

令和元年6月11日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19097

研究課題名（和文）新規光技術に基づく界面選択的流速計測法の開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of novel flow velocimetry at the solid-liquid interface

研究代表者

乙須 拓洋（Otosu, Takuhiro）

埼玉大学・研究機構・助教

研究者番号：90564948

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：固液界面に代表される様々な界面近傍での物質の流れがバルクの流れとどう異なるかを理解することは、界面での効率的な化学反応の制御、血管内壁近傍での血液の流れの理解、などあらゆる分野における研究課題について重要な知見を与える。本研究では申請者が細胞膜研究を目的として開発を行った、エバネッセント光の干渉を利用する新規分光装置を界面での流速計測に応用し、高い精度での界面選択的流速計測法の確立を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では光学顕微鏡に基づく新規光技術を界面での流速計測に適用することにより、その応用分野を拡げることが目的とするものである。界面での流れの理解は、流体力学のみならず化学（界面での化学反応の制御）、生物学（血管近傍の流れの理解）、工学（キャピラリー内の管摩擦抵抗の制御）分野においても非常に重要な課題であるため、新規手法開発による定量的な計測と、それに基づく界面の流れの理解に向けた本研究は大きな学術的、社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Understanding the flow of particles at the solid-liquid interface has important implications on the regulation of the effective chemical reaction at the interface as well as the elucidation of blood flow at the inner surface of blood vessel. In the present study, I aimed at developing new optical technique for flow velocity measurement at the solid-liquid interface.

For that purpose, I applied a novel fluorescence microscope system that I recently developed for biomembrane study. This system utilizes the interference of evanescent waves to excite samples. The fringe pattern (standing evanescent-wave) generated by the interference of the evanescent waves enables us to analyze the flow velocity with high spatial resolution beyond the diffraction limit. To apply this new technique to the flow-velocity measurement, I constructed surface-sensitive flow velocimetry by combining standing evanescent-wave fluorescence microscope with microfluidic device.

研究分野：生物物理化学

キーワード：流速計測 蛍光相関分光法 全反射顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

固液界面に代表される様々な界面近傍での物質の流れは、バルクでの流れとは異なりそれぞれの相を形成する分子の性質や相互作用の強さなどに大きく依存する。このような界面における流れの理解は界面での効率的な化学反応の制御や、血管内壁近傍での血液の流れの理解などあらゆる分野における研究課題について重要な知見を与える。このような観点から界面での精密な流速計測を行うための手法開発が強く求められてきた。これまでのところ主に用いられている手法は固体基板上で光を全反射させることにより発生するエバネッセント光を照明光として利用し、通過する粒子像追跡による流速計測法、もしくは蛍光粒子が観測領域を通過する際に生じる過渡的な蛍光強度の増大を解析する計測法のいずれかがとられてきた。しかしながら、前者の手法では明るい蛍光ビーズの使用が求められるため、粒子径の大きな蛍光ビーズが界面近傍の流れを乱してしまう可能性が懸念されている。一方後者の方法では小さな蛍光色素でも計測が可能となるが、小さな色素分子では界面からバルク層への分子の拡散が早く起こるため、観測領域を通過する前に深さ方向に分子が流れてしまい正確な流速計測ができないといった欠点があった(図1上)。

2. 研究の目的

本研究では1で示した従来の手法の欠点を克服するため、エバネッセント光の干渉による干渉縞を照明光とした新たな流速計測装置の開発を研究目的とした。図1下に示すように、2つのレーザー光によりエバネッセント光を発生させそれらを干渉させた場合、干渉縞照明下を通過する分子からの蛍光信号は、干渉縞の濃淡(励起光の強弱)に従って強度が揺らぐことが予想される。この揺らぎを解析する事により、微小な干渉縞の間隔(~100 nm)を通過する粒子の流速計測が可能となる。この干渉縞の間隔は従来の計測法における観測領域幅よりもはるかに狭く超解像空間分解能を有していることから、小さな分子であってもバルク層に拡散する前にその流速を解析的に求めることが可能になると期待される。

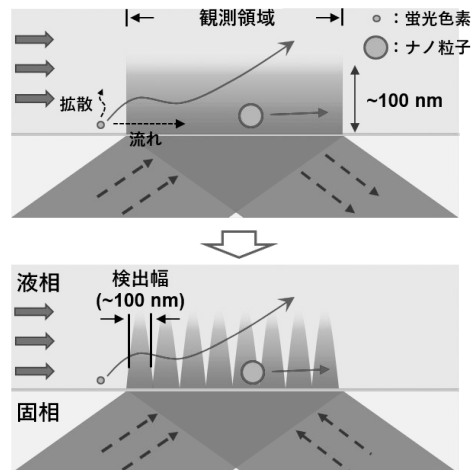


図1：従来の流速計測法(上)と本研究で適用する計測法(下)の概念図。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、まず微小流路セルとエバネッセント光の干渉を利用する蛍光顕微鏡を組み合わせた新規の界面選択的流速計測装置を立ち上げる。装置の概略図を図2に示す。本装置では励起光源から発生されるレーザー光をビームスプリッタで均等に2つに分け、対物レンズの辺縁部にそれぞれ照射することで2つのエバネッセント光を発生させる。これら2つのエバネッセント光はカバーガラス表面の同位置で発生するため、2つのエバネッセント光は干渉し干渉縞を形成する。干渉縞により励起された試料からの蛍光は同対物レンズで収集後、光学フィルタにより散乱光を除去したのち均等に2つに分け、2台の検出器で検出する。解析では2つの検出器から得られる信号の相互相関をとることで解析を行う。これにより検出器由来のアーチファクト(アフターパルス)を除去し、高い時間分解能(約100 ns)で正確な流速計測が可能となる。

