

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4766549号
(P4766549)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日(2011.6.24)

(51) Int. Cl.	F 1		
HO 1 J 49/10 (2006.01)	HO 1 J 49/10		
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62		K
GO 1 N 27/64 (2006.01)	GO 1 N 27/64		B
HO 1 J 49/40 (2006.01)	HO 1 J 49/40		
HO 1 J 49/42 (2006.01)	HO 1 J 49/42		

請求項の数 3 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2005-247134 (P2005-247134)	(73) 特許権者	000001993
(22) 出願日	平成17年8月29日 (2005.8.29)		株式会社島津製作所
(65) 公開番号	特開2007-66533 (P2007-66533A)		京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
(43) 公開日	平成19年3月15日 (2007.3.15)	(73) 特許権者	504261077
審査請求日	平成20年8月26日 (2008.8.26)		大学共同利用機関法人自然科学研究機構
			東京都三鷹市大沢二丁目2番1号
特許法第30条第1項適用	独立行政法人日本学術振興会	(74) 代理人	110001069
マイクロービームアナリシス第141委員会	第11		特許業務法人京都国際特許事務所
9回研究会資料、平成17年3月1日発行	日本質量分析学会	(74) 代理人	100095670
第53回質量分析総合討論会(2005)	講演要旨集、2005年5月25日発行		弁理士 小林 良平
		(72) 発明者	小河 潔
			京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーザー照射質量分析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

照射位置を制御しながら試料に繰り返しレーザーを照射し、そこで生成された試料のイオンを質量分析して、試料の位置情報とその位置における質量分析情報を得ることにより、質量分析情報の2次元像を得るレーザー照射質量分析装置において、

前記レーザーの照射位置を順次移動させるためにステージを移動する及び/又はレーザー光を走査する機構と、

前記機構により、前記レーザーの照射位置を順次移動させるごとに質量分析を行う計測・制御部とを備え、

該イオンの質量分析に、周波数駆動型イオントラップと飛行時間型質量分析装置を用いることを特徴とするレーザー照射質量分析装置。

【請求項2】

周波数駆動型イオントラップの駆動方式としてデジタル駆動方式を用いることを特徴とする請求項1に記載のレーザー照射質量分析装置。

【請求項3】

飛行時間型質量分析装置にマルチターン型飛行時間質量分析装置を用いることを特徴とする請求項1又は2に記載のレーザー照射質量分析装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レーザー光を試料に照射してイオン化を行うイオン源を備える質量分析装置、具体的には、レーザー脱離イオン化法(LDI=Laser Desorption / Ionization)やマトリクス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI=Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization)によるイオン源を備える質量分析装置に関する。これらの装置の典型的な応用例は、顕微質量分析装置や質量分析顕微鏡である。

【背景技術】

【0002】

レーザー脱離イオン化法(LDI)は、試料にレーザー光を照射し、レーザー光を吸収した物質の内部で電荷の移動を促進させてイオン化を行うものである。また、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)は、レーザー光を吸収しにくい試料やタンパク質などレーザー光で損傷を受けやすい試料を分析するために、レーザー光を吸収し易くイオン化し易い物質をマトリクスとして試料に予め混合しておき、これにレーザー光を照射することで試料をイオン化するものである。特にMALDIを用いた質量分析装置は、分子量の大きな高分子化合物をあまり開裂させることなく分析することが可能であり、しかも微量分析にも好適であることから、近年、生命科学などの分野で広範に利用されている。なお、本明細書では、LDIやMALDIによるイオン源を備える質量分析装置を総称して、LDI/MALDI-MSと記すこととする。

10

【0003】

顕微質量分析装置及び質量分析顕微鏡は、異なる概念に基づいて製作されるものである。顕微質量分析装置は、顕微鏡にて光学的に試料の顕微像を観察し、その観察像で特定の質量分析位置を決定して、その箇所での質量分析を行うというもので、光学観察結果を用いて質量分析を行うというものである。一方、質量分析顕微鏡は、質量分析により得られた信号を用いて試料の微細な2次元像を得るというもので、顕微鏡像の組織識別手段として質量分析の結果を用いるというものである。

20

いずれにせよ、上記LDI/MALDI-MSを用いる場合、照射レーザー光のスポット径を微小に絞ることにより、微小部分での質量分析を行うことができ、また、高解像度の質量分析顕微鏡像を得ることができる(非特許文献1、特許文献1)。

