

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5034092号
(P5034092)

(45) 発行日 平成24年9月26日(2012.9.26)

(24) 登録日 平成24年7月13日(2012.7.13)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 27/62	(2006.01)	GO 1 N 27/62		G
HO 1 J 49/10	(2006.01)	HO 1 J 49/10		
HO 1 J 49/04	(2006.01)	HO 1 J 49/04		

請求項の数 16 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2010-534854 (P2010-534854)	(73) 特許権者	304023994 国立大学法人山梨大学 山梨県甲府市武田四丁目4番37号
(86) (22) 出願日	平成21年10月19日(2009.10.19)	(74) 代理人	100080322 弁理士 牛久 健司
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/068294	(74) 代理人	100104651 弁理士 井上 正
(87) 国際公開番号	W02010/047399	(74) 代理人	100114786 弁理士 高城 貞晶
(87) 国際公開日	平成22年4月29日(2010.4.29)	(72) 発明者	平岡 賢三 山梨県甲府市武田4丁目3番11号 国立 大学法人山梨大学内
審査請求日	平成23年3月7日(2011.3.7)	審査官	島田 英昭
(31) 優先権主張番号	特願2008-271954 (P2008-271954)		
(32) 優先日	平成20年10月22日(2008.10.22)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 探針を用いたイオン化方法および装置、ならびに分析方法および装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

導電性探針の先端をステージ上の試料に接触させて試料の一部を捕捉し、その後、上記探針を上記ステージ上の試料から離れる方向に移動させ、試料の一部を捕捉しかつ上記ステージ上の試料から離れた上記探針の先端に加熱した溶媒の蒸気を供給し、上記探針にエレクトロスプレーのための高電圧を印加して上記探針先端の試料の分子をイオン化する、イオン化方法。

【請求項2】

上記探針を試料の方向に近づけて上記探針を試料表面に接触させ、上記探針が試料表面に接触したところから上記探針を試料中の所定の深さまで侵入させる、請求項1に記載のイオン化方法。

【請求項3】

試料の捕捉に先立ち、上記探針先端の表面を、所望の化合物を捕捉する分子で化学修飾する、請求項1または請求項2に記載のイオン化方法。

【請求項4】

探針、試料を保持する試料ステージ、探針および試料ステージの少なくともいずれか一方を、これらが互いに接近離間する方

10

20

向に移動させる変位装置，

少なくとも探針の先端が試料ステージから離れた位置において探針に高電圧を印加する電源装置，ならびに

少なくとも探針の先端が試料ステージから離れた位置において探針先端に加熱装置により加熱した溶媒の蒸気を供給する溶媒供給装置，
を備えたイオン化装置。

【請求項 5】

探針先端が試料ステージ上の試料の表面に接触したことを検出する接触検出装置をさらに備え，

上記変位装置は，探針を相対的に試料ステージの方向に近づけ，探針先端が試料ステージ上の試料の表面に接触したことが上記接触検出装置によって検出されると，その検出された位置から探針を試料中の所定の深さまで侵入させるように変位させるものである，

請求項 4 に記載のイオン化装置。

【請求項 6】

導電性探針の先端を試料に接触させて試料の一部を捕捉し，この後，
試料の一部を捕捉した上記探針の少なくとも先端部を真空中において冷却し，
冷却した上記探針先端部に溶媒ガスを吹き付け，上記探針にエレクトロスプレーのための高電圧を印加して上記探針先端の試料の分子をイオン化する，
イオン化方法。

【請求項 7】

導電性探針の先端部の表面にマトリクスを塗布し，
マトリクスが塗布された上記探針先端を試料に接触させて試料を捕捉し，
試料を捕捉した上記探針の先端に上記マトリクスが吸収する波長のレーザー光を照射し，
かつ上記探針にエレクトロスプレーのための高電圧を印加して，上記探針先端の試料の分子を離脱，イオン化する，
イオン化方法。

【請求項 8】

試料から離れた位置にある上記探針の先端付近にレーザー光を照射して試料のイオン化を促進する，請求項 1，請求項 2，請求項 3 および請求項 6 のいずれか一項に記載のイオン化方法。

【請求項 9】

請求項 1，請求項 2，請求項 3 および請求項 6 ないし請求項 8 のいずれか一項に記載のイオン化方法によりイオン化された分子を分析するイオン化分析方法。

【請求項 10】

請求項 4 または請求項 5 に記載のイオン化装置と，イオン化された分子を分析する分析装置とを備えたイオン化分析装置。

【請求項 11】

導電性探針の先端をステージ上の試料の方向に近づけて上記探針先端を試料表面に接触させ，上記探針先端が試料表面に接触したところから上記探針先端を試料中の所定の深さまで侵入させてステージ上の試料の一部を捕捉し，

その後，上記探針を上記ステージ上の試料から離れる方向に移動させ，

試料の一部を捕捉しかつ上記ステージ上の試料から離れた上記探針の先端に溶媒を供給し，上記探針にエレクトロスプレーのための高電圧を印加して上記探針先端の試料の分子をイオン化する，

イオン化方法。

【請求項 12】

探針，

試料を保持する試料ステージ，

探針および試料ステージの少なくともいずれか一方を，これらが互いに接近離間する方向に移動させる変位装置，

10

20

30

40

50

少なくとも探針の先端が試料ステージから離れた位置において探針に高電圧を印加する電源装置、

少なくとも探針の先端が試料ステージから離れた位置において探針先端に溶媒を供給する溶媒供給装置、ならびに

探針先端が試料ステージ上の試料の表面に接触したことを検出する接触検出装置を備え

、
上記変位装置は、探針を相対的に試料ステージの方向に近づけ、探針先端が試料ステージ上の試料の表面に接触したことが上記接触検出装置によって検出されると、その検出された位置から探針を試料中の所定の深さまで侵入させるように変位させるものである、

イオン化装置。

10

【請求項13】

導電性探針の先端をステージ上の試料の方向に近づけて上記探針先端を試料表面に接触させ、上記探針先端が試料表面に接触したところから上記探針先端を試料中の所定の深さまで侵入させてステージ上の試料の一部を捕捉し、

その後、上記探針を上記ステージ上の試料から離れる方向に移動させ、

上記探針にエレクトロスプレーのための高電圧を印加して上記探針先端の試料の分子をイオン化する、

イオン化方法。

【請求項14】

探針、

20

試料を保持する試料ステージ、

探針および試料ステージの少なくともいずれか一方を、これらが互いに接近離間する方向に移動させる変位装置、

少なくとも探針の先端が試料ステージから離れた位置において探針に高電圧を印加する電源装置、ならびに

探針先端が試料ステージ上の試料の表面に接触したことを検出する接触検出装置を備え

、
上記変位装置は、探針を相対的に試料ステージの方向に近づけ、探針先端が試料ステージ上の試料の表面に接触したことが上記接触検出装置によって検出されると、その検出された位置から探針を試料中の所定の深さまで侵入させるように変位させるものである、

30

イオン化装置。

【請求項15】

請求項11または請求項13に記載のイオン化方法によりイオン化された分子を分析するイオン化分析方法。

【請求項16】

請求項12または請求項14に記載のイオン化装置と、イオン化された分子を分析する分析装置とを備えたイオン化分析装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

この発明は探針（プローブ）を用いた、特にエレクトロスプレーによる、イオン化方法および装置、ならびにイオン化分析方法および装置に関する。

【背景技術】

【0002】

生体試料や、工業製品などを対象としたイメージング質量分析法は、大別して2つある。第1はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI）、第2は、二次イオン質量分析法（SIMS）である。これらの方法は、たとえば次のような文献に記載されている。

“Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization o

50

f peptides and proteins in mammalian tissue sections" Current Opinion in Chemical Biology 2002, 6, 676 - 681

"Direct molecular imaging of *Lymnaea stagnalis* nervous tissue at subcellular spatial resolution by mass spectrometry" Anal. Chem. 2005, 77, 735 - 741

