

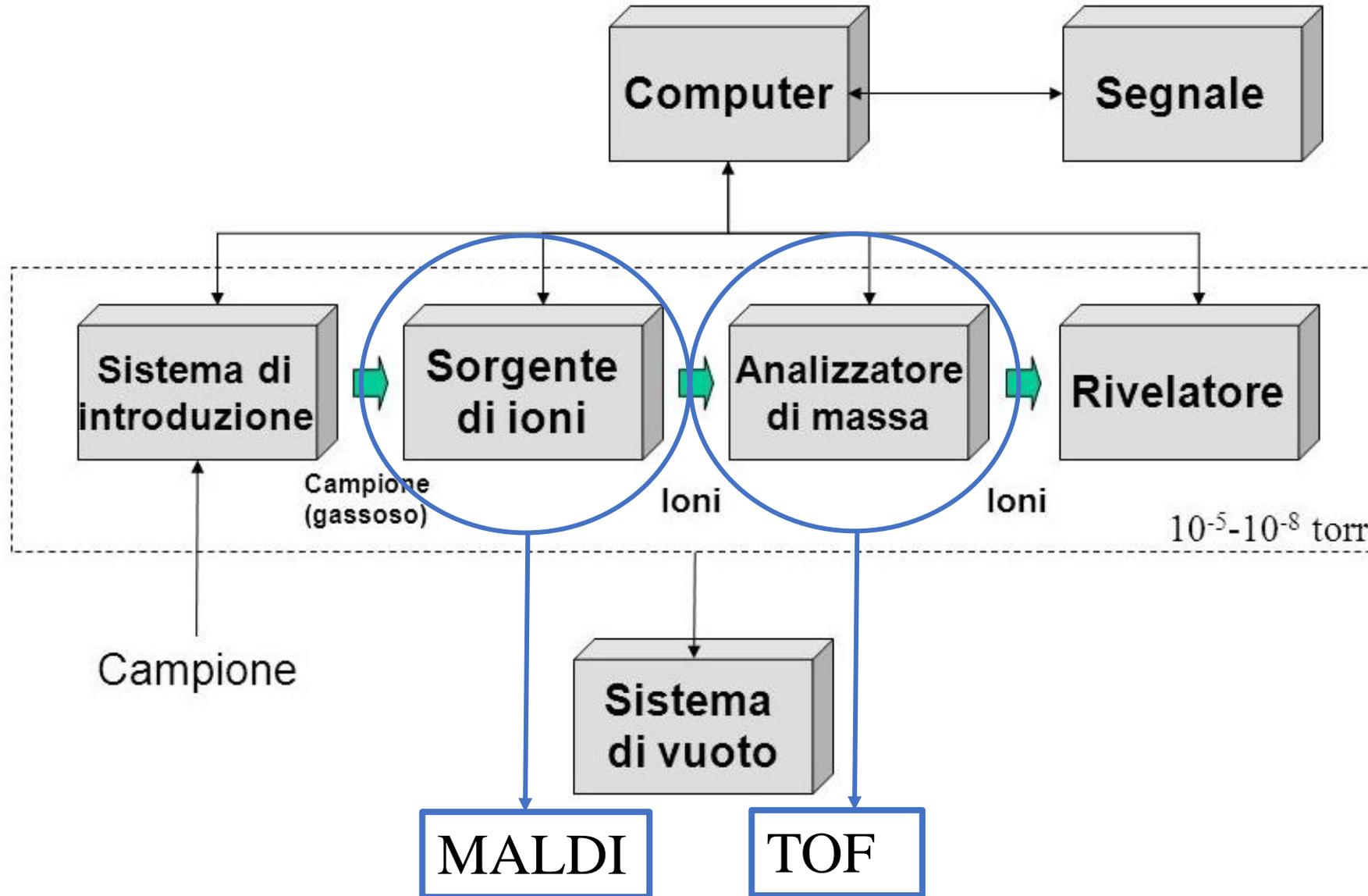
MALDI-TOF

PRINCIPI ED APPLICAZIONI

Dott.ssa Fabiola Eugelio, PhD student
feugelio@unite.it

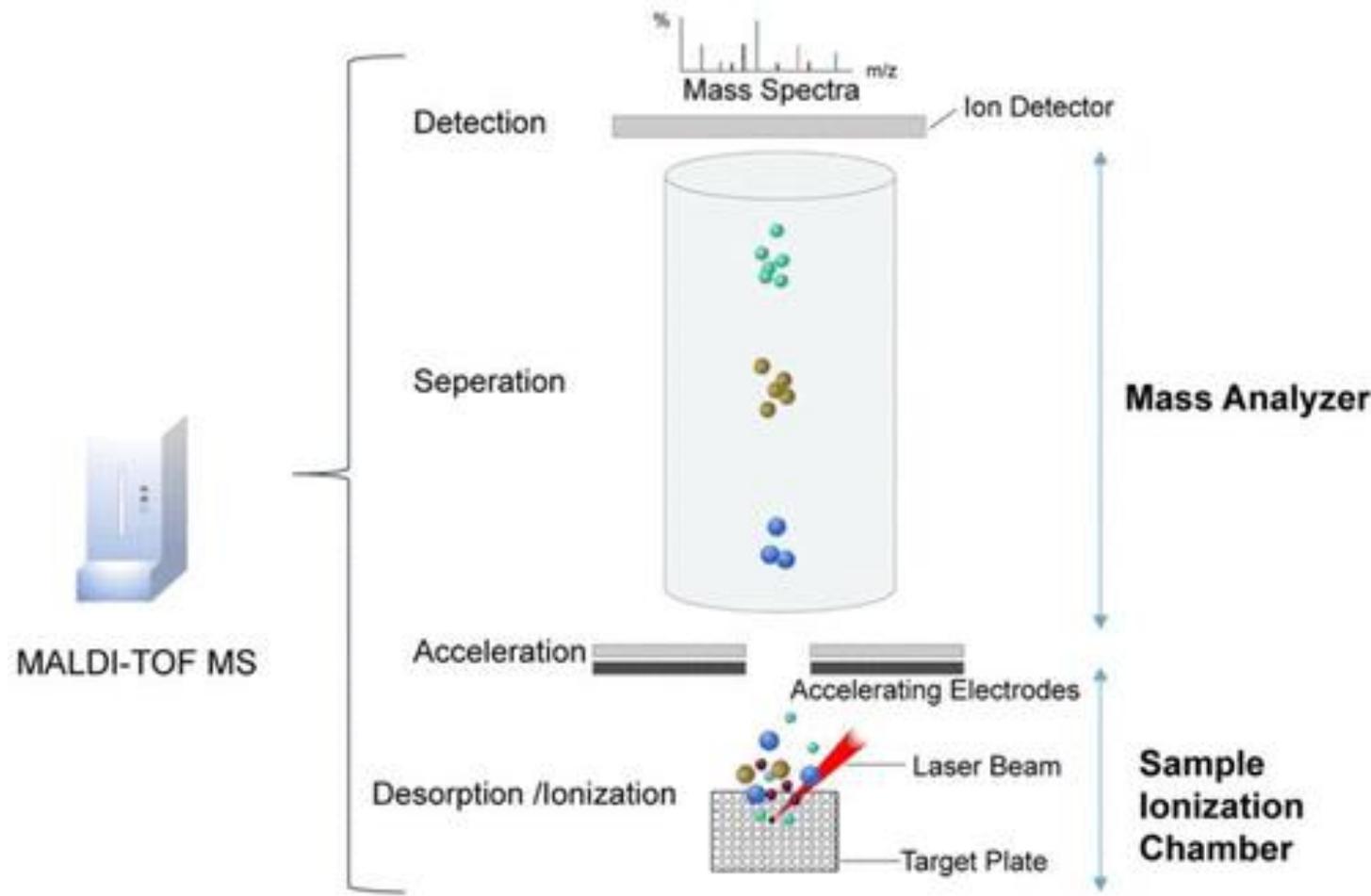


SISTEMA A BLOCCHI-SPETTROMETRIA DI MASSA



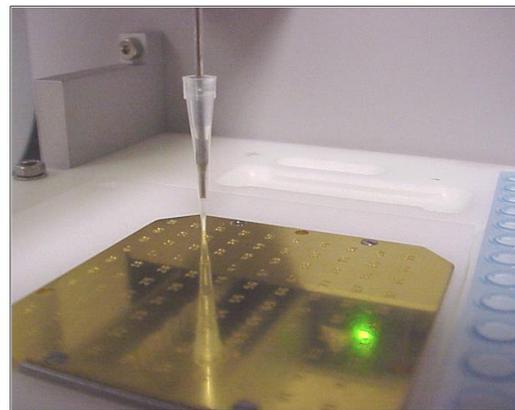
Matrix assisted laser desorption- ionization (MALDI)

In spettrometria di massa il desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice, comunemente indicato con l'acronimo MALDI (dall'inglese Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), è una tecnica di ionizzazione soft usata in spettrometria di massa a partire dagli anni 1990. La tecnica MALDI è normalmente condotta sotto vuoto (10 mTorr o meno di pressione), ma è possibile anche lavorare a pressione ambiente (AP-MALDI) perdendo però sensibilità e restringendo l'intervallo di rivelabilità.



Matrix assisted laser desorption- ionization (MALDI)

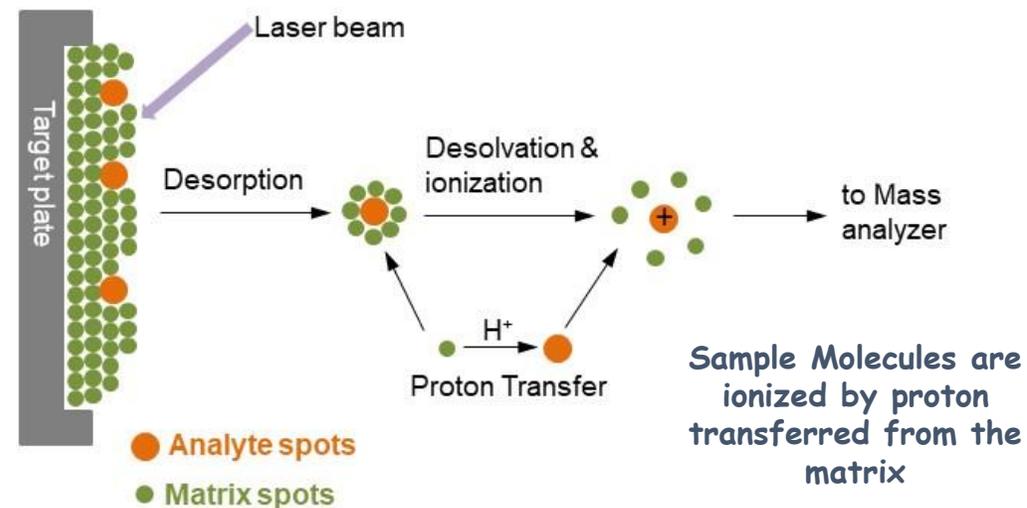
- Preparazione del campione - estrazione
- La tecnica consiste nell'assorbire il campione su una **matrice** e una volta portata in soluzione viene successivamente bombardata con un fascio laser (spesso un laser ad azoto).
- La scelta della *matrice* è cruciale per il MALDI (Le matrici più acide tendono a causare una maggiore frammentazione).
- Il campione è miscelato in un opportuno solvente con un **eccesso di matrice di circa 10000 volte**.
- La miscela matrice-analita (circa 1-2 μL) è depositata su un supporto d'argento (MALDI plate) e lasciata cristallizzare per lenta evaporazione dei solventi della matrice (per riscaldamento o con il vuoto).
- La co-cristallizzazione del campione e della matrice è critica e dipenderà dalle proprietà fisiche di entrambe



Matrix assisted laser desorption - ionization (MALDI)

Un **piccolo volume della miscela** (1-2 μl) viene deposto in uno dei **pozzetti** scavati sulla superficie del target. L'operazione viene ripetuta per tutti i campioni da analizzare.

Dopo avere allontanato il solvente, quando la miscela campione/matrice contenuta in ciascun pozzetto si trova allo stato di **solido amorfo**, il target viene collocato nella sorgente MALDI. La sorgente viene messa sotto vuoto e quindi, in sequenza, i pozzetti vengono investiti da un **raggio laser pulsato** (337 nm). Quando uno dei pozzetti viene investito dal raggio laser, le **molecole della matrice assorbono l'energia della radiazione incidente** (le molecole dei peptidi disciolti nella matrice non vengono direttamente eccitati dai fotoni della luce incidente e quindi non subiscono modificazioni chimiche di alcun genere, ad eccezione di un processo di protonazione).

