

報 文

デスクトップ熱レンズ顕微鏡の開発

比企伸一郎¹, 渡慶次 学², 火原 彰秀³, 北森 武彦^{®2,3}

Development of a desktop-sized thermal lens microscope

Shinichiro HIKI¹, Manabu TOKESHI², Akihide HIBARA³ and Takehiko KITAMORI^{2,3}¹ Institute of Microchemical Technology, KSP East-207, 3-2-1, Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012² Integrated Chemistry Project, Kanagawa Academy of Science and Technology, KSP East-307, 3-2-1, Sakado, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 213-0012³ Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656

(Received 9 May 2003, Accepted 13 June 2003)

A desktop-sized thermal lens microscope (DT-TLM) having high sensitivity and wide applicability was developed. The operability of the DT-TLM compared with that of a big-sized TLM has been remarkably improved by simplifying the optics and optimizing the optical configuration. In order to evaluate the performance, the DT-TLM was applied to the ultrasensitive detection of a non-fluorescent molecule (dye: Sunset Yellow) in water. The concentration dependence of the thermal lens signal (calibration curve) showed good linearity in the range of $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-7}$ M. From the value of twice the standard deviation (2σ) of this calibration curve, the lower limit of the quantitative determination was estimated to be 1.10×10^{-8} M. The lower limit of detection was estimated as 8.27×10^{-9} M from the conditions of the signal-to-noise ratio $S/N=2$. These obtained values were almost the same as that of the big-sized TLM.

Keywords : thermal lens effect; thermal lens microscope; ultra high sensitive detection; non-fluorescent molecule.

1 緒 言

近年、数 cm 角のガラスやシリコン、プラスチック基板（マイクロチップ）に数十～数百 μm の微細流路（マイクロチャネル）をマイクロマシニング技術を用いて作製し、それを利用して化学操作をマイクロチップ上に集積化する研究（ μ -TAS: micro total analysis systems, あるいは lab on a chip と呼ばれる）が大きな注目を集めている¹⁾²⁾。

マイクロチップの利点は、試料量・廃液量の低減、化学処理時間の短縮、マルチ化・自動化などが挙げられる。こ

れらの利点は化学・バイオ関連の研究や産業のみならず、多くの分野にとって非常に大きな魅力を持つ。しかし、上述の利点を最大限に引き出すためには、超高感度検出技術が必須となる。なぜなら試料量の低減は、検出という観点からは逆に大きな問題となるからである。

マイクロチップシステムの検出法としては、これまでに様々な方法が提案されている³⁾。Table 1 にマイクロチップシステムの代表的な検出法の特徴と性能を示す。この中で最も頻繁に用いられているのが、感度が最も高い蛍光法である。ローダミンやフルオレセインなどの蛍光量子収率が高い蛍光性分子の場合、1 分子検出はそれほど難しくない。DNA や生体関連物質などは自らはほとんど蛍光を発しないため、これらの蛍光性分子でラベル化して検出を行う。しかし、ラベル化はすべての分子に対して行うことができるわけではない。また、ラベル化できる場合も煩雑な

¹ マイクロ化学技術株式会社: 213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 KSP 東棟 207² 財団法人神奈川科学技術アカデミー: 213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 KSP 東棟 307³ 東京大学大学院工学系研究科: 113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

Table 1 Comparison of detection methods

	Fluorescence	Electro-chemical detection	Absorption	Thermal lens detection
Sensitivity	◎	△	△	◎
Applicability	△	△	◎	◎
Miniaturization	△	○	△	△

操作が必要である。したがって、蛍光法は感度は高いが、適応できる対象が大きく限定されてしまう。

一方、システム全体の小型化という観点からは、チップ上に容易に集積化できる電気化学検出法がある。電気化学検出法は光検出法と異なり、光源や光検出器が不要なため、小型化がそれほど困難でない。しかし、適応可能な対象が電気化学活性種のみで、感度もそれほど高くない。

はん用性という観点からは、吸光法が最も高い。光の励起波長を測定対象の吸収帯に合わせることで、すべての物質を測定対象にすることができる。しかし、Lambert-Beerの法則から吸光度は光路長に比例するので⁴⁾、光路長が長くとれないマイクロチップでは原理的に高感度化するのは難しい。

