

# Readout

HORIBA Technical Reports

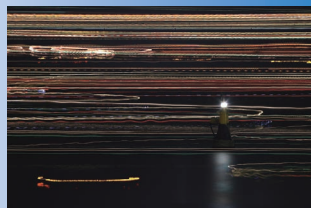
August 2018 No. **49**

## 特集 ライフサイエンスにおける光学分析技術

- 総説      ・時間分解蛍光分光測定法の重要性とその特長  
寄稿論文   ・*In situ* ラマン分光法による界面電子移動プロセスの探索

**HORIBA**<http://www.horiba.com/jp/publications/readout/>

ライフサイエンスへのバイオテクノロジー応用が進む中、光計測が益々重要になってきています。漆黒の海を照らす灯台のように、本号で紹介する最新分析装置が、ライフサイエンスの確かな未来を支え続けるように願っています。



#### ■表紙写真

撮影: 写真家 松井秀雄氏

(二科会写真部 会員)

瀬戸内海は昔から海上交通が盛んな海です。夜になっても途切れることなく多くの船が行き交います。暗い夜の海で前が良く見えない中、行き交う船の安全を見守っている灯台の姿に、人生の道しるべを見る思いがしました。

#### ■誌名について

誌名 Readout (リードアウト) には、「当社が創造・育成した製品・技術を広く世にお知らせし、多くの皆様に読み取っていただきたい」という願いが込められています。

## 特集 ライフサイエンスにおける光学分析技術

### 巻頭言

- 4 光学分析技術の成果をライフサイエンス分野へ  
James THEPOT

### 総説

- 6 時間分解蛍光分光測定法の重要性とその特長  
HORIBA の時間分解蛍光分光測定装置の軌跡  
原 清明
- 13 蛍光寿命を追い求めて  
蛍光寿命測定とライフサイエンスへの応用  
David J S Birch, David McLoskey

### 特別寄稿

- 21 *In situ* ラマン分光法による界面電子移動プロセスの探索：  
基礎から応用事例研究まで  
葛目 陽義

### 特集論文 ライフサイエンスにおける光学分析技術

- 30 ライフサイエンスの問題を解決する分析装置  
Marinella SANDROS, Fran ADAR
- 36 A-TEEM 分子指紋を用いた赤ワインの分光学的解析  
赤路 佐希子
- 44 顕微ラマン分光法がバイオメディカル研究に与えたインパクト  
Fran ADAR, Catalina DAVID, Marinella SANDROS
- 54 チップ増強ラマン分光法  
増加するバイオ分野での研究事例  
Marc CHAIGNEAU, Maruda SHANMUGASUNDARAM, Fran ADAR

### トピックス

- 59 分光エリプソメトリーによるバイオリフサイエンスのアプリケーション  
森山 匠, ナバトバ - ガバイン ナタリア
- 62 平成 28 年度近畿地方発明表彰 [京都発明協会会長賞] 排ガス中の吸着性ガス分析装置
- 64 第 7 回 HORIBA Group IP World Cup Gold Award 受賞案件の紹介

Photonic instrumentation is getting more important as biotechnology application progresses in life science. Like the lighthouse in the jet black ocean, we hope that the latest analytical instruments introduced in this issue will continue to support the reliable future of life science.



Maritime traffic in the Seto Inland Sea has been extensive for a long time. Many ships pass through even in the night. Operation of those ships in pitch dark ocean relies on the light house serving to ensure the safety of the ships. The light it emits makes me feel like looking at the guiding light of our life path.

-Photographer Hideo MATSUI-  
(Member of Nikakai Association of Photographers)

#### Name of the book

This book is named "Readout" in the hope that "the products and technology we have created and developed will be read out and so become widely known".

## Photonic Instrumentation in Life Science

### Foreword

- 4** Bringing the Benefits of Photonic Instrumentation to the Field of Life Science  
James THEPOT

### Review

- 6** Importance of and Features in Time-Resolved Fluorescence Spectrometry Traces in HORIBA's Time-Resolved Fluorescence Spectrometer  
Kiyooki HARA
- 13** Finding the Time for Fluorescence  
Its Measurement and Applications in Life Science  
David J S Birch, David McLoskey

### Guest Forum

- 21** *In situ* Raman Spectroscopy to Monitor Interfacial Electron Transfer Process: from Fundamental to Application Case Studies  
Akiyoshi KUZUME, Ph.D.

### Feature Article Photonic Instrumentation in Life Science

- 30** Life Science Analytical Tools for Real Life Problems  
Marinella SANDROS, Fran ADAR
- 36** Spectroscopic Analysis of Red Wines with A-TEEM Molecular Fingerprinting  
Sakiko AKAJI
- 44** Impact of Raman Microscopy on Biomedical Research  
Fran ADAR, Catalina DAVID, Marinella SANDROS
- 54** Tip-Enhanced Raman Spectroscopy  
Finds a Growing Number of Applications in Biology  
Marc CHAIGNEAU, Maruda SHANMUGASUNDARAM, Fran ADAR

### Topics

- 59** Spectroscopic Ellipsometry Application in Life Science  
Takumi MORIYAMA, Nataliya NABATOVA-GABAIN

# 光学分析技術の成果を ライフサイエンス分野へ



**James THEPOT**

President, HORIBA FRANCE SAS  
Corporate Officer, HORIBA, Ltd.

この数十年の間に分光装置は著しい進化を遂げました。時間分解蛍光法やラマン分光法といった現在では広く普及している技術の多くは、当初、知られてはいましたが、高度に熟練した光学技術を持つ科学者でさえ、時間のかかる実験を経ないと利用できない特別な技術でした。しかし現在の科学機器は性能面と自動化の点で大きく進歩しており、さまざまな分野で多くの科学者や専門技術者が使えるようになっています。

これらの進歩は、レーザー、コンピューターなど、さまざまな要素技術の進歩だけでなく、分析に関わる技術者の洞察力と習熟の努力によるものです。本号に掲載された論文において、数多くのホリバリアン\*1が情熱と才能を注いでこれらの重要な進歩の多くに関わってきたことをご理解いただけたらと思います。

しかし、分析装置をより速く・使いやすく・安く造るだけではより多くの方に幅広く使っていただけるようにはなりません。これまでHORIBAは、先進的な分析技術の需要が急増する様々な分野へ貢献してきました。ライフサイエンスは、こうした成長分野のひとつです。以下の論文は、HORIBAがこの分野の先端研究者の方々と強い関係を築いていることを示しています。当社のアプリケーション技術者は、分光光学と光学分析技術に加えて、ライフサイエンスのさまざまな知見を学び続けています。ユーザの声に応えるために、複数の分析技術をひとつの装置に組み込む事(A. Gilmoreら)、あるいは、一貫した考えのもとに複数の分析装置を提案する事(M. Sandrosら)に取り組んできました。これからも私たちは、お客様が求めるソリューションを提供できる分析装置をお届けできるよう努力を続けてまいります。

パリ・サクレ (Paris Saclay)の中心にあるHORIBA Europe Research Center(写真)は、ハイレベルの研究者との交流や連携の場となっています。パリ・サクレ・



HORIBA Europe Research Center

キャンパスには世界中から毎年約100,000人の研究者が訪問されます。我々のアプリケーションラボも注目していただき、多くのお客様に見ていただくことができました。分光学分野の多くの施設において、HORIBAの“Jobin Yvon technology”ブランドは高性能装置の代名詞となっています。

私たちは、アプリケーションをより重視される産業分野のお客様からの要求にも応えられる体制を整備するとともに、製品納入、サービス、各種規制および標準化への対応、販売網についても充実させてきました。

当社は自社ブランド製品事業に加え、OEM（お客様ブランドによる製造）事業も展開し、自社の先端分析技術による成果をライフサイエンス業界に提供するもうひとつのルートとなっています。OEMされている回折格子と分光器は、この分野で用いられる分析機器の台数増加の原動力となりました。長年OEMを通してお客様の要求にきてきたことによって、アプリケーションについての詳しい理解や直接的な販売ネットワークを持たない分野においても私たちは成長しているのです。

科学の最先端はマイクロ( $\mu\text{m}$ )スケールからナノ( $\text{nm}$ )スケールへと移行しつつあります。ラマン分光装置の有効性をナノワールドへ広げるパイオニアとなることで、当社もこの動きに参入してきました。その高い品質と信頼性によって、私たちがラマン・ナノ顕微鏡を市販していることは、今や世界中の科学者に認知されています。そして、最近のAIST-NT社の原子間力顕微鏡および走査型プローブ顕微鏡技術の買収によって、ナノ顕微鏡事業活動がさらに強化されました。我々は、今後もナノワールドをリードする研究者の皆様へのサポートを続けるだけでなく、さらにライフサイエンス分野を含む多くのお客様にこの技術の成果を展開してまいります。

\*1：HORIBAグループ会社の従業員を指す表現です。

（翻訳：事務局）

## 時間分解蛍光分光測定法の重要性とその特長 HORIBAの時間分解蛍光分光測定装置の軌跡

Importance of and Features in Time-Resolved Fluorescence Spectrometry  
Traces in HORIBA's Time-Resolved Fluorescence Spectrometer

原 清明

Kiyooki HARA

時間分解蛍光分光測定(蛍光寿命測定)により、蛍光物質の環境に応じた分子間相互作用を明らかにすることができる。本稿では、基礎的な解説と事例を通じて、蛍光寿命測定が定常蛍光測定よりも有益であることを述べる。HORIBAの蛍光分光関連の多くのテクノロジーとリソースについても紹介する。

Time-resolved fluorescence measurements reveal intermolecular interactions depending upon the environment of the fluorophore. This paper describes the basic background and some examples of how the fluorescence lifetime is more informative than steady-state fluorescence measurements. HORIBA has many fluorescence technologies and resources.

### はじめに

蛍光は、第一励起一重項状態から基底状態への電気双極子遷移に伴って生じ、通常は $10^{-10}$ ~ $10^{-7}$ 秒の寿命を持つ発光である。蛍光寿命は、蛍光物質の局所環境の影響を受け敏感に変化し、蛍光物質および蛍光標識された高分子の動的挙動プロセス・結合特性を反映する。このことから、時間分解蛍光測定の実用は、バイオテクノロジー・ライフサイエンス・医療診断・マテリアルサイエンス等に広がってきている。これは、新しいタイプの蛍光プローブである量子ドット<sup>[1]</sup>等も含む関連機器の技術が目覚ましく進歩を遂げているためである。

蛍光寿命イメージング顕微マッピング(FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)を使えば、蛍光強度イメージでは区別できない環境が局所的に異なる領域を、蛍光寿命の違いにより明らかにすることができる<sup>[1-3]</sup>。

定常蛍光測定では、蛍光スペクトル・励起スペクトル・蛍光量子収率(吸収された光子の数と放出された光子の比)・偏光/蛍光異方性を求めることができる。一方、時間分解蛍光測定では、蛍光減衰カーブ(蛍光寿命)・時間分解蛍光スペクトル・蛍光異方性減衰カーブを得ることができる。

本稿は、蛍光分光分野におけるHORIBAの歴史とともに、時間分解蛍光分光測定(蛍光寿命測定)の利点を焦点を当てている。

### 蛍光寿命の記述方法

励起状態の分子数の減衰は、すべての励起緩和プロセスの速度定数 $k = (k_r + k_{nr})$ により、以下のように示される。

$$\frac{dn(t)}{dt} = -kn(t) \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 $n(t)$ は、励起後の時間 $t$ における励起状態の分子数であり、 $k_r$ は輻射減衰速度定数、 $k_{nr}$ は無輻射減衰速度定数である。式2は、式1を書き換えて積分したものである。

$$\int_{n_0}^{n(t)} \frac{dn(t)}{n(t)} = - \int_0^t k dt. \dots\dots\dots (2)$$

式2から、励起状態分子数の指数関数的減衰の $n(t) = n_0 \exp(-kt)$ が得られる。ここで、 $n_0$ は、パルス光により励起された瞬時における、蛍光物質の励起状態の分子数である。蛍光強度は $n(t)$ に比例するため、時間依存蛍光強度 $I(t)$ は、以下のように、単一指数関数型の蛍光減衰として表される。

$$I(t) = I_0 \exp(-kt) \dots\dots\dots (3)$$

ここで、 $I_0$ は、 $t=0$ における蛍光強度である。蛍光寿命 $\tau$ は、全減衰速度定数に反比例する(すなわち $\tau = k^{-1}$ )ため、 $I(t)$ は、次の見慣れた式で示される。

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \dots\dots\dots (4)$$

蛍光寿命 $\tau$ は、蛍光強度が $1/e$ すなわち36.8%まで減衰するのに要する時間と定義される。

無輻射プロセスには、以下のように、内部転換 $k_{ic}$ 、項間交差 $k_{isc}$ 、反応生成物への分解 $k_d$ 、分子Mによる二分子消光プロセス $k_m [M]$ 等の多数の励起緩和経路が含まれる。

$$k_{nr} = k_{ic} + k_{isc} + k_d + k_m [M] \dots\dots\dots (5)$$

$k_r$ および $k_{nr}$ は、蛍光量子収率 $\Phi_F$ および蛍光寿命 $\tau$ を表す次式の関係より求められる。

$$\tau = 1/(k_r + k_{nr}), \Phi_F = k_r/(k_r + k_{nr}). \dots\dots\dots (6)$$

## 時間相関単一光子計数法について

時間相関単一光子計数法(TCSPC: Time-correlated Single Photon Counting)は、時間分解蛍光分光測定(TRFM: Time-resolved Fluorescence Measurement)のための最も高感度の測定法であると見なされている。これは、パルス励起後に単一光電子を検知する手法であることによるが、また広いダイナミックレンジを有する特長にもなっている。

TCSPCシステムでは、時間電圧変換器(TAC: Time-to-Amplitude Converter)により、パルス励起された光子と、蛍光光子が光電子増倍管またはマイクロチャンネルプレートにより光電子として検知される間の電圧変化分を測定して時間に換算する。パルス励起を多数回繰り返すことにより、光電子イベント数のヒストグラムが蛍光減衰曲線を形成する。TCSPCの詳細については引用文献を参照されたい<sup>[4-6]</sup>。

## HORIBA製蛍光寿命光度計について

HORIBAは、1983年に同社初のTCSPCの蛍光寿命測定装置の販売を開始した。



Figure 1 NAES-1100

このモデルはNAES-1100と命名したが、それは“Nanosecond Emission Spectrometer”の頭文字から取ったものであり、また、その発音が“nice”に似ていることが理由であった。HORIBAは、さらに低価格モデルであるNAES-500/550を、1985年に高性能モデルのNAES-700F/700Lを1990年にそれぞれ上市した。

NAES-700Lは、 $N_2$ レーザーおよび $N_2$ 励起色素レーザーを搭載できるようにした。これらは、ナノ秒以下の蛍光寿命を有する微弱なフォトルミネセンス材料を励起するための光源として開発され、NAES-700Lは繰り返し周波数最大1 kHzを達成していた(その当時従来型 $N_2$ レーザーの繰り返し周波数は50 Hz程度であった)<sup>[7]</sup>。このパルス光源の繰り返し周波数1 kHzは依然としてTCSPC法による蛍光寿命測定には低すぎたが、以下に述べるように、この課題をマルチTACの採用により克服した。本稿のデータはすべて、30年ほど前にNAESシリーズの装置により得られたものであるが、これらは現在でも、時間分解蛍光分光測定の重要性についての基本的な理解には十分に活用することができる。

### NAESシリーズの装置の特徴

従来のTCSPC法を用いたシステムでは、1回のTACスキャンで単一の光電子しか計数できなかった。光電子生成を統計的イベントと考えると、複数の光電子ではなく単一の光電子のみが生成されるように、測定時の蛍光強度を弱める必要がある。しかしながら、これはデータ取得に長い時間かかることを意味する。測定時間がかかりすぎるという問題を解決するため、1回の励起での走査により複数の光電子を検知できるように、進藤らによって発明されたマルチTAC<sup>[8]</sup>を導入した。

NAESは、実際8つのTACを備えていた。そのうち2つのTACが励起源からのパルス光のプロファイルのモニタリングに使用され、残り6つが蛍光プロファイルのモニタリングに使用された<sup>[7]</sup>。

NAESは、TCSPC法を採用したユーザーフレンドリーな蛍光寿命測定装置として設計されたモデルで、蛍光過渡現象の測定とデータ処理を簡単なキー操作により処理できるようになっており、NIM(Nuclear Instrument Module)や大型コンピューターを必要としなかった。

NAESは、保存されているデータから、最小二乗曲線近似およびデコンボリューションにより、最大3成分の指数関数的減衰カーブを解析処理することができる。この解析処理は、蛍光減衰と励起プロファイルのデータの同時取得中であっても行うことができる。

### 時間分解蛍光分光測定的重要性

時間分解蛍光分光測定(TRFM)、蛍光寿命測定には、定常蛍光測定に比べて、以下の4つの優位性がある。

第一に、時間分解蛍光スペクトルにより、励起状態の分子間相互作用における真のダイナミクスをスペクトルの時間変化として知ることができる。Figure 2は、時間分解蛍光スペクトルの例を示している。パルス励起後10 ns(緑色)、20 ns(赤色)、30 ns(紫色)、40 ns(黄色)、50 ns(青色)に、エキシマー発光(470 nm)が増加し、モノマー発光(387 nm)が減少している。

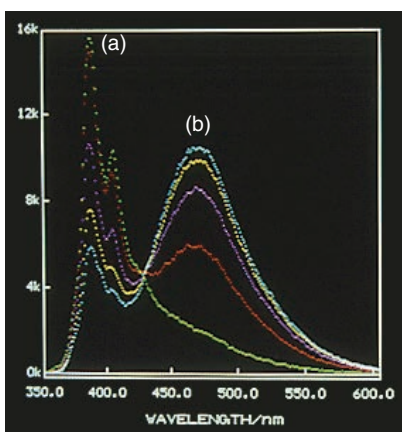


Figure 2 Excimer formation in de-gassed sample: Pyrene in cyclohexane (2.2 mMol). (a) Monomer Emission, (b) Excimer emission.



第二に、時間依存異方性は、測定される高分子のサイズ/体積・回転情報(回転相関時間 $\theta$ )・局所粘度・構造変化を明らかにする。**Figure 3**は、ANS\*<sup>1</sup>を使用して蛍光標識した生体タンパク質(アポミオグロビン)の蛍光異方性減衰の例を示している。蛍光異方性減衰分析の結果、 $T=290$  K、 $\eta=0.106$ ポアズの試験条件で、この生体タンパク質(ANSを使用して標識付けしたアポミオグロビン)の回転相関時間は $\theta=9.3$  ns、 $V=3.5 \times 10^4 \text{ \AA}^3$ であった。異方性減衰の基本理論は、「時間分解蛍光異方性測定について」の段落に述べられている。

\*1: ANS: 1-アニリノ-8-ナフトレンスルホン酸

第三に、蛍光寿命(FL: Fluorescence Lifetime)は、固定された環境内では蛍光物質自体の固有の特性である。一方、定常蛍光測定での蛍光強度(FI: Fluorescence Intensity)は、さまざまな試験条件、例えば、蛍光物質の濃度・蛍光退色・励起強度や光学システム(サンプルセル・光学ミラー・光学レンズ等)のような測定機器の経時的な条件変化等により、大きく影響を受ける。そのため、定常FI測定では、多くの補正やキャリブレーションが不可欠である。定常蛍光測定は多用されているが、電子励起状態にある分子の動特性を明らかにするための定量分析には、FLの方がずっと適している。FLは、粘度や極性、誘電率、pH等のローカライズされたサンプルの環境の変化に非常に敏感である。また、分子間相互作用のタイプによっては、FLは、他の分子との分子相互作用や高分子の構造の研究のために、さかんに使用されている。しばしば非単一指数関数型の蛍光減衰が生じるため、以下のように二成分指数関数型の式として表す場合がある。

$$I(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) \dots\dots\dots (7)$$

蛍光波長が重なっている場合でも、FL分析では加重比 $A_1:A_2$ により、複数の成分に区別することができる<sup>[1,9]</sup>。一方、定常蛍光測定(式7の積分)では、複数の成分の存在を区別できない。**Figure 4**に、結果の例を示している<sup>[10]</sup>。アクリジンオレンジ(AO)で蛍光標識された癌性のDNAと正常なDNAは、異なった寿命を示すことが知られている。DNAとAOの結合の模擬実験系として、AOをドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液に溶解する。535 nm(短い蛍光寿命)と630 nm(長い蛍光寿命)の蛍光成分がある理由は、AOモノマーとダイマーがそれぞれSDSと結合していることであると考えられた。このモノマーとダイマーは、更に周囲との特質的な相互作用により、2成分の蛍光寿命をもつ。FL測定は、供与体分子および受容体分子間の距離およびエネルギー伝達効率を求める際に重要な役割を果たしている。

第四に、時間分解測定では、励起光の時間プロファイルデータを除外することで、散乱したパルス励起光を取り除くことができる。散乱したパルス励起光の影響を取り除くことは、非溶液サンプルやFLIMなどの表面測定において特に重要となる<sup>[3]</sup>。

### フォトルミネセンスの発光寿命について

フォトルミネセンスの発光寿命は、半導体材料の評価に使用されてきた。フォトルミネセンスとは、光励起に伴って生じる伝導帯の電子と、価電子帯の正孔のそれぞれが再結合する際に起きる発光である。このエネルギー緩和プロセスに、不純物レベルが関わっている場合がある。**Figure 5**は、様々な温度で成長させたガリウムインジウムリン(GaInP)のフォトルミネセンス減衰カーブである。サンプル(b)は、より短い発光寿命を示したがこれは、非発光結合の寄与が大き

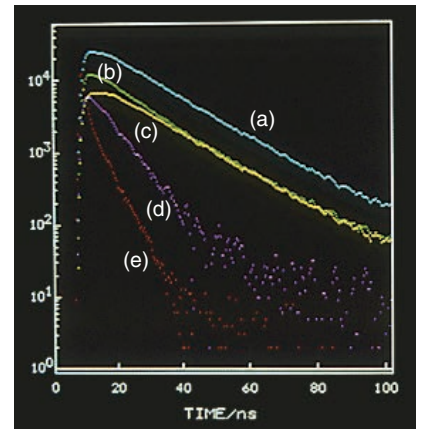


Figure 3 Anisotropy decay: (a)  $I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t)$ , (b)  $I_{\parallel}(t)$ , (c)  $I_{\perp}(t)$ , (d)  $I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)$ , (e) Lamp profile. Sample was provided by Dr. Tunesha Araiso, Hokkaido Univ.

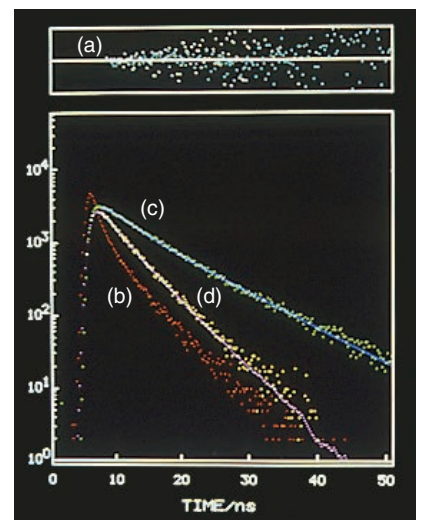


Figure 4 Excitation: 470nm, SDS conc.: 5 nM (a) Residual, (b) Excitation profile (c) Obs.630 nm,  $\tau_1=2.48$  ns (41.2%),  $\tau_2=9.03$  ns (58.8%) (d) Obs.535 nm,  $\tau_1=1.41$  ns (54%),  $\tau_2=3.48$  ns (45.5%)

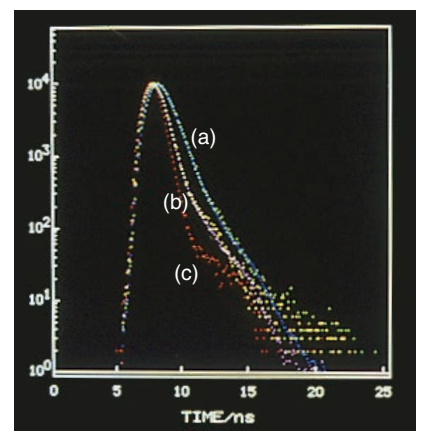


Figure 5 Excitation 337 nm( $N_2$  laser) Observation 660 nm. Sample (a)  $\tau_1=680$  ps(83.1%),  $\tau_2=1.26$  ns(16.9%) Sample (b)  $\tau_1=199$  ps(83.8%),  $\tau_2=1.16$  ns(16.2%) (c) Laser pulse profile. Sample: provided by Dr. Shigekazu Minagawa, Central Research Laboratory, Hitachi Ltd.

かったためである。この場合、サンプル(a)の方が、良いレーザー材料であることがわかる。

### フェルスター共鳴エネルギー移動

フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET: Förster resonance energy transfer)により、分子間相互作用および構造変化を明らかにできる。ここでは、供与体(D)および受容体(A)を用いて、D~Aの間のエネルギー伝達効率およびその距離を求める。FRETは、DからAへ電子励起が無輻射遷移する現象である。

単位Åのフェルスター距離は以下のように求められる。

$$R_0 = 0.211 [\kappa^2 n^4 \Phi_D J(\lambda)]^{1/6} \dots\dots\dots (8)$$

ここで、 $n$ は屈折率、 $\Phi_D$ は供与体の量子収率、 $\kappa^2$ は遷移双極子の配向因子であり、一般的にはランダム配向の $\kappa^2$ は2/3である。 $J(\lambda)$ は、供与体の発光 $F_D(\lambda)$ と受容体の吸収 $\varepsilon_A(\lambda)$ の間のスペクトルの重なりを示す積分である。

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \dots\dots\dots (9)$$

エネルギー移動の速度定数 $k_{et}$ は、フェルスターの式により、以下のように示すことができる。

$$k_{et} = (1/\tau_D) (R_0/R)^6 \dots\dots\dots (10)$$

ここで、 $\tau_D$ は、受容体が存在しない場合の供与体の蛍光寿命であり、 $R_0$ は、エネルギー移動効率が50%のフェルスター距離である。エネルギー移動効率( $E$ )およびD~A間の距離( $R$ )は、以下の式で示される。

$$E = 1 - (\tau_{DA}/\tau_D), R = R_0 [(1/E) - 1]^{1/6} \dots\dots\dots (11)$$

ここで、 $\tau_{DA}$ は、受容体が存在する場合の供与体の蛍光寿命である。

### 時間分解蛍光異方性測定について

分子は遷移モーメントベクトルに沿って励起されるため、パルス偏光入射光により、入射偏光に平行な遷移ベクトルを持つ励起状態の分子が生成される。

その後、エネルギーが他の分子へ移動すること、またはブラウン運動が原因の分子の回転により、偏光解消が起こる。

時間依存異方性 $r(t)$ は、以下の式で示される。<sup>[1, 5, 6, 9]</sup>

$$r(t) = [I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)] / [I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)] \dots\dots\dots (12)$$

ここで、 $I_{\parallel}(t)$ および $I_{\perp}(t)$ は、それぞれ鉛直方向偏光に平行および垂直の時間依存蛍光強度成分である。単一の $\theta$ (蛍光回転相関時間)の場合、 $I_{\parallel}(t)$ および $I_{\perp}(t)$ はSpencerとWeber<sup>[5]</sup>により、以下の式で示される。

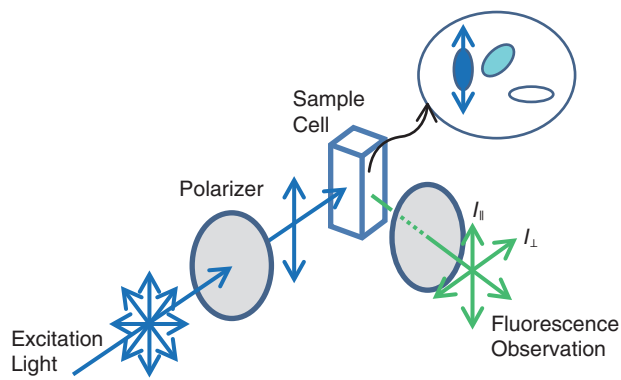


Figure 6 Polarized excitation and fluorescence detection.

$$I_{\parallel}(t) = e^{-t/\tau} (1 + 2r_0 e^{-t/\theta}), I_{\perp}(t) = e^{-t/\tau} (1 - r_0 e^{-t/\theta}) \dots\dots\dots (13)$$

ここで、 $r_0$ は分子の回転運動がない場合の初期異方性である。  
上の式を代入すると、以下により $r(t)$ が得られる。

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta}$$

$\theta$ は、次式のように関係づけられる。

$$\theta = 1/6D_r = \eta V/k_B T \dots\dots\dots (14)$$

ここで、 $D_r$ は回転拡散係数、 $\eta$ は局所粘度、 $V$ は分子の実効体積、 $k_B$ はボルツマン定数、 $T$ は絶対温度である。したがって、 $\theta$ は異方性減衰により求められ、 $\eta$ または $V$ は、どちらかがわかれば求めることができる。 $\theta$ は回転緩和時間( $\rho$ )から求められ、 $\theta = \rho/3$ となる。

定常状態では、以下のようなベラン方程式が用いられる。

$$1/r = (1/r_0) (1 + \tau/\theta), r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}) \dots\dots\dots (15)$$

ここで、 $r$ は蛍光異方性、 $r_0$ は初期の蛍光異方性、 $\tau$ は蛍光寿命を示す。3つのパラメーター $r_0$ 、 $\tau$ 、 $\theta$ は、( $T$ 、 $\eta$ )の1つの条件下の定常状態で $r$ を測定しても、求めることができない。これらのパラメーターを求めるには、 $(1/r)$ 対 $(T/\eta)$ のプロット(ベランプロット)<sup>[1,9]</sup>が必要である。時間分解蛍光異方性測定は、分子の回転やサイズに関する情報を得るには、定常測定よりも簡易な手段である。

Table 1は、時間分解蛍光分光測定(TRFM)における様々な特性をまとめたものである。

## HORIBAグループ会社の 時間分解蛍光分光装置について

堀場製作所からNAESシリーズの蛍光寿命測定装置の販売を開始するよりも以前に、HORIBAのTCSPC技術は、IBH社(1977年、英国スコットランドのストラスクライド大学のベンチャーカンパニーとしてグラスゴーに設立された)にその端を発していた。IBH社は2003年にHORIBA Jobin Yvon(JY)IBHとして、HORIBAグループの一員に加わった。同社は2017年に創立40周年を迎えたが、先進的なTCSPCシステムの開発に特化している。IBH社の技術の詳細については、この後の論文において紹介されることになっている。パルス光源として発光ダイオード(LED)および半導体レーザー(LD)を使用できるようになり、光源の光強度やパルス繰り返し周波数が飛躍的に向上しており、さらに近年の技術革新により、装置のためのエレクトロニクスやコンピューター、ソフトウェアは目覚ましい進歩を遂げつつある。このような技術の発展とともに、当社は多数のパート

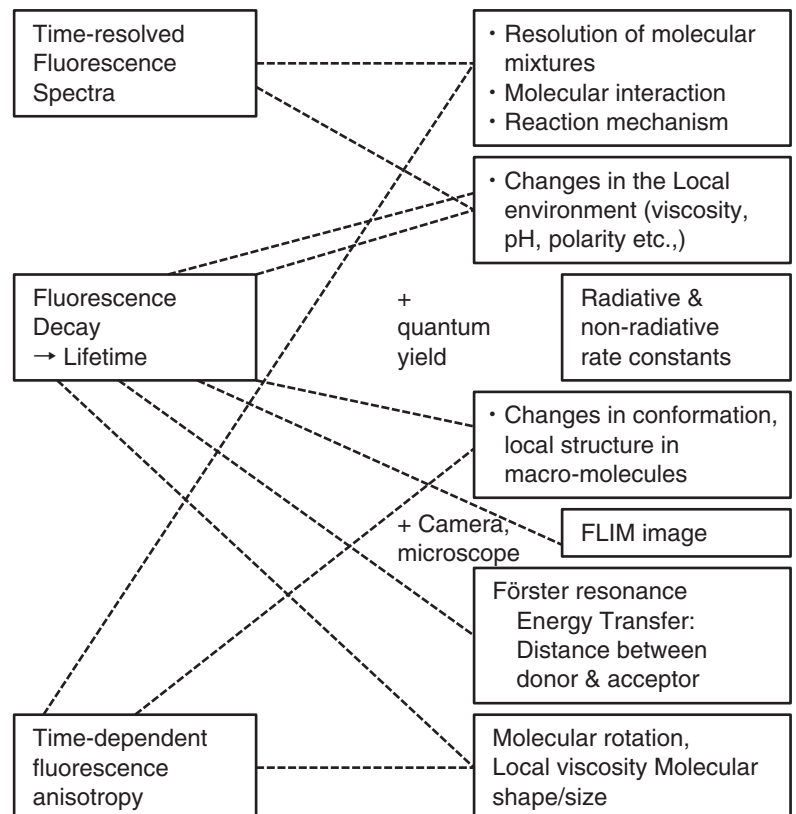


Table 1 Observable and Molecular property in TRFM.

ナーとの協業を通じ、蛍光分光分析の用途範囲を拡大してきた。

さらに、もう1社の蛍光分光技術を有する会社PTI社(Photon Technology International, Inc.)が、2014年にHORIBAグループ会社に加わった。PTI社は、1983年にカナダのオンタリオ州のロンドンに設立されている。オンタリオ州ロンドンにはTCSPC装置メーカーPRA社(Photon Research Associate)が、Western Ontario大学のベンチャー会社としてそれ以前に設立されていた。PRA社の重要メンバーの一部はPTI社へ移行している。したがって、HORIBAは、現在、蛍光分光分野において、多数の技術および技術者を世界中に擁しており、ここにはJY社(JobinYovn)やSPEX社\*2も含まれている。

\*2：JY社は1988年にSPEX社(SPEX Industries)を買収している。

## おわりに

本稿では時間分解蛍光分光測定の評価と基本的な理論背景を説明し、時間分解スペクトル、蛍光寿命および蛍光異方性減衰の測定例をいくつか示した。これらは、蛍光物質の局所環境に対する、蛍光寿命のリアルタイムプロセスおよび感度を反映するものである。ただし、定常蛍光測定・時間分解蛍光測定・リン光測定法を組み合わせれば、蛍光測定をさらに有益なものとすることができる。これらはそれぞれが補完的な役割を果たすからである。

HORIBAは、蛍光分光分析に関して有するグローバルな人材と技術を活用し蛍光装置のユーザーに対してより価値の高い製品とソリューションを提供し続けていくであろう。

## 参考文献

- [1] J. R. Lakowicz "Principle of Fluorescence Spectroscopy" Third Edition, Springer, 2006.
- [2] K. Awasthi, D. Moriya, T. Nakabayashi, L. Li and N. Ohta, J. Photochem. Photobiol. B 165, 256-265, 2016.
- [3] 中林孝和, 太田信廣, 日レ医誌(JJSLSM), 441, Vol.3, No.4, 2010.
- [4] W.R.Ware, Transient Luminescence measurement, In Creation and detection of the excited state, Vol. 1A, pp-213-302. Ed. AA Lamola. Marcel Dekker, New York, 1971.
- [5] D. V. O'Conner and D. Phillips, "Time-correlated Single Photon Counting", Academic Press, 1984.
- [6] 平山鋭, 原清明訳, ナノ・ピコ秒の蛍光測定解析法~時間相関単一光子計数法~, 学会出版センター, 1988.
- [7] I. Yokoyama, Readout, No.2, 27-36,1991.
- [8] 北海道大学学長, 試料の発光寿命測定装置, 特許1395515, 1987.8.24.
- [9] 木下一彦, 御橋廣真編: 蛍光測定~生物科学への応用~, 学会出版センター, 1983.
- [10] N.Miyoshi, K.Hara, I.Yokoyama, G.Tomita and M.Fukuda, Photochem.Photobiol. Vol.47,685-688,1988.