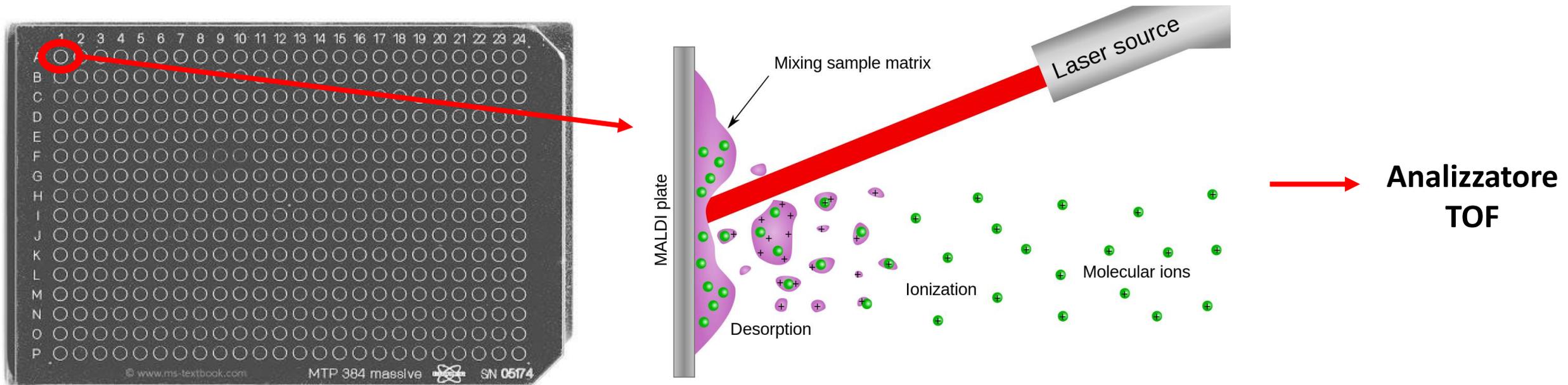


Matrix assisted laser desorption- ionization (MALDI)

- **La matrice deve possedere determinate caratteristiche chimico-fisiche, tra le quali:**
 - ✓ deve essere facilmente evaporabile, ma tale evaporazione non deve essere significativa durante la preparazione del campione o prima dell'effettuazione delle misurazioni;
 - ✓ deve avere un certo carattere acido in modo da fungere da fonte di protoni incoraggiando la ionizzazione dell'analita, con scarsa frammentazione;
 - ✓ possedere un forte assorbimento ottico nella regione UV tale che le permetta di assorbire la radiazione laser in modo efficiente
 - ✓ buone proprietà di miscelazione con l'analita.
 - ✓ Permettere di separare le molecole di campione le una dalle altre.

Matrix assisted laser desorption- ionization (MALDI)

Grazie al fenomeno del desorbimento, il campione viene rilasciato in forma "clusterizzata", ovvero complessato con la matrice. La matrice smorza gli effetti del fascio laser assicurando un'adeguata protezione all'analita che viene ionizzato e vaporizzato tramite l'energia in eccesso ceduta secondariamente dalla matrice stessa. Vengono così ottenuti ioni molecolari generalmente a singola carica, come quelli creati dall'acquisizione o dalla perdita di un protone. Molto spesso la tecnica MALDI viene abbinata a spettrometri dotati di **analizzatore a tempo di volo (Time of flight=TOF)**.



Parametri che influenzano il MALDI

La qualità degli spettri prodotti da MS MALDI dipende essenzialmente da due parametri:

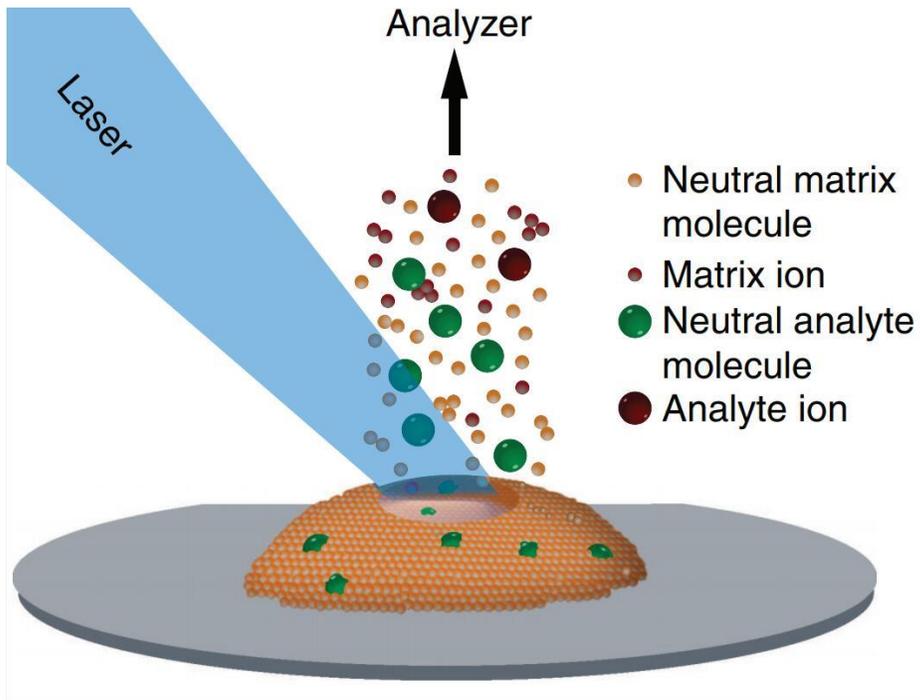
- > l'**omogeneità** della **miscela campione-matrice**
- > l'**intensità** della luce **laser** applicata

Per tale motivo quando si prepara una spettroscopia MALDI occorre considerare i seguenti aspetti:

- la scelta di un **opportuna matrice**
- la scelta di un **appropriato solvente**
- la miscelazione **dell'analita con la matrice**
- la **potenza** del raggio **laser**

Matrix assisted laser desorption- ionization (MALDI)

DESORBIMENTO LASER



Nonostante l'importanza di tale tecnica sperimentale, **il processo di formazione degli ioni** è ancora **poco noto**.

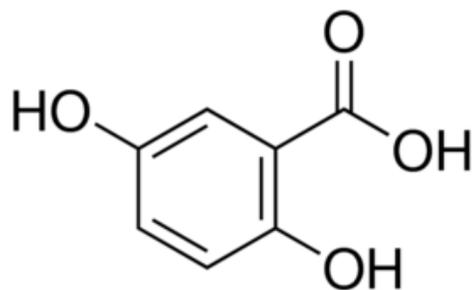
Il meccanismo per quanto ancora ignoto può essere così riassunto:

- Quando un impulso di raggio laser colpisce la **matrice**, la sua energia viene trasferita a quest'ultima, che risulta **parzialmente vaporizzata** e **trasporta nella fase vapore l'analita intatto**. (la porzione di campione colpita è molto piccola 0.05-0.2 mm).
- Durante l'espansione della nuvola di gas, protoni e ioni come Na^+ sono scambiati tra l'analita e la matrice, dando luogo alla formazione di ioni molecolari del campione (sia positivi che negativi).

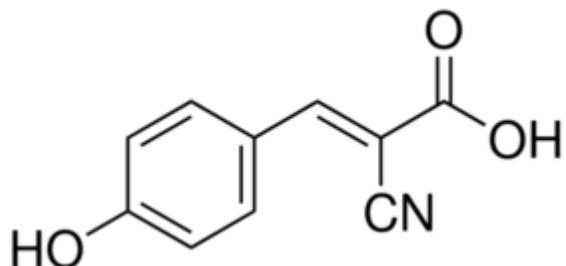
La principale differenza tra la metodica MALDI e le altre tecniche di ionizzazione è che la **MALDI** dà luogo ad una **generazione pulsatile** di ioni e non continua.

1. Formazione di una soluzione solida
2. Eccitazione ed evaporazione della matrice
3. Ionizzazione del campione

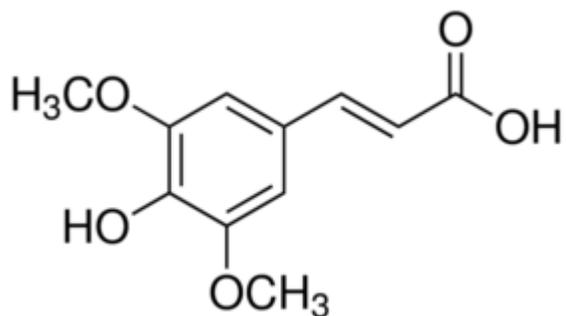
FORMAZIONE DEGLI IONI



DHB



CHCA



SA

Protonazione influenzata dal pH

La ionizzazione in MALDI necessita dell'incorporazione degli analiti nei cristalli prodotti nella matrice **in forma pre-protonata**, anche se la protonazione di piccole molecole può avvenire anche in fase gassosa dopo il desorbimento.

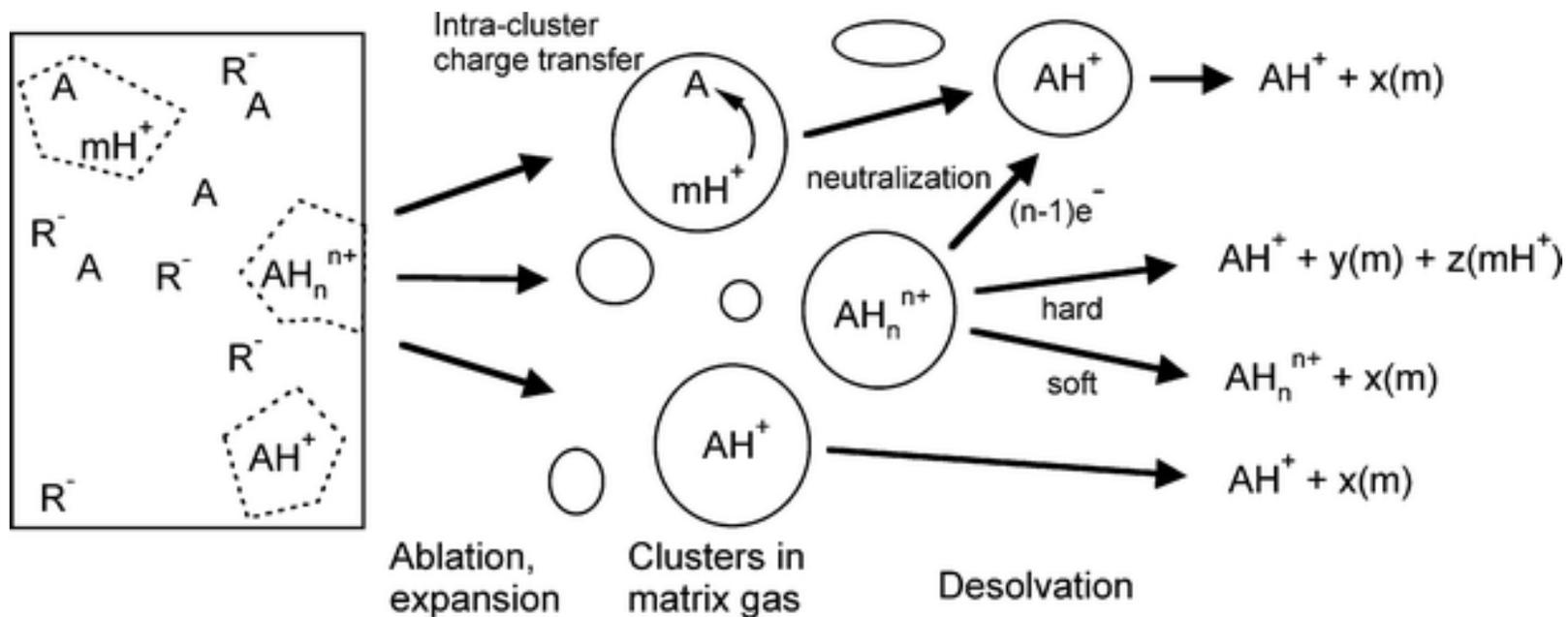
Ionizzazione per trasferimento di carica

Ci sono anche composti che **non riescono a ricevere l'H⁺** dai gruppi carbossilici (analiti leggermente basici) e la cationizzazione può avvenire anche per trasferimento protonico dovuto all'eccitazione conseguente al laser

Ionizzazione per assorbimento

Si possono avere quando gli analiti stessi assorbono alla lunghezza d'onda del laser ovvero di creano ioni radicali come M^{o+} oppure M^{o-}

FENOMENO LUCKY SURVIVOR



Durante il desorbimento gli ioni tendono a neutralizzarsi



Più cariche avrà la molecola più velocemente questa tenderà a neutralizzarsi



Le molecole monocariche tenderanno a neutralizzarsi più lentamente



ABBONDANZA DI IONI MONOCARICATI



La scelta della matrice

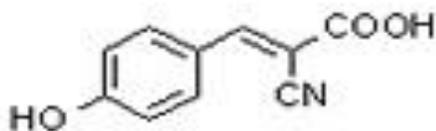
La scelta della migliore matrice dipende da numerosi fattori e la sua scelta è un **processo più empirico** che dettato da regole certe.

Per **piccole molecole** la scelta classica cade soprattutto sull'**acido gentisico (DHB)**, che risulta adatto per **molecole a basso P.M. polari** poiché da scarsa frammentazione e costituisce una matrice "veloce" cioè adatta a ioni che hanno un'elevata velocità iniziale.

