

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月6日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21350046

研究課題名（和文） レーザーの作る電磁場を利用した多元分離場による微粒子の分離分析法の研究

研究課題名（英文） Separation of micro-particles by using electromagnetic field of laser combined with thermal or electrostatic separation fields.

研究代表者

文珠四郎 秀昭 (MONJUSHIRO HIDEAKI)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・放射線科学センター・教授

研究者番号：80191071

研究成果の概要（和文）：レーザー光の電磁場にレーザー光熱変換による温度場や直流電場を組み合わせることで新たな多元分離場を設計し、この多元分離場下での液中微粒子の挙動を詳細に検討した。レーザー光泳動と電気泳動を組み合わせることで、微粒子のサイズ、ゼータ電位、光吸収性などの性質の異なる微粒子を逆方向に泳動分離できることが分かった。特にレーザー波長に光吸収をもつ微粒子について多元分離場による効率的な分離が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：The behavior of fine particles under newly designed separation field by combining DC electric field with electromagnetic field of laser light and/or laser-induced temperature field, were examined in detail. By using combination of electrophoresis and laser photophoresis, it was revealed that micro-particles with different properties, such as particle size, zeta potential and light absorbing, can be separated in the reverse direction. It was found that efficient separation by designed combination field is available in particular for micro-particles with light absorption.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：分離分析

## 1. 研究開始当初の背景

外部場と媒体の流れを用いた微粒子の分離研究は、国内外で盛んに研究が行われている。例えば、流れのみを利用した微粒子のサイズ分離[1]や J. C. Gidings により創始され FFF 法として広く知られている重力や磁場、直流、交流電場、超音波などと流れを組み合わせた分離法[2]の研究が進められている。レーザー光の輻射圧を利用した微粒子分離法

の研究としては、九州大学の今坂らによりクロマトグラフ的検討[3]が行われているが、ナノサイズの微粒子の分離は実現されていない。また、キャピラリー電気泳動をはじめとする電気泳動法はすでに確立した方法となっており、タンパクをはじめとする巨大分子、ナノ微粒子の分離分析にも応用されている。しかし、複数の分離場を組み合わせた多元分離場を設計、ナノ微粒子に適用して、多機能な微粒子分離を実現した例は見当たらない。

研究代表者はこれまで主にレーザー光の輻射圧を分離場として利用した微粒子の分離について研究を行ってきた。媒体の流れと垂直にレーザー光を照射するクロスフロー配置を採用して分離の可能性を検討し、レーザー光の輻射圧を用いた血球細胞の連続分離などが可能であることを示した。しかし、このような配置では輻射圧の作用空間が小さく、また作用時間が小さいため、分離速度を大きくすることができない。また、ナノサイズの微粒子については、作用輻射圧が小さく、このような単純な配置では分離できないことも分かった。

さらに研究代表者は、レーザー光熱変換現象に誘起されるマイクロな温度勾配場により、気泡や液滴が光トラップされる現象、光泳動方向の反転現象などを発見し、温度場が微粒子の泳動に対して非線形的な重要な役割を果たすことを実証してきた。また、レーザー照射によりマイクロな温度勾配を外部から制御できることを見出した。また、分離場を制御するレーザー自身が分離微粒子の検出プローブとなるとの着想も得た。

以上のことから、ナノサイズ微粒子の多機能な分離分析を実現するためには、レーザー光の電磁場、レーザー光熱変換による温度場と外部電場を複合した新たな多元分離場と検出場が有効であることに思い至った。

[1] マイクロ流路を用いた粒子の分級, 山田真澄, 関実, J. Vac. Sci. Jpn., 49, 404 (2006). 他

[2] J. C. Giddings, Unified Separation Science, John Wiley & Sons., New York, 1991.

