

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	単一細胞内微量元素分析用ICP発光・質量分析装置の開発
Title(English)	
著者(和文)	鏑木結貴
Author(English)	Yuki Kaburaki
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9522号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:沖野 晃俊,赤塚 洋,飯尾 俊二,藤井 隆,松本 義久,千葉 光一
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9522号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

東京工業大学

博士論文

単一細胞内微量元素分析用ICP発光・質量分析装置
の開発

平成26年2月

指導教員
沖野 晃俊 准教授

提出者
大学院 総合理工学研究科 創造エネルギー専攻
学籍番号：11D31028
氏名：鏑木 結貴

目次

第1章 序論	1
1.1 はじめに	
1.2 世界でのICP分析の研究動向と本研究の位置づけ	
1.3 論文の構成	
第2章 誘導結合プラズマを用いた元素分析	13
2.1 緒言	
2.2 誘導結合プラズマの生成	
2.3 プラズマの基本特性	
2.3.1 大気圧プラズマの分光測定	
2.3.2 温度測定法	
2.4 ICP 分析装置の測定原理	
2.4.1 誘導結合プラズマ発光分析装置	
2.4.2 誘導結合プラズマ質量分析法	
2.5 結言	
参考文献	
第3章 単一細胞分析用ドロプレット試料導入装置の開発	33
3.1 緒言	
3.2 従来の液体試料導入法	
3.2.1 ニューマティックネブライザとスプレーチャンバ	
3.2.2 直接試料導入法	
3.2.3 液体導入法における問題点	
3.3 ドロプレット試料導入装置の開発	
3.3.1 ドロプレット試料導入装置の原理	
3.3.2 単一細胞分析の必要条件	
3.3.3 生体中の必須微量元素	
3.4 結言	
参考文献	

第4章 ドロプレット試料導入装置の基礎特性調査

49

- 4.1 緒言
- 4.2 電磁バルブ式とピエゾ素子式ドロプレット試料導入装置の比較
- 4.3 ドロプレット試料導入が自励式高周波電源により発生した
ICPへ与える影響調査
- 4.4 インジェクションガスの流量変化と測定位置の関係
 - 4.4.1 インジェクションガス流量変化と測定位置
 - 4.4.2 測定位置による発光の変化
 - 4.4.3 分光写真器を用いた時間分解発光計測
- 4.5 ドロプレット試料導入二重収束Mattauch-Herzogセクターフィールド
マススペクトロメータ
 - 4.5.1 ドロプレット試料導入装置に適した信号処理方法の検討
- 4.6 結言
- 参考文献

第5章 ドロプレット試料導入用脱溶媒装置の開発

85

- 5.1 緒言
- 5.2 脱溶媒の必要性
- 5.3 脱溶媒装置の加熱による効果の評価
 - 5.3.1 ニクロム線を用いた脱溶媒装置
 - 5.3.2 円筒型ヒーターを用いた脱溶媒装置
 - 5.3.3 加熱気化装置のパラメータ評価
 - 5.3.4 ドロプレットの体積と加熱による効果の考察
- 5.4 脱溶媒装置の評価
 - 5.4.1 脱溶媒装置の構成と実験系
 - 5.4.2 冷却装置の効果を検証
 - 5.4.2.1 ICP発光分光分析
 - 5.4.2.2 ICP質量分析
- 5.5 結言
- 参考文献
- Appendix 四重極型ICP質量分析装置のイオン電流直接測定

第6章 ICP飛行時間型質量分析への応用	122
6.1 緒言	
6.2 ICP飛行時間型質量分析装置	
6.2.1 ICP飛行時間型質量分析の測定原理	
6.2.2 ドロプレット試料導入ICP飛行時間型質量分析	
6.2.3 イオン信号の直接取得	
6.3 ドロプレット試料導入用信号処理	
6.4 結言	
参考文献	
第7章 細胞の直接導入分析	135
7.1 緒言	
7.2 細胞の直接導入によるICP発光分光分析	
7.2.1 測定サンプル	
7.2.2 <i>Pseudococcomyxa simplex</i> の含有元素の定量分析	
7.2.3 細胞の直接測定	
7.3 結言	
参考文献	
第8章 結論	151
8.1 総括	
参考文献	
謝辞	157

第1章 序論

1.1 はじめに

20世紀は、めざましく発達した産業とその代償である環境汚染に彩られた時代であった。水俣湾の有機水銀汚染による水俣病や、神通川のカドミウム汚染によるイタイイタイ病などがその代表であり、また目を覆うほど凄惨なこれらの病状は、環境汚染に対する関心をいやおうなしに高めた。半世紀たった21世紀の今日でも過去の反省は引き継がれており、大気・陸水・飲料水・海水・土壌の汚染の状態を絶えず調査し、それらの汚染を軽減していく努力が重ねられている。重金属による環境汚染、化石燃料、都市廃棄物の燃焼、生活・工場排水のような汚染物質を発生する可能性のある施設では、公害を未然に防ぐために環境に悪影響を及ぼす物質の微量元素分析を中心とした、多角的な調査を行う必要がある^[1]。

また、医学や栄養学の分野では、金属タンパクの欠損による発病や、セレンやシスプラチンなどのメタロドラッグによる制ガン効果など、生体作用の正負の両側面に関心が向けられ、2003年5月号のScience誌^[2]でも環境、健康問題における金属の重要性を喚起する特集が組まれている。国民の安全な環境を維持し、病気を予防するとともに、新たな健康産業を創出するためには、環境科学と生命科学との境際領域に、新たな研究領域として「ヒトの健康科学」を興隆させる必要があるとされている。しかしながら、現在市販されている分析装置は、人間の細胞や組織が作り出すタンパク質の集合体、すなわちプロテオームの全体像の解明を行う（プロテオミクス）、あるいは細菌から人体を構成する細胞一つ一つの代謝物を網羅的に解析し、変化に最も影響を与えている因子を特定する研究（メタボロミクス）を開拓した基盤技術ではあるが、さらにその先にある金属を含む生体物質の網羅的な機能解明（メタロミクス）の実現には、これら既存の分析装置では感度が圧倒的に不足しており、極微量でも生理活性機能や毒性を発揮する金属を含む生体成分は分析できない^[3]。

このため、環境試料中の元素はもちろん、生体に吸収された金属元素の代謝や機能を解明するためには、新たな分析手法の開発が不可欠である^{[4][5]}。

また、細胞を1つ1つ分析する単一細胞分析が求められている理由として様々挙げられるが、その代表例がガンの発生メカニズムの解明である。最近の研究

で、がん細胞と正常細胞を個別分析したときの、DNAのタンパク質を測定したところ、がん細胞は遺伝的多様性（それぞれが異なること）が明らかとなり、正常細胞にはその多様性は見受けられなかったとの報告がされている。また、単一細胞からのデータが何を意味しているのか分からない部分が多いが、細胞間の不均一性が癌の解明に寄与することは間違いないと考えられていることから、細胞の個別分析の必要性が分かるであろう^[6]。

1.2 世界での ICP 分析の研究動向と

本研究の位置づけ

このように注目を集めている分析技術であるが、本研究は分析化学（主に本研究で用いたICP発光分光分析やICP質量分析で行われている研究）の分野においてどのような位置づけをされているのか、客観的に見てみたいと思う。その手法として、学術俯瞰システムを使用した。この手法は、私が博士後期課程に在籍しながら技術経営の専門学修士の取得を目指すためのデュアルディグリープログラムで在籍している梶川研究室で研究開発しているものである。学術俯瞰システムは、大規模な書誌情報をテキストマイニングとネットワーク解析に基づいて分析を実行し、学術分野の俯瞰を可能にするシステムである。近年の蓄積されている知識量の爆発に対して、今ある知識を有効活用するために学術全体像を俯瞰することが重要となると考えられる。また、萌芽分野の早期発見のためにも学術俯瞰は強力な支援ツールとなりうる。学術俯瞰システムでは、以下の主要機能を持ち、学術分野の俯瞰および様々な角度からの分析を支援することが可能である。

- 学術俯瞰図の作成
- 直接引用、共引用や書誌結合による引用ネットワーク分析
- 論文間の関係（直接引用、共引用、書誌結合）の重みづけによる分析
- 論文キーワード抽出の自動抽出
- 論文の著者が所属する国名と組織の自動抽出
- 論文のネットワーク指標の自動抽出
- 分析結果のキーワードによる検索

- サブクラスタ分析や分析結果からの新たなデータセット作成
- グラフツール
- ヒートマップ分析ツール

図1.1は学術俯瞰システムの全体的な流れを示している^[7]。まず始めに、Topicとなるキーワードを選ぶ。そのキーワードをWeb of Scienceのようなデータベースを用いて論文の情報を入手する。その後、キーワードで検索される文献のテキスト情報と引用情報を基に解析を行った。また、クラスタリングをおこなう際の詳細は図1.2に示す。引用情報からの分析は、次のような手法で引用関係を作成している。例えば、論文A から論文B に引用があった場合、論文A と B 間に結合関係を作成する。論文の引用主体と引用対象の論文間の類似性を前提とする手法である。この手法で引用関係が明らかになった後、クラスタリングの可視化をおこなう。各引用関係の可視化は、局所最適ばねモデル計算 (large graph layout: LGL)を用いて行った^[8]。第一に引用ネットワーク(共起頻度)が強い文献を中心に置き、その文献から引用関係のある文献を周囲に配置する。そしてそれらの文献から引用関係のある文献を配置し、キーワードの類似度から文献同士の引力と斥力を発生させて、分子動力学的に位置を決める。このステップを繰り返して、文献を配置していき、クラスタを可視化する。つまり、位置が近ければ近いほど、相関性の高いクラスタであることを示している。なお、各クラスタは色で分けて示す。

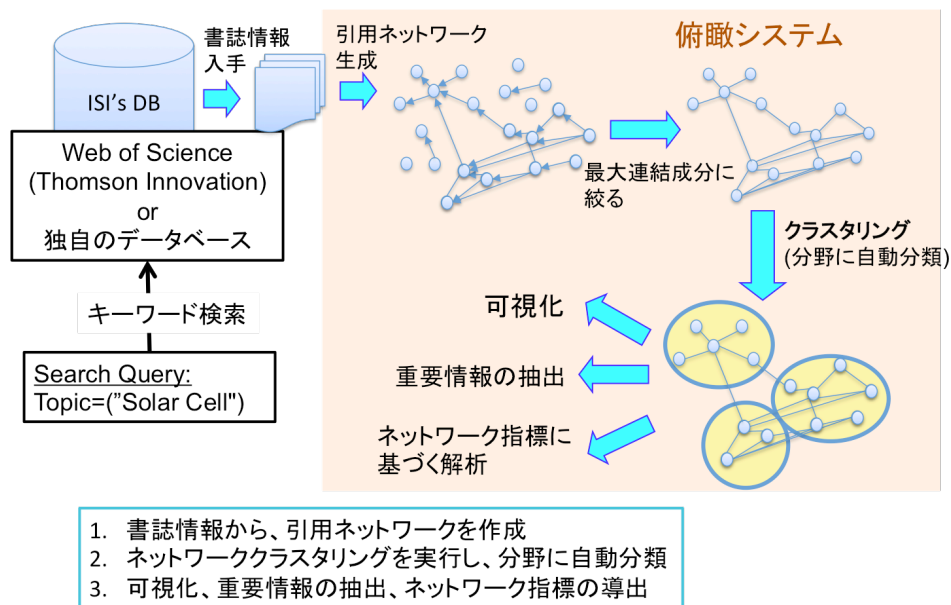


図1.1 学術俯瞰システムの概念図

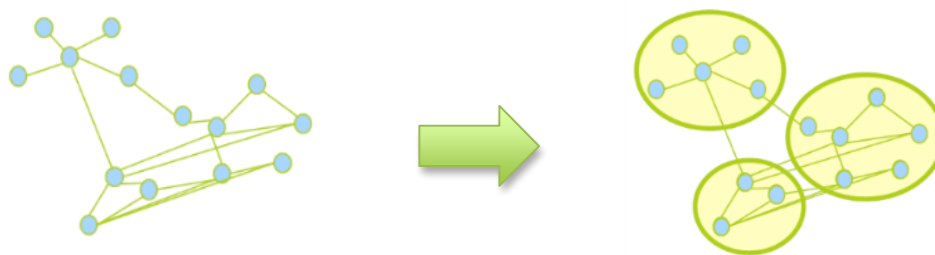


図1.2 クラスタリングの概念図

(各点は1つの文献、線は引用による繋がり、円は1つの研究領域を示している)

今回の分析には、Topicとして“Inductively Coupled Plasma”と“Analysis”を用いて、Web of Scienceをから23048件（2013年11月22日時点）の論文を得ることができた。これらの論文を用いて俯瞰システムを用いて俯瞰マップを作成すると、図1.2のようになる。

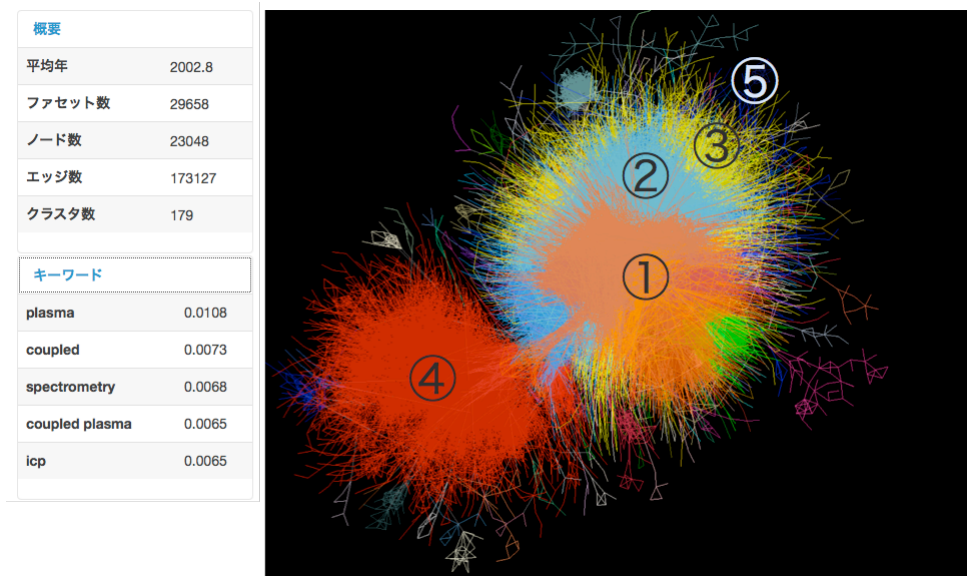


図1.3 ICPと分析をトピックとした全体俯瞰図

このように、クラスタという引用関係が強いまとまりが作成される。概要にはすべての論文の出版年数の平均年数やクラスタのすべての数などが示されている。また、すべての論文の中に含まれるワードの中で共通する数の多いワードをキーワードとして、示している。もちろんのことながら、Topicとして入力している“plasma”や“icp”がキーワードとして取り上げられている。これでは、どのような状況になっているかはよくわからないため、より詳細に見てみることにした。

図1.4～図1.8に図1.2の①～⑤のそれぞれのクラスタの詳細を示す。

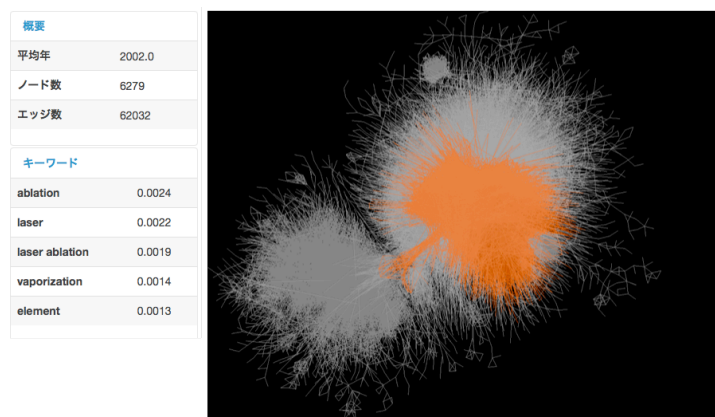


図1.4 クラスタ1の俯瞰図

このクラスタでは，“ablation”や“laser”などがトピックとしてあがり、レーザーアブレーションを用いた分析の内容の論文の集合体であると考えられる。また、平均年数も2002年とそれほど近年のものではなく、件数も6000件と多いため、ほぼ確立されてきている分野であると考えられる。

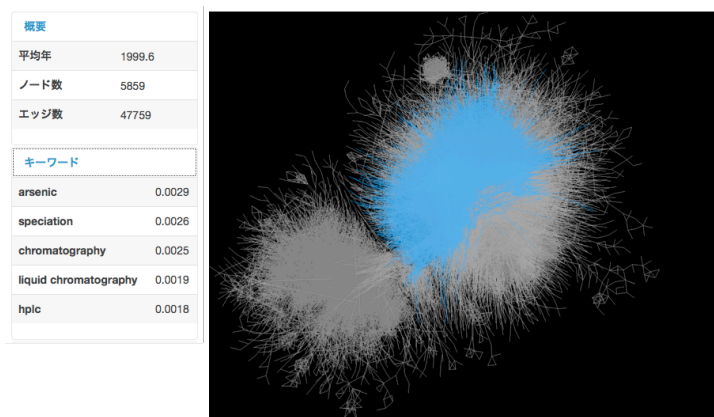


図1.5 クラスタ2の俯瞰図

このクラスタでも同様に考えると、hplc (High Performance Liquid Chromatography) を用いたスペシエーション分析の分野であると考えられる。平均年数と総論文数から見てもほぼ確立されている分野と考えられる。

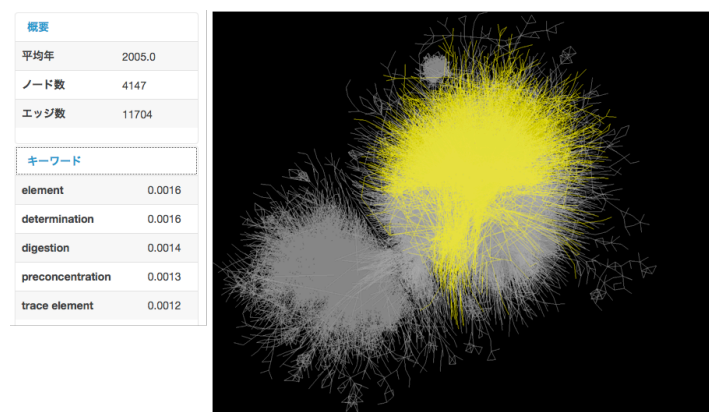


図1.6 クラスタ3の俯瞰図

このクラスタでも同様に考えると、微量元素分析の同定であると考えられる。平均年数から見ると比較的若いクラスタであるため、分析化学の主要テーマであることから近年までずっと研究が行われていると考えられる。

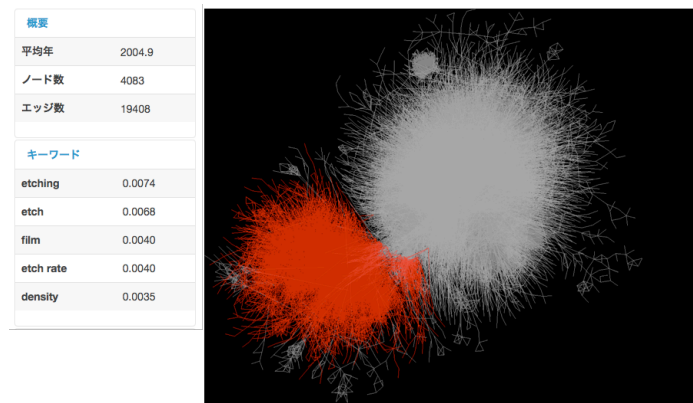


図1.7 クラスタ4の俯瞰図

このクラスタでも同様に考えると，“ething”や“film”というキーワードからICPを用いた分析ではなく、ICPを使ったフィルム（主に半導体）のエッチングをした表面の分析のクラスタであると考えられる。それは、他のクラスタとは重なっていないため、別の分野であることからわかる。ICPの主な利用方法は、分析の他に半導体のエッチングがあるため、このような分析結果になったと思われる。

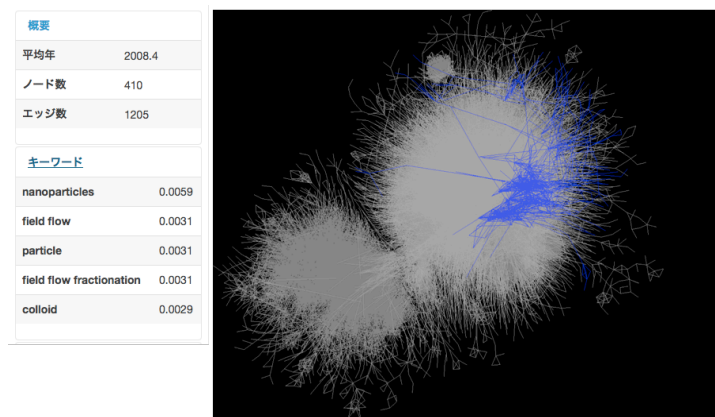


図1.8 クラスタ5の俯瞰図

このクラスタでは、ナノパーティクルの分析やフィールドフローフラクシオネーションという方法を用いた分析を行う分野の集合体であると考えられる。このクラスタは、平均年数が2008年ととても若いことから、近年注目されていると考えられる。また、この中には本研究で行っているドロプレット試料導入装置を用いた分析も含まれる。このことから本研究はこの分野の中でもホッ

トな分野で注目を集めており、かつ、本研究が最先端の研究であることが分かった。このことから、ICPや分析といった観点から本研究の位置づけを確認することができた。

次に、この約20,000件の論文の中で、本研究のターゲットである単一細胞分析“single cell analysis”のTopicで再分析を行うと、図1.8のような結果が得られた。この分析からICPの分野（すなわち、タンパク質や高分子ではなく元素分析の分野）で単一細胞分析がどのようなアプローチで研究を行っているかを見ることができる。

論文のヒット件数が122件と多くないため、俯瞰図から見てもさほど情報が得られないが、平均年数を見てみると2006年と比較的新しいので、近年の注目分野であるように思われる。

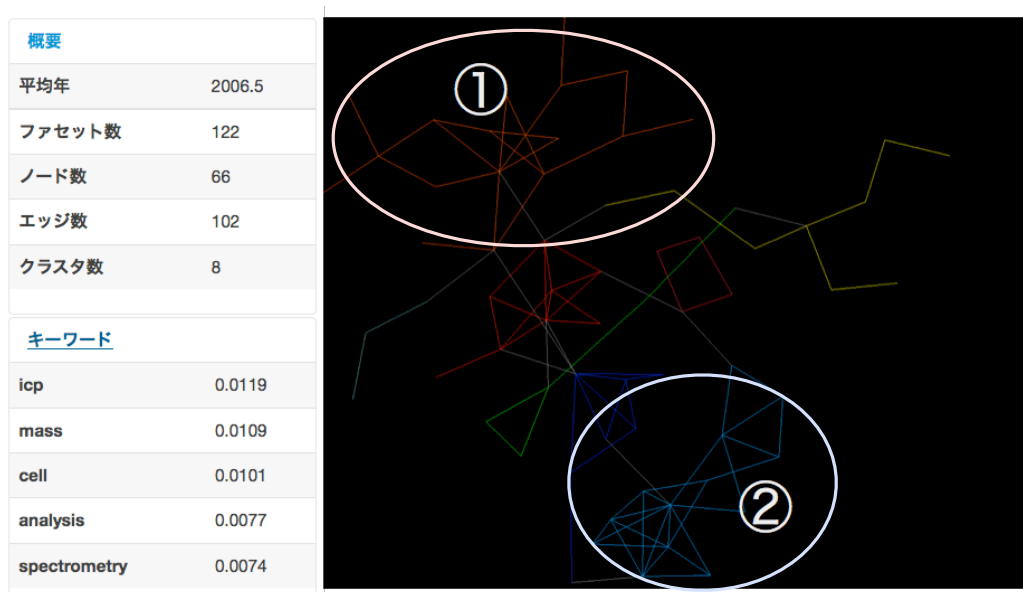


図1.8 single cell analysis をトピックとした全体俯瞰図

次に比較的大きいクラスタ1（図1.9）とクラスタ2（図1.10）について詳しく見てみることにする。

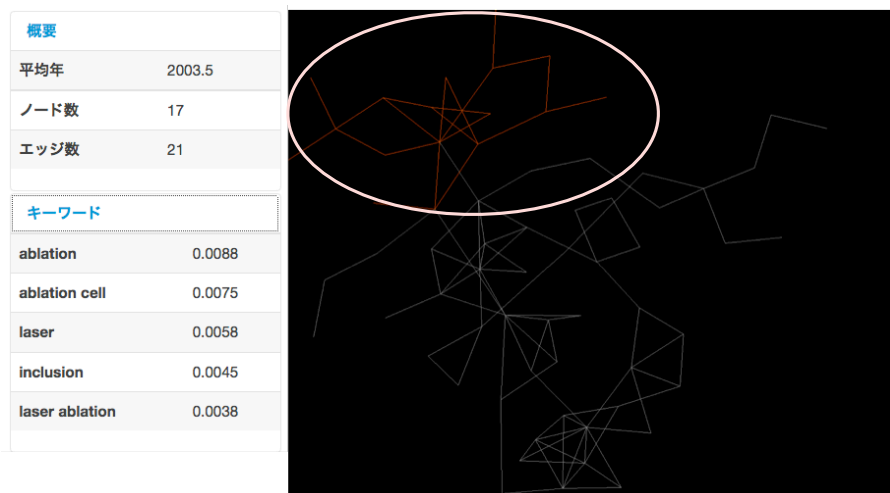


図1.9 クラスタ1の俯瞰図

このクラスタ1は、laser ablation を用いて単一細胞分析に取り組む分野の集合体である。また、平均年数が2003年と全体クラスタから見ると古いことがわかる。そのため、確立されつつある分野であると考えられる。

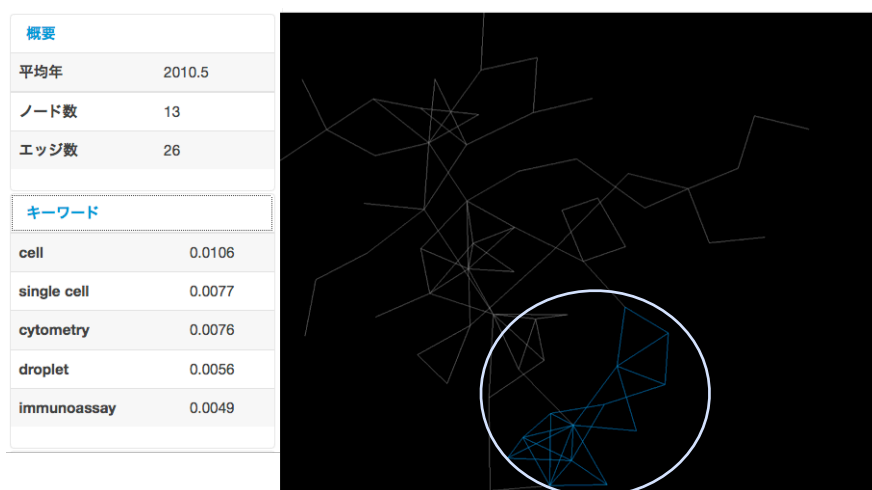


図1.10 クラスタ2の俯瞰図

このクラスタでは、サイトメトリーやドロプレットというトピックから、細胞を1粒ずつ導入する方法を確立する分野の集合体であるように見受けられる。また、平均年数が2010年とすごく最近の集合体であることから注目度が高くなっていると考えられる。論文のタイトルを詳しく見てみると本研究で行っているドロプレット試料導入装置を用いたものは、13報中6報あり、その中には本

研究室からパブリッシュされた論文が含まれ、ドロプレット試料導入装置は単一細胞分析の研究において注目の方法であり、盛んに研究され始めている。本研究室はその中でも最先端の研究をしているといっても過言ではないことがわかった。また、ドロプレット試料導入装置を用いた手法は単一細胞分析をおこなう上で近年の研究において有用な方法であると考えられているため、このような結果になった。

したがって、ICPの研究分野においても単一細胞分析から見ても本研究は注目の分野であることを客観的に確認することができた。

1.2 本論文の構成

本論文は8章から構成されている。

第2章「誘導結合プラズマを用いた元素分析」では、誘導結合プラズマを用いた微量元素分析法の概要とその基礎理論について述べ、現在の誘導結合プラズマを用いた微量元素分析法の問題点を明らかにする。

第3章「単一細胞分析用ドロプレット試料導入装置の開発」では、単一細胞分析の実現に向けた試料導入法としてドロプレット試料導入装置を開発した。ドロプレット試料導入装置では、溶液試料を噴霧ではなくドロプレットとして一粒ずつプラズマ中へ射出導入するため、微量試料を100%の導入効率で細胞を内包して分析することが可能である。本章では、ドロプレット試料導入装置の原理とともに従来法との比較を行った。

第4章「ドロプレット試料導入装置の基礎特性調査」では、本研究で開発した試料導入法をICP発光分光分析とICP質量分析装置に適用し、導入に関わるパラメータの調査を行った。

第5章「ドロプレット試料導入用脱溶媒装置の開発」では、プラズマに対して導入される液滴が大きいため、効率良くイオン化されていないと考え、プラズマに導入される前に、あらかじめ加熱し、その後冷却することによって導入される水蒸気の量を減らすことで、高感度化を実現した。

第6章「ドロプレット試料導入用信号取得方法」では、ドロプレット試料導入装置によって得られる過渡的な信号に適した信号取得方法を確立した。

第7章「細胞の直接導入分析」では、植物細胞をドロプレット試料導入装置を用いてプラズマ中に直接導入し、細胞中に含まれる微量元素の分析を行う。

第8章「結論」では、本論文で得られた結果をまとめ、ドロプレット試料導入装置を用いた質量分析システムが単一細胞分析に有効であることを示し、今後の展望を述べる。

参考文献

- [1] 安藤淳平, 古田直紀, 瀬戸昌之, 秋山堯, 環境の化学 (実用理工学入門講座), 日新出版 (1996).
- [2] Science special issue “Metals, Health and the Environment”, Science, 300, pp. 925-947 (2003).
- [3] K. Inagaki, N. Mikuriya, S. Morita, H. Haraguchi, Y. Nakahara, M. Hattori, T. Kinoshita, H. Saito, Speciation of protein-binding zinc and copper in human blood serum by chelating resin pretreatment and inductively coupled plasma mass spectrometry, Analyst, 125, pp. 197-204 (2000).
- [4] B. K. Mandal, Y. Ogra and K. T. Suzuki, Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-Inductively coupled argon plasma mass spectrometry, Toxicol. Appl. Pharmacol., 189, pp. 73-83 (2003).
- [5] Y. Shiobara, Y. Ogra and K. T. Suzuki, Animal species difference in the uptake of dimethylarsinous acid (DMAIII) by red blood cells, Chem. Res. Toxicol., 14, pp. 1446-1452 (2001).
- [6] NCI キャンサーブレティン, vol 9, Num 18, 米国国立癌研究所発行 (2012).
- [7] 学術俯瞰システムマニュアル, 東京大学工学系研究科総合研究機構 イノベーション政策研究センター作成
- [8] N. Shibata, Y. Kajikawa, I. Sakata, Detecting potential technological fronts by comparing scientific papers and patents, Foresight, 13, pp. 51-60 (2011).

第2章 誘導結合プラズマを用いた元素分析

2.1 緒言

近年、大気圧プラズマの応用例として表面処理技術が注目されつつあるが^[1]、微量元素分析の分野では40年以上前から大気圧アルゴン誘導結合プラズマ(ICP : Inductively Coupled Plasma)が使用されてきた。分析試料は高温の大気圧アルゴンプラズマ中に導入され、励起、イオン化される。励起原子の発光を分光する発光分析装置が1970年代に、差動排気を用いてイオンを真空中に導入して質量分析装置が1980年代に実用化され、現在でも広く使用されている。プラズマを用いた微量元素分析の応用分野は多岐にわたり、半導体産業では半導体や液晶ディスプレイの洗浄プロセス、環境計測では水、空気、土壌などの分析に一般的に使用されている。また、犯罪科学捜査や医療の分野においても威力を発揮している^[2]。現在、プラズマを用いた微量元素分析法として広く使われているのは、誘導結合プラズマ質量分析法(Inductively coupled plasma mass spectrometry: ICP-MS)と誘導結合プラズマ発光分析法(ICP-AES : Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)である。本章では、ICPの特徴と共に現在も進歩を続けている、ICPを用いた微量元素分析について記述する。

2.2 誘導結合プラズマの生成

プラズマとは原子が解離してイオンと電子が別々に存在する、電氣的に中性の高温の状態を意味する。誘導結合プラズマ(ICP)は、アーク、スパーク、ガス燃焼炎に代わる元素の発光分析用光源として開発された高温媒体である。微量元素分析に使用される誘導結合プラズマでは、直径2センチ程度の石英ガラス製のプラズマトーチに8~20 L/min のアルゴンを流し、その外周に配置したコイルに13.56, 27.12 もしくは40.68 MHz などの高周波電力を印加することで交流磁場を発生し、誘導電流によるジュール加熱で大気圧熱プラズマを生成、維持する。図2.1にアルゴンICPの点灯状態と温度分布を図2.2にアルゴンICPの電子密度を示す^[3]。

ICP を用いた分光分析では、まず分析試料はネブライザにより細かな霧となり、プラズマに導入されて、脱溶媒、気化、原子化、励起化、イオン化の諸過程が起きる。このとき、電流密度がプラズマ表面層で最大になり、このことによりICP が環状構造を形成する。したがって、分析試料はプラズマの中心軸上に導入され、試料中の元素の原子化、励起、イオン化が高効率に行われるとされている。ICP は無電極放電のために電極材質がプラズマ中に混入することがなく、高純度なプラズマを生成する事ができる。プラズマに関して最も重要な基本的な特性は、ガス温度 (T_g)、電子温度 (T_e) および電子密度 (n_e) である。さらに、アルゴンICPにおけるガス温度は4,500~8,000 K、電子密度は $1\sim 3\times 10^{15}\text{cm}^{-3}$ であり、高温かつ高密度のプラズマである。試料の滞留時間の長いプラズマ、すなわちプラズマと試料の接触時間が2~3 msのプラズマの場合には、一般的な測定条件下において、試料エアロゾルがプラズマ中に完全に気化、原子化し、同時に化学的および物理的な干渉は極めて小さくなる。これらの条件が分析に有利であるため、40年近くにわたって微量元素分析に使用されてきている。

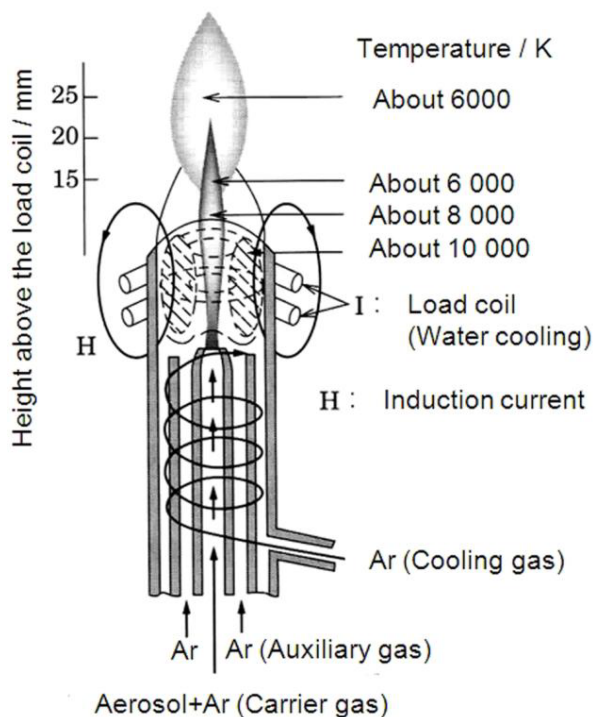


図2.1 アルゴンICP の断面の概略図

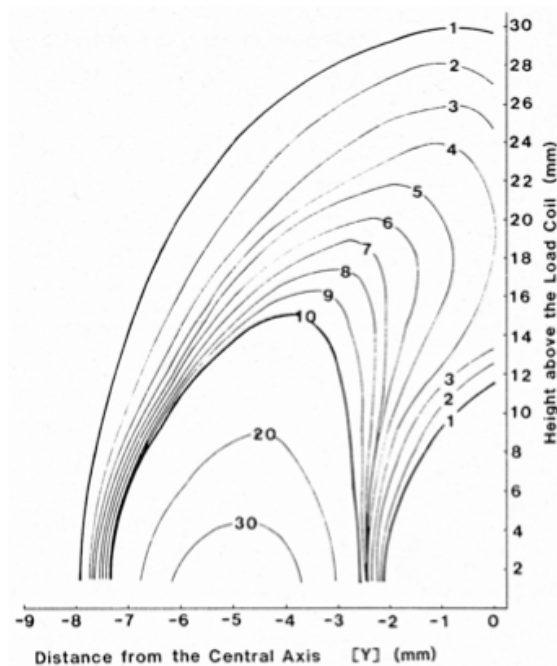


図2.2 アルゴンICPの電子密度分布

2.3 プラズマの基本特性

プラズマの基本特性は、原子、イオン、電子などの密度と、それらの粒子の持つエネルギーで決まる。これらはプラズマパラメータと呼ばれ、気体の種類、圧力、入力電力など、プラズマの生成法に依存するプラズマ外部のパラメータによって制御される。したがって、これらの制御パラメータとプラズマパラメータの関係を明らかにし、目的に応じた特性のプラズマを生成・制御することは、プラズマの基礎的研究や産業応用にとって非常に重要である。プラズマの測定法に関する研究は、プラズマの生成法とともに古くから研究され、現在までに様々な手法が開発されている。それらは、プラズマ特有の導電性や光の放射を利用した方法などが多い。プラズマの導電性を利用した測定法は、プラズマ中にプローブ電極や熱電対などの検出器に相当するものを導入してプラズマパラメータを得る方法で、プラズマに測定系が物理的に直接接触することから直接測定法とも呼ばれる。一方、プラズマの光の放射を利用した測定法は、光の放出と吸収を分光器などにより測定してプラズマパラメータを得る方法で、プラズマと測定系が物理的に接触することがないので間接測定法とも呼ばれる。分光測定によるプラズマパラメータ算出の多くは、簡単のためにプラズマがLTE

であることを前提としている。実際に測定されたヘリウムICP やアルゴンICPの温度も、低気圧プラズマなどと比較するとそれぞれのオーダーはほぼ同じであるから大雑把にはLTEが成り立つプラズマであるといえるが、厳密にはLTEであるとはいえない。しかし、大気圧ICP の測定において分光法による温度および密度測定法は、すでに数多く報告されている他のプラズマ源とのプラズマパラメータの比較を行うには十分であるといえる^[4,5]。分光法とは、プラズマパラメータを分光器からの信号などを頼りに導き出すプラズマの間接測定法の総称である。したがって、その情報源となる光によって分光法はさらに、プラズマ自体の光の放出と吸収を測定する「受動的」な測定方法と、プラズマにレーザー光、電磁波、中性粒子などを入射し、そこで起こる相互作用から生じる光を測定する「能動的」な測定方法に分類される。前者は天体プラズマの観測などにおいて、比較的古くから用いられ発展した方法であり、後者は近年発展した手法で、レーザーを光源とするレーザー誘起蛍光法 (Laser Induced Fluorescence, LIF) やトムソン/ レーリー散乱法 (Thomson/Rayleigh scattering) などがある^[4,5]。特にレーザーを用いた手法では、他の方法では得られない検出感度、空間分解能、時間分解能を得られることもある。しかし、分光器などの測定系が場合によっては複雑になり、非常に大掛かりで高額な測定装置が必要となるために、安易に使用することはできない。本節では、プラズマの受動的分光測定法に関する理論について述べる。

2.3.1 大気圧プラズマの分光測定

本研究で用いる大気圧ICP をはじめ、通常の実験室規模のプラズマは光学的に薄く、熱力学的平衡は保たれていない。しかし、このような光学的に薄いプラズマであっても、原子密度や電子密度が十分に高く、衝突による励起や脱励起の発生頻度が光に吸収や自然放出による遷移の発生頻度よりもはるかに大きくなると、プラズマは放射過程に依存することなく、衝突過程だけで熱平衡状態を維持できる。このようなプラズマでは、温度や密度が空間的に一様ではないとしても、局所的な熱力学的平衡(Local hermodynamic Equilibrium, LTE) が成り立つので、熱平衡プラズマの理論が適用できる。熱平衡状態のプラズマでは、 z 価イオンの準位 i の占有密度 $n_z(i)$ は次式で表されるマクスウェル-ボルツマン分布(Maxwell-Boltzmann distribution) に従う^[6]。

$$\frac{n_z(i)}{n_z(1)} = \frac{g_z(i)}{g(1)} \exp\left\{-\frac{E_z(i)}{kT}\right\} \dots\dots\dots (2.1)$$

ここで、 $g_z(i)$ は準位 i の統計的重率、 $E_z(i)$ は z 価イオンの準位 i の基底状態からのエネルギー、 k はボルツマン定数、 T は温度を表す。また、 z 価のイオン密度は Saha の熱電離式

$$n_e \frac{n_z}{n_{z-1}} = 2 \frac{B_z}{n_{z-1}} \left(\frac{2\pi m_e kT}{h^2}\right)^{\frac{3}{2}} \exp\left\{-\frac{X_{z-1}(1)}{kT}\right\} \dots\dots\dots (2.2)$$

で表される。ここで、 n_e は電子密度、 $X_{z-1}(1)$ は $(z-1)$ 価から z 価へのイオンの電離エネルギー、 m_e は電子の質量、 h はプランク定数、 B_z は分配関数で、

$$B_z(T) = \sum_i g_z(i) \exp\left\{-\frac{X_{z-1}(1)}{kT}\right\} \dots\dots\dots (2.3)$$

である。したがって、 $(z-1)$ 価イオンの励起準位の占有密度は、次式の Saha-Boltzmann の式で表すことができる。

$$n_e \frac{n_z}{n_{z-1}} = 2 \frac{g_z(1)}{g_{z-1}(i)} \left(\frac{2\pi m_e kT}{h^2}\right)^{\frac{3}{2}} \exp\left\{-\frac{X_{z-1}(1)}{kT}\right\} \dots\dots\dots (2.4)$$

このように、熱平衡プラズマでは非平衡プラズマなどと比べると、理論的取り扱いを著しく単純化することが可能である。プラズマには、励起温度 (T_{exc})、電子温度 (T_e)、イオン化温度 (T_{ionize})、ガス温度 (T_{gas})、回転温度 (T_{tor}) など、いくつかの温度が定義されている。LTE が成り立つときにはこれらのすべての温度は一致する。しかし、実際の大気圧 ICP では LTE が成立していないために、これらの温度は完全に一致することはなく、 $T_e, T_{ionize} > T_{exc} > T_{gas}, T_{rot}$ となることが多い。以下に具体的な温度測定方法と電子密度の測定法を記す^{[4]-[7]}。

励起温度 (T_{exe})

プラズマ中の中性原子において、異なるエネルギー準位の原子密度分布がボルツマン分布にしたがっていると仮定するとき、式(2.1) を書き直すと、

$$\frac{n_i}{n} = \frac{g_i(i)}{B} \exp\left\{-\frac{E_i}{kT}\right\} \dots\dots\dots (2.5)$$

$$I_{ij} = n_i A_{ij} h\nu \quad \dots\dots\dots(2.6)$$

ここで、 A_{ij} は準位*i*から*j*への遷移確率、 ν は放射される光の振動数である。したがって、式(2.5)および式(2.6)より、

$$I_{ij} = n \frac{g_i}{B} A_{ij} h\nu \exp\left(-\frac{E_i}{kT}\right) \quad \dots\dots\dots(2.7)$$

となる。さらに式 (2.7) を変形して両辺の対数をとると、

$$\log\left(\frac{I_{ij}}{g_i A_{ij} \nu}\right) = c - \frac{E_i}{kT} \quad \dots\dots\dots(2.8)$$

が得られる。したがって、 g_i 、 A_{ij} 及び E_i が既知である同一粒子の複数のスペクトル線について相対強度を測定し式(2.8)の左辺を縦軸に、 E_i を横軸にとると直線が得られ、その傾きが $-\frac{1}{kT}$ に比例することから、温度*T*を求めることができる。プラズマが熱平衡状態であるかどうかに関わらず、同種粒子のエネルギー準位間ではボルツマン分布が成立していることが多く、プロットした点はほぼ直線上に位置するため、 T_{exc} を規定することができる。また、2本のスペクトル強度比のみを用いるときは特に2線法または2線強度法と呼ばれる。表 2.1にHeのスペクトル、表 2.2にアルゴンのスペクトルを示す。また、表 2.1、表 2.2の各遷移確率を用いた励起温度の測定例を図 2.3及び図 2.4に示す。が得られる。ここで、 n_i は準位*i*の粒子密度、 n は粒子の密度、 $g_i(i)$ は準位*i*の統計的重率、 E_i は準位*i*の励起エネルギー、 B は分配関数である。また、プラズマが空間的に薄いと仮定する、プラズマ中の中性粒子において準位*i*から準位*j*への遷移によって放射される光の単位時間あたりの強度 I_{ij} は以下のように表される。

表 2.1 Ar(I)のスペクトル

λ (nm)	E_i (cm ⁻¹)	g_i	A_{ij} (10 ⁻⁸ sec ⁻¹)
425.118	116660	3	0.0089
425.936	118871	1	0.3665
426.629	117184	5	0.0265
427.217	117151	3	0.0688
430.010	116999	5	0.0318
433.356	118469	5	0.0506
433.535	118459	3	0.0308
434.545	118408	3	0.0273

表 2.2 He(I)のスペクトル

λ (nm)	E_i (cm ⁻¹)	g_i	A_{ij} (10 ⁻⁸ sec ⁻¹)
402.62	193917	15	0.0089
447.15	191445	15	0.3665
471.32	190298	3	0.0265
492.193	191447	3	0.0688
501.568	186210	5	0.0318

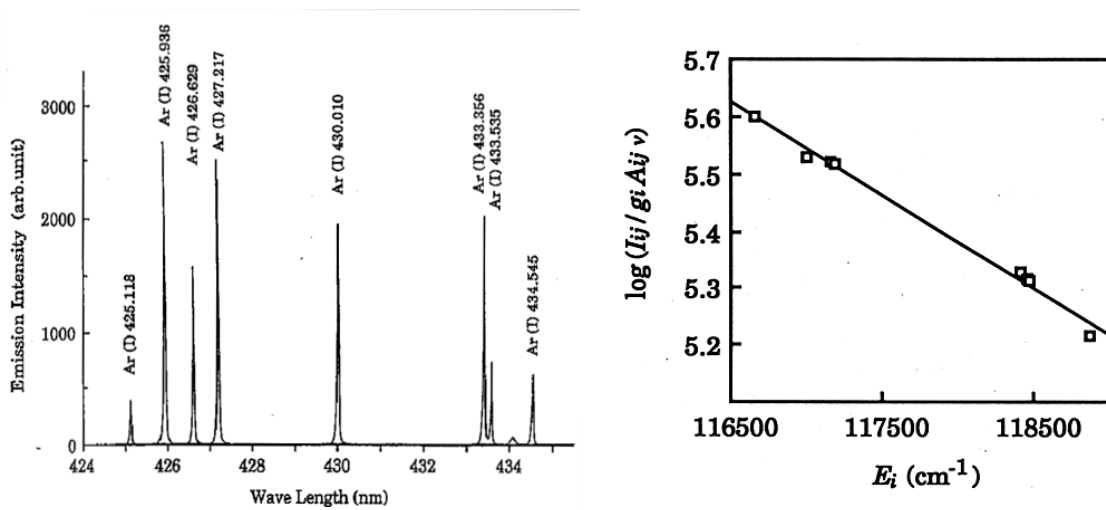


図 2.3 Ar励起温度のボルツマンプロット

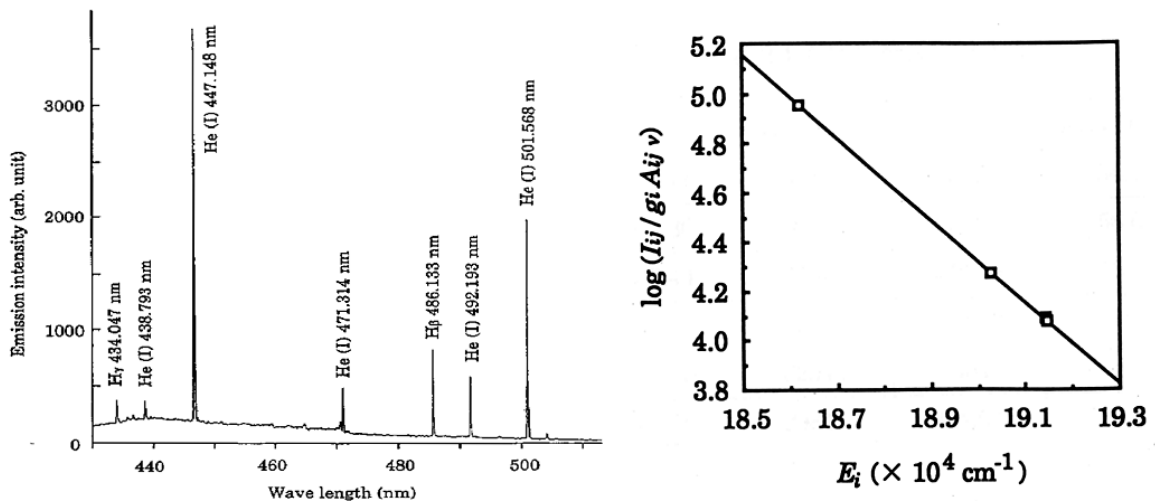


図 2.4 He励起温度のボルツマンプロット

イオン化温度(T_{ion})