それぞれの検出法には一長一短があり、マイクロチップシステムの検出器としては、蛍光法のような感度を持ち、かつ吸光法のようなはん用性を持つものが理想的である。これまでに著者らは超微量分析の検出器として、熱レンズ法を顕微鏡下で初めて実現した熱レンズ顕微鏡 (thermal lens microscope: TLM) を開発した⁵⁾⁶⁾。熱レンズ法は光熱変換分光法の1つであり、物質の光吸収に基づく高感度分光法として古くから知られている⁷⁾。このTLMは、10 μm程度の光路長があれば吸光度で10⁻⁸ (Abs)程度を検出できる能力を持ち、これは吸光法に比べて3けた以上高感度である。理想的な条件下では、非蛍光性分子の1分子レベルの定量も実現している⁸⁾⁹⁾。これらのTLMの特長は、マイクロチップシステムの検出法として理想的なものである^{10)~12)}。

しかし、TLMは光学防振台上で大型のレーザーと多数の光学部品、顕微鏡を組み合わせて構成されており、可搬性はなく、検出システムとしても非常に大型で、専門的な操作技術が必要であった。マイクロチップシステムの検出器としては、当然小型であることと簡便性が望まれており、TLMの小型化・簡便化が期待されていた。そこで著者らは、TLMの持つ高感度能を維持したまま、操作の簡便化と小型化を実現したデスクトップサイズの熱レンズ顕微鏡 (desktop-sized thermal lens microscope: DT-TLM) を開発した。

2 熱レンズ顕微鏡の原理

Fig. 1にTLMの原理図を示す。測定対象を励起するた

めの励起レーザーとそれを検出するためのプローブレーザーを同軸で対物レンズに導入し、試料に照射する。試料中の測定対象は励起光を吸収し、無放射緩和過程を経て吸収した光エネルギーを熱エネルギーとして放出する。放出される熱は、レーザーの強度分布と媒体 (液体中では溶媒) への熱拡散を反映して、光軸に垂直な温度勾配を生じる。温度変化が微小な場合は、温度変化 ΔT は屈折率変化 Δn と比例関係にあるため、 Δn は中心部で最も小さく、中心から離れるにつれて大きくなるような屈折率分布を形成する。この屈折率分布が擬似的な光学レンズとして作用し、これを熱レンズ効果と呼ぶ⁷⁾。試料の後で励起光カットフィルターを用いて励起光をフィルタリングし、プローブ光のみをピンホールを通過させ、プローブ光の光量変化をフォトダイオードで検出する。この光量変化は熱レンズ効果の程度 (発熱量)、つまり励起された分子数に比例するので、光量変化を測定することで定量分析できる。

ここで注意しなければならないのが、励起光とプローブ光の焦点の位置関係である。通常の対物レンズは色収差が完全に補正されているため、波長の異なる励起光とプローブ光の焦点は全く同じ位置になる [Fig. 1(a), (c)]。つまり、励起光によって熱レンズが形成されてもプローブ光の軌跡は変化せず、プローブ光の光量変化は検出されない。したがって、熱レンズ顕微鏡測定を行うためには、励起光とプローブ光の焦点の位置に差 ΔZ をつける必要がある [Fig. 1(b), (d)]¹³⁾。従来のTLMは2枚の光学レンズとピンホールから構成されたプローブ光の焦点位置を任意に移動できる焦点調整ユニットを持っている。

原理の説明からも分かるように、熱レンズ測定は測定対象以外に励起光を吸収するような物質 (きょう雑物) が試料中に含まれている場合には、測定対象だけでなく、きょう雑物も信号発生に寄与する。したがって、マイクロチップシステムによる分離等とTLMの組み合わせは、TLMの性能を引き出す上で非常に都合がよい。

3 装置構成

Fig. 2に従来のTLMの装置構成を示す。励起光とプローブ光には連続発振レーザーを用い、対物レンズに導入する前にダイクロイックミラーで同軸にする。励起光は平行光として対物レンズに導入し、プローブ光は対物レンズに導入する前に焦点調整ユニットを通して、励起光との焦点

