

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：超高分解能高速イメージング質量分析技術(質量顕微鏡)の構築
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

内藤 康秀(光産業創成大学院大学光産業創成研究科 准教授)

主たる共同研究者

栗津 邦男(大阪大学大学院工学研究科 教授)

豊田 岐聡(大阪大学大学院理学研究科 准教授)

3. 研究実施概要

3-1. 研究実施および成果の概要

生体試料中の色々な分子の分布を知ろうとする要求が、近年、医学、薬学方面で高まっている。面内の物質分布を質量分別し可視化する方法はスキャン型と投影型の 2 つの方法がある。スキャン型では、収束レーザー光をある 1 点に照射し、そこから出てくるイオンの質量スペクトルを得る。照射点を次々に変えていき、照射点とそれに対応するスペクトルを得、一連のデータから画像を得る方法である。この方法の欠点は、レーザー光が数 μm 以下に絞れないので、原理的に面分解能が数 μm に制限されることと、データ取得時間が数時間から十数時間に及ぶことである。一方投影型ではレーザー光を試料面全体に均一に照射し、イオン光学的に試料面のある点と検出器面のある点を 1:1 に対応するようにして像を得る方法である。この方法はデータ取得時間が数分から数十分であること、原理的に面分解能に制限がない利点がある一方、歪みの無い像を得るためのイオン光学系が難しいのが難点である。本プロジェクトはあえて難しい投影型で面分解能 $1\mu\text{m}$ を達成し、生体試料をこの面分解能で測定することを目標に、イオン化法の開発はレーザーイオン化で実績のある栗津グループ(大阪大学工学研究科)が担当し、イオン光学系の開発は豊田グループ(大阪大学理学研究科)が担当し、得られたデータからの画像処理法の開発と全体の調整は内藤グループ(光産業創成大学院大学)が行ってきた。

これらの基礎技術を元に以下の成果を得た。

- (1) 標準試料の作製。 $1\mu\text{m}$ の像が取得できたことを確認するためには $1\mu\text{m}$ の標準試料を作製することが必要であった。そこで半導体に $1\mu\text{m}$ の溝を $10\mu\text{m}$ おきに切り、染料を流し込んで標準試料とした。しかし、これではたとえ線が観測されても直接面分解能が $1\mu\text{m}$ という証拠にならないので、非常に薄いアルミ箔 ($1.5\mu\text{m}$) に $1\mu\text{m}$ 間隔で線を切り、これをマスクにしてイオン像を得た。(厚さ $10\mu\text{m}$ のアルミ箔では深さ方向が溝幅の 10 倍あるのでレーザー光が入らない。したがって非常に薄いアルミ箔に線を刻む必要があった)
- (2) 面分解能 $1\mu\text{m}$ と質量分解能 10000 の同時達成。半導体試料で得た像を人為的に $1\mu\text{m}$ ずらしてもとの像に足し合わせると 2 本になったので、間接的に分解能 $1\mu\text{m}$ は達成されたと思われるが、アルミ箔マスクで確認した結果、2 本の線になっていることが確認された。この時の質量分解能は 10100 程度であった。
- (3) 高精度の電場計算法の開発とひずみの無い質量分析計の開発。イオン像を得るためには近軸光線だけでなく、広がったイオンを取り扱う必要があった。質量分析計として実績のある多重周回型質量分析計(MULTUMI1 号機)を当初用いたが、像のひずみが大きかった。そこで、正確な電場計算ができるソフトを開発し、イオン軌道の精度が上がるようにし、歪みの原因を特定することができるようにした。これを用いて、基本的なイオン光学系は同じであるが、機械精度が格段に良く、電場出口入り口のフリンジフィールドを考慮したシャントを持った MULTUMI2 号機を作製し、ほとんどひずみの無いイオン像を得ることができた。
- (4) 新しいイオン引出しのタイミング(PEDA)法の考案。質量分解能を向上させるため、通常の質量分析計

ではレーザー照射後しばらくしてイオンを引き出していた(遅延引出し)が、この方法では像が壊れてしまう。そこで、イオン引き出し後差動加速する方法を考案した。その結果、面分解能を損なわず、質量分解能を向上させることに成功した。

- (5) DLD データを質量別に位置情報に変換するソフトの開発。DLD(ディレイライン検出器)のデータを質量ごとに位置情報にするソフトを開発した。質領域を M と ΔM にとり ΔM の任意の値に対して画像が得られる。
- (6) レーザー照射面の均一化。信頼できる像を得るためには、レーザー照射面の均一化は重要である。100 μm の範囲でレーザー強度をフラットにすることができた。
- (7) 金コート法の改良と生体試料の分析。生体試料から像を崩さずに効率的にイオンを得るための最適な金コートの厚さは 8nm であることを明らかにした。メチレンブルーとクリスタルバイオレットで染色したマウス眼球組織では 250 μm × 250 μm の範囲で光学顕微鏡で見られたパターンとよく似た像が得られた。

