

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26600059

研究課題名(和文) オンチップ質量分析器の開発

研究課題名(英文) Development of on-chip mass spectroscopy

研究代表者

高村 禪 (Takamura, Yuzuru)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：20290877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析のチップ化を試みた。特に、チップ化に適したイオン源として、熱パルスイオン源を開発した。これは、チップ上に作成した微小ヒータ上に、イオン化したいサンプルを薄く塗布し、パルス電流で加熱するだけでイオン化脱離を可能とするものである。マトリックスを必ずしも必要とせず、無機元素から高分子まで、タンパク質、炭水化物や糖も、ソフトに非常に高い効率でイオン化できる、従来にない性質を持つイオン源であることを示せた。

研究成果の概要(英文)：This research tried to miniaturize mass spectroscopy on a chip. Especially, pulse heating ionization and dissociation method (PHDI) was developed. In this method, samples were ionized and dissociated by a heat pulse generated by micro heater on chip. PHDI was found to be a novel ionization method with extremely excellent properties that PHDI not always requires matrix assist for ionization and can ionize wide range of materials from inorganic to macromolecule, including proteins, hydrocarbons and sugars, with very high efficiency and qualities of soft-ionization.

研究分野：分析化学、マイクロ流体デバイス

キーワード：質量分析 タンパク質のイオン化 MALDI 熱パルスイオン化 マトリックスフリー 糖のイオン化 イオン化メカニズム マイクロ流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

質量分析法(MS)の発展により血液や唾液中に含まれる微量バイオマーカーに関する医学的知見が集積されつつある。これにより、癌や脳梗塞等重篤な疾病の予防や治療が期待されている。このように MS で発見された fg/mL 濃度帯の低濃度バイオマーカーの臨床検査需要は今後ますます高まってくると考えられるが、これらを臨床的に検査する方法は、まだ確立されていない。現在の MS は大型・高価で、かつ定量測定にはかなりのノウハウとスキルが必要であり、臨床検査に向いている状況ではない。

一方、MSを除く従来の高感度分析法の多くは、pg/mL 濃度帯までしか測定できない。これを超える測定法が幾つかレポートされているが、標準サンプルなど純粋な系での値であり、夾雑物が存在する実生体サンプルになると pg/mL 帯の性能に劣化するものがほとんどである。fg/ml 帯において実用されている分析法は現在 MS のみである。MS はイオン源、イオン光学系を含む大型高真空チャンバーが必要なため高価であり、fg/ml 帯の極低濃度、微量なバイオマーカー計測の臨床応用には、より現実的な価格の分析法を実現する必要がある。

2. 研究の目的

血液中のタンパクの種類は十万を超える。それら大量多種の分子に埋没している極微量な生体マーカーを臨床的に分析するために、原理的に高感度・高解像度な質量分析法を、チップ上に実現することを目的とする。

真空機器のチップ化は概して困難で、技術的に非常に挑戦的なテーマであるが、質量分析では微細化により要求されるイオンの飛距離が短くなり、数 Pa 程の低真空でも質量分析できる可能性があることに着目した。これにより超高真空ポンプは不要となり、質量分析の全要素をチップ上に集積化できる可能性がある。またチップ化することで、微量サンプルのハンドリングが容易になり、ごく微量サンプルの分析、例えば培養中の1細胞分泌物のモニター等にも応用でき、生命科学の様々な局面に貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

次の各項目について研究を行った。

(1) イオン源開発

これまでに申請者はチップ化 MS に向けたイオン源として、熱パルスを利用した微小イオン源を作製し、チップ上でたんぱく質のイオン化を実現しているものの、再現性に乏しく、定量的評価ができる状態ではなかった。よってどのような条件がイオン化に向いているかもわからず、イオン化機構も不明である。そこで本研究項目では、次に示す小項目に研究を分け、まずイオン化の

再現性向上に注力し、定量性を確保したのち、各種依存性をしらべ、効率的イオン化には何が良いかを明らかにし、それらの知見から、イオン化のメカニズムを考察することとした。

熱パルスイオン化の再現性の向上

熱パルス脱離イオン化源を用いた質量分析器の再現性に影響する要因を調べ、必要な装置的改良を行った。用いた熱パルスイオン化チップを図.1に、飛行時間型(Time of Flight: TOF)質量フィルターを含む全体の実験装置を図2に示す。

