

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24619004

研究課題名(和文) ピエゾ振動ナノCIによる低極性分子標的Live Single-cell MS法の開発

研究課題名(英文) Development of low polar molecules-targetted Live single-cell MS by piezo-oscillated nano-CI.

研究代表者

津山 尚宏 (TSUYAMA, NAOHIRO)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10335747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はナノスプレーチップを用いて一細胞の内容物を先端より回収し、イオン化溶媒を加えて電圧を印加して霧化させ、分子を直接質量分析するLive single-cell MS法を開発した。より極性の低い分子へこの方法を適用するため、霧化の方法として piezo 素子によるナノスプレー振動デバイスを作成し、コロナ放電によりイオン化を行った。極性の低い分子のシグナル強度が増加したが測定環境由来のシグナルも増加したため、活性炭を通過させた清浄な窒素ガス中でイオン化を行うデバイスを新たに作成した。このデバイスを使いイオン化を行うことにより、一細胞内の極性の低い分子も従前より感度高く分析できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We developed Live single-cell MS method which allows serial analysis from single cell content recovery to direct ionization of included molecules extracted with ionization solvent using a nanospray chip followed by mass spectrometric measurement. In order to apply this method for low-polar molecules, we made a nanospray-oscillation device using a piezo element to nebulize solvent. Ionization was achieved by a corona discharge device. We found that signal of low-polar molecules was increased whereas background signal of environmental origin was also increased. To improve background noise, we made a device for ionization in clean charcoal-treated nitrogen gas-environment. We confirmed that signals of low-polar molecules were increased compared to the original method.

研究分野：分析化学・放射線生物学

キーワード：質量分析 メタボロミクス ナノスプレー 化学イオン化 一細胞分析

1. 研究開始当初の背景

生命現象は細胞集団の多様な制御によって引き起こされる。細胞レベルでは、隣り合った細胞同士でも異なった状態を示すことから、1細胞間の多様性を解析できる分析法は重要である。従来の質量分析法は、大量の細胞や組織を破碎し抽出物を解析する方法が一般的で、得られるデータはすべての細胞の平均値である。1細胞レベルの解析では、蛍光標識した分子の顕微鏡下の継時的な観察は一般的に行われているが、未標識の分子をリアルタイムで直接解析する方法論が必要とされており、現在、一細胞レベルの解析を行うための様々な原理の技術開発が行われている。

我々は独自に開発したナノスプレーチップを用い、顕微鏡下で観察を行いながら1細胞の内容物を吸い上げ直接イオン化することで、1細胞の高感度リアルタイム分子検出を行うLive Single-cell MS法を開発した(J. Mass Spectrom., 43, 1692, 2008, Anal. Sci., 24, 559-561, 2008, 特許第5317983号)。問題点として、ナノスプレーイオン化では、高極性の物質は高感度検出が可能であるが、低極性物質は低感度で不安定である。また、ナノスプレーは微量プロテオーム解析等に用いられているが、我々のものと異なり市販スプレーの構造や材質等の問題のため安定した解析が難しく様々な応用はなされていない。本研究では、我々のナノスプレーチップを用いた1細胞質量分析で同時に検出される分子の網羅性を上げるため、極性の高低に関わらず高効率・高感度イオン化検出できる質量分析法の開発を目指した。