【0004】

本出願では、これらをまとめて顕微質量分析装置と呼ぶ。

【0005】

従来の顕微質量分析装置の構成の一例を図1に示す。オペレータはCCD11又は接眼レンズで試料12を観察し、観察像から質量分析箇所を決定する。そして、分析開始操作を行うことにより、レーザー光源13からレーザーパルスが試料12のその箇所に照射される。すなわち、観察光学系とレーザー照射光学系は、そのような位置関係となるように設定されている。

30

【0006】

なお、観察時に1点だけを決め、質量分析はその点のみで行うこともあるし、観察時に広がりのある領域(単一領域又は複数に亘る領域)を決めておき、分析時にはその領域内でレーザー光を走査して、その領域内の試料の面分析を行うこともある。また、レーザー光の照射位置を線(直線、曲線)状に移動させ、ラインプロファイルをとる場合もある。

40

【0007】

レーザー光が照射された箇所では試料がイオン化し、生成されたイオン14がイオンガイド15に導かれて質量分析部16に入る。ここで質量分析を行うことにより、レーザー照射箇所の質量分析プロファイルを得ることができる。

【0008】

図1には試料12の分析箇所の正確な位置関係を観察することができる光学系を備えた装置の例を示したが、必ずしもきちんとした光学観察系がなくとも顕微質量分析を行うことができる。すなわち、目視或いは簡便な光学観察手段だけで試料へのレーザー照射位置を確認し、その後、ステージを移動させながら、或いはレーザー照射位置を移動させながら質量分析を行うことにより、2次元的な質量分析情報を得ることができる。すなわち、

50

顕微質量分析を行うことができる。

【 0 0 0 9 】

質量分解能の高い質量分析を行おうとする場合、質量分析部 1 6 には飛行時間型質量分析装置 (Time Of Flight Mass Spectrometer = T O F M S) を用いることが望ましい。T O F M S では、加速されたイオンが一定距離を飛行する時間がそのイオンの質量に依存することを利用して分析を行う。すなわち、イオンを所定の位置から一斉にスタートさせ、各イオンが所定の長さの空間を飛行して、検出器により検出される時間を測定する。試料に照射されるレーザー光は非常に短いパルス状とされているものの、それにより放出される多数のイオンの位置及び初速は必ずしも揃っていないため、従来は図 1 に示すような直交加速型 T O F M S を用いていた。直交加速型 T O F M S では、生成されたイオン 1 4 の飛行方向に対して直交する方向に加速電圧を印加することにより、検出器 1 7 に対してはほぼ定まった位置からイオンの飛行をスタートさせる。なお、図 1 では反射型 (リフレクトロン型) の T O F M S を用いているが、これはもちろん一方向型 (リニア型) のものでもよい。

10

【 0 0 1 0 】

【特許文献 1】米国特許第 5808300 号公報

【特許文献 2】特表 2003-512702 号公報

【非特許文献 1】内藤康秀「生体試料を対象にした質量顕微鏡」, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., Vol. 53, No. 3, 2005, pp. 125-132.

【非特許文献 2】豊田岐聡他「マルチターン飛行時間型質量分析計『MULTUM Linear plus』の開発」, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., Vol. 48, No. 5, 2000, pp. 312-317.

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 1 】

イメージング質量分析や顕微質量分析では、生体組織や生体細胞内の成分の分析が大きな目的の一つとなっている。特に生体内試料のタンパク質や糖類の分析のニーズが大きい。このようなタンパク質や糖などの分析を行う際には、イオン化したイオンを衝突誘起型開裂法 (Collision Induced Dissociation = C I D) などの方法で開裂させてフラグメントイオン (子イオン) を生成し、そのフラグメントイオンを分析する M S / M S 分析が有効である。このフラグメントの生成には、イオントラップ装置の利用がきわめて有効である。イオントラップを用いれば、単なる M S / M S ばかりではなく、更に開裂を繰り返す M Sⁿ も可能となる。

30

【 0 0 1 2 】

イオントラップはそれ自身が質量分析機能を持つが、それだけでは高い質量分解能を得ることは難しい。そこで、M S / M S (M Sⁿ) 解析を行いつつ、分解能の高い質量分析を行うため、図 2 に示すように、イオントラップ 2 1 の後段に T O F M S 2 2 を配置することが有効である。図 3 に示すように、イオントラップ 2 1 では、リング電極 2 1 1 に印加された高周波電圧によりイオンが内部空間に一旦蓄積され、2 つのエンドキャップ電極 2 1 2、2 1 3 に印加された直流電圧により一斉に外部に排出される。この排出のタイミングを後段の T O F M S 2 2 の飛行スタートのタイミングとすることにより、高い分解能の質量スペクトルを得ることができる。これは、M Sⁿ 分析ではない通常の M S 分析にも適用できる。

