

## 総 説

[木材学会誌 Vol. 53, No. 6, p. 291-297 (2007)]

# ToF-SIMS (飛行時間型二次イオン質量分析) による 木材化学研究\*1

福島和彦\*2, 斉藤香織\*2

## The Chemical Analysis of Wood Using ToF-SIMS\*1

Kazuhiko FUKUSHIMA\*2 and Kaori SAITO\*2

Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) is a powerful technique that provides chemical information about the surface of a solid sample and does not need any pretreatments. The significant advantage of ToF-SIMS over other techniques is imaging analysis, which allows the direct visualization of the chemical distribution on the sample surface with submicrometer spatial resolution. Here the applications of ToF-SIMS to wood science are discussed. Recent studies showed that ToF-SIMS is a useful tool for the structural analysis of lignin by detecting the monomeric ions which correspond to its structural units (guaiacyl and syringyl types). Several ToF-SIMS studies that examined pulp fiber surfaces or properties of paper have been reported. ToF-SIMS has also been used to investigate the distribution of heartwood extractives.

**Keywords:** ToF-SIMS, lignin, extractives, surface analysis, cell wall.

飛行時間型二次イオン質量分析(ToF-SIMS)による木材分析について概説する。ToF-SIMSは、木材切片や紙などの試料表面を、前処理することなく直接測定することが可能である。ToF-SIMSの最大の利点は、イメージ像を得ることにより、試料表面の化学物質分布を可視化できることである。これまでに、リグニン構造解析やパルプ・紙表面の化学特性、また、心材抽出成分分布の分析などに適用されている。ここでは、ToF-SIMSの木材研究への適用例に加え、ToF-SIMSの生体試料分析の最前線、ToF-SIMS分析の将来展望について考察する。

### 1. はじめに

木材は、死んだ細胞の集まり、すなわち木化(リグニンが沈着)した細胞壁の集合体である。植物細胞壁は、植物が生産する有機物であり、セルロース、ヘミセルロースなどの多糖やリグニンに代表されるフェノール性高分子から構成されている。細胞の種類や細胞壁の部位によりそれらの組成や構造は変化し、それぞれがどのような分布形態をとるのか、どのように生合成されるのか本質的な部分では十分にはわかっていない。

木部細胞(仮道管)二次壁の微細構造のモデルをFig. 1(右)に示した。セルロースマイクロフィブリルの間隙にヘミセルロースとリグニンが充填しており、リグニンと多糖との間には共有結合が存在し、

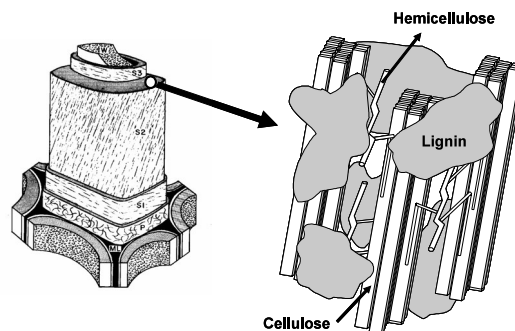


Fig. 1. Schematic illustration of wood cell walls.

\*1 Received August 2, 2007; accepted August 22, 2007.

\*2 名古屋大学大学院生命農学研究科 Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601

ヘミセルロースとセルロースは水素結合により結びついていると考えられている。このように、木化した細胞壁は、高分子物質が絡み合った非常に複雑な構造と有しており、それぞれを単独に取り出すことすら出来ないのが現状である。これまでの高分子化学、有機化学的な解析方法では、得られる情報に限界があり、新たな解析方法の開拓が待ち望まれている。

木材を構成する細胞は、すべて形成層より派生したものであるが、機能発現のために、幾多の種類の細胞に分化する。たとえば、道管は水分通導を担い、木繊維は樹体を支持する役割を担うというように、木を構成する細胞のそれぞれは、樹木が生きていくために必要な機能を備えている。また、その細胞壁はそれぞれの機能に適した化学構造を有していることは容易に想像できる。

