島津製作所のハードウェアグループでは、次世代質量分析装置に関する技術開発を行い、それら技術 を取り入れた試作機を製作した。本試作機は、イオン源にマトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)法を、質量分離部に島津オリジナルのデジタルイオントラ ップ(Digital Ion Trap, DIT)と飛行時間型質量分析装置(Time of Flight Mass Spectrometer, TOFMS)を 組み合わせた、MALDI-DIT-TOFMS装置である。以降DIT-FP機と呼ぶ。DIT-FP機はイオントラップ型質 量分析装置(IT-MS)でありながら、MALDIで生成したイオンをイオントラップで捕捉することなく通過させて TOFMS分析する"Pass Through機能"を備えた世界初の装置である。

図1に、試作機の外観と、Pass Through TOF(P-TOF)のリニアモード(P-LTOF)、リフレクトロンモード (P-RTOF)、およびIon Trap TOF(I-TOFモード)の模式図を示す。これら3つのモードはPCから電気的に 切り替えて使用できる。



MALDI-DIT-TOFMS, DIT-FP機

(a) Pass Through リニアTOF (P-LTOF)
(b) Pass Through リフレクトロンTOF (P-RTOF)
(c) Ion Trap リフレクトロンTOF (I-TOF)

図1 次世代質量分析装置の外観(左)と、Pass Through TOF/Ion Trap TOF の模式図

I-TOFモードにおいては、イオン光学系の改良、イオン追加導入機能によるイオン量の増大、高分離・高 効率の新規イオン選択法の開発を行い、P-TOFモードにおいては、MALDI-TOFMSのための新規遅延引 き出し法の開発を行った。更に全モードに共通する要素として、低ノイズデジタイザによる高感度化、改良 型イオン検出器の評価、高スループット対応試料ステージの開発、長期安定性のための安定化ユニットの 開発、自動分析のためのソフトウェア機能開発を行った。

尚、DIT-FP機は京都大学における応用研究にも使用し、主に疾患バイオマーカーの探索および構造解 析に使用した。

## 1 高感度化のための開発

本プロジェクトでは、疾患バイオマーカーなど生体試料中に微量に含まれる化合物を検出するために、 装置の高感度化に関する研究開発を行った。以下に各開発項目を示す。

## 1-1 イオン光学系の最適化によるイオントラップTOFの感度向上

イオントラップからTOFMSに引き出されたイオンが効率よく検出器に到達できるようイオンレンズ(アイン ツェルレンズ)を配置した。イオンレンズ(アインツェルレンズ)を含めた光学系の配置を最適化し、その高感 度化への効果を調べた。

## 1-2 イオントラップへのMALDIイオン追加導入

DITの特長であるトラップRF周波数瞬時切り替え機能を生かして、イオントラップにイオンを繰り返し導入し蓄積するイオン追加導入機能を、DIT-FP機に適用した。

## 1-3 新規質量選択法によるプリカーサ分離能の向上

MS/MSのプリカーサイオンを高分離かつ高効率で選択する方法を開発し、DIT-FP機に適用した。

## 1-4 低ノイズデジタイザの開発/電源装置の低ノイズ化

新しい低ノイズ信号処理回路(デジタイザ)を開発した。

### 1-5 改良型マイクロチャンネルプレート(MCP)検出器の評価

新しい高性能MCP検出器を特注し、基本性能の評価後、DIT-FP機を用いた評価を行った。

### 1-1 イオン光学系の最適化によるイオントラップTOFの感度向上

【研究目的】

イオントラップTOF(I-TOF)はイオントラップからの引き出し時にトラップ内に形成される電場によってイオン い軌道が収束される。それにより、初速を持たない条件での引き出しでは、引き出されたイオンが全て検出 器に入射していることがシミュレーションによって確認されており、市販の装置ではイオン引き出し後に軌道 を収束させるためのイオン光学系を備えていない。

しかし、実際のイオントラップでは引き出し直前までイオンはトラップ内で往復運動している。したがって 引き出し時にイオンは初速を持ち、その影響で軌道が大きく広がって検出器への入射効率を低下させる。 実際、初速の影響を考慮したシミュレーションではイオントラップから引き出されたイオンの検出器への入 射効率は30 ~ 40%程度にとどまっている。

そこで、イオンレンズ(アインツェルレンズ)をI-TOFのフライトチューブ内の飛行経路上に配置してI-TOFの感度向上を目指した。



#### 図1 アインツェルレンズを含む I-TOF のイオン光学系

イオントラップ~リフレクトロン~検出器で構成されるI-TOFのイオン光学系のイオントラップ~リフレクトロン間のアインツェルレ ンズによって軌道を収束させ、検出器への入射効率を向上させる。アインツェルレンズの設置位置はイオントラップ中心からア インツェルレンズ中心までの距離xを変化させて検出器入射効率についての最適化を行った。

その際、アインツェルレンズへの印加電圧の最適値はアインツェルレンズ設置位置によって変化するが、今回調べた設置位置の範囲では-7.0 kV ~ -8.0 kVの間にあり、この間での入射効率の大きな変化は見られなかった。そのため、設置位置の 最適化はアインツェルレンズ印加電圧を-7.5 kVに固定して比較を行った。

【研究成果】

方法

図1に示すようにイオントラップとリフレクトロン間のフライトチューブにアインツェルレンズを設置し、イオン軌道を収束させることで検出器への入射効率の向上を図る。その際、アインツェルレンズ設置位置の最適化をシミュレーションによって行った。

図2はその結果を示している。x = 300 mmで検出器入射効率は最大になっており、特に500 Daのイオン では発生させた全てのイオンが検出器に入射している。この結果に基づいて、x = 300 mmにアインツェル レンズを設置した場合とアインツェルレンズが無い場合についての比較をシミュレーションによって500、 1,000、2,000、3,000、4,000、5,000 Daのイオンについて行った。その結果を図3に示している。アインツェ ルレンズを設置することによって検出器への入射効率は2 ~ 3倍に向上している。また、図4にはイオンの 初速の有無、アインツェルレンズの有無でのイオン軌道の比較を示している。図4(a)にあるように初速を考慮しない場合はアインツェルレンズが無くても全てのイオンは検出器に入射している。



図2 アインツェルレンズ設置位置による検出器入射効率の変化

イオン排出前のイオントラップの条件はLow Mass Cut Off (LMCO, 捕捉質量の下限)を453.6 Da(RF: 1 kV, 550 kHz) とし、LMCO近傍の500 DaのイオンとLMCOから離れた5,000 Daのイオンについて調べている。これはLMCOに近いほどト ラップ時のイオンの空間分布はトラップ中心に収束されるので、その空間分布の差を確認するためである。図にあるように 500 Daと5,000 Daのイオンのいずれもアインツェルレンズの位置がイオントラップから300 mmの位置で検出器への入射効 率が最大になっている。



図3 アインツェルレンズの有無によるそれぞれ質量のイオンの検出器入射効率 イオン排出前のイオントラップの条件は図2と同じく、LMCOを453.6 Daとした。アインツェルレンズが無い場合(アインツェル レンズ無し)の入射効率は30 ~ 40%であった。それに対してアインツェルレンズを図2で示した最適な位置(x = 300 mm)に 設置した場合(アインツェルレンズ有り)は検出器入射効率が90%以上になった。m/z の値によって入射効率に違いがある のは、イオン排出前のイオンの空間分布に起因すると考えられる。







図4 イオン初速の有無、アインツェルレンズの有無でのイオン軌道の比較

- (a) 初速を考慮しない場合のイオン軌道を示している。引き出し時のイオンの空間分布は引き出し前のトラップ条件が LMCO 453.6 Da の場合と同じにし、初速は 0 としてシミュレーションを行った。
- (b) 初速を考慮した場合のイオン軌道を示している。引き出し前のトラップ条件を LMCO 453.6 Da とし、初速もトラップ時の状態を反映した値を持つものとして初期条件を与え、シミュレーションを行った。
- (c) 初速を考慮した場合に経路にアインツェルレンズがあるときのイオン軌道を示している。イオンの初期条件は(b)と同じもの を用いた。また、アインツェルレンズはイオントラップ中心から 300 mm の位置に設置したとしてシミュレーションを行った。

しかしながら、実際にはイオンは初速を持ち、これを考慮した場合は図4(b)のように軌道は大きく広がってしまう。その結果、図3で示したような低い検出器入射効率となる。それに対して、図4(c)に示したアイン ツェルレンズを設置した場合ではイオンの軌道は収束されており、全てのイオンが検出器に入射しており、 検出器入射効率が向上しているのは明らかである。

以上のシミュレーション結果よりアインツェルレンズをイオントラップ中心からx = 300 mmに設置すること でイオンの検出器入射効率の向上を図った。

#### 結果

シミュレーションの結果をもとにイオントラップ中心から300 mmの位置にアインツェルレンズを配置した 系の装置を制作し、実験により評価を行った。正イオンモードにおいてアインツェルレンズの印加電圧が-10 kVの時はフライトチューブと同電位になり、従来のアインツェルレンズを備えない装置と等価となる。この時 の信号強度に対してアインツェルレンズの印加電圧を変えたときに相対的な信号強度がどのように変化す るかを調べた。

図5はその結果である。Angiotensin IIは印加電圧が-8.0 ~ -7.5 kVで信号強度が従来の3倍程度に、 ACTH 7-38は-7.5 kVで4倍以上になっている。したがって、印加電圧を-7.5 kVにすることでどちらの質量 のイオンも高い効率を得ることが可能であり、ほぼシミュレーション結果に合致するデータが得られた。

【結論】

I-TOFモードにアインツェルレンズを追加したイオン光学系のレンズ設置位置を最適化することで、信号 強度を増加することがシミュレーションおよび実験から確認することができた。この改良により、I-TOFモード の感度を向上させることができた。



図5 アインツェルレンズ印加電圧による信号強度比の変化

Angiotensin II(Ang2、1,046.5 Da)とACTH 7-38(3,657.9 Da)について、アインツェルレンズの印加電圧が-10 kVの時の信 号強度に対する相対強度を実験で調べた。正イオンモードにおいてアインツェルレンズの印加電圧が-10 kVの時はフライトチュ ーブと同電位になり、従来のアインツェルレンズを備えない装置と等価となる。どちらの試料もアインツェルレンズの印加電圧を -10 kVから上げていくことで信号強度が増加している。これはフライトチューブとの電位差が大きくなることでレンズ効果が増 し、イオンが収束されて検出器に入射するイオンの数が増えたためと考えられる。また、-7.5 kVより印加電圧が小さくなると信 号強度は低下している。これは、レンズが強すぎて焦点が検出面よりも手前になり、検出面ではイオンの分布がかえって広が ってしまうためと推測される。

