そのため走査型 MSI とは異なるイオン光学系や検出器が必要となる。ここでは各部分にてイオン像を保ちつつ、質量分析を行うための手法について述べる。

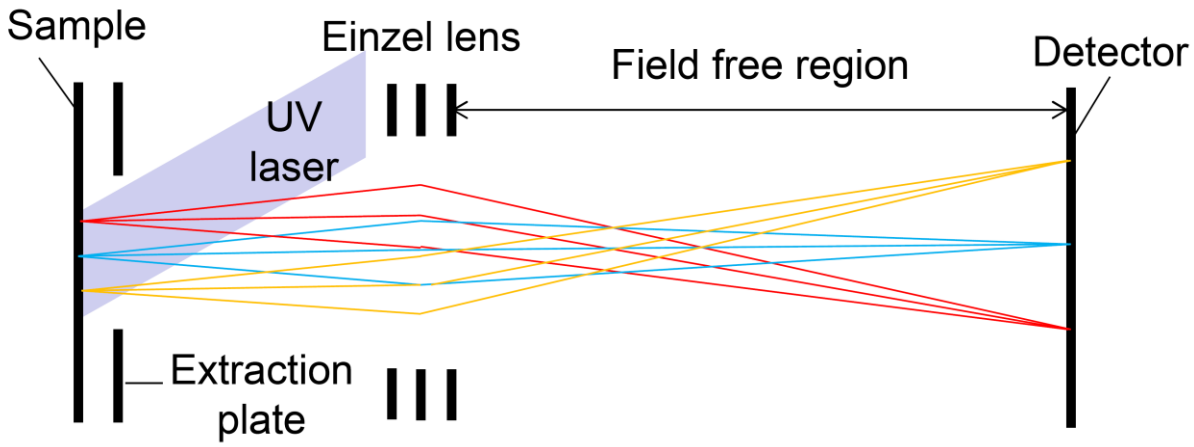


Fig. 2-7 Schematics of stigmatic MSI. Ions are generated by laser irradiation, then extracted by electric field between sample plate and extraction plate. Finally, ion was focused on the detector using the einzel lens with their original distribution.

2.7.1 アインツェルレンズ

レーザー照射によりイオン化されたサンプル分子は引き出し電場によって加速され、検出器に飛来する。投影型質量分析イメージング計では発生したイオンの分布を検出器まで保つ必要がある。静電レンズの一種であるアインツェルレンズを用いることで、飛行する過程において拡散したイオンを収束させ、検出面で再び結像させることでサンプル面での分布を保つことができる。Fig. 2-8 にアインツェルレンズの概念図を示す。アインツェルレンズは 3 つの電極からなり、中心の電極に電圧をかけて使用する。アインツェルレンズに飛来したイオンの軌道は、レンズ内に発生する電場によって変化する。レンズ内に発生する電場は中心の電極への印加電圧によって変化するため、印加電圧を変化させた場合、イオンの焦点距離が変化する。実際の測定では、測定する環境や条件毎に印加電圧を最適化する [40] 。

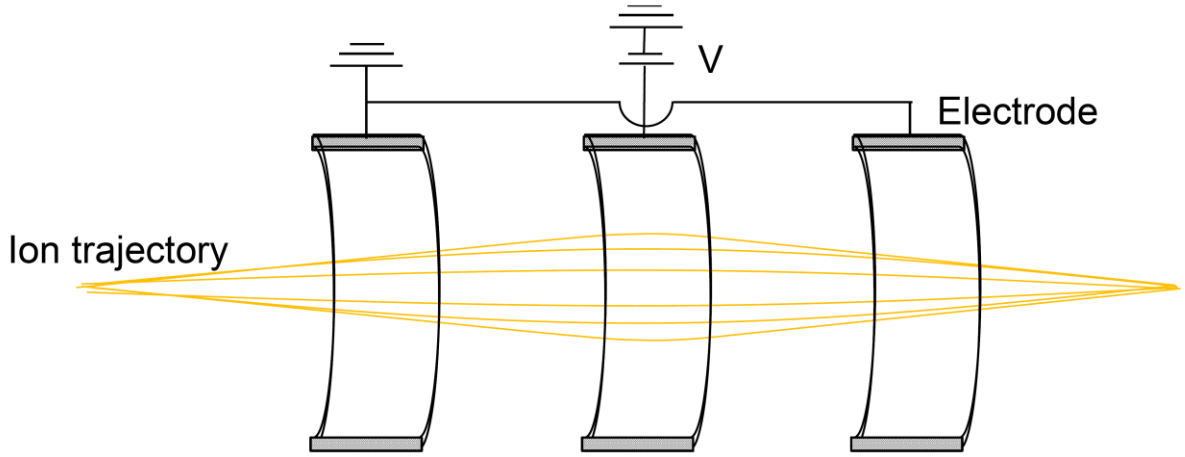


Fig. 2-8 Schematic of einzel lens. Ion trajectory was changed by the electric field in the einzel lens. The focal distance relates applied voltage in the center electrode of einzel lens.

2.7.2 引き出し後差動加速イオン引き出し法

投影型 MSI で DE を用いた場合、イオン初速度の角分散の影響で CE の場合と比べ、静電レンズを用いてイオン像の焦点を合わせることが困難であった。そこで投影型イメージング質量分析計に適用可能な引き出し後差動加速イオン引き出し法 (Post Extraction Differential Acceleration; PEDA) が開発された [41]。Fig. 2-9 に PEDA の概念図を示す。PEDA ではイオン生成後ただちにイオンを加速し，その後 2 段目の加速領域において初速度の差により生じた位置の差とポテンシャルの勾配を利用して加速エネルギーを追加的に与えることで，遅延引き出し法と同様に到着時間の差異を打ち消している。この引き出し法の開発により、投影型イメージング質量分析計においてイオン像を保ちつつ、DE を用いた場合と同程度の質量分解能を実現できる。

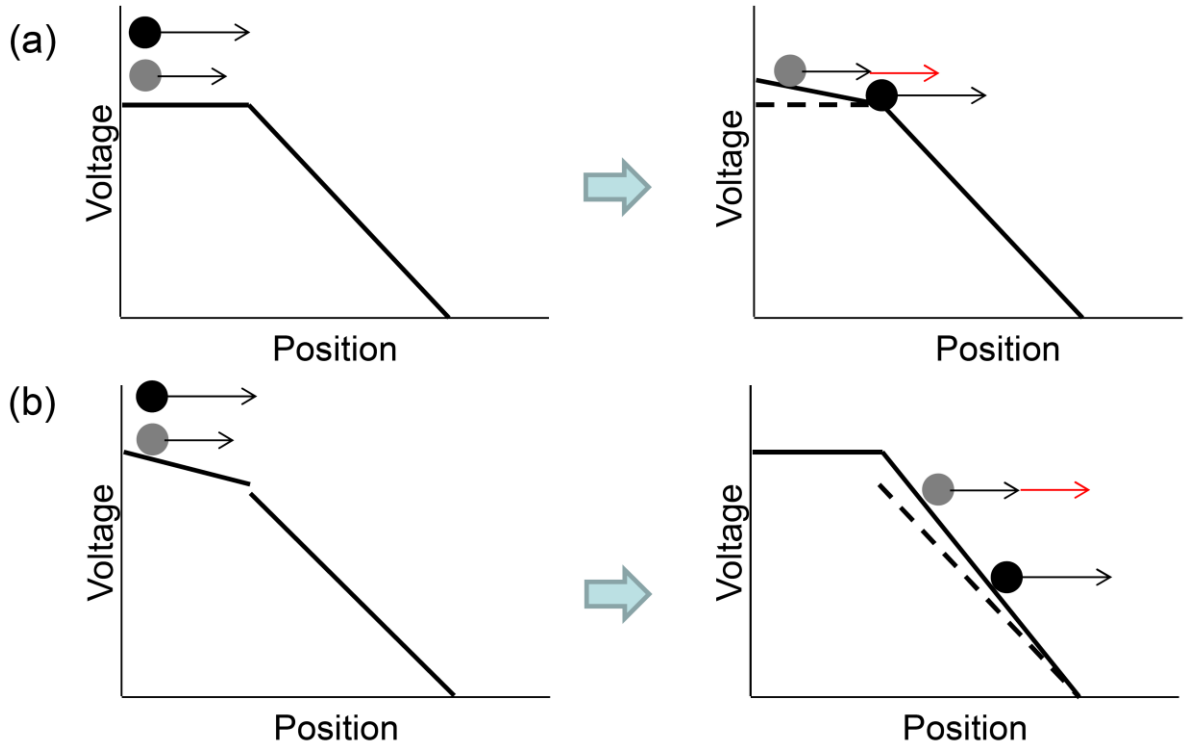


Fig. 2-9 Schematics of (a) DE (b) PEDA. Using PEDA, the high mass resolution and the maintenance of ion distribution are achieved.

2.7.3 ディレイライン検出器

投影型 MSI におけるイオン検出器の性能として、検出面に衝突するイオンの位置と時間を同時に計測することが求められる。本研究ではディレイライン検出器を用いてイオンの検出を行った。Fig. 2-10 にディレイライン検出器の概念図を示す。飛来したイオンは MCP により電子群として変換され、つづら折りにした金属導線からなる検出部を通過する。この時近傍の導線に誘導電荷が誘起され、電気パルス信号が導線の両側に伝播する。この信号の到達時間を導線の両端でそれぞれ計測する [42]。Fig. 2-10 における各部分での信号の到達時間を t_{X1}、t_{X2}、t_{Y1}、t_{Y2} とする。電気パルス信号の伝播速度をvとすると

$$X = (t_{X1} - t_{X2}) \cdot v$$

$$Y = (t_{Y1} - t_{Y2}) \cdot v$$

となる。したがって、この信号の到達時間を導線の両端でそれぞれ計測することでイオンが到達した X、Y の座標を算出することができる。一方ディレイライン検出器ではイオンの衝突時間も同時に計測することが可能であるが、2 つ以上のイオンが同時に飛来した場合、電気パルス信号の乱れから正常にイオンを検出することができない。そのため実際の測定ではレーザーの照射エネルギーの調整、および検出器に飛来するイオンにパルス電圧をかけることによって制限するイオンゲートを用いる。

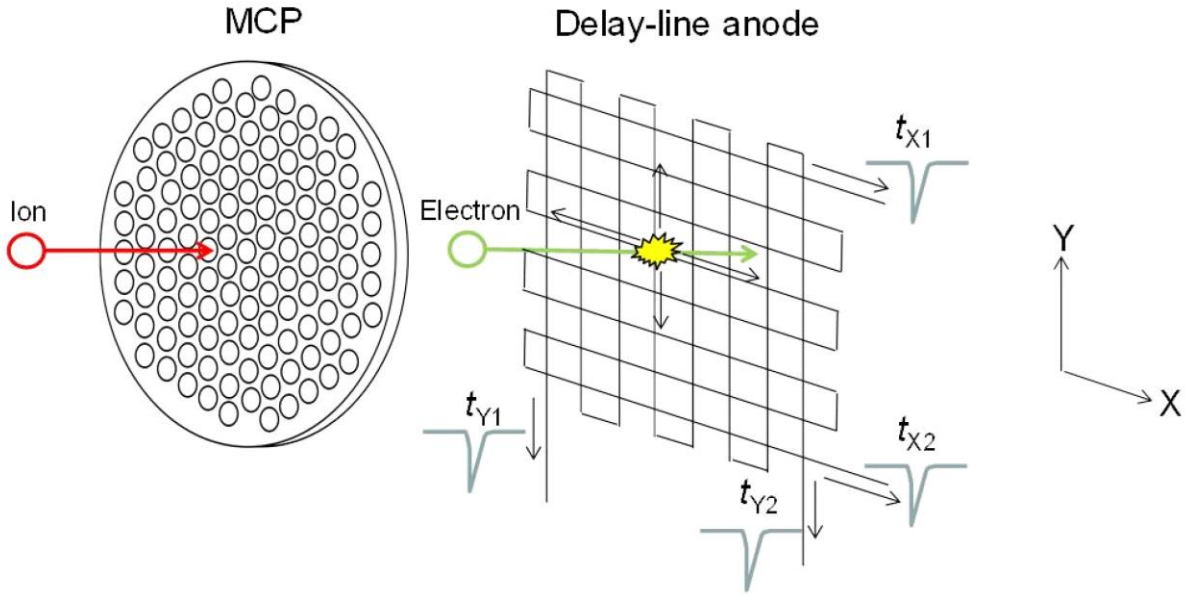


Fig. 2-10 Schematic of delay line detector. Ion generated in ion source enters MCP. The ion is amplified and altered electrons in the hollow glass tube. The position of ion is calculated with measurement time of pulse signals of currents.

第 3 章　実験装置、および試料

3.1 実験装置

3.1.1 走査型質量分析イメージング装置

本研究では、走査型 MSI 装置として、市販の MALDI-TOF 型質量分析装置 (Voyager-DEPRO, Applied Biosystems, California, USA) を使用した（以下 Voyager と表記する）。Fig.3-1 に Voyager の概略図と外観図を、Table 3-1 に仕様を示す。今回の測定では、測定試料に応じてリニア、およびリフレクターモードを使用した。Voyager におけるリニアモードでは発生したイオンを加速領域で加速した後、直線的に飛行させ、MCP で検出する。そのためリフレクターモードと比べて、飛行中の分解などによるイオンの損失が少ないため、高感度での測定が可能である。一方、リフレクターモードではリニアモードの検出器の手前に設置されたイオンリフレクターによって運動エネルギーの異なるイオンを時間軸上で収束させ、質量分解能を向上させることができる。したがって、リニアモードと比べて、高い質量分解能での測定が可能である。またイオンの引き出し法は、DE 法を用いた。DE 法により生成したイオンの初速度の影響を抑え、質量分解能を向上させることができる。試料のイオン化は外部より Nd:YAG レーザー (GAIA II 30-T, Rayture Systems Co., Ltd., Tokyo, Japan) の第三高調波（波長 355 nm）を用いて行った。ディレイジェネレーター（DG 535, Stanford Research Systems, Sunnyvale, California, USA）によりレーザーパルスと Voyager の測定を同期させた。その他の測定条件を Table 3-3 に示す。

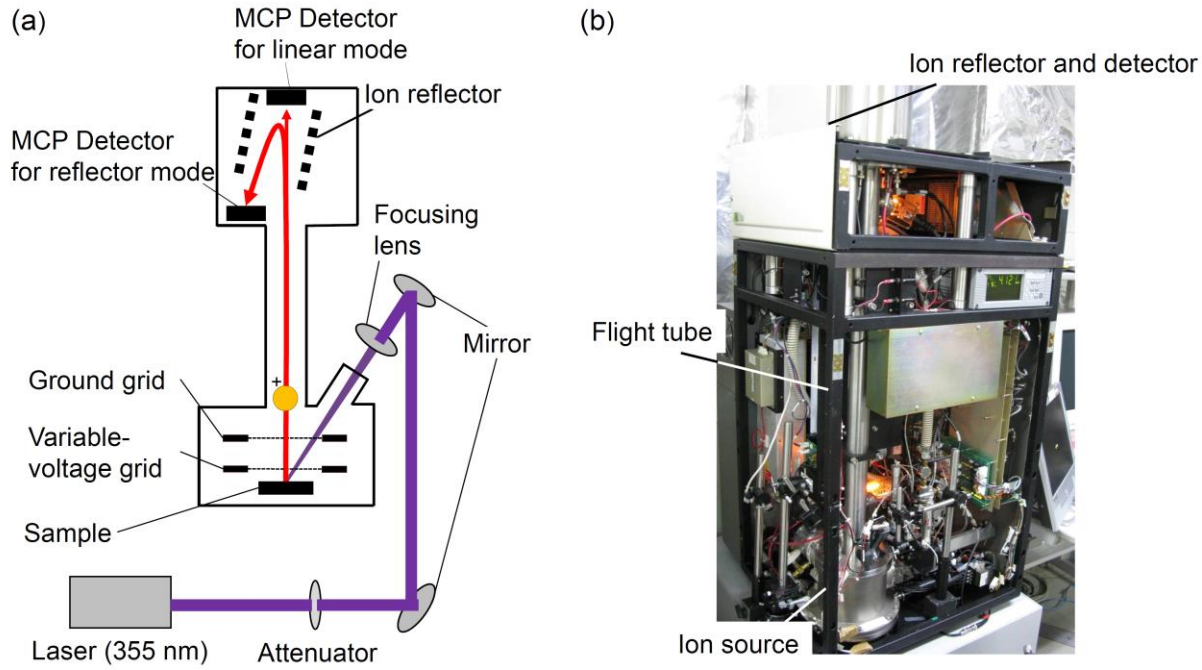


Fig. 3-1 (a) Schematic and (b) photograph of the TOF mass spectrometer, Voyager.

Table 3-1 Specifications of the TOF mass spectrometer, Voyager.

Mass Accuracy	
Linear Mode	$\leq \pm$ 0.05 for angiotensin I (m/z 1,296.6853)
Reflector Mode	$\leq \pm$ 0.01 for ACTH 18-39 (m/z 2,565.1989)
Mass Resolution	
Linear Mode	$\geq$ 2,500 for angiotensin I (m/z 1,296.6853)
Reflector Mode	$\geq$ 10,000 for insulin (m/z 5,734)
Sensitivity	
Linear Mode	S/N $\geq$ 20 for 5 fmol of neurotensin (m/z 1,672.918)
Reflector Mode	S/N $\geq$ 10 for 5 fmol of neurotensin (m/z 1,672.918)

Table 3-2 Measurement conditions for reflector mode.

Extraction mode	DE
Polarity	Positive
Accelerating voltage	20 kV
Voltage for the extraction-grid	13.6 kV
Voltage for the guide wire	0 V
Extraction delay time	100 ns
Laser wavelength	355 nm

Table 3-3 Measurement conditions for linear mode.

Extraction mode	DE
Polarity	Positive
Accelerating voltage	20 kV
Voltage for the extraction-grid	18.8 kV
Voltage for the guide wire	10 V
Extraction delay time	200 ns
Laser wavelength	355 nm

3.1.2 投影型質量分析イメージング装置

投影型 MSI 装置として、大阪大学理学研究科と共同開発された MULTUM-IMG2（以下 MULTUM と表記する）を使用した。Fig. 3-2 に MULTUM の概略図と外観図を示す。MULTUM を用いた測定では、イオン引き出し法として PEDA を用いた。MULTUM ではイオン化した分子を同一軌道上で多重周回させることで飛行時間を延ばし、高い質量分解能で測定を行うことも可能である [43] が、本研究では、まず最もイオンの検出感度が高いリニアモードで測定を行った。試料のイオン化は外部より Nd:YAG レーザー(GAIA II 50-T, RaytureSystems Co., Ltd., Tokyo, Japan) の第三高調波（波長 355 nm）を用いて行った。その他の測定条件を Table 3-4 に示す。

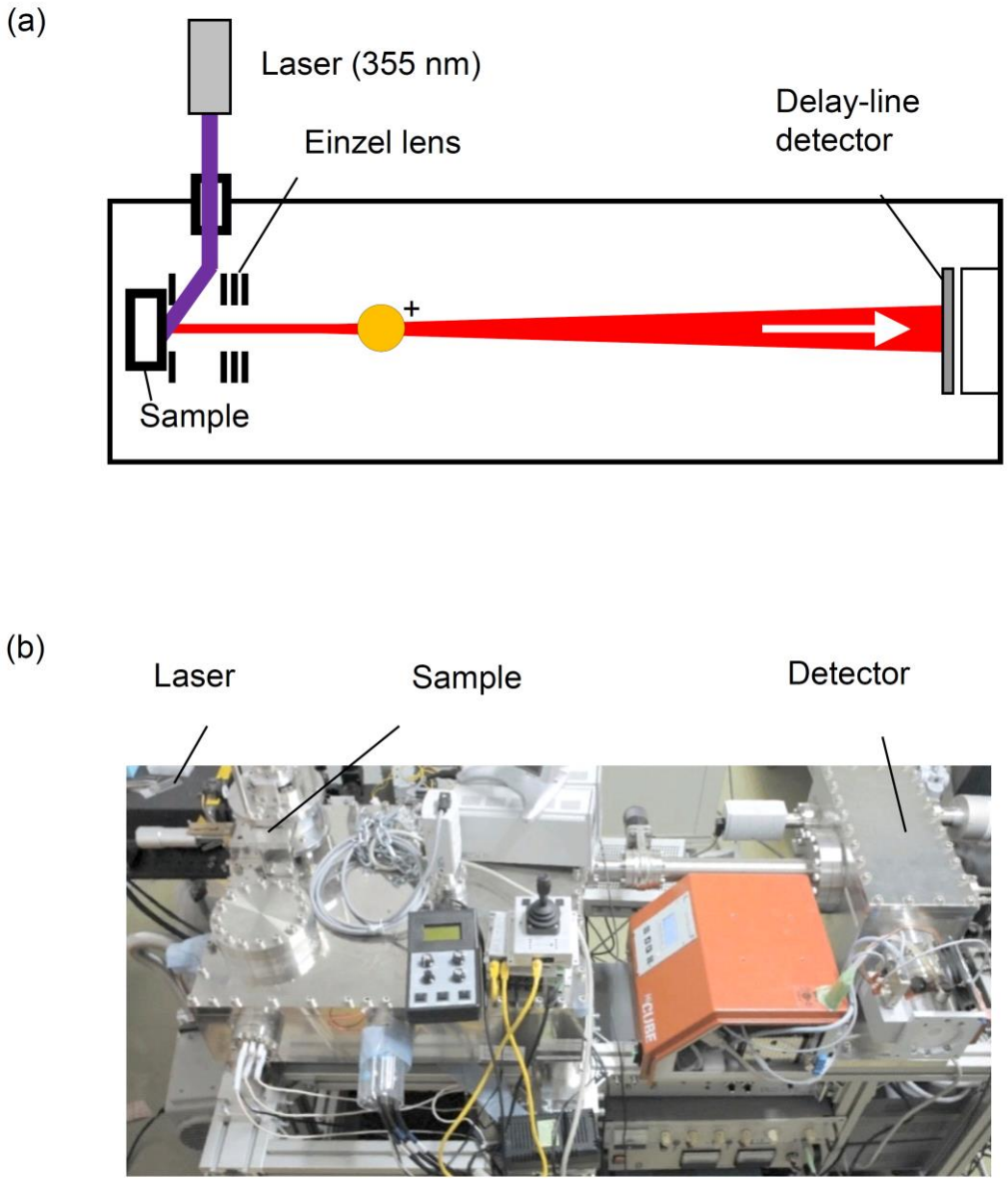


Fig. 3-2 (a) Schematic and (b) photograph of the stigmatic imaging mass spectrometer, MULTUM-IMG2.

Table 3-4 Measurement conditions in the stigmatic imaging mass spectrometer, MULTUMIMG2.

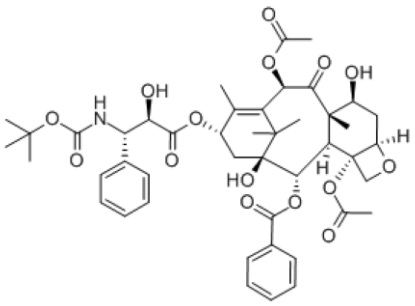
Extraction mode	PEDA
Mode of operation	Linear mode
Polarity	Positive
Accelerating voltage	5 kV
Voltage for the extraction plate	4.8 kV
Voltage for the einzel lens	1.8 kV
Extraction delay time	100 ns
Laser wavelength	355 nm

3.2 測定試料

3.2.1 抗がん剤、ドセタキセル

ドセタキセルは日本では 2008 年に前立腺がんへの適用が承認され、現在ホルモン剤耐性前立腺がん細胞に対して最も有効である抗がん剤である。一般的には商品名タキソテール (サノフィ・アベンティス社) として販売されており、治療に用いられる場合、添加物としてポリソルベート 80 などが加えられる [44]。レーザーイオン化質量分析においてポリソルベート 80 はドセタキセルのイオン化効率を低下させる原因であった。そこで本研究では、ポリソルベート 80 を含まないドセタキセル三水和物（docetaxel hydrochloride, 9-GHZ-87-1, Wako, Osaka,Japan）を用いた。ドセタキセル三水和物は溶液中および体内では解離するため、ドセタキセルとして挙動する。調整では、ドセタキセル三水和物を電子天秤で量りとり、ドセタキセルとドセタキセル三水和物の分子量比である 0.937 をかけ、ドセタキセルの重量を換算し、ドセタキセルのみの濃度とした。ドセタキセルの化学構造と化学情報について Table 3-5 に示す。

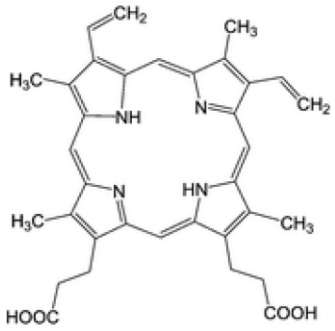
Table 3-5 Chemical structure and properties of docetaxel.

Chemical structure	
Formula	$C_{43}H_{53}NO_{14}$
Molecular mass (u)	807.9
Monoisotopic mass (u)	807.4

3.2.2 光感受性物質、プロトプルフィリン IX

本研究では光感受性物質として、プロトプルフィリン IX（protoporphyrin IX; PpIX, P8293-1G, SIGMA-Aldrich, Tokyo, Japan）を用いた。PpIX は生体内で生成されるヘモグロビンの前駆体であるため副作用が少ないとされ、正常細胞では代謝される一方で、がん細胞では代謝異常により PpIX が集積しやすい性質を持つ [45, 46] 。また Table 3-5 に PpIX の化学構造と化学情報について示す。

Table 3-6 Chemical structure and properties of PpIX.

Chemical structure	
Formula	$C_{34}H_{34}N_4O_4$
Molecular mass (u)	562.7
Monoisotopic mass (u)	562.3

3.3 倒立型光学顕微鏡

Fig. 3-3 に倒立型蛍光顕微鏡の（a）概略図、（b）外観図を示す。PpIX は、400 nm 付近に Soret 帯とよばれる吸収ピークをもち、400 nm 付近の青紫色の光を照射すると励起され、630 nm 付近の赤色光の蛍光を発する [47]。この作用を利用することで、MSI 以外の手法で細胞内への PpIX の取込を評価することができる。本研究では、倒立型蛍光顕微鏡（LEITZDMIRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany）を用いて PpIX の蛍光を観察した。水銀ランプ（02651000, IREM, Italy）を励起光とし、波長 405 nm の励起フィルターを通して測定試料に照射し、発した蛍光を蛍光フィルターを通した後、CCD カメラで撮影した。

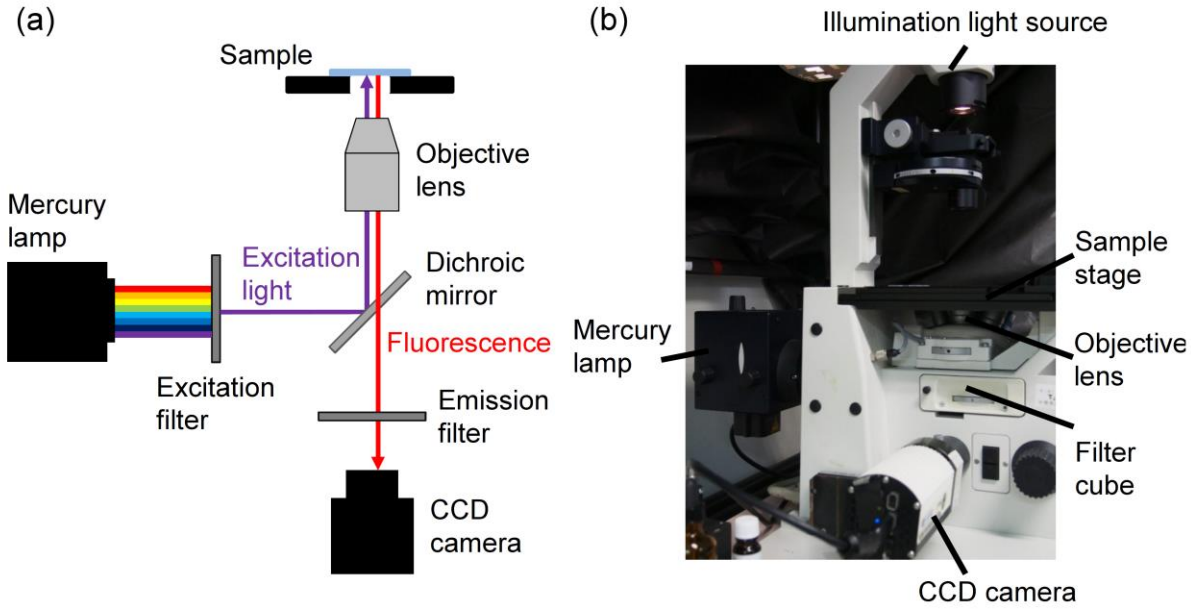


Fig. 3-3 (a) Schematic and (b) photograph of inverted fluorescence microscope.

