

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18350042
 研究課題名（和文）液中微粒子のレーザー光泳動における非線形現象の解明と分析化学的応用
 研究課題名（英文）Study on Non-linear Laser-Photophoretic Phenomena of Micro-Particles in Liquids and its Application to Particle Separation
 研究代表者
 文珠四郎 秀昭 (MONJUSHIRO HIDEAKI)
 大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・放射線科学センター・教授
 研究者番号：80191071

研究成果の概要：液体中に存在する固体、液体、気体微粒子にレーザー光を照射し、光の吸収に起因する、光吸収性の微粒子のレーザー光泳動速度の増幅現象や気泡のレーザー照射位置へのトラップ現象など特異な微粒子の挙動を発見した。詳細な実験と解析により、これらの現象の機構が、レーザー光の吸収とそれに伴う局所的な熱の発生によるものであることを明らかにした。さらにこれらの現象を利用した微粒子の分離分析法の提案を行った。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 8,500,000 | 2,550,000 | 11,050,000 |
| 2007年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,110,000 |
| 2008年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,300,000 | 4,590,000 | 19,890,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：分離分析

1. 研究開始当初の背景

複数の化学種が作る集合体やクラスター、高分子量をもつDNAやタンパク、その集合体のような集合体の化学的・生物学的な機能を解明するためには、その分離分析が必要不可欠であるが、現在の分離分析技術ではこのような巨大分子や集合体の分離とキャラクター化は困難である。このような巨大分子や集合体の分離法として、我々は、レーザー光の輻射圧を利用する溶液中の微粒子の泳動現象を利用したレーザー光泳動分離法の提案、開発を行ってきた。

これまでに、サブマイクロメートルからマイクロメートルサイズの微粒子の光泳動速度の実験的、理論的解明を進め、光泳動速度は半径と屈折率に依存し、その挙動はMie散乱理論により説明できることを明らかにした。また、微粒子が光を吸収する場合には、輻射圧だけでなく光熱変換による微粒子周囲のミクロな温度勾配の生成、相分離などが起こり、泳動速度の変化や泳動方向の逆転など複雑な挙動を呈することを発見した。

これらの現象は、すべて光熱変換効果が寄与しているものと考えられ、レーザー強度に非線形に応答する現象である。このような非

線形現象は、泳動速度の増大や微粒子の選択性を伴うため、分析化学的な応用が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、レーザー光の輻射圧と光熱変換現象が引き起こす種々の非線形現象を実験的に解明、さらに新規な現象を発見し、レーザー光泳動法を光吸収を利用する液中微粒子の選択的な泳動分離法へと発展させることを目的とする。具体的には、以下の4点を目的とする。

(1) レーザーを光源とする液中の微粒子の新規光泳動挙動の観測と解析

発振レーザーおよびパルス発振レーザーを用いて光吸収性微粒子の光泳動挙動の精密測定を行い、微粒子の光吸収性、粒径と微粒子の泳動挙動の関係を明らかにする。尖端出力が大きいパルスレーザーを用いることにより、新規な非線形現象の観測を目指す。

(2) 非線形光泳動に対する光熱変換過程の効果の解明

微粒子内部および周囲溶媒のマイクロ場の温度および流れを蛍光色素および干渉光学系を利用して顕微鏡システムにより観測し、可視化する。これをモデルを用いた熱流体シミュレーション解析と比較し、光吸収性微粒子の非線形光泳動挙動の本質を解明する。

(3) 偏光した光を用いる光泳動の基礎検討

レーザー光の偏光状態、特に円偏光状態とキラルな性質をもつ微粒子の光泳動挙動の関係について基礎的なデータを収集し、偏光レーザーを用いる非線形光泳動現象の探索を行う。

(4) 光吸収性微粒子の非線形光泳動を利用する分離法の提案と確立

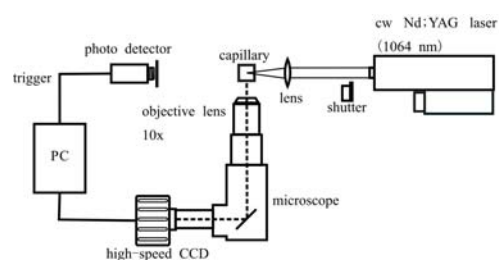
上記の結果を利用し、光吸収性微粒子をレーザー光泳動により分離する新しい方法論を提案、確立する。

