

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420210

研究課題名(和文)細胞内構造分析用マイクロ光TAS構成法の研究

研究課題名(英文)An Investigation on a Light Waveguide Implemented Optical Total Analysis System for Internal Cell Structure Analysis

研究代表者

大久保 俊文(Ohkubo, Toshifumi)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：60349933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、先行する助成成果を引き継ぎ、透明樹脂をベースにマイクロ流路・導波路を一体構成してチップとし、細胞や微粒子にレーザ励起光を精密に照射することで、蛍光の指向性を得て、それらに内在する蛍光物質の分布を推定しようとするものである。ここでは3段階の開発ステップを想定した。まず、細胞サイズの流路や導波路において、極微弱な蛍光を高S/Nで観察すること、次に導波路を切り替えて照射し、蛍光を得ること、最後に励起光の照射角度を切り替えて蛍光を採取し、蛍光発光の指向性を得ることである。3段階の目標はほぼクリアでき、均一に蛍光体が分布した5 μ m径の樹脂粒子について、発生蛍光の指向性を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our research is to estimate distribution of fluorescent substance inside cells or micro particles utilizing directivity of emitted fluorescence from such micro objects. In order to obtain precise directivity, we utilized a transparent resin material and fabricated it as cell-sized micro fluidic channels and light waveguides formed on a monolithic chip. We prepared three stages of development steps: they were, to obtain extremely weak fluorescence with higher signal-to-noise ratio, to obtain fluorescence by switching light waveguides sequentially, and finally, to detect fluorescence by changing illuminating angle sequentially. Three goals could have almost been achieved, and as a result, we have succeeded in obtaining directivity of a 5- μ m-diameter resin particle with uniformly distributed fluorescent substance.

研究分野：知能機械学・機械システム

キーワード：TAS(総合分析システム) マイクロ流路 光導波路 蛍光検出 FDTD法 BPM法 光スキャナー

1. 研究開始当初の背景

本研究は、少子高齢化社会の進展を見据え、修復医療から予防医療への転換を進めるための有力施策である「ユビキタス・ヒューマンヘルスケアシステム」を実現し得る基幹素子として、総合分析システム(TAS)チップを研究開発するに資するものである。チップ主要部は、透明樹脂をベースとし、主に微細流路と光導波路のモノリシック構造からなる。このような樹脂製のチップは、ディスプレイ(使い捨て)性に適し、蛍光分析や高空間分解能化のポテンシャルを有するなど優位性を持つ。ただ、開始当時の趨勢としては、「ユビキタス・ヒューマンヘルスケアシステム」そのものが未だ実用化の流れにないこともあり、細胞サイズに比して比較的大きな流路・導波路サイズの樹脂製チップの作製検討や、光ファイバを組み込んだ即製あるいは混成 TAS としての機能拡張検討などが、大学その他の研究機関で散見されるに止まっていた。先に掲げた優位性やポテンシャルは理解されながらも、一見シンプルに見える樹脂チップ構成の裏に、近接光リソグラフィなど、高度なノウハウ蓄積を必要とする点があり、細胞サイズに近い光応用 TAS の機能拡張に向けた自由発想の研究参加が一気呵成に進展しない状況もある。

2. 研究の目的

本研究では、すでに助成を受けた第一期の成果を踏まえて、透明樹脂からなる流路・導波路のモノリシック構造を特長とする TAS チップに基づき、細胞や微粒子からの単純な前方・側方の伝搬光(散乱光・発生蛍光)を検出する基本機能に止まらず、細胞からの発生蛍光の「指向性」を得ることで、細胞内に取り込まれた蛍光体付き試薬などの分布状態から、さらに踏み込んで、細胞内の構造も推測可能なインテリジェント機能を有するチップ実現に展開しようとするものである。

