

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	創造エネルギー	専攻	申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)
学生氏名： Student's Name	鏑木 結貴		指導教員 (主)： Academic Advisor(main) 沖野 晃俊
			指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

近年、病理研究や再生医療研究の進展に伴って、細胞の個別分析への関心・要求が高まっている。現在、微量元素分析の分野では、誘導結合プラズマ (Inductively Coupled Plasma, ICP) を励起源またはイオン源として用いた分析装置が広く利用されている。しかし、従来の試料導入法では溶液試料を霧状にしてプラズマ中に導入するため、微量試料の分析には適しておらず、単一細胞の分析は困難であった。本論文では、単一細胞分析の実現に必要な 3 つの条件として、細胞の導入、高感度分析、多元素同時分析をあげ、これらを満たす装置の開発を行った。論文題目は、単一細胞内微量元素分析用 ICP 発光・質量分析装置の開発とし、8 章で構成されている。

第 1 章「序論」では、微量元素分析の現状について説明し、その分析対象は細胞や環境中の微粒子などの微量試料に移行しており、さらに、近年の医学の進歩に伴って特定の細胞を個別に分析する、単一細胞分析への要求が高まっていることを説明した。

第 2 章「誘導結合プラズマを用いた元素分析」では、ICP 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、微量試料の分析に適用する際の問題点と限界を指摘した。そして、微量試料や細胞の個別導入を実現できる手法として、ドロプレット試料導入装置が有望であることを説明した。

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、単一細胞分析に適したドロプレット試料導入装置を開発した。本装置では、溶液試料を一粒ずつプラズマ中へ射出導入するため、ドロプレットに細胞を内包することで細胞 1 個中の元素分析が実現できる。しかし、従来の電磁バルブを用いたドロプレット試料導入装置では、液滴の体積が約 700 pL と大きく、プラズマへの負荷が大きいという問題があった。そこで本研究では、ピエゾ素子を用いた、14 pL のドロプレット試料導入装置を開発した。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 1% 以下の安定性で試料導入を実現した。この装置を用いる事で分析試料を時間的かつ空間的に圧縮してプラズマ中に導入できるため、微量試料の高感度分析が期待できることを説明した。

第 4 章「ドロプレット試料導入装置の基礎特性評価」では、ドロプレット試料導入装置を発光分光分析および質量分析に適用し、従来の電磁バルブ式と開発したピエゾ素子式のドロプレット試料導入装置の比較を行った。検出下限値と RSD を評価した結果、ピエゾ素子式は電磁バルブ式に比べて検出下限絶対値は約 1/70 に、RSD は 9.4% から 6.6% に向上することを示した。さらに、モノクロメータを用いてプラズマ中でドロプレットが発光する様子を調べたところ、試料からの発光は溶媒の発光に比べて、時間的な半値幅が約 1/20 になり、また冷却 CCD カメラを用いて測定した結果、空間的な半値幅が約 1/2 となったことから、ドロプレット中の溶存元素はプラズマ中で脱溶媒が進んで濃縮されてから、原子化および励起されていることが示唆された。

第 5 章「ドロプレット試料導入用脱溶媒装置の開発」では、プラズマに与える溶媒負荷の低減を目的として、ドロプレット試料導入用の脱溶媒装置を開発した。ドロプレット試料導入装置で射出されたドロプレットはネブライザを使用したときに比べ体積が約 1,000 倍大きいことと、体積の小さいドロプレットを導入した方が発光強度が大きくなるという結果から、溶媒負荷の低減が感度向上につながると考えた。その結果からそこで、ドロプレットを 150°C 程度に加熱したガス流中を通過させ、次に 5°C 程度まで冷却することで溶媒を取り除く、脱溶媒装置を開発した。この装置を発光分析に適用した結果、脱溶媒装置を適用したときはカルシウムのイオン線が約 9 倍に増加し、 H_{β} 線は約 1/5 に減少したことから、開発した装置が有効に動作していることを確認した。質量分析に適用する事で、従来の 1/300 となる、1.1 ag の検出下限絶対値を得ることに成功した。これは、0.5 pL の細胞中に 2.2 ppb で含まれる微量元素が測定できる事に相当する。

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装置を ICP 飛行時間型質量分析と組み合わせ、微量試料の多元素同時分析を行った。1 個の細胞には多数の元素が含まれるため多元素同時分析の必要がある。そこで、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、多元素同時分析の実験を行った。市販装置では積分時間が 100 ms の場合、質量信号を 3,000 回積算して出力するため、ドロプレットから得られる約 200 μ s の信号の測定には適さない。そこで、イオン検出器からの電流をデジタルオシロスコープで従来の 5 万倍となる 500 MHz のサンプリング周波数で測定した。その結果、市販装置に比べて約 1/200 である 36 fg の検出下限絶対値を達成した。さらに、適応平滑化法を用いて信号処理して S/N 比を向上させ、240 ag の

検出下限絶対値を得た。

第7章「細胞の直接導入分析」では、開発した装置を用いて細胞1個中の発光分光分析を行った。ドロブレット中に単細胞藻類を1個内包してプラズマに導入し、マルチチャネル分光器で分光測定した。その結果、1個の細胞に約30 fg含まれる複数の元素(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行った結果、細胞1個に平均0.73 fg含まれるマンガンの信号を得ることができた。これらの結果から、単一細胞内の27 ppbの微量元素分析の可能性を示した。

第8章「結論」では、本論文の総括を行った。本研究では、10 μm 程度の細胞の個別導入には直径100 μm 以下程度のドロブレットが適している事、ドロブレットの脱溶媒が必要な事、約200 μs の過渡信号を選択的に測定が必要な事などを明らかにし、単一細胞中に約30 fgで含まれる多元素同時分析を実現した。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	創造エネルギー	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 (工学)	Doctor of
学生氏名 : Student's Name	鏑木 結貴		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	沖野 晃俊	
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

In recent years, there is growing interested in trace element analysis for single cell. For example, cause of cancer or Alzheimer disease is hoped to be figured out by trace element in single cell. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) has been widely used for trace element analysis because of analytical figure of merit. However, conventional sample introduction system for ICP-MS consumes large amount of sample solution. So, it is difficult to realize individual single cell analysis. Thus, droplet direct injection nebulizer (D-DIN) was developed. D-DIN can introduce into the ICP droplet of diameter 30 to 70 μm . By including cells in a droplet, this system enables to introduce single cell to ICP. To achieve trace elements analysis in a single cell, analytical sensitivity of ag (10^{-18}g) level is required.

Two way of increasing analytical sensitivity was thought. One is developed desolvation system for droplet, because the droplet volume was too large for ICP to ionize sufficiently. Droplet has heated and cooled before introducing ICP. As a result, mass signal intensity of Ca ion enhanced about 120 times compare without desolvation system. This result was shown effectiveness of droplet desolvation system. Another one is developed high speed data acquisition, because signal integration time is so long for transient signal of droplet in usual ICP-MS. To realize fast signal measurement, ion current from the detector was directly measured using a high-speed digital oscilloscope. Mass signal can be obtained from only signal without integrating unnecessary noise by using this way. As a result, absolute detection limit of 36 fg was obtained. And, desolvation system was combined with high speed data acquisition. As a result, the absolute detection limit was achieved 1.5 ag. Finally, single cell analysis of plant cell was tried. The cell including sub-fg Zn and Mn was measured using ICP-Atomic Emission Intensity.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).