### 1-2 イオントラップへの試料イオン追加導入

【研究目的】

イオントラップに捕捉されているイオン量が増えるほど、MS測定における感度は向上し、MS/MS解析に おいてもプロダクトイオン量が増えてやはり感度は向上する。そのため、一度により多くのイオンをイオント ラップ中に捕捉することが高感度を得るためには好ましい。

しかしながら、MALDIにおいて一度のレーザー照射で発生するイオンの量には限度がある。そのため、 イオン量を増やすために複数回のイオン化を行ってイオントラップに導入することが考えられるが、こちらに ついてもRF電圧印加中のイオントラップに効率よくイオンを導入するのは通常の方法では困難である。

そこで、我々はDITが持つ矩形波RF電圧の周波数を容易に変更できるという特徴を生かしたイオン追加 導入法を開発してきた[1]。その方法をDIT-TOFにも適用し、トラップ内に捕捉するイオン量を増加させるこ とによる感度向上を目指した。

#### 【研究成果】

方法

MALDI-DITではイオン化した試料のパケットがイオントラップに入射したタイミングを見計らって瞬時に RF電圧の印加を開始し、高効率のイオン捕捉を行っている。しかしながら、捕捉したイオンを保持し続ける にはRF電圧の印加を停止するわけにはいかないため、この方法によるイオンの捕捉は一度の計測で一度 しか行えない。そのため、さらにイオンをイオントラップ内に導入するにはRF電圧印加中に行わなければな らないが、RF電圧印加後のイオントラップ内へのイオン導入は一般的に難しく、初めのイオン導入以降は 高効率のイオン導入が難しい。

この問題を解決するために我々はRF印加時でも効率的に行える導入法の開発を行ってきた。図1はその方法を示している。

まず、通常のRF電圧急速立ち上げによるイオンの捕捉後に十分なクーリングを行い、イオンの運動エネ ルギーを奪って、図1の①の状態にする。この状態ではRF電圧によるイオントラップ内部の深い疑似ポテン シャルでイオンは強く捕捉されている。この時、外から入射してくるイオンに対してはRF電場が障壁となり、 イオントラップ内部にイオンを導入することは難しい。

次にRF電圧の周波数を上げ、図1の②のように一時的にポテンシャル井戸を浅くする。この時、イオンに 対するRF電場の拘束力は弱まるが、すでに捕捉されているイオンは十分に運動エネルギーが小さいので トラップ内にとどまり続ける。一方、外部から入射するイオンはポテンシャルの壁が低くなったことでトラップ 内部まで侵入することができる。

新たにトラップに入射したイオンがポテンシャル井戸の中心に来たところで、再びRF電圧の周波数を元 に戻し、図1の③にあるようにポテンシャルを深くする。これにより、新たに入射したばかりの運動エネルギ ーが高いイオンをイオントラップ内に捕捉することができる。

この後、クーリングを行って新たに入射したイオンのエネルギーを十分に奪うことで追加導入したイオン も安定してイオントラップ内にとどめることが出来るようなる。以上の手順を繰り返すことでトラップ内のイオ ン量は導入回数に応じて増えていく。この手法をDIT-FP機にも適用し、高感度化を図った。



図1 イオン追加導入の手順とトラップ内の状態

- ① 内部にトラップされているイオンは十分な時間クーリングされていて、捕捉された当初の運動エネルギーを失っており、ポテン シャル井戸の底付近で運動している。一方、外部のイオンはRFが作る電場に阻まれてイオントラップ内部に入射出来ない。
- ② RF電圧の周波数を上げるとポテンシャル井戸は浅くなる。しかしながら、すでに捕捉されているイオンは持っている運動エネ ルギーが小さいため、トラップ内にとどまり続ける。一方、外部のイオンに対しては障壁が低くなり、イオントラップ内部に入射 出来るようになる。
- ③ RF電圧の周波数が高いままだと新たに入射したイオンをイオントラップ内に捕捉することは出来ない。そのため、RF電圧の 周波数を元に戻して、ポテンシャル井戸を深くする。その後、クーリングを行えば①と同じ状態になり、イオンの追加導入を繰 り返すことが出来る。

結果

図1の手順に従って実験を行った。図2はその結果である。0回はRF電圧を印加していない状態からイオンを捕捉する通常のトラップのみを行った場合で、この時の信号強度に対する強度比について、追加導入回数に対する変化が示してある。実験は質量の異なる3種類のペプチド標準試料(Glufib, Insu B, Cyt C)に対して行った。結果からどの試料についても導入回数に比例して信号強度は増加しており、イオン量が増加しているのが分かる。



図2 追加導入回数と信号強度比の変化(n=5)

試料にGlufib(1,570.68 Da), Insulin oxidized B chain(Insu B 3,494.65 Da), Cytochrome C(Cyt C 12,362 Da)を用いて 実験を行った。各点について5回データを取り、その平均をプロットした。いずれの試料も1回の追加導入で通常のトラップ(0回 目)のおよそ50%程度にあたる信号強度の増加が見られた。そのため、5回の追加導入で通常の3.5倍(1倍+0.5倍x5)に信 号強度が増加した。

### 【結論】

イオン追加導入をDIT-FP機のI-TOFモードに適用することで、導入回数に比例した信号強度の増加が 確認され、より高感度の測定を行えることが分かった。

#### 【成果一覧】

特許出願

(1) 岩本慎一、小寺慶、関谷禎規、イオントラップ質量分析装置、出願番号2009-510783、公開番号 WO2008-129850

【参考文献】

[1] 岩本慎一、小寺慶、関谷禎規、Li Ding、小西郁夫、田中耕一、高真空MALDIデジタルイオントラップ 質量分析計と追加イオン導入法の開発, 第55回質量分析総合討論会、2007年

#### 1-3 新規質量選択法によるプリカーサ分離能の向上

【研究目的】

イオントラップにおける構造解析はプリカーサイオンを分離した後、衝突誘起解離(Collision Induced Dissociation, CID)で開裂を起して生成したプロダクトイオンを計測することで行われる(MS/MS分析)。 そのため、プロダクトイオンのピーク検出が重要となるが、この信号強度は元となるプリカーサイオンの量 に依存する。そのため、プリカーサイオンの効率的な分離が要求される。

従来のプリカーサ分離は、双極励起の励起波形電圧を重畳したFiltered Noise Field(FNF)を用いて行う。しかしながら、この手法では質量選択の範囲を狭めるとプリカーサイオンまで排出され、プリカーサイオンの排出を防ごうとすると選択範囲を広める必要があり、余計なイオンまで残すこととなる。従って、従来法では効率的な質量分離を行うことは難しい。

そこで、分離能向上によってプリカーサイオンを効率的に残し、それによるMS/MS分析の感度向上を目的として新規質量選択法を開発した。

#### 【研究成果】

方法

通常イオントラップMSにおけるプリカーサ分離は、イオントラップに双極励起の複数の励起波形を重畳したもの印加してプリカーサイオン以外を励起排出するFNFによって行われている。しかし、双極励起は排出するイオンの質量範囲とイオントラップ内に残すイオンの質量範囲との境界が明瞭でないために質量分離能が低い。

そのために四重極励起とDIT特有の機能であるDigital Asymmetric Wave Isolation(DAWI)[1] を組み 合わせた新たな質量選択法を開発した。双極励起は図1の左図にあるように位相が反転した励起電圧波 形を対向するエンドキャップに印加する励起方法であるが、四重極励起は図1の右図にあるように同位相 の励起電圧波形をエンドキャップに印加する励起方法である。この励起法の特徴は、双極励起に比べて同 じ振幅の励起波形でも励起する質量範囲が狭いものの、その境界が明瞭な点である。

次にDAWIについてだが、この手法はイオントラップのリング電極に印加している矩形波RF電圧波形の デューティ比を変化させることで図2にあるようにMathieuの安定線図における安定領域を変化させて特定 の質量範囲のイオンだけイオントラップ内に残す質量選択法である。このような柔軟なデューティ比の変更 はDITの特徴の一つである。DAWIは広い質量範囲のイオンを短時間に漏れなく排出することができて、粗 分離に適している。また、トラップ内に残すイオンの質量範囲のうち、低質量側は分離能が高い。

新規質量選択法は上記の方法を以下の手順で用いる。

① DAWIを行い、プリカーサの粗分離および低質量側の高精度分離を行う。

② 四重極励起を用いて残った高質量側の高精度分離を行う。

以上の組み合わせを行うことで、DAWIの高質量域の分離能が低いという欠点と四重極励起の励起範囲 が狭いという欠点を補い、高い質量分離能の質量選択を行うことが出来る。



図1 双極励起と四重極励起

双極励起では片方のエンドキャップ電極に励起電圧波形として正弦波 $V\sin\omega t$ を印加する場合はもう一方には $V\sin(\omega t + \pi)$ を印加する。それに対して、四重極励起では両方のエンドキャップ電極に同じ $V\sin\omega t$ の励起波形を印加する。



図2 DAWIによる質量選択時におけるMathieu安定線図上の変化

通常のトラップ時は矩形波RF電圧の一周期の間で高電位となる時間と低電位となる時間が等しく、その時間の比率 (デューティ比)は0.5である。この比を変化させることで、イオンを安定して捕捉出来るトラップ時の広い安定領 域を狭めてイオンを排出することが出来る。また、デューティ比0.5ではLow Mass Cut Off (LMCO) だけ存在して High Mass Cut Off (HMCO)は存在しないために高質量側の質量範囲は規定されないが、デューティ比が0.5以外の 状態ではHMCOも存在するため、安定領域の質量範囲は低質量側、高質量側ともに規定される。





FNFによってGlufibの第一同位体(1,571.8 Da)ピークを分離する場合、分離前の信号強度に対して分離後の信号強度が 90%以上となるようにするためには選択範囲を広くしなければならない。そのため、両脇の同位体イオンも残り、特に高質量側 のイオンはほとんど排除されていない。一方、両脇のイオンを十分に排除するためには質量選択範囲を狭くする必要がある。 しかし、この場合には第一同位体イオンまで排除されてしまうため、質量選択前の信号強度の10%程度しか信号強度が得ら れていない。このようにFNFを用い場合、質量範囲境界での分離能が低く、効率よく質量選択を行うのは難しい。



#### 図4DAWIと四重極励起による質量選択

DAWIは低質量側の分離能は高いので、まず低質量側の分離および高質量側の粗分離を行う。その後、残った高質量側のイオンについて四重極励起を用いて高精度分離を行う。四重極励起は排除出来るイオンの質量範囲の狭さが欠点ではあるが、 この場合は選択質量近傍以外の高質量イオンは既にDAWIによって排出されているために問題とならない。このようなDAWIと 四重極励起の組み合わせによって高い分離能で高効率の質量選択を行うことが出来る。 結果

