

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750080

研究課題名（和文） 微量必須元素の網羅的解析のための細胞内多元素同時計測法の開発

研究課題名（英文） Development of multielement measurement method for exhaustive study of essential elements in cells

研究代表者

稲垣 和三（INAGAKI KAZUMI）

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・研究室付

研究者番号：50356490

研究成果の概要（和文）：単一細胞内微量元素の動態および相互作用の網羅的解析を実現することを目的として、誘導結合プラズマ質量分析法を基盤とした単一細胞中微量元素の高感度多元素同時計測システムの構築に取り組んだ。本研究では、細胞を直接プラズマに導入できるインターフェースを新規開発し、高時間分解計測と組み合わせることで、プラズマ内で細胞が分解された瞬間をスナップショット計測することを試みた。酵母細胞をモデル使用として、検討した結果、Mg, P, Zn に関して単一酵母細胞計測が可能となった。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new analytical system based on plasma mass spectrometry to realize a single cell analysis of trace elements. The system is constructed of inductively coupled plasma mass spectrometry and its new sample introduction interface that can directly introduce cells into the plasma. The system can get a snap shot of the moment of the decomposition of a cell in the plasma, and can measure multielement in the cell at a time. In the application for multielement analysis of a single yeast cell, Mg, P, and Zn can successfully be measured in single yeast cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：細胞、誘導結合プラズマ質量分析、多元素分析

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| 1. 研究開始当初の背景<br>生体には、鉄、亜鉛のような生命の維持に | 欠かせない微量必須元素、あるいはカドミウム、水銀のように毒性を発現する元素等が存 |
|-------------------------------------|--|

在することが広く知られている。近年では、新たな学術領域として生体内に存在する微量(金属)元素の関わる生命現象全体を科学する「メタロミクス Metallomics」が誕生し、専門学術雑誌(Metallomics, RSC, UK)が刊行されるなど、生体内微量元素に関する研究は急速に進展している。

生体微量元素の機能解明に関する研究も、個体発生及び分化・増殖過程において微量元素がドラスティックに機能しているとの予測から、DNA、タンパク質等を対象にした他の Omics 研究領域同様、実験動物等を用いた実験系から培養細胞を用いた細胞レベルでの実験系へとシフトしており、X線、蛍光等を利用した顕微イメージング手法による微量元素の細胞内分布計測等が試みられている。一方で、動態および相互作用解析に不可欠な定量評価のための計測手法に関しては、いまだ細胞数千個を必要としているのが現状であり、単一細胞レベルでの微量元素分析には対応しきれていないのが現状である

## 2. 研究の目的

本研究では、単一細胞内微量元素の動態および相互作用の網羅的解析を実現し、これまで見逃していた未知なる生命機構発見に資することを目的として、プラズマ質量分析法を基盤とした単一細胞中微量元素の高感度多元素同時計測システムを開発した。

## 3. 研究の方法

本研究では、酵母細胞をモデル試料として (1) 高感度多元素分析装置である ICP 質量分析装置 (ICP-MS) の細胞直接導入インターフェースを新規開発し、(2) 高速スキャニング計測による細胞中微量元素の高感度多元素同時計測技術の確立を試みた。さらに (3) 試料導入部における細胞の吸着損失を抑制する手法についても検討した。

### (1)細胞直接導入インターフェース新規開発

当研究室で開発・製品化した ICP-MS 用高効率試料導入インターフェース AIF-01 を基盤として、細胞直接導入可能な新規インターフェースを開発した。図 1 に開発したインターフェースを示す。

当該インターフェースは、高効率噴霧が可能な高機能三重管ネブライザー (HPCN) と低容量気化室で構成されており、ネブライザーに関しては、細胞直接噴霧を可能とするため、中心管サイズを変更し、気化室に関しては、熱流体解析ソフトウェアによるシミュレーションに基づき、異なる形状・容積の気化室を試作し、高速度カメラによる液滴動態観察、ICP-MS に接続した際に得られる感度及び信号安定性に基づいて性能を評価することで最適化を試みた。

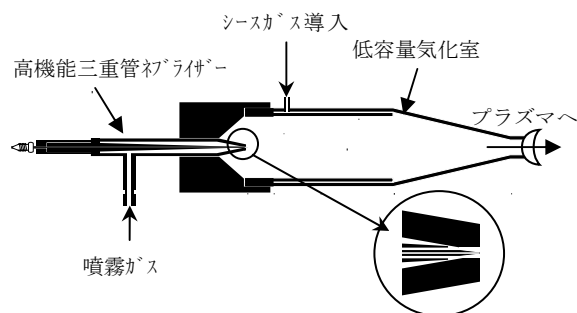


図 1 細胞直接導入インターフェース

### (2) 高感度多元素同時計測技術の確立

単一細胞計測に関しては、高速スキャニングによって計測した信号強度分布とレーザー回折式粒度分布計測によって得られた細胞粒度分布を比較することで、分散液中の細胞を単一細胞として計測可能であることの実証を試みた。さらに、プレートカウンティングにより分散液中の細胞数を計測した結果と ICP-MS 測定における信号検出頻度を比較することでプラズマへの細胞導入効率を評価した。

### (3) 細胞の吸着損失を抑制

細胞分散液にアルカリ金属を添加することで導入系内吸着の抑制を試みた。

## 4. 研究成果

図 2 に、細胞直接導入/高速スキャニング ICP-MS 計測によって得られたマグネシウム、リン、亜鉛の高時間分解計測プロファイルを示す。細胞濃度を変化させて高速スキャニング計測を行ったところ、細胞濃度と ICP-MS 信号検出頻度は非常によい直線関係を示したことから、図 2 に示す信号ピークは単一細胞によるものであることが確認できた。

アルカリ金属添加による試料導入部における細胞の吸着損失抑制を検討した結果、0.1%(wt/v)NaCl でもっとも抑制効果が高い結果が得られた。

セルカウンティングと高速スキャニング計測におけるピーク数よりプラズマへの細胞導入効率を算出したところ、細胞導入効率は 30%以上であり、従来の細胞導入方法の導入効率 0.5%程度に対し 2 桁近く高い効率であった。

細胞内に含まれるリンの大部分が細胞膜に存在すると仮定し、細胞直接導入/高速スキャニング ICP-MS 計測によって得られたリンの信号強度頻度を規格化した信号頻度とレーザー回折法によって計測した酵母細胞粒度分布計測結果を比較したところ、良い一致を示した。

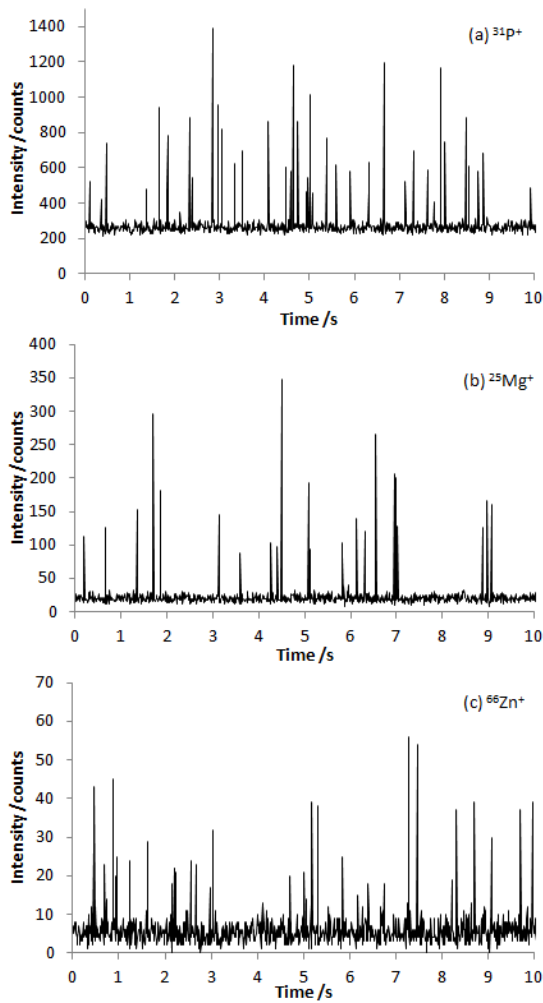


図2 細胞直接導入/高速スキャンング ICP-MS 計測によって得られた Mg, P, Zn の高時間分解計測プロファイル

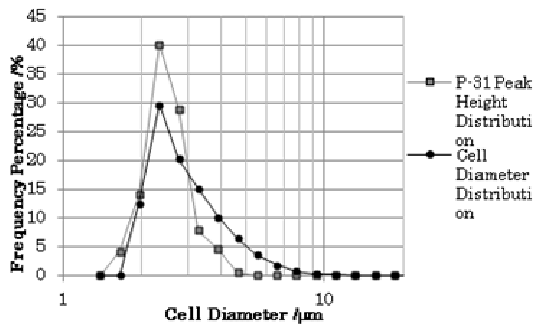


図3 細胞直接導入/高速スキャンング ICP-MS 計測によって得られた P の信号強度頻度 (表面積で規格化) と酵母細胞粒度分布計測結果の比較

酵母細胞を酸分解し、ICP 発光分析法でバルクの微量元素濃度を定量した結果をもとに、単一酵母細胞中に含まれるリン及びマグネシウム濃度の半定量を試みた。図3に半定量によって算出した単一細胞に含まれるリン及びマグネシウム濃度の頻度分布を示す。

