

# 卒業論文

走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法を用いた

質量分析イメージングの溶媒選択性

大阪大学理学部生物科学科生命理学コース

質量分析グループ豊田研究室 4年

大手 虹歩

## 要 旨

質量分析イメージング (MSI, mass spectrometry imaging) は、マスペクトルに基づいて試料成分の分布を可視化することができる。我々はこれまでに、ピコリットルの溶媒で試料成分の抽出—イオン化を高速に行う、タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法 (t-SPESI, tapping-mode scanning probe electrospray ionization) を開発し、生体組織に含まれる分子群の分布情報計測を報告してきた<sup>1</sup>。t-SPESI では、キャピラリプローブ (プローブ) に溶媒を流しながら上下方向に振動させ、試料とプローブ端が断続的に接触と乖離を繰り返すことで抽出とエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を行う。従って、MSI の安定化と高感度化には、溶媒の物理化学的性質と抽出—イオン化過程の関係を明らかにすることが重要である。本研究では、生体組織を破壊しない溶媒として知られている<sup>2</sup>DMF/MeOH (1:1 v/v) 、および DMF、MeOH の純溶媒を用いて MSI を実施し、溶媒の特性とイオンイメージの関係から適切な溶媒選定の指針を得ることを目的とした。得られたイオンイメージから推定された脂質種の数はいくつかの混合溶媒で最も多くなった。これは粘性率が高く担持できる溶媒が多い DMF が MeOH の混合により表面張力が低下し、帯電液滴が生じやすくなったためであると考えられる。

---

<sup>1</sup> Y. Otsuka et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **26**, 2725 (2012)., *Analyst.* **139**, 2336 (2014)., *J. Mass Spectrom.* **50**, 1157 (2015), *Anal. Chem.* **93**, 2263 (2021).

<sup>2</sup> L. S. Eberlin et al., *Chembiochem.* **12**, 2129 (2011).

# 目 次

第1章	はじめに	1
第2章	生体試料における質量分析イメージング	2
第1節	質量分析法	2
第2節	エレクトロスプレーイオン化法(ESI, electrospray ionization)	2
第3節	質量分析イメージング(MSI, Mass spectrometry imaging)	3
第4節	本研究で使用した生体試料	3
	(1)転写抑制因子 Snail 発現上皮細胞	3
	(2)皮膚癌細胞メラノーマを移植したラット脳	4
	(3)マウス脳切片由来タンパク質	4
	(4)マウス脳切片由来脂質	4
第3章	タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法 (t-SPESI, tapping-mode scanning probe electrospray ionization)	5
第1節	生体組織の質量分析に用いられるイオン化機構	5
	(1) LC/MS	5
	(2) DESI	5
	(3)t-SPESI	5
第2節	装置構成	5
第3節	装置の使用手順	6
	キャリブレーション	6
	溶媒の準備	14
	メソッド作成	15
	Feedback システムの設定	16
	バッチ設定	16
	計測の開始	17
第4章	標準試料の計測	18
第1節	試料の作製	18
	(1) NaI	18
	(2) Reserpine	18
第2節	実験方法	19
	(1) NaI	19
	(2) Reserpine	20
第3節	解析方法	20
	(1) NaI	20
	(2) Reserpine	20
第4節	実験結果	21
	(1) NaI	21
	印加電圧の比較	21
	共振周波数の比較	22
	(2) Reserpine	23
	溶媒の比較	23
	印加電圧の比較	25

共振周波数の比較	-----	25
第5章 溶媒の物理化学的性質	-----	27
第1節 表面張力の計測	-----	27
・Wilhelmy法(プレート法、垂直板法)	-----	27
・実験	-----	27
・結果	-----	27
第2節 粘性率の計測	-----	28
・原理	-----	28
・実験	-----	28
結果	-----	28
第3節 比誘電率の計測	-----	29
原理	-----	29
・実験	-----	29
・結果	-----	30
・低周波数領域での比誘電率	-----	30
・実験装置	-----	30
・結果	-----	30
第6章 Snailの計測	-----	32
第1節 実験方法	-----	32
第2節 解析方法	-----	32
第3節 実験結果	-----	32
正イオンモード	-----	32
(1)WT特有の脂質種(WT/Snail=2以上)	-----	32
(2)Snail特有の脂質種(WT/Snail=0.5未満)	-----	33
まとめ	-----	34
負イオンモード	-----	34
(1)WT特有の脂質種(WT/Snail=1.04以上)	-----	34
(2)Snail特有の脂質種(WT/Snail=0.5未満)	-----	35
第7章 マウス脳切片の計測	-----	37
第1節 試料の作製	-----	37
第2節 実験方法	-----	37
第3節 解析方法	-----	37
7月の計測	-----	37
1月の計測	-----	37
第4節 実験結果	-----	38
7月の計測結果	-----	38
1月の計測結果	-----	38
第5節 考察	-----	53
第8章 まとめ	-----	54
謝辞	-----	55

## 第1章 はじめに

質量分析イメージング (MSI, mass spectrometry imaging) は、試料表面上で局所的な質量分析を実施することで、マスペクトルに基づいて化学成分の二次元分布を可視化する技術であり、一度の計測で複数の化学種の分布を同定できるという利点がある。2000年代初期から、大気圧環境下で MSI を行うための多様なイオン化法が報告されてきた。この大気圧サンプリングイオン化法は、液体クロマトグラフィー質量分析法と異なり、分離過程を行わないこと、試料の前処理が不要であることから、迅速な抽出・イオン化が可能になるという利点がある。多くの大気圧サンプリングイオン化法は、1989年に Fenn 博士によって報告されたエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI)<sup>3</sup>を応用している。試料分子を溶解した溶液をキャピラリーに保持し、対向電極との間に高電圧を印加すると、電場方向に溶液が円錐状に変形したテイラーコーンが形成される。テイラーコーンの先端において電場集中が生じ、溶液表面に蓄積した電荷のクーロン反発が表面張力に勝る条件になると、霧状の微小帯電液滴を含むエレクトロスプレーが発生する。微小液滴の乾燥過程で、液滴に内包された分子が気相イオンへ変換される。ESIの利点は、たんぱく質や脂質など、生体試料に多く含まれる多様な分子を破壊することなくイオン化出来る点にある。

大気圧イオン化法に ESI を活用するためには、微小体積の溶媒を試料に接触させ、試料表面の分子を溶媒内に抽出するサンプリング過程と、エレクトロスプレーの生成によるイオン化過程をそれぞれ大気圧環境下で行う必要がある。

我々はこれまでにタッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法 (t-SPESI, tapping-mode scanning probe electrospray ionization) を開発し、報告してきた。本方法は、単一のキャピラリープローブで抽出とイオン化を行う点が特徴である。t-SPESI では、振動するプローブに高電圧を印加した溶媒を流し、試料表面とプローブ先端を断続的に接触させる。プローブ先端と試料表面が接触した際に、プローブ先端から流出する溶媒が試料表面との間に液架橋を形成し、試料成分が抽出される。その後、プローブ先端が試料から離れ、イオンを取り込むための引き出し電極管に近接した際に、プローブ先端部で ESI が生じることで、抽出成分がイオン化される。

本研究では、t-SPESI でプローブに流す溶媒を変えることで推定される脂質種の数と種類、イメージング結果を比較し、生体組織のイメージングの溶媒選定の指針を得ることを目的とした。

---

<sup>3</sup>J.B. Fenn et al., *Science*, **246**, 64 (1989)

## 第2章 生体試料における質量分析イメージング

### 第1節 質量分析法

質量分析法は、化学、生化学、薬学、医学などに加え、多くの関連する科学分野において必要不可欠な分析技術である。質量分析は、生体分子の配列、単細胞内での代謝研究の主戦力である。今日では、プロテオミクスやリポミクスの基礎研究が質量分析の学術誌に掲載されるほどまで質量分析と生物学の融合が進んでいる。質量分析がまず目指すところは物質を構成する分子あるいは原子の質量から化合物を同定することである。質量分析によってもたらされる情報は、元素の同定と分析種の分子式の決定に寄与する。

質量分析の基本原則とは、まず無機あるいは有機化合物を適切な方法でイオン化し、生成したイオンを  $m/z$  で分離して、各々の  $m/z$  のイオン量を測定することで定性・定量分析すること、である。

### 第2節 エレクトロスプレーイオン化法 (ESI, electrospray ionization)

エレクトロスプレーイオン化は、溶液試料を大気圧下で静電気により噴霧しイオン化する方法である。静電場での帯電液滴の分散という現象(エレクトロスプレー)は、1914年の Zeleny の報告<sup>4</sup>以来、今日に至るまで多数の報告がある。1960年代後半に Dole らは、ポリスチレンポリマーの溶液を大気圧下でエレクトロスプレーし、気相の高分子イオンを生成し、質量分析を初めて行うことに成功した<sup>5</sup>。1970年代後半に Iribarne らは水分子から発生したイオンを帯電液滴から抽出し質量分析計で観察することに成功した<sup>6</sup>。その後、エレクトロスプレーと質量分析計を組み合わせた分析技術は、Fenn、山下と Alexandrov らによって確立された。

試料溶液を供給するキャピラリーと対向電極の間に 3~5kV 程度の高電圧を印加すると、強電界により先端部の液中で正・負イオンの分離が起こり、キャピラリー先端に円錐状の液体コーン(テーラーコーン)が形成される。例えば、キャピラリー先端に正の高電圧を印加した場合、正イオンが対向電極に向かって引き付けられ、テーラーコーン先端に集まる。そして、キャピラリー先端に過剰の正電荷で帯電した液滴が生成され、微細な液滴として対向電極に向けて噴霧される。

一般的に、帯電液滴からイオンが生成する2つの機構が考えられる。一つは溶液中にすでに存在するイオンが気相に移る機構で、もう一つは溶液中に存在する中性の試料分子が気相に移る過程でイオン分子反応によりイオン化されるという機構である。ESIは、前者の機構で、試料が元々イオン性であろうと、中性分子にプロトンが付加したイオンであろうと、すでに溶液中にあるイオンを観測していることになる。また、液相中のイオンが気相中に抽出される機構について、二つのモデルが提案されている。エレクトロスプレーされた  $\mu\text{m}$  サイズの帯電液滴が、溶媒の蒸発と表面電荷の反発による分裂を繰り返して 10nm 程度の大きさになったとき、液滴中のイオンが蒸発するモデル(イオン蒸発モデル)と、さらに分裂が繰り返されて、最後に試料のイオン1個だけが液滴に残るのが残留モデルである。おそらく、分子量が 100,000 以上のイオンでは残留モデルが適切だと思われる。

ESI法では、多価イオンが生成されるのが特徴である。スプレーの対向方向から窒素ガスなどを噴射したり、加熱したキャピラリーなどを通して帯電液滴からの溶媒の蒸発を促進させたりすることもある。イオンは、大気圧下から数段に差動排気されながら、高真空下の質量分離部に輸送される。イオンの輸送効率を高めるために、多重極のイオンガイドを用いることが多い。

液体クロマトグラフィーなどと接続し、試料溶液の流量が多い場合には、スプレー用キャピラリーの出口のまわりからネブライザーガスと呼ばれる窒素などのガスを流すことで、液滴の形成と脱溶媒を助ける方式も一般的に用いられる。また、流量を下げて(20~100nL/min 程度)微量サンプルの測定をするために、キャピラリー先端

<sup>4</sup> Zeleny, J, *Phys. Rev.*, **3**, 69 (1914)

<sup>5</sup> Dole, M et al., *J. Chem. Phys.* **49**, 5 (1968)

<sup>6</sup> Iribarne J. V et al., *J. Chem. Phys.* **64**, 6 (1976)

の内径を数 $\mu\text{m}$ 程度まで小さくしたナノエレクトロスプレーイオン源もよく用いられる。

ESI はペプチドやタンパク質などの生体試料の測定に広く用いることができる。多価イオンが生成され、 $m/z$ が小さくなるため、四重極質量分析計やイオントラップ質量分析計のように測定可能な  $m/z$  に上限があるような装置でも、高分子量の試料の測定を行えるという特徴がある。また溶液状態の試料をイオン化できるため、液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動などとの接続も容易である。ただし、イオン化の原理から明らかなように無極性の化合物の測定は困難である。

### 第3節 質量分析イメージング(MSI, Mass spectrometry imaging)

MSI とは試料表面で局所的なイオン化を行いダイレクトに質量分析を行うことで、そのマスペクトルから特定のイオン像を選択し、イメージングする技術である。MSI によって生体組織上の目的分子の分布を位置情報として得ることができる。

### 第4節 本研究で使用した生体試料

#### (1) 転写抑制因子 Snail 発現上皮細胞

九州大学理学部代謝生理学研究室池ノ内順一先生より、マウス乳腺由来の培養上皮細胞(EpH4)の野生株とその Snail 発現細胞株(以降 Snail)を提供いただいた。Snail は上皮-間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT)を引き起こす分子として知られている<sup>7</sup>。上皮細胞を基とする癌は、悪性化の過程で EMT を経て、隣り合った細胞との間の細胞接着を失い、細胞極性を喪失し、浸潤癌になることが知られている。(図 2-1)

この EMT に伴って細胞接着を担う E-カドヘリンやクローディンなどの膜タンパク質が減少することが示されている。細胞膜脂質二重層に存在するタンパク質の機能発現を考える上で、形質膜とともに機能発現する脂質を計測することで生命現象を理解することを目的として計測を行った。

カルチャーインサート法を用いて同一のスライドガラス上に EpH4 と Snail を培養したサンプルを、超純水でリンス後、乾燥させた。計測結果は第 6 章で記述する。

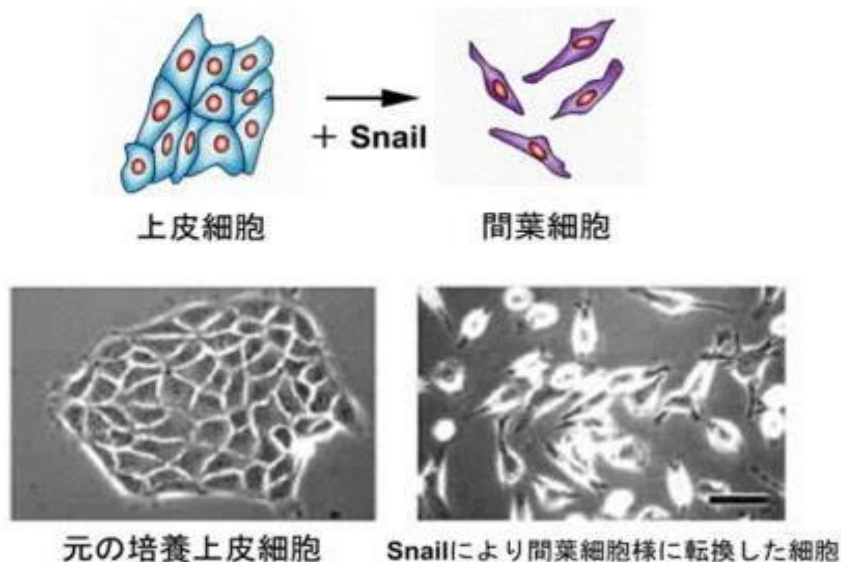


図 2-1 Snail が細胞に与える影響

<sup>7</sup> Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epitheliummesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. J Cell Sci. 2003

May 15;116(Pt 10):1959-67. Epub 2003 Mar 26. PMID: 12668723 DOI: 10.1242/jcs.00389

## (2) 皮膚癌細胞メラノーマを移植したラット脳

大阪大学工学研究科村田勲先生より、提供を受けた。メラノーマ細胞は東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより入手した。

ラット (Jcl:SD 7 週齢♂) にマウス由来がん細胞 (B16F10) である皮膚細胞メラノーマを頭部を切開して頭頂骨を露出させ、ドリルで穴をあけ、シリンジで中心よりズレたところに 4.5mm の深さで注入、16 日間飼育した。マウス脳は Deep freezer で保管したものをクライオマイクロトームで 8  $\mu$ m に切片化して、乾燥状態でスライドガラスに固定した。

## (3) マウス脳切片由来タンパク質

マウス脳切片は、大阪大学工学研究科新聞先生から提供を受けた。クロロホルムで脂質洗浄をすることで、タンパク質を MSI できるかを調べた。サンプル作製の過程で、市販されているマウス脳切片は O.C.T (Optimal Cutting Temperature Compound) で組織が保護されているため、脂質洗浄を行う際に成分が溶け出してしまうという課題があった。そのため、自身でクライオマイクロトームを用いて脳切片を作製した。脂質洗浄の過程では、クロロホルムは揮発しやすいため、組織の上に乗せるだけでは脂質を溶かして広げてしまい成分の位置情報が保たれなかった。そのため、今回の実験ではクロロホルムを入れたシャーレにサンプルを浸し、5 秒間すすぐ操作を 2 回繰り返した。結果、タンパク質の位置情報を得ることはできなかった。その後、同様にエタノールを入れたシャーレにサンプルを浸して 5 秒間すすぐ操作を 2 回繰り返したものを計測したが、タンパク質の位置情報を得ることはできなかった。

計測には、ACN/MeOH=1/1、ACN/MeOH=1/1 (+ギ酸 0.1%)、ACN/DMF=1/1、ACN、ACN/H<sub>2</sub>O=9/1 を用いた。純粋な ACN ではイオンが見られなかったため 10% の H<sub>2</sub>O を混合した溶媒を用いた。結果、ACN/H<sub>2</sub>O=9/1 では計測できた。

## (4) マウス脳切片由来脂質

マウス脳切片は、大阪大学工学研究科新聞先生から提供を受けた新鮮凍結組織を、クライオマイクロトームを用いて 8  $\mu$ m に切片化した。詳細は第 7 章で示す。



## 第3章 タッピングモード走査型プローブエレクトロスプレーイオン化法

(t-SPESI, tapping-mode scanning probe electrospray ionization)

### 第1節 生体組織の質量分析に用いられるイオン化機構

#### (1) LC/MS

通常、不揮発性または高分子量の化合物を含むサンプルは、液体クロマトグラフィー (LC, Liquid chromatography) 分離を行い、質量分析を実施する。液体試料や、何らかの溶媒に溶かした試料を測定するため、成分の分布情報が失われる。

#### (2) DESI

脱離エレクトロスプレーイオン化法 (DESI) はエレクトロスプレー (ES) を、高圧窒素ガスを用いて試料表面に当て、衝撃を与えることで化学成分を脱離イオン化し、質量分析部にイオンを送る方法である。しかし、DESI では ES を試料に吹き付ける過程で ES が反発し広がってしまうため、 $50\mu\text{m}$  と空間分解能が低いことが課題であった。

#### (3) t-SPESI

t-SPESI は振動するキャピラリプローブに溶媒を流し、試料表面で液架橋を形成して抽出を行い、表面から離れた時に ES を発生させて質量分析部にイオンを送る方法である。これまで DESI の 10 倍の高空間分解能での MSI が報告されてきた。凹凸のある試料の計測でもプローブの振幅を一定にして抽出イオン化を安定するために、レーザー光を用いてフィードバックするシステムを組み込んでいる。

他の大気圧サンプリングイオン化と比較して、抽出溶媒の体積を小さくできる点、抽出された成分を迅速に ESI に供することができる点の特徴であり、nano-ESI の体積効果のように高効率なイオン化が期待できる。これまでに、プローブの開口径を縮小することで、サンプリング領域の縮小化とイオン化効率の向上が可能であることが示されている。

### 第2節 装置構成

図 3-1 に装置の模式図を示す。プローブ、シリンジポンプは PEEK チューブで接続されており、シリンジポンプから送液された溶媒は、プローブの前段部分で高電圧が印加される。PEEK チューブ (ジーエルサイエンス株式会社) を徐々に細くして (緑: 内径  $0.75\text{mm}$ 、オレンジ: 内径  $0.5\text{mm}$ 、青: 内径  $0.25\text{mm}$ 、赤: 内径  $0.13\text{mm}$ )、送液の安定化を目指した。印加電圧は  $3\sim 7\text{kV}$  程度である。プローブとして開口径  $10\mu\text{m}$  のシリカエミッタをレーザープレー (P-2000) で作製し、使用した。プローブはピエゾアクチュエータ上に固定され、共振周波数付近の振動周波数で励振される。

プローブ先端部分が試料と断続的に接触するように、試料ステージの高さを調整すると、プローブが試料と接触したタイミングで両者の間に溶媒の液架橋が形成され、ここに試料成分が抽出される。次にプローブが試料から離れ、プローブと対向したイオン引き出し管に近接する間に ESI が生じる。帯電液滴は、加熱されたイオン引き出し管を通過する間に乾燥し、生成した気相イオンが質量分析器に導入される。試料ステージを二次元方向に走査することで、計測位置に対するマススペクトルが計測される。プローブの振動周波数はピアゾアクチュエータからプローブ端までの長さを調整することで  $200\sim 1000\text{ Hz}$  程度の範囲で変化できる。

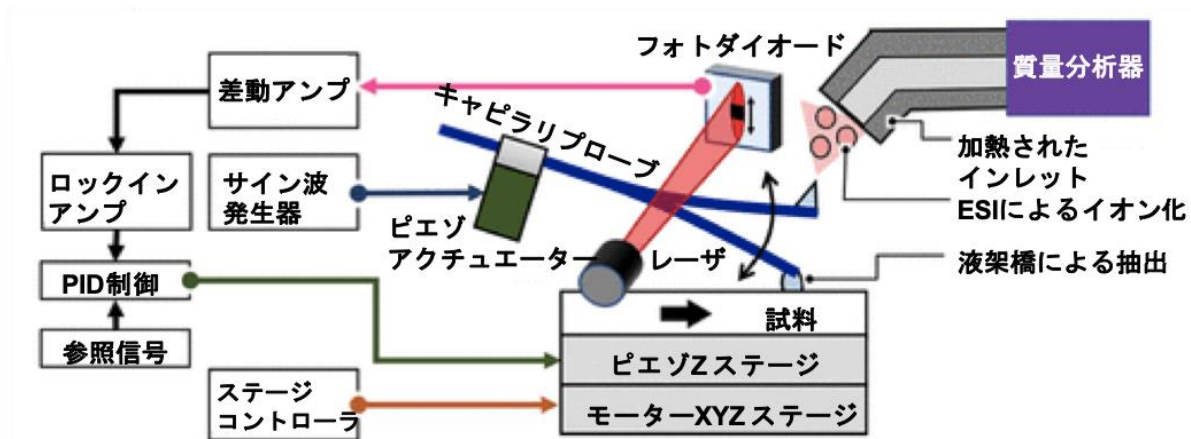


図 3-1 t-SPESI の模式図

### 第 3 節 装置の使用手順

#### キャリブレーション

1. インターフェース内部の針を抜く (図 3-2)

