

## 論文の内容の要旨

論文題目 Study of Single Molecule Analysis Using Thermal Lens Microscope  
(熱レンズ顕微鏡による単一分子分析法の研究)

氏名 清水 久史

### 1. 緒言

近年、マイクロ化学システムや単一細胞分析が発展し、更に小さな拡張ナノ (10-1000 nm) 空間を利用した研究も現れるなど、分析場が微小化の一途を辿っている。このような微小空間では検出体積の減少により検出分子数が減少し、単一分子分析が求められる。従来、単一分子分析にはレーザ誘起蛍光法が用いられてきたが、検出対象が蛍光分子に限られるため、大多数の分子は単一分子研究の対象とはならなかった。それに対して当研究室では、これまでに熱レンズ顕微鏡 (TLM) を開発し、非蛍光性分子の高感度検出に取り組んできた。具体的には、時間平均で7 fL中の0.4分子に相当する濃度を検出し、金属ナノ粒子や $\lambda$ -DNA を一つ一つカウンティングすることにも成功した。しかし、従来のTLMは明視野検出であり、プローブ光のバックグラウンドが高いため、極めて微弱な信号の検出が困難であった。そのため、金属ナノ粒子に比べて吸光係数が2桁以上小さい通常の小分子のカウンティングや、光路長が1000 nm以下と短い拡張ナノ空間内の測定が困難であった。

そこで、微分干渉 (DIC) 観察法をTLMに導入することでバックグラウンドフリーな測定を実現し、単一分子カウンティングや拡張ナノ空間内の分析を可能にできると着想した。しかし、液相中の熱拡散のスケールは数 $\mu\text{m}$ と大きいため、通常のDIC光学系での検出は困難で、専用光学系の設計・開発が必要となるなど技術的課題が多数存在する。以上を踏まえ、本研究の目的は熱レンズ顕微鏡による単一分子分析とした。具体的には、(1) 微分干渉熱レンズ顕微鏡 (DIC-TLM) の創成、(2) 単一分子カウンティングの実現、(3) 拡張ナノ空間内の分析への応用とした。

### 2. 微分干渉熱レンズ顕微鏡の創成

第2章では、DIC-TLM を開発し原理を検証した。具体的には、液相中で DIC-TLM の原理を実現するために専用の DIC プリズムを新規に設計・製作し、装置を開発した。次に、バックグラウンドフリーの効果と信号の発生メカニズムを確認した。

#### 2.1. DIC-TLM の原理

TLM は励起光によって試料を加熱し、 $\mu\text{K}$  程度の温度変化に伴って誘起された屈折率変化 (熱レンズ効果) を検出する装置である。従来の TLM は、図 1 (A) に示すように熱レンズ効果によって屈折したプローブ光の光密度変化を測定していたが、この変化は元のプローブ光の強度に比べて非常に小さい ( $\sim 1/1000$ ) ため、高バックグラウンドな測定となっていた。

ここで、TLM による濃度定量とカウンティングの違いを説明する。濃度定量は積算時間を 1 秒とし、検出部に存在する分子の個数平均 (濃度) を測定する。一方、液相中の分子はブラウン運動によって検出部を数ミリ秒で通過するので、積算時間を 1 ミリ秒とすると

目的分子の通過をイベントとして検出できる。これをカウンティングと呼ぶ。濃度定量では積算時間が長いため、バックグラウンドの揺らぎが平均化され単一分子レベルの濃度定量が可能となる。しかし、カウンティングでは積算時間が短いため、バックグラウンドを取り除いて揺らぎを低減しない限り単一分子測定は困難である。