プラズマ中でLTEが成立し、且つ2価以上のイオンが無視できる程度に少ないとき、原子とその1価のイオンの平衡は次式(Saha-Eggertの式)に従う。

$$\frac{n_e n^+}{n^0} = 2 \frac{B^+}{B^0} \left(\frac{2\pi m_e kT}{h^2} \right)^{\frac{3}{2}} \exp\left\{ -\frac{V}{kT} \right\} \quad \dots\dots\dots(2.9)$$

n^0 は原子密度、 n^+ は基底状態のイオン密度、 B^+ イオンの分配関数、 B^0 は中性原子の分配関数、 V はイオン化エネルギーを示している。

式(2.9)を用いて電子数密度と温度の関係を求めるために、Daltonの法則、電気的中性が成立していると仮定すると、Daltonの法則は

$$P = kT(n_1 + n_e + n^+ + \sum_i n_i) \quad \dots\dots\dots(2.10)$$

となる。 n_1 は基底状態の原子密度、 n_i は準位*i*の電子密度である。ここで、各密度に $n_1 \gg n_e, n^+, n_i$ という関係が成り立っているとすると、式(2.10)を

$$P = n_1 kT = \frac{n_i kT}{\exp\left(-\frac{E_i}{kT}\right)} \dots\dots\dots (2.11)$$

と書き直すことができる。また、電気的中性が成り立っているとすると、

$$n_e = n^+ \dots\dots\dots (2.12)$$

となる。したがって、式(2.11), (2.12)とから式(2.9)は次のように変形できる。

$$n_e^2 = 2 \frac{P}{kT} \frac{B^+}{B^0} \left(\frac{2\pi m_e kT}{h^2} \right)^{\frac{3}{2}} \exp\left\{-\frac{V}{kT}\right\} \dots\dots\dots (2.13)$$

電子密度が測定できれば、式(2.13)から温度を計算できる。この温度をイオン化温度 T_{ion} という。この式を計算する際に分配関数は、Galan らによる多項式近似により計算することができる。すなわち、

$$B(T) = a + b \left(\frac{T}{10^3}\right) + c \left(\frac{T}{10^3}\right)^2 + d \left(\frac{T}{10^3}\right)^3 + e \left(\frac{T}{10^3}\right)^4 + f \left(\frac{T}{10^3}\right)^5 \dots\dots\dots (2.14)$$

に温度を代入すれば分配関数を求めることができる。式(2.14)の各定数はAr(I) で $a = 1.0000$, Ar(II) では $a = 4.8089$, $b = 4.6545 \times 10^{-1}$, $c = -7.8367 \times 10^{-2}$, $d = 4.7063 \times 10^{-3}$, He(I)では $a = 1.0000$, He(II)では $a = 2.0000$ である。式(2.13), (2.14)を用いて導出した、大気圧ヘリウムプラズマ, 大気圧アルゴンプラズマそれぞれにおける電子密度とイオン化温度の関係を図 2.5と図 2.6に示す。計算は、気圧 $P = 1.0 \times 10^5 (Pa)$ のもとで行い、イオン化エネルギーはヘリウム, アルゴンについてそれぞれ $V = 24.587, 15.759 (eV)$ とした。

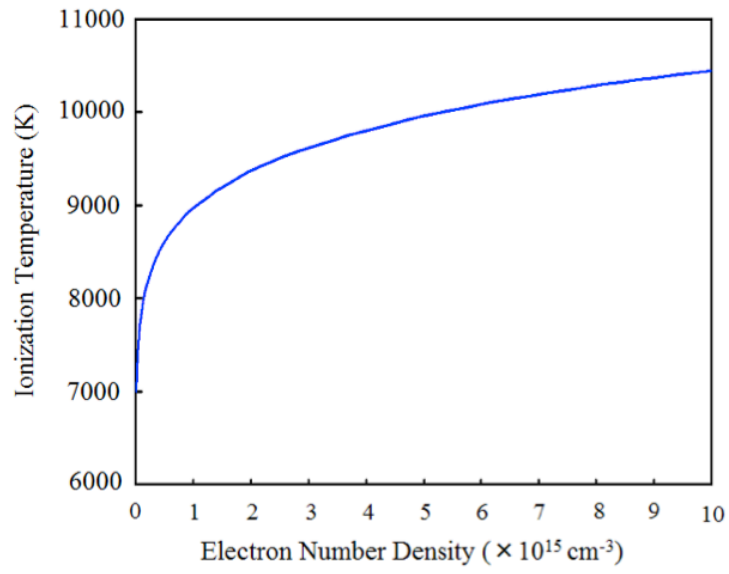


図 2.5 He 励起温度のボルツマンプロット

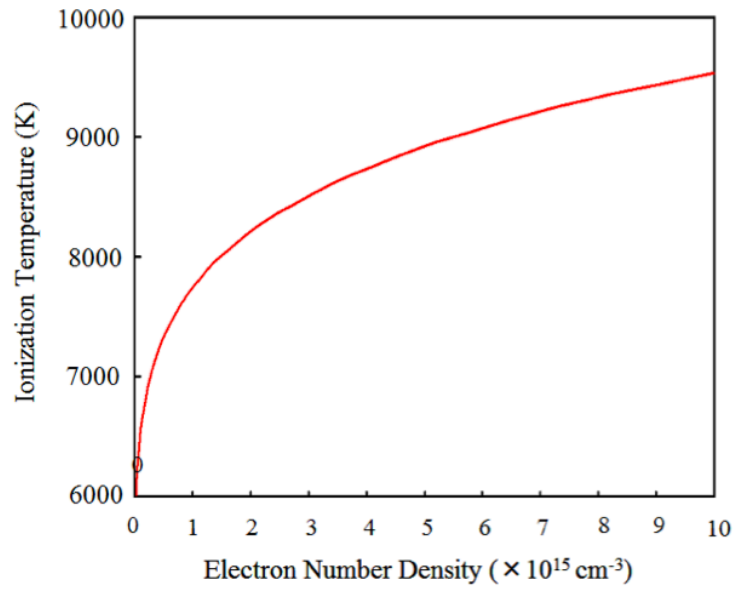


図 2.6 He 励起温度のボルツマンプロット

電子密度

電子密度は温度とともにプラズマの重要な特性であり、その測定には種々の測定法が用いられている。ここでは、温度の低いプラズマに適用できる、スペクトル線のシュタルク広がりを用いた電子密度の測定法について述べる。孤立した一つの原子の場合、束縛電子は原子核の周りの一定の軌道を運動しているが、プラズマの中では発光原子の近くに存在する多数の電子やイオンの作る微視的な電界の影響を受け、電子の軌道は複雑に変化する。この結果、エネルギー準位の広がりやずれを生じ、放射される線スペクトルに広がり (Stark broadening) や波長のずれ (Stark shift) が生じる。プラズマの温度が低く、高速の電子衝突よりも動きの遅いイオンの影響が大きい場合、シュタルク効果の取り扱いにはイオンの運動を無視してイオンの作る静的な電界が支配的と考える準静的近似を用いる。この場合、シュタルク効果は線形的となる。このとき、電場 E との相互作用で起こる粒子のエネルギー変化は、

$$\Delta W \propto E \quad \dots\dots\dots(2.15)$$

で表すことができる。また、電子密度が n_e のとき、各イオン間の平均間隔は

$$\frac{4}{3}\pi\bar{r}n_e^3 = 1 \quad \dots\dots\dots(2.16)$$

より

$$\bar{r} = \left(\frac{3}{4\pi n_e}\right)^{1/3} \quad \dots\dots\dots(2.17)$$

で与えられるので、この平均間隔に対応する平均電界は

$$\bar{E} = \frac{|q_e|}{\bar{r}^2} \propto |q_e| n_e^{2/3} \dots\dots\dots(2.18)$$

となる。よって、式(2.15)および式(2.17)より

$$\Delta W \propto n_e^{\frac{2}{3}} \dots\dots\dots(2.19)$$

が得られる。ここでシュタルク広がり $\Delta\lambda_s$ が、エネルギー変化に対応することを考えると

$$\Delta\lambda_s \propto n_e^{\frac{2}{3}} \dots\dots\dots(2.20)$$

すなわち

$$n_e \propto \Delta\lambda_s^{\frac{3}{2}} \dots\dots\dots(2.21)$$

を求めることができる。現実のプラズマは電子の熱運動のため、式(2.21)は厳密には成り立たず、次式に示す関係が Moselhy らによって理論計算されており^[1]、スペクトルのシュタルク広がり $\Delta\lambda_s$ を用いることで、電子密度を測定することができる。ここで $\Delta\lambda_s$ の単位は[nm]とした。

$$n_e = 1.03 \times 10^{16} (\Delta\lambda_s)^{1.488} \dots\dots\dots(2.22)$$

測定には、スペクトル広がりが比較的大きい水素の β 線を用いることが多い。H $_{\beta}$ 線はバルマー系列の $n = 4$ から $n = 2$ の間の遷移によって放射されるスペクトルで、中心波長は 486.13 nm である。ところが、実際に測定されるスペクトルの形状はシュタルク広がり以外の広がりも含まれているため、他の広がりによる影響の補正が必要となる。実験的に観測されるスペクトル線の広がり要因には次のようなものがある^{[7][8]}。

1. 分光器の分解能による装置関数 $\Delta\lambda_I$
2. 発光粒子の熱運動に起因するドップラー広がり $\Delta\lambda_D$ (ガス温度 T_g に依存)
3. 発光粒子と周囲の粒子の衝突に起因する圧力広がり $\Delta\lambda_P$ (ガス温度 T_g と圧力 p 依存)
4. 発光粒子と電子との相互作用に起因するシュタルク広がり $\Delta\lambda_S$ (電子密度 n_e と電子温度 n_T に依存)

通常、1. と 2. はガウス型(Gaussian)関数で表され、二つの効果を合わせた関数の半値全幅(Full Width at Half Maximum: FWHM)は、以下のように与えられる。

$$\Delta\lambda_G = (\Delta\lambda_D^2 + \Delta\lambda_I^2)^{\frac{1}{2}} \quad \dots\dots\dots(2.23)$$

一方、3. と 4. はローレンツ型(Lorentzian)関数で表され、これら二つの効果を考慮に入れた関数の FWHM は、以下のように表される。

$$\Delta\lambda_L = \Delta\lambda_P + \Delta\lambda_S \quad \dots\dots\dots(2.24)$$

よって、一般に測定される、シュタルク広がり以外の広がりも含まれたスペクトルの波形は、ガウス関数とローレンツ関数の合成からなるフォークト(Voigt)関数

$$V(\lambda; \alpha, \gamma) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\lambda'; \alpha) L(\lambda - \lambda'; \gamma) d\lambda' \dots\dots\dots(2.25)$$

によって表され, その FWHM は近似的に

$$\Delta\lambda_V \approx \frac{\Delta\lambda_L}{2} + \left(\frac{\Delta\lambda_L^2}{4} + \Delta\lambda_G^2 \right)^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots(2.26)$$

で与えられる。ここで $G(\lambda; \sigma)$ はガウス型関数であり

$$G(\lambda; \alpha) = \exp \left[-4 \ln 2 \left(\frac{\lambda - \lambda_0}{2\sigma(2 \ln 2)^{1/2}} \right)^2 \right] \dots\dots\dots(2.27)$$

で表され, その FWHM は $\Delta\lambda_G = 2\sigma(2 \ln 2)^{1/2}$ である。一方, $L(\lambda; \gamma)$ はローレンツ型関数であり

$$L(\lambda; \gamma) = \frac{1}{1 + 4 \left(\frac{\lambda - \lambda_0}{2\gamma} \right)^2} \dots\dots\dots(2.28)$$

で表され, その FWHM は $\Delta\lambda_L = 2\gamma$ である。

大気圧弱電離プラズマの場合は, ドップラー広がり $\Delta\lambda_D$, 圧力広がり $\Delta\lambda_p$ は十分に小さく, 電子密度の測定に際しては無視できるので, 装置関数 $\Delta\lambda_I$ が既知となれば, 式(2.22)のディコンボリューションにより, シュタルク広がり $\Delta\lambda_S$ を求められる。そして, この求めた値を式(2.19)に代入することで, 電子密度の算出が可能となる。

2.4 ICPを用いた元素分析への応用

原子発光分析法 (AES: atomic emission spectrometry) は最も古い原子スペクトルによる多元素分析技術である。全ての元素は適当な条件下でその元素に特有な発光スペクトルを放出するため、未知試料を適当な条件下に置き、そこから放たれる発光を観測することで、試料中の元素を判別・定量することができる。一方、質量分析法 (MS: mass spectrometry) は、原子を正あるいは負の電荷を持つイオンにし、それらを質量と電荷の比 (m/z) によって分離し、検出する多元素同時分析技術である。AESと同じく、未知試料を適当な条件下に置き、そこで発生するイオンを検出することで、試料中の元素を判別・定量することができる。しかし、全ての元素を最適条件の下で励起・イオン化できるような励起・イオン源は存在しない。そのため、一般には同一の励起・イオン源が試料を原子化し、また試料中の原子を励起・イオン化するために利用される。古典的な励起源として、水素-酸素フレイムやアセチレン-酸素フレイムをはじめとするフレイム (化学炎)、アーク放電、スパーク放電を使う方法がよく利用されているが、その応用範囲はそれほど広くなく、現在ではナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウムなど、アルカリ金属および励起が容易な元素の分析にとどまっている。フレイムよりも優れた励起・イオン源として注目されたのがプラズマである。プラズマはイオン、電子、中性粒子を含む電氣的に中性で、大きな電離度を持った気体である。また、従来の励起源である水素-酸素フレイムが3000 K、アセチレン-酸素フレイムが3300 Kであるのに対し、一般に使われるプラズマは7000 K~8000 Kと圧倒的に高いガス温度と励起温度を有し、フレイムよりも反応性が小さい化学的雰囲気となっている。そのため、フレイムでは困難であった耐火性の元素も容易に励起・イオン化することができるのである。

ICP はその生成や扱いが簡単なほか、大気圧下で生成できる高温高密度なプラズマのため、分析用途に非常に適している。この優れた励起・イオン源である誘導結合プラズマを原子発光分析法の励起源として用いたのが誘導結合プラズマ原子発光分析法 (ICP-AES)、そして、質量分析法のイオン源として用いたのが誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) である。

2.4.1 誘導結合プラズマ発光分析装置

発光分析とは、励起源に分析試料を導入し、そこから発せられる光を分光分析することによって、定量・定性分析を行う方法である。図2.7に示す^[6] ように、ICP を励起源に使用したICP 発光分光分析装置は、分析試料導入部、ICP、分光測光部、制御・演算・記録部によって構成される。

ICP 発光分析法の長所としては、(1) 高感度 (多くの金属でng/mLレベル) , (2) 高精度 (RSD 0.2~3%) , (3)一部のハロゲンと非金属以外のほとんどすべての元素を分析可能, そして(4)幅広いダイナミックレンジ(4~5桁以上)などがあげられる。溶液試料はネブライザと呼ばれる霧吹き器によって噴霧され、微少な霧となってプラズマ中に導入される。気体試料の場合は、ヒ素、セレン、スズ、ゲルマニウム、アンチモンなどの水素化物を溶液から発生させてアルゴンガスとともにプラズマ中に導入する方法が用いられている。検出下限値は、アルミニウム (396.152 nm), リン (213.618 nm), 硫黄(180.6 nm) においてそれぞれ5 ng/mL, 20 ng/mL, 20 ng/mL である^[10]。

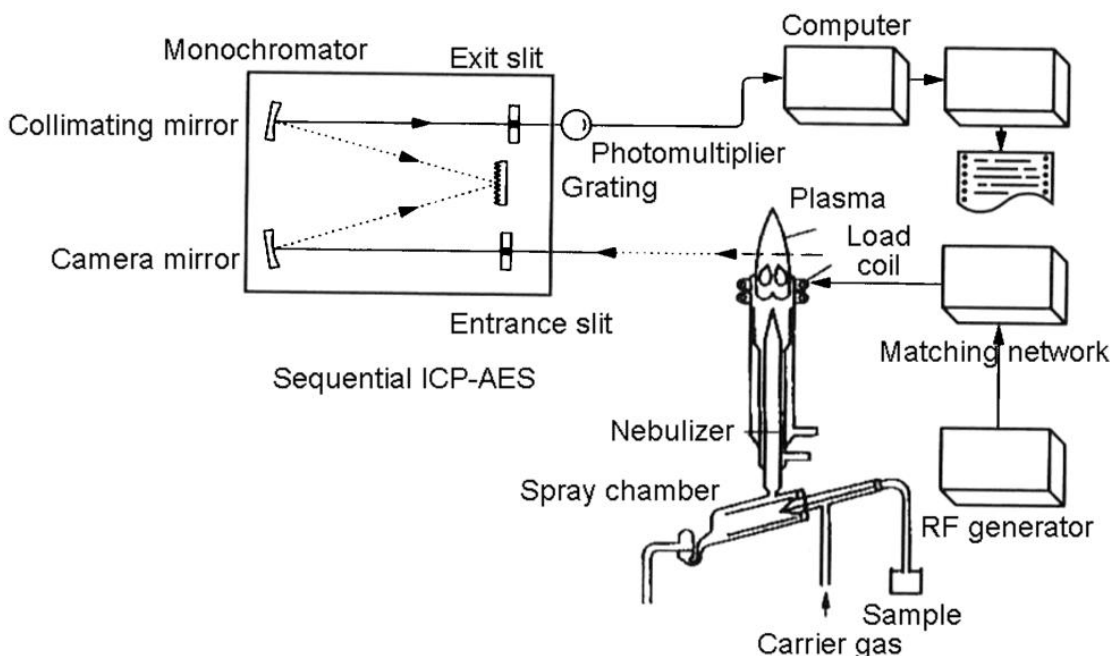


図2.7 ICP-AES 基本構成

2.4.2 誘導結合プラズマ質量分析法

質量分析とは、無機あるいは有機化合物をイオン化し、生成したイオンを質量電荷比 (m/z) で分離して、各々の m/z のイオン量を測定することで定性および定量分析する方法である^[11]。ICP をイオン源に使用したICP 質量分析装置は、分析試料導入部、ICP、差動排気部、質量フィルタ部、イオン検出部から構成される(図2.8)。ICP に導入された試料は原子化、イオン化され、 10^{-5} Torr 程度の高真空中に導入される。その後、四重極質量分析器や二重収束型質量分析によって質量フィルタリングし、二次電子増倍管などのイオン検出器によって計数される。

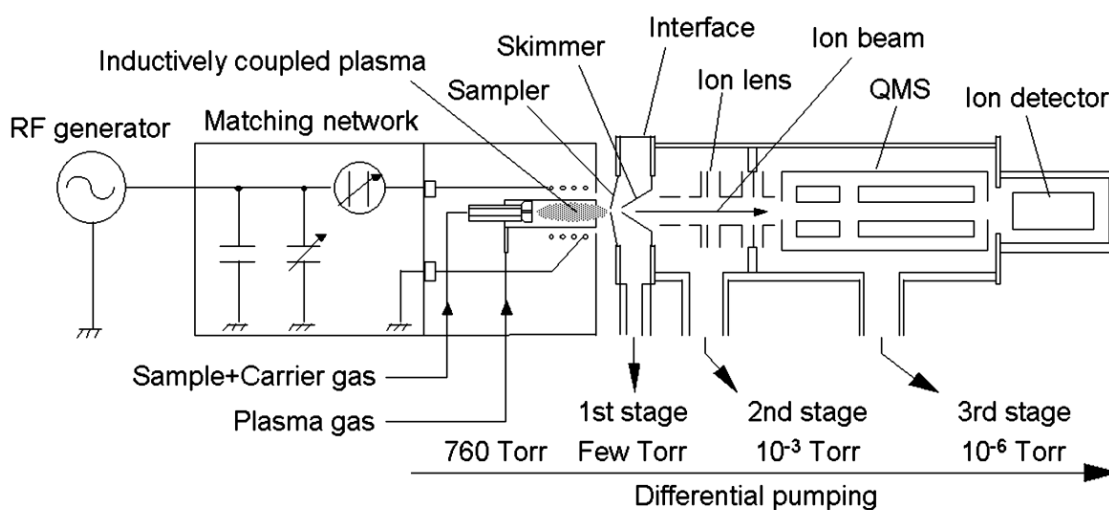


図2.8 四重極型 ICP-MS の基本構成

市販のICP質量分析装置の試料導入系では、ネブライザが広く用いられていたが、試料導入効率は1~5 %程度と大変低いことが問題であった。そのため導入効率を改善する直接導入ネブライザ(Direct Injection Nebulizer, DIN)^[12,13,14]や、直接導入高効率ネブライザ(Direct Injection High Efficiency Nebulizer, DIHEN)^[15,16,17]などが開発されてきた。近年、プラズマ中に1 nL以下の溶液試料を一滴ずつ噴出して導入する、単分散型のドロプレット試料導入装置が注目を集めている^[18,19,20]。かつて単分散型のネブライザはプラズマ内で噴霧された試料がどのようにイオン化されるかを調べるために用いられてきたが、現在ではドロプレット中にナノ粒子や細胞を内包してプラズマ中に導入し、ナノ粒子や細胞を個別に分析することが期待されている。C.C. Garciaらによって、ICP-OESによりドロプレット中に包含したナノ粒子の測定が行われ、その検出

下限値は粒子径にして数百nmだということが報告された。単一細胞を対象とした従来は多数の粒子や細胞の平均情報しか得られなかったのに対し、個別の分析が実現できれば、大気粉塵の起源の解明、ガンやアルツハイマーの発病原因の解明、iPS細胞の分化過程の解明などに利用できると考えられる。

2.5 結言

本章では、微量元素分析の分野で広く利用されている誘導結合プラズマの生成法や基礎特性、各種温度および電子密度の測定法について述べ、発光分光分析、質量分析の原理についても説明した。3章では、単一細胞分析のために開発したドロプレット試料導入装置とその利用法について説明する。

参考文献

- [1] 沖野晃俊, 佐々木良太, 永田洋一, 重田香織, 岩井貴弘, 宮原秀一, 大気圧マルチガスプラズマ源と産業の応用, プラズマ核融合学会誌, 86, 1, pp. 40-42 (2010).
- [2] 鈴木康弘, プラズマを用いた超高感度元素分析 7. 犯罪捜査への応用, プラズマ核融合学会誌, 78, 7, pp. 659-665 (2002).
- [3] 上本道久, ICP 発光分析・ICP 質量分析の基礎と実際, オーム社出版局 (2008).
- [4] 原口紘き, ICP発光分析の基礎と応用, 講談社サイエンティフィック (1986).
- [5] 山本学, 村山精一, プラズマの分光計測, 日本分光学会測定法シリーズ29学会出版センター (1995).
- [6] 沖野晃俊, 大気圧気流安定化無電極プラズマに関する研究, 学位論文, 東京工業大学 (1993).
- [7] K. E. Lawrence, G. W. Rice and V. A. Fassel, Direct liquid sample introduction for flow injection analysis and liquid chromatography with inductively coupled, argon plasma spectrometric detection, *Anal. Chem.*, 56, 2, pp. 289-292 (1984)
- [8] Montaser (Ed.), D. W. Golightly (Ed.), *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, Wiley-VCH, New York (1987).
- [9] 高橋務, 村山精一, 液体試料の発光分光分析-ICP を中心として, 日本分光学会測定法シリーズ5, 学会出版センター (1983).
- [10] W. L. Wiese, M. W. Smith and B. M. Glennon, Atomic transition probabilities (H through Ne - A critical data compilation), In *Natl. Stand. Ref. Data Ser.*, Natl. Bur. Stand., NSRDS-NBS 4, 1, US Government Printing Office, Washington, DC (1966).
- [11] A. Montaser, J. A. McLean, J. M. Kacsir, U.S. Patent, No.6, 166, 379 (1997).
- [12] J. A. McLean and A. Montaser, A Direct Injection High-Efficiency Nebulizer for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 70, 5, pp. 1012-1020 (1998)
- [13] K. Kahen, A. Strubinger, J. R. Chirinos and A. Montaser, Direct injection high efficiency nebulizer-inductively coupled plasma mass spectrometry for analysis of petroleum samples, *Spectrochim. Acta Part B*, 58, 3, pp. 397-413 (2003).

- [14] S. C. K. Shum, S. K. Johnson, H. M. Pang and R. S. Houk, Spatially Resolved Measurements of Size and Velocity Distributions of Aerosol Droplets from a Direct Injection Nebulizer, *Appl. Spectrosc.*, 47, 5, pp. 575–585 (1993).
- [15] D. R. Wiederin, R. S. Houk, Spatially resolved measurements of size and velocity distributions of aerosol droplets from a direct injection nebulizer, *Appl. Spectrosc.*, 47, 5, pp. 575–585 (1993).
- [16] A. Montaser, J. A. McLean and J. M. Kacsir, U.S. Patent, 6, 166, 379, Dec. (1997)
- [17] K. Kahen, A. Strubinger, J. R. Chirinos and A. Montaser, Direct injection high efficiency nebulizer–inductively coupled plasma mass spectrometry for analysis of petroleum samples, *Spectrochim. Acta Part B*, 58, 3, pp. 397–413 (2003).
- [18] J. L. Todoli and J. M. Mermet, Evaluation of a direct injection high–efficiency nebulizer (DIHEN) by comparison with a high–efficiency nebulizer (HEN) coupled to a cyclonic spray chamber as a liquid sample introduction system for ICP–AES, *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, 5, pp. 514–520 (2001).
- [19] F. J. Barry, E. Bernard and J. Raymond, Monodisperse Dried Microparticulate Injector for Analytical Instrumentation, *Anal. Chem.*, 66, 5, pp. 685–691 (1994).
- [20] S. Groh, C. C. Garcia, A. Murtazin, V. Horvatic and K. Niemax, Local effects of atomizing analyte droplets on the plasma parameters of the inductively coupled plasma, *Spectrochim. Acta Part B*, 64, 3, pp. 247–254 (2009).

第3章 単一細胞分析用ドロプレット試料導入装置の開発

3.1 緒言

生命科学の研究領域として、核酸(DNA および RNA)に関するゲノミクス(genomics)や、タンパク質に関するプロテオミクス (proteomics) が注目されてきた。ゲノムの合成には亜鉛を含むタンパク質(酵素)である DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼが関与している。また、タンパク質 (プロテオーム;proteome) の生理機能、すなわち代謝や合成の発現には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、メタロミクス (Metallomics) という学問領域が提唱された。その際、このメタロミクスの主要な10の研究課題が設定されたが、その中の第一に挙げられた課題が「生物(生体)試料中の金属元素の濃度と分布の測定～生物細胞1個の全元素分析」である^[1]。加えて、近年発展がめざましいマイクロチップを用いた化学反応などでは、試料の収量が極端に少ないのが一般的である。これらの分野では、特定の生体細胞1個中、あるいは微粒子1個中といった微量試料に含まれる元素の定性・定量への関心が高まっている。

現在、元素分析の分野において、アルゴン誘導結合プラズマ (Ar Inductively Coupled Plasma; Ar-ICP)を原子発光源やイオン化源とした、誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP Atomic Emission Spectrometry; ICP-AES) や誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP Mass Spectrometry; ICP-MS)は多元素の高感度同時分析が可能であるため、広く用いられている^[2, 3, 4]。しかし、従来の試料導入法では粒径の小さなミストのみが選別されプラズマ中に導入されるため、試料の導入効率は1~2%と低く、測定には1 ml/min程度の比較的多くの試料が必要であった。そのため、微粒子や細胞などの微量試料を分析するには適していなかった。導入効率を改善するため、直接導入ネブライザ (Direct Injection Nebulizer; DIN)や、直接導入高効率ネブライザ (Direct Injection High Efficiency Nebulizer; DIHEN)などが開発されてきた。そこで、本研究では、汎用的な分析装置とは全く異なった、微量試料のための高感度分析装置の開発を行ってきた。溶液試料を従来のように噴霧、すなわち大量に霧化するのではなく、プラズマ中に試料液滴を一滴ずつ噴出する、ドロプレット試料導入装置 (Droplet

Direct Injection Nebulizer; D-DIN) を開発した。ドロプレット試料導入装置では、数 100 pL 程度の液滴試料 (ドロプレット) を任意のタイミングで一滴ずつ噴出し、プラズマの中心軸上に直接導入する。溶液試料を直接プラズマに導入するため、導入効率は 100 %となる。また、間欠的にプラズマの中心軸上のみを試料を導入するため、周囲のプラズマの温度を著しく低下させないという特徴を持つ。さらに、試料を時間的、空間的に圧縮した状態でプラズマ中に導入できるため、使用試料量あたりの分析感度の飛躍的な向上が期待できる。本章では、開発したドロプレット試料導入装置と従来法との比較について述べる。

3.2 従来の液体試料導入法

3.2.1 ニューマティックネブライザとスプレーチャンバ

現在の元素分析にはさまざまな試料導入法が利用されているが、あらゆる試料にわたり、日常分析に使える普遍的な方法は未だ開発されていない。プラズマ中への試料の導入は、通常、気体、液体、固体のいずれかの状態で行われている。気体試料導入はプラズマ中での脱溶媒 (溶媒を蒸発・気化させる) の過程を必要としないため、より効率的に原子化、励起、イオン化でき、感度と検出限界を向上させることができる^[2, 4]。しかし、多くの試料は液体または固体の状態で存在しており、分析対象を容易には気体に変えられない場合もあるため実用的ではない。固体導入法は試料処理時間を短縮でき、試薬などによるコンタミネーションが小さいという利点がある。また、溶媒が存在しないため、溶液に由来する分子イオンのスペクトル干渉が起こらないが、再現性が低くコストがかかるといった欠点がある。さらに、適切な標準物質がないことから、定量分析が困難であるため、固体試料分析の可能性は制約されたものとなっている。液体試料導入法は試料の取り扱い、希釈、定量のための校正が容易なことから、優れた測定精度と正確さが得られる導入法である。このような理由により、様々な導入法の中で液体試料導入法が最も一般的に用いられている^[5, 6, 7]。

一般的に、溶液をプラズマ中に導入する際、ニューマティックネブライザが多く利用される。ニューマティックネブライザは高速気流を液体に触れさせることで、液体試料を噴霧する。噴霧されて液滴となった試料は、スプレーチャンバと呼ばれる装置で小さ

い液滴のみ選別されて、プラズマへと導入される。図 3.2 に典型的なニューマティックネブライザである同軸型ネブライザの構造を示す。外側の管にガスを流し、内側の細管に溶液を流す。先端にある小さなベンチュリー端において、試料を噴霧する。しかしながら、水などのマトリックスが大量にプラズマ中に導入されると、ICP のような大型のプラズマにおいても、励起能力が大きく変化し、試料元素の信号が影響を受けたり、観測できなくなったりする(マトリックス効果)。そこで利用されてきた方法が、ETV(電気加熱気化器)や ITV(トーチ内気化試料導入系)といった電気加熱法である。ETV や ITV といったシステムでは、タンタルのフィラメント、カーボンロッド、あるいは黒鉛炉のような電氣的に加熱されて試料を蒸発させる伝導体の上に、少量の試料(10 μL あるいは 10 mg)を載せる。したがって、プラズマへの負担が大きい、脱溶媒の過程を事前に行うことができる。一方、ETV や ITV を利用する方法は、ネブライザを用いた導入法と比べ手順が煩雑であり、実験パラメータの最適化が難しいといった欠点がある。

また、プラズマに噴霧された溶液試料を導入する際、エアロゾルを短時間で脱溶媒、気化、原子化させるには、励起能力の高い ICP でさえ、直径 10 μm 以下の液滴を生成することが必要であると報告されている。しかし、ネブライザによる噴霧では粒径において分布幅が広く、その直径は最大 100 μm にも達する。この問題を克服して分析特性を向上するためには、スプレーチャンバを利用して、エアロゾルの流れから大きな液滴を取り除くとともに、脱溶媒システムにより溶媒の負荷を減少させる必要がある。しかし、微細なエアロゾルのプラズマへの導入を優先させると、導入効率が犠牲になってしまう。その結果、ネブライザにより吸引された試料溶液のうち導入される割合、すなわち試料導入効率は数%程度に過ぎず、多くはドレインとして捨てられている。したがって、多量の試料を必要とするため、採取できる量が限定されている生体試料、濃縮された試料、多くは導入できない有機溶媒など、微量試料の高感度分析は困難であった。さらに、チャンバの内容積が大きくエアロゾルの軌道も複雑であるため、試料の滞留時間および洗浄時間が長く、試料の供給を停止した後もしばらく信号が低下しない、いわゆるメモリ効果が問題となる場合がある。

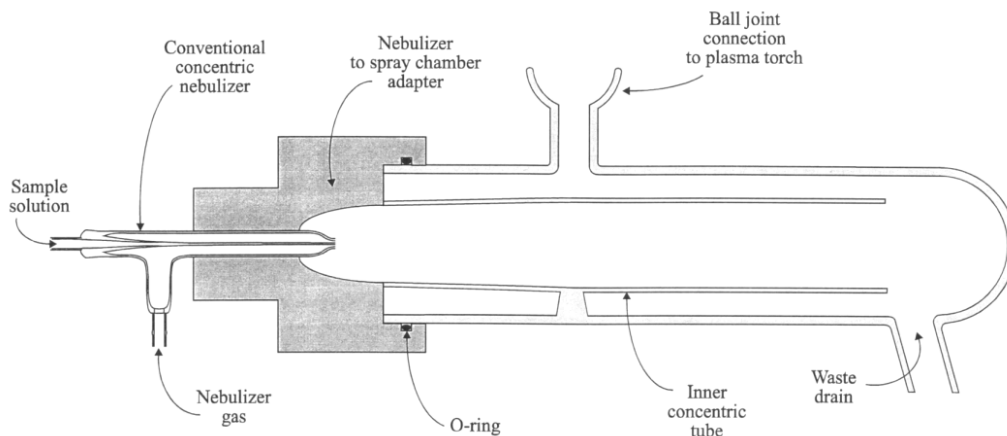


図 3.2 同軸型ネブライザおよびスプレーチャンバ

3.2.2 直接試料導入法

試料消費を減らすために、図 3.3 に示す試料直接噴霧導入ネブライザ(Direct injection nebulizer; DIN)^[6] や図 3.4 に示すような高効率試料直接噴霧導入ネブライザ(Direct injection High Efficiency Nebulizer; DIHEN)^{[2][4][5][6]}などが開発され、試料導入効率の著しい向上とメモリ効果の減少を実現した。これらは、いずれもプラズマの生成部にネブライザを配置し、スプレーチャンバを介さずプラズマに直接試料溶液を導入する機構である。試料を直接プラズマ中に導入するために、試料導入効率は 100% となり、試料消費量も 10~100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度まで抑制することに成功している。しかし、スプレーチャンバを持たないこの試料導入系は、プラズマの中に液体試料が大きな粒子の状態を導入されるため、プラズマが不安定になりやすい。また大量の溶媒が導入されることでプラズマの励起能力の低下を招き、それに伴いマトリックス効果に対する耐性が低下することで、結果的に感度の低下をもたらす。DIHEN はその後 Meinhard 社から市販されるに至ったが、100%近い試料導入効率とメモリ効果が少ないなどの利点を持つにもかかわらず、特殊なネブライザとトーチを組み合わせる必要があること、また高価で取り扱いが困難であることから、一般的に使用されるには至っていない。

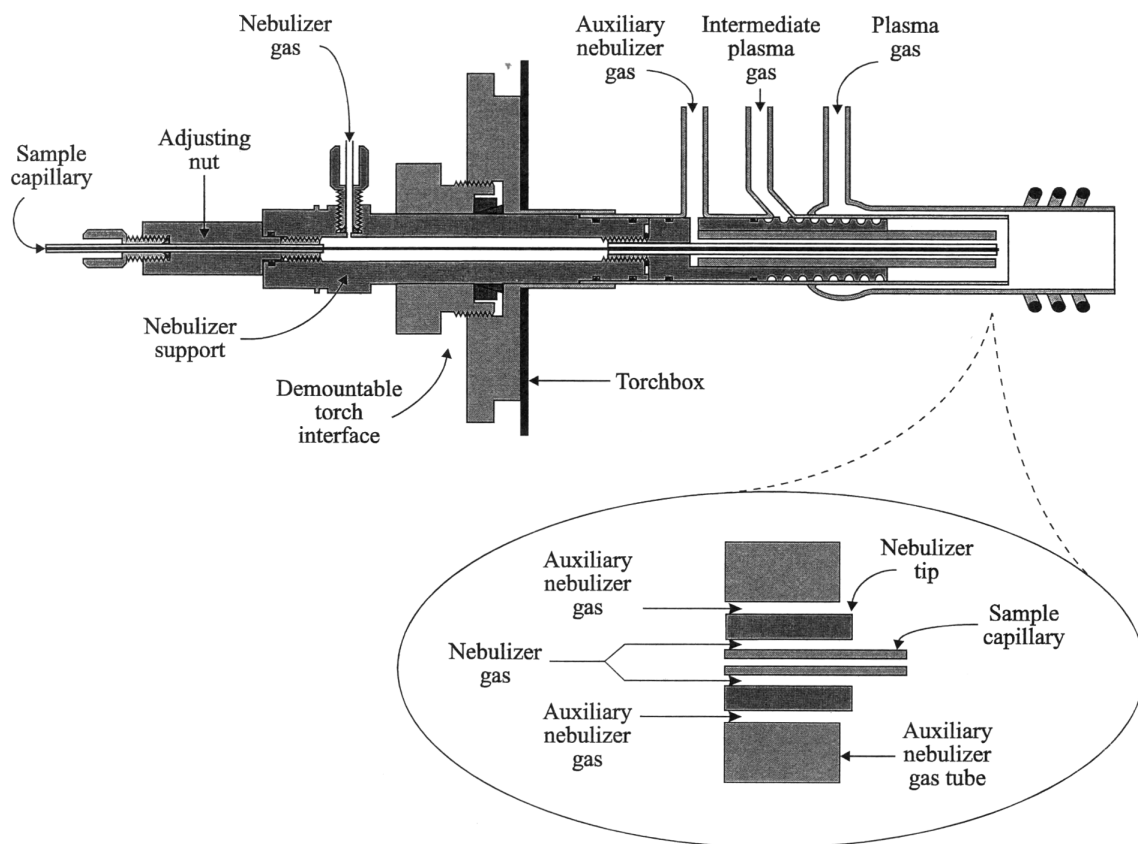


図 3.3 試料直接噴霧導入ネブライザ (DIN)

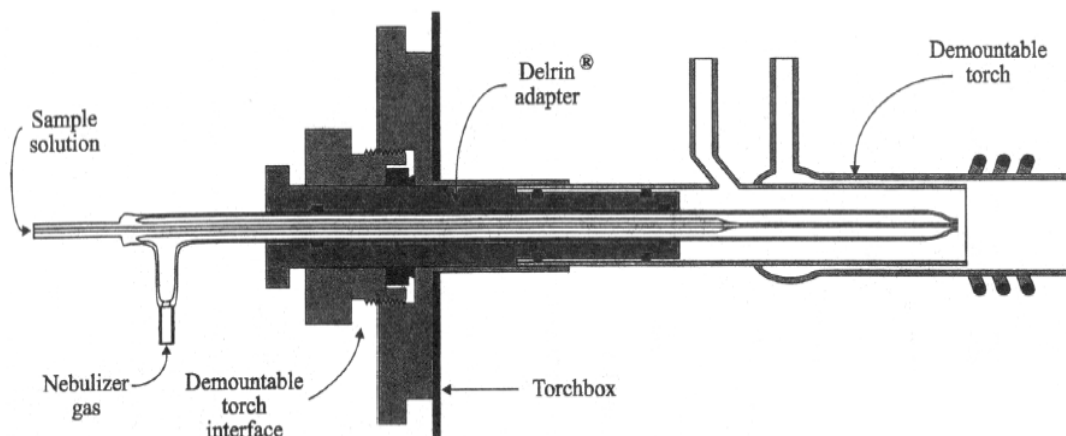


図 3.4 高効率試料直接噴霧導入ネブライザ (DIHEN)

3.2.3 液体試料導入法における問題点

スプレーチャンバとニューマティックネブライザにおいて、約 1 mL/min の試料消費量であったのが、直接試料導入法により約 10~100 μ L/min の試料消費量に抑えることができるようになった。しかし、微量試料中の元素分析を可能とするためには、より試料消費量を低減する必要があると考えられる。また、スプレーチャンバとネブライザを用いた試料導入系や DIHEN などの試料直接噴霧導入法においても、噴霧された試料はプラズマ中で円錐状に拡散してしまう。したがって、円錐状に広がった試料は、周囲のプラズマ温度を低下させてしまい、プラズマが不安定になる原因となる。また、ICP-MS では、中心軸上の信号を検出するために、試料はプラズマの中心軸上へ導入されることが望ましく、中心軸上に導入された試料は、周囲のプラズマ温度を下げることなく加熱される。図 3.5 にこれまで紹介したタイプのネブライザによる試料の拡散の様子を示す。このように全ての試料導入法において、噴霧された試料は円錐状に広がりを持ってしまうことがわかる。

さらに、スプレーチャンバとネブライザを用いた試料導入系でも、DIHEN においても、溶液試料を多量に霧化してプラズマ中に導入するシステムであるので、原理的に多数の試料液滴による平均情報しか得られず、細胞が導入できたとしても細胞の個別情報を取得することは困難である。したがって、細胞やナノ粒子といった試料の個別分析を実現するためには、試料消費量を低減し、試料の円錐状の広がりを抑えるとともに、従来法とは異なるコンセプトを持つまったく新しい分析システムの開発が必要である。

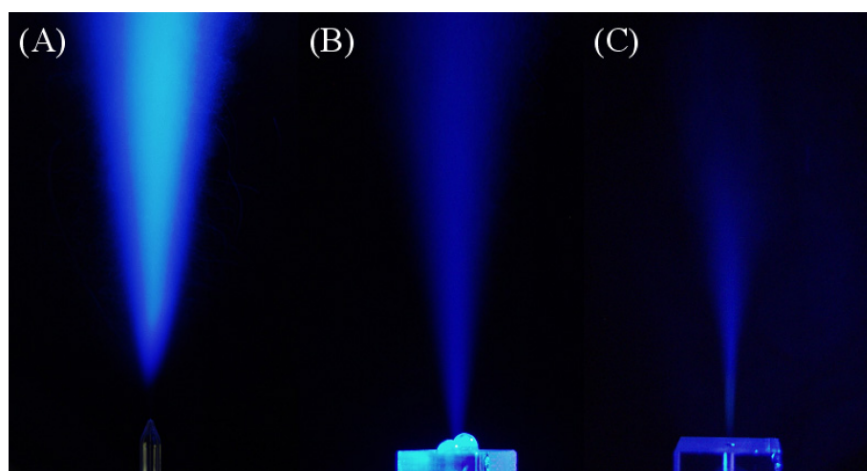


図 3.5 従来のネブライザによる溶液噴霧の様子

(A) Meinhard nebulizer, (B) direct sample solution introduction system with turbulence stabilization system, (C) Meinhard nebulizer with Scott type double pass spray chamber

3.3 ドロプレット試料導入装置の開発

3.3.1 ドロプレット試料導入装置の原理

そこで、本研究では、汎用的な分析装置とは全く異なった、微量試料のための高感度分析装置の開発を行ってきた。細胞やナノ粒子といった微量試料の高感度、高効率分析および、微量試料の個別分析を目的として、ドロプレット試料導入装置を開発した。図 3.6 に従来の液体試料導入法とドロプレット試料導入装置の概念図を示す。ニューマティックネブライザなどを用いた従来の液体試料導入法(a)では、インジェクションガスを用いた噴霧であるために、試料がプラズマ中で円錐状に拡散してしまう。一方、本研究で開発したドロプレット試料導入装置(b)では、ピエゾ素子に電圧を印加し、液体試料を噴出することによってドロプレット状の試料を導入する。この方法では、プラズマへの試料導入効率は 100%であり、液体試料がプラズマ中で拡散することがないため、プラズマの中心軸上にもみ液体試料を導入することが可能となる。また、ドロプレット 1 滴に細胞を内包させてプラズマ中へ導入することにより、微量試料の個別分析が可能になると考えられる。ドロプレット試料導入装置は他の 2 つの方法と比較して、試料消費量が極端に低いことが分かる。さらに、ドロプレット試料の導入効率

が 100 % であるため、単一細胞だけでなく試料そのものの量が少ない分析にも適用できることが考えられる。

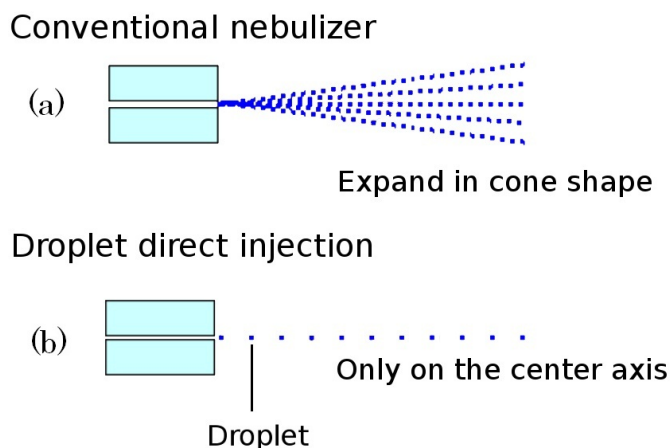


図 3.6 従来のネブライザとドロプレット試料導入装置の概念図

これまでの研究において、溶液試料をコンプレッサーからの圧縮空気により押し出し、電磁バルブの高速開閉することによりドロプレットの生成を行っていた（図3.7）。溶液試料を押し出す射出圧力、電磁バルブの開閉時間によりドロプレットサイズをコントロールできるという利点はあったが、ドロプレット体積は最も小さい場合でも700 pL であり、単一細胞分析を考えた場合、細胞の体積に比べて、ドロプレットの体積が最小の場合でも1300倍ほど大きいため、十分にイオン化されず感度が出ないことやプラズマが不安定になるなどの問題があった^[8]。

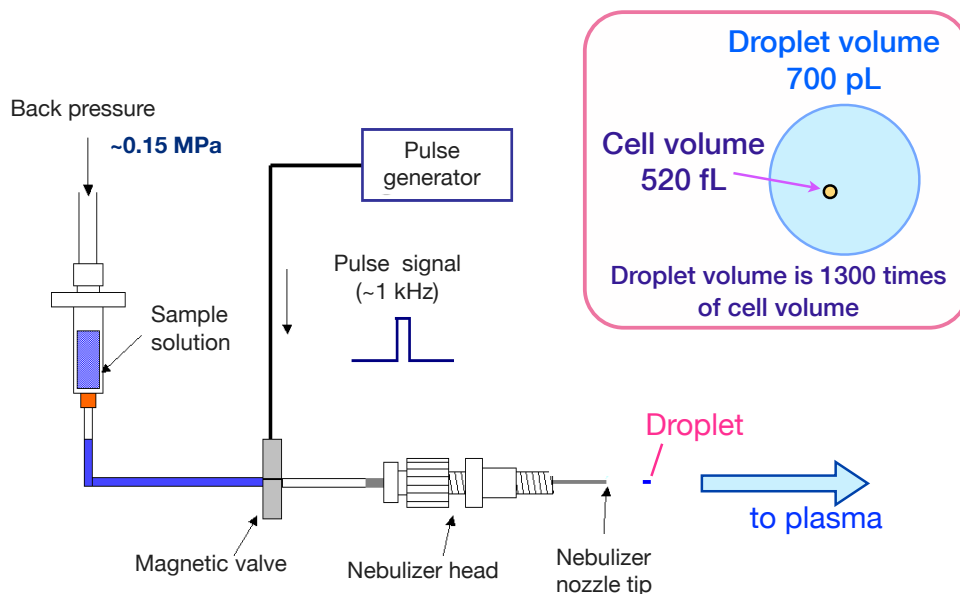


図3.7 電磁バルブ式ドロプレット試料導入装置の概略図

この問題を解決するため、インクジェットプリンターと類似の、ピエゾ圧電素子を用いたドロプレット試料導入装置による、試料導入システムを開発した。そのドロプレット試料導入装置の概略図とピエゾ素子を用いたドロプレット試料導入装置の動作原理をそれぞれ図3.8と図3.9に示す。ドロプレット試料導入装置には溶液試料と同軸方向にインジェクションガスを導入できる箇所があり、ドロプレットはインジェクションガスによりプラズマまで運ぶことができる。ドロプレットの周囲にインジェクションガスを流すことで、ドロプレットをプラズマの中心軸上に安定して導入することができるようにした。ドロプレットの射出原理は、ピエゾ素子に電圧を印加することで、ピエゾ素子がたわみ、このとき内部体積が縮小し、この体積を有するドロプレットが噴出される。また、実際に噴出されたドロプレットの写真を図3.10に示す。