MALDIによる試料調製法の一例を挙げれば、生体試料を -18 程度に冷却し、ステンレスプレートなどによって15 μm の生体試料切片を作成する。これを電導性のフィルムに載せ、試料を乾燥させる。さらに試料表面にマトリックスを薄く塗布してMALDI試料とし、これを真空チャンバーに挿入し、MALDIを行う。また、ポリエチレンフィルム上に生体試料を載せ、フィルムの裏側からレーザー光を照射して高分子フィルムを瞬間的に加熱して、接触界面の細胞をフィルムに転写する方法 (laser capture microdissection) などもある。試料の脱離イオン化には、主に337 nmの窒素レーザーが使用される。

これらの方法では、レーザー光のビーム径を数10 μm 以下に絞るのが困難で、またアブレーションが広域にわたるので、空間分解能は50 μm が限界である。また、MALDIの最大の特徴であるマトリックスを使用することで、イオンの検出感度が飛躍的に増大するが、他方では、試料に塗布するマトリックスの結晶サイズが100 μm 以上になることから、空間分解能が制約される。

SIMS法では、点光源に近い金属イオン源 (Ga^+ , Au^+ など) などが実用化され、 μm 以下の空間分解能が達成されている。しかしながら、イオンのエネルギーが大きく (10 ~ 20 keV), 入射イオンが試料に数100オングストロームの深さにわたって侵入し、試料が損傷を受ける。このため、生体試料など分解し易い試料からのイオンの収率が時間とともに急速に低下する。脱離する試料は表面近傍の分子に限られるので、生体関連試料に対するイオンの検出感度が低い。

この欠点を解消することを目的に、クラスターSIMSが開発されてきた。たとえば、金クラスターイオン (Au_n^+) や C_{60}^+ イオンを入射イオンとして用いると、二次イオンの脱離効率が急増することが明らかとなった。

しかしながら、一次イオンビーム電流が小さいこと、イオンビーム径が数 μm 以上になることなどから、 μm 以下の空間分解能を得ることが困難である。これらのSIMS法は、いずれも生体高分子等の高質量分子には適用が難しい。

以上述べたようなMALDIやSIMSによるイメージング技術が、近年、ライフサイエンスの分野で普及しつつある。しかしながら、これらの方法はその原理的な制約によって μm 以下の分解能を得ることは困難である。したがって、従来のMALDIまたはSIMS法にいかなる改良を加えたとしても、これらを基本技術とする限り、 μm 以下の分解能を実現することは困難である。

他方、従来エレクトロスプレーまたはナノレーザープレーでは、試料液体がキャピラリー先端で円錐状の形状をなし (テイラー (Taylor) コーンと呼ばれる)、円錐状の先端から微細な帯電液滴が生成する。この液滴は、液体の粘性のために、マイクロメートルないしサブマイクロメートル以下のサイズにすることは原理的に不可能である。これは、テイラーコーンの先端が電場の力で引きちぎられて液滴が発生する際、液体の粘性によってテイラーコーンの先端径が自動的にサブマイクロメートルのサイズになってしまうからである。このように、エレクトロスプレーで生成できる液滴サイズは、自然発生的に決まってしまう、更なる極小化は困難である。

また、従来のエレクトロスプレーでは、ナノ化に伴い (ナノエレクトロスプレー)、キャピラリーの径を細くする必要があり、目詰まり等、多くの制約がある。スプレーも発生させにくいし、取り扱いが煩雑である。さらに従来のエレクトロスプレーでは、塩濃度が高くなると、スプレーが困難になり、またイオンの気相への脱離効率が激減する。したがって、生理食塩水など、150 mM程度のNaCl水溶液などには適用が難しい。

10

20

30

40

50

【発明の開示】

【0003】

この発明は、前処理なしの生体組織などを対象試料とすることができ、しかも大気圧下で試料イオンの脱離、イオン化が可能なイオン化方法および装置を提供するものである。

この発明はまた、目詰まり等を起こすことなく極微細な試料を取扱うことができ、しかも効率よくエレクトロスプレーを発生させることが可能な方法および装置を提供するものである。

この発明はさらに、液体状生体試料、塩濃度が高い試料に対してもエレクトロスプレー現象を起こすことができる方法および装置を提供するものである。

さらにこの発明は、ナノメートル（nm）オーダの分解能のイメージングも可能となるイオン化方法および装置を提供するものである。

この発明は試料分析のイメージングのために長い時間がかかって試料が乾いてしまっても、試料分子の脱離とイオン化を行うことができるようにするものである。

この発明はさらに試料の全量を使って有効にイオン化、分析を可能とするものである。

この発明はさらに効率の良い試料のイオン化と脱離が同時に起こるようにするものである。

この発明はさらに高感度な分析が可能な試料のイオン化方法を提供するものである。

この発明はさらに、上記のイオン化方法、装置を用いた質量分析方法および装置も提供する。

この発明によるイオン化方法は、導電性探針（プローブ）の先端を試料に接触させて探針先端に試料を捕捉し（ここでは、探針先端を試料内部に（わずかに）侵入させて捕捉することも含む）、試料を捕捉した後試料から離れた上記探針の先端に溶媒を供給しながら、上記探針にエレクトロスプレーのための高電圧を印加して上記探針先端の試料の分子をイオン化するものである。

この発明によるイオン化装置は、探針、試料を保持する試料ステージ、探針および試料ステージの少なくともいずれか一方を、これらが互いに接近離間する方向に移動させる変位装置、少なくとも探針の先端が試料ステージから離れた位置において探針に高電圧を印加する電源装置、ならびに少なくとも探針の先端が試料ステージから離れた位置において探針先端に溶媒を供給する溶媒供給装置を備えているものである。

溶媒は試料を溶解または湿潤化するものであれば何でもよく、液体状でも気体状でもよい。たとえば、溶媒には、水、アルコール、酢酸、トリフロ酢酸、アセトニトリル、水溶液、混合溶媒、混合気体等がある。これらの溶媒を液体のまま、霧状にして、加熱蒸気にして、またはガス状で探針の先端に供給することができる。

測定中または分析中、常時、試料から離れた位置において溶媒を供給しておき、そこに至った探針先端部に溶媒を供給できるようにしてもよい。これにより溶媒供給制御が簡単になる。探針が試料から離れた位置に至ったときにのみ溶媒を探針先端に供給するようにしてもよい。試料は固体でも液体でもよいが、固体の場合に特に溶媒の供給が重要となる。

試料を浮遊電位にすることで、測定中または分析中、常時、探針にエレクトロスプレー電圧を印加しておくようにすることができる。これにより、高電圧印加の制御が簡単となる。もちろん、探針が試料から離れた後にパルス状の高電圧を探針とイオン導入路との間に印加してもよい。

探針が試料に接触することにより、少なくとも探針が試料に接触している間は探針と試料は同電位となるので、必ずしも積極的に同電位とするための操作または手段を講じなくてもよい（試料を電氣的に浮かせておいてもよい）。もちろん、探針と試料（たとえば試料を載置する試料台や液体試料を供給するキャピラリー）とを強制的に同電位とするように結線してもよい。

この発明によると、導電性探針の先端に試料を捕捉して試料から離れた位置において、探針の先端に溶媒を供給しながら、探針にエレクトロスプレーのための直流高電圧を印加しているから、エレクトロスプレーにより試料の分子が試料から脱離し、かつイオン化す

10

20

30

40

50

る。また、溶媒の供給により、試料が乾燥して、または生体試料のように成分濃度が高い場合でも、エレクトロスプレーによる脱離とイオン化が促進される。さらに、極少量の微細な溶媒の供給により、緩慢なエレクトロスプレーを実現し、試料中の成分が選択性なく、あまねく分析できるようになる。

この発明によると、探針や試料を真空室内に配置する必要はなく、大気圧下（大気、他の不活性ガス中または飽和蒸気圧チャンバー内など）でイオン化を行うことができる。試料に前処理を加えることなくそのまま使用することができる。試料には生体試料を用いることが可能である。

この発明によると、試料を探針（プローブ）の先端に捕捉してエレクトロスプレーさせており、探針を用いるので目詰まりが起こらない。先端の鋭い探針を用いると、効率よくエレクトロスプレーを発生させることができる（電場の効果が極限的に高められる）。原子レベルの先端径をもつ探針を用いれば、針先端の径を極限にまでナノ化できる。この結果、塩濃度が高い試料に対しても、エレクトロスプレー現象を起こすことができる。

