

ヘモグロビンの電子励起状態の光学特性

¹畿央大教育学習基盤センター, ²大阪大院基礎工

○冬木正紀¹, 竹原輝², 永井正也², 芦田昌明²

Optical Property of Electronically Excited Hemoglobin

○Masanori Fuyuki¹, Hikaru Takehara², Masaya Nagai², Masaaki Ashida²

¹ Center for Teaching, Learning and Technology, Kio University, Japan

² Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Japan

【Abstract】 Optical property of electronically excited hemoglobin was investigated by conducting transient absorption measurement of hemoglobin in water. Electronic excitation by UV femtosecond (fs) pulse resonant to the gamma transition induced the decrease of absorbance in the wavelength region from 600 nm to 650 nm. Whereas, NIR fs pulse induced the increase of absorbance in the same wavelength region. The absorbance change remained for several ps after UV pulse irradiation, whereas the change distinguished within several hundred fs after NIR irradiation. These results indicate that hemoglobin molecules excited by UV multiphoton contributed to the negative absorbance change and those excited by NIR multiphoton to the electronic excited states energetically higher than the states reached by the UV multiphoton contributed to the positive absorbance change. In addition, the molecular band-like sequential absorbance change was observed in the wavelength range from 650 nm to 750 nm. The energetic difference between the bands was about 450 cm^{-1} and the change was attributed to Fe-OH vibration.

【序】 血液循環は生体活動においてのみならず、腫瘍治療における薬の体内輸送を担うなど医療においても重要な役割を果たしている。その一方で、可視、近赤外領域において高い吸光特性を持つ血液中のヘモグロビンが、蛍光物質を用いた人体内部の腫瘍検出等を困難にしている。現在は 600nm から 900nm までの比較的吸光度の低い波長領域、いわゆる生体の窓を利用して、体表から数 cm の領域の腫瘍検出や光学力線療法、臓器のイメージング等が行われている[1,2]。

一般に分子は電子励起することによりその光吸収特性が変化する[3]。そこで、本研究では、ヘモグロビンの電子励起により生体の窓がさらに開く可能性の有無を明らかにすることをその目的と定めた。

【方法】 ヘモグロビン水溶液に超短パルス照射し、水溶液の吸光度のポンプ=プローブ遅延時間依存性を計測した。ポンプパルスとしてはヘモグロビンのポルフィリンの π 電子の Soret 遷移に共鳴する 410nm の UV パルスと、その半分の光子エネルギーを持つ 820nm の NIR パルスを用意した。NIR パルスは、再生増幅器 (High Q Laser 社製、SC-1042-1000HE) からの出力パルス (1KHz、1042nm、約 470fs) を OPA 変換することにより発生させた。また、NIR パルスの 2 倍波を BBO 結晶より発生させて UV パルスとして用いた。そして、再生増幅器の出力パルスをサファイア結晶に照射して発生する白色パルスをプローブパルスとして用いた。ポンプパルスのサンプル上のスポット径は約 0.05mm であり、NIR および UV パルスの強度は各々約 3mJ/cm^2 、 1.3mJ/cm^2 であった。

ヘモグロビン水溶液の濃度は約 0.8 % であり、酸素の溶解込みおよび熱効果を抑制するために約 20°C 以下で循環させた。サーキットには光路長約 0.5 mm の分光光度計

測用セル（ジーエルサイエンス社製、FLAB50-UV-02）を組み込み、ポンプおよびプローブパルスを照射した。そして、ポンプ＝プローブ遅延時間を変化させながら、サンプル通過後のプローブパルスを USB 分光器（Thorlabs 社製、CCS175/M）で分光計測した。

【結果・考察】 図 1 に NIR パルス照射直後の過渡吸収スペクトルを記す。600nm から 650nm の領域で吸光度の増加が観測された。電子基底状態のヘモグロビンは 530nm から 600nm にかけてポルフィリンの π 電子の遷移に由来する α および β 帯の吸収ピークを持ち、600nm から 650nm の領域はその裾に相当する[4]。そのため、この吸光度変化はヘモグロビン内部のヘムタンパク質の構造が変化したことを示唆している。

図 2 には 625nm における吸光度変化のポンププローブ遅延時間依存性を示す。NIR ポンプパルスの時間幅（約 400fs）相当の時間のみ過渡的な吸光度の変化が観測された。NIR パルスの 2 光子励起で到達する準位での電子寿命が数百 ps と報告されているため[5]、今回の結果は NIR3 光子以上の励起により吸光度の過渡的な増加が引き起こされたことを示唆している。本実験の照射強度は NIR2 光子励起の飽和強度[6]を上回っているため、過渡的に高エネルギー状態が誘起されたと考えられる。

図 2 には UV パルス照射時の吸光度変化の時間プロファイルも示している。NIR 照射時と異なり負の変化が観測された。また、UV パルス照射後も数 ps にわたり負の吸光度変化が観測された。正の遅延時間領域の時間プロファイルは約 0.6ps と 2.6ps の時定数を持つ指数減衰成分の和によりよく再現される（図 2 実線）。これらの結果は、UV2 光子以上の多光子励起により負の吸光度変化が誘起されたこと、そして、その電子励起状態は NIR パルス照射時の電子励起状態よりも低エネルギーであることを示唆している。

なお、図 1 に示すように NIR パルス照射時には 650nm から 750nm にかけて正負が逆転した比較的細いバンドのペアがほぼ等間隔に観測された。これらの間隔は約 450cm^{-1} であり、電子基底状態におけるヘムタンパク質の Fe と溶媒分子の OH 間の振動エネルギーに相当する[7]。今回の実験結果は、NIR パルス励起時に Fe-OH 結合強度が変化することによっても吸光度の変化が誘起されたことを示唆している。

ポンプパルスの波長に対するヘモグロビンの吸光度変化の依存性を示した本研究の一連の結果は、ポンプパルスの波長を選択することにより、生体の窓をさらに開くことが出来る可能性を示唆している。

【謝辞】 大阪大学基礎工学部の谷本直輝氏の本研究への協力に感謝致します。

【参考文献】 [1] J. T. Alander *et al.* *Int. J. Biomed. Imaging* Article ID 940585 (2012). [2] H. Tsujimoto *et al.* *Cancer Sci.* **105**, 1626 (2014). [3] G. Herzberg, “Molecular Spectra and Molecular Structure, III, Electronic Spectra and Electronic Structure of Polyatomic Molecules, 2nd ed.”, (Van Nostrand, New York, 1950). [4] R. Lemberg and J. W. Legge, “Haematin Compounds and Bile Pigments”, (Interscience Publ., New York, 1949). [5] I. Saytashev *et al.* *Biomed. Opt. Express.* **7**, 3449 (2016). [6] G. O. Clay *et al.* *J. Chem. Phys.* **126**, 25102 (2007). [7] T. Kitagawa and T. Ogura in *Progress Inorg. Chem.* (K. D. Karlin Ed.) (Wiley & Sons, New York, 1996) 45, pp. 431-479.

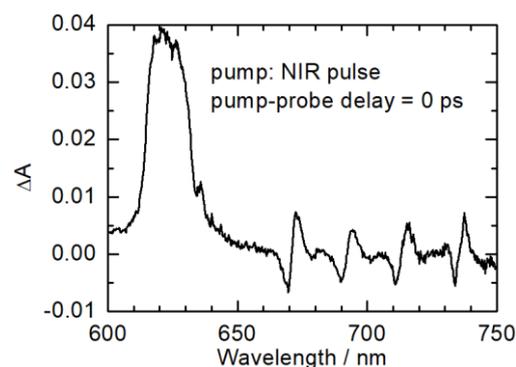


Fig. 1. Transient absorbance spectrum of hemoglobin in water.

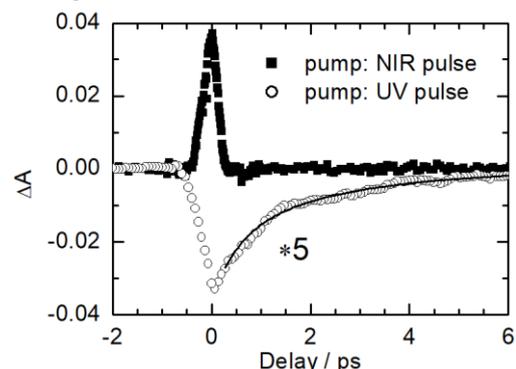


Fig. 2. Absorbance change at 625 nm as a function of pump-probe delay time.