

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4863692号
(P4863692)

(45) 発行日 平成24年1月25日(2012.1.25)

(24) 登録日 平成23年11月18日(2011.11.18)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 27/64	(2006.01)	GO 1 N 27/64	B
HO 1 J 49/26	(2006.01)	HO 1 J 49/26	
GO 1 N 27/62	(2006.01)	GO 1 N 27/62	D
HO 1 J 49/16	(2006.01)	HO 1 J 49/16	

請求項の数 8 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2005-319495 (P2005-319495)	(73) 特許権者	000001993 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
(22) 出願日	平成17年11月2日(2005.11.2)	(73) 特許権者	504261077 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 東京都三鷹市大沢二丁目2番1号
(65) 公開番号	特開2007-127485 (P2007-127485A)	(74) 代理人	110001069 特許業務法人京都国際特許事務所
(43) 公開日	平成19年5月24日(2007.5.24)	(72) 発明者	小河 潔 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会 社島津製作所内
審査請求日	平成20年5月14日(2008.5.14)	(72) 発明者	竹内 貞夫 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会 社島津製作所内
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イメージ質量分析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- a) 試料の画像を取得する試料撮影部、
 - b) 試料の画像中の任意の箇所を使用者に指定させる指定手段、
 - c) 試料の画像から、指定手段により指定された箇所における色又は輝度を中心とした所定の幅の色又は輝度を持つ領域を抽出する領域抽出部、
 - d) 試料にスポット状のレーザー光を照射するレーザー照射部、
 - e) 抽出された領域内で試料とレーザー光スポットの相対位置を変化させる走査部、
 - f) レーザ光が照射された箇所で生成される試料のイオンを質量分析する質量分析部、
- を備えることを特徴とするイメージ質量分析装置。

10

【請求項2】

上記色又は輝度の幅が変更可能であることを特徴とする請求項1に記載のイメージ質量分析装置。

【請求項3】

領域抽出部が、画像中の複数の領域を抽出することを特徴とする請求項1又は2に記載のイメージ質量分析装置。

【請求項4】

試料撮影部が蛍光顕微鏡であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載のイメージ質量分析装置。

【請求項5】

20

更に、抽出された領域の各点の質量分析値の統計値を算出する演算部を備えることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のイメージ質量分析装置。

【請求項 6】

- a) 試料の画像を撮影し、
- b) 前記画像中の任意の箇所を使用者に指定させ、
- c) 前記画像から、指定された箇所における色又は輝度を中心とした所定の幅の色又は輝度を持つ領域を抽出し、
- d) 抽出した領域内でレーザ光スポットを走査しつつ該領域内の質量分析を行う、工程を有することを特徴とするイメージ質量分析方法。

【請求項 7】

予め試料に染色処理を施しておき、その色に基づいて領域を抽出することを特徴とする請求項 6 に記載のイメージ質量分析方法。

【請求項 8】

予め試料に蛍光処理を施しておき、その発光色に基づいて領域を抽出することを特徴とする請求項 6 に記載のイメージ質量分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料を移動しつつレーザ光を試料に照射してイオン化を行い、試料各部の質量分析を行ったり試料の分析像を得るイメージ質量分析装置、具体的には、レーザ脱離イオン化法(LDI=Laser Desorption / Ionization)やマトリクス支援レーザ脱離イオン化法(MALDI=Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization)によるイオン源を備えるイメージ質量分析装置に関する。これらの装置の典型的な応用例は、顕微質量分析装置や質量分析顕微鏡である。

【背景技術】

【0002】

レーザ脱離イオン化法(LDI)は、試料にレーザ光を照射し、レーザ光を吸収した物質の内部で電荷の移動を促進させてイオン化を行うものである。また、マトリクス支援レーザ脱離イオン化法(MALDI)は、レーザ光を吸収しにくい試料やタンパク質などレーザ光で損傷を受けやすい試料を分析するために、レーザ光を吸収し易くイオン化し易い物質をマトリクスとして試料に予め混合しておき、これにレーザ光を照射することで試料をイオン化するものである。特にMALDIを用いた質量分析装置は、分子量の大きな高分子化合物をあまり開裂させることなく分析することが可能であり、しかも微量分析にも好適であることから、近年、生命科学などの分野で広範に利用されている。なお、本明細書では、LDIやMALDIによるイオン源を備える質量分析装置を総称して、LDI/MALDI-MSと記すこととする。

