

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25248035

研究課題名(和文) 単一細胞内zeptogram元素分析用プラズマ質量・発光分析システムの開発

研究課題名(英文) Development of plasma MS/AES measurement system for zepto gram elements in a single cell

研究代表者

沖野 晃俊 (Okino, Akitoshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：60262276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：単一細胞中の超微量元素の分析が可能になると、iPS細胞の高効率な分化誘導や代謝機構の解明などにつながると期待されている。本研究では、一つの細胞を内包した微小液滴をプラズマ発光/質量分析装置に導入できる、ドロプレット試料導入システムを開発した。開発した装置を用いてヒト骨肉腫由来のU2OS細胞と子宮頸がん由来のHeLa細胞との単一細胞分析を行った。それぞれに含まれるMgとCaを測定した結果、U2OS細胞では相関係数は0.91であったが、HeLa細胞では0.64であり、HeLa細胞の方が濃度の相関が有意に低いことを示し、細胞に微量元素の含有濃度のばらつきがある事を始めて実験的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To analyze trace elements in a single cell, we made a Droplet Direct Injection Nebulizer (D-DIN) which can introduce sample solution into Inductively Coupled Plasma (ICP) as a single droplet of 14 to 180 pL volume. A single droplet which contains a single cell of unicellular algae was introduced to ICP and emission spectra of Ca, Mg and Fe were detected simultaneously. Single plant cells and human cells were introduced into ICP individually and trace elements were measured. Human cervical carcinoma HeLa and osteosarcoma U2OS cells were used as the samples to compare the correlation of trace elements. As a result, emission spectra of Ca, Mg contained in pg level in single human cells were detected simultaneously and the correlation coefficient of Ca and Mg in HeLa and U2OS cells were 0.64 and 0.91, respectively.

研究分野：プラズマ分析化学

キーワード：細胞分析 プラズマ 質量分析 発光分析 誘導結合プラズマ ドロプレット マイクロプラズマ

### 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞をはじめとする再生医療の基礎研究の進展に伴って、単一細胞の個別分析の必要性は極めて高くなっている。単一細胞中のタンパク質や DNA などの高分子の高感度分析技術、いわゆる単一分子解析はここ数年で格段に進歩している。一方、微量金属等の無機分析、つまり単一細胞中の元素分析は、高分子の分析に大きく遅れている。これはひとえに、細胞一個の中の濃度 10 ppt の微量元素の絶対量が、わずか数 100 zg (zeptogram= $10^{-21}$ g) に相当する事が原因である。現在、微量元素分析に広く使用されている誘導結合プラズマ(Inductively Coupled Plasma; ICP)を用いた分析法は、0.1 ppt の分析が可能であるが、分析にはマイクロリットルといった、細胞と比べると大量の試料が必要であるため、多数の細胞の平均情報しか得られなかった。絶対感度ではおよそ  $1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$  が目安とされている。この原因は、これまでに開発されている装置は、ppt などの比率で表される低濃度元素の分析には極めて優れているが、多量の分析試料を使用し、かつ低濃度でプラズマ中に導入するため、微量の元素の分析には適していない事が原因である。このため、単一細胞中の元素分析は実現されていなかった。

### 2. 研究の目的

100 pL 以下の微小な液滴中に、狙った一つの細胞を封入して高温プラズマ中に射出導入し、多量元素から極微量元素までを蛍光分析、飛行時間型質量分析、四重極質量分析の三段階で分析しつつ「単一細胞内zeptogram元素分析用プラズマ質量・蛍光分析システム」を開発する。検出下限絶対量の目標は、一般的なプラズマ分析装置の 1/100,000 以下である 10 zeptogram ( $10^{-20} \text{ g}$ )とする。開発した装置の評価を行うとともに、iPS 細胞や HeLa 細胞の個別単一細胞分析を実施し、極微量元素の偏在や分散について、世界で初めて詳細な調査を行う。そして、がんやアルツハイマー等の発症原因の解明、iPS 細胞の分化過程の解明、細胞単位での薬効診断等、人類の健康に関する広い分野の基礎研究に貢献できる新しい分析ツールを提供する。

