COMMENTARY

バイオデバイスの飛行時間型二次イオン
質量分析イメージングTime-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
Imaging of Biodevices

青柳里果

Satoka AOYAGI

島根大学生物資源科学部 *Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Matsue, SHIMANE, JAPAN*

Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging provides ten-nanometer-scale chemical images of biodevices. It is one of the most sensitive surface analysis methods and has recently been applied in life sciences. TOF-SIMS is useful for the evaluation of biodevice surfaces, because it provides ten-nanometer-scale mapping and chemical structures of immobilized proteins on devices. In addition, TOF-SIMS requires no pretreatment of samples, such as labeling with a fluorescent probe or coating with metallic thin films. In this paper, the principles of TOF-SIMS and data analysis methods are introduced, and some examples of biodevice observation with TOF-SIMS are described.

(Received August 23, 2006; Accepted September 27, 2006)

1. はじめに

飛行時間型二次イオン質量分析法 (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: TOF-SIMS)¹⁾ を用いることによって、デバイス上の特定の原子、分子の分布を 10 nm オーダーのスケールで観察することが可能となる。バイオデバイスに利用されることの多い生体高分子も原理的には観察可能である。

TOF-SIMS は一次イオンビームを固体試料に照射し、その際に試料の最表面から放出されるイオン (二次イオン) を高感度な質量分析計である飛行時間型質量分析計で検出する手法である。二次イオン質量分析法 (Secondary Ion Mass Spectrometry: SIMS)^{2)~4)} は、基本的には破壊的な超高感度表面分析法であるが、TOF-SIMS など有機材料やバイオ材料をより穏和に測定する手法が開発された。しかし TOF-SIMS は、同じ飛行時間型質量分析計を用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: MALDI-TOF MS) とは異なり、タンパク質のような巨大分子の場合は、イオン化の際にフラグメント化が避けられないという問題

点があった。そこで、主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA)^{5), 6)} や情報エントロピーの差 (相互情報量)^{7), 8)} などのさまざまなデータ解析法が TOF-SIMS に応用されるようになり、まだ報告は多くはないが、複雑なバイオデバイスの解析にも TOF-SIMS が応用されるようになった。また、TOF-SIMS では試料の最表面数ナノメートル付近の化学構造情報を得られるため、おもにタンパク質の同定に用いられる MALDI-TOF MS とは異なり、デバイス上のタンパク質の最表面の構造や配向性に直接関係する情報が得られると考えられる。

今回は、高分子膜およびガラス上のタンパク質、もしくは材料上の生体由来分子を TOF-SIMS で測定し、イメージ像を得た例を中心に紹介する。

2. TOF-SIMS の特徴

TOF-SIMS は 1980 年代に実用化され、特に 1990 年代以降はそれまで SIMS による測定が困難であったバイオ材料もターゲットとするようになり、SIMS の応用性を大幅に高めた。SIMS はイオンビームの照射によって固体表面から放出される二次イオンを測定する方法であり、1960 年代から実用化され、広く使われるようになった。TOF-SIMS に先立って、有機材料の測定が可能なスタティック SIMS (Static SIMS: S-SIMS) が 1970 年代に開発されていた。従来のダイナミック SIMS (Dynamic SIMS: D-SIMS) は高エネルギーの一次イオンビームを高い電流密度で試料表面に照射するため、高感度だが破壊性

Correspondence to: Satoka AOYAGI, *Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, 1060 Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane 690-8504, JAPAN*, e-mail: aoyagi@life.shimane-u.ac.jp

青柳里果, 島根大学生物資源科学部, 〒690-8504 松江市西川津町 1060

Fig. 1. Schematic representation of information from TOF-SIMS.

が高く、有機物試料から分子イオンを検出することが難しかった。一方、S-SIMSでは一次イオンビームの電流密度を低くすることにより、より穏和なイオン化を可能とし、有機物から化学構造情報が得られるようになった。その後開発されたTOF-SIMSは、TOF質量分析計と連動させて一次イオンビームをパルス的に照射することにより、D-SIMSの高感度な特徴とS-SIMSの穏和なイオン化の特徴をあわせもつ測定手法となった。

TOF-SIMSでは、40～100 nm程度に絞った一次イオンビーム¹⁾がスキャンしながら試料表面に照射されることによって、試料を構成する分子・原子と激しく衝突する。その際にさまざまな粒子が試料の最表面から放出（スパッタリング）されるが、そのほとんどは中性の粒子である。スパッタされる粒子のごく一部（1%未満¹⁾）がイオン化しており、それらは二次イオンと呼ばれ、TOF質量分析計で検出される。一般的な装置では、一度の測定で、正二次イオンもしくは負二次イオンのどちらかのみが検出される。

