

## 質量顕微鏡法

瀬藤 光利

## Imaging Mass Spectrometry

Mitsutoshi Setou

Department of Cell Biology and Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine; 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192, Japan.

(Received December 2, 2011)

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-imaging mass spectrometry (IMS) enables the visualization of the distribution of a range of biomolecules that have varied structures in the cells and tissue sections. This emerging imaging technique was initially developed as a tool for protein imaging, but recently it is increasingly being used for the imaging of small organic molecules. IMS is an effective technique for the imaging of small metabolites, including endogenous metabolites such as lipids and exogenous drugs because of the following advantages: First, IMS does not require any specific labels or probes. Second, IMS is a non-targeted imaging method. Finally, the simultaneous imaging of many types of metabolite molecules is possible, and all these features are necessary for the assessment of metabolite localization. In this review, we discuss the capability of current IMS techniques for imaging small molecules, and introduce representative studies on imaging of endogenous and exogenous metabolites. In addition, the limitations and problems of the technique are also discussed, and reports of progress toward solving the problems with this technique are also introduced.

**Key words**—imaging mass spectrometry; kinetics; visualization for biomolecule

## 1. はじめに

質量分析によって得られる生化学的情報と、従来の顕微鏡による構造解析から得られる形態学的情報を同時に知ることが可能にしたのが、質量顕微鏡法である。これまでの光を検出する光学顕微鏡や、電子を検出する電子顕微鏡と異なり、質量顕微鏡法は生体分子の質量を検出することで可視化を行う。1990年代にスタートした初期の質量分析を用いたイメージングの解像度は0.1–1 mm程度と肉眼解像度であり、顕微鏡とは呼べなかったが、21世紀に入り肉眼解像度を超えるようになり、質量顕微鏡法が誕生した。疾病に由来する病理標本からは様々な形態異常が観察され、その機能を知ることができれば、病因の解明や治療標的の同定につながると考えられる。質量顕微鏡法は、未知の物質に対してその

局在情報を失わずに形態を直接観察でき、また同時に生化学的な情報を得ることができる。

## 2. 質量分析の原理

質量分析 (mass spectrometry; MS) とは、原子・分子・クラスターなどの粒子を気体状にイオン化し、それらの質量と電荷の比 (質量/電荷;  $m/z$ ) に応じて分離・検出し、分子量を分析する手法である。質量分析ではいくつかのイオン化法が用いられてきた。<sup>1,2)</sup> 質量顕微鏡法では、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) による質量分析が一般的である。MALDIは、ソフトレーザー脱離イオン化法を提案し2002年にノーベル化学賞を受賞された田中氏<sup>3)</sup>と、Hillenkamp, Karas<sup>4)</sup>らによって開発され、分子量数十万までのタンパク質やDNAなどの高分子量物質を結晶マトリックスに包み込み、パルスレーザーを照射することにより、イオン化したタンパク質やDNAを真空中に放出させる方法である。MALDIは、従来のイオン化法では壊れ易かったタンパク質などの生体分子までイオン化するこ

浜松医科大学医学部医学科解剖学講座細胞生物学分野 (〒431-3192 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号) e-mail: setou@hama-med.ac.jp

本総説は、日本薬学会第131年会シンポジウムS16で発表したものを中心に記述したものである。

とができる。<sup>3)</sup> 結晶低分子マトリックスとして、2,5-ジヒドロキシ安息香酸などいくつかあり、<sup>4)</sup> 試料に適したマトリックスの選択が、よいマススペクトルを得るために重要である。<sup>5-7)</sup> 質量分析部は、イオン飛行中の他の気体分子による散乱を防ぐため、質量分析部内部をターボ分子ポンプや拡散ポンプで高真空にする。筆者らは、最も一般的な飛行時間型質量分析計 (time-of-flight mass spectrometer; TOF MS) を使用している。パルス状に生成したイオンは真空の分析管を通過する間に質量によって検出器に到達するまでの飛行時間が異なることを利用して重さとして計測される。特定のイオン化した分子のみを選択し、その分子に希ガスなどを衝突させることで分解・断片化し、生成した断片イオンの質量数パターンから構造を特定することで構造解析が可能である。この構造解析は MS を複数回行うことから MS<sup>n</sup> 解析と呼ばれる。化合物の質量数や構造解析で得られた断片イオンの質量数を用いて、データと既存のデータベースを参照することで化合物の同定が可能である。タンパク質のような大きな分子でも、酵素処理により断片化したペプチドやアミノ酸の構成を解析対象とすることで、分子を同定することができる。

