

## バイオ材料分析を目指した飛行時間型2次イオン質量分析法のペプチドイオン検出感度増大法とインクジェットプリンターの応用

小松 学,\* 村山 陽平, 橋本 浩行  
キャノン株式会社 技術フロンティア研究本部 超高感度センシング研究グループ  
〒146-8501 東京都大田区下丸子 3-30-2  
\*komatsu.manabu@canon.co.jp

(2008年2月4日受理; 2008年3月17日掲載決定)

新しいバイオ材料の分析手法として飛行時間型2次イオン質量分析法 (TOF-SIMS: Time Of Flight - Secondary Ion Mass Spectroscopy) が近年注目を集めている。本稿では、TOF-SIMS のさらなるバイオ材料分析への適用を目指して我々が開発を行ってきた、ナトリウム塩、または、酸の水溶液を TOF-SIMS の検出感度増強剤として用いる方法を紹介する。この検出増強剤を、ペプチド膜試料表面にわずかに滴下することにより、質量数 7649 amu までのペプチド分子イオンを高感度に、かつ、試料の分布状態を維持した状態でイメージ検出することに成功している。さらに、この検出法とインクジェットプリント技術の併用による、インシュリン分子や消化処理タンパク質フラグメントの微細な可視化についてを合わせて紹介する。

## Enhanced Peptide Molecular Ion Imaging with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry And Its Application with Ink-Jet Printing Technology for Bio-Material Analysis

Manabu Komatsu,\* Yohei Murayama, and Hiroyuki Hashimoto  
Frontier Research Headquarters, HSS Research Group, Canon inc.  
30-2, Shimomaruko 3-chome, Ohta-ku, Tokyo, 146-8501, Japan  
\*komatsu.manabu@canon.co.jp

(Received: February 4, 2008; Accepted: March 17, 2008)

A new method in time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging, the drop-let-enhanced method, was developed for the molecular analysis of biomaterials. To facilitate the ionization of biomolecules, a small amount of aqueous solution containing sodium salt or an acid as ionization-enhancing agents was dropped onto peptide samples before TOF-SIMS measurement. Using this method, we have successfully obtained strong molecular secondary ion signals from molecular weight (MW) < 7649 peptide samples while maintaining their natural distribution. This method enables to visualize dot-patterned 20 amol insulin (MW 5733) with our bubble jet (BJ) printing technology. We also demonstrated the visualization of dot-patterned digested protein distribution with the BJ printing technology.

## 1. 緒言

さまざまな表面分析の手法において、SIMS 分析は、水素原子以上の元素や分子を ppm オーダー以下の極微量で検出できるといった高感度性に特徴がある。一方、短所としては、破壊分析であることや物質の定量的な計測が困難であるといった点がある。本稿で紹介する TOF-SIMS は、照射 1 次イオンに電流密度を極端に低下させたパルスイオンビームを用いることにより、非破壊に近い状態で測定する目的と合わせて、飛行時間型質量分析計による高分解能な検出を可能とし、有機物などの多彩な試料検出に適用した点が大きな特徴と言える。この TOF-SIMS の開発により、SIMS の高い検出能力を生かして、表面から数 Å 程度以下といった最表面における化学情報を得ることができ、さらには  $M/\Delta M=10,000$  以上の高い質量分解能で、1 万 amu を超える高い質量数までの 2 次イオン測定が可能となった。また、サブ  $\mu\text{m}$  オーダーの空間分解能でイオンイメージ検出も可能である。これらのことから、TOF-SIMS 分析を用いたバイオ関連のみならず、触媒、生体、環境物質などへの応用分野が大きく拓け、多くの材料科学の発展に寄与しつつある。

ここでは、バイオ材料のなかでも、とくに重要な成分となるタンパク質やペプチド高分子について、TOF-SIMS によって直接検出する方法の開発を試みた結果を報告する。

先に述べたように、TOF-SIMS の大きな特徴として有機物などの分子イオンを検出できる点が挙げられるが、ガリウム (Ga) などの単原子を照射 1 次イオンとして用いた場合、実際に分子イオンとして検出可能な質量範囲としては数百 amu 程度以下となっている。この原因はまだ定かではないが、高エネルギーの単原子イオンを試料に照射した場合、表面近傍にある成分の飛翔 (スパッターリング) へのエネルギー伝達が十分ではなく、さらに質量の大きな分子ほど、ある程度十分なエネルギーを与えられないと表面から飛翔しにくいことに起因すると考えられている[1]。近年、金 (Au) やビスマス (Bi)、 $\text{C}_{60}$  フラーレンといったクラスターイオンを照射 1 次イオンとして用い、試料表面近傍への高い密度エネルギー付与による非線形的なスパッターリング効果から、比較的高分子の検出が容易となってきている[2]。しかし、それでもまだ質量数が 1 千 amu を越えるような高分子イオンの検出は容易でない。また、タンパク質をはじめとする多くの生体材料を構成している分子の質量数が数千から数十万 amu であることを考えると、