10

イオン化方法の一実施態様においては、上記探針を試料の方向に近づけて上記探針を試料表面に接触させ、上記探針が試料表面に接触したところから上記探針を試料中の所定の深さまで侵入（進入）させる。

イオン化装置の一実施態様では、探針先端が試料ステージ上の試料表面に接触したことを検出する接触検出装置をさらに備える。上記変位装置は、探針を相対的に試料ステージの方向に近づけ、探針先端が試料ステージ上の試料表面に接触したことが上記接触検出装置によって検出されると、その検出された位置から探針を試料中の所定の深さまで侵入させるように変位させる。

20

試料の表面に凹凸があっても、探針が試料の表面に接触したことを検出して、この表面接触を検出したところから探針を一定深さ試料中に侵入させているから、常に、試料表面から一定深さの試料部分の採取が可能となる。

生体試料のような液体を含む固体状の試料の場合には、特に、イメージングが可能となる。すなわち、探針の先端のサイズをnmオーダーとし、かつ探針を試料表面に沿って変位させるときの最小変位量単位をnmオーダーで制御すれば、試料表面においてnmオーダーの分解能で探針により試料分子を捕捉することができる。したがって、試料表面の分子の分布をnmオーダーで測定すること（2次元イメージング）が可能となる。試料の表面から一定深さの位置のみならず深さ方向のさまざまな位置において試料を捕捉すれば、3次元イメージングが可能となる。このようなイメージングでは多数点において試料部分の採取が行なわれるから時間がかかり、試料が乾燥することがある。そのような場合でもこの発明によると、溶媒の供給により確実な試料の測定、分析を続けることが可能となる。

30

この発明の一実施態様では、試料の捕捉に先だち、上記探針先端の表面を、所望の化合物を捕捉する分子で化学修飾する。これにより、試料中の特定の分子を選択的に捕捉できるようになる。

この発明の他の実施態様においては、探針の先端付近にレーザー光（紫外、赤外または可視光）を照射するレーザー装置を設け、試料から離れた位置の探針の先端付近または先端からわずかに離れた位置（下方に離れた位置）にレーザー光を照射する。これにより、エレクトロスプレーによる試料分子の脱離イオン化が増強される。

40

この発明による他のイオン化方法は、先端に試料を捕捉した導電性探針の少なくとも先端部を真空中において冷却し、冷却した上記探針先端部に溶媒ガスを吹き付けて溶媒ガスを吸着させ、その後、上記探針にエレクトロスプレーのための高電圧を印加して上記探針先端の試料の分子をイオン化するものである。

探針に吸着された溶媒ガスは、探針表面に捕捉された生体試料にしみ込んで、生体試料の流動性を増す。この状態で、探針にエレクトロスプレーのための直流高電圧を印加すると、探針の先端に直流高電場が発生する。吸着ガスが試料に浸潤することで、試料に流動性が生じて、液状の試料が高電場の作用で探針先端に向かって輸送されて、先端からエレクトロスプレーが発生する。このエレクトロスプレーによって、試料中の分子がイオン化される。エレクトロスプレーが真空中で行われるので、大気圧エレクトロスプレーに比べ

50

て質量分析計へのイオンの輸送効率がきわめて高まり、高感度化につながる。

好ましい実施態様では、冷却探針に直流高電圧を印加した状態において、赤外レーザー光、紫外レーザー光または可視光レーザー光を照射し、探針の先端に捕捉した試料を脱離、イオン化させる。赤外レーザー光照射（溶媒分子の振動励起）、または紫外、可視レーザー光照射によって、吸着ないしは凍結した溶媒固体が融解して流動性を増し、探針先端に捕捉された試料分子を溶解しつつ、これらを探針先端に輸送し、探針先端でのエレクトロスプレー現象でイオン化されて、真空に向かって脱離（スプレー）される。また、レーザー照射された金属表面に励起されたプラズモンによって、試料の脱離、イオン化が促進される効果もある。

この発明はさらに、上述したすべてのイオン化方法またはイオン化装置によりイオン化された試料を質量分析する分析方法および装置も提供するものである。

さらにこの発明は、導電性探針の先端部の表面にマトリクスを塗布し、マトリクスが塗布された上記探針先端を試料に接触させて試料を捕捉し（ここでは、探針先端を（わずかに）試料に侵入させて試料を捕捉することを含む）、試料を捕捉した上記探針の先端に上記マトリクスが吸収する波長のレーザー光を照射し、かつ上記探針にエレクトロスプレーのための高電圧を印加して、上記探針先端の試料の分子を離脱、イオン化するイオン化方法を提供している。

直流高電圧が印加されている探針の先端がレーザー照射されると、マトリクスが熔融状態となり、試料との溶解／混合を起こし、探針先端からマトリクス支援レーザー脱離イオン化とエレクトロスプレーが複合したスプレーが発生する。これによって、効率のよい試料のイオン化と脱離が同時に起こる。この方法は、大気圧下、真空下のいずれで行ってもよい。

この発明はさらに、探針の先端が試料に接触する下至点（ここでは、探針先端が（わずかに）試料内に侵入した位置を下至点とすることを含む）と探針の先端が試料から離れた上至点との間で往復動可能に探針を保持し、上至点付近にある探針の先端の近傍に、試料イオンを分析装置に導くイオン導入路の先端部が位置するように上記イオン導入路を配置し、探針を下至点に向けて動かして探針先端を試料に接触させて試料を捕捉し（ここでは探針先端が（わずかに）試料内に侵入して試料を捕捉することを含む）、探針と上記イオン導入路との間に常時エレクトロスプレーのための直流高電圧を印加しておくイオン化方法を提供している。探針が試料に接触している間は、この接触により探針と試料とを同電位に保たれる。その後、探針を上至点に向けて動かすと、探針が試料から離れたときに探針と上記イオン導入路との間にエレクトロスプレーのための高電圧がかかる。これによって探針先端に捕捉した試料がイオン化される。

エレクトロスプレーのための直流高電圧を常時印加しているなのでその制御が簡便となる。

【図面の簡単な説明】

【0004】

第1図は第1実施例によるイオン化装置およびイオン化分析装置（分析装置）の全体構成を示すものである。

第2図は加熱キャピラリー装置（溶媒供給装置）の構成例を示す断面図である。

第3図は溶媒供給装置にシャッタを設けて溶媒の供給を制御する構成を示す断面図である。

第4図は第1実施例におけるイオン化装置の制御と動作の一例を示すタイムチャートである。

第5図は探針先端に試料を捕捉した様子を示す。

第6図はイオン化に基づく質量分析結果を示すマススペクトル（グラフ）であり、第6a図は十分な溶媒蒸気を供給した場合、第6b図は溶媒蒸気の供給を減少させた場合、第6c図は溶媒蒸気を供給しない場合である。

第7図は探針先端に化学装飾した様子を示す。

第8図は第2実施例におけるイオン化分析装置の構成を示す。

第9図は第8図における探針の取付状態を示す一部切欠き平面図である。

第10図は探針先端にマトリクスを塗布した上に試料を捕捉した様子を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0005】

【実施例1】

【0006】

第1図は第1実施例によるイメージングが可能なイオン化装置およびイオン化分析装置の概略構成を示すものである。

イオン化分析装置は、イオン化装置10と質量分析装置(イオン分析装置)50とから構成される。

イオン化装置10によって試料から脱離、イオン化された試料イオンは質量分析装置50に導かれる。質量分析装置の例としては(直交型)飛行時間質量分析計を挙げることができるが、この発明は(リニア)イオントラップ装置、四重極質量分析装置、フーリエ変換質量分析装置等の質量分析装置にも適用可能である。質量分析装置50の内部は真空に保たれる。質量分析装置50はイオンサンプリング用スキマー(オリフィス)51を備え、その先端部にイオン導入孔(イオン導入路)51aがあげられ、この導入孔51aにより質量分析装置50の内部がイオン化装置10が配置された外界(大気圧)とつながっている。イオン導入路としてスキマーではなく、イオンサンプリング用キャピラリーを備える分析装置もある。そして、質量分析装置の種類によってはイオンサンプリング用キャピラリー(オリフィス)に電源装置によりイオン集束用電圧(正イオンモードの場合には+100V以下、負イオンモードの場合には-100V以下の比較的低い電圧)を印加するタイプのものもある。イオンサンプリング用キャピラリーは接地される場合もある。質量分析装置50の外壁は一般に接地される。