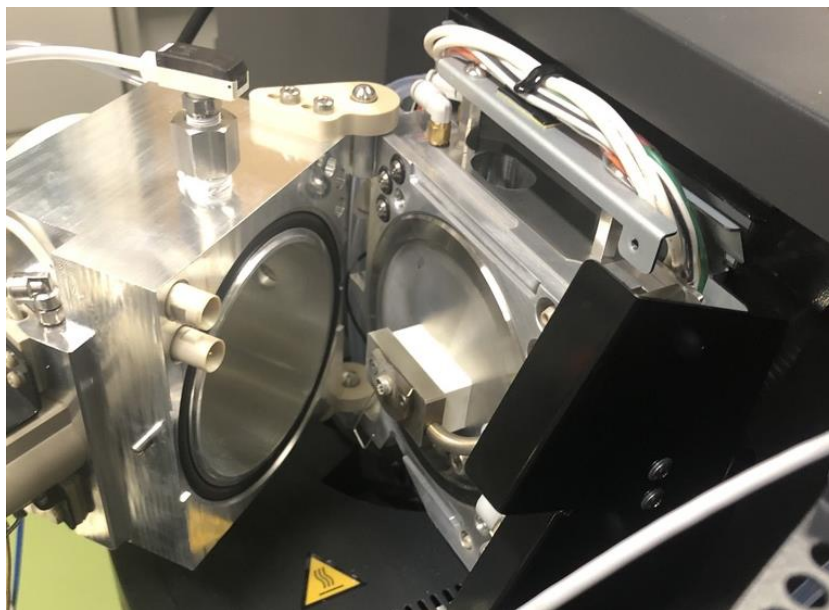


図 3-2

2. サブインターフェースの端子をつける (図 3-3)

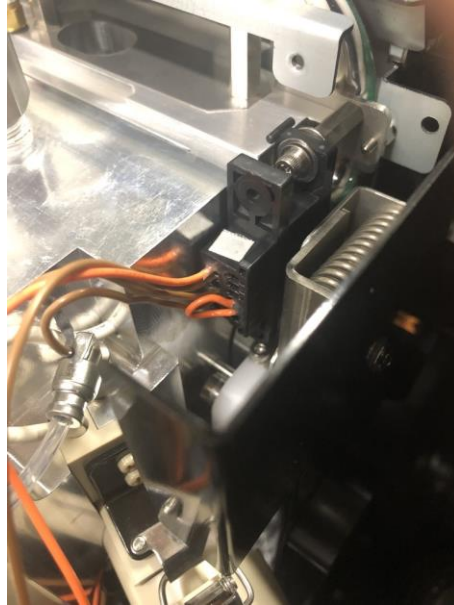


図 3-3

3. サンプルボトルとサブプローブを PEEK チューブで繋ぐ(図 3-4)

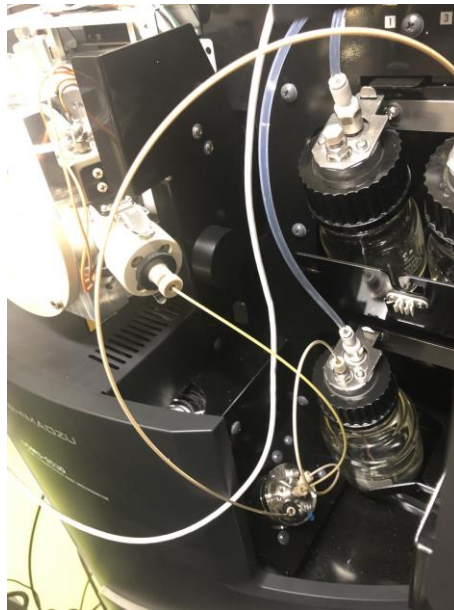


図 3-4

4. 窒素ガスとダイヤフラムポンプの電源を入れる(図 3-5)



図 3-5

5. インレットを 5cm ほど引き出す(図 3-6)

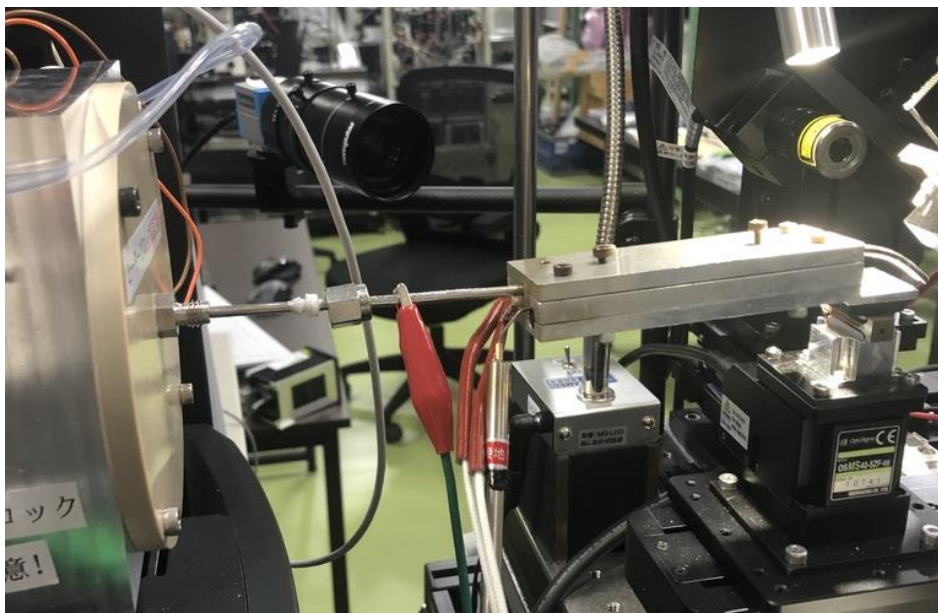


図 3-6

6. Lab solution を起動する(図 3-7)

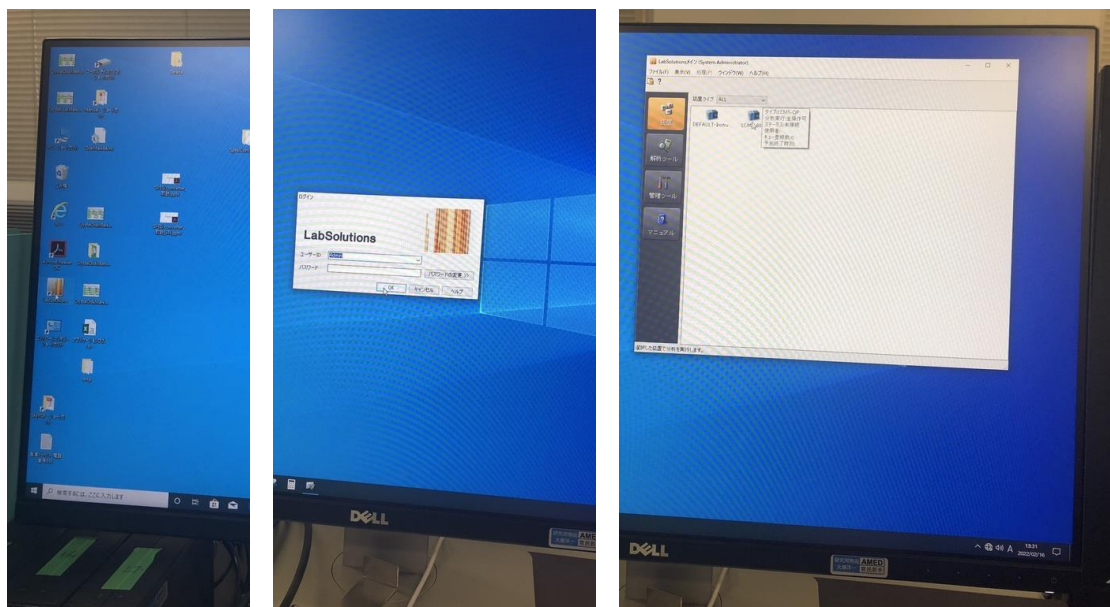


図 3-7

7. メインメニューからチューニングを選択し、マニュアルチューニング画面にする。(図 3-8)

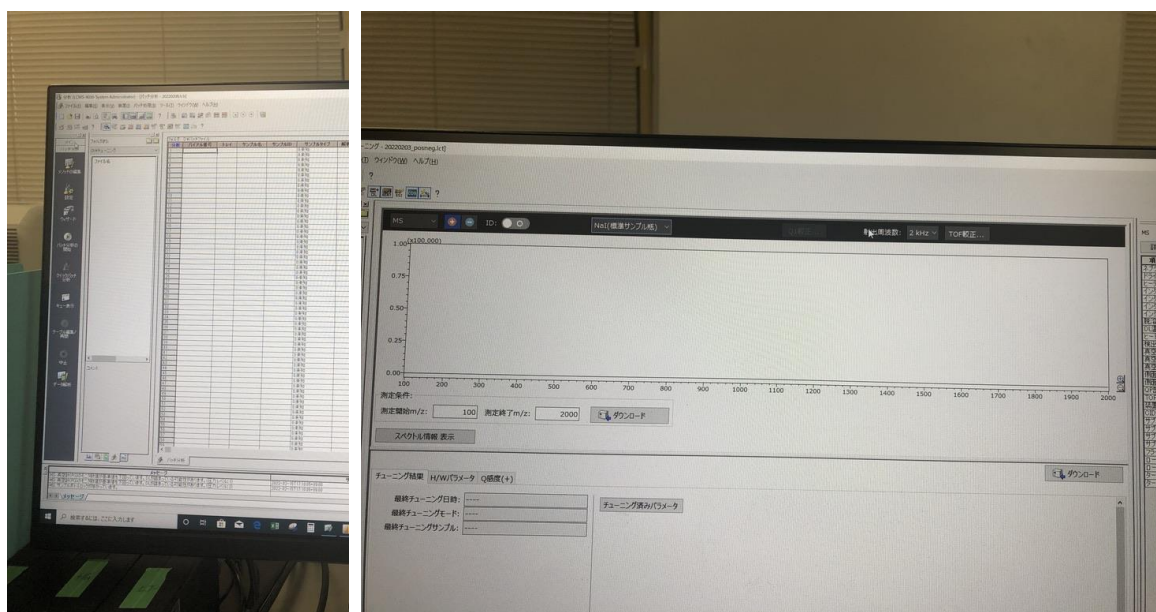


図 3-8

8. ドライビングガス、ネブライザーガス、DL、HEAT、CDS、サブインターフェースの計6つをONにする。(図 3-9)

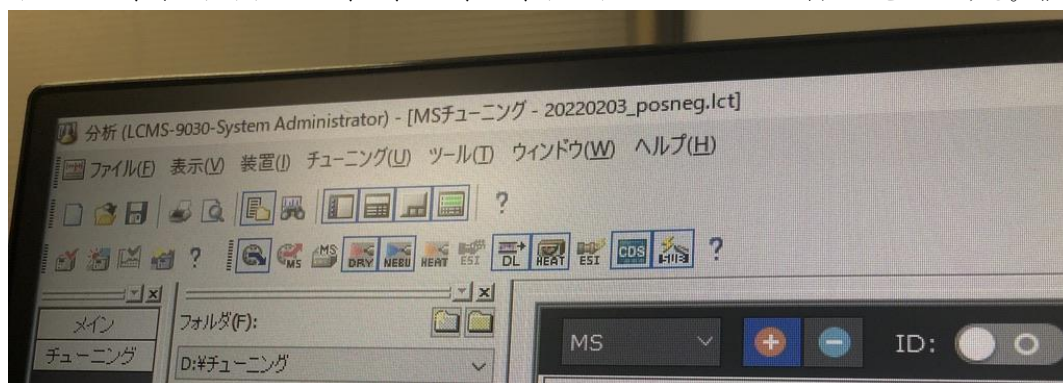


図 3-9

9. ポジティブを選択する。
10. IDはOFFにする。
11. 「未選択」と表示されている部分を選択し、「標準サンプル瓶1」を選択する。
12. 射出周波数を2kHzにする。(図3-10)

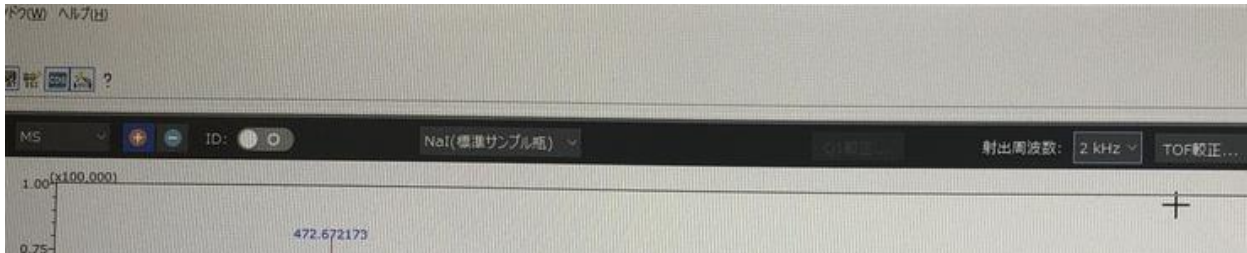


図3-10

13. 「MS」と表示されているところを選択し、「Q1 スキャン」を選ぶ。
14. 5つのピークが出るまで待ち、全て出たら Q1 較正を選択する。
15. 「テーブルの初期化」、「較正値を取得」、「Q1 較正テーブルをダウンロード」の順に選択し、閉じる。(図3-11)

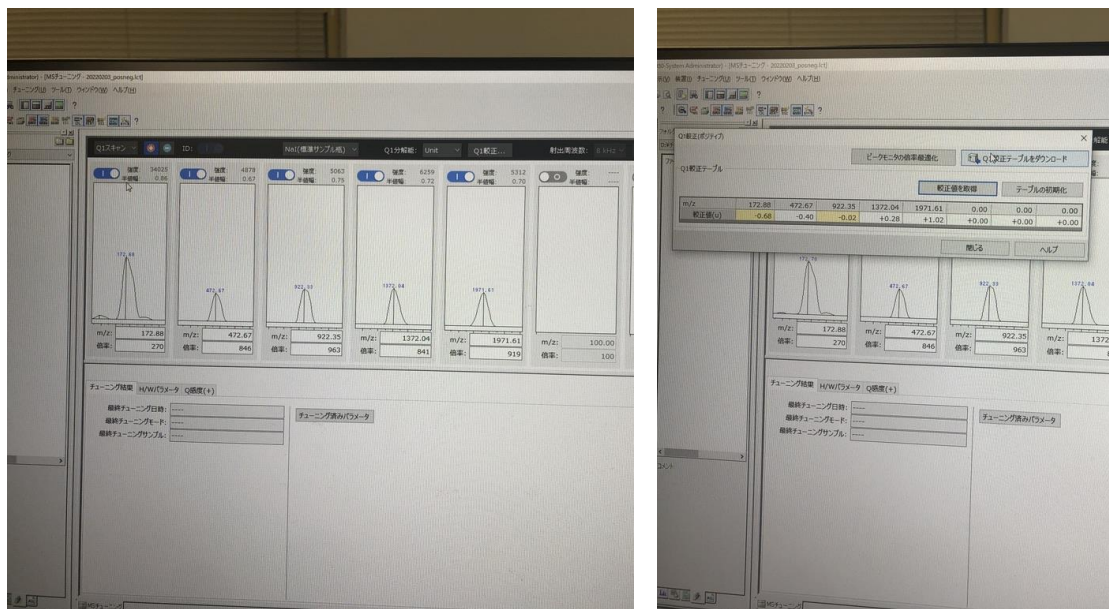


図3-11

16. 「MS」に戻したら、もう一度11~14の手順を確認する。
17. TOF 較正を選択する。
18. 5つの  $m/z$  を一つずつ選択して、「TOF 値を入力」「較正曲線の再計算」の順に選択する。(図3-12)

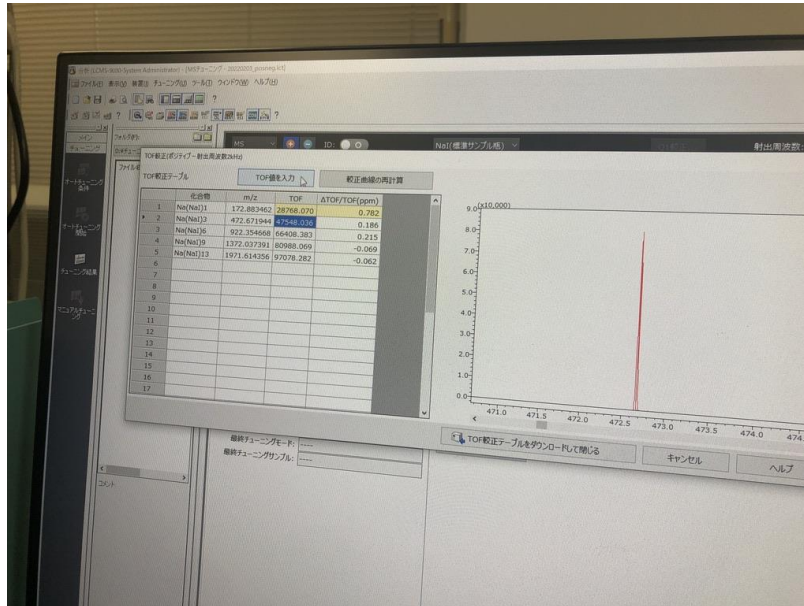


図 3-12

19. 「TOF 校正テーブルをダウンロードして閉じる」を選択する。
20. ネガティブを選択し、12~22の操作を繰り返し行う。
21. チューニングファイルに名前をつけて保存する。(図 3-13)

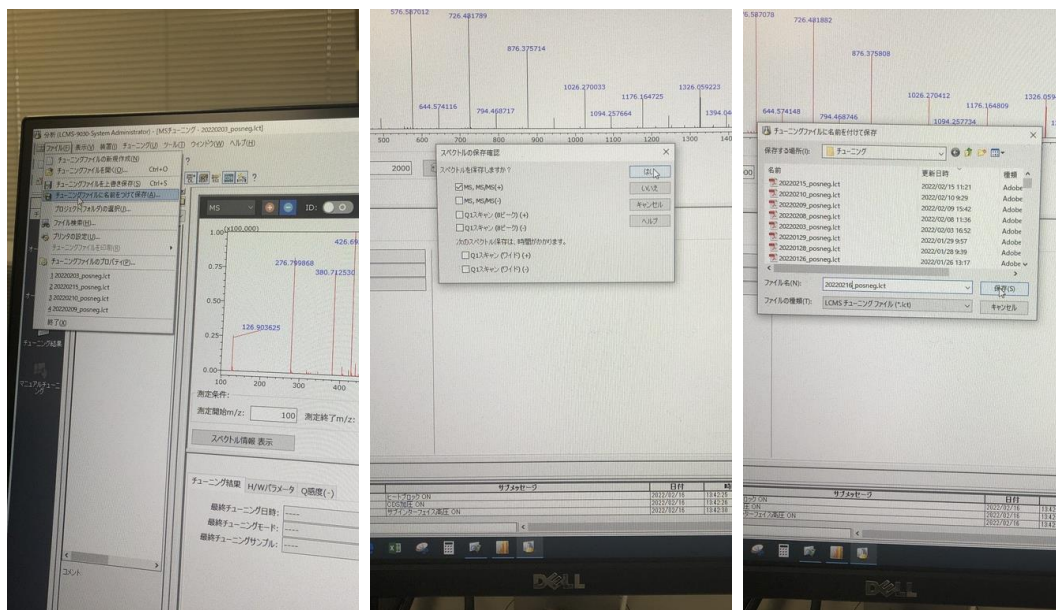


図 3-13

22. CDS とサブインターフェースを OFF にする。
23. メニュー画面で、マニュアルチューニングからチューニング結果に変更しておく。
24. インレットを元の位置に戻す。この時、インレット管とイオン取り込み部が接触しないように少し離す。(図 3-14)



図 3-14

25. 真空ポンプのコントローラなどの電源(タイマー式)と蝟足配線のスイッチを入れる。(図 3-15)



図 3-15

26. 高圧電源(励振用ピエゾアクチュエーター、サンプルステージ用ピエゾアクチュエーター)の出力を ON にする (図 3-16)





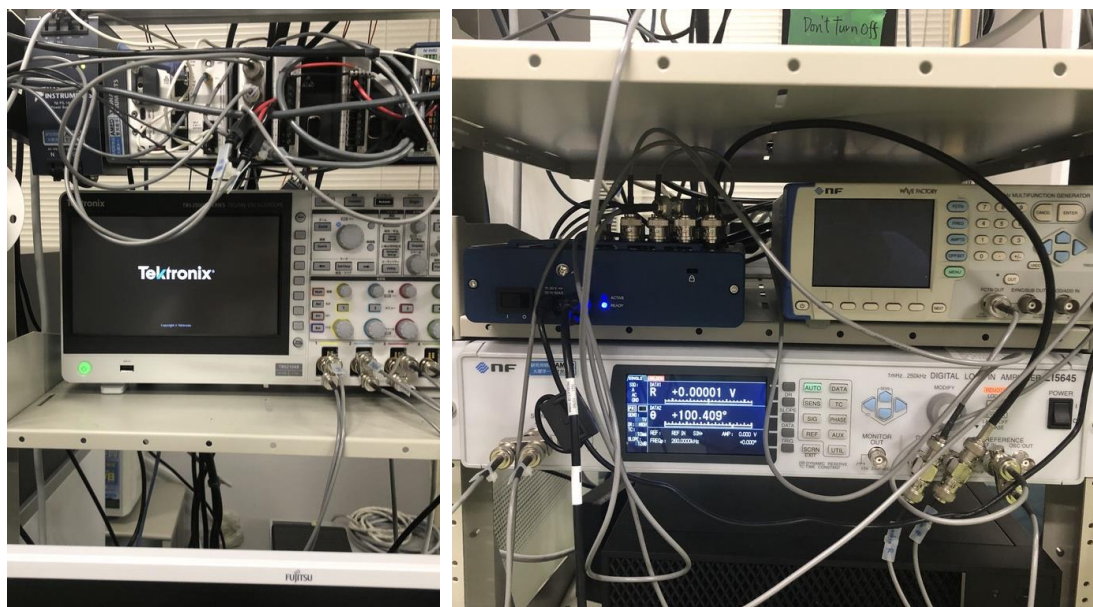


図 3-16

27. カメラの位置を調整しておく。(図 3-17)

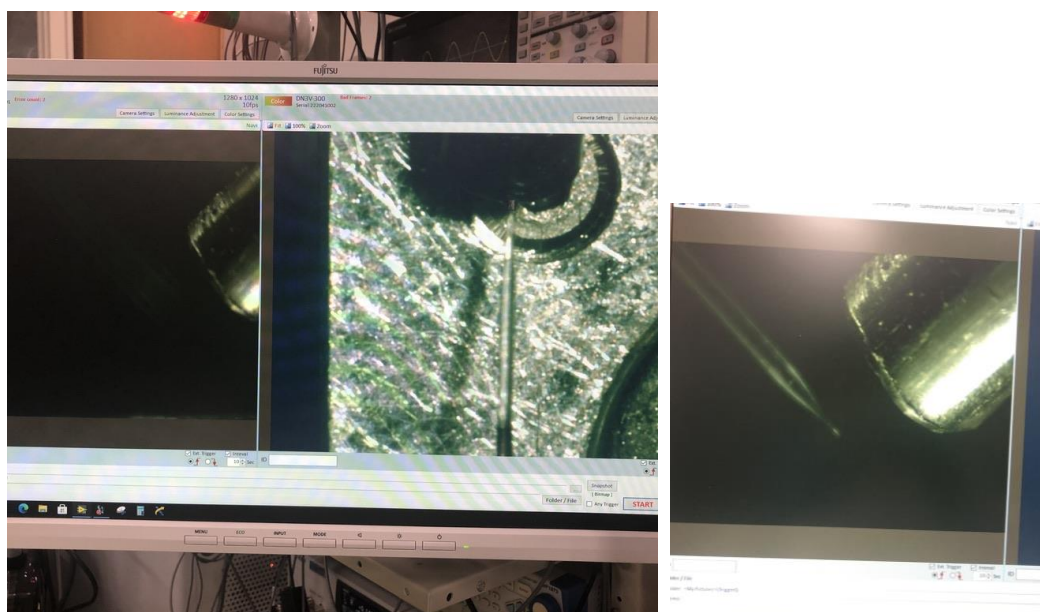


図 3-17

### 溶媒の準備

1. パーツが全て揃っているかを確認する。(図 3-18)