### 原 清明

Kiyooki HARA, Ph.D.

株式会社 堀場製作所  
フェロー 理学博士  
Fellow  
HORIBA, Ltd.

## 蛍光寿命を追い求めて 蛍光寿命測定とライフサイエンスへの応用

Finding the Time for Fluorescence  
Its Measurement and Applications in Life Science

本稿では、分光の専門家の領分であった蛍光寿命測定が、技術の進歩に伴い科学やエンジニアリング分野において主要な研究ツールとして使用されるまでに至った過程をまとめた。研究分野にとどまらず、現実社会での課題の解決に役立つ応用を通じて蛍光寿命測定がもたらす有益性に光を当てる。具体的には、癌やアルツハイマー病等の疾患の診断や治療の技術向上を目的とする最近のアプリケーション事例をご紹介します。

We summarise how developments in technology have brought fluorescence lifetime spectroscopy from being the preserve of the specialist to becoming a major tool for research across many science and engineering disciplines. We highlight the advantages which fluorescence lifetime measurements can bring, not only to underpin research, but also through application in helping to solve real-world problems. We illustrate this with recent examples in cancer and Alzheimer's research, which are aimed at improving disease understanding, diagnosis and therapeutics.

### はじめに

蛍光(Fluorescence)は主要な研究ツールとして使用可能な発光現象であり、多くの分野において利用されている。ライフサイエンス、医学、ナノテクノロジー、マテリアル、環境、エネルギー分野などを例として挙げることができるが、これらはほんの一部に過ぎない。重要なことは1分子レベルを扱うような技術においても蛍光の利用は極めて重要な科学的ブレークスルーを支え続けていることである。それが最も顕著なのはヘルスケア分野ではないかと思われる。蛍光は疾病の診断にもヒトゲノムの塩基配列解読の基礎技術にも利用されている。蛍光アッセイの把握、操作および設計は、蛍光特性の正確でかつ精密な測定が可能か否かに左右される。その特性は多次元の蛍光の各要素からなるフィンガープリントを形成するが、これは便宜上次式のように表すことができる。

$$\text{Fluorescence} = f(I, l_{exc}, l_{em}, \rho, r, t) \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 $I$ は蛍光強度、 $l_{exc}$ 、 $l_{em}$ はそれぞれ励起波長、蛍光波長、 $\rho$ は蛍光異方性測定に必要な偏光度、 $r$ は顕微鏡使用時の位置、 $t$ は蛍光寿命  $\tau$  で記述される時間を示す。このフィンガープリント(蛍光の各要素)の測定技術は分析装置の設計や機能に落とし込むことができる。当社、ホリバ・ジョバンイボンIBH社は、蛍光寿命測定システム、その関連機器および解析ソフトウェアの設計開発および製造を専門とし、1977年に創業し今年40周年を迎える。当社はスコットランド最初の大学ベンチャー企業のひとつであり、2003年にHORIBAグループに加わることで、蛍光分光装置のリーディングサプライヤーとなっている。蛍光寿命測定は蛍光分光市場において最も急速に成長している領域であるが、その理由と

David J S Birch

David McLoskey

しては次のような点が挙げられる。

1. 時間分解によって動的情報や運動速度パラメーターを明らかにすることができる。
2. 時間的弁別によってノイズとなるバックグラウンドや望まない蛍光の影響を回避でき強い選択性を有する。
3. フォトブリーチング等により引き起こされる蛍光色素濃度の変化に影響を受けない。
4. 蛍光強度や量子収量測定に比べて校正やサンプル間の比較が容易である。

堀場製作所の原博士が本号掲載の先の総説にて蛍光寿命測定の基本理論とその技術について詳しく解説をしているので、ここでは同じ内容を繰り返さないが、要するに蛍光分光測定にもたらす蛍光寿命測定の付加的なメリットは、情報量で例えると写真に対する映画のようなものと言えよう。

### 現在の蛍光寿命測定機能の実現に至る道のり

分光計器を扱う他の企業と同様に、当社のルーツは大学での研究に遡る。本稿の著者であるDavid Birchは、英国マンチェスター大学シュスター研究所で、その後グラスゴーにあるストラスクライド大学の物理学科で研究を行っていたが、1977年にBob Imhof氏、Tony Hallam氏と3名で、現在のホリバ・ジョバンイボン IBH社の基盤となるベンチャービジネスをスタートさせた。もう一人の著者であるDavid McLoskeyが1997年にBob Imhof氏から技術責任者の業務を引継いで、現在では18名の社員を抱えるまでになった。この事業を成功へと導いた理念は、今でもなお当社に息づいており、根ざすところは先端的な研究技術を一般の顧客にも広く利用できるものにするのである。またビジネス創業当初から、我々は時間相関単一光子計数法(TCSPC)のデジタル技術こそが最良のアプローチであると考えていた。

初期の装置開発において主力となったのは、Figure 1aで示す金メッキされた同軸型フラッシュランプ(型式: 5000F)だった。繰返周波数30 kHzで発振するこの光源はナノ秒フラッシュランプとしては初めてスパーク放電による高周波振動に起因する減衰曲線の歪みを確実に克服できるものだった。パルスエネルギーは標準で1 pJ程度、平均出力も1  $\mu$ W以下ではあったが、単一光子タイミング検出が可能な感度を有していたため、このフラッシュランプを使用できた。モードロックレーザーと比較して安価で価格競争力があったことから、このフラッシュランプ<sup>[1, 2]</sup>は蛍光寿命測定用パルス光源として20年間の長きわたり用いられてきたが、その後出現した半導体パルス光源にその座を譲ることになる。半導体パルス光源としては、当社からはNanoLEDシリーズ<sup>[3]</sup>、さらに最大繰返周波数100 MHzを実現できるDeltaDiodeシリーズ<sup>[4]</sup>(Figure 1bに示す)を発売している。特にタンパク質の蛍光寿命測定に対応できる紫外領域で発振する発光ダイオード(LED)は励起光源として重宝されている。また、半導体パルス光源は約1000倍以上の高速データ取込速度、高繰返パルス、メンテナンスフリー特性、高安定性、単色性の高いレーザーなどの長所を同時に兼ね備えていたことから、フラッシュランプに取って代わるのに時間はかからなかった。



Figure 1 Model 5000F coaxial nanosecond flashlamp (a) and DeltaDiode picosecond LED/LD (b).

当社の極めて初期の開発段階から、たった1度の測定でいかに多くの蛍光に関する要素の情報(式1)を入手できるかに顧客ニーズとビジネスチャンスがあることをよく認識していたため、1980年代にはこの課題に着手した。すなわち

TCSPC信号の多重化およびルーティング技術の開発に乗り出したのである。我々は当初2チャンネルのアプローチに取り組み、蛍光と励起光の同時測定(SAFE: Simultaneous Acquisition of Fluorescence and Excitation)により励起パルスの経時変化を克服しようとしたが<sup>[5]</sup>、偶然にも、日本の堀場製作所では原博士も、ほぼ同時期に、同じ目標に向かって蛍光寿命測定装置NAESの開発に取り組んでいた。両者のアプローチの違いは、原博士が開発した装置NAESでは時間電圧変換器(TAC)をマルチで用いたのに対して、我々の装置ではTACをシングルで用いたことである。我々が2チャンネルを実装したことは蛍光異方性減衰測定に必要とされる直交する2偏光面の同時測定に適していた<sup>[6]</sup>。ほどなく我々は光ファイバーを分光器にカップリングすることで4チャンネルを実装しようとするアプローチを行った。これは複数の発光波長における蛍光の同時減衰測定を初めて実証するものとなった<sup>[7]</sup>。これによってこれまでの順次的に波長を駆動するタイプのアプローチに比べて超高速な時間分解発光スペクトル測定を実現できることが示された。とはいえ蛍光寿命計測にはこの時点ではまだ1時間単位の測定時間が必要であった。このため高い繰返周波数を持つ半導体パルス光源が世の中に広く普及しはじめても、TCSPC法を用いた蛍光寿命測定には長時間かかるという過去の思いこみはなかなか払拭されなかった。

我々の多重化に関する研究開発により、モデル5000W SAFE (Figure 2)においてSAFEとデュアルチャンネルによる蛍光測定機能が実現した。この測定装置は3チャンネルを内蔵しているだけでなく、同時に最大16までTCSPCチャンネルを多重化することができ、これまでの製品の中では最も汎用性の高い蛍光寿命測定装置となった<sup>[8]</sup>。これを可能にしたのが、蛍光寿命測定用に作られた初のASIC(特定用途向け集積回路)である。CMOS技術に基づき、この集積回路はFigure 2に示す当時広く用いていたNIMモジュール内に組み込まれた。その後マルチアノードマイクロチャンネルプレート光電子増倍管と組み合わせることでさまざまな形式の多重イメージングの実現につながった。

こうした数々の開発は、同時測定による蛍光の多元的要素のさらなる利用に向け、将来に対するベンチマーク(基準)を提供するものとなった。ゴールはいまだ完全には達成されたとは言えないが、現在でも多くの成果が生み出される研究領域となっている。従来の光電子増倍管(PMT)に比べると検出面積はかなり小さいにも関わらず、単一光子アバランシェダイオードアレイ検出器はある特定用途(寿命マッピング測定)でさらなる展開が有望視されている。

今日、われわれの製品は、初期の装置に比べるとずっとユーザフレンドリーになり取り扱いも容易なものとなったが、今でも我々の顧客が求める最先端の研究に対応できる能力を保持している。例えば、近年リリースした、最適化したタッチスクリーンインターフェースを有するソフトウェア「EzTime」は、この分野では画期的なもので、スクリプトによる自動化に加えて、ワンクリックで自動フィッティングを行い、さらにその結果を表示できる等、蛍光寿命測定のプロセスを劇的に簡略化した。さらにF-Linkバス技術によって装置の自動識別や構成の把握ができるので、励起光源やサンプル室のアクセサリ類の載替えやアップグレードを簡単に行うことができるようになった。最新の蛍光寿命測定装置DeltaFlexではTACやADCに代わって時間デジタル変換器(TDC)が採用されている。TDCはTACのような極めて高い時間分解能は持たないものの(TACでは現在、数百フェムト秒を容易に時間分解できるが)、全てがデジタル化されているTDCを用いた場合、繰返周波数100 MHzの半導体パルス光源との組合せで、かつて想像もできなかった1ミリ秒を切る短時間で寿命測定が可能となった。装置開発を始めた頃に我々が耐え忍んだ数時間もかかる測定時間のこ

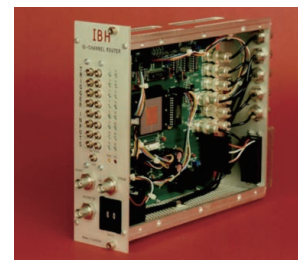
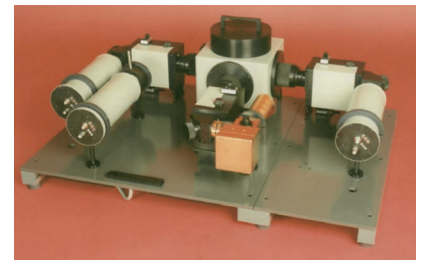


Figure 2 Model 5000W SAFE and its 16 channel TCSPC multiplexing module.

とを思えば格段の技術進歩である。このように短時間測定によって、毎秒20,000ヒストグラムという高速レートでTCSPC測定データのディスクストリーミングが連続的に行えるようになった。これによって単に蛍光寿命を測定するというのではなく3DイメージングやLIDARといったTCSPCの新規アプリケーションも出てきている。今やパソコンは非常に有能なツールであり、光子を計数して固定されたサイズのヒストグラムに記録する必要がなくなり、光子検出の瞬間の状態に関する情報が「タグ付け」され、その後ソートや操作のためにディスクに転送される際には、テラバイトサイズのファイル中でそれぞれ個別に分類され保持される。

現在、当社の蛍光寿命測定装置のラインナップには蛍光寿命測定専用機 (Figure 3a) と、蛍光分光光度計に蛍光寿命測定機能が付与されたハイブリッドシステム (Figure 3b) がある。

蛍光寿命測定装置DeltaFlexは、モジュールタイプのシステムで、当社の初期型の蛍光寿命測定装置 (Figure 2) にその起源があることがはっきりと見て取れる。モジュール故に装置の構成を自由に変更したり機能を拡張することができる。検出器を複数台搭載することや、マイクロチャンネルプレート光電子増倍管 (MCP-PMT) や近赤外対応光電子増倍管 (NIR-PMT) を搭載することもできる。さらに連続発振タイプのレーザや超低温冷却ユニット (クライオスタット) などのオプションの追加にも柔軟に対応できる。このように使い勝手の良さに加えて装置の高性能化により、さまざまな分野において蛍光寿命を測定ツールとして活用する機会が広がり続けている。

## ヘルスケアに関連するライフサイエンスの 蛍光寿命アプリケーション

前述のとおり、蛍光を利用できることになったことでヘルスケアの質を改善するのに多いに役に立っているものと思われる。ここでは多様性に富む3つのアプリケーション例を挙げて、分子に関する新たな知見を提供する蛍光寿命測定の能力について説明する。これらはいずれもDeltaFlexを用いた実施例である。

### メラニンの構造：時間を認識する

皮膚の色素であるメラニンは人体を紫外線 (UV光) から保護する役目があるが、脳や目にも存在しており、さらには菌類、海洋生物、果実など種々の形で自然界にも存在している。読者の方は驚かれるかもしれないが、実はメラニンの構造は未だよく解っていない。その主成分はジヒドロキシインドールであることは知られており、これが黒鉛に類似したシート状の構造を形作るものと考えられている。これはモジュール蛍光分光測定装置Fluorologを用いた、シートセンシングプローブ「チオフラビンT (ThT)」を用いた近年の蛍光プローブ研究によって確認されている<sup>[9]</sup>が、この基本成分が分子レベルでどのように配置されているかはいまだ謎の残る部分がある。メラニンの構造を知ることが重要である理由はいくつかある。メラニンは人体を有害な紫外線から保護しているが、それと同時に皮膚癌の最も攻撃的な形態であるメラノーマにおいてもある役割を果たしていると考えられている。加えて非常に特異な物性の組合せを有していることから、メラニンはバイオミメティクス (生物模倣) への応用も期待されている。メラニンは紫外線から近赤外域までの非常にブロードな吸収スペクトルを持ち、常磁性もある上、その導電性は水和率によって大きさが8桁にわたって変化する。

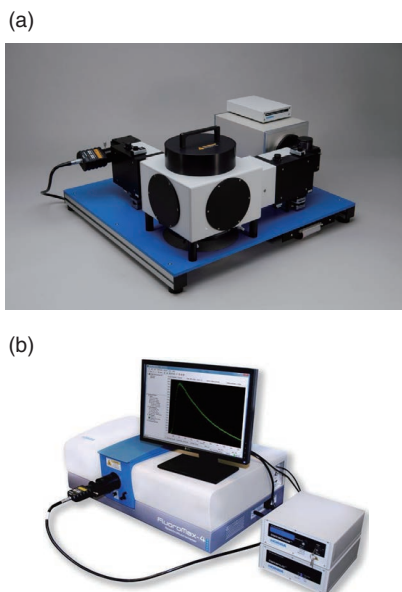


Figure 3 DeltaFlex dedicated lifetime system (a) and a hybrid FluoroMax-TCSPC lifetime system (b).



メラニンから発する蛍光は微弱で、その測定は困難であると長年考えられてきた。しかしDeltaDiodeのような強力安定した半導体パルス光源の進歩によりメラニンの研究には新たな道が開けつつある。メラニンの蛍光減衰は複合的で、複数の指数関数をとることから、その構造が複雑であることが推察される。銅イオンは通常蛍光を消光させる特性があるが、Figure 4に示すように、銅イオン存在下の水中でL-3,4-ジヒドロキシルフェニルアラニン(L-DOPA)の酸化を用いた(メラノソーム中の天然合成を模した形の)メラニンの合成実験では、発光波長480 nmにおける蛍光減衰曲線は蛍光寿命が約6ナノ秒の単一指数型へと変化している<sup>[10]</sup>。単一指数関数の蛍光減衰は単一励起状態によるもので、メラニンの構造において特異な構成成分が存在することを示唆している。他の構造も存在する可能性は高いが、この蛍光寿命6ナノ秒の減衰時間という起点を認識できたことはメラニンの構造を解明する上で非常に有用なステップとなりうる。

### ベータアミロイドの凝集：アルツハイマー病の初期病変

タンパク質は誤った構造に折り畳まれるミスフォールディングが起こると凝集しやすくなりアミロイド症と称されるさまざまな疾患の原因となる。この疾患群には、アルツハイマー病(AD)、2型糖尿病、クロイツフェルト・ヤコブ病、さらにはパーキンソン病といった現代社会では難病といわれている疾患が含まれている。ADは全ての神経変性疾患の中でも広く一般的なものであるが、治療法や簡便な臨床診断が確立していない。アミロイド症の特徴は、疾患ごとに特定のタンパク質が凝集して安定的かつ不溶性のアミロイド線維を形成し、沈着物として体内に滞留することである。ADの場合には、アミロイド線維はベータアミロイド(Aβ)タンパク質の凝集によって形成される。Aβはアミノ酸長38~42程度のアミノ酸ペプチドで、前駆タンパク質であるAmyloid-β precursor protein (APP)の部分断片である。当初は、アミロイド斑として脳に沈着したAβ線維が神経細胞の死をもたらす主要な病原因子であると考えられていたが、神経細胞の機能不全や細胞死は、より短い可溶性のAβオリゴマーにより引き起こされるということ、Aβオリゴマーは凝集の初期段階に形成され細胞膜を破壊することなどが最近明らかになってきた。それゆえAβの凝集を初期のステージで検出することは、ADの発生原因を完全に理解し、より良い治療法を開発するために不可欠である。

蛍光分光測定は一般的に凝集プロセスの研究に適しており、ThT等の外因性蛍光プローブがAβ線維の形成の研究に広く使われている。しかしながら、ThTによって検出できるのは線維を誘導する後期のベータシート形成のみであり、初期のオリゴマー形成は検出できないとされているが、むしろThTが初期段階の凝集を妨害してしまっている可能性がある。しかしながら自然の気まぐれがもたらす幸運とでもいふべきか、Aβは、単一のチロシン残基を含み、励起したチロシン残基からエネルギーを受け取ってしまうトリプトファン残基は含まない。これは光物理学的に見れば、通常のタンパク質の研究よりもずっとシンプルな系であることを意味し、半導体パルス光源NanoLEDやDeltaDiodeを用いて波長285 nmで励起すればチロシン残基のみの蛍光を発光させることができる。すなわち、

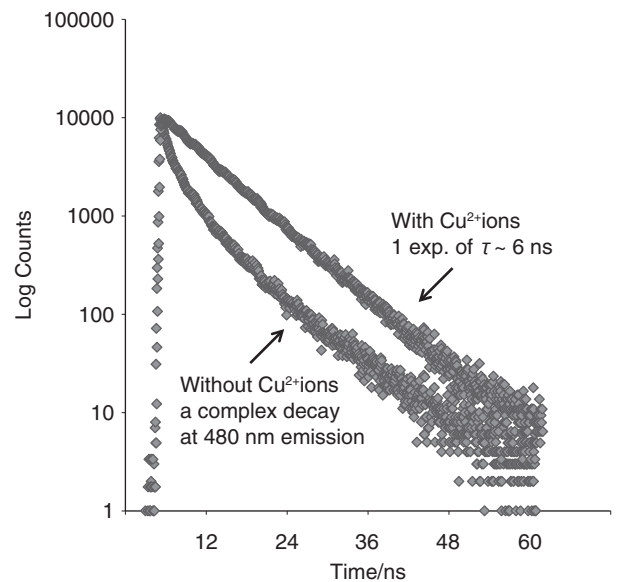


Figure 4 Fluorescence decay of melanin. In the presence of 4 μM Cu<sup>2+</sup> ions the decay becomes a single exponential of τ ~ 6 ns at 480 nm emission, suggesting a simplified structure.

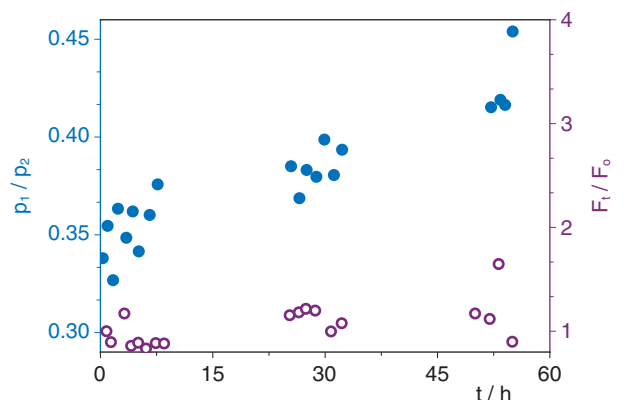


Figure 5 Relative amplitude of two decay parameters ( $p_1/p_2$ ) when a 3-exponential decay model  $i(t) = \sum p_n \exp(-t/\tau_n)$ , for  $n=3$ , is used to describes the tyrosine fluorescence decay of Aβ during the early stages of aggregation.  $F_1/F_0$  describes the fluorescence intensity of the sheet-sensing probe ThT during this time and it can be seen to provide little information on the cytotoxic oligomer formation which occurs as a precursor to Alzheimer's disease.

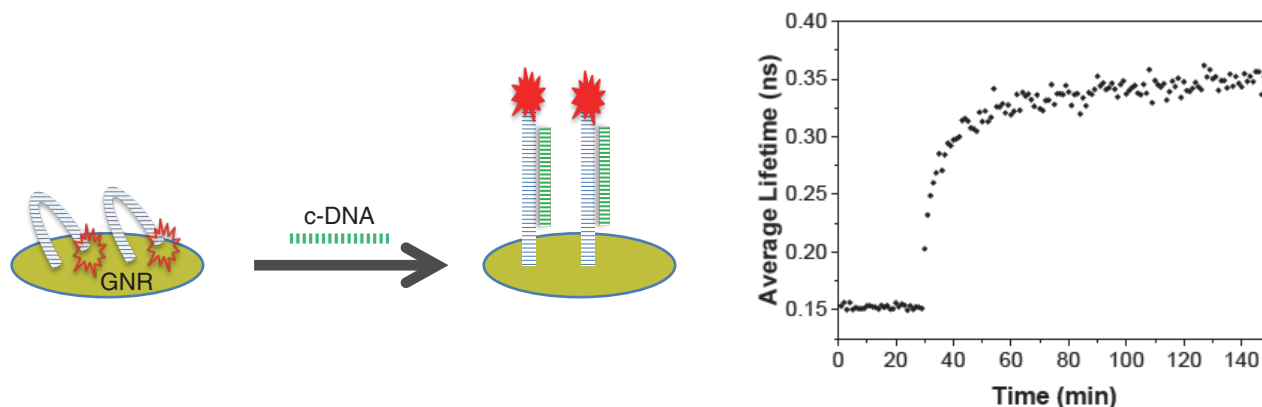


Figure 6 GNR hairpin sensor sprung by binding to c-DNA and the consequential increase in the average fluorescence lifetime of oligonucleotide labelled with 6-carboxyfluorescein as hybridization occurs. Excitation was at 474 nm using the NanoLED laser diode.

初期の凝集を自家蛍光減衰によってモニターできるという仮説が成り立つ。これはまさにその好例であることがわかるが<sup>[11]</sup>、興味深いことに、蛍光減衰パラメーターの(ほんのわずかな)変化ではなく、Figure 5のように相対値によって示される。この挙動は、3種のチロシン回転異性体の相対量の変化を表していると考えられている。

したがって、 $A\beta$ の内在的な蛍光減衰を測定することにより、ADを引き起こす根本的な凝集動態が把握できるだけでなく、さらにはADの新しい治療法の開発にも活用できるであろう。

#### カスタム設計の癌バイオマーカー：検出のための時間

前述の事例では自家蛍光プロセスをモニターする対象だったが、ここでは、細胞中のバイオマーカーとしての「メッセンジャーRNA (mRNA)」を検出することができるカスタム設計のナノプローブの研究を通じて、蛍光寿命測定がどのように活用されるかについて説明する。mRNAは細胞によるタンパク質の産生において主要な役割を負っている。高い選択性と高感度でmRNAの検出を行うことは、疾患の早期診断を可能にし、治療の経過をモニターし評価するのにも役立つ。また、mRNAの検出によって細胞内での基本的なメカニズムを理解する上で価値のある情報を得ることができる。

近年の蛍光分野における最も劇的な発展としては、表面プラズモンを利用したアプリケーションがある<sup>[12]</sup>。最近、mRNAを使った癌バイオマーカー向けのプラズモンセンサーの研究と最適化に蛍光寿命測定装置DeltaFlexが用いられている。このセンサーは、蛍光色素で標識したオリゴヌクレオチドがヘアピン形状で金ナノロッド(GNR)に結合した状態になっている。最初、近接するGNRによって色素の蛍光は消光されるが、オリゴヌクレオチドを対象のmRNAにマッチさせることで、mRNAにおける相補配列を用いたハイブリダイゼーションによってヘアピンが開き、蛍光が増強する<sup>[13]</sup>。相補的(c-)DNAによる癌mRNAバイオマーカーを用いたセンサーの模型をFigure 6に示す。ヘアピンが開きさらにc-DNAがGNRに結合するにつれて、6-カルボキシフルオレセイン標識の平均蛍光寿命が変化していることがわかる。細胞からの内因性の蛍光の影響を取り除くため、このアプリケーションでは紫外域でなく可視域の波長で励起できるという利点がある。

金ナノロッドは容易に細胞内に入りこむことができ、導入剤も不要である。このアプリケーションでは、蛍光色素濃度に影響を受けないなど、前述した蛍光寿命測定のメリットのすべてが重視され始めている。

## おわりに

蛍光寿命技術とその応用は、蛍光色素の基礎的な光物理が明らかになり、ほとんどその応用が化学分野に集中していた当初から長い道のりを歩んできた。堀場製作所とホリバ・ジョバンイボンIBH社はともに蛍光寿命測定装置に対して継続的に装置の改良を行い、使いやすさの追求を通じた性能強化と用途拡大を実現してきた。

その間市場はどのような変化を遂げてきただろうか。蛍光寿命測定装置は価格が安くなり、その一方で装置性能は向上してきた。今やオンラインでのデータ分析や操作が日常的なものとなり、使いやすさやソフトウェアが装置仕様として重要視され、装置のコンパクト化がさらに進み、メリットを享受するためには製品のユーザーになるだけでよく、分光分野のエキスパートである必要もなくなった。対象分野の幅も大きく広がり、サプライヤーと顧客との間での研究協力も盛んになっている。その優れた一例が、HORIBAが開催する国際ワークショップFluoroFestである。FluoroFestではHORIBAグループのスペシャリストらと科学分野コミュニティが一堂に会して「蛍光」という共通言語でアイデアや経験を伝え合う。12回目となった直近のワークショップは2017年4月に英国グラスゴーで開催され大好評を得た。未来へのイノベーションの探求は今も続いている。我々の大きなチャンスは微細化にあると考えられる。その多くは、光源、光子検出、データ取得および処理という観点から半導体技術にリンクしているが、これらはすべて1回の測定で蛍光特性をより短時間で解明できるものであり、将来の新しいセンサーシステムの開発につながるものである。ヘルスケア分野だけではなく、食品、エネルギー、化学、環境などの分野においても同様である。微細化によって蛍光寿命の技術が独創的なものに進化しユーザーの手に委ねられる未来を想像している。時間に余裕をもって蛍光寿命測定がいつも簡単に実現できるようになってきたと言えるかもしれない。もちろん、DeltaFlexのような卓上型蛍光寿命測定装置は今後も新しい装置開発のためのベンチマーク(基準機)としてはなくてはならないものであるし、研究分野においては柔軟性と性能の両方を提供してくれる究極の装置である続けるであろう。

## 参考文献

- [1] *A single-photon counting fluorescence decay-time spectrometer.* D J S Birch and R E Imhof. J. Phys. E, **10**, 1044-9, 1977.
- [2] *Coaxial nanosecond flashlamp.* D J S Birch and RE Imhof, Rev. Sci. Instrum. **52**, 1206-12, 1981.
- [3] *A new sub-nanosecond LED at 280 nm: application to protein fluorescence.* C D McGuinness, K Sagoo, D McLoskey and D J S Birch. Meas. Sci. Technol. **15**, L19-22, 2004.
- [4] *Fast time-correlated single-photon counting fluorescence lifetime acquisition using a 100 MHz semiconductor excitation source.* D. McLoskey, D. Campbell, A. Allison and G. Hungerford. Meas. Sci. Technol. **22**, 067001, 2011.
- [5] *Pulse fluorometry using simultaneous acquisition of fluorescence and excitation.* D J S Birch, R E Imhof and A Dutch, Rev. Sci. Instrum. **55**, 1255-64, 1984.
- [6] *A Multiplexed single photon instrument for routine measurement of time-resolved fluorescence anisotropy.* D J S Birch, A S Holmes, J R Gilchrist, R E Imhof, S M Al-Alawi and B Nadolski, J. Phys. E. Sci. Instrum. **20**, 471-3, 1987.
- [7] *Multiplexed array fluorometry.* D J S Birch, A S Holmes, R E Imhof, B Z Nadolski and K Suhling, J. Phys. E.: Sci. Instrum. **21** 415-7, 1988.
- [8] *Multiplexed single-photon counting 1: A time-correlated fluorescence lifetime camera.* D McLoskey, D J S Birch, A Sanderson, K Suhling, E Welch and P J Hicks, Rev. Sci. Instrum. **67**, 2228-37, 1996.
- [9] *Eumelanin Kinetics and Sheet Structure.* J Sutter, T Bidláková, J Karolin and D J S Birch. App. Phys. Letts., **100**, 113701 (4 pages), 2012.
- [10] *Metal ion influence on eumelanin fluorescence and structure.* J-U Sutter and D J S Birch. Methods Appl. Fluoresc. **2**, 024005, 2014.
- [11] *Early detection of amyloid aggregation using intrinsic fluorescence.* O J Rolinski, M Amaro and D J S Birch. Biosensors and Bioelectronics. **25** (10), 2249-52, 2010.
- [12] *Radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications.* J. R. Lakowicz, Anal. Biochem. **298**(1), 1-24, 2001.
- [13] *Hairpin DNA-functionalized gold nanorods for mRNA detection in homogenous solution.* W Guoke, Y Jun, W Jinliang, G Peng, D J S Birch and Yu Chen. J. Biomed. Opt. **21** (9), 097001, 2016.

**David J S Birch**

President  
HORIBA JOBIN YVON IBH Ltd.  
Professor of the University of Strathclyde  
Ph.D.

**David McLoskey**

Managing Director  
HORIBA JOBIN YVON IBH Ltd.  
Ph.D.

## In situラマン分光法による界面電子移動プロセスの探索： 基礎から応用事例研究まで

In situ Raman Spectroscopy to Monitor Interfacial Electron Transfer Process:  
from Fundamental to Application Case Studies

葛目 陽義

Akiyoshi KUZUME, Ph.D.

東京工業大学科学技術創成研究院 (226-8503 横浜市緑区長津田町 4259)

特任准教授

Tel : +81-45-924-5873

電子メール : Kuzume.aaa@m.titech.ac.jp



In situラマン分光法は、固液界面の局所構造や反応特性の測定を通じて、電気化学的条件下での電子移動プロセスの検証を行うことができる。このため現在、in situラマン分光法は、たとえばエネルギー変換やバイオメディエーション(生物学的環境修復)を利用する装置の開発といった、基礎から応用研究まで広範囲にわたる分野・領域において、その場観察できる強力な表面特性評価ツールの一つとして認識されている。また、精密制御したナノ構造体を表面に導入することで、ラマン信号強度が特異的に増強され、分子レベルでの光学的特性の観察・評価が可能になる。本稿ではラマン分光法の歴史を序論にて簡潔に紹介し、続いて筆者のチームが最近手掛けたin situラマン分光分析の事例を、電位制御条件下の固液界面における電気化学的な、あるいは微生物学的な電子移動プロセスに特にスポットを当てて概観する。

In situ Raman spectroscopy is capable of probing electron transfer processes under electrochemical condition by monitoring local structure and reactivity properties of solid/liquid interfaces. Therefore, in situ Raman spectroscopy is now recognized as one of the powerful surface characterisation techniques for the investigation of the fundamental and application studies, such as development of energy conversion and bio-mediating devices. In addition, an introduction of nanostructured surfaces increases the sensitivity of Raman signals, capable of observing spectroscopic features from molecular level. This article gives a brief history of Raman spectroscopy in the introduction, followed by an overview of the recent in situ Raman spectroscopic studies in our group, particularly focusing on the electrochemical and microbial electron transfer processes at solid/liquid interfaces under electrochemical condition.

