

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26810081

研究課題名(和文)細胞選択的な微量元素分析のためのマイクロ流体デバイス/ICP質量分析装置の開発

研究課題名(英文)Development of microfluidic device/inductively coupled plasma spectrometer for determination of trace elements in selected cells

研究代表者

重田 香織(杉山香織)(Kaori, Shigeta)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・研究員

研究者番号：20639744

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)：生体中の微量元素の役割の解明するため、細胞レベルで高感度かつ多元素の分析が可能な計測技術の開発が求められている。本研究では、マイクロ流体力学に基づく細胞ハンドリング技術を確立し、微小液滴に内包した単一細胞を誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)に導入する技術の開発を行った。作成した単一細胞導入チップにHeLa細胞を導入し、顕微観察システムを用いて細胞の挙動の観察を行った。また、細胞から得られる過渡的な信号を検出するため、高時間分解能ICP-MSの開発を行った。開発した装置を用い、銀ナノ粒子懸濁液をプラズマへ導入し、10nmスケールの銀ナノ粒子から得られる過渡的な信号の検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Development of multi elements analysis system for single cells is required to reveal the functions of trace metal elements in biological cells. In this study, a system of cell-handling technology based on microfluid mechanics were establish, and sample introduction was developed to inject the droplets containing a single cell into inductively plasma mass spectrometer (ICP-MS). The microfluid device for transport of cells was designed, and behavior of HeLa cells transported through a flow channel was observed by a microscope. The time-resolved ICP-MS with shortest time resolution of 10 μ s was developed to measure the transient signals generated by injection of a single cell. Detection of the transient signals from 10 nm scale - silver nano particle was achieved.

研究分野：分析化学

キーワード：単一細胞分析 元素分析 質量分析 誘導結合プラズマ質量分析計 ドロプレット試料導入 インクジェット マイクロ流体デバイス メタロミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 単一細胞中の微量元素分析の現状

長い間、生命科学の研究領域として、ゲノミクスやプロテオミクスが注目されてきたが、ゲノムの合成には亜鉛タンパク質が関与するなど、その他の生体物質の合成、代謝、機能発現にも、多くの場合金属酵素が関与している。このような、生体中に存在する微量元素に関連する研究分野を統合するため、原口らによってメタロミクス (metallomics) という学問領域が提唱された[1]。その際に発表された、主要な 10 の研究課題の中、第一に挙げられたのが「生物細胞 1 個の全元素分析」であり、細胞レベルで高感度かつ多元素の分析が可能な計測技術の開発が求められている。

現在、微量元素分析においては、放射光を利用する方法などがあるが、汎用性、高感度、多元素測定能などを考慮すれば、誘導結合プラズマ (Inductively Coupled Plasma, ICP) をイオン源として用いた ICP 質量分析法 (ICP mass spectrometry, ICP-MS) が、最も有望な方法と期待されている。しかし、従来法では、試料溶液をネブライザで噴霧し、プラズマの安定性を乱す大きな液滴をスプレーチャンバで除いた後、微細な液滴 (1pL 以下) のみを導入していたため、導入効率は 1% 程度と少なく、多量の試料 (1mL/min) を必要とした。さらに、多数の細胞を破砕し、均一化した溶液を用いるため、個々の細胞の濃度情報が失われ、多数の細胞の平均値しか得られなかった (図 1)。そのため、ICP 質量分析法は単一細胞中の微量元素の分析にはほとんど利用されていなかった。

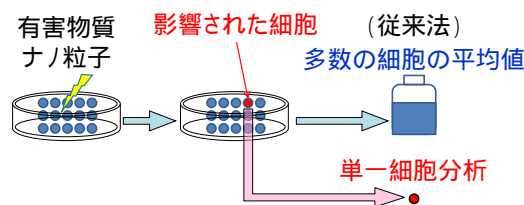


図 1 単一細胞分析と従来法の比較

(2) ドロプレット試料導入法

著者らは、溶液試料を従来のように噴霧するのではなく、インクジェット技術を応用し、微小液滴を 1 滴ずつ ICP 質量分析計のプラズマに導入するドロプレット試料導入法を開発した。この微小液滴に細胞を内包させプラズマ中に噴出することで、単一細胞分析を可能とした【2】。また、細胞を導入する場合、ノズル直径が制限されるため小さな液滴を生成するのは難しいが、新方式のトリプルパルスモードを考案・最適化することで、160 pL から 7 pL へと最小化することに成功した。

