

光計測

光とは電磁波だ。

それは波長によって、ガンマー線、X線、紫外線、光、赤外線、マイクロ波、電波と様々な呼ばれ方をして、様々な性質をもつ。

我々は、その様々な光を使って生体や物質の計測を行っている。

光測定法

赤外分光、IR, FT-IR: 分子振動

可視、紫外分光: 電子軌道エネルギー

NMR: 磁界中の原子の核共鳴

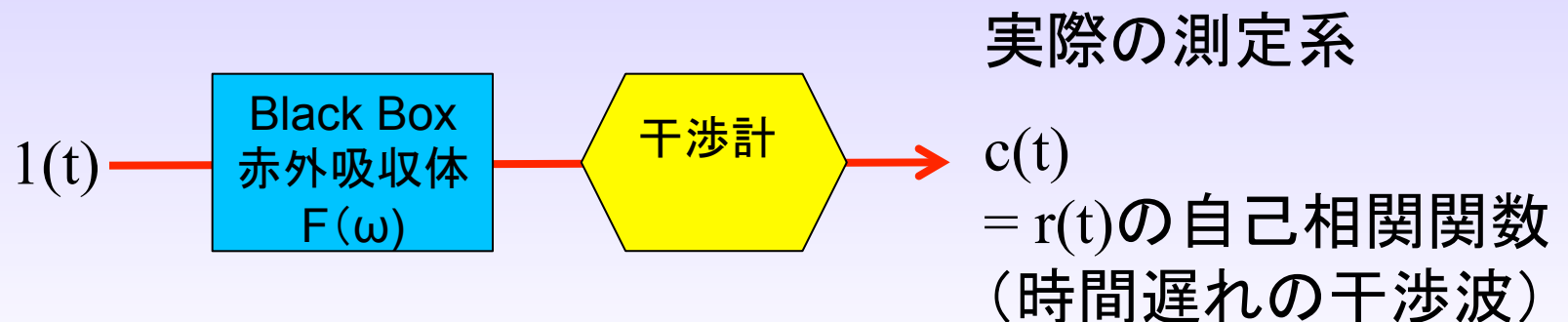
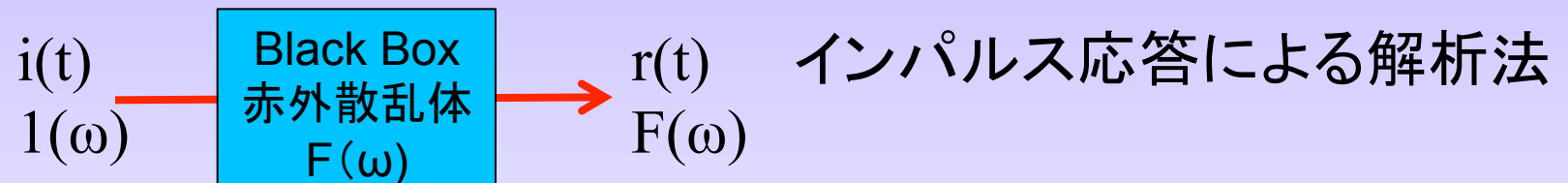
ESR: 磁界中の電子の共鳴

蛍光測定: 1重項色素

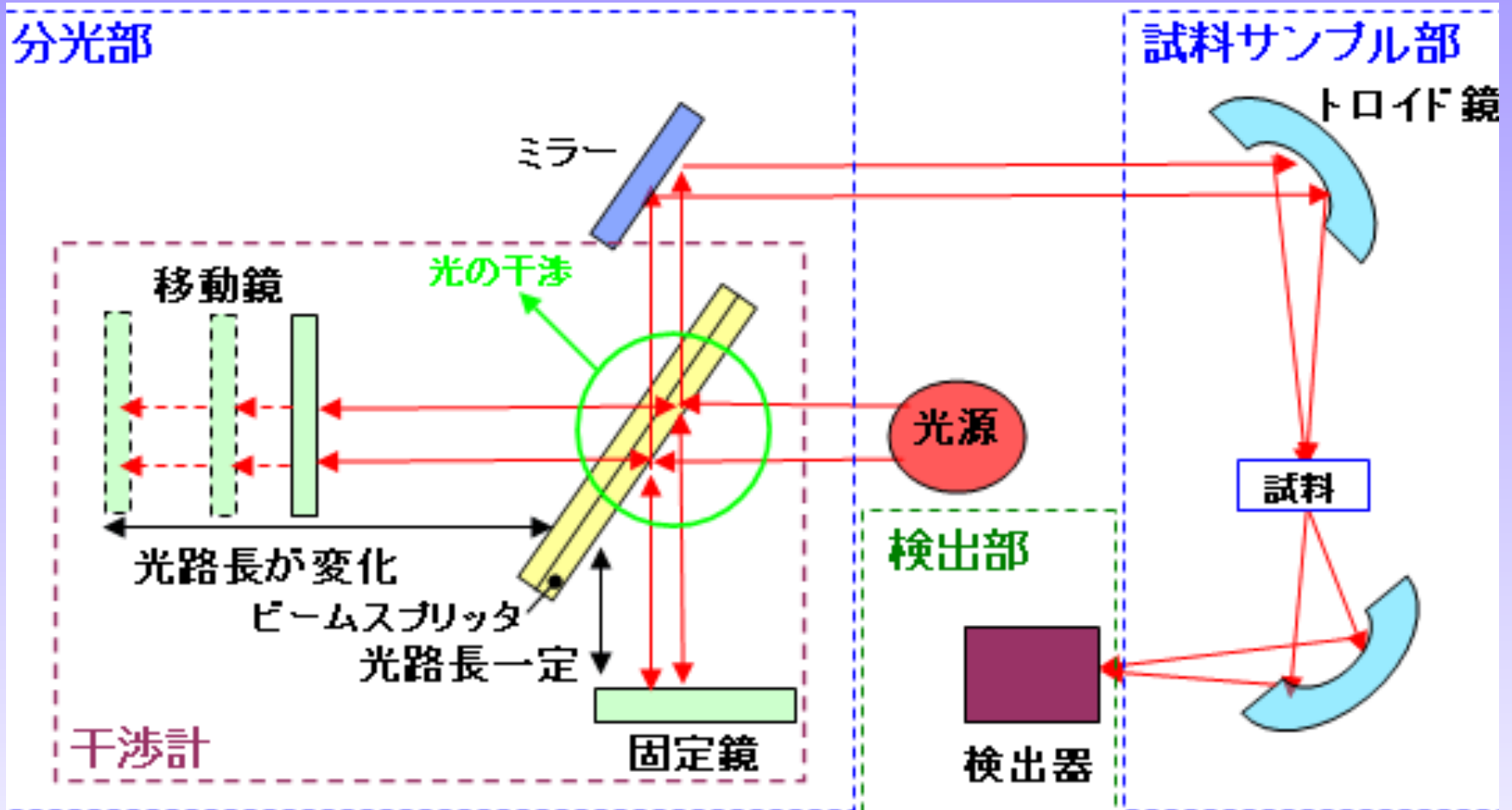
X線: レントゲン、CT(吸収)

FT-IR

FT-IRは赤外線吸収の時系列データから、フーリエ変換により周波数(実際は波長)情報を求める測定法である。理論上は、インパルス応答 $r(t)$ を測定し、そのフーリエ変換を求めれば周波数毎の赤外線強度が求められる。しかし、短いインパルスを作り出すことは技術的に難しいので、干渉法により自己相関関数 $p(t)$ を測定する。

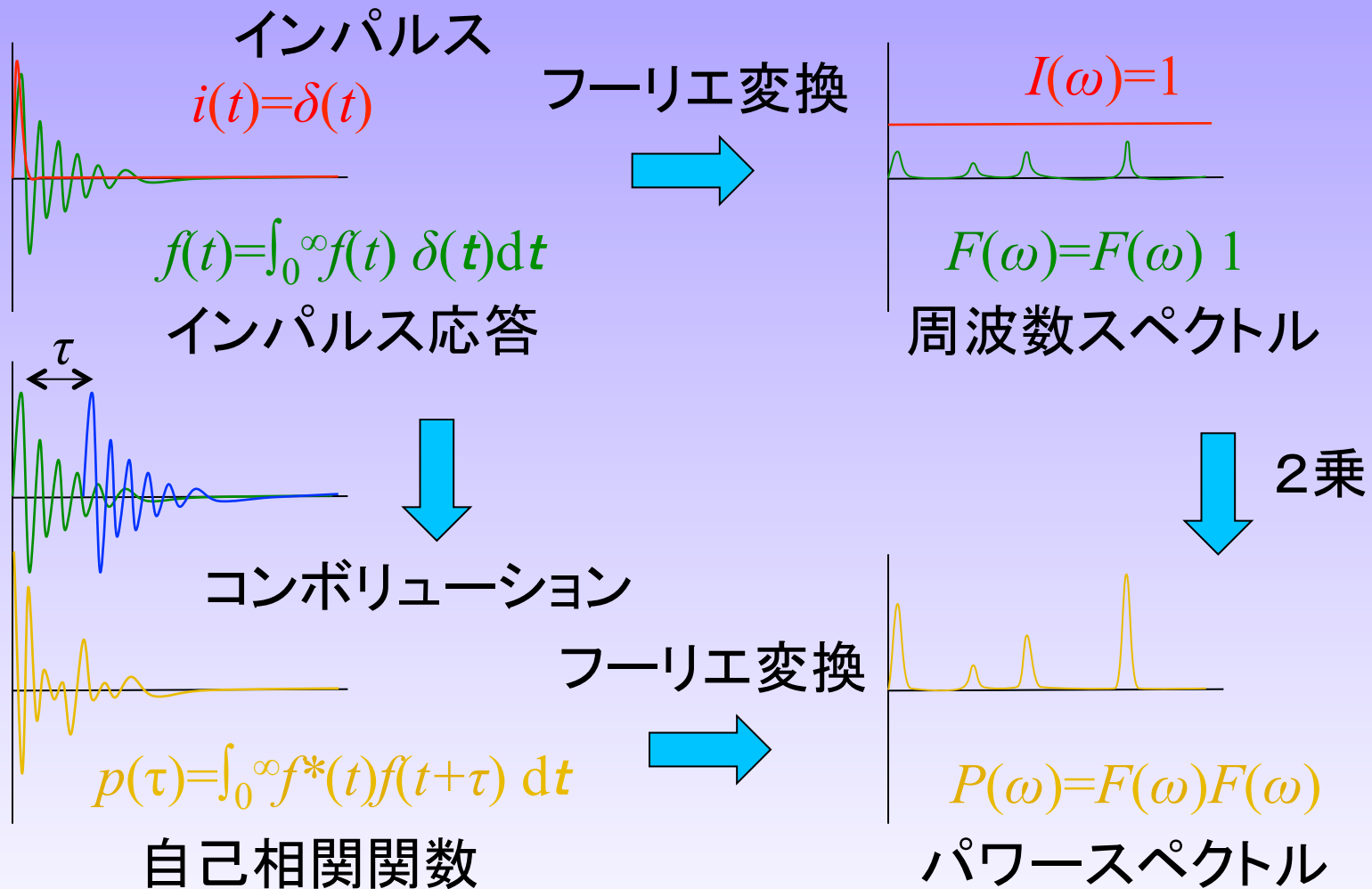


光学系



FT-IRの光学系。移動鏡による光路差で干渉を起こし、試料による吸収スペクトルを持った光の自己相関を測定する。

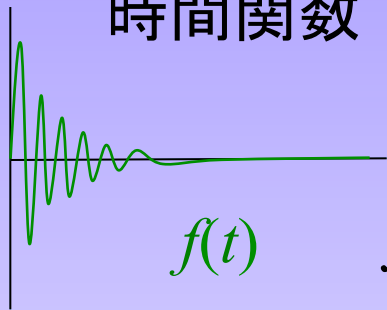
自己相関関数のフーリエ変換



自己相関関数とパワースペクトル

Wiener-Khinchin Theorem

時間関数

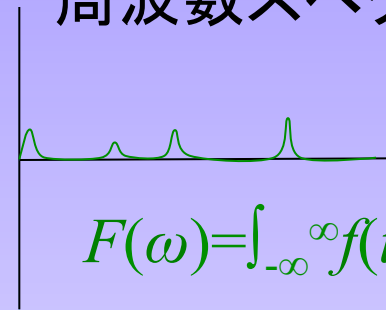


$f(t)$

フーリエ変換

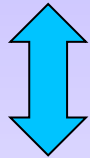


周波数スペクトル

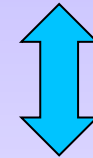


$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \exp(j\omega t) dt$$

時間 τ ずらした
コンボリューション

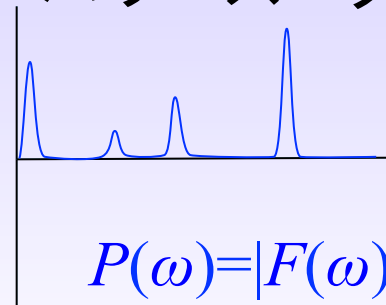


$$\begin{aligned} & \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f^*(t) \cdot f(t+\tau) e^{-j\omega t} dt d\tau \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f^*(t) \cdot f(t+\tau) e^{-j\omega\{(t+\tau)-t\}} dt d\tau \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f^*(t) e^{-j\omega(-t)} \cdot f(t+\tau) e^{-j\omega(t+\tau)} dt d\tau \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} f^*(t) e^{-j\omega(-t)} \cdot F(\omega) dt \\ &= F^*(\omega) \cdot F(\omega) = |F(\omega)|^2 \end{aligned}$$