### 序論

ラマン効果とは入射光(光子)と物質の間でのエネルギー授受に起因する光の非弾性散乱である。RamanとKrishnanによって1923年に初めて実験で確認され、「新たな種類の二次放射(a new type of secondary radiation)」として1928年に報告された<sup>[1]</sup>。この発見が分光学上の新原理として重大なものであったことは、発表からわずか2年後の1930年にノーベル物理学賞を受賞していることから明らかである。一般に、放射により対象分子に分極率の変化(単に“電子雲の体積変化”と言っても良い)を引き起こす振動がラマン活性である。ただし、ラマン散乱の散乱断面積はレイリー散乱の強度と比較すると $10^{-6}$ 倍とかなり小さい。強いレーザー光を照射すると一般にラマンバンドの強度は増すが、測定時に試料温度が上昇し、表面種に深刻な損傷を引き起こす。加えて、試料からの蛍光がスペクトルのバック

グラウンドを増大させることから、ラマン分光法の検出能力に対して制約となった。このラマン効果の「過度の微弱さ(excessive feebleness)」から、初期のこの段階では、まだ技術的に単分子レベルでのスペクトル特性の検出に十分な感度を持っていなかった。その後、ラマン分光法が「ルネサンス期」を迎えるまでには、1923年の初実験から実に50年近い年月が必要となった。

1973年、電気化学的に粗面化された銀電極表面に吸着したピリジン分子における表面増強ラマン散乱現象(SERS)が発見された(最初の報告は1974年、Fleischmannらによる<sup>[2]</sup>)。そのラマンバンドの著しく高い信号強度は、蛍光によるバックグラウンドを凌駕し、表面の単分子層の観測をも可能としたことで、表面科学分野にブレイクスルーをもたらした。この実験的に観測されたSERS現象について後日、別々にJeanmaireとVan Duyne<sup>[3]</sup>、Albrechtと

Creighton<sup>[4]</sup>らのグループによって1977年、論理的に増強メカニズムが説明された。これらは、電磁的効果および化学的効果によるSERSの増強メカニズムに起因すると、それぞれ提唱された。前者の効果がレーザー照射に伴い粗面化表面において励起される局在化表面プラズモンの増強電場に起因すると説明されたのに対し、後者の効果は金属基板と吸着分子間での電荷移動を含む相互作用に由来すると提案された。粗面における顕著なラマン増強に関するこれらのメカニズム解明を幕開けとして、SERSを用いた表面科学分析がより盛んになり、高感度の表面観測技法の構築・改良を通じて固体表面のみならず電気化学的・生物学的な(*in situ*)界面研究を行う大きな流れへとつながっていく。

その後、表面を電気化学的に粗面化する代わりに、表面にナノ構造体を精密制御して配置させるナノ技術が開発されることで、SERS測定法がさらに進展した。ナノテクノロジーの進歩と機器能力・技術の向上により、精密なナノ構造体を有するSERS向け基板表面の作成技術はこの20年で著しく発展し、今やナノ構造体を持つ表面の精密設計を1 nmレンジの精度で作製することが可能である。作製方法としては、トップダウン型の物理的アプローチと、コロイドを用いるボトムアップ型の化学的アプローチがある。トップダウン型アプローチでは、マイクロスケールのバルク材料を連続的に加工・研磨することによってナノ構造体を得る。一方、ボトムアップ型アプローチでは、原子や分子、あるいはクラスターなどの材料を一つずつ積み重ねることで構築する。金、銀、銅のナノ構造体のサイズが10 nm～100 nmの領域になると、特有の表面プラズモン共鳴特性が出現し、表面とその付近の分子のラマン信号を顕著に強める効果が発揮される。SERSの増強度は、ナノ構造体表面に伝搬する表面プラズモンの励起波長とその強さによって大きく変化する。このため、ナノ構造体のサイズ、形状、化学組成、および形態(合金型、コアシェル型など)を精密制御することにより表面プラズモン共鳴を調整でき、再現性の高いSERSデータを取得することが可能となる。データの再現性が高まることで定性分析のみならず定量分析をも可能にする。SERSのさらなる展開について、多数のレビューや書籍にその詳細が記されている<sup>[5]</sup>。

最近の電気化学分野では、局所的な電子移動反応と、反応活性に対する表面構造の影響・相関について解明するために、実験的・理論的に固液界面特性を詳細に制御・理解することが重要となっている。1980年代後半以降の界面電気化学は、金属の結晶構造によって明確に定義されたClavilier型単結晶表面が開発・導入されたことで著しい発展を遂げた<sup>[6]</sup>。つまりMiller指数で表記できる単結晶表面での電気化学特性を調査することで、表面構造と電気化学挙動の相関が詳細に調査された。さらにこの表面作製技術の進歩によって、顕微鏡・分光器技術などの新たな表面科

学技術や理論的シミュレーション技術が大きく飛躍・発展した。なかでも表面増強ラマン・赤外分光分析といった*in situ*分光法は、電極表面付近の酸化還元活性種の電気化学的反応性と固液界面構造の変化を同時に観測することができる<sup>[7]</sup>。電気化学と顕微鏡および分光器によるアプローチを組み合わせることで、電気化学的条件下の固液界面における電子移動(ET)プロセスの根本的原理が、この20年間で急速に解明されてきた。

本稿では基礎的な表面科学の領域から、エネルギー変換触媒やバイオメディエーション装置の開発における応用まで、筆者のチームが最近手掛けたいくつかの*in situ*ラマン分光分析について紹介する。ここで筆者が強調しておきたいのは、ナノスケールでの表面特性評価を可能とする*in situ*評価ツールと、3Dに構築したナノ構造体や、微生物学的システムなどの複雑な系とを組み合わせることによって、これまで未開発であった複雑な固液界面プロセスや相互作用を探究する新興研究分野を切り拓く絶好のチャンスをもたらしてくれるということである。

## 実験について

すべての*in situ*ラマン測定には共焦点ラマン顕微鏡LabRAM HR800(Horiba Jobin Yvon製品)が用いられた(Figure 1A)。本装置は焦点距離800 mmのモノクロメーターを搭載し、高い感度と優れた空間分解能で繊細な試料の特性評価を行うことができる。作動距離の長い対物レンズ(Olympus製LMPLFLN, 倍率50×:開口数0.5)を用い、ダイオード励起固体レーザー光(DPSS)とヘリウムネオンレーザー光(励起波長はそれぞれ532 nmと632.8 nm)のどちらも3~6 mW程度と標準的な出力で試料表面に照射した。ラマン散乱光の収集には後方散乱光学配置を採用した。

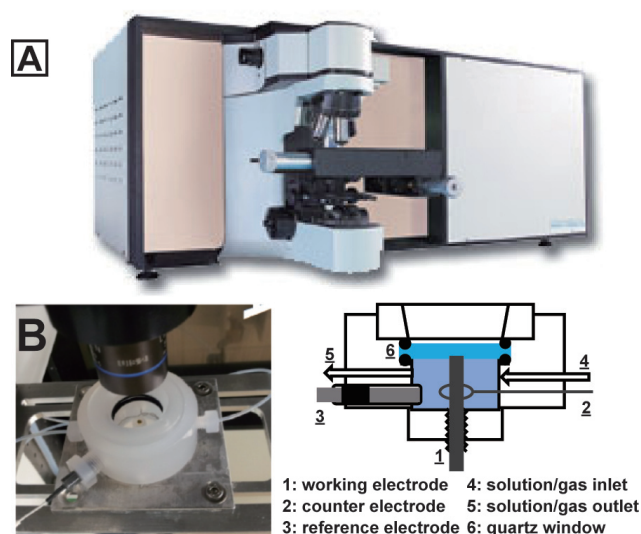


Figure 1 (A)共焦点ラマン顕微鏡LabRAM HR800と(B)自作のKel-F分光電気化学セル

また、自作のKel-F製 (polychlorotrifluoroethylene : PCTFE) 電気化学セルを *in situ* 測定に用いた (Figure 1B)。これにはセル上部に石英窓があり、さらに対極用の白金線、銀-塩化銀参照電極がそれぞれ取り付けられているほか、ガスや電解質溶液の出入口を設けてあり、分光測定時に光学的配置を乱すことなく溶液/ガスを交換することが可能となっている。

サイクリックボルタンメトリー (CV) は複雑な電極反応に対して、簡便に基礎情報を得るための初期的な電気化学測定法としてポピュラーな手法である。二つの電位値の間を、一定の走査速度で電極電位を両方向に連続して掃引することで、「電極の電位を循環」させたときの電極電流値を、印加した電位の関数として記録する。

## *in situ* ラマン分光法の事例研究

### Pt(100) 上でのCO酸化反応

白金表面における電気化学的な一酸化炭素 (CO) の吸着および酸化反応は、小さな有機分子の電極反応において最も重要かつ基礎的な界面反応の一つに数えられる。また、CO は固体高分子型燃料電池における白金アノード触媒の触媒毒として作用する。このことから、サイズ・形状をコントロールした白金ナノ粒子と同様に、モデル研究として白金単結晶電極についても、電気化学的CO吸着および酸化反応の分析が詳細にわたって研究され、表面構造と触媒活性との強い相関が明らかになっている。白金表面上での吸着CO分子と吸着酸素含有種との反応に基づくCO酸化反応は、Langmuir-Hinshelwood型メカニズムが提唱されている。(吸着酸素含有種の多くは、白金上の水分子の酸化的解離によって形成される吸着OHと帰属される。) 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中における白金表面上のCO酸化のCVは、特徴として2本の酸化ピーク、すなわちプレピーク (0.5-0.9 V) とそれに続

くメインの酸化ピーク (0.95 V) を示し、CO酸化プロセスが2段階で進行することを示唆している (Figure 2 黒実線)。メインピークは酸素含有種を伴うテラスサイト上の吸着COの酸化に相当する。一方、プレピークはステップや欠陥部といった活性サイトにおけるCO酸化に起因されると考えられてきた。プレピークの位置と大きさは結晶学的表面構造、欠陥の種類と密度、COの被覆率、および事前の表面処理に応じて異なる。このプレピークの強度は、配列の整ったPt(100)-(1×1)電極でかつ、高CO被覆率の場合に特に顕著となるが、どの表面でも、2周目のCVでは消失する (Figure 2 緑実線)。

Pt(100) 表面の顕著なプレピークの発生メカニズムと第2サイクルにおけるその消失メカニズムの要因は、これまで明らかになっていなかった。筆者らは複数の *in situ* アプローチ、すなわち走査型トンネル顕微鏡法 (STM) と *in situ* ラマン分光法を、単結晶電気化学と組み合わせ、*in situ* 状態におけるCOプレピークの界面プロセスの性質 (構造変化、活性、吸着・脱着など) の解釈を試みた<sup>[8]</sup>。

この研究では、シェル被膜ナノ微粒子増強ラマン分光法 (SHINERS) という手法を導入し、平坦なPt(100)表面に吸着したCO分子のラマン信号の側定を行った。通常は、SERS測定の実験要件として、貨幣金属の基材により構成され、粗面化またはナノ構造化された表面を使用する必要がある。しかしSHINERS法はSERS手法の応用例の一つで<sup>[9]</sup>、厚さ2~3 nmのシリカ層に被膜された金ナノ微粒子を光学アンテナである増強素子 (原文筆者らは「スマートダスト」と呼んでいた) として用いる。これらを平坦な表面上に敷きつめることで、その周辺の対象分子のラマン信号が増強させる。しかし、シリカシェルがあるために化学的にも電気的にも金ナノ微粒子が対象分子および基板表面と相互作用することはない。つまり、SHINERS法では平坦な表面を使うことができ、いかなる素材の表面でも対象分子のSERS測定が可能である。この実験では、CO分子は金ナノ粒子には吸着せず、Pt(100)の表面にのみ吸着するため、観測されるラマン信号はPt(100)表面の吸着COのみであることが確認されている。

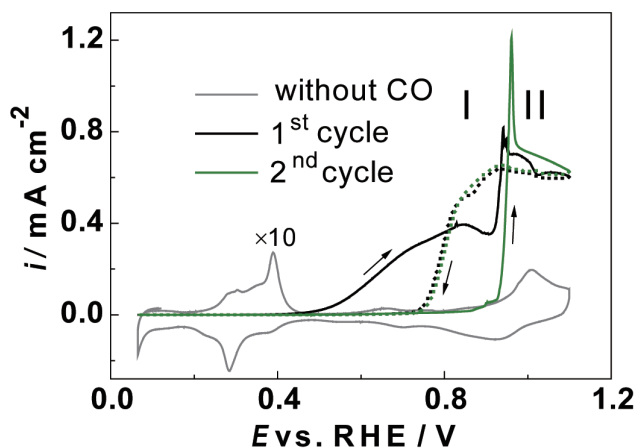


Figure 2 COを飽和させた0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中におけるPt(100)上のCOのサイクリックボルタモグラム。第1サイクルを黒、第2を緑で示す。実線と点線はそれぞれアノード・カソードの電位掃引を表す。(参考文献8より、許諾を得て転載。Copyright 2014, Elsevier Ltd.)

Figure 3A, 3Dに、Pt(100)表面の吸着COの電位依存ラマン分光スペクトルを示す。ラマンバンドは477~484, 1869~1877, および2054~2080 cm<sup>-1</sup>に現れ、それぞれon-top Pt-CO伸縮 ( $\nu$  (Pt-CO<sub>L</sub>)), bridge CO伸縮 ( $\nu$  (CO<sub>B</sub>)), およびon-top CO伸縮 ( $\nu$  (CO<sub>L</sub>))に帰属された。407 cm<sup>-1</sup>付近のショルダーは、bridgeのPt-CO伸縮モード ( $\nu$  (Pt-CO<sub>B</sub>))に相当すると考えられる。ラマンスペクトルで、bridgeおよびon-topの両モードが観察されたことは、CO分子が表面に密に吸着した単分子層の典型的な分光学的特徴であり、これは *in situ* STM測定からも示されている。Figure 3には、1回目のアノード/カソード掃引と、これに

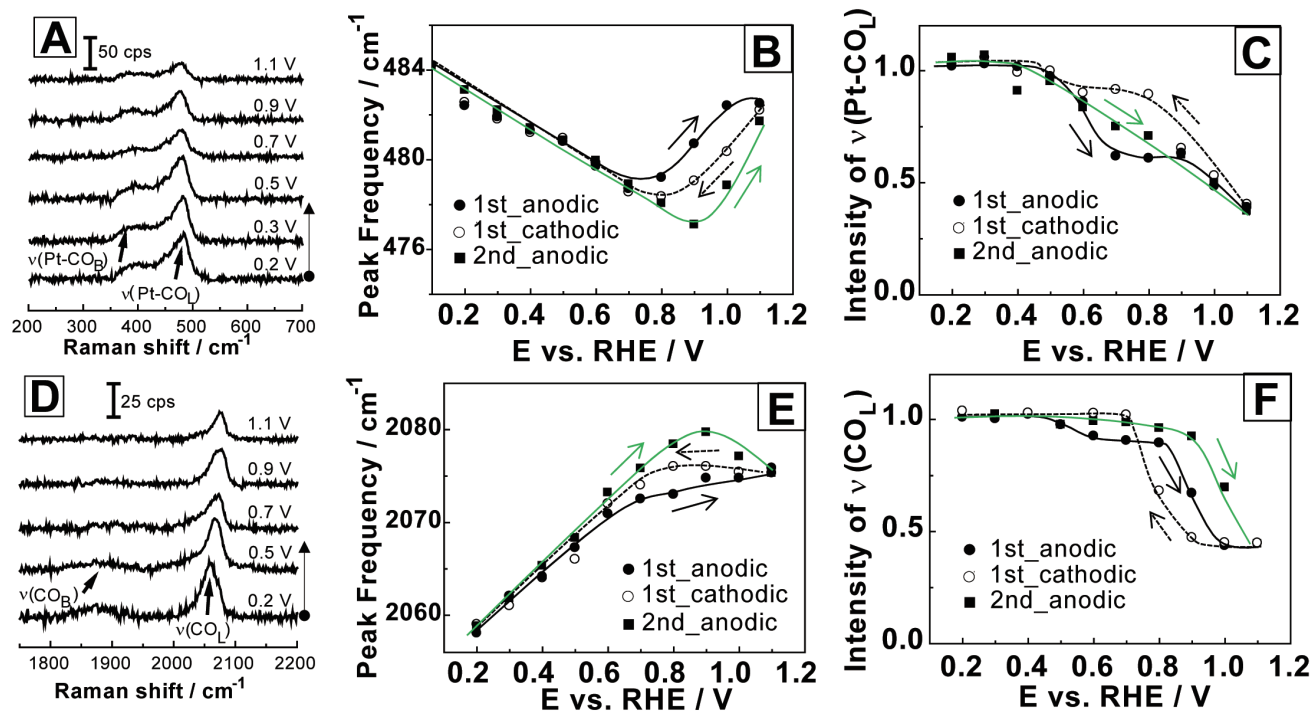


Figure 3 COを飽和させた0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中におけるPt(100)上のCO吸着層の電位依存SHINER定常スペクトル(A, D)と、ラマン周波数シフト(B, E)および積分強度(C, F)を、 $\nu(\text{Pt-CO})$ (A-C)と $\nu(\text{CO})$ (D-F)の各モードについて示した。(参考文献8より、許諾を得て転載。Copyright 2014, Elsevier Ltd.)

続く2回目のアノード掃引時のラマンスペクトル, on-top COバンドの積分強度とラマンシフトの電位依存性をまとめた。低電位領域(0.2-0.4 V)では、二つのCOバンドのラマンシフトは直線的な電位依存変化を示す。その間、COバンドの積分強度値は一定である。これはStark効果によるスペクトル現象である。その後、高電位側( $E > 0.5$  V)では周波数のシフト傾向が変化する。これは近接CO分子間での相互作用の顕著な低下を示唆する。また同時に積分強度も低下することから、白金表面上のCO被覆率が低下したことが示唆される。どちらの変化もプレピークプロセスの開始時より高い電位で進行する。*in situ* STM測定では、基材の構造変化が $E = 0.83$  Vから始まることが示された<sup>[6]</sup>。電位をさらにプラス側に掃引し、0.86 Vにすると、Pt(100)表面の再構成構造である大きな島状部位の周縁部から白金原子が引き抜かれる核形成・成長プロセスが示された。ここで指摘すべきは、プレピークが0.4 Vで発現するにも係らず、STM測定においては構造変化が観測されたのは0.83 V以上であること。つまりこれは、諸文献の著者が提唱する、プレピークが電位の上昇により形成される構造変化・欠陥サイトで引き起こされる、という仮説を否定することを強く示唆している。

COのプレピークがCVに現れない2回目の電位サイクリングでは(Figure 2), ラマンスペクトルが明らかに異なる電位依存性を見せる。つまり0.9 V付近まで、大きなシフト傾向の変化が見られなかった。さらに我々は、2サイクル後にArバブリングによりCOを溶液と電極表面から完全に除去し、その後、0.1 Vに印加することで水素吸着された白金

表面(0.1 V)にCOを再吸着させた時、1回目のアノード掃引における電気化学的応答、つまりプレピーク特性を再現できることを見出した。また、陰イオンが吸着する電位領域でCOを再添加した場合、プレピークの規模が顕著に小さくなった。これらの観測結果は、Pt(100)表面の「不可逆的劣化」がプレピーク特性の喪失につながったとする一部の文献とは食い違う。つまりCOを完全に除去した後で再添加した場合に、高電位で構造変化したPt(100)表面でも、プレピーク特性が回復する現象を説明することができない。

プレピーク領域におけるPt(100)の失活と再活性化に関わる別のメカニズムを提示するためには、活性中心サイトに加えて、反応物質のみならず阻害種としての吸着COの役割を検討する必要がある。特定の活性サイトの消失によってプレピーク特性の失活が引き起こされる可能性が説明できる。CO酸化では、COと酸素含有種が同時に活性サイトにアクセスできなければならない。したがって、Pt(100)表面失活の別の理由としては、潜在的に活性なサイトがCOによって塞がれ、酸素含有種の形成や共吸着が阻まれた結果、その後のCOの酸化が妨げられるということが考えられる。この仮説に従って我々はCVでの所見と*in situ*顕微鏡・分光分析を組み合わせ、Pt(100)表面におけるCO酸化反応のプレピーク特性の無効化について理論付けた。0.1 VにてPt(100)表面にCOを吸着した場合、吸着水素の一部がCO吸着層(吸着単分子層)に置換されないことで、特定のCOフリーサイトが少量形成されると考えられる。これらのサイトでは吸着水素が $E > 0.4$  Vで脱離し、競合的に酸素含有種、CO、および陰イオンにより占められる。酸素含有



種は近隣のCO分子と互いに作用し合い、やがて後者は電気化学的酸化に至り、低電位領域でプレピークとして現れる。電位を $E > 0.9$  Vまで上げると、テラスサイトでのCO酸化が起きる。その後のカソード掃引ではCO分子が、上に述べた特定のサイトを含む白金表面全体を覆い、酸素含有種の共吸着を阻害する。このため、2回目のアノード掃引ではCOのプレピークが抑制される。このメカニズムでは、構造変化・欠陥サイト生成後でも、プレピーク特性が再現される現象を問題なく説明できる。

我々は単結晶電気化学測定に、構造解析手法として*in situ* STMおよび*in situ* SHINERS分析を組み合わせることで、電位掃引中の電気化学的酸化反応特性および反応機構を解明することに成功した。

### SnO<sub>2</sub>系電解触媒上でのCO<sub>2</sub>還元反応

大気中の二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)含有量の著しい増加と、化石燃料の燃焼や森林破壊といったさらなる人為的活動もたらす、地球の気候への重大な影響について前世紀から科学者たちの関心を大いに集めてきた。空気中のCO<sub>2</sub>含有量を低下させるための、CO<sub>2</sub>の回収や隔離に関する数々の技術が開発されている。そのなかでも特にCO<sub>2</sub>の電気化学的還元を扱った文献や論文の数は、1870年のRoyerの先駆的研究<sup>[10]</sup>で初めて取り上げられて以来、増え続けている。CO<sub>2</sub>の電気化学的還元は複数の電子-プロトン移動を伴い、室温の水性媒体中で、CO、ギ酸塩、炭化水素(CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>)およびアルコール(CH<sub>3</sub>OH, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 1-プロパノール)が生産される。1980年代には、Horiらが様々な金属電極におけるCO<sub>2</sub>の電気化学的還元反応について、電極材料に関する生成物の選択性を報告した<sup>[11]</sup>。著者らは金属を、CO<sub>2</sub>の変換産物に基づいて二つのグループに分類した。一つは主にCOを生成し(Cu, Au, Ag, Pt, Pd, Zn, NiおよびGa)、もう一つはギ酸塩を生成する(Hg, Pb, Tl, Cd, In, Sn)。後者の金属の中で、ギ酸塩の生成に対する高い活性と白金族や貨幣金属と比べて著しく低いコストから、スズが注目されてきた。Sn/SnO<sub>x</sub>触媒系では、生成物の選択性と反応効率はさまざまな実験条件に左右される。一例として、形状や構造、化学的な酸化状態、温度、CO<sub>2</sub>の圧力・濃度、過電圧、および電解液のpH値などが挙げられる。このため、CO<sub>2</sub>の電気化学的還元によるギ酸生成のファラデー効率(FE)の報告値は、諸文献において5~90%と大きな差がある。

反応条件下における触媒の詳細な特性を評価することは、その触媒活性、すなわち反応性、選択性、および長期電解プロセスにおける安定性を把握するために欠かせない。しかし、不均一な、ナノ構造を持つ触媒の構造的・化学的特性に生じる同時発生的な動的変化を、実際の電解セル内での電解プロセス中、つまり“*operando*”で測定することは今もなお非常に難しい。そんな中、オペランド・ラマン

分光法<sup>\*1</sup>は、ナノ構造を持つ触媒の特性に関するリアルタイムな化学的情報を提供できる有望な技術である。これにより触媒自身の構造、活性、安定性、つまりは酸化スズの物性およびCO<sub>2</sub>の電気化学的還元活性に対する、反応生成物の選択性との相関を確かめることが可能となる。

\*1: オペランド・ラマン分光法: ラマン分光法を使った触媒特性評価手法で、実反応条件下で同時に触媒本体や反応生成物のリアルタイム・オンライン分析を行う。

そこで実際の酸化スズ触媒の化学的変化を電気化学反応条件下で観察するために、オペランド・ラマン分光分析を実施した。担体として還元型酸化グラフェン(rGO)に担持した酸化スズ ナノ粒子(SnO<sub>2</sub> NP)を電解触媒として合成・使用し、各種pH値での水溶液におけるCO<sub>2</sub>の電解還元を行った<sup>[12]</sup>。過去の文献から、酸化スズの安定性がpHと印加された電極電位の両者に影響されることが明らかになってきたため<sup>[13]</sup>、今回はpH 8.5~12を示す強アルカリ性または弱アルカリ性の溶液を用いた測定を行った。溶液の作製にあたっては、目的のpH値が得られるまで0.5 MのNaOH溶液へのCO<sub>2</sub>の通気時間を制御する方法を用いた。

一連の電位依存の定常状態ラマンスペクトルには、478, 628, および770 cm<sup>-1</sup>において、ルチル型SnO<sub>2</sub>に由来する三つの特徴的なラマンバンドが観測された。これらはE<sub>g</sub>, A<sub>1g</sub>, およびB<sub>2g</sub>の各モードに帰属される(Figure 4A)。CO<sub>2</sub>還元触媒反応と同じ電位領域においては、SnO<sub>2</sub> NP自体の金属Snへの電気化学的還元が進行する。したがって、SnO<sub>2</sub> NP上での還元電流には、CO<sub>2</sub>還元電流と並行して、SnO<sub>2</sub> NP自身の金属Snへの還元電流が重なり、二つを分離することは困難である。そこで後者の電流値の傾向を視覚化するために、各pH値溶液について、628 cm<sup>-1</sup>のメインピークの積分強度を電極電位に対してプロットした(Figure 4B)。プロットの傾向から三つの電位領域(I~III)に区分できた。(I)合成時のSnO<sub>2</sub>相の領域、(II)SnO<sub>2</sub>が部分的に(20~25%)金属Snへ還元された中間領域、(III)SnO<sub>2</sub>が金属Snに完全に還元された後の領域として、それぞれ区別した。領域IからIIへの転換は、pH 8.5の電解液では-0.5 V付近、pH 9.7と12.0では-0.7 Vに見られた。領域IIの強度値は領域Iの値の約75~80%で、 $E < -1.2$  Vまで強度値はほぼ一定であった。さらに、ガスおよびイオン交換クロマトグラフィーを用いた生成物分析を行うことで、ギ酸塩生成におけるファラデー効率(FE)の値が、溶液のpH値と電位との関数として得られた(Figure 4C)。

FEの測定値(SnO<sub>2</sub>の生成物選択性)をラマン分光分析の結果(SnO<sub>2</sub>の減成)と対比することで、ギ酸塩生成のFEが触媒表面の酸化状態に強く依存することが示された。中程度のカソード電位(II)においては、FEは電極電位の低下につれて上昇するが、さらにマイナス側の電位領域でFE曲線が

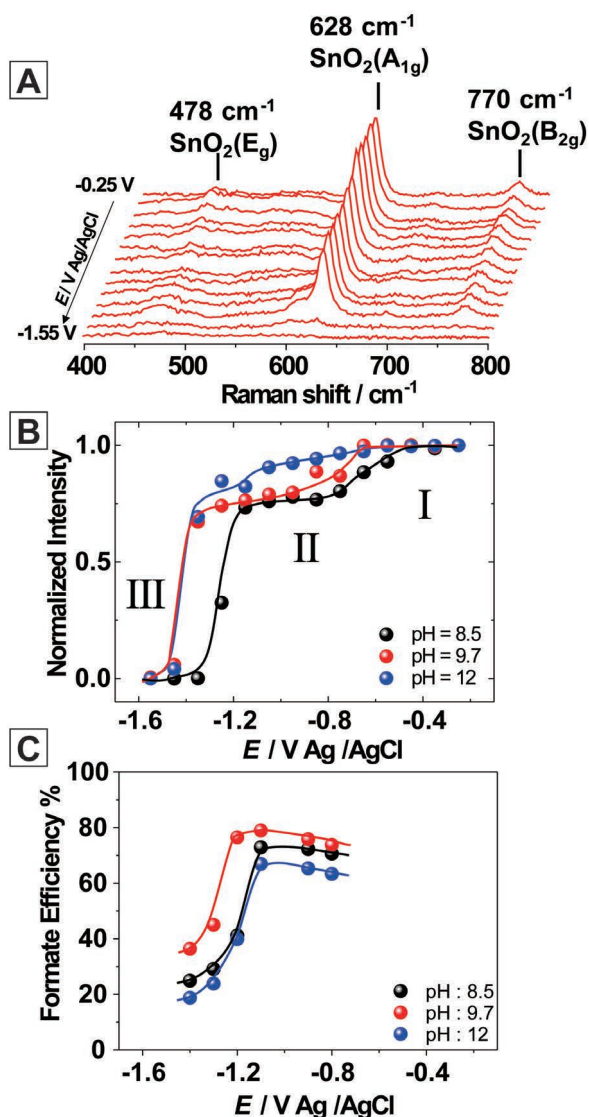


Figure 4 さまざまな電位とpHにおける、電位依存性のオペランドなラマン分析。(A) pH 9.7時の電位依存ラマンスペクトル、(B)  $A_{1g}$  ラマンピークの相対強度、(C) 印加電位の関数としてのFE値。(文献12のデータから、許諾を得て再プロット。Copyright 2015 American Chemical Society)

最大値を通り過ぎ、さらに低い電位領域(III)では、触媒が完全に金属Snに還元され、ギ酸塩生成FEと $A_{1g}$ ピークの強度が両方とも激しく減少した。興味深いことに、各FE曲線の最大値は、熱力学的に安定な相が金属Snとされる電位(プルベダイアグラムに基づき決定<sup>[13B]</sup>)に位置しているにもかかわらず、実働環境下では $SnO_2$  NPの還元は動力学的には妨げられ、触媒が部分的にしか還元されず、 $SnO_2$ 相が依然広く見られることが示された。

オペランド・ラマン分光法を用いることで、実働条件下でのスズ電極上の $CO_2$ 電気化学的還元により、ギ酸を形成する触媒作用において、表面酸化物の部分的な存在が重要な役割を果たすことが実証された。上記のように、我々は実働条件下におけるオペランド・ラマン分光分析の実行可能性を実証すると同時に、ナノスケールの表面検出ツールと市販分析装置とを注意深く組み合わせることにより、 $CO_2$

研究やエネルギー開発の新興分野の先端研究が可能であることを示した。

### 微生物と金属電極との界面における細胞外電子移動プロセス

起電性微生物<sup>\*2</sup>の発見は新たなエネルギー技術における大きなブレイクスルーであり、微生物燃料電池、微生物電気合成、微生物脱塩セル、そして汚染された環境を修復する微生物電気修復セルといった、微生物の起電性呼吸に基づく微生物電気化学技術(MET)の発展への道を切り拓いた。基礎的な理解として、電極と個々の起電性微生物との間で生じる界面プロセスのほとんどが電極表面に近い、最も外側の細胞膜に位置する外膜シトクロム(OMC)に関するものが主である。そのため、微生物と電極との間でOMCを介した効率的な電気的コミュニケーションを確立し、界面抵抗を低減させることにより、METでの微生物の全体的な電流生産量の増大やパフォーマンスの向上を図ることが重要である。

<sup>\*2</sup>: 細胞外電子伝達を含む新しい微生物代謝モードである起電性呼吸をする微生物。具体的には有機物などの燃料を酸化分解して電子を取り出し、外部電極へ移動させる能力・機能を有する微生物。多種多様な有機物から室温で電気を作り出すことができ、さらに自己増殖できる微生物の特徴を生かした廃棄物バイオマスを利用した発電システムへの応用が期待されている。

既知の純粋培養物では最も高い電流密度を作り出すことのできる嫌気性起電性微生物の*Geobacter sulfurreducens* (*Gs*)は、*Shewanella oneidensis*同様、起電性微生物の中で最も徹底的に調査されている科の代表種である。*Gs*表面のOMCは金属電極への直接的な電子移動(ET)を担うとされる。このプロセスはOMCの量が大きく制限された細胞では実際に機能しなくなることからも示唆される。直接的ヘテロ界面でのETにおけるOMCの役割がまだ十分に理解されていない状況で、電気化学的応答とOMCの構造変化の同時測定について検討し、動作条件下における電極/細胞界面に關与する相互作用やETプロセスの複雑な性質を理解することが重要である。

我々は最近、金電極に直接吸着させた*Gs*細胞の電気化学的活性と構造特性の変化を、*in situ*分光法、顕微鏡法、および電気化学的手法を組み合わせることで観察した<sup>[14-16]</sup>。我々の戦略は、(電気)化学的特性が十分理解されている単結晶電極上での電気化学に対し、*in situ*原子間力顕微鏡(AFM)を組み合わせることで*Gs*のサブ単分子層の形態を解明し、表面増強赤外吸収分光法(SEIRAS)およびギャップモード表面増強ラマン分光法(GM-SERS)を組み合わせることで*Gs*/電極界面の*in situ*の分子情報を高い表面選択性と感度で獲得することである。

微生物細胞はマイナスの表面電荷を帯びているので、プラスに帯電したAu (111)およびAg (111)電極上に静電吸着し、Gsのサブ単分子層(subML: 被覆率が10-20%程度の吸着量)を作製できる。このとき電極は電子ドナーの役割を果たす20 mMの酢酸塩を含有した重炭酸塩緩衝液中にあり、同液はあらかじめN<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の混合ガス(4:1)により脱酸素済みのものを使用した。これらの条件により、Gs細胞は安定な酸化型として電極表面に吸着する。12時間の分極処理の後に得られたこの微生物吸着層の形態について、電子顕微鏡法(SEM)と*in situ* AFMによる特性評価から、いずれにおいても、均一に分布した微生物細胞が、孤立して電極表面にしっかりと付着していることが確認された。Gs細胞の数は100 μm<sup>2</sup>につき平均で10±2個で、これは10%の被覆率に相当する。このsubMLの形成によって、以降の*in situ*分析では、近接する微生物間界面ではなく、微生物/電極界面でのETプロセスのみを観察ができる。

Au (111)上のGs細胞subMLの電気化学的酸化還元活性を、CVを用いて分析した(Figure 5A)。CVでは酸化還元信号が直接観測されたことから、微生物表面最外部の一部が電極から十分近い位置にあり、界面を介してETしている直接的証拠である。電位サイクルすることで、全電位領域でその酸化還元電流が顕著に低下し、5サイクル後にはほぼ定常状態に達した。対応するボルタモグラムは、中間点電位をそれぞれ-0.12 Vと-0.33 Vとする2組のピークを特徴とする(Figure 5A)。定常状態におけるこれらの電気化学的挙動は、表面に限定された酸化還元プロセスを示しており、その酸化還元電位は細胞外のc型シクロム(OmcZ)における以前の報告と同じ範囲にあった<sup>[17]</sup>。

CV実験と同様に、減衰全反射光-SEIRA (ATR-SEIRA) スペクトルでも、5サイクル後に分光学的応答が定常状態に達する。このときの挙動は電位に対して可逆的なものと

る。電位値を低くすると、1686 cm<sup>-1</sup>におけるアミド I 由来のシグナルの変化が生じ、同時にカソード走査時の界面水の変角および伸縮モードの強度が増大した<sup>[14]</sup>。アミド I と水の吸収帯はその後のアノード走査時に低下した。こうした実験の観測結果から、次のような重要な側面が明らかになった。(i) Gs細胞の還元型と酸化型との間を行き来する電位サイクリングにおける定常SEIRAスペクトルの可逆的变化から、Gs細胞の被覆率が電位サイクリング中には変化しないことが示唆される。(ii) 微生物細胞は金属電極への直接的な電気的コミュニケーションを維持する。(iii) 1659 cm<sup>-1</sup>(酸化状態)から1686 cm<sup>-1</sup>(還元状態)までのアミド I バンドの顕著な電位依存シフトは、酸化還元活性を持つタンパク質の二次構造の変化(α-ヘリックスからβ-ターンへ)を示唆している。タンパク質構造における電場誘起型の立体配座(コンフォメーション)転移が、界面電子交換により適した立体配置(コンフィギュレーション)に導く可能性が示唆された。