2. 研究の目的

通常のエレクトロスプレーイオン化法では試料溶媒が吐出されるノズルの先端に電圧を印加し、スプレーガスと高電圧下で液滴を形成させる。ナノスプレーの場合には先端径が小さいため電圧の印加のみで霧化が起き微小な液滴となりイオン化が効率的に起きる。このイオン化方式では霧の液滴中から溶媒が脱離する結果極性の高い分子が優先的にイオン化されるため、極性の低い分子は検出されにくくなる。Live Single-cell MS法開発の過程で、高電圧下でナノスプレー先端に放電が観察されると同時に、通常観察が難しい低極性分子が検出されること、ピエゾ(圧電)素子振動を用いたナノスプレーチップの直接ホモジナイゼーションで、ナノスプレーチップ先端から溶媒の霧が生成することを見出した。この2つを組み合わせピエゾ素子振動ナノスプレーシステムを作成し、振動により霧化し微小電極放電を加えて分子を化学イオン化するイオン源を構築する。1細胞質量分析に応用して細胞内分子や投与薬物の網羅的検出系を作成する(図1)。(1)ピエゾ振動ナノスプレーシステムの開発 本法は放電による化学イオン化のため、通常

のエレクトロスプレーイオン化法のようにチップに電圧をかけスプレーすることができない。チップ先端を圧電素子により共鳴振動させ、スプレー内の溶液を霧化する。ナノスプレーチップが壊れることなく微細な液滴を吐出する器具を作成し条件設定を行う。(2)微小電極放電を用いた化学イオン化(CI)法の開発

圧電素子振動により生じたナノスプレーからの微細な液滴に、放電により電荷を与え分子のイオン化を行うための電極を作成する。電極の先端径や形状、ナノスプレーチップ・質量分析計の試料導入口との相対的な位置関係や印加する電圧などについて、試料ピークの追跡を行いながら最適化を行う。

(3) 1細胞分子追跡への適用

1細胞を吸い上げたナノスプレーチップにて検出分子の網羅性の検討を行う。これまで本法を適用してきた対象について、作成した器具を用いて試料採取し、色々な分子の動態や代謝検出を試みる。

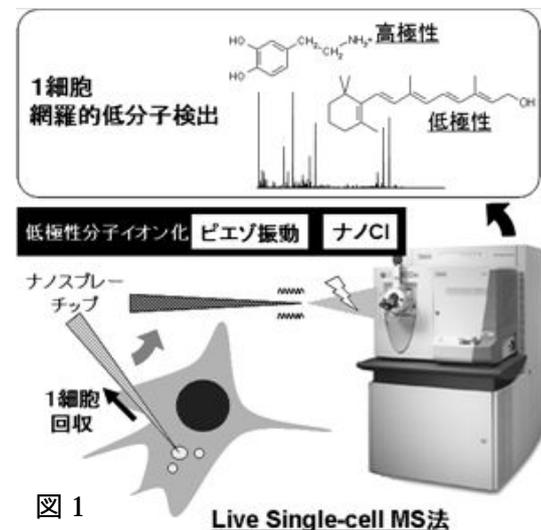


図1

Live Single-cell MS法

3. 研究の方法

(1) ピエゾ振動ナノスプレーシステムの開発

圧電素子デバイスの作成と最適化 圧電素子を用いた液滴形成ではチップ先端が高速振動することにより微細な液滴群が吐出され霧となるため、チップ先端の振動制御が重要である。チップ先端を効率よく振動させるため、チップ取り付けホルダーの材質・形状や重量を検討する。

ナノスプレーチップ形状の最適化 微細な霧を形成させるために、チップ先端の形状、先端径などチップ製造条件を変えながら最適化する。また先端部は高速振動するため、機械的強度が問題となる。一定時間のナノスプレー解析に耐えられるチップ条件を検討する。

ナノスプレーチップ表面処理 圧電素子振動による霧化では、チップに電圧を印加しないため金属コーティングは必要ないが、チップが折れないように剛性を上げるために表面処理を検討する。

(2) 微小電極放電を用いたナノCI法の開発

微小電極の作成 放電による化学イオン化は大気や溶媒を介して起きる。ナノスプレーからの吐出液滴は微細なので表面積が広く、効率よく電荷を転移することができる。低電圧でもコロナ放電が可能になるよう、微小電極先端の形状を検討する。先端の研磨や電極表面の被覆なども検討する。

