

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21710125  
 研究課題名（和文） マルチスポット表面放射集積半導体レーザを用いた2波長励起蛍光免疫センサの研究  
 研究課題名（英文） Research on two-wavelength fluorescence immunosensor system using multispot surface-emitting integrated semiconductor lasers  
 研究代表者  
 上向井 正裕 (UEMUKAI MASAHIRO)  
 大阪大学・工学研究科・助教  
 研究者番号：80362672

## 研究成果の概要（和文）：

コンパクトで多項目一括検査可能な2波長蛍光免疫センサへの応用を目指し、赤色および近赤外のマルチスポット表面放射集積半導体レーザの設計・作製を行った。赤色集積レーザにおいては5×5および7×7のマルチスポットが得られ、近赤外においても同様のマルチスポット出力が得られる出力結合器を作製した。またノッチフィルタとロングパスフィルタの組み合わせた励起光カットフィルタを用い、赤色・近赤外の半導体レーザ励起による蛍光検出予備実験に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

Compact and low-cost semiconductor laser-induced fluorescence detection systems for simultaneous multiple detection can be realized by combination of grating coupled surface-emitting lasers and microfluidic structures. We designed and fabricated red and near-infrared distributed Bragg reflector lasers integrated with the phase-shifted grating coupler for multisport focusing. 5×5 and 7×7 spot arrays were obtained from the red integrated laser. The grating coupler designed for near-infrared light also emitted a multispot array. By combination of the semiconductor lasers, dual-band filter and fluorescence dyes for red and near-infrared light, preliminary test of two-wavelength semiconductor laser-induced fluorescence detection was demonstrated.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：半導体レーザ、光集積デバイス、微小流路、蛍光検出、免疫センサ

## 1. 研究開始当初の背景

近年バイオ・医療分野において、DNA・タンパク質解析や免疫検査などにはマイクロプレートが主に用いられており、結果の読み取りには大型で高価なマイクロプレートレ

ーダが使用されている。このうちDNA解析においては非常に集積度の高いDNAアレイチップが活発に研究され、すでに実用化されている。タンパク質解析・免疫検査においては種々の抗体を配列したプロテインチップが

研究され、サイトカインチップなどごく一部が実用化されているものの、DNA チップに比べて集積度・実用化の点で大きく遅れている。この種のチップ用の解析・検査装置も、主として白色ランプを光源として蛍光検出を行うため大型で非常に高価である。またプロテインチップ自体もまだまだ高価である。

申請者はこれまで、サブミクロンオーダーの極微細周期構造を集積した種々の半導体モノリシック光集積デバイスを実現しており、微細加工技術を応用した微小流路マイクロチップについても研究を行ってきた。この種の表面放射集積半導体レーザとマイクロビーズをアレイ状に封入したマイクロチップを組み合わせれば、チップ・検出器ともに安価でコンパクトなうえ、多項目一括検査が可能な半導体レーザ励起蛍光検出システムを構築できる。また光源となる表面放射集積半導体レーザはチップサイズが数 mm と非常に小さいため、異なる発振波長の表面放射レーザを励起光源に用いても装置全体のサイズをほぼ維持したまま多波長励起蛍光免疫センサシステムを実現することが可能である。この装置が実用化できれば数滴の血液で多項目のアレルギー検査を各医療機関でその場で判定できるようになり、患者の経済的・時間的・身体的負担を大幅に減らすことができると考える

## 2. 研究の目的

本研究では、2次元マルチスポットアレイの表面放射光を出力できる赤色半導体レーザ（発振波長 655nm）および近赤外半導体レーザ（発振波長 775nm）を励起光源とし、抗原抗体反応を検出するコンパクトな2波長励起蛍光免疫センサを実現する。例えばアレルギー検査などに応用する場合、検査したい抗体に特異的に反応する抗原を吸着させた直径 90 $\mu$ m のマイクロビーズを用意し、これらを2次元配列した微小流路マイクロチップを作製する。これに抗体を含む試薬（例えば被験者の血清）を注入すると、対応する抗原を固定化したマイクロビーズにのみ抗体が付着するので、さらにこの捕捉された抗体を蛍光色素で標識する。すべてのマイクロビーズをマルチスポット表面放射レーザで励起して、励起光カットフィルタを通して近赤外光にも感度を有するモノクロ CCD カメラで蛍光観測すれば、試薬に含まれる複数の抗体を一度に特定・定量することができる。ひとつのマイクロビーズに2種類の抗原を付着させておけば、2波長で励起することにより2項目の検査が行える。2波長励起を行うことで同数のマイクロビーズアレイからより詳細なアレルギー情報が得られるようになる。また従来のプロテインチップでは、スポット間で