### 3. 質量顕微鏡法の原理

質量顕微鏡法は、二次元平面上で位置情報を保つ

たまま前述の質量分析を行う手法である。通常、質量分析は分離・精製した溶液中の生体分子を対象とする。質量顕微鏡法では主に生体組織切片を対象とする。生体組織切片を観察し、着目した部位に正確に微小径のレーザー光を照射し、微小領域のイオン化を行う。Figure 1 に質量顕微鏡法の一連の流れを示す。<sup>8)</sup> 凍結させた生体組織から凍結マイクロームにより組織切片を作製する。作製した凍結切片を導電性の素材で表面をコートされた支持素材に載せ、融解させることで組織を接着する。解析を目的とする分子種に応じて適切な前処理を施し、マトリックス溶液を組織切片上に塗布し、質量分析計で各測定点におけるマススペクトルを検出する。測定領域は任意の間隔によって測定点を設定可能であるが、現在ではレーザー収束技術と装置制御能の向上により 10  $\mu\text{m}$  以下の間隔を設定することが可能になっている。測定点をレーザーで二次元走査することによって、測定点毎のマススペクトルが取得される。<sup>9)</sup> そのマススペクトルの中から任意の分子情報を選択的に抽出して、測定点毎のシグナル強度比に応じて対象分子の組織切片における分布を可視化する。マススペクトルの数は1つの試料において測定点数に応じて数万以上にもなり、その情報量は膨大になるため、効率よく高速に解析するソフトウェアが開発されている。得られたスペクトルから生体分

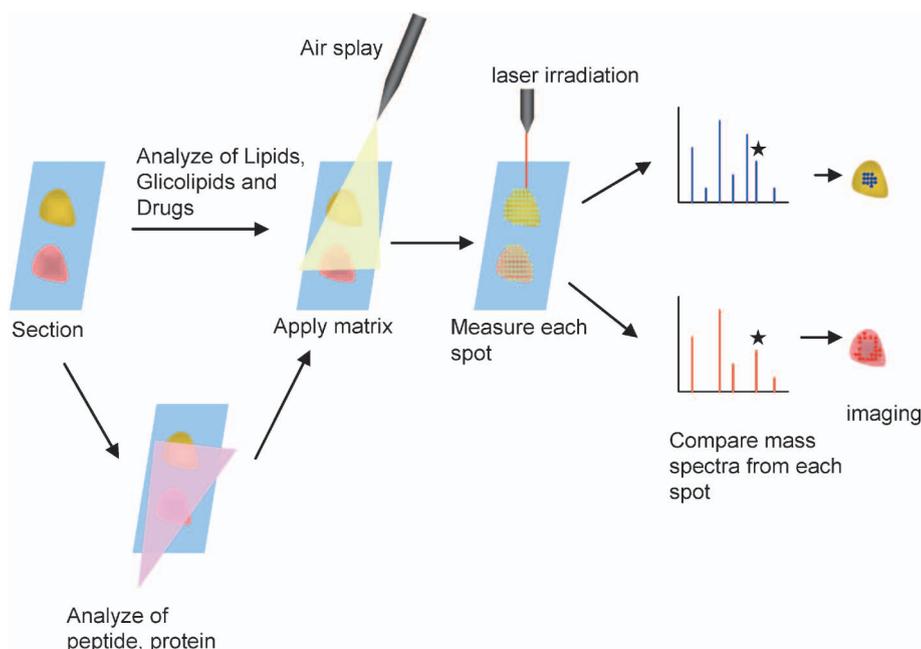


Fig. 1. Steps Involved in Profiling and Imaging MS of Tissue Slice Samples

子の存在量を色の濃淡で表現し、分子分布の可視化を行う。

#### 4. 質量顕微鏡法の実際

細胞内の生体分子の分布を測定するとき、1つの細胞内にある生体分子の量は極めて微量である。このような超微量分子を検出するためには、効率よく各段階にイオンを移行させなければならない。試料の適切な前処理法と装置の高感度化が必要である。高効率イオン化を実現する試料前処理の1つに、最適な厚さの生体組織が10  $\mu\text{m}$  以下となったときに高効率イオン化と低ノイズを示す測定結果が得られる。<sup>10)</sup> 切片を接着する導電性を有する支持素材には、酸化インジウムスズ (indium-tin-oxide; ITO) を表面にコートした ITO スライドガラスが用いられることが多い。一般的に、生体分子の位置情報を保持したうえで分子同定のための試料前処理法が必要になる。例えばタンパク質の場合、組織上におい