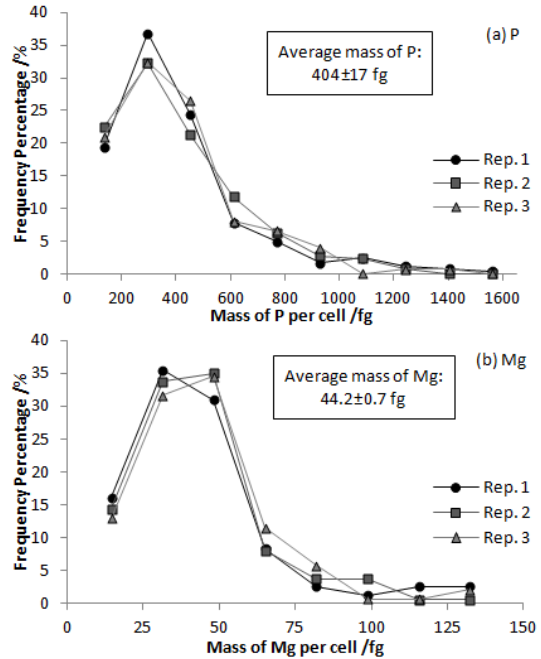


図4 半定量によって算出した単一細胞に含まれるリン及びマグネシウム濃度の頻度分布

以上、検討の結果、細胞直接導入/高速スキャンング ICP-MS 計測により単一酵母細胞に含まれるマグネシウム、リン、亜鉛の高感度計測が可能となった。現在、より高感度計測が可能である二重収束型 ICP-MS による高速スキャンング計測を検討しており、そこでは、単一酵母細胞に含まれる硫黄、マンガン、鉄、銅の高感度が可能となっている。

本研究では、粒径 2-3  $\mu\text{m}$  ほどの比較的小さい酵母細胞をモデルとして検討したが、開発した細胞直接導入型インターフェースは、10  $\mu\text{m}$  ほどの細胞まで対応できることから、今後、より大きな細胞への応用展開が期待できる。

なお、本研究を進める過程において、高塩濃度耐性を有する微量試料導入型ネブライザー、極微量生体試料分析用ハイスループット試料導入インターフェース等、ICP-MS 用の新たな試料導入系開発に結びついた。

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2件)

① 高崎裕加、稲垣和三 他5名、Development of salt-tolerance interface for an high performance liquid chromatography /inductively coupled plasma mass spectrometry system and its application to accurate quantification of DNA sample, Anal. Chim. Acta, 査読有, 713, 2012, 23-29.  
DOI: 10.1016/j.aca.2011.11.039

② 高崎裕加、稲垣和三 他6名、Multielement analysis of micro-volume biological samples by ICP-MS with highly efficient sample introduction system, Talanta, 査読有, 87, 2011, 24-29.  
DOI: 10.1016/j.talanta.2011.09.022

[学会発表] (計6件)

① 稲垣和三、単一酵母細胞中微量元素の高感度多元素分析, 日本薬学会 132 年会, 2012 年 3 月 29 日、北海道、北海道大学.

② 稲垣和三、High sensitive analysis of trace element in Yeast Cell by Time-resolved ICP-MS with High Efficiency Cell Introduction Device, 78th Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology, 2011 年 6 月 8 日、韓国, Daegu、Exhibition Convention Center.

③ 稲垣和三、Multielement analysis of yeast cell by time-resolved ICP-MS with high efficiency cell introduction device, ICAS2011, 2011 年 5 月 25 日、京都府、国立京都国際会館.

④ 稲垣和三、藤井紳一郎、大畑昌輝、高崎裕加、梅村知也、高津章子、千葉光一、Time-resolved ICP-MS Measurement for Multielement Analysis of Single-cell, 2011 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 2011 年 2 月 3 日、Zaragoza, Spain.

⑤ 稲垣和三、藤井紳一郎、高津章子、千葉光一、Development of High Performance Concentric Nebulizer for ICP-OES and ICP-MS, 2011 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 2011 年 2 月 3 日、Zaragoza, Spain.

⑥ 稲垣和三、藤井紳一郎、大畑昌輝、高崎裕加、梅村知也、高津章子、千葉光一、細胞直接導入/ICP-MS による酵母細胞の多元素分析, 第 2 回メタロミクス研究フォーラム, 2010 年 11 月 3 日、京都府、京都薬科大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 和三 (INAGAKI KAZUMI)

独立行政法人産業技術総合研究所・

計測標準研究部門・研究室付

研究者番号 : 50356490