

Title	種々の刺激を受けたサクラン凝集体からの光の倍音の観察
Author(s)	水谷, 五郎; 趙, 越; Khuat, Hien Thi Thu; 岡島, 麻衣子; 金子, 達雄
Citation	YAKUGAKU ZASSHI, 139(3): 351-362
Issue Date	2019-03-01
Type	Journal Article
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/16204
Rights	Copyright (C) 2019 日本薬学会. 水谷五郎, 趙越, Hien Thi Thu Khuat, 岡島麻衣子, 金子達雄, YAKUGAKU ZASSHI, 139(3), 2019, 351-362. http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.18-00177-1
Description	

種々の刺激を受けたサクラン凝集体からの光の倍音の観察

水谷五郎,* 趙 越, Hien Thi Thu Khuat, 岡島麻衣子, 金子達雄

Optical Second-harmonic Observation of Stimulated Sacran Aggregates

Goro Mizutani,* Yue Zhao, Hien Thi Thu Khuat, Maiko Okajima, and Tatsuo Kaneko

School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology; 1-1 Asahidai, Nomi, Ishikawa 923-1292, Japan.

(Received August 8, 2018)

Second-order nonlinear optical images of aggregates of the ampholytic megamolecular polysaccharide sacran under various stimuli were observed by optical second-harmonic generation (SHG) microscopy. SHG intensity microspots of several tens of micrometers in size are seen for sacran cotton-like lumps and fibers and they have very clear incident polarization dependence. In these microspots, the sacran molecules are oriented in concentric multilayers. We also observed SHG images of sacran prepared in a needle-ring electrode with applied voltage, where SHG was enhanced near the negatively biased needle electrode. We also observed SHG signals near the cast film edges of sacran. The appearance of the SHG image suggested a phase-separation structure in sacran aggregates. These results show that sacran molecules aggregate in several different ways.

Key words—sacran; optical second-harmonic generation microscopy; electric field; cation

1. 背景

サクランは、スイゼンジノリの細胞を覆うように存在する寒天状物質から抽出される、今現在地球上で一番分子量が大きいとされる分子である。¹⁾ サクランについては高分子ポリマーとして、食品や化粧品として、多くの性質が調べられ、また、極めて高い抗炎症性、抗アレルギー性を持ち、²⁻⁴⁾ 薬品への応用も検討されている⁵⁾が、基礎的な構造物性を始め未解明な部分も多い。そこで、今回私たちは「対称性の破れ」に敏感な光第二高調波 (second-harmonic generation; SHG, 光の倍音) 顕微鏡を用いてサクラン凝集体の観察を試み、サクラン分子に関する興味深い知見を得たため報告する。^{6,7)}

Figure 1 にサクラン分子の構造を表す化学式の一部を示す。このサクラン分子に特徴的なのは、図の左端に見える両荷電性の硫酸化ムラミン酸の存在で、これと各糖のカルボン酸基が理由で多くのアニオンとごく少量のカチオンが存在する。サクラン分

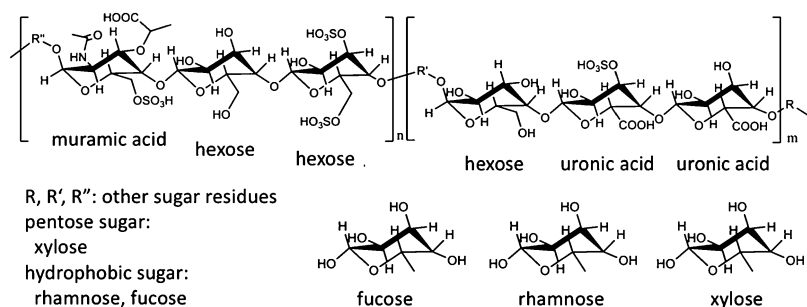
子は Fig. 1 では便宜上直線状に描かれているが、濃度が低い水溶液では球状に丸まり、濃度が高くなると球状だった分子がほどけて伸び複数集合して棒状になる。さらに濃度があがると、ゲル状になり、その中でサクランは配向して液晶性を示す。⁸⁾ 液晶性のサクランは水分子を取り込んで著しく膨潤し、逆に正の多価金属イオンの存在によりゲル状に固められることが知られている。⁹⁻¹³⁾ ヒアルロン酸をはるかに上回る保水力が利活用され、化粧品用保湿剤として既に活用されている。

さて、このサクランに電気的な刺激や力学的な刺激を与えて、光第二高調波 (SHG) 顕微鏡¹⁴⁻¹⁶⁾ という方法で観察したのが、本稿の内容である。SHG 顕微鏡はまだあまり知られていない技術なので、最初に SHG 顕微鏡と装置について紹介し、次にサクラン繊維の SHG 像とその入射偏光依存性⁶⁾ について紹介する。さらに、サクランキャスト膜を製作する原料であるサクラン水溶液に電界を印加しながら膜を作ったとき、その電界が膜の SHG 像に与えた効果について述べる。⁷⁾ またキャスト膜生成の際の流体力学的な力が膜の SHG 像に与えた効果⁶⁾ について紹介して、サクランが相分離構造という興味深い状態を示している可能性を紹介する。最

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系 (〒923-1292 石川県能美市旭台 1-1)

*e-mail: mizutani@jaist.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 138 年会シンポジウム S69 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Part of a Typical Structure of a Sacran Molecule¹⁰⁾

後にこれらの観察からわかるサクラン凝集体のミクロな構造について議論する。

本研究で使用する SHG 顕微観察法の原理について簡単に解説する。^{15,17)} SHG は二次の非線形光学効果の 1 つで、試料に周波数 ω の光を照射すると 2 倍の周波数 2ω の光が発生する現象である。この現象は入射光電場 $E_0 e^{-i\omega t}$ で励起された試料媒質中の二次の非線形分極

$$P^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)} E^2 \propto (E_0 e^{-i\omega t})^2 \propto e^{-i2\omega t} \quad (1)$$

が周波数 2ω の電磁波を放出することによって発生する。ここで一般に $P^{(2)}$ や E はベクトルであり、二次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ は 3 階のテンソルであるが、ここでは簡単のため 1 次元の場合を想定し、スカラーで書いている。この分極より発生する SHG 光の強度は入射光強度の二乗に比例するので、SHG 光は瞬間パワーの強いパルスレーザー光を用いると効率よく発生する。

