

# サブピコ秒パルスラジオリシス法によるテトラヒドロフラン溶媒和電子とフッ素高分子反応測定

産研量子ビーム物質科学分野<sup>a</sup>、北海道大学大学院工学研究院/工学部/大学院工学院<sup>b</sup>

山本洋揮<sup>a</sup>、岡本一将<sup>b</sup>、野村直矢<sup>b</sup>、梅垣 菊男<sup>b</sup>、古澤 孝弘<sup>a</sup>

Measurement of Solvated Electrons in Tetrahydrofuran and Fluorinated Polymer Using Sub-picosecond Pulse Radiolysis System

Dept. of Beam Materials Science, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University<sup>a</sup>, Faculty/ Graduate School/ School of Engineering, Hokkaido University<sup>b</sup>

Hiroki Yamamoto<sup>a</sup>, Kazumasa Okamoto<sup>b</sup>, Naoya Nomura<sup>b</sup>, Kikuo Umegaki<sup>b</sup>, Takahiro Kozawa<sup>a</sup>

Quantum beam nanolithography such as extreme ultraviolet (EUV) and electron beam (EB) lithography is expected as next generation lithography (NGL) technology. In order to develop resist materials, it is very important to understand the interaction between quantum beam and materials. We have already reported a sub-picosecond pulse radiolysis system was improved by introducing a TOPAS Prime automated optical parametric amplifier (OPA). We succeeded in the observation of solvated electron in tetrahydrofuran and dissociative electron attachment in 1300 nm.

極端紫外光 (EUV) リソグラフィのような放射線を利用した微細加工技術は、半導体産業および将来のナノテク産業を支える重要な技術である。それゆえ、ナノメートルサイズの微細加工を可能にする材料を開発するためには、放射線と材料の相互作用の解明が必要不可欠である。

放射線と材料の相互作用の解明する方法の一つに、分光分析がある。この手法は、短パルス加速器の最大の応用分野の一つである。我々は、放射線化学初期過程の研究を行うために、励起源としてフェムト秒電子線ライナック、分析光源としてフェムト秒タンサファイアレーザー、および両者の時間差を正確に測定するためのフェムト秒ストリークカメラから構成されるサブピコ秒パルスラジオリシスシステムを開発した。<sup>1)4)</sup>フェムト秒レーザーを電子線加速器に同期したシステムが開発されており、1psを切るシステムの最高時間分解能800fsが達成されている。さらに、SN比を約1桁向上させる工夫もされている。この装置はフェムト秒時間領域での測定が可能であるが、現在でも更なる測定系の拡張と高精度化が現在でも行われてきた。

しかしながら、レジスト材料分野で求められている要求に応えられるような十分な情報を得るためには

測定システムが不十分である。レジスト材料に放射線が入射すると、ポリマーがイオン化され、ポリマーのカチオンラジカルと電子が生成される。電子は周囲の分子との相互作用によりエネルギーを失い、熱化する。熱化電子の平均初期分布距離はおおよそ数 nm であると考えられている。EUVをはじめとしたイオン化放射線用化学増幅型レジストでは、最初のイオン化で生成したカチオンラジカルと電子の両方が酸の生成に重要な役割を果たしている。<sup>5-8)</sup>それゆえ、ナノメートルの微細加工では、熱化電子の初期分布距離は潜像形成において、重要であり、溶媒和電子の生成過程を知ることが必要である。

これまでの研究から、溶媒和電子の生成過程には可視部と赤外部に少なくとも二つの活性種が寄与していると考えているが、水中で数百フェムト秒、アルコール中で数十ピコ秒と見積もられているように、この溶媒和過程であるために、未だ溶媒和過程を完全に解明するには至っていない。自動波長切り替えができる自動波長可変OPA装置を量子ビーム化学研究施設クリーンルーム内に設置し、Lバンドライナックの電子線照射によって生じる短寿命反応中間体を幅広い波長でプローブできるようになった。本研究では、現在波長領域1300 nmのテトラヒドロフランの溶媒和

電子とフッ素高分子の解離性電子付着反応の測定を行ったので報告する。

既存のフェムト秒再生増幅器(Spitfire)の励起光を波長可変してプローブ光として使用して、幅広い波長領域(290 nm~2600 nm)で反応過程を観察できるようになったので、波長1300 nmでテトラヒドロフランの溶媒和電子の観察を行った。図1は波長1300 nmにおけるテトラヒドロフランの溶媒和電子のタイムプロファイルである。また図2に波長1300 nmにおけるテトラヒドロフランの溶媒和電子のタイムプロファイルを示す。このように、1300nmにおける溶媒和電子および溶媒和電子とフッ素高分子の反応の測定が可能になった。今後、様々な溶媒およびポリマーを調べ、放射線と材料の相互作用の解明を行っていく。

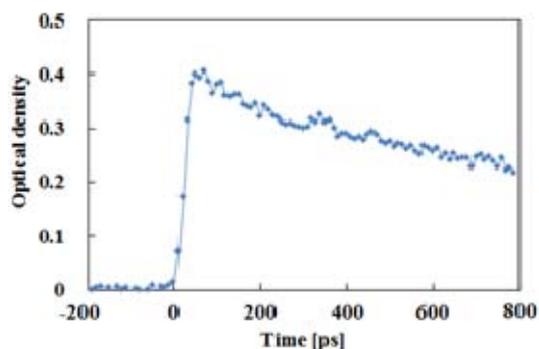


図 1. 波長 1300 nm におけるテトラヒドロフランの溶媒和電子のタイムプロファイル

● 100 mM ● 40 mM ● 16 mM ● 0 mM

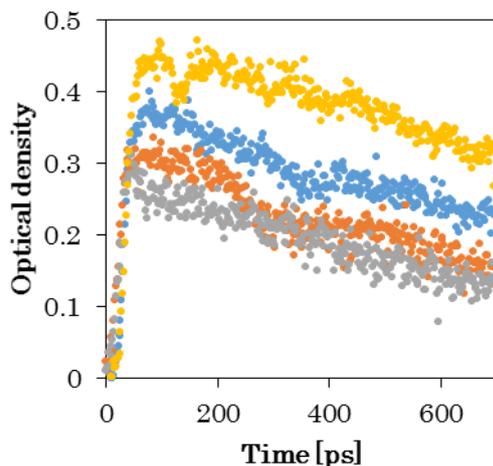


図 2. 波長 1300 nm におけるテトラヒドロフランの溶媒和電子とフッ素高分子の反応を示すタイムプロファイル

#### Reference

- 1) T. Kozawa, Y. Mizutani, K. Yokoyama, S. Okuda, Y. Yoshida and S. Tagawa, Nucl. Instrum. Meth. A **429** (1999) 471-475.
- 2) Y. Yoshida, Y. Mizutani, T. Kozawa, A. Saeki, S. Seki, S. Tagawa and K. Ushida, Radit. Phys. Chem. **60** (2001) 313-318.
- 3) T. Kozawa, Y. Mizutani, M. Miki, T. Yamamoto, S. Suemine, Y. Yoshida and S. Tagawa, Nucl. Instrum. Meth. A **440** (2000) 251-254.
- 4) T. Kozawa, A. Saeki, Y. Yoshida and S. Tagawa, Jpn. J. Appl. Phys. **41** (2002) 4208.
- 5) T. Kozawa, S. Nagahara, Y. Yoshida, S. Tagawa, T. Watanabe and Y. Yamashita, J. Vac. Sci. Technol. **B15** (1997) 2582-2586.
- 6) S. Nagahara, T. Kozawa, Y. Yamamoto and S. Tagawa J. Photopolym. Sci. Technol. **11** (1998) 577-580.
- 7) S. Tsuji, T. Kozawa, Y. Yamamoto, S. Tagawa, J. Photopolym. Sci. Technol. **13** (2000) 733-738.
- 8) S. Tagawa, S. Nagahara, T. Iwamoto, M. Wakita, T. Kozawa, Y. Yamamoto, D. Werst and A. D. Trifunac, SPIE, (2000) 204.

## 極微細加工材料の放射線誘起反応の解明

北海道大学大学院工学研究院 / 大学院工学院<sup>b</sup>、産研量子ビーム物質科学分野<sup>a</sup>  
岡本一将<sup>a</sup>、石田拓也<sup>a</sup>、須佐俊彦<sup>a</sup>、野村直矢<sup>a</sup>、梅垣菊男<sup>b</sup>、山本洋揮<sup>b</sup>、古澤孝弘<sup>b</sup>

Elucidation of Radiation Induced Reactions of Materials for Ultrafine Pattern Fabrication

Faculty/ Graduate School of Engineering, Hokkaido University<sup>a</sup>  
Dept. of Beam Materials Science, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University<sup>b</sup>

Kazumasa Okamoto<sup>a</sup>, Takuya Ishida<sup>a</sup>, Toshihiko Susa<sup>a</sup>, Naoya Nomura<sup>a</sup>, Kikuo Umegaki<sup>a</sup>,  
Hiroki Yamamoto<sup>b</sup>, and Takahiro Kozawa<sup>b</sup>

Chemically amplified resists have been widely used in the mass production line. The acid generation mechanism induced by ionizing radiation such as extreme ultraviolet (EUV) and electron beam is important for improvement of the resist performance such as sensitivity, roughness, and resolution below 11 nm. However, the details of deprotonation kinetics from the ionized resist solid film immediately after the ionization have been still unclear. In this study, pulse radiolysis of highly concentrated the poly(4-hydroxystyrene)(PHS) solutions was performed. The deprotonation reaction in solid state of PHS is assumed more than  $\mu\text{s}$  order.