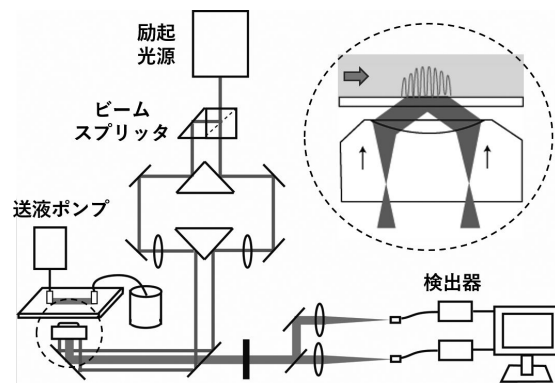


図2：測定に使用する装置の概略図。右上の図は対物レンズ近傍を拡大して示している。

解析では試料から検出される蛍光信号の時系列データより式1を用いて相関関数を計算する：

$$G = \frac{\langle I(T)I(T+\Delta T) \rangle}{\langle I(T) \rangle^2}, \quad (1)$$

ここで、 $I(T)$ は測定時刻 T における蛍光強度、 ΔT は任意の遅延時間、 $\langle \rangle$ は T に関する平均を意味している。干渉縞非存在下での計測の場合、検出される蛍光強度は焦点領域内への出入りによって揺らぐため、焦点領域に入ってきてから出ていくまでの時間に対応する時定数で相関関数 G が減衰することが予想される。その一方で干渉縞が存在する際、前者に加え干渉縞(励起光)の濃淡(強弱)を通過することによる蛍光信号の揺らぎが観測データに加わるため、相関関数は干渉縞一本を通過する時定数で変調することになる。この変調成分を取り出し、フーリエ変換することにより、干渉縞一本を通過する時定数から界面近

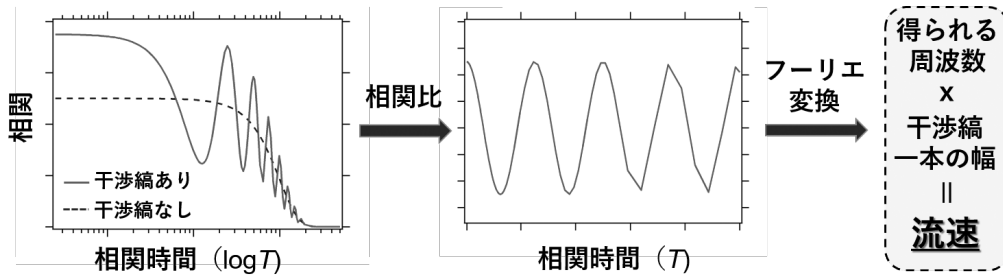


図3：得られるデータの解析手順．相関カーブの変調成分は蛍光分子が干渉縞一本を通過する時間を反映している．ゆえにフーリエ変換で得られる周波数と干渉縞一本の幅より，正確な流速を決定することができる．

傍の流速を計算することが可能となる(図3)．

以上の装置開発，ならびに解析法の確立を行う事により，超解像空間分解能での界面選択的な流速計測装置の構築ならびに流速計測法の確立が達成される．

4．研究成果

本研究ではまず図2に示す装置の開発を行った．顕微鏡システムについてはすでに構築が完成していたので，微小流路セルの開発ならびにサンプルホルダーの作製を行った．微小流路セルの作製にあたって，市販の微小流路セルはすべてのガラスが接着されており交換，洗浄が困難なものであったため，対物レンズ側のガラス基板が着脱可能なセルの作製を試みた．対物レンズ側のガラス基板には24 x 50 mmのカバーガラスを使用し，2穴開いたスライドガラスとシリコンスペーサーを介して接着させた．このシリコンスペーサーには細い溝が彫ってあるため，この部分が流路となる．また，シリコンスペーサーは着脱が容易であると考えられるため，様々な修飾ガラスを適用可能となることが予想された．しかし，実際には流速を上げるとシリコンスペーサーの間から溶液が漏れてしまう，カバーガラスの交換時にカバーガラスが割れてしまう等の問題が発生した．この点については，シリコンスペーサーの種類を変える，全体を抑えるようなサンプルホルダーの作製を行う等の改良を行い，何とか使用に耐えるセルの作製ができた．

