

中赤外キャビティリングダウン分光に基づく

生体試料中放射性炭素同位体分析法の開発

Development of radiocarbon analysis for biomedical applications

based on mid infrared cavity ring-down spectroscopy

2019 年

名古屋大学大学院 工学研究科

寺林 稜平

要旨

炭素の同位体の一つである ^{14}C は、半減期 5730 年の β 崩壊核種であり、考古学や地質学における放射性炭素年代測定その他、環境学・医学・農学など幅広い領域において利用されている。特に、安定同位体 (^{12}C 、 ^{13}C) と比較して、その存在比が小さい ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 10^{-12}$) ことを利用した ^{14}C トレーサーは、環境・生体中の様々な動態を高感度に評価できる有用なツールである。トレーサー応用に伴う ^{14}C 分析には、天然同位体比と同程度の試料を評価できるアバンダンス感度が必要とされ、従来は加速器質量分析法 (Accelerator Mass Spectrometry: AMS) が用いられてきた。AMS は天然存在比を大きく下回る試料に対しても、十分なアバンダンス感度を有するものの、分析スループットや分析コスト、アクセシビリティといった点でトレーサー応用には不向きである。一方で、 ^{14}C からの β 線を計数する液体シンチレーションカウンティング法 (Liquid Scintillation Counting: LSC) は、比較的高いスループットを有し、小型であるため、広く普及しているものの、 ^{14}C が長半減期核種であることから、感度が限られ、試料中に十分な放射エネルギーの ^{14}C が必要であるため、適用範囲が限定されている。このような背景から、 ^{14}C トレーサー応用における広範な分析ニーズを充足するために、より迅速・簡便で高感度な ^{14}C 分析法が求められている。

本研究では、AMS や LSC に代わる新たな ^{14}C 分析手法として、高感度レーザー吸収分光であるキャビティリングダウン分光法 (Cavity Ring-Down Spectroscopy: CRDS) と ^{14}C を含む二酸化炭素の中赤外域基本音吸収を組み合わせた手法の開発を行い、分析システムを構築し、高感度化を目的としてバックグラウンド抑制法・レーザー発振周波数安定化法を開発した。これらにより、より簡便なシステムで生体・環境中トレーサー応用に求められる性能を実現し、複数領域のトレーサー応用実証を行うことで、その有用性を明らかとした。

本論文は全 6 章から構成され、以下に各章ごとの要約を示す。

第 1 章 序論

本章では、主に本研究の背景について述べる。 ^{14}C の利用とその分析ニーズ、既存の ^{14}C 分析手法として、放射線計測・質量分析・レーザー分光に基づく各手法について概説し、特に CRDS について、定量分析の原理と様々な応用例を説明する。最後に、本研究の目的として、CRDS に基づく ^{14}C 分析法の開発と ^{14}C トレーサー分析への適用を挙げ、本論文の構成を述べる。

第 2 章 中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析システムの開発

本章では、中赤外半導体レーザーを用いた CRDS に基づく ^{14}C 分析法

(^{14}C -CRDS) について説明し、その分析システムの開発について述べる。

^{14}C トレーサー応用において想定される分析試料から、アバンダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 1.4 \times 10^{-11}$ ・検出限界 0.017 Bq/sample (= 1 dpm/sample) 以下・測定精度数%・前処理が必要ないこと・測定時間 15 分以内/1 測定を ^{14}C -CRDS 分析システムの性能目標とした。Fig. 1(a)に ^{14}C -CRDS

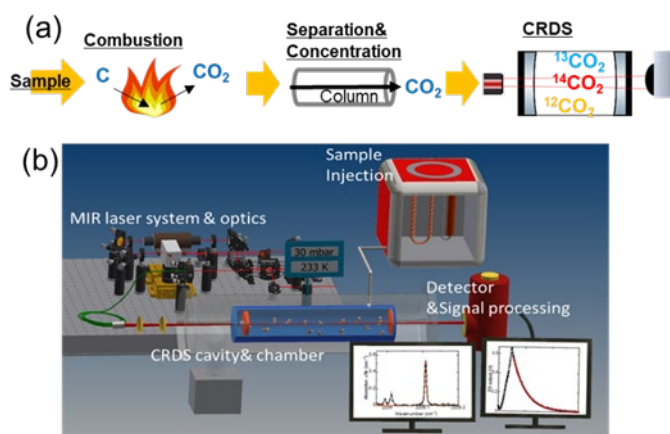


Fig. 1 ^{14}C -CRDS 分析の概要

(a) 分析手順 (b) 分析システム

による ^{14}C 分析法の手順、および Fig. 1(b)に構築された ^{14}C -CRDS 分析システムの概要を示す。分析システムは、試料導入部の他、中赤外半導体レーザー光源・光学系、高反射率光共振器とガスセル、検出器・信号処理系から構成される。分析試料は試料導入部の燃焼管にて燃焼酸化（炭酸ガス化）される。試料由来 CO_2 ガスと夾雑ガスは、加熱吸脱着カラムに一旦吸着された後、分離されて放出される。 CO_2 ガスは CRDS 分析セルに到達したタイミングで閉じ込められ、分析セル中の光共振器に入射された中赤外レーザーにより CRDS 測定がなされる。得られた $^{14}\text{CO}_2$ 吸収スペクトルから ^{14}C が定量される。

分析セルに封じ切られた CO_2 に対し、CRDS 測定により $^{14}\text{CO}_2$ 吸収スペクトルを取得・評価するために、FPGA を用いたレーザー電流、および光スイッチの制御系を開発した。さらに、高分解能ディジタルイザにより取得した光検出器からの減衰信号に対して、オンラインで指数関数フィッティングを行い、減衰率を評価するシステムを開発した。これにより、CRDS 測定中の減衰率・吸収スペクトルのモニタリングが可能となった。開発した信号処理システムを用いて、カラムより放出された試料由来 CO_2 ガスが分析セルに到達する時間分布を評価した結果、カラム温度が上昇し始めてから CO_2 ガスが分析セルに到達するまでの時間はほぼ一定であったことから、カラム温度の上昇をトリガーとして複数の電磁バルブを制御する体系を開発した。また、CRDS 分析セル内の CO_2 分圧を高める導入手法を開発し、その有用性を示した。同様に、カラムの後段に液体窒素冷却に基づく CO_2 トラップを導入し、その CO_2 分圧向上効果を確認した。

第3章 中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析法の高感度化に関する研究

第2章にて構築された ^{14}C -CRDS 分析システムの分析感度は、生体試料分析に

適用するには不十分であり、感度向上を図る必要があった。そこで本章では、 ^{14}C -CRDS 分析法の高感度化に関する研究として、CRDS 分析において分析感度・分析精度がどのような要因で制限されるかについて説明し、バックグラウンド抑制法・中赤外半導体レーザーの発振周波数安定化法を開発した。

^{14}C -CRDS 分析法について、取得される吸収スペクトルのバックグラウンド変動は分析感度を決定づける大きな要因であるが、特にバックグラウンドがレーザー周波数に対し周期的に変動するエタロン効果の影響が大きいと見積もられた。エタロン効果は、光共振器を構成する 2 つの高反射面外に存在する、何らかの反射面による疑似共振が要因で引き起こされる。その影響を低減する手法として、差し引き法・ブリュースタースポイラーによる抑制法・共振器温度変調による抑制法を検討し、 ^{14}C -CRDS 分析システムにてその効果を評価した。バックグラウンド変動の抑制結果として、ブリュースタースポイラーの有無によるバックグラウンドスペクトル (Fig. 2(a)) とそのフーリエ変換結果 (Fig. 2(b)) を示す。ブリュースタースポイラーにより周期約 600 MHz (= 疑似共振長で 25 cm) の振動が抑制されたことが示された。これは、ブリュースタースポイラーによって疑似共振長が変調され、時間平均により周期的振動が平滑化された結果である。ブリュースタースポイラーと温度変調を組み合わせることで、エタロン効果を 100 s^{-1} まで低減させることができ、アバンダンス感度にして $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$ 相当であることが明らかとなった。

天然同位体比以下のアバンダンス感度を達成するためには、エタロン効果を完全に抑制することに加えて、 ^{14}C -CRDS 分析システムで使用される DFB-QCL の発振周波数を光共振器の共鳴条件に対して十分なレベルまで安定化・狭帯域化する必要がある。 ^{14}C -CRDS 分析において使用される光共振器の共鳴条件線幅は約 20 kHz と非常に狭く、光共振器とレーザー光源との高安定・高効率なカッ

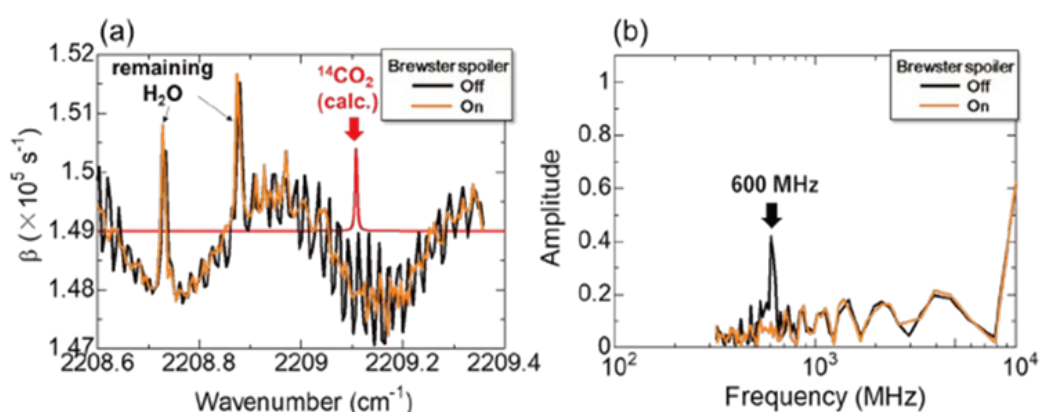


Fig. 2 ブリュースタースポイラー有無によるバックグラウンドの比較
(a) バックグラウンドスペクトル (b) フーリエ変換

プリングは分析感度・精度向上に大きく寄与する。そこで中赤外レーザーの出力光の一部をレーザーに入射させる手法（Passive feedback 法）を適用し、中赤外半導体レーザーの発振線幅を約 350 kHz まで狭帯域化することができた。さらに、中長期的な安定性向上を目的として、中赤外光周波数コムを用いた手法を開発し、周波数不安定性が 1 MHz 以下（5 分間）まで抑えられることを示した。また、制御のセットポイント周波数を変調することで中赤外半導体レーザーの発振周波数を安定化しつつ、掃引する手法を開発し、 ^{14}C -CRDS 分析システムにより、炭素同位体 (^{12}C ・ ^{13}C ・ ^{14}C) を含む二酸化炭素の吸収スペクトルを測定した。繰り返し測定による誤差が安定炭素同位体比で 1 桁、 ^{14}C で 2 分の 1 程度減少し、目標であった 1% 以下の測定精度を達成した。

第 4 章 生体試料中 ^{14}C 分析性能の評価

本章では、 ^{14}C -CRDS 分析システムを用いて ^{14}C 標準試料を分析し、 ^{14}C 同位体比を測定することで定量性とアバダンス感度を評価した。

^{14}C 定量性を評価するために、 ^{14}C 濃度の異なる複数の ^{14}C 標識グルコース溶液を用意し、それぞれについて ^{14}C -CRDS 分析システムにて ^{14}C 同位体比を測定した。結果より、取得された同位体比に試料中 ^{14}C 量に対する良好な線形性を確認した。また、測定されたスペクトルの信号対雑音比より、現状のアバダンス感度は $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$ と評価され、検出限界は 1.7×10^{-3} Bq/sample (= 0.1 dpm/sample) と評価された (Fig. 3)。

医薬品開発におけるヒトトレーサー応用への適用検討として、ヒト生体試料（尿・血漿）に ^{14}C 標識グルコースを微量添加したヒト生体模擬試料を測定する基礎実験を行った。取得された吸収スペクトルに明瞭な $^{14}\text{CO}_2$ のピークを確認でき、ヒト生体試料中の ^{14}C を測定可能であることを示した。

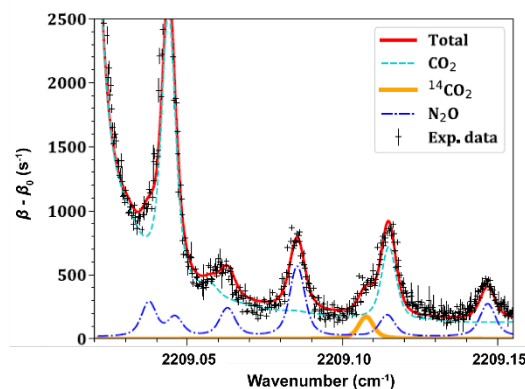


Fig. 3 $^{14}\text{CO}_2$ 吸収スペクトル ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 4.5 \times 10^{-11}$)

第 5 章 ^{14}C トレーサー分析への応用実証

本章では、複数領域への応用実証により、本システムの有用性を示すことを目的として、医薬品開発分野・植物生理学における ^{14}C トレーサー応用に適用する実証実験を行った。

^{14}C -CRDS 分析システムを医薬品開発分野における薬物動態評価に適用し、 ^{14}C

標識医薬品成分化合物の動物中排泄評価実験を行った。 ^{14}C 標識トルブタミド（経口糖尿病用剤）を経口投与させたラットの、各個体からの排泄物（尿・糞）を、投与開始直後から一定時間（24 時間）間隔で採取した。既存の分析手法である LSC との性能比較を行うために、投与放射エネルギーに応じて 2 群用意し、投与放射エネルギーの多い（92.5 kBq/body）群の試料については LSC で、少ない（0.925 kBq/body）群の試料については ^{14}C -CRDS 分析システムにてそれぞれ ^{14}C 量を測定した（Fig. 4）。両手法による結果を比較すると、累積排泄率の時間変化が一致しており、 ^{14}C -CRDS 分析システムでは LSC より 100 倍少ない投与放射エネルギーで薬物の排泄を評価可能であることが示された。これにより、投与放射エネルギーに制限（最大 18.3 kBq/body）のあるヒトに対する薬物動態試験に適用可能であることが示唆された。

植物生理学において、乾燥ストレスなど異なる条件下で栽培した作物にはその生育具合に大きな差異が見られ、光合成産物の動態が異なることが示唆されている。本章では、イネ中炭素動態評価の実証実験を通して、植物生理学における ^{14}C トレーサー分析への ^{14}C -CRDS 分析システムの適用検討を行った。

まず、炭酸水素ナトリウムと酸の化学反応を利用した植物試料用 $^{14}\text{CO}_2$ ラベリングシステムと、植物試料のような固体試料を燃焼可能な試料導入部を構築した。次に、乾燥ストレス有/無の条件下で生育したイネ試料（それぞれ 20 個体ずつ）に対し、ラベリングシステムより発生させた $^{14}\text{CO}_2$ を光合成により吸収させ（約 5.5 MBq、60 分間）、各イネ試料を根系と茎葉部に分け、 ^{14}C -CRDS 分析システムにより測定した。取得されたスペクトルの一例を Fig. 5 に示す。根と葉の同位体比の差を経過時間ごとに比較すると、葉によって生成された ^{14}C を含む光合成産物が、時間の経過とともに根に移動していることが示された。また、乾燥ストレスの有無では、その動態に差異があることが明らかになった。これに

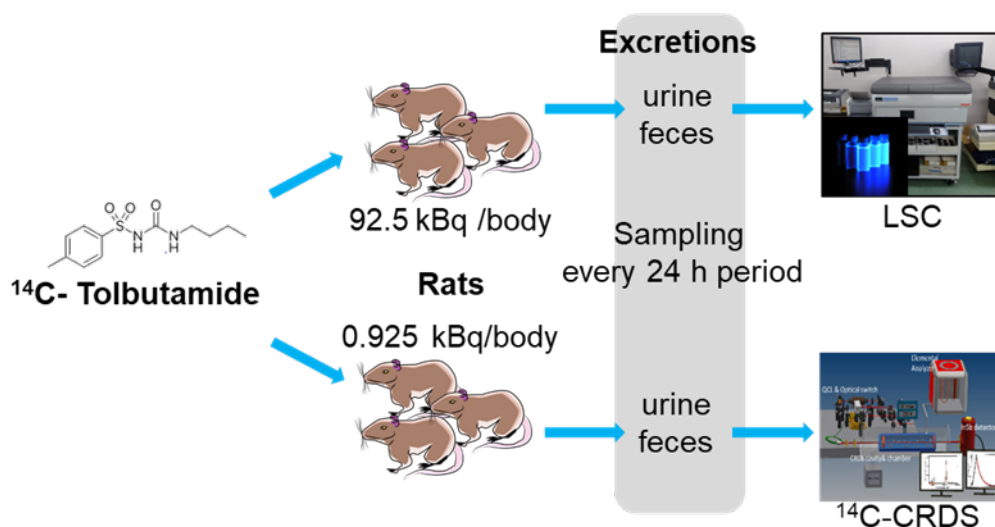


Fig. 4 ラット中トルブタミドの排泄率評価実験概要

より、本手法によるイネ中炭素動態評価が実証された。第 4 章にて評価された分析システムの分析感度から、投与放射能量、または試料量がさらに数桁少なくても同様の結果が得られると予想され、各部位毎の ^{14}C 濃度測定や呼気中 ^{14}C 濃度のモニタリングなどへの本システムの適用が期待される。

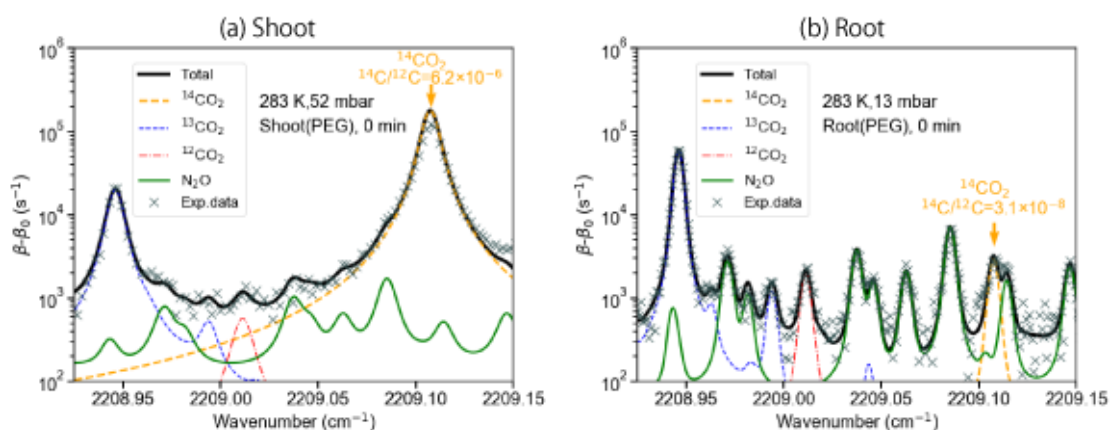


Fig. 5 取得された吸収スペクトル (イネ同一個体、乾燥ストレスあり)

(a) 茎葉部 (b) 根系

第 6 章 結論と今後の展望

本章では、本研究の結論と今後の展望について述べる。中赤外 CRDS による ^{14}C 分析法、分析システム (^{14}C -CRDS 分析システム)、およびその高感度化に関する開発を行った。また、 ^{14}C 標準試料や生体模擬試料を用いた基礎実験により、本システムが、アバンダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$ 、検出限界 1.7×10^{-3} Bq/sample (= 0.1 dpm/sample)、測定精度 1%以下の性能を有し、前処理なく生体試料の測定が可能で、上記性能を 15 分以内の測定で実現できることを示し、トレーサー応用に求められる ^{14}C 分析性能を備えていることを明らかにした。最後に、薬物動態学や植物生理学における ^{14}C トレーサー分析に本手法を適用し、その有用性を実証した。

今後の展望として、レーザー周波数安定化・狭帯域化、バックグラウンド抑制により、天然同位体比、またはそれ以下のアバンダンス感度が実現でき、医薬品開発領域におけるヒトトレーサー応用や植物生理学における作物中炭素動態の評価をはじめとして、高い感度とスループットが同時に求められる種々の ^{14}C 分析応用への本分析法の適用が望まれる。また、本分析法と ^{14}C トレーサーを組み合わせ、呼気中 ^{14}C 濃度の直接分析や、代謝物中 ^{14}C 分析など、生体・環境中の様々な動態を高感度に評価する手法が開発され、これまでにない新たな知見の創出が期待される。

目次

第1章	序論	1
1.1	放射性炭素 ^{14}C の利用と分析ニーズ	1
1.1.1	生体トレーサー応用	1
1.1.2	環境トレーサー応用	13
1.1.3	原子炉廃止措置に伴う定量	16
1.1.4	放射性炭素年代測定	16
1.2	放射性炭素同位体分析法	18
1.2.1	放射線計測に基づく手法	18
1.2.2	質量分析に基づく手法	19
1.2.3	レーザー分光に基づく手法	22
1.3	キャビティリングダウン分光法とその応用	27
1.3.1	原理	27
1.3.2	CRDS による微量ガス分析	33
1.3.3	CRDS を用いた安定・放射性炭素同位体分析	39
1.4	本研究の目的と本論文の構成	50
	参考文献	52
第2章	中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析システムの開発	59
2.1	^{14}C トレーサー分析における測定試料と要求性能	59
2.2	分析システムの概要	68
2.3	中赤外レーザー光源と光学系・光スイッチング	72
2.4	光共振器とその温度制御・冷却	84
2.5	検出器・信号処理系	91
2.6	試料導入系の開発	101
2.6.1	試料導入系および試料燃焼系	101
2.6.2	電磁バルブによる自動制御系	103
2.6.3	液体窒素による二酸化炭素トラップ	110
2.7	まとめ	114
	参考文献	115
第3章	中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析法の高感度化に関する研究	117
3.1	分析感度を制限する要因	117
3.2	バックグラウンドノイズ低減法の開発	126
3.2.1	差し引き法によるエタロン効果影響の低減	126

	3.2.2	ブリュースタースポイラーによるエタロン効果の抑制.....	128
	3.2.3	光共振器温度変調によるエタロン効果の抑制.....	131
	3.2.4	バックグラウンドノイズ低減による分析性能の評価.....	133
3.3		中赤外レーザー発振周波数安定化法の開発.....	135
	3.3.1	Passive feedback による周波数安定化.....	135
	3.3.2	光周波数コムを用いたレーザー発振周波数の較正と安定化...145	
	3.3.3	レーザー発振周波数安定化を用いた分析性能の評価.....	159
3.4		まとめと今後の展望.....	162
		参考文献.....	164
第 4 章		生体試料中 ^{14}C 分析性能の評価.....	167
	4.1	実験体系.....	167
	4.2	分析性能の評価.....	169
	4.2.1	基本動作の確認.....	169
	4.2.2	スペクトルと干渉分子種の影響.....	170
	4.2.3	定量性.....	173
	4.2.4	アバンダンス感度.....	178
	4.3	模擬生体試料中の ^{14}C 分析.....	179
	4.4	まとめ.....	182
		参考文献.....	183
第 5 章		^{14}C トレーサー分析への応用実証.....	185
	5.1	動物中薬物動態評価への応用.....	185
	5.1.1	ラットを用いた薬物動態評価の概要.....	185
	5.1.2	^{14}C 分析結果と薬物動態評価の実証.....	187
	5.2	植物中 ^{14}C トレーサー分析への応用.....	192
	5.2.1	植物生理学における炭素動態評価の概要.....	192
	5.2.2	^{13}C 標識試料を用いた基礎実験.....	194
	5.2.3	植物試料用 $^{14}\text{CO}_2$ ラベリングシステムの構築.....	203
	5.2.4	^{14}C トレーサー分析によるイネの炭素動態評価の実証.....	206
	5.3	まとめと今後の展望.....	212
		参考文献.....	213
第 6 章		結論と今後の展望.....	215
	6.1	結論.....	215
	6.2	今後の展望.....	218

謝辞.....	219
本論文を構成している発表論文.....	221

List of Figures

第1章

Fig. 1-1	臨床試験の全体とプロセス別成功率.....	6
Fig. 1-2	臨床試験被験者数.....	7
Fig. 1-3	医薬品開発プロセスとヒトホット試験.....	7
Fig. 1-4	MD 試験による候補化合物スクリーニング.....	8
Fig. 1-5	一人あたりの自然界から受ける年間被ばく線量.....	8
Fig. 1-6	^{14}C -AAP 投与後の放射能収率.....	9
Fig. 1-7	植物用低エネルギー β 線イメージングシステム.....	11
Fig. 1-8	取得されたイネの時間毎のイメージング画像.....	12
Fig. 1-9	根の浸出液中の ^{14}C 量と時間変化.....	13
Fig. 1-10	大気圏内核実験に伴う大気中 ^{14}C 同位体比の変化.....	15
Fig. 1-11	放射性炭素比率の経時変化.....	15
Fig. 1-12	放射性炭素年代較正曲線 (IntCal13).....	17
Fig. 1-13	典型的な液体シンチレーションカウンター.....	19
Fig. 1-14	General Ionex 社製タンデトロン加速器質量分析計.....	21
Fig. 1-15	CAMS の概要図.....	21
Fig. 1-16	小型 AMS 放射性炭素年代測定システム MICADAS.....	22
Fig. 1-17	分子の振動回転準位.....	25
Fig. 1-18	二酸化炭素の基準振動モード.....	26
Fig. 1-19	ICOGS 測定体系.....	26
Fig. 1-20	CRDS 概要.....	31
Fig. 1-21	Voigt 関数.....	31
Fig. 1-22	二酸化炭素の中赤外域吸収線 ν_3 band (標準温度・標準圧力) ...	32
Fig. 1-23	種々の大気分子種の赤外吸収スペクトル.....	35
Fig. 1-24	ガス中微量水分計の概要.....	36
Fig. 1-25	乾燥 N_2 ガス中微量水分の検出.....	36
Fig. 1-26	FS-CRDS 概要.....	37
Fig. 1-27	Off-axis 型と On-axis 型 CRDS.....	37
Fig. 1-28	Fiber CRDS 概要.....	38
Fig. 1-29	CE-DFCS による呼気分析概要.....	38

Fig. 1-30	尿素呼気試験法.....	43
Fig. 1-31	呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 測定体系.....	44
Fig. 1-32	リングダウン信号と飽和の影響.....	44
Fig. 1-33	QCL を使用した SCAR 測定体系.....	45
Fig. 1-34	ヘルシンキ大 Genoud により測定された $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ スペクトル.....	45
Fig. 1-35	測定により評価された ^{14}C 比.....	46
Fig. 1-36	LLNL による CRDS に基づく ^{14}C 分析装置.....	46
Fig. 1-37	McCartt により取得された吸収スペクトル.....	47
Fig. 1-38	AMS との比較結果.....	47
Fig. 1-39	生体試料中 ^{14}C 濃度の時間変化.....	48
Fig. 1-40	Fleisher により測定された吸収スペクトル.....	49

第 2 章

Fig. 2-1	液体シンチレーションカクテルの着色 (植物葉試料)	60
Fig. 2-2	^{14}C 手法と分析ニーズの比較.....	61
Fig. 2-3	^{14}C -CRDS による ^{14}C 分析手順.....	68
Fig. 2-4	^{14}C -CRDS 分析システムの概要.....	69
Fig. 2-5	基礎実験用近赤外 CRDS システムの概要.....	70
Fig. 2-6	近赤外 CRDS 分析セルの外観.....	70
Fig. 2-7	^{14}C -CRDS 分析システムの概要.....	71
Fig. 2-8	QCL の典型的なバンド構造.....	74
Fig. 2-9	LE0833QCL 外観 (浜松ホトニクス).....	74
Fig. 2-10	典型的な QCL セットアップ.....	76
Fig. 2-11	AOM 概要.....	77
Fig. 2-12	周波数較正用低フィネス FPI(a)と Si エタロン(b).....	80
Fig. 2-13	周波数較正の体系.....	80
Fig. 2-14	CRDS 信号で記録された 1 つの生信号.....	81
Fig. 2-15	エタロンの透過光信号(a)と N_2O 吸収スペクトル(b).....	82
Fig. 2-16	N_2O の吸収スペクトルフィッティング.....	82
Fig. 2-17	CRDS スペクトル (横軸を波数に較正)	83
Fig. 2-18	^{14}C -CRDS 用光共振器.....	84
Fig. 2-19	^{14}C -CRDS 光共振器固有モード (レーザー波長 4526 nm)	86

Fig. 2-20	QCL のファイバ後のビームプロファイル.....	86
Fig. 2-21	モードマッチング計算結果と体系.....	87
Fig. 2-22	光共振からの透過信号.....	87
Fig. 2-23	各温度での吸収スペクトル.....	89
Fig. 2-24	外側チャンバー外観.....	89
Fig. 2-25	ガスセル冷却 (-40 °C) と経過時間.....	90
Fig. 2-26	様々な赤外検出器と検出能力の比較.....	91
Fig. 2-27	InSb 検出器外観.....	92
Fig. 2-28	リングダウン信号と光スイッチング.....	94
Fig. 2-29	RD 信号取得・周波数スキャンシステム (初期)	95
Fig. 2-30	RD 信号取得・周波数スキャンシステム (高速集録)	95
Fig. 2-31	データ取得・オンライン減衰率評価システム概観.....	98
Fig. 2-32	サンプリング速度の比較.....	99
Fig. 2-33	試料導入部概要.....	102
Fig. 2-34	Flow through 測定と Stopped flow 測定.....	102
Fig. 2-35	Flow through 測定による $^{14}\text{CO}_2$ タイムトレンド.....	104
Fig. 2-36	QCL 波長固定 Flow through 測定による $^{13}\text{CO}_2$ タイムトレンド とカラム温度.....	104
Fig. 2-37	導入炭素量に対するエリア値.....	105
Fig. 2-38	Stopped flow 測定バルブ開閉タイミング概要 (手法 A)	107
Fig. 2-39	バルブ開閉タイミング最適化.....	108
Fig. 2-40	$^{14}\text{CO}_2$ スペクトルへの圧力拡がりの影響.....	108
Fig. 2-41	Stopped flow 測定バルブ開閉タイミング概要 (手法 B)	109
Fig. 2-42	手法 A・手法 B のスペクトル比較.....	109
Fig. 2-43	液体窒素による CO_2 トラップ外観.....	111
Fig. 2-44	測定された吸収スペクトル (CO_2 トラップ有り)	112

第 3 章

Fig. 3-1	吸収スペクトル計算結果.....	119
Fig. 3-2	同位体比と吸収強度.....	119
Fig. 3-3	反射率毎の FPI 透過特性.....	122
Fig. 3-4	典型的なアランプロット.....	124
Fig. 3-5	エタロン効果の原理図.....	125

Fig. 3-6	観測されたエタロン効果.....	125
Fig. 3-7	エタロン効果差し引き法によるバックグラウンド抑制結果.....	127
Fig. 3-8	ブリュースタースポイラーの概要.....	129
Fig. 3-9	ブリュースタースポイラー基礎実験体系.....	130
Fig. 3-10	ブリュースタースポイラーの有無による バックグラウンドの比較 (10 スキャン平均)	130
Fig. 3-11	バックグラウンドの周波数特性.....	131
Fig. 3-12	変調された分析セル温度.....	132
Fig. 3-13	取得されたバックグラウンドスペクトル (温度変調)	132
Fig. 3-14	温度変調時に取得された CO ₂ 吸収スペクトル.....	134
Fig. 3-15	エタロン効果変調によるアラン分散の改善.....	134
Fig. 3-16	Passive feedback 実験体系.....	137
Fig. 3-17	Passive feedback による QCL 電流パワー特性の変化.....	139
Fig. 3-18	Passive feedback による FPI 透過信号の変化.....	140
Fig. 3-19	CRDS 共振器共鳴ピークの比較.....	140
Fig. 3-20	パワースペクトル密度の比較.....	141
Fig. 3-21	Voltage divider の構成.....	143
Fig. 3-22	Voltage divider の動作.....	143
Fig. 3-23	Divider の有無と CRDS 共振器共鳴ピーク.....	144
Fig. 3-24	Divider の有無とパワースペクトル密度.....	144
Fig. 3-25	光周波数コムが発振スペクトル.....	146
Fig. 3-26	ファイバーレーザーベース光周波数コム概要.....	147
Fig. 3-27	DFB-QCL 周波数掃引時のビート周波数変化.....	149
Fig. 3-28	中赤外光周波数コムによる DFB-QCL 安定化システム概要.....	149
Fig. 3-29	中赤外光周波数コムを用いた実験体系.....	151
Fig. 3-30	取得された RF スペクトル.....	153
Fig. 3-31	ビート周波数の時間変化.....	154
Fig. 3-32	QCL をステップ状に変調した際のビート周波数の変化.....	154
Fig. 3-33	セットポイント周波数を変調後のビート周波数.....	155
Fig. 3-34	取得された吸収スペクトル.....	155
Fig. 3-35	Passive feedback の有無により取得された RF スペクトル.....	157
Fig. 3-36	ビート信号線幅のヒストグラム.....	157
Fig. 3-37	Passive feedback の有無により取得された	

	ビート周波数の時間変化.....	158
Fig. 3-38	アランプロットによる性能評価.....	159
Fig. 3-39	周波数安定化システムにより取得された吸収スペクトル.....	161

第4章

	¹⁴ C-CRDS 分析システム外観	
Fig. 4-1	(積水メディカル株式会社設置)	167
Fig. 4-2	取得されたリングダウン信号.....	169
Fig. 4-3	冷却によるスペクトルの変化 (70 Torr)	171
Fig. 4-4	冷却による干渉線の低減.....	172
Fig. 4-5	異なる炭素量の試料のスペクトル結果.....	174
Fig. 4-6	安定炭素の検量線.....	175
Fig. 4-7	コンタミネーションの確認.....	175
Fig. 4-8	¹⁴ C含有量の異なる試料測定時の吸収スペクトル.....	177
Fig. 4-9	取得された検量線.....	177
Fig. 4-10	微量 ¹⁴ C 試料の吸収スペクトル.....	178
Fig. 4-11	測定された吸収スペクトル (ヒト血漿+50 dpm ¹⁴ C)	180
Fig. 4-12	測定された吸収スペクトル (ヒト尿+50 dpm ¹⁴ C)	181

第5章

Fig. 5-1	ラット中薬物排泄率評価実験の概要.....	186
Fig. 5-2	取得された吸収スペクトル (ラットの尿試料)	189
Fig. 5-3	取得された吸収スペクトル (ラットの糞試料)	190
Fig. 5-4	ラット中トルブタミドの排泄率評価結果 (日間・累積)	191
Fig. 5-5	植物試料測定用 ¹⁴ C-CRDS システム.....	195
Fig. 5-6	各試料の CO ₂ タイムトレンド.....	196
Fig. 5-7	トウモロコシ試料の外観.....	199
Fig. 5-8	取得された吸収スペクトル (No.5、 ¹³ C 非標識トウモロコシ茎葉部)	199
Fig. 5-9	取得された吸収スペクトル (¹³ C 標識・非標識)	200
Fig. 5-10	補正された吸収スペクトル (¹³ C 標識・非標識)	201
Fig. 5-11	IRMS との結果比較.....	202
Fig. 5-12	¹⁴ CO ₂ 光合成ラベリングシステム.....	204

Fig. 5-13	$^{14}\text{CO}_2$ 標識・非標識イネの茎葉部試料による吸収スペクトル...	205
Fig. 5-14	イネ試料の概要.....	208
Fig. 5-15	吸収スペクトル (^{14}C 標識イネ試料、PEG、直後)	209
Fig. 5-16	経過時間に対する ^{14}C 同位体比.....	210
Fig. 5-17	茎葉部に対する根系の ^{14}C 同位体比時間変化.....	210
Fig. 5-18	評価された放射エネルギーと経過時間.....	211
Fig. 5-19	分配率と経過時間.....	211

List of Tables

第1章

Table 1-1	医薬品開発に必要な費用と期間.....6
Table 1-2	種子の γ 線照射と芽 (shoot) と根 (root) の測定結果.....12
Table 1-3	^{14}C 生成元素とその核パラメータ、および相対貢献度.....16
Table 1-4	光共振器を用いた各分光法とその特徴.....35

第2章

Table 2-1	1g の ^{14}C に対する各単位.....65
Table 2-2	血漿・尿中の炭素量と ^{14}C 濃度.....66
Table 2-3	投与量から算出された尿試料中 ^{14}C 量.....66
Table 2-4	測定試料とアバンダンス感度・検出限界.....67
Table 2-5	トレーサー分析測定試料と要求性能.....67
Table 2-6	$^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2\text{P}(20)$ 吸収線と干渉分子種.....72
Table 2-7	電流ドライバ・温度コントローラの性能.....75
Table 2-8	CompactRIO 各モジュールの動作.....96
Table 2-9	手法 A・手法 B の信号量比較.....110
Table 2-10	CO_2 トラップ導入時に評価された各圧力.....113

第3章

Table 3-1	^{14}C 同位体比評価結果.....161
-----------	----------------------------------

第4章

Table 4-1	n3 測定結果 (グルコース標準試料)174
Table 4-2	ヒト血漿・尿の測定結果.....180
Table 4-3	開発目標と評価された分析性能.....181

第5章

Table 5-1	^{13}C 標識・非標識等トウモロコシ試料測定結果.....202
-----------	---

List of Abbreviations

AAP	AcetAminoPhen
ABA	Absolute Bio-Availability
ADME	Absorption • Distribution • Metabolism • Excretion
AMS	Accelerator Mass Spectrometry
AOM	Acoustic Optical Modulator
AUC	Area Under the blood concentration-time Curve
CAMS	Compact Accelerator Mass Spectrometry
CEAS	Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy
CE-DFCS	Cavity-Enhanced Direct Frequency Comb Spectroscopy
CRDS	Cavity Ring-Down Spectroscopy
CW	Continuous Wave
DFB	Distributed Feed-Back
DFB-QCL	Distributed Feed-Back Quantum Cascade Laser
DFC-CRDS	Direct Frequency Comb Cavity Ring-Down Spectroscopy
DFG	Difference Frequency Generation
dpm	decay per minute
EA	Elemental Analyzer
ECDL	External Cavity Diode Laser
EMA	European Medicines Agency
EOM	Electro-Optic Modulator
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
FFT	Fast Fourier Transform
FPI	Fabry-Pérot Interferometer
FS-CRDS	Frequency Stabilized Cavity Ring-Down Spectroscopy
FSR	Free Spectral Range
FWHM	Full Width Half Maximum
HITRAN	HIgh resolution TRANsmission molecular absorption database
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICOGS	Intra-Cavity Opto-Galvanic Spectroscopy
ICRP	International Commission on Radiological Protection
IP	Imaging Plate
IRLAS	Infra-Red Laser Absorption Spectroscopy
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometry

LAS	Laser Absorption Spectroscopy
LC/MS/MS	Liquid Chromatograph / Mass Spectrometry / Mass Spectrometry
LLNL	Lawrence Livermore National Laboratory
LMA	Levenberg-Marquardt Algorithm
LRS	Linear Regression of the Sum
LSC	Liquid Scintillation Counting/Counter
MB	Mass Balance
MD	Micro Dose
MICADAS	Mini Radiocarbon Dating System
MS	Mass Spectrometry
NDIR	Non-Dispersive Infra-Red Spectroscopy
NIST	National Institute of Standards and Technology
OFC	Optical Frequency Comb
PCF	Photonic Crystal Fiber
PD	Photo Diode
PDB	Pee Dee Belemnite
PDH	Pound-Drever-Hall
PEG	Poly-Ethylene Glycol
PET	Positron Emission Tomography
pMC	Percent Modern Carbon
ppb	parts per billion
ppt	parts-per-trillion
PSI	Paul Scherrer Institute
PV	Photo-Voltaic
QCL	Quantum Cascade Laser
RD	Ring-Down
SCAR	Saturated-absorption Cavity Ring-down spectroscopy
SNR	Signal to Noise Ratio
SPECT	Single-Photon Emission Computed Tomography
TIPS	Total Internal Partition Sums
VIPA	Virtually Imaged Phased Array

第1章 序論

1.1 放射性炭素 ^{14}C の利用と分析ニーズ

炭素は化合物として地球上に広く分布する非金属元素であり、全ての生物の基本骨格を形成する有機物における主要元素である。自然界には 3 種類の炭素同位体 ^{12}C ・ ^{13}C ・ ^{14}C (天然存在比: 98.9%・1.1%・ $1.2\times 10^{-10}\%$) が存在するが、特に ^{14}C は最大エネルギー0.155 MeV の β 線を放出し、 ^{14}N に壊変する長半減期 β 崩壊核種 (半減期: 約 5730 年) であり、核施設の運用・廃止に際して定量が必要な重要な核種の一つであると同時に、その性質から環境学・地学・生物学・医学・考古学など様々な領域において広く利用されている。本節では ^{14}C 分析の背景として ^{14}C の利用とその分析ニーズについて概説する。

1.1.1 生体トレーサー応用

^{14}C はその特性を活かし、動植物など生体中のトレーサーとして盛んに利用されている。同位体効果が無視できる場合には、 ^{14}C は安定な ^{12}C や ^{13}C と化学的に同じ挙動を示すため、天然には極微量な ^{14}C の存在量を人工的な操作により高くし、精度よく測定を行うことで動植物中の様々な反応過程の観測が可能となる。ここでは特に、医薬品開発領域におけるヒト Hot 試験、植物生理学における ^{14}C トレーサーに関して説明する。なお、“生体”を、植物や微生物を除く“ヒトを含めた動物”と定義する分野も存在するが、本論文では、広くヒトを含めた動植物を意味する言葉として使用する。

医薬品開発領域におけるヒト Hot 試験

新薬開発の領域では、炭素の一部が ^{14}C で標識された医薬品候補化合物 (^{14}C 標識化合物) を、マウスや猿・犬といった哺乳類動物に投与し、その血漿・尿・糞中、または脳や臓器の微小部位に蓄積される ^{14}C の濃度を測定することで、投与した化合物の生体内動態 (薬物動態) を分析している。薬物動態は大きく吸収 (Absorption)・分布 (Distribution)・代謝 (Metabolism)・排泄 (Excretion) に分けることができ、その頭文字を取って ADME と呼ばれる。

医薬品開発のプロセスは大きく、①候補化合物の探索・基礎研究、②動物を用

いて行われる非臨床試験（前臨床）、③実際にヒトに投与する臨床試験、④承認・製造の4つから成り立っている。臨床試験はさらに3段階に分かれており、薬物が人体にとって安全であるかどうか、副作用の有無や程度といった安全性を調査するフェーズ1、人体で効能や副作用が現れる量を評価するフェーズ2、個人差や効能等を含め総合的に評価するフェーズ3がある。臨床試験は他のプロセスと比較して莫大な費用と時間が必要な一方で、フェーズ1からフェーズ3までを含めた臨床試験の成功率は臨床試験到達化合物のうちわずか8%程度（アメリカ合衆国、2004年）と報告されており[1]、このことが医薬品開発費と開発期間を増大させている要因となっている。

医薬品開発の日本における現状について詳しく述べる。医薬産業政策研究所のアンケートに基づいた調査[2]によると、2000年から2008年間に前臨床試験・臨床試験を実施した日本国内の新薬開発プロジェクトの内、臨床試験に到達してから頓挫せずに承認され、新薬を上市できたプロジェクト（1つの新有効成分含有医薬品に対し1プロジェクトと計数）はわずか22%と報告されており（Fig. 1-1）、5プロジェクトにわずか1プロジェクトしか成功していない。この統計結果には市場のグローバル化に伴い、海外先行で臨床開発が進められたものが含まれており、実際には純国内開発で行われたプロジェクトの成功確率はさらに低いと考えられる。一方で、臨床試験には一つの有効成分含有医薬品に対し平均して約4.5年を要し、前臨床試験から承認されるまでに90億円程度を必要とした（Table 1-1）。これらの調査結果から途中で頓挫したプロジェクトにかかった費用を含めて、1つの新薬を上市するために必要な開発コストは平均で484億円と計算された（探索プロセスの基礎研究や市販後に行う調査等に係った費用は除く）。すなわち、製薬会社が新薬を開発する場合、成功のためには平均して400億円程度の追加投資が必要となる。また、Fig. 1-2に示されるように、既存薬との有効性や安全性の違いを明らかにする必要が高まり、かつ規制当局からの個体差・長期安定性の確認要求により、臨床試験被験者数が1990年台から倍程度に増加している。更に近年、医薬品会社は日本や欧米などの先進国医薬品市場のみならず、成長著しい新興国市場への進出を目的に活動の場を世界的に拡大している。このような市場のグローバル化は臨床開発のグローバル化を必要とし、国際的な他地域共同治験の実施が必要となる。したがって海外向けの医薬品開発は国内向けの開発より多くの費用を必要とする。以上から、新薬を開発するのに必要な費用は年々増大していくことが予想されている。

このような背景から、臨床試験の失敗が医薬品開発費・開発期間の増長を招いていることは明らかであるが、その約80%は臨床試験において動物試験では現れなかった薬物動態がヒトに現れたことが原因であると言われている。これは同じ哺乳類であってもヒトと試験動物では体内構造が異なっていることに起因

しており、前臨床試験の技術向上では解決できない。このため臨床試験の成功確率向上や開発効率の向上を目的として、臨床試験実施前段階、および臨床試験早期段階でヒトに対して試験を行い候補化合物の人体内動態（Human in vivo pharmacokinetics）を早期に調査するヒト薬物動態試験の開発が進んでいる[3]。中でも放射性同位体を含む化合物（Hot 化合物）を用いた試験は、人体への被ばくの影響を慎重に考慮する必要がある一方で、人体由来バックグラウンドの影響が少ないため、安定同位体を用いた同様の試験と比較してより少ない薬物投与量で測定が可能であり、効果的な ADME 評価が行えることが知られている。このような試験は放射性の化合物（Hot 化合物）を用いることからヒト Hot 試験と呼ばれる。ヒト Hot 試験には、以下に示すような試験において放射性同位体を使用するものが該当する。Fig. 1-3 に医薬品開発プロセスにおけるそれぞれの実施段階を示す。

①絶対的バイオアベイラビリティ（Absolute Bio-Availability: ABA）試験[4]

静脈内投与以外の手法で体内に投与された薬物のうち、体循環においても活性な薬物の割合を示す絶対的バイオアベイラビリティ（ABA）を評価する。例えば経口投与された薬物の場合、薬物が全身をめぐる体循環に至る過程で、不十分な吸収と肝臓通過時の不必要な代謝（初回通過効果）により、投与薬物の一部は全身循環に至ることなく失われる。薬物を静脈内に投与した場合、このような損失はなく、最初から全身循環されるため ABA は 1 となる。ABA 試験を行う場合、単位時間あたりの血漿内薬物濃度を薬物投与後から一定時間経過する毎に測定し、時間に対する濃度曲線を取得する必要がある。ABA は、同量の薬物を投与した場合の静脈内投与・非静脈内投与のそれぞれで取得された濃度曲線の面積である、血中濃度時間曲線面積（Area Under the blood concentration-time Curve: AUC）を除することで計算される。

②マスバランス（Mass Balance: MB）試験[5]

ヒトの体内において投与薬物が体内でどのように吸収され代謝・排泄されるかといった薬物の物質収支（MB）を評価する。具体的には血中濃度や組織分布、未知の代謝物や排泄経路などの代謝・排泄に関する情報、残留性の有無などを調査する。また、動物実験の結果と比較し、ヒトと試験動物の種差の有無に関する情報を取得することが可能である。

③マイクロドーズ（Micro Dose: MD）試験

マイクロドージング試験ともいう。臨床試験成功確率を上げるために、極

微量の標識化合物をヒトに投与し、ヒトにおける薬物動態を臨床試験前段階で評価する試験である。試験の概念は 2004 年に欧州医薬品庁 (European Medicines Agency: EMA) によって提唱され、日本においては 2006 年に厚生労働省から MD 試験実施に関してガイダンスが出された[6]。ガイダンスによると MD 試験は“ヒトにおいて薬理作用を発現すると推定される投与量の 1/100 を超えない用量又は 100 µg のいずれか少ない用量の被験物質を、健康な被験者に単回投与することにより行われる臨床試験”と定義されている。開発する医薬品によって MD 試験にてどのような動態を評価するかは様々であり、ABA や MB を評価する試験であっても、単回投与量が定義を満たしている場合には MD 試験と呼ばれることもある。MD 試験には評価したい項目や放射性同位体使用の有無で以下に示すような 3 種類の測定法に分けられる。

- a. ^{14}C 等の放射性同位体で標識された被験物質を被験者に投与し、被験者の血液・尿・糞中の標識物質濃度を測定する。被験物質の未変化体や代謝物の薬物動態学的情報 (AUC、ABA、最大血中濃度、生物学的半減期、分布容積、初回通過効果、生物学的利用率、MB など) を得るために有効である。
- b. 放射性同位体で標識しない被験物質を被験者に投与し、高感度の液体クロマトグラフ質量分析計 (Liquid Chromatograph / Mass Spectrometry / Mass Spectrometry: LC/MS/MS) 等を用いて変化体や代謝物の薬物動態学的情報を得る。
- c. 被験物質を ^{11}C 等の陽電子放出核種や ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 等で標識し、陽電子放射断層撮影法 (Positron Emission Tomography: PET) や単一光子放射断層撮影法 (Single-Photon Emission Computed Tomography: SPECT) を用いて被験物質の臓器・組織内分布画像を経時的に測定する。

ヒト Hot 試験は上述した医薬品開発の現状を打開する有効な手法として世界中で開発が進められている。特に MD 試験は、Fig. 1-4 に示すように臨床試験の成功確率が高い候補化合物を早期に選別 (スクリーニング) することができるため、注目が集まっている。これにより臨床試験の実施順番を成功確率が高いと評価された順に行うことで、臨床試験成功確率の飛躍的な向上と新薬開発リードタイムの大幅短縮が期待されている。MD 試験においては薬品の投与量が極微量なこともあり、 ^{14}C で被験物質を標識する手法は放射性同位体を使用しない手法と比較して、必要な薬品投与量や分析精度の点で優れている。しかしながら放射

性物質を人体中に投与する必要があるため、被験者の内部被ばくについては十分な考慮が必要となる。MD 試験においてヒトに投与される放射能は 18.5 kBq (500 nCi) 以下で十分である。国際放射線防護委員会 (International Commission on Radiological Protection: ICRP) は、ヒトに投与された ^{14}C 標識有機化合物が成人では半減期 40 日で消失すると仮定したモデルから、1 Bq の ^{14}C 標識有機化合物を経口摂取した場合の実効線量を、成人に対して 5.8×10^{-10} Sv/Bq としている [7]。これより計算される MD 試験の ^{14}C 標識有機化合物による内部被ばくは成人で $18.5 \text{ kBq} \times 5.8 \times 10^{-10} \text{ Sv/Bq} = 10.7 \text{ } \mu\text{Sv}$ と計算できる。これは日常生活における被ばく線量 [8] (Fig. 1-5) と比較しても十分に小さい。一般的な医薬品の半減期は、数時間から数日であることを考慮しても、MD 試験による被験者の内部被ばくは微量であると判断することができる。 ^{14}C を用いた MD 試験を日本国内で実施した例として、2013 年積水メディカル株式会社戸塚らによる報告 [9] がある。戸塚らは、日本人の健康的な成人男性に極微量 ^{14}C 標識アセトアミノフェン (AAP) 7.1 kBq (=192 nCi, 100 μg) / body を投与し、他の薬物との相互作用によって引き起こされる薬物動態の変化 (飲み合わせによる影響) を分析することを想定して、プロベネシド (尿酸排泄促進薬の一種) 投与と非投与を比較した。 ^{14}C 分析には加速器質量分析法 (Accelerator Mass Spectrometry: AMS) が用いられた。Fig. 1-6 に測定された投与放射エネルギーに対する排泄による収率を示す。投与放射エネルギーが体内に蓄積せず、ほぼ排出されていることが確認され、プロベネシド投与・非投与で結果に明確な差が見られ、極微量の薬物投与であってもヒト薬物動態を評価できることが示された。

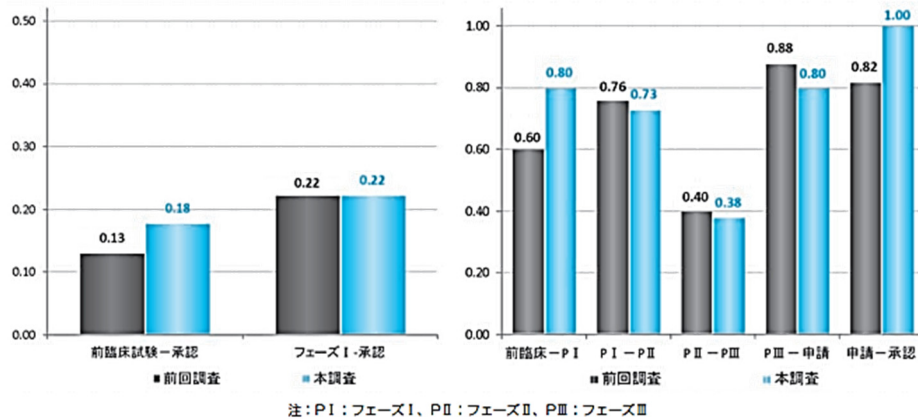


Fig. 1-1 臨床試験の全体（左）とプロセス別（右）成功率[2]

前回調査：1990年～1999年

本調査：2000年～2008年

縦軸は成功割合、フェーズ1～3は臨床試験の各実施段階

フェーズ1: 副作用の有無や程度といった安全性を調査

フェーズ2: 人体で効能や副作用が現れる投与量を調査

フェーズ3: 個人差や効能等を総合的に調査

Table 1-1 医薬品開発に必要な費用と期間[2]

評価項目	本調査/ 前回調査	前臨床 試験	フェーズI	フェーズII	フェーズIII	フェーズIII		前臨床-承認	フェーズI・II
						-申請	申請 -承認		
開発期間 (ヵ月)	本調査	29.0	15.0	15.0	25.0	6.0	20.0	110.0(9.2)	55.0(4.6)
	前回調査	25.7	18.7	35.0	28.2	29.9		137.5(11.5)	81.9(6.8)
開発コスト (百万円)	本調査	1,310.6	1,086.0	2,110.1	4,018.2	349.2		8,874.1	5,518.5
	前回調査	690.0	626.0	1,260.0	2,450.0	529.2		5,555.0	1,951.0

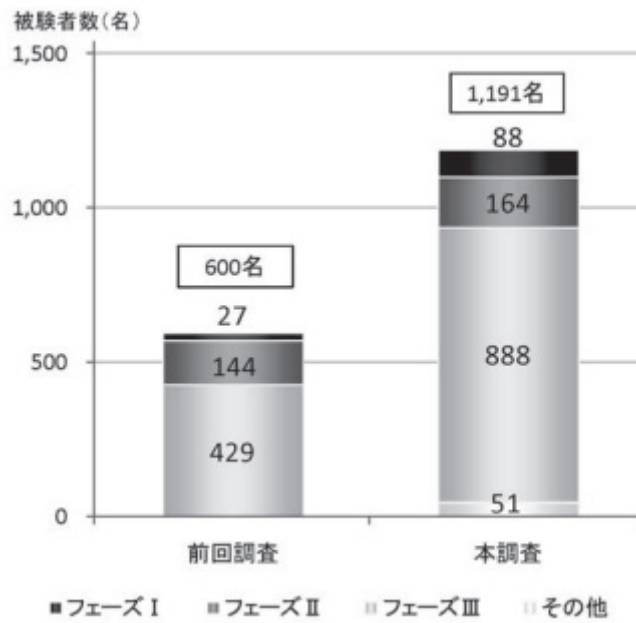


Fig. 1-2 臨床試験被験者数[2]

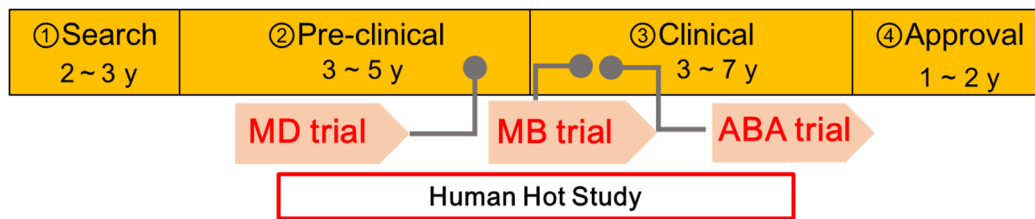


Fig. 1-3 医薬品開発プロセスとヒト Hot 試験

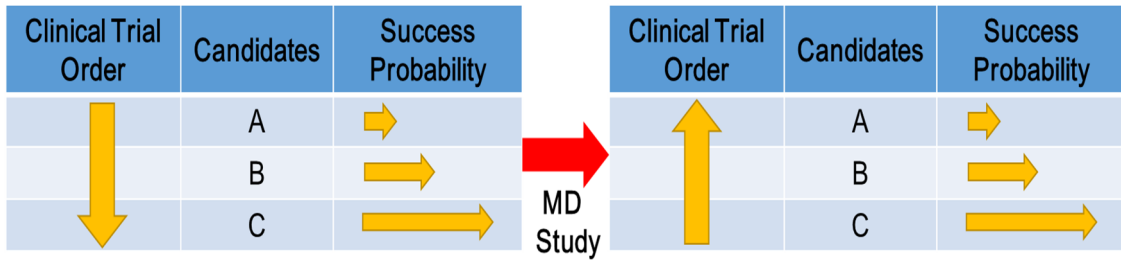


Fig. 1-4 MD 試験による候補化合物スクリーニング

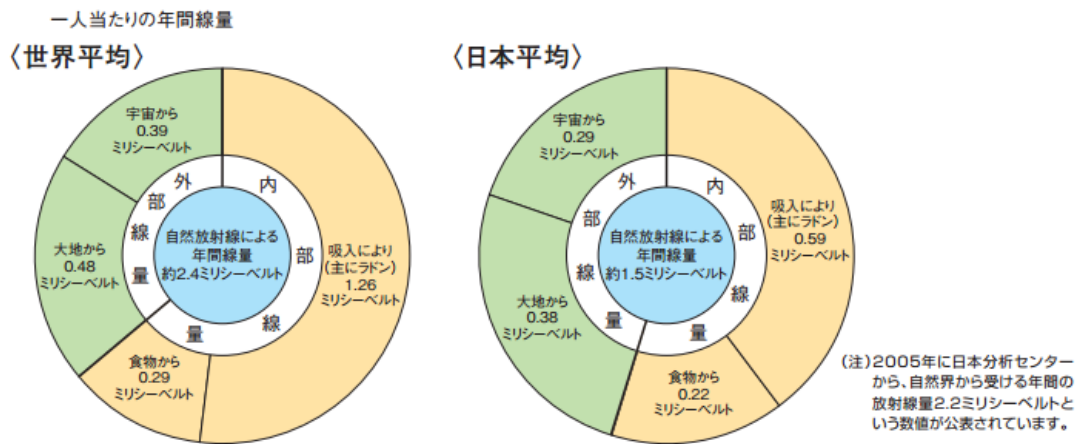


Fig. 1-5 一人あたりの自然界から受ける年間被ばく線量[6]

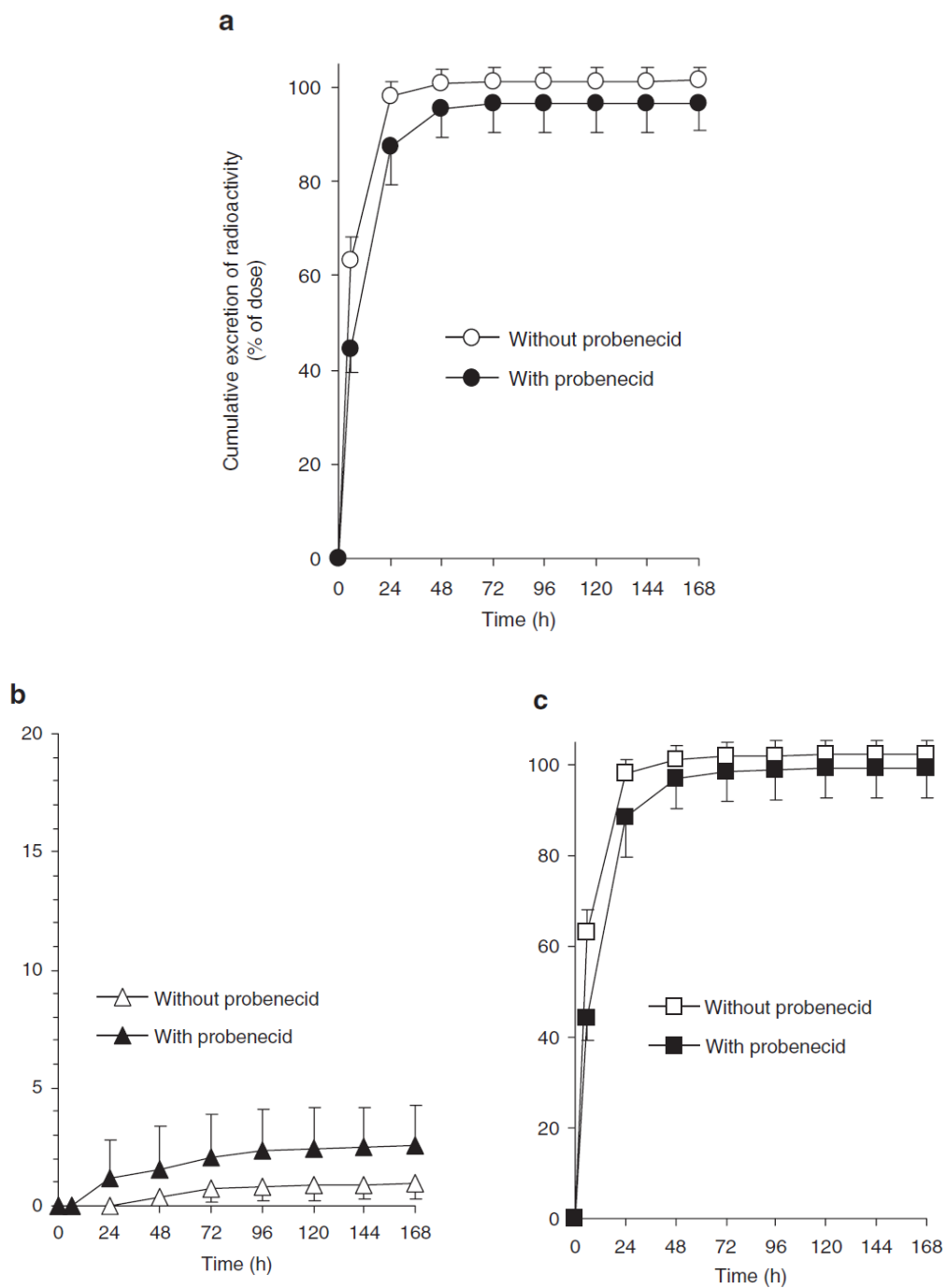


Fig. 1-6 ^{14}C -AAP 投与後の放射能収率[9]
 (a)尿 (b)便 (c)尿と便の和 (縦軸は投与放射能に対する累積収率)

植物生理学における ^{14}C トレーサー応用

植物中トレーサーとして ^{14}C を利用する場合、 ^{14}C 標識を行ったうえで、(1) ^{14}C より発生する β 線を測定し植物のイメージング画像を取得する、(2) 植物中または植物より発生する気体中の ^{14}C 量を測定し、その変化を観測するという2つの方法がある。前者の例として東京大学の放射線植物生理学研究室にて開発された植物用低エネルギー β 線イメージングシステム[10]を紹介する。Fig. 1-7に開発されたシステムの概要を示す。システムは主に光学カメラと光子計数カメラ、CsI(Tl)シンチレーター、暗箱、クラスタ状のLEDライトで構成される。植物中の放射性同位体から放出された β 線は植物の背面に設置されたシンチレーターによって可視光となり光子計数カメラによって計測される。LEDライトは光学カメラで写像を取得するときのみ点灯するように制御されている。このようなシステムにより植物の光学画像と β 線によるラジオグラフィを同時に取得することができ、植物のどの部分にどのように物質が滞留するかなどを測定することが可能である。Fig. 1-8に開発されたシステムで測定されたイネのイメージング画像を示す。テスト測定として ^{35}S で標識されたイネが用いられているが、代わりに ^{14}C を用いた場合にも同様のイメージング画像が取得できる。このような ^{14}C を用いたイメージングは植物の養分循環を解明する有用な手段として様々な植物に適用されている[11,12]。

植物試料、または植物由来気体等の ^{14}C 量を測定しその変化を観測する手法は、植物の動態や生育に関する研究に利用されている[13-15]。例えば肥料の有無や乾燥、土壌といった様々な生育環境下(しばしば環境ストレス下と呼ばれる)では植物の生育や動態に差異が見られる。イネを例にとると、光合成により取り込まれた炭素をもとに生成された養分(光合成産物)は、成長のために各部を構成する材料の一部となる他、個体の生体活動のために使用され、使用された炭素は呼吸によって二酸化炭素として排出される。そこで、光合成により ^{14}C 標識されたイネの各部位、またはそれらの呼気中の ^{14}C 量を測定できれば、イネが光合成産物をどのように運用しているかといった、植物生理学上重要な情報を取得することができる。例えば、様々な環境ストレス化で栽培したイネについて、その動態を評価することで、どのような因子がイネの効率的な成長や、収量の向上につながるかを調査することができる。ここでは例として、Indian agricultural research institute の Singh らによる報告[13]を紹介する。

根の有機化合物(養分)の放出や維管束の樹液流量を調査することは、植物の栄養とソース・シンクダイナミクスを理解する上で非常に重要である。しかしその同定は複雑で非常に時間がかかる。そこで ^{14}C 標識法を用いた迅速で信頼のおける単純な手法が開発され、 ^{60}Co による γ 線を照射された落花生の種子から成長した根や茎について、照射量ごとにその重さと、浸出液・維管束樹液流量を調

査する実験が行われた。チャンバーにて $^{14}\text{CO}_2$ にさらされた植物試料は実験室環境に輸送され、根からの浸出液が異なる時間間隔で一定量ずつ採取された。浸出液中の ^{14}C 量は液体シンチレーションカウンターによって測定された。また、維管束樹液流量については、それぞれの茎を斜めに切り開き 1 mL の脱イオン水に漬けられて液体シンチレーションカウンターにて測定された。Table 1-2 に照射量毎の質量を、Fig. 1-9 に浸出液に関する ^{14}C 測定の結果を示す。結果から 5 ~ 500 Gy の γ 線照射によって芽の質量が減少している一方で、0.82 ~ 100 Gy の間で根の質量が大きくなっていることが明らかとなった。これは低照射線量の γ 線が若い胚の酵素を活性化させ、細胞分裂の増加・植物の成長・開花を促すことを示唆している。また浸出液の結果から、根からの有機炭素の放出は炭素が取り込まれてから 24~48 時間後に顕著に起こり、5 Gy 以上の γ 線照射は根からの養分放出を劇的に抑制することが示された。

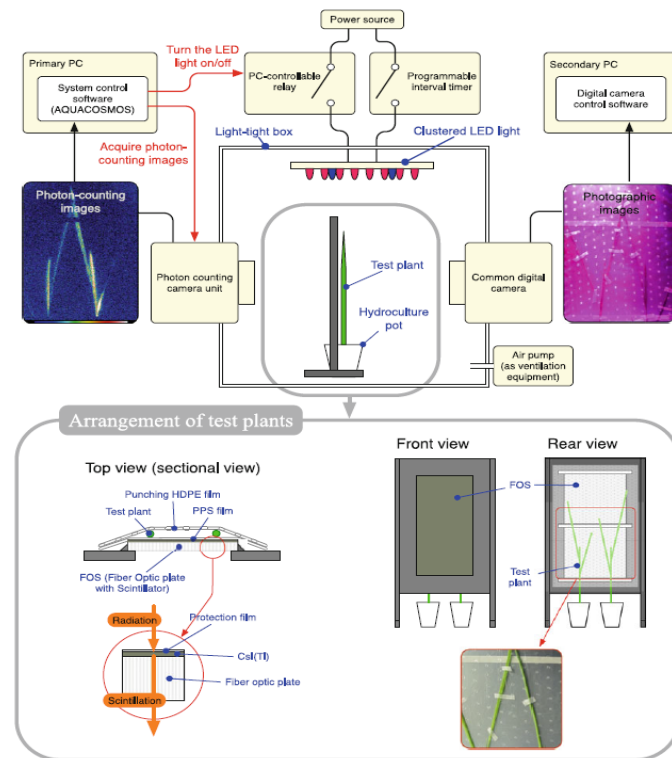


Fig. 1-7 植物用低エネルギー β 線イメージングシステム[10]

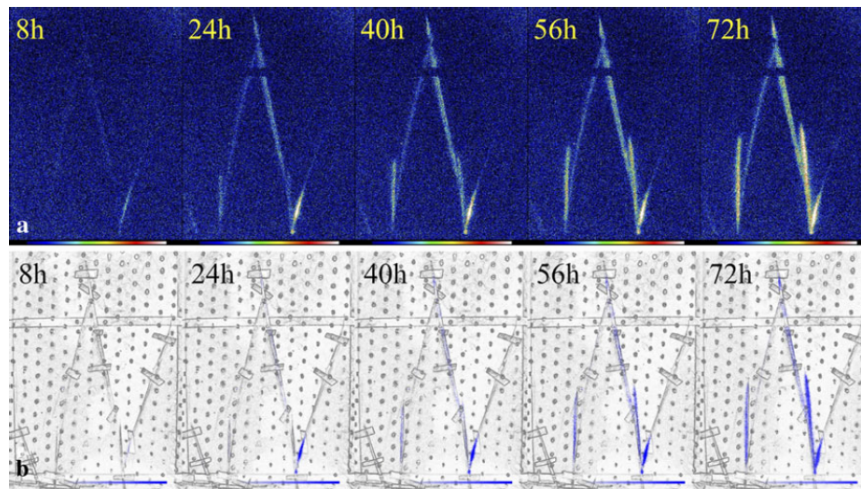


Fig. 1-8 取得されたイネの時間毎のイメージング画像[10]
イネを ^{35}S で標識した時間を基準として 8~72 時間経過時の
それぞれの画像が示されている。

a: ラジオグラフィー画像

b: 光学画像（灰色）とラジオグラフィー（青色）の重畳画像

Table 1-2 種子の γ 線照射と芽 (shoot) と根 (root) の測定結果[13]
図中 g.DW.は乾燥させた試料の質量 (単位:g) である。

Gamma irradiation (Gy)	Shoot biomass (g. DW.)	Root biomass (g. DW.)
0	0.632 ^c ± 0.02	0.187 ^c ± 0.017
0.0082	0.733 ^b ± 0.02	0.159 ^c ± 0.021
0.0164	0.688 ^c ± 0.04	0.276 ^{cd} ± 0.051
0.0328	0.758 ^a ± 0.03	0.312 ^c ± 0.049
0.0656	0.778 ^a ± 0.01	0.244 ^d ± 0.021
0.1312	0.704 ^b ± 0.02	0.279 ^{cd} ± 0.044
5	0.589 ^d ± 0.03	0.372 ^b ± 0.027
25	0.434 ^c ± 0.05	0.421 ^a ± 0.034
100	0.234 ^f ± 0.03	0.279 ^{cd} ± 0.014
500	0.169 ^g ± 0.02	0.154 ^c ± 0.029
Mean of irradiated treatments	0.565	0.277
CV (P _{0.05})	0.024	0.045

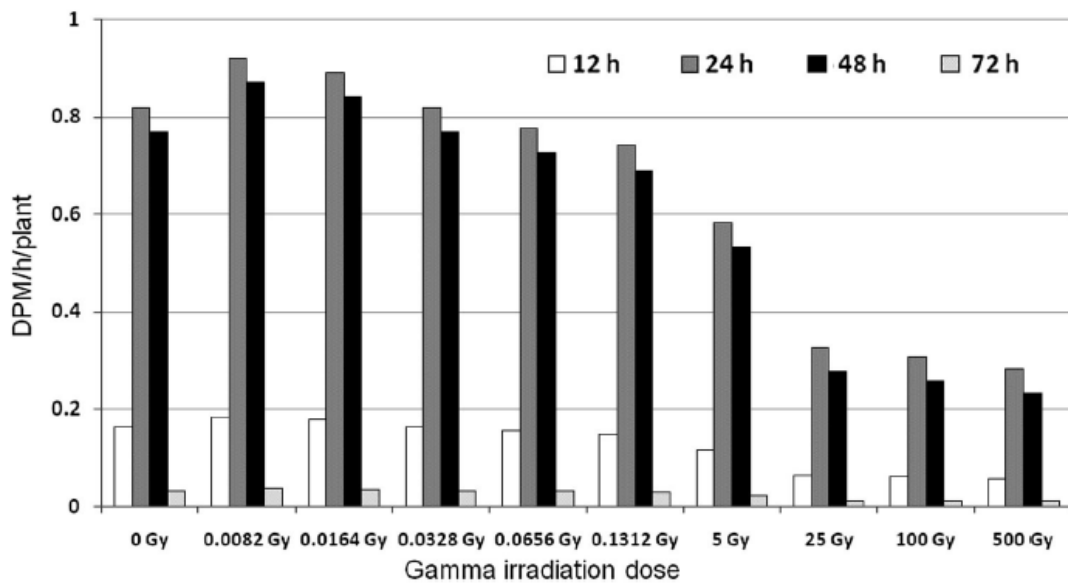


Fig. 1-9 根の浸出液中の ^{14}C 量と時間変化[13]

1.1.2 環境トレーサー応用

炭素は環境を構成する主要元素であり、自然界では様々な形で循環されている。そのため天然に存在する炭素同位体は環境トレーサーとして自然界の動態解明に広く利用されている。その一例として、2007年に国立環境研究所にて行われた微粒子物質の集中観測を紹介する。

現在主要なエネルギーの一つとして利用されている石油や石炭などの化石燃料は、太古に生体活動を停止した生物の遺骸がはるかな時を経て燃料となったものであり、化石燃料中の ^{14}C 同位体比は、現在の天然同位体比と比較し数桁小さい。一方で、1950年代から約10年にわたって実施された大気圏内の核実験によって、大気中の ^{14}C 同位体比は急激に上昇したことが知られている (Fig. 1-10 [16])。大気圏内核実験以降に現存する、 ^{14}C 同位体比の高い生物由来の炭素は現代炭素と呼ばれる。この差を利用し、環境中の化学物質に含まれる ^{14}C 同位体比を調べると、化石燃料に由来する炭素と現代炭素の割合を見積もることが可能である。2007年、国立環境研究所は、大気中の微小粒子物質（空気動学的粒径 $2.5\ \mu\text{m}$ 、PM2.5）の人体健康影響が大きく懸念され始めたことを背景に、その主要な発生源を推定することを目的として、北関東における PM2.5 の、レセプターモデルと放射性炭素同位体比分析を組み合わせた発生源推定測定を実施した [17-19]。レセプターモデルとは粒子状物質の発生源推定方法の一つで、汚染物質が発生源から拡散・輸送することを数値モデルによって計算するフォーワードモデルと異なり、観測された成分組成に基づいて統計的に発生源を推定す

る方法である。レセプターモデルは観測データと発生源に関する成分組成データ（発生源プロファイル）があれば、比較的容易に発生源の推定が可能である。しかし、都市部においても近年、バイオマスの燃焼による発生（一次粒子）や植物起源の揮発性有機物からの生成（二次粒子）など、生物起源の粒子状物質が無視できないレベルで存在している。このような粒子と都市部における化石燃料の燃焼を起源とする粒子の弁別のために、上述した ^{14}C 分析がレセプターモデルと組み合わせて行われた。Fig. 1-11 に群馬県前橋と埼玉県騎西の2箇所で約10日間にわたり採取された微小粒子中の放射性炭素比率（Percent Modern Carbon: pMC）の経時変化を示す。Fig. 1-11 中 pMC は下記の式で表され標準試料で正規化された値である。

$$\text{pMC} = \frac{\left(\frac{^{14}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{14}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{standard}} / 1.3407} \times 100 \quad (1-1)$$

ここで $(^{14}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}}$ は標準試料の ^{14}C 同位体比（1950年の $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ を基準とし、 $\text{pMC} = 134.07$ とする）であり、現代炭素で $\text{pMC} = 100$ 、化石燃料起因の炭素で $\text{pMC} = 0$ となる。Fig. 1-11 より前橋においては昼間は pMC が低くなり、夜間に pMC が高くなる傾向が見られた。これは自動車等の動きが活発な昼間に、化石燃料起因の炭素が多くなることを示している。

^{14}C 分析は炭素循環のトレーサーとしての側面とともに年代測定法という側面を合わせ持つため、数百年・数千年といった長いスケールでの環境の変化を評価することができる。そのため ^{14}C 分析を用いて古環境の復元や気候変動のメカニズムの解明を行う研究が行われている[20-23]。

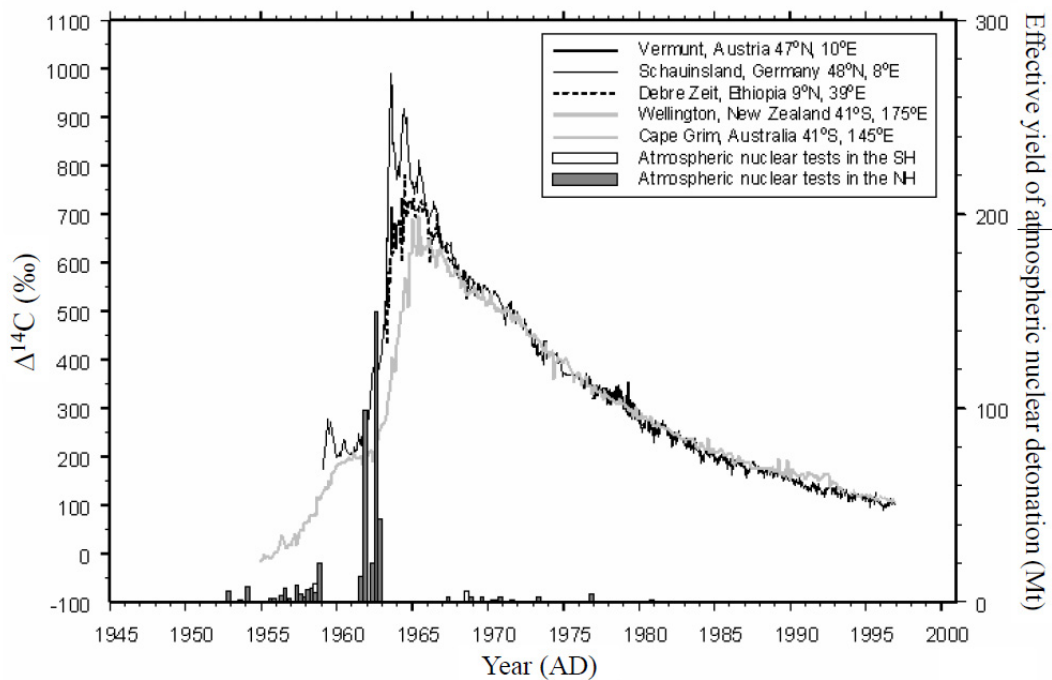


Fig. 1-10 大気圏内核実験に伴う大気中 ^{14}C 同位体比の変化[16]
 図中実線・点線は1955年の値を基準として表される ^{14}C 同位体比、棒グラフは大気内核爆発の実施度合いを表している。

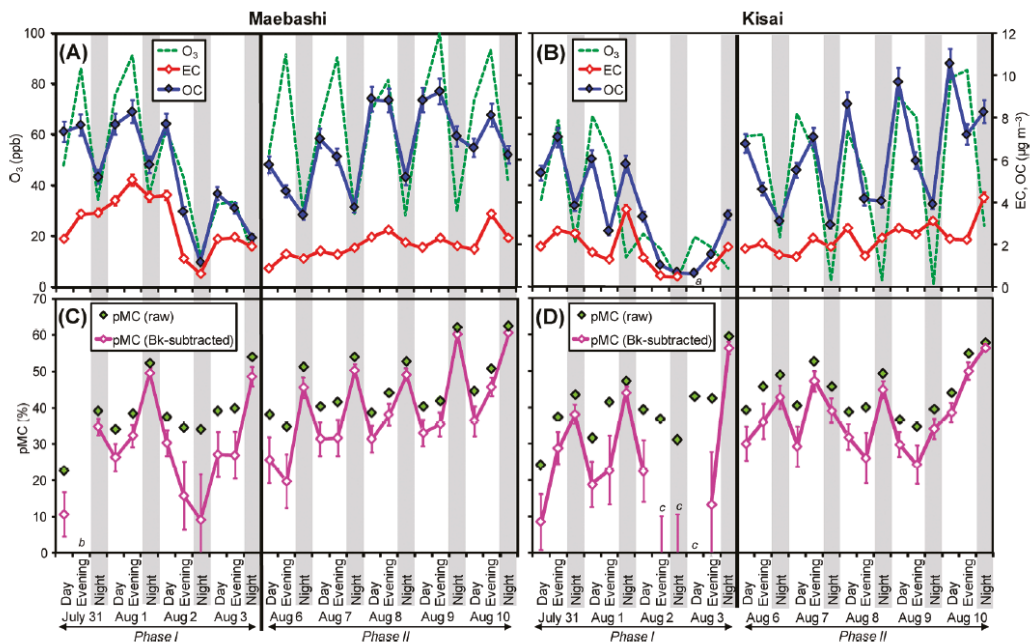


Fig. 1-11 放射性炭素比率の経時変化[19]
 (a) 群馬県前橋における大気中オゾン濃度と試料中炭素量、(b) 埼玉県騎西における大気中オゾン濃度と試料中炭素量、(c) 群馬県前橋における放射性炭素比率、(d) 埼玉県騎西における放射性炭素比率
 OC: 有機炭素、EC: 元素状炭素

1.1.3 原子炉廃止措置に伴う定量

原子炉の廃止措置に伴う放射能インベントリ評価としても ^{14}C の分析ニーズは存在する。運転を終了した原子力発電所の機器や構造物には多くの放射能が存在する。その解体を実施するにあたり、放射能の残存量(放射能インベントリ)を評価することは、解体方式の決定・解体作業に伴う被ばく量の推定・解体計画の策定・放射性廃棄物の処理処分に係る検討などにとって重要である。Table 1-3 に示されるように ^{14}C は原子炉中にて $^{13}\text{C}(n, \gamma)^{14}\text{C}$ 、 $^{14}\text{N}(n, p)^{14}\text{C}$ 、 $^{17}\text{O}(n, \alpha)^{14}\text{C}$ の3つの反応で生成される[24]。中でも ^{14}N は反応断面積が大きく、コンクリート中に多く含まれるため、放射化によって発生する ^{14}C のほとんどは $^{14}\text{N}(n, p)^{14}\text{C}$ 反応によるものである。 ^{14}C は残存核種の中でも比較的長半減期であり、存在量が多い場合は余裕深度処分の対象となる。廃止される原子炉が増加していくにつれて、より迅速で安価な放射性核種の分析装置が求められている。

Table 1-3 グラファイト・コンクリート中 ^{14}C 生成元素とその核パラメータ、および相対貢献度 [24]

Target nuclides	Abundance (%)	Nuclear reaction	Cross section (barn)	Graphite		Concrete	
				Concentration of target element	Relative contribution	Concentration of target element	Relative contribution
^{14}N	99.63	$^{14}\text{N}(n, p)^{14}\text{C}$	1.83	40 ppm	1	300 ppm	1
^{13}C	1.10	$^{13}\text{C}(n, \gamma)^{14}\text{C}$	0.0014	100%	0.21	0.1%	3×10^{-5}
^{17}O	0.04	$^{17}\text{O}(n, \alpha)^{14}\text{C}$	0.24	100 ppm	1.03×10^{-4}	50%	0.088

1.1.4 放射性炭素年代測定

^{14}C は、滞流圏上部から成層圏において、宇宙線によって発生する熱中性子と ^{14}N の核反応により以下の式で生成され、壊変する。



生成された大気中 ^{14}C は、光合成や食物連鎖により動植物の体内に取り込まれる。動植物中 ^{14}C 同位体比は大気から ^{14}C が供給されている間は大気中同位体比と同一であるが、地層中の泥土や岩石、生体活動の停止した動植物など大気から新たな ^{14}C 供給のない閉じた系では、約 5730 年という半減期で時間とともに単調に減少する。したがって ^{14}C 同位体比を系が閉じてから現在までの経過時間の尺度として利用することができる。放射性炭素年代測定 (Radiocarbon dating) として知られるこの手法は、シカゴ大学の W. F. Libby によって開発された[25]。当初この方法は、宇宙線による ^{14}C 生成と壊変はほぼ平衡状態にあり、核実験以前

の大気中 ^{14}C 同位体比はほぼ一定と考えることで実施されていたが、後に、 ^{14}C 生成と壊変の割合は太陽活動の変化による宇宙線量の変動などが要因で厳密には一定ではないことが明らかとなった。そのため、より正確な年代測定のために、既知の年代で放射性炭素同位体比を較正する研究が行われている。この較正には樹木の年輪を利用したものや湖底の堆積物を利用した方法などがある。例えば、福井県水月湖の湖底堆積物は年代ごとに非常にきれいな状態で積み重なっており（年縞）、水月湖堆積物の深さ毎の ^{14}C 同位体比を測定し、その結果から年代を較正することが可能である [26]。また、水月湖による ^{14}C 年代測定データをバハマやベネズエラのカリアコ、中国の葫芦洞など様々な場所の測定データと組み合わせ、より高精度な年代較正曲線 IntCal13 が 2013 年に日英独を含む研究プロジェクトより公開されており [27]、世界標準の年代のものさしとして利用されている (Fig. 1-12)。放射性炭素年代測定は、化石や岩石、遺跡から発見された遺物等様々な試料の年代測定に利用されている [28-32]。

