

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01207

研究課題名(和文) 拡張ナノ熱光学流体デバイスの創成と無標識一分子検出の実現

研究課題名(英文) Creation of Extended-Nano Thermo-Optical Fluidic Device and Realization of Nonlabeled Single Molecule Detection

研究代表者

北森 武彦 (Kitamori, Takehiko)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任教授

研究者番号：60214821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ・拡張ナノ流体デバイスに代表されるように微小空間を活用した分析法が発展している。当研究室ではこれまでに、熱レンズ顕微鏡(TLM)や光熱変換光位相差検出(POPS)を開発し、微小空間における非蛍光分子の高感度検出を実現してきた。しかし、UV励起型のPOPS検出においては、拡張ナノ流路内で発生した熱の散逸や、干渉による光学的バックグラウンドの低減が十分でないなどの問題が存在し、TLM並みの高感度測定が難しかった。そこで本研究では、熱拡散によって失われた感度を回復するための熱光学層を集積化した流体デバイスと、バックグラウンドフリーを実現するPOPS検出器を開発して更なる高感度測定を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単一細胞中のタンパク質は少ないもので10コピーから存在するとされている。このような極めて少ない分子を計測する際、バルク空間に希釈してしまうとその濃度を決定することは困難となるから、極微小空間に閉じ込めたまま測定した方が有利である。当研究室では既に拡張ナノ流路を用いたクロマトグラフィーを初めとする単一細胞分析プロセスの開発に成功しており、本研究で開発したPOPSはその有効な検出法となる。また、フッ化カルシウムを熱光学層としてナノ流路の底面に集積化するために開発したプロセスは、今後他の電極、触媒、メタマテリアル等にも応用可能であり、ナノ流体化学プロセスの更なる発展に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Analytical methods utilizing small spaces, as represented by micro and extended-nano fluidic devices, have been developed. We have developed thermal lensing microscope (TLM) and photothermal optical phase shift (POPS) detection to detect non-fluorescent molecules in small spaces with high sensitivity. However, the UV-excitation POPS detection has some problems such as heat dissipation in the extended-nano channel and insufficient reduction of optical background due to interference, which hinders measurements with high sensitivity as TLM. In this study, we developed an extended-nano fluidic device with an integrated thermo-optic layer to recover the sensitivity loss due to the thermal diffusion and a background-free POPS detector to achieve ultrahigh sensitivity.

研究分野：分析化学

キーワード：光熱変換分光法 ナノ流体工学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マイクロ・ナノ流体工学デバイスに代表されるように、微小空間の持つ特性を活用した分析法が発展するにつれ、高感度な検出法が求められるようになってきた。従来、微小空間における検出法は蛍光法が主流であり、分子の大多数を占める非蛍光分子を検出するには蛍光標識をする必要があった。一方、当研究室ではこれまでに、非蛍光分子を高感度に検出することのできる光熱変換分光法に着目し、熱レンズ顕微鏡 (TLM) を開発してマイクロ空間における高感度検出を実現してきた。また、TLM に波動光学の原理を導入した光熱変換光位相差 (POPS) 検出法を開発し、代表長さ数 100 nm の拡張ナノ空間に適用可能であることを初めて実証してきた。さらに、UV 励起光を用いた POPS 検出器を開発し、蛍光標識していないタンパク質数 100 分子の検出に成功した。しかしながら、UV レーザーに対応した光学系の製作が困難であったことから、TLM 並みの高感度測定を拡張ナノ空間で実施することは困難であった。加えて、石英ガラス製の拡張ナノ流路内の溶液中で発生した熱が、熱拡散に伴ってガラスに伝達した際、水の屈折率が温度上昇に伴って低下するのに対し、ガラスの屈折率は上昇することから、屈折率変化が相殺してしまうという問題が存在していたため、100 nm 以下の空間での POPS 測定は依然として困難であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、POPS 検出のさらなる高感度化に向け、以下の項目に取り組む。