3. 研究の方法

(1) 光泳動挙動観測装置

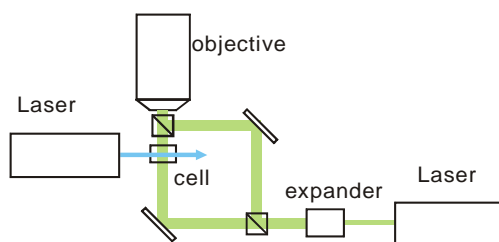
光泳動光源として、連続発振レーザー（波長 1064nm, 532nm）、パルス発振レーザー（波長 1064nm, 532nm, 355nm, 266nm）および 300W キセノンランプを用いた。

試料溶液は、石英製のマイクロセルに導入し、微粒子や液滴の挙動を次図に示すような CCD 顕微システムにて観測した。微粒子の泳動速度の解析および泳動挙動の観測には、通常の CCD カメラ、高感度 CCD カメラまたは高速度カメラを用い、複雑で高速な光泳動挙動の観測を行った。



(2) 干渉系を利用した微粒子および周囲媒体温度分布の観測装置

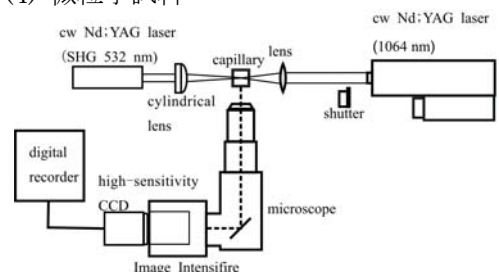
次図に示すような干渉系を利用した温度分布観測装置を組み立て、干渉縞の変形を観測することにより微粒子および周囲媒体の温度変化を屈折率の変化として観測することを試みた。



(3) 蛍光色素を用いた周囲媒体温度分布の観測装置

媒体の温度変化を捉えるため、イメージインテンシファイアを用いた次図のような装置を用いて蛍光色素の発光温度依存性を利用した温度イメージングを行った。

(4) 微粒子試料



色素を含む水中の微小液滴（半径 0.1 から 10 μ m）を対象に観測を行い、微粒子の吸光度および半径とその光泳動挙動の関係を検討した。また、高吸収性微粒子、マイクロエマルション液滴、カーボン微粒子、さらに溶媒中の気泡について実験を行い、非線形光泳動挙動を探索した。また、媒体としては、水だけでなく種々の有機溶媒も用いた。

(5) 熱伝導および流体シミュレーション

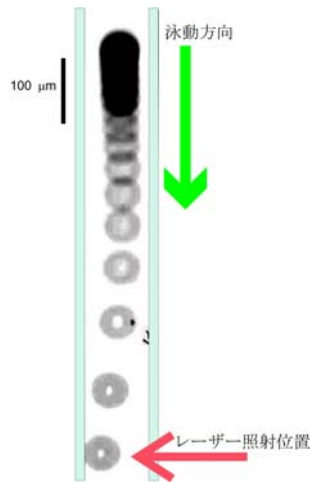
上記の方法で得られた温度分布の解析は、モデルを用いた熱伝導および流体シミュレーションとの比較により行った。温度勾配が微粒子や気泡に及ぼす力を定量的に解析し、実際の微粒子の光泳動挙動と比較検討した。

4. 研究成果

(1) レーザー光熱変換による有機溶媒中の気泡のトラップ現象の発見とその機構の解析

非線形レーザー光泳動現象を探索し、有機溶媒中で数十 μm の気泡が、離れたところからレーザー照射位置に加速しながら泳動し、トラップされる現象を発見した。これは従来の理論では説明できない。トラップは媒体の光熱変換による局所的な加熱により生じた温度勾配による(マランゴニ効果)と考えられる。本研究では矩形マイクロセル内での光熱変換による動的な気泡の挙動および温度勾配について実験を行い、この機構を明らかにした。

ヘプタン中の気泡の泳動現象を図(1-1)に示した。0.001秒毎の気泡の位置を重ねて表示した。レーザーは浮上している気泡の下部に照射した。気泡は半径28 μm 、レーザー強度0.3Wで照射した。気泡は上方から加速しながら下降し、レーザー照射位置にトラップされた。



