

## 高時間分解 ICP-MS による単一細胞中の元素代謝の“見える化”

田中 佑樹, 小椋 康光

### 1 はじめに

生命活動には有機分子の骨格を成す H, C, N, O の 4 大元素に加えて、いわゆるミネラルと呼ばれる元素が必要不可欠である。生体内での存在量によって主要ミネラルに分類される元素には Ca, P, S, Na, Mg, K の 6 元素がある。Na や Mg は電解質として体液量の調節やシグナル伝達に関与する。P は核酸や脂質を構成し、S はタンパク質のチオール基などに含まれ、生体分子に機能的な役割を付与している。さらに、微量ミネラルに分類される Fe, Cu, Zn などの元素は、タンパク質や酵素の補因子として、その構造の維持や活性発現に寄与することが知られている。

生命現象に伴うミネラルの変動は細胞レベルでも観察されている。例えば、細胞分裂前の DNA の合成には十分な量の P や Zn が必要であることが知られている<sup>1)2)</sup>。また、細胞分化前後での含有量の変化から、Cu が細胞分化に関与する可能性も示唆されている<sup>3)</sup>。さらに、近年、小胞体とミトコンドリア間での Ca 輸送が過剰になることでアポトーシスが誘導されるメカニズムも明らかにされた<sup>4)</sup>。このように、ミネラルは細胞レベルでの転写、翻訳、代謝、恒常性維持、細胞死といったあらゆる生命現象に関与することから、元素代謝を基軸に既存のオミクス研究との関連を探ることで生命を理解するという視点は極めて重要である。

生体試料中の元素分析には誘導結合プラズマ (ICP) をイオン化源とした発光分析 (ICP-AES) や質量分析 (ICP-MS) が一般的に用いられている。ICP-MS においては、ICP によって達成される高いイオン化効率という特徴に加えて、高マトリックス耐性のインターフェイスや、質量干渉除去のためのコリジョン/リアクションセルなどの開発によって、微量ミネラルの検出、定量が可能になっている。近年、注目を集めている ICP-MS の応用技術に、粒子状物質一つ一つの元素組成や含有量を計測できる、高時間分解能を有する ICP-MS がある。粒子としてナノ粒子などの材料物質が対象となる場合にはシングルパーティクル (SP)-ICP-MS、細胞が対象となる場合にはシングルセル (SC)-ICP-MS と区別して呼ばれる。いずれも、粒子や細胞を一つずつ ICP に導入し、含有される元素をイオン化し、信号を取得する仕組みになっている。このような分析を可能にしたの

が、イオン信号の読み出しを 1 秒間に  $10^4 \sim 10^6$  回の速さで行う高時間分解の検出システムである。高時間分解 ICP-MS によって、従来の ICP-MS (1 秒間に 10 ~ 100 回の信号読み出し) では不可能だった少量のイオン集団を、他の粒子または細胞由来のイオン集団と区別して検出するという測定が可能となった。

本稿では、細胞内の元素代謝から生命現象へのミネラルの関与を明らかにするための“見える化”技術である SC-ICP-MS について、筆者らのこれまでの取り組みを中心に解説する。

### 2 細胞試料の調製

SC-ICP-MS による生物細胞の分析にはこれまで、出芽酵母<sup>5)~7)</sup>、植物細胞<sup>8)9)</sup>、動物細胞<sup>10)~14)</sup> など多様な細胞種が用いられてきた。ICP-MS に細胞を導入し、正確な元素分析を行う上では、細胞構造を維持できる適切な細胞懸濁溶液を選定し、培地や体液など周囲の環境からのコンタミネーションを低減するために徹底的に細胞を洗浄することにより分析が容易となる。細胞を構造から見てみると、細胞壁と細胞膜とで構成される酵母や植物細胞と、細胞膜のみで構成される動物細胞とに大別できる。このうち細胞壁を有する細胞の方が力学的強度は高いと予想される。そこで、筆者らは力学的により脆弱であると考えられる細胞膜のみを有するヒト慢性骨髄性白血病由来細胞 (K562) を用いて、様々な溶液下で細胞形態の観察し、SC-ICP-MS への細胞の導入に適した溶液の評価を行った (図 1)。超純水で懸濁した細胞は、当然のことながら、液体との浸透圧の差によって、細胞膜が壊れ、生理的とは言い難い様相を示した。50 mM Tris 塩酸緩衝液では、低張液であるため細胞は膨張したものの、破裂した様子は見られなかった。等張である 0.9 % 塩化ナトリウム溶液では細胞の形態が保持された。さらに、細胞を 70 % エタノールで固定した後、超純水で洗浄、懸濁した場合にも、細胞の形態がよく保持されていた。

