

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22350035

研究課題名(和文) 溶液中非蛍光性化学種の無標識超高感度分離検出最終形

研究課題名(英文) The final form for highly sensitive and non-labeling separation-detection of non- or less-fluorescent chemicals in liquid solutions

研究代表者

原田 明 (Harata, Akira)

九州大学・総合理工学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90222231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：溶液中にある非蛍光性の化学種を無標識のままに超高感度で分離検出する方法の最終形として、“深紫外光励起光熱変換効果のヘテロダイン干渉検出”と“マイクロ液体クロマトグラフィー”との組み合わせで構成される新規装置を開発した。屈折率変化の高精度計測のためヘテロダイン干渉計とマイクロ流路系液体セルを結合した計測システムを構築して、光熱変換信号検出に初めて成功し、微量液体試料中の化学種の無標識・分離・高感度検出を可能とした。また、生体関連アミノ酸全20種類の無標識・分離条件を確認した。

研究成果の概要(英文)：As an ultimate method for highly sensitive and non-labeling separation-detection of non- or less-fluorescent chemical species in liquid solutions, a new equipment is developed in coupling micro-liquid chromatographic separation with the heterodyne interferometric detection of ultraviolet-laser excited photothermal effects. Photothermal signal is successfully detected with heterodyne interferometer for liquid sample in micro-flow cells. Separation condition is assigned for non-labeled 20 kinds of biologically important amino acids.

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：5304

キーワード：分析科学 1分子計測 非蛍光性化学種 紫外レーザー分光 光熱変換 ミクロ液体クロマトグラフィー
ヘテロダイン検出 生体・環境関連化学種

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体中や環境中の比較的小さな化学種(分子量:数10~数100程度)には、不完全抗原(ハプテン)、内分泌攪乱物質、発がん性物質に代表されるように、極微量ながら高い生理活性を示すものが多く存在している。これらの超高感度検出を実現する汎用的な手法を確立すれば、生命・環境関連の科学を一新させる強力な分析手法となる。

(2) 標的となる化学種のほとんどは非蛍光性(弱蛍光性)であり、単一分子検出が可能にほど高感度な蛍光法を利用できない。蛍光性の物質で標識することは一般的だが、原理上、目的物を数え漏らすという問題を常に抱えている。一方、深紫外域の光吸収は全ての化学種が有する特性であり、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に対し、深紫外域の光を利用する光熱変換分光法、多光子イオン化分光法、電気化学検出法、荷電粒子検出法等に基づく検出器を接続する手法が研究されてきた。中でも、光熱変換分光法は汎用性に優れた点で最も有望である。

(3) 光熱変換分光法を用いる検出器の主な課題は“適用性拡大”、“高感度化”、“分離分析法との結合”にある。

(4) 適用性拡大には、励起光源の出力・安定性が鍵となる。あらゆる生体関連物質が吸収を示し、かつ、分離分析用の溶媒(リン酸緩衝液、アセトニトリル等)が吸収を示さない波長域(深紫外域、212-220 nm)は、液体中の分子をカウンティングする上で最も重要な唯一の窓である。申請者は212-220 nmの波長域を利用することで生体関連の最も重要な化合物の一つであるアミノ酸の無標識分離検出を可能とした。しかし、光源の性能不足により検出感度が紫外吸光法より若干勝る程度に留まった。将来的には出力が10Wを超える全固体深紫外レーザー光源の開発が期待され、適用性の更なる拡大が見込まれている。

(5) 高感度化については、2001年に渡慶次、北森ら東京大学グループにより、時間平均で0.3分子の検出下限が報告された。しかし、標的とする化学種が限定されており、分離条件も制限されていることに加え、単一分子検出(分子カウンティング)レベルに到達するには更に2桁程度の感度向上が必要である。申請者はこれまでに無蛍光性化学種の過渡吸収を利用した光熱変換多色増幅分光分析を手掛け、215 nm紫外光励起・532 nm可視光増幅によって無標識アミノ酸の13倍の感度向上を実証している。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、“深紫外励起光熱変換効果の顕微(ヘテロダイン干渉計)検出”と“マイクロ液

体クロマトグラフィー”との組み合わせから構成される新規装置を開発することで、蛍光法に匹敵する検出感度を無標識の化学種に対しても実現すべく研究に取り組んだ。

(2) 具体的には、次の目標を掲げて検討した。

- 1) ミクロ液体クロマトグラフィー/深紫外励起・多色増幅型光熱変換計測系の改良
- 2) 分子計数条件の理論的検討と最適装置の設計指針の提示
- 3) 溶液中アミノ酸等の無標識単一分子カウンティングの実証
- 4) 溶液中アミノ酸・核酸塩基等の無標識・超高感度分離分析の実現

3. 研究の方法

(1) 本課題で提示した溶液中非蛍光性化学種の無標識超高感度分離検出装置では、分離と検出を共に最適な条件とする装置系の構築に主眼点を置いた。申請者は研究課題に着手した平成21年10月時点においてマイクロHPLC/深紫外励起多色増幅型光熱変換検出装置を試作し、標的としている試料と疎水性のカラム充填剤との相互作用を利用した逆相モードによる分離分析を検証していた。しかし、光熱変換分光法による検出では、分離用溶媒が水相である逆相モードよりも、有機相を利用可能な親水性相互作用(HILIC)モードによる分離の方が、熱の局在化が生じやすい等のため、信号強度が大きく得られる。そこで、生体関連化合物について、HILICモードによる分離条件の検討を行うとともに、検出器部位の最適化に取り組むことで、単一分子カウンティングの実現に挑戦した。

(2) 検出部位の超高感度検出に必要なとされる具体的な条件は、次の3つである。(a)光源出力、(b)検出系の最適化、(c)検出部流路の最適化。(a)は励起光源の出力に関わる。Tiサファイアレーザーの第4高調波発生に使用する非線形光学結晶を新装し、標的としている化学種の基底状態からの励起効率を高めた。(b)に関しては、従来、レーザー発振の安定性に欠ける半導体レーザーを検出用の光として用いていたことが感度低下の要因になっていた。そこで、これを安定性に優れるHe-Neレーザーへと置き換えた。更に、検出系を株式会社神戸製鋼所技術開発本部電子技術研究所のグループにより開発されたヘテロダイン干渉計へと発展させることで、光熱変換信号検出におけるノイズの大幅低減を試みた。(c)に関しては、分離した試料がレーザー光を通過する部位およびその周辺の流路について、流路の径、流速、ビーム径等の条件最適化を図った。なお、第一励起状態にある標的の化学種の過渡吸収を利用した多色増幅が可能であるが、まず、第一励起状態の無輻射緩和に伴う局所的な屈折率勾配を利用した検出の最適化を検討している。

4. 研究成果

(1) ミクロ液体クロマトグラフィー / 深紫外励起・多色増幅型光熱変換計測系の改良：ミクロ HPLC に HILIC カラムを導入し、分離用溶媒にアセトニトリル-リン酸緩衝液混合系を利用した系において、光熱変換分光検出器によるクロマトグラムを測定することに初めて成功した。新規導入したアコースティックエンクロージャーの性能をフルに活かした計測システムを構築し、微量液体中化学種の高感度光熱変換検出可能とした。特に、屈折率変化の高精度計測のためヘテロダイン干渉計とミクロ流路系液体セルを結合しての光熱変換信号検出に初めて成功している。一方、高感度化の実現に伴い、分離溶媒であるアセトニトリルの 2 光子吸収が問題となることが新たに見いだされた。この分離溶媒による 2 光子吸収が高感度化を実現する上での深刻な制約となっており、現有のフェムト秒パルス紫外レーザー光源を用いる限りでは、高感度化に限界がある可能性が示唆された。集光を緩める、パルス幅をのばす工夫などでどこまで対応可能かが新たな課題である。

(2) 分子計数条件の理論的検討と最適装置の設計指針の提示：単一分子を計数するには、バックグラウンドノイズを極限まで抑制しつつ、単一分子の無放射緩和により生じる熱を増幅する必要がある。(1)で述べたように、現状、アセトニトリルの 213 nm 紫外光源による 2 光子吸収に伴うバックグラウンドが最も深刻なノイズ源である。このことは、紫外域の光を発するナノ秒レーザー光源を利用することで、溶液中非蛍光性分子の単分子カウンティングをめぐる技術が進展することを意味している。

(3) 溶液中アミノ酸等の無標識単一分子カウンティングの実証：得られた絶対量検出限界は、一般的な紫外分光法による検出器よりも 3 桁高感度の $\text{amol}(10^{-18} \text{ mol})$ に到達していた。