図3はFNFによってGlufibの第一同位体ピークの分離を行った実験結果である。広い範囲で質量選択を 行った場合、分離後の信号強度は分離前の90%程度あるが両脇にあるピークも残ってしまっている。一方、 狭い範囲での質量選択を行った場合では、両脇のピークはほぼ排除されているが、第一同位体ピークも元 の10%程度の信号強度しかない。

それに対して、図4はDAWIと四重極励起によって質量選択を行った実験の結果である。第一同位体ピ ークは元のピークの90%の信号強度を保っている。また、それ以外のピークはほぼ排除されている。

【結論】

新規の質量選択法は実験結果から1 Da差のピークを高い効率で分離可能な事が示された。この手法を 用いることでより高効率で質量分離することができ、高感度のMS/MS分析を行うことが期待できる。

## 【成果一覧】

学会発表

(1) Kei Kodera, Masafumi Jinno, Kiyoshi Watanabe, Makoto Hazama, Masaji Furuta, Sadanori Sekiya, Kaori Kinoshita, Hidenori Takahashi, Kosuke Hosoi, Toshinori Kobayashi, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka. "A Novel Precursor Isolation Method using Digital Ion Trap Mass Spectrometer", 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012

## 特許出願

(1)小寺慶、狭間一、イオントラップにおけるイオン選択方法及びイオントラップ装置、出願番号 2012-198396

## 【参考文献】

 Francesco L. Brancia et al., Digital Asymmetric Waveform Isolation (DAWI) in a Digital Linear Ion Trap, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 21, 1530–1533 (2010)

### 1-4 低ノイズデジタイザの開発/電源装置の低ノイズ化

質量分析装置によって取得されるマススペクトルにはイオン検出器で検出されるイオン信号にノイズが 重畳する。ノイズが大きい場合、マススペクトルの信号ノイズ比(S/N比)が低下し、微弱なイオン信号の検 出の判別が困難になる。イオンがない無信号時の検出器信号波形をベースラインとして、ここに重畳するノ イズをベースラインノイズと表現する。微量な試料を高感度に検出するためにはこのベースラインノイズを 可能な限り除去することが必要である。ノイズには主にイオン化時にマトリックスなどがクラスター化するこ とによって生じるケミカルノイズと、装置の電気構成部品が発生する電気的ノイズに大別される。本項では、 電気的ノイズの低減を図るため、低ノイズの新規デジタイザを開発し、更に周辺の電源装置を低ノイズのも ので構成することで、次世代質量分析装置の高感度化を行った。

#### 1-4-1 低ノイズの新規デジタイザの開発

【研究目的】

飛行時間型質量分析装置(TOFMS)において、イオン検出器の出力するアナログ電気信号をデジタル 信号に変換する機器がデジタイザである。高速のイオン信号を処理するために、高速、低ノイズ、かつダイ ナミックレンジが広いデジタイザが必要である。また、検出器周辺は10 kV前後の高電圧となることが多い ため、放電による高電圧パルスノイズが検出器信号線に発生することがある。デジタイザ入力部の高電圧 パルスに対する保護が必要である。

これらを考慮し既存のデジタイザに対して、低ノイズ化を実現できるデジタイザの開発を実施した。

#### 【研究成果】

方法

開発したデジタイザは、フロントエンド部、ADコンバータ(ADC)制御部、および信号処理部で構成される。 図1にデジタイザの外観と構成基板、図2に構成図を示す。検出器からの信号は、デジタイザによってデジ タルデータに変換されPCへ渡され、PCでマススペクトルのデータを生成し表示、分析を行う。

フロントエンド部では、検出器からの微弱な電圧信号をADCの入力電圧範囲に収まるよう増幅し、ADC 制御部へ出力する。1 mV以下の微弱で、半値幅が数ナノ秒の高速パルス信号である検出信号を増幅する ために、高いゲインを持ち周波数帯域が数十kHzから数GHzの高速広帯域アンプを使用した。使用したア ンプは、ノイズに脆弱で破損の恐れがあるため、アレスタ、ショットキーダイオード、PINダイオード等を組み わせて、入力部の等価容量を上げることなく十分な高電圧パルスに対する保護が得られる回路を追加し た。

ADC制御部は、ADCとその制御を行うFPGAとその周辺回路で構成される。ADCには、1.6 GS(Giga Sample)/sec 、12 bit分解能(2 V<sub>P-P</sub>を4,096階調でデジタル値に変換)のコンバータを2 chもつデバイスを 採用し、これを3.2 GS/secで動作させ、高速かつ十分な信号階調を確保した。FPGAは、ADCのデータ取 得を外部からのトリガー信号と厳密に同期制御し、データの取り込みから、信号処理部へのデータ受け渡 しを仲介する。

信号処理部は、FPGAとメモリ、インターフェイス部で構成される。ADC制御部からのデータに対して積算 などの信号処理を行い、PCからの指令に応じて、PCヘデータを送信する。通信には、高速伝送が可能な 通信規格PCI Expressを採用した。



新規開発したデジタイザは、(b)フロントエンド部、(c)ADC制御部、(d)信号処理部の電子基板で構成される。



#### 図2 新規開発したデジタイザの構成図

フロントエンド部では、2系統の検出器信号を受け、DCブロック、アレスタ、サージプロテクタ、アッテネータの回路を通過するこ とでノイズをブロックする。2系統を高周波リレーで切り替えた後、RFパワーリミッタの入力保護をした高速広帯域アンプに入力 される。増幅された信号は、アンプから次段のADCへ差動電圧信号で出力する。ADC制御部は、1.6 GS/sec、12 bit、2 chの ADCを高速FPGAで制御し、3.2 GS/secで動作させる。FPGAは、トリガー信号とADCを同期制御し、データ取込み後、次段の 信号処理部へのデータ受け渡す。信号処理部は、高速FPGAとメモリ、インターフェイス部で構成され、ADC制御部からのデー タを高速に256 bit幅のメモリへバッファし、かつ積算などの信号処理を行い、PCからの指令に応じて、PCへデータを送信する。 PCとは通信規格PCI Expressにて高速なデータ通信を行う。 結果

図3に既存のデジタイザと新規デジタイザの単体でのベースラインノイズの計測結果を示す。結果から、 ベースラインノイズの標準偏差は既存デジタイザで0.464 mV、新規デジタイザで0.095 mV となっており、 5分の1程度に低減できていることがわかる。また表1に既存のデジタイザと新規デジタイザの性能の比較 を示す。



図3 デジタイザ単体でのベースラインノイズ波形

(a) 既存デジタイザ(Acqiris U1065A+入力保護回路)の入力を50 Ωで短絡して測定。

(c) 新規デジタイザの入力を50 Ωで短絡して測定。

表1 既存デジタイザと新規デジタイザの性能比較

	既存デジタイザ(+入力保護回路)	新規デジタイザ
ADC分解能	10 bit (1,024 『皆詞)	12 bit (4,096 階詞)
デジタイザ単体ノイズ	0.464 mV(S.D.)	0.095 mV(S.D.)
入力信号レンジ	100 mV / 1,024 階調(0.098 mV / LSB)	170 mV / 4,096 階調(0.0415 mV / LSB)
積算機能	なし	最大4,096プロファイルの積算 (後述のデュアルゲイン拡張時は、最大200プロファイル)

【結論】

新たに開発したデジタイザによって、デジタイザ由来のノイズをおおよそ5分の1(0.205倍)に低減することが可能となった。

## 1-4-2 低ノイズの電源装置構成

【研究目的】

装置の電気的ノイズにはデジタイザ内部で発生するものの他に各種電源等の電気構成部品に由来する ノイズ成分が多く含まれる。本プロジェクトでは低ノイズの部品で装置を構成することで、ベースラインノイズ を低減し装置の高感度化を行った。

【研究成果】

方法

調査の結果、以下の2つの電源ノイズがベースラインノイズに大きな影響を及ぼすことが分かった。

① 検出器に高電圧を供給するフローティング電源

TOFMSの電圧勾配を与えるため、検出器には-10 kV~+10 kVのオフセット電圧を加えられており、 フローティング電源はこれに対し2 kVの検出器電圧を供給している。

#### ② 真空制御用のACDC電源

真空制御装置(真空ターボポンプ、真空計、バルブ等)へDC電流を供給している。ACDC変換のためのスイッチが搭載されており、そのスイッチングノイズが影響を及ぼしている。

そこでこれらの電源に対し、より低ノイズの電源を採用することで改善を試みた。

結果

複数のフローティング電源の調査の結果、Applied Kilovolts社製の電源が最も良い結果を示し、これを 採用した。同時に、300 WタイプのACDC電源として複合共振方式のスイッチング電源を採用した。これら によりDIT-FP機のベースラインノイズレベルは0.140 mVとなった。

またリニアモード用検出器をEMからMCPに変更することでベースラインノイズレベルはさらに0.140 mV から0.104 mV(S.D.)まで低減した。図1にベースライン波形を示す。この差異は、検出器の高絶縁ACカップリング回路の違いによる信号線のインピーダンス不整合による信号線へのノイズ増加と考えられる。



図1 検出器交換前後のベースライン波形

リニアモード用検出器をEMからMCPに変更することでベースラインノイズレベルは更に0.136 mVから0.104 mVまで低減した。

#### 【結論】

装置由来のベースラインノイズレベルを0.104 mV(S.D.)まで低減することができた。

# 1-4-3 デュアルゲイン機能の実装

【研究目的】

通常マススペクトル信号をデジタイザにより記録する際、ADコンバータ前段のアンプにより検出器からの 信号強度に適した増幅率で増幅してからAD変換を行う。このときアンプの増幅率が大きいほど検出した信 号のS/N比は高くなり、微小な信号を検出することができる。

しかしデジタイザの入力電圧範囲には制限があるため、信号強度に対し増幅率の設定が大きすぎる場合、測定できる信号強度の範囲(ダイナミックレンジ)は狭くなる。これではイオン信号の大きさが測定レンジを超えてしまい、自動化や定量評価を行う上で正常な評価ができない。逆に増幅率が小さすぎると、ダイナミックレンジは広くなるがS/N比は低くなるため微小なイオン信号は検出できなくなる。