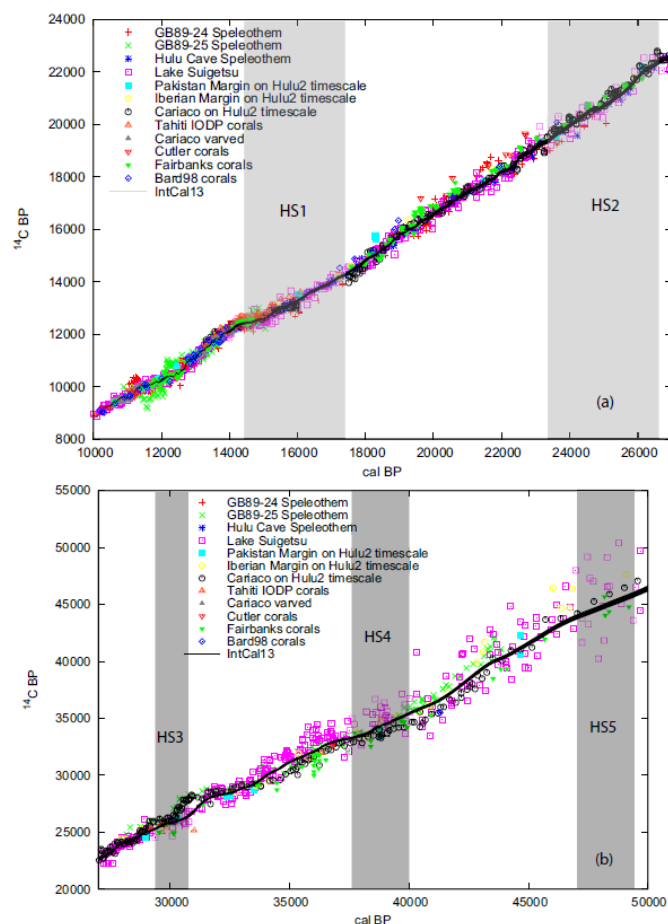


Fig. 1-12 放射性炭素年代較正曲線 (IntCal13) [27]

表中 BP は Before Present の略で 1950 年を基点とした年代単位

(a)は 10,000 ~ 27,000 年まで、(b)は 27,000 ~ 50,000 年までの較正曲線

1.2 放射性炭素同位体分析法

既存の ^{14}C 分析法には放射線計測・質量分析・レーザー分光に基づく手法が存在する。本節ではそれぞれについて詳しく説明する。

1.2.1 放射線計測に基づく手法

^{14}C の崩壊に伴って発生する β 線を計数する手法は比較的早い段階から研究されてきた。比例計数管による β 線計測法[33]も存在するが、ここでは微量 ^{14}C 分析に限って液体シンチレーションカウンティング法 (Liquid Scintillation Counting: LSC) を紹介する[34]。LSC は、必要に応じて化学的な前処理を施した試料に液体シンチレーター (蛍光物質) を加え、試料中 ^{14}C からの β 線による液体シンチレーターの蛍光を光電子増倍管で計数する。Fig. 1-13 に標準的な液体シンチレーションカウンター[35]を示す。LSC は液体シンチレーターが線源に対して 4π 方向に存在するため、100%に近い検出効率を有するが、シンチレーション光の吸収によるクエンチング (消光) [36]が存在し、その検出効率は厳密に 100%には達しない。一般的には、 ^{14}C で 90%程度、比較的 β 線のエネルギーが小さいトリチウム (^3H) で 70%程度である。そのため正確な測定のためには、試料ごとで計数効率を決定する必要がある。また、より高精度な定量分析のために ^{14}C 同位体比が既知な複数の試料を用意し、 ^{14}C 同位体比に対する計数率をプロットすることで較正直線を作成する場合もある。

LSC では測定試料を直接シンチレーターカクテルと混合する場合も多いが、高感度化のための代表的な前処理としてベンゼン合成法[37]が存在する。まず、測定対象である試料から化学操作を通じて炭酸カルシウムとして炭素を捕集する。ベンゼン法では炭酸カルシウムから二酸化炭素を発生させ、リチウムと反応させることでリチウムカーバイドとし、水を加えてアセチレンを生成する。最後に五酸化バナジウムを触媒としてアセチレンを三重合することでベンゼンを生成する。ベンゼンは単位質量あたりの炭素量が最も多い化合物であり、効率的な炭素濃縮が可能である。得られたベンゼンとシンチレーター溶液とを混合して測定試料とする。

LSC の利点として装置自体が比較的安価で測定コストも安く、テーブルトップサイズであるという点、シンチレーションカウンターの安定性が良く操作も容易な点、測定試料・標準試料・バックグラウンド試料を繰り返し入れ替えながら測定でき、経時変化による誤差が抑えられる点が挙げられる。このような利点から、LSC 装置は産学問わず世界中の様々な機関に導入されている。一方で、 ^{14}C が長半減期核種であることから、到達できる検出限界には限度があり、AMS

と比較して数桁劣る点、前処理・試料の合成が複雑で時間がかかる点が短所として挙げられる。また、他の α/β 壊変放射性核種が含まれる場合は、他の核種と明確に区別して測定することはできない。



Fig. 1-13 典型的な液体シンチレーションカウンター[35]
(PerkinElmer、Tri-Carb シリーズ)

1.2.2 加速器質量分析法

質量分析法 (Mass Spectrometry: MS) とは、対象元素の原子あるいはそれを含む化合物を適切な方法でイオン化し、生成したイオンを質量電荷比で分離し、各々の質量電荷比ごとのイオン量を計数することで定性・定量分析する手法である。特に、 ^{14}C の分析には加速器を使用して質量分析を行う加速器質量分析法 (AMS) が用いられる[38]。AMS は、加速器を用いてイオンビームを加速し、衝突により同重体を分解・除去し、着目同位体のみを計測するというものである。Fig. 1-14 に示すようなタンデム加速器を用いた AMS[39]では、測定したいサンプルそのものを固形炭素 (グラファイト) としてイオン源に装填し、1 価の負イオンビームとして引き出す。ここで、質量スペクトル上で ^{14}C の同重体となる ^{14}N は、電子親和性がないために負イオンとならず取り除くことができる。引き出された炭素の負イオンは、電磁石により特定の質量のイオンのみを選んで加速器に入射される。加速管の中心には正の電圧が数 MV かけられており、加速管に導入された負イオンは引力によって急速に加速される。加速管の中心には荷電変換用 Ar ガスが充満した部屋があり、ここに加速された負の炭素イオンが

入ると Ar ガスとの衝突により電子がはぎとられ正の炭素イオンに変化する。すると今度は斥力が炭素イオンに働き、再度加速されて加速管を追い出される。同重体となる $^{13}\text{CH}^-$ や $^{12}\text{CH}_2^-$ は、この衝突の際に分解され炭素の単原子正イオンとなる。十分に加速された炭素のうち、量の多い ^{12}C と ^{13}C はファラデーカップにて電流として計測され、 ^{14}C はイオン検出器にて 1 個ずつ計数される。AMS による ^{14}C 分析は既存の手法では最も高いアバンダンス感度 ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 10^{-15}$) を有する。放射性炭素年代測定では測定試料中の天然存在比以下の ^{14}C を測定する必要があるため、AMS が使用される。

従来 AMS には高感度・高精度な分析を実現するために、同重体干渉を抑制するための高い加速電圧を有する加速器が不可欠であった。そのため AMS 装置には専用建屋を必要とし、装置本体に数十億円という莫大なコストを必要とした。しかし近年、AMS を小型化する研究がなされている。スイスのポール・シェラー研究所 (Paul Scherrer Institute: PSI) とスイス連邦工科大学 (Eidgenössische Technische Hochschule: ETH) の研究グループでは、加速器に印加する電圧が低くても Ar ガスの圧力を高めることで ^{14}C の同重体を分解できることに着目し、Fig. 1-15 に示すように加速器を 500 kV ペレトロン加速器 (National Electrostatics Corporation 製) に変更するなどの工夫を施すことで 4.5 m × 6.5 m まで小型化がなされた[40]。この AMS は Compact-AMS (CAMS) と呼ばれ、従来の AMS と比較しても遜色ない検出限界感度を有する一方で、安価で小型な装置を実現している。また、その後 PSI と ETH の研究グループは、CAMS よりもさらに小型な放射性炭素年代測定のための AMS システム (Mini Radiocarbon Dating System: MICADAS) を開発している[41]。MICADAS では加速電圧 200 kV の加速器により約 2.3 m × 3 m という装置サイズが実現されている。Fig. 1-16 に MICADAS の概観を示す。さらに近年では、解離ガスを Ar から He に変更することで、より効率的に同重分子を破壊し、45 kV という通常の質量分析計と変わらない加速電圧の ^{14}C 分析用 AMS が開発されている[42]。AMS 開発に関する近年の動向は名古屋大学年代測定総合研究センターの南によって詳細にまとめられている[43]。



Fig. 1-14 General Ionex 社製タンデトロン加速器質量分析計[39]
 (名古屋大学年代測定総合研究センター)

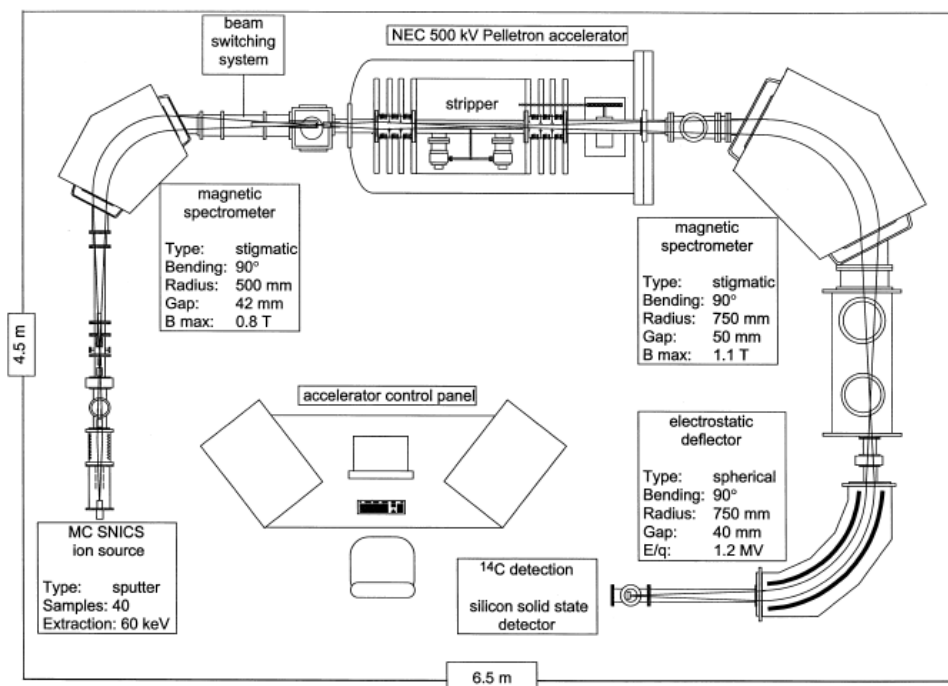


Fig. 1-15 CAMS の概要図[40]

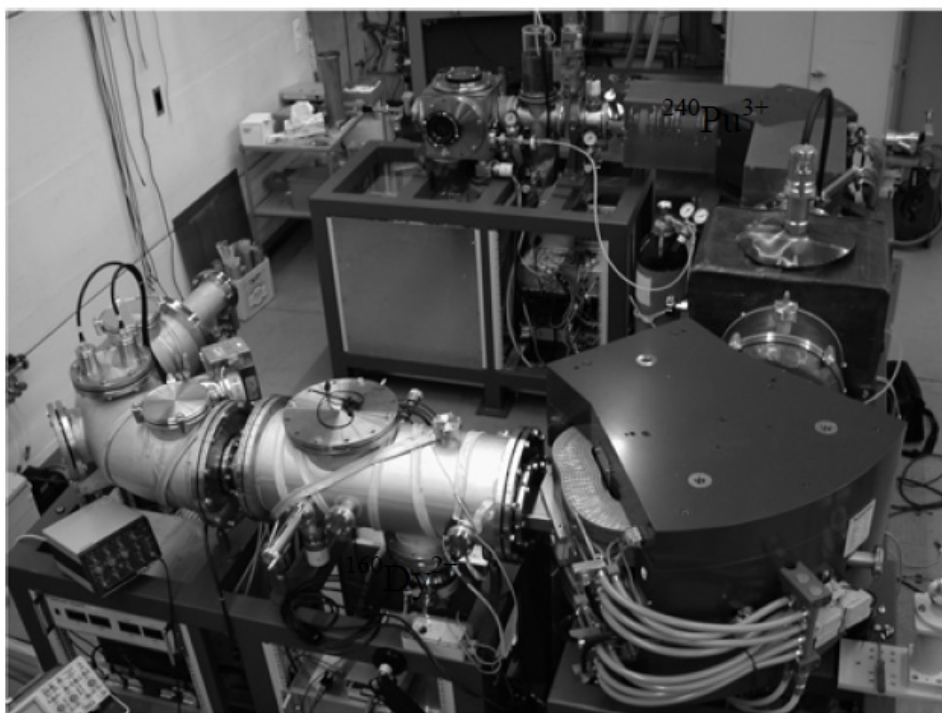


Fig. 1-16 小型 AMS 放射性炭素年代測定システム MICADAS[41]

1.2.3 レーザー分光に基づく手法

^{14}C に限らず、同位体分析の一般的な手法としてレーザー分光に基づいた手法が挙げられる。レーザー分光では、原子や分子のエネルギー準位間のエネルギーに相当するエネルギー（周波数）を持ったレーザーを用いることで、分析対象のみを選択的に測定する。中でもレーザー吸収分光（Laser Absorption Spectroscopy: LAS）は分子種の光吸収線が分子種毎に異なることを利用した分析法である。

気体分子は、エネルギー準位間のエネルギー差に相当するエネルギーを持った光を吸収する。分子のエネルギー準位には、分子中の各軌道上の電子が取りうる離散的なエネルギーである電子エネルギー準位 E_{electron} 、分子内の結合の振動（分子振動）が取りうる離散的なエネルギーである振動エネルギー準位 $E_{\text{vibration}}$ 、分子の回転が取りうる離散的なエネルギーである回転エネルギー準位 E_{rotation} が存在する。赤外吸収の場合は、吸収された光エネルギーは振動エネルギー準位の遷移に相当し、それには回転エネルギー準位の遷移も付随する（振動回転遷移）。分子の回転運動は剛体回転子として考えることができ、そのエネルギーは分子種によって固有の回転定数 B と回転量子数 J を用いて、

$$E_{\text{rotation}} = B \cdot J(J + 1) \quad (J=0,1,2\dots) \quad (1-4)$$

と表される。分子の振動は、調和振動子でよく近似でき、そのエネルギーは固有振動数 ν_0 と振動量子数 ν を用いて、

$$E_{\text{vibration}} = h\nu_0 \cdot (\nu + 1/2) \quad (\nu=0,1,2\dots) \quad (1-5)$$

と離散化されて表される。ここで h はプランク定数である。したがって振動回転準位 $E_{\nu-r}$ は式(1-4)と式(1-5)の和によって表される。

$$E_{\nu-r} = h\nu_0 \cdot (\nu + 1/2) + B \cdot J(J + 1) \quad (\nu=0,1,2\dots, J=0,1,2\dots) \quad (1-6)$$

エネルギー準位間の遷移には選択律が存在し、遷移が可能な許容遷移と遷移が不可能な禁則遷移とが存在する。振動回転準位の選択律はそれぞれの量子数の遷移を Δ で表すと

$$\Delta\nu = +1, \Delta J = \pm 1 \quad (1-7)$$

となる。式(1-7)を満たす遷移のエネルギー差に対応するエネルギーを持った赤外光のみ吸収が起こる (Fig. 1-17)。ここで $\Delta J = +1$ の遷移を R 枝、 $\Delta J = -1$ の遷移を P 枝と呼ばれ、例えば P 枝のとある遷移 P(J)により吸収される赤外光のエネルギー $h\nu$ は、

$$h\nu = E_{\nu-r}(\nu + 1, J - 1) - E_{\nu-r}(\nu, J) = \nu_0 - 2BJ \quad (1-8)$$

と表される。ここで ν は赤外光の周波数である。実際の分子は調和振動子ではなく、その波動関数には非調和の項が存在する。そのため、選択律が崩れ、 $\Delta\nu = +2, +3, \dots$ といった遷移も弱いながら存在する。 $\Delta\nu = +1$ の吸収を基本音吸収、それ以降 $\Delta\nu$ が増える毎に第二倍音吸収、第三倍音吸収... と呼ばれる。また、二酸化炭素のような直線多原子分子の場合、全対称伸縮振動、逆対称伸縮振動、変角振動 (Fig. 1-18) といった基準振動モードを持つ。全対称伸縮振動 ($\nu_1 = 1340 \text{ cm}^{-1}$) はラマン活性・赤外不活性、逆対称伸縮振動 ($\nu_3 = 2349 \text{ cm}^{-1}$) と変角振動 ($\nu_2 = 667 \text{ cm}^{-1}$) はラマン不活性・赤外活性であるため、赤外光吸収の遷移は逆対称伸縮振動 ($\nu_3 = 2349 \text{ cm}^{-1}$) と変角振動 ($\nu_2 = 667 \text{ cm}^{-1}$) による吸収である。この他に同一振動モードの倍音吸収 ($2 \times \nu_1$ など) や複数の振動モードが組み合わさった遷移 ($\nu_2 + \nu_3$ など) も存在するが、その吸収強度は小さい (結合音吸収)。

同じ分子種であっても分子を構成する同位体毎にエネルギー準位は僅かに異なる。この変化は同位体シフトと呼ばれる。調和振動子の固有振動数は、

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1-9)$$

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (1-10)$$

で表される。ここで k はばね定数、 μ は質量 m_1 、 m_2 の原子で構成される分子の換算質量である。このように、固有振動数が分子の換算質量に依存するため、同じ分子種と同じ遷移であってもその吸収周波数（波長）はシフトする。同じ遷移の場合、分子の質量数が大きくなるにつれて吸収周波数は小さい側に、波長は大きい側にシフトする。

単純な赤外吸収分光として非分散型赤外線吸収分光法（**Non-Dispersive Infra-Red Spectroscopy: NDIR**）がある。光源にレーザー光源ではなく発光ダイオードなどの比較的広帯域の光を使用し、光検出器で測定したい分子の波長を選択的に測定するため、プリズムや回折格子等で光を分散させて測定していた初期の赤外分光との対比で非分散型と呼ばれている。NDIR に基づく分析装置は今日、その単純な測定手法から二酸化炭素や水など特に大気中など自然界に存在する気体分子の分析装置として市販され、広く利用されている。

同位体分析には分子種の光吸収量の同位体依存性を利用したレーザー赤外吸収分光法（**Infra-Red Laser Absorption Spectroscopy: IRLAS**）が用いられる。同位体シフトにより、換算質量が大きいほど吸収波長は大きい側にシフトする。一般的にこのような分子吸収線における同位体シフトは 1 nm 以下であるため、光源に同位体シフトを区別できる程度に狭帯域なレーザーを使用することで同位体分析が可能となる。

^{14}C 分析のように高いアバダンス感度を必要とする場合には、光共振器を用いて IRLAS を強化した共振器強化型吸収分光（**Cavity Enhanced Absorption Spectroscopy: CEAS**）が用いられる。特に 1980 年代後半に開発された共振器内での滞在時間を測定するキャビティリングダウン分光法（**Cavity Ring-Down Spectroscopy: CRDS**）[\[44\]](#)は共振器内での滞在時間を測定することでレーザー強度の時間的変動に依存しない極めて高感度な分析を可能とした手法である。CRDS については次節で詳しく述べる。

レーザー分光に基づくその他の ^{14}C 分析手法として光ガルバノ効果を利用した内部共振光ガルバノ分光法（**Intra-Cavity Opto-Galvanic Spectroscopy: ICOGS**）[\[45\]](#)がある。光ガルバノ効果とは原子またはイオンの遷移に相当する波長の光を放電プラズマに照射したとき、原子の準位のポピュレーションに変動が生じて放電インピーダンスが変化する効果のことで、結果として放電電流・放電電圧の変化が観測される。ICOGS では二酸化炭素ガスをレーザー増幅媒質として使う

CO₂ レーザーが、同位体ごとに異なるレーザー共振（内部共振）をするという現象を利用し、¹²CO₂ レーザー、¹⁴CO₂ レーザーをそれぞれ別の測定セルに同時に入射させ、セル中の放電電圧の変化をモニタリングすることで ¹⁴C 分析を行う (Fig. 1-19)。この手法は当初、開発者のラトガス大の Murnick らにより AMS に匹敵する検出感度が実現可能であると報告されたものの、近年、その結果を否定する報告[46,47]がなされている。フローニンゲン大の Paul と Meijer、および ICOGS 開発者の Murnick のグループは共同で研究を行い、現状の検出限界がアバンドランス感度で 10⁻⁴ であり、今後さらなる最適化を行っても一桁向上が限界であると報告した[48]。

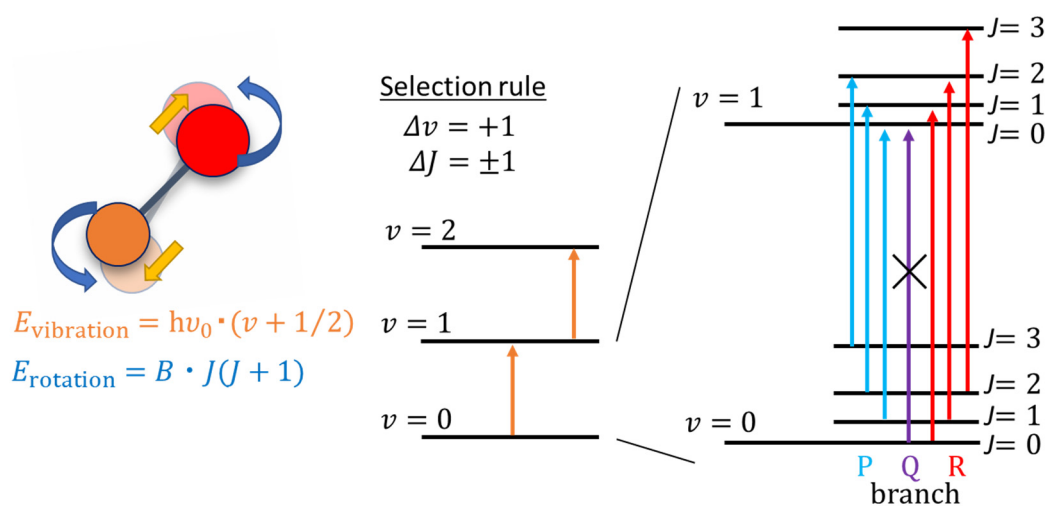


Fig. 1-17 分子の振動回転準位

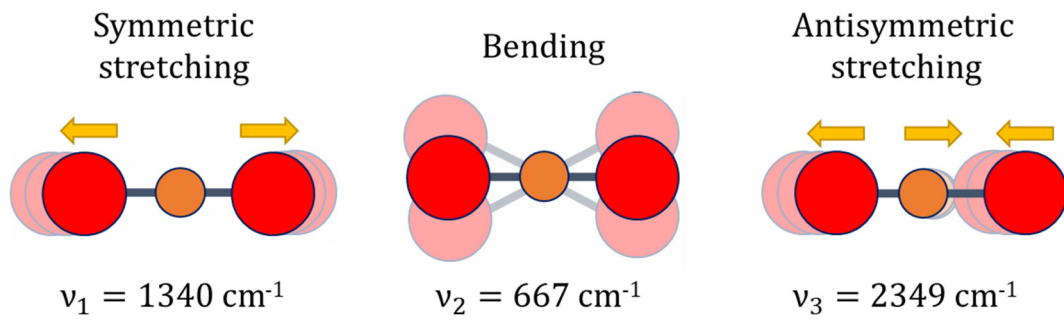


Fig. 1-18 二酸化炭素の基準振動モード
 図中値は $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の基準モード位置

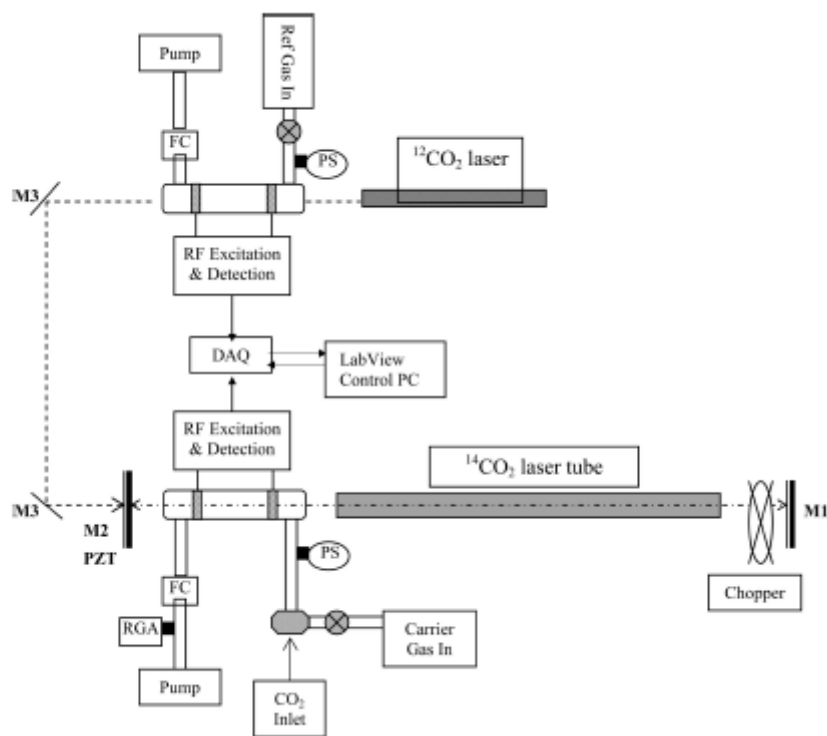


Fig. 1-19 ICOGS 測定体系[45]

1.3 キャビティリングダウン分光法とその応用

本研究では前述した生体トレーサー応用における生体試料中 ^{14}C 分析への適用に向けて、二酸化炭素の中赤外吸収と CRDS を組み合わせた測定法に着目した。CRDS は複数の高反射ミラーで構成された光共振器を用いることで数 km に及ぶ超長光路を実現した吸収分光法である。そこで本節では CRDS の原理・その微量ガス分析への応用、CRDS を用いた炭素同位体分析について記述する。

1.3.1 原理

CRDS の基本原理

Fig. 1-20 に CRDS の概要を示す。CRDS はレーザー吸収分光の一種である。一般に分子の光吸収は Beer-Lambert 則により、式(1-11)で表される。

$$I(t) = I_0 \exp(-\sigma NL) \quad (1-11)$$

ここで、 σ は光吸収断面積（分子種・波長に依存）で N は単位体積あたりの分子数（分子数密度）、 L は光路長である。単純な吸収分光では式(1-11)から、吸収物質がある場合とない場合の光強度の比を求め、吸収物質の分子数を測定する。そのため、吸収量は、光路長が長ければ長いほど大きくなる。しかし、レーザー強度は時間的に不安定なため、吸収前後のレーザー強度の測定には、レーザー強度の時間的な変動による不確かさが含まれる。光共振器により強められた CEAS においてもこの問題は無視できない。CRDS では、光強度ではなく光共振器内の光の減衰時間を測定することにより従来手法の問題を克服し、高感度な測定を可能とした。

CRDS の原理を説明するにあたって、ここでは基本的な光共振器として 2 枚のミラーが向かい合わせに配置されたファブリペロー型光共振器（Fabry-Pérot Interferometer: FPI）について述べる。FPI の基本的な特性については第 3 章 1 節にて述べる。2 枚の高反射率ミラー（反射率: $R > 99.9\%$ 以上）で構成された FPI（共振器長: L ）にレーザー（波長: λ ）を入射させる。光共振器の共鳴条件は、

$$L = n\lambda / 2 \quad (n = 1, 2, \dots) \quad (1-12)$$

と表され、共振器長が半波長の整数倍のときだけレーザー光が共振器内に蓄積される。蓄積された光はミラーの反射率に応じた透過率でその一部を放出しながら多重反射を繰り返す。ここで、共振器内の光の滞在時間よりも十分に素早く入射光を遮断することで、共振器内の光は指数関数的に減衰する。このときの減衰信号はリングダウン（Ring-down: RD）信号と呼ばれ、出力が e^{-1} 倍となる時間（減衰時定数: τ ）で特徴づけられる。共振器内に吸収物質が存在しない場合、共振器内の光の減衰はミラーの反射率が 100% でないために起こる光の損失（結

合損失)のみであると考えることができる。したがって透過光強度 $I(t)$ で表される RD 信号は

$$\begin{aligned}
 I(t) &= I_0 \exp\{-(1 \text{ 往復での反射回数}) \\
 &\quad \times (\text{反射による光の損失}) \\
 &\quad \times (\text{光の往復回数})\} \\
 &= I_0 \exp\{(-2 \times (1 - R) \times (c/2L t))\} \\
 &= I_0 \exp\{-(1 - R)(c/L)t\} \tag{1-13}
 \end{aligned}$$

となる。ここで、式(1-13)中指数部の計数はリングダウンレート: β と呼ばれ、共振器内での光の減衰率を表し、 β は τ の逆数である。また、式中 c は光速である。吸収物質がない場合の β 、および τ はミラーの反射率と共振器長によって決まり、共振器固有の減衰率 β_0 、減衰時定数 τ_0 と呼ばれる。

$$\beta_0 = 1/\tau_0 = (1 - R)c/L \tag{1-14}$$

一方、吸収物質が共振器内に存在する場合には結合損失に加えて吸収による損失(吸収損失)が存在するため、その分だけ減衰率は大きくなる。吸収損失による減衰は式(1-11)より光吸収断面積と分子数密度、光路長に依存するため、吸収物質が存在する場合の RD 信号は、式(1-15)、(1-16)により表される。

$$\begin{aligned}
 I(t) &= I_0 \exp\{-\beta_0 t \\
 &\quad + \{[-\sigma N \times (1 \text{ 往復の光路長}) \times (\text{往復回数})]\} \\
 &= I_0 \exp\{-\beta_0 t + (-\sigma N \times 2L \times (c/2L t))\} \\
 &= I_0 \exp\{-(\beta_0 + \sigma N c)t\} \\
 &= I_0 \exp\{-t/\tau\} \\
 &= I_0 \exp(-\beta t) \tag{1-15}
 \end{aligned}$$

$$\beta = \beta_0 + \sigma N c \tag{1-16}$$

以上から、吸収物質のない場合とある場合の減衰率を測定し、その差分をとることで吸収物質の数密度を求めることができる。

$$\sigma N c = \beta - \beta_0 \tag{1-17}$$

共振器内の光滞在時間より CRDS における実効的な光路長は、CEAS と同様に数 km となり、高感度な測定が実現できる。

気体分子吸収スペクトルと Voigt 関数

気体分子の赤外吸収スペクトルを計算する場合、各吸収線の中心波数、吸収線強度、半値半幅、その温度依存性を示す係数、回転遷移に関わる回転エネルギーの下位準位などの吸収パラメータが必要となり、これらより各々の吸収線を計算し、重ね合わせる方法をライン・バイ・ライン計算 (Line-by-line calculation) という。大気中に存在する分子種に限っては、吸収パラメータを高分解能吸収線データベース (High-resolution TRANsmission molecular absorption database: HITRAN) [49]より入手することができる。HITRAN は、米国空軍の地球物理研究所が 1973 年から開発している吸収線データベースで、大気中に存在する分子に限り、各々の同位体について各吸収線の中心波数、吸収線強度などの情報が記載されている。HITRAN に記載されている吸収線強度 s_{ref} は標準温度 T_0 (296 K) における強度であり、温度 T における吸収線強度 $s(T)$ は式(1-18)に示すように各種温度補正項をかけることで計算することができる。

$$s(T) = s_{\text{ref}} \frac{Q(T) B(T_0) SE(T_0)}{Q(T_0) B(T) SE(T)} \quad (1-18)$$

$Q(T)$: 分子内分配関数 (Total Internal Partition Sums: TIPS)

$$B(T) \equiv \exp\left(-\frac{hcE_j}{kT}\right): \text{ボルツマン因子}$$

$$SE(T) \equiv 1 - \exp\left(-\frac{hcv_j}{kT}\right): \text{誘導放射補正}$$

ここで k , h , c , E_j , ν_j はそれぞれボルツマン定数、プランク定数、光速、吸収線の遷移前エネルギー準位、吸収線中心波数を表す。TIPS は HITRAN の付属ファイルに同位体分子ごとに記載されており、その他の項は吸収線の遷移前エネルギー準位、吸収線中心波数が HITRAN に記載されているため計算により求めることができる。

吸収線スペクトルの広がりには、ローレンツ幅とドップラー幅が存在する。ローレンツ幅は、分子同士の衝突による吸収線の広がり (圧力広がり) を表し、圧力 P 、温度 T の空気中におけるローレンツ幅の値は、

$$\gamma_L(P, T) = \left(\frac{T_0}{T}\right)^n (\gamma_{\text{air}}(P_0, T_0)(P - P_s) + \gamma_{\text{self}}(P_0, T_0)P_s) \quad (1-19)$$

で表される。ここで γ_{air} と γ_{self} はそれぞれ基準圧力 P_0 (= 1.0 atm) ・基準温度 T_0 (= 298 K) における、空気との衝突による半値半幅、および吸収気体同士の衝突による半値半幅で、次数 n は半値半幅の温度依存性を示す係数である (共に HITRAN データベースに記載)。 P_s は吸収気体の分圧である。圧力広がりにはロー

レンツ関数で記述できる。ドップラー幅は大気分子の熱運動による吸収線の広がり（ドップラー広がり）を示し、吸収気体の分子質量を M として

$$\gamma_D(\nu_0, T) = \frac{\nu_0}{c} \sqrt{\frac{2 \ln 2 k T}{M}} \quad (1-20)$$

と表される。ドップラー広がり熱運動による広がりであるためガウス関数で記述できる。一般的に低圧・高温条件下ではドップラー広がり影響力が大きくなるといわれている。

圧力広がりドップラー広がり双方の影響を考慮したい場合、ローレンツ関数とガウス関数のコンボリューションの結果得られる関数を用いる必要がある。この関数は Voigt 関数 (Fig.1-21) と呼ばれ、

$$f_{\text{Voigt}}(\nu, \nu_0, P, T) = \frac{1}{\gamma_D} \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi}} \frac{y}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\exp(-t^2)}{y^2 + (x-t)^2} dt \quad (1-21)$$

$$x = \frac{\nu - \nu_0}{\gamma_D} \sqrt{\ln 2} \quad y = \frac{\gamma_L}{\gamma_D} \sqrt{\ln 2}$$

で表される。温度 T ・圧力 P における吸収線スペクトルは式(1-21)を用いて

$$S(N, \nu, \nu_0, P, T) = \sigma(\nu, \nu_0, P, T) \cdot Nc = s(T) \cdot f_{\text{Voigt}}(\nu, \nu_0, P, T) \cdot Nc \quad (1-22)$$

$$\sigma(\nu, \nu_0, P, T) = s(T) \cdot f_{\text{Voigt}}(\nu, \nu_0, P, T)$$

により求めることができる。Fig. 1-22 に HITRAN を元に計算された二酸化炭素の逆対称伸縮振動による振動回転遷移の吸収線 (ν_3 band) を炭素同位体毎に示す。ここで HITRAN には ^{14}C を含む二酸化炭素についての吸収線パラメータは記載されていないため、 $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の吸収線については文献値[50-52]を参照した。

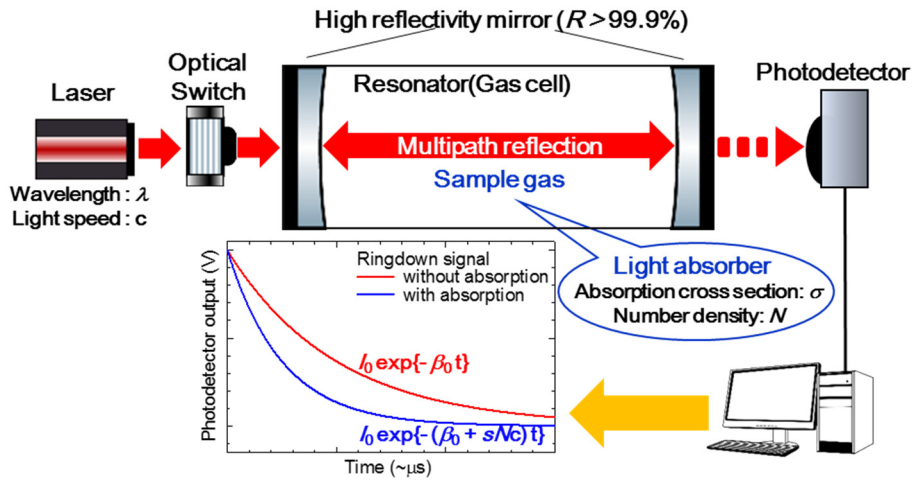


Fig. 1-20 CRDS 概要

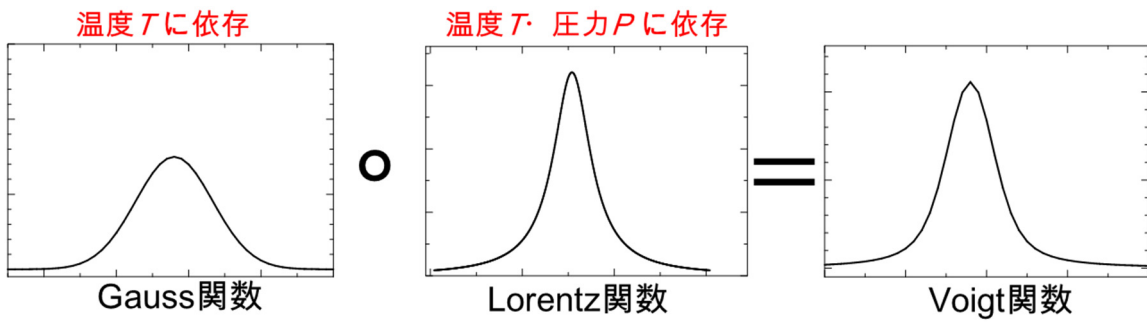


Fig. 1-21 Voigt 関数

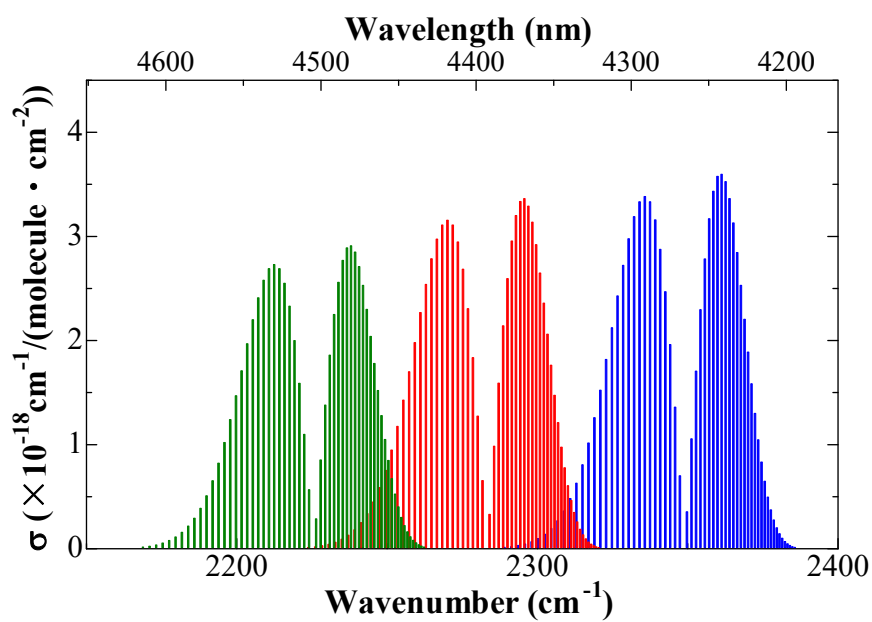


Fig. 1-22 二酸化炭素の中赤外域吸収線 ν_3 band (標準温度・標準圧力)
 縦軸はすべて同位体比を 100%とした吸収強度
 緑： $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 、赤： $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 、青： $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$

1.3.2 CRDS による微量ガス分析

CRDS は吸収分光であるが故の単純な測定原理と、高い感度から、様々な気体試料の分析に適用されている。特に、赤外域には大気中に存在する数多くの分子の高強度吸収が存在し[53] (Fig. 1-23)、微量ガス分析の有用なツールとして、赤外レーザーを用いた様々な CRDS に関する研究がされている。

CRDS を用いた気体分析のその他の例として、大気中の水の分析が挙げられる。産業総合研究所の阿部らの研究グループは半導体製造プロセスにおける環境中の水分をモル分率 10 nmol/mol の感度で測定できる測定手法の開発を目的として、コペルニクス大学と共同で CRDS に基づくガス中微量水分計を開発している [54-56]。水は大気中に大量に存在しているため、装置表面などの内部に容易に入り込み、その高い吸着性から取り除くのが困難な分子である。そのため、科学実験や製造業の分野においては不純物として問題となる場合が多い。半導体産業などのハイテク産業においては求められる水分管理レベルはガス中水分量 10 nmol/mol 以下とされる場合があるが、これを測定できる分析装置は存在していなかった。そこで CRDS に基づく測定システムが開発された。開発されたシステムでは光学カメラにより共振器からの透過光をモニタリングしながら光学系を調整することで、最適なセットアップを可能としている他、周波数安定化 HeNe レーザー、および波長計を用いて、光共振器・1.4 μm 帯分布帰還型 (Distributed Feed-Back: DFB) 半導体レーザーをそれぞれ安定化し、乾燥 N_2 中の極微量水分を sub-ppb (parts per billion = 10^{-9}) レベルで測定している。Fig. 1-24 に開発されたシステムの概要を、Fig. 1-25 にシステムにより測定された水分子の近赤外スペクトルをそれぞれ示す。

上述した近赤外 CRDS に対し、その波長を中赤外域に拡張した中赤外 CRDS は、特に量子カスケード型半導体レーザー (Quantum Cascade Laser: QCL) などの中赤外レーザー光源と中赤外域光検出器、および高反射率ミラーなどの中赤外域光学素子の発展により、近年、2 ~ 10 μm までの波長域で様々な分子種が分析されている[57-60]。一方、青 ~ 紫外の波長域には比較的質量の重い分子の吸収線が存在し、呼気中アルコール類分析計[61]や液体クロマトグラフの分光検出計[62,63]、エッチングプラズマ中のラジカル測定[64]等、CRDS に基づく様々な研究・開発がなされている他、Ti:Sa レーザーと複数回の和周波混合により生成された 197 ~ 204 nm の深紫外光を用いた CRDS が報告されている[65]。

同じ CRDS であっても測定したい対象や求められる感度などによって、使用されるレーザー光源や光共振器等が異なり、いくつかの派生が存在する。これらをまとめたものを Table 1-4 に示す。例えば使用するレーザー光源の種類により、パルスレーザーを用いた (最初期型の) CRDS、連続発振 (Continuous Wave: CW)

レーザーを用いた CRDS (CW-CRDS) と区別される。また、レーザー光源と光共振器に高い安定性を持たせ高感度化を図った Frequency Stabilized Cavity Ring-Down Spectroscopy (FS-CRDS)が存在する[66]。なお、FS-CRDS は米国 National Institute of Standards and Technology (NIST)の Long、Hodges らのグループが提唱したもので、同じような周波数安定化機構を有していても単に CW-CRDS と呼ぶ場合もある。Fig. 1-26 に典型的な FS-CRDS の概要を示す。また、一般的な CRDS ではレーザーをミラーの中心に垂直に入射させて、一つの光路で多重反射を起こさせる (On-axis 型) が、レーザーを曲率のあるミラーに対して角度をつけて入射させ、様々な光路での多重反射を起こさせる Off-axis 型の CRDS も存在する[67]。Fig. 1-27 に On-axis 型、Off-axis 型について概要を示す。光ファイバー内の光の伝搬を用いた CRDS は Fiber CRDS (または Fiber-Optic CRDS) と呼ばれる[68]。Fiber CRDS では、自由空間で構成される光共振器の代わりに、ミラーによる共振器をファイバー内に設ける、またはファイバカップラによってリング共振器を作成するなどの方法を用いてファイバ内に共振器を作成し、共振器内のセンサ部に試料を導入して CRDS を行う (Fig. 1-28)。近年注目されている光周波数コム (Optical Frequency Comb: OFC) を光共振器に入射させ吸収分光を行う手法は Cavity-Enhanced Direct Frequency Comb Spectroscopy (CE-DFCS) と呼ばれる[69,70]。Fig. 1-29 に CE-DFCS による呼気分析の概要を示す。CE-DFCS では OFC を光共振器に直接導入し、共振器からの透過光を Virtually Imaged Phased Array (VIPA) エタロン[71]と回折格子を用いて波長ごとに空間的に分離し[72,73]、CCD カメラなどの多ピクセル光学カメラやラインセンサーなどで各波長ごとの光強度を検出する。これにより、様々な分子種の吸収線を同時に取得することができる。同様の原理で各波長の減衰を測定すれば、Direct Frequency Comb CRDS (DFC-CRDS) を行える可能性がある。また、VIPA エタロン等を用いて空間的に光を波長ごとに分離する代わりに、2 本の OFC を使用し、一方を光共振器に入射させ、もう一方の OFC と空間的に同期させ、その干渉信号を高速フーリエ変換により周波数領域に変換することで吸収スペクトルを取得する Cavity-enhanced dual-comb spectroscopy [74]と呼ばれる手法もある。

Table 1-4 光共振器を用いた各分光法とその特徴

	Features	References
Pulse laser CRDS	pulse laser no optical switch	[44]
CW-CRDS	CW laser (narrow bandwidth) with optical switch	This work
FS-CRDS	CW laser +highly stable cavity with frequency stabilization	[66]
Off-axis CRDS	off-axis laser injection for etalon effect suppression	[67]
Fiber CRDS	cavity inside of the optical fiber for micro sensing techniques	[68]
CE-DFCS	frequency comb for CEAS probe laser + mode separation (Grating, VIPA)	[69, 70]
DFC-CRDS	frequency comb for CRDS probe laser + mode separation (Grating, VIPA)	

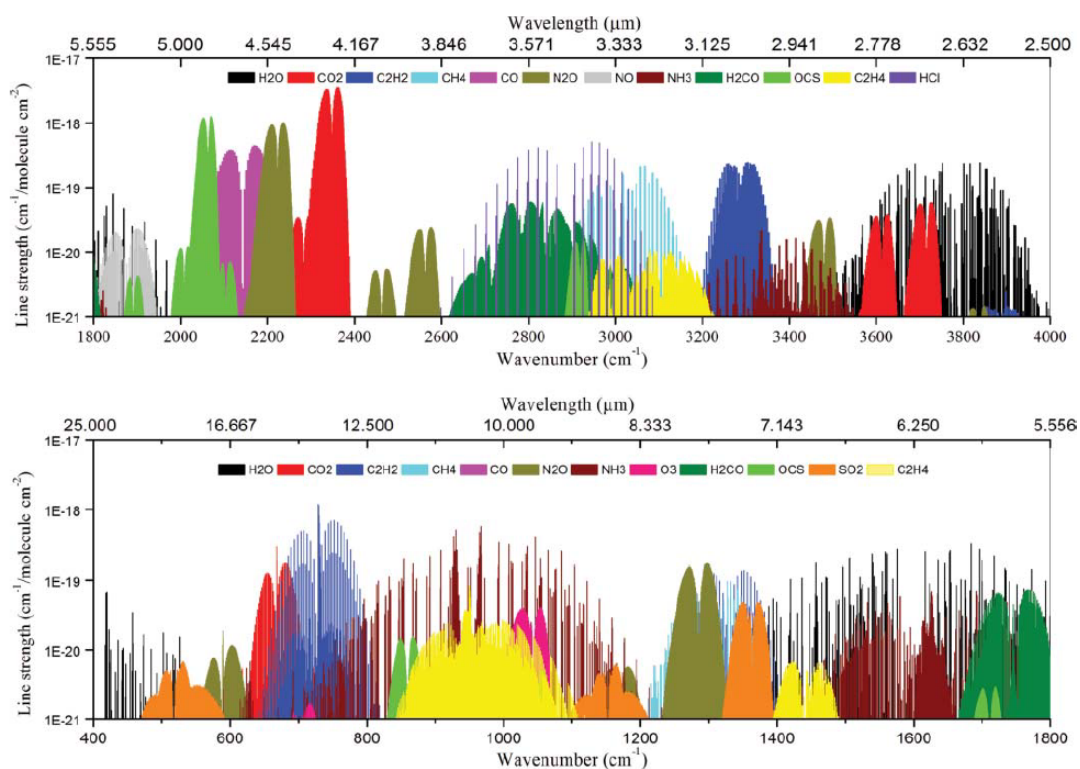


Fig. 1-23 種々の大気分子種の赤外吸収スペクトル[53]

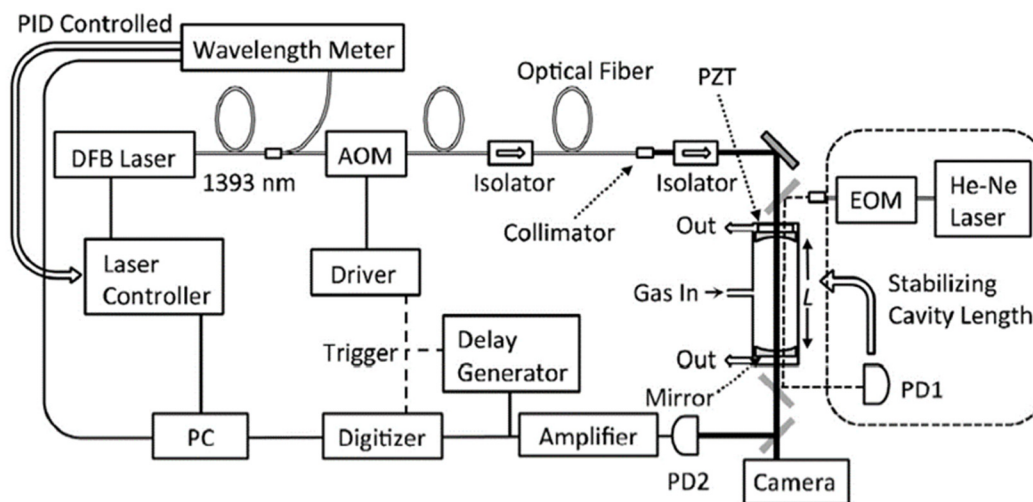


Fig. 1-24 ガス中微量水分計の概要[55]

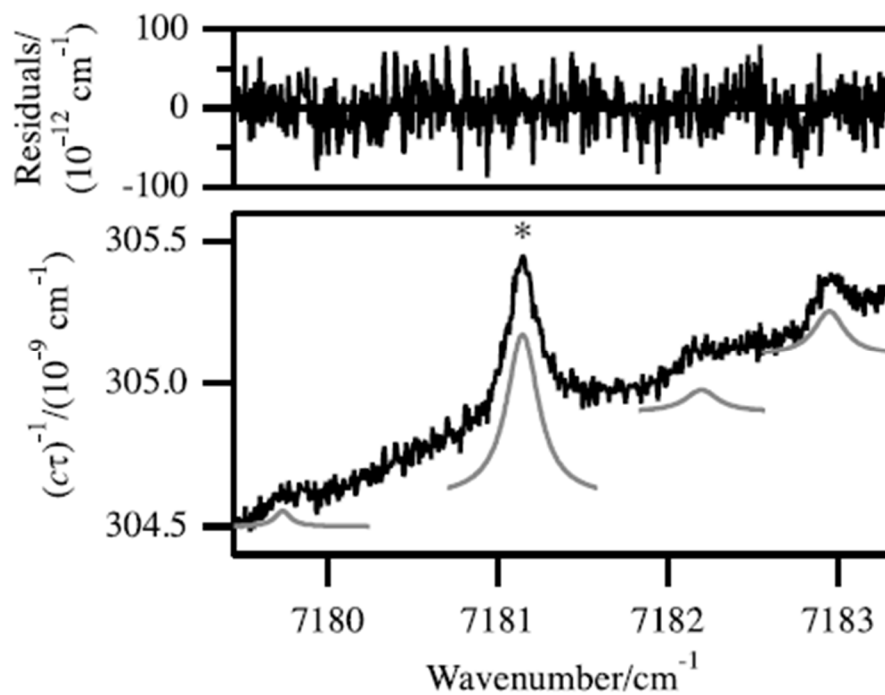


Fig. 1-25 乾燥 N₂ ガス中微量水分の検出[55]

*で示されたピークが水の吸収ピーク
測定されたガス中水濃度は 0.56 nmol/mol

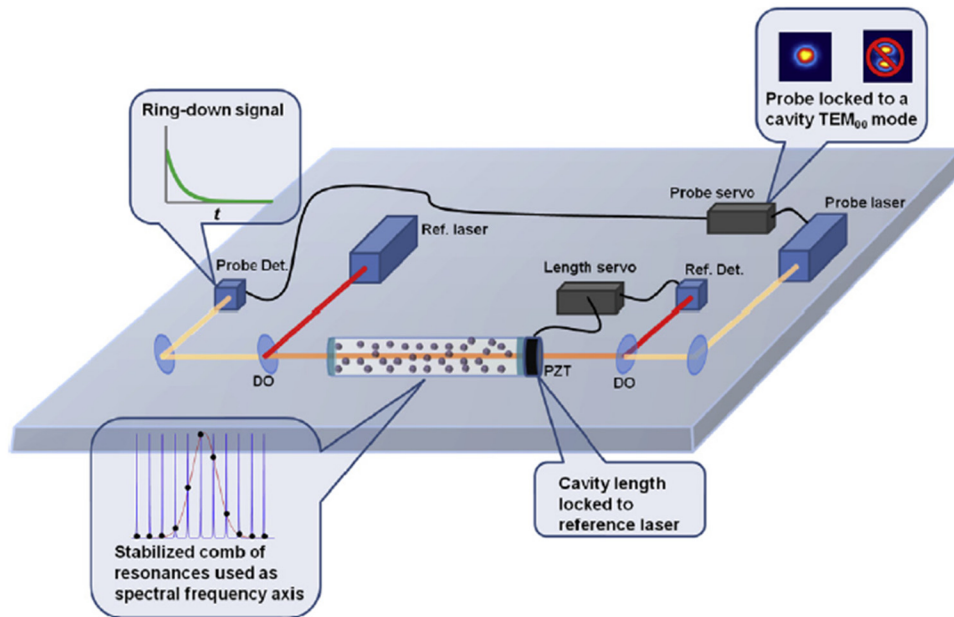


Fig. 1-26 FS-CRDS 概要 [66]

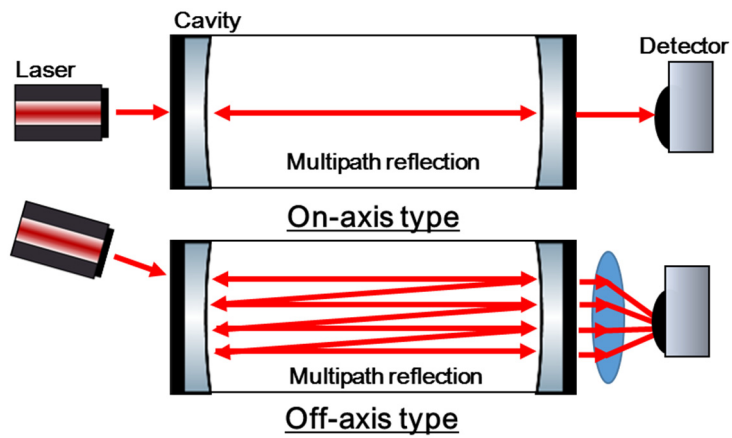


Fig. 1-27 On-axis 型 (上) と Off-axis 型 (下) の CRDS

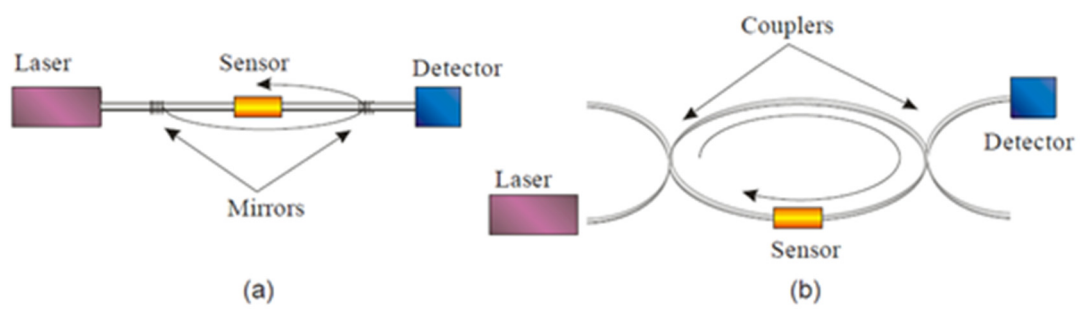


Fig. 1-28 Fiber CRDS 概要[68]
 (a)線形共振器 (b)リング共振器

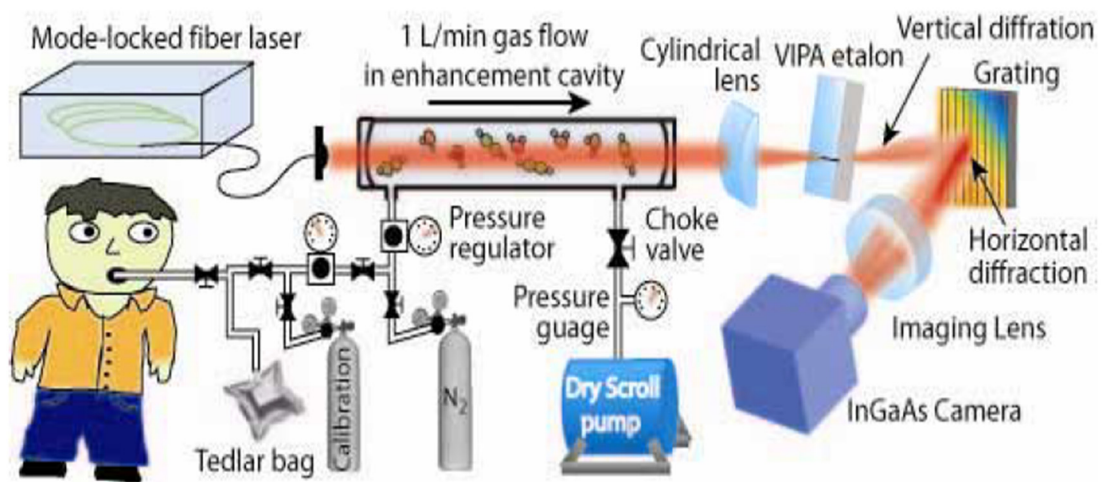


Fig. 1-29 CE-DFCS による呼気分析概要[69]

1.3.3 CRDS を用いた安定・放射性炭素同位体分析

ここまで本節では、CRDS の原理、および微量ガス分析への応用について詳述してきたが、本節最後の締めくくりとして、本研究の目的である CRDS に基づく炭素同位体、特に二酸化炭素の分析に関して、いくつかの例を挙げて紹介したい。

安定炭素同位体分析

安定炭素 (^{12}C ・ ^{13}C) を含む二酸化炭素を分析する CRDS 分析装置には米国の Picarro 社によるものがあり、安定炭素同位体比の高精度分析に関する報告がなされている[75]。医療の分野ではピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) 感染診断法の一つである尿素呼気診断法[76]に適用されている。尿素呼気診断法とは、ピロリ菌が持つウレアーゼという酵素が胃の中で尿素をアンモニアと二酸化炭素に分解することを利用して、 ^{13}C で標識された尿素検査薬を服用し、呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ 同位体比を測定することでピロリ菌感染の有無を判別するという方法である (Fig. 1-30)。CRDS による人体呼気中の $^{13}\text{CO}_2$ 同位体比を測定した例として Crosson らによるものがある[77]。光共振器には反射率 99.996% の高反射率ミラー3 枚により構成されるトライアングル型を採用し、レーザー光源には 1.6 μm 帯の外部共振型半導体レーザー (External Cavity Diode Laser: ECDL) が用いられた。Fig. 1-31 に実験体系を示す。

放射性炭素同位体分析

CRDS に基づいた ^{14}C 分析は世界的に以下のグループらによって報告されている。ここではそれぞれについて簡単に紹介する。

① 名古屋大学富田らのグループ (日本・名古屋、本研究による成果) [78-81]

原子力施設の廃止措置に伴う ^{14}C 分析に対し、CRDS を適用することを 2008 年に提案した。 ^{14}C 分析のための対象分子種として $^{14}\text{CO}_2$ を選定し、波長帯は 4.5 μm を用いることが有望であることが示された。その後、医薬品開発における MD 試験への適用に向けた ^{14}C 分析装置開発プロジェクトとして、CRDS に基づく生体試料中 ^{14}C 分析システム (^{14}C -CRDS) の開発が進められた。2018 年には開発された ^{14}C -CRDS システムによる生体試料中 ^{14}C 分析実験と動物薬物動態評価実証実験の結果が報告された。

② 伊国立光学研究所 Galli らのグループ (イタリア・フィレンツェ) [82-86]

CRDS に基づく ^{14}C 分析として飽和吸収キャビティリングダウン分光法 (Saturated-absorption Cavity Ring-down spectroscopy: SCAR) を開発し、2019 年 5 月時点では最も高い感度を達成している研究グループである。SCAR では高光子密度の赤外線レーザーを使うことで、二酸化炭素の振動回転遷移を飽和、すなわち光の吸収を飽和させる。ここで、飽和による光の吸収の減少は、光軸方向に速度成分を持たない分子のみが寄与するので、気体の運動に起因するドップラー広がりの影響を受けない極めて分解能の高い吸収の変化 (飽和吸収) が実現でき、これを非常に精密な絶対尺度として CRDS に適用することができる。CRDS において吸収の飽和は RD 信号中に振動として現れる (Fig. 1-32)。RD 信号の指数関数フィッティングに飽和による影響を加えることで飽和の影響を考慮することが可能となる。レーザー光源は 1064 nm の Nd:YAG レーザーと、834 ~ 862 nm の ECDL から差周波発生させた 3850 ~ 4540 nm の Ti:Sa 内部共振器差周波光源を用いている。Nd:YAG レーザーと ECDL はいずれも OFC で高安定に周波数ロックさせ、差周波発生に LiNbO₃ リッジ導波路を用いることで 4510 nm で 30 mW 以上という高出力な連続レーザー光の発振を実現している。共振器・ガスセルは $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の吸収線の影響を低減させるためドライアイスによって 195 K まで冷却され、ガスセル内圧力は N₂O の吸収線の影響を低減させるために 11.6 mbar に調節されている。2013 年の報告によると、天然同位体比である 1.2×10^{-12} より 2 桁小さい 4.3×10^{-14} の検出限界が達成されていて、これは 28,000 年前までの年代測定が可能であることを示している。また、2016 年にはレーザー光源に QCL を用い、OFC の代わりに参照セル中 N₂O の吸収線に周波数ロックしたもう一台の QCL (QCL2) を使用することで 5×10^{-15} という AMS に匹敵する検出限界をもつ、よりコンパクトな測定システムが報告されている (Fig. 1-33)。ここでは、2 台の QCL のビート信号を取得し、その周波数を用いて光共振器で安定化したうえで、プローブレーザーである QCL1 の発振周波数を、Pound-Drever-Hall 法 (PDH 法) によって光共振器の共鳴条件にロックしている。

③ ヘルシンキ大学・Genoud らのグループ (フィンランド・ヘルシンキ) [87]

中赤外光源として QCL を用いた CRDS による濃縮 ^{14}C 分析が報告されている。実験体系は Galli らの体系と比べ非常にシンプルである。光源と

して浜松ホトニクス製の QCL を用い、この光源からの 3 mW の光を反射率 ~99.98% の 2 枚の高反射率ミラーからなる長さ 40 cm の共振器ガスセルに入射させ、共振器から出た光を赤外光検出器にて検出する。RD 信号は、レーザー電流を高速で変調することにより取得している。測定試料として 1.0×10^{-9} まで濃縮した $^{14}\text{CO}_2$ 試料を用い、圧力 20 mbar にてスペクトルを取得した。また、ガスセル温度はコントロールされておらず、室温で測定が行われた。Fig. 1-34、Fig. 1-35 に得られた結果を示す。結果より見積もられた検出感度は 1.0×10^{-11} 程度であると報告されている。

- ④ ローレンス・リバモア国立研究所 (Lawrence Livermore National Laboratory: LLNL) ・ McCartt らのグループ (アメリカ・リバモア) [88-91] (※スタンフォード大学で Ph.D. を取得した A. D. McCartt は、その後共同研究を行っていた LLNL に所属し、引き続き CRDS に基づく ^{14}C 分析の開発に携わっている)

^{14}C 測定に向けた低温用 CRDS 装置を開発され、室温と低温にて行った ^{14}C 分析が報告されている。開発された測定の概要を Fig. 1-36 に示す。光学系はシンプルなものだが、トライアングル型の共振器ガスセルがそのまま冷凍機のなかに置かれている点、 piezoelectric アクチュエータのクリープ現象を抑制する新たな共振器長の制御法を採用している点が特徴である。piezoelectric アクチュエータのクリープ現象とは piezoelectric アクチュエータに同じ電圧を印加し続けた場合であっても、時間経過とともに伸び量が安定せず変化してしまう現象のことである。CRDS においては、クリープ現象により共振器長が微小に変化してしまい、共振器内で共振する波長が測定中に変化することを意味し、測定の不確かさの要因となる。この手法では測定したい吸収線とその近傍の大きな吸収に合わせて、2~4 つの共振器長が採用され、測定中は共振器長が常に一定になるような制御がかけられている。以下に開発された共振器長制御法の手順を簡単に説明する。まず、ある共振器長でレーザーの波長をスキャンし、測定された共振器の FSR (Free Spectral Range) から共振器長を推定する。次に、大きな吸収ピークの裾 (ウィング) の位置にレーザーの波長を合わせ、減衰率を 1,000 信号程度取得する。ウィングではクリープ現象による共振器長の変化は減衰率の大きな変化として観測される。この変化はクリープ現象が単純な対数モデルで表現できるため、対数関数に従う。したがって大きな吸収ピークのウィングの位置でクリープ現象の特性を評価し、その影響がキャンセルされるような電圧を piezoelectric アクチュエータに

加え続けることで共振器長を一定に保つことが可能となる。共振器長が一定に保たれている状態でレーザーの波長をスキャンし、測定範囲の吸収スペクトルを取得する。その後、共振器長を変化させ、次に参照となる吸収ピークのウィングにて同様の処理を行う。この手法は PDH 法と比較すると非常に安価に実現することが可能な一方で、Galli らの測定体系のような高安定なレーザーを用いた PDH 法ほど高精度な制御は難しく、測定できる波長間隔が共振器の FSR によって制限され、通常よりも測定に時間がかかるといった欠点が存在する。Fig. 1-37 に開発された測定装置で測定されたスペクトルを、Fig. 1-38 に AMS との比較結果を示す。結果から、検出限界は $0.367 \text{ F}^{14}\text{C}$ ($1 \text{ F}^{14}\text{C} = 1.176 \times 10^{-12}$) と評価された。また開発された CRDS 装置を使用した生体試料中の ^{14}C 分析が、同様に AMS による ^{14}C 分析との比較とともに報告されている。生体試料として ^{14}C で標識されたモルモットからの血漿と肝臓中の ^{14}C が分析されている (Fig.1-39)。

本研究成果をもとに、米国カリフォルニア州に籍を置く Picarro 社が、 $^{14}\text{CO}_2$ を分析する CRDS 装置の実用化に向け動き始めている。2018 年 10 月には LLNL による報告を参照しつつ、Picarro 製 CRDS 分析装置を使用した薬物動態評価の実証実験が、スイスの Roche Innovation Center Basel により、CRDS と AMS の測定結果比較と合わせて報告されている [92]。本報告は、微量 ^{14}C 標識と CRDS を、抗体の薬物動態や生体内分布の研究における高感度なアプローチであり、新薬の薬物動態学・薬力学を理解するための重要なツールであるとしたうえで、Anti-IL17 IgG1 抗体を ^{14}C -標識プロピオン酸塩 ($[^{14}\text{C}]\text{NSP}$) によりラベリングし、 77.7 Bq/kg ($= 2.1 \text{ nCi/kg}$) の放射エネルギーでマウスに投与した。マウスからの血漿や組織を測定試料として、 ^{14}C 分析を行った。CRDS による測定結果は AMS によるものと同様であった。

- ⑤ アメリカ国立標準技術研究所 (NIST) ・ Fleisher、Long、Hodges らのグループ (アメリカ・リバモア) [93]

FS-CRDS を提案し、もともと高感度・高安定な CRDS に関する知見を有していた NIST の研究グループも同様、安定炭素を含む二酸化炭素の分析に加えて 2017 年に $^{14}\text{CO}_2$ を CRDS により分析した結果を報告している。本システムの特徴は、DFB-QCL ・ AOM ・ 波長計などのシンプルな構成に加えて、光共振器からの透過光を超低ノイズ中赤外 InSb カメラにより 2D イメージとして取得し、減衰率を評価するとともに、共振器の

TEM₀₀ モードで共振し続けるようにレーザー電流をフィードバック制御している点である。また、光共振器はインバーロッド (Invar rod) によりその長さを安定化し、片方の高反射率ミラーに取り付けたピエゾアクチュエータにより共振器長を変化させることができる。Fig. 1-40 に取得されたスペクトルを示す。結果より、 $F^{14}\text{C} < 1$ の ^{14}C 分析を実証した。また、不確かさは $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 130 \text{ fmol/mol}$ ($= 0.11 F^{14}\text{C}$) と評価された。

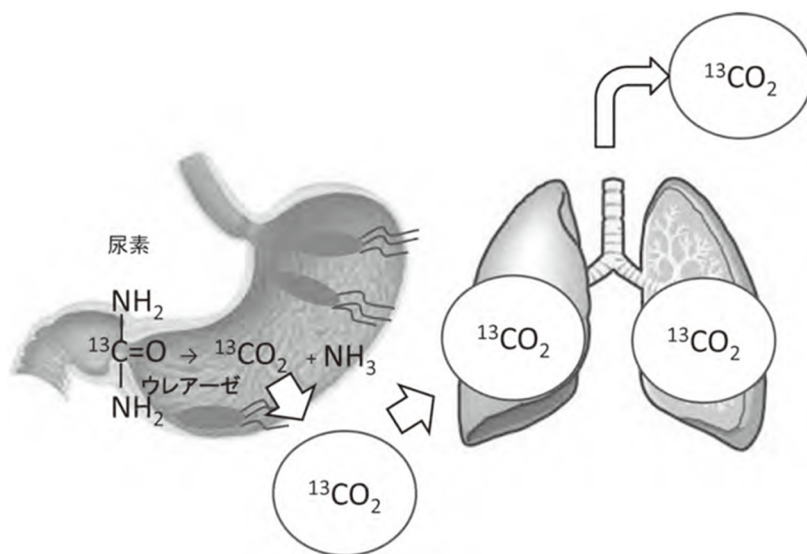


Fig. 1-30 尿素呼気試験法[76]

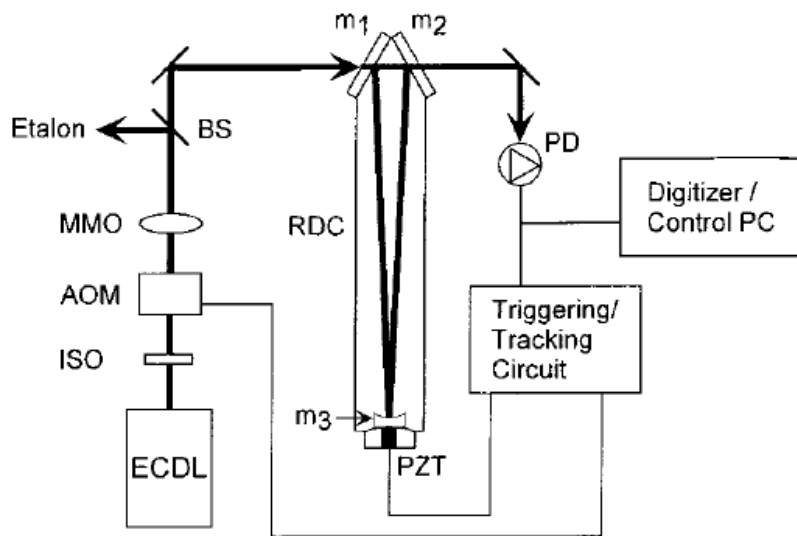


Fig. 1-31 呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 測定体系[77]

ISO: 光アイソレーター AOM: 音響光学変調器
 MMO: モードマッチング光学系 BS: ビームスプリッター
 RDC: リングダウン共振器 PZT: ピエゾアクチュエーター
 PD: フォトダイオード

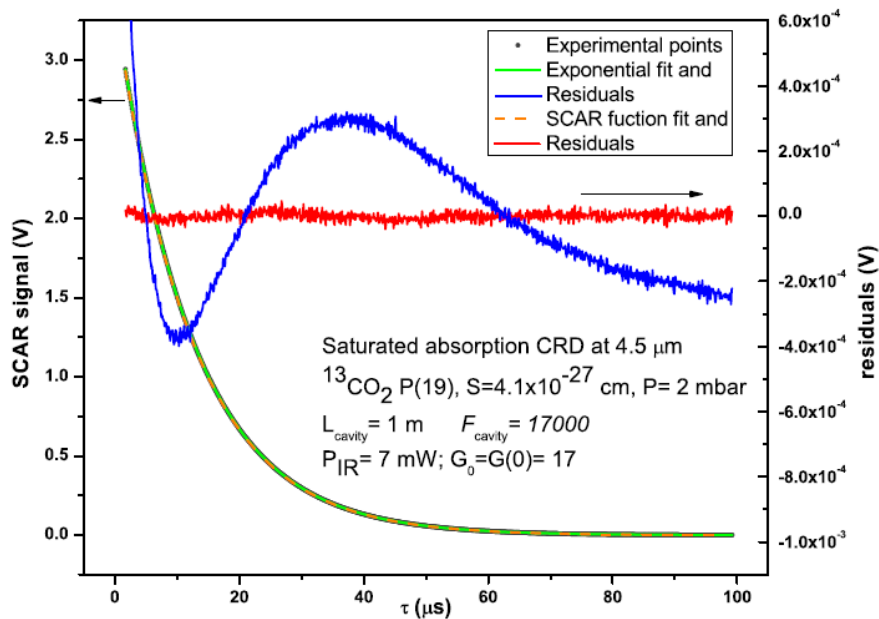


Fig. 1-32 リングダウン信号と飽和の影響[83]

黒点：実験値

緑線：通常の指数関数フィッティング

赤線：通常の指数関数フィッティングの残差

オレンジ点線：飽和を考慮したフィッティング

青線：飽和を考慮したフィッティングの残差

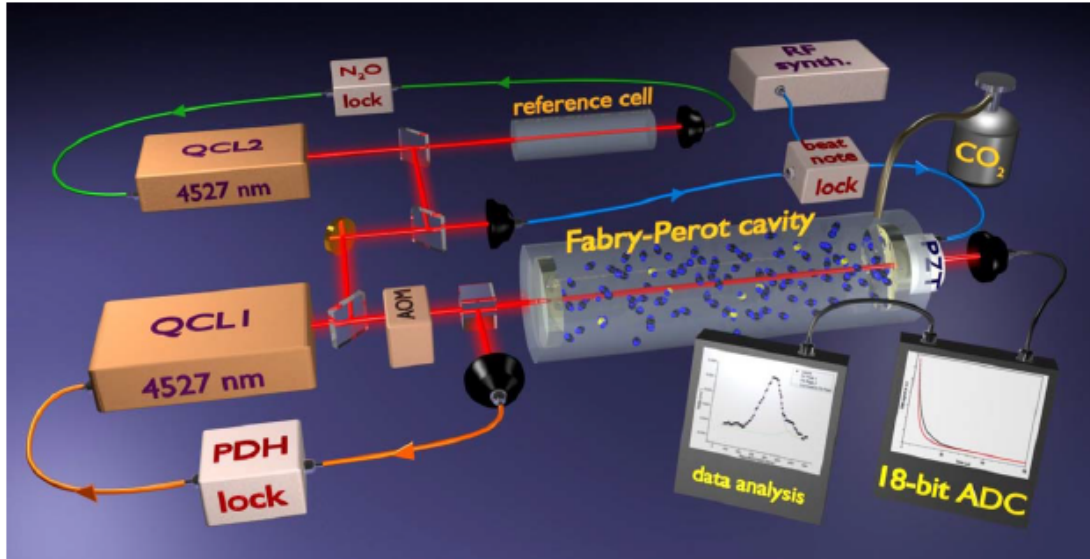


Fig. 1-33 QCL を使用した SCAR 測定体系[85]

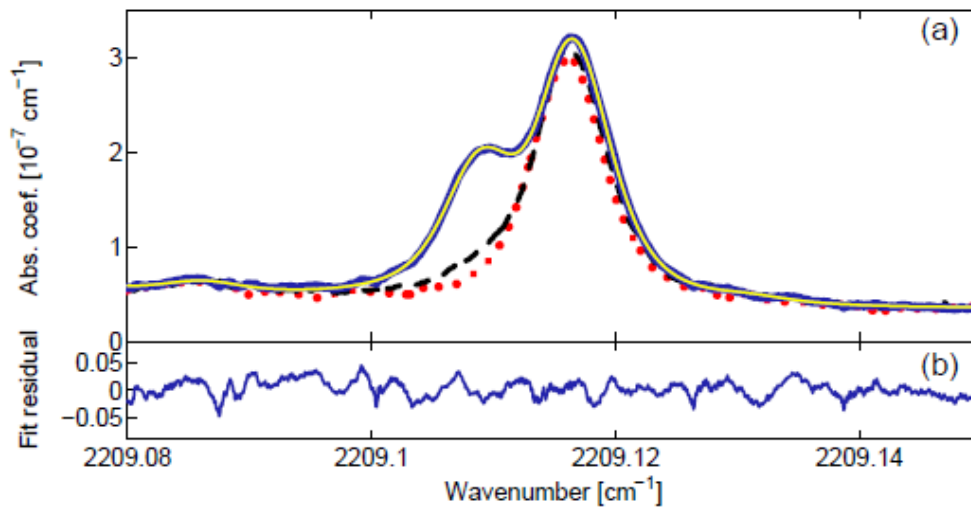


Fig. 1-34 ヘルシンキ大 Genoud により測定された ¹⁴C¹⁶O₂ スペクトル[87]

- (a) 青線: 1.0×10^{-9} の ¹⁴C が含まれた二酸化炭素試料の測定結果
- 赤点線: ¹⁴C で標識されていない二酸化炭素試料の測定結果
- 黒点線: 1.1×10^{-10} の ¹⁴C が含まれた二酸化炭素試料の測定結果
- 黄線: 青線のフィッティング
- (b) フィッティング残差

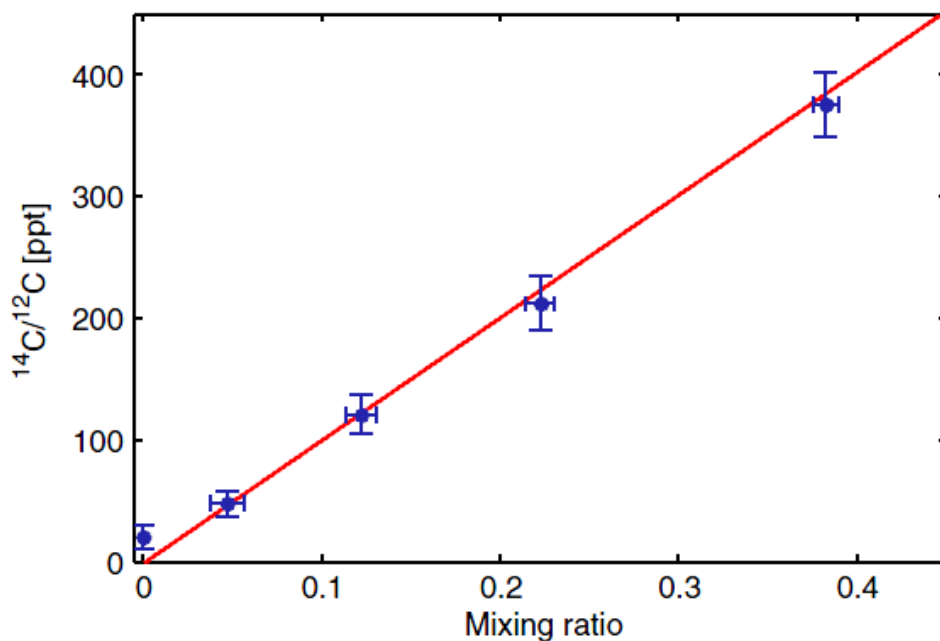


Fig. 1-35 測定により評価された ^{14}C 比[87]
 縦軸の同位対比は測定されたスペクトルのエリア値から評価

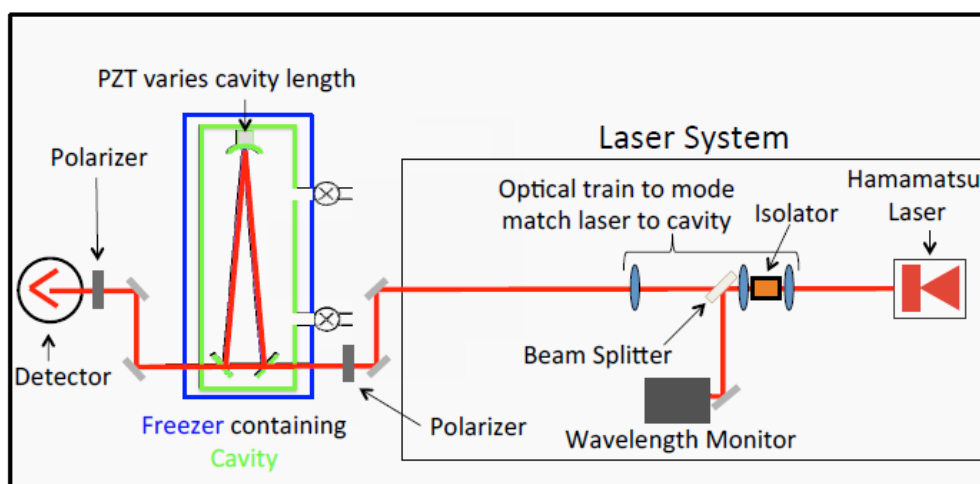


Fig. 1-36 LLNL による CRDS に基づく ^{14}C 分析装置[90]

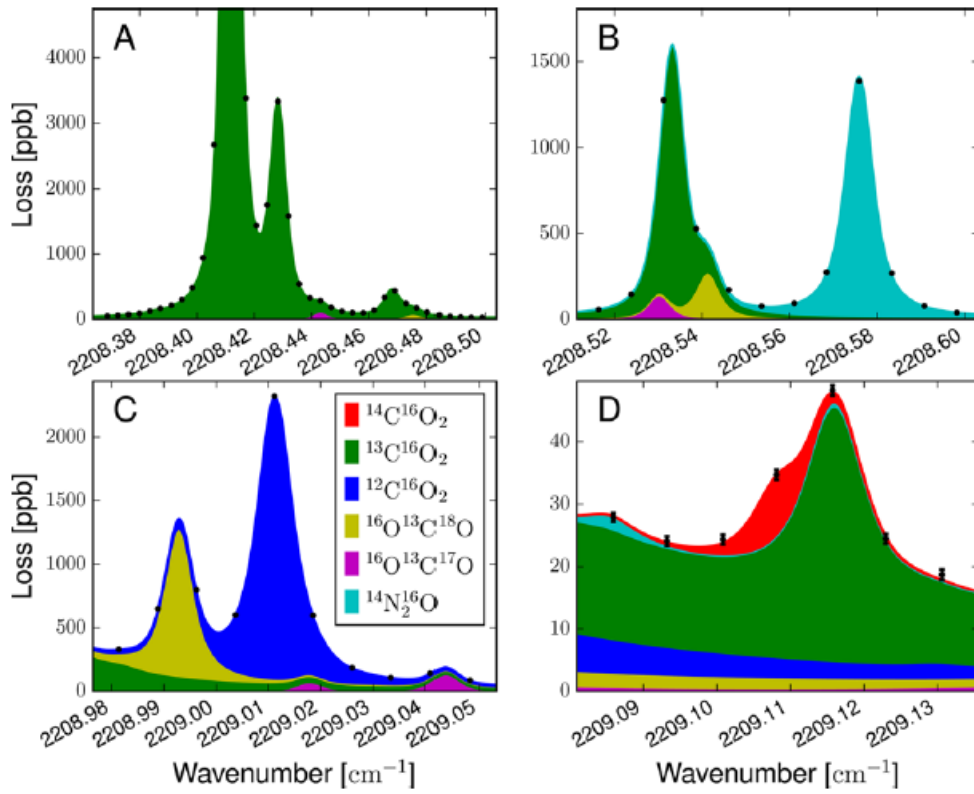


Fig. 1-37 McCartt により取得された吸収スペクトル[90]