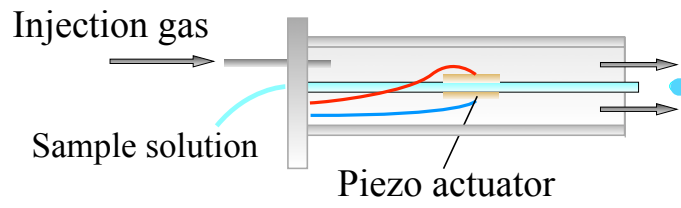


図 3.8 ドロプレット試料導入装置の概略図

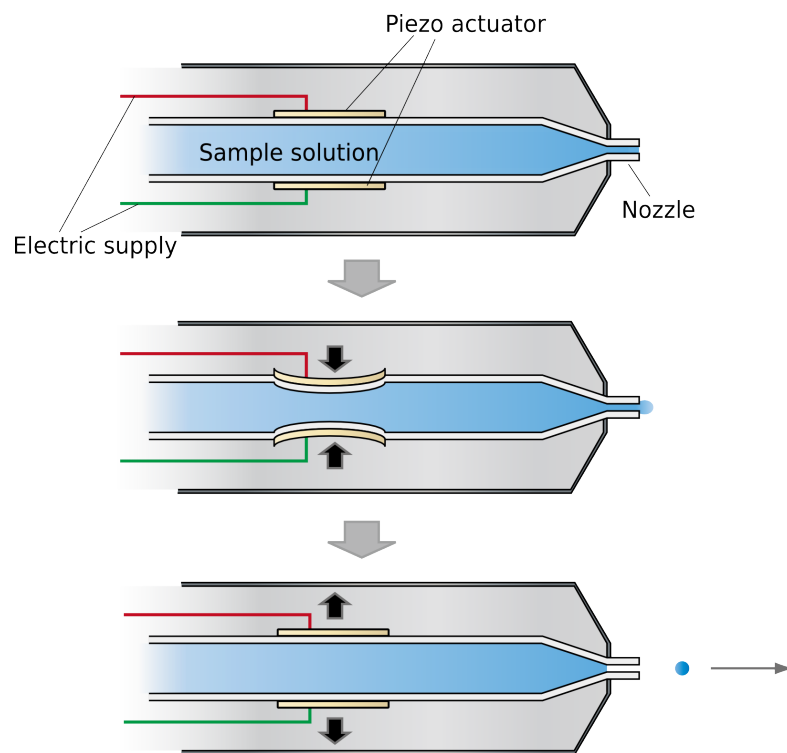


図 3.9 ピエゾ素子式ドロプレット試料導入装置の動作原理

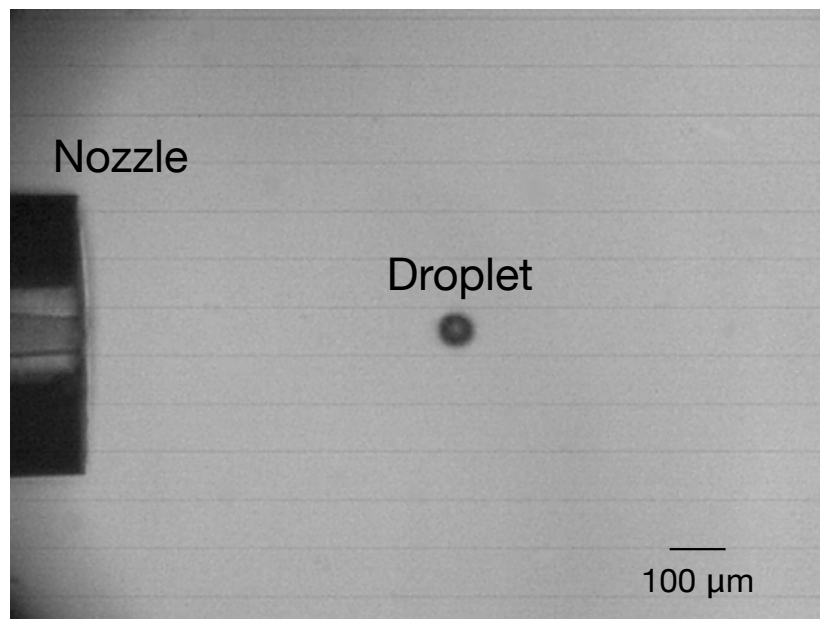


図 3.10 噴出されたドロプレット

ドロプレット試料導入装置では、溶液試料を噴霧ではなくドロプレットとして一粒ずつ射出導入できるため、単一細胞など微量試料の個別分析に有効であると考えられる。スプレーチャンバを用いた試料導入法では、1回の分析に10秒以上の試料噴霧が必要となるため、非常に多くの試料を消費していた。一方、ドロプレット試料導入装置においては、試料消費量を最小で1滴当たり14 pLに抑えることができ、ドロプレット一粒による分析が可能であれば、一回の分析に要する試料消費量を約30万分の1以下に低減することができる。さらに、ドロプレット試料導入装置はドロプレット試料をプラズマの中心軸上へ100%の効率で導入することができるため、試料を無駄なく分析に寄与させることができる。ドロプレットの直径はキャピラリー径に依存するため30 μmまたは70 μm、体積は14 pLまたは180 pL、初速は~2.5 m/sである。

このように、ドロプレット試料導入装置を用いた試料導入法は、微量試料の高感度・高効率分析に加え、個別分析にも有利な特長を有する単分散型試料導入系である。本研究の最終目標として、一粒のドロプレットに細胞試料を内包させ、時間的、空間的に圧縮した状態でプラズマ中に導入することで、単一細胞中に含まれる元素の高感度個別分析が期待できるといえる。

3.3.2 単一細胞分析の必要条件

ここで、本研究の目的である単一細胞分析を実現するための要素を確認する。次の3つの要素、「超高感度(10^{-18} g 程度)」、「細胞の個別導入」、「多元素同時分析」が必要であると考えられる。

まず、「超高感度(10^{-18} g 程度)」については、詳しくは次節の「生体中の必須微量元素」で説明するが、単一細胞中に含まれる元素の濃度および絶対量がある。単一細胞のような微量試料の分析を行うためには、細胞中に含まれる元素量が限られているため、濃度(mg/L; ppm)だけの議論ではなく絶対量(10^{-15} g; fg ~ 10^{-18} g; ag)の議論が重要となる^[9]。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(10^{-18} g)程度の検出下限絶対量が必要であると考えられる。

次に、「細胞の個別導入」については、多量の試料を霧状に粉霧してプラズマ中に導入する従来の方法では、細胞のような微量試料の分析には適さず、また、多数の細胞の平均情報しか得られない。そこで、ここまでの本章で説明してきたように、プラズマ中に任意のタイミングで100 pL程度のドロプレットを一滴ずつ導入できる、ドロプレット試料導入装置を用いて解決できるものと考えられる。

最後に、「多元素同時分析」についてである。細胞は1つ1つ別々の個性を持っていると言われ、そのため、含まれている元素の種類や量も異なると言われている。そこで、1つの細胞から多数の元素を同時に測定することによって、超微量元素の異常な取り込みによって細胞毒性が現れ、細胞の機能が失われることが発症の原因の1つと考えられているAlzheimer病やParkinson病の解明、がん組織と極微量亜鉛の関係の解明、iPS細胞の分化のメカニズムの解明など、人類の健康に関する多くの基礎研究への貢献が期待できる。

次章からは、ドロプレット試料導入装置をICP分析装置に適用し、上記の3つの要素、それぞれに対してアプローチしていく。

3.3.3 生体中の必須微量元素

前節で本研究では、agレベルで含まれる微量元素まで測定したいと書いてきたが、その理由としては微量元素の重要性が分かってきたためである。生体分子を作っているのは、酸素 (O)、水素 (H)、炭素 (C)、窒素 (N)、リン (P)、カルシウム (Ca) の 6 元素である。これらの元素で、人体中に含まれる元素の98.5%を占めている。これらに、硫黄 (S)、カリウム (K)、ナトリウム (Na)、塩素 (Cl)、マグネシウム (Mg) を加えると、11元素となり、人体中に含まれる元素の99.3%を占める。しかし、生体においてこれら11元素のみでは十分でないことが、研究から明らかになってきている。

我々の体に含まれる無機元素はその存在量によって4つのグループに分類されている (表3.1)。多量元素と少量元素は合わせて11種類、微量元素と超微量元素は合わせて23種類が存在する。人体中の微量元素と超微量元素の種類、存在量ならびにヒトでの必須性を表3.2に示す。微量元素10種のうちでヒトに必須であることが明確になっているのが、鉄(Fe)、フッ素 (F)、ケイ素 (Si)、亜鉛 (Zn)、マンガン (Mn)、銅 (Cu) の6元素、超微量元素14種のうちでヒトに必須であることが明確になっているのは、セレン (Se)、ヨウ素 (I)、モリブデン (Mo)、ニッケル (Ni)、クロム (Cr)、コバルト (Co) の6元素である。これらの12元素は酵素やタンパク質の構成成分として存在したり、生体構造を維持したりするなど、重要な生体反応および整理作用を発揮している^[10]

表3.1 体内中元素存在量の分類

classification	abundance / human kg
major element	≥10 mg
minor element	1 ~ 10 mg
trace element	1 ~ 100μg
ultratrace element	20 ~ 1000 ng

表3.2 体内中の存在元素と濃度および絶対量

Element		Concentration (%)			Absolute amount (g)			Classification	Essential		
Oxygen	O	61.43	x	10 ⁻²	(%)	31	x	10 ⁻⁹	(ng)	Major element	◎
Carbon	C	22.86	x	10 ⁻²		11	x	10 ⁻⁹		Major element	◎
Hydrogen	H	10	x	10 ⁻²		5.0	x	10 ⁻⁹		Major element	◎
Nitrogen	N	2.57	x	10 ⁻²		1.3	x	10 ⁻⁹		Major element	◎
Calcium	Ca	1.43	x	10 ⁻²		720	x	10 ⁻¹²	(pg)	Major element	◎
Phosphorus	P	1.11	x	10 ⁻²		560	x	10 ⁻¹²		Major element	◎
Sulfur	S	0.2	x	10 ⁻²		100	x	10 ⁻¹²		Minor element	◎
Potassium	K	0.2	x	10 ⁻²		100	x	10 ⁻¹²		Minor element	◎
Sodium	Na	0.143	x	10 ⁻²		72	x	10 ⁻¹²		Minor element	◎
Chlorine	Cl	0.136	x	10 ⁻²		68	x	10 ⁻¹²		Minor element	◎
Magnesium	Mg	270	x	10 ⁻⁶	(ppm)	14	x	10 ⁻¹²		Minor element	◎
Silicon	Si	260	x	10 ⁻⁶		13	x	10 ⁻¹²		Minor element	○
Iron	Fe	60	x	10 ⁻⁶		3.0	x	10 ⁻¹²		Trace element	◎
Fluorine	F	40	x	10 ⁻⁶		2.0	x	10 ⁻¹²		Trace element	○
Zinc	Zn	30	x	10 ⁻⁶		1.5	x	10 ⁻¹²		Trace element	◎
Rubidium	Rb	10	x	10 ⁻⁶		500	x	10 ⁻¹⁵	(fg)	Trace element	?
Strontium	Sr	4.6	x	10 ⁻⁶		230	x	10 ⁻¹⁵		Trace element	
Bromine	Br	2.9	x	10 ⁻⁶		150	x	10 ⁻¹⁵		Trace element	
Lead	Pb	1.7	x	10 ⁻⁶		85	x	10 ⁻¹⁵		Trace element	?
Copper	Cu	100	x	10 ⁻⁹	(ppb)	5.0	x	10 ⁻¹⁵		Ultratrace element	◎
Aluminium	Al	87	x	10 ⁻⁹		4.4	x	10 ⁻¹⁵		Ultratrace element	?
Cadmium	Cd	71	x	10 ⁻⁹		3.6	x	10 ⁻¹⁵		Ultratrace element	?
Barium	Ba	31	x	10 ⁻⁹		1.6	x	10 ⁻¹⁵		Ultratrace element	
Iodine	I	18	x	10 ⁻⁹		900	x	10 ⁻¹⁸	(ag)	Ultratrace element	◎
Manganese	Mn	17	x	10 ⁻⁹		850	x	10 ⁻¹⁸		Ultratrace element	◎
Nickel	Ni	14	x	10 ⁻⁹		700	x	10 ⁻¹⁸		Ultratrace element	○
Cesium	Cs	2.0	x	10 ⁻⁹		100	x	10 ⁻¹⁸		Ultratrace element	
Uranium	U	130	x	10 ⁻¹²	(ppt)	6.5	x	10 ⁻¹⁸		Ultratrace element	
Beryllium	Be	60	x	10 ⁻¹²		3.0	x	10 ⁻¹⁸		Ultratrace element	

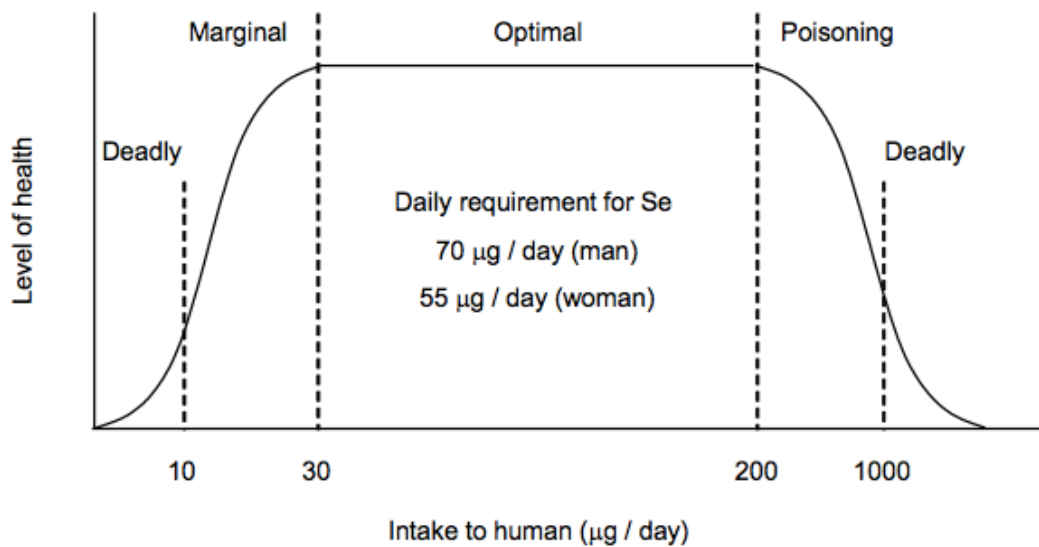


図 3.11 人のための Se の用量曲線

また、微量元素はタンパク質と結合することで、それぞれの生理作用が何倍にも増幅される。そのため、人体にとって必要な微量元素および超微量元素はごくわずかである。あらゆる元素には生体内で最適な濃度範囲が存在する(図 3.11:Se を表記)。この濃度範囲を示適濃度範囲といい、元素の種類によって異なる。例えば、Se は必須超微量元素の 1 つであるが非常に猛毒な元素であることが知られている。すなわち、Se の示適濃度範囲は低い濃度にあり、しかもその範囲は極めて狭い。生体には、これらの元素の濃度をある範囲に保つような機構があるが、この機構の能力にも限度があり限界を越す濃度になると、様々な疾病を引き起こすことがある。Se は成人男性で一日に 70 mg, 成人女性で一日に 55 mg 必要だとされている。Se の不足によって、心筋症, 下肢の筋肉痛, 甲状腺肥大などの症状が引き起こされる。このような場合, 適量の Se を摂取することで症状が緩和される。しかし, Se は毒性が強いため安易に摂取することはできない。Se が過剰になると, 心筋梗塞, 腎不全, 急性の呼吸困難などの症状が引き起こされる^[11]。

このように、微量元素の含有量はごくわずかであるが、その重要性が明らかになっているため、微量元素まで測定することの意味があると言える。そこで、本研究では ag レベルで含まれる微量元素までを測定対象とする。

3.4 結言

本章では、従来の微量試料導入法とドロプレット試料導入装置の比較を行い、他にない新しい試料導入法でドロプレット試料導入装置が単一細胞分析に適していると述べた。その手法は、ガラスキャピラリの周りのピエゾ素子にパルス的な電圧を加えることによってドロプレットを射出させることができる。その生成できるドロプレットは、直径 30 μm ~70 μm , 体積 14 pL~180 pL, 初速~2.5 m/s である。ドロプレット試料導入装置を用いた試料導入法は、微量試料の高感度・高効率分析に加え、個別分析にも有利な特長を有する単分散型試料導入系である。また、本研究のターゲットとしている単一細胞分析に必要となる導入方法, 感度, さらに人体にとっての元素の必要性についても述べた。4 章では、ドロプレット試料導入装置を ICP 分析装置に適用し、その特性調査を行う。

参考文献

- [1] H. Haraguchi, Metallomics as integrated biometal science, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19, pp 5-14 (2004).
- [2] Montaser (Ed.) and D. W. Golightly (Ed.), *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, Wiley-VCH, New York (1987).
- [3] H. Miyahara, K. Shigeta, N. Nakashima, Y. Nagata and A. Okino, Development of New Sample Introduction System and Excitation / Ionization Source for Nano-Litter Samples, *Bunseki Kagaku*, 51, 2. (2010),
- [4] 原口紘丞訳, 微量元素分析の実際, (丸善) (1995), G.Vandecasteele, C. B. Block, Modern, *Methods for Trace Element Determination*, (John Wiley & Sons Ltd, England) (1993).
- [5] 重田 香織, 永田 洋一, 岩井 貴弘, 宮原 秀一, 沖野 晃俊, 大気圧プラズマを用いた微量元素分析技術, *電学論 A*, 130, pp. 955-962 (2010).
- [6] D. Schaumlöffel, J. R. Encinar and R. Lobinski, *Anal. Chem.*, 75, pp. 6837-6842 (2003).
- [7] A. Montaser, J. A. McLean and J. M. Kacsir, U.S.Patent, No.6, 166, 379 (1997).
- [8] 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*, 59, pp. 363-378 (2010).
- [9] 重田香織, 生体微量元素の機能解明を目的とした微量試料分析技術の開発, 博士学位論文, 東京工業大学 (2010).
- [10] 桜井 弘, 微量金属元素と生体, *プラズマ分光分析会 第 63 回講演会講演要旨集*, p 19 (2005).
- [11] 千葉 百子, 鈴木 和夫編, *健康と元素 -その基礎知識-*, 南山堂, 第 1 版, p 72 (1996).

第4章 ドロプレット試料導入装置の基礎特性

評価

4.1 緒言

本章では第3章で述べたドロプレット試料導入装置の基礎特性評価を行う。ドロプレット試料導入装置は従来の霧状に噴霧して導入する試料導入法とは異なるため、プラズマにドロプレットが導入されたときのプラズマの状況や、導入のパラメータについて調査した。

本章では、ICP 発光分光分析と ICP 質量分析装置に適用して実験をおこなった。これまでの研究で開発していた電磁バルブ式のドロプレット試料導入装置と本研究で開発したピエゾ式のドロプレット試料導入装置の比較をおこなった。また、ドロプレットが導入されたときのプラズマに与える影響の調査をおこなった。次に、ピエゾ素子式のドロプレットネブライザを用いて、ドロプレットをプラズマ中に導入しやすくするためにのインジェクションガスの流量の変化による影響やドロプレットのイオン化するまでの詳細調査などを行った。

4.2 電磁バルブ式とピエゾ素子式ドロプレット試料導入装置の比較

第3章で紹介したように、これまでの研究において、溶液試料をコンプレッサーからの圧縮空気により押し出し、電磁バルブの高速開閉することによりドロプレットの生成を行っていた。そのとき、生成されるドロプレット体積は最も小さい場合でも700 pLであり、プラズマが不安定になるなどの問題があった。この問題を解決するため、第3章で述べたようなインクジェットプリンターと同様の原理のピエゾ圧電素子を用いたドロプレット試料導入装置による、試料導入システムを開発してきた。この導入システムでは、14 pLまたは180 pLの体積のドロプレットを射出することができる。ドロプレットの体積はキャピラリ径に依存するため、内径30 mmのキャピラリを用いたときは体積が14 pL、70 mmのときは180 pLのドロプレットを生成する。

まず始めに、空気圧式のドロプレット試料導入装置と本研究で用いたピエゾ素子式のドロプレット試料導入装置の比較をおこなうために、ドロプレット試料導入装置をトーチに直接接続し、ICP発光分光分析を用いて分析をおこなった。その実験セットアップを図4.1に示す。

この実験系で、レンズ($\phi = 50$, $f = 101.7$)を用いて集光し、ファイバーを用いてモノクロメータに取り込み、光電子増倍管から得られる信号をデジタルオシロスコープにより記録した。プラズマの分光測定はトーチ側面からプラズマの中心軸上で行った。分光器は焦点距離 500 mm, 波長分解能 0.0270 nm の Czerny-Turner 型のものを用いた。光電子増倍管(R-928, 浜松ホトニクス, Hamamatsu, Japan)を用いた。測定位置は、発光強度が一番強くなる4本あるロードコイルの一番下流側のコイルから 2.5 mm (Above Load Coil, A.L.C. = 2.5 mm)の位置での測定を行った。

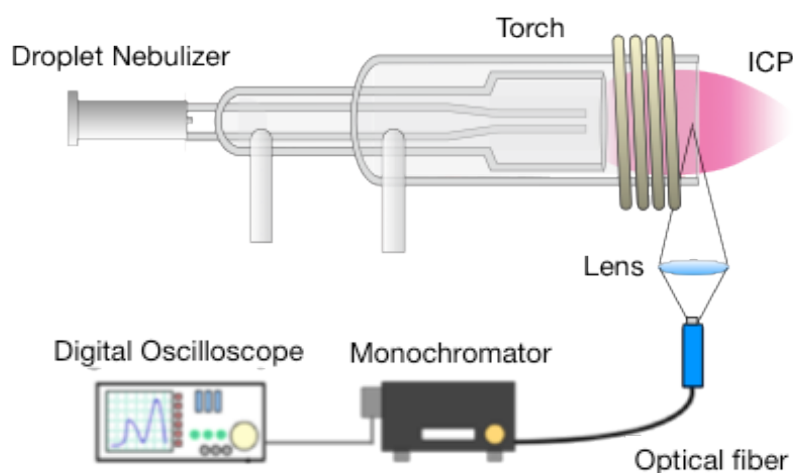
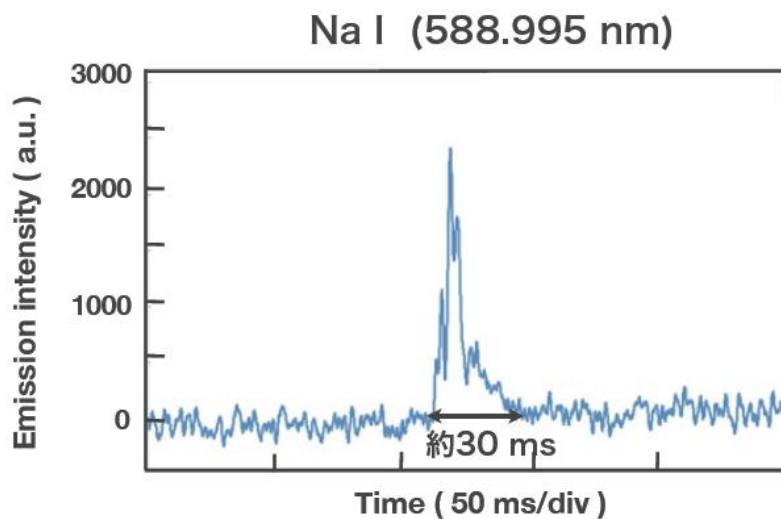


図4.1 ICP発光分光分析のセットアップ

試料は10 mg/L Na, Mg, Sr 標準溶液, 100 mg/L Na, Mg, Sr 標準溶液をそれぞれ用いた。測定元素Naの場合を示す。それぞれのドロプレット試料導入装置を使用して生成できたドロプレットの体積は空気圧式では, 20 nL, ピエゾ式では, 180 pLである。それらのドロプレットを導入したときに得られたスペクトルを図4.2(a)(b)に示す。

(a) 電磁バルブ式:ドロプレットの体積 20 nL



(b) ピエゾ素子式:ドロプレットの体積 180 pL

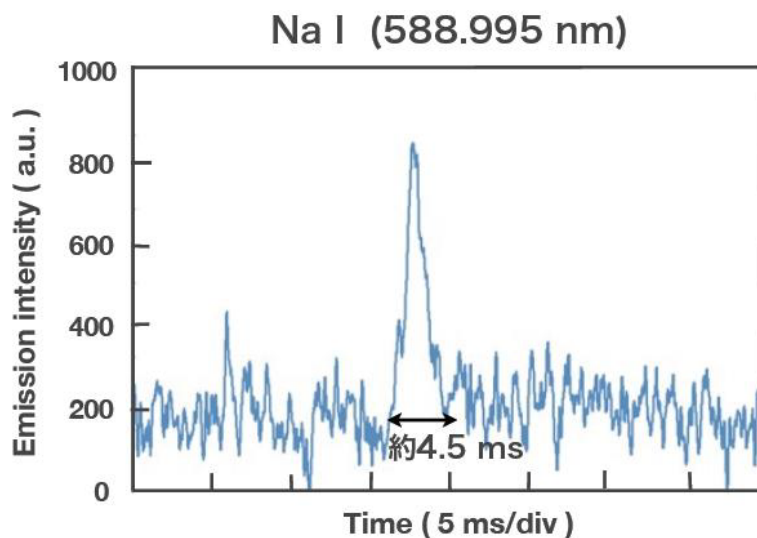


図4.2 ドロプレット試料導入装置を用いた発光スペクトル

空気圧式ドロプレット試料導入装置を用いたときの、発光スペクトルの時間幅は、約30 msとなった。一方でピエゾ素子式ドロプレット試料導入装置を用いたときは、約4.5 msとなった。ピエゾ素子式のドロプレット試料導入装置を用いたことによって、体積が約1/110になり、その発光時間幅では約1/7になったことが分かった。また、検出下限

絶対値を算出すると、空気圧式では22 fg、ピエゾ素子式の場合では、0.33 fgになり、1/70にまで検出下限絶対値を向上させた。ピエゾ素子式ドロプレット試料導入装置を用いることによって、導入されるドロプレットの体積は小さくなっているが、検出感度は向上した。この理由としては、電磁バルブ式ではドロプレットの体積が大きいため、溶媒の蒸発や発光にエネルギーが使われてしまうため、試料を発光させるためにエネルギーが使われていないためだと考えられる。この検討に関しては第5章で詳しく述べる。

次に、安定性の評価をおこなうために、ドロプレットを連続的に導入し、その発光強度から相対標準偏差(RSD)を求めた。電磁バルブ式とピエゾ素子式ドロプレット試料導入装置を用いたときの発光スペクトルを図4.3 (a)(b)にそれぞれ示す。

この発光スペクトルからRSDを求めると、電磁バルブ式では、 $RSD = 9.4\%$ 、ピエゾ素子式では、 $RSD = 6.6\%$ と改善することができた。ドロプレット試料導入装置を用いた研究では、発光・信号強度のRSDは5～10%程度の報告が多いため、この結果は適当であると考えられる^[1]。

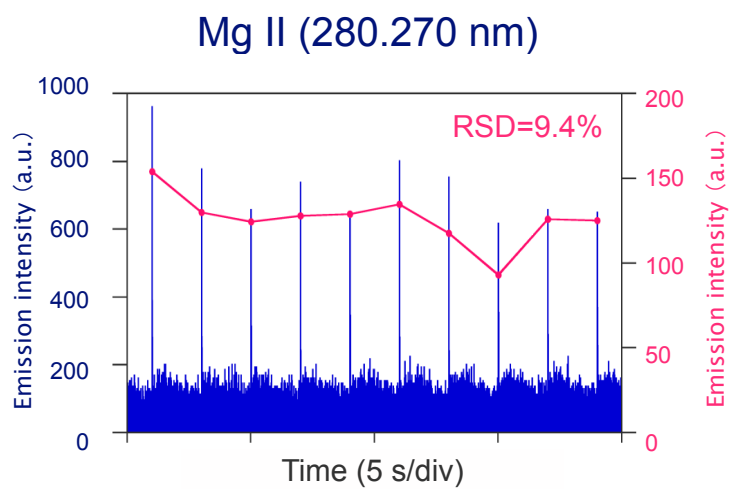


図4.3 (a) 電磁バルブ式ドロプレット試料導入装置を用いたときの連続発光スペクトル

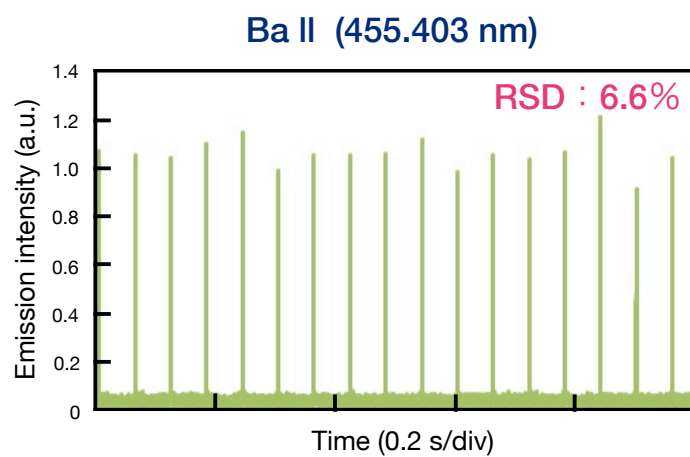


図4.3 (b) ピエゾ素子式ドロプレット試料導入装置を用いたときの連続発光スペクトル

この測定結果のまとめを次の表4.1に示す。

表4.1 電磁バルブ式とピエゾ素子式ドロプレット試料導入装置の比較

	電磁バルブ式	ピエゾ式
体積	0.7~100 nL (可変)	14・180 pL (キャピラリ径に依存)
安定性	RSD = 9.4%	RSD = 6.6%
検出下限 絶対値	22 fg	0.33 fg

この結果から、電磁バルブ式では体積は電磁バルブの開閉時間や背圧によって自由に変更することができるが、その生成はされる体積にはばらつきがあり、また生成できる体積もプラズマに対しては大きかった。ピエゾ素子式での体積はキャピラリ径に依存するため、可変ではない。しかし、表面張力と射出したとき、瞬間的に内圧にすることができるため、ドロプレットの体積を小さく、正確に制御することができる。また、ピエゾ素子式では、プラズマへの試料の導入量は減っているにもかかわらず、検出下限絶対値が良くなっていることから、半値幅から見てより溶液試料が圧縮されて導入されていること、また、ドロプレットの導入量が減ったことで試料がイオン化されやすくなったため検出下限絶対値が向上したと考えられる。このことから、感度向上のためにはドロプレットを小さくすることが有効であると考えられる。さらに、ドロプレット試料導入装置を用いた他の研究グループの研究でもドロプレットの微小化によって分析感度が向上していることが報告されている^[2]。

詳しくは、次章で述べるが、細胞を導入するためにはある程度のドロプレットの大きさが必要であるため、このままドロプレットのサイズを小さくする方法は、細胞分析を目的としている本研究には適していないと考えている。

4.3 ドロプレット試料導入が自励式高周波電源により発生した ICP へ与える影響の調査

ドロプレットが従来のネブライザとスプレーチャンバによる試料導入に比べ、100～1000倍の大きなドロプレットがICPに導入されたとき、ICPが明滅あるいは消滅するなどの問題が生じた^{[3]~[8]}。前節ではこの問題に対して、ドロプレットを小さくする方法を用いて解決しようとした。本節では、別の方法でプラズマの明滅や消滅を解消する方法を紹介する。

その方法とは、プラズマを生成する電源の改良である。ドロプレットを導入することにより、プラズマの電気特性が変化することでインピーダンスが変化し、その結果、高周波のマッチングが保てなくなることがICPの明滅あるいは消滅の原因であると考えられた。そこで、ICPの持つインピーダンスが自動的に高周波電源の発振周波数にフィードバックされ、常に高周波のマッチングが整合状態に保たれる、自励式高周波電源を用いた自励式ICP生成システムを、ドロプレット試料導入装置を適用することで、こうした問題を解決する可能性を見いだした。

生成したプラズマの分光特性は、図4.4に示す光学系を用いて測定した。分光器には、光電子増倍管(R928, 浜松ホトニクス社製)を使用した焦点距離50 cmのツェルネーターナー型分光器 (wave-length resolution;0.027 nm) と、マルチチャンネル分光器 (HR4000, Ocean Optics Inc., FL, USA)を用いた。プラズマからの発光は、プラズマの半径方向から、焦点距離が101.07 mmの直径50 mmの平凸石英レンズを用いて、トーチ軸上の焦点から光ファイバーの入口に集光した。測定系は、ドロプレット導入に伴う高周波電源の発振周波数に与える影響は、ハイスピード周波数カウンタ(CNT-90, Spectracom Corp., NY, USA)と内径10 mmのピックアップコイルからなる発振周波数記録システムを用いた。

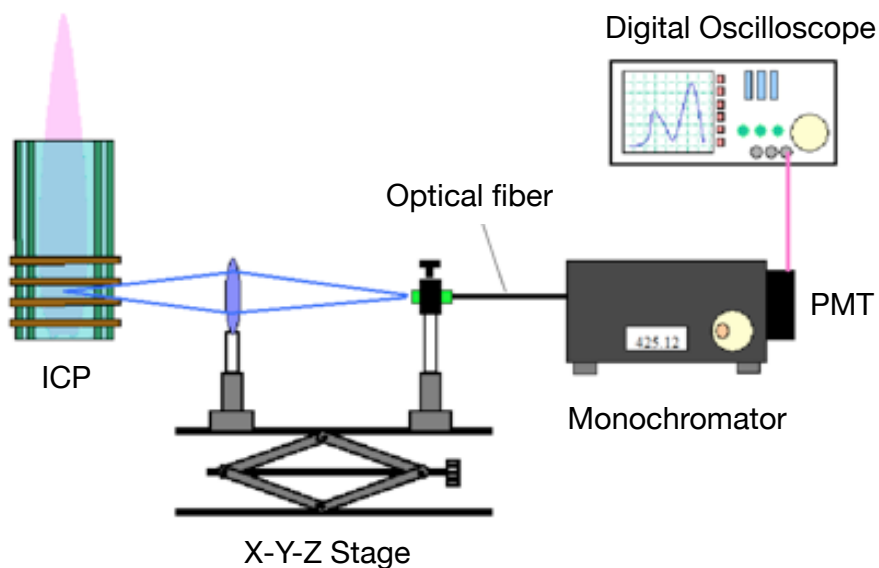


図4.4 ICP発光分光測定の設定アップ

まず、自励式ICPへ試料を含まない純水のドロプレットを導入して、ICPに与える影響を調査した。ドロプレット導入に伴うプラズマ状態の変化を確認するため、60枚/秒の連続撮影が可能であるカメラ(EXILIM PRO EX-F1, CASIO)を用いて、可視光領域でのプラズマの撮影を行った。実験はプラズマガスとしてアルゴン15 L/minを使用し、1080 Wの高周波電力を印加して行った。ドロプレットの体積は約5 nLで、ICP中に導入されている。撮影結果を図4.5に示す。2-3コマ目の写真がドロプレット導入時の写真であり、プラズマがドロプレットにより冷却されたことによってプラズマ体積が減少している様子が確認できる。



図4.5 ドロプレット導入時の時間測定における連続写真

図4.5からも分かるように、自励式ICPを用いた場合でも100 msオーダーで急激なプラズマパラメータや体積に変化が生じていることが明らかとなった。それでもなおICPが維持できていることから、自励式高周波電源の発振周波数が瞬時に変動して、その結果、インピーダンスマッチングが保たれていると考えられる。そこで、ドロプレット導入時の周波数変動を測定した。試料として、純水からなる5 nLのドロプレットを繰り返し周波数0.5 Hzで導入した。その測定結果を図4.6に示す。

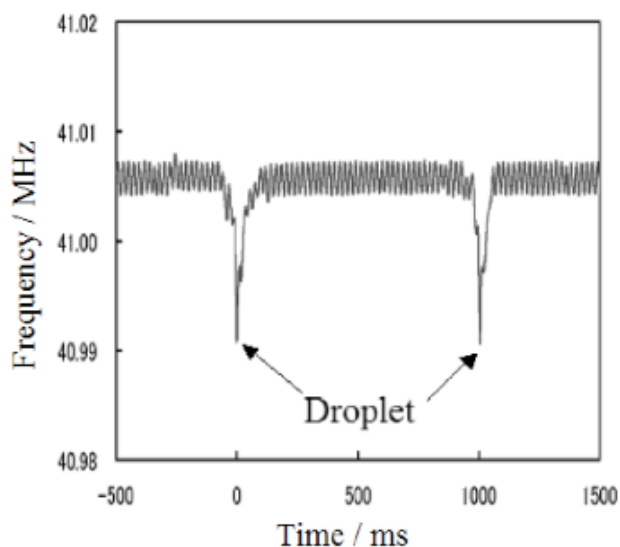


図4.6 ドロプレット導入時の発信周波数変動

ドロプレットが導入されると、周波数が減少する方向に変動するという、挙動を示めすことを確認できた。周波数変動量は17.3 kHzであり、基本周波数に収束するまでに要する時間が130 msであった。本測定により、ドロプレット導入時の急激なインピーダンス変化に、周波数が追従している様子が確認できた。

次に、ドロプレット導入時の自励式ICPの励起温度を、時間分解能を持つ方法で測定を行い、プラズマ温度の変化からドロプレット導入時におけるプラズマの状態と周波数の変動方向が異なる要因について考察した。励起温度は、アルゴンの原子線425.12 nm, 426.63 nmの発光から二線法を用いることで導出した。その結果を図4.7に示す。

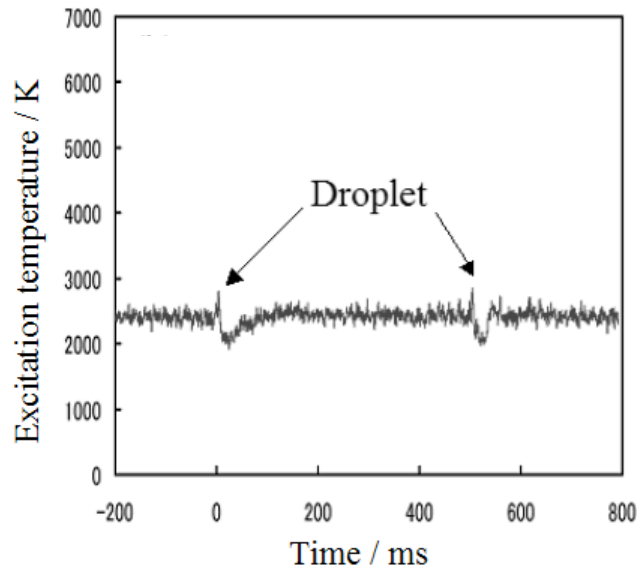


図4.7 ドロプレット導入時の励起温度の変化

ドロプレット導入時の励起温度は500 Kほど上昇した後、1000 K低下する傾向が確認できた。これは熱エネルギーがドロプレットの気化に消費されてプラズマ温度が低下したためだと考えられる。

また、図4.8から、高周波電力の増加に伴い周波数変動量は増加していく。これはすなわち、プラズマの温度が上昇することにより、プラズマが不安定になることが示唆されたことになる。

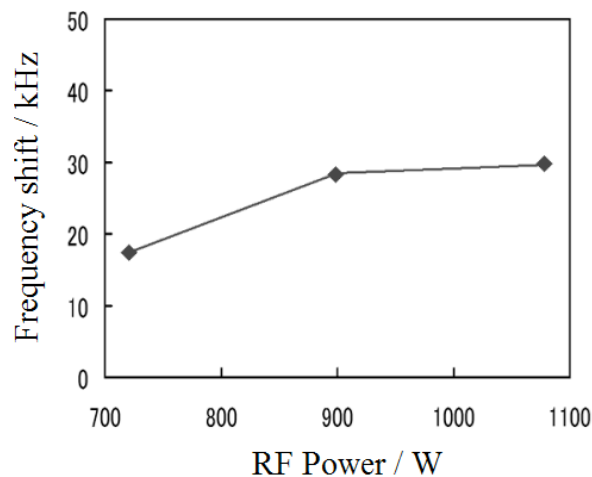


図4.8 高周波電力と周波数変動量の関係

つまり、プラズマ温度を低下させることができれば、プラズマの不安定化を抑制することができると言える。そこで、プラズマガス流量と周波数変動量の関係を測定し、プラズマガスによるプラズマの冷却効果が発振周波数に与える影響を検証した。その測定結果を図4.9に示す。

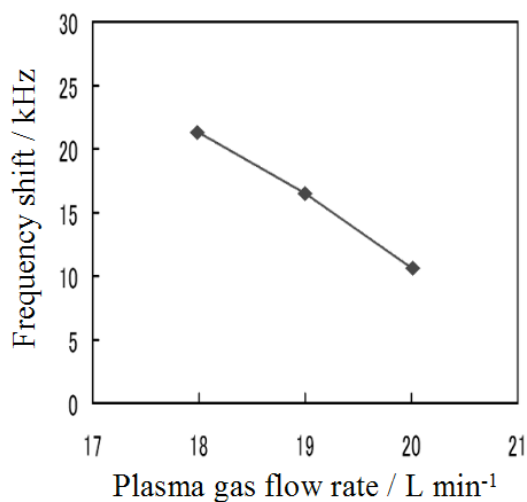


図4.9 プラズマガス流量と周波数変動の関係

図4.9から、プラズマガス流量の増加に伴い周波数変動量が減少している様子が確認できる。プラズマガス流量を増加させることにより、ドロプレット導入時のプラズマの消滅や不安定化をより抑制することができることが明らかとなった。

このように、大きなドロプレットの導入に伴ってICPが明滅したり不安定になったりすることは、プラズマのインピーダンスが変化し、高周波のマッチングが保てなくなるという問題であると考えられた。そこで、機械的な高周波整合ではなく、周波数を変化させることで超高速に周波数整合が期待できる、自励式高周波電源を用いたICPを使用することによって、これらの問題を解決できることを示した。

4.4 インジェクションガスの流量変化と測定位置の関係

4.4.1 インジェクションガス流量変化と測定位置

インジェクションガスは、ドロプレットをプラズマ中まで運ぶためにドロプレットの周囲に、ドロプレットの射出方向と同軸方向に流すガスである。そのため、プラズマに直接導入されるガスであるため、分析感度や分析性能に大きな影響を与えられられる。また、通常用いられるネブライザとスプレーチャンバを使用する時もインジェクションガスが分析感度や信号の安定性などに大きく寄与していることが知られていることから、このガスの重要性を示すことができる^{[9]~[11]}。

まず、発光位置をA.L.C = -2, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20と2 mm間隔で図4.10のように発光位置をスキャンし、測定を行った。なお、インジェクションガスはHeを用いた。装置の都合上、A.L.C=20 mmまでしか動かすことができないため、Arを用いると、発光位置がプラズマの先端部分になってしまうため、発光が観測できなかった。そこで、発光位置が早く、すなわち、プラズマ上流で発光させたいため、熱伝導率の高いHeを使うことによって、ドロプレットの溶媒を蒸発しやすくすることができるのではないかと考え、Heを使用することにした。測定元素はBaで、測定した発光線は、Baのイオン線である455.403 nmを用いた。その結果を図4.11に示す。

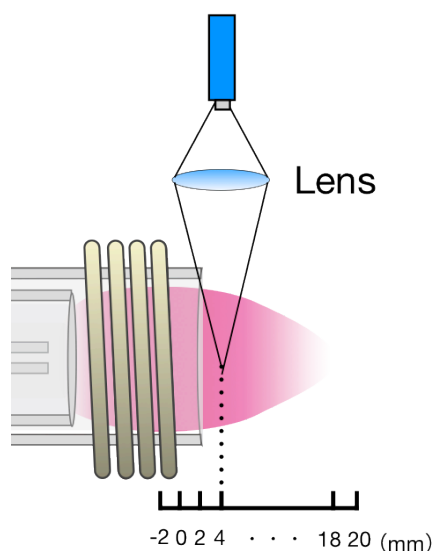


図4.10 発光分析の測定位置

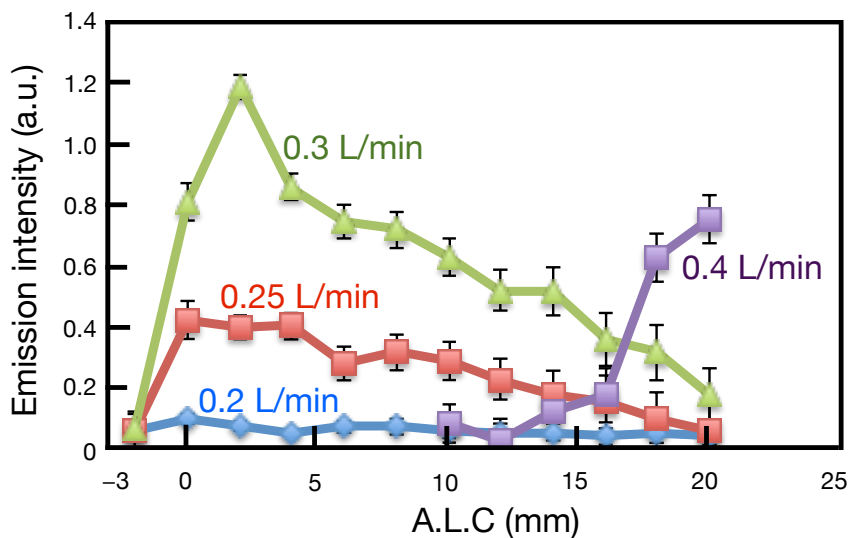


図4.11インジェクションガス流量の変化と発光位置分布におけるBa IIの発光強度関係

上記のグラフより、発光強度については、インジェクションガスが0.3 L/minのときに発光強度が最大になる。また、発光位置においては、ロードコイルから出てすぐのA.L.C = 2 mmのとき発光強度が最大になることが分かった。さらに、インジェクションガス流量が0.2・0.25・0.3 L/minと増加させるに伴って、発光強度が増える。しかし、0.4 L/minまで増やしていくと、Baのイオン線はA.L.C = 12 mm付近までほとんど発光を確認するこ

とができなかったが、A.L.C = 12 mmを越えると急激に発光強度が増加する。これは、インジェクションガスの流量が多くなるため、流速が上がると考えられるため、発光位置が下流になったと考えられる。また、流速の増加に伴い、試料がプラズマ中に滞在する時間が少なくなるため、十分にイオン化されないことが発光強度の減少につながると考えられる。したがって、インジェクションガス流量には最適値が存在し、測定したい位置を考え、適したインジェクションガス流量を決める必要がある。

4.4.2 測定位置による発光の変化

ドロプレットがプラズマ中に運ばれてから、どのような過程で発光するのかについて調査した。ドロプレット試料導入装置から射出されたドロプレットは、プラズマ中に導入されると図4.12のような過程(脱溶媒 (Desolvation)→気化(Vaporization)→原子化 (Atomization)→励起 (Excitation)→イオン化 (Ionization))をたどる^[12]。

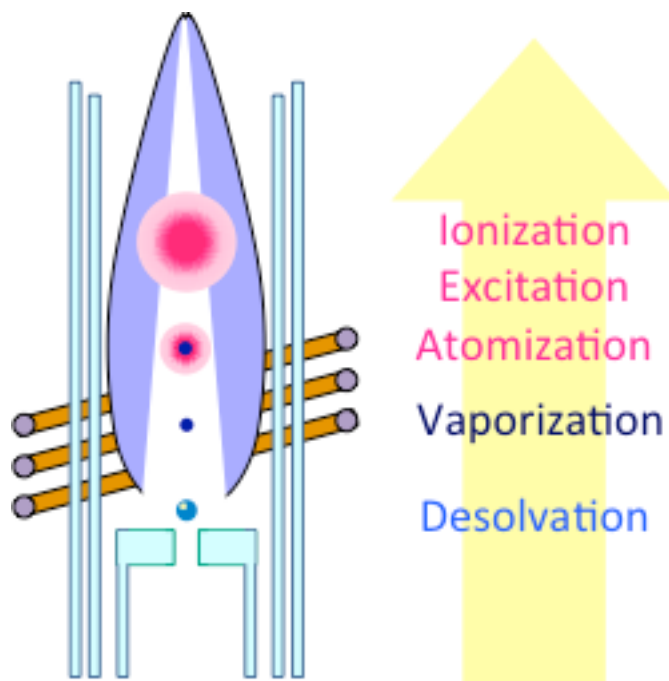


図4.12 ドロプレットがたどるプラズマ中での過程の順序

そこで、測定位置が変化することにより、 H_{α} 線とBaのイオン線はどのように変化するかを調査した。 H_{α} 線は、溶媒からの発光を、Baのイオン線は試料からの発光を評価することができる。実験条件は、インジェクションガスが0.3 L/minで、測定位置をA.L.C = -2~20 mmの間を2 mm間隔で変化させ、 H_{α} 線とBaのイオン線を同時に測定した結果を示す。以下の図4.13(A)~(L)に示す。

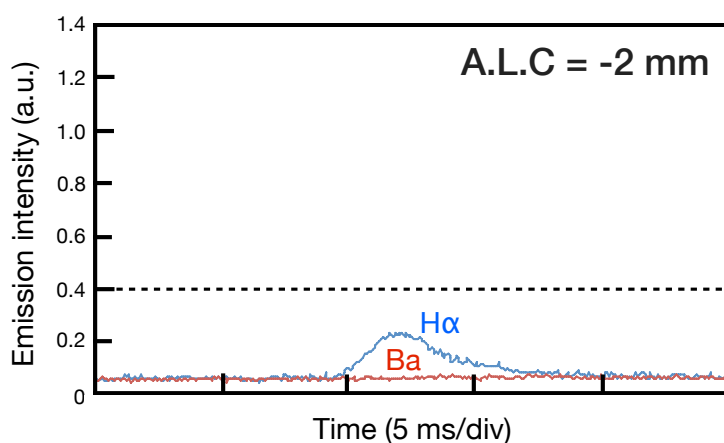


図4.13(A) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = -2 mm)

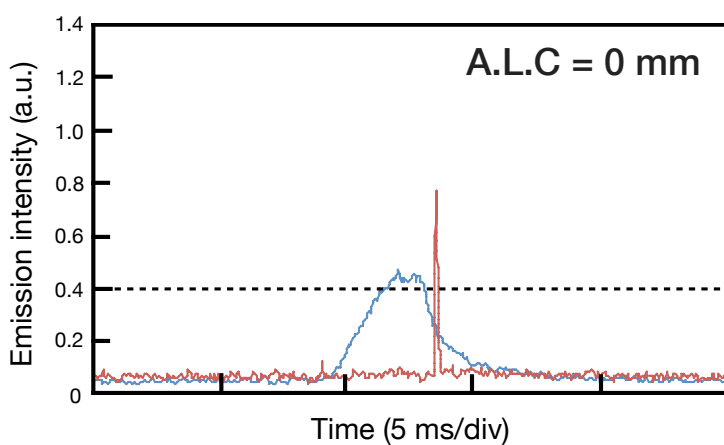


図4.13(B) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 0 mm)

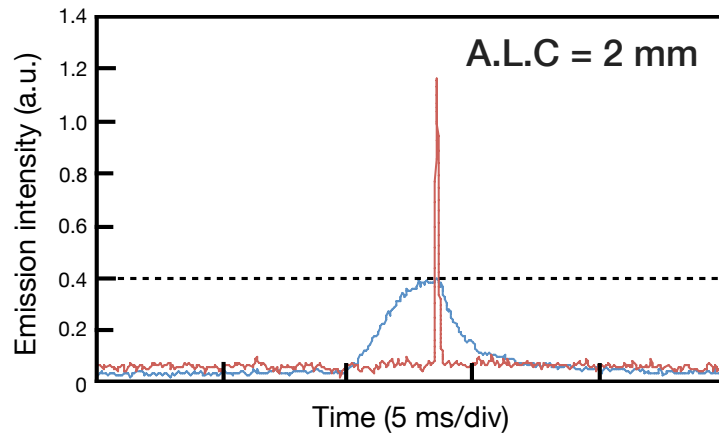


図4.13 (C) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 2 mm)