樹木木部細胞の最大の特徴は、リグニンを多く含むことにある。したがって、細胞の種類や壁層部位により、どのようにその化学構造が異なるのかに焦点が当てられてきた。このためには、組織構造レベルの情報と分子レベルの情報を一時に入手できる方法が欠かせない。これまでに、臭素化した木部のSEM（走査型電子顕微鏡）およびTEM（透過型電子顕微鏡）-EDXA（エネルギー分散X線解析）法<sup>1)</sup>、特定のリグニン構造単位を放射性同位元素で標識しマイクロオトラジオグラフィにより可視化する方法<sup>2-5)</sup>、可視・紫外線顕微分光法<sup>6,7)</sup>など多くの研究がなされてきた。これらの方法は、顕微分析であるため場所の特定（解像度）には問題ないものの、入手できる化学構造に関する情報には限界があった。一方、細胞壁を複合中間層（細胞間層+1次壁）と2次壁に富む画分、あるいは道管と木繊維に富む画分などに分け、ウェットな方法で化学分析<sup>8-10)</sup>する試みもなされてきたが、試料の出所に曖昧さを含んでいた。近年、各種DHP（人工リグニン）を抗原とする免疫電顕法により特定の結合単位構造まで可視化できるとする報告<sup>11,12)</sup>もなされているが、不定形であるとされるリグニンのどの構造が認識されているのか、十分に説明されていない。このように、組織構造と分子（化学）レベルの情報は、木材研究において、未だ完全には補完されてはならず、上述の「容易に想像できる」ことですら、科学的に証明されてはいないのである。

近年、組織構造レベルと分子（化学）レベルの情報をつなぐ分析として、飛行時間型二次イオン質量分析（Time-of-flight secondary ion mass spectrometry; ToF-SIMS）を用いた研究方法が木材化学研究に導

入され、開拓されてきた。今回、その適用例について紹介する。

## 2. ToF-SIMS とは

ToF-SIMS は、一次イオン（ガリウムや金イオン）の照射によって、試料表面から放出されたイオンを測定することにより、表面の化学構造を調べる方法である（Fig. 2）<sup>13)</sup>。この方法は、 $\sim 10^{-9}$  sec にパルス化された一次イオンの照射により固体表面から放出された二次イオンをTOF型質量分析計で計測するもので、半導体をはじめとする先端材料の解析・評価に広く用いられてきている。未処理のまま、試料表面に由来する二次イオンを得ることができると同時に、そのイメージ像を短時間に得ることができる。つまり、ToF-SIMS法においては、分子レベルと顕微レベルの情報を同時に入手することが可能である。試料表面上において、特定の二次イオンの分布を可視化することをイオンマッピングという。また、ToF-SIMSにおいて、高分子化合物から派生する二次イオンは、構成モノマー単位まで効率よく低分子化される場合もあり、高分子内部の分子情報を、分解反応を用いることなく解析できることも特徴のひとつである。

## 3. ToF-SIMS による生体試料分析への適用

ToF-SIMS の生体試料分析への応用は、試料に衝突させる一次イオン種の改良とともに、最近数年間に目覚しく発展した。従来のガリウム  $\text{Ga}^+$  やインジウム  $\text{In}^+$  などの一次イオンでは、元素イオンや質量100前後の二次イオン測定に制限されるものであった<sup>14)</sup>。しかしながら、金やビスマスのクラスター

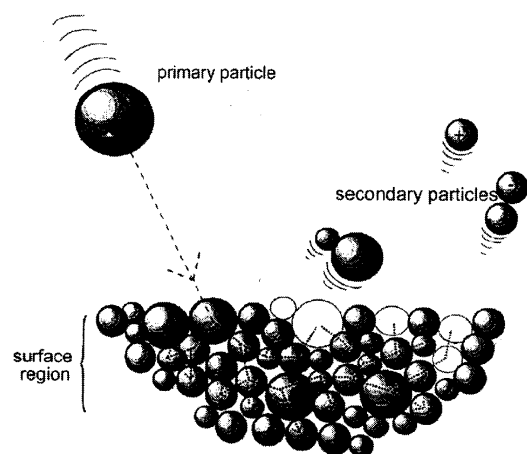


Fig. 2. Schematic diagram of the SIMS process.