[3] Visualization of An Immunological Reaction between Single Antigen and Antibody Molecules by Optical Chromatography, S. Miki, T. Kaneta, T. Imasaka: Anal. Chim. Acta, 404, 1 (2000). 他

## 2. 研究の目的

レーザー光の電磁場、レーザー光熱変換による温度場に電場分離場を組み合わせることにより、新たな多元分離場を設計すること、さらにこの分離用のレーザーを検出用の励起プローブとしても用いることにより、新規な多機能分離分析法を構築することを目的とした。特に以下の2点を具体的な目的とし、多元分離場によるナノサイズ微粒子分離分析法の提案と確立を目指した。

(1) レーザーの輻射圧場と電場からなる多元分離場の構築と多元分離場中の微粒子の挙動観測、その検出と解析

電場による電気泳動とレーザー光による輻射圧場を同方向または逆方向に作用させて、微粒子の挙動を観測し、この結果を元にナノ微粒子の分離を検討する。電位勾配によ

る電気泳動、レーザーの輻射圧による光泳動、媒体の電気浸透流が微粒子に及ぼす複合的作用力を明らかにすることを目的とする。

また、分離用のレーザーを微粒子検出用プローブとしても用い、散乱光、蛍光、ラマン散乱光の検出を行い、分離と同時に検出系での微粒子のキャラクタリゼーションを行える光学系を構築することを目的とした。

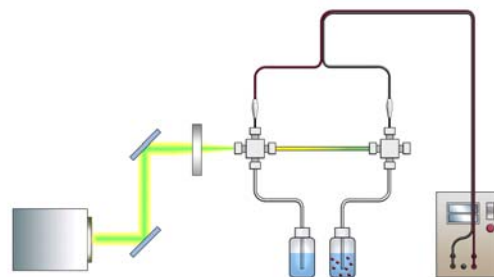
(2) レーザー干渉による周期的マイクロ電磁場勾配場および温度勾配場と電場からなる多元分離場の構築と多元分離場中の微粒子の挙動観測とその解析

レーザー光の干渉現象を利用することにより、周期的なマイクロ電磁場勾配場とこれによる光熱変換温度勾配場を設計、作製する。このような周期的勾配場に対する微粒子の挙動を観測し、微粒子の化学的物性的物性と微粒子に働く作用力の関係を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) レーザーの輻射圧場と電場からなる多元分離場下の微粒子の挙動観測と解析

下図に示すような実験システムを構築し、電場による電気泳動とレーザー光による輻射圧場を同方向または逆方向に作用させて、微粒子の分離挙動を観測、解析した。



試料として色付ポリスチレンビーズを用い、これを緩衝液に分散した。石英製矩形キャピラリー中に試料を導入し、この両端に電極を設置し、微粒子の電気泳動と媒体の電気浸透流を制御した。さらにこのキャピラリーの一端からレーザーを全反射現象を利用して照射し、キャピラリー中に均一な光泳動場を作製した。微粒子の泳動挙動は顕微鏡ービデオシステムにて観測した。種々の条件下で電場による電気泳動とレーザー光による輻射圧場を同方向または逆方向に作用させて、微粒子の挙動を観測し、その泳動速度を解析した。試料微粒子の粒径分布とゼータ電位はナノ粒子解析装置にて測定した。

(2) レーザー干渉による周期的マイクロ電磁場勾配場および温度勾配場と電場からなる多元分離場下の微粒子の挙動観測と解析

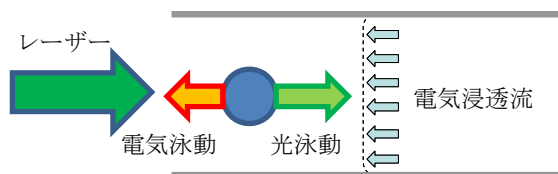
レーザー光の干渉を利用して周期的なマイクロ電磁勾配場を作製し、さらに媒体にレーザー光を吸収する色素を溶かし込むことによりレーザー電磁場強度に対応する周期的光熱変換温度勾配場の作製を試みた。整った周期的勾配場を作製するため、矩形キャピラリーを用いた。

媒体に流れを与え、それぞれの勾配場に対する微粒子の挙動を詳細に観測した。一般に固体微粒子は高温側から低温側へ熱泳動し、その泳動速度は粒子サイズに依存しないとされている。一方、電磁波強度勾配による微粒子の泳動速度は粒子サイズに依存する。したがって、これら2つの周期的勾配場による周期的ポテンシャルには、粒子サイズによって大きな差が生まれると予想される。