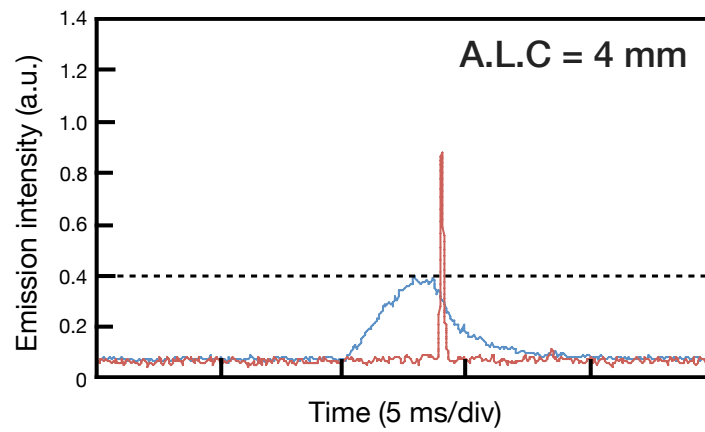


図4.13 (D) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 4 mm)

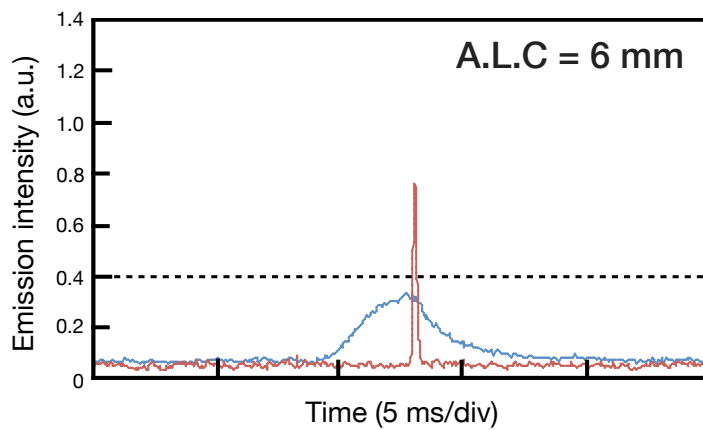


図4.13 (E) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 6 mm)

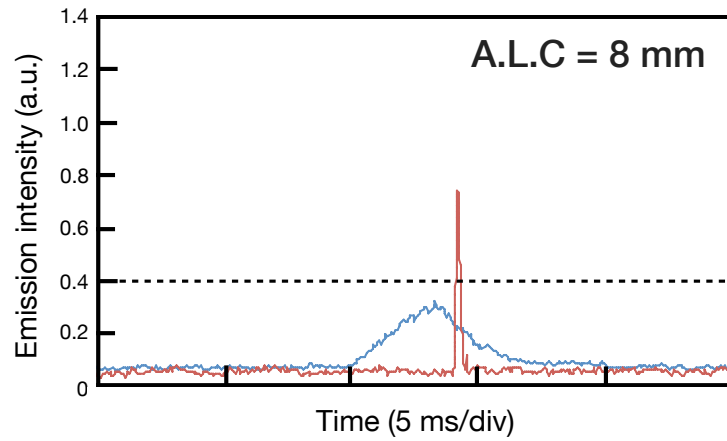


図4.13 (F) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 8 mm)

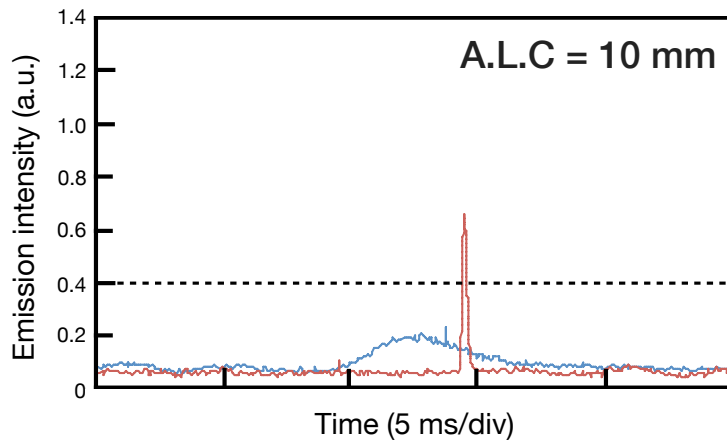


図4.13 (G) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 10 mm)

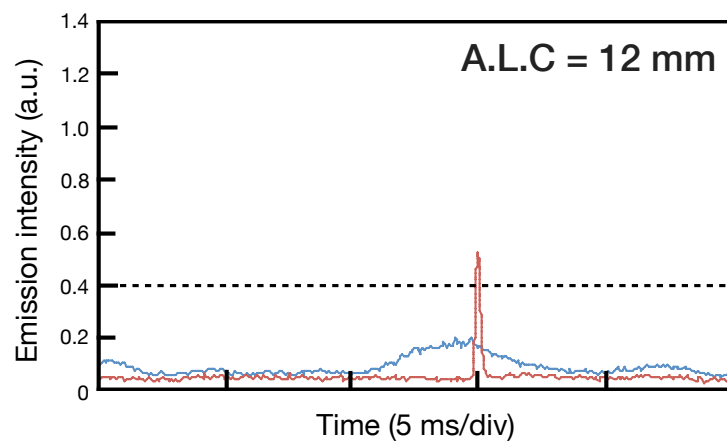


図4.13 (H) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 12 mm)

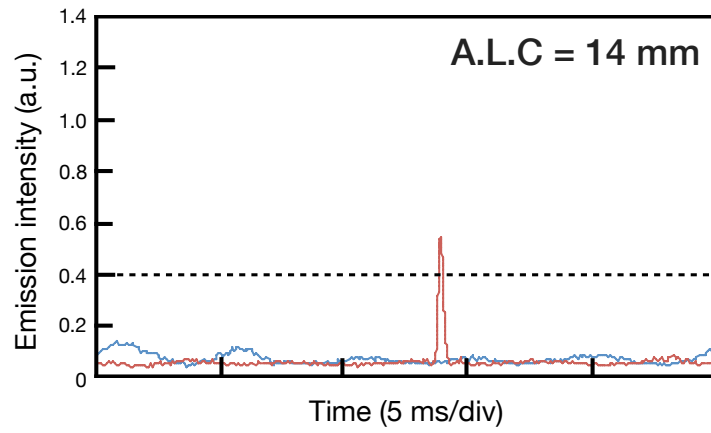


図4.13 (I) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 14 mm)

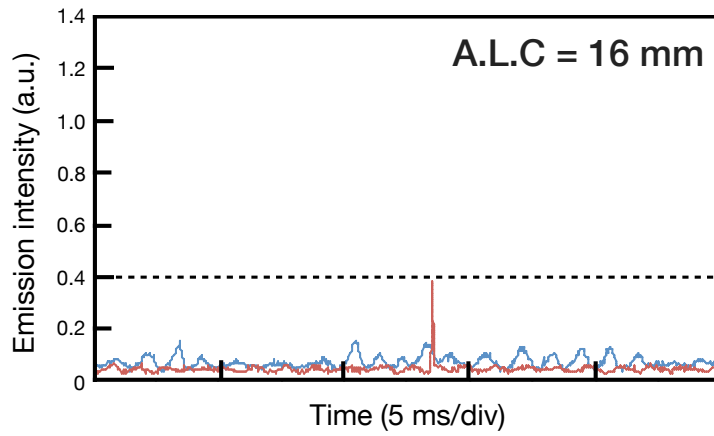


図4.13 (J) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 16 mm)

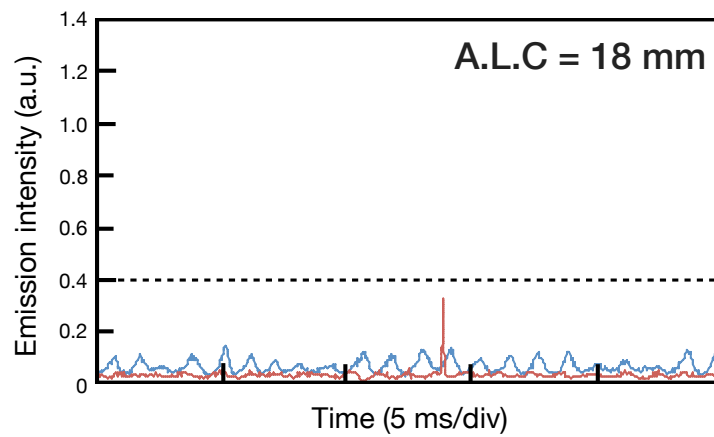


図4.13 (K) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 18 mm)

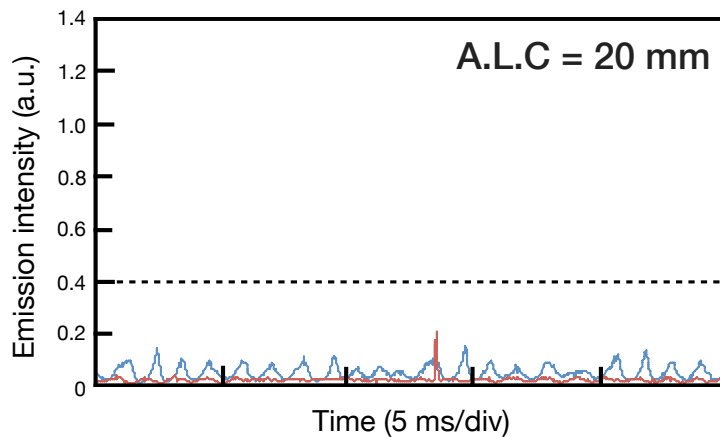


図4.13(L) H_{α} 線とBaのイオン線の同時測定 (A.L.C = 20 mm)

以上の結果より、まず H_{α} 線について考察する。図4.10(a)からも分かるように、A.L.C = 0 mm のとき、 H_{α} 線は最大の発光強度が観測され、測定位置が下流側に来れば来るほど発光強度は小さくなる。また、発光強度が小さくなるA.L.C = 10 mm の位置になるベースラインも揺らぎ始め、ドロプレットに含まれる溶媒はプラズマ中でドロプレットとして存在せず、拡散しているためこのように発光強度は小さく、揺らぎが大きい結果になっていると考えられる。一方で、Baのイオン線はA.L.C = 2 mm のとき発光強度が最大となり、 H_{α} 線と同様にプラズマの下流に行くに従い、発光強度は弱くなる。また、 H_{α} 線とBaのイオン線を比べると、発光スペクトルのパルス幅が極めて短いことが分かる。この理由として考えられることのイメージを図4.14に示す。

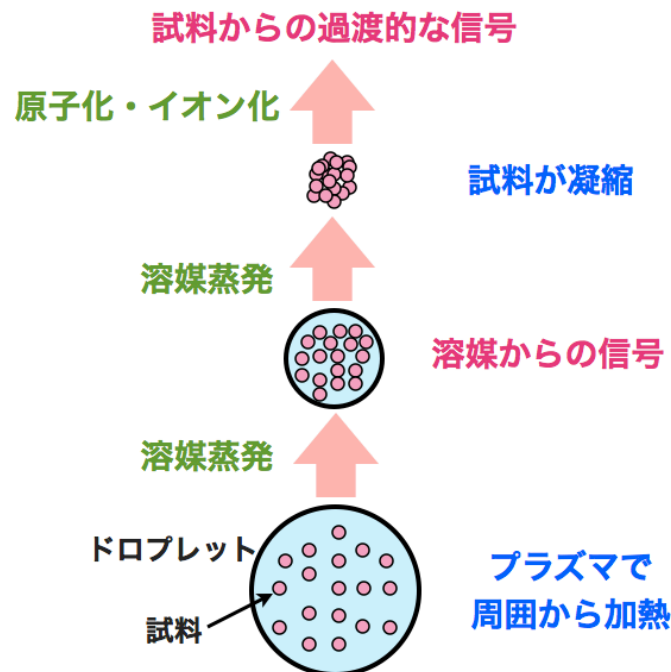


図4.14 ドロプレットのイオン化過程

プラズマに導入されたドロプレットは、周囲から加熱され、溶媒が蒸発する。蒸発した水蒸気から順に、原子化・イオン化されていくため、まず水素からの発光が確認された。さらに、試料量に比べ溶媒の体積は1000倍程度大きいため、その発光量は多く、溶媒が発光している時間も長いと考えられるため、スペクトル幅は広がる。溶媒が蒸発していくため、試料は凝縮されていき、凝縮された状態で原子化・イオン化するため、 H_{α} 線に比べ、試料からの発光スペクトルは過渡的であり、信号強度が高くなった。これは、本研究で開発したドロプレット試料導入装置の目的でもある試料を過渡的に導入し、過渡的な信号を得ることができるため、ノイズに埋もれることなく信号を検出できることを示したとも言える。

4.4.3 分光写真器を用いた時間分解発光計測

次にICCDカメラを用いて、ドロプレットが導入されたときのプラズマ中での発光の空間分布と時間分解測定を行った。時間的な広がりや前節で確認することができたので、空間的な広がりについて調査するために、次のような実験をおこなった。この実験で用いた実験のセットアップを図4.15に示す。ICCDカメラ(Newton CCD and EMCCD Cameras, ANDOR)を用いた。

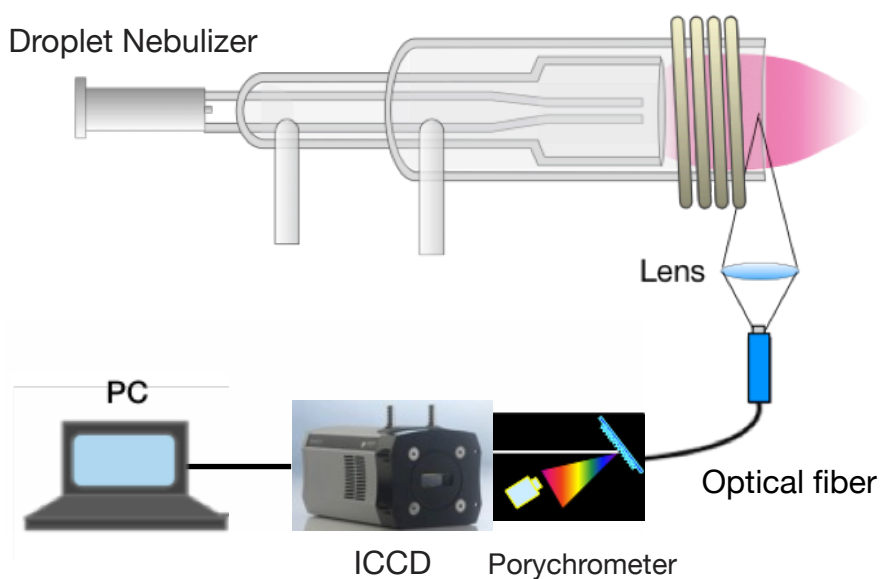
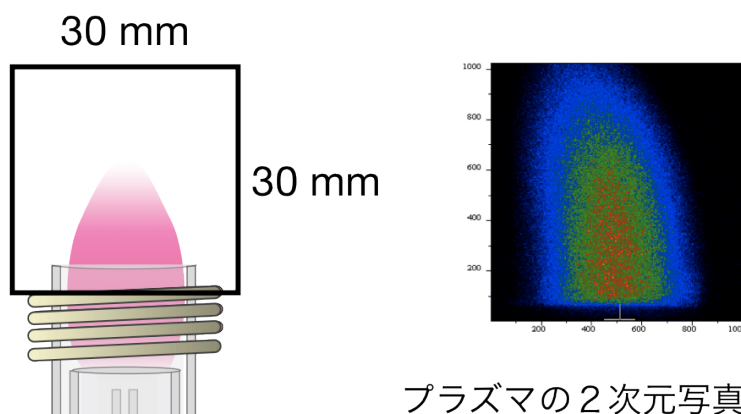


図4.15 ICP発光分光分析のセットアップ

この測定を行うことによって、プラズマの2次元写真を取得することができるので、ドロプレットが通過する過程が時間的にも空間的にも分かる。これまでに実験と同様にH α 線とBaのイオン線を測定した。よって、それぞれのプラズマ中での発光の様子を観測することができる。その測定の詳細と取得できる画像の紹介を図4.16に示す。



プラズマの2次元写真に相当

図4.16 ICCDカメラによる測定位置と取得できる画像データ

また、発光強度のスケールは、図4.17に示す。暗いところほど発光強度が小さく、明るくなるにしたがい発光が大きくなる。

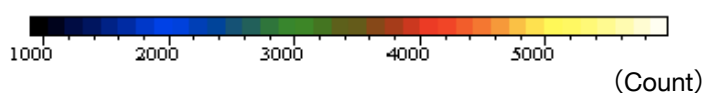


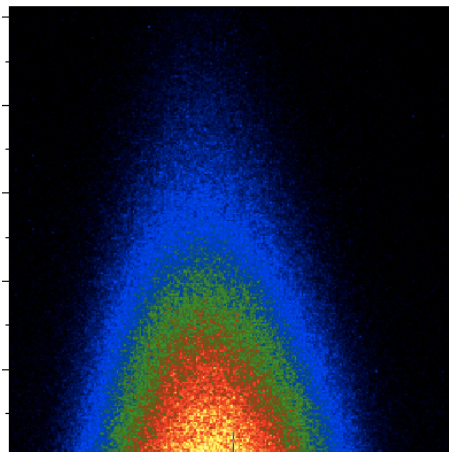
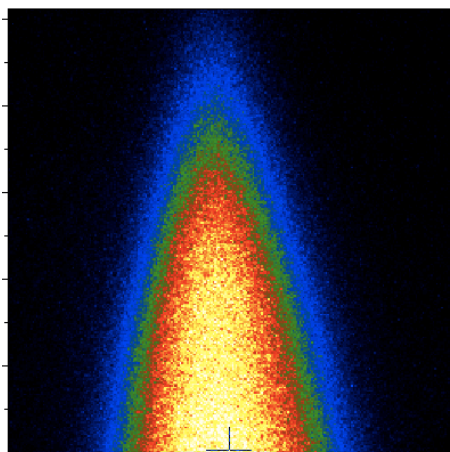
図4.17 発光強度スケール

以下の図4.18に示す画像写真は、ドロプレットが射出されてから同じ時間後の H_{α} 線とBaのイオン線の発光を測定している。200 μs に1枚の画像を撮ることができるが、そのうちで変化がわかりやすい写真を抜き出している。また、ドロプレットが射出されてからの時間とともに示す。

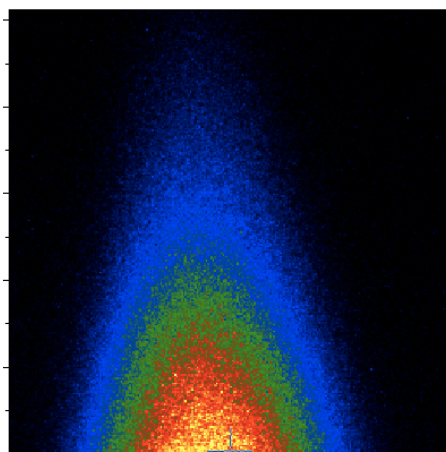
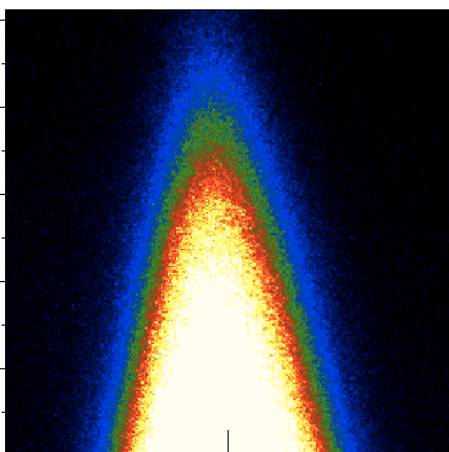
H_α線(656.285 nm)

Ba のイオン線(455.403 nm)

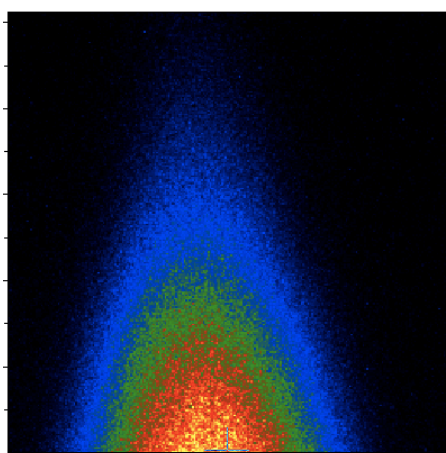
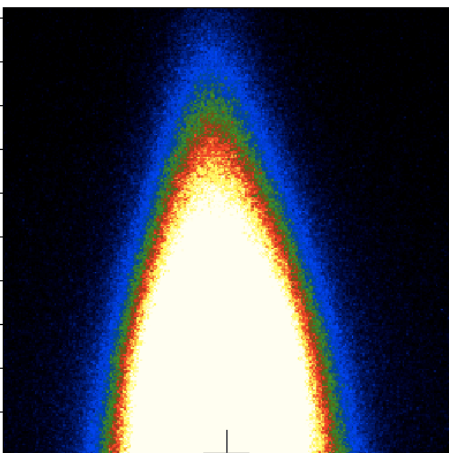
2.7 m 秒後



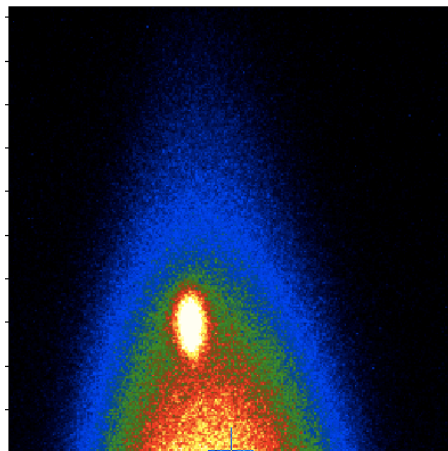
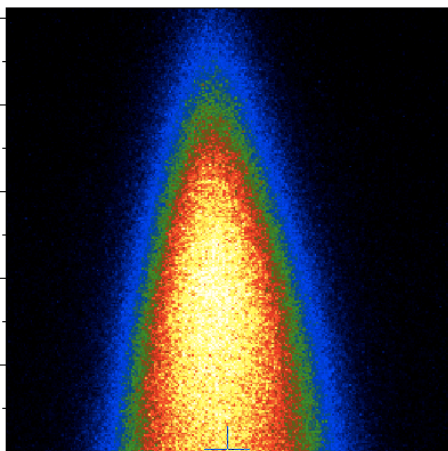
4.5 m 秒後



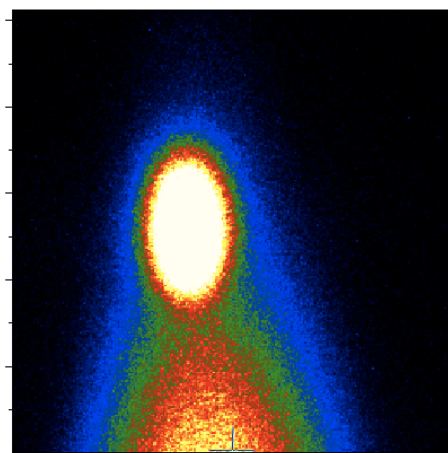
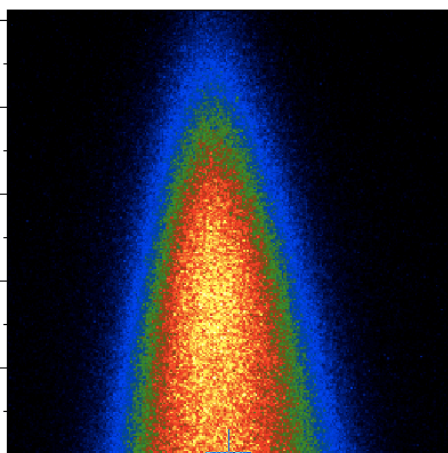
6.5 m 秒後



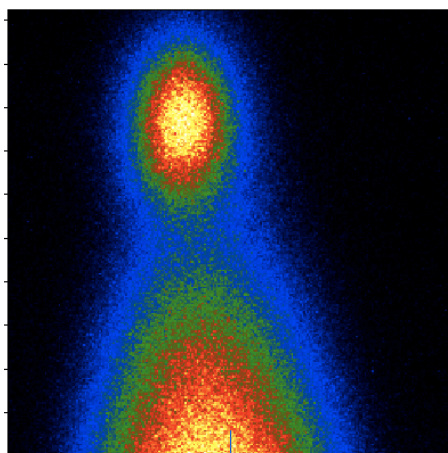
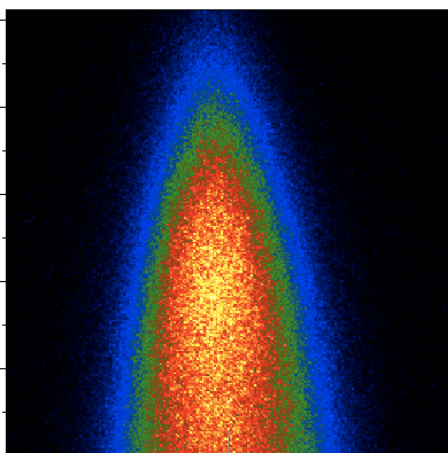
7.5 m 秒後



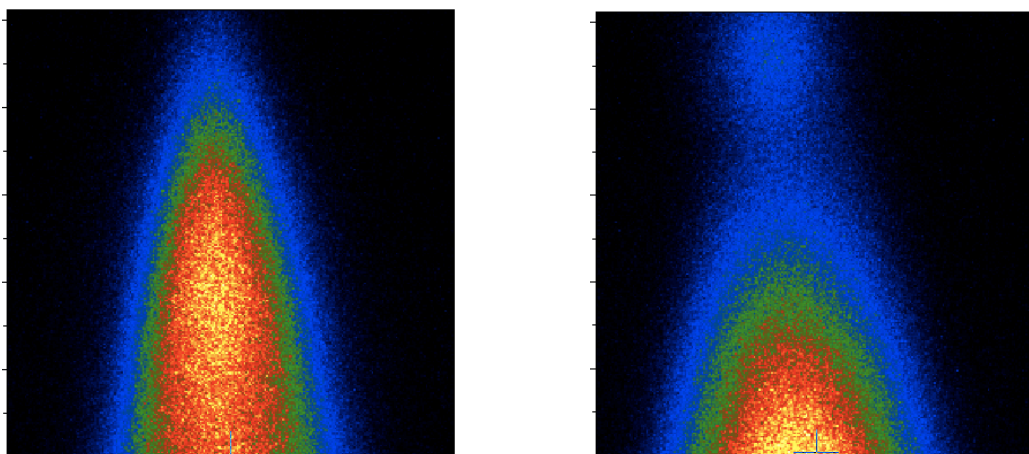
7.9 m 秒後



8.3 m 秒後



8.7 m秒後



9.5 m秒後

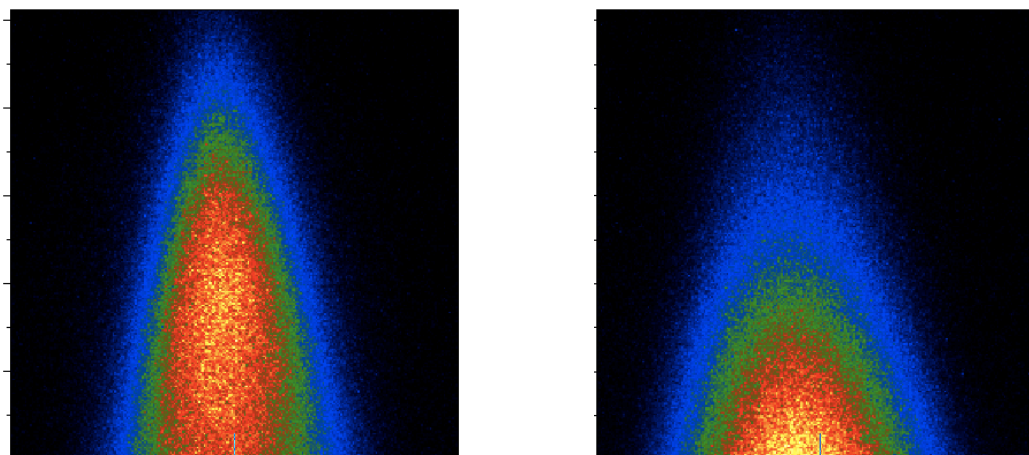


図4.18 ICCDカメラによる H_{α} 線(左)とBaのイオン線(右)の画像

まず、時間的な変化をもとに見ていくと、 H_{α} 線の発光は、ドロプレットが射出されてから、6.5 ミリ秒後に発光が一番強くなり、その後、発光は小さくなっていく。一方で、Baのイオン線の発光は、7.5 ミリ秒後に発光が見え始め、7.9 ミリ秒後に発光が最大になる。この画像からドロプレットの速度を計算すると、約6 ミリ秒となる。また、インジェクションガスの流速を計算する(インジェクションガス流量:300 mL, センターチャネル:直径2 mmプラズマのガス温度を3000Kの場合,)と、約7 ミリ秒となり、計算値と測定値もほぼ同様の結果が得られた。また、空間的な広がりで見ると、 H_{α} 線の発光は広がりをもつことが分かる。その空間的な広がりが一番強いときで約24 mmである。一方で、Baの発光は H_{α} 線の発光に比べてその空間的広がりは、約12 mmと空間的広がりは半

分になった。溶媒からの発光は試料からの発光に比べ、時間的にも空間的にも広がっている。したがって、図4.14に示したイメージ図を用いた説明と合致すると言える。

4.5 ドロプレット試料導入二重収束

Mattauch-Herzogセクターフィールド

マススペクトロメータ

この研究は、博士一貫教育プログラムの派遣プロジェクトによって、アメリカのIndiana Universityに3ヶ月間留学させていただいたときにおこなった実験である。二重収束Mattauch-Herzogセクターフィールドマススペクトロメータ(ICP-MHMS)は、近年、スペクトロ社が発売し始めた、とても新しい分析装置である。この装置の原型を作ったのが、私が留学させていただいたIndiana UniversityのHieftje教授のグループである^{[13]~[16]}。そのため、プロットタイプの実験装置を使うことができ、ドロプレット試料導入装置をこの装置に適用した実験は世界的に見ても初めてであると思われる。その写真を図4.19に示す。

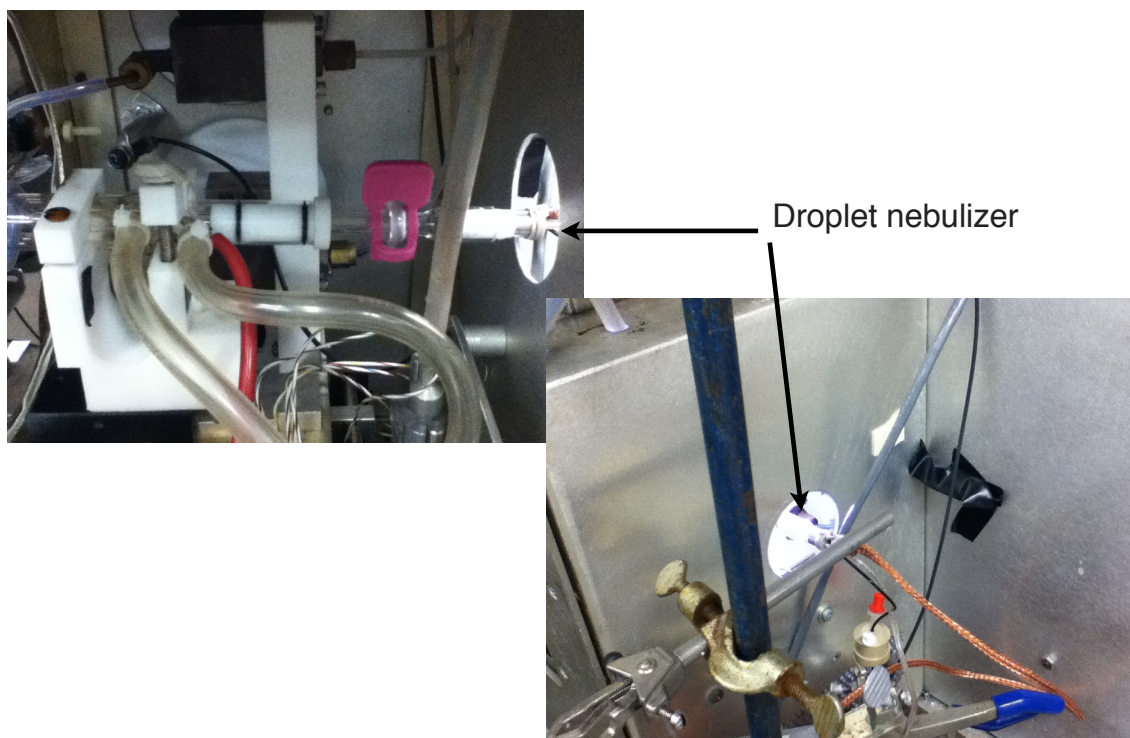


図4.19 ドロプレット試料導入装置をICP-MHMSに適用した写真

図4.20にICP-MHMSの装置概要、図4.21に装置全体の写真を示す。

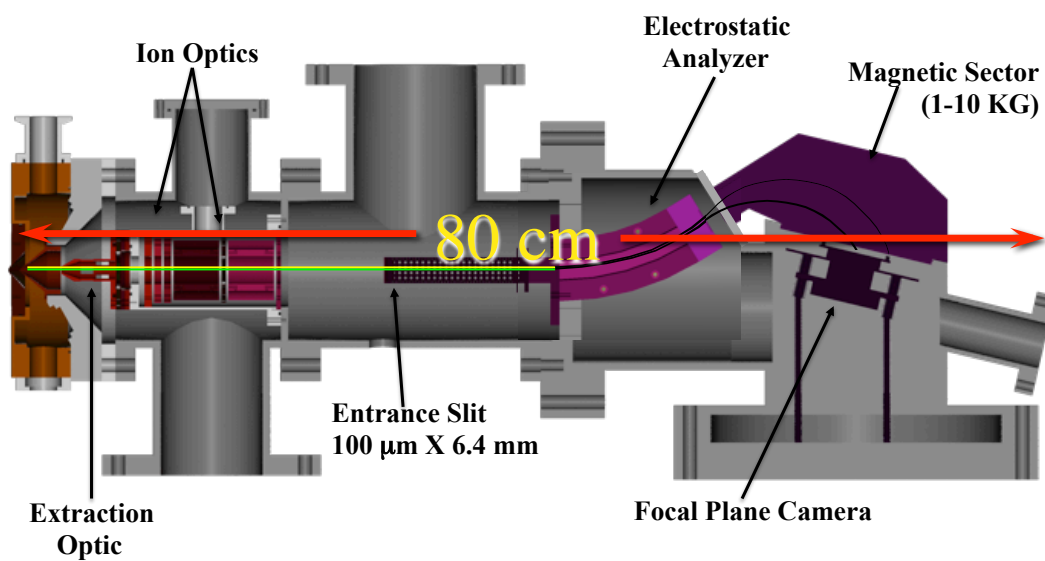


図4.20 ICP-MHMSの概略図

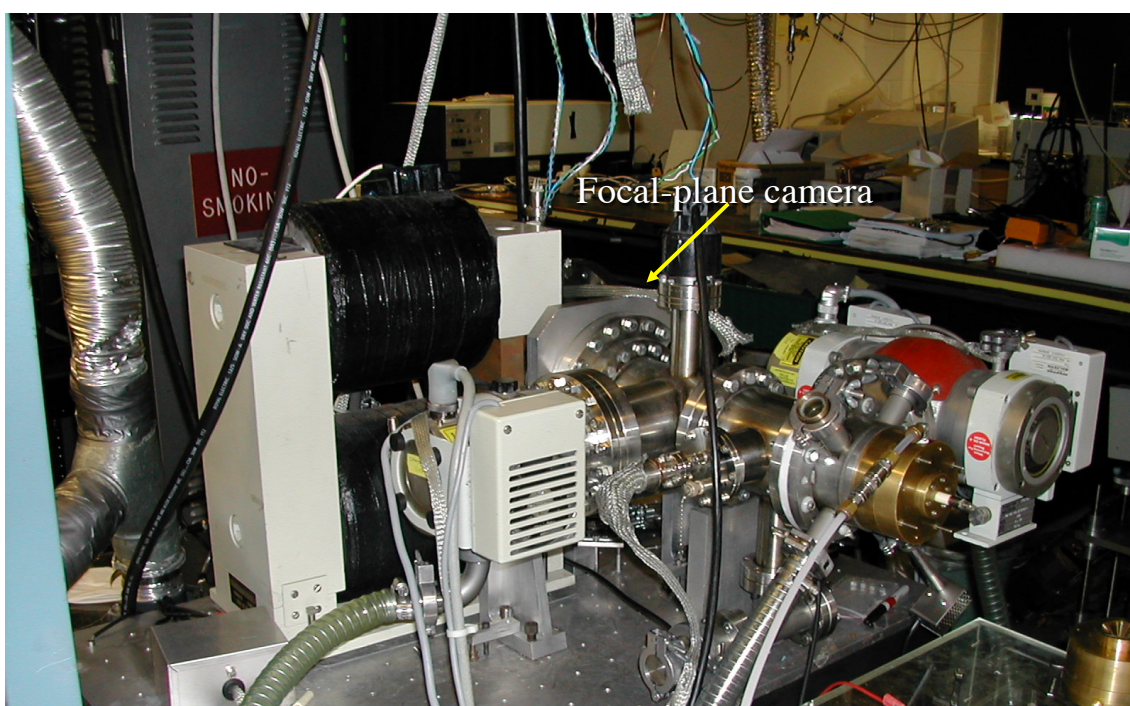


図4.21 ICP-MHMSの装置全体写真

今回用いた装置は、通常のネブライザを用いた連続導入を想定しているため、ドロプレット試料導入装置をICP-MHMSに適用しても正確に分析をおこなうことができるかどうかを調べるために、鉛の同位体比を求めた。この実験で得られたスペクトルを図4.22に示す。このときの実験条件は、入力電力は1200 W、導入周波数は100 Hz、100 mg/Lの鉛の標準溶液試料を用いた。

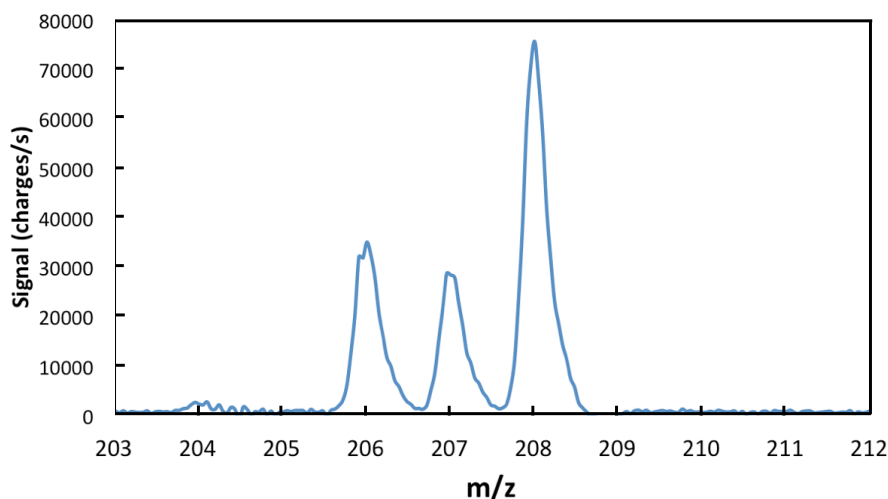


図4.22 ドロプレットの連続導入による鉛スペクトル

鉛の同位体比を計算すると、

$$^{206}\text{Pb} : ^{207}\text{Pb} : ^{208}\text{Pb} = 25.3 : 20.1 : 54.7$$

鉛の天然同位体比は、

$$^{206}\text{Pb} : ^{207}\text{Pb} : ^{208}\text{Pb} = 24.1 : 20.7 : 52.4$$

となり、その誤差はどれも約5%以下である。この結果から、ドロプレット試料導入装置を用いた分析においても、正確に分析できることが示せた^[17]。

また、このスペクトルから検出下限値を算出した。ブランク試料を導入したときのバックグラウンドスペクトルの3SDから算出した。その結果、検出下限値は16.7 $\mu\text{g/L}$ 、検出下限絶対量は3.0 pgとなった。

4.5.1 ドロプレット試料導入装置に適した信号処理方法の検討

これまでの研究でドロプレット試料導入装置から得られる信号は1 ms以下と過渡的であることが分かってきた。そこで注目すべき点は、この装置の積分時間である。この装置の積分時間は試料を連続に導入することを前提としているため、積分時間は最短でも760 msである。そのため、ドロプレットから得られる信号幅から考えると、とても長いと言える。そこで、760 msの積分をおこなわずに、2 msごとに信号をその都度得る、すなわち、生データを直接取得する方法を試みた。本装置の検出器の部分の写真と回路図を図4.23に示す。検出器にはFaraday-Strip Array Detectorを用いており、この検出器には、512個のFaraday-Strip(イオンを検出するストリップ)が並んでいる。この装置では、電場部分と磁場部分でイオンビームが質量数ごとに分離され、各々のFaraday-Stripに到達することで、多元素を同時に測定している。しかし、質量数をすべて($m/z = 5 \sim 250$)を同時に測定することはできず、およそ70の質量数は同時に取得することができる。

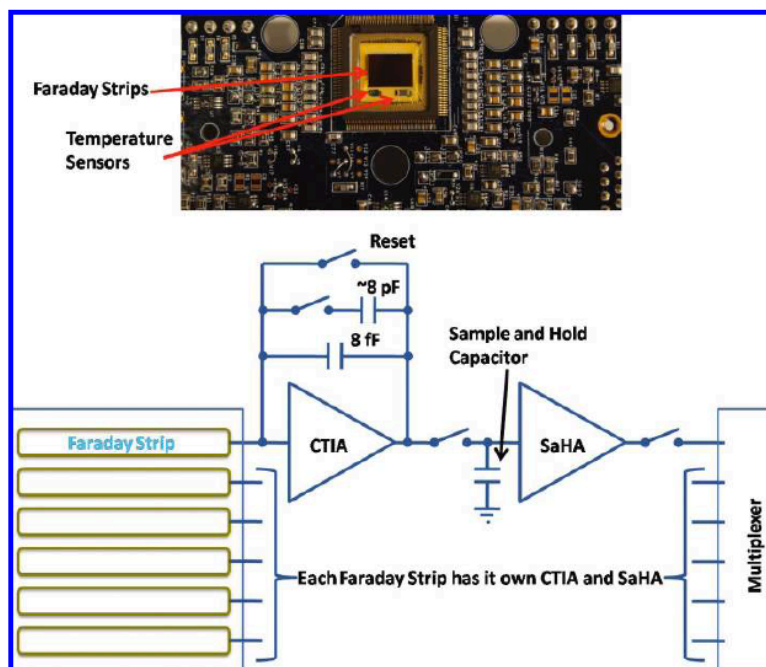


図4.23 検出器の写真と回路図

今回の測定には、100 mg/Lの銀の標準溶液を用いた。取得したデータを次の図4.24に示す。

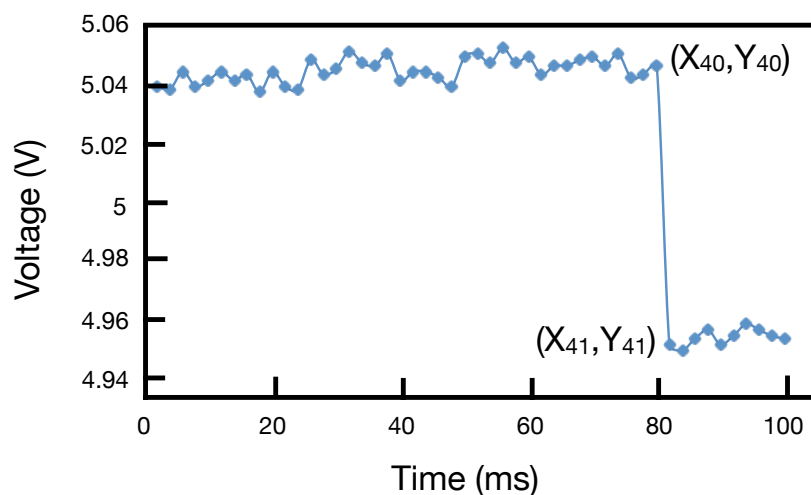


図4.24 2 msごとに取得した信号 (^{107}Ag)

このデータは、銀のスペクトルを取得するために、その質量数付近 ($m/z = 105 \sim 110$) にフォーカスして、信号を取得している。横軸は時間で、1つの測定点は、2 msごとに1つのFaraday-Stripで取得された信号の電圧を示している。ドロプレットからの信号が検出器に到着したときだけ、電圧が下がる。これは1つのFaraday-Stripに着目したグラフである。この方法で各々のFaraday-Strip (512個分)からのデータを取得した。

次に、80 ms付近で電圧が急激に変化していることに注目した。この変化をスロープ関数を用いて次のような式を用いて、横軸を質量数、縦軸を信号強度に変換した。

$$-\text{SLOPE}(Y_{40}:Y_{41}, X_{40}:X_{41}) \times 24194 \times 2 / 0.009$$

X_{40} , X_{41} , Y_{40} , Y_{41} グラフ上に示した、急激に電圧が変化している部分の2点を使用した。各々のFaraday-Stripに取得した信号を上記の式によって計算し、その値をプロットすると、横軸が質量数、縦軸が信号強度に変換されたことになる。この手法で得られたグラフを図4.25に示す。また、標準の方法 (積分時間760 ms) で取得したグラフを図4.26に示す。

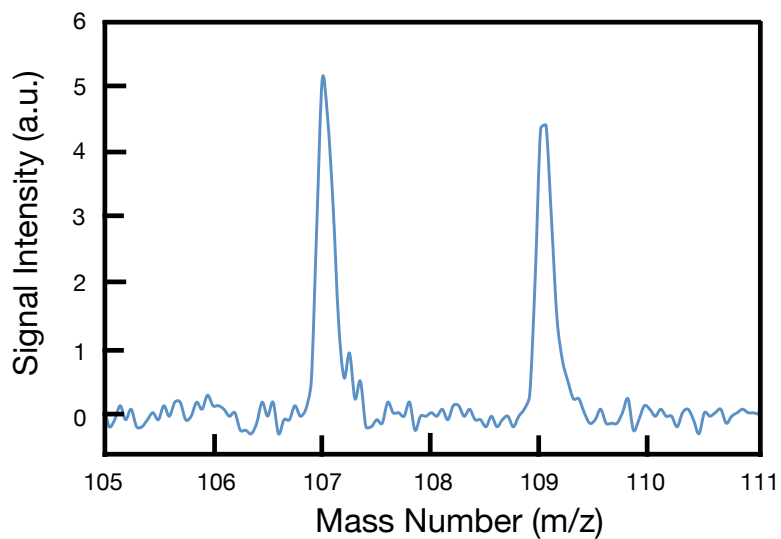


図4.25 2 msごとに信号を取得した場合の ^{107}Ag の質量スペクトル

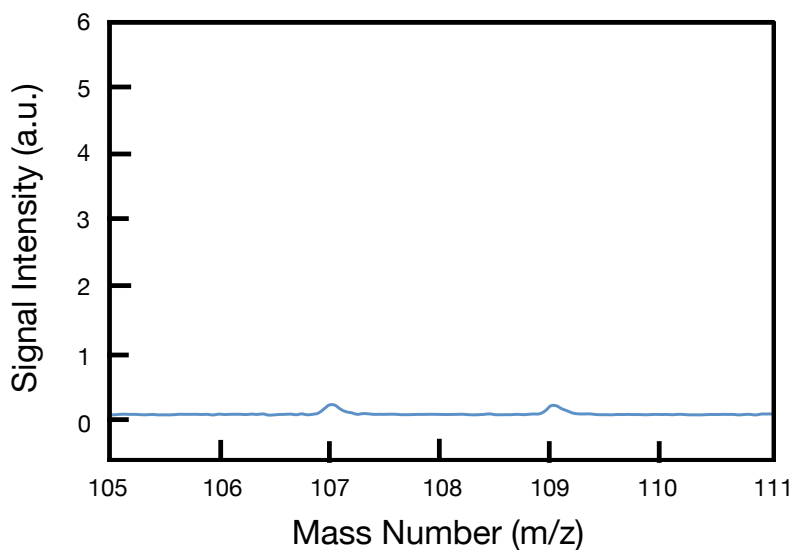


図4.26 通常の積分時間760 msで取得した ^{107}Ag の質量スペクトル

図4.25のグラフは不必要なノイズを積分することなく、ドロプレットからの信号のみを取得できる方法のため、通常の信号取得方法と比べると約25倍もの信号強度を得ることができた。したがって、過渡的な試料導入系に適した、不要なノイズを積分しない信号取得方法を開発することができた。

4.6 結言

本章では、まず、ドロプレット試料導入装置をICP-AESに適用し、電磁バルブ式とピエゾ素子式のドロプレット試料導入装置の比較をおこなった。その結果から、ピエゾ素子式のドロプレット試料導入装置を開発したことによって、ドロプレットの体積を小さくすることに成功した。その結果、ドロプレットからの発光強度の安定性が向上し、検出下限絶対値も向上した。この理由として、プラズマに導入されるドロプレットの量が減ったことで試料がイオン化されやすくなったため、検出下限絶対値が向上したのではないかと考えられる。

次に、体積が大きなドロプレットがICPに導入されたとき、ICPが明滅あるいは消滅するなどの問題が生じており、上記のようにドロプレットを小さくする方法ではなく、別の方法を試みた。ICPの明滅や消滅の原因は、ドロプレットを導入することにより、プラズマの電気特性が変化することでインピーダンスが変化し、その結果、高周波のマッチングが保てなくなることであったと考えられた。そこで、ICPの持つインピーダンスが自動的に高周波電源の発振周波数にフィードバックされ、常に高周波のマッチングが整合状態に保たれる、自励式高周波電源を用いた自励式ICP生成システムを、ドロプレット試料導入装置に適用することで、こうした問題を解決した。その結果、ドロプレット導入時の急激なインピーダンス変化に、発振周波数が追従している様子が確認できた。したがって、ドロプレット導入法のようなプラズマに対してパルス的に負荷がかかる導入法に対しては、自励式高周波電源を用いた自励式ICP生成システムが有用であることが分かった。

次に、インジェクションガスの流量を変化と発光する位置を調査した。その結果、インジェクションガスが0.3 L/min、測定位置はA.L.C = 2 mmのときに一番発光強度が高くなることが分かった。この実験から、インジェクションガスの流量によっても測定する位置によっても発光強度が大きく変化することが分かった。したがって、実験をする際は、測定に合わせて、インジェクションガス流量と測定位置を最適化する必要がある。

また、ドロプレットがプラズマ中に導入されてからどのように発光しているのかを詳細に調べた。まず、時間変化に注目してモノクロメータを用いて実験をおこなった。その結果、溶媒からの発光(H_{α} 線)は、試料からの発光(Ba II)に比べ、スペクトル幅が約10倍長くなることが分かった。次に、ICCDカメラを用いて空間分布を測定した結果、一番強く発光したときを比べると、溶媒からの発光(H_{α} 線)は試料からの発光(Ba II)に比べ、約2倍広がっていることが分かった。したがって、溶媒からの発光は時間的にも空

間的にも広がり、それに比べ試料からの発光は時間的にも空間的にも圧縮されていることが分かった。本研究で開発したドロプレット試料導入装置の1つのメリットである、溶液試料を時間的にも空間的にも圧縮して導入できているため、ノイズに埋もれることなく信号を検出できていることも示すことができたと言える。

また、ドロプレット試料導入装置をICP-MHMSに適用した。ドロプレット試料導入ICP-MHMSを用いて、鉛の同位対比を測定し、約5%以下の誤差で天然同位対比と一致していることが分かった。ドロプレット試料導入ICP-MHMSを用いて分析できることが示した。さらに、信号取得方法に注目し、過渡的な信号を取得するため適した信号取得方法を開発した。従来の方法では、積分時間がドロプレットの信号幅に比べて、1000倍程度大きいため、不要なノイズを積分することなく、信号のみを取得できる信号取得開発した。その結果、25倍の信号強度を達成し、ドロプレット試料導入装置のような過渡的な信号を得られる場合では、この手法が有用であることが分かった。

細胞導入をするためにはある程度のドロプレットの大きさが必要であると考えられるので、生成時のドロプレットの大きさは変化させず、溶媒の負荷のみを減らすことで感度向上につながるのではないかと考えた。

そこで、次章では溶媒負荷低減を目的としたドロプレット試料導入用の脱溶媒装置の開発を行った。

参考文献

- [1] M. P. Dziewatkoski, L. B. Daniels and J. W. Olesik, Time-Resolved Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Measurements with Individual, Monodisperse Drop Sample Introduction, *Anal. Chem.*, **68**, pp.1101–1109 (1996).
- [2] K. Shigeta, H. Traub, U. Panne, A. Okino, L. Rottmann, and N. Jakubowski, Application of a micro-droplet generator for an ICP-sector field mass spectrometer - optimization and analytical characterization, *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**, pp. 646–656 (2013).
- [3] D. R. Wiederin and R. S. Houk, Measurements of Aerosol-particle Sizes from a Direct Injection Nebulizer, *Appl. Spectrosc.*, **45**, pp.1408–1412 (1991).
- [4] J. A. McLean, H. Zhang, and A. Montaser: “Direct Injection High-Efficiency Nebulizer for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”, *Anal. Chem.*, **70**, pp.1012–1020A (1998).
- [5] J. L. Todol and J. M. Mermet: “Evaluation of a direct injection high-efficiency nebulizer (DIHEN) by comparison with a high-efficiency nebulizer (HEN) coupled to a cyclonic spray chamber as a liquid sample introduction system for ICP-AES”, *J. Anal. At. Spectrum.*, **16**, pp.514–520 (2001).
- [6] M. G. Minnich, J. A. McLean, and A. Montaser: “Spatial aerosol characteristics of a direct injection high efficiency nebulizer via optical patternation”, *Spectrochimica Acta Part B*, **56**, pp.1113–1126 (2001).
- [7] K. Kahen, A. Strubinger, J. R. Chirinos, and A. Montaser: ”Direct injection high efficiency nebulizer- inductively coupled plasma mass spectrometry for analysis of petroleum samples”, *Spectrochimica Acta Part B*, **58**, pp.397–413 (2003).
- [8] 目黒太一, 宮原秀一, 中島尚紀, 堀田栄喜, 沖野晃俊:「微量試料元素分析用ドロプレット試料導入ヘリウム誘導結合プラズマの基本特性」電気学会プラズマ研究会, PST-07-069, (2007).
- [9] 阪田健一, ICPの開発と楽しみ～仕事と趣味の境界で～, プラズマ分光分析研究会第82回講演会 (2011).
- [10] G. C. Y. Chan, Z. Zhu, G. M. Hieftje, Operating parameters and observation modes for individual droplet analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* **76**, pp. 77–86 (2012).

