

# 2015筑波セミナー 質問コーナー

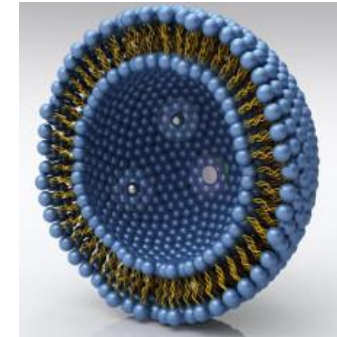
Q2) 現在、ICPを用いて一つの細胞中の元素を計測する装置を開発しています。その装置の性能を評価するため、細胞の標準試料もしくはそれに変わる疑似細胞試料をさがしています。どんなものを使えばいいか、アドバイスを頂けますでしょうか？

→梅村

沖野研の学生さん 質問ありがとう。

◆疑似細胞(リポソーム)を作製する。

◆酵母をちゃんとした環境で育てる！

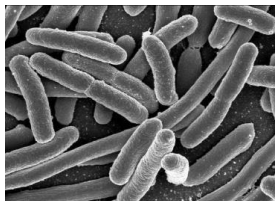


Q3) 生体などの細胞をICPで分析する場合、どのような処理が必要なのでしょうか。

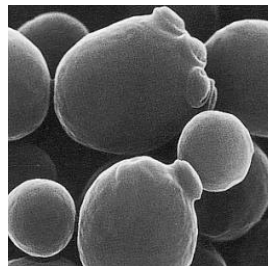
→梅村 2枚目と3枚目にマウス臓器の分析手順を示します。

1細胞分析(single cell analysis)を目指すときのポイントは4枚目以降に・・・

E. Coli  
(大腸菌)



Yeast  
(酵母)



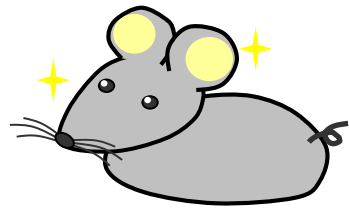
Euglena  
(ミドリムシ)



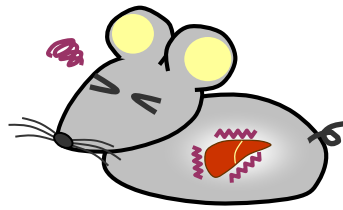
Fertilized salmon egg  
(サケの受精卵)