外膜シクロムCユニット(OmcZなど)のヘム中心の構造特性について、*in situ* GM-SERSを用いて、電気化学的制御下での界面電子移動による構造変化を直接観察することができる。GM-SERSでは粒径55 nmの銀ナノ粒子(Ag NP)を光学アンテナとして使用した。同粒子をGs液と混合した後で、平滑なAg電極上に、subMLの被覆率(約10%)分を滴下した。Ag NPとAgの表面との組み合わせに適した緑色励起レーザー(波長532 nm)を選択した。これはナノ粒子のプラズモン共鳴だけでなく、ヘム中心のQバンド吸収にも対応する波長で、表面増強共鳴ラマン効果を利用した。

Figure 5Bに、GsのsubMLの酸化型(0.0 V)および還元型(-0.6 V)におけるGM-SERS応答を示す。バンド幅が大きい個々のバンドを明確に帰属することが困難であるが、純粋なGs試料の標準ラマンスペクトルとの比較によ

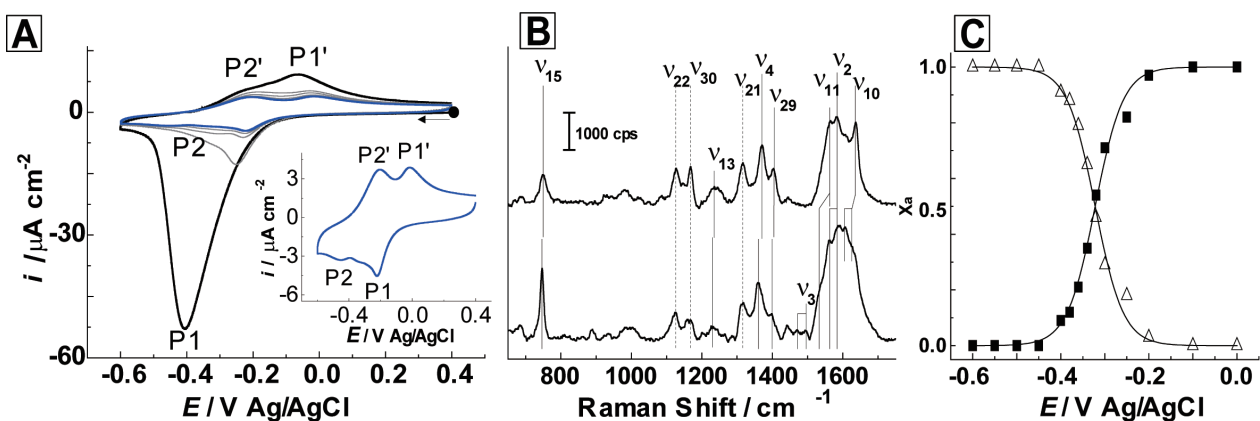


Figure 5 (A) Au(111)上のGs subMLのサイクリックボルタモグラム。走査速度は0.01 Vs<sup>-1</sup>。黒線: サイクル1, 灰色線: サイクル2~7。はめ込み図: 対応するサイクル8のCV(青色)。(B) Ag NPと混合されたGs subMLの電位依存性GM-SERSスペクトル。それぞれ、0.0 Vの酸化状態(上)、-0.6 Vの還元状態(下)。これらのスペクトルはλ=532 nmの励起により得られた(レーザー出力1 mW, 150 mmのデフォーカス, 取得時間10 s)。(C) GM-SERSスペクトル中のν<sub>15</sub>バンドの成分分析から取得した酸化型(中実の正方形)と還元型(中空の三角形)の電位依存モル分率(Xa)。実線は一電子酸化還元反応のネルンスト式のフィットを表す。(文献14のデータから、許諾を得て再プロット。Copyright 2014 the Owner Societies)

て、酸化型のc型シトクロムを識別するためのバンドが明らかになった。酸化型Gs細胞では、スピン状態を表すマーカースバンドν2とν10の位置から、ヘムがヒスチジン基およびメチオニン基を軸配位子とし、六配位低スピン状態にあることを示した。この結果から、持続的なレーザー照射を受けても、プラスに分極された電極/電解質界面におけるOMCの固有構造は多くの場合、保持されることが示唆された。また我々のラマン測定では、Ag NPの存在がGs細胞の活性機能を妨害するようには見えないものの、Ag NPの部分的内部化の可能性は排除できない。

電位をマイナス方向に掃引するとGsが電気化学的還元され、それに伴いラマンスペクトルにも顕著な変化が現れる。波数の下方シフトとスピンマーカのピーク分裂がν2, ν4, ν10, ν11, およびν15のモードで観測された。ν4とν15の二つの強いバンドはとりわけヘムタンパク質の酸化還元状態に対する感度が高い。二つとも、中心のFeに対してNが配位されたピロール部分の対称なリングブリーディングモードを表している。そこで酸化還元マーカースバンドν15の積分強度を、印加電極電位の関数として定量的に分析し、吸着細胞の分光学的酸化還元応答として描写した。酸化型と還元型のモル分率の変化は、はっきりとしたS字型の挙動を示した(Figure 5C)。このGsのsubMLにおける酸化還元プロセスにおける成分変化について、二つの酸化還元状態の相対濃度を印加電極電位の関数としてNernst式から試算することができ、有効酸化還元電位-0.32 V、有効電子交換数0.8が導かれた。前者の値はCV実験で得られたGs関連の酸化還元電位の範囲とよく一致するが、後者は均一な性質を持つc型シトクロムの酸化還元プロセスにおける期待値(1)をやや下回る。この結果は、界面酸化還元電位に特定の分布があることを示唆しており、ブロードなピークを示すポルタンメトリープロファイルとよく一致する。低スピンと高スピンの共存による、スピンマーカースモードν2, ν3およびν10が分裂することは特筆すべきであるが、この遷移の性質についてはまだ明らかになっていない。

我々は、金属電極と密な接触を持つOMCが、その構造や電気化学的性質を微生物/電極界面の電極電位に応じて変えている明確な証拠を、in situ分光分析手法の活用によって示すことができた。この界面効果は、自己組織化単分子膜(SAM)の導入によって微生物/電極表面間距離が広がるにつれて減少する<sup>[15]</sup>。さらに、我々は、各種の外部結合基を含むω-官能性アルキルチオールSAMでAu電極を修飾し、Gs細胞を固定化することで、SAMの生体適合性とGs細胞の電流生産特性に対する配位子効果を調べた<sup>[16]</sup>。カルボキシル基を末端に有する配位子では、微生物/電極界面におけるヘテロ界面ETを促進することを見出し、GsのOMCの生体適合性の条件として必要であることを示した。表面電気化学に基づいた、微生物細胞のsubMLに関する

我々のアプローチは、動作条件下における単一細胞の詳細なin situ分析が実現可能であることを示した。電気微生物学という新興分野にとって、ナノスケールやマイクロスケールの表面電気化学的ツールと微生物学的アプローチとの組み合わせは、微生物と電気装置とを組み合わせた新しいシステムのプロセスや相互作用を探究する新しい機会を提供してくれる。

## 結論

本稿では、ラマン分光法の歴史に続き、近年のin situラマン分光研究を、特に電気化学的条件下の固液界面における電気化学的および微生物学的電子移動プロセスに着目しつつ、手短に概観した。1974年に初めて表面増強ラマン散乱の発見が報告されて以来、分析装置の技術進歩に伴って、表面増強ラマン分光法は基礎研究・応用研究の分析における強力な診断的技法へと発展してきた。我々の研究室では、共焦点ラマン顕微鏡LabRAM HR800を用いたin situラマン分光分析による固液界面の局所構造と活性特性の測定を通じて、電気化学的条件下での分子レベルでの電子移動プロセスの検証を行っている。

## 参考文献

- [1] C.V. Raman, K.S. Krishnan, *Nature* 121, 501(1928).
- [2] M. Fleischmann, P.L. Hendra, A.J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* 26, 163(1974).
- [3] D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.* 84, 1 (1977).
- [4] M.G. Albrecht, J.A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.* 99, 5215(1977).
- [5] Just for examples, (a)S. Schluecker, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 4756(2014);(b)Z.Q. Tian, B. Ren, D.Y. Wu, *J. Phys. Chem. B* 37, 9463(2002);(c)S. Schluecker "Surface Enhanced Raman Spectroscopy" Wiley-VCH, Weinheim (2011); (d)R. Aroca "Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy" Wiley, West Sussex(2006).
- [6] J. Clavilier, D. Armand, S.G. Sun, M. Petit, *J. Electroanal. Chem.* 205, 267(1986).
- [7] (a)Z.Q. Tian, B. Ren, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 55, 197(2004);(b) D.Y. Wu, J.F. Li, B. Ren, Z.Q. Tian, *Chem. Soc. Rev.* 37, 1025 (2008).
- [8] A.V. Rudnev, A. Kuzume, Y. Fu, Th. Wandlowski, *Electrochim. Acta* 133, 132(2014).
- [9] J.F. Li, Z.Q. Tian et al. *Nature* 464, 392(2010).
- [10] M.E. Royer *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 70, 731 (1870).
- [11] Y. Hori, H. Wakebe, T. Tsukamoto, O. Koga, *Electrochim. Acta* 39, 1833(1994).
- [12] A. Dutta, A. Kuzume, M. Rahaman, S. Vesztergom, P. Broekmann, *ACS Catalysis* 5, 7498(2015).
- [13] (a)S. Lee, H.K. Ju, R. Machunda, S. Uhm, J.K. Lee, H.J. Lee, *J. Mater. Chem. A* 3, 3029(2015);(b)M. Pourbaix, *Atlas d'équilibres électrochimique; Gauthier-Villars et Cie: Paris*, P 479(1963).
- [14] A. Kuzume, U. Zhumaev, J. Li, Y. Fu, M. Füg, M. Estévez, Z. Borjas, Th. Wandlowski, A. Esteve-Nuñez, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 22229(2014).
- [15] M. Füg, Z. Borjas, M. Estévez, A. Esteve-Nuñez, I.V. Pobelov, P. Broekmann, Th. Wandlowski, A. Kuzume, *submitted to Bioelectrochemistry*.
- [16] A. Kuzume, U. Zhumaev, J. Li, Y. Fu, M. Füg, M. Estévez, Z. Borjas, A. Esteve-Nuñez, Th. Wandlowski, *Electrochim. Acta* 112, 933(2013).
- [17] (a)K. Inoue, X. Qian, L. Morgado, B.C. Kim, T. Mester, M. Izallalen, C.A. Salgueiro, D.R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3999(2010);(b)K. Inoue, C. Leang, A.E. Franks, T.L. Woodard, K.P. Nevin, D.R. Lovley, *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 211(2011).

## ライフサイエンスの問題を解決する分析装置

Life Science Analytical Tools for Real Life Problems

Marinella SANDROS

Fran ADAR

光が物質、すなわち試料中の分子に作用すると、さまざまな興味深い現象が起きる。試料に光が吸収されることもあるが、試料の特性によっては光の放射、反射、散乱として観測される。HORIBAグループ科学システム機器部門(HORIBA Scientific)では、これらの現象を測定するための分析装置(ツール)を製造し、ユーザーによる計測・分析を支援している。これらのツールは研究における問題の解決に用いられるほか、さまざまな分野で製品開発する手掛かりとなる。とりわけライフサイエンスの分野は、近年急速に成長し、現在も拡大を続ける重要な市場である。植物、動物、ヒトを含む生物の科学的研究に従事するあらゆる部門はライフサイエンスに分類される。本稿では、ライフサイエンスのうち、医薬品および医療の領域におけるHORIBA製品の主な貢献にスポットを当て、これらが持つ強みを既存の技術と比較する。

When light interacts with matter (i.e. molecule/sample) many interesting phenomena occur. Light may get absorbed by your sample and depending on the sample properties you will observe light emission, reflection and scattering. HORIBA Scientific builds tools that measure these phenomena allowing our users to gain meaningful information about their samples. This information is used to solve outstanding problems in research or guide scientists to monitor product development in various fields. Life Science, in particular, is an attractive market because, over the years, it has experienced exponential growth, and continues to do so. All the divisions that engage in the scientific study of living organisms including plants, animals and human beings fall under the life science umbrella. This article will highlight the key contributions our products offer in the life science sub-divisions - pharmaceutical and health sciences - and will compare their advantages over existing technologies.

### はじめに

HORIBA Scientificは、主に物理学と化学の研究を専門とする科学者に向けた高度な技術を応用したハイエンド型分析装置を長年にわたって開発し、最近では、その対象はライフサイエンス市場に拡大している。蛍光技術はすでにライフサイエンスにおいて広く利用されているが、「表面プラズモン共鳴イメージング」(SPRi)と呼ばれる新製品が我々の製品ラインに加わることで新たな展開を見せた。ライフサイエンスの顧客の需要に応えるためには、測定装置やソフトウェアに対するニーズや期待が物理学や化学の研究分野とは非常に異なっていることを理解しなければならない。ライフサイエンスにおける顧客の主な関心は、我々の製品が問題のソリューションを提供できるかどうかにあ

る。ライフサイエンスが直面している問題を解決するには、常に挑戦することが求められるが、その価値のある重要な市場といえる。本稿では製剤、バイオプロセス、医学的診断における蛍光分光、ラマン分光、およびSPRiを利用した技術の有用性について概説する。

### 製剤

人体は膨大な数の細胞からできている。これらの細胞は各種のタンパク質の働きによって、栄養素の処理や解毒、生理的反応の制御まで、さまざまな生体機能を果たしている。製薬分野では、幾年にもわたる低分子薬剤の開発ののち、「抗体」と呼ばれるY字型をした固有の種類タンパク質(Figure 1B)が、特定の疾病、つまりがんの治療において、

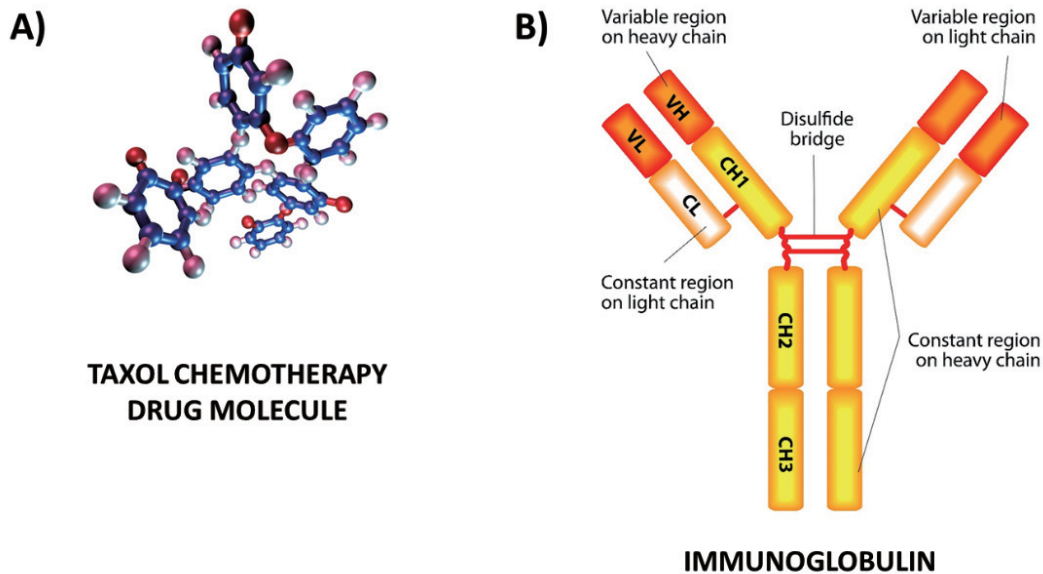


Figure 1 A schematic comparison between small molecule (TAXOL) and protein (antibody IMMUNOGLOBULIN) drugs.

低分子薬剤よりも効果的であることがわかってきた。しかし、この抗体分子の質量は150,000ダルトン (Da)であるのに対して、低分子抗がん剤(TAXOL)は854ダルトン (Da)である。この分子量の違いは、抗体の方がはるかに複雑でその評価が難しいことを意味している。

抗体医薬の発見と開発の過程は極めて困難なものであり、その品質や利用可能性の早期評価が非常に重要な意味を持つ。抗体には凝集しやすい傾向があるため、抗体の不安定性が薬剤の評価を困難にしている要因のひとつとなっている。通常は「水を嫌う(疎水性の)」チロシン (Tyr) やトリプトファン (Trp) といった芳香族アミノ酸は分子内部の空洞に埋もれているが、タンパク質が凝集の前に折りたたまれた状態からほどけていくと、芳香族アミノ酸が水にさらされ、その局所環境が親水性へと変化する。タンパク質の三次構造におけるこの変化はラマン分光法によって観察することができる。この手法では、試料(つまりタンパク質)に固有のスペクトル波形を、分子の指紋として得ることができる。ラマンスペクトルはタンパク質の局所環境の変化に敏感で、その二次および三次構造の動的ゆらぎの追跡を可能にしている。蛍光や示差走査熱量測定のような分子のコンホメーション(立体配座)の変化を捉える従来の技術と比べてラマン分光法の有利な点は、薬剤の安定性評価が患者に投与される濃度範囲で可能となることである。希釈すること自体が安定性に影響し測定精度の低下を引き起こすことを考えると、試料を希釈することなく高濃度の状態で製剤の安定性を評価できることはきわめて重要なことである。高濃度試料の評価においてタンパク質の構造に関する詳細な情報が得られる分析法は、現在ラマン分光法のみである。

卵白に由来含まれている低分子タンパク質のリゾチームを

用いたFran Adar博士の最近の研究<sup>[1]</sup>では、20%のエタノール添加によって高次構造の変化が生じ、ラマンスペクトルにおけるTrpのバンド比( $I_{877}/I_{760}$ )の相対強度が増大したことが明らかになった。これはTrp成分周辺の局所環境の変化(Figure 2)が疎水性の変化を伴って生じたことを示唆している。

また、東京大学の津本浩平教授<sup>[2]</sup>は、IgGポリクローナル抗体の安定性と濃度の関係を調査した。溶液の濃度が高くなると、チロシルダブレットの比( $I_{856}/I_{830}$ , 特定側鎖マーカー)が増大し始め、80 mg/mLを超える濃度で過飽和状態となった。この結果から、濃度が低い状態からチロシン側鎖が近隣の他のタンパク質と接近し始めることが見て取れる(Figure 3)。分析対象となったもう1つのタンパク質安定性マーカーは、トリプトファン( $1555\text{ cm}^{-1}$ にある側鎖マーカー)に関するもので、濃度が高くなると分子間相互作用によってバンド幅が増大した(Figure 3)。これは、高濃度においては乱雑さ(エントロピー)が増大し、Trp残基が隣り合った側鎖のアミノ酸残基に対する立体反発を避け、さまざまな立体配座をとるためである。

高濃度のタンパク質薬剤の立体構造の変化を観測できることは、製薬科学者にとっては凝集傾向を測定する手段が得られるということの意味し、その重要性は極めて高い。薬剤の安全性や効能は凝集によって大きく損なわれるため、製剤開発プロセスのさまざまな段階における最初のスクリーニングツールとして、ラマン分光法を用いることができる。

## バイオプロセス

モノクローナル抗体などのタンパク質ベースの医薬品製造プロセスでは、製薬科学者はチャイニーズハムスター卵巣

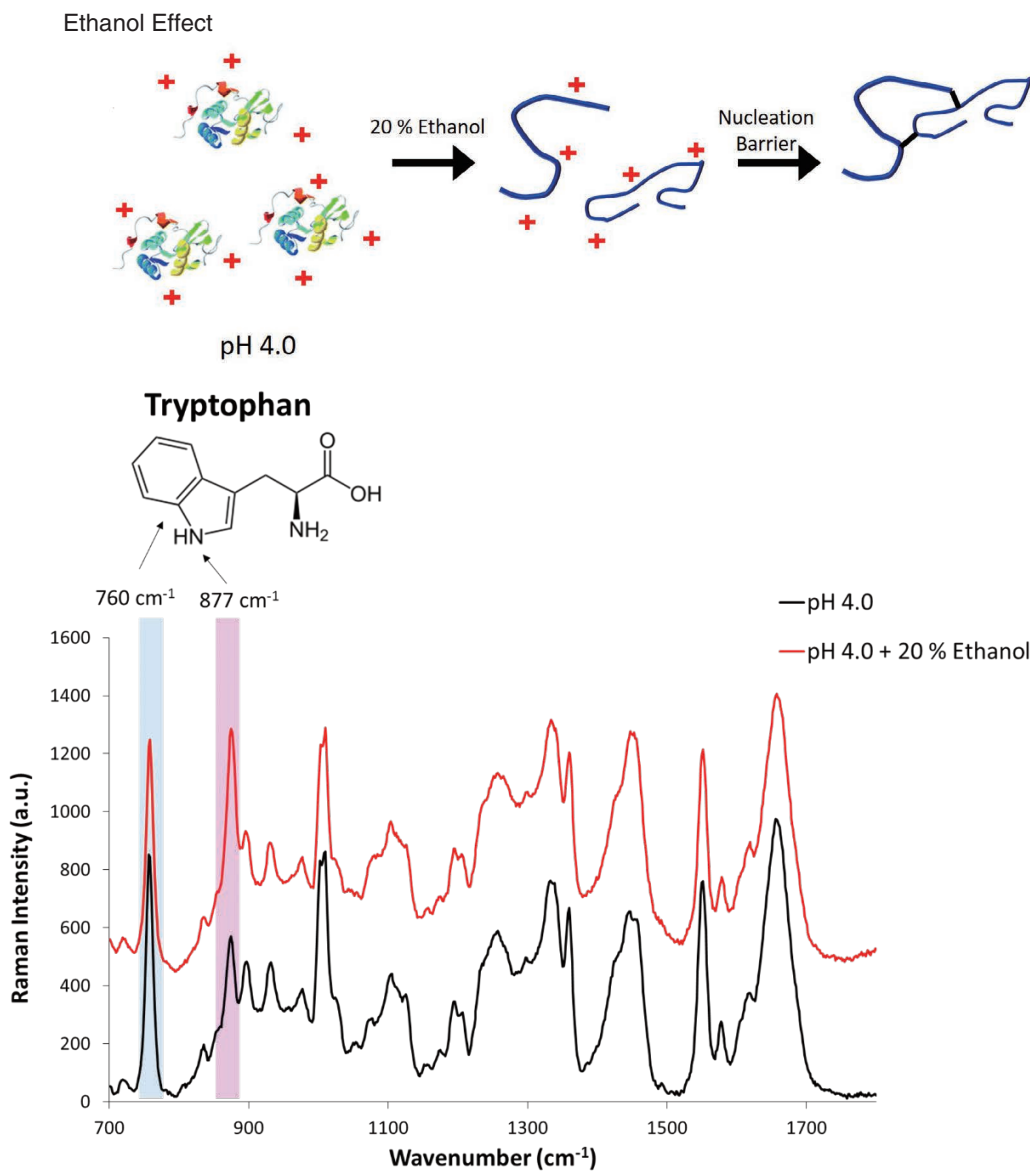


Figure 2 Raman Analysis of lysozyme (200 mg/mL) in 20 mM Citrate-PBS buffer at pH 4.0 before and after the addition of 20 % ethanol. Sample was excited with a 532 nm laser and a grating of 1800 lines/mm was used on the XploRA, a 200 mm focal length instrument.<sup>[1]</sup>

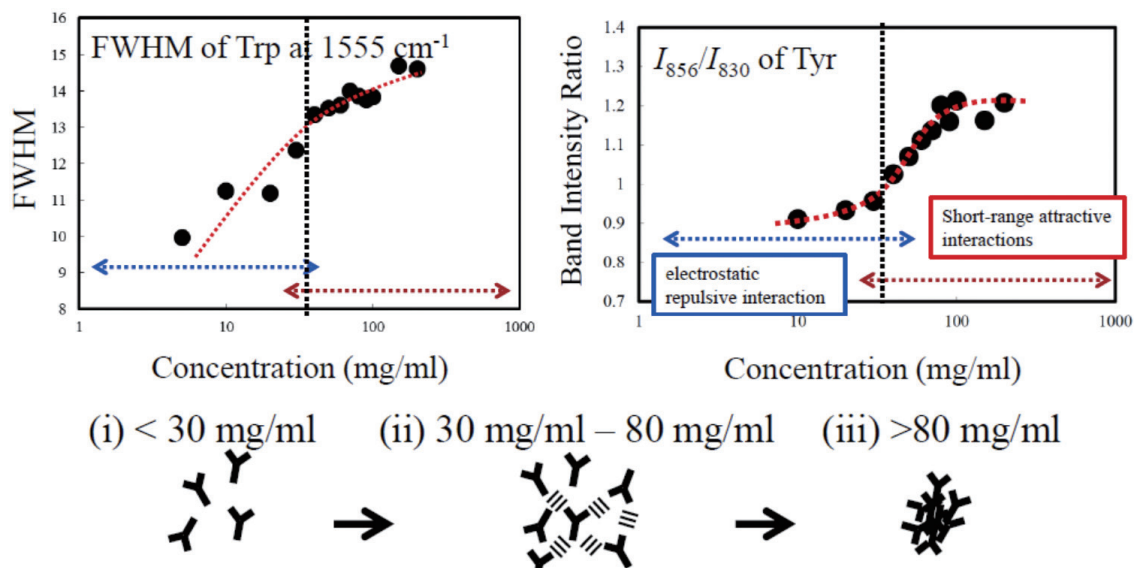


Figure 3 Comparison of the Trp band at 1555  $\text{cm}^{-1}$  full width half maximum (FWHM) width (top left) and  $I_{856}/I_{830}$  tyrosyl ratios (top right) at concentrations ranging from 10 to 200 mg/mL. A schematic representation of the microenvironment around IgG molecules changes as the concentration increases (bottom (i)-(iii)).<sup>[2]</sup>



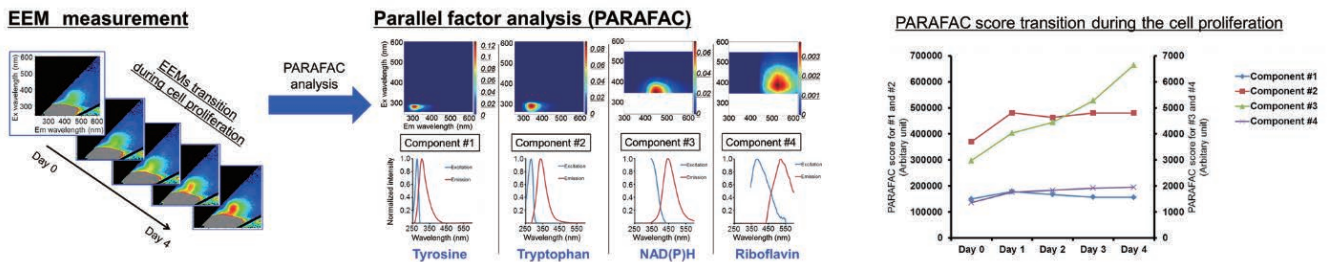


Figure 4 Monitoring cell proliferation over 4 days using ATEEM. The EEM data were analyzed using PARAFAC analysis. As a result, four spectral components were successfully extracted and assigned to tyrosine, tryptophan, NAD(P)H and Riboflavin.<sup>[3]</sup>

細胞(CHO細胞)を使用している。特定のヒト疾患の治療を目的とした治療用モノクローナル抗体の生産を目的として、ヒトのDNAがこれらの細胞の遺伝子改変に使われる。改変された細胞は、バイオリアクターと呼ばれる装置内部に導入され、増殖する。ここでは、細胞の健全な成長と再生産を促進するよう成分調整が施された液体培地が使用される。それぞれの細胞から治療用抗体は少量しか生産されないため、バイオリアクターは生産条件に応じて数週間、あるいは数か月間にわたり培養を続け、300億個にもものぼる細胞を生産する。生産された細胞はより大きなバイオリアクターへと移され、細胞の生産がさらに続けられる。目的とする細胞の数量に達するまで、これが何度か繰り返される。

最適な生産を確立するために、細胞には定期的に成分調整された栄養素が供給される。タンパク質の生産効率を高めるためには、バイオリアクターの状態をオフライン・オンラインで監視することが何よりも重要となる。一方で、汚染要因となる物質の侵入を最小限に抑えなければ、生産されたタンパク質製剤の有効性に影響する恐れがある。その有効な解決策となるのがラマンプロブ技術である。プローブをバイオリアクターに直接挿入(閉ループ制御)して、生細胞密度、ブドウ糖、アンモニア、乳酸塩、グルタミン酸塩、グルタミンおよび総細胞密度の継続的なリアルタイムモニタリングを行うことが可能となる。これらの情報を用いれば、栄養供給の過程を最適化し、生産効率や濃度について良好な結果を出すことができるであろう。

バイオプロセスにおいて科学者たちが直面する課題の1つに、バイオリアクター内のいわゆる「上澄み」に含まれる遊離アミノ酸の測定がある。細胞培養中のアミノ酸の存在、種類および濃度を知ることは、細胞の成長を促進し生産量を高めるための最適な栄養量の確保に欠かせない。総合分析には通常、時間のかかるクロマトグラフ分離と質量分析の組み合わせ(すなわちLC-MS)を用いる必要があったが、最近、「吸収-透過・蛍光励起発光マトリクス」(Absorbance-Transmission and fluorescence Excitation-Emission

Matrix: A-TEEM)と呼ばれる今までにない新技術がHORIBAにより開発された。この技術は、バイオリアクターの状態を示す重要な指標となる遊離アミノ酸濃度のオフラインプロファイリングに非常に有用である。A-TEEMにより、蛍光性の試料成分すべての励起・発光スペクトルを個別に作成すると同時に、光を吸収したが蛍光を出さなかった成分についての情報も得ることができる。ラマン分光と同種のこの技術は、本質的に、試料ごとに固有の分子指紋の作成が可能である。

北川雄一<sup>[3]</sup>らは、CHOリアクター内の複数の重要成分のモニタリングにおけるA-TEEMの有用性について解説している。これらの成分はリアクターの状態を知る上で大きな手掛かりとなる。Figure 4に示すように、細胞増殖のモニタリングが4日間にわたって行われ、EEMデータにおける成分分析が多変量解析の手法に基づくPARAFAC(Parallel Factor Analysis)を用いて実施された。その分光学的な特徴から、構成成分はそれぞれチロシン、トリプトファン、NAD(P)H、およびリボフラビンと判明した。同定された4つの成分のうち、NAD(P)Hは着実に増加している。この成分は細胞環境条件の変化を示す既知のバイオマーカーである<sup>[4]</sup>。新しいA-TEEMシステムは、細胞培地に含まれる遊離アミノ酸のプロファイリングを可能とするだけでなく、従来手法と比べて時間とコストの低減も実現できる。

## 医学的診断

牛乳に対する幼い子供のアレルギー反応は、 $\alpha$ -ラクトアルブミン(LAC)が原因となって引き起こされる。このため、このアレルゲン血液から検出できるロバストな診断プラットフォームを構築することにより、診断の向上を図ることができる。診断プラットフォームに欠かせない条件は、良好な感度、再現性、および特異性を達成することであるが、スクリーニングによって捕捉リガンド(相互作用を測定する対象物質と特異的に結合する物質)を選択することが重要になる。表面プラズモン共鳴イメージング(SPRi)は、特定の対象に対して複数種のリガンドをセンサ上に配

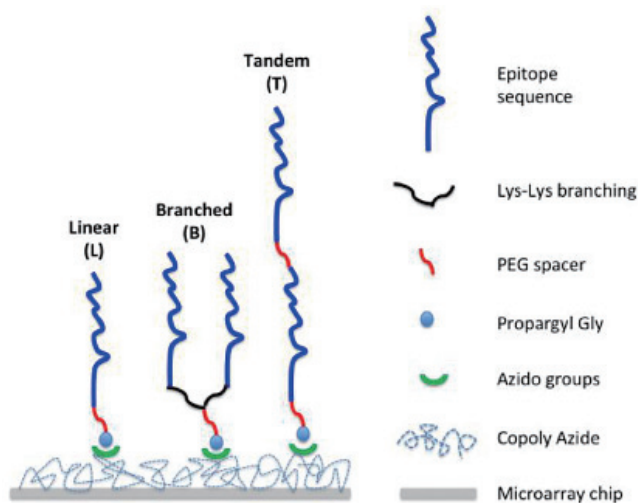


Figure 5 A schematic representation of the three different configuration of peptides (ligands) used on the microarray chip: linear (L), branched (B) and Tandem (T).<sup>[5]</sup> (Reproduced with permission from ref.5, Copyright 2017, Elsevier)

列すること(マイクロアレイ)によりスクリーニングを可能とする,リアルタイムかつラベルフリーな測定技術である。スクリーニングに加え,試料の動力学的パラメーターの取得も可能である。最近, Renzo Vanna博士のグループは<sup>[5]</sup>, 新型のSPRiシステム「XelPlex」を用いて3種類の形状(直線, 分岐, タンデム)のペプチドのマイクロアレイによるLAC抗体のスクリーニングを行った(Figure 5)。

タンデム形状(LAC1\_T)は,直線(LAC1\_L)および分岐(LAC1\_B)ペプチドに比べ,結合能力の向上において最もすぐれていた(Figure 6)。その理由は速度の遅い解離相にあるとされ,タンデム形状が多価相互作用を受ける(分析物が複数のペプチドと結合する)と結論できた。この情報

は結合親和性の値しか得ることができない酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)などの従来の手法では取得不可能なものである。一方,SPRiシステムならば上記のように,親和性の数値の背後にあるメカニズムを見抜くことが可能となる。

## おわりに

本稿では,医薬品や医療分野における実際の問題について,我々の製品(Figure 7)を使ったソリューションを紹介した。ラマン分光(Raman),SPRiおよびA-TEEMといったラベルフリー技術の効果は,競合する技術には無い高い有用性を持っている。これらの技術に共通するのは,紹介した各アプリケーションにおいて,評価の時間とコストを低減することができるという効果である。各技術はいずれも将来有望な技術であり,ライフサイエンス市場における一層の活用と普及が見込まれる。

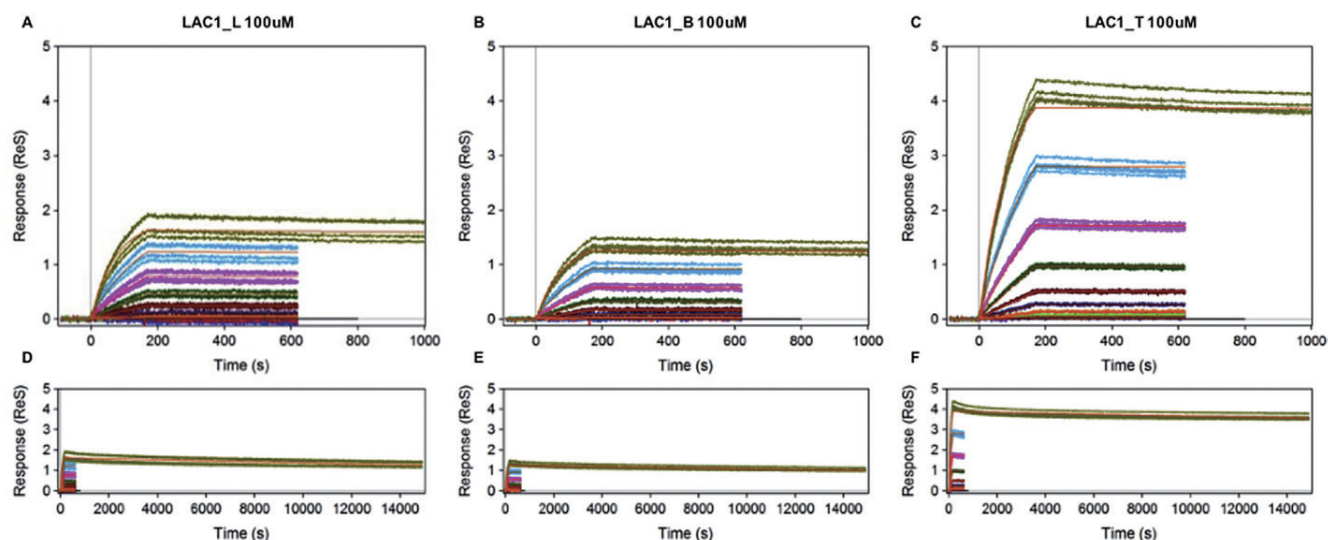


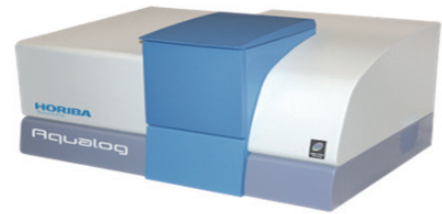
Figure 6 SPRi study of alpha lactalbumin (LAC) antibody binding to the microarray peptide pre-functionalized with various orientation of alpha lactalbumin IgE epitopes LAC1\_L, LAC1\_B, LAC1\_T. The SPRi association (A-C; association rates were deduced from 3 min of association) and dissociation curves (D-F, dissociation rates were deduced from 4 h of dissociation) after the injection of 8 different concentrations (0.98-500 nM) of the antibody (colored plots).<sup>[5]</sup> (Reproduced with permission from ref.5, Copyright 2017, Elsevier)



**Raman**



**SPRi**



**A-TEEM**

Figure 7

#### 参考文献

- [1] Marinella G. Sandros and Fran Adar. Assessing biotherapeutics stability using Raman Spectroscopy. (Application note) <http://www.horiba.com/scientific/products/horiba-life-science-solutions/application-notes/>
- [2] Chikashi Ota, Shintaro Noguchi, Satoru Nagatoishi and Kouhei Tsumoto. Assessment of the Protein-Protein Interactions in a Highly Concentrated Antibody Solution by Using Raman Spectroscopy, *Pharm. Res.*, 33, 956-969(2016).
- [3] Yuichi Kitagawa, Takumi Moriyama, Daisuke Irikura, and Yasushi Nakata. Holistic Analysis of Mammalian Cell Proliferation using Fluorescence Spectroscopy. (Application note) <http://www.horiba.com/scientific/products/horiba-life-science-solutions/application-notes/>
- [4] D.W.Zabriskie and A.E.Humphrey, Estimation of Fermentation Biomass Concentration by Measuring Culture Fluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 337-343(1978).
- [5] Alessandro Gori, Marina Cretich, Renzo Vanna, Laura Sola, Paola Gagni, Giulia Bruni, Marta Liprino, Furio Gramatica, Samuele Burastero, Marcella Chiari *Analytica Chimica Acta* 983, 189-197(2017).