イオン化装置10は、導電性探針(プローブ)11、探針11の支持および駆動(Z方向駆動)のためのZステージ(装置)12、試料Sを保持する試料ステージ21、試料ステージ21(試料S)をZ方向に駆動するZステージ(装置)22およびXY方向に駆動するためのXYステージ(装置)23、溶媒を供給するための加熱キャピラリー装置(溶媒供給装置)31、探針11に印加するエレクトロスプレーのための直流高電圧を発生する高電圧発生装置41、探針11が試料ステージ21上の試料Sの表面に接触したことを検出する接触検知回路45、これらの各装置を制御する制御装置40等を備えている。試料のイオン化は大気圧下で行なわれる。

ここで駆動とは探針11または試料SをX、YまたはZ方向に移動(変位)させることを意味する。探針11の先端が向う方向(第1図で上下方向)(探針が変位する方向)がZ方向であり、Z方向に直交する2方向がX、Y方向である。Zステージ12、22が探針11および試料ステージ21の少なくともいずれか一方を、これらが互いに接近離間する方向(Z方向)に移動させる変位装置を構成する。この変位装置はZステージ12、22のいずれか一方で実現することもできる。XYステージ23は、試料Sの2次元イメージングのために、試料SをXY平面内(試料ステージ21の試料載置面内)で移動させるものである。試料Sのサンプリングは、XY平面内の一箇所につき1回(探針11の1回の上下往復動)でも、2回以上でもよい。この実施例ではXYステージ23にZステージ22が支持され、このZステージ22に試料ステージ21が設けられている。試料ステージ21は質量分析装置50の方向に延び、その先端部に試料Sを載せた基板24が固定される。

Zステージ12上には支持部材13が設けられ、この支持部材13上に絶縁体14を介して探針11が固定されている。探針11はこの実施例では直角に曲げられてその先端部が垂直下方(Z方向)を向くように配置されている。

これらの駆動装置12、22、23は、ピエゾ素子、モータ駆動または磁気駆動装置など機械的に再現性のよい運動機能を備えた装置を含み、各方向にnmオーダで変位量を制御できることが好ましい。特に、探針11をその長手方向に往復動させる装置12は、往復動(振動:1回の往復動を含む)の周波数、振幅および振動回数の制御ができるもので

10

20

30

40

50

あることが好ましい。

探針 1 1 が、その測定動作範囲内の上下動において、最も上方に位置したときに（この位置を上至点という）、探針 1 1 の先端が質量分析装置 5 0 のスキマー 5 1 のイオン導入孔 5 1 a の前方近傍にあり、導入孔 5 1 a の高さと同じか、わずかに高いところに位置するようにあらかじめ調整される。この位置で探針 1 1 の先端に捕捉された試料の分子がイオン化されて導入孔 5 1 a から分析装置 5 0 内に導かれることになる。試料 S は探針 1 1 の先端の真下に位置する。

イオン・サンプリング用スキマー 5 1 と探針 1 1 との間には高電圧発生装置 4 1 により、数 kV 程度のエレクトロスプレーのための直流高電圧が印加される。探針 1 1 の電位は正の高電位（正イオン観測モードの場合）、または負の高電位（負イオン観測モードの場合）である。試料 S（および基板 2 4、さらに必要であれば試料ステージ 2 1）が絶縁性のものである場合には（試料 S は電氣的に浮いている）、測定動作中は、常時、上記の直流高電圧を印加しておくことができる。この場合には、探針 1 1 が試料 S に接触すると（探針 1 1 が試料 S 内に侵入しているときも含む）、探針 1 1 と試料 S が同電位となる。探針 1 1 とスキマー 5 1 との間には直流高電圧が印加されているから、探針 1 1 が試料 S から離れて（探針 1 1 の先端には試料の一部が捕捉されている）、探針先端がイオン導入孔 5 1 a に近づくと、探針先端の電場強度が大きくなり、導入孔 5 1 a 近傍に達した探針先端からエレクトロスプレーが発生する。

上の条件において、探針 1 1 が試料 S の表面に接触すると、高電圧発生回路 4 1 の出力側と探針 1 1 との間に接続された抵抗（高抵抗体）にきわめて微弱な信号が現れる。これは、探針 1 1 が接地との間でキャパシタの一部を構成すると考えられ、試料 S との接触によりそのキャパシタンスにわずかな変化が生じるものと推定されるからである。上の微弱な信号は接触検知回路 4 5 によって検知され、制御装置 4 0 に与えられる。この信号はたとえば高電圧発生回路 4 1 に供給される商用電源の周波数をもつもので、それを増幅器 4 4 で増幅した後、接触検知回路 4 5 内のフィルタで抽出し、レベル弁別することにより検知される。

加熱キャピラリー装置（溶媒供給装置）3 1 の構成例が第 2 図に示されている。この装置 3 1 はブロック 3 2（セラミックまたは金属製）内に溶媒送液用細管 3 3 が通っていると同時に、ヒーター（ペンシルヒーター）3 4 が設けられている。送液ポンプ 4 2 から溶媒が細管 3 3 に供給され、ヒーター 3 4 によって加熱されて細管 3 3 の先端から溶媒の高温の蒸気が噴霧（スプレー）される。溶媒蒸気が上至点に位置する探針 1 1 の先端に当たるように、装置 3 1 が位置決めされ、かつ支持されている（支持体は図示略）。ヒーター 3 4 への加熱電流は電流制御装置 4 3 によってヒーター 3 4 が所望（所定）の温度となるように制御される。

溶媒としては、水、アルコール（メタノール、エタノール等）、アセトニトリル、各種水溶液、各種混合溶媒（たとえばクロロホルムとメタノールの混合溶媒）等、試料の種類に応じて、試料を溶解するもの、または湿潤させるものであれば何でもよい。

顕微鏡（光学顕微鏡、長距離顕微鏡、走査プローブ顕微鏡（SPM = Scanning Probe Microscopy）、走査型トンネル顕微鏡等）6 0 は、探針 1 1 の先端に試料（生体試料など）S を接触させかつわずかに突き刺して試料を捕捉した状態を観察するものであり、必ずしもなくてもよい。たとえば、第 5 図に示すように探針 1 1 の先端に極微量の試料（符号 SA で示す）が捕捉される。探針 1 1 の先端径は μm オーダまたはそれ以下（nm オーダ）である。

上述したように、好ましくは、探針 1 1 に常時直流高電圧を印加しておく。詳細な動作例については後述するが、概略を説明しておくこと次の通りである。

探針 1 1 を下降させて試料 S の所望の箇所に接触させ（探針 1 1 の先端が試料内に侵入することも含む）、探針 1 1 の先端に試料を捕捉する（サンプリング）。探針 1 1 が試料 S に接触している間は両者は同電位である。この後、探針 1 1 を上方に移動させる。探針 1 1 が試料 S から離れて、イオン導入孔 5 1 a に接近すると、探針 1 1 と質量分析装置 5 0 のイオン・サンプリング・スキマー 5 1 との間に印加された電位差によって、探針 1 1

10

20

30

40

50

の先端からエレクトロスプレーが発生し、探針 1 1 の先端に捕捉された試料 S の分子が気相に脱離しイオン化する。このようにして生成された試料イオンはイオン・サンプリング・スキマー 5 1 のイオン導入孔 5 1 a から吸い込まれて、質量分析装置 5 0 内へ導入される。

この実施例では、探針 1 1 と試料 S が常に同電位であるので、探針 1 1 から試料 S に向かうエレクトロスプレーは発生しない。探針 1 1 が試料 S から離れて、イオン導入孔 5 1 a に近づくと、探針先端の電場強度が増大して、探針 1 1 の先端からイオン・サンプリング・スキマー 5 1 に向かってエレクトロスプレーが発生する。この場合、探針 1 1 の先端とイオン・サンプリング・スキマー 5 1 先端との間の距離を数 mm 以下まで接近させることができるので、エレクトロスプレーで発生したイオンを効率よく質量分析装置 5 0 内に導入できる。