(4) 溶液中アミノ酸・核酸塩基等の無標識・超高感度分離分析の実現：核酸塩基 5 種 (シトシン、ウラシル、グアニン、チミン、アデニン) について、リン酸緩衝液を分離溶媒とした逆相モード (疎水性相互作用を利用) により分離を試みた。分離した試料は紫外吸光法と光熱変換分光法に基づく 2 つの検出器を順に通過するように装置を用意した。分離の成功を紫外分光法にて確認したものの、熱レンズ効果をピンホールを用いて検知する従来型の検出器では、ピーク形状の鋭いピリミジン塩基 3 種 (シトシン、ウラシル、チミン) の検出に留まり、バックグラウンドノイズに対する試料の信号の比率も小さくなった。残り 2 種のプリン塩基は、解離平衡により複数の構造異性体が生じることに起因してクロマトグラムのピークが広がる傾向があると考えられ、紫外分光検出器より下流に設置され

た光熱変換法検出器に到達した時点で試料のフラクションがバックグラウンドレベルまで広がったと考えられる。以上、分離カラム後の流路の最適化が必要なこと、熱レンズ信号の検出手段に改善の余地があることの 2 点を明らかにした。

(5) 生体関連アミノ酸の無標識検出では、ミクロ HPLC/HILIC モードを用い、中性アミノ酸 15 種、酸性アミノ酸 2 種、塩基性アミノ酸 3 種について、それぞれの同時分離に成功した。また、一部のアミノ酸について光熱変換分光法 (顕微熱レンズ法) による検出に成功した。

(6) ニトロ化多環芳香族の分離検出を試みた。ニトロ化された多環芳香族は、他の多環芳香族と同様、微量でも発がん性を示すことが知られているが、ニトロ化に伴って弱蛍光性となるため蛍光検出器では検知できないことが問題となっている。逆相モードのミクロ HPLC に熱レンズ顕微法に基づく検出器を接続し、分離溶媒として水-アセトニトリル混合系を利用することで、他の多環芳香族とニトロ化されたものを同時検出可能な系を構築した。結果、熱レンズ顕微法に適する条件において、6 種類の多環芳香族の混合試料の分離およびクロマトグラム測定に成功した。

(7) ビタミン類について、HILIC モードのミクロ HPLC にヘテロダイン干渉計を接続した装置を用いて、分離条件の検討と光熱変換信号の取得を試みた。分離に成功したビタミン数種類について、ヘテロダイン干渉計によるフラクションの光熱変換信号を測定したが、励起光に用いた波長 375 nm の半導体レーザーでは熱レンズ信号を取得することは出来なかった。一方、ニトロ化した多環芳香族では光熱変換信号が得られ、検出限界 (3σ) が $3.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ と求められた。この違いは化学種ごとの無放射緩和速度の違いを反映していると考えられ、励起光源の更なる最適化 (発振波長、パルス幅や繰り返し間隔等) の必要性が鮮明化した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

原田 明, 溶液中にある非蛍光性化学種の単一分子検出に向けて (Toward single molecule detection of non-fluorescent species in solution, 信学技報 (IEICE Technical Report), Vol. 113, No. 167, US2013-32, pp. 51-54 (2013), 査読無, Noriyuki FUJII and Akira HARATA, Development of the Multi-color Excitation Photothermal Lens Microscope, Proc. 33rd Symposium on Ultrasonic Electronics (Chiba, Japan, 2012), pp331-332, 査読有, Takahiro ONIKI and Akira HARATA, Ultraviolet laser-excited autofluorescence for

aqueous solution of amino acids, Proc. 13rd Cross Straits Symposium on Materials, Energy and Environmental Sciences (Kasuga, Japan, 2011) pp.207-208, 査読無.

Sayaka NOJI, Miki ISODA and Akira HARATA, Direct Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using micro-HPLC/Ultraviolet Excitation Thermal Lens Spectroscopy, Proc. of 13rd Cross Straits Symposium on Materials, Energy and Environmental Sciences (Kasuga, Japan, 2011) pp.171-172, 査読無.

Noriyuki FUJII and Akira HARATA, Observation of Single Yeast Cell with Advanced Photothermal Lens Microscope, Proceedings of the 32th Symposium on Ultrasonic Electronics (Kyoto, Japan, 2011), pp81-82, 査読有.

Noriyuki FUJII and Akira HARATA, Development of Reflection Objective-Employed Collinear Mode-mismatched Thermal Lens Microscope, Jpn. J. Appl. Phys., 50 (2011) 07HC05 (2 pages), 査読有, DOI: 0.1143/JJAP.50.07HC05

Noriyuki FUJII and Akira HARATA, Development of Photothermal Lens UV Imaging Method for Living Cells, Proceedings of the 31th Symposium on Ultrasonic Electronics (Tokyo, Japan, 2010), pp181-182, 査読有.

Hitoshi KATAE, Satoshi HIRASHIMA, and Akira HARATA, Direct detection of gradient-eluted non-labeled amino acids using micro-HPLC with ultraviolet thermal lensing, J. Phys.: Conf. Ser. 214, 012122, 1-4 (2010), 査読有.

[学会発表] (計 2 8 件)

Akira HARATA, Ultrasensitive Detection of Nonfluorescent Molecules in Liquid Solutions [Invited keynote lecture], 15th Beijing conference and exhibition on Instrumental Analysis (Beijing, China, 平成 25 年 10 月 25 日)

原田 明, 溶液中にある非蛍光性化学種の単一分子検出に向けて[招待講演], 第 58 回音波と物性討論会(九州大学筑紫キャンパス、福岡、平成 25 年 7 月 29 日)

野崎 恭平, 原田 明, 多色励起光熱変換分光法の開発, 第 50 回化学関連支部合同九州大会 (小倉、平成 25 年 7 月 6 日)

松本 滉生, 原田 明, マイクロ HPLC を用いた環境関連物質の微量成分分析, 第 50 回化学関連支部合同九州大会 (小倉、平成 25 年 7 月 6 日)

原田 明, 井之上 紗緒梨, micro-HPLC/紫外励起熱レンズ法を用いた無標識化学種の分離高感度検出と溶媒, 第 73 回分析化学討論会 (北海道大学函館キャンパス、平成 25

年 5 月 18 日)

Noriyuki FUJII and Akira HARATA, Development of the Multi-color Excitation Photothermal Lens Microscope, 第 33 回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (千葉大学、平成 24 年 11 月 15 日)

Noriyuki FUJII and Akira HARATA, Three Dimensional Imaging with Multi-color Excitation Photothermal Lens Microscope, 9th International Symposium on NOVEL CARBON RESOURCE SCIENCES (九大筑紫、平成 24 年 11 月 3 日)

井之上 紗緒梨, 原田 明, micro-HPLC/紫外励起熱レンズ法を用いた酸性および塩基性アミノ酸の無標識高感度分離検出, 日本分析化学会第 61 年会 (金沢大学、平成 24 年 9 月 20 日)

藤井 宣行, 原田 明, 反射対物型紫外励起熱レンズ顕微鏡による 3 次元イメージング, 日本分析化学会第 61 年会 (金沢大学、平成 24 年 9 月 19 日)

井之上 紗緒梨, 原田 明, 酸性および塩基性アミノ酸の無標識高感度分離検出, 第 49 回化学関連支部合同九州大会 (小倉、平成 24 年 6 月 30 日)

原田 明, 鬼木 喬玄, 深紫外レーザー励起による非蛍光性アミノ酸水溶液の蛍光スペクトル測定, 第 72 回分析化学討論会 (鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島、平成 24 年 5 月 18 日)

T. ONIKI A. HARATA, Ultraviolet laser-excited autofluorescence for aqueous solution of amino acids, 13rd Cross Straits Symposium on Materials, Energy and Environmental Sciences (CSS13) (Kasuga, Kyushu Univ., Fukuoka, 平成 23 年 11 月 23 日)

Sayaka NOJI, Miki ISODA, Akira HARATA, Direct Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons By Using micro-HPLC/Ultraviolet Excitation Thermal Lens Spectroscopy, 13rd Cross Straits Symposium on Materials, Energy and Environmental Sciences (CSS13) (Kasuga, Kyushu Univ., Fukuoka, 平成 23 年 11 月 23 日)

Noriyuki FUJII and Akira HARATA, Observation of Single Yeast Cell with Advanced Photothermal Lens, 第 32 回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (京都大学、平成 23 年 11 月 9 日)

藤井 宣行, 原田 明, 細胞観察のための広波長域対応型紫外熱レンズイメージング法の開発, 2011 年度 総理工セミナー (千里阪急ホテル、大阪、平成 23 年 9 月 16 日)

野地 紗也加, 磯田 美紀, 原田 明, micro-HPLC/紫外励起熱レンズ法を用いた多環芳香族炭化水素の分離検出, 日本分析

化学会第 60 年会 (名古屋大学、平成 23 年 9 月 14 日)

鬼木 喬玄, 原田 明, 深紫外レーザー照射時のアミノ酸の分光特性解析, 日本分析化学会第 60 年会 (名古屋大学、平成 23 年 9 月 14 日)

藤井 宣行, 原田 明, 反射対物型紫外励起熱レンズ顕微鏡の開発と細胞イメージングへの適用, 第 72 回応用物理学会学術講演会 (山形大学、平成 23 年 8 月 29 日)

野地 紗也加, 礪田 美紀, 原田 明, 紫外励起熱レンズ法と micro-HPLC を組み合わせた多環芳香族炭化水素の分離検出, 第 48 回化学関連支部合同九州大会 (小倉、平成 23 年 7 月 9 日)

鬼木 喬玄, 原田 明, 深紫外レーザー光を用いたアミノ酸の分光特性解析, 第 48 回化学関連支部合同九州大会 (小倉、平成 23 年 7 月 6 日)

⑲ Yujiro SUMI and Akira HARATA, Design for Highly Sensitive Detection of Non-Labeled Amino Acids Using Hilic with Micro-HPLC/ Ultraviolet Thermal Lens Spectroscopy, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (京都国際会議場、Kyoto、平成 23 年 5 月 23 日)

⑳ Y. SUMI and A. HARATA, Direct detection of nonlabeled amino acids using micro-HILIC-HPLC with ultraviolet thermal lens spectroscopy, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010) (Honolulu, U.S.A., 平成 22 年 12 月 18 日)

㉑ N. FUJII and A. HARATA, Ultraviolet photothermal image of a single nonstained yeast cell measured with reflection objective, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010) (Honolulu, U.S.A., 平成 22 年 12 月 17 日)

㉒ Noriyuki FUJII and Akira HARATA, Development of Photothermal Lens UV Imaging Method for Living Cells, 第 31 回超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (日本大・駿河台、東京、平成 22 年 12 月 6 日)

㉓ Noriyuki FUJII and Akira HARATA, Technical Points of Photothermal Lens UV Imaging, The 6th International Symposium on Novel Carbon Resource Sciences - Aiming toward Low-Carbon Society - (Kyushu University, Kasuga, 平成 22 年 11 月 12 日)

㉔ 角 裕次郎, 原田 明, 紫外励起熱レンズ分光法/micro-HPLC を用いた HILIC による無標識アミノ酸の高感度分離分析, 日本分析化学会第 59 年会 (東北大、仙台、平成 22 年 9 月 15 日)

㉕ 角 裕次郎, 原田 明, 紫外励起熱レンズ法と micro-HILIC-HPLC による無標識アミノ酸の高感度分離検出, 第 47 回化学関連支部合同九州大会 (北九州国際会議場、小倉、

平成 22 年 7 月 10 日)

㉖ Akira HARATA, Yasushi IMNISHI, Miki SATO (ISODA), and Toshio ISHIOKA, Spectroscopic Investigation of Environmental Molecules at the Water Surface, 5th International Symposium on Novel Carbon Resource Sciences (Curtin University of Technology, Perth, Australia, 平成 22 年 4 月 22 日)

[図書](計 3 件)

原田 明, 「化学のブレークスルー - 革新論文から見たこの 10 年の進歩と未来」化学同人編集部編 (化学同人、2011.10) 分担執筆 pp.239-253 (全 293 頁) “生細胞をターゲットとした顕微鏡が技術発展を加速する”

原田 明, 「化学のブレークスルー【機器分析編】」別冊化学 (丸善、2011.4) 分担執筆 (著者 15 名) pp.44-48 (全 82 頁) “生細胞をターゲットとした顕微鏡が技術発展を加速する”

Akira HARATA, Miki SATO (ISODA), and Toshio ISHIOKA, “Ionization of Solute Molecules at the Liquid Water Surface, Interfaces, and Self-Assembled Systems”, in “Charged Particle and Photon Interactions with Matter: Recent Advances, Applications, and Interfaces”, eds. Yoshihiko Hatano, Yosuke Katsumura, and Asokendu Mozumder (CRC press, Taylor & Francis, Boca Raton) Chapter 17, pp. 445-472 (Total 1064 pages, 34 chapters) (2010.11), 査読有.

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

[その他]

「原田 明」教育研究関連のデータベース
http://www.mm.kyushu-u.ac.jp/lab_07/members/harata/AHDB_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 明 (HARATA, Akira)
九州大学・大学院総合理工学研究院 教授
研究者番号: 90222231

(2) 連携研究者

礪田 美紀 (ISODA, Miki)
九州大学・大学院総合理工学府・技術専門職員
研究者番号: 70467885