

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06768

研究課題名(和文) 一粒子・一細胞中の極微量元素定量分析法開発と全元素化学への応用に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Development of an analytical method for trace elemental analysis in single particle/single cell

研究代表者

岩井 貴弘 (Iwai, Takahiro)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：90756694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：単一細胞や単一微粒子中に含まれる極微量元素を分析するために、微小液滴を噴出できるドロプレットネブライザと、液滴試料用の脱溶媒装置、誘導結合プラズマ分析装置を組み合わせ、ドロプレット試料導入ICP分析システムを構築した。液滴試料用の脱溶媒装置の試料加熱部の最適化を行い、藻類細胞中に含まれるMgの分析において従来装置の約30倍の信号強度を得ることに成功した。磁性ラテックス粒子を用いて本システムの分析精度の評価を行った結果、相対標準偏差で19.5%の精度で分析できることが分かった。本システムを用いてヒト癌細胞の単一細胞分析を行い、一つの細胞にpgレベルで含まれるMgとCaの発光分光分析に成功した。

研究成果の概要(英文)：To analyze trace elements in single cell and single particle, an ICP analytical system was established by hyphenating droplet direct injection nebulizer, desolvation system and ICP spectrometer. we succeeded to increase mass signal intensity of Mg in single algae cell 30 times by optimizing sample heating region in desolvation system. To evaluate spectral analysis precision of the system, uniform-sized particles of magnetic polymer latex were analyzed and 19.5% of relative standard deviation was obtained from this system. Single human cancer cells were introduced into this system and emission spectra of Mg and Ca, which is contained in single cell pg level, were successfully detected simultaneously.

研究分野：分析化学

キーワード：単一細胞分析 微量試料分析 微量元素分析

1. 研究開始当初の背景

近年では、PM2.5 やディーゼル排気微粒子などの大気粉塵に含まれる重金属や、ナノテクノロジー産業などの先端産業で使用されている希土類元素、水源に含まれる有機スズ化合物やヒ素など、環境物質に含まれる ng/g ~ pg/g レベルの微量成分が人体に与える影響に注目が集まっている。特に、極微量でも生体に対して生理活性や毒性を発揮する金属化合物の研究が盛んになっており、例えば、個別の細胞一個や、環境中微粒子一粒中に含まれる ag (10^{-18} g) オーダーの極微量から μ g (10^{-6} g) オーダーの多量元素までの元素を分析できれば、個別の粒子・細胞の個性を反映した非常に細かな単位での環境・生体相互作用の研究に大きく貢献できると考えられる。

微量元素の分析には、高温の大気圧プラズマである誘導結合プラズマ (Inductively Coupled Plasma: ICP) を励起・イオン化源として用いた分析が広く行われている。しかし、分析には多量の試料が必要であるため、一粒子、一細胞レベルでの極微量元素の挙動の調査は実現できていなかった。

2. 研究の目的

生体物質の網羅的な機能解明や、環境中における微量金属元素の挙動解明に寄与するため、一つの微粒子や一つの細胞に含まれる主成分からアトグラム (ag; 10^{-18} g) オーダーの極微量元素までの分析法の確立を目標とする。本研究では、そのための新しい装置の開発と評価を行う。また、開発した装置を用いてヒト細胞の分析を行い、実試料への応用可能性を調査する。

3. 研究の方法

東京工業大学沖野研究室で開発されたドロプレットネブライザを ICP 分析装置の試料導入に用いる。ドロプレットネブライザでは、従来の ICP 分析装置の試料導入装置のように溶液試料を噴霧するのではなく、一滴ずつの液滴として噴出して ICP に導入する (図 1)。この液滴中に単一の微粒子や細胞を内包して、直接プラズマに導入することができる。噴霧導入では試料導入効率が 1~3% であるのに対し、本手法では試料導入効率が 100% かつ試料を空間的・時間的に圧縮してパルス的に導入できるため、試料信号がバックグラウンドノイズに埋もれにくくなり、高感度な分析が可能となる。

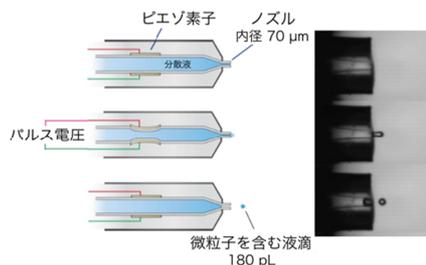


図1 ドロプレットネブライザの構造と液滴吐出の様子

本研究ではまず、ドロプレットネブライザおよびドロプレット試料用の脱溶媒装置を ICP 発光・質量分析装置に適用し、図 2 のようなドロプレット試料導入 ICP 分析システムを構築した。次に、粒子標準物質をもちいて開発した装置の分析特性を評価した。そして、装置の最適化を行い、実試料として応用が考えられるヒト細胞の分析を行った。

