

研究終了報告書

「反応性量子ビームによる細胞内生命現象の可視化」

研究期間： 2017 年 10 月～2021 年 3 月

(新型コロナウイルス感染症の影響を受け 2021 年 9 月まで延長)

研究者： 藤井 麻樹子

1. 研究のねらい

化学反応で試料分子のイオン化を補助することにより、高空間分解能と高感度を両立する新しい量子ビームを開発し、これをプローブとしたイメージング質量分析により、一細胞内の生命現象を可視化する。

質量分析技術は、元素情報だけでなく有機試料の組成、さらには化学構造情報までが得られる点で、他の分光法などの手法に比べて有利である。また、抽出や分離のプロセスを用いないため、代謝物などの未知の検出対象物質についてもラベルフリーで多成分同時検出が可能である。イメージング質量分析は、イオン化のための一次プローブを試料表面に対してスキャンしていくことで、試料上の位置情報に応じた質量スペクトルを取得する手法である。イメージング質量分析において、検出感度は空間分解能とトレードオフの関係にある。これは、ある条件において試料の単位面積あたりから検出できるイオン量が一定であるために、感度が不足する場合には空間分解能を犠牲にする必要があるためである。そこで本研究提案においては、化学反応を利用した新しい量子ビームを開発し、目的分子のイオン化効率を抜本的に向上させることにより、高空間分解能と高感度を両立する新しいイメージング質量分析装置を開発する。

これまでに得られた知見では、試料中の生体分子を高効率にイオン化することが可能な反応性の高い化学物質の補助により、従来法の 10000 倍程度の感度を実現できると見込まれる。有機物のイオン化メカニズムに関する知見から、試料上に大量のプロトンを供給できるイオンビーム種が有利であると考えられるため、酸あるいは酸のアルカリ金属塩を投射物とすることから検討を始める。また、投射物の質量が大きいほど試料表面からの分子の脱離効率が高いため、たとえば安息香酸や安息香酸ナトリウムなどの比較的質量の大きな有機酸を用いる。本研究課題において掲げる分析対象は一細胞内部での生命現象であるが、研究課題遂行のプロセスで、生体や組織切片などの比較的空間分解能を要求しない試料についても随時測定対象としていく。将来的な技術展望や社会への貢献内容は広範に考えうるが、医療機器への応用、薬物動態解析や細胞内代謝活動の解明などに寄与することが期待される。さらに、人工細胞を用いた新規バイオ医薬品開発・エネルギー物質の産生や、食品の安全性評価などの分野への応用も期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究提案の成果は3つに分けることができる。研究テーマ A「イオンビーム照射による有機分子イオン化機構の検討」、研究テーマ B「反応性ビーム照射装置の開発」、研究テーマ C「細胞サンプルのイメージング分析」である。

反応性量子ビームは、生体試料表面へ衝突する際に化学反応的なプロセスにより試料を

構成する有機分子のイオン化を促進するものである。この反応性量子ビームのビーム源として、有機分子に対してプロトンあるいはカチオンを供給しやすい性質を持つ物質を用いることで高効率イオン化を実現することが本研究課題の目的である。本研究では、有機分子にダメージを与えずに高効率にスパッタリングを行える巨大ガスクラスターイオンがビーム源として好適であると判断し、これの実装を行った。

また、本研究課題では、1細胞内部の生体分子の二次元分布を可視化することをゴールとして掲げており、比較的前処理の容易な皮膚の角層細胞の予備検討を行った。サンプリング法にテープ剥離法を用い、皮膚の同一箇所複数回テープ剥離を行うことで、角層細胞内のアミノ酸をはじめとした低分子化合物の深さ方向分布が分析可能であることを確かめた。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、ビームの安定生成のための装置改良を行った。ガスクラスターイオンビームのクラスターサイズがガスの導入圧力やイオン化電圧に依存することに着目し、条件の最適化を行った。