40

【 0 0 1 3 】

このようにイオントラップ 2 1 と T O F M S 2 2 を組み合わせることにより、効率の良い M Sⁿ 分析を行うことができるとともに、通常の M S 分析と M Sⁿ 分析を共に高い分解能で行うことができる。顕微質量分析装置ではないが、このようなイオントラップと T O F M S を組み合わせた図 2 に示すようなレーザー質量分析装置は既の実現されている。

【 0 0 1 4 】

しかし、従来のこのような装置において、イオントラップ内にイオンを蓄積・排出する等のイオンの操作は、イオントラップのリング電極に印加する電圧を変化させることによ

50

り行われていた。この方式では、大きい質量を持つ（高い質量／電荷比を持つ）イオンをトラップするためには、高い電圧を有する高周波電圧をリング電極に印加する必要がある。しかし、高い高周波電圧を生成するためには大きな電源が必要となり、また、放電の問題も生ずる。そのため、従来のこのような装置では高い質量数のイオンはトラップすることができないという制約があった。

【 0 0 1 5 】

前記の通り、顕微質量分析やイメージング質量分析では生体試料に対する質量分析の要望が高まっているが、生体試料を分析する場合、試料をそのまま試料台に置いて分析することになる。この場合、酵素による消化なども行いにくいいため、イオントラップにおいて高い質量数の試料を分析することが強く望まれている。

10

【 0 0 1 6 】

従来の装置ではこのようなイオントラップにおけるトラップ可能質量範囲の問題の他に、質量分解能の問題も存在する。従来のリニア型TOFMSやリフレクトロン型TOFMSでは、質量数の分解能は10000程度であるが、タンパク質などでは数万以上の分子量をもつものも多数存在する。このため、生体組織や生体細胞内の成分を高い精度で質量分析する場合、従来の装置では十分な分析を行うことができないという問題がある。

【 0 0 1 7 】

本発明が解決しようとする課題は、これらの問題を解決した、特に生体試料を分析するに適したレーザー照射質量分析装置を提供することである。

【課題を解決するための手段】

20

【 0 0 1 8 】

上記課題を解決するために成された本発明は、照射位置を制御しながら試料に繰り返しレーザーを照射し、そこで生成された試料のイオンを質量分析して、試料の位置情報とその位置における質量分析情報を得ることにより、質量分析情報の2次元像を得るレーザー照射質量分析装置において、

前記レーザーの照射位置を順次移動させるためにステージを移動する及び／又はレーザー光を走査する機構と、

前記機構により、前記レーザーの照射位置を順次移動させるごとに質量分析を行う計測・制御部とを備え、

該イオンの質量分析に、周波数駆動型イオントラップと飛行時間型質量分析装置を用いることを特徴とする。

30

【 0 0 1 9 】

なお、この周波数駆動型イオントラップの駆動方式には、デジタル駆動方式を用いることが望ましい。

【 0 0 2 0 】

また、ここで用いる飛行時間型質量分析装置は、マルチターン型飛行時間質量分析装置とすることが望ましい。

【発明の効果】**【 0 0 2 1 】**

本発明に係るレーザー照射質量分析装置では周波数駆動型イオントラップを用いることから、高い質量数のイオンをトラップするために高周波電圧の電圧値を上げる必要がなく、その周波数のみを制御すればよい（具体的には、高い質量数ほど周波数を低くする）。このため、大きな高周波電源を用意する必要がなく、また放電の心配もないことから、容易に高分子量試料分析用の質量分析装置を作製することができる。このようなイオントラップの周波数制御には、デジタル駆動方式を用いるのが最も適している。

40

【 0 0 2 2 】

また、マルチターン型飛行時間質量分析装置を用いることにより質量分解能を飛躍的に高めることができ、高分子量の試料を更に、高分解能で分析することができるようになる。すなわち、タンパク質や糖類などの試料について、高精度で顕微質量分析やイメージ質量分析を行うことが可能となる。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