リソグラフィの発展により半導体製品の高性能、大量生産化が実現されてきた。現在では露光に ArF エキシマレーザー（波長 193 nm）を用いたプロセスにより最小加工寸法 30 nm 以下の半導体量産が行われている。そしてさらに 13.5 nm の極端紫外光を用いた EUV リソグラフィが 10 nm 以下の次世代半導体量産技術の候補として期待されている。加工材料であるレジスト開発においては、高解像度、高感度、低 LER (Line Edge Roughness) 等の性能を満たす必要がある。加工線幅がシングルナノメートルまで達すると、レジスト内の反応がナノサイズレベルで影響することから、EUV 露光により生じるレジスト中での放射線化学反応機構を解明し、反応を制御する指針を明らかにすることがレジスト性能向上にとって重要となる。

これまでパルスラジオリシス法により、希薄系のレジストモデル溶液中で起こる放射線化学反応機構に関する研究が多く行われてきた。しかし、実際に固体薄膜として利用されるレジスト中での放射線化学反応ダイナミクスの詳細はこれまでほとんど明らかにされていない。そのため、EUV リソグラフィ用固体薄膜レジストの放射線

化学反応を擬似的に求めるため、レジストのベースポリマーとして用いられるポリヒドロキシシチレン (PHS) の透明性を維持できる高濃度溶液に対し、電子線パルスラジオリシスによる評価を行った。さらに、化学増幅型レジスト中での放射線化学初期過程を明らかにするために、酸発生剤を加えた系においてパルスラジオリシスを行い、高分子ラジカルカチオンの脱プロトン反応について評価を行った。

PHS 溶液（溶媒：cyclohexanone, dioxane）に酸発生剤として TPS-tf を添加したサンプルに対し、阪大産研 LINAC からの電子線パルスを用い、ナノ秒パルスラジオリシスを行った。サンプル調製は、石英セル（光路長 1 cm）内に初め PHS 濃度 20 wt% 程度の溶液サンプルを用意し、その後真空オープン内で減圧・加熱を行った。

PHS/シクロヘキサノン溶液のパルスラジオリシスによって得られたラジカルカチオンの脱プロトン反応速度定数と溶液動粘度の PHS 濃度による変化を Figure 1 に示す。溶液の動粘度は PHS 濃度とともに増加し、40 wt% 付近で急激に増加することが明らかとなった。動粘度は溶液の高分子の鎖間の絡み合いに大きく起因することから、

PHS 濃度増加による高分子鎖の運動の減少を示唆している。一方、脱プロトン反応速度も粘度増加と共に減少しているが、50 wt%以上ではほとんど変化が見られないことが分かる。従ってこのような高濃度溶液中では、脱プロトン反応のドナー—アクセプター間の配向を含む大きな分子鎖運動が抑えられることによって脱プロトン反応が制限され、反応速度定数が  $10^4 \text{ s}^{-1}$  オーダーでほぼ一定になることが示唆された。また、固体薄膜系でも同様になることが予想される。

Figure 2 は化学増幅型レジスト PHS/シクロヘキサノン溶液に酸発生剤 TPS-tf (0, 5, 10 wt%) を

加えたときの PHS ラジカルカチオンの吸収を示す波長 1150 nm において得られたタイムトレースである。酸発生剤を加えると、PHS ラジカルカチオンの吸収強度および脱プロトン反応速度が減少した。このことは PHS のラジカルカチオンが、酸発生剤と電子が反応し生成したアニオンと対イオンを生成することで安定化し、PHS ラジカルカチオンの分子内の電荷の拡がり小さくなるためであると考えられる。以上のように、レジスト中の放射線化学反応を理解する上で、酸発生剤添加による対イオン生成が放射線誘起反応機構に影響することが明らかとなった。

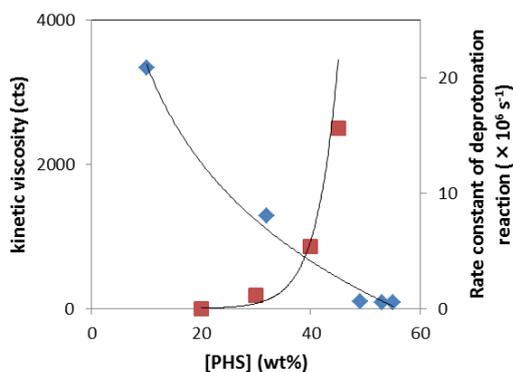


Figure 1 Relation between PHS concentration and viscosity and rate constant of deprotonation in PHS / cyclohexanone solutions.

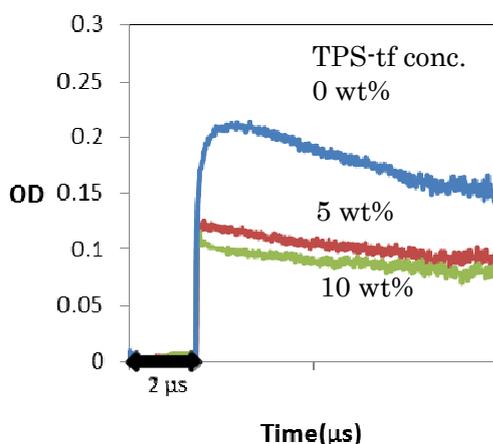


Figure 2 Kinetic traces in PHS/cyclohexanone solutions (about 50 wt%) with and without TPS-tf observed at 1150 nm obtained by pulse radiolysis.

## パルスラジオリシス法による軟 X 線顕微鏡用レジストの高感度化研究

早稲田大学理工学研究所<sup>a</sup>、産研ナノ極限ファブリケーション研究分野<sup>b</sup>

王楚程<sup>a</sup>、保坂勇志<sup>a</sup>、鷲尾方一<sup>a\*</sup>、近藤考文<sup>b</sup>、大島明博<sup>b</sup>、田川精一<sup>b</sup>、吉田陽一<sup>b</sup>

Study on Sensitivity Improvement of the Soft X-ray Resist with Pulse Radiolysis

Research Institute for Science and Engineering, Waseda University<sup>a</sup>, Dept. of Nano Ultimate Fabrication<sup>b</sup>

Chucheng Wang<sup>a</sup>, Yuji Hosaka<sup>a</sup>, Masakazu Washio<sup>a\*</sup>, Takafumi Kondoh<sup>b</sup>, Akihiro Oshima<sup>b</sup>, Seiichi Tagawa<sup>b</sup>, Yoichi Yoshida<sup>b</sup>

ZEP520A is a main-chain scission-type electron beam (EB) resist, and is known for its good spatial resolution and high sensitivity. In our previous work, the radiation-induced early reactions of ZEP520A were investigated with pulse radiolysis in ISIR, and the direct ionization of ZEP520A in tetrahydrofuran was confirmed. Following these results, early reactions in polystyrene and highly concentrated poly ( $\alpha$ -allyloxymethyl methyl acrylate) solution in methylethylketone were investigated with pulse radiolysis in the present study. The transient absorption band of multimer phenyl radical cation was observed in the solution.

早稲田大学で開発中の軟 X 線顕微鏡の撮像用レジスト材料として、ハロゲン系のポリスチレン誘導体からなる電子線レジスト材料を候補材料としており、その高感度化を図るために、レジスト反応機構の解明を目指しパルスラジオリシス法を用いて検討した。一般に電子線や X 線などの電離放射線により高分子材料は主鎖切断や架橋反応を誘起する。例えば代表的な非増幅型のポジ型(分解型)電子線レジストである ZEP (ゼオン)は、塩素とフェニル環を含む塩素系ポリスチレン誘導体の一種であり、高い解像度と優れた感度特性を併せ持つが、その初期反応過程に関する情報はほとんどない。<sup>1)</sup>

我々は、X 線顕微鏡の撮像用レジストとして ZEP を適用することを検討しており、さらなる高感度化を目的に電子線照射による ZEP の反応機構に関する研究を生成物分析<sup>2)</sup>ならびにパルスラジオリシス法を用いて研究してきた<sup>3)</sup>。

これまでの実験で、ZEP520A 溶液(ゼオン)から、再沈殿精製法により ZEP520A を精製し、得られた粉末試料をテトラヒドロフラン (THF) へ溶解させ、大阪大学産業科学研究所 L バンド電子ライナックを用いて、吸光法パルスラジオリシス測定を行った。ZEP520A を高濃度(500 mM)で THF に溶解させた

