

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560299

研究課題名(和文) 光融合型マイクロ総合分析システム(μ-TAS)構成法の研究

研究課題名(英文) An Investigation of Design Method on a Light Waveguide Incorporated Optical Total Analysis System

研究代表者

大久保 俊文(OHKUBO, Toshifumi)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：60349933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血液等の生理学情報を分析・採取が可能なマイクロチップを機軸としたユビキタスヘルスケアシステムの構築を前提に、現存するフローサイトメータ等の大型分析装置の機能を、マイクロ流路・光導波路等を組み合わせたチップ上に凝縮して実現しようとするものである。ここでは発想を変えて、チップ実現のための技術基盤を、信号処理回路基板で用いられる樹脂製の光導波路に置いた。これに血液細胞オーダの微細流路を併設加工することで、流動する細胞に的確にレーザー光を照射し、かつ透過光、側方散乱光を確実に検出できるマイクロチップを構想・試作するとともに、微弱光検出実験を経て、チップの基本機能を確認した。

研究成果の概要(英文)：Assuming the realization of a ubiquitous human healthcare system in the near future society, I performed the research of realizing principal functions of high-end cell analyzer like a flow-cytometer into a minute total analysis system (TAS) chip which consists of both micro fluidic channels and light waveguides. Our fundamental concept of realizing this novel TAS utilized for the healthcare system is founded on the technologies of resin-based light waveguide that is already applied to a high-speed signal processing circuit board. Carefully fabricating minute fluidic channels on a surface of waveguide-formed resin layer could make it possible to properly and precisely illuminate cells or particles running along a fluidic channel, and finally, through a series of experiments of detecting extremely weak scattered light, we could successfully confirm fundamental functions to evaluate optical properties of a pseudo-cell, utilizing trial-manufactured resin-based TAS chips.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学 ・ 知能機械学・機械システム

キーワード：TAS(総合分析システム) マイクロ流路 光導波路 FDTD法 BPM法 前方散乱光 側方散乱光

1. 研究開始当初の背景

少子・高齢化社会の急進展に伴い、医療費の増大や医療システムへの負荷の増大が懸念される。この解決には「修復医療」から「予防医療」への着想の転換が必至であり、これを実現するための有力な提案として、血液等の検体採取・分析を行う微小流路チップと、医療機関との間で双方向データ通信を行う情報処理機能部から成る「ユビキタス・ヒューマンヘルスケアシステム」があげられる。このシステムの中で機能実現の中核の一つとなるのは、光導波路のような検査光の配置・誘導が自在にできる機能要素が流路に併設され、大型検査機なみの血液細胞の生理学的分析が可能な微小流路チップである。

そもそも血球細胞の自動分析は、今を遡ること60余年前に提案されたWallis Coulterによる世界初の自動細胞計数装置、いわゆる「コールターカウンター」に端を発するもので、細胞をはじめとする微小な粒状物質に固有な情報を、検体フローを形成することで自動採取可能としたものである。1960年代後半にはレーザ光源と、高圧ジェット噴射による高速液滴フローとを組み合わせたフローサイトメータが登場し、複数波長のレーザとこれに基づく多方散乱光データの収集により、極めて短時間に、しかも多岐にわたる生理学情報が採取可能となった。これらの装置はコンピュータの導入により高速デジタル処理がなされ、同時に分析手法についても格段の進歩を遂げた。しかしながら、これらは基本的には固定の専用分析機器であり、その寸法は現有の最小構成をもってしても、デスクトップ装置程度の空間を占有する。

フローサイトメータの小型化に関しては、従来の開放空間への液滴ジェットの形成と、レンズ・プリズムなど大型光学部品による集光系を有するものが定番の構成となっているが、近年はシースフロー（鞘流）によって流体力学的に細胞位置を精密に制御した微小管路流れに、光ファイバを用いて光の伝送、集光と散乱光検出をコンパクトに行うことが可能な超小型フローセルユニットをもつものも登場してきた。

