

システム開発

14 - F - 13

平成14年度

微小サンプル量試料のための高感度計測・分析システムの

開発に関するフェージビリティスタディ

報告書

- 要旨 -

平成15年6月

財団法人 機械システム振興協会

委託先 社団法人 日本分析機器工業会



この事業は、競輪の補助金を受けて実施したものです。

## 序

わが国経済の安定成長への推進にあたり、機械情報産業をめぐる経済的、社会的諸条件は急速な変化を見せており、社会生活における環境、都市、防災、住宅、福祉、教育等、直面する問題の解決を図るためには技術開発力の強化に加えて、多様化、高度化する社会的ニーズに適応する機械情報システムの研究開発が必要であります。

このような社会情勢の変化に対応するため、財団法人機械システム振興協会では、日本自転車振興会から機械工業振興資金の交付を受けて、経済産業省のご指導のもとにシステム技術開発調査研究事業、システム開発事業、新機械システム普及促進事業等を実施しております。

このうち、システム技術開発調査研究事業及びシステム開発事業については、当協会に総合システム調査開発委員会（委員長：放送大学教授 中島 尚正氏）を設置し、同委員会のご指導のもとに推進しております。

本「微小サンプル量試料のための高感度計測・分析システムの開発に関するフェージビリティスタディ」は、上記事業の一環として、当協会が社団法人日本分析機器工業会に委託し、実施した成果をまとめたもので、関係諸分野の皆様方のお役に立てれば幸いです。

平成15年6月

財団法人 機械システム振興協会

## はじめに

本報告書は、社団法人日本分析機器工業会が、平成 14 年度事業として、財団法人機械システム振興協会から受託した「微小サンプル量試料のための高感度計測・分析システムの開発に関するフィ - ジビリティスタディ」の実施内容をまとめたものです。

分析機器は、あらゆる産業分野の基礎研究から先端技術開発に関わるツ - ルとして製品の研究開発、品質管理等に利用されていますが、年々、その用途は多様化するとともに、より高度な性能が要求されてきています。産業の技術基盤を支える分析機器産業としては、益々多様化・高度化する各分野の要望に沿った分析・計測機器、システム等を提供し、産業技術力の強化、国際競争力をもった最先端技術の開発、それらを使った高付加価値製品の開発などに貢献することが大きな責務となっています。

本フィ - ジビリティスタディにおける少量の試料でも計測・分析が可能で、しかも同一試料を複数の分析手法で計測・分析可能な高感度計測・分析システムの実現は、本報告書にあるマイクロ化学チップを利用した試料測定モジュールに見られるように最先端技術を用いた分析機器・システムの提供に繋がることが期待されます。

本報告書は、微小サンプル量を可能とする試料セルにマイクロ化学チップの流路を用いた試料測定モジュールの設計、試作と 2 種の検出方法を用いたシステムの性能評価を主に、「文献調査」、「試料測定モジュールの概念設計」、「試料測定モジュールの設計試作」、「試料測定モジュールの実証実験」、「総括と提言」の 5 章より構成されています。本フィ - ジビリティスタディの成果が、今後の先端技術を用いた分析機器の開発の一助となることを期待いたします。

最後に、このフィ - ジビリティスタディの実施に当って、委託事業として取り上げていただきました財団法人機械システム振興協会に深く感謝申し上げますとともに、設計・試作と実証実験にご協力を戴きました財団法人神奈川科学技術アカデミ -、及び実施機関である社団法人日本分析機器工業会において「微小サンプル量試料のための高感度計測・分析システムの開発に関するフィ - ジビリティスタディ」に参加し、貴重なご意見、ご審議を戴きました委員長をはじめとする各委員のご尽力に対し、厚くお礼申し上げます。

平成 15 年 6 月

社団法人 日本分析機器工業会  
会 長 矢 嶋 英 敏

## 目次

### 序

#### はじめに

1. スタディの目的 .....	1
2. スタディの内容 .....	2
3. 実施体制 .....	3

### 第1章 文献調査 .....

7

1 - 1 はじめに .....	7
1 - 2 調査した文献例 .....	7
1 - 3 まとめ .....	11

### 第2章 試料測定モジュールの概念設計 .....

13

2 - 1 はじめに .....	13
2 - 2 各種検出法の原理と特徴 .....	13
2 - 3 検出法の選定 .....	15
2 - 4 試料測定モジュールの概念設計 .....	16

### 第3章 試料測定モジュールの設計試作 .....

23

3 - 1 はじめに .....	23
3 - 2 設計 .....	24
3 - 3 試作 .....	36

### 第4章 試料測定モジュールの実証実験 .....

45

4 - 1 はじめに .....	45
4 - 2 試料測定モジュールの特性評価 .....	45
4 - 3 試料測定モジュールの実証試験 .....	48
4 - 4 まとめ .....	52

### 第5章 総括と提言 .....

55

5 - 1 総括 .....	55
5 - 2 提言 .....	56

### 参考文献 .....

57

## 1. スタディの目的

20 世紀における石油化学産業や半導体産業の興隆とこれらの産業から生産される工業用製品は人類に多大な恩恵を及ぼした。これらの製品の品質を保証したのは人工生成物として多数の化学種（半導体結晶、無機化合物、有機化合物等）を同定できる分析機器である。このような分析機器は通常、実験室で使用されていた。21 世紀に入り、これらの人工生成物の副産物として人類に有害な物質の影響が無視できなくなり、また、DNA の発見に端を発するライフサイエンスの進展はバイオテクノロジーの産業化の競争となり各国が競っている。このような環境、バイオという分野においても化学種（有害金属、有機化合物、蛋白質等）の同定と定量は、研究開発から安全で安心な社会生活を支える基盤技術として必要である。しかし、このような対象物は従来の分析とは違い、利用できる試料は少量に、分析目的となる物質はより微量となる。つまり対象となる物質は従来の工場という閉ざされた空間からバイオであれば生体中、環境物質であれば河川や建築物の中等に空間的に広く分布をしている。分析する試料の多様性や用いる分析法の多様性を満たし、不特定な場所等の条件での高感度計測・分析手法の確立のためには、多様な状態の試料を現在ある高性能の分析機器で効率よく解析し、相互比較ができる手段が必要となる。

当初、科学研究用の機器として発展したラボ用分析機器は、試料をある一定の状態にすることによりあらゆる試料に対応できるような構成と機能をもっているが、試料の多面的な評価には、1 つの分析手法ではデータが不足し、通常は複数の分析手法による分析結果を利用して試料の全体像を得ている。このため現状ではそれぞれの装置に対応して試料を準備しているが、試料の量が微量になると、装置に別々の試料を準備することが困難になる。そこで下記のような条件を満たす高感度計測・分析システムが必要となる。

1. 複数の計測・分析機器で同一の試料を使用する。
2. 複数の計測・分析機器で同一の条件下（前処理、温度、湿度、雰囲気等）で測定・計測をする。

この条件を満たすためには「試料セル」や「試料ホルダー」をモジュール化し、この装置での測定時には同一の大きさ、形状のモジュールとして装着できると共に、モジュールそのものは

1. 複数の分析機器に装着でき、共通に使用できる。
2. 気体、液体、固液混合状態に対応できる。
3. 試料を同一の条件下（例えば、温度、流速等）で保持できる。
4. 携帯が可能（持ち運び可能）である。

ことが必要となる。

この課題の解決の一方法として本フィージビリティスタディ（以下スタディという。）では、試料測定部分のモジュール化についての開発を行うことを目的とする。

## 2. スタディの内容

本スタディでは、まず試料測定モジュールに必要なとされる仕様・機能を明確にして概念設計を行い、これに基づいて試料測定モジュールを設計し試作を行った。この試作した試料設計モジュールにより、実証実験を行い、実験結果をもとに、本システムの有効性、実用性等を検討し今後の設計指針を作成した。また、同時に試料測定モジュールについての内外の現状を把握するための調査を行い、報告書としてまとめた。

### 1) 文献・資料調査

文献・資料により今後の動向を把握し、概念設計にあたり、必要となる情報を得る。

### 2) 試料測定モジュールの概念設計

同一の試料を複数の計測・分析機器により計測・分析できる試料測定モジュールについて仕様・必要な機能を明確にし、多様な目的に対しなるべく少数の試料測定モジュールで対応できるように概念設計を行った。なお、分析手法としては非破壊、非接触で計測し、分析が可能な分光的手法の中から選択した。

### 3) 試料測定モジュールの設計試作

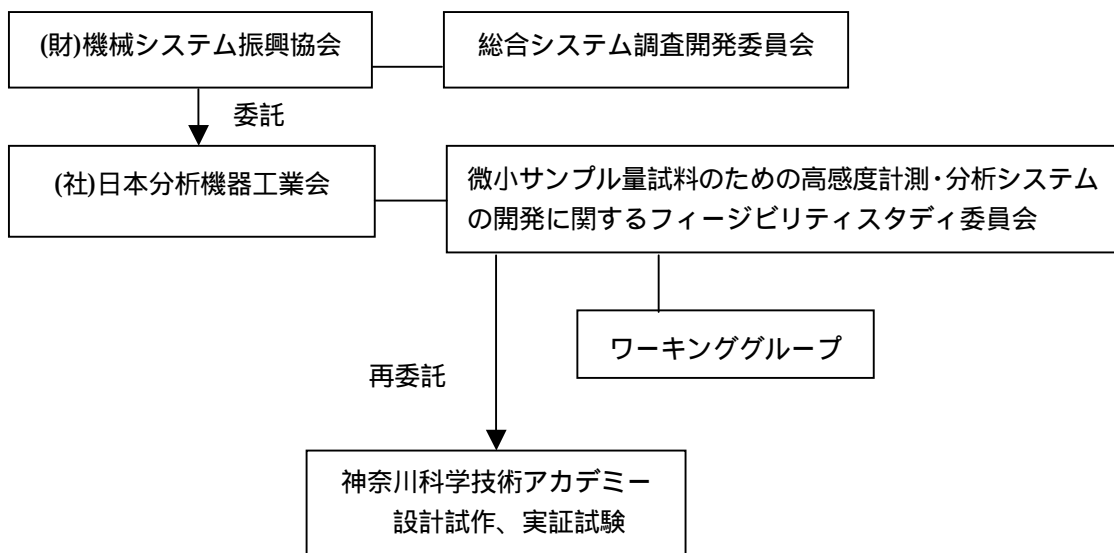
具体的に熱レンズ法と蛍光法を想定し、実験が可能な試料測定モジュールを設計試作した。また、検出・測定のための計測用エレクトロニクス等は市販のものから最適な仕様のものを選び購入し、システムとして構成した。

### 4) 試料測定モジュールの実証実験

試作した試料測定モジュールを熱レンズ法、蛍光法等の計測・分析法により試料として抗体タンパク（アレルギー、ガン等）を用いて測定し、目標とする性能・機能の評価を行うことで問題点を抽出し、今後の設計指針を得た。

### 3. 実施体制

(財)機械システム振興協会内に「総合システム調査開発委員会」を設置し、(社)日本分析機器工業会内に「微小サンプル量試料のための高感度計測・分析に関するフイージビリティスタディ委員会」を設け、ここで事業計画細部の決定と執行を図り、かつ「ワーキンググループ」を設けて専門事項に関する作業を分担し、また、必要に応じて適切な専門家にアドバイスを求め、当初の目的を達成すべくこれを推進した。特に、設計・試作と実証実験にあたっては、分光に関する専門家を擁して、パイオ等の試料を用いて研究を推進している神奈川科学技術アカデミーに再委託した。





## 総合システム調査開発委員会委員名簿

(順不同・敬称略)

委員長	放送大学 教養学部 教授	中島尚正
委員	政策研究大学院大学 政策研究科 教授	藤正巖
委員	東京工業大学 大学院総合理工学研究科 知能システム科学専攻 教授	廣田薫
委員	東京大学大学院 工学系研究科 助教授	藤岡健彦
委員	独立行政法人産業技術総合研究所 つくば東事業所 管理監	野崎武敏
委員	独立行政法人産業技術総合研究所 つくば中央第2事業所 管理監	太田公廣

微小サンプル量試料のための高感度計測・分析システムの開発に関するフェージビリティスタディ

委員会委員構成

(順不同・敬称略)

委員長	北森 武彦	東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻教授
	金 幸夫	東京大学工学部附属総合研究機構助教授
	火原 彰秀	東京大学工学部附属総合研究機構助手
	渡慶次 学	(財)神奈川科学技術アカデミー インテグレートッド・ケミストリープロジェクト副研究室長
	吉田 佳一	マイクロ化学プロセス技術研究組合技術第二部長
	服部 明彦	日本板硝子(株)情報電子カンパニー技術企画本部主席研究員
	下出 浩治	旭化成(株)中央技術研究所第1研究部主幹研究員
	根本 清志	オリンパス光学工業(株)研究開発センター研究開発本部基礎技術部 技術第3グループリーダー
	古川 良知	京都電子工業(株)東京営業所営業企画部部長代理
	後藤 良三	東亜ディーケーケー(株)営業企画部営業推進課課長
	長谷川勝二	日本分光(株)開発部技術管理室課長
	原田 勝仁	(株)日立ハイテクノロジーズライフサイエンス事業統括本部 事業企画本部専門部長
	平井 正徳	三菱化学(株)情報電子カンパニー企画管理部部長
	高田 義博	理学電機(株)熱分析事業部設計部設計グループマネージャー
	松岡 広和	横河アナリティカルシステムズ(株)営業本部企画室長
	作間 英一	(社)日本分析機器工業会専務理事
幹事	小島 建治	日本電子(株)経営戦略室副理事
*幹事	大浦 俊彦	(株)堀場製作所開発センター技術情報チームシニアマネージャー
*幹事	関 秀世	(株)堀場製作所開発センター新技術企画プロジェクトマネージャー
幹事	齋藤 壽	(株)島津製作所分析計測事業部専門部長
オブザーバ	吉野 昌治	経済産業省産業機械課課長補佐
オブザーバ	吉田健一郎	経済産業省産業機械課課長補佐
オブザーバ	松下 公一	経済産業省産業機械課係長
オブザーバ	小西 洋展	経済産業省産業機械課
事務局	戸野塚房男	(社)日本分析機器工業会

\*平成15年4月に大浦委員から関委員に交代

# 第 1 章 文献調査

## 1 - 1 はじめに

本スタディでは、次世代の計測・分析装置の技術の中核となるマイクロ化学プロセス技術を装置化する時に必要な要素技術となる「微量における光計測・分析性能」のフィージビリティを確認するため試料測定モジュールを試作し、性能を検証する。

マイクロ化学プロセス技術はガラス基板あるいはシリコン基板上へのマイクロ流路の形成が主であるが、この計測・分析についてはラボ用の光分析機器を利用している場合も多い。そこで文献調査により、現状を確認した。文献調査はレビュー文献を基にして、今回の試料測定モジュールを設計する上でキーポイントとなる、検出器の設置方法に関して集中して調査した。具体的には 4 編の論文を精査した。

## 1 - 2 調査した文献例

### 1. Monolithic Capillary Electrophoresis Device with Integrated Fluorescence Detector<sup>1)</sup>

著 者： J.R.Webster, M.A.Burms, D.T.Burke and C.H.Mastrangelo

所 属： Center for Integrated Microsystems, Department of Electrical Engineering and Computer Science, Department of Chemical Engineering, and Department of Human Genetics, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109-2122

出 典： Analytical Chemistry, Vol. 73, No. 7, April 1, 2001

シリコン基板上に蛍光検出器を埋め込んだキャピラリー電気泳動システムを製作した。シリコン基板上に埋め込んだホトダイオードにより、溶出してくる分子からの蛍光を測定する。蛍光測定に妨害する励起光を防ぐため、この装置は薄いフィルムのチップ埋め込み干渉フィルターを備えている。また、透明のアルミニウム・亜鉛酸化物 (AZO) でできたアース地板を用いて、ホトダイオードの応答に影響を与える高電場を防いだ。この装置で SYBR Green 染料を用いた DNA 制限フラグメントの検出限界として、フェムトグラムまで測定できた。

チップに検出器を埋め込んだマイクロ電気泳動システムは、手のひらに乗る大きさの診断装置となるだろう。チップ埋め込み蛍光検出部 (フィルター、検出器、電場シールド) をもったマイクロ電気泳動システムの製作と実験を行った。蛍光励起は青色 LED を用いた。分離は SYBR-Green でラベル化した dsDNA を用いて行われた。分離間隔はマイクロ流路 0.9 cm で、理論段数 30,000 以上の分離能を示す。そして、最小検出シグナルは 75 fg であった。

狭いバンド幅とより輝度の高いレーザー励起を使用すれば、さらに検出限界を向上させるこ

とができる。半導体レーザーをこのシステムに用いて、従来型分析装置に匹敵する高感度な装置を製作することができた。

## 2. Microfabrication of a Planar Absorbance and Fluorescence Cell for Integrated Capillary Electrophoresis Devices<sup>2)</sup>

著 者： Zhenhua Liang, Nghia Chiem, Gregor Ocvirk, Thompson Tang, Karl Fluri,  
and D. Jed Harrison

