

レーザートラップ・ラマン顕微鏡を用いる生体分子の分光分析化学

味戸 克裕

Spectroscopy and Analytical Chemistry of Biological Molecules Using a Laser Trapping Raman Microscope

Katsuhiko AJITO

A laser-trapping Raman microscope developed by combining optical tweezers with a near-infrared Raman microscope enables us to noninvasively analyze biological and organic molecules in single particles ranging from micrometers to nanometers. The laser-trapping Raman spectroscopy (LTRS) is advantageous for obtaining various kinds of information about species, structures, and conformation of molecules in single particles, and shows high performance as a tool for *in-situ* chemical analysis to reveal the roles of biological molecules in cells. The LTRS system can capture single polymer nanoparticles, as small as 40 nm in diameter by the force of optical radiation pressure and has enough sensitivity to obtain their Raman spectra. This paper describes applications of the LTRS system to the detection of neurotransmitters, lipids, and proteins in single nerve terminals isolated from neurons.

Key words: Raman spectroscopy, laser trapping, neurotransmitters, single particles

グルタミン酸, γ -アミノ酪酸, グリシンは, 脳神経のシナプスにおいて, 情報伝達にかかわる神経伝達物質としてよく知られている. 特に興奮性の神経伝達物質のひとつであるグルタミン酸に対しては, さまざまなバイオセンサーが開発されており, 神経細胞における情報伝達機能を解明するため精力的な研究が行われている¹⁻³⁾. 神経伝達物質は, シナプスとよばれるニューロン相互の接合部で放出される. 神経伝達物質を保持する前シナプス側の末端部分を単離したものは神経終末 (nerve terminal) またはシナプトソーム (synaptosome) とよばれ, 神経伝達物質の取り込み, 保持, エキソサイトーシスなどの情報伝達の機能を調べるために用いられている^{4,5)}. エキソサイトーシスとは開口分泌ともいい, シナプス小胞のように単位膜に包まれた分泌顆粒が細胞膜に接着し, 融合・開口という順序で内部の物質を放出する方式であり, 放出した抜け殻の分泌顆粒は細胞内に引き込まれるのが特徴である. 図1に示すように, このシナプトソームの大きさは 500 nm 程度であり,

シナプス小胞 (synaptic vesicle) とよばれる膜タンパク質を含む 50 nm 程度の脂質二分子膜の小胞 (ベシクル) を多数含んでおり, 単離後の数時間は, その中の神経伝達物質にかかわる機能をほとんど失わないことが知られている. このシナプトソームを用いたグルタミン酸の放出機構の研究はこれまで蛍光分光などを用いて行われてきているが⁶⁻⁸⁾, シナプトソーム 1 個に対する測定は困難であり, またグルタミン酸の局所的な pH など, 分子の状態に関する情報が不十分であった.

筆者らの開発したレーザートラップ・ラマン顕微鏡で, シナプトソーム 1 個をレーザー光の放射圧によって捕捉し, 同時にそのレーザー光で励起されたラマン分光スペクトルより微粒子内分子の分析が可能である. この方法は, 単一シナプトソーム内でのグルタミン酸のキャラクタリゼーションを可能とし, これまで *in-situ* 分析が困難であった 1 μ m 以下の細胞小器官 (オルガネラ) を調べる方法のひとつとして有用なものであると思われる. レーザートラ