イオン ( $\text{Au}_n^+$ ,  $\text{Bi}_n^+$ ) 銃の開発によって、空間分解能約  $1\ \mu\text{m}$  以下を保ちながら、分子量200以上の生体分子イオンを感度良く検出し、マッピングすることが可能となった。マウスの脳組織を試料とした分析では、金イオン銃の使用により、分子量200から500前後のリン脂質やコレステロール、さらにはビタミンEなどのイメージングに成功した<sup>15,16)</sup>。これら2次元のToF-SIMSイメージングにおける生体分子イメージングが着々と進展を遂げる一方、最近ではフラレンが一次イオン銃として開発され、カエルの卵細胞における分子量1000以下の脂質などの3次元イメージングが報告された<sup>17)</sup>。フラレンイオン銃は、金イオン銃に比べて空間分解能はかなり低いが、サンプルの深さ方向に掘り進めながら二次イオンを壊さずに検出することが可能であり、今最も注目されているイオン銃の一つである。また、ごく最近には、NanoSIMSと呼ばれる磁場型の質量分析器によるSIMSが、動物組織における $^{12}\text{C}^-$ と $^{13}\text{C}^-$ といった同位体組成を検出し、高空間分解能約100 nmでマッピングすることに非常に有用であることが報告された<sup>18)</sup>。その他の技術面においては、乾燥した状態の生体サンプルではなく、凍結した生体サンプルそのままの状態における分子マッピングが試行さ

れ、今後の発展が期待される。以上のように、生体分子マッピングに対して、ToF-SIMSは高い感度・分解能を発揮しており、今後広く利用されていくであろう。次項では、木材研究へのToF-SIMSの適用とその発展について概説する。

#### 4. ToF-SIMSの木材研究への適用

##### 4.1 リグニン分析

Fig. 3は、ラジカルカップリングによるリグニンモノマー（コニフェリルアルコール）の重合と構成単位間結合、リグニン高分子のモデルを表している。リグニンは他の天然高分子とは異なり、繰り返し単位を持たない。二つとして同じ構造の高分子リグニンは存在しないのである。リグニン化学構造の研究には、通常、有機化学的に特定の単位間結合を切断して、派生する分解物を分離定量する手法が用いられる。例えばチオアシドリシスは、リグニン中の特定の結合様式である $\beta$ -アリアルエーテル(8-O-4')結合のみを選択的に切断することに基づいているため、リグニン全てをモノマー、ダイマーといったフラグメントに分解できるわけではなく、収率は50%程度である<sup>19,20)</sup>。このように化学分解法において得られる結果は、リグニンすべての構造を反映するも