#### A 拡張ナノ熱光学流体デバイスの開発

ナノ流路近傍への熱光学層の集積化により POPS 検出を高感度化するデバイスを開発する。

#### B UV 励起 POPS 検出器の性能向上

UV 励起 POPS 検出器における光学的バックグラウンドのさらなる低減に取り組む。

#### C 生体分子の無標識単一分子検出の実現

A、B を組み合わせることにより生体分子の無標識単一分子検出を実現する。

### 3. 研究の方法

研究項目 A では、ナノ流路底面にフッ化カルシウムによる熱光学層を集積化した。フッ化カルシウムは、水や大多数の液体と同様に温度上昇に伴って屈折率が低下する性質を持つ。また、水への溶解度が低いことから、基板の洗浄や流路内に液体を導入した状態での測定にも耐えられると判断した。フォトリソグラフィおよびドライエッチングによって作成した石英ガラス製ナノ流路の底面に真空蒸着法を用いて接着層となるクロムおよびフッ化カルシウムの薄膜を形成し、その上にシリカをスパッタリングした。フォトレジストを除去することによってリフトオフし、低温接合法によって上板と貼り合わせることでデバイスを完成させた。

研究項目 B では、可視光用に設計された市販の微分干渉 (DIC) プリズムを用いて UV 励起の POPS 検出器を構築した。従来の光学系では、対物レンズの近傍に DIC プリズムを配置する必要があったため、励起光 (UV レーザ) が DIC プリズムを通過せざるを得なかった。そのため、UV 光への耐久性と透過率を兼ね備えた特殊な DIC プリズムの設計・製作が必要であり、干渉の精度が犠牲になっていた。一方、本研究では図 1 に示すように、顕微鏡外部で DIC プリズムを用いて分離したプローブ光をリレー光学系を用いて顕微鏡に導入する光学系を採用したことにより、UV 励起光が DIC プリズムを通過することなく試料に集光されるような光学系を実現した。

研究項目 C では、A で作製したデバイスおよび B で開発した検出器を用いて性能評価を実施した。流路の底面のみに熱光学層を集積化したデバイスと、底面および上面に集積化したデバイスを作製し、検出性能に与える影響を比較評価した。

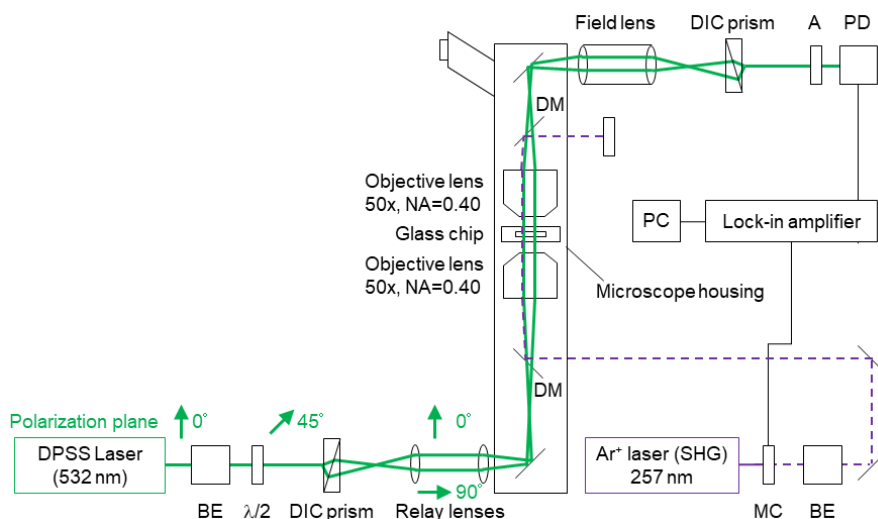


図 1. 本研究で構築した UV-POPS の光学系

#### 4. 研究成果

研究項目 A では、まずナノ流路底面に集積化した熱光学層を X 線光電分光法を用いて評価した。その結果、期待したとおりに Ca および F が検出されたが、Ca と F の存在比率は 1 : 1.6 となり F が不足していることが示唆された。また、膜厚は設計通りの値である 250 nm であることが確かめられた。さらに、リークテストの結果、400 kPa をかけてもナノ流路から液体が漏れ出さないことが分かり、流体デバイスとして十分な耐圧を有していることが分かった。

研究項目 B では、まずプローブ光が設計通りに分離・干渉していることを確認した。干渉したプローブ光の明暗の強度比を測定したところ 340 : 1 となり、従来の UV 励起 POPS 光学系 (77 : 1) よりも大きく改善していた。また、蛍光標識していないウシ血清アルブミン (BSA) を用いて深さ 2.1  $\mu\text{m}$  の流路中で検出限界を評価したところ 30 分子で、従来 (300 分子) よりも 1 桁低かった。以上の結果より、干渉の精度を向上し、光学的バックグラウンドをさらに低減することによって微小信号の検出を改善するという目的を達成した。