Si utilizza una **soluzione satura di DHB in acqua per i carboidrati**, mentre **soluzioni di DHB in metanolo o in metanolo/cloroformio** sono particolarmente adatte per i **lipidi**. L'acido gentisico si può utilizzare sia nella ionizzazione positiva sia negativa.

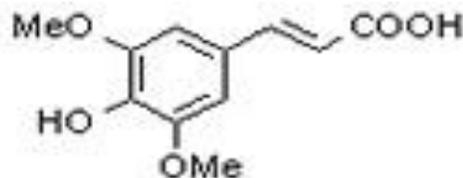
Per le **proteine** e i **peptidi** si utilizza l'**acido sinapinico** e l'**acido cianoidrossicinnamico** (quest'ultimo soprattutto per i peptidi o le proteine di piccole dimensioni) nella ionizzazione positiva ed il **2,4,6 triidrossi acetofenone** nella ionizzazione negativa.

Analisi Peptidi



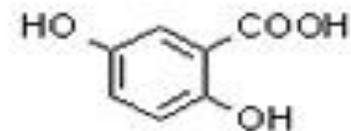
α -Ciano-4-idrossicinnamico Acid

Analisi Proteine



Sinapinico Acid

Analisi Oligosaccaridi



2,5-idrossibenzoico Acid

TIPOLOGIE DI MATRICE

Composto	Nome alternativo	Solvente	Lunghezza d'onda	Applications
Acido 2,5-dihydroxybenzoico	DHB	Acetonitrile, acqua, metanolo, acetone, cloroformio	337, 355, 266	Peptidi, nucleotidi, oligonucleotidi, oligosaccaridi, lipidi
Acido Sinapinico	SA	Acetonitrile, acqua, acetone, cloroformio	337, 355, 266	Peptidi, proteine, lipidi
Acido Ferulico	FA	Acetonitrile, acqua, propanolo	337, 355, 266	Proteine
Acido α -ciano-4-idrossicinnamico	CHCA	Acetonitrile, acqua, etanolo, acetone	337, 355	Peptide, lipidi, nucleotidi
Acido pinolinico	PA	Etanolo	266	Oligonucleotidi
Acido 3-idrossipinolinico	HPA	Etanolo	337, 355	Oligonucleotidi

Attenzione che alcune matrici come i derivati cinnamici tendono a polimerizzare (per esempio in presenza di alcheni) per cui tali composti vanno preparati poco prima dell'esperimento.

MATRICI MALDI

Devono formare solidi cristallini con un bassa pressione di vapore in modo da non sublimare all'interno della sorgente MALDI

MATRICI IR

- Devono contenere gruppi OH o NH per assorbire a 3 μm tramite vibrazioni di stretching
- Oppure contenere un gruppo CO o NH che assorbono rispettivamente tramite vibrazioni di stretching e bending a 10 μm

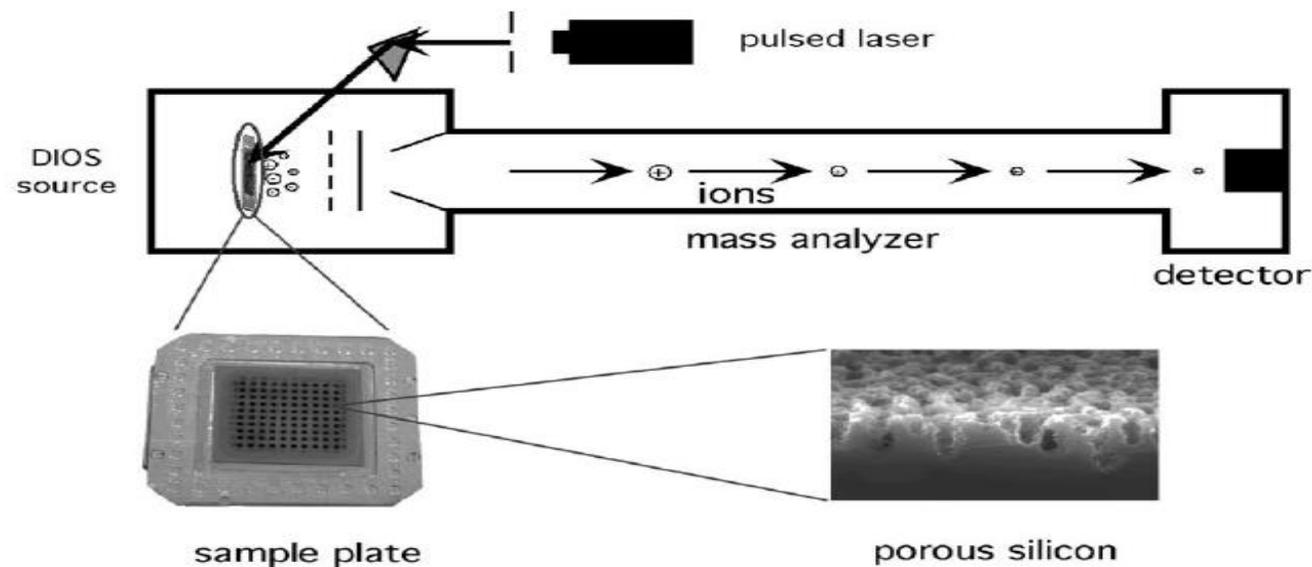
MATRICI UV

- Devono contenere **gruppi cromofori** che assorbono alla lunghezza d'onda del laser

Matrix assisted laser desorption - ionization (MALDI)

Se un composto assorbe raggi UV può essere utilizzato nella ionizzazione MALDI senza l'utilizzo di alcuna matrice. In tal caso esso funge da analita e da matrice contemporanea mente: la sigla più adatta in tal caso è LDI anziché MALDI. Tale fenomeno avviene solo con molecole dal peso molecolare inferiore a 3kDa.

Ionizzazione su silice



La scelta del solvente

Il principale scopo del solvente è quello di dare una **soluzione omogenea** in cui soluto e matrice sono uniformemente distribuiti.

Un buon solvente è quello nel quale analita e matrice sono ugualmente solubili, in modo che quando esso evapora si **formino cristalli omogenei campione-matrice**.

Se un solvente solubilizza meglio uno dei due componenti si otterranno zone ricche di campione e zone ricche di matrice: per ciò bisogna far sì che matrice e analita abbiano la stessa polarità.

In molti casi si utilizzano **miscele di solventi apolari** (acetonitrile o acido trifluoroacetico) e solventi **polari** (acqua, metanolo o etanolo) quando c'è un'elevata differenza tra la polarità dei due soluti.

Si è inoltre osservato che l'aggiunta di acido trifluoroacetico ha la capacità di favorire la formazione degli ioni positivi.

La miscelazione dell'analita con la matrice

Ci sono essenzialmente due possibilità:

1. **Si miscelano precedentemente** (si prepara comunque poco prima, mai diverse ore altrimenti la soluzione degrada) e si trasferisce la soluzione ottenuta nel plate dello strumento MALDI: è **adatto quando si usa un solo solvente che solubilizza bene entrambi i soluti**
2. Si miscelano direttamente **"in situ"** nel plate dello strumento: è più adatto quando si usano miscele di solventi per evitare la separazione dei solventi o il precipitato del campione.

Si aggiunge sempre prima il campione e poi la matrice altrimenti quest'ultima in eccesso tende a cristallizzare separandosi dall'analita.

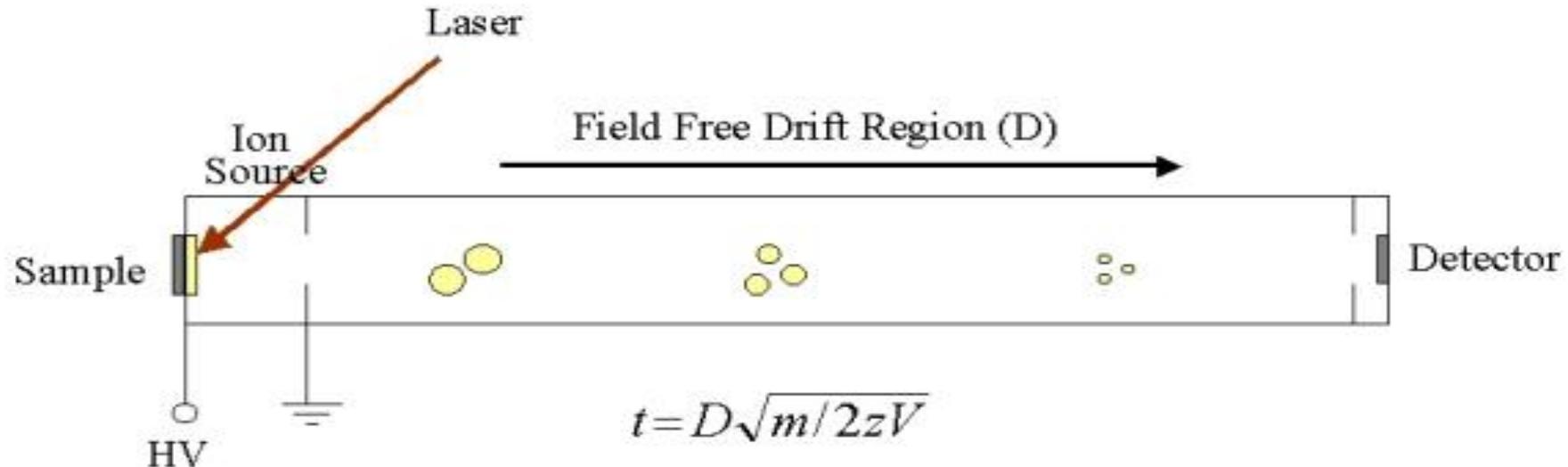
Matrix assisted laser desorption - ionization (MALDI)

Il **raggio laser** non deve decomporre il campione e l'impulso di energia deve avere un tempo inferiore a **100 ns**.

Una volta formati gli ioni vengono **accelerati da un campo** elettrico di 20 kV.

Dopodiché gli ioni sono **lasciati liberi** di "cadere" in uno **spazio di volo** lungo fino a **3 m**: la separazione degli ioni si basa sul tempo impiegato per percorrere una certa distanza nota.

E' possibile correlare il cammino dello ione con il suo rapporto m/z .



La potenza del raggio laser

La scelta di tale parametro è un altro fattore determinante la bontà di uno spettro MALDI: in genere si può affermare che **umentando** la potenza del raggio laser aumenta la **sensibilità** ma **diminuisce la risoluzione**. Inoltre **umentando tale potenza**

- si aumenta la **frammentazione della molecola**
- si **induce** la **formazioni di ioni e quella di dimeri**.

Inoltre la potenza del raggio laser dipende dal tipo di sostanza analizzata: mentre le proteine si analizzano con basse potenze laser, i carboidrati richiedono alte potenze.

Occorre infine aumentare la potenza del raggio laser se sono presenti alte quantità di impurezze ioniche.

Matrix assisted laser desorption- ionization (MALDI)

La tecnologia laser ha consentito di dirigere, in maniera quasi istantanea, una grande quantità di energia su un campione, portando al desorbimento di molecole intatte piuttosto che alla loro decomposizione.

Questa tecnica di ionizzazione laser assistita dalla matrice, utilizza l'impatto di fotoni ad alta energia su un campione, inglobato in una matrice organica solida, per desorbire e al tempo stesso ionizzare l'analita.