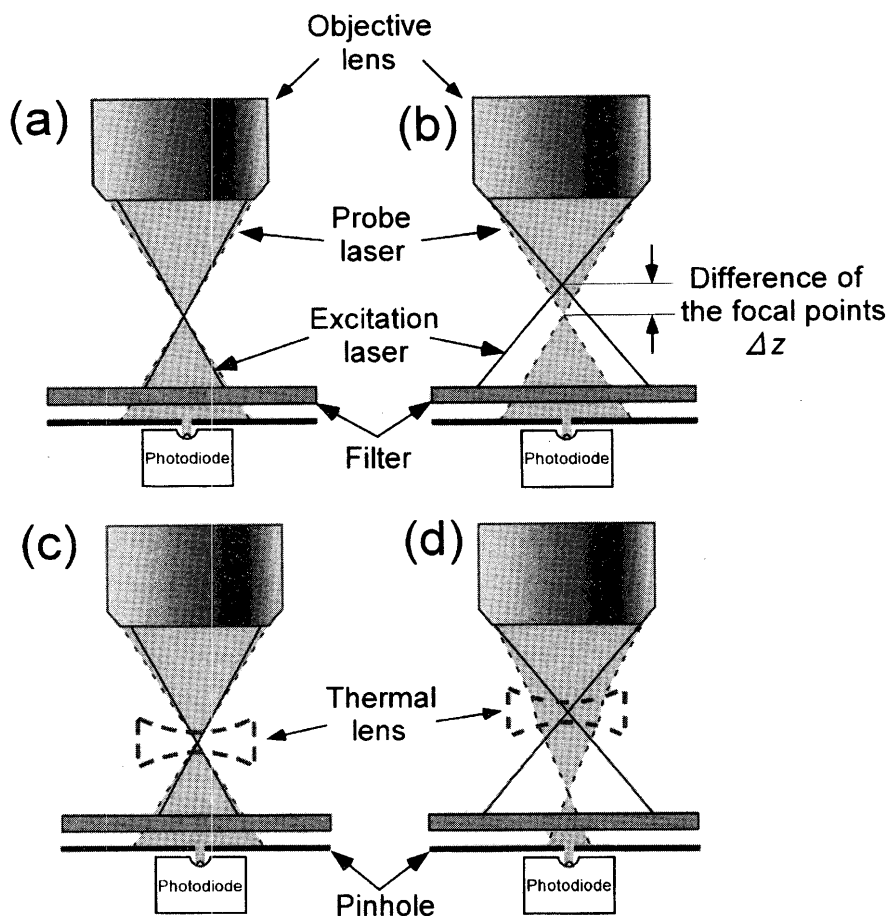


Fig. 1 Principle of thermal lens microscope

The focal points of excitation and probe beams are (a) in the same position and (b) out of position. (c) thermal lens effect induced in the case of configuration (a). (d) thermal lens effect induced in the case of configuration (b).

差を最適調整する。励起光は光チョッパーで変調し、その変調周期とプローブ光の光量変化をロックインアンプで同期検出する。Fig. 2 から分かるように、従来の TLM は多数の x - y 軸, x - y - z 軸, θ 軸の精密調整が必要のため、測定には高度な技術が必要であった。

Fig. 3 に開発した DT-TLM の装置構成を示す。操作・調整の簡略化を実現するために、光学部品点数を最小限にし、顕微鏡鏡筒内部に一体化した。Fig. 4 に DT-TLM の概観写真を示す。従来の TLM は焦点調整ユニットがプローブ光の光路上にあったが、小型化するために励起光の光路上に焦点調整用のレンズ対を配置した。励起光には半導体励起固体レーザー（波長: 532 nm, 75 mW）を、プローブ光にはダイオードレーザー（波長: 670 nm, 0.95 mW）を用いた。励起光は光チョッパーで変調（変調周波数: 1 kHz）され、焦点調整用のレンズ対, ダイクロイックミラー, キューブビームスプリッターを通り、対物レンズに導入される。プローブ光は励起光の光軸と垂直な位置に配置されており、ダイクロイックミラーで励起光と同軸にする。対物レンズから照射された励起光とプローブ光は

試料, コンデンサーレンズを通して, ミラーでフォトダイオードに導かれる。励起光はフォトダイオードの手前に配置された励起光カットフィルターでフィルタリングされ, プローブ光のみがピンホールを通過し, フォトダイオードで検出される。

DT-TLM の調整可能な光学系は, 焦点調整用のレンズ対とダイクロイックミラー, コンデンサーレンズの 3 つだけで, ほとんどすべての光学系に調整が必要な従来の TLM に比較すると大幅な調整の簡略化が実現し, 操作性が大きく向上した。

今回開発した DT-TLM は, 光学系の配置の問題から正立顕微鏡をベースにして開発を行ったが, 原理的には倒立顕微鏡でも同じように TLM を構成することができる。

4 DT-TLM の評価

開発した DT-TLM の性能を評価するために, 非蛍光性色素水溶液である Sunset Yellow 水溶液をテスト試料として, 熱レンズ信号の濃度依存性を測定した。測定には光路長が 100 μm の光学セルを用いた。Fig. 5 にその結果を示

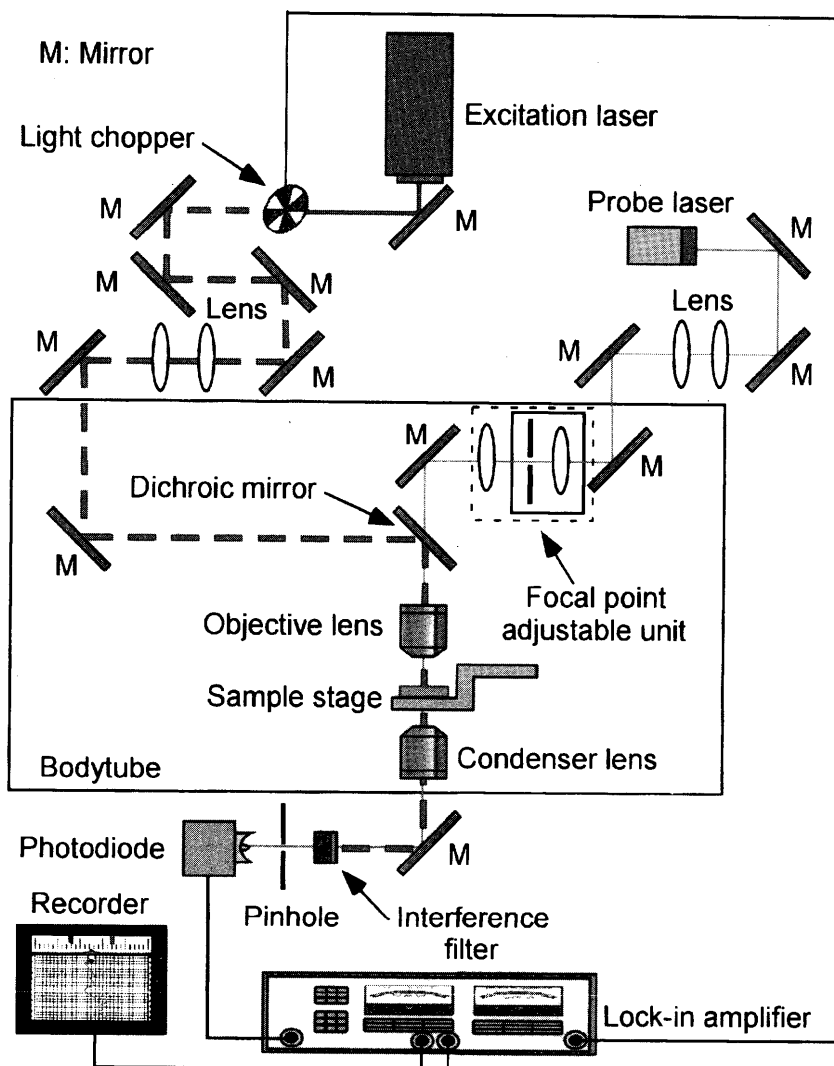


Fig. 2 System diagram of TLM

す。 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-7}$ M の濃度範囲で良好な直線関係を示した。得られた検量線から見積もった定量限界 (2σ) は 1.10×10^{-8} M で、検出限界 ($S/N=2$) は 8.27×10^{-9} M であった。式(1)の関係から、定量限界と検出限界を吸光度で表すと、それぞれ 5.12×10^{-7} と 3.85×10^{-7} になる。

$$A = \epsilon cl \quad (1)$$

ここで、 A は吸光度、 ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{l cm}^{-1}$) はモル吸光係数、 c (mol l^{-1}) は試料濃度、 l (cm) は光路長である。励起光波長 532 nm における Sunset Yellow 水溶液のモル吸光係数は 4657 である。

ここで得られた結果と従来の TLM を用いて同じ測定を行った結果の比較を Table 2 にまとめた。両者の比較から、DT-TLM は従来の TLM とほぼ同等の性能を有していることが分かる。むしろ、若干 DT-TLM のほうがよい結

果を示している。この原因として、DT-TLM は高剛性基板上に最小限の部品点数で光学系を組み上げたことで、振動等の外乱による雑音を抑えることができたと考えられる。