このことから一度の測定で微小な信号に対する感度を犠牲にすること無くダイナミックレンジを広く保つことを目的としてデュアルゲイン機能を実装した。

【研究成果】

方法

2系統の入力とアンプ、ADコンバータを備えたデジタイザに検出器からの信号をパワースプリッタで分岐 し、それぞれ入力する。片方の系統のアンプは増幅率を高く、もう片方は増幅率を低く設定する。こうしてひ とつのマススペクトル波形に対し増幅率の異なるデジタルデータを2つ同時に記録する。記録されたデータ を合成することにより微小信号に対しては高増幅率の、信号強度の高い信号に対しては低増幅率のデータ が得られる。図1にその模式図を示す。



図1 デュアルゲイン機能における波形データ処理

開発した低ノイズデジタイザにこのデュアルゲイン機能を実装した。図2にその構成を示す。フロントエンド部で信号を分岐し異なるゲインのアンプを介し、2台の12 bit分解能ADCで並列に処理し、これをFPGAの高速信号処理回路で合成する。

結果

図3にゲイン機能を用いた波形の合成結果を示す。高い増幅率のデータでは信号強度の高いピークは 測定レンジを超えている。低い増幅率のデータではすべての信号が測定レンジ内に収まっているが、微小 な信号に対しては検出できてはいるもののS/N比が低い。これらに対しデュアルゲイン機能を使用すると、 すべての信号を測定レンジ内に収めながら微小信号もS/N比を高く良好に検出できた。

低ノイズデジタイザにデュアルゲイン機能を実装した結果、入力電圧範囲を-1.275 V~+1.275 Vに広げ、 かつ測定波形の小信号部を高分解能、低ノイズで取得することが可能になった。



図2 ゲイン機能を実装したデジタイザの構成

新規開発したデジタイザにデュアルゲイン機能を実装した。フロントエンド部で信号分岐回路と低ゲインのアンプを追加し、ADC制御部に12 bit分解能ADCを追加し、これを並列処理し、信号処理部のFPGAで合成処理を行う。



#### 図3 デュアルゲイン機能による波形の合成結果

7mixペプチドを試料として、デュアルゲイン機能で測定したマススペクトルと、合成する前のそれぞれの増幅率のスペクトル波 形を示す。高い増幅率のデータでは信号強度の高いピークは測定レンジを超えてしまっている。一方、低い増幅率のデータで はすべての信号が測定レンジ内に収まっているが、微小な信号(ACTH7-38)に対しては検出できてはいるもののS/N比が低 い。デュアルゲイン機能を使用したデータではすべての信号を測定レンジ内に収めながら微小信号もS/N比を高く良好に検出で きている。

【結論】

デュアルゲイン機能を実装することで、装置のダイナミックレンジを広げ大小の信号強度が混在するマス スペクトルを一度で取得することが可能となった。

## 1-5 改良型マイクロチャンネルプレート検出器の評価

### 【研究目的】

飛行時間型質量分析装置(Time Of Flight Mass Spectrometer, TOFMS)において、イオン検出器とし て主にマイクロチャンネルプレート検出器(Micro Channel Plate, MCP)や電子増倍管(Electron Multiplier, EM)が用いられる。これらイオン検出器に求められる重要な性能として、イオンが入射した際の出力波形 がある。特にTOFMSで用いる場合、1 Da差のイオンが数nsから10 ns程度の短い時間差で検出器に入射 するため、出力波形幅の広がりが質量分解能に与える影響が大きい。図1にMCPのイオン検出原理を示 す。MCPにイオンが入射すると、MCP内壁に衝突し、イオンが電子に変換される。その電子がMCP端面に 印加された電圧によって加速され、ふたたびMCP内壁へ衝突し二次電子を生成する。この過程を繰り返す ことで電子が増幅され、信号として検出できるようになる。



#### 図1 MCPの構造とイオン検出原理

MCPは内壁を抵抗体とした非常に細いガラスのチャンネルを多数束ねた二次元構造をしている。電子増幅によりMCP1枚 あたり10<sup>3</sup> ~ 10<sup>4</sup>個程度の電子が生成される。MCPのパラメータとしてチャンネル径(D)とバイアス角(θ)とチャンネル長(L) がある。MCP1枚あたりの電荷利得はL/Dで調整され、通常L/Dが40~50程度になるように設計される。

本研究ではTOFMSの質量分解能の向上をめざし、従来型より短い出力波形幅を持つMCPを浜松ホト ニクス(株)に特注し、その評価を行った。表1に今回開発したMCP(S015、S016、S017)の仕様を示す。 出力波形幅を抑えるために、従来型と比較してチャンネル径を小さく、またバイアス角を大きくした。また DIT-FP機内ではMCPをフローティングして用いるため、読み出しにACカップリングのためのコンデンサが 必要である。しかし、これが出力波形をなまらせる要因となっている。そこで今回はその回路を一体化・最 適化することで、波形の広がりを抑える設計を行った。さらにS017にはトライオード(MCP出力面とアノード 電極の間に別途加速電極を設けることで、増幅後の電子群の広がりを抑える機構)を採用した。これらの MCPに対し性能評価を行い、質量分解能への影響を調べた。

検出器	チャンネル径(D)	バイアス角(8)	備考
S015	6 µm	13°	カップリングコンデンサー体型
S016	4 µm	20°	カップリングコンデンサー体型
<b>S0</b> 17	4 µm	20°	トライオード、カップリングコンデンサー体型
従来型	6 µm	13°	

表1 新MCPの仕様

チャンネル径が小さいほど電子増幅過程における経路長のばらつきが小さくなり、さらにイオンパケット(イオン群)が検出器に 入射する時にMCP内壁に衝突するタイミングのばらつきも小さくなるので、検出器の出力波形幅が小さくなる。またバイアス角 を大きくしても、イオンパケットがMCP内壁に衝突するタイミングのばらつきが小さくなるので、これも出力波形幅の改善につな がる。

【研究成果】

方法

実際の質量分析装置においては、複数のイオンが同時にイオン検出器に入射する。この場合、イオン数 およびイオンパケット(イオン群)の空間的な広がりは制御できない。よって検出器そのものの評価系として DIT-FP機を用いた評価は不適切である。そこで今回まず単イオンを検出器に入射できるテストベンチで検 出器そのものの性能を評価し、次にDIT-FP機に搭載時の性能評価を行った。

①単イオン入射時の性能評価

まず検出器そのものの性能を評価するために、単イオン入射時の性能測定を行った。単イオンならば数 の制御も容易で、イオンパケットの空間的広がりを考慮する必要もない。測定に用いたテストベンチの構成 について、図2に示す。

ここでの評価項目として、出力波形幅とピーク高さがある。これらを調べるために、単イオン入射時の出力波形の半値幅(FWHM)と波高値を測定した。同様の測定1,000試料分の平均値をそれぞれの測定結 果として用いた。



#### 図2 単イオン入射時の波形測定を行うテストベンチ構成

真空チャンバー内で電子イオン化(EI)により生成した窒素イオンをMCP検出器に入射し、その時の出力波形を評価した。この とき検出器からの波形出力レートが数kHzになるようにEIイオン源を調整することで、単イオン入射であることを保証した。また 検出器への印加電圧(V<sub>mcp</sub>)は、DIT-FP機に搭載した際にイオン検出が可能な下限値である1,700 Vから、検出器仕様上限で ある2,500 Vまで100 V刻みで変化させた。なお、DIT-FP機搭載時には検出器全体をフローティングして用いるが、本評価では アノード電圧を常に接地(GND)にした。

## ② DIT-FP機搭載時の性能評価

次に、DIT-FP機に各MCP検出器を搭載したときの性能を評価した。図3にDIT-FP機の概略図を示す。 評価すべき装置性能として、質量分解能と検出感度の2つが挙げられる。質量分解能については、試料 としてセシウム(Cs<sup>+</sup>: 132.91 Da)を、マトリックスとしてCHCAを用いて、MALDIイオン源のレーザー1ショッ トでのマススペクトルおよび16ショット分の積算マススペクトルにおけるイオン信号波形のFWHMを求めた。 検出感度に関しては、試料として市販ペプチド試料のGlufib ([M+H]<sup>+</sup> = 1,570.68 Da)を、マトリックスとし てCHCAを用いて、レーザー9ショット×36点(試料上での照射位置は図3参照)の積算マススペクトルを取 得し、試料イオンピークの有無(S/N比 > 3程度)を指標とした。またこれらDIF-FP機による測定については 各MCP検出器に加えて電子増倍管(EM)についても同様に評価した。



図3 MALDI-DIT-TOFMSの概要図

各測定はDIT-FP機のP-RTOF(正イオン、リフレクトロンTOF)で行った。質量分解能の評価時は、各検出器間でイオン信号の 波高値をおおよそ同じにするために検出器への印加電圧を調整し、レーザー照射強度はどの検出器の場合でも同じにした。ま た検出限界の評価時は、検出器への印加電圧含む各パラメータは各検出器に対し最適化を行った。

# 結果

①単イオン入射時の性能評価

図4にS017測定時の出力波形を、図5にそれぞれのMCP検出器の測定結果を示す。結果から、新たに 開発したMCPはどれも従来型MCPよりも出力波形のFWHMが小さいことがわかる。出力波形のFWHMは 良いほうからS017, S016, S015となっており、各MCPの差であるチャンネル径やバイアス角、トライオード などの影響が予想通りに出ている。また波高値(電荷利得)に関しては、良いほうからS015,従来型, S016となっている。これも各MCPの差から考えて妥当である。よってS016とS017に関しては、従来型 MCPと同じ電荷利得を得るためには、より高い電圧を印加する必要があると言える。





S017に単イオンを入射した時の出力波形のFWHMはおよそ0.4 nsecであることがわかった。また特にリンギングなども発生していないことも確認できた。





左図は縦軸が出力波形のFWHMで、これが小さいほどDIT-FP機搭載時の質量分解能がよくなる。また印加電圧を上げるほど FWHMが広がっているのは、増幅される電子が増えることで、空間電荷による電子群の広がりが大きくなったためである。

## ② DIT-FP機搭載時の性能評価

まず質量分解能評価の結果について、図6に出力波形例を、表2に各検出器について出力波形の FWHMの評価結果を示す。



図6 Cs<sup>+</sup>ピークの出力波形例

マススペクトルのFWHMは、試料として用いたCs<sup>+</sup>ピークから求めた。またCs<sup>+</sup>ピークの周辺にはマトリックス由来とみられるピー クもいくつか確認できた。

検出器	印加電圧	1 ショットでのFWHM	16 ショット積算時でのFWHM
S015	1500 V	1.290 nsec	1.664 nsec
S016	1980 V	1.250 nsec	1.624 nsec
S017	2100 V	1.007 nsec	1.520 nsec
従来型	1700 V	1.465 nsec	1.720 nsec
EM	1700 V	1.464 nsec	1.862 nsec