て試料の拡散を最小限に抑えるタンパク質変性法、酵素消化法が施される。これを on-tissue digestion 法という。<sup>11-13)</sup> 組織内タンパク質を変性させた後に、ケミカルインクジェットプリンター (島津製作所) を用いて微量のトリプシン溶液を分注し、タンパク質を消化することにより、分子量が大きく、そのままではイオンとして検出され難いタンパク質もトリプシン消化産物として検出できる。<sup>14)</sup> 一方、リン脂質やコレステロールのような中性脂質、さらに糖脂質のような低分子量有機化合物の測定では、組織切片上で位置情報が失われ易いため切片の洗浄工程は行わない。マトリックス溶液の組織切片上への塗布は、マトリックスの結晶が均一かつ微細に生成されることが測定感度の向上のために重要である。霧状にして組織切片上へ噴霧するスプレーコーティング法や、組織切片上のあらかじめ定められた領域に正確な量のマトリックスを滴下するドロップ

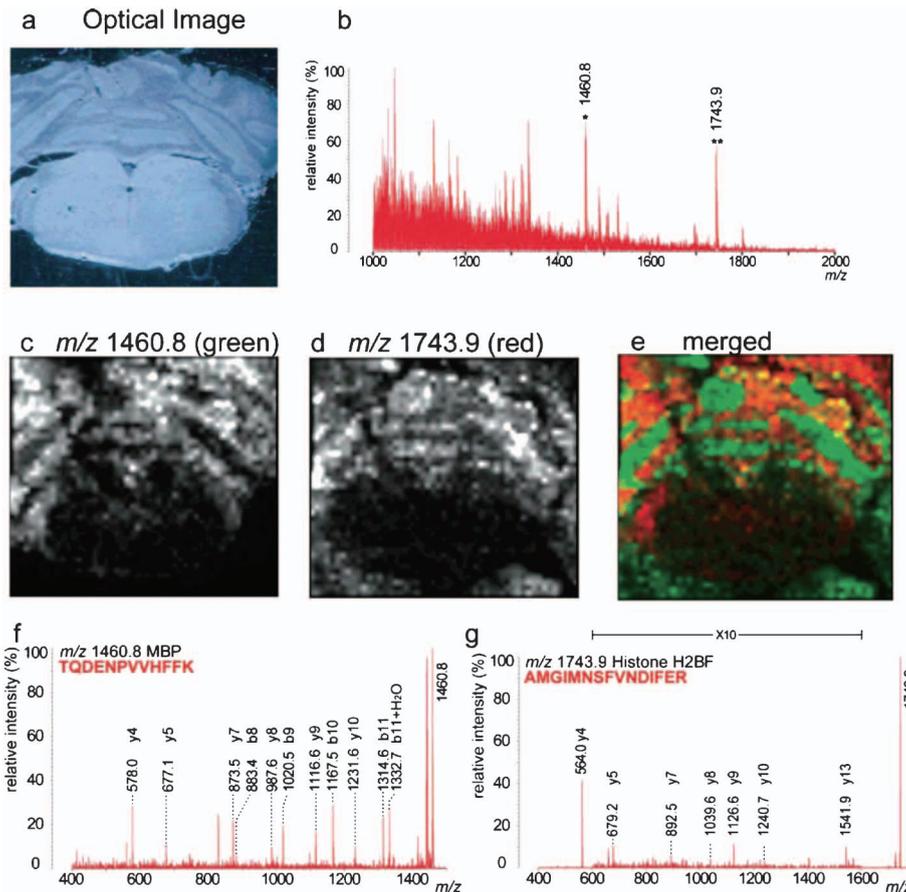


Fig. 2. Example of Tryptic-digested Protein Imaging and Precursor Ion Mass Spectra with Positive Ion Detection Mode

(a) Optical image of imaging region and (b) accumulated mass spectrum from imaging region. (c) and (d) are imaging results of  $m/z$  1460.8 and 1743.9, which are labeled by asterisks in (b). Merged image (red,  $m/z$  1460.8; and green,  $m/z$  1743.9) is shown in (e). These peaks were identified by direct MS<sup>n</sup> and were identified as the fragment ions of myelin basic protein (MBP) (f) and histone H2B (g). Partially adapted from Ref. 13.