その一方で、マイクロマシン技術の進展により、光導波路、マイクロレンズ、光分岐器さらにレーザ光源自体も基板上に一体形成され、卓上分析機器の機能をマイクロチップ上に凝縮して実現する「Lab-on-a-Chip」なる試みも近年盛んに行われている。さらにこのような新規なチップ構成の中にも、電気泳動型セル・ソータ、ホログラムパターンに基づく任意形状の平面型光源、プラズモン利用センサ、超小型質量分析センサなど、新規な機能要素も漸次取り入れられていく可能性もある。

2. 研究の目的

本研究は、すでに用いられている血液細胞等の高速・高機能分析装置であり、光検出を

基本原理とするフローサイトメータの機能を、ターンアラウンドタイムの短縮などの超高速処理性は除外して、微小流路チップ中に凝縮して実現することで、先に掲げた「ユビキタス・ヒューマンヘルスケアシステム」への適用を狙う。ここでは、使い捨ても考慮して、樹脂製で一体型の光導波路と流路の混成構造を礎とする複数の創案により、流路中を流動する細胞の光応答を、精度よくこれに分析光を照射することで、a)高分解能、b)高効率・高スループットにて、さらにc)複数の光特性の採取が可能な拡張性をもって、動作可能な微小光分析チップを目指す。

3. 研究の方法

マイクロマシン技術をはじめとするこれら一連の技術進展の中で、光検出をその基本とする融合型の微小流路チップの実現には、以下の本質的な課題がある。

まず(1)血球サイズ程度の流路を確保した上で、血液細胞等へ光の精密集光を行う必要がある。また(2)狭小な二次元のチップ空間（平面）内で、種々の応答光を検出可能な光学系を構成する必要がある。さらに、検体採取量を制限した上で、微細流路を通過させることから、(3)シースフローに依らない精密な細胞の流動（走査）を実現する必要がある。

本研究では上述の課題に鑑み、以下の提案をもってその解決にあたる。

まず、(1)については、血球サイズ（ $\sim 10\mu\text{m}$ ）幅の流路によって隔てられ、その端面を対向する同サイズの導波路コアの「対」による光照射と応答に関する基礎検討が、すでに樹脂材料をベースとした光導波路技術の応用として端緒についており、検出粒径の限界（ $\sim 0.6\mu\text{m}$ ）、信号S/N、応答波形の粒径依存性などの潜在性能を検証する段階にある。その上で、平面レンズ等の組合せによるさらなる集光性、空間分解能の向上を検討する。(2)については、T字あるいはL字型流路などにおいて、流路の一部を導波路（管）として利用し、微弱な側方散乱光の伝搬・集光をチップ面内で完結して実現する手法について、その特性と実現性を明かにする。また、これとは全く異なる発想として、サブマイクロサイズのホログラムパターン（人工欠陥）を、導波路コア表面の一部領域に形成することで、この領域を微小な線状あるいは面状など任意形状の平面光源とし、近接した流路を流れる細胞を照光する新たな光走査の可能性と、それらの適用性を判断する。(3)については、導波路交叉流路をプラットホームに、電極を形成することで、加減圧ポンプによる機械吸引に加えて、電界による細胞の駆動（電気泳動）を加えた混成走査を導入し、その特性を明かにする。

最後に、上述の一連の検討を行うための試料チップの作製に並行して、検体（細胞もしくは微粒子）への光照射および散乱光の検出

について数値シミュレーションを行う。具体的には、時間領域差分法 (FDTD 法) 単独、あるいはビーム伝搬法 (BPM) を併用したハイブリッド解析を行う。ここでは、まず、検体細胞等を取り巻く $10 \sim 20 \mu\text{m}$ 角程度の領域を対象に、事前実験で採取された光学データ、検体を含む各パーツ相当の光学構造の推定などに基づき、種々の照光状態に対応した光応答を解析可能とする。解析結果については、多様な実験結果との対照を進めながら、モデル化や採用光学定数の妥当性を結めることで、事後の流路チップの設計・製作 (光プロセス) に順次反映できるようにする。

4. 研究成果

まず、一連の本助成研究の中で最もシンプルで基本的な構成となる導波路と流路の直交交叉試料については、**図 1** に示すように、流路幅 $12 \mu\text{m}$ 、深さ $22 \mu\text{m}$ (血球直径の 1.5 倍から 3 倍) の流路が、コア断面形状がやはり $12 \mu\text{m}$ 角の導波路を横断する形状を採用した。これは、微粒子または細胞を含む検体の狭小流路部の流動性と、導波路コア端から流路に伝搬する光の広がり度合いを考慮したものである。当初、実験系の構築に当たっては、複数の方向からチップに光を導入したり、散乱光を検出するための光ファイバを個々に精密位置決めできる超コンパクトな 3 軸ステージが必須であったが、これを実現できなかった。このため、通過光の検出には横置き

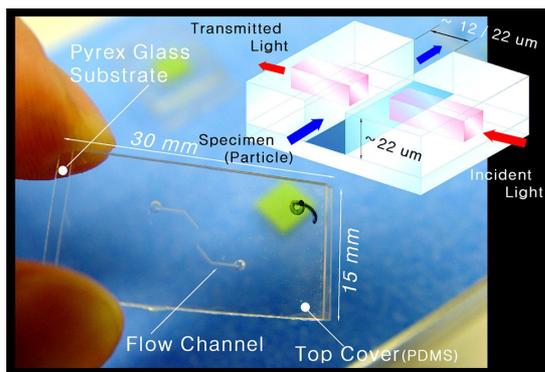


図 1 光導波路と流路が直交交叉する試作光 TAS チップ (出展：雑誌論文)

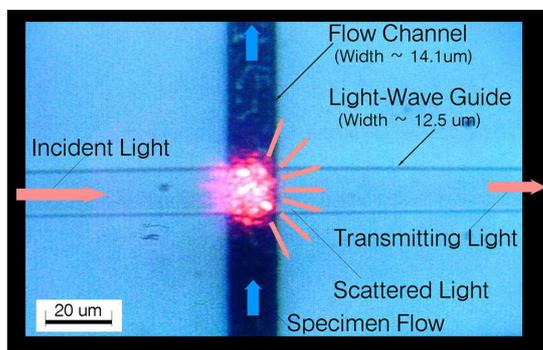


図 2 導波路 (水平方向) と流路 (垂直方向) の交叉部の写真 (出展：雑誌論文)

顕微鏡によって反対側のコア端面の輝度変化を画像解析することで行った。また、側方散乱光についても、同様に面外散乱光を、縦置き顕微鏡にて観察し、発光部の輝度変化を画像解析して行った (**図 2** に示すレーザ導入時の交叉部の写真参照)。これら一連の結果によれば、導波路による光の伝搬・照射はきわめて効率的であり、 μW オーダの微弱光の入射によっても十分高い感度 (応答波形) が得られることが分かった。この TAS 形態においては、一般的に粒子 (細胞) が導波路と流路の交叉部を通過することで、定常通過光はその一部が遮られ、側方散乱となって面外に伝搬する。したがって検出光の強度波形は通過光が負パルスに、側方散乱光が正パルスになる。このパルス強度について、通過光のそれを横軸に、側方散乱光のそれを横軸にプロットして相関を示したのが**図 3**である。相関図には 2 つの主要な傾き成分が観察されるが、これは流路の中心軸と、導波路の中心軸がわずかにずれているためである。すなわち、微粒子の多くは流路の中心軸に沿って流動する傾向が強いが、導波路の中心軸をはずれて横断するために側方散乱効率は相対的に低く、緩やかな傾斜のパターンを示す。一方、導波路の中心軸を横断する粒子は、その数は減るものの側方散乱効率は高く、散乱光の強