TOF-SIMSによって、原子、分子、フラグメントイオンに関する情報を含む質量スペクトルと、それぞれの二次イオンの分布を表す二次イオン像から固体表面に関する詳細な情報が得られる（Fig. 1）。ただし、SIMSでは物質や条件によってイオン化のしやすさが大きく異なるため、質量スペクトルに現れた強度がそのまま試料表面の存在量に対応するとは限らない。したがって、厳密に定量的な分析は困難な場合もある。

二次イオン像（イメージング、ケミカルマッピング）の空間分解能は、一次イオンのビーム径に依存する。イメージングにはガリウムなどの低融点金属が有利であり、ガリウムイオンを一次イオン源として用いた場合、最高で40 nm程度の空間分解能が得られる。一般的なバイオ材料の測定でも少なくともサブミクロンスケールのイメージングは可能である。

また、現在のTOF-SIMSのイオン化技術ではタンパク質などの巨大分子はフラグメント化が避けられない。さらに、イオン化過程が解明されていないため、バイオ材料に

含まれる生体高分子などの場合、フラグメント化の予測が困難であり、スペクトルの解析が複雑である。巨大分子の測定に有利な一次イオン源として、エネルギーを分散して与えられるため、より穏和なイオン化が期待されるクラスターイオン源が開発され、金クラスターイオン源、ビスマスクラスターイオン源、 C_{60} イオン源などが近年利用されるようになった。イメージングにおける空間分解能は、ガリウムイオン源が最も高いが、金クラスターイオン源やビスマスクラスターイオン源もサブミクロンスケールのイメージングを可能⁹⁾としている。

3. タンパク質のTOF二次イオン質量スペクトル解析法

TOF-SIMSは超高感度な表面分析法であり、試料最表面の1～2 nm程度¹⁰⁾の情報を得るといわれる。そのため、タンパク質計測においては、タンパク質の一分子イオン化が困難であるばかりでなく、タンパク質が数nm～10 nm程度の巨大分子であるため、タンパク質の一部分の情報しか得られないという問題点もある。タンパク質は20種の特定のアミノ酸からなり、アミノ酸組成比はタンパク質ごとに異なるが、異なるタンパク質でもフラグメント化した基本構造は類似している場合が多い。したがって、基本構造が類似し、かつ一部の情報しか得られないTOF-SIMSから得られたスペクトルでは、タンパク質の識別は困難と考えられた時期があった。しかし、近年、適切なスペクトル解析を用いることによってタンパク質のTOF-SIMSスペクトルが適切に解釈できる¹¹⁾ことが示され、タンパク質の同定、定量、分布イメージング測定が行われるようになった。

3.1 主成分分析

1990年代に、試料中のタンパク質が含むアミノ酸組成比をPCAなどの多変量解析法^{5), 6), 11), 12)}を用いて解析することにより、タンパク質を同定する方法が開発された。PCAはすでにさまざまな分野へ応用されているパタン認識法の一つであるが、PCAのように多変量を解析できる

Table 1. Positive Ions Related to Amino Acids^{13), 14)}

Amino acid	Formula	m/z
Ala	C ₂ H ₆ N	44
Arg	CH ₃ N ₂	43
	C ₂ H ₇ N ₃	73
	C ₄ H ₁₀ N ₃	100
	C ₄ H ₁₁ N ₃	101
	C ₅ H ₁₀ N ₃	112
	C ₅ H ₁₁ N ₄	127
Asn	C ₃ H ₄ NO	70
	C ₃ H ₇ N ₂ O	87
	C ₃ H ₆ NO ₂	88
	C ₄ H ₄ NO ₂	98
Asp	C ₃ H ₆ NO ₂	88
Cys	CHS	45
Gln	C ₄ H ₆ NO	84
Glu	C ₄ H ₆ NO	84
	C ₄ H ₈ NO ₂	102
Gly	CH ₄ N	30
His	C ₄ H ₅ N ₂	81
	C ₄ H ₆ N ₂	82
	C ₅ H ₈ N ₃	110
Ile	C ₅ H ₁₂ N	86
Leu	C ₅ H ₁₂ N	86
Lys	C ₅ H ₁₀ N	84
Met	C ₂ H ₅ S	61
Phe	C ₈ H ₁₀ N	120
	C ₉ H ₇ O	131
Pro	C ₄ H ₆ N	68
	C ₄ H ₈ N	70
Ser	C ₂ H ₆ NO	60
	C ₃ H ₃ O ₂	71
Thr	C ₄ H ₅ O	69
	C ₃ H ₈ NO	74
Trp	C ₉ H ₈ N	130
	C ₁₀ H ₁₁ N ₂	159
	C ₁₁ H ₈ NO	170
Tyr	C ₇ H ₇ O	107
	C ₈ H ₁₀ NO	136
Val	C ₄ H ₁₀ N	72
	C ₅ H ₇ O	83