#### **Marinella SANDROS, Ph.D.**

Business Development Manager for Life Sciences  
SPRi Product Manager  
HORIBA Instruments Inc.



#### **Fran ADAR, Ph.D.**

Worldwide Raman Applications Manager  
HORIBA Instruments Inc

## A-TEEM分子指紋を用いた赤ワインの分光学的解析

Spectroscopic Analysis of Red Wines with A-TEEM Molecular Fingerprinting

赤路 佐希子

Sakiko AKAJI

A-TEEMとはAbsorbance-Transmission and fluorescence Excitation-Emission Matrixの略で、HORIBA製 蛍光分光装置Aqualogに搭載されている技術である(US patent 8901513)。この技術を使って、水処理工程における分析、薬品分析、タンパク分析だけでなく、食品・飲料産業においても重要な様々なパラメータを取得することができる。従来Aqualogは水分析用の装置と考えていたが、ワインのような飲料の分析にも応用できることがわかった。Aqualogは完全な紫外可視吸収スペクトルを取得でき、ワイン中のフェノール類含有量評価に重要で、Hue値(ワイン独自の色合い)と強度値を求める時に必要な280, 420, 520および620 nmにおける吸光度を測定することができる。Aqualogは透過スペクトルも出力でき、CIElab色空間上での色味表示もできる。Aqualogが取得するEEM (fluorescence Excitation-Emission Matrix) 指紋は、NIST標準試料で校正されており(NISTトレーサブル)、PARAFAC (Parallel Factor Analysis) や主成分解析PCA (Principal Components Analysis) といった多変量解析を用いて評価することができる。最も重要なのは、単なる吸光データあるいは透過データの解析では決定できない、ブドウ飲料やワインの香りや色を決める成分の定性と定量値を、A-TEEM指紋から求めることができることである。

The patented (US patent 8901513) Aqualog which facilitates simultaneous Absorbance- Transmission and fluorescence Excitation-Emission Matrix (A-TEEM) technology, provides rapid access to a wide range of parameters of significance in water treatment, drug and protein analysis as well as the food and beverage industry. We think of Aqualog as an instrument for water analysis, but find that it is adept at wine analysis and more. Aqualog acquires a complete UV-VIS spectrum including the wine industry-standard Absorbance wavelength values at 280, 420, 520 and 620 nm which are important to evaluate a wine's phenolic content, and derive characteristic Hue and Intensity values. Aqualog also reports the Transmission spectrum which can be used to determine the CIElab Tri-Coordinate color descriptions. Aqualog reports a NIST-traceable EEM fingerprint which can be evaluated using multivariate statistics such as PARAFAC (Parallel Factor Analysis) and PCA (Principal Components Analysis). Most importantly, A-TEEM fingerprints yield qualitative and quantitative composition of key flavor and color determinants in grape juice and wine that are not discernible with simple Absorbance or Transmission data analysis.

### はじめに

A-TEEMの技術により、複雑な化合物の分子指紋を取得し、成分を正確迅速に同定することができる。今回、Aqualogを使いこの技術を赤ワイン分析に応用した例を詳

述する。赤ワインは、おそらく、水に次いでもっともよく研究され分析されている。安価な輸送が可能になり、バルクワイン、および瓶詰されたワインの国際取引が急増している。この国際取引の増加にともない、安価で品質の低いワインやその他の類似品への添加物混入の危険性が増加し

ている。このことから、比較的簡単に迅速にワインの産地や成分を現場で分析することが最も強く求められるようになった。

世界的なワイン業界の商業規模は3千億ドル<sup>[1]</sup>で、US単体では320億ドルとなり、そのほとんどをカリフォルニアで生産している。一方で様々な種類を含むワイン市場では様々なタイプや種類のワインが取引されているが、ブドウ醸造前後で行われる成分分析では、ほぼ赤ワインが分析されている。特に、注目されるのは赤ワインの色である。その熟成期間中の色の安定性は、同品質のワインを評価する際に、最も重要視される項目となっている。ブドウに含まれる数百種にわたる成分のうち、熟成したブドウ果実中のフェノール類含有量は、ワインの品質を決める最も重要な成分である。様々な分類されるフェノール類(アントシアニン、タンニン、フラボノール、カテキン)が、ワインの様々な色、口当たり、味や香りに影響を与えている<sup>[2]</sup>。これらのフェノール類を構成する個々の化合物が一体となって、ワインの独特な風味が作り出されている。Veraison(仏)と呼ばれる熟成開始時期と、その後およそ30日から60日の期間の育成作業(intervention)は、ワインの最終品質を決める重要な作業である。これらの育成作業として、果実への日射を変化させる葉の剪定作業(結果的にフェノール類の合成に影響を与える<sup>[3]</sup>)、収穫量をコントロールするブドウの房を取り除く作業(摘房作業)(これによって一定のブドウ粒数に果実成長するように導く)、varaison後の灌漑作業(protocol)が含まれている。よって、適切な収穫時期決定に際し、フェノール類の評価には大きな関心が向けられている。糖含有量、pHや酸度に関するバルク測定は、特別なトレーニングなしに行うことができる基本的な測定であるが、フェノール類解析に用いられる高速液体クロマトグラフ(HPLC)、ガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)、紫外可視分光(UV/VIS)といった装置は、詳細な情報が得られる一方で、適切なトレーニングと経験が求められる。現に、そのために多くのワイン解析サービスラボが世界的に存在しているほどである。

ここで、Aqualogにおける革新的な技術として、内部補正効果(Inner Filter Effect, IFE)を用いた補正機能を紹介したい。IFE補正とは、Primary Filter Effect (PIF)と

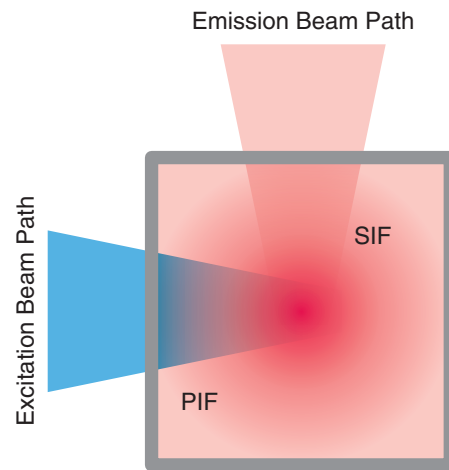


Figure 1 Inner Filter Effect (IFE)

Secondary Filter Effect(SIF)を補正する機能である。PIFとは、液体サンプル測定時において蛍光測定部に励起光が到達するまえに、サンプル自体の吸光によって励起光強度が徐々に減少していく現象で、SIFとは、同様に蛍光測定部における発光がサンプルに吸収されることによって弱められる現象である。

Figure 1に示すように青の励起光強度は、蛍光測定部に到達する前にサンプル自体の吸光により徐々に減少していく。赤の発光は、サンプル内における再吸収により弱められる。

Figure 2はIFEのスペクトル結果である。蛍光スペクトルにおける短波長域の発光強度は、蛍光の再吸収により弱められる。光学密度の高いサンプルにおけるIFEなしの蛍光スペクトルを左に、IFEありの蛍光スペクトルを右に示す。

リアルタイムにIFE効果補正を適応できるので、Aqualogは定量的な水分析の産業標準になった。

吸光度、透過度、IFE補正EEMを同時に取得することにより、ロット間、地域性や様々な特徴の評価、さらに酸化、亜硫酸処理といった処理効果を検出するなど、工業的なワイン特徴づけのツールとしてAqualogを活用することが可能となった<sup>[4]</sup>。これらの測定により、ワインに含まれるフェ

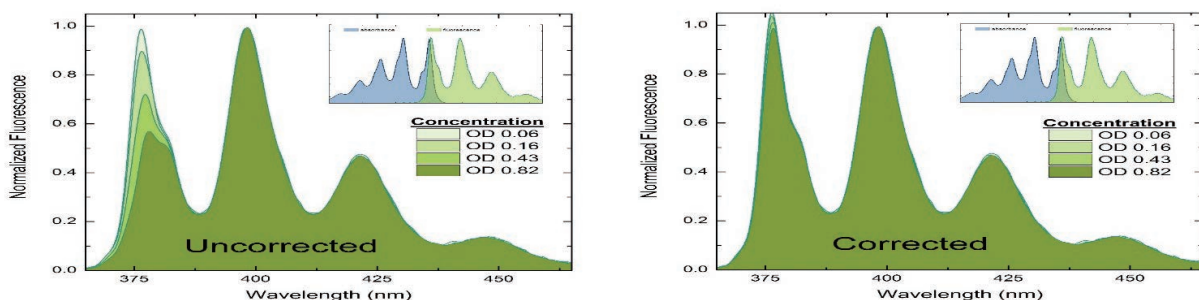


Figure 2 Spectral consequence of the inner filter effect

Table 1

Molecular groups	Main contribution	Examples of individual molecules
anthocyanins	color	cyanidin-, petunidin-, delphinidin-, malvidin (-3-glucosides)
catechins	bitterness	monomeric flavon-3-ols catechin, epicatechin, epicatechin-gallate
tannins	astringency	polymers of flavon-3-ols catechin, epicatechin
non-flavonols	antioxidants, sun screen	coumaric, caffeic, ferulic, gallic acids, resveratrol
flavonols	photoprotection	quercetin, myricetin, kaempferol, isorhamnetin, syringetin

ノール類とその変化の網羅的な解析が可能になり、ヴィンテージとSO<sub>2</sub>処理の識別、ワインの産地同定、腐敗や潜在的な問題要素を見つけ出すことに活用できるのではと考えられる。

**Table 1**に、ワインの特徴である芳香、長期安定性および色に影響するごく一般的なフェノール類を示す。

収穫後のブドウおよびブドウ果汁におけるタンニン(tannins)とアントシアニン(anthocyanins)のモニタリングによって、ワイン製造者は適切な発酵期間を決定し、果実の皮や種から抽出されるこれらの化学成分の量を知ることができる。ブレンド工程においてこれらの成分量を調整することによって色や芳香を修正し、求められる最終製品のワインに仕上げることができる。

アントシアニンとタンニンの含有量及び抽出量はブドウの果実熟成期間に増加する。熟成期間6週以降においてカテキンから渋味を出すタンニンへの急激な成分変化が起こり、アントシアニン含有量は4倍に増加する。文献<sup>[5]</sup>にみられるような深みのある色を提示することになる。

現在、吸光度と蛍光指紋(fluorescence excitation-emission matrix, EEM)を同時に取得する特許技術を持つAqualogがワイン研究に使用されている。研究の主な目的はA-TEEMとワインの色味や含有成分といった統計的に特長のある項目を関連付けることである。280, 420, 520および620 nmにおける吸光度と透過度およびCIE色度図は、ワイン業界において、そのプロセス評価、品質管理における許容誤差の設定に使われる重要な指標である。IFE補正済みEEMを用いてPARAFACやPCAといった多変量解析することにより、ワインの色を決定づける成分のスペクトル情報と濃度情報を取得することができる。このようにして得られる情報を用いて、ワインのロット間、種類、数多くのワイン製造プロセスによる色味成分解析に有用な考察ができると思われる。

## 試料と実験方法

測定には以下の7タイプの赤ワインを使用した。各ワインの生産地およびブドウ種を**Table 2**に示す。サンプルを脱イオン水で希釈し、1 cm光路長の石英セルにて278 nmに

Table 2

Production region	Grape cultivar
Italy (Italy)	50% Cabernet Sauvignon 50% Merlot
Italy (Italy N/A)	ND
Chile	Merlot
California (CA)	Merlot
Argentina (Arg)	Malbec
France (France)	55% Cabernet Sauvignon 40% Merlot 5% Petit Verdot
Spain (Spain)	50% Tempranillo 50% Gamacha

おける光学密度(OD)が0.6になるように調整し、室温で測定した。各サンプルのEEMと吸光スペクトルは3回測定した。サンプルはそれぞれ、ボトルを開封して1時間以内の新鮮な状態、および大気に1週間さらした状態において測定を行った。

測定後、すべてのEEMにおいて水ラマン散乱を用いた正規化を行い、発光状態を均一化した。またEEMはすべてNISTトレーサブルである。その後、IFE補正およびレイリー光マスキングを行い、Eigenvector社のSOLOパッケージをPARAFAC、およびPCA解析に使用した。

## 結果と考察

**Figure 3**に示すように、EEM測定の結果、開封後の赤ワインにおける吸光度および透過率に変化が見られた。EEMでは、複数成分の励起および発光の重なりが観察されるため、等高線から主要成分の定性定量的な解釈は限られる。しかし、このEEMからはっきりとわかるのは、励起・発光(Ex/Em)ピークが275/309 nm付近にあるUV域で励起発光する成分が主要成分であることだ。大気にさらす前後における吸光度(および透過度)スペクトルから、主要な吸収ピークが275 nmであること、320 nmおよび520 nm付近にも弱いながらも吸収があることがわかる。275 nmのピークは通常フェノール類と関連があり、520 nmのピークはアントシアニン成分と関連付けることができる。520 nmの吸収における発光は弱く、**Figure 3**に示す発光スケールでは表示されていない。EEM中の500-600 nm付近のピークは主要成分として分離成分に含まれる(**Figure 6**参照)。

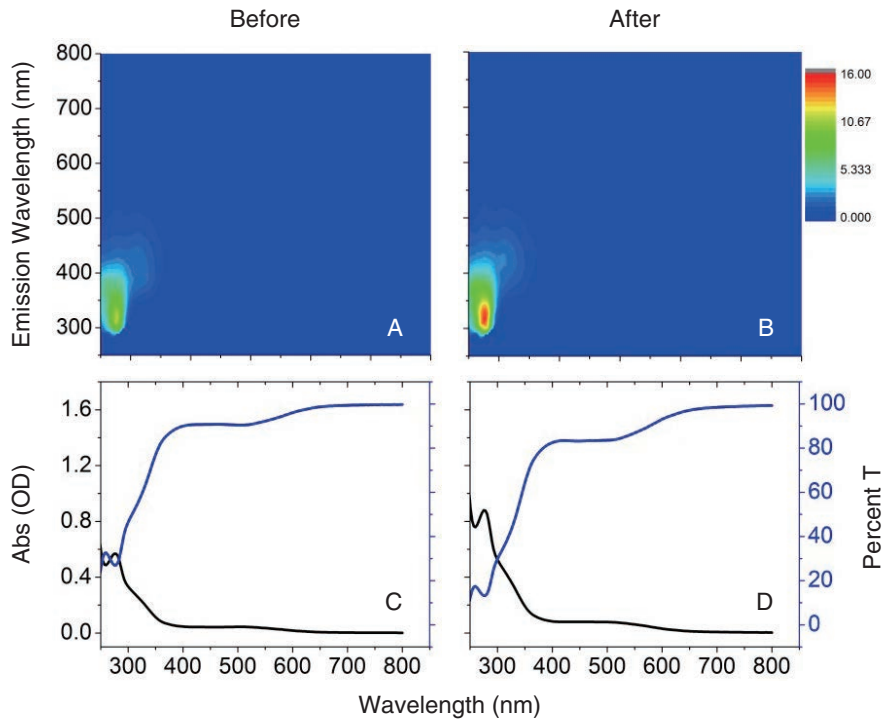


Figure 3 Simultaneously recorded EEMs (A and B) and Absorbance and percent Transmission spectra (C and D) for a typical Italian red wine from a freshly opened bottle Before (A and C) and After a one week exposure to air (B and D).

大気にさらす前後(Figure 3C, 3D)を比較すると、酸化により吸光度スペクトルが増加していることがわかる。同様に、大気にさらした後のEEM (Figure 3B)ではさらす前のEEM(Figure 3A)よりも発光強度が増加している様子が示されている。

### 吸光度、透過度およびCIE色度図解析

ワイン業界は、従来3つの波長における吸光度を用いた解析を採用しており、それぞれA420、A520、A620と呼ばれている。これらの指標は、ワインの色味(赤、茶色、黄色)の特徴づけ、HUE(色調)やIntensity(強度)を示す際に使われる。AqualogではUV-VIS領域の吸光スペクトルを測定するので、これらの3波長の吸光度を用いた解析が可能である。HUEは以下の式で表される。

$$Hue = A420/A520$$

またIntensityは以下の式にて計算される。

$$Intensity = (A420+A520+A620)$$

また、A280の値は通常フェノール類が存在するかどうかの測定基準として使われる。しかしながら、A280は他の成分の吸光度も含まれていると思われる。

Figure 4AおよびBにおけるデータは、左から右に向かってIntensityの平均値(Figure 4B)が大きい順にサンプルを並べたものである。Italy N/Aサンプルが最も高い強度を示

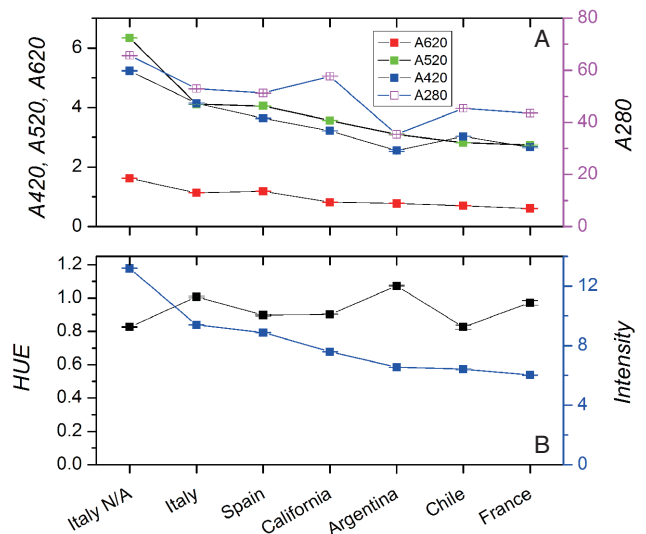


Figure 4 Comparison of the Absorbance parameters (A) and Hue and Intensity parameters (B) defined above, measured with Aqualog for a series of freshly opened red wines from various countries.

し、Franceサンプルが最も弱い。強度のパラメータであるA420、A520、A620をFigure 4Aに示すが、これらの値は、いずれのワインにおいても高い吸光度を示したA280とは相関を示さなかった。同様に、HUEは、Figure 4Bにおいて、0.82から1.07の間に分布し若干ランダムな様子を示しており、強度パラメータとの相関はあまり見られなかった。

Figure 5にCIE1931色度図における各ワインサンプルの分布を示す。CIE1931をフルスケールで示したFigure 5Aに

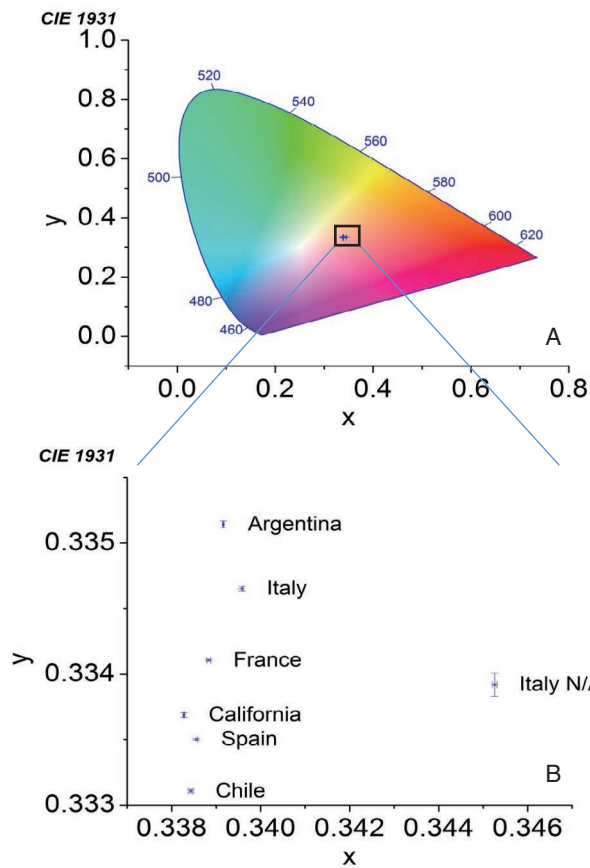


Figure 5 CIE 1931 x and y coordinates for each of the wine samples from Figure 4.

おいては、赤ワイン分布はほぼ1カ所に集中していた。**Figure 5B**は、**Figure 5A**で四角に囲った部分の拡大図で、すべてのサンプルは非常に狭い範囲 ( $x=0.337-0.347$ ,  $y=0.333-0.335$ ) に分布していたことがわかる。 $x$ ,  $y$ の各データポイントには、標準誤差バーも示している。**Table 3**に、**Figure 3**に示したItalyワインサンプルの吸光度、色度、およびCIE色度図パラメータ値を示す。開栓前から開栓後の値を差し引いた差 $\Delta$ はマイナスの値を示しており、明らかにすべての吸光度パラメータおよび強度にて有意な増加 ( $p < 0.05$ ) を示した。これは**Figure 3**で示したEEMおよび吸光度・透過度のデータと一致した。色度パラメータも顕著に増加していた。よってCIE色度図に関わるパラメータも酸化により有意な変化 ( $p < 0.05$ ) を示した。

### EEM PARAFAC解析

PARAFACとは、3次元マトリックス分解の手法で、以下に述べるように、各推定モデルコンポーネントの①励起スペクトルのローディング形状、②発光スペクトルのローディング形状、③濃度ローディングスコアを得るために使用した。PARAFAC結果は最小自乗フィッティングの性能指数 ( $r^2$ ) により評価され、core consistency, および交差検証によりモデルの適切さとパラメータの冗長性を評価する。今回評価したPARAFACモデルは、すべてのローディングおよびスコアにおいて非負拘束の条件で解析を行った。今回測定したすべてのサンプルについて開栓直後と酸化後について複数回測定したデータをPARAFACで解析した。分離されたローディング結果として5つの励起-発

Table 3 Absorbance, Hue, Intensity and CIE Lab color index parameters for the Italy wine sample shown in Figure 3 Before and After oxidation.

Absorbance	Before	$\sigma$	After	$\sigma$	$\Delta$	$\sigma$
A620	1.14E+00	1.09E-02	2.11E+00	1.17E-02	-9.78E-01	1.60E-02
A520	4.12E+00	1.50E-02	7.15E+00	1.70E-02	-3.03E+00	2.27E-02
A420	4.14E+00	1.86E-02	7.60E+00	1.14E-02	-3.46E+00	2.18E-02
A280	5.30E+01	1.38E-01	8.21E+01	1.36E-01	-2.92E+01	1.93E-01
HUE	1.01E+00	5.82E-03	1.06E+00	2.99E-03	-5.69E-02	6.54E-03
Intensity	9.39E+00	2.63E-02	1.69E+01	2.36E-02	-7.47E+00	3.53E-02
CIE Lab						
X	1.10E+02	3.00E-02	1.06E+02	3.39E-02	4.79E+00	4.53E-02
Y	1.09E+02	3.29E-02	1.03E+02	3.85E-02	5.69E+00	5.07E-02
Z	1.06E+02	5.09E-02	9.72E+01	2.14E-02	8.57E+00	5.52E-02
x	3.40E-01	2.71E-05	3.45E-01	2.25E-05	-5.50E-03	3.52E-05
y	3.35E-01	1.59E-05	3.37E-01	3.30E-05	-2.25E-03	3.66E-05
X+Y+Z	3.25E+02	1.14E-01	3.06E+02	8.89E-02	1.91E+01	1.44E-01
L*	1.03E+02	1.21E-02	1.01E+02	1.46E-02	2.12E+00	1.89E-02
a*	1.18E+01	4.74E-03	1.32E+01	7.58E-03	-1.40E+00	8.94E-03
b*	6.57E+00	1.12E-02	8.45E+00	1.80E-02	-1.88E+00	2.12E-02
C*ab	1.35E+01	9.48E-03	1.57E+01	7.02E-03	-2.17E+00	1.18E-02
h*ab	5.09E-01	5.68E-04	5.70E-01	1.16E-03	-6.11E-02	1.29E-03
S*	1.31E-01	1.07E-04	1.55E-01	6.70E-05	-2.42E-02	1.26E-04
Q*	1.33E+02	1.08E-02	1.31E+02	1.31E-02	1.91E+00	1.70E-02



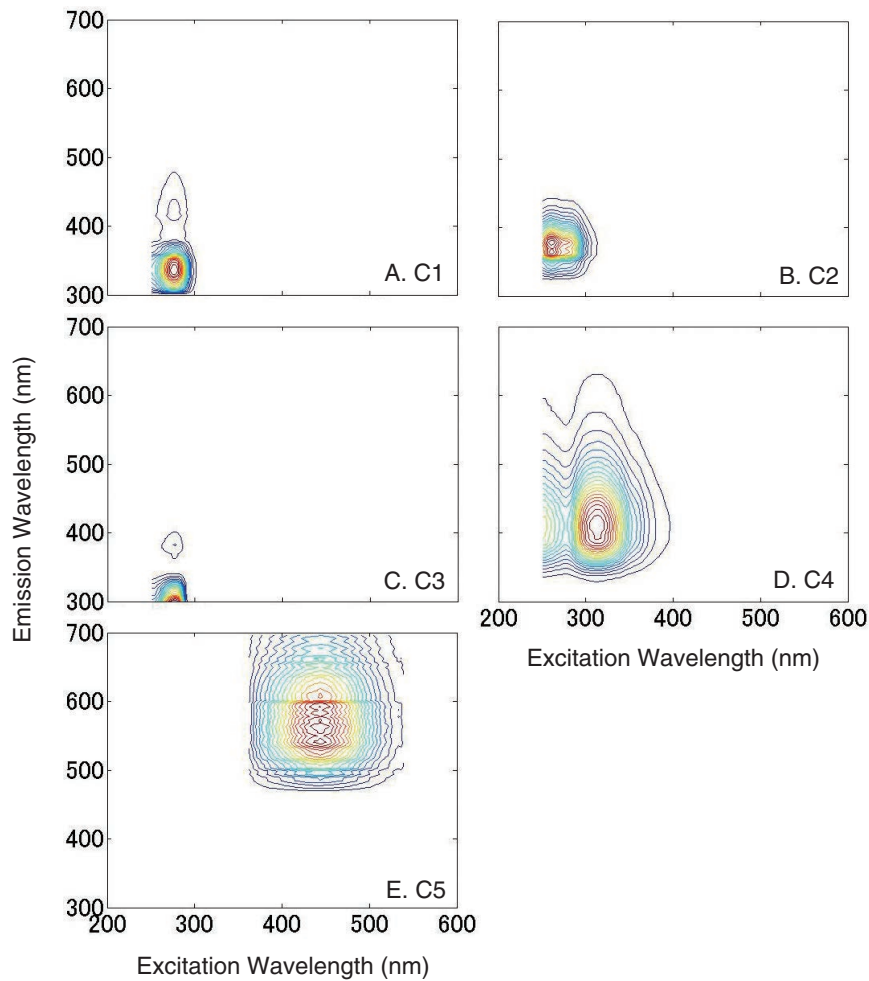


Figure 6 IFE corrected excitation and emission spectral contour loadings for the five component model evaluated for all wine sample replicates before and after oxidation. The PARAFAC model (n=84) was described with an  $r^2=0.997$  and a split half validation score  $r^2=0.906$  (where the model is tested with two halves of the dataset separately).

光等高線の結果をFigure 6に示す。コンポーネント1には、主要成分(275/330 nm)とマイナー成分(275/425 nm)のEx/Em等高線が認められた。コンポーネント2は、単一成分の等高線(260/370 nm)を示している。コンポーネント3は、UV域における主要成分(275/300 nm)と非常にマイナーな成分(275/370 nm)の等高線を示している。コンポーネント4は、広範な発光であり、励起波長に二峰性を持つ主要成分(Ex/Em=325/410 nm)の等高線を示している。ただし、より短波長側の励起波長域におけるバンドは本解析で使用した250 nm以上の範囲からはずれており、十分に分離できていない可能性がある。コンポーネント5は広範な等高線(430/560 nm)を描いており、最も存在量が少ない

と思われる。Ex/Em座標に基づき分解したこれらのコンポーネントを文献値と比較し、暫定的に同定した結果をTable 4<sup>[6]</sup>に示す。

Italyワインにおけるボトル開栓後の酸化による変化をFigure 7に示す。コンポーネント1は、酸化前後いずれにお

Table 4 Qualitative assignment of PARAFAC components

PARAFAC Component	Excitation Max, nm	Emission Max, nm	Name
C1	278	340	Caffeic Acid
C2	263	380	Flavonol Like
C3	280	300	Epicatechin
C4	315	405	Gentisic Acid
C5	445	568	Anthocyanin

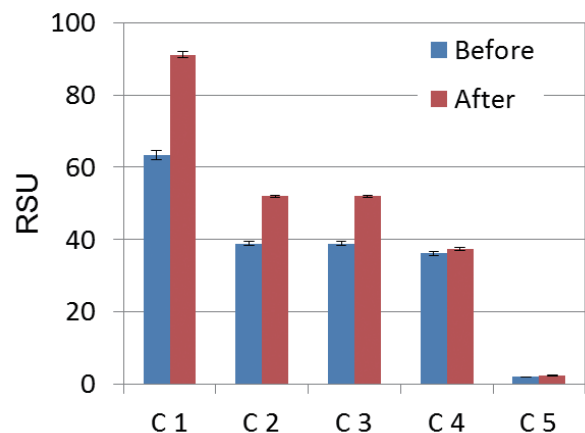


Figure 7 Comparison of the five PARAFAC component scores in the Italy wine samples (n= 3 replicates per sample) before and after oxidation. Component scores are reported normalized water Raman scattering units (RSU).

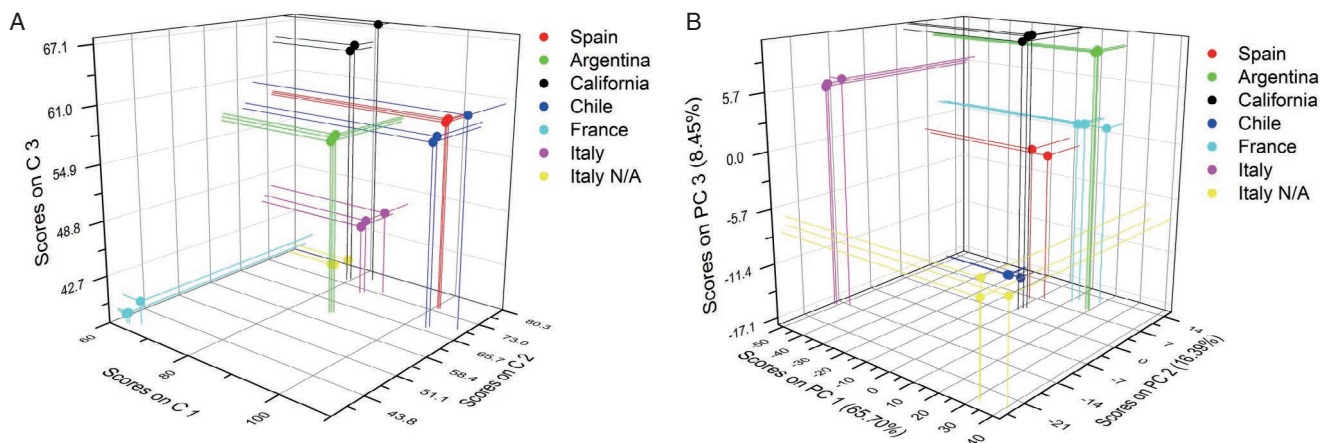


Figure 8 Comparison of the three major component cluster plots for PARAFAC (A) and PCA (B) analyses of the freshly opened wine samples ( $n=3$  replicates per sample).