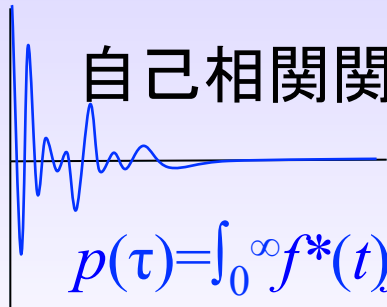
2乗

パワースペクトル



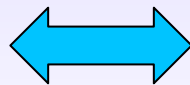
$$P(\omega) = |F(\omega)|^2$$

自己相関関数



$$p(\tau) = \int_0^{\infty} f^*(t) f(t+\tau) dt$$

フーリエ変換

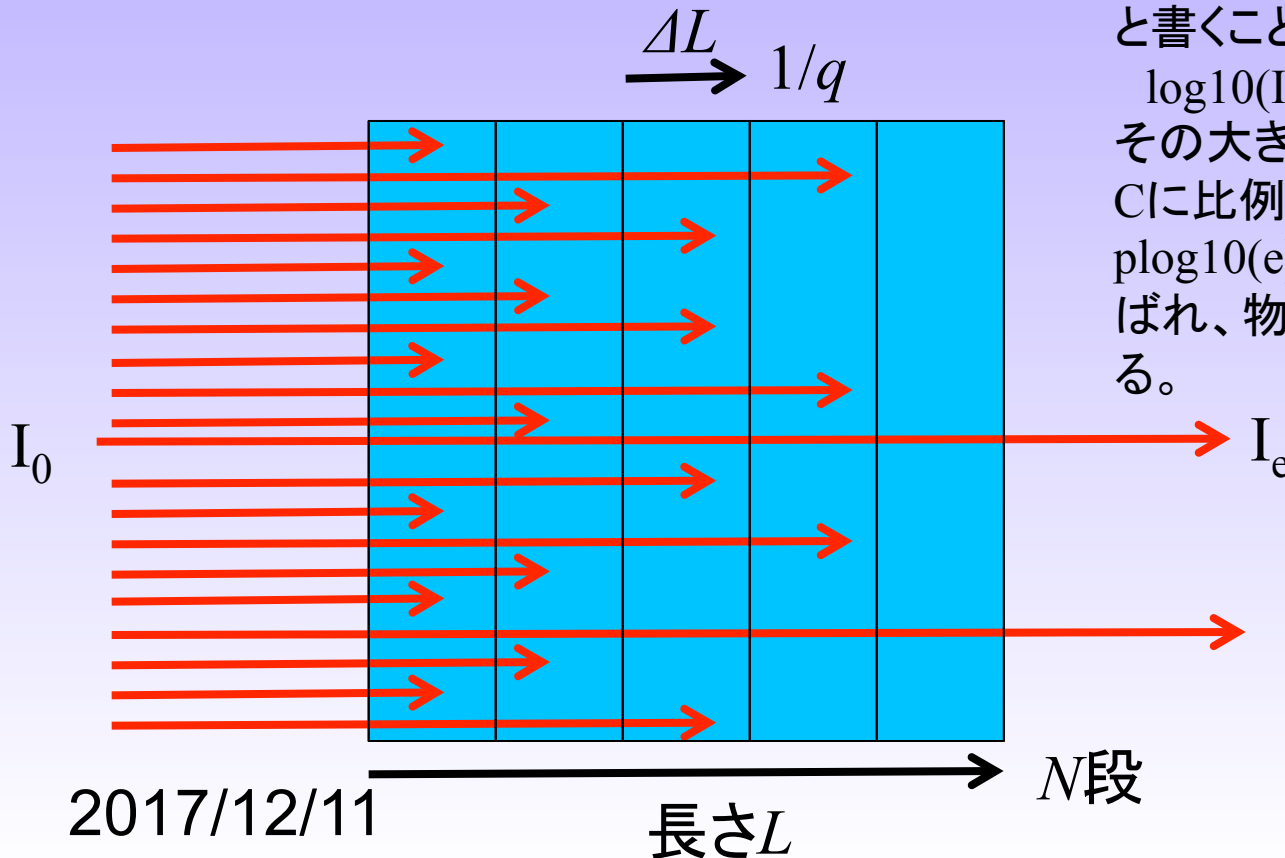


吸光測定

濃度 C の溶液中では、強度 I の光は長さ ΔL 進む毎に $C \times \Delta L \times I \times p$ の割合で分子に吸収される。 p は分子の種類によって決まる確率定数で、散乱断面積と量子吸収効率の積である。光が微小距離 ΔL 進むときの減衰 ΔI は、 $\Delta I = -IC\Delta Lp$ なので、 $dI/dL = -ICp$ の関係が得られる。この微分方程式の解は $\ln(I_e/I_0) = -CpL$ だが、計算上の便のため \log_{10} を用いて

$\log_{10}(I_e/I_0) = -CLp \log_{10}(e)$
と書くことにする。

$\log_{10}(I_e/I_0)$ は吸光度と呼ばれ、その大きさは光路長 L と物質濃度 C に比例する。比例定数 $p \log_{10}(e) = \epsilon$ はモル吸光定数と呼ばれ、物質毎に決まった定数である。



NMR

粒子が角運動量を持っていると、それは回転運動をしているのと等価である。さらに粒子に電荷が存在すれば、渦電流が流れているのと同じ。渦電流は磁場を発生するので、巨視的には磁石のように見える。このため、電子や陽子、原子核などの荷電粒子が、0でない(実際には1/2の整数倍の)スピン角運動量を持つ場合、回転する小さな磁石となる。その磁気モーメントは μ_B にほぼ等しい値になる。

$$\mu_B = eh/2m = \hbar\gamma \quad \text{ボーア磁子}(\gamma \text{は磁気回転比})$$

回転する磁石に磁場をかけると、磁気ポテンシャルを持ち、歳差運動で決まる周波数 ω の電磁波を放出・吸収して、状態間を遷移する。原子核の場合、この共鳴現象を核磁気共鳴NMRと呼ぶ。

磁気回転比 γ

角運動量 J と、それが生み出す磁気モーメント μ の比を**磁気回転比 γ** と呼ぶ。回転を z 軸に固定して考えると、 γ は角運動量 $J=mvr$ に対する磁気モーメント μ の大きさなので、

$$\gamma = \mu/J = IA/J = ev/2\pi r \times \pi r^2/mvr = e/2m$$

になる。しかし実際には量子論的補正項 g があるため、 $\gamma = gq/2m \doteq q/m$ となる。 g は約2である。

歳差運動において、外部磁場の磁束密度 B によって磁気モーメントに対して発生するトルク Γ は

$$\Gamma = \mu \times B = \gamma J \times B$$

である。このトルクによって起きる J の回転運動の方程式は

$$dJ/dt = \gamma J \times B$$

となる。この解は円周角 ϕ 方向、角速度 ω の**歳差運動**で、これを代入してスカラー量を求めると

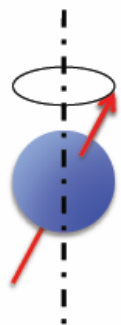
$$\omega J = \gamma B J$$

となる。 $\omega = \gamma B$ の ω は**ラーモア周波数**と呼ばれる。

NMRシグナル

NMR: 核磁気共鳴とは・・・

スピンを持つ
原子核は、
奇数個の核子
からなる。

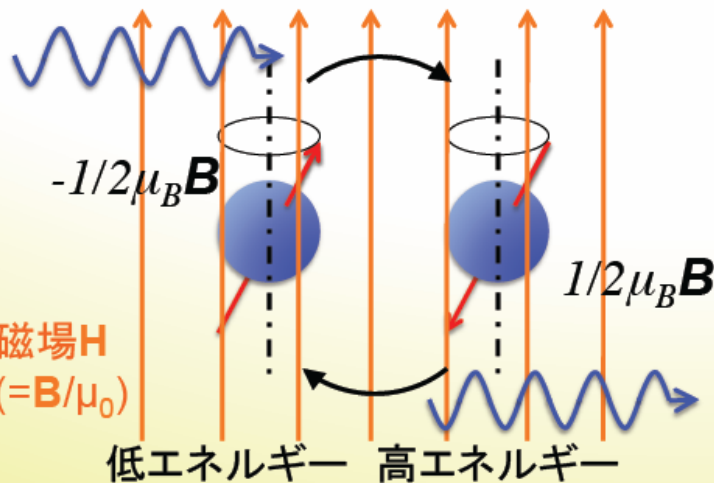


磁気双極子モー
メント \mathbf{m}_s

$$\mathbf{m}_s = \mu_0 I \cdot \mathbf{A} = \frac{\mu_0 q}{2m} \mathbf{p}$$

I : 電流、 A : 面積、 q : 電荷、
 m : 質量、 p : 角運動量、
 μ_0 : 真空の透磁率
 $p_m =$

電磁波



磁場 H
($=B/\mu_0$)

奇数個の核子からなる原子核(1H , ^{13}C , ^{15}N など)は奇数/2のスピンのため、外部磁場中ではコマのようにスピンしながら歳差運動している。

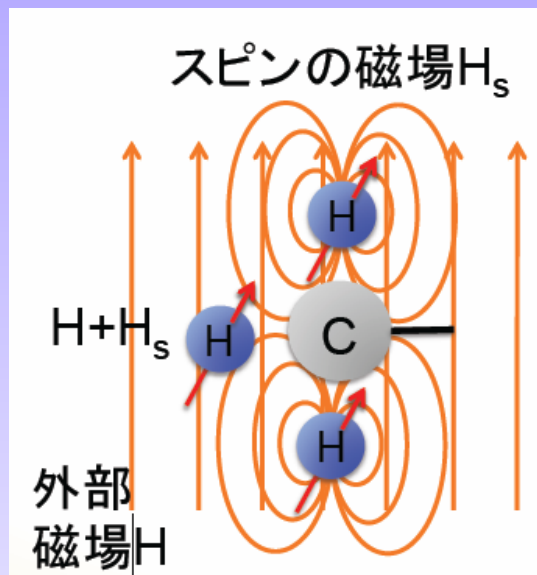
磁気モーメントは外部の電磁場と相互作用するので、**ラーモア周波数の電磁波に共鳴**する。その結果、電磁波の光子のエネルギー $\hbar\omega$ を吸収放出する。