微小電極最適化 電極からの放電条件を決定するため、ナノスプレーとの相対的位置関係を検討しながら、電極の位置および電圧設定を検討する。分子種や質量電荷比により、最適位置が異なる可能性があるため、同時に解析を行う。

窒素ガス雰囲気によるノイズ低減 放電により生じた荷電液滴からのイオンの脱離を促進するため、脱溶媒の効率化を試みる。霧に向け、窒素ガスをステンレスノズルの先端より吹きつける。ノズル口径やガス流速を検討する。

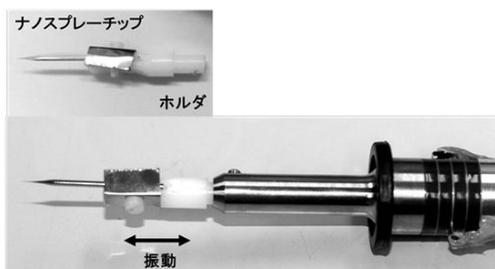
(3) 1細胞解析での網羅性検討

標準物質で溶媒組成などの最適条件を決定した後、培養がん細胞を用いて、我々が通常行っているナノスプレーに直接電圧をかける方法と比較しながら、シグナル強度と網羅性について1細胞分析を行う。また、植物組織についても同様な解析を行い、検出可能な分子について検討する。

4. 研究成果

(1) ピエゾ振動ナノスプレーシステムの開発

圧電素子デバイスの作成と最適化 ナノスプレーチップを用いたエレクトロスプレーイオン化(nanoESI)では極性分子のイオン化効率が高いので、極性の低い分子のイオン化も可能な化学イオン化法を適用するため、電圧印加に依らない霧化の方法としてナノスプレーチップ自体を高速振動させ霧化を行った。高速振動デバイスとして、ピエゾ振動素子を用いた。装置作成の簡易化のため、まず本多電子の商品名「超音波カッター」に内蔵されているピエゾ振動デバイスを取り出し実験に供した。先端部分にナノスプレーチップを取り付けるため、ジュラルミンおよびポリオキシメチレン(POM)の丸棒からホルダを削り出し、ナノスプレーチップを取り付けて霧化の際のイオン強度を比較した。ホルダの重量が軽いほど、ホルダ長が短いほど、イオン強度が高くなった。ピエゾ振動デバイスとの共振を妨げない、かつ加工可能な最小のホルダをPOMで作成し使用に供した(図2)。



ナノスプレーチップ形状の最適化

口径や形状の異なるナノスプレーチップを升島が作成した。走査型電子顕微鏡により先端径を測定したところ、0.9, 2, 3, 5, 8 μmのチップが再現性良く制作できた。各々のチップに細胞溶解液を加え、振動デバイスに取り付けイオン化を行いシグナルの安定性とイオン化の継続時間を観察した。3μmのものまでは、1分程度で破断し、継続したシグナルを得ることが難しかった。他方でシグナルの安定性は口径が大きくなるほど低下した(図3)。

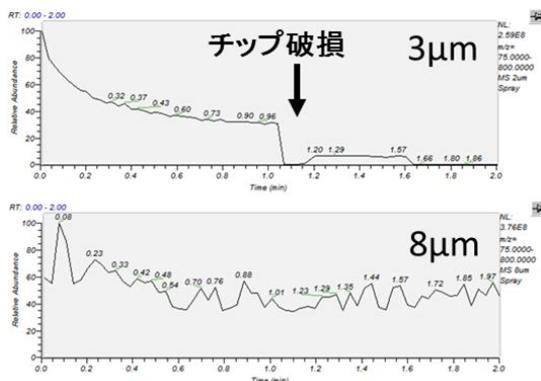


図3 チップ口径によるイオン強度変化

ナノスプレーチップ表面処理

ナノスプレーの強度や導電性を上げるため、表面に金属(金、プラチナ)をスパッタリング、あるいは導電ポリマー(ポリアニリン)をスピコートした。細胞溶解液を加え、振動デバイスに取り付けイオン化を行いイオン強度と継続時間の比較を行ったところ、プラチナ>金>ポリアニリンの順で高いシグナルが得られた。またプラチナは金に比べて継続時間が長い傾向が認められた。