次に、懸濁液の違いによって生じる細胞内の元素含有量への影響を評価した。K562 を前述の 3 通りの方法、すなわち (1) Tris 塩酸緩衝液で洗浄・懸濁、(2) 0.9 % 塩化ナトリウム溶液で洗浄・懸濁、(3) 70 % エタノールで固定後、超純水で洗浄・懸濁という処理をした後、濃硝酸で湿式灰化し、細胞中の元素含有量を測定した。図 2

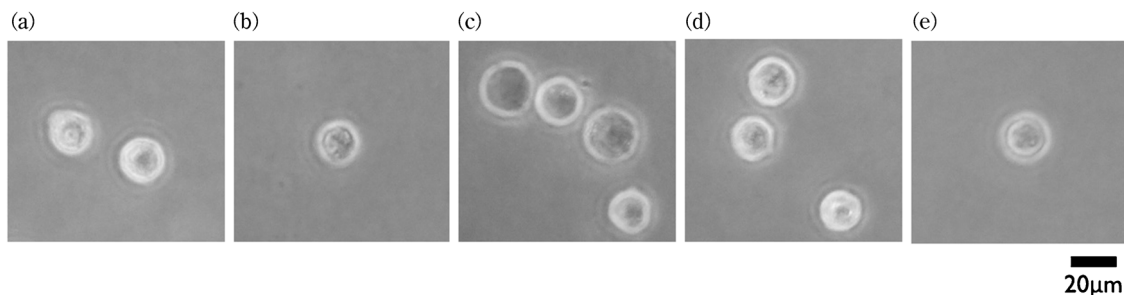


図1 様々な懸濁液中での細胞形態

(a) 培養培地 (RPMI1640) 懸濁, (b) 超純水懸濁, (c) 50 mM Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.4) 懸濁, (d) 0.9 % 塩化ナトリウム溶液懸濁, (e) 70 % エタノール固定, 超純水懸濁

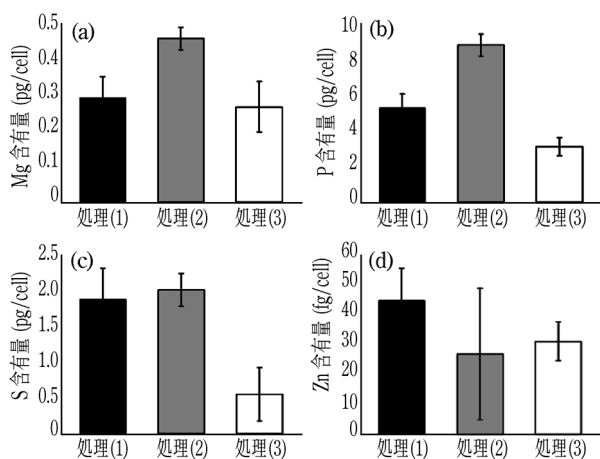


図2 洗浄溶液による細胞内元素濃度への影響

(1) Tris 塩酸緩衝液で洗浄・懸濁, (2) 0.9 % 塩化ナトリウム溶液で洗浄・懸濁及び(3) 70 % エタノールで固定後, 超純水で洗浄・懸濁の3通りの処理を行った K562 細胞中の (a) Mg, (b) P, (c) S, (d) Zn 含有量, 平均値±標準偏差 ( $n=3$ )

に示すように, Mg, P, S などの元素では (1) や (3) の処理では, (2) に比べて, 数値が低く測定された。この結果は, Tris 塩酸緩衝液やエタノール固定では一見, 細胞の形態は保っているものの, 細胞内から元素の溶出が生じている可能性を示唆している。