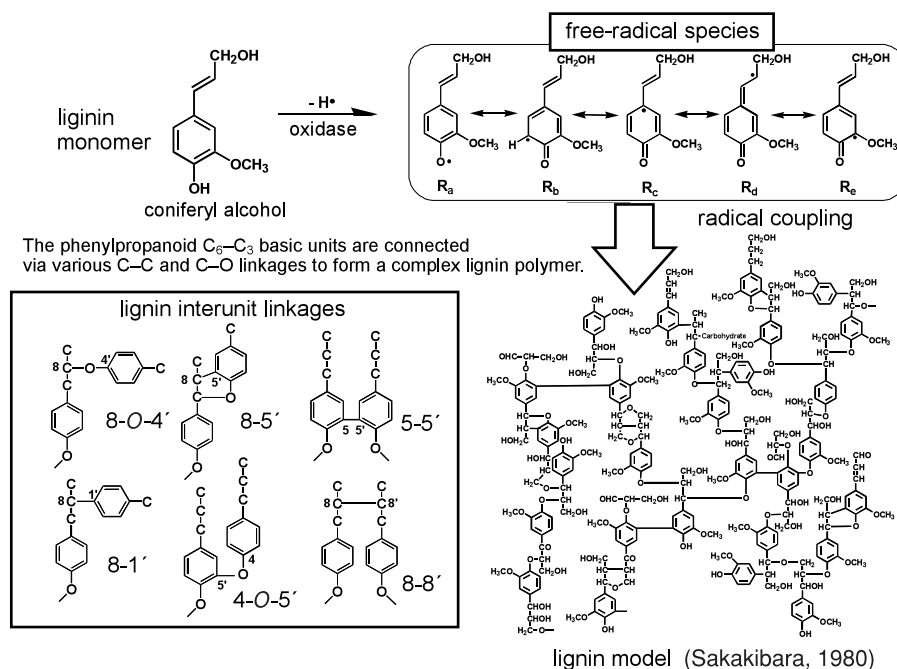
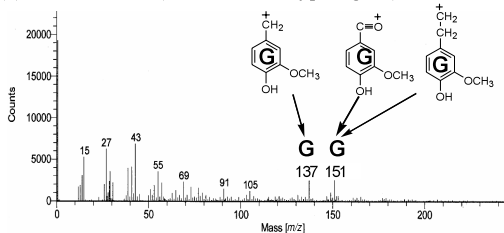


Fig. 3. The chemical structure of lignin. Lignin polymers are believed to be produced by random free radical coupling of phenylpropanoid monomers such as coniferyl alcohol. The interunit linkages between phenylpropanoid monomers include 8-O-4', 8-8', 8-5', 4-O-5', 8-1' types.

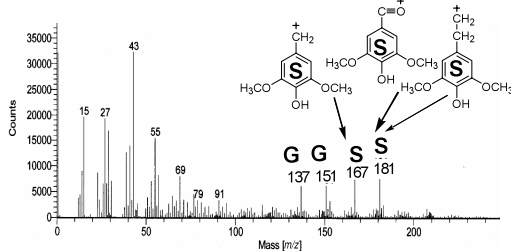
のではなく、実験操作も煩雑であった。そこで、簡便かつ信頼性の高い研究手法を構築する目的で、この複雑な高分子物質であるリグニン分析にToF-SIMSが導入された。

マツのMWL (Milled wood lignin: 木粉を微粉碎後、含水ジオキサンで抽出されたもの)、LCC (Lignin-carbohydrate complex: リグニン-炭水化物複合体)、DHP (Dehydropolymers: 人工リグニン)、重水素ラベルしたDHPの正イオンToF-SIMSスペクトルから、グアイアシル(G)リグニンに特徴的な正の二次イオンは、 $m/z$  137と $m/z$  151であることがわかった (Fig. 4)。 $m/z$  137では $C_6-C_1$ の構造が、 $m/z$  151の場合は $C_6-C_1$ と $C_6-C_2$ の2通りの構造が推定された<sup>21)</sup>。ブナMWLもToF-SIMS分析において、4つの主要なピーク(G環由来のピークに加え、メトキシ分の質量数30がそれぞれ増加したシリングル(S)環由来イオンピーク $m/z$  167, 181)を与えた (Fig. 4)。

(a) Pine MWL (Softwood, G-type lignin)



(b) Beech MWL (Hardwood, GS-type lignin)



(c) D-labeled DHP (lignin model compound)

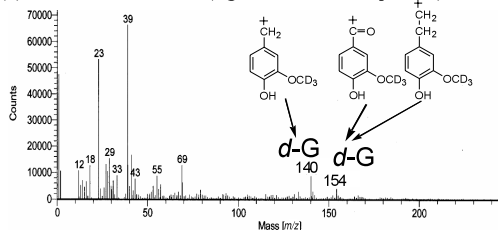


Fig. 4. Positive ToF-SIMS spectra of (a) pine MWL, (b) beech MWL, and (c) D-labeled DHP from coniferyl alcohol-[9,9-d2, -OCD3]. The figure shows the tentative structures of the main secondary ions, each of which has a guaiacyl (G) or syringyl (S) ring.