- [11] G. C. Y. Chan, Z. Zhu, G. M. Hieftje, Effect of single aerosol droplets on plasma impedance in the inductively coupled plasma, *Spectrochim. Acta Part B* 76, pp. 87-95 (2012).
- [12] J. W. Olesik, Investigating the Fate of Individual Sample Droplets in Inductively Coupled Plasmas, *Appl. Spectrosc*, 51, 5, pp. 158A-175A (1997).
- [13] J.A. Felton, G. D. Schilling, S. J. Ray, R. P. Sperline, M. B. Denton, C. J. Barinaga, D. W. Koppenaal and G. M. Hieftje, Evaluation of a fourth-generation focal plane camera for use in plasma-source mass spectrometry, *J. Anal. At Spectrom*, 26, pp. 300-304 (2011)
- [14] G. D. Schilling, S. J. Ray, A. A. Rubinshtein, J. A. Felton, R. P. Sperline, M. B. Denton, C. J. Barinaga, D. W. Koppenaal, and G. M. Hieftje, Evaluation of a 512-Channel Faraday-Strip Array Detector Coupled to an Inductively Coupled Plasma Mattauch-Herzog Mass Spectrograph, *Anal. Chem.* 81, pp. 5467-5473 (2009)
- [15] A.K. Knight, R.P. Sperline, G.M. Hieftje, E. Young, C.J. Barinaga, D.W. Koppenaal and M.B. Dentona, The development of a micro-Faraday array for ion detection, *INT J MASS SPECTROM*, 215, pp. 131-139 (2002).
- [16] G. D. Schilling, F. J. Andrade, J. H. Barnes, R. P. Sperline, M. B. Denton, C. J. Barinaga, D. W. Koppenaal, and G. M. Hieftje, *Anal. Chem.*, 78, pp. 4319-4325 (2006)
- [17] 長尾敬介, 基礎から学ぶマススペクトロメトリー/質量分析の源流 第10回同位体の質量分析, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 59, (2011).

第 5 章 ドロプレット試料導入用脱溶媒装置の 開発

5.1 緒言

第 4 章では、ドロプレット試料導入装置を ICP-AES に適用し、インジェクションガスのガス流量や測定位置の関係など、ドロプレット試料導入 ICP-AES の詳細な調査を行ってきた。その結果から導入されるドロプレットの体積が、霧状に噴霧する従来法に比べ大きいことが感度に大きく影響していると考えられる結果を得た。また、これまでの実験においても第 4 章でドロプレット試料導入装置を ICP-MHMS に適用してきたが、ドロプレットの連続導入において、1 滴相当の検出下限絶対値を求めると、 ^{208}Pb において 3.0 pg という結果を得た。しかし、本研究でターゲットとしている単一細胞分析において微量元素を測定できるレベル (ag レベル) を達成するためには、更なる感度向上を必要とする。その方法として、本章では、ドロプレットが導入されたときのプラズマに与える溶媒負荷の低減を目的として、脱溶媒装置の開発を行ったのでその詳細な構成と脱溶媒が分析感度やプラズマに与える影響を報告する。なお、プラズマへの溶媒負荷を低減するための研究はドロプレット試料導入装置を用いた研究ではなくても数多く行われており、分析能力の向上には重要な検討すべき課題である^{[1]-[5]}。

5.2 脱溶媒の必要性

まず始めに、キャピラリ内径 30, 70 μm のドロプレット試料導入装置を用いて、直径の異なるドロプレットを生成し、発光分析の比較をおこなった。この実験セットアップを図 5.1 に示す。また、その結果を、図 5.2 に示す。

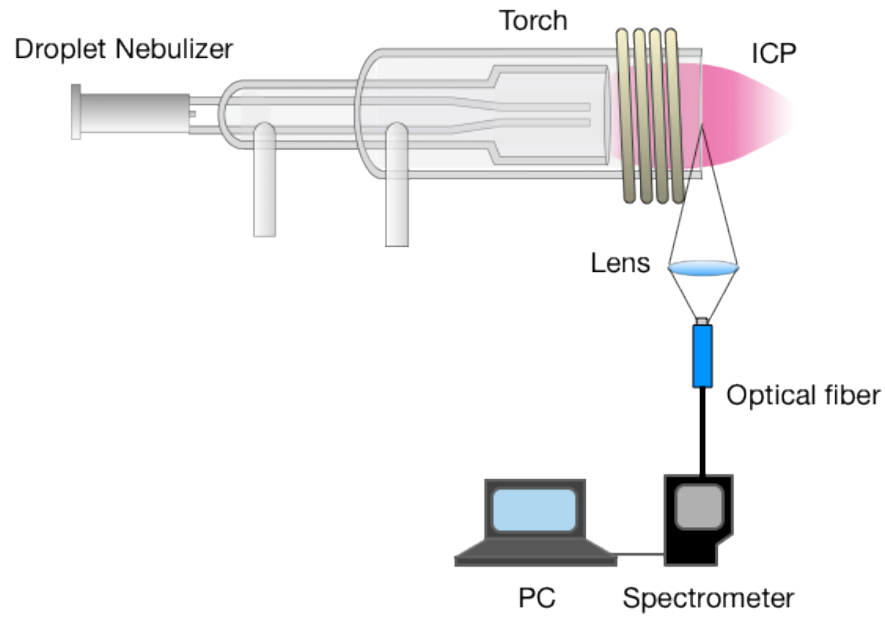


図 5.1 ドロプレット試料導入 ICP-AES のセットアップ

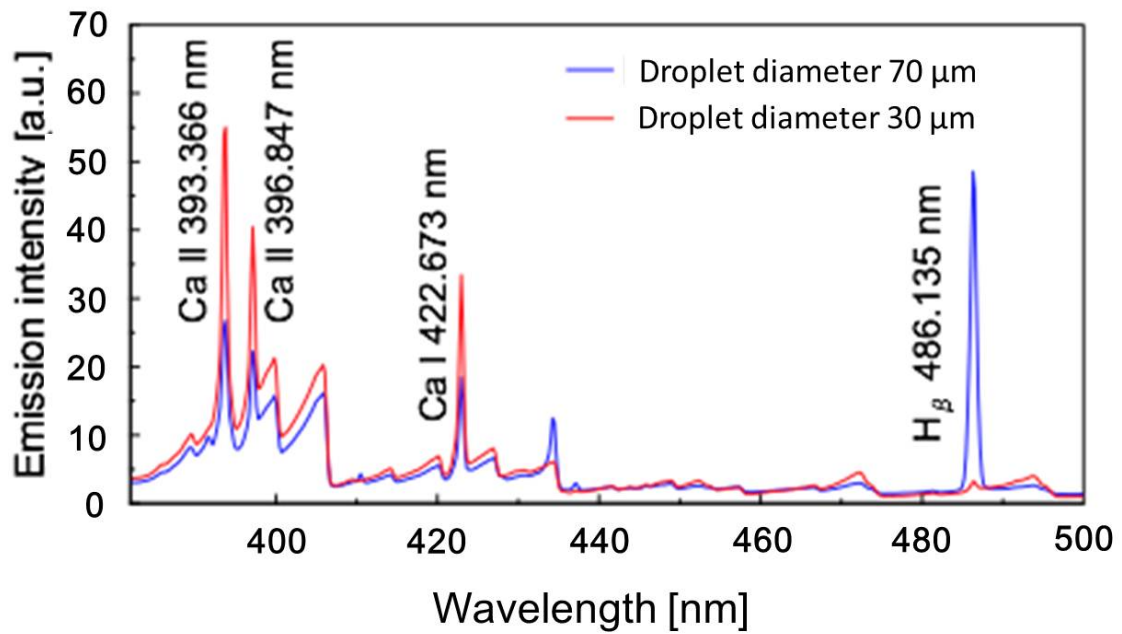


図 5.2 ドロプレット体積と発光強度の関係

両者の発光強度を比較すると、直径 30 μm の方が原子線、イオン線ともに約 2 倍発光強度が確認された。また、70 μm のドロプレットに比べて、30 μm のドロプレットの方が、原子線の発光強度に比べイオン線の発光強度比が高くなることが分かった。導入される試料量は 70 μm の方が大きいにも関わらず、30 μm の方が発光強度が高くなるのは、ドロプレットの体積が小さい方がプラズマに与える溶媒負荷が小さく、イオン化および励起がされやすくなるためだと考えた。

そこで、この結果からドロプレットがプラズマ中でイオン化されるまでにどのくらいのエネルギーが必要とされるのか概算で計算を行った。その概算結果を図 5.3 に示す。計算の条件は、1 ppm の Ca の標準溶液で、直径 70 mm、すなわち、体積は 180 pL である。計算結果のまとめは表 5.1 に示す。

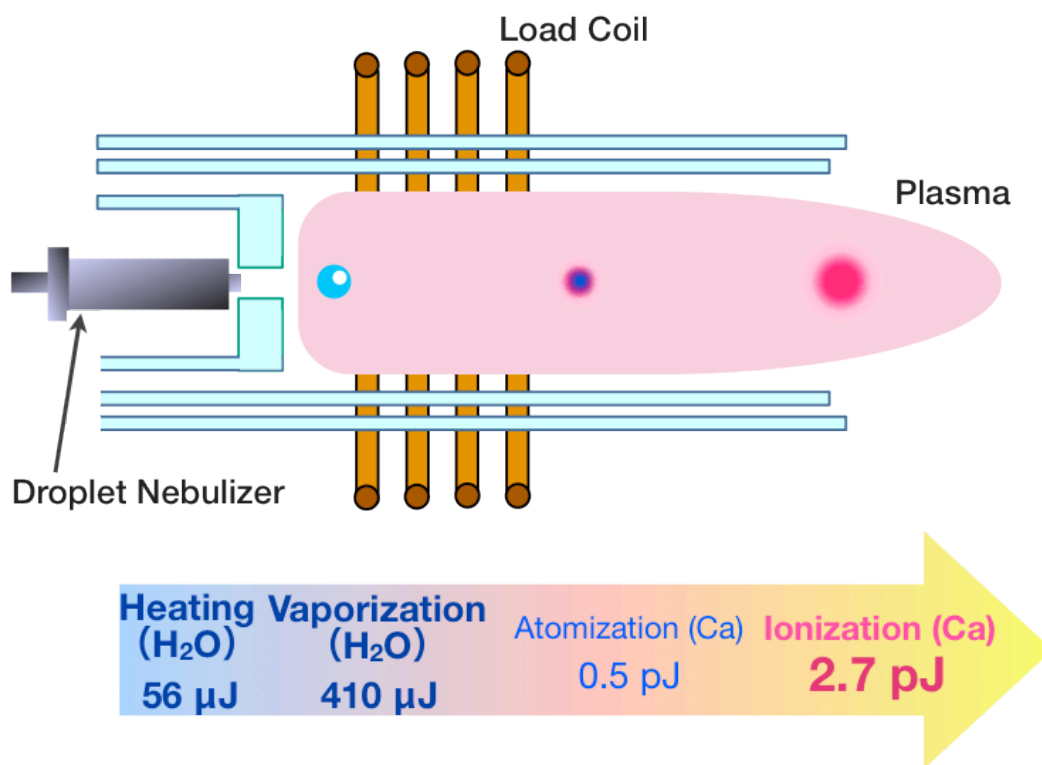


図 5.3 ICP 中におけるドロプレットのイオン化過程と必要エネルギーの概算

表 5.1 直径 70 μm (体積 180 pL) のドロプレットをイオン化するまでに
必要なエネルギー

	Heating	Vaporization	Atomization	Ionization
Water	56 μJ	410 μJ	10 μJ	490 μJ
Ca			0.5 pJ	2.7 pJ

溶媒の加熱に必要なエネルギーは 56 μJ , 蒸発に必要なエネルギーは 410 μJ , また溶媒をイオン化するためには, 490 μJ 必要であることが分かった。水の蒸発にかかるエネルギーは全体の約半分を占めていることがわかる。また, 加熱・気化の合計のエネルギー 466 μJ に比べ, 分析に必要な原子化, イオン化の過程に使われるエネルギーは, その 1000 分の 1 程度とかなり少ないことが分かる。したがって, 溶媒を加熱および蒸発させるために消費されるエネルギーを低減することで試料のイオン化をより向上させることができると考えられる。

本研究で開発した脱溶媒装置は, ヒーターで加熱した高温ガス中にドロプレット試料を通過させ, その後, 導入経路の壁面を冷却することによって蒸発させた溶媒の水蒸気を取り除くことができるため, 溶媒負荷を低減した状態でプラズマ中に導入することができる。本装置を用いることで, ドロプレット試料の導入によるプラズマへの溶媒負荷の影響が少ない分析システムとなり, 分析能力の向上が期待できると考えている。

5.3 加熱気化装置の開発と評価

5.3.1 ニクロム線を用いた加熱気化装置

まず、プラズマに対する溶媒負荷の低減を目的として、ドロプレット試料を高温のガス中に導入し、加熱気化を行う装置を開発した。始めに加熱することによる効果の検証を行うため、自作可能な装置を作成した。脱溶媒装置の構成は高い耐熱性を持つ石英のガラス管にニクロム線を巻くことで加熱部を作製し、電源は AC 100 V の家庭用コンセントからスライダックにつなぎ、電圧調整を行うことでニクロム線の温度調整を行った。ニクロム線を巻いた石英管を直接 ICP トーチにつなぎプラズマを下向きに生成し、ドロプレットをプラズマに導入しやすい様にして実験を行った。加熱部の概要を図 5.4、ICP トーチと加熱部の組み合わせおよび実験系を図 5.5 に示す。

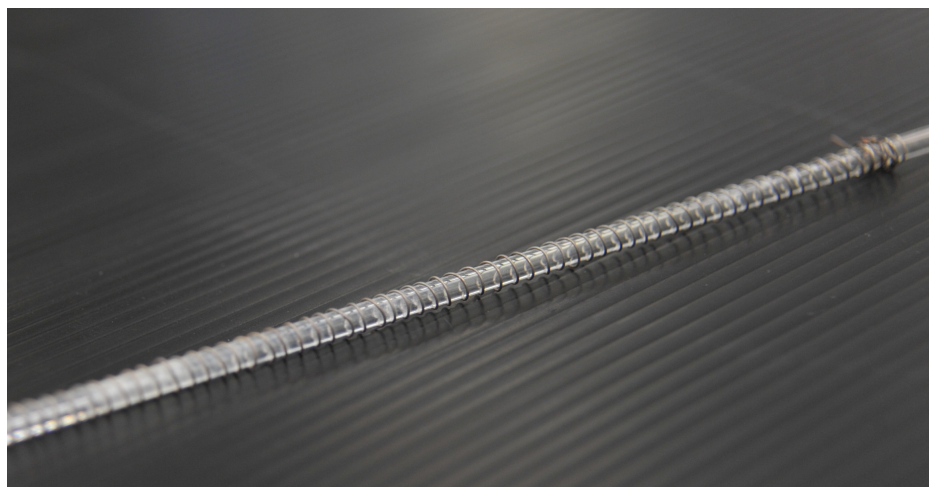


図 5.4 ニクロム線を用いた加熱部

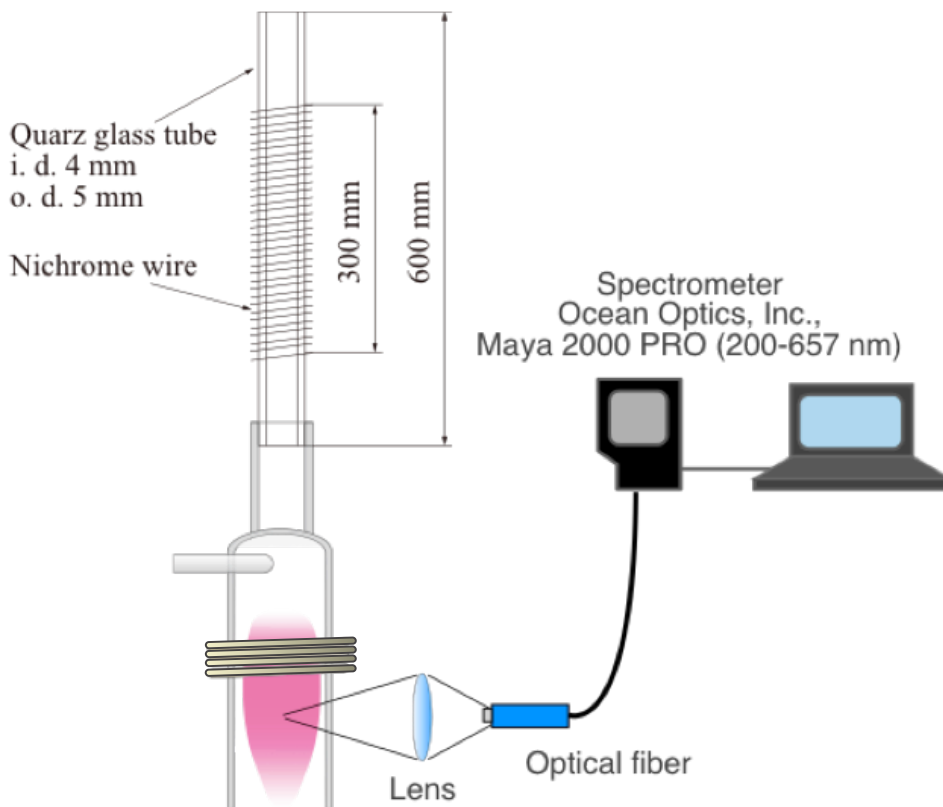


図 5.5 脱溶媒装置付きドロプレット試料導入 ICP の概要

石英管は ICP トーチおよび、ドロプレット試料導入装置と接続しやすい内径 2 mm, 外形 4 mm を用い, 試料には 100 mg/L のカルシウム溶液を使用した。ヘリウム ICP の生成には 40.68 MHz を使用し, ロードコイルには 4 ターン(内径 25.0 mm)の 1/8 インチ銅パイプ製水冷コイルを用いた^[4]。プラズマの維持に用いるヘリウムガスは 99.99 %の純度の市販のガスボンベから圧力調整器およびニードルバルブ流量調節器, フロートを用いた面積式流量計を経て, ICP トーチに導入した。ヘリウム ICP を用いた理由として低流量でプラズマを生成及び維持することができ, ノイズが少なく, ドロプレット試料をプラズマ中に安定して導入できたためである。また, プラズマガス流量を 1.5 L/min, インジェクションガス流量を 1 L/min に固定して測定を行った。プラズマの分光測定は, トーチ半径方向からプラズマの中心軸上で測定を行った。光学系には焦点距離 300 mm のレンズ, 光ファイバー, 分光器には波長分解能 0.23 nm のマル

チチャンネル型(Ocean Optics, Inc., MAYA PRO2000)を用いた。

はじめに、本研究で開発した脱溶媒装置を用いて脱溶媒前後のカルシウムの原子線およびイオン線の発光強度を比較した。これを図 5.6 に示す。

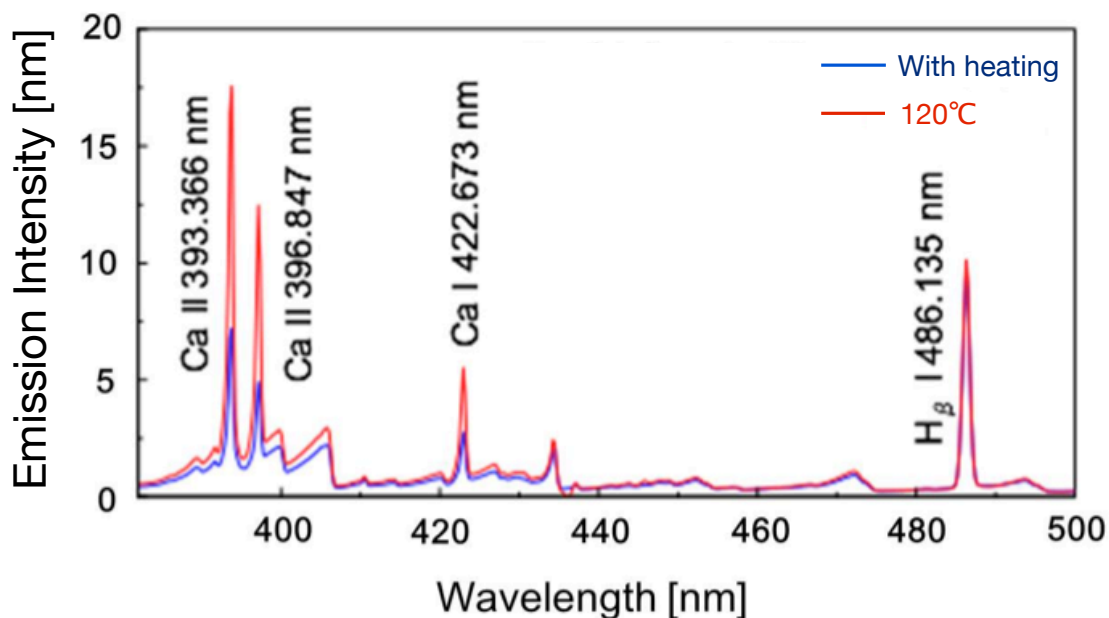


図 5.6 加熱前後における発光強度比較

本加熱気化装置は、ドロプレットの導入経路を加熱することにより、インジェクションガスを加熱することでドロプレットを加熱している。インジェクションガスを約 120°Cまで加熱したとき、カルシウムの原子線およびイオン線の発光強度は約 3 倍増加していることが確認された。この主な要因として、ドロプレットが加熱されることで、溶媒が蒸発されることでプラズマのエネルギーが溶媒の蒸発ではなく、試料の励起やイオン化に使われたためだと考えられる。また、 H_{β} の発光強度は脱溶媒前後で変化がないことが明らかとなった。これは、ドロプレットから蒸発した溶媒を除去せずに、インジェクションガスをプラズマ中に導入しているためだと考えられる。したがって、ドロプレットの導入経路を加熱することによってインジェクションガスが加熱され、効率良くイオン化できることが分かり、本装置の有用性を示した。しかしながら、ICP トーチを下向きに生成しなければならぬため質量分析に適用することができないことや、加熱部分を断熱ができていないため、より優れた脱溶媒装置の開発を行った。

5.3.2 円筒型ヒーターを用いた加熱気化装置

そこで、新しい円筒型ヒーターを用いた加熱気化装置の開発を行った。ステンレス管をT字型につなぎその周りにステンレス管の外径と同じ内径の円筒型ヒーターを通し、導入経路の加熱を行う。その構成を図 5.7 に示す。ドロプレットは加熱気化装置の上方から下向きにインジェクションガスと共に導入し、導入経路をヒーターで加熱することで溶媒が加熱気化される。溶媒が蒸発された状態でドロプレットは加熱気化装置下部でアディショナルガスによりアルゴン ICP に運ばれ、発光分析および質量分析を行う。

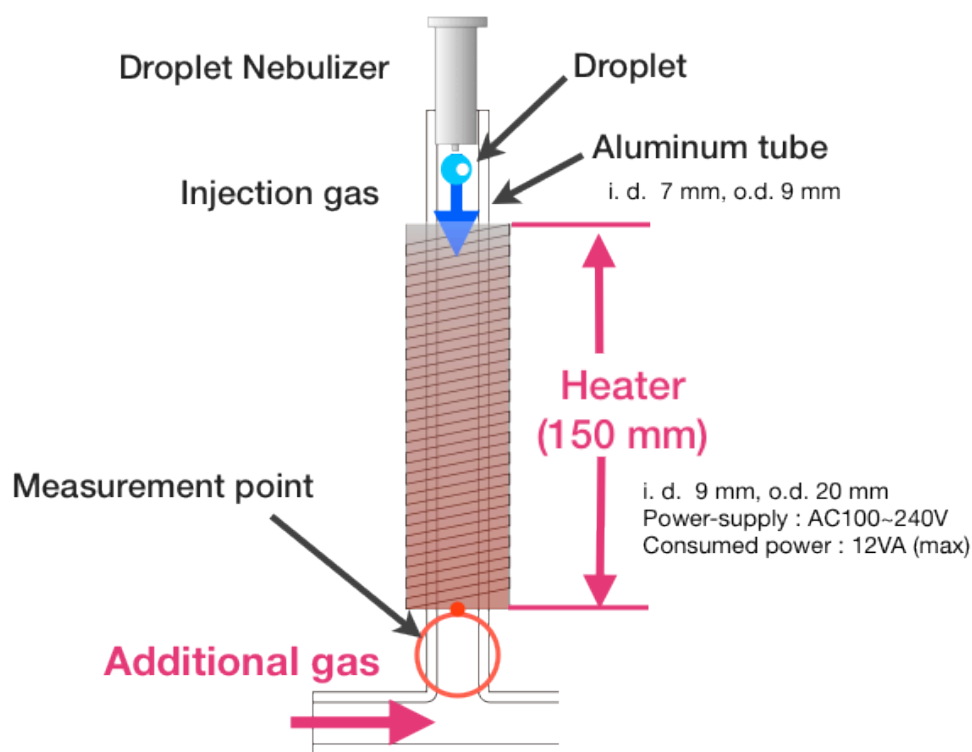


図 5.7 円筒型ヒーターを用いた脱溶媒装置の構成

さらに、加熱部には温度センサー付ヒーターを用いたことでヒーター温度を正確に制御できるようにした。ヒーター温度とインジェクションガス温度の関係を図 5.8 に示す。熱電対を用いてヒーター出口の温度を計測し、インジェクションガス温度とした。インジェクションガス温度はヒーター温度の上昇にともない線形に増加し、その正確性は

$R^2=0.999$ であることから示されるように、再現性よくヒーターの設定温度とインジェクションガスの温度を制御できることを確認した。

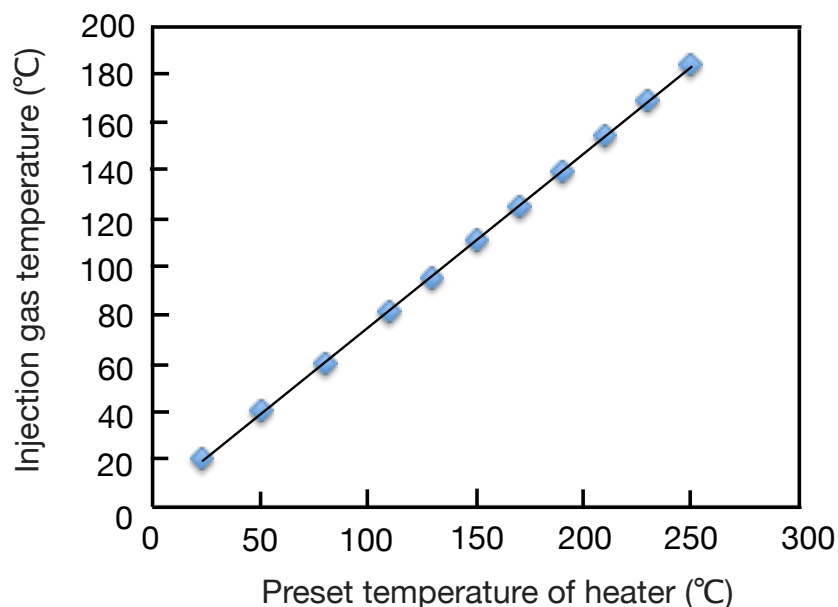


図 5.8 ヒーターの設定温度とインジェクションガス温度の関係

本実験に用いたプラズマ発光分光分析の測定系を図 5.9 に示す。プラズマの分光測定は、トーチ半径方向からプラズマの中心軸上で測定を行い、光学系には焦点距離 300 mm のレンズ、光ファイバー、分光器には波長分解能 0.23 nm のマルチチャネル型(Ocean Optics, Inc., HR4000)分光器を用いて、パーソナルコンピュータによってデータの抽出を行った。試料溶液には、原子吸光分析用標準溶液(Ca : 1001 mg/L in 0.1 mol/L HNO₃, Kanto Chemical Corp. Ltd., Tokyo, Japan)を 100 mg/L になるよう milli-Q 水で希釈調整したものをを用いた。実験条件は、表 5.2 に示す。また、測定ラインは Ca のイオン線である 393.366 nm を用いた。

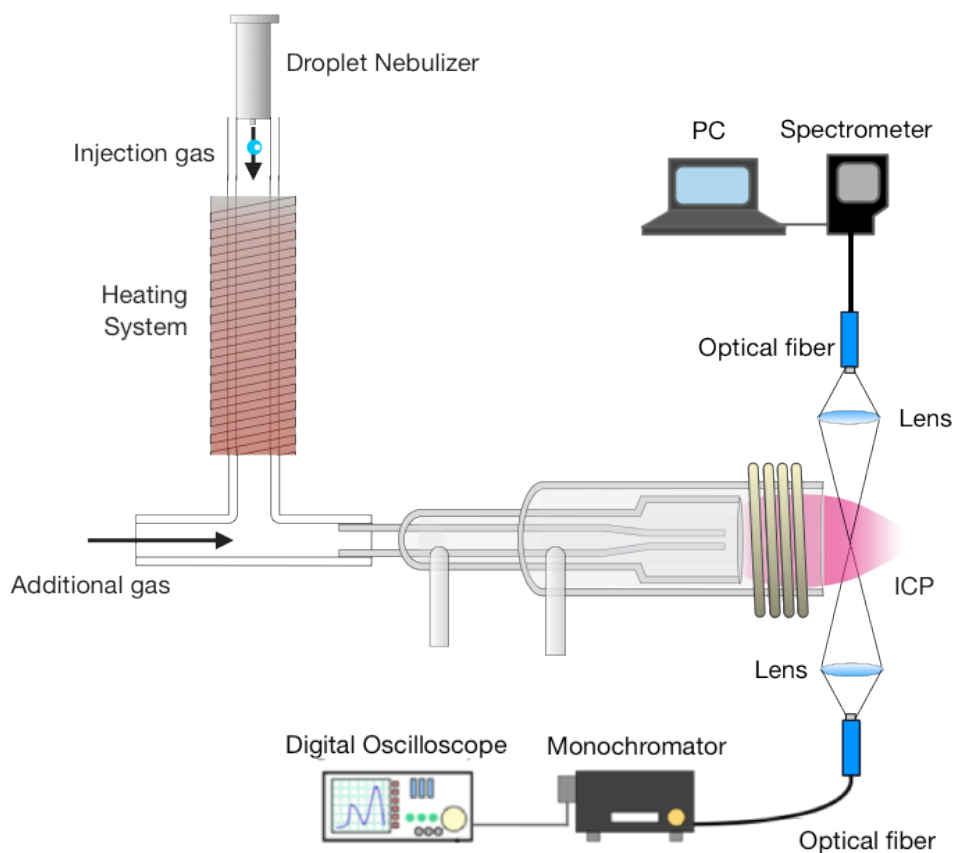


図 5.9 プラズマ発光分光分析の測定系

表5.2 加熱気化装置を用いた実験の実験条件

Parameter	Value
Plasma gas	Ar 15 L/min
Auxiliary gas	Ar 1.0 L/min
RF-power	1200 W
Droplet Diameter	30, 70 μm
Droplet frequency	100 Hz
Injection gas	Ar 200 mL/min
Sample solution	100 mg/L Ca

5.3.3 加熱気化装置のパラメータ評価

本研究で開発した脱溶媒装置の試料導入方法は、ドロプレット試料を垂直に装置内に導入した後、装置下部でアディショナルガスにより水平方向に曲げる方法をとっているため、インジェクションガスとアディショナルガスの流量変化による分析性能に与える影響と射出されたドロプレットがプラズマ中まで届き、分析できているかの安定性の測定、ヒーターの温度変化による分析感度に与える影響を調査した。また、本実験ではドロプレット試料導入装置は内径70 μm を用いた。

まず、インジェクションガスは脱溶媒装置の垂直部を安定して通過できる流量としてArを200 mL/minに固定した。

次に、アディショナルガスを0～1000 mL/minまで変化させ、測定位置をA.L.C=-17.5～77.5 mmまで、5 mm間隔でプラズマの上流部からスキャンを行った。この実験を行うことにより、アディショナルガスの流量によって感度がどのように変化してくるのか、また、発光の強い位置の変化についても考察することができる。なお、このときのヒーターの温度は200 $^{\circ}\text{C}$ に設定したため、インジェクションガスは147 $^{\circ}\text{C}$ になる。その結果を図5.10に示す。

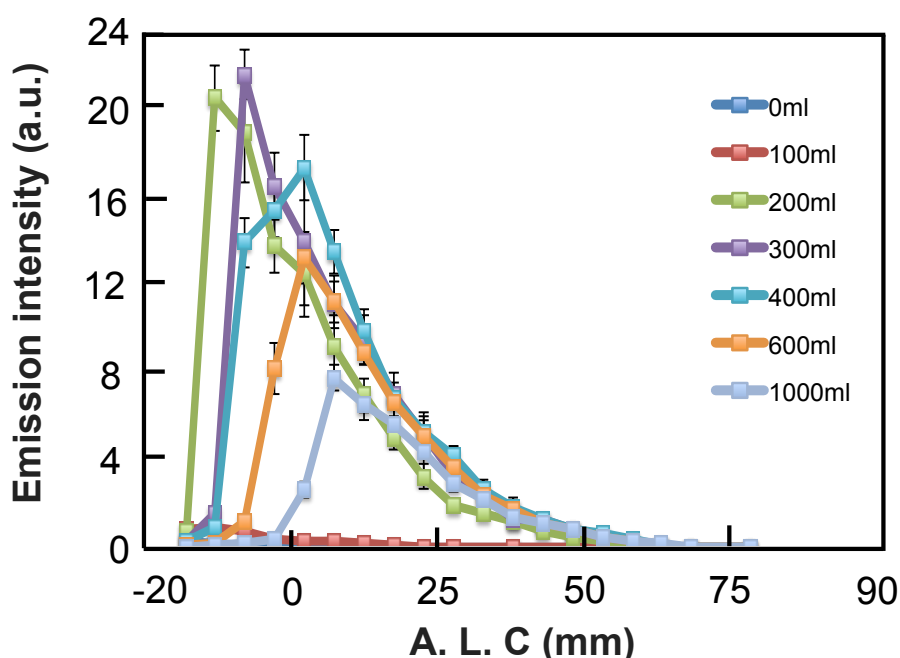


図5.10 アディショナルガス流量と信号強度, 信号位置の関係

この実験では1つの測定点につき5回の測定を行い、その標準偏差をエラーバーとしてグラフに掲載している。この結果より、アディショナルガスが全く入っていない0 mL/minでは、ほとんど信号は見る事ができない。100 mL/minになるとわずかに信号が見えるようになってくるが、ほぼ信号を観測することはできない。200 mL/minに増やすことによって急激に信号強度は跳ね上がった。さらに100 mL/min増加させ、300 mL/minになると200 mL/minのときよりわずかに発光強度が上昇し、かつ、発光する位置が下流にシフトした。このとき最大の発光強度を観測した。さらに、流量を増やしていくと、発光強度は、小さくなり、発光のピーク位置はプラズマの下流にシフトしていくことが分かる。したがって、アディショナルガス流量は大きすぎても小さすぎても良くなく、発光のピーク位置と発光強度の関係を良く考慮した上で、流量を決めることが求められる。

次にインジェクションガスの温度と発光強度と発光のピーク位置を検討した。インジェクションガスの温度は室温から183℃まで変化させ、前実験と同様に測定位置をA.L.C=-17.5~77.5 mmまで、5 mm間隔でプラズマの上流部からスキャンを行った。なお、このときのアディショナルガス流量は質量分析を見据え、A.L.C=3~5 mm前後で発光強度が一番高くなっている400 mL/minに固定した。その結果を図5.11に示す。

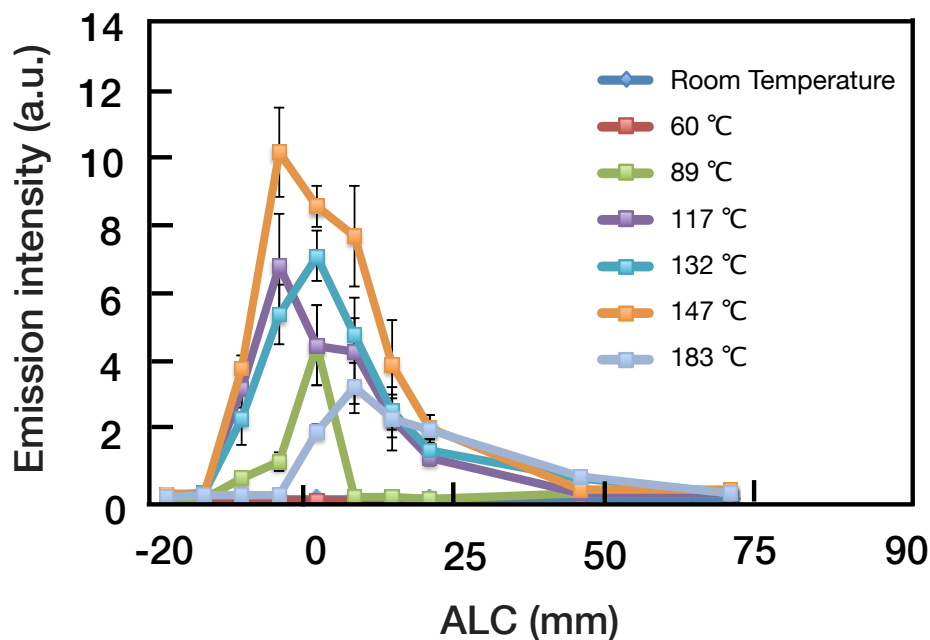


図5.11 インジェクションガス温度と発光位置による発光強度の関係

この実験でも1つの測定点につき5回の測定を行い、その標準偏差をエラーバーとしてグラフに掲載している。なお、このグラフではヒーターで温度を設定し、インジェクションガス温度は図5.8から算出したものを使用している。そのため、切れの良い数字ではなく、中途半端な数字になっている。このグラフより結果を考察すると、インジェクションガスの温度が室温や60°Cの場合では、信号が観測できていないのが、温度の上昇に伴い、信号強度は急激に上がった。また、発光するピーク位置が温度上昇に伴い、プラズマの上流側にシフトした。これは、温度の上昇に伴い、溶媒の蒸発する量が増え、プラズマに与える溶媒負荷が減ったため、効率良くイオン化が行えたためであると考えられる。その理由として、発光のピーク位置がプラズマの上流部にシフトしていることも考えられる。溶媒負荷が減ったため、プラズマ中に試料が導入されてからイオン化が行われるまでの時間が早くなっていると考えられるためである。しかしながら、147°Cを越えてさらにインジェクションガスの温度を上げると、急激に信号強度が下がった。この原因として考えられることは、温度上昇に伴い、ガスが膨張することによって流速が上がるため、ドロプレットのプラズマ中での滞在時間が少なくなること、または、増加した流速がそのままプラズマ中に導入されるとプラズマの安定性が悪くなることなどが信号強度の減少につながっているのではないかと考えられる。そこで、気体の温度による体積膨張を考えると、気体の温度が室温から183°Cまで上がったとき、体積は約1.56倍(200 mLから311 mL)に増加することが分かる。これに比例して流速も速くなる。また、プラズマガスは旋回気流を作っており、ドーナツ構造をしているため、中心にインジェクションガスとドロプレットが導入される時、プラズマガスの流速とは関係ないと考えられる。よって、147°Cから183°Cの間に信号強度が変化する閾値があるかもしれない。

したがって、これ以降の実験では、発光強度が最大となるインジェクションガス温度を147°C(ヒーターの設定温度:200°C)に固定する。

さらに、上記の実験で示された結果より、アディショナルガスを400 mL/min、インジェクションガス温度を147°Cに設定し、100 Hzでドロプレットを導入した。プラズマに導入される導入効率を測定した。その結果を図5.12に示す。

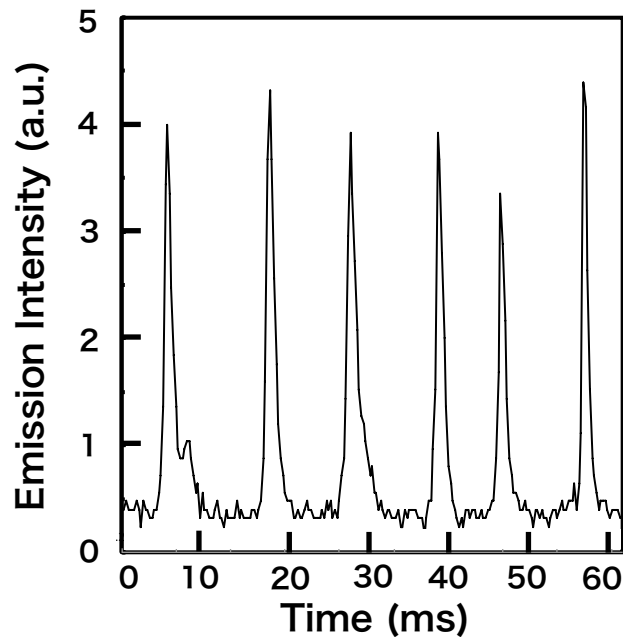


図5.12 ドロプレットの連続導入による発光分析

100 Hzで導入し、約10 msごとに信号を得ることができていることから、多少の発光強度のばらつきはあるもののドロプレットはプラズマ中に導入することができていることが分かる。また、RSDを計算してみると、約8.7%になった。ドロプレット試料導入装置を用いている場合、10%程度のRSDであるとの報告が多いため、この結果は妥当であると考えられる^[7]。

5.3.4 ドロプレットの体積と加熱による効果の考察

これまでの実験で加熱することによって、試料をイオン化しやすくすることができたので、さらにその効果について詳細に調べることにした。ドロプレット試料導入装置に与える電圧の矩形を変化させる(トリプルパルスモードを使用)ことによって、体積の異なるドロプレットを生成することができる^[8]。この手法を用いて、ドロプレットの直径が30 μm , 45 μm , 70 μm と異なるように生成した。また、インジェクションガスの温度が89°Cのときと147°Cのときについてそれぞれ測定を行い、Caの原子線(422.673 nm)とイオン線(393.366 nm), それぞれの比較を行った。この実験を行うことによって、体積とインジェクションガスの温度との関係を詳細に考察できるであろう。

まず、89°Cと147°Cにインジェクションガスの温度を加熱したときの体積差によるイオン線の発光強度の違いを図5.13に示す。

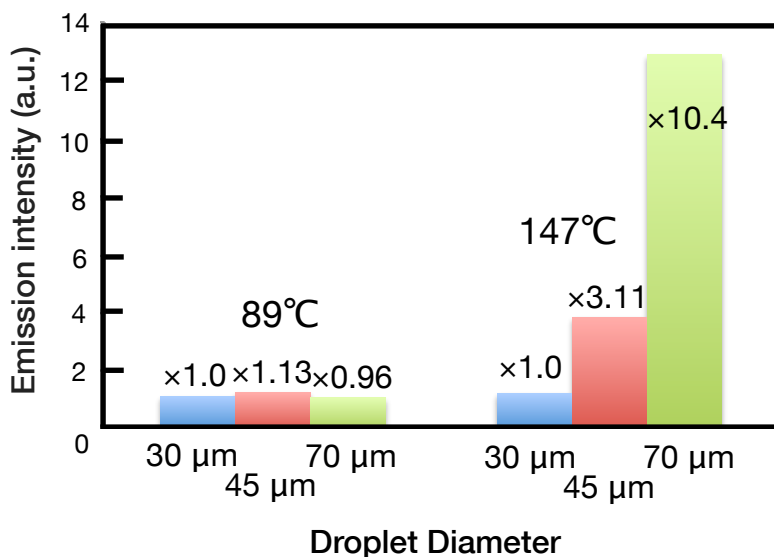


図5.13 インジェクションガス温度が89°Cと147°Cのときのドロプレットの直径とCaのイオン線の発光強度比の関係

このグラフは導入するドロプレットの体積が異なるときの発光強度について比較をおこなった。ドロプレットの体積差による比較を行うため、30 μmのときの発光強度を1とする。このとき、インジェクションガス温度が89°Cのとき、45 μmでは1.13倍、70 μmでは0.96倍となることが分かった。また、インジェクションガス温度が147°Cのとき、45 μmでは3.11倍、70 μmでは10.4倍となることが分かった。89°Cのときは、体積が変化しても、すなわち導入されている試料量に変化しているにもかかわらず、ほとんど発光強度に差が現れないことから、イオン化されない試料が存在しているのではないかと考えられる。また、147°Cのときは、ドロプレットの直径(すなわち体積)が大きいほど発光強度が大きくなる。この値は、それぞれのドロプレットに含まれる試料量の比(30 mm:45 mm:70 mm = 1:3.57:12.8) におおむね一致する。

同様に、原子線の場合を図5.14に示す。

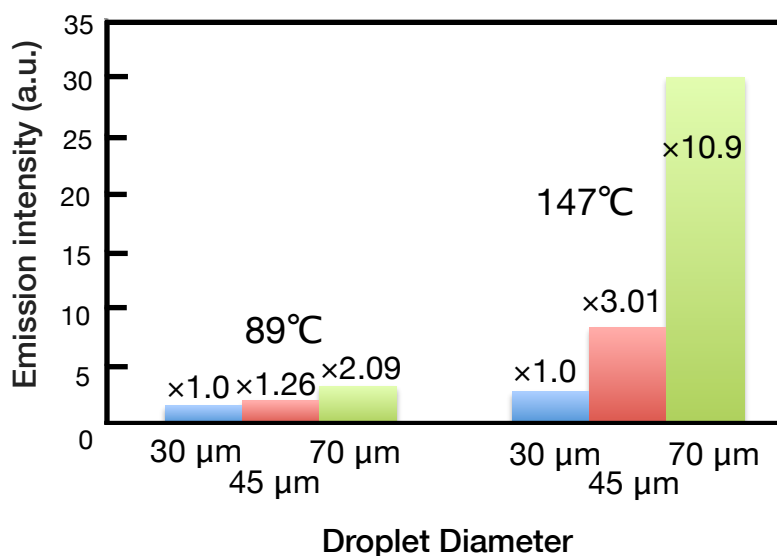


図5.14 インジェクションガス温度が89°Cと147°Cのときのドロプレットの直径とCaの原子線の発光強度比の関係

ドロプレットの体積差による比較を行うため、イオン線のと看と同様に30 μmのときの発光強度を1とする。このとき、インジェクションガス温度が89°Cのとき、45 μmでは1.26倍、70 μmでは2.09倍となることが分かった。また、インジェクションガス温度が147°Cのとき、45 μmでは3.01倍、70 μmでは10.9倍となることが分かった。89°Cのときは、体積の増加にともって、発光強度がやや増加することから、イオン化のときではほぼ強度比が変わらなかったことを考慮すると、原子化まで到達する試料はあるが、加熱の効果が小さく溶媒負荷の影響が大きいため、十分に原子化もされていない。また、147°Cのときは、イオン化と同様にドロプレットの直径(すなわち体積)が大きいほど発光強度が大きくなる。この値も、それぞれのドロプレットに含まれる試料量の比(30 μm:45 μm:70 μm = 1:3.57:12.8)におおむね一致する。すなわち、インジェクションガスを147°Cまで加熱することによって、原子化もイオン化も溶媒負荷の影響をほぼ無視できる程度の結果を得ることができた。それは、ドロプレットの中に含まれる試料量と発光強度比がそれぞれほぼ一致することから言える。また、89°Cでは、約0.12 J、147°Cのときでは、約0.22 Jのエネルギーがヒータからエネルギーが加わっている。これは180 pLのドロプレットが加熱・気化するのに必要なエネルギー(470 μJ)に対して、約0.2%と十分な熱量が加えられている。ヒーターから外部に熱が逃げたり、導入経路を加熱しているため、

直接加熱でないことなどを考慮しても、十分に加熱・気化するだけのエネルギーがドロプレットに与えられていると考えられる。これらの結果から、この加熱気化装置による効果の有用性を示すことができたと言える。

5.4 脱溶媒装置の開発と評価

5.4.1 脱溶媒装置の構成と実験系

加熱部分で熱したことにより溶媒を蒸発させることはできているが、それを取り除き、そのままプラズマ中に導入しているため、水蒸気の原子化・イオン化にもプラズマのエネルギーは使われている。そこで、本節では、加熱部の下部に冷却装置を適用し、蒸発させた水蒸気を取り除く実験を行った。なお、溶媒を加熱・気化させ、その水蒸気を取り除くことを脱溶媒という。

まず始めに、脱溶媒装置のセットアップを図5.15に示す。ドロプレット試料導入装置から射出されたドロプレットはインジェクションガスとともに加熱部を持つ内径7 mmのアルミ管に導入される。加熱部では全長150 mmの温度センサ付きヒーターを用いてアルミ管流路壁を加熱し、アルミ管内を通過するインジェクションガスを加熱し、その加熱されたガスでドロプレットの溶媒を蒸発させる。その後、T字管を用いて直角に曲げた後、冷却部では全長100 mmのらせん状銅パイプをアルミ管流路に巻き付け、銅パイプ内を約0°Cまで冷やした水を流すことによって壁面を冷却する。加熱部同様に壁面を冷やし、インジェクションガスを冷やすことによって蒸発した溶媒を凝結させ、プラズマに導入される水蒸気量を減らすことができる。

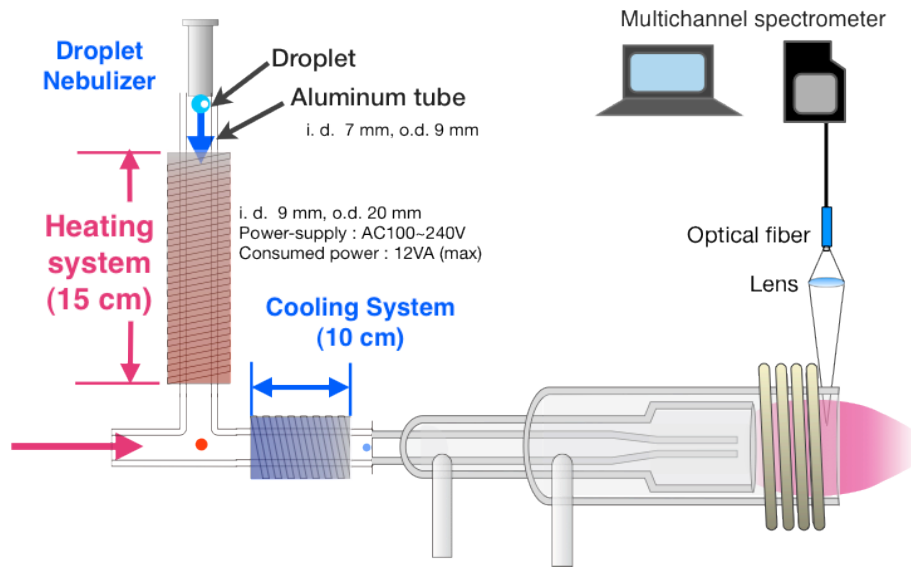


図5.15 ドロプレット試料導入用脱溶媒装置と発光分光分析のセットアップ

200°Cまでヒーターの温度を上昇させるため、冷却部分にその熱が伝わるのを防ぐため、また、200°C付近まで上がったガスを段階的に冷やしたかったため冷却装置をこのような配置にした。このときのそれぞれの位置でのガス温度を測定した。その測定位置とヒーターの設定温度とガス温度の関係を図5.16に示す。

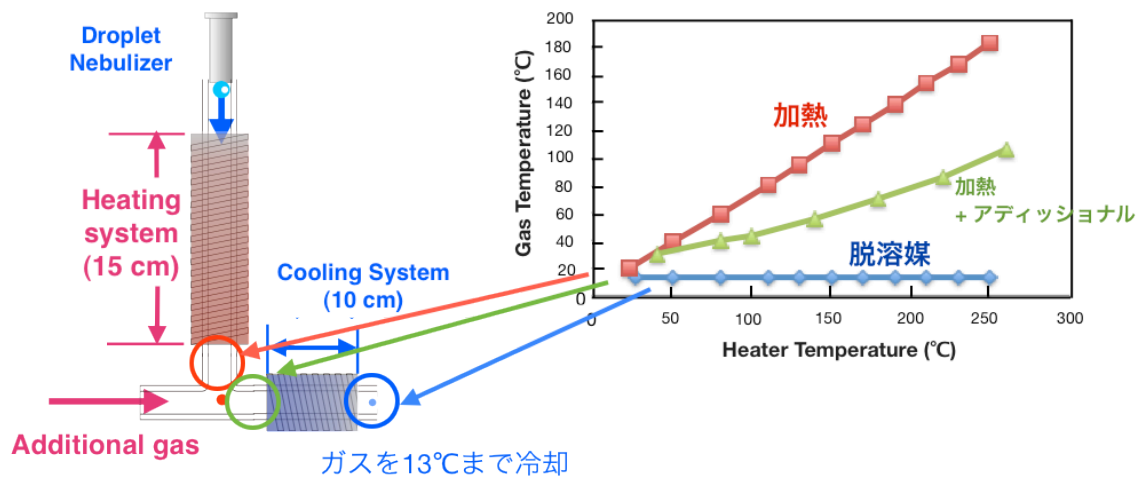


図5.16 ヒーターの設定温度とガス温度の関係

実験条件は、これまでの発光分析と同様である。図5.17に H_{β} 線の結果を、図5.18にはCaの原子線とイオン線の発光強度比を温度変化ごとに示す。なお、図5.17は試料がどの程度、イオン化しているのかを示すために強度比を比較するグラフを用いている。

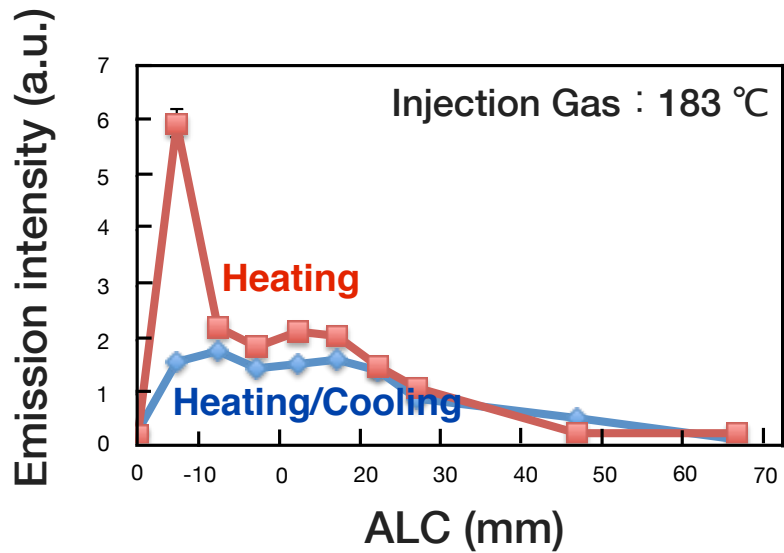


図5.17 冷却の有無による H_{β} 線の発光分布の比較

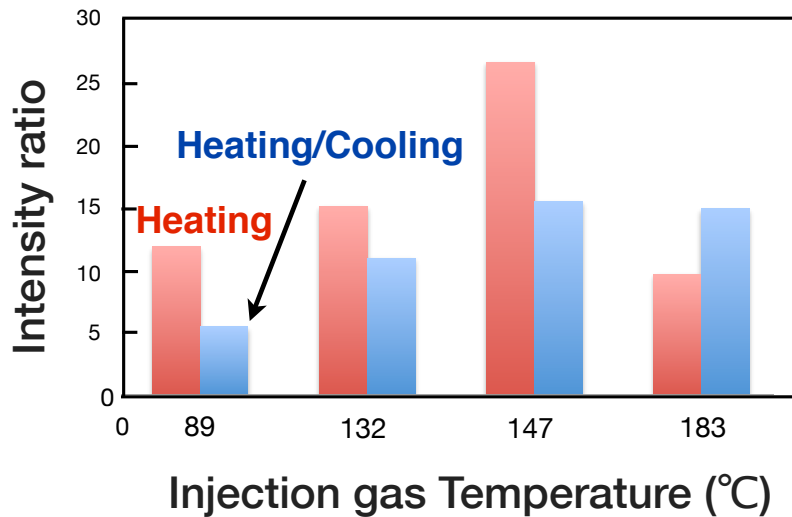


図5.18 冷却の有無による発光位置の原子線に対するイオン線の発光強度比
($CaII$ (393.3 nm)/ CaI (422.6 nm))

この実験でも1つの測定点につき5回の測定を行い、その標準偏差をエラーバーとしてグラフに掲載している。この結果から、インジェクションガスが183℃のとき、冷却することによって感度が向上すると考えられたが、それ以外は加熱のみの方が感度が良くなることが分かった。そのときのH_β線の発光を見てみると、ALC=-10 mm付近にあるH_β線の急激なピークはなくなっている。したがって、加熱によって蒸発した溶媒の導入量を抑えることに成功している。しかし、それ以外では、冷却した方が感度が下がってしまう結果となった。この理由としては、冷却効果が足りないことが考えられる。ヒーター部分で溶媒を蒸発させた後、その水蒸気を約10℃まで冷やしたことでまた水に戻ってしまっているのではないかと考えた。そこで、次に、ヒーターの直下に冷却装置を持つてくることによって、流量がインジェクションガスのみと少ないため、急激に冷やすことができるのではないかと考え、次のような装置を開発した。

まず始めに、脱溶媒装置のセットアップを図5.19に示す。

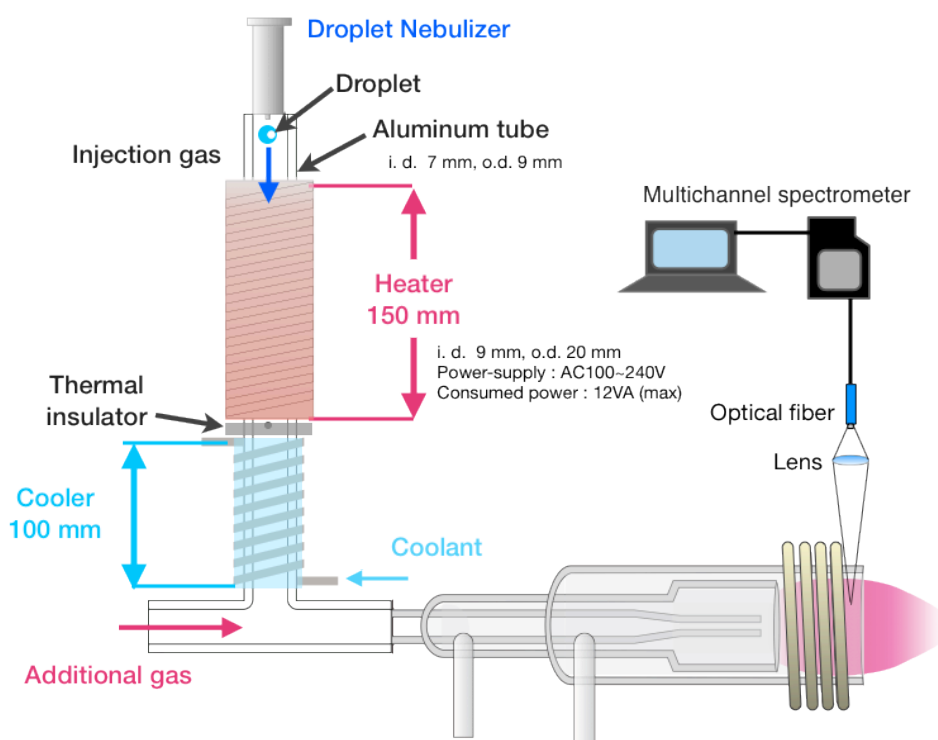


図5.19 ドロプレット試料導入用脱溶媒装置と分光セットアップ

図 5.15 と同様でドロプレット試料導入装置から射出されたドロプレットはインジェクションガスとともに加熱部と冷却部を持つ内径 7 mm のアルミ管に導入される。加熱部分

と冷却部分での熱移動を避けるために、テフロン素材の断熱材を挟んでいる。射出されたドロプレットはヒーター部で加熱されて溶媒は蒸発し、冷却部で蒸発した溶媒が凝結して除去される。そして、溶媒が取り除かれた状態の試料が、アディショナルガスによってプラズマ中に導入される仕組みである。

5.4.2 冷却装置の効果を検証

5.4.2.1 ICP 発光分光分析

これまでドロプレットの導入経路を加熱することによる効果を検証し、その有用性を示してきた。そこで本節では、加熱に加え冷却したときの実験をICP-AESとICP-MSの両方に適用し、検証した。なお、ドロプレットの体積が少ないため安定した測定ができやすいため、本実験では、内径30 mmのドロプレット試料導入装置を使用して次のような評価を行った。

冷却を行ったときの効果について検証したいため、脱溶媒していないとき・加熱のみのとき・脱溶媒したときのCaのイオン線・原子線・H β 線を測定した。この測定から水蒸気が除去されているかどうかやイオン線の発光強度についての考察などを行うことができる。実験条件は、ヒーターを200°C、冷却は設定できる最低の-23°Cまで不凍液を冷やし実験を行った。そのとき、導入経路の壁面は-12°C、インジェクションガス温度は5°C程度まで冷やすことができている。インジェクションガスは100 mL/minにし、A.L.C=-17.5~37.5 mmまで、5 mm間隔でプラズマの上流部からスキャンを行った。

まず、加熱のみのときと同様にアディショナルを0~1000 mL/minまで変化させた。その結果を図5.20に示す。使用した溶液は、100 mg/LのCa溶液を用いた。測定した発光線はCa II (393.366 nm)を測定した。

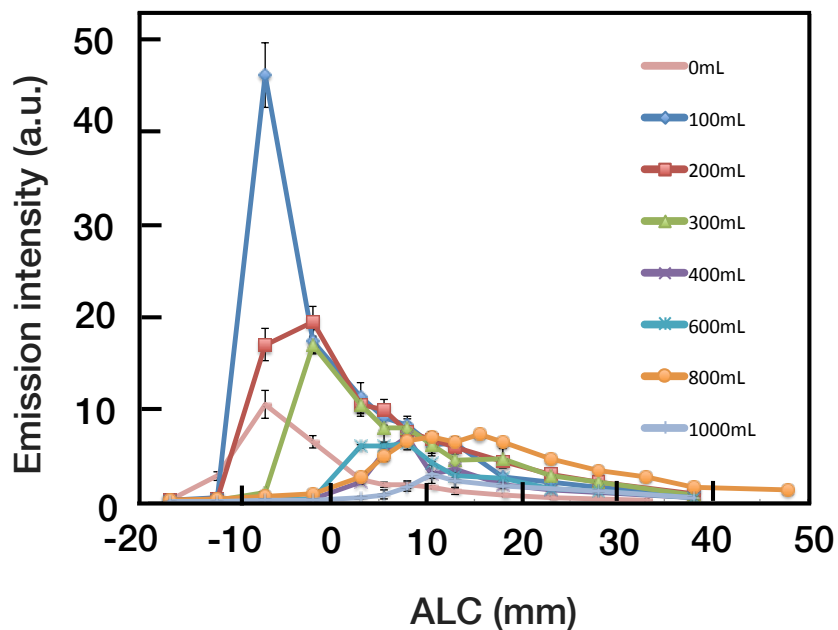


図5.20 アディショナルガス流量と発光強度，発光位置の関係

この実験でも1つの測定点につき5回の測定を行い，その標準偏差をエラーバーとしてグラフに掲載している。この結果より，アディショナルガスを導入しなくても信号が見えるようになっている。これは，ドロプレットの溶媒を取り除くことができるようになったため，ドロプレットが軽くなり，インジェクションガスのみでもプラズマまで試料が届くようになったと考えられる。100 mL/minに増やすことによって急激に信号強度は跳ね上がった。それ以上，アディショナルガス流量を増やすと信号は急激に減少し，あとは減少する一方である。流量を増やしていくと，発光強度は，小さくなり，発光のピーク位置はプラズマの下流にシフトしていくことが分かる。したがって，加熱のみのときと同様にアディショナルガス流量は大きすぎても小さすぎても良くなく，発光のピーク位置と発光強度の関係を良く考慮した上で，流量を決めることが求められる。

次に，冷却を行ったときの効果について検証した。脱溶媒していないとき・加熱のみしたとき・脱溶媒したときのCaのイオン線・原子線・ $H\beta$ 線を測定することによって，水蒸気が除去されているかどうかやイオン線の発光強度についての考察などを行うことができる。実験条件は，ヒーターを200°Cに設定し，冷却部分の出口ではインジェクションガスを5°Cまで冷やし実験を行った。アディショナルガスは最大の発光強度を得られた100 mL/minにし，A.L.C=-17.5~37.5 mmまで，5 mm間隔でプラズマの上流部から

スキャンを行った。その結果を図5.21 (A)にCaのイオン線(393.366 nm), (B)にCaの原子線(422.673 nm), (C)にH β 線(486.135 nm)の結果を示す。

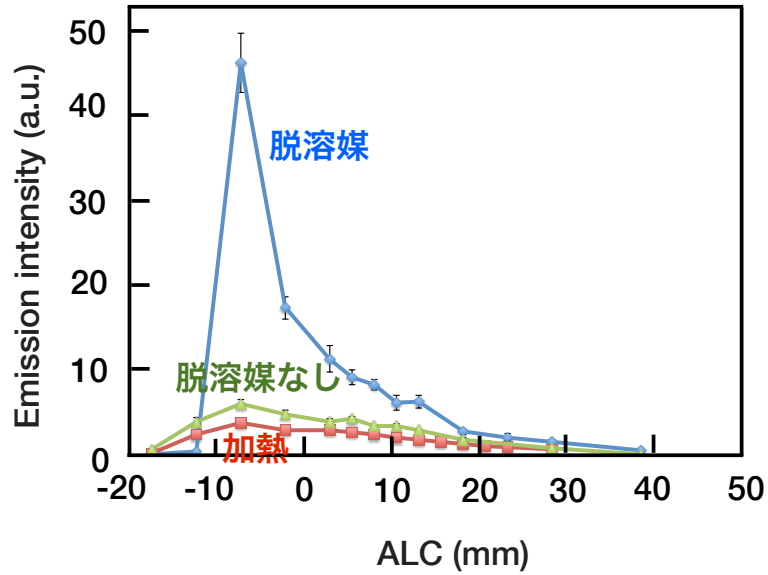


図5.21 (A) 脱溶媒の有無によるCaのイオン線(393.366 nm)の発光強度の関係

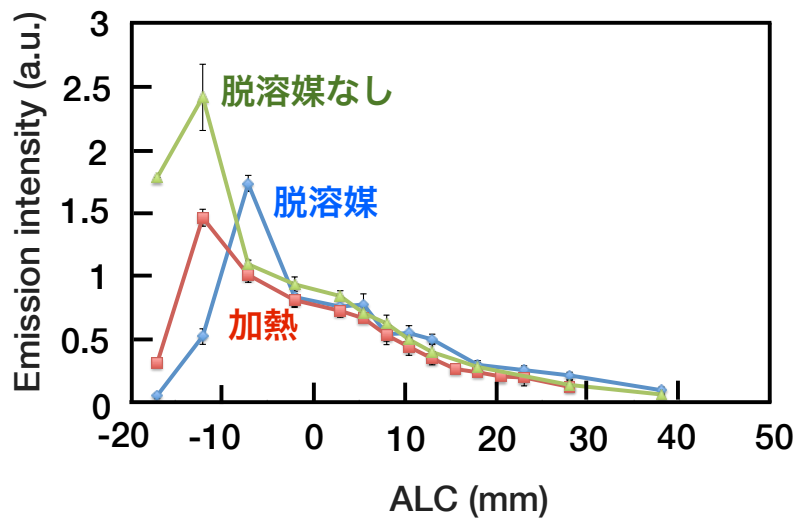


図5.21 (B) 脱溶媒の有無によるCaの原子線(422.673 nm)の発光強度の関係

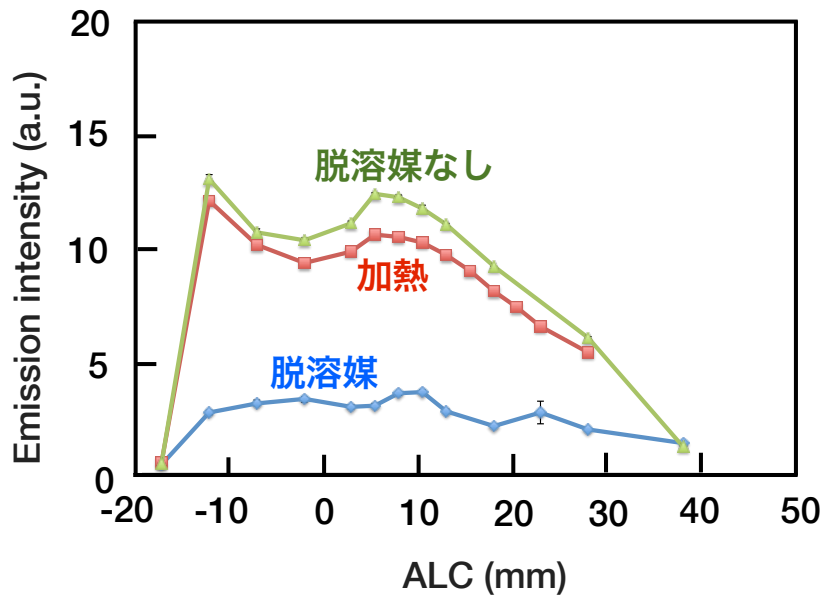


図5.21 (C) 脱溶媒の有無によるH β 線(486.135 nm)の発光強度の関係

この実験でも1つの測定点につき5回の測定を行い、その標準偏差をエラーバーとしてグラフに掲載している。図5.21 (A)の結果より、Caのイオン線は脱溶媒(加熱/冷却)を行うことによって、加熱のみに比べ、発光強度が約9倍に増加することが分かった。また、加熱のみの場合でも発光強度が上昇したが、冷却も併用することによって、急激に発光強度が増大した。この理由は、図5.21 (C)を見ると、脱溶媒を行ったとき、H β 線の発光強度が約1/5にまで減少することが分かる。これより、脱溶媒によってプラズマ中に導入される水蒸気の量を減らすことに成功し、水蒸気にエネルギーが使われることなく、試料のイオン化に使われたため、イオン線の発光強度が劇的に上昇したと考えられる。したがって、脱溶媒装置の開発に成功した。また、原子線を見てみると、脱溶媒しないときと加熱のみしたときの方がプラズマ上流部で発光のピーク位置が存在し、脱溶媒したときの方が、後から発光のピーク位置を観測した。また、発光強度も加熱のみの方が脱溶媒のときに比べてやや大きくなっている。この理由としては、原子線の振る舞いとH β 線の振る舞いが似ていることから考えて、脱溶媒しないときと加熱のみをしたときは、導入される水蒸気の量は変わらないため、最初に水蒸気の原子化・イオン化にエネルギーが使われてしまうと考えられる。一方で、脱溶媒をすると導入される水蒸気の量が少なくなるため、乾燥された状態で導入されるため、ドロプレットの外側から徐々に脱溶媒→原子化→イオン化していくわけではなく、一気に原子化とイオ

ン化をするため、原子線の発光するピーク位置がプラズマの下流に来ているのではないかと考察した。

したがって、脱溶媒を行うことによって、効率的にイオン化させることができ、発光強度を向上させることに成功した。よって、本研究で開発した脱溶媒装置の有用性を示すことができた。

5.4.2.2 ICP 質量分析

ICP発光分析において脱溶媒装置の有用性を示すことができたので、次にICP質量分析装置に適用し、その効果を検証した。本研究では最終的に質量分析装置に適用し、単一細胞分析を達成したいため、質量分析装置での脱溶媒装置の検証は重要となる。これまでの実験の通り、アディショナルガスや測定する位置などは実験装置ごとに依存しているように考えられるためである。

まず始めに、アディショナルガスの流量とサンプリング位置(質量分離部に導入するサンプリングコーンの位置)を変化させることによって、分析感度にどのような影響を調査した。実験の概略図を図5.22に示す。今回用いた質量分析装置は四重極型ICP質量分析装置(ICP-Quadrupole Mass Spectrometer; ICP-QMS, Agilent 7500cs, Agilent Technologies)を使用した。実験条件は、表5.3に示す。なお、このときのヒーターの温度は200℃に設定し、冷却部分の出口ではインジェクションガスを5℃まで冷やし実験を行った。その結果を図5.23に示す。

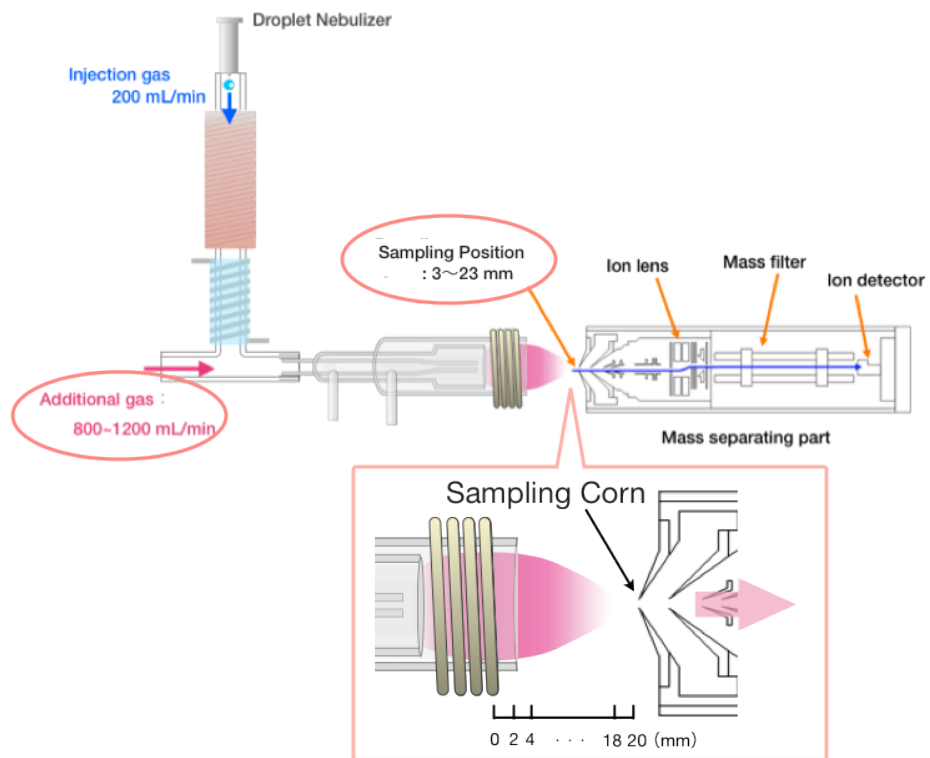


図5.22 脱溶媒装置をICP質量分析装置に適用した概略図

Parameter	Value
Plasma gas	Ar 15L/min
Auxiliary gas	Ar 1.5L/min
RF-power	1500W
Droplet Diameter	30 μm
Droplet frequency	100 Hz
Injection gas	200 mL/min
Heater Temperature	200 $^{\circ}\text{C}$
Sample solution	In 100 ng/L

表5.3 脱溶媒ICP-MSの実験条件

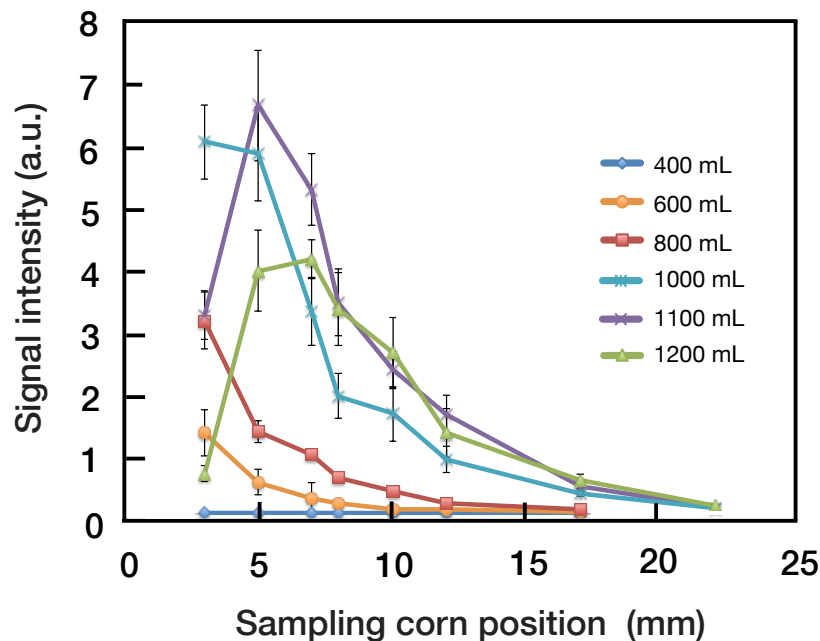


図5.23 アディショナルガス流量とサンプリング位置の関係

この実験でも1つの測定点につき5回の測定を行い、その標準偏差をエラーバーとしてグラフに掲載している。質量分析の結果は、発光分析の結果と異なる結果となった。発光分析のように100 mL程度のアディショナルガスでは信号は全く検出されず、400 mL入れてもほぼ信号は見られない。さらに増やしていくことによって信号が大きくなって行くことが分かる。質量分析では、サンプリングコーンがプラズマに近ければ近いほど感度が高くなる傾向にあるが、放電が起こったり、サンプリングコーン自体の金属を検出したり、2価イオンが増大するなどの問題があるため、ある程度の距離(5 mm以上)をとる必要があると考えられる^[9]。そのため、質量分析においては、信号が出るピーク位置をコイルの外側に出す必要があるため、アディショナルガスの流量を増やす必要がある。この実験より、最大の信号強度を得た、アディショナルガスは1000 mL/min、サンプリングコーンの位置は5 mmに決めた。

次に、脱溶媒装置の効果を調べるために、脱溶媒していないとき、加熱のみ行ったとき、脱溶媒を行ったときの3点を比べる実験を行った。サンプリング位置は5 mmのときが良いという結果であったが、脱溶媒なしの場合と加熱のみの場合で振る舞いが変わるのかを見るために、横軸にサンプリング位置をとった。ヒーターの温度は、200°Cに固

定し、冷却温度は設定できる最低の-23℃まで不凍液を冷やしている。その結果を図5.24に示す。

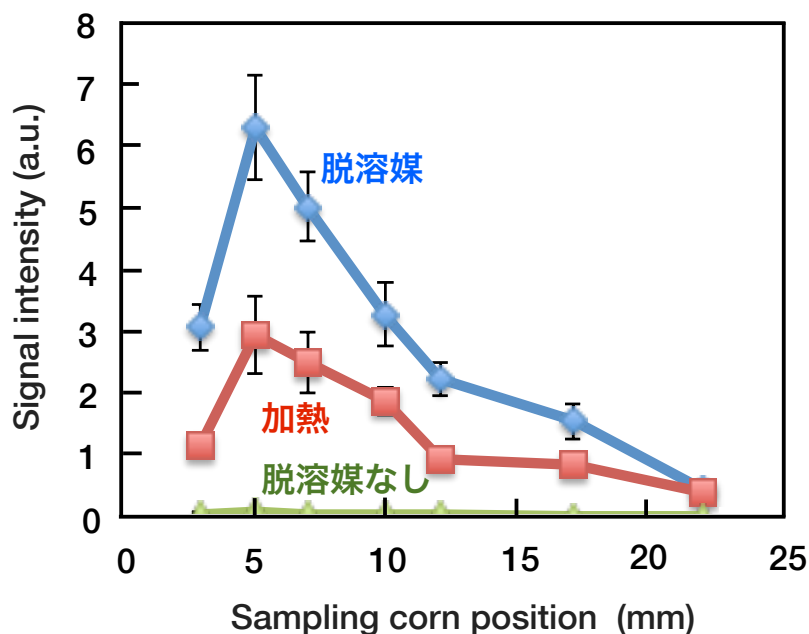


図5.24 脱溶媒の有無とサンプリング位置と信号強度の関係

この結果より、加熱と冷却システムを用いた脱溶媒を行った場合の質量信号強度が最も高くなった。サンプリング位置は、図5.23で調べた通り、5 mmのところが一番信号強度が強くなる。加熱のみの場合と比較すると信号強度は約2倍となり、脱溶媒を用いない場合と比較すると120倍の感度向上が確認できた。この理由としては、加熱によって膨張しインジェクションガスを冷却することで体積膨張、すなわち、流量の増加を防ぐため試料の滞在時間を確保し、プラズマの揺らぎを小さくすることができるため、脱溶媒したドロプレットを安定してプラズマに導入できるため、分析感度が向上したものと考えられる。つまり、脱溶媒装置は分析感度向上に対して、非常に有用であることを示すことができた。

5.3.2.3 イオン電流の直接取得

イオン電流の直接測定の優位性については次章で詳しく説明する。またICP-QMSのイオン電流直接測定については、本章のAppendixに示す。前節の実験と同様であるが、検出器から得られるイオン電流をデジタルオシロスコープ(TDS5054B, Tektronix社製)を用いて直接取得する方法を適用した。実験条件はアルゴンガス流量15 L/min, 高周波電力1500 W, ドロプレット試料導入装置は内径30 μ mを使用した。溶液には10 mg/Lの鉛の標準溶液を用いた。その結果を図5.25に示す。

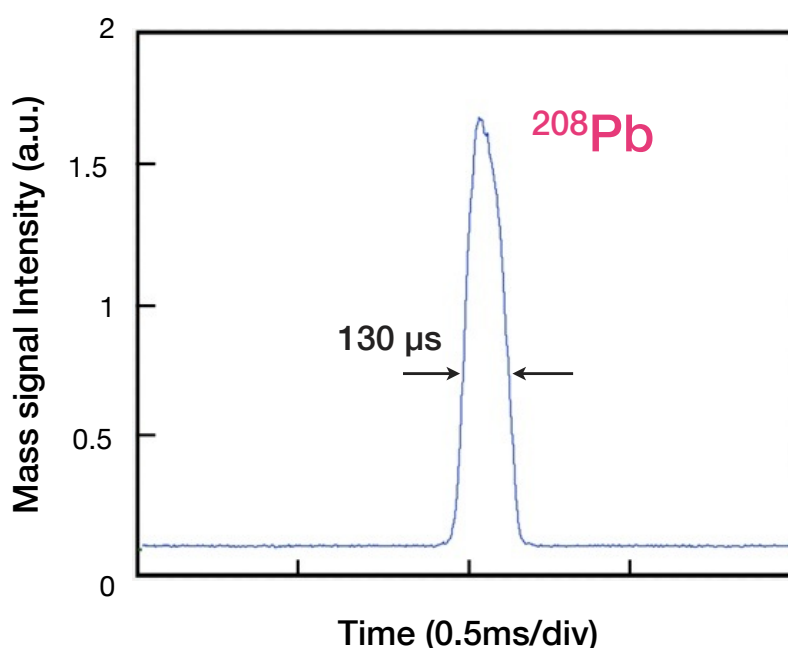


図5.25 脱溶媒装置を適用し、イオン電流の直接測定で取得した鉛の質量スペクトル

このグラフから、検出下限絶対値を計算すると、1.1 agになった。また、スペクトルの半値幅も130 μ sと、脱溶媒したことで、これまでの結果(スペクトル幅:1 ms)よりもはるかに短い過渡的な信号を取得することができた。これまで開発してきた脱溶媒装置とイオン電流の直接測定を両方ともおこなうことによって、本研究の目的である単一細胞分析に必要なagレベルでの検出下限絶対値を得ることに成功した。この結果を原子数の観点から考えてみると、1.1 agに相当するPbの原子数を計算すると、 3.2×10^3 個となった。一方で14 pLのドロプレット中に入っているPbの原子数を計算すると、 4.1×10^8 個となる。また、ICP-MSの透過効率は約1億分の1といわれている^[10]が、スプレーチャ

ンバーとネブライザの部分で100分の1ずつ透過効率が落ちているので、ドロプレット試料導入装置の場合、すべての試料が導入できていると考えることができるので、その後のサンプリングコーン・スキマーコーン・キューポールの部分のみで考えると、本実験での透過効率は1万分の1になる。よって、 4.1×10^8 個の1万分の1と考えると、ギリギリではあるが測ることができるのではないかと考えられる。

5.4 結言

本章では、ドロプレット試料導入用脱溶媒装置の開発を行った。

まず、加熱気化装置を開発し、その効果について調べた。ドロプレットの導入経路を加熱することによって約10倍の信号強度を実現した。またその効果について検証してみると、インジェクションガス温度を89°Cに加熱したときは試料の導入量に関わらず、イオン線の発光強度が一定であったが、147°Cまで上昇させたことによって、試料の導入量の比と発光強度比がほぼ一致することが分かった。したがって、ドロプレットの導入経路を加熱する加熱気化装置の有用性を示すことができた。また、加熱することによって見えてきた問題点として、加熱によって溶媒を蒸発させた後、そのままプラズマに水蒸気が入ってしまうため、水蒸気の方にエネルギーが使われているのではないかと考えた。

そこで、加熱部の下部に冷却装置を適用した。その脱溶媒装置の効果について検証した。まず、プラズマにドロプレットを運ぶためのアディショナルガスを変化させ、それぞれに適した値があることを確認した。ICP-AESを用いて、イオン線の発光と H_{β} 線の発光を測定することによって、発光強度の変化と水蒸気の導入量を評価することができる。その結果、Caのイオン線は約9倍に増加し、 H_{β} 線は約1/5倍に減少させることに成功し、水蒸気の導入量を減らせたことを確認し、イオン線の感度が向上したことが分かった。したがって、脱溶媒装置の有用性を示した。また、質量分析に適用した結果、脱溶媒しなかったときに比べ、脱溶媒を行ったことによって、約120倍の信号強度を得ることができた。したがって、本章で開発したドロプレット試料導入用脱溶媒装置の有用性を示すことができた。

さらに、質量分析を用いたときの検出下限絶対値は、1.1 agとなり、本研究で目的としている単一細胞中の微量元素レベル(agレベル)の検出下限絶対値を実現した。

次章では、S/N向上を目的としたドロプレット試料導入装置に適した信号取得方法の開発と信号処理方法について検討する。

参考文献

- [1] S. Gschwind, L. Flamigni, J. Koch, O. Borovinskaya, S. Groh, K. Niemax and D. Gunther, Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the detection of nanoparticles carried by monodisperse microdroplets, *J. Anal. At. Spectrom.*, 26, pp. 1166-1174 (2011).
- [2] 平田岳史, 高下一太郎, 多重検出器型誘導結合プラズマ質量分析法による高精度鉄同位体分析のための直接加熱型脱溶媒試料導入装置の開発, *BUNSEKI KAGAKU*, 54, 5, pp. 347-354 (2005).
- [3] 田中智一, 玉村武嗣, 軸方向観測型 ICP-AES への電熱気化法の適用と微量試料分析への応用, *福井工業大学研究紀要 第 37 号* (2007).
- [4] C. M. Benson, S. F. Gimelshein, D. A. Levin and Akbar Montaser, Simulation of droplet heating and desolvation in an inductively coupled plasma – Part I, *SPECTROCHIM ACTA, Part B* 56, pp. 1097-1112 (2001).
- [5] C. M. Benson, J. Zhong, S. F. Gimelshein, D. A. Levin and Akbar Montaser, Simulation of droplet heating and desolvation in inductively coupled plasma—part II: coalescence in the plasma, *SPECTROCHIM ACTA, Part B*, 58, pp. 1453-1471 (2003)
- [6] T. Tamura, Y. Kaburaki, R. Sasaki, H. Miyahara and A. Okino, Direct Decomposition of Anesthetic Gas Exhaust Using Atmospheric Pressure Multigas Inductively Coupled Plasma, *IEEE Transactions on Plasma Science*, 39, 8 (2011).
- [7] J. A. Horner, G. C.Y. Chan, S. A. Lehn and G. M. Hieftje, Computerized simulation of solute-particle vaporization in an inductively coupled plasma, *SPECTROCHIM ACTA, Part B* 63, pp. 217-233 (2008).
- [8] K. Shigeta, H. Traub, U. Panne, A. Okino, L. Rottmann, and N. Jakubowski, Application of a micro-droplet generator for an ICP-sector field mass spectrometer - optimization and analytical characterization, *J. Anal. At. Spectrom.*, 28, pp. 646-656 (2013).
- [9] 上本道久[監修], *ICP 発光分析・ICP 質量分析の基礎と実際 (装置を使いこなすために)*, オーム社 (2008).

[10] 野々瀬 菜穂子, 基礎から学ぶICP-MS 四重極, セクター, コリジョン・リアクションを使いこなすために, プラズマ分光分析会 2013筑波セミナー講演要旨集, p 9 (2013).

Appendix

四重極型ICP質量分析装置のイオン電流直接測定

本研究で用いたICP 質量分析装置 (HP 4500, Agilent 7500cs, Agilent Technologies) の概略図を図5.26に示す。その測定原理は、プラズマ中で原子化、イオン化されたドロプレット試料は、サンプラーを通過して数Torrに減圧されたインターフェース部へ導入され、イオンレンズ部で収束された後、質量選択部へと運ばれる。質量選択部として四重極型マスフィルタが使用されており、特定の質量電荷比 (m/z) をもったイオンだけが振動しながら電極にあたることなく通過する。通過した測定質量数のイオンは、二次電子増倍管で電気パルスに変換され、プリアンプで増幅された後、ディスクリミネータで設定された基準電圧 (ディスクリ電圧 V_r) によって信号とノイズに分離され、ディスクリミネータから出力されるパルス信号がカウンタで計測される。

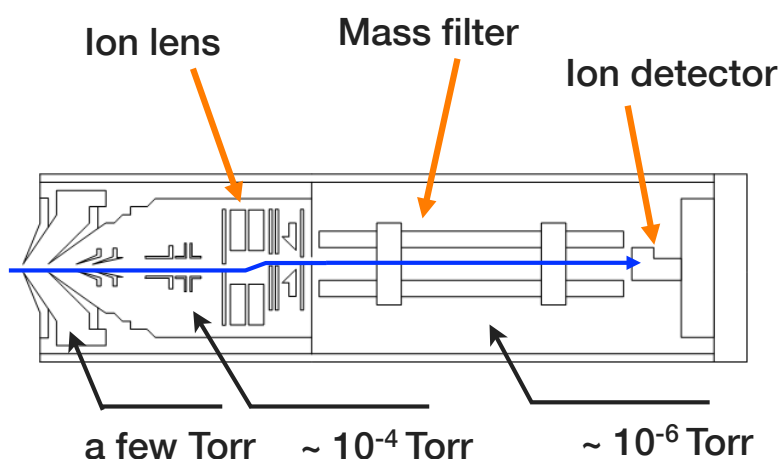


図5.26 四重極型ICP質量分析装置の概略図

ドロプレット試料導入装置のような過渡的な信号が得られる場合、イオン信号を積分システムを介さずに直接測定し、高い時間分解能で計測する方法が有用であると考えられる。ICP-QMSもICP-TOFMSも二次電子増倍管を用いており、検出系は同様のシステムであるため、まず始めにICP-QMSについて説明する。

信号の取得方法には、パルスカウンティングとアナログ電流測定がある。パルスカウンティングによるイオン信号測定は、一般に、高 S/N 比、高安定、小信号域向きとされている。微小信号域でも検出器によりある程度のパルス高さが得られるため、ノイズと

の切り分けが容易であり、S/N 比の高い測定が可能である。また、イオン 1 個あたりの増幅電子数で表される、検出器の増幅ゲイン変化に対しても比較的影響を受けにくい。反面、高カウントレート領域では、パルスの数え落とし頻度が増えるため、リニアリティが悪化するという特性をもつ。一方で、今回実験に用いるイオン電流の直接測定は、アナログ電流測定の方である。イオン信号測定は、一般に、大信号域向き、良リニアリティとされている。多数のパルス信号をまとめてアナログ信号(電流値)として測定するもので、高信号領域までリニアリティが保たれる。しかし、微小信号域まで測定することが難しく、信号が検出器のゲインに直接影響を受けるなどの特性をもつ。測定の概略図を図 5.27 に示す。本研究で使用した ICP 質量分析装置のダイノード電子増倍管およびイオン検出部の外観写真を図 5.28, 図 5.29 (A)・(B) にそれぞれ HP 4500, Agilent 7500cs を示す。検出器からの信号出力を、オシロスコープ (TDS5054B, Tektronix 社製) で観測した。オシロスコープの入力インピーダンスは 1 M Ω とし、検出器からの出力電流を電圧に変換したものをモニタした。

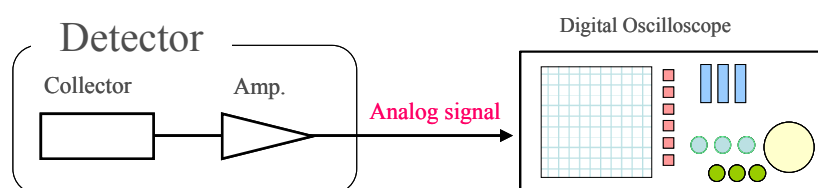


図 6.27 アナログ電流測定の概略図

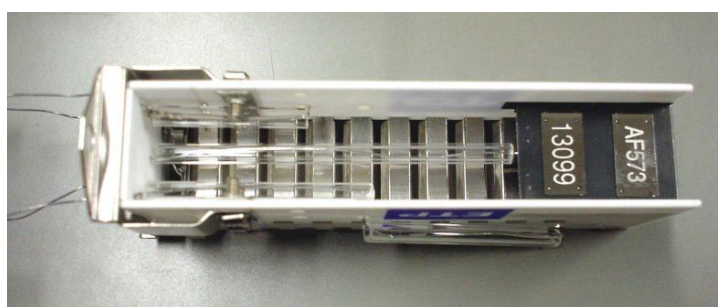


図 5.28 ダイオード電子増倍管

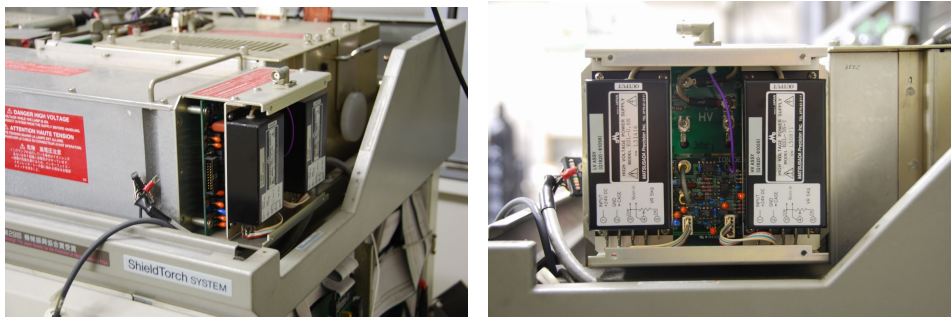


図 5.29(A) イオン検出部外観(HP4500)



図 5.29(B) イオン検出部外観(Agilent 7500cs)

実験条件は、アルゴンガス流量15 L/min, 高周波電力1000 W, ドロプレットサイズ70 mm, 分析試料には100 mg/L のICP混合標準液 (ICP 混合溶液D: 1000 mg/L, Na, K, Mg, Ca, Sr, Ba, 関東化学社製) を用いた。積分時間を従来(100 ms)の1/500,000の20 nsにした結果、過渡的な信号を高い時間分解で測定できるようになった。その結果、Na, Mgでは、それぞれ図5.30のような質量スペクトルを得ることができた。

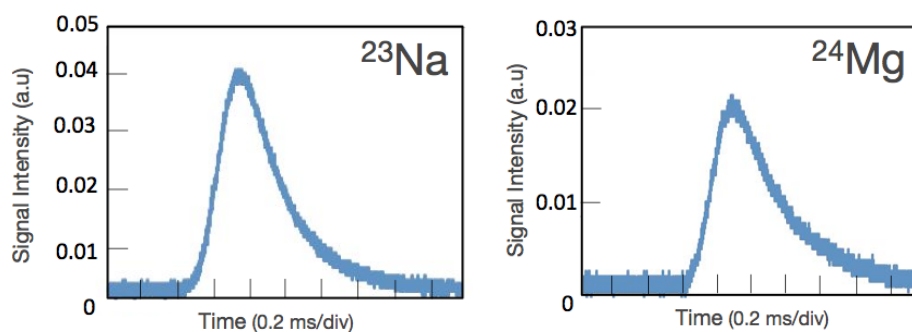


図 5.30 ドロプレット導入によるアナログ信号の直接分析

このイオン電流の直接測定を用いることによって、得られた検出下限絶対値はNaとMgがそれぞれ0.31 fg, 2.4 fgという結果を得られた。従来の積分する方法で取得する方法のときは、検出下限絶対値がNaとMgがそれぞれ30 fg, 47 fg程度であることから、約1/100倍の感度向上に成功した。このようにドロプレット試料導入のような、溶液試料が時間的、空間的に凝縮された試料が間欠的に導入される場合、不要なノイズを積分することなく、信号を直接得られるこのイオン電流の直接測定は、ドロプレット試料導入の検出に適した方法であると考えられる。

第6章 ICP飛行時間型質量分析への応用

6.1 緒言

前章で、感度向上のために溶媒負荷低減を目的としたドロプレット試料導入用脱溶媒装置の開発を行ってきた。ここで、本研究の目的である単一細胞分析を実現するための要素を再度確認する。次の3つの要素、「超高感度(10^{-18} g 程度)」、「細胞の個別導入」、「多元素同時分析」である。これまでに、「超高感度(10^{-18} g 程度)」に対しては脱溶媒装置を用いて、「細胞の個別導入」についてはドロプレット試料導入装置を用いて研究を進めてきた。そこで、本章では「多元素同時分析」について検討する。

これまでの研究において、ドロプレット試料導入装置を用いて得られる信号は 1 ms 以下であることが明らかになってきた。これまで用いていた ICP-QMS においては、試料の連続導入を用いて分析をおこなう際には、測定元素を切り替えることにより多元素を分析することができていた。しかし、1 ms 以下の信号中に測定元素を切り替えることはできない。そのため、ICP-QMS では過渡的な信号を測定する際には多元素を同時に分析することはできない。

そこで、本研究では多元素同時分析が可能なICP飛行時間型質量分析装置を用いることにした。本章では、ICP飛行時間型質量分析装置の測定原理とその分析結果、また S/N 比の向上を目的としたイオン電流の直接測定と信号処理についての研究をおこなったので、報告する。

6.2 ICP飛行時間型質量分析装置

6.2.1 ICP飛行時間型質量分析の測定原理

本実験で用いたICP飛行時間型質量分析装置(ICP-TOFMS, Optimass 9500, GBC)について説明する。図6.1に概略図を示す。この測定原理は、あるエネルギーを持つイオンが一定の距離を飛行するのに要する時間は、イオンの質量に対応する性質を利用したのが、飛行時間型質量分析装置である。イオンレンズの後段に、ビームと直角方向に加速するための高電圧パルスの印可ユニットを配し、線形反射型の飛行軌道をとるように設計されている。イオンの質量電荷比はイオンの加速電圧、飛行距離、飛行時間の関数となるため、第二者を一定にすれば飛行時間が質量電荷比に対応

する。全質量範囲(5~260)をマイクロ秒オーダーで測定することができ、500 (^6Li) ~ 2200 (^{238}U) 程度の分解能を有するとされている。また、TOF-MSは質量分離部に入ったイオンはすべて計測するためレーザーアブレーション、電気加熱気化やフローインジェクションなどの一過性信号を観測するには好都合である。イオン源で生成するイオンのエネルギー幅を狭くし、飛行時間を大きくすることで原理的には分解能が向上するが、後者は大空間を高真空に保つなど技術的課題もある^[2]。

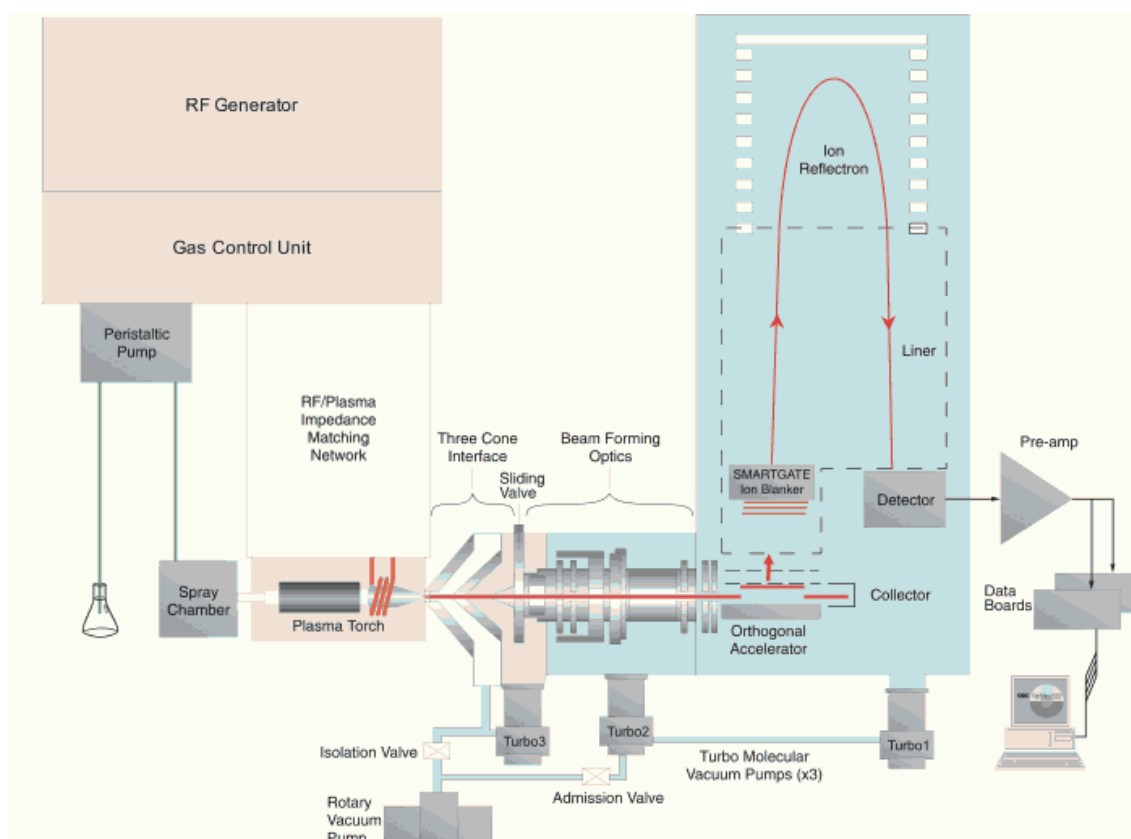


図6.1 ICP飛行時間型質量分析装置の概略図

6.2.2 ドロプレット試料導入 ICP 飛行時間型質量分析

まず、ドロプレット試料導入装置をICP-TOFMSに適用し、その際の検出下限値を求めた。ドロプレットを300 Hzで連続導入した。試料には100 $\mu\text{g/L}$ の銅、亜鉛の標準溶液を用いた。その結果、銅、亜鉛それぞれ4.3 ppb、16 ppbの検出下限値を得た。

また、検出下限値から検出下限絶対量を計算し、0.23 pg, 0.85 pg の結果を得た。なお、この実験では 300Hz の連続導入しているため、ドロプレットとして導入したドロプレットの体積(180pL×300 個=54nL)を用いて、検出下限絶対量を算出した。しかし、この結果は、単一細胞分析に必要な ag オーダーの検出下限絶対量に達成していない。

そこで、前章の最後でも少し述べたが、信号取得による問題があることが分かってきた。これまでの実験で、ドロプレット試料導入装置を用いた場合、溶液試料を時間的、空間的に圧縮された状態でプラズマ中へ導入することが可能となった。このため、発光分光測定・質量分析からもわかるように質量信号は数 100 μ s~1 ms 程度の幅を持った、短い過渡的な信号となる。一方、市販の ICP 質量分析装置は連続的な試料導入を前提としているため、1 つの測定点は 100 ms 程度の積分を行うような設定になっている。この方が、濃度の薄い試料でも測定することができるため、連続的な試料導入においては有用な方法である。しかしながら、ドロプレット試料導入装置のような過渡的な信号を得る場合、S/N 的に不利となる。図 6.2 に示す概念図のように、1 滴のドロプレットから得られる信号は 1 ms 以下の過渡的な信号であり、その信号を含めて 100 ms の積分時間で信号処理してしまうと、信号強度がかなり低い位置の信号として出力されることとなり、信号を検出できなくなる。そこで本研究では、イオン信号を積分システムを介さずに直接測定し、高い時間分解能で計測した^[1]。

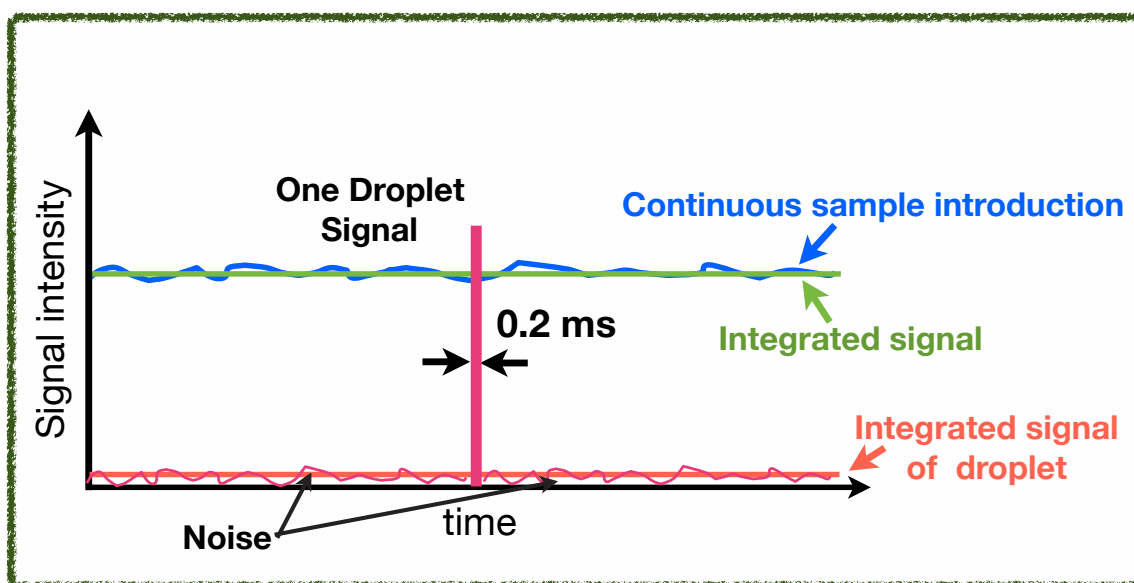


図 6.2 パルスの信号と信号の積分

6.2.3 イオン信号の直接取得

ICP-TOFMSでイオン信号を積分システムを介さずに直接測定し、高い時間分解能で計測する方法を以下に示す。その概略図を図6.3に示す。

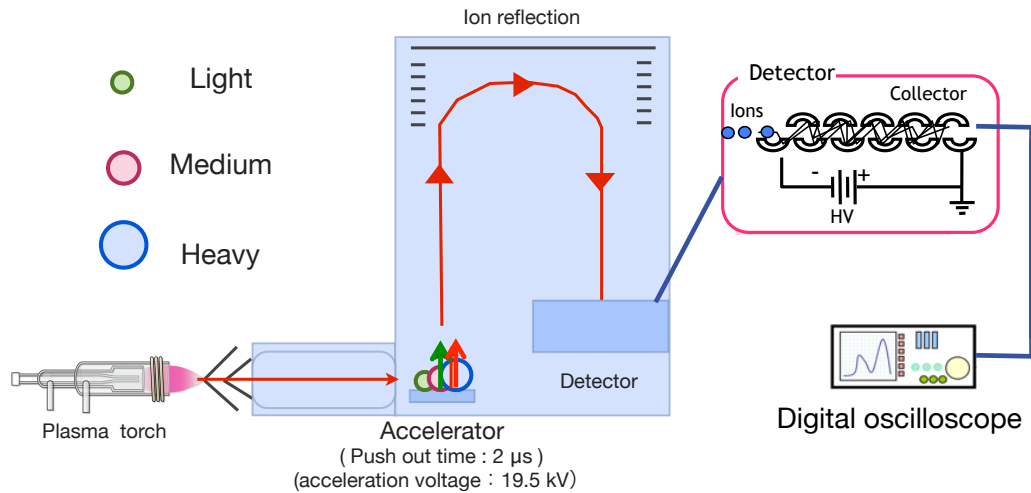


図6.3 イオン電流の直接測定の概略図

本実験で使用しているICP-TOFMS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^[3]。過渡的な信号を不要なノイズを積分しないために、イオン信号をデジタルオシロスコープ(TDS5054B, Tektronix)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。その原理を図6.4で説明する。本研究で使用しているICP-TOFMSは、測定周期が34 μsである。そのため、積分時間が100 msの場合では、3000回分の信号を積分していることになる。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は0.4 m秒間に約12回のイオン飛行が繰り返され、その1つ1つからスペクトルを取得することができる。これまでの研究で、ドロプレット試料導入で得られる信号の半値幅は、200 μs程度であるため、信号の幅は0.4 msであるとした。

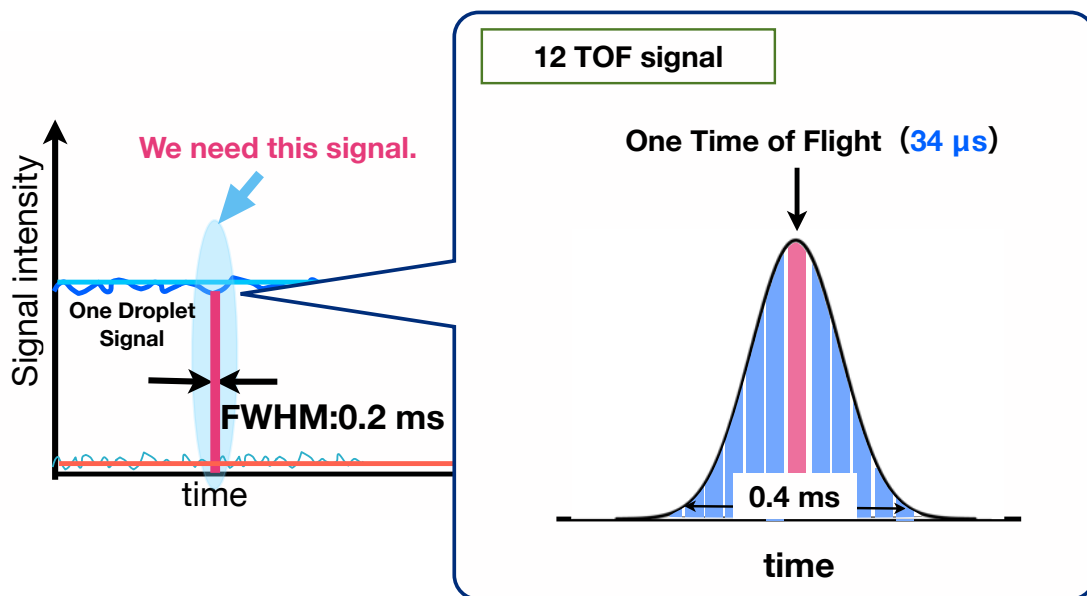


図6.4 直接信号取得によって得られる信号の模式図

まず、この手法で信号を得ることができるのかを確認するために、従来の導入法であるネブライザを用いて実験を行った。また、確実に元素を特定するために単一元素のみが含まれている1 mg/L のインジウム標準溶液を用いた。デジタルオシロスコープのサンプリングレートは100 Ms/sとした。他の実験条件は、アルゴンガス流量15 L/min, 高周波電力1200 Wに設定した。このときのサンプリング周波数は、100MS/sである。図6.5にこの方法を用いて取得したグラフを示す。飛行時間からインジウムであることを判断し、インジウムの信号を高感度かつ高時間分解で測定することに成功した。なお、両端に見えるスペクトルはイオンを加速するときに行われるプッシュアウトパルスである。

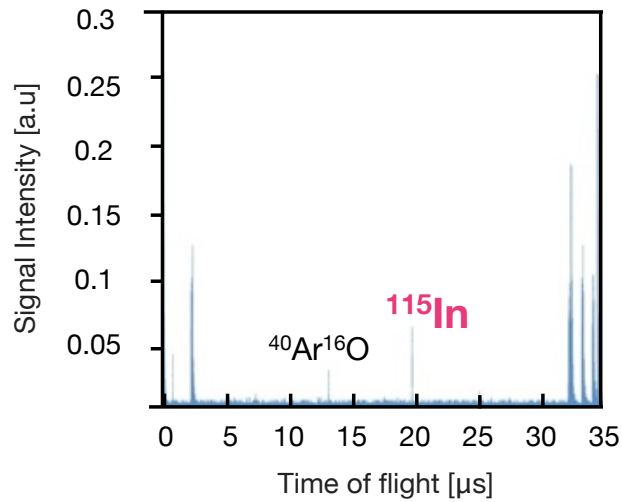


図 6.5 イオン電流の直接測定による質量信号(ネブライザ使用)

次に、実際にドロプレット試料導入装置を用いて、このイオン電流の直接測定を行った。その結果を図6.6に示す。実験条件は、図6.5と同様で、溶液に100 mg/Lの鉛の標準溶液を用いた。このときの測定点数は515,000 point、サンプリング周期は66 psで測定をおこなった。

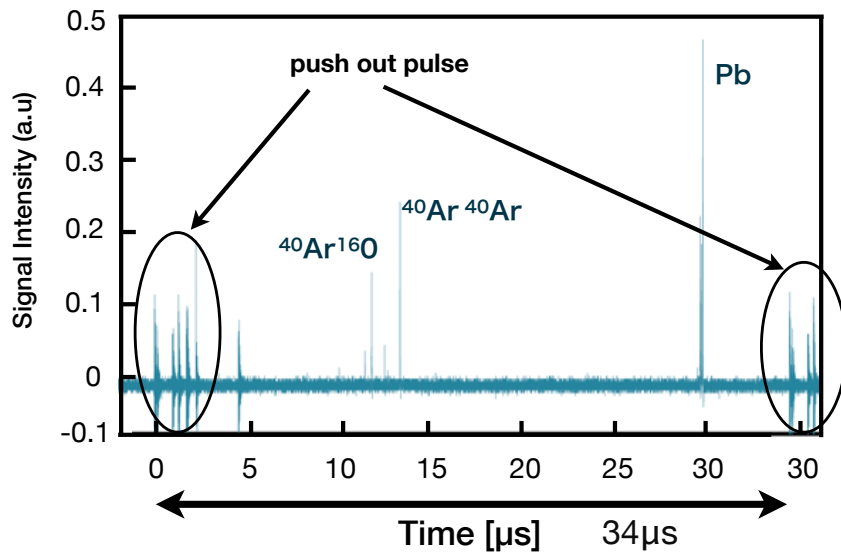


図 6.6 イオン電流の直接測定による質量信号
(ドロプレット試料導入装置使用)

したがって、イオン電流の直接測定において、信号ピーク時の1周期分 (34 μ s) の信号を積分せずに信号を取得した。

鉛の質量スペクトルの部分を拡大したグラフを図6.7に示す。このとき、鉛のスペクトルの部分では、測定点数は1745 pointである。

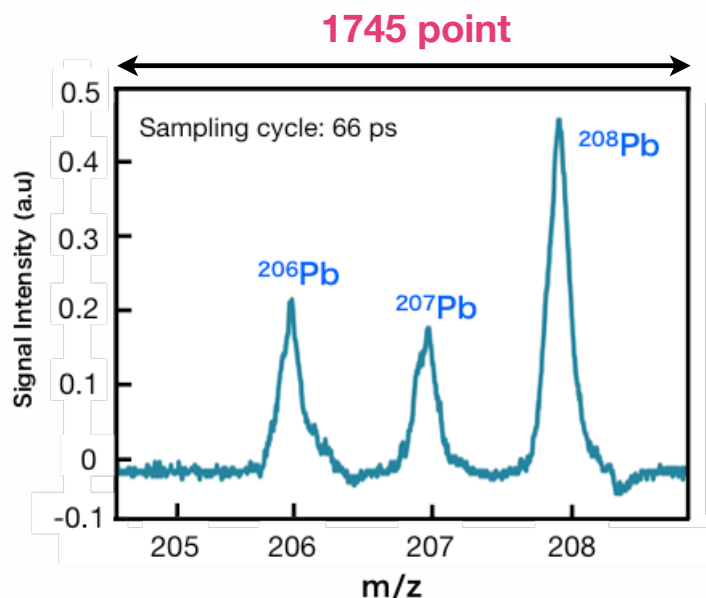


図6.7 イオン電流の直接測定による鉛の質量スペクトル

このときの同位体比を見ることによって、ドロプレット試料導入装置かつイオン電流の直接測定を用いた手法で、正確に分析できているかを確認することができる。その結果、

鉛の同位体比の理論値は、

$$^{206}\text{Pb} : ^{207}\text{Pb} : ^{208}\text{Pb} = 1 : 0.86 : 2.17$$

であり、測定結果から計算すると、

$$^{206}\text{Pb} : ^{207}\text{Pb} : ^{208}\text{Pb} = 1 : 0.82 : 2.2$$

となり、同位体比の測定誤差は5%以下であり、ドロプレット試料導入ICP-TOFMSを用いても分析できることを示した。また、検出下限絶対値を求めてみると、36 fgとなった。従来の信号取得方法でドロプレットを連続導入して測定した際は、 ^{65}Cu と ^{64}Zn を測定し、それぞれ7.5 pg, 17 pgという検出下限絶対値を得ていた。このイオン電流の直接測定によって、約1/200に検出下限絶対値が向上した。ICP-TOFMSでもこのイオン電流の直接測定は、ドロプレット試料導入装置において有用な方法であることが分かった。

6.3 ドロプレット試料導入用信号処理

前節までで、溶液試料を時間的、空間的に圧縮された状態でプラズマ中へ導入する本研究で開発したドロプレット試料導入装置は、イオン信号を積分システムを介さずにデジタルオシロスコープを用いて直接取得することが有用であることが示された。デジタルオシロスコープを用いることによって、高時間分解能で取得できることから、信号処理(移動平均など)をすることで、さらなるS/N比の向上が期待できる。

まず、高速取得する意味について説明する。市販装置を用いて信号を取得する際に、最短のサンプリング周期は2 nsである。このときのグラフを図6.8に示す。

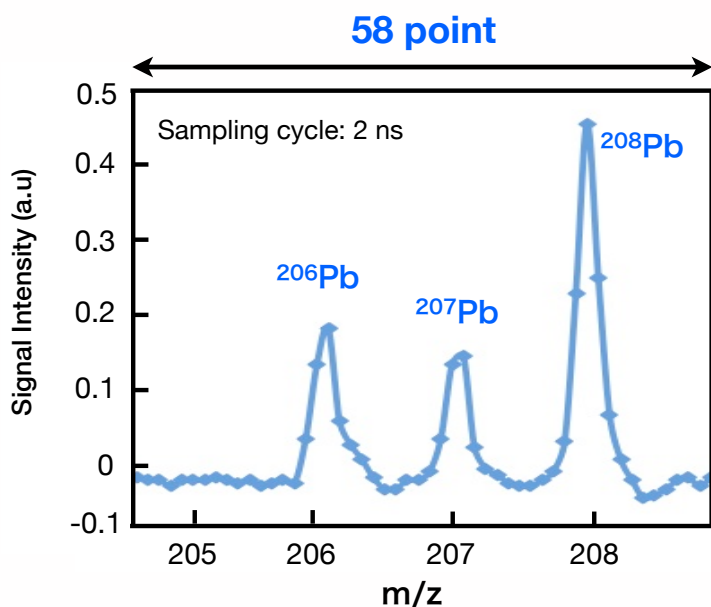


図6.8 サンプリング周期が2 nsで測定したときの鉛の質量スペクトル

図6.7と図6.8を比較すると、測定点数は同じ範囲で58 pointと1745 pointであり、測定点数は30倍になった。このように高速に信号取得することで測定点数を増やすことによって、スペクトルの頂点を正確に捉えることができるため、前節で示した通り、検出下限絶対値を向上させることができた。さらに、測定点数が増えることは、信号処理をする際において、S/N比を向上させることに有効である。

そこで、単純移動平均(Simple moving average)を適用した。移動平均は、信号波形を滑らかにすることであり、この処理を信号波形の「平滑化」といい、平均値を計算することと等価であると言える^[4]。図6.7を移動平均を適用したグラフを図6.9に示す。

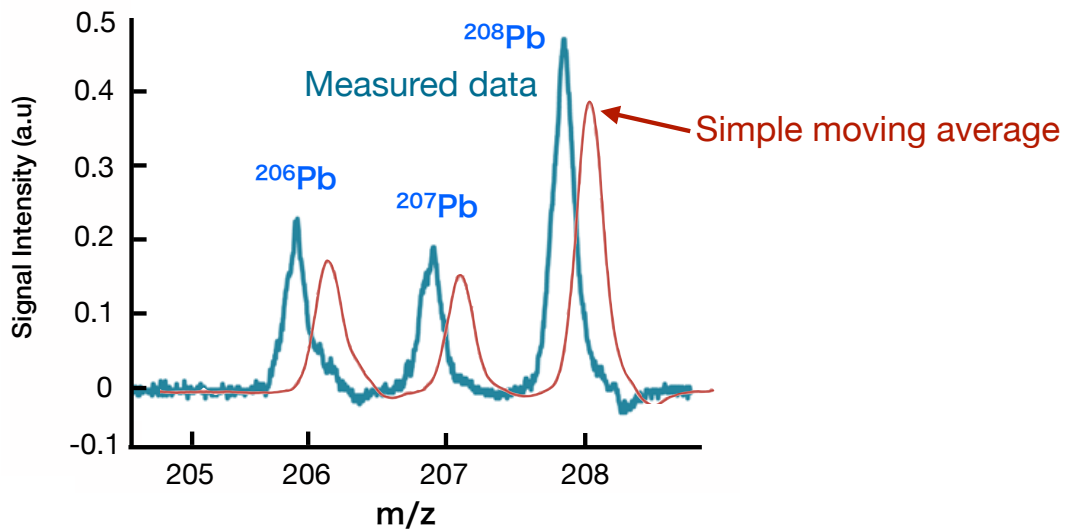


図6.9 イオン電流の直接測定で取得した鉛の質量スペクトルと
単純移動平均を適用した鉛の質量スペクトル

今回は、S/N比が最大になるように単純移動平均を適用した。今回の単純移動平均には、61 pointの測定点を使用した。移動平均後の検出下限絶対値を計算してみると、4.9 fgとなった。移動平均を適用する前の36 fgと比べて、約1/10倍になることが分かった。移動平均は過渡的な信号を得る本研究にも有用であることが分かった。しかし、移動平均は近接点との平均を取るため、ベースライン付近のノイズの部分は滑らかな信号になるが、それに伴い、ピーク付近の信号も平均値のため、小さくなってしまう。S/N比の向上には、ノイズ部分は小さく、ピーク付近はそのままの信号を使いたい。

そこで、次に適応平滑化法(Adaptive smoothing)の適用を検討した。適用平滑化法は、次の式(6.1)で使用する測定点を決める。

$$\hat{s}(i) = \frac{\sigma_x^2(i) - \sigma_n^2}{\sigma_x^2(i)} \left(x(i) - \bar{x}(i) \right) + \bar{x}(i) \quad \dots (6.1)$$

$\sigma_x^2(i)$: 測定データの分散

σ_n^2 : ノイズの分散

この式より、ピークの近くでは、 $\sigma_x^2 > \sigma_n^2$ となるので、

$$\hat{s}(i) \doteq x(i) \quad \dots (6.2)$$

となり、測定点が採用され、グラフにプロットされる。また、 $\sigma_x^2 \doteq \sigma_n^2$ のときは、

$$\hat{s}(i) \doteq \bar{x}(i) \quad \dots (6.3)$$

$\bar{x}(i)$ (移動平均の値)

単純移動平均された値が採用される。したがって、ピーク近傍では、測定点そのまま使われ、ベースライン付近では移動平均が適用され、ノイズが減る。したがって、ピーク(S)はそのままにノイズ(N)は減少するため、S/N比の改善につながる。この信号処理を適用したグラフを図6.10に示す。このとき、161 pointの測定点を使用して適応平滑化法をおこなった。また、適応平滑化法を10回繰り返して適用した。

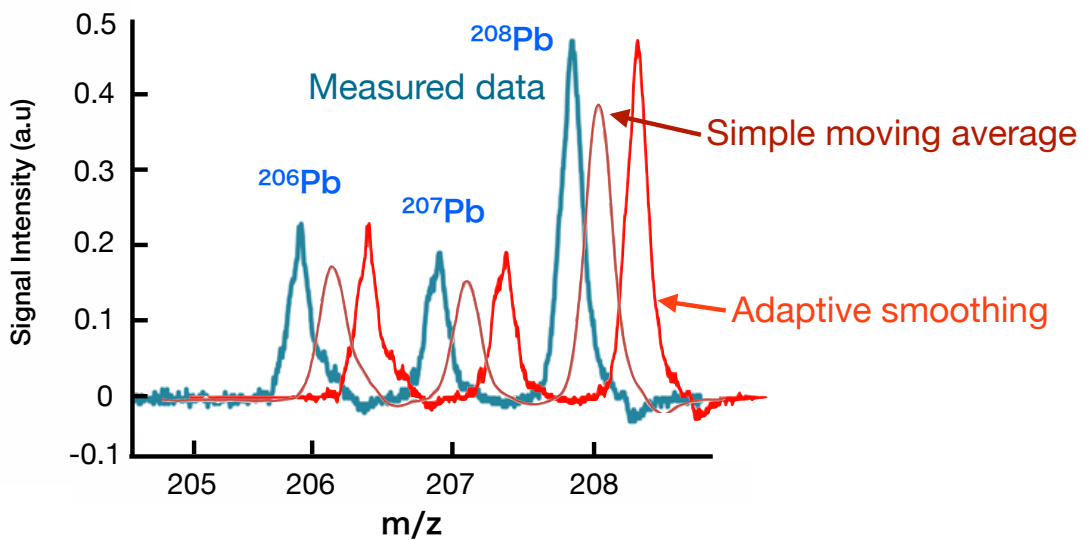


図6.10 イオン電流の直接測定で取得した鉛の質量スペクトルに単純移動平均と適応平滑化法を適用

このようにノイズ部分は移動平均が適用され、ノイズを減らすことができ線、ピーク付近は鈍ることなく、そのままの信号が使われている。また、繰り返し適応平滑化法を適

用することによって、ノイズ部分の信号のみ小さくなるため、繰り返し行うことで、ノイズのみを減らすことができる。このときの検出下限絶対量を算出してみると、240 agとなり、移動平均のみの場合と比べ、約1/20倍の検出下限絶対値を得ることができた。したがって、本研究で得られる過渡的な信号に対して信号処理をおこないS/N比を向上させる場合は、この適応平滑化法が適していると考えられる。

なお、例えば 3σ 以上を信号と見なすと考えると、この適応平滑化法では、信号が残ってしまい、ノイズは減っていくので本来の信号ではない信号を信号として残してしまうということもあるため、本来の信号であるかどうか検討する必要がある。そのため、S/N比を向上させる際に使うことは有効であるが、直接的な感度向上につながっているわけではない。

6.4 結言

本章では,ドロプレット試料導入装置をICP飛行時間型質量分析装置に適用した。そのとき,ドロプレット試料導入装置のような過渡的な信号を得る場合,従来の信号取得方法ではS/N的に不利となることを示した。

そこで,ドロプレット試料導入装置で得られる過渡的な信号に適した信号取得方法としてイオン電流の直接測定方法の開発を行った。イオン電流を検出器からデジタルオシロスコープを用いて取得した。ドロプレット試料導入ICP-TOFMSを用いて信号取得に成功し,1滴のドロプレットからの信号を得ることができ,S/N比の向上に成功した。その結果,約1/200倍の検出下限絶対値を向上させることができた。

また,過渡的な信号に適した信号処理方法を検討し,適用平滑化法が適していることを見つけた。その方法を用いて,信号処理をおこなったことによって,信号処理しないときに比べ,約1/100倍の240 agという検出下限絶対値を得ることができた。

次章では実際に細胞を導入して実験をおこなう。

参考文献

- [1] 重田香織, 生体微量元素の機能解明を目的とした微量試料分析技術の開発, 博士学位論文, 東京工業大学 (2010).
- [2] 上本道久[監修], ICP発光分析・ICP質量分析の基礎と実際(装置を使いこなすために), オーム社 (2008).
- [3] 大畑昌輝, 誘導結合プラズマ飛行時間型質量分析法, ぶんせき, Vol. 12, pp. 641-648 (2008)
- [4] 三谷 政昭 著, やり直しのための信号数学, CQ出版社 (2004).
- [5] S. Kawata and S. Minami, Adaptive Smoothing of Spectroscopic Data by a Linear Mean-Square Estimation, Applied Spectroscopy, 38, pp. 49-58 (1984).

第7章 細胞の直接導入分析

7.1 緒言

これまでに実サンプルの測定として酵母細胞の測定をおこなってきた。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分析を行った。試料には、オリエンタルドライイースト（オリエンタル酵母社製）を純水で希釈した溶液を用いた。ICP-QMSによって酵母細胞の分析をおこない、第6章で説明してきたイオン電流の直接測定をすることによって、約5つの酵母細胞から、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^[1]。その結果を図7.1に示す。

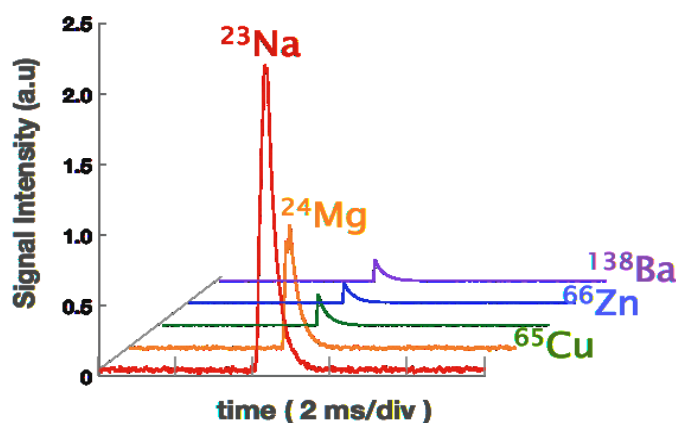


図 7.1 酵母細胞を約 5 個内包したドロプレット導入による多元素質量スペクトル

約 5 つの酵母細胞から信号を取得することはできたが、1 つの細胞から信号を得ることはできなかった。そこで、第 5・6 章では、ドロプレット試料導入用の脱溶媒装置の開発と信号取得方法を開発してきた。その結果、感度の向上をはかることに成功し、単一細胞分析に必要なレベルでの検出下限絶対値を得てきた。そこで、本章では、本研究の最終目標である単一細胞分析に向けて、実サンプル（単細胞藻類）の測定を行った。

7.2 細胞の直接導入によるICP発光分光分析

7.2.1 測定サンプル

まず、本実験で用いた測定サンプルについて紹介する。本実験で用いたサンプルは、“*Pseudococcomyxa simplex*” という単細胞藻類である。細胞の写真を図 7.2 に示す。この細胞は直径が約 $5 \mu\text{m}$ であり、植物細胞のため動物細胞よりは扱いやすく、最終的なターゲットである人の細胞が約 $10 \mu\text{m}$ 程度であることから本研究のサンプルとしては適していると考えている。また、この細胞は陸上の岩や樹皮表面などの水のない場所に生息する寄生藻である。これ細胞を浮遊培養法により、培養温度：室温 ($22^{\circ}\text{C} \sim 26^{\circ}\text{C}$)、光量： $3000 \sim 6000 \text{ lux}$ の条件下で 2 週間の培養をおこなった^[2]。その様子を図 7.3 に示す。この研究においては、東京電機大学工学部環境化学科 保倉明子准教授に株分けや培養法等をご協力いただいた。



図 7.2 *Pseudococcomyxa simplex* の写真

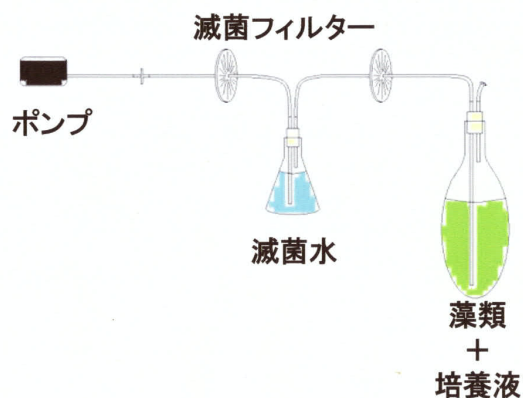


図 7.3 浮遊培養法による培養の様子

7.2.2 *Pseudococcomyxa simplex*の含有元素の定量分析

この細胞 1 個にどんな元素がどのくらい含まれているのかを調べるために、酸分解（硝酸：過酸化水素水=25：1）をおこなった。培養している細胞を milli-Q 水で、遠心分離機をもちいて、3 回洗い、milli-Q 水と細胞に酸溶液を 20% 程度加え、酸分解をおこなった^[3]。今回の実験では、1 mL 中に 3.9×10^7 個の細胞が含まれている溶液を使用した。その溶液を ICP 発光分光分析装置（シーケンシヤル形プラズマ発光分析装置，ICPS-8100，（株）島津製作所製）と ICP 質量分

析装置 (ELAN-DRC (株) パーキンエルマー) を用いて定量分析をおこなった。
その測定手順を図 7.4 に示す。

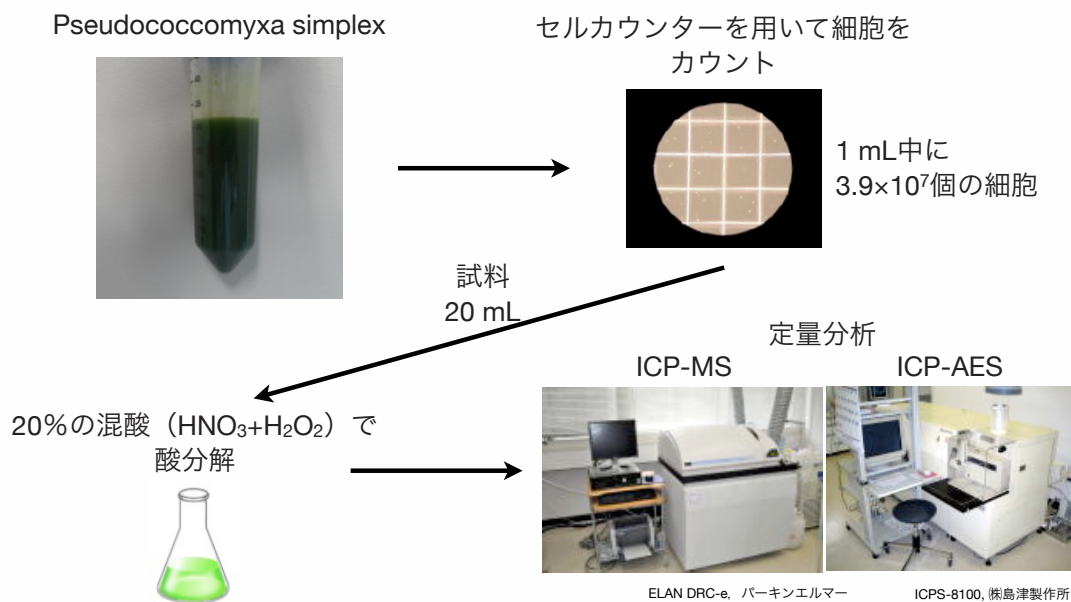


図 7.4 Pseudococcomyxa simplex の含有元素の定量分析の手順

検量線法を用いて定量分析をおこない、測定された濃度から細胞の個数を用いて細胞 1 個あたりに含まれる元素相当量を計算した。その結果を表 7.1 に示す。多くの微量元素は数 100 fg~sub-fg レベルで含まれていることが分かる。また、比較のために一般的な植物細胞に含まれる元素とその絶対量を表 7.2 に示す。

表 7.1 1 個の *Pseudococcomyxa simplex* 中の平均元素量

Element	Absolute amount (fg)
P	290
Fe	360
Mg	92
S	63
Ca	26
Zn	0.91
Mn	0.73

表 7.2 一般的な植物細胞の必須元素含有量

Element	Absolute amount (g)
C	5.9×10^{-12}
O	5.9×10^{-12}
H	7.8×10^{-13}
N	2.0×10^{-13}
K	1.3×10^{-13}
Ca	6.5×10^{-14}
P	2.6×10^{-14}
S	1.3×10^{-14}
Fe	1.3×10^{-15}
Mn	6.5×10^{-16}
Mg	2.6×10^{-16}
B	2.6×10^{-16}
Zn	2.6×10^{-16}
Cu	7.8×10^{-17}
Mo	1.3×10^{-18}

この表から、使用している細胞が異なるので含有量の値は正確に一致しているわけではないが、測定サンプルの違いや測定誤差などを含めると含有量のオーダーは一致していることから、この定量分析の結果の信頼性を示した。

7.2.3 細胞の直接測定

まず、どのような元素が入っているのかを同時に測定したいため、発光分析を用いて分析をおこなった。試料は、前節で述べたように培養した細胞を3回milli-Qを用いて洗い、その後、内標準として10 mg/LのYの標準溶液で細胞を希釈した。セルカウンターを用いて、ドロプレット37滴に1個の細胞が入るように希釈調整をおこなった。確実に1滴のドロプレットに1個の細胞が入ったときの信号を得たいため、2個以上細胞が入ることのないように試料を調整したため、このような条件となっている。この溶液調整の手順を図7.5に示す。

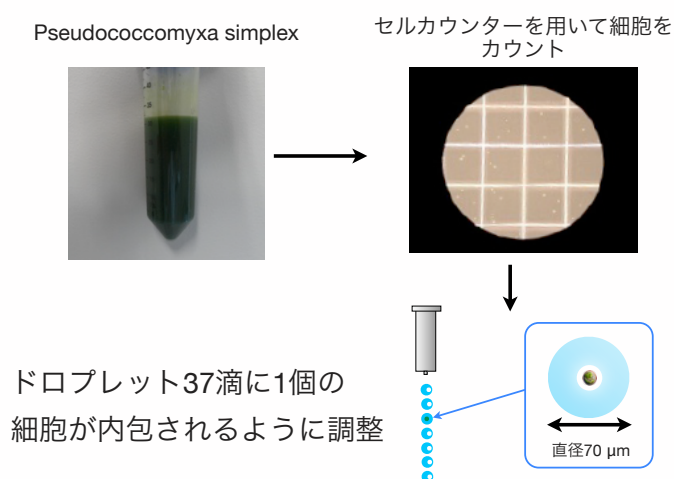


図 7.5 測定試料（細胞溶液）の調整手順

実験のセットアップは図7.6、実験条件は表7.3に示す。光学系には焦点距離300 mmのレンズ、光ファイバー、分光器には波長分解能0.23 nmのマルチチャンネル型(Ocean Optics, Inc., HR4000)分光器を用いた。

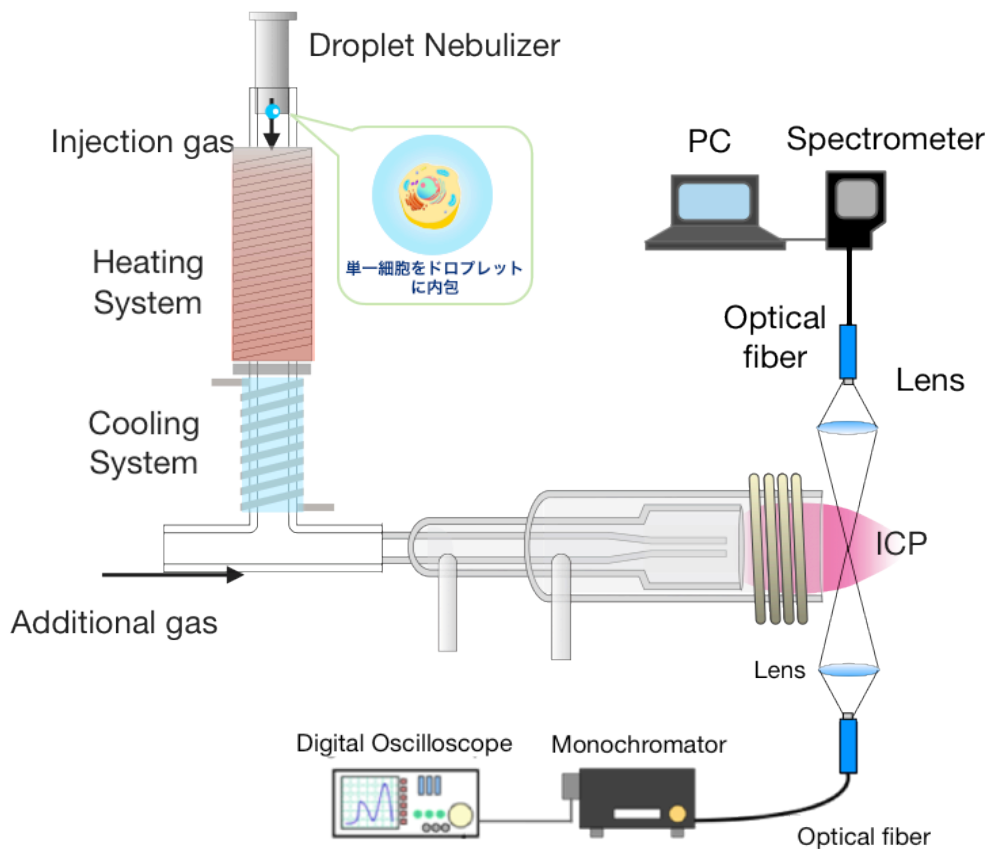


図 7.6 プラズマ発光分光分析の測定系

表 7.3 細胞の直接導入における実験条件

Parameter	Value
Plasma gas	Ar 15 L/min
Auxiliary gas	Ar 1.0 L/min
RF-power	1200 W
Droplet Diameter	70 μm
Droplet frequency	100 Hz
Injection gas	Ar 200 mL/min
Additional gas	Ar 100 mL/min
Sample solution	Cell in 10 mg/L Y

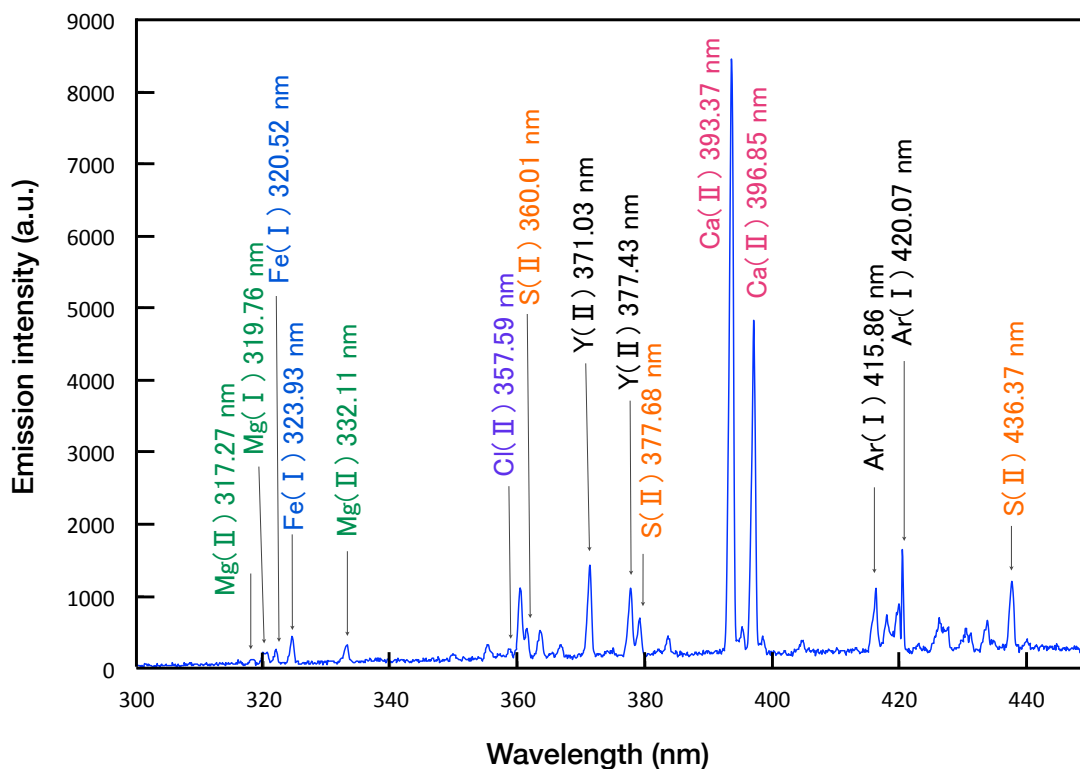


図 7.7 単細胞藻類 1 個の発光スペクトル

マルチチャンネル分光器を用いて分析をおこなった結果，図 7.7 のように 1 個の細胞中の数 10 fg オーダーの多元素同時分析に成功した。

また，細胞からの発光であることを確かめるための結果として次の発光スペクトルを示す。ドロプレットを導入しないときの発光スペクトル（図 7.8 (a)），細胞が入っていない溶媒からのみの発光スペクトル（図 7.8 (b)），細胞が導入されているときの発光スペクトル（図 7.8 (c)）をそれぞれ示す。このときの分析試料は内標準として 10 mg/L の Ba の標準溶液で細胞を希釈した。セルカウンターを用いて，ドロプレット 18 滴に 1 個の細胞が入るように希釈調整をおこなった。