これらの有機材料の分析において TOF-SIMS はまだ十分に対応しきれていないと言える。従って、TOF-SIMS 測定において、質量の大きな分子イオンの検出感度を高めることが、バイオ材料を中心とする有機材料などへの適用範囲を広げるために必要不可欠であると考えられる。そこで我々は、ペプチド高分子の検出感度を高める手法について検討した。また、将来的にインクジェットプリント技術の応用を考えて、水溶性の材料を用い、それを試料表面に滴下するだけでイオン検出感度の増大効果があるような物質の検討をおこなった。その結果、イオン検出感度を飛躍的に増大させる 2 種類の水溶性材料を見出すことができた。

## 2. ペプチド高分子検出技術の開発

今回、測定用試料として、ペプチドを水に溶解させ (濃度は約  $10^{-4}$  M)、シリコン基板や金蒸着膜基板の上にピペッターで滴下 (約  $2 \mu\text{l}$ ) 後、大気中で乾燥してペプチド薄膜を作製したものを用いた。

金蒸着基板を用いるのは、基板効果と呼ばれる効果を期待するためで、この方法は、金や銀などの貴金属を蒸着した基板上に単分子レベルの薄い膜を作製する[3]、または、直接、試料表面に薄く貴金属を蒸着することにより[4]、貴金属原子を介して 1 次イオン照射時のエネルギーを試料表面近傍に高密度に付与する働きがある。この働きにより試料成分の分子が飛翔しやすくなり、生成イオン効率を増大する効果があると考えられている。また今回、同様のペプチド膜試料で、基板に様々な金属 (金、銀、白金、アルミニウム、インジウム、ビスマス、ニッケル、シリコン) を用いての実験をおこなったところ、ペプチド膜試料に対しては、金蒸着基板を用いるのが最適であるとの結論を得ている。

この金蒸着基板上に薄く作製した質量数 1600 amu 程度の Y (チロシン)、C (システイン) からなる合成ペプチド (YYYYCYYYYY) 膜試料の表面に、ペプチド高分子のイオン検出感度の増大効果を得られる増感物質として、濃度約 0.1% の炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 水溶液をピペッターで  $1 \mu\text{l}$  ほど滴下して、同様に大気中で乾燥して測定用の試料を作製した。この試料を TOF-SIMS で測定すると、ペプチド分子に  $\text{Na}^+$  が付加した形のイオン ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) を、イメージとして得られる程に強く検出することに成功している (Fig. 1) [5]。

Fig. 1 のスペクトルに示されているように、ペプチド分子にプロトンイオン ( $\text{H}^+$ ) が付加したピーク

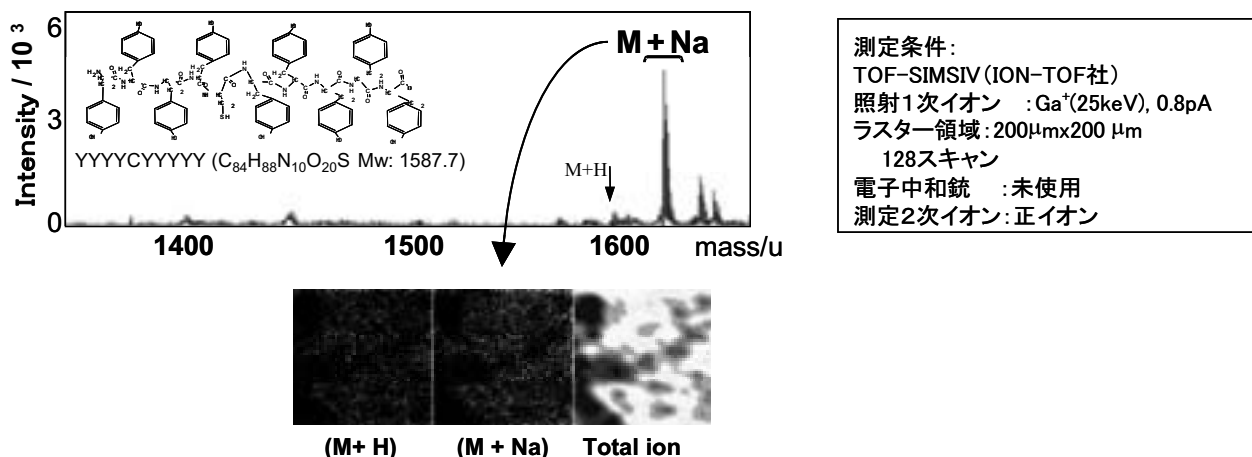


Fig. 1. Positive ion ToF-SIMS spectrum and ion image of YYYYYCYYYYY peptide after enhancing treatment using Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq. droplet.