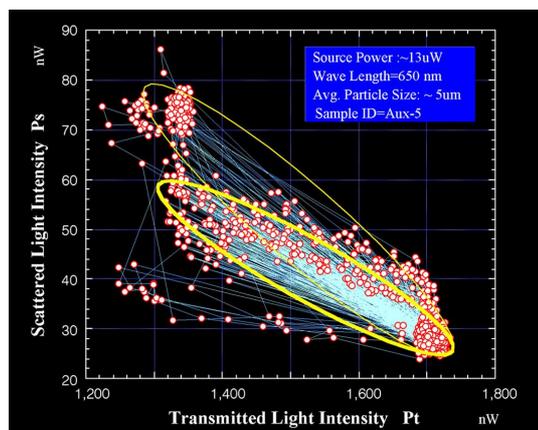


図 3 通過光強度変化 (横軸) と側方散乱光強度変化 (縦軸) の相関 (出展：雑誌論文)

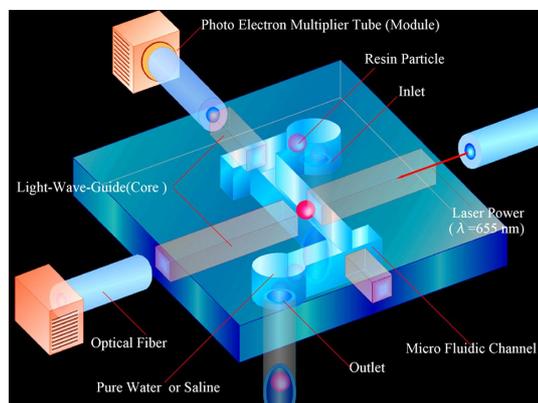


図 4 L 字型流路による面内側方散乱光を検出可能なチップ構成 (出展：雑誌論文)

度が高いために傾斜の急なパターンを示す。このような樹脂製で導波路流路一体成形のコンセプト提案と試作による部分的な実証研究はすでに行われているものの、肝要な導波路ギャップ（流路幅）は $200\mu\text{m}$ と本研究の実に 15 倍以上も広く、流路深さも $50\mu\text{m}$ と 2.5 倍程度も大きい。また対応して導波路コアサイズも $40\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ と 3~4 倍程度大きいもので、血球細胞サイズに近い寸法構成で細胞相当の粒子を用いた光応答を子細に実証できた点で、本研究の意義は大きいと考える。

次に、上記直交交叉型の光 TAS を改良し、**図 4** に示すようにチップ面内にて側方散乱光を検出するチップ構成に基づき、光 TAS を試作するとともに、超小型の 3 軸超音波微動ステージを新規導入して、入射光、通過光、側方散乱光をいずれも光ファイバにて、導入あるいは検出可能な構成を実現した。L 字型流路を採用することで、チップ面内の側方散乱光成分を流路の一部に沿って伝搬させ、検出用の導波路に導いている。なお、ここでは小型でかつ高電圧源を陽には要しない高感度光センサモジュール（光電子増倍管）を用いて散乱光を計測した。**図 5** に試作した L 型流