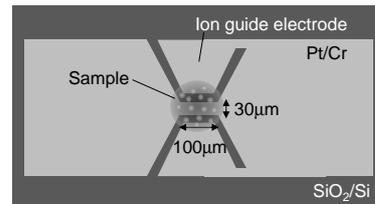


図1. 熱パルスイオン化チップの構造

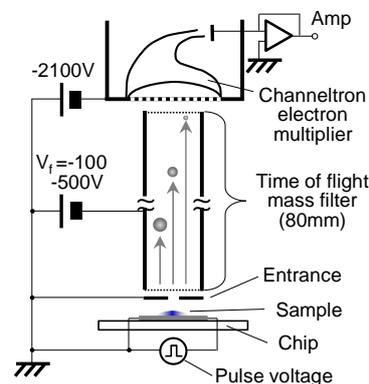


図2. 実験装置図

熱パルスイオン化の高効率化

再現性を確保したのち、様々な実験パラメータのイオン化率に及ぼす効果を定量的にしらべ、熱パルスイオン化の素性を明らかにするとともに、イオン化効率の最大化を試みる。特にマトリックスの種類と量、印加する熱エネルギーの強度、サンプルの塗布方法等に関して系統的に研究を進める。

熱パルスイオン化のイオン化機構の解明

一般的なイオン化法の MALDI は光と熱が複合した反応から成り、マトリックスの選択的な光イオン化に引き続いて試料のイオン化が起こるとされている。レーザーを用いず物理衝撃のみでイオン化を行った研究もあるが、一価イオンの生成には高温ガスが不可欠であった。一方、本法の新規性は熱パルス印加のみでも試料の一価イオンが生じることであり、そのメカニズムは、従来の MALDI 等のイオン化メカニズムの研究者にとっても非常に興味深いものと思われる。本研究項目では、様々なマトリックス、マトリックスの有無、たんぱくだけでなく無機塩や金属等様々なサンプルの熱パルスイオン源によるイオン化を試み、さらに正イオンだけでなく、負イオンの生成状況も調査し、そのメカニズムに関する知見を

得る。

(2) 熱パルスイオン化質量分析のチップ化

チップ化に適したイオン検出系の開発

熱パルスイオン源のチップ化に適したイオン検出系を開発する。

チップ化 MS の開発

イオン源からのイオンを変更し、加速し、TOF部を飛行させて、検出部まで導入するイオン工学系を設計し、真空ポンプとイオン検出器を除く全てのエレメントをチップ上に集積したチップ化 MS を作成する。

4. 研究成果

(1) イオン源開発

熱パルスイオン化の再現性の向上

実験と数値シミュレーションによる解析により、MS フィルターとイオン源の相対位置が再現性に大きく影響することが分かった。そこでイオン源を精密に再現良くアライメントできるチップホルダーとステージを新規開発し、再現性が向上した。パルス電源波形の改良も再現性向上に寄与した。また、たんぱく質やマトリックスをイオン源に塗布する際の均一性と膜厚が致命的に再現性に影響することが分かった。酸素プラズマを用いたサンプルの塗布面の改質により、サンプルを 20 という薄さで均一に塗布することを可能とし、脱離イオン化の効率と再現性を大幅に改善し、またこれが本質的に重要であることを明らかにした。

熱パルスイオン化の高効率化

による再現性確保後、様々なパラメータ依存性を調べた結果、第 1 に、試料とマトリックスの、微小ヒータ面への塗布の仕方が、重要であり、特に、まずマトリックのみを塗布し、そのあと、試料とマトリックスを混合したものを塗布する、2 層構造を用い、さらに全体の厚みを 1 μ 程度に抑えることで、飛躍的に良い結果が得られることが分った。特に、2,5-ジヒドロキシアセトフェンを用い、牛血清アルブミンを分析したところ、多価イオンや、フラグメントイオンが非常に少なく、1 価のイオンが多い、良質のマスペクトルが得られることが分った。従来の MALDI (ruker 社の ultrafleXtreme を使用) と、同じ試料を用いて比較したところ、熱パルスイオン化の方が試料をよりソフトに、かつ効率的にイオン化できていることが示唆された。従来の MALDI 法を遥かに凌駕するデータが得られたことは、全く予期していなかった進展であり、特筆すべきことである。