特性がばらつくなどの問題がある。しかしマイクロビーズを用いれば、マイクロチューブ内で攪拌しながらタンパク質をビーズ表面に均一に付着させることができるうえ、検査項目数を拡大することも容易である。

## 3. 研究の方法

蛍光検出の予備実験：これまでの研究で表面放射 GaInP 赤色半導体レーザアレイ（発振波長 655 nm）を用いて、蛍光色素 Alexa Fluor 647 を付着させた直径 90 $\mu$ m のマイクロビーズアレイを励起することで、半導体レーザ励起蛍光検出の実験に成功している。AlGaAs レーザ（発振波長 775nm）においても、作製済みの端面出射 DBR レーザと赤外用蛍光色素 Alexa Fluor 790 を付着させたビーズを用いて、同様の蛍光検出の予備実験を行う。上記の2波長で蛍光検出を行うには、波長 655nm 近傍と 775nm 近傍の両方をカットする励起光カットフィルタが必要であるが、このようなフィルタは市販されていない。そこで 664nm 以下の波長をカットするロングパスフィルタと波長 785nm 近傍をカットするノッチフィルタを組み合わせ、本研究に必要な特性を有する励起光カットフィルタとして利用できることを確認する。

マルチスポット表面放射集積半導体レーザの設計・作製：これまで実績のある赤色曲線 DBR レーザに、3 $\times$ 3 のマルチスポット表面放射光が得られる多焦点位相シフトグレーティング結合器を集積したマルチスポット表面放射集積レーザを設計・作製する。単焦点のグレーティング結合器を2次元のセグメントに分割し、各領域内で半周期ごとにグレーティングラインを光軸方向にシフトさせて位相変調を与えることで、マルチスポットアレイが得られる。3 $\times$ 3 の各スポットで強度が均一になるよう設計し、実際に表面放射レーザの作製を行った。作製したレーザを CW 駆動して表面放射光を観察したところ、ほぼ均一の強度の 3 $\times$ 3 スポットアレイが得られている。多焦点位相シフトグレーティング結合器を 3 $\times$ 3 のマイクロビーズアレイの同時励起に必要なスポットアレイ（スポット径 100 $\mu$ m、スポット中心間隔 400 $\mu$ m）が得られるよう最適化し、これを集積した発振波長 655nm の GaInP レーザを作製する。発振波長 775nm のレーザについても同様の手法でグレーティング結合器を設計でき、実際にマルチスポット表面放射 AlGaAs レーザを作製してその諸特性を評価する。また多焦点出力結合器は、単焦点の出力結合器のグレーティングラインに周期的な連続位相変調を与えることで任意のスポット数のマルチスポットアレイを形成できる。単一のレーザでより規模の大きいマルチスポットアレイを得ることをめざ

し、例として5×5および7×7のスポットを等強度に出射する出力結合器を設計し、これを集積化したレーザを作製する。

マイクロビーズアレイ封入微小流路マイクロチップ作製：微小流路マイクロチップはPDMSを用いて作製する。厚膜レジストSU-8を用いて型を形成し、これにPDMSを流しこんで固化させることで容易に微小流路チップを大量生産できるうえ、平面に対する吸着性が高く接着剤なしでカバーガラスと貼り合わせることができる。微小流路（幅60 $\mu\text{m}$ 、高さ120 $\mu\text{m}$ ）の途中に2次元アレイ状に空間（一辺120 $\mu\text{m}$ ）を設け、この空間にマイクロビーズ（直径90 $\mu\text{m}$ ）をひとつずつ封入することで、液体を流したときにビーズの流出を防ぐ構造とする。すでに蛍光色素を付着させたマイクロビーズを封入したPDMSチップの作製と赤色半導体レーザ励起蛍光検出の予備実験に成功している。バイオを専門とする研究者の協力のもと、あらかじめ複数の抗原を付着させたマイクロビーズ（まずは1つのビーズには1つの抗原）を封入しておき、抗原と特異的に結合する1次抗体、および蛍光標識2次抗体を微小流路に流す。蛍光顕微鏡下での蛍光観察により、実際に微小流路内で抗原抗体反応が行われることを確認する。最初は上図のような微小流路でテストを行うが、流す試薬がマイクロビーズ周辺で十分攪拌されるような構造を微小流路内に導入するなどして抗原抗体反応の効率向上を図る。