試料においては、電荷移動錯体(CT 錯体)とフェニルマルチマーラジカルカチオンによる弱い吸収が観測された。CT 錯体の生成にもフェニルラジカルカチオンが必要であるため、この結果はフェニルラジカルカチオンが生成された事を意味する。一方で溶媒の THF に生じたラジカルカチオンは素早く他の THF 分子と反応し、ラジカルとカチオンに分離するため、フェニルラジカルカチオンは溶媒の THF からのホール移動では生成されないと考えられる。これらの考察より ZEP520A を高濃度溶解させた THF 溶液において、フェニルラジカルカチオンがホール移動ではなく ZEP520A の直接イオン化により生成されたものと結論づけられている<sup>3)</sup>。

今年度の実験では、溶液の粘度を上げることで固相状態に近づけ、実際の使用環境を模擬できると考え、THF 環の存在下において溶液の粘度を変え溶質を動きにくくした環境下での実験を行った。THF 環を含む高粘度環境を実現するため、ポリ $\alpha$ -アリルオキシメチルアクリル酸メチル(日本触媒、以下 THF ポリマーと略す)を用いた。THF ポリマーはメチルエチルケトン (MEK) 中に溶解した状態であったため、予備実験として MEK に ZEP520A を 20 mM 溶解させ吸光法パルスラジオリシス実験を行った。

\* M. Washio, 03-5286-3893, washiom@waseda.jp

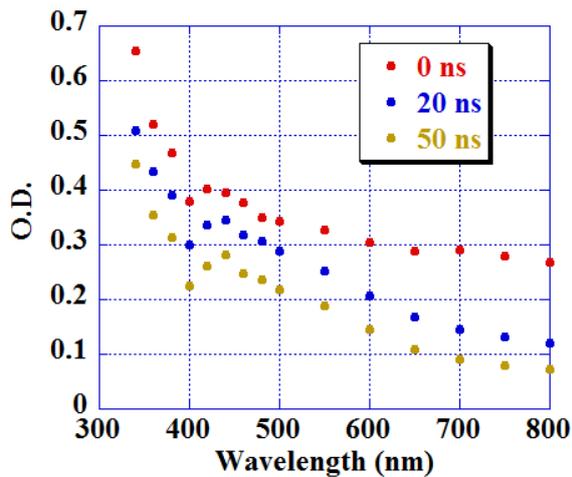


Figure 1 Transient absorption spectra in 20 mM ZEP520A solution in MEK

その結果を Figure 1 に示す。

この過渡吸収スペクトルでは 400-500 nm 付近に弱い吸収帯が存在しており、これはフェニルラジカルカチオンの吸収と考えられる。CT 錯体の顕著な吸収が確認できないのは、ZEP の濃度が低いことや MEK による電子スカベンジングが原因と考えられるが、MEK 中の ZEP520A の溶解度が低いためこれ以上高濃度の溶液は作成できなかった。

次に、MEK-THF ポリマーを用いてパルスラジオリシス実験を行った。ZEP520A では溶解度に問題があるため、まずフェニル基を含む基本的な高分子であるポリスチレンを溶解させ実験を行った。Figure 2 に近赤外での過渡吸収スペクトルを示す。1100 nm にて幅広い吸収帯が確認された。これはフェニルマルチマーラジカルカチオンによる吸収だと考えられるが、確証を得るためさらにカチオンスカベンジャーとして 20 mM のトリエチルアミン(TEA)を添加し実験を行った。1100 nm における TEA 有無での過渡吸収挙動を Figure 3 に示す。1100 nm の吸収は TEA の添加により短寿命化したことが明らかであり、フェニルラジカルカチオンがこの系でも生成されていることが確認された。

これらの反応は ZEP520A を溶解させた系での実験においても期待されるが、MEK 中の ZEP520A の溶解度が低いという問題がある。

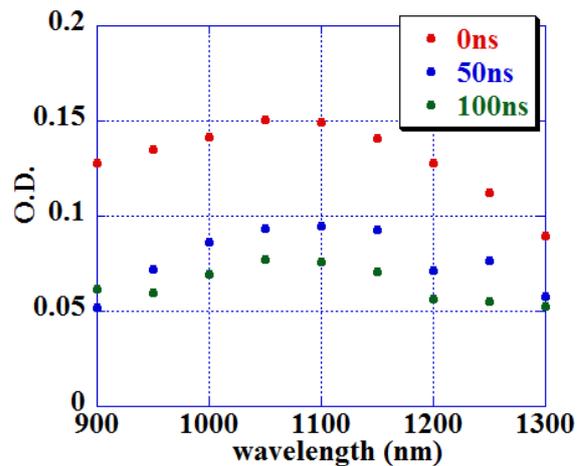


Figure 2 NIR Transient absorption spectra in 200 mM polystyrene and 2.7 M poly ( $\alpha$ -allyloxymethyl methyl acrylate) solution in MEK

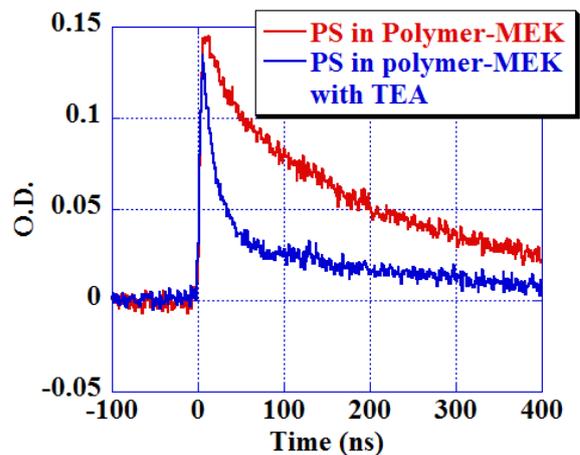


Figure 3 time dependence of transient absorption in the solution with TEA and without TEA at 1100 nm

今回の結果により高粘度のTHFポリマー環境下でもフェニルマルチマーラジカルカチオンが観測された。今後はレジストの高感度化への寄与を目指し、THFポリマー溶液の濃度・粘度を変化させて実際のレジストの使用環境を再現し、パルスラジオリシス法による固体中初期反応の解明を計画している。

#### Reference

- 1) K. Harada: J. Appl. Polym. Sci. **26** [10] (1981) 3179.
- 2) T. G. Oyama, K. Enomoto, Y. Hosaka, A. Oshima, M. Washio, S. Tagawa: Appl. Phys. Express **5** (2012) 036501.
- 3) Y. Hosaka, T. G. Oyama, A. Oshima, S. Enomoto, M. Washio, S. Tagawa: J. Photopolym. Sci. Tech. **26** [6] (2013) 745.

# 放射線化学によるシクロパラフェニレンのラジカルイオンの研究

産研励起分子化学研究分野<sup>a</sup>、産研量子ビーム科学研究施設<sup>b</sup>、京大化研<sup>c</sup>

藤塚 守<sup>a</sup>、藤乗幸子<sup>b</sup>、岩本貴寛<sup>c</sup>、茅原栄一<sup>c</sup>、山子 茂<sup>c</sup>、真嶋哲朗<sup>a</sup>

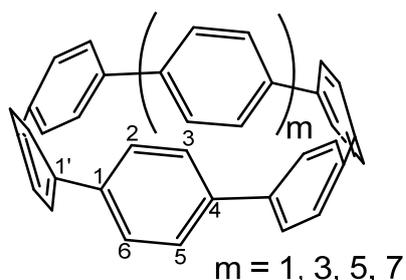
Study on Radical ions of cycloparaphenylenes by Radiation Chemistry

Dept. of Molecular Excitation Chemistry<sup>a</sup>, Research Laboratory for Quantum Beam Science<sup>b</sup>,  
Institute for Chemical Research, Kyoto University<sup>c</sup>

Mamoru Fujitsuka<sup>a</sup>, Sachiko Tojo<sup>b</sup>, Takahiro Iwamoto<sup>c</sup>, Eiichi Kayahara<sup>c</sup>, Shigeru Yamago<sup>c</sup>, Tetsuro Majima<sup>a</sup>

Cycloparaphenylenes (CPPs) have attracted wide attention because of their interesting properties owing to distorted and strained aromatic systems and radially oriented p-orbitals. For application of CPPs, information on their charged states (radical cation and radical anion) is essential. Here, we measured absorption spectra of the radical cations and the radical anions of CPPs with various ring sizes, over wide spectral region by means of radiation chemical methods. The peak position of the near-IR bands for both the radical cation and the radical anion shifted to lower energies with an increase in the ring size. This trend is contrary to what observed for transitions between HOMO and LUMO of the neutral CPP. The observed spectra of the CPP radical ions were reasonably assigned based on time-dependent density functional theory. These results indicate that the next HOMO and the next LUMO levels are important in the electronic transitions of radical ions.