$$E = \hbar\omega$$

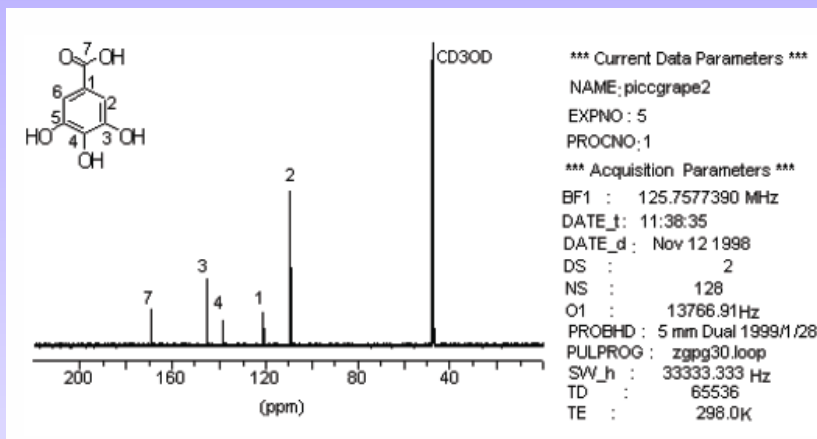
$$= \hbar\gamma B = \mu_B B$$

光子のエネルギーは量子化されている点に注意。

分子構造と周波数のケミカルシフト



水素原子 ^1H の共振周波数は近傍の水素原子の磁場 H_s の影響を受けてシフトする。簡単な分子なら、シフトの割合から分子構造を推測できる。

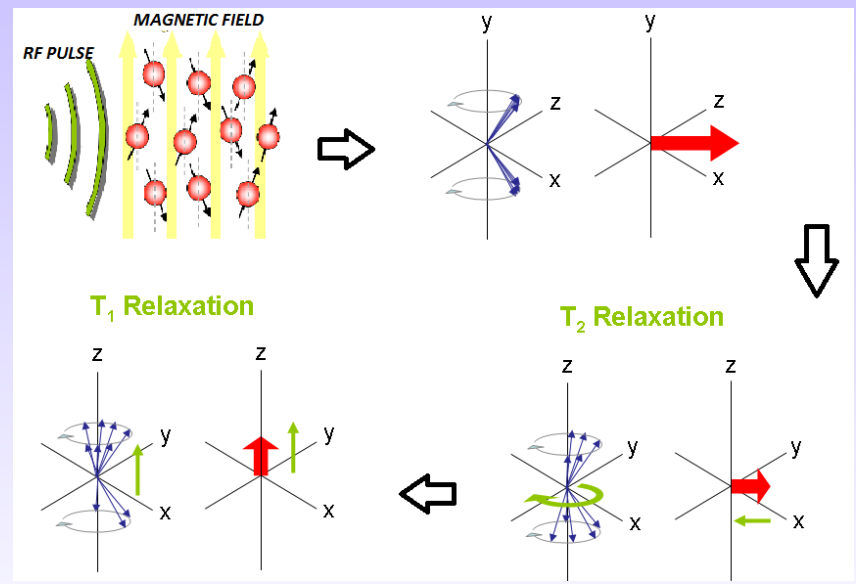
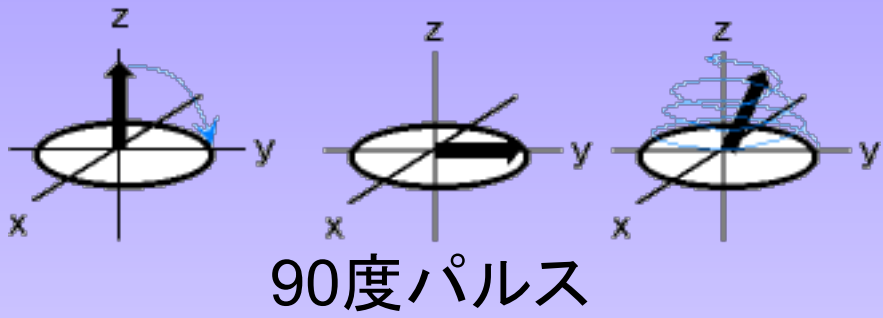


炭素 ^{13}C の NMR シグナル。原子量が奇数の同位元素を用いれば、 H だけでなく、 C , N , O などの NMR も測定できる。

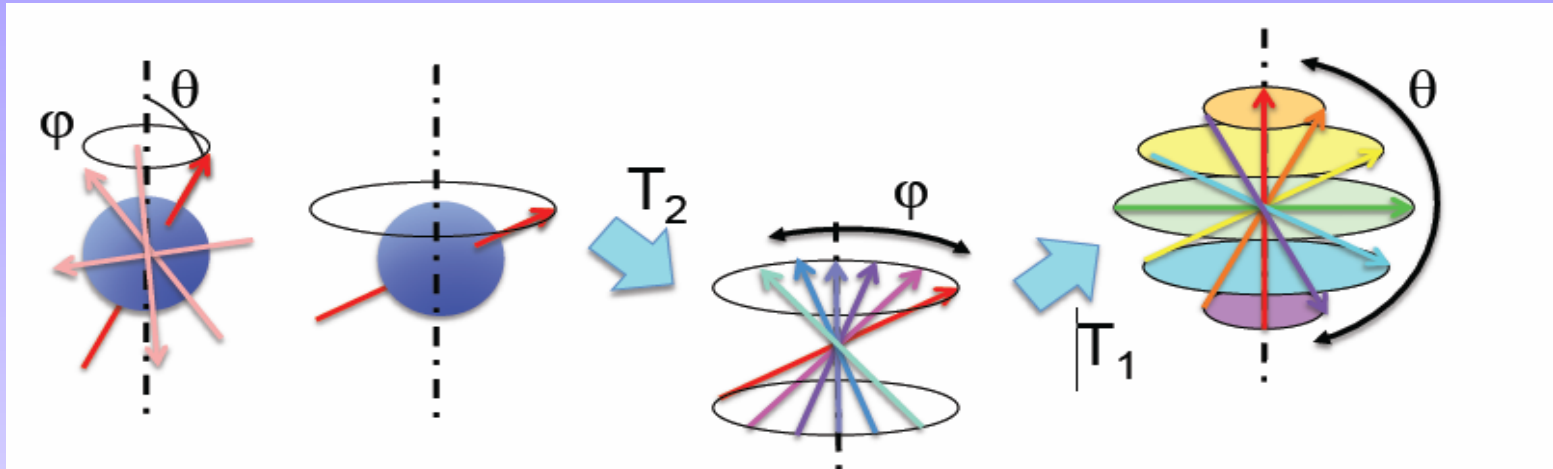
しかし、巨大分子では多くのシグナルが重なり、構造を解析できない。

電磁波の磁場の向きとパルス長

z方向の静磁場中の原子はおよそz方向を向いたスピンの歳差運動している。そこにx方向の磁界成分を持つラーモア周波数の電磁波パルスをかけると、スピンはx軸周りに回転する。パルスの長さでスピンを90度回すようにすると、前スピンはxy平面上のy軸に集まる。ここからスピンのz軸に戻るまでの時間が縦緩和時間 T_1 , xy平面内で均等に広がるまでの時間が横緩和時間 T_2 である。



スピンの縦緩和と横緩和

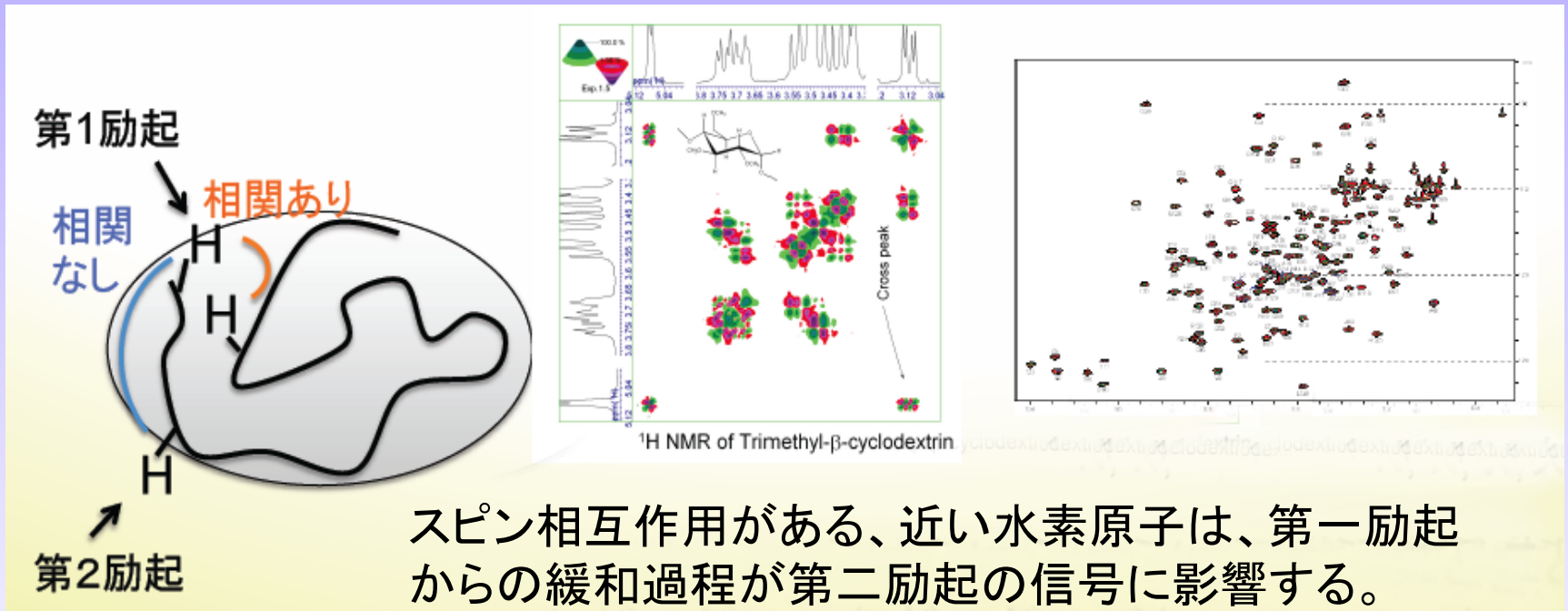


回転運動には二つの角度 θ と ϕ の自由度がある。磁場中の原子に電磁波を当ててスピンの向きをそろえると、電磁波を切った後歳差運動しながら、それぞれの角度方向へ拡散する。この時、 θ 方向の拡散緩和時間 T_1 を縦緩和時間、 ϕ 方向の T_2 を横緩和時間と呼ぶ。

実際に観測されるNMRシグナルは、原子集団からの平均信号で、そのなかにはいろいろな状態の原子が含まれる。緩和時間は各原子の状態(磁場強度、原子間の共鳴)に依って変わるので、緩和時間から分子構造や周囲の情報が得られる。

2次元NMR

近接したプロトン間では、スピン-スピン相互作用のため、スピンの値が交換し、緩和時間が変化する。COrrrelation SpectroscopY(COSY) 異なるシフトピーク間の緩和時間の相関をしらべることで、どの水素同士が近接しているかが分かる。



パルス励起の間隔 t_1 、励起周波数と継続時間で特定のスピン状態を作り出し、その結果のFID(Free Induction Decay)の時間 t_2 とでシグナルを得る。得られた時間情報はフーリエ変換により周波数情報に直して解析する。

光免疫センサ

免疫センサは抗原(病原体)と抗体(イムノグロブリンタンパク)の結合を検出するセンサ。

今までに様々なトランスデューサと抗体を組み合わせた免疫センサが研究された。その中でも、特に生体に対する侵襲がほとんどない、光免疫センサの原理について紹介する。

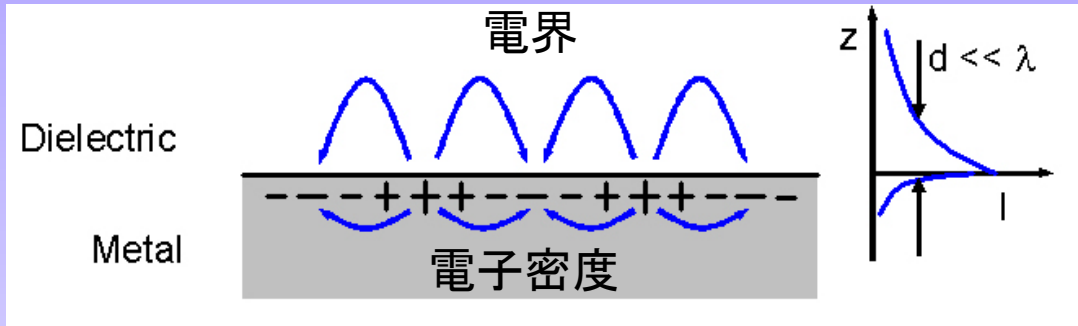
それらの問題点が理解できれば、今後の発展の可能性についても見通しが見えてくるのではないだろうか。

SPRセンサ

SPRは表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance) の略で、金属と誘電体の境界において、特定周波数 (波長、波数) の電子密度波が励起される現象である。

SPRは極めて狭い周波数範囲で起きるため、周波数の僅かな変化も敏感に検知できる。
この現象を利用して、金属表面の誘電率変化を測定するのがSPRセンサである。

SPRの原理



$$K(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2 \mu_1 \mu_2}{\epsilon_1 \mu_1 + \epsilon_2 \mu_2}}$$

K : wave number, ω : angular frequency

c : light velocity,

ϵ : electric permittivity,

μ : magnetic permittivity

(1: the glass block, 2: the metal film)

金属と誘電体の境界において、誘電体中に電界の波が発生すると、電界の連続性により金属中にも電界が侵入し、それによって電子密度の波ができる。

誘電体中の電界はマクスウェルの法則に従って、誘電率と透磁率で波数が決まる。

一方、金属中の電子密度波は損失項によって位相の遅れが生じるため、複素誘電率と透磁率によって波数が決まる。

誘電体と金属中の波の波数が一致した波が境界面に発生する。この時の周波数が共鳴周波数である。

波数の一致

進行する平面波、

$$E = E_0 \exp j(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})$$

の波数ベクトル \mathbf{k} は座標軸の方向成分に分解できる。波数の絶対値 k と x 成分 k_x の関係は、波数の方向ベクトルと x 軸がなす角を θ とすると、