蛍光免疫センサの動作確認：まずは蛍光色素Alexa Fluor 647を異なる濃度で付着させたマイクロビーズを封入したマイクロチップを作製し、マルチスポット表面放射GaInP量子井戸レーザとモノクロCCDカメラとを組み合わせて蛍光観察することにより、蛍光強度の蛍光色素濃度依存性を測定し、色素濃度の検出限界および定量特性を明らかにする。蛍光色素Alexa Fluor 790とマルチスポット表面放射AlGaAs量子井戸レーザの組み合わせについても、同様に蛍光検出特性を明らかにする。つぎに両表面放半導体レーザとマイクロビーズアレイ封入PDMSチップおよび励起光カットフィルタ・高感度モノクロCCDカメラを組み合わせ、実際に微小流路内で抗原抗体反応をおこして蛍光観測することにより蛍光免疫センサとしての動作確認を行う。現在、微量の血液でスギ花粉・ダニなどのアレルギーを簡便・多項目・短時間（15分以内）で検査でき、各医療機関に配備できる装置の開発が強く望まれており、この安価でコンパクトな半導体レーザ励起蛍光免疫センサをより実用的なシステムへと改善する。

#### 4. 研究成果

これまで3×3の2次元マルチスポットを

形成できる多焦点2値位相シフトグレーティング結合器を集積した半導体レーザを実現してきたが、これを4本配列してレーザアレイとすることで6×6のマルチスポットアレイを得ることを試みた。等間隔の6×6マルチスポットを構成するよう各レーザのグレーティング結合器の設計を行い、レーザアレイを作製した。スポット強度が等強度となるよう各レーザに注入する電流を調整し、スポット中心間隔約390 $\mu\text{m}$ と設計値400 $\mu\text{m}$ に近い6×6マルチスポットを得ることに成功した。

DBRレーザ発振器、テーパ型光増幅器および多数のスポット光を出射できる出力結合器を集積したレーザを設計・作製し、単一のレーザでより規模の大きいマルチスポットアレイを得ることを試みた。多焦点出力結合器は、単焦点の出力結合器のグレーティングラインに周期的な連続位相変調を与えることで任意のスポット数のマルチスポットアレイを形成する。例として5×5および7×7のスポットを等強度に出射する出力結合器を設計し、これを集積化したレーザを作製した。発振器、光増幅器それぞれに同期したパルス電流を注入し、出射光を測定した。スポット強度間に多少のばらつきはあったが、各集積レーザから5×5、7×7のマルチスポットアレイが得られ、多焦点出力結合器・増幅器集積化DBRレーザの実現に成功した。

780nm帯赤外半導体レーザ用の単焦点出力結合器のグレーティングラインに、周期的な連続位相変調を与えることで任意のスポット数のマルチスポットアレイを形成するグレーティング出力結合器を実現する。例として5×5および7×7のスポットを等強度に出射する出力結合器を設計し、赤外半導体レーザ用AlGaAs量子井戸導波路上に作製した。同じ導波路を用いて作製した半導体レーザからのレーザ光を導波路内に端面結合することで、作製した出力結合器からマルチスポット表面放射光を得ることに成功した。

吸収ピーク波長が作製した赤色半導体レーザ（発振波長655nm）と赤外半導体レーザ（同780nm）に近い蛍光色素Alexa Fluor 647および同790を用意し、これらを別々のマイクロビーズに付着させカバーガラス上に配列した。赤色レーザ光をカットするロングパスフィルタと赤外レーザ光をカットするノッチフィルタを組み合わせ励起光カットフィルタとし、これを通してCCDカメラで蛍光観察を試みた。赤色半導体レーザでマイクロビーズアレイを照射したところAlexa Fluor 647の付着したビーズのみが、赤外半導体レーザで同じビーズアレイを照射したところAlexa Fluor 790の付着したビーズのみが観察され、半導体レーザによる2波長励起蛍光検出の予備実験に成功した。

## 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 1 件)

1. S. Takushima, M. Uemukai and T. Suhara, "GaInP red distributed-Bragg-reflector laser integrated with phase-shifted grating coupler for multispot focusing," Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, vol. 48, (2009), 030206.

[その他]

ホームページ等

<http://ioe.eei.eng.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上向井 正裕 (UEMUKAI MASAHIRO)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：80362672