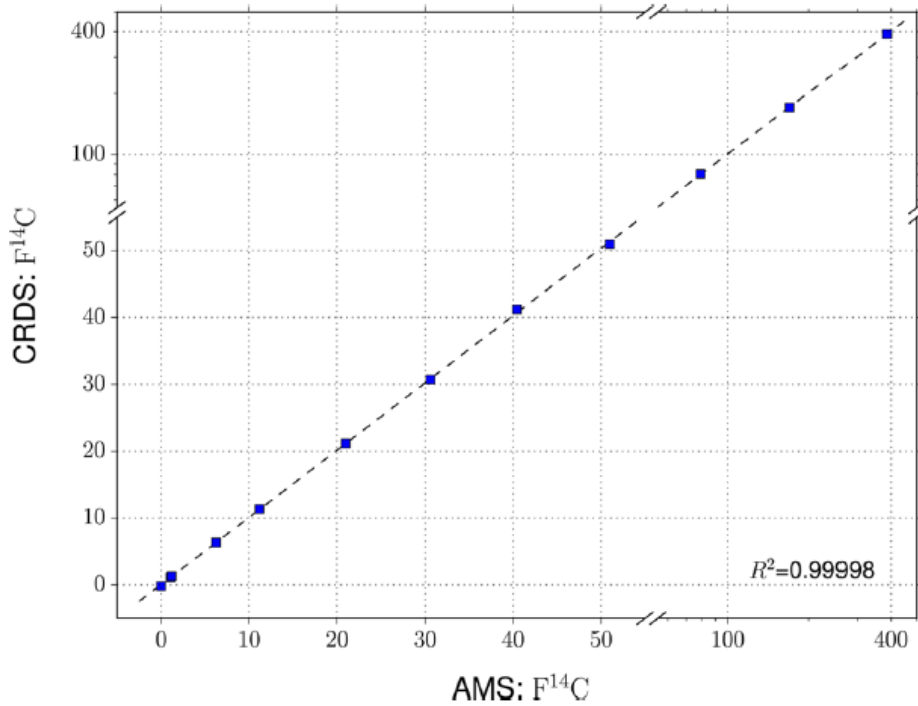


Fig. 1-38 AMS との比較結果[90]

図中 $F^{14}C = 1.176 \times 10^{-12}$

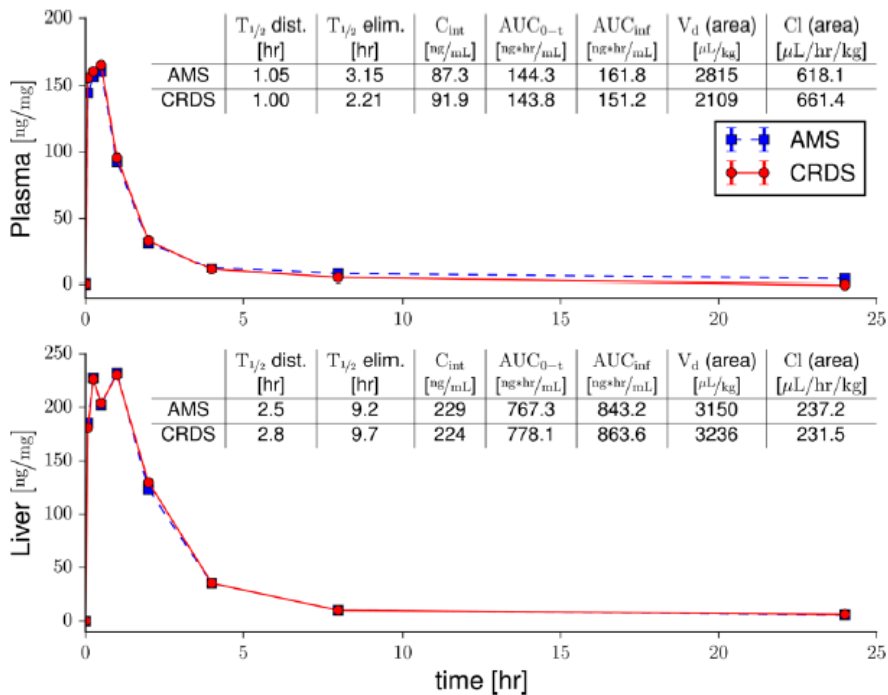
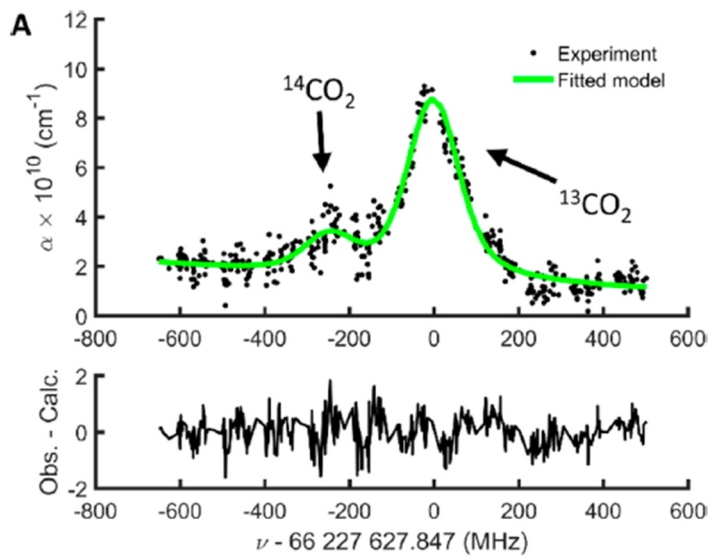


Fig. 1-39 生体試料中 ^{14}C 量の時間変化[90]
 横軸は ^{14}C で標識された時間からの経過時間



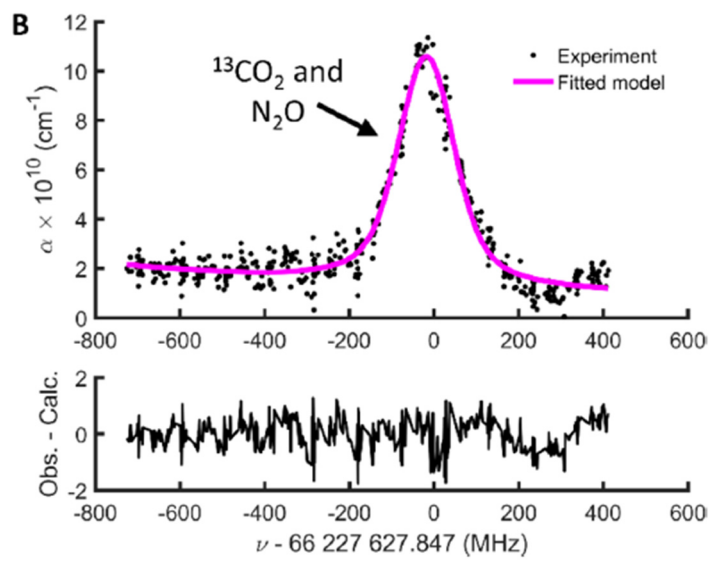


Fig. 1-40 Fleisher により測定された吸収スペクトル[90]
 A: $^{14}\text{CO}_2$ と $^{13}\text{CO}_2$ 領域 B: $^{13}\text{CO}_2$ と N_2O の領域

1.4 本研究の目的と本論文の構成

放射性同位体である ^{14}C は、半減期 5730 年の β 崩壊核種であり、天然存在比は $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 10^{-12}$ 程度と非常に少ない。このような性質から、考古学や地質学における放射性炭素年代測定その他、環境学・医学・農学など幅広い領域において利用されている。一方で、天然存在比程度の ^{14}C を分析できる手法は AMS しか存在せず、より迅速・簡便かつ高スループットな高感度 ^{14}C 分析法が確立されれば、環境・生体トレーサーをはじめとする様々な応用に適用が見込める。

そこで本研究では、高感度レーザー吸収分光であるキャビティリングダウン分光法 (CRDS) と ^{14}C を含む二酸化炭素の中赤外域基本音吸収を組み合わせた手法に着目し、環境・生体トレーサー応用に求められる分析性能 (第 2 章にて議論) の観点から、 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 10^{-11}$ レベルのアバンダンス感度を有する生体試料中 ^{14}C 分析システムの開発を行った。また、高感度化に関する取り組みとしてバックグラウンドノイズ低減法・レーザー周波数安定化法の開発を行い、分析性能の評価と応用実証を通して、本手法のトレーサー応用への適用性を明らかにすることにした。具体的には、トレーサー応用に求められる感度 ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 10^{-11}$ レベル)・スループット (測定時間 15 分程度) を有し、前処理を必要とすることなく簡便に測定可能であること、多様な生体試料を測定可能であることを示し、トレーサー応用における本手法の有用性を明らかにすることを目的とした。前節で取り上げた既往研究に対し、本研究は、環境・生体トレーサー応用への適用を念頭に、より簡便なシステムで上記を実現し、複数領域のトレーサー応用実証を行った。

本論文は全 6 章で構成される。

第 1 章では、 ^{14}C 分析の利用とニーズ、既往の ^{14}C 分析手法として放射線計測・質量分析・レーザー分光による手法を挙げ、CRDS の原理とその微量ガス分析について説明し、本研究の目的を説明した。

第 2 章では、生体試料中放射性炭素同位体分析における測定試料について明らかとし、分析システムの要素部品や技術について項目別に開発し、特に効率的な試料導入法に関する開発を行った上で、試料中 ^{14}C 由来の吸収スペクトルを取得する体系 (^{14}C -CRDS 分析システム) を構築する。

第 3 章では、CRDS 測定において分析感度・分析精度がどのような要因で制限されるかについて説明し、第 2 章において開発された ^{14}C -CRDS 分析システムの高感度化、性能向上に関する研究として、バックグラウンド抑制法の開発、中赤外半導体レーザーの発振周波数安定化法の開発について述べる。

第 4 章では、第 2 章・第 3 章にて構築された ^{14}C -CRDS 分析システムを用いて、 ^{14}C 標準試料を分析し、 ^{14}C 同位体比を測定することで定量性とアバンダン

ス感度を評価する。また、ヒト生体試料に ^{14}C 標識グルコースを添加した模擬生体試料を用いた基礎実験を行い、生体試料中の ^{14}C 分析を実証する。

第 5 章では、医薬品開発領域・植物生理学における ^{14}C トレーサー応用に着目し、それぞれ実試料分析を行うことで本手法の複数領域への応用実証を行う。具体的には、 ^{14}C 標識医薬品成分化合物の動物中排泄評価実験を行い、既存の分析手法との結果比較を行う。また、植物生理学における ^{14}C トレーサー応用実証として、植物試料測定用の試料導入部、 ^{14}C 植物ラベリングシステムを構築し、 ^{14}C 標識イネの炭素動態評価実験を行う。これらの応用実証を通して、 ^{14}C -CRDS 分析システムの生体・環境中トレーサー応用における有用性を示す。

第 6 章では、本研究の結論と今後の展望について述べる。

参考文献

第1章

- [1] I. Kola, J Landis, “Can the Pharmaceutical Industry Reduce Attrition Rates?”, *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, 711-716 (2004).
- [2] 医薬産業政策研究所、「医薬品開発の期間と費用」、*JPMA News Letter*、No. 136 (2010).
- [3] 中島栄一、「ヒトにおける放射性薬物動態 (hot ADME) 試験—日本における現状と将来—」、*Radioisotopes*、第 54 卷第 8 号、p. 337-345 (2005).
- [4] J. Strong, *et al.*, “Absolute Bioavailability in Man of N-Acetylprocainamide Determined by a Novel Stable Isotope Method”, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **18**, 613-622 (1975).
- [5] M. Acharya, *et al.*, “A phase I, Open-label, Single-dose, Mass Balance Study of ¹⁴C-labeled Abiraterone Acetate in Healthy Male Subjects”, *Xenobiotica*, **43**, 379-389 (2013).
- [6] 厚生労働省、「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス」(2006).
- [7] ICRP, “Age-dependent Doses to the Members of the Public from Intake of Radionuclides - Part 5 Compilation of Ingestion and Inhalation Coefficients. ICRP Publication 72”, *Ann. ICRP*, **26**, 1 (1995).
- [8] 文部科学省、「放射線等に関する副読本」(2011).
- [9] Z. Tozuka, *et al.*, “Microdose Study of ¹⁴C-Acetaminophen with Accelerator Mass Spectrometry to Examine Pharmacokinetics of Parent Drug and Metabolites in Healthy Subjects”, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **88**, 824-830 (2010).
- [10] A. Hirose, *et al.*, “Development of a ¹⁴C Detectable Real-time Radioisotope Imaging System for Plants Under Intermittent Light Environment”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **296**, 417-422 (2013).
- [11] R. Sugita, *et al.*, “Nondestructive Real-time Radioisotope Imaging System for Visualizing ¹⁴C-labeled Chemicals Supplied as CO₂ in Plants using *Arabidopsis Thaliana*”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **298**, 1411-1416 (2013).
- [12] M. Teramoto, *et al.*, “Transfer of ¹⁴C-Photosynthate to the Sporocarp of an Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria Amethystina*.”, *Mycorrhiza*, **22**, 219-225 (2012).
- [13] B. Singh, *et al.*, “¹⁴CO₂ Labeling: a Reliable Technique for Rapid Measurement of Total Root Exudation Capacity and Vascular Sap Flow in Crop Plants”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **302**, 1315-1320 (2013).

- [14] R. Remus, *et al.*, “Determining the Timepoint when ^{14}C Tracer Accurately Reflect Photosynthate Use in the Plant-Soil System”, *Plant and Soil*, **408**, 457-474 (2016).
- [15] M. Werth, Y. Kuzyakov, “Root-Derived Carbon in Soil Respiration and Microbial Biomass Determined by ^{14}C and ^{13}C ”, *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 625-637 (2008).
- [16] Q. Hua, M. Barbetti, “Review of Tropospheric Bomb ^{14}C Data for Carbon Cycle Modeling and Age Calibration Purposes”, *Radiocarbon*, **46**, 1273-1298 (2004).
- [17] Y. Morino, *et al.*, “Contrasting Diurnal Variations in Fossil and Nonfossil Secondary Organic Aerosol in Urban Outflow, Japan.”, *Environmental Science & Technology*, **44**, 8581-8586 (2010).
- [18] 高橋克行ら、「北関東における微小粒子状物質のレセプターモデルと放射性炭素同位体比を組み合わせた発生源寄与率推定」、*大気環境学会誌*第46巻第3号、p. 156-163 (2011).
- [19] A. Fushimi, *et al.*, “Radiocarbon (^{14}C) Diurnal Variations in Fine Particles at Sites Downwind from Tokyo, Japan in Summer.” *Environmental Science & Technology*, **45**, 6784-6792 (2011).
- [20] E. R. M. Druffel, *et al.*, “Radiocarbon in Dissolved Organic Carbon of the Atlantic Ocean.”, *Geophysical Research Letters*, **43**, 5279-5286 (2016).
- [21] S. Rella, M. Uchida, “A Southern Ocean Trigger for Northwest Pacific Ventilation during the Holocene?”, *Scientific Reports*, **4**, 4046 (2014).
- [22] W. Kutschera, *et al.*, “The Tyrolean Iceman and His Glacial Environment During the Holocene.”, *Radiocarbon*, **59**, 395-405 (2016).
- [23] P. R. Nigst, *et al.*, “Early Modern Human Settlement of Europe North of the Alps Occurred 43,500 Years Ago in a Cold Steppe-type Environment”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 14394-14399 (2014).
- [24] X. Hou, “Rapid Analysis of ^{14}C and ^3H in Graphite and Concrete for Decommissioning of Nuclear Reactor”, *Applied Radiation and Isotopes*, **62**, 871-882 (2008).
- [25] W. F. Libby, *et al.*, “Age Determination by Radiocarbon Content: World-wide Assay of Natural Radiocarbon”, *Science*, **109**, 227-228 (1949).
- [26] C. B. Ramsey, *et al.*, “A Complete Terrestrial Radiocarbon Record for 11.2 to 52.8 kyr BP.” *Science*, **338**, 370-374 (2012).
- [27] P. J. Reimer, *et al.*, “Intcal 13 and Marine 13 Radiocarbon Age Calibration Curves 0-50,000 Years Cal BP.”, *Radiocarbon*, **55**, 1869-1887 (2013).

- [28] T. Higham, *et al.*, “The Timing and Spatiotemporal Patterning of Neanderthal Disappearance”, *Nature*, **512**, 306-309 (2014).
- [29] R. W. Graham, *et al.*, “Timing and Causes of Mid-Holocene Mammoth Extinction on St. Paul Island, Alaska”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201604903 (2016).
- [30] S. Lim, *et al.*, “50,000 Years of Vegetation and Climate Change in the Southern Namib Desert, Pella, South Africa.”, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **451**, 197-209 (2016).
- [31] 西本寛ら、「西郷遺跡・野地遺跡出土木柱の ^{14}C 年代測定」、名古屋大学加速器質量分析計業績報告書第 26 巻、p. 86-89 (2015).
- [32] 藤尾慎一郎ら、「鳥取平野における水田稲作開始期の年代学的調査: 弥生前期中頃の突帯文土器」、国立歴史民俗博物館研究報告第 185 巻、p. 489-509 (2014).
- [33] P. Povinec, “Multiwire Proportional Counters for Low-level ^{14}C and ^3H Measurements”, *Nucl. Instrum. Methods*, **156**, 441 -446 (1978).
- [34] H. Jeffay, J. Alvarez, “Liquid Scintillation Counting of Carbon-14. Use of Ethanolamine-Ethylene Glycol Monomethyl Ether-Toluene”, *Anal. Chem.*, **33**, 612-615 (1961).
- [35] PerkinElmer Japan, <http://www.perkinelmer.co.jp/ri/tabid/212/Default.aspx>
- [36] 石河寛昭、「液体シンチレーションにおけるエネルギー移行機構とクエンチング」、*Radioisotopes*、第 25 巻第 6 号、p. 43-51 (1976).
- [37] 富樫茂子、松本英二、「ベンゼン-液体シンチレーションによる ^{14}C 年代測定法」、*地質調査所月報*、第 34 巻第 10 号、p. 513-527 (1983).
- [38] J. Barker, R.C. Garner, ”Biomedical Applications of Accelerator Mass Spectrometry-Isotope Measurements at the Level of the Atom”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 285–293 (1999).
- [39] 名古屋大学年代測定総合研究センター, <http://www.nendai.nagoya-u.ac.jp/>
- [40] H.A. Synal, *et al.*, “The PSI/ETH Small Radiocarbon Dating System”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.*, **172**, 1-7 (2000).
- [41] H.A. Synal, *et al.*, "MICADAS: a New Compact Radiocarbon AMS System", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.*, **259**, 1, 7-13 (2007).
- [42] H.A. Synal, *et al.*, “Mass Spectrometric Detection of Radiocarbon for Dating Applications”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **294**, 349-352 (2013).
- [43] 南雅代、「近年の ^{14}C AMS 進歩の概要」名古屋大学加速器質量分析計業

績報告書、第 26 卷、p. 55-60 (2015).

- [44] A. O’Keefe, D. A. G. Deacon, “Cavity Ring-down Optical Spectrometer for Absorption Measurements using Pulsed Laser Sources”, *Rev. Sci. Instr.*, **59**, 2544-2551 (1998).
- [45] D. E. Murnick, *et al.*, “Intracavity Optogalvanic Spectroscopy. An Analytical Technique for ^{14}C Analysis with Subattomole Sensitivity”, *Anal. Chem.*, **80**, 4820–4824 (2008).
- [46] C. G. Carson, *et al.*, “Invalidation of the Intracavity Optogalvanic Method for Radiocarbon Detection.”, *Radiocarbon*, **58**, 213-225. (2016).
- [47] A. Persson, M. Salehpour, “Intracavity Optogalvanic Spectroscopy: Is There any Evidence of a Radiocarbon Signal?”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **361**, 8-12 (2015).
- [48] D. Paul, H. Meijer, “Intracavity Optogalvanic Spectroscopy not Suitable for Ambient Level Radiocarbon Detection”, *Anal. Chem.*, **87**, 9025–9032 (2015).
- [49] HITRAN online, <https://hitran.org/>
- [50] S. Dobos, *et al.*, “Improved Spectroscopic Constants for $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ Obtained from ν_3 band”, *Z. Naturforsch.*, **44a**, 633-639 (1989).
- [51] I. Galli, *et al.*, “The ν_3 Band of $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ Molecule Measured by Optical-frequency-comb-assisted Cavity Ring-down Spectroscopy”, *Molecular Physics*, **109**, 2267-2272 (2011).
- [52] M. Wahlen, “Tunable Diode Laser Spectroscopy of $^{14}\text{CO}_2$ Absorption Coefficients and Analytical Applications”, *ApplOpt.*, **16**, 2350-2352 (1977).
- [53] J. S. Li, *et al.*, “Quantum Cascade Laser Spectrometry Techniques: a New Trend in Atmospheric Chemistry.”, *Applied Spectroscopy Reviews*, **48**, 523-559 (2013).
- [54] H. Abe, K. M. T. Yamada, “Performance Evaluation of a Trace-moisture Analyzer based on Cavity Ring-down Spectroscopy: Direct Comparison with the NMIJ Trace-moisture Standard”, *Sensors and Actuators A*, **165**, 230-238 (2011).
- [55] K. Hashiguchi, *et al.* “Wavelength-meter Controlled Cavity Ring-down Spectroscopy: High-sensitivity Detection of Trace Moisture in N_2 at Sub-ppb Levels”, *Sensors and Actuators A*, **241**, 152-160 (2016).
- [56] H. Abe, *et al.*, “Dual-laser Cavity Ring-down Spectroscopy for Real-time, Long-term Measurement of Trace Moisture in Gas”, *Measurement Science and Technology*, **30**, 015002 (2018).
- [57] S. Zhou, *et al.*, “Pressure Optimization of an EC-QCL based Cavity Ring-down Spectroscopy Instrument for Exhaled NO Detection”, *Applied Physics B*, **124**, 1-8 (2018).

- [58] S. Maithani, *et al.*, “High-resolution Spectral Analysis of Ammonia near 6.2 μm using a CW EC-QCL Coupled with Cavity Ring-down Spectroscopy”, *Analyst*, **143**, 2109-2114 (2018).
- [59] A. Maity, *et al.*, “Cavity Ring-down Spectroscopy using an EC-QCL Operating at 7.5 μm for Direct Monitoring of Methane Isotopes in Air”, *Laser Phys. Lett.*, **14**, 115701:1-7 (2017).
- [60] I. Sadiq, *et al.*, “Quantitative Mid-infrared Cavity Ringdown Detection of Methyl Iodide for Monitoring Applications”, *Anal. Chem.*, **89**, 8445-8452 (2017).
- [61] M. Sun, *et al.*, “A Fully Integrated Standalone Portable Cavity Ringdown Breath Acetone Analyzer”, *Rev. Sci. Instrum.*, **86**, 095003:1-9 (2015).
- [62] K. L. Snyder, R. N. Zare, “Cavity Ring-down Spectroscopy as a Detector for Liquid Chromatography”, *Anal. Chem.*, **75**, 3086-3091 (2003).
- [63] L. van der Sneppen, *et al.*, “Cavity Ring-down Spectroscopy for Detection in Liquid Chromatography: Extension to Tunable Sources and Ultraviolet Wavelengths”, *Appl. Spectrosc.*, **60**, 931-935 (2006).
- [64] J. P. Booth, *et al.*, “Ultraviolet Cavity Ring-down Spectroscopy of Free Radicals in Etching Plasmas”, *Chemical Physics Letters*, **317**, 631-636 (2000).
- [65] M. Snee, *et al.*, “Deep-ultraviolet Cavity Ringdown Spectroscopy”, *Opt. Lett.*, **29**, 1378-1380 (2004).
- [66] D. A. Long, *et al.*, “Frequency-stabilized Cavity Ring-down Spectroscopy”, *Chemical Physics Letters*, **536**, 1-8 (2012).
- [67] J. D. Ayers, *et al.*, “Off-axis Cavity Ringdown Spectroscopy: Application to Atmospheric Nitrate Radical Detection”, *Applied optics*, **44**, 7239-7242 (2005).
- [68] H. Waechter, *et al.*, “Chemical Sensing using Fiber Cavity Ring-Down Spectroscopy”, *Sensors*, **10**, 1716-1742 (2010).
- [69] M. J. Thorpe, *et al.*, “Cavity-enhanced Optical Frequency comb Spectroscopy: Application to Human Breath Analysis”, *Optics Express*, **16**, 2387-2397 (2008).
- [70] F. Adler, *et al.*, “Cavity-enhanced Direct Frequency Comb Spectroscopy: Technology and Applications”, *Annual Review of Analytical Chemistry*, **3**, 175-205 (2010).
- [71] M. Shirasaki, “Large Angular Dispersion by a Virtually Imaged Phased Array and Its Application to a Wavelength Demultiplexer”, *Optics Letters*, **21**, 366-368 (1996).
- [72] S. A. Diddams, *et al.*, “Molecular Fingerprinting with the Resolved Modes of a Femtosecond Laser Frequency Comb”, *Nature*, **445**, 627-630 (2007).
- [73] N. B. Hebert, *et al.*, “A Quantitative Mode-resolved Frequency Comb

- Spectrometer”, *Optics Express*, **23**, 13992-14001 (2015).
- [74] B. Bernhardt, *et al.*, “Cavity-enhanced Dual-comb Spectroscopy”, *Nature Photonics*, **4**, 55-57 (2010).
- [75] E. H. Wahl, *et al.*, ”Applications of Cavity Ring-down Spectroscopy to High Precision Isotope Ratio Measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in Carbon Dioxide”, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **42**, 21-35 (2006).
- [76] 松浦知和ら、「安定同位体呼気試験の臨床応用」、*The Chemical Times*、第 2347 号、(2014).
- [77] E. R. Crosson, *et al.*, “Stable Isotope Ratios using Cavity Ring-Down Spectroscopy: Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ for Carbon Dioxide in Human Breath”, *Anal. Chem.*, **74**, 2003-2007 (2002).
- [78] H. Tomita, *et al.*, “Radioactive Carbon Isotope Monitoring System based on Cavity Ring-down Laser Spectroscopy for Decommissioning Process of Nuclear Facilities”, *J. Power and Energy Systems*, **2**, 221-228 (2008).
- [79] V. Sonnenschein, *et al.*, “Development of CO_2 Cavity Ring-Down Spectroscopy for Medical Applications”, *Proc. of ISRD*, **11**, 060003 (2016).
- [80] R. Terabayashi, *et al.*, “Development of Analytical Method for ^{14}C Determination in Biomedical Sample by Laser Spectroscopy”, *Radioisotopes*, **67**, 85-91 (2018).
- [81] V. Sonnenschein, *et al.*, ”A Cavity Ring-down Spectrometer for Study of Biomedical Radiocarbon-labeled Samples”, *J. Appl. Phys.*, **124**, 033101:1-9 (2018).
- [82] I. Galli, *et al.*, “Molecular Gas Sensing Below Parts Per Trillion: Radiocarbon-Dioxide Optical Detection”, *Phys. Rev. Lett.*, **107**, 270802 (2011).
- [83] P. Cancio, *et al.*, “Saturated-Absorption Cavity Ring-Down (SCAR) for High-Sensitivity and High-Resolution Molecular Spectroscopy in the Mid IR”, *Cavity-Enhanced Spectroscopy and Sensing*, pp. 143-162, Springer Berlin Heidelberg. (2014).
- [84] I. Galli, *et al.*, “Optical Detection of Radiocarbon Dioxide: First Result and AMS Intercomparison”, *Radiocarbon*, **55**, 213–223 (2013).
- [85] I. Galli, *et al.*, “Spectroscopic Detection of Radiocarbon Dioxide at Parts-per-quadrillion Sensitivity”, *Optica*, **3**, 385-388 (2016).
- [86] S. Borri, *et al.*, “High Precision Molecular Spectroscopy in the Mid-infrared using Quantum Cascade Lasers”, *Appl. Phys. B*, **125**, 1-9 (2019).
- [87] G. Genoud, *et al.*, “Radiocarbon Dioxide Detection Based on Cavity Ring-down Spectroscopy and a Quantum Cascade Laser”, *Opt. Lett.*, **40**, 1342–1345 (2015).
- [88] A. D. McCartt, “Development of a Low-temperature Cavity Ring-down

Spectrometer for the Detection of Carbon-14”, a Thesis for a Doctorate of Stanford University (2014).

- [89] A. D. McCartt, *et al.*, “Measurements of Carbon-14 with Cavity Ring-down Spectroscopy”, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B*, **361**, 277-280 (2015).
- [90] A. D. McCartt, *et al.*, “Quantifying Carbon-14 for Biology using Cavity Ring-Down Spectroscopy”, *Anal. Chem.*, **88**, 8714-8719 (2016).
- [91] A.D. McCartt, *et al.*, “Model-based, Closed-loop Control of PZT Creep for Cavity Ring-down Spectroscopy”, *Measurement Science and Technology*, **25**, 095201 (2014).
- [92] N. A. Kratochwil, *et al.*, “Nanotracing and Cavity-ring down Spectroscopy: A New Ultrasensitive Approach in Large Molecule Drug Disposition Studies”, *PLoS ONE*, **13**, e0205435:1-18 (2018).
- [93] A. J. Fleisher, *et al.*, “Optical Measurement of Radiocarbon below Unity Fraction Modern by Linear Absorption Spectroscopy”, *J. Phys. Chem. Lett.*, **8**, 4550-4556 (2017).

第2章 中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析システムの開発

2.1 生体試料分析における測定試料

トレーサー応用における既存分析手法の課題

放射性炭素 ^{14}C は炭素の安定同位体 (^{12}C 、 ^{13}C) と比較して存在比が小さいことから、様々な分野・領域において環境・生体中のトレーサーとして利用されている。トレーサー応用においては、人工的に ^{14}C 標識を行い、標識した ^{14}C の空間・時間的な動きを ^{14}C 分析により評価する。したがって、放射性炭素年代測定とは異なり、天然同位体比の数桁上から同程度までの ^{14}C を評価できるアバンダンス感度が求められる。このような背景から、トレーサー応用に伴う ^{14}C 定量分析には、従来、AMS による測定や、LSC による測定 (^{14}C 標識量が多い場合) がなされてきた。トレーサー応用のうち、有機化合物の分布を評価したい場合に限っては、イメージングプレート (Imaging Plate: IP) による ^{14}C イメージングが行われているが[1]、 ^{14}C は放出する β 線のエネルギーが低く、試料による自己吸収が顕著であり、多量の ^{14}C 投与が必要となると同時に、その定量が難しい。 ^{14}C からの β 線を計数する LSC は、比較的高いスループットを有し、小型であるため、広く普及しているものの、 ^{14}C が長半減期核種であることから試料中に十分な ^{14}C 量が必要であり、感度が限られる。また、土壌試料や植物試料、動物やヒトの血漿・糞尿など様々な試料を測定する必要があるが、試料によっては Fig. 2-1 に示すように液体シンチレーションカクテルが着色され、カラークエンチングによる検出効率の低下が顕著になる。このような場合には前処理による脱色や、試料種・量ごとに標準試料を作成して補正するといった工夫がなされるが、煩雑な処理が必要となるなどの制約がある。また、測定後の液体シンチレーションカクテルと試料の混合液は放射性有機廃液として処理する必要がある。一方、AMS は天然存在比を大きく下回る試料に対しても、十分なアバンダンス感度を有するが、試料の前処理に時間を要するため、1日あたり十サンプル程度しか測定できない (前処理を含んだ平均)。また、近年小型化は進んでいるものの、加速器という大がかりな装置を必要とし、その運用には専用建屋が必要である。さらに、1回の測定あたりの分析コストが非常に高いといった課題がある。AMS は、国内では名古屋大学や山形大学などの大学や国立環境研究所などの研究所等、各所に設置されており、分析依頼や共同利用が可能ではあるが、その利用料金は決

して安くなく、トレーサー応用で求められる多量サンプルの測定には向かない。このように、AMS は分析スループットや分析コスト、アクセシビリティといった点でトレーサー応用には不向きである。そこで本研究では LSC・AMS に代わる手法として、中赤外キャビティリングダウン分光法 (CRDS) に着目し、高い感度と高いスループットを兼ね備えた ^{14}C 分析法 (^{14}C -CRDS) の開発を行った。Fig. 2-2 に、 ^{14}C トレーサー応用に対して、スループット、およびアバンダンス感度の点で既存の分析手法・本研究を比較した結果を示す。



Fig. 2-1 液体シンチレーションカクテルの着色 (植物葉試料)

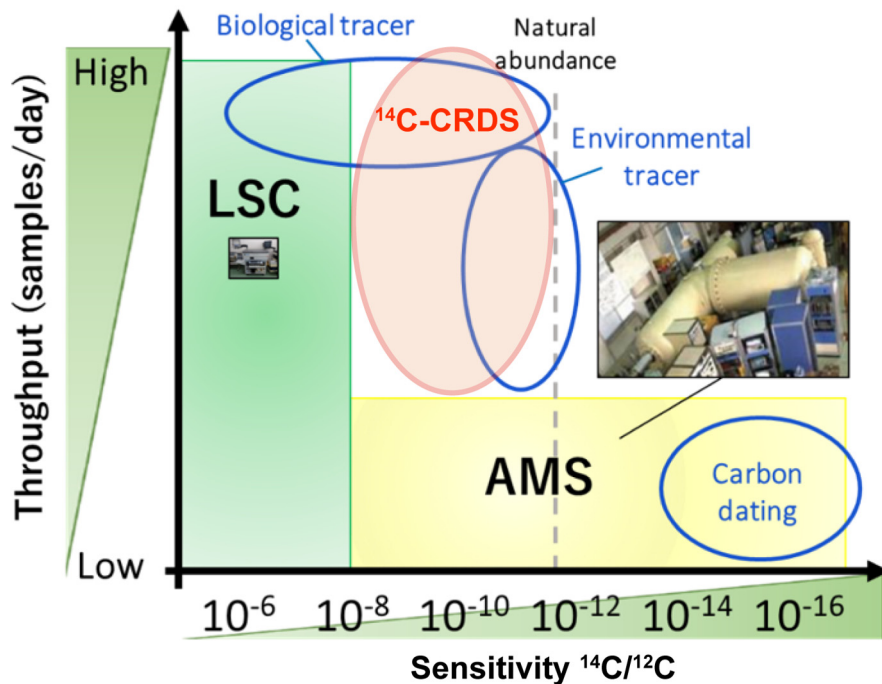


Fig. 2-2 ^{14}C 手法と分析ニーズの比較

図中、AMS の写真は名古屋大学年代測定センターより引用[2]

^{14}C トレーサー応用における測定試料と ^{14}C 分析への要件

ここでは ^{14}C トレーサー応用において、 ^{14}C 分析法に求められる要件について述べる。 ^{14}C -CRDS 分析システムの具体的な適用領域として医薬品開発領域におけるヒト Hot 試験、特にマイクロドーズ (MD) 試験が挙げられる。MD 試験は医薬品開発早期段階に行われる臨床試験であり、ヒトに対し ^{14}C 標識医薬品候補化合物を極微量投与し、その薬物動態を評価する試験である。まずは、 ^{14}C トレーサー応用の中でも、 ^{14}C 投与量に対する制限が他より厳しい、MD 試験を例として、想定される試料中にどのような量、どのような同位体比で ^{14}C が含まれるのかを計算により評価した。なお、計算にあたっては、後述する ^{14}C -CRDS 分析システムの試料導入部の要件により、測定試料は液体で $50\ \mu\text{L}$ であるとした。また、計算に用いた ^{14}C 量を表す各単位の間関係を Table 2-1 に示す。なお、本計算においては多くの仮定を用いているが、実応用における経験に基づいた値であり、その計算結果は分析システムに対する要件の大まかな指標として扱うことができる[参考文献注釈※1]。

MD 試験で測定が求められる試料はヒトの血漿 (Plasma)・尿 (Urine)・糞便 (Feces)、または高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) により化合物毎に分離された HPLC 分画試料である。

Table 2-2 に示すように、通常の（標識化合物を投与していない）ヒトの血漿と尿には、それぞれ 1 mL あたり約 45 mg、4.5 mg の炭素（mgC/mL と表記）が含まれており、そのうち ^{14}C 同位体比 ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) は 1.4 ppt (parts-per-trillion, 1.0×10^{-12}) 程度であることが AMS により測定されている [3]。糞便については実測したデータはないが、一般的に 5 ~ 15 mgC/mL 程度であることが知られている。 ^{14}C 標識化合物を投与されたヒトの血漿や尿では、 ^{14}C 同位体比は大きくなる。その値は投与量やサンプリングの箇所・タイミングによって大きく異なる。そこでまずは代表的な例として、排泄を考える。例えば 18.3 kBq (= 1.1×10^6 dpm = 500 nCi) をヒトに単回投与した場合、24 時間かけて尿から 2000 mL の排出量で体外に排出されたとする (dpm: decay per minute、1 分間当たり崩壊数)。ここで、18.3 kBq は MD 試験において想定されるヒトへの投与放射エネルギーである。薬物動態学の分野では放射能を Bq ではなく dpm で表す慣習がある。ここでは、dpm を放射能の単位として使用する。1 dpm は $1/60 = 0.01667$ Bq である。例えば 1 時間ごとに尿を回収し、都度の回収率を評価することで排泄に関する動態が取得できる。投与から、時間が経過すればするほど試料中の ^{14}C は減少していき、その値は最終的には限りなく天然存在量・天然同位体比に近くなる。例えば、投与量の回収率 (recovery rate、% of dose) を 100% とした場合には 500 dpm/mL の、1% では 5 dpm/mL の ^{14}C が尿試料中に含まれる計算となる。 ^{14}C 同位体比は尿中炭素量が 4.5 mgC/mL であることから Table 2-1 に示される各値を用いて計算できる。Table 2-3 に計算された回収率ごとの、尿試料中 ^{14}C 量・同位体比を示す。回収率 0.01% では天然同位体比を下回るが、実際には天然に存在する ^{14}C 同位体比 1.4×10^{-12} との和が試料中 ^{14}C 同位体比となる。より長い時間スケールの評価を行いたい場合には当然、天然同位体比を測定できるアバンドンス感度が必要であるが、最低限の目標としては、100% から 1% までの回収率が評価できれば基本的な排泄率評価に対して十分である。そこで排泄率評価に求められる性能として、1% 回収率の場合の尿中 ^{14}C 同位体比 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.1 \times 10^{-10}$ とした。糞試料についても同様の議論ができ、ここでは含有炭素量として 10 mgC/mL であるとし、尿と同じく 1% 回収率の場合の糞中 ^{14}C 同位体比を $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.1 \times 10^{-10}$ とした。また、 ^{14}C 量では、それぞれの含有炭素量から、尿試料 0.3 dpm/50 μL 、糞試料では 0.5 dpm/50 μL と計算された。他の薬物動態評価として、血中 ^{14}C 同位体比を評価するような試験では、ヒト血漿中の ^{14}C を分析する必要がある。尿糞と同様に、投与からの経過時間次第で血漿中 ^{14}C 同位体比は大きく変化し、何をどの程度評価したいかによって求められる性能は異なる。尿・糞試料と同様に、血漿試料中の ^{14}C 同位体比は ^{14}C 標識薬剤の投与によって天然より数桁大きくなる。ここでは、血漿試料中下限値として、天然同位体比から最低でも 1 桁大きくなると仮定し、 ^{14}C 同位体比 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.4 \times 10^{-11}$ とした。全量については、Table 2-2 より尿中炭素量

が 45 mgC/mL であることから、 ^{14}C 同位体比 1.4×10^{-11} と Table 2-1 を用いて計算され、0.3 dpm/50 μL とした。また、HPLC 分画試料の分析により、投与薬物がどのように代謝されるかを評価することが可能である。HPLC により化合物毎に分離されるため、不純物となる生体由来炭素が大幅に抑制され、 ^{14}C 同位体比は数桁程度高くなる。一方で、含有炭素量が大幅に低下し、 ^{14}C 量については数桁低くなる。これらの値は、投与化合物と、測定したい代謝化合物によって大きく異なる。 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.4 \times 10^{-11}$ の血漿試料を例にとり、HPLC 分画試料では、分画前試料に対して 3 桁小さくなり、測定したい化合物に含まれる ^{14}C 量は、分画前試料に対して一桁小さくなったと仮定する。これにより、 ^{14}C 同位体比として分画前試料より 3 桁高い $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.4 \times 10^{-8}$ を、 ^{14}C 量としてより 1 桁小さい 0.003 dpm/50 μL を下限とした。なお、測定試料中の水分を蒸発させ濃縮することにより、 ^{14}C 量を数桁改善できる可能性はある。この場合、 ^{14}C 同位体比を変化させることなく、試料中含有 ^{14}C 量を増加させることが可能である。しかし、もともと採血量が限られている血漿のような試料（1 回の採血で数 mL）では濃縮による改善は限られる。また、CRDS 分析セルの体積が限られており、濃縮しても発生させた気体をすべて閉じ込められるわけではなく、濃縮の効果はシステムによって制限される。本研究においては、より厳しい要求として、濃縮を含めた一切の前処理を行わない、生の試料を直接導入する場合における値を要件とした。以上の議論を Table 2-4 にまとめた。

本研究では前処理なく試料を測定できることを開発目標の一つとしているが、仮に感度向上を目的に前処理を実施する場合、試料中の生体由来炭素を除去することで、被験者に投与された化合物由来の炭素のみを効率的に取り出すことができ、試料中 ^{14}C 同位体比を高めることが可能である。ヒトの血漿・尿・糞便などの生体試料において、大きなバックグラウンドとなるのが生体由来炭素である。生体由来炭素は主にタンパク質・脂質である。タンパク質を除去する有用かつ一般的な前処理法として有機溶媒を用いた除タンパク法が挙げられる。除タンパク法は有機溶媒によってタンパク質を変性させることで沈殿させ、遠心分離によって ^{14}C が含まれる上清を取り出すという方法である。しかし、有機溶媒を添加することによって外部から炭素が測定試料に持ち込まれるため、添加した有機溶媒を乾固等によって抽出する必要がある。また、溶液中の目的化合物と不純物とを化学的性質に基づいて分離する固相抽出法も適用可能である。除タンパク法や固相抽出法による前処理により生体由来炭素は 99%程度除去され、試料中の ^{14}C 同位体比は 20 倍から 10^4 倍程度大きくなることを見込まれる。

医薬品開発領域以外の ^{14}C トレーサー応用として、本研究では植物生理学における植物中 ^{14}C トレーサー応用に注目している。植物においては、 ^{14}C 標識量に具体的な制限はない（実際には使用する施設に使用量の制限が存在するが、その

値は十分大きく、基本的に超過することはない)。一方で、例えば光合成による標識を例にとると、発生させた $^{14}\text{CO}_2$ 全てを植物試料が吸収するというわけではなく、多量の標識のためには、目的とする標識量よりも数桁多い $^{14}\text{CO}_2$ を発生させる必要がある。また、植物は個体差が顕著であり、統計的なデータを取得するためには、必然的に試料数が多くなる。一度に数十から数百個体を同時標識する場合には、それに応じて $^{14}\text{CO}_2$ 発生量を増やす必要がある。例として、地上部(茎葉部)から根系への光合成産物の移動を評価する研究への適用について議論する。薬物動態評価と同様に、茎葉部試料と根系試料について ^{14}C 量や同位体比の経時変化を測定することが求められる。1 個体から取得できる試料量は植物の種類や生育状態によって様々である。ここでは要件として厳しい条件を設定し議論する。100 kBq の ^{14}C を CO_2 化し、100 個体の植物試料を一度に標識したと仮定する。ここで 100 個体は、評価したい個体が多いラベリング実験において、一度に標識する植物の量として妥当である。試料は生育間もない新芽のような非常に小さな個体で、1 個体が 1 mg の茎葉部と 1 mg の根系から構成される。植物の組成から、そのうち約 40% が炭素である。この条件では、単純計算で 1 個体あたりに配分される ^{14}C は 1 kBq となるが、吸収の効率(標識効率)が 10% と仮定し、0.1 kBq (=6,000 dpm) が 1 個体中総放射エネルギーである。このうち、最低で 0.1% だけ根系に移動した ^{14}C を評価したい場合、根系試料中 ^{14}C 量は 0.6 dpm / 1 mg sample であり、根系試料の炭素量 (0.4 mgC / 1 mg sample) から、 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.5 \times 10^{-10}$ となる。葉については、その値は、根と比較して数桁高い。標識量を増やすことなく、各微小部位について評価したい場合には、要件はさらに厳しくなる。また、植物の体積・質量が茎葉部・根系ともに 2 倍に増えた場合、標識効率が変わらないとすると、 ^{14}C 量が変わらない一方で、試料に存在する安定炭素量が 2 倍になり、同位体比が半分になる。そのうえ、同様に 1 mg を測り取り、測定試料とすると試料中 ^{14}C 量についても半減することになる。このように、どのような試料について、どのような動態を評価したいのかによって、求められるアバダンス感度・検出限界 ^{14}C 量は変化することを留意されたい。

求められる測定精度については、トレーサー応用において、どの程度の変化量を区別して測定する必要があるか、といった点に大きく関係する。例えば、 ^{14}C 量の経時変化を測定したい場合であっても、より短い時間スケールでの変化を評価したい場合には、サンプル間での ^{14}C 量の変化が相対的に小さく、より高い精度が求められる。既往手法である LSC、AMS において、その精度は統計誤差により制限される。AMS は繰り返し測定の ^{14}C 分析相対誤差として数% (1% = 0.1%) であると言われている[4]。一方、LSC は微量 ^{14}C に対しては、計数が低く、統計誤差が低減できないため、その精度は AMS と比較して格段に劣る。本研究では、分析システムに求められる精度として、AMS の数% を要件と設定し

た。また、スループットについても高ければ高い方が望ましいが、分析法開発における目標設定として、～100 測定/日、すなわち 1 測定 10～15 分程度とした。

以上の議論をもとに、薬物動態評価・植物中炭素動態評価について、 ^{14}C -CRDS 分析システムの要件を、試料種類・アバンダンス感度、検出限界 ^{14}C 量、測定精度・測定時間の観点からまとめ、Table 2-5 に示す。Table 2-5 を総括し、本手法を生体トレーサー応用に適用する場合の目標として、血漿のような試料当たり炭素量が大きな試料（～2 mgC/sample）について天然同位体比にあと一桁まで迫るアバンダンス感度（ $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 1.4 \times 10^{-11}$ ）を有すること、0.017 Bq/sample (= 1 dpm/sample) 以下の検出限界を有すること、測定精度数%、前処理なく試料を測定できること、1 つの試料の測定が 15 分以内で完了することを本手法の目標とした。なお、HPLC 分画試料については、非常に低い検出限界が求められ、本研究のさらなる発展として、性能向上が図られることが望まれる。これらのトレーサー応用に即した要件を満たす分析システムを、複雑な機構（既往研究で用いられているような、光共振器と中赤外レーザー光源の超高効率カップリングのための周波数ロック体系など）をできる限り排して実現し、実試料分析を行うことで、開発されたシステムのトレーサー応用における有用性を示すことを本研究の目的とした。トレーサー応用において、測定試料の ^{14}C 同位体比はその原理上天然同位体比を下回ることはない。したがって、トレーサー応用における測定において、天然存在比を下回るアバンダンス感度を有することが望ましいのは言うまでもない。ここで設定した要件は、あくまでもトレーサー応用において、代表的に求められる性能である。

Table 2-1 1g の ^{14}C に対する各単位

ここで、1 Ci = 3.7×10^{10} Bq、1 dpm = 1/60 Bq とした。

^{14}C	1	g
Decay constant: λ	3.83587×10^{-12}	1/s
Number of atom in 1g	4.30×10^{22}	個
Activity in 1g	1.65×10^{11}	Bq
	4.46	Ci
	9.90×10^{12}	dpm

Table 2-2 血漿・尿中の炭素量と ^{14}C 濃度[3]
12人の異なる検体について測定

Subject	Plasma		Urine	
	Total C mgC/mL	$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ ppt	Total C mgC/mL	$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ ppt
1	43.8	1.431	3.1	1.438
2	44.7	1.424	3.5	1.438
3	43.4	1.415	5.9	1.284
4	42.6	1.426	5.2	1.397
5	48.2	1.408	6.7	1.398
6	43.4	1.431	6.8	1.426
7	40.9	1.406	5.3	1.433
8	45	1.403	4.4	1.419
9	45.4	1.413	7.4	1.430
10	43.5	1.407	3.7	1.456
11	41.4	1.408	4.2	1.426
12	41.5	1.405	7.3	1.388
means	44	1.41	5	1.4
SD	2	0.01	1	0.04

Table 2-3 投与量から算出された尿試料中 ^{14}C 量
(尿 2000 mL/日、18.3 kBq 投与と仮定)
各値は天然に存在する ^{14}C を考慮していない。

Recovery rate % of dose	^{14}C amount in sample			$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$
	dpm/mL	dpm/50 μL	fg/50 μL	
100	500	25	2525	1.12×10^{-8}
10	50	2.5	253	1.12×10^{-9}
1	5	0.25	25	1.12×10^{-10}
0.1	0.5	0.025	3	1.12×10^{-11}
0.01	0.05	0.0025	0.3	1.12×10^{-12}

Table 2-4 測定試料とアバンダンス感度・検出限界

Sample	Carbon amount ^{Total} C		Abundance sensitivity ¹⁴ C/ ¹² C	Detection limit ¹⁴ C	
	mgC/mL	mgC/50 μ L		fg/50 μ L	dpm/50 μ L
Urine	4.5	0.2	1.1×10^{-10}	24.8	0.3
Feces	10.0	0.5	1.1×10^{-10}	55.0	0.5
Plasma	45.0	2.3	1.4×10^{-11}	31.5	0.3
HPLC(Plasma)	0.005	0.0002	1.4×10^{-8}	3.2	0.03

Table 2-5 トレーサー分析測定試料と要求性能

Sample	Abundance sensitivity ¹⁴ C/ ¹² C	Detection limit dpm/50 μ L	Precision	Pre-treatment	Throughput
Urine	1.1×10^{-10}	0.3		None	100 samples/day
Feces	1.1×10^{-10}	0.5		None	
Plasma	1.4×10^{-11}	0.3	1%~1‰	None	
HPLC(Plasma)	1.4×10^{-8}	0.03		HPLC	
Plant root	1.5×10^{-10}	0.60		None	

2.2 分析システムの概要

¹⁴C-CRDS 分析法・分析システムの全体概要

¹⁴C-CRDS による分析手法は、生体トレーサー応用全般への適用が見込めるが、本研究ではまず、名古屋大学弘津・緩詰による先行研究[5,6]を踏まえ、特に医薬品開発領域における MD 試験への適用を念頭に、分析システムを開発した。本節では、¹⁴C-CRDS に基づく ¹⁴C 分析法、および分析システムの全体的な概要を述べる。

¹⁴C-CRDS に基づく ¹⁴C 分析の流れを Fig. 2-3 に、分析システムの概要を Fig. 2-4 に示す。分析システムは中赤外レーザー光源・光学系、CRDS 測定用光共振器、検出器・信号処理系、試料導入系の 4 つの要素から成る。ヒト尿やヒト血漿・ヒト糞などの生体試料中の炭素は元素分析計 (Elemental Analyzer: EA) を応用した試料導入系の燃焼管で酸化され CO₂ ガスとなる。試料由来 CO₂ ガスと夾雑ガスは、加熱吸脱着カラムに一旦吸着された後、分離されて放出される。CO₂ ガスは CRDS 測定用光共振器、および分析ガスセルに到達したタイミングで閉じ込められる。精密なアライメントにより光共振器とよくカップリングされた中赤外レーザーは、共振器内で多重反射を繰り返しセル内の CO₂ ガスにより吸収される。炭素同位体を含む各 CO₂ による吸収をレーザー周波数のモニタリング信号と合わせて、光検出器・信号処理系にて検出・分析する。得られた各 CO₂ 吸収スペクトルから ¹⁴CO₂、¹²CO₂、¹³CO₂ のセル中数密度が、その比から各同位体の同位体比が測定される。

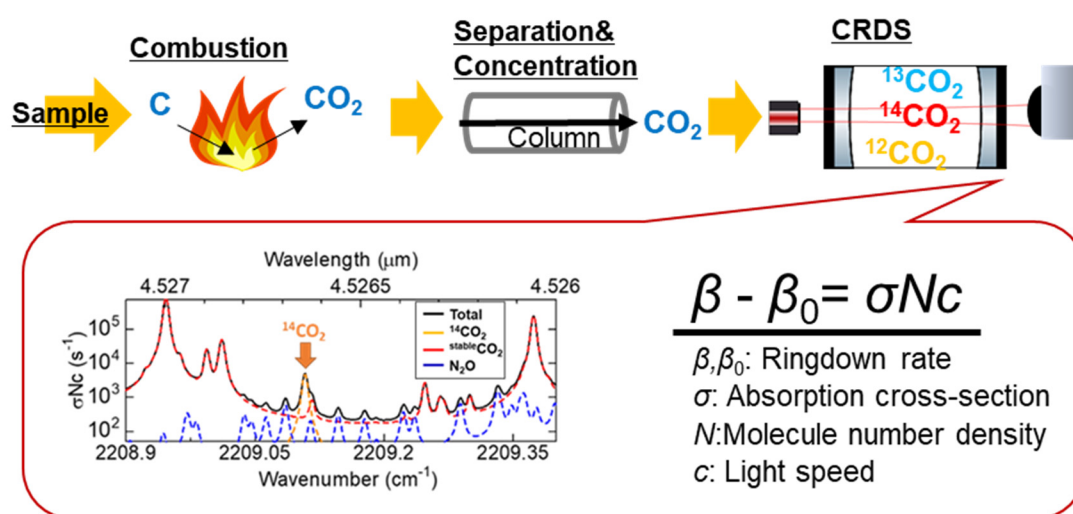


Fig. 2-3 ¹⁴C-CRDS による ¹⁴C 分析手順

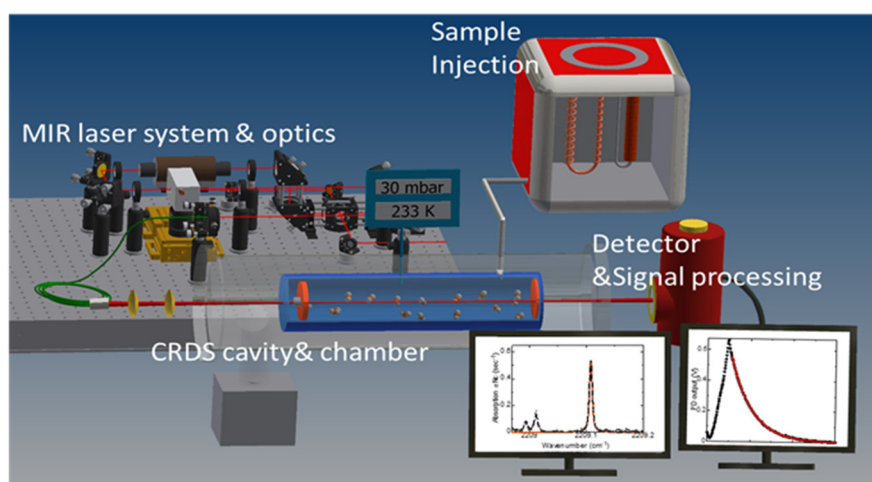


Fig. 2-4 ^{14}C -CRDS 分析システムの概要

近赤外半導体レーザーを用いた基礎実験用 CRDS システム

^{14}C を含む二酸化炭素の高強度吸収 (ν_3 band) は中赤外域 $4.5 \mu\text{m}$ 帯に存在し、 ^{14}C -CRDS分析システムでは中赤外レーザー、中赤外用光学部品を使用する必要がある。一方、通信帯近赤外域 $1.6 \mu\text{m}$ 帯には二酸化炭素の結合音吸収が存在し、吸収強度は数桁低いものの、狭帯域半導体レーザー光源、ミラーやレンズなどの光学部品、ファイバーベースの光学素子、光検出器などが比較的容易に手に入りやすいという利点がある。そこで本研究では、CRDSによる試料中炭素同位体比測定の実証として、まずは中心波長 $1.61 \mu\text{m}$ の分布帰還型 (DFB) 半導体レーザーを使用した近赤外CRDSシステムを構築した[7]。Fig. 2-5にその概要を示す。なお、本システムの基本的な構成は、レーザー光源・光学系・光共振器を除いては、後述する中赤外レーザーを用いた ^{14}C -CRDS分析システムと変わらない。

DFBレーザー (Fitel Technologies, FOL15DCWD-A81-18620-B) は中心波長 $1.61 \mu\text{m}$ 、線幅が 2 MHz 以下という狭帯域のレーザーであり、温度・電流によって発振波長を変調できる。DFBレーザーの温度・電流はレーザードライバ (Toptica Photonics, DC110, DTC110, DCC110) により制御され、ファンクションジェネレータからの波形電圧により、電流を掃引した。DFBレーザーから出射したレーザー光は90:10のファイバーカップラによって分けられ、一部の光は波長測定のために波長計 (Advantest, Q8326) に入射された。残りの光は光スイッチ (Thorlabs, BOA1004PXS) とアイソレータ (Thorlabs, IO-H-1550APC) を経由した後、50:50のファイバーカップラによって分割され、半分は自由空間上の2枚のモードマッチング用レンズを経由して光共振器へ入射された。光共振器からの透過光を光検出器により検出し、リングダウン (RD) 信号を取得した。当初、光スイッチ

により光を遮断するタイミングトリガには、透過光信号をそのまま用いていたが、反射光をファイバーケーブルにより分岐して光検出器により検出し、光スイッチ遮断のタイミングとする手法[8]についても可能とした。ここで用いた光スイッチは、電流が流れている間は入射光を増幅し、電流が遮断されると光を増幅しないことで高速なスイッチング（ \sim ns）を実現する素子である。光共振器には2枚の高反射率ミラー（反射率: $R=99.995\%$ ）を用い、共振器長: $L=30$ cmとした。光共振器、分析セルの外観をFig. 2-6に示す。本システムを用いて中赤外CRDSシステムを構築する前段階の基礎検討・ノウハウの蓄積を行った。

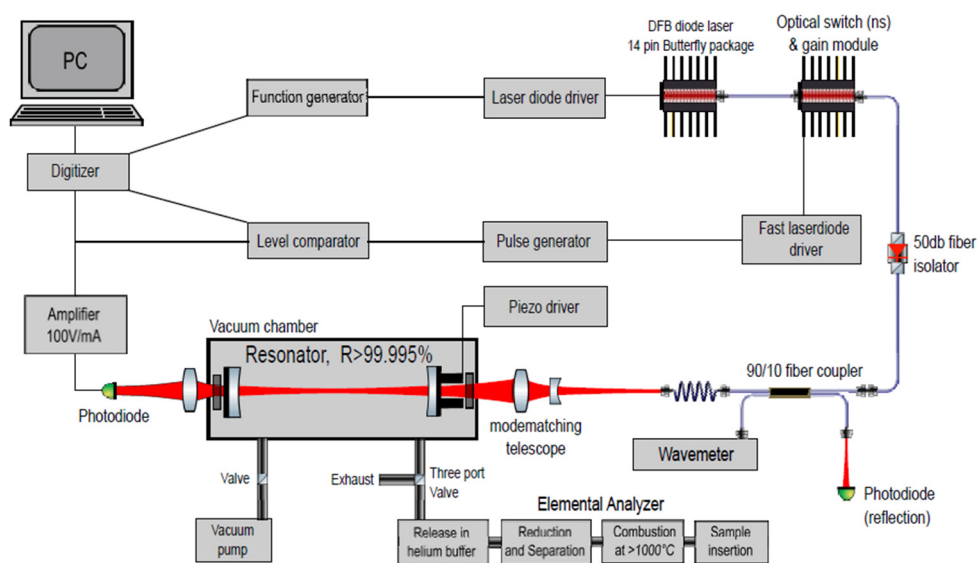


Fig. 2-5 基礎実験用近赤外 CRDS システムの概要[7]

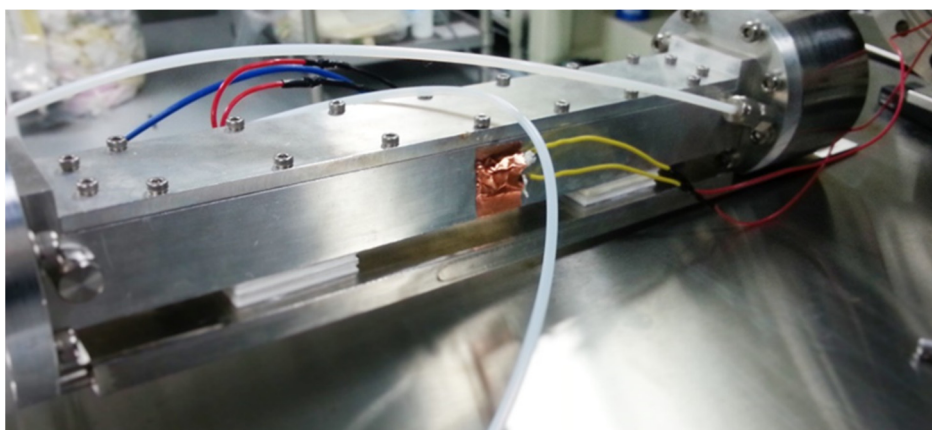


Fig. 2-6 近赤外 CRDS 分析セルの外観

中赤外半導体レーザーを用いた ^{14}C -CRDS 分析システム

本研究にて構築された ^{14}C -CRDS 分析システムの概要を Fig. 2-7 に示す。分析システムは ^{14}C を含む二酸化炭素の基本音吸収線に発振波長を合わせた中赤外半導体レーザー光源、および光スイッチなどの光学系、 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ (233 K) までの冷却が可能な光共振器、光共振器からの微弱光を検出する中赤外検出器・信号処理系、試料導入系の4つの要素から成る。各部の詳細は次節以降に示した。

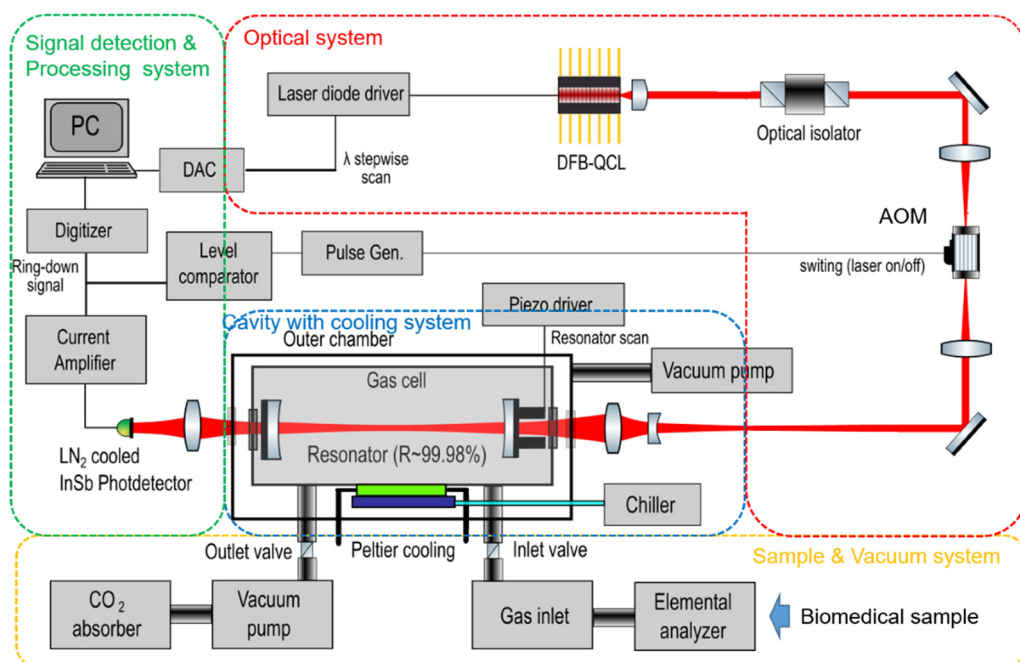


Fig. 2-7 ^{14}C -CRDS 分析システムの概要

2.3 中赤外レーザー光源と光学系・光スイッチング

吸収線の選定と干渉分子種の吸収線

$^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ のv3 band の遷移のうち、より吸収が強く他の分子種や同位体分子の干渉を受けにくい $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の吸収線として P(20)遷移を選定した。Table 2-6 に $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ (00⁰1-00⁰) P(20)と主な干渉分子種の吸収線の各データをまとめたものを示す。表中吸収線強度は、標準温度・標準圧力において、存在比を 100%としたものである。

Table 2-6 $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ P(20)吸収線[10,11]と干渉分子種[9]

*単位: $\text{cm}^{-1}/(\text{molecule} \cdot \text{cm}^{-2})$

Molecule	Transition	Wavenumber (cm^{-1})	Wavelength (nm)	Line strength*
$^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$	(00 ⁰ 1-00 ⁰) P(20)	2209.108[10]	4526.714	2.58×10^{-18} [11]
$^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$	(05 ⁵ 1-05 ⁵ 0) P(19)e	2209.1159	4526.698	4.18×10^{-27}
CO	(1-0) R(18)	2209.5083	4525.894	7.50×10^{-20}
N ₂ O	(01 ¹ 1-01 ¹ 0) Q(9)f	2209.1468	4526.634	9.96×10^{-22}
	(01 ¹ 1-01 ¹ 0) Q(12)e	2209.1144	4526.701	6.61×10^{-22}
O ₃	asymmetry	2209.0806	4526.770	2.25×10^{-23}

中赤外レーザー光源

CRDS による同位体分析のためには、レーザー光源は波長可変かつ、各吸収線を区別するのに十分なレベルで狭帯域である必要がある。また P(20)吸収線をターゲットとすることから、レーザー光源は中赤外域 2209.108 cm^{-1} (= $4.526 \mu\text{m}$)での発振が必要とされる。そこで本研究では、 ^{14}C -CRDS のための中赤外レーザー光源として量子カスケードレーザー (QCL) を使用した。QCL は半導体レーザーの一種であり、Faist、Capasso らによって 1994 年に開発された中赤外から遠赤外域のレーザーである[12]。一般的な半導体レーザーが電子-正孔のバンド間遷移を利用する一方で、QCL は量子井戸を作製した際に現れる量子化準位の遷移 (サブバンド間遷移) により特定の波長の発振を得る[13] (Fig. 2-8)。QCL の活性層はレーザー上位準位と下位準位間のサブバンド間遷移による発光を得る利得領域と、レーザー下位準位に緩和したキャリアを次の領域に引き渡すキャリア引抜き/注入領域を 1 ユニットとして、これを多段に接続した構成をとる。そのため、QCL では一度発光遷移を起こしたキャリアは、次のユニットに移動後に再度発光に関与するため、接続したユニットの段数に比例した高い量子効率が得られる。このようにキャリアがポテンシャルエネルギーの滝 (cascade) を

落ちていく様子から、量子カスケードレーザーと呼ばれている。QCL の発振波長はサブバンド間エネルギーで決まるので、量子井戸幅を変えることで、波長を任意に変えることができる。また、非常に高速な非発光遷移過程に起因して本質的にスペクトル線幅が狭い。さらにレーザー素子に回折格子を作りこむことで分布帰還型量子カスケードレーザー (DFB-QCL) とし、さらなる狭帯域化とシングルモード発振が実現されている。従来の QCL は、発振における閾値電流密度が高く、室温での連続発振 (CW) は難しいとされてきたが、近年では TEC を搭載し室温動作が可能となり、4 ~ 10 μm の室温動作の DFB-QCL が浜松ホトニクスや Daylight Solutions から販売されている。QCL は、室温動作でパルス発振のものも市販されているが、狭帯域でないことから本研究には向かないとし、CW の DFB-QCL とした。

本研究では DFB-QCL (浜松ホトニクス, L12004-2209H-C) を採用した。温度を変調することで電流-波数特性が変化し、20 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ までの温度変調で 2207 ~ 2211 cm^{-1} まで変調が可能である。なお、L12004-2209H-C はコリメータが内蔵されておらず、出射光はすぐに発散してしまう。このためコリメータにより集光した。コリメータレンズは Thorlabs 製の赤外域用非球面レンズ (有効焦点距離: $f=5.95\text{ mm}$ 、開口数: $\text{NA}=0.56$ 、AR コーティング: 3 ~ 5 μm 、390028-E) を使用した。また、浜松ホトニクスによって同モデルのコリメータ内蔵型パッケージ (LE0833QCL) が開発されており、これによりコリメータへの入射に伴うパワーの損失を最小限にすることができる。本研究では L12004-2209H-C、LE0833QCL どちらについても使用した。同様に、QCL パッケージの外部に取り付ける温度制御用ヒートシンクは L12004-2209H-C については空冷タイプ (A11709-01) を使用した。振動や空気の対流による気圧変化が QCL の周波数安定性に影響することが明らかとなったため、LE0833QCL については水冷タイプ (A11709-02) を使用した。Fig. 2-9 に LE0833QCL の外観を示す。

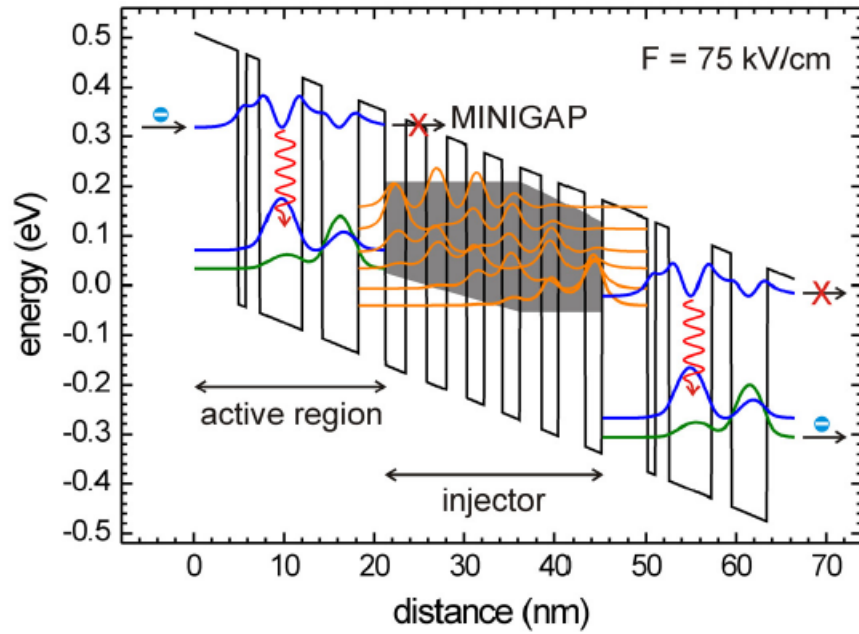


Fig. 2-8 QCL の典型的なバンド構造[13]

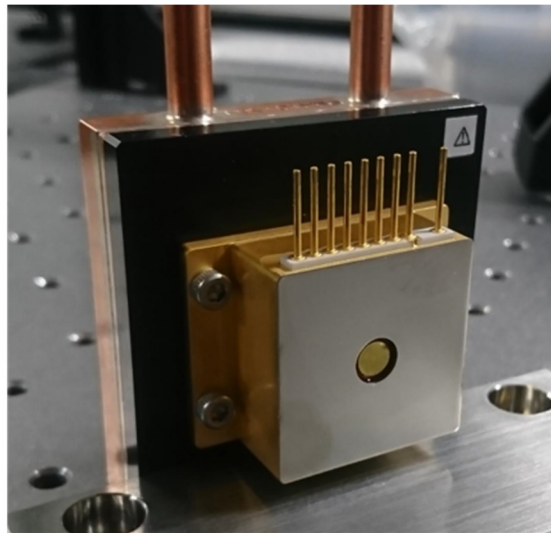


Fig. 2-9 LE0833QCL 外観 (浜松ホトニクス)

LD ドライバと温度コントローラ

QCL を正常に動作させるためには、電流源である LD ドライバと温度制御用の温度コントローラ・ヒートシンクが不可欠である。本研究ではこれに対し、LD ドライバとして低ノイズ QCL ドライバである QCL1000LAB (Wavelength Electronics) を、TEC コントローラとして温度制御の分解能が高い PTC2.5K-CH 2.5A (Wavelength Electronics) を使用した。Table 2-7 にそれぞれの主な性能を示す。

Table 2-7 電流ドライバ・温度コントローラの性能

Module	Model	Specifications	
LD driver	QCL1000LAB (Wavelength Electronics)	Current	0 ~ 1 A
		Modulation bandwidth	3 MHz
		Current noise (Max. RMS)	1.3 μ A
TEC controller	PTC2.5K-CH 2.5A	Max. output current	2.5 A
		Temp. stability (Short term)	< 0.0012°C

QCL セットアップと光学系

QCL セットアップおよび光学系は本研究を遂行する過程で、複数回のデザイン変更を経た。QCL・レーザー光学系全体のセットアップとして、典型的な例を Fig. 2-10 に示す。DFB-QCL から出射した光が、光共振器や各光学素子により反射し、QCL 素子に不用意に戻る (戻り光) と QCL の動作が不安定になってしまう。このため、30 dB の中赤外光アイソレータ (Thorlabs, IO-4-4500-WG) を設置し戻り光を遮断した。アイソレータ直後のパワーを最適化し、アイソレータ入射前の 75% のパワーを得た。これは光アイソレータの透過仕様と同程度であり、アイソレータは最適に使用されていると評価した。CRDS 測定のための光スイッチング用の素子として音響光変調器 (Acoustic Optical Modulator: AOM) を採用した。AOM は光の偏光に大きく依存するため、アイソレータの前には中赤外 $\lambda/2$ 波長板を設置した。AOM については後述する。

光共振器へのレーザー光の輸送には光ファイバー (Thorlabs, P3-32F-FC-1) を用いた。光ファイバーとの効率的なカップリングのために、2 枚のレンズにより構成されるテレスコープでビーム径を調整した。ファイバーカップリングの効率性は最大で 60% 程度となった。最終的に光共振器に導入されるパワーは典型値で温度 25°C・電流 900 mA の QCL で、約 5 mW であった。以上に加え、第 3 章

にて述べる Passive feedback、低 Finesse ファブリペロー干渉計 (FPI) または Si 製のエタロンと N_2O ガスセルを組み合わせた QCL 周波数較正システム(後述)、中赤外光周波数コムとのビート測定用の光ピックアップが、典型的な ^{14}C -CRDS の QCL セットアップである。QCL セットアップは $60 \times 60 \times 2.5$ cm のアルミニウム製ハニカム光学ブレッドボード (Thorlabs, B6060AE) に収まるように配置された。これにより QCL セットアップのアライメントを壊すことなく輸送することができる。本研究遂行において、茨城県東海村の積水メディカル株式会社薬物動態センターでの共同実験や名古屋大学西澤研究室での共同実験、および名古屋大学アイソトープ総合センターへの装置移設の際は、実際にブレッドボードごと輸送したが、大きな調整を必要とせず、装置の可搬性が証明されている。

当初、可搬性の確保のしやすさや設置位置に自由度を持たせるために、光共振器への入射には光ファイバーを用いていたが、その後、光ファイバーへの入射効率が低くパワーを損失してしまうこと、光ファイバーによる偏光の変化やカップリング効率の変動が装置全体の不安定性につながる可能性があることが示唆され、自由空間で光共振器まで輸送する体系を構築した。本論文において、これ以降、特別な記述がない場合には、DFB-QCL として L12004-2209H-C、光共振器までの輸送は光ファイバーを使用した体系を使用したものとする。

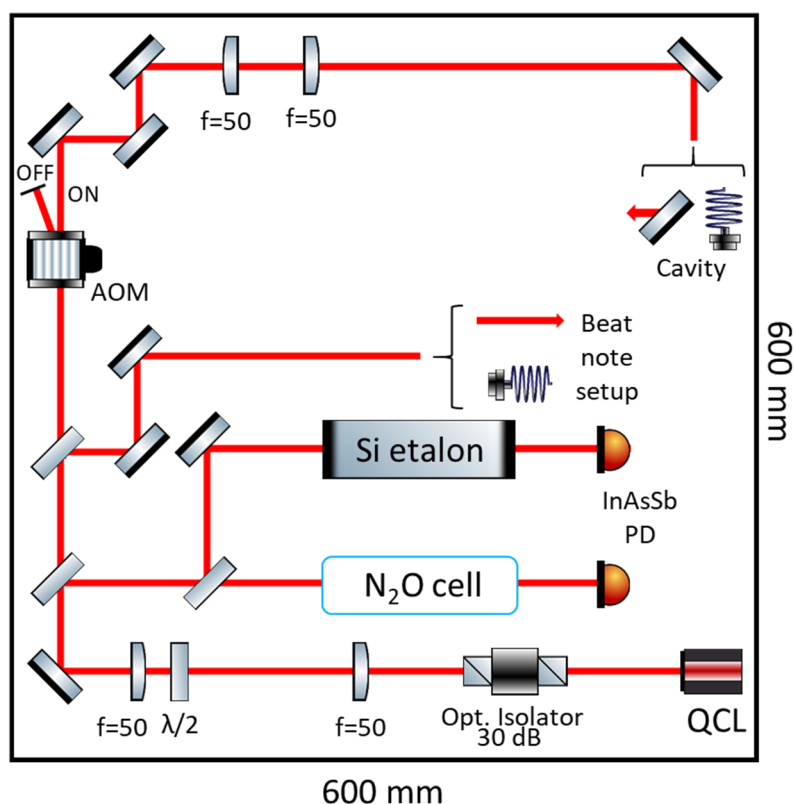


Fig. 2-10 典型的な QCL セットアップ

光スイッチング

CRDS 測定のためには光共振器から光が透過したタイミングで、入射光を共振器内の光の滞在時間より十分に早く遮断する必要がある。これには大きく分けて二つの手法が存在する。入射レーザー光の波長、もしくは共振器長を素早く変調することによって共鳴条件から高速に外す手法と AOM や電気光学変調器 (Electro-Optic Modulator: EOM) などの光変調素子を用いてレーザー光を変調し、遮断する手法である。本研究では光スイッチとして 37 dB の AOM (Isomet, M1208-G80-4) を採用した。AOM は音響光学効果を利用したもので、結晶を超音波で振動させると音波の周波数に応じて格子定数が制御できる。Fig. 2-11 に AOM の概要を示す[14]。AOM は信号発生器である RF ドライバ (Isomet, iSPA-281) によって制御され、回折角は RF ドライバからの信号の周波数に依存する。AOM の仕様に従い、iSPA-281 からの RF 周波数は 80 MHz と設定した。QCL のファイバカップラは AOM の変調後のパスに合わせられており、AOM を高速で off にすることによりパスが大きく変化する。この結果、光がファイバーを通らなくなることで、レーザーが遮断される。AOM、RF ドライバともに動作に伴い発熱するため、チラーを用いた水冷により 20°C 以下に保つ必要がある。水冷ヒートシンクを使用した QCL (LE0833QCL) にも冷却水が必要なため、1 台のチラーを用いて両方を冷却した。

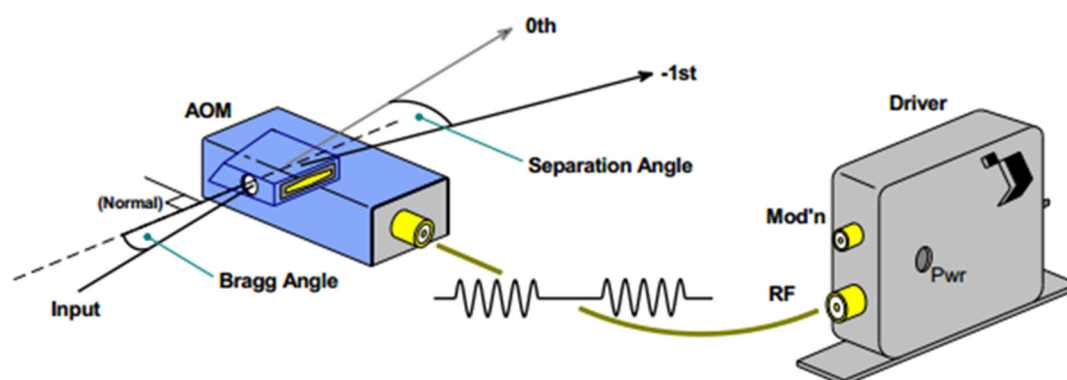


Fig. 2-11 AOM 概要[14]

低フィネス FPI と分子吸収線を用いた周波数較正

DFB-QCL の周波数較正には低フィネス FPI (Fig.2-12(a)) [15]、その後継としてシリコン (Si) エタロン (Fig.2-12(b)) と N₂O セルを用いた。Fig. 2-13 に Si エタロンを使用した周波数較正の体系を示す。低フィネス FPI と Si-エタロンの大きな違いは Si の屈折率の高さにある。自由空間を媒質とする低フィネス FPI と比較して、Si エタロンのフリースペクトルレンジ (FSR、第 3 章にて説明) は低くなり、同じ長さであっても周波数的に多くの共振ピークを取得可能である。また、Si エタロンは FPI と異なり 1 つの素材で作られ、反射面となりうる面が共振器を構成する 2 つのみしか存在せず、常に平行に向かい合うため、アライメントの変化やミラー背面のエタロン効果によって共振ピークがゆがむ問題が生じない。一方で、Si は温度変化で屈折率が大きく変化するため、FSR が不安定になり、周波数較正精度が悪くなる。この影響を低減するために、Si エタロンの周囲を温度制御されたケースで覆うとともに、絶対周波数リファレンスとして N₂O セルを用いた。分子吸収線のピーク位置は Si エタロンと異なり外部温度変化に対して安定なため、分子吸収線を用いてエタロンの FSR を毎スキャン較正することで QCL の周波数をより高精度に較正できる。N₂O はターゲットである ¹⁴CO₂ 吸収線付近に断面積の大きい吸収線が数多く存在しており、周波数参照として最適である。Si エタロンとして Light Machinery 製 Si ソリッドエタロン (OP-2638-83110、長さ: 83.11 mm、透過率: 43% at 4.5 μm、屈折率: 3.42、FSR: ~ 512 MHz)、N₂O セルとして Wavelength Reference 製 N₂O ガスセル (N2O-0.5-MgF₂、セル内圧力: 2 Torr、N₂O 分圧: 100%) を用いた。Si エタロン全体は断熱材で覆ったアルミ製の箱に収め、ペルチェ素子、サーミスタを用いた温度制御を行った。制御には DFB-QCL と同様の、Wavelength Electronics 製 PTC2.5K-CH を用いた。周波数較正系へ送る QCL のパワーはガラスプレート (透過反射比、90:10) と偏光板によって調整された。

Si エタロンと N₂O セルによる QCL の周波数較正について流れを説明する。Fig. 2-14 に CRDS 測定により取得される信号として、デジタイザ (National Instruments, PXI-5922) にて測定された CRDS スペクトル(a)、DAQ (National Instruments, PXIe-6341) にて測定されたエタロンの透過光信号(b)、N₂O の吸収スペクトル(c)を示す。ここで各横軸は測定時間であるが、エタロンのピーク間隔は周波数スケールではエタロンの FSR に等しい。よって、まず時間スケールの横軸をエタロンの山と谷の位置を利用して横軸を FSR 数 (相対周波数) に較正した。横軸を FSR 数としたエタロンの透過光信号(a)と N₂O の吸収スペクトル(b)を Fig. 2-15 に示す。ここで FSR 数とエタロンの FSR (512 MHz) の積に、オフセット周波数を加算することで絶対周波数に変換が可能である。しかし、前述の通りエタロンは温度変動による FSR の時間的变化が大きく、数秒の測定には耐

えられるとしても、数分間の連続測定のためには不確かさが大きい。そこで、 N_2O の吸収線を用いてエタロンの FSR とオフセット周波数を波長掃引毎に求めることで周波数較正の不確かさを抑制した。CRDS によるスペクトル同様、HITRAN 吸収線パラメータ[9]を用いることで N_2O の吸収スペクトルを計算可能である。エタロンの FSR とオフセット周波数をフィッティングパラメータとして、 N_2O 吸収スペクトルの実験値と計算値に対して最小二乗法によるフィッティングを行い、FSR 数を絶対周波数に較正した。Fig. 2-16 に横軸が波数 (=周波数/光速) に較正された N_2O 吸収スペクトルを示す。以上から、エタロンと N_2O 吸収線を用いた周波数較正がなされる。また、当初は PXI-5922 と PXIe-6341 の同期は、QCL への電流変調信号をどちらでも取得することで行っていたが、後にデジタイザのデータ取得時に出力される TTL パルスを用いて同期した。これにより、CRDS により測定された減衰率が各波数に対応し、最終的なスペクトルが出力される。上述した処理は、オフラインで Python によるプログラムにより実施された。Fig. 2-17 に波数に較正された CRDS スペクトルを示す。このようにして絶対周波数に較正した各スキュンのスペクトルを重ね合わせ平均を取得することで、統計誤差の低減を図った。

本手法は、従来までの電流による周波数較正と比較して、格段に高精度な較正が可能であるが、1 スペクトルを取得する測定時間が長い場合には、1 スキャンの間の不安定性が精度に影響する。また、その周波数較正精度はエタロンの透過特性に依存し、現状のシステムでは原理上 5 MHz 程度の不確かさをもつ。また、少なくとも 2 本以上の N_2O 吸収線が存在するような領域を 1 スペクトル取得の範囲として選ぶ必要があり、例えば $^{14}\text{CO}_2$ 吸収のみの領域を測定したい場合には適用できない。