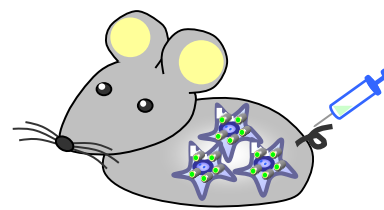
# マウス臓器の前処理・試料調製



ノーマルマウス



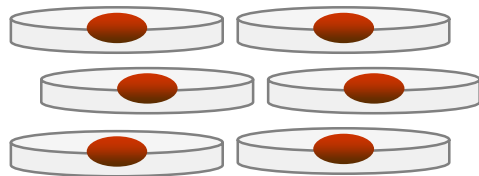
肝障害マウス



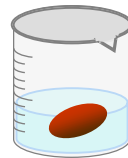
QD-ASCs静注マウス



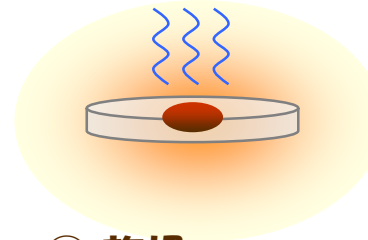
臓器・血液を採取



① 解剖・採取  
部位ごとに分類する



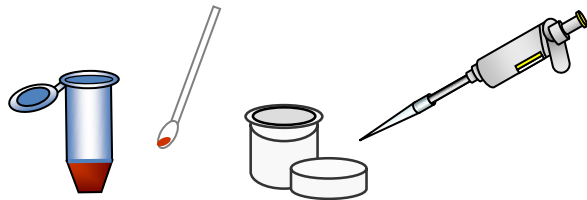
② 洗浄  
血液や体液を洗う



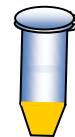
③ 乾燥  
水分を飛ばす



④ 粉碎・攪拌  
均一な粉末にする



⑤ 溶液化  
マイクロ波酸分解する



⑥ 溶液調製  
内標準元素を添加する



ICP-MS測定  
元素濃度算出

# 生体試料のマイクロ波酸分解

|             | 分解容器<br>容量                                                                                         | 分解に適した<br>試料量        | 分解に要する酸の量<br>(最終的なサンプル量)       | 分解装置                                                                                                   |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 標準ベッセル      | <br>100 mL        | 100 mg               | 10 mL<br>(100 mL)              | マイクロ波<br>酸分解装置<br>  |
| 微量<br>インサート | <br>5 mL          | 10 mg                | 1 mL<br>(10 mL)                | 電子レンジ<br><br>簡便、迅速 |
| テフロン容器      | A B<br><br>1 mL | 1 mg<br>微量の試料<br>に対応 | 過度の希釈が必要ない<br>0.1 mL<br>(1 mL) |                                                                                                        |

# 細胞を構成する物質(細胞はどんな元素で構成されるのか?)

## 文献を探してみると・・・

第1節 タンパク質 生物II>第1部 分子からみた生命現象>第1章  
生物体内の化学反応と酵素>第1節 タンパク質

### A 生物体を構成する化学物質

#### ◆細胞の成分とタンパク質

タンパク質は、生物の主要な構成物質で、固形物のほぼ半分を占める(教科書p.表1)。細胞の成分でもっとも多いのは水で約70%である。固形物には、タンパク質のほかに、細胞膜の成分の脂質、エネルギー源の炭水化物、代謝に必要な無機イオン、遺伝にかかわる核酸などがある。

細胞の成分の分析は、細菌の大腸菌で詳細に行われている。純粋な細胞として容易に集めることができるからである。大腸菌では約3000種類のタンパク質が存在する。また、哺乳類の細胞では約10万種類ある。

大腸菌の構成物質(J.D.ワトソン：遺伝子の  
分子生物学(第2版), 化学同人(1970)より)

| 構成物質     | 重量<br>[%] | 平均分子量             | 種類数  | 細胞あたりの数            |
|----------|-----------|-------------------|------|--------------------|
| 水        | 70        | 18                | 1    | $4 \times 10^{10}$ |
| 無機イオン*   | 1         | 40                | 20   | $2.5 \times 10^8$  |
| 炭水化物**   | 3         | 150               | 200  | $2 \times 10^8$    |
| 脂質**     | 2         | 750               | 50   | $2.5 \times 10^7$  |
| アミノ酸**   | 0.4       | 120               | 100  | $3 \times 10^7$    |
| ヌクレオチド** | 0.4       | 300               | 200  | $1.2 \times 10^7$  |
| その他の低分子  | 0.2       | 150               | 200  | $1.5 \times 10^7$  |
| タンパク質    | 15        | $4 \times 10^4$   | 3000 | $10^6$             |
| 核酸       |           |                   |      |                    |
| DNA      | 1         | $2.5 \times 10^9$ | 1    | 2                  |
| RNA      | 6         | $5 \times 10^5$   | 1000 | $10^5$             |

\* $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  など

## 化学の教科書 (啓林館)



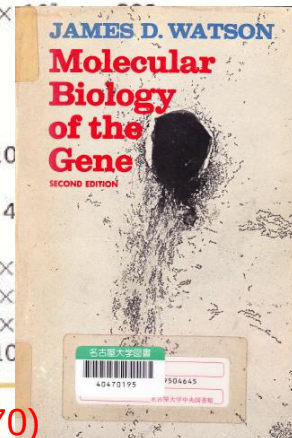
James D. Watson  
ノーベル生理学・医学賞受賞  
(1962年)