4. 研究成果

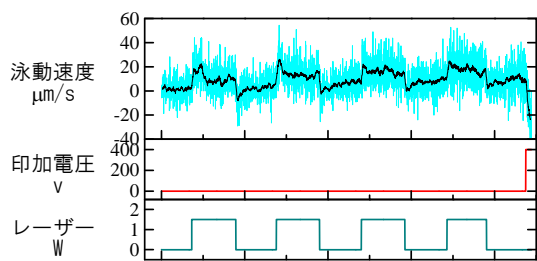
(1) レーザーの輻射圧場と電場からなる多元分離場下の微粒子の挙動観測と解析

微粒子試料として4種類の色付ポリスチレンビーズ(直径3および6 $\mu\text{m}$ )を用い、これを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に分散した。石英製矩形キャピラリー中に試料溶液を導入し、この両端に白金製電極を設置し、微粒子の電気泳動と媒体の電気浸透流を制御した。さらにこのキャピラリーの一端からcw-Nd:YAGレーザー(532nm, 最大出力2.0W)を集光レンズを通して照射した。微粒子の泳動挙動は顕微鏡-ビデオシステムにて観測した。種々の条件下で電場による電気泳動とレーザー光による輻射圧場を同方向または逆方向に作用させて、微粒子の挙動を観測し、その泳動速度を解析した。試料微粒子の粒径分布とゼータ電位はナノ粒子解析装置(Horiba, SZ-100)にて測定した。



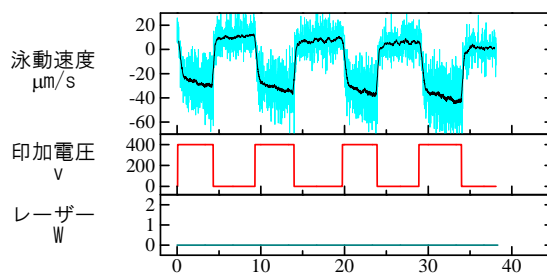
この実験配置では、上図に示すように微粒子には、光泳動力と電気泳動力が働き、さらに媒体は電気浸透流によって移動することになる。これら作用力による微粒子の挙動を明らかにするため、レーザーおよびキャピラリーにかかる電圧をON/OFFしてその挙動を観測した。

キャピラリー両端に電圧を印加しない場合には、微粒子が光の進行方向に泳動する通常のレーザー光泳動挙動が観測された。試料微粒子の光泳動速度は微粒子サイズにほぼ比例し、光吸収の大きな微粒子で大きくなることが確認できた。その観測結果の一例を下図に示した



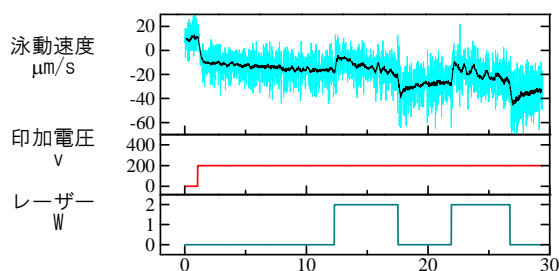
レーザー(1.5W)のON/OFFによる赤色微粒子の泳動挙動

また、キャピラリー両端に電圧を印加した場合には、下図に示すように試料として用いたポリスチレンビーズは、正極側に電気泳動することがわかった。ポリスチレンビーズは中性域で負のゼータ電位をもち、媒体の電気浸透流とは逆方向に泳動するためである。