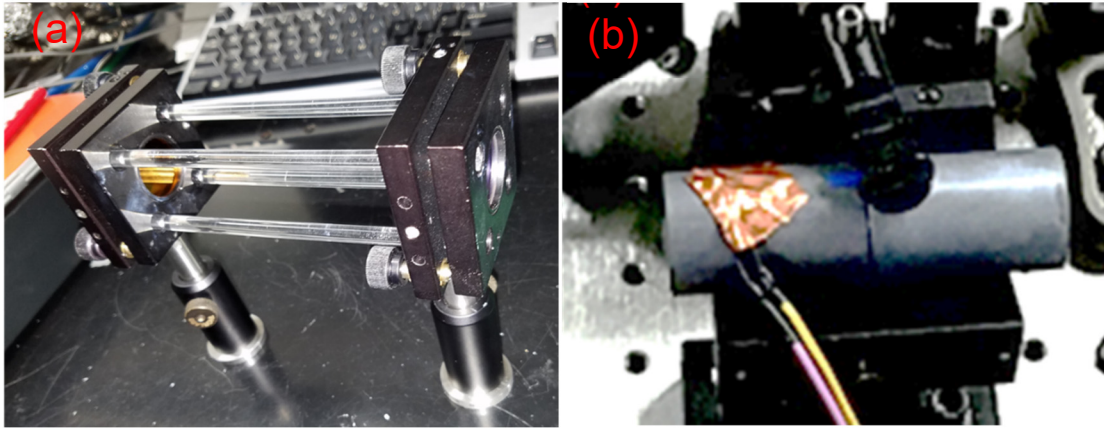


Fig. 2-12 周波数較正用低ファイネス FPI(a)と Si エタロン(b)

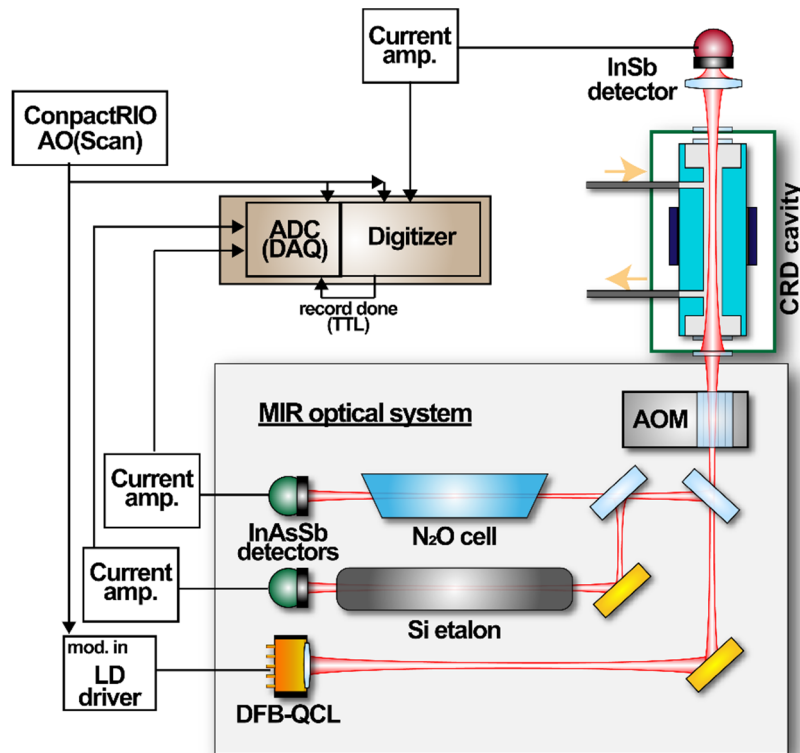


Fig. 2-13 周波数較正の体系

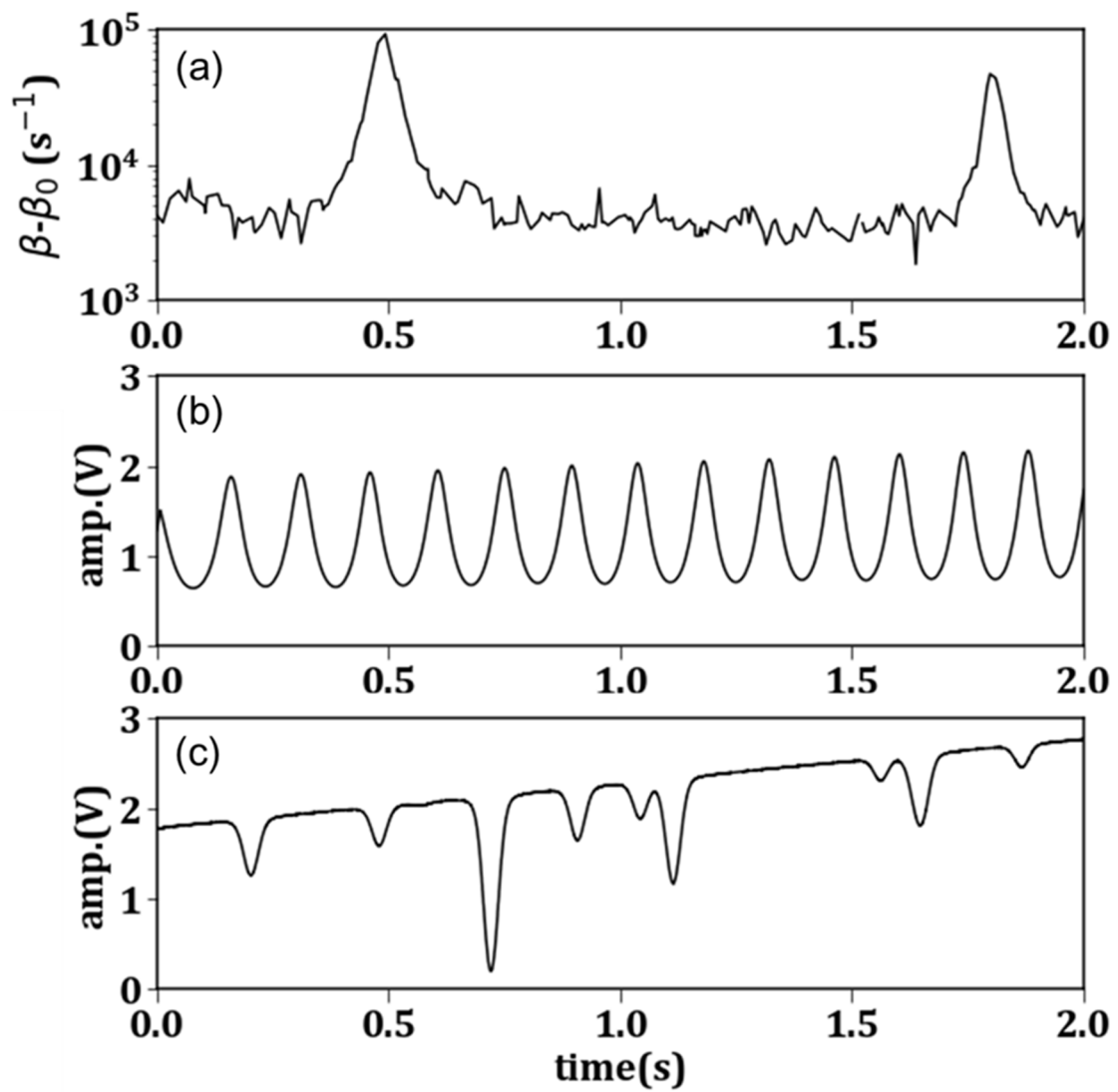


Fig. 2-14 CRDS 信号で記録された 1 つの生信号
 (a)CRDS 減衰率、(b)エタロンの透過光信号、
 (c)N₂O の吸収スペクトル
 QCL の波長は時間線形的にスキャンされた。

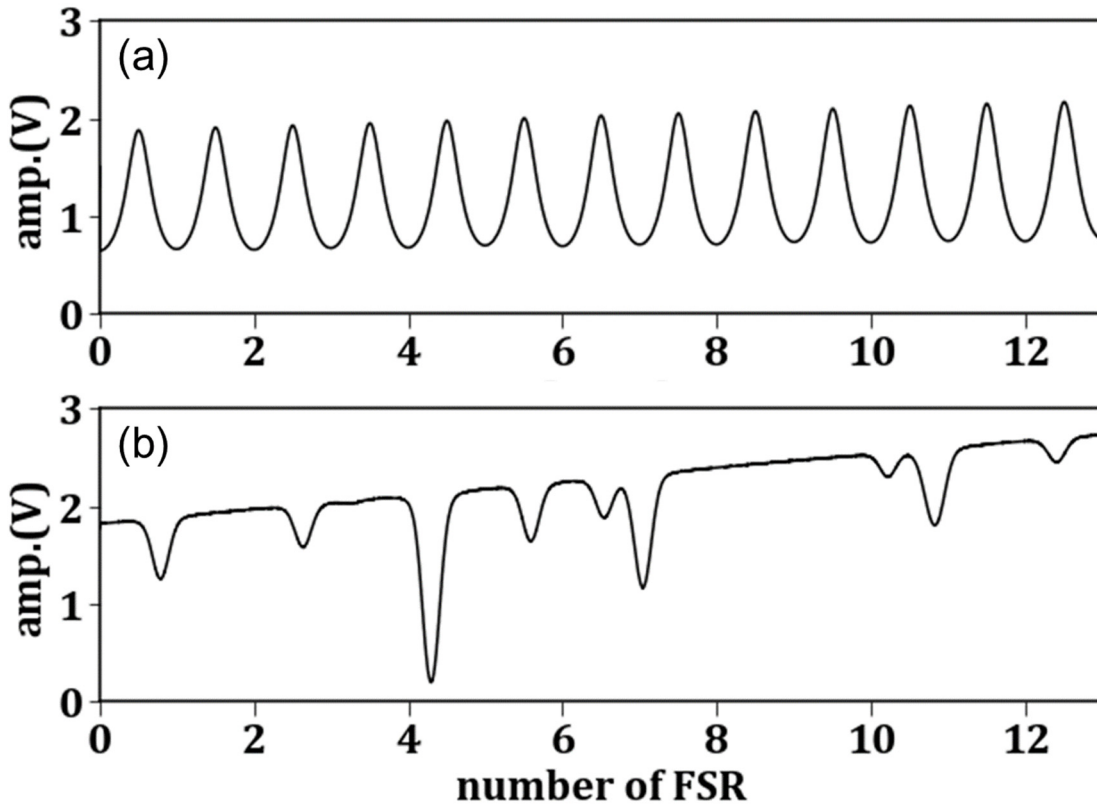


Fig. 2-15 エタロンの透過光信号(a)と N₂O 吸収スペクトル(b)
 横軸を FSR 数 (相対周波数) に較正

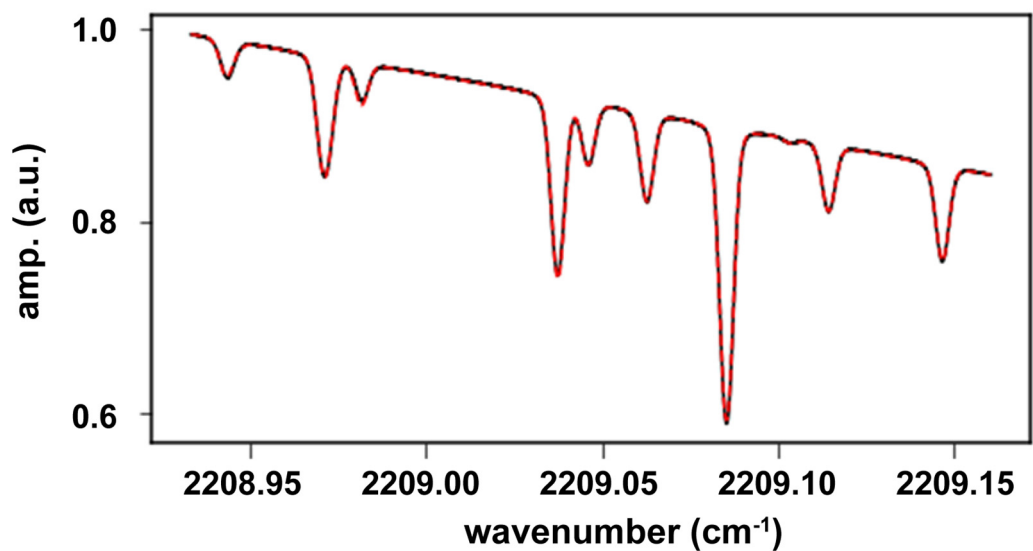


Fig. 2-16 N₂O の吸収スペクトルフィッティング
 (黒線: 実験値、赤点線: 計算値)

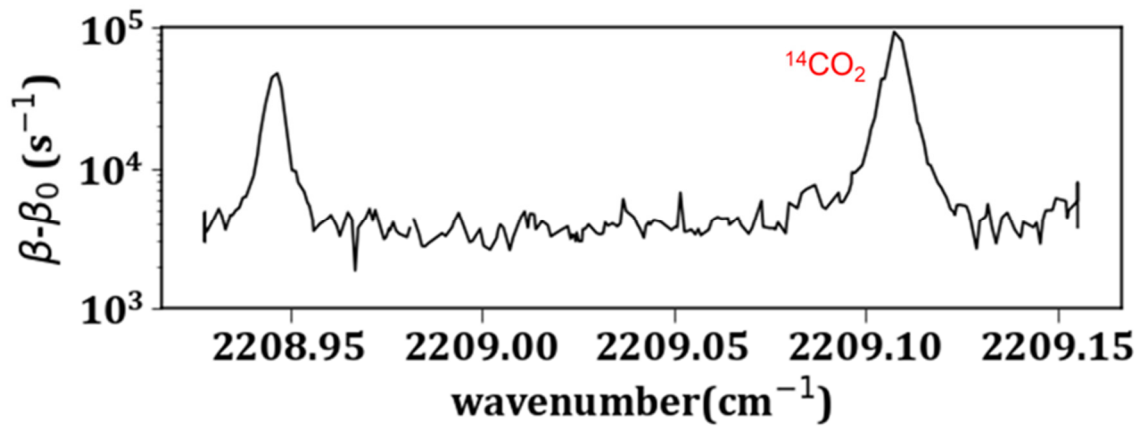


Fig. 2-17 CRDS スペクトル (横軸を波数に較正)

2.4 光共振器とその温度制御・冷却

光共振器・ガスセル

光共振器・ガスセルは ^{14}C -CRDS 用に設計・製作された[5,16]。共振器は 2 枚の中赤外高反射率ミラー (CRD optics 製、中心波長: 4600 nm、反射率: ~99.98%、曲率半径: 1 m) で構成された FPI であり、共振器長は 33 cm である。また共振器中心には直径 5 mm の穴が開いており、空洞内をレーザー、および測定ガスが通る仕組みとした。Fig. 2-18 に光共振器の 3D-CAD イメージと実際の外観を示す。レーザー入射側 (ファイバーサイド) のミラーにはリングピエゾアクチュエータ (Piezomechanik 製、16 μm 最大ストローク) を取り付け、光軸調整が可能な真空用高安定ミラーマウントで保持し、検出器側は、同様の真空用高安定ミラーマウントを用いてミラーを保持した。ピエゾは、ファンクションジェネレータとピエゾドライバーを用いて動作させ、共振器長を三角形的にスキャンした。レーザー透過用窓には 2 つのサファイヤビューポートを用いた。ビューポート装着面はエタロン効果防止のため光軸と垂直な面に対して角度を 1~4 度つけた。共振器を冷却する必要 (詳細は後述) から共振器をチャンバーに導入する二重真空構造を採用した。

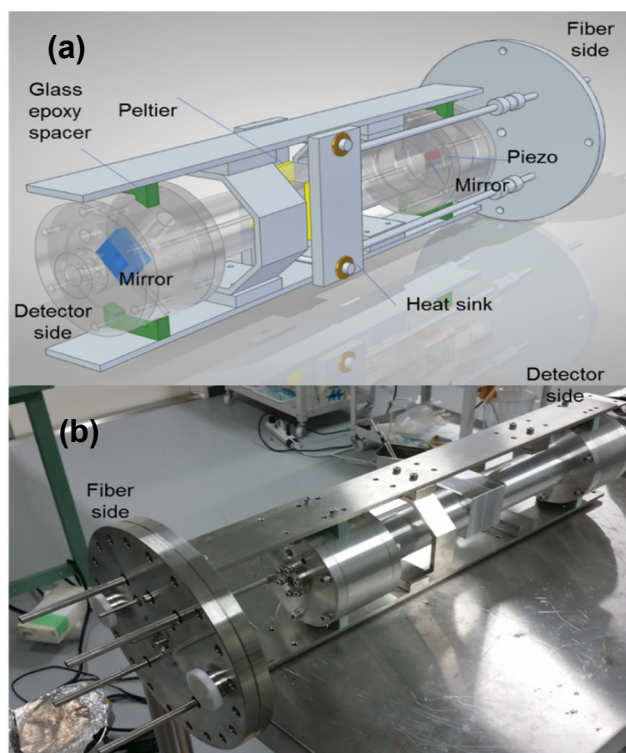


Fig. 2-18 ^{14}C -CRDS 用光共振器
(a)3D-CAD イメージ (b) 実際の外観

モードマッチング

レーザー光は空間的に拡がりをもって輸送され、レンズ等によって整形される。レーザー光の伝搬する Z 方向に対し、それぞれ垂直な X 軸・Y 軸方向の断面はそれぞれガウシアン関数で表せる。このようなレーザー光をガウシアンビームと呼び、光学系をガウシアン光学系という。また、X・Y 断面のビーム形状のことをビームプロファイルと呼び、それぞれ強度が最大値から e^{-2} (= 13.5%) となる幅をビーム径 (半径、Beam radius) と定義する。ここで、Z 軸は地面に対し平行であり、X 軸を地面に対し水平、Y 軸を鉛直方向にそれぞれとる。Z 軸にレーザーを輸送する場合の輸送距離 z に対するビームプロファイルはレンズなどの光学系を含め、ABCD 行列によるガウシアンビーム輸送計算により計算することができる[17]。一方、光共振器には、使用しているミラーの曲率半径と光共振器長により固有の空間モード (固有モード) が存在している。Fig. 2-19 に ^{14}C -CRDS 用光共振器 (FPI) の固有モード (縦軸はビーム半径) を示す。ミラーの形状に水平・鉛直方向で差がなければ、固有モードはどちらも等しくなる。Fig. 2-19 中で最小のモード半径をとる点をくびれになぞらえてビームウェスト (Beam waist) と呼ぶ。理想的には、FPI に入射した光は、その固有モード内部のみに閉じ込められ、同一線上で多重反射を繰り返して透過光が漏れ出てくる (TEM₀₀ モード)。この時、固有モード内の光は必ず同一の反射回数で FPI 内部を 1 周する。しかし、入射レーザーが FPI の中心軸からずれている場合や、レーザー光の入射ビームプロファイルと FPI の固有モードが全く一致していない場合などには、1 周期が固有モードよりも多い反射回数を持った、高次モードが発生するようになる。すなわち、FPI の共振周波数にモード縮退が起き、透過スペクトルに TEM₀₀ モード以外のサイドモードと呼ばれるピークが発生する。高次モードが発生すると、単一モード (シングルモード) で発振しているときと比べて透過光の強度が減少するとともに、反射回数が異なるせいで、TEM₀₀ モードより大きなリングダウンレートを示すため、リングダウンレートのばらつきの一因となる。このため、FPI をシングルモードで発振させるために、入射レーザーのビームプロファイルを FPI 固有のモードに一致させること (モードマッチング) が求められる。モードマッチングでは固有モードに一致させるために、適切な焦点距離を持つ 2 つのレンズ (フォーカスレンズ・マッチングレンズと呼ばれる) を適切な位置に設置することでビームプロファイルを変換する。Fig. 2-20 にナイフエッジ法により測定されたファイバコリメータ直後のレーザーのビームプロファイルを示す。これより、コリメータ直後のビームウェストは 0.428 mm で、コリメータ表面から 6.48 mm に存在することが分かった。以上から、ABCD 行列により計算されたモードマッチング光学設計とそのビームプロファイルを Fig. 2-21 に示す。これらの評価によりモードマッチングレンズを含めた FPI へ

のレーザー入射体系を構築した。よりコンパクトで、輸送可能なシステムを実現するため、Thorlabs 製の 30 mm ケージシステムを用いて、ガスセルの外側フランジに直接保持した。FPI からの透過光を測定して得られた典型的な共鳴信号を Fig. 2-22 に示す。図中 5 ms 付近にみられるピークが FPI の TEM₀₀ (メイン) モードであり、2 ms 付近にみられるのがサイドモードである。モードマッチングによりサイドモードは十分に抑制された。

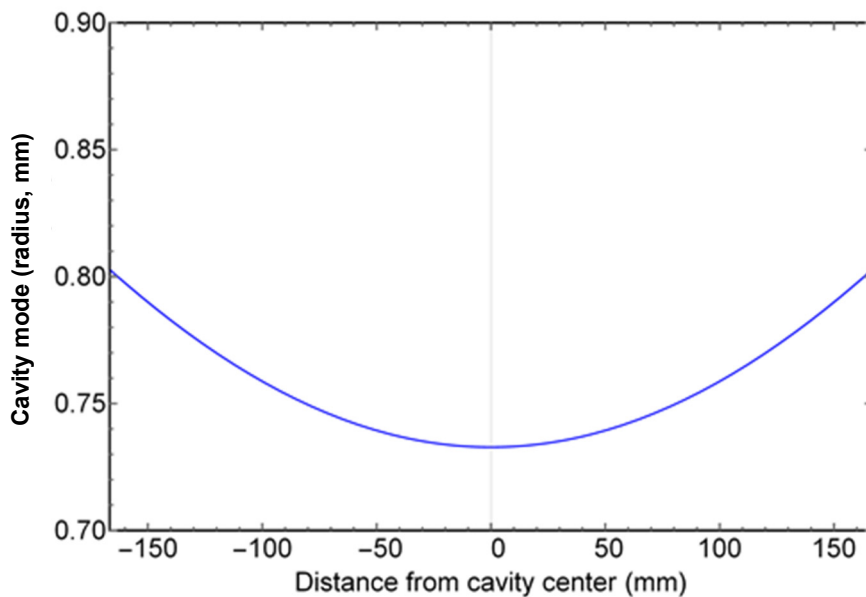


Fig. 2-19 ¹⁴C-CRDS 光共振器固有モード (レーザー波長 4526 nm)

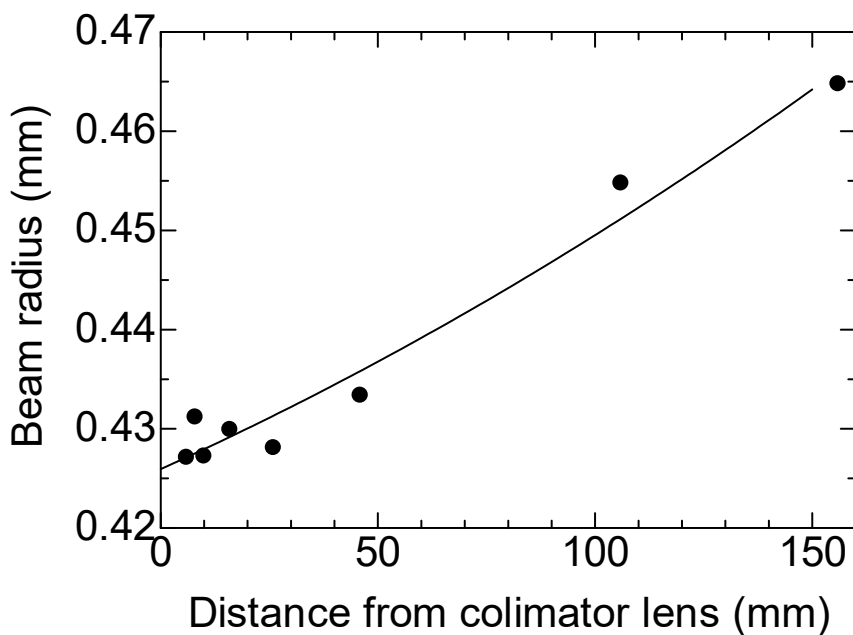


Fig. 2-20 DFB-QCL のファイバコリメータ後のビームプロファイル

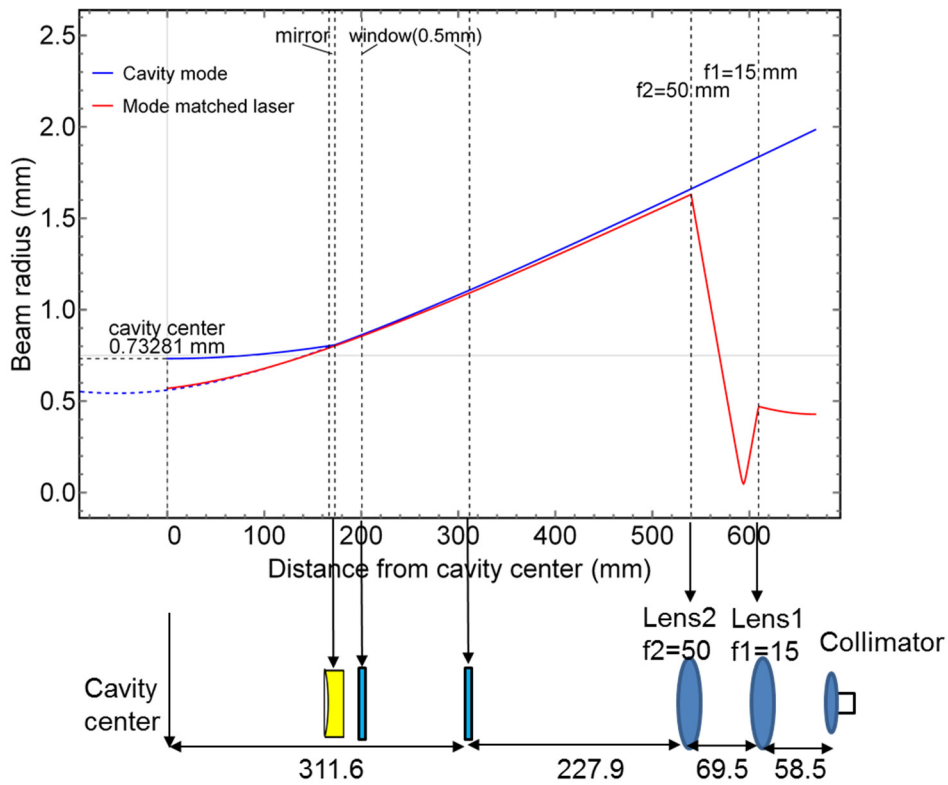


Fig. 2-21 モードマッチング計算結果と体系
 図中単位は mm

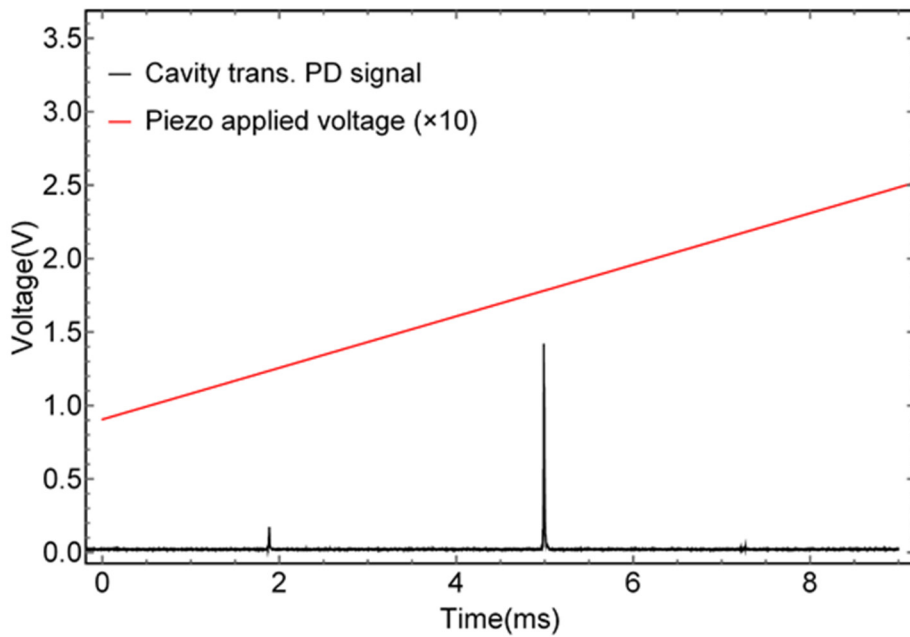


Fig. 2-22 光共振からの透過信号
 図中赤線はピエゾに印加された電圧を示し、共振器長に対応

光共振器の冷却機構とその温度制御

Table 2-6 に示される干渉線のうち、CO・N₂O・O₃ は、測定気体中の濃度を小さくすることで抑制が可能である。一方、¹³C¹⁶O₂ による吸収は、試料中の炭素同位体比を変化させなければ（同位体分離しなければ）減少させることができず、¹⁴C 濃度が低くなると、¹³C¹⁶O₂ 吸収線に ¹⁴C¹⁶O₂ 吸収線が埋もれてしまうため測定できない。このため、気体冷却により ¹³C¹⁶O₂ 吸収線のみを低減させる必要がある。一般に、分子吸収強度は、遷移前の状態にある分子のポピュレーションに依存する。通常の流れのない気体では、それを構成する分子の速さ v は $v = 0$ を中心としてマクスウェル・ボルツマン分布に従い、

$$f(v) = 4\pi v^2 \left(\frac{m}{2\pi kT}\right)^{3/2} \exp\left(-\frac{mv^2}{2kT}\right) \quad (2-1)$$

で記述される。ここで $f(v)$ は確率密度関数、 m は分子質量、 k はボルツマン定数、 T は分子温度である。温度が高いほどより高エネルギー準位に存在する割合が増加する。ここで、本研究で着目した ¹⁴C¹⁶O₂ 吸収線に干渉する ¹³C¹⁶O₂ 干渉線は、(05⁵1-05⁵0) というすでに高エネルギー準位にある分子がさらに上の準位に上がる吸収遷移である。このような高エネルギー準位にある分子の数は温度を下げれば下げるほど少なくなるので、¹³C¹⁶O₂ の吸収は気体を冷却することで抑制することが可能である。一方で、¹⁴C¹⁶O₂ の(00⁰1-00⁰0) P(20) 遷移は基底準位にある分子が一つ上の準位に上がる吸収遷移であり、気体温度が下がってもその吸収強度は大きく変化することはない（むしろ若干、増加する）。これまでの研究で 100 ppt の ¹⁴C を測定したい場合、信号対雑音比（Signal to Noise Ratio: SNR）を 100 確保したい場合には気体温度を 233 K（−40 °C）以下まで冷却する必要があると評価されている [18]。Fig. 2-23 に全圧 20 Torr・二酸化炭素分圧を 20%・¹⁴C 存在比 100 ppt とした場合の ¹⁴C¹⁶O₂ P(20) と安定炭素同位体を含む二酸化炭素の吸収スペクトルを、気体温度を変化（300 K、273 K、253 K、233 K）させて計算した結果を示す。低温にすればするほど安定炭素を含む二酸化炭素の吸収は低減され、¹⁴C¹⁶O₂ P(20) 吸収が顕著になった。これより、冷却による分析感度向上の見込みを得た。

233 K まで光共振器を冷却するために低温冷媒循環チラーとペルチェ素子（Sensor Controls, UT7070-AL）を 2 枚用いた冷却機構を構築した。共振器は Fig. 2-24 に示されるような外側チャンバーの中に導入されており、二重真空構造によって大気と隔離された。チラー温度を 243 K に設定し、ペルチェ素子による冷却実験を行った結果、到達温度 233 K を達成した（Fig. 2-25）。実験ではサーミスタをヒートシンク上、分析セル（Inner chamber）のヒートシンク近く（セル中央部、測定点 A）、分析セルの端（測定点 B）に取り付け、それぞれの温度を記

録した。この結果より、273 K から 233 K まで到達するのに約 5 時間かかることが分かり、実験の準備時間の関係から、本研究においては 253 K 以上の温度で実験を行った。この冷却時間は、外側チャンバーの真空度を高め、断熱性能を高めることで向上することが期待される。

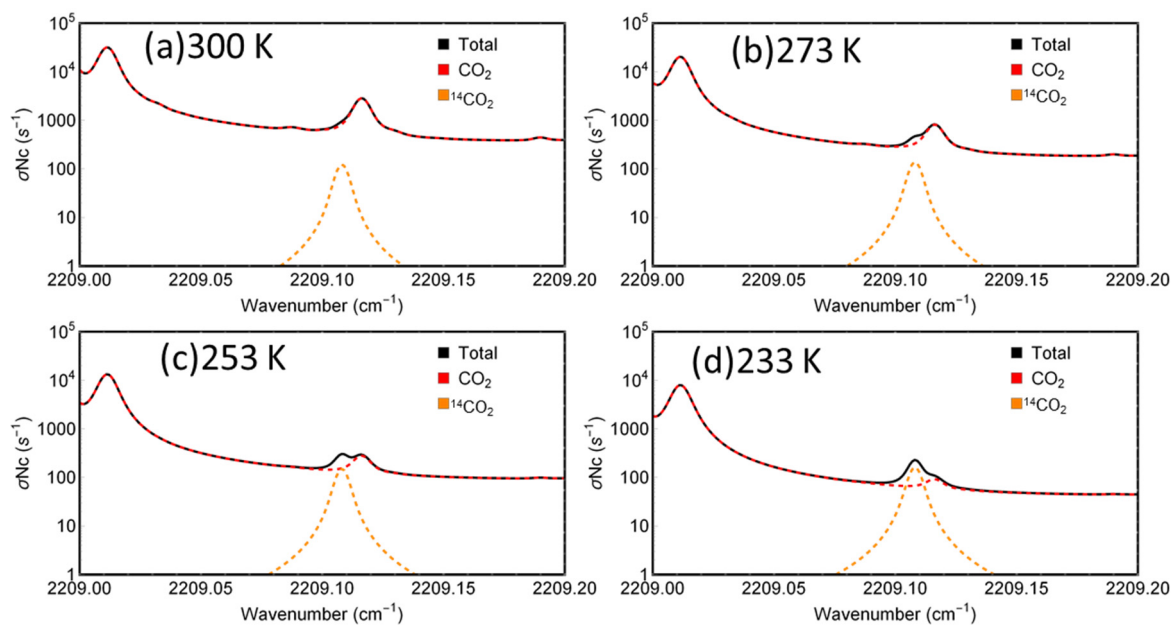


Fig. 2-23 各温度での吸収スペクトル
全圧 20 Torr ・ 二酸化炭素分圧 20% ・ ^{14}C 存在比 100 ppt

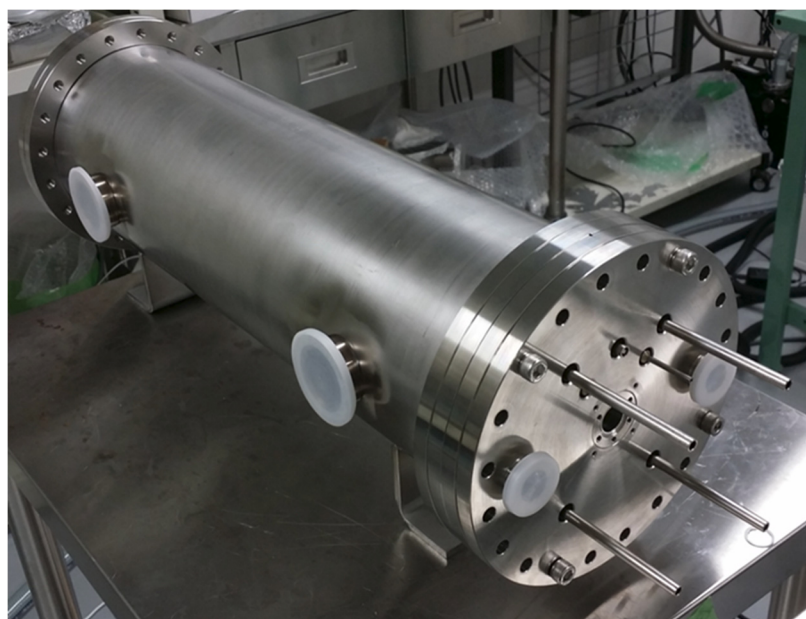


Fig. 2-24 外側チャンバー外観

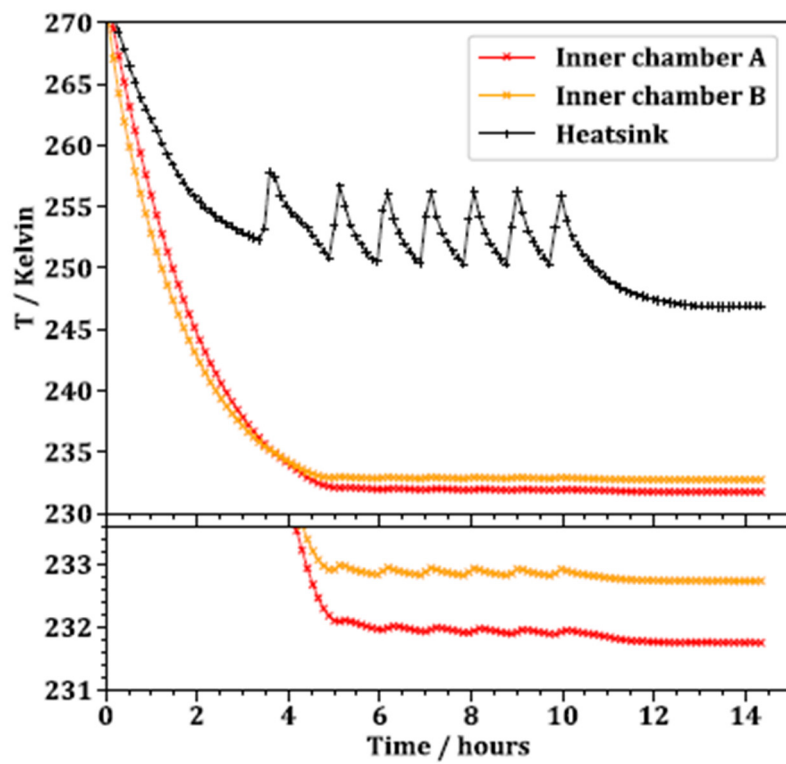


Fig. 2-25 ガスセル冷却 (233 K) と経過時間

2.5 検出器・信号処理系

光検出器

光共振器から漏れでた光はフォトダイオード (Photo Diode: PD) などの光検出器を用いて検出される。光検出器は Fig. 2-26 に示すように、その素子により対応波長が異なる[19]。図中 D^* は受光面積で規格化された比検出能力で、1 W の光が 1 cm^2 の受光面に入射したときに、検出素子の SNR がどれだけあるかを示す指標である。 D^* が高いほど感度の高い検出器である。4.5 μm 帯光の検出において InSb (Indium Antimonide) 検出器はほぼ理論限界値に近い最適な検出器と評価できる。これより 4.5 μm 帯光の検出のために、InSb 光起電力型 (Photo-Voltaic: PV) 検出器を採用した。InSb 検出器は高い電子移動度を持っているため検出感度が高く応答速度も速い一方で、狭いバンドギャップ (0.17 eV、300 K) を持つため室温では熱によって起電力が発生してしまい S/N 比が悪くなる。InSb 検出器での高分解能測定時には液体窒素とデュワー冷却器を用いた冷却が必要となる。ここでは InSb 検出器として高い信頼性を持つ Teledyne Judson technologies 製の J10D-M204-R100U-60 を採用した。Fig. 2-27 に示すように、液体窒素冷却のためのデュワーとセットになっている。

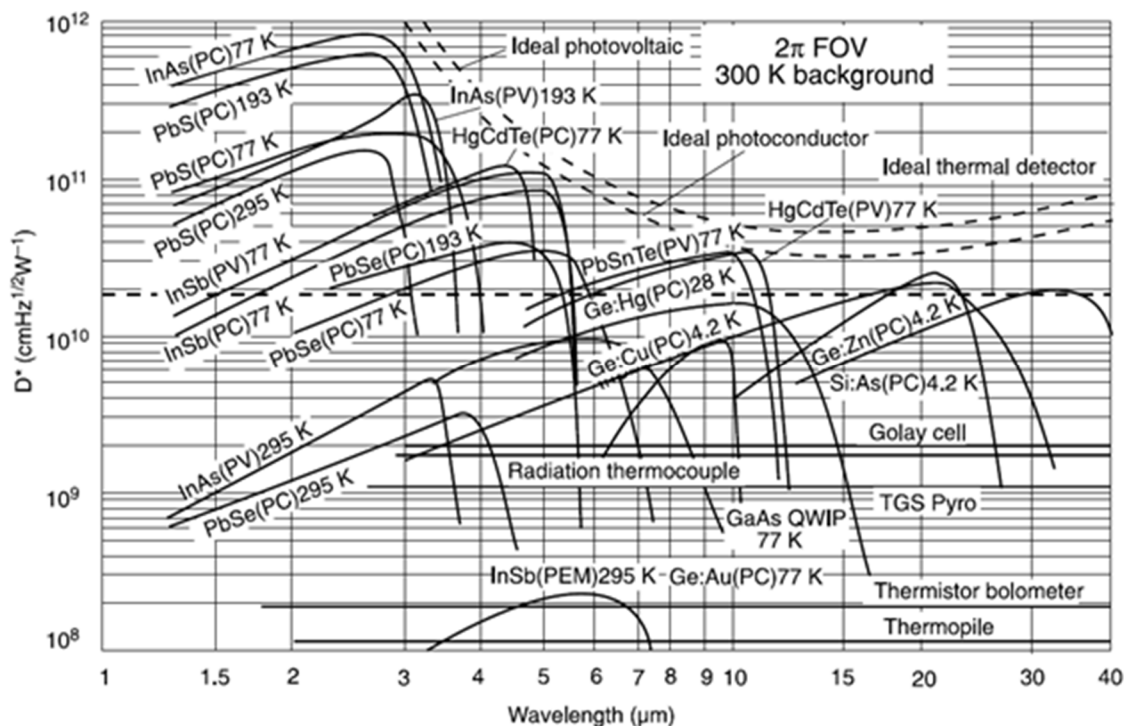


Fig. 2-26 様々な赤外検出器と検出能力の比較[19]



Fig. 2-27 InSb 検出器外観

リングダウン信号取得・データ集録・波長スキャン

検出器からの電流信号は 10^5 V/A のトランスインピーダンスゲインと 40 MHz の帯域を持つ高速カレントアンプ (Femto-Messtechnik, HCA-40M-100K-C) により電圧信号に変換され、コントロール PC である PXIe-8840 (National Instruments) に実装された高分解能ディジタイザ (National Instruments, PXI-5922) にてデータ集録された。リングダウン (RD) 信号取得・信号集録・波長スキャンの流れを以下に示す。AOM は通常 on の状態になっており、DFB-QCL のパスは AOM が on の状態に合わせている (Fig. 2-10 参照)。まず共振器からの透過光は光検出器に入射され、その出力信号 (カレントアンプからの信号) がコンパレータ (自作) で設定した閾値を超えたタイミングでコンパレータより TTL パルスが出力される。閾値には CompactRIO (National Instruments) に実装された AO モジュール (National Instruments, NI9269) から出力された DC 電圧を用いた。TTL パルスは FPGA モジュールである CompactRIO (National Instruments) に実装されたデジタル I/O モジュール (National Instruments, NI9402) のデジタル Input に入力され、同モジュールのデジタル Output から AOM の RF ドライバに LvTTL (~ 3.5 V) によって off の信号が送られる。これにより共振ピークが現れたタイミングでレーザーを off にすることで RD 信号が取得される (Fig. 2-28)。コンパレータおよび FPGA モジュールである CompactRIO の動作は十分早い (閾値を超えてから 100 ns 程度の遅れ) 一方で、CompactRIO からの off 信号を受け取ってから、

AOM が光を遮断するまでには数 μs の遅れが生じる。これは AOM の RF ドライバに起因していることが分かっており、今後の改善が望まれる。ディジタイザはトリガとして AOM に送られる LvTTL を立ち下りで待機しており、RD 信号が生成されるごとに集録を開始する。これにより RD 信号のみを集録し続けることが可能である。

吸収スペクトル取得のためには RD 信号を取得しながら DFB-QCL の周波数を掃引(スキャン)する必要がある。周波数スキャンは CompactRIO アナログ Output モジュール (National Instruments, NI9269) から DFB-QCL の LD ドライバに階段状の変調信号を送ることでなされる。このとき、RD 信号取得中に DFB-QCL 周波数が変更された場合、AOM により光は遮断されているため、原理的には測定には影響を及ぼさない。しかし、有効な波長モニタリング手法が存在しない場合には、LD ドライバに加えた変調から DFB-QCL の周波数を推定する必要があり、周波数の 1 ステップごとに確実に 1 つの RD 信号を集録できるようにする必要があった。しかし、ディジタイザのトリガ待機デッドタイム (リアムタイム) などの問題で発生する RD 信号を 1 つも逃すことなく取得することは難しい。そこでディジタイザのデータ集録に合わせて NI9402 デジタル Output から LvTTL を出力し、同モジュールのデジタル Input (周波数スキャンタイミング用) に入力するシステムを構築した。これにより周波数スキャンをディジタイザの RD 信号取得に同期させることができ、ディジタイザが 1 つ RD 信号を取得するたびに DFB-QCL の周波数が 1 段階変化する処理を実現することができた。Fig. 2-29 に構築した RD 信号取得・周波数スキャンシステムの概要を示す。CompactRIO、PXI-5922 は PXIe-8840 にインストールされた LabVIEW™ (National Instruments) により制御された。

上述したシステムは確実な周波数スキャンとデータ集録が可能な一方で、RD 信号のサンプリング速度が周波数スキャンの速度により制限されるという問題が存在した。そこで、低フィネス FPI、または Si エタロンによる周波数較正が実装された後は、Fig. 2-30 に示すように AOM に向けた LvTTL を直接周波数スキャンのタイミング用デジタル Input に入力するようなシステムに変更した。また、ディジタイザ (PXI-5922) に加え、複数チャンネルを有し、PXIe-8840 に実装可能な Analog Digital Converter (ADC) である PXIe-6341 (National Instruments) を用いて、周波数較正用の信号 (低フィネス FPI、または Si エタロンの透過信号、 N_2O ガスセルの信号) を集録した。PXIe-6341 についても PXIe-8840 にインストールされた LabVIEW™ により制御された。このシステムと高速サンプリング用ディジタイザ LabVIEW プログラム (後述) を組み合わせることで、これまでよりも速いサンプリングが実現された。Table 2-8 に CompactRIO の各モジュール・チャンネルについて役割をまとめた。DFB-QCL 周波数は RD 信号が生成される

たびに変化し、ディジタイザには数信号の取り逃がしがあるが、測定中に波長を正確にモニタリングできる機構がある場合には十分無視できる。PXI-5922 と PXIe-6341 は同じモジュール上に実装されているものの、それぞれのデータ集録は同期されていない。これらの同期のために、PXI-5922 と PXIe-6341 どちらでも CompactRIO からの周波数スキャン用 DC 電圧を合わせて集録し、データ取得後にオフラインで完全に同期できるようにした。

また、名古屋大学アイソトープ総合センターへの装置移設に際して、本データ取得・制御系についても変更が加えられた。具体的には、① 周波数スキャンがディジタイザのデータ取得とは完全に切り離され、線形・連続的にスキャンされるようになった、② 上述した周波数スキャン用 DC 電圧による PXI-5922 と PXIe-6341 の同期に加えて、PXI-5922 で 1 信号取得ごとに出力される TTL パルスを PXIe-6341 で取得した。これらの変更により、より安定した集録・周波数掃引・装置の時間同期を可能とした。

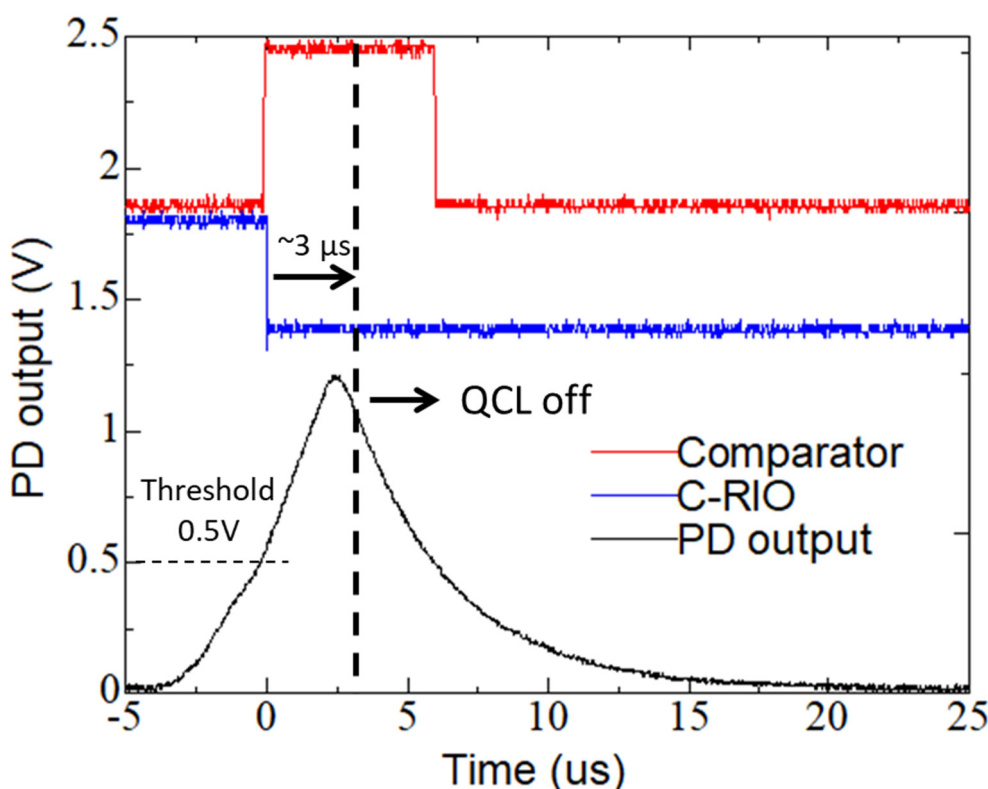


Fig. 2-28 リングダウン信号と光スイッチング
Comparator、CompactRIO（図中 C-RIO）の縦軸は任意にスケールされている。

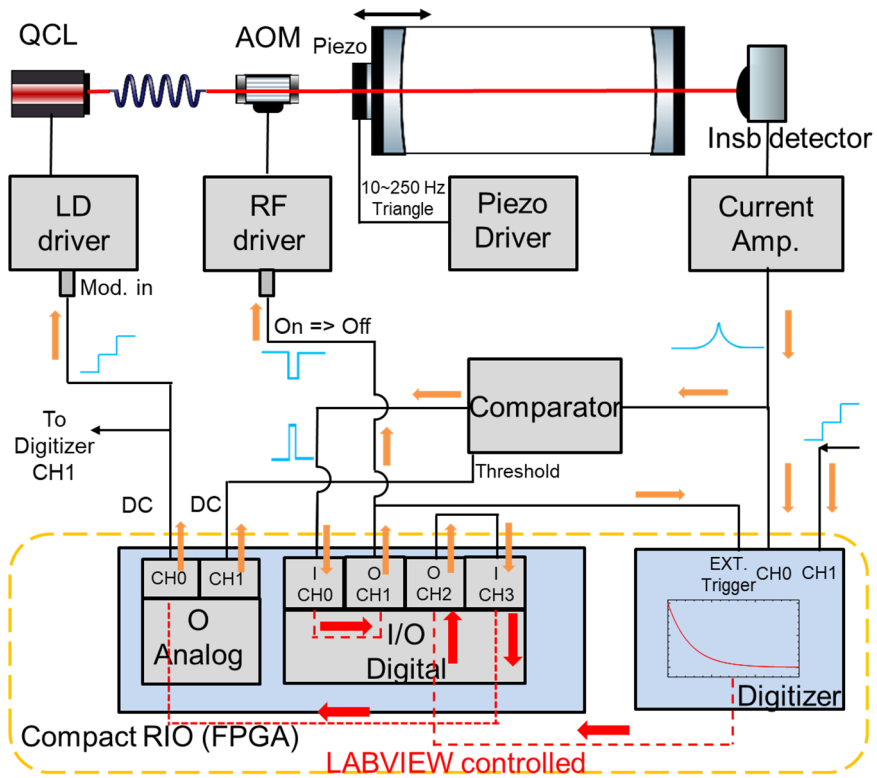


Fig. 2-29 RD 信号取得・周波数スキャンシステム (初期)

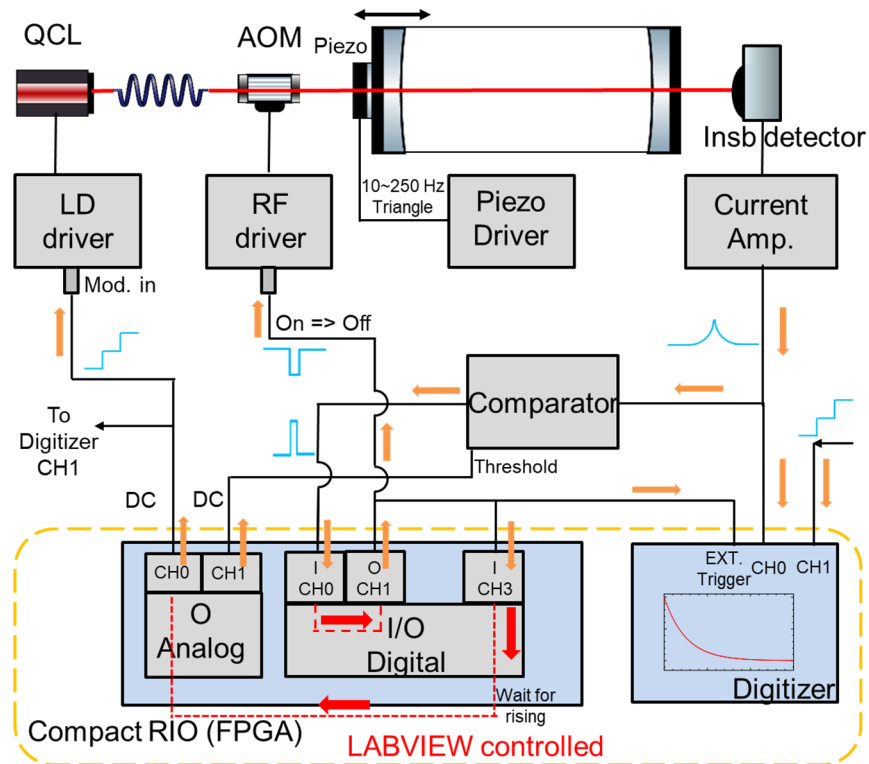


Fig. 2-30 RD 信号取得・周波数スキャンシステム (高速集録)

Table 2-8 CompactRIO 各モジュールの動作

		Nomal system	High speed	Role
AO	CH0	Wavelength scan modulation	Wavelength scan modulation	Wavelength scan
	CH1	Comparator threshold	Comparator threshold	RD signal
D I/O	CH0:1	Waiting for pulse from comparator	Waiting pulse from comparator	RD signal
	CH1:0	Pulse to AOM for switch	Output pulse to AOM for switch	
	CH2:0	Pulse for timing synchronization		Wavelength scan
	CH3:1	Waiting for pulse for wavelength scan	Waiting pulse for wavelength scan	

信号処理系

RD 信号は指数関数的な減衰信号であるため、その減衰率 β を得るためには指数関数で RD 信号をフィッティングする必要がある。本研究以前は、ディジタルザで RD 信号を集録し、アスキー形式でデータファイルに全て書き出したのち、各 RD 信号に対して Levenberg-Marquardt Algorithm (LMA) による非線形最小二乗フィッティングを適用し、 β を求めていた。この方法には、測定中に β をモニタリングすることができない、どのようなスペクトルが得られているかが測定終了後にしか分からないといった問題があった。また、統計誤差の低減のためにより多くの RD 信号を取得しようとした場合には、測定データのデータサイズが数 GB を超えてしまった。そこで、これらの問題を解決するため LabVIEW によるリアルタイム指数関数フィッティングを開発した。RD 信号のフィッティングには Linear Regression of the Sum (LRS) を用いている。推定したい関数が

$$f(t) = A e^{-\beta t} + b \quad (2-2)$$

で表されるとし、ある一点の時間 $t_i = i\Delta t$ ($i = 0, 1, 2, \dots$) での推定値を式(2-3)であるとす。

$$f_i = A e^{-\beta t_i} + b \quad (2-3)$$

ここで、 I_i を $t=0$ から $t=t_i$ までの $f(t)$ の積分と定義する (式(2-4))。

$$I_i \equiv \int_0^{ti} f(t)dt \quad (2-4)$$

式(2-3)から式(2-4)は

$$I_n = \sum_{k=0}^n f_n \Delta t = A \Delta t \left(\frac{1 - e^{-\beta \Delta t} e^{-\beta t_n}}{1 - e^{-\beta \Delta t}} \right) + b t_n + b \Delta t \quad (2-5)$$

と近似できる。ここで式(2-2)を用いれば、

$$I_n = \left(\frac{A \Delta t}{1 - e^{-\beta \Delta t}} \right) + b \Delta t - \left(\frac{e^{-\beta \Delta t}}{1 - e^{-\beta \Delta t}} \right) (f_n - b) \Delta t + b t_n \quad (2-6)$$

と表せる。式(2-6)を f_n について解くと

$$f_n = \left(\frac{A + b}{e^{-\beta \Delta t}} \right) - \left(\frac{1 - e^{-\beta \Delta t}}{e^{-\beta \Delta t} \Delta t} \right) I_n + \left(\frac{1 - e^{-\beta \Delta t}}{e^{-\beta \Delta t} \Delta t} \right) b t_n \quad (2-7)$$

ここで、 I_n と $b t_n$ を変数と考えると各項の係数をパラメータとして

$$f_n = a_0 - a_1 I_n + a_2 b t_n \quad (2-8)$$

$$\beta = \frac{1}{\Delta t} \ln(1 - a_1 \Delta t) \quad (2-9)$$

と表される。式(2-8)のような 2 変数の線形関数の係数は、行列で表された単純な連立方程式を解くことで求められ、式(2-9)より β を推定することができる。この手法は LMA より 10 倍程度早くパラメータを推定できる非常に高速な手法である一方で、LMA と近い推定値を得られることが報告されている[20]。LRS に基づく減衰率の高速評価を LabVIEW による PXI-5922 用データ収録プログラムに実装し、CRDS 測定中にオンラインで減衰率を評価するシステムを構築した。Fig. 2-31 にその概観を示す。これにより、 β を測定中に評価できるようになり、LD ドライバの電流に対する β をプロットすることで測定中に測定された吸収スペクトルをモニターできるようになった。

ディジタイザは集録したデータをいったんオンボード上のバッファに格納する。その後 PC 上の集録用プログラムが、ボード上のバッファから格納されたデータを読み取ってくることでデータが PC 上に移動する仕組みになっている。オンボードバッファは有限であるため、格納したデータを十分に早く読みだせない場合には、サンプリングの一時中断、またはデータの上書きが行われる。した

がってサンプリング速度は、集録用プログラムのバッファからのデータ読み出し速度に大きく依存している。一方、LabVIEWは、グラフやデータのファイルへの書き出し、ローカル変数やグローバル変数などに対してPCのメモリを大きく使用するため、これらが多く存在するとオンボードバッファからの読み取りが遅くなってしまう。そこで、Fig. 2-30に示されるシステムを使用する場合には、高速サンプリング用プログラムとして、グラフをなくし機能を最低限まで減らした集録プログラムを開発した。通常のプログラム（Fig. 2-31に示されるプログラム）とFig. 2-29のシステム、高速用プログラムとFig. 2-30のシステムについて、RD信号の生成周波数（ピエゾのスキャン周波数に依存）を変えた場合のサンプリング速度を比較した（Fig. 2-32）。どちらもある周波数からは実際のデータ取得数が変化しなくなった。これは、データ集録が信号生成速度に追い付かず、それ以上は向上しない（その分、データを逃している）ことを示している。この結果から、高速サンプリング用プログラムでは通常と比較して3倍程度速いサンプリングが可能であることが示された。

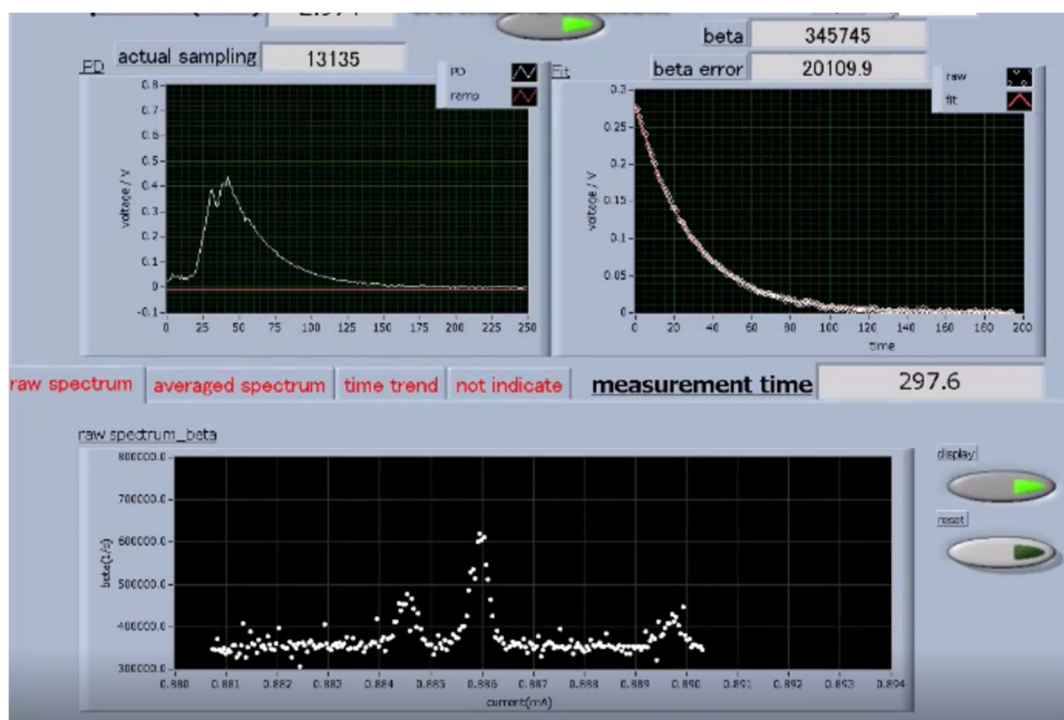


Fig. 2-31 データ取得・オンライン減衰率評価システム概観

左上: 生のリングダウン信号

右上: 減衰部分とフィッティング結果

下: スペクトル (横軸: QCL 電流、縦軸: 減衰率)

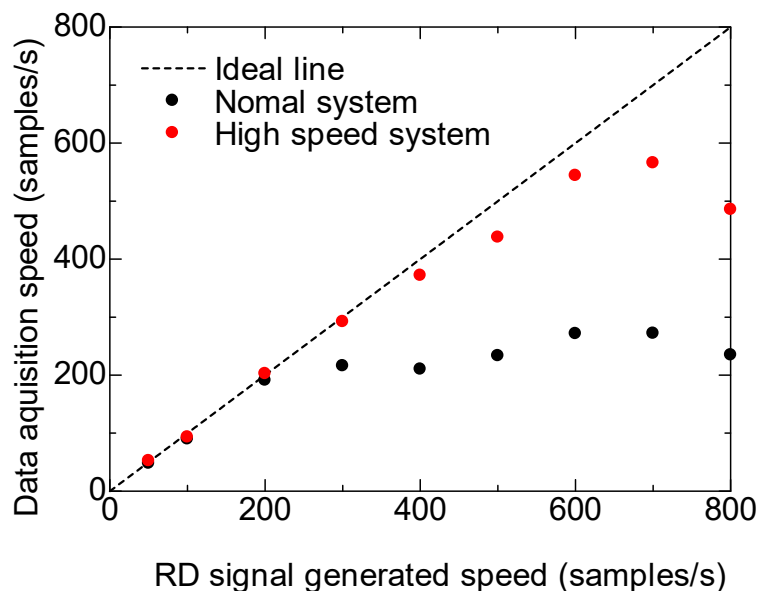


Fig. 2-32 サンプリング速度の比較

スペクトルの評価と同位体比推定

RD 信号から減衰率を評価し、DFB-QCL の周波数と対応付けることで吸収スペクトルを取得する。ここで、第 1 章にて説明した通り、吸収スペクトルは Voigt 関数で記述される。

$$S(N, \nu, \nu_0, P, T) = \sigma(\nu, \nu_0, P, T) \cdot Nc = s(T) \cdot f_{\text{Voigt}}(\nu, \nu_0, P, T) \cdot Nc \quad (1-22)$$

$$\sigma(\nu, \nu_0, P, T) = s(T) \cdot f_{\text{Voigt}}(\nu, \nu_0, P, T)$$

実際には、取得された吸収スペクトルは、複数の分子種、複数の吸収線の重ね合わせであり、式(1-22)にて表される関数の和で表現される。したがって、取得される吸収スペクトル f_{spectra} は、式(1-16)、式(1-22)より、以下のようになる。

$$f_{\text{spectra}} = c \sum_{\text{mol}} \left(N_{\text{mol}} \sum_i \sigma_i \right) + \beta_0 \quad (2-10)$$

ここで、それぞれの分子数密度を N_{mol} 、各吸収線の吸収強度（断面積）を σ_i 、光

共振器固有の減衰率を β_0 とした。例えば、二酸化炭素については酸素同位体 ^{16}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O の組み合わせにより、天然には数種類の異なる CO_2 が存在し、それぞれ複数の吸収線を持つ。 N_2O や H_2O など、他の分子であっても構成する同位体ごとに吸収は異なる。しかし、ここで興味があるのは ^{14}C と ^{12}C ・ ^{13}C の存在比であり、他はすべて天然同位体組成であるとして問題ない。HITRAN データベースの吸収強度は、同位体ごとに天然に存在する割合で最初から補正されており、そのまま使用できる。式(2-10)において、ガス圧力やガス温度は、測定時の条件を入力し、各分子種の分子数密度 N_{mol} ($N_{^{14}\text{C}\text{CO}_2}$ 、 $N_{^{13}\text{C}\text{CO}_2}$ 、 $N_{^{12}\text{C}\text{CO}_2}$ 、 $N_{\text{N}_2\text{O}}$ 、 $N_{\text{H}_2\text{O}}$) をパラメータとして、実験で得られたスペクトルに対する非線形最少二乗フィッティングを行った。 β_0 は同じくフリーパラメータとし、同時に推定した。推定された分子数密度の比をとることで $^{14}\text{CO}_2$ の $^{12}\text{CO}_2$ に対する同位体比、すなわち ^{14}C 同位体比 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ を評価した。

実際には、各分圧の評価を行うために、分子数密度ではなく分圧に変換した。評価された分子数密度 N は、標準温度 (296 K) ・標準圧力 (1.01325 bar) における原子数密度であるロシュミット数 (Loschmidt's constant: $N_L = 2.47937 \times 10^{19}$ 個/ cm^{-3}) によって以下の式により分圧 P (単位: bar) に変換できる。

$$P = 1.01325 \times \frac{T}{296} \times \frac{N}{N_L} \quad (2-11)$$

当然、各分圧の比から、 ^{14}C 同位体比 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ が計算できる。

CRDS により評価される分子数密度とガスを封じ切る系の内部体積の積は、封じ切られたガスの絶対量 (分子数) となる。試料導入部における燃焼効率、発生した CO_2 の封じ切り効率、また、封じ切られた後のポンプ陰圧による損失などを全て考慮した試料由来炭素の総利用効率の値が装置として安定であれば、CRDS 分析のみで試料中 ^{14}C 絶対量の測定が可能である。一方で、安定炭素と ^{14}C の間で、各種効率に差異はないと考えられ、同位体比のような相対評価においては、このような効率の議論は必要ではない。本研究における範囲では、吸収スペクトルから ^{14}C 同位体比を取得し、CRDS とは別に試料中全炭素量を測定し、 ^{14}C 同位体比との積を取得することで絶対量を推定した。評価された ^{14}C 絶対量の誤差には、原理上、全炭素量評価による不確かさと CRDS 測定による不確かさが重ね合わされる。本研究の発展として、全効率が評価され、絶対量を CRDS 分析のみで評価できるようになることが望まれる。

2.6 試料導入系の開発

2.6.1 試料導入系および試料燃焼系

^{14}C -CRDS の試料導入部として、全自動元素分析装置 (EA) (vario MICRO cube, Elementar Analysensysteme) を応用した。EA は固体、液体ともに測定が可能であり、粉末試料や液体を錫箔に包んで燃焼させる。錫の溶融により燃焼効率が上がり、瞬間 1800 °C まで燃焼温度が上昇する。本研究では容積 50 μL の錫製カプセルを用いた。オートサンプラに設置された試料はキャリアガスである He でパージされた燃焼部に落下し、落下と同時に O_2 がパルス的に供給されて燃焼が起こり、酸化物 (CO_2 、 CO 、 NO_x 、 SO_2) と H_2O を発生させる。発生した窒素酸化物は還元され N_2 と O_2 に、 CO は酸化されて CO_2 となる。 H_2O は除湿機構により取り除かれる。これらの分子は加熱吸脱着カラムによって一旦吸着されたのち、吸脱着カラム温度を上昇させることで温度の上昇に応じて分離され、異なるタイミングで排出される。それぞれの分子は He ガスの流れによって運ばれ、出口付近で EA に備え付けられた熱伝導度型検出器 (Thermal conductivity detector) により定量される。残ったガスが CRDS 分析セル (光共振器+ガスセル) に導入され、CRDS 分析セルで CO_2 に対する高感度分光測定が行われる。

本研究では、CRDS 分析セルはドライスクロール真空ポンプにより減圧、試料排気し、外側チャンバーは同様に別のドライスクロール真空ポンプによって常に減圧した。分析セル内を低真空に保つため、試料導入側にニードルバルブを設置し、分析セル内圧の調整を行った。分析セル内の圧力をバラトロン真空計 (MKS Instrument, 626A-22161) によって測定した。分析セルの試料導入側と排気側に電磁バルブを設置し、開閉を自動制御した。試料導入側には inlet バルブの他、3 port バルブを設置した。これは通常、大気側に解放し、流路を切り替えることで EA と分析セルがつながる向きで導入した。Fig. 2-33 に試料導入部の概要を示す。 CO_2 トラップについては後述する。

CRDS 分析セルでの CO_2 測定には二通りの方法がある。分析セルに CO_2 が導入されたタイミングで電磁バルブを閉め、セル中に CO_2 を閉じ込めて測定を行う Stopped flow 測定と、バルブは常に開いておき、キャリアガス流量と系内の圧力差に依存する速度でセル中を流れ出ていくガスを測定する Flow through 測定である。Flow through 測定と比較して Stopped flow 測定は、一つの試料に対して複数回の測定が可能である (吸収スペクトルが取得できる) ため統計精度を向上させることができる。一方で、 CO_2 の流れに対してバルブ開閉のタイミングがずれると、定量性が損なわれる可能性があるため、十分な評価が必要となる (後述)。EA の加熱吸脱着カラムの温度を、K タイプの熱電対と CompactDAQ の熱

電対測定用モジュール (National Instruments, NI9211) により測定し、電磁バルブは CompactDAQ の 24 V デジタルモジュール (National Instrument, NI9472) によって制御した。Fig. 2-34 に Flow through 測定と Stopped flow 測定の概要を示す。

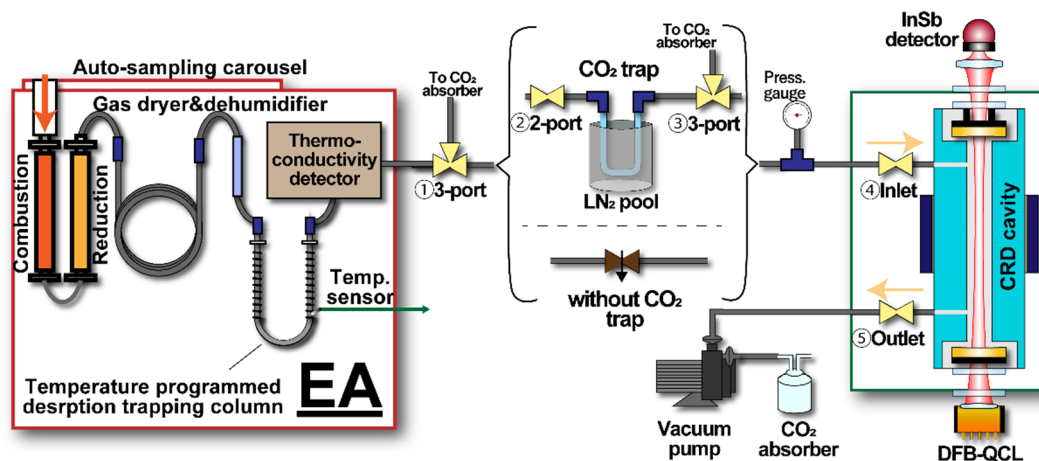


Fig. 2-33 試料導入部概要

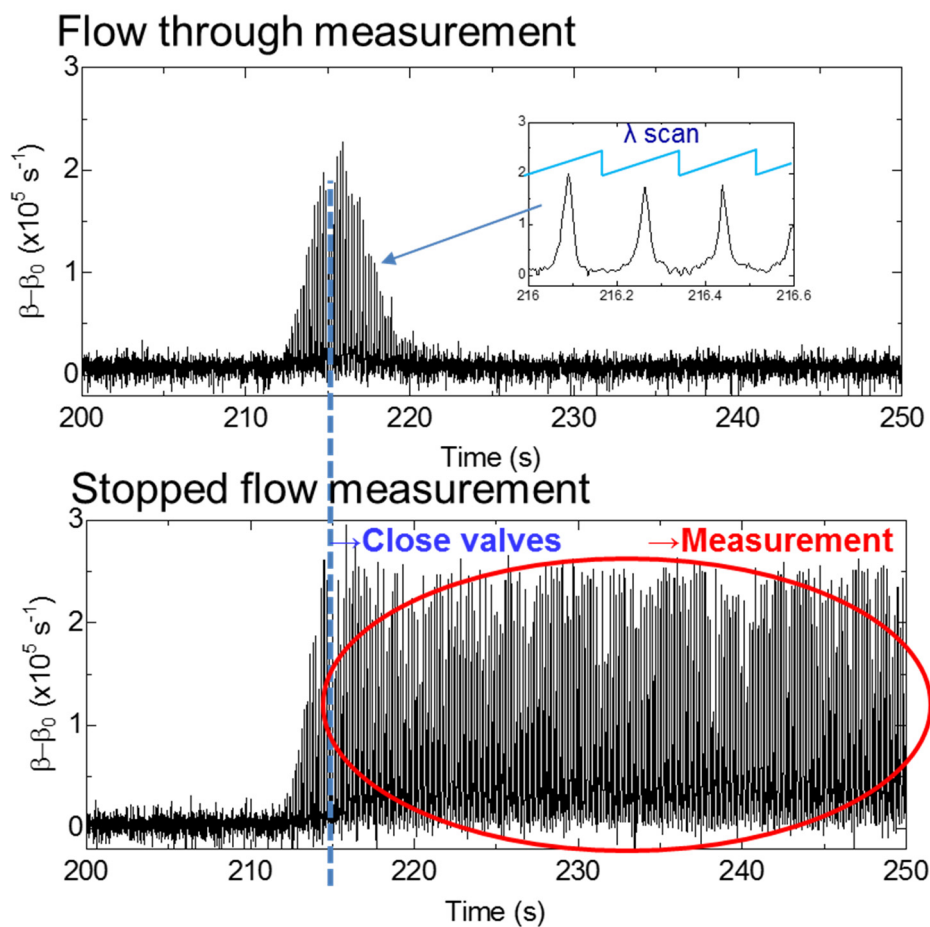


Fig. 2-34 Flow through 測定と Stopped flow 測定

2.6.2 電磁バルブによる自動制御系

Flow through 測定

Flow trough 測定では inlet、outlet 双方のバルブが開かれ、3 port バルブは常に CRDS ガスセル側に開かれた。 $^{14}\text{CO}_2$ の吸収スペクトル (2209.108 cm^{-1}) が含まれる狭い領域で DFB-QCL の周波数を連続的にスキャンし (DFB-QCL 電流変調 4 mA 程度)、EA に試料が導入されてからの経過時間と各 RD 信号の減衰率 β を記録した。Fig. 2-35 に 50 μL 中に 0.52 ng ^{14}C を含んだ ^{14}C 標識アセトアミノフェン試料の測定結果を示す。測定は ^{14}C 量の同じ 5 つのサンプルに対して行われた。分析セルの温度は室温 (298 K) であった。この結果は CO_2 トラップ (後述) を導入していない体系での結果である。結果から $^{14}\text{CO}_2$ のピークが現れるタイミング、すなわち CRDS 分析セルに CO_2 が到達する時間には 30 秒程度のばらつきがあることが分かった。以上から、試料導入のタイミングを直接的にバルブ開閉のタイミングには使用できないことが分かった。そこで、カラムから CO_2 が放出されるタイミングさえ測定できれば、その後配管内を CO_2 が流れる速度は、キャリアガスの流速に従って概ね一定になるのではないかという仮説のもと、カラムが CO_2 を放出するタイミング、すなわちカラムの温度上昇をタイミングとして使用できないかと検討した。

仮説を検証するために、DFB-QCL の周波数を $^{13}\text{CO}_2$ の吸収ピーク (2209.011 cm^{-1}) に固定し、経過時間と β 、およびカラムの温度を同時に測定する Flow through 測定を行った。この際、ガスセルの温度は $10\text{ }^\circ\text{C}$ に保たれた。測定試料は、 ^{14}C の含まれていない標準グルコース ($1\sim 0.01\text{ mgC}/50\text{ }\mu\text{L}$) とし、Flow through 測定による炭素の定量性についても同時に評価した。カラムの温度が $100\text{ }^\circ\text{C}$ に達した時を 0 秒として経過時間を補正した結果を Fig. 2-36 に示す。これより、カラムの温度が上昇してから CO_2 が CRDS ガスセルに到達するまでの時間のばらつきは $\pm 0.4\text{ s}$ であることが明らかとなった。この不確かさは LabVIEW による測定系のサンプリング間隔 (約 500 ms) に起因するものであると考えられ、実際のばらつきはこれより小さいと考えられる。これより、カラムの温度をバルブ制御のタイミングに使用することで、効率的に試料由来 CO_2 を封じ切ることが可能であることが示唆された。また、ピークのエリア値を求めて試料中炭素量に対してプロットした結果が Fig. 2-37 である。結果に対し最小二乗法による線形フィッティングをかけると、 R^2 値は 0.9999 と評価され、非常に明確な線形性を得ることができた。この結果により Flow through 測定により得られるピークエリアから、全炭素量を測定できる見込みを得た。 ^{14}C 測定においても、同様に $^{14}\text{CO}_2$ 吸収ピークに DFB-QCL を固定することで、 ^{14}C 定量が可能である可能性はあるが、試料中 ^{14}C に起因する信号は元来小さく、かつ、干渉分子の影響を考慮できない

ため、適用は難しいと考えられる。このため、微量 ^{14}C 測定においては Stopped flow 測定を開発し、繰り返しスペクトルを取得することで統計誤差を低減する必要がある。

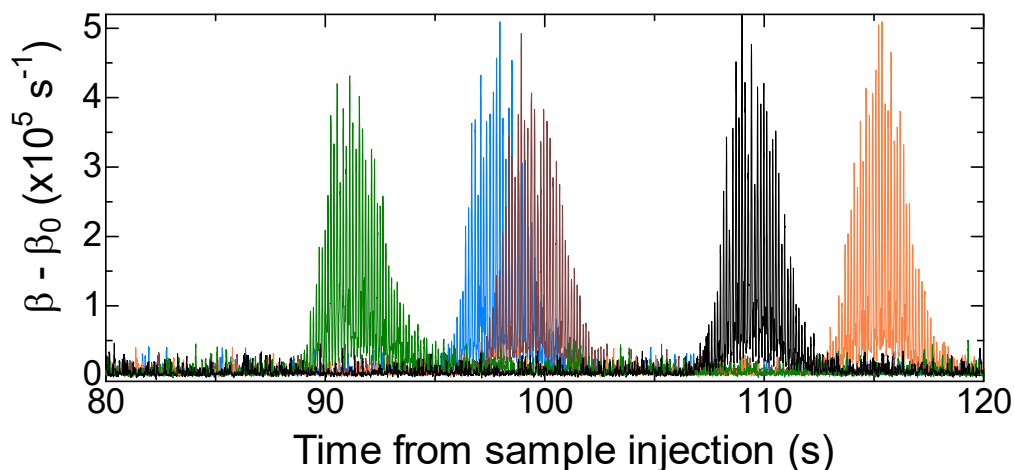


Fig. 2-35 Flow through 測定による $^{14}\text{CO}_2$ タイムトレンド

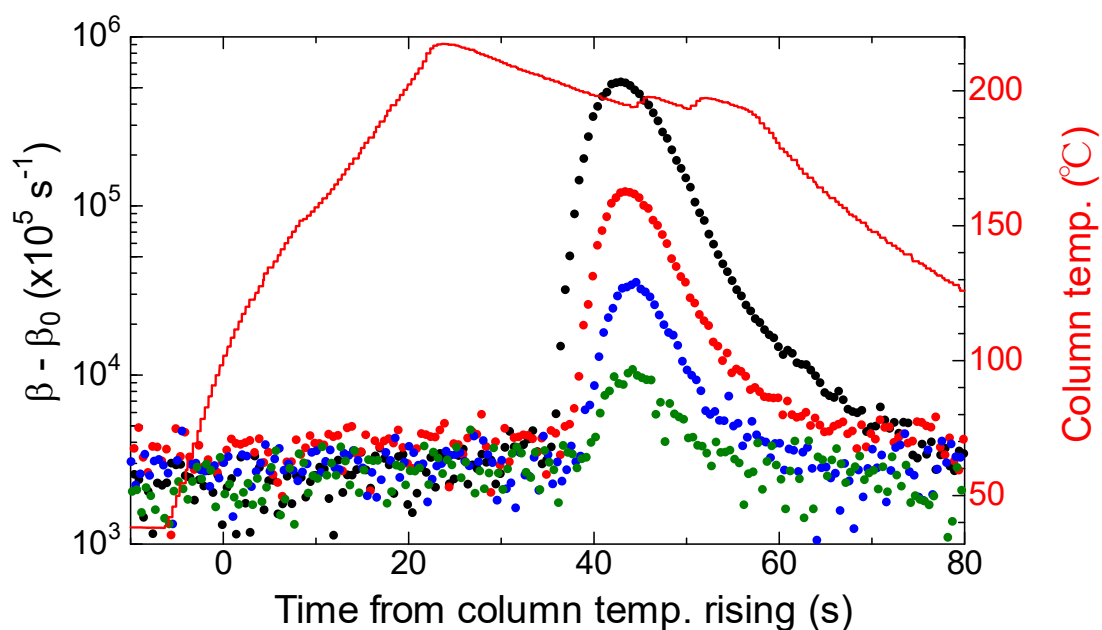


Fig. 2-36 QCL 波長固定 Flow through 測定による $^{13}\text{CO}_2$ タイムトレンドとカラム温度
横軸はカラム温度が 100 °C になった瞬間を 0 として補正

図中赤線がカラム温度。

黒: 1 mgC、赤: 0.2 mgC、青: 0.05 mgC、緑: 0.01 mgC

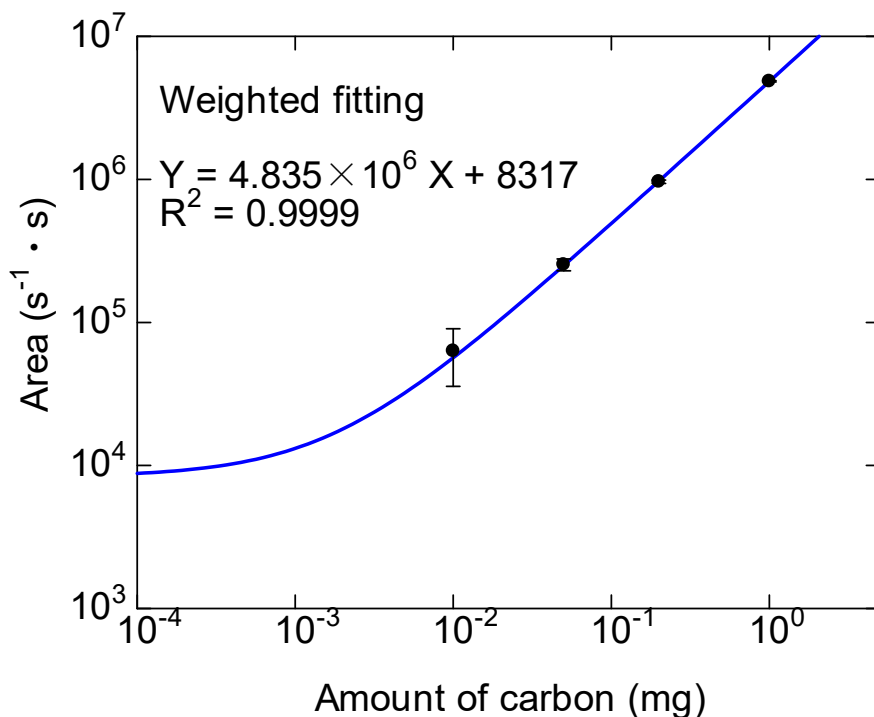


Fig. 2-37 導入炭素量に対するエリア値

Stopped flow 測定

Stopped flow 測定では Fig. 2-36 で示されるようにカラムの温度上昇から炭酸ガスが流れてくるまでの時間が一定であることを利用し、カラムの温度が閾値 100 °Cを超えた瞬間から一定時間経過後に自動的に閉じるように電磁バルブを制御した。ガスが封じきられた後、すぐに取り得たいスペクトルの周波数範囲を繰り返しスキャンし、周波数に対する β を測定した（本論文ではスペクトルの横軸は常に波数としてプロットした）。測定した複数スキャンのスペクトルを β 推定時のフィッティング誤差を重みとして加重平均した。加重平均したスペクトルに対し Voigt 関数と HITRAN に基づく非線形最小二乗フィッティングを適用し、¹⁴C 同位体比を評価した。Fig. 2-38 にバルブ開閉手法の概要を示す。バルブ開閉手法は以下の流れで行った。