### 3. 研究の方法

まず、一つの細胞を内包した 180 pL 程度の微小液滴を 1 滴ずつ誘導結合プラズマ(Inductively coupled plasma; ICP) 蛍光/質量分析装置に導入できる、ドロプレット試料導入法の開発を行った。次に、単一細胞内の微量元素を高感度に分析するため、ドロプレットの溶媒を気化除去するための、脱溶媒システムを開発した。そして、その加熱や冷却の最適条件を求め、植物やヒト細胞の分析を実現した。装置の評価は、体積が比較的均一な人工のラテックス粒子を用いて実施した。最後に、開発した装置を用いて、単一ヒト細胞の分析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (a) ピエゾ素子を用いたドロプレットネブライザ

細胞やナノ粒子といった微量試料の高感度、高効率分析および個別分析を目的として、ドロプレット試料導入法(Droplet Direct Injection; D-DIN)の開発を行った。図 1 に示すように、ドロプレットネブライザには、溶液試料であるドロプレットと同軸方向にキャリアガスを導入できる箇所が存在し、ドロプレットとキャリアガスを導入する経路はそれぞれ独立に存在している。このキャリアガスは射出されたドロプレットをプラズマ中へ直接導入させる役割を果たしている。ガラスキャピラリー上に設置したピエゾ素子にパルス的な電圧を印加することで、ピエゾ素子が伸縮させて液滴を射出する。ドロプレットのストロボ写真を図 2 に示す。

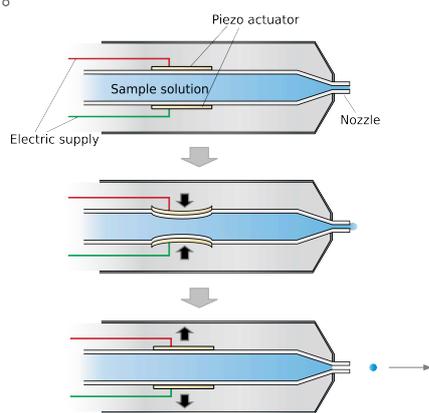


図 1 ドロプレットネブライザの動作原理

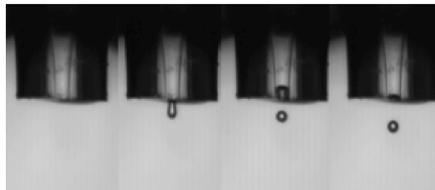


図 2 ドロプレットが射出される様子

この方法により、プラズマへの試料導入効率は DIHEN などの試料直接注入ネブライザと同様の 100%となる。DIHENと異なる点は、プラズマの中心軸上のみ溶液試料を導入することができることである。これにより、溶液試料がプラズマ中に拡散されることなく導入されるため、周囲のプラズマ温度を低下させない特徴を持つ。また、射出されるドロプレットに特定の細胞を内包させてプラズマ中へ導入することで、単一細胞内の微量元素の分析が可能である。

#### (b) ドロプレット用脱溶媒装置

開発したドロプレット試料用脱溶媒装置の構成を図 3 に示す。この装置では、プラズマに対する溶媒負荷の低減を目的として、ドロプレット試料を高温のガス中に導入し、さらに低温ガス中に導入することでドロプレット試料の溶媒の除去を行う。上部のステンレス管の周りにリボンヒーターを配置し、下部のステンレス管の周りに冷却水を流す。冷却液として不凍液を用いることで、 $-20^{\circ}\text{C}$  から  $20^{\circ}\text{C}$  程度までの調節が可能である。ドロプレットネブライザから射出されたドロプレット試料は、加熱部で溶媒が気化蒸発され、冷却部で蒸発した