レット法が用いられる。この2つのマトリックス塗布法を組み合わせたスプレッドドロップレット法も使われる。<sup>14)</sup> またナノ微粒粒子はその大きさが数ナノメートルオーダーであることから、その質量顕微鏡法への適用は、数十 $\mu\text{m}$ 大の結晶を形成するマトリックスよりも高解像度で生体分子の分布を可視化するだけでなく、マトリックスではイオン化され難い生体分子のイオン化を可能にする。<sup>15)</sup>

### 5. ペプチドの解析

次に、筆者らが発表してきた質量顕微鏡法の生体組織への応用研究をいくつか紹介する。島津製作所が製造している AXIMA-QIT-TOF MS は、試料中の分子をイオン化する MALDI, イオン化された分子を溜めこむ四重極型イオントラップ (quadrupole ion trap; QIT) と、イオン化された分子を質量に応じて飛行分離を行う TOF から構成される。そのため、検出感度が高く、MS/MS 解析だけでなく MS<sup>n</sup> 解析も可能である。この装置を用いてマウス小脳におけるリン脂質、糖脂質、トリプシン消化したペプチドの可視化を行った。<sup>13)</sup> Figure 2 にペプチドの解析結果を示す。Figure 2(a) は小脳切片の光学写真、Fig. 2(b) はトリプシン消化処理を施したマウス小脳から得られた積算マススペクトルである。このマススペクトルから、イメージング画像描出のためのソフトウェアである BioMap (<http://www.mald-msi.org>) を用いて、任意の  $m/z$  における質量分布のイメージング画像を描出した。 $m/z$  1460.8 [Fig. 2(c)] と  $m/z$  1743.9 [Fig. 2(d)] の2つの質量ピークのイメージを構成したところ、これらは相補的な関係にあることを見出した [Fig. 2(e)].  $m/z$  1460.8 は白質と延髄、 $m/z$  1743.9 は灰白質に局在していた。これらの質量の生体分子を特定するため、直接切片上で MS/MS 解析による構造解析を行ったところ、 $m/z$  1460.8 はミエリン塩基性タンパク質 (myelin basic protein; MBP) [Fig. 2(f)],  $m/z$  1743.9 はヒストン H2B (histon H2B) [Fig. 2(g)] であることが明らかになった。

### 6. リン脂質の解析

マウス網膜の組織切片を対象として質量顕微鏡法により生体分子の局所的な分布を示した。<sup>16)</sup> マウス網膜は幅 150  $\mu\text{m}$  もの微小領域内に 9 層もの膜構造を有している。この試料に対して 50  $\mu\text{m}$  の間隔で測定を行った。その結果、組織切片上から多数のシ

グナルが検出された。それらのシグナルについて MS/MS 解析を行ったところ、リン脂質の一種であるホスファチジルコリン (phosphatidylcholine: PC) と同定された。PC には 2 本の脂肪酸が結合しており、その脂肪酸の違いにより生体内での働きが異なることが知られている。網膜上における PC の分布を解析したところ、結合している脂肪酸の種類によって分布が異なることが示され、3 つの層に分類・可視化することに成功した (Fig. 3)。特に網膜における光神経伝達に重要な役割を果たす膜タンパク質であるロドプシンと脂肪酸の一種であるドコサヘ

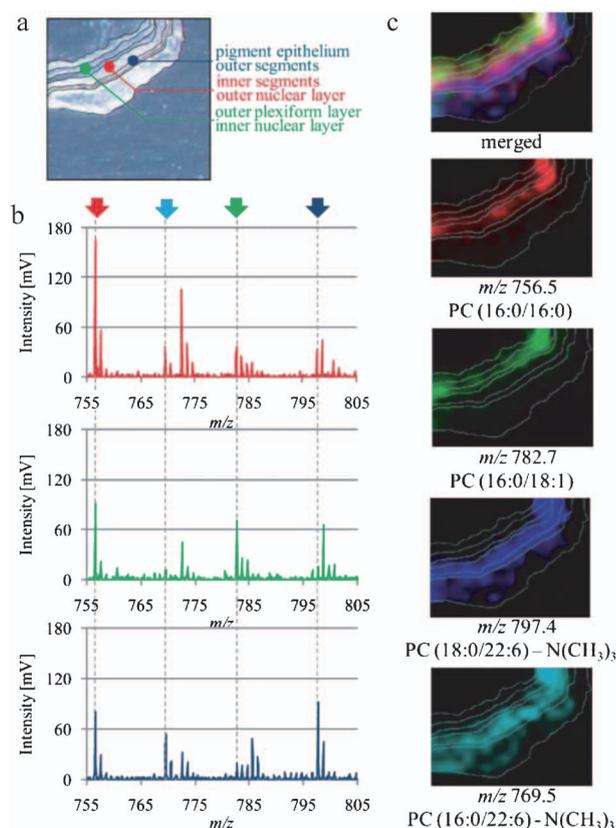


Fig. 3. Distribution of PC Molecular Species in a Mouse Retinal Section

(a) Each area can be roughly distinguished in this optical image of the mouse retinal section, and three colored dots are shown. (b) Three spectra between  $m/z$  755 and 805 from the measurement areas at the red dot (outer nuclear layer and inner segment), green dot (inner nuclear layer and outer plexiform layer), and blue dot (outer segment and pigment epithelium) in the mouse retinal section are compared. The signal intensities at  $m/z$  756.5 ([PC (diacyl-16:0/16:0) + Na]<sup>+</sup>) and  $m/z$  782.7 ([PC (diacyl-16:0/18:1) + Na]<sup>+</sup>) were the highest in the red dot and in green dot, respectively. The signal intensities at  $m/z$  797.4 ([PC (diacyl-18:0/22:6) + Na-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>) and  $m/z$  769 ([PC (diacyl-16:0/22:6) + Na-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>) were the highest in the blue dot. (c) The ion image merged from [PC (diacyl-16:0/16:0) + Na]<sup>+</sup> (red), [PC (diacyl-16:0/18:1) + Na]<sup>+</sup> (green), and [PC (18:0/22:6) + Na-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (blue) revealed the three-zone distribution of the retinal section. [PC (16:0/22:6) + Na-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (light blue) was distributed in the same region as [PC (18:0/22:6) + Na-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. Reprinted with permission from Ref. 16.

キサエン酸 (docosahexaenoic acid: DHA) の係わりについては過去にも報告があるが、本研究により両者の局在が一致したことから、質量顕微鏡法の有用性を示すうえで非常に興味深い結果となった。現在までのところ、このようなリン脂質の脂肪酸組成が異なる分子種の分布イメージングが可能なのは、質量顕微鏡法だけである。

### 7. 高解像度質量顕微鏡の開発

既存の質量分析装置よりも微細な領域の高精度な分析と、より高い質量分析能の実現を目指し、筆者らは JST 先端計測分析技術・機器開発事業の支援の下、島津製作所、がん研究会、理化学研究所、三菱化学生命科学研究所、及び大阪大学との産学連携で新たな質量顕微鏡を開発してきた。<sup>17)</sup> 顕微質量分析装置 (質量顕微鏡) の最終プロト機では、光学観察系は大気圧下 MALDI を採用し、デジタルイオントラップ (digital ion trap: DIT) を搭載することで高効率にイオンを集め、高分解能マルチターン飛行時間型 (multi-turn TOF: mTOF) を用いて、質量分解能を向上させることに成功した。1  $\mu\text{m}$  以下のレーザー照準精度、5  $\mu\text{m}$  以下のレーザースポット径、10  $\mu\text{m}$  以下の空間的分解能を実現し、分析感度も改善された。上述の技術のうち、光学顕微鏡、大気圧 MALDI、四重極型イオントラップ、そして TOF で構成された質量顕微鏡が製造されており、浜松医科大学に 1 号機が設置されている (Fig. 4)。

### 8. 高解像度質量顕微鏡を用いた薬物動態の解析

生体の臓器は形状や機能によって組織学的に分類され、各組織がそれぞれの役割を担っている。したがって、組織特異的な分布を期待する医薬品を評価

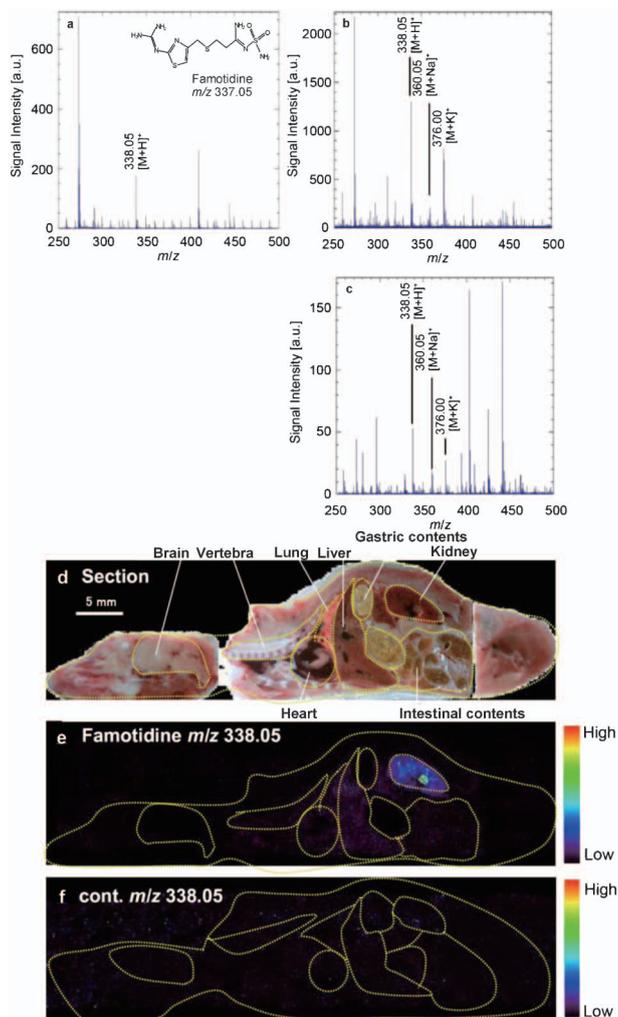


Fig. 5. Mass Spectrum of Famotidine and MS Ion Image on the Whole-body Section

(a) Structure and mass spectrum of Famotidine. (b) Mass spectrum of Famotidine detected on the tissue section. (c) Mass spectrum of Famotidine detected on the kidney in the tissue section. (d) Optical image of the mouse tissue section. (e) MS ion image of Famotidine ( $m/z$  338.05) on the mouse tissue section at 3 min after injection. The Famotidine is observed to be distributed with significantly localization in the kidney. (f) MS ion image at  $m/z$  338.05 on Control mouse tissue section. Partially adapted from Ref. 18.

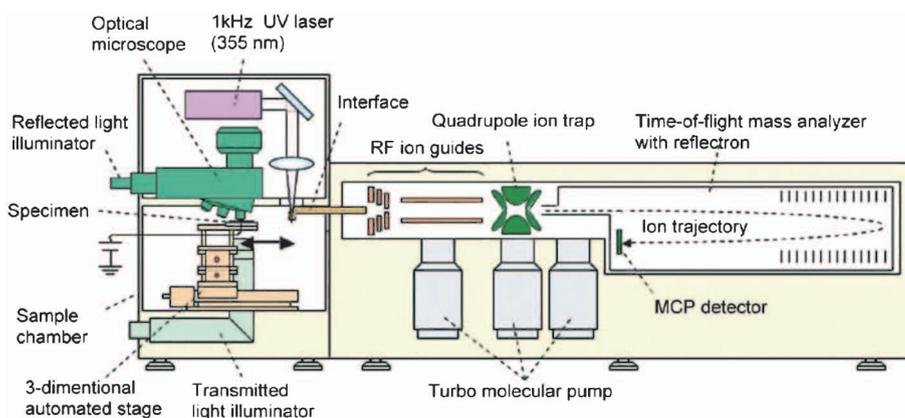


Fig. 4. Scheme of the Atmospheric-Pressure MALDI Mass Spectrometry Imager "Mass Microscope"

Reprinted with permission from Ref. 17.

する際、更なる空間的分解能が必要とされている。ファミチジンを尾静脈内から投与し、3分後の体内分布を質量顕微鏡を用いて解析した。<sup>18)</sup> マウス断面図を Fig. 5 (d) に示す。全身の輪郭と主要な臓器(脳、脊椎、肺、肝臓、胃、腎臓、心臓、腸)を点線で示している。ファミチジンのピークと考えられる  $m/z$  338.05 ( $[M+H]^+$ ),  $m/z$  360.05 ( $[M+Na]^+$ ),  $m/z$  376.00 ( $[M+K]^+$ ) の中で最も強度の高かった  $[M+H]^+$   $m/z$  338.05 に着目し、その全身分布を Fig. 5 (e) に示した。各測定点におけるイオン強度の違いを色で示している。ファミチジンを投与したマウスでは腎臓に一致する領域に相対的に高い強度が得られ、肝臓、心臓、肺、消化管にも分布がみられたが、他の臓器からは分布は認められなかった。比較対象としてコントロールマウス全身切片上の  $m/z$  338.05 の分布を Fig. 5 (f) に示した。コントロールマウス全身切片では  $m/z$  338.05 の分布は全く認められなかったことから、投与したファミチジンが主に腎臓に分布していることが示唆された。この結果は過去に報告されている、ファミチジンを筋肉内投与した5分後に腎臓、ついで肝臓に未変化体で分布しているという全身オートラジオグラフィーの結果と同様であり、<sup>19)</sup> 被検体をラベル化することなく検出できる質量顕微鏡を用いることが、薬物動態の解析にも有効であることを示すことができた。さらに Fig. 5 (e) の腎臓を示す領域では中心部に強い強度を示したことから、腎臓の組織内でも分布の違いが生じていると考えられた。