3.4 抗がん剤耐性ヒト前立腺がん細胞

ホルモン剤耐性ヒト前立腺がん細胞 PC-3、およびそのドセタキセル耐性細胞 PC-3-DR を用いた。培地には Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM; D6046, SIGMA-Aldrich,Tokyo, Japan) に 10% ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum; FBS, S1820, Biowest)、100 units/mL ペニシリン、および 0.1 mg/mL ストレプトマイシン (Penicillin-StreptomycinMixed Solution, P4458, Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を加えたものを使用した。この培養培地を D-MEM と表記する。細胞培養は温度 37 ℃、CO_2 濃度 5% の環境下で行った。PC-3-DR は大阪大学大学院医学系研究科、分子治療講座、遺伝子治療学分野、金田研究室の波多野氏、および山口氏によって作製された。医学系研究科からいただいた PC-3-DR はドセタキセル耐性が浸漬濃度 10 nM 程度で確認されていたが、本研究においてドセタキセル耐性を約 10000 倍の 100 μM 程度まで向上させた。PC-3-DR の作製方法は、まずドセタキセルを培地に溶かし、この培地にて PC-3 を 1 時間培養した。その後ドセタキセルを溶解させていない培地に交換し、生き残った細胞を 1 週間程度培養した。細胞が増殖する速度がドセタキセル浸漬前と同程度になる状態まで培養し、ドセタキセルの濃度を少しずつ上げながらこの工程を繰り返し行い、PC-3 に対してドセタキセル耐性を獲得させた。この場合、ドセタキセルの浸漬濃度は PC-3-DR がある程度生存する濃度に設定する必要がある。あらかじめ PC-3-DR に対してドセタキセルを投与し、細胞生存率を測定することで、より正確に浸漬させるべき濃度を決定することができる。また PC-3-DR は長期間の培養により耐性が低下するため、1 ヶ月に 1 回程度で上記の工程によりドセタキセルへ浸漬させる必要がある。

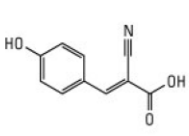
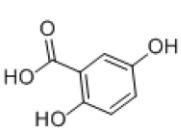
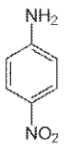
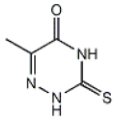
3.5 イオン化補助剤

MALDI 法で使用するレーザーは主に N2 レーザー(波長 337 nm) や Nd:YAG レーザーの第三高調波(波長 355 nm) などの紫外レーザーである。これらの波長帯域に吸収ピークを持ち、測定試料のイオン化を促進する物質をイオン化補助剤と呼ぶ。一般的なイオン化補助剤として、紫外域に吸収ピークを持つ芳香族化合物が挙げられる(以降、有機マトリックスと呼ぶ)。これらの有機マトリックスを用いることで、ポリペプチドやタンパク質のような生体由来の高い分子量を持つ化合物の分析が容易となり、MSI においても広く応用されている。一方、有機マトリックスを用いた低分子薬剤のイメージングにおいて、2 つの問題が挙げられる。1 つは、有機マトリックス自身のシグナルが低分子領域に強く検出されるため、薬剤のピークがこれらのノイズに埋もれてしまうことである。もう一つは、MALDI 法では、測定試料とマトリックスが混合し、結晶化させ、この混合結晶に対してレーザーを照射するため、イオン化補助剤の結晶サイズによって空間分解能が低下してしまうことである。これらの問題を解決する方法として、近年金属ナノ粒子(以降、無機マトリックスと呼ぶ)が注目されている [48), 49)]。金属ナノ粒子は一般に直径 100 nm 以下の金属粒子を指す。金属ナノ粒子は様々な反応に対して触媒活性を示すため、分析化学、バイオセンサー、ドラッグデリバリーやプロテオミクスなど、多数の分野に応用されている。金属ナノ粒子を使って生体内に存在する脂質をイメージングとした例や生物内の低分子化合物をイメージングした例が報告されている [50), 51)]。本研究では、MSI の適用範囲の拡大に向けて、高検出感度化、高空間分解能化に向けたイオン化補助剤の開発を行った。高検出感度 MSI の実現を目指し、従来のイオン化補助剤と比べてイオン化効率を向上させることを目的とし、ゼオライトマトリックスの検討を行った。高空間分解能 MSI において、結晶サイズを小さくするため、無機マトリックスの検討を行った。

3.5.1 有機マトリックス

イオン化補助剤であるマトリックスとして、α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid; CHCA, SIGMA-Aldrich, Tokyo, Japan)、2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid; DHB, SIGMA-Aldrich, Tokyo, Japan)、4-ニトロアニリン(4-nitroaniline; 4NA, SIGMA-Aldrich, Tokyo, Japan)、および 6-アザ-2-チオチミン(6-aza-2-thiothymine; ATT, SIGMA-Aldrich, Tokyo, Japan)を用いた。これらの化学構造と化学情報について Table 3-7 に示す。

Table 3-7 Chemical structures and properties of the matrices, CHCA, DHB, 4NA and ATT.

	CHCA	DHB	4NA	ATT
Chemical structure				
Formula	$C_{10}H_7NO_3$	$C_7H_6O_4$	$C_6H_6N_2O_2$	$C_4H_5N_3OS$
Molecular mass (u)	189.17	154.12	138.12	143.16

3.5.2 無機マトリックス

本研究では低分子量の試料の測定に適するとされる無機マトリックスを用いて、薬剤の検出感度を向上させつつ、微細な結晶を生成させることを目指した。無機マトリックスとして、4 種類の粒子径を持つ TiO_2、280 nm (CR-58; Ishihara Sangyo Kaisha, Osaka, Japan)、 21 nm (718467-100G; SIGMA-Aldrich)、 5–15 nm (US7050; US Research Nanomaterials, Houston, TX, USA)、5 nm (7930DL; Skyspring Nanomaterials, Houston, TX, USA)、280 nm (MKCL7773, SIGMA-Aldrich, Tokyo, Japan)、また Fe_3O_4 (MKCM9976, SIGMA-Aldrich, Tokyo, Japan)、および ZnO (APR5350, Wako, Osaka, Japan)を用いた。これらの分子量、および粒子径について Table 3-8 に示す。

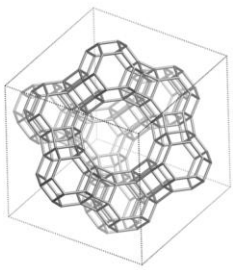
Table 3-8 Molecular masses and Particle sizes of nano particles

	Fe_3O_4	**ZnO**		**TiO_2**		
Molecular mass (u)	231.53	81.38		79.87		
Particle size (nm)	15	20	280	21	5–15	5

3.5.3 ゼオライトマトリックス

ゼオライトと呼ばれる結晶構造中にナノメートルサイズの細孔を持つアルミケイ酸塩をマトリックスに混合したものをゼオライトマトリックスと呼ぶ。MALDI における測定に用いることで、測定試料の検出強度が増大する報告がされている。この効果については、ゼオライト表面に存在する水分子が触媒となり、測定試料のイオン化を促進する仮説 [52] やレーザー照射による過剰なエネルギーをゼオライトが緩衝することでマトリックスのイオンが安定化され、試料分子との反応確率、およびイオン化効率が向上する [53] といった報告がされている。Table3-9 に本研究で用いた Y 型ゼオライトの骨格構造を示す。ゼオライト結晶を構成するアルミニウムの周りは 1 価であるため、ゼオライトは骨格中にカチオンを持ち、このカチオンは可逆的に交換が可能である。本研究ではカチオンがナトリウムイオンである Na^+置換型のゼオライト NaY5.6（Catalysis Society of Japan, Tokyo, Japan）を用いた。4NA と NaY5.6、ATT と NaY5.6 のゼオライトマトリックスをそれぞれ 4NA/NaY、ATT/NaY と表記する。

Table 3-9 Crystal structures and properties of type Y zeolite [54]

Crystal structure	
Pore size (Å)	7.4
Number of membered-rings	12

3.6 イオン化補助剤の塗布装置

MALDI-MSI で薬剤を検出するためにはイオン化補助剤を塗布する必要がある。しかし、試料にイオン化補助剤の塗布する場合、結晶の大きさによって薬剤分布が乱れ、空間分解能が低下する原因となる。本研究では微細な結晶を形成しつつ、細胞に取り込まれた薬剤を検出できる塗布手法を検討するため、スプレー、および真空蒸着による 2 つの塗布方法を用いた。

3.6.1 スプレー塗布装置

Fig. 3-3 に本研究にて用いたスプレー装置を示す。市販されているエアブラシ（PS-153:3500 PRO SPRY Mk-2, Mr. hobby, GSI Creos Co. ,Tokyo, Japan）を用いた。酸性のマトリックス溶液を塗布する場合、金属ノズルから金属が溶解し、薬剤の検出感度が低下する。そのため本研究では金属ノズルを取り外し、マイクロチップ（DIAMOND TIP 0.1-10 µL,F171100, Gilson, Middleton, WI, USA）、および約 5.5 cm のガラスチューブ(CalibratedPipets, 2-000-001-90, Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA) で Fig. 3-4 に示すようなノズルを作成した。サンプルをドラフト側面高さ 20 cm の位置に固定し、30 cm 離れた位置にエアブラシを高さ 20 cm で水平に設置した。エアブラシとコンプレッサーをレギュレーターを通して接続し、スプレー塗布中にレギュレーターの圧力が 0.125 MPa 程度になるようにバルブを調整した。イオン化補助剤の溶液を 2, 3 cm 程度サンプルの下部に吹き付けることで、生成される大きな液滴のサンプルへの付着を防ぐことができる。実際のスプレーでは、レギュレーターの圧力、溶液を吹き付ける位置、ノズルの長さをさらに微調整し、表面に液滴がつかないよう目視で確認しながら塗布した。

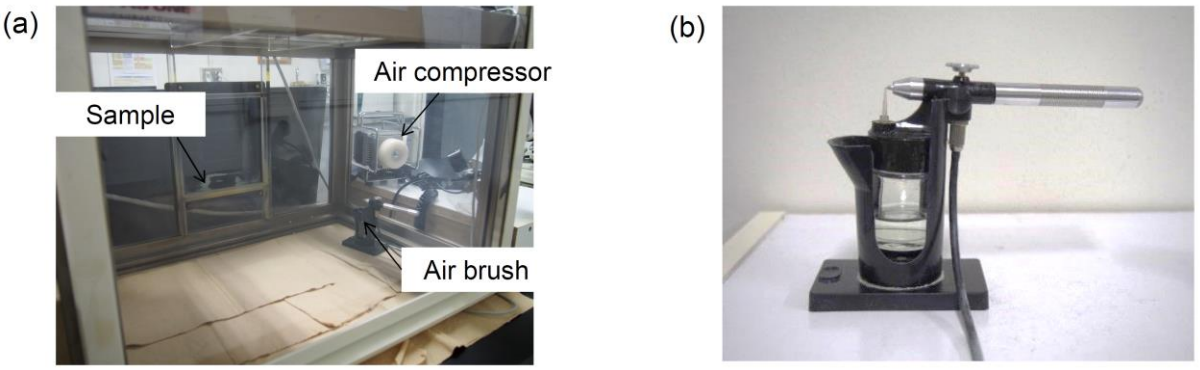


Fig. 3-4 Photograph of (a) the spray-coating station, (b) the spray-coating equipment.

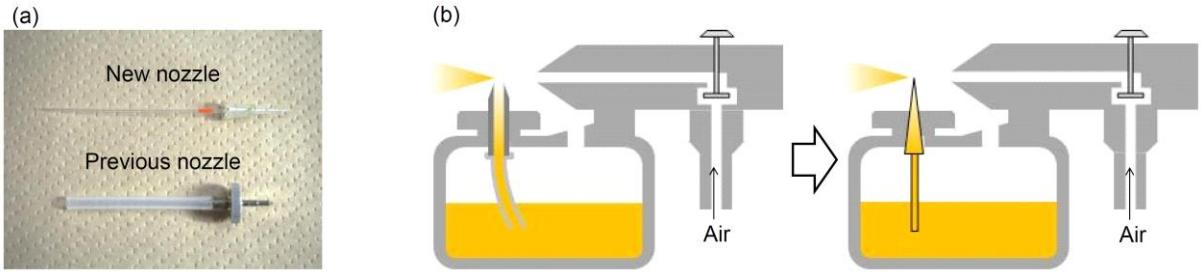


Fig. 3-5 (a) Photograph and (b) schematic of nozzle for spray equipment comprised of a microchip and a glass tube.

3.6.2 真空蒸着塗布装置

真空蒸着によってイオン化補助剤を塗布することで、微細な結晶を形成することができる[55]。Fig. 3-5 に本研究にて用いた蒸着装置の概略図と外観図を示す。蒸着中の温度管理には温度コントローラー（THC-15, III High, Yokohama, Japan）を用いた。

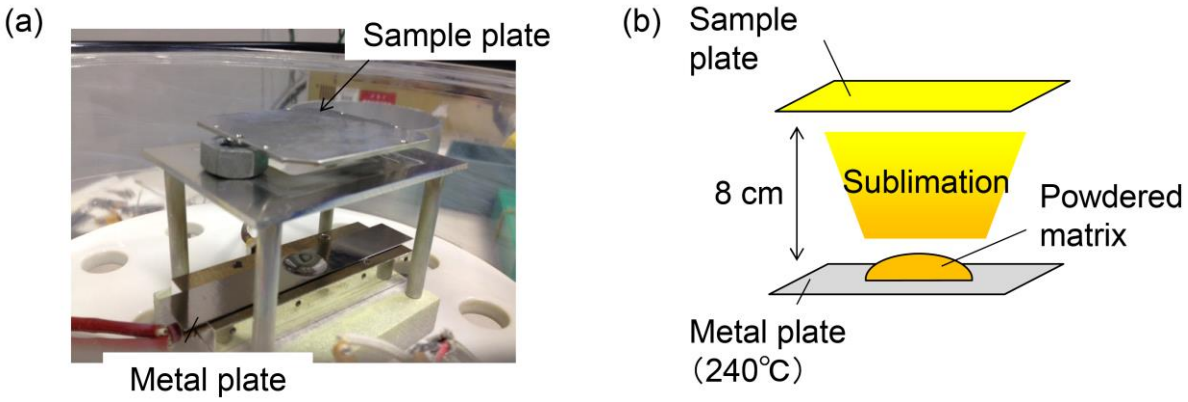


Fig. 3-6 (a) Photograph and (b) schematic of the equipment for matrix application in vacuum deposition.

第 4 章　ドセタキセルの検出感度の向上に向けた新規イオン化補助剤の開発

MSI にて細胞に取り込まれたドセタキセル、および PpIX を検出するために、それぞれの薬剤のイオン化に適切なイオン化補助剤の検討を行った。生体組織、および細胞に取り込まれたドセタキセルの MSI は過去に報告されていない。MSI の報告がある他の薬剤と比べ、ドセタキセルはイオン化効率が低いことが大きな原因の一つであると考えられる。そこでまず、Voyager 測定用の金属サンプルプレート（4347686, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA）上にてドセタキセルの検出における適切なイオン化補助剤の検討を行った。

4.1 ドセタキセルのイオン化に適切なイオン化補助剤の検討

MSI に十分な検出感度を得るために、まず従来のイオン化補助剤を用いてドセタキセルの検出を試みた。イオン化補助剤として、薬剤などの低分子化合物の MSI に用いられる DHB [56]、ATT [57]、およびドセタキセルと同じタキサン系抗がん剤であり、化学的特性が類似するパクリタキセルのイオン化に適切な 4NA [58] を検討した。

4.1.1 実験方法

メタノール 50% 水溶液でドセタキセルを 100 μg/mL に調整した。DHB、4NA、ATT をメタノール 50% 水溶液でそれぞれ 30、5、10 μg/mL に調整した。金属サンプルプレートにドセタキセル溶液を 1 μL 滴下し、真空下で乾燥させた後、3 種類のマトリックス溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。Voyager により質量スペクトルを測定した。1 つのスポットに対してレーザー照射点をランダムに 10 点取り、それぞれの照射点に対して、レーザーを 100 パルス照射した。照射エネルギーを 3 μJ 刻みで変更し、それぞれのエネルギーで 3 スポットずつ照射した。

4.1.2 実験結果

Fig. 4-1 に 3 種類のマトリックスを用いた場合に得られた質量スペクトルを示す。マトリックスに DHB を用いた場合はドセタキセルのナトリウム付加イオン$[D + Na]^+$ (m/z 829.9)、4NA を用いた場合はプロトン付加イオン$[D + H]^+$ (m/z 807.9) 、ナトリウム付加イオン、およびカリウム付加イオイン$[D + K]^+$ (m/z 845.9) 、ATT を用いた場合はナトリウム付加イオンが検出された。検討した全てのマトリックスを用いた場合、ドセタキセルのナトリウム付加イオンの信号強度が最も高かった。それぞれのマトリックスを用いた場合における、ドセタキセルのナトリウム付加イオンの信号強度と照射エネルギーの関係を Fig. 4-2 に示す。マトリックスに、4NA、および ATT を用いた場合に、ドセタキセルのナトリウム付加イオンの高い信号強度が得られた。この実験結果が示すように、DHB を用いた場合と比べて、4NA、および ATT はドセタキセルのイオン化に有効であった。

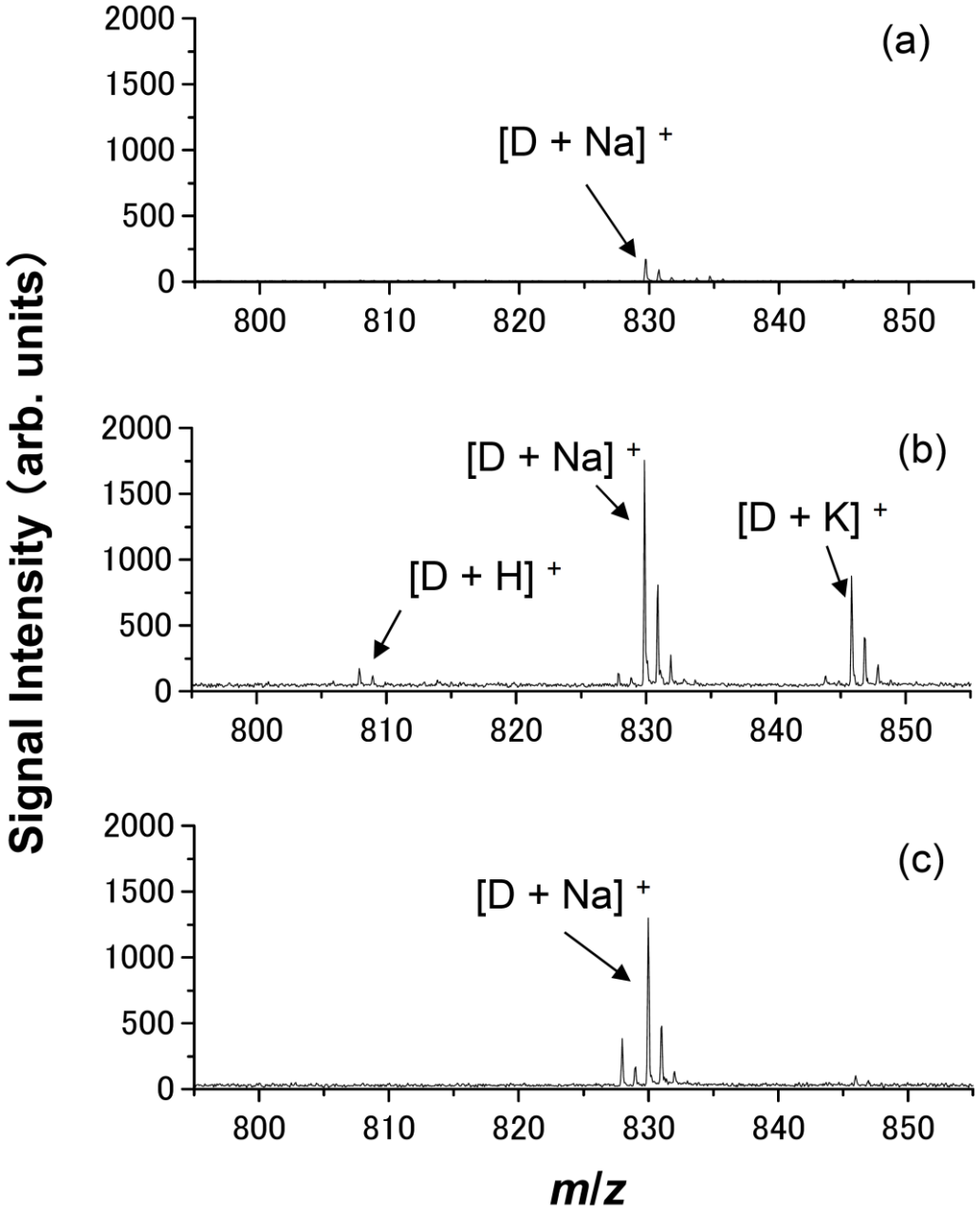


Fig. 4-1 Typical mass spectra obtained from 1 μg/mL docetaxel using (a) DHB, (b) 4NA, (c) ATT. D indicates docetaxel.

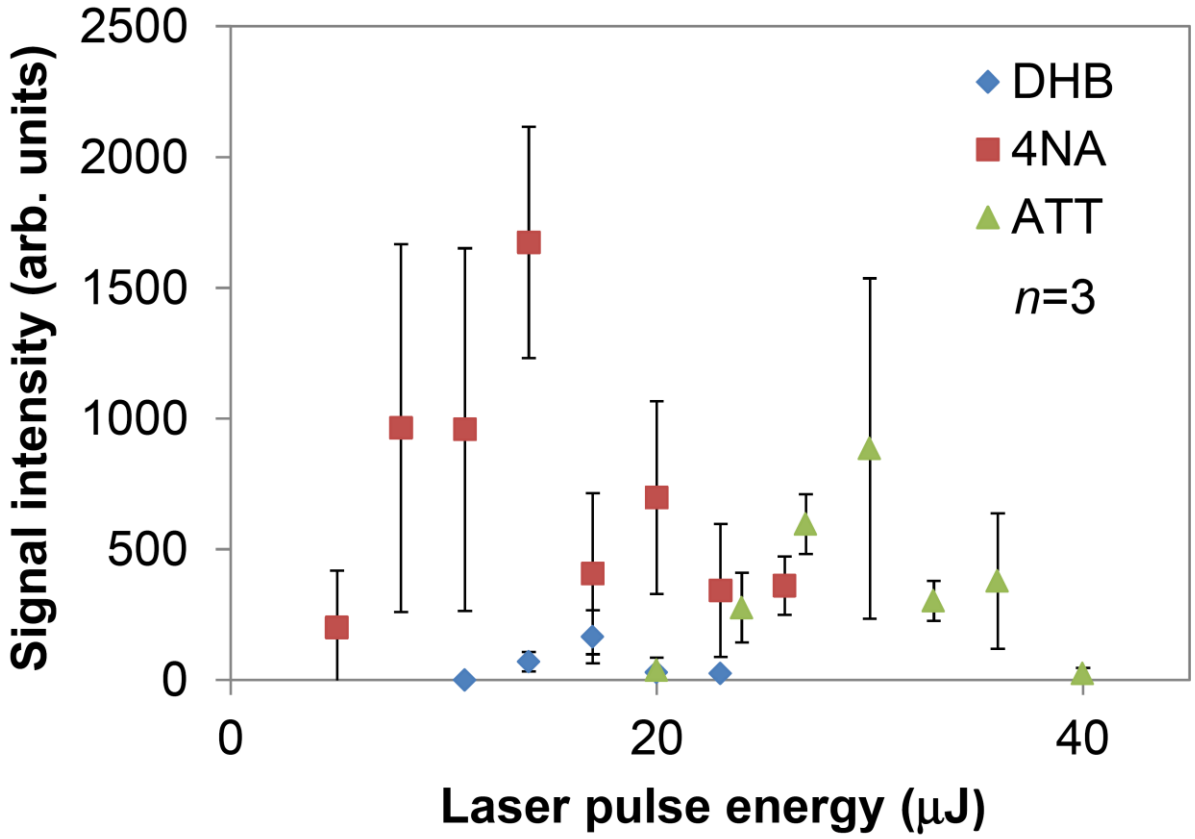


Fig. 4-2 Relationship between the signal intensity and laser pulse energy using DHB, 4NA and ATT.