二次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ は試料の微視的な構造に中心対称性がある場合にはゼロとなる。このことを以下で証明する。いま媒質の構造に中心対称性がある場合には、電場と媒質の分極を空間反転しても同じ式 Eq. (1) を満たすはずである。このことは $P^{(2)}$ や E を $-P^{(2)}$ や $-E$ で置き換えた式、

$$-P^{(2)} = \epsilon_0 \chi^{(2)} (-E)^2 \quad (2)$$

が成り立つことを意味する。そこで、Eq. (1) から Eq. (2) を両辺引き算すると右辺は等しいので、 $2P^{(2)} = 0$ となり、二次の非線形分極はゼロとなる。したがって二次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ もゼロとなる。と言うことは逆に、試料のミクロな構造に中心対称性が欠如していると、二次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ はノンゼロな値を持つ。すなわち SHG 顕微鏡は「対称性の破れが見える顕微鏡」である。

例えば、Fig. 2(a) のトランプのマークを分子だ

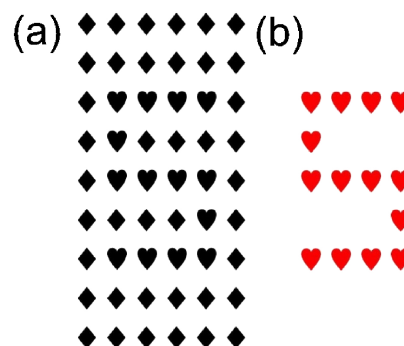


Fig. 2. (a) Schematic Representation of Aggregated Molecules, and (b) Schematic SHG Image of the Molecular Aggregate Depicted in (a)

(a) Each playing-card symbol represents a molecule. Hearts represent noncentrosymmetric molecules, and diamonds represent centrosymmetric molecules. (b) Only the asymmetric molecules represented by hearts are emitting SHG light. (Color figure can be accessed in the online version.)

と考える。ダイヤモンドのマークのように上下左右対称の形の分子は反転対称性があるので SHG 禁制である。一方、ハートのマークは上下方向に反転させると自身には重ならないので反転対称性を持たず、SHG 許容である。いま、トランプのマークの形をした分子が Fig. 2(a) のように入り乱れて分布していたとする。普通の光を当ててこれを見ても分子の分布は判然としないが、パルスレーザー光を照射し SHG 像を観察すると、Fig. 2(b) のように対称性の破れた分子のみが選択された像が見える。このように SHG 顕微鏡は物質の対称性に敏感な選択的な観測ができる顕微鏡である。



水谷五郎

北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系教授。パルスレーザーを用いた二次の非線形分光法や顕微観察法の開発に従事。世界初のデンプン粒子やクモの糸の光第二高調波の検出。共焦点光和周波顕微鏡及び超高真空光和周波顕微鏡の開発者。

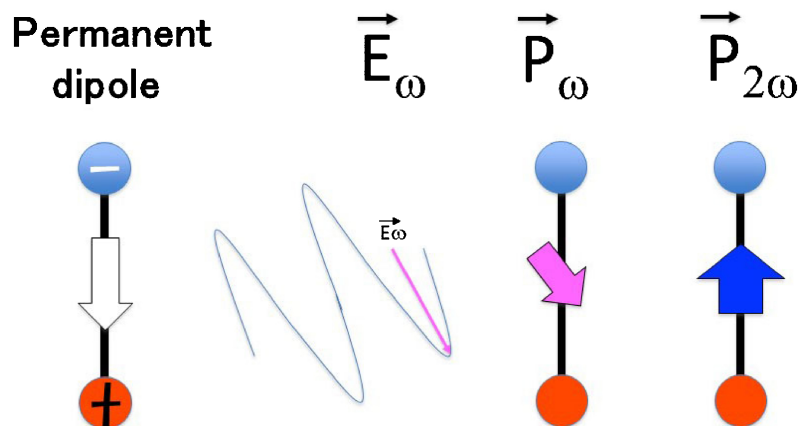


Fig. 3. Permanent, Linear, and Second-harmonic Polarization of an Asymmetric Molecule
(Color figure can be accessed in the online version.)

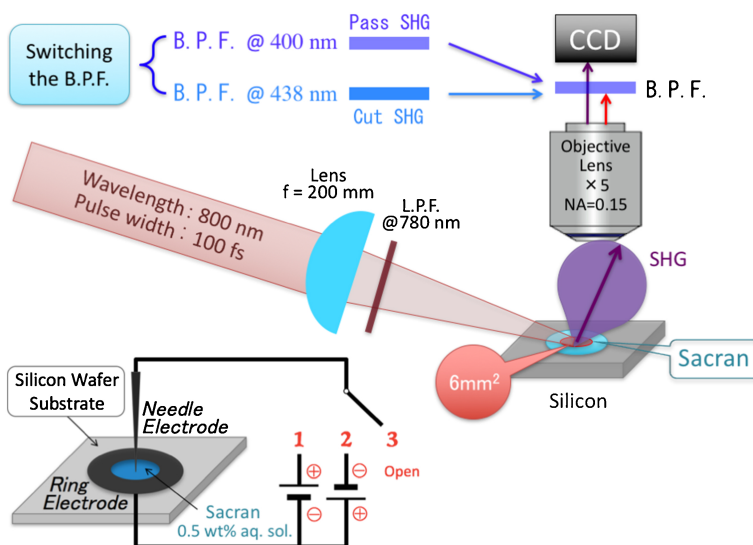


Fig. 4. Schematic Configuration of the SHG Measurement Near the Sample When the Sample Structure Is in a Ring-shaped Cell with the Electric Circuit

(Color figure can be accessed in the online version.)

さらにこの SHG 分極は、入射光や出射光の偏光に対して興味深い性質を示す。Figure 3 にその様子を示した。Figure 3 の左端のような永久双極子を持った 2 原子分子があったとし、その永久双極子の方向が紙面の下側を向いているとする(白い矢印)。そこに外部から電磁波による電場 \vec{E}_ω が作用すると、この分子に誘起される線形分極 \vec{P}_ω もおよそ入射電場と同じ方向を向く(ピンクの矢印)。一方、入射電場 $|\vec{E}_\omega|$ が最大値をとるときの SHG を発する二次の非線形分極 $\vec{P}_{2\omega}$ の方向はほぼ分子と平行で紙面では上向き方向を向く(青い矢印)。この性質があるので、この図で左右方向に偏光を持つ入射光 \vec{E}_ω は $\vec{P}_{2\omega}$ を励起し難く、また発生する SHG

光も紙面の上下方向に偏光成分を持つ成分が強くなる。これより、この分子からの SHG の入射出射偏光依存性は、分子の方向を反映したものとなり、分子の配向の決定に利用することができる。私たちのグループでは、この SHG 顕微鏡を用いていくつかの興味深い系について、観察を行った。¹⁸⁻²⁴⁾