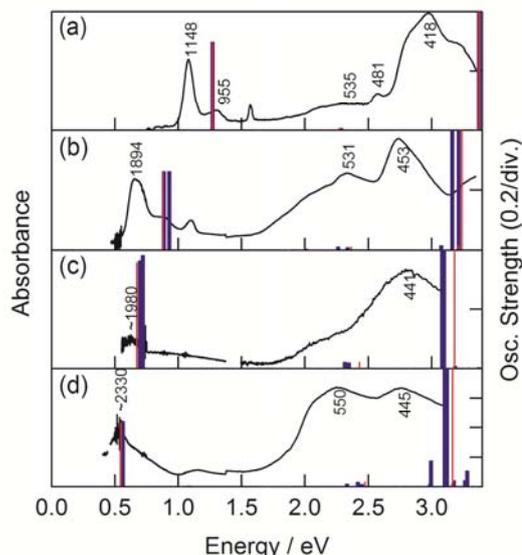
Cycloparaphenylene (CPP, Fig. 1)は代表的な環状 $\pi$ -共役オリゴマーであり、高度にひずんだ構造に特異的な物性を示すことから広く関心を集めている。たとえばCPPのHOMO-LUMOギャップに起因する物性は鎖長の増加にともない高エネルギー化するなど、直線状の $\pi$ -共役オリゴマーとは逆の傾向を示すことなどが報告されている。CPPはフラレンなどに対しホスト分子となることから超分子としての応用が可能である。CPP類の酸化還元挙動に関する知見は超分子としての機能の解明に不可欠である。本研究では低温マトリックス中のCPPに $\gamma$ -線照射を行うことでラジカルイオン種を生成し、その吸収スペクトルを近赤外から紫外域まで測定した。得られた吸収スペクトルを



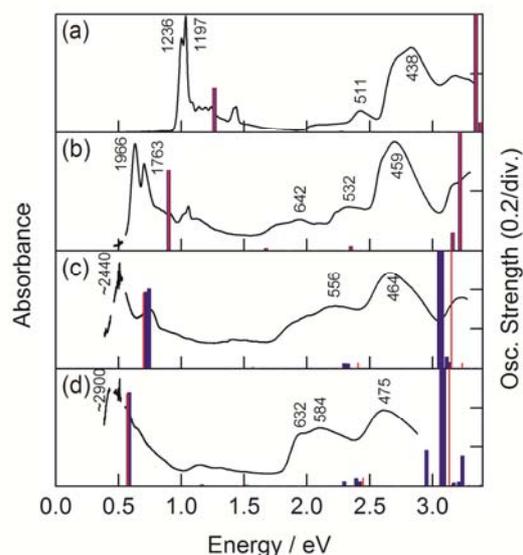
**Fig. 1.** Molecular structures of  $[n]$ CPPs ( $n = 6, 8, 10, \text{ and } 12$ ).

理論計算と比較することで新たな知見を得たので報告する。<sup>1</sup>

Fig. 2に $\gamma$ -線照射より得られたBuCl低温マトリックス



**Fig. 2.** Absorption spectra of  $[n]$ CPPs ( $n = 6$  (a), 8 (b), 10 (c), and 12(d)) in BuCl glassy matrix after  $\gamma$ -ray irradiation. Numbers near absorption peaks indicate peak positions in nm unit. Blue and red bars indicate oscillator strengths obtained by TDDFT at UB3LYP/6-31G(d) level assuming  $C_1$  and  $D_{(n/2)d}$  symmetries, respectively.

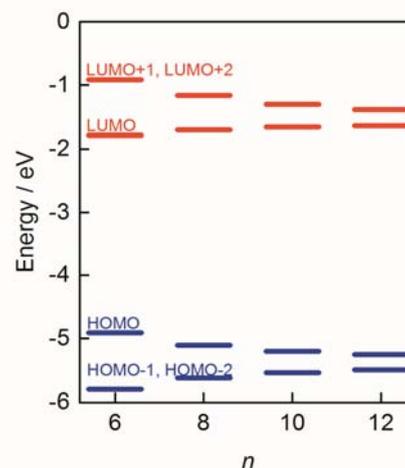


**Fig. 3.** Absorption spectra of  $[n]$ CPPs ( $n = 6$  (a), 8 (b), 10 (c), and 12(d)) in MTHF glassy matrix after  $\gamma$ -ray irradiation. Numbers near absorption peaks indicate peak positions in nm unit. Blue and red bars indicate oscillator strengths obtained by TDDFT at UB3LYP/6-31G(d) level assuming  $C_1$  and  $D_{(n/2)d}$  symmetries, respectively.

中の $[n]$ CPP ( $n = 6, 8, 10, 12$ )ラジカルカチオンの吸収スペクトルを示す。ラジカルカチオンはいずれも近赤外領域ならびに紫外可視領域に明瞭なピークを示し、いずれのピークも鎖長の増加にともない低エネルギーシフトを示した。この傾向は中性状態のCPP類とは逆の傾向である。

得られた吸収ピークに対応する電子遷移を明らかにするため時間依存密度汎関数法による理論計算を行った。Fig. 2に $C_1$ および $D_{(n/2)d}$ 対称を仮定することで得られたラジカルカチオンの振動子強度を示した。理論計算で得られた振動子強度より、ラジカルカチオンの近赤外領域のピークはHOMO-2およびHOMO-1からHOMOへの遷移であり、また、紫外可視領域の吸収は主にHOMO-1 (HOMO-2)からLUMOおよびHOMOからLUMO+1 (LUMO+2)への遷移であることが示された。

Fig. 3に $\gamma$ -線照射より得られたMTHF低温マトリックス中のCPPラジカルアニオンの吸収スペクトルを示す。ラジカルアニオンの吸収も近赤外および紫外可視領



**Fig. 4.** MO levels of neutral  $[n]$ CPPs ( $n = 6, 8, 10,$  and  $12$ ) calculated at B3LYP/6-31G(d) assuming  $D_{(n/2)d}$  symmetry.

域に明瞭なピークを示し、それぞれが鎖長の増加にともない低エネルギー側にシフトすることが確認された。理論計算より、ラジカルアニオンの近赤外吸収はHOMOからLUMOおよびLUMO+1への遷移であり、また、紫外可視領域の吸収はHOMO-2 (HOMO-3)からHOMOおよびHOMO-1からLUMO (LUMO+1)への遷移であることが示された。

分子軌道のパターンを比較すると、中性分子とラジカルカチオンはほぼ同一であり、ラジカルアニオンのHOMOと中性分子のLUMOが同一であることなどから、ラジカルイオン種の近赤外領域の吸収は中性分子のHOMOとnext HOMOおよびLUMOとnext LUMO間の吸収に起因することが示された。Fig. 4に中性分子のnext HOMO, HOMO, LUMO, next LUMOのエネルギーレベルを鎖長に対しプロットした。この図より、next HOMOとHOMOおよびLUMOとnext LUMO間のエネルギー差は鎖長とともに減少する傾向にあり、そのためラジカルイオン種の吸収が鎖長とともに低エネルギー化することが示された。

#### Reference

- 1) M. Fujitsuka, S. Tojo, T. Iwamoto, E. Kayano, S. Yamago, T. Majima: *J. Phys. Chem. Lett.* **5** (2014) 2302.

# シトクロム *c* の折り畳みに伴うのヘムの立体配置変化の研究

産研励起分子化学研究分野

崔 正権<sup>a</sup>、Dae Won Cho<sup>b</sup>、藤乗幸子<sup>c</sup>、藤塚 守<sup>a</sup>、真嶋哲朗<sup>a\*</sup>

Configurational Changes of Heme Followed by Cytochrome *c* Folding Reaction

Dept. of Molecular Excitation Chemistry,<sup>a</sup> Korea University,<sup>b</sup> Research Laboratory for Quantum Beam Science<sup>c</sup>

Jungkweon Choi,<sup>a</sup> Dae Won Cho,<sup>b</sup> Sachiko Tojo,<sup>c</sup> Mamoru Fujitsuka,<sup>a</sup> Tetsuro Majima<sup>a\*</sup>

The configurational change of heme in the Cyt-*c* folding process induced by one-electron reduction has investigated using a combination of time-resolved resonance Raman spectroscopy and pulse radiolysis. The results presented herein reveal that reduction of ferric Cyt-*c* and the ligation of Met80 occur simultaneously within a timescale of approximately 2  $\mu$ s, and that the ligand binding and exchange of heme depends on the initial configuration of the heme. The rapid ligation of Met80 observed in this study may be attributed to the intramolecular diffusion of Met80 into ferrous Cyt-*c* with a 5-coordinated high-spin configuration. Conversely, the ligand exchange of a ferrous Cyt-*c* with a 6-coordinated low-spin configuration was significantly slower.

Although various time-resolved spectroscopic techniques have been used to investigate the folding dynamics of Cyt-*c* in the presence of a denaturant such as guanidine hydrochloride (GdHCl), the dynamics of the heme coordination states accompanied with the electron transfer-triggered folding reaction of Cyt-*c* are not yet clear. To our knowledge, here, we present the first study on the configurational changes of heme accompanied with Cyt-*c* folding induced by one-electron reduction using the time-resolved resonance Raman (TR<sup>3</sup>) spectroscopy combined with pulse radiolysis.<sup>1</sup>

In native Cyt-*c*, the Fe ion of heme coordinates axially with the His18 and Met80 residues of the Cyt-*c* protein. However, upon addition of GdHCl, the bond between Met80 and the Fe ion is disrupted, resulting in denaturation of the protein. In denatured ferric Cyt-*c*, the coordination site of met80 is either occupied by a histidine (His33 or His26) to form a 6cLS configuration. Moreover, ferrous Cyt-*c* is folded in the presence of  $\sim$ 4 M GdHCl, whereas ferric Cyt-*c* is denatured under same conditions.

