

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655054

研究課題名(和文)小型蛍光偏光測定デバイスの開発

研究課題名(英文)Development of compact fluorescence polarization measurement devices

研究代表者

渡慶次 学 (Tokeshi, Manabu)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60311437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子間の相互作用や生体分子-薬物間の相互作用を測定することを可能とする小型蛍光偏光測定システムの開発を行った。本研究では、光ファイバーとローションプリズムを利用した小型蛍光偏光測定デバイスと液晶ディスプレイとCCDを利用した蛍光偏光測定システムを試作し、その性能を評価した。これらの性能評価から、いずれも蛍光偏光測定が可能であることが確認できた。ここで開発したデバイス及びシステムは、容易に小型化することが可能であり、安価な小型測定装置の実現に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Compact fluorescence polarization measurement systems for analyzing the interaction between biomolecules and between biomolecule-drug was developed. In this study, we developed a compact fluorescence polarization detection device using fiber optics and a lotion prism and a system using a liquid crystal display and a CCD detector, and evaluated these performances. From these evaluation, both were able to confirm that fluorescence polarization measurement was possible. The device and system developed here can be miniaturized easily, and these achievements lead to the realization of a cheap compact apparatus for fluorescence polarization measurement.

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：生体分析

1. 研究開始当初の背景

蛍光偏光測定法は、生体分子間の相互作用（タンパク質-DNA、タンパク質-糖鎖など）や生体分子-薬物間の相互作用をタンパク質を固定化することなく、溶液中での直接測定できる有用な方法である。簡便かつ迅速に複雑な相互作用解析が可能な蛍光偏光法は、ライフサイエンスの分野では極めて有用で様々な系に適応されているが、広く普及しているとはいえない。これは測定に高価な装置が必要であることが最も大きな理由である。申請者が知る限りでは、小型・安価な蛍光偏光測定システムの開発に関する報告・研究例はなく、その開発に成功すれば、学術だけでなく、産業的にも大きなインパクトを与えることは間違えない。

申請者はこれまでに光ファイバーと波長合波器を組み合わせた高感度な小型熱レンズ検出器を開発してきた（JST 先端計測分析技術・機器開発事業：平成 17 年度～19 年度）。大型の熱レンズ顕微鏡をファイバー光学系で再構築することで、小型化・低コスト化、簡便化を実現したことから、蛍光偏光測定に対してもファイバー光学系で再構築できるのではないかと着想した。

また、申請者はマイクロ化学チップと顕微鏡ベースの蛍光偏光測定装置を組み合わせ、血中の薬物濃度の測定に世界で初めて成功した（*Lab Chip*, **9**, 966-971 (2009).）。さらに名古屋大学医学部と協力して、患者血清中の薬物濃度測定にも成功した（*Anal. Bioanal. Chem.*, **401**, 2301-2305 (2011).）。このマイクロ化学チップと本研究で開発する小型蛍光偏光測定システムを組み合わせれば、小型の血中薬物濃度測定装置も実現できることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、生体分子間の相互作用（タンパク質-DNA、タンパク質-糖鎖など）や生体分子-薬物間の相互作用を測定する重要な分析法である蛍光偏光測定用の小型システムを開発することを目的とする。従来の蛍光偏光測定は、偏光子や偏光フィルターを組み込んだ特殊な蛍光分析装置を用いて行われており、簡便に生体分子間の相互作用や生体分子-薬物間の相互作用の測定が可能にもかかわらず、あまり普及していない。また、簡便かつ迅速に測定結果を得ることができることから、臨床診断では広く用いられているが、装置は大型で高価である。そこで本研究では、光ファイバーとローションプリズム（特殊な偏光子）を利用した新しい原理の安価な小型蛍光偏光測定装置を開発する。

3. 研究の方法

(1) ファイバー型小型蛍光偏光測定デバイス：従来の蛍光偏光装置は、図 1 に示すように空間光学系の光学部品で構築されている。蛍光偏光測定には偏光子あるいは偏光フ