([M+H]<sup>+</sup>)も同時に検出されているが、その強度は非常に弱く、単純に、Na<sup>+</sup>付加したピークとの強度を比較すると約 1/400 倍となっている。また、増感物質としての Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液を加えない試料においては、このペプチド分子の H<sup>+</sup>付加、および、Na<sup>+</sup>付加の両イオンとも一切検出されなかった。

さらなる高質量のペプチド高分子の検出を高める手法として、上記と同様に、金蒸着膜基板の上に作

製したペプチド薄膜試料表面に、濃度約 0.2%のトリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を 5 μl ほど滴下することにより、ペプチド分子に H<sup>+</sup>が付加した形で、質量数 7649 amu までのペプチド高分子が検出されることを我々は見出した [6]。Fig. 2 に、インシュリン・グロースファクター -I (Insulin Growth Factor-I, 質量数 7649 amu) とインシュリン (Insulin from Bovine Pancreas, 質量数 5733 amu), それぞれのペプチド分

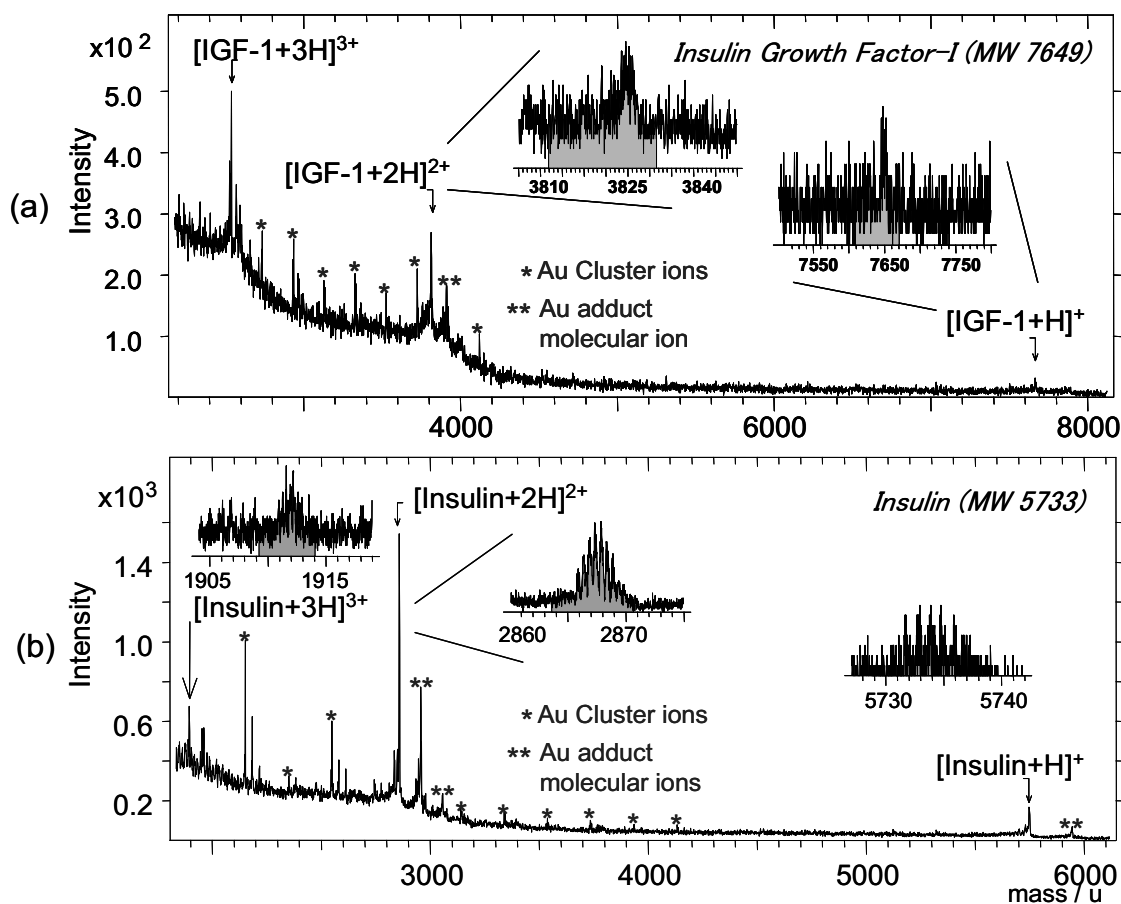


Fig. 2. Positive ion ToF-SIMS mass spectrum of (a) Insulin Growth Factor-I and (b) Insulin from thin film sample after enhancing treatment using TFA droplet.

子イオンの検出例を示す(測定条件は, Fig. 1 の時と同様). さらに, この手法で得られるスペクトルの特長として, TOF-SIMS では検出報告例が少ない,  $H^+$  が 2 つ, 3 つと付加した形の, 2 価, 3 価のペプチド分子イオンが検出される点にある. この多価イオン検出の特長は, 2 価, 3 価と価数が増えるにしたがって, 検出器への衝突エネルギーが 2 倍, 3 倍と大きくなり, 質量数 2000 amu 以上の高質量域イオン検出時に生じるマイクロチャンネルプレート (MCP) の検出能力低下の問題[7]を回避できるため, 通常の 1 価イオンを直接検出するよりも感度良く検出できる点にある.