溶媒が凝結除去される。その後、脱溶媒された試料は脱溶媒装置下部に流すアディショナルガスによってプラズマ中に導入される。

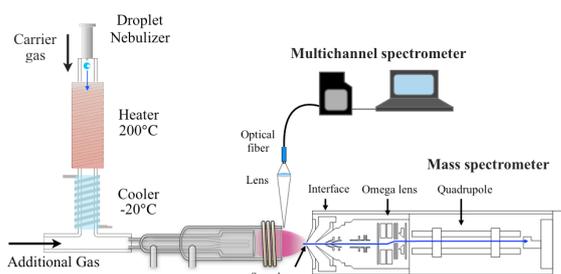


図3 脱溶媒装置を適用した基本的な測定系  
脱溶媒装置を ICP-MS に適用し、脱溶媒の効果の評価を行った。図4に、脱溶媒前、加熱のみ、脱溶媒後の In の質量信号強度を示す。試料溶液には、原子吸光分析用標準溶液インジウム (In: 1001 mg/L in 0.1 mol/L HNO<sub>3</sub>, Kanto Chemical Corp. Ltd., Tokyo, Japan) を超純水 Milli-Q で 0.1 mg/L に希釈調整したものを使用した。加熱、冷却を共に行わない場合、緑線のように、サンプリングコーン位置 5 mm のとき、質量信号強度は最大となったが、その質量信号強度は 600 cps 程度となった。次に、脱溶媒装置の加熱部分のみを使用した場合、赤線に示すように、サンプリングコーン位置 5 mm のとき、質量信号強度は最大となり、信号強度は約 30000 cps であった。さらに冷却部も使用して脱溶媒を行った結果、青線に示すように、サンプリングコーン位置 5 mm のとき、質量信号強度は最大となり、信号強度は 64000 cps 程度となった。以上の結果から、開発した脱溶媒装置の有効性が示された。

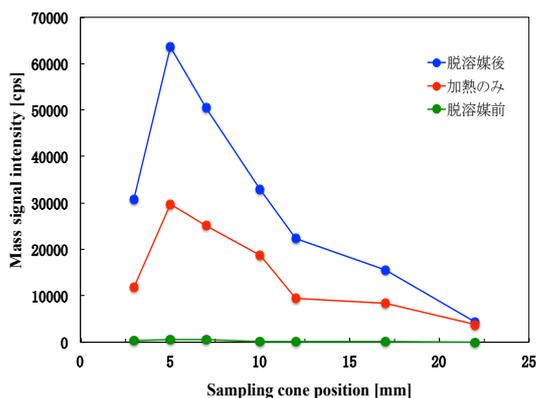


図4 脱溶媒の有無による質量信号強度の変化  
この装置を使用した結果、ナトリウムの溶液試料で、55 ゼプトグラムの検出下限絶対量を達成した。

### (c) ヒト細胞の単一細胞内元素分析

溶液試料の分析が実現できたので、細胞の分析を行った。測定試料として、ヒト子宮頸ガン細胞由来の HeLa 細胞と、ヒト骨肉腫ガン細胞由来の U2OS 細胞を使用した。これは、細胞種による元素含有量の違いを評価するためである。HeLa

細胞と U2OS 細胞を開発した装置に適用し、多元素同時分析が可能なマルチチャンネル分光器を用いて発光分光分析を行った。ドロプレットネブライザは 70 μm のノズルチップを使用し、導入周波数は 100 Hz とした。脱溶媒装置はヒーターの加熱温度を 90°C、冷却温度を -20°C、アディショナルガス流量を 350 mL/min とした。図6と7に、マルチチャンネル分光測定により得られた各ヒト細胞 1 個の発光スペクトルを示す。これより、HeLa 細胞と U2OS 細胞の両方において、細胞 1 個に平均 720pg 含まれるカルシウム (Ca) と 14pg 含まれるマグネシウム (Mg) の発光線を確認した。