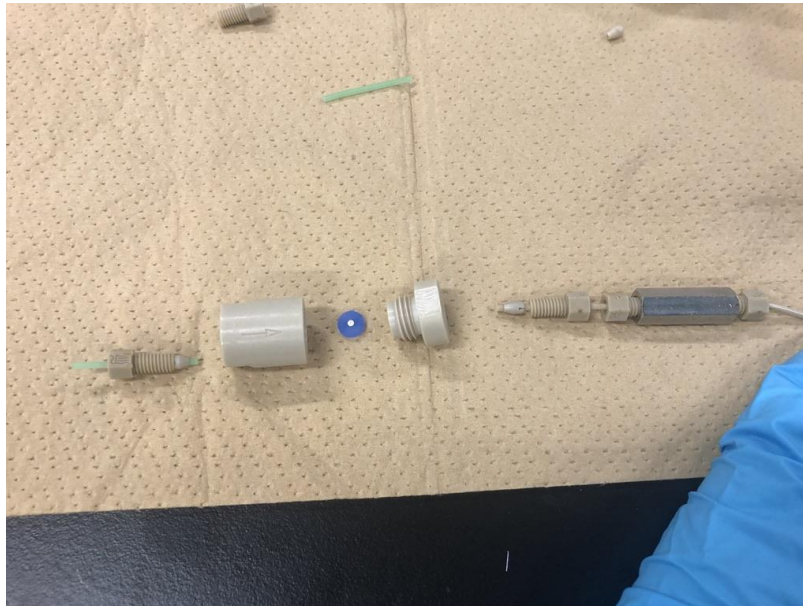
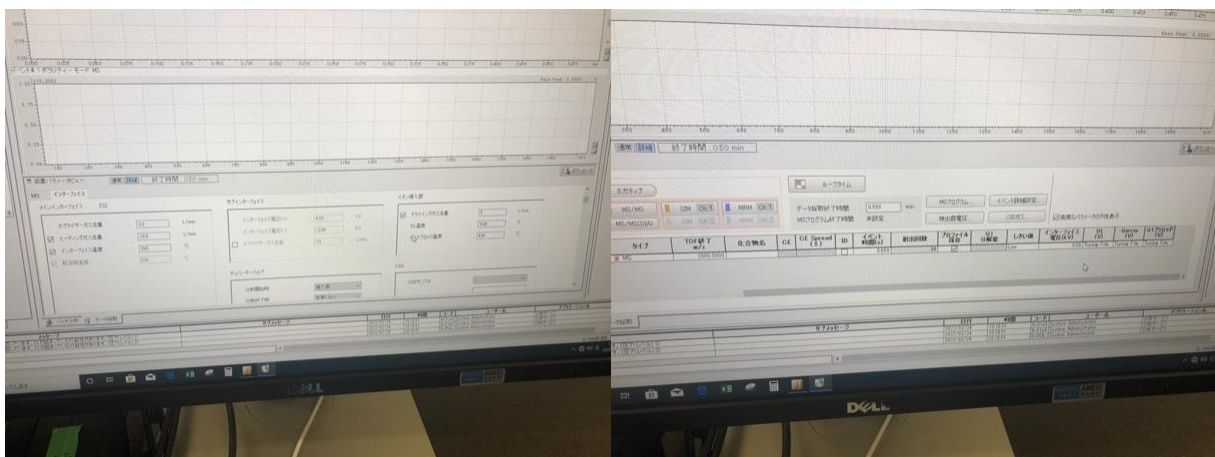


図 3-18

2. シリンジに溶媒を詰めて全て出す操作を 2, 3 回繰り返し、内部を洗浄する。
3. PEEK チューブと緑色のスリーブにつなげて溶媒を流す操作を 2, 3 回繰り返す。
4. キャピラリプローブをつけて、溶媒が流れるかを確認する。
5. カメラでインレットとの距離を確認しながら共振周波数を調整する。ここでは 680~700Hz
6. 計測の前に 10 分程度、溶媒を流し続けておく。

#### メソッド作成

1. メインメニューからデータ採集を選択する。
2. ネブライザーガス 0.5L、ドラインガス 5.0L、DL 温度 300°C に設定し直す。
3. 開始 0.000min、終了 0.5000min、TOF 開始 100.0000、TOF 終了 2000.0000、イベント時間 0.100、しきい値 Low、インターフェイス電圧 0.00 に設定する。
4. 検出器電圧をチューニングファイルの値に合わせる。
5. メソッドファイルに名前をつけて保存する。(図 3-19)



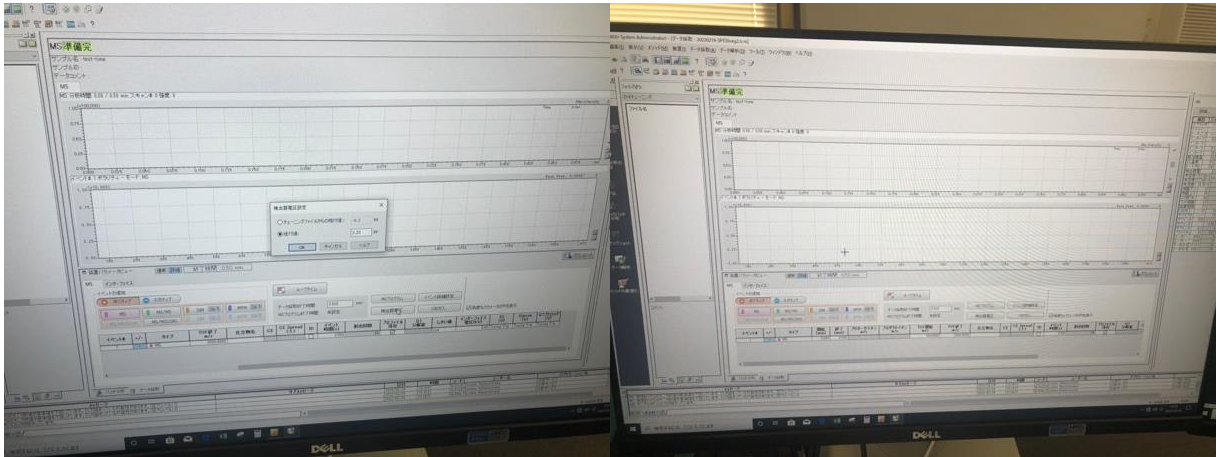


図 3-19

### Feedback システムの設定

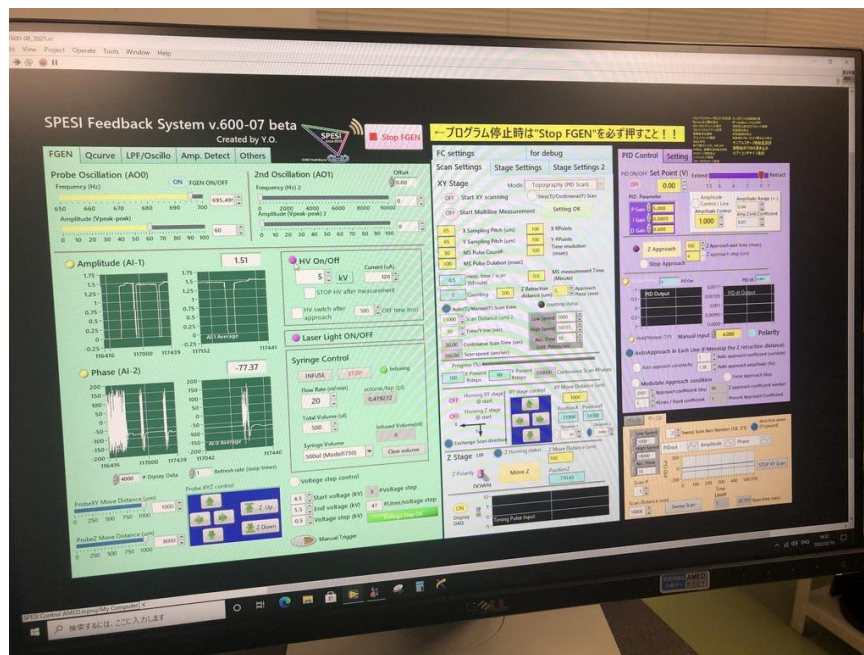


図 3-20

1. Frequency と Amplitude を操作して、Phase が 90 前後になるように調整する。(ここではレーザー電流を 45.0mA として、振幅が 1.5 になるように調整している。)
2. Sample pitch と #points、Scan distance で計測範囲を定める。
3. Set point を設定し、Auto approach amplitude (fix) にも同じ値を入れる。

### バッチ設定

1. メインメニューからバッチ分析を選択する。(図 3-21)

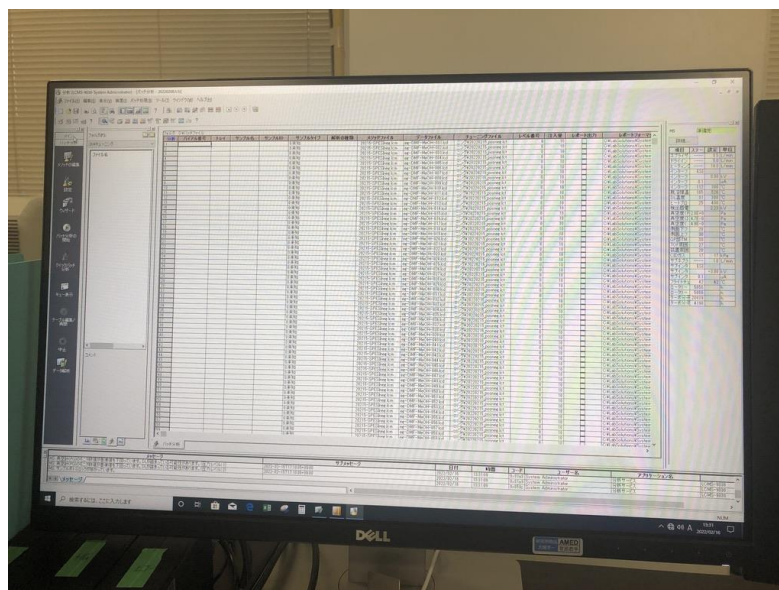


図 3-21

2. バッチの数はスキャンするラインの数と同じ数にする。
3. メソッドファイルとチューニングファイルは計測日に作成したものを設定し、右クリックで「コピーして設定」を選択する。
4. データファイルには、DATA ドライブに入れた自分のフォルダに新しいファイルを作成して、右クリックで「連番で設定」を選択する。
5. ファイルを保存しておく。

#### 計測の開始

1. バッチを作成した PC でバッチ分析の開始を選択する。
2. Feedback システムを設定した PC でアプローチを行う。
3. 画面中央上部の Start Multiline Measurement を ON にする。
4. Setting OK を選択し、デスクトップ上の自分のファイルにフォルダを作る。
5. ファイルに名前をつけて Enter を押すと計測が開始する。

## 第4章 標準試料の計測

### 第1節 試料の作製

#### (1) NaI

##### 1. NaI: キャリブレーション試薬

(400mg/L in Milli-Q/MeOH=1/1)をスポット径1mmのマイクロウェルスライドに0.4 $\mu$ Lずつ滴下し自然乾燥したものを用いた。スライドは計測する際にステージに乗る大きさ(最大3cm程度)にカットした。スライドのカットにはダイヤモンドカッターを用いた。カットしたスライドは窒素ガスを噴射して、大きなごみを取り除いた。その後UVオゾン洗浄機(Filgen)で表面改質を行い、マイクロウェルスライドの濡れ性を向上させた。O<sub>2</sub>導入時間は5分間、UV照射時間は30分間、N<sub>2</sub>導入時間は10分間に設定した。使用後はオゾンキラーを10分程度用いてオゾンの排気と分解を行った。表面改変終了後すぐに、マイクロピペットを用いて0.4 $\mu$ Lずつ滴下し自然乾燥した。ピペットの先端は10数回滴下ごとに交換した。乾燥後の試料を光学顕微鏡で観察した結果、スポットよりも広くNaIが分布していた。



##### 2. NaI: 調整

(750mg/L in Milli-Q/MeOH=4/1)をスポット径1mmのマイクロウェルスライドに0.4 $\mu$ Lずつ滴下し、100°Cに加熱して乾燥した。試薬の調整は、まず150mgのNaIを4mLのMeOHに溶かし、16mLのMilli-Qを加えて希釈した。その溶媒を1mLとり、Milli-Q/MeOH=4/1で10倍に希釈した。マイクロウェルスライドの準備は1.同様である。加熱にはホットプレートを用いた。光学顕微鏡で観察すると、1.同様にスポットより広い範囲でNaIが分布していた。



##### 3. NaI: 調整

(7500mg/L in Milli-Q/MeOH=4/1)をスポット径1mmのマイクロウェルスライドに0.4 $\mu$ Lずつ滴下し、40°Cに加熱しながら乾燥した。マイクロウェルスライドの準備は1.同様である。加熱にはホットプレートを用いた。光学顕微鏡で観察すると、スポットの中心に直径0.3mm程度の結晶としてNaIが観察された。

#### (2) Reserpine

300mg/Lの水溶液を調製した。文献より、レセルピンは水に難溶、MeOHに不溶であるので、Milli-Qを用いた水溶液を調整した。0.6mgのreserpineを2mLの水に溶かそうとしたが、ほとんど溶けていなかったためVORTEXで5分間振動を与えて分散させた分散水溶液を用いた。40°Cに加熱しながら乾燥したものを光学顕微鏡で観察した。光学顕微鏡像を図4-1に示す。膜状にはならなかったが、微結晶がスポット内に分散されていた。また、スポットの外周部に多くの微結晶が分布していた。

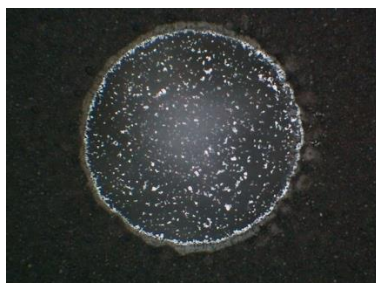


図4-1 Reserpineの分散水溶液を乾燥したサンプル像(スポット径1mm)

## 第 2 節 実験方法

### (1) NaI

12/13 の計測 全ての計測は DMF/MeOH=1/1 溶媒を用いて流量 200nL/min で計測を行った。

表 4-1 NaI の計測条件

条件	電圧	共振周波数
1	3.5kV	699.1Hz
2	5kV	699.1Hz
3	6.5kV	699.1Hz

$m/z$  472.6696

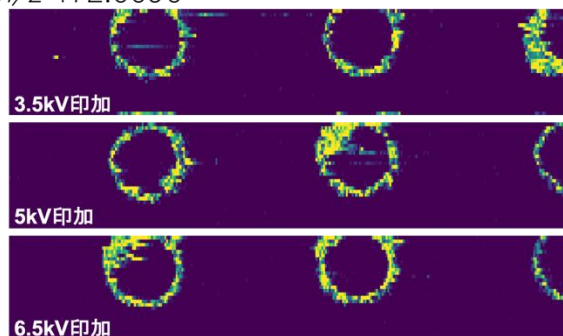


図 4-2 NaI 計測のイオンイメージ

表 4-2 NaI の計測条件

条件	電圧	共振周波数
4	5kV	565.9Hz
5	5kV	709.0Hz
6	5kV	818.7Hz

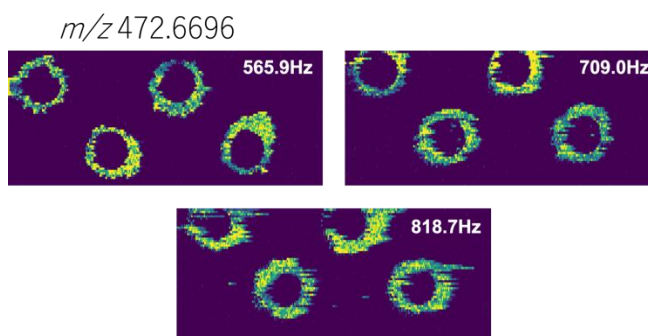


図 4-3 NaI 計測のイオンイメージ

12/20 の計測 全ての計測は流量 100nL/min で DMF/MeOH=1/1 溶媒を用いて計測した。

表 4-3 NaI の計測条件

条件	電圧	共振周波数
1	3.5kV	688.6Hz
2	5kV	688.6Hz
3	6.5kV	688.6Hz

条件	電圧	共振周波数
4	5kV	603.5Hz
5	5kV	688.6Hz
6	5kV	806.7Hz

12/24 の計測 全ての計測は 100nL/min で DMF/MeOH=1/1 溶媒を用いて計測した。ここでは印加電圧の比較をした。

表 4-4 NaI の計測条件

条件	電圧	共振周波数
1	2kV	695.9Hz
2	5kV	695.9Hz
3	8kV	695.9Hz

スポットの中心に結晶ができてしまい、イメージングがうまくできなかった。

## (2) Reserpine

DMF と MeOH それぞれの純溶媒と、その体積比 1 : 1 混合溶媒を用いて質量分析イメージングを行なった。光学顕微鏡で観察して、15 サンプル中 7 サンプルの均質に見えるものを用いてピーク強度の比較を行なった。全ての流量は 50nL/min に揃えた。

表 4-5 Reserpine の計測条件

条件	電圧	共振周波数	溶媒	条件	電圧	共振周波数	溶媒	条件	電圧	共振周波数	溶媒
1	5kV	687.9Hz	MeOH	1	3kV	685.6Hz	DMF/MeOH	1	5kV	503.6Hz	DMF/MeOH
2	5kV	683.6Hz	DMF/MeOH	2	5kV	683.6Hz	DMF/MeOH	2	5kV	683.6Hz	DMF/MeOH
3	5kV	686.6Hz	DMF	3	7kV	685.6Hz	DMF/MeOH	3	5kV	793.3Hz	DMF/MeOH

## 第 3 節 解析方法

### (1) NaI

1. キャリブレーションで用いている標準サンプル瓶からサブインターフェースに直接試料を導入してシングル分析を行った
2. 1cd. ファイルから最も強度の高いピークを 100%とした時の強度比 10%までのものを使用した
3. 理論的に想定される NaI ピーク (Na の物質質量 23 から NaI の式量 149.89 ごとにピークが現れる) と一致したものでピークリストを作った

表 4-6 理論値

$m/z$	Assignment
22.99	Na <sup>+</sup>
172.89	(NaI) Na <sup>+</sup>
322.78	(NaI) <sub>2</sub> Na <sup>+</sup>
472.67	(NaI) <sub>3</sub> Na <sup>+</sup>
622.56	(NaI) <sub>4</sub> Na <sup>+</sup>
772.45	(NaI) <sub>5</sub> Na <sup>+</sup>
922.34	(NaI) <sub>6</sub> Na <sup>+</sup>
1072.23	(NaI) <sub>7</sub> Na <sup>+</sup>
1222.12	(NaI) <sub>8</sub> Na <sup>+</sup>

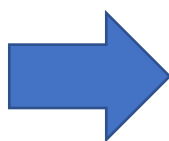


表 4-7 ピークリスト

$m/z$	Assignment
172.882	(NaI) Na <sup>+</sup>
322.776	(NaI) <sub>2</sub> Na <sup>+</sup>
472.670	(NaI) <sub>3</sub> Na <sup>+</sup>
622.563	(NaI) <sub>4</sub> Na <sup>+</sup>
772.457	(NaI) <sub>5</sub> Na <sup>+</sup>
922.350	(NaI) <sub>6</sub> Na <sup>+</sup>
1072.244	(NaI) <sub>7</sub> Na <sup>+</sup>
1222.137	(NaI) <sub>8</sub> Na <sup>+</sup>

4. 比較する計測結果を全て同じプロジェクトファイルで開いた。
5. イメージング結果から ROI を定めた。
6. 前処理を行わずに、ピークリストで ROI 平均を計算した。
7. 条件の異なる計測を比較するため、Excel に ROI のピーク強度を含めた全てのデータをコピーした。
8. 安定して強いピークが得られた  $m/z$  472.6696 で得られた強度を 1 として規格化した。
9. 標準偏差を用いてエラーバーを含む結果をプロットした。

### (2) Reserpine

1. ピーク強度の比較には Monoisotopic Mass ( $m/z$  609.2812) とそのフラグメントイオンとして見られた  $m/z$  607.2656 と  $m/z$  605.249 を用いた。
2. 比較する計測結果を全て同じプロジェクトファイルで開いた。
3. イメージング結果から ROI を定めた。
4. 前処理を行わずに、ピークリストで ROI 平均を計算した。
5. 条件の異なる計測を比較するため、Excel に ROI のピーク強度を含めた全てのデータをコピーした。
6. Monoisotopic Mass ( $m/z$  609.2812) で得られた強度を 1 として規格化した。



7. 標準偏差を用いてエラーバーを含む結果をプロットした。

#### 箱ひげ図の作り方

1. IMAGEREVEAL の画面で  $m/z$  を選択し、MS イメージを追加した。この時、ROI 内のみで作成にチェックをつけた。
2. MS イメージ一覧から出力したイメージを選択した。
3. 右クリックしてテキスト形式でエクスポートした。( .csvfile)
4. Excel のマクロ有効ブックで開いた。
5. 開発タブから Visual Basic を開いた。
6. モジュールを作り下記のコードを使って各 ROI のデータを 1 列にまとめた。

```
Sub 複数列のデータを 1 列にまとめる ()

Dim Last_Row As Long
Dim i As Long
Dim Target_Row As Long

' 転記開始行は 2 にする (各列の番号を挿入しているため)
Target_Row = 2

' 各 ROI の範囲を定めてその列分ループする (ここでは N:NP)
For i = 14 To 380

    ' 最終行を取得 (いじらない)
    Last_Row = Cells(Rows.Count, i).End(xlUp).Row

    ' コピーして貼り付け (最後の 1 は 1 列目に転記することを示す)
    Range(Cells(2, i), Cells(Last_Row, i)).Copy Cells(Target_Row, 1)

    ' 転記開始行 (Rows.Count, の後の数字を上のコードの最後の数字に合わせる)
    Target_Row = Cells(Rows.Count, 1).End(xlUp).Row + 1

Next i

End Sub
```

7. Excel を使って箱ひげ図を作成した。

## 第 4 節 実験結果

### (1) NaI

#### 印加電圧の比較

印加電圧によるピーク強度の違いは見られなかった。Na の大きな金属クラスターを形成する領域では印加電圧によるピーク強度の違いは見られないが、 $m/z$  172.88 では測定日によってピーク強度にばらつきがあった。金属クラスターは、数個から数百個の金属原子が集まった原子の集合体で、大きさは 1~2nm 程度の粒子である。Na において 2 は魔法数と呼ばれており、 $(\text{NaI})_2\text{Na}^+$  は特に安定するとされている。以下に 2 度の計測の結果を示す。

## 12/13 の計測結果

表 4-8  $m/z$  472.6696 を 1 とした時のピーク強度

$m/z$	3.5kV	5kV	6.5kV
172.8824	0.729	1.012	0.926
322.7758	0.000	0.001	0.002
472.6696	1.000	1.000	1.000
622.5631	0.007	0.006	0.005
772.4569	0.334	0.304	0.329
922.3502	0.147	0.103	0.140
1072.244	0.184	0.160	0.181
1222.137	0.072	0.069	0.079

