

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00185

研究課題名（和文）2次元ガスクロマトグラフ-安定同位体比質量分析計（GC-GC-IRMS）の開発

研究課題名（英文）Development of GC-GC-IRMS

研究代表者

力石 嘉人（Chikaraishi, Yoshito）

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：50455490

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、有機化合物の安定同位体比分析の大幅な能力向上を目標に、ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計（GC-IRMS）に、2次元ガスクロマトグラフシステムを導入した。その結果、2次元ガスクロマトグラフにより、クロマトグラム上での有機化合物のピーク分離能を著しく向上し、また、市販のGC-IRMSに比べて、約500倍の感度の向上が達成された。実際に、開発したGC-GC-IRMSを用いることで、炭素同位体比については、0.1nmolの炭素量、窒素同位体比に関しては0.04nmolの窒素量での同位体比分析が可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでGC-IRMSを用いた研究手法には、(1) GCクロマトグラム上での有機化合物のピーク分離が非常に難しいこと、(2) 測定に必要な試料量が多いこと、の2点の重大な欠点があった。しかし本研究により、上記の(1)と(2)を同時に解決するGC-GC-IRMSが完成したことで、本手法の応用範囲は劇的に広がったと考えている。これは、生物・生態系とその生成・代謝系の機能や進化、地球生物圏における有機物・エネルギー循環、宇宙空間や初期地球における有機物生成や生命の起源に関連した研究など、幅広い分野で、本分析方が利用できることを意味し、様々な分野への大きな波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we introduced a two-dimensional gas chromatograph system into a gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer (GC-IRMS) to develop a GC-GC-IRMS. The GC-GC-IRMS developed have achieved the great improvement of (1)the chromatographic separation of compound peaks and (2) the sensitivity of stable isotope ratio analysis. Based on the results of this study, the GC-GC-IRMS can achieve a highly sensitive isotope ratio analysis by approximately 500 times compared to the commercial GC-IRMS, such that we can measure stable isotope ratios for 0.1nmol carbon and 0.04nmol nitrogen of organic compounds in biological and geological samples.

研究分野：有機地球化学，同位体生態学，同位体生理学

キーワード：安定同位体比 微量分析 2次元クロマトグラフィ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地球惑星科学，とくに地球生命科学の研究に共通する有効な解析法の 1 つに，ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS, 図 1) による有機化合物の安定同位体比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ など) 分析がある。この解析法は，有機化合物の同位体比に，物理化学・生化学反応の 5W2H (Who, What, When, Where, Why, How, How many) が記録されるという基本原理が，個々の反応スケールの研究から地球化学・地質学のスケール研究まで共通の一般則として適用できるため，様々な研究で広く用いられている。しかし，測定法が開発されてから約 30 年が経った現在においても，この解析法を用いて測定できる試料には，大きな制約がある。それは，

一般的なガスクロマトグラフ-質量分析計等と比較して，GC-IRMS の感度が 4-6 桁悪い

夾雑物や他の有機化合物からの同位体比の干渉を防ぐための GC クロマトグラフィでの厳格なピーク分離が要求される (図 2)

のためであり，これらのいずれか，あるいは双方の理由によって，糖やアミノ酸，核酸塩基などの生物にとって重要な分子を含む多くの有機化合物，とくに，生体に含まれるマイナー成分や，難培養性微生物やオルガネラ，化石の結晶タンパク質，隕石などの微量試料に含まれる有機化合物などにおいて，従来法では安定同位体比を測定することができなかった。

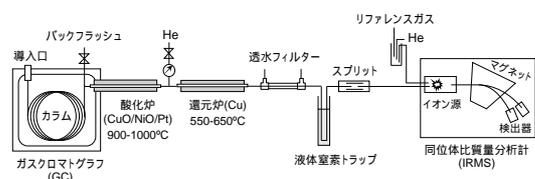


図 1 GC-IRMS の概念図

GC-IRMS は，GC と IRMS 間に酸化炉・還元炉・各種トラップ系が配置され，それらがキャピラリーカラムで接続されている機器である。試料に含まれる有機化合物の安定同位体比を，1 つ 1 つの化合物レベルで測定する機器として，様々な研究で広く用いられている。