また、今回の評価では光路長が 100 μm の光学セルを用いたが、熱レンズ信号強度は光路長が 10 μm 程度までは光路長に依存しないので、吸光度としては更に 1 けた向上させることができる。更に熱レンズ信号強度は、溶媒に有機溶媒を用いた場合は溶媒に水を用いた場合の約 20 倍強くなるので、より高感度な測定を行うことができる⁷⁾¹³⁾。

5 結 言

熱レンズ顕微鏡の持つ高感度能を維持したまま、操作の簡便化と小型化を実現したデスクトップサイズの熱レンズ顕微鏡を開発した。DT-TLM はマイクロチップシステムの検出器として、感度、はん用性、操作性、可搬性といった点で非常に優れた特徴を持っており、今後マイクロチッ

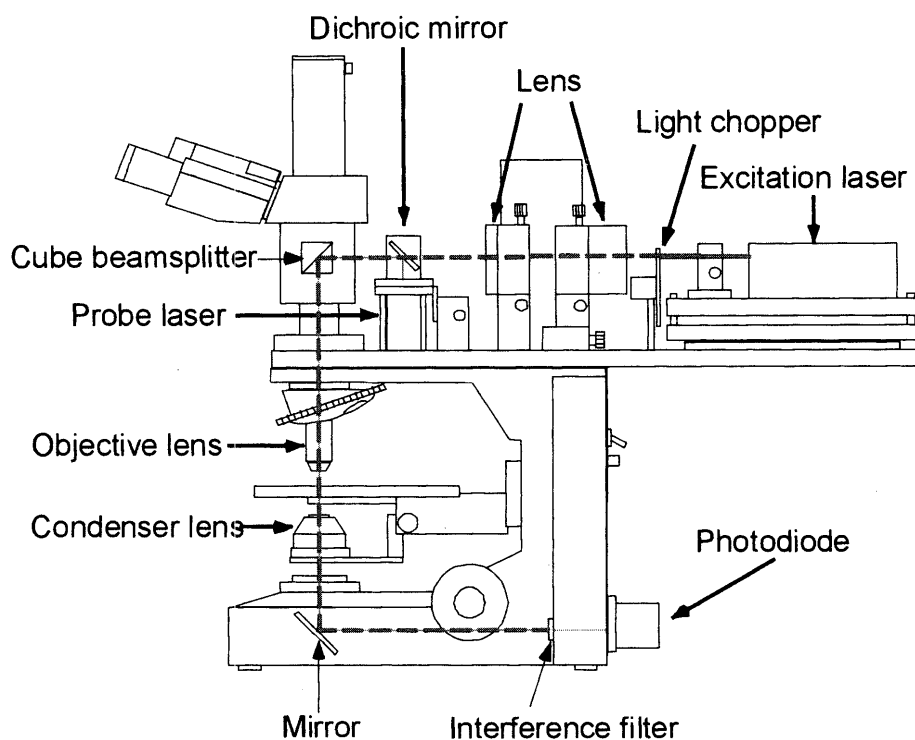


Fig. 3 System diagram of DT-TLM

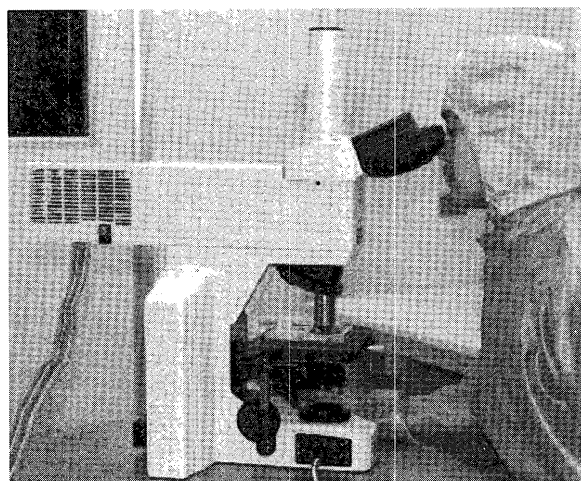


Fig. 4 Photograph of DT-TLM

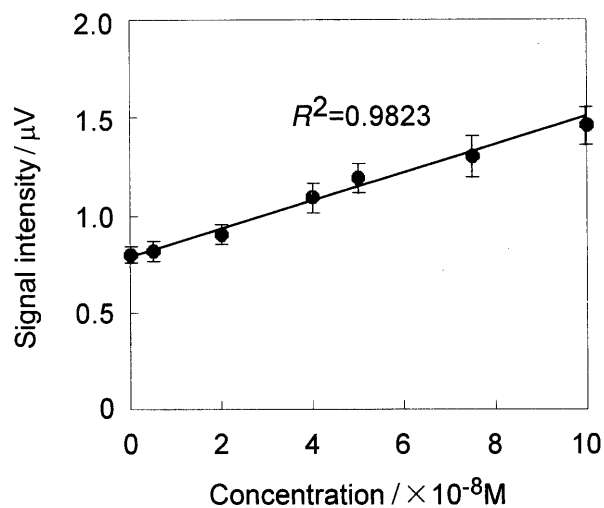


Fig. 5 Calibration curve

ブシステムの検出器として広く利用されることを期待している。

また、熱レンズ法は測定対象に光吸収があればラベル化が不要で、試料形態を選ばず、細胞上¹⁴⁾あるいは細胞内¹⁵⁾の直接測定も可能で、様々な分野への応用が期待される。

本研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)「平成13年度基盤技術研究促進事業」の成果である。

また、DT-TLMの初期開発メンバーとして大きな貢献をいただいた(株)カノマックス技術研究所の常見 亮氏に感謝します。

Table 2 Limit of detection and determination

	DT-TLM	TLM
Limit of detection/mol l ⁻¹	8.27 × 10 ⁻⁹	1.87 × 10 ⁻⁸
Limit of determination/mol l ⁻¹	1.10 × 10 ⁻⁸	2.41 × 10 ⁻⁸
Limit of detection/Abs.	3.85 × 10 ⁻⁷	8.29 × 10 ⁻⁷
Limit of determination/Abs.	5.12 × 10 ⁻⁷	1.12 × 10 ⁻⁶
Noise level/μV	0.0189	0.0359
Standard deviation of noise	0.0102	0.0169

文 献

- 1) D. R. Reyes, D. Iossifidic, P. Auroux, A. Manz: *Anal. Chem.*, **74**, 2623 (2002).
- 2) P. Auroux, D. Iossifidic, D. R. Reyes, A. Manz: *Anal. Chem.*, **74**, 2637 (2002).
- 3) M. A. Schwartz, P. C. Hauser: *Lab Chip*, **1**, 1 (2001).
- 4) 日本分析化学会九州支部編: “機器分析入門”, 改訂第3版, p. 12 (1996), (南江堂).
- 5) K. Uchiyama, A. Hibara, H. Kimura, T. Sawada, T. Kitamori: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **39**, 5316 (2000).