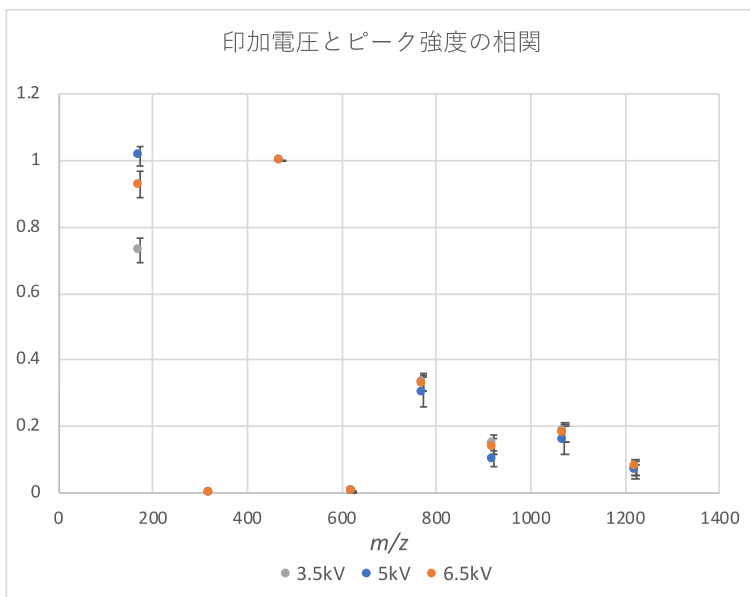


図 4-4 印加電圧とピーク強度の相関

## 12/20 の計測結果

表 4-9  $m/z$  472.6696 を 1 とした時のピーク強度

$m/z$	3.5kV	5kV	6.5kV
172.8824	3.046	2.320	2.215
322.7758	0.003	0.002	0.002
472.6696	1.000	1.000	1.000
622.5631	0.006	0.010	0.011
772.4569	0.322	0.423	0.426
922.3502	0.036	0.066	0.065
1072.244	0.234	0.420	0.406
1222.137	0.094	0.170	0.168

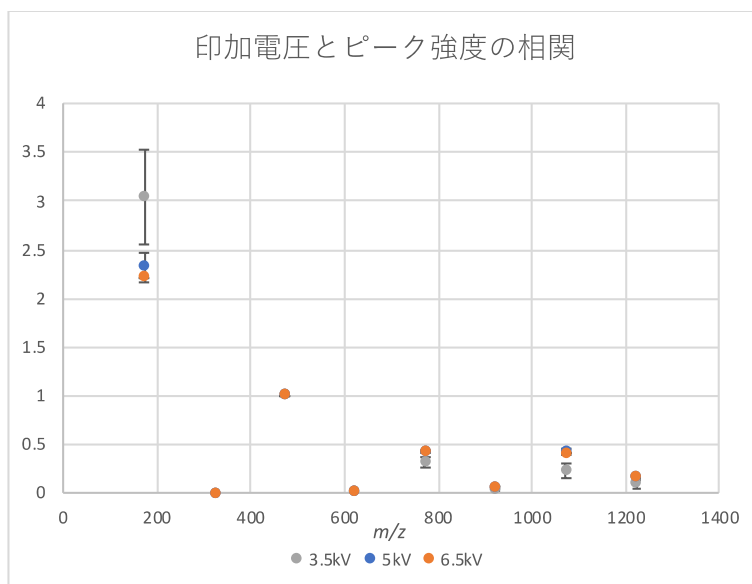


図 4-5 印加電圧とピーク強度の相関

## 共振周波数の比較

共振周波数が低い時のピークが最も強く計測できた。Na の大きな金属クラスターを形成する領域では共振周波数によるピーク強度の違いは見られないが、 $m/z$  172.88 では測定日によってピーク強度にばらつきがあった。

## 12/13 の計測結果

表 4-10  $m/z$  472.6696 を 1 とした時のピーク強度

$m/z$	565.9Hz	709.0Hz	818.7Hz
172.8824	1.203	1.419	1.874
322.7758	0.000	0.001	0.001
472.6696	1.000	1.000	1.000
622.5631	0.002	0.003	0.003
772.4569	0.268	0.316	0.313
922.3502	0.027	0.023	0.021
1072.244	0.140	0.265	0.247
1222.137	0.040	0.058	0.064

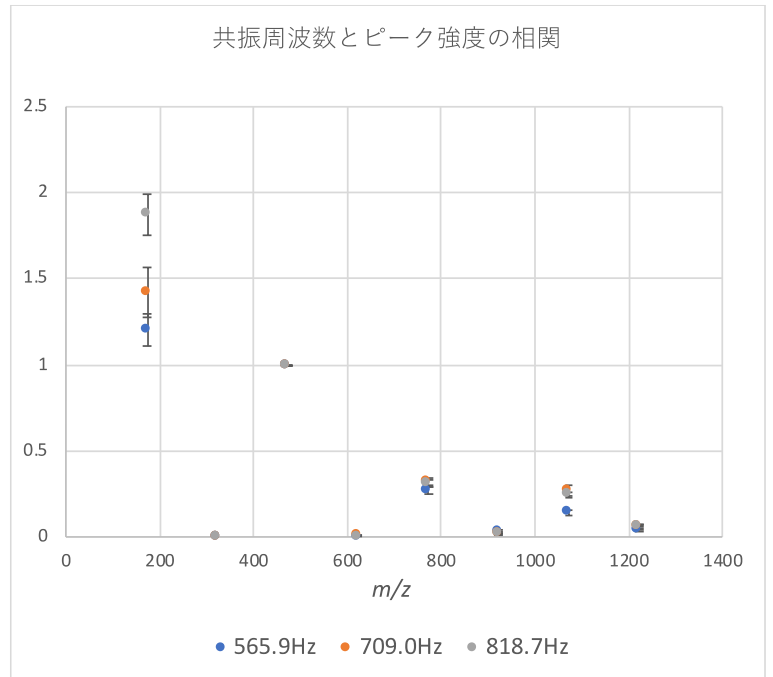


図 4-6 共振周波数とピーク強度の相関

## 12/20 の計測結果

表 4-11  $m/z$  472.6696 を 1 とした時のピーク強度

$m/z$	565.9Hz	709.0Hz	818.7Hz
172.8824	2.690	2.320	2.776
322.7758	0.003	0.002	0.002
472.6696	1.000	1.000	1.000
622.5631	0.006	0.010	0.005
772.4569	0.358	0.423	0.347
922.3502	0.043	0.066	0.044
1072.244	0.307	0.420	0.292
1222.137	0.120	0.170	0.120

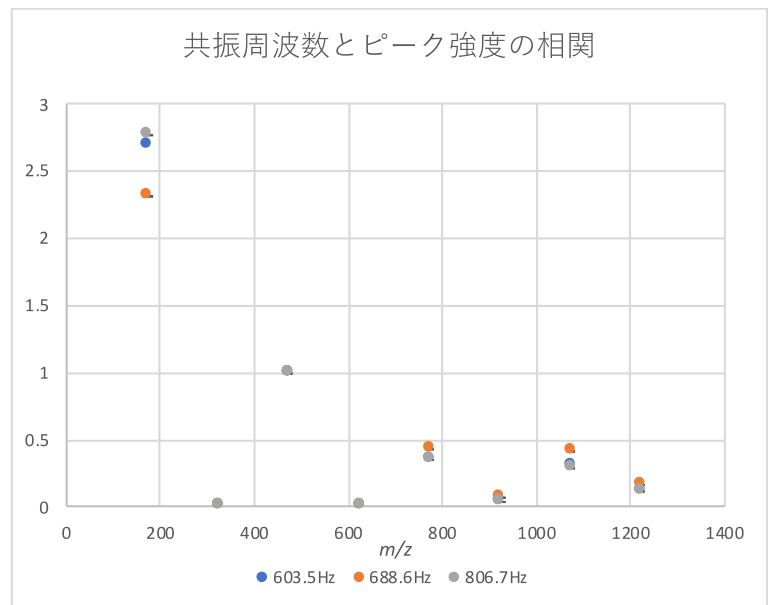


図 4-7 共振周波数とピーク強度の相関

## (2) Reserpine

### 溶媒の比較

DMF の純溶媒での計測が最もピークが強く現れた。(図 4-6 左)しかし、混合溶媒でのイメージングが最も光学顕微鏡写真と似ていたため、イメージングの精度の観点では混合溶媒のほうが適していると考えられる。(図 4-5)1 ピクセル単位でのピーク強度をプロットすると、混合溶媒で高いピーク強度を示すピクセルがあったことが示された。(図 4-7)この高いピーク強度はスポット端の Reserpine が多く存在する部分を示していると考えられた。また、フラグメントイオンのピーク強度とも比較すると、混合溶媒での計測ではフラグメンテーションが起こりにくいと考えられた。(図 4-6 右)

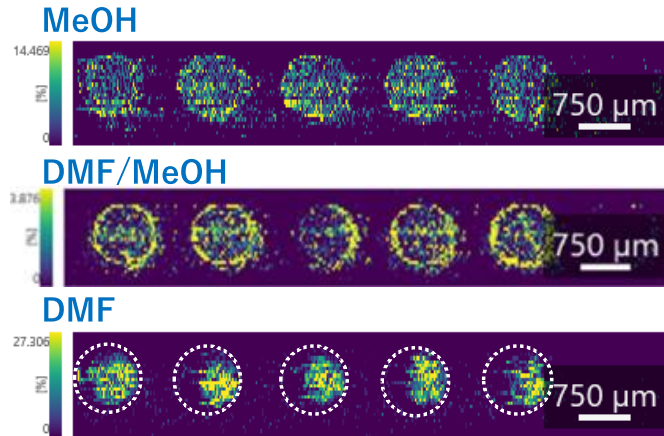


図 4-8 各計測のイメージ比較

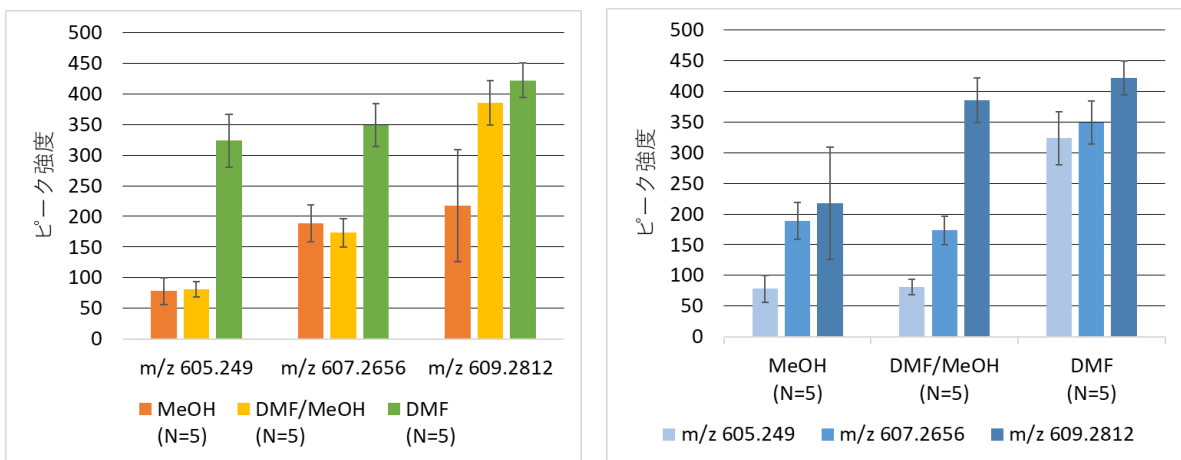


図 4-9 溶媒の種類とピーク強度の相関 (ここで  $m/z$  609.2812 が Reserpine の Monoisotopicmass)

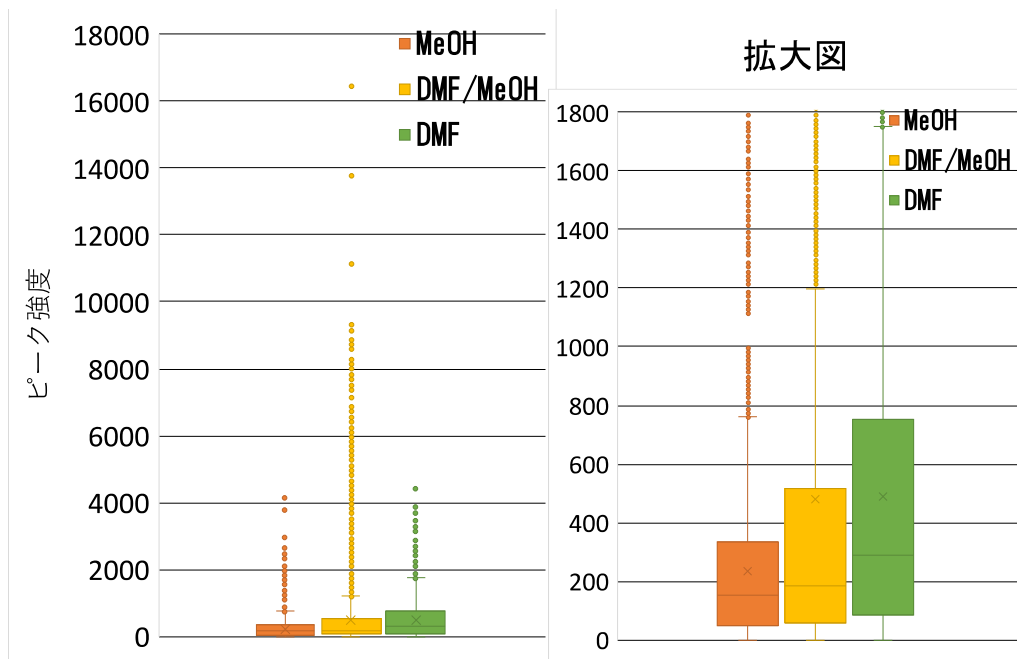


図 4-10 計測で得られたピーク強度を 1 ピクセル単位で出力してその分布を箱ひげ図で示した

### 印加電圧の比較

印加電圧による違いは見られなかった。(図 4-9)また、3kV ではサンプルによる誤差が大きく、7kV ではフラグメントイオンのピークが強かったため、5kV が適すると考えられた。

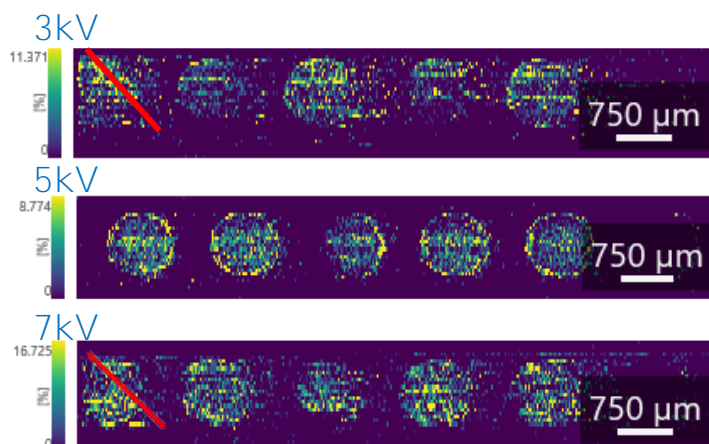


図 4-11 各計測のイメージ比較

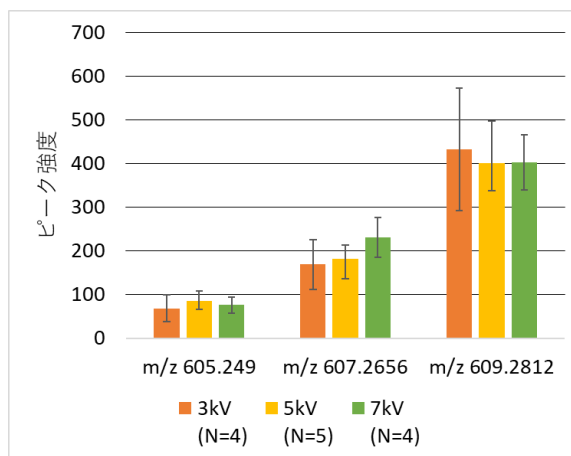


図 4-12 印加電圧とピーク強度の相関

### 共振周波数の比較

共振周波数が低い時のピークが最も強く計測できた。(図 4-11)これは試料表面とプローブが接触する時間が長くなるために抽出する試料成分が多くなるためだと考えられた。しかし、683.6Hz でのイメージングが最も光学顕微鏡写真と似ていたため、イメージングの精度の観点では 680Hz 程度の共振周波数が適していると考えられた。(図 4-10)

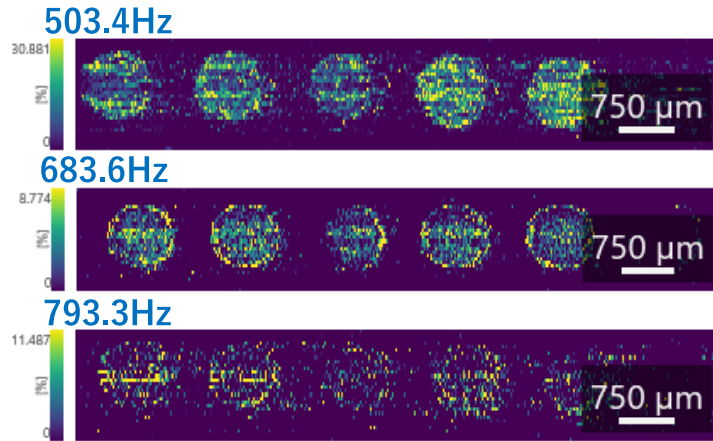


図 4-13 各計測のイメージ比較

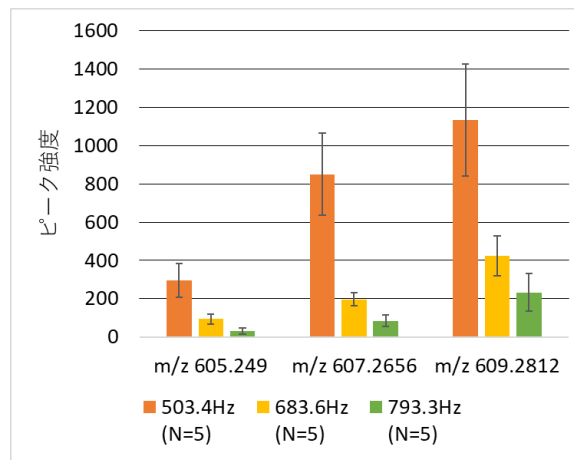


図 4-14 共振周波数とピーク強度の相関

## 第5章 溶媒の物理化学的性質

### 第1節 表面張力の計測

表面張力はプローブに担持された抽出溶媒がイオン化する過程で、イオン化しやすさに関わるパラメータとして必要だと考えた。

#### ・Wilhelmy法(プレート法、垂直板法)

白金プレートなどの薄板状の測定子を液体試料の表面に垂直に接液させると、液体試料が測定子にぬれ上がる(メニスカスという)。この測定子周辺に形成されたメニスカス部分の表面張力により、測定子が液体試料中に引き込まれる。この引き込む力を測定し、計算する。

$$\gamma = \frac{F}{L \cos \theta}$$

$\gamma$ : 表面張力 (mN/m)

$F$ : 測定力 (mN)

$L$ : 測定子の周囲長 (m)

$\theta$ : 測定子と液体試料との接触角

多くの液体は白金プレートに対して十分に濡れるので接触角  $\theta = 0^\circ$  である。

$$\gamma = \frac{F}{L}$$

#### ・実験

動的接触角解析装置(DCA-700, 協和界面科学)を用いた。解析には表面解析ソフトウェア(DYNALYZER, 協和界面科学)を用いた。MeOHに対するDMFの混合比が0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%の溶媒を用意して計測した。それぞれ5回ずつ計測し、その平均値と標準偏差を用いた。室温は24°Cであった。

#### ・結果

DMF/MeOHの混合溶媒はそれぞれの純溶媒の中間の値を示した。(図5-1)文献値は25°Cでの値<sup>8</sup>。

表 5-1 計測値と文献値の比較

DMF濃度 (%)	表面張力 (mN/m)	文献値 (mN/m)
0	23.27	22.4
10	24.57	
30	26.63	
50	29.8	
70	32.48	
90	35.14	
100	36.23	36.4

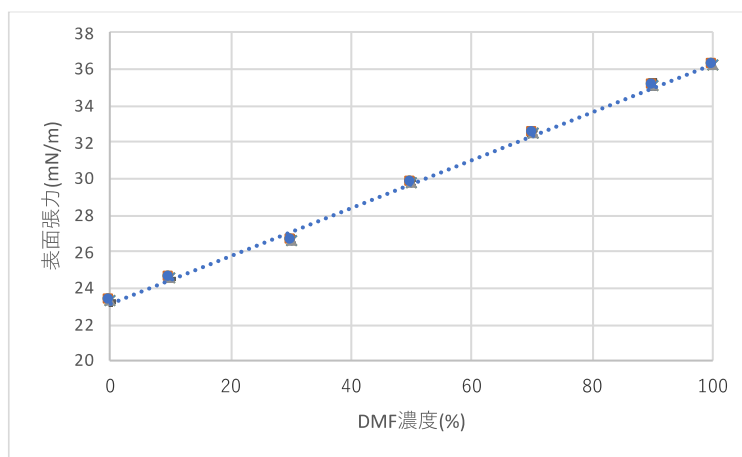


図 5-1 MeOH と DMF の組成比と表面張力の相関

<sup>8</sup> 化学便覧 基礎編 改訂6版, 丸善書店

## 第2節. 粘性率の計測

粘性率はプローブに担持された抽出溶媒の総量に関わるパラメータとして必要だと考えた。

### ・原理

QCM (Quartz-Crystal Microbalance : 水晶振動子マイクロバランス)法粘度解析ソフトでは、クウォーツに何も乗せていない時と計測する溶媒を乗せた時の共振周波数の差と、その振幅の半値幅の差を得ることができる。その値から以下の式<sup>9</sup>を用いて複素粘度  $\eta'$  を求めることができる。

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} = -\frac{\pi Z_q^2}{\rho_{liq} f} \frac{\Delta f \Delta \Gamma}{f_F^2}$$

$$\eta'' = \frac{G'}{\omega} = \frac{1}{2} \frac{\pi Z_q^2}{\rho_{liq} f} \frac{(\Delta \Gamma^2 - \Delta f^2)}{f_F^2}$$

$\eta'$  : 粘性率に対するパラメータ

$Z_q$  : 水晶の固有振動数(定数)

$\rho$  : 溶媒の密度

$f$  : 共振周波数

$f_F$  : 基本共振周波数

$\Delta f$  : 周波数の差

$\Delta \Gamma$  : 半値幅の差

### ・実験

open QCM Q-1(Novaetch S.r.l 社製)を用いて計測した。数値は文献値と異なる値を示すので、文献値(20℃)との比率をとってフィッティングした。MeOH に対する DMF の混合比が 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%の溶媒を用意して計測した。室温は 24℃であった。

### 結果

DMF/MeOH の混合溶媒はそれぞれの純溶媒の中間の値を示した。

表 5-2 計測値と文献値に照らし合わせて  
フィッティングした値

DMF濃度 (%)	測定値	粘性率 (mPa・sec)
0	0.71992353	0.555
10	0.77075696	0.600130109
30	0.81063656	0.635535374
50	0.8546021	0.674568139
70	0.92413045	0.736295675
90	0.96801403	0.775255681
100	0.99137991	0.796