3. 研究の方法

本研究では、概して透明樹脂をベースに、基板上に形成された微細流路とこれと交叉する導波路コアを基本とし、流路中を移動する微粒子(疑似細胞)に導波路を用いて光照射を行い、やはり導波路を用いて発生光をチップ外縁に誘導させて検出する構成を一貫して採っている。前項の目標を達成するため、以下の3ステップを踏んで研究を進めた。

(1) 樹脂製チップを用いた微弱蛍光検出

大前提として、マーカとして蛍光体を付与した様々な薬品類が細胞にどう取り込まれるかを分析できるよう、一般的な励起光(488nm)をチップに導入し、別導波路を通過してチップ外に伝搬した発生蛍光(~520nm)を、光ファイバを通してダイクロイックミラーや干渉フィルタからなる蛍光分離光学系に誘導し、最大200万倍のゲインを有する光電子増倍管モジュールによって光電変換で

きることを実証する。

(2) 光ファイバ加振機構を用いた励起光の導波路への導入スイッチング

最終的に微粒子に照射する励起光の角度を順次変えて発生蛍光の指向性を得るためには、照射すべき導波路を順次切り替えることが必要となる。これを簡易かつ安価な構成で実現するために、チップに励起光を導入する光ファイバ先端を強制加振し、チップ端に配列した導波路コア端部に順次光カップリングさせる機構を提案した。現実的なファイバの共振周波数や、先端のたわみ状態などから、十分なカップリング効率を得られ、また微粒子が光照射点を通過する際に、必要な回数(往復走査)が可能な共振周波数を、安定的に維持できることを検証する。

(3) 放射状に配置した導波路コアチップを用いた励起光の角度照射と発生蛍光の採取

上記2段階のステップの後、流路との交叉部において放射状に配した導波路コアを形成した角度走査用チップを試作し、照射角度を順次変えて励起した微粒子からの蛍光を、一定角インターバルごとに採取する。申請当初は、超扁平導波路コアを放射状に配置し、この照射点中心部を微粒子が垂直(チップ面に対して垂直)に流動する構成を採ることで、360度の走査角度域を有する細胞版の「CT スキャナ」様の配置を計画した。しかし、扁平導波路の作製実績の不足から、光カップリングも併せた伝搬効率が極めて不明確であること、微粒子の垂流動を実現する厚膜の光リソグラフィ、あるいは斜め流動を実現するためのパーティクルリフト構成の難しさなど、角度走査を実現するために直列的に難度の高い課題が立ちはだかることが見えてきた。

このため、原理的な信号品質の優劣はさておき、角度走査自体を実現することを最優先に、従来の水平流動流路を基本として、これに放射状の導波路を配したチップ構成にて角度走査の実証を進めることとした。ちなみに、ここでは導波路コアは可能な限り縦長とすべく、高アスペクト比の断面形状を採用した。

4. 研究成果

まず、樹脂製チップを用いた蛍光検出(前項(1))について述べる。本チップに用いられているエポキシ樹脂は、500nm程度以下の短波長域では損失が増大する。一方、従類似のチップを用いた検討では、赤色レーザー(650nm)を用い、主に前方透過変調光と側方散乱光を観察してきた。ここでは、光照射角度走査を見越して、狭幅高アスペクト比の導波路とL型流路を有する TAS を対象とし、励起光、蛍光波長も一般的な青緑~緑の波長帯を想定した(図1)。流路およびコア断面を図2に示す。疑似細胞には、一般的な励起波長である488nm帯付近で吸収効率が高く、520nm帯に発光ピークを有する蛍光体を内在

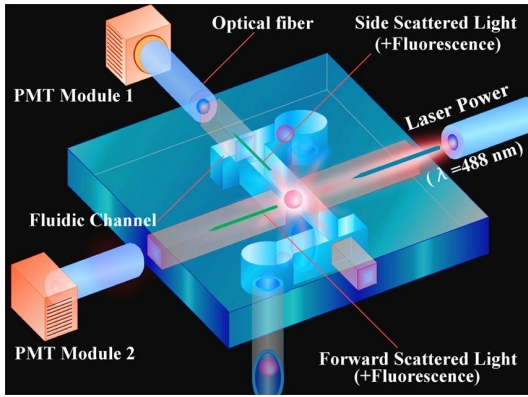


図1 L字型流路を構成した光導波路内存在 TAS チップの基本構成 (出展: 雑誌論文)