表2. DIT-FP機搭載時における各検出器の出力波形のFWHM

FWHMは小さいほど質量分解能がよくなる。例えば1ショットでのFWHMから算出されるCs<sup>+</sup>の質量分解能は、S017の場合約 20,000、従来型MCPの場合は約13,000となる。

レーザー1ショットでの出力波形のFWHMは、良いほうからS017, S016, S015となっており、DIT-FP機 搭載時も実験①での結果が反映されていることがわかる。ここでFWHMが実験①よりも広がっている理由 に関しては、イオン群の空間的広がりや検出器以降の回路系の違いなどの理由が考えられる。またレーザ ーショット16回分積算時でのFWHMが1ショットの場合より大きいのは、レーザーショットごとにピーク位置 がばらついているためである。この原因としては、レーザー照射トリガー、引き出し電圧トリガー、デジタイザ へのトリガーなどのタイミングがレーザーショットごとでずれていることが考えられる。これらを改善できれば、 従来型とS017を比較して、質量分解能が1.5倍程度に向上することが期待できる。

次に検出感度の評価に関して、結果を表3 に示す。またそれぞれの濃度でのマススペクトルを図7に示 す。結果から、検出限界についてはS015と従来型が2.5 amol程度でほぼ同等、S016とS017については 5.0 amol程度という結果になった。これは実験①の電荷利得性能を反映したような結果となっている。

	印加電圧	レーザーパワー	検出限界
S015	1800 V	64	2.5 amol
S016	2100 V	72	5.0 amol
S017	2200 V	65	5.0 amol
従来型	1800 V	68	2.5 amol
EM	1600 V	66	5.0 amol

#### 表3 DIT-FP機搭載時における各検出器の検出限界

印加電圧とレーザーパワーについては、それぞれのイオン検出器に対して1,000 ~ 3,000 Daの範囲内でよい質量分解能が得ら れるよう最適化してある。



図7 各検出器でのGlufib検出限界

検出感度に関してはS015、従来型MCP、EMがよく、2.5 amolの試料を用いた場合でもピークが確認できた(1.0 amolでは十分 なS/N比にならなかった)。

# 【結論】

今回、TOFMS装置の質量分解能向上のための新しいMCP検出器についてその性能評価を行った。その結果、検出器の性能として、出力波形のFWHMを1 nsecから0.4 nsecまで向上させることができた。またDIT-FP機搭載での評価も行い、レーザー1ショットあたりのスペクトルにおけるイオンピークのFWHMが 1.465 nsecから1.007 secまで改善されていることも確認できた。この結果から、新しいMCPを用いることで、 TOFMSの質量分解能が1.5倍程度に向上することが確認できた。

### 2 高スループット化・自動化のための開発

大量試料を詳細に分析するために、装置のハイスループット化と分析の自動化が求められる。次世代質量分析装置DIT-FP機の高スループット化・自動化のために、下記の項目を開発した。

### 2-1 高スループットに対応した試料ステージ

駆動モータを真空槽の外に配置した高速駆動試料ステージを開発した。

## 2-2 機内温度安定化ユニットの開発

装置の長時間安定性を実現するために、装置内温度を調節するユニットを開発し、DIT-FP機に搭載しその効果を確認した。

## 2-3 MALDI-TOFMSにおける新規遅延引き出し法の開発

広い質量範囲の化合物を同時に測定するための新規遅延引き出し法を開発し、DIT-FP機に実装した。

## 2-4 MALDIスィートスポット自動探索機能の開発

測定オペレータの操作に依存せずに高スループット・高感度および高い再現性でデータ取得を可能にする制御ソフトウェアを開発し、DIT-FP機に実装した。

## 2-5 MALDIイオン源電圧自動最適化機能の開発

MS<sup>n</sup>測定高感度化のために、プリカーサイオンの質量に応じてイオン源電圧を自動最適化する機能を開発し、DIT-FP機に実装した。

### 2-1 高スループットに対応した試料ステージ

【研究目的】

従来のMALDI-TOFMS装置では、試料プレートを駆動するため、真空用モータと直動機構を2組組み合せた試料測定ステージが使われている。しかし、真空装置内にモータのあることで次のような欠点がある。

- 真空用モータの選択肢が少ない
- モータからアウトガスが発生する
- モータ用ケーブルが駆動部と干渉の恐れがある
- モータ用ケーブルからのアウトガスが発生する

MALDI-TOFMS測定の高スループット化、高安定化のためには、動力源であるモータを真空外に出す必要があり、本研究ではその実現を検討した。

【研究成果】

方法

試料測定ステージからモータを真空装置の外に出すため、2点の工夫をした。

① モータの動力を真空装置内に伝達する機構

磁性流体シール真空軸受を使用し、モータの動力を真空装置内に伝達する。図1にY軸の構造を示す。 磁性流体シールとY軸の直動機構を結合して、モータ動力を伝達することができた。



図1 磁性流体シールによる真空内への動力伝達

磁性流体シールは、液体シールで固体同士の接触がないため、次のような特徴がある。

・クリーン: 摩擦損耗による発塵がない

- ・長寿命: 摩擦損耗がなく、省メンテナンスで長寿命
- ・高真空: 低蒸気圧の磁性流体のため10<sup>-6</sup> Pa以下の高真空領域で使用可能
- ・その他:損失トルクが小さく、高速回転が可能

② ボールスプラインとマグネットギアによるX軸への動力伝達機構

X軸はY軸と違い、X軸の直動機構がY軸上で移動する必要があるため、磁性流体シールに直結することができない。そこで、直動機構がY軸上を移動する動きに追従しながらモータ動力を伝達するため、ボールスプラインとマグネットギアを使った機構を考案した。(図2、図3、図4)

モータの回転は、ボールスプライン上のスプラインナットが軸方向へ移動しながら伝達し、マグネットギアで回転力の向きをY軸方向からX軸方向に90度変換し、X軸直動機構に伝達する。





X 軸の直動機構は、Y 軸の直動機構上を図の赤矢印の方向に移動する。この動きに追従してモータの動力を伝達するため、ボ ールスプラインを使用した。X 軸の直動機構の入力部とボールスプラインの距離を変化させないために、ボールスプラインは Y 軸と平行に配置しなければならない。回転力の方向を合わせるため、マグネットギアはボールスプラインの回転力を 90 度変換し て、X 軸の直動機構に伝える。





ボールスプラインは軸方向の溝にボールがはまり、ボールが転動することで軸方向の動きを実現する。スプラインナットが回転軸上を移動可能なため、移動しながら回転力を伝えられる。



## 参考 スパイラルギヤ

#### 図4 マグネットギア

マグネットギアは、回転軸に対して45度の角度でN極S極が交互に着磁されている。2個1組を左図のように組み合わせると、非接触で直交する動力伝達ができる。動力伝達はスパイラルギヤと同じ形態であるが、スパイラルギヤにはない下記の特徴がある。

- ・部品の接触がないため、潤滑が不要で、アウトガス、発塵の心配がない。
- ・ ギアの磁極同士が引き合うため、バックラッシュ(歯車のガタ)がない。
- ・過大な回転力にはスリップして動力伝達の制限ができ、直動機構の破損防止ができる。

上記の工夫により、試料測定ステージのモータを真空外に配置することができた。このため、モータの選 択肢が増え、試料測定ステージの高速化と高精度化を進めることが可能になった。

### 高速、高精度モータの使用

モータを真空装置の外部に配置できるようになったため、ステッピングモータよりも高速かつ高精度な モータであるACサーボモータを適用することが可能になった。

### 高速化、高精度化された試料測定ステージ

真空装置外にモータを配置できたため、発熱、アウトガス等の不安要素が排除でき、高速、高精度な ACサーボモータを搭載した試料測定ステージが製作できた(図5)。



#### 図5 高速化,高精度化された試料測定ステージ

モータの動力を真空内に導入するため磁性流体シールを使用した。また、動力をX軸の直動機構に伝達するために、ボールス プライン、マグネットカップリングを使用した。モータを真空外に置けたことから、ACサーボモータが使用でき、高速化、高精度化 を実現できた。

> 磁性流体シール: SNL006NNC61(フェローテック) マグネットギア: FD26(FEC) ボールスプライン: LT10CLM+400LPM(THK) ACサーボモータ: SGMAV-04ADA21 200VAC 400W(安川電気)

ステージ移動の高速化

ACサーボモータの高回転力により加減速時間が減った。さらに、最高速度を上げることで動作時間が 短縮される。図6に100 mmの直線動作の例を示す。動作時間がステッピングモータの約3分の1に短縮 できた。





モータのフィードバック信号を基に作成した時間-速度ダイヤグラムを示す。青色がステップモータ、赤色がACサーボモータを示 す。ACサーボモータは高回転力を持ち、ステージの加速度をステッピングモータの54.6倍にできた。また、高速回転も可能なた め、最高速度も83.3 mm/sから200 mm/sへ2.4倍にできた。その結果, 100 mmの移動にかかる時間が1.70秒から0.52秒に短 縮できた。 ③ ラスター動作時間の短縮

MALDI-TOFMSの標準測定では、1ウェル内で微小移動の繰り返し(ラスター動作、図7)を行う。測定を 高スループット化するにはラスター動作の高速化が必須である。

ラスター動作はモータにとって加減速の繰り返しとなるため、回転力を強化することで加減速時間を減ら すことができる。ACサーボモータの高回転力により、ラスター動作時間を動作時間がステッピングモータの 約8分の1に短縮できた。



図7 ラスター動作時間の短縮

ラスター動作の例を示す。1ウェル内を0.2 mmピッチで9×9点移動、約0.004秒停止するラスター動作を行い、10ウェルの動作 時間を測定した。その結果、平均0.98 秒/ウェルを達成した。ステッピングモータと比較して、約8分の1の動作時間に短縮でき た。また、高精度なACサーボモータの使用により、動作位置の再現性が改善され、動作終了後のずれは2 μm以内であった。こ れはステッピングモータの約5倍の改良に相当する。

【結論】

真空装置の外にモータを設置して、真空装置内のXYステージを駆動することができた。これにより真空 装置内にモータがある場合の発熱、アウトガス等の不安要素を排除することができた。さらに、高出力な ACサーボモータを使用することで、高速なステージ移動動作やラスター動作が行えるようになり、高スルー プットMALDI-TOFMS測定が可能になった。

ACサーボモータの副次的な効果として、モータの分解能が高く高精度であるために、動作位置の再現性が改善された。これによりMALDI-TOFMS測定の安定性向上が期待できる。

