慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	水分子振動モード・水素結合の全反射光マッピング法による細胞内イオン分布非侵襲計測
Sub Title	Non-intrusive measurement of intercellular ions distribution by total internal reflection mapping method between vibration modes and hydrogen bonding of water molecules
Author	佐藤, 洋平(Sato, Yohei)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	電解質溶液における水分子およびイオンの動態を、潜在的に困難と思われてきた全反射ラマン顕微法（全反射ラマン分光法および全反射ラマン散乱光イメージング法）の開発により解明を行った。取得した水分子からの微弱なラマンスペクトルおよびラマン散乱光画像を用いた新たな解析法の提案を行い、イオン介在による水分子の水素結合状態、そしてイオン周りの水和殻状態を実験的に明らかにした。 Dynamics of water molecules and ions in electrolyte solutions were investigated by development of total internal reflection (TIR) Raman microscopy. In this study, TIR Raman spectroscopy and TIR Raman imaging were proposed, whose signals have been considered as the low signals-to-noise ratio. The new type of analysis methods using the Raman spectra and the Raman images from water molecules were proposed to investigate the dynamics of the hydrogen bonding of water molecules and the hydrogen shell around ions. The obtained results will provide further insight into the dynamics of intra-and intercellular water molecules.
Notes	研究種目：挑戦的研究 (開拓) 研究期間：2019～2023 課題番号：19H05505・20K20431 研究分野：熱流体工学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K20431seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ５ 月 ２２ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的研究（開拓）
研究期間：2019～2023
課題番号：１９Ｈ０５５０５・２０Ｋ２０４３１

研究課題名（和文）水分子振動モード・水素結合の全反射光マッピング法による細胞内イオン分布非侵襲計測

研究課題名（英文）Non-intrusive measurement of intercellular ions distribution by total internal reflection mapping method between vibration modes and hydrogen bonding of water molecules

研究代表者

佐藤　洋平（SATO, Yohei）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：００３４４１２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　20,000,000円

研究成果の概要（和文）：電解質溶液における水分子およびイオンの動態を、潜在的に困難と思われてきた全反射ラマン顕微法（全反射ラマン分光法および全反射ラマン散乱光イメージング法）の開発により解明を行った。取得した水分子からの微弱なラマンスペクトルおよびラマン散乱光画像を用いた新たな解析法の提案を行い、イオン介在による水分子の水素結合状態、そしてイオン周りの水和殻状態を実験的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
水分子およびイオンの動態は、現在まで古典物理や古典化学に基づいて議論されてきたが、イオン介在による物理現象を的確に把握することが困難であった。本研究では実験的に初めて、イオン周りの水分子の水素結合状態、そして水和殻状態を定量的に把握し、様々な物理パラメータとの関連性を明らかにした点は、学術的意義を有している。細胞内液には様々なイオンが存在していることから、イオンが病に及ぼす影響の解明に貢献できると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Dynamics of water molecules and ions in electrolyte solutions were investigated by development of total internal reflection (TIR) Raman microscopy. In this study, TIR Raman spectroscopy and TIR Raman imaging were proposed, whose signals have been considered as the low signals-to-noise ratio. The new type of analysis methods using the Raman spectra and the Raman images from water molecules were proposed to investigate the dynamics of the hydrogen bonding of water molecules and the hydrogen shell around ions. The obtained results will provide further insight into the dynamics of intra-and intercellular water molecules.

研究分野：熱流体工学

キーワード：全反射ラマン分光法　全反射ラマン散乱光イメージング法　ラマンスペクトル解析法　水分子動態　水素結合状態　イオン動態　イオン周りの水和殻状態　細胞内液

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

（１）癌をはじめとする様々な病と、細胞内外液に含まれるイオン種との関連性が明らかになりつつあるが（Stroka *et al.* 2014）、細胞内外液に存在する水分子およびイオンの動態に関する実験的研究は皆無であった。何故なら、分子動力学シミュレーションでさえも再現することが困難であり、水分子やイオンからの微弱な信号を取得することは不可能であると思われていた。人体の約 60%は水分子から構成されていることから、病が水分子に何らかの影響を及ぼしていることは、古くから考えられていた（Mentré 1996）。水分子およびイオンの動態が、病に及ぼす影響が明らかとなれば、将来の未病に貢献すると期待されている。

２．研究の目的

（１）細胞内液を模擬した電解質溶液における水分子およびイオンの動態を、潜在的に困難と思われてきた全反射ラマン顕微法（全反射ラマン分光法および全反射ラマン散乱光イメージング法）の開発により解明を行った。本研究では、イオン周りの水分子の水素結合状態、そしてイオン周りの水和殻状態を、「動態」と呼ぶ。細胞膜極近傍の細胞内液を模擬するため、石英ガラス基板の極近傍に存在する水分子およびイオンに、レーザ光の全反射によるエバネッセント波を励起光として照射し、ラマン不活性なイオン周りに存在する水分子からのラマン散乱光の取得を行った。取得した水分子からの微弱なラマンスペクトルおよびラマン散乱光画像を用いた新たな解析法を開発し、水分子およびイオンの動態の解明を行った。

３．研究の方法

（１）励起光として 488 nm を有するレーザ光源、広視野エバネッセント波照射システム等を顕微鏡に装着し、分光器を介して EM-CCD カメラを装着した計測システムにより全反射ラマン分光法を、バンドパスフィルタを介して EM-CCD カメラを装着した計測システムにより全反射ラマン散乱光イメージング法を構築した。全反射ラマン散乱光イメージング法では、水分子の水素結合、非水素結合、および多価陽イオン（金属イオン）の振動モードに特化した 3 種類のバンドパスフィルタを選定し、それぞれを EM-CCD カメラに装着し、計 3 台の EM-CCD カメラを用いて、ラマン散乱光画像を撮像した。全反射ラマン分光法により、ラマン不活性なイオン周りの水分子のラマンスペクトルを、そして全反射ラマン散乱光イメージング法により、イオン周りの水分子のラマン散乱光画像の時空間分布の取得を行った。

（２）細胞内液を模擬した陽イオン（金属イオン）および陰イオンを選定した。その際、構造破壊イオンおよび構造形成イオンとの組み合わせを、細胞内液に近い組み合わせとし、数百種類以上の濃度を調整した。

（３）一般的に用いられているホウケイ酸ガラス基板からの著しいノイズが除去できないため、石英ガラス基板を選定した。しかし、水分子とシラノール基との結合によるノイズの除去は、ハードウェアの観点からは困難であったため、バックグラウンドノイズとしてポストプロセッシング処理を行った。

（４）本研究において新たに開発した解析法は、①多種イオンに特化したイオン周りの水分子の水素結合状態を明らかにする解析法、②多種イオン周りの水和殻状態を明らかにす

る解析法、③イオン周りの水分子の水素結合状態の時空間分布を明らかにする解析法である。

４．研究成果

（１）イオン周りの水分子の水素結合状態は、イオンの性質（構造破壊、あるいは構造形成)、固体壁面の有無（バルク、あるいは壁面極近傍)、固体壁面の性状（親水性、あるいは疎水性)、イオン濃度、外力の有無（電界、コリオリ力）等で、変化することが明らかとなった。（図１参照）

（２）従来、多種イオン介在（例えば、2 種類の陽イオンと 2 種類の陰イオン等）による解析結果は､単体イオンの解析結果の総和により現象の把握が可能であると思われていた。しかし、本研究による解析結果より、イオン間の相互干渉や固体壁面の有無等の影響により、単なる総和のみで現象の把握が不可能であることが明らかとなった。具体的には、構造破壊イオンが構造形成イオンに及ぼす影響、そしてその逆の影響が、固体壁面の有無によって変化することが明らかとなった。

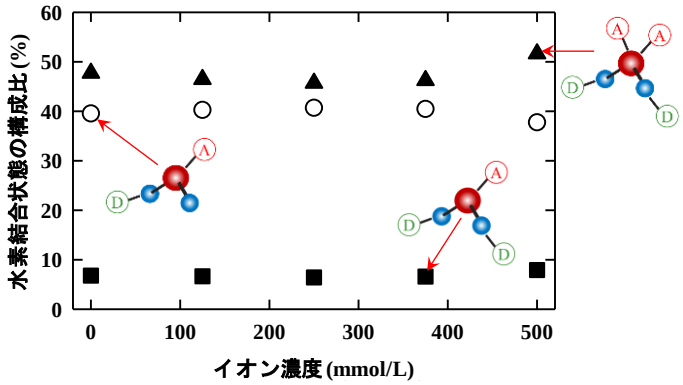

図１　Na_3PO_4 溶液における、イオン周りの水分子の水素結合状態の構成比。

（３）従来、古典物理では、イオン周りの水和殻を形成する水分子の数を「水和数」と定義されてきたが、電解質溶液中では陽イオンおよび陰イオンが共存しているので、他のイオンの影響を水和数に反映することが不可能であった。本研究では、他のイオン、そして水分子の影響を考慮した解析法を開発し、イオン周りの第 2 水和殻までに引き寄せられる水分子の数を「水分子誘引数」と新たに定義をした。これにより、例えば、構造破壊を有する陰イオンによる、構造形成を有する陽イオンへの影響を考慮することが可能となり、

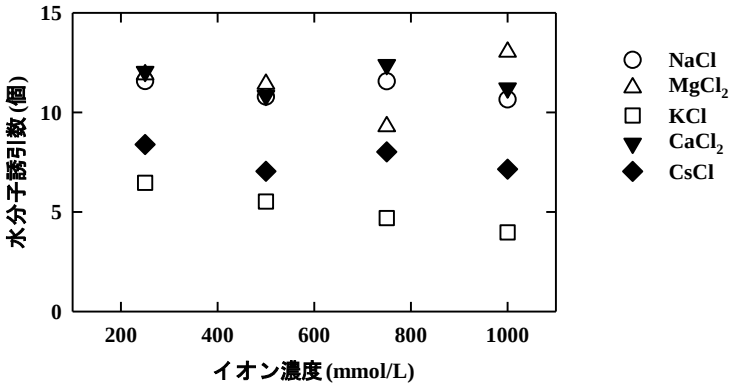

図２　イオン周りの水分子誘引数。

「水分子誘引数」は、介在するイオン種、イオン濃度や固体壁面の有無等によって変化することが明らかとなった。（図２参照）

（４）「水分子誘引数」を用いた解析法を、多種イオンが介在する電解質混合溶液へ拡張を行い、混合溶液における所望のイオン周りの水和殻状態を解明することが可能となった。更に介在するイオン種、イオン濃度や固体壁面の有無等によって変化することが明らかとなった。

（５）全反射ラマン散乱光イメージング法によって取得したラマン散乱光画像から、イオン周りの水分子の水素結合状態を抽出可能とする解析法により、全反射ラマン分光法により得られた水素結合状態の結果との整合性を確認した。

（６）全反射ラマン顕微法による水分子からのラマン散乱光強度は、通常のラマン散乱光強度と比べて、3 桁程度微弱であり、更に様々な外的要因によるノイズを含んでいる。本研究では、コロナ禍において制限された実験、そして実験器具や材料等の入手が困難となった状況下で、殆どのノイズの特定を行い、除去することが可能となった。これにより、全反射ラマン顕微法による微弱なラマン散乱光を用いても、充分、水分子およびイオンの動態を解析することが可能となった。

＜引用文献＞

Mentré, P., 1996, L’eau dans la cellule−Une interface hétérogène et dynamique des macromolécules, Elsevier Masson.

Stroka, K.M., *et al.*, 2014, Water permeation drives tumor cell migration in confined microenvironments, *Cell*, Vol. 157, No. 3, pp. 611−623.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Reiko KURIYAMA, Yuta TANAKA, Shimon AKIYAMA, Yohei SATO	４．巻 30
２．論文標題 Precise near-wall pH measurement in pressure-driven and electrically-driven flows using nanoscale laser-induced fluorescence imaging	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Measurement Science and Technology	６．最初と最後の頁 115204（14pp）
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6501/ab2d3e	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 栗山怜子，佐藤洋平	４．巻 58
２．論文標題 マイクロ・ナノスケールにおける熱流動可視化技術の発展（表面近傍計測ならびに非侵襲化への取り組み）	５．発行年 2019年
３．雑誌名 伝熱	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） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計9件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 田島慶太，渡邉宙志，佐藤洋平，山本詠士
２．発表標題 分子シミュレーションを用いた水溶液中の過酸化水素分子の構造ダイナミクス解析
３．学会等名 日本機械学会関東支部第28期総会・講演会
４．発表年 2021年

１．発表者名 加藤優佑，佐藤洋平，山本詠士
２．発表標題 極性-無極性混合溶液の構造変化が熱輸送に与える影響
３．学会等名 日本機械学会 関東支部 第27期総会・講演会
４．発表年 2021年

１．発表者名
西川祐貴，長田晃輔，嘉副裕，佐藤洋平

２．発表標題
交差型CARS分光顕微鏡を用いた電解質混合溶液の非侵襲濃度計測

３．学会等名
2019年度日本分光学会年次講演会

４．発表年
2019年

１．発表者名
黒栁颯人，宮島昂宏，山本詠士，佐藤洋平

２．発表標題
電解質溶液・石英ガラス界面極近傍における水分子挙動の解明

３．学会等名
2019年度日本分光学会年次講演会

４．発表年
2019年

１．発表者名
熊谷哲，木下晴貴，嘉副裕，佐藤洋平

２．発表標題
壁面ゼータ電位の変化に伴う固液界面極近傍における水分子振動モードの計測

３．学会等名
2019年度日本分光学会年次講演会

４．発表年
2019年

１．発表者名
吉﨑駿人，馬場徹太，山本詠士，佐藤洋平

２．発表標題
電解質混合溶液における水分子の水素・非水素結合の評価

３．学会等名
2019年度日本分光学会年次講演会

４．発表年
2019年

１．発表者名
福井健策，川合裕高，山本詠士，佐藤洋平

２．発表標題
電解質溶液のイオン濃度変化による水分子の水素・非水素結合の評価

３．学会等名
2019年度日本分光学会年次講演会

４．発表年
2019年

１．発表者名
加藤優佑，山本詠士，佐藤 洋平

２．発表標題
温度勾配下における水分子ダイナミクスの電場による制御

３．学会等名
第40回日本熱物性シンポジウム

４．発表年
2019年

１．発表者名
Yusuke KATO, Yohei SATO, Eiji YAMAMOTO

２．発表標題
Water dynamics under thermal gradient and electric field

３．学会等名
International Conference on Molecular Simulation（国際学会）

４．発表年
2019年

〔図書〕　計1件

１．著者名	４．発行年
マイクロ・ナノ熱工学の進展編集委員会	2021年
２．出版社	５．総ページ数
株式会社エヌ・ティー・エス	808
３．書名	
マイクロ・ナノ熱工学の進展	

〔産業財産権〕

〔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

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関