以上, ペプチド高分子イオンを高感度に得られる新しい手法について紹介したが, このイオン検出感度の増大メカニズムについてはまだ不明瞭な点が多い. 表 1 に, 様々な質量数のペプチド高分子の結果をまとめた. この表に示すように, 現段階で検出ができた最大質量数のペプチドイオンは, 質量数 7649 amu の Insulin Growth Factor-I までで, それ以上の質量数を持つペプチドイオンの検出はできていない. また,  $Na_2CO_3$  を用いた  $Na^+$  付加の増感法では, 質量数が 1600 amu 程度までのペプチド分子に有効であり, TFA を用いた  $H^+$  付加の増感法では, どちらかと言えば, それ以上の質量数のペプチドに有効である. また, Fig. 1 で示した  $Na^+$  が付加した形のイオン ( $[YYYYCYYYYY+Na]^+$ ) のスペクトルを正確に読み取り, 分子構造式に基づいて計算したスペクトルと比較すると, ペプチド ( $YYYYCYYYYY = C_{84}H_{88}N_{10}O_{20}S$ ) の質量数 (1587.7 amu) に Na の質量

数 (22.99 amu) を加えた質量数位置 (1610.7 amu) でイオンが強く検出されていることが判る(Fig. 3). このことから, イオンの形成は, 多くのペプチド分子の末端位置に存在するカルボキシル基 ( $-COOH$ ) での Na 置換 ( $-COONa$ ) が生じているのではなく, 単に, ペプチド分子に  $Na^+$  が吸着してイオンが形成されていることを意味している. つまり, 化学的な結合の変化ではなく, 試料が 1 次イオン照射でスパッタリングされて基板から飛翔したのちに, 中性ペプチド分子に  $Na^+$  イオンが吸着して  $[M+Na]^+$  の形態のイオンが形成されることを示唆している. このことは, カルボキシル基を持たないペプチド分子でも同様のイオン検出感度の増大効果を得られる[5]ことから推察される. 同様に, TFA を用いた増感法では, TFA が強酸性であることから試料中に  $H^+$  を多数存在させる働きがあり,  $Na^+$  の付加と同様にペプチド分子への  $H^+$  吸着の現象が増加し, ペプチド分子イオンの検出感度が向上したと考えられる[8].

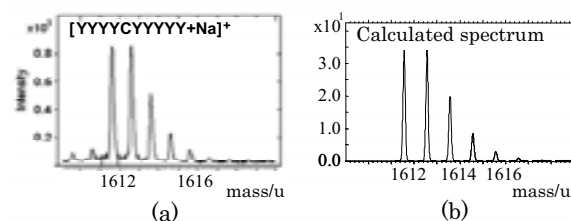


Fig. 3. (a) Expansion of mass spectrum of in vicinity of  $[YYYYCYYYYY+Na]^+$  at Fig. 1(a). (b) Calculated spectrum from molecular structural formula of  $[YYYYCYYYYY+Na(=C_{84}H_{88}N_{10}O_{20}SNa)]^+$ .

Table 1 Detection of various peptide after  $Na_2CO_3$ /TAF aqueous droplet treating.

Peptide name	Molecular weight	$Na_2CO_3$ enhancing	TFA enhancing
Morphiceptine	521	◎	○
Synthetic polypeptide [YYYYCYYYYY]	1589	◎	○
Insulin A chain	2531	×	◎
Insulin B chain, oxide	3496	×	○
Gastric inhibitory polypeptide	4983	×	◎
Insulin	5733	×	◎
Insulin growth factor-I	7649	×	○
Ubiquitin	8565	×	×
Cytochrome c	12327	×	×

◎: very good, ○: good, ×: not detected

したがって、このイオン検出増感法のメカニズムとしては、ペプチド分子の試料中に、Na や H といった比較的イオン化エネルギーが小さく TOF-SIMS のスパッタリングでイオン化されやすい物質が適度に存在すると、スパッタリング中で Na<sup>+</sup>や H<sup>+</sup>と中性のペプチド分子イオンとの吸着確率が高まるため、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>付加ペプチド分子イオンが検出されやすくなると考える。ただし、Na や H があまり多く存在すると、逆にイオン検出増感の効果が減少することも確かめられている[5,6].

このイオン形成増大の手法は、2004 年のノーベル化学賞受賞となった島津製作所の田中耕一氏が開発したことで広く知られる、マトリックス・アシスト・レーザー脱離イオン化法 (MALDI) [9]のマトリックス剤の作用に似ている。このマトリックス剤も、タンパク質などの試料と混在させておき、レーザー照射エネルギーを受けることによりマトリックス分子自身が爆発しながら分解し、試料の飛翔を促すと同時に H<sup>+</sup>を多数放出する。この H<sup>+</sup>が中性タンパク質分子などの試料成分への吸着確率を高め、検出イオンの増大につながるのである[10]。このマトリックス剤の効果と同様の現象が、TOF-SIMS のスパッタリングで生じ、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>付加ペプチドイオンの検出増大につながったと考えるのが妥当である。余談ではあるが、TOF-SIMS にマトリックス剤を適用することにより、ペプチド高分子の検出も可能である[11-12]。しかしながら、マトリックス剤を試料に混ぜて用いなければならないことや、乾燥時にマトリックス剤が数 $\mu\text{m}$  レベルの微結晶を形成してしまうといった問題があるため、この手法を用いて TOF-SIMS の特長である微細なイメージングを活用することはできていない。