4.2 ナトリウムイオン、カリウムイオンの添加によるドセタキセルの検出感度の向上

ドセタキセルはナトリウムイオンやカリウムイオンが付加して検出される傾向が見られた。これらのナトリウムイオン、カリウムイオンはサンプル調整段階でごく微量で混入したと考えられる。そこでナトリウムイオン、カリウムイオンをサンプル調整段階で添加することで、ドセタキセルのナトリウム付加イオン、カリウム付加イオンの検出感度の向上が期待できた。4NA を用いた場合にドセタキセルのナトリウム付加イオン、カリウム付加イオンの信号強度が高かったため、4NA の溶媒へのナトリウムイオン、カリウムイオンの添加を検討した。

4.2.1 実験方法

ドセタキセルを濃度 100 μg/mL に調整した。酢酸ナトリウム、および酢酸カリウムを 10mmol/L で溶解させた 50% メタノール水溶液で 4NA を 5 mg/mL に調整した。金属サンプルプレートにドセタキセル溶液を 1 μL 滴下し、真空下で乾燥させた後、酢酸ナトリウム、および酢酸カリウムを含むマトリックス溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。Voyager により質量スペクトルを測定した。1 つのスポットに対してレーザー照射点をランダムに 10 点取り、それぞれの照射点に対して、レーザーを 100 パルス照射した。

4.2.2 実験結果

Fig. 4-3 に酢酸ナトリウム、および酢酸カリウムを 4NA への添加物として用いた場合に得られたドセタキセルのナトリウム付加イオン$[D + Na]^+$（*m/z* 829.9）、カリウム付加イオン$[D + K]^+$（*m/z* 845.9）の信号強度を示す。酢酸ナトリウムを添加した場合、ドセタキセルのナトリウム付加イオンの信号強度が約 4 倍に向上した。一方、酢酸カリウムを添加した場合、ドセタキセルのカリウム付加イオンの信号強度は向上しなかった。以上より、ドセタキセルの検出感度の向上にはナトリウムイオンの添加が有効であると考えられる。

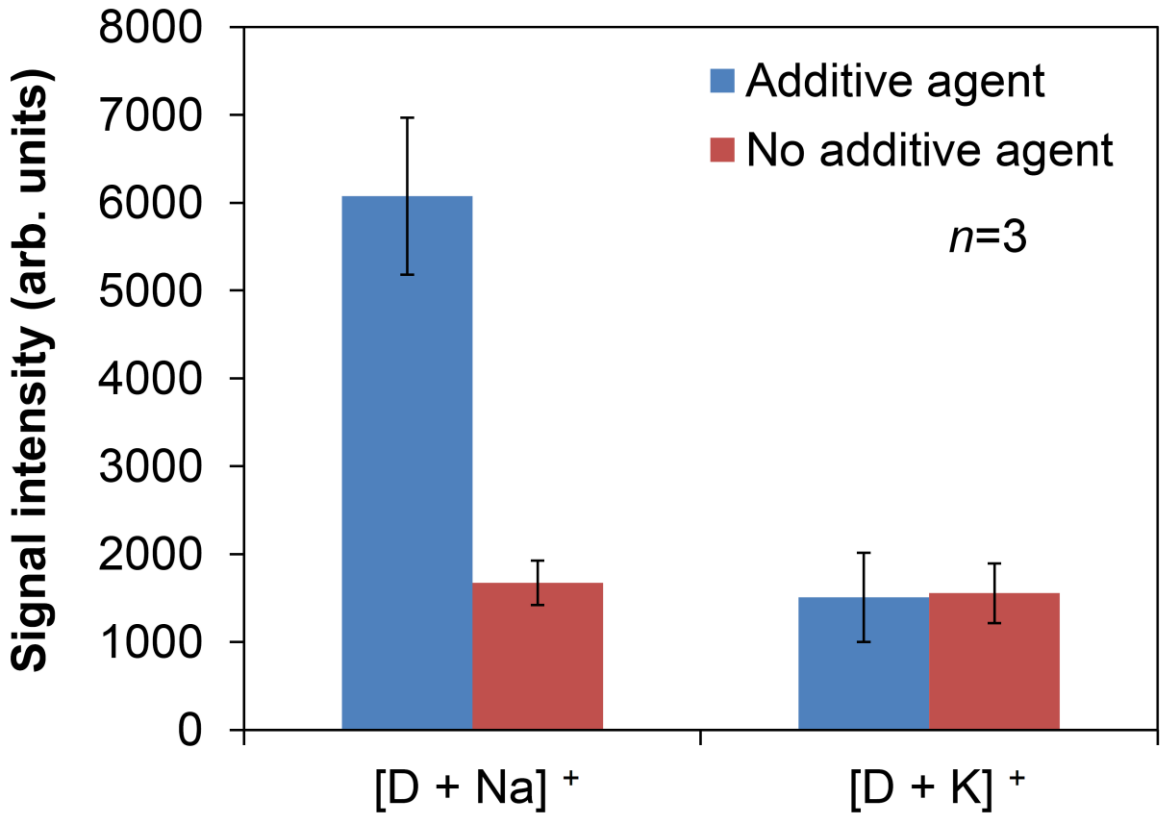


Fig. 4-3 Peak intensity of [D + Na] $^{+}$ and [D + K] $^{+}$ using 4NA with each additive agent. D indicates docetaxel.

4.3 ゼオライトマトリックスによる検出感度の向上

細胞に取り込まれたドセタキセルの検出に向けたドセタキセルの検出感度向上のため、新規イオン化補助剤であるゼオライトマトリックスの検討を行った。ドセタキセルはナトリウムイオンが付加して検出され、ナトリウムイオンを添加することで検出感度が向上することが分かった。したがって、ゼオライトの中でも、Na^+ によってカチオン置換されている Na^+置換型ゼオライト（NaY5.6）に着目した。ゼオライトに混ぜ合わせるマトリックスとして、前の実験にて高い信号強度の得られた 4NA、および ATT を用いた。混ぜ合わせるマトリックス、およびゼオライトを乳鉢で 10 分間すり合わせ、ゼオライトマトリックスを作製した。乳鉢ですり合わせることで、ゼオライト細孔内にマトリックス分子を吸着すると考えられる。

4.3.1 実験方法

メタノール 50% 水溶液を用いてドセタキセルを 100 μg/mL に調整した。4NA、および 4NA を NaY5.6 と 1:1 (w/w) で 10 分間乳鉢にて混合し、4NA/NaY、ATT/NaY を作製し、それぞれメタノール水溶液で 10、20 μg/mL に調整した。金属サンプルプレートにドセタキセル溶液を 1 μL 滴下し、真空下で乾燥させた後、2 種類のゼオライトマトリックス溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。

4.3.2 実験結果

Fig. 4-4 にドセタキセルに 4NA、ATT、4NA/NaY、および ATT/NaY を用いた場合に得られた質量スペクトルを示す。4 種類のマトリックスを用いた全ての場合において、ドセタキセルのナトリウム付加イオン$[D+Na]^+$（*m/z* 829.9）が検出された。4NA/NaY を用いた場合、ドセタキセルの検出感度は向上しなかった。一方で ATT/NaY を用いた場合、ドセタキセルの検出感度が劇的に向上することが分かった。また ATT/NaY と ATT を用いた場合を比べて、ドセタキセルのカリウム付加イオン$[D+K]^+$（*m/z* 845.9）の検出感度は向上しなかった。Fig. 4-5 に 4NA、ATT、4NA/NaY、および ATT/NaY を用いた場合のドセタキセルのナトリウム付加イオンの信号強度とレーザー照射エネルギーの関係、また Fig. 4-6 に 4NA、ATT、4NA/NaY、および ATT/NaY を用いた場合に得られたドセタキセルのナトリウム付加イオンの最大の信号強度を示す。ATT/NaY を用いた場合、ドセタキセルのナトリウム付加イオンの検出感度が約 13 倍に向上した。

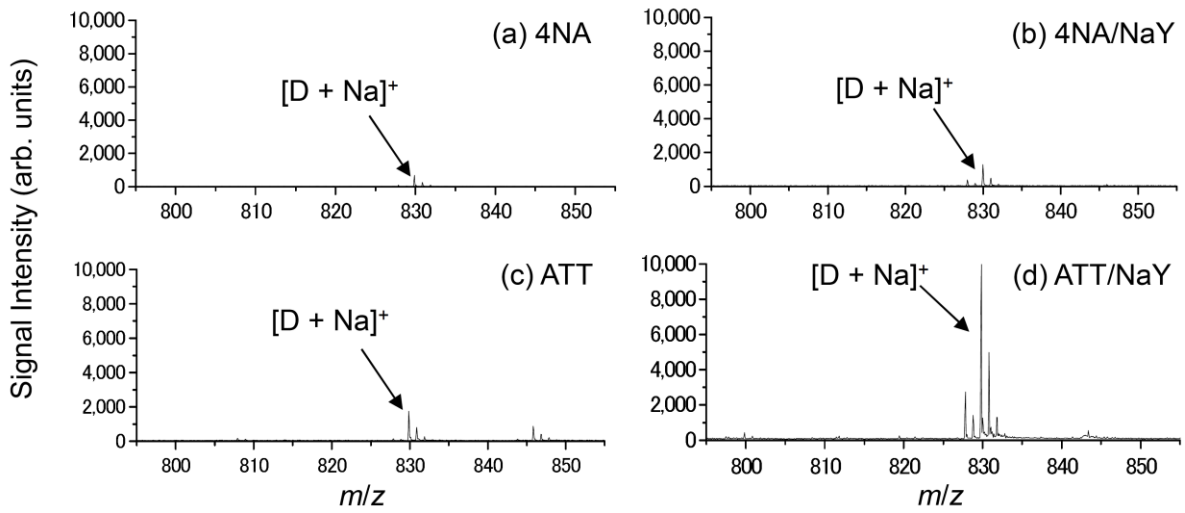


Fig. 4-4 Typical mass spectra obtained from 1 μL docetaxel using (a) 4NA, (b) 4NA/NaY, (c) ATT and (d) ATT/NaY. D indicates docetaxel.

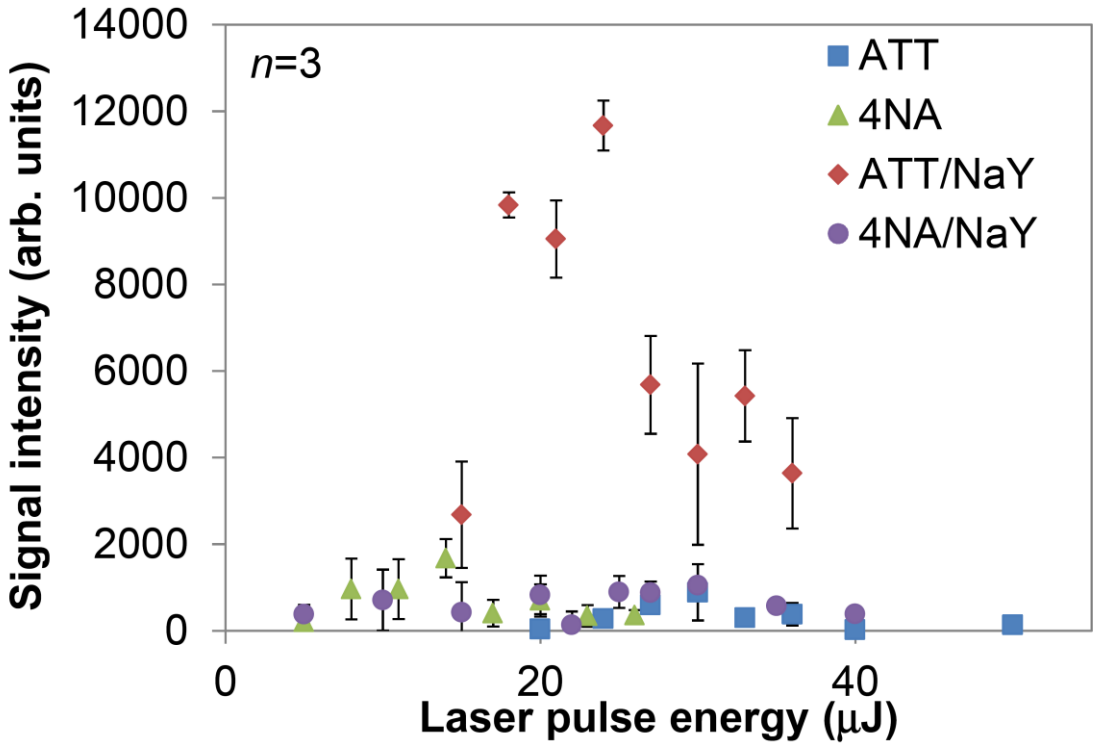


Fig. 4-5 Peak intensity of $[D + Na]^+$ obtained from 1 μL docetaxel using 4NA, 4NA/NaY, ATT and ATT/NaY at each laser pulse energy. D indicates docetaxel.

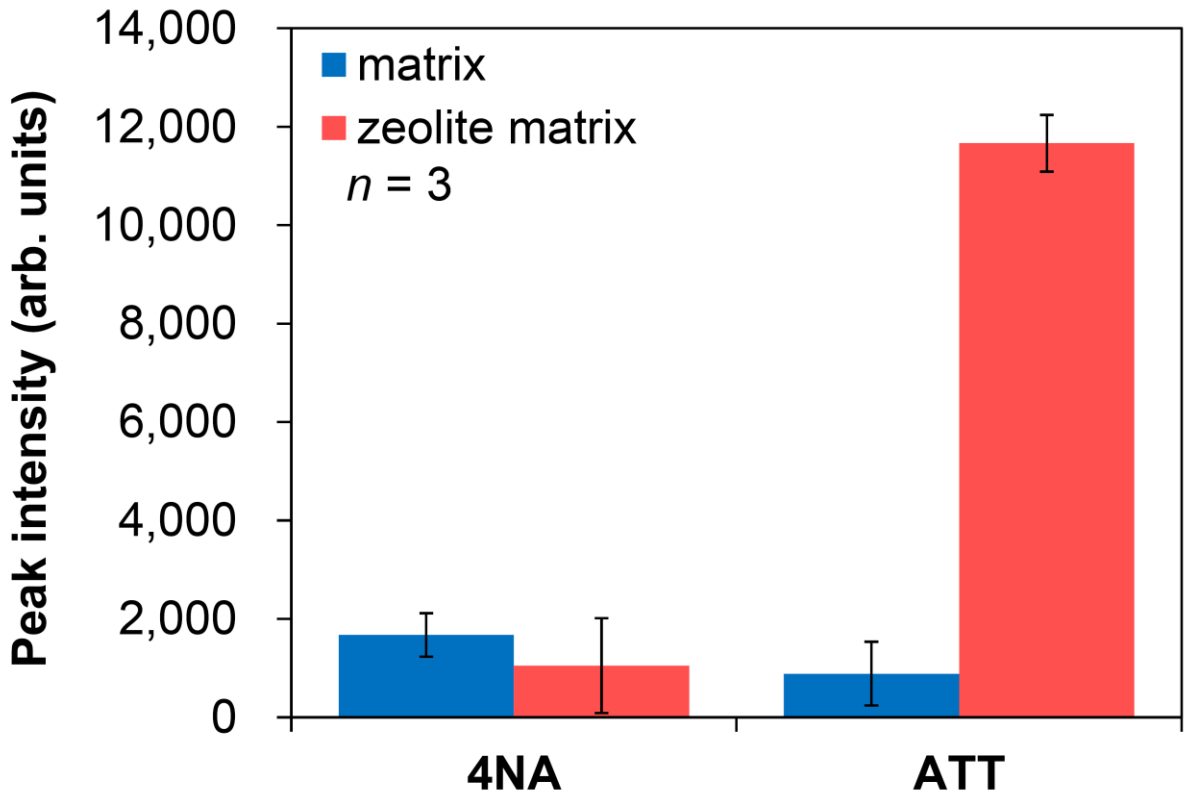


Fig. 4-6 Peak intensity of $[D + Na]^+$ obtained from 1 μL docetaxel using 4NA, 4NA/NaY, ATT and ATT/NaY. D indicates docetaxel.

4.4 ゼオライトマトリックスによるドセタキセル、および PpIX の同時検出

ドセタキセル、および PpIX の同時検出において、それぞれの薬剤の検出感度に差がある場合、イオン化の抑制が生じる可能性がある。イオン化の抑制とは、イオン化効率の低い物質のイオン化が、イオン化効率の高い物質によって抑制される現象である。一般に生体内に含まれる塩類や脂質などの物質は、イオン化効率が高く、測定物質の検出感度が低下することが報告される[59,60]。本研究においても、CHCA を用いた場合、ドセタキセルの検出限界濃度は 10μM であったのに対して、PpIX は 100 nM であり、ドセタキセル、および PpIX を同時に検出することができなかった。ゼオライトマトリックスによってドセタキセルの検出感度が約 13 倍に向上し、検出限界濃度が 1 μM になったことで、ドセタキセル、および PpIX を同時に検出できる可能性がある。

4.4.1 実験方法

50% メタノール水溶液を用いて、ドセタキセル、および PpIX をそれぞれ 1、5 μM になるように調整した。50% メタノール水溶液を用いて、ATT/NaY を 5 mg/mL に調整した。金属サンプルプレート上にドセタキセル、および PpIX の混合溶液を 1 μL 滴下し、真空中で乾燥させた。その上にゼオライトマトリックス溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。

4.4.2 実験結果

Fig. 4-7 に ATT/NaY を用いた場合に(a) ドセタキセル、および PpIX の混合試料、(b) ドセタキセルのみの試料から得られた質量スペクトルを示す。ドセタキセル、および PpIX の混合試料から PpIX のプロトン付加イオン$[PpIX+H]^+$（*m/z* 563.3）、およびドセタキセルのナトリウム付加イオン$[Docetaxel+Na]^+$（*m/z* 829.9）が検出された。一方ドセタキセルのみの試料からもドセタキセルのナトリウム付加イオン$[Docetaxel+Na]^+$が検出され、ピーク信号強度はドセタキセル、および PpIX の混合試料から得られた場合と同程度であった。以上より、ATT/NaY を用いた場合にイオン化の抑制が生じずにドセタキセルを検出することができた。また今回検討したドセタキセルの濃度 1 μM は検出限界濃度であり、PpIX の濃度 5 μM は PC-3 細胞に浸漬させることのできる最も高い濃度である。したがって、PC-3 細胞に対してドセタキセル、および PpIX を浸漬させた場合にイオン化の抑制を受けずに同時検出できると考えられる。

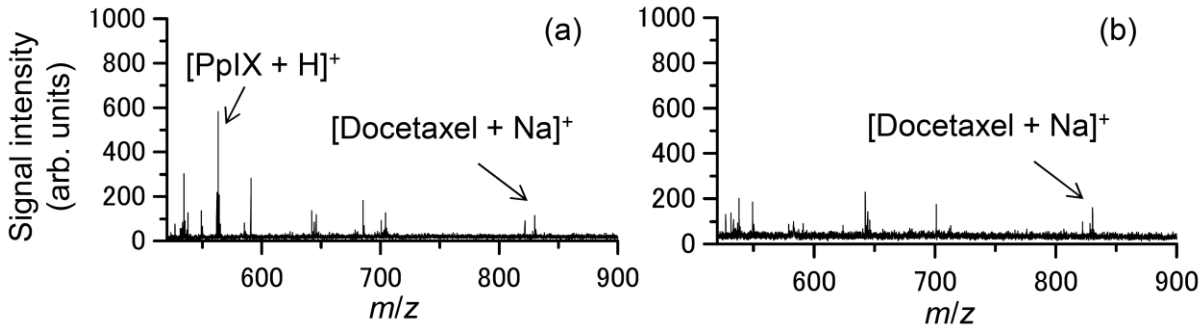


Fig. 4-7 Typical mass spectra obtained from (a) 1 μM of docetaxel and 5 μM of PpIX using ATT/NaY.

4.5 ゼオライトマトリックスの調整条件が検出感度に与える影響

ゼオライトマトリックスの濃度、マトリックスとゼオライトの混合比、および溶媒が薬剤の検出感度に与える影響に関して考察を行った。

4.5.1 ゼオライトマトリックスの濃度と検出感度の関係

ドセタキセルを濃度 1 μg/mL に調整し、ATT/NaY を濃度 20、15、10、5、1 μg/mL に調整した。ドセタキセル、およびゼオライトマトリックスの溶媒として 50% メタノール水溶液を用いた。金属サンプルプレートにドセタキセル溶液を 1 μL 滴下し、真空下で乾燥させた後、5 種類の濃度のゼオライトマトリックス溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。

Fig. 4-8 に 20、15、10、5、1 μg/mL の ATT/NaY を用いた場合にドセタキセルから得られた質量スペクトルを示す。ATT/NaY 20、15、10、5 μg/mL を用いることで ATT のみでは検出できなかった濃度 1 μg/mL でドセタキセルのナトリウム付加イオン$[D + Na]^+$（*m*/*z* 829.9）を検出できた。5 mg/mL を用いた場合にドセタキセルのナトリウム付加イオン$[D + Na]^+$ の信号強度が最も高かった。Fig. 4-9 に ATT/NaY の各濃度におけるドセタキセルのナトリウム付加イオン$[D + Na]^+$ の信号ピークの S/N 比(Signal/Noise) と測定時の照射エネルギーの関係を示す。5 mg/mL の ATT/NaY を用いた場合、ほかの濃度と比べて S/N 比が約 3〜4 倍に向上することが分かった。また 1 mg/mL の ATT/NaY を用いた場合、ドセタキセル由来のピークは確認できなかった。

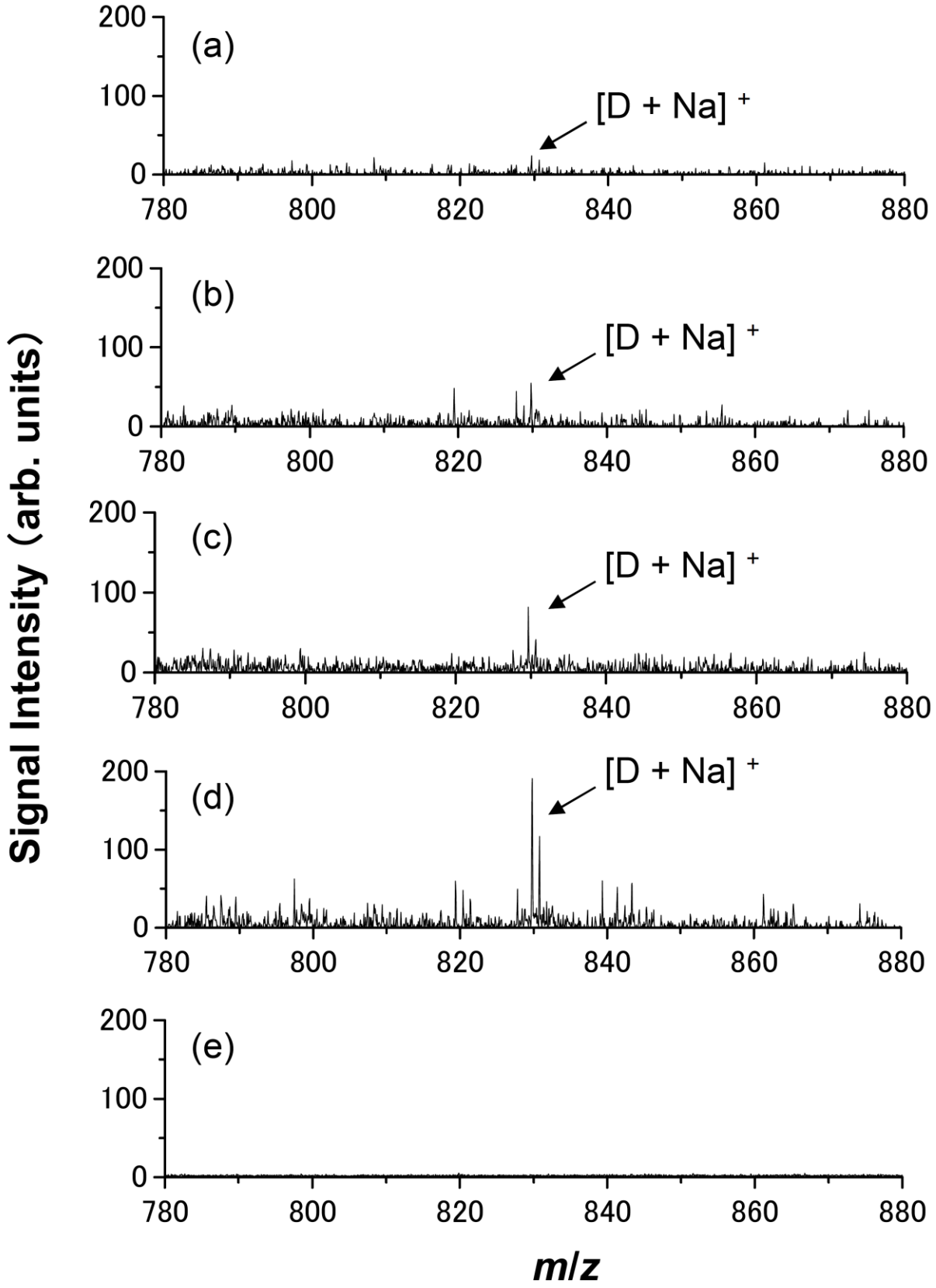


Fig. 4-8 Typical mass spectra obtained from 1 μg/mL docetaxel using ATT/NaY at the concentrations of (a) 20, (b) 15, (c) 10, (d) 5, (e) 1 μg/mL. D indicates docetaxel.

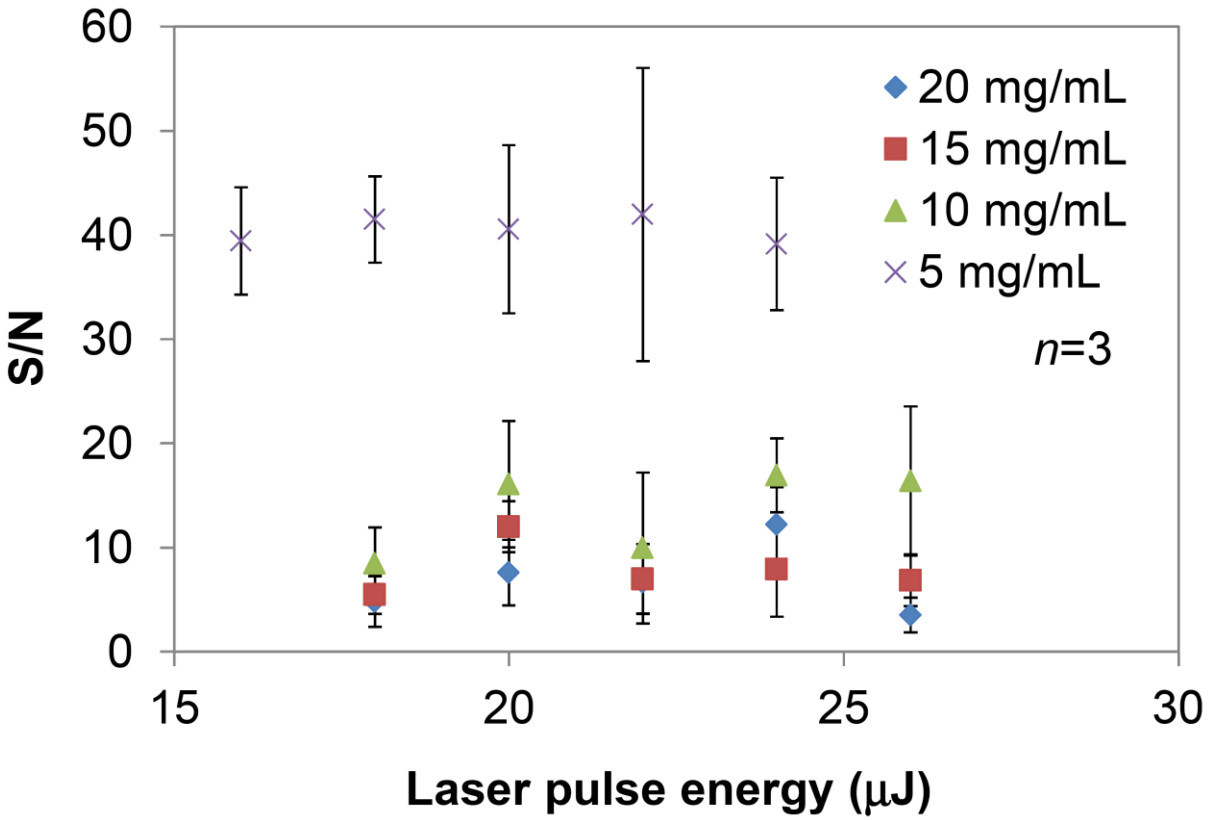


Fig. 4-9 Peak intensity of $[D + Na]^+$ obtained from 1 μL docetaxel using 4NA, 4NA/NaY, ATT and ATT/NaY. D indicates docetaxel.

