

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5月15日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20245017

研究課題名（和文） 微量試料分析用高出力パルスマイクロプラズマ分析装置の開発

研究課題名（英文） Development of High-Power Pulsed Microplasma for Analysis of Small Amount Samples

研究代表者

沖野 晃俊（OKINO AKITOSHI）

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授

研究者番号：60262276

研究成果の概要（和文）：

細胞やナノ粒子などの微量試料内の微量元素の超高感度分析を目的として、高出力パルスマイクロプラズマ分析装置の開発を行った。最大 55 kW の入力電力を達成し、直流動作と比べてヘリウム原子線の発光強度を約 10,000 倍向上させることに成功した。微量試料の分析のため、最少で 14 ピコリットルの液滴をプラズマ中に射出できるドロレットネブライザを開発した。その結果、ナトリウムでは従来の誘導結合プラズマ発光分析法と比べて約 100 万分の 1 以下となる 3.2 ag の検出下限絶対量を実現した。また、誘導結合プラズマにドロレットネブライザを適用し、酵母細胞の単一細胞分析を実現した。

研究成果の概要（英文）：

In recent years, there is growing interest in element analysis for small samples such as bio-cells. In this study, high power pulsed microplasma source and droplet direct injection nebulizer (D-DIN) system were developed. The maximum input power of 55 kW was achieved and about 10,000 times higher emission intensity compared with DC discharge was obtained. D-DIN was applied to microplasma and absolute detection limit of 3.2 ag with sodium was achieved. It was less than 1/1,000,000 compare with conventional ICP-MS. Finally, single cell analysis of yeast cell was achieved using D-DIN-ICP-MS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,300,000	3,990,000	17,290,000
2009年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2010年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2011年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：マイクロプラズマ，微量元素分析，細胞分析，大気圧プラズマ，パルスパワー

1. 研究開始当初の背景

近年、微量元素分析の分野では、大気粉塵などのナノパーティクルや、ガン細胞や iPS 細胞などの、微細な試料の個別分析への要求

が高まっている。しかし、従来の ICP を用いた分析装置は低濃度試料の分析には有効であるもののプラズマの体積が大きいため、毎分 1 mL 程度の大量の試料導入が必要となり、

微量試料の分析には適していなかった。

一方、従来の試料導入法では試料を霧状にしてプラズマ中に導入するため、低濃度試料の分析には適している。しかし、単一細胞中に含まれる微量元素の存在量は ag オーダーのものもあり、非常に少ないことが分かる。ここで重要となるのが、従来の微量元素分析の分野で議論されている濃度 (mg/L ; ppm) ではなく、絶対量 (10^{-15} g; fg ~ 10^{-18} g; ag) の議論である。単一細胞中の微量元素を測定するためには絶対量において ag 以下の検出下限絶対量が望ましいことになる。しかし、Spring-8 を用いてもようやく 50 ag 程度の検出下限を達成できるのが現状である。また、高感度分析に加えて多元素を同時に測定すること及び 1 つ 1 つの特定の細胞を分析するための個別分析が可能な分析手法の開発が急がれる。

2. 研究の目的

こうした要求に応える分析手法実現ためには (1) 高い励起能力を持つ超小型のプラズマ源と (2) 極微量試料の導入法の開発が重要な技術課題であると位置づけ研究を遂行する。具体的には、(1) 全元素中で最も高いイオン化エネルギーを有するヘリウムもプラズマガスとして利用可能な、微量元素分析用の超高出力マイクロプラズマと (2) 試料溶液もしくは細胞 1 つを包含した溶液を 15 pL 程度の単一の液滴に成型し、これをプラズマの中心部へと飛翔入射させるドロレットネブライザを開発する。加えて、(3) これらを組み合わせることで得られる、時間的に短くしかし信号強度が著しく高い過渡的な信号を取得・解析するのに適したデータ収集システムの構築と検証を行い、単一細胞の個別分析を実現する。

3. 研究の方法

(1) 高い励起能力を持つ

超小型プラズマ源の開発

分析用途のプラズマ源には、高い励起能力を持つことのほか優れた放電安定性が要求される。分析用の小型プラズマ源としてこれまで申請者らの研究では高電圧直流電源を利用した電極放電 (マイクロホローカソード放電) を応用して、安定なプラズマを生成していた。これは図 1 に示すとおり、厚さ 300 μm の 2 枚のモリブデン電極板で 900 μm の絶縁用軟質ガラスを挟み、中心部に直径 300 μm の小孔を開けてある。この細孔にプラズマガスを流し、電極間に数 ~ 数十 W の電力を供給することで、プラズマが生成する。