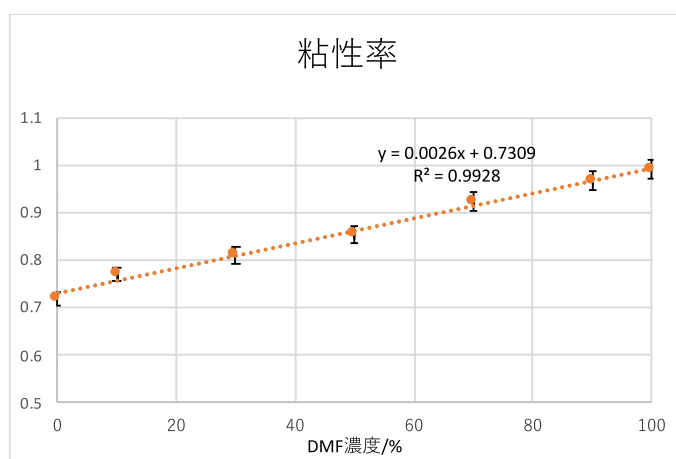


図 5-2 MeOH と DMF の組成比と粘性率の相関

<sup>9</sup> Diethelm Johannsmann, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **10**, 31 (2008)



### 第3節. 比誘電率の計測

#### 原理

計測器では周波数を入力し、インピーダンスを計測することで静電容量を求めることができる。

$$|Z| = \frac{1}{\omega C}$$

|Z| : インピーダンスアナライザで測定されたインピーダンスの絶対値

$\omega$  : 角周波数 (=2 $\pi$ f) ※f は測定した周波数

C : 理想的コンデンサの静電容量

静電容量から試料の誘電率を求めることができる。実験では、セルに何も入れない状態での計測結果を $C_0$ として比誘電率を求める。

$$C = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{S}{d}$$

S : 電極の面積

d : 電極間隔

$\epsilon_r$  : 試料の比誘電率

$\epsilon_0$  : 真空の誘電率

#### ・実験

LCR ハイテスター 3535-50(日置電機社製)を用いて計測した。MeOH に対する DMF の混合比が 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%の溶媒を用意して計測した。まず、セルに何も入れずに空セル状態で計測し、その値を $C_0$ とした。室温は 21°Cであった。データは自動で入力される周波数に従った誘電率が得られた。

表 5-3 入力した周波数

周波数(Hz)	周波数(Hz)	周波数(Hz)
1.00E+06	1.58E+07	2.51E+08
1.10E+06	1.78E+07	2.82E+08
1.30E+06	2.00E+07	3.16E+08
1.40E+06	2.24E+07	3.55E+08
1.60E+06	2.51E+07	3.98E+08
1.80E+06	2.82E+07	4.47E+08
2.00E+06	3.16E+07	5.01E+08
2.20E+06	3.55E+07	5.62E+08
2.50E+06	3.98E+07	6.31E+08
2.80E+06	4.47E+07	7.08E+08
3.20E+06	5.01E+07	7.94E+08
3.50E+06	5.62E+07	8.91E+08
4.00E+06	6.31E+07	1.00E+09
4.50E+06	7.08E+07	1.12E+09
5.00E+06	7.94E+07	1.26E+09
5.60E+06	8.91E+07	1.41E+09
6.30E+06	1.00E+08	1.58E+09
7.10E+06	1.12E+08	1.78E+09
7.90E+06	1.26E+08	2.00E+09
8.90E+06	1.41E+08	2.24E+09
1.00E+07	1.59E+08	2.51E+09
1.12E+07	1.78E+08	2.82E+09
1.26E+07	2.00E+08	3.00E+09
1.41E+07	2.24E+08	

・結果

DMF/MeOH の混合溶媒はそれぞれの純溶媒の中間の値を示した。

表 5-4 計測値と文献値の比較

DMF濃度 (%)	比誘電率 (@f=10MHz)	文献値 (@20°C)
0	32.9365	32.6
10	33.1326	
30	34.6101	
50	35.6586	
70	37.4403	
90	37.8333	
100	38.3025	36.7

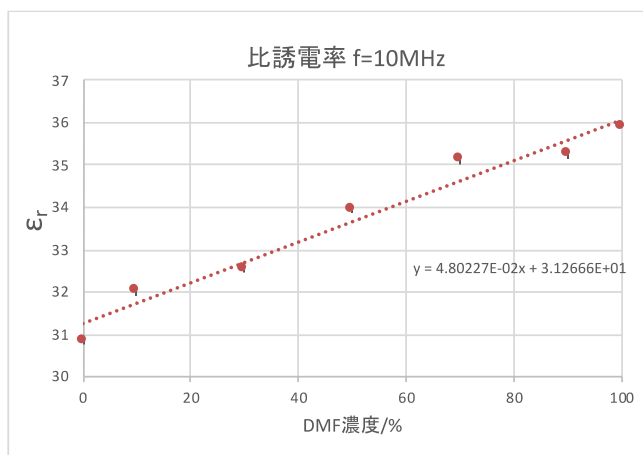


図 5-3 MeOH と DMF の組成比と比誘電率の相関

・低周波数領域での比誘電率

・実験装置

LCM メーターと液体セルを用いた。DMF と MeOH の混合溶媒 (DMF 混合割合 0%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% の計 7 種類) の低周波帯 (マウス脳切片の計測で使用した数百 Hz) での誘電率の計測を行った。周波数は 200 Hz から 100000 Hz で計測した。解析用の PC を起動 (ID:students、Pass:chem) して、解析ソフトを開き測定開始を選択して、周波数を入力した。まず、セルに何も入れずに空セル状態で計測し、その値を  $C_0$  とした。各溶媒で得られた  $C_p$  を  $C_0$  で割った値が比誘電率であった。解析に用いたのは、1209、1210、1210-2、1216、0222-1、0222-2 の 6 つ。

表 5-5 入力した周波数

周波数(Hz)	周波数(Hz)	周波数(Hz)
200	1700	50000
300	1800	60000
400	1900	70000
500	2000	80000
600	3000	90000
700	4000	100000
800	5000	200000
900	6000	300000
1000	7000	400000
1100	8000	500000
1200	9000	600000
1300	10000	700000
1400	20000	800000
1500	30000	900000
1600	40000	1000000



図 5-4 実験に用いた装置

・結果

混合した溶媒で誘電率が高かった。

また、周波数が小さければ小さいほど組成比による誘電率の差が大きかった。

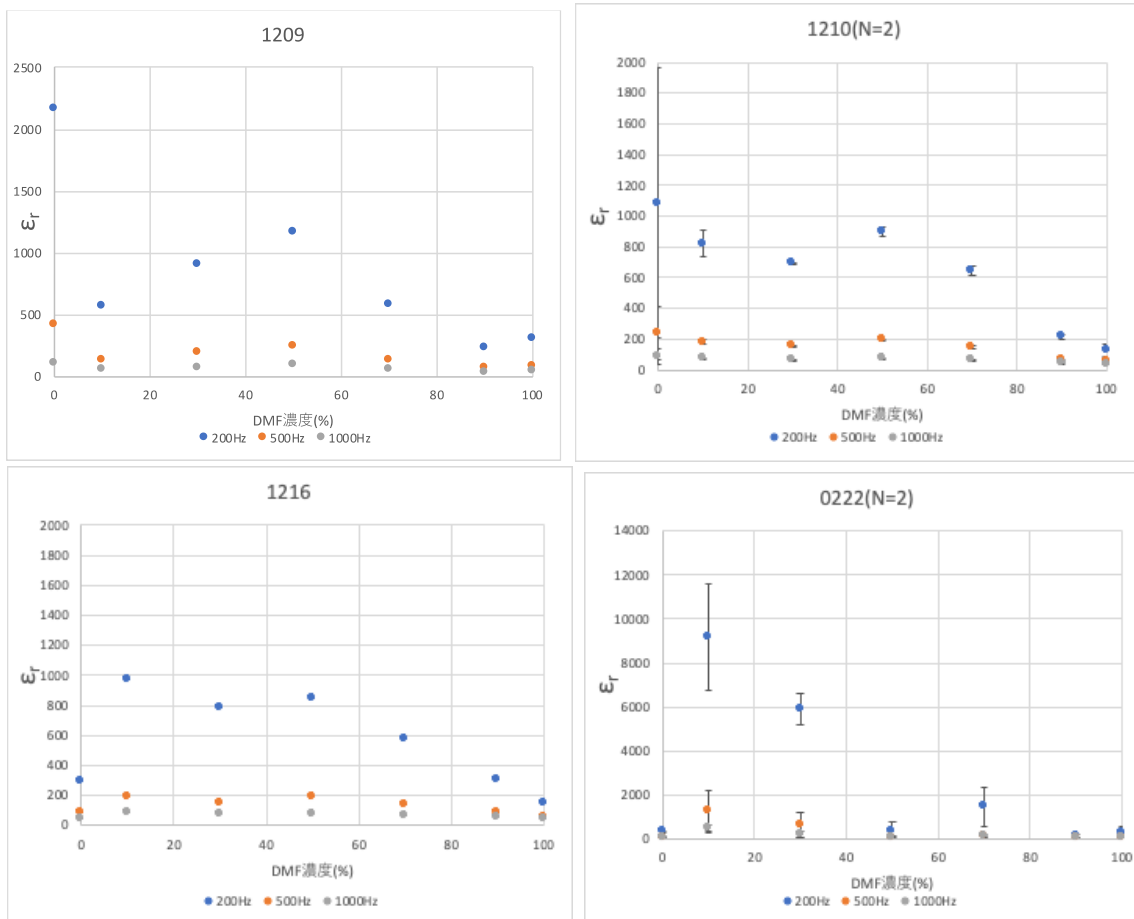


図 5-5 周波数ごとの MeOH と DMF の組成比と比誘電率の相関

## 第6章 Snail の計測

### 第1節 実験方法

DMF と EOH の体積比 1 : 1 混合溶媒を用いてマウス乳腺由来の培養上皮細胞 (Eph4) の野生株 WT と Snail 発現株の質量分析イメージングを行なった。また、正イオンモード、負イオンモード両方の計測を行った。共振周波数は 509.174 Hz、印加電圧は 7 kV、流量は 100nL/min. で計測した。

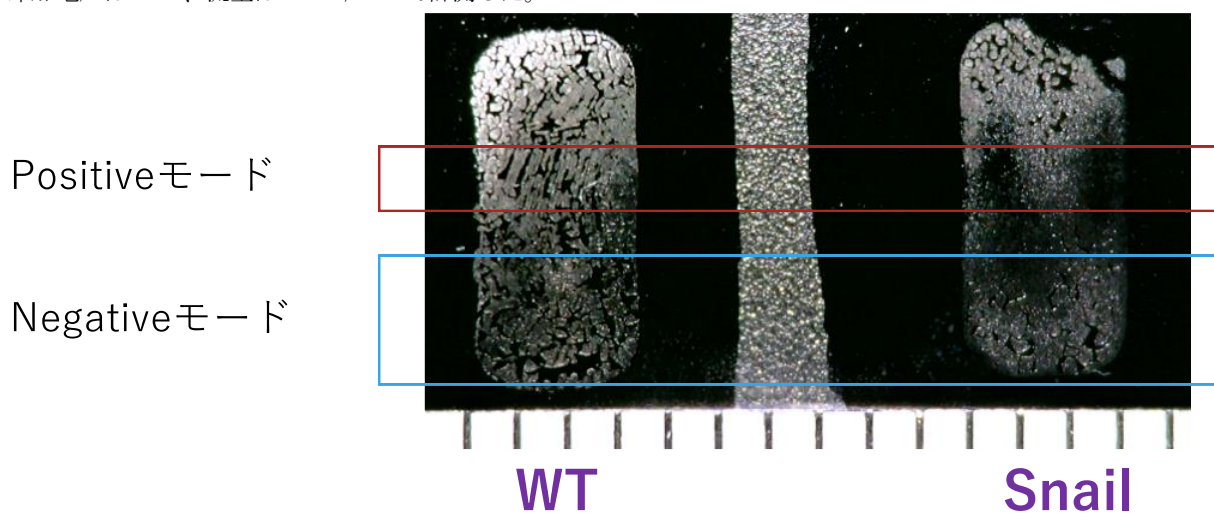


図 6-1 計測範囲

### 第2節 解析方法

#### 解析手順

1. 組織の全体とガラス基盤を ROI として定めた。(計 3 つ)
2. TIC で前処理を行い、ROI 平均のマスペクトルを得た。
3. 閾値を 50 に設定し、それぞれの組織の ROI でピークピッキングを行った。
4. ここで得られたピークリストから、ガラス基盤のピークを削除した。
5. 結果で得られた 2 つのピークリストを合わせて重複を削除した。
6. LIPIDMAPS で  $\pm 0.005$  の範囲で LMSD 検索したものを使用した。複数候補があった場合は  $\Delta m/z$  が小さいものを使用した。
7. WT と Snail のピーク強度を比較して WT/Snail の値で分類した。

### 第3節 実験結果

#### 正イオンモード

(1) WT 特有の脂質種 (WT/Snail=2 以上)

推定された脂質種の数 11 種の脂質種が推定された。

脂質種の分類 推定された 11 種のうち、5 種がグリセロリン脂質 (PS、PC/PE)、5 種がスフィンゴ脂質 (HexCer、SM)、1 種が脂肪酸 (TG) であった。また、 $m/z$  787.673 の SM40:1 が推定できた。

表 6-1 推定された脂質種

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
624.3183	624.3143	0.004	PS 22:2;O2	C28H50NO12P	[M+H] <sup>+</sup>
705.5926	705.5905	0.0021	SM 34:0;O2	C39H81N2O6P	[M+H] <sup>+</sup>
722.5589	722.5541	0.0048	HexCer 34:1;O2	C40H77NO8Na	[M+Na] <sup>+</sup>
727.5721	727.5724	0.0003	SM 34:0;O2	C39H81N2O6PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
772.6244	772.6215	0.0029	PC O-36:2	C44H86NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
	772.6215	0.0029	PE O-39:2	C44H86NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
787.6731	787.6687	0.0044	SM 40:1;O2	C45H91N2O6P	[M+H] <sup>+</sup>
813.6892	813.6844	0.0048	SM 42:2;O2	C47H93N2O6P	[M+H] <sup>+</sup>
814.6343	814.632	0.0023	PC 38:2	C46H88NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
	814.632	0.0023	PE 41:2	C46H88NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
826.6296	826.6296	0	PC 37:0	C45H90NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
	826.6296	0	PE 40:0	C45H90NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
851.6486	851.6525	0.0039	TG 49:4	C52H92O6K	[M+K] <sup>+</sup>
852.6505	852.6477	0.0028	PC 41:4	C49H90NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
	852.6477	0.0028	PE 44:4	C49H90NO8P	[M+H] <sup>+</sup>

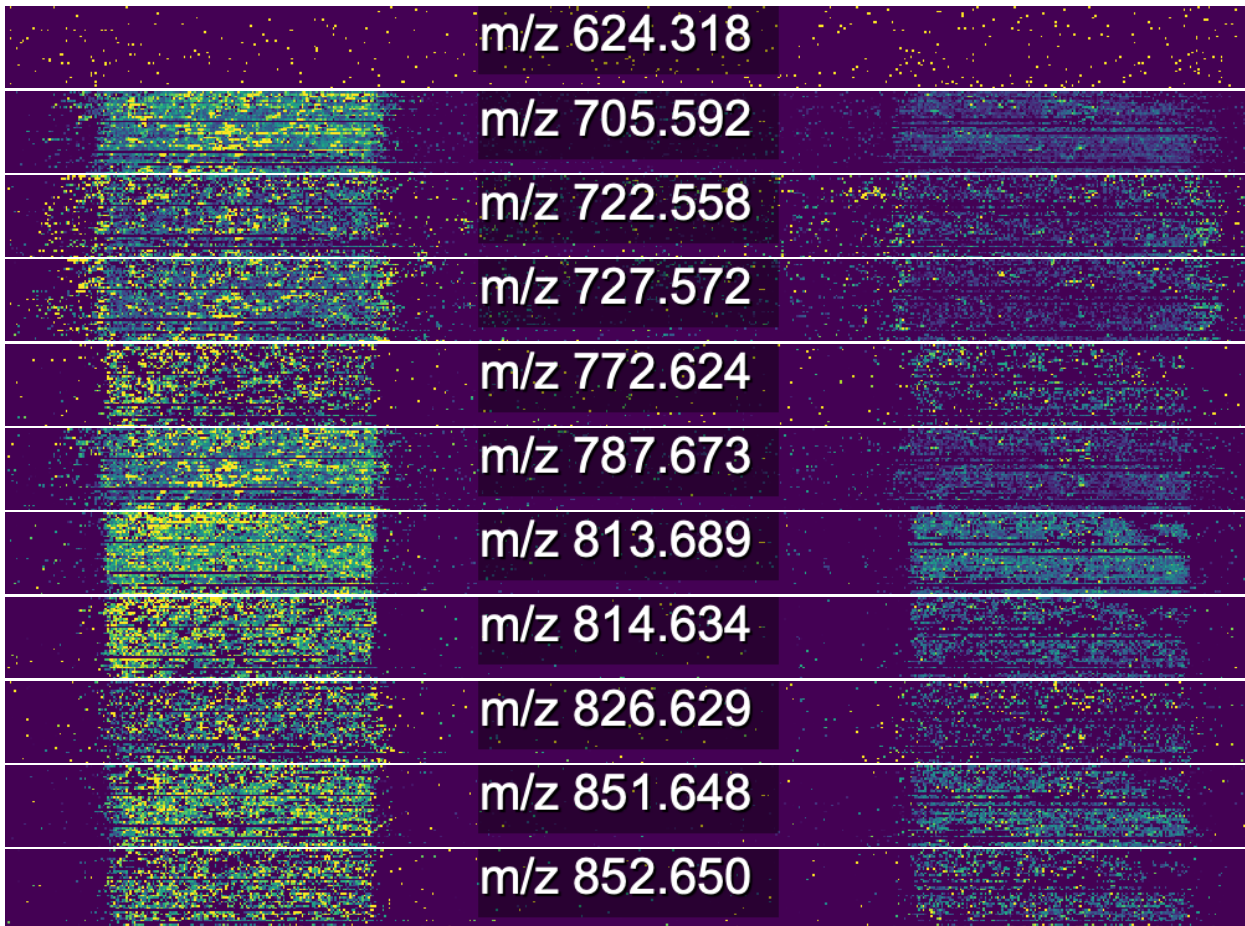


図 6-2 計測されたイオンイメージ

(2) Snail 特有の脂質種 (WT/Snail=0.5 未満)

推定された脂質種の数 7 種の脂質種が推定された。

脂質種の種類 推定された 7 種のうち、2 種がグリセロリン脂質 (PC/PS、PS)、1 種がスフィンゴ脂質 (SM)、4 種が脂肪酸 (DG、CE) であった。

表 6-2 推定された脂質種

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
617.5152	617.5139	0.0013	DG 36:4	C39H68O5	[M+H] <sup>+</sup>
631.4729	631.4698	0.0031	DG 34:2	C37H68O5K	[M+K] <sup>+</sup>
666.4369	666.4341	0.0028	PC 25:1;O2	C33H64NO10P	[M+H] <sup>+</sup>
	666.4341	0.0028	PS 27:0	C33H64NO10P	[M+H] <sup>+</sup>
689.5632	689.5633	0.0001	CE 18:1	C45H78O2K	[M+K] <sup>+</sup>
701.5636	701.5592	0.0044	SM 34:2;O2	C39H77N2O6P	[M+H] <sup>+</sup>
716.4512	716.4497	0.0015	PS 31:3	C37H66NO10P	[M+H] <sup>+</sup>
737.5486	737.5481	0.0005	DG 42:5	C45H78O5K	[M+K] <sup>+</sup>

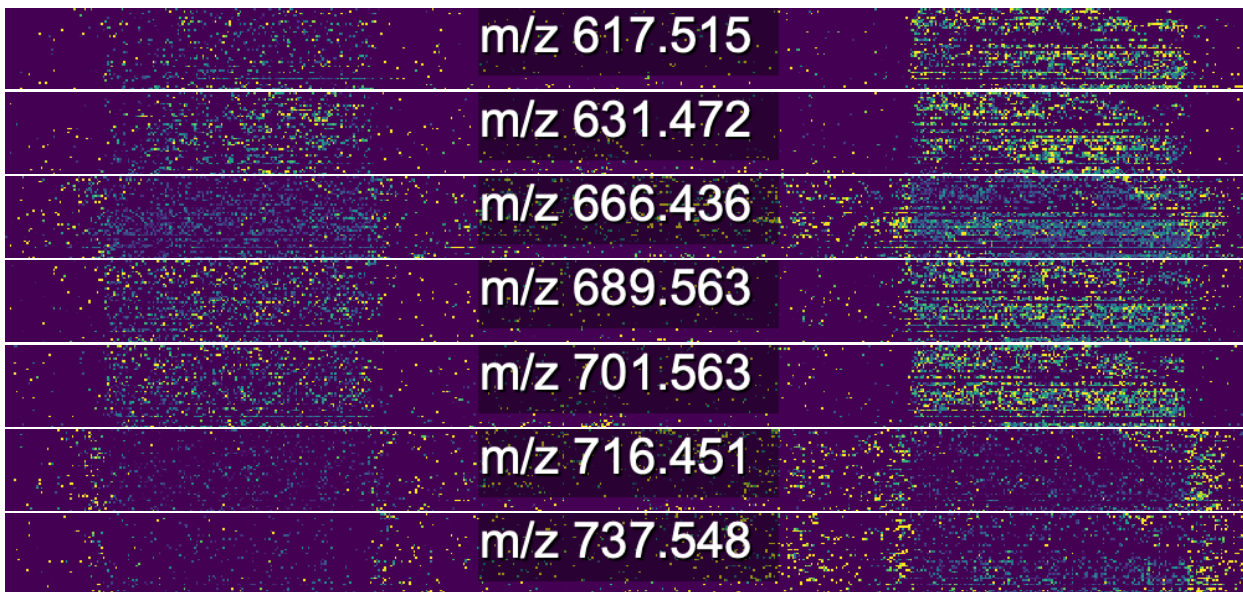


図 6-3 計測されたイオンイメージ

#### まとめ

上皮細胞に限定して認められる  $m/z$  787 のスフィンゴミエリン(SM)が Snail 発現株には存在しないとする、LC-ESI-MS の先行研究<sup>10</sup>の結果と一致した。

#### 負イオンモード

(1) WT 特有の脂質種 (WT/Snail=1.04 以上)

推定された脂質種の数 6 種の脂質種が推定された。

脂質種の種類 推定された 6 種全てがグリセリン脂質であった。そのうち、2 種がホスファチジルイノシトール (PI)、1 種がリゾホスファチジルセリン (LPS)、2 種がホスファチジルセリン (PS) であった。

<sup>10</sup> 池ノ内 順一, 上皮細胞の極性形成とリン脂質, 医学のあゆみ「生命を支える脂質—最新の研究と臨床」、248 巻 13 号 2014 年 3 月 29 日

表 6-3 推定された脂質種

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
480.2748	480.2732	0.0016	LPS O-16:1	C22H44NO8P	[M-H]-
734.5374	734.5342	0.0032	PS O-33:0	C39H78NO9P	[M-H]-
761.5539	761.5491	0.0048	PA O-42:6	C45H79O7P	[M-H]-
887.5662	887.5655	0.0007	PI 38:3	C47H85O13P	[M-H]-
888.5713	888.576	0.0047	PS 44:7	C50H84NO10P	[M-H]-
889.5814	889.5812	0.0002	PI 38:2	C47H87O13P	[M-H]-