4.5.2 ゼオライトとマトリックスの混合比と検出感度の関係

ドセタキセルを濃度 1 μg/mL に調整し、2.5 mg/mL の ATT を 1 とした場合の NaY の混合比を 1、0.5、0.25 (w/w) として、メタノール 50% 水溶液で ATT/NaY を調整した。金属サンプルプレートにドセタキセル溶液を 1 μL 滴下し、真空下で乾燥させた後、3 種類の混合比で調整したゼオライトマトリックス溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。Fig. 4-8 に 2.5 mg/mL の ATT を 1 とした場合の NaY の混合比を 1、0.5、0.25 として調整した ATT/NaY を用いた場合にドセタキセルから得られた質量スペクトルを示す。ATT:NaY=1:1（w/w）で調整した場合にドセタキセルのナトリウム付加イオン $[D + Na]^+$（*m/z* 829.9）の信号強度が最も高かった。ATT:NaY=1:0.25（w/w）で調整した場合、ドセタキセルのナトリウム付加イオンの信号強度が急激に低下した。

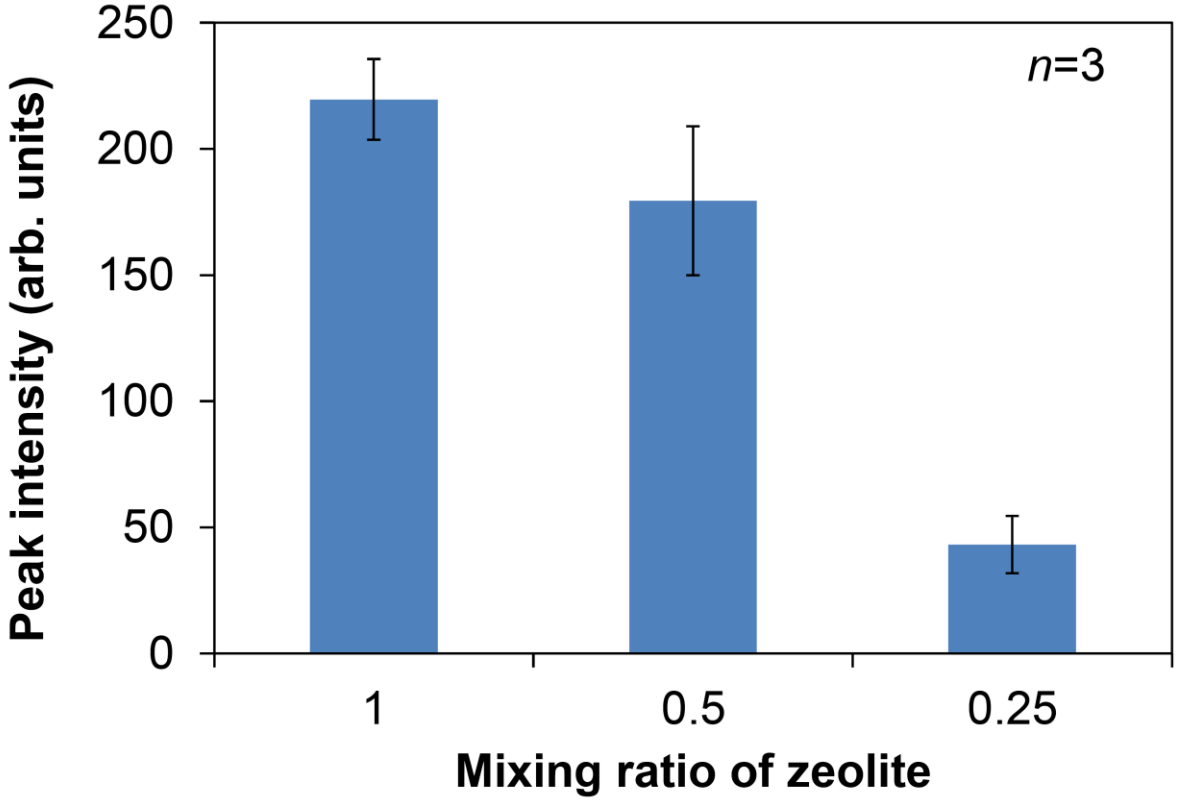


Fig. 4-10 Peak intensity of obtained $[D + Na]^+$ obtained from 1 μg/mL docetaxel using ATT/NaY at the mixing ratio of ATT:NaY 1:1, 1:0.5, 1:0.25 (w/w). D indicates docetaxel.

4.5.3 ゼオライトマトリックスの溶媒と検出感度の関係

メタノール 50% 水溶液を用いてドセタキセルを 1 μg/mL に調整した。50% メタノール水溶液、50% アセトニトリル水溶液、および 50% アセトン水溶液を用いて、ATT/NaY を 5 mg/mL に調整した。金属サンプルプレートにドセタキセル溶液を 1 μL 滴下し、真空下で乾燥させた後、3 種類の溶媒で調整したゼオライトマトリックス溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。

Fig. 4-11 に 50% メタノール水溶液、50% アセトニトリル水溶液、および 50% アセトン水溶液で調整した ATT/NaY をドセタキセルのイオン化に用いた場合に得られたドセタキセルのナトリウム付加イオン$[D + Na]^+$（*m/z* 829.9）の S/N 比を示す。ドセタキセルの検出感度は 50% アセトン水溶液、50% メタノール水溶液、50% アセトニトリル水溶液を用いた場合の順で高かった。50% アセトン水溶液を用いた場合、50% メタノール水溶液を用いた場合と比べて約 1.5 倍、50% アセトニトリル水溶液を用いた場合と比べて約 2 倍の検出感度を得ることができた。メタノール、アセトニトリル、アセトンに対するドセタキセルの溶解度は、50、10、230 mg/mL である [61]。試料に対する溶解度の高い溶媒をイオン化補助剤の調整に用いることで、試料とイオン化補助剤が混合し、結晶化しやすくなる。これによりイオン化効率が向上すると考えられる。

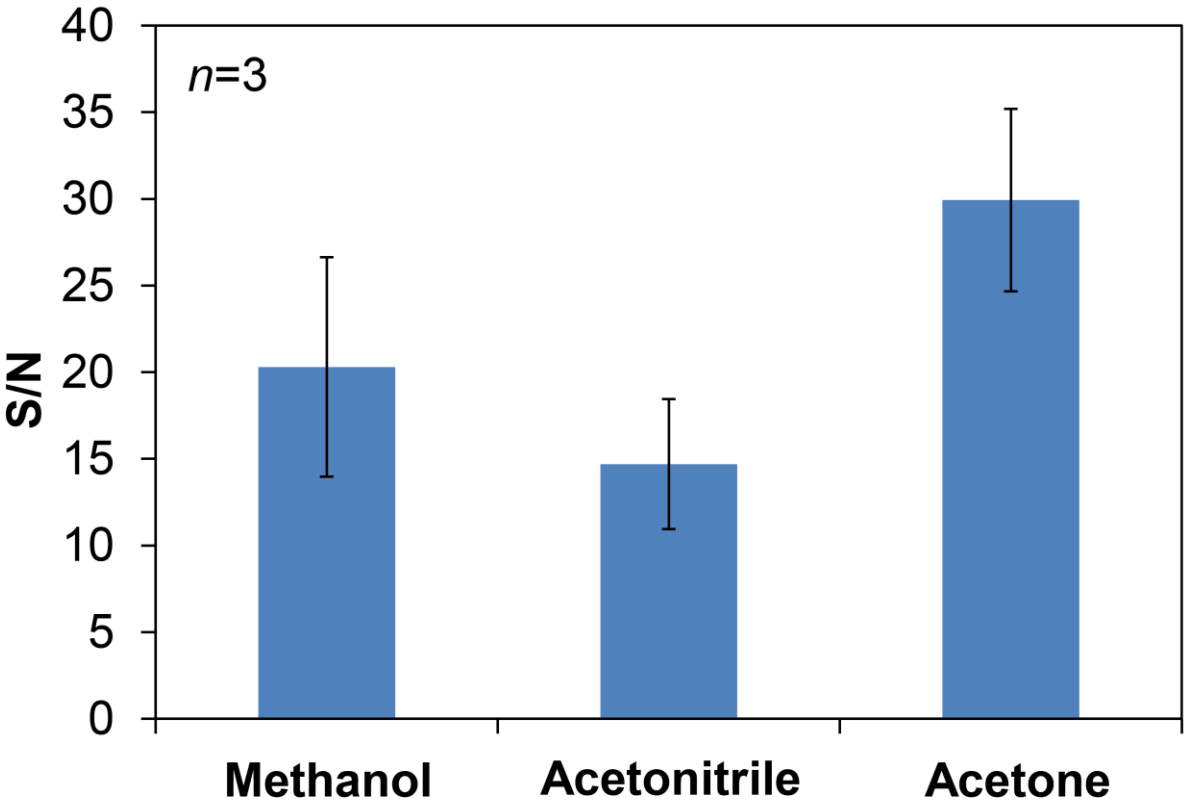


Fig. 4-11 S/N of $[D + Na]^+$ obtained from 1 μg/mL docetaxel using ATT/NaY dissolved in 1:1 (v/v) methanol:water, 1:1 (v/v) acetonitrile:water and 1:1 (v/v) acetone:water. D indicates docetaxel.

第 5 章　ゼオライトマトリックスによる細胞に取り込まれたドセタキセルの検出

本研究において開発したゼオライトマトリックスを用いた場合に PC-3 細胞からドセタキセルが検出できるか検討を行った。またゼオライトマトリックスを用いた場合に得られる検出感度が十分であるか PC-3-DR 細胞のドセタキセル耐性と比較することで考察を行った。

5.1 PC-3 細胞に取り込まれたドセタキセルの検出

ATT/NaY を用いることでドセタキセルの検出感度が約 13 倍に向上し、金属サンプルプレートでのドセタキセル、および PpIX の同時検出に成功した。ここでは PC-3 細胞に取り込まれたドセタキセルの検出を試みた。

5.1.1 実験方法

PC-3 細胞を底面積 25 cm_2 のフラスコ（3103-025, IWAKI, Japan）にて、37 ℃、CO_2 濃度 5%の環境下で前培養した。24 時間後、PC-3 細胞にドセタキセルを 50 μM で溶解させた培地にて 3 時間浸漬させた。対照実験におけるコントロールとして薬剤を溶解させていない培地にて 3 時間同様に培養した PC-3 細胞を用意した。phosphate buffered saline (PBS, D8527, Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) にて 1 回洗浄を行い、遠心分離した後に蒸留水で 5.0×10^3 cells/μL になるように細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を金属サンプルプレートにそれぞれ 1 μL 滴下し乾燥させた。ATT/NaY をメタノール 50 %水溶液を用いて 10 mg/mL に調整し、1 μL 滴下した。Voyager、リフレクターモードで測定を行った。

5.1.2 実験結果

Fig. 5-1 に ATT/NaY を用いた場合に細胞懸濁液から得られた質量スペクトルを示す。ATT/NaY を用いた場合に細胞懸濁液からドセタキセルのナトリウム付加イオン$[D + Na]^+$（*m*/*z* 829.9）が検出された。一方、上澄みからドセタキセル由来のイオンは検出できなかった。Fig. 5-2 にドセタキセルを 100、10、0 μM にて浸漬させた場合に PC-3 細胞から得られたドセタキセルのナトリウム付加イオンの S/N 比を示す。10 μM 以上でドセタキセルを浸漬させた場合、PC-3 細胞からドセタキセルを検出することに成功した。

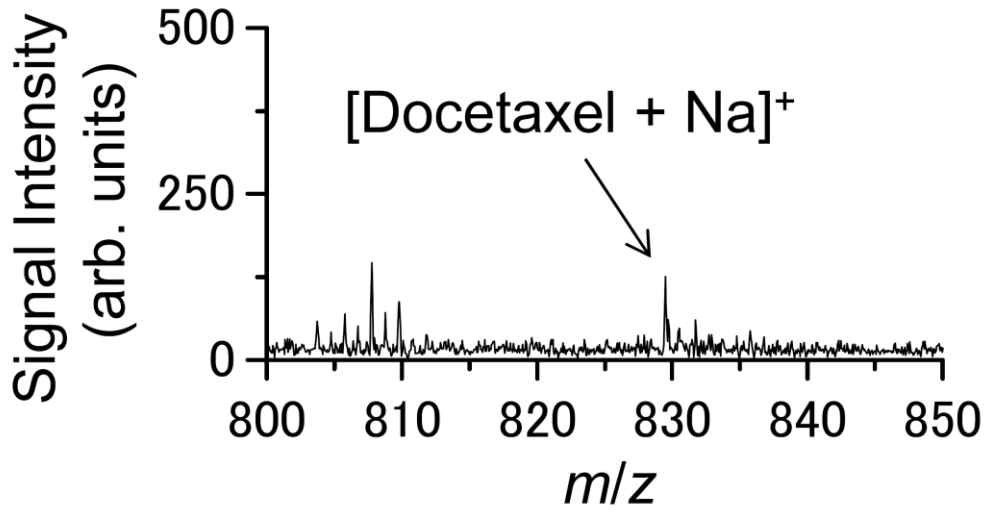


Fig. 5-1 Typical mass spectra obtained from PC-3 administered docetaxel at a concentration of 50 μM using ATT/NaY.

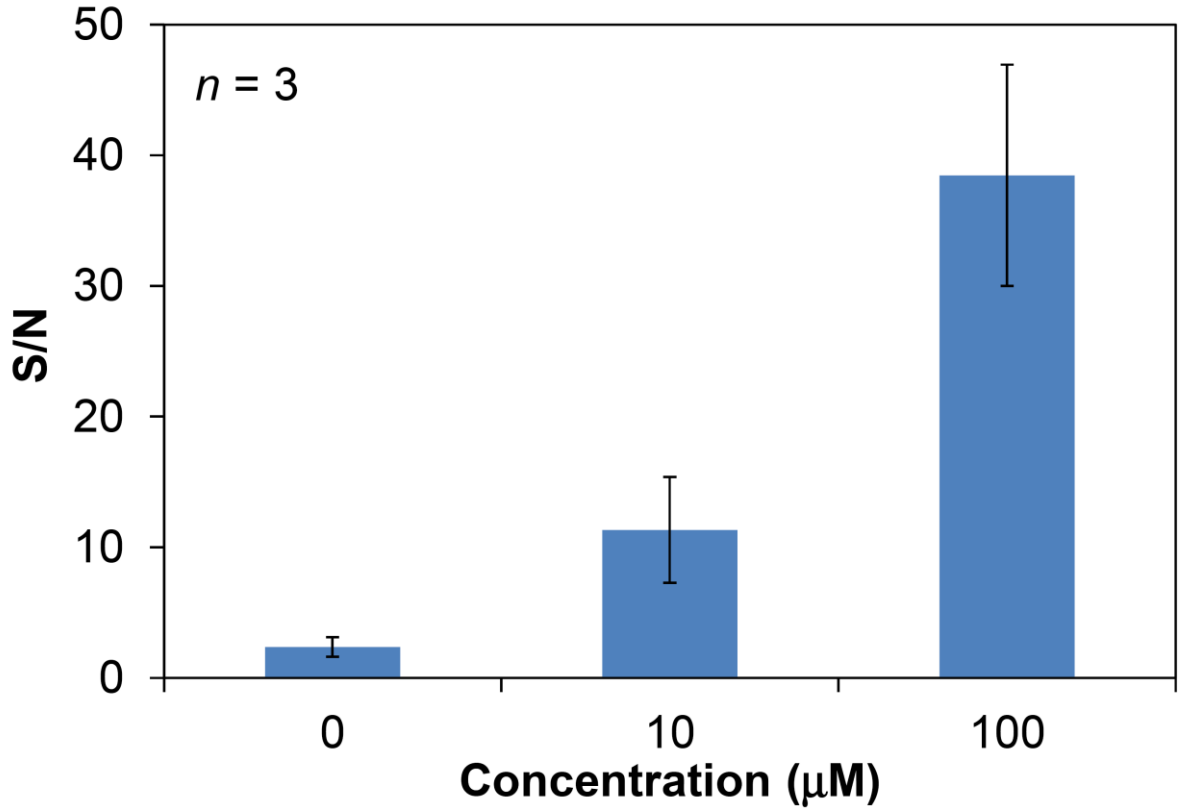


Fig. 5-2 S/N of [docetaxel + Na] $^{+}$ obtained from PC-3 cells administered docetaxel at the concentration of 0, 10, 100 μM.

5.2 細胞に取り込まれたドセタキセルの検出感度に関する考察

本研究にて作製した PC-3-DR 細胞に対してドセタキセル耐性の評価を行い、PC-3、および PC-3-DR 細胞の生存率に差が生じる浸漬濃度の算出を行った。この浸漬濃度と MSI における検出限界濃度を比較することで、ゼオライトマトリックスを用いた場合の検出感度が十分であるか評価した。

培地交換における細胞への影響を最小限に抑えるために 96 wells のプレート上に 10%ポリエルリジンにてコーティング処理を行った。このプレートに PC-3、および PC-3-DR 細胞を 1000 cells/well で播種した。24 時間後ドセタキセルを 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5,10, 25, 50, 100 μM にて 1 時間浸漬させた。ドセタキセルの入っていない培地に交換し、さらに 48 時間培養した。その後 WST （Water soluble Tetrazolium salts） アッセイにより細胞生存率を算出した。

Fig. 5-3 に各濃度にてドセタキセルを浸漬させた場合に得られた PC-3、および PC-3-DR 細胞の生存率を示す。10 μM 以下でドセタキセルを浸漬させた場合、PC-3、および PC-3-DR 細胞の間に生存率の差が確認された。また 25 μM 以上で浸漬させた場合、各細胞間で細胞生存率に差は確認できなかった。Fig. 5-4 に Fig. 5-3 で得られた細胞生存率のうち、0.01, 1, 10, 25 μM にて浸漬させた場合を示す。得られた細胞生存率において p 検定を行った結果、1, 10 μM にて浸漬させた場合に各細胞の生存率に有意な差が確認された。Fig. 5-5 に 0.1 μM においてドセタキセルを浸漬させた場合、および浸漬させなかった場合に得られた薬剤浸漬後 48 時間の細胞の光学画像を示す。PC-3 細胞ではドセタキセルを浸漬させた場合細胞数が減少しているのに対して、PC-3-DR 細胞ではドセタキセルを浸漬させた場合でも細胞数は減少しないことが分かった。以上のことから PC-3-DR 細胞のドセタキセル耐性が確認される浸漬濃度は 0.1～10 μM であった。一方、MSI では 10 μM で浸漬させた場合に PC-3 細胞からドセタキセルを検出することができるため、ゼオライトマトリックスを用いた場合、十分な検出感度が得られていると考えられる。

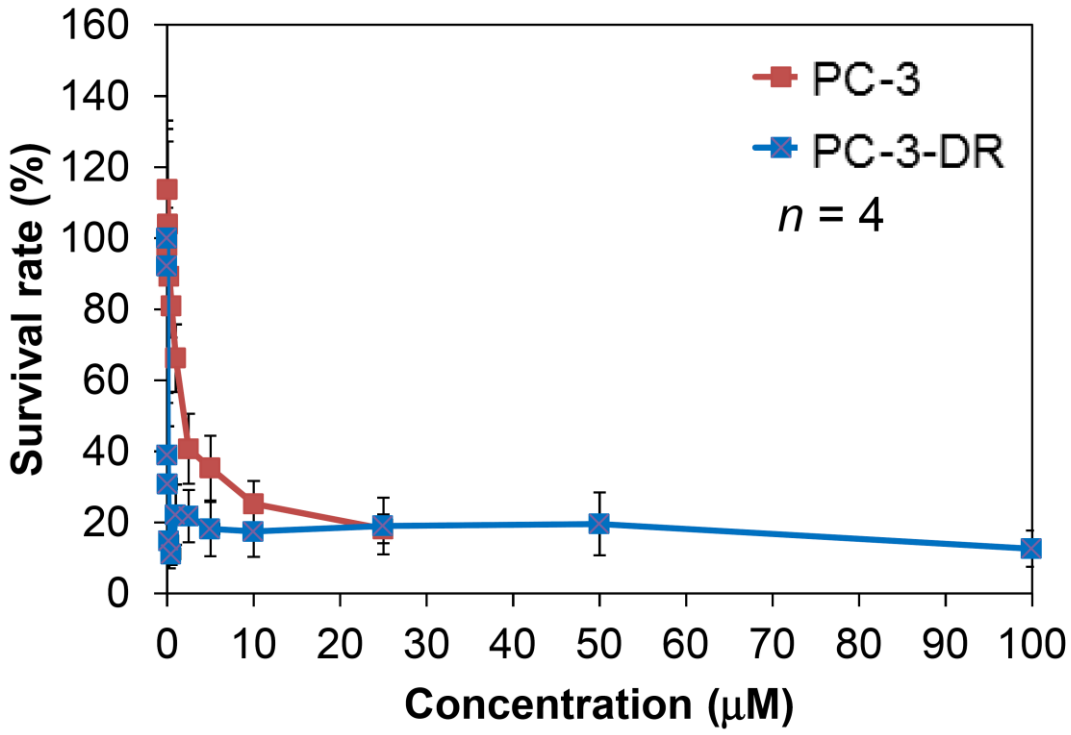


Fig. 5-3 Survival rates of PC-3 and PC-3-DR administrated docetaxel at the concentrations of 0–100 μM.

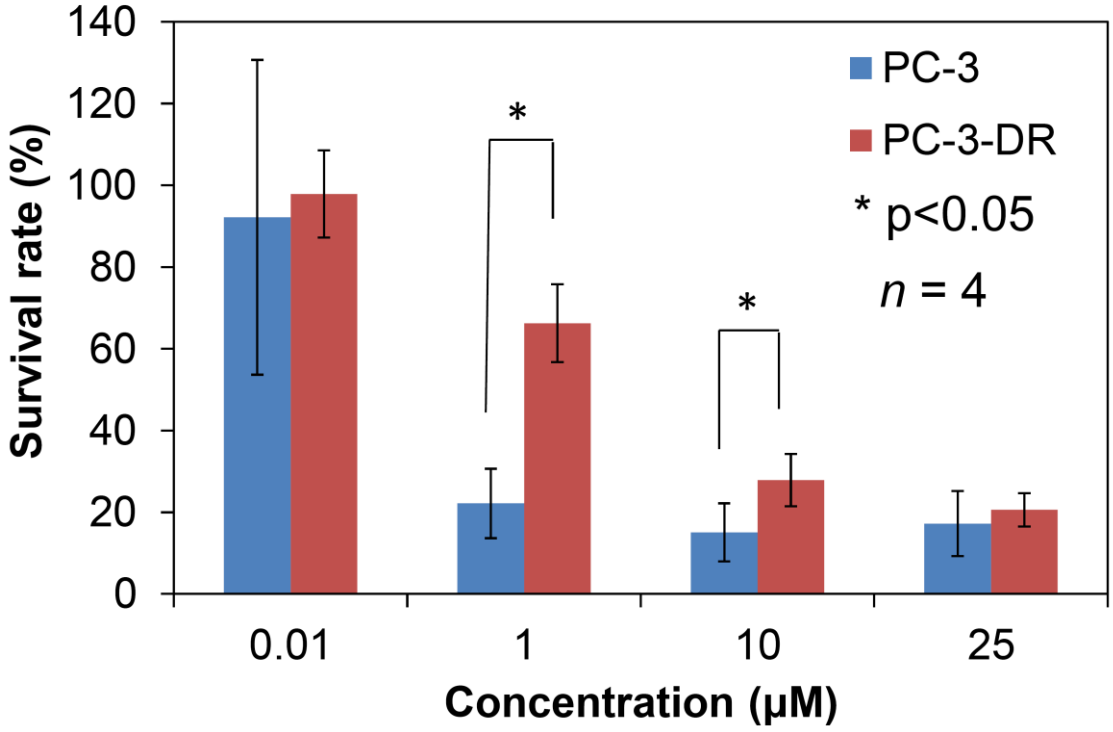


Fig. 5-4 Survival rates of PC-3 and PC-3-DR administrated docetaxel at the concentrations of 0.01, 1, 10, 25 μM.

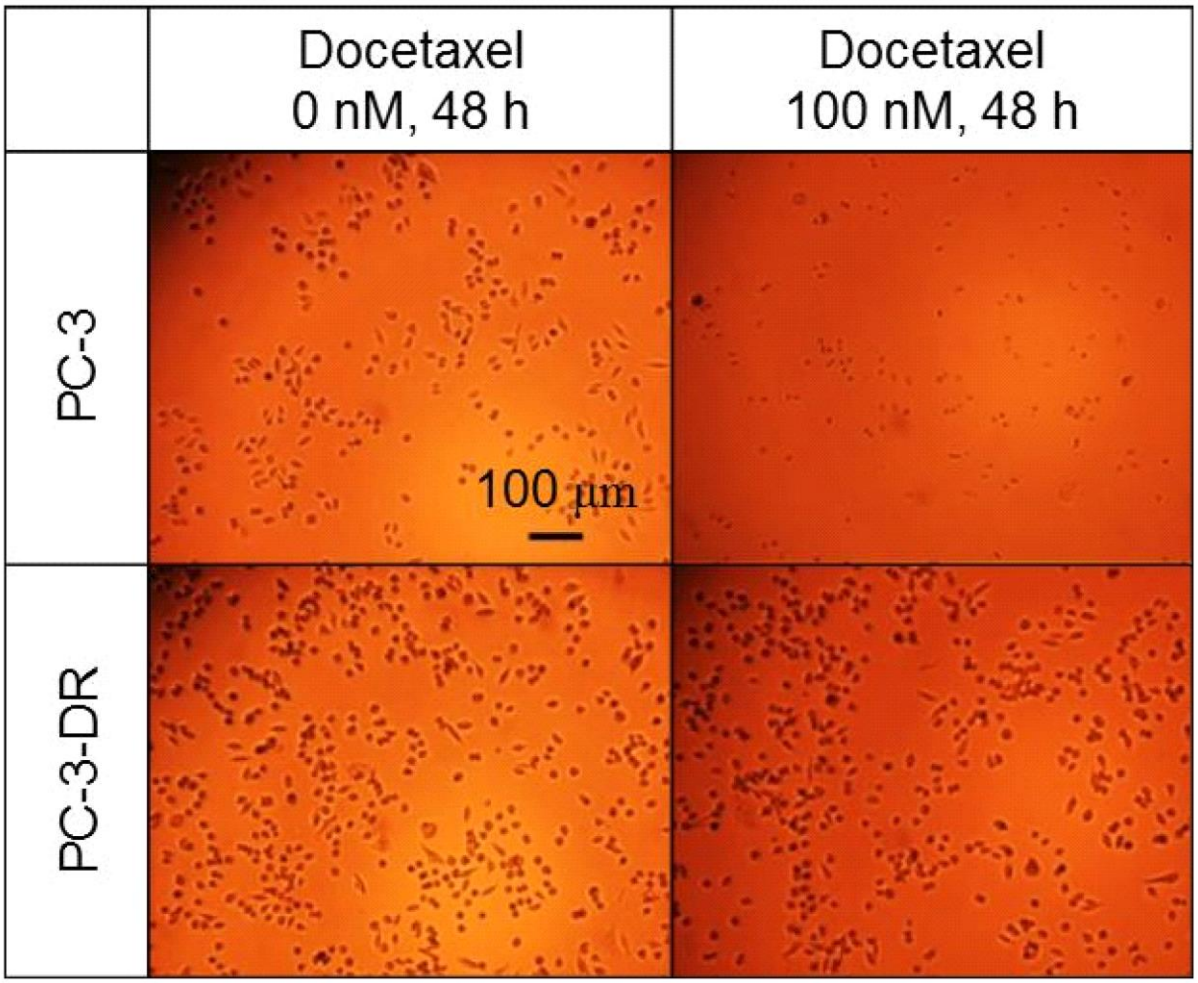


Fig. 5-5 Optical images of PC-3 and PC-3-DR administrated docetaxel at the concentrations of 0, 0.1 μM.