以上、増感剤を用いることによって TOF-SIMS のイオン検出感度が増大する理由について述べたが、これらはまだ推測の域であり、また、ここで述べた以外にも、TOF-SIMS のイオン形成メカニズムには様々な要因が存在するため、現段階ではこの検出イオンの増大の説明はまだ十分にできていないと考える。この現象をより詳細に解明できれば、より大きな分子をさらに高感度に検出することも可能となると思われる。今後もこの技術についての開発をおこなっていく予定である。

また、この増感法の応用面としての特徴は、試料表面へ増感物質の水溶液をわずかに滴下することによって、試料の位置情報をほぼ保持したままペプチド高分子イオンの検出ができることである。この技

術により、他の多くの有機材料において高質量分子のイメージングを可能にすることができると考えられる。以下に、そのひとつの応用例として、インクジェットプリント技術を用いた方法を紹介する。

### 3. BJ プリント技術の応用

キャノンが開発したバブルジェット(BJ)方式のプリント技術は (Fig. 4), 水溶性の材料に限られるが、ピコリットル (pL) オーダーの液滴を、安定した液滴量で数 $\mu\text{m}$  レベルの位置制御で吐出できるという特徴を持つ[13]。また、この作製手法により、吐出量を正確にコントロールした微小な薄膜のドットパターンを容易に形成できることから、ある程度の定量的な分析も可能となる。たとえば、この作製手法により作られた DNA チップに TOF-SIMS 分析を適用して、DNA プローブの存在量の定量的な測定を可能にした報告などをしている[14-15].

以下に、上記の増感物質の水溶液滴下によるペプチド高分子イオン検出技術の応用例として、この BJ プリント技術を適用した実験をいくつか紹介する。

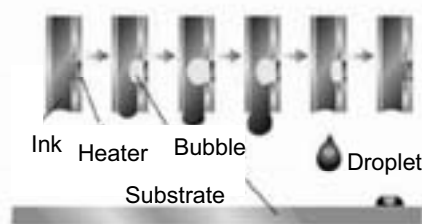


Fig. 4. Scheme of bubble jet printer head system.

#### 3.1. BJ プリントによるペプチド分子の微細/微量検出

質量数 500 から 1600 amu までの 3 種類のペプチドを、それぞれをあらかじめ 0.1%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液と混ぜ、それぞれ異なる BJ プリントヘッドからの重ね打ちで、金蒸着基板上にドットパターン状にプリントした試料を作製、それを TOF-SIMS で測定した結果を Fig. 5 に示す。全てのペプチドイオンがイメージで得られるほどの感度で検出されている。この実験により、BJ プリント技術と TOF-SIMS を合わせることで、複数種のペプチド分子を同時に検出でき、さらには、BJ プリント技術によって、各種ペプチド分子を 0.2~2 fmol (1 ドット内) といった微量なペプチドサンプルに対しての定量的な検出も可能にすることが示唆された[5]。将来的に、ペプチドなどを用いた薬剤スクリーニングを BJ プリント技術

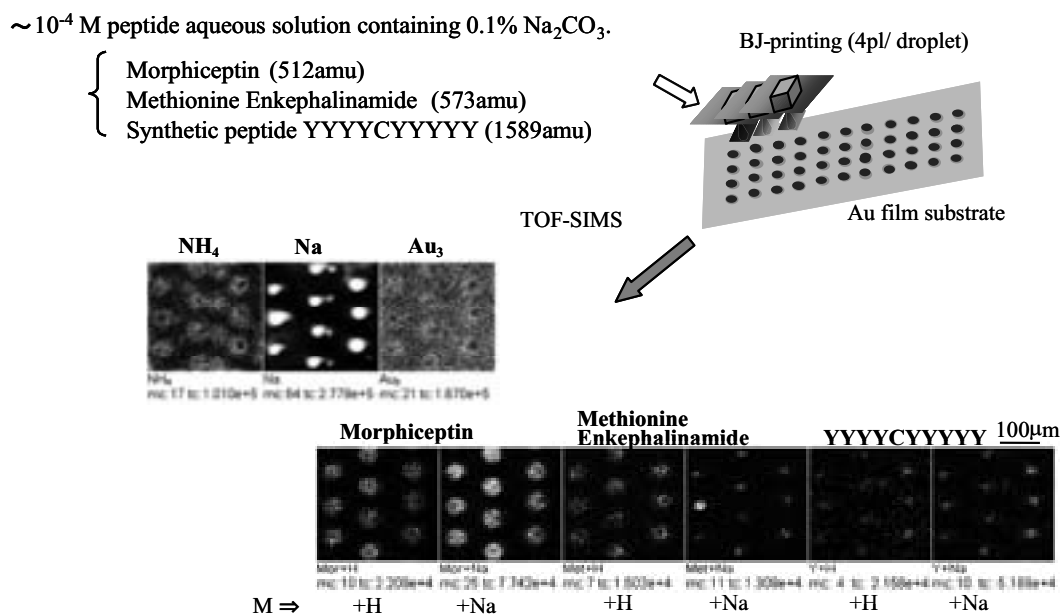


Fig. 5. Ion images of three peptides sampling with a multi-head bubble jet printing. The number of each peptide molecules were 0.2~2 fmol in one BJ dot.