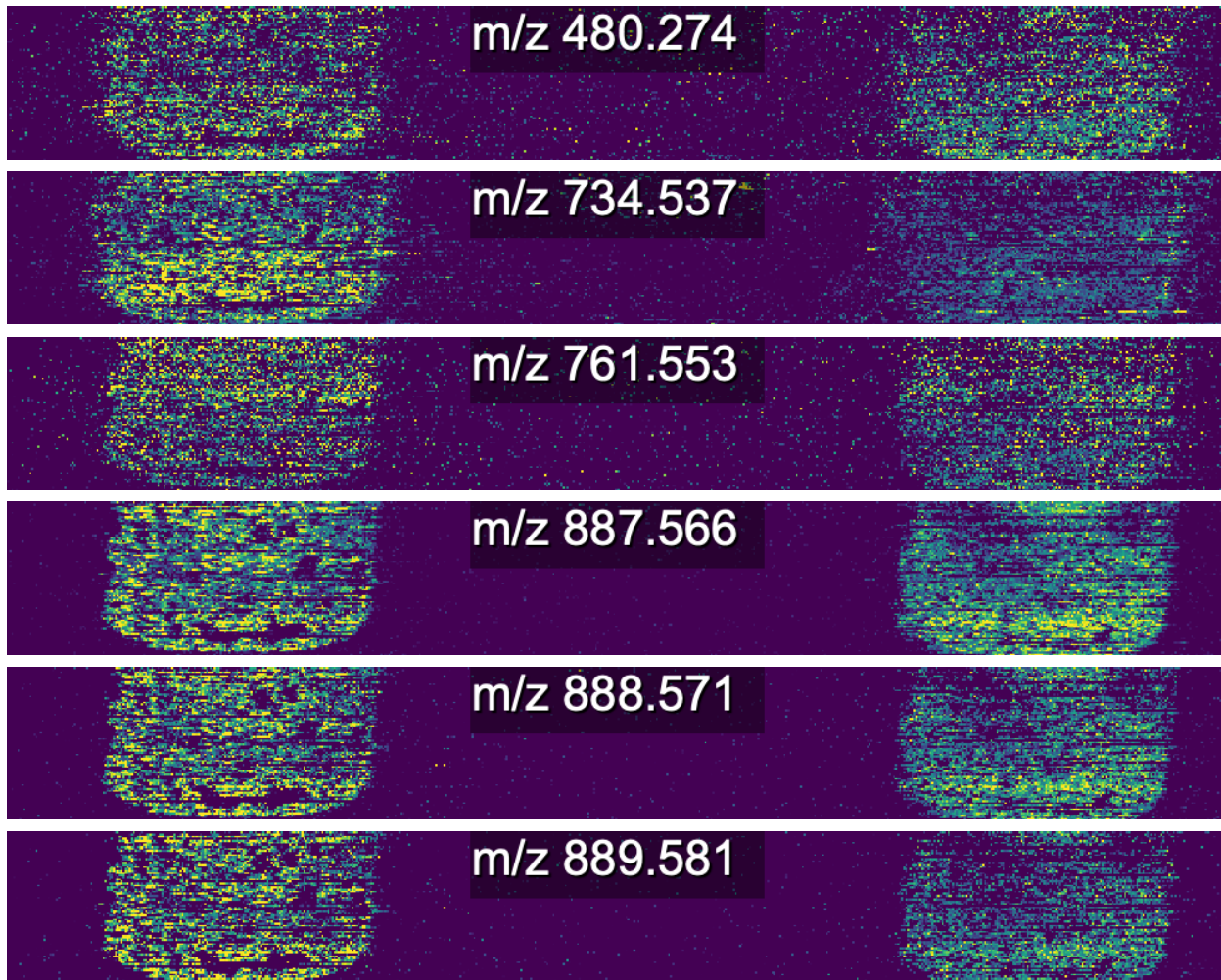


図 6-4 計測されたイオンイメージ

(2) Snail 特有の脂質種 (WT/Snail=0.5 未満)

推定された脂質種の数 6 種の脂質種が推定された。

脂質種の種類 推定された 6 種全てがグリセロリン脂質であった。そのうち 2 種がリゾホスファチジルイノシトール (LPI)、2 種が PI であった。

表 6-4 推定された脂質種

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
571.2906	571.2889	0.0017	LPI 16:0	C25H49O12P	[M-H]-
597.3064	597.3045	0.0019	LPI 18:1	C27H51O12P	[M-H]-
	597.3045	0.0019	PG 21:1;O2	C27H51O12P	[M-H]-
599.3219	599.3202	0.0017	LPI 18:0	C27H53O12P	[M-H]-
857.5217	857.5186	0.0031	PI 36:4	C45H79O13P	[M-H]-
858.5244	858.5291	0.0047	PS 42:8	C48H78NO10P	[M-H]-
881.5205	881.5186	0.0019	PI 38:6	C47H79O13P	[M-H]-

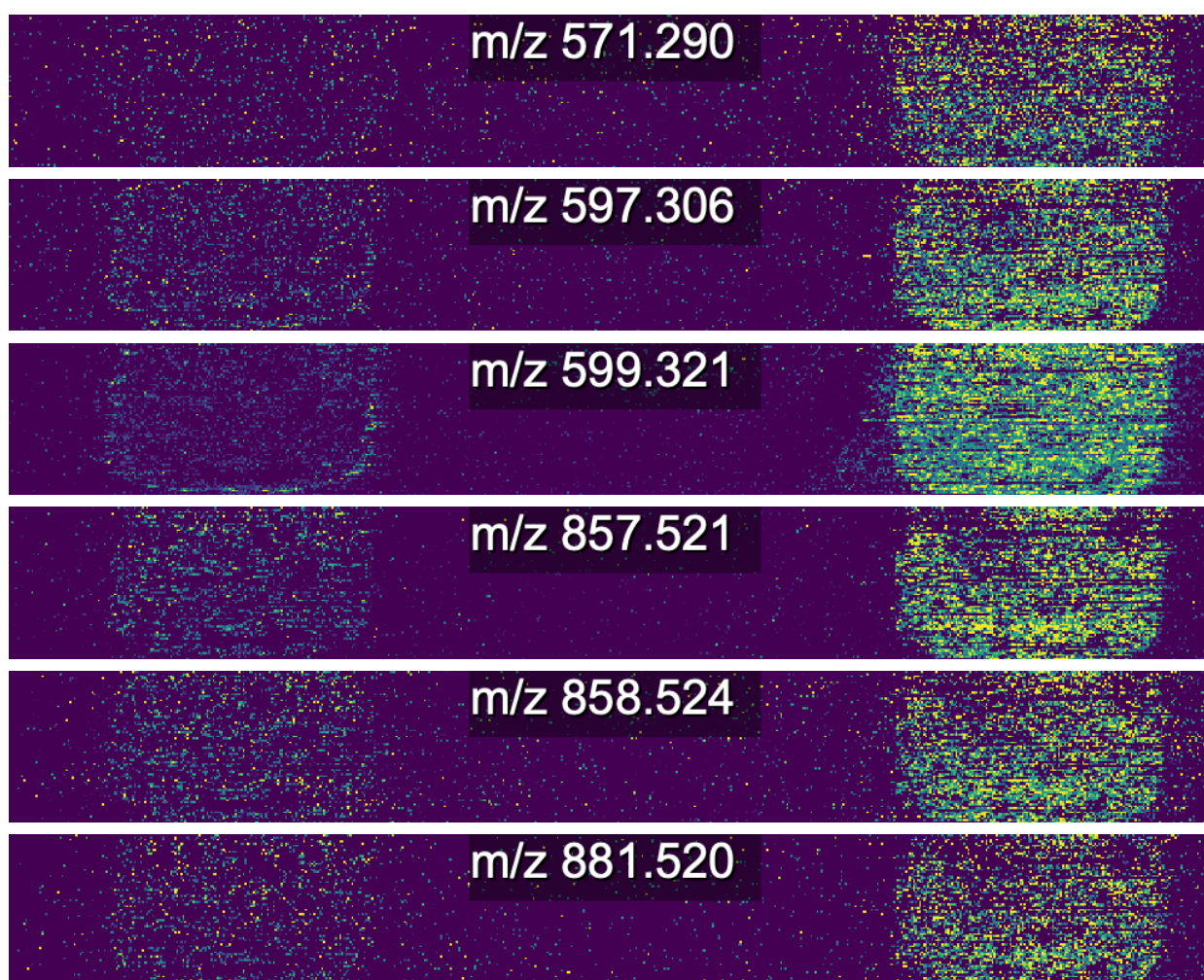


図 6-5 計測されたイオンイメージ



## 第7章 マウス脳切片の計測

### 第1節 試料の作製

工学研究科の新聞先生に提供いただいた凍結マウス脳組織 (Japan Bio Serum) を、クライオマイクロトームを用いて  $8\mu\text{m}$  の厚みに切片化し、乾燥状態で用いた。マウス脳組織は Deep freezer から取り出し、OCT でクライオマイクロトームに取り付けた。最も刃との接地面が短くなる位置を定めた。図 6-2 に試料の光学顕微鏡による観察結果を示す。



図 7-1 脳組織の切片化



図 7-2 光学顕微鏡像

### 第2節 実験方法

DMF と MeOH それぞれの純溶媒と、その体積比 1 : 1 混合溶媒を用いてマウス脳切片の質量分析イメージングを行った。また、正イオンモード、負イオンモード両方の計測を行った。共振周波数、電圧、振幅の条件は揃えて計測を行った。

### 第3節 解析方法

#### 7月の計測

##### 解析手順

- 3つ全てを同じプロジェクトファイルで開いた。
- それぞれの計測で組織の全体とガラス基盤を ROI として定めた。(計6つ)
- TIC で前処理を行い、ROI 平均のマススペクトルを得た。
- 閾値を 50 に設定し、それぞれの組織の ROI でピークピッキングを行った。
- ガラス基盤は 7500 ピークを得るように設定してピッキングした。
- ここで得られたピークリスト (MeOH:6868、DMF:5294、混合溶媒:6716) から、ガラス基盤のピークを削除した。
- 結果で得られた 3 つのピークリスト (MeOH:4900、DMF:3728、混合溶媒:4669) を合わせて重複を削除した (8716 種)
- LIPIDMAPS で LMSD 検索したものと COMP\_DB で検索したものを合算して使用した。
- 脂質の見え方で分けた 3 分類と、可視化できた溶媒で分けた 5 分類で、計 15 分類を目視で行った。

#### 1月の計測

##### 解析手順

1. 3つ全てを同じプロジェクトファイルで開いた。
2. それぞれ組織の全体を ROI として定めた。
3. 前処理は行わずに ROI 平均のマスペクトルを得た。
4. 平均して 1000 ピークを得るように閾値を定めたいので、MeOH のマスペクトルから、強いものから 1000 個のピークを選ぶように設定し、ピークピッキングを行った。
5. MeOH で 1000 をピッキングする閾値(ここでは 73.39128)を混合溶媒と DMF のマスペクトルにも適用してリストを得た。
6. ここで得られたピークリスト(MeOH:1000、DMF:946、混合溶媒 : 1385)の重複を削除して一つのリストにした。ここで得られたリストは 2206 種であった。
7. LIPIDMAPS で LMSD 検索したものを使用した。(773 種)
8. 脂質の見え方で分けた 3 分類と、可視化できた溶媒で分けた 5 分類で、計 15 分類を目視で行った。

## 第 4 節 実験結果

### 7 月の計測結果

**推定された脂質種の数** 混合溶媒で最も多くの脂質が検出された。また純溶媒では DMF の方が、脂質が多く検出された。LIPIDMAPS で推定された脂質種は 3 種類全て、混合溶媒のみ、混合溶媒と DMF のみ、DMF のみ、MeOH のみ、それぞれ 102 種、260 種、41 種、6 種、18 種であった。ここで、混合溶媒と MeOH のみ、DMF と MeOH のみで推定された脂質種はなかった。

**脂質種の分類** そして、混合溶媒で推定された 260 の脂質種を、組織内構造の見え方によって 3 つに分類した。①組織が均一に見える、②脳漿が強く見える、③脳漿と皮質脊髄路だけ見える、の 3 つである。また、その脂質の比率を比較した。①大脳、視床、視床下部では脂肪酸やセラミド類、グリセロリン脂質が多く分布していた。また、②③脳漿、皮質脊髄路ではグリセロール類が多く分布していた。さらに、純溶媒のみで検出された脂質についても検討した。DMF についてはステロール、MeOH については脂肪酸が多く分布していたが、どちらについてもイオン強度は低かった。

### 1 月の計測結果

**推定された脂質種の数** 混合溶媒で最も多くの脂質が検出された。また純溶媒では MeOH の方が、脂質が多く検出された。LIPIDMAPS で推定された脂質種は 3 種類全て、混合溶媒のみ、混合溶媒と DMF のみ、DMF のみ、混合溶媒と MeOH のみ、それぞれ 230 種、34 種、17 種、8 種、47 種であった。ここで、MeOH のみ、DMF と MeOH のみで推定された脂質種はなかった。

**脂質種の分類** そして、混合溶媒で推定された 338 の脂質を、組織内構造の見え方によって 3 つに分類した。その中で③の分類のみ、混合溶媒>DMF>MeOH の順で多くの脂質種が推定された。また、その脂質の比率を比較した。①②組織全体ではグリセロリン脂質が多く分布していた。また、③脳漿、皮質脊髄路では HexCer に代表されるスフィンゴ脂質が多く分布していた。

3種類全てで可視化された①のパターン(103種)

表 7-1

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
429.23792	429.2402	0.0022	ST 24:2;O4	C24H38O4K	[M+K]+
429.24081	429.2402	0.0006	ST 24:2;O4	C24H38O4K	[M+K]+
430.24311	430.2388	0.0043	NAT 18:0	C20H41NO4SK	[M+K]+
534.295	534.2956	0.0006	LPC 16:0	C24H50NO7PK	[M+K]+
552.27017	552.2698	0.0003	LPS O-17:0;O	C23H48NO9PK	[M+K]+
564.24769	564.2487	0.001	LPE 22:6	C27H44NO7PK	[M+K]+
576.26952	576.2698	0.0003	LPS 19:1	C25H48NO9PK	[M+K]+
586.51623	586.517	0.0007	Cer 36:2;O2	C36H69NO3Na	[M+Na]+
588.53117	588.5326	0.0014	Cer 36:1;O2	C36H71NO3Na	[M+Na]+
596.27477	596.2749	0.0001	PC 20:4	C28H48NO8PK	[M+K]+
597.27798	597.2799	0.0019	PA 25:4;O2	C28H47O10PNa	[M+Na]+
602.49033	602.4909	0.0006	Cer 36:2;O2	C36H69NO3K	[M+K]+
603.49407	603.4959	0.0018	DG 33:1	C36H68O5Na	[M+Na]+
604.50591	604.5065	0.0006	Cer 36:1;O2	C36H71NO3K	[M+K]+
605.50959	605.5115	0.002	DG 33:0	C36H70O5Na	[M+Na]+
688.39466	688.395	0.0004	LPS O-27:2;O	C33H64NO9PK	[M+K]+
688.39745	688.395	0.0024	LPS O-27:2;O	C33H64NO9PK	[M+K]+
688.39995	688.395	0.0049	LPS O-27:2;O	C33H64NO9PK	[M+K]+
731.60575	731.6061	0.0004	SM 36:1;O2	C41H83N2O6P	[M+H]+
734.56965	734.5694	0.0002	PE 35:0	C40H80NO8P	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
739.46722	739.4675	0.0002	PA 36:2	C39H73O8PK	[M+K]+
739.4686	739.4675	0.0011	PA 36:2	C39H73O8PK	[M+K]+
739.47265	739.4756	0.0029	PI O-28:1	C37H71O12P	[M+H]+
753.58591	753.5881	0.0022	SM 36:1;O2	C41H83N2O6PNa	[M+Na]+
754.53618	754.5357	0.0005	PC 32:1	C40H78NO8PNa	[M+Na]+
756.55138	756.5514	0	PC 32:0	C40H80NO8PNa	[M+Na]+
757.55433	757.5508	0.0035	PA O-38:0	C41H83O7PK	[M+K]+
768.55059	768.5514	0.0008	PE 36:1	C41H80NO8PNa	[M+Na]+
769.5602	769.562	0.0018	SM 36:1;O2	C41H83N2O6PK	[M+K]+
770.56534	770.567	0.0017	PC 33:0	C41H82NO8PNa	[M+Na]+
771.56482	771.5664	0.0016	PA O-39:0	C42H85O7PK	[M+K]+
772.525	772.5252	0.0002	PE O-38:6	C43H76NO7PNa	[M+Na]+
773.52805	773.5303	0.0023	PG 34:0	C40H79O10PNa	[M+Na]+
774.52899	774.528	0.001	PS 35:2	C41H76NO10P	[M+H]+
775.53089	775.5272	0.0037	PA 42:7	C45H75O8P	[M+H]+
775.5376	775.5355	0.0021	MGDG 36:6	C45H74O10	[M+H]+
782.56671	782.567	0.0003	PC 34:1	C42H82NO8PNa	[M+Na]+
783.56941	783.5664	0.003	PA O-40:1	C43H85O7PK	[M+K]+
783.5712	783.5664	0.0048	PA O-40:1	C43H85O7PK	[M+K]+
785.57856	785.5821	0.0035	PA O-40:0	C43H87O7PK	[M+K]+

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
785.58212	785.5821	0	PA O-40:0	C43H87O7PK	[M+K] <sup>+</sup>
802.47861	802.4784	0.0003	PC 35:6	C43H74NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
803.48265	803.4834	0.0007	PG 37:6	C43H73O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
804.55103	804.5514	0.0003	PC 36:4	C44H80NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
805.55414	805.5508	0.0033	PA O-42:4	C45H83O7PK	[M+K] <sup>+</sup>
806.50867	806.5097	0.001	PC 35:4	C43H78NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
806.56574	806.567	0.0013	PC 36:3	C44H82NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
806.56869	806.5694	0.0007	PC 38:6	C46H80NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
807.51222	807.5147	0.0024	PG 37:4	C43H77O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
807.51422	807.5147	0.0004	PG 37:4	C43H77O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
808.51319	808.5123	0.0009	PS 38:6	C44H74NO10P	[M+H] <sup>+</sup>
810.59701	810.5983	0.0013	PC 36:1	C44H86NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
810.59894	810.5983	0.0006	PC 36:1	C44H86NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
810.60199	810.6007	0.0013	PC 38:4	C46H84NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
811.60069	811.5977	0.0029	PA O-42:1	C45H89O7PK	[M+K] <sup>+</sup>
820.52474	820.5253	0.0006	PC 36:4	C44H80NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
821.52885	821.5303	0.0015	PG 38:4	C44H79O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
822.53164	822.528	0.0037	PS 39:6	C45H76NO10P	[M+H] <sup>+</sup>
828.55463	828.5538	0.0009	PC 40:9	C48H78NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
830.51368	830.5097	0.004	PC 37:6	C45H78NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
830.55594	830.5542	0.0018	PC 36:4;O3	C44H80NO11P	[M+H] <sup>+</sup>
831.51435	831.5147	0.0003	PG 39:6	C45H77O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
831.51718	831.5147	0.0025	PG 39:6	C45H77O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
831.55522	831.5512	0.004	PG 37:0	C43H85O10PK	[M+K] <sup>+</sup>
832.5164	832.5123	0.0041	PS 40:8	C46H74NO10P	[M+H] <sup>+</sup>
832.58111	832.5827	0.0016	PC 38:4	C46H84NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
834.58885	834.5937	0.0049	Hex2Cer 32:1;O2	C44H83NO13	[M+H] <sup>+</sup>
834.59803	834.5983	0.0003	PC 38:3	C46H86NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
844.52473	844.5253	0.0006	PC 38:6	C46H80NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
845.52832	845.5303	0.002	PG 40:6	C46H79O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
846.53024	846.5256	0.0047	PS 39:5	C45H78NO10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
846.53226	846.5372	0.0049	SHexCer 36:1;O3	C42H81NO12SNa	[M+Na] <sup>+</sup>
847.5337	847.5331	0.0006	PI 35:3	C44H79O13P	[M+H] <sup>+</sup>
848.55235	848.5566	0.0043	PC 38:4	C46H84NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
849.5587	849.5616	0.0029	PG 40:4	C46H83O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
850.56135	850.5593	0.0021	PS 41:6	C47H80NO10P	[M+H] <sup>+</sup>
851.56475	851.5644	0.0003	PI 35:1	C44H83O13P	[M+H] <sup>+</sup>
852.53132	852.5361	0.0048	PC 36:4;O3	C44H80NO11PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
854.56248	854.567	0.0045	PC 40:7	C48H82NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
854.5672	854.5672	0	PS O-39:2	C45H86NO9PK	[M+K] <sup>+</sup>

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
856.58014	856.5827	0.0025	PC 40:6	C48H84NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
858.58859	858.5913	0.0027	Hex2Cer 32:0;O2	C44H85NO13Na	[M+Na] <sup>+</sup>
859.64651	859.6423	0.0043	PG 42:2	C48H91O10P	[M+H] <sup>+</sup>
860.5251	860.5202	0.0049	PS O-40:6	C46H80NO9PK	[M+K] <sup>+</sup>
863.52469	863.5199	0.0048	PG 40:5	C46H81O10PK	[M+K] <sup>+</sup>
868.51474	868.5101	0.0047	PC 36:4;O3	C44H80NO11PK	[M+K] <sup>+</sup>
869.51729	869.5175	0.0002	PI 37:6	C46H77O13P	[M+H] <sup>+</sup>
869.51964	869.5175	0.0022	PI 37:6	C46H77O13P	[M+H] <sup>+</sup>
870.53991	870.541	0.0011	PC 40:7	C48H82NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
870.54154	870.541	0.0006	PC 40:7	C48H82NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
871.54482	871.546	0.0011	PG 42:7	C48H81O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
871.54653	871.546	0.0006	PG 42:7	C48H81O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
872.55463	872.5566	0.002	PC 40:6	C48H84NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
873.55801	873.5616	0.0036	PG 42:6	C48H83O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
878.50536	878.5097	0.0043	PE 44:10	C49H78NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
878.51256	878.5097	0.0029	PE 44:10	C49H78NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
880.50827	880.5099	0.0016	PS 42:9	C48H76NO10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
881.56769	881.5668	0.0008	PG 41:3	C47H87O10PK	[M+K] <sup>+</sup>
882.641	882.6431	0.0021	HexCer 42:1;O4	C48H93NO10K	[M+K] <sup>+</sup>
882.64253	882.6431	0.0006	HexCer 42:1;O4	C48H93NO10K	[M+K] <sup>+</sup>
897.54912	897.5488	0.0004	PI 39:6	C48H81O13P	[M+H] <sup>+</sup>
897.5506	897.5488	0.0018	PI 39:6	C48H81O13P	[M+H] <sup>+</sup>
910.67121	910.6744	0.0032	HexCer 44:1;O4	C50H97NO10K	[M+K] <sup>+</sup>