2. 光第二高調波 (SHG) 顕微観察の方法

Figure 4 に模式的な SHG 顕微観察法の配置図を示す。私たちの SHG 顕微鏡システムの光源は、再生増幅したモード同期チタンサファイアレーザーで、繰り返し周波数 1 kHz、パルス時間幅約 100 fs、中心波長 800 nm である。レーザーから出た励起光は、励起光強度を光学フィルタを用いて、偏光を半

波長板, 偏光板を用いて調整し, 焦点距離 200 mm のレンズを用いて, 試料ステージに対して入射角 60° でスポット径 $1\text{ mm}\phi$ の楕円形にゆるく集光した. 集光レンズと試料との間に, 780 nm より短波長の光を除去する長波長パスフィルター (long pass filter; LPF) を入れ, 散乱方向へ発生する SHG 光は市販の顕微鏡 OLYMPUS BX60 を使用して結像した. 対物レンズを通過した試料からの SHG 光は平行光線となり, 短波長パスフィルター (short pass filter; SPF) により 800 nm の波長の光が除去され, 最後は Semrock 社製バンドパスフィルター (band pass filter; BPF) FF01-395/11 を通して, インテンシファイアーツきの CCD カメラ (HAMAMATSU, PMA-100) を用いて光子観測モードで像観察した. 二光子励起発光 (2-photon-excited fluorescence; 2PEF) の像を確認するために, 中心波長 438 nm の Semrock 社製バンドパスフィルター FF02-438/24 を, 400 nm を透過させる BPF フィルターと差し替えて使用した. 400 nm の BPF で像が見えてもそれは多光子励起発光の可能性もあるので, その像が 438 nm の BPF の像と異なれば SHG と判定した. 低感度で白色光照射像をモニターするために, CMOS カメラ (Lumenera Corp., Lu135M) を使用した. 顕微鏡の空間分解能は, II-CCD カメラのチップサイズ $11\ \mu\text{m} \times 13\ \mu\text{m}$ で決まり, 倍率 $\times 5$ ($\text{NA} = 0.15$) では $2.6\ \mu\text{m}$, 倍率 $\times 20$ では $\text{NA} = 0.65\ \mu\text{m}$ ($\text{NA} = 0.15$) である. この実験では, サンプル上の最大励起光エネルギー密度は $8.6\ \mu\text{J}/\text{mm}^2$ である.

多くのグループで行っている²⁵⁻³²⁾ように, くりかえし周波数が $\sim 80\text{ MHz}$ の再生増幅していないフェムト秒レーザー光源を用いて, 励起光を顕微鏡の鏡筒側から入射させる観察法もある. この場合には, 入射光が自動的に試料の観察位置を照らすので, 試料への励起光の光学軸合わせが容易である. しかし本顕微鏡のシステムでは, 光強度の尖頭値が 5 桁ほど高い再生増幅したフェムト秒レーザー光源を用いているのが理由で, このような配置は採用していない. なぜなら, 再生増幅されたフェムト秒レーザー光は光強度の尖頭値が高く, 対物レンズを通過するときにスーパーコンティニウム光と呼ばれる白色光が発生してしまい, 試料からの SHG 光よりずっと強い信号を検出器に与えるからである. しかし一方

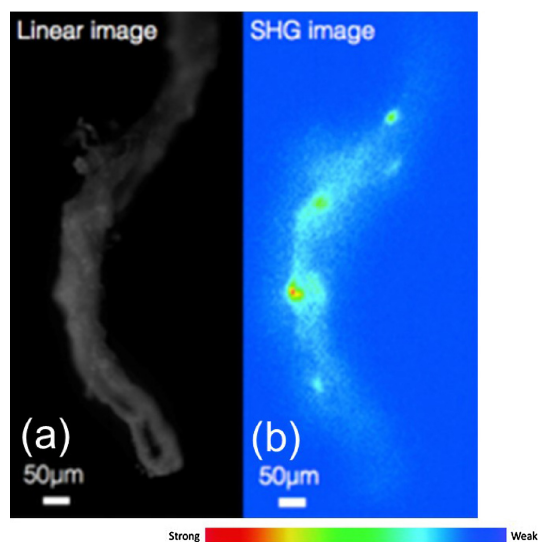


Fig. 5. (a) Linear and (b) SHG Images of a Sacran Fiber Removed Gently from Cotton Ball-like Pure Sacran Aggregates (Color figure can be accessed in the online version.)

で, 本システムのような強度尖頭値の高い励起光を用いると, SHG 光信号の強度が強くて観測でき, 数秒から数分というこの種類の計測では比較的短い時間でより広い視野での計測結果が得られるというメリットがある.

3. 光第二高調波 (SHG) 顕微鏡による刺激を受けたサクラン凝集体の像の観察

3-1. 高純度の綿状サクラン塊の SHG 像の観察⁶⁾

Figure 5 (a) は綿状のサクランの試料の中から繊維状の集団を一本そっとひきだし, 白色光を照らして CMOS カメラで撮影したものである. この繊維は液晶状態のサクラン分子が形成したマイクロな棒状の繊維が多く集まったものである. この試料に波長 800 nm , 時間幅 $\sim 100\text{ fs}$ のフェムト秒光パルスを照射して, 波長 400 nm の SHG 像を観察したものが, Figure 5 (b) である. Figure 5 (a) のリニアイメージにおいて, この試料は長さ 1 mm 程度, 太さ数十 μm 程度の連続的な糸状の塊であるが, 同じ試料の SHG イメージ [Figure 5 (b)] を見てみると, 試料の中央付近や上半分にも 3 ヲ所, SHG が局所的に強い場所がある. この繊維をとりだしたもとの綿状の塊試料全体の SHG 像においても, SHG はスポット状にあちこちで強く観察された. Figure 5 (b) で試料全体にわたって比較的弱く見えているシグナルは多光子励起発光の可能性があり, SHG 光とは限らない.

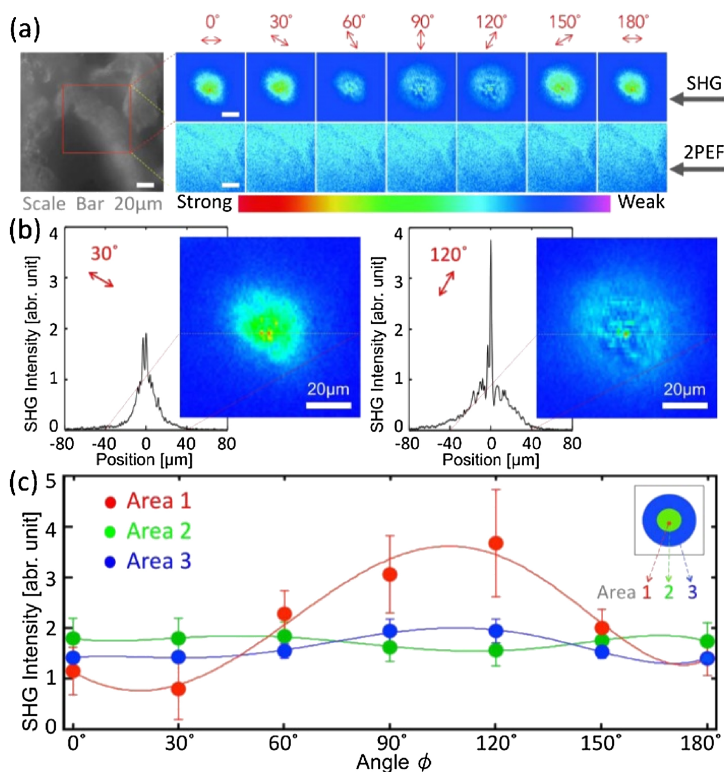


Fig. 6. Incident Polarization Dependence of the SHG Intensity and the 2PEF Images of Pure Sacran at One SHG Spot