(2) 詳細

研究テーマ A「イオンビーム照射による有機分子イオン化機構の検討」

有機分子の高効率なイオン化を実現するビーム種を選定する目的で、候補となる有機酸をポリマーに混合してビーム照射し、ポリマーのイオン化効率の変化を検討した。

ポリマーサンプルには、繰り返し単位が分子量 50 弱であり、イオン化効率の分子量依存性を検討しやすいという理由から、平均分子量が 2000 g/mol のポリエチレングリコールを用いた。添加剤としては、サンプル分子に対してチャージを持ったプロトンやカチオンを供給しやすい化学構造が好適であろうという考えから、有機酸や有機酸のアルカリ金属塩について広く検討した。その結果の1つとして、添加剤としてクエン酸を添加した場合にはポリマーのイオン化効率向上がみられた一方で、類似の化学構造をもつグルタル酸を添加した場合にはイオン化効率の向上はみられず、むしろ減少する傾向がみられた。両者の化学構造の比較から、当初予想していたカルボキシル基の存在ではなく、ヒドロキシル基の存在がイオン化効率の向上に寄与していることが示唆された。

図1には、ポリマーサンプルに対して混合比を変えてクエン酸を添加した場合に得られた分子量分布を示す。本来、平均分子量 2000 のポリエチレングリコールの平均重合度は 45 となるは

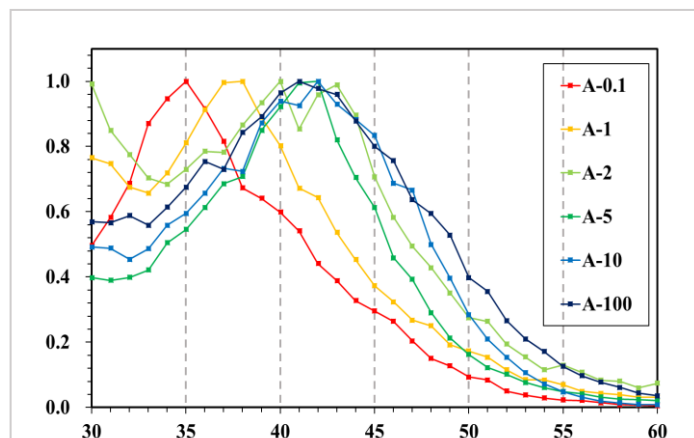


図1. ポリマーサンプル（ポリエチレングリコール）に添加剤（クエン酸）を加えた際の分子量分布の変化。縦軸は分布の最大値を1として規格化したもの、横軸は重合度を表し、系列名の添え字（0.1, 1 など）は高分子に対する添加剤のモル比を表す。

ずである。クエン酸の添加量の少ないサンプルで重合度が小さい方向へピークがシフトしているのは、ビーム照射により高分子内の結合が開裂しフラグメントが生じた影響であると考えられる。このことは、クエン酸の添加により高分子のフラグメンテーションが抑制されていることを示唆しており、今後この新たな知見を応用することで、壊れやすくこれまで測定に適さなかったような分子についても、適切な添加剤を用いることで測定できるようになる、などのブレークスルーが期待できる。

研究テーマ B「反応性ビーム照射装置の開発」

反応性ビームのエミッション方法としては、高分子を低損傷でスパッタリング可能なガスクラスターイオンビームが好適であると判断し、これを基本骨格として装置設計をおこなった。検出器としては、これまでの知見から、ビームのパルス幅と質量分解能を独立に制御することが可能な直交加速型飛行時間質量分析装置を購入し、用いることとした。現在、新型コロナウイルス感染症拡大の影響で改良用部品の入手に遅延が生じている。

研究テーマ C「細胞サンプルのイメージング分析」

アプリケーション展開のモデルサンプルとして、比較的取り扱いが容易である皮膚の角層細胞を用いた。得られたイメージのうち、ラウリル硫酸ナトリウム由来のフラグメントイオンと、アミノ酸の一種であるリシンの分子イオンのイメージを図2に示す。なお、このデータは従来法のビームを用いて取得した。