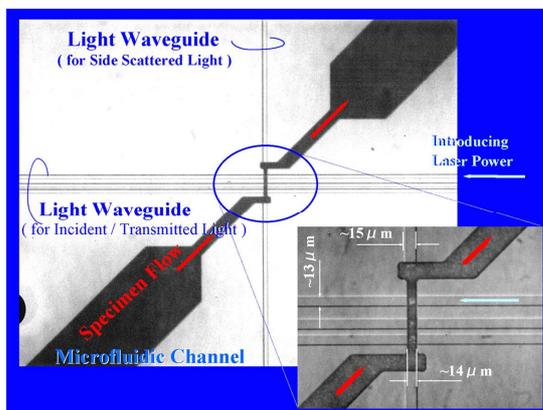


図 5 試作したチップの L 字型流路と導波路交叉部写真（出展：雑誌論文）

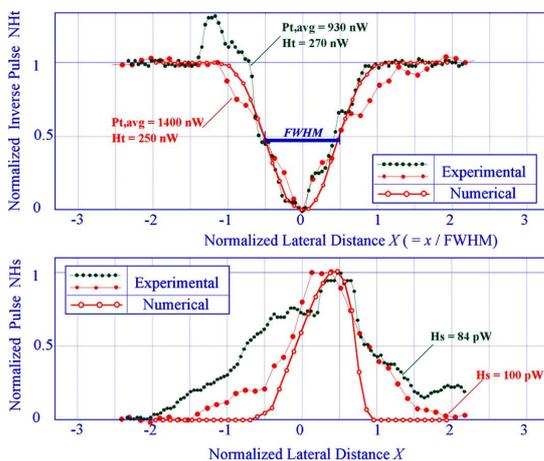


図 6 通過光(上段)と側方散乱光(下段)の実験結果とシミュレーション結果の比較（出展：雑誌論文）

路をもつ光 TAS チップの流路と導波路の交叉部周辺の写真を示す。複数の近接して平行配置された導波路群は、各導波路への光源光の高速切り替え入射の実験検討もかねている。

図 6 は、通過光と側方散乱光の光強度変化を光ファイバ-光センサモジュールを用いて計測した結果を示す。通過光強度変化は、基本的には線対称であり、その極値からやや遅れて側方散乱光の非対称な強度特性の極値が確認できる。なお、シミュレーションにおいては、流路・導波路の交叉部近辺について時間領域差分法を適用し、入射光源から交叉部、あるいは交叉部から検出導波路を通じてセンサに至る長距離空間部を、ビーム伝搬法を用いて解析した。

これらの結果によれば、樹脂製微粒子等の試料が必ずしも単純な光学特性を有していないことも伺い知れ、さらに散乱光については周辺からの回り込みとおぼしき成分によって応答波形が鈍っている可能性もあり、一段と微弱な蛍光実験に向けては周辺光、回り込み光の遮蔽に関する工夫が必要である。

なお、導波路流路一体構成において、側方散乱光の検出もチップ面内において行う提案（特許等）はいくつかあるが、細胞サイズの流路や導波路コアを用い、微弱散乱光の面内検出を実証できた点に本研究の価値があり、さらに光源、フィルタ、高感度光センサを組み合わせた統合的なマイクロチップ開発への弾みとなるものと考えられる。

最後に、**図 7** に示すように、平坦な導波路コアの一部の領域にサブミクロンサイズの人工欠陥アレイを形成することで、導波路伝搬光の一部を規則的に面外に散乱させる構造を利用した新規な光 TAS に関する検討結果を報告する。このような構造を採用することで流路に近接して、任意形状・任意輝度の光源として配置することができる。たとえば矩形形状の均一輝度の面光源や、線状光源を用いれば、微粒子や細胞の 2 次元的な光学特性の分布を採取できる可能性がある。