10

探針 1 1 の上下動は Z ステージ 1 2 により、試料 S の上下動は Z ステージ 2 2 によりそれぞれ行うことができ、試料 S の表面の 1 箇所につき探針 1 1 を試料 S に 1 回侵入させてもよいし、複数回侵入させてもよい。後者の場合、侵入の深さ (Z 方向位置) を変えてもよい。XY ステージ 2 3 によって探針 1 1 を侵入させる試料 S の表面の位置 (XY 方向位置) を少しずつ変えることにより、試料 S 表面のイメージングを行うことが可能となる。

探針支持台 (図示略) に多数の探針を設けておき (マルチプローブ)、試料表面の多数箇所から同時にサンプリングをして分析のスループットを上げることができる。探針 1 1 の先端は、試料の保持 (採取、捕捉) 効率を高めるために、表面を粗く加工してもよい (たとえば探針 1 1 の先端にねじ溝のような溝を切っておく)。

20

第 2 図に示すように、試料 S A を捕捉し、上至点付近に至った探針 1 1 の先端に、加熱キャピラリー装置 3 1 によって溶媒の高温蒸気を連続的に供給しながら、探針 1 1 に直流高電圧を印加してエレクトロスプレーを発生させる。これにより、探針先端部に捕捉された試料 S A はゆっくりと (たとえば、数 1 0 0 ミリ秒から数秒くらいで) エレクトロスプレーされる。これにより試料全体の分子がイオン化されて質量分析装置に導かれ、分析される。

溶媒の供給にはいくつかの技術的意味がある。

一般に、生体試料は多くの成分からなるので、試料を捕捉した探針に高電圧を加えて直ちにエレクトロスプレーさせると、エレクトロスプレーされやすい疎水性の成分が選択的にエレクトロスプレーされて、親水性の成分が探針に取り残される場合がある。生体成分の全成分をあまねく検出するために、探針先端に極少量の微細な溶媒液滴を供給し、緩慢なエレクトロスプレーを実現させる。これにより、帯電液滴のサイズが微細化されて、試料中の成分が選択性なく、エレクトロスプレーされ易い成分から、されにくい成分にわたって順次エレクトロスプレーされるので、全成分を分析できるようになる。すなわち、試料を溶解しつつ (試料に流動性を与えて) 探針先端から溶液状態となった試料がエレクトロスプレーされる。

30

溶媒供給によって、溶媒液体が探針表面の試料を溶解させながら表面流動して、探針先端からエレクトロスプレーが発生する。生成する帯電液滴サイズが数 1 0 nm オーダ以下となるので、1 個の液滴内に存在できる試料イオンが 1 分子イオン (一個) 以下になる。このため、試料中の分子イオンのすべてが検出されることになり、イオン検出効率が極限的に高まる。

40

一般に、エレクトロスプレーは極めて高感度で、探針先端に捕捉されたピコリットル以下の試料量で十分なイオン・シグナルを与える。この試料の全量を使って有効に分析するには、ゆっくりと試料をエレクトロスプレーさせる必要がある。この要求を満たすのが、この実施例の技術である。探針先端径は、好ましくは数 1 0 ないし数 1 0 0 nm であり、これが空間分解能を決める。すなわち、細胞一個 (直径が 1 0 μ m 程度) が十分測定対象となり得る。これにより、1 μ m 以下の空間分解能が達成できる。分子イメージング測定において、 μ m 以下の空間分解能をもつ技術が実現する。

このような分子イメージング測定において、多数点 (たとえば、1 mm² 程度の範囲内で 3 0 0 点) のサンプリングを行うと、非常に長い時間がかかる (たとえば数時間) ので

50

、試料が乾いてしまう。乾いた試料ではイオンがエレクトロスプレーしない。そこで、溶媒の（高温）蒸気を探針先端に吹きかけると試料がイオン化されてエレクトロスプレーされるようになる。

高温の溶媒蒸気（試料によって異なる、水の場合120 ~ 140 くらい）を弱く（ソフトに）探針先端に吹きかける。高温の水蒸気が常温の針に凝縮して結露する。上述したように、加熱キャピラリー装置31には送液ポンプ42から水を供給し、ヒーター34で加熱し、蒸気にし、加熱蒸気を加熱キャピラリー装置31から常時吹き出しておく。

探針11は上至点と下至点（試料Sの表面との接触位置、または試料S内に侵入した位置でもよい）との間を往復する。探針11が上至点に至ったときに、その先端に高温蒸気が当るように位置決めする。探針11が下至点にあるときには、高温蒸気は探針の先端よりやや上部の箇所に当るが問題はない。供給する溶媒は、一例としては、水で表現すると数マイクロリットル/分、水蒸気で表現するとその約1000倍で、数ミリリットル/分くらいの流量である。

このように、溶媒蒸気の供給は水分を多く含まない半乾燥状態の固体様試料について特に有効である。

第6a図から第6c図はマウスの脳の海馬を試料として用いたときの質量分析装置による分析結果を示すマススペクトル（グラフ）である。第6a図は十分な高温溶媒蒸気（溶媒は水で、数マイクロリットル/分程度）を供給したときに得られたグラフであり、第6b図は供給する高温溶媒蒸気の量を減少させたときに得られたグラフである。第6c図は溶媒蒸気を供給しなかったときに得られたグラフであり、イオンは全く検出されていない。このように、特に乾燥が進んだ試料のときには、溶媒蒸気を供給することにより、試料から分子が離脱しかつイオン化されていることが分る。

制御装置40は、あらかじめ定められたプログラム（探針11の往復動の周期、探針11の上下動距離、探針11を突き刺す深さ、2次元イメージング測定における測定点間隔、溶媒の流量、溶媒蒸気の温度、直流高電圧の値等）にしたがって、接触検知回路45からの接触検知信号に反応して、第4図に示すような一連の制御、すなわち、Zステージ12、22の制御、XYステージ23の制御、加熱キャピラリー装置31の制御、直流高電圧の印加制御を行う。

第4図を参照して、制御装置40による制御の一例を説明する。

探針11は上至点に位置している（時点t1）。探針11の下端と試料Sを載置した基板24の上面との間の距離Z1はたとえば数mmから十mm程度である。

Zステージ12の駆動により探針11は、たとえば基板24の上面から1mmから2mm程度（Z2で示す）の高さ位置まで下降し、停止する（この実施例では、この位置を下至点としている）（時点t2を経てt3）。

この後、Zステージ22の駆動により、試料ステージ21が上昇し、接触検知回路45から接触検知信号が出力されると（探針の先端が試料の表面に接触）（時点t4）、この位置から一定深さ分（探針11を突き刺す深さ。たとえば数 μm ~数百 μm ）（深さZ3）上昇して停止する（時点t5）。

試料Sの表面には凹凸があるので、その表面を検出し（表面接触検知）してから一定深さ分（Z3）基板24を上昇させれば、探針11の先端が常に試料表面から一定の深さまで達することになり、その位置にある試料の部分が採取（捕捉）されることになる。

この後、探針11は上至点まで上昇し、試料Sは元の高さ位置まで下降する（時点t6を経てt7）。

探針11には常に直流高電圧が印加されており（Vで示す）、かつ加熱キャピラリー装置31からは高温溶媒蒸気が供給されている。上述したように、探針11の先端が試料Sから離れ、探針先端がイオン導入孔51aに近づくとエレクトロスプレー発生が始まるが、探針11の先端が上至点に近づいた高さ位置で探針11の先端に溶媒蒸気が吹き付けられるので、試料の分子が離脱しかつイオン化して、その分析結果が得られる。

この間に、またはその後、XYステージ23によって、試料Sの位置がX方向またはY方向に微小距離移動する（時点t7~t11の間）。

10

20

30

40

50

再び探針 11 が下降していった（時点 t_{11} , t_{12} ），先に測定した箇所とわずかにずれた試料の箇所に探針 11 が突き刺さり，その試料部分を採取していき，同じように試料の分子の脱離とそのイオン化に基づいて分析が行なわれる。このようにして，試料 S の一定範囲内において，沢山の点についての部分の採取と分析が行なわれていくことになる（2次元イメージング）。試料上の同じ箇所，または異なる箇所で突き刺す深さ Z_3 を変えれば 3次元イメージングも可能となる。