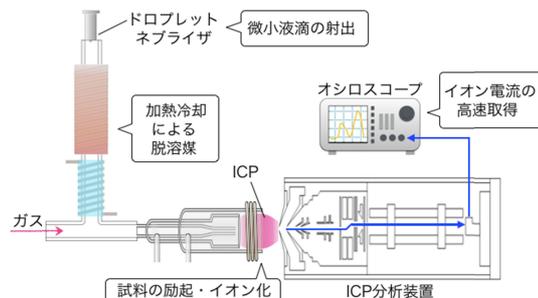


図2 ドロプレット試料導入 ICP 分析システム

4. 研究成果

(1) ドロプレット試料導入用脱溶媒装置の開発

単一細胞や単一微粒子のみを ICP に導入するためには、導入前にドロプレットの溶媒を十分に取り除く必要がある。そのため、試料導入経路を加熱・冷却することで溶媒を除去するドロプレット用脱溶媒装置の開発を行ってきた。しかし従来装置では、十分な溶媒気化のため加熱温度を 200 以上の高温にすると細胞が破裂し、破碎した細胞が個々にプラズマに導入されることで分析の際のシグナルノイズ比が低下するという問題があった。

そこで、プラズマ中に形状を保ったまま細胞を導入するための脱溶媒装置の加熱部の構造を検討した。ドロプレット試料の加熱時間を調整するために、加熱経路長を従来の 200 mm から 300 mm に長くし、90 の低い加熱温度で飛翔している単一細胞を含んだドロプレット試料を長時間加熱できるような装置を開発した。その結果、細胞を破裂させることなくプラズマに導入することに成功し、藻類細胞中に含まれる Mg の分析において、従来装置を使用した場合より約 30 倍の質量信号強度を得ることに成功した (図 3)。

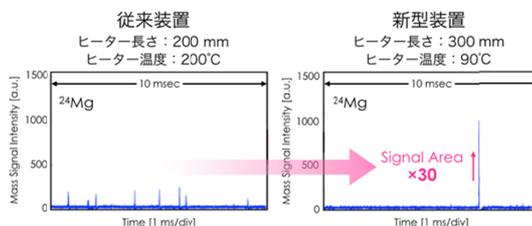


図3 従来および新型の脱溶媒装置と ICP 分析システムを用いて分析した単細胞藻類中の Mg の質量信号

(2) 粒子標準物質を用いた分析システムの特徴評価

ドロプレット試料導入 ICP 分析システムを構築したので、粒子標準物質を用いて開発した分析システムの分析精度の評価を行った。粒子標準物質として、比較的粒径が揃っていて体積偏差が小さく、酸化鉄の重量百分率が保証されている磁性ラテックス粒子を用いた。磁性ラテックス粒子に含まれる Fe の質量分析を行って開発した分析システム由来の相対標準偏差を求めたところ、24.6%となった。磁性ラテックス粒子の体積の相対標準偏差 15%より開発したシステムによる分析の不確かさを評価したところ 19.5%であった(図 4)。

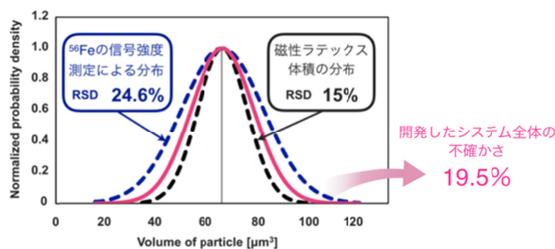


図 4 開発した装置による分析の不確かさ評価

(3) ヒト細胞の単一細胞微量元素分析

開発した分析システムを用いて、ヒト細胞の単一細胞分析を行った。試料として、ヒト癌細胞である HeLa 細胞と U2OS 細胞を使用した。その結果、一つの細胞中に pg レベルで含まれる Mg と Ca の発光分光分析に成功した(図 5)。

