

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：20760113

研究課題名 (和文) 表面近傍における生体物質の三次元・直接追跡

研究課題名 (英文) Three-dimensional direct measurement of biological substances near-surface region

研究代表者

神田 健介 (KANDA KENSUKE)

首都大学東京 システムデザイン研究科 客員研究員

研究者番号：20446735

研究成果の概要：界面から数 100nm 以内の固液界面近傍における、ナノ粒子の濃度分布を直接観察により 3 次元的に測定する方法を確立し、これを用いて、濃度分布に溶媒の電気的特性や粒子のサイズが及ぼす影響を評価した。粒子サイズや溶媒の電気的特性によって、界面・粒子間の相互作用ポテンシャルは変化し、結果として界面近傍の粒子濃度分布が大きく変わることを見事に明らかにした。さらに、固体壁に電位を与えることで界面近傍における粒子濃度を増加させることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2400000	720000	3120000
2009 年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：流体工学

キーワード：粒子追跡、全反射蛍光法、生体物質位置測定、マイクロチャンネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 拡散律速な化学反応は反応場を小型化することで高効率化することが可能であり、このことを利用した医療分析デバイスが数多く報告されている。しかしながら、必ずしも拡散則通りに小型化が反応の高速化につながっておらず、これは反応が行われる壁面すなわち固液界面に電解液が作り出すポテンシャル障壁に起因すると考えられる。

(2) 流体工学および界面工学分野では、流体の抵抗低減効果における界面の影響評価や、種々のポテンシャルの影響評価のため、様々

な壁面近傍における粒子追跡法が開発されてきた。特に、我々はエバネッセント光と蛍光法を用いることで 3 次元的に界面近傍におけるナノ粒子の追跡手法を確立している。

(3) ナノ粒子のみならず生体物質の界面近傍における追跡手法を確立することができれば、界面近傍における抗原抗体反応などの免疫反応に、溶媒のイオン強度や生体分子サイズなどが及ぼす影響を明らかにすることができ、さらには界面における反応速度を制御することができる可能性もあるが、液体中の界面から数 100nm 以内という極限領域にお

ける 3 次元的な生体物質の直列追跡手法現状では見あたらない。

2. 研究の目的

(1) エバネッセント光を用いた 3 次元・直接粒子追跡法を微小な生体物質に適用可能にすること

(2) 確立した手法を用いて、界面と生体物質間の相互作用への、溶媒の電気的特性や生体物質のサイズ依存性などを明らかにすること

3. 研究の方法

(1) 界面近傍におけるナノ粒子の位置情報は、全反射蛍光粒子追跡法により得ることが出来る。ガラス壁/液体界面に照射された全反射光は界面極近傍の液体側に近接場光を生み出す。この近接場光の強度は界面からの距離に対して指数関数的に減少するため、この領域に存在する蛍光ナノ粒子の界面からの距離は、近接場光によって励起された蛍光強度に比例する。よって、蛍光強度情報より界面からの距離情報を得ることが可能であり、顕微鏡より得られる 2 次元位置情報と合わせて 3 次元的な粒子追跡が可能である。この手法を微小な生体分子へ拡張するため、粒子を微小化した際の影響を実験的に評価する。同時に、測定精度についても評価を行う。

(2) 全反射顕微鏡を用いた 3 次元粒子濃度測定システムを図 1 に示す。レーザを顕微鏡対物レンズを通して全反射角でマイクロチャンネルのガラス壁と流体界面へ入射させる。流路内の固液界面には全反射によるエバネッセント光が生じる。一方、蛍光を含む対象生体物質などのナノ粒子はシリンジポンプによりマイクロチャンネル内へ送液され、エバネッセント光によって蛍光を生じる。その蛍光像は高速 Intensified-CCD カメラによって撮影され、PC 上で画像処理を行うことで 3 次元的な粒子濃度分布を得ることが出来る。