- ① EA に試料が導入されてからカラムの温度が上がるまでは、3 port バルブはセル側、inlet バルブ・outlet バルブは開かれた。ガスセルには EA からのキャリアガスである He が常に流れており圧力は 100 Torr 以上であった。
- ② カラムの温度が 100 °Cを超え、熱電対で 100 °Cを超える温度が測定さ

れた。

- ③ トリガが働き、遅れ時間 t_1 後に inlet バルブが閉じられた。この時点でセル中には試料由来の CO_2 が導入されている。EA 内の流れが止まらないようすぐに 3 port バルブは大気側に開放された。
- ④ 一定時間 t_2 の間、ガスが CRDS セルからポンプによってひかれ、圧力が調整された。その後 outlet バルブが閉じられた。
- ⑤ CRDS により測定を開始。

また、 t_1 の最適化は以下の手順で行った。

- I. Flow through 測定によりカラムの温度が 100°C に達してから CO_2 のピークが最大値になるまでの時間を測定。
- II. Stopped flow 測定によりカラム温度トリガからの遅れ時間に、I の時間の前後数秒を 1~2 秒間隔で設定し、スペクトルを取得。
- III. 加重平均後のスペクトルのピークトップ（またはフィッティングにより評価された分圧）を遅れ時間に対してプロット。
- IV. 最も信号量が大きくなる遅れ時間を最適なタイミングと決定。

Fig. 2-39 にタイミングの最適化の一例を示す。なお、カラムの温度上昇から CO_2 が流れてくるまでの時間は、EA から CRDS までの配管の長さや、ニードルバルブの状態に大きく依存するため、体系を変えるたびに最適化を行った。また、吸収スペクトルは気体の全圧が大きくなると、圧力拡がりによりスペクトルが広がる。この結果、 $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 吸収線の近郊の干渉線が $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の吸収に重なってしまう、 $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 吸収線そのものの拡がりにより信号量が低下してしまうといった問題が生じ、高感度な測定の妨げとなる。封じきった場合のセル中ガスは試料から発生した CO_2 ガスと He の混合ガスであり、その殆どは He である。Fig. 2-40 に同量の CO_2 量・ ^{14}C 存在比で全圧を 85 Torr、20 Torr とした場合のスペクトルを示す。より高感度な測定のためには、より低い全圧で He の混入をできる限り防ぎ、 CO_2 の分圧を高くすることが好ましい。

セル内圧力の改善を目的としてバルブの開閉方法について 2 通りの手法を試した。一つ目の手法は上述した手法 (Fig. 2-38) で t_2 の値を大きくし、 CO_2 ガスが CRDS ガスセルに導入されてから Outlet バルブのみを開けたままにしてポンプでガスを抜き、セル内圧力を下げる手法である (以降、手法 A と呼ぶ)。一方、 CO_2 ガスが流れてくるまでの間 3port バルブは大気側に開放しておき、CRDS ガスセルを真空状態に保っておいた状態で、試料由来の CO_2 ガスが流れてくるタイミングで 3port バルブをセル側に開き、局所的にガスを CRDS ガスセルに導入

し封じきる手法が手法 B である。Fig. 2-41 に手法 B の概要を示す。手法 A・手法 B ともに、試料由来 CO₂ を減圧により損失してしまう。しかし、損失による信号量低下に対して、圧力拮がりによる影響の方が支配的であるため、低圧での測定は不可欠である。同位体比測定でなく、CRDS 分析のみで絶対量測定を行う場合には、損失の割合を何らかの形で評価し、取得された結果を補正する必要がある。

手法 A・手法 B の効果を比較するために、¹⁴C 標識グルコースをヒト血漿に添加した試料 (¹⁴C 量: 5 pg/50μL) に対する Stopped flow 測定をそれぞれ行った。結果を Fig. 2-42 に示す。ガス圧は封じきった状態で 20 Torr 程度となった。両手法ともガス圧を 20 Torr まで改善することができたが、手法 B は手法 A と比較して 3 倍の分圧と信号量を得られた (Table 2-9)。これは手法 A では、試料由来 CO₂ が導入される前にすでにセル内に存在する He が、試料由来 CO₂ と混合されてしまう一方で、手法 B では試料由来 CO₂ 導入前には He はほとんど存在せず、高い CO₂ 分圧を保つことができたと考えられる。以上から、手法 B の有用性が示された。

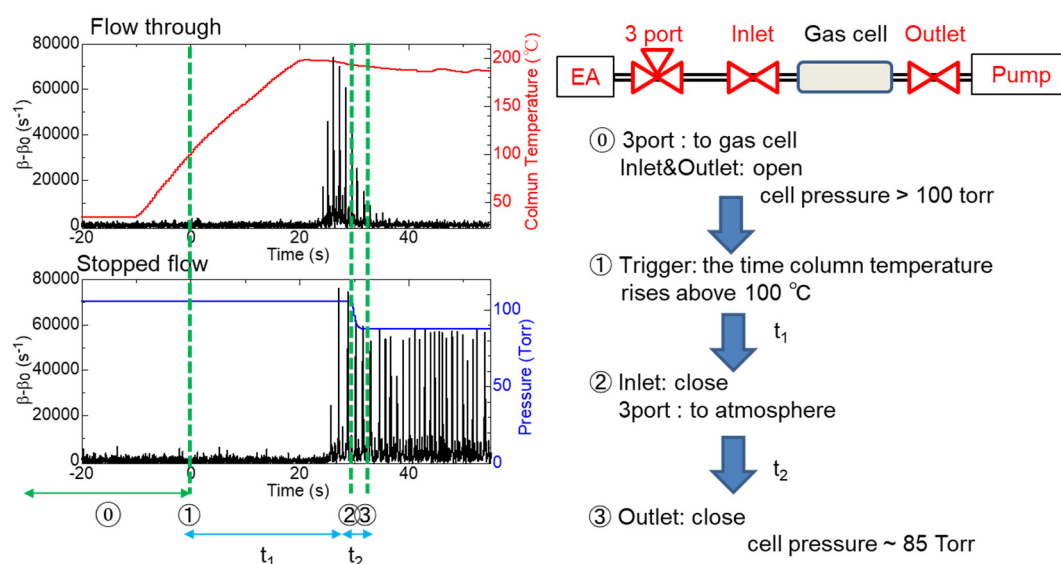


Fig. 2-38 Stopped flow 測定バルブ開閉タイミング概要 (手法 A)

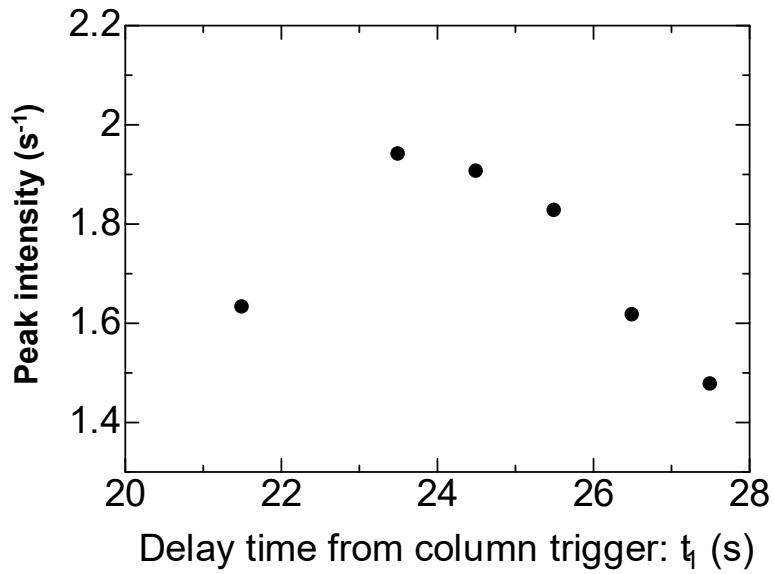


Fig. 2-39 バルブ開閉タイミング最適化 ($t_2 = 1$ s)
 縦軸は $^{13}C^{16}O_2$ の 2209.374 cm^{-1} 吸収線周辺のスキャンを
 20 スキャン平均したピーク最大値

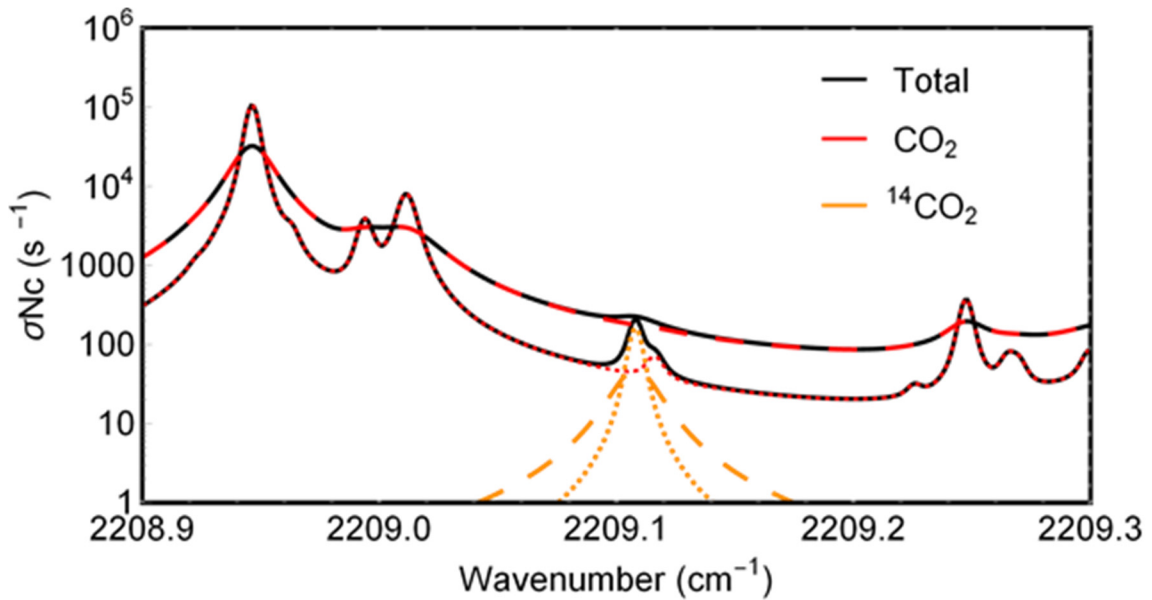


Fig. 2-40 $^{14}CO_2$ スペクトルへの圧力拡がりの影響
 CO_2 量 (全圧 $\times CO_2$ 分圧) \cdot ^{14}C 比 (100 ppt) は固定して計算
 破線: 全圧 85 Torr、 CO_2 分圧 4.7%
 点線: 全圧 20 Torr、 CO_2 分圧 20%

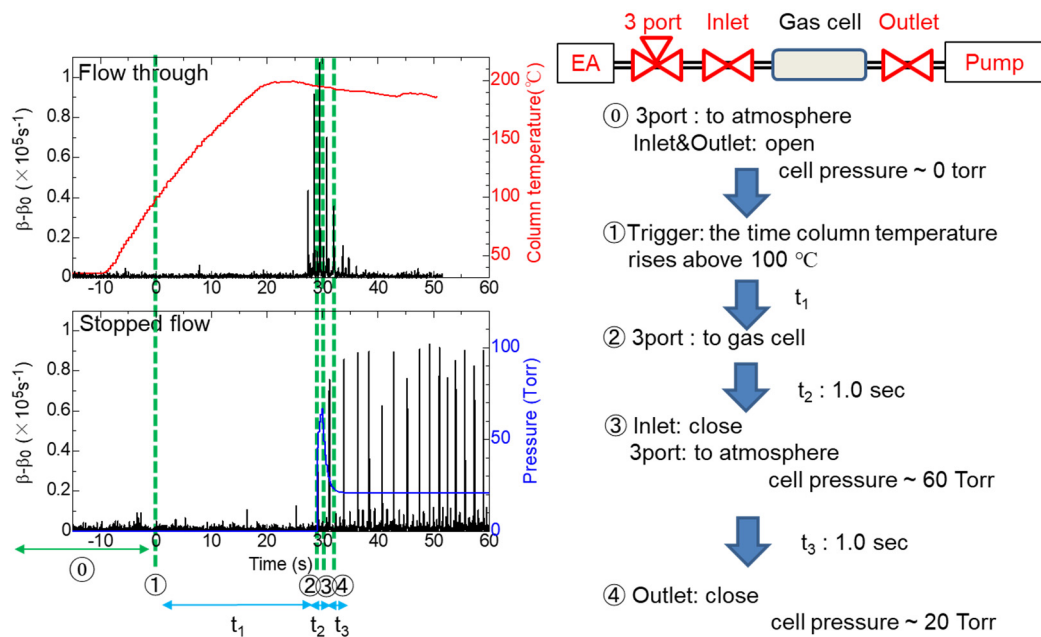


Fig. 2-41 Stopped flow 測定バルブ開閉タイミング概要 (手法 B)

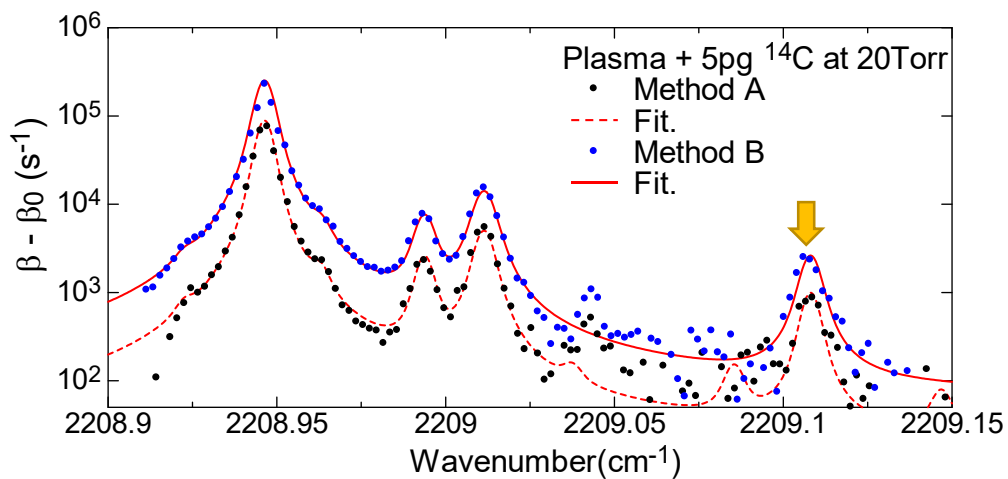


Fig. 2-42 手法 A・手法 B のスペクトル比較 (全圧 20 Torr)

図中矢印が $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 吸収線

Table 2-9 手法 A・手法 B の信号量比較

Method	A	B
Total pressure (mbar)	26.8	26.5
Measured CO ₂ (mbar)	1.5	4.9
CO ₂ partial pressure (%)	6	18
Measured ¹⁴ CO ₂ (mbar)	3.12×10^{-9}	9.36×10^{-9}
Measured ¹⁴ C/ ¹² C	2.0×10^{-9}	1.9×10^{-9}

2.6.3 液体窒素による二酸化炭素トラップ

二酸化炭素トラップ概要

さらなる CO₂ 分圧の向上を目的として、液体窒素を用いて、CO₂ ガスを一旦固化することで濃縮する CO₂ トラップを構築し、EA と CRDS 分析セルの中間に配置した。体系は Fig. 2-33 にすでに示した。CO₂ トラップはガラス製の U 字管で構成される。以下、測定手順を示す。

- A) 測定開始前は Fig. 2-33 中①の 3 port バルブのみ大気側、残りをセルにつなぐことで U 字管内部まで陰圧される（手法 B の知見を使用）。U 字管は液体窒素（77 K）のプールに浸され、この状態で試料が EA に導入される。
- B) 試料由来 CO₂ が U 字管に到達する直前、①の 3 port バルブがセル側に、②のバルブが開かれ、③のバルブは大気側に切り替えられて、U 字管内をガスが通過する。ここで、CO₂ は液体窒素温度では瞬時に固化（常圧では 194 K で固化）し、U 字管内に留まる。一方で He は気体のまま、U 字管を通過する。この状態を事前に測定した CO₂ タイムトレンドの幅（~20 秒程度）だけ継続する。
- C) ③の 3 port バルブをセル側につなぎ、①の 3 port バルブを大気側に、②のバルブを閉じて U 字管まで陰圧。残存している気体状態の He を U 字管から追い出す。
- D) ④のバルブが閉じられ、U 字管が液体窒素プールから出される。U 字管を温め、CO₂ を気化する。
- E) ④のバルブを開け、CO₂ を CRDS 分析セルまで拡散。

F) ④のバルブを閉め、分析セル圧力を 20 Torr 程度まで下げて⑤のバルブを閉めてから CRDS 測定を開始。

以上の手順により、試料由来 CO₂ の濃縮を行った。Fig. 2-43 に CO₂ トラップの外観、および、U 字管内部で固化した CO₂ の一例を示した。

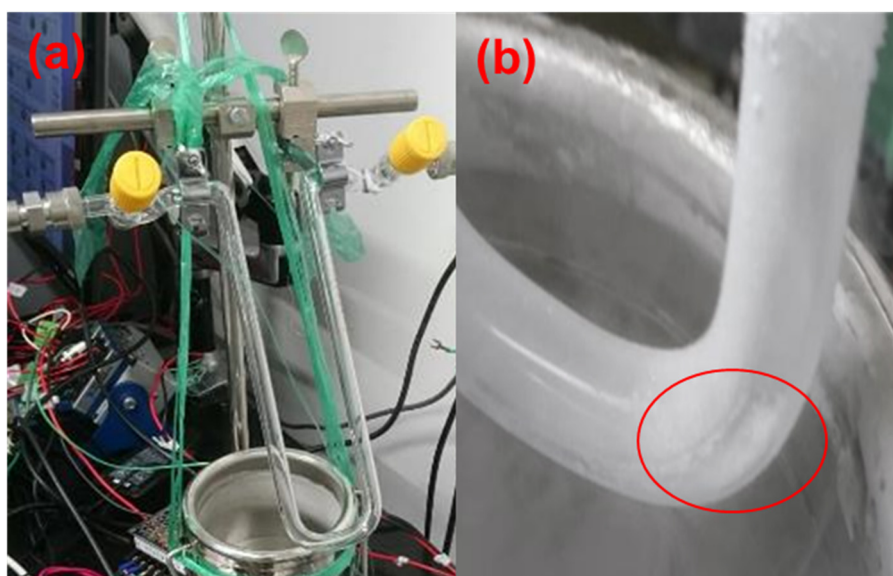


Fig. 2-43 液体窒素による CO₂ トラップ外観
(a) U 字管と液体窒素プール、(b) 固化した CO₂

二酸化炭素トラップによる分圧向上

CO₂ トラップによる分圧向上を確認するために、CO₂ トラップを導入した体系で ¹⁴C 標識グルコース試料 (1 pg¹⁴C/50μL, 2.0 mgC/50μL) を測定試料とした基礎実験を行った。この時、ガスセルの温度は 258 K であった。取得された吸収スペクトルを Fig. 2-44 に、スペクトルから評価された全圧および各気体の圧力を Table 2-10 に示す。結果より、CO₂ トラップにより CO₂ 分圧が 80%程度まで向上した。この結果は、Table 2-9 で示された手法 B による結果と、試料が異なるために直接比較はできないものの、ヒト血漿中の炭素量は約 2.25 mgC/50μL (Table 2-1 参照) であることから、Table 2-9 時の実験と炭素分圧の点では大きな差はないと考えられる。CO₂ トラップにより約 4 倍高い分圧が得られたことから CO₂ トラップの有用性が示された。一方で、液体窒素温度では干渉分子である N₂O (沸点 184.67 K) まで固化・濃縮されてしまうという懸念も存在し、窒素の多く含まれる試料では注意を必要とする。本研究で測定された試料については、N₂O の影響が大きすぎて測定ができなかったという結果は存在しなかった。これ以

降、CO₂トラップを使用した実験については明記し、特に記述がない場合には手法 B を使用したものとする。

Fig. 2-44 に示された測定結果から第 2 章時点でのアバンダンス感度・検出限界を評価した。アバンダンス感度・検出限界はスペクトルにおける SNR から評価できる。詳細は第 3 章 1 節を参考されたい。Fig. 2-44 において、¹⁴CO₂ の吸収ピーク（図中オレンジ点線）の強度は最大で約 1730 s⁻¹ であり、吸収のない領域（バックグラウンド）のばらつきは約 500 s⁻¹ であった。これらの比から、本測定における SNR は 3.5 であった。したがって、本測定における同位体比 ¹⁴C/¹²C = 3.2×10⁻¹⁰ から、現時点でのアバンダンス感度は 2.0 mg の試料中炭素量に対して、¹⁴C/¹²C = (3.2×10⁻¹⁰)/3.5 ~ 1×10⁻¹⁰ と評価された。また、検出限界は測定試料中 ¹⁴C 量が 1 pg/sample (~0.17 Bq/sample = 10 dpm/sample) であったことから、単純計算により、1 pg/3.5 = 300 fg/sample (~0.05 Bq/sample = 3 dpm/sample) と評価された。以上の評価から、目標であるアバンダンス感度 ¹⁴C/¹²C ~ 1.4×10⁻¹¹、検出限界 0.017 Bq/sample (= 1 dpm/sample) 以下を達成していないことが明らかとなり、感度向上が必要であることが示された。感度向上については次章にて述べる。

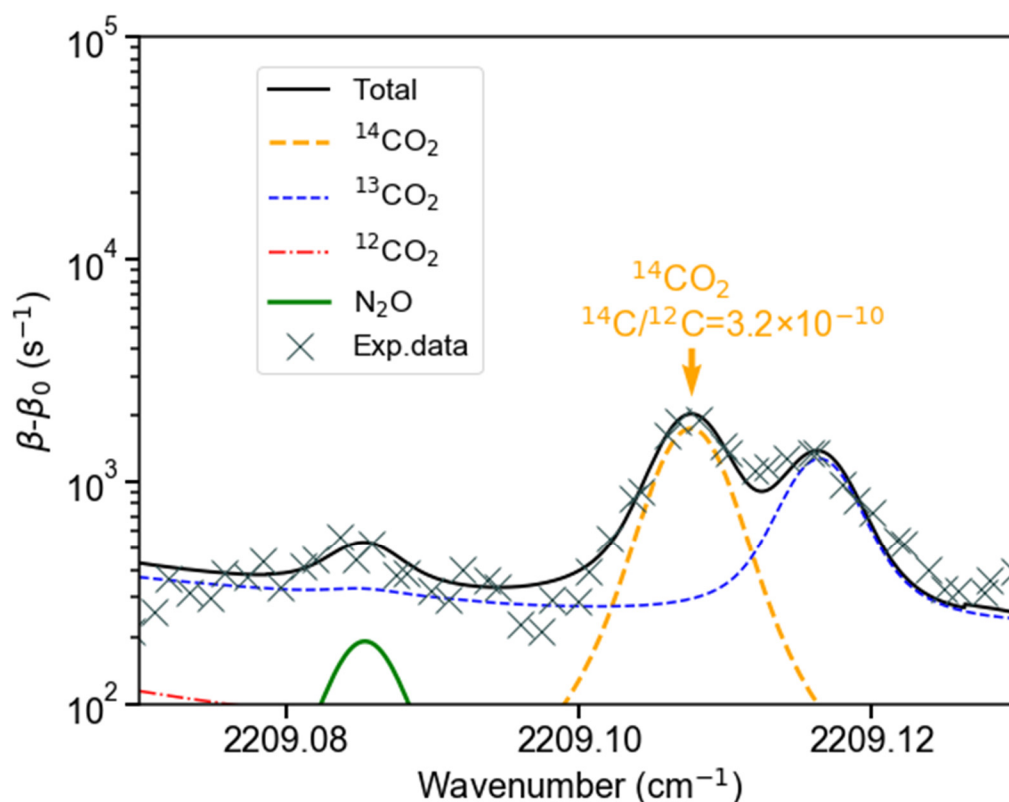


Fig. 2-44 測定された吸収スペクトル (CO₂トラップ有り)

Table 2-10 CO₂トラップ導入時に評価された各圧力

Total pressure (mbar)	18.8
Measured CO ₂ (mbar)	15.4
CO ₂ partial pressure (%)	81.9
Measured ¹⁴ CO ₂ (mbar)	4.99×10^{-9}
Measured ¹⁴ C/ ¹² C	3.2×10^{-10}

2.7 まとめ

本章では、中赤外半導体レーザーを用いた CRDS に基づく ^{14}C 分析法 (^{14}C -CRDS) について説明し、その分析システムの開発について述べた。

まず、トレーサー応用における測定試料とその分析要件を明らかとし、試料当たり炭素量 $\sim 2 \text{ mgC/sample}$ 対して天然同位体比にあと一桁まで迫るアバダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 1.4 \times 10^{-11}$ 、 0.017 Bq/sample ($= 1 \text{ dpm/sample}$) 以下の検出限界、測定精度数%、前処理なく試料を測定できること、測定時間 15 分以内/1 測定を本研究の目標とした。

生体試料中 ^{14}C 分析に向けた中赤外 CRDS プロトタイプシステムを構築した。光源として DFB-QCL を採用し、DFB-QCL および光学系は全て $60 \times 60 \text{ cm}$ のブレッドボード上に設置され、アライメントを崩すことなく輸送を可能とした。光共振器・ガスセルを 233 K まで冷却できるよう二重真空構造で設計・作製した。作製されたガスセルを用いて 233 K まで冷却する実験を行い、その動作を確認した。QCL と光共振器のモードマッチングにより光共振器透過光信号におけるサイドモードを抑制し、RD 信号を取得した。検出器・信号処理系は、RD 信号を効率的に取得できるよう構築し、データ集録プログラムに RD 信号のリアルタイムフィッティングを実装した。これにより吸収スペクトルをリアルタイムでモニタリングできるようになった。また、高速サンプリング法を開発し、従来手法の 3 倍のサンプリング速度を達成した。試料導入系は EA を中心に構築し、CRDS ガスセルと接続し、CRDS ガスセルの入口と出口は電磁バルブによって自動で開閉可能とした。Flow through 測定・Stopped flow 測定それぞれについて基礎的な実験を行い、試料由来 CO_2 が流れてきたタイミングで CRDS ガスセル内にガスを封じきるよう動作させる導入系を構築できた。CRDS 分析セル内の CO_2 分圧を高めることを目的として、 CO_2 ガスが分析セルに到達する直前まで分析セル内を真空ポンプによって陰圧することで、 CO_2 ガスに混入するキャリアガスを低減する制御法を開発し、実験によりその有用性を示した。また、カラムの後段に液体窒素冷却に基づく CO_2 トラップを導入し、基礎実験を行った結果、 CO_2 分圧が向上したことを確認した。結果より評価されたアバダンス感度・検出限界は、それぞれ $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1 \times 10^{-10}$ 、 0.05 Bq/sample ($= 3 \text{ dpm/sample}$) であり、目標達成のためには検出感度向上が不可欠であることが明らかとなった。

参考文献

第2章

- [1] 二瓶直登ら、「イネ幼植物におけるアミノ酸（グルタミン，アラニン，バリン）の吸収・蓄積部位の検討」、根の研究、第21巻第4号、p. 119-121 (2012).
- [2] 名古屋大学年代測定総合研究センター、<http://www.nendai.nagoya-u.ac.jp/>
- [3] S. H. Kim, *et al.*, “Carbon Isotopes Profiles of Human Whole Blood, Plasma, Red Blood Cells, Urine and Feces for Biological/Biomedical ^{14}C -Accelerator Mass Spectrometry Applications”, *Anal. Chem.*, **83**, 3312-3318 (2011).
- [4] 中村俊夫、「I. 加速器質量分析 (AMS) による環境中およびトレーサ放射性同位体の高感度測定」、*Radioisotopes*、第52号第3巻、p. 145-171 (2003).
- [5] 弘津嵩大、「修士論文 放射性炭素同位体分析のためのキャビティーリングダウン分光システムの開発」、名古屋大学 (2016) .
- [6] 揺詰聡士、「修士論文 生体試料中炭素同位体分析のためのキャビティーリング分光システムの特性評価」、名古屋大学 (2016) .
- [7] V. Sonnenschein, R. Terabayashi, *et al.*, “Development of CO_2 Cavity Ring-down Spectroscopy for Medical Applications”, *Proc. of ISRD*, **11**, 060003 (2016).
- [8] Z. Li, *et al.*, “Continuous-wave Cavity Ringdown Spectroscopy based on the Control of Cavity Reflection”, *Opt. Exp.*, **21**, 17961-17971. (2013).
- [9] L. S. Rothman, *et al.*, “The HITRAN2012 Molecular Spectroscopic Database”, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, **130**, 4-50 (2013).
- [10] I. Galli, *et al.*, “The ν_3 Band of $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ Molecule Measured by Optical-frequency-comb-assisted Cavity Ring-down Spectroscopy”, *Mol. Phys.*, **109**, 2267-2272 (2011).
- [11] M. Wahlen, “Tunable Diode Laser Spectroscopy of $^{14}\text{CO}_2$ Absorption Coefficients and Analytical Applications”, *ApplOpt*, **16**, 2350-2352 (1977).
- [12] J. Faist, *et al.*, “Quantum Cascade Laser”, *Science*, **264**, 553-556 (1994).
- [13] H. Tholl and J. Wagner, “Mid-IR Semiconductor Lasers for Power Projection and Sensing”, *Proc. SPIE 7836: Technologies for Optical Countermeasures VII*, 78360Q (2010).
- [14] Isomet, <http://www.isomet.com/index.html>
- [15] 加藤修介、「卒業論文 キャビティーリングダウン分光のための中赤外量子カスケードレーザー周波数較正・安定化法の開発」、名古屋大学 (2017).
- [16] 林紀善、「修士論文 光周波数コムによる周波数較正を用いた中赤外キャビティーリングダウン分光法の開発」、名古屋大学 (2018) .
- [17] ヤリーヴ イェー著、多田邦雄、神谷武志 監訳 (2010)、「光エレクトロニクス基礎編 原書6版」、丸善出版

- [18] 寺林稜平、「卒業論文 光周波数コムーキャビティリングダウン分光に基づく放射性炭素同位体分析法に関する基礎研究」、名古屋大学（2015）。
- [19] A. Rogalski and K. Chrzanowski, “Infrared Devices and Techniques” (2002).
- [20] M. A. Everest and D. B. Atkinson, “Discrete Sums for the Rapid Determination of Exponential Decay Constants”, *Review of Scientific Instruments*, **79**, 023108 (2008).

※1 積水メディカル株式会社創薬支援センター吉田賢二様、同佐藤淳史博士、名古屋大学大学院生命農学研究科仲田麻奈博士からの情報提供

第3章 中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析法の高感度化に関する研究

3.1 分析感度を制限する要因

第2章では、 ^{14}C -CRDS 分析システムを構築し、試料中 ^{14}C 由来の吸収スペクトルを取得し、感度を評価した。結果として、アバundance感度・検出限界はそれぞれ $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1 \times 10^{-10}$ 、 0.05 Bq/sample (= 3 dpm/sample) と評価され、目標達成に向けては高感度化が不可欠であることが明らかとなった。そこで本章では、中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析法の性能向上に向けた取り組みとして、吸収スペクトルにおけるバックグラウンドノイズ低減法・中赤外レーザー周波数安定化法を開発した。本節ではまず、分析法の感度がどのような要因で制限されているのかについて議論する。 ^{14}C -CRDS 分析システムでは、試料由来の CO_2 を効率的に閉じ込め、DFB-QCL の周波数を掃引 (スキャン) することで、 $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の吸収スペクトル、および干渉分子による吸収スペクトルを取得し、 ^{14}C 同位体比を推定する。この時、吸収スペクトル測定による ^{14}C 同位体比の推定における感度と精度には、レーザー周波数安定性と共振器固有の減衰率のばらつきが大きく関係する。

CRDS におけるシステムの感度について議論を進めるにあたって、まずは第1章にて説明した CRDS の原理に立ち戻る必要がある。CRDS による測定では、吸収が存在する場合の減衰率 β と吸収がない場合の減衰率 β_0 の差分が分子の吸収量、さらには吸収分子の数密度を表す (式(1-17))。

$$\sigma N c = \beta - \beta_0 \quad (1-17)$$

一方、吸収断面積 σ と分子数密度 N の積は吸収係数 (Absorption coefficient: α) と呼ばれ、長さの -1 乗の次元をもつ。システムの検出限界、すなわち検出できる最小の吸収係数を α_{\min} とすると式(1-17)より、

$$\alpha_{\min} = (\sigma N)_{\min} = \frac{1}{c} \Delta\beta_{\min} \quad (3-1)$$

と表される。ここで $\Delta\beta$ は測定によって得られる吸収物質による減衰率の変化 (= $\sigma N c$)、 $\Delta\beta_{\min}$ は正確に測定できる最小の $\Delta\beta$ と定義する。 $\Delta\beta_{\min}$ は共振器固有の減衰率のばらつき $\delta\beta_0$ に $\Delta\beta$ が埋もれてしまうことにより制限される。ノイズと信

号の強度比で定義される信号対雑音比 (SNR) を導入することで、

$$\Delta\beta_{\min} = SNR \times \delta\beta_0 \quad (3-2)$$

ここで、確保したい SNR を 1 とすれば、 α_{\min} は

$$\begin{aligned} \alpha_{\min} &= (\sigma N)_{\min} = \frac{1}{c} \delta\beta_0 \\ &= \frac{1-R}{L} \left(\frac{\delta\beta_0}{\beta_0} \right) \end{aligned} \quad (3-3)$$

と表される。測定に SNR をどの程度確保するかによって α_{\min} の評価は変わること
に注意されたい。本研究では、SNR=1 の時の検出感度 (式(3-3))、すなわち雑
音等価感度 (Noise-equivalent sensitivity) をシステムの感度と定義する。以上か
ら CRDS の検出限界はミラーの反射率 R と共振器長 L 、そして吸収物質のない
場合の減衰率のばらつき $\delta\beta_0$ に依存する。したがって、より高感度な CRDS シス
テムを開発するためには R と L を大きくし、 $\delta\beta_0$ を低減する必要がある。 R 、お
よび L はシステム的设计によるものであり、感度を制限する主要な要因は $\delta\beta_0$ で
ある。

バックグラウンドのばらつき $\delta\beta_0$ の要因としては、光共振器の不安定性、レー
ザ光源の周波数不安定性、エタロン効果、レーザー光源のショットノイズ及び
光検出器の熱ノイズ、光学系セットアップなどその他のシステムの不安定性が
ある [1]。

バックグラウンドのばらつきとアバンダンス感度の評価

バックグラウンドのばらつき $\delta\beta_0$ が分析感度に直接的に関係することは前述し
た通りである。実際にどの程度の $\delta\beta_0$ がどの程度のアバンダンス感度を意味する
のか把握することを目的として、スペクトル計算による基礎検討を行った。

計算は、温度 233 K、全圧 15 Torr、CO₂ トラップを導入した体系で、試料中の
炭素量が血漿相当 2.0 mgC/sample とした場合、すなわち CO₂ 分圧が 70% である
とし、¹⁴C の同位体比を変化させて行った。なお、干渉分子である N₂O の分圧に
ついては ¹⁴C 標識グルコース試料を用いた実験から典型的な値を使用した。計算
されたスペクトルを Fig. 3-1 に示す。計算結果より、¹⁴C¹⁶O₂ の吸収線 (2209.108
cm⁻¹) の信号量を、信号とノイズが等価のとき、すなわち SNR=1 の時の検出感
度として縦軸にとり、横軸に ¹⁴C 同位体比をプロットした (Fig. 3-2)。これより、
Fig. 3-2 縦軸は、想定される ¹⁴CO₂ 信号量であり、雑音等価感度 (SNR=1) はノ
イズである $\delta\beta_0$ と Fig. 3-2 縦軸の値が等価になる点である。以上より、 $\delta\beta_0 < 5 \text{ s}^{-1}$
を達成することで、その感度は天然同位体比に達するということが分かった。

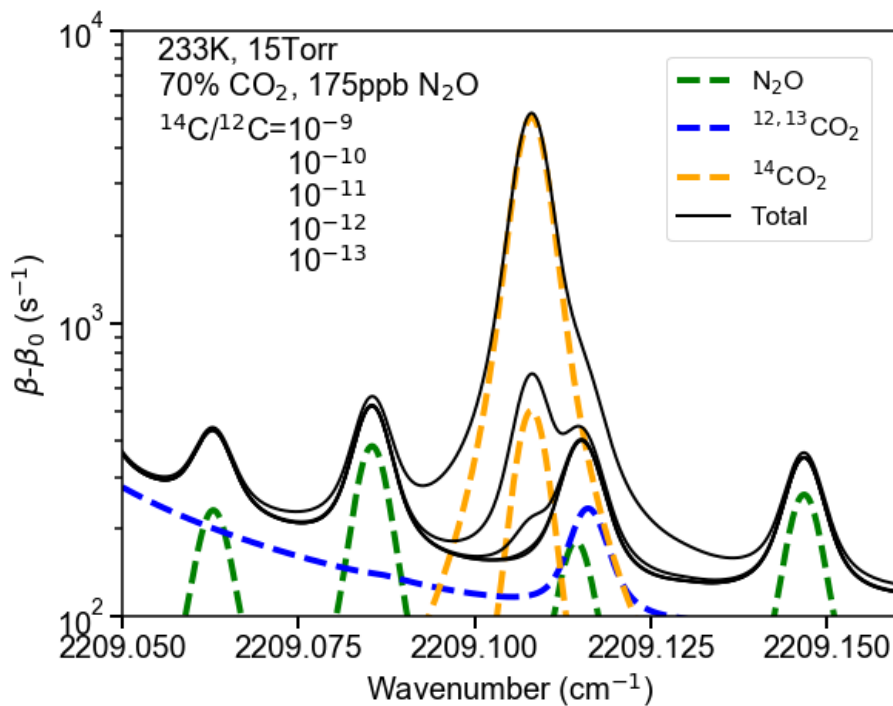


Fig. 3-1 吸収スペクトル計算結果

図中オレンジ線は $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 10^{-9}, 10^{-10}$ のときの $^{14}\text{CO}_2$ 吸収スペクトル（以降は表示範囲外）、Total（黒線）はすべての分子の重ね合わせで上から順に $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13}$ 。ただし、 10^{-12} と 10^{-13} は重なっている。

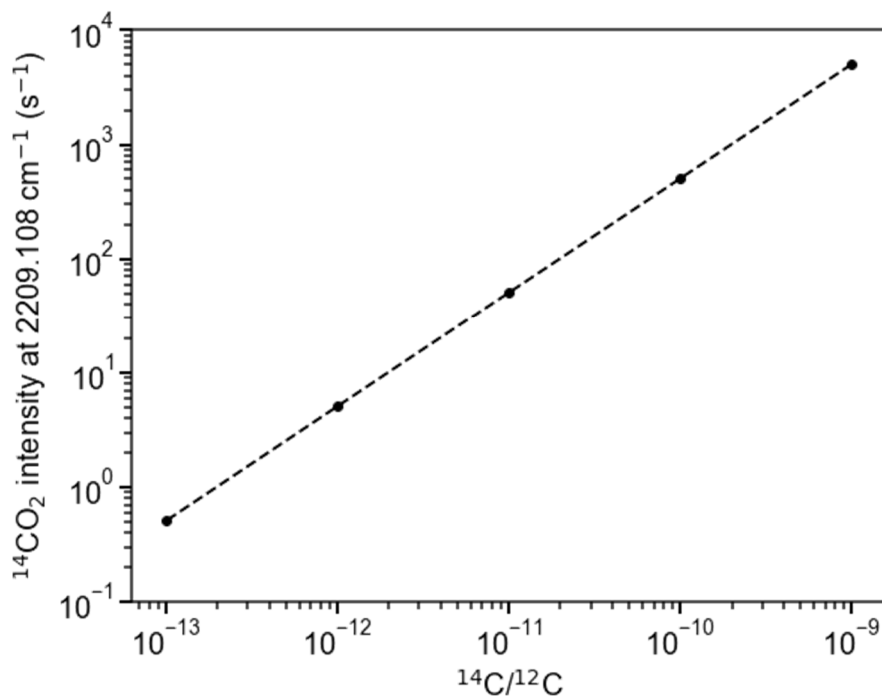


Fig. 3-2 同位体比と吸収強度

レーザー周波数不安定性と分析感度

レーザーの出力には元来、量子ノイズとよばれる不安定性を含み、それによって線幅は有限となっている。ここでいう線幅とは、観測時間に対する発振周波数不安定性である。例えば周波数的に、100 ms 以下のオーダーにおいて高い安定性を持つが、それより長い時間スケールにおいては中心周波数が増減するようなレーザーの場合、狭帯域（狭線幅でも同じ意）であるが、中長期的には周波数不安定である。特に半導体レーザーの場合、周波数不安定性には、レーザー媒質自身の自然放出を原因とする量子ノイズの他に、レーザー媒質内の光共振器の振動や温度変動、媒質中の電流ノイズなど技術的な要因もある[2,3]。

レーザー光源が周波数不安定性 $\delta\nu$ を持ち、分子による何らかの吸収が存在する場合、式(1-16)より、測定される減衰率 β は次式で表せる。

$$\begin{aligned}\beta &= \beta_0 + \sigma(\nu \pm \delta\nu)Nc \\ &\approx \beta_0 + \sigma(\nu)Nc + \frac{\partial\sigma}{\partial\nu}\delta\nu Nc\end{aligned}\quad (3-4)$$

ただし、

$$\sigma(\nu \pm \delta\nu) \approx \sigma(\nu) + \frac{\partial\sigma}{\partial\nu}\delta\nu$$

式(3-4)最終項は、レーザー周波数不安定性が吸収スペクトルにおける縦軸に不確かさを生むことを示している。また、共振器固有の減衰率、すなわちバックグラウンド β_0 についてもエタロン効果によるレーザー周波数に依存したばらつき（後述）や、統計的なばらつきをもつ。実際の測定においてはこれらのばらつきを区別することは不可能であり、総合的な不確かさ $\delta\beta_0$ として現れる。本研究でターゲットとしている、 $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 吸収線測定においては、干渉分子（ $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2 \cdot ^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}$ ）の吸収が隣接しており、式(3-4)に示されるレーザー周波数の不安定性に起因した不確かさは、より顕著に分析感度・分析精度に影響を及ぼす。

式(3-4)に現れるようなレーザー周波数の不安定性に起因する縦軸の不確かさは、CRDSに限った話ではなく、レーザー分光において似たような形で問題となる。一方で、CRDSにおいては、高反射率光共振器という要素が入ることで議論が多少複雑化する。本研究においては、最も一般的な光共振器の一つであるFPIを用いている。FPIは2枚のミラーを向い合せて構築される光共振器である。FPIの共振条件は共振器長 L 、共振器内の屈折率 n 、入射光波長 λ 、任意の整数 m を用いて次式で表せる。

$$2nL = m\lambda \quad (m = 1, 2, 3 \dots) \quad (3-5)$$

入射光が共振条件を満たす時、FPI内部で光は共振し透過光強度は最大となる。共振条件は入射光周波数 ν について次式のように変換できる。ただし c は光速である。

$$\nu = \frac{c}{2nL} m \quad (3-6)$$

FPI の透過率および反射率はそれぞれ次式で表される。ただし、 I_t は透過光強度、 I_r は反射光強度、 I_i は入射光強度、 R はミラーの反射率である。

$$\text{Transmittance} = \frac{I_t}{I_i} = \frac{1}{1 + F \sin^2(2\pi nLv/c)} \quad (3-7)$$

$$\text{Reflection} = \frac{I_r}{I_i} = 1 - \frac{1}{1 + F \sin^2(2\pi nLv/c)} \quad (3-8)$$

$$F = \frac{4R}{(1 - R)^2} \quad (3-9)$$

Fig. 3-3 に、式(3-7)を用いて計算した各ミラー反射率ごとの透過光を示す。ここで、光が共振条件を満たす毎に透過率は最大になるため、透過率のピーク（共鳴ピーク）は等間隔となる。この間隔をフリースペクトルレンジ（FSR）という。FSR は式(3-6)から次式で表せる（共焦点型ではない場合）。

$$\text{FSR} = \frac{c}{2nL} \quad (3-10)$$

式(3-7)から透過率のピークの半値全幅（Full Width Half Maximum: FWHM）、すなわち共振モード幅は次のように求まる。

$$\text{FWHM} = \frac{c}{\pi L \sqrt{F}} \quad (3-11)$$

FSR と FWHM の比は、光共振器の分解能を表す指標であり、フィネス（Finesse）と呼ばれる（式(3-12)）。

$$\text{Finesse} = \frac{\text{FSR}}{\text{FWHM}} = \frac{\pi}{\sqrt{F}} \quad (3-12)$$

以上のように、ミラーの反射率を高くすることで、フィネスは大きくなる。

CRDS においては高反射率ミラー（ $R > 99.9\%$ ）が使用され、そのフィネスは非常に高い。本研究にて構築された FPI の場合、反射率 $R = 99.98\%$ 、すなわちフィネスが 15,000 以上であるのに対し共振器長 $L = 33 \text{ cm}$ であることから、FSR ~ 454 MHz である。これは、共鳴条件の一つの共振モード幅が 30 kHz 以下であることを示している。FPI からの透過光強度は、レーザーの持つ発振線幅と共振モード幅の重ね合わせにより決定され、フリーランニングの DFB-QCL の不安定性と線幅は通常、FPI 共振モード幅よりも数桁大きい。ここで、光共振器がレーザー光に対して周波数的に高安定であると、安定かつ狭帯域な光共振器の共鳴モードを満たすレーザー光のみが共振するため、DFB-QCL の周波数不安定性に起因する不確かさは小さくなり、光共振器の不安定性のみが不確かさに起因するよう見える。しかし一方で、光共振器が安定であっても、入射レーザー光が周

波数的に不安定であると、レーザー光のわずか一部のみしか共振に寄与しないことになり、透過光信号、すなわち RD 信号が安定に生成されない。また、本研究では、 piezo素子によって共振器長を RD 信号の減衰時定数に対して十分遅い速度で常に繰り返し掃引し、光共振器共鳴モードを周波数的に変調することで、RD 信号生成の頻度を高めており、DFB-QCL の周波数不安定性はそのまま不確かさに影響する。このような理由から、レーザー周波数を安定化し、スペクトル測定におけるデータ点密度を犠牲にする（光共振器の FSR 間隔でしか信号を取得できないため）代わりに、光共振器の共振器長を固定する体系を選択している研究も多い。本研究の発展として、DFB-QCL の発振周波数がより安定となった場合には、CRDS 測定時には共振器長を固定し、複数の共振器長・FSR を用いて、スペクトルを密にするような測定体系への変更も可能となる。光共振器の安定な信号取得は、後述する統計誤差低減のためには不可欠な要素であり、高効率カップリングによる高安定・高強度な透過光信号の取得が求められる。実際には、光共振器自身の不安定性（共振器長の温度変化による不安定性など）が存在し、式(3-4)で示される不確かさは、DFB-QCL、光共振器、双方の不安定性が影響しあって発生する。当然、光共振器の不安定性を取り除くことも重要であるが、高効率カップリングを目指して、レーザー周波数をできる限り安定化するとともに、線幅をできる限り、狭帯域化することが求められる。

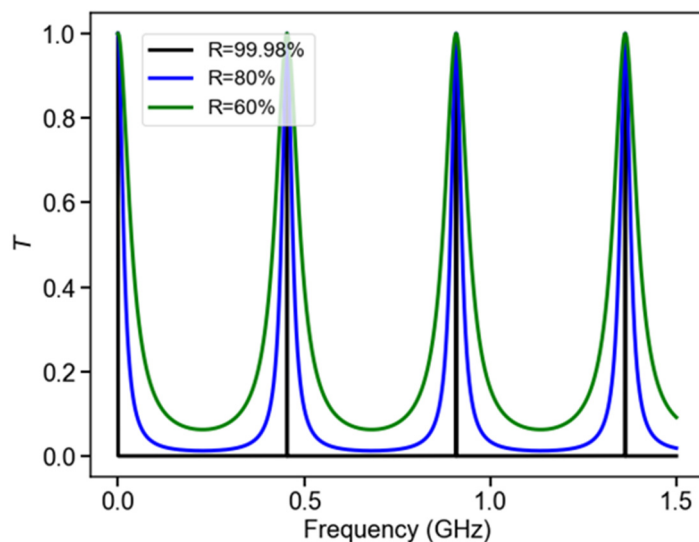


Fig. 3-3 反射率毎の FPI 透過特性
 $L=33\text{ cm}$ で計算

バックグラウンドノイズと分析感度

CRDS において、高感度化を行うためにはバックグラウンドノイズの低減も不可欠である。ここでバックグラウンドのばらつきには統計誤差とシステム誤差が存在する。統計誤差とは、ばらつきの確率密度関数が正規分布で表されるような誤差のことで、平均をとるサンプリング数を n とすることでその標準偏差は $1/\sqrt{n}$ に低減される。このようなノイズをガウスノイズとも呼ぶ。統計誤差は取得データの平均によって低減できる。しかし、光共振器やレーザー光源の温度・圧力の変動、振動などの系の不安定性や、特に後述するエタロン効果によるばらつきは、何らかの分布に従うものではなく、時間的にもドリフトするため、 n を大きくしても低減されることはない。一般的には、最初 n を大きくしていくにつれて統計誤差の低減により分散の低下が見られるが、徐々に低減が見られなくなり、最後にはシステム誤差により、分散が増加していく。このような議論は、アラン分散[4]によりよく評価されることが知られている。アラン分散 σ_{Allan}^2 は下記の式で表される。

$$\sigma_{\text{Allan}}^2 = \frac{1}{2N/(n-1)} \sum_{i=1}^{\frac{N}{n}-1} (\bar{y}_{i+1} - \bar{y}_i)^2 \quad (3-13)$$

ここで、 N は全サンプル数、 \bar{y}_i : i 番目サンプル群の平均、 n は各平均区画のサンプル数である。 σ_{Allan} はアラン偏差と呼ばれ、アラン偏差を、 n を変えて計算しプロットする手法 (アランプロット) は最適な平均時間を算出するとともに、装置全体の性能を評価する指標として有用であり、CRDS に関する研究において装置の分析感度の評価に用いられている。Fig. 3-4 に本研究で取得された典型的なアランプロットを示す。本結果では、平均サンプル数 10^3 までは $1/\sqrt{n}$ に近いトレンドで偏差が低減し、その後、増加していくことが分かる。よって、サンプル数 10^3 までは、平均により誤差を低減することが可能である。現状のシステムでは約 200 samples/s (= 5 ms/sample) のサンプリング速度であり、 10^3 サンプルの取得に 5 秒を有する。すなわち、Fig. 3-4 から分析システムは 5 秒程度安定であることが評価できる。

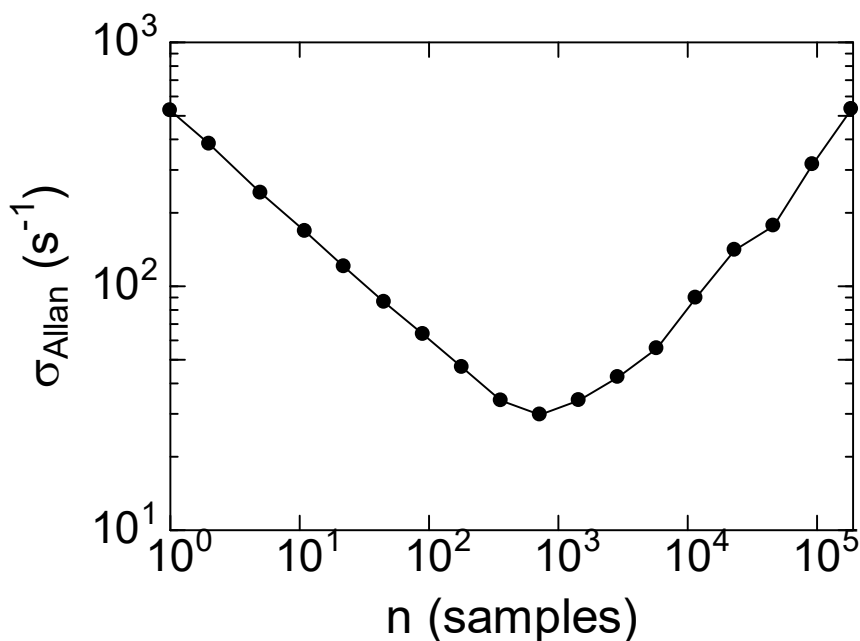


Fig. 3-4 典型的なアランプロット

エタロン効果によるバックグラウンド変動

上述したように、検出感度を制限するシステム誤差の一つにエタロン効果がある[5]。エタロン効果は、光共振器を構成する2つの高反射面外に存在する、何らかの反射面による意図しない疑似共振が要因で引き起こされる。Fig. 3-5に原理の簡略図を示す。この疑似共振器（エタロン）は意図しない反射面で構成されることからフィネスは低い。しかし、微弱であっても外部の反射面から光が共振器内に戻ると、光共振器内の光の損失に加えて、戻り光による光子の供給がなされ、見かけ上、減衰率が下がったように観測される。このとき、外部の反射面と光共振器を構成する高反射面の間で共鳴が起これば、戻り光の強度はレーザーの周波数に依存し、周期的に強弱を繰り返す。結果として、見かけ上の減衰率変化が周波数に依存して振動する。これがスペクトル上にバックグラウンドノイズとして現れる。Fig. 3-6に¹⁴C-CRDS分析システムにおいて試料を何も入れず、キャリアガス(He)を流し続けて取得したバックグラウンドを示す。非常に顕著なエタロン効果が観測され、複数の振動周期が確認された。これは、異なる外部反射面により引き起こされるエタロン効果が重なって生じていることを示唆している。エタロン効果は β_0 を系統的にシフトさせる要因であり、データを多く取得しても低減できないため、根本的な解決が必要となる。特に本研究の目

指す ^{14}C 天然同位体比 1.0×10^{-12} の検出感度に対しては、 $\delta\beta_0$ を 5 s^{-1} まで抑える必要があることが明らかとなったが、現システムでは最も良い条件でも、およそ 500 s^{-1} のエタロン効果（アバンドンス感度 1.0×10^{-10} ）が存在し、検出限界を制限している支配的な要因である。そのため、効果的な抑制方法開発が不可欠である。

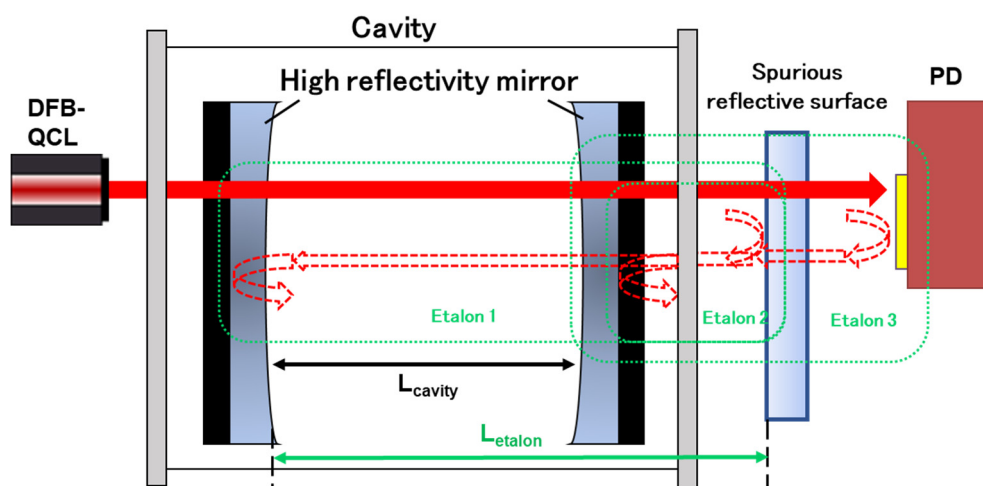


Fig.3-5 エタロン効果の原理図

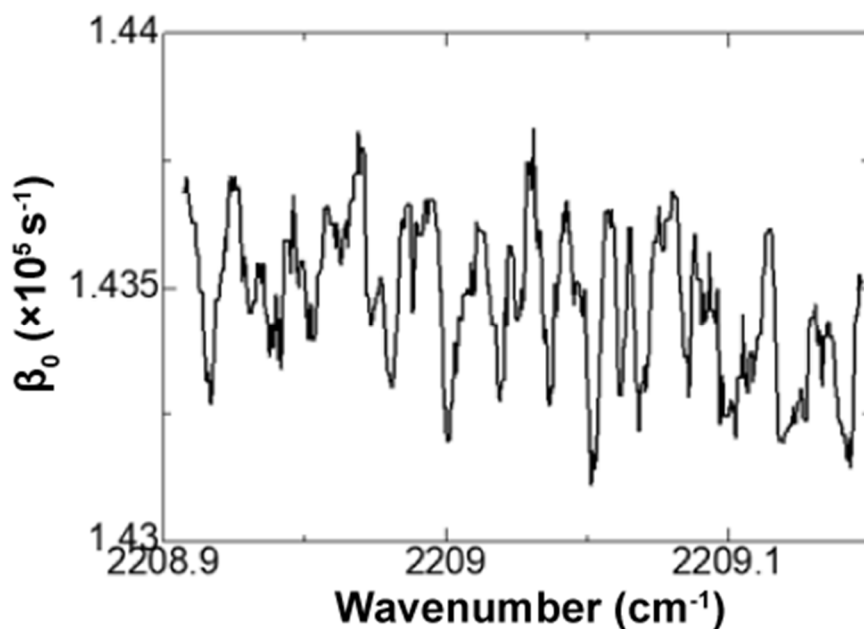


Fig. 3-6 観測されたエタロン効果

3.2 バックグラウンドノイズ低減法の開発

3.2.1 差し引き法によるエタロン効果影響の低減

本項からは、バックグラウンド変動の主要な要因であり、 ^{14}C -CRDS 分析システムの分析感度を制限しているエタロン効果抑制法の開発について述べる。

エタロン効果による影響を低減する単純な手法として差し引き法がある。これは、試料ガスを導入していない状態（キャリアの He ガスのみの状態など）で吸収スペクトルを取得し、エタロン効果を評価したうえで、測定試料ガスを導入してスペクトルを取得し、両者の差分をとることでエタロン効果の影響を取り除く方法である。He ガスのみの状態で取得したバックグラウンドスペクトル、および $^{14}\text{CO}_2$ ガスを導入して取得した吸収スペクトルを Fig. 3-7(a)に、そこからバックグラウンドのデータを差し引いた結果を Fig. 3-7(b)に示す。波数 2209.00 ~ 2209.15 cm^{-1} の範囲での減衰率 β のばらつきは 400 s^{-1} から 100 s^{-1} となり、4 倍向上した。本手法はエタロン効果が時間的に安定であり、取得されるバックグラウンドが測定中に不変であることを前提としたものである。しかし、実際にはエタロン効果の強度・周期・位相は、エタロン効果を誘発する疑似共振器長の温度や圧力の変化により時系列的に変化し、完全なエタロン効果の抑制のためには、毎測定のたびにバックグラウンドを評価する必要がある。これは測定スループットの悪化につながる。また、測定中であってもエタロン効果は変動するため、統計誤差低減のために測定時間を長くとり場合には、不確かさが増大してしまう。同様に、バックグラウンドの評価次第で結果が変化するため、測定精度の点で問題が残る。このため、エタロン効果を根本的に抑制する方法が求められる。

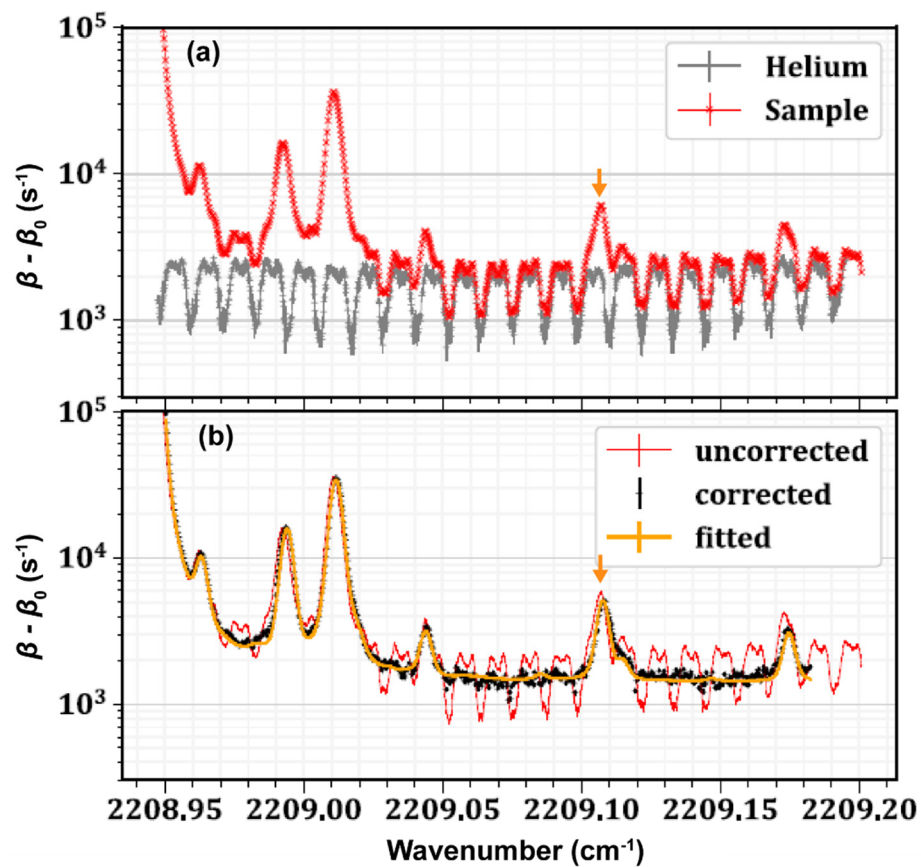


Fig. 3-7 エタロン効果差し引き法によるバックグラウンド抑制結果

(a) 取得された生のスペクトル

(b) 差し引き法により補正されたスペクトル

図中矢印が $^{14}\text{CO}_2$ の吸収ピーク

3.2.2 ブリュースタースポイラーによるエタロン効果の抑制

エタロン効果を根本的に解決する方法の一つとして、疑似光路長を強制的に変調しながらデータを取得し、エタロン効果の位相を大きく変動させ、複数のスペクトルを平均することで平滑化する方法が考えられる。以下では、ブリュースタースポイラーによる方法(本項)、測定セルの温度に変調をかける方法(次項)についてそれぞれ検討し、その効果を評価した。

ブリュースタースポイラーは、ある光学媒質に光が入射した際、入射角に従って、その光路長が変化することを利用する。ウィンドウのような平面光学素子をブリュースター角に近い角度で光軸上に設置した際、光はウィンドウ面でほとんど反射されずに大きな損失を伴わずにウィンドウ内を透過する。この物質内の透過光の光路長は物質の屈折率と光の入射角に依存するため、ウィンドウの角度を少しずらすと、ウィンドウ内部の透過光の光路長が変化する。これにより、光軸をほとんど変化させることなく、わずかに光路長の違う体系を作り出すことができる。そこで、このウィンドウ設置角度に変調をかけ、エタロン効果の位相を変調するブリュースタースポイラーと呼ばれる体系を構築することで、光路長に変調をかけることができる[6,7]。1 スペクトルを取得する時間に対して、十分な速度で変調をかけると、エタロン効果による周期的な変動の位相、すなわち β_0 の周期的なばらつきを無作為化でき、複数のスペクトルを平均することで、エタロン効果を統計誤差とともに抑制することができる。Fig. 3-8(a)にブリュースタースポイラーの概念図を、Fig. 3-8(b)に ^{14}C -CRDS 分析システムに導入されたブリュースタースポイラーの外観をそれぞれ示す。

ブリュースタースポイラーによるエタロン効果抑制を確認するため、ブリュースタースポイラー体系を構築し、基礎実験を行った。ウィンドウとして、厚さ5 mmのSi ウィンドウ(屈折率: 3.42 at 4.5 μm)をブリュースター角(74度)で光共振器と光検出器の間に設置した(Fig. 3-9)。角度変調機構には、ステップモーターとArduinoを組み合わせた。Si ウィンドウの角度は、ブリュースター角から三角形的に ± 0.75 度、周期100 msで変調した。これは幾何計算より、最大約100 μm の光路長変調に相当する。変調速度は、ステップモーターとArduinoによる変調機構により制限されたが、100 msは1スペクトルの取得時間(~数秒)に対して十分に短い。なお、周波数較正は低フィネスFPIにより行った。Fig. 3-10にブリュースタースポイラーの動作有無により取得されたバックグラウンドスペクトルを示す。ブリュースタースポイラーの動作なしの場合は単にステップモーターの変調を止め、ブリュースター角に近い状態で取得した。この時、ガスセルは陰圧(< 1 mbar)され、温度は253 Kであった。結果より、比較的周波数周期の小さな変動について、エタロン効果が抑制された。また、

Fig. 3-10 を高速フーリエ変換により周波数成分ごとの強度を求めた結果が Fig. 3-11 である。フーリエ変換の分解能は限られているものの、約 600 MHz に顕著に存在したピークがブリュースタースポイラーによって低減され、ピークとして観測されなくなった。周期 600 MHz は式(3-10)より、光路長にして約 25 cm であり、光共振器を構成する高反射率ミラーと光検出器までの距離におおよそ一致している。これより、両者の中間に設置されたブリュースタースポイラーによりエタロン効果を平滑化できることが明らかとなった。一方で、Fig. 3-11 ではフーリエ変換の周波数分解能が低く、周期の正確な評価はできないものの、1 GHz を超える周期のエタロン効果は全く抑制されておらず、これらのエタロン効果はブリュースタースポイラーの設置場所に関連しない疑似共振によるものであると示唆された。共振器長では約 10 cm 以下と考えられるこれらのエタロン効果は分析セルのウィンドウと高反射率ミラー、または高反射率ミラーそのものの表面・裏面、モードマッチングレンズの表面などが考えられる。

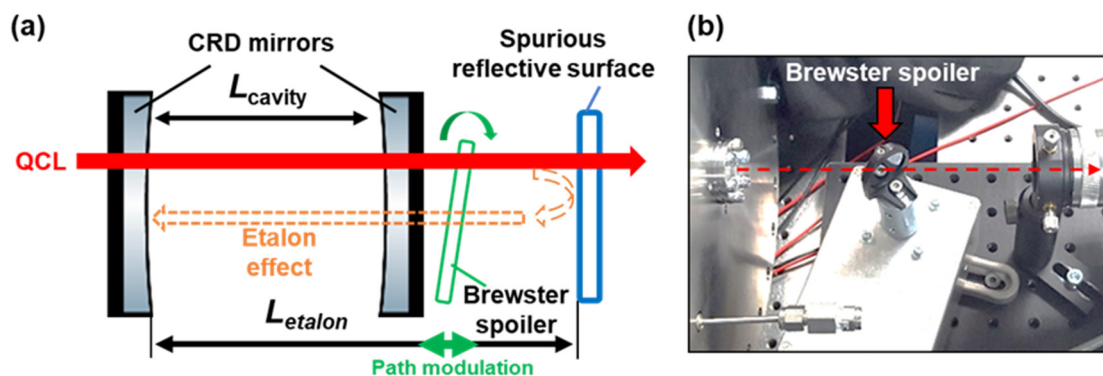


Fig. 3-8 ブリュースタースポイラーの概要

(a) 概念図

(b) 外観

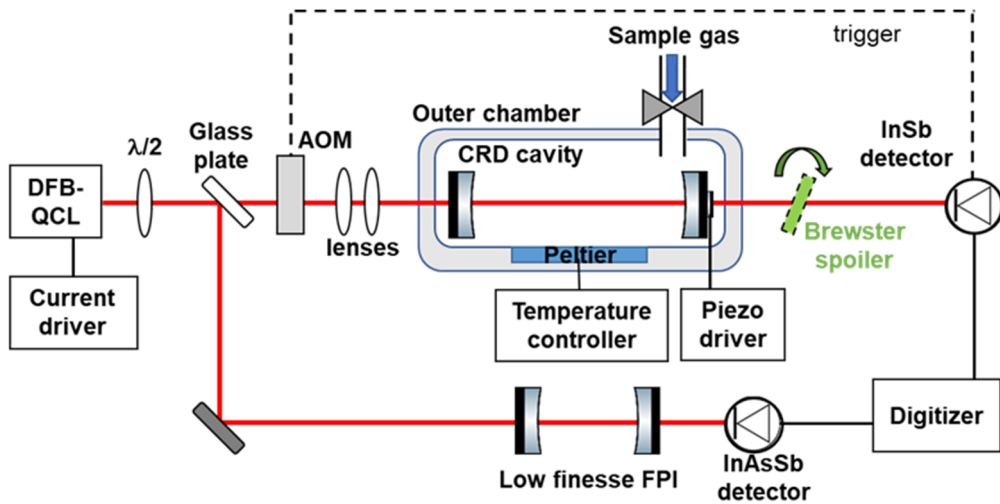


Fig. 3-9 ブリュースタースポイラー基礎実験体系

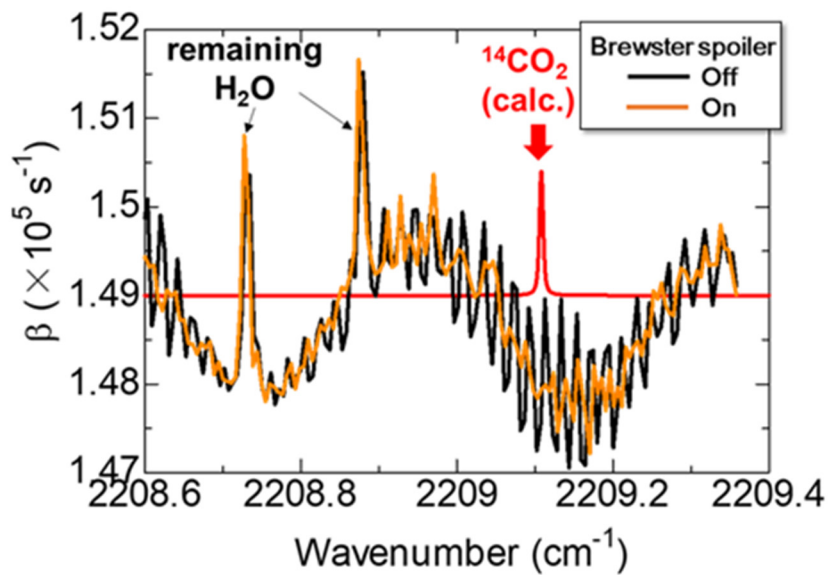


Fig. 3-10 ブリュースタースポイラーの有無によるバックグラウンドの比較 (10 スキャン平均)

図中赤線は想定される $^{14}\text{CO}_2$ の吸収ピーク
 $(\beta_0 = 1.49 \times 10^5 \text{ s}^{-1}, 253 \text{ K}, 10 \text{ mbar}, ^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 3 \times 10^{-10})$

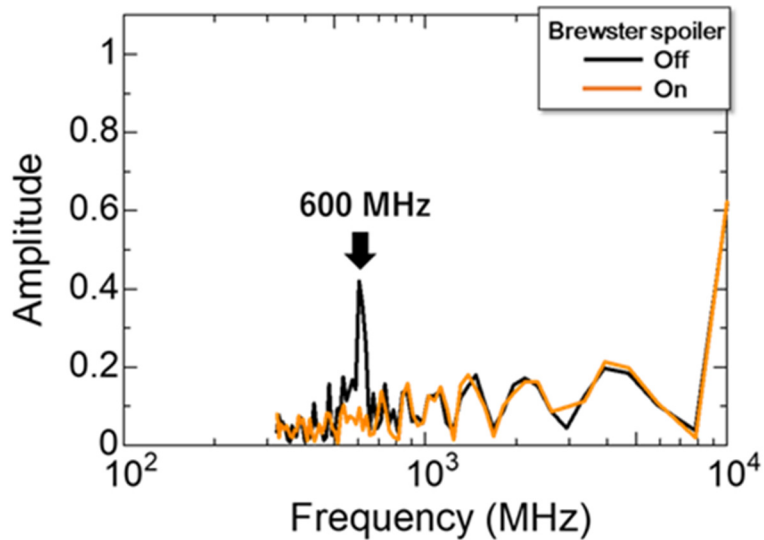


Fig. 3-11 バックグラウンドの周波数特性

3.2.3 光共振器温度変調によるエタロン効果の抑制

ブリュースタースポイラーでは、設置場所に関連するエタロン効果がよく抑制できることが明らかとなった。ここではブリュースタースポイラーとの組み合わせを想定し、その他のエタロン効果を包括的に抑制する手法を検討した。光共振器の温度変調に着目すると、光共振器の温度を変調することで、光共振器の共振器長を微小に変調することができる[8]。

^{14}C -CRDS 分析システムは干渉線抑制の目的から、分析セルをペルチェ素子による電子冷却により温度制御している。本手法では、そのセル温度に変調をかけることで、測定セルの共振器長、および疑似共振器の共振器長を熱膨張・収縮により微小に変化させ、エタロン効果の位相変調をかけることを試みた。実験体系は Fig. 3-9 と同様である。Fig. 3-12 に変調された分析セル温度の実測値を示す。分析セルは最初 254.5 K に安定化され、その後、 ± 1.5 K で 2.5 分周期の変調がかけられた。Fig. 3-13 に温度変調の有無により取得されたバックグラウンドスペクトルを示す。ブリュースタースポイラーは常に動作させた。結果より、バックグラウンドの変動は約 500 s^{-1} から約 100 s^{-1} 程度まで抑制され、温度変調とブリュースタースポイラーを組み合わせることで、エタロン効果を抑制できることが示された。これらより、温度変調による共振器長の変調がエタロン効果抑制に一定の効果を示すことを明らかとした。一方で、非常に遅い周期のエタロン効果 (Fig. 3-13 の波数範囲では線形的なバックグラウンド変化に相当) は依然残っ

た。これは、光共振器を構成される高反射率ミラーの表裏の面によるものであることが予想されるが、温度変調によってこの成分を取り除くにはより大きな温度変調が必要となり、スペクトル測定に影響を与えかねない。この成分は疑似共振がミラー媒質内部で起こるということもあり、他のエタロン効果と比較して時間的に安定である。また、吸収ピークに対して明らかに周期が大きいことから、一定時間経過ごとにバックグラウンド測定を行う等でその影響は最小化できると考えられる。

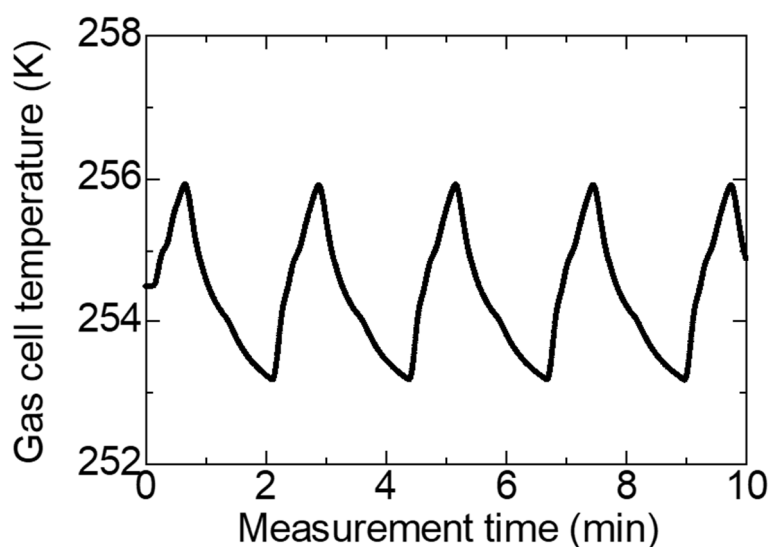


Fig. 3-12 変調された分析セル温度
10 k Ω サーミスタにより実測

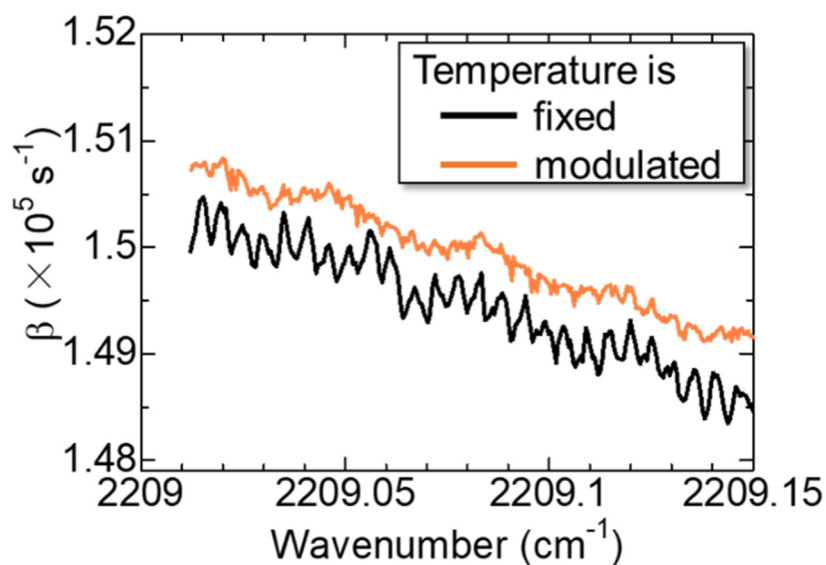


Fig. 3-13 取得されたバックグラウンドスペクトル（温度変調）
表示のため変調（オレンジ）にのみ 500 s $^{-1}$ のオフセットあり。

500 スキャンを平均

3.2.4 バックグラウンドノイズ低減による分析性能の評価

前述したエタロン疑似共振器長の強制変動による手法を組み合わせた場合の分析性能を評価するために、本手法を用いて安定 CO₂ の吸収スペクトルを取得した (Fig. 3-14)。測定中に温度を変調させることは、吸収スペクトル測定に悪影響を及ぼす懸念があったが、得られたスペクトルは中心温度 254.5 K、全圧 20 mbar の吸収スペクトルとよく一致し、ゆがみなどは見られなかった。これより、 ± 1.5 K の温度変調は、吸収スペクトルに悪影響は与えないことが明らかとなった。また、吸収がない部分で評価された、依然存在するバックグラウンドの変動は約 100 s^{-1} 程度であり、Fig. 3-13 にてセルを陰圧してバックグラウンドのみを測定した場合と一致した。Fig. 3-2 より、 100 s^{-1} のばらつきはアバダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 2 \times 10^{-11}$ に相当し、バックグラウンドの抑制によりノイズレベルが抑えられ、感度が $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1 \times 10^{-10}$ から 2×10^{-11} まで向上したことが明らかとなった。一方で、レーザー周波数を固定し、分析セルを陰圧して式(3-13)を用いてアラン分散を各平均点数ごとに計算しプロットすると、Fig. 3-15 のようになった。最初、位相変調を動作させた方がアラン分散の値は大きくなる。レーザー周波数を固定していてもエタロン効果の位相が変調されているため、より長い時間平均することでエタロン効果は平滑化され、その値は \sqrt{n} に従って減少した。 10^4 サンプルの平均で 15 s^{-1} を下回り、さらなる平均が可能であることが分かった。実際の測定では、依然エタロン効果が存在し、アラン分散による評価よりアバダンス感度は悪くなる。しかし、本結果は、エタロン効果が完全に抑制された場合、本システムのアバダンス感度は天然同位体比 10^{-12} レベルに十分到達可能であることを示している。これらより、ブリュースタースポイラーと温度変調による共振器長の変調がエタロン効果抑制に効果的であり、感度を向上させることを明らかとした。実際に ^{14}C を測定した評価については第 4 章を参照されたい。

エタロン効果による影響を抑制する他の手法として、Differential CRDS[9]、Off axis 型[10]、V 字型光共振器[11]、飽和吸収 CRDS (SCAR) [12]などが挙げられるが、現状のシステムに容易に導入・実装するには課題が多く、今後の評価が期待される。また、エタロン効果の位相をちょうど半周期分だけずらし、打ち消しあう手法が 2018 年にカリフォルニア工科大の Gibson により報告され、 ^{14}C -CRDS 分析システムによる詳細な評価が期待される[13,14]。

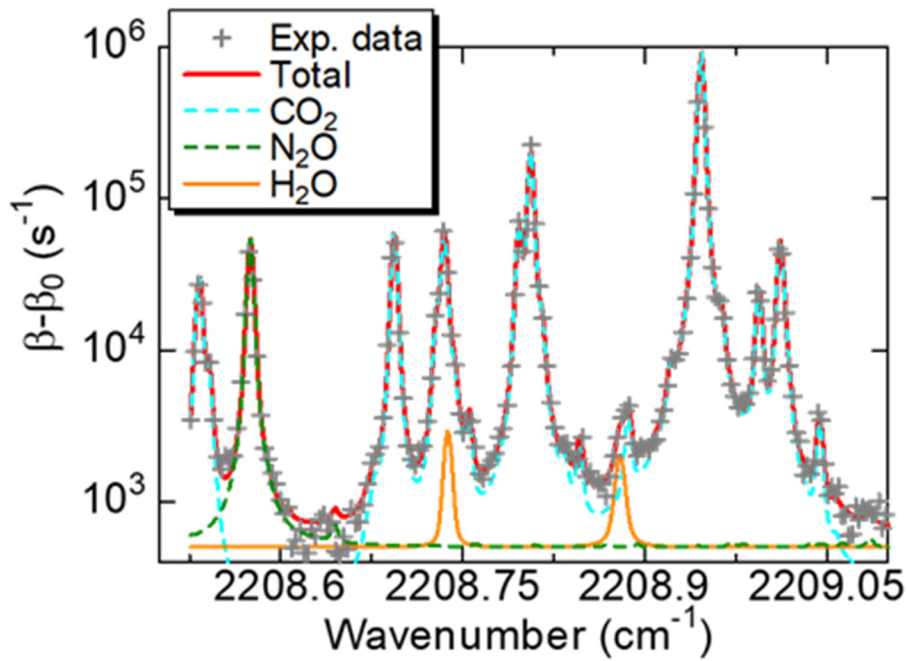


Fig.3-14 温度変調時に取得された CO₂ 吸収スペクトル
254.5 K、20 mbar

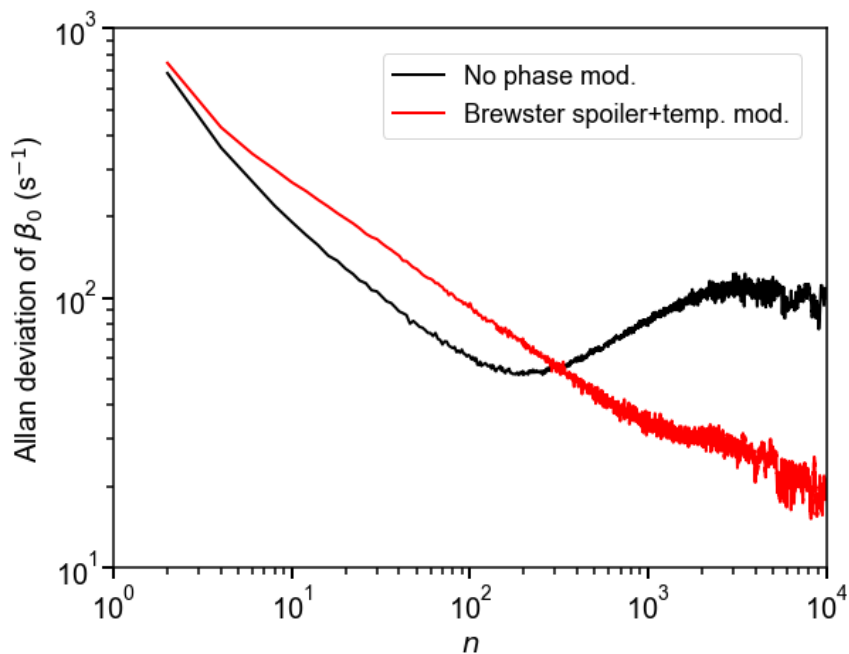


Fig. 3-15 エタロン効果変調によるアラン分散の改善

3.3 中赤外レーザー発振周波数安定化法の開発

3.3.1 Passive feedback による周波数安定化

前節にてバックグラウンドノイズであるエタロン効果抑制法を開発し、アバダンス感度は $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}=2\times 10^{-11}$ まで向上した。今後、さらなるエタロン効果抑制法の開発により、完全にエタロン効果が抑制できれば、最終目標である天然同位体比 10^{-12} を下回るアバダンス感度の達成が可能であることが示唆された。一方そのためには、統計誤差の低減のためにより多くの信号をより短時間で取得する必要があり、1 節で述べた中赤外レーザーの発振周波数の安定性が大きく関係する。そこで本節では、中赤外レーザー光源である DFB-QCL の発振周波数を安定化・狭帯域化する手法を開発し、 ^{14}C -CRDS 分析システムに適用することでその性能を評価した。

DFB-QCL の発振周波数は QCL 素子の温度変化の影響などを受け、温度制御をかけていても数 MHz 程度の変動があり、CRDS 光共振器との最適なカップリングのためには DFB-QCL の周波数を安定化し、線幅を共鳴条件程度まで細くすることが求められる。そこで本研究では Passive feedback による安定化法[15]を開発した。なお、本節における成果は、 ^{14}C -CRDS 分析システムに完全に導入するには課題も存在したため、後段の生体試料分析実証（第 4 章）、トレーサー応用実証（第 5 章）においては用いなかった。