【成果一覧】

特許出願

(1) 古田 匡智、真空用2軸ステージ、公開番号2012-219992

#### 2-2 機内温度安定化ユニットの開発

【研究目的】

質量分析において、出力データの精度を上げるために質量較正が重要である。また、較正後その精度を 長時間維持することも、データの連続性・信頼性という点で同様に大切である。これは自動分析にも重要な 要素である。測定値が変動する原因はいろいろとあるが、高電圧電源を多数使用しているDIT-FP機にお いては、それら電源類に多大な影響を及ぼす温度変化(電源自身の発熱や周囲温度等)がその主たるも のといえる。そこで高電圧電源の出力を安定させ、質量較正後の精度維持の時間をできる限り伸ばすため に、DIT-FP機に吸気、断熱、排熱、温度調節の観点から対策を施した。

#### 【研究成果】

方法

DIT-FP機内の温度調節を実現するために以下の課題を解決する。

#### ① DIT-FP機の吸気温度の安定化

DIT-FP機はロータリーポンプ、ターボ分子ポンプ、電磁弁、リレー、高電圧電源等を多数内蔵し、これら が大量の熱を発生させるので、装置内部の熱を外部に放出する必要がある。そのためにファンを使用して 外部から冷えた空気を導入し、内部の熱い空気を放出している。しかし外部の空気、すなわちDIT-FP機の 周囲温度が±2℃程度変動するといった問題がある。

そこでDIT-FP機内に取り込む空気の温度(吸気温度)を制御するために、DIT-FP機の外気導入口に空 気を加熱制御する吸気温度制御ユニット(以下、本項目では"本ユニット"と称す)を製作し、DIT-FP機に取 り付けた。なお、現状のDIT-FP機の改造が最小限になるように、装置背面にある外気導入口に本ユニット (図1参照)を覆い被せる方式を採用した。

本ユニットは主にコントローラ、温度センサ、ファン、パッシブヒートシンク、ヒータ、熱交換器から構成され ている(図2参照)。本ユニットの基本的な機能は、温度センサ(熱電対、測温抵抗体等)でセンシングする ポイントの温度を希望の温度(制御温度)に近づけるようにコントローラがヒータを制御する、というものであ る。

本ユニットの重要パーツは以下の2点である。

#### 熱交換器

熱交換器は第一に、ヒータ(セラミックヒータ1,500 W)で発生させた熱量を空気へ高効率に伝達する 能力が必要で、その力は熱交換器の表面積に比例するため、可能な限り大きな表面積を求められる。 第二に温度制御(ヒータのON/OFF)に対して高速に応答すること、すなわち時定数が小さいことが必要 である。時定数は質量に比例するため、熱交換器には軽量であることが求められる。

これらを満たすために、パソコンのCPUを冷却する目的で使用される高性能CPUクーラを、熱交換器 として応用することにした。採用したCPUクーラ(図2参照)は熱伝達率0.09°C/Wと優れた熱伝達能力を 持ち、重量は610 gと軽量でもある。これをヒータと接続して、冷却ではなく加熱用熱交換器として使用す る。さらにパソコンに使用されている量産品のため、短納期かつ低コストで入手可能である。

#### <u>パッシブヒートシンク</u>

予備実験の結果、短時間の小さな外気温の変化に対して、本ユニットが追従できない場合があること 判明した。そこで外気温の変動を遅くして、制御可能にするためのパッシブヒートシンクを考案した。熱容 量の大きな物質を上流側に置くことで空気の温度変化の時定数を大きくするものである。具体的には市 販のアルミブロックのヒートシンク(図2参照)を使用した。



図1 吸気温度制御ユニット(外観) DIT-FP機の背面に設置し,外気を熱交換器で加熱制御後、内部に導入する。 供給空気量:5 m<sup>3</sup>/分以上 加熱能力消費電力:最大1,500 W





コントローラ、ファン、パッシブヒートシンク、熱交換器、カバーから構成されている。
 コントローラ: C35TV0UA1000(アズビル)
 ファン: 9WB1424H501(山洋電気)
 CPUクーラ:ETS-T40-ETA(ENERMAX Technology Corp.)
 パッシブヒートシンク:124CB124 L100(リョーサン)

DIT-FP機に取り付ける前に本ユニット単体でその性能を評価した結果を図3に示す。吸気(外気)温度、 すなわち室温は±1.4℃変動しているが、本ユニットから排出される空気の変動は±0.1℃に抑えられてい る。



#### 図3 性能評価

コントローラの温度センサ(測温抵抗体Pt100 Ω)を本ユニットの空気排出口に取り付け、制御温度を25.2℃に設定した(予備 実験で室温の変動が23.2±1.5℃であったため、本ユニットの制御温度を2℃高めに設定した)。その後吸気口と排出口の温度 を24時間連続測定した。

2 断熱化

吸気温度を安定化しても、DIT-FP機を覆っているパネルは金属(アルミ)板なので、外気の温度が外部 から内部へと伝わりやすい構造となっている。そこでパネルの内側に断熱材を余すところなく貼り付けるこ とで、その影響(熱伝導)を極力減らすことにした。

さらに隣り合うパネルの間隙から外気が進入しないように、パネル同士の接合部を断熱素材のテープで 隙間なく埋めて、外気を完全に遮断した。

## ③ イオントラップモードの安定化

DIT-FP機にはP-LTOFモード、P-RTOFモード、I-TOFモードの3種類の測定モードがある。 P-LTOFモードとP-RTOFモードにおいては低消費電力、すなわちほとんど電流の流れない高電圧電源しか使用しないが、I-TOFモードにおいては他の2モードと違って高消費電力の高電圧・高周波スイッチ(HVHF-SW)を使用し、HVHF-SW用の高電圧電源(HVHF-PSU、±1 kVdc・300 mA)と合わせて常時300 Wを超える熱源が発生する。そこでI-TOFモード時のHVHF-SWとHVHF-PSUへの対抗策も講じる必要がある。

HVHF-SWは240W程度の熱風を発生させるが、その熱風をそのままDIT-FP機内で放出すると、

DIT-FP機内の温度が一気に上昇してしまう。それを避ける為にHVHF-SWの吸気口はそのままDIT-FP機内に残し、排気口側に空気の流れを90度曲げるガイドを付けて、熱風をDIT-FP機外に送り出すことにした(図4参照)。これによってHVHF-SWの発生する熱はDIT-FP機内部に影響を及ぼさなくできる。



図4 HVHF-SWの排気ガイド

次にHVHF-PSUも60 W程度の発熱源となるが、それ自体の影響は小さく、HVHF-PSUの出力電圧(± 1 kVdc)が変動することの方が精度に影響が出る。また、HVHF-PSUも吸気口を持ち、ここから内部に流入する空気のわずかな温度変化(0.5℃未満)で出力電圧が数十ppm変化することが分かってきている。そこでHVHF-PSUの吸気口をDIT-FP機内でも比較的温度変化の小さい、DIT-FP機本体の吸気口から離れた場所に設置することにした。

結果

上記の対策を実施する以前の安定度を図5に示す。測定開始から時間の経過と共に高質量側に変化していき、一日(24時間)たって今度は少しずつ低質量側に変化していく兆しを見せており、わずか30時間の短い間に±30 ppmの誤差を生じている。

これをベースに複数の試料において、±20 ppm以下の誤差を3日間(72時間)に渡って維持できること 改善目標とした。



#### 図5 改善前の連続測定

I-TOF モード(正イオン)による連続 30 時間の MS 測定(10 時間後から 23 時間後までは省略)。5 分毎に 6 種類の試料を測定し、その誤差(真値を全データの中央値とした)の時間変化をプロットした。

初めに本ユニットの温度制御を働かせず、単純に吸気だけ(すなわち換気だけ)にした。さらにDIT-FP機内の十数ヶ所に温度センサ(熱電対)を取り付け、各ポイントの温度を連続的に記録できるようにした。その上でI-TOFモード(正イオン)で高電圧を印加し、測定はせずに7日間の温度変化だけを記録した。これにより外気温度(室温)24.0±2°Cにおける、本ユニットの温度制御を働かせない場合のDIT-FP機内の各ポイントの温度変化を把握した。何故これが必要かというと、あるポイントの温度センサをコントローラに接続して本ユニットを働かせた場合、そのポイントで記録された最大温度より高い温度に制御温度を設定しないと、加熱機能だけの本ユニットは正常に動作できないからである。

次に各ポイントの温度を記録しながら、試料Angiotensin II(*m/z* 1,046.5)をI-TOFモード(正イオン)で一 日連続測定した。そのAngiotensin IIの測定値(質量値)の変化と最も相関の高い(温度上昇時に高質量側 にシフトし、温度下降時に低質量側にシフトする)ポイントの温度センサを特定し、本ユニットのコントローラ に接続した。そしてそのポイントの先に取得した7日間の最大温度より3℃高い温度を本ユニットの制御温 度(29.0℃)として設定した。

本ユニットをその制御温度で働かせ始め、DIT-FP機内が温度的に安定したと思われた後(48時間後)に、 7種類の試料を連続測定した結果を図6に示す。当初の目標を大幅に超えて、7日間(168時間)もの間、鵜 ±10 ppmの誤差に抑えることができた。



図6 改善後の連続測定

I-TOFモード(正イオン)による連続168時間(7日間)のMS測定。20分毎に7種類の試料を測定し、その誤差(真値を全データの 中央値とした)の時間変化をプロットした。外気温度(室温)は24.0±2℃。本ユニットの制御温度は29.0℃。

【結論】

DIT-FP機の高安定化を目指してDIT-FP機内部の温度制御を実施したことで、±10 ppm以下の誤差を 7日間も維持したまま、連続使用できることが可能となった。

【成果一覧】

特許出願

(1) 古田匡智、乾公隆、空気温度安定装置及びそれを用いた分析装置、出願番号2013-002361

### 2-3 MALDI-TOFMSにおける新規遅延パルス引き出し法

【研究目的】

MALDIによってイオン化した試料をそのまま加速して飛行時間の測定を行い、質量を計測する MALDI-TOFMSではイオン化時に初期運動エネルギーのばらつきが発生し、飛行時間のピーク幅が広が ってしまう。そのため、エネルギー補償のために遅延パルス引き出し法がMALDI-TOFMSでは一般的に用 いられ、分解能を向上させている。