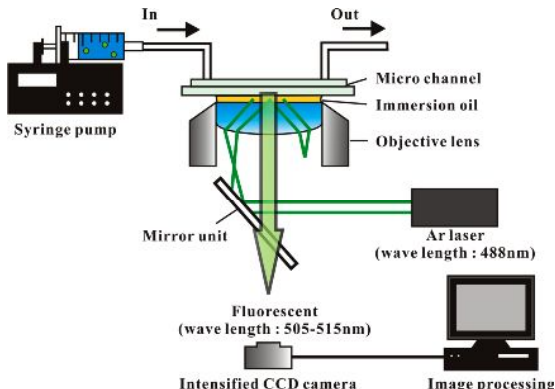


図 1 全反射顕微鏡を用いた 3 次元粒子濃度測定システム

(3) 確立した測定手法を用い、界面近傍の電気ポテンシャルの影響を評価し、ポテンシャル障壁によって界面近傍における生体物質濃度の低下を防ぐ手法を考察する。

(3) 具体的には、電圧を印加することにより、界面のポテンシャル障壁を低減することで界面の生体物質濃度の向上を行う。

(4) 予測される問題として、対象物質が数 nm ～数百 nm となるため、ブラウン運動が顕著になる。対象物質の速度上昇は測定誤差に直結するので、グリセリンなどを用いた液体粘度の調整を行い、各種パラメータの影響を切り分けて評価を行う。

(5) 実際の生化学反応を行うマイクロ分析チップを想定し、マイクロチャンネルを作製し、内部に液体を充填して評価を行った。なお、流動の影響がないよう、十分な経過時間において測定は行われた。作製したマイクロチャンネルを図 2 に示す。マイクロチャンネルは、全反射光によるエバネッセント光をチャンネル内に生じさせる必要があるため、カバーガラスを入射側とし、これにシリコーン樹脂 (polydimethylsiloxane) 製の凹型流路をプラズマ照射によって接合した。

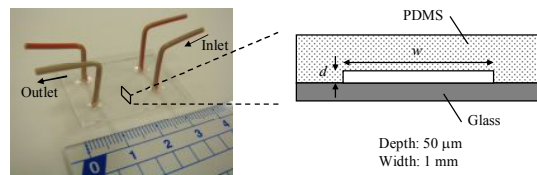


図 2 粒子濃度測定用マイクロチャンネル

4. 研究成果

(1) 参照粒子との相互相関による粒子の検出アルゴリズムの開発を行い、重なる粒子の分離抽出手法、粒子濃度の決定手法を確立した。また、粒子検出のための標準参照粒子の測定手法を改善し、褪色の影響を考慮することにより、最小直径 20nm の粒子まで 3 次元的に粒子追跡することができた。

(2) 上述の手法を用い、濃度分布に対する粒子サイズ依存性の評価を行った。図 3 は界面からの距離に対する直径 20nm と 100nm のナノ粒子の濃度分布を示しており、図 4 は DLVO 理論より算出した、測定と同条件下における粒子・固体壁間の電氣的ポテンシャルカーブである。粒子直径の減少にともない、van der Waals 引力ポテンシャルは小さくなり、直径 20nm のナノ粒子では静電反発力が支配的になる。このため、微小な粒子は界面近傍で濃度が減少したと考えられる。ポテンシャルの