(3) ドロプレット輸送/脱溶媒システム

ドロプレット試料導入法を ICP 質量分析法に適用する際に、直径 1 cm 程度の円柱状の

プラズマの中心に液滴試料を正確に導入する必要がある。また、従来の噴霧による試料導入法と比べ、大きな液滴をプラズマに導入するため、プラズマが不安定になったり、イオン化効率が下がる問題があった。そこで、著者らは、ドロプレット輸送/脱溶媒システムを開発し、液滴の輸送効率 100% を達成した。さらに、脱溶媒により、液滴を 1 pL 以下まで小さくし、9 種類の元素について、従来装置の約 1/1000 となる 1.1 ag (10^{-18} g) (Mg) ~ 120 ag (Fe) の絶対検出下限値を実現した[2]。

(3) ドロプレット試料導入のための高速スキャンモード

ドロプレット試料導入による信号は、極短パルスとなるため、従来法のように 100 ms 毎の信号積分ではノイズに埋もれ検出できない。そこで、申請者らは、ドロプレット試料導入のための高速スキャンモードを考案して、時間分解能を 0.1 ms まで改善し、極短パルス状の信号 (半値幅 0.5 ms) を検出することに成功した[3]。

(4) 細胞分布の予備調査

人工的にセレンを濃縮させたセレン酵母をモデル細胞として使用し、細胞の単一細胞分析の予備調査を行った。微小液滴に細胞を内包させプラズマ中に導入することで、酵母細胞 1 個 (体積 0.065 pL) から Cu, Zn, Se の信号を取得し、ICP 質量分析法において、世界で初めて単一細胞中の微量元素分析に成功した (図 2)。

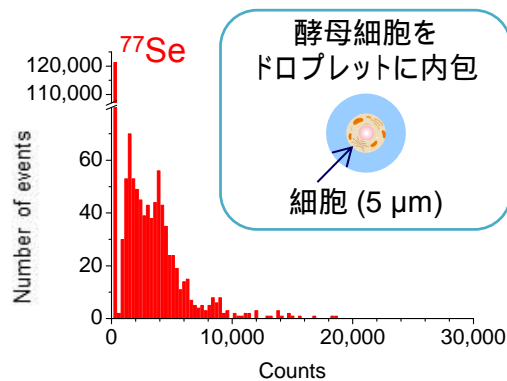


図 2 単一酵母細胞によるセレンのヒストグラム

課題 1: 細胞導入効率の改善

これまでの研究では、微小液滴に一細胞を内包させるため、試料を希釈することにより微小液滴 100 個あたり 1~5 個の細胞が含まれるように細胞懸濁液を調製していたが、細胞を包含しない空のドロプレットが多く、測定効率が良くなかった。また、時間の経過とともに細胞が沈殿、凝集するといった問題が生じた。

課題 2: 細胞形態観測の必要性

金属摂取による影響は、癌化の例にみられるように細胞形態にも現れるため、濃度と細胞形態の両方を観測できるシステムは、メタロミクス研究において極めて重要なツールとなる。しかし、現在の試料導入法は懸濁液に分散する細胞をランダムに吸い上げてインクジェットから射出する方式であり、細胞形態の情報が得られない。

2. 研究の目的

ヒ素やカドミウムなどの微量金属元素による細胞の癌化メカニズム、あるいは細胞の発生・分化における必須微量元素の役割など、生体における微量金属元素の役割の解明を目指すメタロミクス研究は、iPS細胞の開発により、単一細胞レベルでの研究を可能とする新たなステージに入っている。しかし、単一細胞を対象とした有効な微量元素分析法はこれまで開発されていなかった。

著者は、これまでに従来法と全く発想の異なるドロプレット試料導入法を開発し、ICP質量分析法において、世界で初めて単一細胞中微量元素分析に成功した。本研究では、細胞のハンドリング技術をさらに発展させ、細胞選択的な微量元素分析を実現することを目的とする。