ィルターを回転させる必要があり、自動測定装置を実現するためには、モーターなどによる駆動系が必要になる。そのため装置は複雑になり、大型かつ高価になる。それに対して、本研究では、ローションプリズムを利用することで、偏光子を回転させることなく、蛍光偏光測定が可能なデバイスを開発する。ローションプリズムを円筒状のマイクロレンズで挟み込み、一方のレンズ側に励起光導入用の光ファイバーと横偏光検出用の光ファイバーを接続する。励起光導入用の光ファイバーの途中には、WDM (Wavelength Division Multiplexing) 型の波長分波器を接続し、光ファイバーを介して水平偏光検出用の光電変換素子と接続する。同様に、垂直偏光検出用の光ファイバーの末端には光電変換素子を接続する（図 2）。これによって、励起光を含む一体型の蛍光偏光測定デバイスが実現できると考えられる。

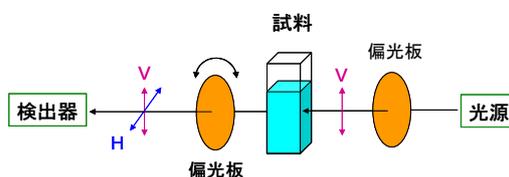


図 1 従来の蛍光偏光測定の模式図

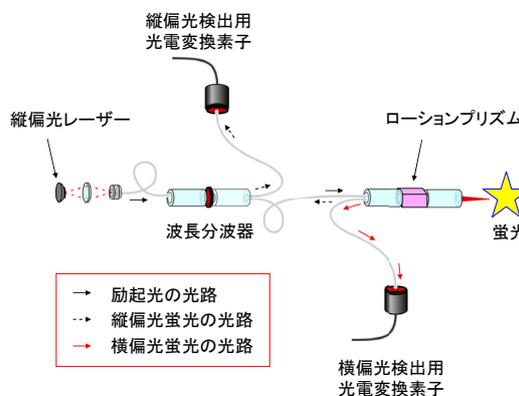


図 2 蛍光偏光測定用デバイスの光学配置

(2) 液晶ディスプレイと CCD を組み合わせた蛍光偏光測定システム：一般に、蛍光偏光度 P は次の式で表される。

$$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$$

ここで I_{\parallel} と I_{\perp} は励起光の偏光に対して水平および垂直な偏光の蛍光強度である。図 3 上に示したように液晶ディスプレイ (LCD) と CCD を利用することで、簡便に蛍光偏光度 P が測定できると考えた。LCD は電圧制御により透過する光の偏光面をスイッチングすることができる。これを特定の周波数 f Hz で切り替えて、CCD でそれぞれの蛍光を検出する。その場合、CCD 上には $(I_{\parallel} - I_{\perp})$ を振幅 (AC 成分)、 $(I_{\parallel} + I_{\perp}) / 2$

をオフセット (DC 成分) とする f Hz の信号が検出される。CCD を $4f$ Hz で動作させると、信号 1 周期に対して 4 枚の画像が得られる。この 4 枚の画像から、AC/2DC を演算して画像化すれば、蛍光偏光度 P を 1 度の測定で画像化できると考えられる (図 3 下)。