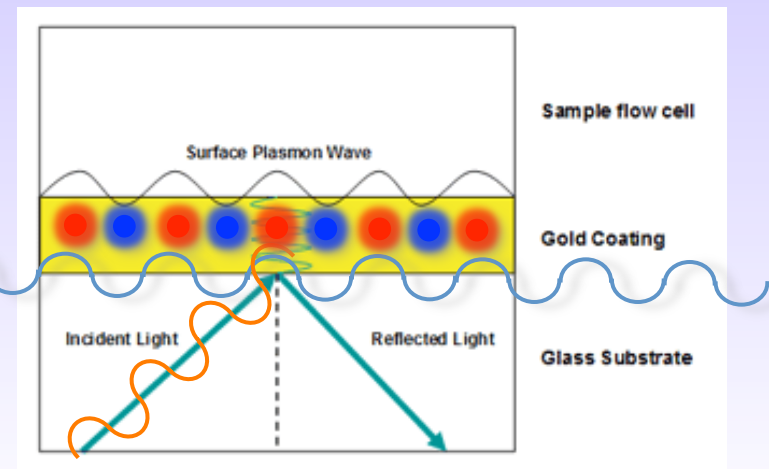
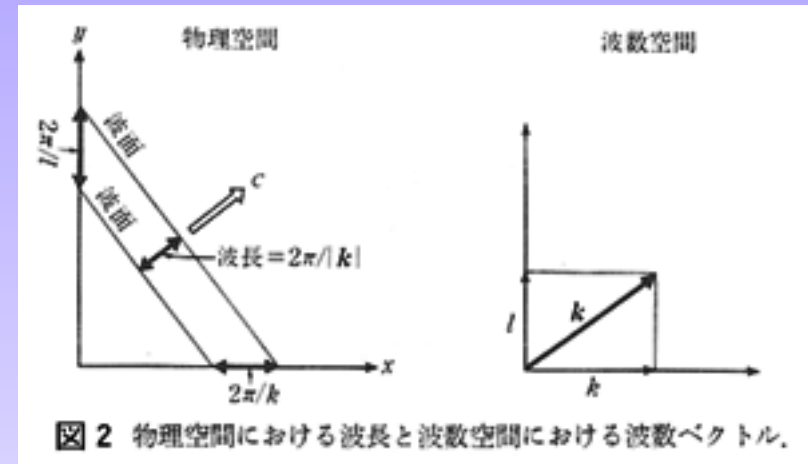
$$k_x = k \cos(\theta)$$

で与えられる。波数は波長 λ の逆数であることから、 x 軸方向の波長 λ_x は

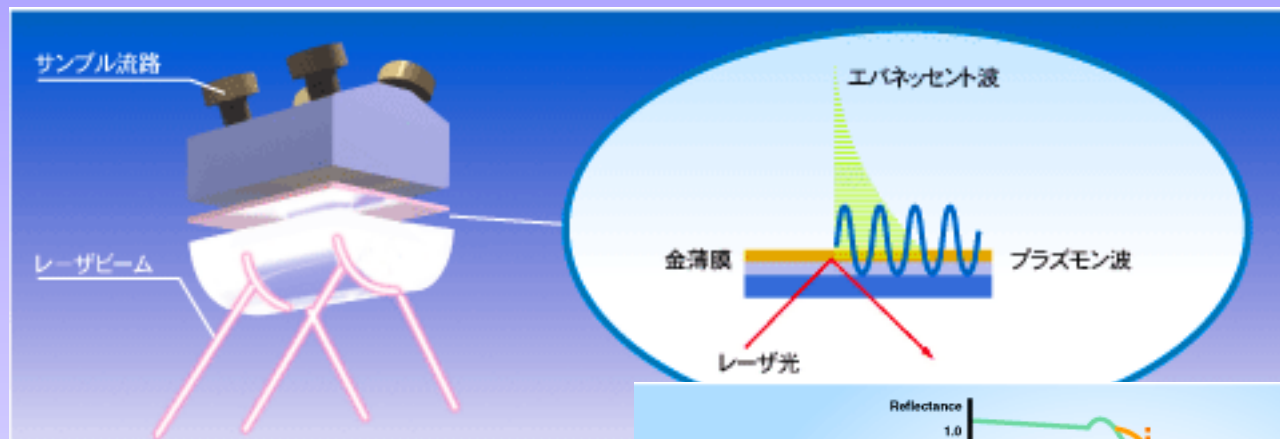
$$\lambda_x = \lambda / \cos(\theta)$$

で、角度によって波長が変わることが分かる。

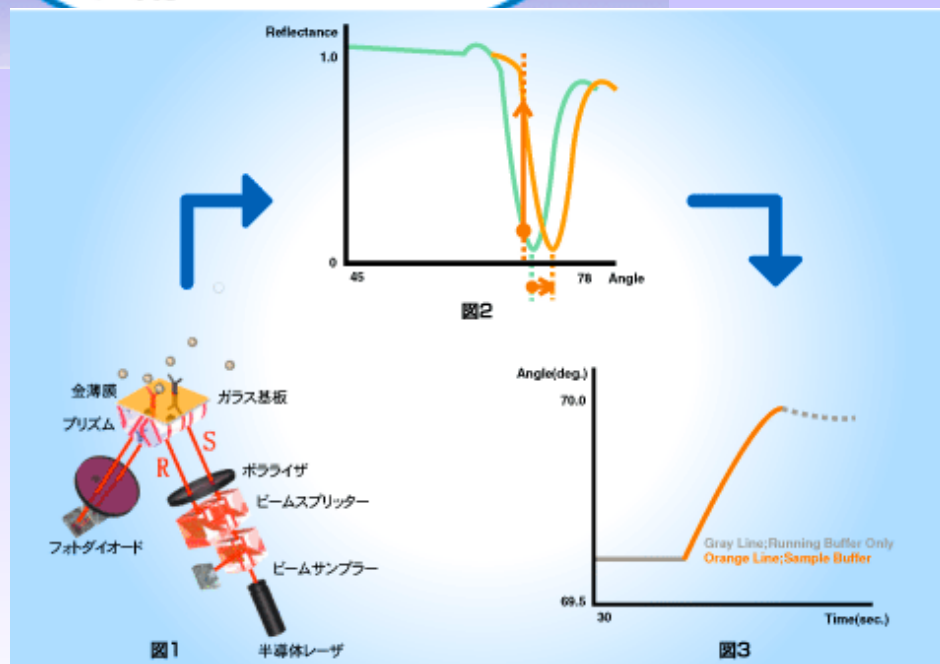
SPR周波数より少し高い周波数の光を入射した場合、入射角を調整することで波長を伸ばし、共振条件を満たすことができる。界面に沿った波数が共振に一致したとき、プラズモンが光エネルギーを金薄膜の表面に伝達し、エバネッセント波を励起する。



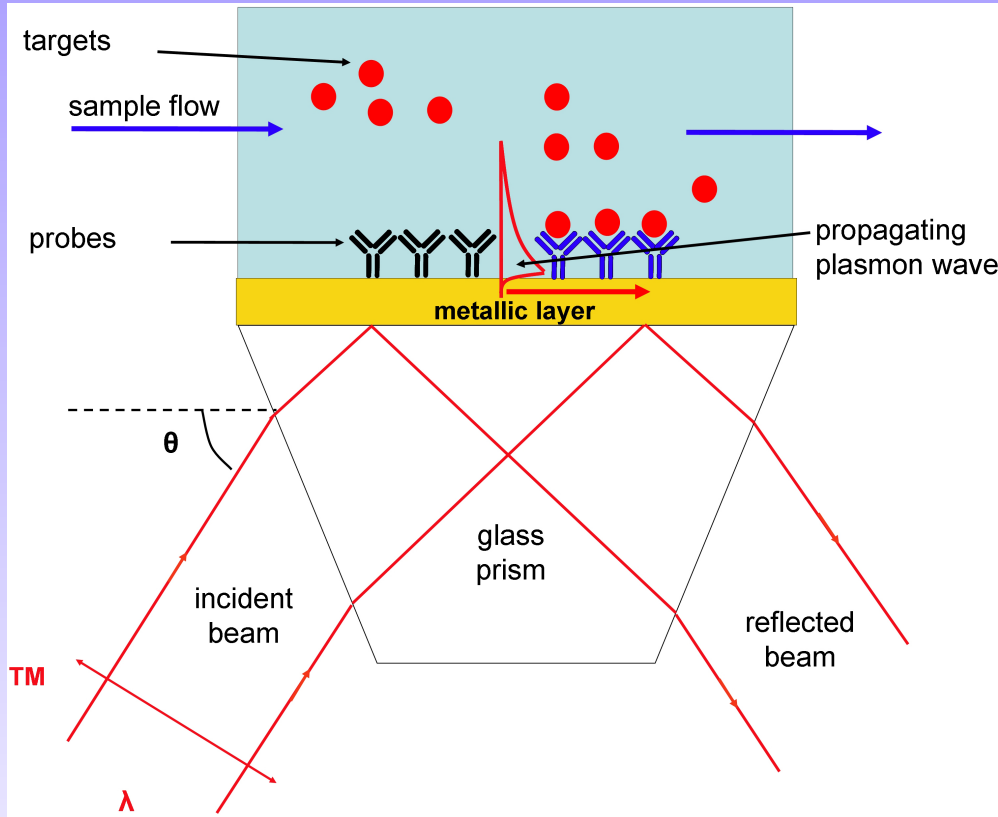
SPR装置



金の薄膜の裏からプリズムを通してレーザービームを入射すると、共鳴周波数でプラズモン波が立ち、表面側の溶液にエバネッセント波が侵入する。タンパク質などが吸着すると表面の誘電率が変わるので、共鳴周波数もシフトする。このシフトを反射角の変化として検出する。



SPR免疫センサ



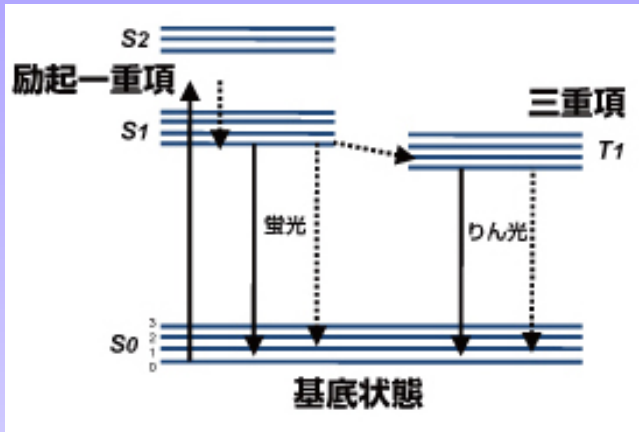
抗体に対する、抗原の特異的結合を、抗原結合量の変化としてSPRで検出することで、免疫センサとなる。

精製した試料に対しては非常に高い感度を持っている。非特異吸着を表面修飾で抑えると、標的の検出が可能。

しかし、・・・生成された1種類のタンパクにしか使えないのでは、血液などの免疫検査には使えない。

蛍光

蛍光



電子は光エネルギーを吸収して基底状態から励起状態に上がり、光を放出してもとの状態に戻る。この時発生する光を蛍光や燐光と呼ぶ。

HOMO軌道内の電子のスピンの $1/2$ と $-1/2$ で全スピン 0 の状態から、 0 の状態のLUMOへの遷移を一重項遷移と呼ぶ。一重項遷移はスピン状態が変わらないので速く(数ns)で起きる。これによる速い発光が蛍光である。

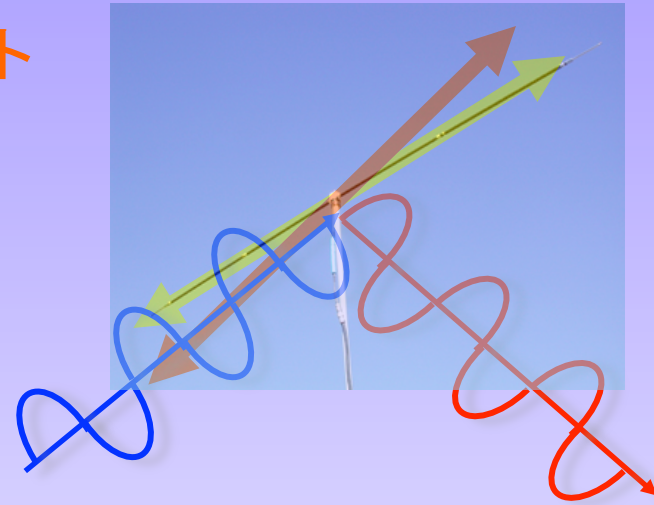
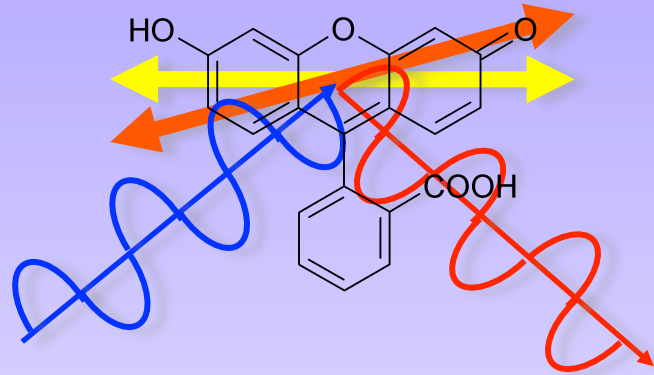
LUMO軌道内の電子のスピンの $1/2$ と $1/2$ で全スピン 1 の状態を三重項と呼ぶ。励起された電子が一重項からより安定な三重項に落ちると、その後スピンを交換しなければ一重項のHOMOには戻れない。このため、遷移確率が低く、発光までの時間が長くなったのが燐光である。