測定においては、角層剥離用の専用テープを用いて角層サンプルを採取した。数 10 μm 径の角層細胞の内外を十分に識別で

きる分解能で、アミノ酸をはじめとする低分子化合物の分布が明瞭に取得できることを確認した。また、サンプリングの際に、同一箇所にも複数回テープ剥離を行うことで、成分の深さ方向への分布情報が取得可能であることも確かめられた。さらに、外因性の成分(アスコルビン酸)を意図的に皮膚表面に塗布したものに対して同様のサンプリングを行い、皮膚表面からの浸透深さを解析することに成功した。

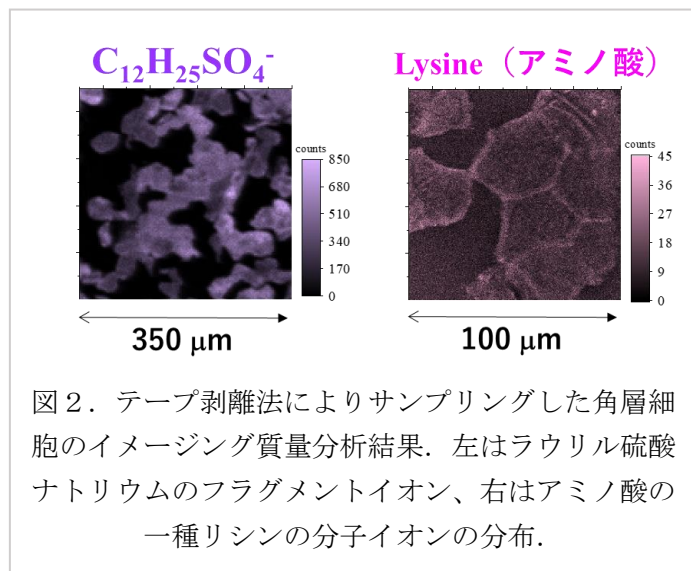


図2. テープ剥離法によりサンプリングした角層細胞のイメージング質量分析結果. 左はラウリル硫酸ナトリウムのフラグメントイオン、右はアミノ酸の一種リシンの分子イオンの分布.

3. 今後の展開

新規に開発した反応性イオンビームの照射効果として、エッチングレートと付加イオン生成について特に詳細に検討する。

4. 自己評価

本研究提案では、要素技術としての新規ビーム照射装置の開発と、イオン化機構に関する理論的アプローチに加え、アプリケーション例として角質細胞内の内因性および外因性成分の可視化を行った。装置の立ち上げと基礎評価については、研究提案時に掲げた性能を満たすため、今後も継続して改良をおこなう必要がある。一方で、イオン化機構の検討においては、本法の分析プローブ以外の応用の可能性を示した。さらにアプリケーション例により、本法が細胞内の生命現象に関わる低分子化合物の分布可視化に適した技術であることを示した。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:1件

1. 長谷川悦子, 藤井麻樹子; ToF-SIMSを用いた皮膚組織中低分子化合物のイメージング質量分析, 分析化学, 2021, 70巻, 4.5号, 271-276

概要: ヒト皮膚角層サンプルをテープストリッピング法と呼ばれる手法を用いてサンプリングし、ToF-SIMSを用いたイメージング質量分析を行った。数 μm 程度の角層細胞の内部の成分分布に関して、低質量化合物に関しては十分に高い空間分解能で検出が可能であることを示した。「※コロナ延長時の成果」

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表: M. Fujii, Y. Ishii, E. Hasegawa, R. Shishido and J. Matsuo; Study on ionization process and quantitative analysis of organic molecules with cluster ion beam irradiation, The 22nd International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, (SIMS22), Kyoto, Japan, (2019.10.22)

招待講演: 藤井麻樹子; 二次イオン質量分析法による高分子イメージングの課題と展望, 日本分析化学会第69年会(2020.9.17)

受賞: Excellent Presentation Award, The 22nd International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, (SIMS22), Kyoto, Japan, (2019.10.24)