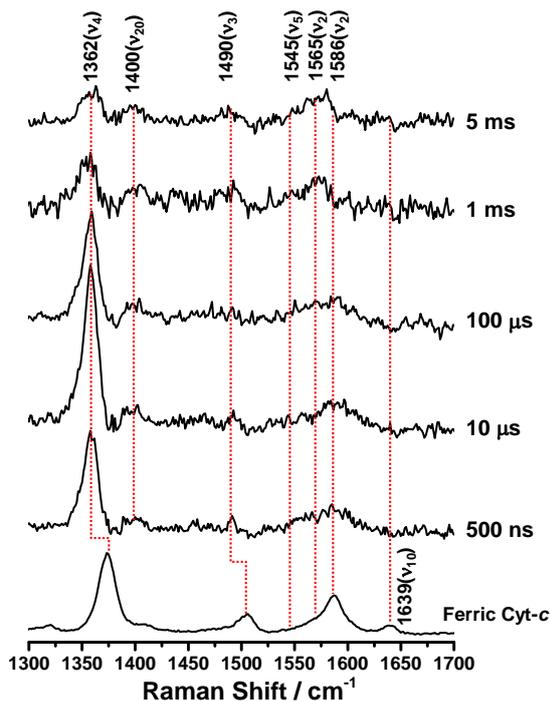
The denatured ferric Cyt-*c* exhibited the characteristic  $\nu_4$  ( $\nu(\text{pyrrole half-ring})_{\text{sys}}$ ) mode at 1375  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to the porphyrin breathing mode, and the  $\nu_{10}$  ( $\nu(\text{C}_{\alpha}\text{C}_m)_{\text{asys}}$ ) mode at 1639  $\text{cm}^{-1}$ . In addition, the  $\nu_2$  ( $\nu(\text{C}_{\beta}\text{C}_{\beta})_{\text{sys}}$ ) mode, a spin-state marker band, was observed at 1565 and 1588  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to 6-coordinated low-spin (6cLS) and 5-coordinated high-spin (5cHS) configurations, respectively. These data indicate that the heme moiety has a mixed configuration under denaturing conditions.

In comparison to the Raman spectrum of

unfolded ferric Cyt-*c*, ferrous Cyt-*c* exhibits significantly down-shifted  $\nu_4$  and  $\nu_{10}$  vibrational modes at 1362 and 1621  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, which is characteristic of the properly folded ferrous Cyt-*c*. The  $\nu_4$  mode is considered an indicator of the oxidation state of heme because of its sensitivity to the electron density of heme. Meanwhile, the  $\nu_{10}$  mode is sensitive to structural changes in a protein. Thus, the down-shifts in both the  $\nu_4$  and  $\nu_{10}$  modes, observed in the spectrum of ferrous Cyt-*c*, can likely be attributed to changes in both the oxidation states and in the structures of ferric and ferrous Cyt-*c* in the presence of  $\sim$ 4 M GdHCl. It is also noteworthy that the  $\nu_3$  ( $\nu(\text{C}_{\alpha}\text{C}_m)_{\text{sys}}$ ) mode is more pronounced in the spectrum of ferrous Cyt-*c* than in that of ferric Cyt-*c*, suggesting that this mode can also be used as an indicator of the folding state of Cyt-*c*.

To investigate the configurational changes of heme during the reduction-induced folding reaction of ferric Cyt-*c*, we measured the TR<sup>3</sup> spectra after pulse radiolysis of ferric Cyt-*c* in 3.5 M GdHCl. Figure 1 shows the TR<sup>3</sup> spectra obtained after pulse radiolysis of unfolded ferric Cyt-*c* in 3.5 M GdHCl. The TR<sup>3</sup> spectrum of the unfolded ferric Cyt-*c* in 3.5 M GdHCl exhibits  $\nu_4$ ,  $\nu_3$ ,  $\nu_2$ , and  $\nu_{10}$  modes at 1373, 1505, 1587, and 1639  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. The observation of the  $\nu_2$  mode at  $\sim$ 1585  $\text{cm}^{-1}$ , which consists of two peaks with centre frequencies of 1564 and 1587  $\text{cm}^{-1}$ , indicates that the 6cLS state of heme coexists with the 5cHS state under denaturing conditions. The formation of the unfolded ferric Cyt-*c* with 6cLS configuration is mediated by His33 (or His26) and His18, whereas formation of the

\* T. Majima, 06-6879-8495, majima@sanken.osaka-u.ac.jp



**Figure 1.** Time-resolved resonance Raman spectra obtained during pulse radiolysis of ferric Cyt-*c* in 3.5 M GdHCl. ([Cyt-*c*] = 50  $\mu$ M,  $\lambda_{\text{Excitation}}$  = 416 nm)

unfolded ferric Cyt-*c* with 5cHS configuration is coordinated by the His18 residue alone.

On the other hand, the TR<sup>3</sup> spectra measured after pulse radiolysis of unfolded ferric Cyt-*c* in 3.5 M GdHCl also exhibited  $\nu_4$  and  $\nu_{20}$  modes at 1362 and 1400  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, even in the early time-delay (e.g. at 500 ns). These  $\nu_4$  and  $\nu_{20}$  vibrations are characteristic Raman modes of ferrous Cyt-*c*, implying that the unfolded ferric Cyt-*c* undergoes rapid reduction via an electron transfer from the guanidine radical. The time-dependent signal intensity of the  $\nu_4$  mode at 1362  $\text{cm}^{-1}$  could be well fitted by a tetra-exponential function with relaxation times of 1.4  $\mu$ s, 5.4  $\mu$ s, 296  $\mu$ s, and >5 ms (constant). The fast component of 1.4  $\mu$ s may be due to the reduction dynamics of ferric Cyt-*c* because the  $\nu_4$  mode is very sensitive to the oxidation state of heme. Thus, one interpretation of this observation is that the reduction of ferric Cyt-*c* occurs either more rapidly than or simultaneously with the ligation of Met80. Chen et al. found that the reduction of oxidized Cyt-*c* and the ligation of Met80 to the heme iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) occur simultaneously within a 5  $\mu$ s timescale.<sup>2</sup> Several other studies have reported that binding of methionine residues (Met80 or Met65) to the heme iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ), followed by photodissociation of the CO ligand, takes place within a timescale of a few microseconds ( $\sim$ 2  $\mu$ s). Furthermore, the new  $\nu_3$  vibrational mode at 1490  $\text{cm}^{-1}$  due to

presence of ferrous Cyt-*c* with the 6cLS heme configuration was observed in the early delay time (500 ns); however, the intensity of this mode was weak. Therefore, we propose reduction of ferric Cyt-*c* and the ligation of Met80 occur simultaneously within  $\sim$ 2  $\mu$ s. Meanwhile, the two decay components of 5.4 and 296  $\mu$ s probably stem from conformational changes triggered by the reduction of a denatured ferric Cyt-*c* and the ligation of Met80. The slow dynamics of >5 ms (constant) may be due to the rearrangement to the native conformation.

During the folding of ferric Cyt-*c*, the ligand exchange from His18- $\text{Fe}^{3+}$ -His33 (or His18- $\text{Fe}^{3+}$ -His26; 6cLS) to His18- $\text{Fe}^{3+}$ -Met80 (6cLS) occurs via a 6-coordinate intermediate linked to a water molecule as a distal ligand. Consequently the dynamics of this reaction are very slow. The data presented herein show that ferric Cyt-*c*, under denaturing conditions, exists in both the 6cLS and 5cHS forms. Oellerich et al suggested that, similar to the formation of an unfolded ferric Cyt-*c*, the formation of an unfolded ferrous Cyt-*c* with a 6cLS heme might also be mediated by His-18 and His-33. Given the folding dynamics of ferric Cyt-*c*, one would predict that the ligand exchange from His18- $\text{Fe}^{2+}$ -His33 (or His18- $\text{Fe}^{2+}$ -His26) to His18- $\text{Fe}^{2+}$ -Met80 during the protein folding reaction would be slow. Indeed, the  $\nu_2$  mode at 1565  $\text{cm}^{-1}$  of ferrous Cyt-*c*, corresponding to the 6cLS configuration, was measured with a weak intensity even in the late delay time of 5 ms, as shown in Figure 1. In contrast, the  $\nu_2$  mode of 1586  $\text{cm}^{-1}$ , corresponding to the 5cHS configuration of ferrous Cyt-*c*, was undetectable, suggesting a rapid ligand binding process. This result indicates that the ligand binding and exchange of heme depends on the initial coordination state of the heme molecule even though the reduction dynamics of ferric Cyt-*c* occur within a timescale of a few microseconds. That is, the ligand binding of ferrous Cyt-*c* with the 5cHS configuration, generated by pulse radiolysis, is relatively fast, whereas ferrous Cyt-*c* with the 6cLS configuration exhibits slow reaction dynamics. The fast ligation of Met80 can likely be attributed to the intramolecular diffusion of Met80 to a reduced ferrous Cyt-*c* with a 5cHS configuration.