サンゴの蛍光

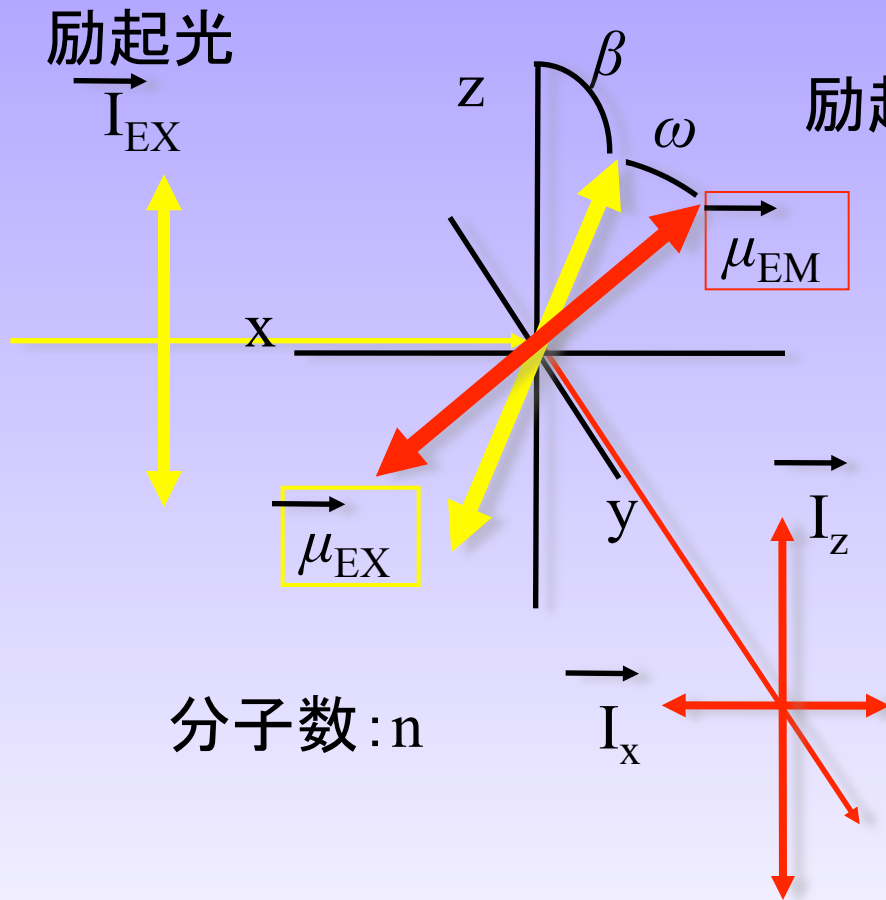
光のアンテナ

励起モーメント 発光モーメント



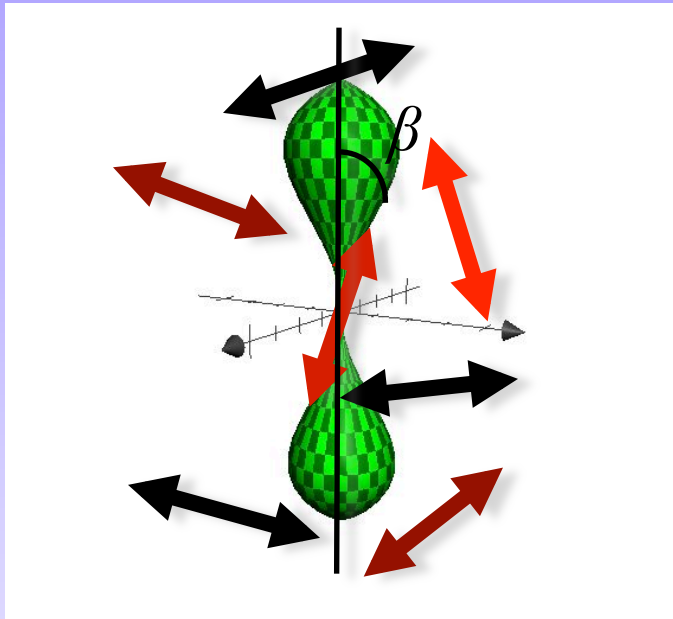
電磁波の振動方向が分子の励起モーメントと同じ向きだと励起されやすく、同じ方向に振動する電磁波を放出する。

1 蛍光分子の励起と発光



励起分子からの蛍光発光は、発光モーメント μ_{EM} の方向によって、 I_z 成分と I_x 成分の両方向振動成分を持つ。観測される蛍光は色々な方向を向いた分子集団からの発光の積分となる。

蛍光分子集団の励起と発光



励起分布: $\Omega_E(\beta)$

励起光の振動ベクトルをz軸とした時の、極からの天頂角を β ,励起光入射軸からの方位角を ϕ とする。励起確率はエネルギー密度に比例するので、励起モーメント方向の電界強度 $E \cos(\beta)$ の2乗に比例する。また、 β 方向を向いた励起分子数はその立体角 $2\pi \sin(\beta)$ 倍になる。よって励起分子の分布関数 Ω_E は角度 β の関数となる。

$$\begin{aligned}\Omega_E(\beta) &= n \cos^2 \beta \cdot 2\pi \sin \beta \\ &= 2n\pi \cos^2 \beta \sin \beta\end{aligned}$$

ここで、 n は分子数の密度である。

簡単のため分子の励起モーメント μ_A と発光モーメント μ_E が等しいとすると、発光する分子集団も同じ分布を持つ。

このように、蛍光分子は本来、角度分布を持って励起され、発光する。

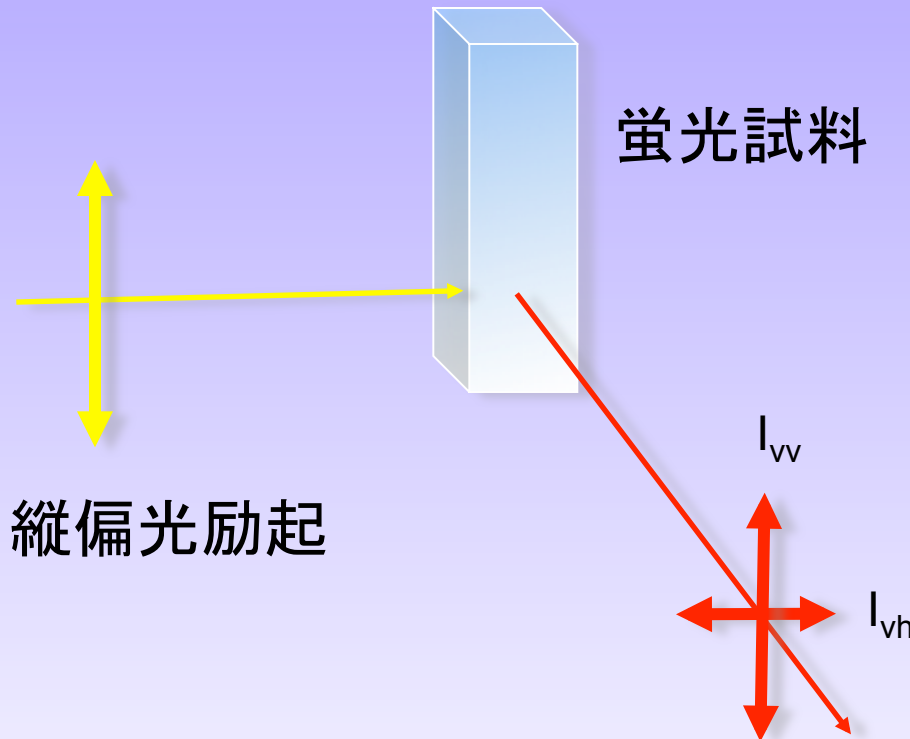
蛍光異方性

励起光が偏光でなければ、励起分布は等方的になる。

しかし、縦偏光によって励起すると、蛍光分子が角度分布を持って励起され、縦横で異なる強度の偏光発光がおきる。縦偏光を I_{vv} 、横偏光を I_{vh} として、励起分布の偏りの大きさ、蛍光異方性 r を以下の式で定義する。

$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2I_{vh}}$$

蛍光異方性 r は分子の角度分布を表し、分子の回転運動によって減少する。



1分子の蛍光異方性

天頂角 β の発光ベクトルを持つ
1分子からの蛍光は、強度を
与える定数 k 、円周角 φ として、
垂直成分 I_{vv} と水平成分 I_{vh} は、
それぞれ

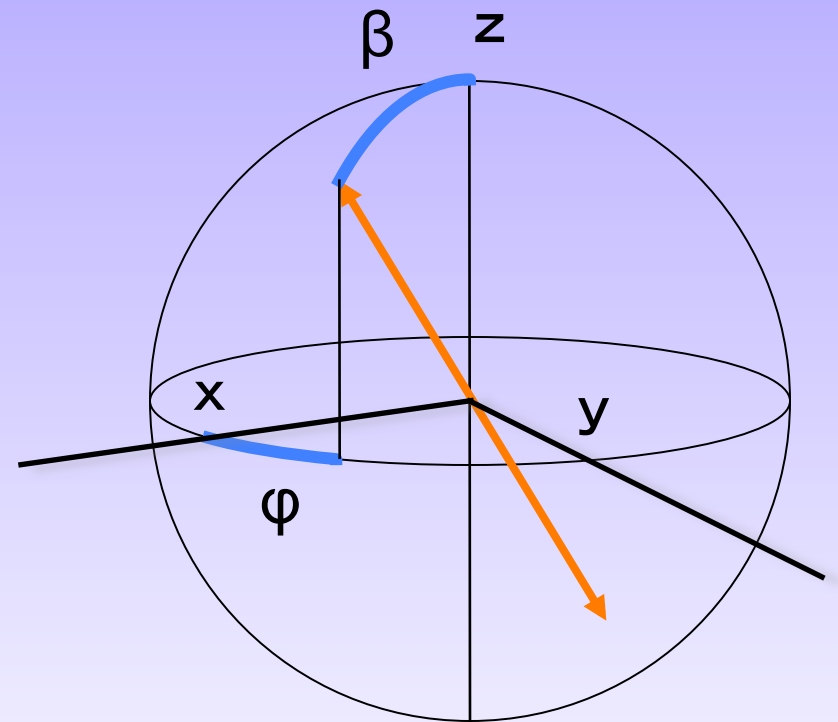
$$I_{vv} = k \cos^2 \beta$$

$$I_{vh} = k \sin^2 \beta \cos^2 \varphi$$

となる。 $\cos^2 \varphi$ を一周積分すると
 $1/2$ 。各成分を異方性 r の定義
式に代入して、

$$r = \frac{k(\cos^2 \beta - 1/2 \sin^2 \beta)}{k(\cos^2 \beta + \sin^2 \beta)} = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2}$$

を得る。



蛍光分子の方向分布

全積分が1となるように規格化した励起分布 $\Omega(\beta)$

$$\Omega(\beta) = 3\cos^2\beta\sin\beta$$

をもつ分子集団からの、蛍光発光の異方性 r は、

$$\begin{aligned} r &= \int \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \Omega_E(\beta) d\beta \\ &= \int \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} 3\cos^2\beta\sin\beta d\beta \end{aligned}$$