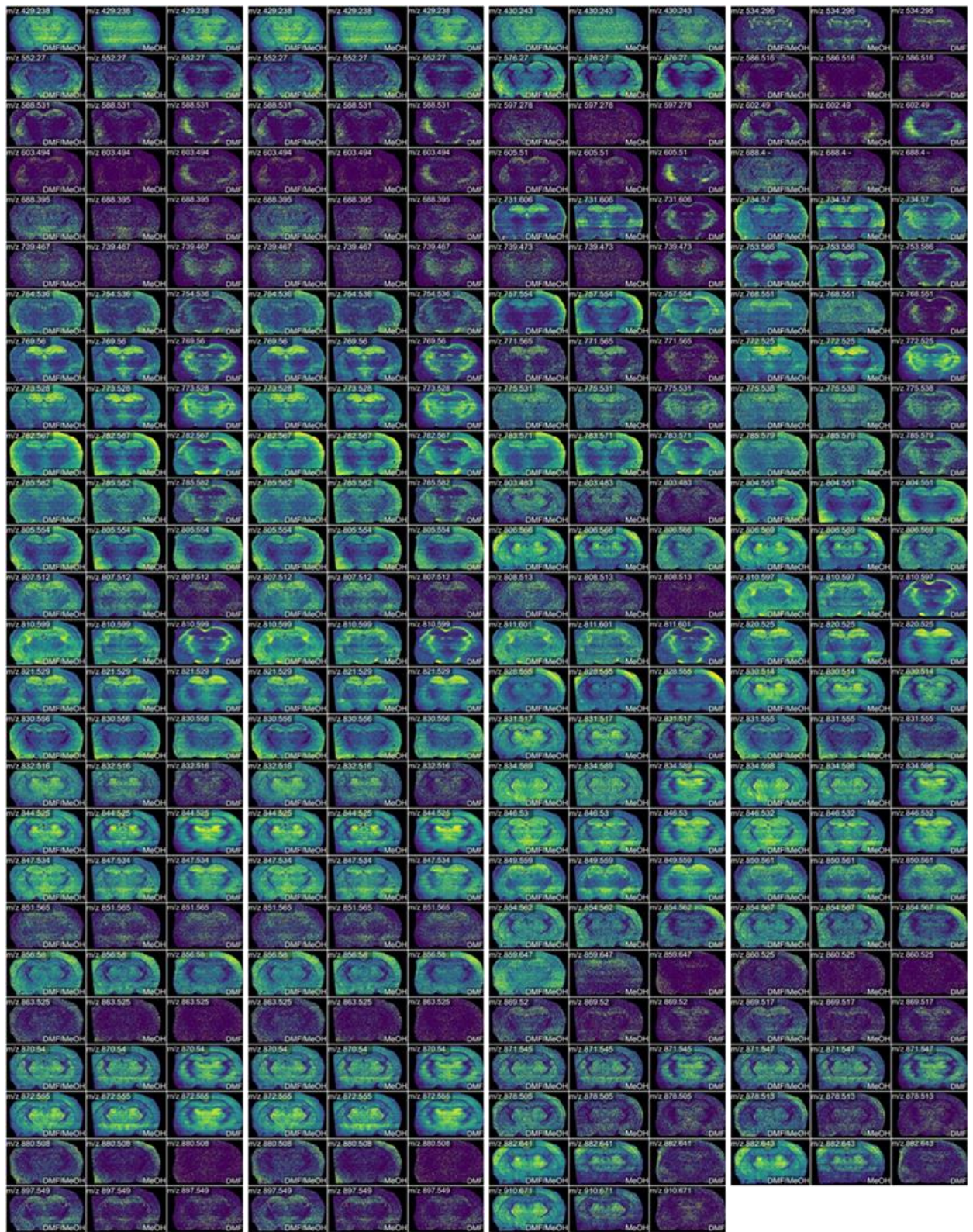


图 7-3

3種類全てで可視化された②のパターン(18種)

表 7-2

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
769.52144	769.5225	0.0011	PI O-30:0	C39H77O12P	[M+H] <sup>+</sup>
779.55967	779.5586	0.001	TG 44:5	C47H80O6K	[M+K] <sup>+</sup>
779.56829	779.5668	0.0015	MGDG 36:4	C45H78O10	[M+H] <sup>+</sup>
779.57047	779.5668	0.0037	MGDG 36:4	C45H78O10	[M+H] <sup>+</sup>
786.60043	786.6007	0.0003	PC 36:2	C44H84NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
788.5025	788.4991	0.0034	PE O-38:6	C43H76NO7PK	[M+K] <sup>+</sup>
788.6164	788.6164	0	PC 36:1	C44H86NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
789.50458	789.5042	0.0003	PG 34:0	C40H79O10PK	[M+K] <sup>+</sup>
796.52704	796.5253	0.0017	PC 34:2	C42H80NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
797.53125	797.5303	0.0009	PG 36:2	C42H79O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
807.63309	807.635	0.002	SM 40:2;O2	C45H89N2O6PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
812.60188	812.6012	0.0006	HexCer 38:0;O3	C44H87NO9K	[M+K] <sup>+</sup>
816.53275	816.5304	0.0024	PE O-40:6	C45H80NO7PK	[M+K] <sup>+</sup>
824.556	824.5566	0.0006	PC 36:2	C44H84NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
825.5605	825.5616	0.0011	PG 38:2	C44H83O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
826.57136	826.5721	0.0007	PE O-42:7	C47H82NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
827.57484	827.5773	0.0024	PG 38:1	C44H85O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
862.67204	862.6742	0.0022	HexCer 43:2;O3	C49H93NO9Na	[M+Na] <sup>+</sup>

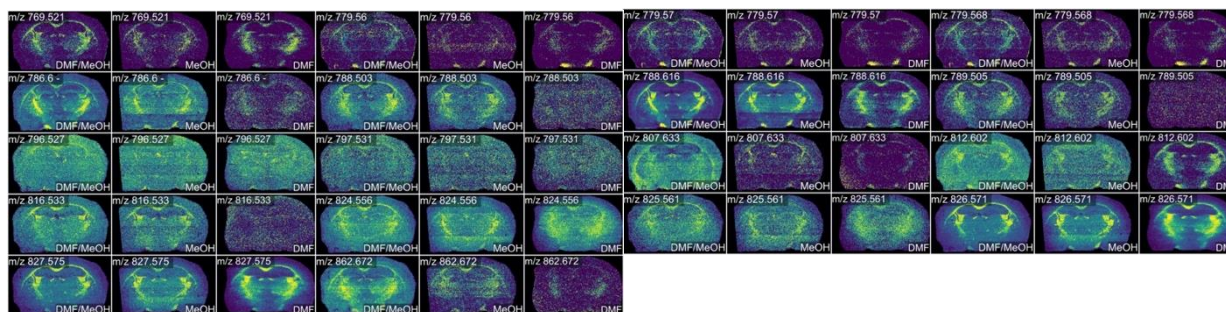


図 7-4

3種類全てで可視化された③のパターン(119種)

表 7-3

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
370.29281	370.2952	0.0024	CAR 14:1	C21H39NO4	[M+H] <sup>+</sup>
372.31022	372.3108	0.0006	CAR 14:0	C21H41NO4	[M+H] <sup>+</sup>
373.31413	373.3101	0.004	FA 25:5	C25H40O2	[M+H] <sup>+</sup>
398.32602	398.3265	0.0005	CAR 16:1	C23H43NO4	[M+H] <sup>+</sup>
400.34109	400.3421	0.001	CAR 16:0	C23H45NO4	[M+H] <sup>+</sup>
401.34535	401.3414	0.004	ST 27:2;O2	C27H44O2	[M+H] <sup>+</sup>
426.35718	426.3578	0.0006	CAR 18:1	C25H47NO4	[M+H] <sup>+</sup>
427.36019	427.3571	0.0031	ST 29:3;O2	C29H46O2	[M+H] <sup>+</sup>
428.37246	428.3734	0.001	CAR 18:0	C25H49NO4	[M+H] <sup>+</sup>
445.27114	445.2713	0.0002	ST 28:6;O3	C28H38O3Na	[M+Na] <sup>+</sup>
445.27388	445.2715	0.0024	ST 25:1;O4	C25H42O4K	[M+K] <sup>+</sup>
547.26153	547.2643	0.0027	PA 21:1;O2	C24H45O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
558.316	558.3166	0.0006	PC 18:1	C26H50NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
574.29087	574.2906	0.0003	PC 18:1	C26H50NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
606.29767	606.2956	0.002	LPC 22:6	C30H50NO7PK	[M+K] <sup>+</sup>
617.51008	617.5115	0.0015	DG 34:1	C37H70O5Na	[M+Na] <sup>+</sup>
633.48488	633.4854	0.0005	PA O-32:1	C35H69O7P	[M+H] <sup>+</sup>
639.49165	639.4959	0.0042	DG 36:4	C39H68O5Na	[M+Na] <sup>+</sup>
655.47037	655.4698	0.0005	DG 36:4	C39H68O5K	[M+K] <sup>+</sup>
657.4823	657.483	0.0007	PA O-32:0	C35H71O7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
659.49991	659.501	0.0011	PA O-34:2	C37H71O7P	[M+H] <sup>+</sup>
661.51615	661.5167	0.0005	PA O-34:1	C37H73O7P	[M+H] <sup>+</sup>
666.49498	666.4915	0.0034	HexCer 30:1;O2	C36H69NO8Na	[M+Na] <sup>+</sup>
679.46893	679.4697	0.0008	PA O-36:6	C39H67O7P	[M+H] <sup>+</sup>
681.48082	681.483	0.0021	PA O-34:2	C37H71O7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
681.48436	681.4854	0.001	PA O-36:5	C39H69O7P	[M+H] <sup>+</sup>
683.50036	683.501	0.0007	PA O-36:4	C39H71O7P	[M+H] <sup>+</sup>
686.51131	686.5119	0.0006	PE O-33:3	C38H72NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
687.53187	687.5323	0.0004	PA O-36:2	C39H75O7P	[M+H] <sup>+</sup>
689.54303	689.548	0.0049	PA O-36:1	C39H77O7P	[M+H] <sup>+</sup>
694.52574	694.5228	0.0029	HexCer 32:1;O2	C38H73NO8Na	[M+Na] <sup>+</sup>
707.4996	707.4986	0.001	PA O-36:3	C39H73O7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
709.51088	709.5143	0.0034	PA O-36:2	C39H75O7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
711.53294	711.5324	0.0005	DG 40:4	C43H76O5K	[M+K] <sup>+</sup>
711.53826	711.5411	0.0029	SM 33:1;O2	C38H77N2O6PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
739.56661	739.5637	0.0029	DG 42:4	C45H80O5K	[M+K] <sup>+</sup>
741.48668	741.4831	0.0036	PA 36:1	C39H75O8PK	[M+K] <sup>+</sup>
744.592	744.5902	0.0018	PC O-34:2	C42H82NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
746.60699	746.6058	0.0012	PC O-34:1	C42H84NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
750.58369	750.5854	0.0017	HexCer 36:1;O2	C42H81NO8Na	[M+Na] <sup>+</sup>



Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
750.58555	750.5854	0.0001	HexCer 36:1;O2	C42H81NO8Na	[M+Na]+
766.51897	766.523	0.004	HexCer 35:2;O3	C41H77NO9K	[M+K]+
766.52336	766.523	0.0004	HexCer 35:2;O3	C41H77NO9K	[M+K]+
766.56181	766.5594	0.0024	HexCer 36:1;O2	C42H81NO8K	[M+K]+
767.50477	767.5069	0.0021	PI O-30:1	C39H75O12P	[M+H]+
794.59846	794.6034	0.0049	PC O-36:2	C44H86NO7PNa	[M+Na]+
795.53883	795.5383	0.0005	MGDG 34:1	C43H80O10K	[M+K]+
795.54734	795.551	0.0037	PG O-37:3	C43H81O9PNa	[M+Na]+
795.55467	795.551	0.0036	PG O-37:3	C43H81O9PNa	[M+Na]+
796.62363	796.6215	0.0022	PC O-38:4	C46H86NO7P	[M+H]+
800.65613	800.6528	0.0034	PC O-38:2	C46H90NO7P	[M+H]+
800.66221	800.661	0.0012	HexCer 40:1;O3	C46H89NO9	[M+H]+
804.6336	804.6324	0.0012	HexCer 40:2;O2	C46H87NO8Na	[M+Na]+
805.63745	805.6341	0.0034	TG 49:8	C52H84O6	[M+H]+
806.64902	806.648	0.001	HexCer 40:1;O2	C46H89NO8Na	[M+Na]+
808.65995	808.6637	0.0037	HexCer 40:0;O2	C46H91NO8Na	[M+Na]+
813.68262	813.6844	0.0018	SM 42:2;O2	C47H93N2O6P	[M+H]+
814.62733	814.632	0.0047	PC 38:2	C46H88NO8P	[M+H]+
814.62856	814.632	0.0035	PC 38:2	C46H88NO8P	[M+H]+
816.64714	816.6477	0.0005	PC 38:1	C46H90NO8P	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
820.60919	820.6063	0.0029	HexCer 40:2;O2	C46H87NO8K	[M+K]+
820.61418	820.6191	0.0049	PC O-38:3	C46H88NO7PNa	[M+Na]+
820.65928	820.6637	0.0044	HexCer 41:1;O2	C47H91NO8Na	[M+Na]+
820.6622	820.6637	0.0015	HexCer 41:1;O2	C47H91NO8Na	[M+Na]+
821.62185	821.6266	0.0048	PG 39:0	C45H89O10P	[M+H]+
821.63026	821.6266	0.0037	PG 39:0	C45H89O10P	[M+H]+
822.63756	822.6371	0.0004	PC O-40:5	C48H88NO7P	[M+H]+
824.64571	824.6504	0.0046	PC O-38:1	C46H92NO7PNa	[M+Na]+
825.62563	825.6246	0.001	SM 40:1;O2	C45H91N2O6PK	[M+K]+
825.62814	825.6246	0.0035	SM 40:1;O2	C45H91N2O6PK	[M+K]+
828.69557	828.6923	0.0033	HexCer 42:1;O3	C48H93NO9	[M+H]+
831.65423	831.6497	0.0045	TG 51:9	C54H86O6	[M+H]+
832.66301	832.6637	0.0007	HexCer 42:2;O2	C48H91NO8Na	[M+Na]+
833.64807	833.6507	0.0026	SM 42:3;O2	C47H91N2O6PNa	[M+Na]+
833.65982	833.663	0.0031	TG 49:5	C52H90O6Na	[M+Na]+
833.66713	833.6654	0.0018	TG 51:8	C54H88O6	[M+H]+
834.6546	834.6582	0.0036	PS O-40:0	C46H92NO9P	[M+H]+
836.5983	836.6012	0.0029	HexCer 40:2;O3	C46H87NO9K	[M+K]+
836.60391	836.6012	0.0027	HexCer 40:2;O3	C46H87NO9K	[M+K]+
836.60999	836.6094	0.0006	Hex2Cer 32:0;O2	C44H85NO13	[M+H]+

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
838.61716	838.6169	0.0003	HexCer 40:1;O3	C46H89NO9K	[M+K] <sup>+</sup>
839.61897	839.616	0.0029	PG O-42:5	C48H87O9P	[M+H] <sup>+</sup>
840.62388	840.6243	0.0004	PC O-38:1	C46H92NO7PK	[M+K] <sup>+</sup>
841.62836	841.6293	0.0009	PG O-40:1	C46H91O9PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
842.62808	842.6245	0.0035	PS O-39:0	C45H90NO9PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
846.6235	846.6219	0.0016	PS 40:1	C46H88NO10P	[M+H] <sup>+</sup>
848.63817	848.6376	0.0005	HexCer 42:2;O2	C48H91NO8K	[M+K] <sup>+</sup>
848.64061	848.6376	0.003	HexCer 42:2;O2	C48H91NO8K	[M+K] <sup>+</sup>
849.64168	849.6369	0.0048	TG 49:5	C52H90O6K	[M+K] <sup>+</sup>
850.65185	850.6533	0.0014	HexCer 42:1;O2	C48H93NO8K	[M+K] <sup>+</sup>
851.64444	851.6403	0.0042	SM 42:2;O2	C47H93N2O6PK	[M+K] <sup>+</sup>
851.64883	851.6525	0.0037	TG 49:4	C52H92O6K	[M+K] <sup>+</sup>
852.58765	852.5879	0.0003	PC 38:2	C46H88NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
852.58986	852.5879	0.002	PC 38:2	C46H88NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
853.58931	853.5929	0.0036	PG 40:2	C46H87O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
854.60476	854.6036	0.0012	PC 38:1	C46H90NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
854.60829	854.6118	0.0035	HexCer 40:1;O4	C46H89NO10K	[M+K] <sup>+</sup>
854.63902	854.6399	0.0009	PC O-39:1	C47H94NO7PK	[M+K] <sup>+</sup>
854.64413	854.6399	0.0042	PC O-39:1	C47H94NO7PK	[M+K] <sup>+</sup>
855.60974	855.611	0.0012	PG 42:4	C48H87O10P	[M+H] <sup>+</sup>

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
864.6324	864.6325	0.0001	HexCer 36:1;O	C48H91NO9K	[M+K] <sup>+</sup>
864.63394	864.6325	0.0014	HexCer 36:1;O	C48H91NO9K	[M+K] <sup>+</sup>
865.63635	865.6317	0.0047	TG 52:10	C55H86O6Na	[M+Na] <sup>+</sup>
866.64559	866.6482	0.0026	HexCer 42:1;O3	C48H93NO9K	[M+K] <sup>+</sup>
867.63698	867.6321	0.0049	PI O-37:0	C46H91O12P	[M+H] <sup>+</sup>
867.64851	867.6497	0.0012	TG 54:12	C57H86O6	[M+H] <sup>+</sup>
868.63704	868.6402	0.0031	PS O-41:1	C47H92NO9PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
868.65187	868.6556	0.0037	PC O-40:1	C48H96NO7PK	[M+K] <sup>+</sup>
872.72038	872.7185	0.0019	HexCer 44:1;O4	C50H97NO10	[M+H] <sup>+</sup>
876.67266	876.6689	0.0037	HexCer 44:2;O2	C50H95NO8K	[M+K] <sup>+</sup>
876.67874	876.6817	0.0029	PC O-42:3	C50H96NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
878.64814	878.6482	0	HexCer 43:2;O3	C49H93NO9K	[M+K] <sup>+</sup>
878.65259	878.6482	0.0044	HexCer 43:2;O3	C49H93NO9K	[M+K] <sup>+</sup>
880.61946	880.6192	0.0003	PC 40:2	C48H92NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
880.62357	880.6192	0.0044	PC 40:2	C48H92NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
880.64495	880.6402	0.0048	PS O-42:2	C48H92NO9PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
898.6274	898.6296	0.0022	PC 43:6	C51H90NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
898.62901	898.6296	0.0006	PC 43:6	C51H90NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
912.61826	912.6205	0.0022	SHexCer 42:2;O2	C48H91NO11SNa	[M+Na] <sup>+</sup>

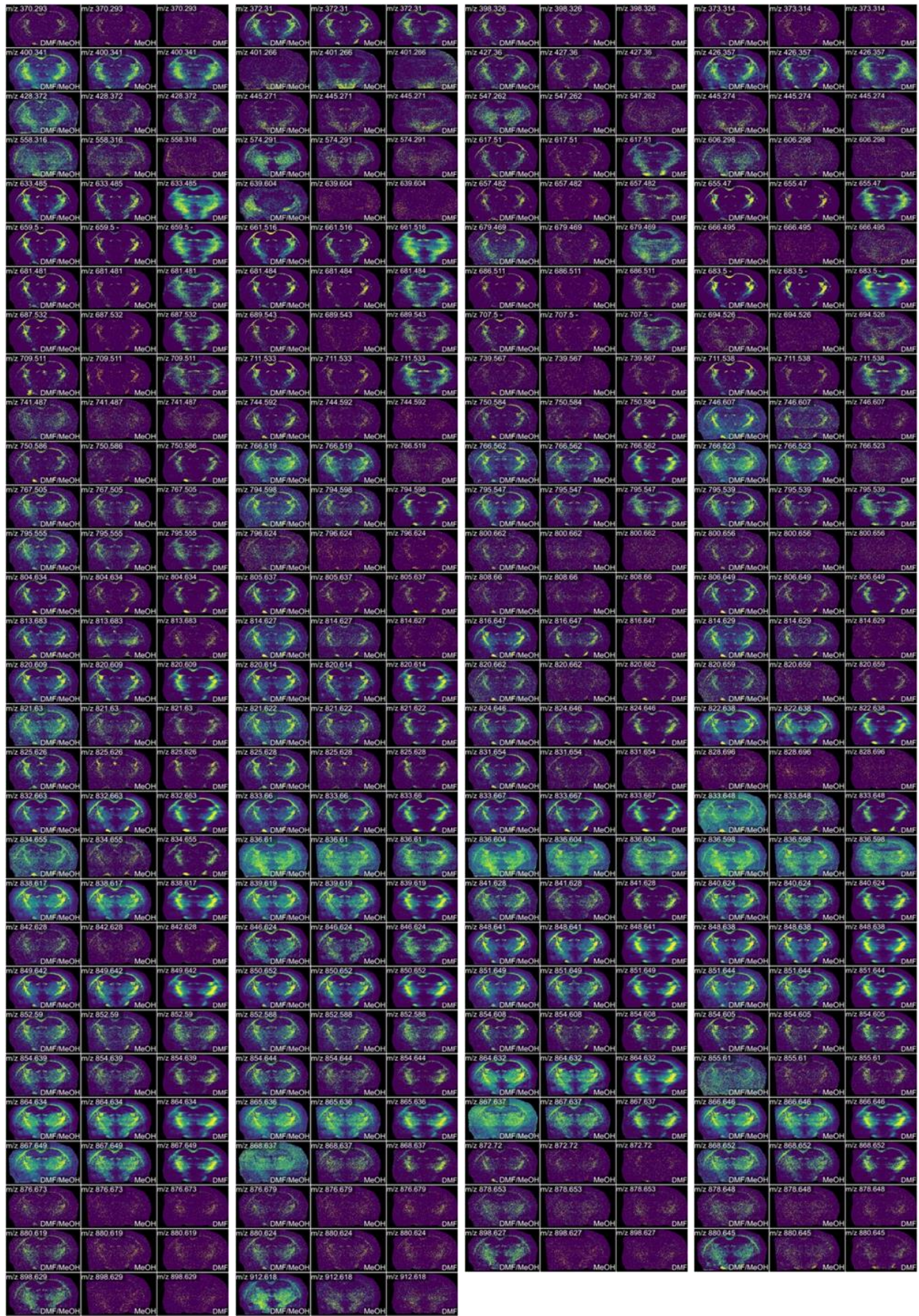


图 7-5

混合溶媒のみで可視化された①のパターン(17種)

表 7-4

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
555.2914	555.2928	0.0014	ST 30:5;O8	C30H44O8Na	[M+Na] <sup>+</sup>
629.35606	629.3579	0.0019	PA 28:1	C31H59O8PK	[M+K] <sup>+</sup>
648.32789	648.3273	0.0006	PC 21:1;O2	C29H56NO10PK	[M+K] <sup>+</sup>
674.34583	674.343	0.0028	PC 23:2;O2	C31H58NO10PK	[M+K] <sup>+</sup>
676.35839	676.3586	0.0003	PS 25:0	C31H60NO10PK	[M+K] <sup>+</sup>
677.34726	677.3427	0.0046	PG 25:1;O	C31H59O11PK	[M+K] <sup>+</sup>
704.39009	704.3899	0.0002	PC 25:1;O2	C33H64NO10PK	[M+K] <sup>+</sup>
725.51086	725.5116	0.0007	PA 38:4	C41H73O8P	[M+H] <sup>+</sup>
725.51506	725.5116	0.0035	PA 38:4	C41H73O8P	[M+H] <sup>+</sup>
866.69386	866.6973	0.0034	PC O-41:1	C49H98NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
868.58199	868.5827	0.0007	PC 41:7	C49H84NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
905.62247	905.6242	0.0017	PG 44:4	C50H91O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
905.62379	905.6242	0.0004	PG 44:4	C50H91O10PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
930.6256	930.6278	0.0022	Hex2Cer 36:0;O2	C48H93NO13K	[M+K] <sup>+</sup>
931.63065	931.627	0.0036	PI 41:3	C50H91O13P	[M+H] <sup>+</sup>
934.66251	934.6662	0.0037	PC 44:3	C52H98NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
957.64658	957.6427	0.0039	PI 43:4	C52H93O13P	[M+H] <sup>+</sup>