しかしながら、この手法によって分解能が向上する質量範囲は狭く、そのために広い質量範囲を測定す る場合は遅延パルスの条件を変えながら複数回測定する必要が生じる。

そこで、スループット向上のために、より広い質量範囲拡大で分解能が向上する新規遅延パルス引き出し 法の開発を行った。



#### 図1 従来の遅延パルス引出法によるエネルギー補償

MALDIによるイオン化は狭い空間領域で広い初速の分布をもってイオンが発生する。そのため、パルス電圧によるエネルギー 補償を行うために従来法ではイオン発生直後は一定時間の間、イオンを自由飛行させて空間分布が広がるのを待ち、パルス 電圧を印加する。しかしながら、初速の分布はm/zによらずに一定であるため、運動エネルギーはm/zに比例し、必要なエネル ギー補償も同様である。一方、自由飛行後の空間分布は初速の分布が等しいため、m/zによらず一定となる。そのため、あるパ ルス電圧によるエネルギー補償は特定のm/zとその近傍のイオンのみ有効で、パルス電圧が小さいとm/zが大きいイオンに対 してエネルギー補償が不足し、パルス電圧が大きいとm/zが小さいイオンに対してエネルギー補償が過剰となる。

#### 【研究成果】

方法

遅延パルス引き出し法とは発生したイオンを一定時間自由飛行させ、イオンの分布が広がったところで パルス電圧を印加してエネルギー補償を行う手法である。これは、イオン化が非常に小さい領域で起こり、 かつ発生したイオンは大きな速度分布を持つというMALDIの特徴に対してTOFでの分解能を向上させるた めに用いられる。



図2 改良法1 初期電場による質量分離

イオン発生前から加速電場よりも勾配の小さい電場をイオン源付近に発生させておく。そうすると、イオンはm/zに応じて加速さ れるため、一定時間経過後にはm/zごとに空間分布が分かれ、重いイオンほど試料プレート近傍に存在する。この状態でも初速 によるエネルギーのばらつきはあるので、パルス電圧を印加することでエネルギー補償を行う。この時、試料プレートに近いほど 大きなエネルギー補償を受けることが出来るので、加速の遅い重いイオンほど大きいエネルギーを受け取ることになる。その結 果、それぞれの質量に適したエネルギー補償を受けることが出来、検出面で飛行時間の収束する質量範囲が従来法に比べて 広がる。

しかしながら、MALDIによるイオン化にはイオンの初期速度は質量に依存せずに一定の速度となるというもう一つの特徴を持つ。そのため、パルス電圧印可時のイオンの空間分布も質量によらない。だが、運動 エネルギーは速度が同じ場合は質量に比例して増加するため、必要とする初期エネルギーの補償も質量 に比例して大きくなる。したがって、パルス電圧によるエネルギー補償は印加電圧や遅延時間などの条件 が最適となる質量を中心とした狭い範囲でしか分解能向上の効果が得られない。

例えば、図1にあるようにパルス電圧が小さい場合は軽いイオンしか飛行時間は収束出来ず、大きなパルス電圧を印加する場合は、重いイオンしか時間収束出来ない。そこで図2に示すような改良を行った。イオンが発生する前から加速電場に比べて緩やかな勾配の電場を引き出し領域に印加しておき、一定時間の間イオンを飛行させることでイオンの空間分布を質量に応じて分離し、その後にパルス電圧を印加する事で質量毎に応じて受けるエネルギー補償が大きくなり、より広い質量範囲で飛行時間を収束するようになる。

また、図3のように新たな引き出し電極の追加も行い、さらなる質量範囲の拡大を行った(改良法2)。これは補償に必要なエネルギーは無限大に発散し、理想的なパルス電圧の電位も無限大に発散し、その分 布の電位形状は曲線状になるからである。

そのため、より広い範囲でこの曲線を近似するために第二引き出し電極を追加した。これにより、パルス 電圧の電位分布は折れ線状に変化させることが出来て、理想的な電位分布の近似領域は拡大され、時間 収束する質量領域もさらに広がる。

以上の従来法、初期電場による質量分離を行う手法(改良法1)、それに加えて折れ線状のパルス電圧 を印加する手法(改良法2)を用いた実験を行い、質量範囲の比較を行った。



図3 改良法2 理想的なパルス電圧の折れ線による近似

イオンは重くなるほど加速されにくく、m/zが無限大ではほとんど加速されず、時間t<sub>0</sub> 経過後も速度変化が無いために初速のまま 飛行し、x = v<sub>0</sub>t<sub>0</sub>に存在する。そのため、ある位置に存在するイオンのm/zはx = v<sub>0</sub>t<sub>0</sub>に向かって発散し、エネルギー補償に必要な パルス電圧の電位も同様にx = v<sub>0</sub>t<sub>0</sub>に向かって発散することになる。したがって、全ての質量のイオンのエネルギー補償が行える パルス電圧は図に示したようにx = v<sub>0</sub>t<sub>0</sub>で無限大に発散する曲線となる。しかしながら、二電極間の電位変化は直線状となる。そ のため、改良法1だけで時間収束する場所は理想的な電位分布を直線で近似した区間だけとなる。そこで、引き出し領域に第二 引出電極を追加し、折れ線によって理想的な曲線の電位分布を近似した。これによって、適切なエネルギー補償が行われる空 間を広げられ、その結果、適切なエネルギー補償が受けられる質量範囲も広がる。



#### 図4 遅延引出法の比較実験概略図

従来法、改良法1、2の高分解能が得られる質量範囲について図に示した全長およそ1.2 mのリニアTOFMSで比較を行った。従 来法および改良法1については試料プレートから第一引き出し電極までを引き出し領域として扱い、それより先の第一引き出し 電極~第二引き出し電極~加速電極の間を加速領域とした。一方、改良法2では折れ線状のパルス電位を作り出すために試料 プレート~第一引き出し電極~第二引き出し電極の間を引き出し領域とし、第二引き出し電極と加速電極の間を加速領域とし た。加速電圧はおよそ18 kVとした。 結果

図4に示したリニアTOFMSの系で評価実験を行った。図5はその結果を示しており、それぞれの引き出し 方法を用いた時の各ピークの分解能を示している。高い分解能が得られる範囲は、従来法に対して改良法 1では約1.5倍に、改良法2では約2.5倍になった。



図5 それぞれの引き出し方法を用いた場合の各PMMAの分解能

図4で示した系でPoly(methyl methacrylate)(PMMA, Mw: 2,540, Mn: 2,310)を測定した結果を示している。従来法では分解 能3,000を超えた質量範囲は1,400 Da ~ 2,700 Daの間の1,300 Daの幅になり、分解能が5,000を超えたピークは無かった。 それに対して、改良法1では800 Da ~ 2,900 Daの2,100 Daの幅と範囲は1.5倍以上になっている。さらに改良法2では1,000 Da ~ 4,200 Daの3,200 Daの幅で範囲は約2.5倍になっている。また、どちらの場合もほとんどの点で分解能は5,000を超え た。

# 【結論】

遅延パルス引き出し法を改良することによって、分解能が向上する質量範囲を従来法よりも2.5倍広くすることが出来た。これにより、一度に広い質量範囲で測定データを取得することが可能になり、スループットを向上することが出来る。

### 【成果一覧】

# 学会発表

- (1) Kei Kodera, Sadanori Sekiya, Makoto Hazama, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka."Improvement of MALDI-TOFMS Ion Source for Higher Resolving Power over Wider Mass Range", 61<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2013
- (2)小寺慶、小林俊則、関谷禎規、狭間一、岩本慎一、田中耕一「MALDI-TOFMSにおける高分解能質 量範囲拡大のための新規遅延引き出し法」、第61回質量分析総合討論会、2013年

### 特許出願

- (1) 小寺慶、飛行時間型質量分析装置、公開番号2011-175898
- (2) 小寺慶、飛行時間型質量分析装置、公開番号2013-041699

### 2-4 MALDIスィートスポット自動探索機能の開発

【研究目的】

MALDI-MSでは、試料プレート上に分画されたウェルと呼ばれる領域に試料を滴下し、イオン化用レー ザーを試料領域の一部分に照射して質量分析を行う。測定時のレーザー照射位置の決定は、測定者がレ ーザー照射位置を変化させながら予備測定(プリスキャン)を行い、得られた信号強度及び信号の持続性 に基づいて判断することが一般的である。これは、MALDI用に調製された試料では、測定対象物質が試料 内に不均一に局在化し、測定対象物質が存在する位置(スィートスポット)が目視では判断できないことに 起因する。このため、MALDI-MSで得られるスペクトルが測定者の操作に依存するためにデータの再現性 が低下する場合がある。

この問題を解決するためにMALDI-MSには通常ラスター測定と呼ばれる機能が搭載されている。ラスタ ー測定では、試料領域内で機械的に予め設定した多数の測定点の各点において規定回数のレーザー照 射を行って、それら全ての測定データを積算することによって最終測定データを導出する測定手法である。 ラスター測定を行うことにより測定者の恣意的な判断が関与せず、再現性の高いデータが得られる。ただし、 ラスター測定ではできる限り多数の点を測定することが必要であり、測定スループットが低下する場合があ る。

そこで本開発では、測定オペレータの操作手順に依存せずに高スループット・高感度及び高い再現性で データ取得を可能にするために、画像認識機能及びスィートスポット探索機能を持つ制御ソフトウェアの開 発を行った。

#### 【研究成果】

方法

### ① 試料領域の取得

CCDカメラから取得される試料領域の画像から試料が滴下された領域をソフトウェアが自動取得を行う。 液体マトリックスなど画像の輝度情報だけでは認識が難しい場合は、カラー情報も併用して領域の取得を 行う。図1に画像認識の動作例を示す。矩形枠内に試料が存在することを画像認識によりソフトウェアが判 定している。画像認識では試料の輝度や輝度の密集度などから試料領域を判定する。



#### 図1 画像認識動作例

ウェル上に滴下された試料の形状及び位置は使用するマトリックス及び試料プレートの組み合わせによって大きく異な り、同一の組み合わせでも滴下毎に変化する。画像認識機能では、マトリックス及び試料プレートの組み合わせをユーザ が指定することで、予め登録された各組み合わせにおける一般的な試料の形状を元にソフトウェアが自動的に滴下領域を 自動判別する。 ② 高速プリスキャンによるスィートスポット探索

上記①で得られた試料領域からスィートスポットを探索するために、プリスキャンを行う。ただし、従来技術ではプリスキャンを実施することにより全体的な測定スループットが低下することが問題となっていた。そこで本ソフトウェアでは、測定速度が比較的低速(約20 Hz)であるI-TOFモードの測定時でも、DIT-FP機の特徴の一つである1 kHzの高速P-LTOFモードを利用してプリスキャンを行うことでその問題点を解決した。プリスキャンでは各点数ショットの測定を行い、得られたピーク強度から各点の順位付けを行う。順位が上位の点をスィートスポットとして判定する。図2に動作例を示す。試料領域端に測定対象物質が局在化していることが分かる。