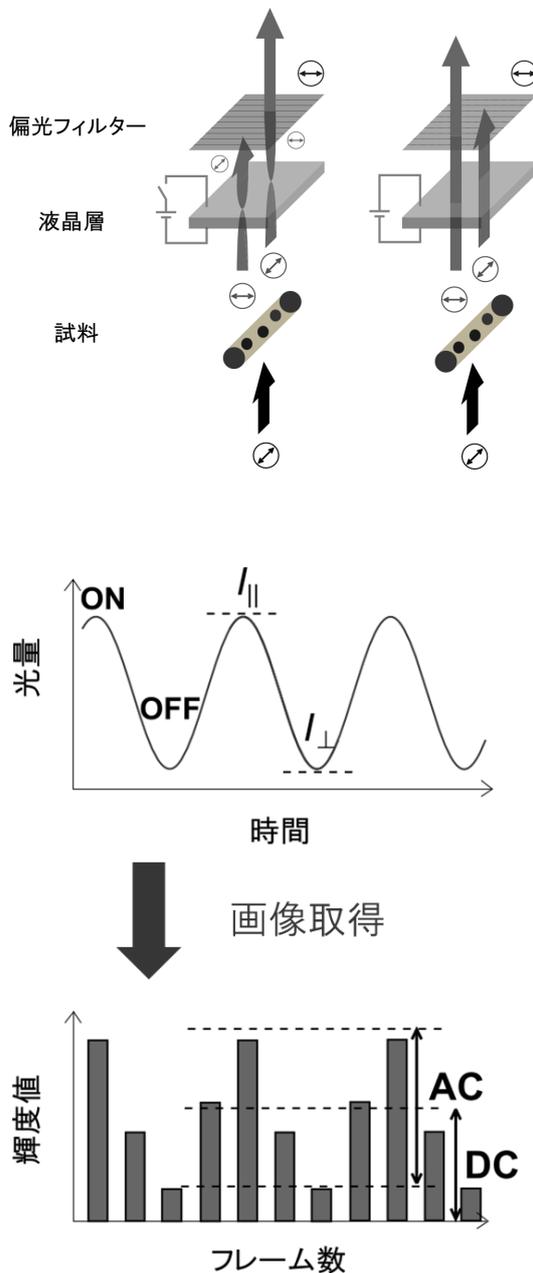


図 3 上：LCD による偏光スイッチングの概略
下：LCD-CCD 同期検出による画像取得の模式図

4. 研究成果

(1) ファイバー型小型蛍光偏光測定デバイス： 原理検証実験を行うために、半導体レーザー、フォトダイオード、ローションプリズム

ムを組み合わせた測定システムを構築した (図 4)。呼吸器系疾患の治療薬のテオフィリンを用いて、測定システムの性能評価を行った。フォトダイオードの前面に、励起光カットフィルターを設置することで、それぞれの偏光成分を検出した。構築した空間光学系の測定システムとマイクロ化学チップ (図 5) を用いて、テオフィリンの蛍光偏光免疫分析を行ったところ、構築したシステムで蛍光偏光測定が可能であることを確認した。次に、ファイバー光学系で測定システムを構築した (図 2)。構築したファイバー光学系の測定システムを用いて、テオフィリンおよび抗生物質 (クロラムフェニコール) の蛍光偏光免疫分析を行った。構築したシステムは、光ファイバーと複数の光学素子 (レンズ、干渉フィルター、フォトダイオード、ローションプリズム) が物理的に接触しており、それらの接触面で散乱・反射が起こる。そのため、試料から放出された蛍光の光強度がかなり弱くなってしまい、使用した光源では十分な強度を得ることができなかった。しかし、図 4 で示した測定システムは、目的の蛍光偏光測定が可能であることが確認できたので、光源の出力や各種光学素子の性能の向上、光ファイバーと光学素子の接触面の改良などにより、本原理で蛍光偏光測定が可能であることを検証できた。

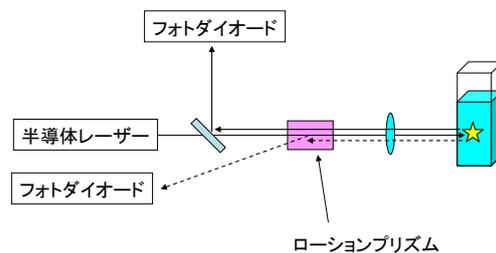


図 4 ローションプリズムを用いた蛍光偏光測定システムの光学配置

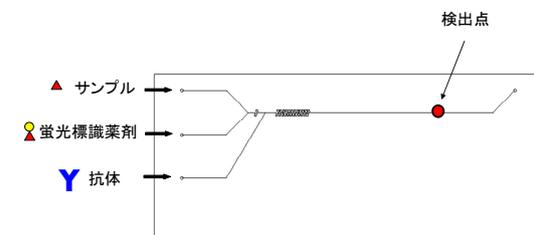


図 5 マイクロ化学チップの概略

(2) 液晶ディスプレイと CCD を組み合わせた蛍光偏光測定システム： 原理検証実験を行うために、液晶ディスプレイ (LCD) と CCD

を組み合わせた測定システムを構築した(図6)。最初に、フルオレセインの水/エチレングリコール溶液(V/V:0~100)を用いて蛍光偏光度の粘度依存性を測定した(図7)。粘度の増加とともにフルオレセインの偏光度の増加が観測された。市販の蛍光偏光度測定装置による結果も併せて示す。これらの結果より、構築した測定システムを用いて、目的の蛍光偏光度測定が可能であることを確認できた。さらに、構築した測定システムとキャピラリー型マイクロデバイスを用いて、クロラムフェニコールの蛍光偏光免疫分析を行った。その結果を図8に示す。市販の蛍光偏光度測定装置による結果も併せて示す。測定誤差が大きいものの、測定結果は蛍光偏光度測定装置の結果と良い一致を示した。測定誤差の原因は、光学系や信号処理プロセスにあると考えられ、それらを最適化・改良することで、改善することができると考えられる。