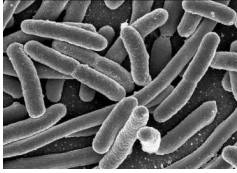
TABLE 3-3 Approximate chemical composition of a rapidly dividing *Escherichia coli* cell\*

| Component                                                                                                                                                                      | Per cent<br>of total<br>cell weight | Average<br>MW     | Approximate<br>number<br>per cell | Number of<br>different<br>kinds |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| H <sub>2</sub> O                                                                                                                                                               | 70                                  | 18                | $4 \times 10^{10}$                | 1                               |
| Inorganic ions ( $\text{Na}^+$ ,<br>$\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ ,<br>$\text{Cl}^-$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , etc.) | 1                                   | 40                | $2.5 \times 10^8$                 | 20                              |
| Carbohydrates and<br>precursors                                                                                                                                                | 3                                   | 150               | $2 \times 10^8$                   | 200                             |
| Amino acids and<br>precursors                                                                                                                                                  | 0.4                                 | 120               | $3 \times 10^7$                   | 100                             |
| Nucleotides and<br>precursors                                                                                                                                                  | 0.4                                 | 300               | $1.2 \times 10^7$                 | 200                             |
| Lipids and<br>precursors                                                                                                                                                       | 2                                   | 750               | $2.5 \times 10^7$                 | 50                              |
| Other small molecules<br>(heme, quinones,<br>breakdown products<br>of food molecules,<br>etc.)                                                                                 | 0.2                                 | 150               | $1.5 \times 10^7$                 |                                 |
| Proteins                                                                                                                                                                       | 15                                  | 40,000            | $10^6$                            |                                 |
| Nucleic acids                                                                                                                                                                  |                                     |                   |                                   |                                 |
| DNA                                                                                                                                                                            | 1                                   | $2.5 \times 10^9$ | 4                                 |                                 |
| RNA                                                                                                                                                                            | 6                                   |                   |                                   |                                 |
| 16s rRNA                                                                                                                                                                       |                                     | 500,000           | $3 \times 10^3$                   |                                 |
| 23s rRNA                                                                                                                                                                       |                                     | 1,000,000         | $3 \times 10^3$                   |                                 |
| tRNA                                                                                                                                                                           |                                     | 25,000            | $4 \times 10^4$                   |                                 |
| mRNA                                                                                                                                                                           |                                     | 1,000,000         | $10^5$                            |                                 |

\* Weight  $10^{12}$  daltons. 2nd edition (1970)