(2) 微小電極放電を用いたナノCI法の開発

微小電極の作成 液滴に電荷を与えるために、針電極に高電圧印加に依り生じるコロナ放電を用いた。電極には注射針や金属針を尖鋭加工したものに加え、ナノスプレーを使用した(図4)。電圧を1000~2500Vの間で印加しシグナルを観察したところ、ナノスプレーを用いた場合に、最もシグナル強度が高くなった。

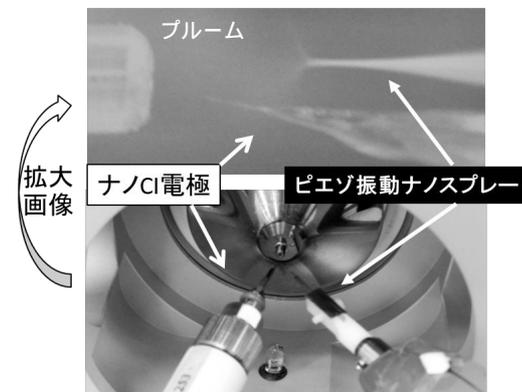
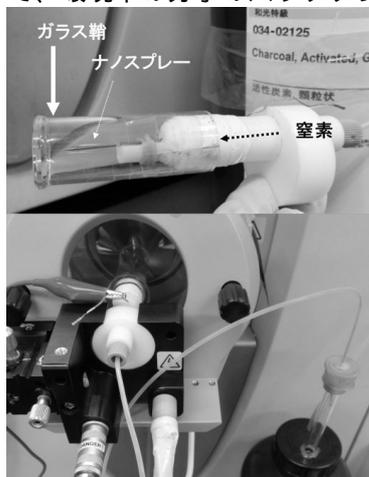


図4 ピエゾ振動ナノCIイオン源

微小電極最適化 様々な口径のナノスプレーニードルに、金あるいはプラチナの厚めスパッタリングを施したチップを作成し、細胞抽出液を用いてイオン強度を比較した。先端径が一番小さな0.9 μ mニードルでは低い電圧からコロナ放電(先端が光る)が認められ、シグナルも高い傾向が認められたが、先端が破損するのも早く、適切な電圧値(1100V程度)の設定が必要であった。また金よりもプラチナの方が持続的なスプレーが認められたことから、0.9 μ mニードルでプラチナコートしたものを電極に使用することとした。また電極の位置はブルームの中に置いた場合に、シグナルが強くなる傾向が認められた。

窒素ガス雰囲気によるノイズ低減

コロナ放電では、環境中の窒素をはじめとする分子にコロナ放電による電荷が乗り、さらに試料分子に電荷が転移・化学イオン化し質量分析できる。コロナ放電に関する問題点として、環境中の分子のバックグラウンドシグナルの増加が認められた。



の増加が認められた。清浄環境中でイオン化を行うデバイスを作成し、活性炭処理した窒素雰囲気下でイオン化を行ったところ、環境由来のピークの低減が認められた(図5)。この窒素雰囲気は piezo 振動デバイスに組み込む必要があるが、イオン源のスペースから達成できていない。piezo 圧電素子による霧化を使わなくとも、通常のスプレーイオン化の際に印加電圧を倍にすることでコロナ放電が認められ、清浄窒素雰囲気下でイオン化を行うことができた。

(3) 1細胞解析での網羅性検討

薬剤処理した癌細胞株から薬物を検出する、植物組織中の一細胞の内容物を直接回収する、を8 μ mナノスプレーニードルを用いて行った。最適化した電極をセットした、このデバイスを用いて極性の低い培養細胞内の分子や薬物、植物組織の分子解析ができることを精密質量から確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

1. Fujii T, Matsuda S, Tejedor ML, Esaki T, Sakane I, Mizuno H, Tsuyama N, Masujima T. Direct metabolomics for plant cells by live single-cell mass spectrometry., *Nature Protocols*. 査読有, 10, 1445-1456, 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.084.

2. Abe Y, Miura T, Yoshida MA, Ujiie R, Kurosu Y, Kato N, Katafuchi A, Tsuyama N, Ohba T, Inamasu T, Shishido F, Noji H, Ogawa K, Yokouchi H, Kanazawa K, Ishida T, Muto S, Ohsugi J, Suzuki H, Ishikawa T, Kamiya K, Sakai A. Increase in dicentric chromosome formation after a single CT scan in adults. *Scientific Reports*, 査読有, 5, 13882. 2015, doi: 10.1038/srep13882.
3. Abe Y, Miura T, Yoshida MA, Ujiie R, Kurosu Y, Kato N, Katafuchi A, Tsuyama N, Kawamura F, Ohba T, Inamasu T, Shishido F, Noji H, Ogawa K, Yokouchi H, Kanazawa K, Ishida T, Muto S, Ohsugi J, Suzuki H, Ishikawa T, Kamiya K, Sakai A. Analysis of chromosome translocation frequency after a single CT scan in adults. *Journal of Radiation Research* 査読有, 2016, doi: 10.1093/jrr/rrv090.
4. Tsuyama N, Mizuno H, Katafuchi A, Abe Y, Kurosu Y, Yoshida M, Kamiya K, Sakai A. Identification of low-dose responsive metabolites in X-irradiated human B lymphoblastoid cells and fibroblasts. *Journal of Radiation Research*, 査読有, 56, 46-58. 2015, doi: 10.1093/jrr/rru078
5. 津山尚宏, 放射線量を見える化する生物学的分析法, *BUNSEKI KAGAKU*, 査読無, 63, 445-453, 2014
6. Sasada S, Miyata Y, Tsutani Y, Tsuyama N, Masujima T, Hihara J, Okada M. Metabolomic analysis of dynamic response and drug resistance of gastric cancer cells to 5-fluorouracil. *Oncology Reports*, 査読有, 29, 925-31. 2013, doi: 10.3892/or.2012.2182.
7. 伊達沙智子, 津山尚宏, 升島努. 一細胞質量分析法による迅速一細胞薬物代謝解析. *実験医学*, 査読無, 31, 443-448, 2013
8. Fukano Y, Tsuyama N, Mizuno H, Masujima T. Drug metabolite heterogeneity between cultured single cells profiled by pico-trapping direct mass spectrometry., *Nanomedicine*, 査読有, 7, 1365-1374, 2012, doi: 10.2217/nmm.12.34
9. Tejedor ML, Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. In Situ Molecular Analysis of Plant Tissues by Live Single-Cell Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 査読有, 84, 5221-5228, 2012, doi: 10.1021/ac202447t.
10. Date S, Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T. Direct drug metabolism monitoring in a live single

- hepatic cell by video mass spectrometry. Anal. Sci., 査読有, 28, 201-203. 2012, doi: 10.2116/analsci.28.201
11. Tsuyama N, Mizuno H, Masujima T. Molecular and functional analysis of cellular phenomena using single-cell mass spectrometry. Biol. Pharm. Bull., 査読有, 35, 1425-1431, 2012, doi: 10.1248/bpb.b212012
〔学会発表〕(計 10 件)
 1. 小林勇太, 上田一樹, 水野初, 轟木堅一郎, 関俊哲, 津山尚宏, 豊岡利正, N 標識化クロレラを用いた多成分高精度分析法の開発, 「新アミノ酸分析研究会」第 5 回学術講演会 2015 年 12 月 7 日, 東京大学武田先端知ビル(東京都文京区)
 2. Tsuyama N. Low-dose radiation metabolomics in human cells. 15th International Congress of Radiation Research, 2015 年 5 月 25-29 日, 京都国際会議場(京都府京都市)
 3. 津山尚宏, 質量分析による放射線メタボロミクス. 平成 26 年度日本薬学会東北支部第 3 回物理・分析系若手研究者セミナー, 2014 年 9 月 20 日, 東北薬科大学(宮城県仙台市)
 4. 津山尚宏, 片渕淳, 阿部悠, 黒須由美子, 吉田光明, 神谷研二, 坂井晃 ヒト培養細胞株を用いた低線量放射線メタボロミクス, 第 57 回放射線影響学会, 2014 年 10 月 1 日-3 日, かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
 5. 津山尚宏, 片渕淳, 阿部悠, 黒須由美子, 吉田光明, 神谷研二, 坂井晃 X 線照射ヒト EB トランスフォーム B 細胞を用いた代謝変動指標探索, 第 56 回放射線影響学会, 2013 年 10 月 18 日-20 日, ホテルクラウンパレス青森(青森県青森市)
 6. 津山尚宏, 水野初, 片渕淳, 升島努, 阿部悠, 黒須由美子, 吉田光明, 神谷研二, 坂井晃 ヒト B リンパ球細胞株を用いた低線量放射線メタボロミクス, 第 36 回日本分子生物学会, 2013 年 12 月 3 日-6 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
 7. Tsuyama N, Mizuno H, Harada T, Date S, Masujima T. Realtime Molecular Analysis of Single Cell State by Fluorescence-assisted Live Single-cell Mass Spectrometry, 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012 年 9 月 15-21 日, 京都国際会議場(京都府京都市)
 8. 津山尚宏, 深野泰史, 水野初, 伊達沙智子, 原田隆範, 升島努, Live Single-cell MS による肝細胞薬物代謝能の多様性解析, 第 25 回バイオメディカル分析化学シンポジウム, 2012 年 8 月 8 日-10 日, 慶応大学薬学部(東京都港区)
 9. Tsuyama N, Fukano Y, Mizuno H, Harada T, Date S, Masujima T. Detection of Drug Metabolism Heterogeneity in Primary Human Hepatocytes by Live Single-cell Mass Spectrometry. 60th ASMS Conference, 2012 年 5 月 20 日-24 日, Vancouver BC (Canada)
 10. 津山尚宏, 蛍光プローブを併用した 1 細胞質量分析, 一細胞分析高速創薬フォーラム, 2012 年 5 月 14 日, 理研 QBic(大阪府吹田市)
〔図書〕(計 3 件)
 1. 津山尚宏 化学便覧 応用化学編 第 7 版, オミクス支援分析技術, 93-95, 丸善出版, 2013
 2. 津山尚宏 試料分析講座 タンパク質分析, タンパク質分析概論, 1-19, 丸善出版, 2012
 3. 津山尚宏, 升島努 試料分析講座 アミノ酸・生体アミン分析, LC-MS による尿中カテコールアミン分析, 85-99, 丸善出版, 2012
〔産業財産権〕
取得状況(計 1 件)

名称: 細胞観察をともなった細胞液捕獲と成分分析法および細胞液捕獲・分析装置
発明者: 升島努, 津山尚宏, 水野初
権利者: 升島努, 津山尚宏, 水野初
種類:
番号: 特許第 5317983 号
取得年月日: 2013 年
国内外の別: 国際特許
 6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
津山 尚宏 (TSUYAMA NAOHIRO)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10335747
 - (2) 研究分担者
水野 初 (MIZUNO HAJIME)
理化学研究所・生命システム研究センター・研究員
研究者番号: 30457288

升島 努 (MASUJIMA TSUTOMU)
理化学研究所・生命システム研究センター・グループリーダー
研究者番号: 10136054