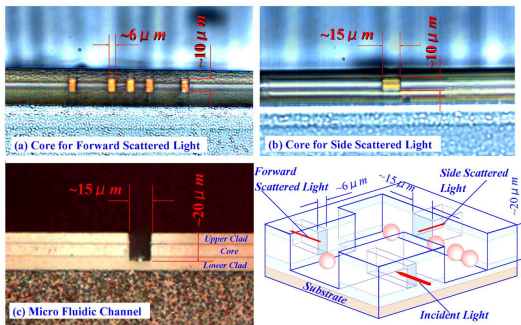


図2 蛍光検出検証のための高アスペクト比コアを有する TAS チップ (出展: 雑誌論文)

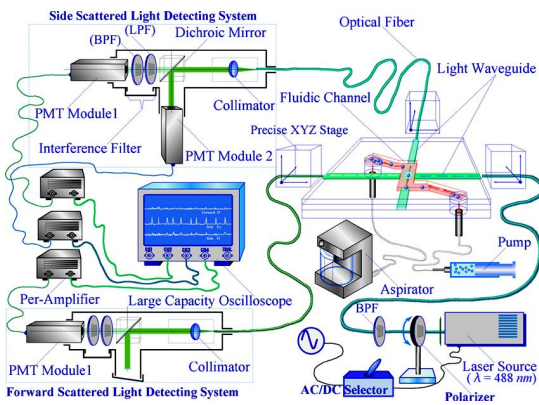


図3 蛍光検出検証のための TAS チップの実験系 (出展: 雑誌論文)

した樹脂ビーズを用いた。発生蛍光は、検出用導波路を通じて光ファイバによって、蛍光分離光学系に導き、励起光成分と発生蛍光成分を別々に光電子増倍管モジュールによって採取できるようにした (図3)。

図4に採取蛍光のパルス状波形の一部を示す。前方及び側方発光蛍光ともに、ほぼ同程度の強度であり、数~数100pWにわたっている。照射レーザー光は直流光であり、光源にAC変調をかけるとともに、ロックイン検出などの手法を採れば、さらに微弱パワー条件にても蛍光検出は可能である。

次に、光ファイバ先端の強制加振による微粒子 (細胞) 照射のための導波路のスイッチ

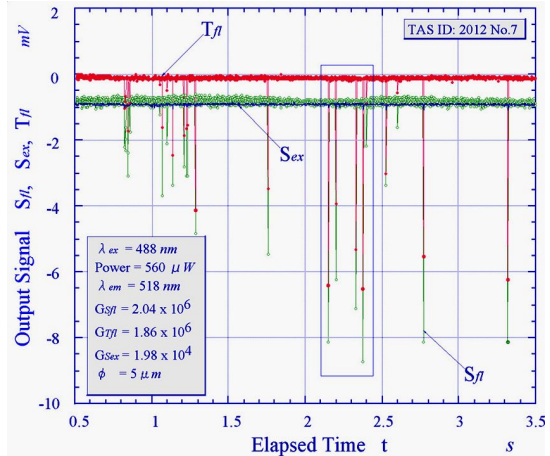


図4 前方および側方発光の蛍光パルスの検出波形 (出展: 雑誌論文)