図(1-1) 気泡のレーザーによるトラップ

気泡の泳動速度を詳細に解析した結果、気泡はレーザー照射位置に近づくほど急激に加速していること、速度は気泡のサイズに関係することもわかった。

レーザーを上昇する気泡の下部に照射した場合、泳動の駆動力は下向き(F)、浮力は上向き(F_B)、粘性抵抗力は上向き(F_R)に加わると仮定して、駆動力の見積もりを行った。浮力は下式に示した計算で求めた。

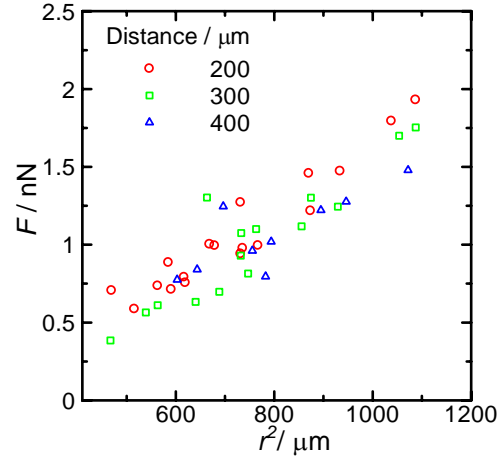
$$F_B = \frac{4}{3} \pi r^3 \rho g$$

一方、粘性抵抗力 F_R は次式で与えられる。

$$F_R = 6\pi\eta \left\{ \frac{2\eta + 3\eta_{int}}{3(\eta + \eta_{int})} \right\} r v C_{w,||}^2$$

ここで η 、 η_{int} はそれぞれ媒体及び気泡内部の粘度である。 $C_{w,||}$ とはキャピラリー壁がもたらす泳動への影響である。

これらの見積もりより得られた駆動力の気泡サイズに対する依存性を図(1-2)に示す。駆動力は気泡半径の二乗に比例していることがわかった。

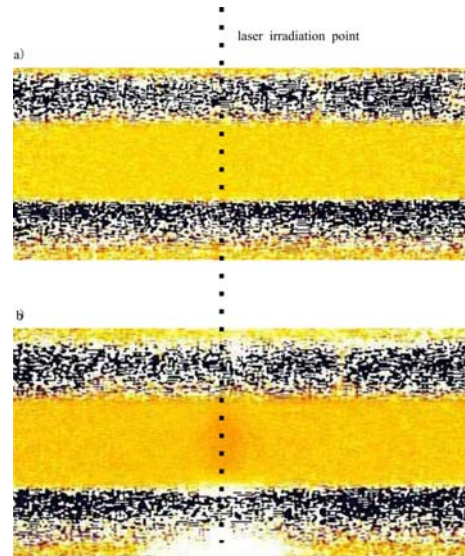


図(1-2) 気泡の半径と気泡にかかる力の関係

また、駆動力はレーザー強度に比例していることがわかった。

さらにレーザーを照射してから気泡が加速し始めるまでの応答時間は、レーザー照射位置からの距離の二乗にほぼ比例していた。

次に蛍光試薬を用いたキャピラリー内の温度測定を行った。レーザー照射前と照射1秒後の温度イメージング結果を図(1-4)に示す。



図(1-4) レーザー照射前(a)と照射1秒後(b)のキャピラリー内温度イメージング

この結果から、レーザー照射により溶媒中に温度勾配が生じていることが明らかとなった。

た。また、この結果はモデルを用いた熱伝導および流体シミュレーションと良い一致を示した。

気泡表面(気液界面)における界面張力について次式が成り立つ。

$$P_0 = P + \frac{2\sigma}{r}$$

P_0 、 P はそれぞれ気泡の内部圧、外部圧、 σ は溶媒の界面張力である。これを気泡界面全体について考えると次式が得られる。

$$F = -\left(\frac{8\pi}{3}r^2\right)\frac{\partial\sigma}{\partial T}\text{grad}(T)$$

ここで $\partial s / \partial T$ は界面張力の温度係数であり、 $\partial s / \partial T < 0$ であるため、気泡は高温部へ泳動すると考えられる。