電圧(400V)のON/OFFによる赤色微粒子の泳動挙動

また、電圧を印加しながらレーザーをON/OFF制御すると下図に示すような挙動が観測された。



レーザー(2W)および電圧(200V)のON/OFF制御による赤色微粒子の泳動挙動

これらの結果より、電気泳動速度と光泳動速度を調整することにより、微粒子の泳動方向を電圧およびレーザー光のON/OFFで制御することがわかった。

一般に電気泳動速度は以下の式で表されるように微粒子のゼータ電位に比例するが、微粒子のサイズや光吸収性など物理的性質には依存しない。

$$v = \epsilon\zeta/4\pi\eta E$$

一方、次式で表される光泳動速度は、微粒子の半径に比例し、屈折率や光吸収性などの光学的性質に依存する。

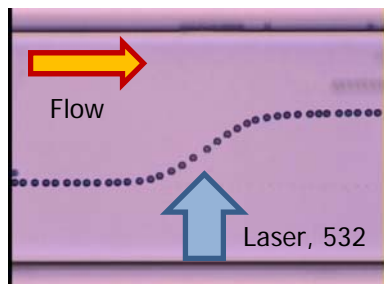
$$v = nrQ/3\pi\eta c I$$

したがって、レーザー光泳動と電気泳動を組み合わせることにより、微粒子のサイズ、ゼータ電位、光吸収性などの性質の異なる微粒子を逆方向に泳動分離できると考えられる。しかし、キャピラリー中における輻射圧場と電気浸透流の流れが不均一となるため、キャピラリー中の観測位置により微粒子の泳動速度が異なるという問題が明らかとなり、分離法としての実用化に向けてキャピラリーの選択やレーザーの照射方法など実験系のさらなる改良が必要である。

## (2) 光吸収性微粒子の光泳動挙動の精密測定による光熱変換効果の抽出と微粒子分離システムの構築

これまでの研究で、光吸収性微粒子の光泳動速度が吸収のない微粒子に比べて非常に大きいことが分かっていたが、この違いを精密に測定し、光泳動挙動に対する光熱変換効果を明らかにした。

試料は無色透明および4種類の色素含有ポリスチレン微粒子を水に分散させたものを用いた。この溶液をマイクロセル(内径 200×200 μm)中にポンプを用いて一定速度でフローさせ、Nd:YAG laser(532nm)を照射し、光泳動挙動を観測、解析した。

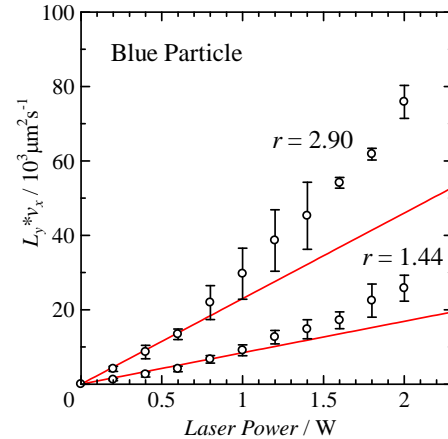


レーザー照射による微粒子の泳動挙動

分離実験には double-Y 型の PDMS 製マイクロ流路を用い、レーザー波長における吸収の有無による微粒子の分離挙動を解析した。

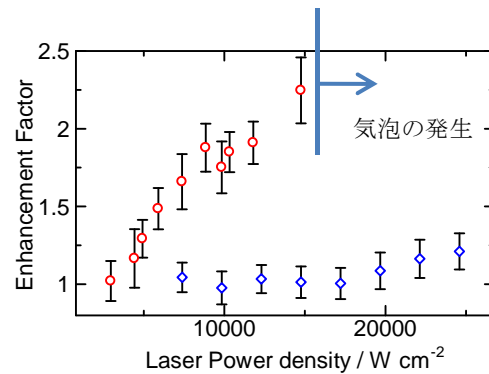
光吸収性微粒子では光熱変換による周囲媒体の温度上昇のため、光吸収性の微粒子の光泳動効率が Mie 散乱理論による計算値よりも非常に大きくなることがわかった。

例として青色の直径 6 μm と 3 μm の微粒子の光泳動距離と照射レーザー強度の関係を下図に示す。



青色ポリスチレン微粒子の光泳動距離と照射レーザー強度の関係

図中の直線は Mie 散乱理論に基づく計算値である。光吸収のある青色微粒子の場合には、レーザー強度が大きくなるにしたがって移動距離が理論計算値より増大していることが分かる。



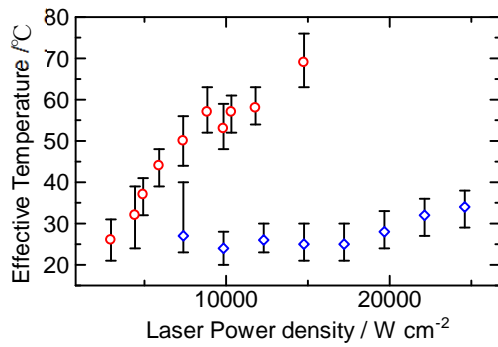
レーザー光密度と高熱変換による増倍率の関係

レーザー波長においてもっとも吸収係数の大きい赤色微粒子と吸収がほとんどない紫色微粒子の泳動速度の増大率（計算値との比）と照射レーザーのパワー密度の関係を上図に示した。

