

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号： 11301  
研究種目： 奨励研究  
研究期間： 2021 ~ 2021  
課題番号： 21H04130  
研究課題名 TOF-SIMSによる有機分子の検出感度向上のための前処理法の開発

## 研究代表者

穴戸 理恵 (Shishido, Rie)

東北大学・多元物質科学研究所・技術一般職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 450,000 円

研究成果の概要： TOF-SIMSは、高感度・高空間分解能な分析手法である。しかしながら、本手法では、質量数が大きい分子の場合、イオン化しにくいという難点があり、その検出感度は低質量の分子と比較して2桁以上低下する傾向にある。

そこで本研究では、検出感度の低いリン脂質を評価分子として選定し、そのイオン化を促進させるための新しい添加剤を探索した。具体的には、高いプロトン供給効果を期待できるクエン酸を添加剤として使用した。その結果、クエン酸を混合させた試料では、リン脂質の感度が大きく向上し、未添加の場合と比較して、約400-1000倍の感度向上効果が得られた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

有機分子の可視化技術は、癌や感染症などを調べる細胞診断や組織診断に利用されている。本手法の開発により、TOF-SIMSでは、これまで検出することが困難であった生体分子の高感度分析が可能になった。この成果は、精密かつ迅速な病理診断の実現につながるものと期待され、病理学分野への波及効果は大きいと考えられる。

研究分野： 表面分析

キーワード： TOF-SIMS イオン化 検出感度向上

## 1. 研究の目的

有機分子の可視化技術は、癌や感染症を調べる細胞診断や組織診断に利用されている。飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)は、高感度・高空間分解能な特徴を有する分析手法で、ポリマー、薬剤、生体組織をはじめとする有機分子の化学構造解析や、その分布情報を取得する手段として用いられている。しかしながら、本手法では質量数が1000を超える分子の場合、イオン化しにくいという難点があり、その検出感度は低質量の分子と比較して2桁以上低下する傾向にある。目的とする分子の明瞭な分布情報を得るためには、その感度を如何に向上させるかが重要となる。SIMS 研究分野では、新しいイオンビームの開発が行われているが、その実現には膨大な時間と費用を有する現状がある。そのため、簡便な手法により有機分子の感度を向上させることができれば、病理学分野への波及効果は大きいと考えられる。

そこで本研究では、簡便かつ安価に有機分子の検出感度を向上させるための新しい前処理法の開発を目指した。具体的には、検出感度の低い生体リン脂質を評価分子として選定し、そのイオン化を促進させる新しい添加剤(マトリックス)を探索した。これまで一般的にマトリックスとして使われてきた芳香族の酸を参照用とし、本研究では、分析対象に対して、高いプロトン供給効果が期待できる脂肪族のカルボン酸をマトリックスとして用いた場合の効果を評価した。

## 2. 研究成果

### (1) 研究方法

#### 評価試料の作製

生体リン脂質として DPPC ( $C_{40}H_{80}NO_8P$ , 734.0 g/mol) および DSPC ( $C_{44}H_{88}NO_8P$ , 790.1 g/mol) を選定し、脂肪族のカルボン酸マトリックスとして、アコニット酸( $C_6H_6O_6$ , 174.1 g/mol)およびクエン酸( $C_6H_8O_7$ , 192.1 g/mol)を用いた。さらに、これまで一般的に用いられてきた DHB ( $C_7H_6O_4$ , 154.1 g/mol)を参照用のマトリックスとした。リン脂質およびマトリックスは、それぞれ濃度が 20 mM および 200 mM となるようクロロホルムおよびエタノールに溶解し、リン脂質とマトリックスの濃度比が 1:0、1:10、1:100 および 1:1000 となるよう溶液を調製した。その後、10  $\mu$ l の溶液を Si 基板上に滴下し、スピンコート法により成膜した。

#### TOF-SIMS 分析

加速電圧 25 kV の  $Bi_3^+$ を一次イオン種として選択し、正にイオン化した二次イオンを検出した。分析領域は  $300 \times 300 \mu m^2$  とし、 $128 \times 128$  pixels でランダムにビーム照射を行った。また一次イオンのドーズ量は、 $5.1 \times 10^{11}$  ions/cm<sup>2</sup> とした。

#### 検出感度の評価

リン脂質およびマトリックスの検出感度は、二次イオン収率を算出することで評価した。二次イオン収率は、得られた質量スペクトルから、それぞれの二次イオンのカウントを求め、これを一次イオンのドーズ量で除することにより算出した。

### (2) 研究結果

マトリックス混合試料から得られたリン脂質のプロトン付加イオン( $[M + H]^+$ )の二次イオン収率を図1に示す。アコニット酸およびクエン酸混合試料では、マトリックスの添加濃度増加とともに $[M + H]^+$ の収率値が向上する傾向が確認されたのに対し、DHB 混合試料では、その値が濃度に依存していないことがわかる。さらにクエン酸を1:1000の濃度比で添加した試料では、DPPC および DSPC の両分子において、収率値が大きく向上する結果が得られた。

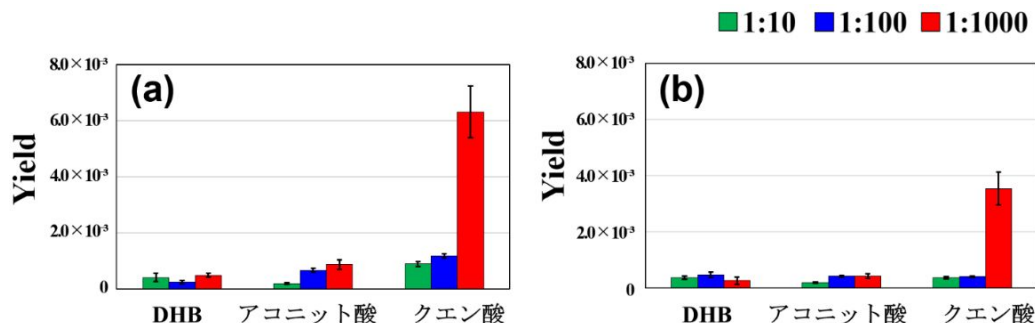


図1 マトリックス混合(a) DPPC および(b) DSPC から得られた $[M + H]^+$ の二次イオン収率

二次イオンの質量と二次イオン収率の向上率の関係を図 2 に示す。リン脂質の[M + H]<sup>+</sup>および[2M + H]<sup>+</sup>の収率値に加えて、それぞれのフラグメントイオンの収率値についても算出を行った。マトリックスを評価分子に対して、1:1000 の濃度比で混ぜ合わせた試料の二次イオン収率を 1:0 の収率値で規格化した値を向上率と定義している。高質量側の分子は、低質量側のフラグメントイオンと比較して、マトリックス添加により、二次イオン収率が大きく向上する傾向が確認され、特にクエン酸添加試料では、[M + H]<sup>+</sup>および[2M + H]<sup>+</sup>の収率が 400-1000 倍程度増加する結果が得られた。またリン脂質とマトリックスの濃度比を考慮すると、低質量側のフラグメントイオンについても、マトリックス添加により感度が向上することが明らかとなった。