また、酸素プラズマを用いたサンプルの塗布面の改質により、サンプルを 20nm という薄さで均一に塗布した場合では、再現性とイオン化率がさらに良くなった。これは、質量分析器のチップ化の目的を超えて、従来の質量分析器の性能を大きく改善する可能性も持った成果である。

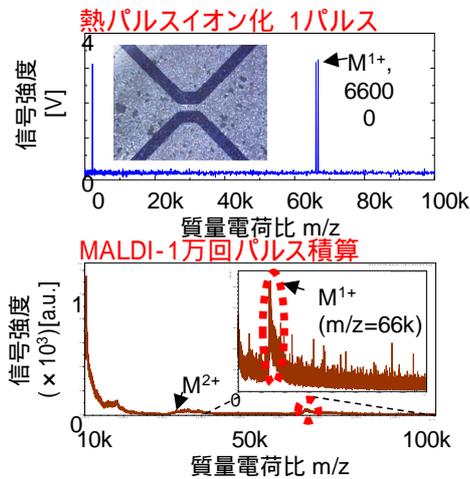
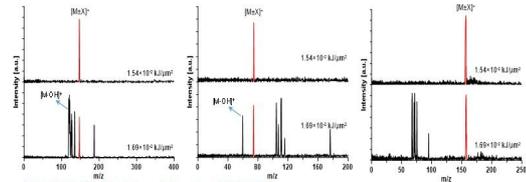


図3 熱パルスと MALDI の比較

熱パルスイオン化のイオン化機構の解明

従来の MALDI で使われているマトリックに限らず、様々なマトリックスが利用でき、さらにマトリックス無しでもイオン化が可能なが分かった。これにより、熱パルスイオン化メカニズムにおいて、マトリックスのアシストは本質ではないことが明確になった。NaCl のような無機塩も効率良くイオン化でき、Na と Cl はそれぞれ、正と負のイオンにイオン化していることが分かった。これにより、本イオン化メカニズムは、単原子から高分子まで、広い範囲の分子をソフトにイオン化できることが分かった。マトリックスが不要なことから、低分子の質量スペクトルをマトリックスの干渉無しに得ることができ、また、従来の MALDI が苦手とする極性のない分子、炭水化物や糖などもイオン化可能なことが分かった (図 4)。

アミノ酸の分析 (上熱パルスイオン化、下MALDI)



糖の分析 (上熱パルスイオン化、下MALDI)

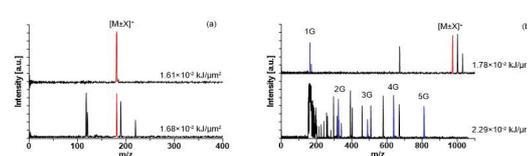


図4 アミノ酸と糖の熱パルスイオン化

(2) 熱パルスイオン化質量分析のチップ化

チップ化に適したイオン検出系の開発

単に 2 次電子増幅機構をチップ化するだけの研究は、他のグループでも研究例が報告されてきており、新規性と重要性があまり高くない。そこで、我々のグループでは、熱パルスイオン源を用いたイオンの検出に特化した、イオン検出系の開発を行うこととした。ここまでの研究で、熱パルスイオン源を用いた質量分析では、他の

MSと異なる要求があることが分かってきた。その対策として検出系の設計や一部試作を行ったが、まとまった成果は得られていないので、ここでは詳細を省く。

チップ化 MS の開発

イオンの通り道を構成する上下の平面内にパターンニングされた2次元の電極のみで、イオン源からイオンを90度偏向し、約40%のイオンを5mm自由飛行させることが可能なイオン光学系を開発した。これにより、チップ上のイオン源とマスフィルタを用いてタンパクの質量スペクトルを成功した。

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. Luo, Xi; Phan-Trong Tue; Sugiyama, Kiyotaka; Takamura, Yuzuru. High yield matrix-free ionization of biomolecules by pulse-heating ion source, Sci. Rep. 査読有, 2017: 7, 15170.
2. Kiyotaka Sugiyama, Hiroki Harako, Yoshiaki Ukita, Tatsuya Shimoda and Yuzuru Takamura, Pulse-heating ionization for protein on-chip mass spectrometry. Analytical Chemistry, 査読有, 86, 15, 7593-7597, 05 August 2014. DOI : 10.1021/ac501407c.