- 6) 火原彰秀, 渡慶次 学, 北森武彦: 光技術コンタクト, **39**, 212 (2001).
- 7) S. E. Bialkowski: “*Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis*”, p. 29 (1996), (John Wiley and Sons, New York).
- 8) M. Tokeshi, M. Uchida, K. Uchiyama, T. Sawada, T. Kitamori: *J. Luminescence*, **83-84**, 261 (1999).
- 9) M. Tokeshi, M. Uchida, A. Hibara, T. Sawada, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **73**, 2112 (2001).
- 10) M. Tokeshi, T. Minagawa, K. Uchiyama, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, 1565 (2002).
- 11) H. Hisamoto, T. Horiuchi, K. Uchiyama, M. Tokeshi, A. Hibara, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **73**, 5551 (2001).
- 12) K. Sato, M. Yamanaka, H. Takahashi, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori: *Electrophoresis*, **23**, 734 (2002).
- 13) R. D. Snook, R. D. Lowe: *Analyst*, **120**, 2051 (1995).
- 14) H. Kimura, K. Sekiguchi, T. Kitamori, T. Sawada, M. Mukaida: *Anal. Chem.*, **73**, 4333 (2001).
- 15) E. Tamaki, K. Sato, M. Tokeshi, K. Sato, M. Aihara, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, 1560 (2002).

要 旨

超高感度かつはん用性の高い, デスクトップサイズの熱レンズ顕微鏡 (DT-TLM) を開発した. 光学系の単純化と最適化によって, DT-TLM の操作性は従来の大型 TLM に比較して大きく向上した. 非蛍光性の色素分子 (Sunset Yellow) 水溶液を用いて性能評価したところ, 色素分子濃度 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-7}$ M の範囲で良好な直線関係を示した. 検量線の標準偏差 (2σ) から定量下限値は 1.10×10^{-8} M, S/N 比 (=2) から検出下限値は 8.27×10^{-9} M とそれぞれ見積もられた. これらの結果は大型 TLM とほぼ同等の値であった.