これらの結果は、電子銃より照射された一次イオンがリグニンをランダムに切断するのではなく、特定の切れやすい場所(単位間結合)を選択的に切断することを示唆した。

ToF-SIMSにおける二次イオンの発生機構を明らかにするために、グアイアシル型2量体モデル化合物を用いて詳細な検討をおこなった。8-O-4', 8-1', 8-5', 8-8'型ダイマーから $m/z$  137と151のイオンが検出されたが、5-5'型では分子イオンのみが得られた (Fig. 5)<sup>22)</sup>。このことから、リグニンより派生する4つの特徴的なイオン(G+S)は、細胞壁中のリグニン構造の大部分を反映しているものと考えられる。また、モデル化合物により、リグニンの主要タイプのひとつである

-ヒドロキシフェニル(H)核からも、G、S核と同様な二次イオンが得られることが分かっている<sup>23)</sup>。

ToF-SIMSは全イオンに対し計測可能であるため、標的分子二次イオンを選択的に抽出・マッピングして分布を捉えることができる。スライディングマイクロトム仕上げのコブシ木口表面に対し、 $m/z$  137,  $m/z$  167をそれぞれGリグニン、Sリグニン由来の二次イオンとして選択的にマッピングしたところ、道管と道管に挟まれた細胞間層ではGリグニンに富むことが示された (Fig. 6)<sup>24)</sup>。今後、さらなる研究により、オートラジオグラフ法やUV顕微鏡法で報告されているようなG、Sリグニンの不均一な分布を検証するためのToF-SIMSイメージングが達成されることが期待される。

また、重水素で標識したリグニン前駆物質を樹木新生木部に投与し、リグニンが標識された部位を二次イオン( $m/z=2$ の重水素アトミックイオン)を抽出、マッピングすることが可能となり、生化学的研究にも適用できることが示された<sup>24)</sup>。

#### 4.2 紙・パルプ研究

ToF-SIMSは、表面分析であることから、紙・パルプ表面化学の分野において注目されてきた。これまでに、ToF-SIMSにより、パルプ表面におけるS/G比などのリグニン評価に適用されている他に、多糖や抽出成分由来の二次イオンが提案され、パルプ特性評価に適用されている<sup>25-28)</sup>が、これらの二次イオンは詳細に同定されたものではなく、今後さらに詳しく解明する必要がある。

ToF-SIMSは、抄紙科学においても利用され、サイズ剤やデンプンの分布が分析されている<sup>29-33)</sup>。最近、重水素ラベルの手法を用いることにより、ロジングリセリンエステルを含む中性ロジンサイズ剤の挙動を可視化することに成功した<sup>32)</sup>。紙表面の

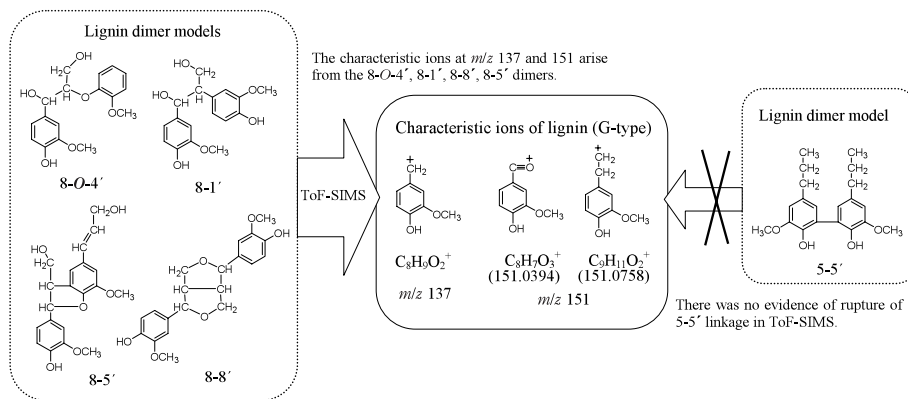


Fig. 5. The relationship between the ToF-SIMS characteristic ions of lignin and the common interunit linkages.

