蛍光測定で使われる略号

蛍光は，蛍光骨格の電子が励起一重項状態から基底状態に戻る際に放出される光であり，その波長は二つの状態のエネルギー差で規定される．蛍光には，波長，量子収率，寿命などの特性があり，これらは蛍光骨格の近傍の原子団や蛍光分子が存在する環境によって変化する．そして，蛍光は，微量物質の定量，標的物質の選択的な測定，微小環境の評価など，様々な目的で利用されている．測定対象物質が蛍光分子である場合は，そのまま測定可能であるが，多くの物質は蛍光を持たないため，蛍光分子との選択的な反応を利用して，測定することが多い．

1　蛍光特性に関する用語

1･1　PeT（photoinduced electron transfer, 光誘起電子移動）

まず初めに，蛍光の on 状態と off 状態を制御する仕組みである PeT を紹介する．PeT は，光吸収によって励起状態になる際の蛍光骨格とその近傍の原子団との間の電子移動である．移動により，電子が元の基底状態に戻ることができなくなり蛍光が off 状態になる a-PeT（acceptor excited PeT）と，戻ることができるようになり蛍光が on 状態になる d-PeT（donor excited PeT）がある（図 1）[1]．

a-PeT では，蛍光骨格の近傍の原子団の HOMO エネルギーレベルが，蛍光骨格の基底状態と励起一重項状態の間にあり，励起によって空いた蛍光骨格の基底状態に近傍の原子団の HOMO に存在する電子が移動する．その結果，蛍光骨格の励起された電子は元に戻れず，近傍の原子団の空いた HOMO に入るため，蛍光が off 状態になる．一方，d-PeT では，近傍にの原子団の LUMO のエネルギーが蛍光骨格の励起一重項状態より高くなり，電子が励起一重項から基底状態に戻ることができるようになり，蛍光が on 状態になる．近傍の原子団の HOMO 及び LUMO のエネルギーは，その原子団の電子密度によって調整することができる．

1･2　FRET（förster resonance transfer, 蛍光共鳴エネルギー移動）

次に，蛍光分子の励起や蛍光の波長を制御する仕組みとして，FRET，ICT，EPIST を紹介する．FRET は，2 種の蛍光骨格が近い位置（通常は 10～100 Å）に存在する時に，励起エネルギーが donor から acceptor へ無輻射的に移動するため，励起波長の短い蛍光骨格が励起される．その結果，蛍光波長の長い蛍光骨格の蛍光が観察される現象である．エネルギー移動が起こる効率（FRET 効率）は二つの蛍光骨格の相対的位置関係を反映している．また，励起エネルギー移動速度が，発光遷移速度，無放射遷移速度よりも速ければ，FRET 効率が高くなる．

1･3　ICT（intramolecular charge transfer, 分子内電荷移動）

ICT は，蛍光骨格が励起された後に，電荷の再配置が起こり，分子内で donor から acceptor に電荷が移動する現象である．PeT は近傍の原子団の HOMO や LUMO のエネルギーレベルが変化するのに対して，ICT は蛍光団の donor の HOMO に acceptor の LUMO が強い影響を及ぼし，HOMO-LUMO ギャップが小さく

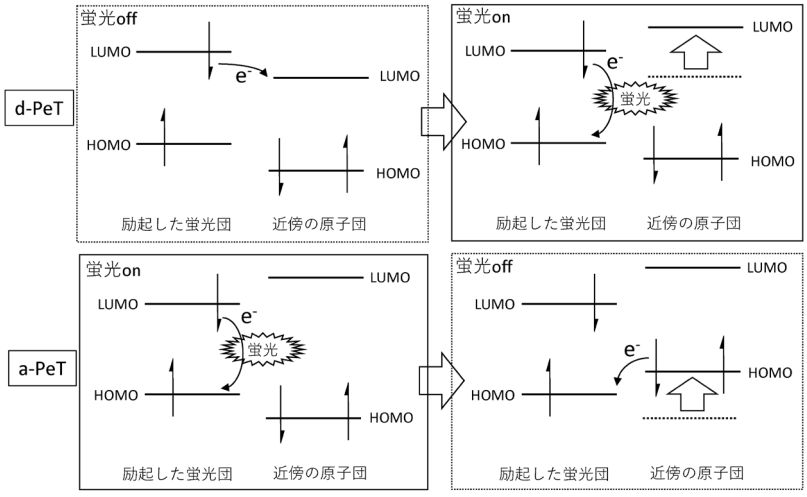

図 1　PeT による電子移動

なる．そのため，環境に鋭敏に応答して，蛍光スペクトルが大きくシフトする．

1･4　ESIPT（excited-state intramolecular proton-transfer, 励起状態分子内プロトン移動）

ESIPT とは，励起状態でプロトンの移動による化学結合の組み換え（互変異性）が起こり，電子が基底状態とは異なる原子に移動する現象である．その結果，蛍光波長の長波長シフトが起こるため，近赤外領域の蛍光に利用されている．