第 6 章　走査型 MSI による PC-3、および PC-3-DR 細胞における薬剤取込の評価

走査型 MSI にて PC-3-DR 細胞のドセタキセル耐性を確認する場合に薬剤の検出感度が十分であることが分かった。ここでは PC-3、および PC-3-DR 細胞における薬剤取込の評価を走査型 MSI を用いて行った。

6.1 細胞に取り込まれた薬剤の検出に適したイオン化補助剤の検討

前回までの検討にて細胞に取り込まれたドセタキセルのイオン化に 6-アザ-2-チオチミンのゼオライトマトリックスを用いた場合に、PC-3-DR 細胞のドセタキセル耐性を確認するために十分な検出感度が得られることが分かった。ここではゼオライトマトリックスや PpIX のイオン化に適した CHCA を用いて PC-3-DR 細胞のドセタキセル耐性の評価、および PC-3-DR 細胞への PpIX の集積性を示すことが可能であるか検討を行った。

6.1.1 実験方法

PC-3、および PC-3-DR を底面積 25 cm_2 のフラスコに播種し、24 時間培養した。ドセタキセルを 50 μM のみ、または PpIX、およびドセタキセルを 10、50 μM で培地に溶解させ各細胞に 1 時間浸漬させた。対照実験におけるコントロールとして薬剤を溶解させていない培地にて 1 時間同様に培養した PC-3、および PC-3-DR 細胞を用意した。PBS にて 1 回洗浄を行い、遠心分離した後に蒸留水で 5.0×10^3 cells/μL の細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を酸化インジウムスズ（indium tin oxide; ITO）コーティングスライドガラス（♯ 237001, Bruker, Billerica, MA, USA）にそれぞれ 1 μL 滴下し乾燥させた後、6-アザ-2-チオチミンのゼオライトマトリックスをメタノール 50% 水溶液を用いて 10 mg/mL、6-アザ-2-チオチミンをメタノール 50% 水溶液にて 10 mg/mL、CHCA をアセトニトリル 50% 水溶液にて 10 mg/mL、6-アザ-2-チオチミンのゼオライトマトリックスおよび CHCA の混合マトリックスを 1:1 (v/v) で 20 mg/mL に調整し 1 μL 滴下した。乾燥後に Voyager にてドセタキセル、および PpIX の分布画像を取得した。

6.1.2 実験結果

Fig. 6-1 に各マトリックスを用いた場合にそれぞれの薬剤を浸漬させた各細胞から得られた、(a) ドセタキセルのナトリウム付加イオン（*m/z* 829.9）、(b) PpIX のプロトン付加イオン（*m/z* 563.3）の分布画像を示す。6-アザ-2-チオチミンのゼオライトマトリックスを用いた場合のみ、PC-3 細胞のみからドセタキセルのナトリウム付加イオンが検出され、PC-3-DR 細胞のドセタキセル耐性が確認できた。6-アザ-2-チオチミンのみでは各細胞からドセタキセル由来のイオンは検出できなかった。6-アザ-2-チオチミンのゼオライトマトリックスを用いることでドセタキセルのナトリウム付加イオンの検出感度が向上したためである。CHCA、および CHCA と 6-アザ-2-チオチミンのゼオライトマトリックスの混合マトリックスを用いた場合、PC-3、および PC-3-DR 細胞から PpIX

を検出することができた。しかし今回検討したイオン化補助剤では細胞に取り込まれたドセタキセル、および PpIX を同時に検出することはできなかった。

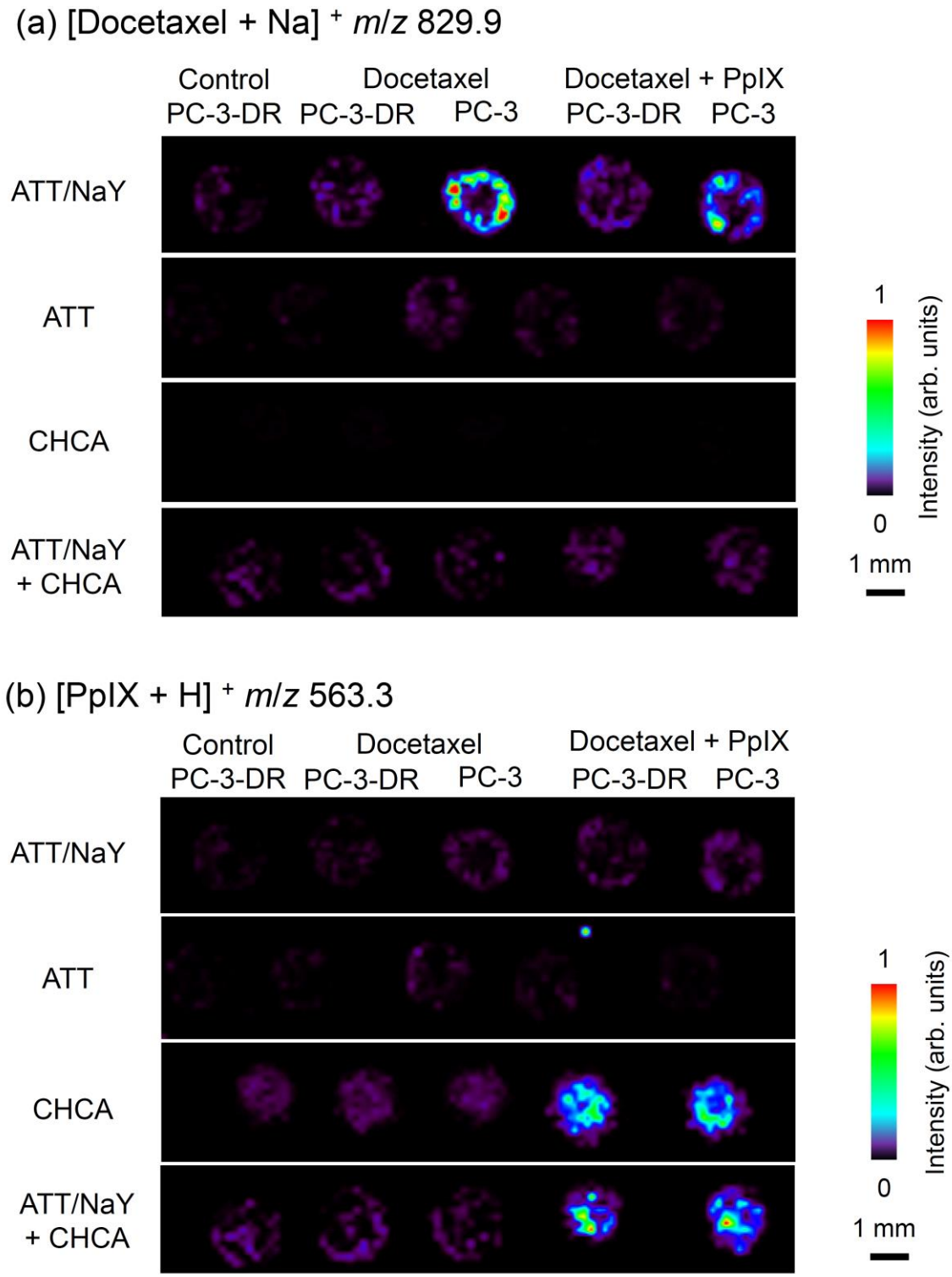


Fig. 6-1 Ion Image of (a) [Docetaxel + Na] + and (b) [PpIX + H] + obtained from PC-3, PC-3-DR cells administered only docetaxel or both docetaxel and PpIX using each matrix.

6.2 同一細胞懸濁液サンプルにおけるドセタキセル、および PpIX の複数回数イメージング

ドセタキセル、および PpIX のイオン化に適切なイオン化補助剤を用いた場合に前立腺がん細胞からそれぞれの薬剤を検出することができた。ここではまずドセタキセルのイオン化に適切な条件にてドセタキセルのイメージングを行い、その後 PpIX のイオン化に適切な条件にて PpIX の質量分析イメージングを行うことで、同一細胞サンプルからドセタキセル、および PpIX が検出できるか検討を行った。

6.2.1 実験方法

PC-3、および PC-3-DR を底面積 25 cm_2 のフラスコに播種し、24 時間培養した。PpIX、およびドセタキセルを 10、50 μM で培地に溶解させ各細胞に 1 時間浸漬させた。対照実験におけるコントロールとして薬剤を溶解させていない培地にて 1 時間同様に培養した PC-3、および PC-3-DR 細胞を用意した。PBS にて 1 回洗浄を行い、遠心分離した後に蒸留水で 5.0×10^3 cells/μL の細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を ITO スライドガラスにそれぞれ 1 μL 滴下し乾燥させた後、6-アザ-2-チオチミンのゼオライトマトリックスをメタノール 50% 水溶液を用いて 10 mg/mL に調整し 1 μL 滴下した。乾燥後に Voyager にてドセタキセルの分布画像を取得した。その後同一サンプル上に CHCA をアセトニトリル 50% 水溶液にて 10 mg/mL に調整し 1 μL 滴下した。乾燥後に再度 Voyager にて PpIX の分布画像を取得した。2 度目のイメージングを行う場合、レーザーの照射位置を 1 度目の位置からサンプルを正面から見て左右、および上下方向に 100 μm ずらして測定を行った。1 度目の測定はリニアモード、2 度目の測定はリフレクターモードで行った。

6.2.2 実験結果

Fig. 6-2 (a) に 1 度目のイメージングで各細胞から得られたドセタキセルのナトリウム付加イオン（*m*/*z* 829.9）の分布画像を示す。Fig. 6-2 (b) に 2 度目のイメージングで各細胞から得られた PpIX のプロトン付加イオン（*m*/*z* 563.3）の分布画像を示す。1 度目のイメージングで PC-3 細胞のみからドセタキセルのナトリウム付加イオンを検出することに成功した。2 度目のイメージングで PC-3、および PC-3-DR 細胞から PpIX のプロトン付加イオンを検出することに成功した。混合マトリックスを用いた場合、ドセタキセルのナトリウム付加イオンは検出されず、PpIX のプロトン付加イオンのみ検出されたことから、2 つのマトリックスを用いた場合、ドセタキセルの方がイオン化しにくいと考えられる。1 度目のイメージングにてゼオライトマトリックスのみを用いてまずドセタキセルを検出し、2 度目のイメージングにて CHCA を混合させた場合にイオン化しやすい PpIX を検出したと考えられる。また 1 度目と 2 度目のイメージングでのレーザー照射位置をずらすことで、サンプルの消耗による検出感度の低下を防ぐことができたと考えられる。

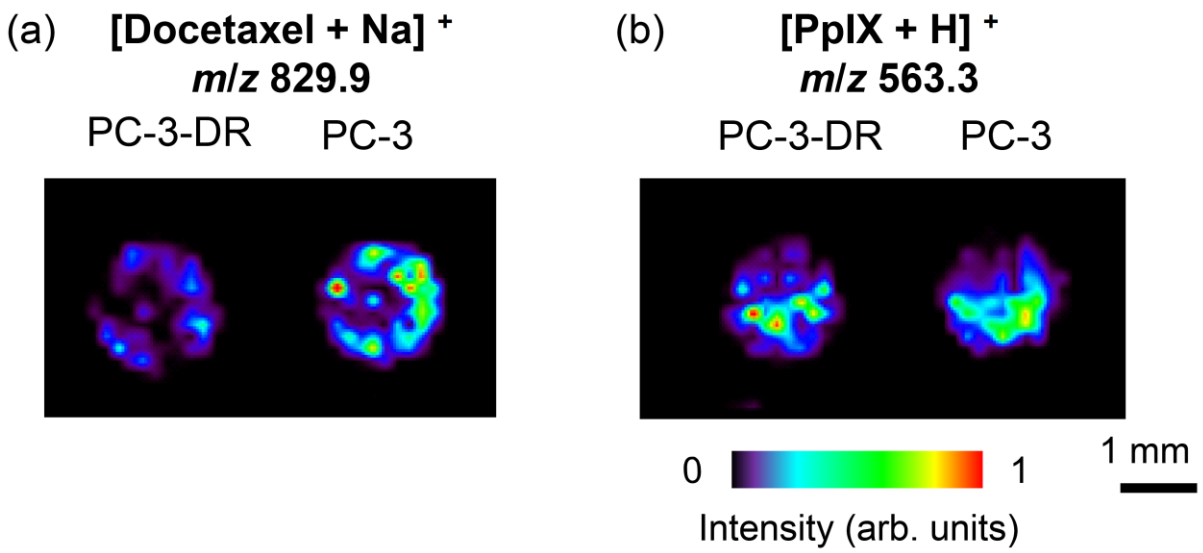


Fig. 6-2 Ion Image of (a) [Docetaxel + Na] $^{+}$ in the first scan and (b) [PpIX + H] $^{+}$ in the second scan obtained from PC-3, PC-3-DR cells administered docetaxel and PpIX.

6.3 同一細胞におけるドセタキセル、および PpIX の同時イメージング

前回の実験にて同一細胞サンプルからドセタキセル、および PpIX を検出可能な質量分析イメージング手法の開発を行った。ここではドセタキセル、および PpIX を同時にイメージングできるよう、サンプル調整条件、および測定モードを検討した。

6.3.1 実験方法

PC-3、および PC-3-DR を底面積 25 cm_2 のフラスコに播種し、24 時間培養した。PpIX、およびドセタキセルを 5、30 μM で培地に溶解させ各細胞に 1 時間浸漬させた。対照実験におけるコントロールとして薬剤を溶解させていない培地にて 1 時間同様に培養した PC-3、および PC-3-DR 細胞を用意した。PBS にて 1 回洗浄を行い、遠心分離した後に蒸留水で 5.0×10^3 cells/μL の細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を ITO スライドガラスにそれぞれ 1 μL 滴下し乾燥させた後、6-アザ-2-チオチミンのゼオライトマトリックスをアセトン 50% 水溶液を用いて 10 mg/mL に調整し 1 μL 滴下した。乾燥後に Voyager、リフレクターモードにてドセタキセル、および PpIX の分布画像を取得した。

6.3.2 実験結果

Fig. 6-3 に同時に検出されたドセタキセルのナトリウム付加イオン（*m/z* 829.9）、および PpIX のプロトン付加イオン（*m/z* 563.3）の分布画像を示す。ドセタキセル、および PpIX が PC-3 細胞から検出された。また PC-3-DR 細胞においてドセタキセルは検出されたが、その信号強度は PC-3 細胞と比べ低かった。PpIX では 2 種類の細胞の間で同程度の信号強度が得られた。Fig. 6-4 に測定において得られた質量スペクトルを示す。PpIX のプロトン付加イオン（*m/z* 563.3）において細胞による信号強度の差は見られなかった。一方ドセタキセルのナトリウム付加イオン（*m/z* 829.9）において、ドセタキセル耐性細胞では信号強度が半分程度になったことがわかった。このことから PC-3-DR 細胞のドセタキセル耐性を示し、かつ耐性細胞への光線力学療法の有効性が示唆された。前実験でゼオライトマトリックスのみを使用した場合、PpIX は検出できなかった。前回までは検出感度の高いリニアモードで測定を行っており、このモードでは質量分解能が低く、PpIX のピーク(*m/z* 563.3) は *m/z* 540.0 のピークと重なっていたため、コントロールの信号強度との違いを確認することが困難であったと考えられる。

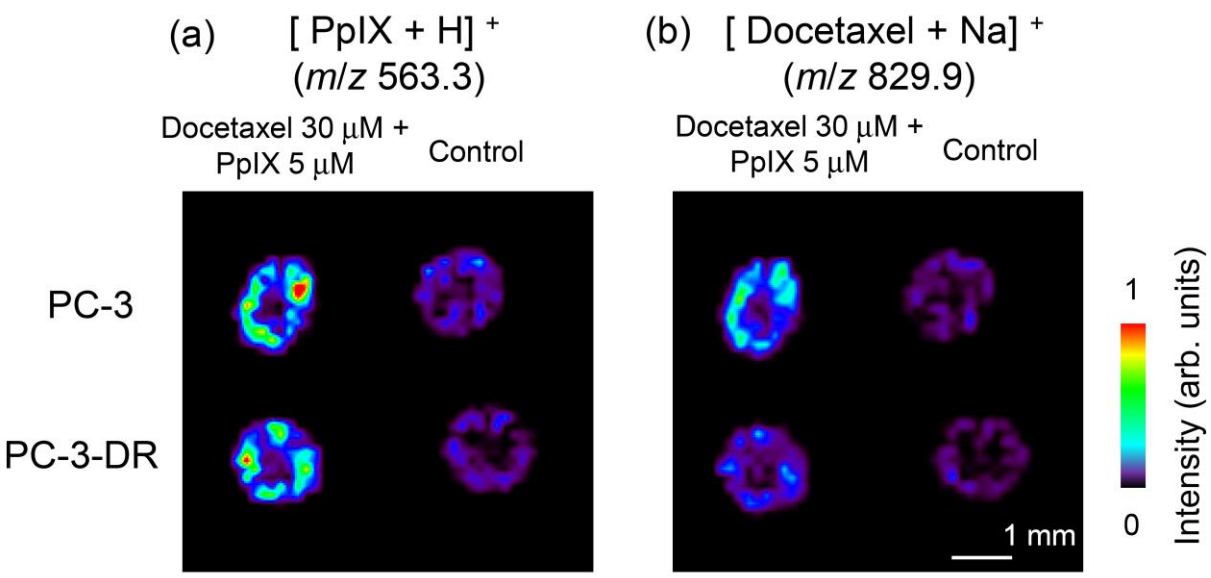


Fig. 6-3 Ion images obtained from PC-3 or PC-3-DR cells administered docetaxel and PpIX.

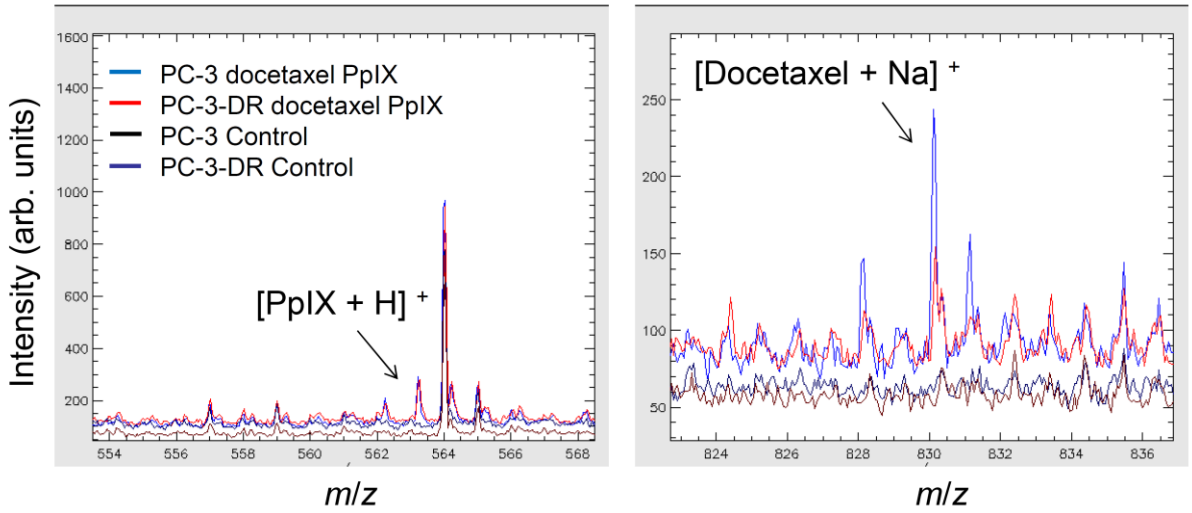


Fig. 6-4 Mass spectra obtained from PC-3 or PC-3-DR cells administered docetaxel and PpIX during MSI.

6.4 ヒト、および実験動物の前立腺組織に取り込まれたドセタキセルの検出におけるゼオライトマトリックスの有効性の考察

本研究にて開発したイオン化手法にて抗がん剤治療、および PDT の集学的治療の有効性をより正確に評価するためには、ヒト、および実験動物の前立腺組織に取り込まれたドセタキセル、および PpIX の分布を確認する必要がある。その場合に現在得られているそれぞれの薬剤の検出感度が十分なものであるか検討すべきである。特にドセタキセルは投与濃度を高くした場合、正常細胞への副作用が生じるため治療時の投与濃度に設定しなければならない。したがって、ここでは現在のイオン化手法にてドセタキセルの検出感度が十分であるか考察を行った。

Voyager において細胞に取り込まれたドセタキセルの検出において ATT/NaY を用いた場合、検出限界浸漬濃度は 10 μM 程度であった。一方実際の前立腺がんの治療に最も良く用いられる投与量 70 mg/m_2 おいて、ヒト血漿中のドセタキセルの最大濃度は 2.27 ± 0.42 μg/mL である。AR 法によりラットにドセタキセルを投与した場合、0.5 時間後にラットの血漿中のドセタキセル濃度に対して前立腺には 12.4 倍多く、3.06 μg/mL で集積する [61]。これを用いてヒト前立腺組織内のドセタキセル濃度に外挿すると、組織内の濃度は約 28.1 μM となる。この濃度で前立腺がん細胞に対してドセタキセルを浸漬させた場合、MSI によるドセタキセル耐性の評価を行うことが可能である。一方、ラットの前立腺組織には 3.06 μg/mL で集積するため、現在のイオン化手法では十分であるとは言えない。そこで Voyager よりも 100 倍程度検出感度が高く、一般に広く用いられ、MSI も可能である ultraflexIII（Bruker Daltonics, Massachusetts, USA） [62, 63] を用いて検出感度の比較を行った。Fig. 6-5 に Voyager、および ultraflexIII を用いた場合に得られたアンジオテンシン II のプロトン付加イオン（*m/z* 1046.5）の S/N 比を示す。Voyager の測定と比べて、ultraflexIII で測定を行った場合、約 10 倍程度検出感度が高いことが分かった。Fig. 6-6 に (a) Voyager、(b) UltraflexIII でドセタキセルから得られた質量スペクトルを示す。UltraflexIII を用いた場合に、Voyager では検出できなかった濃度でドセタキセルのナトリウム付加イオン（*m/z* 829.9）を検出することに成功した。したがって、一般に用いられている質量分析計での MSI において、今回開発したイオン化手法を用いて、実験動物の前立腺組織に集積したドセタキセルを検出することが可能であると考えられる。

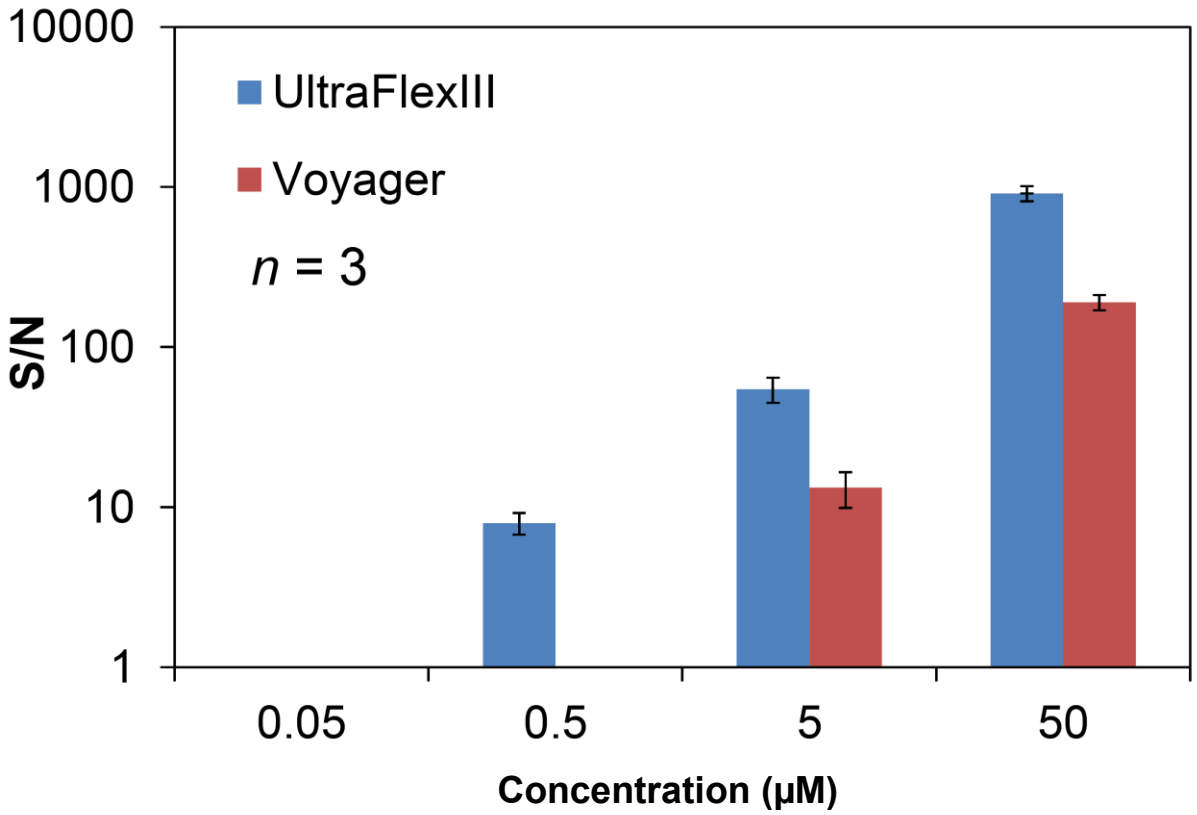


Fig. 6-5 S/N of [Docetaxel + Na] $^{+}$ using ultraflexIII or Voyager.

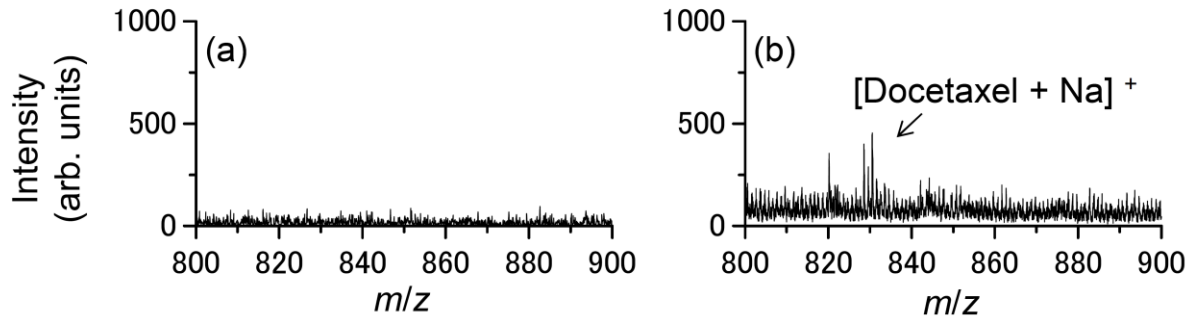


Fig. 6-6 Typical mass spectra obtained from docetaxel at the concentration of 0.5 μM using (a) Voyager, (b) UltraflexIII.