【0003】

LDI/MALDI-MSにおいて、照射レーザ光のスポット径を小さく絞り、その照射位置を試料上で移動させる(多くの場合、試料の方を移動させる)ことにより、試料の質量分析値の分布を表すイメージを得ることができる。これがイメージ質量分析装置である。多くの場合、レーザ光のスポット径を数百~数 μm に絞ることにより、顕微鏡(質量分析顕微鏡)として使用する(非特許文献1、特許文献1)。

【0004】

従来の質量分析顕微鏡の構成の一例を図1に示す。オペレータは観察系11のCCD又は接眼レンズで試料12を観察し、観察像から質量分析領域を決定する。そして、オペレータが分析開始操作を行うと、照射系13からレーザ光が試料12に照射され、一方、ステージ駆動部14が試料12を載置した試料ステージ16を2次元移動する。

【0005】

レーザ光が照射された箇所では試料12がイオン化し、生成されたイオン17が質量分析部18に入る。ここでイオンは質量(厳密には質量電荷比)に応じて分離され、検出器

10

20

30

40

50

19により検出される。検出器19からの信号は計測・制御装置20（多くの場合、専用のプログラムをインストールしたパソコンが用いられる）に送られる。計測・制御装置20では、この質量分析情報を試料12の位置（すなわち、試料12上のレーザー光照射箇所）と関連付け、分析像を作成する。作成された分析像は、表示及び/又はプリントアウトされる。

【0006】

【特許文献1】米国特許第5808300号公報

【非特許文献1】内藤康秀「生体試料を対象にした質量顕微鏡」, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., Vol. 53, No. 3, 2005, pp. 125-132.

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

イメージ質量分析或いは顕微質量分析では、生体組織や生体細胞内の成分の分析が大きな目的の一つとなっている。特に生体内試料のタンパク質や糖類の分析のニーズが大きい。しかし、生体内では多くの場合、特定のタンパク質や糖類は分散して存在しており、目的とする成分について質量分析を行っても十分な信号強度が得られず、信頼性の高い結果を得ることができなかった。

【0008】

本発明が解決しようとする課題は、このような問題を解決し、希薄存在成分についても高い信頼性で質量分析を行うことのできるイメージ質量分析装置を提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するために成された本発明に係るイメージ質量分析装置は、

- a) 試料の画像を取得する試料撮影部、
- b) 試料の画像中の任意の箇所を使用者に指定させる指定手段、
- c) 試料の画像から、指定手段により指定された箇所における色又は輝度を中心とした所定の幅の色又は輝度を持つ領域を抽出する領域抽出部、
- d) 試料にスポット状のレーザー光を照射するレーザー照射部、
- e) 抽出された領域内で試料とレーザー光スポットの相対位置を変化させる走査部、
- f) レーザ光が照射された箇所で生成される試料のイオンを質量分析する質量分析部、

30

【発明の効果】

【0010】

本発明に係るイメージ質量分析装置では、試料の画像より（画像に基づいて）所定の領域を抽出しておき、その抽出された領域内でのみレーザー光スポットを走査して質量分析を行う。このため、目的の領域の分析を短時間に行うことができる。また、多くの試料では、画像の色や輝度に基づいてその領域を定めることにより、ほぼ同一又は近い成分組成の領域のみを抽出することができるため、その試料中の目的成分の領域のみを迅速に分析することができる。また、その領域の分析値の加算値（平均値）を算出することにより、その領域に存在する成分の分析を高い感度（S/N比）で行うことができる。さらに、分散等の複雑な統計値を算出することにより、その試料中の成分の存在に関するより深い情報が得られる。

40

【0011】

例えば、生体試料では、所定の染料等により着色処理を施すと、特定の組織のみを着色することが可能となる。従って、本発明に係る装置を用いることにより、そのような組織にのみ存在する成分等を迅速且つ高い精度で分析することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の一実施例である顕微質量分析装置について説明する。本実施例の顕微質量分析装置のハードウェア構成は、前述の従来のもとのほぼ同様である。すなわち、図1に示す

50

ように、本体は、試料部 1 5 と質量分析部 1 8 を内蔵する筐体と、筐体に設けられた観察窓を通して試料を観察し、その画像を撮影する撮像系 1 1 と、筐体に設けられた別の透過窓であるレーザ光照射窓を通して試料 1 2 に微小スポット状に絞ったレーザ光を照射するレーザ照射系 1 3 から成る。この本体には、本顕微質量分析装置で行われる計測、制御やデータ処理等を行うための専用のプログラムを備えたパーソナルコンピュータが接続されており、これが本顕微質量分析装置の計測・制御装置 2 0 を構成している。

