

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、基礎的な解説と実例を通じて、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^[1]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^[1-3]。

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 τ 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 τ 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 Φ_F および蛍光寿命 τ 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^[4-6]。

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、N₂レーザーおよびN₂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N₂レーザーの繰り返し周波数は50 Hz程度であった)^[7]。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^[8]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^[7]。

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。

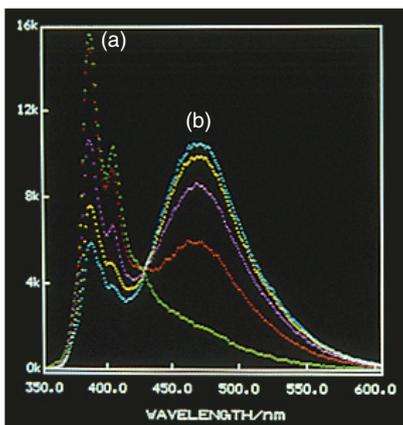


Figure 2 Excimer formation in de-gassed sample: Pyrene in cyclohexane (2.2 mMol).
(a) Monomer Emission, (b) Excimer emission.

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 θ)・局所粘度・構造変化を明らかにする。**Figure 3**は、ANS*¹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^[1,9]。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^[10]。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^[3]。

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

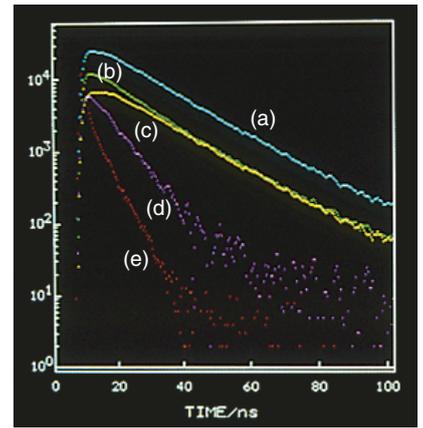


Figure 3 Anisotropy decay: (a) $I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t)$, (b) $I_{\parallel}(t)$, (c) $I_{\perp}(t)$, (d) $I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)$, (e) Lamp profile. Sample was provided by Dr. Tunesha Araiso, Hokkaido Univ.

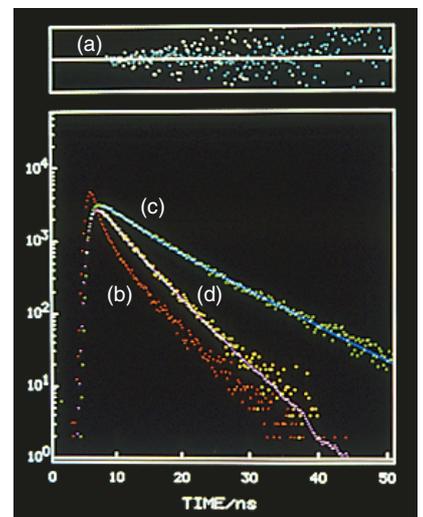


Figure 4 Excitation: 470nm, SDS conc.: 5 nM (a) Residual, (b) Excitation profile (c) Obs.630 nm, $\tau_1=2.48$ ns (41.2%), $\tau_2=9.03$ ns (58.8%) (d) Obs.535 nm, $\tau_1=1.41$ ns (54%), $\tau_2=3.48$ ns (45.5%)

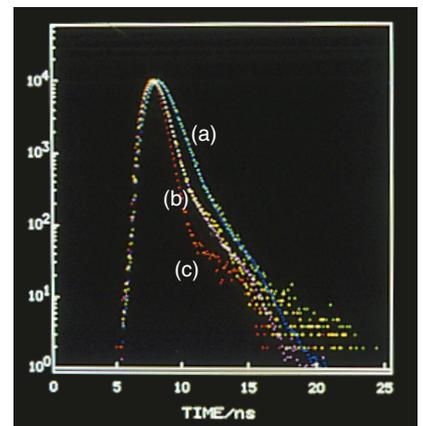


Figure 5 Excitation 337 nm(N_2 laser) Observation 660 nm. Sample (a) $\tau_1=680$ ps(83.1%), $\tau_2=1.26$ ns(16.9%) Sample (b) $\tau_1=199$ ps(83.8%), $\tau_2=1.16$ ns(16.2%) (c) Laser pulse profile. Sample: provided by Dr. Shigekazu Minagawa, Central Research Laboratory, Hitachi Ltd.