1･5　FLQY（fluorescence quantum yield, 量子収率）

（蛍光）量子収率 ϕ は，物質が吸収した光子に対して，蛍光として放出された光子の割合であり，1 個の光子を吸収した際に蛍光として光子が放出される確率と考えることもでき，以下の式で計算される．

ϕ＝蛍光として放出された光子数/吸収された光子数

値が 1 または 100 % に近いほど量子効率が高いことを意味する．

励起された電子は，様々な緩和過程（振動緩和，項間交差，蛍光発光など）によって基底状態に戻るが，量子収率はそれらの速度定数の総和の中での蛍光発光の速度定数の割合である．測定には積分球を用いた絶対法と量子収率が既知の蛍光物質を標準試料として用いる相対法が用いられ，分子の構造や溶媒などの環境によって変化する．

1･6　TRF（time-resolved fluorescence, 時間分解蛍光）

励起されたすべての分子が蛍光を発して緩和したときの寿命を自然寿命といい，これに量子収率（ϕ）を乗じたものが蛍光寿命になる（蛍光寿命＝自然寿命×ϕ）．蛍光寿命は，化合物によってピコ秒（10^{-12} 秒）からミリ秒（10^{-3} 秒）と様々であり，分子の環境に大きく依存し，振動緩和等の他の緩和過程と競合すると寿命が短くなる．蛍光寿命が短くなると，定常状態での蛍光収率は下がるが，時間分解蛍光を測定すると，励起直後の蛍光強度は高いことがわかる．TRF の代表的な測定法として，TCSPC（time correlated single photon counting, 時間相関単一光子係数法）や TRES（time-resolved emission spectroscopy, 時間発光スペクトル）がある．

TCSPC は，励起光の発信時点と測定試料からの蛍光の検出時点との時間差を繰り返し測定し，取得したデータの縦軸を信号数，横軸を時間のヒストグラムとしてプロットし，蛍光減衰曲線を得る．

TRES では，発光スペクトルの波長を増加させつつ蛍光減衰を測定する．光強度の空間分布だけでなく分光器と組み合わせて発光スペクトルの時間変化も測定することで，時間分解蛍光を得ることができる．

蛍光寿命の違いを利用したイメージング技術を FLIM（fluorescence lifetime imaging）と呼ぶ．同法では蛍光スペクトルの近い蛍光分子の蛍光を，蛍光寿命特性の違いで識別できるため，より多くの蛍光分子を同時に利用することができる．

2　測定に関する用語

2･1　RF（ratiometric fluorescence, レシオメトリック蛍光）

蛍光分析では，通常，定量には蛍光強度が，定性には励起や蛍光スペクトルが利用される．しかし，例えば細胞内や細胞小器官内など，蛍光分子の濃度を正確に調節することが難しい，または測定環境（温度や pH）が変化する状況で物質を測定する際には，異なった 2 波長の蛍光強度を同時に測定し，その比（レシオ）を計算することで，定量的な解析が可能になる．レシオ測定では，蛍光分子の濃度等に加えて，光路長及び励起強度などの測定要因等の変動も補正することができる．レシオ測定には，測定対象分子との反応等によって励起波長か蛍光波長が変化する蛍光分子を用いる．この波長変化には，上記の FRET や ICT などが用いられている．

2･2　EEM（excitation-emission matrix, 励起―蛍光マトリクス）　3D fluorescence spectra　3 次元蛍光スペクトル，fluorescence fingerprint 蛍光指紋

環境や生体試料は，通常，いろいろな物質が混在している．そのような試料に対して，照射する励起光の波長を連続的に変化させながら蛍光スペクトルを測定し，それらを重ね合わせた 3 次元蛍光スペクトルを得ることで，多成分の解析が可能になる．

EEM は励起波長，蛍光波長，蛍光強度の三つの情報を 3 次元にプロットしたものであり，3D fluorescence spectra や fluorescence fingerprint とも呼ばれている．EEM は，多成分の測定に利用され，通常は測定結果を主成分分析等の多変量解析を用いて解析する．蛍光を利用しているため ppb 領域の低濃度の蛍光物質の存在も識別でき，水中の発色性溶存有機物を測定し，水質の評価などにも応用されている．一方で，EEM では，試料の光路長に応じて励起光の強度が吸収により弱まる 1 次フィルター効果と，放出された蛍光が再吸光によって弱まる 2 次フィルター効果の影響を受ける．これらの内部フィルター効果の影響を補正するために，EEM に加えて，吸光度と透過率も同時に測定する手法も用いられている．

文　献

1）長野哲雄：*Yakugaku Zasshi*, **134**, 89 (2014).

〔昭和医科大学　加藤 大〕