所 属： Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada  
T6G 2G2

出 典： Analytical Chemistry, Vol. 68, No. 6, March 15, 1996

マイクロマシン技術により、キャピラリー電気泳動用の吸収及び蛍光検出用ガラス基板を作成した。吸収用の U 型セルは流れに平行な方向で 120 - 140  $\mu\text{m}$  で、流れに交差する方向に比べ、吸光度で 10 倍の改善され、イソチオシアン酸蛍光色素の検出限界は 6  $\mu\text{M}$  であった。同じ装置を蛍光の励起に使用し、シースフローで散乱を抑えることで、信号/バックグラウンド比を 20 倍改良した。蛍光の検出限界は蛍光物質分子量  $\sim 20,000$  分子、3nM であった。

120  $\mu\text{m}$  のセルでの吸光度限界を推測した。吸収用サンプル 50  $\mu\text{M}$  のインジェクション長と吸光度のグラフから 0.003au、S/N = 3 が得られた。これはファイバーのカップリングが不十分なためと、レーザー源が Ar イオンレーザで不安定なためで、同じセル構成でもこの 2 点を改良すれば検出限界は下がる。FITC の濃度検出限界 (S/N = 3) は約 6  $\mu\text{M}$  と推定される。

蛍光検出では励起光の散乱が検出限界を大きくしてしまうことになる。ここで使用したプレーナ型のデバイスではガラスや曲がったチャンネルの壁からの散乱が多くある。励起光の壁からの散乱を少なくするにはビームをチャンネルより細くした構造が有効で、これは検出限界を低くすることができる。これはシースフローに似ている。励起光がサンプル流れに平行な場合、検出限界は 3nM で約 20,000 分子である。

レーザー及びファイバーはシングルモードを使用したが多モードでも同様に使用できる。安定な光源と PMT の良い電気系で吸光度の限界は改良が可能であるが、ここでは原理的な設計が確立できた。これにより吸収を使ったマイクロチップ方式が広いレンジで使用可能なことがわかった。

蛍光では流路に平行な励起光において、散乱光の影響を少なくすることで、検出限界を下げる事ができた。これは抗体などバイオでの光が少ない場合のマイクロチップではキーになる。更なる改良点は、効果的に集光するレンズ、大口径の励起光ファイバー、ファイバーカップリ

ング改良がある。

3. Integrated optical measurement system for fluorescence spectroscopy in microfluidic channels<sup>3)</sup>

著 者： Jorg Hubner,

所 属： Research Center COM, Orsted's Plads, Building 345 West, Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark

著 者： Klaus B. Mogensen, Anders M. Jorgensen, Peter Friis, Pieter Telleman, and Jorg P. Kutter

所 属： Mikroelektronik Centret, Orsted's Plads, Building 345 East, Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark

出 典： REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS Vol.72, No.1 Jan.2001

マイクロ流体処理システムにおいて、蛍光検出で計量できる可搬型小型ファイバー - ピグテイル測定システムを紹介する。マイクロ流体処理チップは、シリコン技術に基づきシリカで作られ、光学的機能性は、マイクロ流路システムと一体構造にすることによって写真製版の精度が得られ、優れた安定性が得られる。

光ファイバーが取り外されないよう光源、検出部に直付けし、そしてデータ処理システムをしっかりと接続することによって、フィールドでの使用を可能にした。

二種類の色素、蛍光色素と Bodipy650 / 665X を用いた蛍光測定は、広範囲の濃度で直線性を示した。最小検出感度は、蛍光色素で 250pM、Bodipy650 / 665X で 100nM だった。

本研究の実験で使ったファイバーでは、スポットサイズは、およそ 10000  $\mu\text{m}^2$  でこれはミリワットレンジの励起光では平方センチメートルあたり数十ワット程度の輝度となる。

マルチモード光ファイバーの標準コアサイズは、50  $\mu\text{m}$  で、実験に使用した光導波路は、4  $\mu\text{m} \times 24 \mu\text{m}$ 。コアとクラッドの屈折率差は、約 1.2% であり、500  $\mu\text{m}$  の広いマイクロチャンネルを含むファイバーからファイバーまでの全損失は、ほぼ 18dB であった。

装置の感度を決定するもう一つの重要な問題は、マイクロ流路に蛍光性の光を収集する光導波路の能力である。これは、光導波路の開口数によって決まる。

ここでは、蛍光染料（色素）の希釈液が絶えずマイクロ流路を通して注入され、検出ユニットをベースにした光電子増倍管を使って蛍光が測定される。ホウ酸塩で希釈された蛍光色素の場合、最低 250pM 濃度が、なお検出できた。測定された光の信号は蛍光色素濃度に比例し、桁違いの定量的測定値を示す。

この実験で使った励起レーザーパワーは、870  $\mu\text{W}$ であった。これは、約 10000  $\mu\text{m}^2$  のスポットサイズで、チャンネルにおよそ 9W/cm<sup>2</sup> の輝度を引き起こす。同様に Bodipy 色素と赤色レーザーダイオードでホウ酸塩バッファー中の 100  $\mu\text{M}$  までの濃度は、簡単に検出できる。調査した濃度域にわたってキャリブレーションプロットは良好な直線性を示している。

アルゴンイオンレーザーと蛍光色素を利用しているシステムほど感度は良くないが、このシステムは費用対効果が非常に優れている。

消費電力が少ないので電池駆動ができ、スタンドアローンのソーラー電池式のフィールドセンサーで、連続的なサンプルの監視のような応用にも利用できる可能性がある。

要約すれば、標準コネクタで終端処理されるが永久に取り付けられるファイバーがこのコンパクトで頑丈なシステムを可能にしている。光導波路とマイクロ流路は一体構造で作られるため、正確に調整され本質的に安定している。オプティカルコネクタでチップを適当な光源、及び近紫外線から遠赤外線まで動作する検出装置にも接続できる。

この「プラグ&プレイ」のアプローチはこのシステムを一般的に、いくつかの異なるチップデザインに適し、また、バイオ、医学分野の様々な応用に適したものになる。

4 . An Integrated Fluorescence Detection System in Poly(dimethylsiloxane) for Microfluidic Applications.<sup>4)</sup>

著者: Michael L. Chabinyc, Daniel T. Chiu, J. Cooper McDonald, Abraham D. Stroock, James F. Christian, Arieh M. Karger, and George M. Whitesides

所属: Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard University, Radiation Monitoring Devices, Inc.,

出典: Analytical Chemistry, Vol. 73, No.18, September 15, 2001

この文献はポリジメチルシロキサン (PDMS) に組み込んだ微小流路素子のための光検出器として  $\mu\text{APD}$  (microavalanche photodiode) を使った集積蛍光検出システムの試作について述べる。この試作器は再利用が可能な検出システムと簡単な形を組み合わせた使い捨ての微小流路システムから構成されている。組み立ての第一段階は PDMS 中に微小流路のチャンネルを組み込み、更にマルチモード光ファイバー (核径 100  $\mu\text{m}$ ) を組み込む。ファイバ - 先端はチャンネルの一つの側面に近接させる。光ファイバーは微小チャンネル中に蛍光分析の励起に対する光を供給する。試作固相  $\mu\text{APD}$  アレイ光検出器は PDMS の薄板(1cm)に埋め込まれる。薄い(80  $\mu\text{m}$ ) 着色ポリカーボネートフィルターは散乱された励起光が検出器に到達する前に吸収するように  $\mu\text{APD}$  の最上部に付ける。  $\mu\text{APD}$  は微小チャンネルの下側で光ファイバーと

直角に配置する。

$\mu$ APDの1ピクセルの大きさ(30  $\mu$ m)はチャンネルの大きさ(50  $\mu$ m)に合う。青色ダイオードは蛍光の励起に使用される。 $\mu$ ADPは蛍光検出をガイガーモードで作用させる。試作器の検出限界(～25nM)はフルオレセイン溶液で示した。また、この素子を使いタンパク質と低分子をキャピラリー電気泳動(CE)によって分離検出した。

今回、試作したシステムの利点として(1)システム設計は汎用的な検出システムをもつ使い捨ての流路システムが許される、(2)全ての構成部分は $\mu$ APDを除きすでにすぐ使えるものであり、安価、(3)PDMSに光ファイバーの先端を組み込む技術はマイクロマシンで述べられてきたいくつかの問題を無視することができる、(4) $\mu$ APDsの直径は微小流路チャンネルの広さと比べて小さいために、大きさ合わせで光学系の選択を無視できる、などである。しかし、よりよい効率を求めめるためにいくつかの改良をしていく必要がある。例えばピクセルサイズをチャンネル幅に対して増大させることと光量子数の増加やチャンネルと $\mu$ APDの距離の縮小、などである。この集積された検出システムは集積度、感度、可搬性、経済性に対して十分な方向性を持っている。

### 1 - 3 まとめ

マイクロ分析チップについてはMantzらの報告を契機として研究が始まり、最近では研究も多岐にわたって展開されている。このようなマイクロ分析チップで分析手法として分光法を利用する場合、分析チップと分光計測を行う素子の位置の配置により分析性能が左右されることが問題になる。ここで調査した文献は、いずれもマイクロチップの検出システムに関する研究である。

Websterらの文献では、このチップ製作過程において、検出に必要な部品を同時に組み込んでいる。シリコン基板上にホトダイオードを埋め込んで蛍光を検出しているほか、干渉フィルターやアース地板などを埋め込んでチップを製作している。

他の文献では、検出器は分離して配置し、光ファイバーを用いる光学系とマイクロ流路を集積している。表1 - 3 - 1に、今回精査した4つの文献について、検出法、励起源、検出器、検出器の設置方法等と、実験結果(検出限界)をまとめた。文献調査の結果から検出限界は、セパレート型と埋め込み型で差異はほとんどないことがわかった。

表 1 - 3 - 1 調査文献一覧

	文献 1	文献 2	文献 3	文献 4
検出法	蛍光法	蛍光法 吸光法	蛍光法	蛍光法
励起源	青色ダイオード (LED)	レーザー (488 nm)	レーザー (赤色)	青色ダイオード (LED)
検出器	シリコンホト ダイオード	ホトマル チューブ	ホトマル チューブ	マイクロアレイ 光検出器
検出器の 設置等	検出器をチップに 埋め込み	光ファイバーで 集光	光ファイバーで 集光	マルチモード光フ ァイバーで集光
検出限界	75 fg (DNA 72bp)	3 nM (約 20,000 分子量)  6 μM (蛍光色素 FITC)	250 pM (蛍光色素)  100 nM (Bodipy650/655X)	25 nM (フルオレセイン類)
設置方法	埋め込み型	セパレート型	セパレート型	セパレート型



## 第2章 試料測定モジュールの概念設計

### 2 - 1 はじめに

本スタディでは少量の試料で複数の計測・分析法の測定が可能となるように、試料を格納し、試料の状態を一定に保ちつつ分析機器での測定を可能とする試料測定モジュールを開発することを目的としている。試料測定モジュールを概念設計するに当たって、試料セルとしては微小サンプル量を扱えることで最近に大きな注目を集めているマイクロチップを利用することにした<sup>1,2)</sup>。マイクロチップは数 cm 角のガラス基板上に作製された微細流路（マイクロチャネル）を試料セルとするものであるため、液体試料であれば広範囲な測定対象に用いることができ、かなり汎用性が高い。したがって、概念設計にするに当たっては、マイクロチップの検出システムとしていくつかの候補の中からそれぞれの特徴と性能を比較検討して、本スタディでは検出法を2つに絞って、それらが実現できような試料測定モジュールの概念設計を行った。

### 2 - 2 各種検出法の原理と特徴

#### 1. 吸光法

微量分析の検出法として最もポピュラーなものとしては、光の透過率変化を利用した吸光法がある。測定対象である物質が吸収する波長の光を入射して、ブランク（溶媒のみ）と試料（溶質 + 溶媒）の透過光強度の差を測定することで吸光度を求めることができる。入射光の波長を測定対象物質の吸収帯に合わせることで、吸光法は広範囲の物質に適応することができる。吸光度は Lambert-Beer の法則から濃度と比例関係にあるので、それをを用いることで測定対象物質を定量することができる。

$$\text{吸光度 (Abs.)} = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon c \lambda$$

ここで  $I_0$  と  $I$  はそれぞれ入射光強度と透過光強度、 $\epsilon$  はモル吸光係数 ( $\text{mol/L} \cdot \text{cm}^{-1}$ )、 $c$  は濃度 ( $\text{mol/L}$ )、 $\lambda$  は光路長 ( $\text{cm}$ ) である。しかし、Lambert-Beer の関係式からわかるように吸光度は光路長に比例するため、マイクロチャネルのような光路長を長くすることが難しい場合は原理的に高感度測定することは困難である。通常用いられているマイクロチャネルの場合、光路長が  $10 \sim 100 \mu\text{m}$  程度と短い。測定機器によって違いはあるが、吸光度は  $10^{-3}$  程度が定量限界となることが多いので、例えば、モル吸光係数の大きい  $\epsilon=10^4$  ( $\text{mol/L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) の色素分子を  $10 \mu\text{m}$  ( $\lambda=10^{-3} \text{cm}$ ) 深さのチャネル中で定量する場合、 $c=10^{-4}$  ( $\text{mol/L}$ ) 程度しか測定できないことになる。これまでにいくつか光路長を長く取るための特殊なチャネル構造などが提案されているが、それでも感度的には十分とはいえない<sup>3,4)</sup>。

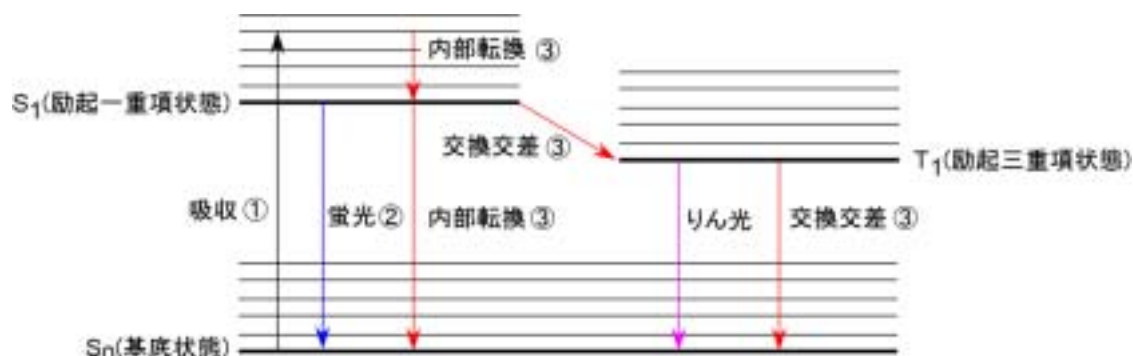


図 2 - 2 - 1 分子の基底・励起状態のエネルギー準位と緩和過程

図 2 - 2 - 1 に光励起後の分子の緩和過程とエネルギー準位の関係を示した。この中の の過程を利用したものが吸光法に対応する。

## 2. 蛍光法

蛍光法は、図 2 - 2 - 1 に示した分子の励起緩和過程のうち項間交差を伴わない放射緩和による蛍光発光量を測定する の過程を利用したものである。蛍光法は水銀ランプなどのインコヒーレント光源を用いた場合でも比較的高い感度が得られる。さらに高い感度や空間分解能を求める場合には、レーザー光源を用いた測定システムを用いる（レーザー誘起蛍光法、LIF：Laser Induced Fluorescence）。共焦点レーザー顕微鏡を用いれば、1 個の蛍光分子がレーザーの光子場にいる間に励起・緩和を繰り返すことにより放出される多数の光子を高感度検出することにより、分子をカウンティング（単一分子検出）することも可能である。実際に共焦点レーザー蛍光顕微鏡をマイクロチップの検出器として用いることで、マイクロチップ内においても単一分子検出が実現している<sup>5)</sup>。

しかし、蛍光法は測定対象が蛍光量子収率の高いローダミンやフルオレセインのような物質の場合は単一分子検出が可能な超高感度検出法であるが、原理的に測定対象が蛍光分子に限定されてしまう。自然界あるいは人工的に合成された物質の大部分は非蛍光性なので、蛍光法に適応できる物質は非常に限定されてしまう。この問題を解決する方法の 1 つとして、DNA などの生体試料を検出するために頻繁に用いられている蛍光標識法（対象物質に蛍光分子を標識する）がある。

蛍光法は、汎用性は低いが、感度的には液体中の分子 1 個を検出することのできる最も高感度な手法といえる。

### 3. 熱レンズ法

微量サンプルが対象のマイクロチップシステムの検出法としては、広範囲の物質を対象にできる汎用性と微量物質を検出できる感度を兼ね備えることが必要である。最近、この条件を満足させるものとして、熱レンズ顕微鏡 (Thermal Lens Microscope) が注目されている<sup>6)</sup>。熱レンズ顕微鏡は光熱変換分光法<sup>7)</sup>の一種である熱レンズ分光法を顕微鏡下で行うものである<sup>8)</sup>。図2 - 2 - 1 に示したように光を吸収した分子の緩和過程には、蛍光やりん光を放出する放射遷移 (Radiative Transition) と熱を放出する無放射遷移 (Non-Radiative Transition) がある。図2 - 2 - 1 では示した過程が無放射緩和過程に対応する。りん光は通常室温では観測されないので、分子の緩和過程としては蛍光を放出する放射遷移と熱を放出する無放射遷移に大別される。前者を利用したものが図2 - 2 - 1 に記述した蛍光法で、後者を利用したものが光熱変換分光法である。一部の蛍光量子収率の高い分子を除いては、分子の緩和過程としては無放射遷移が主要な緩和過程である。したがって、無放射遷移を利用した光熱変換分光法は広範囲の物質に適応できる非常に汎用性の高い検出法といえる<sup>9)</sup>。

マイクロチップの検出器として熱レンズ顕微鏡を用いた例は、北森らによって多数報告されている<sup>16)</sup>。熱レンズ顕微鏡は汎用性が高く、かつ高感度というマイクロチップの検出器として好適な特徴を持っている。

### 4. その他の検出法

前述の吸収法、蛍光法及び熱レンズ法以外にもマイクロチップの検出法として様々なものが提案されている<sup>17-19)</sup>。光 (レーザー) を使ったものとしては、屈折率の変化を利用した屈折率法<sup>20)</sup>とラマン分光法<sup>21)</sup>が報告されており、これらの測定法にはそれぞれユニバーサル検出が可能、振動分光が可能という長所があるが、感度はそれほど高くない。また、検出システム自体の小型化という観点からは、光源のいらぬ化学発光法<sup>22)</sup>や電気化学検出法<sup>23)</sup>が報告されている。しかし、これらは測定対象種が限定されてしまうことと感度が光検出法にはおよばない。その他にも質量分析法<sup>24)</sup>やNMR法<sup>25)</sup>などがマイクロチップの検出法として報告されている。

## 2 - 3 検出法の選定

本スタディの目的は複数の計測・分析機器に使用可能な試料測定モジュールを開発することであるので、本スタディで検討する検出法として光検出と他の検出法といった組み合わせにするには試料セルであるマイクロチップ自身をそれぞれの検出法に対応した物を作製する必要がある。例えば、光検出と電気化学検出法を検討するには、光検出は通常のマイクロチップでよいが、電気化学検出用には電極を集積化した特殊なマイクロチップを作製しなければならない。

また、微小サンプル量試料を測定対象とするので、検出法は高感度であることが必須である。さらに、理想的には汎用性が高いことと、現在広範囲に用いられている検出法であることが望ましい。2 - 2 節で示した検出法の特徴を表 2 - 3 - 1 にまとめた。

表 2 - 3 - 1 検出法の特徴

特徴	吸収	蛍光	熱レンズ	屈折率	ラマン	化学発光 電気化学	質量分析	NMR
感度								×
汎用性						×		

感度の点から、吸収法、屈折率法、ラマン法、化学発光法、電気化学法、NMR 法は本スタディで開発する試料測定モジュールの検出法としては適当ではないと判断した。蛍光法、熱レンズ法及び質量分析法は非常に感度の高い検出法であるが、前述したように光検出法(蛍光法、熱レンズ法)と他の検出法(質量分析法)を組み合わせることは困難であるため、本スタディでは蛍光法と熱レンズ法を検出法として選択した。

## 2 - 4 試料測定モジュールの概念設計

### 1. 試料測定モジュール

本スタディでは、検出法として熱レンズ法と蛍光法を適応することが可能な試料測定モジュールを開発する。図 2 - 4 - 1 に熱レンズ測定モジュールを、図 2 - 4 - 2 に蛍光測定モジュールのシステム模式図を示す。両者を比較して分かるように熱レンズ測定モジュールと蛍光測定モジュールでは、光学系と信号処理システムが異なっている。入射光学系については、熱レンズ測定の場合はプローブ光の光路途中に焦点調整機構のレンズ対が入っているが、蛍光測定の場合は励起光のみしか対物レンズに入射する必要がないので、共通の入射光学系で両方の測定が可能である。検出光学系については、熱レンズ測定の場合は、励起カットフィルター(干渉フィルター)を透過してきたプローブ光をピンホールを通した後に、ホトダイオードで検出するのに対して、蛍光測定の場合は、蛍光をレンズで集光して、バンドパスフィルターあるいはローパスフィルターやハイパスフィルター等で励起光をカットして、蛍光を光電子増倍管や CCD カメラなどの高感度光検出器で検出する。また、熱レンズ測定の場合は、信号処理システムとしてロックインアンプを用いている。これは、ホトダイオードから出力される電気信号のなかで、励起光の変調周波数に同期した成分のみをロックインアンプで増幅検出することで

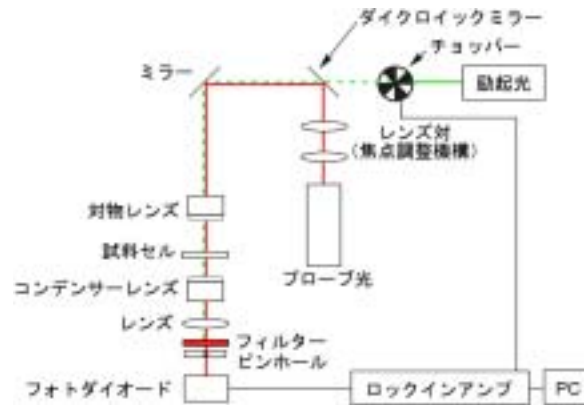


図2 - 4 - 1 熱レンズ測定モジュールのシステム模式図

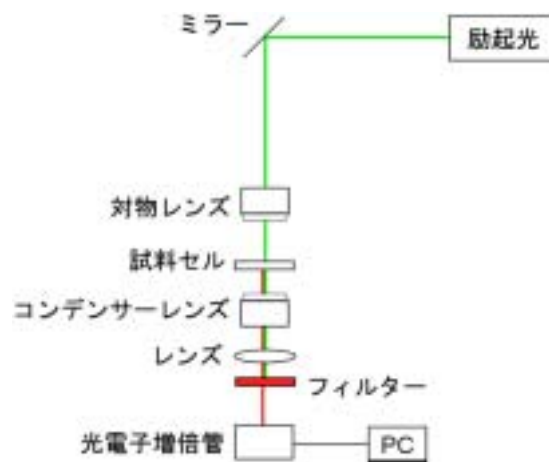


図2 - 4 - 2 蛍光測定モジュールのシステム模式図

高感度化実現するためである。これは微弱信号を検出する常套手段で、蛍光測定に対しても適応することができると考えられる。つまり、蛍光測定においても、励起光を変調してロックインアンプを用いて同期検出することで、検出器に光電子増倍管や CCD カメラなどを用いなくてもフォトダイオードで高感度検出できる可能性がある。

これらを検討するために既存の熱レンズ顕微鏡を用いて蛍光測定の予備実験を行ってみた。この熱レンズ顕微鏡の検出光学系を図2 - 4 - 3、図2 - 4 - 4、図2 - 4 - 5に示した3つの光学配置で蛍光測定を行った。試料はローダミン 6G 水溶液を用いた。励起波長は 514.5nm を用いた。励起光をカットするために干渉フィルター (646 ± 5nm) を用いた。試料セルは 100μm 深さの組み立て式光学セルを用いた。励起光の変調周波数は 1kHz とした。

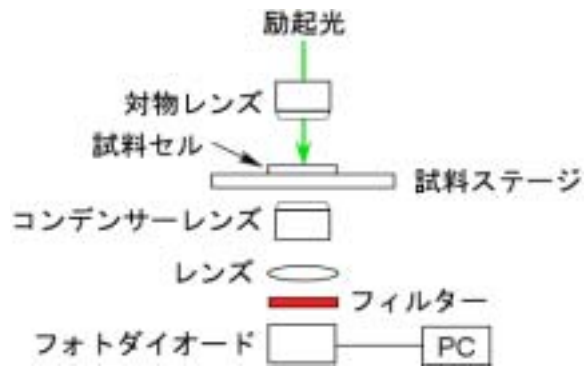


図 2 - 4 - 3 蛍光測定的光学系 1

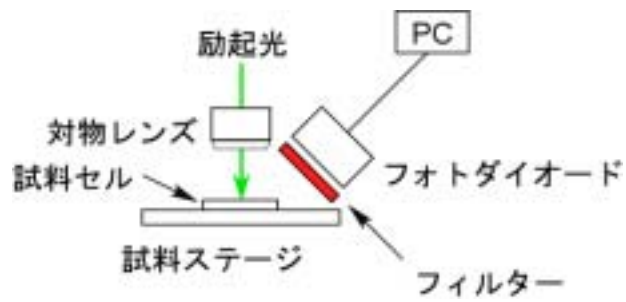


図 2 - 4 - 4 蛍光測定的光学系 2

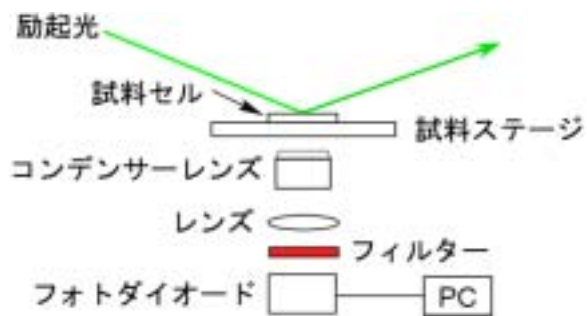


図 2 - 4 - 5 蛍光測定的光学系 3

表 2 - 4 - 1 定量限界と検出限界

	光学配置 1	光学配置 2	光学配置 3
定量限界 ( $2\sigma$ )	$2.7 \times 10^{-7}$ M	$3.0 \times 10^{-7}$ M	$2.7 \times 10^{-8}$ M
検出限界 (S/N=2)	$9.1 \times 10^{-9}$ M	-	$1.2 \times 10^{-8}$ M

表 2 - 4 - 1 にそれぞれの光学配置における検量線から求めた定量限界 ( $2\sigma$ ) と検出限界 (S/N=2) をまとめた。

蛍光測定の場合、検出器に入ってくる励起光がバックグラウンドとなるため、励起光の光軸と検出器とが同軸にない方が良いと考えられるが、今回の結果は従来の熱レンズ測定における光学配置と同じ光学配置が最も感度が高い。これは図 2 - 4 - 4 と図 2 - 4 - 5 の光学配置は、熱レンズ顕微鏡下ではレンズやホトダイオードの位置を最適化することが、空間的に制限されているためだと考えられる。いずれにしても、図 2 - 4 - 3 の熱レンズ測定と同じ同軸配置でもかなり高感度な測定が、ロックインアンプで同期検出することで可能であるということが確認できた。さらに、試料セルを組み立て式の光学セルからマイクロチップ (マイクロチャネルの幅:  $100\mu\text{m}$ 、深さ:  $40\mu\text{m}$ ) に変えた場合もほぼ同様な感度で測定できることも確認できた。

これらの結果から、入射光学系と信号処理システムを共通にして、検出光学系のみを熱レンズ測定と蛍光測定で若干変更することで両方の測定が可能であることがわかった。

また、入射光学系の対物レンズは試料セルに対してサイズが大きいため最適空間配置で設置することが困難である。さらに、熱レンズ測定の場合は、プローブ光の光路の途中にレンズ対を配置しなければならない。本スタディでは、ファイバー光学系と GRIN レンズを使うことで、入射光学系の空間配置のフレキシビリティと GRIN レンズの色収差による焦点差を持たすことにした<sup>26)</sup>。また、励起光とプローブ光を合波器を用いて同軸にすることでダイクロイックミラーなどの光学系の省略も実現される<sup>27)</sup>。それによって、完全に共通の入射光学系で熱レンズ測定及び蛍光測定が可能になると考えられる。最終的なシステム概略図を図 2 - 4 - 6 に示す。

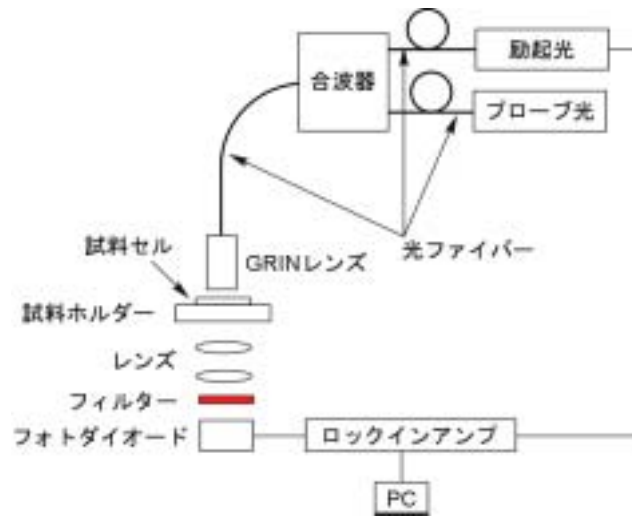


図2 - 4 - 6 システム概略図

## 2. マイクロチップ

本スタディでは、70mm×30mm×1.4mmのパイレックスガラス製マイクロチップを試料セルとして用いることにした。マイクロチップはフォトリソグラフィとウェットエッチングにより作製する。したがって、マイクロチャネルの断面は半円状の形状を持つ。図2 - 4 - 7に表面形状測定顕微鏡を用いて測定したマイクロチャネルの断面の3次元イメージを示す。マイクロチャネルのサイズは、一般に良く用いられている幅200 $\mu\text{m}$ ×深さ100 $\mu\text{m}$ 程度のサイズのものを用いることにした。図2 - 4 - 8にマイクロチップの写真を示す。

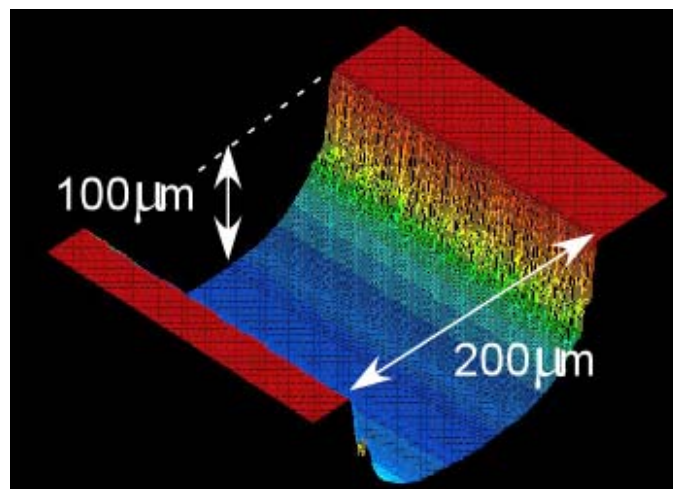


図2 - 4 - 7 マイクロチャネル断面形状の3次元イメージ



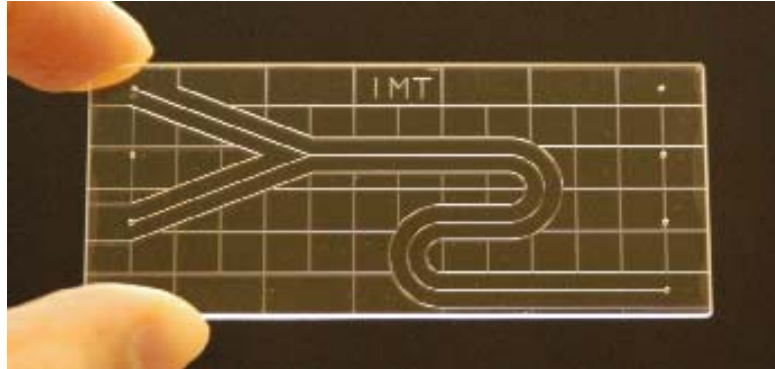


図2 - 4 - 8 マイクロチップ

## 第3章 試料測定モジュールの設計試作

### 3 - 1 はじめに

チップ内に形成された溝の中を流れる試料を熱レンズ法及び蛍光法で測定可能な試料測定モジュールを設計するにあたり、試料測定モジュールを、チップを保持し、測定位置調整をするために用いられる試料モジュールと、試料モジュールに保持された試料に測定に用いられる光を照射して試料の濃度等を検出する検出モジュールとに分けて設計を行った。

各モジュールに含まれるユニットは下記のとおりである。

#### 1. 検出モジュール

##### ( i ) 測定に用いる光を発生する光源ユニット

測定に必要な光を発振するレーザーダイオード

レーザーダイオードから出た光を伝送経路となる光ファイバー内へ入射させるのに用いられるレーザーダイオードモジュール

2つの波長の光を合波して1本の光ファイバー内へ入射させる2波長合波素子

その他：レーザーダイオードを制御するためのドライバー回路

変調信号を出すパルスジェネレーター

電源

##### ( ) 光源より発生した光を試料に導くプローブ

伝送経路として用いられるシングルモード光ファイバー

励起光及び検出光を試料に集光するための対物レンズ (SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズ)

##### ( ) 試料より発した光または試料によって偏向した光を測定するホトダイオードユニット

光を検出するために用いるホトダイオード

検出時に邪魔となる励起光を除去するバンドパスフィルター

一部の光のみを切り取るピンホール

##### ( ) 検出した信号を処理する電気回路

ホトダイオードにて得られた信号を電圧に変換し、増幅するIVアンプ

ノイズが多い信号の中から信号のみを取り出すロックインアンプ (外付け)

#### 2. 試料モジュール

##### ( i ) 測定に用いる試料を流す溝を形成したチップを固定するためのホルダー

##### ( ) ホルダーに固定したチップに試料を送液するためのキャピラリーを接続するコネクタ

- ( ) 試料モジュールを保持し、測定するための位置に調整するステージ
- ( ) 試料溶液を送液するためのシリンジポンプ（外付け）

### 3. その他

測定時の温度及び湿度を測定するための温湿度データロガー

熱レンズ法及び蛍光法を同一のモジュールにて測定するに当たり、兼用できる部分は全て兼用し、兼用できない部分のみを測定方法毎に取り替える構成とした。上記の検出モジュールに当たっては、( i ) 測定に用いる光を発生する光源ユニット、( ) 光源より発生した光を試料に導くプローブまでは全く同じ構成でよいので、測定方法毎に交換する必要は全くない。( ) 試料より発生した光または試料によって偏向した光を測定するホトダイオードユニットにおいては、蛍光法で試料から発生する蛍光の波長が熱レンズ法で用いる検出光の波長と異なる場合においては、使用するフィルターを交換することとなる。また、熱レンズ法に対して蛍光法の場合の方が測定する光の光量が小さく、より励起光の影響がでやすいため、蛍光法での実験では複数枚のフィルター使用が必要となる場合がある。

試料ステージにおいては、チップを保持して試料を送液する部分は全く共有できるので、測定法毎に変更する必要はない。

## 3 - 2 設計

### 1. 検出モジュールに用いられる各構成部材について

本検出モジュールに用いた光学系の概略構成を図3 - 2 - 1に示す。図3 - 2 - 1において、熱レンズ法と蛍光法では光学系がほとんど兼用できるので、兼用できる部分は全て兼用することとした。その結果、測定に必要な光を試料に照射する部分までは全く同一の構成でモジュールを構成でき、検出の部分のみを測定方法によって取り替えるという構成にすることができたため、装置を非常にシンプルで、小型のものとすることができた。

熱レンズ法においては試料に熱レンズを形成させるための励起光(試料が吸収する波長の光)と形成した熱レンズを検出するための検出光(試料が吸収しない波長の光)を試料まで導かなければならないのに対し、蛍光法では試料に蛍光を発生させるために必要な励起光のみを試料に伝送すればよいので、熱レンズ法で使用できる伝送光学系は蛍光法でも使用できるものとなる。よって、測定に必要な光を試料に導くまでの光学系は熱レンズ法に必要な条件で設計し、蛍光法で適応できるか確かめることを行うこととした。

以下図3 - 2 - 1を構成する各部材について説明する。

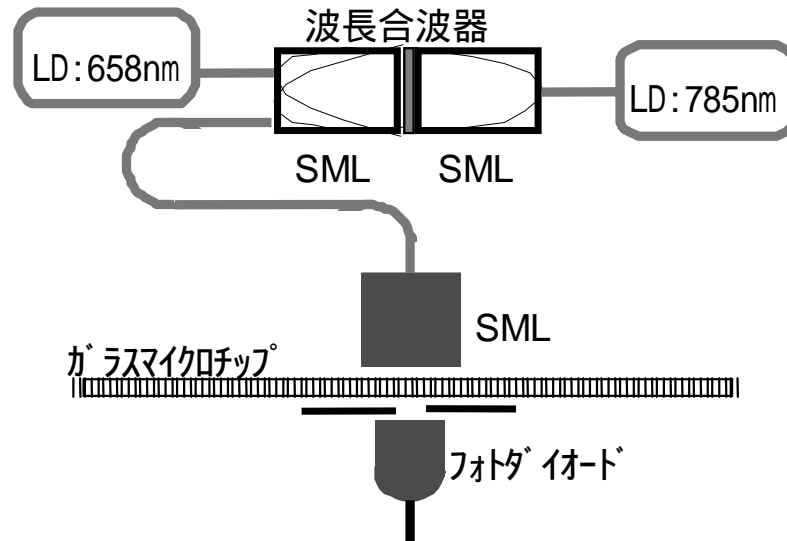


図3 - 2 - 1 検出モジュールに用いた光学系の概略構成図

(1) プローブ (対物レンズ及び光伝送経路)

伝送経路 (シングルモード光ファイバー)

熱レンズ法では、その測定原理より試料が吸収する光 (励起光) と試料が吸収しない光 (検出光) の2つの波長を用いる必要がある。熱レンズ法では、これらの2つの波長の光を試料に集光照射し、試料が吸収した励起光によって熱レンズを形成させ、検出光によってその熱レンズの度数を測定する。そのため、熱レンズ法にて試料を測定するモジュールにおいては、励起光及び検出光を同軸で伝送し、試料に集光照射することが必要となる。一般に熱レンズ法に用いられる装置では、励起光及び検出光を空間レーザー光として伝送し、ダイクロイックミラー等で合波することで同軸としている。しかしながらこの方法では測定毎に各レーザー光の光軸調整が必要となること、光軸調整用の治具が必要となることにより、装置が大きくなるとともに測定者の作業性が悪い問題がある。そのため、本モジュールでは伝送経路として光ファイバーを採用することとした。光ファイバーを伝送経路に用いることにより、光ファイバー内に入射させた2つの光は常に同軸となるうえ、環境 (温度、振動等) による変化で光路が変化しないので、測定毎に光路を調整する必要がなくなり、測定者の作業性が向上するとともに光軸調整用の治具がなくなりモジュールを小型化することができる。

熱レンズ法では、測定感度を向上させるためには、励起光をできるだけ小さく絞って熱レンズ形成に利用されるエネルギーを高くするとともに、励起光によって形成する熱レンズを収差の少ないレンズとすることが望ましい。そのため、本モジュールでは光ファイバーとして励起光をシングルモードで伝搬する光ファイバーを用いることとした。励起光をシングルモードで伝送する光ファイバーは、その端面から励起光をガウス分布で出射するので、対物レンズにて集光した際に励起光の焦点を小さくすることが可能となる。また、励起光によって形成された

熱レンズが小さい場合、この熱レンズを通過する検出光の光量をできる限り多くするためには検出光もできる限り小さく絞ることが望ましいので、本モジュールでは励起光とともに検出光もシングルモードで伝搬する光ファイバーを伝送経路に用いることとした。

#### 対物レンズ (SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズ:SML)

熱レンズ測定においては、励起光及び検出光の焦点位置が異なっていることが必要となる。熱レンズは励起光の焦点位置に形成されるが、励起光の焦点位置と検出光の焦点位置が同じ場合は、形成された熱レンズによって検出光の光路が全く偏向されないため、検出器によって熱レンズを検出することができない。励起光の焦点位置と検出光の焦点位置がずれている場合は励起光の焦点位置に生成する熱レンズによって検出光が偏向するので、その偏向の度合いによって熱レンズの度数を測定することが可能となる。

励起光及び検出光を集光するために用いられる対物レンズが色収差を有している場合は、対物レンズのみで励起光及び検出光の焦点位置をずらすことが可能となるため、光学系の構成が非常に簡単になる。しかしながら、一般に顕微鏡の対物レンズは色収差がないように設計されているため、本モジュールではSELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズを対物レンズとして用いることとした。

SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズの外観写真を図3 - 2 - 2に示す。SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズは長手方向に伸びる中心線位置から半径方向に屈折率が連続的に変化し、中心線位置の屈折率を $n_0$ とし、2乗分布定数を $g$ として、中心線位置から半径方向に $r$ の距離の位置における屈折率 $n(r)$ が近似的に $r$ に関する2次方程式

$$n(r) = n_0 \{ 1 - (g^2 / 2) \cdot r^2 \}$$

で表される集束性伝送体である。SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズはその全長 $Z_0$ を $0 < Z_0 < \pi / 2g$ の範囲内で選択する場合、両端面が平坦でありながら通常の凸レンズと同じ結像特性を有し、平行入射光線によって出射端より、

$$s_0 = \cot(gZ_0) / n_0g$$

の位置に焦点が作られる。

SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズは両端面が平面であるので、光ファイバーの端部に容易に取り付けることができると共に、SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズの光軸と光ファイバーの光軸とを容易に一致させることができる。このため、本モジュールで伝送経路として用いた光ファイバーに容易に接続して使用することができる。また、レンズの大きさが非常に小さいので、チップに近接させてレンズを配置でき、検出モジュールを小型に設計することができた。



図3 - 2 - 2 SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズの外観写真

SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズの焦点距離、色収差量は、その形状（ロッド径、ロッド長さ、端面形状）及び材質によって調整することが可能である。よって、本モジュールでは、直径1mm、長さ2.3mm、励起光と検出光の焦点位置差40 $\mu$ m（励起光に波長658nmの光、検出光に785nmの光を用いた場合：設計値）のSELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズを使用することとした。

SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズと光ファイバーは図3 - 2 - 3のようにして接続することとした。SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズと接続するシングルモード光ファイバーの外径をSELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズと揃えるため、SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズと外径が同じ円柱状のフェルールにシングルモード光ファイバーを挿入して固定する。外径が同じフェルールとSELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズはガラスチューブにて固定されている。実際のプローブ先端の写真を図3 - 2 - 4に示す。

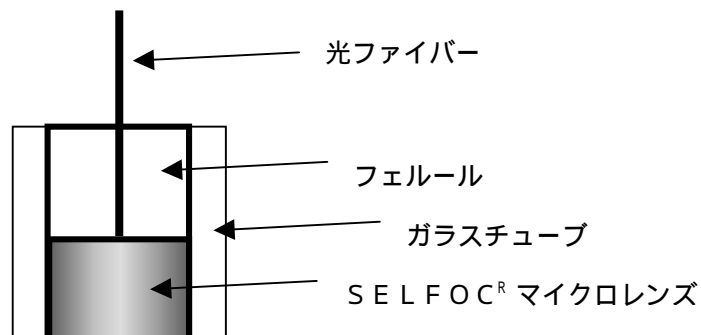


図3 - 2 - 3 SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズと光ファイバーの接続方法

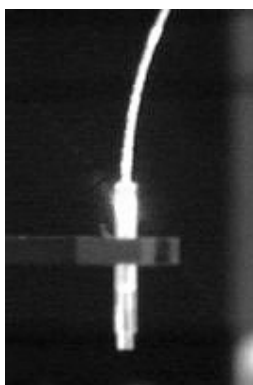


図3 - 2 - 4 プローブ先端構成写真

以上熱レンズ法に必要な条件で対物レンズを決定したが、蛍光法においては単一の波長の光（励起光）を試料に集光照射できればよいので、色収差に関しては問題にならない。蛍光法においては、試料が全方位に発する蛍光をできるだけ広範囲に検出することが測定感度向上に必要であるので、非常に小さな対物レンズを使用することはメリットとなる。

## （２）光源ユニット

本検出モジュールにおいては、熱レンズ法及び蛍光法に用いる光源を一つのユニットとして箱に納めることとした。このようにユニットに分割することによって、検出ユニットの組み立てを容易にし、また、ユニットごとに作製を進められるので納期的にもメリットがある。

光源ユニットには熱レンズ法及び蛍光法における励起光及び熱レンズ法における検出光を発振する光源、２つの波長の光を同軸にする２波長合波素子、電源及び各光源を制御するための回路が含まれる。以下それぞれの部材について説明する。

### 光源（レーザー発振源：レーザーダイオード）

本モジュールでは、熱レンズ法及び蛍光法の励起光用光源として 658nm のレーザーダイオードを、熱レンズ法の検出光として 785nm のレーザーダイオードを用いることとした。用いることとしたレーザーダイオードの定格最大出力はともに 35mW（連続光で）である。

熱レンズ法においては、試料への励起光の照射を続けていると、試料の温度分布の飽和により熱レンズの形状が悪くなる問題がある。そのため、試料の温度分布の飽和を防止するために励起光の照射を規則的に止め、熱レンズをある時間ごとに作り直すことで熱レンズの形状が悪くなることを防ぐことを行う。このためには励起光の照射を周期的に ON、OFF することが必要となる。レーザーダイオードはその構造よりレーザー発振に必要な電気の供給を制御することで、その発振を制御することが可能である。よって、励起光の周期的な ON、OFF（以

下変調と記す)をレーザーダイオードの発振を制御することで達成できるため、一般の励起光用光源として用いられているガスレーザー等の場合のように、変調の手段として光路上にチョッパー等を設置する必要がなくなり、光学系を非常にシンプルにまた小型にできる。また、チョッパー等を設置する必要がないので、励起光の光路の一部を空間光とする必要がなくなり、伝送経路全体を光ファイバーとすることができる。

本検出モジュールにおいては、励起光の変調速度を光源箱内部に設置したパルスジェネレーターにて制御することとした。制御できる励起光の変調速度は、0(変調なし：連続光発振)~2.0kHzである。変調速度0の場合は連続光であるので、前述したとおり熱レンズ法での測定は難しいが、蛍光法における測定においては励起光は連続光を用いることが多いため、変調した場合と変調しなかった場合との比較をできるように設置する。

#### レーザーダイオードモジュール

レーザーダイオードから発振されたレーザー光を対物レンズまで伝送する経路として光ファイバーを選択したため、レーザーダイオードから発振された光を集光させて光ファイバーへ入射させるためのレンズをレーザーダイオードの前に設置したレーザーダイオードモジュールを使用することとした。レーザーダイオードモジュールの構造略図を図3-2-5に示す。レーザーダイオードモジュールは励起光用レーザーダイオードと検出光用レーザーダイオードそれぞれに一つずつ設置されている。

レーザーダイオードは、活性層に平行な方向に約10度、活性層に垂直な方向へ40度近く広がった状態でレーザー光を発振する。そのため、レーザーダイオードより発振されたレーザー光を効率よく光ファイバーへ入射させるためには、レーザーダイオードの前に通常の凸レンズではなくシリンドリカルレンズを設置することとした。特に本検出モジュールでは励起光(658nm)をシングルモードで伝搬する光ファイバーを伝送経路に用いているため、光ファイバーの中で光が伝搬するコア部分の径が約4 $\mu$ mしかなく、光ファイバー、集光レンズ及びレーザーダイオードの調芯が非常に難しい。

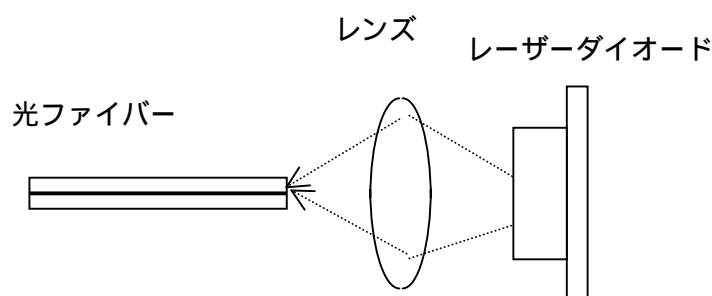


図3-2-5 レーザーダイオードモジュール構造略図



## 2 波長合波素子

レーザーダイオードより発振された熱レンズ法及び蛍光法における励起光及び熱レンズ法における検出光は、レーザーダイオードモジュールにて光ファイバー内に入射され、光ファイバー内を伝搬する。しかしながら、対物レンズへは両レーザー光を1本の光ファイバーに入射させて伝送しなければならない。そこで本検出モジュールでは2波長合波素子を用いることで励起光及び検出光を同軸にして1本の光ファイバー内へ入射させ、対物レンズへ伝搬することを図3-2-6に示す。

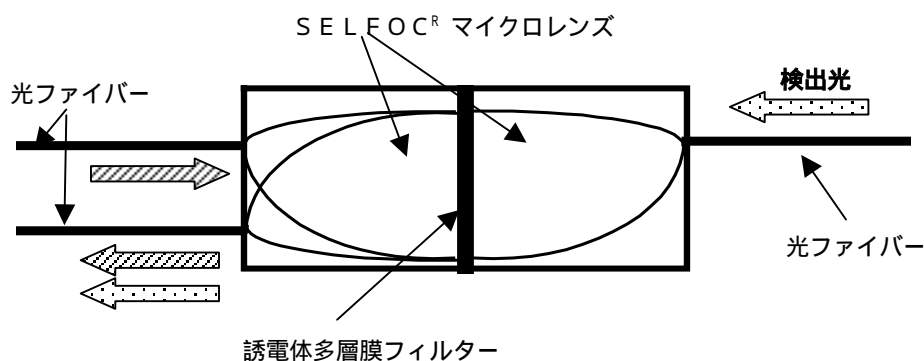


図3-2-6 2波長合波素子の構造

2波長合波素子は、波長多重通信（1本の光ファイバー内に多数の波長の光を入射し、同時に多数の信号を伝送する通信方法）の中で波長を多重させるために用いられているものである。2波長合波素子には大きく分けて薄膜フィルターを用いたものと、光導波路を用いたものがあるが、本検出モジュールでは合波効率の高い薄膜フィルタータイプを用いることとした。

図3-2-6に示した、本検出モジュールで用いる2波長合波素子は、中心軸に垂直な断面内で屈折率が中心から周辺に向かって徐々に減少しているSELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズを、その中心軸に垂直な断面間の長さが異軸入射光ビームの蛇行周期の約1/4になるように両端面を切断研磨し、SELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズの一方の端面に蒸着によって785nmの波長の光を透過して658nmの波長の光を反射する誘電体多層膜フィルターを成膜し、そこにこのSELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズとほぼ同じ長さの別のSELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズを接着固定したものである。

この2波長合波素子の動作原理は次のとおりである。SELFOC<sup>®</sup>マイクロレンズ（図3-2-6中で左側に設置したもの）の誘電体多層膜フィルターを成膜した側と反対の入射側端面の中心軸からずれた位置に、熱レンズ法及び蛍光法における励起光（波長658nm）を発振するレーザーダイオードモジュールに接続された光ファイバー端を固定すると、その励起光の出射光

ビームは蛇行してビーム径が拡大するビームとなって図3 - 2 - 6左側の SELFOC<sup>R</sup> マイクロレンズ中を進み、誘電体多層膜フィルターに入射する。誘電体多層膜フィルターは励起光を反射する特性を有しているため、誘電体多層膜フィルターで反射された後に図3 - 2 - 6左側の SELFOC<sup>R</sup> マイクロレンズ中を進み、図3 - 2 - 6左下側に固定された光ファイバー（逆端に対物レンズが接続された光ファイバー）に入射する。一方、前述した励起光を発振するレーザーモジュールに接続された光ファイバー同様、図3 - 2 - 6右側の SELFOC<sup>R</sup> マイクロレンズの中心軸からずれた位置に固定された、熱レンズ法における検出光（785nm）を発振するレーザーダイオードモジュールに接続された光ファイバーから出射される検出光は、図3 - 2 - 6右側の SELFOC<sup>R</sup> マイクロレンズに入射し、SELFOC<sup>R</sup> マイクロレンズ中を蛇行してビーム径が広がるビームとして進み、誘電体多層膜フィルターに入射する。誘電体多層膜フィルターは検出光を透過する特性を有しているため、誘電体多層膜フィルターを透過した後、図3 - 2 - 6左側の SELFOC<sup>R</sup> マイクロレンズ中を進んで図3 - 2 - 6左下側に固定された光ファイバーに入射する。以上のようにして励起光及び検出光が同一の光ファイバー内へ入射し、その後同一の光ファイバー内を同軸で対物レンズまで伝搬する。

本検出モジュールで用いる2波長合波素子は、2つの SELFOC<sup>R</sup> マイクロレンズの間に誘電体多層膜フィルターを挟み込んだ構成となっているため、構成要素が少なく、全ての構成部品を固定することができるため、2波長合波における損失が少なく、長時間の使用に対しても安定である。また、SELFOC<sup>R</sup> マイクロレンズが極めて小型であるため、2波長合波素子を極めて小型にできる。

#### その他

以上説明した構成部材のほかに、光源（箱）には前述の各レーザーモジュールを駆動するためのドライバー回路、ドライバー回路に電源を供給するための電源、変調した励起光と同期を取るための同期信号を発生する信号発生回路及び各レーザーの発振を ON、OFF するスイッチを設置する。これらは検出モジュール内に設置した場合に操作しやすいよう、前面パネル上にスイッチ、つまみ全てを設置することとした。

### （3）ホットダイオードユニット

#### ホットダイオード

本検出モジュールにおいては、励起光の変調速度が最大で2.0kHzであるため、それほど速い応答速度は必要がない。よって、ホットダイオードとして浜松ホトニクス製 S1337-33BR を使用することとした。

### バンドパスフィルター

熱レンズ法及び蛍光法において、励起光は試料に熱的变化または蛍光発生のために必要なものであって、検出時には必要ないものである。そのため、励起光を除去し、目的とする光（熱レンズ法の場合は検出光、蛍光法の場合は蛍光）のみを選択的に検出することが必要となる。そのため、前述のホットダイオードの上にフィルターを設置し、目的とする光のみを選択的に透過させて検出することとした。

熱レンズ法においては、ホットダイオードで検出する光が検出光であるので、検出光の波長（785nm）のみを透過するフィルターとして、バンドパスフィルターを使用することとした。バンドパスフィルターは誘電体多層膜フィルターの種類で、目的とした一部の巾（バンド）波長の光だけを選択的に透過し、その他の波長の光を反射するものである。

市販されているバンドパスフィルターより、小型で波長が一致しているものとして、アンダーバー社が製造している 780FS20 - 12.5 を使用することとした。

蛍光法においては、測定に用いる蛍光物質によって蛍光スペクトルが異なり、また励起波長によっても最大蛍光波長は異なる。よって、数種類のバンドパスフィルターを用意し、それらを使い分けることで蛍光の測定を行うこととした。蛍光においては励起光の影響がよりでやすいと考え（測定すべき光量が少ない）、バンドパスフィルターを 2 枚重ねて使用することとした。

### ピンホール

ホットダイオードは中心付近の感度と外周域での感度が若干異なるため、より正確に測定を行うためには外周域を使用せず、中心部分のみを選択的に使用した方がよい。熱レンズ法は励起光の照射によって形成した試料中の熱レンズによる検出光の偏向を測定するので、もともとの光量が大きい場合、ピンホールにて光束を絞っても測定は十分可能である。よって、ホットダイオードの上（対物レンズ側）に設置したバンドパスフィルターの上に、ホットダイオードの中心のみに検出光が当たるようにピンホールを設置することとした。ピンホールの径を余り小さくしすぎると、測定に用いる検出光の光量が少なくなってしまうので、使用したホットダイオードの大きさから考えて（2.4mm 角）、1mm のピンホールを使用することとした。

蛍光法においては、試料から発生する蛍光の光量が少ないため、できるだけ蛍光を集めて測定する必要があり、ピンホールは使用しないこととした。

## ケース

上述したホトダイオード、バンドパスフィルター及びピンホールを固定するためのケースを作成した。ホトダイオードにて測定された熱レンズ及び蛍光の信号は、ケース下部に繋がれた同軸ケーブル(終端はBNCコネクタ)にてIVアンプに送られ、そこで電圧に変換されて信号処理用計測器に送られる。

### (4) 信号処理用計測器

#### ロックインアンプ

熱レンズ法において、熱レンズによる検出光の偏向は励起光の変調(励起光照射のありなし)に依存している。よって、熱レンズ法で得られた信号は励起光の変調速度に同期させて処理させる必要がある。

励起光の変調速度に同期した熱レンズの信号を取り出すために、ロックインアンプを用いる。ロックインアンプは参照信号に同期した信号のみを取り出すアンプで、下記の原理で動作する。

ロックインアンプでは、ヘテロダイン技術を用いて測定信号を直流に周波数変換している。ヘテロダイン技術により、外部から取りこんだ参照信号と測定信号を掛け合わせると、参照信号周波数と等しい成分のみが直流となり、ローパスフィルターを透過することができる。その他の成分は交流成分に変換されるためにローパスフィルターで除去される。

本測定においては、NF回路設計ブロック社製デジタルロックインアンプLI5640を試料測定モジュールに内蔵させることなく、外付けとして用いることとした。

#### IVアンプ

ホトダイオードに光が入力すると電流が発生する。発生した電流量にて信号処理を実施してもよいが、電気ケーブルを伝送中にノイズが載りやすいために電圧に変換して信号処理を実施することとした。入力した電流量に応じて電圧を出力するアンプをIVアンプとよび、本実験においては0.01mAを3.3Vに変換するIVアンプを用いた。IVアンプは試料測定モジュールに内蔵することとした。IVアンプで電圧として増幅された信号は、試料測定モジュールに付けられた端子を経由して上述のロックインアンプまでケーブルにて伝送される。

## 2. 試料モジュール

### (1) 試料ホルダー

2章で設計したチップを保持し、チップ内に液を供給するキャピラリーを接続するためのホルダーとして、図3-2-7に示すホルダーを設計した。

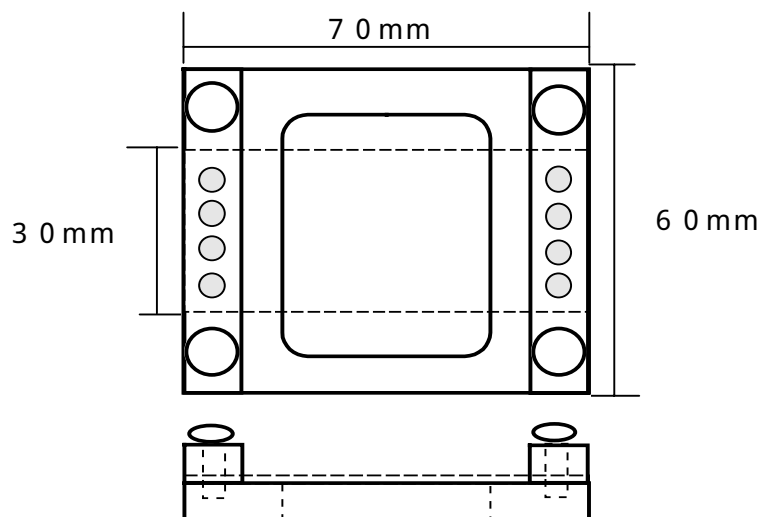


図3 - 2 - 7 チップ保持用ホルダー

チップ保持用ホルダーは、チップを支えるための下板、チップを挟み込むための上板（両側に各1枚）及び上板と下板を止めるためのネジ（4本）にて構成される。チップは上板に掘られたくぼみに挟み込んで固定する。上板には、左右各4箇所ずつ送液用のキャピラリーを繋ぎこむためのネジ穴が掘られている。下穴にはチップ中の試料を透過した検出光が透過する穴が形成されている。

ホルダーの材質はアルミとした。さきにプラスチックで同じ構成のものを作製したが、キャピラリー取り付けネジを締め付けた際に変形し、チップのエッジを破損したので変形しないようアルミで作製することとした。

### （2）キャピラリー取り付けネジ

ホルダーに保持したチップに、試料送液用のキャピラリーを接続するため、キャピラリーの先端に取り付けネジを取り付けることとした。ネジは耐薬品性に優れたテフロン製とし、M5のネジ穴に差し込めるように外周にネジをきり、中央にキャピラリーを差し込める穴をあけることとした。ネジの先端にはキャピラリーにて送液された試料がチップ内に確実に挿入されるよう、バイトン製Oリングを取り付けることとした。

### （3）測定用ステージ

チップを固定し、熱レンズ法及び蛍光法にて測定するための測定ステージ概要を図3 - 2 - 8に示す。

図3 - 2 - 8に示した測定ステージは3段構成となっている。下段のステージには、ホトダイオードを搭載したケースを治具によって固定し、X,Y軸（測定ステージの長手方向をX軸、

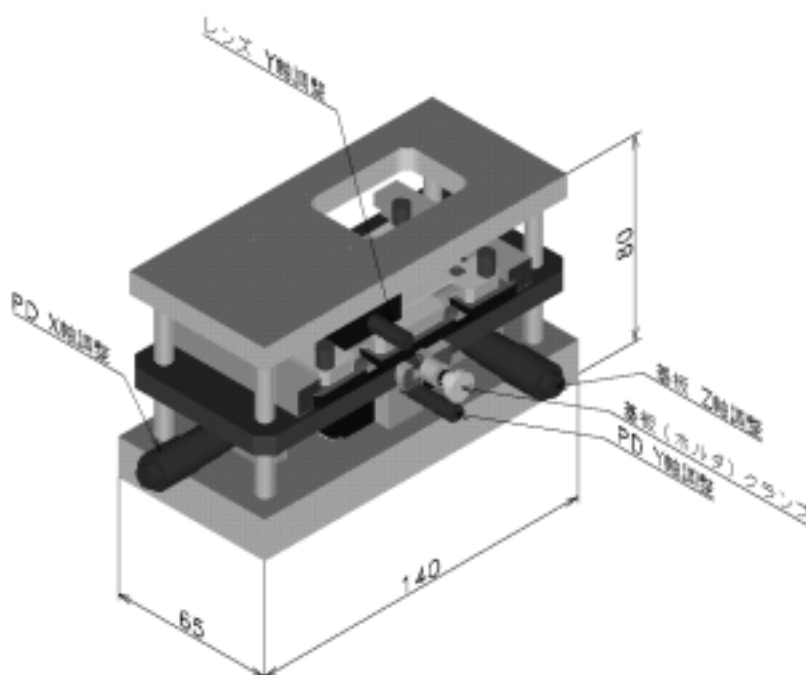


図3 - 2 - 8 測定ステージの概要図

奥行き方向を Y 軸、高さ方向を Z 軸と表記する) 方向に調整できる機構が搭載されている。

中段のステージには、チップを固定したホルダーを固定する機構、チップの高さを調整するための Z 軸調整機構が搭載されている。

上段のステージには、光源に接続されている光ファイバーの先端に固定された対物レンズを固定する機構、対物レンズの Y 軸を調整する機構が搭載されている。

対物レンズとチップとの距離は、中段の Z 軸を調整することで行う。中段の Z 軸を調整することでチップの高さが変化し、固定された対物レンズとの距離が変化する。このとき、チップと対物レンズが当たらないようにストッパーを取り付ける。

チップ上の測定位置の調整は対物レンズの Y 軸を調整することで行う。本ステージでは測定位置の X 軸方向の調整は実施しないこととした。

ホトダイオードの位置は、チップ上の測定位置の変化に伴い調整する必要がある。大まかに対物レンズの下にホトダイオードがくるように X,Y 軸を調整し、その後は実際の信号を測定しながら信号が最大となる位置に調整する。

#### (4) 送液用シリンジポンプ

チップ内に試料溶液を送液するために、送液用キャピラリーの先端にシリンジを取り付け、シリンジポンプを用いることでシリンジを一定の速度で押し、チップ内に定速で試料溶液を挿

入することとした。

シリンジポンプとして、KD Scientific 社製の Model-200 を用いることとした。

### 3 . その他 ( 温湿度データロガー )

外的温度の変化による測定の安定性を確認するため、試料測定モジュールに温湿度記録用データロガーを取り付けることとした。取り付けるデータロガーには、TASCO 製 TMS-80A を選んだ。このデータロガーは、- 15 ~ 60 度の温度及び 20 ~ 90%H の湿度を 0.1 度及び 1%H の分解能で測定できる。測定した温度及び湿度は、本体内部に保存しておけ、そこから通信ケーブルにてパソコンへ取り出すことができる。本データロガーは本体から測定プローブをはずすことができるので、プローブを伸ばすことでチップ近傍の温度及び外部条件に近いモジュール壁面付近の温湿度の 2 点を測定することとした。

## 3 - 3 試作

3 - 2 節で述べた設計に基づき、試料測定用モジュールを試作した。

### 1 . 検出モジュール

#### ( 1 ) 試料測定ステージ全体

試作した試料測定モジュールの外観写真を図 3 - 3 - 1 に示す。



図 3 - 3 - 1 試作した試料測定モジュール前面写真

## (2) 光源 (箱)

試作した試料測定モジュール内に含まれる、試作した光源 (箱) の外観写真を図 3 - 3 - 2 に示す。図 3 - 3 - 2 の箱の内部には、熱レンズ法及び蛍光法における励起光及び熱レンズ法における検出光を発生するレーザーダイオード、発振した 2 つの波長の光を合波する 2 波長合波素子、各レーザーダイオードの発振を制御するレーザーダイオードドライバー回路、励起光を変調するための信号を出すパルスジェネレーター、励起光の変調と同期させるための信号を出す参照信号発生回路、各回路へ電気を供給する電源回路が含まれている。試作したレーザーダイオードモジュール、2 波長合波素子の外観写真を図 3 - 3 - 3、図 3 - 3 - 4 にそれぞれ示す。



図 3 - 3 - 2 試作した光源 (箱) の外観写真  
(箱の大きさ 100 × 140 × 40mm : 横 × 奥行き × 高さ)



図 3 - 3 - 3 試作したレーザーダイオードモジュールの外観写真 (検出光側)



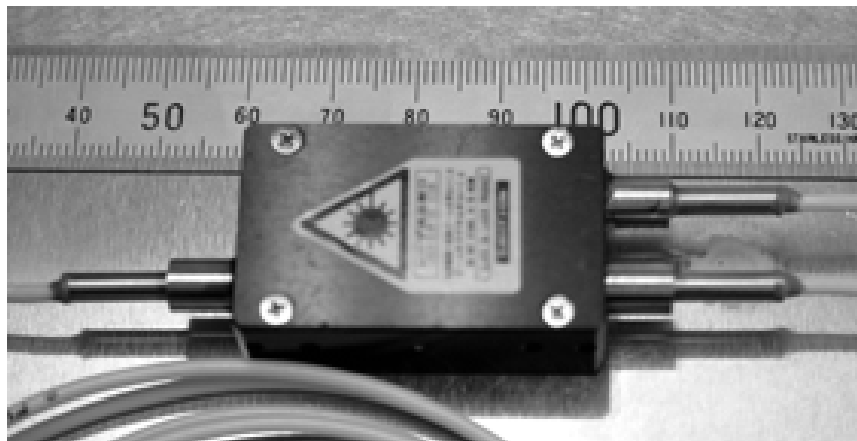


図3 - 3 - 4 試作した2波長合波素子の外観写真

試作した光源は、励起光及び検出光それぞれにスイッチをつけてあるので、独立してその発振を制御できる。各光の出力は、それぞれの波長の記載されているロータリースイッチを回すことで調整可能である。また、励起光はデューティ比（光を出射している時間と停止している時間の比）50%で変調可能である。励起光の変調は、出力0%と100%とを繰り返す矩形波で行う。測定時に励起光の変調と同期させるため、光源前面パネルの右より参照信号を出力する。参照信号はTTL信号とした。

対物レンズのついたプローブとは、装置前面左側にあるFCコネクタにて行う。FCコネクタの構造を図3 - 3 - 5に示す。

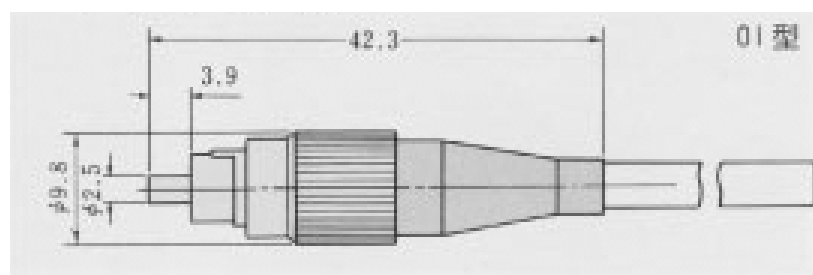


図3 - 3 - 5 FCコネクタの構造

試作した光源の特性を表 3 - 3 - 1 に示す。

表 3 - 3 - 1 試作した光源 (箱) の特性

	励起光	検出光
波長	658nm	785nm
最大出力 (LD)	35mW	35mW
出力 (FC コネクター出口)	2 ~ 6mW (CW) 1.2 ~ 3.5mW (変調)	0.4 ~ 1.5mW -
変調速度	0 (CW) ~ 1.2kHz	CW (連続)
電源	DC9V (付属アダプター使用)	
大きさ	100W × 140D × 40H	
重さ	0.5Kg	

### (3) プローブ

#### プローブ (元)

試作したプローブ先端 (対物レンズ部分) の外観写真を図 3 - 3 - 6 に示す。対物レンズとして日本板硝子製 SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズ (特注品) を用いた。SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズの大きさは、直径 1mm、長さ 2.331mm であり、SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズ両端は平研磨で反射防止膜付きとなっている。励起光 (658nm) 及び検出光 (785nm) での焦点位置の差を測定したところ、約 40 μm であった。



図 3 - 3 - 6 試作したプローブ先端 (対物レンズ部分) の外観写真

## 改良プローブ

実験結果については第4章で詳しく述べるが、前述したプローブでは SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズの端面及び光ファイバー出口端面が平面であったため、光ファイバーを伝搬してきた光がそれらの平面で反射し、戻り光として伝播してきた経路を逆向きに戻る問題が発生した。試料測定モジュールの光源として用いたレーザーダイオードは、戻り光が戻ると発振が不安定となる特性がある。そのため、戻り光が戻らない構成のプローブ形状を検討し、図3-3-7に示す構造のプローブ（以下改良プローブと記す）を試作した。

改良プローブにおいては、光ファイバー端面及び SELFOC<sup>®</sup> マイクロレンズの端面を斜めに研磨し、そこでの反射光がそのまま戻らないように改良されている。プローブの改良によって戻り光量がどれだけ減少したかを表3-3-2に示す。表3-3-2中のプローブ（元）は、

プローブ（元）に記載したプローブのことを示す。また、表3-3-2中のリターンロスとは、測定位置において戻り光によって減少する光量をもとの光量と比較した割合を dB で表したものである。よって数字が大きくなるほど戻り光量が少なくなることを表す。表3-3-2に示すように、プローブの構造を改良することによって戻り光量が格段に減少したことがわかる。

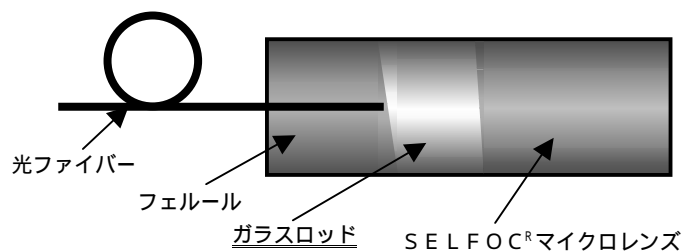


図3-3-7 改良プローブの構造概略図

表3-3-2 プローブ構成による戻り光量の差

プローブ種類	リターンロス	リターンロス（反射率）
プローブ（元： ）	18dB	3%
改良プローブ	50dB	0.001%

## 2．試料モジュール

### (1)ホルダー

#### ホルダー（元）

試作したホルダーの外観写真を図3 - 3 - 8に示す。図3 - 3 - 8のホルダーは、ガラスを挟んで保持するためにネジを締めていっても、プラスチックで作製した場合のようにチップのエッジを破損することはなかった。

試作したホルダーにキャピラリーを取り付けたテフロンネジを取り付け、シリンジポンプにて試料を送液したところ、試料がもれることなくチップ内の溝中に挿入することができた。

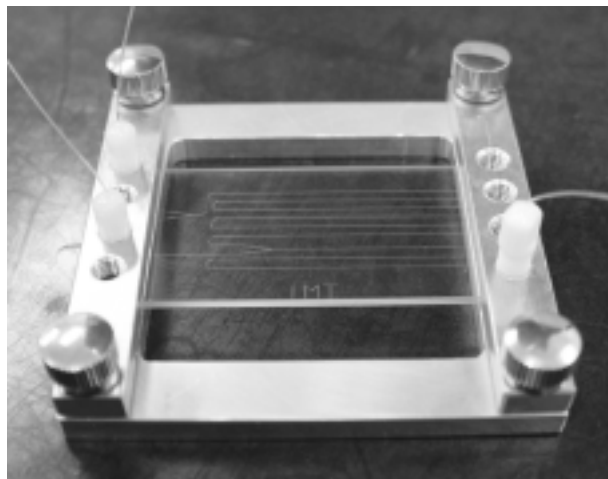


図3 - 3 - 8 試作したホルダーの外観写真

#### 改良ホルダー

前述したホルダー（元）では、チップを上板の窪みにはめ、上板をネジで締め付けることによってチップを固定している。上板に設置した窪みはチップの取り外し及びチップ間の外形公差を考慮して0.5mm程度はチップ設計寸法より大きくしてあるので、チップを取り外すごとにホルダー内でチップの位置が変化する。そのため、後述するステージにチップを設置して測定する毎に測定位置が変化し、測定値が安定しない問題が発生した。そこで、チップの固定位置がホルダー内で変化しない改良ホルダーを試作することとした。ホルダー内でチップを固定する方法として、ホルダーに3点の支持ピンを取り付け、逆側にばねを設置し、ばねの力でチップを支持ピンに常に押し付けることでホルダー内のチップの位置を固定することを試みた。試作した改良ホルダーを図3 - 3 - 9に示す。

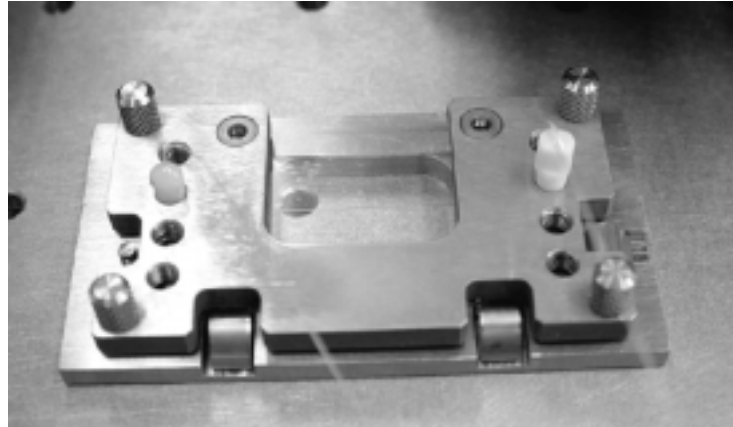


図3 - 3 - 9 試作した改良ホルダーの外観写真

## (2) ステージ

試作したステージの外観写真を図3 - 3 - 10に示す。図3 - 3 - 10には改良ホルダーを取り付けるよう改良した後のステージを示した。

ステージ上、中、下段はそれぞれ4本の支柱で固定されており、中段のみがボールベアリングによって上下に移動できる機構となっている。4本の支柱に沿って上下するので、中段を上段、下段と平行に移動させることができる。

ステージ上段の下面には、プローブ先端の対物レンズ部分を固定し、位置を調整するための治具が設置されている。上段下面に見えるマイクロメーターを動かすことで、図3 - 3 - 10の奥方向(Y軸方向)へ対物レンズ位置を調整することができる。調整量は $\pm 3\text{nm}$ である。

ステージ中段には、チップを保持した改良ホルダーを取り付けるための治具が取り付けられている。取り付け治具はレールで取り出せるようになっており、取り出した状態でホルダーをはめ、測定位置に押し込んで固定する。治具にセットされたホルダーはばねの力で奥側へ押されており、それによって設置毎の位置を同じとしている。測定時には、治具自体は手前に見えるネジによって奥側へ押されて固定される。ホルダーは水平方向にスライドさせて出し入れできるため、チップと対物レンズの距離を変化させることなくチップを取り外すことができるので、測定毎の測定条件を変化させずに試料及びチップの交換することができる。

下段の右側に見えるマイクロメーターにて中段は上下に移動でき、それによって上段に取り付けられている対物レンズとの距離を調整する。調整量は $\pm 3\text{mm}$ である。

ステージ下段に見える2つのマイクロメーター(手前左と左側面のもの)は、ホットダイオード、バンドパスフィルター及びピンホールを内蔵したケースをX,Y方向に調整するためのものである。調整量はどちらとも $\pm 6.5\text{m}$ である。

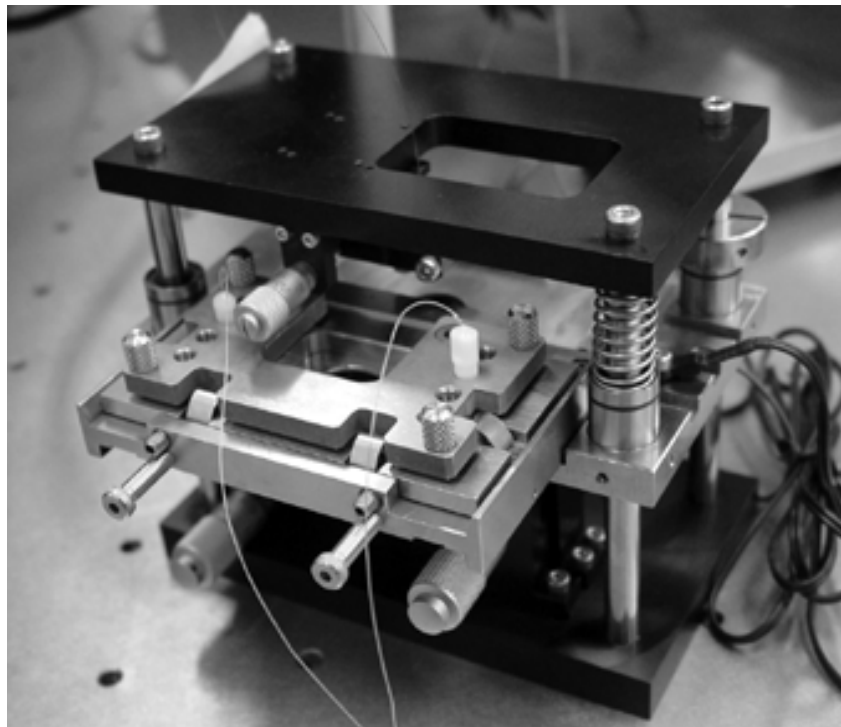
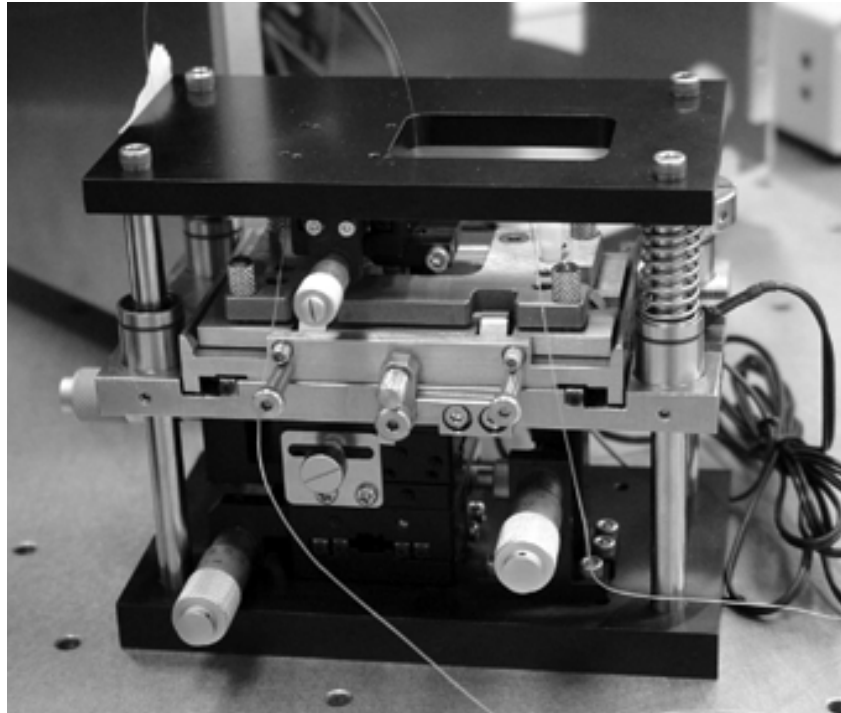


図3 - 3 - 10 試作したステージの外観写真（改良ステージ版）  
上図：ホルダーをセットした状態（測定状態） 下図：ホルダー取り出し状態

## 第4章 試料測定モジュールの実証実験

### 4 - 1 はじめに

本章では第3章で作製した試料測定モジュールの性能試験（熱レンズ測定、蛍光測定）をモデル試料を用いて行った。その結果と従来装置による結果と比較することで試作した試料測定モジュールの性能を評価した。さらに、マイクロチップ内で酵素免疫検定法（ELISA）によるタンパク質（インターフェロン- $\gamma$ ）の定量を行った。これについても従来装置による結果と比較した。これらの結果から、問題点を抽出し、今後の改良指針を得た。

### 4 - 2 試料測定モジュールの特性評価

#### 1. モデル試料

##### (1) 熱レンズ測定

本スタディで作製した試料測定モジュールの励起光及びプローブ光の波長はそれぞれ 658nm と 785nm なので、熱レンズ測定のモデル試料としては 658nm に吸収を持ち、かつ 785nm に吸収がなく、蛍光を発しないものである必要がある。これらの条件を満たすものとしてニッケル錯体（Nickel(II) phthalocyanine tetrasulfonic acid, tetrasodium salt）を選定した<sup>1)</sup>。このニッケル錯体は、波長 658nm で大きなモル吸光係数（約 50000）を持つ

##### (2) 蛍光測定

本スタディで作製した試料測定モジュールの励起光の波長は 658nm であるので、蛍光測定のモデル試料としては、660nm 付近に吸収を持ち、かつ蛍光量子収率が高い蛍光色素分子が望ましい。このような性質を満足させるものを色素レーザー用のレーザー色素の中からオキサジン 725（3-Diethylamino-7-diethyliminophenoxazonium Perchlorate）を選定した<sup>2)</sup>。

#### 2. 試料モジュール

第3章で試作した試料モジュールに設置する2つのマイクロチップホルダー（図3 - 3 - 8と図3 - 3 - 9）を用いて、マイクロチップを出し入れすることによる測定点の位置ずれ（マイクロチップを出し入れすることによる測定位置のずれ）を、熱レンズ信号強度のばらつきから評価した。試料セルであるマイクロチャンネルの断面は半円状をしているため、測定位置が大きくなると熱レンズ信号の強度が変化する。試料にはニッケル錯体水溶液（ $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ）を用いた。ロックインアンプの時定数は4秒で、変調周波数は1kHzとした。図4 - 2 - 1に図3 - 3 - 8のホルダーを用いた場合、図4 - 2 - 2に図3 - 3 - 9のホルダーを用いた場合の

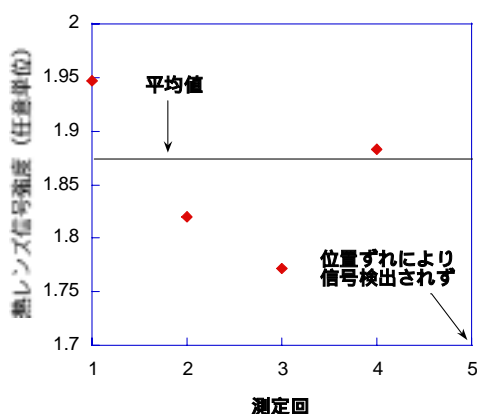


図4 - 2 - 1 マイクロチップの出し入れによる熱レンズ信号のばらつき

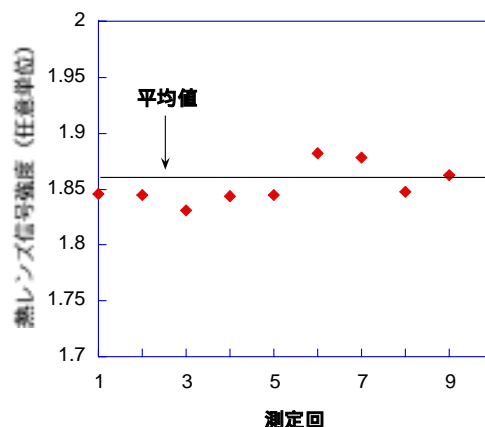


図4 - 2 - 2 マイクロチップの出し入れによる熱レンズ信号のばらつき

結果を示す。各回の測定値は 100 秒間の平均値をプロットした。図4 - 2 - 1と図4 - 2 - 2の比較から、明らかに図3 - 3 - 9のホルダーを用いた場合がマイクロチップの出し入れによる測定位置のずれが少ないことがわかる。いったん測定位置を最適化すれば、マイクロチップの出し入れを繰り返しても3点の支持ピンによって、測定位置は熱レンズ測定に影響を及ぼすほどにはずれないということがわかった。一方、図3 - 3 - 8のホルダーでは、測定位置を最適化してもマイクロチップを出し入れすることによって信号が全く出ない、つまり、流路内を光が透過せずに流路のない部分を光が透過するくらい測定位置がずれることがわかった。

### 3. 熱レンズ信号の変調周波数依存性

第2章で述べたように熱レンズ測定における S/N 比の変調周波数依存性は、装置固有の電気特性や実験環境に大きく影響を受けるので、試作した試料測定モジュールの最適な変調周波数を求めるために S/N 比の変調周波数依存性の測定を行った。試料は  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  のニッケル錯体水溶液を用いた。図4 - 2 - 3に熱レンズ信号強度及び S/N 比の変調周波数依存性を示す。図から熱レンズ信号強度は周波数の増加とともに信号強度が減少していることがわかる。熱レンズ測定では、原理的に信号強度は周波数とともに減少するので、この結果は作製した試料測定モジュールが正常に作動（熱レンズ測定できている）していることを意味している。

一方、S/N 比は試作した試料測定モジュールの電気特性（ノイズ特性）や実験環境に依存するため、変調周波数には依存しない。図4 - 2 - 3の結果から、S/N 比は変調周波数には依存せず、1kHz 近傍が S/N 比が高いことがわかった。以後の実験は全て 1kHz の変調周波数で行うことにした。



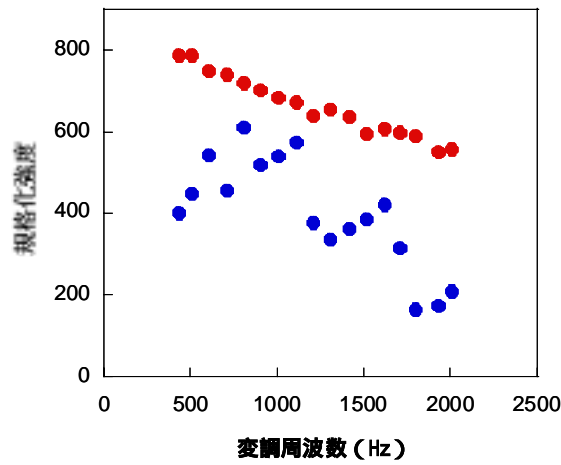


図4 - 2 - 3 熱レンズ信号及びS/N比の変調周波数依存性

#### 4. 熱レンズ信号のプロープ光強度依存性

熱レンズ信号強度は励起光強度に比例し、プロープ光強度にも依存する。熱レンズ信号強度のプロープ光強度依存性は、光学配置によって異なるので、本スタディで作製した試料測定モジュールの最適プロープ光強度を検討した。図4 - 2 - 4に熱レンズ信号強度及びS/N比のプロープ光強度依存性を示す。図からわかるようにプロープ光強度が低いほどS/N比が高い。したがって、以後の実験はS/N比の最も高い63 $\mu$ Wで行うことにした。

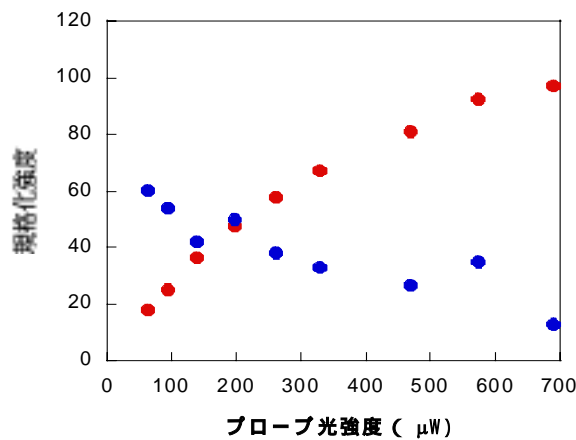


図4 - 2 - 4 熱レンズ信号及びS/N比のプロープ光強度依存性

### 4 - 3 試料測定モジュールの実証試験

#### 1. 熱レンズ測定（検量線）

ニッケル錯体水溶液を用いて検量線を作成し、その検量線から定量限界(2σ)と検出限界(S/N=2)を求めた。表4-3-1に検量線から求めた定量限界と検出限界をまとめた。定量限界及び検出限界の値が濃度だと、波長の異なる装置で測定された既に報告されている結果と比較することができないので、励起光波長 658nm におけるニッケル錯体のモル吸光係数と光路長（マイクロチャネルの深さ）を用いてそれらの値を吸光度に変換した値もあわせて示す。第3章で述べたように反射光を抑えるように改良したプローブを用いた場合の定量限界と検出限界を表4-3-2にまとめた。表4-3-1と表4-3-2を比較すると明らかに改良プローブを用いた後者の結果がよいことがわかる。

表4-3-1 定量限界と検出限界

定量限界 (mol/L)	$1.07 \times 10^{-7}$
定量限界 (Abs)	$5.04 \times 10^{-5}$
検出限界 (mol/L)	$7.70 \times 10^{-9}$
検出限界 (Abs)	$3.85 \times 10^{-6}$

表4-3-2

改良プローブによる定量限界と検出限界

定量限界 (mol/L)	$6.53 \times 10^{-8}$
定量限界 (Abs)	$3.27 \times 10^{-5}$
検出限界 (mol/L)	$6.31 \times 10^{-9}$
検出限界 (Abs)	$3.16 \times 10^{-6}$

表4-3-3に市販の大型熱レンズ顕微鏡とデスクトップ型熱レンズ顕微鏡による定量限界と検出限界を示す<sup>4)</sup>。この結果は、励起波長 532nm で、試料としてサンセットイエロー水溶液を用いた結果である。励起光のパワーはそれぞれ大型熱レンズ顕微鏡とデスクトップ型熱レンズ顕微鏡で 9mW と 12mW である。

表4-3-3 大型熱レンズ顕微鏡とデスクトップ型熱レンズ顕微鏡の定量及び検出限界

	大型熱レンズ顕微鏡	デスクトップ型熱レンズ顕微鏡
定量限界 (mol/L)	$2.41 \times 10^{-8}$	$1.10 \times 10^{-8}$
定量限界 (Abs)	$1.12 \times 10^{-6}$	$5.12 \times 10^{-7}$
検出限界 (mol/L)	$1.87 \times 10^{-8}$	$8.27 \times 10^{-9}$
検出限界 (Abs)	$8.29 \times 10^{-7}$	$3.85 \times 10^{-7}$

今回試作した試料測定モジュールの結果と市販の大型熱レンズ顕微鏡及びデスクトップ型熱レンズ顕微鏡の結果を比較すると、今回の結果は定量限界と検出限界とともに約 1 桁高い。これの原因としては、以下のことが考えられる。

1. 熱レンズ信号は励起光強度に比例する。試作した試料測定モジュールの励起光のパワーは 3mW なので、大型熱レンズ顕微鏡の 1/3、デスクトップ型熱レンズ顕微鏡の 1/4 である。
2. 熱レンズ信号は励起光の焦点のビーム径が小さいほど信号強度が強い（原理的に励起光を絞れば絞るほど信号強度が高くなる）。試作した試料測定モジュールのプロープ（SELFOC マイクロレンズ）の NA（開口数）は 0.2 で、大型熱レンズ顕微鏡及びデスクトップ型熱レンズ顕微鏡の測定に用いられている対物レンズの NA は 0.46 である

したがって、これらを考慮すると今回試作した試料測定モジュールの定量限界及び検出限界は妥当な値だと考えられる。この結果は、超高感度検出器といわれている市販の熱レンズ顕微鏡の性能に、励起光強度と開口数を考慮すればほぼ同じ性能を有しているということを意味している。

## 2. 蛍光測定（検量線）

試料測定モジュールの検出光学系（レンズ及びフィルター）を熱レンズ測定用から蛍光測定用に交換して蛍光測定を行った。オキサジン水溶液を用いて検量線を作成し、その検量線から定量限界（ $2\sigma$ ）と検出限界（ $S/N=2$ ）を求めた。測定は、励起光と同軸（ $0^\circ$ ）にホトダイオードを設置した場合と励起光と垂直（ $90^\circ$ ）にホトダイオードを設置した場合の 2 つの光学配置で行った。表 4 - 3 - 4 にそれぞれの検量線から求めた定量限界（ $2\sigma$ ）と検出限界（ $S/N=2$ ）をまとめた。

蛍光測定の場合は励起波長と発光波長が近いので、検出感度を上げるには励起光と蛍光を効率よくフィルタリングする必要がある。光学フィルターによる励起光と蛍光の分離には限界があるため、一般には散乱光（励起光）を減らすために励起光と同軸には検出器を設置しない。

表 4 - 3 - 4 定量限界と検出限界

	$0^\circ$	$90^\circ$
定量限界 (mol/L)	$2.3 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{-7}$
検出限界 (mol/L)	$8.7 \times 10^{-7}$	$3.6 \times 10^{-7}$

表4 - 3 - 4の結果も90°の場合が0°の場合に比べて定量及び検出限界が低い。第2章で行った結果(表2 - 4 - 2)と比較すると、試料測定モジュールで得られた結果の方が定量及び検出限界が低い、これは測定した試料が異なることが原因だと考えられる。第2章で測定したローダミン6Gは励起波長514.5nmにおけるモル吸光係数は65058<sup>3)</sup>で、蛍光量子収率が0.95である。それに対して、ここで測定したオキサジン725は励起波長658nmにおけるモル吸光係数は61487<sup>3)</sup>で、蛍光量子収率が0.11<sup>6)</sup>である。また、ここで用いたバンドパスフィルターは第2章で用いたバンドパスフィルターに比べるとフィルタリングの効率が悪い。したがって、これらを考慮すると表4 - 3 - 4の結果は妥当な値だと考えられる。

これまでも、マイクロチップを用いた蛍光測定にファイバー光学系を利用した測定システムがいくつか報告されている<sup>7-9)</sup>。ここで得られた結果はそれらと比較すると若干検出感度が低い、検出光学系の配置及びフィルター等の改良で感度向上は実現できると考えられる。

### 3. たんぱく質の定量

本スタディで試作した試料測定モジュールをたんぱく質の定量に応用した。具体的には、ELISA法(酵素免疫検定法)によるインターフェロン- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )の定量を行った。インターフェロン- $\gamma$ の定量にELISA法を用いたので、検出は熱レンズ法によって行った。図4 - 3 - 1に実験手順を示す。抗原抗体反応は25 $\mu$ m径のポリスチレンビーズ上で行うため、ここで用いたマイクロチップはマイクロチャネルの流路途中にビーズを堰き止めるためのダム構造が作製されている。

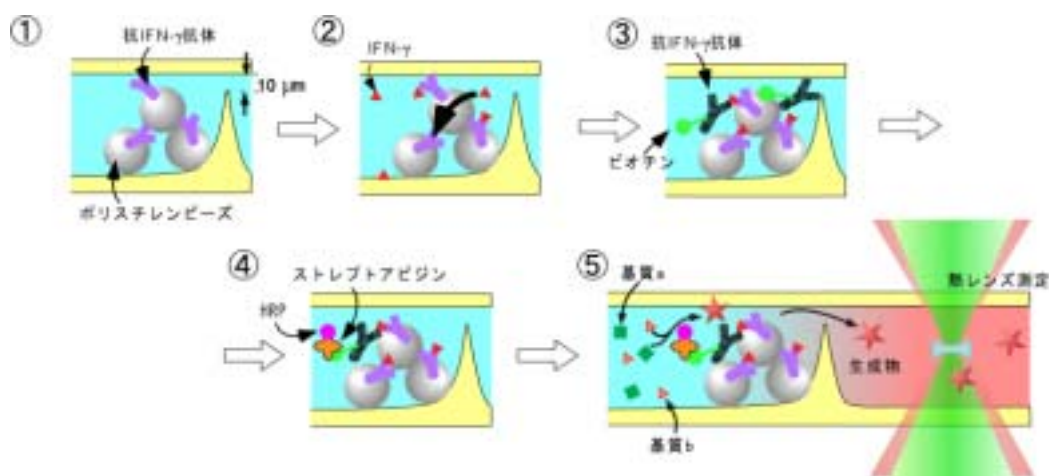


図4 - 3 - 1 実験手順

まず、あらかじめ調製しておいた IFN- $\gamma$ 抗体付きビーズをマイクロチャネルの堰き止め部分に詰める。次に、IFN- $\gamma$ 抗原を流しビーズに吸着している抗体と抗原/抗体反応させる。反応させる時間は流速 1 $\mu$ l/min でマイクシリンジポンプを用いて 5 分間流し、その後ポンプを止め 10 分間放置しさらに 1 $\mu$ l/min で 5 分間反応させたあとリン酸バッファーで洗い流す。これと同じようにしてビオチン付 IFN- $\gamma$ 抗体を流し反応させ、洗浄、ストレプトアビジン付 HRP を流し反応させる。次いで、 $1 \times 10^{-3}$ M の基質 a (過酸化水素) 溶液の入ったシリンジ、もう一方に  $1 \times 10^{-3}$  M の基質 b (TMBZ) と  $1 \times 10^{-4}$  M の過酸化水素水の入ったシリンジとを接続し、抗原/抗体反応を利用して酵素を標識として吸着させたビーズ部分に、同時に流し、ビーズ上の酵素により反応させる。マイクロチャネルの堰き止め部分から下流 5mm の地点で、酵素反応で生成した反応生成物を試料測定モジュール (熱レンズ検出) 用いて測定した。反応生成物は 658nm に強い吸収を持つ。

図 4 - 3 - 2 に反応性生物 IFN- $\gamma$ の定量を行った結果を示す。0.01 ~ 0.1ng/ml の範囲で IFN- $\gamma$ の定量を行うことができた。図 4 - 3 - 3 に市販の大型熱レンズ顕微鏡を用いて IFN- $\gamma$ の定量を行った結果を示す<sup>10)</sup>。0.03 ~ 100ng/ml の範囲で定量できていることがわかる。両者を比較しやすいように濃度範囲を 0.1 ~ 1ng/ml にして、両方プロットした図 4 - 3 - 4 に示す。この結果は気質に TMBZ ではなく、4-AA と TOOS を用いた結果なので一概に比較することはできないが、本スタディで試作した試料測定モジュールにおける定量下限 0.01ng/ml は、大型熱レンズ顕微鏡による定量下限である 0.03ng/ml より 1 桁以上高く、本試作機によって IFN- $\gamma$ が感度よく定量できることがわかった。

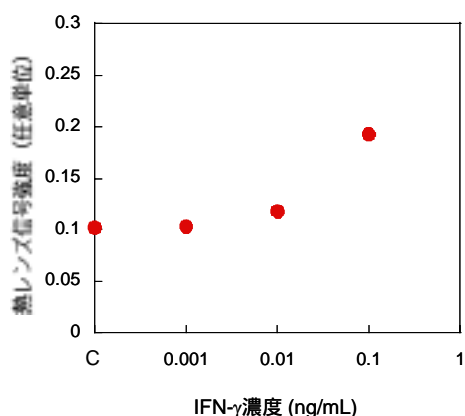


図 4 - 3 - 2 IFN- $\gamma$ の検量線

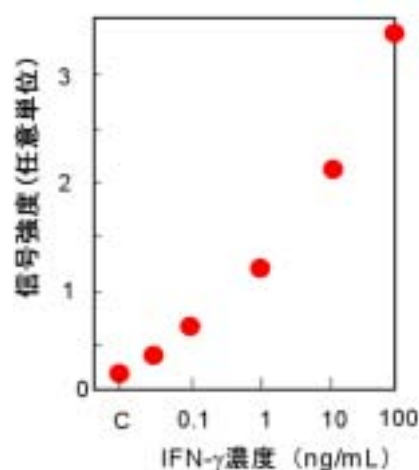


図 4 - 3 - 3 大型熱レンズ顕微鏡による IFN- $\gamma$ の検量線

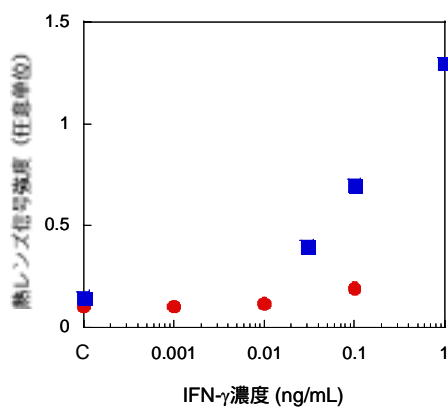


図4 - 3 - 4 IFN- $\gamma$ の検量線

#### 4 - 4 まとめ

試作した試料測定モジュールの性能を熱レンズ測定及び蛍光測定を行うことで評価した。熱レンズ測定に関しては、市販の大型熱レンズ顕微鏡やデスクトップ型熱レンズ顕微鏡と同等の性能を持っていることが確認できた。蛍光測定に関しては、報告されている光ファイバーを用いたタイプの蛍光システムの性能に若干およばなかったものの、光学系の配置やフィルターの改良で性能の向上は可能だと考えられる。さらに、実証試験としてタンパク質（インターフェロン- $\gamma$ ）の定量を行ったところ、0.01ng/mlの定量限界を得た。この値は、実用にも十分対応することができる。

本試料測定モジュールの特徴は検出光学系（レンズとフィルター）を取り替えることで、同一の入射光学系で熱レンズ測定及び蛍光測定ができることであるが、検出光学系を取り替える際に光学配置の最適化が必要であった。このように試料モジュールを複数の検出法に対応させる場合、検出光学系を取り替えるのではなく、それぞれ検出法に対応させて、あらかじめ複数の検出光学系を試料モジュールに設置しておけば、取り替えの際の光学配置の最適化は必要ない。マイクロチップをいったん試料モジュールに設置すれば、複数の測定が行えるようなシステムを構築することができると考えられる。例えば、熱レンズ測定と蛍光測定の組み合わせの場合は、図4 - 4 - 1に示したような光学配置に検出光学系を設置することで両方の測定を行うことができる。

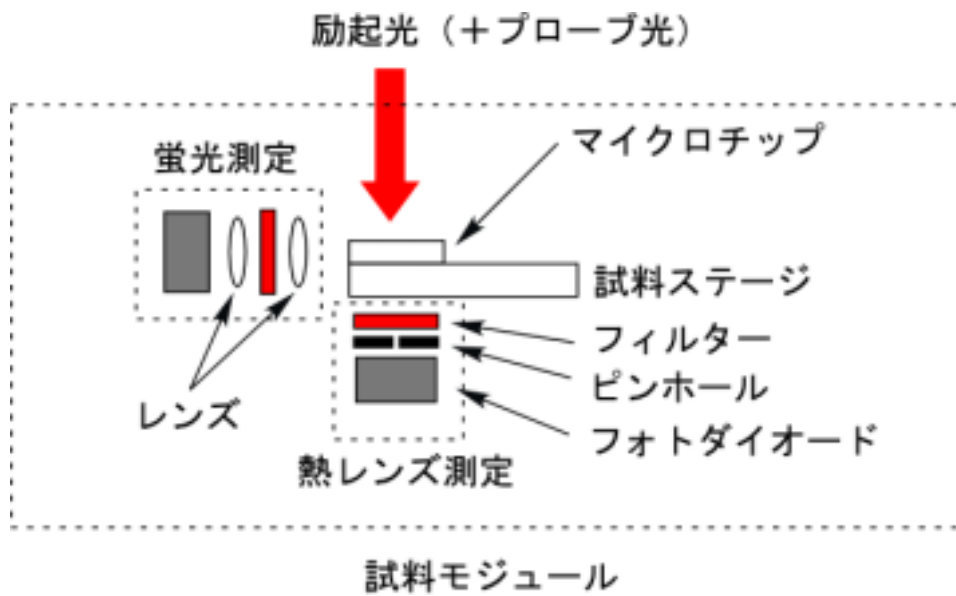


図4 - 4 - 1 熱レンズ及び蛍光測定に対する試料モジュールの光学配置

## 第5章 総括と提言

### 5 - 1 総括

このフィージビリティスタディ（以下スタディという）では微小サンプル試料に特化した、新規超高感度検出器を試作し、その科学機器と産業機器への適用可能性、及び当該技術がもたらす効果について検討した。あわせて、世界的視野における技術情報調査に基づき、当該技術の国際的位置付に関しても検討した。

まず、試作した超高感度検出器については極めて良好な結果を得た。この試作機はレーザー蛍光検出器と熱レンズ検出器を一体化したもので、超小型化の要点として超小型ガラスロッドレンズを心臓部の光学素子に適用したものである。この技術は光 IT 技術を応用したもので、通常であれば蛍光分光器と熱レンズ分光器の機能を兼ね備えた大型の光学顕微鏡に匹敵する規模の光学システムを、わずか数ミリメートルのマイクロガラスロッドに集積化することができた。近年急速に展開しているバイオ関連の技術だけでなく、健康や医療、環境など至る所で要求されている微小サンプル量の高度分析システムに対応するため、超小型であることと多機能であることを同時に満たすことができている。

ちなみに、この場合の超小型化と多機能性とは、いつでもどこでも高度な分析技術を安心して使えることと、さまざまな特性の試料に対応することができることを意味している。特に、光で物質を分析する場合には、互いに相補的な関係にある蛍光と吸光分光法を両方ともカバーできれば、おおよそ光分析についてはほぼその全てをカバーできることになる。しかしながら、吸光分光法は小型化すると感度が劇的に悪くなる。これを根本原理から解決した熱レンズ分光法を代替法として採用し、しかも、マイクロガラスロッドレンズと半導体レーザーを用いることで、レーザー蛍光と熱レンズ分光装置を一体化して同時にマイクロ化した技術は世界的にも前例を見ない。

ノーベル化学賞のMALDI TOF 質量分析装置のように高度な分析計測技術は科学や産業にあっては基盤技術として、また、社会にとっては高度医療診断分析の普及など安心した生活を築くために必須の技術である。この場合、分析技術はただ単に超検出技術だけでは成立せず、極めてわずかな目的物質を分離する手段が必須である。その技術はゲノム解析の主役を演じたキャピラリー電気泳動や近年急速に開発が進むマイクロ化学チップに期待が集まっている。したがって、このスタディで試作した検出器は、これらのマイクロ化学技術との組み合わせで、極めて強力な分析手段となることが期待できる。



## 5 - 2 提言

分析計測技術は科学技術や産業、一般市民生活のどこにでも必要な基盤技術である。特に、DNA やタンパク質、医薬品や高機能化合物などの高性能で高度な分析技術は、これから期待されている産業分野などに極めて重要な共通基盤技術である。したがって、こうした共通性の高い技術は、産業技術の核としてとらえ、分析計測のハードウェアだけでなく、標準化や規格化などのソフトウェアも含め、国家的な共通基盤技術資産として確固たる技術と制度を整備していく必要がある。特許は企業を、規格は国益を守る。こうした認識は欧米技術先進国には強く、米国のNISTに代表される強力な国家機関が存在するが、そうした国家機関にあっては制度や行政だけでなく、それらの裏付けとなる先端的な技術開発にも注力している。こうした状況に倣うまでもなく、科学技術開発と開発技術の国際競争力強化のために分析計測技術の政策的な支援が強く望まれる。

今回の試作のように、共通性が高く、また、波及効果の期待できる技術については早期の実用化と、汎用性が期待できる応用には部品としての互換性と信頼性確保のために、標準化と規格戦略を同時に策定しながら進めることが望ましい。そこには国の関与のもとに企業、大学、産総研などの良好な連携が効率よくスピーディーな実用化への道を開くものと確信する。

このスタディの結果をもとに、マイクロ、モバイル、高度分析技術、標準、規格という項目を含む国家的規模の研究を上記の観点で立ち上げ、新しい産業と市場を創成するとともに、国際的にも一歩先んじているこの分野での競争力を決定的に確保することを提言する。

## 【 参 考 文 献 】

## 第 1 章

- 1) J.R.Webster, M.A.Burms, D.T.Burke and C.H.Mastrangelo, Monolithic Capillary Electrophoresis Device with Integrated Fluorescence Detector, *Analytical Chemistry*, Vol. 73, No. 7, April 1, 2001
- 2) Zhenhua Liang, Nghia Chiem, Gregor Ocvirk, Thompson Tang, Karl Fluri, and D. Jed Harrison, Microfabrication of a Planar Absorbance and Fluorescence Cell for Integrated Capillary Electrophoresis Devices, *Analytical Chemistry*, Vol. 68, No. 6, March 15, 1996
- 3) Jorg Hubner, Klaus B. Mogensen, Anders M. Jorgensen, Peter Friis, Pieter Telleman, and Jorg P. Kutter, Integrated optical measurement system for fluorescence spectroscopy in microfluidic channels, *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS* Vol.72, No.1 Jan.2001
- 4) Michael L. Chabynec, Daniel T. Chiu, J. Cooper McDonald, Abraham D. Stroock, James F. Christian, Arieh M. Karger, and George M. Whitesides, An Integrated Fluorescence Detection System in Poly(dimethylsiloxane) for Microfluidic Applications, *Analytical Chemistry*, Vol. 73, No.18, September 15, 2001

## 第 2 章

- 1) D.R.Reyes, D.Iossifidis, P.-A.Auroux, A. Manz, Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology, *Anal.Chem.*, **74**, 2623 (2002).
- 2) P.-A.Auroux, D.Iossifidis, D.R.Reyes, A. Manz, Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications, *Anal.Chem.*, **74**, 2637 (2002).
- 3) Z.Liang, N.Chiem, G.Ocvirk, T.Tang, K.Fluri, D.J.Harrison, Microfabrication of a Planar Absorbance and Fluorescence Cell for Integrated Capillary Electrophoresis Devices, *Anal.Chem.*, **68**, 1040 (1996).
- 4) H.Salimi-Moosavi, Y.Jiang, L.Lester, G.Mckinnon, D.J.Harrison, A Multireflection Cell for Enhanced Absorbance Detection in Microchip-Based Capillary Electrophoresis Devices, *Electrophoresis*, **21**, 1291 (2000).
- 5) A.J.de Mello, Seeing Single Molecules, *Lab Chip*, **3**, 29N (2003).
- 6) 火原彰秀, 渡慶次学, 北森武彦, 熱レンズ顕微鏡, *光技術コンタクト*, **39**, 212 (2001).
- 7) 澤田嗣郎(編), “光熱変換分光法とその応用”, 学会出版センター (1997).
- 8) K.Uchiyama, A.Hibara, H.Kimura, T.Sawada, T.Kitamori, Thermal Lens Microscope, *Jpn.J Appl.Phys.*, **39**, 5316 (2000).
- 9) S.E.Bialkowski, “Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis”, John-Wiley & Sons (1996).

- 10) M.Tokeshi, M.Uchida, A.Hibara, T.Sawada, T.Kitamori, Determination of Subyoctomole Amounts of Nonfluorescent Molecules Using a Thermal Lens Microscope: Subsingle-Molecule Determination, *Anal.Chem.*, **73**, 2112 (2001).
- 11) K.Sato, H.Kawanishi, M.Tokeshi, T.Kitamori, T.Sawada, Sub-Zeptomole Molecule Detection in a Microfabricated Glass Channel by Thermal Lens Microscope, *Anal.Sci.*, **15**, 525 (1999).
- 12) J.Zheng, T.Odake, T.Kitamori, T.Sawada, Fast Slab Gel Electrophoretic Separation of DNA Fragments with a Short Migration Distance Using Thermal Lens Microscope, *Anal.Sci.*, **15**, 223 (1999).
- 13) M.Harada, M.Shibata, T.Kitamori, T.Sawada, Sub-Attomole Molecule Detection in a Single Biological Cell *in-vitro* by Thermal Lens Microscopy, *Anal.Sci.*, **15**, 647 (1999).
- 14) K.Mawatari, T.Kitamori, T.Sawada, Individual Detection of Single-Nanometer-Sized Particles in Liquid by Photothermal Microscope, *Anal.Chem.*, **70**, 5037 (1998).
- 15) R.D.Snook, R.D.Lowe, Thermal Lens Spectrometry - A Review, *Analyst*, **120**, 2051 (1995).
- 16) “北森「インテグレートド・ケミストリー」プロジェクト研究概要集”, 財団法人神奈川科学技術アカデミー (2003).
- 17) K.Swinney, D.J.Bornhop, Detection in Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis*, **21**, 1239 (2000).
- 18) G.J.M.Bruin, Recent Developments in Electrokinetically Driven Analysis on Microfabricated Devices, *Electrophoresis*, **21**, 3931 (2000).
- 19) M.A.Schwarz, P.C.Hauser, Recent Developments in Detection Methods for Microfabricated Analytical Devices, *Lab Chip*, **1**, 1 (2001).
- 20) K.Swinney, D.Markow, D.J.Bornhop, Chip-Scale Universal Detection Based on Backscatter Interferometry, *Anal.Chem.*, **72**, 2690 (2000).
- 21) D.Pan, R.A.Mathies, Chromophore Structure in Lumirhodopsin and Metarhodopsin I by Time-Resolved Resonance Raman Microchip Spectroscopy, *Biochemistry*, **40**, 7929 (2001).
- 22) Y.Xu, F.G.Bessoth, J.C.T.Eijkel, A.Manz, On-Line Monitoring of Chromium(III) Using a Fast Micromachined Mixer/Reactor and Chemiluminescence Detection, *Analyst*, **125**, 677 (2000).
- 23) A.T.Woolley, K.Lao, A.N.Glazer, R.A.Mathies, Capillary Electrophoresis Chips with Integrated Electrochemical Detection, *Anal.Chem.*, **70**, 684 (1998).
- 24) Q.Xue, F.Foret, Y.M.Dunayevsky, P.M.Zavracky, N.E.McGruer, B.L.Karger, Multichannel Microchip Electrospray Mass Spectrometry, *Anal.Chem.*, **69**, 426 (1997).
- 25) J.D.Trumbull, I.K.Glasgow, D.J.Beebe, R.L.Magin, Integrating Microfluidic Systems and NMR Spectroscopy, *IEEE Trans.Biomed.Eng.*, **47**, 3 (2000).

- 26) J.Yamaguchi, A.Hattori, M.Tokeshi, T.Kitamori, Integration of Detection System on a Chip - Thermal Lens Microscope Using Selfoc™ Micro Lens - , Proceedings of  $\mu$ TAS 2001 Symposium, 369 (2001).
- 27) J.Yamaguchi, A.Hattori, M.Tokeshi, T.Kitamori, Integration of Photo-Thermal Spectroscopy Detection System on a Chip, Proceedings of  $\mu$ TAS 2002 Symposium, 281 (2002).

#### 第 4 章

- 1) F.J.Green, The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators, Aldrich Chemical Company Library, (1990).
- 2) U.Brachmann, Lambdachrome<sup>R</sup> Laser Dyes 2nd revised Edition, Lambda Physik GmbH, 193 (1994).
- 3) H.Du, R.A.Fuh, J.Li, A.Corkan, J.S.Lindsey, PhotochemCAD: A Computer-Aided Design and Research tool in Photochemistry, *Photochemistry and Photobiology*, **68**, 141 (1998).
- 4) 比企伸一郎, 渡慶次学, 火原彰秀, 北森武彦, 分析化学, 投稿中.
- 5) R.F.Kubin, A.N.Fletcher, Fluorescence Quantum Yields of Some Rhodamine Dyes, *J. Luminescence*, **27**, 455 (1982).
- 6) R.Sens, K.H.Drexhage, Fluorescence Quantum Yield of Oxazine and Carbazine Laser Dyes, *J. Luminescence*, **24**, 709 (1981).
- 7) Z.Liang, N.Chien, G.Ocvirk, T.Tang, K.Fluri, D.J.Harrison, Microfabrication of a Planar Absorbance and Fluorescence Cell for Integrated Capillary Electrophoresis Devices, *Anal.Chem.*, **68**, 1040 (1996).
- 8) J.Hubner, K.B.Mogensen, A.M.Jorgensen, P.Friis, P.Telleman, *Review Sci.Instrum.*, **72**, 229 (2001).
- 9) M.L.Chabinyk, D.T.Chiu, J.C.McDonald, A.D.Stroock, J.F.Christian, A.M.Karger, G.M.Whitesides, An Integrated Fluorescence Detection System in Poly(dimethylsiloxane) for Microfluidic Applications, *Anal.Chem.*, **43**, 4491 (2001).
- 10) 佐藤記一, 山中真帆, 渡慶次学, 北森武彦, 投稿準備中

- 禁無断転載 -

14 - F - 13

微小サンプル量試料のための高感度計測・分析システムの  
開発に関するフェージビリティスタディ

報告書

- 要旨 -

平成 15 年 6 月

作成 財団法人 機械システム振興協会

東京都港区三田 1 丁目 4 番 28 号

TEL : 03(3454)1311

委託先 社団法人 日本分析機器工業会

東京都千代田区神田小川町 3 丁目 22 番

TEL : 03(3292)0642