Passive feedback 概要

レーザー周波数の安定化を目的として、電気光学変調器（EOM）を用いた PDH 法[16]のような高速の電気信号フィードバックが様々な光共振器やレーザーシステムに使用されている。PDH 法はレーザー周波数を高安定化できる一方で、実現するためには高速な信号処理系が不可欠であり、大きなコストがかかる。一方、レーザー自身の遅延自己注入を用いた方法[17,18]はそのような高価で複雑な装置や機構を導入することなく、簡便な構成で線幅低減が期待される。このような手法は受動的な光のフィードバックによる安定化手法であるため Passive feedback と呼ばれる。戻り光によってレーザーの発振線幅が狭くなる効果は以下の式で表される[19]。

$$\Delta f \approx \frac{\Delta f_0}{(1 + \kappa\tau)^2} \quad (3-14)$$

ここで Δf はフィードバックにより減少したレーザー線幅、 Δf_0 は元々のレーザー線幅、 κ はフィードバック率、 τ は外部光共振器による光の往復遅延時間である。

κ はレーザー出射面の反射率 r_2 、ダイオード内の往復時間 τ_c 、外部ミラーの反射率 r_3 を用いて下式で表せる。また τ は、外部光共振器の長さ L 、光速 c 、屈折率 n を用いて下式で表せる。

$$\tau = \frac{2nL}{c} \quad (3-15)$$

$$\kappa = \frac{(1-r_2)}{\tau_c} \sqrt{\frac{r_3}{r_2}} \quad (3-16)$$

以上から、外部ミラーの反射率が高く、外部光共振器長が長いほど大きな線幅の減少を見込むことが分かる。しかし実際には、外部共振器長を長く設計するとフィードバック系が大きくなるため、振動や温度変化などの外乱による不安定性の影響が大きくなる。よって外部共振器長を長くすることで、際限なく線幅の減少の効果が得られる訳ではない。また共振器長を長くする (FSR を小さくする) ことは次の 2 つの問題を生じる。まず、**Passive feedback** は自身の共鳴条件によって使用レーザーの利便性を大きく制限することに注意したい。レーザーは外部共振器の共鳴条件を満たす周波数のみで発振するため、その周波数は外部光共振器の FSR 毎に離散的な値をとる。各共振モードには離散的な発振モードにおいて、隣接するモードにジャンプすることをモードホップという。FSR の値が小さいことはそれだけ容易にモードホップを引き起こすことを表し、レーザー電流を掃引してレーザー周波数のスキャンを試みる場合には、モードホップを起こさず線形的に掃引できる範囲 (モードホップフリー領域) は限られる。また、レーザーの元々の発振線幅が外部光共振器の FSR より大きい場合、複数の共振モードで発振してしまう。この時、レーザー中心周波数のメインモードに対してそれ以外のモードをサイドモードという。外部光共振器長を大きくすると線幅の大きな現象を見込めるが、FSR が小さくなるために上述のモードホップとサイドモードの発生を促進してしまう危険も存在する。

実験体系

Fig. 3-16 に ^{14}C -CRDS プロトタイプシステムに組み込む形で構築された **Passive feedback** の体系を示す。DFB-QCL レーザー (浜松ホトニクス, L12004-2209H-C, 空冷ヒートシンク付き) より出射された光の一部は、コリメータの手前で 50:50 ビームスプリッター (Thorlabs, BSW511) によってフィードバックのためにピックアップされた。25 cm ~ 4 m の可変遅延パスの後、フィードバック用のレーザー光は、ミラーに向かってレンズで集光された。この機構はミラー表面でのビームが猫の目のようになることから、”キャットアイ”反射機構とよばれ、反射光の

角度アジャストメントの依存性を低減させ、DFB-QCL への容易な再入射を可能とさせる。ミラーで反射した光は同じパスを通過して QCL 素子に戻る。DFB-QCL はフィードバックの効果を検証するために、同時にパワー測定用光検出器・自作の低フィネス FPI (FSR = 1.86 GHz)・CRDS ガスセルにそれぞれ入射された。DFB-QCL 電流は、三角波により変調された。DFB-QCL 温度は 25 °C であった。フィードバックを無しとする場合には、”キャットアイ”用のレンズの後にビームブロックを置いた。CRDS ガスセルは室温に保たれた。

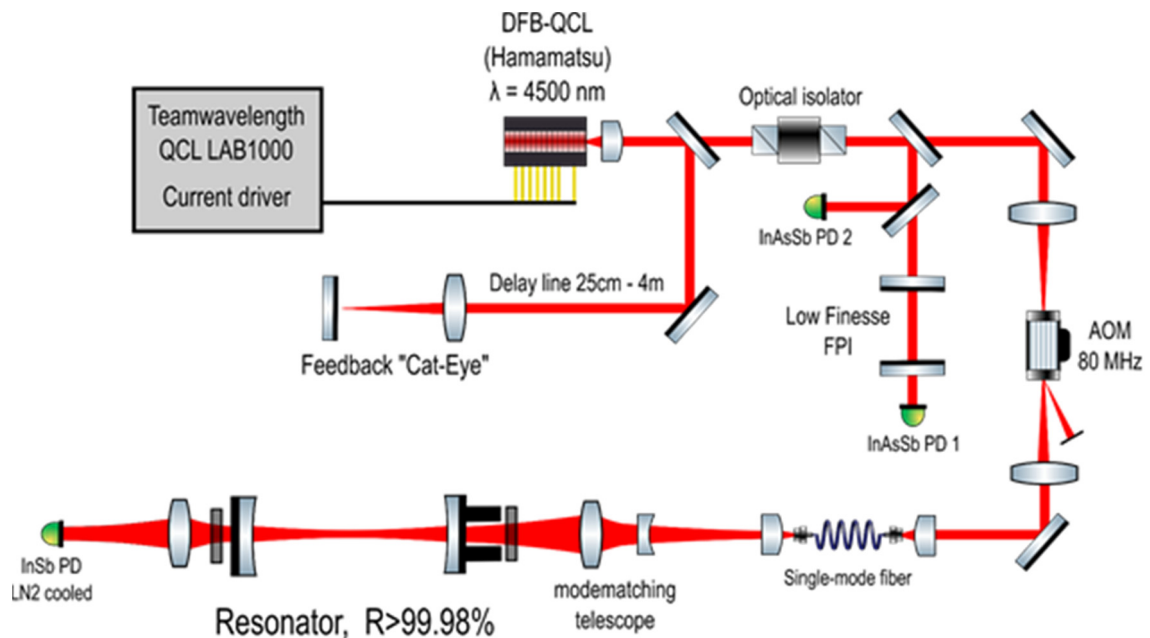


Fig. 3-16 Passive feedback 実験体系

Passive feedback の効果

Fig. 3-17 に電流に対する出力の依存性を示す。Passive feedback によって DFB-QCL にモードホップが起こり、それに起因するパワーの振動がフィードバック用の外部共振器の FSR 毎に引き起こされた (Fig. 3-17(a))。また、電流を増加させる場合と減少させる場合とで傾きに大きな違いが見られた。これは特に電流を減少させる際に強いヒステリシスがあるためと考えられる。さらに、レーザー閾値電流がフィードバックによって数 mA 減少することが確認された (Fig. 3-17(b))。この減少量をモニターしながら、フィードバックの強さを最適化した。Fig. 3-18 に、電流変調時の FPI 透過光信号を示す。DFB-QCL のモードホップが明瞭に示されている。フィードバックを用いた場合には、僅かな発振周波数のシフトが見られた。これはフィードバックによって QCL 素子の温度変化が起こったためだと考えられる。

次にレーザー線幅に対するフィードバックの効果を確認するため、CRDS 共振器の透過光を測定した。DFB-QCL の電流を 850 mA に固定し、透過光ピークの範囲で共振器長を 1 Hz の三角波でゆっくりとスキャンした。Fig. 3-19 に、CRDS 共振器の共鳴ピークを示す。共鳴近傍の急峻な周波数依存性から、ピークの周波数特性はレーザー光源の発振周波数の揺らぎが要因と考えられる。フィードバックがない場合、共鳴ピークはスパイク状で広範囲に渡って存在した。これは、QCL の周波数が高速に変動していることを示唆しており、使用した QCL 電流ドライバのノイズに起因していると思われる。このノイズについては次項で述べる。一方で、フィードバックがある場合の QCL の透過光信号は、明瞭なシングルピークを示しており、わずかな変動しか観測されなかった。以上の結果から Passive feedback は、線幅向上に効果的であると結論づけた。より詳細な線幅の評価は光周波数コムを用いた実験と合わせて後述する。各条件で 100 信号ずつピークを取得し、フーリエ変換によるパワースペクトル密度 (Power spectral density) を求めた。結果を Fig. 3-20 に示す。100 kHz 以上の周波数領域で、Passive feedback により 30 dB ほどノイズレベルが減少した。4 m のフィードバックパスでは 25 cm の結果と比較してより高い安定性をもたらすように見え、これは式 (3-15)、式 (3-16) と一致する。一方で、低周波数領域 (< 5 kHz) でのノイズは増加した。この低周波数領域の増加は、フィードバックパスの音響振動や空気の流れによる圧力変化、温度の不安定性に起因するものと考えられ、レーザーの長期的な安定性を改善するために、レーザーシステムを空気の流れを遮断するシールドで覆う、QCL を水冷タイプに変更するなどによって改善されることが期待される。また、ミラーに piezo 素子を取り付けることでフィードバック共振器長を変調させ、モードホップフリー領域の広範な Passive feedback 法の開発が望まれる。

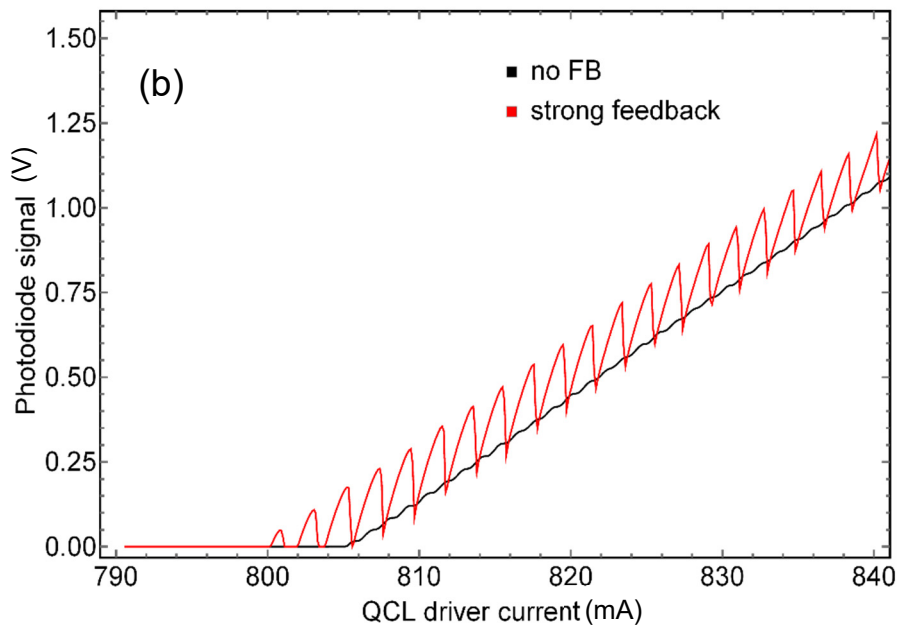
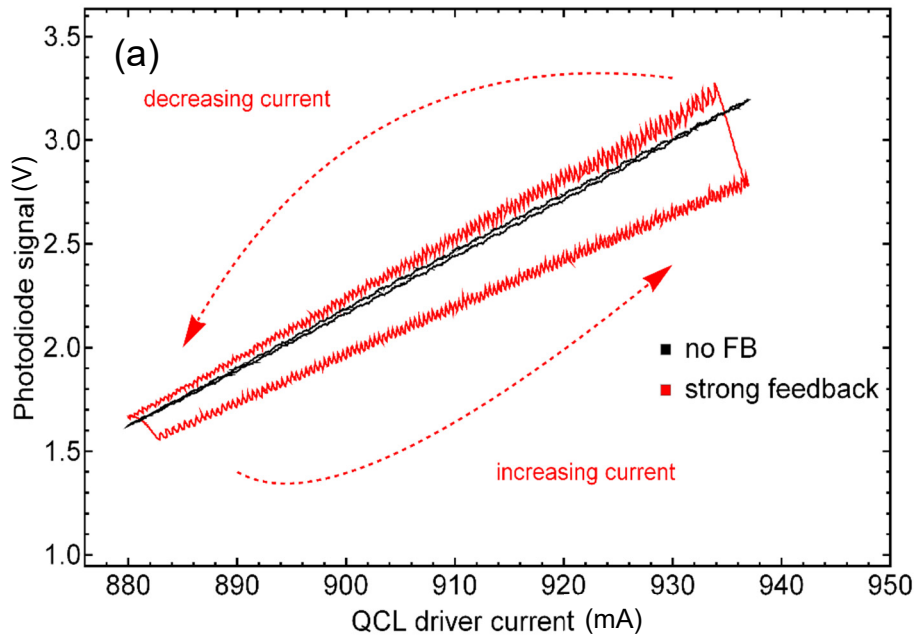


Fig. 3-17 Passive feedback による QCL 電流パワー特性の変化
 (a) CRDS での使用電流領域 (b) 発振閾電流周辺領域

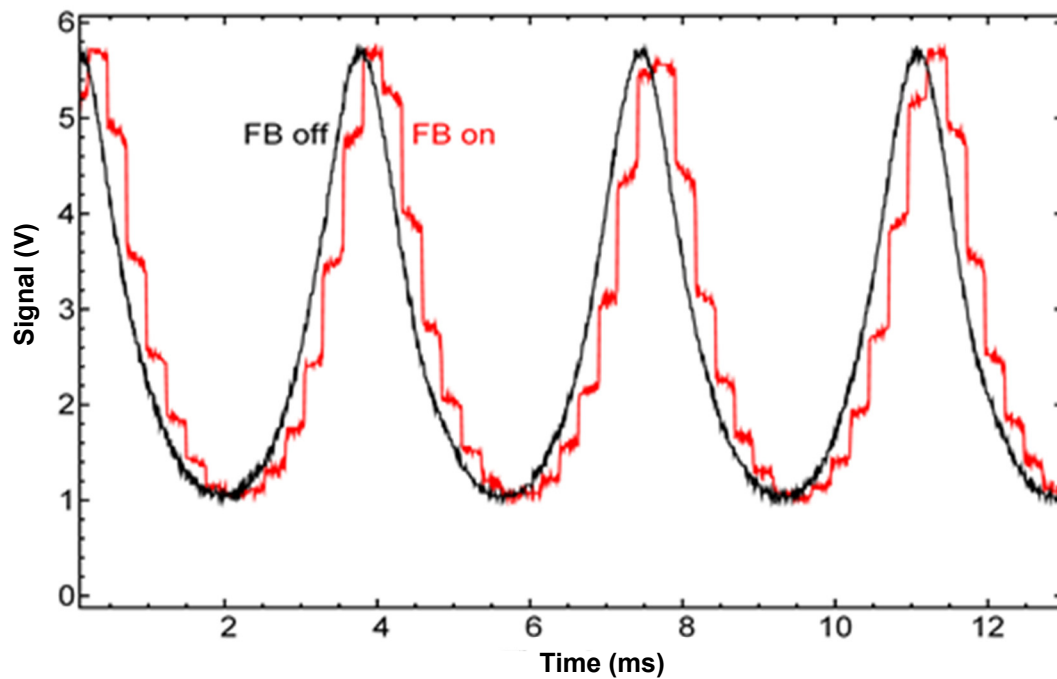


Fig. 3-18 Passive feedback による FPI 透過信号の変化

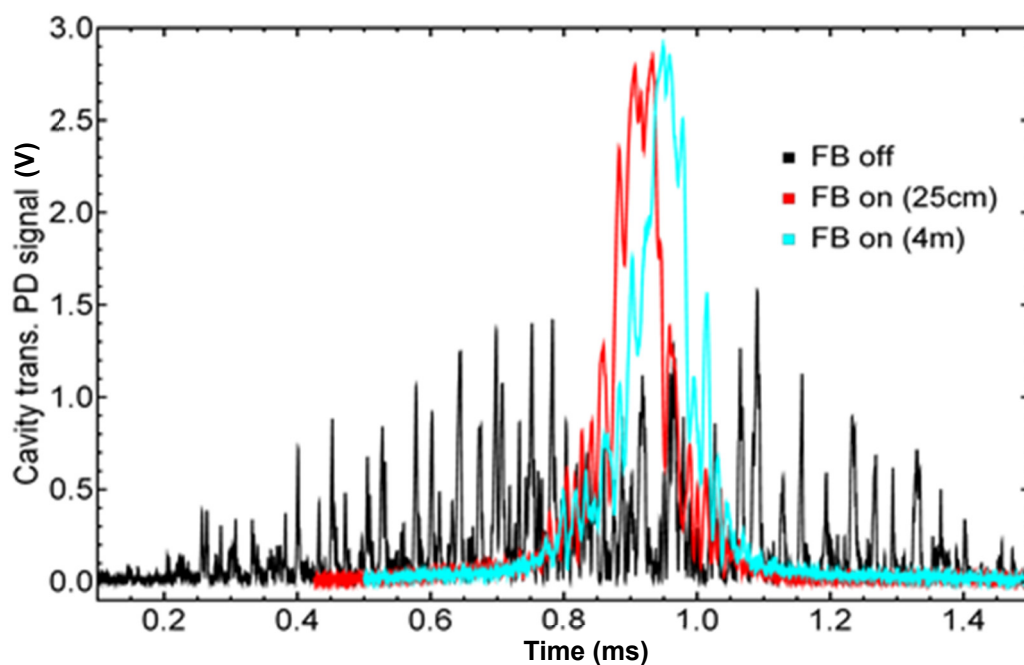


Fig. 3-19 CRDS 共振器共鳴ピークの比較

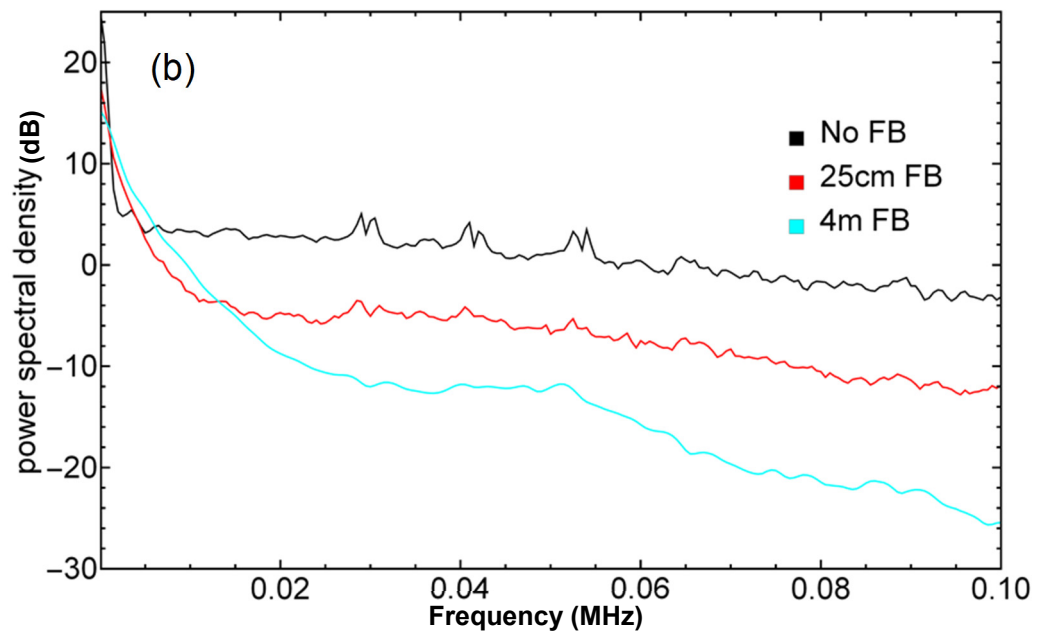
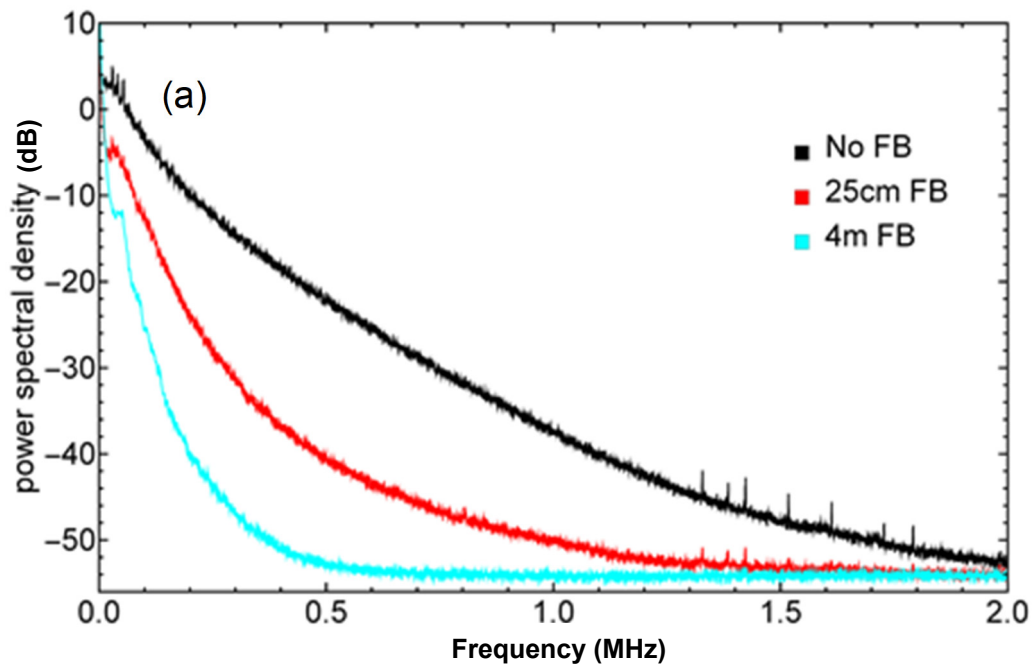


Fig. 3-20 パワースペクトル密度の比較
 (a) 0 ~ 2 MHz (b) 0 ~ 100 kHz

Voltage divider による変調ノイズの低減

Fig. 3-19 に示された Passive feedback 無しの QCL 周波数の高速な変動について、LD ドライバ (Wavelength electronics, QCL1000LAB) のカタログ上電流ノイズは最大 $1.6 \mu\text{A}$ と非常に小さく、モジュレーションインプット (mod. in) に電流変調のために印加されている電圧信号のノイズが、LD ドライバの電流を微小に変調し、結果として電流ノイズとなっているのではないかと仮説を立てた。 ^{14}C -CRDS プロトタイプシステムでは CompactRIO のアナログ I モジュール (National Instruments, NI9269) からのアナログ信号が常に LD ドライバの mod. in につながっており、電流変調をしない場合には一定の電圧値をかけて使用していた。NI9269 は $\pm 10\text{V}$ レンジで 16 bit の分解能を持っているが、両者の接続方法などに起因した「ノイズ」があり、オシロスコープで測定した所 $\pm 10\text{mV}$ 程度の電圧変動が常に見られた。このノイズを低減することを目的として Fig. 3-21 に示されるような 3 つの抵抗からなる簡単な分圧器を製作して、LD ドライバの mod. in と NI9269 の間に挿入した。Voltage divider が正しく機能しているかを評価するため、QCL の電流を 800mA に設定し、Divider 有/無の場合について NI9269 から一定の電圧値を印加して LD ドライバの電流の変化を測定した。結果を Fig. 3-22 に示す。LD ドライバは 1V の変調電圧に対して 0.2A の電流変調がかかるようになっている。Divider 無の場合は 0.2 に近い傾きを得られたのに対して Divider 有では約 32 分の 1 の傾きとなった。これは LD ドライバの mod. in の入力インピーダンス $1\text{k}\Omega$ から計算される比率と等しく、Divider は正確に機能していると評価できた。次に、Passive feedback 同様、CRDS 共振器の共振器長をゆっくりスキャンし、透過光をモニタリングした。Divider 無・Divider 有・Divider 有 + Passive feedback 有の 3 パターンについて同様の測定を行った。結果を Fig. 3-23 に示す。結果より Fig. 3-19 に見られたスパイク状の複数のピークは Divider が無いときにのみ観測されたため、変調電圧のノイズが QCL 周波数を高速で変動させる原因であることが分かった。また、Passive feedback をオンにすると、ピークは非常に細くなった代わりに、数本のピークが見られるようになった。これは QCL の発振周波数が依然不安定なため、遅い共振器長のスキャン中に複数回、共鳴条件を満たしてしまっていると考えられる。実際、共振器長のスキャンを早くした場合には、このような複数ピークは観測されなくなった。Fig. 3-23 からパワースペクトル密度を求めると Fig. 3-24 のようになった。Divider を挿入したことでノイズレベルは全体的に下がり、Passive feedback によって特に 2MHz 以下の周波数成分が抑制されていることが分かった。この結果は Fig. 3-20 と一致する。以上により、Passive feedback によって DFB-QCL の短期的な周波数安定性が向上し、その線幅が狭帯域化されることが明らかとなった。これ以降の実験では、特段の記述がない場合には Voltage divider は導入された。

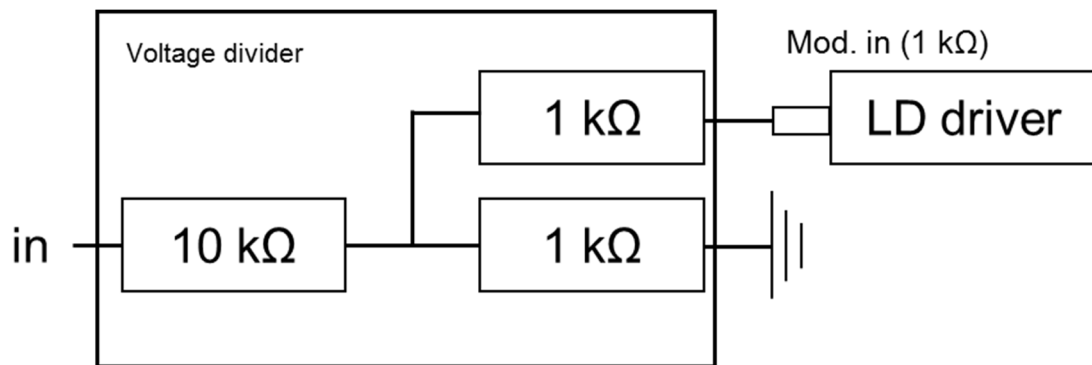


Fig. 3-21 Voltage divider の構成

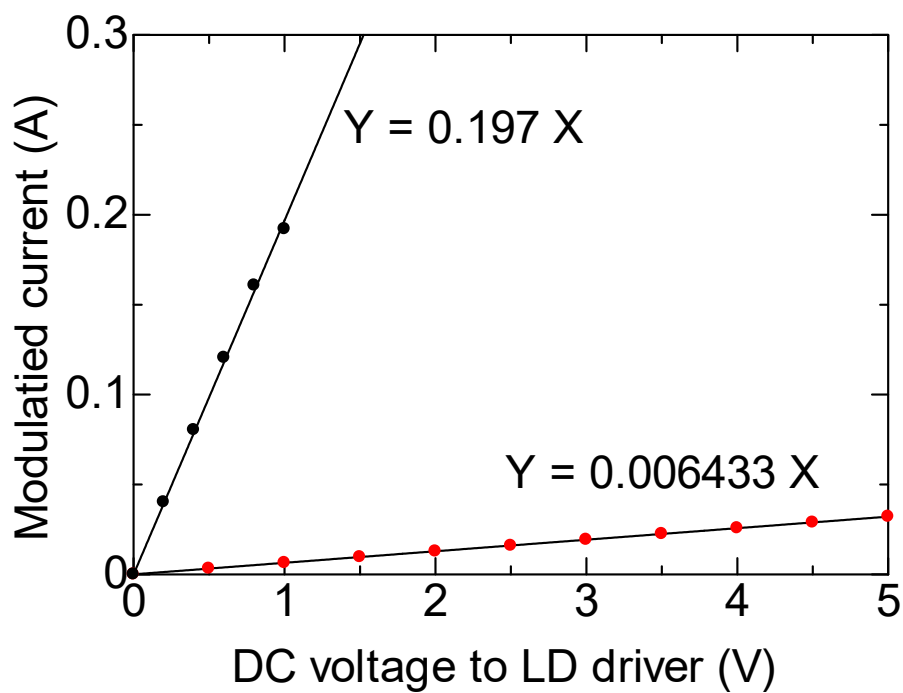


Fig. 3-22 Voltage divider の動作

黒点: Divider 無 赤点: Divider 有

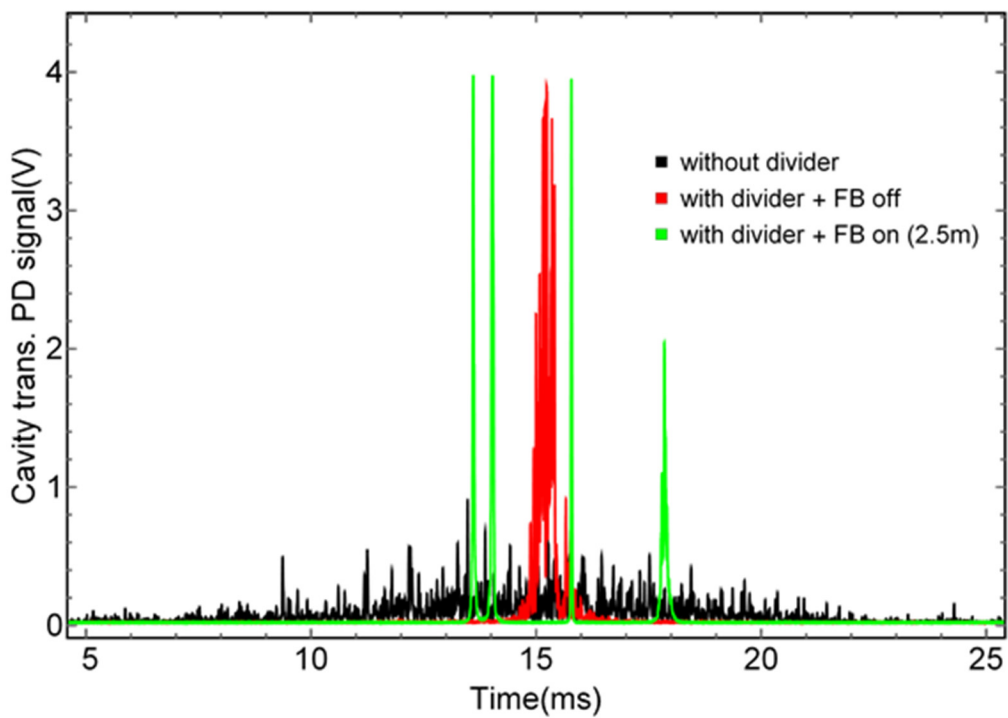


Fig. 3-23 Divider の有無と CRDS 共振器共鳴ピーク

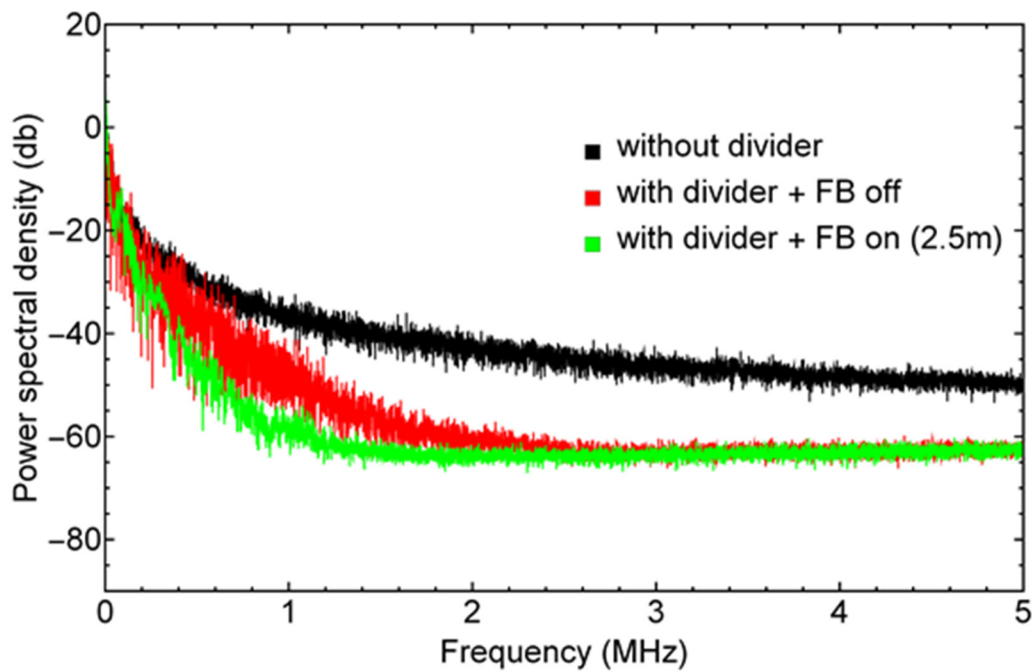


Fig. 3-24 Divider の有無とパワースペクトル密度

3.3.2 光周波数コムを用いたレーザー発振周波数の較正と安定化

Passive feedback により DFB-QCL の高周波ノイズを低減でき、発振周波数の狭帯域化がなされることを示した。しかし、特に中長期的な安定性には依然課題が残る。また、第2章にて説明した Si エタロンと N₂O セルによる DFB-QCL の周波数較正にはその精度に原理的な限界がある。そこで本項ではさらなる周波数安定化を目指し、近年その発振周波数が中赤外域まで拡張され、高い注目を集める光周波数コムを用いたレーザー周波数安定化システムを開発した。また、光周波数コムを用いることで DFB-QCL の発振線幅を直接評価できるようになった。

光周波数コム

光周波数コム (OFC) は、周波数軸上で等間隔に多くの縦モードが並んだスペクトルを有する光のことであり、その周波数スペクトルを櫛に見立ててコム (Comb) と呼ばれている。光周波数領域で極めて優れた周波数安定性を実現できるため、長さの国家標準、精密な測長用光源、分光測定用広帯域光源としてなど、計測、分光の分野での応用が拡大している。その開発者である J. Hall と T. Hänsch には、”光周波数コム技術を含むレーザーを用いた精密分光の発展への貢献”により、ノーベル物理学賞が授けられた (2005 年)。OFC を生成する方法は複数あるが、モード同期により生成される超短パルス光を用いる方法が最も広く使われている。

超短パルス光とは、数フェムト秒から数ピコ秒のパルス幅をもつパルス光のことを呼ぶ。超短パルスの特性の一つに超広帯域な発振が可能という点が挙げられる。超短パルス光の生成にはモード同期 (mode-locking) が必要となり、可飽和吸収体を用いられる [20]。ここで、可飽和吸収体は、強度の低い入射光に対しては吸収体として働き、強度の高い入射光に対しては吸収体の能力が飽和して透明体として働く物質である。パルス光を可飽和吸収体に入射させた場合、その特性により、パルス光の中心部では吸収が飽和し、透過光強度は変化しないが、パルス光のすその部分では吸収により透過光は弱まる。結果として、可飽和吸収体を通過することでパルス光の時間幅が短くなる。レーザー内部の半導体媒質に対して可飽和吸収体の吸収特性を適切に選択することで、モード同期により超短パルス光を生成できる。可飽和吸収体の例としては後述のファイバーレーザーに用いられるカーボンナノチューブなどがある。モード同期レーザーの発振は時間軸では等間隔なパルス列として観測される。各モードの周波数が極めて安定な超短パルス光が OFC である。OFC の発振スペクトルを Fig. 3-25 に示す [21]。超短パルス光のパルス発振の繰り返し周波数を f_{rep} 、オフセット周波数 (キ

キャリアエンベロープオフセット) を f_{CEO} と定義すると、OFC の発振スペクトルは、モード間隔を f_{rep} として、全体が f_{CEO} だけ周波数シフトされた多数のモードの集合体になる。OFC の n 番目モードの周波数は、

$$\nu(n) = n \cdot f_{rep} + f_{CEO} \quad (n: \text{a large integer}) \quad (3-17)$$

と決まる。その周波数精度は非常に高く、最近では約 11 桁の精度での周波数測定が報告されている[22]。

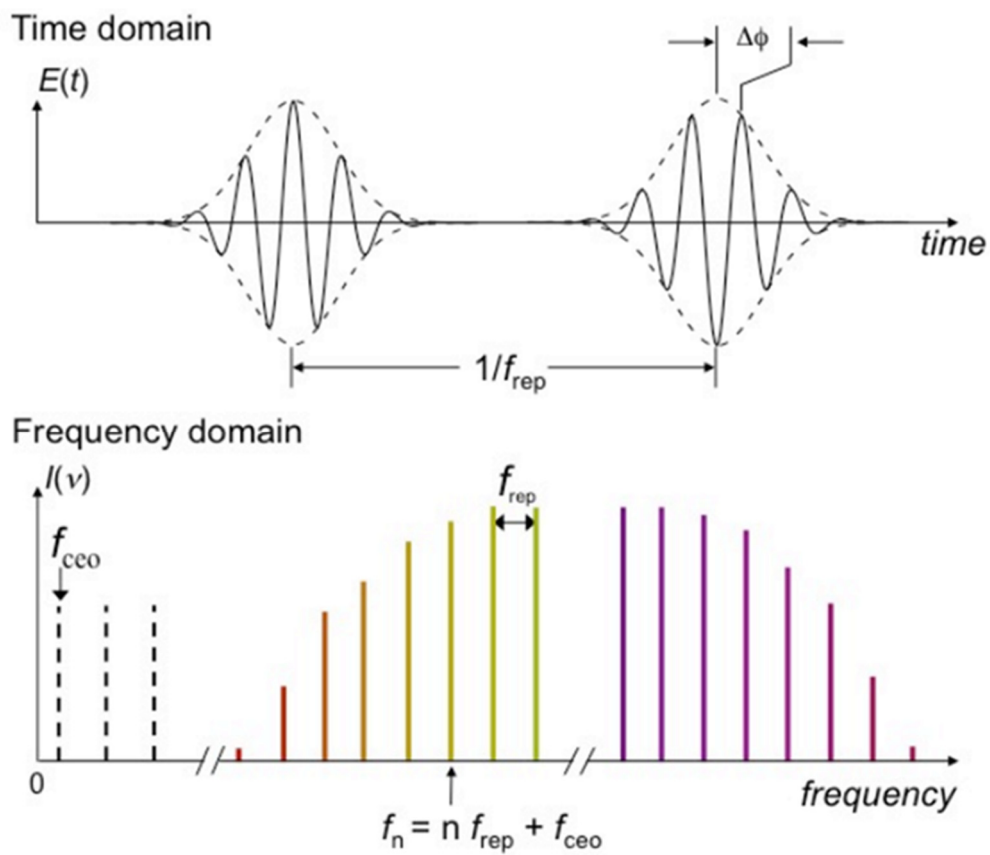


Fig. 3-25 光周波数コムの発振スペクトル[21]

フェムト秒ファイバーレーザーベース中赤外光周波数コム

本研究で使用した中赤外 OFC は、名古屋大学大学院工学研究科西澤研究室により開発されたものである[23]。Fig. 3-26 に中赤外 OFC の概要を記す。中赤外 OFC は Yb ドープファイバーベースのフェムト秒ファイバーレーザーを、差周波発生 (Difference Frequency Generation: DFG) により周波数変換することで生成される。中心波長 1040 nm のファイバーレーザーは二つに分けられ、片方はフォトニック結晶ファイバー (Photonic Crystal Fiber: PCF) に入射される。PCF 内で光ソリトンが生成され、ソリトン自己周波数シフトによってレーザー光の波長はシフトする。入射光強度によって光ソリトンの波長シフトの大きさが変わるため、中心波長 1300 ~ 1360 nm の光生成を可能としている。波長シフトさせた光ともう片方の Yb ファイバーレーザー光を非線形光学結晶である PPMgSLT (Periodically Poled Mg-doped Stoichiometric Lithium) 結晶に同時に入射させることで、DFG によって中赤外 OFC を生成する。光ソリトンの周波数を変化させ、中心波長を 4.4~5.2 μm まで変化可能なスペクトル線幅 70 nm (FWHM) の OFC コムが生成される。十分高速な光検出器で受光し、コムを隣接するモード同士のビート周波数を RF スペクトルアナライザで測定した結果、繰り返し周波数 (f_{rep}) 184.32 MHz 間隔でピークが観測された。

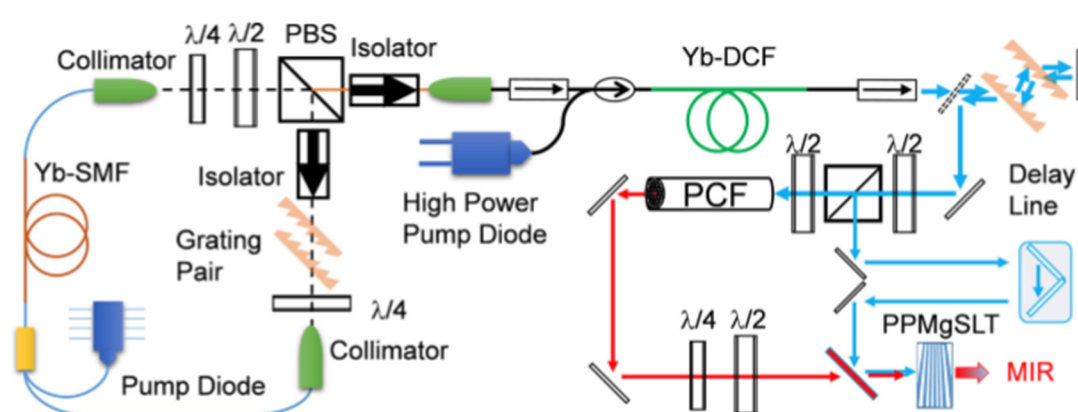


Fig. 3-26 ファイバーレーザーベース光周波数コム概要[23]

中赤外光周波数コムを用いた周波数較正/安定化の原理

OFC を用いた周波数較正/安定化手法は光ヘテロダイン法に基づいている。発振周波数が異なる 2 つのレーザーがあり、一方は測定対象の信号光、他方は周波数測定用の安定なリファレンス光であるとする。それぞれの光の電場成分を E_s と E_r とすると次式で表すことができる。ここで、それぞれ ν_s と ν_r は発振周波数、 A_s と A_r は振幅である。

$$\begin{aligned} E_s &= A_s \exp(2\pi i \nu_s t) \\ E_r &= A_r \exp(2\pi i \nu_r t) \end{aligned} \quad (3-18)$$

2 つの光の干渉光の強度を I とすると次式で表せる。

$$I = |E_s + E_r|^2 = A_s^2 + A_r^2 + 2A_s A_r \cos(2\pi(\nu_s - \nu_r)t) \quad (3-19)$$

$$\nu_{beat} = |\nu_s - \nu_r| \quad (3-20)$$

式(3-19)から、干渉光を光検出器で測定した場合、2 つのレーザーの強度に関係する DC 成分と正弦的な AC 成分とに分かれる。この AC 成分がうなり（ビート）である。ビートの周波数は元の 2 つの光の差周波数となる（式(3-20)）。一般的に光の周波数は非常に高い（数十 ~ 数百 THz）ため直接測定することは困難である。一方、2 つの光の周波数のビートは、両者の周波数差が光検出器の帯域（例えば、数 GHz ~ kHz レベル）以下となれば、観測可能である。よって、一方に周波数が安定なリファレンス光を用いて干渉光を生成することで、対象となる光の周波数をビートの周波数から測定することが可能である。この測定手法を光ヘテロダイン法という。OFC をリファレンスレーザーとして用い、DFB-QCL の周波数を測定する場合には、DFB-QCL と隣接する周波数を持った複数のビートが観測される。DFB-QCL の周波数をスキャンした場合、ビート信号の周波数変化、およびそのモニタリングは Fig. 3-27 のようになる。実際には、検出器系の帯域等によって取得できる周波数の範囲が限られ、複数同時に存在するビート周波数のうち、モニタリングに適するものを一つ選択しトレースする必要がある。例えば Fig. 3-27 において、赤色点線で示された範囲のビート信号をトレースすると、DFB-QCL の周波数変化に対して、ビート信号周波数は三角波のような軌跡を描く。折り返しの周波数は厳密に OFC の繰り返し周波数の半分、 $f_{rep}/2$ の整数倍となる。よって、DFB-QCL の単位時間あたりの周波数変化・掃引が $f_{rep}/2$ に対して十分小さい場合、ビート周波数の変化を線形的にモニタリングすることができる。ビート信号周波数を RF スペクトルアナライザで取得する場合には、単位時間は RF スペクトルアナライザの 1 回あたりの掃引時間となる。

中赤外 OFC とのビート信号を用いて DFB-QCL 発振周波数を安定化する場合、ビート周波数を測定し、その周波数が一定となるように DFB-QCL への印加電流にフィードバックをかければよい。本研究では、高速 RF スペクトルアナライザ

を用いてビート周波数をデジタル的に測定し、LabVIEW™ を用いたプログラムにより計算された変調量 (PID 制御) を、DAC より DFB-QCL の LD ドライバに加えるシステムを開発した (Fig. 3-28)。

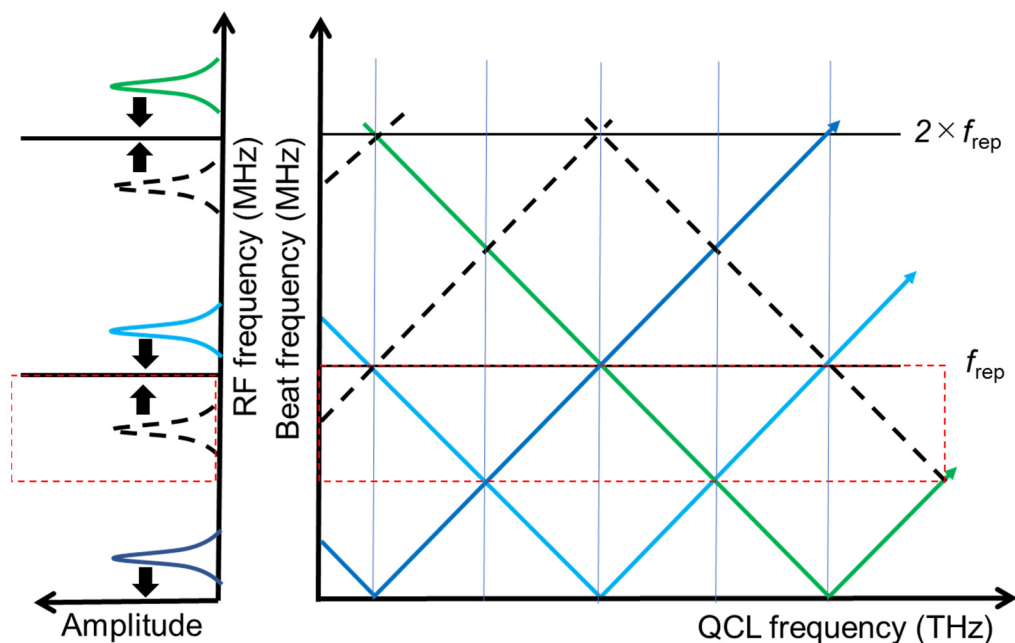


Fig. 3-27 DFB-QCL 周波数掃引時のビート周波数変化

左: 周波数掃引開始時の RF スペクトル

右: QCL 周波数に対するビート周波数の変化

赤色点線がモニタリング領域

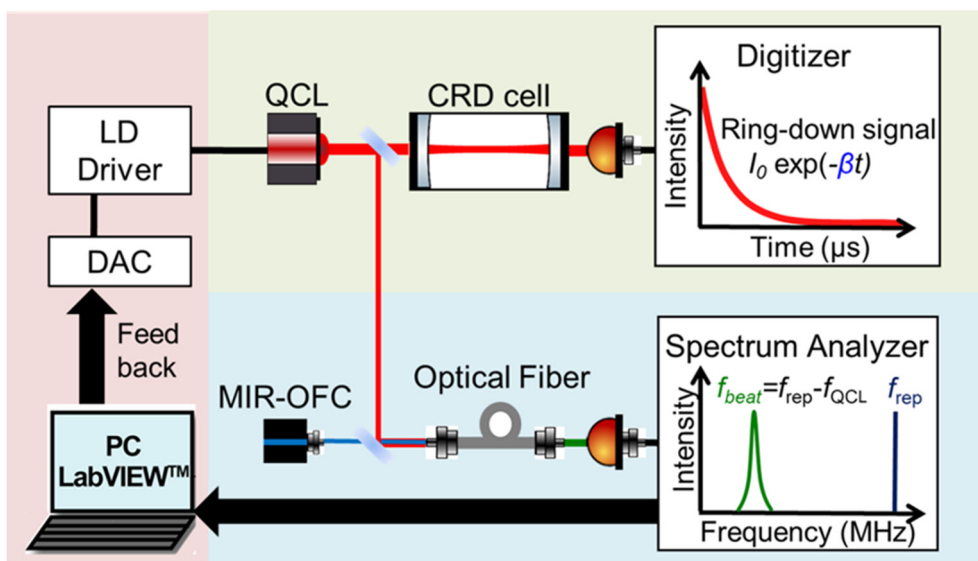


Fig. 3-28 中赤外光周波数コムによる DFB-QCL 安定化システム概要

実験体系

中赤外 OFC と ^{14}C -CRDS 分析システムを組み合わせた実験は、中赤外 OFC を含めたすべての装置を名古屋大学アイソトープ総合センター管理区域内に移設して実施した。光学系の体系を Fig. 3-29 に示す。

DFB-QCL 光の一部及び中赤外 OFC を、光路を完全に一致させるために InF_3 シングルモードファイバー内に導入し、内部で干渉させることでビートを生成した。干渉光はグレーティングで反射した後に光検出器にて測定された。グレーティングは DFB-QCL との周波数差が大きい、測定対象ではない OFC のモードを取り除くために使用し、グレーティングによって分散された不要な光成分はスリットを用いて完全に遮断した。OFC が間隔 f_{rep} (~ 184 MHz) 毎の多数のモードを持つため、干渉光用の光検出器には、帯域が 200 MHz の MCT 光検出器 (Vigo, PVI-4TE-5) を使用した。光検出器からの信号は RF スペクトルアナライザにより処理され、 $f_{\text{rep}}/2 \sim f_{\text{rep}}$ を RF 周波数の掃引範囲として RF スペクトルに変換することでビートの周波数情報を取得した。ここで、スペクトルアナライザの応答の速さは最終的なフィードバック制御の応答時間への寄与が大きく、制御の性能を決定する要因となるため、高速でデータ測定が可能なものが望ましい。そこで、Signal Hound 製 RF スペクトルアナライザ BB60C を使用した。BB60C は信号をデジタルデータとして取り込み FFT (Fast Fourier Transform: FFT) 処理することで RF スペクトルを取得する。また、Software defined radio 技術によって PC での本体制御やデジタル信号処理が可能であり、最大 486 ksample/sec のサンプリングレートで測定が可能である。また Application programming interface が公開されており、自作プログラミングによる測定の自動化が可能である。BB60C により連続的に取得した RF スペクトルから中赤外 OFC と DFB-QCL のビートによるピークを抽出し、ガウシアンフィッティングによってその線幅と中心位置をオンラインで評価する LabVIEW™ によるプログラムを開発し、CRDS 測定データと合わせてファイルに記録した。本プログラムは範囲 90~195 MHz、Resolution Band Width (RBW) 300 kHz の RF スペクトルを 15 ms で集録可能である。ただし、連続集録では BB60C のリアムタイムや、LabVIEW™ プログラム処理起因の遅れが存在し、RF スペクトルは約 200 ms 間隔で取得された。また、Passive feedback の体系を同時に構築し、フィードバックパスを遮断することで Passive feedback の有無を変化させた。変調用の Digital Analog Converter (DAC) として NI9269 (National Instruments) を使用し、Voltage divider を導入した。

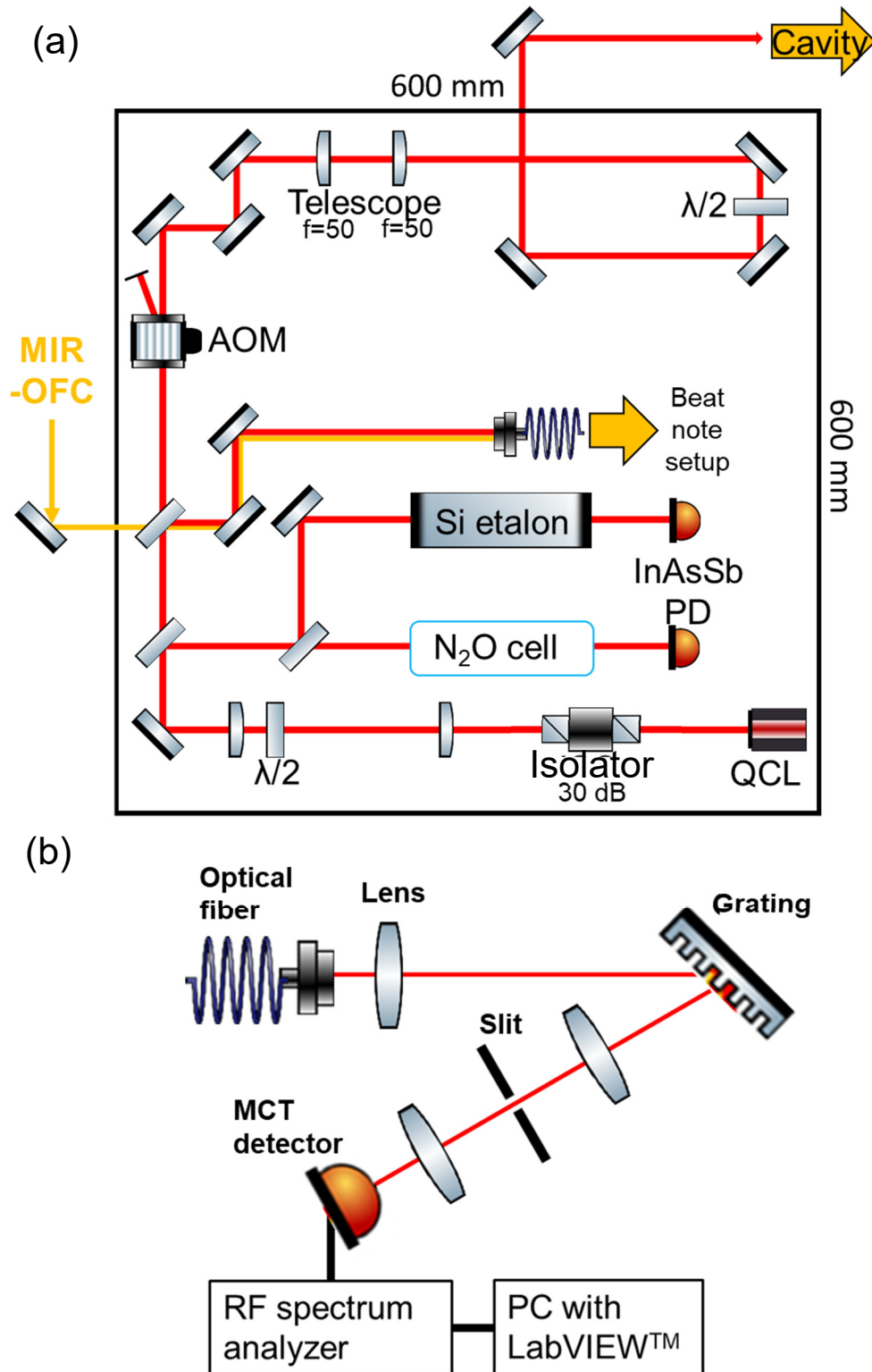


Fig. 3-29 中赤外光周波数コムを用いた実験体系
 (a) DFB-QCL 光学系 (b) ビート取得体系

ビート測定及び周波数安定化の特性評価

RF スペクトルアナライザによって測定された RF スペクトルの一例を Fig. 3-30 に示す。 f_{beat} が QCL と中赤外 OFC のビートである。この時、ビートの 3 dB 幅は 690 kHz と評価された。中赤外 OFC の各モードの線幅が未評価であるため、DFB-QCL の線幅はこれ以下であると考えられる。一方で、一般的な OFC のモード線幅と、DFB-QCL のカタログ値としての線幅 (1 MHz 以下) を考慮すると、評価された数値は妥当であると評価した。

Fig. 3-29 に示した周波数安定化システムを用いて QCL の周波数安定化を行った。Fig. 3-31 にビート周波数の時間変化を示す。安定化無しの場合、実験室の温度変化等の不安定性が原因と考えられる 30 MHz / 5min 程度の周波数変動が観測されたが、安定化によって変動が 1 MHz / 5min 程度に抑制されることを確認した。これにより開発したシステムを用いて DFB-QCL の周波数安定化が可能であることが示された。また安定化のための PID 制御各ゲインの設定についてはビートの安定性の実測によって最適化を行い、P: 0.0001、I: 0.0320 として D ゲインは用いなかった (D: 0)。よって本制御は結果的に PI 制御であった。また、スペクトルアナライザの測定範囲は $f_{rep}/2$ から f_{rep} としており、実験時は $f_{rep} = 191$ MHz であった。フィードバックは RF スペクトルが測定される度に行われるため、その帯域は 5 Hz 程度であると見積もれた。この性能はレーザー線幅の狭帯域化などを行うには十分でないが、系の温度、圧力変化や振動などが由来の遅い周波数変動を抑制するには十分に効果的である。なお、本手法を用いて発振線幅の狭帯域化を行うためにはより高速な変調を DFB-QCL の電流に加える必要がある。この実現のためには、ビート周波数をデジタル的に取得しては不十分である。光検出器で取得された信号からハイパスフィルタ、ローパスフィルタを組み合わせ一つ一つのビート周波数以外のピークを減衰させ、そのうえで位相同期回路等により高速なフィードバックをかけることで、本手法による DFB-QCL の狭帯域化が見込める。

周波数安定化システムを CRDS に適用するためには、安定化と同時に周波数掃引を行い、スペクトルを取得する必要がある。QCL 変調にオフセット電圧をステップ状に加えると同時に、PI 制御のセットポイント周波数を周波数等間隔に変化させることで、QCL の周波数を安定化しつつ、ステップ状に周波数掃引することを考えた。周波数安定化と同時にステップ状に QCL 周波数を変化させた場合のビート周波数の変化を Fig. 3-32 に示す。黒線がビート周波数、赤線が QCL 電流コントローラに加えた変調電圧である。適切な電圧ステップ幅で変調することで、QCL の周波数を 1 方向に変化させつつ、ビート周波数の安定化を行った。この時のビート周波数のセットポイント周波数からのずれを Fig. 3-33 に示す。周波数をステップ状に変化させると瞬時にビート周波数が安定となっ

た。以上より、QCL の周波数を安定化させると同時に、ステップ上に電流変調を行うことで周波数を 1 方向に掃引可能であり、CRDS スペクトルを取得可能である見込みが得られた。次に、周波数安定化システムを用いて標準 CO₂ ガス分子の CRDS 吸収スペクトルを取得した。試料は標準 CO₂ と大気混合ガス (13.4 mbar、291 K)、測定範囲は 2209.7~2209.85 cm⁻¹ であり、掃引は 1 方向に 1 度のみ行った。結果を Fig.3-34 に示す。これより、本手法を用いて DFB-QCL を安定化しつつ、CO₂ 吸収スペクトルを取得可能であることが示された。また、測定時間は約 5 分であった。なお、ステップ上の変調が加えられていない時は DFB-QCL の周波数が安定なため、その間取得されたすべての β をそのまま平均すればよく、かつ、スペクトルの周波数較正は安定化/掃引に使用するビート周波数を直接用いて行うことが可能なため、従来法より単純で簡便なデータ処理を実現した。

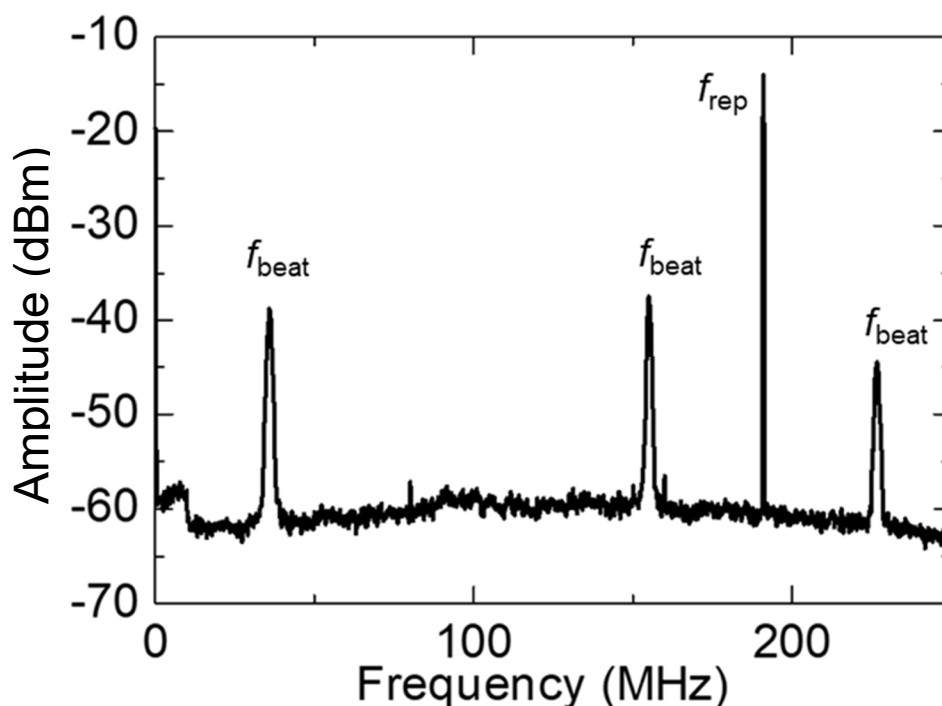


Fig. 3-30 取得された RF スペクトル

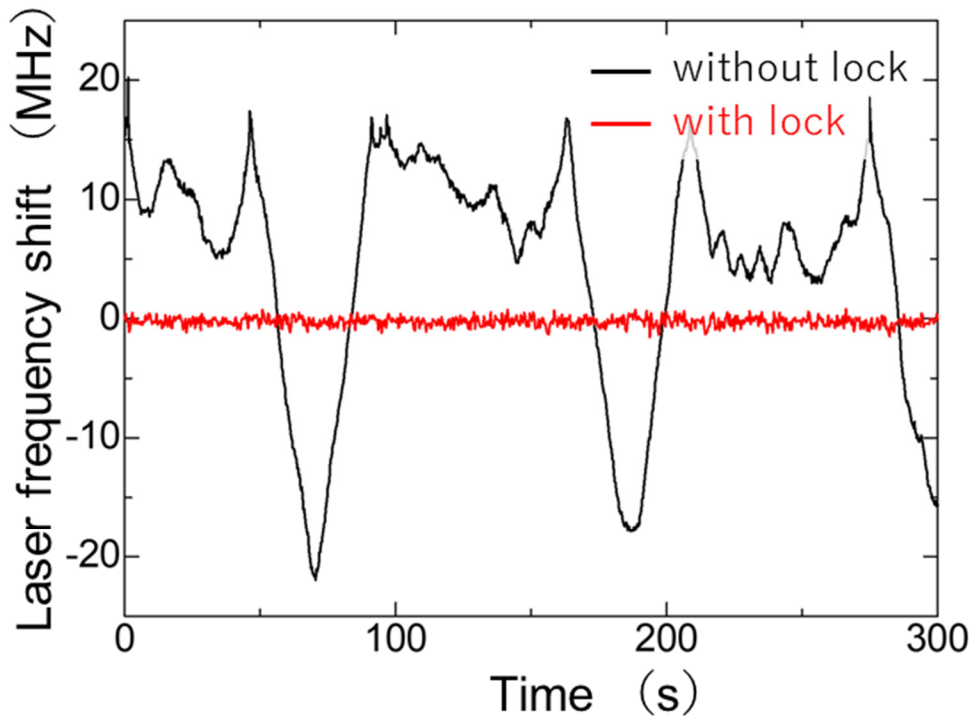


Fig. 3-31 ビート周波数の時間変化

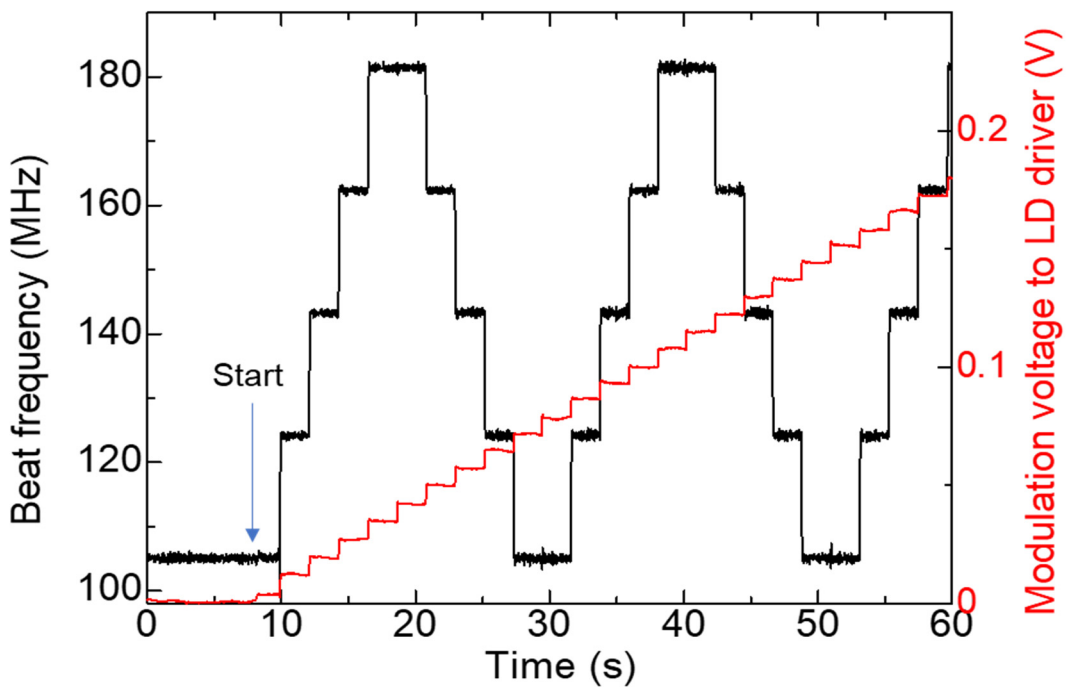


Fig. 3-32 QCL をステップ状に変調した際のビート周波数の変化
 黒: ビート周波数 赤: LD ドライバへの変調電圧

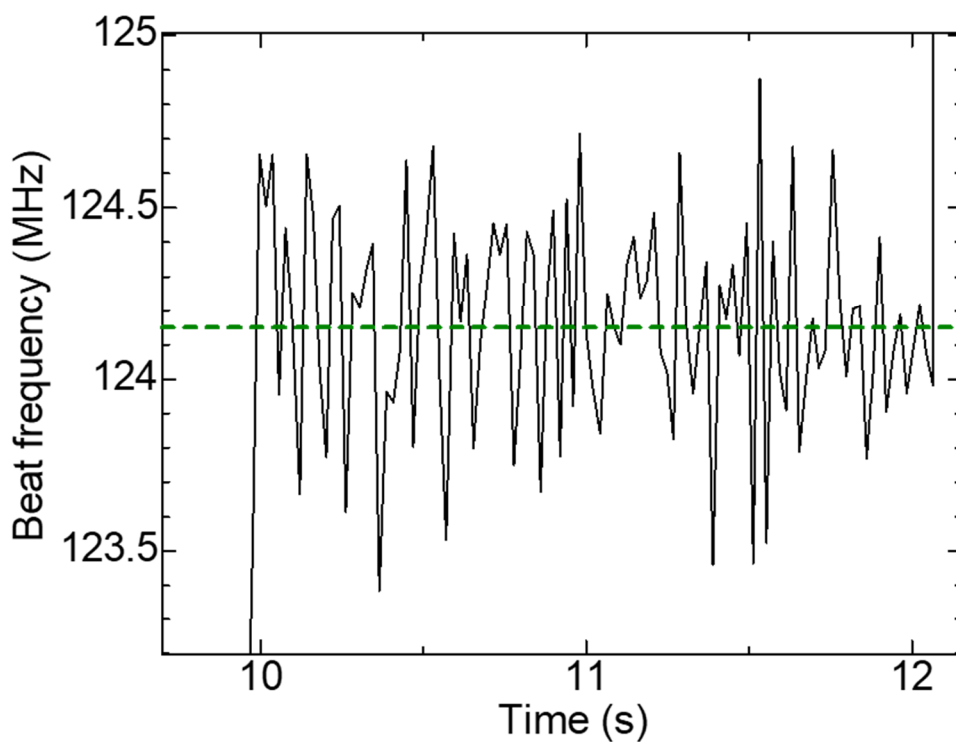


Fig. 3-33 セットポイント周波数を変調後のビート周波数
Fig.3-32 の一部を拡大

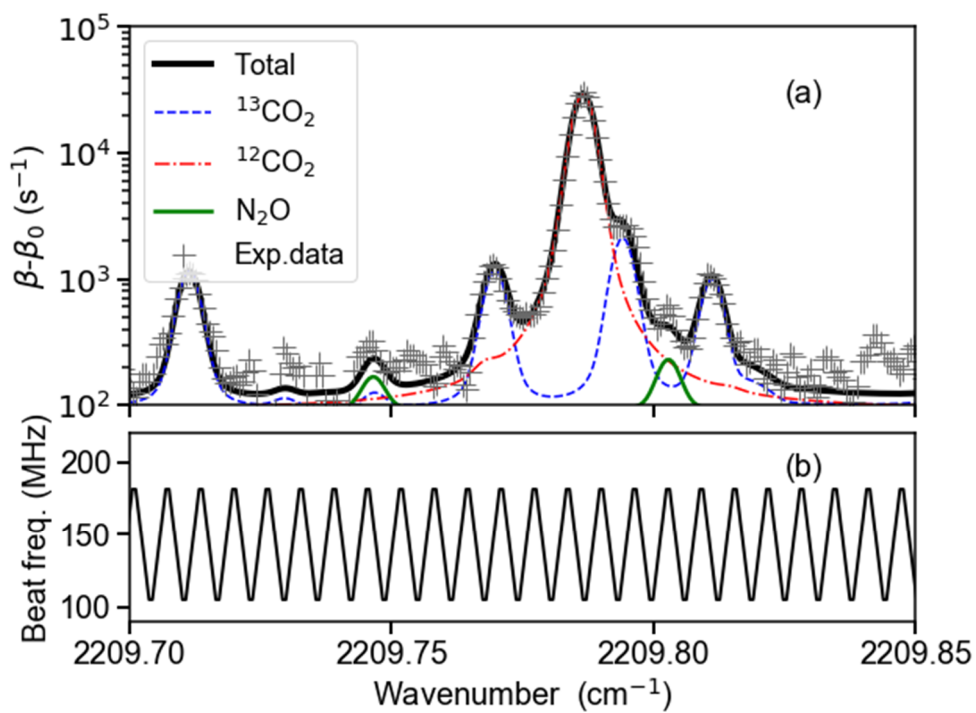


Fig. 3-34 取得された吸収スペクトル
(a) CRDS 吸収スペクトル (b) ビート周波数

Passive feedback の性能評価

ビート信号の線幅を評価することで、DFB-QCL の線幅を評価できる。そこで Passive feedback 有り、無しの場合でビート信号を取得し、Passive feedback による狭帯域化の効果を直接評価した (RBW: 50 kHz、Sweep time: 0.001 s)。なお、フィードバックの光路長は約 16 cm、約 3.5 m とした。得られた RF スペクトルを Fig. 3-35 に示す。また、DFB-QCL の周波数掃引はせず、ビート信号を 10 分程度取得し、線幅のヒストグラムを評価した (Fig. 3-36)。フィードバック長 16 cm の線幅の平均値は 458 kHz であり、3.5 m では 347 kHz であったことから、Passive feedback 無しのときの 688 kHz と比較して明らかな向上が見られた。16 cm は 3.5 m より線幅が太くなっているが、そのモードホップ間隔は 936 MHz 程度であり、3.5 m のモードホップ間隔 45 MHz と比較すると CRDS による吸収スペクトルの取得には 16 cm が使用しやすい。また、ビート周波数の時間変化を Fig. 3-37 に示す。Passive feedback 無しの場合と比較して 3.5 m ではビート周波数が安定 (2 分間で 10 MHz) となったが、時間的にその周波数がシフトした。これは温度の変化による光路長の変化によるものであると思われる。フィードバック長 16 cm では Passive feedback 無しの場合よりその時間変化が大きくなった。これは光路長を短くしたことで、温度の変化による周波数変化がより顕著に現れたためである。以上から、Passive feedback は DFB-QCL の狭帯域化、短期的な安定化には効果があることが明らかとなり、フィードバック長が長いほど効果が高いことが示された。一方で、吸収スペクトル取得のためには周波数を掃引する必要があるが、フィードバック長を長くすればするほどレーザー周波数を線形的に掃引できるモードホップフリー領域が狭くなると同時に、中長期的な不安定性が増大してしまうことが示唆された。本手法については、長いフィードバック長であってもモードホップフリー領域を拡張できる可能性として、フィードバックミラーにピエゾ素子を取り付けることでフィードバック共振器長を変調させる Passive feedback 法が挙げられ、開発が望まれる[24]。また、その他の手法として高反射率光共振器を用いた手法も報告されており[25,26]、光共振器長をピエゾ素子によって変調することで同様に DFB-QCL の広範な周波数掃引が可能となる。

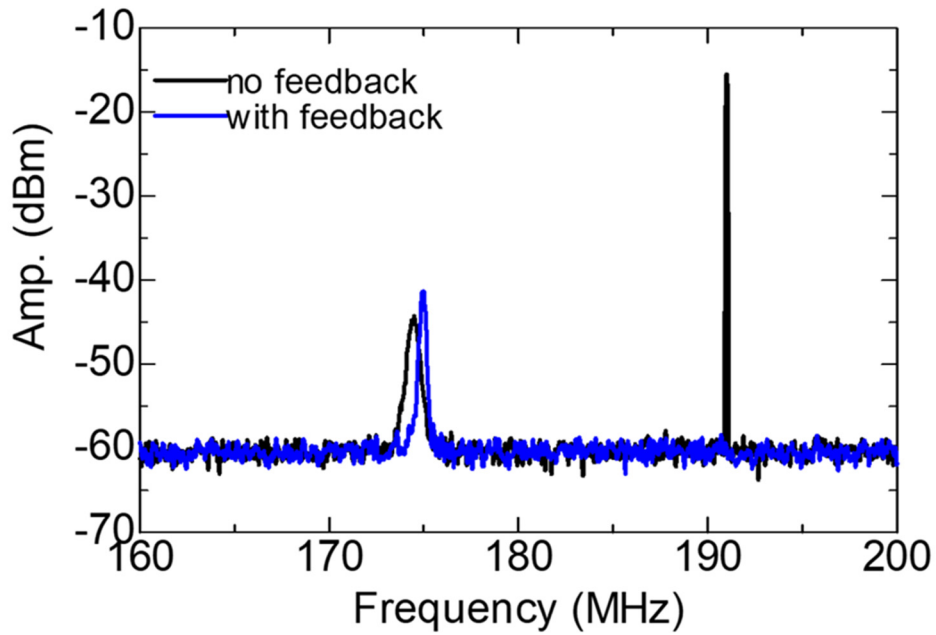


Fig. 3-35 Passive feedback の有無により取得された RF スペクトル
フィードバック光路長は 3.50 m

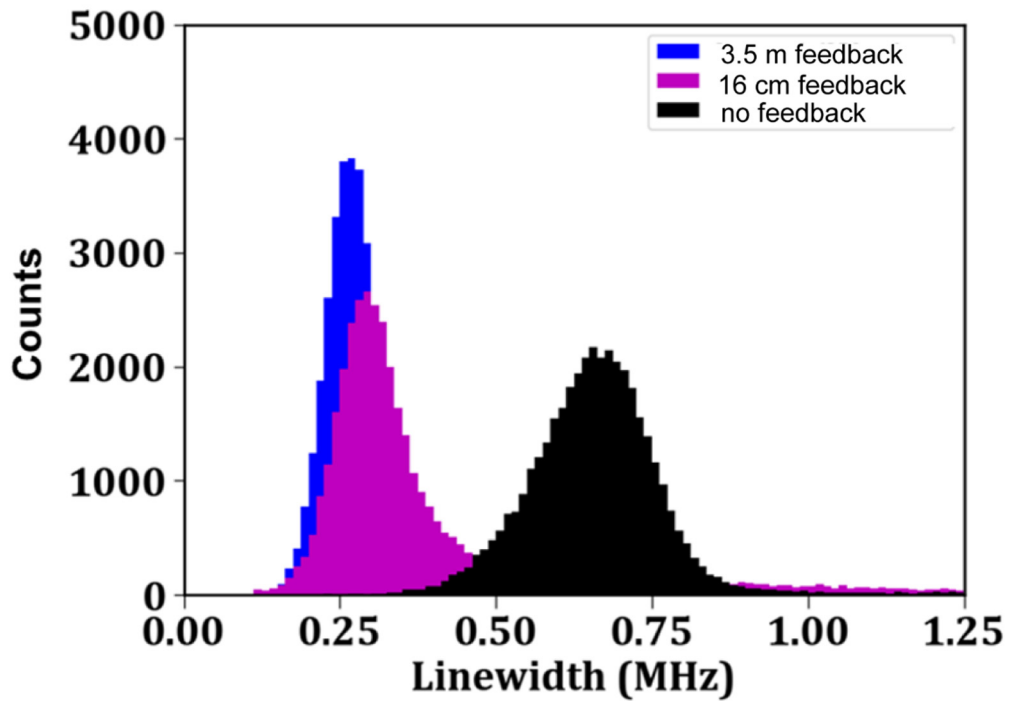


Fig. 3-36 ビート信号線幅のヒストグラム

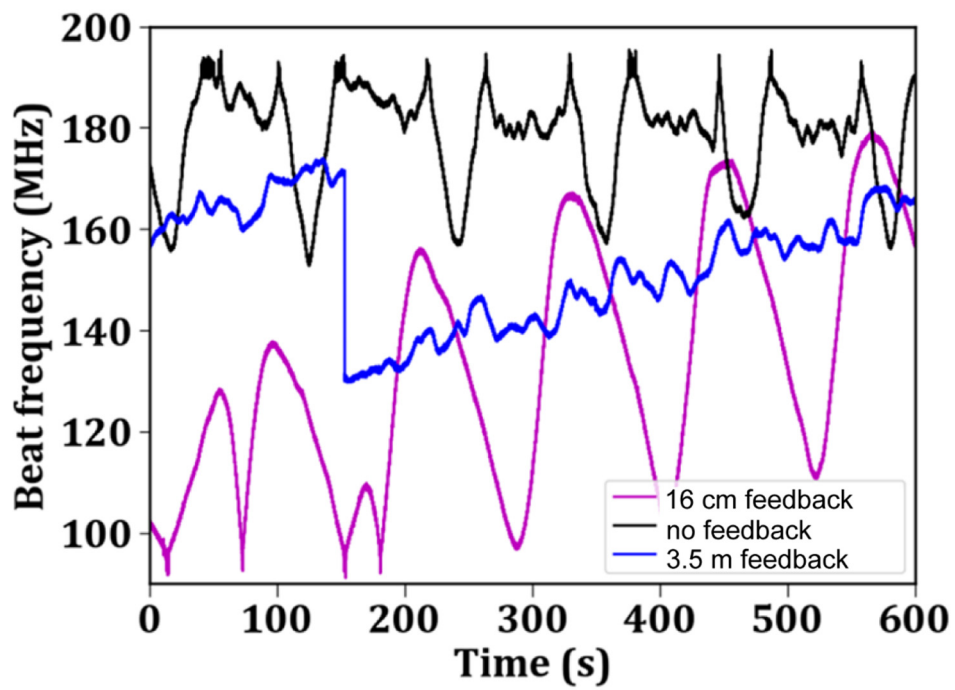


Fig. 3-37 Passive feedback の有無により取得されたビート周波数の時間変化

3.3.3 レーザー発振周波数安定化を用いた分析性能の評価

前項までで開発された DFB-QCL の周波数安定化法を用いて、 ^{14}C 標準試料を測定し、分析性能の評価を行った。

アランプロットによる分析感度の評価

中赤外 OFC による周波数安定化と CRDS 測定を同時に行い、安定化有り、無しの場合で RD 信号を 10^4 信号測定し、評価された β_0 のアランプロットを取得した (Fig.3-38)。この時、セル内には He を導入し、かつ圧力を十分に下げて測定を行い、QCL の周波数掃引は行っていない。また、エタロン効果抑制法は未導入であった。両者を比較すると、安定化によってシステムが安定となり、より長い時間平均をとることで統計誤差が 40% 低減されることが明らかとなった。Fig. 3-2 より、最小値である 30 s^{-1} は、アバundance感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 6.0 \times 10^{-12}$ に相当する。現状、前節で議論されたエタロン効果が支配的であるため、本評価で示された感度は、あくまでも、アランプロットによるスペクトル上の 1 点でのばらつきのレベルを示している。一方で、エタロン効果そのものも温度変化等で時間的に変化するため、エタロン効果が完全に抑制できたとすると、アランプロットによる感度についても向上する可能性がある。

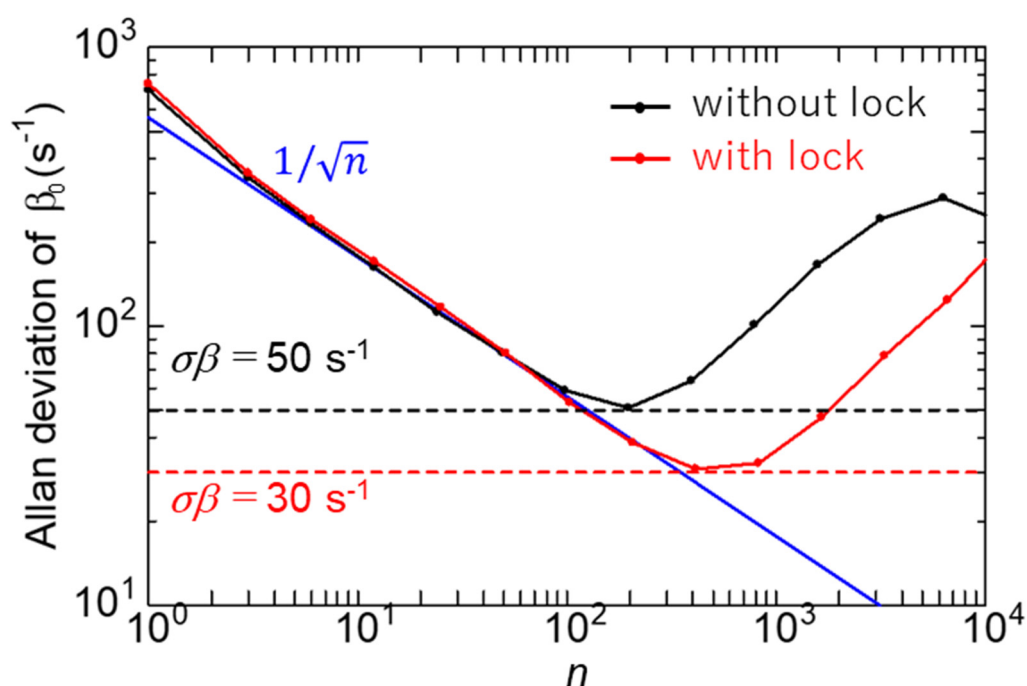


Fig. 3-38 アランプロットによる性能評価

¹⁴C 標識グルコース試料を用いた分析精度の評価

¹⁴C 標識グルコース溶液を用いて中赤外 OFC による周波数安定化システムの ¹⁴C 分析性能を評価した。ここでは特に分析システムの測定精度について、繰り返し測定における誤差を評価した。使用したグルコース溶液は総炭素量 2.5 mgC/50 μL、¹⁴C 濃度: 250 dpm/50 μL (=4.17 Bq/50 μL) に調整された。試料は第2章で述べた ¹⁴C-CRDS 分析システムに導入され、CO₂ トラップにより濃縮された上で、CO₂ として CRDS セルに導入された。本実験は名古屋大学アイソトープ総合センターにて実施された。エタロン効果抑制法は未導入であった。周波数安定化システムによる分析精度を評価するために、CRDS セルに封じ切ったガスに対して 5 回 (n5) 測定を実施した。取得されたスペクトルの一例を Fig.3-39 に、評価された ¹⁴C、¹³C の同位体比を Table 3-1 にそれぞれ示す。周波数安定化を用いることで ¹⁴C 同位体比の変動係数が 1.6%から 1.0%に低減され、¹³C 同位体比の変動係数は 2.0%から 0.2%に低減された。これより、中赤外 OFC による DFB-QCL の発振周波数安定化により同位体比分析精度が向上することが示された。結果を目標である測定精度数% (1‰ = 0.1%) と比較すると、その精度は ¹³C 同位体比精度 2‰、¹⁴C 同位体比精度 1‰であり、トレーサー応用に十分な精度を達成することができた。¹³C 同位体比に対して ¹⁴C の同位体比分析精度が劣る理由は、¹³CO₂ の吸収線が領域に複数本存在する一方で、¹⁴CO₂ の吸収線は 1 本しかないためであり、参照できる情報が ¹³C のほうが多いことが原因であると考えられる。また、エタロン効果の時間的な変化も不確かさを大きくする要因であり、参照できるピークが 1 本しかない ¹⁴CO₂ では ¹³CO₂ よりその影響は大きい。エタロン効果のさらなる抑制により ¹⁴C 同位体比分析精度のさらなる向上が期待される。

以上から中赤外 OFC を用いた DFB-QCL の周波数安定化により、分析性能が向上することが明らかとなった。一方で、中赤外 OFC は依然開発段階のレーザー光源であり、コムが発振を維持するためには 1 時間に 1~2 回程度の頻度で調整を行う必要があり、体系が複雑で体積が大きいなど、¹⁴C-CRDS 分析システムへの本格的な実装には解決すべき課題が存在する。今後、このような課題が解決され、¹⁴C-CRDS 分析システムに本格的に組み込まれることが望まれる。

Table 3-1 ^{14}C 同位体比評価結果
 (試料: 250 dpm/50 μL ^{14}C -グルコース調整試料)

	Without lock		Withlock	
	$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
n1	6.59×10^{-9}	1.12×10^{-2}	6.22×10^{-9}	1.10×10^{-2}
n2	6.57×10^{-9}	1.07×10^{-2}	6.28×10^{-9}	1.10×10^{-2}
n3	6.36×10^{-9}	1.12×10^{-2}	6.32×10^{-9}	1.11×10^{-2}
n4	6.52×10^{-9}	1.11×10^{-2}	6.42×10^{-9}	1.11×10^{-2}
n5	6.36×10^{-9}	1.12×10^{-2}	6.33×10^{-9}	1.10×10^{-2}
Average	6.31×10^{-9}	1.11×10^{-2}	6.48×10^{-9}	1.10×10^{-2}
Standard deviation	6.55×10^{-11}	2.16×10^{-4}	1.02×10^{-10}	1.73×10^{-5}
Coefficient of variation	1.6%	2.0%	1.0%	0.2%

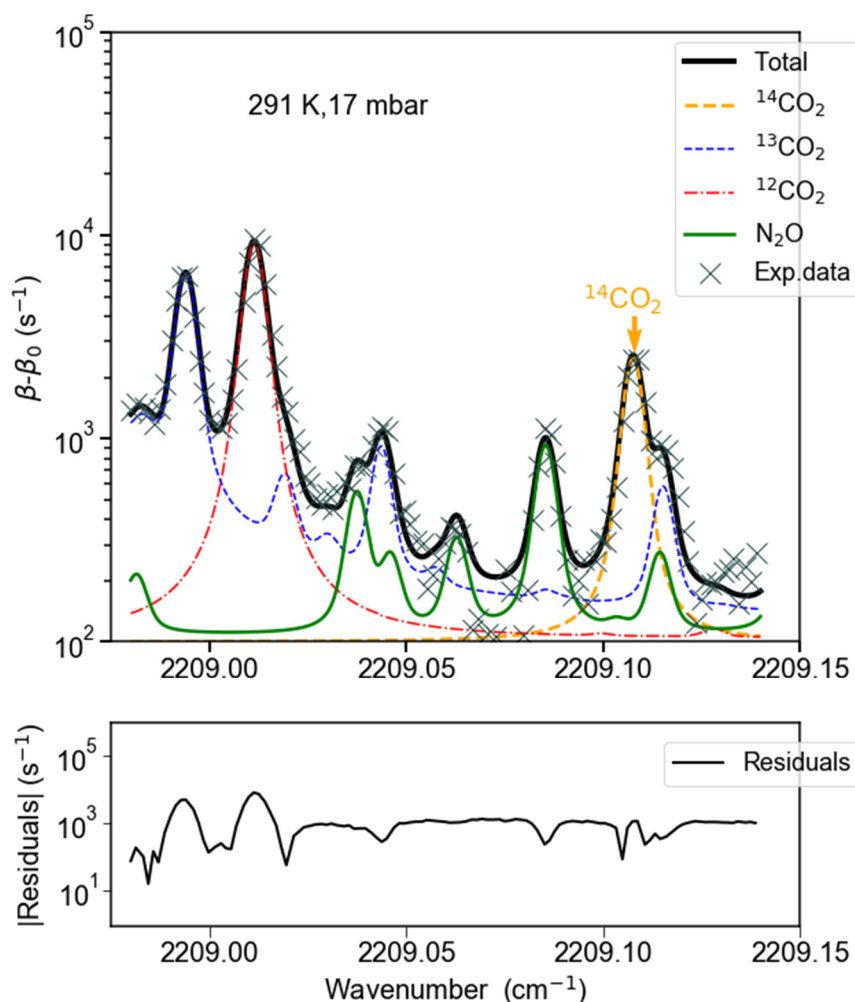


Fig. 3-39 周波数安定化システムにより取得された吸収スペクトル
 (試料: 250 dpm/50 μL ^{14}C -グルコース調整試料)
 上: 吸収スペクトル 下: フィッティング残差

3.4 まとめと今後の展望

第2章にて開発・構築された¹⁴C-CRDS分析システムの感度は目標である $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.4 \times 10^{-11}$ に対しては一桁程度大きく、システムの高感度化が必要であることが示唆された。そこで中赤外CRDSの高感度化に関する研究として、バックグラウンドノイズであるエタロン効果を低減する手法、および中赤外レーザーの発振周波数の安定化・狭帯域化法の開発を行った。

まず、分析感度が制限される要因について説明し、スペクトル上のバックグラウンドノイズが $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 吸収強度と等価になるときの感度（雑音等価感度）を本研究における感度と定義した。そこでスペクトル計算を行い、減衰率のばらつきが 50 s^{-1} 以下で目標アバンダンス感度を、 5 s^{-1} 以下であれば天然同位体比（ $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.0 \times 10^{-12}$ ）以下のアバンダンス感度を持つことを示した。次に差し引き法・ブリュースタースポイラー・光共振器温度変調法についてそれぞれ実験を行い、エタロン効果による影響の低減を確認した。ブリュースタースポイラーと温度変調を組み合わせることで 500 s^{-1} あったエタロン効果を 100 s^{-1} まで抑えられ、 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 2 \times 10^{-11}$ まで向上したことを示し、目標アバンダンス感度（ $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.4 \times 10^{-11}$ ）を概ね達成した。また、スペクトル上1点（レーザー周波数固定）での減衰率のばらつきを、アランプットを用いて評価した結果、2つの手法を組み合わせることで 10^4 信号以上の平均が可能となり、 15 s^{-1} 以下まで到達可能であることが示された。今後さらなるエタロン効果抑制により目標感度、さらには 10^{-12} オーダーのアバンダンス感度が達成可能であることが示唆された。

上述したさらなる感度向上のためには、中赤外レーザー発振周波数の安定化・狭帯域化が不可欠である。そこで、DFB-QCLの発振周波数を安定化・狭帯域化する手法として、遅延自己注入フィードバックに基づくPassive feedback法と、中赤外OFCを用いた手法を開発しその性能を評価した。

¹⁴C-CRDS分析システムの中赤外レーザー体系にPassive feedback法の体系を構築し、低フィネスFPI、およびCRDS光共振器にてその特性を評価した。結果としてDFB-QCLの高周波のノイズが抑制され、CRDS光共振器からの透過光が高強度で安定になった。中赤外OFCによる線幅評価により、DFB-QCLの線幅が688 kHzから347 kHz（3.5 m フィードバック長）まで狭帯域化されたことを確認した。一方で、中長期的な不安定性は改善しないことが分かった。

中長期的な安定性の向上のために、中赤外OFCを用いたDFB-QCL周波数安定化法の開発を行った。中赤外OFCとDFB-QCLを干渉させビート信号を取得した。ビート周波数が一定になるようなフィードバックをDFB-QCL電流にかけることで安定化を可能とした。これによりビート周波数が一定に保たれ、その不安定性は1 MHz以下（5分間）であることを明らかとした。安定化の有無

でアランプロットを評価すると、安定化を行ったことでより長い時間の平均が可能となり、最少の減衰率のばらつきは 30 s^{-1} と評価された。本実験においては、エタロン効果抑制法は動作させておらず、両者を組み合わせることでさらなる感度向上が期待できる。また、セットポイント周波数を変えることにより、安定化を行ったままで DFB-QCL の周波数を掃引する手法を開発し、 ^{14}C 同位体比の分析を行った結果、繰り返し測定を行った際の測定誤差が炭素の安定同位体比では 0.2%、 ^{14}C では 1%まで低減された。これらの分析精度は目標である数%に肉薄し、トレーサー応用に対して十分な精度を達成した。

今後の展望として、Passive feedback 法のミラーにピエゾ素子を取り付ける、光共振器を用いる等によって、モードホップフリー領域の広範な Passive feedback 法の開発がなされ、中赤外 OFC による安定化と Passive feedback による狭帯域化を組み合わせるうえで、DFB-QCL の周波数を掃引する新たなシステムの開発が望まれる。また、中赤外 OFC を ^{14}C -CRDS に本格実装したうえで、周波数安定化 DFB-QCL を用い、安定同位体比を下回るアバンダンス感度の達成が期待される。

参考文献

第3章

- [1] H. Huang and K. K. Lehmann, “Long-term Stability in Continuous Wave Cavity Ringdown Spectroscopy Experiments”, *Applied Optics*, **49**, 1378–1387(2010).
- [2] L. Tombez, *et al.*, “Linewidth of a Quantum Cascade Laser Assessed from Its Frequency Noise Spectrum and Impact of the Current Driver”, *Appl. Phys. B*, **109**, 407-414 (2012).
- [3] L. Tombez, *et al.*, “Temperature Dependence of the Frequency Noise in a Mid-IR DFB Quantum Cascade Laser from Cryogenic to Room Temperature”, *Opt. Express*, **20**, 6851-6859(2012).
- [4] D. W. Allan, “Time and Frequency (Time-domain) Characterization, Estimation, and Prediction of Precision Clocks and Oscillators”, *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelectr., Frequency Control*, **34**, 647–654 (1987).
- [5] R. W. Fox and L. Hollberg, “Role of Spurious Reflections in Ring-down Spectroscopy”, *Opt. Lett.*, **27**, 1833-1835 (2002).
- [6] C. R. Webster, “Brewster-plate Spoiler: a Novel Method for Reducing the Amplitude of Interference Fringes that Limit Tunable-laser Absorption Sensitivities”, *J. Opt. Soc. Am. B*, **2**, 1464–1470 (1985).
- [7] C. R. Markus, *et al.*, “Improving Cavity-enhanced Spectroscopy of Molecular Ions in the Mid-infrared with Up-conversion Detection and Brewster-plate Spoilers”, *Opt. Exp.*, **25**, 3709-3721 (2017).
- [8] L. Yang, *et al.*, “Temperature-scanning Saturation Cavity Ringdown Spectrometry for Doppler-free Spectroscopy”, *Opt. Exp.*, **26**, 10203-10210 (2018).
- [9] J. Courtois, *et al.*, “Differential Cavity Ring-down Spectroscopy”, *J. Opt. Soc. Am. B*, **30**, 1486-1495 (2013).
- [10] D. S. Bear, *et al.*, “Sensitive Absorption Measurements in the Near Infrared Region using Off-axis Integrated-cavity Output Spectroscopy”, *Appl. Phys. B*, **75**, 261-265 (2002).
- [11] E. H. Wahl, *et al.*, “Applications of Cavity Ring-down Spectroscopy to High Precision Isotope Ratio Measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in Carbon Dioxide”, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, **42**, 21-35 (2006).
- [12] G. Giusfred, *et al.*, “Saturated-absorption Cavity Ring-down Spectroscopy”, *Phys. Rev. Lett.*, **104**, 110801 (2010).
- [13] B. M. Gibson, “Adjacent-resonance Etalon Cancellation in Ring-down Spectroscopy”, *Optics Letter*, **43**, 3257-3260 (2018).