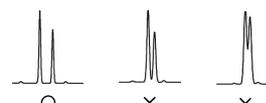


図 2 GC-IRMS では，クロマトグラフィで有機化合物ピークの厳格な分離が必須である。

このような背景から，本研究の研究代表者(カ石)は当時，実施していた基盤研究 B (平成 29 年 - 令和 2 年)「アミノ酸の安定同位体測定法の超高感度化技術の開発」において，GC-IRMS の各部品(測定機器本体，各反応炉から，ネジ一本に至るまで)を再設計し，異なる性質の複数の GC カラムを直接連結して 1 つのカラムとして運用する「カラムカップリング法」を開発し，従来法(図 3)に比べ，約 80 倍の感度の向上を行った。この成果により，上記の①の課題の多くの部分が解決され，もしくは，今後の努力次第で解決できる可能性が高いとの見通しを得ていた。しかしその一方で，②の課題の克服は，現行法やそれを改良した方法では，技術的に困難である(ほとんど解決の見込みがない)こと，および，②の課題が克服できないと，測定機器の高精度化が達成できても，地球惑星科学分野の様々な研究に展開しにくい，もしくは限定的にしか展開できないことも，明白になってしまい，②の課題を抜本的に克服する新たな装置「2次元ガスクロマトグラフ-安定同位体比質量分析計(GC-GC-IRMS, 図 3)」の開発が求められていた。

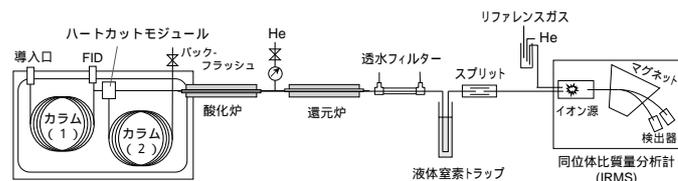


図 3 本研究で開発する GC-GC-IRMS の概念図

2. 研究の目的

本研究の目的は「2次元ガスクロマトグラフ-安定同位体比質量分析計(GC-GC-IRMS)」を開発し，有機化合物の安定同位体比分析における長年の課題であった「クロマトグラフィでの厳格なピーク分離の要求」を抜本的に克服すること，および，それにより，従来は測定ができなかった様々な試料に含まれる様々な有機化合物に関して，安定同位体比の測定を可能にすることである。

本研究では，4 つの達成目標を設定した。

第 1 到達目標：GC-GC-MS で使われている「GC-GC モジュール」を購入し，それを既存の GC-IRMS へ組み込むこと

第 2 到達目標：組み立てた GC-GC-IRMS が運用できるように PC ソフトウェアを改良し，測定を可能にすること

第 3 到達目標：ピコモルオーダーの有機化合物の安定同位体比の測定できるようにすること

第 4 到達目標：実試料へ応用し，開発した GC-GC-IRMS の正確な評価を行うとともに，ハード面・ソフト面双方でフィードバックをおこない，開発した GC-GC-IRMS の利便性・安定性を向上させること

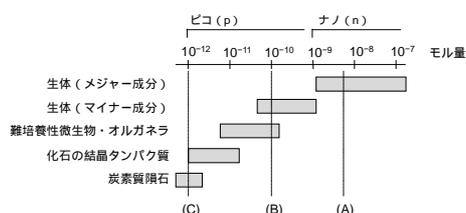


図 4 GC-IRMS の感度：(A) 市販の機器，(B) 研究代表者の当時の機器，(C) 本研究の目標値
試料 1mg (難培養性微生物等は，1 μg) に含まれるアミノ酸のモル量で規格化

3. 研究の方法

第1到達点に対して：

GC-GC-MS で使われている「GC-GC モジュール」を購入し、それを既存の GC-IRMS へ組み込む。具体的には、① 既存の GC-IRMS の GC 部のフロントパネルとオープン内に、それぞれ「GC-GC モジュール」と、1次元目のカラムからの溶出物を捕集し2次元目のカラムに送り出す「ハートカットモジュール」を組み込む、② 各部（とくに各部の温度、ガスフローのコントロール装置）を再設計し、安定同位体比を測定時に、分析条件が変化しないような安定化措置を講じる。

第2到達点に対して：

組み立てた GC-GC-IRMS が運用できるように PC ソフトウェアを改良する。現行の多く科学分析機器は、様々な情報をやり取りできるデジタル信号の他に、他機器からのスタート信号の受信と他機器へのスタート信号をアナログ信号で送受信する機能を備えている。すなわち、アナログ信号ベースで全ての機器を接続すれば装置を動かすことができるが、開発した GC-GC-IRMS の利便性・運用の安定性を確保するために、デジタル信号での通信をできるだけ多く残すことを検討する。

