

「物質現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 17 年度採択研究代表者

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

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

1. 研究実施の概要

H17、H18 年度は各研究グループにおいて、イメージング質量分析の開発に関係する技術課題の精査・克服と要素技術の構築を進めてきた。これにより質量顕微鏡の開発環境がほぼ整備された。H19 年度は質量顕微鏡開発の中核的課題である**脱離イオン群のイメージ検出、周回後のイオン群のイメージ検出**（周回時のイオン群イメージ保持の実証・確立）、**脱離イオン群のプレート法線方向指向性の確立**、の 3 点を集中的に取り組んだ。これにより主に次の成果が得られた。

1. レーザー脱離イオン化で生成したイオン群は試料面法線方向に対して鋭い初期角度分布を有することを発見した。この性質が投影方式による検出面上へのイオン像結像を可能にしている。（投影型イメージング質量分析の原理実証）
2. リニアモード飛行時間型イオン光学系においてイオン像を投影方式によって検出し、約 20 倍の像倍率を得た。これにより、線幅 $5\mu\text{m}$ 、間隔 $8\mu\text{m}$ のメッシュパターンを撮像した。（従来の走査型 MALDI イメージング質量分析を超える高解像度の達成）
3. イメージング用多重周回飛行時間型イオン光学系（MULTUM-IMG）を構築し、この中を複数回周回した後のイオン群を撮像した。1 周後のイオン像は位置が移動し著しく変形したが、2 周後では MULTUM-IMG の収差を打ち消す作用が働き、形状の回復したイオン像が検出された。（周回時のイオン群イメージ保持の実証）

今後は MULTUM-IMG 周回後のイオン像の歪みを抑制しイオン像の検出をより多い周回数で可能にするとともに、二次元位置検知型イオン検出器による高速の時系列データ収集技術を確立して、投影型イメージングによる質量分離を実現していく。周回後のイオン像の歪みは MULTUM-IMG に入射するイオンビームの径を十分細くしかつ拡がり角を抑えることによって改善できると考えている。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

2-1. イオン源でのイオン像検出

レーザー脱離イオン化で生成したイオン群を検出器に投影すること(投影方式)によってイメージングが可能であることを実証するため、MALDI イオン源に二次元位置検知型イオン検出器を直結してイオン像の取得を試みた。MALDI で使用する液体マトリックス(α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸と 3-アミノキノリンの混合物)をサンプルプレートに載せ、電頭用グリッドを被せて試料とした。Nd:YAG レーザーの 3 倍高調波(355nm)を約 $500 \mu\text{m}$ ϕ のスポットに集光して試料に照射しイオンを生成した。この際にレーザー光のビームプロファイルがガウシアン状であるため、イオン像の強度分布に影響すると考えられるので、集光光学系に可変形ミラーを用いてビームプロファイルをフラット化して照射した。検出器には蛍光板を組み合わせたマイクロチャンネルプレート(MCP)アセンブリを使用し、蛍光像に変換されたイオン像を CCD カメラで撮影した。