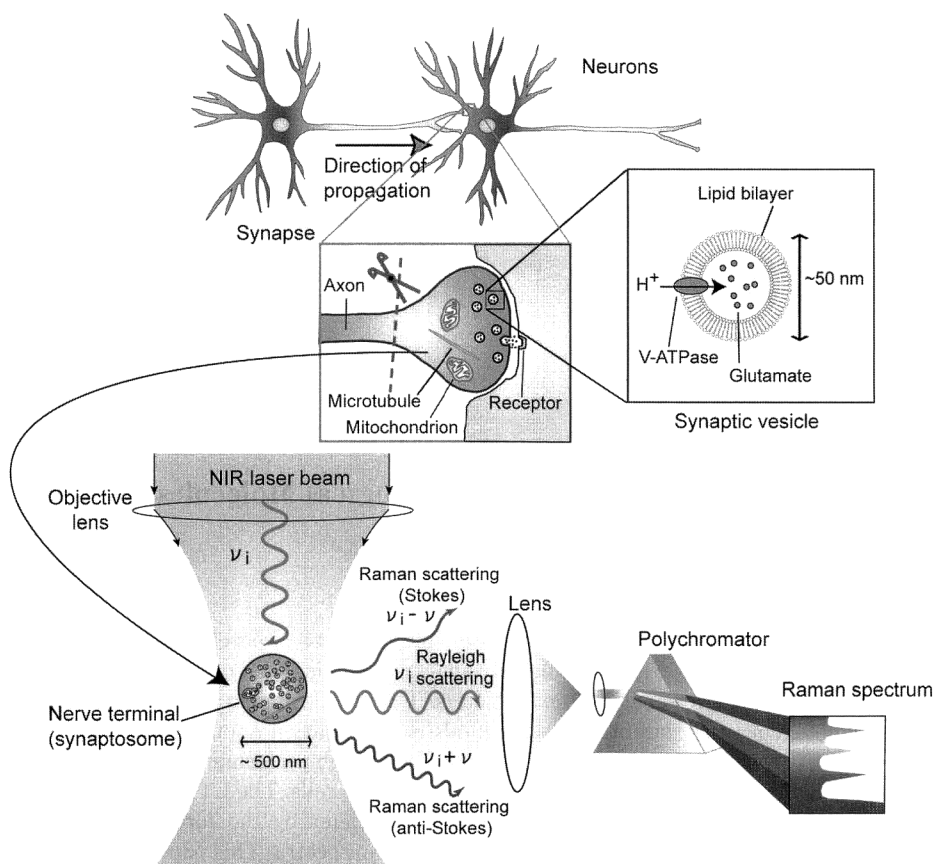


図1 神経終末（シナプトソーム）のモデル図とレーザートラップ・ラマン分光法の概念図。（カラー口絵参照）

ップ法の基本原理，ラマン分光法との融合システムの装置系を含め，本稿で解説する。

1. 単一微粒子のトラップ法とレーザートラップ・ラマン顕微鏡

微粒子1個を分光分析するためには，微粒子を捕捉するためのトラップ法が必要となる．おもな方法としては，電場を用いる electrodynamic balance (EBD) 法と光の放射圧を用いるレーザートラップ法がある．EBD 法は，直流と交流の電場を用いて1個または複数の帯電した微粒子をトラップする方法であり，気相中でのエアロゾル粒子のトラップによく利用されている⁹⁾．これまでに EBD 法を分光法と組み合わせる分析法が報告されており，赤外吸収分光法の場合は，気相中でトラップされた分子を同定するために使われている¹⁰⁾．さらに，スペクトル分解能の高いラマン分光法と EBD 法を組み合わせることで，大気環境計測として重要なエアロゾル中に含まれる硝酸イオンや硫酸イオンなどの無機イオンの定量分析に有効なことが示されている¹¹⁾．特に，ラマン分光法を高感度化するために広く用いられる共鳴ラマン散乱法により，EDB トラップされたエアロゾル粒子中の色素分子からのラマン散乱を増強すること

が可能である¹²⁾．さらに，O-H や C-H 結合の伸縮振動モードなどのブロードなピークがある場合は，morphology-dependent resonances (MRDs) 法を利用することができる．この方法は，粒子のサイズと屈折率が干渉の条件を満たすと，ラマン散乱が弾性的に増強されるものである¹²⁾．

一方，レーザートラップ法は，有機微粒子（微小液滴，エアロゾル粒子，ラテックスビーズ，マイクロカプセルなど）¹³⁻¹⁶⁾をはじめバクテリア，血液細胞などのマイクロメートルサイズの微小生体組織¹⁷⁻²¹⁾の非破壊マニピュレーション法として広く利用されている．微粒子をトラップするレーザートラップ法は，Ashkin によって2本のレーザー光を用いる方法が提案された²²⁾．その後，1本のレーザー光を顕微鏡の対物レンズにより集束し，勾配放射圧を発生させる方法が Chu らにより報告されることで，より実用的な技術となった²³⁾．レーザー光を屈折率（すなわち誘電率）の大きな微粒子に集束すると，光の焦点部分では電場が大きくなる．誘電体は電場の大きなところに引き寄せられるので，微粒子がトラップされるというのがレーザートラップ法の原理である．特に，近赤外域（波長：700~1100 nm 程度）のレーザー光を使うことで，レーザートラップ法による生体試料のトラップやマニピュレーショ

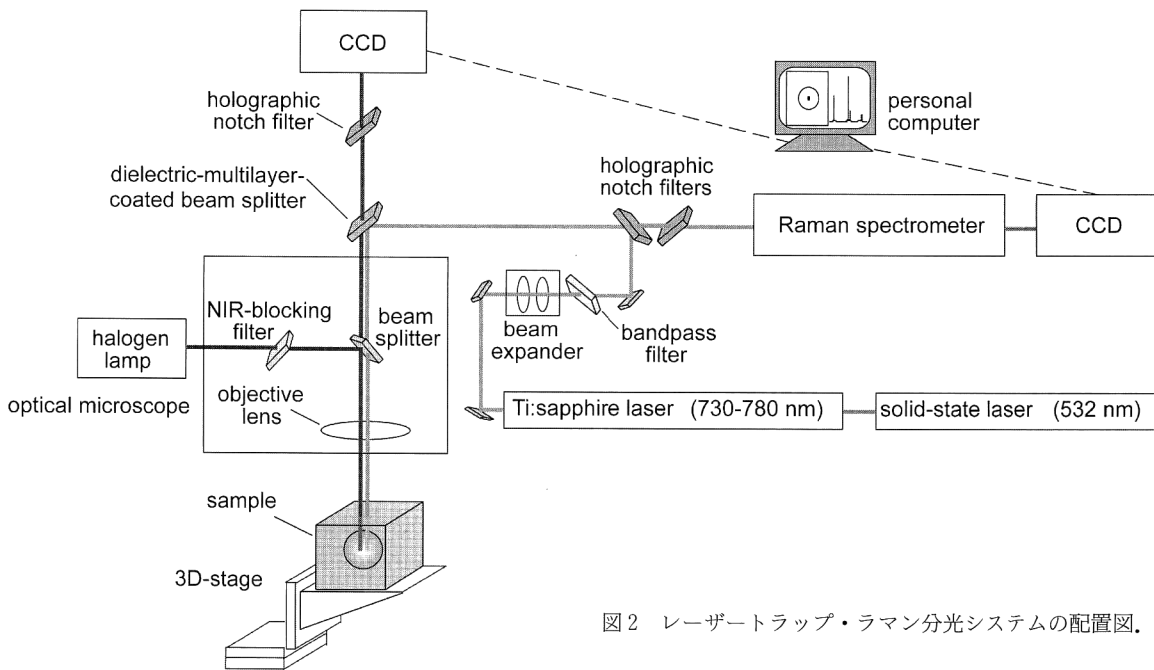


図2 レーザートラップ・ラマン分光システムの配置図。

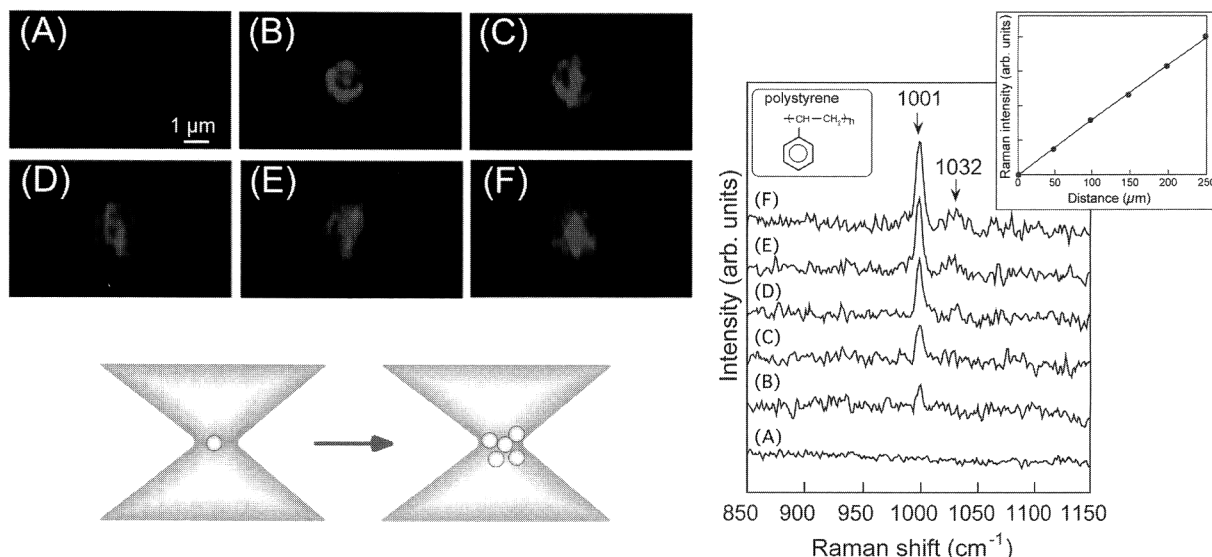


図3 レーザートラップされたラテックス粒子 (40 nm) からのレーザー光干渉パターンおよび対応したラマンスペクトル。(A)～(F) でのトラップされた粒子数は0～5個に相当する。

ンが可能となる。これは可視や紫外域のレーザー光では光化学反応による試料へのダメージがあり、また波長が長すぎると水の吸収があるためである。

レーザートラップ法が実用上対象となる有機微粒子や生体組織の大きさは、20 nm～20 μm 程度である。これよりも小さいDNAなどの単一分子のマニピュレーションは、分子の末端を修飾しラテックスビーズを取り付けることで実現している²⁴⁻²⁶⁾。分析化学では、長さ単位のナノメートルより容量単位のナノリットル (nL) がよく使われ、より小さな単位としてアトリットル (aL, 10⁻¹⁸ L) やzeptoリットル (zL, 10⁻²¹ L) など、一般には聞き慣れない単位も