In conclusion, the results presented herein show that the ligand binding and exchange of heme depends on the initial coordination state of the heme molecule even though the reduction dynamics of ferric Cyt-*c* occur within a timescale of a few microseconds.

## References

- 1) J. Choi et al.: *Mol. Biosyst.* **11** (2015) 218.
- 2) E. F. Chen: *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 3811.

# ビフェニル誘導体及びそれらのラジカルカチオンの構造に対する研究

産研励起分子化学研究分野

崔 正権<sup>a</sup>、Dae Won Cho<sup>b</sup>、藤乗幸子<sup>c</sup>、藤塚 守<sup>a</sup>、真嶋哲朗<sup>a\*</sup>

Structural Study of Various Substituted Biphenyls and their Radical Anions Based on Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy Combined with Pulse Radiolysis

Dept. of Molecular Excitation Chemistry,<sup>a</sup> Korea University,<sup>b</sup> Research Laboratory for Quantum Beam Science<sup>c</sup>

Jungkweon Choi,<sup>a</sup> Dae Won Cho,<sup>b</sup> Sachiko Tojo,<sup>c</sup> Mamoru Fujitsuka,<sup>a</sup> Tetsuro Majima<sup>a\*</sup>

The structures of various *para*-substituted biphenyls (Bp-X; X = -OH, -OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>3</sub>, -H, -CONH<sub>2</sub>, -COOH, and -CN) and their radical anions (Bp-X<sup>•-</sup>) were investigated by time-resolved resonance Raman spectroscopy combined with pulse radiolysis. The inter-ring C1-C1' stretching modes ( $\nu_6$ ) of Bp-X were observed at  $\sim 1285$  cm<sup>-1</sup>, whereas the  $\nu_6$  modes of Bp-X<sup>•-</sup> with an electron donating or withdrawing substituent were significantly up-shifted. The difference ( $\Delta f$ ) between the  $\nu_6$  frequencies of Bp-X and Bp-X<sup>•-</sup> showed significant dependence on the electron affinity of the substituent and exhibited a correlation with the Hammett substituent constants ( $\sigma_p$ ).

Biphenyl (Bp-H), which consists of two benzene rings with weak electronic interactions, has been experimentally and theoretically investigated to understand its structure in gas, liquid, and solid phases.

[ENREF 1 ENREF 1 ENREF 1 ENREF 8 ENREF 9](#)As a result, it is well known that in the gas and liquid phases, Bp-H has a twisted structure owing to steric hindrance between the *ortho* hydrogen atoms, whereas in the solid state Bp-H has a planar structure. In contrast to neutral Bp-H, its radical ions (radical anion Bp-H<sup>•-</sup> and radical cation Bp-H<sup>•+</sup>) tend to have a quinoidal character, resulting in a planar structure even in the liquid phase. However, there are a number of arguments for the structure of Bp-H<sup>•-</sup> and Bp-H<sup>•+</sup> in solution. In addition, most studies have been focused on halogen-substituted biphenyls, because of the pollution concerns related to polychlorinated biphenyls (PCB). Here, we present the comparative investigation of the structures of Bp-X and Bp-X<sup>•-</sup> with electron donating or withdrawing substituents at the *para* position using TR<sup>3</sup> spectroscopic measurements combined with pulse radiolysis.<sup>1</sup> Theoretical calculations for the structures of Bp-X and Bp-X<sup>•-</sup> are also conducted and compared with the experimental results.

Figure 1 shows the representative Raman spectra of Bp-X and Bp-X<sup>•-</sup> in DMF. The TR<sup>3</sup> spectra of Bp-X<sup>•-</sup> were measured with a delay of 50 ns after the electron pulse irradiation by pulse radiolysis in DMF. The  $\nu_6$  modes for Bp-H and Bp-H<sup>•-</sup>, observed at 1286 and 1327 cm<sup>-1</sup>, respectively. Notably, the  $\nu_6$  modes for Bp-Xs are observed at 1286–8 cm<sup>-1</sup>, which are close to that of Bp-H. These results imply that the structures of Bp-Xs are not affected by the

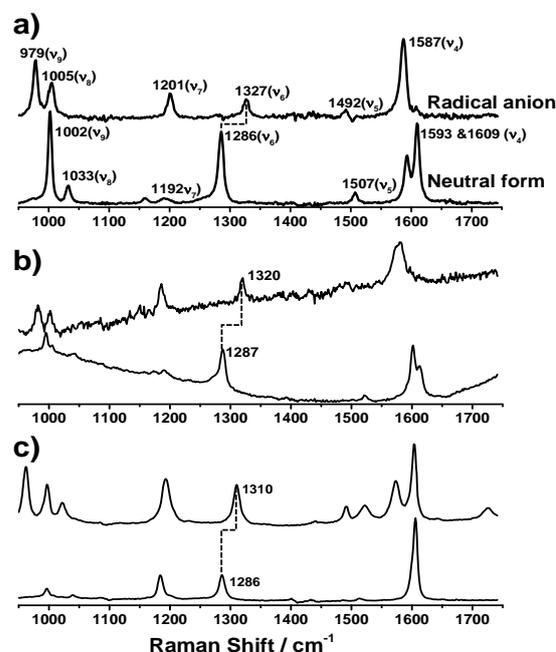


Figure 1. Representative TR<sup>3</sup> spectra of Bp-X (top line) and Bp-X<sup>•-</sup> (bottom line) in DMF; Bp-H (a), Bp-OH (b), and Bp-CN (c). TR<sup>3</sup> spectra of Bp-X<sup>•-</sup> were measured with a delay of 50 ns after the radiation of electron pulse during the pulse radiolysis of Bp-H, Bp-OH and Bp-CN in DMF.

substituents attached at the *para* position (C<sub>4</sub>) of the phenyl ring. Furthermore, the theoretically calculated *D* and  $r_{C1-C1'}$  values for all Bp-Xs showed little change. This result supports the hypothesis that the twisted structure is attributable to the repulsion of the *ortho* hydrogens, and not the electronic properties of the *para* substituents.

On the other hand, the  $\nu_6$  mode of Bp-X<sup>•-</sup> is markedly up-shifted. The up-shift of the  $\nu_6$  mode

\* T. Majima, 06-6879-8495, majima@sanken.osaka-u.ac.jp

accompanied by the one-electron reduction has been interpreted in terms of the structural change from Bp-X to Bp-X<sup>•-</sup> with a quinoidal character. Interestingly, the largest difference ( $\Delta f$ ) between the  $\nu_6$  frequencies of Bp-X and Bp-X<sup>•-</sup> was observed for Bp-H. Numerous experimental and theoretical results indicate that Bp-H<sup>•-</sup> has a shorter  $r_{\text{Cl-Cl}'}$  than Bp-H, and that it has a planar structure due to the quinoidal character ( $D_{\text{Bp-H}^{\bullet-}} = \sim 0^\circ$ ). However, the results presented herein clearly show that the  $\Delta f$  values for other Bp-Xs are smaller than that of Bp-H. This may be attributed to the weak quinoidal character of Bp-X<sup>•-</sup> compared to that of Bp-H<sup>•-</sup>, owing to the presence of electron donating or withdrawing substituents. The smaller  $\Delta f$  values, compared to Bp-H<sup>•-</sup>, indicate that Bp-X<sup>•-</sup> may have a slightly twisted structure. Furthermore, the difference ( $\Delta f$ ) between the  $\nu_6$  frequencies of Bp-X and Bp-X<sup>•-</sup> showed significant dependence on the electron affinity of the substituent and exhibited a correlation with the Hammett substituent constants ( $\sigma_p$ ).

The opposite effect of electron donating and withdrawing substituents on the  $\Delta f$  values, shown in Figure 2, can be interpreted by considering the different distributions of the unpaired electron and negative charge densities of the two benzene rings in Bp-X<sup>•-</sup>. To date, it is well known that the planarity of Bp-H<sup>•-</sup> is predominantly due to the  $\pi$ -electron delocalization, which results in an increase in the quinoidal character of the two benzene rings i.e., the delocalizations of the unpaired electron and charge densities of the two benzene rings in Bp-H<sup>•-</sup> are equal. However, the substitution of the *para*-hydrogen atom with an electron donating or withdrawing group should result in unequal negative charge densities on the two benzene rings, even in the ground state. In addition, Mönig et al. suggested that the radical cations of PCBs in DCE show a twisted structure, wherein the unpaired electron and the positive charge are localized mainly on one benzene ring.<sup>2</sup> Taking into account the  $\sigma_p$ -dependence of the  $\Delta f$  values of Bp-X, observed in the present study, and the twisted structure of Bp-X<sup>•-</sup>, we conclude that, with or without a substituent, the unpaired electron and negative charge in Bp-X<sup>•-</sup> substituted with an electron donating or withdrawing group may be localized on one benzene ring. Indeed, theoretical calculations show that in the case of Bp-X<sup>•-</sup> with an electron donating group, the sum of the spin and charge density for the unsubstituted benzene ring is larger than those for the substituted benzene ring. However, in the case of Bp-X<sup>•-</sup> with an electron withdrawing group, the sum of the spin and charge density for the unsubstituted benzene ring is smaller than that for the substituted benzene ring. This result indicates that the unpaired electron and negative charge density in Bp-X<sup>•-</sup> substituted with an