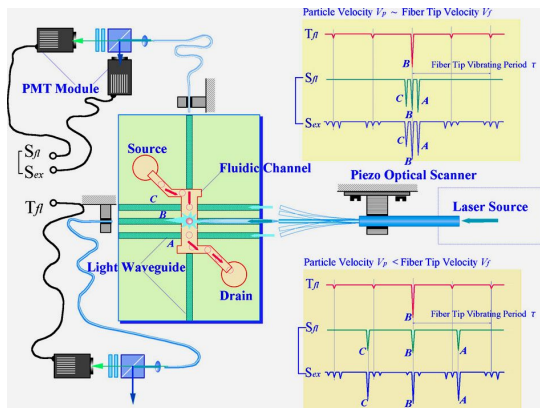
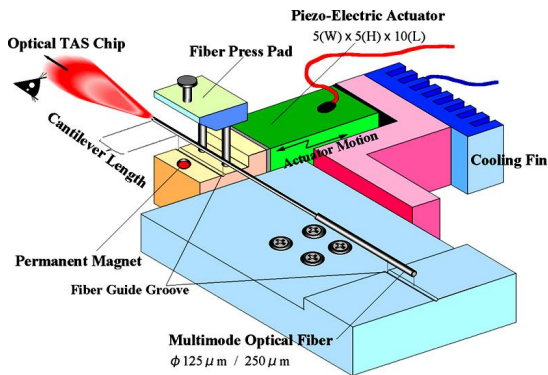
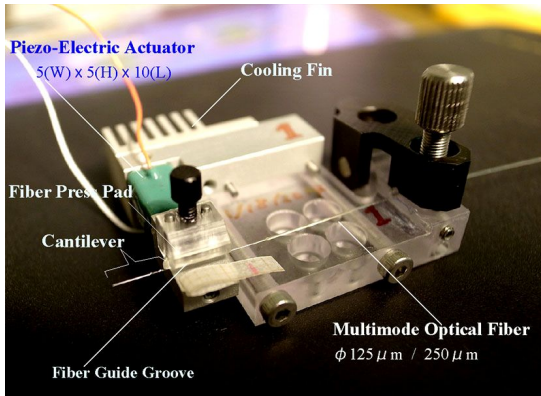


図5 光誘導用導波路のスイッチング実験系の概要 (出展: 雑誌論文)

ング (前項(2)) について述べる。実験系の基本構成を 図5 に示す。ここでは従来から用いていた L 型の流路と、これに直交交叉する不等間隔・平行配置の 3 本の導波路を有する TAS チップを検証対象とした。コアサイズは粒子サイズに比して $13 \times 13 \mu\text{m}$ と比較的大きく、十分な光の伝搬性を有する。流路を流れる粒子の速度を調整し、粒子速度を光ファイバの先端速度、およびタイミングに調整すれば、3カ所の交叉点で粒子の蛍光発光が観察される。また粒子速度がファイバ先端速度よりも遅ければ、3カ所 (3 回の蛍光発光) の交叉帯を通過する間に、交叉部に粒子が存在しない複数の未発光状態を伴った蛍光発光が観察される。 図6(a)および(b)には、光ファイバの加振機構を示す。駆動体には、長さ10mmの積層型圧電アクチュエータを用いた。ここでは、駆動周波数選択の自由度を犠牲にして、定振幅・定周波数振動持続の安定性を優先した。保護層を削った直径 $125 \mu\text{m}$ の光ファイバの有効長さは8mm程度であり、共振周波数は約1.7kHz、空気の影響も含めたQ値は200程度であった。これらによって、 $80 \mu\text{m}$ の間に配置した3個 (箇所) の導波路コアを、低駆動電圧で十分な往復走査が実現でき