本研究でこのプラズマ源の励起能力を改善、すなわち高温高密度化のために数 W の直流電力でプラズマを維持しつつ、高周波電力もしくはパルス電力を重畳印加することで

アーク放電の発生を防ぎつつプラズマの加熱を強化する検討を行った。直流電源を用いたマイクロホローカソード放電では電極の径方向に電子が振動することにより効率的な加熱がなされる。ここで高周波電力を重畳印加すると、半周期毎に電極の軸方向の電界が反転し、軸方向にも電子が加速されると予想した。また、直流電力にパルス電力を重畳印加することで平均印加電力を抑えつつ瞬間的に大きな電力を印加して、アーク放電の発生を防ぎつつ、瞬間的なプラズマの高温化および高密度化が実現する。

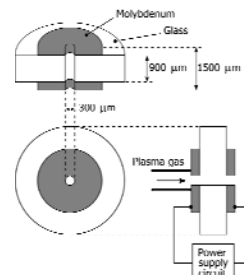


図 1 電極の概要

直流電力と高周波電力を重畳させるに電源は発信周波数 144MHz の高周波電源と直流高電圧電源とを並列接続することで実現した。高周波電力は 50 pF と 100 pF の可変容量コンデンサおよび 10 nH の空芯コイルからなる T 型のマッチング回路を高周波電源と電極の間に配置し、インピーダンスの整合を行い負荷へと供給される。直流電源と高周波電源の間に 20 k Ω の抵抗および 1,000 pF のコンデンサからなるローパスフィルタと 7 nH のチョークコイルを配置し、高周波電力が直流電源側へ流入するのを防止した。

直流電力とパルス電力を重畳させる電源も、同じくパルス電源と直流高電圧電源とを並列に接続することで実現するが、本研究では磁気エネルギー回生スイッチ (Magnetic Energy Recovery Switch; MERS) を用いた誘導蓄積型のパルス電源を開発した。MERS は逆阻止能力を持たない 4 つの半導体素子と 1 つのコンデンサで構成された双方向の電流スイッチであり、自動力率調整や電流の位相制御などが可能である。出力端開放時の最大発生電圧は 3,600 V であり、瞬間最大電流は、繰り返し周波数を 5 kHz とした場合に 170 mA であった。

研究を通じ「直流電力に高周波などを重畳する」システムでは、極端な高出力化が困難であることも明らかとなった。プラズマは始動時に高電圧を必要とするのだが、プラズマ始動に必要な電力を通常の高周波電源などから供給しようとする、プラズマの維持時には過剰な電力が供給されることとなり電極が破壊される。一方、プラズマの維持に必

要な電力を供給しようとする、プラズマの始動に必要な高電圧が供給されずプラズマが生成しない。このため、直流電力で穏やかにプラズマを生成し、そこにパルス電力などを加えることで高出力化を試みたが、常に供給され続けている直流電力により電極の熱履歴が増大することで、パルスなどを 100 W 程度重畳するだけで電極が破壊されることが問題となった。

そこでプラズマ始動のための数 kV の高電圧短パルスと、それに遅れること数ナノ秒後に分析元素の励起、イオン化のための低電圧大電流パルス(150 ~ 550 V, 10 ~ 80 A 程度)を供給できる電源を考案し、最大 55kW の超高出力化に成功した(特許公開 2009-289432)。