で求められ、全立体角上での積分値は0.4になる。

励起モーメントと発光モーメントのなす角が ω の場合には球面三角法の計算により

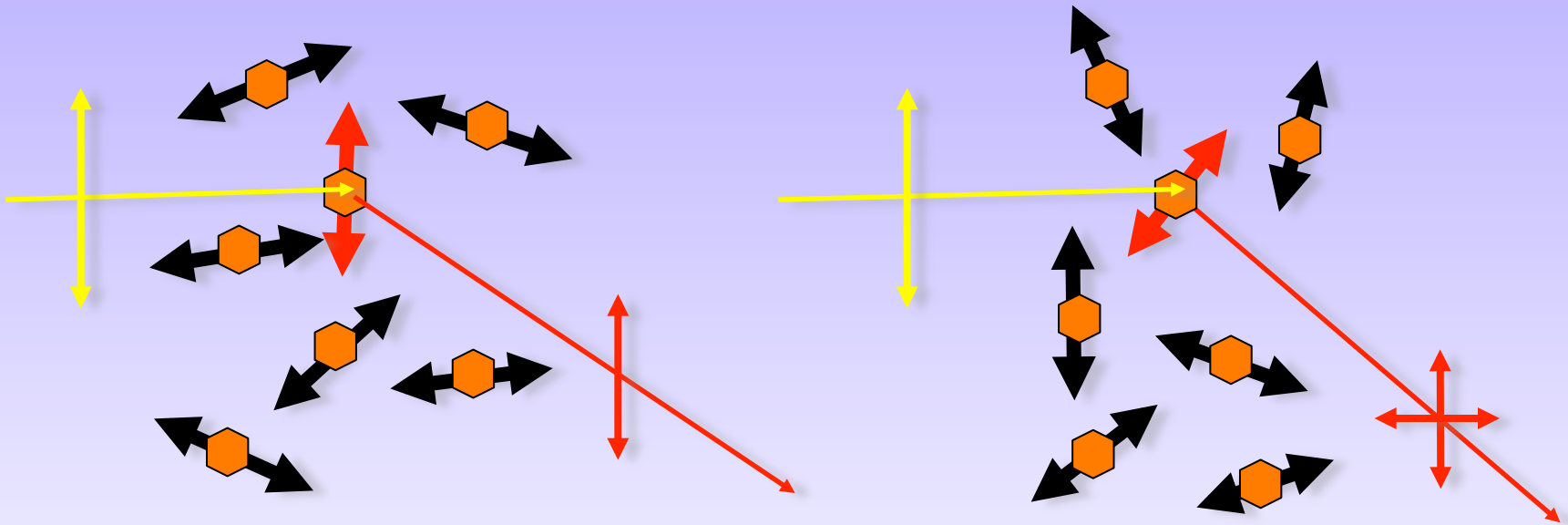
$$\begin{aligned} r &= \int \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \left(\frac{3\cos^2\omega - 1}{2} \right) \Omega_E(\beta) d\beta \\ &= 0.4 \left(\frac{3\cos^2\omega - 1}{2} \right) \end{aligned}$$

となる。

この値は励起モーメントと発光モーメントがずれるほど減少し、0.4から-0.2の間で変化する。

励起分布方向の緩和

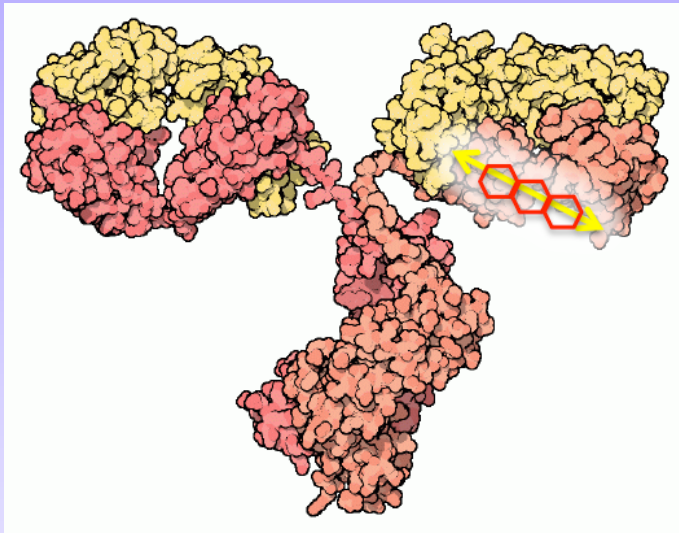
熱振動によって励起と発光のモーメントがずれる場合も、全く同じように異方性は減少する。分子集団の異方性は分子振動の速さによって緩和され、その様子が蛍光異方性の現象として観測される。



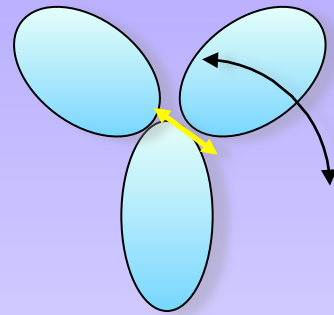
運動が遅いと励起と発光の振動方向が一致。＞異方性が高い。

運動が速いと発光までに振動方向がずれる。＞異方性が低くなる。

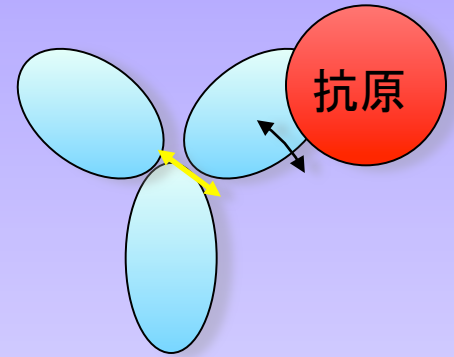
抗体タンパク



IgG分子(抗体)の模式図。
様々な病原体を認識して結合する。
抗体に蛍光分子をラベルすることで、運動速度を測定する。



何も結合していない抗体
回転速度が速く、
 r が小さい。

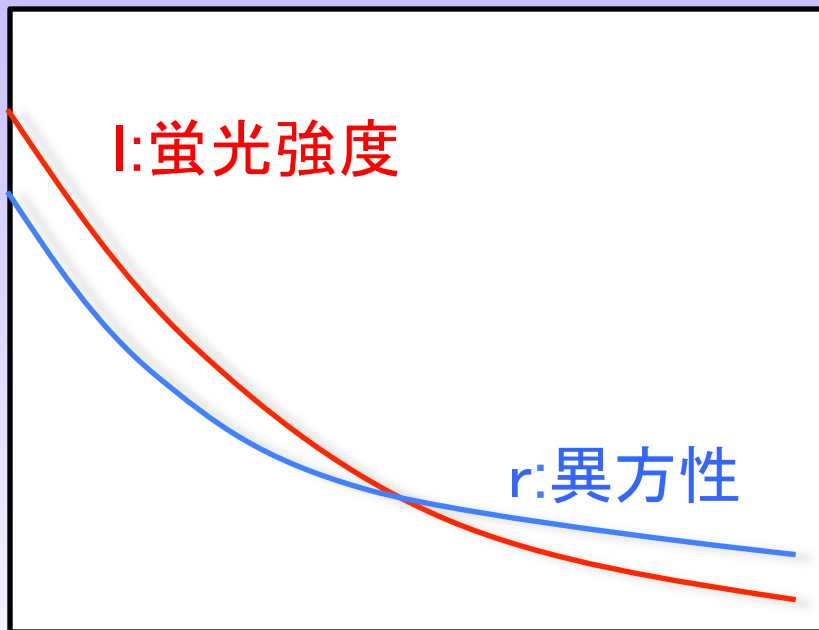


抗原が結合した抗体
回転速度が下がり、
 r が大きい

抗体単独では速く振動するので異方性 r が小さいが、病原体(抗原)が結合すると、振動が遅くなり、 r が大きくなる。

連続光励起

異方性の時間的緩和は、インパルス状の励起光に対して観察できる現象と考えられる。しかし、連続光で励起した場合でも、蛍光強度の減少と異方性緩和の積が積分された値が観測される。



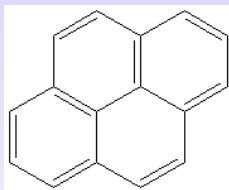
蛍光強度が一瞬で0になれば、観測される異方性の値は、最大値になる。逆に蛍光強度が減少しなければ異方性はもっとも低い値に近くなる。

異方性の緩和速度の変化を、最も敏感に測定するためには、異方性の緩和時間と蛍光の寿命が近い方が良い。

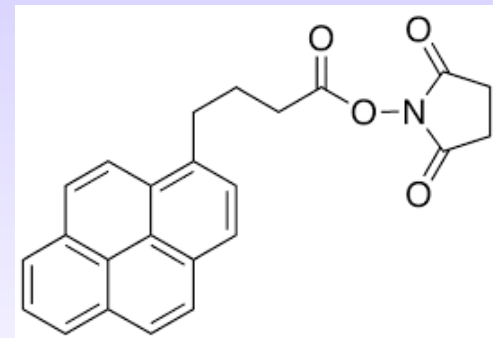
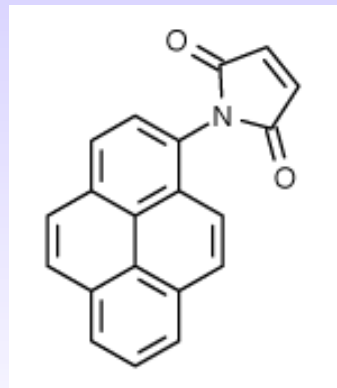
蛍光分子の選択

単独の蛍光分子の回転運動速度は1ns程度、タンパク分子の分子振動の特性時間は10ns以上(30ns)になる。蛍光寿命は通常4ns程度なので、巨大分子の運動観測にはふさわしくない。

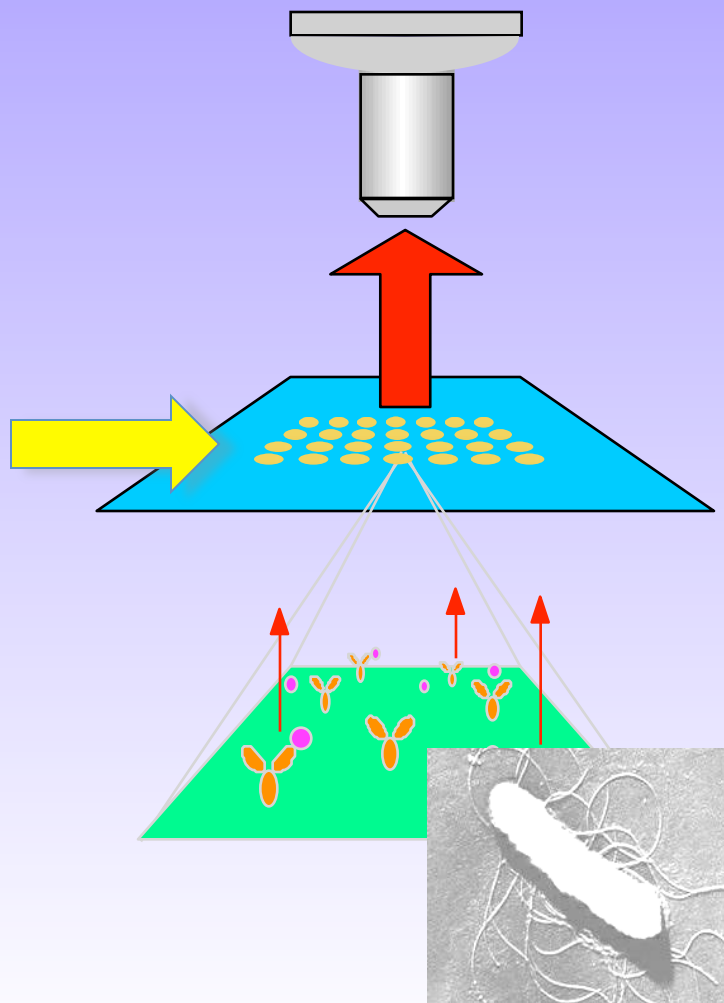
Pyrene分子は蛍光分子としては異例に長い30-100nsの寿命を持つ。抗体分子をPyreneでラベルすることで回転緩和速度の変化を高感度で測定することができる。



Pyrene



蛍光異方性光免疫センサ



様々な病原体に結合する抗体をガラス基板上のスポットに固定。抗体一分子の運動を蛍光の偏光性で測定することで、各スポットに病原体が結合したかどうかを知ることができる。

このセンサなら、血液一滴でどんな病気も診断できる？

光ファイバプローブを用いた蛍光相関分光測定

現在の微細加工技術はナノ・メートルスケールに及び、原子・分子を直接操作するナノテクノロジーの発展が期待されている。一方、タンパクのような生体高分子はそれ自体がナノマシンであり、一分子計測の重要性が増している。

この研究では、生体高分子における分子間相互作用をネイティブの状態で測定する、蛍光相関分光法をより簡便かつ柔軟に実施するため、光ファイバ型近視野プローブを開発する。