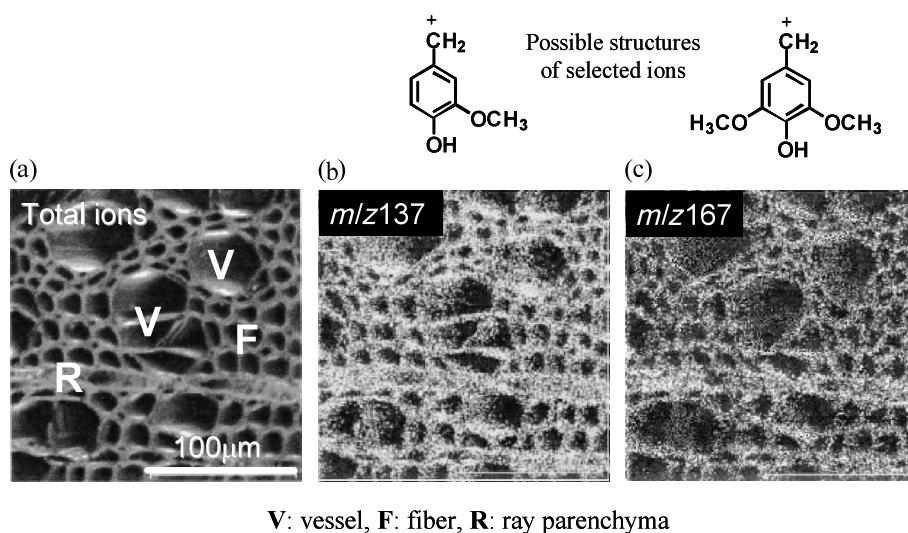


Fig. 6. ToF-SIMS images (positive ions) of the transverse surface of magnolia xylem. (a) total ions, (b)  $m/z$  137 ion (guaiacyl), (c)  $m/z$  167 ion (syringyl) Bar: 100  $\mu$ m.

ToF-SIMS 分析の結果、重水素ラベルしたロジングリセリンエステルは、中性条件とアルカリ条件ともに可溶化せず、繊維表面に吸着して分布することが示された。よって、ロジングリセリンエステルは、サイズ効果を示すアビエチン酸やマレイン化ロジンの溶出を防いでいることが示唆された。さらに、紙の強度を向上させる目的で、ウエットエンド工程などで多く用いられるカチオン化デンプンの分布が、ToF-SIMS により可視化された<sup>33)</sup>。その結果、カチオン化デンプンの繊維への吸着は、ある程度不均一であり、また、繊維の種類によって大きく異なることが明らかとなった。紙断面のイメージングにおいて、内添されたカチオン化デンプンは主に繊維表面

に吸着し、繊維内への浸透・吸着はほとんど起こらないことが示された (Fig. 7)。

#### 4.3 木材抽出成分

スギ心材形成過程において、心材抽出成分であるフェルギノール由来の二次イオン ( $m/z$  285, 301) の同定、マッピングに成功し、心材成分の生合成をダイナミックかつ細胞レベルで追跡することに道が拓かれた<sup>34)</sup>。スギ心材切片の ToF-SIMS イメージにおいて、フェルギノールは、仮道管壁、放射柔細胞壁、軸方向柔細胞内容物などの心材組織全体に均一に分布することが示された (Fig. 8)。