元画像



スィートスポット探索結果

図2 スィートスポット探索結果の表示画面

スィートスポットの探索結果をHSV色空間で表現したものである。認識結果はリアルタイムで装置制御ソフトウェア上に表示される。

③ スィートスポットでの実測定

実測定では、上記②で探索されたスィートスポットでのみ測定を行う。スィートスポット情報は測定ウェル 毎に保存されており、各ポイントでのレーザーショット数なども全て記録される。これにより、規定のショット が照射されたポイントでは随時プリスキャンを再度行うことで、常に最新のスィートスポット情報に基づいて 実測定を行う。

結果

上記のアルゴリズム(AutoQuality)を用いて得られた測定スペクトルを図3に示す。図3(a)はスィートス ポット探索を行わずに機械的に選択した試料領域上の121点の積算平均の結果であり、図3(b)はスィート スポット探索の上位10点の積算平均、図3(c)は上位11~20位、図3(d)は上位21~40位のデータである。 スィートスポット探索により得られた上位10点のデータのみを積算することで、試料全領域を測定積算した 場合と比較して、信号強度が5倍向上することが確認できた。信号強度の増加に加えて、スィートスポット探 索の結果を用いた方が測定点数は通常のラスター測定よりも減少するために測定時間は約10分の1に短 縮された(データ省略)。

図4はスィートスポット探索により得られた信号強度を横軸に、各点64ショットの実測定を行った強度を縦軸に示したデータである。スィートスポット探索と実測定の相関係数を算出したところ、100 amol~1 fmolの

試料量において相関係数0.6が得られた。本装置の測定限界試料量の仕様値が50 amolであることから、 測定限界に近い試料量でもP-TOFモードを用いた高速プリスキャンにより実測定と相関を持ったスィートス ポット探索が行えることが確認された。

図5に同一の測定ウェルを複数回測定して得られた信号強度とその変動係数を示す。図中の斜線棒グ ラフは通常のラスター機能の結果を、塗り潰された棒グラフはAutoQuality機能の結果を示している。横軸 は試料プレートのウェル番号を示しており、各ウェルには同一量の試料とマトリックスが滴下されている。そ れぞれのウェルにおいて独立した10回の測定を行い、信号強度とその変動係数を得た。各測定では試料 領域上の8点を選択して各点32ショットの積算平均を得た。図5(a)は各ウェルで行った10回分の信号強度 の平均値を示している。ラスター機能では平均6.5 mV、AutoQuality機能ではその2.5倍の平均16 mVが 得られた。これは図3の結果と同様にAutoQuality機能を用いることで平均信号強度が向上することを示し ている。図5(b)は10回分の信号強度の標準偏差を平均値で割った値(変動係数)を示している。ラスター 機能では0.76、AutoQuality機能では0.6が得られており、AutoQualty機能を用いることで変動係数が80% 以下に抑えられている。これは通常のラスター機能では、レーザー照射位置が機械的に選択されるため試 料の存在しない領域での測定結果も信号値に積算され測定結果が過小評価される。AutoQuality機能で は試料領域上のスィートスポットのみで測定を行うことで、過小評価の影響を排除できたため変動係数が 改善したと考えられる。



# 図3 AutoQuality機能による感度の向上

ステンレス試料プレートにマトリックスDHBを用いて、Glufibペプチド100 amolを滴下した試料の測定結果である。(a)は格子状 に選択した試料領域上の121点の積算平均、(b)はスィートスポット探索の上位10点の積算平均、(c)は上位11~20位、(d) は上位21~40位のデータである。本装置の検出限界試料量が50 amolであり、検出限界近くの試料量においても、スィートス ポット探索機能により積算平均後の強度が5倍程度増加することが分かる。



図4 スィートスポット探索による実測定データとの相関性

スィートスポット探索により得られた信号強度を横軸に、各点64ショットの実測定を行った強度を縦軸に示したデータである。スィートスポット探索と実測定の相関係数を算出したところ、100 amol~1 fmolのサンプル量において相関係数0.6が得られ、検出限界近くでもスィートスポット探索の結果が実測定の値を反映することを確認した。





同一の測定ウェルを複数回測定して得られた信号強度とその変動係数を、ラスター機能とAutoQuality機能で比較した結果で ある。横軸は試料プレートのウェル番号を示しており、各ウェルには同一量の試料とマトリックスが滴下されている。(a)は各ウ ェルで行った10回分の信号強度の平均値を、(b)は10回分の信号強度の標準偏差を平均値で割った値(変動係数)を示してい る。測定ではステンレスプレートを使用して、テスト試料としてAngiotensin II(マトリックスDHB)を用いた。 【結論】

AutoQuality機能をDIT-FP装置制御ソフトウェアに搭載することで以下の性能を実現した。

①従来のラスター機能を用いるよりもAutoQuality機能を用いることで、より少ない測定時間(測定点)で高 い平均信号強度の測定が行えることを確認した。実施例として、121点のラスター測定では、プリスキャン により得られた上位10点のスィートスポットの測定により約5倍の平均積算信号が得られた。

②測定限界に近い試料量においても、P-TOFモードを用いた高速プリスキャンにより0.6以上の相関係数 を持ったスィートスポット探索が行えることが確認された。これにより検出限界近くの試料用においても AutoQuality機能が適用可能であることが示された。

③AutoQuality機能を用いることにより、通常のラスター測定による信号強度の変動係数を80%以下に改善できることが確認できた。これは、試料領域上のスィートスポットのみで測定を行うことで、測定対象物質の存在しない箇所での測定による過小評価の影響を排除できたためであると考えられる。スィートスポットの分布は試料毎に大きく変化するため、本機能を用いることで試料の状態に強く依存しない再現性の高い測定が行えることが示された。

### 【成果一覧】

# 学会発表

(1) Masaki Murase, Hidenori Takahashi, Yosihiro Yamada, Sadanori Sekiya, Shigeki Kajihara, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka. "Data-dependent acquisition system for N-linked glycopeptides using MALDI-DIT-TOF MS", 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012

### 2-5 MALDIイオン源電圧自動最適化機能の開発

【研究目的】

3Dイオントラップにイオンを導入する場合、異なる質量のイオンは飛行速度が異なることから、異なるタ イミングでイオントラップ内に到着しイオントラップ内を飛行後に排出される。このため、3Dイオントラップ内 に同時に捕捉することができる質量範囲はイオントラップのサイズ及び飛行速度などにより制約を受ける。

今回開発した「最適化試料プレート電圧自動設定機能」は、各質量のイオンが高効率でイオントラップに 捕捉される装置パラメータを予め設定しておくことで、測定時に最適化したい質量に対して適した装置パラ メータが自動的に設定される機能である。これにより、測定感度の向上が実現できる。

【研究成果】

方法

装置の据え付け時に各質量イオンが最も導入される試料プレート電圧を装置に登録する(図1)。測定者がMS<sup>n</sup>測定を行う際に、プリカーサイオンの質量に最適化した装置パラメータが自動的に装置に設定される。

校正表:

	Mass	Volt
	0.00	10.00
	1047.00	10.00
	2465.00	13.00
•	3665.00	20.00

#### 図1 パラメータ設定表

最適化したい質量値に対する試料プレート電圧のリストを装置に登録する。これにより測定者がMS<sup>n</sup>測定 を行う際に、プリカーサイオンの質量に最適化した装置パラメータが自動的に装置に設定される.

結果

図2に本機能使用時と未使用時の1,047~2,465 Daの質量範囲における信号強度の比較結果を示す。 横軸が測定ピークの質量であり、縦軸はピーク強度を示している。本機能を用いることにより最大2.2倍の 信号強度の増加が得られることが分かる。特に1,047 Daのピークの強度が大きく増加しているが、これは 機能未使用時の装置パラメータ設定が、測定質量範囲の中心(1,500 Da付近)に最適化されていたためで ある。

図3に本機能の使用時と未使用時における積算回数に対するS/N比の変化を示す。横軸が積算回数を 示しており、縦軸がS/N比を示している。本機能(プロット●)を用いることで未使用時(プロット▲)と比較して 30%程度の積算回数で同程度のS/N比を持つスペクトルが得られることが分かる。一般に、MS<sup>n</sup>測定の段 数が進むに従ってプリカーサイオンの強度が減少するために、有意なスペクトルを得るために必要な測定 積算回数は増加し、測定スループットが悪化する。本機能を用いることで、図3に示したように少ない積算 回数で有意なスペクトルが得られることから、測定スループットの向上に加えて、少ない試料消費量で測定 が可能であることが分かる。



#### 図2「最適化試料プレート電圧自動設定機能」を使用時と未使用時の信号強度比較 「最適化試料プレート電圧自動設定機能」を使用時と未使用時における、各質量値ピーク強度の変化を示している。プロット●は本 機能を使用時の結果であり、▲は使用しない場合の結果である。測定ではステンレスプレート、マトリックスにCHCAを使用した。 テスト試料としてAngiotensin II(1,046.5 Da)、Glufib(1,570 Da), Renin Substrate(1,800.9 Da)、ACTH1-17(2,093.1 Da)、 ACTH18-39(2,465.2 Da)を用いた。機能未使用時の試料プレート電圧は30 Vに設定した。



図3 積算回数に対する信号S/N比の変化

「最適化サンプルプレート電圧自動設定機能」を使用時と未使用時における、積算回数に対するスペクトルのS/N比の変化を示している。プロット●は本機能を使用時の結果であり、▲は使用しない場合の結果である。測定ではステンレスプレート、マトリックスに CHCAを使用した。テスト試料としてAngiotensin II(1,046.5 Da)を用いた。

両データともに積算回数が70回程度までS/N比の増加率は緩やかであり、積算回数が250回程度までS/N比は積算回数と共に 大きく増加する。積算回数が250回を超えたあたりからS/N比の増加率が再び緩やかになる。MALDIによるイオン化では、レーザ ーの照射回数(積算回数)と共に信号強度が強まり試料が枯渇していくと信号強度が弱まるような山型の特性を持つことがある。 今回の測定でも、積算回数に対して山型の信号強度特性を示したために、積算回数に応じてS/N比の増加率が測定結果のように 変化したと考えられる。

【結論】

「試料プレート電圧最適化機能」をDIT-FP装置制御ソフトウェアに搭載することで、従来法と比較して最 大2.2倍の信号強度が得られることを確認した。本機能の効果として、信号強度の増加により検出限界が 向上するだけでなく、少ない積算回数で有意なスペクトルを取得することが可能になり、測定時間の短縮及 び試料枯渇の軽減につながることを確認した。

【成果一覧】

特許出願

(1) 関谷禎規、小林俊則、MALDIイオントラップ質量分析装置、出願番号2013-092636