(2) 極微量試料の導入法の開発

微量試料の分析を目的として開発したドロプレット試料導入法の概略を図 2 に示す。

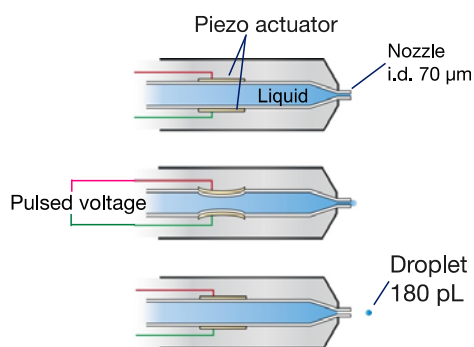


図 2 ドロプレット試料導入法の概略

ドロプレット試料導入法は液体を内包する細管外周に配置したピエゾ素子にパルス的に電圧を加えることによって微小液滴として射出する。ドロプレットの直径は 30 μm ~ 70 μm, 体積は 14 pL ~ 180 pL, 初速は ~2.5 m/s である。ドロプレット試料導入法では、分析試料を噴霧するのではなく、プラズマの中心軸上に一粒ずつ導入することができる。そのため、試料をプラズマ中に効率良く導入ことができ、分析試料を時間的かつ空間的に圧縮してプラズマ中に導入できるため、微量試料の高感度分析ができる。さらに、ドロプレットに細胞を内包して射出することで、特定の単一細胞を狙って分析する個別分析が可能となる(特許第 4560634 号)。

(3) 分析信号の高速信号取得

上記の励起源および試料導入法を組み合わせることで 1 つの元素分析装置として機能させるために、検出器としては検出感度に優れた原子発光分析器および質量分析器を採用した。この際、本実験で採用した質量分析器は 33 kHz のサイクルでイオンを飛翔させて質量分離したイオン信号を取得し、それを多数回積分

して質量スペクトルを得ている。ドロプレット試料導入法では溶液試料を液滴として時間的に圧縮した状態で導入するため、得られる質量信号は過渡的な信号となる。このため、微弱かつパルスの信号を測定する際には不要なノイズを積分してしまうため、S/N 的に不利となる。そこで、イオン信号を高速デジタルオシロスコープを用いて検出器から直接イオン電流を測定し、高い時間分解能で計測を行った。

4. 研究成果

(1) 高い励起能力を持つ

超小型プラズマ源の開発

実験の一例として 7 W の直流電力にパルス電力を重畳印加した際の、He I 501.57 nm (23.09 eV) の発光強度を図 3 に示す。

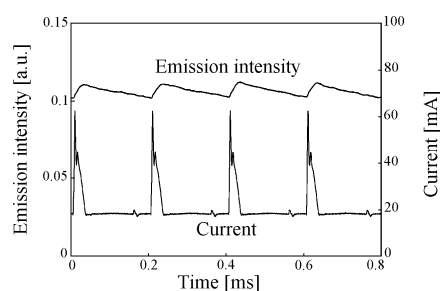


図 3 パルス重畳動作時におけるヘリウム原子線 (He I 501.57 nm) の発光強度の関係

本実験で開発したパルス電源では、パルスの先頭部で電流値が最大となり、30 μs 程度のパルス幅を有している。以上より、この 27 μs 程度の時間でプラズマにエネルギーが注入されていると考えられる。また、He I 501.57 nm の発光強度の変動幅は 10% 程度であった。したがって、パルス電力の印加により、ヘリウム励起原子が一時的に増加していると考えられる。励起温度は直流動作の場合とほぼ変わらず約 2,800 K であった。また、OH 回転温度は 1,380 K 程度であり、変動幅は 40 K 未満 (3% 未満) であった。すなわち、励起温度と回転温度の変動幅は、発光強度の変動幅と比べて小さかった。同様に、高周波を重畳した実験でも劇的な分析性能の向上にはつながらなかった。分析試料としてハロン 1211 の発光分光分析を行った結果を示す。

ハロゲン元素の検出下限値

Power supply	Fluorine	Chlorine	Bromine
DC 10 W	8.9 pg	15 pg	9.1 pg
DC 10 W + RF 30 W	8.1 pg	16 pg	8.8 pg
DC 11 W + pulse 3.5 W	5.7 pg	10 pg	5.0 pg

これを改善するために開発した、一周期に

二つのパルスをもつ超高出力電源をマイクロプラズマ生成に用いた。これにより印加電力を直流動作時の約 8000 倍である 55 kW に増大する事が可能となった。この際の放電電流・電圧波形を図 4 に示す。0 ms 付近の鋭いパルスがイグニッションパルスであり、4 ms 付近に緩やかなピークを持つパルスが主放電パルスである。また、He I 501.57 nm を用いて発光強度を直流動作時と比較した結果、約 10000 倍に上昇した。次に He I 492.19 nm 及び He I 501.56 nm よりボルツマンプロットすることによりプラズマの励起温度を算出したところ、4300 K という値が得られた。これは、直流動作時に約 2500 K であったことから、約 1800 K 程度改善されたことを示しており、励起・イオン化能力が大幅に改善された。