3. 研究の方法

単一細胞中のppbオーダー（絶対量ではag）の微量元素分析の実現を目標として、マイクロ流体デバイスによる細胞ハンドリング・顕微観察システム、およびドロプレット輸送/脱溶媒システム等の要素技術を開発する。細胞ハンドリング・顕微観察システムでは、平野（研究協力者）らが作成したマイクロ流体デバイスのフローサイトメトリー技術を応用して、単一細胞レベルでのハンドリングを可能なシステムに改良する。そして、それら全ての技術を統合して「マイクロ流体デバイス/ICP質量分析装置」を構築する。開発した装置の基本性能の評価後、酵母細胞の各細胞周期時期において元素分布の解析や、ヒトiPS細胞を用い、心筋、肝臓、皮膚等に分化する過程の各細胞の微量元素濃度を測定する。

4. 研究成果

(1)細胞ハンドリング技術の開発

マイクロ流体デバイスを用いることにより、単一細胞を分離、移動、静止可能な細胞ハンドリング技術の開発を行った。すでに開発した電気泳動現象を利用する微生物分離チップにおいて、フローサイトメトリー技術を応用して流路形状の最適化を行い、単一細胞レベルでのハンドリングを可能なシステムに改良を行った。開発したマイクロ流体デバイスにおいて、実際にHeLa細胞を導入し、顕微観察システムを用いて細胞の挙動を観察した。

(2) 第二世代 高速スキャンシステムの開発

特許申請のため、再提出予定。

(3)開発装置のナノ粒子への適用

細胞から得られる過渡的な信号を検出するため、銀ナノ粒子懸濁液をネブライザによって噴霧し、誘導結合プラズマへ直接導入し、銀ナノ粒子から得られる過渡的な信号の検出を行った。このとき、開発した高時間分解能の質量分析計を用い、検出器から取得したパルスを任意の時間で積分することで、10nmスケール銀ナノ粒子の検出に成功した(図3)。さらに、ナノ粒子懸濁液中の粒子サイズ、そのサイズ分布を求めるため、得られた信号強度からヒストグラムを作成する解析ソフトウェアの開発を行った。

10nmスケール銀ナノ粒子

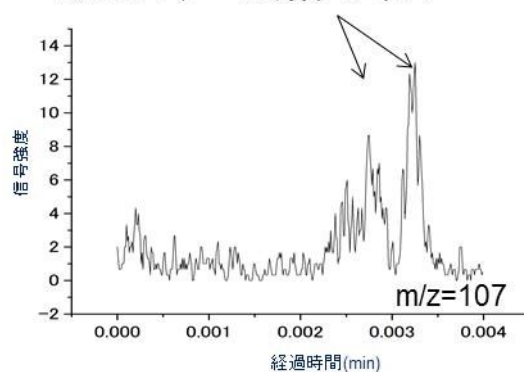


図3 時間分解能 10 μ s による10nmスケールの銀ナノ粒子の測定

<引用文献>

【1】 H. Haraguchi, J. Anal. At. Spectrom., 2004, 19, 5-14. [2] K. Shigeta et. al., J. Anal. At. Spectrom., 2013, 28, 646-656.

【2】 K. Shigeta et. al., J. Anal. At. Spectrom., 2013, 28, 646-656.

【3】 K. Shigeta et. al., J. Anal. At. Spectrom., 2013, 28, 637-645.

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 1件)

Kaori Shigeta, Yuki Kaburaki, Takahiro Iwai, Hidekazu Miyahara and Akiyoshi Okino, Evaluation of the analytical performances of a valve-based droplet direct injection system by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 査読有, 30, 2015, 100-125.

DOI: 10.1039/C3JA50382H, Paper

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重田 香織 (SHIGETA, Kaori)

産業技術総合研究所・環境管理研究部門・
研究員

研究者番号：20639744

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

中里哲也 (NAKAZATO, Tetsuya)

田尾博明 (TAO, Hiroaki)

平野 研 (HIRANO, Ken)