第 7 章　投影型 MSI における薬剤分布の評価に向けた同一サンプルでの MSI、および蛍光イメージングが可能なサンプル調整手法の開発

走査型 MSI において PC-3、および PC-3-DR 細胞に取り込まれたドセタキセル、および PpIX の同時検出に成功した。これにより PC-3-DR 細胞への PpIX を用いた PDT の有効性が示唆された。しかし今回行った走査型質量分析イメージングの空間分解能は 200 μm であり、細胞スケールでのイメージングではなかった。より正確に抗がん剤耐性細胞への PDT 効果の評価を行うためには細胞スケール(10 μm 以下) での薬剤の検出が必要である。そこで空間分解能 1 μm を誇る MULTUM を用いてがん細胞における薬剤取込の評価手法を検討した。まず投影型 MSI において得られた薬剤分布を別のイメージング手法においても評価するために、MSI 以外の手法で同一サンプルから薬剤分布を取得する必要がある。ここでは MSI を行うサンプル中の薬剤を蛍光イメージングにおいても検出できる手法の開発を行った。

7.1 細胞に取り込まれた PpIX の MSI、および蛍光イメージング

本研究において、検討してきた PpIX は光励起によって赤色の蛍光を発する。この性質を利用して細胞に取り込まれた PpIX を MSI、および蛍光イメージングにて検出した。

7.1.1 実験方法

PpIX を 10 μM に調製し、無血清培地にて PC-3 細胞に 3 時間浸漬させた。PBS にて細胞を 1 回洗浄し、トリプシン処理を施した後、細胞を回収した。回収した細胞溶液を遠心分離し、蒸留水を加え、5000 cells/μL の細胞懸濁液を作製した。金を厚さ 10 nm でコーティングした ITO スライドガラス上に細胞懸濁液を 1 μL 滴下し、乾燥させた。その後再度金を厚さ 10 nm でコーティングした。CHCA をアセトニトリル 50% 水溶液を用いて 10 mg/mL に調整し、スプレー法にて約 1 $\mu g/mm_2$ で塗布した。Voyager、リフレクターモードにて測定を行った。

7.1.2 実験方法

Fig. 7-1 に PpIX を投与した場合に PC-3 細胞から得られた(a) 光学画像、(b) PpIX の蛍光画像、(c) PpIX のイオン像（*m/z* 563.3）を示す。PpIX を投与した場合、PpIX の蛍光のイメージングに成功した。また PpIX を投与した場合、懸濁液を滴下したスポット形の PpIX のプロトン付加イオンのイオン像が得られ、質量分析計によるイメージングにも成功した。質量分析によるイメージングではマトリックスの塗布時に PpIX の分布が乱れていることも確認された。

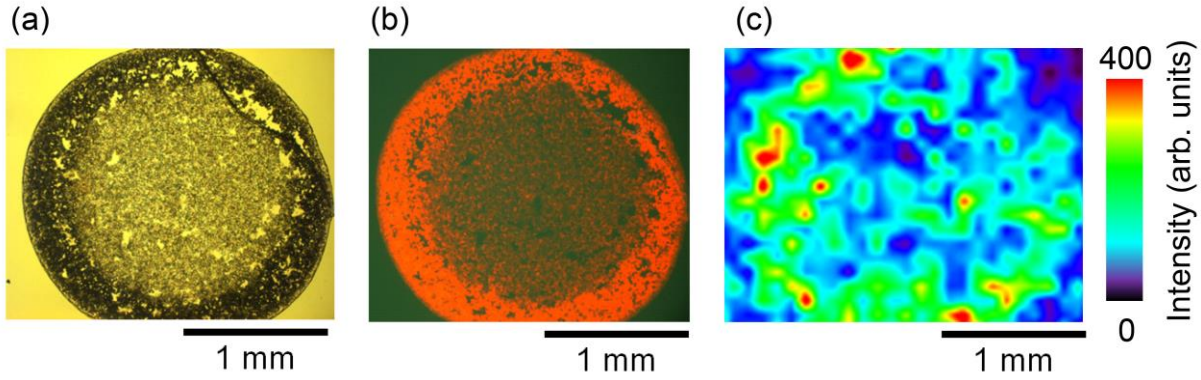


Fig. 7-1 (a) Optical, (b) fluorescence, (c) ion image obtained from PC-3 cells administered PpIX.

7.2 金のコーティング手順が MSI の検出感度に与える影響に関する考察

MSI、および蛍光イメージングにおいて PpIX を検出する上で、金のコーティング手順によってそれぞれのイメージングでの検出感度が大きく異なることが分かった。金のコーティングは MSI において、イオンの引き出す必要があり、サンプルプレートと引き出し電極間に電圧をかける。導電性が低い場合、サンプル表面にイオン分子が帯電し、引き出し電場に影響を与え、検出感度が低下する 。一方、蛍光イメージングにおいて、金のコーティングにより蛍光強度の低下が見られた。したがって、MSI、および蛍光イメージングで同一サンプルを測定する場合、金のコーティング手順が非常に重要であった。Fig. 7-2 に細胞懸濁液を滴下する前に金をコーティングしなかった場合に得られた低分子領域の質量スペクトルを示す。Fig. 7-2(a) は測定初期に得られたチャージアップによる影響を受けていない質量スペクトルである。一方 Fig. 7-2（b）は長時間測定した後に得られたチャージアップによる影響を受けた質量スペクトルである。金をコーティングしなかった場合、イメージング中に検出感度の低下、および質量スペクトルの乱れが観察された。これは試料の導電性が低い場合にイオンが試料表面に帯電し、イオンの引き出し電場に影響を与えるチャージアップが原因であると考えられる。従来、金は試料を滴下した後にのみコーティングしていた。今回試料の滴下前にもコーティングすることで、サンプルプレートの導電性が向上し、導電性が低い場合にイオン分子がサンプル表面に帯電し、引き出し電場に影響を与えるチャージアップを改善することができたと考えられる。

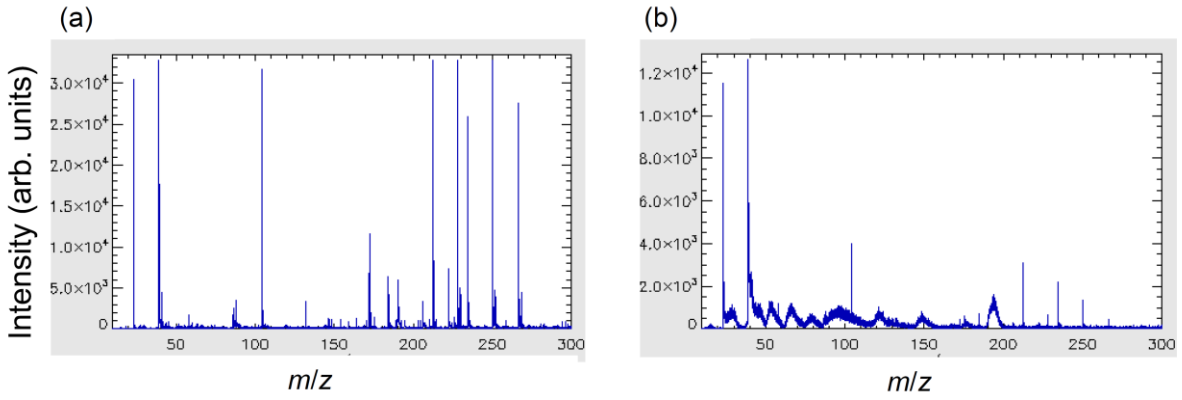


Fig. 7-2 Typical mass spectra obtained from PC-3 cells administered PpIX not coated gold before spotting cell suspension. (a) and (b) were obtained at the early measurement, middle measurement, respectively.

第 8 章　細胞スケールでの MSI に向けたサンプル調整手法の検討

走査型質量分析イメージング計において PC-3、および PC-3-DR 細胞に取り込まれたドセタキセル、および PpIX の同時検出に成功した。しかし、前回までの検討では細胞に対して一度トリプシン処理を行う必要があり、培養状態の細胞から形状を保ったままイメージングを行うことができなかった。そこで細胞の形状、および細胞内の薬剤分布の保持が可能なサンプル調整方法の検討を行った。またイオン化補助剤を必要としない色素で細胞を染色し、投影型 MSI で細胞スケールのイメージングが可能であるか検討した。

8.1 細胞に取り込まれた PpIX の MSI、および蛍光イメージング

細胞スケールでの薬剤のイメージングにおいて培養細胞の形状を保ったまま測定することが求められた。固定処理、および洗浄を行うサンプル調整方法の検討を行った。

8.1.1 実験方法

金を厚さ 10 nm でコーティングした ITO スライドガラスに PC-3 細胞を播種し、24 時間培養させた。PpIX を 10 μM にて無血清培地を用いて PC-3 細胞に浸漬させた。3 時間後、細胞外の PpIX を除去するために PBS を用いて 2 回洗浄した。ITO スライドガラスごとホルマリン溶液に 30 分間浸漬させ固定処理を行い、その後細胞表面の塩を除去するために蒸留水を用いて 2 回洗浄した。その後サンプルを真空中で乾燥させ、蛍光画像および光学画像を取得した。露光時間は 20 秒にて撮影を行った。

8.1.2 実験結果

Fig. 8-1 に金を厚さ 0, 10 nm でコーティングしたプレートを用いて PC-3 細胞を播種し、固定処理を行った場合、行わなかった場合に得られた光学、および蛍光画像を示す。金をコーティングした場合蛍光強度の低下が見られたが、蛍光画像を取得できることが分かった。一方固定処理を行わずに蒸留水にて洗浄を行った場合、形状が変化し蛍光強度が低下することが分かった。

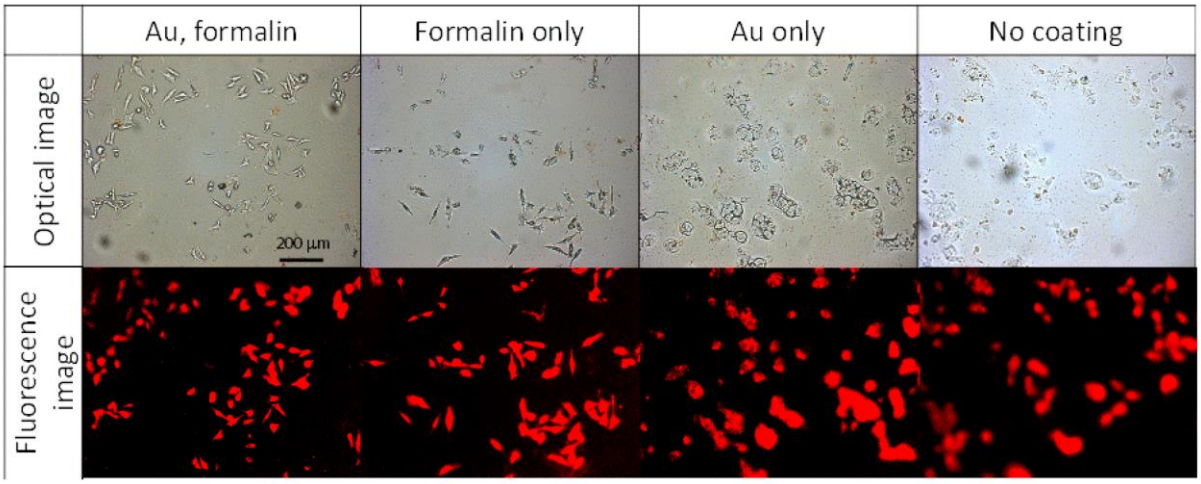


Fig. 8-1 Optical and fluorescence images obtained from PC-3 cells administered PpIX with gold coating and fixation.

8.2 高空間分解能イメージングに向けたイオン化補助剤塗布方法の検討

細胞に取り込まれた PpIX や他の薬剤の検出にはイオン化補助剤を塗布し、検出感度を向上させる必要がある。そこで微細な結晶の生成が可能である蒸着法、およびスプレー法の組み合わせによるイオン化補助剤の塗布を検討した。

8.1.1 実験方法

PC-3 細胞を ITO スライドガラスに播種し、24 時間培養した。PpIX を 3 時間浸漬させた後、ホルマリン溶液にて 30 分間固定処理を行なった。蒸留水を用いて 2 回サンプルを洗浄し、その後金を厚さ 10 nm にてコーティングした。マトリックスである CHCA を 10 mg、240℃にて 10 分間蒸着させ、その後アセトニトリル 50% 水溶液を用いて 10 mg/mL に調整した CHCA 溶液をスプレーした。同一サンプル上に蒸着のみ、スプレーのみ、蒸着後スプレーした箇所を作り、SEM にて結晶の大きさを確認した。また蒸着のみ、蒸着後スプレーをした箇所から得られる PpIX の信号強度を Voyager、リフレクターモードにて測定した。

8.1.2 実験結果

Fig. 9-1 に SEM にて（a）蒸着のみ、（b）蒸着後スプレー、（c）スプレーのみを行った箇所の結晶の画像を示す。蒸着した場合、結晶の大きさが細胞スケール（10 μm 以下）であることがわかった。スプレーのみの場合、結晶が大きくなったのに対し、蒸着した後にスプレーをすることで結晶の均一性、また大きさが改善していたことがわかった。Fig. 9-2 に蒸着のみ、蒸着後スプレーをした場合に得られた質量スペクトルを示す。蒸着のみの場合、PC-3 細胞に取り込まれた PpIX を検出することができなかった。一方蒸着した後にスプレーをすることで PpIX のプロトン付加イオン$[PpIX + H]^+$（*m/z* 563.3）を検出することに成功した。

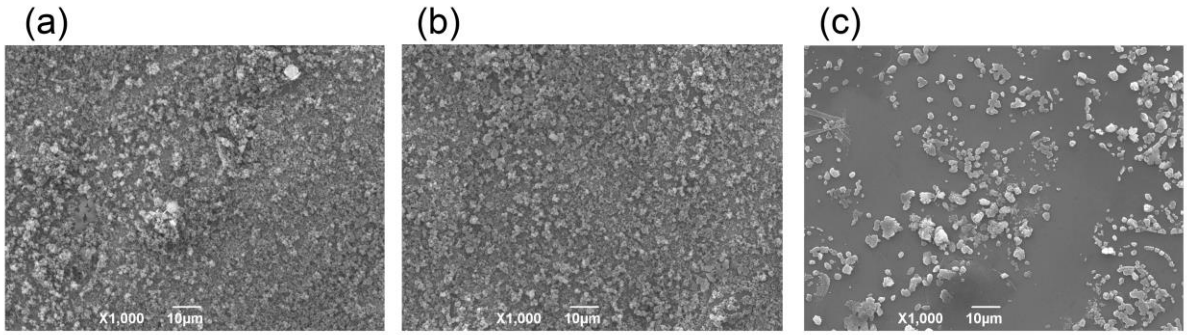


Fig. 8-2 Electron microscope image obtained from PC-3 cells with (a) sublimation, (b) sublimation and spray, (c) spray matrix application method.

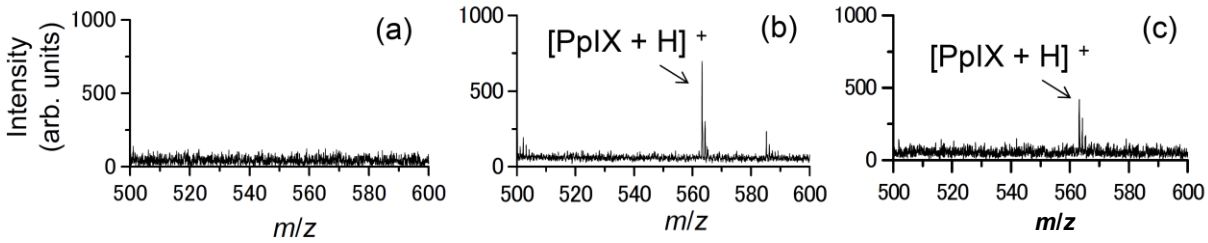


Fig. 9-3 Typical mass spectra obtained PC-3 cells administered PpIX with (a) sublimation, (b) sublimation and spray, (c) spray matrix application method.

第 9 章　細胞スケールでの MSI に向けた新規イオン化補助剤の検討

有機マトリックスをスプレー塗布した場合、結晶サイズが大きくなり、薬剤の分布が乱れることが指摘されている。この課題を解決するために、8 章において、有機マトリックスの蒸着法を検討し、微細な結晶を生成することに成功した。一方蒸着法は専用の設備が必要になるという問題があるため、スプレー法で簡便に結晶のサイズを小さくできる無機マトリックスの検討を行った。

9.1 PpIX の検出に適した金属ナノ粒子の検討

9.1.1 実験方法

50% アセトニトリル水溶液を用いて、PpIX をそれぞれ 10 μM に調整した。50%アセトニトリル水溶液を用いて、ZnO、および TiO_2 を 10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01 mg/mL、Fe_3O_4 を 5、1、0.5、0.1、0.05、0.01 mg/mL に調整した。金属サンプルプレート上に TiO_2、ZnO、Fe_3O_4 溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、真空中で乾燥させた。その上に、PpIX 溶液を 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。本実験では、粒子径 21 nm の TiO_2 を用いた。

9.1.2 実験結果

Fig. 9-1 に各金属ナノ粒子を各濃度で調整し用いた場合に、PpIX のプロトン付加イオンの信号強度が最も高くなった時の質量スペクトルを示す。(a) PpIX のみと比べて、(b) TiO_2 を用いた場合に、PpIX のプロトン付加イオンの信号強度が向上した。一方、(c) ZnO、(d) Fe_3O_4 を用いた場合、信号強度は向上しなかった。

Fig. 9-2 に各金属ナノ粒子を各濃度で調整し用いた場合に得られた PpIX のプロトン付加イオンの信号強度の平均値を示す。TiO_2 の濃度が 0 mg/mL の時の信号強度は、PpIX のみで得られた信号強度を示している。TiO_2 を用いた場合、PpIX のみと比べて、信号強度が約 1.6 倍に向上した。

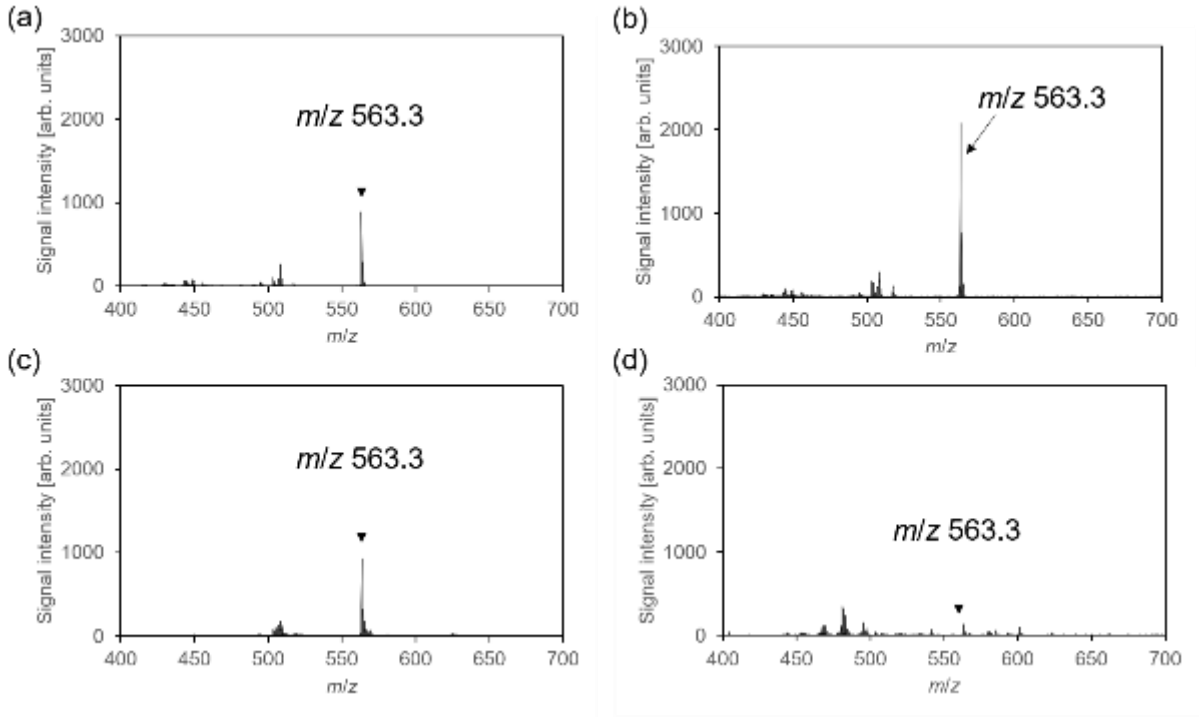


Fig. 9-1 Typical mass spectra obtained from a pure mixture of PpIX with a volume of 1 μL using (a) no NPs, (b) TiO_2, (c) ZnO, and (d) Fe_3O_4. PpIX is dropped on each NP. Particle size of TiO_2 is 21 nm.

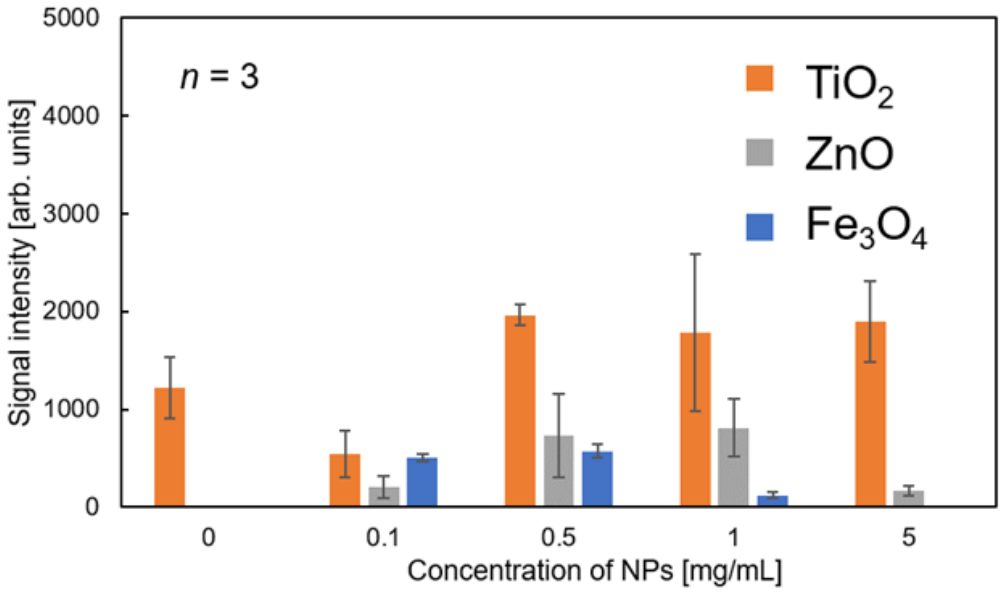


Fig. 9-2 Average signal intensities of the ions at *m/z* 563.3 obtained from a pure mixture of PpIX using each NP at concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1, and 5 mg/mL. Particle size of TiO_2 is 21 nm.

9.2 金属ナノ粒子の調整における有機溶媒の比率の最適化

金属ナノ粒子を用いる場合、凝集により検出感度が低下することが報告されている。有機溶媒の比率を変えたときの、乾燥サンプルにおける凝集状態と PpIX の信号強度を比較した。

9.2.1 実験方法

50% アセトニトリル水溶液を用いて、PpIX をそれぞれ 10 μM に調整した。10%、50%、90%アセトニトリル水溶液を用いて、TiO_2 を 5、1 mg/mL に調整した。金属サンプルプレート上に TiO_2 溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、真空中で乾燥させた。その上に、PpIX 溶液を 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。本実験では、粒子径 21 nm の TiO_2 を用いた。

9.2.2 実験結果

Fig. 9-3 に 10%、50%、90%アセトニトリル水溶液を用いて TiO_2 を 5、1 mg/mL に調整した場合に得られた PpIX のプロトン付加イオンの信号強度の平均値を示す。TiO_2 の濃度が 0 mg/mL の時の信号強度は、PpIX のみで得られた信号強度を示している。90%アセトニトリル水溶液を用いた場合、信号強度が最も高くなり、アセトニトリルの比率が高いほど、PpIX の信号強度が高くなった。90%アセトニトリル水溶液にて TiO_2 を 1 mg/mL に調整した場合、PpIX のみと比べて、信号強度が約 12.7 倍に向上した。

乾燥サンプルにおける凝集状態を確認するために、SEM にて乾燥サンプルの状態を確認した。Fig. 9-4 に(a) 10%、(b) 90%のアセトニトリル水溶液を用いて、TiO_2 を 1 mg/mL に調整した場合に得られた乾燥サンプルの SEM 画像を示す。TiO_2 は 10%アセトニトリル水溶液よりも 90%アセトニトリル水溶液を用いた場合に、均一に分布していることが分かった。アセトニトリルは水よりも揮発性が高いため、TiO_2 の均一な層を形成することができると考えられる。乾燥サンプルにおいて、均一な TiO_2 の層を形成することで、凝集による検出感度の低下を防ぐことができ、結果として、PpIX のイオン化効率が良くなったと考えらえる。

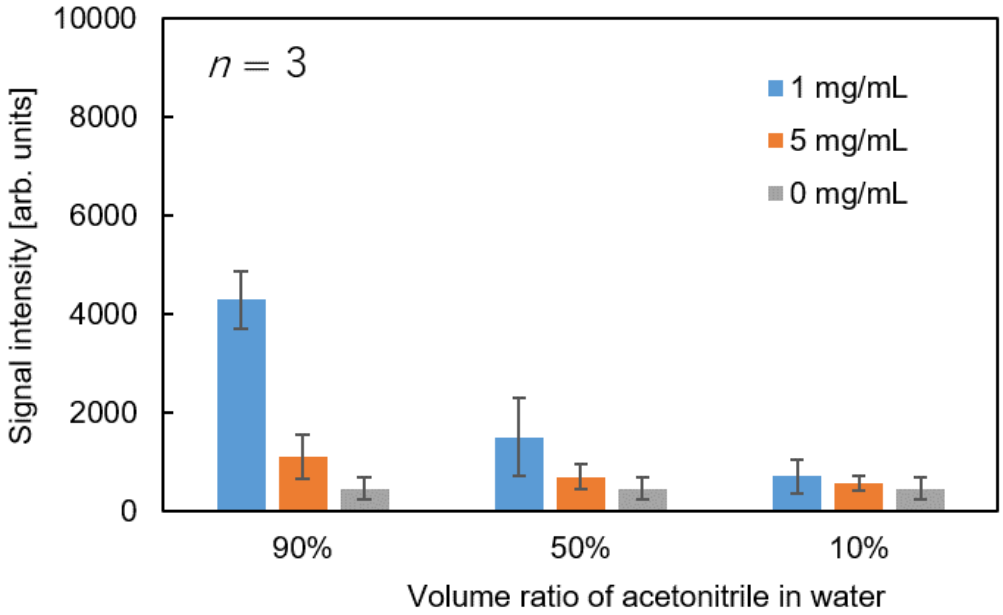


Fig. 9-3 Average signal intensities of the ions at *m/z* 563.3 with TiO_2 at concentrations of 0, 1, and 5 mg/mL using 10%, 50%, or 90% acetonitrile as the solvent. PpIX is dropped on TiO_2. Particle size of TiO_2 is 21 nm.

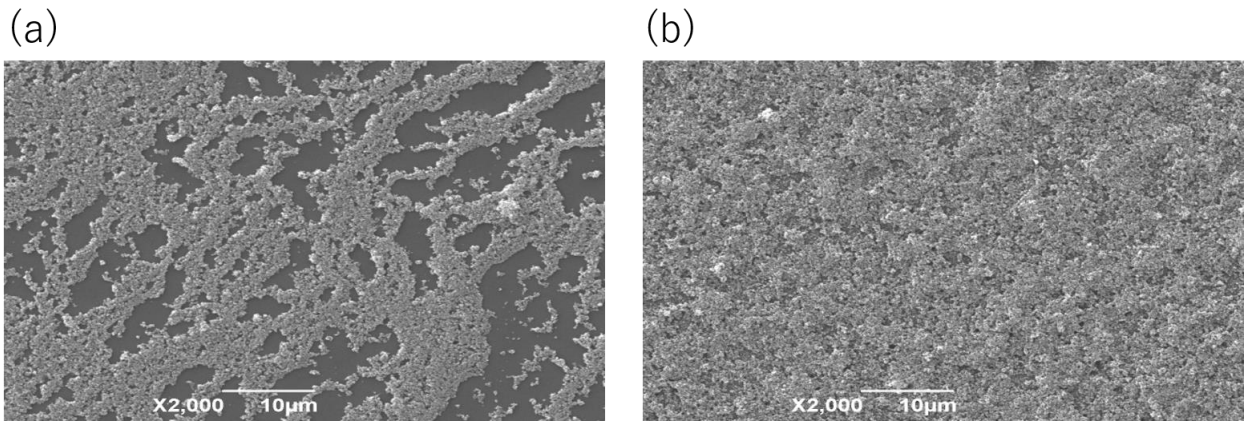


Fig. 9-4 SEM images obtained from the dropping spots of TiO_2 dissolved in water with (a) 10% and (b) 90% acetonitrile at a concentration of 1 mg/mL.

9.3 金属ナノ粒子の結晶サイズによるイオン化効率の違い

一般に金属ナノ粒子の結晶サイズが小さくなるほど、金属ナノ粒子の表面積が多くなり、イオン化効率が向上すると言われている。一方、結晶サイズが小さいほど凝集しやすくなるため、適切な結晶サイズが存在すると考えられる。TiO_2 の結晶サイズ毎に PpIX の信号強度を比較した。

9.3.1 実験方法

50% アセトニトリル水溶液を用いて、PpIX をそれぞれ 10 μM に調整した。90%アセトニトリル水溶液を用いて、粒子径 5, 5–15, 21, 280 nm の TiO_2 を各濃度で調整した。金属サンプルプレート上に TiO_2 溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、真空中で乾燥させた。その上に、PpIX 溶液を 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。

9.3.2 実験結果

Fig. 9-5 に 90%アセトニトリル水溶液を用いて 4 種類の TiO_2 を各濃度で調整した場合に得られた PpIX のプロトン付加イオンの信号強度の平均値を示す。TiO_2 の濃度が 0 mg/mL の時の信号強度は、PpIX のみで得られた信号強度を示している。粒子径 5–15 nm の TiO_2 を用いた場合に、PpIX の信号強度が最も高くなり、PpIX のみと比べて、約 9.0 倍であった。粒子径 5 nm の TiO_2 を用いた場合、5、10 mg / mL に調整した時に PpIX のプロトン付加イオンを検出することができなかった。粒子サイズが小さいほど、TiO_2 を高濃度で使用した場合に凝集が起こり、信号強度が低くなると考えられる。一方、粒子径 5–15 nm の TiO_2 を用いた場合に、信号強度が最も高くなったのは、TiO_2 の結晶構造に依存すると考えられる。粒子径 5–15 nm の TiO_2 は、ルチル結晶構造を持っている。一般に、金属ナノ粒子を用いたイオン化手法では、パルスレーザー照射時の急激な温度上昇がサンプルのイオン化効率に大きく影響する。ルチル型の TiO_2 の紫外光の吸収ピークがはアナターゼ型よりも高い。したがって、ルチル型の結晶構造と小さな粒子サイズを持つ粒子径 5–15 nm の TiO_2 を使用した場合に、PpIX のイオン化効率が最も高くなったと考えられる。

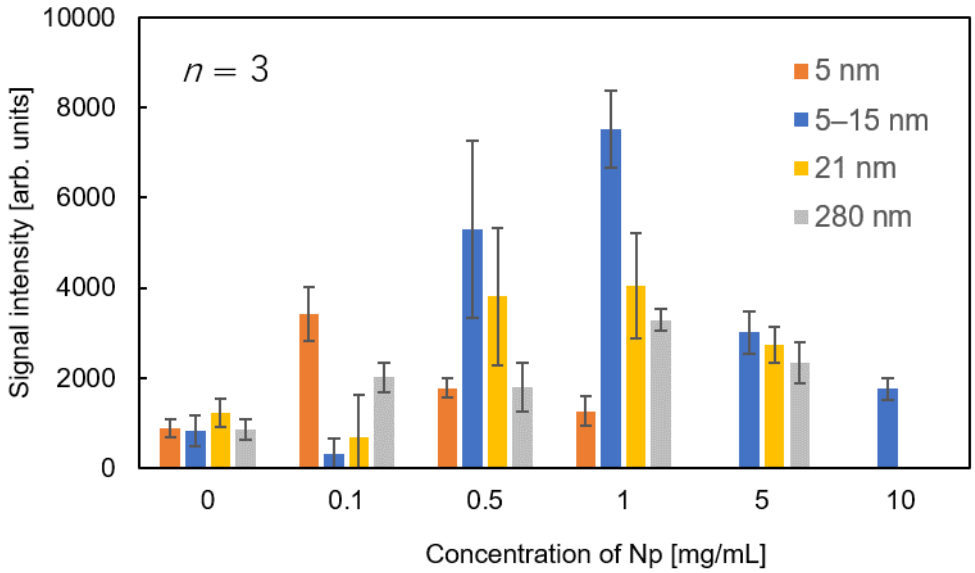


Fig. 9-5 Average signal intensities of the ions at *m*/*z* 563.3 using four types of TiO_2 at concentrations of 0–10 mg/mL. PpIX is dropped on TiO_2.

9.4 金属ナノ粒子の滴下順によるイオン化効率の違い

MSI では試料の上にイオン化補助剤を塗布する方法が主流である。一方、金属ナノ粒子を用いたイオン化手法では、試料の下にイオン化補助剤を塗布する方法が広く採用されている。今回、金属ナノ粒子の滴下順によって PpIX の信号強度がどの程度異なるのか比較検討した。

9.4.1 実験方法

50% アセトニトリル水溶液を用いて、PpIX をそれぞれ 10 μM に調整した。90%アセトニトリル水溶液を用いて、TiO_2 を 5、1 mg/mL に調整した。金属サンプルプレート上に TiO_2 溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、真空中で乾燥させた。その上に、PpIX 溶液を 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。本実験では、粒子径 21nm の TiO_2 を用いた。

9.4.2 実験結果

Fig. 9-6 に 90%アセトニトリル水溶液を用いて TiO_2 を調整し、滴下順を変更した場合に得られた PpIX のプロトン付加イオンの信号強度の平均値を示す。TiO_2 の濃度が 0 mg/mL の時の信号強度は、PpIX のみで得られた信号強度を示している。TiO_2 の下に PpIX を滴下した場合、TiO_2 の上に PpIX を滴下した時と比べて、PpIX のイオン化効率が低下することが分かった。この傾向は、TiO_2 の濃度が増加するにつれてより顕著になった。TiO_2 の下に PpIX を滴下した場合、濃度 0.5 mg/mL の TiO_2 を用いた時に PpIX のプロトン付加イオンの信号強度が最も高くなり、PpIX のみと比べて、約 3 倍に向上した。滴下順が強度に影響する理由は，TiO_2 がレーザーを吸収してしまい PpIX までエネルギーが届きにくくなっているため，であると考えられる。PpIX の上に TiO_2 を滴下した場合，TiO_2 の濃度を高くなるにつれて、信号強度が低下する傾向が見られた。これはサンプル表面の TiO_2 がレーザーを吸収してしまい， PpIX へのエネルギー受け渡しの効率が下がってしまうことが原因であると考えられる。一方，PpIX の下に TiO_2 を滴下した場合，同じく TiO_2 の濃度が高くなると，信号強度が低下するのは，TiO_2 自身の凝集の影響が顕著になるためであると考えられる。実際に，SEM で照射痕を確認した事があるのですが，MALDI とは異なり，照射痕がサンプルの表面で止まっているように見える。

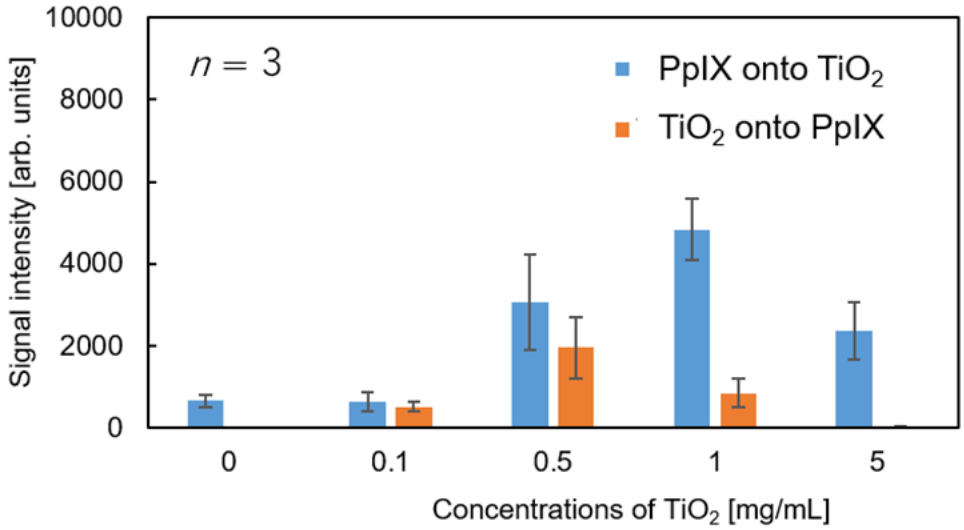


Fig. 9-6 Average signal intensities of the ions at *m*/*z* 563.3 with TiO_2 at a concentration of 1 mg/mL using 90% acetonitrile as the solvent in two dropping orders of TiO_2. Particle size of TiO_2 is 21 nm.

9.5 カチオン化剤添加によるイオン化効率の向上

PpIX はプロトン付加イオンとして検出される。一般に MALDI ではカチオン化剤を添加すると試料の信号強度が向上すると言われている。したがって、プロトン付加イオンが生成しやすいように、カチオン化剤を添加した場合に、PpIX のイオン化効率が向上するか検討した。

9.5.1 実験方法

50% アセトニトリル水溶液を用いて、PpIX をそれぞれ 10 μM に調整した。0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を添加した 50%アセトニトリル水溶液を用いて、TiO_2 を 5、1 mg/mL に調整した。金属サンプルプレート上に TiO_2 溶液をそれぞれ 1 μL 滴下し、真空中で乾燥させた。その上に、PpIX 溶液を 1 μL 滴下し、再び真空下で乾燥させた。本実験では、粒子径 21nm の TiO_2 を用いた。

9.5.2 実験結果

Fig. 9-7 に 0.1%TFA を添加した 50%アセトニトリル水溶液を用いて TiO_2 を調整した場合に得られた、PpIX のプロトン付加イオンの信号強度の平均値を示す。TiO_2 の濃度が 0 mg/mL の時の信号強度は、PpIX のみで得られた信号強度を示している。1 mg/mL の TiO_2 を用いた場合に PpIX のみと比べて、PpIX のプロトン付加イオンの信号強度が約 1.4 倍に向上した。一方、0.1%TFA を添加しない場合、PpIX のみと比べて信号強度が約 1.6 倍に向上しているため、0.1%TFA を添加したことによる有意な差は見られなかった。

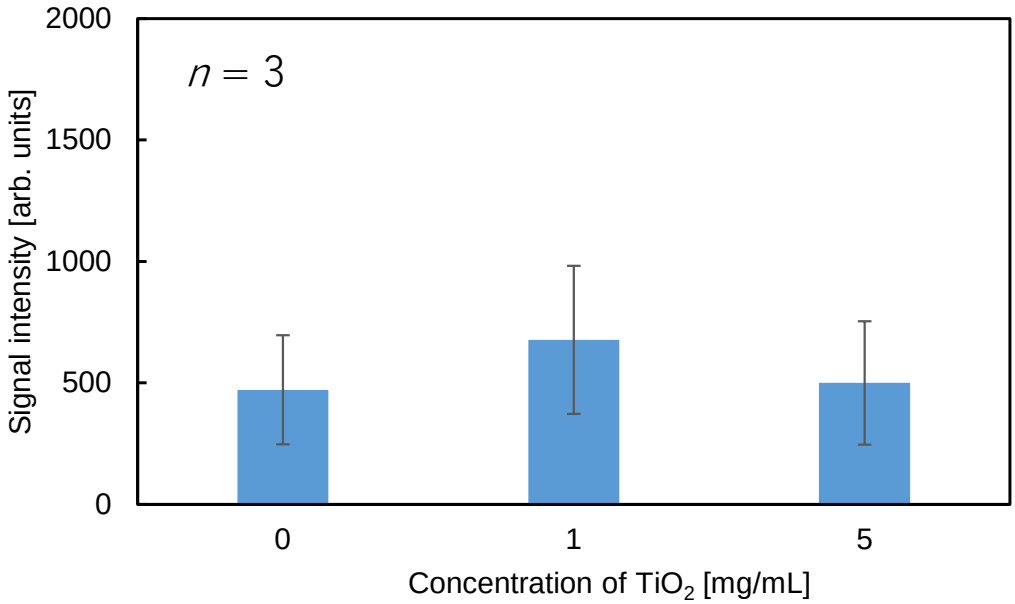


Fig. 9-7 Average signal intensities of the ions at *m/z* 563.3 with TiO_2 at concentrations of 0, 1, and 5 mg/mL using 50% acetonitrile with 0.1%TFA as the solvent. PpIX is dropped on TiO_2. Particle size of TiO_2 is 21 nm.

第 10 章　細胞スケールでの投影型 MSI

投影型 MSI によって細胞スケールでの薬剤の観察を行うために、まずレーザーを照射することで容易にイオン化するクリスタルバイオレット（crystal violet; CV）を薬剤モデルとして用い、細胞スケールでの検出が可能であるか検討を行った。

10.1 投影型質量分析イメージング計による染色細胞の観察

10.1.1 実験方法

金を厚さ 10 nm にてコーティングしたカバーガラスに PC-3 細胞を播種した。24 時間培養した後に PBS にて 2 回洗浄した後、30 分間ホルマリン固定を行った。蒸留水にて 2 回洗浄し乾燥させ、PBS を用いて作製した濃度 10 mg/mL の CV 溶液を 1 μL 滴下し、数分間室温にて放置した。蒸留水で 2 回洗浄した後、再度乾燥させ、金を厚さ 15 nm でコーティングした。MULTUM、リニアモードにて測定を行った。

10.1.2 実験結果

Fig. 10-1 に染色細胞のサンプルから得られた(a) 光学画像、(b) $[CV - Cl]^-$ (*m*/*z* 372) のイオン像、および(c) 光学画像とイオン像を重ねた画像を示す。染色細胞が分布する範囲のみからクリスタルバイオレット由来のイオンが確認された。一方非染色細胞群からはこのイオンは検出されなかった。またクリスタルバイオレット由来のイオン像は染色細胞の位置とほぼ一致しており、細胞レベルでの薬剤の観察が可能であることが示された。染色細胞は均一に分布しているにもかかわらず、イオンの分布が不均一であった。これはレーザーやイオン化の安定性が関与していると考えられる。イオン像全体から検出された小さな点は非染色細胞群からも得られているため、ノイズであると考えられる。

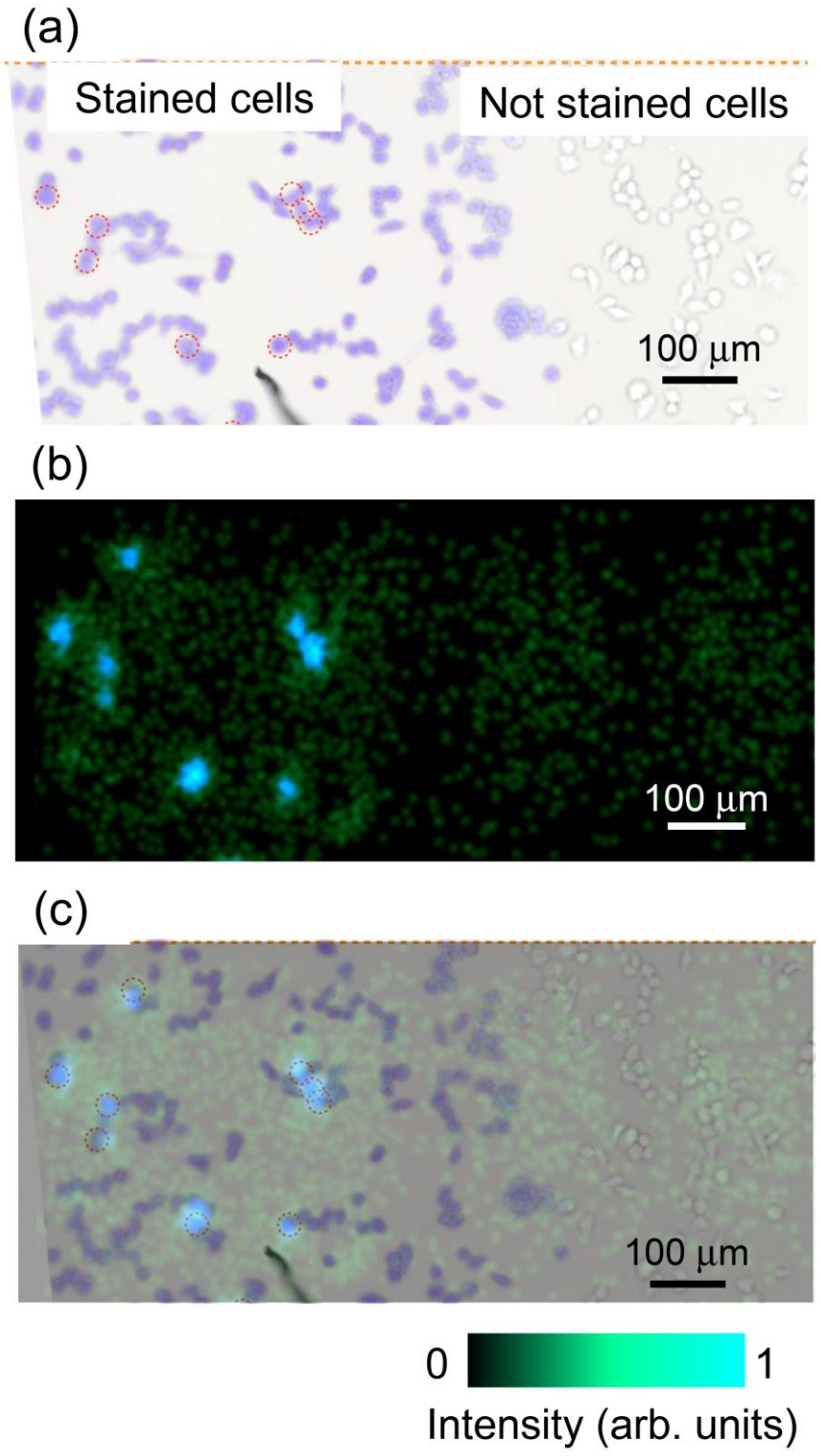


Fig. 10-1 (a) Optical image of PC-3 cells stained with CV, (b) Ion image of $[CV - Cl]^-$ and (c) merged image.

10.2 投影型質量分析イメージング計におけるイオン像の乱れに関する考察

MULTUM において染色細胞の光学画像、およびイオン像が完全に一致しなかった。その原因として現状の MSI ではレーザーを 1 時間程度照射し続ける必要があり、その過程で細胞の位置や形状が変化したこと、また固定処理をすることで細胞内の物質が染み出したことによって染色範囲が広がってしまったことが考えられた。これらに関して原因の考察を行った。

Fig. 10-2 に(a) 投影型 MSI 前、(b) 投影型 MSI 後に得られた染色細胞のサンプルの光学画像を示す。イメージング前は染色細胞を播種したカバーガラスを透過光にて観察したが、イメージングで金属プレートにカバーガラスを貼り付ける必要があり、剥がすことが困難であったため、イメージング後の観察は反射光で行った。レーザーを 1 時間程度照射し続けることによる細胞の位置や形状の大きな変化は見られなかった。

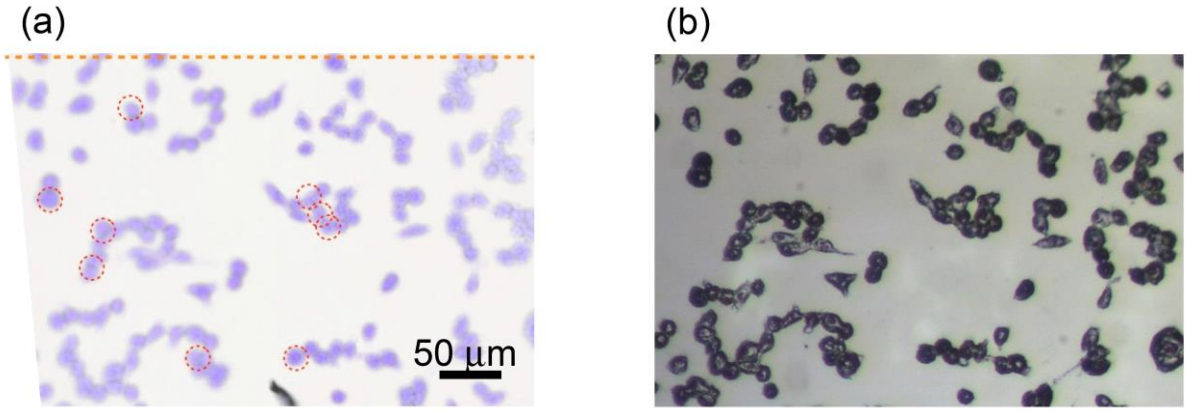


Fig. 10-2 Optical image obtained (a) before laser irradiation using transmitted light (b) after laser irradiation using reflected light.

固定処理が染色細胞に与える影響を検討するために、固定処理を行い、染色する前の細胞の形状を走査型電子顕微鏡(scanning electron microscope; SEM, JCM-5700, JEOL, Tokyo, Japan)) にて観察した。ITO スライドガラスに PC-3 細胞を播種し、ホルマリン溶液にて 30 分間固定処理を行った後に、蒸留水にて 2 回洗浄し、真空中にて乾燥させた。Fig. 10-3 に染色前の細胞から得られた SEM の画像を示す。細胞周辺に物質が分布していることが確認された。固定処理を行った後に蒸留水にて 2 回洗浄を行い、CV により染色し、再度蒸留水にて 2 回洗浄を行っている。固定処理を行う前に細胞内の物質が染み出している可能性がある。その場合、染色作業に用いた CV が細胞周辺にも分布しており、投影型質量分析イメージングにおけるイオン像の広がりが起こったと考えられる。MULTUM において薬剤を観察する場合、まず薬剤を細胞に集積させた後に固定処理を行う。細胞に取り込まれた PpIX においてこの固定処理を行った場合、薬剤の溶出は確認されていない。そのため、染色細胞の観察においてイオン像が広がる現象は、薬剤の観察におけるサンプル調整の段階では起こり得ないと考えられる。

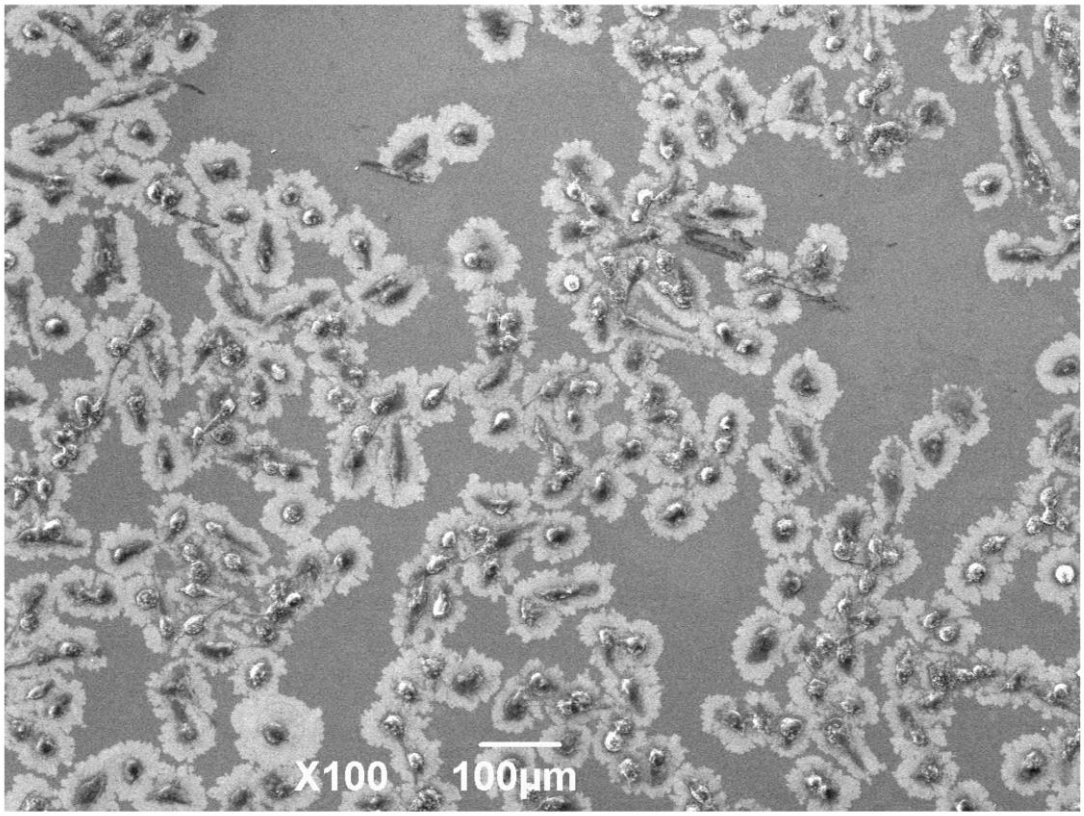


Fig. 10-3 Electron microscope image obtained from PC-3 cells after fixation.