手法を用いるとタンパク質のような巨大分子の TOF-SIMS スペクトルが容易に解析でき、微生物や細胞の測定などにも応用できると期待されている。

PCA は、多変量の情報（スペクトル中の多数の二次イオンピークの強度）を元の情報の特徴を損なわずに集約し、主成分（第一主成分 Principal Component 1: PC₁, 第二主成分 Principal Component 2: PC₂ など）の得点という新しい変数に変換する解析法である。得られた主成分の中で重要な数個を用いれば、元のデータの解釈が可能となる場合が多く、生体試料の TOF-SIMS の場合は、各スペクトル

の比較だけでは困難であった多数のピークの動向を容易に解釈できる場合が多い。一般的に PCA を行う前処理として、TOF-SIMS で得られた正二次イオン（バイオ系材料の場合、負二次イオンでは特異的なフラグメントが検出されない場合が多い¹⁰⁾）の中から、タンパク質由来のアミノ酸フラグメントイオン（Table 1 に代表的なものを示す^{13), 14)}）を選出し、各測定における総イオン強度（Total Count）で規格化したピーク強度を得る。その相対ピーク強度値を主成分分析し、各主成分の得点をグラフ化して、各試料の特徴を明らかにする。また、主成分に対する各ピークのかかわり方を表す負荷量を用いて、各主成分が代表する特徴を考察することも可能である。

3.2 相互情報量によるスペクトル解析

特異的な二次イオンピークを用いて特定タンパク質のイメージを得るために、相互情報量を用いた TOF- 二次イオン質量スペクトル解析法が開発されている。特定のタンパク質にのみ起因する特異的な二次イオンピークは、複数のアミノ酸に由来するフラグメントイオンである可能性が高いが、その場合は無数の可能性があり、あらかじめ重要なフラグメントイオンを予測することは困難である。そこで、スペクトル上のすべての二次イオンピークを相互情報量に基づいて客観的に数値化することにより、特異性の高いピークを選び出す解析法が開発¹⁵⁾された。

Fig. 2 に示す例では、二つの試料を各 5 回ずつ測定したスペクトルデータに対して、あるピークに注目してその強度に関する情報を得た場合の相互情報量を考える。選んだデータのピークの強度が、適当に設定した閾値 V よりも高いかどうかについて情報を得ることにより、そのデータの帰属がわかるかどうかで情報を得た後での情報エントロピーが変化する。Case 1 では、 V に対するピーク強度の高低に関する情報を得てもそのデータがどちらの試料に帰属するかはわからない。したがって、情報を得た前後で情報エントロピーの値は変わらないために相互情報量は 0 に近づく。一方、Case 2 の場合は、 V に対するピーク強度の高低に関する情報を得れば、どちらの試料に帰属するか判断できる。このような場合は、情報を得ることにより確実性が最大になるので情報エントロピーは 0 となり、相互情報量は 1 に近づく。このように相互情報量が 1 に近づくときは、そのピークは二つの試料を識別する重要なピーク、つまり特異性の高いピークである可能性が高い。

Fig. 2. Classification based on mutual information.