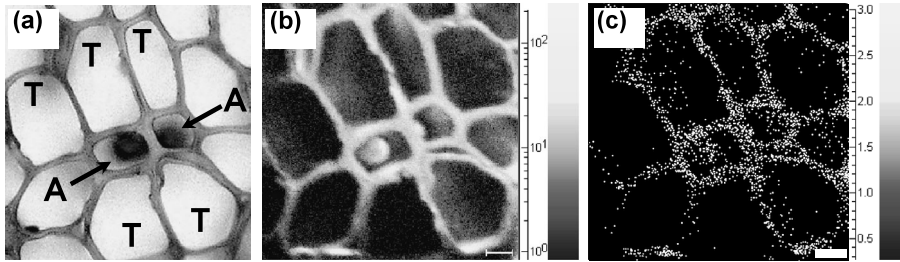


Fig. 7. Light microscopic photograph (a) and ToF-SIMS images (b, c) of the cross section of Sugi heartwood tissue. Softwood tissue predominantly consists of tracheid cells (T), and axial parenchyma cells (A), which often contain brownish substances. b Total ion image (cross section). c  $m/z$  285 ion image (cross section). This image shows the distribution of ferruginol in the tissue because  $m/z$  285 ion originates from ferruginol.

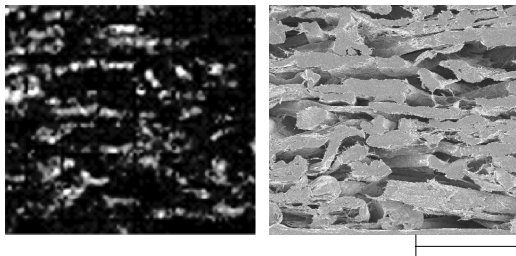


Fig. 8. SEM and ToF-SIMS images from a handsheet cross section containing cationic starch. (A) SEM, (B) ToF-SIMS; cationic starch image. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

## 5. おわりに

リグニン, 抽出成分, 紙添加剤の化学構造, 組織内分布に ToF-SIMS 分析が大きく貢献することが示された。このことは, 迅速かつ簡便な木質の材質評価, あるいは劣化評価に本分析法が十分に役立つことを示唆している。また, マッピングにより特定化学構造の分布を可視化できることも示され, 生体成分の生合成研究や生分解過程の追跡等に十分に利用できることを示した。ToF-SIMS は, 生体高分子の分子情報を何の処理を施すことなく, 顕微レベル, かつ動的に解析することを可能にすることから, 今後さらなる発展・利用が期待される。

## 文 献

- 1) Saka, S., Goring, D. A. I. : "Biosynthesis and biodegradation of wood components", Higuchi, T. ed., Academic Press, NY, USA, **1985**, pp. 51-62.
- 2) Terashima, N., Fukushima, K., Sano, Y., Takabe, K. : *Holzforchung* **42** (6), 347-350 (1988).
- 3) Fukushima, K., Terashima, N. : *Holzforchung* **45** (2), 87-94 (1991).
- 4) Fukushima, K., Terashima, N. : *J. Wood Chem. Technol.* **10** (4), 413-433 (1990).
- 5) Fukushima, K., Terashima, N. : *Wood Sci. Technol.* **25** (5), 371-381 (1991).
- 6) Fergus, B. J., Goring, D. A. I. : *Holzforchung* **24** (4), 118-124 (1970).
- 7) Wu, J., Fukazawa, K., Ohtani, J. : *Holzforchung* **46** (3), 181-185 (1992).
- 8) Eom, T. J., Meshitsuka, G., Ishizu, A., Nakano, J. : *Cell. Chem. Technol.* **22** (3-4), 211-219 (1988).
- 9) Westermark, U. : *Wood Sci. Technol.* **19** (3), 223-232 (1985).
- 10) Westermark, U., Hardell, A. L., Iversen, T. : *Holzforchung* **40** (2), 65-68 (1986).
- 11) Joseleau, J.-P., Ruel, K. : *Plant Physiol.* **114** (3), 1123-1133 (1997).
- 12) Burlat, V., Ambert, K., Ruel, K., Joseleau, J.-P. : *Plant Physiol. Biochem.* **35** (8), 645-654 (1997).
- 13) Vickerman, J. C. : "ToF-SIMS. Surface analysis by mass spectrometry", Vickerman, J. C., Briggs D. eds., IM Publications and Surface Spectra Limited, West Sussex, U. K., **2001**, pp. 1-40.
- 14) Ostrowski, S. G., Van Bell, C. T., Winograd, N., Ewing, A. G. : *Science* **305** (5680), 71-74 (2004).
- 15) Touboul, D., Halgand, F., Brunelle, A., Kersting, R., Tallarek, E., Hagenhoff, B., Lapr evote, O. : *Anal. Chem.* **76** (6), 1550-1559 (2004).
- 16) Brunelle, A., Touboul, D., Lapr evote, O. : *J. Mass Spectrom.* **40** (8), 985-999 (2005).
- 17) John, S., Fletcher, J. S., Lockyer, N. P., Vaidyanathan, S., Vickerman, J. C. : *Anal. Chem.* **79** (6), 2199-