使われる。zeptoリットルは10 nmの立方体の体積であり、ウイルス、リボゾーム、シナプス小胞など非常に小さなオルガネラの大きさに相当するナノ分析化学の単位である。1 mMの溶液は分析化学としては大して低い濃度という印象はないが、1 zL容量の分子数を見積もると、 $6 \times 10^{23} \times 10^{-3} \times 10^{-21} = 0.6$ (個) であり、なんと1分子以下に相当する。レーザートラップ法は、分光法などの分析手法と組み合わせることによって、液滴やマイクロカプセルにおける物質の拡散、電子移動、光重合といったさまざまな化学反応を単一微粒子レベルで分析することができる。電気化学的測定法²⁷⁾、蛍光分光法²⁷⁾、ラマン分光法^{15,28-31)}な

ど、さまざまな応用が報告されている。特にラマン分光法は、分子の種類、構造、コンフォメーションに関する多くの情報が得られる点で有利である。

単一微粒子のラマン分光測定においては、可視レーザー光が広く用いられ、近赤外レーザー光は最近まで使われていなかった。これは、近赤外ラマン分光法の顕微分析としての感度が可視のものに比べ低かったからである。筆者らは、高感度の近赤外顕微ラマン分光法とレーザートラップ法とを組み合わせることで、単一微粒子中の生体分子や有機分子の非破壊分析を可能にする新しいレーザートラップ・ラマン顕微鏡を開発した。図2に、レーザートラップ・ラマン分光システムの光学系を示す³²⁻³⁴。連続発振、単一周波数、TEM₀₀モードのチタンサファイア (Ti:S) レーザー (波長 730~780 nm) を、レーザートラップとラマン分光の両方に用いている。Ti:S レーザーのポンプ光は波長 532 nm の固体レーザーである。顕微ラマン分光器は、近赤外光用に最適化するため改良を行っている。ビーム径を調整されたレーザー光はバンドパスフィルターを通った後、試料の光学イメージモニター用の光学系を経て、顕微鏡に導かれている。顕微鏡には高開口数 (0.8~1.4) の対物レンズがマウントされており、レーザー光 (出力: 80~150 mW) はこの対物レンズによって直径 1 μm 程度に集束されている。試料からの反射光や散乱光は、入射光に対し 180° の後方位置で、レーザー光集束用と同じ対物レンズにより集光されている。2つのホログラフィック・ノッチフィルター (レーザー波長透過率: 約 10⁻¹⁴%, その他の波長域透過率: 約 64%) を通った散乱光は、シングル・ポリクロメーター (焦点距離: 25 cm, グレーティング: 1200 本/mm) の入射スリットへ集束される。分散されたラマン散乱光は、ペルチェ素子で 200 K に冷却された高感度の CCD 検出器 (画素: 384×576) に結像される。ここで、トラップされた微粒子からの散乱光のみを検出するため、分光器の入射スリットとそれに直交する CCD 検出器の読み出しウィンドウを用いた共焦点配置を用いており、約 1.6 fL の検出容量を実現している。また、トラップされた試料の光学イメージの観察をラマン分光測定と同時に行えるように、別の CCD 検出器が顕微鏡に取り付けられている。こちらの CCD 検出器への光路はビームスプリッターにより分岐され、光学イメージを観察しながらのラマン分光測定が可能となっている。

2. 単一ナノ粒子のラマン分光

レーザートラップ法は通常、光学イメージから確認できる直径約 1 μm 以上の大きさの粒子に対して多く利用されている。レーザートラップ法では、さらに小さなナノメー

トルサイズの微粒子 (ナノ粒子) をトラップできることが報告されているが、ラマン分光測定では微粒子の体積が小さくなるにつれてその散乱断面積が減るため、スペクトル測定は難しくなる。ここでは、ラマン分光によるナノ粒子の検出について紹介する³⁵。

試料として水中に分散させたポリスチレン系ラテックス粒子 (直径: 40 nm, 屈折率: 1.59) を 1 ppm 濃度に調整し、ガラスセル中に入れ可動ステージ上に固定した。図3は、試料溶液にレーザー光を照射したときのレーザーでトラップされたナノ粒子のレーザー干渉パターンイメージと、それに対応したラマンスペクトルである。(A) はトラップ前であり、イメージとラマンスペクトルでは何も検出されていない。その後、ステージを 50 μm ずつ連続的に移動させたときのイメージとスペクトル変化を (B) ~ (F) に示す。ナノ粒子 1 個をトラップすると、イメージ (B) のように円状の干渉パターンがみられ、ラマンスペクトルに 1001 cm⁻¹ のフェニル基のモードのピークが現れている。十分希薄な溶液中では、レーザースポット近傍に他のナノ粒子が存在しないため、単一ナノ粒子をトラップすることができたと考えられる。さらに、スペクトル (C) ~ (F) でラマンのピーク強度が増加したことは、トラップしている粒子数が増加したことを示している。このラマンピーク強度の増加は離散的であり、(C) ~ (F) のピーク強度は (B) のピーク強度の整数倍であることから、(B) は単一ナノ粒子からのスペクトルであることが確認された。この結果は、ラマン分光を用いることによって、回折限界以下の大きさのナノ粒子であっても、レーザーでトラップされている個数や含まれる分子の情報を十分得ることが可能であることを示している。