4. TOF-SIMS イメージングの例

空間分解能と化学種識別能力の高さを利用した TOF-SIMS によるバイオ材料のイメージングは期待されている。生体組織におけるカリウムやナトリウムなどの金属イオン分布¹⁶⁾や、人工臓器やバイオデバイス上の生体高分子の分布^{17), 18)}などの観察にすでに TOF-SIMS は応用されている。SIMS では試料を超高真空 ($10^{-9} \sim 10^{-6}$ Pa) 下で測定するため、生体組織などは凍結、凍結乾燥、もしくは何らかの乾燥法によって処理する必要がある。また、現在のイオン化技術では SIMS によるイメージングは比較的低分子量のイオンに限られるため、生体高分子の識別が困難であることが問題であった。低分子量フラグメントイオンでも特異性の高いケミカルマッピングを可能とするために、放射性同位元素などによる標識が試みられ、マイクロレベルでパタン化されたタンパク質の鮮明なイメージングに成功¹⁹⁾した。しかし、標識した試料の詳細な観察は他の手法^{20), 21)}でもすでに成功しており、例えば、蛍光標識による生体高分子観察は水溶液中でも可能であるという利点もある。したがって、TOF-SIMS の特徴を活かすには非標識試料をそのまま観察することが望ましい。

4.1 タンパク質吸着高分子透析膜（中空糸膜）

腎不全患者の透析治療用に利用されている中空糸型透析膜は、表面にナノレベルの細孔をもつ高分子膜²²⁾である。血液中の不要物質を膜の細孔を介して透析液中に排出することにより血液が浄化される。しかし、血中タンパク質の透析膜への吸着などによって透析治療中に膜透過性能が変化するという問題がある。そこで、タンパク質の膜細孔への吸着を実測することにより、吸着メカニズムの解明が求められていた¹⁷⁾。

ここで紹介する測定例¹⁷⁾では、市販されている 3 種類の透析膜、APS-E（旭メディカル）、PAN-SF（旭メディカル）、FLX-GW（日機装）を対象に、モデルタンパク質としてウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) を透過、吸着させた試料を TOF-SIMS (TRIFT III, Physical Electronics) によって測定した。標準試料として、洗浄処理のみの中空糸膜を用意した。

中空糸膜試料は Fig. 3 のように断面ホルダーに挟むことにより、内外表面および断面を測定した。中空糸膜の直径は $100 \mu\text{m}$ 程度である。形状効果を抑えるために、得られた各ピークの強度は総二次イオン強度によって規格化した。

Fig. 3. Hollow fiber membrane on sample holder of TOF-SIMS.

Fig. 4. Images of secondary ions related to bovine serum albumin.

参照試料と比較して求めた各ピークの相互情報量の値をもとに選出された BSA および各膜に由来するフラグメントイオンの中でイメージングに適したフラグメントイオンを選び、BSA の分布を得た。その結果を Fig. 4 に BSA に起因する二次イオン像として示す。スケールバーは白く明るいほど存在量が多いことを表す。

BSA を吸着させていない未処理の膜では、BSA の分布は存在しない結果が得られ、イメージングに採用された二次イオンピークの適切さは確認された。各膜は、細孔径、細孔分布、膜材質などが異なる。Fig. 4 では、膜によって異なる傾向の BSA 吸着が示された。例えば、FLX-GW は、他の 2 種類の膜とは異なり、表面の親水化処理が施されていないために、他の膜よりもタンパク質が吸着しやすい。他の膜ではほとんど断面の吸着が見られないが、FLX-GW では断面への BSA 吸着もはっきり現れていることが確認できた。

4.2 タンパク質固定化ガラス基板（バイオセンサー）

バイオセンサーには、電極や基板上に固定化した生体高分子が利用されることが多い。固定化生体高分子の分布、配向性は高性能バイオセンサーを得るために重要である。特に、数種類の生体高分子を同一基板上に配列する場合は、それぞれを識別して評価する必要がある。そこで、ここではバイオセンサー基板上に固定化されたタンパク質（プロテイン A）と固定化プロテイン A と特異的に結合した抗体タンパク質の分布をそれぞれ識別して TOF-SIMS で計測した例^{18), 23)}を示す。

基板であるスライドガラスをアミノシラン化し、グルタルアルデヒドで架橋して、プロテイン A のアミノ基部分と共有結合させて固定化した。この試料を免疫グロブリン G (immunoglobulin G: IgG) 溶液中で 1 時間反応させたものを TOF-SIMS で測定し、それぞれのタンパク質の分布を計測した。参照試料として、プロテイン A のみを固定化させたものと、同様の固定化手順でプロテイン A の代わりに IgG を固定化させたものと、タンパク質固定化前のアミノシラン化ガラスを用意した。

IgG は分子量 155,000 程度であり、分子量 42,000 程度のプロテイン A と比べて非常に大きい。どちらもタンパク質であるために、構成するアミノ酸は類似している。したがって、フラグメントイオンによる各タンパク質の識別には適切な解析法が求められる。Fig. 5 に、PCA によるスペクトル解析結果を示す。スペクトルを直接比較すると区別が難しいが、各試料のスペクトルにはそれぞれ特徴が

Fig. 5. PC1-PC2 score plot of positive TOF-SIMS spectra for each sample.

Fig. 6. Distribution of each secondary ion on IgG-immobilized chrome-patterned substrate.

あり、識別できることが Fig. 5 よりわかる。この場合は、第一主成分、第二主成分は、元のデータの情報をそれぞれ 85%, 7% に集約している。

さらに、主成分得点と負荷量から、特定の物質に起因するピーク候補の選出も可能である。特に、主成分分析と同じく多変量解析法の一つである判別分析を用いれば、各試料に特徴的なピークの選出がより確実となるが、判別分析を正確に行うためには、解析するピーク数に対して 3 倍以上のデータ数が必要¹³⁾とされているため、実現が困難な場合が多い。また、タンパク質のような生体高分子を対象とする場合は、発生する二次イオンの予測が困難な場合が多く、解析にかかる二次イオンピークを十分に選び切れない可能性も高い。したがって、タンパク質イメージングのために特異的ピークを選ぶ場合は、次に示す相互情報量による解析が有効である。

ここでは、各試料の質量スペクトルで、 m/z 40~200 の範囲の二次イオンピークを対象として、相互情報量を計算し、各試料に特徴的なピークを選出した。40 m/z 値以下は汚染物との識別が困難なため省き、200 m/z 値以上は本測定では十分な強度が得られなかったため省いた。

各試料における各ピークの相互情報量の比較から各タンパク質に特徴的な二次イオンを得て、それぞれのタンパク質のイメージングに成功した。ただし、いずれも均一な分布であるため、タンパク質の分布を明確に確認するために、クロムでパタン化した基板に IgG のみを固定化した試料における二次イオン像を Fig. 6 に示す。

クロムのパタンは、Fig. 6 の Si^+ 二次イオン像で、暗く抜けた部分として示される目盛状の形である。タンパク質は Si^+ 二次イオン像で白く示される目盛り以外の部分（ガラス部分）に固定化されるはずであり、Fig. 6 では IgG 由来の二次イオン像は、クロムの目盛上パタン部分を避けるように分布している様子が示された。

プロテイン A と IgG を結合させた試料の TOF-SIMS による観察では、それぞれのタンパク質は均一に分布していることが確認され、固定化プロテイン A と溶液中 IgG との反応に偏りがないことが確認された。

4.3 ケミカルマッピング

比較的低質量のイオンの観察が生体材料やバイオ材料を対象として行われてきた。ここでは、そうした研究例を紹介する。

船舶の金属部分を傷める原因とされる海洋性バイオ汚染は、タンパク質の吸着から始まると考えられる²⁴⁾。そこで、バイオフィルム形成のメカニズムを解明するために、海水中に含まれる塩のタンパク質吸着への影響をケミカルマッピングによって検討した研究例がある。Poleunis ら²⁴⁾のステンレス板に対する BSA 吸着への塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウムの影響を調べた報告では、ナトリウム、マグネシウム、カルシウム、塩素の各イオンの分布と BSA の分布を TOF-SIMS で計測し、それぞれの分布を照合した。その結果、海水塩中のおもに金属イオンによって生じたマイクロ粒子の周りにタンパク質吸着が生じていることが示された。

また、高屋ら¹⁶⁾はダイナミック SIMS を用いて、凍結した細胞試料中の金属イオンや炭化水素イオンの観察を行い、カエルの眼球におけるナトリウムイオンの分布を詳細に示した。このような生体組織、毛髪、木材などの TOF-SIMS による観察²⁵⁾も近年盛んに行われている。

5. ま と め

サブミクロンスケールでの特定化学種のイメージングが可能な TOF-SIMS は、ケミカル顕微鏡としての応用が期待されている。バイオデバイス上の生体高分子から生体試料における各化学種の分布まで、観察対象は幅広く、すでにさまざまな計測例が報告されているが、SIMS のイオン化過程が不明瞭なこともあり、この手法を一般化するためには解決しなければならない問題も少なくない。しかし、高質量イオンの高感度検出が難しい TOF-SIMS では計測が困難と考えられていた生体高分子は、適切なスペクトル解析法を用いることにより、容易に測定できるようになった。複数のタンパク質を識別して、特定タンパク質の分布をイメージングすることも可能である。