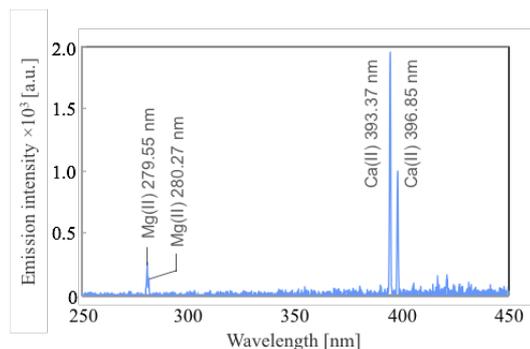


図5 HeLa 細胞 1 個の発光スペクトル

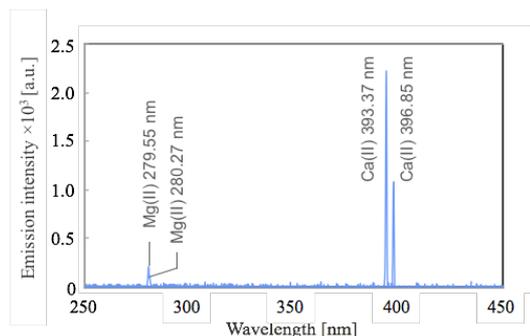


図6 U2OS 細胞 1 個の発光スペクトル

次に、細胞種による違いを評価するため、HeLa 細胞と U2OS 細胞をそれぞれ 20 個用いて、単一細胞分析を行い、微量元素間の相互関係を調査した。実験結果を図7と8に示す。横軸は、カルシウム (Ca) の信号強度 (波長: 393.37 nm)、縦軸はマグネシウム (Mg) の信号強度 (波長: 280.27) を表しており、プロットされている点は単一の細胞における Ca と Mg の信号強度である。これらの結果から、U2OS 細胞における Ca と Mg の信号強度比は 0.91 と高い相関係数を示した。一方、HeLa 細胞では 0.69 と相関係数は低かった。マグネシウムは、カルシウムの代謝と深く関わっていることは明らかになっているが、細胞種の違いによって微量元素の含有量分布に違いが生じていると考えられる。また、各元素の信号強度が大きければいいことが確認できるが、この原因を考察するため、細胞の大きさの分布から、体積偏差求めた。その結果を Table 1 に示す。各細胞における各元素の信号強度の相対標準偏差 (RSD) は、50%程度であったが、細胞体積の RSD はどちらも約 40%であった。したがって、細胞の大きさが信号強度のばらつきに影響を与

えている可能性が示された。

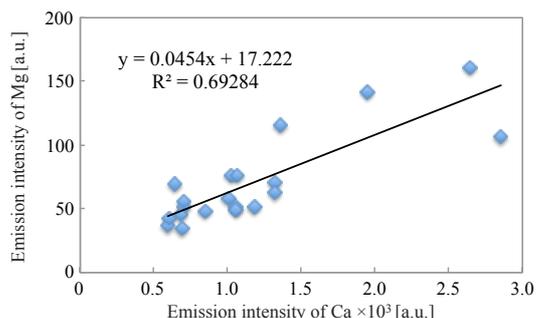


図 7 HeLa 細胞における Ca と Mg の信号強度比

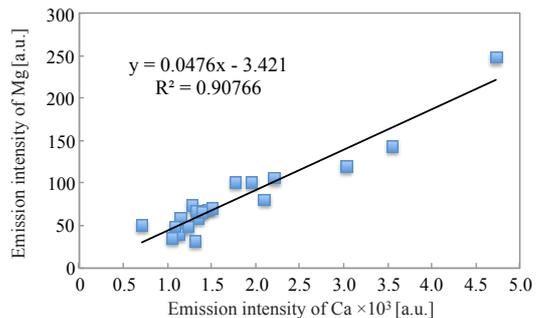


図 8 U2OS 細胞における Ca と Mg の信号強度比

表 1 HeLa と U2OS における Ca と Mg の信号強度と体積偏差

Sample	Elements	Wavelength [nm]	Average of peak height n=20 [a.u.]	RSD of intensity [%]	RSD of volume [%]
HeLa	Ca	393.37	1160	<b>53</b>	<b>39</b>
	Mg	280.27	70	<b>48</b>	
U2OS	Ca	393.37	1770	<b>54</b>	<b>40</b>
	Mg	280.27	81	<b>59</b>	