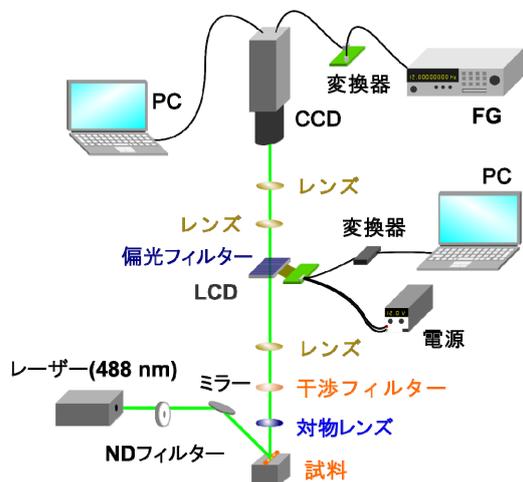


図6 LCD-CCDを利用した測定システムの概略

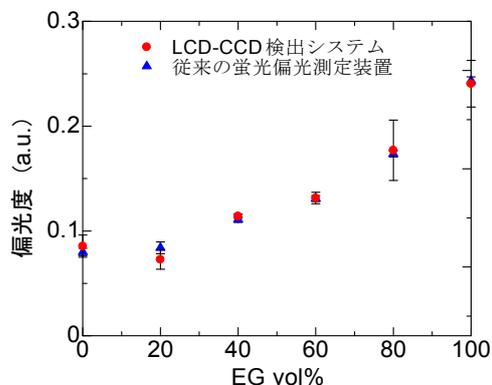


図7 偏光度の粘度依存性(フルオレセインの水/エチレングリコール溶液)

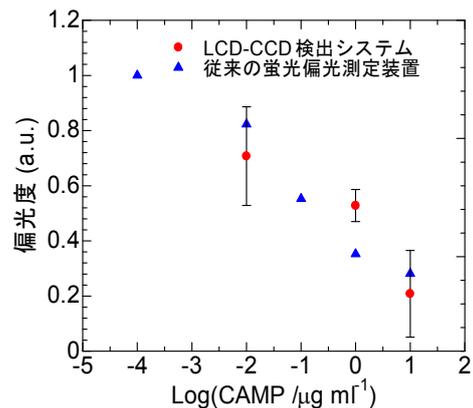


図8 クロラムフェニコールの検量線

本研究では、2つの新しい蛍光偏光度測定システムを構築し、それぞれの原理検証実験を行った。それらの結果、両システムともに原理的に蛍光偏光度測定が可能であることを確認した。今後は、システムを構成する光学素子・電気素子および制御系の最適化・改良を行うことで、高性能の蛍光偏光度測定システムが実現すると期待できる。また、これらを小型化・集積化することで、安価な小型蛍光偏光度測定装置が実現できるものと思われる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

- ① 若尾撰 他、LCD-CCD同期法を利用した蛍光偏光度測定システムの開発、化学とマイクロ・ナノシステム学会第29回研究会、平成26年5月23日、日本女子大学
- ② 若尾撰 他、蛍光偏光免疫測定に向けた新規同期検出システムの開発、日本化学会北海道支部2014年夏季研究発表会、平成26年7月21日、苫小牧工業高等専門学校

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 偏光分析装置

発明者: 渡慶次学、若尾撰、火原彰秀

権利者: 北海道大学、東京工業大学

種類: 特許

番号: 特願2014-102446

出願年月日: 26年5月16日

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

http://labs.eng.hokudai.ac.jp/labo/toke-shi_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡慶次 学 (TOKESHI, Manabu)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：24655054