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、 Φ_D は供与体の量子収率、 κ^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 κ^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 $\epsilon_A(\lambda)$ の間のスペクトルの重なりを示す積分である。

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

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、 τ_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、 τ_{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。^[1, 5, 6, 9]

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

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 θ (蛍光回転相関時間)の場合、 $I_{\parallel}(t)$ および $I_{\perp}(t)$ はSpencerとWeber^[5]により、以下の式で示される。

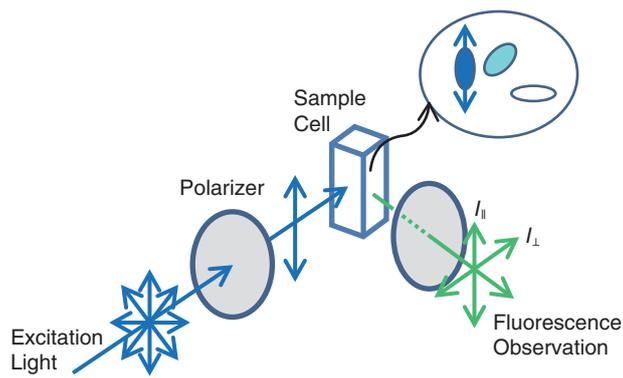


Figure 6 Polarized excitation and fluorescence detection.

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

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。

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

θ 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、 η 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、 θ は異方性減衰により求められ、 η または V は、どちらかがわかれば求めることができる。 θ は回転緩和時間(ρ)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、 τ は蛍光寿命を示す。3つのパラメーター r_0 、 τ 、 θ は、(T 、 η)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/η) のプロット(ベランプロット)^[1,9]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

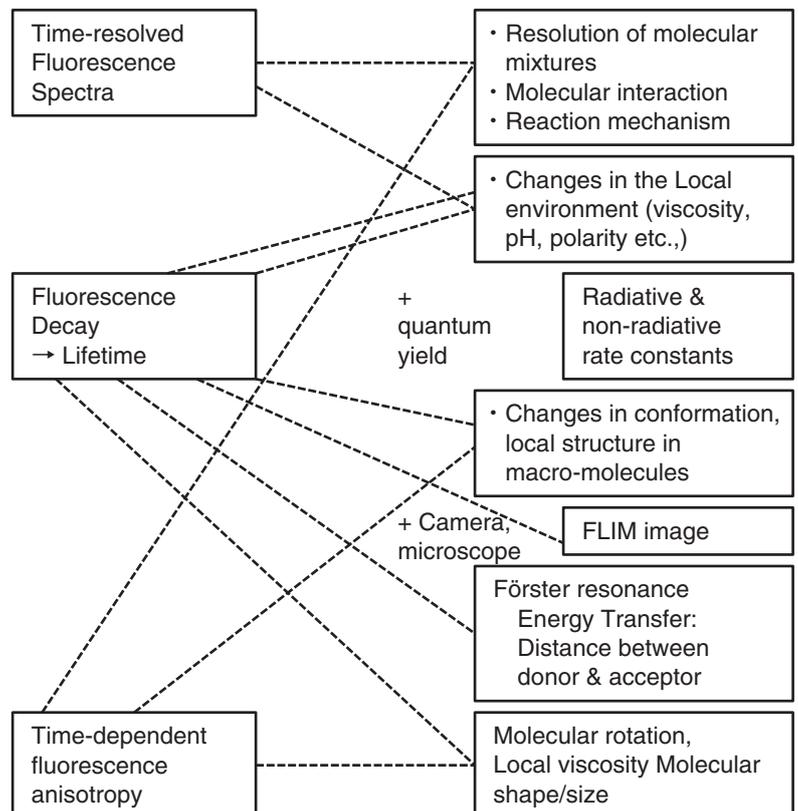


Table 1 Observable and Molecular property in TRFM.

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(JobinYovon)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.