3. レーザートラップ・ラマン顕微鏡による神経伝達物質のモニタリング

図4に、レーザートラップ・ラマン顕微鏡を用いた、神経終末 (シナプトソーム) というオルガネラ 1 個のラマン分光の測定例を示す³⁶⁻³⁸。図に示すように、試料溶液は、ラットの大脳組織から抽出したシナプトソームをリン酸緩衝液中に分散して調製している。シナプトソームは直径 500 nm 程度の球状のオルガネラで、内部には多数のシナプス小胞のほか、ミトコンドリアも含まれていることが、透過型電子顕微鏡像からわかる。シナプトソームは単離後数時間活性をもち続け、神経伝達物質の取り込み、貯蔵、エキソサイトーシスなどの機能を保持できることが知られている。このシナプトソームの試料溶液をガラスセル中に入れ、対物レンズ下のステージ上に固定した。試料濃度を十

分に希薄にすることで、シナプトソーム1個のトラップを行うことが可能となる。

図5に、レーザーでトラップされた単一シナプトソームのレーザー干渉パターンイメージと、それに対応したラマンスペクトルの時間変化を示す。1個の微粒子を安定にトラップしたときは、円状の干渉パターンが現れる。神経伝達物質の放出過程を調べるため、20分後に4アミノピリジン(4AP)を濃度が4 μ Mとなるよう溶液中に添加しているが、この円状の干渉パターンは安定していることがわかる。4APは神経性興奮を調節するK⁺チャンネルの阻害剤として働き、シナプトソームがまるで離れた軸索から活動電位を受け取っているかのように、繰り返しNa⁺チャンネルが興奮することで脱分極し、エキソサイトーシスによって神経伝達物質が放出されることが知られている。ラマンスペクトルの1445 cm⁻¹のピークはCH₂変角振動のモードであり、1657 cm⁻¹のピークはアミドIのモードである。なお、溶液からのラマン散乱光はバックグラウンドとして除去されている。CH₂変角振動のモードは脂質の膜からのもの、アミドIのモードは膜に含まれるさまざまなタンパク質からのものと考えられる。これらシナプトソーム中での脂質やタンパク質は分子の数が多く、ラマン散乱断面積が大きいので、その散乱光はスペクトル上のピークとして大きく現れるので、シナプス小胞に含まれるアミノ酸などの神経伝達物質をこのスペクトルから直接同定することは困難であった。

図6(a)では、4APを添加してシナプトソームでのエキソサイトーシスによる神経伝達物質の放出が終わり、十分時間が経った50分後のラマンスペクトルを、バックグラウ

ンドとして0~40分後の各ラマンスペクトルから差し引いている。この処理によって、タンパク質や脂質の強度の大きなピークを除くことができ、グルタミン酸に帰属される4つのピークが現れている。ピークC(1616 cm⁻¹)はNH₃⁺COO⁻基のCOO⁻伸縮振動モードであり、ピークA(1344 cm⁻¹)とピークD(1727 cm⁻¹)はそれぞれCOOH基のCH₂変角振動モードとC=O伸縮振動モードである。ピークBは1つのモードではなく、COO⁻対象伸縮振動モード、CH₂変角モード、NH₃⁺変角振動モードなどが混在していると考えられる。グルタミン酸は、シナプス小胞内で他の神経伝達物質より高い50~100 mMの高濃度であるとされ、これが単一シナプトソームでの同定を可能にしている。ピークの高さは20~30 photons/sであり、高いバックグラウンドの中では検出限界に近い値であると思われる。ピークA~Dの4つのピークは4APの添加により減少し、最後には消失している。これは、エキソサイトーシスによるグルタミン酸の放出のためである。シナプス小胞

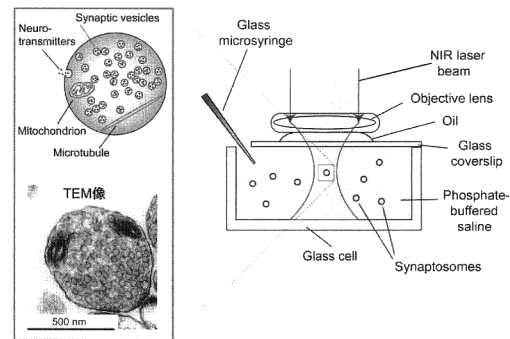


図4 神経終末(シナプトソーム)の透過型電子顕微鏡像とレーザートラップするための実験系。

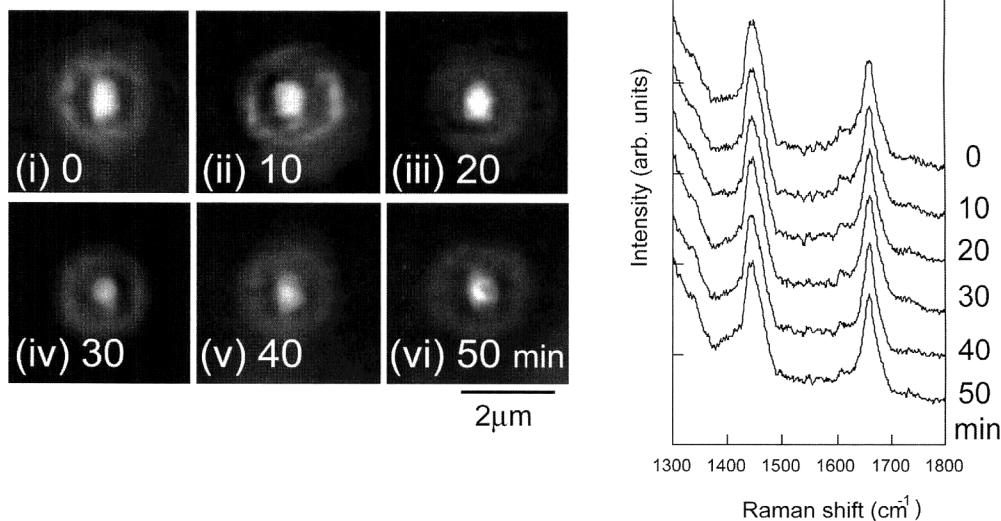


図5 レーザートラップされた単一シナプトソームからのレーザー光干渉パターンおよびラマンスペクトルの時間変化。20分後からは4アミノピリジンを添加した様子を示す。

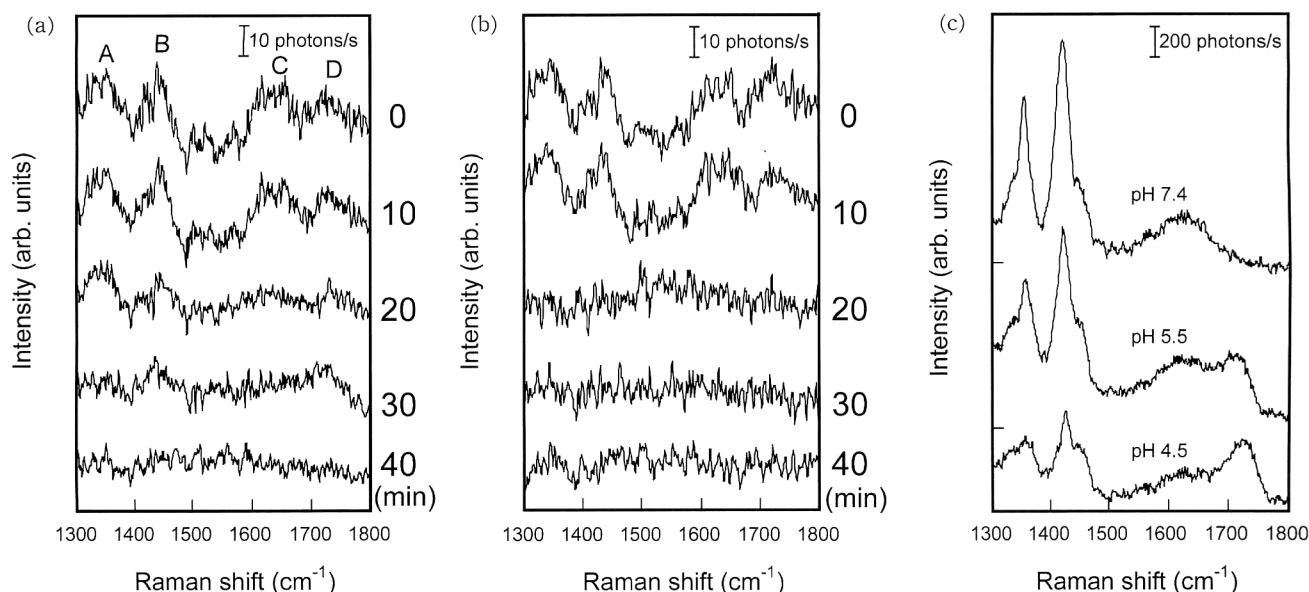


図6 単一シナプトソームからのグルタミン酸放出過程におけるラマンスペクトル変化. 20分後に, 4アミノピリジン (K^+ チャネル阻害剤, 濃度: (a) $4 \mu\text{M}$, (b) $10 \mu\text{M}$) を添加している. (c) グルタミン酸バルク水溶液のラマンスペクトル (濃度: 50 mM).

のエキソサイトーシスの過程ではグルタミン酸の再取り込みが行われるため, 放出が数十分という長い時間にわたり観測されていると考えられる. 図6(b)は, 図6(a)と同様の実験を, 4APの濃度を2.5倍の $10 \mu\text{M}$ に変えて測定した結果である. この場合, グルタミン酸のピークの消失が早まっていることから, 放出過程と4APの濃度に関係があることがわかる. 図6(c)は, グルタミン酸のバルクの水溶液 (pH 4.5~7.4) の結果を比較のため示している. シナプス小胞内のpHは約5.5であり, 内部pHとよばれている. シナプス小胞内が酸性であるのは, 図1で示しているように, 脂質二分子膜内にあるV-ATPaseというプロトンポンプの作用によるものである. 内部が酸性になることによって, グルタミン酸がプロトン化されながらシナプス小胞内に移動し蓄えられる. スペクトルで特徴的なのは, 図6(a)のピークD (1727 cm^{-1}) に対応するCOOH基のC=O伸縮振動モードが, 図6(c)のpH 7.4の場合にはみられないことである. このように, バルク溶液とシナプトソームのラマンスペクトルの比較によって, シナプス小胞内のグルタミン酸は酸性であることが確認された. また, 共焦点配置で検出される容量とスペクトルから見積もられるグルタミン酸の平均濃度 (約 2 mM) との関係から, 4APの添加によりシナプトソーム1個から放出されたグルタミン酸量は約3アトモル (amol) であることがわかった. シナプトソームには他のアミノ酸の神経伝達物質も含まれていると考えられるが, それらの検出には, さらにシステムの高感度化が必要不可欠であると考えられる.

本稿では, レーザートラップ・ラマン顕微鏡について, その装置系から脳神経科学への応用までを紹介した. これまでのバイオフィジクスでのレーザートラップ法の応用は, 光学顕微鏡で観察しながらの細胞レベルがほとんどであったが, 本顕微鏡の登場によって, 数十~数百nmの小さなオルガネラの分光分析法として活用できることが示された. 今後は, 表面増強ラマン散乱などの活用によってラマン分光の検出感度の高感度化を図ることで, その適用範囲をさらに広げることが可能であると考えている.

本稿をまとめるにあたりご支援をいただいたNTT物性科学基礎研究所の各位に感謝いたします.

文 献

- 1) A. Hirano, N. Moridera, M. Akashi, M. Saito and M. Sugawara: "Imaging of L-glutamate fluxes in mouse brain slices based on an enzyme-based membrane combined with a difference-image analysis," *Anal. Chem.*, **75** (2003) 3775-3783.
- 2) J. Cordek, X. Wang and W. Tan: "Direct immobilization of glutamate dehydrogenase on optical fiber probes for ultrasensitive glutamate detection," *Anal. Chem.*, **71** (1999) 1529-1533.
- 3) N. V. Kulagina, L. Shankar and A. C. Michael: "Monitoring glutamate and ascorbate in the extracellular space of brain tissue with electrochemical microsensors," *Anal. Chem.*, **71** (1999) 5093-5100.
- 4) D. G. Nicholls: "Bioenergetics and transmitter release in the isolates nerve terminal," *Neurochem. Res.*, **28** (2003) 1433-1441.
- 5) A. G. M. Leenders, G. Scholten, V. M. Wiegant, H. L. D. Silva and W. E. J. M. Ghijsen: "Activity-dependent neurotransmitter release kinetics: Correlation with changes in morphological distributions of small and large vesicles in

- central nerve terminals," *Eur. J. Neurosci.*, **11** (1999) 4269-4277.
- 6) M. S. Perkinson and T. S. Shira: "A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes)," *Neuroscience*, **90** (1999) 1281-1292.
 - 7) H. T. McMahon and D. G. Nicholls: "Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: Evidence for biphasic release and triggering by localized Ca^{2+} ," *J. Neurochem.*, **56** (1991) 86-94.
 - 8) G. R. Tibbs, A. P. Barrie, F. J. E. Van-Mieghem, H. T. McMahon and D. G. Nicholls: "Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: Effects on cytosolic free Ca^{2+} and glutamate release," *J. Neurochem.*, **53** (1989) 1693-1699.
 - 9) J. F. Widmann, C. L. Aardahl and E. J. Davis: "Microparticle Raman spectroscopy," *Trends Anal. Chem.*, **17** (1998) 339-345.
 - 10) N. Kitamura, H.-B. Kim, S. Habuchi and M. Chiba: "Space- and time-resolved spectroscopic analyses in micrometer dimensions," *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999) 675-684.
 - 11) G. S. Grader, S. Arnold, R. C. Flagan and J. H. Seinfeld: "Fourier-transform infrared-spectroscopy of a single aerosol-particle," *J. Chem. Phys.*, **86** (1987) 5897-5903.
 - 12) K. H. Fung, D. G. Imre and I. N. Tang: "Detection limits for sulfates and nitrates in aerosol particles by Raman spectroscopy," *J. Aerosol Sci.*, **25** (1994) 479-485.
 - 13) K. H. Fung and I. N. Tang: "Analysis of aerosol-particles by resonance Raman-scattering technique," *Appl. Spectrosc.*, **46** (1992) 159-162.
 - 14) K. E. Miller and R. E. Synovec: "Review of analytical measurements facilitated by drop formation technology," *Talanta*, **51** (2000) 921-933.
 - 15) K. Ajito and K. Torimitsu: "Near-infrared Raman spectroscopy of single particles," *Trends Anal. Chem.*, **20** (2001) 255-262.
 - 16) H.-B. Kim, S. Yoshida, A. Miura and N. Kitamura: "Direct excitation energy transfer as a technique for *in situ* measurements of ion-exchange processes in single polymer particles," *Anal. Chem.*, **70** (1998) 111-116.
 - 17) A. Ashkin, J. M. Dziedzic and T. Yamane: "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams," *Nature*, **330** (1987) 769-771.
 - 18) M. W. Berns, J. R. Aist, W. H. Wright and H. Liang: "Optical trapping in animal and fungal cells using a tunable, near-infrared titanium-sapphire laser," *Exp. Cell Res.*, **198** (1992) 375-378.
 - 19) K. König, Y. Liu, G. J. Sonek, M. W. Berns and B. J. Tromberg: "Autofluorescence spectroscopy of optically trapped cells," *Photochem. Photobiol.*, **62** (1995) 830-835.
 - 20) K. Svoboda and S. M. Block: "Biological applications of optical forces," *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23** (1994) 247-285.
 - 21) M. P. Sheetz ed.: *Laser Tweezers in Cell Biology; Methods in Cell Biology (Vol. 55)* (Academic Press, California, 1998).
 - 22) A. Ashkin: "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure," *Phys. Rev. Lett.*, **24** (1970) 156-159.
 - 23) A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm and S. Chu: "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Opt. Lett.*, **11** (1986) 288-290.
 - 24) T. T. Perkins, S. R. Quake, D. E. Smith and S. Chu: "Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy," *Science*, **264** (1994) 822-826.
 - 25) M. S. Z. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier and C. Bustamante: "Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers," *Science*, **276** (1997) 1112-1116.
 - 26) S. R. Quake, H. Babcock and S. Chu: "The dynamics of partially extended single molecules of DNA," *Nature*, **388** (1997) 151-154.
 - 27) K. Nakatani, T. Uchida, H. Misawa, N. Kitamura and H. Masuhara: "Electrochemistry and fluorescence spectroscopy of a single, laser-trapped oil droplet in water—Mass-transfer across microdroplet water interface," *J. Phys. Chem.*, **97** (1993) 5197-5199.
 - 28) C. Esen, T. Kaiser and G. Schweiger: "Raman investigation of photopolymerization reactions of single optically levitated microparticles," *Appl. Spectrosc.*, **50** (1996) 823-828.
 - 29) M. Trunk, J. Popp, M. Lankers and W. Kiefer: "Microchemistry: Time dependence of an acid-base reaction in a single optically levitated microdroplet," *Chem. Phys. Lett.*, **264** (1997) 233-237.
 - 30) J. Musick, J. Popp, M. Trunk and W. Kiefer: "Investigations of radical polymerization and copolymerization reactions in optically levitated microdroplets by simultaneous Raman spectroscopy, Mie scattering, and radiation pressure measurements," *Appl. Spectrosc.*, **52** (1998) 692-701.
 - 31) D. P. Cherney, J. C. Conboy and J. M. Harris: "Optical-trapping Raman microscopy detection of single unilamellar lipid vesicles," *Anal. Chem.*, **75** (2003) 6621-6628.
 - 32) K. Ajito: "Combined near-infrared Raman microprobe and laser trapping system: Application to the analysis of a single organic microdroplet in water," *Appl. Spectrosc.*, **52** (1998) 339-342.
 - 33) K. Ajito and M. Morita: "Imaging and spectroscopic analysis of single microdroplets containing *p*-cresol using the near-infrared laser tweezers/Raman microprobe system," *Surf. Sci.*, **428** (1999) 141-146.
 - 34) K. Ajito, M. Morita and K. Torimitsu: "Investigation of the molecular extraction process in single subpicoliter droplets using a near-infrared laser Raman trapping system," *Anal. Chem.*, **72** (2000) 4721-4725.
 - 35) K. Ajito and K. Toimitsu: "Single nanoparticle trapping using a Raman tweezers microscope," *Appl. Spectrosc.*, **56** (2002) 541-544.
 - 36) K. Ajito and K. Toimitsu: "Laser trapping and Raman spectroscopy of single cellular organelles in the nanometer range," *Lab Chip*, **2** (2002) 11-14.
 - 37) K. Ajito: "Raman spectroscopy of a single microdroplet," *Single Organic Nanoparticles*, eds. H. Masuhara, H. Nakanishi and K. Sasaki (Springer, Berlin, 2003) Chapter 22, pp. 285-296.
 - 38) K. Ajito, C. Han, K. Torimitsu: "Detection of glutamate in optically trapped single nerve terminals by Raman spectroscopy," *Anal. Chem.*, **76** (2004) 2506-2510.

(2004年9月2日受理)