

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26288068

研究課題名(和文)非蛍光性化学種の無標識超高感度検出技術の革新

研究課題名(英文)Development for an ultrasensitive and non-labeled detection method of non-fluorescent molecules in liquid solutions

研究代表者

原田 明 (Harata, Akira)

九州大学・総合理工学研究院・教授

研究者番号：90222231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：重要性が高く微量な生体・環境関連の溶液中化学種を、無修飾のまま単一分子検出レベルの高感度で検出できる手法の適用範囲を広げるための技術として、(1) 213 nmの深紫外光を励起光に用いた光熱変換効果ヘテロダイン干渉検出系装置開発と性能評価、および、熱レンズ分光法との比較、(2)マイクロ液体クロマトグラフィーおよびマイクロチップ流路との結合による超高感度分離検出の検証を行い、無標識・超高感度検出技術の革新を図った。高感度検出の一般的な手法である蛍光法が、ラベル化操作無しでは全くの無力となる化学種、即ち、紫外域にのみ光吸収を持ち、かつ、非蛍光性(低蛍光量子収率)の化学種を主な検出対象とした。

研究成果の概要(英文)：To enhance versatility of photothermal heterodyne interferometer, a highly sensitive and direct detection method for biologically and environmentally important molecules in liquid solutions with no labeling pretreatment, deep ultraviolet laser at the wavelength of 213 nm is equipped for excitation and the performance of the detection system is evaluated in comparison with a thermal lens detection system. The performance for separation/detection analysis is evaluated in combination with a micro-HPLC and a micro-chip flow device. Non- and less-fluorescent chemicals having no visible light absorption are target species of detection for which fluorometry of the ultrahigh sensitive detection method is quite powerless unless troublesome labelling pretreatment.

研究分野：分析化学

キーワード：超高感度分離検出
マイクロチップ
非蛍光性化学種
マイクロチップ
紫外レーザー分光
溶液中化学種
光熱変換
ヘテロダイン検出
超高速液体ク

1. 研究開始当初の背景

(1) 不完全抗原 (ハプテン)、内分泌攪乱物質、多環芳香族塩素化合物に代表される生体中や環境中で重要な役割を担う比較的小さな化学種(分子量: 数 10 ~ 数 100 程度)は、ほとんどが非蛍光性(弱蛍光性)であり、また、多くは紫外域にのみ光吸収を持つ。これら化合物は、極微量で生理活性を持つ場合があり、溶液系や表面吸着系における高感度検出が強く求められている化合物群である。

(2) 化学種の高感度検出に関して、1990 年に蛍光性化学種の単一分子検出が実証され、2000 年以降に関連論文が急増した。現在、単一分子検出は物理化学・生命科学の新しい領域を拓く道具として活用されている。しかし、蛍光法は、無蛍光・非蛍光性化学種の直接検出には無力ないしは不向きで、一般的には蛍光標識操作との併用が不可避である。

(3) 前述の欠点を克服できる可能性を持つ非蛍光性化学種の無標識高感度検出法には、光熱変換分光法、多光子イオン化分光法、電気化学検出法、荷電粒子検出法等があるが、現状、どれも蛍光法に遜色ない感度性能を発揮するケースは例外的である。また、多くの場合、前述の化合物群の直接検出への適用性は期待できない

(4) 非蛍光性化学種の単一分子レベルでの超高感度無標識検出に最も有望な手法として光熱変換分光法が注目されている。この検出法の近年の主要な研究動向は、“適用性拡大(全固体化・深紫外励起光源の利用)”と“高感度化”にある。

(5) 適用性拡大に関しては、励起光源が問題である。2006 年以降、全固体紫外レーザー光源を用いた検討が活発化している。研究代表者らは、212-220 nm の励起光を用いて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、主に光源性能の制約を受けて、検出感度は紫外吸光法より若干勝る程度に留まっていた。この光波長帯は、分析用溶媒として優れた特性を持つリン酸バッファー水溶液とアセトニトリルが強い吸収を持たず、ほとんどの有機物が吸収を持つ下限である。

(6) 213 nm 発振の Nd:YAG レーザー第 5 高調波は、全固体深紫外光源として期待できる最も有望な光源と考えられる。2013 年時点で市販品は少ないが、近年、ようやく市販の Nd:YAG レーザー第 5 高調波システムの利用が現実的となっている。

(7) 高感度化については、2010 年に Gaiduk らが表面吸着化学種の単一分子イメージングをデモンストレーションし、2013 年には、Laesen らにより微細加工技術による機械的

振動共鳴を利用した表面吸着単一ナノ粒子検出が報告されており、単一分子・粒子の光熱変換検出に新しい流れが生まれている。溶液中化学種については、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ているが、単一分子検出(分子カウンティング)レベルに達するには 2 桁程度感度不足である。

(8) 研究代表者らは過渡吸収の利用を提案し、410 nm 可視光励起・532 nm 可視光増幅により 2 桁以上、215 nm 紫外光励起・532 nm 可視光増幅により、1 桁以上の信号増幅を実証している。また、ヘテロダイン干渉法を利用した検出感度そのものの向上にも成功しており、液中化学種の無標識単一分子カウンティング装置の最適設計指針を提示していた。

(9) 紫外域では光源性能の制約が厳しく、紫外域にのみ光吸収があるような実用的な関心が高い化学種については、全世界的にも、液中系・表面吸着系を問わず、分子カウンティングレベルの検出感度は達成されていなかった。

2. 研究の目的

(1) 重要性が高く微量な生体・環境関連の溶液中化学種を、無修飾のまま単一分子検出レベルの高感度で検出できる手法の適用範囲を広げるための技術開発に取り組み、無標識・超高感度検出技術の革新を図った。

(2) 具体的には、次の目標を掲げて検討した。

- 1) 213 nm の深紫外光を励起光に用いた光熱変換効果ヘテロダイン干渉検出系装置開発と性能評価、および、熱レンズ分光法との比較。
- 2) セミマイクロ液体クロマトグラフィー(HPLC)およびマイクロチップ流路との結合による超高感度分離検出の検証。
- 3) 2色2光子励起光熱変換効果の原理的検証。
- 4) 顕微イメージングとの結合による表面ナノ粒子分散系への適用性能の実証。

3. 研究の方法

(1) 非蛍光性化学種の無標識・超高感度検出法として申請者らが開発してきた深紫外励起・多色増幅型光熱変換計測法を発展させた普及型装置の試作と合わせて、多色多光子吸収を利用した深紫外吸収帯の励起の実現等を図り、汎用性・高感度性・化学種選択性を併せ持つ非蛍光性化学種の無標識・超高感度検出技術の革新を図った。前出の 4 つ目標を柱に研究を遂行し、成果は逐次発表する。

(2) 光熱変換検出により非蛍光生化学種の超高感度検出のためには、発熱由来の屈折率変化の高精度計測が不可欠である。操作性・長

期安定性を確保しつつ、性能向上を図り、高感度化を実現するための装置開発には5つのポイントがある。

- 1) 汎用性を維持するため213 nmの光波長の全固体レーザーを励起光源とする。
- 2) 屈折率変化の高精度計測のためヘテロダイン干渉計を用いる。
- 3) HPLCとの結合を考慮して、溶媒混合の早いマイクロ流路系を用いる。
- 4) 光熱変換検出に有利な有機溶媒系を用いる親水性相互作用クロマトグラフィー分離モードを採用する。
- 5) 流速・流量を考慮して設計した顕微光学系、試料セル部を用いる。

(3) 前述の5つのポイントを全て兼ね備えた装置は、非蛍光生化学種の汎用的な分離検出において、現在考え得る最も高感度な手法として研究代表者らが提案してきたものである。213nm 紫外レーザー光源”の導入により1)の要件を満たしつつ、2)~5)を再検討する。

(4) 光熱変換検出法として、より一般的に用いられてきた熱レンズ検出法と熱変換効果ヘテロダイン干渉法との検出感度等についての比較を行う。

(5) 開発した装置をマイクロないしはセミマイクロ HPLC、および、各種検出セルないしはマイクロチップ流路と連結し、分離検出性能を検証する。

(6) 高感度検出の一般的な手法である蛍光法が、ラベル化操作無しでは全くの無力となる化学種、即ち、紫外域にのみ光吸収を持ち、かつ、非蛍光性(低蛍光量子収率)の化学種を主な検出対象とする。具体的には、生態関連アミノ酸(20種類)、5種類の核酸塩基、および多環芳香族塩素化合物、ニトロ化合物の幾つかについて測定し、検出限界を求める。

(7) 213 nmの光による励起は溶媒吸収が妨害となる可能性がある。この困難をクリアする手法の一つが、多光子励起蛍光などに汎用されている多光子吸収の利用である。光熱変換検出に用いられた例は皆無であるので、可能性を実験的に検討する。

(8) 熱レンズ効果を用いた顕微イメージング応用を展開する。単一ナノ粒子のカウンティング感度を目標とし、空間分解能の向上を検討する。

4. 研究成果

(1) 375 nmの紫外光(半導体レーザー、TC20-0375-0070-4.5、NEOARK製)を励起光に用いた光熱変換効果ヘテロダイン干渉検出系装置を開発し、信号検出に成功した。各光学素子やそれらの配置を見直して最適化を進め、高感度化と共に長期間の安定化を

図った。

(2) 開発した検出系をマイクロ HPLC(Micro 21 LC-02、JASCO製)/マイクロセル系(U字キャピラリーセル Cat. No. 6001-70174、容量250 nL、ジーエルサイエンス製)、セミマイクロ HPLC(EXTREMA、JASCO製)/マイクロセル系ないしは、セミマイクロセル系(フローセル Cat. No. 6001-70179、容量1 μ L、ジーエルサイエンス製)、石英製マイクロチップ流路(特注、マイクロ化学技研製)と結合し、分離検出性能を評価した。

(3) 分離カラムを選択(TSK gel Amide-80、東ソー、粒径2 μ m、2.0 mm I.D. \times 10 cm、等)し、分離用溶媒に3 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)/アセトニトリル = 20/80 v/v%等を採用して条件を最適化することにより、多環芳香族ニトロ化合物、塩化物、5種類の核酸塩基、生体関連アミノ酸(20種類)について、無修飾の条件下で良好な分離性能を実現することに成功した。なお、極性の強い4種類のアミノ酸(グリシン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸)に関しては、他のアミノ酸と分離条件を変える必要がある。

(4) 前述の4種類を除く残り16種のアミノ酸について、保持時間とオクタノール/水分分配係数(P)とに良好な相関関係があることを見いだした。一般に疎水性が高い化学種(P > 1)では、保持時間と分配係数Pとの相関は明確である(JIS Z 7260-117: 2006 参照)が、分配係数Pが-1から-3.6の値でも相関を成り立たせる条件があることを実験的に証明している。

(5) 多環芳香族ニトロ化合物の分離検出における検出感度は、一般的な紫外分光法による検出器よりも、感度的には試料濃度の検出限界で1.5倍から8.4倍、吸光度の検出限界で2.9倍から16.6倍優れていることを実証した。また、分離性能(見かけの理論段数、分離度)でも優れていることを示した。しかしながら、分子カウンティングレベルの検出感度には到っていない。

(6) ヘテロダイン干渉検出系と熱レンズ検出系を比較検討した。検出感度的には前者が若干優れるケースが見られるものの、両者に桁違いの差異は見られなかった。しかしながら、実験経験的に、前者は短時間および長期間の安定性が優れると判断している。この点に関しての定量的な判断には到らなかった。また、後者の光学系の簡便さは利点でもある。

(7) 213 nmの深紫外光を発振するレーザー光源の機種選定を行い、実験目的に最も合致する装置として、Nd:YVO₄レーザー第5高調波 Impress 213(213 nm, 100 mW, 15 kHz, Xiton Photonics製)を導入した。この213 nmを励

起光に用いた光熱変換ヘテロダイン干渉検出系装置を開発し、信号検出に成功した。また、開発した検出系をマイクロHPLCまたはセミマイクロHPLCと結合しての、分離検出を実証した。特に、無標識アミノ酸の中でもモル吸光係数が小さいために検出が容易でないアラニンやセリンの分離検出にも成功している。

(8) 検出部に、マイクロセルやマイクロチップ流路を用いる等の多様な条件下での分離検出を試みた。深紫外光励起光熱変換ヘテロダイン干渉検出をHPLCの検出器として用いると、生体・環境関連で重要性が高い溶液中化学種のほとんど全てを測定対象にでき、かつ、見かけの分離性能も向上できる。しかしながら、検出感度の向上は容易でない。

(9) 感度が上がらない理由は、バックグラウンド信号のレベルが大きく、かつ、揺らぐことにある。バックグラウンド信号は、本研究開始前に行っていたフェムト秒光源を用いた検討から、多光子吸収由来が支配的であると推測していた。本研究に用いたナノ秒光源でもバックグラウンド信号を充分には抑制できなかったこと、溶媒による変動の大きさや光学配置の微妙な調整具合への依存性から考察して、アセトニトリルの純度由来、ないしは、セル壁の影響であると結論した。

(10) 2色2光子励起による光熱変換検出を試みたが、信号検出を実証するには至らなかった。問題点を整理して、それに基づいての解決策を提案した。本研究においての最大の問題点は、実験に用いたフェムト秒光源の出力不足にあるが、一般論としては、本研究で検出ターゲットとした化学種群に関して、2色2光子吸収断面積が十分に調べられていない点、実験条件設定の妨げとなっている。

(11) 波長390 nmでの1光子励起、波長780 nmでの熱レンズ検出による顕微イメージング装置を開発した。試料ステージの走査性能不足もあり、単一ナノ粒子カウンティング感度の実現には到らなかった。一方、光ビーム直径より細かい構造を観測できる超解像の可能性のあることを実験的に再確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Miki SATO, Yuki MAEDA, Tohsio ISHIOKA, and Akira HARATA, Photoionization of environmentally polluting aromatic chlorides and nitrides on the water surface by laser and synchrotron radiations, *Analyst*, Vol. 142, pp. 4560-4569 (2017), 査読有, DOI: 10.1039/C7AN01311F
Toshihiko ABE, Miki ISODA, and Akira HARATA, Development of an analytical

method of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons using ultraviolet-excitation micro-photothermal heterodyne-interferometer, *Proc. 38th Symposium on Ultrasonic Electronics (Sendai, Japan, 2017)*, 3P2-11 (2 pages), 査読有.
Kai AOKI, Miki ISODA, and Akira HARATA, Deep ultraviolet-excitation photothermal heterodyne-interferometer combined with micro-HPLC, *Proc. 36th Symposium on Ultrasonic Electronics (Tsukuba, Japan, 2015)*, 2E3-2 (2 pages), 査読有.
原田 明, 環境・生体関連分子計測法の開発, *グリーンアジア国際戦略プログラム News Letter*, Vol.3, p9 (2014), 査読無.
Makoto FUKUMA, Miki ISODA, and Akira HARATA, Development of microscopic photothermal heterodyne-interferometric detection method combined with a micro-HPLC for highly sensitive analysis, *Proc. 35th Symposium on Ultrasonic Electronics (Ochanomizu, Japan, 2014)*, pp. 1-2, 査読有.
Midori MANAKO and Akira HARATA, Performance estimation of photothermal contrast-applied microscope, *Proc. 35th Symposium on Ultrasonic Electronics (Ochanomizu, Japan, 2014)*, pp 399-400, 査読有.

(学会発表) (計 20 件)

磯田 美紀, 福間 誠, 原田 明, 高感度分離検出のためのマイクロ高速液体クロマトグラフィー/光熱変換ヘテロダイン干渉法の開発, 九州大学技術発表会(九州大学伊都キャンパス, 福岡, 平成 30 年 2 月 21 日)
Toshihiko ABE, Miki ISODA, and Akira HARATA, Development of an analytical method of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons using ultraviolet-excitation micro-photothermal heterodyne-interferometer, 第 38 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(多賀城市文化センター, 宮城, 平成 29 年 10 月 27 日)
原田 明, 當房 実咲, 磯田 美紀, セミマイクロHPLC・深紫外レーザー励起熱レンズ分光法による無標識アミノ酸の分離・検出, 日本分析化学会 66 年会(東京理科大学葛飾キャンパス, 東京, 平成 29 年 9 月 11 日)
安倍 聡彦, 磯田 美紀, 原田 明, HPLC/紫外励起顕微光熱変換ヘテロダイン干渉検出法を用いたニトロ多環芳香族炭化水素の高感度分析法開発, 第 54 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 29 年 7 月 1 日)
磯田 美紀, 原田 明, ミクロ高速液体クロマトグラフィー/光熱変換ヘテロダイン干渉法によるニトロ多環芳香族炭化水素の高感度分離検出, 総合技術研究会 2017 東京大学(東京大学本郷キャンパス, 東京, 平成 29 年 3 月 9

日)
原田 明, 福間 誠, 青木 開, 磯田 美紀, HPLC用紫外光熱変換ヘテロダイン干渉検出器の開発, 日本分析化学会 65 年会 (北海道大学工学部, 札幌, 平成 28 年 9 月 16 日)
當房 実咲, 磯田 美紀, 原田 明, 深紫外励起光レンズ分光法による無標識アミノ酸の分離・高感度検出, 第 53 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 28 年 7 月 2 日)
Miki. ISODA, Makoto FUKUMA, and Akira HARATA, Development of photothermal heterodyne-interferometric detection method as micro-HPLC detector, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015) (Honolulu, U.S.A., 平成 27 年 12 月 16 日)
Kai AOKI, Miki ISODA, and Akira HARATA, Development of deep ultraviolet-excitation photothermal heterodyne-interferometer combined with capillary HPLC for label-free analysis of biologically-relevant molecules, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015) (Honolulu, U.S.A., 平成 27 年 12 月 16 日)
原田 明, 光ビーム照射で生じる諸現象の高感度・高精度計測に基づいた分子情報の未開拓領域探索法の探索 [招待講演], 2015 年度九州支部講演会 [2015 年度九州分析化学会賞受賞講演] (京セラ株式会社鹿児島国分工場, 国分, 平成 27 年 11 月 20 日)
Kai AOKI, Miki. ISODA, and A. HARATA, Deep ultraviolet-excitation photothermal heterodyne-interferometer combined with micro-HPLC, 第 36 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 (つくば国際会議場, 筑波, 平成 27 年 11 月 6 日)
青木 開, 磯田 美紀, 原田 明, 深紫外励起光光熱変換ヘテロダイン干渉検出を用いた無標識アミノ酸の微量・高感度分離分析法の開発 [ポスター賞], 第 52 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 27 年 6 月 27 日)
Makoto FUKUMA, Miki ISODA, and Akira HARATA, Development of microscopic photothermal heterodyne-interferometric detection method combined with a micro-HPLC for highly sensitive analysis, 1st Joint Symposium of Kyushu University and Yonsei University on Materials Science and Chemical Engineering, (Kasuga, Kyushu Univ., Fukuoka, 平成 27 年 2 月 6 日)
Midori MANAKO and Akira HARATA, Performance estimation of photothermal contrast-applied microscope, 第 35 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 (明治大学アカデミーコモン, お茶の水, 平成 26 年 12 月 5 日)
Makoto FUKUMA, Miki ISODA, and Akira HARATA, Development of microscopic

photothermal heterodyne-interferometric detection method combined with a micro-HPLC for highly sensitive analysis, 第 35 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 (明治大学アカデミーコモン, お茶の水, 平成 26 年 12 月 3 日)
Makoto FUKUMA, Miki ISODA, and Akira HARATA, Development of microscopic photothermal heterodyne-interferometric detection method combined with a micro-HPLC for highly sensitive analysis of bio-related materials, 16th Cross Straits Symposium on Materials, Energy and Environmental Science and Technology (CSS16) (Pusan National Univ., Pusan, Korea, 平成 26 年 11 月 15 日)
Midori MANAKO and Akira HARATA, Development of photothermal contrast-applied microscope, 16th Cross Straits Symposium on Materials, Energy and Environmental Science and Technology (CSS16) (Pusan National Univ., Pusan, Korea, 平成 26 年 11 月 13 日)
原田 明, 福間 誠, 磯田 美紀, 溶液中非蛍光性化学種の無標識高感度分離検出 [依頼講演], 日本分析化学会 63 年会 (広島大学, 東広島, 平成 26 年 9 月 17 日)
青木 開, 原田 明, Micro-HPLC ヘテロダイン干渉検出法を用いたアミノ酸の高感度分離および検出系の開発, 第 32 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (北九州かんぼの宿, 北九州, 平成 26 年 7 月 26 日)
眞子 翠, 野崎 恭平, 原田 明, 光熱変換コントラストを用いた顕微鏡の開発, 第 51 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 26 年 6 月 28 日)

[図書] (計 0 件)

[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/member_s/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

磯田 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