次に立ち上げた装置を使用して通常の全反射顕微鏡配置(干渉縞なし)で流速計測が可能かテスト計測を行った．サンプルには粒径25 nmの蛍光ビーズを使用，シリコンスペーサーは厚さ200 μmのものに幅4 mmの溝が彫ってあるものを使用した．図4には異なる流速で得られた蛍光ビーズの相関関数を示している．結果より，流速に従って，約10 msに見られる相関減衰時間が早くなっていることが確認された．この事から，今回作成した微小流路セルを用いて，界面約100 nm近傍での流速計測が可能であることが示された．

この結果を受けて，次に干渉縞存在下で同様の計測を行った．結果を図5に示す．図に示したように，約10 msあたりに図4同様流速による相関減衰時定数の減少が見られた．加えて，図4では見られなかった100 μsでの減衰項が確認された．しかしながら，この早い減衰項は流速に依存せず一定の時定数を示した．また，その時定数から得られる蛍光ビーズの流速は，遅い減衰項から計算される流速よりもはるかに遅いものであり，むしろ流れのないときの蛍光ビーズの拡散速度に近い値となった．この結果について，流速や流路等条件の変更，ならびに装置の性能再確認を行ったが，何に起因するものか明らかにすることができなかった．

今後は今回の測定系を模したシミュレーションを行うなどして，このようなデータが得られた要因について追及していく予定である．

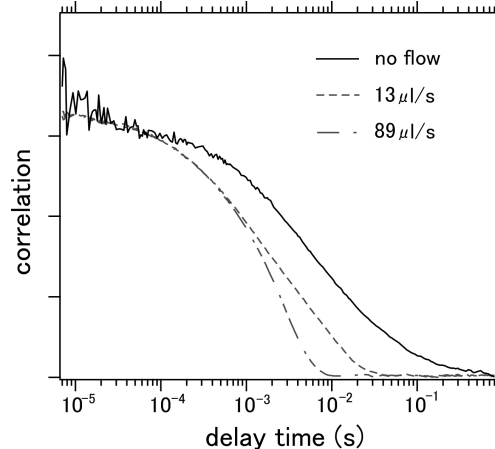


図4：通常の全反射顕微鏡で得た，異なる流速における蛍光ビーズの相関関数．

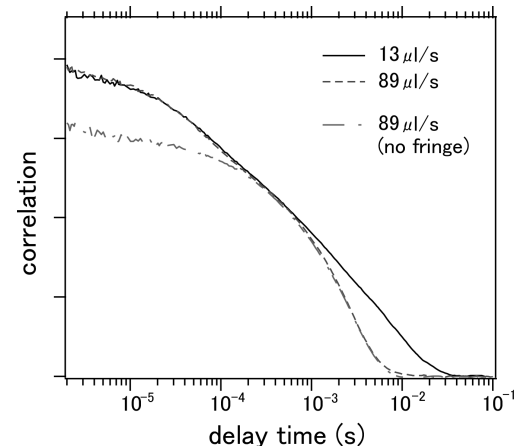


図5：干渉縞照明で得た，異なる流速における蛍光ビーズの相関関数．比較として通常の全反射系で得たデータ(no fringe)も示している．

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Shoichi Yamaguchi, Yudai Suzuki, Yuki Nojima, and Takuhiro Otsu “Perspective on Sum Frequency Generation Spectroscopy of Ice Surfaces and Interfaces” *Chem. Phys.* **522**, 199-210 (2019). 査読あり

Takuhiro Otsu and Shoichi Yamaguchi “Quantifying the Diffusion of Lipids in the Proximal/Distal Leaflets of a Supported Lipid Bilayer by Two-dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy” *J. Phys. Chem. B* **122**, 10315-10319 (2018). 査読あり

Takuhiro Otsu and Shoichi Yamaguchi “Two-dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy: Concepts and Applications” *Molecules* **23**, 2972 (2018). 査読あり

Takuhiro Otsu and Shoichi Yamaguchi “Total Internal Reflection Two-dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy” *J. Phys. Chem. B* **122**, 5758-5764 (2018). 査読あり

Takuhiro Otsu, Kaito Kobayashi, and Shoichi Yamaguchi “Local pH at the Surface of Hen Egg White Lysozyme” *Chem. Phys. Lett.* **693**, 165-169 (2018). 査読あり

Takuhiro Otsu and Shoichi Yamaguchi “Communication: Development of Standing Evanescent-wave Fluorescence Correlation Spectroscopy and its Application to the Lateral Diffusion of Lipids in a Supported Lipid Bilayer” *J. Chem. Phys.* **147**, 041101 (2017). 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

乙須 拓洋, 山口 祥一 「二次元蛍光寿命相関分光法による支持脂質二重膜中脂質の拡散特性に関する研究」第12回分子科学討論会, Oral, 2018年9月10日, 福岡国際会議場, 福岡

小林 海斗, 乙須 拓洋, 山口 祥一 「フルオレセインの酸塩基平衡に基づくタンパク質表面の微視的環境の研究」第7回CSJ化学フェスタ2017, Poster, 2017年10月17日, タワーホール船堀, 東京

乙須 拓洋, 山口 祥一 「全反射顕微鏡を用いた蛍光寿命相関分光法の開発と生体膜研究への応用」第11回分子科学討論会, Oral, 2017年9月15日, 東北大学川内北キャンパス, 宮城

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。