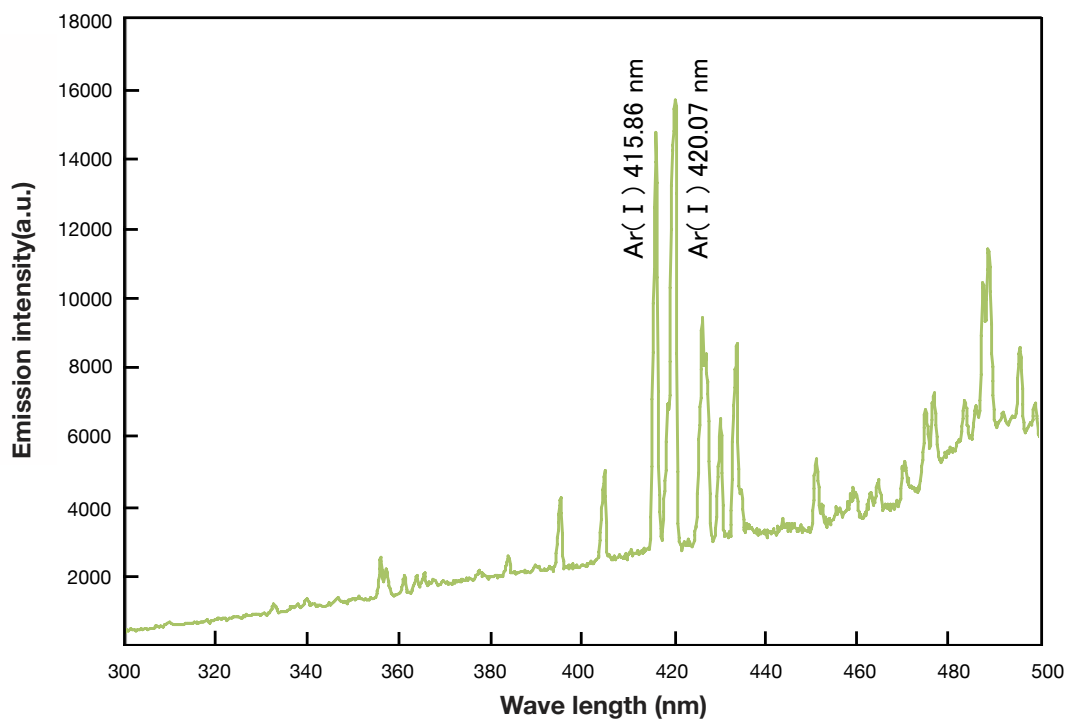


図 7.8 (a) ドロプレットを導入しないときの発光スペクトル

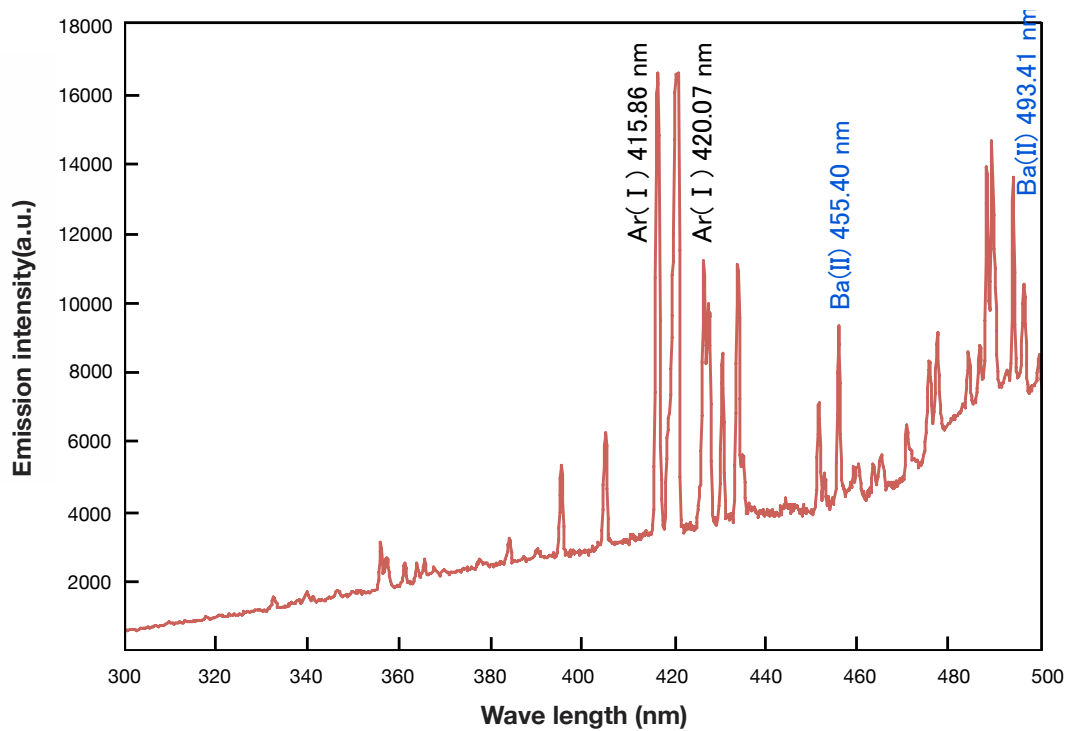


図 7.8 (b) 細胞が入っていない溶媒からのみの発光スペクトル

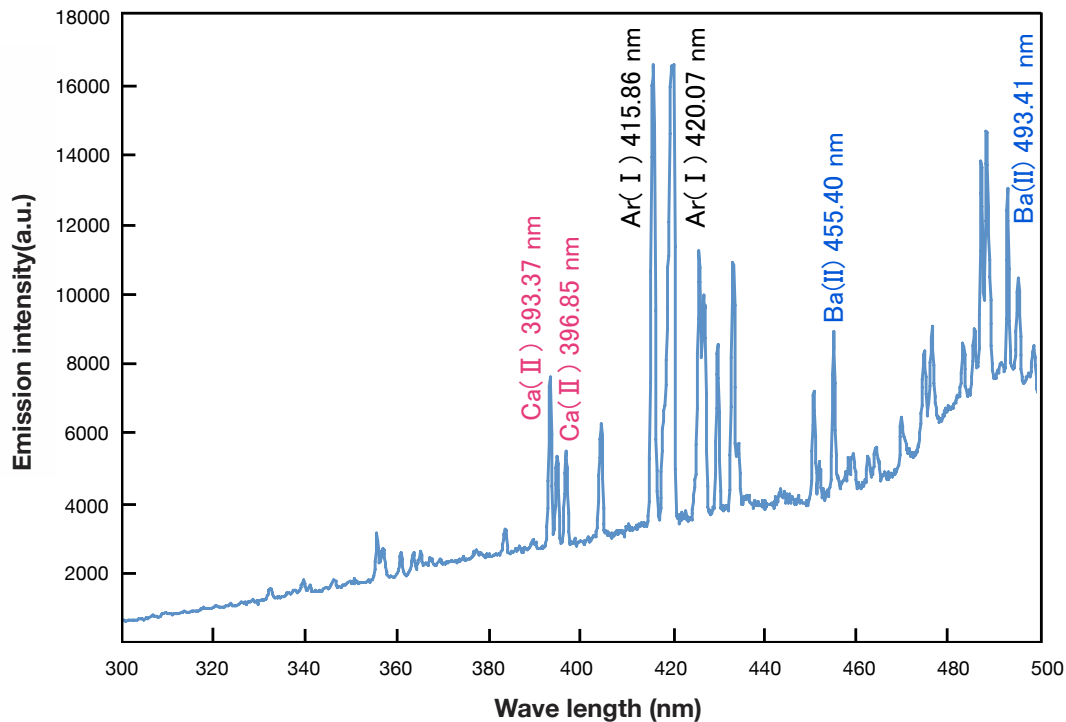


図 7.8 (c) 細胞が導入されているときの発光スペクト

このように、図 7.8 (c)から細胞が入っているときはCaのイオン線を確認することができる。また、Baのイオン線の発光強度は図 7.8 (b)と図 7.8 (c)でほぼ変わらない。さらに図 7.8 (a)のドロプレットを導入しないときの発光スペクトルはBaもCaも検出されない。これらのことから、細胞からの発光が得られていることを示すことができた。また、ドロプレットが導入されると、バックグラウンドのスペクトルが若干上昇していることも分かった。

次に、マルチチャネル分光器の積分時間は最小でも 3.8 ms と 1 ms 程度のドロプレットから得られる信号に対しては長い。そこで、時間分解能良く測定できるモノクロメータを使って信号を取得した。モノクロメータを使って実験すること以外、実験条件はすべて同じである。その結果をBaのイオン線 (455.403 nm) を図 7.9 (a)に、Caのイオン線 (396.847 nm) を図 7.9 (b)に示す。このときのデジタルオシロスコープのサンプリング周期は 4 μ s である。

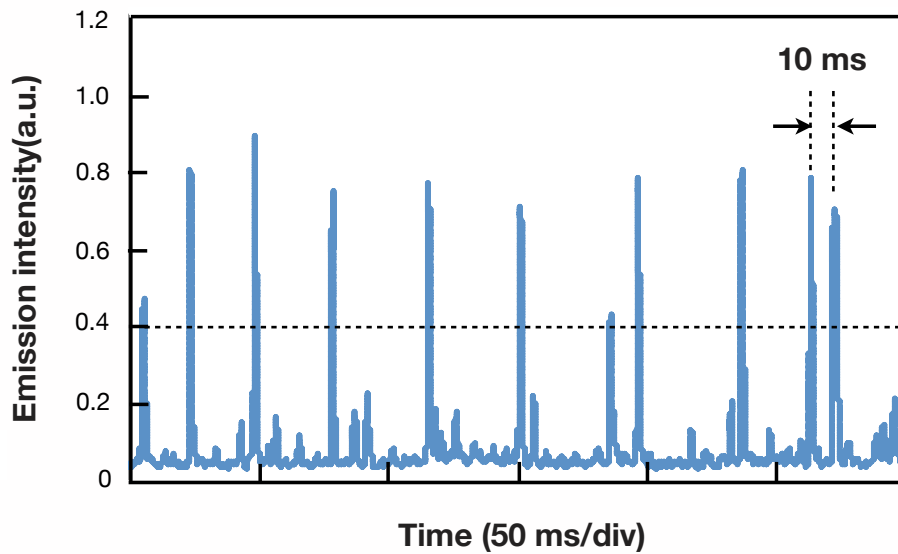


図 7.9 (a) Ba のイオン線 (455.403 nm) の発光スペクトル

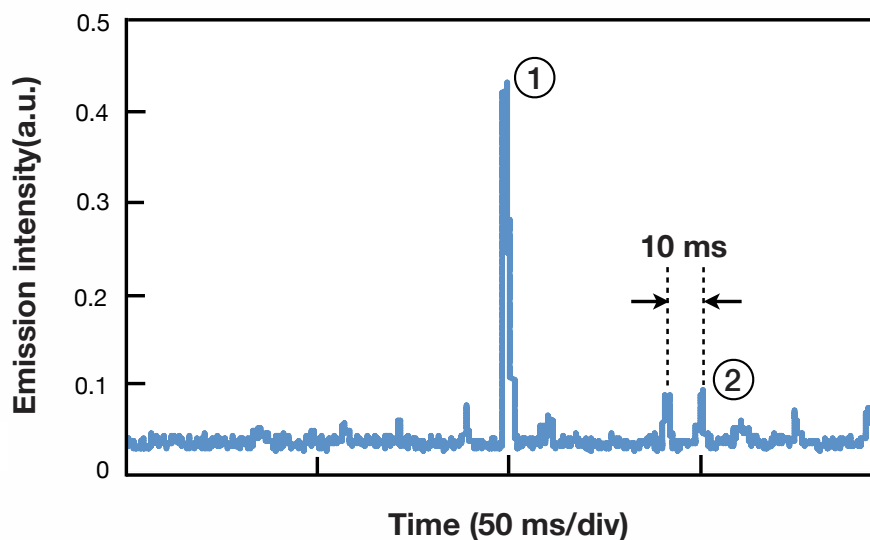


図 7.9 (b) Ca のイオン線 (396.847 nm) の発光スペクトル

図 7.9 (a)では、100 Hz で導入しているため、本来であれば 10 ms ごとに信号が検出されるはずであるが、導入経路が長いことなどの原因から、毎回発光スペクトルを得られていないと考えられる。発光強度が大きいスペクトルのすぐ近くにある小さいスペクトルは、ドロプレットを生成する際に生成されてしまう小さいドロプレット (サテライト) であると考えられるため、本測定では

発光強度が 0.4 以上のものを信号と考えると、約 37% のドロプレットからの発光スペクトルが検出された。このときの Ba の発光強度の RSD は約 11% である。同様の測定を Ca のイオン線を見てみると、図 7.9 (b) のように、グラフの中央付近に見られる大きい発光スペクトル①が細胞からの発光であると考えられる。また、その他に見える小さい発光スペクトルは溶媒に milli-Q 水を用いているため細胞からしみ出したり、培養液から持ち込まれたりする Ca が溶媒に溶けているため、その Ca からの発光と考えられる。また、スペクトル②が小さい細胞が導入されたときのスペクトルである可能性は否定できない。その理由は発光強度の差が①と②で約 6 倍しかないため、細胞の大きさ、すなわち、細胞中に含まれる元素の絶対量が異なり、直径が 2 倍異なると単純計算で体積が 8 倍異なるため、細胞に含まれる元素量もそれに応じて変化していると考えられることから、細胞中の絶対量と発光強度が対応していると考えられるためである。しかし、図 7.9(b) のスペクトル②を細胞からの信号と考えると、その他にも同程度の発光強度を持つスペクトルが 10 本程観測できている。このとき、細胞は 18 ドロプレットに 1 個入るように溶液調整され、かつ、100 Hz で導入しているため、グラフ中では 200 m 秒間の測定であるため、計算上は 1 個の細胞が入ることになる。そのため、スペクトル②のような発光強度の小さいスペクトルは溶媒由来のものであり、細胞からのスペクトルではないとした。同様の測定を 3 回行い、その結果も以下の図 7.9(c) ・ (d) に示す。

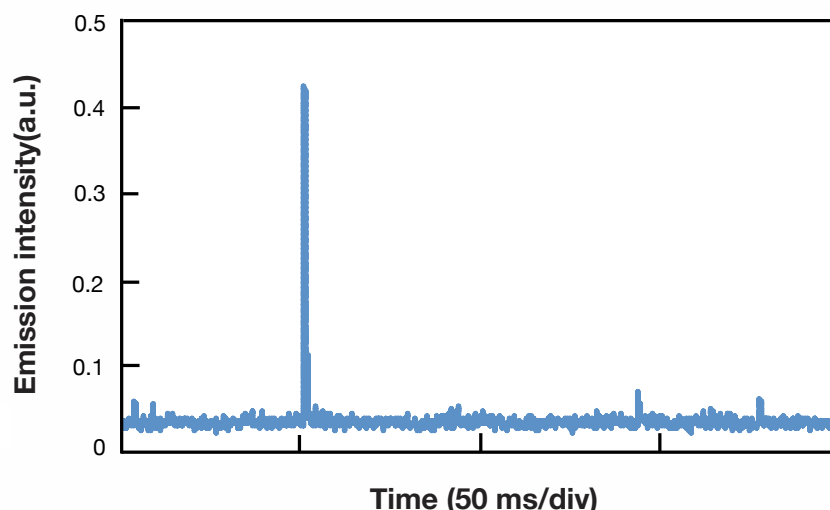


図 7.9(c) Ca のイオン線 (396.847 nm) の発光スペクトル

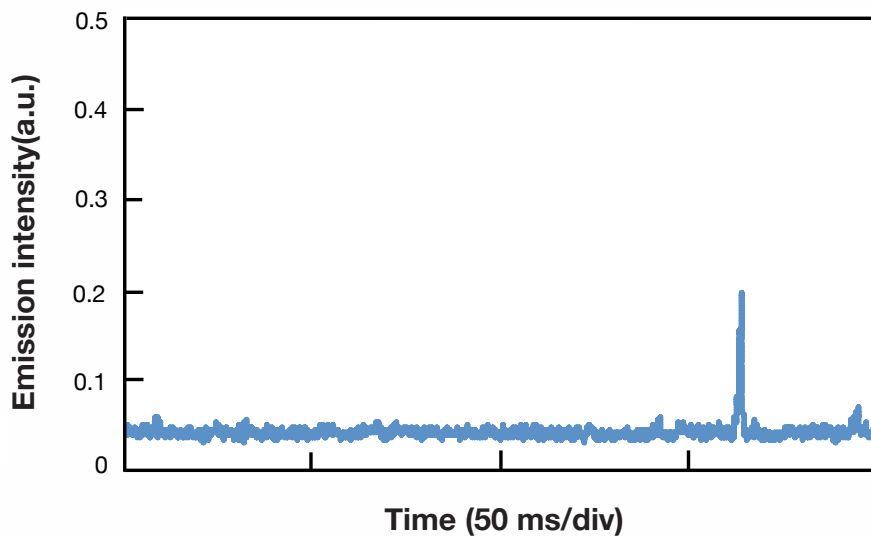


図 7.9(d) Ca のイオン線 (396.847 nm) の発光スペクトル

この同様の 3 回の測定結果の図 7.9(b)～(d) から、発光強度にばらつきはあるものの、明らかに発光強度が高いスペクトルは 200 m 秒間に 1 回ずつ観測されることを示した。図 7.9(b) のスペクトル①は細胞からの発光スペクトルであり、スペクトル②は溶媒からの発光スペクトルであるという、上記の結論を繰り返し測定により検討した。

さらに、マルチチャンネル分光器では検出することができなかった微量元素をモノクロメータを用いた時間分解分析で試みた。測定元素は、Mn を用い、測定線はイオン線である 257.610 nm を測定した。

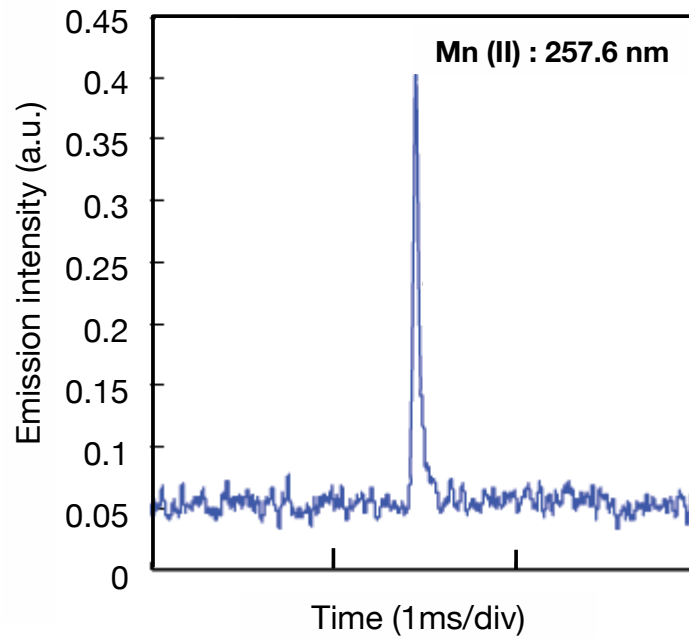


図 7.8 1 個の *Pseudococcomyxa simplex* の時間分解分析による
Mn の発光スペクトル

このとき、サンプリング周期は $16 \mu\text{s}$ で取得している。その結果、図 7.8 のように、細胞 1 個中の微量元素である Mn からの発光スペクトルを得ることができた。

7.3 結言

本章では、第5章で開発した脱溶媒装置を ICP-AES に適用し、単細胞藻類の直接導入をおこなった。まず、細胞中に含まれる元素量が分からないため、1 mL 中に 3.9×10^7 個の細胞が含まれている溶液を酸分解し、その溶液を ICP 発光分光分析装置と ICP 質量分析装置を用いて定量分析をおこない、細胞 1 個あたりに含まれる平均元素量を求めた。

次に、ドロプレット 1 滴中に 1 個の細胞が含まれるようにするために、本研究では、数 10 ドロプレットに 1 個の細胞が入るように溶液調整をおこなった。その細胞を含んだ溶液をマルチチャンネル分光器によって測定をおこなった結果、細胞中に含まれる多元素 (Mg, Fe, S, Ca) を同時に分析することに成功した。また、モノクロメータを用いて時間分解分析をおこなうことで、細胞の連続導入によって評価をおこなった。その結果、得られた発光スペクトルを溶液調整で調整した導入されるであろう細胞の数と比較することで、細胞からの発光と溶媒由来の発光を区別した。発光強度の安定性を向上させることによって、細胞の大きさの違いを発光強度で再現することができるのではないかと考えられ、繰り返し測定をおこなうことで、統計的に評価することができるだろう。また、積分時間が長いマルチ分光器では微量元素の発光は見えていない。そこで、モノクロメータを用いて実験をおこなった結果、1 個の細胞に 730 ag 含まれている微量元素である Mn の検出に成功した。したがって、単一細胞に含まれる微量元素を測定することに成功し、本研究で開発した分析装置によって、単一細胞分析が実現できる可能性を示した。

参考文献

- [1] 重田香織, 生体微量元素の機能解明を目的とした微量試料分析技術の開発, 博士学位論文, 東京工業大学 (2010).
- [2] 保倉 明子, 本田 真央, 植物を利用した環境浄化および有用メタルの回収, 平成25年度 研究成果発表会 (2013)
- [3] K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino and N. Jakubowski, Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements, *J. Anal. At. Spectrom.*, 28, 637 (2013).

第8章 結論

8.1 総括

本研究では、単一細胞分析を目的として、細胞を1つずつプラズマ中に導入するためのドロプレット試料導入法を開発し、ICP-AESとICP-MSに適用してきた。そのドロプレット試料導入法の性能調査や感度向上をはかるために脱溶媒装置の開発、過渡的な信号に適した信号取得方法の開発をおこなった。以下に、第3章以降の各章で得られた主な成果をまとめる。

第3章「ドロプレット試料導入法の開発」では、従来の微量試料導入法とドロプレット試料導入法の比較を行い、他にない新しい試料導入法でドロプレット試料導入法が単一細胞分析に適していると述べた。その手法は、ガラスキャピラリの周りのピエゾ素子にパルス的な電圧を加えることによって液滴を射出させることができる。その生成できるドロプレットは、直径 $30\ \mu\text{m}$ ～ $70\ \mu\text{m}$ 、体積 $14\ \text{pL}$ ～ $180\ \text{pL}$ 、初速 $\sim 2.5\ \text{m/s}$ である。ドロプレットネブライザを用いた試料導入法は、微量試料の高感度・高効率分析に加え、個別分析にも有利な特長を有する単分散型試料導入系である。また、本研究のターゲットとしている単一細胞分析に必要な導入方法、感度、さらに人体にとっての元素の必要性についても述べた。

第4章「ドロプレット試料導入法の基礎特性調査」では、ドロプレット試料導入法をICP-AESに適用し、電磁バルブ式とピエゾ素子式のドロプレットネブライザの比較をおこなった。その結果、ピエゾ素子式のドロプレットネブライザを開発したことによって、液滴の体積を小さくできたことから、発光強度の安定性が向上し、検出下限絶対値も向上した。この理由として、プラズマに導入される液滴の量が減ったことで試料がイオン化されやすくなったため、検出下限絶対値が向上したのではないかと考えられる。次に、体積が大きなドロプレットがICPに導入されたとき、ICPが明滅あるいは消滅するなどの問題が生じており、上記のように液滴を小さくする方法ではなく、別の方法を試みた。ICPの明滅や消滅の原因は、ドロプレットを導入することにより、プラズマの電気特性が変化することでインピーダンスが変化し、その結果、高周波のマッチングが保てなくなることであったと考えられた。そこで、ICPの持つインピーダンスが自動的に高周波電源の発振周波数にフィードバックされ、常に高周波のマッチングが整合状態に保たれる、自励式高周波電源を用いた自励式ICP生成システムを、ドロプレット試料導入法に適用することで、こうした問題を解決し、ドロプレット試料導入法に対して

は、自励式高周波電源を用いた自励式 ICP 生成システムが有用であることを示した。

次に、ドロプレットがプラズマ中に導入されてからどのように発光しているのかを詳細に調べた。時間的には溶媒からの発光(H_{α} 線)は、試料からの発光(Ba II)に比べ、スペクトル幅が約10倍長くなることが分かった。また、空間的には、溶媒からの発光(H_{α} 線)は試料からの発光(Ba II)に比べ、約2倍広がっていることが分かった。したがって、溶媒からの発光は時間的にも空間的にも広がり、それに比べ試料からの発光は時間的にも空間的にも圧縮されていることが分かった。本研究で開発したドロプレット試料導入法の1つのメリットである、溶液試料を時間的にも空間的にも圧縮して導入できているため、ノイズに埋もれることなく信号を検出できていることも示すことができたと言える。

第5章「ドロプレット試料導入用脱溶媒装置の開発」では、ドロプレット試料導入用脱溶媒装置の開発を行った。そして、その開発した脱溶媒装置をICP-AESとICP-QMSに適用し、その効果について検証した。まず、AESによって加熱のみ行った場合の実験を行った。加熱することによって約10倍の信号強度を実現した。したがって、加熱することによる感度向上を示したことによって、加熱の有用性を示すことができた。また、加熱することによって見えてきた問題点として、加熱によって溶媒を蒸発させた後、そのままプラズマに水蒸気が入ってしまうため、水蒸気にエネルギーが使われていた。そこで、加熱部の下部に冷却装置を適用した。その脱溶媒装置の効果についてICP発光分光分析を用いて検証した。その結果、Caのイオン線は約9倍に増加し、 H_{β} 線は約1/5に減少させることに成功し、本研究で開発した脱溶媒装置の有用性を示した。また、質量分析に適用した結果、脱溶媒しなかったときに比べ、脱溶媒を行ったことによって、約120倍の信号強度を得ることができ、1.1 agという検出下限絶対値を達成した。この値は、したがって、本章で開発したドロプレット試料導入用脱溶媒装置の有用性を示すことができた。本研究で目的としている単一細胞中の微量元素レベル(agレベル)の検出下限絶対値を実現したことになる。

第6章「ICP飛行時間型質量分析への応用」では、ドロプレット試料導入法をICP飛行時間型質量分析装置に適用した。そのとき、ドロプレット試料導入法のような過渡的な信号を得る場合、従来の信号取得方法ではS/N的に不利となることを示した。そこで、ドロプレット試料導入法で得られる過渡的な信号に適した信号取得方法としてイオン電流の直接測定方法の開発を行った。イオン電流を検出器からデジタルオシロスコープを用いて取得した。ドロプレット試料導入ICP-TOFMSを用いて信号取得に成功し、

1滴のドロプレットからの信号を得ることができ、S/N比の向上に成功した。その結果、約1/200倍の検出下限絶対値を向上させることができた。また、過渡的な信号に適した信号処理方法を検討し、適用平滑化法が適していることを見つけた。その方法を用いて、信号処理をおこなったことによって、信号処理しないときに比べ、約1/100倍の240 agという検出下限絶対値を得ることができた。

第7章「細胞の直接導入分析」では、第5章で開発した脱溶媒装置をICP-AESに適用し、単細胞藻類の直接導入をおこなった。マルチチャンネル分光器を用いて、細胞中に含まれる多元素(Mg, Fe, S, Ca)を同時に分析することに成功した。また、モノクロメータを用いて時間分解分析をおこなうことで、細胞の連続導入によって評価をおこなった。その結果、細胞からの発光と溶媒由来の発光を区別することができた。また、積分時間が長いマルチ分光器では測定できなかった微量元素の測定を試みた結果、1個の細胞に730 ag含まれている微量元素であるMnの検出に成功した。したがって、単一細胞に含まれる微量元素を測定することに成功し、本研究で開発した分析装置によって、単一細胞分析が実現できる可能性を示した。

本研究をまとめると、まず、単一細胞分析を実現するために細胞を1個ずつ導入することができ、またパルス的な試料導入が可能のためノイズに埋もれることなく信号を検出することができる、ドロプレット試料導入法を開発した。この試料導入法を高感度元素分析が可能なICP-AESとICP-MSに適用した。市販のICP-AESやICP-MSは、霧状に噴霧してその小さい霧のみをプラズマ中に導入する試料導入法を用いているため、プラズマも信号取得方法もその導入法に最適化されたものになっている。そこで、ドロプレット試料導入法で試料導入をおこなうと、生成される液滴が大きいため十分にイオン化できないことが明らかになってきた。そこで、ドロプレットの導入経路を加熱し、溶媒を蒸発させ、その直後に冷却することにより、溶媒を除去することによって、溶媒の加熱・気化に使われるエネルギーを減らすことで、効率良くイオン化できる脱溶媒装置を開発した。その結果、脱溶媒装置なしのときに比べて約120倍に信号強度が増加し、その有用性を示した。その結果、1.1 agという単一細胞分析に必要な検出下限絶対値を達成した。さらに、過渡的な試料導入においても多元素同時分析が可能なICP-TOFMSにドロプレット試料導入法を適用したことで、細胞中の多元素を同時に分析できるようにした。しかし、市販装置の信号取得は、定常的な試料導入を想定しているため、積分時間が長くなっている。よって、過渡的

な信号を得るドロプレット試料導入法では、余分なノイズまで積分してしまうことから、不向きであった。そこで、検出器からイオン電流を直接オシロスコープを用いて取得する方法を開発した。その結果、約1/100倍以上のS/N比向上することに成功した。また、過渡的な信号は適応平滑化法を用いることによってさらなるS/N比に向上につながることを示し、信号処理しないときに比べ、約1/100倍の240 agという検出下限絶対値を得ることができた。

ここまでの研究で、単一細胞分析の実現に向けて、実際に植物細胞を導入し、発光分光分析をおこなった。その結果、1個の細胞から多元素 (Mg, Fe, S, Ca) を同時に測定することに成功した。したがって、単一細胞分析を成功させたことから、単一細胞中の全元素分析の可能性を示唆した。このように細胞1個からの信号を得ることに成功したことから、今後、さらに感度がよく、多元素同時分析が可能な ICP-TOFMS に適用することによって、単一細胞中の全元素分析の達成が期待できる。

本研究で明らかにしたことを次のようにまとめる。まず、ICPへ細胞を個別に導入するためには、直径数10 μm のドロプレットが必要であるということである。プラズマへの溶媒負荷を減らすために、液滴の大きさを小さくする方法は本研究には向いていない。次に、直径数10 μm のドロプレットはICPに対して負荷が大きいことを明らかにし、脱溶媒が必要であることを示した。さらに、ドロプレット試料導入法で得られる信号は過渡的であるため、ノイズに埋もれやすいことが分かった。したがって、高速信号取得が必要であることを示した。最後に、1つの細胞から複数の元素情報を得るため、多元素同時分析が必要であることを明らかにした。この明らかにしたことそれぞれに対して、解決するために開発をおこなった結果、単一細胞中の微量元素を分析することを実現した。

今後の本研究の展開としては、分析の安定性と定量性の改善が必要となる。現段階では、ドロプレット試料導入法 ICP-AES の発光強度のばらつきがあるため、細胞中に含まれる元素量と発光強度がある程度対応していることを示すことができているが、その評価をする必要がある。安定的に導入、信号検出できるようにすることはもちろん、発光強度を統計的に測定し評価する。また、細胞からの発光スペクトルも同様に評価をおこなう。さらに、顕微鏡やフローサイトメトリーなどで、細胞の大きさの分布を測定した結果と発光分析の結果を照らし合わせることで、統計的に発光強度と細胞の大きさの評価をおこなうことができると考えられる。

さらに、今後の展望として、マイクロマシンを用いて導入する細胞を振り分け、その後、ラマン顕微鏡や蛍光顕微鏡などで、細胞の大きさや形、分光特性をあらかじめ測定してから、ドロプレット試料導入法によって単一細胞分析をおこなう（図 8.1）。その後、高濃度で含まれる元素（Ca, K など）は発光分光分析を用いて、微量元素（Zn, Mn, Mo など）は質量分析を用いて測定することによって、多数の元素を同時に測定することが可能となり、特定の細胞を個別に分析する単一細胞分析が達成されると考えられる。

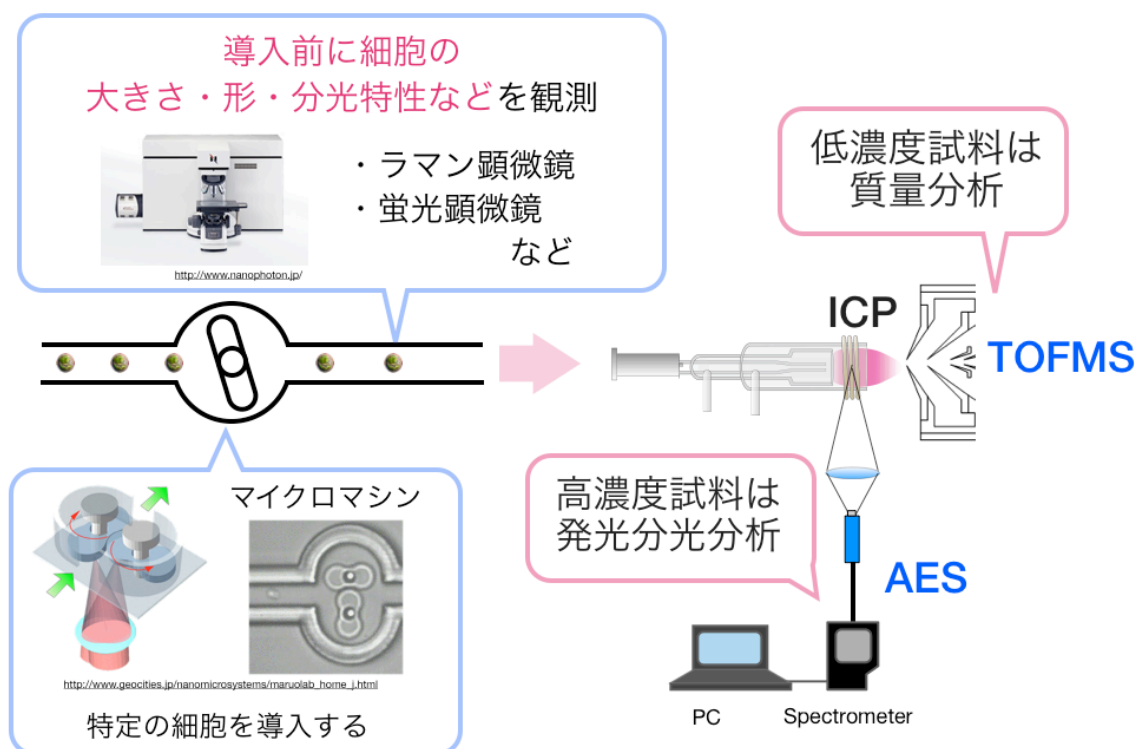


図 8.1 期待される単一細胞分析装置

このような単一細胞分析装置を開発することによって、個々の細胞に存在するヘテロジェネイティー（異質性・異種性）を示すことができるようになれば、病気の発生メカニズムの解明につながるかもしれない。現時点では、単一細胞分析で得られる単一細胞からのデータが何を意味しているものなのか分かっていないが、研究が進むにつれ、その意味が分かるようになると思われる。したがって、例えば癌においては、単一細胞レベルで起こる健常細胞をがん細胞に変換する変化の形が理解できれば、リスクを構成するものへの理解が変化するとと言える。このように、細胞の集団分析のレベルから単一細胞のレベルで分

析から得られることはとても大きいと考えられる^[1]。

参考文献

[1] NCI キャンサーブレティン, vol 9, Num 18, 米国国立癌研究所発行 (2012).

謝辞

本研究は東京工業大学大学院総合理工学研究科創造エネルギー専攻沖野研究室において行われたものです。研究の遂行にあたり、数多くの方々にご指導、ご協力をいただき、ここに博士論文として完成させることができました。末尾になりましたが、みなさまに御礼を申し上げさせていただきます。

常に適切なお指導とご鞭撻を賜りました同専攻准教授 沖野晃俊先生に心より感謝申し上げます。修士で入学してすぐに、博士課程への進学を勧めいただき、不安と少しの期待を胸に進学を決意しましたが、海外留学をドイツとアメリカと2カ国もさせていただいたり、国内外の学会へも多数行かせていただき、自分の考え方や視野が大きく広がりました。また、研究に対しての有益なアドバイスを数多くして頂いたほか、文章の修正等に昼夜休日を問わず多くの時間を割いて頂きました。本当にありがとうございました。さらに、科学者維新塾・御茶ノ水に誘っていただけたことに、本当に感謝しています。多くの人と出会い、様々な世界を学ばせていただけたことは私の宝物であり大きな財産です。科新塾やデュアルディグリープログラムなど自由にやらせていただけたこと、先生のご理解に大変感謝しております。博士課程の4年間を沖野先生のもとで過ごせたこと本当に幸せでした。沖野先生から教えていただいたこと、学び得た知識、知恵、人脈など、今後社会で還元できるよう努めていきたいと思えます。

学位審査にあたり、数多くの貴重なご助言をくださいました同大学原子炉工学研究所准教授 赤塚洋先生に心より感謝申し上げます。計測工学での授業は今でのプラズマ測定をおこなう上での基礎となっています。論文執筆に当たり、的確なアドバイスやご指摘を賜りましてありがとうございました。ここに深く感謝いたします。

学位審査にあたり、数多くの貴重なご助言をくださいました同大学原子炉工学研究所准教授 飯尾俊二先生に心より感謝申し上げます。修士論文発表会や中間発表の際にも、アドバイスやご指摘いただきありがとうございました。また、プラズマ核融合学会 夏の学校にお誘いいただきありがとうございました。同世代の研究をする人たちと交流することができ、良い刺激になりました。ここに深く感謝いたします。

学位審査にあたり、数多くの貴重なご助言をくださいました同大学院総合理工学研究科連携教授 藤井隆先生に心より感謝申し上げます。ゼミでのご指導では、たくさんのアドバイスをいただきました。また、お会いしたときはいつも「頑張ってますね！」とお声掛けしていただきありがとうございました。とても嬉しかったです。ここに深く感謝いた

します。

学位審査にあたり、数多くの貴重なご助言をくださいました同大学院原子炉工学研究所准教授 松本義久先生に心より感謝申し上げます。お会いするときにはいつも「良い研究だね、頑張っ！」とおっしゃっていただき、研究へのモチベーションが上がりました。論文執筆に際してもたくさんのアドバイスをいただきありがとうございました。ここに深く感謝いたします。

学位審査にあたり、数多くの貴重なご助言をくださいました独立行政法人産業技術総合研究所計測標準研究部門長 千葉光一先生に心より感謝申し上げます。学会などでお会いするときにはいつも声をかけてくださり、研究に対するアドバイスをたくさんいただきました。いつもパワフルな千葉先生を拝見すると、私も元気になりました。ここに深く感謝いたします。

同大学院総合理工学研究科特任助教、株式会社プラズマコンセプト東京代表取締役社長 宮原秀一先生には日頃より多岐に渡ってご指導、ご鞭撻賜りました。何を聞いても必ず答えを導き出す姿に驚かされつつ、とても頼りにさせていただいていました。また、初めての国際学会で不安な中、国際学会の楽しさとたくさんの方々を紹介していただいたことで、留学への一步を踏み出せたように思っています。宮原さんから学んだ行動力と問題解決能力を少しでも行かせるように、今後も精進してまいります。ここに深く感謝いたします。

同大学院総合理工学研究科教授 堀田栄喜先生に心より感謝申し上げます。ゼミでのご指導では、様々なアドバイスをいただきました。また、BBQ に招待していただき、OB/OG とお会いすることもでき、楽しい時間を過ごさせて頂きました。ここに深く感謝いたします。

東京工業大学すずかけ台分析支援センター技術職員の中村紳兵様には、細胞に含まれる微量元素分析においてご協力頂きました。ここに深く御礼申し上げます。

博士一貫教育プログラムのご支援のもと、3 か月間の留学を受け入れてくださった Indiana University の Gary M. Hieftje 先生および Heftje Group のみなさまに心より感謝申し上げます。英語がたたくなく、海外での長期滞在に不安を抱える私に対して、いつも笑顔で優しく、忙しい中でも耳を傾けてくださいました。また、たくさんのご助言をいただき、技術や研究だけでなく研究に取り組む姿勢など本当にたくさんのことを学ぶことができました。ここに深く感謝いたします。

複合創造領域のご支援のもと、40 日間の短期留学を受け入れてくださった BAM (Federal Institute for Materials Research and Testing) の Norbert Jakubowski 先生と Norbert Group のみなさまに心より感謝申し上げます。ディスカッションをすることの大切さと楽しさ、また、研究のメリハリの付け方などたくさんの方のアドバイスをいただきました。ここに深く感謝いたします。

独立行政法人産業技術総合研究所計測標準研究部門のみなさまには、研究での助言をいただき、大変お世話になりました。プラズマ分光分析研究会や学会等でお会いさせていただき、いつもの確で有用なアドバイスをたくさんいただきました。この場をお借りして、深く御礼申し上げます。

アジレント・テクノロジー株式会社分析化学事業部のみなさまには大変お世話になりました。学会や貴社訪問の際に、様々な観点から有用なアドバイスをたくさんいただきました。また、学会ではみなさまにいつもお声掛けいただき、とても楽しく充実した学会を過ごすことができました。特に、同分析化学事業部の松田敏明氏には国際学会でお会いした際に、たくさんの方の研究者の方々を紹介していただき、留学をできるようにお話もしていただきました。松田様から聞かせていただくお話がいつも楽しみでした。この場をお借りして、深く御礼申し上げます。

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センターの上本道久先生には国内外の学会でお世話になりました。研究だけでなく、発表の仕方についてもアドバイスをいただきました。学会ではいつも声をかけていただき、海外の文化などたくさんの方のアドバイスをいただき、楽しく有意義な学会を過ごすことができました。この場をお借りして、深く御礼申し上げます。

大阪大学特別教授・工学研究科応用物理学専攻特別教授、フォトニクスセンター・センター長 河田聡先生に心より感謝申し上げます。修士1年で河田先生に初めてお会いしたときの驚きは今でも忘れません。私の4年間の院生生活は科新塾とともにありました。4年間も活動をさせていただいたのは、先生のお人柄といつもかけてくださるお言葉に惚れ込んでいたからです。このようにたくさんの方の貴重な経験と機会を与えていただけたこと本当に感謝しております。この場をお借りして、深く御礼申し上げます。

博士一貫教育プログラム支援グループのみなさまに心より感謝申し上げます。国際学会や派遣プロジェクトでは、渡航・滞在費用のご支援をいただき、研究はもちろんのこと様々な経験をさせていただくことができました。また、事務の服部典子氏には事務

手続きにおいて、ご迷惑をおかけしましたが、いつも迅速に対応してくださいました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

沖野研究室秘書の井筒優子さんに深く感謝いたします。事務手続きなど大変お世話になりました。また、井筒さんの話し方や振る舞いがとても素敵で女性として見習いたいと思っています。3年間、楽しく笑顔で過ごせたのは井筒さんのお陰です。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室元秘書の遊佐陽子さんに深く感謝いたします。何も分からず入学してきた私をいつも気にかけていただきました。とても心強かったです。ここに深く感謝いたします。

堀田研究室助教 渡辺正人先生にはゼミのアレンジなどをしていただきました。御礼申し上げます。

堀田・藤井・肖研究室秘書 岡真美恵さんに心より感謝申し上げます。お茶会を開いていただき、研究の合間の休息をいただいていた。ここに深く感謝いたします。

創造エネルギー専攻事務 平山洋子さんに心より感謝申し上げます。RA の書類を提出する際、毎回丁寧にチェックして頂きありがとうございました。留学の際など、お手数をおかけしましたが、いつも笑顔で対応していただきありがとうございました。ここに深く感謝いたします。

沖野研究室卒業生 佐々木良太博士に心から感謝申し上げます。佐々木さんはすぐに研究室に打ち解けられるようにと、いろいろお心遣いいただきました。また、科新塾の立ち上げも一緒にやらせていただき、佐々木さんの行動力はとても頼もしかったです。ありがとうございました。

沖野研究室卒業生(現在、産業技術総合研究所所属) 重田香織博士に心から感謝申し上げます。研究とはどういうものなのか全然わかっていない私に、実験や発表の仕方、アブストラクトの書き方など一から教えていただきました。卒業後もドイツへの留学の際に大変お世話になりました。重田さんが教えてくださったからこそ、研究の基礎を築くことができたと思います。感謝してもきれないほどです。ありがとうございました。

沖野研究室卒業生(現在、Agilent Technologies, Inc. 所属) 永田洋一博士に心から感謝申し上げます。どんなことを聞いても何でも知っていて、楽しく、詳しく教えてくださる永田さんは大変頼りになりました。お忙しい時期にも関わらず、オシロスコープに

ついて 3 時間も教えてくださったときは、本当に頭が下がりました。また、卒業後も ICP-MS についてたくさん質問させていただきましたが、いつもの確な答えを出していただきました。本当にお世話になりました。

沖野研究室博士課程 3 年 岩井貴弘氏に心から感謝申し上げます。入学時、となりの席で分析についてたくさんのお話を教えていただきました。一緒に実験をさせていただいたり、学会も一緒に行かせていただいたりと本当にお世話になりました。学会での積極的な姿にいつも感心させられていました。今後も研究でご活躍されることを大変楽しみにしております。

沖野研究室修士課程修了(現在、日本テキサス・インスツルメンツ株式会社所属) 田村利幸氏に心より感謝申し上げます。ガス分解の研究と一緒にさせていただき、不器用な私にもできるまで一緒に付き合ってください、教えてくださいました。このときのご指導があったからこそ、今の研究ができています。お世話になりました。

沖野研究室修士課程修了(現在、株式会社日立製作所所属) 高橋勇一郎氏に心より感謝申し上げます。ガスクロの研究を一人で着実にこなす姿が印象的でした。また、ハワイでの国際学会では、色々アレンジしていただきありがとうございました。

沖野研究室修士課程修了(現在 三菱電機株式会社所属) 平位英之氏に心より感謝申し上げます。平井さんの研究に取り組む姿勢は本当に勉強になりました。どんな難題にも着実に答えを出す姿がとても印象的でした。ありがとうございました。

沖野研究室博士課程 3 年の高松利寛氏に深く感謝いたします。高松くんが博士課程に進み、一緒に頑張れる人がいてとても心強かったです。どんどん頼もしくなり、研究して行く姿に、とても刺激を受けました。4 年間、本当にお世話になりました。今後も活躍されることを楽しみにしています。

沖野研究室卒業生(現在、パナソニック株式会社所属) 柴田萌女史に心から感謝いたします。柴田さんは自分の意見をしっかりと持ち、それを伝える姿を見て、私もしっかりしなければと思われました。また、留学の際には、色々教えていただきありがとうございました。同期に女の子がいてとても良かったです。ありがとうございました。

沖野研究室卒業生(現在、株式会社ブリジストン所属) 根岸祐多氏に心から感謝いたします。ドロプレットに悩まされながらも一緒に実験できたことは、とても良い思い出です。また、いつも優しく気にかけてくれ、外食や買い出しに連れて行ってくださいました。学会やプラ研でもいろいろなところと一緒にきましたが、根岸くんのお陰でとて

も楽しく過ごせました。ありがとうございました。

沖野研究室博士課程 2 年 大下貴也氏に心から感謝いたします。電気系の知識が少ない私に色々教えてくださいました。後輩とは思えない頼もしさと知識には、本当に驚かされていました。また、後輩を指導する姿は見習うべきところがたくさんありました。来年は沖野研のトップとして、また今後の進む道でのご活躍を楽しみにしています。

沖野研究室卒業生(現在, 株式会社サイバーエージェント所属) 高妻智一氏に心から感謝いたします。同じ班で研究していましたが, その実験センスの良さと実験結果の考察の鋭さには, 驚かされ, とても頼もしく思っていました。一緒に班で研究をすることができて良かったです。ありがとうございました。

沖野研究室卒業生(現在, 横河電気株式会社所属) 鈴木雄太氏に心から感謝いたします。入学してすぐの国際学会でしっかりと発表し, ディスカッションする姿に, ただただ感心させられました。実験でも色々質問させていただきましたが, 的確に教えてくださいました。ありがとうございました。

沖野研究室卒業生 鍋野幸大氏に心から感謝いたします。世間離れした話を聞かせてくれて, いつも楽しく過ごさせてもらいました。どんなときもへこたれない鍋野くんを見て, 私も強く頑張ろうと思いました。ありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年 上原広大氏に心から感謝いたします。いつも穏やかで心遣いのできる上原くんがとなりの席で, 私はすごく救われていました。また, いつも極限まで頑張って研究する姿は本当にすばらしいと思いつつながら, 陰ながら応援させていただけっていました。お世話になりました。ありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年 奥村健祐氏に心から感謝いたします。ドロプレットに関していろいろ教えていただき, ありがとうございました。いつも実験室で研究している姿が印象的でした。また, 学会なども一緒に行き, 楽しい時間を過ごさせていただきました。ありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年 尾崎健氏に心から感謝いたします。研究に対して全然貢献できませんでしたが, 共同研究をしっかりとおこなっている姿を頼もしく見ていました。研究室の雑用も快く引き受けていただき, 実験室の引っ越しや片付けのときはいつも心遣いをしていただきました。ありがとうございました。

沖野研究室修士課程 2 年 川手彬嗣氏に心から感謝いたします。ひたむきに研究する川手くんがとても印象的でした。海外への強い興味から, ゼミ合宿で不採用にな

っても自分自身で TABIPPO を企画した、そのバイタリティーは圧巻でした。ありがとうございました。

沖野研究室修士課程2年 野村亮仁氏に心から感謝いたします。研究で頼りない部分がある私にかわって率先して、研究を進めていただきました。その頼もしい野村さんに頼りすぎていた自分を反省しています。また、実験中や学会に行ったときなど、いろいろな話をしてくれ、とても楽しく、知識を広げることができました。本当にありがとうございました。

沖野研究室修士課程1年 石原由紀子女史に心から感謝いたします。奈良女からの後輩ということもあり、沖野研に入ってきてくれたこと本当に嬉しく思っています。入学してからどんどん成長する石原さんがすごく頼もしく見えました。沖野研で細胞を培養できるようになるとは思っていなかったのも、本当に感謝しています。今後の成長を楽しみにしています。

沖野研究室修士課程1年 宇都宮嘉孝氏に心から感謝いたします。新しい研究テーマに真剣に取り組み、成果を上げて行く姿が印象的でした。あきらめることなく何度も納得のいくまで実験をやったり、アブストを書き直したりとその真摯な姿勢には驚かされました。プラ研のときなど、軽快なトークでとても楽しい時間を過ごさせていただきました。ありがとうございました。

沖野研究室修士課程1年 掛川賢氏に心から感謝いたします。入学してすぐに博士課程進学を決め、昼夜問わず研究する姿に感激していました。本当にすばらしい姿勢だと思います。ガスボンベ係は面倒だったと思いますが、掛川くんのお陰でいつも快適に実験ができました。ありがとうございました。

沖野研究室修士課程1年 佐々木洋太氏に心から感謝いたします。先輩方と一緒に楽しそうに研究をしている佐々木くんがとても印象的でした。また、佐々木くんの独特なユーモアのある世界観にとっても楽しませてもらいました。これからも研究室を楽しく盛り上げていってください。

沖野研究室修士課程1年 渡辺洋輔氏に心から感謝いたします。実験も共同研究もどんどん進める姿はとても頼もしかったです。また、ゼミ合宿で M1 をまとめている姿もまた頼もしく、とても素敵でした。周りのことに良く気がつき、心遣いができ、研究室の雰囲気作りが上手だなと思っています。これからも研究室を盛り上げていってください。ありがとうございました。

文末となりましたが、これまで、私の長い学生生活を支えてくれ、決して反対することなく全力で応援してくれた祖父、祖母、父、母、兄に深く感謝いたします。家族みんなのお陰で何も心配することなく、学生生活を送ることができました。これから少しずつ恩返しできるように頑張っていきたいと思います。

最後になりましたが、研究生生活を支えてくださいましたすべての方々に、厚く御礼申しあげます。4年間本当にお世話になりました。

2014年2月
鏑木 結貴