と TOF-SIMS 分析で行うなど、さまざまな応用が考えられる。

また、Fig. 6 に示したのは、同じく BJ プリント技術を用いて、増感剤の TFA (0.2%) 水溶液に混ぜたインシュリン (10<sup>-4</sup> M) を、1 ドット 4 pL で金基板の上にドットパターン状にプリントし、TOF-SIMS で測定したものである。1 つのドットに含まれるインシュリンの分子数は、約 0.2 fmol と非常に微量であるが、これをイメージにできるほどの感度で検出できている。また、このプリントドットのサイズは直径 30 μm ほどである[6]。

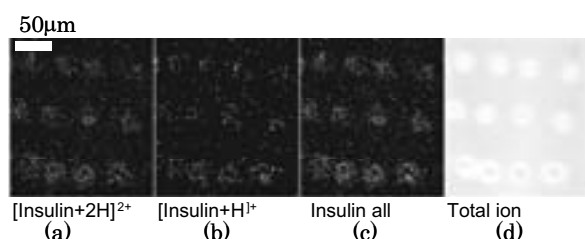


Fig. 6. TOF-SIMS images from the Insulin BJ dot sample. (a) [M+2H]<sup>2+</sup>, (b) [M+H]<sup>+</sup>, (c) the sum of [M+2H]<sup>2+</sup> and [M;H]<sup>+</sup>, and (d) total ion. The number of insulin molecules was about 0.2 fmol in one BJ dot and the diameter was about 30 μm.

### 3.2. BJ プリントによるタンパク質消化技術の開発

続いて、BJ プリント技術の応用手法として生体試料表面への消化酵素付与によるタンパク質の消化処理を試みた。先に述べたように、質量数が数万から数十万 amu におよぶタンパク質の検出は TOF-SIMS では不可能であるため、その対応手段の 1 つとして、近年、MALDI で広くおこなわれるようになった手法であるが[16-17]、消化処理によってタンパク質分子を断片ペプチドに分解し、その断片ペプチドを TOF-SIMS で検出することにより元のタンパク質を同定するという手段が考えられる。ただ、この消化処理時に問題となるのは、消化酵素付与などにより断片ペプチドなどの流出が生じ、元のタンパク質の分布情報が得られなくなることである。現在の BJ プリント技術では、吐出される 1 滴の液量は最少で 1 pL と微量であり、基板上に形成されるドットの径は 10 μm 程度に抑えることが可能である。そのため消化酵素の付与方法、および試料表面での液滴の乾燥や流出を抑える工夫を加えることにより、たとえば細胞レベルでのタンパク質イメージングをも TOF-SIMS で実現できると我々は考えている。しかし、ここで問題となるのは、BJ プリント技術を用いての数 pL といった非常に微量な液滴で、はたしてタンパク質の消化処理をおこなえるか? といった点である。今回、この問題を検証するために、32 pL の消化酵素液滴付与による消化処理の実験をおこなった

ので、それを紹介する。

金蒸着基板上にスピコートで形成したタンパク質 (HAS: human serum albumin, MW ~66k) 膜を形成し、消化酵素のトリプシンをBJプリンターで滴下(4 pℓ を 8 回重ね打ち)して、タンパク質の消化処理をおこなった。TFA 増感剤の付与後、TOF-SIMS で測定したタンパク質の断片ペプチドをイメージ検出した結果を Fig. 7 に示した[18]。Fig. 7(a)に TOF-SIMS 分析時の試料の光学顕微鏡像を示す。ここで見える半透明の4つの点が、滴下したトリプシン液滴の凝固したものである。Fig. 7(b)に、それぞれ代表的な断片ペプチドイオンのイメージを示したが、いずれも検出強度が低いため十分なイメージを得ることができていない。Fig. 7(c)に、それらの各断片ペプチドイオンのイメージデータを足し合わせたイメージを示すと、Fig. 7(a)にある液滴ドットの箇所に一致した4つのドットパターンを明瞭に得ることができた。これにより、BJプリントによって滴下された消化酵素ドット箇所での消化がおこなわれていることがわかる。また、Fig. 7(d)に、同じ測定で得られたコンタミ成分のシロキサン由来の  $\text{SiC}_3\text{H}_9^+$  イオン ( $m/z=73.1$ ) と基板から生じる  $\text{Au}^+$  イオン ( $m/z=196.9$ ) のイメージを代表例として示すが、断片ペプチド以外の物質ではドットパターンは観察されていない。このことから、断片ペプチドのイメージデータで得られた4つのドットパターンは試料の凹凸などによって生じた信号エラーなどではなく、明らかに消化酵素反応で形成された断片ペプチドの分布を表していることが判る。ここで示した1つのドットサイズは  $50 \mu\text{m}$

程度であることから、この BJ プリント技術による消化処理により、実質、空間分解能が  $50 \mu\text{m}$  以上でタンパク質イメージングをおこなえたことに相当する。さらに、BJプリントの液滴をより小さくするなどの工夫により、より小さな径での消化処理をおこなえる可能性がある。