本発明の一実施例である顕微質量分析装置を図4に示す。この顕微質量分析装置は、イオントラップにデジタル回路による周波数駆動方式のものを用い、飛行時間型質量分析装置としてリフレクトロン型のものを用いたものである。試料の観察、レーザー照射及び移動（走査）の部分は図1、図2に示した従来の装置と同様であるため説明を省略し、ここではレーザー照射で生成されたイオンの動きについて説明する。

【0024】

照射箇所が発生した試料のイオンは、試料室と質量分析室の圧力差やイオンガイドの電界により質量分析室のイオントラップに導入される。このとき、イオントラップにおいても、イオンを導入し、内部空間に保持（トラップ）するための電圧が各電極に印加されている。前記の通り、本実施例ではこのイオントラップには周波数駆動型のものを使用し、図5(b)又は(c)に示すようなデジタル駆動回路を用いて生成した図5(a)に示すような波形を有する高周波電圧をリング電極に印加する。このデジタル駆動回路では、リング電極に印加する電圧の大きさは、2つのDC電源（DC P/S）の電圧V1、V2の大きさにより定められているが、その周波数は、各電圧の印加時間W1、W2を任意に設定することにより、自由に設定することができる。従って、図8に示すイオンの安定領域S条件をイオントラップ内で実現するために、従来のように高周波電圧の大きさで制御するのではなく、周波数を制御することにより行うことができる。

【0025】

具体的には、従来の電圧制御方式では、高い質量数のイオンをトラップするためには高い電圧（高周波電圧）が必要であったが、周波数駆動方式のイオントラップでは、周波数を低くするほど高い質量数のイオンをトラップすることができる。高電圧の生成には前述のような問題があったが、周波数制御は図5(b)(c)等のような小型且つ安価なデジタル駆動回路により容易に行うことができるため、高質量数のイオンをトラップすることが可能となる。従って、試料として生体試料をそのまま用いた場合にも、タンパク質や糖類等の大きな分子量のイオンをそのままトラップすることができ、生体試料に関する豊富な情報を得ることができるようになる。

【0026】

イオントラップにトラップされたイオンは、場合によってはCIDによりフラグメント化が行われる。

【0027】

イオントラップにトラップされているイオンは、2つのエンドキャップ電極の間に直流の高電圧を印加することにより一斉に引き出され、後段の飛行時間型質量分析装置に導入される。導入されたイオンは長い無電界飛行空間を自由飛行し、他端に設けられた反射器（リフレクトロン）により反射されて再び飛行空間を飛行して検出器に入る。イオントラップから放出された時刻と検出器により検出される時刻の間の飛行時間が各イオンの質量数に依存することから、検出器による検出時刻から検出されたイオンの質量数が求められる。

【0028】

ここで、イオントラップの引き出し口（出口）から遠い位置にあるイオンはそこに到達するまでのより長い時間加速され、出口に近い位置にあるイオンは加速時間が短いため、イオントラップから引き出されたイオンは空間的・時間的なフォーカシングが行われる。このフォーカス点を後段のリフレクトロン型飛行時間質量分析装置の入口側のフォーカス点に一致させておくことにより、リフレクトロン型飛行時間質量分析装置の検出器においても時間フォーカスができるため、高い質量分解能を実現することができる。

【0029】

本発明の別の実施例である顕微質量分析装置を図6に示す。この顕微質量分析装置は、イオントラップの駆動回路に前記実施例と同様、デジタル周波数駆動方式のものを用い、飛行時間型質量分析装置にはリフレクトロン型ではなくてマルチターン型のものを用いた

10

20

30

40

50

ものである（マルチターン型飛行時間質量分析装置については、非特許文献2参照）。図6の例では、マルチターン型飛行時間質量分析装置のイオン周回路は「8」字形となっているが、これは図7に示すような単純周回型でももちろん構わない。

【0030】

前記実施例と同様の方法でイオントラップにトラップされ、引き出されたイオンは、マルチターン型飛行時間質量分析装置41、51に入り、そこに設けられたイオン周回路を所定回数周回する。この周回回数を多くすることにより、イオンの飛行距離はリニア型やリフレクトロン型よりもはるかに大きくなり、100000以上の高い質量分解能も十分実現可能となる。