以上の結果のように、細胞に微量元素の含有濃度のばらつきがある事を始めて実験的に明らかにした。ICP-AES やマルチチャンネル質量分析装置といった多元素同時分析装置では、多数の元素間の相互関係の調査が行える。本研究で開発した装置を用いて、様々な細胞の測定を実施し、これまでは適切な装置がなかったために調べられてこなかった細胞腫や、培養状況の違いによる微量元素含有量の調査を細胞単位で実施する事ができる。例えば、この装置を iPS 細胞の測定に適用し、高効率な分化誘導の実現のためのツールとして活用したいと考えている。

## 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 12 件) (全て査読あり)

1. Ken Kakegawa, Ryoto Harigane, Mari Aida, Hidekazu Miyahara, Shoji Maruo and Akitoshi Okino, Development of High-density Microplasma Emission Source for Micro Total Analysis System, Anal. Sci., 33, pp.505-510 (2017).

2. Do Van Khoai, Hidekazu Miyahara, Tamotsu Yamamoto, Phan Trong Tue, Akitoshi Okino, Yuzuru Takamura, Development of Alternating Current Driven Liquid Electrode Plasma for Sensitive Detection of Metals, Jpn. J. Appl. Phys., 55, 02BC23 (2016).
3. Kaori Shigeta, Yuki Kaburaki, Takahiro Iwai, Hidekazu Miyahara and Akitoshi Okino, Evaluation of the Analytical Performances of Valve-based Droplet Direct Injection System by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, J. Anal. At. Spectrom., 30, 7, pp.1609-1616 (2015).
4. Yukiko Ishihara, Mari Aida, Akito Nomura, Hidekazu Miyahara, Akiko Hokura and Akitoshi Okino, Development of Desolvation System for Single Cell Analysis Using Droplet Injection Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, Analytical Sciences, 31, 8, pp.781-785 (2015).
5. Takahiro Iwai, Ken Kakegawa, Kensuke Okumura, Mieko Kanamori-Kataoka, Hidekazu Miyahara, Yasuo Seto and Akitoshi Okino, Fundamental Properties of a Touchable High-power Pulsed Microplasma Jet and Its Application as a Desorption/Ionization Source for Ambient Mass Spectrometry, J. Mass Spectrom., 49, 6, pp.522-528 (2014).
6. 宮原秀一, 鑄木結貴, 岩井貴弘, 沖野晃俊, ドロプレット試料導入が自励式高周波電源により発生した ICP へ与える影響, 分析化学, 63, 2, pp.109-117 (2014).
7. Hidekazu Miyahara, Takahiro Iwai, Yuki Kaburaki, Tomokazu Kozuma, Kaori Shigeta and Akitoshi Okino, A New Air-Cooled Argon/Helium-Compatible Inductively Coupled Plasma Torch, Anal. Sci., 30, 2, pp.231-236 (2014).
8. 宮原秀一, 鑄木結貴, 岩井貴弘, 沖野晃俊, ドロプレット試料導入法に適した自励式高周波電源による ICP の発生と電源の発振周波数変動の調査, 分析化学, 63, 2, pp.101-107 (2014).
9. Yuki Kaburaki, Akito Nomura, Yukiko Ishihara, Takahiro Iwai, Hidekazu Miyahara, Akitoshi Okino, Development of an Injection gas Heating System for Introduction Large Droplets, Anal. Sci., 29, 12, pp.1147-1152 (2013).
10. Kaori Shigeta, Gunda Köllensperger, Evelyn Rampler, Heike Traub, Lothar Rottmann, Ulrich Panne, Akitoshi Okino and Norbert Jakubowski, Application of a Micro Droplet Generator for an ICP-sector Field Mass Spectrometer - Optimization and Analytical

- Characterization, J. Anal. At. Spectrom., 28, pp.646-656 (2013).
11. Kaori Shigeta, Gunda Köllensperger, Evelyn Rampler, Heike Traub, Lothar Rottmann, Ulrich Panne, Akitoshi Okino and Norbert Jakubowski, Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into ICP-Sector Field Mass Spectrometer for label free detection of trace elements, J. Anal. At. Spectrom., 28, pp.637-645 (2013).
  12. 鍋木結貴, 沖野晃俊, ドロプレット試料導入法を用いた微量試料の発光/質量分析, 分光研究, 62, 1, p.15 (2013).