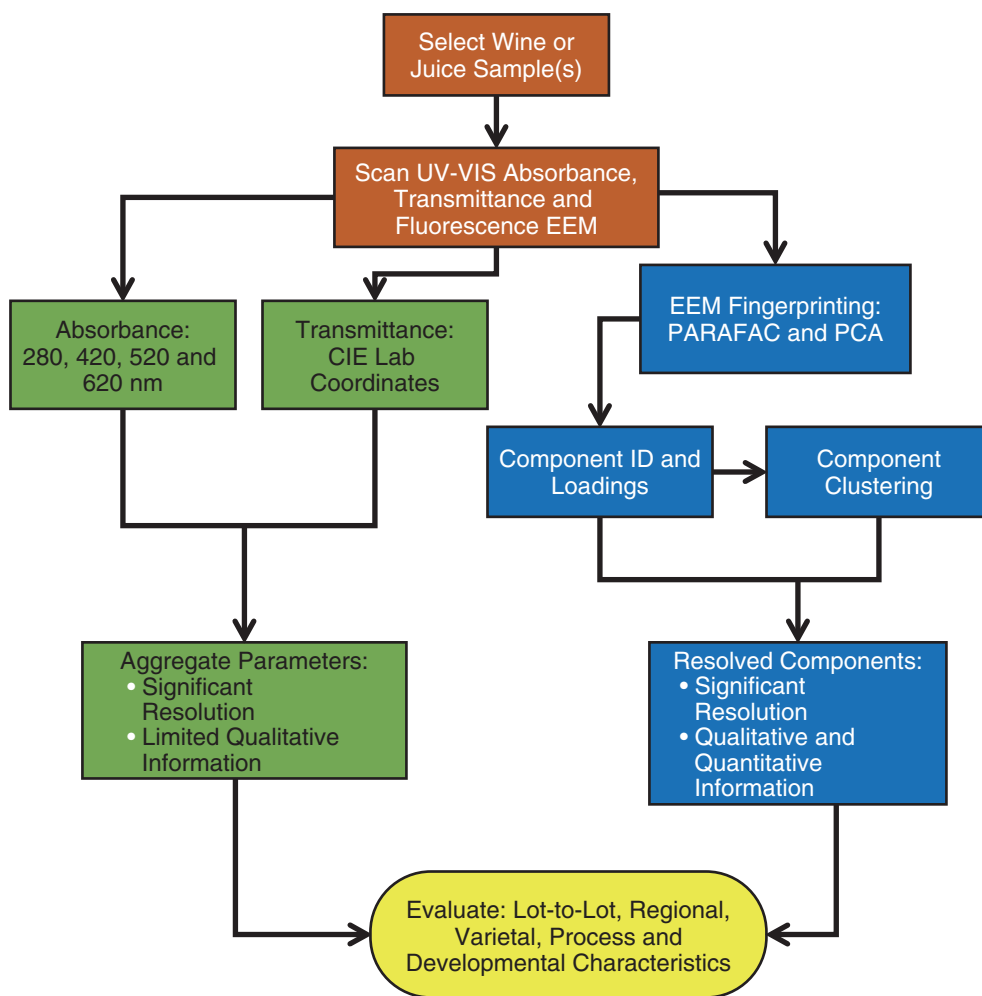


Figure 9 Schematic of the relationships among the simultaneous Absorbance and EEM data acquisition and analysis with respect to the significance of wine sample and component resolution pertaining to this study.

いても主要な成分であった。5つすべてのコンポーネントにおいて酸化後の強度ローディングが有意( $p < 0.05$ )に増加しており、UV域に発光を持つコンポーネント1-3は、長波長域に発光を持つコンポーネント4,5と比較して、より増加していた。

### PARAFACおよびPCAによるクラスター解析

PARAFACおよびPCA (two-way Principal Component Analysis)により分離された3つの蛍光主要成分のモデルコンポーネントローディングを用いて、開封直後のワインのクラスター解析を行った結果をFigure 8に示す。PCAは2

次元解析(two-way analysis)手法で、得られるコンポーネントスコアが負の値を示すこともあり、化学成分のスペクトルとしては物理的に現実的でないこともある。しかし、PCAはサンプルのスペクトル成分の定性/定量的な変化を示す方法として以前から用いられている方法である。クラスター解析の結果、PARAFAC (Figure 8A)およびPCA (Figure 8B)のいずれにおいても、各ワインが異なるクラスターを示している。これはそれぞれ独自の色味を持つことを表しており、CIE1931色度図(Figure 5)におけるワインの色味分布が異なっていることと矛盾しない。各データセットにおける統計的優位性は、各3つのスコアパラメータを比較することで判断した。PARAFACモデルは、すべてのデータセットにおいて $p < 0.05$ の優位確率を、PCA解析では $p < 0.1$ の優位確率を示した。

## おわりに

以上のデータは、Aqualogによる吸光度とEEMの同時測定および解析がワインの評価に活用できることを示している。また吸光度からHue(色調)やIntensity(強度)を、透過度からCIE1976(L\*, a\*, b\*)を算出することで、従来の評価項目もカバーすることができる。Figure 9に、これらの関係図を示す。特に、吸光度や透過度による情報は、処理シグナルに寄与する多成分のスペクトルが集約された情報である。それゆえ、EEM解析によって、ワイン中に含まれる個別の色成分に関連させて、定性定量的情報を得ることができる点は特筆すべき点である。以上述べた解析結果は、産業的なワイン評価への有効性を示すだけでなく、他の多くのアプリケーションに応用できる可能性を示している。

(本記事は、文献<sup>[7]</sup>に基づき、新たに邦文にて書き起こしたものです。)

## 参考文献

- [1] <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/wine-market> [accessed 21<sup>st</sup>, October 2017]
- [2] A. L. Waterhouse et al. Understanding Wine Chemistry, ed. Wiley and Sons 2016.
- [3] M. Sternad Lemut et al., *J Sci Food Agric.*, 2013, **93**, 3670–3681.
- [4] C. Coelho et al., *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 8132–8137.
- [5] <https://www.etslabs.com/library/44> [accessed 21<sup>st</sup>, October 2017]
- [6] D. Airado-Rodriguez et al., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, **24**, 257–264.
- [7] A. Gilmore, A. Akaji, K. Castorday, “Spectroscopic Analysis of Red Wines with A-TEEM Molecular Fingerprinting”, *Readout English Edition*, 2017, **49**, 41–48.



赤路 佐希子

Sakiko AKAJI

株式会社 堀場製作所  
開発本部 先行開発センター  
Advanced R&D Center  
HORIBA, LTD.

## 顕微ラマン分光法がバイオメディカル研究に与えたインパクト

Impact of Raman Microscopy on Biomedical Research

Fran ADAR

Catalina DAVID

Marinella SANDROS

ラマン分光法は、赤外(IR)吸収分光法を補完する振動分析手法である。この2つの手法は分子や結晶の振動を通じて材料の情報を提供する。赤外分光法がより広汎に利用される一方、ラマン分光法は明確に異なる特徴を持っており、これが生体物質の測定にメリットをもたらす。本稿で紹介する3つのトピック(微生物同定・疾患診断・ラマンイメージング)は、顕微ラマン分光法が世界的に画期的な活躍を遂げている事例や、導入によって未解決の問題を克服する可能性を取り上げている。これらの活動の一部にとって極めて重要な意味を持つ測定装置のイノベーション(とりわけラボオンチップ)に関する情報についても触れる。参照先はすべてが網羅されているわけではないが、関心を抱いた読者に諸文献への入口を示すものとなれば幸いである。

Raman spectroscopy is a vibrational technique complimentary to Infrared (IR) Absorption. They both provide information on materials via their molecular and crystalline vibrations. While IR spectroscopy has been used more widely, Raman has some distinctly different characteristics that provide advantages when making measurements on biological materials. For this article we have selected three topics where there is groundbreaking activity in Raman microscopy worldwide and where the implementation has potential to solve outstanding problems. Information on instrumentation innovations that are critical to some of this work (especially lab-on-a-chip) will be mentioned. The references, while not exhaustive, will provide the interested reader entry to the literature. The topics that have been selected are identification of bacterial micro-organisms, disease diagnosis, and Raman imaging.

### はじめに

ラマン分光法は新しい手法ではなく、1928年にC. V. Ramanによって最初に紹介された。ラマン分光法は当初、少数の先進的物理学の研究所の領分で用いられていたが、その後は有用で多用途な非侵襲的分析手段へと進化し、迅速な化学物質の検出や識別を可能にした。この手法は単色のレーザー光と試料における化学結合との相互作用を測定するもので、試料の分子や構造の構成についての豊富なスペクトル情報が取得できる。光の照射を利用する手法であるため、光学顕微鏡下で測定できるようにすることも可能だ。

ラマン分光法および顕微ラマン分光法は、その振動スペクトルに含まれる情報の豊富さから、バイオメディカル研究において長い間関心事となっていた。タンパク質、脂質、

核酸、および炭水化物のスペクトルにはそれぞれ特徴的な差異を見出すことができるが、細菌等では特定の分類に属する種を同じ分類の別の種と区別することも可能である。興味を持った研究者がラマン分光法の入門書を手に入れることのできる場は数多く存在するが、バイオメディカル分野に関しては、各種の生体材料に割り当てられるラマン振動周波数を網羅した表が掲載されたレビュー論文<sup>[1]</sup>をお勧めする。

バイオメディカル研究におけるラマン分光法／顕微法の利用は、ここ20年に至るまでは技術的ハードルによって妨げられていた。数々のイノベーションによって状況は変化を遂げており、同技術の応用は急激に進んでいる。本稿では、顕微ラマン分光法がバイオメディカル分野に画期的変革をもたらす可能性のある、極めて活動的ないくつかの領域を探る。

## 微生物同定

細菌の通常の大きさは、0.5~1.0  $\mu\text{m}$ 前後のレーザー光の集光サイズにほぼ相当する。つまり、集光したレーザー光により生成されたスペクトルはすべて、その細菌性生物の全体を表している可能性が高いということである。1990年には早くも単一細胞のスペクトルが報告され<sup>[2]</sup>、その後単一細菌細胞のスペクトルも2000年<sup>[3]</sup>と2004年<sup>[4]</sup>に発表された。Schusterらによる2000年の発表では、貯蔵された顆粒や成長段階に関連した化学組成の変化を容易に特定できることが示された。暫定的にバンドを帰属し、7つの異なる細菌種をスペクトルによって識別したのが2004年の研究である。またHuangらは、任意の生物の成長段階(表現型分類)を判別できること、<sup>13</sup>Cを多く含むグルコース炭素源で培養された試料では、細菌内で新たに合成される分子に重量の大きいこの同位体が含まれることを反映して、一部のラマンバンドが明瞭なレッドシフトを起こすことを示した。この同位体シフトの検出能力によって、非常に重要なアプリケーションである細菌代謝の追跡が可能となることは明らかであろう。

例えば2007年、Huang教授のグループは、安定同位体プロービング(SIP)ラマン分光法と蛍光in situハイブリデーション(FISH)を組み合わせ、同位体標識を施したナフタレンの環境中での分解を追跡した<sup>[5]</sup>。この研究ではナフタレンの分解が特定できること、および<sup>13</sup>Cを細菌に取り込ませ、どの細菌が分解に関与しているか識別できることの2つが重要であった。また、同研究は実験室標本ではなく地下水の中にて行われた。培地では培養不可能な細菌を得るためである。実験室では培養できない生命体の割合が大きいことから、これは極めて重要なことであった。

同グループからさらに1歩進んだのが「ラマン分光法を用いた細胞分離」(RACE)<sup>[6, 7]</sup>である。このスキームでは、細胞がマイクロ流体素子を通して流れる間に単一細胞のラマンスペクトルを記録し、当該細胞を収集して生物学的検定に使用するか判断を行うことができる。その狙いは「遺伝子発現を、細胞の生理学的状態や表現型に関連付ける」ことである。

微生物の同定は臨床的にも環境的にも意義がある。とりわけ、緊急治療室環境における菌株や菌種の同定は、患者の感染症に効果的な抗生物質を選択するために重要である。害をなす細菌の確認方法として現在行われているのは2~3日間の培養である。その結果、菌種と菌株の両方が同定される。この情報が得られるまで、患者は多くの場合その生命を維持するためにさまざまな種類の抗生剤による治療を受ける。だが実際にはこのことが耐性菌の発達可能性を高めてしまっている。数時間で菌を同定するラマン分析の潜在能力は、生きるか死ぬかの問題に対処するだけでなく、耐性菌の発達を最小限に抑えるものとなり得る。ラマン分光法による細菌の種や株の同定を可能とするためには、関連する生物のスペクトルのデータベースを収集し、利用できる状態にしなければならない。スペクトルの収集などは標準化(例:コロニーの齢数や培養栄養物も記録する)の必要があるほか、多変量解析アルゴリズムに対しては、良好な結果を得られるか厳格なテストが必要になる。データベースは継続的に更新し、新しい抗生物質耐性菌が含まれるようにしなければならない。数々の著者がこの実現可能性について論じている<sup>[8-12]</sup>。また欧州連合はこのニーズに対処するためのコンソーシアムを結成した(hemospec.eu)。同コンソーシアムが提案する、最小サイズの血液サンプルから微生物を同定するプロトコルをFigure 1に示す。

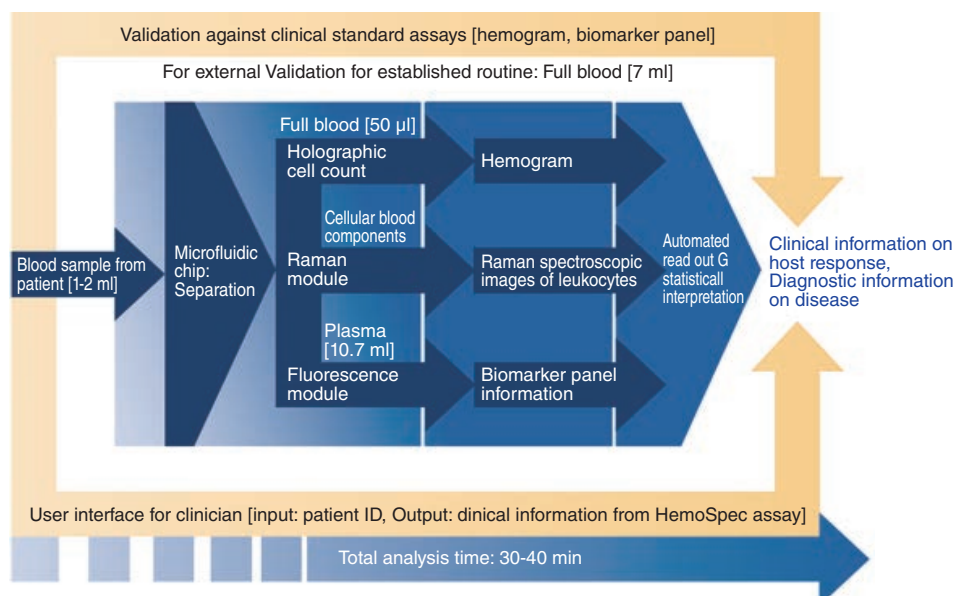


Figure 1 Scheme proposed by European Union for identifying infectious organism and preparing the best antibiotic defense. This figure is reproduced from <http://www.hemospec.eu/index.php/technology>.

すでに挙げた文献のうち「Journal of Raman Spectroscopy」の2015年のレビュー論文<sup>[12]</sup>で、環境、食品汚染物質、医療における、微生物の同定に関する数々の応用例の概要がまとめられている。その論考では人体の安全に対して一定の意義を持つ、非医療目的の応用についても触れられているが、その中には細菌性のバイオテロ物質、および食品・水病原体の検出も含まれている。この資料は非常に興味深いものではあるが、その大部分は短論文である本稿の目的からは外れているため、関心を持たれた読者には当該論文を直接ご覧になることを強くお勧めする。

このレビュー論文<sup>[12]</sup>では、高い感度と特異度\*1をもって、また場合により高スループットモードを用いて生物を同定するラマン分光法の複合的な応用例が紹介されている。これらの測定には微生物の参照スペクトルの膨大なデータベースと洗練された多変量アルゴリズムが必要であるという認識は重要である。例えば、病院での感染症アウトブレイク（通常発生しているレベル以上に感染症が増加すること）において、あるシステムのテストが行われ、「分離株の集合の内部におけるばらつきのスクリーニング」に有効であることが判明している。著者らは、ラマン分光法とマイクロ流体素子との統合によって高速／高スループットな細菌同定を実現するためのSERS（表面増強ラマン散乱）の応用についても精査している。いくつかの事例では、病原性細菌、菌類、ウイルスの病原体特異的な核酸シークエンスの検出にSERS法が使用されていた。とりわけ注意が払われたのが、体液中の病原体の検知（これも培養を伴わない）についての記述である。対象とされたのは尿、血液・血清、腹水（腹腔から出る液体）、唾液、脳脊髄液、涙液、および頸管粘液であった。また、皮膚と爪の感染モードも検討対象となった。抗生物質と細菌との相互作用を分析した刊行物も検証されている。例えば、ラマン分光法によるスペクトル波形によって、バンコマイシンに敏感な、または耐性を持つ細菌が識別できることが見出された。別の研究では、DNAのラマンバンドの検出を通じて、抗生物質の静菌作用と殺菌作用が識別された。この著者らは、最後のトピックとして、細胞内病原体の検出と、異なる代謝状態を示す標的細胞の内部と外部にある同じ病原体の識別における、ラマンスペクトルの有効性について概説している。

\*1：感度と特異度：臨床検査の有用性を評価する指標。両指標が高い（1に近い）ときは、その検査を行うだけで疾患の有無を判定できる。

## 疾患診断

疾患診断では、アテローム性動脈硬化、骨疾患、およびさまざまな形態のがんがその主要な領域とされてきた。

1992年にはマサチューセッツ工科大学のMichael Feldが

ヒトの動脈のラマンスペクトルを計測。これはアテローム性動脈硬化症の疾患経過についての組織化学的情報を抽出するための手段であった<sup>[13]</sup>。

その後、2006年には同じグループがアテローム性動脈硬化症と不安定プラークの病理学的in vivo評価を開始した<sup>[14]</sup>。2012年には、Jenaグループが、外径1 mmの内視鏡プローブを用いた、ウサギをモデルとするアテローム性動脈硬化プラークのin situ測定について論文を発表した<sup>[15]</sup>。脂質（飽和、不飽和、遊離脂肪酸およびエステル化脂肪酸。トリグリセリド類含む）やタンパク質について文献に記載されたバンドの帰属に基づき、大動脈管腔の各部の特徴付けが行われた。その目的は化学組成に基づいた不安定プラークの予知診断であった。ラマン分光測定に続いて、CARS（コヒーレント反ストークスラマン散乱）イメージの記録が、正常な大動脈とプラークが蓄積した大動脈を対象に行われた。CHの振動周波数がタンパク質と脂質とで大きく異なる（それぞれ $2930\text{ cm}^{-1}$ と $2840\text{ cm}^{-1}$ ）ことから、CARSイメージにおけるコントラストは非常に良好であった。

骨は、ヒドロキシアパタイト（鉱物の一種）とコラーゲン（タンパク質の一種）との複合材である。必要な機械的特性を得るために、骨は多孔質であり、常に破骨細胞と増骨細胞によって再構築（リモデリング）されている。これにより形成される骨単位は、環状の構造を持ち、骨の長軸に対して平行であり、同心の薄いミネラル層を有している。ミネラルと結合するOH<sup>-</sup>およびPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>サイトの一部は炭酸塩に置き換えられ、結晶化度はさまざまである。ミネラルとタンパク質の相対比、炭酸塩置換、およびミネラルの結晶化度は、すべてラマン分光法により測定可能なパラメーターであり、これらを用いて骨品質の特徴付けを行うことができる。1999年、ミシガン大学のMichael Morris教授が骨を対象とした初期のラマン分析について発表した。これは各コンポーネントの分光法における特徴を分析し、多変量解析の手法を応用してラインマップ（線分析）の解析を行い、皮質骨の化学的性質の検討に用いたものである<sup>[16]</sup>。（皮質骨とは長さのある骨の長手方向の中央部の緻密な骨をいう。）この発表内容において重要なのは、リン酸塩バンドの中央ラマンシフトが $951\sim 963\text{ cm}^{-1}$ となるミネラル相に関する3つの因子の発見である。Morris教授と彼のグループは以降も骨の研究、特に骨疾患の研究を継続している<sup>[17]</sup>。

その後、Ozan Akkusと共同研究者らが顕微ラマン分光法を用いてヒトの緻密骨の老化に関する研究を行った<sup>[18]</sup>。これは具体的には、17歳から73歳までの被験者の骨単位においてリモデリングされない骨と新たに形成される骨の組成を記録し、その壊れやすさについて把握するというものであった。前者（リモデリングされない骨）のミネラルの含有量は寿命の最初の20年間にわたり増加し、ミネラル結晶のサイズも増大した。一方、新たな骨は平均してタンパク質

対ミネラル比が大きく、結晶が小さめの状態を維持し、骨がより脆性の低い状態に保たれていた。当該論文には「リモデリングの速度が低下すると、ミネラル化した組織の割合が高くなり、骨の壊れやすさが増大する可能性がある」と述べられている。

**がん診断**への顕微ラマン分光法の応用の可能性について関心を持つ方々にとっては、2008年に出版されたとある書籍の章が良き出発点となるだろう<sup>[19]</sup>。その章は実際には膀胱と食道の疾患診断をもっぱら扱っているが、その2つの例に向けた手法の展開は、これらの組織種別に固有というよりも、むしろ他の模範としてとらえるべきものである。現在のがん診断の代表的な基準は、病理学者の結論をベースとしている。しかし、複数の病理学者が同じ標本を検証した結果、異なる結論にたどり着く場合があることは周知の事実である。このためラマン診断の開発手順には、150の生検標本の収集と、それらを分類のために病理学者の集団に提出する作業が含まれた。最終的には、意見の一致をみたくわずか50の標本がラマン法のための分類に使用された。正常な組織、噴門バレット組織、胃底バレット組織、腸管バレット組織、軽度異形成、高度異形成、腺がん上皮異形成および扁平上皮がんの平均スペクトルが示された。線形判別分析(Linear Discriminant Analysis : LDA)が判定のために適用され、3グループモデル(正常な扁平上皮粘膜、バレット食道、異形成およびがん)の感度および特異度はそれぞれ84~97%と93~99%であった。これらの値は病理学者たちと比べて遜色ないものであったが、診断の結果として臓器が摘出される場合、偽陽性は最小限に抑えたい。同時に、がん組織を見逃すことも避けたいものである。誤分類のコストを考慮することで誤診が改善された。

膀胱鏡検査時に切除された膀胱の標本も、上記に引用した食道がんの場合と同様の結果となった。さらに、これらの標本のスペクトルを、この膀胱疾患の病期分類、つまり腫瘍が膀胱壁をどの程度浸潤しているかの判定に用いることが可能であることがわかった。もちろん究極的には、即時に判断を下すために現場のデータを提供したいと人は考えるものであるが、これはラマン内視鏡プローブの使用により可能となる。本件では、1本を芯に6本のファイバーを周囲に配置したバンドル構造で、励起ファイバーからのシリカのラマン信号と集光ファイバーからのレーザー信号を消去するフィルタリング機能付きのプローブが用いられた。Enviva Ramanプローブという名称の、Visionex社の製品である。生体外標本に再びLDAアルゴリズムが用いられ、良性の標本(正常および膀胱炎)が移行期の細胞がんとして区別された。全体の精度は84%であった。この原理の証明は、手術室環境における生体内測定の可能性を支持するものである。

2008年に書かれたこの章の最後に、著者らはラマン分光法

をがんの診断に応用する際の注意点を指摘している。まず、スペクトルの差異が極めて微小であることから、スペクトルをいくつかの構成部に分解し、疾病過程を理解しやすくなることが有用と考えられる。良性の組織を新生物組織と区別する際には、多変量解析手法が用いられた。だが、1つの機器に集められたスペクトルに基づくモデルを、別の機器に集められたスペクトルによる組織の状態予測に用いることができるのかという疑問が、少なくとも本稿執筆時点においては残ったままである。機器の応答に対し、広帯域の光源に基づきスペクトルを補正することは確かに可能だが、さまざまなスペクトル分散を提供する(スペクトル分解能が異なる)機器によってスペクトルが集積された場合、幅が異なるバンドの相対強度は、スペクトルの分散に応じて変化する。この現象については、我々が知る限り対応がなされていない。

2015年、Stone教授のグループは、がん診断に関する別のレビュー論文を著している<sup>[20]</sup>。彼らはさまざまな種類の腫瘍(脳、乳、肺、皮膚、食道、前立腺、直腸結腸、および骨)に対するがん診断に加えて、がんやその他のコンディションのための体液診断分析についても考察を加えており、この論文では腫瘍境界の判定という重要な事柄について取り上げている。手術室において、境界判定のために患者の腫瘍全体の完全なスペクトルイメージング・データを収集することは、必要な時間を考えれば法外な行為である。だが、スポット間の変動を探ることで試料採取箇所を減らすアルゴリズムが既に開発されている。これは脳組織の除去において特に重要といえる。再発の確率を最小化するために腫瘍を極力取り除きつつ、神経学的欠損を避けるために健康な組織を除去しないようにすることが望ましいためだ。この論文ではCARS(コヒーレント反ストークスラマン分光法)やSRS(誘導ラマン分光法)、SERS(表面増強ラマン分光法)およびTRS(透過ラマン分光法)といったその他の測定手法もレビュー対象となっている。

この論文に引用された研究の一部では、ラマンスペクトルと多変量解析手法の併用によって、予知分析が可能であるだけでなく、ラマンスペクトルによって分子と疾患との相関関係を知ることができる場合もあることが示されている。例えば非小細胞肺癌において、健康な組織ではポルフィリンの濃度が高いが、腫瘍組織ではDNAバンドが高くなることがわかった。別の引用研究では、自家蛍光の内視鏡測定によって識別された疑わしい領域が、その後ラマン分光法により91%の特異度で新生物発生前組織であると特定された。

皮膚がんに関する議論では、スペクトルを用いた腫瘍境界の定義が、コストのかかるモース顕微鏡手術に代わるものとして検討された。基底細胞がん(最もよくみられる皮膚がんの一種)を正常な組織と区別する際、分類モデルには

核酸に割り当てられるバンドの相対強度が用いられ、感度は $90 \pm 9\%$ 、特異度は $85 \pm 9\%$ であった。

腫瘍境界評価へのラマン分光法の使用を最初に探求したのは、Michael Feld教授の研究グループであった<sup>[21]</sup>。教授はとりわけ、病理学による悪性状態の確認後に再手術が必要となった、目に見えないがんを持つ1人の患者を特定している。最近では、ラマン分光法による灰白質、白質、壊死、および病理性膠芽腫の識別が可能であることが示された<sup>[22, 23]</sup>。第1の文献<sup>[22]</sup>では、小型のポータブル分光器に接続された $6 \times 1$ ファイバースコープを用いて測定を行っている。測定では、ラットの脳に発生させた腫瘍にプローブを接触させた。この研究の目的は「手術中のリアルタイムな脳生検を可能にする生体内ラマン分光法を構築するための」プロトコルの開発であった。同研究やその他の研究において、腫瘍の成長が脳組織の脱髄に引き続いて脂質の減少を引き起こすことが判明した。第2の文献<sup>[23]</sup>では、タンパク質と脂質に割り当てられているバンドが画像化され、言及された各相を識別できることが見出された。またこれらの画像はH&E染色<sup>\*2</sup>された近隣の組織切片と相関していた。

とりわけ興味深いのが、ラマン分光法による**体液の直接診断分析**の可能性である。我々が取り上げている参考文献20には、その可能性が存在する6つの領域について触れられている。すなわち、糖尿病および血糖値モニタリング、がん診断、喘息、炎症、血中の凝固・抗凝固因子、そしてマラリアである。2008年にはChanらにより、レーザートラッピングを利用することで個別の白血病細胞のスペクトルが取得できることが実証された<sup>[24]</sup>。健康人と白血病患者から採取したB細胞・T細胞両方の集団が調べられた。DNAおよびタンパク質マーカーががんの発見に役立つ優れた識別力を持つことが確認された。マーカーの検証とスペクトルの分類には主成分分析(Principal Component Analysis : PCA)とLDAの2つが用いられた。

しかし最も重要なのは、マイクロ流体素子の光学トラップにおける、単一細胞のラマン分光分析の併用である<sup>[25]</sup>。これによってラマン分光技術と標準の流体評価法の統合が可能になると予想される。増強メカニズム(悪性細胞を標的とするSERSタグやSRS, CARSなどのコヒーレントなプロセス)と組み合わせることにより、循環体液中の単独の転移細胞を発見できる可能性がある。

\*2: 組織を形態観察する目的で、細胞核と細胞質を染色する手法

## ラマンイメージング

組織学は組織の生理学的状態の評価を目的として発展してきたが、組織、細胞および細胞小器官の生化学的状態の評

価手段としては間接的である。ラマン分光法は、生物学や生物医学の主要な手法として、これまでに何度もその有効性を実証してきた。イメージングとマッピングはいずれも、生体外・生体内共に広く用いられている、病変などのさまざまな生物医学の諸問題の分析アプローチである。ラマン分光法は単一細胞から組織レベルまで応用可能であり、構造や機能に関する情報を非破壊的かつ標識を用いない方法で取得することができる。

この節では、バイオイメージング手法としての顕微ラマン分光法の主なメリットを指摘したい。すなわち、標識を用いず非侵襲的であること、分解能が高いこと、高度な多量データ処理手法が使用できることである。また、細胞生物学および組織がん医療の分野における応用事例を挙げる。すでに細胞や組織のような複雑な構造を持つ生物試料の解析に用いられる顕微イメージング手法は数多く存在しており、例えば光学顕微鏡法や、共焦点レーザー走査顕微鏡法、走査電子顕微鏡法(SEM)、原子間力顕微鏡法(AFM)などがある。しかし、こうした手法では非常に詳細な画像が得られるが、検査中に試料の化学的状態や組成の特徴を明らかにすることはできない。それを可能にするのが分光的手法である。特にラマン顕微分光法は、マイクロメートルレベルで細胞の生化学的性質を調べる手段として急速に確立されつつある。共焦点ラマン顕微鏡の開発により、光学顕微鏡の空間分解能でこのような詳細な化学情報が取得可能となっている。したがって、細胞や組織の化学的性質の検証、およびマッピングイメージの作成を迅速に行うことができる。これらのイメージには、画素ごとにスペクトル情報が含まれており、構成要素の分布をラマンスペクトルに基づいて可視化することができる。倒立顕微鏡を用いた測定機器の出現により、この手法は生物学者の研究領域で使われはじめた。

ラマンスペクトルイメージングおよびマッピングはバイオメディカルの世界で幅広く受け入れられている。これは第1に水のラマンスペクトル強度が非常に弱い(生体試料の多くは75%以上の水を含んでいる)、第2に試料の化学的・物理的構成に関する高度な情報が得られるためである<sup>[26]</sup>。ラマンイメージまたはマップから得られる大量の情報から主要パラメーターを識別し取得するためにはケモメトリックス(多変量解析:MVA)を分析の主要なツールとして用いる<sup>[27-30]</sup>。方法論的な視点から重要となるのは、ラマンマッピングとラマンイメージングとの区別である。マッピングは、試料上の対象領域を規定する座標 $(x, y)$ の各地点でスペクトルを測定することによって実現する<sup>[28]</sup>。この方法によって、マッピングされた各地点の詳細な化学情報が取得できる。ラマンイメージングでは、特定の波数にて試料表面をほぼ同時に解析することが可能となる。実際には、選択された波数範囲にわたり小刻みに波数を変えてラマンイメージは測定される<sup>[31]</sup>。ラマンマッピングの性能



をラマンイメージングと比較した場合、取得時間がマッピングではかなり長くなるのが通常指摘される。これはマッピング領域内の各地点におけるスペクトルが個別に測定されるためである。しかし、公平に時間を比較した場合には、各波長において多くのラマンイメージが収集されることになるため、こうした時間差が小さくなることに留意しなければならない。もっとも、技術の進歩に伴い、マッピングの時間的制約はそれほど問題にならなくなってきている<sup>[32]</sup>。

ラマンマップに用いられてきた多変量解析法には、PCA、判別成分分析(Discriminant Component Analysis : DCA)、部分最小二乗法(Partial Least Squares : PLS)、多重最小二乗法(Multiple Least Squares : MLS)、および古典的的最小二乗法(Classical Least Squares : CLS)などがある。これらはすべて単一のピークではなく完全なスペクトルパターンを用いてスペクトルの差異を抽出するものである。多変量解析のアルゴリズムには、ユーザーが純粋スペクトルの知識をあらかじめ持っている場合(教師あり<sup>\*3</sup>)と、ユーザーがそうした知識を持たず、アルゴリズムに差異を示す因子を「発見」させる場合(教師なし<sup>\*3</sup>)とがある。

高品質のラマンイメージの取得に際しては、自家蛍光の存在が重大な障害となる。これはラマン散乱よりも高効率の(光強度が強い)プロセスであることが多いからである。この蛍光の影響を低減するさまざまな方策が生み出されてきたが、その中には深紫外<sup>[33]</sup>または近赤外<sup>[34]</sup>レーザー励起を用いるものや、シフト励起ラマン差分光法、誘導ラマン散乱(SRS)、そして取得後に適用される数々の処理法が含まれる。また他には、ラマン分光法に自家蛍光分光法や拡散反射法を組み合わせる手法もある。

**\*3** : 統計学の用語。supervise (教師あり), unsupervise (教師なし)。

### 単一細胞の分析

一例として、ミュンスター大学病院の生殖医療・男性病学センターのCon Mallidis教授と共同研究者らは、精子細胞の研究を行った。彼らは、精子のDNAと、これらに紫外光(UV)を照射した際の影響に関心を寄せていた<sup>[35]</sup>。この研究の目的は、正常な細胞と生殖力のない細胞における精子核DNA (nDNA)の状態(UV照射の影響)をラマンイメージ

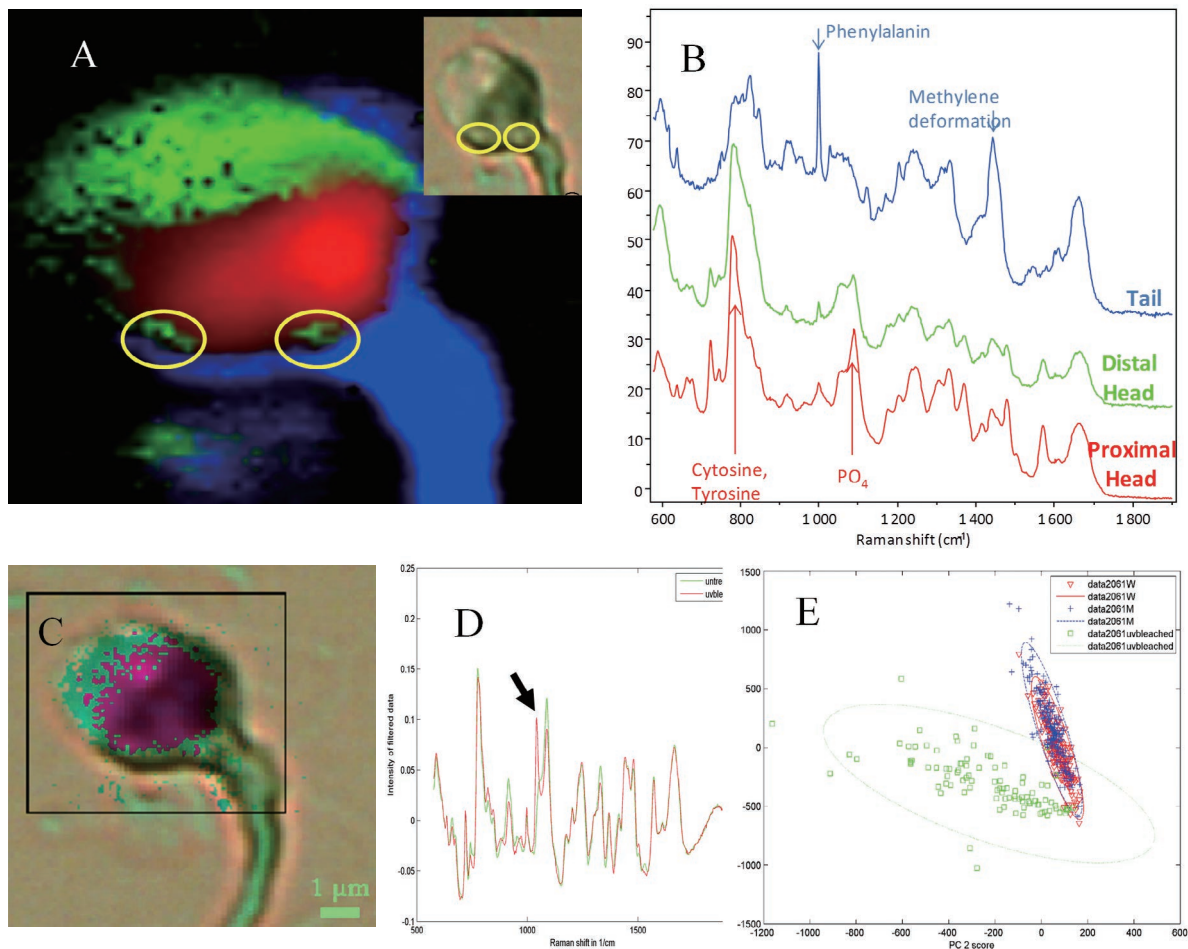


Figure 2 (A) (B) Raman map and the characteristic Raman spectra of native sperm (the video image of the sperm in the inset). Three distinct regions in the sperm are observed: proximal head, distal head and tail, as well as small details as vacuoles. (C) Overlay of human sperm showing the locations of spectra found to be indicative of intact (purple) and damaged (aqua) DNA. (D) Averaged spectra showing the distinct shift at 1042 cm<sup>-1</sup> (arrow) in spectra of irradiated (red) compared with that of the untreated human sperm (green). (E) Scores cluster plot derived from PCA: native sperm (red and blue, for two observers) and UVB-irradiated sperm (green).