第 4 図のタイムチャートにおいて，探針 11 に直流高電圧 V を常に（連続的に）印加している。また，溶媒蒸気も常に供給している。探針 11 が下降したときには溶媒蒸気は探針 11 の先端（最下端）ではなく，その上部にスプレーされるが，きわめて微量であるから支障が生じることはない。

10

他の実施態様としては，第 4 図に破線で示すように，探針 11 が試料 S から離れて，ある距離上昇した後（上至点の付近において），イオン・サンプリング・スキマー 51 と探針 11 との間に高電圧パルス印加して，探針 11 の先端にエレクトロスプレーを発生させてもよい。この場合，探針 11 と試料 S の間に電位差が生じないように両者を同電位としておくことが望ましい。

溶媒蒸気の供給も，第 4 図に破線で示すように，間欠的に行ってもよい。好ましくは高電圧パルスの印加よりもわずかに早目に溶媒を供給する。しかしながら，高電圧印加と溶媒供給のタイミングを厳密に制御しなくてもよく，これらがほぼ同時に行なわれればよい。

溶媒の間欠的な供給は，第 3 図に示すように，加熱キャピラリー装置 31 の溶媒蒸気出口と探針 11 との間（この間隔はたとえば数 mm ~ 十 mm 程度）に，シャッタ 35 を移動自在（進退自在）に設け，探針 11 が下降したときにシャッタ 35 を閉じ，シャッタ 35 によって溶媒蒸気が探針 11 にスプレーされるのを遮断するようにすればよい。

20

上記実施例では，溶媒を加熱してその蒸気を生成しているが，霧化器等により霧状の溶媒を生成してこれを探針に吹きかけてもよい。

上記の実施態様では試料ステージ 21 を XY 方向に移動させているが，探針 11 を XY 方向に移動させてもよい。また，第 4 図に示すタイムチャートにおいて，探針 11 が試料表面に接触したのち，試料を上昇させるのではなく，探針 11 を深さ Z_3 分下降させるように制御してもよいのはいうまでもない。

さらに，レーザ装置（たとえば YAG レーザ）を設け，そのレーザ出射方向が探針 11 の先端部の方向に向くように配置することができる。このレーザ装置も XY 方向および Z 方向に位置調整自在に支持されることが好ましい。

30

上至点位置にある探針 11 に，レーザ装置 16 によって横方向から，たとえば波長 532 nm の YAG レーザ光（2倍波）を照射する。探針 11 が最上部に引き上げられた位置（上至点位置）で，レーザビーム光が探針 11 の先端付近より数 μm 以内に照射されるように位置を調節する。レーザ光によって照射された金属（探針 11）表面には，表面プラズモンが誘起される。この表面プラズモンは探針 11 表面を先端に向かって伝播し，先端付近の電場強度が数桁にも増強される。また，赤外レーザ光で照射した場合，試料で濡れた探針表面が急速加熱され，この加熱効果で，捕捉された試料の脱離が促進される。また，赤外レーザ加熱により，非共有結合性複合体などの生体試料のサブユニットへの選択的解離も観測できる。赤外レーザ光を探針先端に直接照射せず，探針先端から外れた近傍（たとえば少し下方）に照射する。これにより，探針先端からスプレーされた帯電液滴を加熱することができる。この加熱で帯電液滴中のイオンの気相への気化を促進させ，イオン・シグナルを増強することができる。

40

試料中から特定の分子（たとえば癌のマーカ分子など）を選択的に探針に捕捉するために，第 7 図に示すように，試料の捕捉に先だち，探針 11 の先端部の表面を，所望の分子（化合物）を捕捉する分子 MO で化学修飾するとよい。

探針表面を化学修飾する分子としては，疎水性基修飾分子として $-(CH_2)_{17}-CH_3$ などが，親水性基修飾分子として， $-(CH_2)_{10}-NH_2$, $-(CH_2)_{10}-COOH$ などがあ

50

カー（抗原）の探索も可能となる。

このように、探針（金属）表面を種々の官能基をもつ分子で化学修飾し、ある特定の分子に対して特異的に親和性をもつようにし、これを生体試料などに接触させて、試料中の特定分子を選択的に探針先端に捕捉させることができる。

探針先端部のみを露出させ、その上部をテフロン等の高分子膜で覆って、探針先端部のみを試料が捕捉されるような構造の探針を用いることもできる。

【実施例 2】

【0007】

第 8 図は第 2 実施例のイオン化分析装置の構成を示すものである。この装置は、イオン化装置と質量分析装置（直交飛行時間質量分析装置）とが一体化されたものである。

イオン化分析装置 70 は、質量分析装置部（直交飛行時間質量分析装置部）71 とイオン化装置部 72 とから構成されており、その内部は真空中に保持される。

イオン化装置部 72 には、探針保持兼冷却用ステージ 73 が設けられている。このステージ 73 はヘリウム循環型冷却機、その他の冷却装置 76 上に回転軸を介して回転自在に保持され、かつ冷却装置 76 により所定温度まで冷却される。冷却装置 76 上に断熱材を介して設けられたモータ 77 によって歯車 78、79 等による減速機構を介して、ステージ 73 の回転軸が回転される。

ステージ 73 上には、多数本の探針 11 がステージ 73 の回転軸を中心として水平方向に放射状に配置可能であり、これらの探針 11 は、ステージ 73 にねじ 75 によって固定されるリング 74 によって押さえつけられ、固定、保持される（第 9 図参照）。ステージ 73 の表面の少なくとも探針 11 を保持する部分には絶縁体（図示略）が設けられる。またリング 74 も絶縁体である。各探針 11 にはリング 74 にねじはめられた導電性接触子 86 が接触している。

レーザー装置（図示略）からのレーザー光は、ミラー 82 で反射して（必要なら光学系で集光され）、窓 81 を通して装置 70 の内部に導かれる。ステージ 73 に保持された一つの探針 11（イオン収束用レンズ 83 に最も近い位置にあり、質量分析装置部 71 の方向を向いた探針）の先端部がレーザー光により照射される。

レーザー光によって照射される位置にある探針 11 の先端部付近に溶媒ガスを導入しかつ吹きつけるための細管 80 が配置されている。また、この位置にある探針 11 に接触する接触子 86 には、直流高電圧を印加するための摺動子 85 が接触し、該探針 11 にエレクトロスプレーのための直流高電圧が印加される。

第 1 図に示すイオン化装置を用いて、もしくは他の装置を用いて、または装置を用いずに作業者が手操作により、大気圧下において探針 11 の先端に上記実施例と同じように試料（生体試料）を捕捉する。

先端に試料を捕捉した探針 11 を第 8 図に示すイオン化分析装置 70 内に入れ、ステージ 73 上に固定する。ステージ 73 上には多数の試料を捕捉した探針をセットすることができる。

イオン化分析装置 70 内を真空排気し、かつ冷却装置 76 を作動させて探針 11（および捕捉された試料）を冷却する（たとえばマイナス 200 程度まで）。冷却温度は任意に設定することができる。

冷却した探針 11 の先端部に、細管 80 から溶媒ガス（水蒸気、アルコール、酢酸、トリフロオ酢酸、またはこれらの混合ガス）を吹き付けて探針 11 の先端部に蒸着（吸着捕捉）させる、すなわち、探針 11 に捕捉された試料の表面に溶媒による薄い吸着薄膜層を形成させる。溶媒ガスを吸着させる際に、探針 11 に高電圧を印加すると、ガスが高電場が発生している探針先端部に選択的に吸着されやすくなる。この効果を利用して、探針先端にガスの吸着を促進させることができる。探針に高電圧を印加せずに溶媒ガスを探針先端付近に吸着させてもよい。

探針 11 に吸着された溶媒ガスは、探針（金属）表面に捕捉された生体試料にしみ込んで、生体試料の流動性を増す。この状態で、探針 11 にエレクトロスプレーのための直流高電圧（数ないし数 10 kV）を印加すると、探針 11 の先端に直流高電場が発生する。