3-2 グループ別の成果

3-2-1 像の歪の少ない MULTUM の開発(阪大理学研究科グループ)。

質量分析計としては高い質量分解能を有する MULTUMI1 号機を当初用いたが、像の歪が大きかった。この歪の原因を探るために、近軸光線から離れたところの電場、電場出入口のフリッジングフィールドを正確に計算できるソフトを開発し、イオン軌道を正確にトレースできるようにした。この計算機ソフトを元に、歪のない像を得るために要求される質量分析計の機械精度やフリッジングフィールドの形を求め、MULTUMI2 号機を設計し、ほぼ歪のない像が得られる質量分析計を製作できた。また、イオン引き出し系では像をボケさせないために、レーザー照射と同時に引き出し電圧をかけなければならないが、そうすると、イオンの初期速度が質量分解能を悪くする。これを避けるために PEDDA 法を開発した。

3-2-2 画像を得るための適切な試料の前処理(阪大工学研究科グループ)。

ある面内でレーザーイオン化を均一に行うためには照射するレーザー光強度が均一でなければならない。全体としてレーザー強度を落とさずに 250 μm 四方でレーザー光を均一にできる光学系を設計した。次にこのレーザー光を試料に当てイオン化すると一般の質量分析計では問題にならなかったことが起こった。それは元の像とは違う斑点模様になってしまった。これは試料のチャージアップのためと考え、金コーティングを行った。金の蒸着厚さはイオン化効率、像の歪などを勘案し 8nm が適当であるとした。

3-2-3 DLD データから像を得るソフトウェアの開発(光産業創成大学グループ)。

レーザー1ショットごとに位置と時間(質量)を含んだデータが取れる。これらのデータを足し合わせ、1 つの母データとする。この母データから質量スペクトルや像を求めるソフトを開発した。任意の質量 M と質量差 ΔM を決め M と $M + \Delta M$ 内にあるデータから画像を作製できるようにした。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

- ① 原著論文(国内 2 件、海外 4 件)、その他の著作物・総説、書籍 22 件
- ② 学会招待講演 (国内会議 20 件、国際会議 7 件)
- ③ 学会口頭発表 (国内会議 13 件、国際会議 5 件)、ポスター発表(国内会議 13 件、国際会議 15 件)
- ④ 国内特許出願 (2)、海外特許出願(0)
- ⑤ 受賞 2 件、新聞報道等 0 件

以上のようにプロシーディングが主であるが、学会発表、原著論文等、招待講演等発表の総数は妥当な水準にあると思われる。国内特許も 2 件あり成果が上がったものと思われる。ただ、質量顕微鏡と生体とを結びつける世間の注目を浴びる分野であるので、プレス発表をして欲しかった。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

投影型質量顕微鏡は本チーム以外ではオランダのグループが研究しているだけで、彼らの結果は面分解能

数 μm 以上で、分解能 $1\mu\text{m}$ を達成するのは相当難しいというのが質量分析分野での常識になっていた。一方、スキャン型には市販装置があるが、最高位置分解能 $5\mu\text{m}$ での像を取得するには数時間が必要である。本研究では、標準試料で測定時間十数分、面分解能 $1\mu\text{m}$ が達成されたが、残念ながら測定質量領域が 100 以下に留まり有意義な有機物、例えば脂質分布がわかる $m/z=300$ 以上のデータがない。今後、試料イオン化法の改良で数百の分子量のイオンが測定されるようになれば、細胞レベルの脂質の分布測定や薬物動態が可能になり、医学、薬学への応用が進むことで、今後に大きな社会的インパクトが期待できる。

4-3. 総合的評価

本研究では面分解能は世界トップレベルの $1\mu\text{m}$ が達成され、独自のイオン光学系の優れた結像性能が実証されたが、測定イオン領域が特定のもの(色素)を除いて $m/z=100$ 以下の物質に留まっている。生体中で有用な情報を得るための物質、例えば脂質や投与薬物の分布を見るには $m/z=300$ 以上のイオンの検出が不可欠である。当初目標としていた生体試料の測定には今ひとつの努力が必要である。生体試料のような塩類が多量に含まれる試料では、イオン化効率が当初のもくろみより相当悪いことが確認される結果となった。イオン光学的には色素イオンで、標準試料を用いて面分解能 $1\mu\text{m}$ 、質量分解能 10000 が達成されたといえども、当初目標にしていたイオン化効率の改善が完全には達成されなかったので、今後課題を残す結果となった。