[学会発表] (計 95 件)

1. Takahiro Iwai, Hidekadzu Miyahara, Mikio Shimada, Yoshihisa Takahiro Iwai, Shunsuke Hosoda, Satoshi Kohno, Mari Aida, Ken Kakegawa, Tomoko Miyake, Hidekadzu Miyahara, Yoshihisa Matsumoto, Koichi Chiba, Akitoshi Okino, High-sensitive Elemental Analysis of Single Human Cell using Droplet Injection ICP-AES/MS, European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2017, p.32 (2017). (Sankt Anton am Arlberg, Austria)
2. Shunsuke Hosoda, Satoshi Kohno, Mari Aida, Ken Kakegawa, Tomoko Miyake, Akitoshi Okino, Single Cell Elemental Analysis of Human Cells Using Droplet Injection ICP-AES/MS, SciX 2016, p.81 (2016). (Minneapolis, USA)
3. Yukiko Ishihara, Mari Aida, Takahiro Iwai, Hidekazu Miyahara, Akitoshi Okino, Single cell elemental analysis of a unicellular algae using droplet injection ICP-TOFMS, 2015 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, NP5-PO04 (2015). (Munster, Germany)

ほか

[図書] (計 11 件)

1. Akitoshi Okino, Hidekazu Miyahara, Takahiro Iwai, Koichi Chiba, Plasma Spectroscopy, the Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons (2016).  
DOI: 10.1002/9780470027318.a9554
2. Takahiro Iwai, Hidekazu Miyahara, Akitoshi Okino (分担), Microplasma Atomic Emission Spectroscopy, Encyclopedia of Plasma Technology, Taylor&Francis, pp.773-779 (2016).
3. Toshihiro Takamatsu, Hidekazu Miyahara, Akitoshi Okino (分担), Gas Plasma Sterilization in Microbiology: Theory,

Applications, Pitfalls and New Perspectives, Caister Academic Press, pp.51-58 (2016).

4. 宮原秀一, 沖野晃俊, 元素の同定・検出 - 元素検出手段の基礎から応用例まで-, 化学と教育, 63, 7, pp.352-357 (2015).
5. 掛川賢, 相田真里, 沖野晃俊, 大気圧プラズマを用いた超高感度化学分析~単一細胞から化学兵器の分析まで~, 電気学会誌, 135, 4, pp.226-229 (2015).
6. 沖野晃俊, 宮原秀一 著(分担), 製品中に含まれる(超)微量成分・不純物の同定・定量ノウハウ, 技術情報協会, pp.90-102 (2014).
7. 沖野晃俊 著(分担), 日本分析化学会編, 分析化学実技シリーズ ICP発光分析, 共立出版, pp.8-32 (2013).
8. 沖野晃俊 著(分担), 技術シーズを活用した研究開発テーマの発掘, 技術情報協会, pp.575-581 (2013).
9. 沖野晃俊, 宮原秀一, 新しい大気圧プラズマ装置の開発, ケミカルエンジニアリング, 58, 12, pp.24-27 (2013).
10. 沖野晃俊, 宮原秀一, プラズマの基礎と大気圧プラズマの新展開, 化学と教育, 60, pp.370-375 (2012).
11. 宮原秀一, 鍋木結貴, 沖野晃俊, 大気圧プラズマを用いた単一細胞分析, Optronics, オプトロニクス社, 366, pp.102-106 (2012).

[その他]

ホームページ等

<http://ap.first.iir.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖野 晃俊 (OKINO, Akitoshi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：60262276

(2) 研究分担者

丸尾 昭二 (MARUO, Shoji)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：00314047

梅村 知也 (UMEMURA, Tomonari)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：10312901

千葉 光一 (CHIBA, Koichi)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：20281066

稲垣 和三 (INAGAKI, Kazumi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・その他部局・研究員

研究者番号：50356490

宮下 振一 (MIYASHITA, Shinichi)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・そ  
の他部局・研究員  
研究者番号：60614766

古田 直紀 (FURUTA, Naoki)  
中央大学・理工学部・教授  
研究者番号：90101055