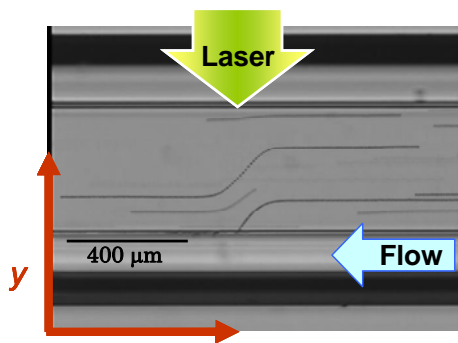
この式と実際に観測された温度勾配を用いて気泡の駆動力を見積もったところ、気泡の移動速度から求めた駆動力と良い一致を示した。したがって気泡泳動の駆動力は温度勾配による界面張力の変化が原因と考えられる。

(2) 光吸収性微粒子の光泳動速度の非線形性

レーザー光泳動速度は、微粒子のサイズや屈折率に依存することが示されているが、微粒子の光吸収係数と光泳動速度の詳細な関係についてはまだ明らかにされていない。ここでは、光吸収性の異なる微粒子を対象としてレーザー光泳動速度を解析し、微粒子の吸収係数と光泳動速度の関係を検討した。

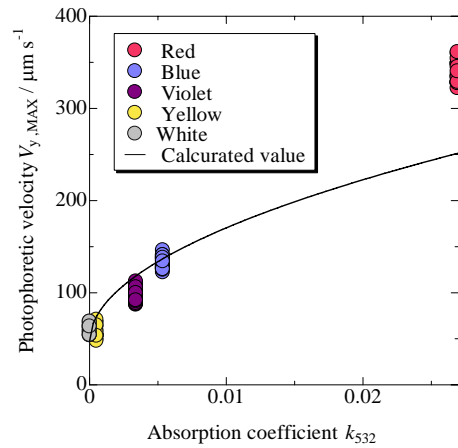
光吸収性の試料として直径 $6 \mu\text{m}$ の着色、無着色のポリスチレン粒子を用いた。これらを純水に分散させて、試料溶液として用いた。

マイクロセル中に一定速度で流れる試料溶液にレーザーを照射した時の光泳動の様子を図(2)-1 に示す。



図(2)-1 着色 PS 粒子の泳動挙動

測定した光泳動速度と各微粒子のレーザー波長における吸光度の関係を図(2)-2 に示す。



図(2)-2 粒子の吸収係数と光泳動速度の関係

レーザー波長における光吸収係数の高い粒子ほど速く泳動することがわかった。最も吸収係数の大きな粒子の実測値を Mie 散乱による理論値と比較すると、1.4 倍高いことがわかった。一方、吸収係数の小さな粒子では、実測値は計算値とよく一致した。光吸収係数の大きい粒子の実測値が理論値より大きな値を示したのは、粒子が光を吸収し、周囲の媒体の温度上昇が起こり、粘性率が下がったことによるものと考えられる。光泳動速度から見積もった微粒子周囲の媒体温度は約 40°C であった。

以上のように光吸収係数の異なる様々な粒子について光泳動速度測定を行ったところ、吸収係数が高くなるほど光泳動速度は速くなり、同じ粒径でも光吸収により泳動速度に 5 倍以上の差が生じることがわかり、吸収係数の差による微粒子の光泳動分離の可能性が示唆された。

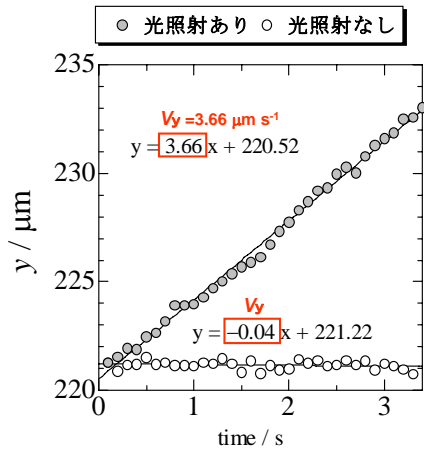
この微粒子の吸収と泳動速度における非線形性は光熱変換による泳動速度の差を利用した分離に応用できる。

(3) 連続光光源を用いた液中微粒子の光泳動分離法の検討

光泳動には、単色性・光の直進性に優れ、集光しやすい為レーザーが用いられており、単一波長で光の強度密度を上げることで試料の分離能の向上が期待できる。これに対して、連続光光源である Xe ランプはこれまで光泳動実験でほとんど用いられていない。Xe ランプを光源とすることにより、波長を選択的に変えることができ、光吸収率の差によって様々な粒子を分離できる可能性がある。そこで、Xe ランプを用いた液中微粒子の光泳動について基礎的な検討を行った。

Xe ランプは、レーザー光に比較して集光が困難であるため、マイクロセル内での光泳動速度を正確に観測することが困難であった。そ

ここで、セル中に一定速度で試料溶液を流し、光泳動により移動した距離を解析した。解析結果の一例を図(3)-1に示した。



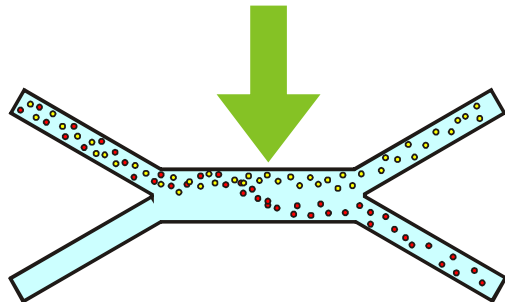
図(3)-1 Xe ランプ光の照射により移動した微粒子の位置と照射時間

Xe ランプはビーム径が広く、観察領域全体に均一な力が働く為、直線的なグラフが得られた。この直線の傾きから粒子の光泳動速度 V_y を求めた。無着色微粒子の光泳動速度は、Xe ランプの波長には依存せず、照射パワーにのみ比例することがわかった。

しかし、Xe ランプ光源の実験系では光密度が低く、光吸収性微粒子に対する非線形的な光泳動速度の増大は観測できなかった。Xe ランプのビーム幅を 1 mm 程度にまで絞る、あるいは泳動距離を 20 倍に延長することができれば、対象粒子によって波長を選択できる分離方法に発展が可能であると考えられる。

(4) 光熱変換による光泳動速度の増幅を利用した血球細胞の連続分離法の検討

光熱変換による光泳動速度の増幅を利用して、液中微粒子の連続的な分離分析法の検討を行った。試料としては緑色レーザーに対し大きな吸収をもつ赤血球と吸収をもたない白血球、血小板を主な成分とする血液を対象として選んだ。



図(4)-1 レーザー光泳動を利用したマイクロ流路型連続分離システム

Y型のマイクロ流路チップを利用し、図(4)-1に示すような配置で分離を検討した。

左上方より試料溶液を連続的に導入し、光熱変換レーザー光泳動により赤血球のみを泳動させる。この結果、赤血球のみが右下方に流出、その他の血球細胞は右上方に流出させることで分離ができる。

上記の配置で基礎実験を行ったところ、レーザー照射による血球細胞の移動距離は、赤血球 > 白血球 > 血小板となった。とくに赤血球の光泳動距離は、白血球移動距離の1.2倍以上であり、赤血球と他の血球細胞の分離が可能であることがわかった。また、赤血球は円板型の形状であるため、レーザー光に対する配向により、泳動速度が異なることがわかった。

微粒子の泳動距離は、レーザー照射される時間に比例するため、試料のフロー速度が小さいほど分離度が大きくなる。実験を行った配置では、十分な泳動距離を得るために試料の導入速度を小さくする必要があり、現在、血球細胞の分離に広く用いられているフローサイトメトリー法に比較して分離速度が不十分であり、レーザー光の照射方法、マイクロ流路の設計などをさらに改良する必要があると考えられる。

(5) 本研究で得られた成果のまとめと展望

本研究により得られた主な成果を上記(1)~(4)に示した。これ以外にも、関連した成果として、標準固体微粒子の粒径の測定、キラリな性質をもつ微粒子のキラリティのマイクロ測定などの成果も得られた。

本研究で得られた光の輻射圧と光熱変換現象が引き起こす種々の非線形現象に関する知見は、レーザー光泳動法を光吸収を利用する液中微粒子の選択的な泳動法へと発展させる基礎になるものと考えられる。成果の中でも特に光熱変換による光泳動速度の増幅を利用した血球細胞の連続分離法については、国際会議等で高い評価を受けた。

本研究で得られた成果は、今後さらに化学的、生物的重要性が増すであろう複数の化学種が作る集合体やクラスター、高分子量をもつDNAやタンパク、ナノ粒子、その集合体、またその複合体のような巨大分子や集合体の分離とキャラクタリゼーション法の新しい原理として発展、応用されていくものと考えられる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yukiko Enomoto, Hideaki Monjushiro, Hitoshi Watarai,
"Simple and Precise Size-Separation of Microparticles by Nano-Gap Method"
Analytical Sciences, vol.25, p605-610, (2009) 査読あり
- ② Hideaki Takechi, Kenta Adachi, Hideaki Monjushiro, Hitoshi Watarai,
"Linear dichroism of Zn(II)-tetrapyrrolylporphyrin aggregates formed at the toluene/water interface"
Langmuir, vol. 24, 4722-4728, (2008) 査読あり
- ③ Aira MATSUGAKI, Hideaki TAKECHI, Hideaki Monjushiro, Hitoshi Watarai,
"Microscopic Measurement of Circular Dichroism Spectra"
Analytical Sciences, vol.24, p297-300, (2008) 査読あり
- ④ Sayaka Wada, Kazuhiko Fujiwara, Hideaki Monjushiro, Hitoshi Watarai,
"Optical chirality of protonated tetraphenylporphyrin J-aggregate formed at the liquid-liquid interface in a centrifugal liquid membrane cell"
J. Phys.: Condens. Matter, vol.19, 375105 (12pp) (2007) 査読あり

[学会発表] (計 13 件)

- ① Yuka Urabe, Hideaki Monjushiro, Hitoshi Watarai
"Laser-Photothermal Migration of a Micro-Bubble in Organic Solvent", 60th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, March 8-13, 2009, Chicago, IL, USA 1300-2 (Poster).
- ② 高橋茉莉*, 文珠四郎秀昭、渡會仁
"Xe ランプを光源とする光吸収性微粒子の光泳動", 日本分析化学会第 57 年会, 福岡大学(福岡市), I3020, 08/09/10-08/09/12, (Oral).
- ③ 卜部由佳*, 文珠四郎秀昭、渡會仁
"気泡および w/o 液滴のレーザー光熱変換熱泳動機構", 第 69 回分析化学討論会, 名古屋国際会議場(名古屋市), Y1219, 08/05/15-08/05/16, (Poster).
- ④ Hideaki Monjushiro*, Hideaki Takechi, Aira Matsugaki, Hitoshi Watarai

"Microscopic Circular Dichroism Measurements of Biological Samples", International Symposium on Metallomics 2007(ISM2007), Nagoya, Japan, 048, 07/11/28-07/12/01, (Poster).

- ⑤ 卜部由佳*, 文珠四郎秀昭、渡會仁
"レーザー光熱変換による気泡および o/w 液滴のトラップ挙動の解析", 日本分析化学会第 56 年会, 徳島大学(徳島市), P3026, 07/09/19-07/09/21, (Poster).
- ⑥ Hideaki Monjushiro*, Yuko Tanahashi, Hitoshi Watarai
"Laser-Photophoretic Migration and Separation of Human Blood Cells" 13th International Symposium on Field- and Flow-based Separations (FFF 2007), University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA, L21, 07/06/27-07/06/30, (Oral).
- ⑦ 卜部由佳*, 五十嵐千佳栄, 文珠四郎秀昭、渡會仁
"レーザーによる有機溶媒中での気泡の発生とトラップ挙動の解析", 第 68 回分析化学討論会, 宇都宮大学(宇都宮市), G2005, 07/05/19-07/05/20, (Oral).

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
文珠四郎 秀昭 (MONJUSHIRO HIDEAKI)
高エネルギー加速器研究機構・放射線科学センター・教授
研究者番号：80191071
- (2) 研究分担者
渡會 仁 (WATARAI HITOSHI)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：30091771
(平成 18~19 年度)
- (3) 連携研究者
渡會 仁 (WATARAI HITOSHI)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：30091771
(平成 20 年度)