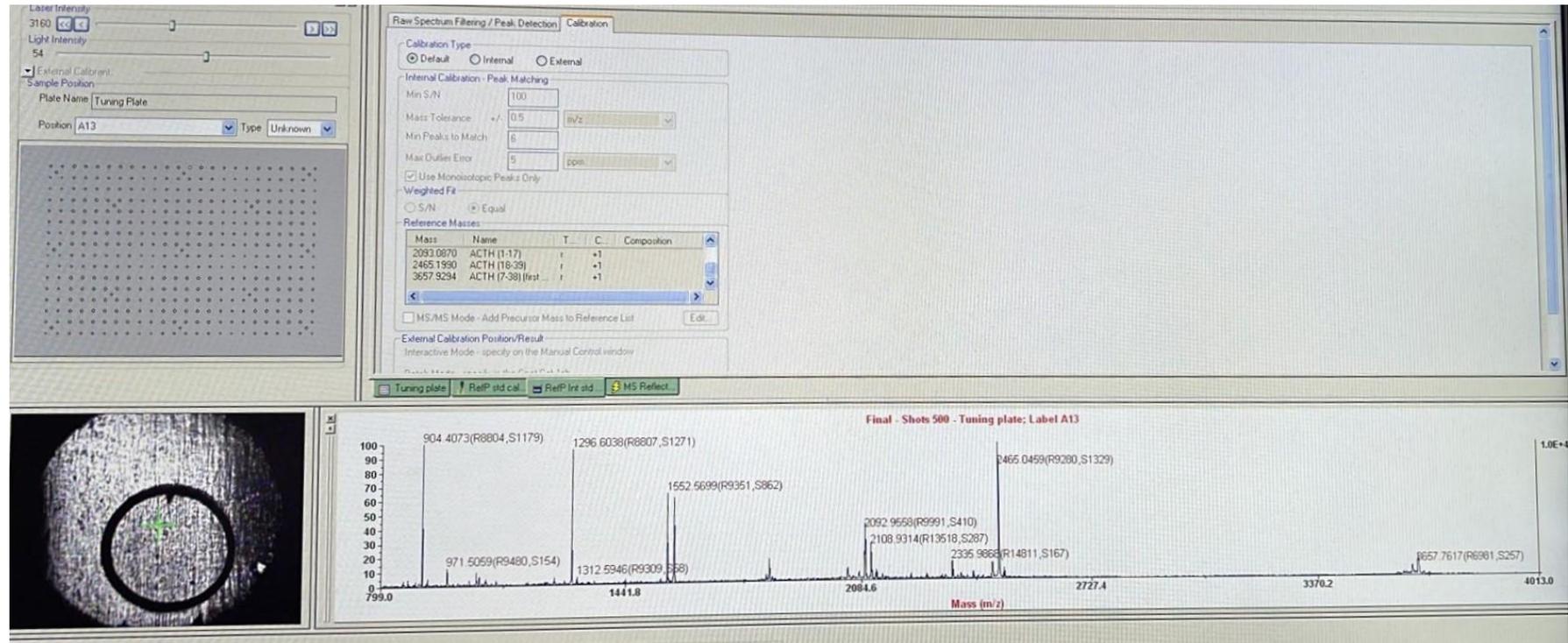
Assieme all'electrospray, è attualmente tra i metodi di ionizzazione più importanti per i composti non volatili ad alto peso molecolare.

Per ogni analita si possono variare diversi parametri sperimentali:

- lunghezze d'onda laser
- energia d'impulso
- matrici e comatrici
- combinazioni matrice-analita.

Matrix assisted laser desorption- ionization (MALDI)

- I lasers offrono due importanti benefici:
 - ✓ possono pulsare da un'onda continua fino ai femtosecondi (10^{-15} s); allo scopo di ridurre la decomposizione termica di molecole organiche
 - ✓ possono essere focalizzati su diametri submicrometrici, consentendo all'operatore di controllare il raggio con un appropriato microscopio e di accumulare spettri successivi dalla stessa area o da aree diverse



TIPOLOGIE DI LASER

Intervallo spettrale	Lunghezza d'onda	Energia dei fotoni	Tipo laser
UV	193 nm	6.4 eV	Laser a eccimeri ArF
UV	248 nm	5.0 eV	Laser a eccimeri KrF
UV	266 nm	4.7 eV	Laser a Nd:YAG QIF
UV	308 nm	3.8 eV	Laser a eccimeri di XeCl
UV	337 nm	3.7 eV	Laser ad azoto
UV	355 nm	3.5 eV	Laser a Nd:YAG TIF
IR	1.06 μm	1.2 eV	Laser a Nd:YAG
IR	2.94 μm	0.4 eV	Laser a Er:YAG
IR	1.7-2.5 μm	0.7-0.5 eV	Laser OPO
IR	10.6 μm	0.1 eV	Laser a CO2

Vantaggi del MALDI

I principali vantaggi della tecnica MALDI che offrono possibilità uniche di analizzare molecole di interesse biologico sono:

- possibilità di **analizzare molecole volatili e polari in modo rapido**
- le **reazioni di frammentazioni sono rare**
- lo **ione molecolare è sempre rilevabile**
- sono analizzabili **miscele di sostanze senza alcuna separazione**
- si formano solo **ioni monocarica**
- è indipendente dalla presenza di impurezze

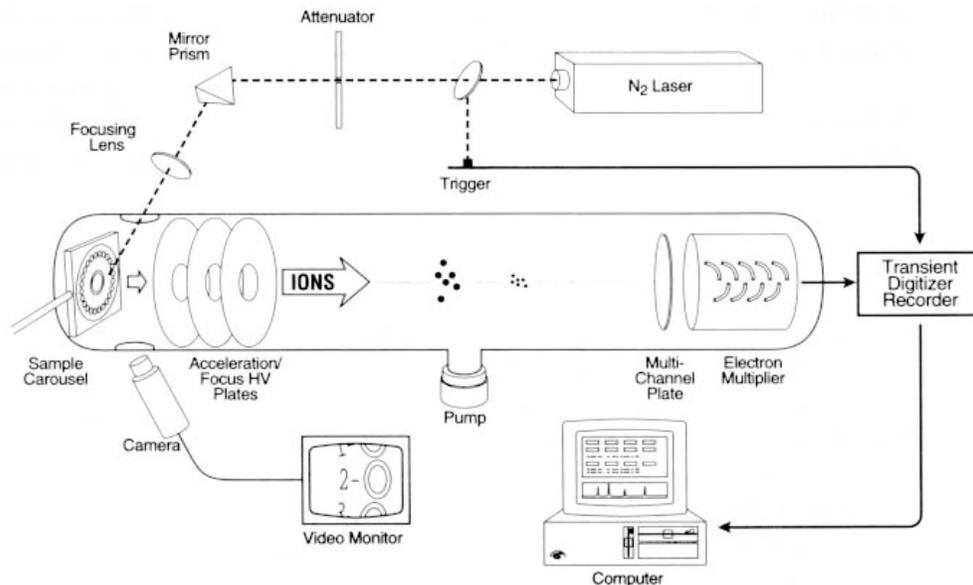
Gli ultimi due vantaggi danno luogo a spettri facilmente interpretabili e rendono tale tecnica preferibile ad altre tecniche come la ionizzazione ad elettrospray.

ANALIZZATORI A TEMPO DI VOLO (TOF)

Due sono gli stadi in cui si articola il suo funzionamento:

1. accelerazione degli ioni
2. misura del tempo di volo

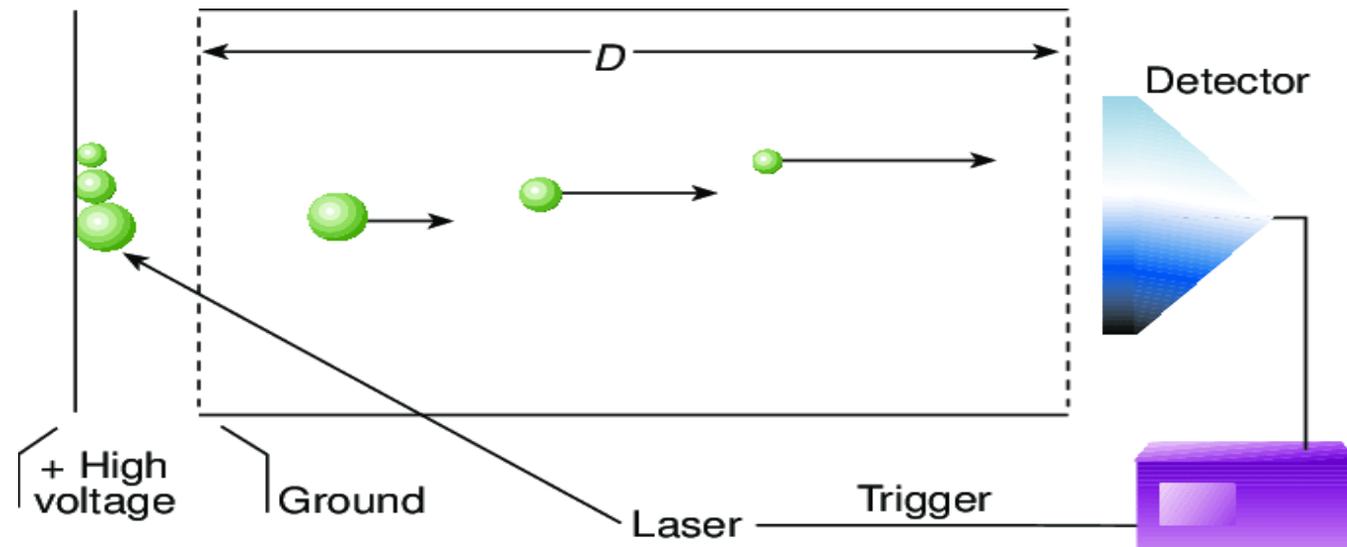
Gli ioni sono formati nella sorgente come pacchetto discreto di ioni, inizialmente consistente di ioni con diversi valori di m/z , che è pulsato (mediante le slitte di accelerazione all'uscita della sorgente) nella regione del tubo di volo (lungo 30-100cm) libera da campi elettrici.



- Il principio essenziale dell'analizzatore a tempo di volo è che se gli ioni con differenti masse sono accelerati alla stessa energia cinetica, ciascuno ione acquista una velocità caratteristica che dipende dal suo valore di m/z .
- Ciascuno ione ha un'energia cinetica zV e poiché tutti gli ioni hanno essenzialmente la stessa energia le loro velocità sono inversamente proporzionali alle radici quadrate delle loro masse.
- Ioni con differenti m/z si separano spazialmente viaggiando lungo il tubo di volo: ioni con bassi rapporti m/z , essendo più veloci viaggiano in testa e colpiscono il detector prima degli ioni con rapporti m/z più alti.

Il tempo di volo presenta altri **vantaggi** oltre alla sua *semplicità e robustezza*:

- *la velocità*: l'intero spettro di massa è ottenuto in ogni singolo ciclo di misura senza necessità di scansione di voltaggi e correnti ed i tempi di volo richiedono da 1 a 30 μs ;
- *la sensibilità*: poiché gli ioni attraversano pochi elementi ottici, la loro trasmissione dal punto di ionizzazione al detector è usualmente più alta di qualsiasi altro analizzatore (si potrebbe arrivare ad analizzare quantità femtomolari);
- *un intervallo di masse da analizzare praticamente illimitato* (potrebbero essere rilevati ioni a singola carica fino a 1Mda).



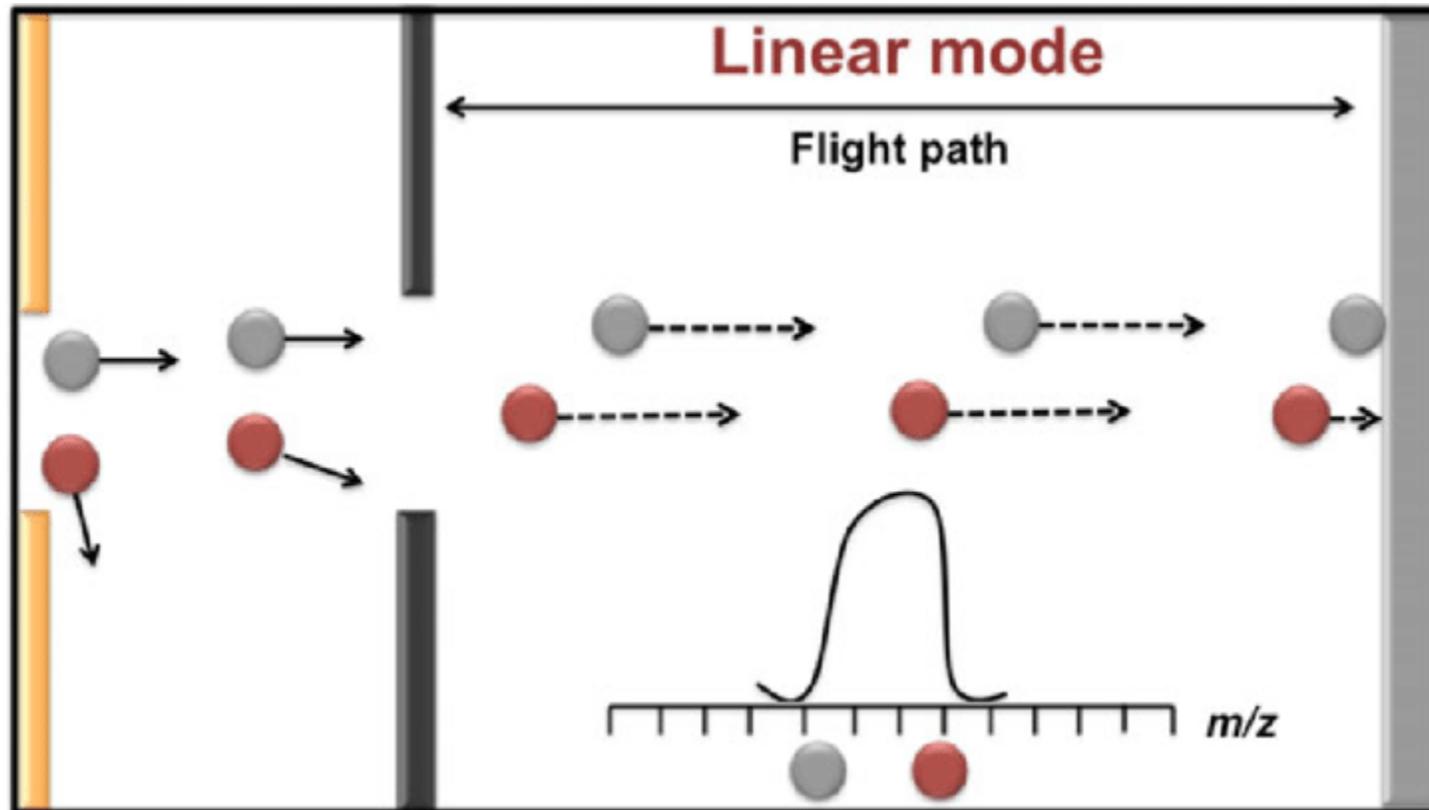
MODALITA' DI ACQUISIZIONE: LINEAR

I primi analizzatori TOF avevano risoluzione bassa.

Il motivo è essenzialmente l'energia cinetica con cui gli ioni sono desorbiti dalla matrice dopo l'impulso del laser, e che si somma a quella fornita dal campo elettrico.

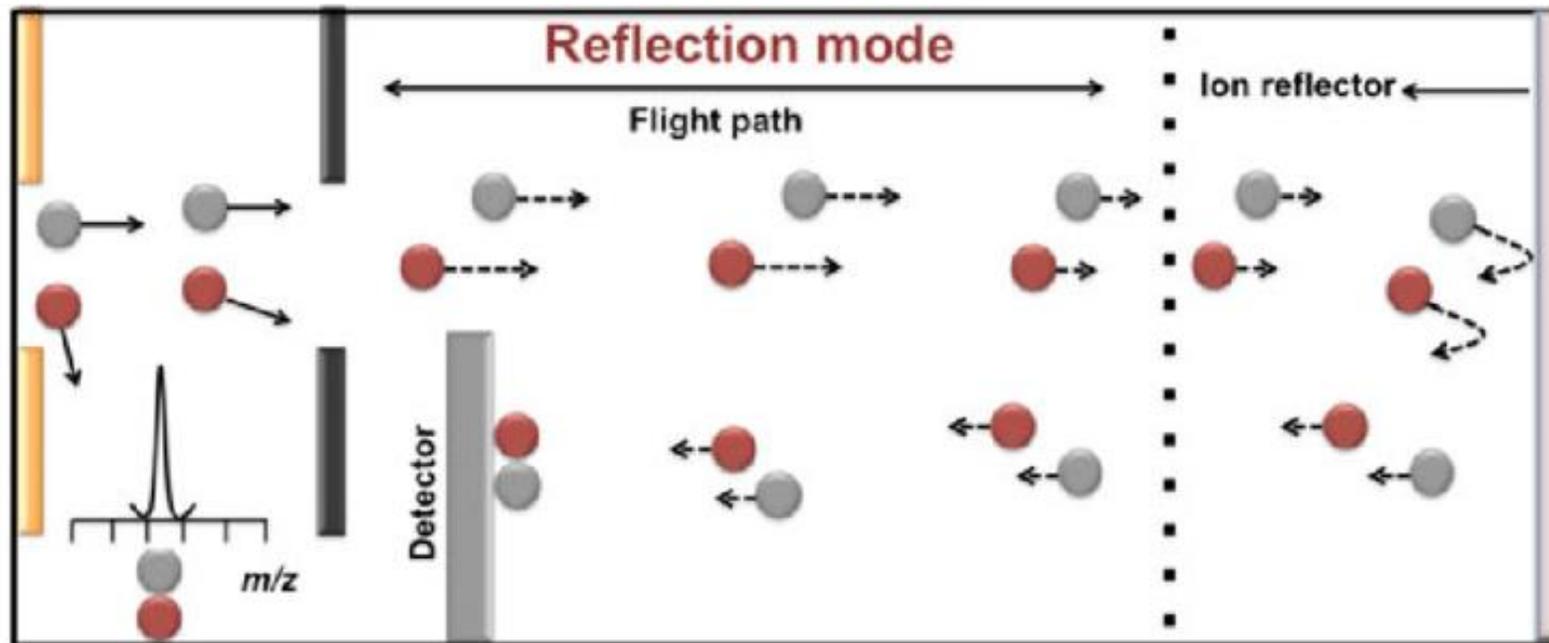
Ioni con la stessa massa ma con energia cinetica iniziale diversa arrivano al detector in momenti leggermente diversi.

Questo allarga i picchi e diminuisce la risoluzione.

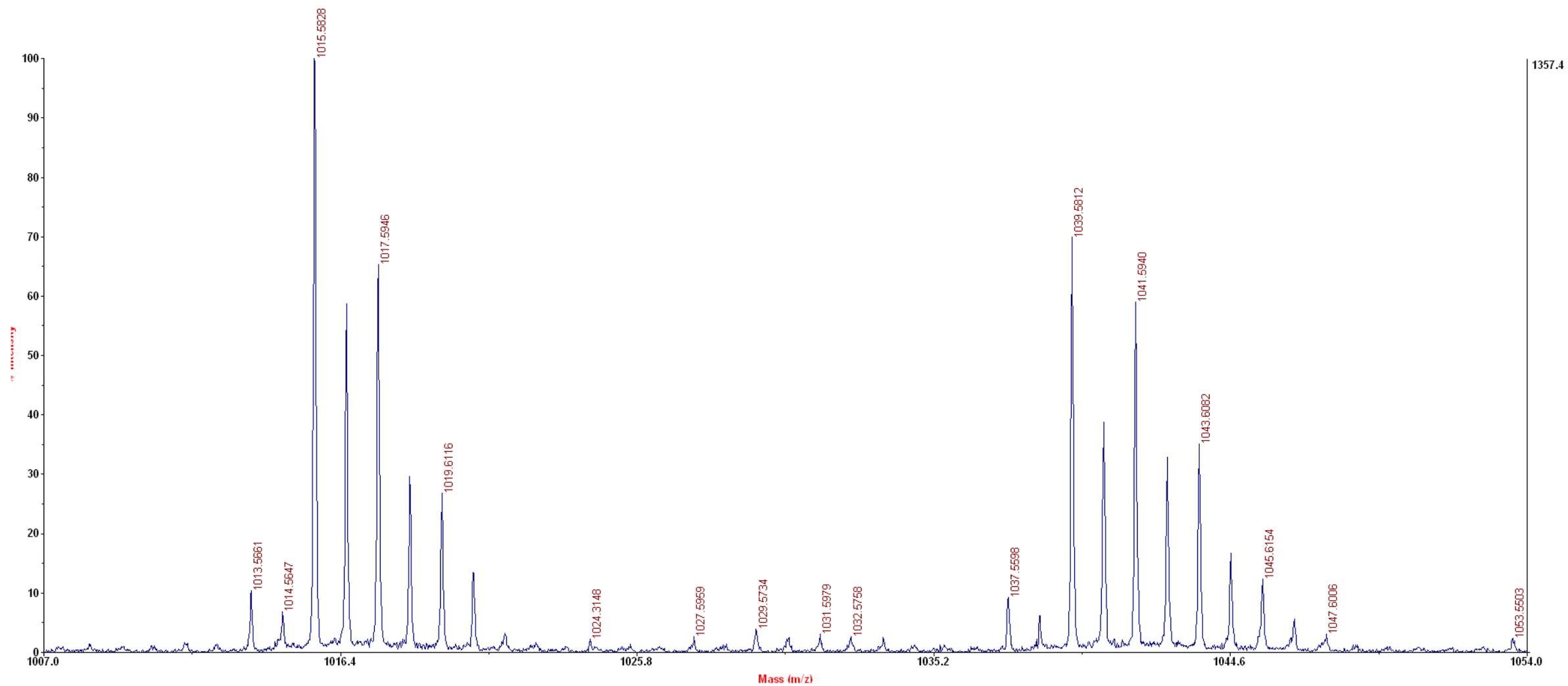


Il Reflectron: TOF a riflessione

Si definisce Reflectron uno spettrometro di massa a tempo di volo in cui la **correzione delle differenze energetiche di un gruppo di ioni con lo stesso valore di m/z** viene realizzato grazie all'uso di un **campo elettrico di decelerazione (Reflector)**: in un tale dispositivo gli ioni con lo stesso m/z ed energie cinetiche differenti sono dapprima **rallentati, poi fermati ed infine respinti** (per azione di un potenziale dello stesso segno della polarità degli ioni) con **un'inversione della loro direzione di volo**. Gli ioni a più alta energia penetrano più profondamente nel campo di riflessione e quindi vi trascorrono più tempo di quelli a bassa energia. Se l'azione ritardante del campo del reflector è adeguata, **questo effetto compensa le differenze nel tempo di volo di ioni con lo stesso m/z** ed il pacchetto viene rifocalizzato in uscita.

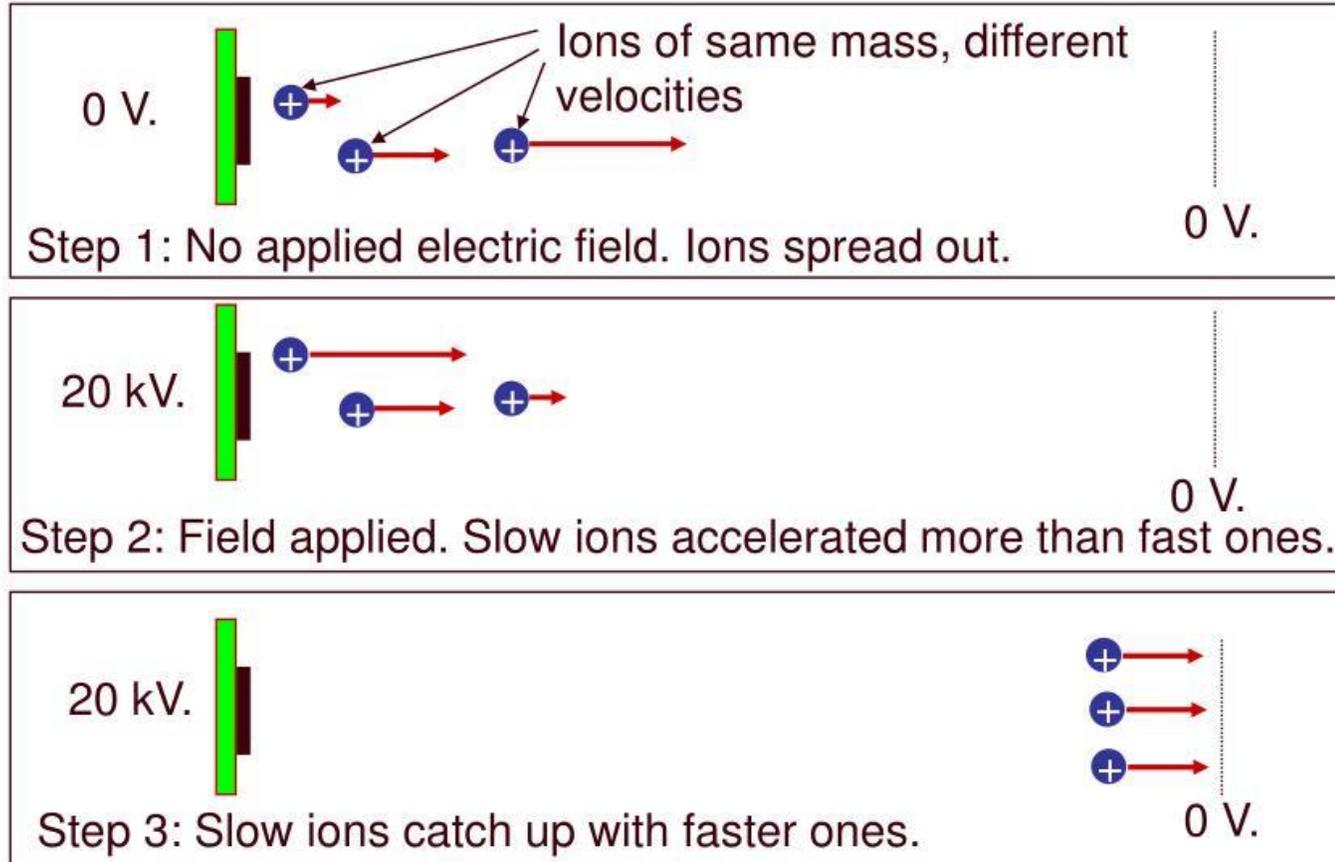


MODALITA' DI ACQUISIZIONE: REFLECTRON



DELAYED EXTRACTION

Delayed Extraction (DE) improves performance



La delayed extraction compensa la diversa velocità iniziale degli ioni.