# 大腸菌1細胞に含まれる元素の種類と個数(定量できた元素に関して…)

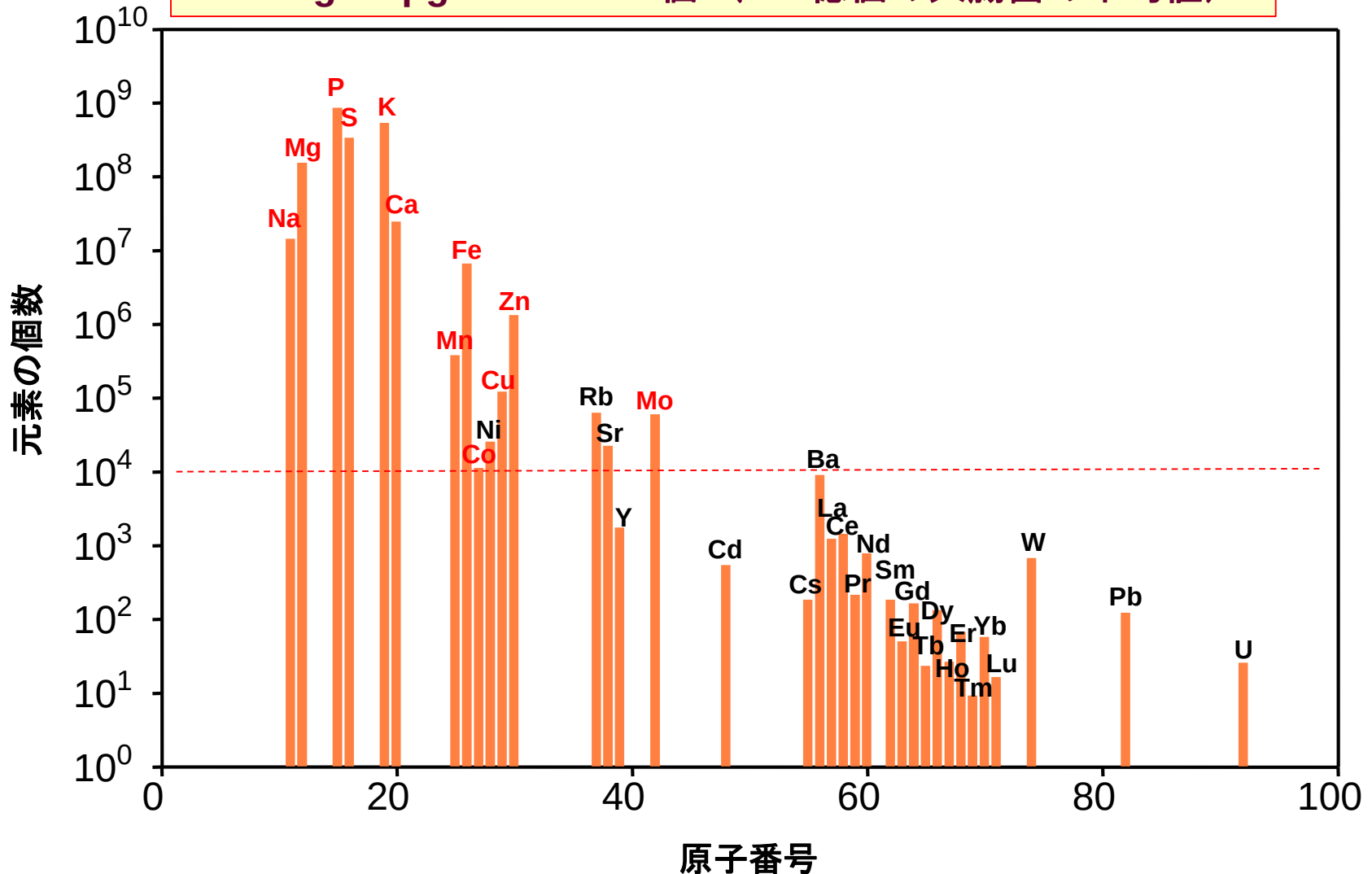


## 大腸菌1細胞あたりの元素個数

ICP-MSで  
48元素を定量



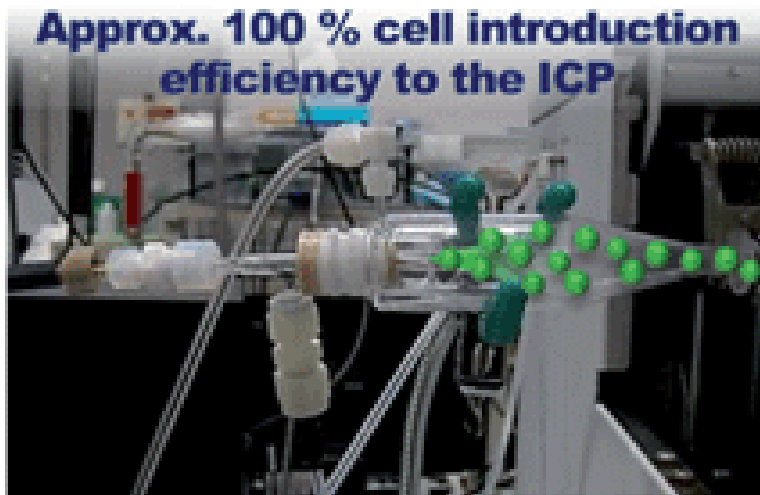
20 mg / 2 pg =  $1 \times 10^{10}$  個 (100億個の大腸菌の平均値)



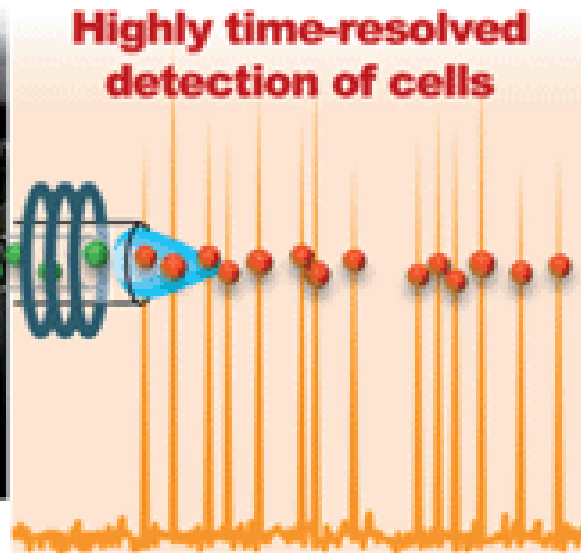
細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマにひとつずつ  
放り込めるツールはあるの？  
→産総研 宮下さん、重田さん

## Highly Efficient Single-Cell Analysis by ICP-MS

Approx. 100 % cell introduction  
efficiency to the ICP



Highly time-resolved  
detection of cells



[\*J. Anal. At. Spectrom.\*, 2014,29, 1598-1606](#)

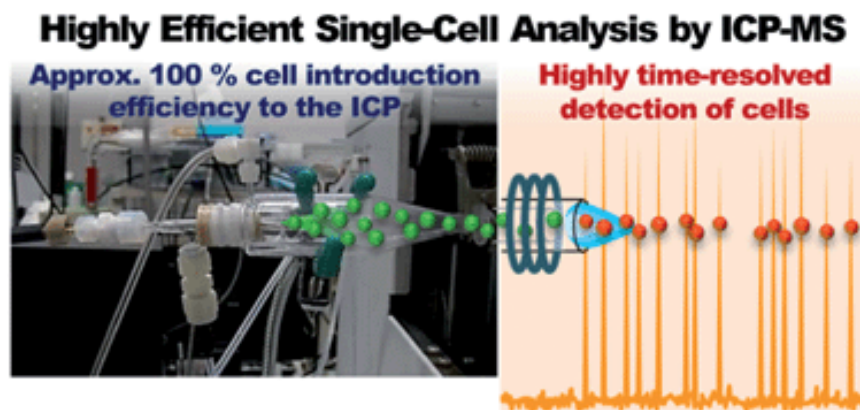
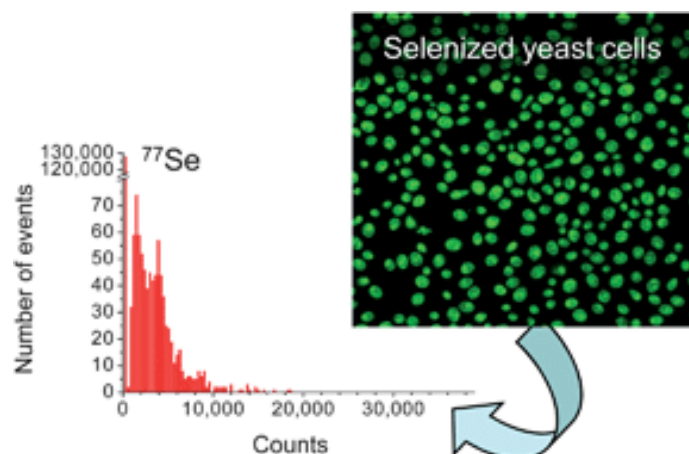


# 細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマに放り込めるツールは完成した？

産総研 宮下さん&重田さん

1. →完成していません。そもそも、稲垣さんを中心に開発しているネブライザーは、「細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマに放り込む」ことを狙っていないため、プラズマに導入される細胞の間隔は異なっています。その代りに、細胞濃度の最適化(互いに重なり合わない濃度に調製)と、検出システムの時間分解能の向上(互いの間隔が近くてもそれぞれを区別して検出できるだけの短い積分時間設定の実現)を達成したことで、一細胞分析が可能になっています([J. Anal. At. Spectrom., 2014,29, 1598-1606](#))。
2. 一方、重田さんらが開発されたドロプレットジェネレーターは、原理上、「細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマに放り込む」ことになりすし、それを達成されています([J. Anal. At. Spectrom., 2013,28, 646-656](#))。
3. ドロプレットジェネレーションによるプラズマへの細胞導入については、マイクロチップの活用例があります([Anal. Chem., 2014, 86 \(12\), pp 6012-6018](#))。彼らの論文に基づき、「1) 何Hz(何秒間隔で細胞を導入できるのか)」に回答するのであれば、90 Hz～300 Hzです。

# 細胞を規則正しい間隔でアルゴンプラズマに放り込めるツールは完成した？

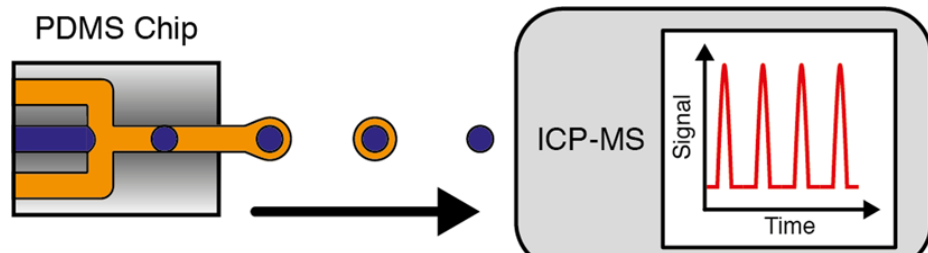


[\*J. Anal. At. Spectrom.\*, 2013, \*\*28\*\*, 646-656](#)

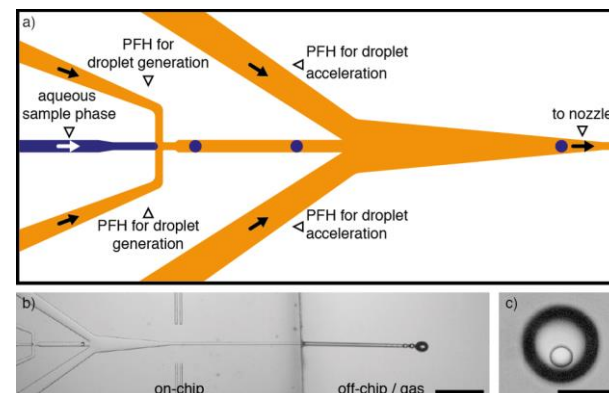
[\*J. Anal. At. Spectrom.\*, 2014, \*\*29\*\*, 1598-1606](#)

ドロップレット(液滴)に1個 細胞が入っていればいいな～

質量分析計の時間分解能を上げればなんとかなるだろー



[\*Anal. Chem.\*, 2014, \*\*86\*\* \(12\), pp 6012–6018](#)



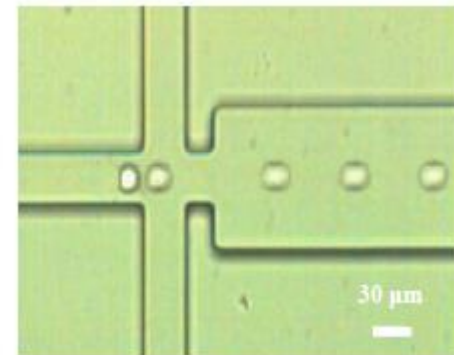
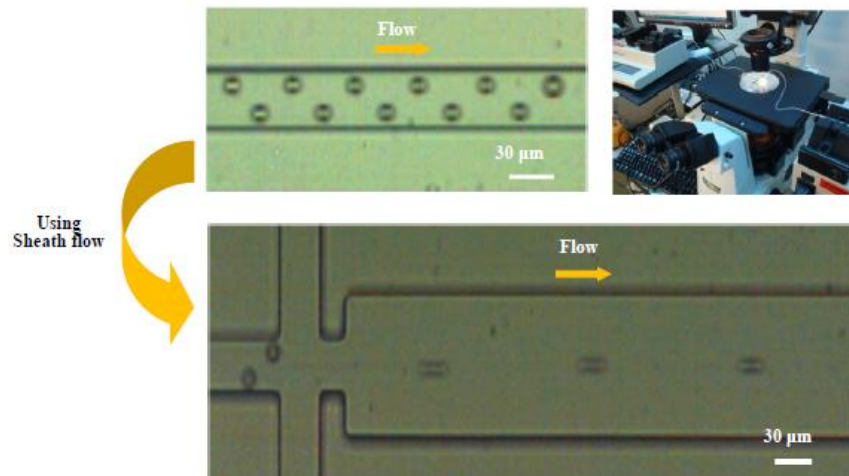
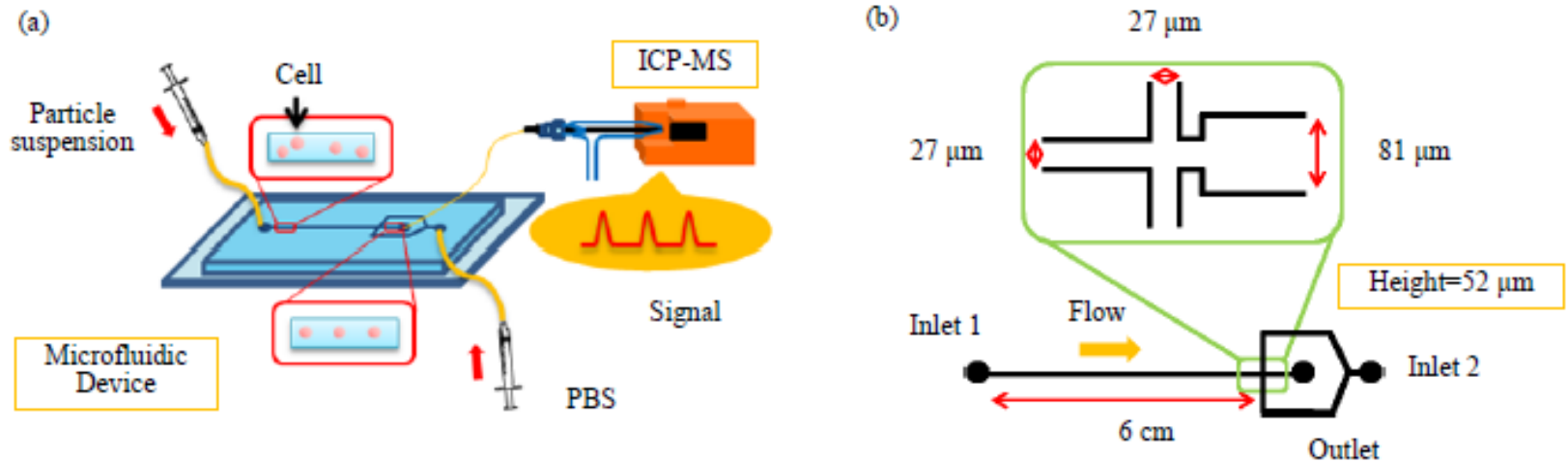


# 細胞を規則正しく整列させてゆっくいと送液するデバイスの開発

*Micro Total Analysis Systems 2012, 2012, 767-769.*

## DETECTION OF METALLIC ELEMENTS IN A SINGLE CANCER CELL USING MICROFLUIDIC DEVICES COUPLED WITH ICP-MS

Yoshiyuki Miyazaki<sup>1,2</sup>, Takao Yasui<sup>1,2</sup>, Kazumi Inagaki<sup>3</sup>, Yukihiro Okamoto<sup>2</sup>, Noritada Kaji<sup>1,2</sup>,  
Tomonari Umemura<sup>1</sup>, Manabu Tokeshi<sup>2,4</sup>, and Yoshinobu Baba<sup>1,2,5</sup>