【0031】

マルチターン型飛行時間質量分析装置では、同じ質量数でもエネルギーの高いイオンは周回路の各コーナーに置かれた転向電極42、52の中心軌道よりも外側を通るため、飛行距離が長い。逆に、エネルギーの低いイオンは内側の軌道を通るため、飛行距離は短い。そこで、各転向電極42、52に印加する電圧を適切に制御することにより、或る1点から出た同一質量数の複数のイオンは、それらのエネルギーの異なっても周回路を1周した後その点に同一時間に戻ってくるようにすることができる（時間的・空間的フォーカシング）。このフォーカス点を上記イオントラップ31のフォーカス点に一致させることにより、イオントラップ31からエネルギー分布をもって出射した多数のイオンも周回毎にフォーカスされ、高分解能の質量分析を行うことができるようになる。なお、イオンを検出器43、53へ送るためのガイド電極44、54もこのフォーカス点に一致させるようにする。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】従来の顕微質量分析装置の概略構成図。

【図2】従来のイオントラップを用いた顕微質量分析装置の主要部の概略構成図。

【図3】イオントラップの概略構成図(a)と、各電極に印加される電圧のイオン引き出し時点前後の変化の様子を示すグラフ(b)。

【図4】本発明の一実施例であるリフレクトロン型飛行時間質量分析装置を用いた顕微質量分析装置の主要部の概略構成図。

【図5】実施例の顕微質量分析装置のイオントラップのリング電極に印加される高周波電圧の波形図(a)、およびその高周波電圧を生成するためのデジタル駆動回路の構成例(b)、(c)。