Applicazioni del MALDI

- Determinazione peso molecolare
- Identificazione proteica
- Mapping Peptidico: digestione in situ
- Identificazioni modificazioni post-traslazionali
- Controllo in tempo reale di processi enzimatici
- Studi di binding ligando-recettore
- Charting proteico == Proteomica
- Sequenziamento DNA/RNA
- Sequenziamento a.a.: frammentazione in situ
- Analisi di omogenati non trattati
- Caratterizzazione oligosaccaridi
- Caratterizzazioni lipidi e loro aggregati
- Analisi polimeri organici e/o impurezze

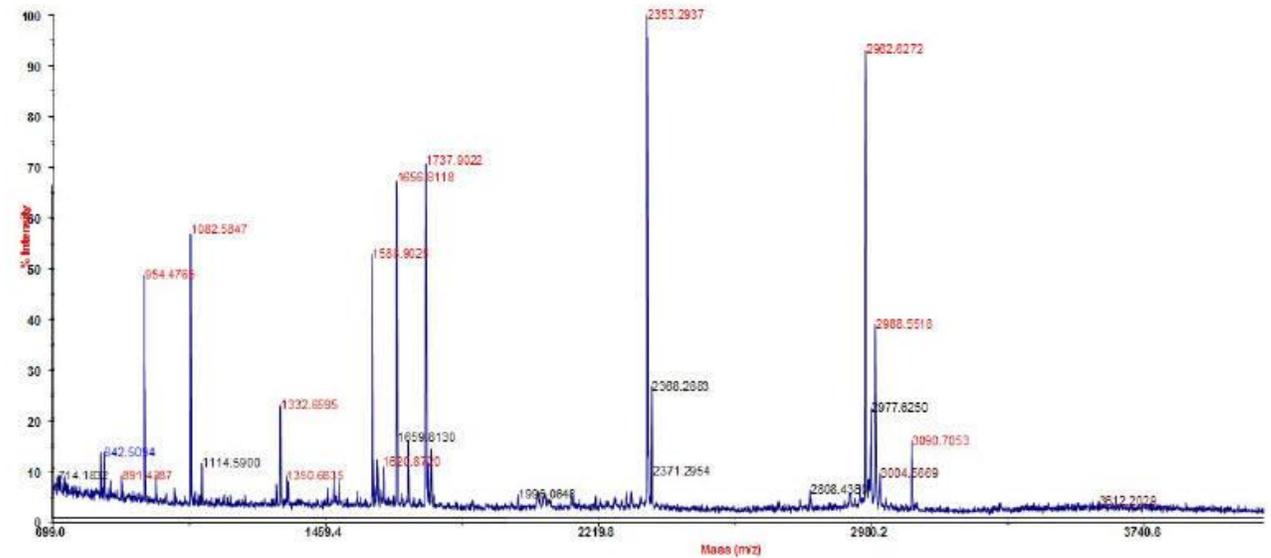
ANALISI DI PROTEINE CON LA TECNICA MALDI-MS

Fingerprinting proteico

E' la tecnica di analisi MALDI più utilizzata ma anche la più semplice

Le matrici comunemente utilizzate sono DHB e SA

Viene utilizzato il TOF in modalità linear



FINGERPRINTING PROTEICO



Biology Methods and Protocols, 2019, 1–8

doi: 10.1093/biomethods/bpaa013
Methods Manuscript

METHODS MANUSCRIPT

MALDI-TOF MS protein fingerprinting of mixed samples

Michael A. Reeve* and Denise Bachmann

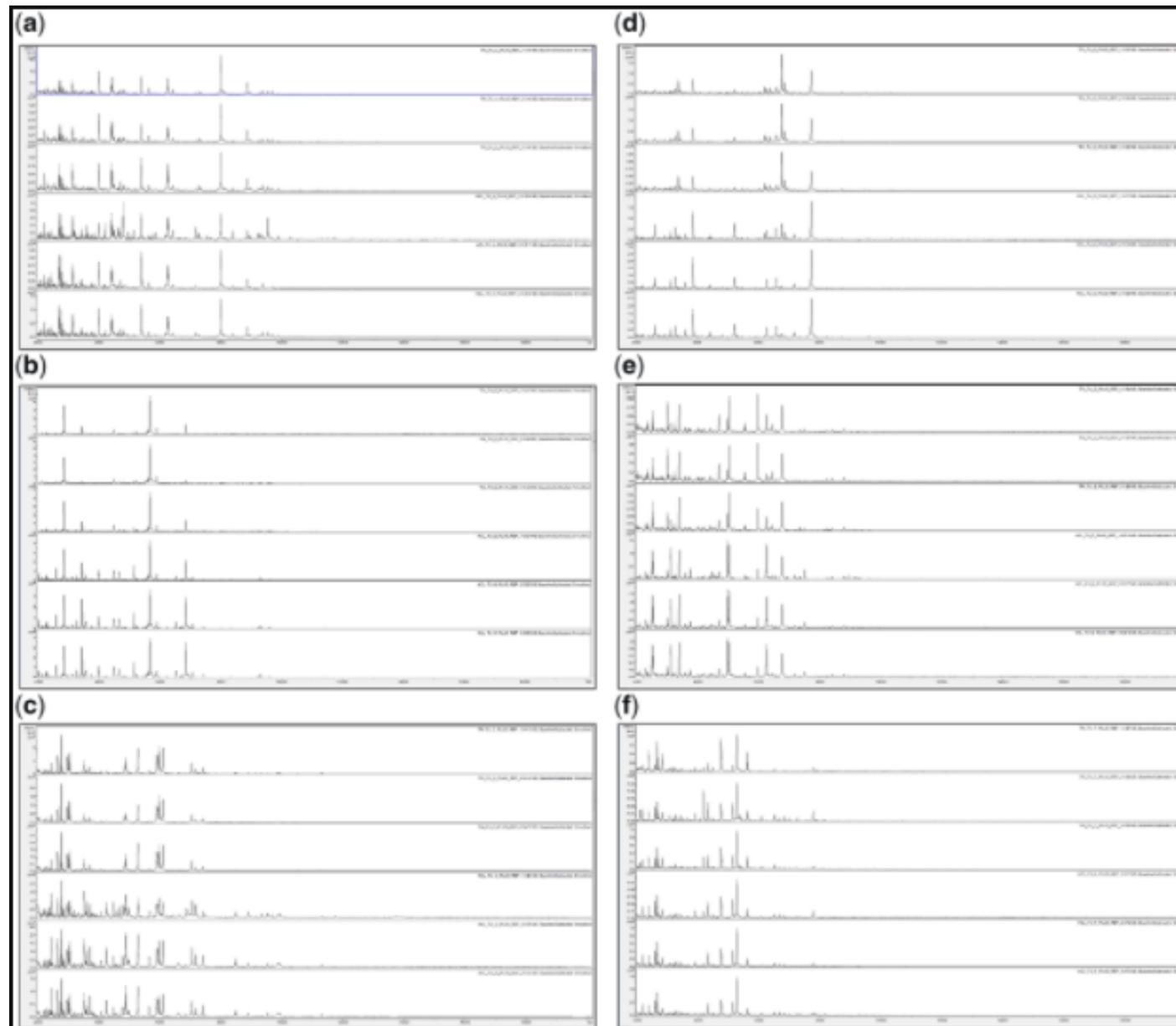
Department of Bioscience, CABI Bioscience, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY, UK

*Correspondence address. Department of Bioscience, CABI Bioscience, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY, UK. Tel: +44 (0)1491-829033; Fax: +44 (0)1491-829100; E-mail: M.Reeve@cabi.org

Downloaded from <https://academic.oup.com/biomethods>

Matrix: HCCA + TFA 1%

Mode: Linear Positive



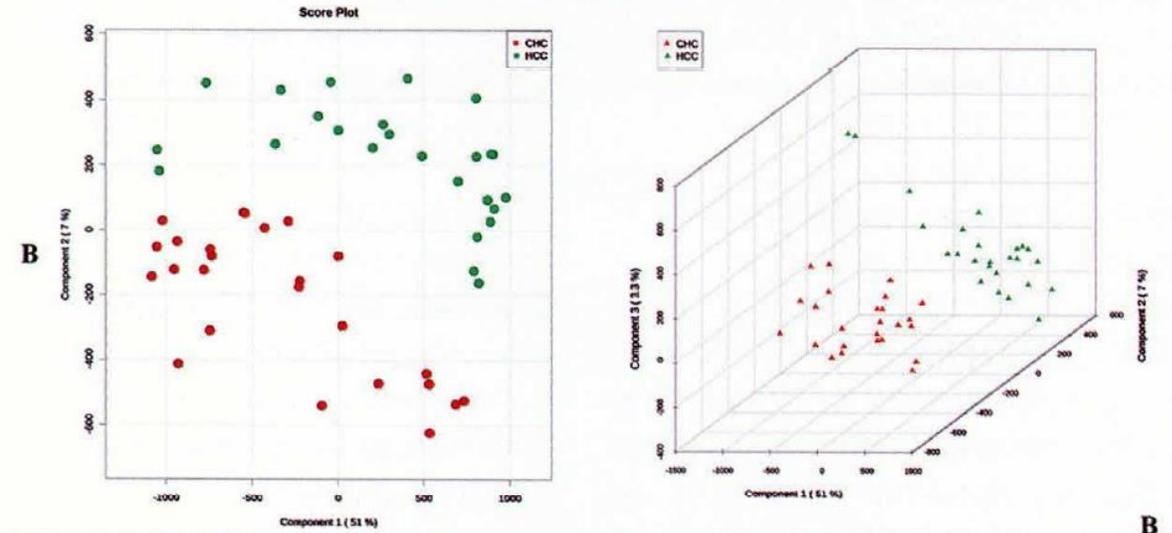
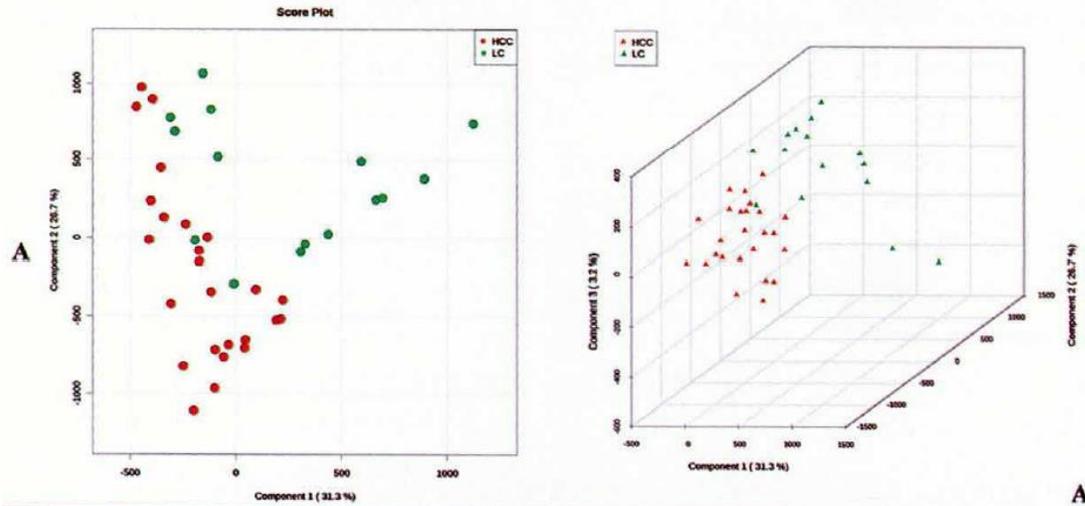
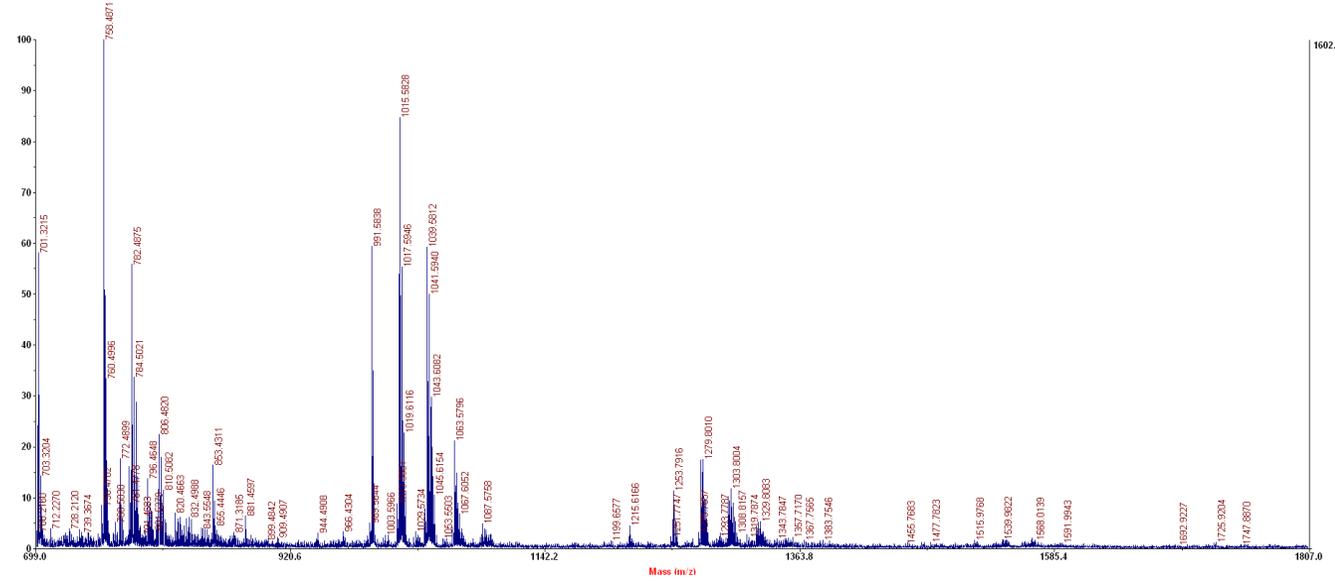
FINGERPRINTING LIPIDICO