(学会発表) (計16件)

1. Xi Luo, Phan Trong Tue, and Yuzuru Takamura, Matrix-free biomolecule analysis by a miniaturized on-chip pulse-heating ionization mass spectrometer, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), 2017.10.22-26, Savannah, Georgia (USA).
2. 羅希, Tue Trong Phan, 高村禪, オンチップ熱パルスイオン化質量分析法による糖質のイオン化, 第78回応用物理学会秋季学術講演会, 2017.9.5-8, 福岡国際会議場, 国際センター・福岡サンパレス福岡県福岡市.
3. 羅希, Tue Trong Phan, 高村禪, オンチップ熱パルスイオン源イオン化のメカニズム, 第65回質量分析総合討論会2017, 2017.5.17-19, つくば国際会議場茨城県つくば市.
4. Xi Luo, Phan Trong Tue, Yuzuru Takamura, Matrix-free protein ionization by pulse-heating ion source, 第64回応用物理学会春季学術講演会, 2017.3.14-17, パシ

フィコ横浜(神奈川県横浜市).

5. Xi Luo, Trong Tue Phan, Kiyotaka Sugiyama, Yuzuru Takamura, Chip holder for on-chip ion source mass spectrometry, Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology 2016 (APCOT2016), 2016.9.26-29, Kanazawa Bunka Hall (Ishikawa JAPAN).
6. Xi Luo, Trong Tue Phan, Yuzuru Takamura, Pulse-heating ionization for inorganic material, 第77回応用物理学会秋季学術講演会, 2016.9.13-16, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市).
7. 羅希, Phan Trong Tue, 高村禪, 熱パルスイオン化による質量分析装置の開発, 第10回バイオ関連化学シンポジウム-第31回生体機能関連化学シンポジウム, 第19回バイオテクノロジー部会シンポジウム, 2016.9.7-9, 石川県立音楽堂 もてなしドーム地下イベント広場(石川県金沢市).
8. 高村禪, アクチュエータを集積化した微小流体デバイスのバイオ応用, 電気化学会化学センサ研究会(招待講演), 2016.8.26, ホテルグランテラス富山(富山県富山市).
9. Xi Luo, Phan Trong Tue, and Yuzuru Takamura, Negative ion behavior in pulse-heating ion source mass spectrometry, 21st International Mass Spectrometry Conference, 2016.8.20-26, Toronto (CANADA).
10. 高村禪, アクチュエータを組み込んだ微小流体デバイスによる生体材料の高感度分析, バイオチップコンソーシアム JMAC 第76回ワーキンググループ会議特別講演, 2015.3.30, 東京ウィメンズプラザ(東京都渋谷区).
11. 杉山清隆, 高村禪, オンチップ質量分析に向けた熱パルスイオン化法と試料膜形成法, 第62回応用物理学会春季学術講演会, 2015.3.11-14, 東海大学(神奈川県平塚市).
12. Yuzuru Takamura, Biomedical Application of Microfluidic Devices, The 1st Malaysia-Japan Joint Symposium on Nanotechnology 2014, University Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur Malaysia, 2014.12.9-10 (Invited).
13. Kiyotaka Sugiyama, Hiroki Harako, Yoshiaki Ukita, Yuzuru Takamura,

Development of miniaturized ionization source for protein mass spectrometry on a chip The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), 2014.10.26-30, San Antonio, USA.

14. 杉山清隆、高村禪、オンチップ質量分析に向けた熱パルスイオン源とマトリックスの効果、第75回応用物理学会秋季学術講演会、2014.9.17-20、北海道大学(北海道札幌市).
15. 杉山清隆、高村禪、生体試料の高感度分析を目指した質量分析チップの開発に向けた微小イオン源、第8回バイオ関連化学シンポジウム、2014.9.11-13、岡山大学(岡山県岡山市).
16. 高村禪、MBG的使用が可能な医療用高感度イムノアッセイチップの開発、JIEP 最先端実装技術シンポジウム(招待講演)、2014.6.4-6、東京ビックサイト(東京都江東区).

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

1. 名称:瞬間加熱によるイオン化装置、質量分析、質量分析システム及びイオン化方法
発明者:杉山清隆、高村禪
権利者:国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学
種類:特許
番号:特願 2015-039745 (P2015-039745)
出願年月日:平成 27 年 3 月 2 日
(2015.3.2)
国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/takamura/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高村禪 (TAKAMURA YUZURU)
北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授
研究者番号: 20290877

(2)研究分担者

浮田芳昭(UKITA YOSHIAKI)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 40578100