これまでの報告では酵母や植物細胞は超純水に懸濁し, 動物細胞はエタノール固定後に超純水に懸濁する場合が多かった。筆者らの検討結果から, 細胞種に依存しない共通の処理方法としては等張液による洗浄・懸濁が望ましく, その場合, コンタミネーションのリスクが最小となる最も単純な組成の等張液である 0.9 % 塩化ナトリウム溶液を用いるのが最適であるとの結論に至った。

### 3 SC-ICP-MS の装置構成

筆者らが使用した高時間分解 ICP-MS の装置構成を図 3 に示す。試料導入系には, ICP-MS による溶液試料の分析で一般的に用いられる, 同軸型ネブライザー (MicroMist, Glass Expansion) と低流量での試料導入の際に用いられる全量消費型スプレーチャンバー (Single-Cell Sample Introduction System for Agilent ICP-

MS, Glass Expansion) を採用した。細胞の導入にはマイクロ流路デバイス<sup>14</sup>やピエゾ素子を用いたドロップレットジェネレーター<sup>15</sup>によって液滴に細胞を内包させる装置が利用されることもある。これに対して, 筆者らは市販の器具で試料導入系を構成することにより, 特殊なデバイスを利用することなく, どの程度の分析が可能かを評価した。

ICP に導入された細胞 1 個から生じるイオンの集団は質量分析計内に引き込まれる際の初期運動エネルギーのばらつきによって空間的な広がりが生じるものの, 極めて短い時間 ( $\sim 500 \mu\text{s}$ ) にすべてのイオンが検出器に到達する。このようなイオンのパルス的な信号を検出するためには,  $500 \mu\text{s}$  よりも短い時間間隔でデータを取得することが必要となる。筆者らは高時間分解 ICP-MS (Agilent 8900 ICP-QQQ, Agilent Technologies) を用いて,  $100 \mu\text{s}$  ごとに信号を計測し, 1 細胞ごとの元素情報を取得した。このような高時間分解のイオン検出が可能で ICP-MS であれば, 質量分離系の種類によらず細胞内の元素含有量の測定が可能である。最も安価で汎用性が高い四重極型の ICP-MS では, 高時間分解分析を行わなければ複数元素の測定が可能であるが, 高時間分解測定では,  $m/z$  掃引の時間がパルス信号の時間幅よりも長い場合, 同一細胞から複数元素の情報は得られない。同一細胞中の複数元素を測定するためには, 飛行時間型 (TOF) の ICP-MS が有用である<sup>6)</sup>。TOF-ICP-MS では, 1 粒子から発生した全質量数のイオンをフライトチューブに導入し, 検出器までの飛行時間に差をつけ, 質量数の小さいイオンから順にすべてのイオンを検出することができる。また, 測定対象を質量数 ( $m$ ) の上下 10 % ほどの範囲の元素 (同位体) に限定すれば, イオンの同時検出が可能で二重収束型の ICP-MS によって粒子物質中の元素の精密同位体比を測定することも可能である<sup>16)</sup>。

ミネラルには P や S など, イオン化ポテンシャルが高く, 多原子イオンによる同重体干渉 ( $^{31}\text{P}$  に対しては  $^{14}\text{N}^{16}\text{OH}$ ,  $^{32}\text{S}$  に対しては  $^{16}\text{O}_2$  など) の影響を受けやすい元素が存在する。このような元素の分析には, 質量分