【図6】本発明の別の実施例であるマルチターン型飛行時間質量分析装置を用いた顕微質量分析装置の主要部の概略構成図。

【図7】マルチターン型飛行時間質量分析装置の別のイオン周回路の例の概略構成図。

【図8】イオントラップ内におけるイオンの安定化領域を示す $a - q$ パラメータ図。

【符号の説明】

【0033】

1 1 ... CCD

1 2 ... 試料

1 3 ... レーザー光源

1 4 ... イオン

1 5 ... イオンガイド

1 6 ... 質量分析部

1 7 ... 検出器

2 1 ... イオントラップ

2 1 1 ... リング電極

2 1 2、2 1 3 ... エンドキャップ電極

2 2 ... リフレクトロン型飛行時間質量分析装置

3 1 ... 周波数駆動型イオントラップ

10

20

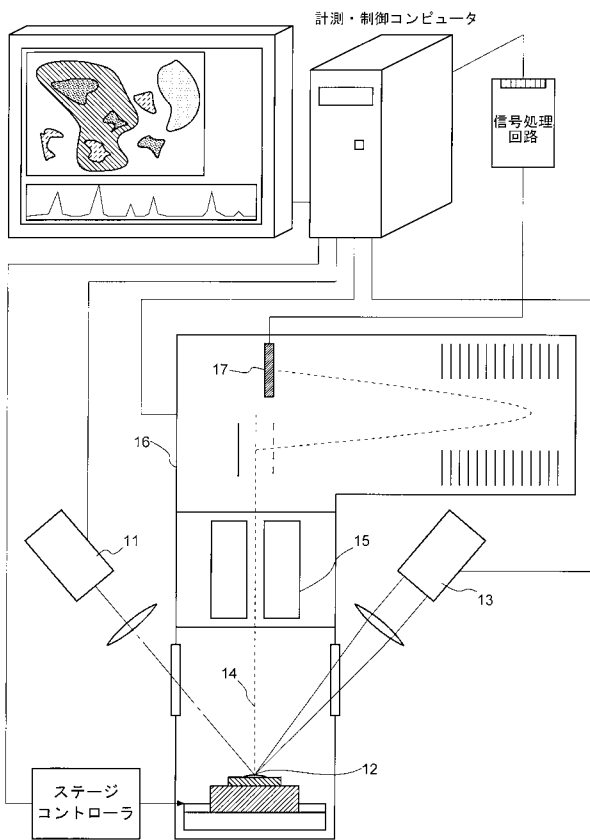
30

40

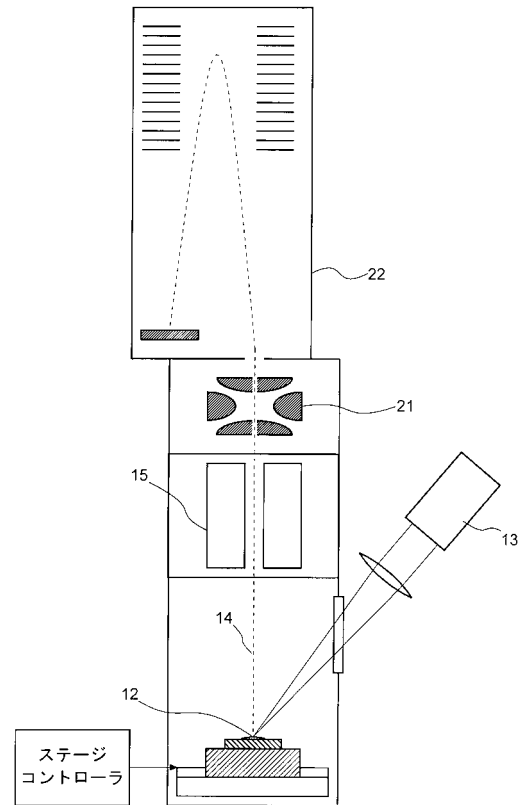
50

4 1、5 1 ... マルチターン型飛行時間質量分析装置

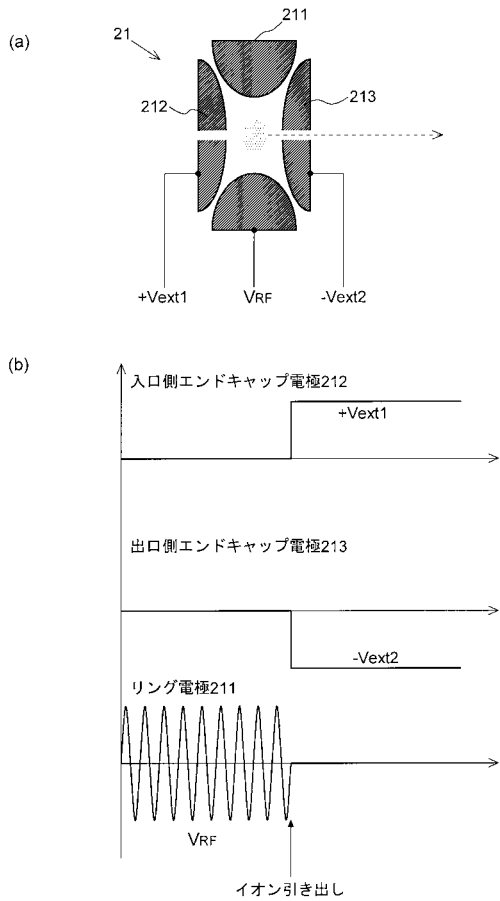
【図 1】



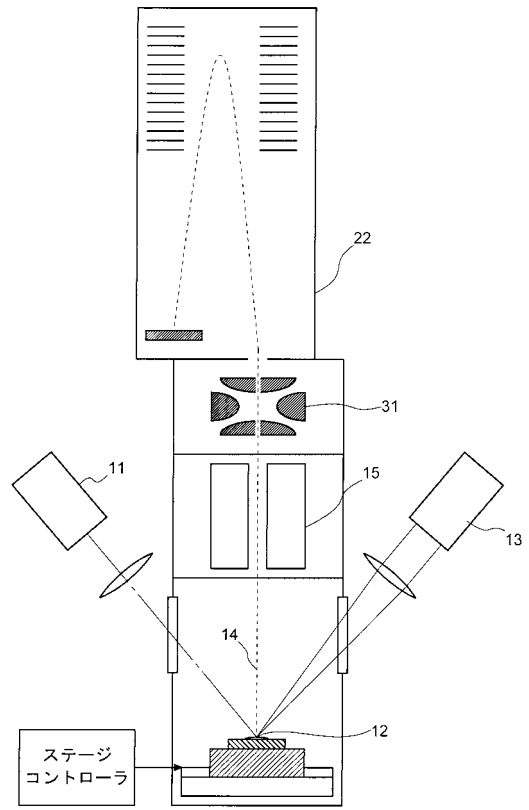
【図 2】



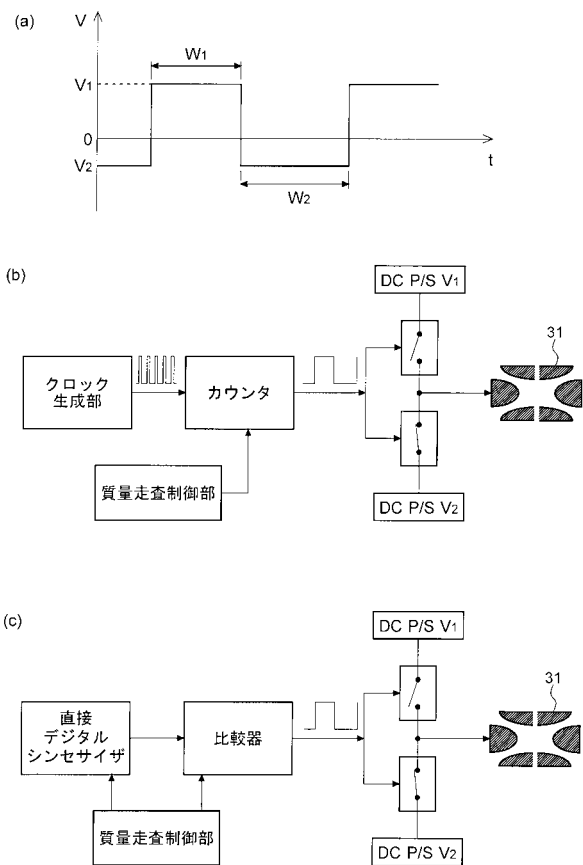
【図3】



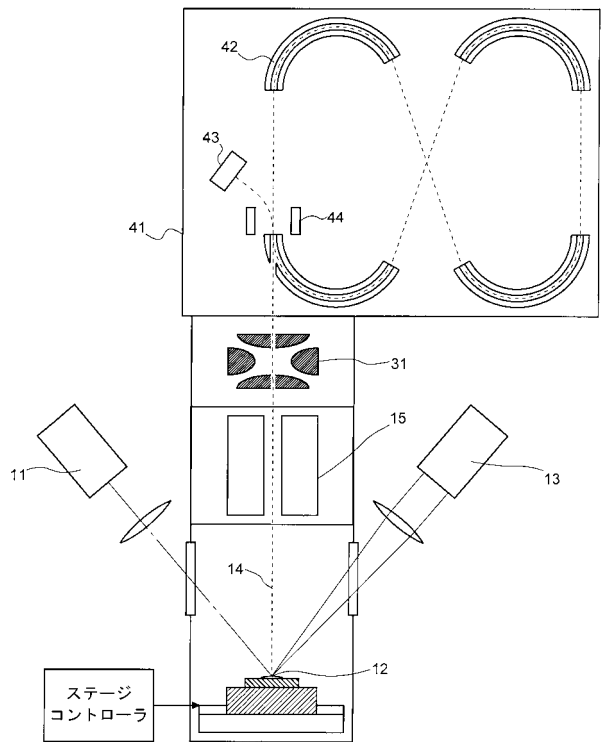
【図4】