ピーク位置と粒子濃度のピーク位置は良く一致し、DLVO 理論を実験的に検証している。

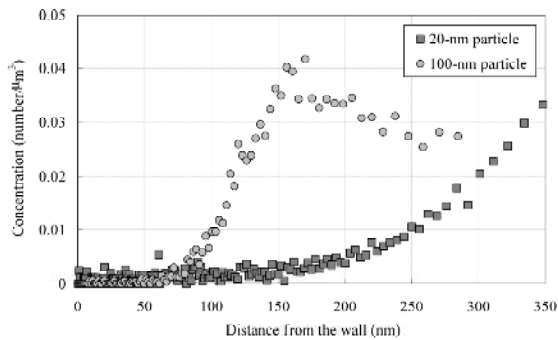


図3 界面近傍における粒子濃度分布

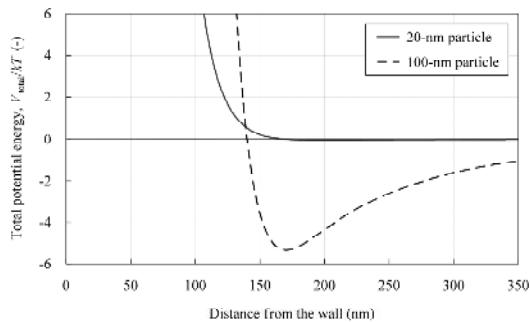


図4 DLVO 理論より算出した界面におけるポテンシャルカーブ

(3) 界面近傍における粒子濃度分布を制御するために、壁面に電位を印加することで界面におけるポテンシャルカーブを変化させる手法を提案した。図5は直径100nmのナノ蛍光粒子像である。図5(a)に示すように、電圧印加前には壁面近傍には粒子はほとんど存在していないことが分かる。それに対し、3Vの電位を10秒間印加させた後には、図5(b)のように界面近傍の粒子数が大幅に増加していることが分かる。また、図6は印加した電界と界面近傍における平均粒子濃度の関係であるが、電界を増加させると界面近傍の粒子濃度が増加することが明らかである。このように、印加電圧によっては界面近傍における粒子濃度を劇的に増加させることが可能であることを明らかにした。

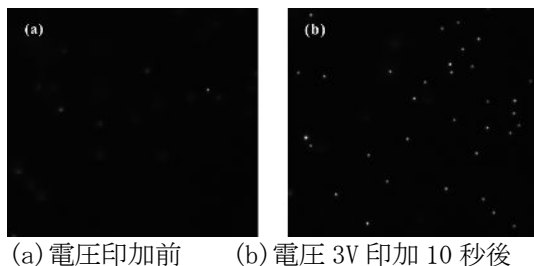


図5 電圧印加前後の界面近傍の粒子濃度

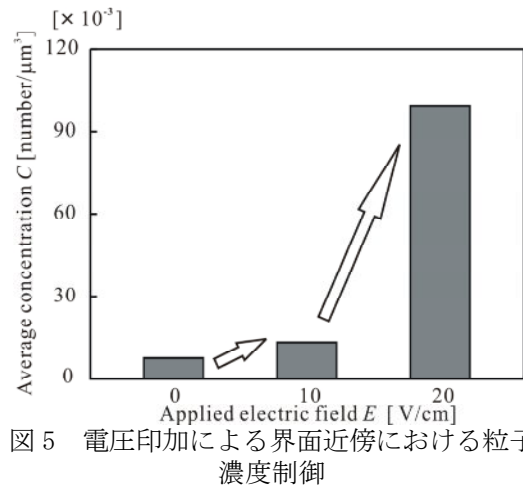


図5 電圧印加による界面近傍における粒子濃度制御

(4) 用いる生体物質の物性が明らかであれば、それから予測される界面・生体物質間のポテンシャルカーブに基づいて印加電圧を適切に選択することで、医療分析チップなどの固液界面上の反応を期待通りに向上させることができることを明らかにした。

(5) 実生体物質についての応用に、タンパク質を修飾させた量子ドットの利用を検討していたが、想定していたよりも褪色や消光の影響が大きく、実験が困難であった。しかしながら、本研究において得られた、壁面ポテンシャルの影響を考慮した電圧印加を用いることで、固液界面における生体物質濃度の改善を行うことは可能である。今後、実際に免疫反応である抗原抗体反応への適用を目指した測定を行って行く予定である。

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)

〔図書〕(計 4 件)

- ① 河野雄飛、神田健介、小方聡、楊明、エバネッセント光を用いた壁面近傍におけるナノ粒子の濃度分布の計測、日本機械学会 2009 年度年次大会講演論文集、Vol. 8、pp. 157-158、(2009)
- ② 水越拓真、神田健介、楊明、マイクロ流路中におけるナノ粒子挙動の測定と制御、日本機械学会 2009 年度年次大会講演論文集、Vol. 8、pp. 155-156、(2009)
- ③ Y. Kono, K. Kanda, S. Ogata, M. Yang, Near-wall Nanoparticles Perpendicular Distribution Measured by using an Evanescent Illumination, Proc. of the 4th International Conference on Experimental Mechanics (ICEM2009), CD-ROM, (2009)
- ④ T. Mizukoshi, K. Kanda, S. Ogata, M. Yang, Measurement and Control of

Motion of Nanoparticles in
Microchannel, Proc. of the 4th
International Conference on
Experimental Mechanics (ICEM2009),
CD-ROM, (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 健介 (KENSUKE KANDA)

首都大学東京大学院システムデザイン研
究科・客員研究員

研究者番号：20446735