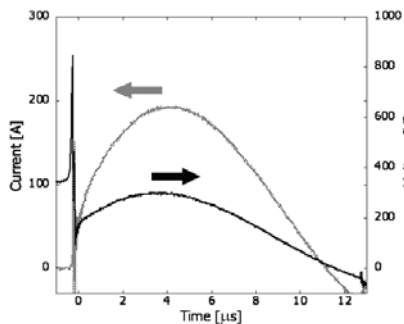


図 4 超高出力パルスマイクロプラズマの放電電流 / 電圧波形

また、従来のマイクロプラズマ源ではプラズマが消滅するために溶液試料の導入は不可能であったが、高出力化を実現した本装置では超音波ネブライザを用いて溶液試料をマイクロプラズマ中に直接導入することが可能となった。

(2) 極微量試料の導入法の開発

開発したドロプレットネブライザを評価するために、微量元素分析の分野で広く使用されている高感度分析が可能な四重極型 ICP 質量分析装置 (HP-4500, Agilent Technologies) に接続した。その結果、検出下限絶対量を計算すると、ナトリウム、マグネシウム、ストロンチウムにおいてそれぞれ 55 zg, 160 zg, 450 zg ($zg = 10^{-21} g$) の検出下限絶対量を得た。前述の通り、単一細胞中の微量元素を測定するためには ag 程度の検出感度が必要だと考えられるが、本実験において ag レベル以下の検出下限絶対量を達成することができた。以上より、今回開発した手法で単一細胞分析の実現を視野に入れる事ができた。

そこで、実際にドロプレット中に酵母細胞を内包し、プラズマに直接導入することで酵母細胞中元素の直接分析を行った。試料には、オリエンタル酵母社製ドライイーストを純

水で懸濁した溶液をドロプレットとして導入した。その結果、図 5 に示すように、5 個の酵母細胞を含んだドロプレット一滴 (180 pL) を導入することで、ナトリウム、マグネシウム、銅、亜鉛、バリウムの信号を取得した。

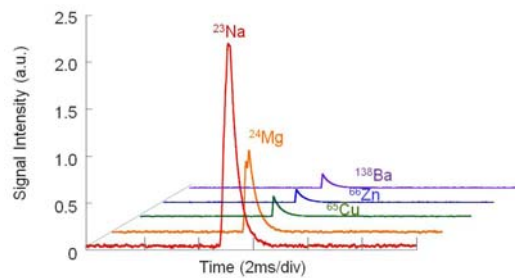


図 5 5 個の酵母細胞の質量スペクトル

(3) 分析信号の高速信号取得

本研究で使用している質量分析器は、1 回のイオン飛行時間が 34 μs であり、イオン信号を直接取得することによって 34 μs ごとに信号を取得することができる。したがって、ドロプレットから得られる信号 1 \cdot 秒間に約 30 回のイオンの飛行が繰り返され、その 1 つ 1 つからスペクトルを取得することができる。その得られたスペクトルを模式的に表すと図 6 (a) のようになる。

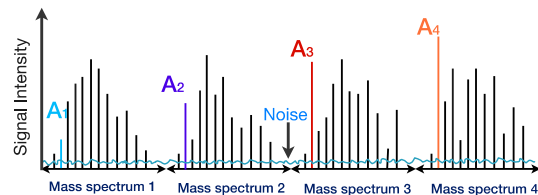


図 6 (a) 高速信号取得の模式図

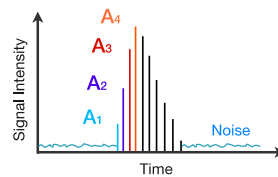


図 6 (b) 高速信号取得によって得られるスペクトル

次に測定したい元素のみのスペクトルを 1 \cdot 秒間分足し合わせることによって (図 6 (b)), ドロプレットから得られる過渡的な信号でもノイズを積分することなく、信号のみを取得することが可能となる。この高速信号取得を用いて実際に信号を取得した。

その結果、ドロプレット試料導入による過渡的な分析信号を有効に検出できることとなり、ナトリウム、マグネシウム、ストロンチウムにおいて 0.14 ag, 0.20 ag, 0.45 ag と検出下限絶対値が大幅に改善された。これ

は、時間分解能の改善に伴って、不要なノイズの積算も低減できるため、結果として S/N 比が向上し、検出下限量が大きく改善されたものである。冒頭で示した通り、単一細胞中の微量元素を測定するためには、絶対量において ag 程度の検出感度が必要だと考えられるが、本実験において ag レベルの検出下限絶対量を達成することができた。以上より、今回開発した装置において単一細胞分析が視野に入ったことから、1 個の酵母細胞を含んだドロレット 1 滴の分析を行ったところ、Cu, Zn の質量信号を得ることに成功し、またこのときの検出下限絶対量は Cu で 0.23 pg, Zn で 0.85 pg であり十分な感度を達成した。またこのときの各元素の天然同位対比との偏差は 1.4~26 % となり、本検証に用いた質量分析器の性能を考慮すると、十分な定量性を実現できたと評価できる。

(4) 超高出力パルスマイクロプラズマとドロレット試料導入法を結合した元素分析装置

最後に、これまでに述べた成果を組み合わせた微小試料分析用マイクロプラズマ微量元素分析装置の試作を行った。超高出力マイクロプラズマの生成と、ドロレットの飛翔はいずれも時間的に過渡的な現象のため、両者のタイミングを同期させる必要がある。特にプラズマの生成が間欠的に繰り返し行われる場合、プラズマが発生し消滅するまでのどのタイミングで分析試料を導入するのが望ましいかは未知であった。そこで燃焼炎観察用高速度カメラを用いてマイクロプラズマの生成過程を高い時間分解能をもって発光分光計測を行った。その結果、プラズマが生成・消滅していく過程を 500 ns という高い時間分解能で、100 画素程度の解像度において空間的分布を観測することに成功した。

こうして求められた、電力、ドロレット体積、タイミングを適条化し、ドロレット 1 滴からの発光分析を行ったところ、ナトリウムでは従来の誘導結合プラズマ発光分析法と比べて 100 万分の 1 以下となる 3.2 ag の検出下限絶対量を実現する事に成功した。

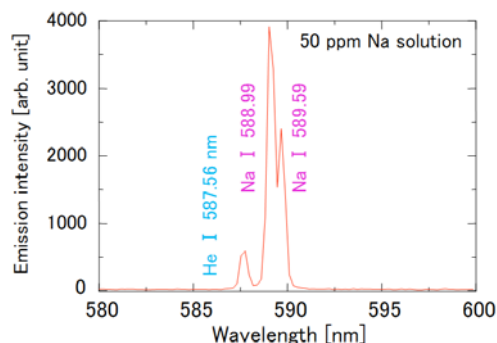


図 6 ドロレット一滴から得られた発光スペクトル

なお、研究期間終了後の実験では、微小なプラズマ源に対する溶媒負荷を低減することで分析感度が上昇することを突き止め、ドロレットがマイクロプラズマに到達する前に溶媒を除去する、加熱型脱溶媒装置の開発を行っている。この装置は、ヒーターで加熱した高温ガス中をドロレット試料を通過させ、溶媒を低減した状態でプラズマ中に導入することができ、ナトリウムでは、発光強度を約 17 倍に増加させる事に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. 岩井貴弘, 鍋木結貴, 沖野晃俊, 大気圧非平衡プラズマを用いた新しい励起・イオン化法, ぶんせき, 査読有, 2011 年 第 11 号, 2011, 662-667.
2. 永田洋一, 宮原秀一, 大場吾郎, 磯部高範, 嶋田隆一, 堀田栄喜, 沖野晃俊, 微量元素分析用高周波/パルス重畳大気圧マイクロプラズマ源の評価, 電気学会論文誌 A, 査読有, 130, 7, 2010, 669-676.
3. 宮原秀一, 重田香織, 中島尚紀, 永田洋一, 沖野晃俊, ナノリットル試料分析のための試料導入法及び励起・イオン化源の開発, 分析化学, 査読有, 59, 5, 2010, 363-378. 【他 4 件】

[学会発表](計 43 件)

1. 根岸祐多, 鈴木雄太, 岩井貴弘, 永田洋一, 宮原秀一, 沖野晃俊, 細胞の個別分析を目的としたマイクロプラズマ発光分析装置の開発, 日本分析化学会第 60 年会, 2011.09.14, 名古屋大学東山キャンパス.
2. Y. Negishi, Y. Nagata, Y. Takahashi, K. Shigeta, H. Miyahara, A. Okino, Development of Droplet-DIN Microplasma AES System for Individual Analysis of Single Cell/ Particle, 6th International Workshop on Microplasmas, 2011.04.05, France.
3. Y. Nagata, Y. Takahashi, Y. Negishi, K. Kodama, H. Miyahara, K. Kitagawa, A. Okino, Investigation of Excitation / Ionization Processes of High-Power Pulsed Microplasma for Aqueous Sample Analysis, The 37th annual Federation of the Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies (FACSS), 2010.10.19, USA.
4. 根岸祐多, 永田洋一, 高橋勇一郎, 重田香織, 宮原秀一, 沖野晃俊, 超微量溶液試料導入マイクロプラズマ発光分析装置の開発, 日本分析化学会第 59 年会, 2010.09.15, 東北大学 川内北キャンパス.