蛍光相関分光法

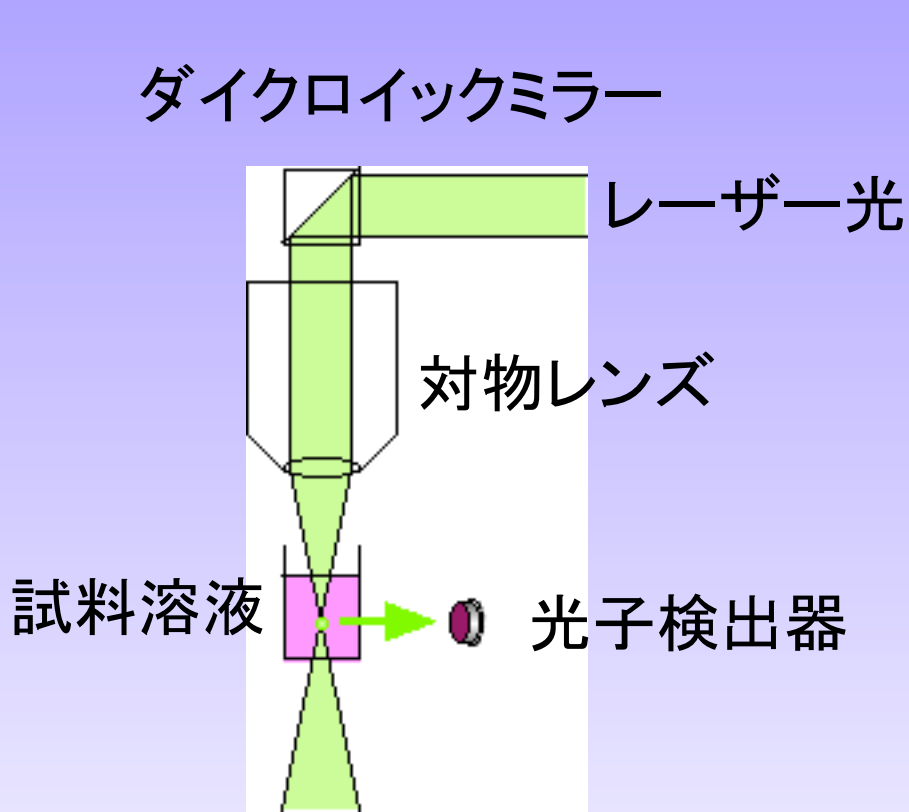


図1a 蛍光相関分光用のレーザー光学系

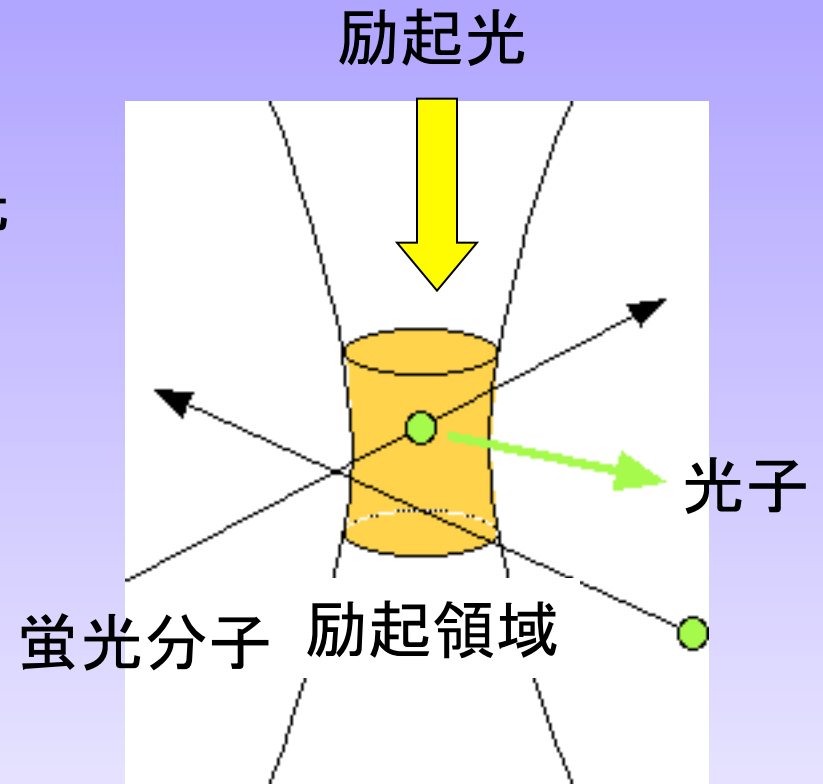


図1b 微小な励起領域を通過する分子の検出

パルス列の自己相関

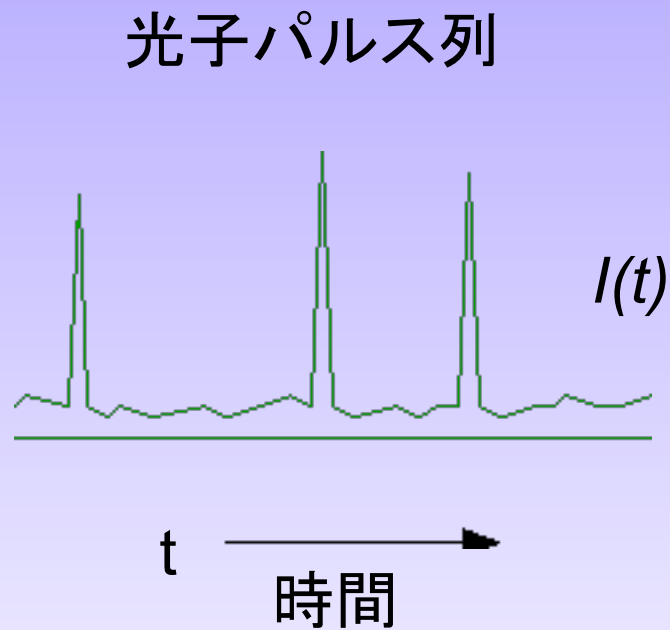


図2a 通過分子から発する光子のパルス列

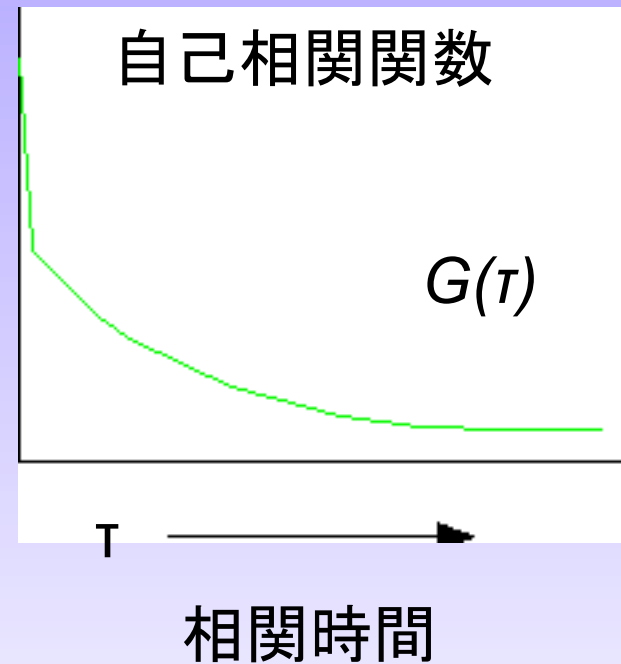


図2b 光子の相関

自己相関関数と拡散・分子密度

$$C(\tau) = \frac{\langle I(\tau)I(t+\tau) \rangle}{\langle I^2 \rangle}$$

$$= 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + 4D\tau / w_{xy}^2} \right) \left(\frac{1}{1 + 4D\tau / w_z^2} \right)^{1/2}$$

$I(t)$: 蛍光強度、 $C(\tau)$: 規格化された相関関数、
 τ : 相関時間、 D : 拡散係数、 w_k : 励起領域の軸長
 N : 分子密度

光ファイバプローブ

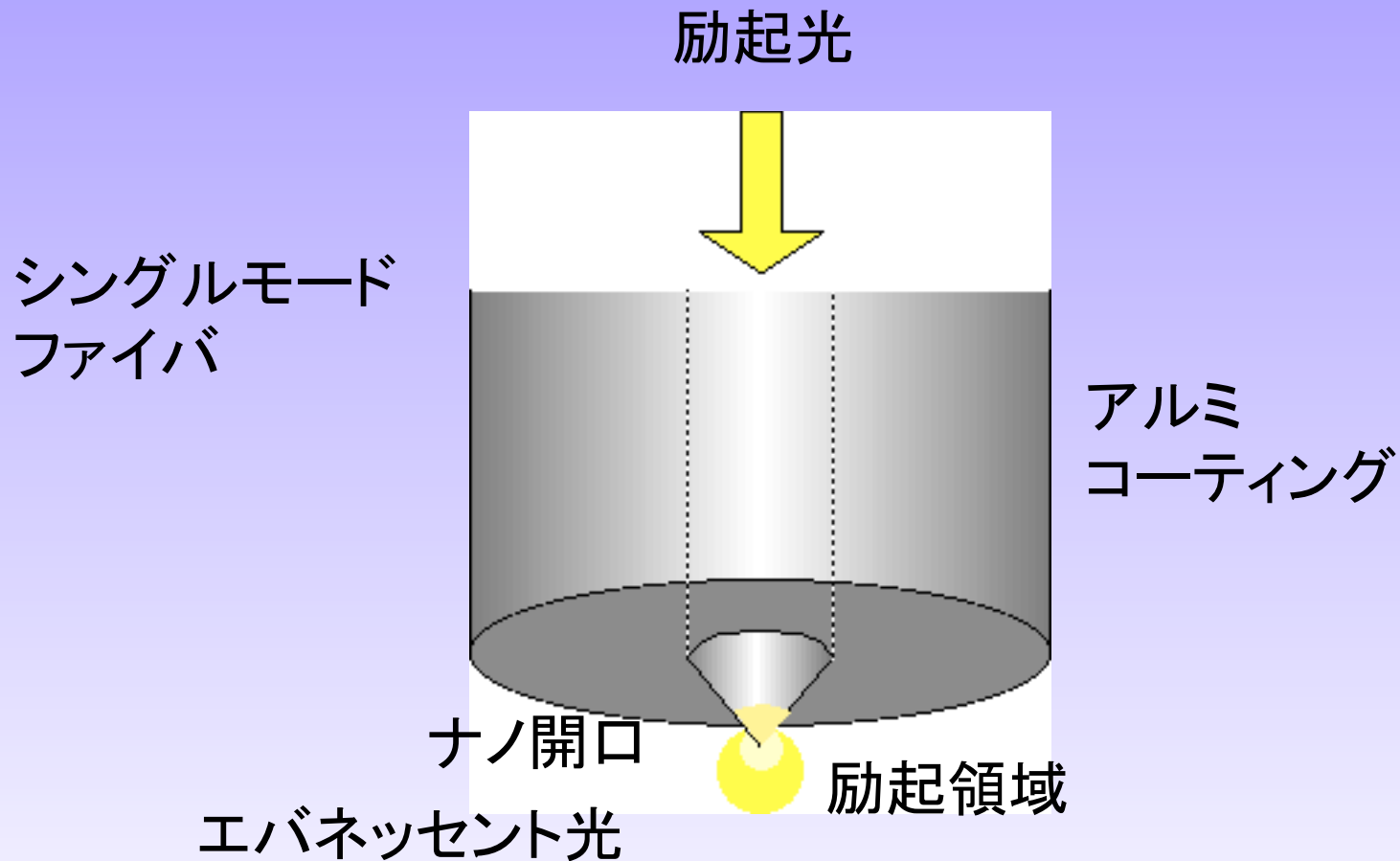
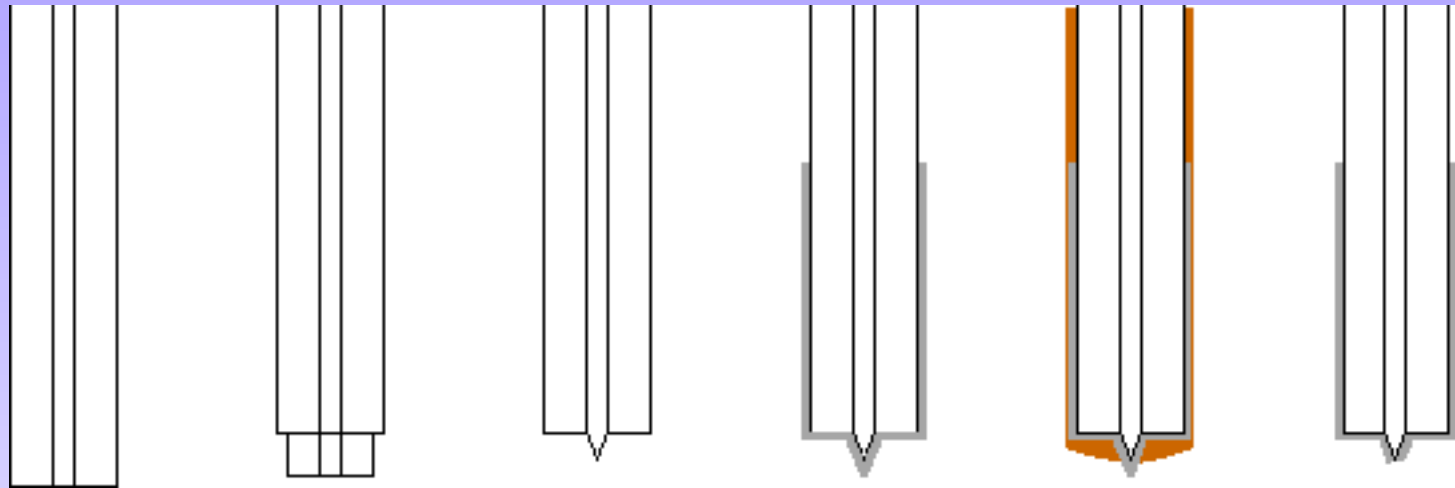