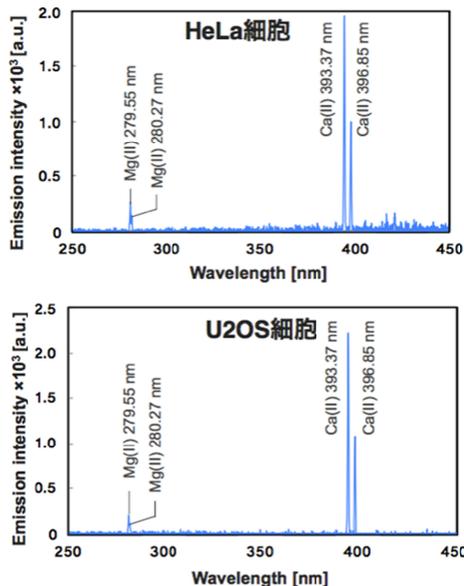


図 5 単一 HeLa 細胞と単一 U2OS 細胞を ICP 分析システムに導入して得られた発光スペクトル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 8 件)

T. Iwai, S. Shunsuke, S. Kohno, M. Aida, K. Kakegawa, T. Miyake, H. Miyahara, Y. Matsumoto, K. Chiba, A. Okino, High-sensitive Elemental Analysis of Single Human Cell using Droplet Injection ICP-AES/MS, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2017, 2017 年 2 月 20 日 (St. Anton Am Arlberg, Austria)

S. Hosoda, M. Aida, K. Kakegawa, T. Iwai, H. Miyahara, K. Chiba, A. Okino, Single Cell Elemental Analysis of Human Cells using Droplet Injection ICP-AES/MS, 2016 SCIX FACSS, 2016 年 9 月 22 日 (Minneapolis, USA)

細田駿介, 相田真里, 掛川賢, 岩井貴弘, 宮原秀一, 千葉光一, 沖野晃俊, ドロプレット ICP 発光・質量分析装置による動物細胞の単一細胞微量元素分析, 日本分析化学会第 65 年会 2016 年 9 月 16 日, 北海道大学(北海道, 札幌市)

河野聡史, 細田駿介, 相田真里, 掛川賢, 岩井貴弘, 宮原秀一, 千葉光一, 沖野晃俊, 単一細胞分析のためのドロプレット-ICPMS 用脱溶媒装置の加熱部の検討, 日本分析化学会第 65 年会, 2016 年 9 月 14 日, 北海道大学(北海道, 札幌市)

細田駿介, 相田真里, 掛川賢, 岩井貴弘, 宮原秀一, 千葉光一, 沖野晃俊, ドロプレット ICP-AES/MS によるヒト細胞の単一細胞微量元素分析, 2016 筑波セミナー, 2016 年 9 月 6 日, 幕張メッセ(千葉県, 千葉市)

河野聡史, 細田駿介, 相田真里, 掛川賢, 岩井貴弘, 宮原秀一, 千葉光一, 沖野晃俊, 単一細胞分析のためのドロプレット用脱溶媒装置の検討, 2016 筑波セミナー, 2016 年 9 月 6 日, 幕張メッセ(千葉県, 千葉市)

細田駿介, 相田真里, 掛川賢, 岩井貴弘, 宮原秀一, 千葉光一, 沖野晃俊, ドロプレット用脱溶媒装置の加熱温度が単一細胞分析に与える影響の調査, 日本分析化学会第 76 回分析化学討論会, 2016 年 5 月 28 日, 岐阜薬科大学・岐阜大学(岐阜県,

岐阜市)

細田駿介, 相田真里, 掛川賢, 岩井貴弘,
宮原秀一, 千葉光一, 沖野晃俊, マイク
ロ粒子を用いた単一細胞分析用ドロプレ
ット ICP 発光・質量分析装置の評価, 平
成 28 年度日本分光学会年次講演会, 2016
年 5 月 24 日, 大阪大学(大阪府, 大阪市)

〔図書〕(計 2 件)

T. Iwai, H. Miyahara, A. Okino,
Microplasma Atomic Emission
Spectrometry, Encyclopedia of Plasma
Technology, pp.773-779, Taylor &
Francis (2016.10)

A. Okino, H. Miyahara, T. Iwai, K.
Chiba, Plasma Spectroscopy, The
Encyclopedia of Analytical Chemistry,
pp.1-17 Wiley & Sons (2016.10)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 貴弘 (IWAI, Takahiro)
関西学院大学・理工学部・助教
研究者番号: 90756694

(2) 研究協力者

千葉 光一 (CHIBA, Koichi)
沖野 晃俊 (OKINO, Akitoshi)
稲垣 和三 (INAGAKI, Kazumi)