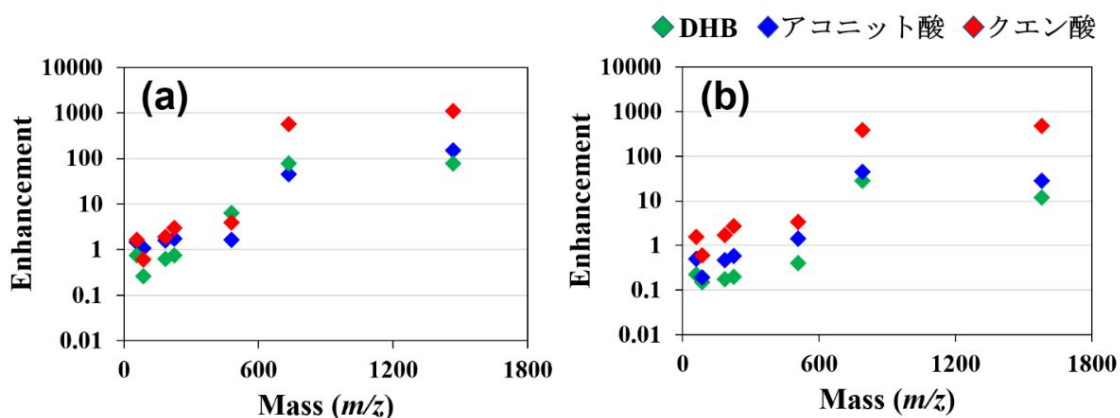


図 2 リン脂質とマトリックスの濃度比が 1:1000 の試料から得られた(a) DPPC および(b) DSPC 由来の二次イオンの質量と感度向上の関係

次にマトリックス側の二次イオン収率に着目し、リン脂質の感度とマトリックスのイオン化率の関係について調査した。図 3 は、DPPC および DSPC に異なる濃度比でマトリックスを混合させた試料から得られた[M + H]<sup>+</sup>の二次イオン収率である。DHB およびアコニット酸と比較して、クエン酸はリン脂質との混合により、プロトン付加でのイオン化が大きく抑制されていることがわかる。

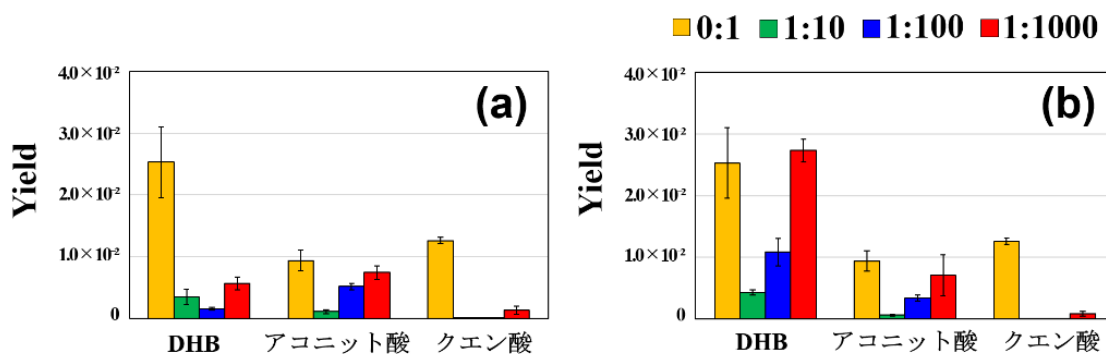


図 3 異なる濃度比でマトリックスを混合させた(a) DPPC および(b) DSPC から得られたマトリックスの[M + H]<sup>+</sup>の二次イオン収率

以上の結果から、リン脂質の感度向上には、分析対象とマトリックスとの間で起こるプロトンの授受、いわゆるマトリックス効果に関与しているものと推察できる。本研究により、これまでマトリックスとして用いられることのなかった脂肪族のカルボン酸は、芳香族の酸と同等、または、それ以上に有機分子に対する高い感度向上効果を有することが明らかとなった。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shishido Rie	4. 巻 54
2. 論文標題 Effect of cocrystallization due to bile acid on molecular ion sensitivity of biological phospholipids in Bi cluster time of flight secondary ion mass spectrometry measurements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surface and Interface Analysis	6. 最初と最後の頁 203 ~ 211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/sia.7039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Rie Shishido, Hideyuki Magara and Tomoyuki Akutagawa
2. 発表標題 Effect of Carboxylic Acid Matrix on Sensitivity of Phospholipid in Bi-Cluster SIMS Measurements
3. 学会等名 The 21th Scientific International Symposium on SIMS and Related Techniques Based on Ion-Solid Interactions (SISS-21) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 穴戸理恵、真柄英之、芥川智行
2. 発表標題 BiクラスターSIMSによるカルボン酸マトリックスを用いた生体リン脂質の感度向上に関する評価
3. 学会等名 日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rie Shishido, Hideyuki Magara and Tomoyuki Akutagawa
2. 発表標題 Sensitivity enhancement of biological phospholipids using carboxylic acid matrix in Bi-cluster TOF-SIMS measurements
3. 学会等名 13th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices ' 21 (ALC ' 21) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

SISS-21 Poster Award (Karen Award)

研究組織（研究協力者）

氏名

ローマ字氏名