- [14] 武田晨、「修士論文 中赤外キャビティリングダウン分光におけるエタロン効果抑制法の開発」、名古屋大学 (2019).
- [15] R. Terabayashi, *et al.*, “Optical Feedback in DFB Quantum Cascade Laser for Mid-infrared Cavity Ring-down Spectroscopy”, *Hyperfine Interactions*, **238**, 10 (2017).
- [16] R. W. P. Drever, *et al.*, “Laser Phase and Frequency Stabilization using an Optical Resonator”, *Applied Physics B*, **31**, 97-105 (1983).
- [17] S. Borri, *et al.*, “Tunable Microcavity-Stabilized Quantum Cascade Laser for Mid-IR High-Resolution Spectroscopy and Sensing”, *Sensors*, **16**, 238 (2016).
- [18] R. A. Cendejas, *et al.*, “Single-Mode, Narrow-Linewidth External Cavity Quantum Cascade Laser through Optical Feedback from a Partial-Reflector”, *Opt. Express*, **18**, 26037–26045 (2010).
- [19] D. Brunner, *et al.*, “Semiconductor Laser Linewidth Reduction by Six Orders of Magnitude via Delayed Optical Feedback”, *Opt. Lett.*, **42**, 163–166(2016).
- [20] E. Garmire and A. Yariv, “Laser Mode-locking with Saturable Absorbers”, *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **3**, 222-226 (1967).
- [21] A. Schliesser, N. Picque, and T. W. Hansch, “Mid-infrared Frequency Combs”, *Nature Photon.*, **6**, 440-449 (2012).
- [22] S. Okubo, *et al.*, “Absolute Frequency List of the ν_3 -band Transitions of Methane at a Relative Uncertainty Level of 10^{-11} ”, *Opt. Exp.*, **19**, 23878-23888 (2011).
- [23] L. Jin, *et al.*, “3.1–5.2 μm Coherent MIR Frequency Comb Based on Yb-Doped Fiber Laser”, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **24**, 0900907 (2018).
- [24] 加藤修介、「修士論文 中赤外キャビティリングダウン分光のための量子カスケードレーザーの周波数安定化」、名古屋大学 (2019).
- [25] G. Maisons, *et al.*, “Optical-feedback Cavity-enhanced Absorption Spectroscopy with a Quantum Cascade Laser”, *Opt. Lett.*, **35**, 3607 - 3609 (2010).
- [26] A. G. V. Bergin, *et al.*, “Linear Cavity Optical-feedback Cavity-enhanced Absorption Spectroscopy with a Quantum Cascade Laser”, *Opt. Lett.*, **38**, 2475 - 2477 (2013).

第4章 生体試料中 ^{14}C 分析性能の評価

4.1 実験体系

^{14}C -CRDS 分析システム体系

本章では、前章までで開発を進めてきた ^{14}C -CRDS 分析システムを用いて試料中の ^{14}C を測定する基礎実験を通して、これまでに開発された分析システムの性能を評価し、ヒト薬物動態試験（MD 試験）におけるヒト模擬試料中の ^{14}C 分析実証実験を行うことで、ヒト生体試料中であっても本システムによる ^{14}C 分析が可能であるかを確認した。

^{14}C -CRDS 分析システムは元素分析計（EA）を応用した試料導入部・中赤外レーザー光源/光学計・光共振器/ガスセル・信号処理系から構成された。試料導入部に導入された試料中の炭素は燃焼酸化により二酸化炭素化し、キャリアガスである He ガスによって CRDS ガスセルに運ばれ、電磁バルブにより効率的にガスセル内に封じ込められた。ガスセル内の試料由来の ^{14}C を含む二酸化炭素に対して中赤外 CRDS による同位体選択的な高分解能吸収分光を行うことで試料中 ^{14}C 量を測定した。 ^{14}C -CRDS 分析システムの体系は第 2 章を参照されたい。

本章における実験はすべて、積水メディカル株式会社創薬支援センター内の放射線管理区域に装置を移設して行われた。Fig. 4-1 に積水メディカル株式会社に移設された ^{14}C -CRDS 分析システムの外観を示す。

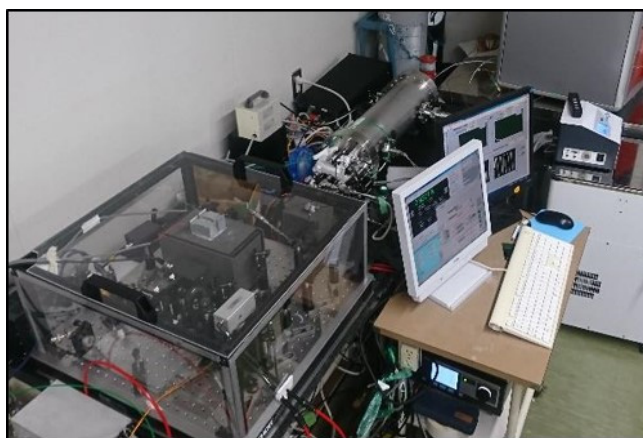


Fig. 4-1 ^{14}C -CRDS 分析システム外観（積水メディカル株式会社設置）

¹⁴C 分析基礎実験用測定試料

測定された試料はすべて液体試料であり、¹⁴C 標識グルコース (C₆H₁₂O₆) に非標識グルコース (以下、標準グルコースと呼ぶ) を添加して調整された標準試料・¹⁴C 標識グルコースを添加されたヒト血漿試料・¹⁴C 標識グルコースを添加されたヒト尿試料の 3 種類であり、全て積水メディカル株式会社佐藤淳史博士の協力により用意された。

4.2 分析性能の評価

4.2.1 基本動作の確認

本節では ^{14}C 標識グルコースと標準グルコースを混合した標準試料を用いた実験結果から ^{14}C -CRDS プロトタイプシステムの分析性能評価を行った。まず、システムの基本動作を確認した。

分析セルを陰圧し、セル中に試料が入っていない状態でリングダウン (RD) 信号を取得した。Fig. 4-2 に取得された RD 信号を LabVIEW のリアルタイムフィッティングの結果とともに示す。フィッティングの残差は $\pm 0.01\text{ V}$ 以下であった。また、吸収物質のない場合の減衰率 β_0 は $1.275 \times 10^5\text{ s}^{-1}$ と推定され、減衰率から評価された反射率は $R \sim 99.986\%$ と評価された。これは使用したミラーの性能 ($R > 99.98\%$) と同等であり、共振器の性能を十分に発揮できていることが分かった。フィッティング残差に波形のような成分が見られたが、これは AOM の光スイッチングが十分でないためであると考えられる。現状、測定感度はエタロン効果によって制限されているため、現段階では大きな影響を及ぼさないものの、AOM にレーザー光を 2 回通す Double-path AOM による改善が見込まれる[1,2]。

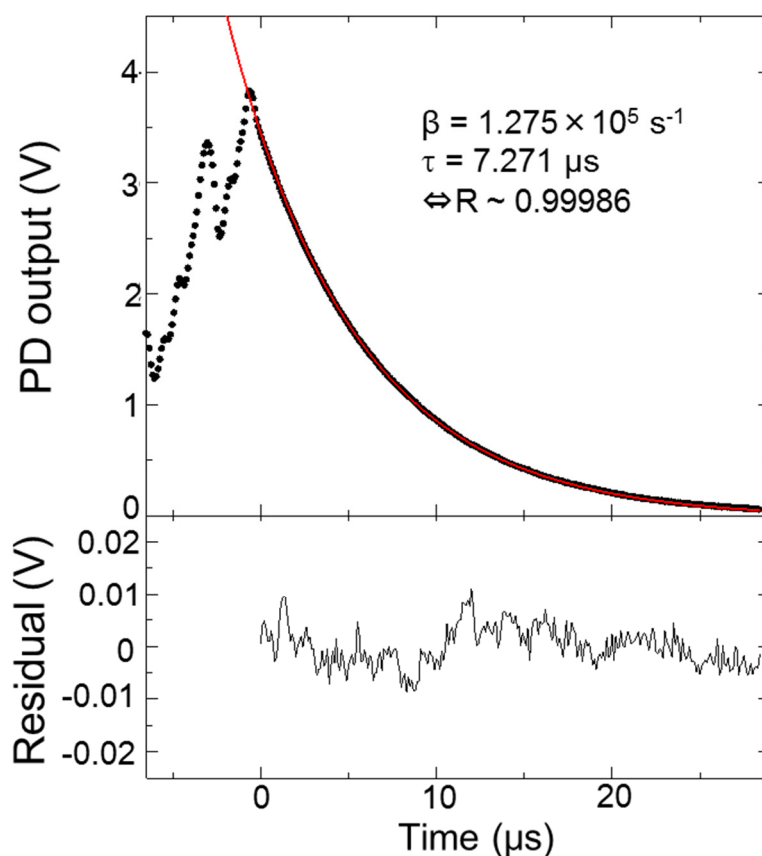


Fig. 4-2 取得されたリングダウン信号

4.2.2 スペクトルと干渉分子種の影響

第 2 章に示された干渉分子種 $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の冷却による吸収低減を確認するため、ガスセルを冷却して吸収スペクトルを取得した。試料は $0.83 \text{ Bq}/50\mu\text{L}$ (= $50 \text{ dpm}/50 \mu\text{L}$) で $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 5.0 \times 10^{-8}$ にデザインされたものを使用した。バルブは手法 A によって閉じられ、測定時のセル内圧力は 70 Torr であった。ガスセルの温度を $283 \sim 253 \text{ K}$ まで変化させ、それぞれの温度で Stopped Flow 測定を行った。この測定では、 $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 吸収線とその周囲をカバーするように周波数をスキャンした ($2208.9 \sim 2209.15 \text{ cm}^{-1}$)。200 スキャンのスペクトルを平均し、以降の解析に使用した。

Fig. 4-3 に取得された平均後のスペクトルを示す。 2209.108 cm^{-1} に存在する $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 吸収スペクトルが温度に対してほぼ一定の強度であったのに対して、低波数側に存在する吸収は強度が下がった。これは測定温度で計算された吸収スペクトルのフィッティング結果ともよく一致した。一方、 2209.01 cm^{-1} にある吸収線 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$) は、 263 K 、 253 K では実験値とフィッティングに大きな差異がみられた。これは HITRAN データベースの各吸収線の吸収強度温度依存性が精度良く測定されていないために引き起こされていると考えられる。また、このピークはこの他の実験においても冷却時には強度がフィッティングで過小評価される傾向にあった。しかし、測定においては ^{12}C と ^{13}C の組成は常に大気組成 (HITRAN データベースに記載の値) とし、複数の吸収線を使用して評価しているため、大きな影響は生じない。一方で、 ^{14}C を含む分子種のデータ欠如を含め、このような HITRAN データベースの不完全性を考慮し、将来的には ^{14}C -CRDS 分析システム全体として同位体比が完全に既知の標準試料を用いた較正が必要である。Fig. 4-4 にフィッティングにより求められた各分子種ごとの吸収スペクトルを 283 K と 253 K のときに限って示す。これより $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ の冷却により $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ P(20)吸収線の干渉線である $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 吸収線を低減できることを確認した。 233 K まで冷却することにより、更に一桁干渉線強度を軽減できる見込みを得た。

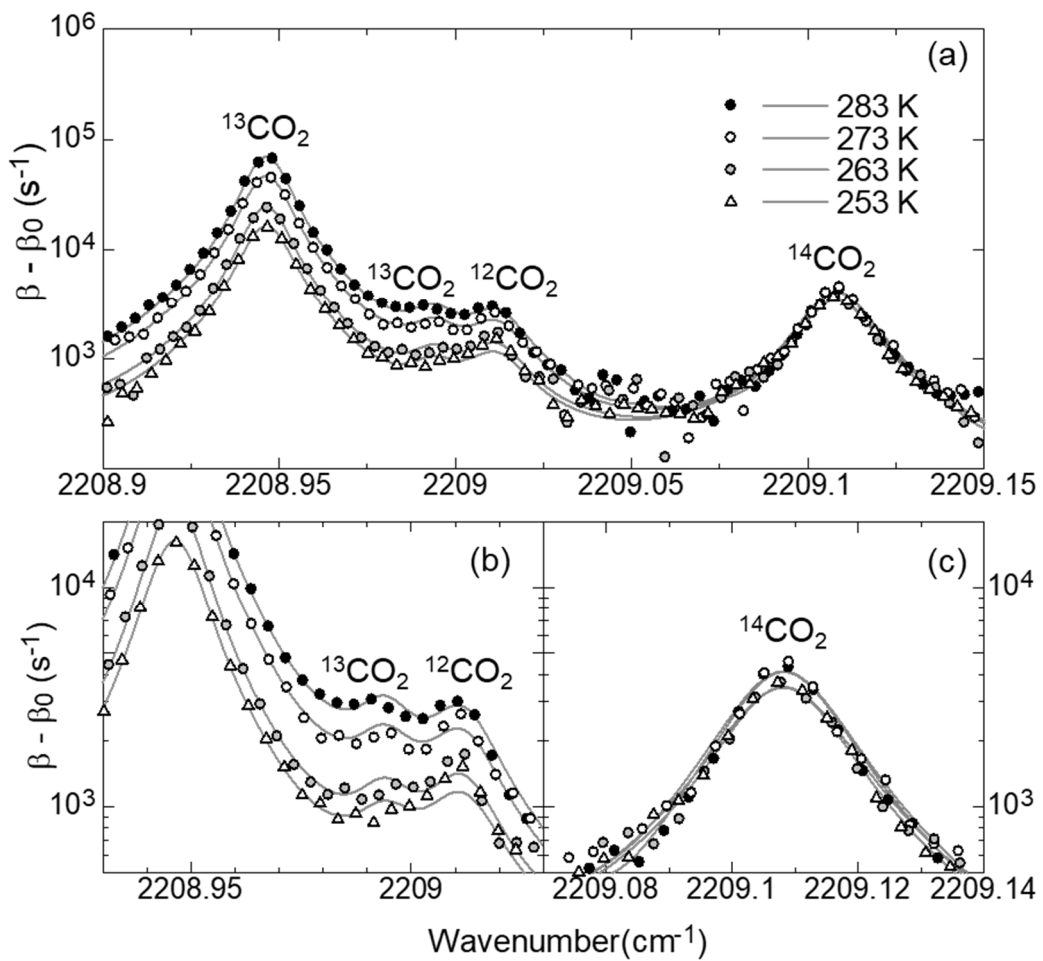


Fig. 4-3 冷却によるスペクトルの変化 (70 Torr)

ガス温度はそれぞれの値で固定してフィッティング (実線) を行った

(a) スペクトル全図

(b) ¹³C¹⁶O₂ · ¹²C¹⁶O₂ 吸収スペクトル領域

(c) ¹⁴C¹⁶O₂ 吸収スペクトル領域

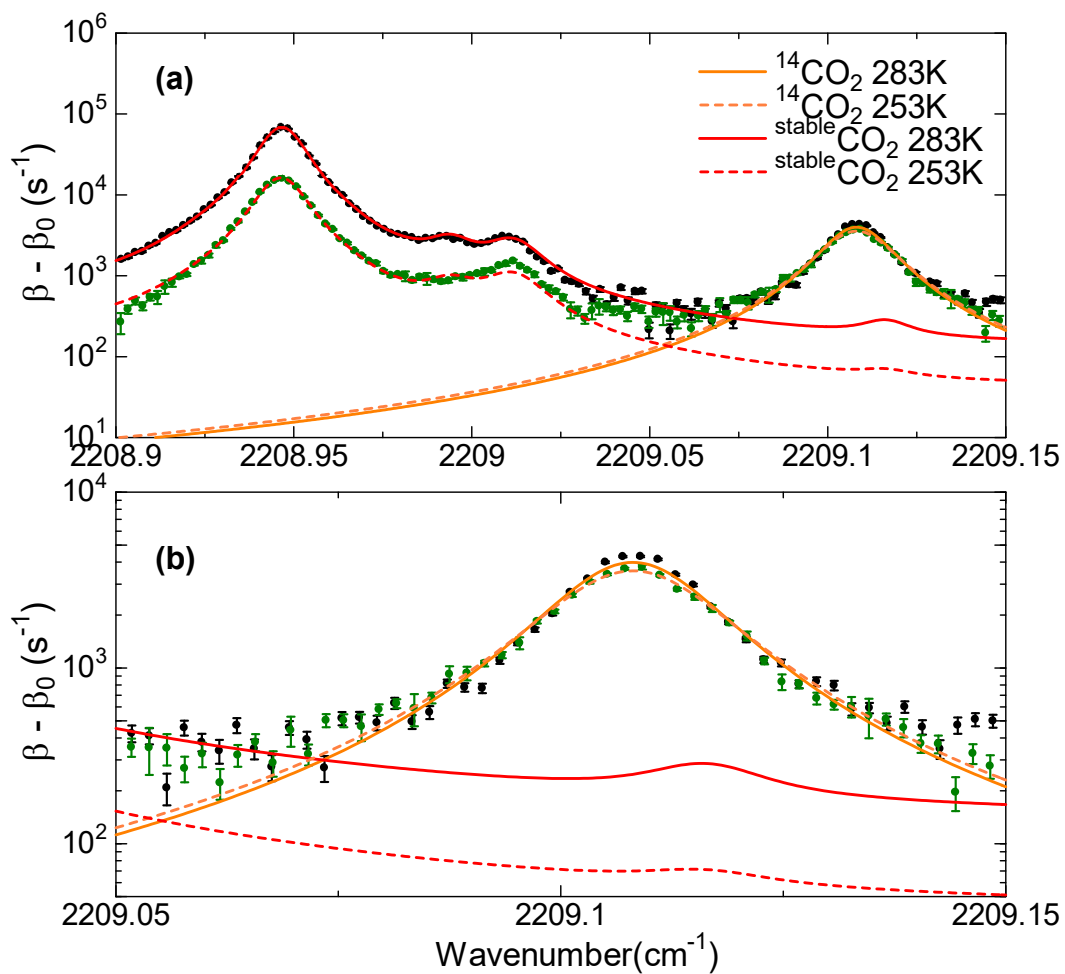


Fig.4-4 冷却による干渉線の低減

黒: 283 K (10 °C)、緑: 253 K (-20 °C)

実線・点線はフィッティングにより求められたそれぞれの温度における分子種毎のスペクトル

(a) スペクトル全図 (b) $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ 吸収スペクトル領域

4.2.3 定量性

安定炭素の定量性

^{14}C 含有量の違う試料を用いてシステムの定量性を評価した。ここでは、まず予備実験として ^{14}C で標識されていない標準グルコース試料を用いて、1.0 mgC/50 μL から 0.01 mgC/50 μL までの試料、および試料を導入していない錫カプセル（ブランク）を手法 B による Stopped flow 測定で測定した。周波数の掃引範囲は 2208.9 ~ 2209.05 cm^{-1} であり 20 スキャンを平均した。測定時のセル圧力は 60 Torr であった。ガスセルは 263 K に保った。測定はそれぞれの炭素量について 3 試料 (n3 測定) ずつ行った。フィッティングにより得られた CO_2 分圧を CRDS による測定結果とした。Table 4-1 にフィッティングにより推定された CO_2 分圧とその推定誤差を、Fig. 4-5 に得られたスペクトルを示す。結果から横軸に試料導入量、縦軸に加重平均をとった測定値をとり、検量線を作成した。Fig. 4-6 に重み付き最小二乗フィッティングによる結果とともに示す。本結果より、 ^{14}C -CRDS 分析システムが安定炭素量の評価についても一定の性能を持つことが示された。また、炭素量が 0.01 mgC を下回ると、検量線が寝てきており、0.01 mgC のスペクトルを見ると、ピークがノイズに埋もれてしまいピークとして判別が難しくなっていることが分かった。これより 20 スキャンの平均では十分な統計精度が得られないため、低い信号量が予想される試料については少なくとも 10 倍はスキャンを繰り返し平均する必要があることが明らかとなった。また、Fig. 4-7 に示されるように、ブランク測定にもピークが確認された。これより、前に測定した試料残留（メモリー効果）、試料生成時のカプセルへの大気混入、リークによる配管・ガスセルへの大気混入などによるコンタミネーションがあることが分かった。これらが検量線におけるオフセットの要因であると考えられる。微量な安定炭素量を評価したい場合にはこのような問題が測定に影響を及ぼす可能性はあるものの、現状、トレーサー応用にて想定される試料中炭素量は数百 μg ~ 2 mg 程度であり、この範囲では Fig. 4-6 に示された検量線の線形性は十分保たれている。したがって、本結果に見られたオフセットは測定に大きな影響を及ぼさないと考えられる。

Table 4-1 n3 測定結果 (グルコース標準試料)

mgC	n1		n2		n3	
	CO ₂ (bar)	error	CO ₂ (bar)	error	CO ₂ (bar)	error
0	0.00007	0.00002	0.00004	0.00001	0.00002	0.00001
0.01	0.00007	0.00001	0.00008	0.00001	0.00007	0.00001
0.05	0.00021	0.00002	0.00027	0.00001	0.00025	0.00001
0.2	0.00101	0.00004	0.00087	0.00003	0.00104	0.00004
0.5	0.00253	0.00009	0.00254	0.00007	0.00269	0.00007
0.8	0.00421	0.00007	0.00429	0.00010	0.00441	0.00010
1	0.00499	0.00013	0.00502	0.00008	0.00499	0.00009

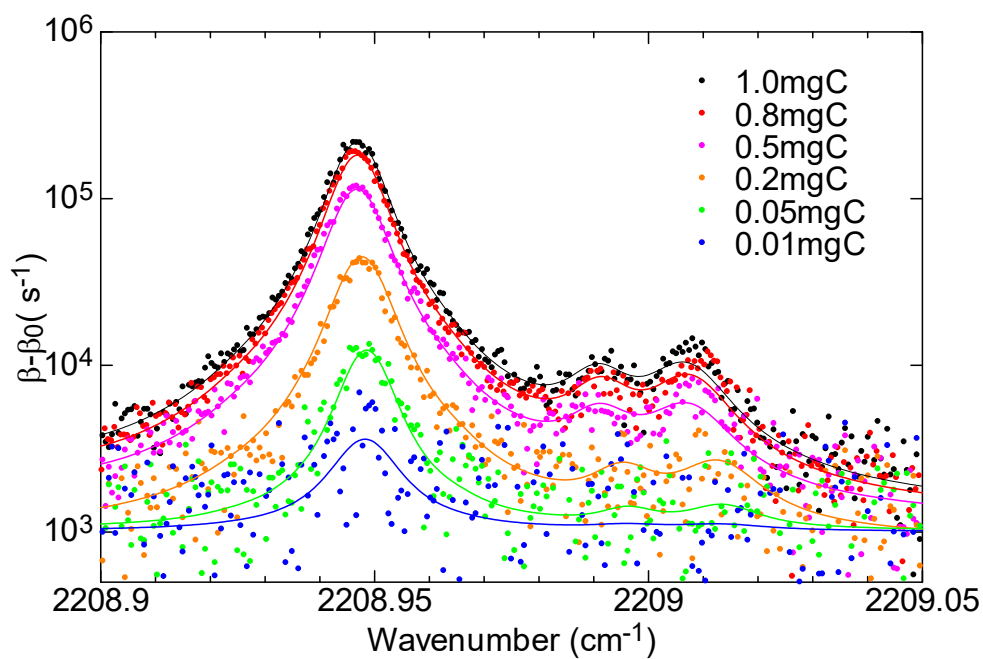


Fig. 4-5 異なる炭素量の試料のスペクトル結果
各線はフィッティング結果 (色は点と線に対応)

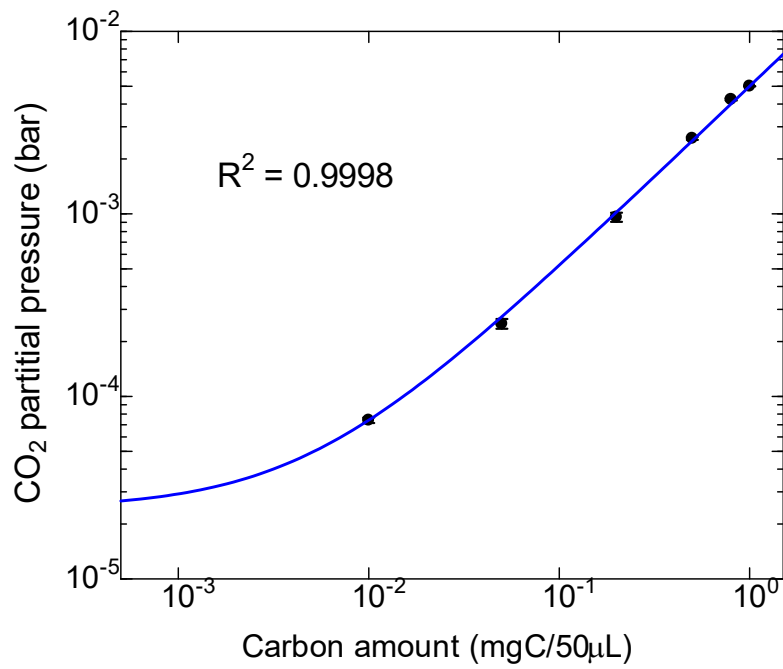


Fig. 4-6 安定炭素の検量線
青線は一次関数によるフィッティング結果

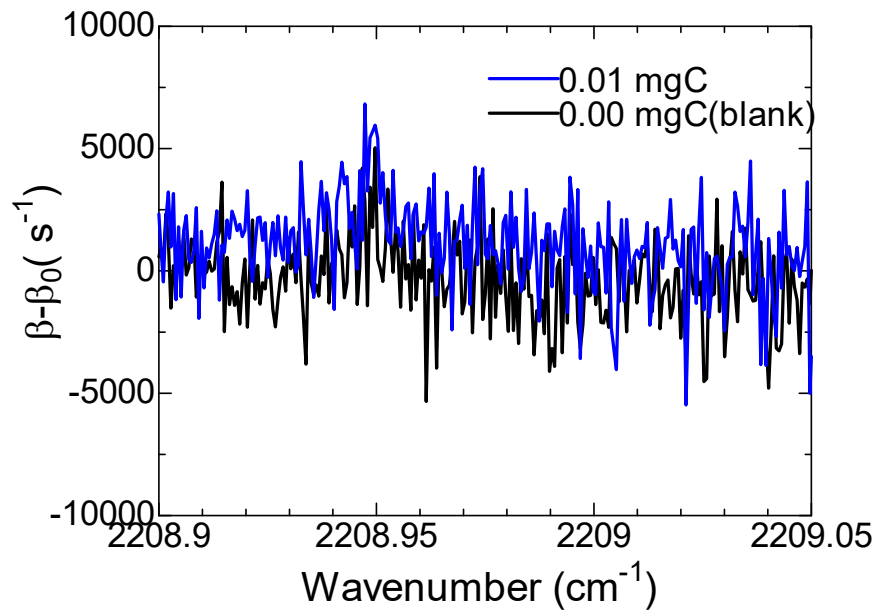


Fig. 4-7 コンタミネーションの確認
2208.95 cm⁻¹に見られるピークが¹³C¹⁶O₂による吸収

¹⁴C の定量性

次に ¹⁴C 含有量の違う試料を用いてシステムの定量性を評価した。0.2~10,000 dpm/50 μL ($3.3 \times 10^{-3} \sim 167$ Bq/50 μL) までで 2.0 mg の炭素を含有したグルコース溶液を調整し、同位体比の異なる複数の試料とした。手法 B による Stopped flow 測定を行い、スキャン範囲は 2208.9 ~ 2209.17 cm⁻¹、200 スキャンを平均した。測定時のセル圧力は 20 Torr であった。ガスセルは 253 K に保った。また、周波数較正は低フィネス光共振器のみで行った。各試料について 3 試料ずつ測定 (n3 測定) した。

Fig. 4-8 に測定されたスペクトルを示す。安定炭素のピーク強度に変化はないが、¹⁴CO₂ の強度は試料中 ¹⁴C 調整量に従って減少した。全ての測定について横軸に LSC によって評価された放射エネルギー、縦軸に ¹⁴C-CRDS により評価された ¹⁴C 同位体比をプロットした測定結果を Fig. 4-9 に示す。本結果から、現状の ¹⁴C-CRDS 分析システムが、10,000 dpm ~ 1 dpm (167 ~ 0.017 Bq)、同位体比で ¹⁴C/¹²C = 10⁻⁶ ~ 10⁻¹⁰ の範囲で、導入放射エネルギーと評価された同位体比に良好な線形性を持つことが明らかとなった。本結果は、エタロン効果抑制による感度の向上がなされていない段階での結果であり、エタロン効果抑制法の導入により、¹⁴C/¹²C = 2 × 10⁻¹¹ までの線形性が見込まれる。一方で放射エネルギーが少ないサンプルでは、同位体比の過大評価がみられた。これらの測定については、スペクトル上に導入 ¹⁴C 量と比較して顕著な ¹⁴CO₂ 吸収ピークが観測されており、前の試料のメモリー効果によるものではないかと考えられた。実際、試料を導入せずに試料導入部 (EA) を動作させ、ブランク測定を複数回行うことで、このような過大評価は改善された。これより、メモリー効果は主に、EA の可燃吸脱着カラムによるものであることが示唆された。メモリー効果は空うちを複数回行う等で十分抑制が可能である。¹⁴C 量が数桁異なるような試料を同時に測定する必要がある場合には、測定の順番を考慮することはもちろん、状況に応じて空うちを複数回はさむなど、メモリー効果への注意が必要である。

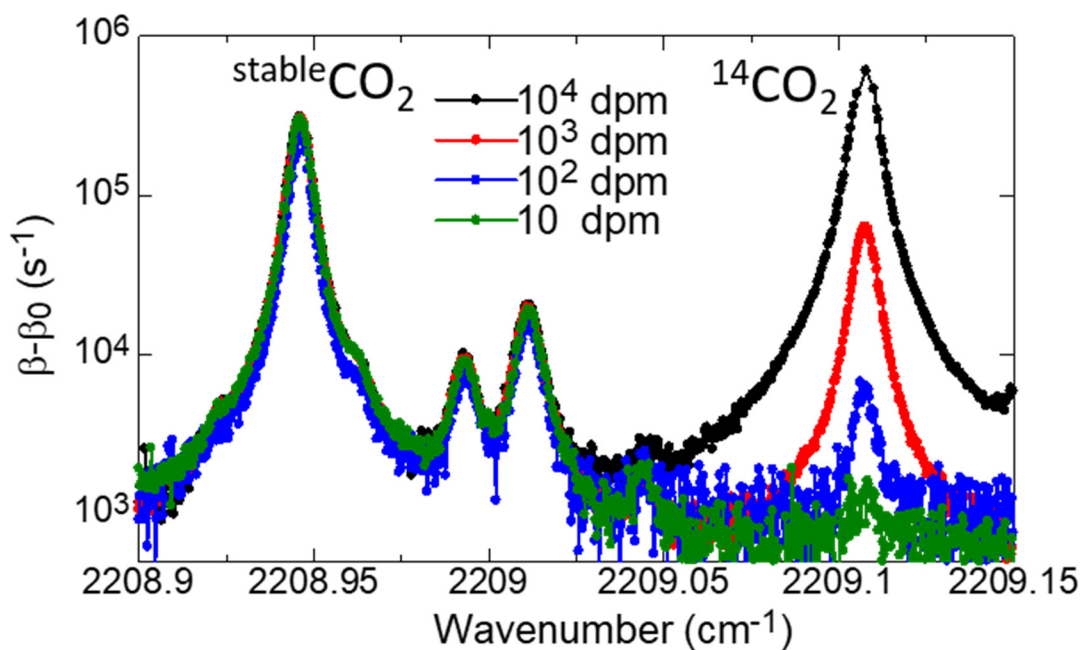


Fig. 4-8 ¹⁴C 含有量の異なる試料測定時の吸収スペクトル

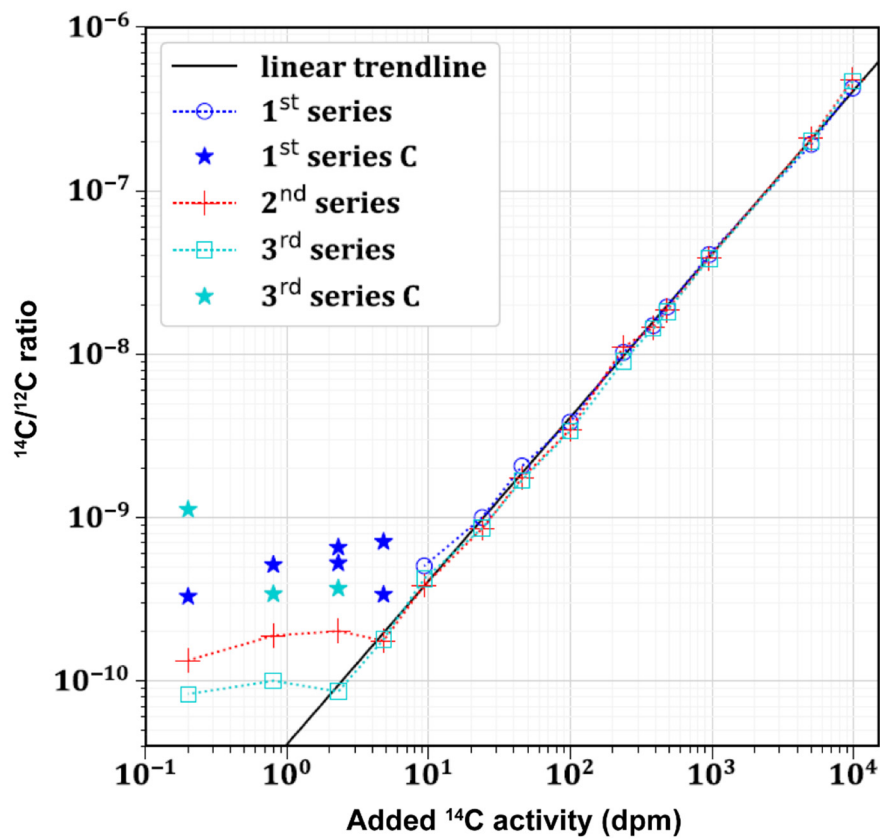


Fig. 4-9 取得された検量線
スターは顕著なメモリー効果が見られた点

4.2.4 アバダンス感度

第2章で開発されたCO₂トラップとエタロン効果抑制法を含んだ¹⁴C-CRDS分析システムの、現状のアバダンス感度を評価するために、0.3 dpm/50 μLの¹⁴C標識グルコース試料を生成し測定試料とした。CO₂トラップとブリュースターズポイラー・温度変調法を用いたStopped Flow測定を行い、2209.0 ~ 2209.17 cm⁻¹の範囲を10分間測定した。波長較正は低フィネス光共振器のみによって行った。ガスセルの温度は253 K、圧力は19 mbar (= 14 Torr)であった。

取得されたスペクトルをFig. 4-10に示す。同位体比は¹⁴C/¹²C = 4.5×10⁻¹¹と評価された。第3章にて議論された雑音等価感度を評価すると、本結果における信号(200 s⁻¹)と雑音(90 s⁻¹)の比2.2から、現状のアバダンス感度は¹⁴C/¹²C = 2×10⁻¹¹であることが明らかとなった。これは、第3章で評価されたアバダンス感度と一致しており、実際の¹⁴C分析において¹⁴C/¹²C = 2×10⁻¹¹を実証できた。また、検出限界として、0.3 dpm/2.2 = 0.1 dpm/sample (= 1.7×10⁻³ Bq/sample)と評価された。第2章Table 2-5に示された目標と比較すると、HPLC分画試料を除く試料について、必要な検出限界を達成できたといえる。一方で、依然エタロン効果によるバックグラウンドノイズが存在していることが示唆され、さらなる改善が望まれる。

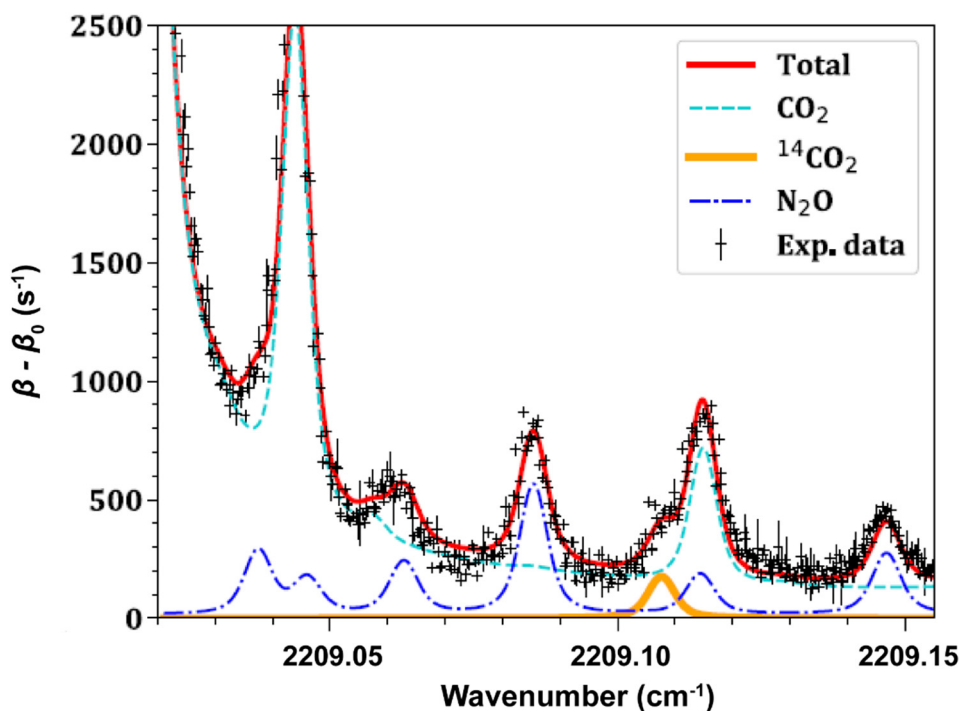


Fig. 4-10 微量¹⁴C試料の吸収スペクトル
(¹⁴C/¹²C ~ 4.5×10⁻¹¹)

4.3 模擬生体試料中の ^{14}C 分析

MD 試験を想定し、ヒト生体試料中の ^{14}C 測定を前処理なく測定可能であることを確認するため、 ^{14}C 標識グルコースを添加したヒト血漿・ヒト尿を前処理なく直接導入し、手法 B による Stopped flow 測定を行った。試料は 50 dpm/50 μL (0.83 Bq/50 μL) に調整された ^{14}C 標識グルコース添加ヒト血漿・ヒト尿とした。スキャン範囲は 2208.9 ~ 2209.17 cm^{-1} であり 20 スキャンを平均した。測定時のセル圧力は 20 Torr であった。ガスセルは 253 K に保った。本実験時は、周波数較正用の低フィネス光共振器は未導入であり、QCL 電流値による周波数較正を行った。また、エタロン効果抑制法は未導入であった。

ヒト血漿試料測定により取得されたスペクトルを Fig. 4-11 に、ヒト尿試料測定により取得されたスペクトルを Fig. 4-12 に、推定された各分子の分圧を Table 4-2 に示す。得られたスペクトルから $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の P(20)吸収線周辺に $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の他、 $\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$ の吸収ピークが得られたが、 $^{14}\text{C}^{16}\text{O}_2$ の明瞭な吸収ピークを取得できた。推定された炭素量を比較すると血漿が尿より 5 倍多く見積もられた。一般に血漿の炭素含有量 (~2.25 mgC/50 μL) は尿の含有量 (~0.225 mgC/50 μL) の 10 倍程度であり [3]、試料毎の差異は想定より小さくなったが、一方で、血漿中炭素量が 2.25 mgC/50 μL であると仮定すると、50 dpm/50 μL = 5.1 pg ^{14}C /50 μL の ^{14}C が含まれる場合の ^{14}C 同位体比は $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 2.24 \times 10^{-9}$ 、尿はその 1/10 と計算され、評価された血漿・尿試料の ^{14}C 比、およびその差はよく一致した。従って、本手法によって血漿・尿の差異は妥当である。血漿と尿で評価された安定炭素量が想定より少なくなった理由は、発生した CO_2 の封じ切り効率がそれぞれ異なっているためと考えられ、測定の際にニードルバルブに無作為に触れ、キャリアガス流量が変わってしまったために、 CO_2 がセルに到達するタイミングがずれてしまったことが一因と考えられる。実際、試料中 ^{14}C 量が同量であるため、評価された $^{14}\text{CO}_2$ 分圧は一致すべきだが、これについても異なっており、封じ切り効率が測定間で異なっていることを示唆している。 $^{12}\text{C} \cdot ^{13}\text{C} \cdot ^{14}\text{C}$ ではその効率に差はないため、同位体比の測定を行う上では問題にはならないが、 CO_2 トラップの導入により改善が可能である。以上より、前処理を施していないヒト生体試料中であっても本手法により ^{14}C の分析が可能であることが明らかとなった。

前章・本章により評価された ^{14}C -CRDS 分析システムの性能は、開発目標であるアバンダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 1.4 \times 10^{-11}$ ・検出限界 0.017 Bq/sample (= 1 dpm/sample) 以下・測定精度数%・前処理なし・測定時間 1 測定当たり 15 分以内に対し、アバンダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$ 、検出限界 1.7×10^{-3} Bq/sample (= 0.1 dpm/sample)、測定精度 1%以下、前処理なく生体試料の測定可能、1 測定 15 分以内と評価され、目標を概ね達成できた。目標に対して評価された分析性能を Table 4-3 にま

とめた。

Table 4-2 ヒト血漿・尿の測定結果

Sample	$^{14}\text{CO}_2$ (bar)	CO_2 (bar)	$^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$
Plasma	8.2×10^{-12}	0.00510	1.6×10^{-9}
Urine	1.6×10^{-11}	0.00102	1.5×10^{-8}

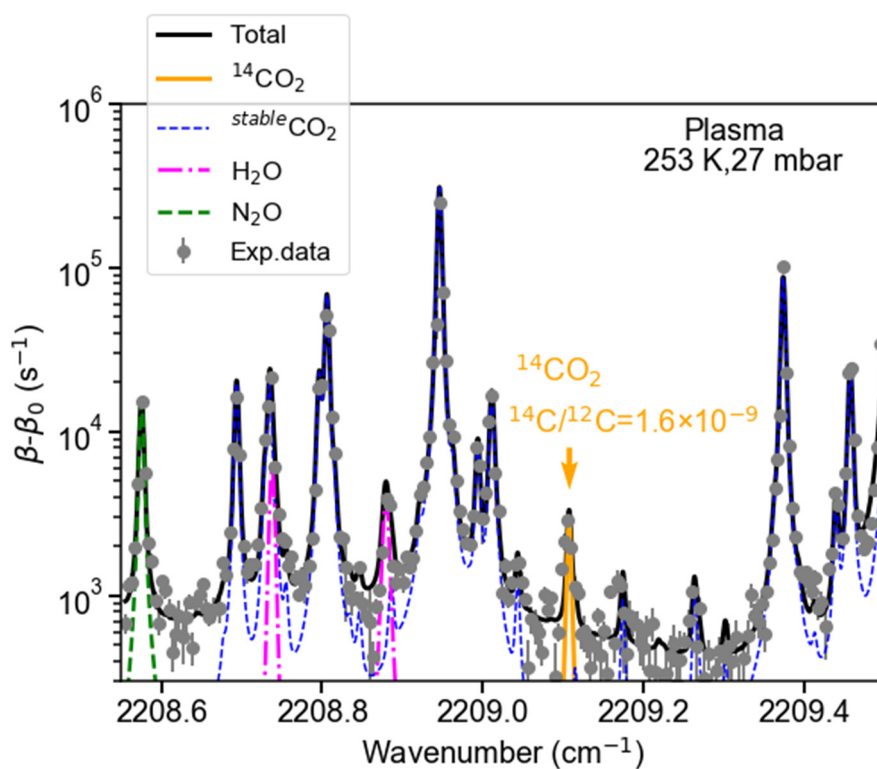


Fig. 4-11 測定された吸収スペクトル (ヒト血漿+50 dpm ^{14}C)

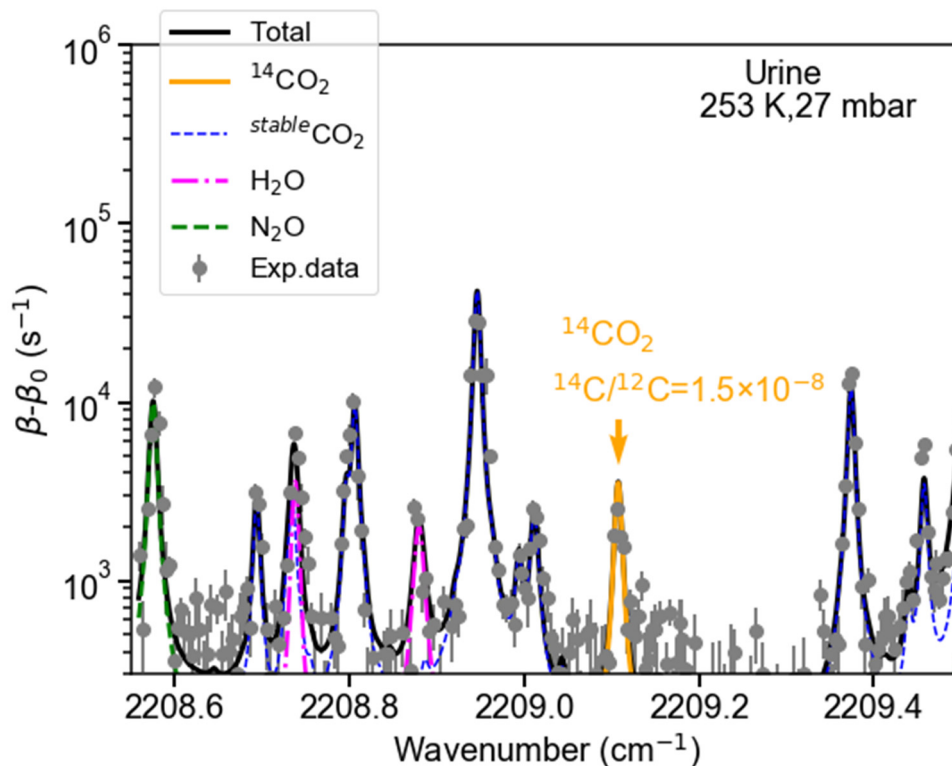


Fig. 4-12 測定された吸収スペクトル (ヒト尿+50 dpm ^{14}C)

Table 4-3 開発目標と評価された分析性能

	Requirements	This work
Abundance sensitivity ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$)	1.4×10^{-11}	2×10^{-11}
Detection limit (dpm/sample)	1.0	0.10
Precision	1%~1‰	<1%
Pre-treatment	None	None
Measurement time (min./meas.)	15	<15

4.4 まとめ

^{14}C 標識グルコースを含んだ標準試料を用いて、これまでに開発された分析システムの実性能を評価し、ヒト薬物動態試験 (MD 試験) におけるヒト模擬試料中の ^{14}C 分析実証実験を行うことで、ヒト生体試料中であっても本システムによる ^{14}C 分析が可能であることを確認した。

構築された ^{14}C -CRDS 分析システムの基本動作を確認するために、ガスセル中に試料が入っていない状態で RD 信号を取得し、ミラーの反射率を評価した。結果より、ミラーの反射率はカタログ値と同等であり、分光システムが正しく動作していることを確認した。

次にガスセルの温度を変えて測定を行い、冷却による干渉線低減の効果を確認した。283 K から 253 K の冷却により安定炭素を含む CO_2 の干渉線強度を一桁低減できることを実験により明らかとし、233 K まで冷却することでさらに一桁の低減が見込まれた。また、 ^{14}C 含有量の違う複数の試料を測定し、 ^{14}C -CRDS 分析システムの定量性を評価した。10,000 dpm ~ 1 dpm (167 ~ 0.017 Bq)、同位体比で $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 10^{-6} \sim 10^{-10}$ の範囲で良好な線形性を確認したが、存在量・存在比が低いサンプルでは過大評価してしまう場合があった。これは試料導入系である EA に、前試料の残留 (メモリー効果) が存在するためであると示唆された。測定試料中の ^{14}C 同位体比に応じて測定順番を考慮する、測定間に空うちを挟むなどにより影響を最小化することが可能であるものの、メモリー効果を最小化する実験方法のプロトコルの確立や、根本的な解決が今後望まれる。

微量 ^{14}C 試料を測定する実験により、第 2 章、第 3 章の成果としてエタロン効果抑制法・ CO_2 トラップによる感度向上を図った分析システムの検出感度は $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 2 \times 10^{-11}$ と評価された。これは第 3 章における感度評価とも一致し、 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 2 \times 10^{-11}$ のアバンダンス感度を実際の ^{14}C 分析において実証できた。また、検出限界は 1.7×10^{-3} Bq/sample (= 0.1 dpm/sample) と評価され、目標であった 0.017 Bq/sample (= 1 dpm/sample) を達成した。以上より、トレーサー応用の実証が十分可能であることが示唆された。

最後に、 ^{14}C を添加したヒト生体試料を用いた模擬実験を行った。干渉線に埋もれない明瞭な $^{14}\text{CO}_2$ のピークを確認し、評価された ^{14}C 同位体比は想定される同位体比と概ね一致した。これにより ^{14}C -CRDS 分析システムによって生体試料 (ヒト血漿・ヒト尿) 中 ^{14}C が前処理なく分析可能であることを明らかとした。これより、第 2 章にて示された開発目標を概ね達成したことが示された。

参考文献

第4章

- [1] Chih-Hao Chang, *et al.*, “Design of a Double-pass Shear Mode Acousto-optic Modulator”, *Rev. Sci. Instrum.*, **79**, 033104:1–5 (2008).
- [2] W. J. Schwenger and J. M. Higbie, “High-speed Acousto-optic Shutter with no Optical Frequency Shift”, *Rev. Sci. Instrum.*, **83**, 083110:1–5 (2012).
- [3] S. H. Kim, *et al.*, “Carbon Isotopes Profiles of Human Whole Blood, Plasma, Red Blood Cells, Urine and Feces for Biological/Biomedical ¹⁴C-Accelerator Mass Spectrometry Applications.”, *Anal. Chem.*, **83**, 3312-3318 (2011).

第5章 ¹⁴C トレーサー分析への応用実証

本章では、前章までで構築・評価を行った ¹⁴C-CRDS 分析システムのトレーサー応用における有用性を示すことを目的として、医薬品開発領域・植物生理学における ¹⁴C トレーサー応用にそれぞれ適用し、本システムの複数領域への応用実証を行った。

5.1 動物中薬物動態評価への応用

5.1.1 ラットを用いた薬物動態評価の概要

医薬品開発分野における薬物動態評価に適用することを念頭に、その動態がある程度既知の ¹⁴C 標識医薬品成分化合物を動物に投与し、動物中排泄評価実験を行った。

前章までで、開発された ¹⁴C-CRDS 分析システムは天然同位体比にあと一桁まで迫るアバンダンス感度を持ち、第 2 章にて明らかとしたヒトに対する薬物動態評価 (MD 試験) に求められる性能を有することが示された。安全性の担保や倫理規定、実験費用など諸般の事情から、ヒトに対する実験に即座に適用することは困難であったため、動物に投与する放射能の量を、ヒト実験において想定される量に調整し、ヒトに対する実験を想定した動物中薬物動態評価実験を行った。また、既存の分析手法との比較を行うため、LSC を用いて同様の測定を行った。ここで LSC はヒトに対する想定投与量では感度が不十分なため、¹⁴C-CRDS 分析システムに対して 100 倍多い放射エネルギーの ¹⁴C を投与した。本実験は全て積水メディカル株式会社創薬支援センター放射線管理区域内で実施され、動物実験に関する倫理規定等は積水メディカル株式会社を通して遵守された。

本実験は積水メディカル株式会社戸塚らによる報告[1]を参考にしてデザインされた。戸塚らは AMS を用いたマイクロドーズ試験を行い、¹⁴C 標識アセトアミノフェンを投与したヒトの血漿・尿・糞を測定試料としている。詳細は第 1 章を参照されたい。本研究では、検体としてラットを複数体用意し、投与医薬品成分化合物として、¹⁴C で標識されたトルブタミド (C₁₂H₁₈N₂O₃S) を用意した。トルブタミドは第一世代のスルホニルウレア系 (SU 剤) 経口血糖降下薬であり、インスリンの分泌を促進することで血糖値を低下させる。一般的には、ヒト体内

において、トルブタミド投与後 4.5 ~ 6.5 時間で半減し、24 時間以内に投与量の約 75%が尿より回収されることが知られている[2]。¹⁴C 標識トルブタミドを単回経口投与させたラットの各個体からの排泄物（尿・糞）をそれぞれ分けて蓄積させ、投与開始直後から一定時間（24 時間）間隔で 7 日間採取した。既存の分析手法である LSC と ¹⁴C-CRDS 分析システムの性能比較を行うために、投与放射エネルギーに応じて 2 群（3 体 × 2）用意し、投与放射エネルギーの多い（92.5 kBq/body）群の試料については LSC で、少ない（0.925 kBq/body）群の試料については ¹⁴C-CRDS 分析システムにてそれぞれ ¹⁴C 量を測定した。ヒトに投与すると想定される量は最大で 18.3 kBq (= 1.1 × 10⁶ dpm = 500 nCi) である。ラットとヒトの体重差を考慮し 0.925 kBq/body とした。Fig. 5-1 に実験の概要を示す。

¹⁴C-CRDS 分析システムの概要は第 2 章を参照されたい。ブリュースターズポイラー、温度変調法、CO₂ トラップは導入された。各試料について、スキャン範囲は 2209.00 ~ 2209.13 cm⁻¹、200 スキャンが平均された。また、EA による全炭素量の測定結果と ¹⁴C-CRDS 分析システムにより測定した同位体比の積から測定試料中 ¹⁴C 量を求め、採取された試料全量と、測定した試料量の比から、各試料の ¹⁴C 全量を算出した。

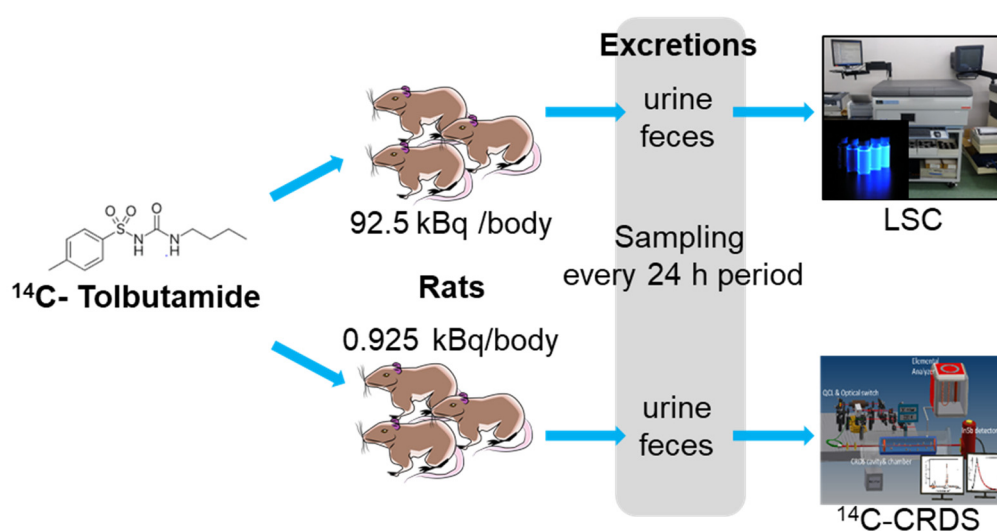
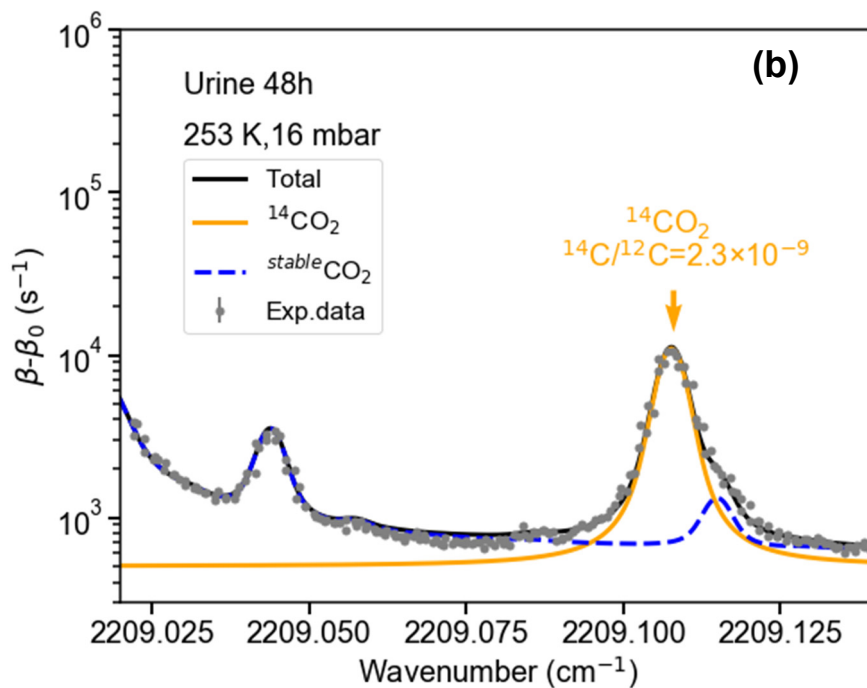
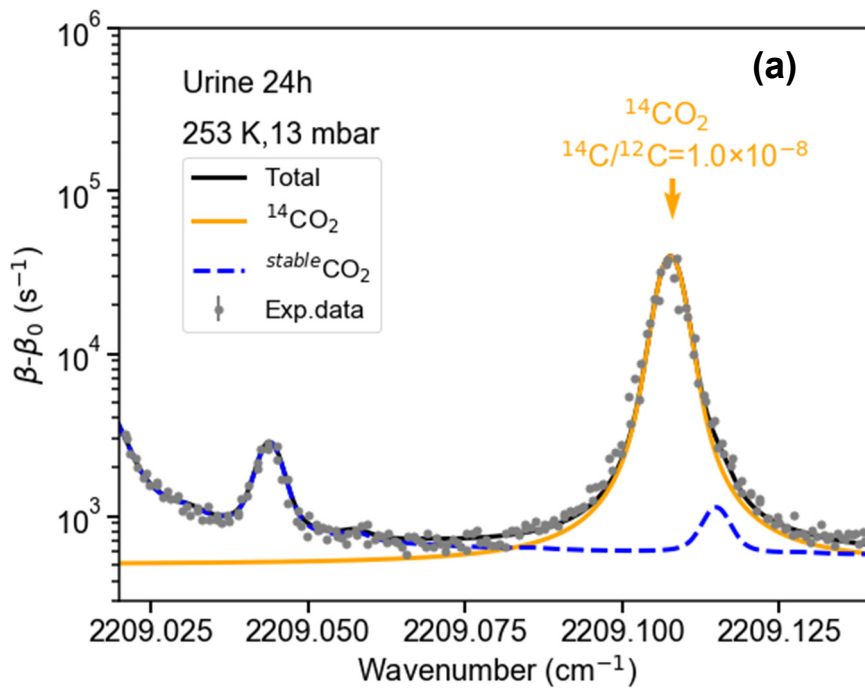


Fig. 5-1 ラット中薬物排泄率評価実験の概要

5.1.2 ^{14}C 分析結果と薬物動態評価の実証

2群のラット（各群3体ずつ）について、24時間毎に採取された尿・糞試料中の ^{14}C 量をそれぞれLSC、 ^{14}C -CRDS分析システムで測定した。糞試料については蒸留水を加えることで液体試料とした。投与から24、48、96時間経過時に採取された尿試料（Urine）によるスペクトルをFig. 5-2に、糞試料（Feces）によるスペクトルをFig. 5-3にそれぞれ示す。96時間経過時に採取された糞試料の同位体比が ^{14}C -CRDSの検出限界とほぼ等しくなった。EAによる全炭素量と ^{14}C 比との積を取り、全採取試料中の ^{14}C 量を算出したうえで、放射能（Bq）換算した。さらに、総投与放射エネルギー（92.5 kBq/body, 0.925 kBq/body）を100%として測定された ^{14}C 放射エネルギーを放射能排泄率（% of dose）に変換した。経過時間毎に3検体の測定結果を平均した。LSCによる測定、 ^{14}C -CRDS分析システムによる測定の両者について、日間・累積の放射能排泄率をFig. 5-4にまとめた。結果より、どちらの手法も24時間経過時点で投与放射エネルギーの70%程度が尿から回収されており、前述したトルブタミドの動態とおおむね一致した。また、累積値を見てみると、投与後48時間で投与放射エネルギーの90%以上が体外に排泄されたことが分かった。LSCと ^{14}C -CRDS分析システムによる結果にはその値に多少の違いが見られたが、そもそも検体が異なるため個体差の範囲内である。一方で、LSCの測定結果に対して ^{14}C -CRDS分析システムにて評価された放射エネルギーが5~10%程度低く見積もられることが経験的に分かっている。スペクトル評価に使用している $^{14}\text{CO}_2$ 吸収強度パラメータ[3]に10%の不確かさがあるためであり、同位体比が既知の標準ガス等を用いて較正することが望まれる。以上から、 ^{14}C -CRDS分析システムによってLSCより100倍少ない ^{14}C 投与量で ^{14}C 標識トルブタミドのラット中排泄率評価を実証した。これはヒト薬物動態試験であるMD試験を想定した投与量であり、本手法のMD試験への適用が可能であることが示された。



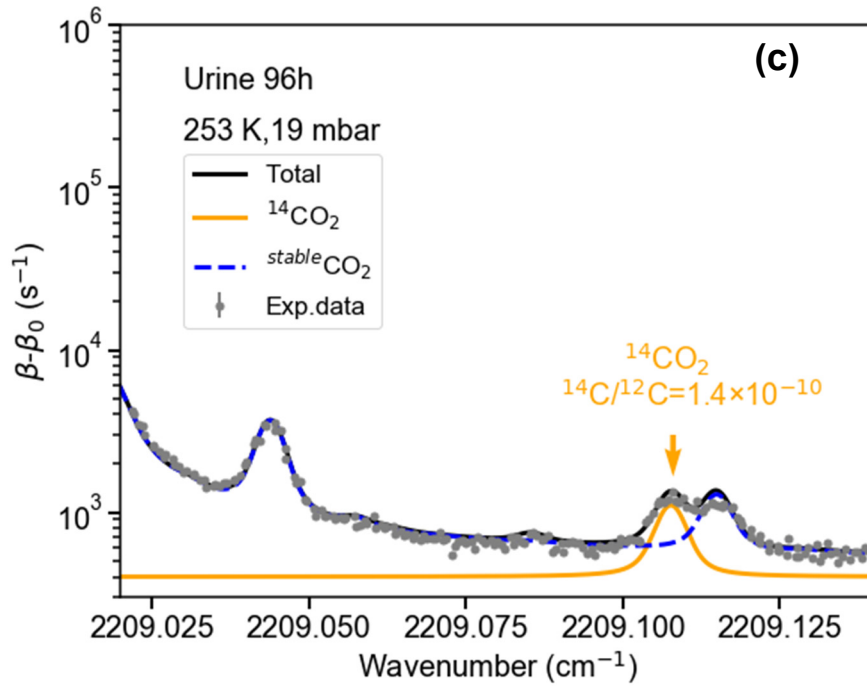
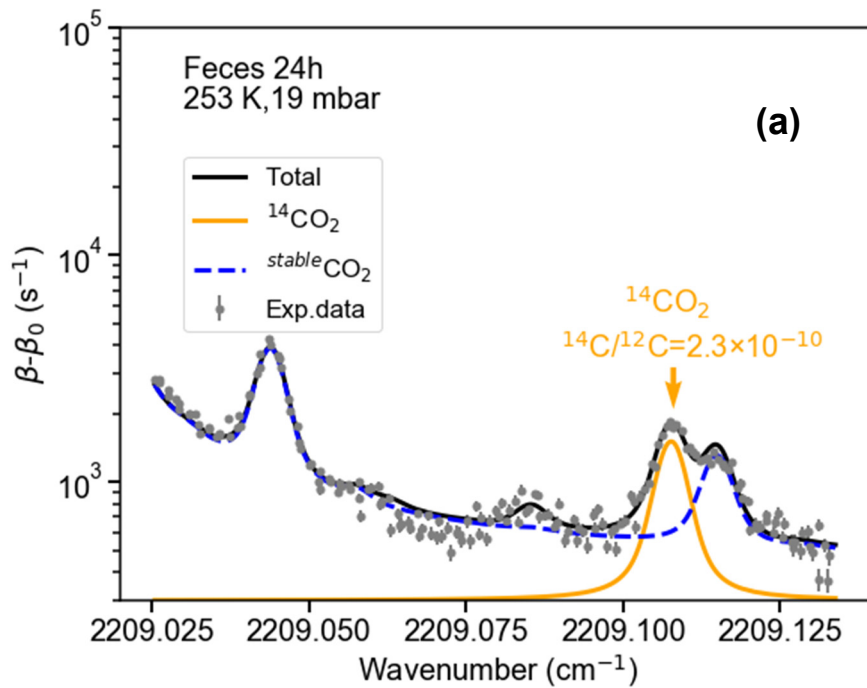


Fig. 5-2 取得された吸収スペクトル (ラットの尿試料)
 (a) 24 時間後 (b) 48 時間後 (c) 96 時間後



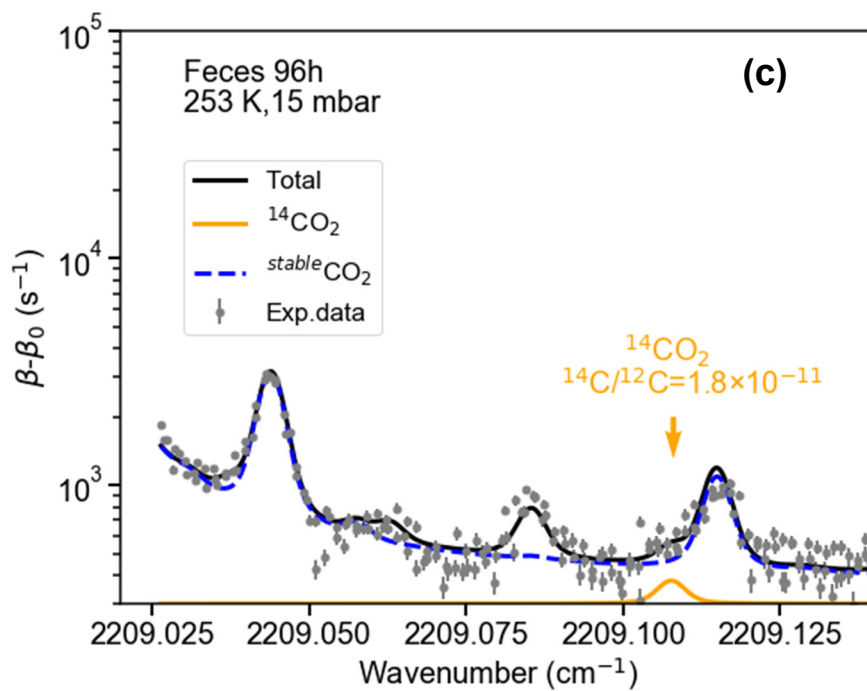
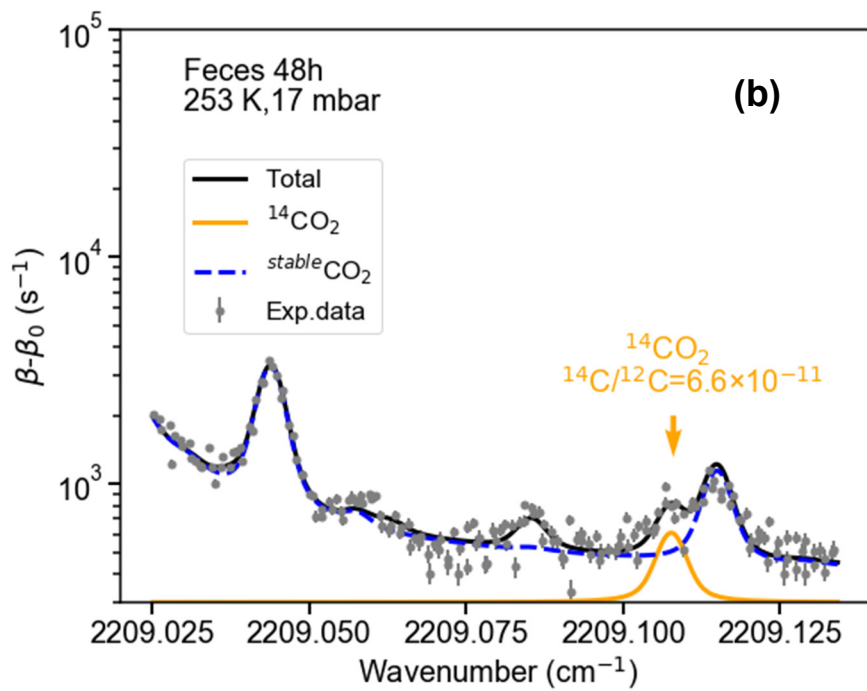


Fig. 5-3 取得された吸収スペクトル (ラットの糞試料)
 (a) 24 時間後 (b) 48 時間後 (c) 96 時間後

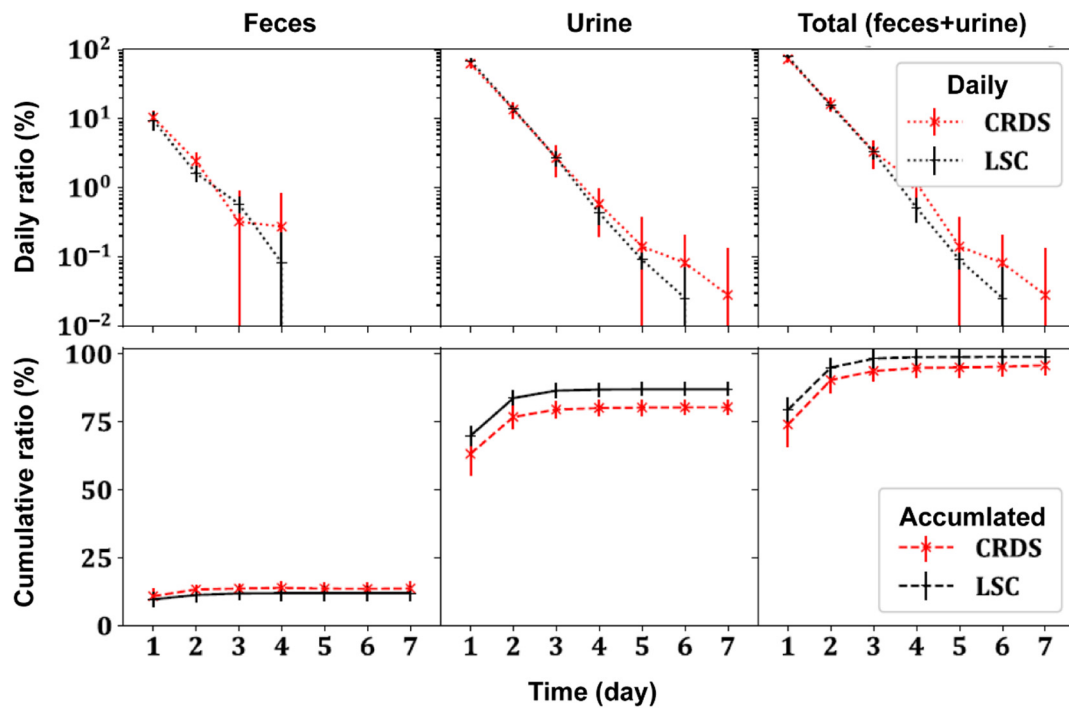


Fig. 5-4 ラット中トルブタミドの排泄率評価結果（日間・累積）

上段: 日間 下段: 累積

左側: 糞、中側: 尿、右側: 尿と糞の和

5.2 植物中 ^{14}C トレーサー分析への応用

5.2.1 植物生理学における炭素動態評価への適用

前節では、医薬品開発領域における薬物動態評価への実証実験を通して、本研究により開発されたシステムが、ヒトに対する MD 試験に適用可能であることを示した。加えて、医薬品開発とは異なる領域における ^{14}C トレーサー応用への適用が実証されれば、複数領域における異なる目的・試料種に対して本分析システムが適用可能であることが明らかとなり、 ^{14}C -CRDS 分析システムの多領域に及ぶ多様な ^{14}C トレーサー応用への有用性を示すことができる。そこで、本節では植物生理学における炭素動態評価への適用実証を行った。

^{14}C トレーサーは医学・薬学における応用の他、植物、特に穀物や野菜などの作物において、植物生理学上重要な様々な動態を評価する有用なツールとして使用されている。例えば、米国・カリフォルニア大の Calvin らの研究グループは $^{14}\text{CO}_2$ を光合成により植物に吸収させ、その化学的反応過程を解明した[4]。本研究により解明された過程はカルビン回路と呼ばれ、1961 年にノーベル化学賞を受賞している。このような植物生理学における ^{14}C トレーサー応用においては、基本的に放射線計測に基づく手法が用いられてきた。例えば、植物に投与された ^{14}C 由来の β 線を、生体活動を停止することなくイメージング（ライブイメージング）するシステムが東京大学・田野井らの研究グループ[5]により開発されている（第 1 章においても取り上げた）。一方で、イメージングプレートによるイメージング手法は、動態を視覚的に評価できる強力なツールである一方で、 ^{14}C からの β 線エネルギーが弱く、植物体内で吸収されてしまうため、測定感度が低く定量分析は難しい。定量を伴う分析には、液体シンチレーションカウンター（LSC）が使用される[6,7]。原子力分野では同様のトレーサー応用として、LSC を用いて、 ^{14}C が根から吸収され、茎葉部に移行する動態を評価した例が報告されている[8]。