フッ化カルシウムの熱光学層を流路の底面のみに集積化したデバイスとしなかったデバイスについて、流路の深さを 320 nm に揃えて感度 (検量線の傾き) を比較したところ、それぞれ 6.8 と 1.9 であった。また、検出限界はそれぞれ 5000 分子と 2000 分子であった。この結果より、熱拡散によって失われた感度を熱光学層の導入によって回復するという目的を達成した。また、熱光学層を両面に集積化したデバイスを用いた実験も実施したが、検出限界は 1700 分子に留まった。単一分子検出の実現には、今後熱光学層の厚みや測定条件などの更なる最適化が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiyuki Tsuyama, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori	4. 巻 -
2. 論文標題 SIMPLE AND LABEL-FREE ULTRA-SENSITIVE CONCENTRATION DETECTION METHOD IN 10-1000 nm SPACE UTILIZING OPTICAL DIFFRACTION	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS 2018	6. 最初と最後の頁 953-954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tokio Sato, Kazuma Mawatari, Hisashi Shimizu, Takehiko Kitamori	4. 巻 -
2. 論文標題 THERMAL DIFFUSIVITY OF WATER CONFINED IN EXTENDED-NANO SPACE: MEASUREMENT OF EXTENDED-NANO CHANNELS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS 2018	6. 最初と最後の頁 450-451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hisashi Shimizu, Shigenori Takeda, Kazuma Mawatari, and Takehiko Kitamori	4. 巻 -
2. 論文標題 ULTRASENSITIVE DETECTION OF NONLABELED PROTEIN USING UV PHOTOTHERMAL OPTICAL PHASE SHIFT DETECTION	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS 2018	6. 最初と最後の頁 971-972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hisashi Shimizu, Naoya Miyawaki, Yoshihiro Asano, Kazuma Mawatari, and Takehiko Kitamori	4. 巻 89
2. 論文標題 Thermo-Optical Characterization of Photothermal Optical Phase Shift Detection in Extended-Nano Channels and UV Detection of Biomolecules	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6043-6049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.7b00630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Sato, H. Shimizu, K. Mawatari, and T. Kitamori	4. 巻 -
2. 論文標題 IN-SITU MEASUREMENT OF THERMAL DIFFUSION CONSTANT OF LIQUID USING PHOTOTHERMAL OPTICAL PHASE SHIFT	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS 2017	6. 最初と最後の頁 295-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Tsuyama, K. Mawatari, and T. Kitamori	4. 巻 -
2. 論文標題 SIMPLE AND ULTRA SENSITIVE DETECTION METHOD OF NON-FLUORESCENT MOLECULES IN EXTENDED-NANO SPACES UTILIZING LIGHT DIFFRACTION: INVESTIGATION OF SIGNAL GENERATION MECHANISM	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS 2017	6. 最初と最後の頁 537-538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S. Takeda, H. Shimizu, K. Mawatari, and T. Kitamori	4. 巻 -
2. 論文標題 PHOTOTHERMAL OPTICAL PHASE SHIFT MICROSCOPY USING RELAY OPTICS FOR SENSITIVE DETECTION OF BIOMOLECULES	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS 2017	6. 最初と最後の頁 575-576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 11件)