#### 4. おわりに

TOF-SIMS のバイオ材料の分析技術について、高質量数のペプチド分子イオン検出を目指して開発をおこなったイオン検出増感法を紹介し、さらに、この増感手法とインクジェットプリント技術を併用することによる新しいバイオ材料の分析応用をいくつか紹介した。上記においては詳しく述べなかったが、この手法の問題点として、増感効果を得るためには金蒸着基板などの基板効果を与える補助材料を必要とすることである。実際、多くのバイオ試料を薄く切片化して基板上に設置するのは非常に困難である。従って、この増感剤を実際のバイオ試料に適用する際には、試料表面に薄く金蒸着をおこなう方法が今のところ一番有効である。しかし、その分手間がかかるのも事実であり、今後、この問題の改善が強く望まれる。

また冒頭に紹介したように、最近では、Au や Bi,  $\text{C}_{60}$  を用いたクラスタービームを1次イオンとして用いる事が主流となりつつあり、増感剤や基板効果を使用しなくても質量数が1千 amu 程度までの高分子イオンであれば検出が可能となっている。このクラスタービームと今回紹介した増感手法をうまく

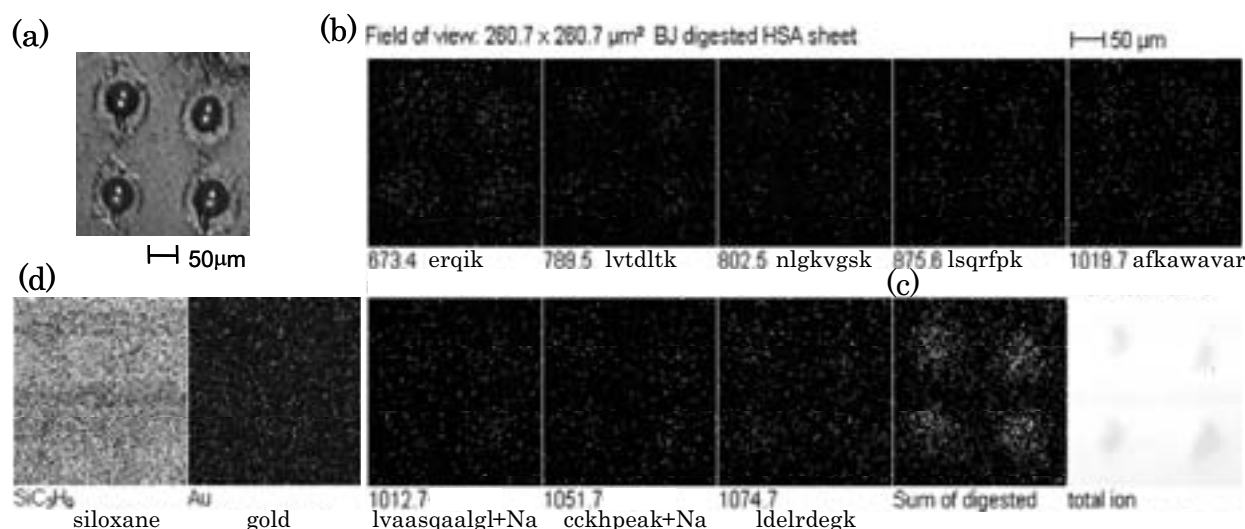


Fig. 7. TOF-SIMS imaging from BJ dot digested HAS film sample. (a) optical microscope image of the sample. (b) Ion images correspond to the representative digested fragment peptide ion peaks from HAS. (c) Gathered ion image of all digested fragment peptide ion images. (d) Ion images of non-digested material (siloxane molecule and gold) ion images.

併用させるなどして、また新しい展開が開けるかもしれない。このようにして、今後も様々な発展が期待されることから、TOF-SIMS で容易にバイオ材料の分析をおこなえるよう、この開発を続けていく予定である。