- 2206 (2007).
- 18) Kraft, M. L., Weber, P. K., Longo, M. L., Hutcheon, I. D., Boxer, S. G. : *Science* **313**(5795), 1948-1951 (2006).
- 19) Rolando, C., Monties, B., Lapierre, C. : "Methods in lignin chemistry", Lin, S. Y., Dence, C. W., eds., Springer-verlag, Berlin, Heidenberg, 1992, pp. 334-349.
- 20) Lapierre, C., Pollet, B., Monties, B. : *Holzforschung* **45**(1), 61-68 (1991).
- 21) Saito, K., Kato T., Tsuji, Y., Fukushima, K. : *Biomacromolecules* **6**(2), 678-683 (2005).
- 22) Saito, K., Kato, T., Takamori, H., Kishimoto, T., Fukushima, K. : *Biomacromolecules* **6**(5), 2688-2696 (2005).
- 23) Saito, K., Kato, T., Takamori, H., Kishimoto, T., Yamamoto, A., Fukushima, K. : *Appl. Surf. Sci.* **252**(19), 6734-6737 (2006).
- 24) Fukushima, K., Yamauchi, K., Tsuji, Y., Saito, K., Yasuda, S., Takahashi, M., Hoshi, T. : Proc. of 12th Int. Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vol. 1, Madison, WI, USA 2003, pp. 151-154.
- 25) Fardim, P., Durán, N. : *Holzforshung* **56**(6), 615-622 (2002).
- 26) Fardim, P., Durán, N. : *Colloids Surf. A : Physicochem. Eng. Aspects.* **223**(1-3), 263-276 (2003).
- 27) Kleen, M., Kangas, H., Laine, C. : *Nordic Pulp Paper Res. J.* **18**(4), 361-368 (2003).
- 28) Kleen, M. : *Holzforschung* **59**(5), 481-487 (2005).
- 29) Kagawa, T., Sawatari, A., Fukuda, K., Uchimura, H., Nushi, M., Osada, T., Miyagawa, T. : *SENI GAKKAISHI* **60**(3), 99-103 (2004).
- 30) Lipponen, J., Lappalainen, T., Astola, J., Grön, J. : *Nordic Pulp Paper Res. J.* **19**(3), 300-307 (2004).
- 31) Fardim, P., Holbom, B. : *Appl. Surf. Sci.* **249**(4), 393-407 (2005).
- 32) Matsushita, Y., Ookura, A., Imai, T., Fukushima, K., Kato, T. : *Japan Tappi Journal* **59**(1), 79-87 (2005).
- 33) Matsushita, Y., Sekiguchi, T., Saito, K., Kato, T., Imai, T., Fukushima, K. : *Surface and Interface Analysis* **39**(6), 501-505 (2007).
- 34) Imai, T., Tanabe, K., Kato, T., Fukushima, K. : *Planta* **221**(4), 549-556 (2005).