ORIGINAL PAPER

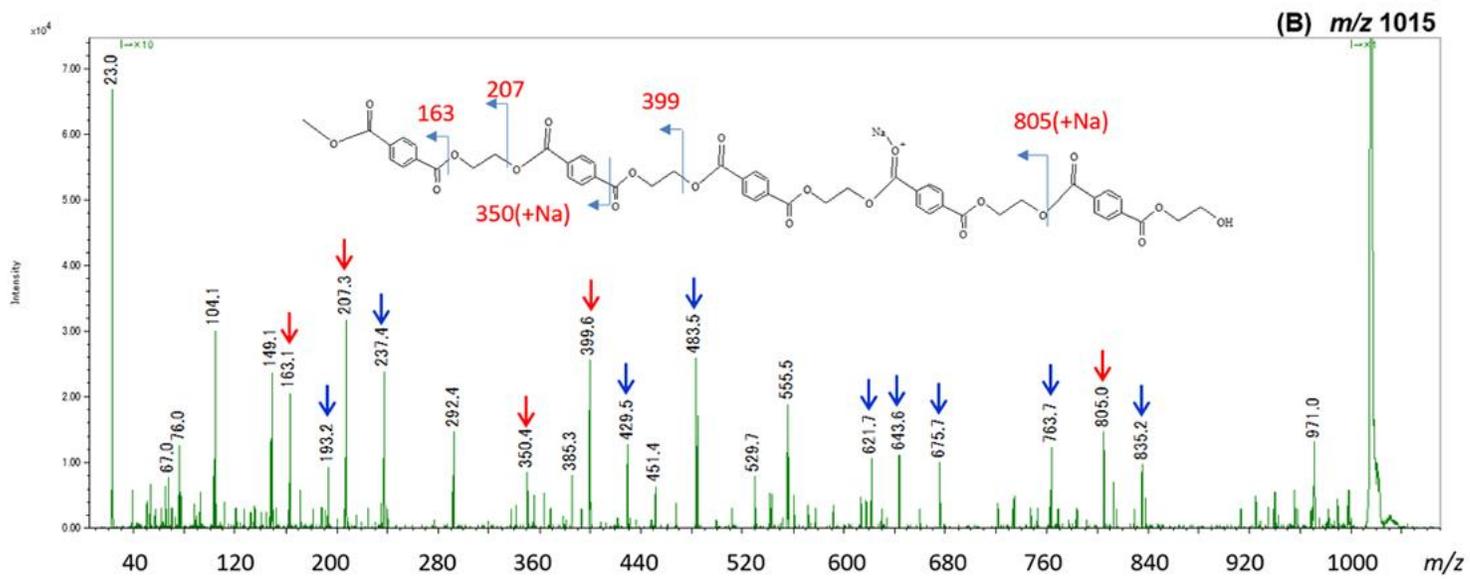
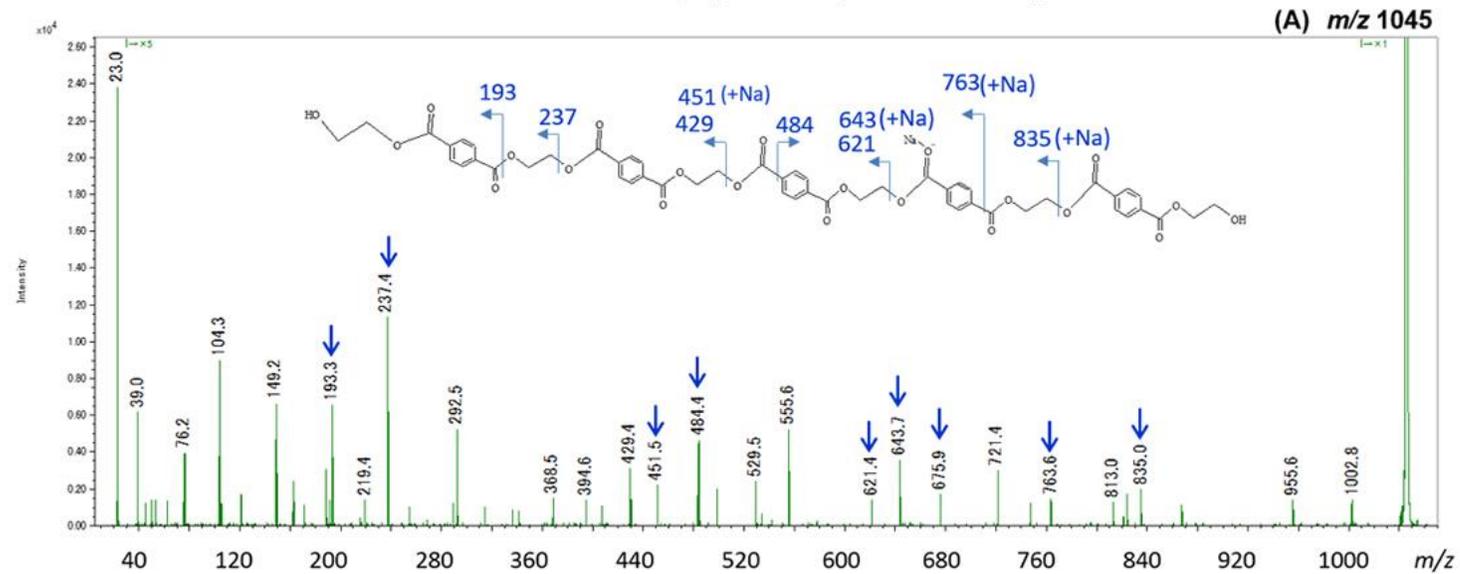
Available from: URL: <http://www.jgld.ro/2015/1/10.html>
 DOI: <http://dx.doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.pas>

Plasma Lipidomic Fingerprinting to Distinguish among Hepatitis C-related Hepatocellular Carcinoma, Liver Cirrhosis, and Chronic Hepatitis C using MALDI-TOF Mass Spectrometry: a Pilot Study

Ana Maria Passos-Castilho¹, Edson Lo Turco², Maria Lúcia Ferraz³, Carla Matos³, Ivonete Silva³, Edison Parise³, Eduardo Pilau^{4,5}, Fabio Gozzo⁴, Celso Granato¹

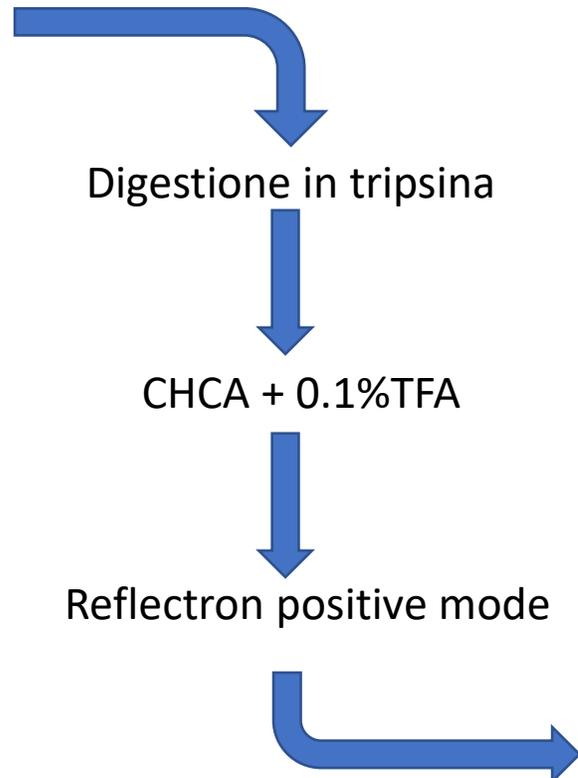
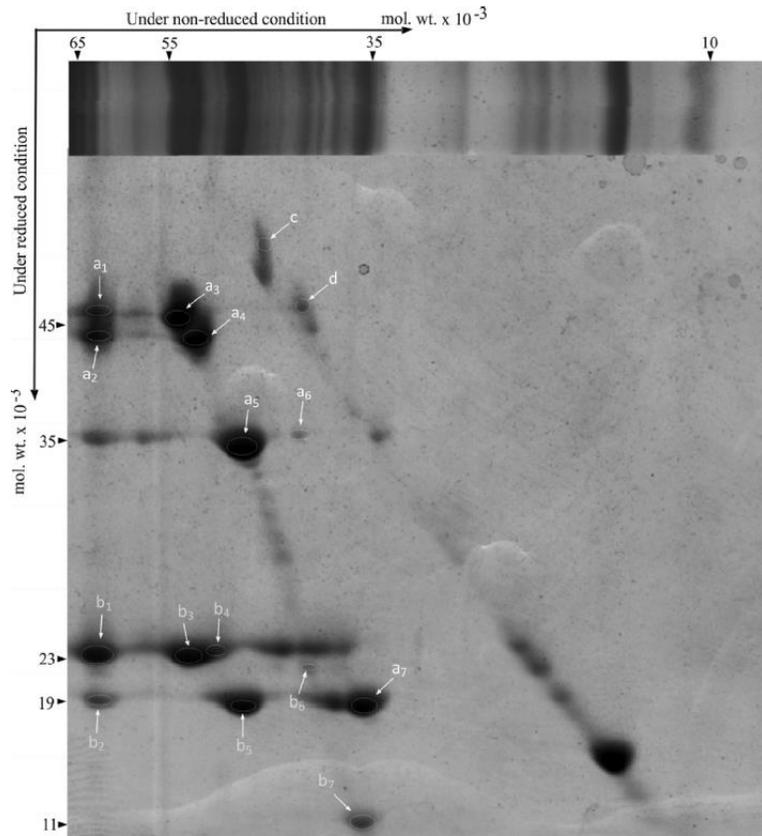


MODALITA' DI ACQUISIZIONE: MS/MS



ANALISI DI PROTEINE CON LA TECNICA MALDI-MS/MS

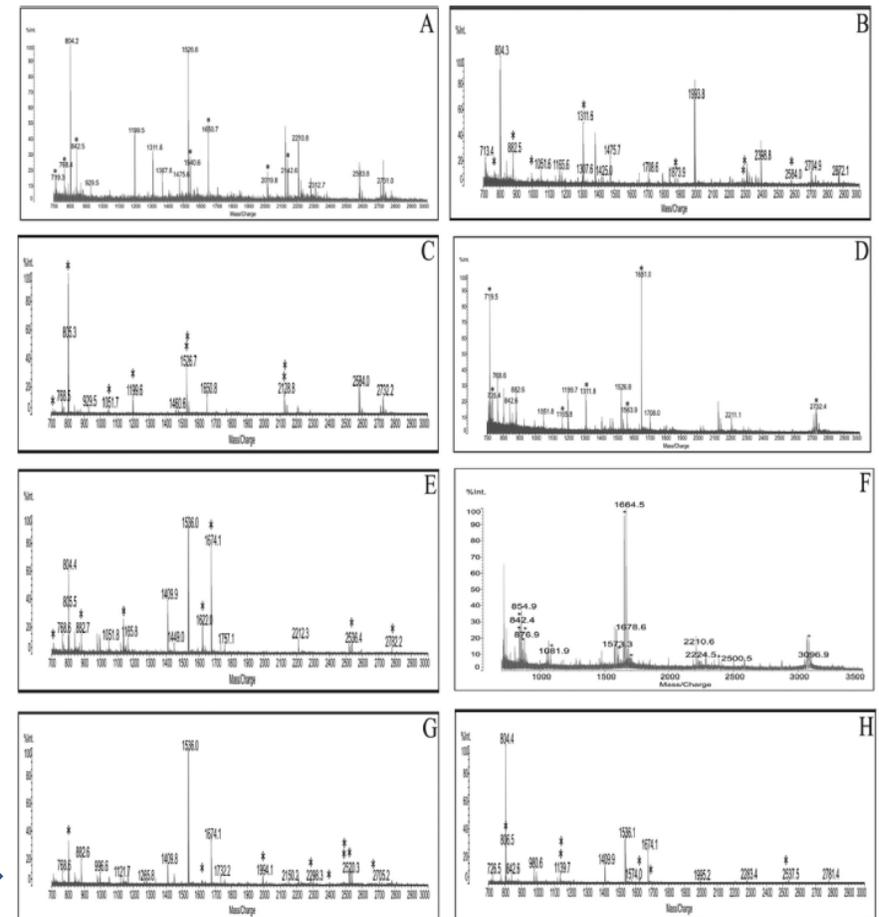
Identificazione di proteine



Proteome Profiling of Seed Storage Proteins Reveals the Nutritional Potential of *Salicornia brachiata* Roxb., an Extreme Halophyte