10.3 MULTUM における PpIX の検出

Voyager において、細胞の形状を保ち、非常に細かい結晶にてイオン化補助剤を塗布した場合に、PC-3 細胞に取り込まれた PpIX を検出することに成功した。細胞に取り込まれた PpIX の投影型 MSI を行うために、まず MALDI 投影型質量分析イメージング計 MULTUM において PpIX が検出できるか確認を行った。

10.3.1 実験方法

ジメチルスルホキシドにて 5, 0.05 mM に調整した PpIX の溶液を蒸留水を用いて 100 倍に希釈し、50, 0.5 μM の PpIX 溶液を作製した。50 μM は Voyager にてマトリックスを用いずにイオン化する濃度、0.5 μM は Voyager にてマトリックスを用いてイオン化できる限界の濃度である。カバーガラスに金を厚さ 10 nm でコーティングした後に、各 PpIX 溶液を 1 μL ずつ滴下し乾燥させた。再度金を厚さ 10 nm でコーティングし、CHCA を 10mg、10 分間、240 ℃で蒸着させた。その後アセトニトリル 50 % 水溶液を用いて CHCA を 10 mg/mL に調整し、スプレー塗布した。カバーガラスをカットし、金属プレートに導電性テープで貼付しサンプルプレートとした。MULTUM、リニアモードにて測定を行い、MCP に流れる電流を時間的にオシロスコープを用いて検出し、質量スペクトルを取得した。

10.3.2 実験結果

Fig. 10-4 に(a) マトリックスを使用せずに測定を行った場合に得られた 50 μM の PpIX の質量スペクトル、マトリックスを使用した場合に得られた(b) 50 μM、(c) 0.5 μM の PpIX の質量スペクトルを示す。Voyager で測定した場合、50 μM の PpIX 溶液からマトリックスを使用せずに PpIX を検出することができた。一方 MULTUM においても同様に PpIX を検出することに成功した。またマトリックスを使用した場合、PpIX の信号強度が高くなった。PpIX のプロトン付加イオン $[PpIX+H]^+$（m/z 563.3）のピーク付近にマトリックス由来のピークは見られなかった。また PpIX の濃度が 0.5 μM の場合、PpIX のプロトン付加イオンのピークを得ることができたが信号強度は低かった。精度の高いイメージングにはディレイライン検出器を用いた実験が必要であるが、この検出器を用いた場合、ある時間内に検出器に到達するイオンの数が制限されるというデメリットがある。そのため PpIX の信号強度が他の信号強度よりも低い場合検出は困難になる。ディレイライン検出器を用いた場合、検出するイオンを制限することが可能であるため、ある程度他の信号強度が高い場合でも検出は可能であるが、PpIX の信号強度が非常に低い場合、イオン像として検出できない可能性がある。

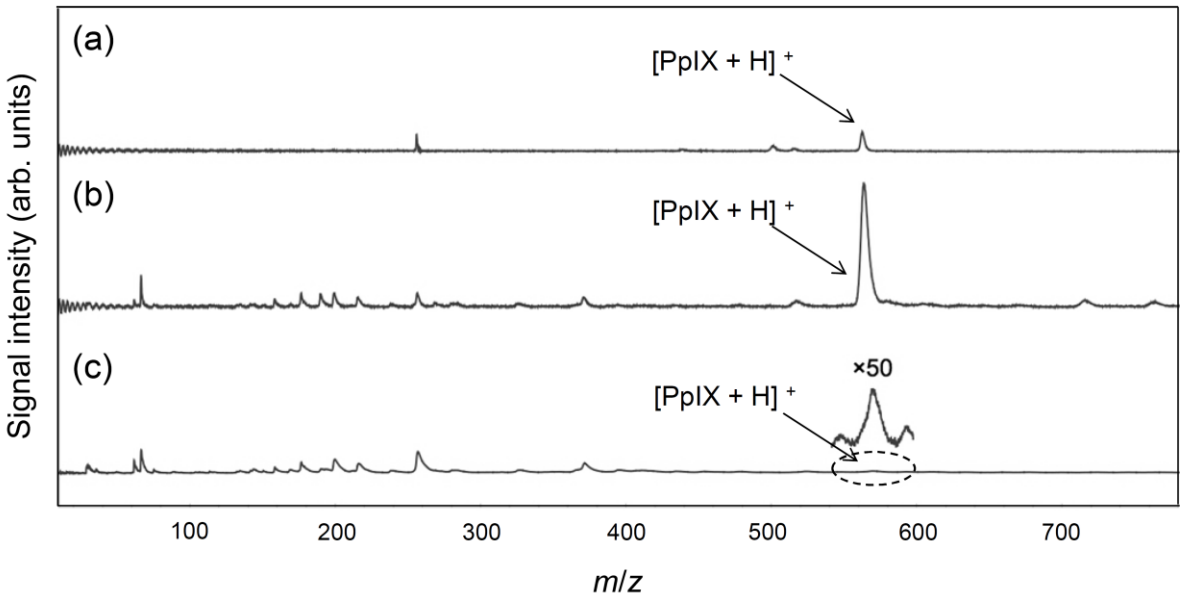


Fig. 10-4 Mass spectra obtained from PpIX at the concentration of (a), (b) 50, (c) 0.5 μM in (a) LDI, (b), (c) MALDI.

10.4 走査型 MSI、および投影型 MSI における検出感度の違いに関する考察

本研究では走査型質量分析イメージング計 Voyager、および投影型質量分析イメージング計 MULTUM を用いた検討を行ってきた。アセトニトリル 50% 水溶液で 10 mg/mL に調整した CHC を用いた場合、溶液の PpIX における検出限界濃度を測定した結果、Voyager において 100 fmol/μL であったのに対し、MULTUM では 500 fmol/μL 程度であった。したがって約 5 倍の検出感度の違いが存在する。その原因として質量分解能の違いが挙げられる。Fig.10-5 に Voyager、および MULTUM におけて 50 μM の PpIX 溶液を LDI 法で測定した結果を示す。MULTUM で測定した PpIX のピークの幅は Voyager で測定した場合と比べ、大きいことが分かった。検出器に飛来するイオンの量が同様である場合、質量分解能が低いとピークがなだらかになるため、検出されるイオンの信号強度が低くなり、検出感度が低下する。

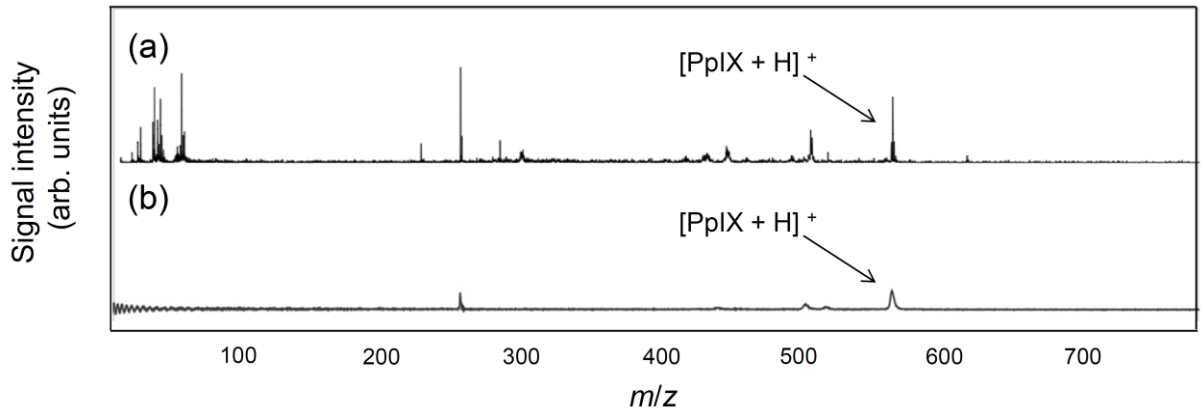


Fig. 10-5 Mass spectra obtained from PpIX at the concentration of 50 μM in (a) Voyager and (b) MULTUM.

一般に質量分解能 R は次のように定義される。m、および Δm はそれぞれ分子の質量、およびピークの半値全幅を示す。

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

ここで T、L、V、z、e をそれぞれ検出器までの到達時間、検出器までの飛行時間、引き出し電圧、分子の電荷数、および素電荷量とすると、

$$T = L\sqrt{\frac{1}{2eV}\frac{m}{z}}$$

が成り立つことから、

$$\frac{m}{z} = \frac{2eV}{L^2}T^2$$

となる。

$$\frac{1}{z}\mathrm{d}m = \frac{4eTV}{L^2}\mathrm{dt}$$

であることから

$$\frac{m}{\mathrm{d}m} = \frac{T}{2dT}$$

が導かれる。
これにより、以下の式が成り立つ。

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{T}{2\Delta T}$$

また、同一の質量を持つ分子において、*L*、*T* は比例関係にあることから、質量分解能は以下となる。

$$R \approx \frac{L}{2\Delta x}$$

つまり質量分解能はイオン分子の飛行距離 *L* に比例し、イオンの広がり幅 *x* に反比例する。一般に飛行距離が長い程、質量分解能が高くなるため、質量分解能を向上させるために飛行時間を原理上上限なく延長する多重周回飛行時間型質量分析計 MULTUM が大阪大学理学研究科にて開発された。一方、今回用いた Voyager の飛行距離はリニアモードで 1.3 m であり [61]、MULTUM のリニアモードでのイオンの飛行距離は約 0.85 m であった。この飛行距離の差が質量分解能の違いの原因の一つであると考えられる。
また今回の測定では PEDA を適用せずにイオンを連続的に引き出していた。今回の実験ではまず既存の検出システムを用いて MALDI 投影型 MSI に向けた薬剤の検出を試みた。Voyager の測定で得られた質量スペクトル中の PpIX のプロトン付加イオン（*m/z* 563.3）の周辺に他のピークが見られなかった。そのため、PEDA を適用する必要がないと判断した。イオンを連続的に引き出すことで、イオンの持つ検出器方向への初期速度の差やイオンの発生した時間の差による誤差が収束させることなく飛行している。一方、DE を適用している Voyager ではイオンの持つ検出器方向への初期速度の差やイオンの発生した時間の差による誤差が時間軸上で収束される。実際に、CE の場合、MULTUM における質量分解能は 60 程度であるのに対して、PEDA では 1,450 に向上することが報告されている。したがって MULTUM の測定では Voyager と比べて、質量分解能が低下していたと考えられる。

第 11 章　結論

抗がん剤が集積しにくいがん細胞に対して、レーザーなどの光源および光感受性薬剤を用いる PDT を検討するために、細胞ごとに複数の物質の分布測定が可能な MSI にて薬剤取込の評価を行った。従来の MSI の問題点として、検出感度が低いため測定対象が限られること、また空間分解能が低く細胞スケールでの薬剤の検出が困難であることが挙げられた。そこで、検出感度の向上のための新規イオン化補助剤の検討、および高空間分解能 MSI による細胞スケールでの薬剤の検出を目指した。

検出感度が低く、MSI による報告がなされていない抗がん剤ドセタキセルの検出感度を向上させるために、新規イオン化補助剤の検討を行った。ドセタキセルはナトリウムイオンが付加して検出され、また試料にナトリウムイオンを添加した場合に検出感度が向上する傾向があったため、構造中にナトリウムイオンを多数含む Na^+ 置換型のゼオライト NaY5.6 に着目した。NaY5.6 に従来のイオン化補助剤である 6-アザ-2-チオチミンを混合させ、作製したゼオライトマトリックスを用いた場合に、ドセタキセルのナトリウム付加イオンの検出感度が約 13 倍に向上した。またこのゼオライトマトリックスを用いることで、従来は困難であった細胞に取り込まれたドセタキセルを検出することに成功した。次に本研究においてドセタキセルに有意な生存率の差が確認されたドセタキセル耐性 PC-3 細胞（PC-3-DR 細胞）、およびドセタキセルに耐性を持たない PC-3 細胞に対して、ドセタキセル、および光感受性物質である PpIX を浸漬させて、それぞれの薬剤の取込を評価したところ、開発したゼオライトマトリックスを用いた場合にのみ、ドセタキセルは PC-3 細胞のみから検出され、一方、PpIX は PC-3、および PC-3-DR 細胞から検出された。これによりドセタキセル耐性ヒト前立腺がんに対する PDT の有効性が示唆された。

高空間分解能 MSI による薬剤分布の評価法として、MSI 以外の手法でも薬剤分布を検出し、双方を比較できるサンプル調整手法の開発を行った。またホルマリン溶液による固定処理、およびサンプルの洗浄処理を行うことで、細胞の形状を保ったまま MSI を行うことに成功し、色素によって染色した細胞からイオン像を取得することに成功した。これにより投影型質量分析イメージング計、MULTUM-IMG2 において細胞スケールでの MSI が可能であることが示された。

高空間分解能 MSI で薬剤を検出するためには、一般的に結晶サイズが大きくなると言われている有機マトリックスの新たな塗布手法を開発し結晶サイズを小さくした。また、結晶サイズが小さいと言われている無機マトリックスによる新たなイオン化手法を開発した。ともに、結晶サイズを小さくしつつ、PpIX のイオン化効率を向上させることに成功した。これらの技術を用いることで、薬剤の空間分布を乱さずに、高い検出感度と高い空間分解能を得ることができると考えられる。

MULTUM-IMG2 の検出システムにおいて蒸着法を用いて有機マトリックスを塗布したサンプルから PpIX を検出することに成功した。現時点での問題点として、MULTUM-IMG2 の検出システムでは、多くのイオンを一度に検出できないことが挙げられる。現在大阪大学ではこの問題を解決するために、新しい検出システムの開発を行っており、その検出システムを用いることで、細胞スケールでの薬剤の分布測定の可能性になると期待される。

本研究は、抗がん剤治療、および PDT の治療効果を検討するために、新規イオン化補助剤、および新規 MSI 手法の検討を行ってきたが、新規イオン化補助剤の開発によってイメージングできなかった薬剤の研究開発、また新規 MSI 手法の確立によって MSI の高空間分解能化による細胞スケールでの創薬の研究開発が期待される。

参考文献

1) 独立法人国立がん研究センターがん対策情報センター http://ganjoho.jp/public/index.html
2) 竹島薫, 山藤和夫, 朝見敦規, 林憲孝, 馬場秀雄, 松井淳一：集学的治療が構想した十二指腸乳頭部原発腺内分泌癌の 1 例, 日臨外会誌, **68** (6), 1451–1454 (2007)
3) 樋野興夫：がん医療入門, 朝倉書店, 77–80 (2008)
4) L. Zhou, S. Wei, X. Ge, J. Zhou, H. Jiang, F. Li and J. Shen: Combination of chemotherapy and photodynamic therapy using graphene oxide as drug delivery system., Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, **135** (5), 7–16 (2014)
5) B. Diez, G. Ernst, M. J. Teijo, A. Batlle, S. Hajos and H. Fukuda: Combined chemotherapy and ALA-based photodynamic therapy in leukemic murine cells., Leukemia Research, **36** (9), 1179–1184 (2012)
6) M. F. Zuluaga: Combination of Photodynamic Therapy with Anti-Cancer Agents, Current Medicinal Chemistry, **15** (17), 1655–1673 (2008)
7) R. L. Lipson and E. J. Baldes: The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative., Arch. Dermatol., **80** (4), 1–8 (1960)
8) 白田実男, 加藤治文: 癌治療における光線力学的治療の現況, 日本光線力学学会(2009) http://square.umin.ac.jp/jpa/whatPDT.html
9) M. S. Thompson, A. Johansson, T. Johansson, S. Andersson-Engels, S. Svanberg, N. Bendsoe and K. Svanberg: Clinical system for interstitial photodynamic therapy with combined on-line dosimetry measurements, Optics, **19**, 4023–4031 (2005)
10) Rebecca Siegel, Deepa Naishadham and Ahmedin Jemal: Cancer Statistics (2012)
11) 独立法人国立がん研究センターがん対策情報センター http://ganjoho.jp/professional/statistics/statistics.html
12) J. Holzbeierlein, P. Lal, E. LaTulippe, A. Smith, J. Satagopan, L. Zhang, C. Ryan, S. Smith, H. Scher, P. Scardino, V. Reuter and W. L. Gerald: Gene Expression Analysis of Human Prostate Carcinoma during Hormonal Therapy Identifies Androgen-Responsive Genes and Mechanisms of Therapy Resistance, The American Journal of Pathology, **164**, 217–227 (2004)
13) 満武里奈: 開発進む去勢抵抗性前立腺がんの新薬治療薬, 日経メディカル別冊 (2012)
14) A. Ganju, M. M. Yallapu, S. Khan, S.W.Behrman, S. C. Chauhan and M. Jaggi: Nanoways to overcome docetaxel resistance in prostate cancer, Drug resitance updates, **17**, 13–23 (2014)
15) S. G. Patterson, S. Wei, X. Chen, D. A. Sallman, D. L. Gilvary, B. Zhong, J. Pow-Sang, T. Yeatman and J. Y. Djeu: Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells, Oncogene, **25**, 6112–6122 (2006)
16) S. Kaufmann and D. Vaux: Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance, Oncogene, **22**, 7414–7430 (2003)
17) 佐治英雄, 前田稔, 小島周二: 新放射化学・放射性医薬品学, 南江堂(2006)

18) J. M. Chirgwin, A. E. Przybyla, R. J. Macdnald and W. J. Rutter: Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease, Bio. Chem., **18**, 5294–5299 (1979)
19) S. Shimma and M. Setou: Applications of a Mass Microscope for Bionanotechnology, 表面化学, **27**, 79–85 (2006)
20) S. Shimma and M. Setou: Review of Mass spectrometry imaging, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., **53**, 230–238 (2005)
21) 杉浦悠毅, 末松誠: 見つける、量る、可視化する！質量分析実験ガイド, 羊土社 (2013)
22) 瀬藤光利: 質量顕微鏡法, シュプリンガー・ジャパン(2008)
23) M. Niehaus, J. Soltwisch, M. E. Belov and K. Dreisewerd: Transmission-mode MALDI-2 mass spectrometry imaging of cells and tissues at subcellular resolution, Nature Methods, 16, 925–931 (2019)
24) H. Hazama, H. Yoshimura, J. Aoki, H. Nagao, M. Toyoda, K. Masuda, K. Fujii, T. Tashima, Y. Naito, K. Awazu: Development of a stigmatic mass microscope using laser desorption/ionization and a multi-turn time-of-flight mass spectrometer, J. Biomed. Opt., **16** (4), 046007 (2011)
25) K. Shimada, 創薬の探索段階における薬物動態研究の意義と実践, *Folia Pharmacol. Jpn.* **133**, 210–213 (2009)
26) I. Horii, 新薬の創出に重要な創薬初期段階での安全性、薬物動態および物性試験, *Folia Pharmacol. Jpn.* **127**, 217–221 (2006)
27) Y. Yamada, 創薬段階でのハイスループット分析技術, *Folia Pharmacol. Jpn.* **125**, 109–112 (2010)
28) 杉山雄一, 最新創薬学 2007, 株式会社メディカルドゥ (2007)
29) N. C. Fenner and N. R. Daly: Laser Use for Mass Analysis, Rev. Sci. Instrum, **37**, 1068–1070 (1966)
30) F. J. Vastola and A. J. Pirone: Ionization of Organic Solids by Laser Irradiation, Adv. Mass Spectrom. **4**, 101–104 (1968)
31) 渡邉俊宏: マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOFMS) の開発とその歴史について, Summer School, 34–50
32) Y. Sugiura, S. Shimma and M. Setou: Two-Step Matrix Application Technique To Improve Ionization Efficiency for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization in Mass spectrometry imaging, Anal. Chem., **78**, 8227–8235 (2006)
33) J. A. Hankin, R. M. Barkley and R. C. Murphy: Sublimation as a Method of Matrix Application for Mass Spectrometric Imaging, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **18**, 1646–1652 (2007)
34) M. L. Vestel, P. Juhasz and S. A. Martin, Rapid Commun. Mass. Spectrom., **9**, 1356–1361 (1995)
35) M. Guilhaus: Principles and Instrumentation in Time-of-flight Mass Spectrometry, J. Mass. Spectrom., **30**, 1519–1532 (1995)
36) 田中耕一, 吉野健一, 林雅宏, 内藤康秀, 大久保雅隆; マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析用の検出器, J. Mass. Spectrom., **58** (3) (2010)
37) 飛行時間型質量分析, アジレント・テクノロジー株式会社

http://www.chem-agilent.com/pdf/l

38) M. Stoeckli, P. Chaurand, D. E. Hallahan and R. M. Caprioli: Mass spectrometry imaging: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues, Nature Medicine, **7**, 493–496 (2001)

39) L. A. McDonnell and R. M. A. Heeren: Mass spectrometry imaging (2006)

40) H. Hazama, J. Aoki, H. Nagao, R. Suzuki, T. Tashima, K. Fujii, K. Masuda, K. Awazu, M. Toyoda and Y. Naito: Construction of a novel stigmatic MALDI imaging mass spectrometer, Appl. Surf. Sci., **255**, 1257–1263 (2008)

41) J. Aoki, H. Hazama and M. Toyoda: Novel Ion Extraction Method for Mass spectrometry imaging, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., **59** (3), 57–61 (2011)

42) A. Oelsner, O. Schmidt, M. Schicketanz, M. Klais, G. Schnhense, V. Mergel, O. Jagutzki and H. SchmidtBocking: Microspectroscopy and imaging using a delay line detector in time-of-flight photoemission microscopy, **72**, 3968 (2001)

43) J. Aoki, S. Ikeda and M. Toyoda: Observation of Accumulated Metal Cation Distribution in Fish by Novel Stigmatic Imaging Time-of-Flight Mass Spectrometer, J. Phys. Soc. Jpn. **83**, 023001 (2013)

44) The package insert of Taxotere (Docetaxel for Injec-tion, Sanofi-Aventis). http://e-mr.sanofi.co.jp/

45) 木村誠: 光線力学治療, 光技術情報誌「ライトエッジ」, **38** (2012)

46) M. Yamauchi, N. Honda, H. Hazama, S. Tachikawa, H. Nakamura, Y. Kaneda, K. Awazu: A novel photodynamic therapy for drug-resistant prostate cancer cells using porphyrus envelope as a novel photosensitizer, Photodiag. Photodyn. Ther., **11**, 48–54 (2014)

47) 木村誠, 徳岡由一, 落合晃, 森和之, 森本幸裕, 平本立躬, 川島徳道, 金子貞男: 新規水銀ランプを利用した光線力学的診断用ランプ光源装置, 日本レーザー医学会誌, **27** (2), 83-89 (2006)

48) H. Komori, R. Hashizaki, I. Osaka, T. Hibi, H. Katano, and S. Taira, Analyst, **140**, 8134 (2015). PALDI

49) S. Taira, H. Taguchi, R. Fukuda, K. Uematsu, Y. Ichiyanagi, Y. Tanaka, Y. Fujii, and H. Katano, Mass Spectrometry, 3, S0025 (2014)

50) S. Taira, Y. Sugiura, S. Moritake, S. Shimma, Y. Ichiyanagi, and M. Setou, Anal. Chem., **80**, 4761 (2008). MSI PALDI

51) S. Taira, M. Tokai, D. Kaneko, H. Katano, and Y. Kawamura, Konishi, J. Agric. Food Chem., **63**, 6109 (2015) MSI PALDI.

52) Y. Komori, H. Shima, T. Fujino, J. N. Kondo, K. Hashimoto and T. Korenaga: Pronounced Selectivity in Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry with 2,4,6-Trihydroxyacetophenone on a Zeolite Surface: Intensity Enhancement of Protonated Peptides and Suppression of Matrix-Related Ions, J. Phys. Chem., **114**, 1593–1600 (2010)

53) 間久直, 守口直樹, 藤野竜也, 粟津邦男: マトリックス支援レーザー脱離イオン化を用いた薬剤の質量分析イメージングに向けたゼオライトによるイオン化効率の向上, 電気学会論文誌 C, **134** (5), 657–663 (2014)

54) Ch. Baerlocher and L. B. McCusker: Database of Zeolite Structures http://www.iza-structure.org/databases/
55) J. Yang and R. M. Caprioli: Matrix Sublimation/Recrystallization for Imaging Proteins by Mass Spectrometry at High Spatial Resolution, Anal. Chem., **83** (14), 5728–5734 (2011)
56) Y. Hsieh, R. Casale, E. Fukuda, J. Chen, I. Knemeyer, J. Wingate, R. Morrison and W. Korfmacher: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging for direct measurement of clozapine in rat brain tissue, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20, 965–972 (2006)
57) S. R. Shanta, T. Y. Kim, J. H. Hong, J. H. Lee, C. Y. Shin, K. Kim, Y. H. KMSI. K. Kim and K. P. Kim: A new combination MALDI matrix for small molecule analysis: application to mass spectrometry imaging for drugs and metabolites, Royal Society of Chemistry, **137**, 5757–5762 (2012)
58) M. E. Gimon, G. R. Kinsel, R. D. Edmondson, D. H. Russell, T. R. Prout and H. A. Ewald: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry of Paclitaxel and Related Taxanes, **57** (10), 1404–1410 (1994)
59) D. S. Cornett, M. L. Reyzer, P. Chaurand and R. M. Caprioli: MALDI mass spectrometry imaging: molecular snapshots of biochemical systems, Nature Methods, **4**, 828–833 (2007)
60) E. R. A. Hove, D. F. Smith and R. M. A. Heeren: A concise review of mass spectrometry imaging, Journal of Chromatography A, **1217**, 3946–3954 (2010)
61) The Interview Form of Taxotere (Docetaxel for Injec-tion, Sanofi-Aventis). Available online: http://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1121404/000119312511050947/d20f.htm
62) Voyager User's Guide. Available online: http://www.niu.edu/ANALYTICALLAB/ms/voyager v51users guide.pdf
63) ultraflexIII. Available online: http://openfacility.cris.hokudai.ac.jp/catalog/01 210 Ultraflex-S.pdf

謝辞

本研究は大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻量子エネルギー工学講座量子ビーム応用工学領域において行われました。

初めに、素晴らしい研究環境を与えて下さり、また御鞭撻を賜りました粟津邦男教授に深謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、医学的な見地からのアドバイス、PC-3、および PC-3-DR 細胞の提供、および薬剤取込に関するアドバイスを頂きました大阪大学金田安史教授、波多野浩士氏、山口　聡平氏に深謝の意を表します。

ゼオライトのご提供、ゼオライトマトリックスの作製について御教示頂きました東洋大学藤野竜也教授に深謝の意を表します。

投影型質量分析イメージングの実験に関して、御指導、およびアドバイスを頂きました青木　順氏に深謝の意を表します。

金属ナノ粒子の実験に関して、作業を補佐いただいた三好　悠斗氏に深謝の意を表します。

本研究全般に渡り丁重なる親切な御指導、御討論を頂きました間久直准教授に心より感謝いたします。

業績リスト

査読付き原著論文

1. H. Kannen, H. Hazama, Y. Kaneda, T. Fujino and K. Awazu: Development of Laser Ionization Techniques for Evaluation of the Effect of Cancer Drugs Using Mass spectrometry imaging, Int. J. Mol. Sci., **15** (7), 11234–11244 (2014)
2. H. Kannen, S. Nomura, H. Hazama, Y. Kaneda, T. Fujino and K. Awazu: Enhancement of Ionization Efficiency Using Zeolite in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Multiple Drugs in Cancer Cells, Mass Spectrometry, A0091, Vol. 9 (2020)
3. H. Kannen, Y. Miyoshi, H. Hazama and K. Awazu: Improvement in Ionization Efficiency Using Metal Oxide Nanoparticles in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of a Cancer Drug, Mass Spectrometry, A0099, Vol. 10 (2021)

国内学会発表

1. 閑念弘樹, 守口直樹, 間久直, 波多野浩士, 金田安史, 藤野竜也, 粟津邦男: "がん治療薬剤の動態解析に向けたレーザーイオン化イメージング質量分析手法の開発," 電気学会光・量子デバイス研究会（バイオメディカル・フォトニクス応用） (2013.3.4, 東北大学東京分室, 千代田区).
2. 閑念弘樹, 守口直樹, 間久直, 金田安史, 藤野竜也, 粟津邦男: "イメージング質量分析によるがん治療用薬剤の動態解析に向けたレーザーイオン化手法の開発," 第 61 回質量分析総合討論会 (2013.9.11-13, つくば国際会議場, つくば).
3. 閑念弘樹, 間久直, 金田安史, 藤野竜也, 粟津邦男: "イメージング質量分析によるがん治療用薬剤の動態解析に向けたレーザーイオン化手法の開発," 第 62 回質量分析総合討論会 (2014.5.14-16, ホテル阪急エキスポパーク, 吹田).
4. 閑念弘樹, 間久直, 金田安史, 藤野竜也, 粟津邦男: "抗がん剤耐性がん細胞における薬剤分布の評価に向けた投影型イメージング質量分析手法の開発," 第 2 回レーザーイオン化研究会 (2014.11.29-30, 首都大学東京 南大沢キャンパス, 八王子).

国外学会発表

1. Kannen Hiroki, The 20th International Mass Spectrometry Conference (IMSC), Geneva, Switzerland, Aug 24-29, 2014.