(a) 光ファイバ加振系の概要

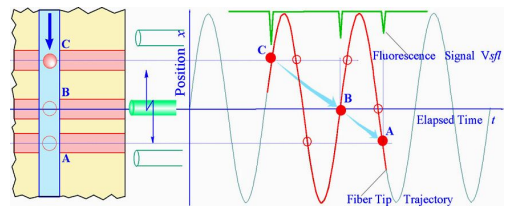


(b) 試作した光ファイバ加振機構

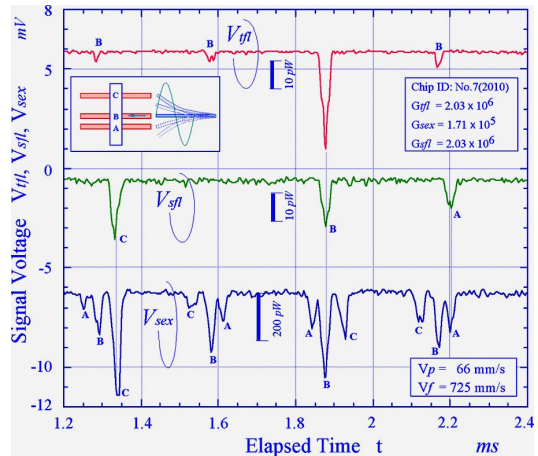
図6 励起光切り替えのための光ファイバの加振機構（出展：雑誌論文）

た。図7に、光ファイバの振動速度に同期して流路を微粒子が流動した際の検出蛍光の結果を示す。図7(b)の中央の波形が側方発光の蛍光波形 (V_{sfl}) を示す。粒子が、どの導波路と流路の交叉点を通じたかの判定は、同図下段の側方散乱蛍光の波形 (V_{sex}) と蛍光波形 (V_{sfl}) とを対比し、時間軸上での一致を見れば、交叉点を識別できる。これらの検討によって、長時間にわたりほぼ安定に光ファイバを加振でき、導入励起光のスイッチングが継続できることが確かめられた。なお、この実験において採取できた蛍光微粒子の最大流動速度は、約 700mm/s であった。

最後に、本研究の集大成となる蛍光微粒子の発生蛍光の指向性の計測（前項(3)）について述べる。指向性計測のために、図8(a)に示すような流路との交叉部において、 ± 45 度、 ± 67.5 度、 90 度で交叉する放射状導波路コアを有する TAS チップを作製した。左右のチップ端部においては、これらのコアは平行配置となっており、交叉部から端部までは、最大 5mm の曲率半径を有する曲線部と直線部で構成される。図8(b)には、コア断面の顕微鏡写真を示す。既述のように、縦長の高アスペクト比のコア形状を狙っており、実物は、幅約 $4.8\mu\text{m}$ 、高さ約 $11\mu\text{m}$ （アスペクト比 2.3）が実現できている。角度走査の実験系を図9に示すが、基本機能は前述の「2ステップ」において、すでに完成しており、本試作の放