10

20

30

40

50

吸着ガスが試料に浸潤することで、試料に流動性が生じて、液状の試料が高電場の作用で探針先端に向かって輸送されて、先端からエレクトロスプレーが発生する。このエレクトロスプレーによって、試料中の分子がイオン化される。イオンは、収束レンズ83、イオン・ガイド84を経て質量分析装置部71に送られ、測定される。すなわち、試料イオンのマススペクトルが得られる。エレクトロスプレーが真空中で行われるので、大気圧エレクトロスプレーに比べて質量分析計へのイオンの輸送効率が1000倍程度高まり、高感度化につながる。

溶媒ガス吹き付けによるガスの吸着で（生体）試料の流動性を増し、またその脱離を支援することを目的として、冷却探針11に直流高電圧を印加した状態において、赤外レーザー光（10.6 μm）、紫外レーザー光（337 nm（窒素レーザー）または355 nm（YAG 3倍波））、または532 nm（YAG 2倍波）の可視光パルスレーザー光を照射し、探針11の先端に捕捉した試料を脱離、イオン化させる。赤外レーザー光照射（溶媒分子の振動励起）、または紫外、可視レーザー光照射（金属の表面プラズモン励起：分子の電子状態が励起される）によって、吸着ないしは凍結した溶媒固体が融解して流動性を増し、探針先端に捕捉された試料分子を溶解しつつ、これらを探針先端に輸送し、探針先端でのエレクトロスプレー現象でイオン化されて、真空に向かって脱離（スプレー）される。また、レーザー照射された金属表面に励起されたプラズモンによって、試料の脱離、イオン化が促進される効果もある。

溶媒分子として、水、アルコール、酸などを用いると、生体分子等のイオン化（プロトン化）が促進できる。532 nmの可視レーザー光照射を併用してもよい。これにより、金属表面に表面プラズモンが発生し、捕捉された試料の脱離が促進される。

ステージ73上には多数の探針11を保持することができるので、ステージ73を回転させて、探針11を順次、レーザー光の照射位置（高電圧印加位置）にもたせれば、これらの探針11に捕捉した多くの試料を順次分析することができる。

上記のすべての実施例において、探針材質は、基本的に金属またはシリコンなどの半導体を用いるとよい。赤外光を照射する場合には、探針は赤外線を反射しやすい金、Pt/Irなどが望ましいが、タングステン、SUS等でもよく、材質を問わない。また、探針は、極微量試料をその先端に捕捉できるよういかなる形状のものでもよい。単に真直な型のもの、ピンセット型のもの、ねじを切ったものなど、試料捕捉を可能とするすべての形状のものを含む。

上記のすべての実施例によると、細胞など、μmオーダのサイズをもつ生体のnmオーダのイメージングが可能となる。また、大気圧下での操作では、生きた細胞などを対象とすることができる。探針先端に捕捉される試料の量は、ピコリットル（pL）以下なので、生きた細胞や生体組織を低侵襲で測定、観察できる。

上記すべての実施例では、エレクトロスプレーで試料分子が脱離イオン化し、試料分子イオンに過剰なエネルギーが与えられないので、フラグメンテーションが起こらない。これらはきわめてソフトなイオン化法である。

生体試料には、塩が多く含まれ、電界によるスプレーが発生しにくいという取り扱いにくさがある。しかしながら、上記第1、第2実施例によると、たとえば、メタノールを大気圧下、または真空下で探針に吹き付け、もしくは蒸着させることで、生体分子のみを選択的にメタノールに溶解させてスプレーイオン化できる。塩は、メタノールに溶解しないので、スプレーされず、試料スプレーに悪影響を及ぼすことがない。

第2実施例における真空下での操作においては、脱離、イオン化が真空下で行われるため、生成したイオンのほぼ全量が質量分析計の検出系に導入され、測定できるので、高検出能が保証される。特に第2実施例の装置を用いると、探針を数多く使用し、多点試料捕捉できる。これら多くの探針を連続的に分析にかけることができるので、高スループット処理が可能となる。

その他の実施例

第10図に示すように、導電性（金属製）探針11の先端部の表面に、MALDI（Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization）

10

20

30

40

50

on : マトリクス支援レーザー脱離イオン化) のマトリクスMXを薄く塗布する。たとえば、探針11をマトリクスを溶解した溶液に侵入させて探針表面を濡らし、引きだした後、乾燥させるなどの操作を行う。マトリクスの厚さは数 μm 以下が好ましい。マトリクスの塗布は大気圧下で行うことができる。

次に、マトリクスMXが塗布された探針11の先端を大気圧下において試料(生体試料)に接触させて、試料SAを先端に捕捉する。そして、探針11の先端部に、マトリクスが吸収帯をもつ波長のレーザー光を照射して、マトリクスを脱離させる。このとき、探針11に(探針11とイオン・サンプリング・スキマーまたはキャピラリーとの間に)直流高電圧を印加しておく。レーザー光は、マトリクスが大きな吸収を示す赤外レーザー光 $10.6\mu\text{m}$ 、または紫外レーザー光 337nm などが好ましいが、マトリクスが吸収するものであれば、波長を問わない。

10

直流高電圧が印加されている探針11の先端がレーザー照射されると、マトリクスMXが熔融状態となり、試料との溶解/混合を起こし、探針先端からマトリクス支援レーザー脱離イオン化とエレクトロスプレーが複合したスプレーが発生する。これによって、効率のよい試料のイオン化と脱離が同時に起こる。この操作は、大気圧下、真空下のいずれで行ってもよい。発生したイオンはイオン・サンプリング・スキマー、キャピラリー等により質量分析装置内に導かれ、分析される。

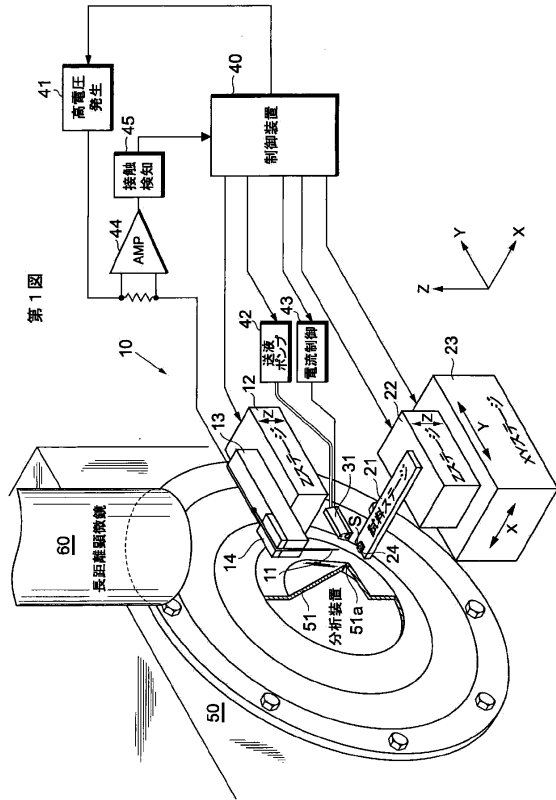
探針11の先端部表面にMALDIを塗布する実施形態においては、第1図に示すイオン化装置およびイオン化分析装置を用いることができるが、溶媒蒸気の噴霧は必ずしも必要ないから、加熱キャピラリー装置31を除いてもよい。

20

さらに他の実施例として、第1図の構成において、加熱キャピラリー装置31、送液ポンプ42、電流制御回路43を省いて溶媒を供給しないイオン化装置およびイオン化分析装置がある。この装置の特徴は、探針と分析装置のイオン導入路との間に常時(計測または分析動作中)直流高電圧を印加しておくことである。これにより高電圧印加の制御が簡単になる。また、探針が試料に接触することにより、少なくとも探針が試料に接触している間は探針と試料は同電位となるので、必ずしも積極的に同電位とするための操作または手段を講じなくてもよい(試料を電氣的に浮かせておいてもよい)。そして、探針が試料から離れて、イオン導入孔(イオン導入路)に接近すると、探針とイオン導入路との間に印加された電圧による電場が増強されて探針からイオン導入路に向かってエレクトロスプレーが発生する。この場合、探針の先端をイオン導入路の先端部にかなり(たとえば数mmまで)接近させることができる。エレクトロスプレーで発生した試料イオンを効率よく質量分析装置に導入することができる。