今回、このコンセプトに基づいて、**図 8** に示す光 TAS チップを試作した。導波路コアは、

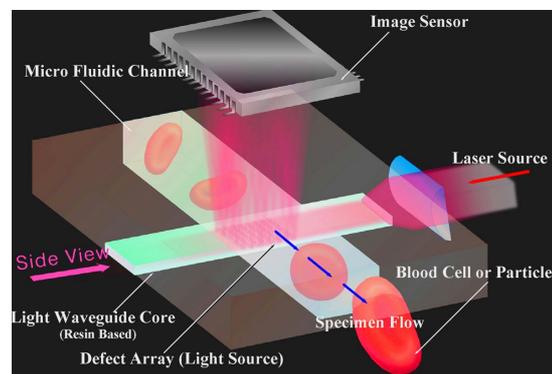


図 7 扁平導波路コアに形成した人工欠陥を用いた任意形状光源によって照光する光 TAS の構想図（出展：雑誌論文）

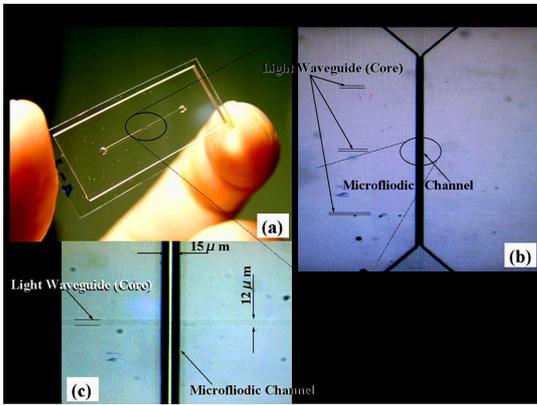


図 8 扁平導波路コアに人工欠陥を形成した光 TAS の試作チップ（出展：雑誌論文）

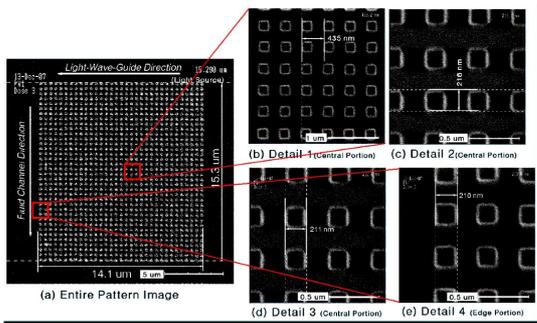


図 9 扁平導波路コアに形成した人工欠陥の電子顕微鏡写真（出展：雑誌論文）

幅約 $12\ \mu\text{m}$ 、厚さ約 $1\ \mu\text{m}$ の超扁平状であり、これに幅 $15\ \mu\text{m}$ 、深さ約 $10\ \mu\text{m}$ の流路が、厚み $3\ \mu\text{m}$ の層を隔てて「ねじれの位置」関係をもって配置されている。試作した代表的なパターン領域は約 $15\ \mu\text{m}$ 角であり、縦横方向ともに、約 220nm 角のパターンが、約 440nm ピッチで配置されている。この導波路コアに波長 650nm 、約 1mW のレーザー光を導入した際の顕微鏡写真を図 10 に示す。ほぼ矩形の領域が発光していることが確認できる。

図 11 は、流路の中心軸に沿って、樹脂製の球状微粒子が流動した際の輝度分布のシミュレーション結果の一部を示す。本シミュレーションに当たっては、パターン部と流路の交叉部の十分遠方に光源を設け、光源から交叉部までの長距離の解析に、ビーム伝搬法を適用するとともに、上記交叉部周辺に時間領域差分法を、さらに交叉部から面外遠方の受光器位置までを、再びビーム伝搬法を適用して解析した。詳細に観ると、粒子中心付近では光輝度が増大するのに反し、粒子周縁部では逆に輝度が減少するなどが分かった。

シミュレーションに対応する実験についても進めた。ここでは受光センサ（CCD カメラ）位置に、画像解析ソフトによって等価な幅可変の線状スリットを配置し、より線状領域に限定した輝度変化を採取しつつ、解析結果と比較している。解析結果と定性的に対応する実験結果も得られてはいるものの、本原

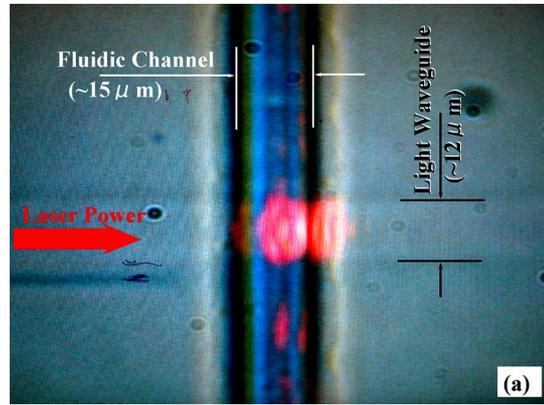


図 10 導波路コアにレーザーを入射した際の人工欠陥部の発光状態（出展：雑誌論文）

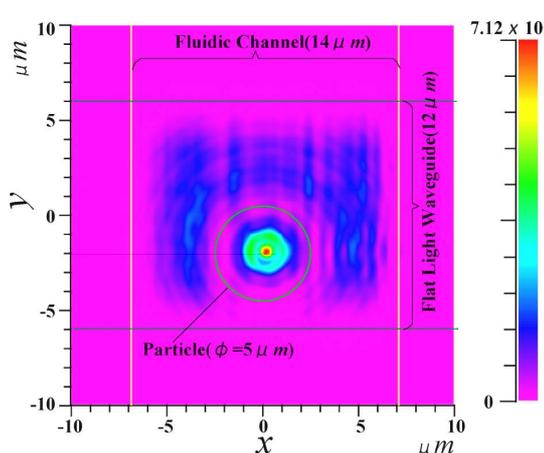


図 11 流路中を直径 $5\ \mu\text{m}$ の微粒子が流動する際の面外光強度分布（出展：雑誌論文）

理を積極応用した光 TAS の実現に向けては、欠陥アレイの配置を含む光源形状やその輝度分布と、採取信号、採取画像（2 次元）との対応関係の検証を継続的に行い、データの蓄積・分析を進める必要がある。

以上述べたように、研究の目的・方法と対応する研究成果とを以下に簡潔に整理する。

(1)の血球サイズの流路を用いた（疑似）細胞粒子への光の精密集光と散乱光の採取は、細胞サイズの流路とこれを隔てて対向する導波路コアの組み合わせを、樹脂導波路を用いて実現するとともに、光源光の利用効率、および検出光の分析性の高さを確認できた。

(2)のチップ面内に完結した検出光の採取については、導波路・流路の構造を改良して L 字型流路形態を採用することでこれを可能とし、実験によって実証した。また、対応する光学モデルに基づくシミュレーション結果とも対応させた。さらに、超扁平導波路の一部にサブミクロン寸法の欠陥パターンを形成することで任意形状の平坦光源を作り出し、近接した流路を流動する粒子を照光して、光応答を採取可能とした。

(3)のシーフローによらない精密な細胞の走査については、電極形成の困難さも手伝い、研究期間における顕著な進展はなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

T. Ohkubo, N. Terada, Y. Yoshida, Illumination and Scattered Light Detection Using a Light Source Consisting of Sub-Micrometer Defect Arrays Formed on a Extremely Flat Light Waveguide Core, *Microsystem Technologies*, Springer, (2014) (印刷中) (査読あり)

DOI 10.1007/s00542-014-2132-9

T. Ohkubo, N. Terada, Y. Yoshida, In-Plane Detection of Scattered Light from a Minute Particle Using a Resin-Based Light Waveguide Incorporated with a Microfluidic Channel, *Microsystem Technologies*, Vol.19, No. 9-10, Springer, (2013), pp.1319-1328. (査読あり)

DOI 10.1007/s00542-013-1791-2

T. Ohkubo, N. Terada, Y. Yoshida, Minute Particle Detection Using a Light-Wave-Guide Incorporated Optical TAS (Total Analysis System), *Microsystem Technologies*, Vol.17, No. 5-7, Springer, (2011), pp.849-856. (査読あり)

DOI=10.1007/s00542-011-1263-5

〔学会発表〕(計2件)

T. Ohkubo, N. Terada, Y. Yoshida, Illumination and scattered light detection of a minute particle using a light source consisting of sub-micrometer defect arrays formed on an extremely flat waveguide core, *Proceedings of the ASME 2013 Conference on Information Storage and Processing Systems ISPS2013*, 2846, 1-3 (2013.06.24-25), Santa Clara, California, USA

T. Ohkubo, N. Terada, Y. Yoshida, In -Plane detection of scattered light from a minute particle using a resin based light-wave-guide incorporated with a micro fluidic channel, *Program and Extended Abstracts 2012 Joint International Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment (MIPE 2012)*, 4-6 (2012.06.18-20), Santa Clara, California, USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://ris.toyo.ac.jp/profile/ja.FR21Va3TZP42g0heFsX.XQ==.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大久保 俊文 (OHKUBO, Toshifumi)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：60349933

(2)研究分担者(0)

(3)連携研究者(0)