【 0 0 1 3 】

計測・制御装置 2 0 は前記専用プログラムを実行する際は、図 2 に示すような機能ブロックを持つ装置として動作する。

【 0 0 1 4 】

以上の構成を有する本実施例の顕微質量分析装置の動作を、図 3 のフローチャートを用いて説明する。まず、試料 1 2 を筐体内の試料ステージ 1 6 にセットする（ステップ S 1 1）。このとき、試料ステージ 1 6 が存在する試料部 1 5 と質量分析部 1 8 の間は完全に密閉され、質量分析部 1 8 の真空度が低下しないようになっている。試料 1 2 をセットした後、試料部 1 5 の扉を密閉し、必要な真空度となるまで試料部 1 5 内の空気を吸引する所定の真空度に到達した時点で、試料部 1 5 と質量分析部 1 8 の間に設けられた、イオンを通過させるための小さな開口が開放される。なお、試料部 1 5 については真空引きを行わず、大気圧下でイオン化を行う場合もある。

【 0 0 1 5 】

撮像系 1 1 において、試料 1 2 の像は観察窓を介して CCD カラーカメラにより撮影され、その画像データは CCD カメラから計測・制御装置 2 0 の撮像部 2 0 2 に送られる。計測・制御装置 2 0 はその試料像を表示装置 2 1 の所定の領域（ウィンドウ）に表示する（S 1 2）。この画像の一例を図 4 (a) に示す。

【 0 0 1 6 】

例えば生体試料をこの顕微質量分析装置で分析する場合、使用者は多くの場合、このカラー画像を見ることにより、経験的に、どの色の部分がどの組織であるかを概略的に理解することができる。そこで使用者は、このカラー画像を見て、マウス等の入力装置 2 2 を用いて分析を行いたい箇所を画面上で指定する（S 1 3）。すると領域抽出部 2 0 3 は、その箇所の色を中心とした所定範囲の色を持つ領域を抽出する（S 1 4、図 4 (b)）。なお、ここで領域を抽出する場合、色で範囲を設定してもよいし、図 6 に示すように、各色のデータ（又は特定色のデータ）から輝度データを作成し、その値に基づいて範囲を設定してもよい。撮像系 1 1 に蛍光顕微鏡システムを用いた場合には、このように輝度値のみで範囲を設定する。いずれにせよ、この領域抽出部 2 0 3 で領域を抽出する際に用いる色又は輝度の範囲の幅は、使用者が自由に設定できるようにしておくことが望ましい。使用者は、この幅の広狭を適宜設定することにより、それに応じて大小する抽出領域のいずれが妥当なものであるか否かを判断することができる。

【 0 0 1 7 】

また、領域抽出部 2 0 3 は、領域抽出の基準となる色又は輝度の範囲を複数設定しておくことができるようにしておいてもよい。例えば、赤色の領域と青紫色の領域を同時に抽出したり、輝度値が 0 (黒) ~ 0.2 の範囲と 0.8 ~ 1 (白) の範囲の 2 つの領域を抽出する等である。

【 0 0 1 8 】

こうして抽出された領域が妥当なものであると使用者が判断した場合、使用者は入力装置 2 2 を操作して分析開始を指令する。すると、走査制御部 2 0 4 はステージ駆動部 1 4 に制御信号を送り、抽出領域の所定の端の箇所（図 5 の A 点）がレーザ光照射箇所位置するように、試料ステージ 1 6 を移動させる。A 点がそこに到達した時点で、走査制御部 2 0 4 はステージ駆動部 1 4 に、抽出領域内におけるレーザ光スポットの走査を指令する。この指令に応じて、ステージ駆動部 1 4 は試料ステージ 1 6 を x 方向に所定の短距離 x ずつ移動させ、各箇所短時間ずつ停止するという動作を繰り返す（図 5）。試料 1 2 が停止している間、レーザ制御部 2 0 5 はレーザ照射系 1 3 に指令信号を出し、レーザ光を

10

20

30

40

50

試料のその箇所照射する。これにより、試料からイオンが発生し、発生したイオンは試料部 15 と質量分析部 18 の圧力差とイオンガイド 181 の電場により質量分離部 182 に引き込まれる。質量分離部 182 ではイオンをそれらの質量に応じて分離する。分離されたイオンは、検出器 19 により検出される。

【0019】

レーザ光照射箇所が抽出領域の端に到達した時点でステージ駆動部 14 は試料を所定の距離だけy方向に移動させ、次の行の走査を行う。領域が複数の島に分かれている場合は、各島の間は高速で試料を移動させる。

【0020】

こうして走査を行っている間、質量分析部 18 の検出器 19 からは、各箇所において質量毎に分離されたイオンの検出信号が計測・制御装置 20 の検出データ処理部 206 に送られる。検出データ処理部 206 は、検出器 19 からの信号に基づいて質量毎の強度を算出し、そのデータ(検出データ)を中央処理部 201 に送る。中央処理部 201 は、走査制御部 204 からの制御信号に基づき(或いは、ステージ駆動部 14 からのステージ位置信号に基づき)検出される試料 12 の各測定個所の情報とこの検出データとを関連づけて所定の記憶領域に記録する(S15)。

【0021】

抽出領域の全てを走査し終えた時点で、中央処理部 201 は、抽出領域全体の検出データに基づき、その総和又は平均、そして必要に応じて分散・標準偏差等の統計値を算出し(S16)、表示装置に表示する(S17)。このように統計値として総和又は平均をとった場合、その値は試料上における同じ色の領域の質量分析値の和又は平均となり、例えば生体試料のように色と組織(生体組織)の構成に関連が強い試料では、その色の部分の組織の質量分析スペクトルを高感度(高S/N比)で得ることができる。

【0022】

また、生体試料に染色処理を行った場合には、染色された部分のみを選択的に質量分析することができ、染色領域の生体成分を高感度で質量分析することができる。現在では、生体試料の多くの組織がそれぞれ固有の染料で染色することが可能となっているので、この手法は生体試料の分析に有用な効果をもたらす。

【0023】

さらに、撮像系 11 に紫外光源等の励起光源を設け、それにより励起される試料の蛍光像を撮影するようにすれば、生体試料に関して更に多くの情報を得ることができる。

【0024】

上記のように全抽出領域(全箇所)の検出データをまとめて統計値を算出するのではなく、各箇所の検出データをそのまま試料画像図 4(a)(又は抽出領域像図 4(b))に重畳して表示するようにしてもよい。この場合、上記方法のステップ S13 において(代表)分析箇所を指定するのではなく、色を予め設定しておけば、領域抽出部 203 が自動的に染色部分や蛍光部分を選択し抽出してくれるので、使用者がいちいち染色部分や蛍光部分にレーザ光のスポットなどのイオン化領域を合わせる必要がなくなり、染色部分や蛍光部分の質量分析を簡便に行うことができるというメリットがある。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】本発明の一実施例である顕微質量分析装置の概略構成図。