5. H. Miyahara, Y. Nagata, R. Shimada, E. Hotta, A. Okino, SPECTROSCOPIC CHARACTERISTICS OF HIGH POWER PULSE OPERATED MULTI-GAS MICROPLASMA SOURCE FOR ELEMENTAL ANALYSIS, 35th IEEE International Conference on Plasma Science, 2008.06.16, Karlsruhe, Germany. 【他 38 件】

〔図書〕(計 2 件)

1. 沖野晃俊監修, シーエムシー出版, 大気圧プラズマの技術とプロセス開発 2011 268 第 1 編第 7 章さまざまな大気圧プラズマ源: 宮原秀一, 楠木結貴, 沖野晃俊, 56-69 第 11 編第 3 章地球温暖化ガスの分解処理: 楠木結貴, 宮原秀一, 沖野晃俊, 128-136
2. 橘邦英, 寺嶋和夫監修, シーエムシー出版, マイクロ・ナノプラズマ技術の開発と産業応用, 2012, 第 7 章微量元素分析への応用: 沖野晃俊, 宮原秀一, 282-292

〔産業財産権〕

出願状況(計 10 件)

1. 名称 高周波・高速パルス用絶縁機構および絶縁装置ならびに電流導入端子
発明者 沖野晃俊, 宮原秀一
権利者 同上
産業財産権の種類 特許権
番号 特許出願 2011-123911
出願年月日 2011/6/2
国内・国外 国内
2. 名称 プラズマを用いた検出方法および検出装置
発明者 藤田修, 豊浦行雄, 沖野晃俊, 宮原秀一, 永田洋一, 高橋勇一郎
権利者 同上
産業財産権の種類 特許権
番号 特願 2011-001945
出願年月日 2011/1/7
国内・国外 国内
3. 名称 プラズマ発生装置及びプラズマ生成方法
発明者 沖野晃俊, 宮原秀一, 永田洋一
権利者 東京工業大学
産業財産権の種類 特許権
番号 特許公開 2009-289432
出願年月日 2008/5/27
国内・国外 国内 【他 7 件】

取得状況(計 2 件)

1. 名称 プラズマ温度制御装置及びプラズマ温度制御方法
発明者 沖野晃俊, 宮原秀一
権利者 同上
産業財産権の種類 特許権
番号 特許第 4611409 号
取得年月日 2010/10/22

- 国内・国外 国内
2. 名称 液体導入プラズマシステム
発明者 沖野晃俊, 宮原秀一, 大場吾郎
権利者 東京工業大学
産業財産権の種類 特許権
番号 特許第 4560634 号
取得年月日 2010/8/6
国内・国外 国内

〔その他〕

新聞報道:

1. 「大気圧プラズマ装置 温度を精密に制御 医療利用に道」, Fuji Sankei Business i2012.2.22 P.11
2. 「温度制御プラスマイナス 1 度 内 プラズマ装置 氷点下でも使える」, 日刊工業新聞 2011.11.3 P.13 【他 4 件】

その他の活動:

1. 国際水素・燃料電池展 FC EXPO 2012 (東京ビッグサイト) で特別講演講演と研究室ブース出展 (2012.2.29-3.2)
2. 神戸大学医学部で生命医学イノベーション特論特別講義 (2011.9.8)
3. 日本化学会主催「化学だいすきクラブ〜大学研究室への招待」を研究室で開催 (2011.8.4) 【他 12 件】

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖野 晃俊 (OKINO AKITOSHI)
東工大院・総理工・准教授
研究者番号: 60262276

(2) 研究分担者

堀田 栄喜 (HOTTA EIKI)
東工大院・総理工・教授
研究者番号: 70114890

渡邊 正人 (WATANABE MASATO)
東工大院・総理工・助教
研究者番号: 20251663

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