本研究において開発された ^{14}C -CRDS 分析システムの応用実証として、特にイネの根系の可塑性に関する研究に着目した。可塑性とは環境条件の変化に対して植物が発揮する適応能力の一種であり、環境の変化に直面した際に、個体の成長や繁殖の維持・促進などに貢献するように変化する能力のことである。例えば、乾燥ストレスや土壌水分変動ストレスに対し、イネ根系の発揮する可塑性がストレスへの適応には重要であることが示されている[9,10]。一方で、根が可塑性を発揮する、すなわち、根を乾燥ストレスに対して適応する形で成長させるためには、当然より多くのコスト（養分）を要求する。一般に根の成長や機能の促進と作物収量はトレードオフの関係にあることが知られており、根の可塑性発揮

を促進することは、収量の減少につながる懸念がある[11]。したがって、イネにおいて根系から地上部間の炭素収支を解明することは、例えば砂漠地域など、乾燥した環境（水ストレス）下における生産性向上や高い収量を持つ新たな品種開発等の観点から重要である。

本節では、植物試料測定用の試料導入部の構築、 ^{13}C 標識トウモロコシ試料を分析する基礎実験、 $^{14}\text{CO}_2$ ラベリングシステムによって ^{14}C 標識されたイネを、 ^{14}C -CRDS 分析システムによって測定し、イネの地上部から根までの炭素動態を評価する基礎実験について述べる。

5.2.2 ¹³C 標識植物試料を用いた基礎実験

植物試料導入部の構築と評価

植物トレーサー分析においては、放射性同位体である ¹⁴C の他、安定の ¹³C を使用する場合もある。天然にはほとんど存在しない ¹⁴C に対して、¹³C は多量に存在するため、¹⁴C と比較してトレーサーとしての感度は大きく限られる。本研究ではまず、イネ試料の ¹⁴C 標識実験に向けた基礎検討として、光合成により ¹³C 標識されたトウモロコシ試料中の ¹³C 同位体比を ¹⁴C-CRDS 分析システムにより測定し、植物試料分析が可能かを確認する基礎実験を行った。ここでは、その準備として植物試料導入部の構築と評価を行った。

前章までで測定された試料は全て液状（糞試料については蒸留水に攪拌）であり、植物のような固体試料を導入した実験は行われていなかった。従って、まずは植物試料が同様の装置によって燃焼酸化・ガス化され、本システムによって分析可能であることを確認する必要がある。これまでの試料導入部である元素分析計（EA）は、固体状の試料についても分析が可能であり、植物試料用の導入部としても機能することが予想された。一方で、EA の燃焼炉は縦向きに配置されており、上部の試料ポートから下の炉に自由落下させることで試料を燃焼させる。そのため、植物試料のような周囲に散逸する可能性の高い試料については、液状試料同様、炉温度（900 °C）に対して融点の十分低い錫カプセル（融点：約 230 °C）等に挿入する必要がある。植物の測定においては、部位ごとの差異を平均化するために裁断・粉末化される場合が多く、比較的柔らかい錫カプセルに重さを計量済みの植物粉末を全て確実に挿入するのは容易ではない。そこで、EA に代わる植物試料燃焼用の試料導入部として、全有機炭素計の固体試料燃焼装置を ¹⁴C-CRDS 分析システムに接続する体系を構築した。Fig. 5-5 にその概要を示す。固体試料燃焼装置は 900 °C の燃焼炉が横向きに配置されており、アルミナ製の試料ポートに試料を入れ、炉に挿入することで測定が開始される。燃焼炉から発生した CO₂ ガスは、キャリアガス（純酸素）によって運ばれ、除湿機構を通過した後に CRDS 分析セルに導入される。

EA と大きく異なる点として、加熱吸脱着カラムが存在しないことが挙げられる。しかし、体系に CO₂ 濃縮機構として CO₂ トラップが導入されており、CO₂ が時間パルス的に発生するのであれば、測定に大きな支障はないと考えた。そこで、標準グルコース水溶液 2.5 mg/50 μL、固体状の標準グルコース約 2.5 mg、トウモロコシ茎葉部粉末試料約 2 mg を導入し、CRDS による Flow through 測定によって、CO₂ が発生し CRDS 分析セルに到達する時間プロファイルを評価した。この時、CO₂ トラップの体系は導入されたが、液体窒素には浸していない。また、カラムの温度上昇に代わるバルブ開閉のトリガーとして、試料が炉に挿入され

るタイミングを取得し、開始時間とした。なお、本章における実験では、第2章にて開発されたエタロン効果抑制法は導入されていない。結果を Fig. 5-6 に示す。結果より、いずれの試料の場合も、時間パルスのように CO_2 が発生することが分かった。一方で、その到達タイミングには液体と固体で約 10 秒程度差異が生じ、また、同じ固体であってもグルコースとトウモロコシ茎葉部ではそのピーク形状に差異が見られた。これは、試料の組成や形状（粒子径など）、熱伝達の違いにより、燃焼炉での CO_2 発生時間プロファイルが異なるためと考えられる。固体試料燃焼装置後段の CO_2 トラップは、 CO_2 を一旦固化しトラップするため、タイミングやピークの形状が多少異なっても、問題にはならない。また、EA と比較すると CRDS 分析セルにて測定された時間プロファイルのピークの幅が広がった。これは加熱吸脱着カラムが存在しないことに起因しているもので、炉における燃焼の時間的な分布がそのまま観測されているものとして妥当である。以上から、固体試料燃焼装置を接続することで、これまでに開発された ^{14}C -CRDS 分析システムによって植物試料中の炭素を CO_2 化し、輸送可能であることが明らかとなった。

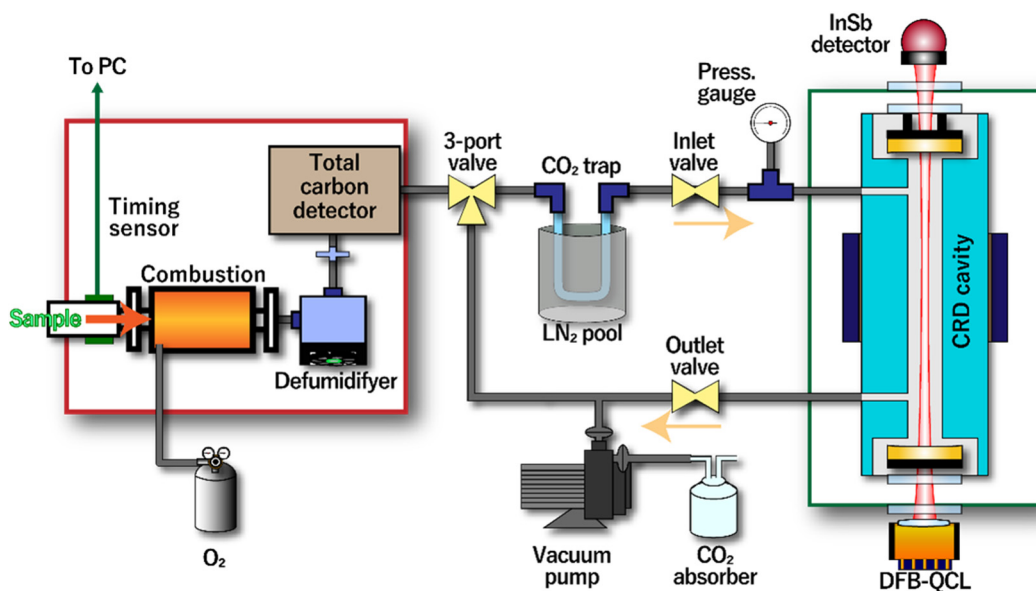


Fig. 5-5 植物試料測定用 ^{14}C -CRDS システム

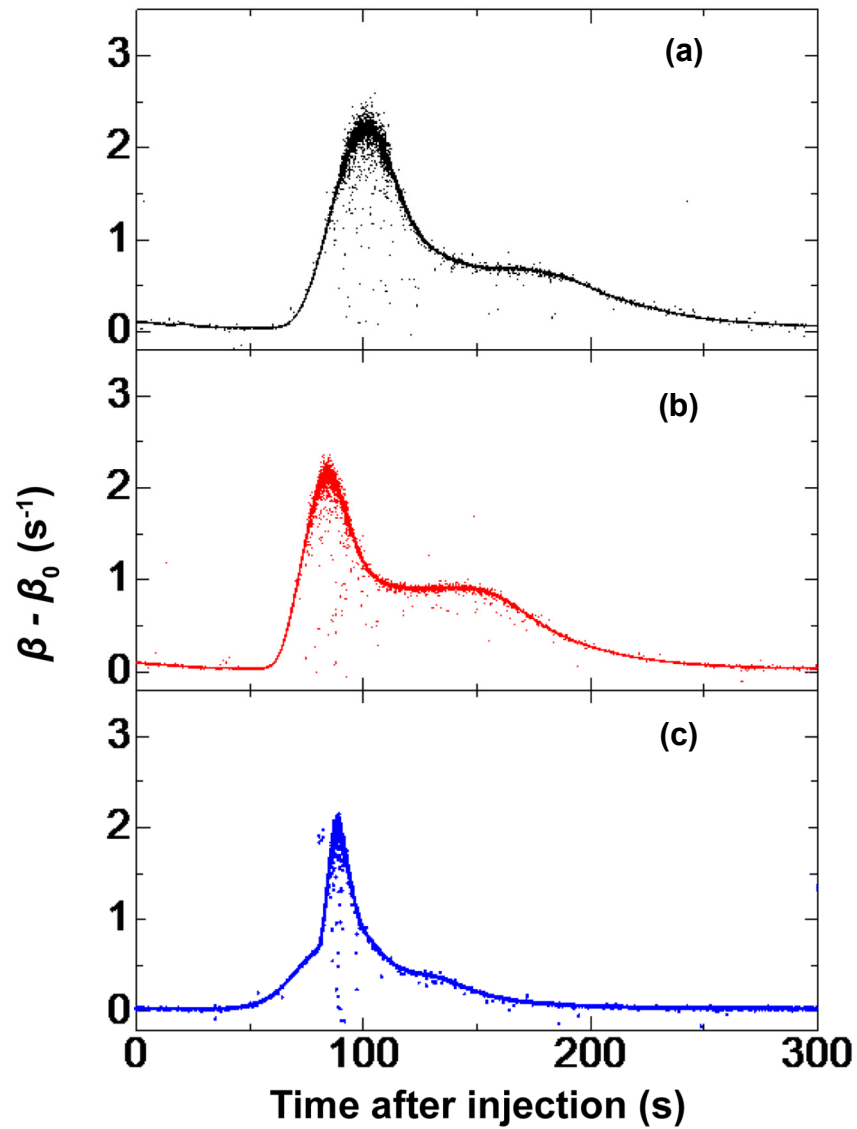


Fig. 5-6 各試料の CO₂ タイムトレンド

DFB-QCL の波長を ¹³CO₂ 吸収ピークに固定し Flow through 測定を行った。横軸は試料導入からの時間、縦軸は CRDS 分析セルにおける ¹³CO₂ 吸収量であり、セル中 CO₂ 濃度に依存。

- (a) グルコース水溶液試料
- (b) グルコース固体試料
- (c) トウモロコシ茎葉部試料

¹³C 標識トウモロコシ試料の測定

¹⁴C 標識実験の前段階として、安定同位体のため ¹⁴C と比較して扱いが容易で、トレーサーとしてはより感度が要求される ¹³C トレーサー分析における ¹³C 標識トウモロコシ試料を用いた基礎実験を行い、植物試料分析が可能かを確認する基礎実験を行った。

¹⁴C-CRDS 分析システムのレーザー周波数は、¹⁴C¹⁶O₂ P(20)吸収 (2209 cm⁻¹ 近傍) にデザインされており、¹³C・¹²C を含む CO₂ の吸収線は発振可能な領域に複数存在するものの、その強度は相対的に弱い。このため、¹⁴C 分析と比較すると原理的に精度・確度の点で劣ることが予想された。そこで、同位体比質量分析計 (Isotope Ratio Mass Spectrometry: IRMS) により ¹³C 同位体比を測定済みの ¹³C 標識トウモロコシの茎葉部・根系試料を測定試料とし、¹⁴C-CRDS 分析システムによる結果と比較した。本試料は、本研究とは別の目的で ¹³C 標識されたものであり、名古屋大学生命農学研究科仲田麻奈博士より譲渡された。試料は最初から細かく裁断・粉末化されていた (Fig. 5-7)。標識の有無でそれぞれ 3 試料の計 6 試料あり、¹³C 標識有りの試料を No.1~3 (1,2: 茎葉部、3: 根系)、¹³C 標識無しの試料を No.4~6 (4,5: 茎葉部、6: 根系) とした。また、天然同位体比の基準試料としてアセトアニリド (C₈H₉NO) 試料 (固体) を測定した。各試料のうち約 2 mg を計量し、アルミナ製の試料ポートに入れた後、固体試料燃焼装置に挿入した。

まず、¹⁴C-CRDS 分析システムによって、植物試料由来の CO₂ 吸収スペクトルを取得できることを確認するため、No.5 の標識無しの試料 (茎葉部) を導入し、¹²C、¹³C を含む二酸化炭素の比較的大きな吸収が存在する波数領域、2209.25 ~ 2210.0 cm⁻¹ をスキャンして比較的広い範囲の吸収スペクトルを測定した。ガスセルの温度は 283 K に保たれ、測定時の圧力は 20 mbar であった。取得されたスペクトルを Fig. 5-8 に示す。N₂O・CO・H₂O の吸収ピークが確認されたが、それらに埋もれることなく ¹³CO₂・¹²CO₂ の明瞭な吸収ピークが得られた。これより、植物試料由来の CO₂ 吸収スペクトルの測定が可能であることが示された。以降、スキャン範囲を ¹³CO₂・¹²CO₂ のピークが両方存在する 2209.75 ~ 2210.0 cm⁻¹ とした。

次に、すべての試料 (No.1~6)、アセトアニリド試料についてスペクトルを取得し、その同位体比を評価した。ガスセルの温度は 283 K に保たれ、測定時の圧力は 20 mbar であった。取得されたスペクトルの例 (No.1・No.5、ともに茎葉部) を Fig. 5-9 に示す。ここで、図中縦軸はピーク強度の変化を明らかとするために、対数ではなく線形スケールとした。試料導入量が若干異なることにより、試料中炭素含有量に個体差があるため、Fig. 5-9 から縦軸を ¹²CO₂ の強度で規格化した (Fig. 5-10)。これより、¹³C 標識された試料 No.1 は、標識無しの試料 No.5 より

明らかに $^{13}\text{CO}_2$ 吸収の相対強度が大きいことが分かる。また、同位体比は No.5 が天然同位体比であるのに対して No.1 は倍程度大きい。全ての試料について 3 回ずつ (n3) 測定し、評価された同位体比を IRMS による評価結果とともに Table 5-1 に示す。なお表中、 $\delta^{13}\text{C}$ は、天然 ^{13}C 同位体比の基準試料 (Pee Dee Belemnite 鉱石: PDB) の値 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.012021\%$) [12] を基準とした値であり、以下の式で表される。なお、単位は千分率 (パーミル、‰) である。

$$\delta^{13}\text{C} = \{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{sample}}) / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{PDB}}) - 1\} \times 1000 \quad (5-1)$$

Table 5-1 より、 ^{14}C -CRDS 分析システムにより評価された $\delta^{13}\text{C}$ は、IRMS と比較して小さくなる傾向があることが分かった。 ^{14}C -CRDS 分析システムにより測定可能な波数領域 ($2208\text{ cm}^{-1} \sim 2212\text{ cm}^{-1}$) に存在する $^{13}\text{CO}_2 \cdot ^{12}\text{CO}_2$ の吸収線は $^{14}\text{CO}_2$ 吸収線と比較して吸収断面積が低く、吸収強度に大きな不確かさ (10%以上) が存在するためであると考えられる。そこで、縦軸をアセトアニリドの結果により補正し、試料ごとに測定された $\delta^{13}\text{C}$ をプロットした (Fig. 5-11)。補正により、 ^{14}C -CRDS 分析システムによる評価は、IRMS の評価とよく一致した。IRMS は同位体比測定法として広く普及している同位体比測定精度が評価されている分析装置であり、これまでに開発された ^{14}C -CRDS 分析システムと固体試料燃焼装置を用いて、植物試料中の炭素同位体分析が可能であることを確認した。



Fig. 5-7 トウモロコシ試料の外観 (名大生命農・仲田博士より提供)

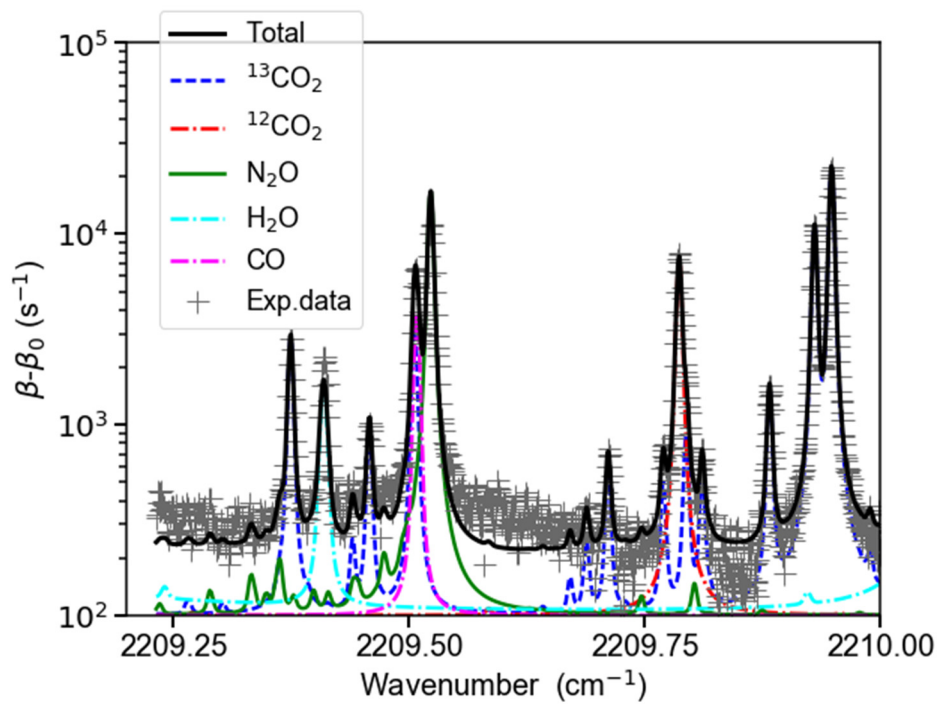


Fig. 5-8 取得された吸収スペクトル
(No.5、 ^{13}C 非標識トウモロコシ茎葉部)

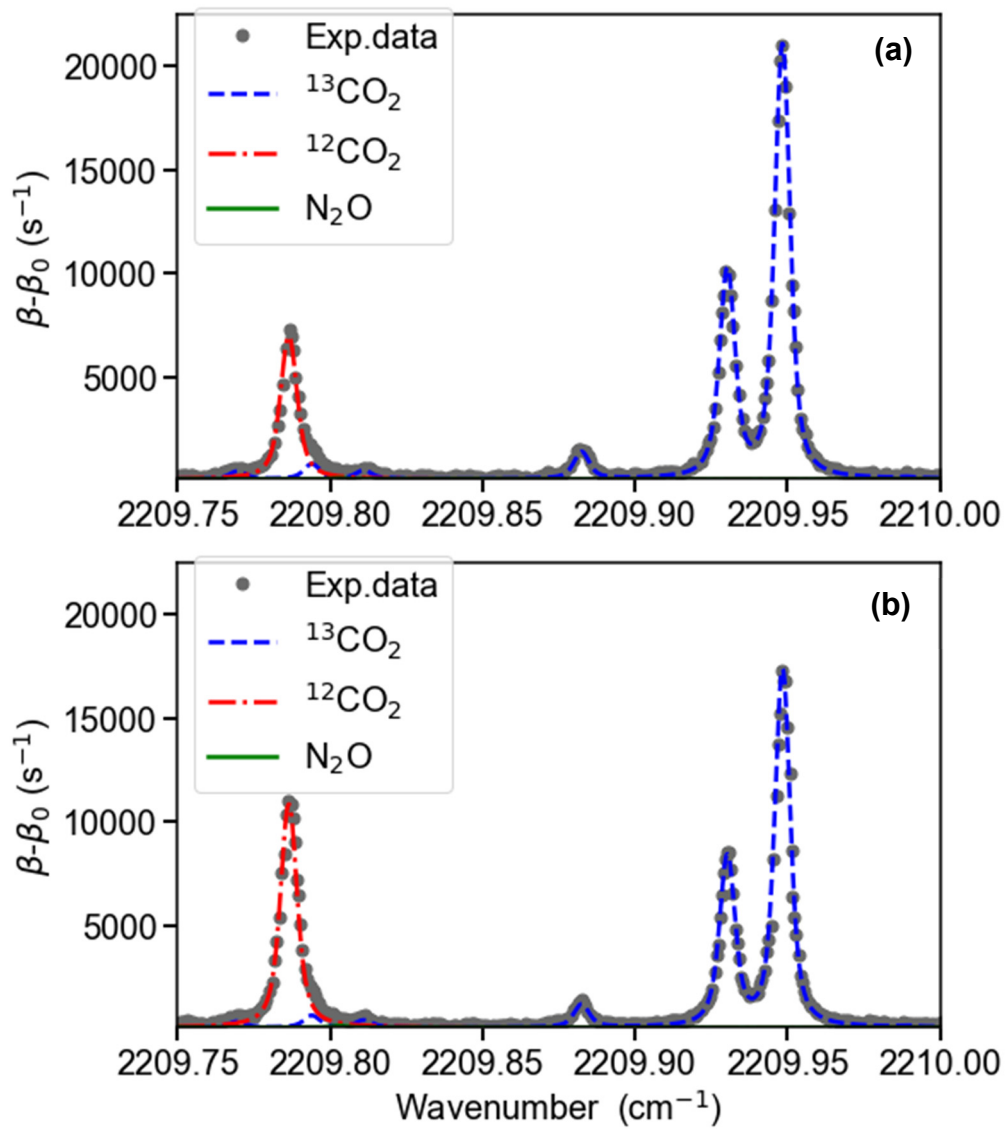


Fig. 5-9 取得された吸収スペクトル (^{13}C 標識・非標識)

(a) No.1、 ^{13}C 標識トウモロコシ茎葉部

(b) No.5、 ^{13}C 非標識トウモロコシ茎葉部

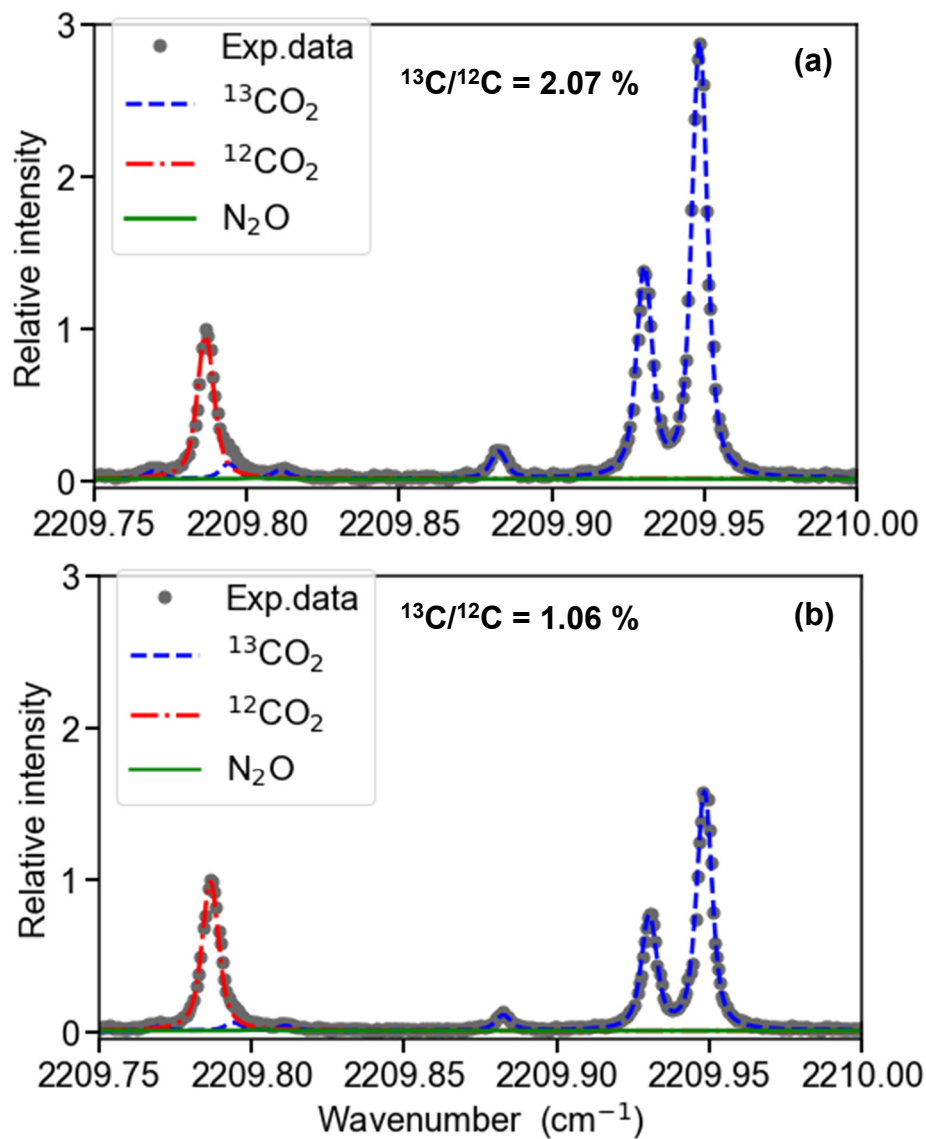


Fig. 5-10 補正された吸収スペクトル (¹³C 標識・非標識)

縦軸は ¹²CO₂ 吸収ピーク強度に対する相対強度

(a) No.1、¹³C 標識トウモロコシ茎葉部

(b) No.5、¹³C 非標識トウモロコシ茎葉部

Table 5-1 ^{13}C 標識・非標識トウモロコシ試料測定結果

	sample info.	IRMS		^{14}C -CRDS			
		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ error	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ error
No.1	Labelled	943.29	2.18	860	18	2.08	0.02
No.2		575.65	1.77	502	24	1.68	0.03
No.3		422.89	1.59	368	58	1.53	0.06
No.4	Not labelled	-12.74	1.11	-42	4	1.073	0.005
No.5		-14.11	1.10	-50	3	1.065	0.004
No.6		-13.67	1.10	-44	4	1.071	0.005
Acetanilide	Ref.	-23.93	1.09	-60	10	1.05	0.012
PDB		0	1.12021	0		1.12021	

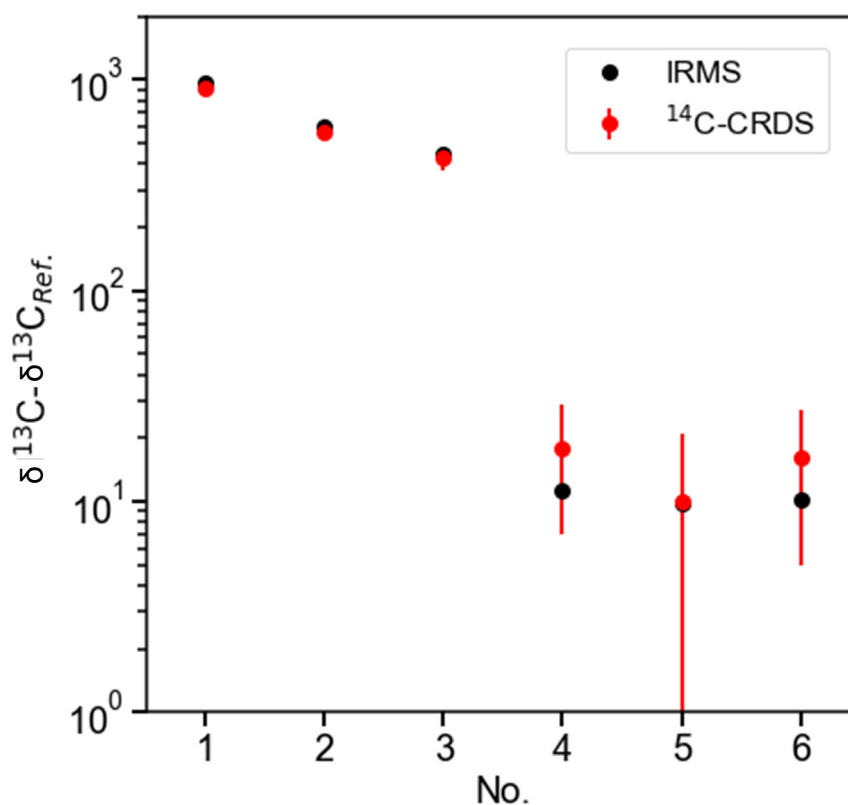


Fig. 5-11 IRMS との結果比較

5.2.3 植物試料用 $^{14}\text{CO}_2$ ラベリングシステムの構築

本節では、本研究で構築・使用した植物試料用 $^{14}\text{CO}_2$ 光合成ラベリングシステムについて説明する。

イネの地上部にて生成された光合成産物が根まで移動する動態を評価する実験を行うために、植物試料を $^{14}\text{CO}_2$ 環境下に導入し、光合成により ^{14}C 標識する必要がある。そこで、既往研究[5]を参考に、 ^{14}C 標識炭酸水素ナトリウム溶液 ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, 37 MBq/mL, PerkinElmer) と弱酸 (乳酸, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$) の化学反応を利用したラベリングシステムを構築した。Fig. 5-12 に概要を示す。システムは、 $^{14}\text{CO}_2$ を発生させるバイアル、いったんガスを蓄積させるサンプルバック、植物を導入するアクリル製のデシケータから構成され、それぞれが接続されている。バイアル内の ^{14}C 標識炭酸水素ナトリウム溶液に乳酸を滴下すると、以下の化学反応により $^{14}\text{CO}_2$ ガスが発生する。

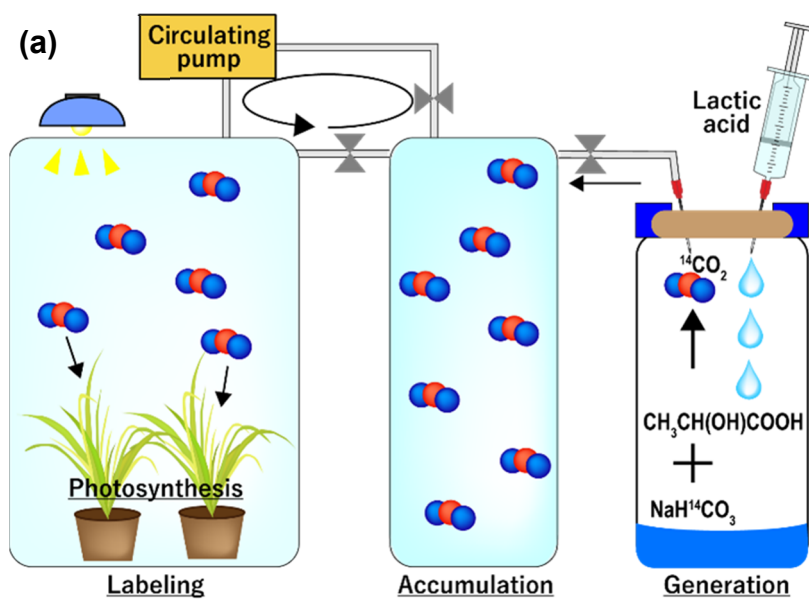


この時、乳酸の量が炭酸水素ナトリウムの量より十分多ければ、バイアル内の ^{14}C はすべて $^{14}\text{CO}_2$ ガスとなり、発生させた $^{14}\text{CO}_2$ ガスはバイアル内に存在する ^{14}C -炭酸水素ナトリウム溶液量から容易に計算することができる。

本システムの動作について説明する。まず、バイアルとサンプルバックのみがつながるようにバルブを開閉した。サンプルバックにバイアルから発生した $^{14}\text{CO}_2$ ガスを蓄積した後に、バルブを切り替えてサンプルバックとデシケータのみを接続し、デシケータ内に $^{14}\text{CO}_2$ ガスを充満させた。サンプルバックの体積 (600 mL) はデシケータの体積 (30 L) に対して十分に小さく、サンプルバック内の全てのガスを容易にデシケータ内に導入可能である。その後、循環ポンプを用いて系内のガスを循環させた。デシケータ内部の植物試料は光合成によって $^{14}\text{CO}_2$ を体内に取り込んだ。デシケータ上部には LED ライトが設置され、デシケータ内部の植物試料の光合成を促進させた。

植物試料の ^{14}C 標識を確認するために、同条件で生育されたイネ試料を $^{14}\text{CO}_2$ 光合成ラベリングシステムにより標識する実験を行った。 ^{14}C -炭酸水素ナトリウム溶液 20 μL (= 740 kBq) を使用し、 $^{14}\text{CO}_2$ ガスを発生させ、イネ試料を $^{14}\text{CO}_2$ ガスに 50 分間曝した (標識した)。結果比較のために、1 個体は標識しなかった。標識後、茎葉部と根系に分け、液体窒素に浸すことで生体活動を停止した後、乾燥機で乾燥させた。試料を細かく裁断し、 ^{14}C -CRDS 分析システムにより吸収スペクトルを取得した。 ^{14}C 標識・非標識茎葉部試料の結果について、Fig. 5-13 に示す。結果より、標識された試料には、非標識試料には見られない $^{14}\text{CO}_2$ の明瞭

なピークが測定され、本システムによって光合成による $^{14}\text{CO}_2$ 標識が可能であることを示した。



(b)

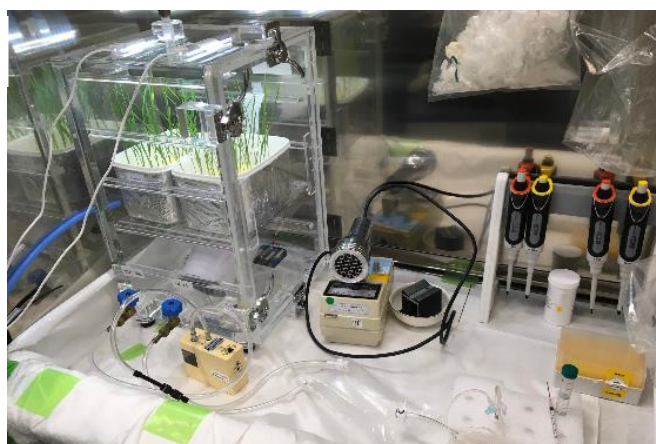


Fig. 5-12 $^{14}\text{CO}_2$ 光合成ラベリングシステム

(a) 概要 (b) 外観

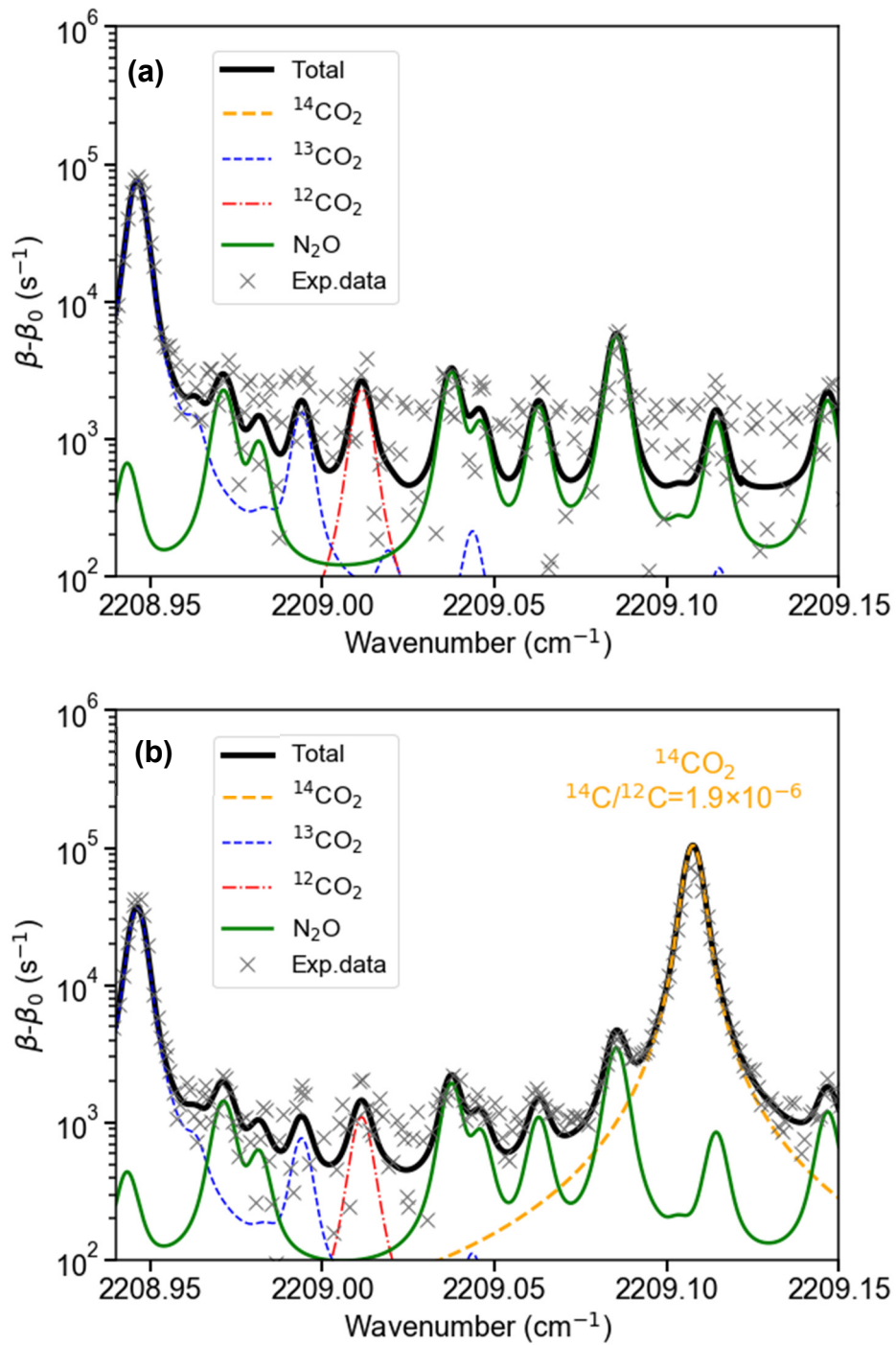


Fig. 5-13 $^{14}\text{CO}_2$ 標識・非標識イネの茎葉部試料による吸収スペクトル
 (a) 非標識 (b) 標識

5.2.4 ^{14}C トレーサー分析によるイネの炭素動態評価の実証

前章までに ^{14}C -CRDS 分析システムによって植物試料分析が可能であることを確認し、光合成による ^{14}C ラベリングシステムを構築し、その動作を確認した。そこで、イネ試料に $^{14}\text{CO}_2$ を光合成により吸収させ、光合成産物が根まで移動する動態を評価する実験を行った。

イネ試料として人工気象機内において水耕条件で 10 日間栽培したイネ (品種: 日本晴) を 2 群 (各 20 個体、計 40 個体) 用意した。一方は人工気象機内において通常通り生育され (Control)、一方はポリエチレングリコール (Poly-Ethylene Glycol: PEG) を水耕液に混ぜることにより疑似的に乾燥ストレスを生じさせた。PEG は内部に大量の水を吸収することができ、植物が水を吸収するのを抑えることができる。Fig. 5-14 にイネ試料の外観を示す。Control 群・PEG 群の全ての個体を前節にて開発されたラベリングシステムのデシケータ内に導入した (Fig. 5-12(b))。前項におけるラベリングシステムの動作確認実験 (標識は 1 個体のみ) と比較して、標識したい個体数が 40 個体と多く、各個体の生育も進んでいたため、前項における実験より 50 倍多い ^{14}C -炭酸水素ナトリウム溶液 1 mL (= 5.5 MBq) を使用し、 $^{14}\text{CO}_2$ ガスを発生させ、イネ試料を $^{14}\text{CO}_2$ ガスに 50 分間曝した。その後、デシケータ内から試料を取り出し、Control・PEG 各 5 個体ずつグループ化し、一定時間経過後 (直後・30・60・120 分後) に茎葉部 (Shoot) と根系 (Root) に分けたうえで、それぞれ液体窒素に浸し生体活動を停止した。この作業に 5 分程度を必要とし、結果についてはその中央値を生体活動を停止させた時間とした。その後、乾燥機で乾燥させ、個体ごとに各試料の重さを計量し、裁断・粉末化した。このような作業をサンプリングと呼ぶ。 ^{14}C 量が相対的に多いことが予想される茎葉部については 1.0 mg、根系については 1.5 mg を測り取り、 ^{14}C -CRDS 分析システムにより吸収スペクトルを取得した。ガスセルは 283 K に保たれ、測定時の圧力は、根系で約 15 mbar、茎葉部で約 50 mbar とした。茎葉部では ^{14}C 量が非常に多く 15 mbar では、 $^{14}\text{CO}_2$ 吸収ピークに飽和が見られた [13]。飽和が発生すると、吸収ピーク強度が ^{14}C 量に依存しなくなり、ピークの天頂が本来より低くなってしまう。吸収飽和の程度は吸収に寄与する分子数に依存するため、茎葉部試料ではガス圧力を上げ、吸収スペクトルの圧力拡がりを大きくすることでその影響を低減した。

取得された吸収スペクトルの例として、PEG 群の直後にサンプリングした同一個体の茎葉部・根系の結果を示す (Fig. 5-15)。各群各グループ 5 個体ずつの茎葉部・根系を測定し、その ^{14}C 同位体比を評価した。横軸に標識からの経過時間、縦軸に ^{14}C 同位体比とし、結果を根系・茎葉部に分けてプロットした (Fig. 5-16)。また、根系と茎葉部の同位体比の比をとり、同様に横軸を標識からの経

過時間とした図を Fig. 5-17 に示す。茎葉部と根系の試料で評価された同位体比を比較すると、根系の方が数桁低く、経過時間が大きくなるにつれてその差が小さくなる（根と茎葉部の比は増加）ことが分かった。これは、茎葉部にて光合成により吸収された ^{14}C が、根系に移動した結果である。また、以下の式により ^{14}C 同位体比を試料中放射エネルギー A （単位: Bq）に換算することができる。

$$A = \frac{{}^{14}\text{C}/{}_{12}\text{C} \times \text{測定炭素量} \times \frac{N_A}{14} \times \lambda}{\text{測定試料質量}} \times \text{全質量} \quad (5-3)$$

ここで、 N_A はアボガドロ定数（ $=6.022 \times 10^{23}$ ）、 λ は ^{14}C 崩壊定数である。横軸に標識からの経過時間、縦軸に試料中放射エネルギーとして、根系、茎葉部中の ^{14}C 時間変化を Fig. 5-18 に示す。また、根系への分配率 D_{root} は茎葉部と根系の放射エネルギーの和（全放射エネルギー）と根系の放射エネルギーの比であり、以下の式で計算される。

$$D_{\text{root}} = A_{\text{root}} / (A_{\text{root}} + A_{\text{shoot}}) \quad (5-4)$$

ここで $A_{\text{root}} \cdot A_{\text{shoot}}$ はそれぞれ根系・茎葉部で評価された放射エネルギーである。経過時間ごとの分配率を Fig. 5-19 に示す。結果より、PEG（乾燥ストレス有）は全体的に放射エネルギーの値が低くなった。これは乾燥ストレスによって、茎葉部の成長や光合成に関する機能が低下していることを示している。実際、PEG 群の試料は茎葉部の大きさ・重さが相対的に小さくなっており、Fig. 5-16・Fig. 5-18 に示されるように取り込まれた $^{14}\text{CO}_2$ が相対的に少ない。一方で、根系の ^{14}C 根への分配率増加の傾きは PEG が Control より大きくなった。これは乾燥ストレスに適応するために光合成産物がより根に送られていることを示唆している。実際、Fig. 5-16・Fig. 5-18 において、根の結果には、同じくその増加傾向にストレスの有無で差異が見られる。その一方で、PEG の結果には分配率および、根の同位体比・放射エネルギーの増加に飽和の傾向が見られた。根は茎葉部から光合成産物を受け取るだけでなく、それを呼吸により CO_2 として体外に排出している。乾燥ストレス下において、根の呼吸速度が増加することが知られており [14]、茎葉部から根への ^{14}C 供給速度と、呼吸による ^{14}C 排出速度が平衡状態に達した可能性が示唆された。CRDS は気体を分析する手法であり、今後、本実験と同様の評価に加えて、根系からの呼気中の $^{14}\text{CO}_2$ 量を評価するといった、これまでにない新たな評価法の開発が期待される。

以上より、 ^{14}C -CRDS によって、乾燥ストレスを与えたイネは、光合成産物をより多く根に送っていることが明らかとなり、根の活発な呼吸によって CO_2 として体外に排出している可能性が示唆された。葉により生成された光合成産物が根に輸送される時間的なトレンドを取得し、乾燥ストレスの有無による差異

を評価できたことから、 ^{14}C -CRDS 分析システムによるイネにおける光合成産物の動態評価を実証した。第 4 章にて評価された検出感度 ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$) より、投与放射エネルギーが数桁小さくても同様の測定ができ、導入試料についても、より少ない量での評価が可能であると考えられる。

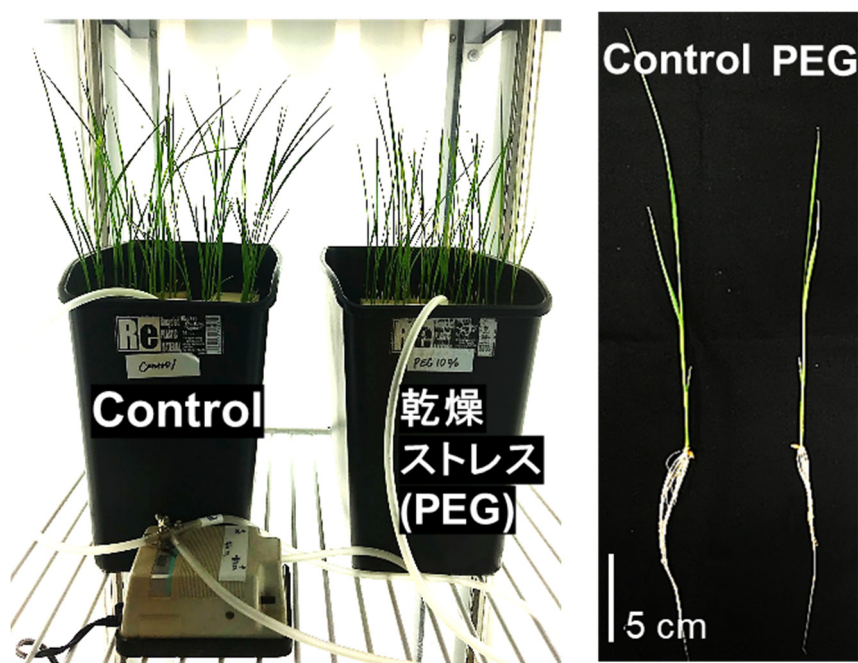


Fig. 5-14 イネ試料の概要
左側: 全体 右側: 1 個体

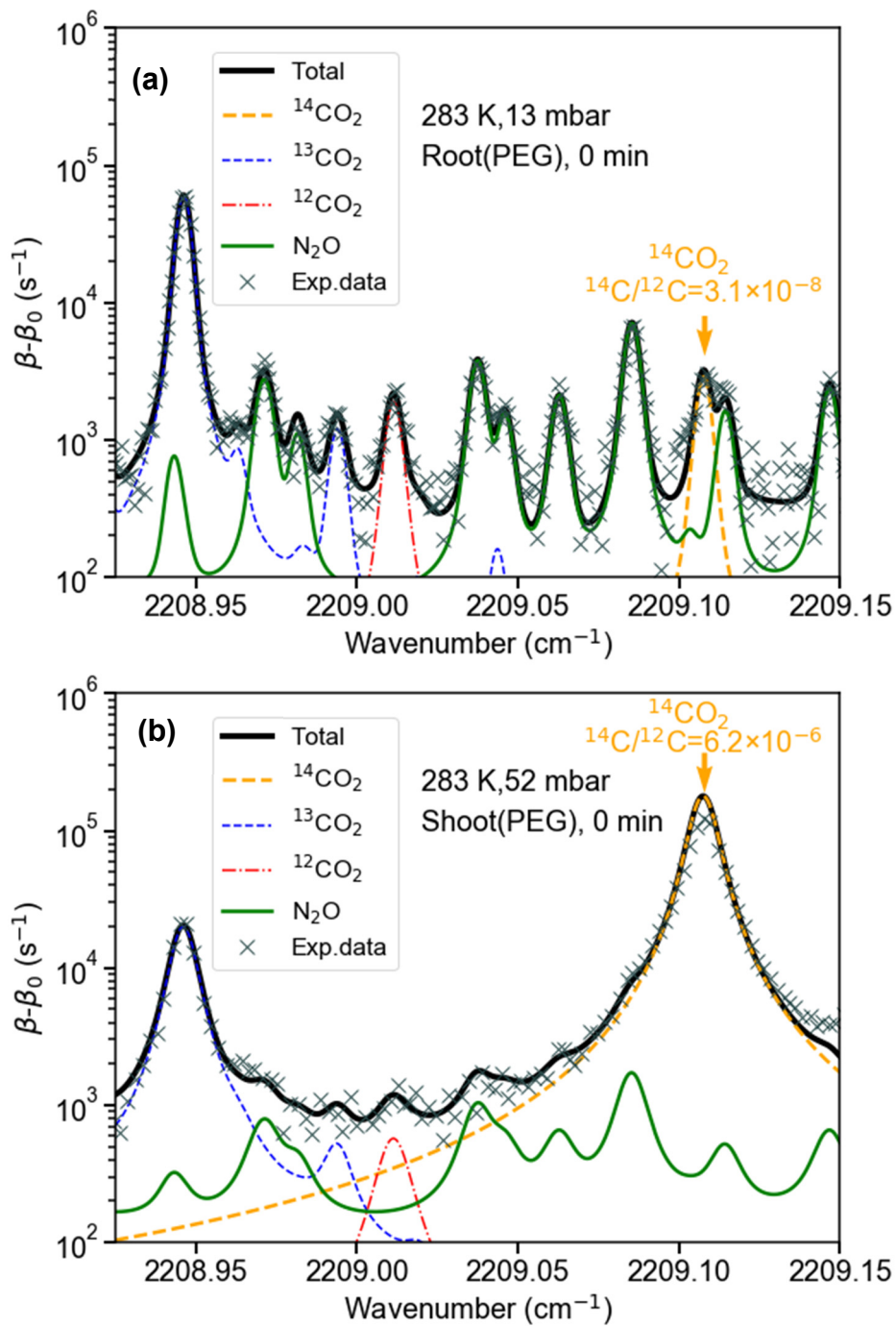


Fig. 5-15 吸収スペクトル (^{14}C 標識イネ試料、PEG、標識終了直後)
(a) 根系 (b) 茎葉部

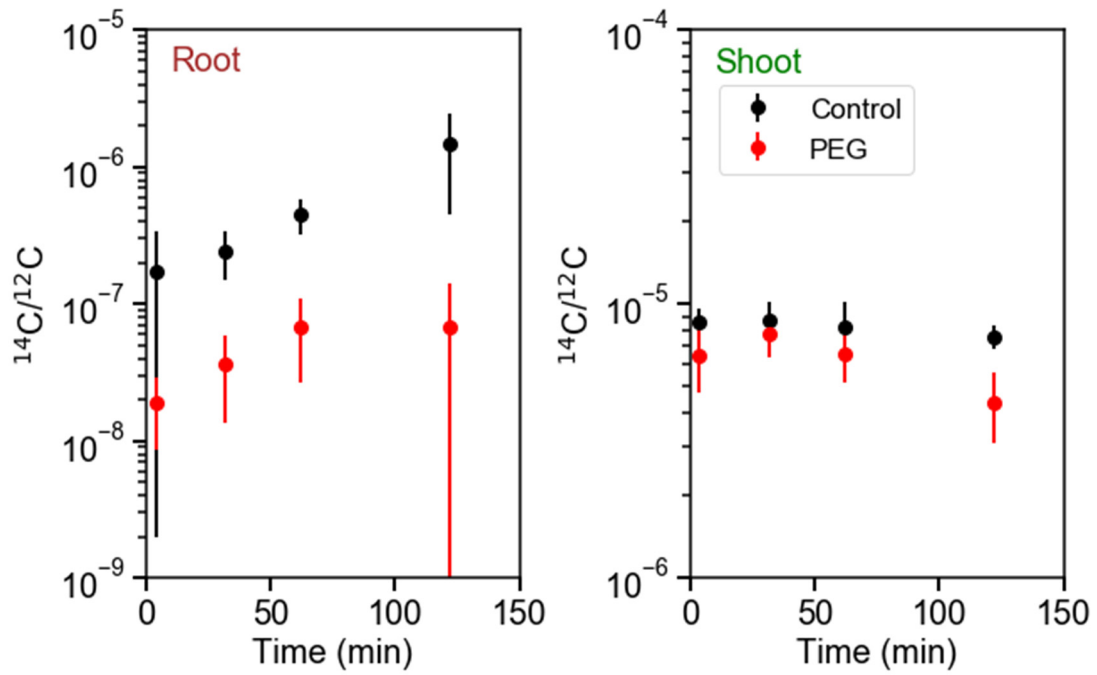


Fig. 5-16 経過時間に対する ^{14}C 同位体比
 左側: 根 右側: 茎葉部

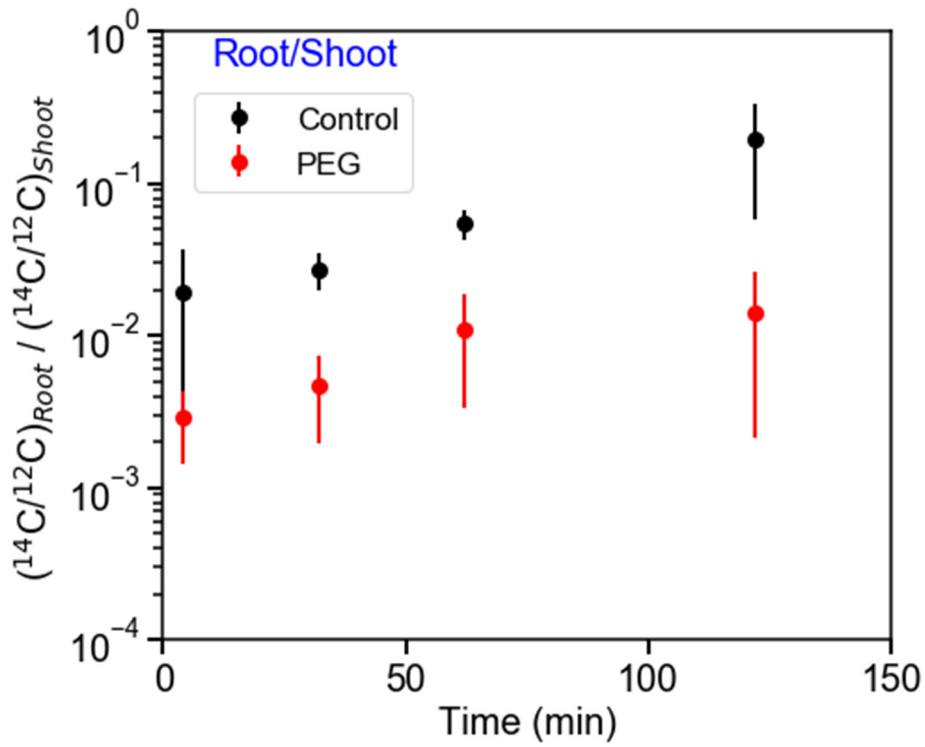


Fig. 5-17 茎葉部に対する根系の ^{14}C 同位体比時間変化

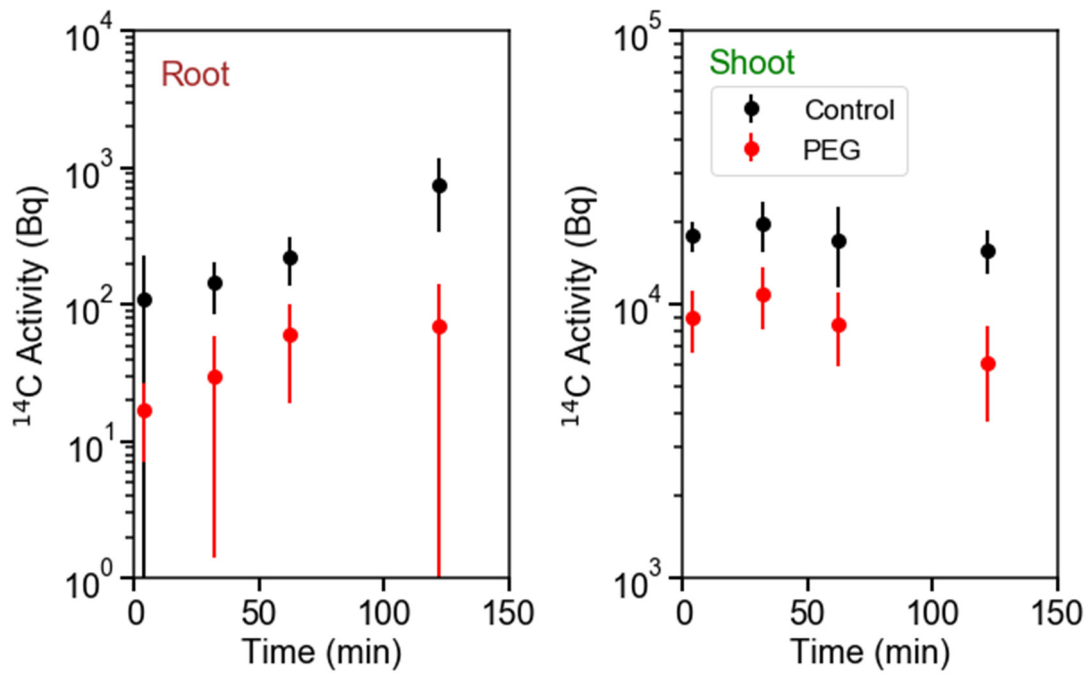


Fig. 5-18 評価された放射エネルギーと経過時間
 左側: 根 右側: 茎葉部

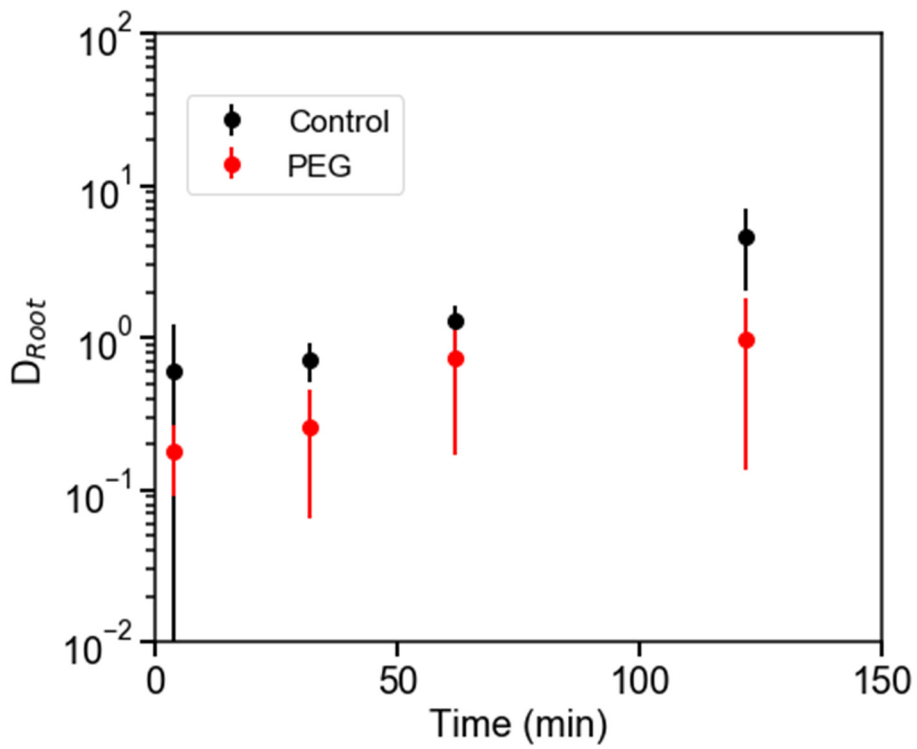


Fig. 5-19 分配率と経過時間

5.3 まとめと今後の展望

前章までで開発された ^{14}C -CRDS 分析システムの複数領域への応用実証を行い、本システムの有用性を示すことを目的とし、医薬品開発分野・植物生理学における ^{14}C トレーサー応用に適用する実験を行った。

まず、医薬品開発領域におけるヒト薬物動態試験 (MD 試験) に適用することを念頭に、 ^{14}C 標識トルブタミドをラットに投与し、ラット中トルブタミドの排泄率評価実験を行った。投与放射エネルギーは MD 試験においてヒトに投与することが想定される量に対し、ヒトとラットの体重差を考慮した量とした。比較として既存の分析手法である LSC を用い、感度が十分ではないため投与放射エネルギーのみを 100 倍多くして同様の実験を行った。結果として、 ^{14}C -CRDS 分析システムによる結果は LSC とよく一致し、トルブタミドの排泄に関する知見に沿った結果を得ることができた。これより、LSC より 100 倍少ない、ヒト想定放射能投与量でトルブタミドの排泄を評価でき、 ^{14}C -CRDS 分析システムによる動物中薬物動態評価を実証した。以上から、投与放射エネルギーに制限のあるヒト薬物動態試験 (MD 試験) に本手法が適用できる見込みを得た。

次なる応用実証として、植物生理学における ^{14}C トレーサー応用に着目し、イネ試料を ^{14}C 標識し、その動態を評価する実証実験を通して、本手法の植物生理学における有用性を明らかとした。これまでの試料導入部に代わる植物試料測定用の導入部を構築し、その動作を確認したうえで、 ^{13}C 標識トウモロコシ試料を用いた基礎実験により、植物試料中の炭素同位体比の測定が可能であることを確認した。また、植物試料用 $^{14}\text{CO}_2$ ラベリングシステムを構築し、乾燥ストレスの有/無条件下で生育されたイネ試料を ^{14}C 標識し、光合成により葉から取り込んだ ^{14}C が根に移送される時間的なトレンドを取得した。 ^{14}C が葉から根に移動する炭素動態を明瞭に評価でき、乾燥ストレスの有無によって動態が異なることを明らかとした。また、乾燥ストレスによって、根の呼吸量が増加することを示唆する結果を得ることができた。既存の分析手法と比較して、数桁高い感度を有することから、より少ない投与放射エネルギー、試料量で同様の評価が可能であると考えられる。

以上より、複数領域において、異なる目的のもと異なる試料に対する ^{14}C トレーサー応用を ^{14}C -CRDS 分析システムにより実証でき、本手法の有用性が示された。今後の展望として、本手法による MD 試験の実試料分析、根の呼気中 $^{14}\text{CO}_2$ 測定法の開発の他、茎葉部浸出液の測定や葉と茎、主根と側根など微小な部位に分けての動態評価、代謝物中の ^{14}C 分析などこれまで適する分析法が存在しなかったために実現できなかった様々な分析・応用への本手法の適用が期待される。

参考文献

第5章

- [1] Z. Tozuka, *et al.*, “Microdose Study of ^{14}C -Acetaminophen With Accelerator Mass Spectrometry to Examine Pharmacokinetics of Parent Drug and Metabolites in Healthy Subjects”, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **88**, 824-830 (2010).
- [2] Drugs.com, <https://www.drugs.com/pro/tolbutamide.html>
- [3] M. Wahlen, “Tunable Diode Laser Spectroscopy of $^{14}\text{CO}_2$ Absorption Coefficients and Analytical Applications”, *Appl. Opt.*, **16**, 2350-2352 (1977).
- [4] M. Calvin, “The Path of Carbon in Photosynthesis”, *Science*, **135**, 879-889 (1962).
- [5] R. Sugita, *et al.*, “Visualization of Uptake of Mineral Elements and the Dynamics of Photosynthates in Arabidopsis by a Newly Developed Real-time Radioisotope Imaging System (RRIS)”, *Plant Cell Physiol.*, **57**, 743-753 (2016).
- [6] J. H. Cock, Shouichi Yoshida, “Accumulation of ^{14}C -labelled Carbohydrate Before Flowering and Its Subsequent Redistribution in the Rice Plant”, *Proc. of the Crop Science Society of Japan*, **21**, 226-234 (1971).
- [7] L. M. Recalcati, *et al.*, “On the Determination of ^{14}C -labelled Photosynthesis Products by Liquid Scintillation Counting”, *Plant Science Letters*, **27**, 21-27 (1982).
- [8] 荻山 慎一ら、「TRU 廃棄物の地層処分を想定した放射性炭素の植物による経根吸収—酢酸を起源とする放射性炭素の植物への移行—」、*保険物理*、第43巻第3号、p. 268-277 (2008).
- [9] M. Kano-Nakata, *et al.*, “Root Development, Water Uptake, and Shoot Dry Matter Production under Water Deficit Conditions in Two CSSLs of Rice: Functional Roles of Root Plasticity”, *Plant Prod. Sci.*, **14**, 307-317 (2011).
- [10] M. Kano-Nakata, *et al.*, “Functional Roles of the Plasticity of Root System Development in Biomass Production and Water Uptake under Rainfed Lowland Conditions” *Field Crops Res.*, **114**, 288-296 (2013).
- [11] 仲田 (狩野) 麻奈ら、「イネの可塑的な根系発育による水ストレス適応機構」、*根の研究*、第24巻第2巻、p. 53-62 (2015).
- [12] J. Meija, *et al.*, “Isotopic Compositions of the Elements 2013 (IUPAC Technical Report)”, *Pure Appl. Chem.*, **88**, 293-306 (2016).
- [13] P. Cancio, *et al.*, “Saturated-Absorption Cavity Ring-Down (SCAR) for High-Sensitivity and High-Resolution Molecular Spectroscopy in the Mid IR”, *Cavity-Enhanced Spectroscopy and Sensing*, pp. 143-162, Springer Berlin Heidelberg. (2014).
- [14] 仲田 (狩野) 麻奈ら、「イネ根系の土壤乾燥ストレス応答に関する通気組

織形成と根呼吸特性」、第 243 回日本作物学会講演会、p. 192 (2017).

第6章 結論と今後の展望

6.1 結論

放射性同位体である ^{14}C は、天然存在比が $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 10^{-12}$ と非常に小さく、長半減期の放射性核種であることから、環境学・医学・農学など幅広い領域において、生体・環境中トレーサーとして利用されている。一方で、このようなトレーサー応用に求められる感度・スループット・簡便さを兼ね備えた ^{14}C 分析法は現状存在せず、このことが ^{14}C トレーサー応用の拡大を妨げてきた。本研究では、生体・環境トレーサー応用に伴う ^{14}C 分析に向けて、高感度レーザー吸収分光であるキャビティリングダウン分光法 (CRDS) と ^{14}C を含む二酸化炭素の中赤外域基本音吸収を組み合わせた手法 (^{14}C -CRDS) の開発を行い、分析システムを構築するとともに、分析システムの性能評価を行い、感度向上のためのバックグラウンドノイズ低減法、中赤外レーザー発振周波数安定化法を開発した。開発された分析法により、医薬品開発領域・植物生理学における応用を実証することにより、既往の ^{14}C 分析手法に対して、 ^{14}C トレーサー応用に対する本手法の有用性を明らかとした。

本研究で行った内容、および得られた成果を要約すると以下のとおりである。

(1) 中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析 (^{14}C -CRDS 分析) システムの開発

^{14}C トレーサー応用において想定される測定試料から試料当たり炭素量 $\sim 2 \text{ mgC/sample}$ に対して、天然同位体比にあと一桁まで迫るアバンダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 1.4 \times 10^{-11}$ 、 0.017 Bq/sample (= 1 dpm/sample) 以下の検出限界、測定精度数%、前処理なく試料を測定できること、測定時間 15 分以内/1 測定を ^{14}C -CRDS 分析システムの性能目標とし、以上の要件を満たした分析システムをより簡便な体系で実現することを本研究の目的とした。分析システムは、試料導入部の他、中赤外レーザー光源・光学系、高反射率光共振器とガスセル、検出器・信号処理系から構成される。分析試料は試料導入部である元素分析計 (EA) の燃焼管にて燃焼酸化 (炭酸ガス化) され、 CO_2 ガスとして加熱吸脱着カラムに一旦吸着された後、分離されて放出される。 CO_2 ガスは CRDS 分析セルに到達したタイミングで電磁バルブにより閉じ込められ、分析セル中の光共振器に入射された中赤外レーザーにより CRDS 測

定がなされる。得られた $^{14}\text{CO}_2$ 吸収スペクトルから ^{14}C が定量される。信号処理系として FPGA を用いたレーザー電流、および光スイッチの制御系を開発し、高分解能ディジタイザにより取得した光検出器からの減衰信号に対して、オンラインで指数関数フィッティングを行い、減衰率を評価するシステムを開発した。これにより、測定中に減衰率、およびスペクトルのモニタリングが可能となった。

感度向上に向けて、効率的に試料由来 CO_2 を封じ切る手法の開発を行った。カラムより放出された試料由来 CO_2 ガスが分析セルに到達する時間分布を評価した結果、カラムの温度上昇を封じきりのタイミングに使用できることが示された。また CRDS 分析セル内の CO_2 分圧を高めることを目的として、 CO_2 ガスが分析セルに到達する直前まで分析セル内を真空ポンプによって陰圧し、ガスを封じ切った際に CO_2 ガ스에混入するキャリアガスを低減する制御法を開発し、従来法と比較して 3 倍の分圧・信号量向上を確認した。また、カラムの後段に液体窒素冷却に基づく CO_2 トラップを導入し、 CO_2 分圧が 80% まで向上したことを示した。

(2) 性能向上に向けたエタロン効果抑制法・レーザー周波数安定化法の開発

^{14}C -CRDS 分析システムのアバンダンス感度向上を目指し、バックグラウンドノイズの一つであるエタロン効果抑制法を開発した。CRDS 分析の感度は減衰率のばらつきにより制限されることを示したうえで、スペクトル計算により、天然同位体比の感度を達成するためには 5 s^{-1} まで減衰率のばらつきを抑える必要があることを明らかとした。その主要、かつ支配的な要因にエタロン効果があることを示し、エタロン効果抑制法として、特にブリュースタースポイラーと温度変調によりエタロン効果の位相を変調し、平滑化する手法を組み合わせることで、エタロン効果を 5 分の 1 (100 s^{-1}) まで低減させることができた。これはアバンダンス感度で $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$ 相当であった。

天然同位体比以下のアバンダンス感度を達成するためには、エタロン効果をさらに抑制することに加えて、 ^{14}C -CRDS 分析システムで使用される DFB-QCL の発振周波数を光共振器の共鳴条件に対して十分なレベルまで安定化・狭帯域化する必要がある。そこで、遅延自己注入フィードバックに基づく **Passive feedback** 法、中赤外光周波数コム (OFC) を用いた安定化法の開発を行った。**Passive feedback** により DFB-QCL の線幅は 688 kHz から 347 kHz (3.5 m フィードバック長) まで減少した。一方で、外部共振器の環境変化に伴って中長期的な不安定性が増大することが示唆された。中長期的な安定性の向上のために、中赤外 OFC と DFB-QCL を干渉させビート信号

を取得し、その周波数が一定になるようなフィードバックをDFB-QCL電流にかけることで安定化を行った。これにより5分間の間、ビート周波数が一定に保たれ、その不安定性は1 MHz以下であることを示した。また、セットポイント周波数を変えることにより、安定化を行いつつも、DFB-QCLの周波数を掃引する手法を開発し、スペクトルを取得することで ^{14}C 同位体比の分析を行った結果、繰り返し測定を行った際の測定誤差が炭素の安定同位体比では1桁、 ^{14}C では2分の1程度低減され、目標であった1%以下の測定精度を達成した。

(3) 生体試料中 ^{14}C 分析性能の評価

開発された ^{14}C -CRDS分析システムの分析性能を、 ^{14}C 標識グルコース試料を用いた基礎実験により評価した。リングダウン信号取得によりシステムの基本動作を確認したうえで、冷却による干渉線強度の低減を確認し、283 Kから253 Kの冷却により安定炭素を含む CO_2 の干渉線強度が一桁低減したことを確認した。次に ^{14}C 含有量の違う複数の試料を測定し、 ^{14}C -CRDS分析システムの定量性を評価した。10,000 dpm ~ 1 dpm (167 ~ 0.017 Bq)、同位体比で $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 10^{-6} \sim 10^{-10}$ の範囲で良好な線形性を確認した(本結果時点ではエタロン効果抑制法は未導入)。微量 ^{14}C 試料を測定する実験により、エタロン効果抑制法・ CO_2 トラップを使用して感度向上を図った分析システムの検出感度は $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} = 2 \times 10^{-11}$ と評価され、検出限界は 1.7×10^{-3} Bq/sample (= 0.1 dpm/sample)であった。

ヒト生体試料(尿・血漿)に ^{14}C 標識グルコースを添加した試料を測定し、生体試料由来の干渉分子に埋もれない明瞭な $^{14}\text{CO}_2$ ピークを取得できた。評価された同位体比は想定された量と概ね一致し、本手法によりヒト生体試料中 ^{14}C を前処理なく分析可能なことを示した。

(4) 動物中薬物動態評価・植物中炭素動態評価への応用実証

^{14}C -CRDS分析システムの生体トレーサー分析への応用実証として医薬品開発における動物中薬物動態評価、および植物生理学における作物中炭素動態評価の実証実験を行った。

経口糖尿病用剤 ^{14}C 標識トルブタミドをラットに投与し、ラット中トルブタミドの排泄率評価実験を行った。、 ^{14}C -CRDS分析システムによる結果はLSCとよく一致し、両者の結果はトルブタミドの排泄に関する知見とも一致した。これより、LSCより100倍少ない、ヒトへの投与を想定した放射エネルギーでトルブタミドの排泄を評価でき、 ^{14}C -CRDS分析システムによる動物

中薬物動態評価を実証した。本実験による投与量はヒトに対する試験を想定した投与量であり、投与 ^{14}C 量に厳しい制限のあるマイクロドーズ (MD) 試験に本手法が適用可能であることが示された。

同様に本手法を植物生理学、特にイネの生産性向上に関する研究における炭素動態評価に応用する実験を行った。乾燥ストレスの有/無条件下で生育されたイネ試料を ^{14}C 標識し、光合成によりイネが葉から取り込んだ ^{14}C が、根に移送される時間的なトレンドを取得した。 ^{14}C の葉から根への炭素動態を明瞭に評価でき、乾燥ストレスの有無によってその動態が異なることを明らかとした。同時に、既存の分析手法と比較して数桁高い感度を有することから、より少ない投与放射エネルギー、試料量で同様の評価が可能であると考えられる。

以上より、上述した開発目標 (アバンダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 1.4 \times 10^{-11}$ ・ 検出限界 0.017 Bq/sample (= 1 dpm/sample) 以下 ・ 測定精度数% ・ 前処理なし ・ 測定時間 15 分以内/1 測定) に対し、アバンダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$ 、検出限界 $1.7 \times 10^{-3} \text{ Bq/sample}$ (= 0.1 dpm/sample)、測定精度 1% 以下、前処理なく生体試料の測定が可能で、上記性能を 15 分以内の測定で実現できる ^{14}C 分析システムを開発し、その性能を ^{14}C 標準試料・生体試料を用いて明らかとした。また、医薬品開発・植物生理学の二つの領域における ^{14}C トレーサー分析への応用を実証し、本システムの ^{14}C トレーサー応用への有用性を示した。

6.2 今後の展望

レーザー周波数安定化・狭帯域化法として、Passive feedback 法のミラーにピエゾ素子を取り付け、周波数掃引を可能とするなどの開発が進められ、エタロン効果のさらなる抑制法が開発されることにより、天然同位体比、またはそれ以下のアバンダンス感度が実現でき、本研究の発展として、本手法が医薬品開発領域における MD 試験や植物生理学における作物中炭素動態評価に適用されることが期待される。また、本分析法と様々な前処理装置、試料導入部を組み合わせることにより、呼気中 ^{14}C 濃度の分析や、代謝物中 ^{14}C 分析など、生体・環境中の様々な動態を多様かつ高感度に評価する手法が開発され、これまでにない新たな知見創出への貢献が望まれる。また、上述した 2 例以外にも、環境学や原子力分野など、高い感度とスループットが同時に求められる種々の ^{14}C 分析応用への本分析法の適用が望まれる。

謝辞

本研究を進め、本論文を執筆するにあたり、名古屋大学大学院工学研究科エネルギー理工学専攻の井口哲夫教授には、学部4年次から、研究全般に関するご指導・ご助言をいただき、人として何より大切な仁義について学ばせていただきました。また、本論文審査の主査として、ご指導をいただきました。同、富田英生准教授には、研究遂行に不可欠な基礎的な知識から様々な技術に至るまであらゆる面についてご教授いただき、本研究に対する議論に多くの時間を割いていただきました。また、研究に直接関連する内容だけではなく、企業や共同研究先とのコミュニケーション・交渉の方法から私生活に関することまで多くのことを学ばせていただきました。さらに、本論文においては副査としてご助言をいただきました。同、Volker Sonnenschein 助教には、本研究遂行に関する全ての事項について知識面・技術面で多大なご支援をいただき、特に、レーザー光源・光学系・光共振器に関して、大きな寄与をいただきました。日常的な英語での議論は大変刺激になりました。名古屋大学工学研究科総合エネルギー工学専攻の山澤弘実教授、東京大学大学院工学系研究科原子力専攻の長谷川秀一教授には本論文において副査としてご助言をいただきました。同様に、名古屋大学工学研究科総合エネルギー工学専攻の森泉純准教授、渡辺賢一准教授には本論文審査の審査委員としてご助言をいただきました。

共同研究先である、名古屋大学工学研究科電子工学専攻の西澤典彦教授・山中真仁助教・金磊助教（現東京大学工学研究科）には中赤外光周波数コムに関して多大なご協力をいただきました。また、吉田賢二氏、佐藤淳史博士をはじめ、積水メディカル株式会社創薬支援センター（旧薬物動態研究所）の皆様には、 ^{14}C -CRDS 分析システムの構築、 ^{14}C を含む試料の準備や動物実験においてご協力をいただくとともに、システムのユーザー的な視点から貴重なご意見を数多くいただきました。名古屋大学生命農学研究科の仲田麻奈助教（現在は名古屋大学農学国際教育研究センター所属）には、植物生理学に関する実験においてご協力をいただき、植物生理学の専門家として、数多くのご助言をいただきました。神谷直浩博士はじめ、島津製作所の皆様には分析装置開発の観点から大変貴重なご意見をいただきました。名古屋大学アイソトープ総合センター、および同放射線安全管理室の皆様には、施設内管理区域の利用について大変お世話になりました。

フィンランド Jyväskylä 大学の Iain D. Moore 教授には、同大学への留学の折に大変お世話になり、放射能分析・レーザー分光に関して多くのことを学ばせていただきました。名古屋大学理学研究科の杉山直教授はじめ、リーディング大学院 PhD プロフェッショナル登龍門スタッフの皆様には、修士1年次からお世話に

なり、通常では考えられないような様々な経験をさせていただきました。登龍門で培ったスポーク能力と経験、友人たちは私の宝です。特に登龍門スタッフでもあり、名古屋大学工学研究科電子工学専攻の藤巻朗教授には、登龍門における活動においてサポートをいただいただけでなく、キャリアに関するご相談等、様々な側面において大変お世話になりました。

名古屋大学工学研究科エネルギー理工学専攻井口研の弘津嵩大氏、緩詰聡士氏、林紀善氏、加藤修介氏、武田晨氏、齊藤圭亮君、奥山雄貴君とは、同じ CRDS グループとして、苦楽を共にしてきました。本研究遂行・本論文執筆には、各位のご協力が不可欠でした。また、井口研同期でもあり親友の、一ノ瀬裕一郎氏には、卒業後も強力な精神安定剤としてご活躍いただきました。また、上記に挙げたメンバーをはじめ、井口研の卒業生、現役生からは研究に限らず多くのことを学ばせていただきました。今泉翔一朗氏をはじめ名大 TFT プロジェクト、TFT-UA 東海支部メンバー各位には、対外的なメールの作成方法、効果的なプレゼン、グループワークの仕方、リーダーシップなど社会的なスキル・経験を研究室配属に先駆けて学ぶ場を提供していただきました。

以上、本研究・私自身を支えてくださいました皆様に厚く御礼を申し上げます。また、今後は一人の研究者として精進していく所存です。今後とも変わらぬご支援ご高配を賜りますよう、よろしく願いいたします。

最後に、登龍門の履修生仲間・工学研究科の博士課程仲間をはじめ、長い在学生活で培ったかけがえのない友人たち、執筆期間中自身の仕事もある中で食事を用意してくれたパートナー、そして何より、内心では早く安定してほしいと願っているにも関わらず、表に出すことはなく、好きなことを好きなようにやりなさいと力強く背中を押し、経済的にも惜しみない支援をしてくれた父母、祖父母、姉に心から感謝の意を申し上げます。

2019 年 6 月
寺林稜平

本論文を構成している発表論文

学会誌等

- 1) V. Sonnenschein, R. Terabayashi, H. Tomita, T. Hirotsu, S. Yuruzume, N. Hayashi, L. Jin, M. Yamanaka, N. Nishizawa, A. Sato, A. Omori, A. Ideno, T. Oh-hara, T. Iguchi, “Development of CO₂ Cavity Ring-Down Spectroscopy for Medical Applications”, JPS Conference Proceedings, **11**, 060003:1-6 (2016).
- 2) R. Terabayashi, V. Sonnenschein, H. Tomita, N. Hayashi, S. Kato, L. Jin, M. Yamanaka, N. Nishizawa, A. Sato, K. Nozawa, K. Hashizume, T. Oh-hara, T. Iguchi, ”Optical Feedback in DFB Quantum Cascade Laser for Mid-Infrared Cavity Ring-down Spectroscopy”, *Hyperfine Interact*, **238**, 1-7 (2017).
- 3) 寺林稜平、Volker Sonnenschein、富田英生、佐藤 淳史、林紀善、加藤修介、金磊、山中真仁、西澤典彦、野沢耕平、橋爪研太、井口哲夫、「高感度レーザー分光に基づく生体試料中放射性炭素同位体分析システムの開発」、*RADIOISOTOPES*、第 67 巻第 3 号、pp. 85-91 (2018).
- 4) 寺林稜平、Volker Sonnenschein、富田英生、林紀善、加藤修介、武田晨、金磊、山中真仁、西澤典彦、井口哲夫、佐藤淳史、野沢耕平、吉田賢二、「キャビティリングダウン分光に基づく生体試料中放射性炭素同位体分析法の開発」、*放射線*、第 44 巻第 1 号、pp. 17-21 (2018).
- 5) V. Sonnenschein, R. Terabayashi, H. Tomita, S. Kato, N. Hayashi, S. Takeda, L. Jin, M. Yamanaka, N. Nishizawa, A. Sato, K. Yoshida, T. Iguchi, “A Cavity Ring-down Spectrometer for Study of Biomedical Radiocarbon-labeled Samples”, *Journal of Applied Physics*, **124**, 033101:1-9 (2018).
- 6) R. Terabayashi, V. Sonnenschein, H. Tomita, N. Hayashi, S. Kato, S. Takeda, L. Jin, M. Yamanaka, N. Nishizawa, A. Sato, K. Nozawa, K. Yoshida, T. Iguchi, “Background Noise Reduction in Mid-Infrared Cavity Ring-Down Spectroscopy for Radiocarbon Analysis”, JPS Conference Proceedings, **24**, 011024:1-6 (2019).

国際会議等

- 7) R. Terabayashi, V. Sonnenschein, H. Tomita, N. Hayashi, S. Kato, S. Takeda, L. Jin, M. Yamanaka, N. Nishizawa, A. Sato, K. Yoshida, K. Nozawa, T. Iguchi, “Mid Infrared Cavity Ring-Down Spectroscopy for Radiocarbon Analysis toward Medical Applications”, The 7th Advanced Lasers and Photon Sources (ALPS2018), April 24-27, Yokohama (Japan), ALPS2-H-3 (2018).
- 8) R. Terabayashi, “Development of Novel Method of Radiocarbon Detection based on Mid-Infrared Cavity Ring-Down Spectroscopy”, Fukushima Research Conference on Development of Analytical Techniques in Waste Management (FRCWM2018), June 19-20, Fukushima (Japan), 8.1 (2018).
- 9) R. Terabayashi, V. Sonnenschein, H. Tomita, K. Saito, S. Kato, S. Takeda, M. Yamanaka, N. Nishizawa, M. Kano-Nakata, K. Yoshida, N. Kamiya, S. Yamamoto, T. Furukawa, T. Iguchi, "Development of Radiocarbon Analysis System with Mid-infrared Cavity Ring-down Spectroscopy for Biological and Environmental Tracer Applications", International Conference Merger of the Poznan Meeting on Lasers and Trapping Devices in Atomic Nuclei Research and the International Conference on Laser Probing (PLATAN2019), May 19-24, Mainz (Germany), 59 (2019).

なお、本論文では各章にて以下の通り参考にした。

第2章：1)、3)、5)、6)

第3章：1)、4)、5)、8)

第4章：5)、7)

第5章：9)

第6章：2)、7)