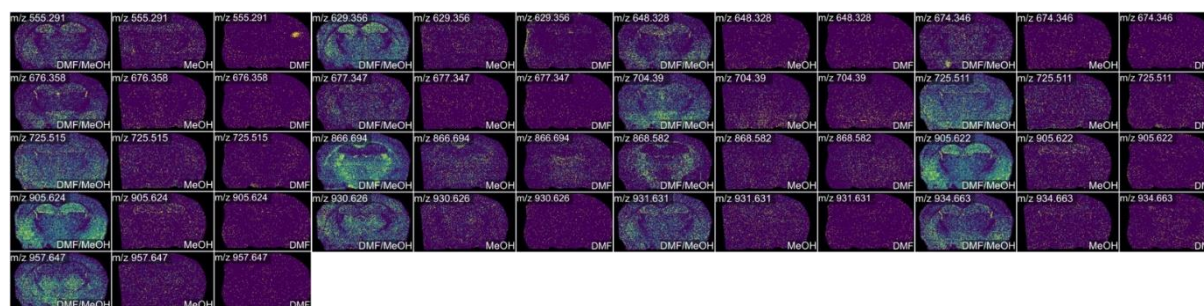


図 7-6

混合溶媒のみで可視化された②のパターン(7種)

表 7-5

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
531.28843	531.2847	0.0037	LPA 22:1	C25H49O7PK	[M+K] <sup>+</sup>
738.50358	738.5044	0.0008	PC 31:2	C39H74NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
774.59942	774.6007	0.0013	PC 35:1	C43H84NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
774.60515	774.6007	0.0044	PC 35:1	C43H84NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
847.68448	847.681	0.0035	TG 52:8	C55H90O6	[M+H] <sup>+</sup>
866.70075	866.6973	0.0034	PC O-41:1	C49H98NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
884.58256	884.5777	0.0048	PS 40:1	C46H88NO10PK	[M+K] <sup>+</sup>

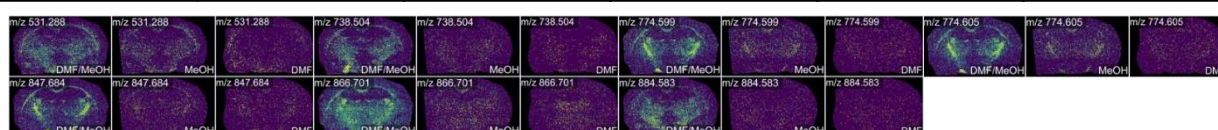


図 7-7

混合溶媒のみで可視化された③のパターン(10種)

表 7-6

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
772.62265	772.6215	0.0012	PC O-36:2	C44H86NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
772.63254	772.6297	0.0028	HexCer 38:1;O3	C44H85NO9	[M+H] <sup>+</sup>
774.63752	774.6371	0.0004	PC O-36:1	C44H88NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
774.64709	774.6454	0.0017	HexCer 38:0;O3	C44H87NO9	[M+H] <sup>+</sup>
802.6357	802.632	0.0037	PC 37:1	C45H88NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
815.69579	815.7	0.0043	SM 42:1;O2	C47H95N2O6P	[M+H] <sup>+</sup>
844.68596	844.6872	0.0013	HexCer 42:1;O4	C48H93NO10	[M+H] <sup>+</sup>
870.69445	870.6946	0.0002	PC 42:2	C50H96NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
875.71654	875.7123	0.0042	TG 54:8	C57H94O6	[M+H] <sup>+</sup>
877.68725	877.6892	0.002	PG 43:0	C49H97O10P	[M+H] <sup>+</sup>

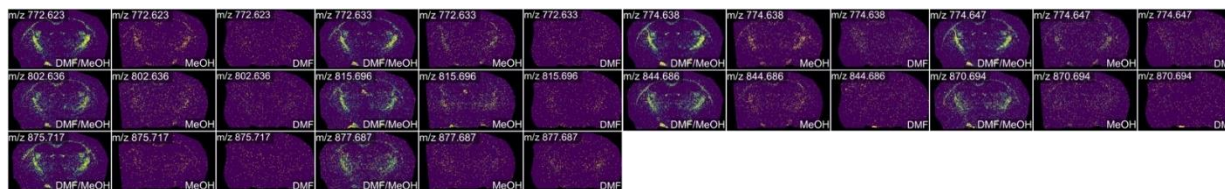


図 7-8

混合溶媒と DMF のみで可視化された①のパターン(6種)

表 7-7

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
383.31293	383.3132	0.0002	MG O-18:0;O	C21H44O4Na	[M+Na] <sup>+</sup>
399.28645	399.287	0.0005	MG O-21:5	C24H40O3Na	[M+Na] <sup>+</sup>
808.57415	808.5699	0.0042	HexCer 38:2;O3	C44H83NO9K	[M+K] <sup>+</sup>
808.57958	808.5827	0.0031	PC 36:2	C44H84NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
809.57807	809.5821	0.004	PA O-42:2	C45H87O7PK	[M+K] <sup>+</sup>
809.58497	809.5821	0.0029	PA O-42:2	C45H87O7PK	[M+K] <sup>+</sup>

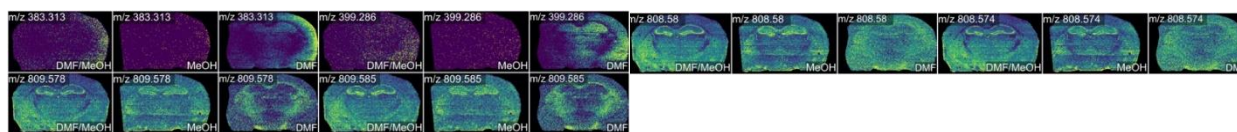


図 7-9

混合溶媒と DMF のみで可視化された②のパターン(0 種)

混合溶媒と DMF のみで可視化された③のパターン(11 種)

表 7-8

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
605.45306	605.4541	0.001	PA O-30:1	C33H65O7P	[M+H] <sup>+</sup>
607.46869	607.4697	0.001	PA O-30:0	C33H67O7P	[M+H] <sup>+</sup>
619.5104	619.5062	0.0042	DG O-34:1	C37H72O4K	[M+K] <sup>+</sup>
631.46904	631.4697	0.0007	PA O-32:2	C35H67O7P	[M+H] <sup>+</sup>
636.49607	636.4963	0.0002	LPE O-29:1;O	C34H70NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
686.58489	686.5848	0.0001	Cer 42:2;O2	C42H81NO3K	[M+K] <sup>+</sup>
696.5387	696.5385	0.0002	HexCer 32:0;O2	C38H75NO8Na	[M+Na] <sup>+</sup>
708.50413	708.5021	0.002	HexCer 32:2;O3	C38H71NO9Na	[M+Na] <sup>+</sup>
710.51302	710.5095	0.0035	PC O-30:2	C38H74NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
713.54096	713.5456	0.0046	PA O-36:0	C39H79O7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
715.56286	715.5636	0.0008	PA O-38:2	C41H79O7P	[M+H] <sup>+</sup>

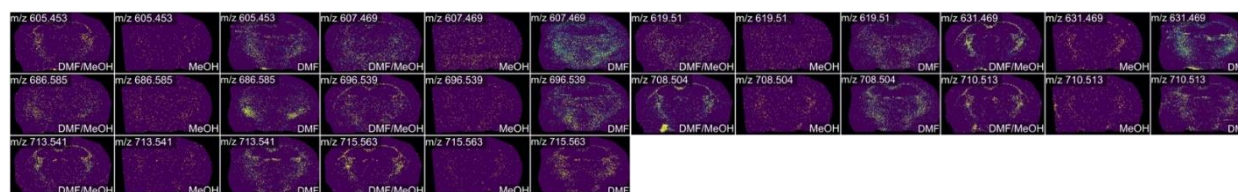


図 7-10

DMF のみで可視化された①のパターン(7 種)

表 7-9

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
325.27085	325.2737	0.0029	FA 20:2;O	C20H36O3	[M+H] <sup>+</sup>
369.27603	369.2764	0.0004	FA 23:4	C23H38O2Na	[M+Na] <sup>+</sup>
369.29597	369.2975	0.0016	MG O-17:0;O	C20H42O4Na	[M+Na] <sup>+</sup>
411.34367	411.3445	0.0008	MG O-20:0;O	C23H48O4Na	[M+Na] <sup>+</sup>
427.31787	427.3183	0.0004	ST 26:1;O3	C26H44O3Na	[M+Na] <sup>+</sup>
442.24317	442.2388	0.0044	NAT 19:1	C21H41NO4SK	[M+K] <sup>+</sup>
902.65663	902.6609	0.0043	PC 43:4	C51H94NO8PNa	[M+Na] <sup>+</sup>

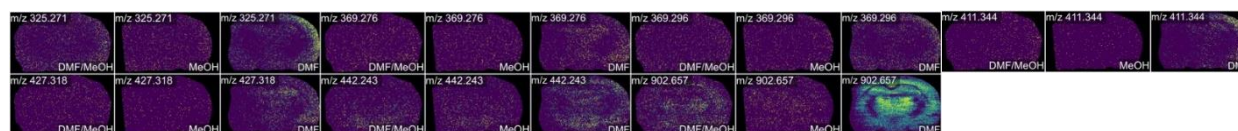


図 7-11

DMF のみで可視化された②のパターン(0 種)

DMF のみで可視化された③のパターン(1 種)

表 7-10

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
632.53707	632.5378	0.0008	Cer 38:1;O2	C38H75NO3K	[M+K] <sup>+</sup>

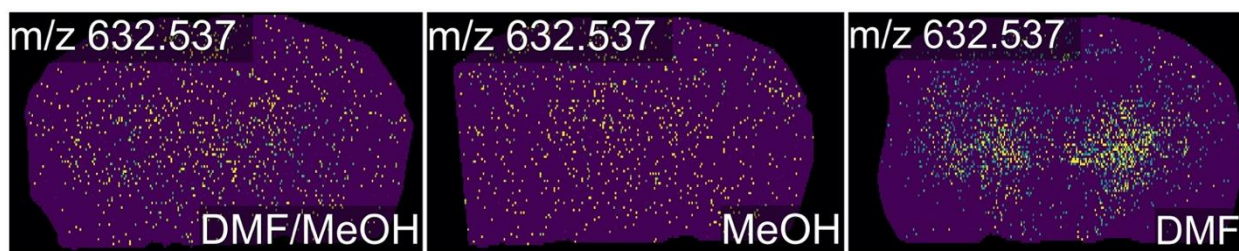


図 7-12

混合溶媒と MeOH のみで可視化された①のパターン(32 種)

表 7-11

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
518.32179	518.3217	0.0001	LPC 16:0	C24H50NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
720.59025	720.5903	0	Cer 42:1;O4	C42H83NO5K	[M+K] <sup>+</sup>
733.61424	733.6107	0.0036	DG 41:0	C44H86O5K	[M+K] <sup>+</sup>
736.57438	736.5698	0.0046	HexCer 35:1;O2	C41H79NO8Na	[M+Na] <sup>+</sup>
748.52837	748.5276	0.0008	PE O-38:7	C43H74NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
749.52852	749.5327	0.0042	PG 34:1	C40H77O10P	[M+H] <sup>+</sup>
755.58969	755.5925	0.0028	PA O-39:0	C42H85O7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
755.59393	755.595	0.0011	DG 43:3	C46H84O5K	[M+K] <sup>+</sup>
764.5227	764.5225	0.0002	PC 35:6	C43H74NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
776.55726	776.5565	0.0008	PC O-35:4	C43H80NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
777.54797	777.5487	0.0007	MGDG 34:2	C43H78O10Na	[M+Na] <sup>+</sup>
777.56203	777.564	0.002	PG 36:1	C42H81O10P	[M+H] <sup>+</sup>
792.553	792.5538	0.0008	PC 37:6	C45H78NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
793.55895	793.562	0.0031	SM 38:3;O2	C43H83N2O6PK	[M+K] <sup>+</sup>
810.64017	810.6371	0.0031	PE O-42:4	C47H88NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
810.64183	810.6371	0.0047	PE O-42:4	C47H88NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
828.69054	828.6923	0.0018	HexCer 42:1;O3	C48H93NO9	[M+H] <sup>+</sup>
883.64115	883.6423	0.0011	PG 44:4	C50H91O10P	[M+H] <sup>+</sup>
883.64553	883.6423	0.0033	PG 44:4	C50H91O10P	[M+H] <sup>+</sup>
884.65032	884.6505	0.0002	PC 40:0	C48H96NO8PK	[M+K] <sup>+</sup>
896.48327	896.4838	0.0006	PS 42:9	C48H76NO10PK	[M+K] <sup>+</sup>
896.4853	896.4838	0.0015	PS 42:9	C48H76NO10PK	[M+K] <sup>+</sup>
897.4858	897.489	0.0032	PI 36:4	C45H79O13PK	[M+K] <sup>+</sup>
907.58099	907.5825	0.0015	PG 43:4	C49H89O10PK	[M+K] <sup>+</sup>
909.52388	909.5254	0.0015	PI O-38:5	C47H83O12PK	[M+K] <sup>+</sup>
913.63311	913.6294	0.0037	PG 43:1	C49H95O10PK	[M+K] <sup>+</sup>
914.63788	914.6362	0.0017	SHexCer 42:1;O2	C48H93NO11SNa	[M+Na] <sup>+</sup>
915.64812	915.6473	0.0008	TG 56:13	C59H88O6Na	[M+Na] <sup>+</sup>
925.52064	925.5203	0.0004	PI 38:4	C47H83O13PK	[M+K] <sup>+</sup>
925.52291	925.5203	0.0026	PI 38:4	C47H83O13PK	[M+K] <sup>+</sup>
930.62286	930.6278	0.005	Hex2Cer 36:0;O2	C48H93NO13K	[M+K] <sup>+</sup>
941.6673	941.663	0.0043	TG 58:14	C61H90O6Na	[M+Na] <sup>+</sup>

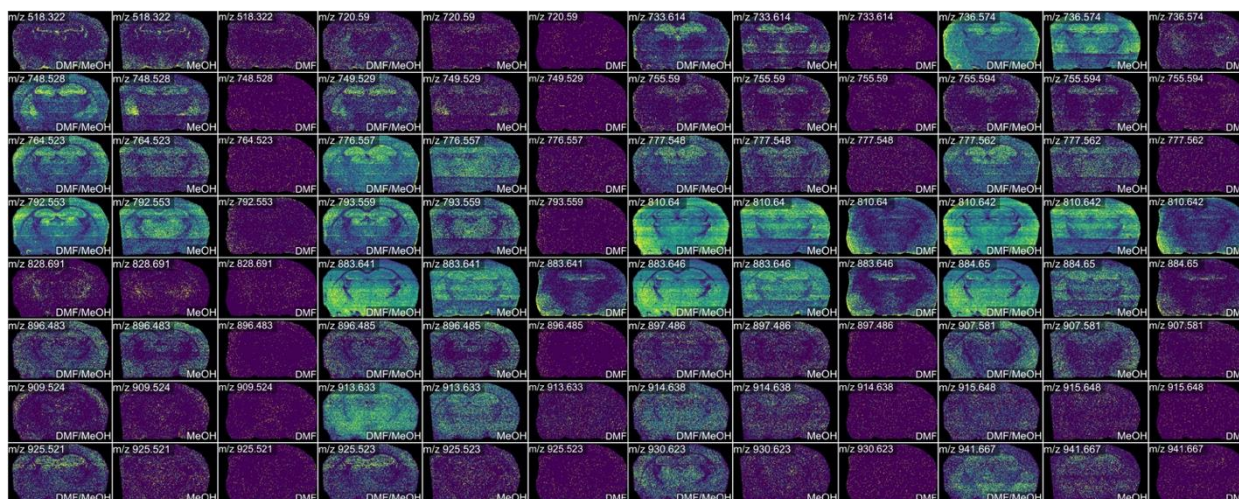


図 7-13

混合溶媒と MeOH のみで可視化された②のパターン(12種)

表 7-12

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
706.5393	706.5381	0.0012	PC 30:0	C38H76NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
724.52585	724.5252	0.0007	PC O-31:2	C39H76NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
732.55226	732.5538	0.0015	PC 32:1	C40H78NO8P	[M+H] <sup>+</sup>
750.5383	750.5408	0.0025	PC O-33:3	C41H78NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
750.54129	750.5408	0.0005	PC O-33:3	C41H78NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
751.54525	751.5484	0.0031	PG 34:0	C40H79O10P	[M+H] <sup>+</sup>
751.54659	751.5484	0.0018	PG 34:0	C40H79O10P	[M+H] <sup>+</sup>
778.56985	778.5721	0.0023	PC O-35:3	C43H82NO7PNa	[M+Na] <sup>+</sup>
817.53568	817.5355	0.0001	PG 36:0	C42H83O10PK	[M+K] <sup>+</sup>
818.54616	818.546	0.0001	PE O-40:5	C45H82NO7PK	[M+K] <sup>+</sup>
818.55062	818.546	0.0046	PE O-40:5	C45H82NO7PK	[M+K] <sup>+</sup>
921.69374	921.6943	0.0005	TG 56:10	C59H94O6Na	[M+Na] <sup>+</sup>

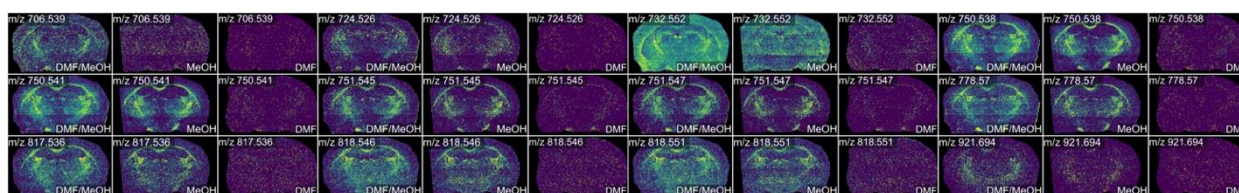


図 7-14

混合溶媒と MeOH のみで可視化された③のパターン(3種)

表 7-13

Input Mass	Matched Mass	Delta	Name	Formula	Ion
728.55979	728.5589	0.0009	PC O-33:3	C41H78NO7P	[M+H] <sup>+</sup>
810.68196	810.6817	0.0002	HexCer 42:2;O2	C48H91NO8	[M+H] <sup>+</sup>
855.73902	855.7412	0.0022	TG 50:1	C53H100O6Na	[M+Na] <sup>+</sup>

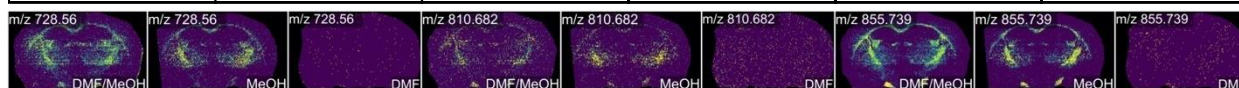


図 7-15



## 第5節 考察

混合溶媒と純溶媒で確認できる脂質数を比較すると、混合溶媒で最も多くの脂質が確認できた。これは、DMFは粘性率が高く、抽出溶媒の担持量が多いことが考えられ、MeOHの混合によりDMFの表面張力が低下し、帯電液滴が生じやすくなったためであると考えられる。以上の結果は、t-SPESIによるMSIの安定化と高感度化には、適切な粘性と表面張力の溶媒の使用が重要であることを示している。

## 第 8 章 まとめ

第 4 章の標準試料の計測では NaI の薄膜を作製することができなかつたため、Reserpine の分散水溶液を乾燥させたサンプルの計測結果を用いた。DMF と MeOH の 1:1 混合溶媒とそれぞれの純溶媒の 3 種類の溶媒の比較では、DMF の純溶媒で最も強いピークが現れた。しかし、光学顕微鏡写真とイメージを比較した結果からは混合溶媒が適していると考えられた。印加電圧の比較では、ピーク強度の違いは見られなかつた。これは NaI でも同様の結果を示していた。共振周波数の比較では、共振周波数が低いほどピーク強度が高かつた。しかし、光学顕微鏡写真とイメージを比較した結果からは 680Hz 程度の周波数が適していると考えられた。

第 5 章の結果から、表面張力と粘性率では DMF と MeOH の混合溶媒はそれぞれの純溶媒の間の値を示した。比誘電率については、高周波数帯では同様に間の値を示したが、低周波数帯では DMF と MeOH の組成比と比誘電率に規則性が認められなかつた。

第 6 章の結果から、Snail 発現株で存在しないとされる  $m/z$  787 のスフィンゴミエリン (SM) が推定された。これは、今後の t-SPESI を用いた生体試料の同時計測の実現につながる結果であつた。

第 7 章のマウス脳組織の t-SPESI を用いた質量分析イメージングの結果から、混合溶媒で最も多くの脂質種を推定できた。イメージのパターンで分類した後も混合溶媒で最も多くの脂質種を推定できた。

本研究では DMF と MeOH の混合溶媒はそれぞれの純溶媒の中間の物性を示すことが示され、混合溶媒の物性が担持一イオン化を連続的に行う過程に適していると考えられる。本研究によって t-SPESI の溶媒選定の指針が得られたと言えるだろう。

## 研究発表

日本分析化学会 2021 年度第 15 回近畿支部若手夏季セミナー～巻ノ拾伍～  
日本分析化学会第 70 年会

## 受賞

日本分析化学会 2021 年度第 15 回近畿支部若手夏季セミナー～巻ノ拾伍～ サイエンスアート賞受賞

## 謝辞

本研究において、豊田岐聡先生には、貴重なご意見ご指導はもちろんのこと学生生活全般においても多大なご助力、助言をいただきました。大塚洋一先生には、実際の実験を進めるにあたり貴重な助言指導をいただきました。質量分析における重要な理論をはじめ様々な装置の特性やコンピュータプログラムについても丁寧なご指導をいただきました。樋上照男先生には、溶媒の化学的特性について貴重な助言指導をいただきました。化学専攻の院生の糸井祐人さんには装置の使用法、立ち上げから実験の基礎にわたり丁寧な指導、助力をいただきました。豊田研究室の学生の皆様には様々な助言、助力をいただきました。

また、工学研究科の新聞秀一先生には、マウス脳組織を提供いただき、切片の作製方法について丁寧なご指導をいただきました。九州大学理学研究科の池ノ内順一先生には、マウス乳腺由来の培養上皮細胞 (EpH4) の野生株とその Snail 発現細胞株 (以降 Snail) を提供いただき、生体組織内の脂質の基礎について貴重な助言指導をいただきました。化学専攻の浦川理先生には、比誘電率と粘性率の計測において必要な装置をお貸ししていただき、その計測原理について丁寧なご指導をいただきました。化学専攻の金澤有紘先生には、表面張力の計測において必要な装置をお貸ししていただき、その計測原理について丁寧なご指導をいただきました。

本研究を無事進めることができたのも、ご協力して下さった多くの方々のおかげであることを深く認識しています。ご協力して下さった皆様に心より感謝いたします。