図3 ナノ開口を持つ近接場ファイバプローブ

選択化学エッチング



シングル
モードフ
ァイバ

1段階エ
ッチング

2段階エ
ッチング

アルミ
蒸着

レジストコ
ーティン
グ

アルミ
エッチン
グとレジ
スト除去

図4 光ファイバプローブの製作工程

ナノ開口の検証

表1 開口サイズの検証

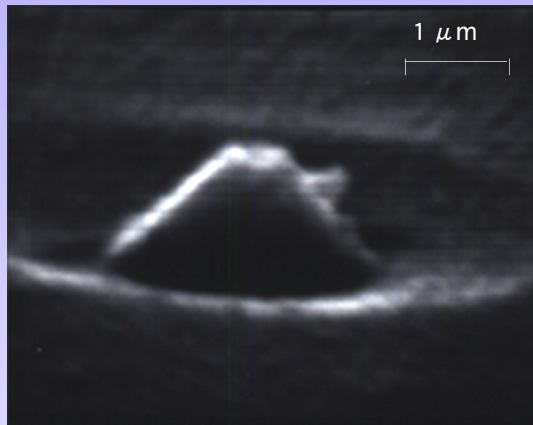


図5 ナノ開口の走査型電子顕微鏡写真

開口サイズ	水 光学フィルタなし	蛍光分子 光学フィルタなし	蛍光分子 光学フィルタ挿入
波長以上	カウント大	カウント大	カウント減少
波長以下	ノイズ	カウント増加	カウント増加
開口なし	ノイズ	ノイズ	ノイズ

フォトンカウンティング装置

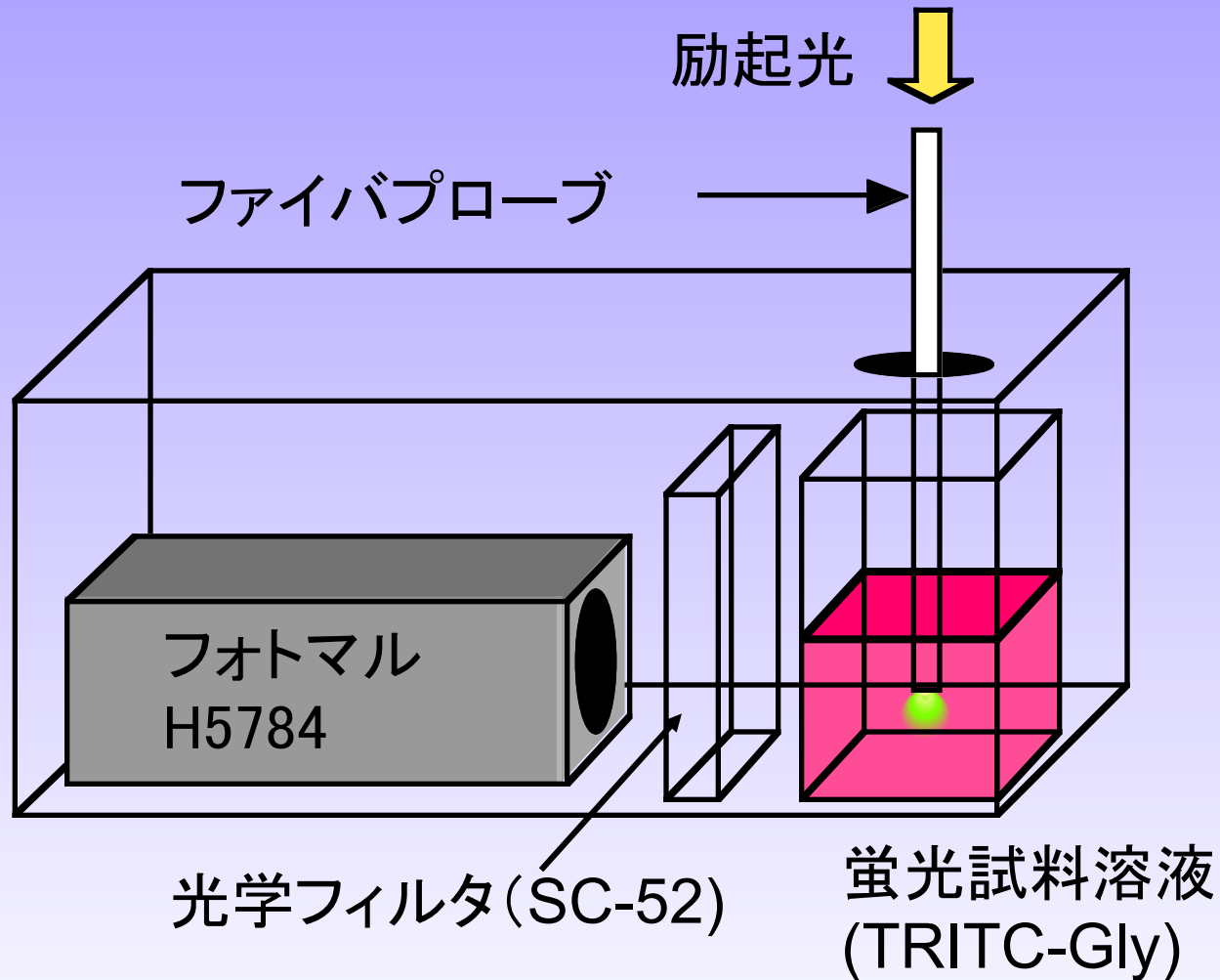


図6 フォトンカウンティング用の蛍光測定系

蛍光分子からのフォトンカウント

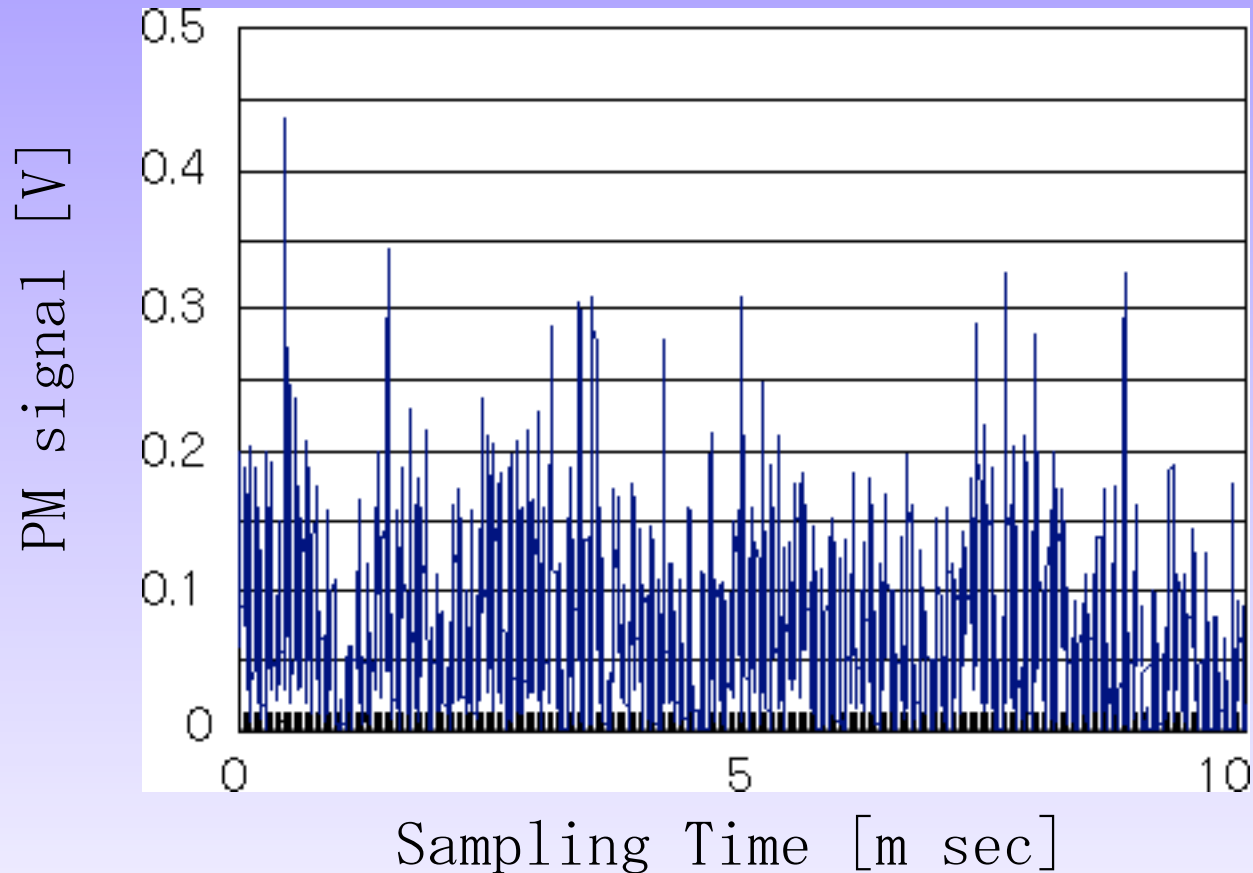


図7 10msecの間に発生したTRITC-Gly溶液からのフォトンのパルス列。

自己相関関数

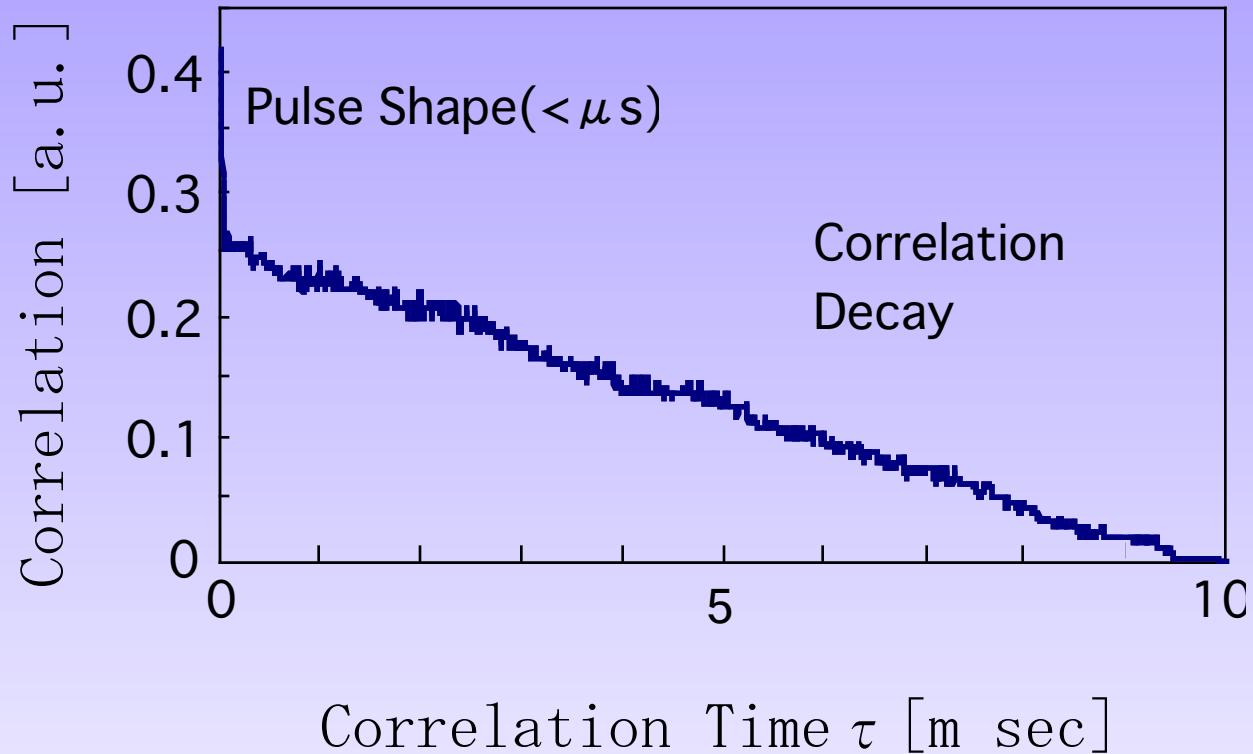


図8 フォトンパルス列の自己相関関数。

微小開口光ファイバプローブの応用

<生体試料のIn situ測定>

生物が生きた状態での、分子間の相互作用を組織にファイバ先端を挿入するだけで測定する。

<高濃度試料の蛍光相関分光測定>

本来希薄溶液が必要である蛍光相関分光法をより高濃度の試料に適用することができる。

<サブミクロン領域での1分子観察>

1分子の位置を1ミクロン以下の領域内に特定できる。