今後 TOF-SIMS は、一次イオン源、試料調整法の改良によるイオン化効率の増大、ユーザーフレンドリーなスペクトル解析法の開発などによって、バイオデバイスや生体試料を対象としたケミカル顕微鏡としての応用範囲をさらに広げるものと期待できる。また、本紙では触れなかったが、バイオインフォマティクスのような用い方として、バイオ

デバイス上のタンパク質の配列や配向性²⁶⁾, さらに化学反応や環境変化によるタンパク質の構造変化の計測にも応用できると期待される。

文 献

- 1) “TOF-SIMS: Surface Analysis by Mass Spectrometry,” ed. by J. C. Vickerman and D. Briggs, IM Publications, Manchester, UK (2001).
- 2) “二次イオン質量分析法”, 日本表面科学会編, 丸善, 東京 (1999).
- 3) “表面科学の基礎と応用 (新訂版)”, 日本表面科学会編, エヌ・ティー・エス, 東京 (2004), p. 781.
- 4) “固体表面分析 I”, 大西孝治, 堀池靖浩, 吉原紘一編, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1995), p. 196.
- 5) C. J. Huberty, “Applied Discriminant Analysis,” Wiley & Sons Inc., NY, USA (1994).
- 6) A. M. Belu, D. J. Graham, and D. G. Castner, *Biomaterials*, **24**, 3635 (2003).
- 7) C. E. Shannon and W. Weaver, “The Mathematical Theory of Information,” University of Illinois Press, Urbana and Chicago, USA (1947).
- 8) S. Aoyagi and M. Kudo, “Proteins at Solid-Liquid Interfaces,” ed. by P. Dejardin, Springer Verlag, Berlin (2006), Chap. 7.
- 9) F. Kollmer, *Appl. Surf. Sci.*, **231-232**, 153 (2004).
- 10) M. S. Wagner and D. G. Castner, *Langmuir*, **17**, 4649 (2001).
- 11) J.-B. Lhoest, M. S. Wagner, C. D. Tidwell, and D. G. Castner, *J. Biomed. Mater. Res.*, **57**, 432 (2001).
- 12) M. S. Wagner and D. G. Castner, *Appl. Surf. Sci.*, **231-232**, 366 (2004).
- 13) D. S. Mantus, B. D. Ratner, B. A. Carlson, and J. F. Moulder, *Anal. Chem.*, **65**, 1431 (1993).
- 14) J.-B. Lhoest, E. Detrait, P. van den B. de Aguilar, and P. Bertrand, *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**, 95 (1998).
- 15) S. Aoyagi, M. Hayama, U. Hasegawa, K. Sakai, M. Tozu, T. Hoshi, and M. Kudo, *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, **1**, 67 (2003).
- 16) K. Takaya, M. Okabe, M. Sawataishi, and T. Yoshida, *Appl. Surf. Sci.*, **231-232**, 502 (2004).
- 17) S. Aoyagi, M. Hayama, U. Hasegawa, K. Sakai, M. Tozu, T. Hoshi, and M. Kudo, *J. Membrane Sci.*, **236**, 91 (2004).
- 18) S. Aoyagi, Y. Kawashima, and M. Kudo, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **232**, 146-152 (2005).
- 19) A. M. Belu, Z. Yang, R. Aslam, and A. Chilkoti, *Anal. Chem.*, **73**, 143 (2001).
- 20) “限界を超える生物顕微鏡—見えないものを見る 日本分光学会 測定法シリーズ〈21〉”, 宝谷絃一, 木下一彦編, 学会出版センター, 東京 (1991).
- 21) M. Navratil, G. A. Mabbott, and E. A. Arriaga, *Anal. Chem.*, **78**, 4005 (2006).
- 22) 吉田文武, 酒井清孝, “化学工学と人工臓器 第二版”, 共立出版, 東京 (1997).
- 23) S. Aoyagi and M. Kudo, *Biosens. Bioelectronics*, **20**, 1626 (2005).
- 24) C. Poleunis, C. Rubio, C. Compere, and P. Bertrand, *Appl. Surf. Sci.*, **203-204**, 693 (2003).
- 25) N. P. Lockyer and J. C. Vickerman, *Appl. Surf. Sci.*, **231-232**, 377 (2004).
- 26) S. Aoyagi, M. Hayama, U. Hasegawa, K. Sakai, M. Tozu, T. Hoshi, and M. Kudo, *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, **4**, 1 (2006).

Keywords: TOF-SIMS, Imaging, Chemical mapping, Bio-device, Protein