30

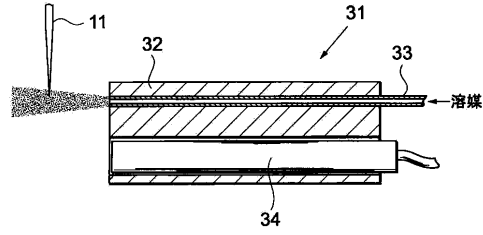
【図1】



第1図

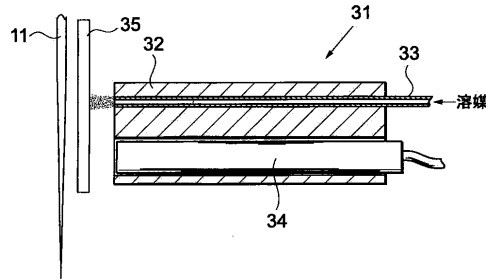
【図2】

第2図

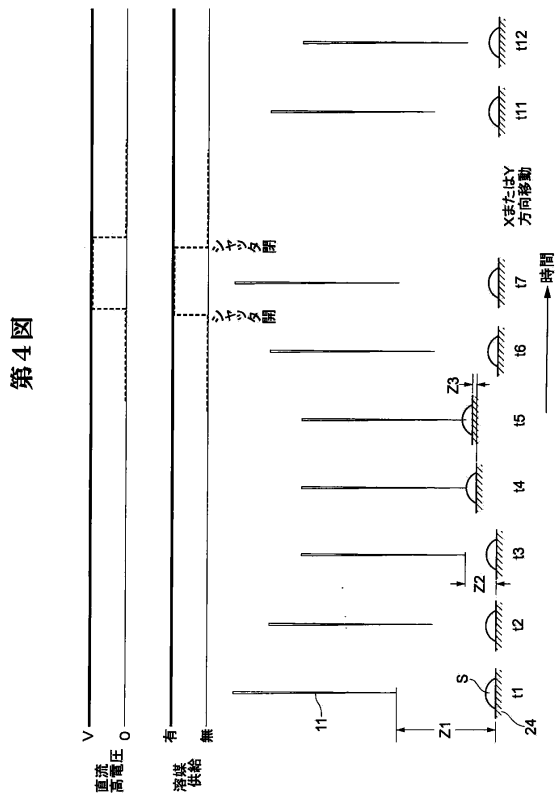


【図3】

第3図



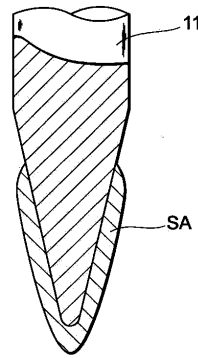
【図4】



第4図

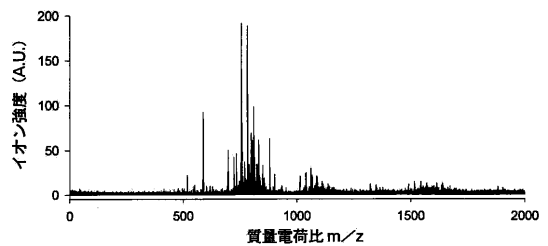
【図5】

第5図

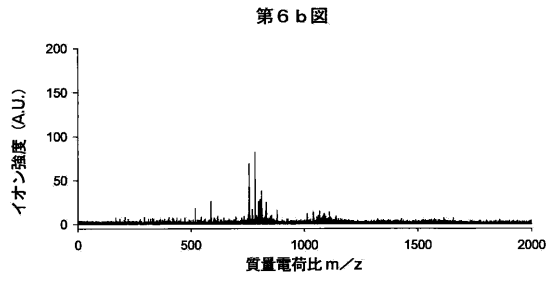


【図6a】

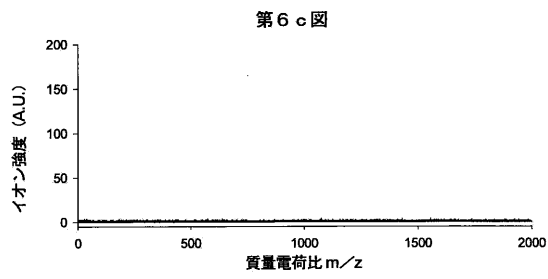
第6a図



【図6b】

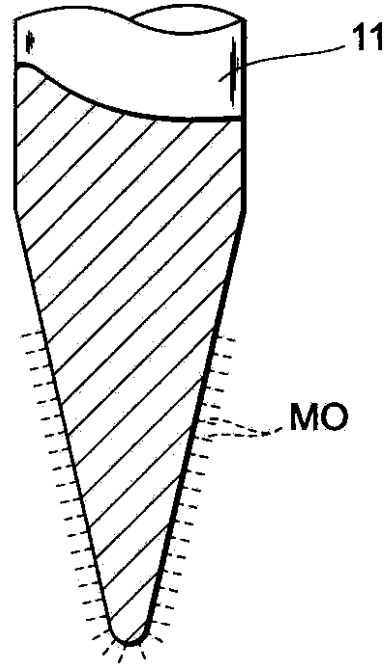


【図6c】

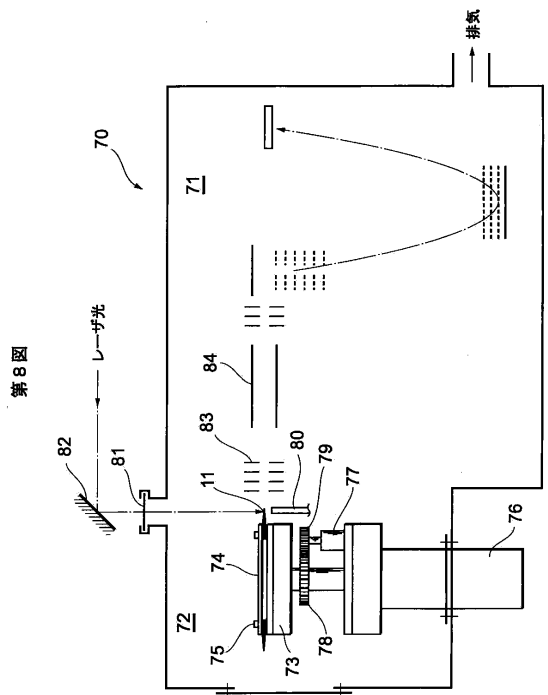


【図7】

第7図

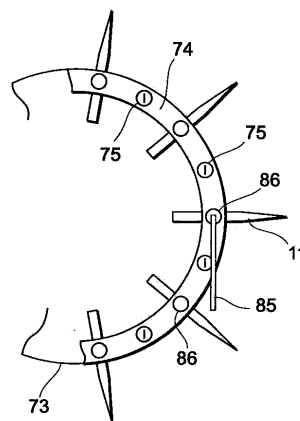


【図8】



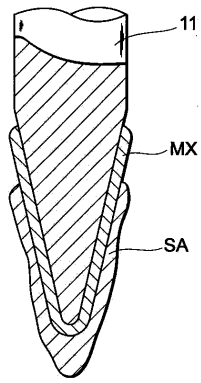
【図9】

第9図



【図 10】

第10図



フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第2007/126141(WO, A1)

特開2006-125984(JP, A)

特開平10-112279(JP, A)

特開2005-098909(JP, A)

特開2008-209544(JP, A)

特開2004-191262(JP, A)

特開2000-146775(JP, A)

特開2008-203057(JP, A)

Lee Chuin Chen, et al., "Characteristics of Probe Electrospray Generated from a Solid Needle", J. Phys. Chem., 2008年 8月12日, Vol.112, No.35, p.11164-11170

Lee Chuin Chen, et al., "Application of probe electrospray to direct ambient analysis of biological samples", RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, 2008年 7月1日, Vol.22, No.15, p.2366-2374

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N27/62-27/70

H01J49/00-49/48

JSTPlus(JDreamII)