【図2】実施例の顕微質量分析装置の計測・制御装置の機能ブロック図。

【図3】実施例の顕微質量分析装置の動作を示すフローチャート。

【図4】試料のCCD撮像画像(a)と抽出領域の画像(b)。

【図5】抽出領域の走査の状況を示す説明図。

【図6】試料画像のRGB各色の輝度値と全体の輝度値の関係を示すグラフ。

【符号の説明】

【0026】

11 ... 撮像系

10

20

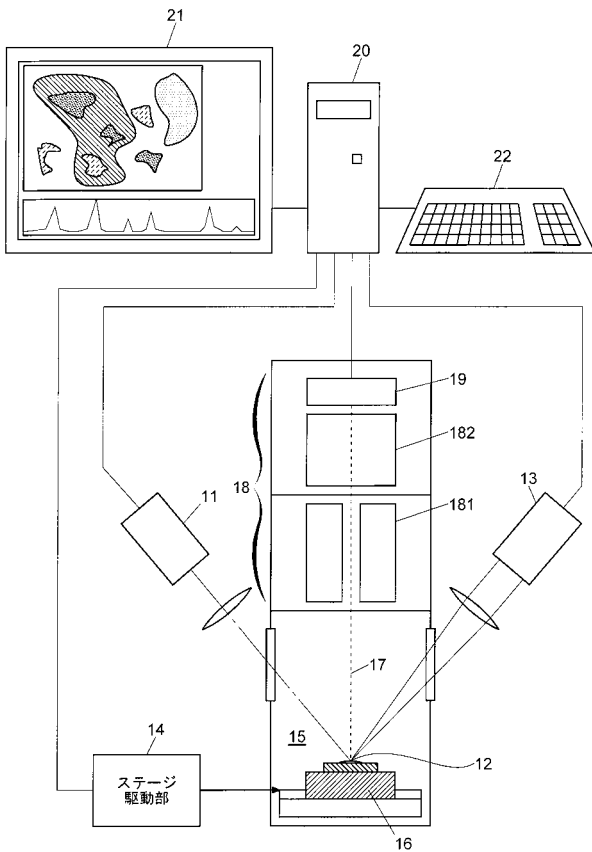
30

40

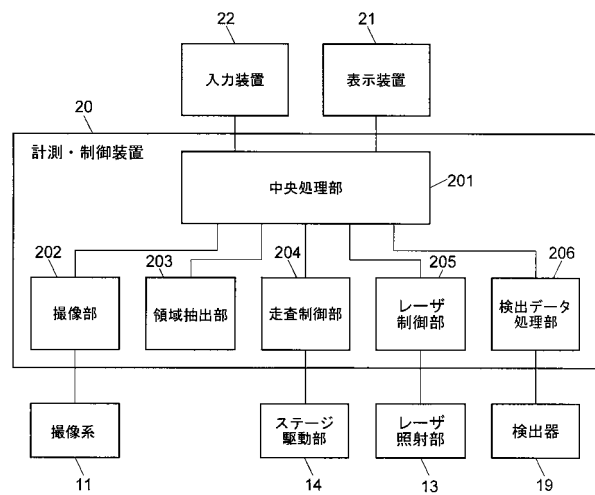
50

- 1 3 ... レーザ照射系
- 1 4 ... ステージ駆動部
- 1 5 ... 試料部
- 1 6 ... 試料ステージ
- 1 8 ... 質量分析部
 - 1 8 1 ... イオンガイド
 - 1 8 2 ... 質量分離部
- 1 9 ... 検出器
- 2 0 ... 計測・制御装置
 - 2 1 ... 表示装置
 - 2 2 ... 入力装置

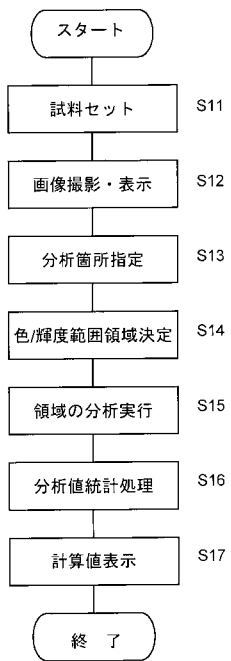
【図 1】



【図 2】

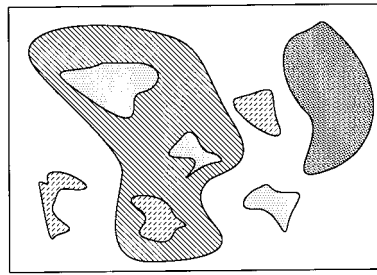


【図3】

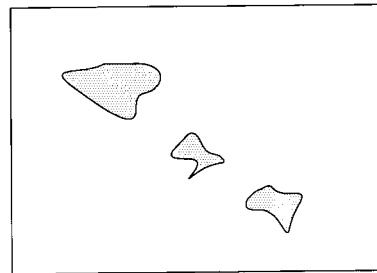


【図4】

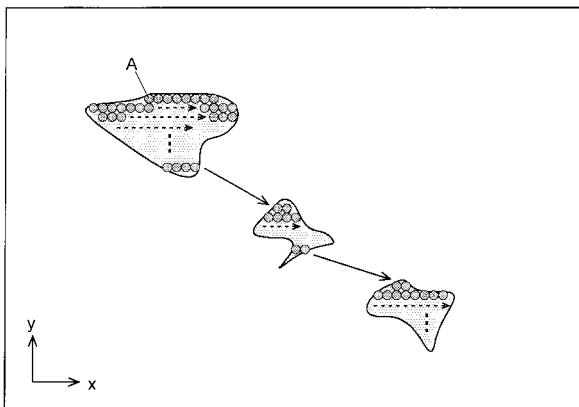
(a) 試料像



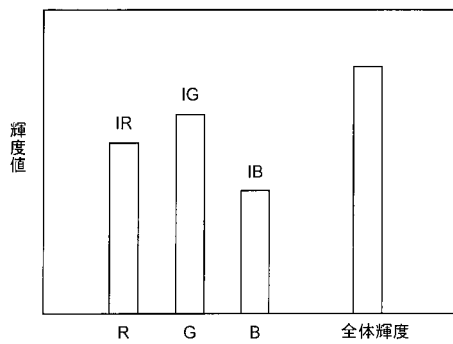
(b) 抽出領域



【図5】



【図6】



フロントページの続き

- (72)発明者 原田 高宏
京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 上野 良弘
京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 井上 藤男
京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 瀬藤 光利
愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター内

審査官 伊藤 裕美

- (56)参考文献 特開2004-340646(JP,A)
国際公開第2005/095942(WO,A1)
特開2004-347594(JP,A)
国際公開第03/034024(WO,A2)
特開2007-121135(JP,A)
再公表特許第2007/020862(JP,A1)
特開2007-066533(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 27/60 - 27/70
H01J 49/00 - 49/48