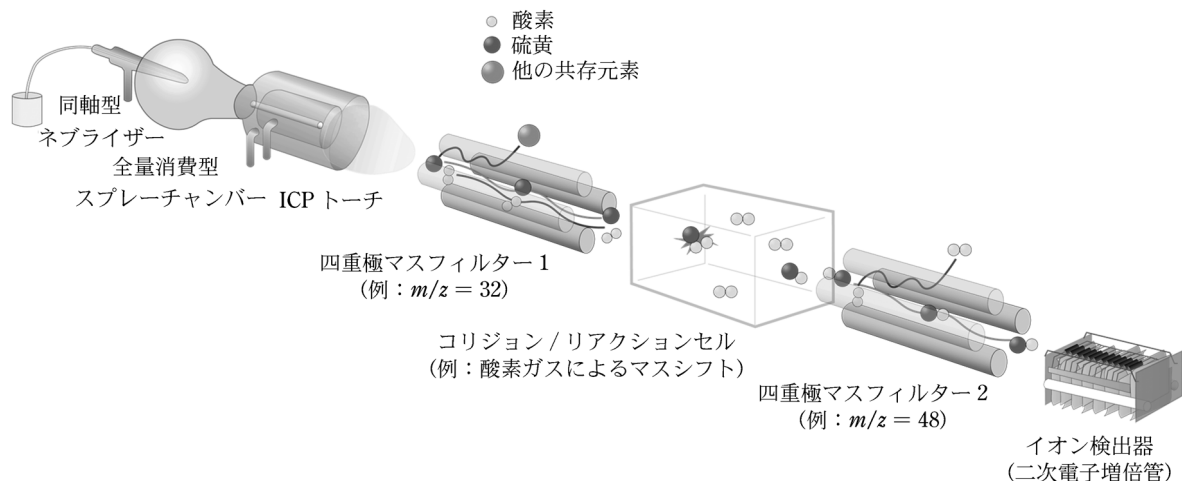


図3 SC-ICP-MSの装置構成

1段階目の四重極マスフィルターで  $m/z=32$  のイオン ( $^{32}\text{S}^+$  や  $^{16}\text{O}_2^+$ ) を通過させ、コリジョン/リアクションセルで酸素ガスと  $^{32}\text{S}^+$  を優先的に反応させ、生成した  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  を2段階目の四重極マスフィルター ( $m/z=48$ ) で分離し、検出する様子を示している (マスシフト法)。

離部の前段にコリジョン/リアクションセルを配置し、衝突誘起解離や運動エネルギー弁別、マスシフトによって干渉の影響を低減する測定法が有効になる。例えば、筆者らは細胞内の P, S の測定の際に、コリジョン/リアクションセル内に酸素ガスを充填し、 $^{31}\text{P}^+$ 、 $^{32}\text{S}^+$  と酸素を選択的に反応させ、 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 、 $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  を生成させた上で、 $m/z=47$  及び  $48$  の信号を計測するマスシフト法を適用している。また、Fe の測定では同位体存在度の大きい  $^{56}\text{Fe}^+$  の信号をモニターするのが望ましいが、 $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$  による同重体干渉が測定精度に深刻な影響を与える。そこで、コリジョン/リアクションセル内に水素ガスを充填し、衝突誘起解離や運動エネルギー弁別によって  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$  を選択的に減少させている。このような、コリジョン/リアクションセルシステムによって、特に SC-ICP-MS で測定の対象となる P, S 及び Fe の測定を高感度に行うことが可能となっている。

#### 4 定量プロトコル

細胞内元素含有量を定量するためには、ネブライザー効率 (Nebulization efficiency または Transport efficiency) と感度係数 (Sensitivity factor) という二つの係数を決定する必要がある。ネブライザー効率は、ネブライザーから噴霧されたエアロゾルがどの程度の輸送効率で ICP まで到達するかを示す値である。筆者らは Si イオン溶液とシリカ ( $\text{SiO}_2$ ) 粒子を用いて、ネブライザー効率を求めた。すなわち、 $\text{SiO}_2$  粒子を構成する Si 原子はプラズマまで損失することなく輸送されるが、イオン溶液中の Si は導入量に対して、プラズマまでの輸送中にエアロゾルとしてスプレーチャンバーやトーチに付着し、損失が生じる。イオン溶液中とシリカ粒子中の Si が質量分析計内での挙動に差がないと仮定すると、両者

の信号強度を比較することで、プラズマまでの輸送効率、つまりネブライザー効率 ( $f$ ) を決定することができる (式 1)。

$$f = \frac{m_{\text{Silica}} \cdot (I_{\text{Si}} - I_{\text{Blk}})}{C_{\text{Si}} \cdot v \cdot I_{\text{Silica}}} \dots \dots \dots (1)$$

$m_{\text{Silica}}$  は  $\text{SiO}_2$  粒子に含まれる Si 原子の数、 $C_{\text{Si}}$  は Si イオン溶液濃度、 $v$  は試料溶液の導入流速を示しており、既定の条件下では定数となる。 $I_{\text{Silica}}$ 、 $I_{\text{Si}}$ 、 $I_{\text{Blk}}$  はそれぞれ、Si に関して、 $\text{SiO}_2$  由来のパルス信号 (ピーク部分の積分値)、イオン溶液、ブランク溶液の信号強度を示している。ネブライザー効率の算出は、個数濃度が既知のナノ粒子溶液を用いて、観測されるパルス信号の数との比較から評価するという方法も可能である。

