

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：32629  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2013～2016  
課題番号：25410143  
研究課題名(和文)成分未知組織を構成する分子の同定と分布を同時解析可能な新規イメージング法の開発

研究課題名(英文)Development of new analysis protocols for identification and imaging of molecules in tissues

研究代表者  
青柳 里果 (AOYAGI, SATOKA)  
成蹊大学・理工学部・教授

研究者番号：20339683  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：飛行時間型二次イオン質量分析は、100nm程度以下の高い空間分解能で固体試料の分子イメージングが可能な手法だが、分子およびそのフラグメントから構成されるスペクトルの解釈が難しい場合が多く、多成分系でかつ未知成分が含まれるような系での分析は困難だった。本研究で、多変量解析による未知成分も含めた試料分析と同程度の空間分解能を持つ近接場赤外顕微鏡との併用による定量性の向上を実現した。

研究成果の概要(英文)：Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) is a powerful analysis method because it provides detailed chemical images with high spatial resolution approximately 100 nm. However, it is often difficult to interpret TOF-SIMS data, especially for the analysis of unknown materials in multicomponent samples, due to complex spectrum information. New analysis protocols for identification and imaging of molecules in complex samples using TOF-SIMS and near-field infrared microscopy, which also provides chemical mapping, have been developed.

研究分野：表面科学

キーワード：質量イメージング 表面科学 TOF-SIMS 多変量解析 近接場赤外顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

生体組織の観察には、古くは光学顕微鏡、現在では電子顕微鏡が用いられている。しかし、顕微鏡技術では一般的には分子の分布を知ることはできない。生体組織から化学物質を抽出したり、試料を均一化した状態での分析によって、未知の生体分子の同定は可能であるが、この場合は、特定分子が組織のどこに分布しているのかは分からない。標的分子に蛍光物質などを標識することによって、鮮明なイメージを得ることはすでに可能だが、あらかじめ標識する場合には測定対象の分子があらかじめ判明している必要があり、未知分子の計測はできない。したがって、未処理試料から高感度に化学構造情報と分布情報が得られる手法が求められている。

固体表面の高感度な表面分析法である飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)は、特定の化学物質の分布が 100 nm 程度の空間分解能で得られる優れた手法であり、材料分野から生命科学分野まで幅広く応用されている。特に生体試料の観察では、標識やマトリックスの添加なしに、生体分子や投与した薬剤の分布が見られることが高く評価されている。しかし、TOF-SIMS では、高分子の場合はフラグメント化が避けられないため、データの解析が複雑となり、特に国内の生命科学分野では限られた研究者の間でしか活用されていないという問題がある。特に、生体試料のような多成分系試料では、共存物質由来のピークとの重ね合わせなどによって、単純な解析では標的分子の分布を得るのが容易ではない場合もある。

そこで、位置情報とスペクトル情報の多変量解析による物質決定と他の測定法との併用が望まれる。併用する測定法は TOF-SIMS と同程度の空間分解能を持ち異なる化学情報を与えることが望ましい。本研究では、TOF-SIMS と同程度の空間分解能で赤外吸収の分布測定が可能な近接場赤外分光法(NFIR)を相補的に用いることにより、質量スペクトルと赤外吸収スペクトルから試料の詳細な化学情報が得られると考えられた。TOF-SIMS および NFIR いずれの手法も、多変量解析を分布データに適用することにより、スペクトルの解釈が容易になる。質量だけでは同定できない物質に関して赤外吸収の情報を加えることで同定が可能になることと、逆に赤外吸収だけでは決定できない分子に関して質量スペクトルの情報をあわせることによって分子の決定ができることも期待される。さらに、マトリックス効果のため定量評価が難しい TOF-SIMS に対して、赤外吸収スペクトルの情報を加えることで定量性を高めることが期待できる。

多変量解析の中でも、試料の概要をとらえるには主成分分析(PCA)が有用であり、特定の物質の化学情報を詳細に得るためには混

合成成分のスペクトルから純粋成分のスペクトルを抽出する解析法である多変量スペクトル分離法(MCR)が有用である。MCR は、複雑な成分からなる生体組織のデータを分類分けすることも可能であると期待され、生体組織が比較的単純な物質からなる成分に分類分けできれば、もとの TOF-SIMS データよりもより単純化されたスペクトルから標的分子の同定および分布イメージングが可能となる。したがって、そのまま解析することが難しい複雑な測定データが、多変量解析の応用によって可能になると考えられるが、TOF-SIMS で得られた生体組織データへの多変量解析の応用例はまだ少なく、また NFIR では注目物質に特徴的なピークを見つけるためにもプロトコルの確立が必要であった。

## 2. 研究の目的

飛行時間型二次イオン質量分析法(TOF-SIMS)と近接場赤外分光法(NFIR)を組み合わせて、分子の同定とその体組織における分子の分布イメージングが 1 $\mu$ m 以下の空間分解能で測定可能な手法開発を目指した。TOF-SIMS と NFIR の共に高分解な化学情報を相補的に活用するため、両手法のデータ解析に多変量解析法を応用してその妥当性を検討し、位置情報とスペクトル情報から多成分系における特定の成分の情報を抽出するプロトコルを開発して、詳細な化学分布イメージングできる手法開発を目指した。

## 3. 研究の方法

モデル試料として、植物組織、3種類の高分子4層試料および脂質やペプチドの生体分子からなる試料などを作製した。植物組織は、TOF-SIMS で金属クラスターイオンを用いて測定し、試料表面のクリーニングを目的としたスパッタリング(ガスクラスターイオン)の有無を変えた測定も実施した。高分子試料は TOF-SIMS と近接場赤外顕微鏡(NFIR)で測定し、TOF-SIMS の測定条件としては、金属クラスターイオンを一次イオンに用い、クリーニングの有無を変えた測定も実施した。ペプチド試料は、TOF-SIMS の一次イオン源を Mn, Bi, Bi クラスターおよびガスクラスターで測定した。モデル試料の中で、3種類の高分子4層試料に関しては、NFIR でも測定し、多変量解析の応用によるスペクトル解釈を試みた。

さらに、よりソフトなイオン化方法である分子クラスターを用いたイオン検出(DINeC: Dürr 教授、ギーセン大学、ドイツ)によって、未知物質の分子イオンの正確な検出や、ToF-SIMS 測定によって発生したフラグメントイオンの構造評価が可能かどうか検討した。

## 4. 研究成果

測定した試料のデータのうち植物組織と高分子試料のデータは、主成分分析 (PCA) と多変量スペクトル分解 (MCR) で解析し、解析結果を比較した。超高感度であるために汚染に敏感な TOF-SIMS データの解析では、予測できない汚染状態を把握するのに PCA は有用であることが確認できた。一方、MCR は実在の成分に対応したスペクトルが得られるために解釈しやすいだけでなく、汚染状態の変化に関わらず安定した結果が得られることも確認できた。複雑な試料の解析では、異なる性質の情報を与える二つ以上のデータ解析法を組み合わせることによって、より正確に試料状態が把握できることが示唆された。

例えば、雑誌論文の研究では、ワサビ組織内での辛味成分シニグリンの分布を得るために、あらかじめスペクトルを G-SIMS で解析して、シニグリン由来のフラグメントイオン候補を探し、その二次イオンイメージをとったが、それだけでは分布がはっきりわかるイメージが得にくかったため、PCA および MCR によって、シニグリンを主として含む成分を抽出し、そのイメージから、辛味成分の分布を明らかにした。図 1 左端は、シニグリン由来のフラグメントイオン (174.9 u) の二次イオン像で、中央の図は MCR から示唆されたシニグリン由来の二次イオン群の分布図である。

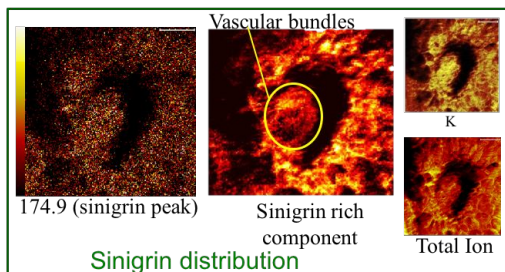


図 1：ワサビ葉柄断面試料におけるシニグリン由来の二次イオン分布像

高分子層試料は、図 2 に示すように 3 種類 (ポリエチレングリコール PET, ポリスチレン PS, ポリカーボネート PC) の高分子が 4 層を形成する試料である。

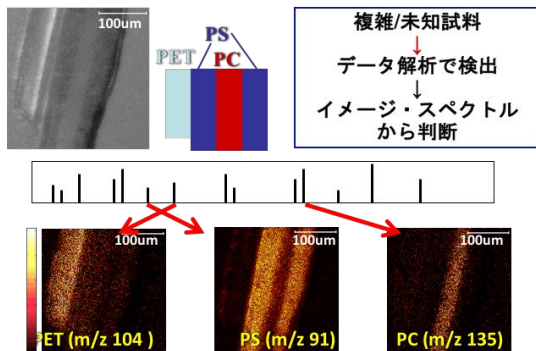
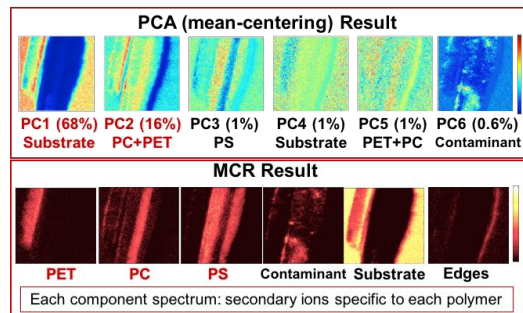


図 2：高分子試料の構造模式図 (上段) と各高分子に由来する TOF-SIMS 二次イオン分布像 (下段)

それぞれに特徴的な二次イオンから分布を得ることはできるが、未知試料として解析し、事前情報無しに、PCA や MCR による同定、分布評価が可能かどうか確認した。

結果として、図 3 に示すように、PCA、MCR ともに各高分子に関する情報 (ここでは示していないがスペクトル情報も分布図に付随して得られる) が得られ、さらに完全に未知な汚染に関する情報も抽出された。

図 3：高分子試料の PCA および MCR 結果



(各成分の分布図)

同一高分子試料を用いて NFIR による測定も行い、NFIR データに関して、多変量解析の応用を検討した。はじめに、データ前処理方法を変えて主成分分析した場合、結果がどのように変化するか検討し、データ前処理方法の有無も含めて主成分分析で評価できる可能性が示された。

よりソフトなイオン化方法である分子クラスターを用いたイオン検出による検討では、未知物質の分子イオンの検出によって同定が容易となる可能性が示唆された。応用例としては、図 4 に示すように、TOF-SIMS によって詳細な分布イメージ (左側) を得て、未知成分の同定に関してはほとんどフラグメント化を起こさない分子クラスターによるイオン検出 (DINeC) で分子イオンを選択的に検出し同定することによって、未知成分の同定および詳細な分布計測が可能となることが示された。分子イオンがわかれば TOF-SIMS スペクトル上のフラグメント化した二次イオンの帰属も容易となる。

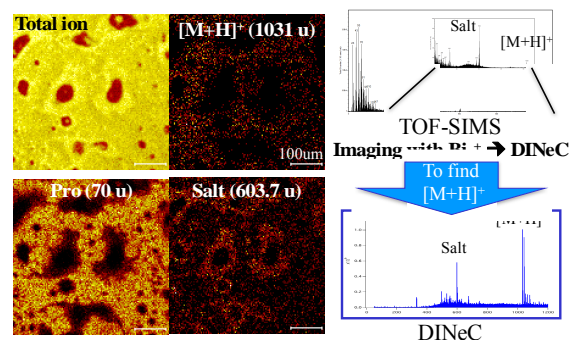


図 4：DINeC と TOF-SIMS の相補利用による分析例 (左図は TOF-SIMS 二次イオン像)

以上の結果から、本研究では、多変量解析

やスペクトル解析法である G-SIMS などを用いることにより、未知試料の分析に関しても、ピーク群を抽出し、同定およびイメージングが可能となることが示唆された。

TOF-SIMS は、100 nm 程度以下の高い空間分解能で固体試料の分子イメージングが可能な手法だが、分子およびそのフラグメントから構成されるスペクトルの解釈が難しい場合が多く、多成分系でかつ未知成分が含まれるような系での分析は困難だった。本研究課題によって、こうした問題点がデータ解析によって改善もしくは解消できることが示された。

また、TOF-SIMS への応用とほぼ同様に、NFIR のデータに対して、多変量解析が応用可能であり、単独のピークでは分布マッピングに十分な強度が得られない場合でも解析対象の成分に関してイメージングできることが示された。したがって、未知成分が含まれる試料の TOF-SIMS データおよび NFIR データへの多変量解析の応用と、さらに DiNeC の利用による分子イオンの選択的イオン化により未知成分同定が可能となる。さらに、分布イメージに関しては、TOF-SIMS と同程度の空間分解能を持つ近接場赤外顕微鏡との併用による定量性の向上を実現した。

結論として、1 μm 以下の空間分解能を持ち、定量評価にも応用可能な化学イメージング手法が実用化できた。

#### 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 6 件)

Takayuki Yamagishi, Kenta Honobe, Satoka Aoyagi\*, Mayumi Okawa, Tomoko Kawashima "Multivariate Analysis Applied to Polymer Imaging Data Obtained by Near-Field Infrared Microscopy", e-Journal of Surface Science and Nanotechnology Vol. 15 (2017) p. 19-24

DOI: org/10.1380/ejsnt.2017.19

Yuta Yokoyama, Satoka Aoyagi, Toshinori Shimanouchi, Miki Iwamura, Hideo Iwai, "ToF-SIMS analysis of amyloid beta aggregation on different lipid membranes", Biointerphases, 11, 02A314 (2016);

DOI: org/10.1116/1.4940706

Satoka Aoyagi\*, Toshinori Shimanouchi, Tomoko Kawashima, Hideo Iwai "ToF-SIMS observation for evaluating the interaction between amyloid beta and lipid membranes", Anal. Bioanal. Chem., 407(10) 2859-63 (2015).

DOI: 10.1007/s00216-015-8527-3.

Yuta Yokoyama, Tomoko Kawashima, Mayumi Ohkawa, Hideo Iwai and Satoka Aoyagi\*, "Extraction of hidden information of ToF-SIMS data using different

multivariate analysis", Surface and Interface Analysis Surface and Interface Analysis, 47(4) 439-446 (2015).

DOI: 10.1002/sia.5731

Yasuko Kajiwara, Hideo Iwai, Keizo Nakagawa, Noriko Kodani, and Satoka Aoyagi\*, "Evaluation of hydroxyapatite nanoparticles synthesized with phosphate surfactant by means of G-SIMS and g-ogram", Surface and Interface Analysis 46, 209-212 (2014) DOI: 10.1002/sia.5398

Satoka Aoyagi\*, Noriko Kodani, Akira Yano, Toshiki Asao, Hideo Iwai and Masahiro Kudo, "ToF-SIMS data analysis for complex plant tissue samples using multivariate analysis and G-SIMS", Surface and Interface Analysis 46, 131-135 (2014)

DOI: 10.1002/sia.5588

##### [学会発表](計 8 件)

青柳里果, 阿部聖, 保延健太, 山嵜崇之, 飛行時間型二次イオン質量分析と近接場赤外顕微鏡による高分子及び生体分子評価、第 36 回表面科学学術講演会、名古屋、2016 年 11 月

Satoka Aoyagi, Kiyoshi Abe, Hideo Iwai, Satoshi Yamaguchi, and Takashi Sunohara, Blood adsorption onto hollow fiber membrane, PSA-16、太田、韓国、2016 年 10 月

青柳里果, 化学イメージング ~飛行時間型二次イオン質量分析(TOF-SIMS)イメージングと近接場赤外顕微鏡~, 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会、新潟、2016 年 9 月

Satoka Aoyagi, Evaluation of biomolecules using Time-of-flight secondary ion mass spectrometry, IVC-20, 釜山、韓国、2016 年 8 月

Satoka Aoyagi, Toshinori Shimanouchi, Evaluation of the interaction between amyloid beta and lipid membranes using TOF-SIMS, SIMS Europe 2014, Munster, September, 2014

Satoka Aoyagi, Tomoko Kawashima, Melissa Passarelli, Rasmus Havelund, Ian S. Gilmore and Masahiro Kudo, A study of peptide fragmentation by Ar cluster ions of varying size and energy, ALC'13, ハワイ、2013 年 12 月

Satoka Aoyagi, Evaluation of nanomaterials using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS), 成都、中国 2013 年 10 月

Satoka Aoyagi, Masahiro Kudo, TOF-SIMS data analysis for complex samples using multivariate analysis and G-SIMS, SIMS 19, 濟州島、韓国、2013 年 9 月

##### [図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.ml.seikei.ac.jp/spectra/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

青柳 里果 (AOYAGI,Satoka)  
成蹊大学工学部・教授  
研究者番号：20339683

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )