

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02756

研究課題名（和文）マイクロリアクターを組込んだ逐次赤外分光顕微鏡の創製 - 生命・材料科学への展開 -

研究課題名（英文）Fabrication of sequential infrared spectroscopy incorporating micro reactor  
-development in life science and materials science-

研究代表者

石黒 孝 (ISHIGURO, TAKASHI)

東京理科大学・基礎工学部材料工学科・教授

研究者番号：10183162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,500,000円

研究成果の概要（和文）：我々が注目する化学反応の多くは水溶液中で生ずる。赤外分光法は化学種の検出に優れているが、定量測定を行う場合、強い水自体の吸収による困難がある。さらに参照光と試料透過光測定における時間差に伴う赤外分光装置感度の変化が避けられない。そこで本研究では、参照光・試料透過光を別領域で同時計測可能なマイクロリアクターを組込んだ透過赤外分光システムを作製した。これにより水溶液中化学種の安定した計測を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水溶液中の化学種は、イオンや水素結合状態にあり化学反応の進行を定量的に評価する手段が望まれている。赤外分光法は化学種同定に優れているが、参照光と試料透過光を異なる時刻に計測し、吸光度を算出するのが一般的である。赤外線の水に透過させるために光路長は短くしなければならず、加えて無視できない装置感度の時間的変動のため、化学反応の長時間定量評価は困難である。そこで2流路を持つ1μm程度の光路長のマイクロリアクターを作製し、リニアアレーによる同時計測を実現した。これにより長時間の安定的透過赤外分光評価が可能となった。

研究成果の概要（英文）：Many of the chemical reactions we note occur in aqueous solutions. Infrared spectroscopy is excellent for detecting chemical species, but it is difficult to perform quantitative measurement because of strong absorption of water itself. Furthermore, it is inevitable that the sensitivity of the infrared spectrometer changes with the time difference between the reference light and the sample transmitted light measurement. Therefore, in this study, we constructed a transmission infrared spectroscopy system incorporating a microreactor that can simultaneously measure reference light and sample transmitted light in different regions. As a result, stable measurement of chemical species in aqueous solution was realized.

研究分野：機能性材料

キーワード：赤外顕微分光 FT-IR ATP マイクロリアクター

## 1. 研究開始当初の背景

我々は水中で刻々と変化する化学反応を水和構造を踏まえてリアルタイムで定量評価できる手段を求めている。赤外分光は化学種検出に優れているが、水による吸収が強すぎるため水中反応の観察は通常、困難とされていた。これに対し、我々は赤外線が透過できる程に薄い水膜のセルを作製し、透過赤外分光を実現した。

しかし反応の逐次進行を高精度で定量評価するには入射光と検出感度の更なる安定性が不可欠であることが分かった。一例として図1にMCT検出器で計測した入射赤外線スペクトル(SB)の2000~2200 $\text{cm}^{-1}$ の積分強度の時間変化を示す。検出器冷却用の液体窒素補充の度に無視できない検出感度の変動があることが分かる。

通常の赤外線分光では、検出感度等の装置の時間的安定性を前提としており、入射光(参照光)を測定した後に、試料を置いて試料透過光を測定し、除して吸光度を算出している。しかしこの前提は崩れている。試料の化学種を安定的に定量するには、装置変動があっても吸光度の定量性を保証する新システムが必須となる。

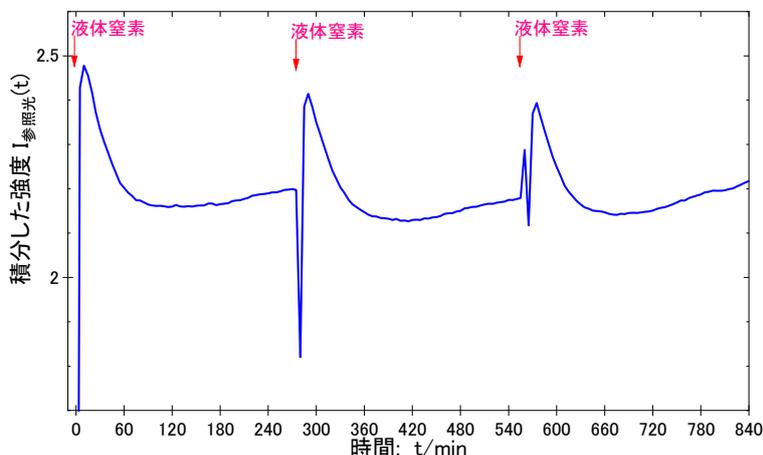


図1 入射赤外線積分強度の時間変動

## 2. 研究の目的

本研究では先ず透過赤外分光顕微鏡システムにおける不安定要因を検討し、これを踏まえて、新しい逐次赤外分光顕微鏡システムを提案した。すなわち、マイクロリアクタに試料測定流路と入射光測定流路を近接して別々に形成し、二か所を同時測光・逐次規格化することにより、装置の時間的ドリフトに左右されずに吸光度を求めることが可能な逐次赤外分光顕微鏡システムを具現化することを目的とした。これを生命・材料科学に係る対象の計測への適応を検討した。

## 3. 研究の方法

通常の赤外分光では測光位置座標を  $x$ 、測光時刻を  $t$  として、入射光:  $I_0(x, t_0)$  と試料透過光:  $I(x, t_s)$  を、別々の時刻( $t_0$  及び  $t_s$ ) (入射光を添字 "0"、試料透過光を添字 "s") に、同一箇所  $x$  で試料有無しの条件で測定して吸光度 ( $A = -\log(I/I_0)$ ) を算出する。本研究で検出すべき化学種は微量・希薄であるため測光装置には高い S/N 比が求められ、さらに検出器及び光学系の時間安定性が要求される。水中で進行する反応、例えば、細胞分裂では始めの分裂から次の分裂までの細胞周期は長時間に及ぶため、この間の入射光強度および検出器感度の時間的変動は無視できない。この困難を原理的に解消するために  $I_0(x_0, t)$  と  $I(x_s, t)$  を多チャンネル(Ch)検出が可能なりニアアレイにより同時刻  $t$  に測定することとし、入射光と試料透過光を独立した2流路(測定箇所が  $x_0$  と  $x_s$ )のマイクロリアクタを設計・製作し、新たな赤外分光顕微鏡システムを構築した。

## 4. 研究成果

図2に本研究で立ち上げた初代赤外分光顕微鏡システムを示す。装置の温度変化を抑制するためにアクリルチャンバー内に送液ポンプ及び制御・データ収集用PCを設置したマイクロリアクタのセルはヒーターによる温度制御を行った。初号機の場合は窓材として  $\text{CaF}_2$  板を用い、厚さ  $40\ \mu\text{m}$  の塩化ビニールシートを精密カッティングして流路スペーサーとした。参照光測定用に乾燥窒素ガスを、試料として  $n$ -ヘキサンを流して、二流路をまたいで16 Chのリニアアレイにて測定した。図3に測定されたスペクトルとデータ処理の過程を示す。(a)に見られるように入射(参照)光と試料透過光のスペクトル強度は検出器感度の違いにより必ずしも直接比較できるわけではない。しかも赤外分光顕微鏡システムの光路途中に存在する水蒸気及び二酸化炭素に起因する多くの吸収が見て取れる。ところが一方を他方で除すると(a)緑色の曲線となりほぼ一定の値となる波数領域が現れた。そこで波数領域  $2100\sim 2200\ \text{cm}^{-1}$  の強度積分値でリニアアレイチャンネル間の感度補正值  $C$  を算出し、 $C$  を乗じてスペクトルを規格化・比較すると(b)のように重なる波数領域が現れ、これから吸光度を求めると(c)のように水蒸気、二酸化炭素の吸収がほとんど相殺された試料  $n$ -ヘキサンの吸光度スペクトルが求められた。以上により本手法が、装置の時間的変動に左右されない吸光度の定量評価に有効であることを実証した。

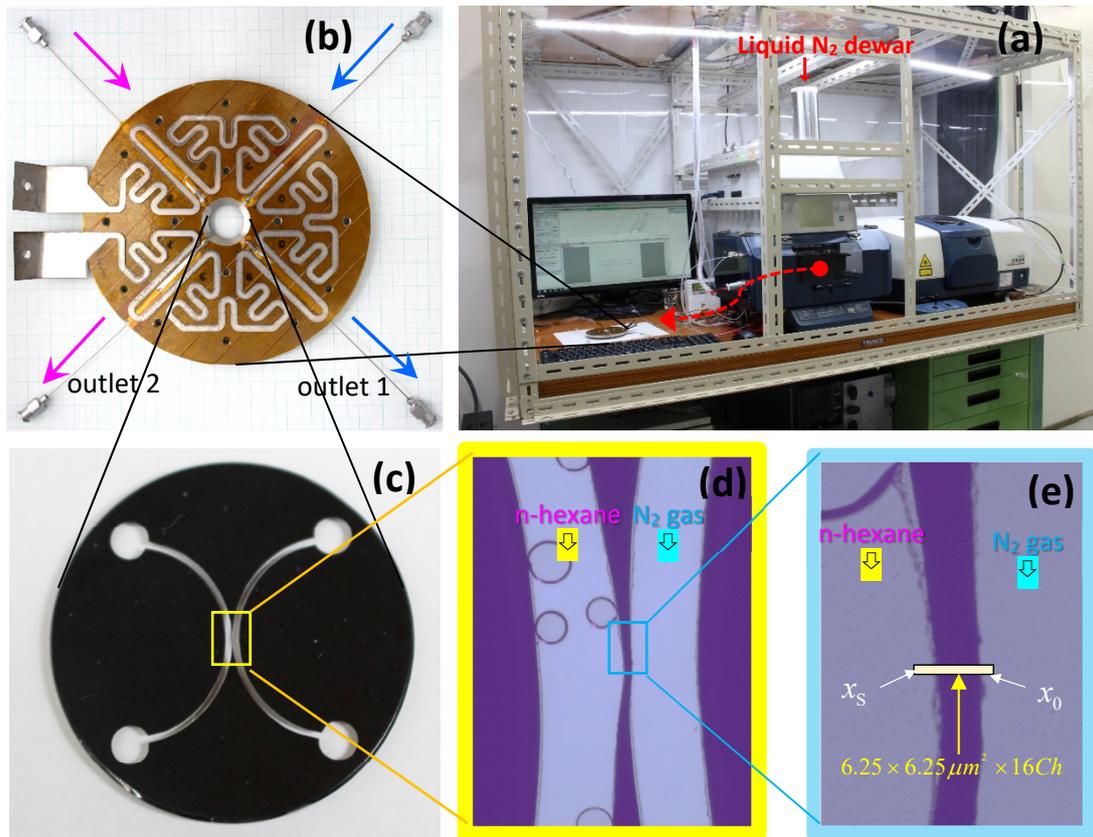


図2 初代赤外分光顕微鏡システム (a)全体 (b)送液配管(ヒータ付) (c)流路スペーサー  
(d)n-hexaneとN<sub>2</sub>ガス導入 (e)リニアアレー測光領域(6.25×6.25μm<sup>2</sup>×16Ch)

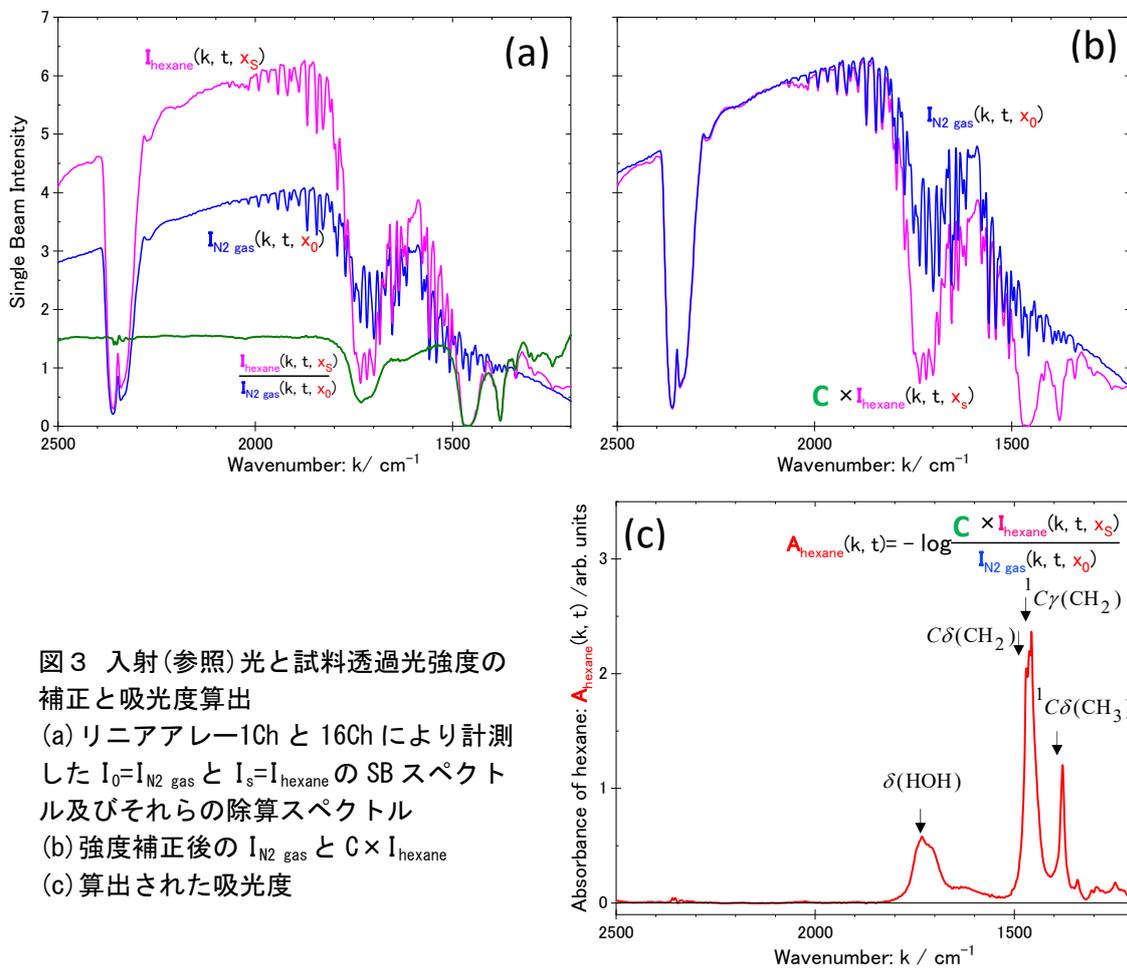


図3 入射(参照)光と試料透過光強度の補正と吸光度算出  
(a)リニアアレー1Chと16Chにより計測した  $I_0=I_{\text{N}_2 \text{ gas}}$  と  $I_S=I_{\text{hexane}}$  のSBスペクトル及びそれらの除算スペクトル  
(b)強度補正後の  $I_{\text{N}_2 \text{ gas}}$  と  $C \times I_{\text{hexane}}$   
(c)算出された吸光度

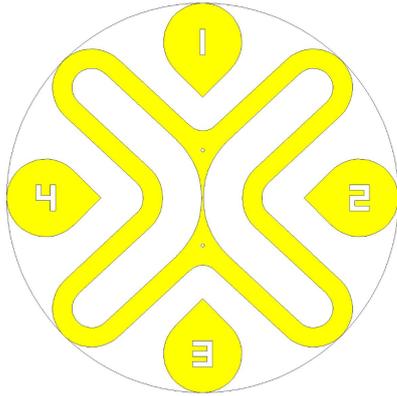


図4 マイクロリアクタのセルパターン

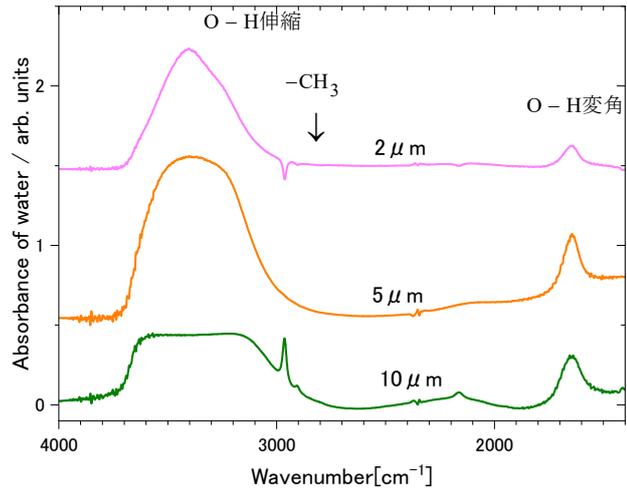


図5 水の吸光度のセル行路長依存性

続いて水溶液測定のために行路長のさらに短いマイクロリアクターセルの開発を行った。紫外線硬化型液状シリコンゴム PDMS (KER-4690-A-B, 信越シリコン) をトルエン希釈し、CaF<sub>2</sub> 円板 (φ 30mm, t=2mm) 上にスピンコート (5000rpm) し、図4のパターンマスクを用いて紫外線照射し、放置・洗浄乾燥後に同形 CaF<sub>2</sub> 円板を重ねてマイクロリアクタを作製した。行路長はトルエン希釈組成により調整した。乾燥室素を参照試料として超純水を測定した。図5に示すように 2 μm では水分子の伸縮、変角振動による吸光度を飽和させずに測定できた。(わずかな残留 PDMS による CH<sub>3</sub> 吸収も見られる) 5、10 μm の行路長では伸縮振動による吸光度に飽和傾向が見られるが、例えば細胞観察に必要な 10 μm でも水の吸収以外の波数範囲で計測可能であることが分かった。

また水の透過赤外吸収スペクトルについて古典的分子動力学計算により求めた酸素原子の位置を用いて第一原理計算を行い、実測されたスペクトルを低コストで再現することに成功した。図6に実験値と計算値の比較を示す。(Jpn. J. Appl. Phys., 57(5)2018 058005-1~3)

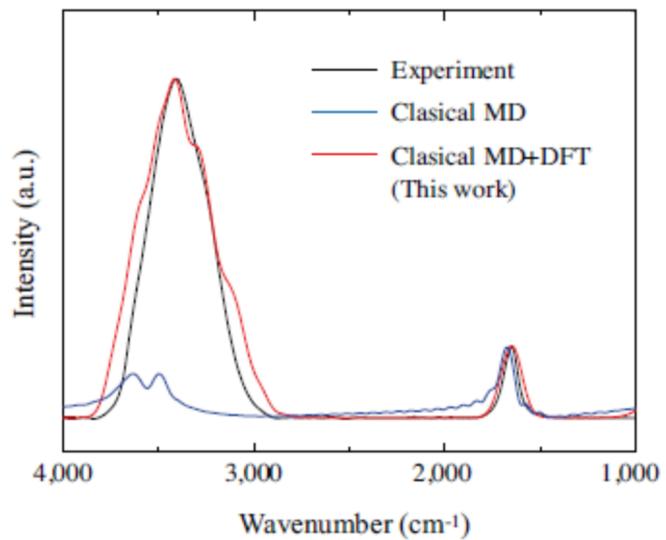


図6 水の IR 吸収スペクトル計算

細胞の赤外分光については、セル中に図7に示すような細胞を捕獲できる柵を PDMS により作製し、3T3-B16 細胞を 36 時間培養後に生きたままの1個の細胞の赤外分光スペクトルを計測した(図8)。各成分に対応する吸収を捉えることができる。

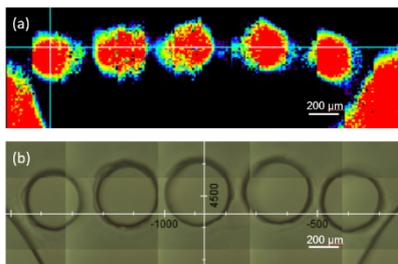


図7 (a) PDMS 製柵形状の IR マッピング  
(b) 対応する光学写真

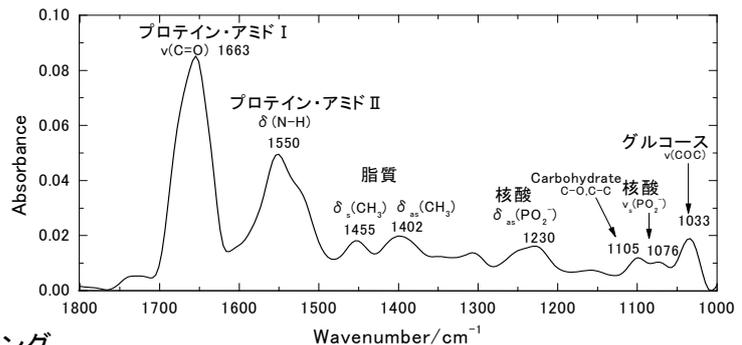


図8 1個の細胞の吸光度スペクトル

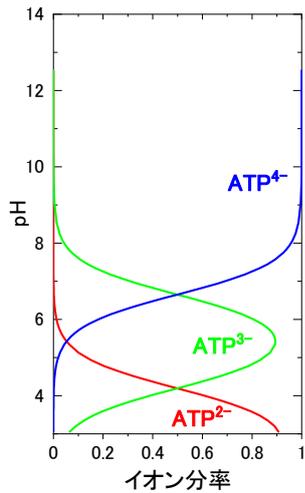


図 10 ATP 水溶液のイオン分率 pH 依存性

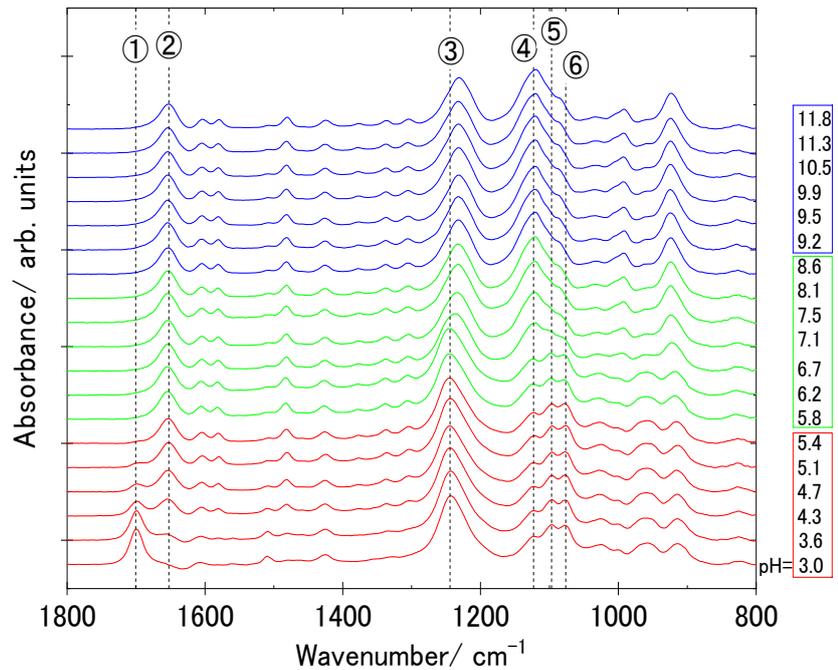


図 11 ATP 水溶液の IR スペクトルの pH 依存性

生命のエネルギー源であるところの ATP (アデノシン三リン酸) の水溶液中での赤外線スペクトル pH 依存性について測定を行った. 図 10 に ATP 水溶液の中和滴定曲線から算出したイオン分率を示す. 塩基性に変化するに従いプロトンが外れてイオン化が進行している.

対応する赤外分光スペクトルを図 11 に示す. pH3.0~5.4 の範囲では pH 増大に従って①1700  $\text{cm}^{-1}$  の  $\nu(\text{C}=\text{N}^+)$  が減少し, ②1650  $\text{cm}^{-1}$  の  $\nu(\text{C}=\text{N})$  が増加している. また pH5.8~8.6 の範囲でも 1100  $\text{cm}^{-1}$  付近にある 3 つの  $\nu(\text{P}=\text{O})$  振動グループの⑤  $\nu(\text{P}=\text{O}-\text{H})$  が減少し, ④  $\nu(-\text{P}\text{O}_3^{2-})$  が増加している. さらに④, ⑤の変化に伴って, ③1245  $\text{cm}^{-1}$  の  $\nu(\text{P}=\text{O})$  が低波数にシフトしている. これは  $\text{P}=\text{O}$  の電子の非局在化に起因すると考えられる. そして, ①②④⑤の積分強度の変化は滴定曲線(図 10)の結果と一致している. 以上のことから透過赤外分光法を用いた ATP 分子の水溶液中状態を定量的に観察できたものと考えられる.

以上のように水及び水溶液中の化学種の検出, 定量に関して本研究で具現化した短い光路長を有する試料セル並びにマイクロ流路を組み込んだ透過赤外分光法は有用な手法であることが分かった. 今後は本装置を用いた応用展開が期待される.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maekawa Yuki, Sasaoka Kenji, Ube Takuji, Ishiguro Takashi, Yamamoto Takahiro	4. 巻 57
2. 論文標題 Hybrid classical/quantum simulation for infrared spectroscopy of water	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 058005 ~ 058005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.7567/JJAP.57.058005">https://doi.org/10.7567/JJAP.57.058005</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ube Takuji, Yamamoto Kanako, Ishiguro Takashi	4. 巻 98
2. 論文標題 Transmission infrared micro-spectroscopic study of lactic acid production in cultured cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vibrational Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 8 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.06.012">https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.06.012</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ube Takuji, Kawamoto Akizumi, Nishi Tomoya, Ishiguro Takashi	4. 巻 4
2. 論文標題 Fabrication and Morphological Control of a Palladium Film with a Three-Dimensional Nano-Network Structure as a Hydrogen Gas Sensing Material using Organic Acid Chelation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MRS Advances	6. 最初と最後の頁 319 ~ 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1557/adv.2019.82">https://doi.org/10.1557/adv.2019.82</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takuji Ube, Yasuko Yoneyama, and Takashi Ishiguro	4. 巻 33
2. 論文標題 In situ Measurement of the pH-dependent Transmission Infrared Spectra of Aqueous Lactic Acid Solutions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ANALYTICAL SCIENCES	6. 最初と最後の頁 1395-1400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.2116/analsci.33.1395">https://doi.org/10.2116/analsci.33.1395</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoya Nishi, Syuya Hasegawa, Takuji Ube, and Takashi Ishiguro	4. 巻 5
2. 論文標題 Reaction Acceleration of Nanoporous High-Purity Pd Film Formation by Dealloying of Al-Pd-N Film in pH-Controlled EDTA Solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MRS Advances	6. 最初と最後の頁 531-538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.1557/adv.2020.59">http://dx.doi.org/10.1557/adv.2020.59</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Takashi Ishiguro, Takuji Ube, and Yuta Kurokawa
2. 発表標題 Development of Sequential Transmission Infrared Spectroscopic Microscope Incorporating Microreactor
3. 学会等名 19th Internataional Microscopy Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川雄太、石黒孝、宇部卓司、谷口潤、鐘愷楽
2. 発表標題 入射光・試料透過光の同時計測・透過赤外分光顕微鏡システムの開発
3. 学会等名 2019年日本金属学会春期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Anna Ohwada, Takuji Ube, and Takashi Ishiguro
2. 発表標題 pH Dependence of Transmission Infrared Spectrum of ATP Aqueous Solution
3. 学会等名 European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 TakujUbe, Akizumi Kawamoto, Takashi Harumoto, and Takashi Ishiguro
2. 発表標題 Acceleration of dealloying reaction of Pd-Al-N films using pH controlled citric acid chelate solution and formation of nanoporous Pd-Al films
3. 学会等名 5th Nano Today Conference ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇部卓司、河本明純、石黒孝
2. 発表標題 有機酸を用いた脱合金反応による3Dナノポーラスパラジウム膜の形態制御と特性評価
3. 学会等名 2018年日本金属学会春期大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河本明純、宇部卓司、石黒孝
2. 発表標題 クエン酸を用いたPd-Al-N膜の脱合金反応によるナノポーラス膜形態制御
3. 学会等名 2017年日本金属学会秋期大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Ishiguro, T. Ube, and Y. Yoneyama
2. 発表標題 Development of in situ transmission infrared microscopy system and its application to observation of living cell
3. 学会等名 Microscopy Conference 2017 ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katsura Masukawa, Takuji Ube, and Takashi Ishiguro
2. 発表標題 Transmission FT-IR spectroscopy of DPPC membrane modified by using ScaleA2
3. 学会等名 International Symposium on Imaging Frontier 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takuji Ube and Takashi Ishiguro
2. 発表標題 Application of transmission infrared spectroscopy to living cells and biomaterials evaluation in aqueous solution
3. 学会等名 International Symposium on Imaging Frontier 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇部卓司、米山靖子、石黒 孝
2. 発表標題 透過赤外分光顕微鏡による細胞代謝その場観察
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第73回学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 分光測定装置、及び分光測定方法	発明者 石黒孝, 宇部卓司, 黒川雄太	権利者 東京理科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-117747	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 貴博  (YAMAMOTO TAKAHIRO)  (30408695)	東京理科大学・理学部・助教    (32660)	
研究分担者	谷口 淳  (TANIGUCHI JUN)  (40318225)	東京理科大学・基礎工学部電子応用工学科・教授    (32660)	