(a) The left panel is a linear microscopic image. The upper right and lower right images are SHG and 2PEF microscopic images, respectively. (b) Intensity profiles in the strongest SHG spot for the 30° and 120° input polarization angles. (c) SHG intensity variations as a function of the incident polarization in areas 1, 2, and 3.⁶⁾ Reprinted with permission from Ref. 6), The Optical Society of America. (Color figure can be accessed in the online version.)

さて、この試料全体を回転及び傾斜させてみると、SHG 像中の各スポット同士の相対強度は変化した。このことより、このスポットには光学的な異方性があることが考えられる。そこで、入射しているフェムト秒レーザー光の偏光を回転させて SHG 光スポットの強度イメージを計測した。その結果を、Fig. 6 に示す。

Figure 6(a) は純粋な綿状のサクランの塊の 1 つの SHG 強度スポットに注目し入射偏光角依存性を調べたものである。一番左の画像は白色光で照らした綿状サクランの白黒像である。その右の 2 段組みの図列の上の段は、左の白黒像中の赤い枠内にフェムト秒レーザー光を照射して観測した SHG 像であり、下の段は二光子励起発光の像である。励起するレーザー光の偏光方向を各図の上に示した。

まず下段の 2PEF 像を見る。2PEF 像に関してムラはあるがほぼ様な像強度を示し、左の白色光照射像におおよそ対応している。また、この 2PEF の強度は入射光の偏光方向の角度には依存しない。一方、上段の SHG 像では画面の中心のおよそ直径 50

μm の円形の範囲で SHG 光強度が強い。そして SHG 光強度は入射光の偏光角度に強く依存し、入射光偏光角度が 0° 付近で強く、90° 付近で弱い。

Figure 6(b) は Fig. 6(a) の 30° と 120° の SHG 像を拡大し、さらにその中心部を通る水平な直線上の SHG 光強度のプロファイルのプロットしたものである。Figure 6(b) 右の入射偏光角度 120° に対する SHG プロファイルを見ると中央の部分で SHG 光強度が局所的に強いことがわかる。この中央の SHG 光強度の強い領域の大きさは直径おおよそ 2 μm である。それに対応して、2次元の SHG 像の方も中央の 2 μm の領域で強度が強い。また 2 つの SHG プロファイルのピークのすそ野を見てみると、入射偏向角度 30° については半径 40 μm 以内に分布しているのに対し、120° については SHG 光は半径 40 μm より大きい範囲にもものびていることがわかる。これに対応して、入射偏光角度 120° に対する SHG 像の大きさ [Fig. 6(b), Right] は、強度が弱いながら 30° のそれ [Fig. 6(b), Left] より大きいことがみてとれる。

この SHG 像の入射偏光角度依存性は、試料を 3 つの領域に分類することにより現象論的に記述できる。Figure 6(c)の右上部の模式図に、この分類の様子を示す。すなわち、中心から半径 $1\ \mu\text{m}$ の範囲内の領域 (Area 1)、中心から半径 $15\ \mu\text{m}$ の範囲内の領域 (Area 2)、中心から半径 $50\ \mu\text{m}$ の範囲内の領域 (Area 3) の 3 つの領域を考える。SHG 強度の位置分布をこの 3 つの大きさを持つガウス型分布に分離してその成分の大きさをプロットしたのが Fig. 6(c)の各ドットである。これを見ると、赤いドットの示す Area 1 及び紺色のドットの示す Area 3 の成分の大きさは、 100° 付近で大きく 20° 付近で小さい。一方、黄緑色のドットの示す Area 2 の成分の大きさは、 50° 付近で大きく 120° 付近で小さい。

本稿冒頭で述べたように、永久双極子を持った分子は一般に、その永久双極子のベクトルと方向が逆を向いている二次の非線形分極を持つ。Figure 6(c)で、ある角度の入射偏光角に対して SHG が強いことは、その方向と平行な方向に二次の非線形分極及び永久双極子を持つからだと考えられる。このことはサクラン繊維の中のサクラン分子が配向している結果だと推測できる。

この SHG 像にのみ見える構造の由来は何かを考えるために、原料水溶液をパーティクルフィルターでろ過して用い製作したキャストフィルムについて、同様の SHG 顕微観察を行った。成膜法としては、サクランの 0.5 wt% 水溶液を作り、ろ過後シリコンウェーハーに滴下して乾燥させた。サクラン水溶液としては、フィルター処理しないもの、及び $0.45\ \mu\text{m}$ の孔サイズのパーティクルフィルターを通したものをを用いた。その結果、フィルター処理しないサクラン水溶液から作ったサクランのキャストフィルムでは、綿状の試料と同じように SHG スポットが観測されたが、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターを用いた膜に対しては、エッジ以外の部分は綿状のように場所に依存しない SHG スポットは全く観測されなかった。エッジの部分における SHG は別のメカニズムで発生したものであり、3-3. の節で解説する。したがって、この SHG スポットの原因となるものは、 $0.45\ \mu\text{m}$ の孔径のフィルターによって取り除かれることがわかった。

それでも、この SHG 強度スポットの起源はかならずしも明らかではない。Figure 5 や 6 を見ると、

サクランが連続的に存在している場所においても、SHG 強度は大きく変化しているため、サクラン凝集体全体で SHG 光が発生しているわけではない。SHG 光を発生させるという事実からはこの部分の媒質の対称性に中心対称性がないということしか言えない。今の場合の SHG の起源の候補として挙げられるのは、サクランを抽出したスイゼンジノリの細胞の破片などが、あるいはサクラン分子の中で特殊な構造をしたものである。細胞の破片のサイズは大きく、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターに除外されるのは自然である。一方で $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターに除外される大きなサイズのサクランがあっても不思議ではない。大きなサイズのサクランがフィルターの孔にひっかかる場合もあり得るし、フィルターの作用で分解し、小さなサイズのサクランになった可能性もある。