赤色微粒子では光吸収による光熱変換効果により、光泳動速度が2倍以上に増大することがわかる。この光泳動距離の増大は、光熱変換による微粒子周囲の媒体の温度上昇（粘度低下）に起因するものと考えられる。したがって、光泳動移動距離の増大から温度上昇を導くことができる。下図に増大率から見積もった微粒子周囲の媒体の温度と照射



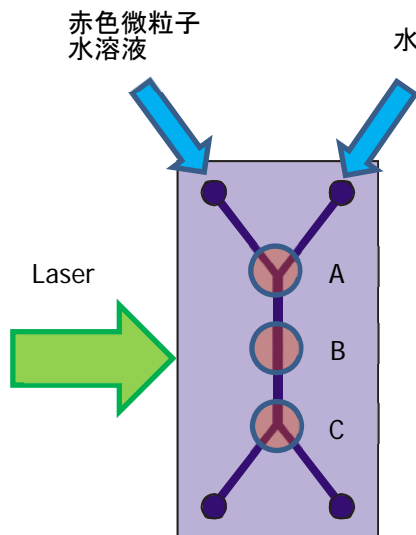
レーザーのパワー密度の関係を示した。



増大率から見積もった微粒子周囲の媒体の温度と照射レーザーのパワー密度の関係

図より明らかなように、微粒子周囲の媒体（水）の温度は沸点近くまで上昇することが分かった。この光熱変換による泳動距離の増大は、吸収性微粒子のみを泳動分離する原理として有用であると考えられる。

次にこのような光熱変換による微粒子の泳動特性を利用して **double-Y** 型のマイクロ流路を用い、レーザー波長における吸収の有無による微粒子の分離を試みた。実験に用いたマイクロ流路とレーザー照射の配置を次図に示した。



マイクロ流路を用いた微粒子の光泳動分離

レーザーの照射により赤色微粒子は流路の右方向に泳動し、流路出口では右側の流路に流出することが分かる。赤色微粒子の分離効率、レーザー強度 1.4W で 80%、2.0W で 95%となった。

このように光熱変換光泳動増強現象を利用することにより、吸収の大きい赤色微粒子

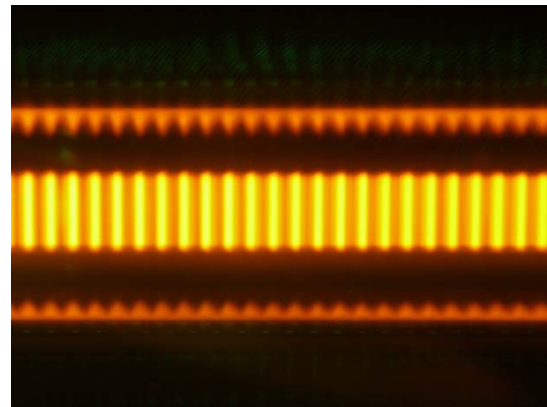
のみを分離できる可能性を示すことができた。

### (3) 光干渉を利用した周期的分離場の構築とラマン散乱検出器の試作

レーザー光の干渉を利用して周期的なマイクロ電磁勾配場を作製することを試みた。

まず、レーザー光を2分割し、これを交叉させてキャピラリーに照射するシステムを試作したが、交叉角度の調整が困難であり、また振動などによる干渉縞の不安定性が大きな問題となることが分かった。

そこで、ピッチ 250 $\mu$ m、焦点距離 1.6mm の石英製マイクロフライアイコンデンサアレイに直接レーザー光を入射し、集光出射光間の干渉を利用した周期的光場を作成した。マイクロアレイから適切な距離にキャピラリーを配置することによりキャピラリー内に周期的な光場を作成することができた。その一例を次図に示した。約 30 $\mu$ m の周期で等間隔に光電磁場を安定的に作成することができている。