感度係数は測定対象元素の質量分析計内での透過効率を示している。濃度既知の測定対象元素のイオン溶液を測定し、ネブライザー効率 ( $f$ ) を用いてプラズマまでの元素損失を見積もった上で、質量分析計内だけでどのくらいの透過効率が達成されているかという係数として求める。細胞内の元素は  $\text{SiO}_2$  粒子と同じくプラズマまでは元素の損失がなく、質量分析計内のみで損失が起るため、得られたパルス信号の強度を感度係数で除すれば、元々細胞内に存在していた元素量 ( $m$ ) が計算できる。以上の算出方法は式 2 のように表せる。

$$m = \frac{I_{\text{Cell}}}{(I_{\text{Std}} - I_{\text{Blk}})} \cdot f \cdot C_{\text{Std}} \cdot v \dots \dots \dots (2)$$

$I_{\text{Cell}}$ 、 $I_{\text{Std}}$ 、 $I_{\text{Blk}}$  はそれぞれ、測定対象元素に関して細胞由来のパルス信号 (ピーク部分の積分値)、イオン溶液、ブランク溶液の信号強度を示している。 $C_{\text{Std}}$  は測定対象元素イオン溶液の濃度を示している。なお、式 2 では

$C_{Std} \cdot v / (I_{Std} - I_{Blk})$  が感度係数の逆数にあたる。

## 5 様々な細胞中の必須ミネラルの定量

SC-ICP-MS での元素の定量性を評価するために、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、緑藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、ラット赤血球という3種類の細胞を用いた評価を行った<sup>17)</sup>。3種の細胞からはそれぞれの細胞1個に由来する Mg, Zn, P, S 及び Fe のパルス信号が検出された。この結果から、導入した細胞はプラズマまで輸送され、構成元素がイオン化に至っていることを示唆している。それぞれのパルス信号のピーク面積から見積もった元素含有量の結果を図4に示す。各細胞にはアトグラム (ag) からピコグラム (pg) のオーダーで上のミネラルが含まれることが明らかになった。緑藻はクロロフィル、赤血球はヘムにそれぞれ配位する Mg, Fe が他の細胞よりも多く存在しており、細胞種を特徴付ける元素情報が得られた。詳細な定量精度を議論するために、酸分解した細胞試料中の元素濃度を通常の溶液導入の ICP-MS で測定した結果と比較した (図4)。出芽酵母および緑藻では S 以外の元素の含有量は2通りの分析法の間でおおむね一致し、筆者らが用いた SC-ICP-MS のシステムで前項の定量プロトコルが正しく適用できることが確かめられた。S に関しては、すべての細胞で SC-ICP-MS による測定値が通常の溶液導入

による測定値より低くなった。これは細胞内の S 原子のほとんどが炭素 (C) と共有結合し、タンパク質などの高分子量の物質に含まれているために、主に硫酸イオンの形で S が存在するイオン溶液 (標準液) よりも S のイオン化効率が低下したことが原因ではないかと考えられる。

ラット赤血球に関しては、2通りの分析法の間で測定値に差が見られた。通常の溶液導入法では少量の細胞懸濁液を灰化して測定溶液を調製している。このとき細胞以外に懸濁液に含まれる元素も測定していることになる。赤血球が細胞膜のみの構造であることを考えると、力学的に脆弱であり、洗浄や懸濁などの操作で赤血球の破裂 (溶血) が生じる可能性が考えられる。このように、溶血によって細胞外に溶出した元素が、最終的な懸濁液中に残存したために、灰化試料では細胞以外からの元素の付加が加わり、計測した細胞数に対して、元素含有量に正の誤差を与えてしまったと考えられる。赤血球中のタンパク質はほとんどがヘモグロビンであり、ラット赤血球中のヘモグロビン濃度の参照値から推定される赤血球1細胞あたりの Fe 含有量は約 67 fg となる。この値は SC-ICP-MS による定量結果 (70 fg) とよく一致することから、赤血球においても SC-ICP-MS による測定結果は信頼性が高く、パルス信号に対するベースラインの補正を適切に行えば、溶血などで生じる懸濁液の元