ング手法を用いて分析し、結果をすでに確立されている nDNA 試験と比較することであった。

合成石英 (Suprasil) 製顕微鏡スライドに塗布され空気乾燥させたヒトの精子に対し、高空間分解能のマッピングが行われた。化学的特徴に応じてそれぞれに固有の色を割り当てることで、精子細胞の各部の識別を可能とした (Figure 2A, 2B)。イメージの作成には CLS が用いられた。3つのはっきりとした化学的プロフィール (スペクトル) が

特定され、これらは頭部基部 (DNA を含む)、頭部先端部 (ア クロソーム)、そして精子の尾部 (鞭毛) に相当するもので あった。高い空間分解能で測定されたラマンマップからは、 空胞 (黄色の円) のような精子頭部における小さな異常を検 出することができた。

この未処理 (ネイティブ) の精子細胞が、nDNA に変化を与 える意図で UV を照射された精子細胞と詳細に比較された。 標準的な PCA 分析が、「ネイティブの精子 / 観察者 W」「ネ

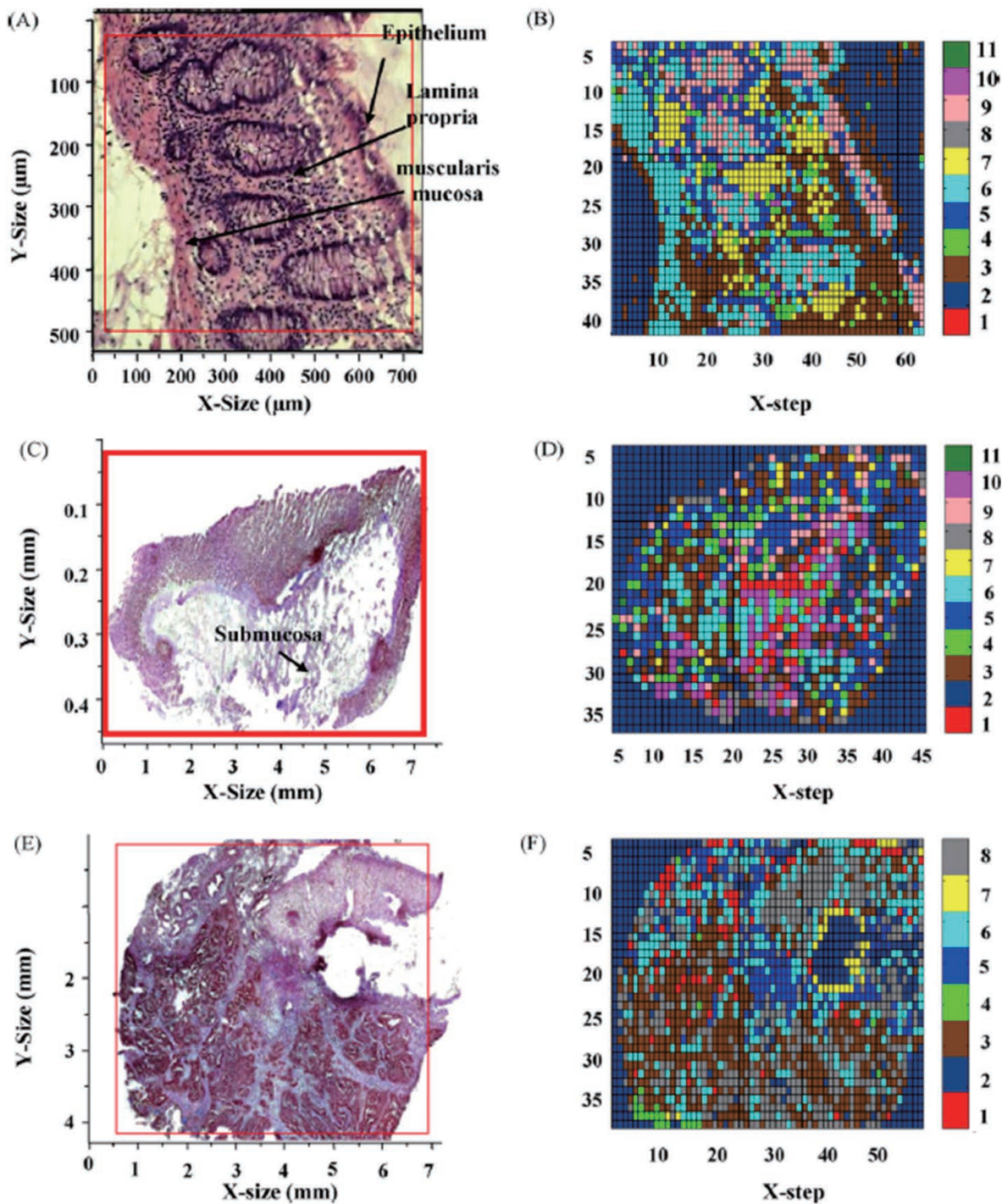


Figure 3 Histopathologic HE-stained section of normal (A and C) and of adenocarcinomatous (E) colonic tissues; B, D and F display pseudo-color Raman maps based on 11-means cluster (B and D) and 8-means cluster (F) on the same areas of the adjacent unstained section. Each cluster (consisting of similar spectra) was assigned to one color and corresponded to the extracted model.

イティブの精子／観察者M]および「損傷した精子」の3つのデータセットに対し行われた。その結果、異なる観察者によるネイティブの精子に対する測定値の間に差異は認められなかったが、これらの値とUV-B処理後に取得された測定値との違いは明確であった(Figure 2E)。スペクトル的には、ネイティブの精子サンプルとUV処理されたサンプルの主な違いはDNAの $\text{PO}_4^{3-}$ 振動バンドと関連がある(Figure 2B)。この違いはUV-Bにより引き起こされたヌクレオチド塩基の二量化\*4を示している。スペクトルシフトを利用すれば、単一細胞中の損傷したDNAと無損傷のDNAの分布を可視化することができる(Figure 2C)。

\*4：二量化は、隣り合った塩基間に結合ができたことにより生じる。

### 生体外組織検査

がん研究と患者のケアにおいて、従来の診断方法は病理組織学的染色と(訓練された)人間の目(病理学者)をベースとしている。しかしこのような方法では、顕著に異なる健康状態しか識別できない場合が多い。ラマン分光法を用いれば、詳細な化学情報によって組織の状態のより微妙な違いを見つけることが可能であり、既にラマン顕微分光法による診断の成功が多数報告されている。この分析法により、組織が癌性であるか否かについて、非常に迅速かつ再現性のある判定ができるだけでなく、腫瘍の成長段階やその悪性を明確に示すことも可能となる。

フランス・ランス大学のManfait教授と共同研究者たちは、ラマン顕微分光法の力をライフサイエンスの分野で活かすべく取り組んできた。最近の研究ではラマン分光法を医学に応用し、ヒトの結腸における正常な組織と腺がん性組織との識別に力を入れている<sup>[36]</sup>。これらの腫瘍は特に侵襲性

が高く、広がるのが早いために、これを除去しようとする旧来の外科技術の手を逃れてしまうことも多い。

Figure 3に、無染色の正常な結腸組織と腺がん性の結腸組織の切片のマップ化されたラマンイメージングの結果を示す。

この分光分析データは代表的な病理組織学的手法と関連付けられた。PCA、クラスター分析(Clustering Analysis : CA)、多重最小二乗法(Multiple Least Squares algorithm : MLS)といった多変量統計解析を使用して、結腸を構成する個々の物質(タンパク質、脂質、コラーゲン、核酸、および粘液)における分子変化の空間分布の調査が行われた。Figure 4のイメージはそれぞれ、結腸標本中の正常な組織と腺がん組織におけるタンパク質、コラーゲン、脂質および粘液の分布を示している。

著者らの所見によると、健康な組織ではタンパク質が粘膜中に存在する一方、脂質とコラーゲンは粘膜下層に集まっており、粘液が組織を包囲している。また、基質により分離された組織の腫瘍部にはDNAが高度に分布し、組織周辺に粘液が存在していることがわかる。使用した多変量解析手法(MLS)によって、腺がん組織に脂質が存在しないこと、基質の周囲にコラーゲンが存在することが裏付けられている。

これらのイメージング分析から得られる重要なメッセージは、組織学的・形態学的なエビデンスが得られない悪性腫瘍の初期段階において生じる分子変化をも、顕微ラマン分光法が識別できるということである。

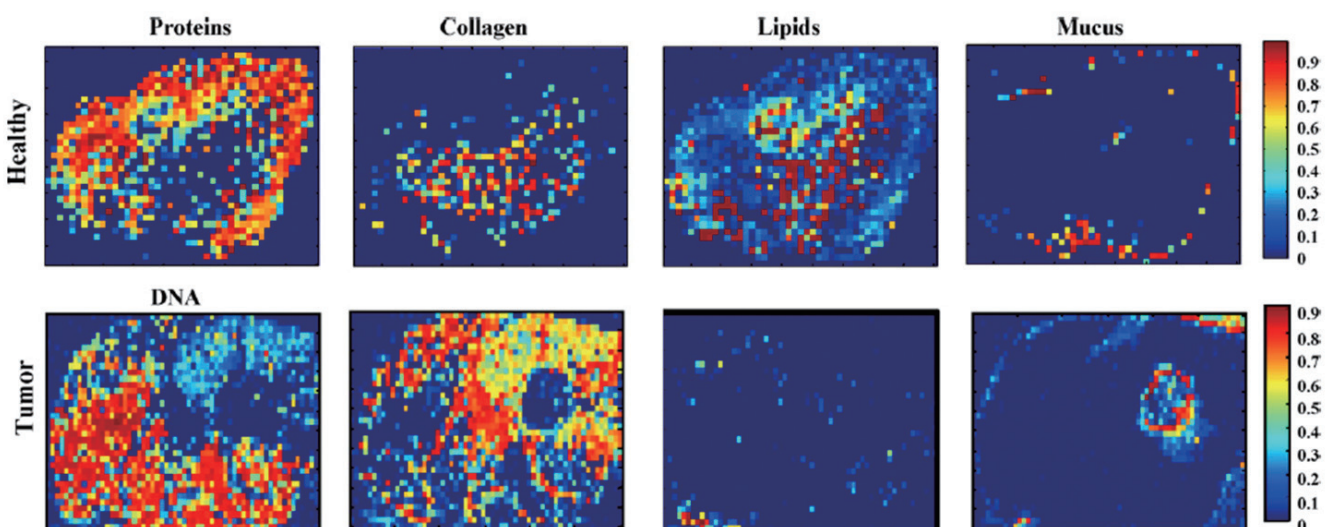


Figure 4 Biochemical distribution of the individual constituent (proteins, collagen, lipids, DNA, and mucus) between normal, adenocarcinoma colonic tissues produced by applying the MLS algorithm. To determine the molecular composition of tissue composition, the relative scattering intensities of the various components were normalized to add up to 100%. The spatial and biochemical information obtained from these maps can be used to identify which biochemical markers could discriminate between normal and cancer tissues

## おわりに

細菌種や株の同定, 疾患診断, そして分子マッピングへのラマン分光法の応用を概説してきた。本稿ではこの分野の人々, 特に特定の領域を最初に探索した人々の功績を紹介すべく努めた。しかし同分野は急速に拡大しつつあり, ここに挙げた参考文献を少し調べれば, この10年間におびただしい数の論文が発表されていることがわかる。よって本稿も, ラマン分光法の可能性がどのようなものかを理解するための入門書としてとらえていただきたい。

## 参考文献

- [1] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I.U. Rehman, Raman Spectroscopy of Biological Tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.* 42, 493-541(2007)
- [2] G.J. Puppels, F.F.M. Demul, C. Otto, J. Greve, M. Robertnicoud, D.J. Arndtjovin and T.M. Jovin, Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy, *Nature* 327, 301-303, 1990
- [3] K.C. Schuster, I. Reese, E. Urlaub, J.R. Gapes and B. Lensl, Multidimensional Information on the Chemical Composition of Single Bacterial Cells by Confocal Raman Microspectroscopy, *Anal. Chem.*, 72, 5529-5534(2000)
- [4] W.E. Huang, R.I. Griffiths, I.P. Thompson, M.J. Bailey and A.S. Whiteley, Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells, *Anal Chem.* 76, 4452-4458(2004)
- [5] W.E. Huang, K. Stoecker, R. Griffiths, L. Newbold, H. Daims, A.S. Whiteley and M. Wagner, Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function, *Environmental Microbiology* 9(8), 1878-1889(2007)
- [6] M. Li, J. Xu, M. Romero-Gonzalez, S.A. Banwart and W.E. Huang, Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging, *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 56-63(2012)
- [7] Y. Song, H. Yin and W.E. Huang, Raman activated cell sorting, *Curr Opin Chem Biology* 33, 1-8,(2016)
- [8] K. Maquelin, C. Kirschner, L.P. Choo-Smith, N. van den Braak, H.P. Endtz, D. Naumann and G.J. Puppels, Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy, *J. Microbiol Methods* 51, 255-271(2002)
- [9] M. Krause, B. Radt, P. Rosch and J. Popp, The identification of single living bacteria by a combination of fluorescence staining techniques and Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 38, 369-372(2007)
- [10] M. Harz, P. Rosch, J. Popp, Vibrational Spectroscopy - A Powerful Tool for the Rapid Identification of Microbial Cells at the Single-Cell Level, *Cytometry A*, 75A,104-113(2009)
- [11] J.F.M. Almarashi, N. Kapel, T.S. Wilkinson and H.H. Telle, Raman Spectroscopy of Bacterial Species and Strains Cultivated under Reproducible Conditions, *Spectroscopy: An International Journal* 27, 5-6, 361-365(2012)
- [12] S. Stockel, J. Kirchhoff, U. Neugebauer, P. Rosch and J. Popp, The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms, *J. Raman Spectrosc.* 47, 89-109(2016)
- [13] J.J. Barage, M.S. Feld, and R.P. Rava, In Situ Optical Histochemistry of Human Artery Using near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 8, 3473-3477(1992)
- [14] J. Motz, M. Fitzmaruice, A. Miller, S. Gandhi, A. Haka, L. Galindo, R.R. Dasari, J. Kramer, and M. Feld, In vivo Raman Spectral Pathology of Human Atherosclerosis and Vulnerable plaque, *J. Biomed. Opt.* 11, 2, 021003(2006)
- [15] C. Matthaus, S. Dochow, G. Bergner, A. Lattermann, B.F.M. Romeike, E.T. Marple, C. Krafft, B. Dietzek, B.R. Brehm and J. Popp, In vivo Characterization of Atherosclerotic Plaque Depositions by Raman-Probe Spectroscopy and in Vitro Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopic Imaging on a Rabbit Model, *Anal. Chem.* 84, 7845-7851(2012)
- [16] J.A. Timlin, A. Carden and M.D. Morris, Chemical Microstructure of Cortical Bone Probed by Raman Transects, *Appl. Spect.* 53, 11 1429-1435(1999)
- [17] G.S. Mandair and M.D. Morris, Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength,

- BoneKEy Reports 4, Article #620(2015)
- [18] O. Akkus, A. Polyakova-Akkus, F. Adar and M. Schaffler, Aging of Microstructural Compartments in Human Compact Bone, *J. Bone and Mineral Res.* 18, 6 1012-1019(2003)
- [19] N. Stone, C. Kendall and H. Barr, Raman Spectroscopy as a Potential Tool for Early Diagnosis of Malignancies, pp. 203-230, in *Esophageal and Bladder Tissues*, in *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, Ed. M. Diem, P.R. Griffiths and J.M. Chalmers, John Wiley ISBN 978-0-470-01214-7(2008)
- [20] K. Kong, C. Kendall, N. Stone and I. Notingher, Raman spectroscopy for medical diagnostics – from in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection, *Adv. Drug Del Reviews*, 89 121-134(2015)
- [21] A.S. Haka, Z. Volynskaya, J.A. Gardecki, J. Nazemi, J. Lyons, D. Hicks, M. Firzmaurice, R.R. Dasari, J.P. Crowe, and M.S. Feld, In vivo Margin Assessment during Partial Mastectomy Breast Surgery Using Raman Spectroscopy, *Cancer Res* 66, 6 3317-3322(2006)
- [22] A. Beljebbar, S. Dukic, N. Amharref and M. Manfait, Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe, *Anal Bioanal Chem* 398, 477-487(2010)
- [23] R. Kast, G. Auner, S. Yurgelevic, B. Broadbent, A. Raghunathan, L.M. Poisson, T. Mikkelsen, M.O. Rosenblum and S.N. Kalkanis, Identification of regions of normal grey matter and white matter from pathologic glioblastoma and necrosis in frozen sections using Raman imaging, *J. Neurooncol* 125, 287-295(2015)
- [24] J.W. Chan, D.S. Taylor, S.M. Lane, T. Zwerdling, J. Tuscano and T. Huser, *Anal. Chem.* 80, 2180-2187(2008)
- [25] S. Dochow, C. Krafft, U. Neugebauer, T. Bocklitz, T. Henkel, G. Mayer, J. Albert and J. Popp, Tumor cell identification by means of Raman spectroscopy in combination with optical traps and microfluidic environments, *Lab Chip* 11, 1484-1490 (2011)
- [26] J.J. McGarvey and J. Renwick Beattie, Raman Imaging, Chapter 7, *Raman Microscopy : A Versatile Approach to Bio-Imaging*, ISBN 978-3-642-28251-5, 2012
- [27] J. Renwick Beattie, Josephine V. Glenn, Michael E. Boulton, Alan W. Stitt, John J. McGarvey, Effect of signal intensity normalization on the multivariate analysis of spectral data in complex 'real-world' datasets, *JRS*, Volume 40, Issue 4, April 2009, Pages 429–435
- [28] Clark D, Sasić S. Chemical images: technical approaches and issues. *Cytometry A*. 2006 Aug 1; 69(8): 815-824.
- [29] Lavine B, Workman J. Chemometrics. *Anal Chem.* 2008 Jun 15; 80(12): 4519-31
- [30] Gendrin C, Roggo Y, Collet C. Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Nov 4; 48(3): 533-553
- [31] Schlücker S, Schaeberle MD, Huffman SW, Levin IW. Raman microspectroscopy: a comparison of point, line, and wide-field imaging methodologies, *Anal Chem.* 2003 Aug 15; 75(16): 4312-8
- [32] Krafft C, Knetschke T, Funk RH, Salzer R. Studies on stress-induced changes at the subcellular level by Raman microspectroscopic mapping. *Anal Chem.* 2006 Jul 1; 78(13): 4424-9
- [33] Bykov S, Lednev I, Ianoul A, Mikhonin A, Munro C, Asher SA. Steady-state and transient ultraviolet resonance Raman spectrometer for the 193-270 nm spectral region. *Appl Spectrosc.* 2005 Dec; 59(12): 1541-1552
- [34] Huang Z, McWilliams A, Lui H, McLean DI, Lam S, Zeng H. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer, *Int J Cancer.* 2003 Dec 20; 107(6): 1047-1052.
- [35] C. Mallidis, J. Wistuba, B. Bleisteiner, O.S. Damm, P. Groß, F. Wubbeling, C. Fallnich, M. Burger, and S. Schlatt, In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy, *Human Reproduction*, Vol.26, No.7 pp. 1641–1649, 2011
- [36] A. Beljebbar, O. Bouché, M.D. Diébold, P.J. Guillou, J.P. Palot, D. Eudes, M. Manfait, Identification of Raman spectroscopic markers for the characterization of normal and adenocarcinomatous colonic tissues, *Critical Reviews Oncology/Hematology* 72(2009)255–264



### Fran ADAR, Ph.D.

Worldwide Raman Applications Manager  
HORIBA Instruments Inc.



### Catalina DAVID, Ph.D.

Application Scientist  
HORIBA FRANCE SAS



### Marinella SANDROS, Ph.D.

Business Development Manager for Life Sciences  
SPRI Product Manager  
HORIBA Instruments Inc.

## チップ増強ラマン分光法 増加するバイオ分野での研究事例

Tip-Enhanced Raman Spectroscopy  
Finds a Growing Number of Applications in Biology

Marc CHAIGNEAU

Maruda SHANMUGASUNDARAM

Fran ADAR

チップ増強ラマン分光法(Tip-enhanced Raman spectroscopy, TERS)は、ラマン散乱がもつ高い化学識別能力と走査プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscopy, SPM)がもつナノメートルレベルの高い空間分解能の双方の特徴を備えている。TERSを用いると、複数成分からなる材料表面を、20 nmを超える分解能で、かつラベルフリー(対象分子に標識をつけない)で分析することができる。この論文では、生体系の研究において、アミノ酸のような生体構成成分から、細胞表面のような複合環境に存在する細胞膜レセプターといった対象まで、TERSがいかにして応用されているかを解説する。

Tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) combines the high chemical specificity of Raman scattering with the nanoscale spatial resolution of Scanning Probe Microscopy (SPM). It enables label-free detection of surface components in multi-component samples with ultra-high spatial resolution (better than 20 nm). This article describes how TERS can be applied to study biological systems ranging from pure components like amino acids to membrane receptors found in complex environments such as cell surfaces.

### はじめに

ラマン分光法は、分子構造に対応する情報を物質の指紋として取得できるという特徴があるが、生物学、医学などの分野では、①ラマン散乱光の本質的な微弱さにより十分なS/N比が得られない、②光の回折限界(空間分解能 $\sim 0.5 \lambda^*$ )に制約されるといった課題がある。実際、回折限界を超えるナノメートルレベルの高い空間分解能が必要なケースは多く、これが実現すれば分子一個を見分ける空間分解能で化学的情報を取得できる可能性がある。チップ増強ラマン分光法(TERS)と呼ばれる手法によって、こうした空間分解能の向上が実現できるようになった<sup>[1]</sup>。

\*1:  $\sim 0.5 \lambda$ : 散乱光の波長の半分程度の長さ

TERSはラマン散乱のもつ高い化学識別能力と走査プローブ顕微鏡(SPM)のもつナノスケールの空間分解能を組み合わせたものである。非常に高い空間分解能(最小10 nm)で試料の表面成分を検出することが可能で、ナノマテリアルやナノメートルレベルの対象物の分析に適している<sup>[2-6]</sup>。また生体分子の分析において、TERSは他の分光法や顕微鏡分析手法と比べて以下のような利点がある。例えば、生体分析を難しくしているS/N比の低さを克服できるため、体

積の大きな試料を使用する必要がなくなる。これは、ナノメートルスケールの空間分解能が得られることに加えて、TERSでは表面増強ラマン分光法(SERS)と同様に増強されたラマン信号を得ることができるからである。これにより単一分子を対象とした分析の可能性も見出されている。他の手法として、汎用の電子顕微鏡分析(EM)も、SPMと共にナノメートルレベルの粒子観察に用いられてきた。しかしEMは、SPMと同様得られる化学情報が限られており、生体試料に重金属による染色を必要とする場合もある。また、他の回折限界を超える微細な化学情報を取得できる手法としては、超解像蛍光顕微鏡が開発されているが、依然として蛍光標識を必要とし、また、そのバンド幅が広くラマン分光法のような詳細な分子情報は得られない。ラベルフリー法では、標識と分析物の無用な相互作用がなく分析対象の機能を保持することが可能であり、標識からの信号もないことから、化学的同定に際して高い識別能力を実現できる。このようにナノメートルレベルの化学組成情報をラベルフリー法で提供する能力を持っているのがTERSである。本稿ではアミノ酸や核酸塩基の単分子層、タンパク質、多タンパク質複合体、核酸、細胞表面、および細胞表面相互作用など、数多くの生体システム研究へのTERS応用の可能性について述べる。

## ラマンとAFMの組み合わせ

ラマン分析とAFM (SPMの一種である原子間力顕微鏡) 分析を同一の顕微鏡システム上に組み合わせる用いることができる。そこでは同じ試料表面から得られる物理的情報と化学的情報を総合することによって試料の組成や構造に関する新しい情報が入手できるため、今までにない興味深い知見を得られる可能性がある。実際、AFMとラマン分析を同一箇所 (co-localizedモード) で測定する場合には、SPM (走査プローブ顕微鏡) 測定とラマンマッピングを、交互に、あるいは同時並行で測定し、測定情報を重ねて画像化できる。AFMおよびその他のSPM法からは、形状分布・機械的特性・熱的特性・電気的特性および磁気的特性に関する情報が分子レベルの分解能 (ナノメートル) で、マイクロメートルレベルの対象面積に対して提供される。他方、共焦点ラマン分光分析およびそのラマンイメージからは、対象物に関する特定の化学情報が回折限界の空間分解能 (マイクロメートル未満) にて提供される。

チップ増強ラマン分光法 (TERS) と組み合わせることによって、上述のAFMラマン装置において、ナノメートルの空間分解能でラマンイメージを取得できるようになる。この手法は金属製 (通常は金または銀) のチップを用いるもので、入射光をチップの最先端部に集中させ、これをナノメートルサイズの光源および局所的増幅装置として機能させることで、ラマン分析の感度を大幅に向上させ ( $10^3 \sim 10^7$  倍)、観測エリアをチップ先端の局所領域まで絞り込むことができる。

この組み合わせには2種類の光学配置が存在する。1つは透過型 (transmission)、もう1つは反射型 (reflection) で、それぞれ長所と短所がある (Figure 1)。

斜め方向から照明する方式の反射型の場合は多種類のSPMプローブを用いることが可能になり、さまざまな種類の (不透明あるいは透明な) 試料についてTERS測定ができるよう設計され、開口数 (NA) が大きく作動距離の長い対物レ

ンズ (NA最大0.7) が最適な角度 ( $60^\circ$ ) で配置されている。こうすることでTERSの増幅に最も適した偏光方向のレーザー光 (p偏光) をプローブ先端に照射し、かつプローブ先端が走査される際に生じる影を最小限に抑えることで、集光効率が最高となるようになっている。

透過型で測定する場合の倒立配置は透明試料に適しており、透明試料が多い生物系のアプリケーションに向いている。この配置によって油浸レンズ (NA最大1.45) のような非常に高いNAの対物レンズが使用できるので、焦点における光密度を高めることで高感度にラマン信号が収集できる。この透過型の配置においても偏光方向は適切に設定する必要がある。その際、プラズモンの励起およびプローブ先端周辺に誘導される電磁場の強度を高めるためには、(照射面に対して) 垂直方向に偏光したレーザー光線を用いなければならない。

TERS効果は、貴金属製の鋭いチップの先端部にレーザー光線が集束するように照射されて電磁場が局所的に増強された際に生じる。現在のところ、TERSチップは、標準的なAFMチップに (全体または部分的に) 金属皮膜を形成するか、あるいはすべて金属で作られたチップ (全体が金属の細線) に電気化学的エッチングを施して製造されている<sup>[7]</sup>。金属細線のチップは、水晶振動子のフォーク部に取り付けられSTMやシアフォースモードAFMに使用されるものと同様である。今日もっとも一般的な方法は、標準的なAFM用カンチレバーに厚さ数十nmの金または銀の被膜を形成する金属化処理である。通常は蒸着<sup>[8, 9]</sup>、スパッタリング<sup>[10]</sup>、または電気めっき<sup>[11, 12]</sup>を用いる。電磁場増強効果を高めるため被膜形成直後にこの層を集束イオンビーム (FIB) でエッチングすることもある<sup>[13]</sup>。また、最終先端部の寸法形状をFIBによりナノメートルレベルの機械加工を施すことによって、プラズモンの共鳴波長に応じた調整が可能となり<sup>[14]</sup>、こうした加工は、エッチング処理により作成される金属細線のチップにも適用することができる<sup>[15]</sup>。

## ナノメートルレベルの空間分解能

TERSは近接場分光イメージング (near-field spectroscopic imaging) 手法の一種であり、その意味では、散乱光-SNOM (走査型近接場顕微鏡) 技術とラマン分光器との組み合わせによる走査プローブ顕微鏡技術と同じ分類に属するものと言える。それでもやはりTERSは光学的イメージング技術の一種であり、空間分解能の概念は光学における一般的な定義に沿っていなければならない。

その場合、光学における分解能の厳密な定義とは画像として識別できる2つの物体の間の最小距離である。光学顕微鏡の場合、分解能は使用される照射光の波長の半分より小さくはならないとするレイリー基準に支配される。近接場

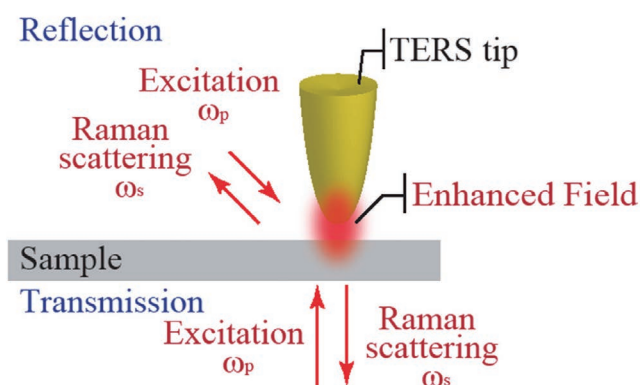


Figure 1 Reflection and transmission TERS configurations.

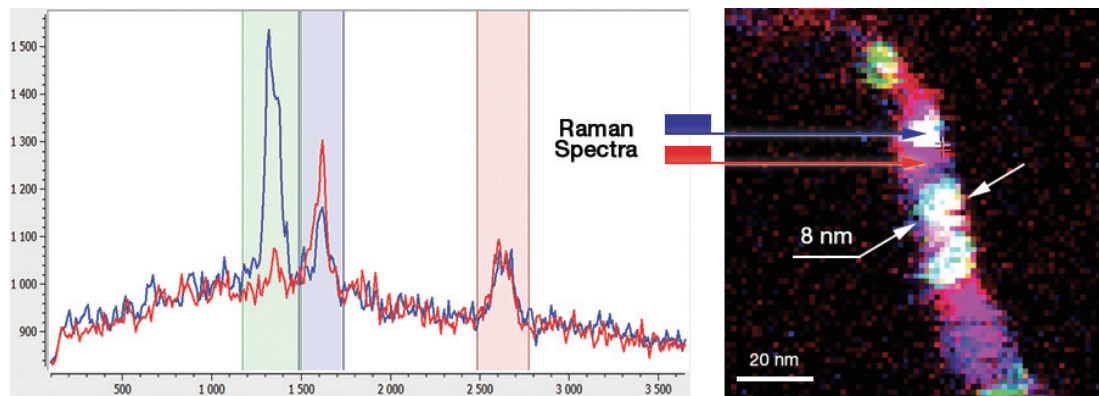


Figure 2 TERS image of 100 nm × 100 nm (75 × 75 pixels) of a carbon nanotube showing an optical spatial resolution down to 8 nm; total map acquisition time < 9 minutes.