## 5. 参考文献

- [1] Z. Postawa, B. Czerwinski, M. Szewczyk, E. J. Smiley, N. Winograd, and B. J. Garrison, *J. Phys. Chem. B* **108**, 7831 (2004).
- [2] A. Brunelle, S. Della-Negra, J. Depauw, D. Jacquet, Y. Le Beyec, and M. Pautrat, *Phys. Rev. A* **63**, 022902 (2001).
- [3] A. Delcorte, J. Bour, F. Aubriet, J.-F. Muller, and P. Bertrand, *Anal. Chem.* **75**, 6875 (2003).
- [4] A. F. M. Altelaar, I. Klinkert, K. Jalink, R. P. J. de Lange, R. A. H. Adan, R. M. A. Heeren, and S. R. Piersma, *Anal. Chem.* **78**, 734 (2006).
- [5] M. Komatsu, K. Kuge, and H. Hashimoto, *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **4**, 1 (2006).
- [6] Y. Murayama, M. Komatsu, K. Kuge, and H. Hashimoto, *Appl. Surf. Sci.* **252**, 6774 (2006).
- [7] I. S. Gilmore and M. P. Seah, *Inter. J. Mass Spec.*, **202**, 217 (2000).
- [8] A. Benninghoven and W. K. Sichter mann, *Anal. Chem.* **50**, 1181 (1978).
- [9] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spec.* **2**, 151 (1988).
- [10] 田中耕一, ぶんせき 4月号, 253 (1996).
- [11] K. J. Wu and R. W. Odom, *Anal. Chem.* **68**, 873 (1996).
- [12] A. F. M. Altelaar, J. van. Minnen, C. R. Jimenez, R. M. A. Heeren, and S. R. Piersma, *Anal. Chem.* **77**, 735 (2005).
- [13] T. Hara and I. Endo, *J. Instrum. Image Electron. Eng. Jpn.* **11**, 66 (1982).
- [14] T. Okamoto, T. Suzuki, and N. Yamamoto, *Nature Biotechnol.* **18**, 438 (2000).
- [15] H. Hashimoto, K. Nakamura, H. Takase, T. Okamoto, and N. Yamamoto, *Appl. Surf. Sci.*, **231-232**, 385 (2004).
- [16] S. Shimma, M. Furuta, K. Ichimura, Y. Yoshida, and M. Setou, *Surf. Interface Anal.* **38**, 1712 (2006).
- [17] M. R. Groseclose, M. Andersson, W. M. Hardesty, and R. M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.* **42**, 254

(2007).

- [18] M. Komatsu, M. Murayama, and H. Hashimoto, *Appl. Surf. Sci. (in press)*.

## 査読コメント

### 査読者 1. 工藤正博 (成蹊大学)

基本的には問題ありませんが、より格調の高い、読者に親切な論文にするために以下のコメントをしました。

#### [査読者 1-1]

緒言で“分子の質量が大きくなるほど照射1次イオンによる破壊などの問題により”と述べていますが、本当ですか？小さいと問題にならない？

また、高質量イオンの検出が難しい理由がはっきりと述べられていないように思えますが、簡単に整理して記述してはいかがでしょう。

#### [著者]

私の理解が浅く、とても考えされたコメントです。まだ十分ではないかもしれませんが、参考文献[1,2]と共にあらたな解釈を加え、補足して記述しました。

#### [査読者 1-2]

TFAの説明は本文中でなされていますか？

#### [著者]

ご指摘の通り、TFAの説明がありませんでした。「2. ペプチド高分子検出技術の開発」の後半部分に、加筆しました。

### 査読者 2. 阿部芳巳 (三菱化学科学技術研究センター)

本投稿原稿は、バイオマテリアルの検出感度増大法にする有用な研究成果がまとめてあり、JSAのToF-SIMS特集号に掲載する価値が高いと考えます。ただし、掲載を採択する前に、いくつか改訂コメントを付しましたので、ご検討のほど、よろしくお願い申し上げます。

#### [査読者 2-1]

「2. ペプチド高分子検出技術の開発」で、はじめにペプチド薄膜を試料に用いた旨が記述されており、Fig. 1をみるとペプチドがYYYYCYYYYYであることがわかります。ただ、アミノ酸の略号表記になじみのない読者にも分かりやすいよう、本文中で、“チロシン (Y) とシステイン (C) から成る合成ペ



「ペプチドを水に溶解させ」などと補足してください。

**[著者]**

適宜補足しました。

**[査読者 2-2]**

「2. ペプチド高分子検出技術の開発」で、Na イオンや H イオンによる増感効果が紹介されており、Table2 に元素のイオン化エネルギーが記載されています。ここで、イオン化エネルギーがより高い H の方が Na に比べて高い質量数のペプチド検出に有効である理由は何でしょうか？もし、補足できる点があれば記述ください。そうでなければ、Table 2 の掲載の意図がわかりません。

**[著者]**

ご指摘の通りだと思います。実は、H, Na の意味はある程度の説明がつくのですが、現在その検証をおこなっている最中でして、本稿では理由を記載していません。Table 2 を含め、削除いたしました。

**[査読者 2-3]**

「3. BJ プリント技術の応用」の「3.1. BJ プリント

によるペプチド分子の微細/微量検出」で、“BJ プリント技術によって、各種ペプチド分子を 0.2~2 fmol (1 ドット内) といった高感度かつ定量的な検出も可能にする”と記述しています。ここで、高感度化を実現したのは増感剤の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> との混合と考えられますが、BJ プリント技術との因果関係が分かりません。また、定量的な検出というのは、濃度既知のペプチド溶液を BJ プリント技術でプリントすることにより、濃度と得られる検出強度との関係式(検量線)を導いて定量できる、といった意味でしょうか？読者の理解を助けるために、“BJ プリント技術”と“高感度かつ定量的な検出”の関係をもう少し補足して記述ください。

**[著者]**

ご指摘の通り、BJ プリントが増感作用を持つわけではありません(本当は、極薄膜の作製などでの働きはあるのですが)。この箇所は、適切に訂正しました。また、定量の実験も、参考文献[5]に記載がありますので、本稿では参考文献を明示し、本稿の結果では“示唆する”との表現にさせていただきました。