第3到達点に対して：

同位体比既知の標準試薬を用い、1次元 GC モード、および2次元 GC モードで安定同位体比の測定を実施し、クロマトグラム上での有機化合物のピークの厳格な分離、および安定同位体比の測定ができる分析条件を設定する。

第4到達目標に対して：

開発した GC-GC-IRMS を用いて、実試料の分析を行う。開発した GC-GC-IRMS の正確な評価を目的に、科学的に質の高い実践的な応用研究を展開する。

4. 研究成果

4.1. GC-GC-IRMS の製作

2次元ガスクロマトグラフ (GC-GC) は、1次元目のカラム (例えば、微極性カラム) から溶出物を、液体窒素等で冷却した捕集管 (ハートカットモジュール) によりトラップし、それをオンライン (全自動で) で異なる性質の固定相を持つ2次元目のカラム (例えば、高極性カラム) に導入する装置である (図3)。これにより、1次元目の GC で研究対象の有機化合物と共溶出した夾雑物を、2次元目の GC で完全に分離することができる (図5)。

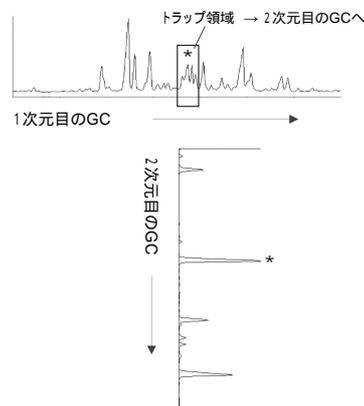


図5 GC-GCによる*ピーク分離：1次元目のGCでは夾雑物と分離できないが、2次元目のGCで、完全に分離できる。

この約15年間に質量分析計 (MS) と接続した GC-GC-MS として開発され、ゲステル社 (ドイツ) やアジレント・テクノロジー社 (アメリカ) から販売されており、地球惑星科学分野のみならず、すでに多くの研究分野、とくに、食品科学、法医学、薬学、医療分野などの研究で用いられている。本研究では、ゲステル社 GC-GC を GC-IRMS に組み込み、GC-GC-IRMS を作成した (図6)。

なお、開発にあたり、「GC-燃焼炉」間のヒーターの安定性に悩まされた。コロナ禍で、ヒーター製作者が、北海道への出張を見合わせ、メール・オンラインのみでの打ち合わせを余儀なくされたことにより「GC-燃焼炉」間を、 $300^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ の一定温度に保つヒーターの作製が難しく、最終的には製作者に作製を断念されてしまった。その後、低温科学研究所の技術部の支援を得て、「GC-燃焼炉間のヒーター」を自作するに至ったが、この問題の解決に、約2年を費やしてしまった。ヒーター製作者は世界トップレベルの技術力・知識・経験・ノウハウを持っていたため、コロナ禍でなければ、このような事態には陥らなかったと思われ、本研究をコロナ禍で実施しなければならなかったことが非常に悔やまれる。

「GC-燃焼炉」間の温度コントロールは ① 温度が 40°C から 300°C まで変化する GC 部 ② 950°C の燃焼炉、③ 1次元目の GC カラムと2次元目の GC カラムの間で有機化合物をトラップする液体窒素 (-196°C) の排出口の近くで、 $300^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ の一定温度に保つ必要があるため、「GC-GC-IRMS の製作」における難問であった。最終的には、ヒーターを1層目に熱伝導効率が低いステンレス管、2層目に熱伝導効率が高い銅管、3層目にヒーターと熱センサー、4層目に断熱材を設置した4層の筒構造にすることで、安定した温度コントロールを達成した。また、温度が不安定にならないように、GC部、「GC-燃焼炉」間のヒーター、燃焼炉の3つの配置と接続も重要であり、これらは全て台座から自作することで達成した。

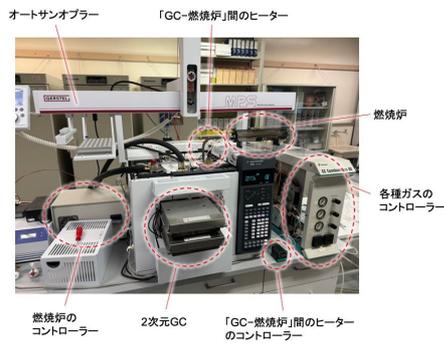


図6 本研究で作製したGC-GC-IRMSシステム

4.2 GC-GC-IRMS のコントロール (PC との接続)

現行の多く科学分析機器は、様々な情報をやり取りできるデジタル信号の他に、他機器からのスタート信号の受信と他機器へのスタート信号をアナログ信号で送受信する機能を備えている。また、上記「4.1. GC-GC-IRMS の製作」に述べた「GC-燃焼炉間のヒーター」などの自作装置は、基本的にアナログ信号のみでの運用になる。すなわち、アナログ信号ベースで全ての機器を接続すれば装置を動かすことができるが、それでは、開発した GC-GC-IRMS の利便性・運用の安定性は確保できない。

本研究では、最終的に以下の3系統で2台のPCから装置をコントロールし、一部の装置に関しては常時 ON (または OFF) として、運用できるように設定した。

1 台目の PC : 2 次元 GC, オートサンプラーのコントロール (系統 1 : LAN ケーブル)

2 台目の PC : IRMS のコントロール (系統 2 : 光ファイバーケーブル)

常時 ON (または OFF) : 燃焼炉, 還元炉, GC-燃焼炉間のヒーターの温度コントロール (系統 3)

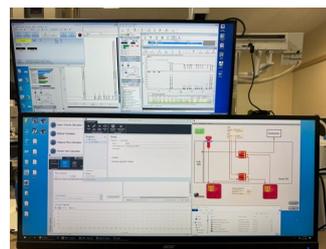


図7 本研究で作成したGC-GC-IRMSシステムのコントロール (上モニター) IRMSのコントロール, (下モニター) GC-GC, オートサンプラーのコントロール

4.3 分析条件の設定と標準試薬の分析

安定同位体比の既知に試薬を用いて、正しい同位体比が、安定的に(高い再現性で)測定できる条件を検討した。なおこの「正しい同位体比が、安定的に(高い再現性で)測定」には、GC-GC のキャリアーガスであるヘリウム(He)の流速(Flow, 単位 mL/min)を、全ての測定で一定に統一する必要があるため、図8のようなGC-GCシステムを構築した。

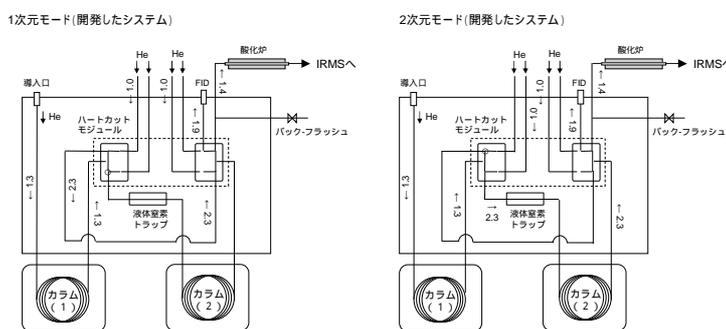


図8 1次元GCモードと2次元モードでの流路と流速 (○: 閉, ●開)

従来のシステムでは、① 酸化炉での燃焼効率を維持するには、ヘリウム(He)の流速を1.4mL/min以下にする必要がある、② 安定同位体比を、安定的に測定できるようにするには、Heを、1次元モードと2次元モードで、同じ流速に設定する必要がある、の2点がクリアできず、GC-GC-IRMSが製作できない(成立しない)原因になっていた。一方で、本研究で製作したGC-GC-IRMS(図8のようなGC-GCシステム)では、酸化炉へのHeの流速は、常に1.4mL/minとなり、1次元GCモードでも2次元GCモードでも、常に同一のGC分離条件、燃焼条件となり、安定同位体比を安定的に測定できるようになった(現時点での測定精度は $\pm 0.3\text{‰}$ から $\pm 0.7\text{‰}$ である)。

なお、上記「4.1. GC-GC-IRMSの製作」に述べた自作した「GC-燃焼炉間」の温度コントロールは、図8の酸化炉の左下「1.4mL/min」のラインのことであり、ヘリウム(He)の流速は温度によって支配されるため(低温で流れやすく、高温で流れにくい)、ここを「 $300\text{°C} \pm 5\text{°C}$ 」の一定温度にコントロールできないと、FIDへの1.9mL/minと酸化炉への1.4mL/minの分配が不安定になってしまう。すなわち、分析の定量性が低下し、燃焼条件が変動してしまうことで、得られる安定同位体比の再現性が低下する。実際に、装置の開発当時の測定精度は、 $\pm 20\text{‰}$ にもなり、これは、一般的なGC-IRMSでの測定精度($\pm 0.5\text{‰}$ から $\pm 1.0\text{‰}$)と比べると、著しく悪かった。

測定の実例として、炭素数14, 15, 16のn-alkaneの分析結果を図9に示す。「1次元モード」の分析(図9上)では、3種類のn-alkaneの全てのピークが検出されており、また、炭素数14, 15を対象にした「2次元モード」の分析(図9下)では、炭素数14, 15のn-alkaneのみが検出されている。重要な点として、①ピークの強度は、「1次元モード」と「2次元モード」で、ほとんど変化しないこと、および②「2次元モード」では、炭素数14, 15のn-alkaneのピーク分離(分離能)が著しく向上している。これは、開発したシステムが、測定条件を常に一定に保ち、うまくコントロールできていることを示す。

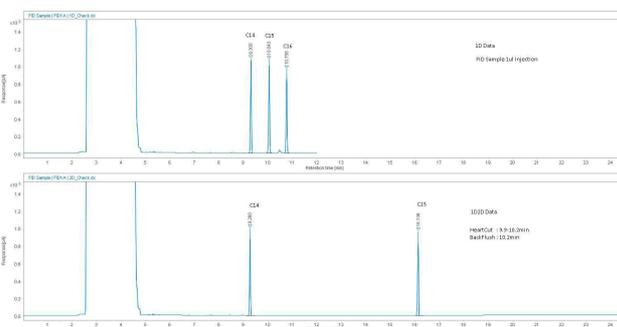


図9 1次元GCモードと2次元モードでのFIDクロマトグラムの比較 (C14, C15, C16のn-alkaneの分析例)

安定同位体比の測定は、市販の GC-IRMS の約 500 倍の高感度での分析が可能である。具体的には、例えば、測定に必要な最低試料量は、*n*-alkane などの炭化水素の炭素同位体比の測定では、0.1nmol であり(図 10)、アミノ酸では、0.04nmol となっている。研究代表者は、過去 25 年間、GC-IRMS を用いた有機化合物の安定同位体比を用いた研究に取り組み、また、分析機器を改良していた。研究代表者の所有する GC-IRMS は、本研究を実施する前は、市販の GC-IRMS に比べて、約 80 倍の感度の向上を持っていた。すなわち、本研究の結果は、実施前に比べて、約 6.3 倍(合計 500 倍)の感度向上をもたらしたことになる。しかし、これは当初目標としていた 1pmol (=0.001nmol, 図 4)に比べると、炭素で 100 倍、

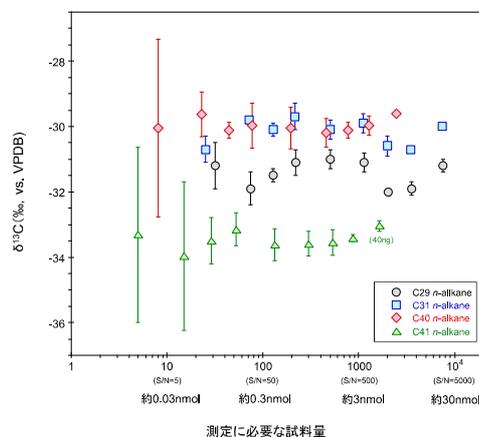


図10 安定同位体比の測定精度と必要な試料量 (C29, 31, 40, 41のn-alkaneの分析例)

窒素で 40 倍悪く、さらなる検討が必要である(本研究では、装置開発の遅れから、分析感度を向上させるための様々な条件の最適化を実施する時間がなかった)。本来 GC-IRMS での分析において、有機化合物の炭素は、1つの炭素原子が1分子の CO₂ ガスになり、窒素は2つの窒素原子が、1つの N₂ ガスになるため、窒素の分析感度は、炭素の分析感度に比べて、約2倍以上悪い。しかし、本研究で得られた結果は、逆であり(窒素の分析感度は、炭素の分析感度に比べて、2倍以上良い)、この理由は、GC カラムの固定相(吸着剤)に由来する炭素が、分析中に溶出し、分析対象の有機化合物とともに、燃焼炉に送られてしまい、それによりクロマトグラムのバックグラウンドを上昇させてしまうためと考えられる。

4.4 実試料の分析

本研究では、上記「4.1. GC-GC-IRMS の製作」に述べたように、「GC-燃焼炉間のヒーター」の作製が著しく遅れたため、測定装置の完成が遅れ、実試料への応用研究がほとんどできなかった。これは、上記「4.3 分析条件の設定と標準試薬の分析」に述べたように、開発した装置を最適化する時間を十分にとることができず、当初に予定していた pmol の試料に対する同位体分析に必要な感度に到達できなかったことも、大きな原因である。そのような状況であったが、最終年度には、図 4 で示した「難培養生物・オルガネラ」「化石の結晶タンパク質」に関連する予備的な研究として、

研究室で培養したサンゴに含まれる共生藻類のアミノ酸の窒素同位体比分析

琥珀中のアリに含まれるアミノ酸の窒素同位体比分析

を実施した。なお、窒素同位体比を測定したのは、上記「4.1. GC-GC-IRMS の製作」に述べたように、現時点では炭素同位体比の測定に比べて、窒素同位体比の測定の方が、感度が良いためである(それぞれ、0.1nmol, 0.04nmol)。以下に結果を示す。

4.4.1. サンゴに含まれる共生藻類

サンゴには、炭酸カルシウムの骨格を除く軟体部の重量に対して、約 10%の共生藻類が含まれている。本研究では、サンゴを細かく切断し、サンゴ本体の軟体部と、取り出した共生藻類をフィルターにて分離し、共生藻類の同位体比分析を実施した。その結果、湿重量で 0.5g のサンゴ片から取り出した共生藻類について、アミノ酸の窒素同位体比分析に成功した(得られた結果は、論文にまとめ、現在投稿中である)。これは、市販の GC-IRMS を用いた場合には、安定同位体比分析に、湿重量で 250g のサンゴが必要になるところ、本研究で開発した装置を用いると、0.5g で十分に測定できることを意味し、実際に、試料採取における環境への負担、研究者の負担、使用する試薬の使用量を、著しく軽減することができた。

4.4.2. 琥珀中のアリ

琥珀は「数億年～数百万年前」の樹木の樹脂化石であり、昆虫などの生物遺骸を頻繁に内包している。これらの生物遺骸は、樹脂に閉じ込められたのち、外界から隔離された脱水・無酸素環境におかれるため、数千万年前のものであっても、生物遺骸の重量比で 0.1-1%の「オリジナル」の有機物(とくにアミノ酸)を保持していることが近年わかってきている。実際に、琥珀中に保存されている昆虫の多くは ng-μg オーダーであるため、アミノ酸量としては 0.05pmol から 0.05nmol で存在することになる。本研究では、本研究では、アリが閉じ込められている琥珀(約 3000 万年前のもの)を用いて、デンタルドリルにてアリ部を削り出し、同位体比分析を実施した。その結果、琥珀に閉じ込められたアリが大型のもの(アミノ酸量としては 0.05pmol 近く存在しているもの)であれば、アミノ酸の窒素同位体比分析が実施でき、一方で、小型のものでは十分なアミノ酸を得られず、分析が実施できない、という結果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yoshito Chikaraishi
2. 発表標題 Interaction between hosts and symbionts: a perspective from compound-specific isotope analysis of amino acids
3. 学会等名 ASLO Aquatic Sciences Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 力石嘉人
2. 発表標題 アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物地球化学および生態学の研究
3. 学会等名 第40回有機地球化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshito Chikaraishi
2. 発表標題 Effect of symbiosis on the ^{15}N values of amino acids
3. 学会等名 International Symposium on Isotope Physiology, Ecology, and Geochemistry 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshito Chikaraishi
2. 発表標題 Trophic Isotopic discrimination of amino acids, For illustrating food web structures and their dynamics
3. 学会等名 35th Congress of the International Society of Limnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 力石嘉人・滝沢侑子
2. 発表標題 生化学プロセスにおける 炭素・窒素の同位体分別
3. 学会等名 日本地球化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshito Chikaraishi
2. 発表標題 Stable nitrogen isotopic composition of amino acids: as a potential powerful tool for studying food web ecology
3. 学会等名 3rd Natural Gas Isotope Technology & Application Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古川 善博 (Furukawa Yoshihiro) (00544107)	東北大学・理学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	滝沢 侑子 (Takizawa Yuko) (90822536)	北海道大学・低温科学研究所・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 International Symposium on Isotope Physiology, Ecology, and Geochemistry 2022	開催年 2022年～2022年
---	--------------------

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------