1. 発表者名 Yoshiyuki Tsuyama, Kazuma Mawatari, Takehiko Kitamori
2. 発表標題 SIMPLE AND LABEL-FREE ULTRA-SENSITIVE CONCENTRATION DETECTION METHOD IN 10-1000 nm SPACE UTILIZING OPTICAL DIFFRACTION
3. 学会等名 MicroTAS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tokio Sato, Kazuma Mawatari, Hisashi Shimizu, Takehiko Kitamori
2. 発表標題 THERMAL DIFFUSIVITY OF WATER CONFINED IN EXTENDED-NANO SPACE: MEASUREMENT OF EXTENDED-NANO CHANNELS
3. 学会等名 MicroTAS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisashi Shimizu, Shigenori Takeda, Kazuma Mawatari, and Takehiko Kitamori
2. 発表標題 ULTRASENSITIVE DETECTION OF NONLABELED PROTEIN USING UV PHOTOTHERMAL OPTICAL PHASE SHIFT DETECTION
3. 学会等名 MicroTAS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tokio Sato, Kazuma Mawatari, Hisashi Shimizu, Takehiko Kitamori
2. 発表標題 Thermal diffusivity of water confined in extended-nano space: Evaluation of channel size effect
3. 学会等名 Tokyo International Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tokio Sato, Hisashi Simizu, Kazuma Mawatari and Takehiko Kitamori
2. 発表標題 THERMAL DIFFUSIVITY MEASUREMENT OF LIQUID CONFINED IN MICRO/EXTENDED-NANO SPACE
3. 学会等名 ISMM 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤言生、馬渡和真、清水久史、北森武彦
2. 発表標題 拡張ナノ空間における熱拡散係数測定法
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津山慶之、馬渡和真
2. 発表標題 光回折を利用した拡張ナノ空間におけるラベルフリー分子検出法の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第38回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津山慶之、馬渡和真、北森武彦
2. 発表標題 光回折を利用した拡張ナノ空間における非蛍光性分子の検出法の最適化と性能評価
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Tsuyama, K. Mawatari, and T. Kitamori
2. 発表標題 Simple and Versatile Detection Method of Non-fluorescent Molecules in Extended-nano Channel Utilizing Optical Diffraction: Theory And Signal Generation Mechanism
3. 学会等名 17th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 T. Sato, H. Shimizu, K. Mawatari, and T. Kitamori
2 . 発表標題 IN-SITU MEASUREMENT OF THERMAL DIFFUSION CONSTANT OF LIQUID USING PHOTOTHERMAL OPTICAL PHASE SHIFT
3 . 学会等名 Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Y. Tsuyama, K. Mawatari, and T. Kitamori
2 . 発表標題 SIMPLE AND ULTRA SENSITIVE DETECTION METHOD OF NON-FLUORESCENT MOLECULES IN EXTENDED-NANO SPACES UTILIZING LIGHT DIFFRACTION: INVESTIGATION OF SIGNAL GENERATION MECHANISM
3 . 学会等名 Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 S. Takeda, H. Shimizu, K. Mawatari, and T. Kitamori
2 . 発表標題 PHOTOTHERMAL OPTICAL PHASE SHIFT MICROSCOPY USING RELAY OPTICS FOR SENSITIVE DETECTION OF BIOMOLECULES
3 . 学会等名 Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 S. Takeda, H. Shimizu, K. Mawatari, and T. Kitamori
2 . 発表標題 Development of UV excitation photothermal optical phase shift detector for single nonfluorescent molecule detection
3 . 学会等名 AMN/ISMM/APBCM/ANZNM2017 (国際学会)
4 . 発表年 2017年



1. 発表者名 津山慶之・馬渡和真・北森武彦
2. 発表標題 光回折を利用した拡張ナノ空間における簡易で汎用的な分子検出法の開発
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹田薫識・清水久史・馬渡和真・北森武彦
2. 発表標題 生体分子高感度検出にむけた紫外励起光熱変換光位相差検出法 の開発
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹田薫識・清水久史・馬渡和真・北森武彦
2. 発表標題 バックグラウンドフリーUV励起光熱変換光位相差検出法の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第36回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 津山慶之・馬渡和真・北森武彦
2. 発表標題 光回折を利用した拡張ナノ空間での非蛍光分子検出法の信号発生機構の検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第35回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤言生・清水久史・馬渡和真・北森武彦
2. 発表標題 拡張ナノ空間における水の熱物性解明に向けた熱拡散係数測定法の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第35回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤言生・清水久史・馬渡和真・北森武彦
2. 発表標題 拡張ナノ空間への応用を目的とした熱拡散係数測定法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会 第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Tsuyama, K. Mawatari, and T. Kitamori
2. 発表標題 SIMPLE AND ULTRA SENSITIVE DETECTION METHOD OF NON-FLUORESCENT MOLECULES IN EXTENDED-NANO SPACES UTILIZING LIGHT DIFFRACTION : INVESTIGATION OF SIGNAL GENERATION MECHANISM
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北森研究室ホームページ <a href="http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/kitamori/cms/">http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/kitamori/cms/</a> 北森研究室ホームページ <a href="http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/kitamori/">http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/kitamori/</a>
--

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	嘉副 裕  (Kazoe Yutaka)  (20600919)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・講師    (32612)	
研究分担者	森川 響二郎  (Morikawa Kyojiro)  (20796437)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教    (12601)	
研究分担者	馬渡 和真  (Mawatari Kazuma)  (60415974)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授    (12601)	
研究分担者	清水 久史  (Shimizu Hisashi)  (60631281)	東京大学・ニューロインテリジェンス国際研究機構・特任助教    (12601)	