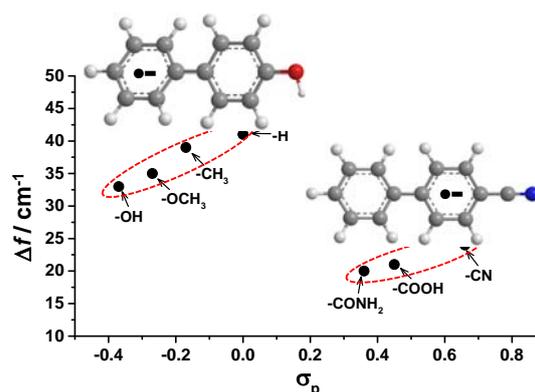


Figure 2. Plots of the frequency difference ( $\Delta f$ ) against Hammett  $\sigma_p$  constants for Bp-Xs. The frequency difference ( $\Delta f = f_{\text{Bp-X}} - f_{\text{Bp-X}^{\bullet-}}$ ).

electron donating group are located predominantly on the unsubstituted benzene ring, whereas those in Bp-X<sup>•-</sup> substituted with an electron withdrawing group are located predominantly on the substituted benzene ring. Moreover, this result supports the hypothesis that the position of the unpaired electron and negative charge in Bp-X<sup>•-</sup> significantly depends on the electron affinity of the substituent. These experimental and theoretical results suggest that the twisted structure of Bp-X<sup>•-</sup> is due to the localization of the unpaired electron and negative charge on one benzene ring and that the opposite effect caused by electron donating and withdrawing groups on the  $\Delta f$  value stems from the unequal distribution of the spin and charge densities between the two benzene rings in Bp-X<sup>•-</sup>.

In conclusion, the structure of Bp-X<sup>•-</sup> is significantly affected by the electron affinity of the substituent, while Bp-X has a twisted structure regardless of the type of substituent. In addition, the  $\Delta f$  values clearly show a linear correlation with the  $\sigma_p$  values for both electron donating and withdrawing groups. From the theoretical and experimental results, we show that Bp-X<sup>•-</sup> substituted with an electron donating and withdrawing group at the *para* position has a slightly twisted structure, whereas Bp-H<sup>•-</sup> has a planar geometry. The twisted structure of Bp-X<sup>•-</sup> is due to the localization of the unpaired electron and negative charge on one benzene ring. Moreover, the unpaired electron and negative charge in Bp-X<sup>•-</sup> substituted with an electron donating group are located on the unsubstituted benzene ring, whereas those in Bp-X<sup>•-</sup> substituted with an electron withdrawing group are located on the substituted benzene ring.<sup>3</sup>

## References

- 1) J. Choi et al.: *Mol. Biosyst.* **11** (2015) 218.
- 2) J. Mönig: *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2** (1986) 891.
- 3) J. Choi et al.: *J. Phys. Chem. A* on the web. DOI: 10.1021/jp511229t.

# L バンド電子ライナックによる偏光高強度 THz 光を用いた固体電子状態の研究

摂南大学<sup>a</sup>  
産研量子ビーム発生科学研究分野<sup>b</sup>

東谷篤志<sup>a\*</sup>、入澤明典<sup>b</sup>、加藤龍好<sup>b</sup>、川瀬啓悟<sup>b</sup>、磯山悟朗<sup>b</sup>

Electronic states of solids probed by IR-THz spectroscopy using FEL light source from L-band linac at ISIR

Industrial Technology of Wakayama Prefecture<sup>a</sup>  
Dept. of Accelerator Science<sup>b</sup>

A. Higashiya<sup>a\*</sup>, A. Irizawa<sup>b</sup>, R. Kato<sup>b</sup>, K. Kawase<sup>b</sup> and G. Isoyama<sup>b</sup>

Infrared spectroscopy is an effective technique for direct observing electronic states of solids. A terahertz free-electron-laser (THz-FEL) at the Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR) in Osaka University is one of the most intense light source in a far infrared region. It has also possibilities as a pump source because of its huge peak power with the short pulse length. Meanwhile this also has a linear polarized character originating in the undulating electrons through the wiggler. A circular polarized THz light can be reconstructed from 90 degree phase shifted linear polarized ones. These characteristic THz-FEL will be the key for developing new experimental physics of solids in THz region.

## (背景と目的)

量子ビーム発生科学研究分野では、産業科学研究所附属の量子ビーム科学研究施設において L バンド電子ライナックを用いた THz-遠赤外自由電子レーザー (以下、ISIR-FEL) の開発・利用研究を行っており、様々な研究分野における内部および外部ユーザー利用の開拓を推進している。高強度性、短パルス性、単色性、偏光特性を兼ね備える ISIR-FEL に対しての利用方法は大きく分けてエネルギー(もしくは波長)分散測定(分光測定)、時間応答測定、および空間分散観測(イメージング)があげられるが、本研究ではこれらを組み合わせた様々な利用実験を模索しており、今回は THz 領域のイメージングの可能性についてビームラインの現状と改良点について報告する。THz 光はその波長の長さが回折限界として $\sim 100\mu\text{m}$ 程度の空間分解能に対する制限となってくる事が知られているが、利用方法としては強相関固体電子物質における相分離や生体内の癌細胞における含水特性評価など様々な分野にわたる活用が期待できる。空間分解能向上の一つの方法として近接場光の検出による分解能の拡張が精力的に研究されているが、探針による

スキヤンなどの点でデメリットもあり、限られた実験環境に制限されるのが現状である。

本研究ではこれまで集光したテラヘルツ光を用いて試料のラスタースキヤンにより高分解高速分光イメージングを行った。従来の手法でありながら高速かつ分光イメージングを可能にし、物質固有の吸収に伴った分布イメージングが可能となった。また、光源の高度化に伴い、拡散光においてもテラヘルツカメラでの検出限界を上回る輝度が得られており、マルチアレイによる 1 ショットイメージングが可能となった。

## (研究方法)

実験は大阪大学産業科学研究所附属量子ビーム科学研究施設の L-バンドライナックを用いた ISIR-FEL で行った。マクロパルス周波数は 5Hz、最大強度 10mJ 程度、 $100\mu\text{m}$  径程度まで集光することによって電場強度は 10MV/cm 強に及ぶ。イメージングはビームをテラヘルツレンズによって  $200\mu\text{m}$  程度に集光、もしくは内径 8mmφ の銅パイプをライトパイプとして使い、8mmφ 程度の拡散光にして観測対象物に照射し、検出器もしくはテラヘルツカメラにより測定した。

## (結果および考察)

分光イメージングは CuO, Cu<sub>2</sub>O の粉末をポリ

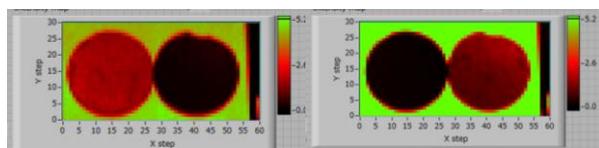
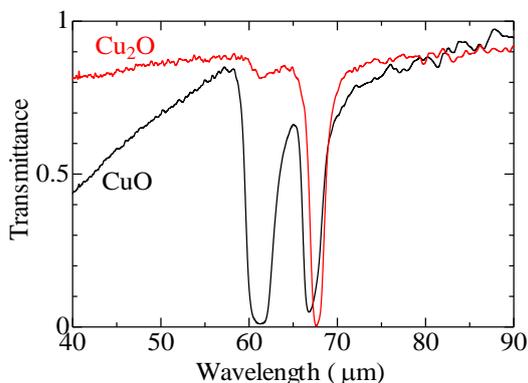


図 1 銅酸化物 CuO,Cu<sub>2</sub>O の吸収ピーク 67.0μm (左) , 68.0μm (右) それぞれの波長での分光イメージング

プロピレンパウダーに混合し、ペレット化したものを用いて透過モードで行った。CuO, Cu<sub>2</sub>O は波長 67.0μm, 68.0μm といったわずかにずれた吸収ピークを持つ (図 1 上)。実験の結果、それぞれの波長でのイメージの濃淡が明確に反転した (図 1 下)。これにより、わずかな構造変化による固体物質のフォノンピークの変調や、近傍環境のわずかに異なる分子結合の振動・回転モードなど、物質の分散や相平衡の乱れといった興味深い物質状態の空間分布の直接観測が可能となった。今後は線分析、面分析などスペクトルの同時取得に発展していく予定である。次にテラヘルツカメラを用いた 1 ショットイメージングの結果を示す。テラヘルツ光は当初レンズ系による拡散平行化を試みたが、テラヘルツカメラである程度均一に観測できる程度の先頭値の平坦化は不可能であったため、先に述べたように銅管内を反射散乱通過させることによって局所的な空間分布の緩和を行った。ナイフエッジは鮮明に観測できており、M2 のネジ山 (ピッチ 0.7mm) の観測や、両面テープ内部の格子状の繊維サポート部の