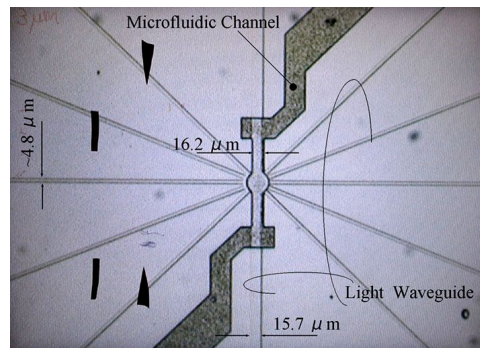


(a) 微粒子の同期励起の概要

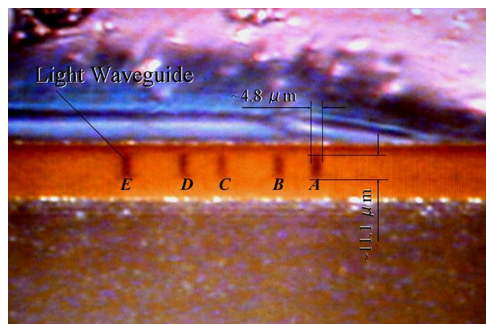


(b) 同期励起時の採取蛍光の信号波形

図7 光ファイバの同期励振による導波路切り替えと蛍光波形（出展：雑誌論文）



(a) 流路と導波路の交叉部



(b) 導波路コア端部

図8 試作した角度走査用 TAS チップの主要部（出展：雑誌論文）

射状導波路コアを有するチップをそのまま換装したものとなっている。

図10には、流路に検体（水ベースの樹脂製微粒子分散体）を導入する前の状態で、静

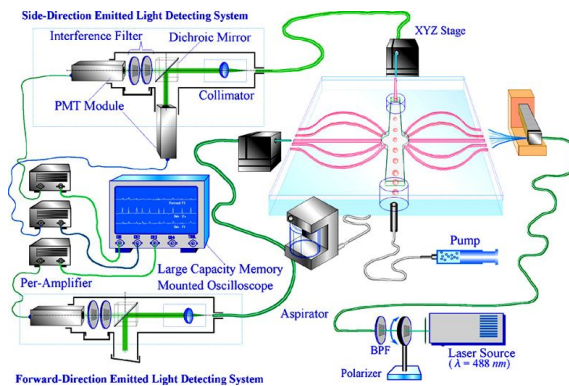


図9 角度走査実験系の構成図(出展: 雑誌論文)

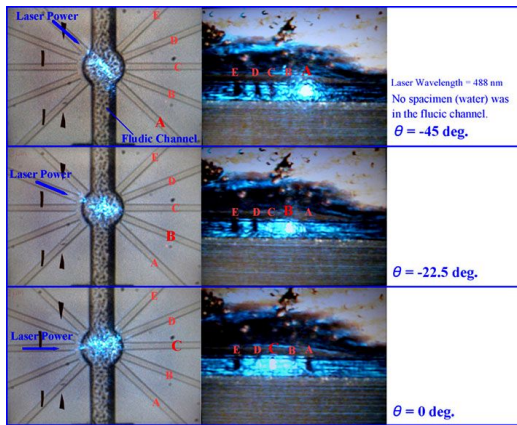


図10 励起光導入時の交叉部およびコア端部のイメージ(出展: 雑誌論文)

的に励起光を導入する導波路を切り替えた際の散乱光の様子を示す。照射角度の切り替えが確実に実現できていることが確認できており、さらに流路に水を充填することで、動的にも光伝搬を評価している。少ない試作回数のため、高い伝搬特性が安定して実現できていない。実際、倍あるいは半分程度の透過率のばらつきがあり、これらの結果を用いて、指向特性を補正している。

図11には、採取した角度走査時の原波形の一例を示す。励起側に対向する側の放射状導波路の一部を使って検出した蛍光波形 (V_{fl}) がやはり、信号出力がかなり小さく、結果的にS/N比も悪い。これらの結果を基に、最終的に発光蛍光の指向特性に変換した結果を、図12に示す。

おおかた、励起光方向(前方)と90度側方に大きな強度ピークがあり、45度前方にボトムがあるようにもとれるが、採取データ数や信号S/N比が必ずしも十分でない速報的な点も否めず、今後さらにこれらの課題も順次クリアしながら、指向性の評価を詰める必要がある。粒子内の蛍光体の局在性と指向性の検討と関連付けは、さらにその先の課題になる。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計3件)

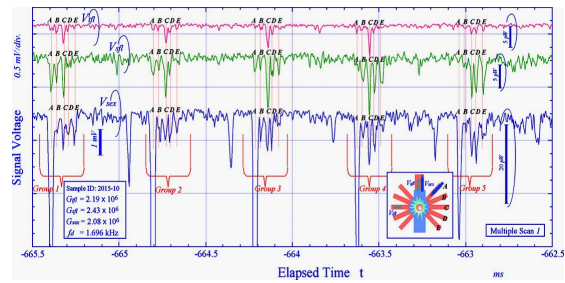


図11 角度走査時の採取波形(45度~225度)(出展: 雑誌論文)

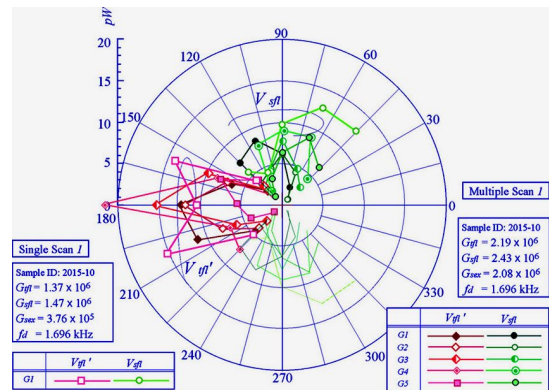


図12 発光蛍光の指向性(出展: 雑誌論文)