光学すなわちTERSにおいても分解能はこの定義に従わなくてはならない。しかし、測定対象がこの必要条件(試料表面で2つのナノ物体が適当な間隔で十分に近接している)が満たされる状態になっていることは非常にまれであり、一般には、TERS(およびその他の近接場光学イメージング技術)における空間分解能は、ひとつのナノ物体を対象とする光学的セクショニング解析(対象の境界におけるラマンバンド強度変化形状から解析すること)によって定量化することが容認されている。

Figure 2の例に示すTERSイメージ(走査範囲100 nm × 100 nm, ピクセルあたりのステップ長1.3 nm, 総取得時間9分未満, ピクセルあたりの積分時間100 ms)は、一本のカーボンナノチューブ(CNT)についてのナノメートルレベルの化学組成情報をイメージ化したもので、その空間分解能はDバンド光(1360 cm<sup>-1</sup>)のセクショニング解析から8 nmと確認された。第一近似としては、この分解能はTERSチップの曲率半径によって決まるもので、この「8 nm」は実はチップの半径とナノチューブ形状の畳み込みである。したがって実現可能なTERS分解能を近似することが可能であり、それはTERSチップの曲率半径の1/2に等しいと考えら

れる。Figure 2に示される例のTERSマップは、Dバンドの強度(白と緑のピクセルで示されている)は格子構造の欠陥を示しており、これに対して赤色の領域はCNTの完全なグラファイト構造の配列を2Dバンドの強度を通して表している。局在的な格子欠陥の近傍ではステップが一段進むとDピーク強度が明らかに上昇しており、チューブに沿う方向の1.3 nmの範囲で化学組成感度あることが示されている。

### 生物学におけるTERSの応用

生物学分野のTERSの研究は、当初、核酸塩基やアミノ酸などの純粋成分が対象であった。通常の核酸塩基すべてについてチップ増強ラマンスペクトルが報告されており、非近接場スペクトルに比べ信号が増強された特徴的なピークを示している。ラマン信号をプラズモンにより増幅することで、ピコモルレベルの核酸塩基をラベルフリーで検出することが可能となる<sup>[16]</sup>。またTERSの研究により核酸塩基の相違に基づく明確なシグネチャー(識別遺伝子)をRNAとDNAから検出できることも示され、直接、核酸シーケンシング(塩基配列決定)をラベルフリーで実現できる可能性が見出されている(Figure 3)。原理上、この手法は紫外線

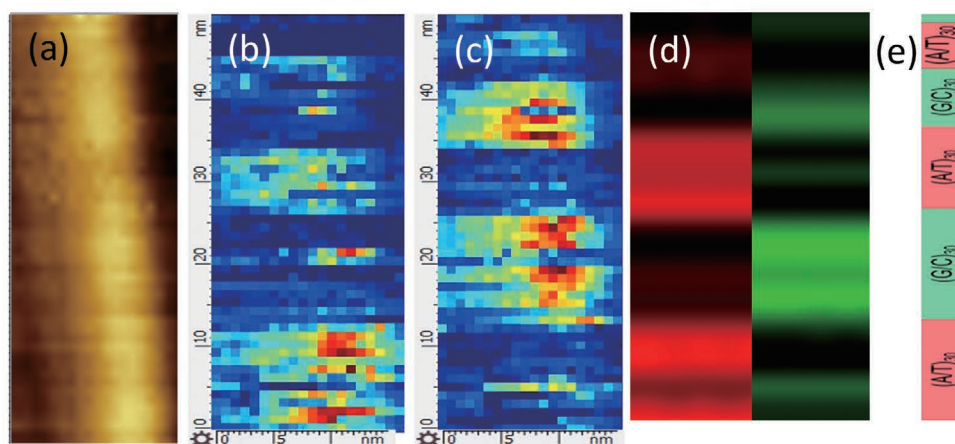


Figure 3 (a) AFM topography of engineered DNA, (b)-(c) corresponding TERS spectral mapping of over 50 × 20 nm<sup>2</sup> showing clear differentiation of spectral regions of pattern and size consistent with the expected (b) A/T and (c) G/C homopolymeric blocks, (d) horizontally averaged spectral map from the previous TERS maps, showing a good agreement with the (e) original sequence. (Data courtesy of Dr Noah Kolodziejski, Radiation Monitoring Devices.)



等の環境ストレスや遊離基等の代謝副産物によって生じるDNAの化学修飾の検出に適用可能であり、これによってDNA修復機構について重要な理解がもたらされる可能性がある。シスチンおよびヒスチジンの単分子膜から得られたチップ増強ラマンスペクトルからそれらの表面に相異なるイオン化状態が存在することが明らかになり<sup>[17]</sup>、このことがヒストン形成に関連している。同じような化学的特異性はタンパク質についても実証されている。シトクロムcのチップ増強ラマンスペクトルからは、アミノ酸および関連するヘム部分を示す明瞭なスペクトルに加え、これらの分子の向きの違いに起因する特性の違いも示された<sup>[18]</sup>。これらの結果は、高感度ではあるが分析対象物から得られる情報が集合的であるSERSとは対照的であった。

さらに、神経変性疾患に関与する多タンパク質複合体であるアミロイド線維の表面分析研究にもTERSは応用された。その結果、原線維表面におけるアミノ酸組成と二次構造(コンフォメーション、立体構造)が解明されている。これによって、原線維の全体構造と比べてあまり理解が進んでいない原線維の表面構造の分析において、TERSのポテンシャルがはっきりと示された。最近ではTERSによってインスリン原線維の多形構造を識別する研究もされるようになってきているが、それも表面組成に基づいている。原線維多形体の違いによって毒性レベルが決まるため、それらの増殖機構がわかれば適切な阻害剤を設計できる可能性がある。ふたつのインスリン原線維多形体(「フラット型」と「ツイスト型」)の表面の化学組成がインスリンのプロトフィラメントの表面組成に関係することに基づいて、原線維成長過程においてこれらの多形体から増殖が進むことを特徴とするメカニズムが提唱されている<sup>[19]</sup>。

## 複雑な生体システムへのTERSの応用

TERSは核酸やアミロイド原線維といった多成分試料に関する研究の他にも複雑な生体システム、例えばウイルスの表面、細菌、ヒト細胞などの生化学的組成の研究にも応用されてきた。タバコモザイクウイルスから取得されたチップ増強ラマンスペクトルは、ウイルス外被タンパク質とRNAからの明確な化学物質信号を示す。最近の研究で水痘帯状疱疹ウイルスと豚テッショウウイルスを区別するのにTERSが用いられたが、その際は2つのウイルスの表面のタンパク質と脂質の組成の違いが利用された<sup>[20]</sup>。特に注目すべき点は、ヒト赤血球に含まれる膜タンパク質をチップと分析対象の両方を浸した水溶液中で検出したことである<sup>[21]</sup>。この試みはまだ探求途上であるが、生体物質を自然環境下で分析することが可能であり、レーザー照射による温度上昇に伴う試料の分解や酸素の介在による光退色を最低限に抑えられるという利点がある。大型で、複雑、かつ不均質な細胞表面を対象とする場合、ナノメートルレベルの形状特性に関わる課題に直面する可能性がある。この対処

として、暗視野顕微鏡法により観察可能な抗体結合性ナノ粒子を標的とする手法が提案されている<sup>[22]</sup>。この場合、細胞表面と抗原の間で起こる特殊な相互作用をTERSで探ることができる。この方法によって、損傷を受けていないきれいな細胞膜表面上でのインテグリン受容体の検出ができるようになった<sup>[23]</sup>。

## おわりに

TERSは特徴的な化学的信号をナノメートルレベルの分解能で取得する新技術であり、表面の化学状態や組成分析に適用できる。それゆえ、TERSは超高解像の化学イメージング技術と言える。さらに良く言えば、ラベルフリーの超高解像のイメージング技術でもある。本稿で述べた生物学的応用の進歩と同時に測定装置の設計も向上している。現在では、一点をTERS測定する装置としてではなく、試料表面の形状プロファイルとTERSハイパースペクトラルイメージング(スペクトル計測に基づくイメージング技術)とを組み合わせた装置として市販されている。空間分解能は当初50 nmだったが、現在は~10 nmも達成できている。最近では水溶液中での測定例も報告されており、元来の条件下における生体物質のラベルフリー検出という、TERSの可能性を実現するものとして期待される。

## 参考文献

- [1] "Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy", R. M. Stöckle, Y. D. Suh, V. Deckert, and R. Zenobi, *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 131(2000).
- [2] "Improving resolution in quantum subnanometre-gap tip-enhanced Raman nanoimaging", Y. Zhang, D. V. Voronine, S. Qiu, A. M. Sinyukov, M. Hamilton, Z. Liege, A. V. Sokolov, Z. Zhang and M. O. Scully, *Scientific Reports*, **6**, 25788(2016).
- [3] "Nanoscale imaging and identification of a four-component carbon sample" E. Sheremet, R. D. Rodriguez, A. L. Agapov, A. P. Sokolov, M. Hietschold, D. R.T. Zahn, *Carbon*, **96**(2016)588-593.
- [4] "20-nm-Resolved Stress Profile in SiGe Nano-strips Obtained by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy", M. Chaigneau, G. M. Vanacore, M. Bollani, G. Picardi, A. Tagliaferri and R. Ossikovski, *Handbook of Enhanced Spectroscopy*, Chapter 13, (Pan Stanford Publishing 2014).
- [5] "Simultaneous topographical, electrical and optical microscopy of optoelectronic devices at the nanoscale", N. Kumar, A. Zoladek-Lemanczyk, A. A. Y. Guilbert, W. Su, S. M. Tuladhar, T. Kirchartz, B. C. Schroeder, I. McCulloch, J. Nelson, D. Roy and F. A. Castro, *Nanoscale*, **9**(8), 2723-2731 (2017).
- [6] "Side-illuminated tip-enhanced Raman study of edge phonon in graphene at the electrical breakdown limit", Y. Okuno, S. Vantasin, I. S. Yang, J. Son, J. Hong, Y. Y. Tanaka, Y. Nakata, Y. Ozaki, N. Naka, *Appl. Phys. Lett.*, **108**, 163110(2016).
- [7] "Preparation of gold tips suitable for tip-enhanced Raman spectroscopy and light emission by electrochemical etching", B. Ren, G. Picardi, B. Pettinger, *Rev. Sci. Instruments.*, **75**, 837-841 (2004).
- [8] "Enhancement of Raman signals with silver-coated tips.", B. S. Yeo, W. Zhang, C. Vannier, R. Zenobi, *Appl. Spectrosc.*, **60**(10), 1142-1147(2006).
- [9] "Highly reproducible tip-enhanced Raman scattering using an oxidized and metallized silicon cantilever tip as a tool for everyone", N. Hayazawa, T. Yano, S. Kawata, *Journal of Raman Spectroscopy*, **43**(9), 1177-1182(2012).
- [10] "The controlled fabrication of "Tip-On-Tip" TERS probes", Y. Yang, Z. Y. Li, M. Nogami, M. Tanemura, Z. Huang, *RSC Advances*, **4**(9), 4718-4722(2014).
- [11] "Rational fabrication of a gold-coated AFM TERS tip by pulsed electrodeposition", L. K. Yang, T. X. Huang, Z. C. Zeng, M. H. Li, X. Wang, F. Z. Yang, B. Ren, *Nanoscale*, **7**(43), 18225-18231 (2015).
- [12] "Facile Fabrication of Spherical Nanoparticle-Tipped AFM Probes for Plasmonic Applications", A. Sanders, L. Zhang, R. W. Bowman, L. O. Herrmann, J. J. Baumberg, *Particle & Particle Systems Characterization*, **32**(2), 182-187 (2015).
- [13] "Nano-Raman spectroscopy with metallized atomic force microscopy tips on strained silicon structures", L. Zhu, C. Georgi, M. Hecker, J. Rinderknecht, A. Mai, Y. Ritz and E. Zschech, *J. Appl. Phys.*, **101**(10), 104305(2007).
- [14] "Optical antennas for tunable enhancement in tip-enhanced Raman spectroscopy imaging", I. Maouli, A. Taguchi, Y. Saito, S. Kawata, P. Verma, *Applied Physics Express*, **8**(3), 032401(2015).
- [15] "Tuning Localized Surface Plasmon Resonance in Scanning Near-Field Optical Microscopy Probes", T. L. Vasconcelos, B. S. Archanjo, B. Fragneaud, B. S. Oliveira, J. Riikonen, C. Li, D. S. Ribeiro, C. Rabelo, W. N. Rodrigues, A. Jorio, C. A. Achete, L. G. Cancado, *ACS Nano*, **9**(6), 6297-6304(2015).
- [16] "Tip-enhanced Raman spectra of picomole quantities of DNA nucleobases at Au(111)", K. F. Domke, D. Zhang, and B. Pettinger, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6708(2007).
- [17] "Spectroscopic imaging of biological samples using near-field methods", L. Langelüddecke, T. Deckert-Gaudig, and V. Deckert, *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, Chapter 11, Wiley-VCH, (2014).
- [18] "Tip-enhanced Raman spectroscopy can see more: The case of cytochrome C", B-S. Yeo, S. Mädlar, T. Schmid, W. Zhang, and R. Zenobi, *J. Phys. Chem. C* **112**, 4867(2008).
- [19] "Surface characterization of insulin protofilaments and fibril polymorphs using tip-enhanced Raman spectroscopy(TERS)", D. Kurouski, T. Deckert-Gaudig, V. Deckert, and I. K. Lednev, *Biophys. J.* **106**, 263(2014).
- [20] "A manual and an automatic TERS based virus discrimination", K. Olschewski, E. Kämmer, S. Stöckel, T. Bocklitz, T. Deckert-Gaudig, R. Zell, D. Cialla-May, K. Weber, V. Deckert, and J. Popp, *Nanoscale*, **7**, 4545(2015).
- [21] "Tip-enhanced Raman spectroscopy - Its status, challenges and future directions", B-S. Yeo, J. Stadler, T. Schmid, R. Zenobi, and W. Zhang, *Chem. Phys. Lett.* **472**, 1(2009).
- [22] "Tip-enhanced Raman detection of antibody conjugated nanoparticles on cellular membranes", K. D. Alexander and Z. D. Schultz, *Anal. Chem.* **84**, 7408(2012).
- [23] "TERS detection of  $\alpha_v\beta_3$  integrins in intact cell membranes", H. Wang and Z. D. Schultz, *Chem. Phys. Chem.* **15**, 3944(2014).

**Marc CHAIGNEAU**

AFM/Raman Product Manager  
Sales & Marketing Division  
HORIBA FRANCE SAS  
Ph.D.

**Maruda SHANMUGASUNDARAM**

Application Scientist  
HORIBA Instruments Inc.

**Fran ADAR**

Raman Principal Scientist  
HORIBA Instruments Inc.  
Ph. D.

## 分光エリプソメトリーによる バイオリフサイエンスのアプリケーション

Spectroscopic Ellipsometry Application in Life Science

### はじめに

直線偏光を平坦な表面に斜入射すると、反射光は一般に楕円偏光に変わる。分光エリプソメトリー (Spectroscopic Ellipsometry: SE) は、この偏光状態の変化を非破壊、非接触で測定する手法である。この測定手法により得られたデータに対して光学モデルを作成し、フィッティング計算をすることにより薄膜の膜厚(d)および光学定数(屈折率n, 消衰係数k)を求めることができる<sup>[1]</sup>。

分光エリプソメトリーは約30年前から半導体分野を中心に使われてきたが、ここ10年でディスプレイ、太陽電池、化学、金属など様々な分野で使われるようになった。分光エリプソメトリーは膜厚と光学定数の他に、バンドギャップ、組成、電気特性(抵抗率、キャリア密度、移動度)も求められる。また、液中のサンプルに対しても測定ができる。近年はバイオリフサイエンスの分野においても、分光エリプソメトリーが使われるようになってきており、本稿ではその例を紹介する。

### バイオリフサイエンスのアプリケーション

#### DLC膜の生体親和性<sup>[2]</sup>

本研究は東京電機大学と共同で行われたものである。ダイヤモンドライクカーボン(Diamond-like carbon: DLC)膜は高硬度、高耐摩耗性、高化学安定性といった特性があることで知られている。また、生体親和性も高いことから、近年、人工血管や人工心臓などの表面改質膜といった医療・生体分野への応用が期待されている。一方で、DLC膜は成膜方法や条件によってダイヤモンド結合(sp<sup>3</sup>)とグラファイト結合(sp<sup>2</sup>)の比や水素化の状態が変わり、それが構造や物性の違いとして現れる。DLC膜の生体親和性はこの違いの影響を強く受け、状態によっては生体親和性が悪くなる。よって、DLC膜の構造や物性を評価することは重要である。本研究では様々なDLC膜を分光エリプソメトリーで測定し、光学定数と生体親和性の関係について調べた。

DLC膜は化学気相堆積(Chemical vapor deposition: CVD)法によってポリ塩化ビニル(PVC)、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、ポリスチレン(PS)の細胞培養ディッシュの上に蒸着し<sup>[3]</sup>、その上にマウス由来の繊維芽細胞(NIH-3T3)を用いて細胞増殖を行った。細胞増殖は吸光度測定より求め、DLC膜の屈折率は分光エリプソメトリー

### 森山 匠

Takumi MORIYAMA

### ナバトバ-ガバイン ナタリア

Nataliya NABATOVA-GABAIN

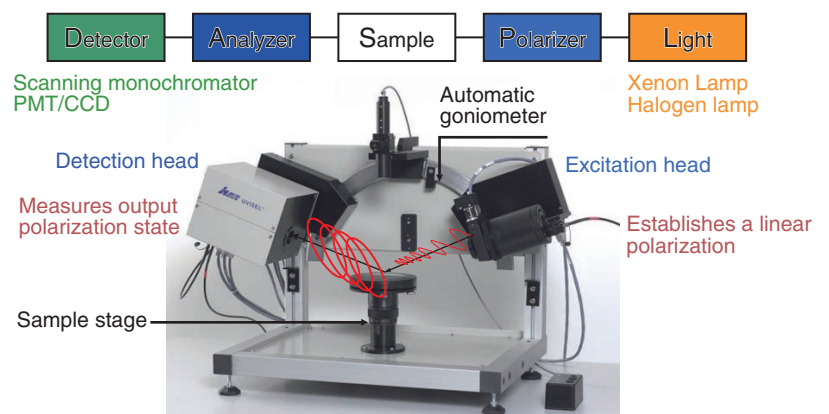


Figure 1 Setup of spectroscopic ellipsometer (UVISEL)

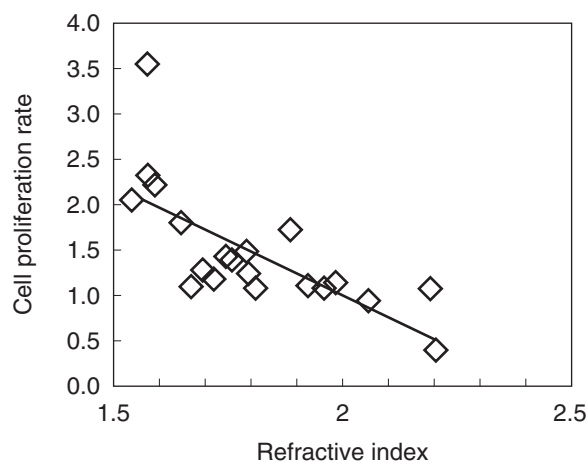


Figure 2 Correlation between refractive index and cell proliferation rate<sup>[3]</sup> (Correlation coefficient "r" = 0.71, Significant difference "P" = 0.0004)

によって求めた。Figure 2に細胞増殖比とDLC膜の屈折率の相関を示す。ここでDLC膜が付いていない細胞培養ディッシュの上に細胞を増殖させたときの細胞増殖比を1と定義した。

その結果より細胞培養ディッシュ上のDLC膜の屈折率が低いと、その上で培養させた細胞増殖比が大きくなることがわかった。また、DLC膜に含まれる水素の濃度が高いと屈折率が低くなることがわかっており、この高い水素濃度がDLC表面の細胞増殖を促進させると考えられる。この結果は分光エリプソメトリーを使うことにより、DLC膜の生体親和性が評価できることを示している。

### 歯表面の脱灰と再石灰<sup>[4]</sup>

本研究は東京医科歯科大学と共同で行われたものである。歯は酸に浸されるとミネラル密度が小さくなる「脱灰」が起こり、唾液中に浸されるとミネラル密度が回復する「再石灰化」が起こる。

本研究では分光エリプソメトリーを用いて、以下のように脱灰と再石灰化の状態を評価した。

- (1) 歯を酸に浸し表面を脱灰させる
- (2) 脱灰させた歯を唾液中に浸し再石灰化を促進させる。このとき、唾液中に浸す時間はサンプル毎に異なる
- (3) 再石灰化させた歯をブラッシングする
- (4) ブラッシング前後の歯をそれぞれ分光エリプソメトリーで測定し、Figure 3aに示す光学モデルから有効粗さの差を求めた。

結果をFigure 3に示す。これより、唾液中に浸す時間が長くなるとブラッシング前後の有効粗さの差が小さくなることがわかった。この結果は唾液による歯表面の再石灰化の効果を示しており、食後の歯磨きはすぐに行うのではなく、時間をあけてから行ったほうがよいということを示唆している。以上のように、分光エリプソメトリーは歯表面の脱灰と再石灰化の状態を確認することが可能である。また、これより人口唾液などへの応用も期待される。

### おわりに

分光エリプソメトリーはDLC膜が生体親和性に適しているかを簡便に評価することができる。また歯表面の状態を評価することも可能である。今後、分光エリプソメトリーが、バイオリフサイエンスでさらに利用されることを期待する。

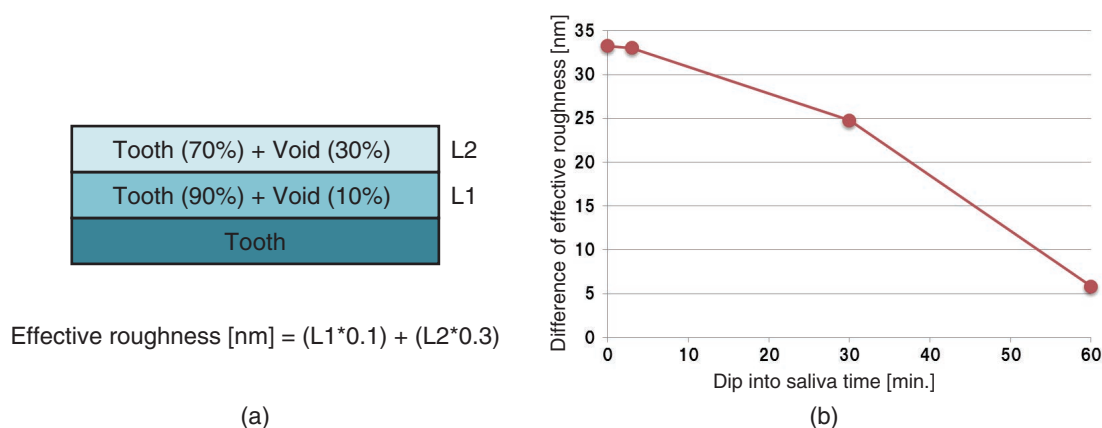


Figure 3 (a) Optical model of tooth and (b) difference of effective roughness after brushing as function of dip into saliva time..

## 謝辞

研究を進める上で有益な議論をいただき、本稿への掲載許可をいただいた、東京電機大学の平栗健二先生、東京医科歯科大学のサダル アリレザ先生、中嶋省志先生、北迫勇一先生、田上順次先生に感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] 平川 誠一 他, HORIBA Technical Reports, 21, 26(2000)
- [2] 特開2014-57578
- [3] Y. Murayama, *et al.*, Abstract of 2016 Hong Kong International Conference on Engineering and Applied Sciences, HKICEAS-4905
- [4] 特開2016-128780



### 森山 匠

Takumi MORIYAMA, Ph.D.

株式会社 堀場テクノサービス  
分析技術センター 博士 (工学)  
Analytical Technology Center  
HORIBA TECHNO SERVICE Co., Ltd.



### ナバトバ - ガバイン ナタリア

Nataliya NABATOVA-GABAIN

株式会社 堀場テクノサービス グローバル戦略本部 マネジャー  
Manager  
Global Strategy Division  
HORIBA TECHNO SERVICE Co., Ltd.

### 平成28年度近畿地方発明表彰

#### 京都発明協会会長賞

#### 排ガス中の吸着性ガス分析装置(特許第5667912号)

##### 表彰の概要

本発明表彰は、近畿地方における発明の奨励・育成を図り、科学技術の向上と地域産業の振興に寄与することを目的としており、近畿地方において優秀な発明、考案、又は意匠(以下「発明等」という。)を完成された方々、発明等の実施化に尽力された方々、発明等の指導、奨励、育成に貢献された方々の功績を称え顕彰するものである。HORIBAからは特許第5667912号(排ガス中の吸着性ガス分析装置)が京都発明協会会長賞を受賞した。

##### 表彰案件内容

排ガス中に含まれるアンモニア(以下、 $\text{NH}_3$ )・ヒドロカーボン(以下、HC)等の吸着性の高いガス(以下、吸着性ガス)成分の濃度を高精度かつ高応答に測定する吸着性ガス分析装置に関する発明である。

従来の $\text{NH}_3$ の濃度測定に用いられるガス分析装置は、自動車等の排気管から出る排ガスをサンプリング配管によって測定セルに導入して、 $\text{NH}_3$ の濃度を測定するものであった。しかしながら、排ガス中に含まれる $\text{NH}_3$ 等の吸着性ガスがサンプリング配管やポンプの内壁に付着することで、 $\text{NH}_3$ 等の吸着性ガスの濃度を精度良く測定することが難しいという課題があった。また、濃度測定にフーリエ変換赤外分光計(FTIR)又は非分散型赤外線分析法(NDIR)を用いていたので、測定セル内をほぼ大気圧と同等にする必要があり、測定セル内に吸着性ガスが吸着してしまうという課題があった。さらに、排ガス中に含まれる吸着性ガスが低濃度である場合、配管や内壁等への付着により、測定セル内に導入されるまでに時間を要することから、応答速度が著しく低下するという課題があった。

本発明の吸着性ガス分析装置(Figure 2及びFigure 3参照)は、濃度測定にレーザー光を用いた吸光光度法を用いることで、測定セル(21)を大気圧と同等の圧力にする必要がなくなったことに着目してなされたものである。具体的には、測定装置本体(2)の外部に設けられた加熱管(4)の上流側端部に流量制限部(32)を設け、負圧ポンプ(24)を用いて、測定セル(21)内及び流量制限部(32)の下流側から測定セル(21)までの流路を負圧にしている。このため、排ガスの流入圧力によって流量制限部(32)の下流側が正圧になることを防止し、サンプリング開始時から測定終了時までの排ガス流路を負圧に維持することに成功した。こ



Figure 1 平成28年度近畿地方発明表彰表彰式の様子



Figure 2 本発明が搭載されている装置(MEXA-ONE-QL-NX)

れにより、排ガス中に含まれる吸着性ガスが、サンプリング開始時から測定終了時までの排ガス流路内の配管等に付着することを防止し、応答速度を向上させると共に、吸着性ガスが低濃度であっても精度良く測定可能となる。また、加熱管(4)の上流側端部に流量制限部(32)が設けていることから、負圧にされた排ガスが加熱されることになり、加熱管(4)内の結露に伴う吸着性ガス成分の溶解損失をより一層防止することで、吸着性ガスの濃度をより高精度に測定可能となる。

本発明は、これらの点が評価され、2012年度のSAE World Congress Tech Award, 及び2013年度のレーザー学会産業賞「優秀賞」を受賞した。

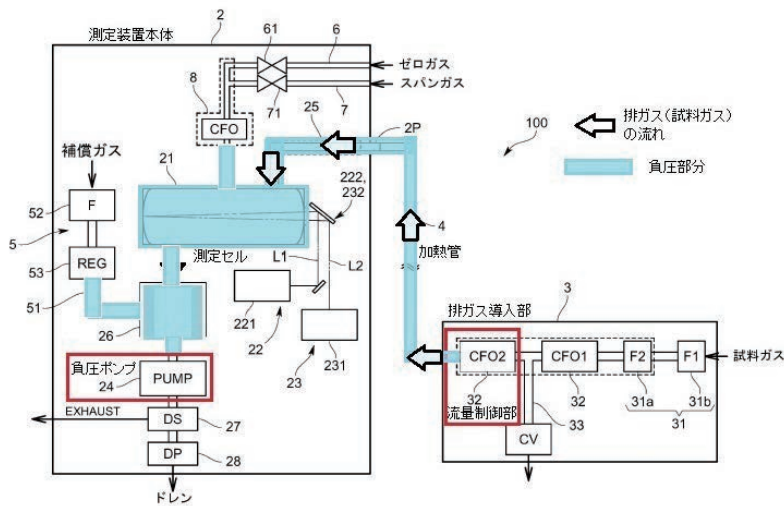


Figure 3 本発明による効果を示す図(特許公報より)

【登録番号】

特許第5667912号

【発明者】

原健児, ラーマン・モンタジール, 中谷茂, 中根正博

その他受賞案件

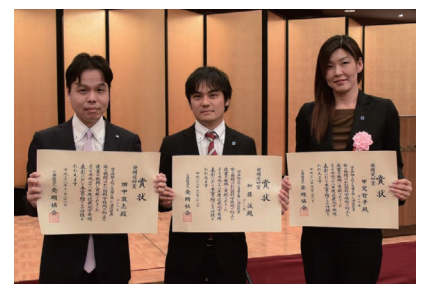
受賞名	特許番号	名称	発明者氏名
発明奨励賞	特許第5658059号	サーモパイル素子を用いた熱型赤外線センサ	古川泰生, 大須賀直博, 高田秀次
発明奨励賞	特許第5411096号	粒子物性測定セル及び粒子物性測定装置	山口哲司, 名倉誠
発明奨励賞	特許第4176241号	ノーマリクローズ型流体制御弁	西川正巳, 林繁之, 正田敏
発明奨励賞	特許第5641646号	液の接触を防ぐ気層を用いた滴定装置	甲斐智子, 田中敦志, 加藤誠



Figure 4 平成28年度近畿地方発明表彰 HORIBA受賞者 特許第5667912号, 特許第5658059号, 特許第5411096号



特許第4176241号



特許第5641646号

### 第7回HORIBA Group IP World Cup Gold Award受賞案件の紹介



Figure 1 HORIBA Group IP World Cup

HORIBAグループで生まれた数々の独創的な技術や知的財産が事業の推進力となってきた。技術開発とその成果たる知的財産がHORIBAブランドの本質的な要素であり、HORIBA Group IP World Cup (Figure 1) は、HORIBA Group is One Companyの精神のもと、事業を牽引する技術・知的財産をグループ全体で賞賛し、次なる成長の起爆剤となる技術・知的財産の創出をさらに奨励していくことを趣旨として創設された。

第7回HORIBA Group IP World Cup\*では、海外を含むHORIBAグループの開発拠点から22件の応募があった。2018年3月23日に第7回HORIBA Group IP World Cupの授賞式が行われ、ホリバABX社(フランス)の「Compact automatic blood analyzer(コンパクト自動血液検査装置)」がGold Awardを受賞した。この知的財産は、低価格かつ高性能な検査装置を実現するために複数の技術を組み合わせたものであり、HORIBAグループを代表する技術として以下に紹介する。

\*：第7回では、2016年7月1日から2017年5月31日の間に創作、出願、論文発表、特許登録、または外部表彰を受賞したなどの知的財産を対象としている。

### コンパクト自動血液検査装置

#### Gold Award受賞案件の概要

低価格かつ高性能な検査装置という小規模検査施設の市場要求に応えるべく、コンパクト自動血液検査装置Yumizen H500/550 (Figure 2) は開発された。以下のような革新的な技術・ユニークな機能を組み合わせるため、装置開発に際してマーケティング部門・開発部門・サプライチェーン部門からなるチームを組織し、ノウハウや技術者を集めた。

- 重力を利用してラックを取り除く機構を搭載し、ハードウェアの削減を実現したコンパクトなラックローダー。これにより装置の取扱いが容易になり、保守の手間を削減できた。
- 1種類でヘモグロビン測定と白血球計数・分類が同時に行えるようにした溶血試薬。
- 試薬消費量の低減化により廃液量の削減し、廃液処理の手間を軽減。
- 最適化された光学系と移動閾値マトリックスを用いた信号処理手法で白血球分画の直線性と精度が向上し、より信頼性の高い測定結果を提供できるようになった。
- 確実なサプライチェーンに最適化された梱包形態
- MOSAR (Medical Open System ARchitecture) と呼称したハードウェアとソフトウェアを見直した新規なシステムアーキテクチャ。今後のYumizenシリーズの全製品に採用予定である。



Yumizen H500/550は個人医師の診療室からサテライトラボまで様々な検査場の要望に合うように設計されており、5大陸の80以上の国で販売されている。今や世界で1000人以上のユーザーがYumizen H500/550で迅速かつ総合的な血液診断を行っている。昨今求められている品質・接続性を満たすために、Yumizen H500/550ではHORIBAの医用製品として初めてHL7通信規格(医療情報交換用)に適合している。このように、Yumizen H500/550に組み込まれた技術は、将来の医用製品を開発する際に基礎となる技術である。また、人間工学を詳細に検討することで、Yumizen H500/550では使いやすいインターフェースと簡単な操作を実現している。最小限のトレーニングでも血液検体を安全なワークフローで装置をすぐに操作できる。ユーザーの安全性を確保しながら最大限自動化が実現できる検体処理の設計がなされている。例えば操作に専念しなくてよい装置構成、様々な血液検体に対する互換性、バーコードによる血液検体の同定システム、自動搬送と自動攪拌、緊急検体測定モード、検体容器の継続搬送である。

非常にコンパクトな設計を基本にYumizen H500/550は以下の市場要求に適應するため開発が行われた。

- Yumizen H500 OT：オープンチューブ用の装置では、多種の検体容器を取り扱えることにより、救命医療・救急・小児科での早急な検査に対応している。
- Yumizen H500 CT：クローズドチューブ用の装置で、キャップピラスチューブを扱うことができるので、検査室の衛生と安全の要求に対応している。
- Yumizen H550：高度な自律性と検体の自動化処理により、操作に専念しなくてよくなった。自動搬送機構は上位機種Yumizen H1500/2500で使用されている10検体ラックが使用できるように設計されている。そのため、Yumizen H550はYumizen H1500/2500が使用できないときのバックアップとしても使うことができる。

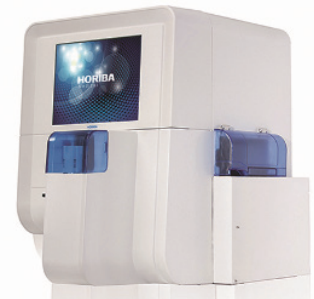


Figure 2 Yumizen H500シリーズ  
(上からYumizen H500 OT,  
Yumizen H500 CT, Yumizen H550)

### 第7回HORIBA Group IP World Cup受賞者



#### 【Gold Award】

##### 【受賞課題】

コンパクト自動血液検査装置

HORIBA ABX SAS

受賞者 Jean-Emmanuel Laravine,  
Guilhem Couderc

#### 【Silver Award】

##### 【受賞課題】

RDE試験ルートに関するソフトウェアツール  
(RDE+ Coach)

HORIBA MIRA Limited

受賞者 Richard Mumby

#### 【Bronze Award】

##### 【受賞課題】

分析装置及び校正方法

HORIBA, Ltd.

受賞者 水野 裕介, 青山 朋樹, 松尾 公佑,  
松本 絵里佳

#### 【Honorable Mention】

##### 【受賞課題】

炭素/硫黄分析装置のダスト集塵機構

HORIBA, Ltd.

受賞者 井上 貴仁, 平田 泰士, 黒住 拓司

---

## Readout HORIBA Technical Reports August 2018 No.49

発行日 2018年8月20日  
発行人 青山 剛士  
発行元 株式会社 堀場製作所  
〒601-8510 京都市南区吉祥院宮の東町2番地

<http://www.horiba.com/jp/publications/readout/>



DTP・製版・印刷・製本

株式会社 写真化学

### <Readout編集委員会>

委員長 青山 剛士  
副委員長 野村 聡  
編集委員 吉岡 誠一郎, 河野 猛,  
Marinella SANDROS  
編集局 中田 靖

### お問い合わせ先

株式会社 堀場製作所 開発本部 開発企画センター  
Tel:075-313-8121 (代)  
e-mail:readout@horiba.co.jp

# HORIBA

Explore the future



この印刷物は、EPAのシムルバー基準に適合し、  
地球環境に配慮した印刷方法にて作成されています。  
EPA：環境保護印刷推進協議会  
<http://www.e3pa.com>