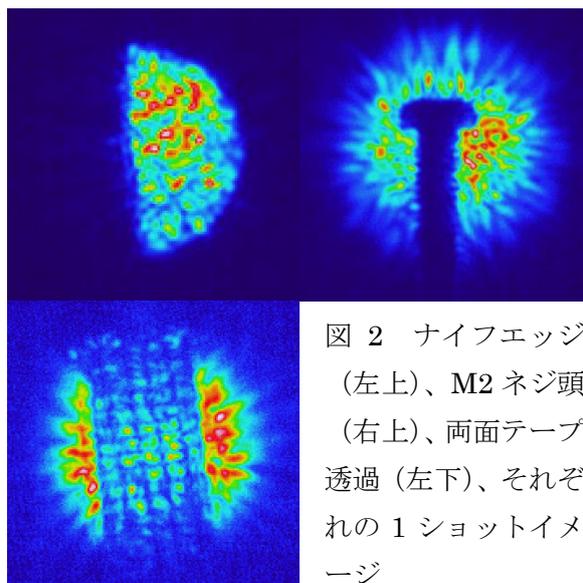


図 2 ナ이프エッジ (左上)、M2 ネジ頭 (右上)、両面テープ透過 (左下)、それぞれの 1 ショットイメージ

透過像など、明確に観測されている。テラヘルツ光の空間分布の不均一やテラヘルツカメラとの同期の問題などいくつかの技術的改良点は必要であるが、10mmφ 程度に広げられた光を用いれば 5Hz 間隔での 1 ショットイメージングが可能であることを示す結果となった。

#### Reference

1. 入澤明典, 川瀬啓悟, 加藤龍好, 藤本將輝, 矢口雅貴, 堤亮太, 船越壮亮, 磯山悟朗, 東谷篤志 “遠赤外・テラヘルツ自由電子レーザーの最近の展開” 第 4 回光科学異分野横断萌芽研究会(2014 年 8 月 6 日)
2. Akinori Irizawa, Ryukou Kato, Keigo Kawase, and Goro Isoyama, ‘Current condition and Utilization Environment of ISIR THz-FEL’ The 18th SANKEN International Symposium 2014, Dec.10.2014.
3. 入澤明典, 川瀬啓悟, 加藤龍好, 藤本將輝, 矢口雅貴, 堤亮太, 船越壮亮, 磯山悟朗, 東谷篤志 “高強度テラヘルツ FEL の利用展開” 第 21 回 FEL と High-Power Radiation 研究会

# 低線量放射線による影響の解明に向けた自動細胞解析手法の研究

<sup>1)</sup>福井大学附属国際原子力工学研究所、<sup>2)</sup>大阪大学産業科学研究所 ナノテクノロジーセンター、  
戸田圭哉<sup>1</sup>、松尾 陽一郎<sup>\*1</sup>、平山誠<sup>1</sup>、泉佳伸<sup>1</sup>、安田仲宏<sup>1</sup>、誉田義英<sup>2</sup>

Study of fully automated analyzing system  
for the study of low-dose radiation effects on cellular radiobiology

<sup>1)</sup>Research Institute of Nuclear Engineering, University of Fukui, Japan.  
<sup>2)</sup>Nanoscience and Nanotechnology Center, ISIR, Osaka University

Keisuke Toda<sup>1</sup>, Youichirou Matuo<sup>\*1</sup>, Makoto Hirayama<sup>1</sup>, Yoshinobu Izumi<sup>1</sup>, Nakahiro Yasuda<sup>1</sup>  
and Yoshihide Honda<sup>2</sup>

Health risks from low-dose radiation has a concern for the potential risks from environmental and clinical radiations, especially after the Fukushima nuclear disaster, even public people has a great interest about the risks of low-dose radiation. Since experimental signal changes are extremely rare on DNA strand breaks and/or cell survivals at low-dose region, in the current situation, experimental data in this region with statistical significance are very difficult to obtain because of the need for large number of samples. We have been developed a fully automated colony counter system by utilizing the nuclear track detection technologies in order to verify radiation damage on cellular radiobiology such as the cell survival at low-dose region. As a sample to use in this research, the colonies were prepared from the cell which irradiated gamma-rays.

## 【研究背景】

放射線による人体影響は確定的影響と確率的影響の2種類に大別され、DNAの損傷に引き続く細胞死など細胞の状態が関係していることが分かっている。しかしながら、特に低線量域での影響に関しては、科学的に解明できていない事項も存在し<sup>1)</sup>、国民の不安に明解に込えられてないことも事実である。低線量域における影響の発生頻度は低く（例：マウスの性細胞の突然変異誘発率は10～100万個に1個の事象<sup>2)</sup>）、他の要因に隠れてしまうことが解明できていない主な原因であると考えられている。

我々は、低線量放射線による影響解明へのアプローチとして人体影響に関連している「細胞での影響」に着目し、画像解析<sup>3)</sup>などの工学的手法を導入することにより大統計量で影響研究を可能にする手法の開発を行っている。放射線照射による細胞からのシグナル測定（放射線細胞影響研究）の一連の操作を機械に置き換えて自動化する

ことで、最終的には大量のサンプル処理によって稀な事象を再現性よく検出するためのシステム構築を目指すものである。

本年度は、基礎データの取得を目的として、生体影響の指標となるサバイビングフラクションを求めるための実験系の立ち上げを行った。

## 【実験内容】

本研究では、放射線生物学の分野で標準的に用いられているチャイニーズハムスターの卵母細胞由来（Chinese Hamster Ovary Cells）のCHO-K1細胞を対象とした。CHO-K1細胞の培養は、二酸化炭素濃度5%、37℃の環境下で行った。T25フラスコ(FALCON)に $5 \times 10^5$ 個のCHO-K1細胞を入れ、7mlの10%の牛胎児血清を含むHam's F-12培地を加えたものをサンプルとした。CHO-K1細胞の計数は、TC-20(Bio-rad)を用いた。産業科学研究所のDog82線源を用い、0.01、0.05、1Gyのガンマ線を照射した。照射後、各線量につき

\*Youichirou Matuo, y-matsuo@u-fukui.ac.jp

10 枚の 9 センチ細胞培養皿あたり  $3 \times 10^2$  個の細胞を播種し、10 日間培養した。メタノールで細胞を固定後、5mg/ml クリスタルバイオレット溶液で染色し、コロニー数を計測した。ここで 50 個以上の細胞集団をコロニーとして、コロニー数を計数した。一般的に、生存率は、式 (1) のように定義される。

$$\text{生存率} = \frac{\text{生成コロニー数}}{\text{播種細胞数}} \dots (1)$$

また、未照射の細胞の生存率を 1 とした時の照射された細胞の生存率を比較することで、生存曲線を作成した。この指標はサバイビングフラクション(SF)と定義され、式 (2) で表される[2]。

$$\text{SF} = \frac{\text{吸収線量 } D(\text{Gy}) \text{ での生存率}}{\text{未照射での生存率}} \dots (2)$$

生体影響の指標となるサバイビングフラクションを求めるための実験の流れを図 1 に示す。

### 【結果】

図 1 にガンマ線を照射した場合の生存曲線を示す。ガンマ線の吸収線量の増加に対してサバイビングフラクションが低下することが示された。0.01Gy および 0.05Gy の低線量域については、エラーバーが大きく、未照射の場合と有意差は見られなかった。本年度はガンマ線の照射実験の系が確立できた。次年度以降、線量ごとのサンプル数を増やし、実験操作の一部を機械に置き換えて自動化することで、大統計量を背景とした低線量放射線による影響の解明へつなげていく計画である。

### 謝辞

本研究の成果の一部は、平成 26 年度 福井県「原子力防災・危機管理」教育研究推進事業の支援を受けて実施された。

### Reference

- 1) ICRP Publication 99.: (2005).
- 2) Rusell *et al.*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **79**, pp.542-544, (1982).
- 3) N. Yasuda *et al.*: Radiation Measurements, **40** (2005) 311.
- 4) Barendsen *et al.*, International journal of Oncology, **19**, 247-256, (2001).

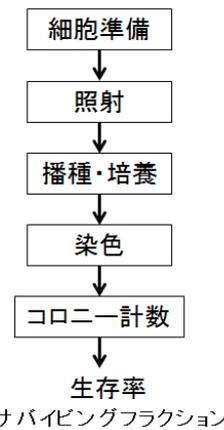


図 1 生体影響の指標となるサバイビングフラクションを求めるための実験の流れ。

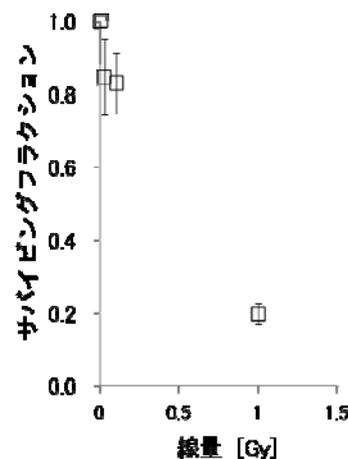


図 2 ガンマ線を照射した場合の CHO-K1 細胞の生存曲線。n=10。エラーバーは SD。