マイクロフライアイコンデンサアレイを用いて作成したキャピラリー内の周期的な光場

作成した周期的光電磁場中において種々のポリスチレン微粒子の挙動を観測したが、特殊な泳動挙動を観測することができなかつた。微粒子にかかる光泳動力が小さいことが原因であり、レーザー強度が不十分であると思われる。

さらに媒体にレーザー光を吸収する色素を溶かし、レーザー電磁場強度に対応する周期的光熱変換温度勾配場をつくり、この周期場中の微粒子の挙動を顕微ビデオシステムを用いて観測したが、やはり特殊な泳動挙動を観測することができなかつた。温度場が熱伝導により平均化されることが原因であると考えられる。今後は入射レーザーを断続的に照射するなどの方策が必要であることが分かった。

また、微粒子の分離とキャラクタリゼーションを同時に行うために、キャピラリー内の微粒子を測定対象とするレーザーラマン散乱検出システムを構築した。

この検出システムにより、微粒子のラマンスペクトルを測定することができたが、ラマン散乱光が微弱なため、測定に時間がかかることがわかった。このため、キャピラリー内を移動、泳動する微粒子を実時間で測定するには至らなかった。また、2枚のチューナブルバンドパスフィルターを用いて顕微ラマン画像の直接観察を試みたが、やはりラマン散乱光が微弱なため、画像の取り込みに時間がかかり、実時間観測が困難であることがわかった。

この問題を解決するためには、イメージング分光器の導入、超高感度CCD検出器の導入が必要であり、測定システムの配置をさらに見直すことが必要である。

#### (4) 本研究で得られた成果のまとめと展望

本研究により得られた主な成果と明確となった問題点を上記(1)~(3)に示した。レーザー光の電磁場、レーザー光熱変換による温度場に電場分離場を組み合わせることにより、新たな多元分離場を設計することができた。本研究で得られたレーザーによる電磁場と光熱変換温度場、直流電場中における微粒子の泳動挙動に関する知見は、レーザー光泳動法を液中微粒子の選択的な泳動法へと発展させる基礎になるものと考えられる。

本研究で得られた成果は、今後さらに化学的、生物学的な重要性が増すであろう複数の化学種が作る集合体やクラスター、高分子量をもつDNAやタンパク、ナノ粒子、その集合体、またその複合体のような巨大分子や集合体の分離とキャラクタリゼーション法の新しい原理として発展、応用されていくものと考えられる。

#### 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)

[雑誌論文] (計2件)

- ① H. Monjushiro, M. Takahashi, and H. Watarai “Migration and Separation of Photo-Absorbing Micro-Particles Using Laser-Photophoresis in Aqueous Solution”, 査読あり  
Proceedings of The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 1739-1741 (2010).

- ② ENOMOTO, Yukiko; MONJUSHIRO Hideaki; WATARAI, Hitoshi “Simple and Precise Size-Separation of Microparticles by a Nano-Gap Method.” 査読あり  
Anal. Sci., 25(5), 605-610 (2009).

[学会発表] (計3件)

- ① 文珠四郎秀昭, 別所光太郎, 渡會 仁, “レーザー光泳動法による有色微粒子のマイクロチップ分離法の検討”  
日本分析化学会第60年会,  
2011年9月16日  
名古屋大学東山キャンパス (愛知県)
- ② H. Monjushiro, M. Takahashi, and H. Watarai, “Migration and Separation of Photo-Absorbing Micro-Particles Using Laser-Photophoresis in Aqueous Solution”.  
The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro-TAS 2010)  
University of Groningen, Groningen, The Netherlands, October 3 - 7, 2010.
- ③ 文珠四郎秀昭, 別所光太郎, 渡會 仁, “光電磁場と直流電場を組み合わせた複合場における水中微粒子の泳動挙動の解析”  
日本分析化学会第59年会, 2009年9月15日(水)~9月17日(金)  
東北大学川内北キャンパス,

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

文珠四郎 秀昭 (MONJUSHIRO HIDEAKI)  
大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・放射線科学センター・教授  
研究者番号: 80191071

##### (2) 研究分担者

別所 光太郎 (BESSHO KOTARO)  
大学共同利用機関法人・高エネルギー加速器研究機構・放射線科学センター・准教授  
研究者番号: 10300675

##### (3) 連携研究者

なし