Bhavanath Jha,* Nater Pal Singh, and Avinash Mishra

Discipline of Marine Biotechnology and Ecology, CSIR – Central Salt and Marine Chemicals Research Institute, G. B. Marg, Bhavnagar 364002, Gujarat, India

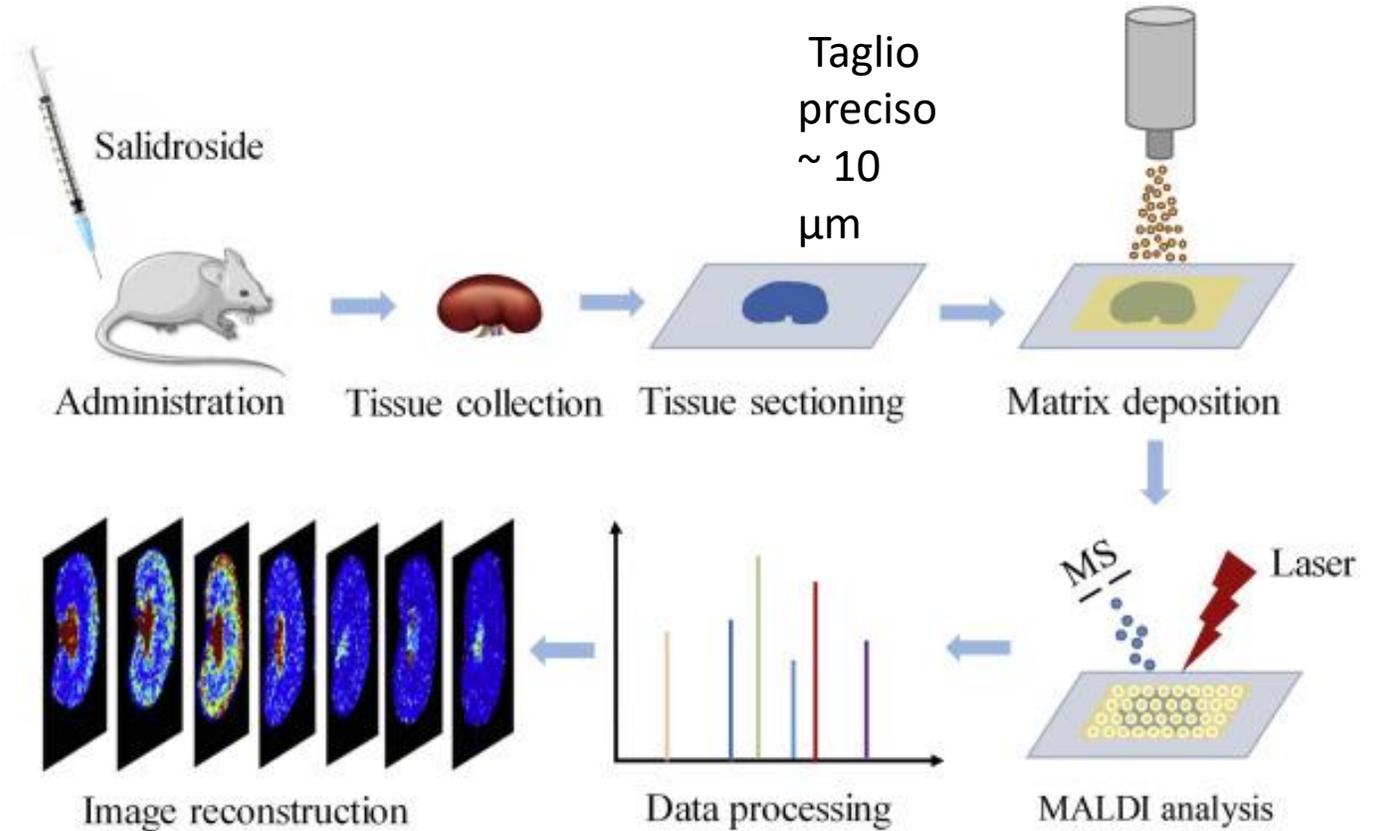


MALDI IMAGING

Una delle applicazioni più interessanti del MALDI è l'ion imaging (IMS), ossia una tecnica di indagine microscopica, introdotta nel 1997, che prevede l'analisi delle molecole di interesse direttamente su un tessuto biologico; in questo modo, è possibile determinare la distribuzione spaziale e l'abbondanza relativa di proteine, peptidi, glicoproteine, lipidi, metaboliti e farmaci su una porzione sottile di tessuto biologico.

A seguito della ricopertura della sezione di tessuto con una matrice opportuna è possibile acquisire i dati di massa in vari punti del campione e per ognuno si registra uno spettro di massa.

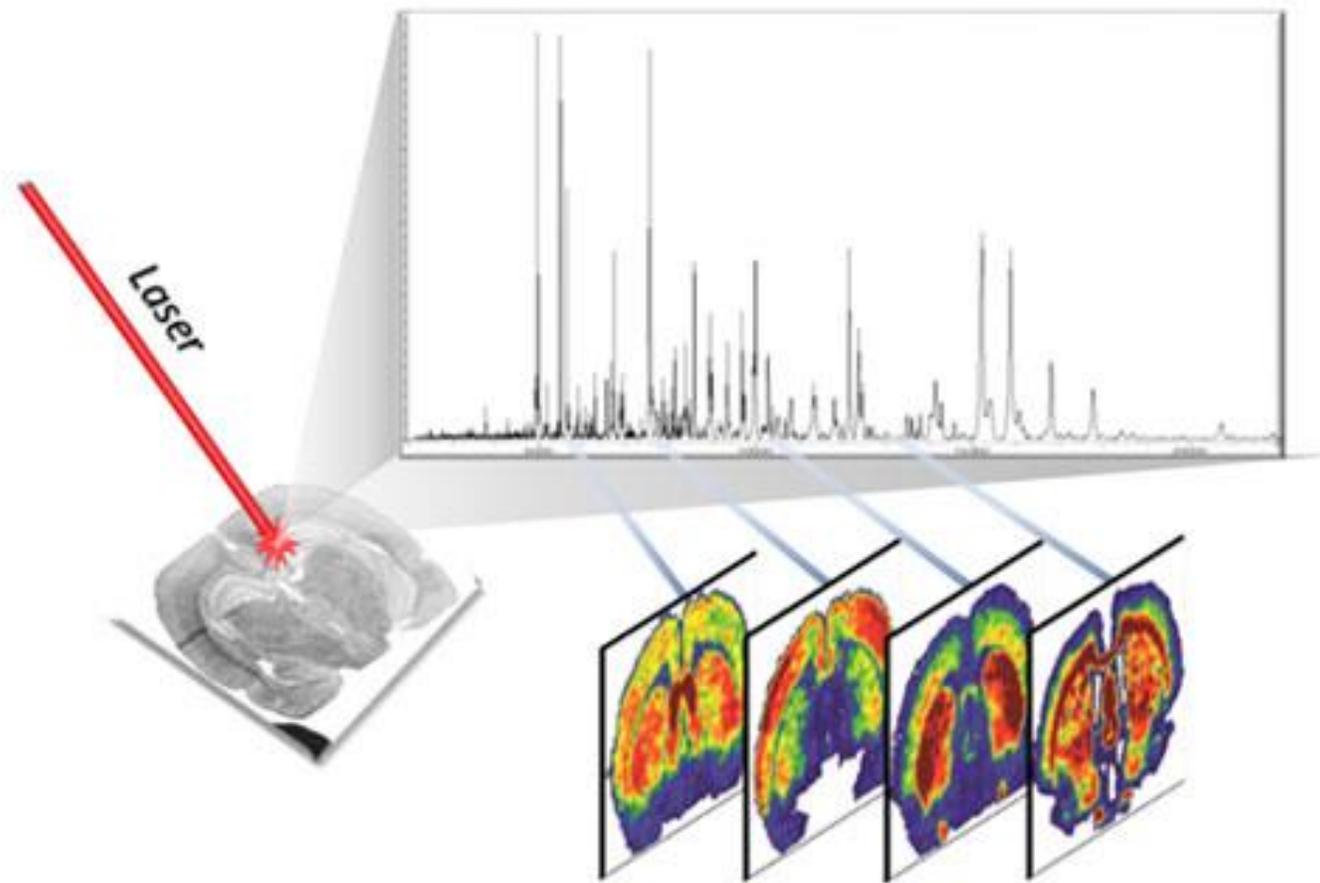
Successivamente, attraverso un software, è possibile selezionare una particolare specie con un certo valore di m/z dagli spettri acquisiti; così facendo si può ricostruire un'immagine del tessuto, dove attraverso una scala cromatica si indica quali sono i punti dove la specie selezionata è presente con una certa intensità.



MALDI IMAGING

Applicazioni:

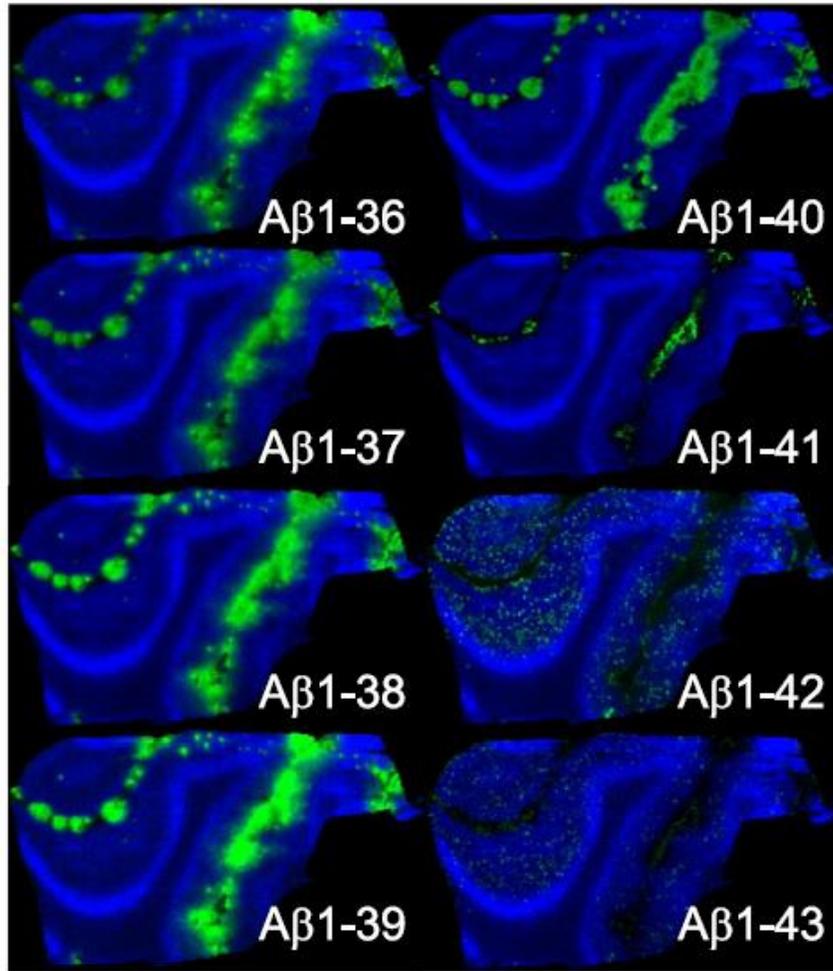
- ✓ identificazione di **biomarker**, ovvero peptidi, metaboliti o piccole molecole diagnostiche di un certo stato biologico (malattia, intossicazione, metastasi, etc.) del tessuto e la loro distribuzione;
- ✓ **Analisi farmacocinetica**, cioè la possibilità di monitorare il deposito, l'eliminazione e la degradazione di farmaci, tossine o molecole biologicamente attive nel tessuto o sulla sezione di un intero animale;
- ✓ **studio di profili proteici e metabolici**, e l'identificazione di zone sane o malate in relazione a patologie specifiche;
- ✓ più **analisi qualitative e quantitative** in parallelo sullo stesso campione;
- ✓ **identificazione contemporanea di più proteine** mediante digestione triptica in loco.



ANALISI DI PEPTIDI CON LA TECNICA MALDI-IMAGING

Kakuda et al. *Acta Neuropathologica Communications* (2017) 5:73
DOI 10.1186/s40478-017-0477-x

Acta Neuropathologica
Communications



RESEARCH

Open Access



Distinct deposition of amyloid- β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry

Nobuto Kakuda^{1†}, Tomohiro Miyasaka^{2†}, Noriyuki Iwasaki³, Takashi Nirasawa³, Satoko Wada-Kakuda², Junko Takahashi-Fujigasaki⁴, Shigeo Murayama⁴, Yasuo Ihara⁵ and Masaya Ikegawa^{1*}