ファミチジンのような主に腎臓で排出される薬物は腎臓によって濃縮を受け、最終的に尿中へ排出される。マウス腎臓断面図を Fig. 6 (a) に示した。腎臓は組織学的に外側から腎皮質、腎髄質、腎盂と呼ばれる構造からなり、全身から血液に乗って集められた薬物はこの順で血液の中からろ過され、水分の再吸収による濃縮を受けながら尿路へ向かい膀胱に蓄積され排泄される。中央に位置する白色の部分は濃縮を受けた尿が集まる腎盂である。ここでは点線で示した領域を  $50\ \mu\text{m}$  間隔で MS 及び MS/MS イメージング測定を行った。Figure 6 (b), (c) はそれぞれファミチジンの MS イメージング測定によるイオンイメージ ( $m/z$  338.05) と MS/MS イメージング測定によるイオンイメージ ( $m/z$  259.08) を示している。この実験結果から、質量顕微鏡の高い解像度を用いて腎臓内の薬物分布を示すことができた。(b), (c) いずれの場合も皮質や髄質と比べて腎盂に高い分布強度が認められた。また、血管に合致する領域では相対的に低い分布強度を示した。これは腎臓における排泄過程でファミチジンが濃縮を受けているため、周りの髄質、皮質と比較して腎盂で高い強度を示したと考えられる。

このように、高解像度で薬物の組織分布を示すことができる質量顕微鏡法を、治療を目的とした薬物の体内やがん等の病変部位への分布の評価に応用していけば、医薬品開発の発展に貢献できると考えている。

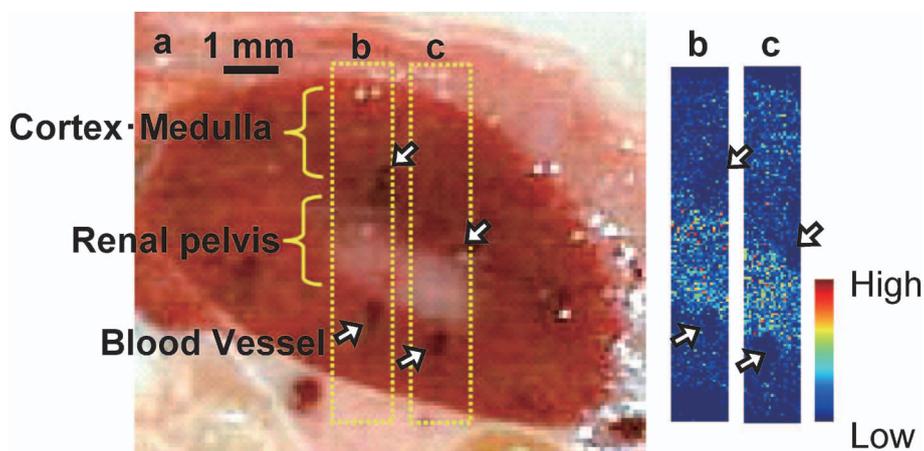


Fig. 6. High Resolution Ion Image of Famotidine in the Kidney

(a) Optical image of kidney in whole-body section. (b), (c) MS ( $m/z$  338.04, b) and MS/MS ( $m/z$  338.05→259.08, c) images of Famotidine. It is suggested that Famotidine is concentrated on the renal pelvis. Arrows indicate vessels. Partially adapted from Ref. 18.

## 9. おわりに

筆者らは質量顕微鏡法を開発し、生体組織研究へ適用して多くの成果を報告してきた。<sup>20-27)</sup> 質量顕微鏡法は一度に数千から数万の分子の量的・位置的な挙動を、ターゲットを絞らずにモニターできる手法であることから、薬物動態、さらに薬物投与などの操作を加えたときの反応など、創薬の面でも既に各製薬メーカーで使用され始めている。さらに、今後は質量顕微鏡法が生物医薬に限らず、食品<sup>28)</sup>や環境、有機材料分析などの様々な分野にも応用され、数多くの問題を解決することを期待している。