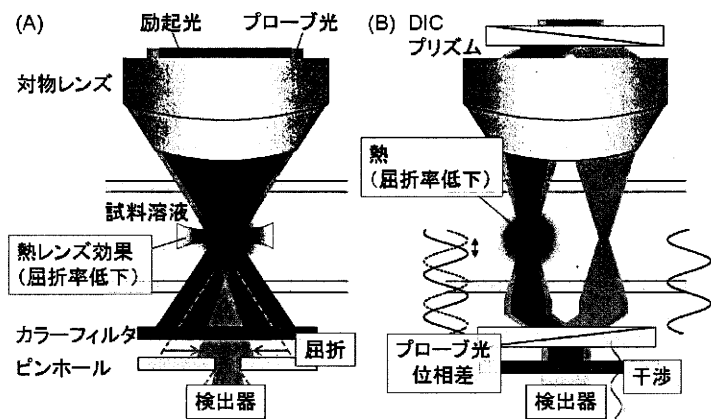


図 1. (A) 従来の TLM (B) DIC-TLM の原理

そこで、DIC-TLMでは図 1(B) のようにプローブ光を 2 本に分離し、再び進路を合成した後に干渉させることで強度を 0 とする。ここで、一方のプローブ光側の屈折率が変化すると、光の進む速度が変化し位相にずれが生じる。これにもう一方のプローブ光を干渉させると、位相差分が打ち消されず信号として取り出される。屈折率変化がないときはプローブ光が打ち消されるため、バックグラウンドフリーな測定が実現する。

## 2.2. 実験装置

以上の原理を液相で実現するためには、DIC プリズムが重要となる。通常、光学顕微鏡に用いる DIC プリズムは光線分離幅が  $0.5 \mu\text{m}$  程度である。一方、熱レンズ効果の半径に相当する熱拡散長  $l$  [m] は変調周波数  $f$  [Hz] と溶媒の熱拡散係数  $D$  [ $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ] を用いて

$$l = \sqrt{D/\pi f} \quad (\text{式 1})$$

で表され、水中では  $7 \mu\text{m}$  程度である。そのため、光学顕微鏡用の DIC プリズムでは図 2 (A) に示すように両方のプローブスポットに熱が発生し、高感度な測定ができない。そこで、分離幅を拡大した DIC プリズムを新たに設計した。分離を大きくするために材質を水晶から方解石に変更し、図 2 (B) に示す分離幅  $5.3 \mu\text{m}$  の DIC プリズムを製作した。図 3 に装置図を示す。励起光には波長  $488 \text{ nm}$  の Ar+ レーザ、プローブ光には  $633 \text{ nm}$  の He-Ne レーザを用いた。

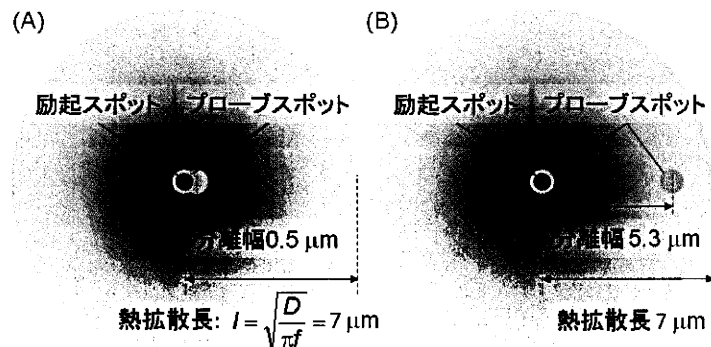


図 2. (A) 光学顕微鏡 (B) DIC-TLM 用の DIC プリズム設計

## 2.3. 原理検証の結果と考察

まず、図 4 に示すように干渉によってプローブ光強度は  $1/100$  に減少した。また、Sunset Yellow FCF 水溶液の濃度定量で信号とバックグラウンドの強度比 (S/B 比) を測定したところ、従来の

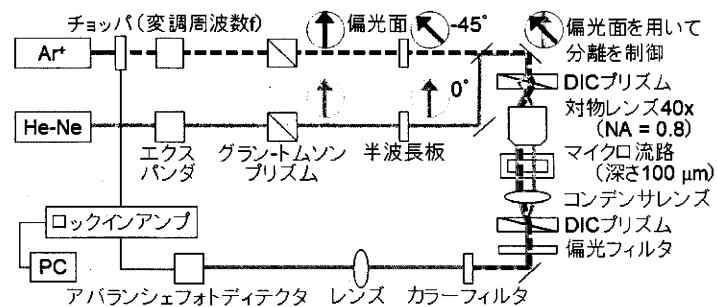


図 3. DIC-TLM の装置図

TLMに比べて10倍向上していた。これにより、バックグラウンドの低減効果を確認した。

次に、信号の発生メカニズムを確認するために励起光の偏光面を回転させながら測定した。結果を図5に示す。励起光の偏光面が $\pm 45^\circ$  のとき励起光は分離されず、位相差が発生して信号値は最大となった。一方、偏光面が $0^\circ$  のときは励起光も分離され、位相差が発生せず信号値はほぼ0となった。この結果より、信号が位相差に由来することを確認した。

### 3. 単一分子カウンティング

第3章では、液相中の非蛍光性分子の単一分子カウンティングに取り組んだ。まずDIC-TLMのカウンティング性能を評価し、単一分子の測定系を検討した後にカウンティングを行った。また、カウンティングの性能向上を目指してDIC-TLMを改良した。

#### 3.1. カウンティングの実験

カウンティング性能の評価には、金ナノ粒子(直径5 nm)の水溶液を用いた。単一分子カウンティングには、ポルフィリン化合物のクロロホルム溶液を用いた。

#### 3.2. カウンティングの結果と考察

金ナノ粒子のカウンティング結果を図6に示す。従来と比較して信号とノイズの比(S/N比)が10倍に向上していた。これより、S/B比の改善によってS/N比が向上したと結論付けた。

単一分子の測定系について、通常の分子の吸光係数は金ナノ粒子に比べると2桁以上小さい。一方、有機溶媒を用いれば熱レンズ信号を増幅することが可能である。これらの影響を考慮して、モル吸光係数 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ のポルフィリンのクロロホルム溶液について信号が検出可能と見積もった。単一分子のカウンティング結果を図7に示す。S/N比が3程度の単一分子と見られる信号が多数検出されたが、本手法は選択性がないため、不純物微粒子とみられる信号も検出された。そのためこれらを統計的に区別することが必要であるが、検出部を通過した分子の数に対して検出された信号の数が1%と非常に少ないため、単一分子検出の証明にはS/N比の改善が不可欠であった。そこで、バックグラウンドを極限まで低減することによって性能を更に向上できると考えた。具体的には、2個の対物レンズを上下対称に配置した光学系を採用することにより、バックグラウンドを限界まで低減してS/B比を1桁向上した。今後、この新しい装置を用いて単一分子検出を証明していく。

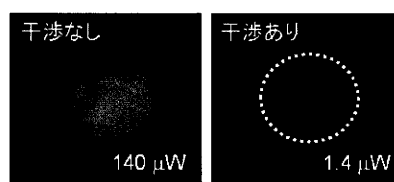


図4. 干渉前後のプロブ光の写真

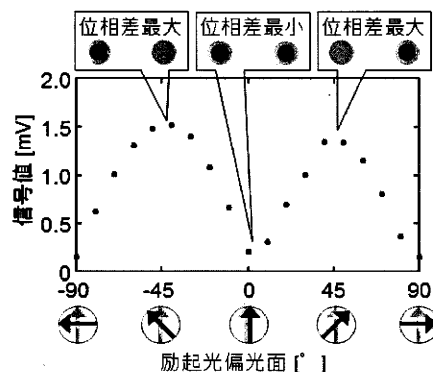


図5. 励起光偏光面と信号値の関係

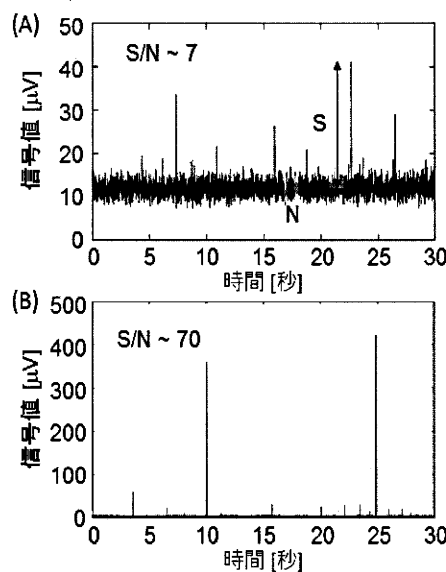


図6. 金ナノ粒子カウンティング結果 (A) 従来のTLM (B) DIC-TLM

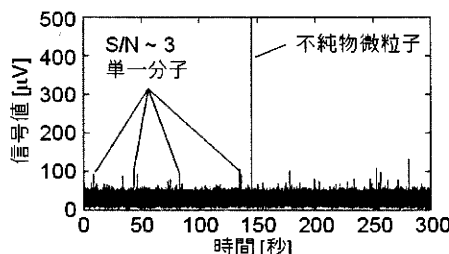


図7. 単一分子カウンティング結果

#### 4. 拡張ナノ空間内の計測

第4章では、DIC-TLMを拡張ナノ空間内の分析へと応用した。まず、拡張ナノ空間内において初めて高感度な濃度定量を実現した。次に、これを拡張ナノ流体デバイス（例として、拡張ナノクロマトグラフィー）へと応用した。

##### 4.1. 拡張ナノチップを用いた実験

石英ガラス基板の上に電子線リソグラフィーとプラズマエッチングを用いてナノ流路を作成した。試料は圧力駆動法を用いてナノ流路内に導入した。まず、幅  $21\ \mu\text{m}$ 、深さ  $500\ \text{nm}$  の流路と Sunset Yellow FCF 水溶液を用いて拡張ナノ空間における濃度定量の性能を評価した。拡張ナノクロマトグラフィーの実験装置を図8に示す。固定相をシリカ表面、移動相をヘキササンとし、幅  $2.3\ \mu\text{m}$ 、深さ  $250\ \text{nm}$  の流路を用いて非蛍光性の色素 Sudan I と Sudan Orange G を分離した。

##### 4.2. 拡張ナノ空間内の濃度定量およびクロマトグラフィーの結果

拡張ナノ空間は熱拡散長よりも小さい空間であるため、試料溶液から石英ガラスへの熱移動が起こる。このとき、温度上昇に伴って溶液の屈折率が低下するのに対して、ガラスの屈折率は上昇する。そのため、これらの屈折率変化が相殺し感度が低下する。そこで、変調周波数  $f$  を大きくして熱拡散長  $l$  を小さくすることで屈折率変化の相殺を軽減できると考えた。その結果、図9に示すように熱拡散長  $4.5\ \mu\text{m}$  で S/N 比が最大となり、高感度な測定が可能になることが分かった。サンセットイエロー水溶液の検量線を図10に示す。検出限界は  $250\ \text{aL}$  中の  $390$  分子となり、DIC-TLMを用いることで拡張ナノ空間内の非蛍光性分子の高感度濃度定量に初めて成功した。

また、拡張ナノクロマトグラフィーのクロマトグラムを図11に示す。積算時間を  $100$  ミリ秒とすることによりピークが良好に分離された。また、ピーク面積の検量線では直線関係が得られ、定量性能を実証した。

#### 5. 結言

本研究では、TLMによる単一分子分析を初めて実現した。具体的には、(1) DIC-TLMの創成により、(2) 単一分子カウンティングを実現し、(3) 拡張ナノ空間内の計測に応用した。今後は、紫外励起型の DIC-TLMを開発し拡張ナノ空間で生体分子の無標識単一分子検出を目指す。従って、本研究はマイクロ・ナノ化学チップと組み合わせることによって単一細胞・単一分子分析のための新しい検出法を提供するものとする。

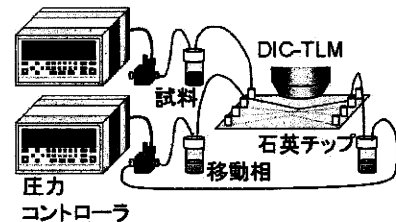


図8. 拡張ナノクロマトグラフィーの実験装置

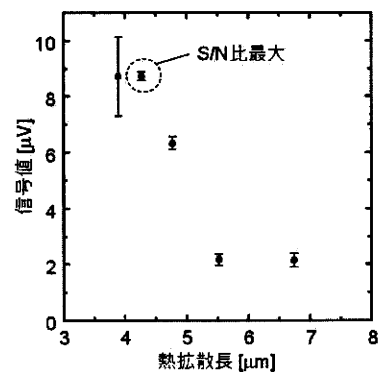


図9. 拡張ナノ空間における熱拡散長と信号値の関係

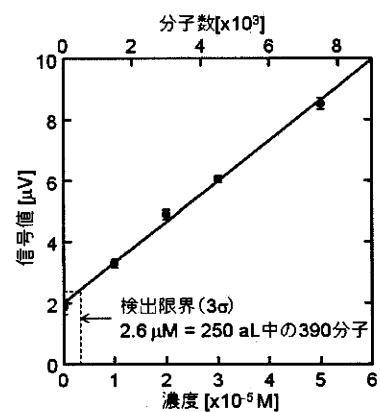


図10. 拡張ナノ空間における濃度定量の結果

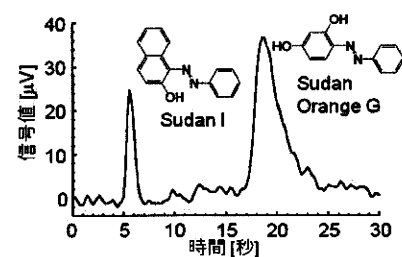


図11. 非蛍光性分子のクロマトグラム