ここからは 1 つの可能性であるが、大きなサイズのサクランが正体である場合の 1 つの候補として、後に述べる電場をかけた計測からわかるように、周りにアニオンのサクランを従えたサクランカチオンを挙げる。Figure 6(c)に見るような、SHG スポットの同心球状の多層構造は、1 点の電荷から放射状に発生して分布する電場の形に対応している。電場の大きさに従ってアニオンのサクランが配向したと考えられる。この場合、中心にサクランのカチオンが存在し、そのカチオンサクランを取り巻くようにアニオンのサクランが集まり、各領域の電場の強さに応じて 3 つの配向したサクランの層ができたと思われられる。平均的なサクラン分子そのものは、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターを通過することはわかっているが、サクランカチオンの周囲にアニオンが凝集している場合は嵩高くなって、フィルター孔を通過しなかったと考えられる。しかし、各層でなぜサクランの電気分極の配向が発生するのかという機構についてはいまだ明らかではない。

一方、細胞の破片の候補では Fig. 6(c)にみられる同心球殻構造は期待されない。また、スイゼンジノリについて同様の計測をした結果によれば、スイゼンジノリの細胞の破片は強い 2PEF を発する確率が高い。したがって細胞の破片の可能性はここでは捨て、Fig. 6(b)のスポットの中心にあるのはサクランのカチオンであると推定して話を進める。

3-2. 電場をかけながら成膜したサクランキャスト膜の負電位針電極付近の SHG 像の観察⁷⁾ サクランにおける SHG にはサクランカチオンが関連していることを推測したので、次にサクランに対する電場の効果を SHG 顕微鏡で調べた。Figure 4 に模式的に示したように、シリコン基板の上にリング状の電極（内径 6.6 mmφ）を置き、中心に直径 50 μmφ の針状の電極を配置した。両電極の材質は金やステンレスを用いたが、結果は同じだったので本稿ではステンレスを用いた結果を示す。この電極の内側に孔径 0.45 μm のパーティクルフィルターを通した 0.5 wt% のサクラン水溶液を 70 μL 滴下し、針電極をおろして直ちに +6 V 又は -6 V の電圧をかけて電流を流した。目視で観察した限りでは針電極が -6 V のときのみ、最初の数分間水溶液の負極正極両方から気泡が観察された。電圧のかけ方には関係なく膜は 2 時間ほどで完全に乾燥した。

中心電極に -6 V をかけたときの電流値の時間変化を Fig. 7 に示す。電流によりサクランが劣化したかどうかを確認するために、得られた材料をセルから取り出し、90-100°C の温水に入れ、部分的にゲル化していることを確認した。したがってサクランは電流によって著しく化学変化はしなかったことが確認できた。Figure 7 では、電流の指数関数的な減衰が 1200 秒までみられ、3000 秒付近にも電流の低いピークがみられる。右上の挿入図は同じデータについて横軸の時間を引き延ばしたグラフであるが、最初の 4 分間に電流が繰り返し上下している様子が観察される。

Figure 7 で観測された電流は、サクラン水溶液中の陽イオン及び陰イオンの移動に起因すると考えられるが、その詳細な起源は不明である。7000 秒後には、サンプルが乾燥したため、イオンの動きがなくなり電流はゼロとなった。気泡の起源は電気分解された水、すなわち酸素（正極）と水素（負極）であると思われる。200 秒までの電流値の振動の起源は 2 つの候補が考えられる。1 つめとしては、針から発生した気泡が針電極と溶液との間の電氣的接触を遮断した効果が考えられる。気泡が壊れると針電極と溶液は再び接触し、イオン電流が再開し、結果として振動を示す。2 つめとしては、サクラン分子の粘度とサイズのばらつきが考えられる。挿入図の曲線は、それらのサクラン分子の到着時間の分布に

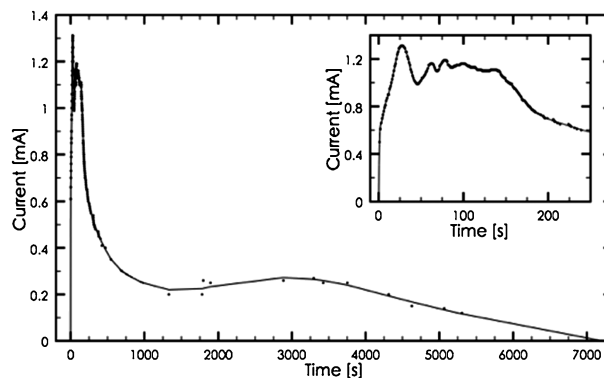


Fig. 7. Current Volume Change over Time through Sacran Aqueous Solution When the Applied Voltage Was -6 V

At time zero, the voltage was switched on, and at time 7000 s the sample was dry. The inset shows the chart with the time scale expanded.⁷⁾

対応しているとも考えられる。気泡の発生が中心電極が -6 V のときだけだった理由はわからない。

Figure 8 は電界をかけながら水溶液から乾燥させたサクラン膜の SHG 像である。上中下段は中央に模式的に表したような電極に印加する電界の方向の違いに対応した図である。各段 3 つ組の図の一番左は白色光を当てて撮影した白黒像、真ん中が SHG 像、右が 2PEF 像である。各段 3 つ組の図の測定箇所は、中央に示す模式図に示している。これらの観察のときは両電極は取り除いた。

Figure 8 において SHG 像は (b), (e), (h), (k), (n), (q) であり、438 nm の 2PEF 像は (c), (f), (i), (l), (o), (r) である。この中で Fig. 8(e) は中央電極に -6 V をかけたときの SHG 像である。電極の付近 200 μm 程度の大きさの範囲で SHG が強くなっている（黄色い矢印で示した）ことがわかる。Figure 8(k) は中央電極に +6 V をかけたときの SHG 像であるが、検出器感度の範囲では SHG は観測されなかった。Figure 8(n) は電場をかけていないときの周辺電極付近の 400 nm の像であり、有意なシグナル強度が見えるが、Fig. 8(o) の 438 nm の像でも同様なシグナル分布がみられるので、SHG とは判定できない。以上をまとめると、強い電場がかかったときには負極の針電極の周辺で SHG を出すサクラン分子が集まるといことがわかる。この SHG 像を見ながら、入射偏光を回転させると、偏光ベクトルが負の針電極を向くときに SHG が強くなっており、サクラン分子が電場により配向していることが示唆された。⁷⁾ なお、Fig. 8(e) と同様の実験を、パーティクルフィルターを通

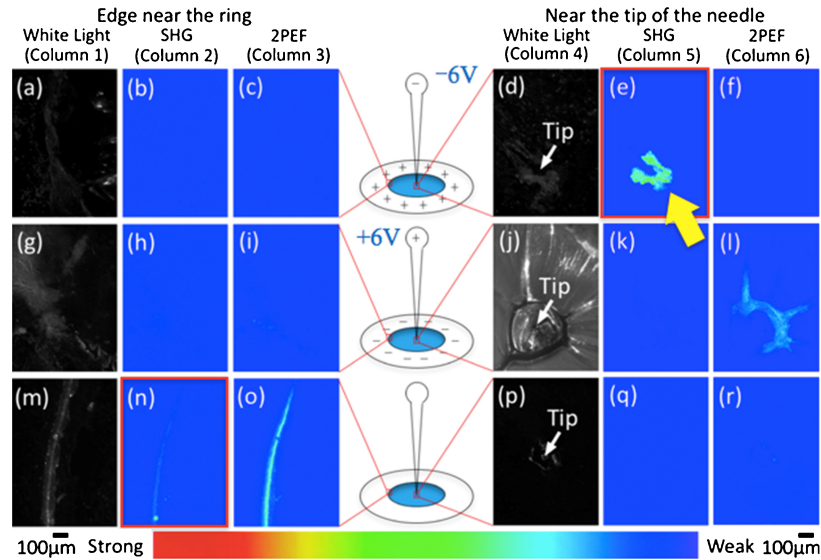


Fig. 8. SHG Images of Sacran Film after Drying Aqueous Solution

The nine images on the left show the sacran film near the inner edge of the steel ring electrode. The nine images on the right show the area near the central steel needle electrode. For (a)–(f) and (g)–(l), the needle electrode was negatively and positively biased, respectively, and for (m)–(r) the voltage was not applied during film formation. Microscopic images using white light illumination are shown in (a), (g), (m), (d), (j), and (p). SHG and 2PEF images are shown in (b), (h), (n), (e), (k), and (q) and (c), (i), (o), (f), (l), and (r), respectively. The excitation power was 20.1 mW, and the irradiated area was 6 mm². The integration time was 60 s. The diameter of the tip of the needle was about 50 µm, and its position is indicated by white arrows in (d), (j), and (p). The thick arrow indicates the intense SHG near the negatively biased needle electrode.⁷⁾ (Color figure can be accessed in the online version.)

していないサクラン水溶液を原料として行ったところ、Fig. 6で観察されたようなスポット状のSHGのスポットが負電極の周りに観察された。

電場をかけて成膜したサクランフィルムの各位置に存在する元素を調べるために、X線光電子分光(X-ray photoelectron spectroscopy; XPS)を行った。フィソズ・インスツルメント社製のS-Probe TM 2803を用いた。結果をTable 1に示す。サクランにおいては、S原子を含む硫酸基(11 mol%)と、カルボン酸(22 mol%)が負電荷を、N原子を含むアミノ糖、混入するNaイオンが、正電荷を与える可能性がある。Table 1は、サンプル中のすべての箇所にもNすなわちアミノ糖が存在することを示している。これはサクランがアミノ糖を含んでいるので妥当な結果である。一方、負電圧をかけた針電極の周りで生成されたサクラン膜においてはSの信号が観測されなかった。Naの信号は印加電圧にかかわらずフィルムの外縁では検出されなかった。そこで参考のためNaClを混ぜたサクランフィルムを製作しSHG観察を試みたが、SHG信号はなかった。したがって、Na⁺イオンはサクラン分子をSHG活性にする要因としては除外される。したがってこの計測では、SHGを発生させるサクランはS元素を持たないという相関が見つかった。

Table 1. XPS Response of the Sacran Film under Electric Field

Element	Without electrode		With electrodes (ring: +, needle: -)	
	Center	Edge	Center	Edge
N	○	○	○	○
S	○	○	×	○
Na	○	×	○	×

従来、サクラン分子としては、負電荷を持つカルボン酸と硫酸基を持つムラミン酸が電荷の担い手として支配的であり、アニオン性高分子としてふるまうと考えられてきた。しかし、今回の実験結果よりムラミン酸やガラクトサミンなどの正電荷を持ったアミノ糖も無視できないと推測される。この類例は硫酸基を持つ紅藻由来のカラギーナンにおいてもみられる。すなわちカラギーナンは通常は硫酸基を多く有するが、硫酸基を持たない成分もみられ、β-カラギーナンと呼ばれている。³³⁻³⁵⁾なお、Fig. 5のサクランの例において、SHG強度のスポットが数個しか観測されないのは、サクランカチオンはある程度以上のプラス電荷がないと、SHGスポットを発生させないためと考えられる。

水溶液中でサクラン分子の濃度が上がって棒状の多重螺旋構造をとるメカニズムは、動的誘電率の測

定結果より議論されている。⁸⁾ すなわち、水溶液中の濃度が上がるとアミノ糖残基間距離が縮まりそれらがアニオン性基と相互作用し最終的に螺旋を巻き、液晶性を示し配向するとされている。カチオン性部位の多いサクランがそのなかに混ざっていると、より強固な液晶相ができると思像される。このときサクランアニオンの液晶相がサクランカチオンの周りを取り巻いていると、マクロな対称性が破れ SHG 活性になる可能性がある。Figure 8 (e) で、SHG が観測され、Fig. 8 (h) では観測されなかったことは、サクランカチオンの周りのアニオンの集まり方に差があることを意味している。そして Fig. 6 では、カチオンからの距離すなわち電場の強さに応じて液晶層に複数の相が存在したと推測される。

3.3. サクランキャスト膜の端部の SHG 像の観察⁶⁾ パーティクルフィルターを通しカチオンを除いたと思われる水溶液から作ったサクランキャスト膜は、電界がかからないと全く SHG を出さないのかというところではない。われわれは電界をかけない状態でフィルムの端部から SHG 光が発生することを確認した。

Figure 9 (c) は $0.45 \mu\text{m}$ のパーティクルフィルターを通した $0.5 \text{ wt}\%$ サクラン水溶液をシリコンウェハー基板上に滴下し、自然乾燥してつくったキャスト膜の SHG 像である。観察位置は Figs. 9 (a), (b) に示すように、フィルムの端より $50 \mu\text{m}$ 程度の距離である。Figure 9 (c) で SHG が観測される範囲を Fig. 9 (b) に黄色い曲線で示した。SHG 光の発生している領域は、線形像では大きな特徴がない。Figure 9 (c) は、Fig. 9 (d) の二光子励起発光 (2PEF) とは明らかに異なる分布を示しており、Fig. 9 (c) が SHG 像であることを示している。このような SHG 光はキャスト膜の端部全域から発生しており、またパーティクルフィルターを用いないフィルムの端部からも観測された。

この SHG はいわゆるコーヒーリング効果の影響で起きたものではないかと考えている。コーヒーの滴が机などに落ちて乾くと、滴の縁に沿ってコーヒーの粒子が濃く分布しているのを日常生活で見かける。これをよく“コーヒーリング効果”と呼ぶ。^{36,37)} このとき、落ちた滴の中のコーヒー粒子に対して、溶液からの表面張力と粘性による流体力学的で異方的な力が働くと考えられている。サクラン水溶

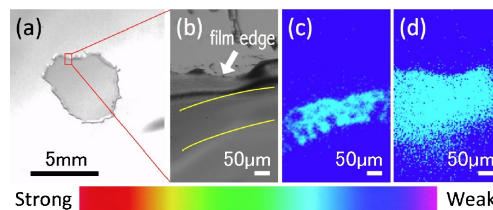


Fig. 9. Linear and Nonlinear Images of a Cast Film Made from Sacran Aqueous Solution Dropped onto a Silicon Substrate after Passing through a Membrane Filter of $0.45\text{-}\mu\text{m}$ Pore Size

(a) Photographic image, (b) microscopic image using a CMOS camera, (c) SHG image, and (d) 2PEF image. The small square frame in (a) is the observed area of the microscopic images in (b).⁶⁾ (Color figure can be accessed in the online version.)

液中のサクラン分子は濃度が上がってくると、丸まった状態から棒状に安定状態が変わり水溶液の性質が変わる。コーヒーリング効果で液滴のエッジがフィルムの内側に後退すると、その分子濃度が上がり、棒状のサクランが発生³⁸⁾し、さらにエッジの後退に伴う液体の流れにより分子が液滴の周辺方向に引っ張られて配向する。それ時点以降は、この流れがなくなって一斉に乾くので、中央の方の分子の方位はランダムに固定される。リングの中央のサクランの分子は分極を打ち消すように分布しているから SHG 不活性であると考えられる。

さて、Fig. 9 (c) をよく見ると、SHG の発生している領域の中でも強度はかならずしも連続ではなく、ところどころに SHG が観測されない斑点があることがわかる。斑点が明瞭でない場所においても、SHG の弱い小さな領域が観察される。これらの SHG の弱い斑点はこの試料について SHG が観測されるほぼ全域に分布している。この現象についての解釈は難しいが、1つの可能性として相分離構造が観測されているという可能性がある。³⁹⁾ 相分離構造とは典型的にはブロック共重合体について観測される現象で、ブロック共重合体 AB の A と B のバランスがよいときには、モルフォロジーはラメラ構造となるが、A と B のバランスが崩れると、マイクロドメインが球やシリンダーの形状になるものを言う。ブロック共重合体の典型的なマイクロドメインのサイズは数 nm から 100 nm 程度であるが、このサイズは分子のサイズによって大きくなると言われており、分子量が大きいサクランにおいて数十マイクロンのマイクロドメインが出現することは否定できない。⁴⁰⁾ サクランにおいても電子顕微鏡観察によりラ

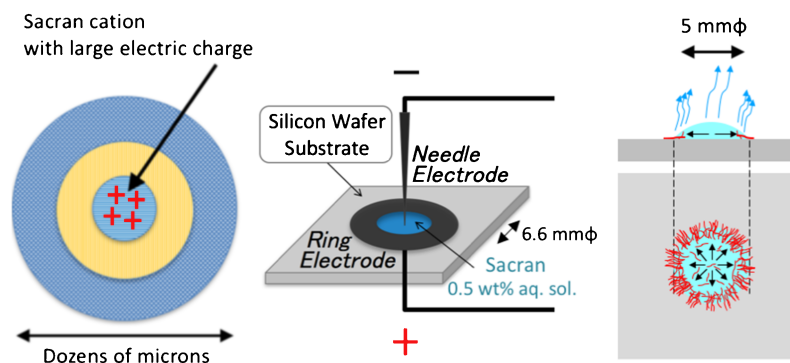


Fig. 10. Three Samples of Sacran Found to Emit SHG Light under Different Conditions in This Study
(Color figure can be accessed in the online version.)

メラ構造が観察されているため上記の相分離構造は形成されている。⁴¹⁾ サクラン分子の糖鎖の中で、ブロック共重合体のような配列を持つものがこの領域に偏析したのかもしれない。また、桶葭らはサクランの水溶液に空間的な制限を与えて、ミリメートルサイズの自己組織化膜構造の発生を報告している⁴²⁾ ため、サクラン分子同士の相互作用は大きく、比較的大きなサイズのパターンを作ることは不思議ではない。この場合に、Fig. 9(c)において、SHG 活性なサクラン分子と SHG 不活性なサクラン分子が分離して分布している可能性がある。

本稿で観測された刺激を受けたサクラン凝集体からの SHG について Fig. 10 を用いてまとめる。まず、精製され乾燥したサクランの中には正電荷を持つ部分があると推察され、その周りに平均として負電荷を持つサクランが多層構造の配向状態を持って集まっていると推測される。サクランは液晶状態をとる⁴¹⁾ ことが知られておりそれと類似の状態をとっていると思われる。また、同心円状の電極に入れて、電場をかけながら乾燥したサクラン膜は、中心電極が -6 V のときに中心に直径 $200\ \mu\text{m}$ 程度以内の位置で SHG が発生するような分極を持ったサクランが集まる。このサクランも針電極に向けて配向しており、カチオンのサクランが集まってアニオンのサクランとともに分極を持った領域を作ったものと思われる。また、サクラン溶液を滴下して乾燥した膜では、端部において、コーヒーリング効果で分子鎖がひっぱられて分極を持って配向したことにより SHG が観測されていると推測している。しかし、どのような構造を介してサクラン分子が分極を持つのかは依然として謎であり、更なる研究が必要

である。

4. まとめ

サクラン繊維とフィルムからの初めての SHG の観察結果について解説した。SHG の増強はサクラン分子の配向に関連すると思われる。逆に SHG が発生しない多くの他の部分では、サクラン分子は反転対称性を持つように配列している。SHG 活性なサクラン分子の配向は自発的には起こらず、特別な分子か電界の効果かコーヒーリング効果によって起こる。今後は、今回発見されたサクラン分子のふるまいが、サクラン特有の性質が発現するときどのように変化するかを探求していきたい。また、サクラン膜の著しい吸湿性や、重金属イオンのとりこみなどの際の SHG 像の変化などを追跡していきたい。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Okajima M., Ono M., Kabata K., Kaneko T., *Pure Appl. Chem.*, **79**, 2039–2046 (2007).
- 2) Ngatu N. R., Okajima M. K., Nangana L. S., Vumi-Kiaku S., Kaneko T., Kanbara S., Wumba R. D.-M., Wembonyama-Okitotsho S., *Ann. Phytomedicine*, **4**, 49–51 (2015).
- 3) Ngatu N. R., Hirota R., Okajima M. K., Kaneko T., Malonga K. F., Sukanuma N., *Ann. Phytomedicine*, **4**, 111–113 (2015).
- 4) Ngatu N. R., Okajima M. K., Yokogawa M., Hirota R., Eitoku M., Muzembo B. A., Dumavibhat N., Takaishi M., Sano S., Kaneko T., Tanaka T., Nakamura H., Sukanuma N., *Ann. Allergy Asthma Im-*

- munol.*, **108**, 117–122 (2012).
- 5) Wathoni N., Motoyama K., Higashi T., Okajima M., Kaneko T., Arima H., *Int. J. Biol. Macromol.*, **89**, 465–470 (2016).
 - 6) Zhao Y., Hien K. T. T., Mizutani G., Rutt H. N., Amornwachirabodee K., Okajima M., Kaneko T., *J. Opt. Soc. Am. A*, **34**, 146–152 (2017).
 - 7) Zhao Y., Li Y., Hien K. T. T., Mizutani G., Ito N., Rutt H. N., Okajima M., Kaneko T., *J. Phys. Soc. Jpn.*, **86**, 124401 (2017).
 - 8) Okajima M. K., Kaneko D., Mitsumata T., Kaneko T., Watanabe J., *Macromolecules*, **42**, 3057–3062 (2009).
 - 9) Okajima M. K., Nguyen Q. T., Nakamura M., Ogawa T., Kurata H., Kaneko T., *J. Appl. Polym. Sci.*, **128**, 676–683 (2013).
 - 10) Okajima M. K., Nakamura M., Mitsumata T., Kaneko T., *Biomacromolecules*, **11**, 1773–1778 (2010).
 - 11) Okajima M. K., Miyazato S., Kaneko T., *Langmuir*, **25**, 8526–8531 (2009).
 - 12) Okajima M. K., Nakamura M., Ogawa T., Kurata H., Mitsumata T., Kaneko T., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **51**, 8704–8707 (2012).
 - 13) Okajima M. K., Higashi T., Asakawa R., Mitsumata T., Kaneko D., Kaneko T., Ogawa T., Kurata H., Isoda S., *Biomacromolecules*, **11**, 3172–3177 (2010).
 - 14) Freund I., Deutsch M., *Opt. Lett.*, **11**, 94–96 (1986).
 - 15) Hattori T., “Hisenkeikougakunyumon,” Shokabo Co., Ltd., Tokyo, 2009.
 - 16) Mizutani G., “Microbeam Analysis Handbook, Hikari Daini Kouchouha (SHG) Kenbikyuu,” ed. by The 141st Committee on Microbeam Analysis, Japan Society for the Promotion of Science, Ohmsha, Tokyo, 2014, pp. 296–298.
 - 17) Bloembergen N., “Nonlinear Optics,” Addison-Wesley, New York, 1992.
 - 18) Tanaka H., Kurokawa H., Kobayashi E., Sano H., Mizutani G., Ushioda S., *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, **33**, 129–132 (1996).
 - 19) Sonoda Y., Mizutani G., Sano H., Ushioda S., Sekiya T., Kurita S., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **39**, L253–L255 (2000).
 - 20) Sano H., Shimizu T., Mizutani G., Ushioda S., *J. Appl. Phys.*, **87**, 1614–1619 (2000).
 - 21) Mizutani G., Sonoda Y., Sano H., Sakamoto M., Takahashi T., Ushioda S., *J. Lumin.*, **87–89**, 824–826 (2000).
 - 22) Sano H., Kume M., Nakagawa H., Mizutani G., *J. Appl. Phys.*, **91**, 4229–4232 (2002).
 - 23) Miyauchi Y., Sano H., Mizutani G., *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, **4**, 105–109 (2006).
 - 24) Zhao Y., Hien K. T. T., Mizutani G., Rutt H. N., *Appl. Phys. B*, **123**, 188 (2017).
 - 25) Ambekar R., Toussaint K. C. Jr., Wagoner Johnson A., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **4**, 223–236 (2011).
 - 26) Kissick D. J., Wanapun D., Simpson G. J., *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **4**, 419–437 (2011).
 - 27) Moreaux L., Sandre O., Blanchard-Desce M., Mertz J., *Opt. Lett.*, **25**, 320–322 (2000).
 - 28) Yoshiki K., Hashimoto M., Araki T., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44**, L1066–L1068 (2005).
 - 29) Gannaway J. N., Sheppard C. J. R., *Opt. Quantum Electron.*, **10**, 435–439 (1978).
 - 30) Theodossiou T. A., Thrasivoulou C., Ekwobi C., Becker D. L., *Biophys. J.*, **91**, 4665–4677 (2006).
 - 31) Sacconi L., Froner E., Antolini R., Taghizadeh M. R., Choudhury A., Pavone F. S., *Opt. Lett.*, **28**, 1918–1920 (2003).
 - 32) Dombeck D. A., Kasischke K. A., Vishwasrao H. D., Ingelsson M., Hyman B. T., Webb W. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7081–7086 (2003).
 - 33) Usov A. I., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **65**, 115–217 (2011).
 - 34) McLachlan J., “Biosalinity in Action: Bioproduction with Saline Water, Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization,” ed. by Pasternak D., San Pietro A., Springer, Boston, 1985, pp. 137–157.
 - 35) Greer C. W., Yaphe W., *Bot. Mar.*, **27**, 473–478 (1984).
 - 36) Deegan R. D., Bakajin O., Dupont T. F., Huber G., Nagel S. R., Witten T. A., *Nature*, **389**, 827–829 (1997).
 - 37) Yunker P. J., Still T., Lohr M. A., Yodh A. G., *Nature*, **476**, 308–311 (2011).
 - 38) Mitsumata T., Miura T., Takahashi N., Kawai M., Okajima M. K., Kaneko T., *Phys. Rev. E*, **87**, 042607 (2013).
 - 39) Matsushita Y., Takano A., *Koubunshi*, **53**,

- 719–721 (2004).
- 40) Nam Y.-S., Park T.-G., *J. Biomed. Mat. Res.*, **47**, 8–17 (1999).
- 41) Okeyoshi K., Joshi G., Rawat S., Sornkamnerd S., Amornwachirabodee K., Okajima M. K., Ito M., Kobayashi S., Higashimine K., Oshima Y., Kaneko T., *Langmuir*, **33**, 4954–4959 (2017).
- 42) Okeyoshi K., Okajima M. K., Kaneko T., *Sci. Rep.*, **7**, 5615 (2017).