謝辞 原稿作成に協力頂いた瀬藤研の早坂孝宏先生、齋藤祐介先生に感謝します。

## REFERENCES

- 1) Carl-Ove A., *Acta Chem. Scand.*, **10**, 1353 (1958).
- 2) Yamashita M., Fenn J. B., *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451-4459 (1984).
- 3) Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151-153 (1988).
- 4) Strupat K., Karas M., Hillenkamp F., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **111**, 89-102 (1991).
- 5) Schwartz S. A., Reyzer M. L., Caprioli R. M., *J. Mass Spectrom.*, **38**, 699-708 (2003).
- 6) Lemaire R., Tabet J. C., Ducoroy P., Hendra J. B., Salzet M., Fournier I., *Anal. Chem.*, **78**, 809-819 (2006).
- 7) Moritake S., Taira S., Sugiura Y., Setou M., Ichiyangi Y., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **9**, 169-176 (2009).
- 8) Zaima N., Matsuyama Y., Setou M., *J. Oleo Sci.*, **58**, 267-273 (2009).
- 9) Caldwell R. L., Caprioli R. M., *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 394-401 (2005).
- 10) Sugiura Y., Shimma S., Setou M., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 45-48 (2006).
- 11) Shimma S., Furuta M., Ichimura K., Yoshida Y., Setou M., *Surf. Interface Anal.*, **38**, 1712-1714 (2006).
- 12) Groseclose M. R., Andersson M., Hardesty W. M., Caprioli R. M., *J. Mass Spectrom.*, **42**, 254-262 (2007).
- 13) Shimma S., Sugiura Y., Hayasaka T., Zaima N., Matsumoto M., Setou M., *Anal. Chem.*, **80**, 878-885 (2008).
- 14) Sugiura Y., Shimma S., Setou M., *Anal. Chem.*, **78**, 8227-8235 (2006).
- 15) Goto-Inoue N., Hayasaka T., Sugiura Y., Taki T., Li Y. T., Matsumoto M., Setou M., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **870**, 74-83 (2008).
- 16) Hayasaka T., Goto-Inoue N., Sugiura Y., Zaima N., Nakanishi H., Ohishi K., Nakanishi S., Naito T., Taguchi R., Setou M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3415-3426 (2008).
- 17) Harada T., Yuba-Kubo A., Sugiura Y., Zaima N., Hayasaka T., Goto-Inoue N., Wakui M., Suematsu M., Takeshita K., Ogawa K., Yoshida Y., Setou M., *Anal. Chem.*, **81**, 9153-9157 (2009).
- 18) Saito Y., Hayasaka T., Onoue K., Takizawa Y., Kajihara S., Ogawa K., Setou M., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **59**, 79-84 (2011).
- 19) Esumi Y., Ueda T., Jin Y., Tsutsumi S., Takiie S., Yokoshima T., Imasaki H., Matsui H., *The Clinical Report*, **21**, 111-119 (1987).
- 20) Morita Y., Ikegami K., Goto-Inoue N., Hayasaka T., Zaima N., Tanaka H., Uehara T., Setoguchi T., Sakaguchi T., Igarashi H., Sugimura H., Setou M., Konno H., *Cancer Sci.*, **101**, 267-273 (2010).
- 21) Onoue K., Zaima N., Sugiura Y., Isojima T., Okayama S., Horii M., Akai Y., Uemura S., Takemura G., Sakuraba H., Sakaguchi Y., Setou M., Saito Y., *Circ. J.*, **75**, 221-223 (2010).
- 22) Takizawa Y., Mizuta K., Hayasaka T., Nakanishi H., Okamura J., Mineta H., Setou M., *Audiol. Neurootol.*, **16**, 315-322 (2011).
- 23) Goto-Inoue N., Hayasaka T., Zaima N., Setou M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1811**, 961-969 (2011).
- 24) Kaneko Y., Obata Y., Nishino T., Kakeya H., Miyazaki Y., Hayasaka T., Setou M., Furusu A., Kohno S., *Exp. Mol. Pathol.*, **91**, 614-621 (2011).
- 25) Matsumoto J., Sugiura Y., Yuki D., Hayasaka T., Goto-Inoue N., Zaima N., Kunii Y., Wada A., Yang Q., Nishiura K., Akatsu H., Hori A., Hashizume Y., Yamamoto T., Ikegami K., Setou M., Niwa S., *Anal. Bioanal.*

- Chem.*, **400**, 1933–1943 (2011).
- 26) Miyamura N., Nakamura T., Goto-Inoue N., Zaima N., Hayasaka T., Yamasaki T., Terai S., Sakaida I., Setou M., Nishina H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **408**, 120–125 (2011).
- 27) Shrivastava K., Hayasaka T., Goto-Inoue N., Sugiura Y., Zaima N., Setou M., *Anal. Chem.*, **82**, 8800–8806 (2010).
- 28) Zaima N., Goto-Inoue N., Hayasaka T., Enomoto H., Setou M., *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1865–1871 (2011).