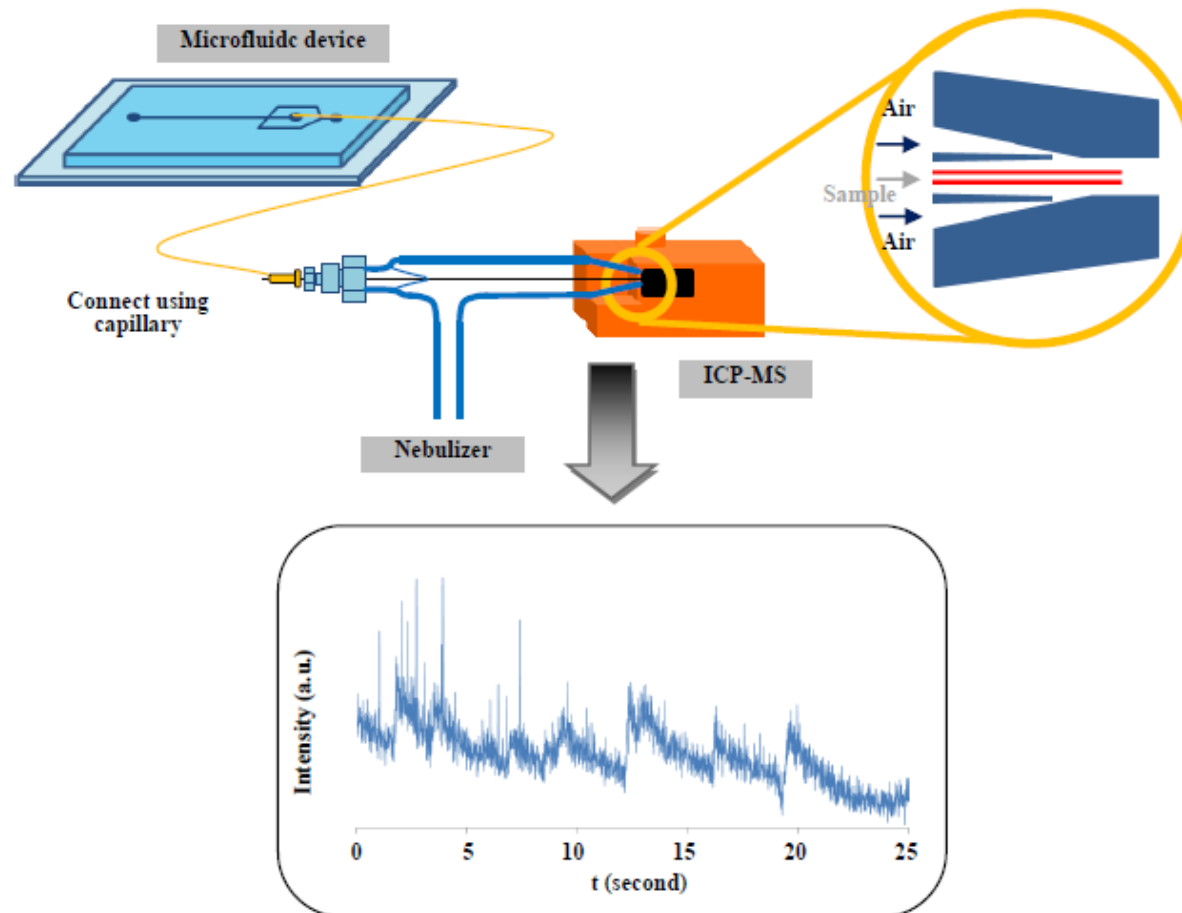


# 細胞を規則正しく整列させてゆっくいと送液するデバイスの開発

*Micro Total Analysis Systems 2012, 2012, 767-769.*

## DETECTION OF METALLIC ELEMENTS IN A SINGLE CANCER CELL USING MICROFLUIDIC DEVICES COUPLED WITH ICP-MS

Yoshiyuki Miyazaki<sup>1,2</sup>, Takao Yasui<sup>1,2</sup>, Kazumi Inagaki<sup>3</sup>, Yukihiro Okamoto<sup>2</sup>, Noritada Kaji<sup>1,2</sup>,  
Tomonari Umemura<sup>1</sup>, Manabu Tokeshi<sup>2,4</sup>, and Yoshinobu Baba<sup>1,2,5</sup>



10 Hzぐらいで1つずつ細胞を送れてる！？