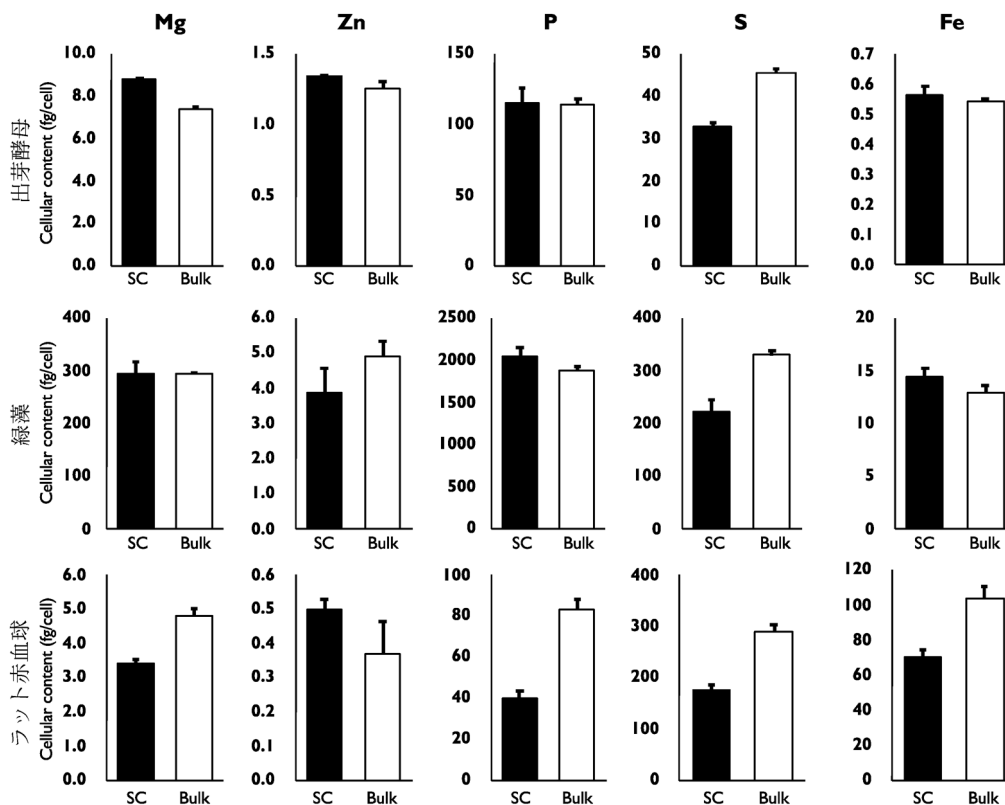


図4 3種の細胞内におけるミネラル含有量

SC-ICP-MS 分析 (SC) 及び細胞を湿式灰化した溶液の ICP-MS 分析 (Bulk) で得られた元素含有量, 平均値±標準偏差 (n=3)



素汚染の影響は無視できると考えられる。

## 6 まとめ

長時間分解 ICP-MS による細胞の分析は真菌、植物、動物といった多様な試料に適用可能な技術であることが確かめられた。生命現象に対するミネラルの関与を明らかにする上で、細胞内の元素含有量を正確に求めることのできる SC-ICP-MS は非常に有用な技術であるといえる。長時間分解 ICP-MS では、バックグラウンド信号がデータ取得時間(積分時間)に比例して減少し、一方で細胞内の元素は短時間にパルス信号として現れる。そのため、細胞内の微量成分であるミネラルの検出、定量を行うのに、SC-ICP-MS では通常の ICP-MS と比べ、必要な細胞数を大幅に削減することができる。すなわち、培養が可能な細胞であれば、時間や量に関する実験条件を増やし、栄養学的、毒性学的な元素代謝の評価が容易に行える。また、血球細胞のような臨床利用しやすい細胞では、栄養状態の評価や特定の疾患の有無など健康状態を把握するためのスクリーニングとして SC-ICP-MS の応用が期待される。

謝辞 本稿で紹介した研究は飯田里紗子氏、高田翔平氏(千葉大学薬学部)、久保田哲央氏、山中理子氏、杉山尚樹氏、Yolande Abdelnour 博士(Agilent Technologies)のご協力及び Agilent Technologies からの助成(ACT-UR, No. 4366)を受けて実施した。

## 文献

- 1) A. L. Baker, R. R. Schmidt: *Biochim. Biophys. Acta*, **74**, 75 (1963).
- 2) M. N. Lo, L. J. Damon, J. Wei Tay, S. Jia, A. E. Palmer: *eLife*, **9**, e51107 (2020).
- 3) Y. Ogra, A. Tejima, N. Hatakeyama, M. Shiraiwa, S. Wu, T. Ishikawa, A. Yawata, Y. Anan, N. Suzuki: *Sci. Rep.*, **6**, 33007 (2016).
- 4) B. Bonneau, H. Ando, K. Kawaai, M. Hirose, H. Takahashi-Iwanaga, K. Mikoshiba: *eLife*, **5**, e19896 (2016).
- 5) R. Álvarez-Fernández García, M. Corte-Rodríguez, M. Macke, K. L. LeBlanc, Z. Mester, M. Montes-Bayón, J. Bettmer: *Analyst*, **145**, 1457 (2020).
- 6) A. S. Groombridge, S. Miyashita, S. Fujii, K. Nagasawa, T.

Okahashi, M. Ohata, T. Umemura, A. Takatsu, K. Inagaki, K. Chiba: *Anal. Sci.*, **29**, 597 (2013).

- 7) Z. Liu, A. Xue, H. Chen, S. Li: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **103**, 1475 (2019).
- 8) E. Mavrikakis, L. Mavrouidakis, N. Lydakis-Simantiris, S. A. Pergantis: *Anal. Chem.*, **91**, 9590 (2019).
- 9) X. Shen, H. Zhang, X. He, H. Shi, C. Stephan, H. Jiang, C. Wan, T. Eichholz: *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 5531 (2019).
- 10) Y. Cao, J. Feng, L. Tang, C. Yu, G. Mo, B. Deng: *Talanta*, **206**, 120174 (2020).
- 11) S. Meyer, A. López-Serrano, H. Mitze, N. Jakubowski, T. Schwerdtle: *Metallomics*, **10**, 73 (2018).
- 12) H. Wang, B. Wang, M. Wang, L. Zheng, H. Chen, Z. Chai, Y. Zhao, W. Feng: *Analyst*, **140**, 523 (2015).
- 13) H. Wang, M. Wang, B. Wang, L. Zheng, H. Chen, Z. Chai, W. Feng: *Anal. Bioanal. Chem.*, **409**, 1415 (2017).
- 14) H. Wang, B. Chen, M. He, B. Hu: *Anal. Chem.*, **89**, 4931 (2017).
- 15) K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino, N. Jakubowski: *J. Anal. At. Spectrom.*, **28**, 637 (2013).
- 16) 平田岳史, 山下修司, 鈴木敏弘, 石田未来: 分析化学, **68**, 81 (2019).
- 17) Y. Tanaka, R. Iida, S. Takada, T. Kubota, M. Yamanaka, N. Sugiyama, Y. Abdelnour, Y. Ogra: *ChemBioChem*, in press, 10.1002/cbic.202000358.



田中佑樹 (Yu-ki TANAKA)

千葉大学大学院薬学研究院 (〒260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1)。京都大学大学院理学研究科地球惑星科学専攻。博士(理学)。《現在の研究テーマ》ICP質量分析計を用いた、生体試料中の元素・同位体分析法の開発と医学応用。《主な著書》“衛生試験法・注解2020”(金原出版)。《趣味》研究、愛猫の世話、サイクリング。

E-mail: yu-ki.tanaka@chiba-u.jp



小椋康光 (Yasumitsu OGRA)

千葉大学大学院薬学研究院 (〒260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1)。千葉大学大学院薬学研究科博士後期課程。博士(薬学)。《現在の研究テーマ》金属の生理作用及び毒性機構の解明。《主な著書》“衛生試験法・注解2020”(金原出版)。《趣味》激辛探訪。

E-mail: ogra@chiba-u.jp