Toshifumi OHKUBO, Nobuyuki TERADA and Yoshikazu YOSHIDA, Evaluation of fluorescence emitting characteristics of a microparticle by illumination angle scanning utilizing a resin-based monolithic TAS chip, *Mycrosyst. Technol. Springer*. (2017) (印刷中につき、巻、号なし) (査読有)
DOI: 10.1007/s00542-016-3199-2

Toshifumi OHKUBO, Nobuyuki TERADA, Yoshikazu YOSHIDA, Preliminary scanning fluorescence detection of a minute particle running along a waveguide implemented microfluidic channel using a light switching mechanism, *Mycrosyst. Technol. Springer*. **22**, (2016), 1227-1240 (査読有)
DOI: 10.1007/s00542-016-2844-0

Toshifumi OHKUBO, Nobuyuki TERADA, Yoshikazu YOSHIDA, Fluorescence detection of minute particles using a resin-based optical total analysis system with a high-aspect-ratio light waveguide core, *Mycrosyst. Technol. Springer*. **21**, (2015), 2611-2622 (査読有)
DOI: 10.1007/s00542-015-2505-8

〔学会発表〕(計6件)

Toshifumi OHKUBO, Nobuyuki TERADA, Yoshikazu YOSHIDA, Evaluation of fluorescence emitting

characteristics of a microparticle by illumination angle scanning utilizing a resin-based monolithic TAS chip, The 14th International Symposium on Bio-Science and Nano Technology, November 24, (2016), Toyo University, Kawagoe, Saitama 350-8585, JAPAN

Toshifumi OHKUBO, Nobuyuki TERADA, Yoshikazu YOSHIDA, Evaluation of fluorescence emitting characteristics of a micro particle by illumination angle scanning utilizing a resin-based monolithic TAS chip, ASME 2016 Conference on Information Storage and Processing Systems, ISPS2016, June 21, (2016), Santa Clara (Mariott), California, USA

Toshifumi OHKUBO, Nobuyuki TERADA, Yoshikazu YOSHIDA, Preliminary scanning fluorescence detection of a minute particle running along a waveguide implemented microfluidic channel using a light switching mechanism, The 13th International Symposium on Bio-Science and Nano Technology, November 27, (2015), Toyo University, Kawagoe, Saitama 350-8585, JAPAN

Toshifumi OHKUBO, Nobuyuki TERADA, Yoshikazu YOSHIDA, Preliminary scanning fluorescence detection of a minute particle running along a waveguide implemented microfluidic channel using a light switching mechanism, 2015 JSME-IIP/ASME-ISPS Joint Integration Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment, MIPE2015, June 15, (2015), Kobe International Conference Center, Kobe, JAPAN

Toshifumi OHKUBO, Nobuyuki TERADA, Yoshikazu YOSHIDA, Fluorescence detection of minute particles using a resin-based optical total analysis system with a high-aspect-ratio light waveguide core, The 12th International Symposium on Bio-Science and Nano Technology, November 14, (2014), Toyo University, Kawagoe, Saitama 350-8585, JAPAN

Toshifumi OHKUBO, Nobuyuki TERADA, Yoshikazu YOSHIDA, Fluorescence detection of minute particles using a resin-based optical total analysis system with a high-aspect-ratio light waveguide core, ASME 2014 Conference on Information Storage and Processing

Systems, ISPS2014, June 24, (2014), Santa Clara University, San Jose, California, USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://ris.toyo.ac.jp/profile/ja.5efeabbf9c86c31faf262871afbb8730.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大久保 俊文 (OHKUBO, Toshifumi)

東洋大学・理工学部・教授

研究者番号：60349933

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし