

Title	二波長エバネッセント波照射細胞電位・屈折率センシングによる細胞膜イオン輸送制御
Sub Title	Ion transport control of cell membrane by developing sensing technique using evanescent wave for refractive index and electrostatic potential of cell
Author	佐藤, 洋平(Sato, Yohei) 村上, 俊之(Murakami, Toshiyuki)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	マイクロ流体デバイスを用いた培養液中の細胞膜・液体間イオン輸送制御技術の確立を目標として、エバネッセント波照射による細胞屈折率および電位の非侵襲センシング技術の開発を行った。正常細胞と培養液との屈折率差をエバネッセント波照射による細胞・液体界面から発生する散乱光強度を撮像することにより、屈折率非侵襲センシング技術の開発を行った。二色ナノLIF法を確立し、電位時空間分布カラーイメージングに成功した。
Notes	研究種目：基盤研究(B) 研究期間：2008～2010 課題番号：20360102 研究分野：工学 科研費の分科・細目：機械工学・熱工学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20360102seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20360102

研究課題名（和文）二波長エバネッセント波照射細胞電位・屈折率センシングによる細胞膜イオン輸送制御

研究課題名（英文）Ion transport control of cell membrane by developing sensing technique using evanescent wave for refractive index and electrostatic potential of cell

研究代表者

佐藤 洋平（SATO YOHEI）

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：00344127

研究成果の概要（和文）：マイクロ流体デバイスを用いた培養液中の細胞膜・液体間イオン輸送制御技術の確立を目標として、エバネッセント波照射による細胞屈折率および電位の非侵襲センシング技術の開発を行った。正常細胞と培養液との屈折率差をエバネッセント波照射による細胞・液体界面から発生する散乱光強度を撮像することにより、屈折率非侵襲センシング技術の開発を行った。二色ナノ LIF 法を確立し、電位時空間分布カラーイメージングに成功した。

研究成果の概要（英文）：A non-invasive sensing technique using evanescent wave for the refractive index and electrostatic potential of cell was developed in order to control ion transport between cell and culture solution in microfluidic device. A novel technique to detect refractive index difference was proposed utilizing light scattering by evanescent wave illumination. A color imaging of electrostatic potential distribution was achieved by developing a two-color LIF technique.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総 計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：マイクロ流体デバイス、細胞表面電位、細胞内屈折率、エバネッセント波、マイクロ PIV、マイクロ LIF

1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロ TAS 分野では、化学や生物分野で確立されてきた分析、反応、混合や分離技術をマイクロ流体デバイス内に実現する試みが数多く行われ、近年では医療現場で DNA チップ等が用いられるようになってきている。研究代表者はマイクロスケール熱流動を支配する速度、温度、pH やイ

オン濃度等のセンシング技術の開発をこれまで行い、熱流体工学の観点から現象解明を行ってきた。現在、マイクロチャネル流の標準計測ツールであるマイクロ粒子画像流速計（マイクロ PIV）は、チャネル内液体中に混入した粒子を対象とした速度計測に用いられているが、アプリケーションの観点から見ると、極めて理想的な現象に限定していることから、生物や医療分

野で必要とされている計測ツールであるとは残念ながら言い難い。しかし、計測対象としているものが粒子であろうと細胞であろうと、電位や屈折率に代表される物性値は固有のものであることから、物理的観点に立脚して現在の計測ツールを発展させることは学術的観点から重要であると研究代表者は考えている。

- (2) DNA やタンパク質を対象とした電気泳動チップは分析のみに主眼を置いているが、分析や分離機能を一つのデバイス（チップ）上で実現させるというマイクロ TAS の本来の目的を達成させるためには、個々の現象に特化したセンシング技術と制御技術の連携が必要不可欠である。本研究では細胞を対象としているが、液体中の細胞に関しても電位や屈折率等の固有の物性値が存在する。細胞の種類によって屈折率が異なるので光ピンセットによる補足力の違いから細胞の分別を行う、あるいは細胞が死滅すると電気泳動移動度が変化するという研究例からも明らかなように、細胞固有の物性値の高精度センシングが可能となれば、分離（分別）や培養が容易となる。

2. 研究の目的

- (1) マイクロチャンネル内液体（培養液）中の細胞にエバネッセント波を照射し、液体中にてイオン化する蛍光色素からの蛍光強度分布比を計測し、細胞表面電位を求める。細胞表面は固体壁ではないので、ゼータ電位は定義できないとされているが、研究代表者が開発したナノスケール・レーザ誘起蛍光法（ナノ LIF）を応用し、計測されたイオン濃度分布から細胞表面電位を求める。
- (2) エバネッセント波を照射し細胞内エバネッセント波強度比変化を検出することによる細胞屈折率センシング技術の開発を行う。マイクロチャンネルを構成するガラス内をレーザ光が全反射し、低屈折率を有する液体そして細胞内にエバネッセント波が発生するが、屈折率の違いによる細胞の種類（培養環境や死滅した細胞）の特定を行う。
- (3) 流体力学観点からマイクロチャンネル壁面への表面修飾パターンを最適化し、屈折率高速センシング技術から得られたデータを基に、マイクロチャンネル内速度を制御し、マイクロチャンネル内の細胞培養に適したイオン濃度分布の形成を行う制御技術の提案を行う。

3. 研究の方法

- (1) 電解質溶液中にて、陽イオンそして陰イオンとなる蛍光色素を二種類選定し、エバネッセント波照射法および 3CCD カメラを用いた二色ナノ LIF 法の開発を行った。物質表面電位によって、蛍光色素にはクーロン力が作用し、電位の大きさに応じて、どちらの蛍光色素が物質表面に引き寄せられるかが決まる。電位時空間分布を緑から赤の色合いによって簡単に判別することが可能となった。
- (2) 正常細胞と培養液との屈折率差をエバネッセント波照射による細胞・液体界面から発生する散乱光強度を撮像することにより、屈折率非侵襲センシング技術の開発を行った。エバネッセント波照射領域内に細胞を配置した場合、細胞・液体界面において散乱光が発生する。散乱光の強度は、両物質間の屈折率差に依存するため、散乱光強度による屈折率差計測が可能となる。
- (3) イオン輸送制御技術の確立を目指して、マイクロ流体デバイス内に配置したマイクロチャンネルのバルクおよび壁面極近傍における pH 二次元分布のセンシングを行い、マイクロチャンネル壁面極近傍に形成される電気二重層のイオン輸送への影響を実験的に解明した。蛍光強度が pH に著しく依存している Fluorescein Sodium Salt を電解質溶液に混入し、共焦点スキャナによるマイクロ LIF 法をマイクロチャンネルのバルク pH 分布センシングに、またエバネッセント波によるナノ LIF 法をマイクロチャンネル壁面極近傍の pH 分布センシングに適用した。

4. 研究成果

- (1) マイクロチャンネル壁面にオクタデシルトリクロロシラン（OTS）を用いて化学的に表面修飾を行い、二色ナノ LIF 法を用いて電位時空間分布カラーイメージングの取得に成功した（図 1 参照）。マイクロ PIV による流速計測と併用することにより、壁面ゼータ電位パターンの流体力学的観点から最適化を行った（図 2 参照）。更に電界強度および電界印加方向を制御し、表面修飾を施したマイクロチャンネル内電気浸透流速をパルスジェネレーターにより制御可能な技術の開発を行い、マイクロ PIV およびナノ LIF を併用してマイクロチャンネル内の対流と拡散によるイオン濃度分布変化を定量的に把握することが可能となった。

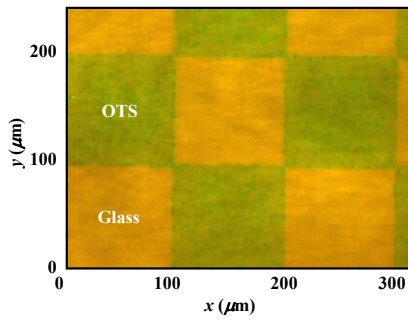


図1 電位時空間分布カラーイメージングの一例。

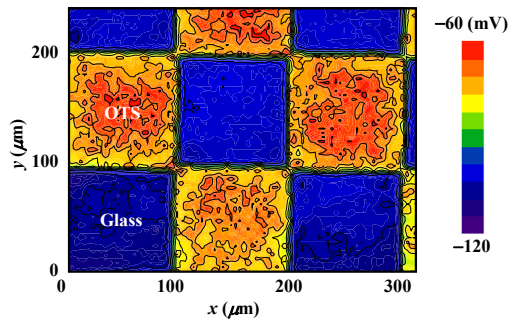


図2 壁面ゼータ電位パターンの一例。

- (2) エバネッセント波照射領域内に細胞を配置した場合、細胞・溶液界面において散乱光が発生する。散乱光の強度は、両物質間の屈折率差に依存するため、散乱光強度による屈折率差計測の可能性が考えられる。本研究では、屈折率差計測手法の確立に向け、屈折率差を有する二物質界面を作製し、散乱光強度の計測を行った。対象とする場合は石英ガラス及びPDMS製マイクロ流路内におけるPDMS・溶液界面であり、流路底面からエバネッセント波を照射して散乱光を発生させた。流路内に満たす実験溶液の屈折率を調整することにより、PDMS（屈折率1.410）との所望の屈折率差を実現し、PDMS・溶液間の屈折率差と散乱光強度との定量的関係を把握した。PDMS・溶液間の屈折率差増大に伴い、界面における散乱光強度が二次関数的に増加することが確認された（図3参照）。散乱光強度に影響する因子として、流路壁面の性状、エバネッセント波の強度分布などが挙げられる。0.04以上の屈折率差を有する細胞・水界面の屈折率差計測による細胞状態判別の可能性が示された。

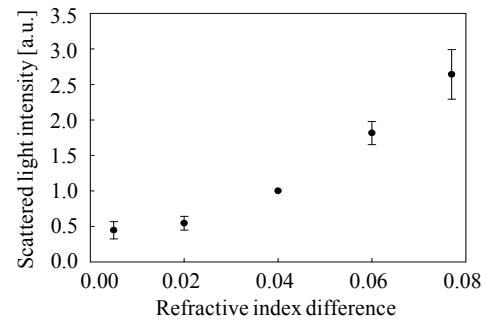


図3 屈折率差と散乱光強度との関係。

- (3) 蛍光強度がpHに著しく依存しているFluorescein Sodium Saltを電解質溶液に混入し、共焦点スキャナによるマイクロLIF法をマイクロチャンネルのバルクpH分布センシングに、またエバネッセント波によるナノLIF法をマイクロチャンネル壁面極近傍のpH分布センシングに適用した。その結果、壁面極近傍のpHの値はバルクよりも低い値を示していることが明らかとなった。これは、電気二重層形成時により、プロトンが過度に集中すること起因している（図4参照）。バルクにおけるイオン輸送は対流に支配されているが、壁面極近傍では液体速度が小さくなり対流の影響は減少するが、電気二重層によって陽イオンの挙動が制約されることが明らかとなった。

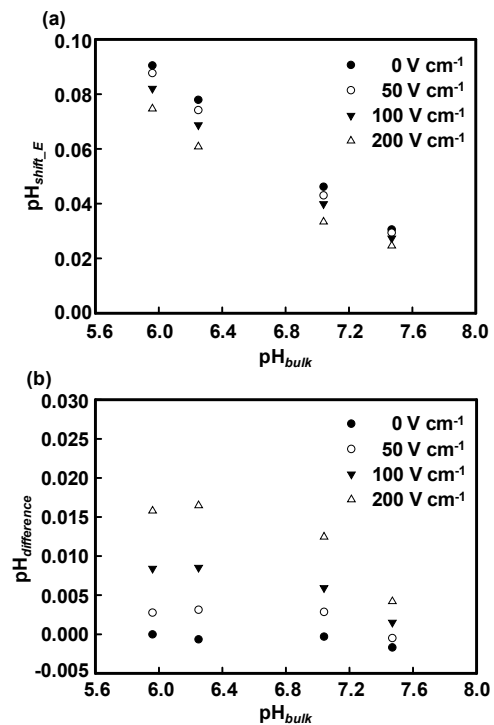


図4 バルクと壁面近傍のpH分布。

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8件)

- ①嘉副裕, 中村翼, 佐藤洋平, “エバネッセン
ト波および体積照射を用いた非一様ゼ
ータ電位を有する電気浸透流の時系列速度
計測,” 日本機械学会論文集 B 編, 査読有,
第76巻770号, 2010, pp. 1455–1463.

- ②Yutaka Kazoe, Tsubasa Nakamura & Yohei Sato, “Evanescent-wave/volume illuminated velocity measurements of transient eletrokinetically-driven flow with nonuniform wall electrostatic potential,” Measurement Science and Technology, 査読有, Vol. 21, 2010, 055401(10pp).

- ③Yutaka Kazoe, Shu Miyakawa, Norihisa Miki & Yohei Sato, “Fluorescence imaging technique of surface electrostatic potential using evanescent wave illumination,” Applied Physics Letters, 査読有, Vol. 95, 2009, 234104(3pp).

〔学会発表〕(計16件)

- ①Reiko Kuriyama, Yuta Tanaka & Yohei Sato, “Refractive index difference sensing illuminated by evanescent wave for noninvasive diagnosis of cell’s pathological state,” International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2010年11月8日, CD-ROM.

- ②栗山怜子, 田中雄太, 佐藤洋平, “非侵襲細胞状態判別を実現するエバネッセント波照射屈折率差計測法の開発,” 第47回日本伝熱シンポジウム講演論文集, Vol. 1, 2010年5月26日, pp. 109–110.

- ③Yutaka Kazoe, Shu Miyakawa, Norihisa Miki and Yohei Sato, “Quantitative evaluation of patterned self-assembled monolayers by color imaging of zeta-potential obtained from two-color fluorescence and evanescent wave illumination,” Micro Total Analysis Systems 2008年10月13日, Vol. 1, 2008, pp. 643–645.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 二色蛍光色素を用いたゼータ電位定量

法

発明者: 佐藤洋平、嘉副裕、宮川修

権利者: 学校法人慶應義塾

種類: 特許

番号: 特願 2008– 263639

出願年月日: 2008年10月10日

国内外の別: 日本

○取得状況 (計1件)

名称: Quantitative evaluation method and device for zeta potential, pH or temperature distribution at wall surface and quantitative visualization method and device for surface modification

発明者: 佐藤洋平、嘉副裕、宮川修

権利者: 学校法人慶應義塾

種類: 特許

番号: WO2010/041560

出願年月日: 2010年4月15日

国内外の別: 米国

〔その他〕

受賞

社団法人日本伝熱学会優秀プレゼンテーション賞 (2010年5月26日)

ホームページ:

<http://www.tfe.sd.keio.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 洋平 (SATO YOHEI)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号: 00344127

(2) 研究分担者

村上 俊之 (MURAKAMI TOSHIYUKI)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号: 00255598

(3) 連携研究者

該当なし