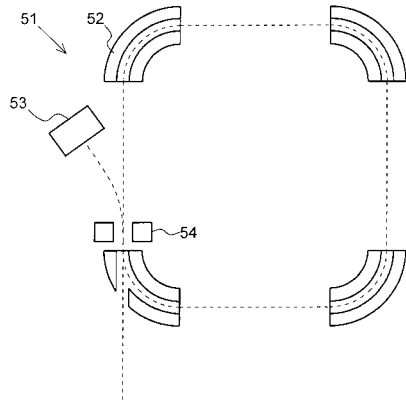
【図5】



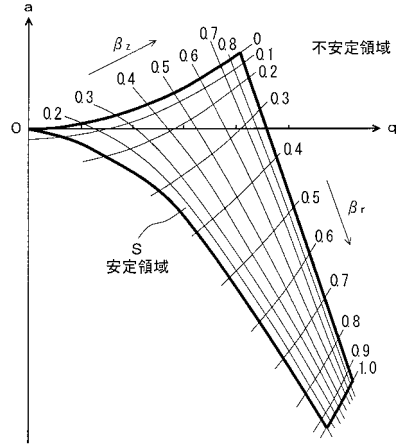
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

- (72)発明者 吉田 佳一
京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 島津 光三
京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内
- (72)発明者 瀬藤 光利
愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター内
- (72)発明者 新間 秀一
愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター内
- (72)発明者 豊田 岐聡
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

審査官 遠藤 直恵

- (56)参考文献 特開2004-303719(JP,A)
特表2003-512702(JP,A)
特開平08-189917(JP,A)
米国特許第05808300(US,A)
特開2005-116246(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

H01J 49/00 - 49/48
G01N 27/60 - 27/70, 27/92