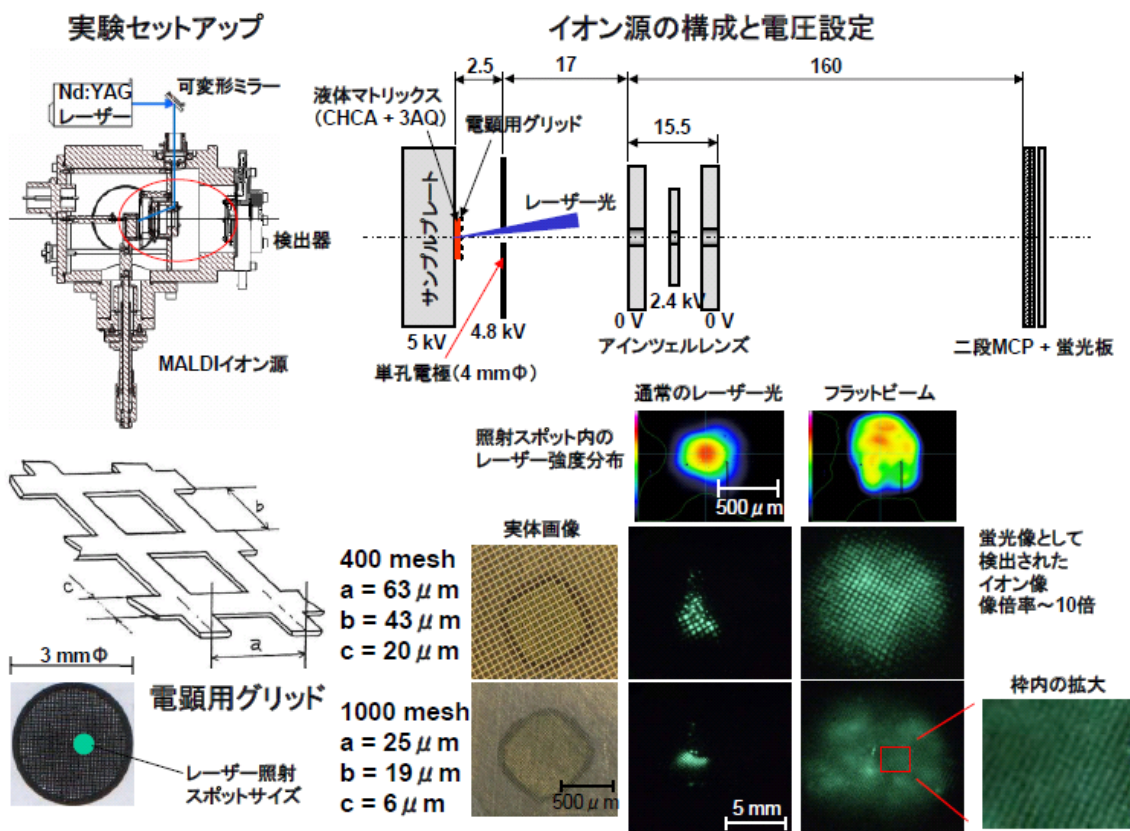


図1. MALDI イオン源に直結した検出器でのイオン像の検出

引き出し電極の形状とアライメントを最適化し引き出し電圧とアインツェルレンズ電圧を調節した結果、メッシュパターンのイオン像を取得できた(図1)。像を与えているのはUVレーザー照射で容易にイオン化する液体マトリックス由来のイオンであり、サンプルプレート上で電頭用グリッドに

遮られてメッシュ状のパターンを形成する。したがって、試料の微小領域における形状を反映した空間分布を持つイオン群をレーザー脱離イオン化によって生成し、投影方式によりイオン像として取得できることが明らかになった(文献3)。メッシュの間隔を細かくしていき1000mesh(線幅 $6\mu\text{m}$ 、間隔 $19\mu\text{m}$)でも明瞭なメッシュパターンのイオン像が得られた。また、レーザー光をフラットビーム化することによって照射スポット全体にわたり強度ムラのないイオン像が得られた。像のぼやけの程度をイオン軌道シミュレーション結果と対比させる解析により、レーザー脱離イオン化で生成したイオン群はサンプルプレートに垂直な方向に対して $\pm 0.01\text{rad}$ 以内の極めて鋭い初期角度分布を持ち、投影型イメージングに適していることが示された。

2-2. リニアモード飛行時間型イオン光学系でのイオン像検出

このMALDIイオン源をMULTUM-IMGに接続し、まずMULTUM-IMGの直線区間のみをリニアモード飛行時間型イオン光学系として用い、レーザー脱離イオン化によるイオン像の検出を行った(総飛行距離 0.96m)。サンプルプレート上にローダミンBのドット(約 $30\mu\text{m}\phi$)を約 $30\mu\text{m}$ 間隔で並べてレーザー光の照射スポット(約 $500\mu\text{m}\phi$)に収まるサイズの文字を描き試料とした。イオン像の検出には上述のMCPアセンブリを用いた。

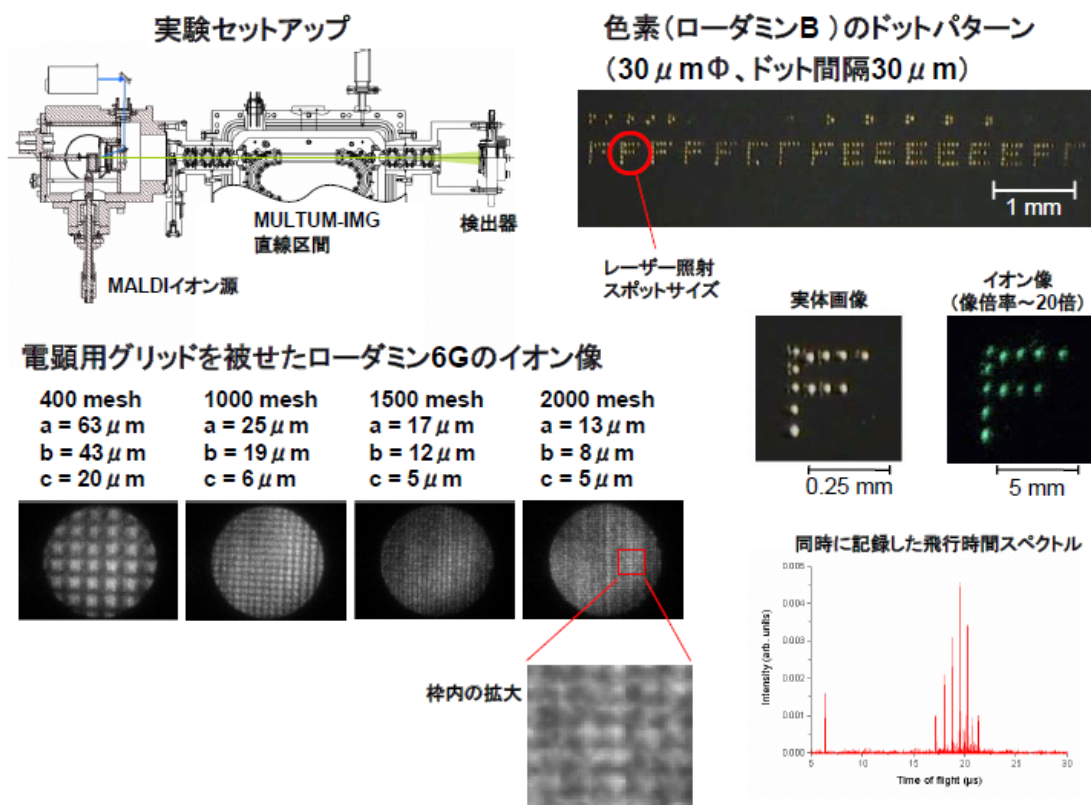


図2. MULTUM-IMGの直線区間を用いたイオン像の検出

引き出し電圧、アインツェルレンズ電圧、Qレンズ電圧を適正に調節することにより、文字として十分なコントラストで識別できるイオン像が得られた(図2、文献3)。イオン像の取得と同時に飛行時間スペクトルの記録が可能であることを確認した。

次に、サンプルプレートへ載せたローダミン6G に電頭用グリッドを被せて試料とし、上述と同様にイオン像を検出した。2000mesh (線幅 $5\ \mu\text{m}$ 、間隔 $8\ \mu\text{m}$) のメッシュパターンが明瞭に識別できるイオン像を得た。従来の走査型 MALDI イメージング質量分析の空間分解能の最高値は $10\ \mu\text{m}$ であり、これを超える高解像度を実現した (図2)。

2-3. 多重周回飛行時間型イオン光学系周回後のイオン像検出

サンプルプレートへ載せたローダミン6G に電頭用グリッドを被せて試料とした。レーザー脱離イオン化で生成したイオン群を MULTUM-IMG の周回区間に入射する際、イオン源側の電場セクター (セクターIV) のみ接地電位とし、他の3つの電場セクターに適正な正の直流電位を与えてイオン群を周回軌道に乗せ、直後にセクターIVを他のセクターと同電位にして閉軌道とした。設定した周回数に相当するタイミングで検出器側の電場セクターを接地電位に落とし、イオン群を周回区間から取り出して上述の MCP アッセンブリに入射しイオン像を検出した。

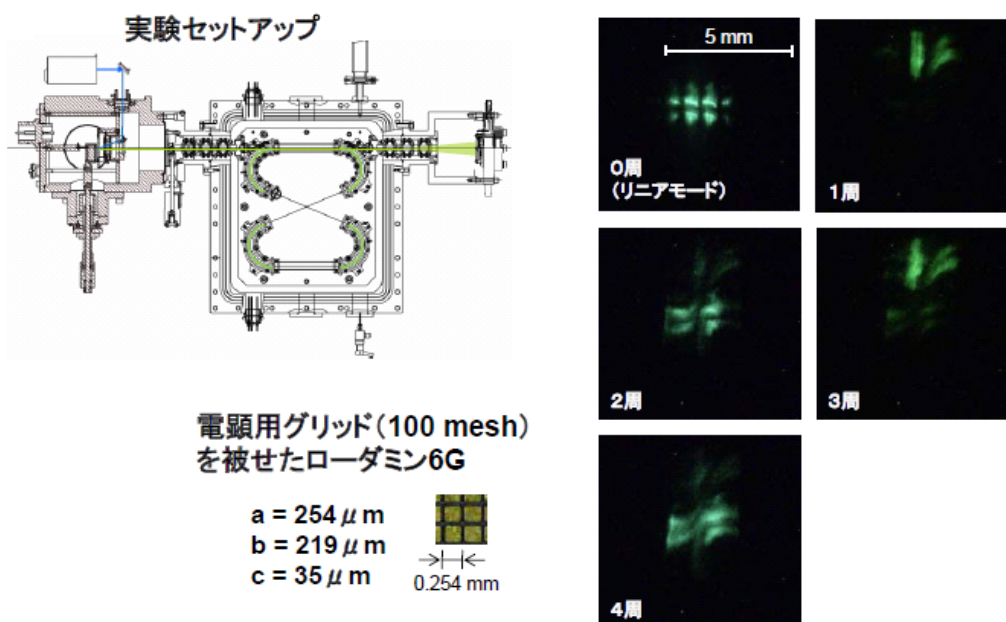


図3. MULTUM-IMG 周回後のイオン像の検出

1周後のイオン像は位置が移動し著しく変形したが、2周後ではメッシュパターンを識別できる程度に形状の回復したイオン像が検出された (図3)。MULTUM-IMG のイオン軌道は1周ごとに上下左右が反転するので、1周目の収差の影響が2周目に打ち消されるように作用している。

周回時のイオン像の保持はまだ不十分であり、正確なイオン像を得るには1周目に生じるイオン像の位置の移動と変形を抑える必要がある。周回区間に入射するイオン群の軌道を中心軸近傍に狭めれば、MULTUM-IMG の理論上の性能が発揮され周回後のイオン像を改善できると考えている。

3. 研究実施体制

(1)「内藤研究」グループ

①研究分担グループ長:内藤 康秀(光産業創成大学院大学、准教授)

②研究項目

1. 二次元荷電粒子撮像システムの開発
2. 高指向性・低分散脱離イオン抽出法の確立
3. 拡大投影静電レンズ系の最適化

(2)「豊田研究」グループ

①研究分担グループ長:豊田 岐聡(大阪大学大学院、准教授)

②研究項目

1. 多重周回飛行時間型質量分析計の収差の影響の実験的評価
2. 内藤研究グループで試作するイオン引き出しレンズ群、拡大レンズ群光学系の理論面からのサポートを行うためのイオン軌道シミュレーション手法の確立
3. 微小半導体構造の輸送特性への不純物などの不均一性の影響の調査

(3)「栗津研究」グループ

①研究分担グループ長:栗津 邦男(大阪大学大学院、教授)

②研究項目

1. DFGレーザーおよび紫外レーザーの2波長照射効果の確認
2. フラットビーム集光用光学系を用いたレーザー脱離イオン化
3. マトリックスフリー高効率レーザー脱離イオン化法の確立

(4)「益田研究」グループ

①研究分担グループ長:益田 勝吉((財)サントリー生物有機科学研究所、主席研究員)

②研究項目

1. 細胞表層における膜蛋白質の調製およびMALDI試料調製法の検討
2. 高指向性・低分散脱離イオン群抽出法の確立
3. マトリックスフリー高効率レーザー脱離イオン化法の確立

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Michisato Toyoda and Masaru Nishiguchi, "Simulation of Beam Profile of Multi-Turn Time-of-Flight Mass Spectrometers", *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 55(1), 2007, pp.17-24.
2. Hisanao Hazama, Hirofumi Nagao, Ren Suzuki, Michisato Toyoda, Katsuyoshi Masuda, Yasuhide Naito and Kunio Awazu, "Comparison of mass spectra of peptides in different matrices using matrix-assisted laser desorption/ionization and a multi-turn time-of-flight mass spectrometer, MULTUM-IMG", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 2008, pp.1461-1466 (to be published).
3. Hisanao Hazama, Jun Aoki, Hirofumi Nagao, Ren Suzuki, Toshio Tashima, Ken-ichi Fujii, Katsuyoshi Masuda, Kunio Awazu, Michisato Toyoda and Yasuhide Naito, "Construction of a Novel Stigmatic MALDI Imaging Mass Spectrometer", *Appl. Surf. Sci.* (to be published).

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:0 件(CREST 研究期間累積件数:1 件)