

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286034

研究課題名(和文) 1細胞計測のためのフォトニクス・マイクロフルイーディックス融合デバイスの構築

研究課題名(英文) Development of a photonic microfluidic device for single cell analysis

研究代表者

鈴木 博章 (SUZUKI, HIROAKI)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：20282337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞から分泌される分子の検出を目的に、光方向性結合器(DC)型バイオセンシングシステムを作製した。まずポリマー導波路DCによる原理検証を行った後、窒化シリコン導波路DCにより、センシング領域の微小化を図った。シミュレーションによるデバイス設計の後、実際にデバイスを作製し、その動作を確認した。これを微小流路と結合して、微小領域で生体関連物質のセンシングが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：To detect molecules secreted from animal cells, an optical directional coupler (DC) was used to realize a micro biosensing system. First, the DC was fabricated with polymer waveguides and the function was confirmed. Then, a silicon nitride DC was fabricated. Simulation was conducted to design these devices and the performance of the devices was characterized. The device was coupled with a microfluidic system and sensing of biomolecules was conducted there.

研究分野：センサ・マイクロマシン

キーワード：細胞 光方向性結合器 導波路 ポリマー 窒化シリコン バイオセンサ

1. 研究開始当初の背景

医学、分子生物学における知見の蓄積にもかかわらず、遺伝子発現、情報伝達において、未解明の細胞機能は数えきれない。これを裏付けるように、近年、単一細胞の機能解析の必要性が高まっている。従来の細胞機能解析では、ディッシュ上で細胞を培養し、様々な刺激に対する応答を調べることが行われてきた。しかし、これでは多くの細胞の平均化された応答しか得られない。この分析を超微量溶液中で、少数の細胞、極限的には1個の細胞で行うことができれば、時間的にも空間的にも格段に高分解能のデータ、これまで得られなかった新たな知見を得ることができる。最近の研究では、希薄な細胞懸濁液を作り、アレイ状に形成された微小セル中に細胞を落とし込み、分子濃度の変化を蛍光でとらえるものが多く見られる(Gorris, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 3880 (2010))。しかし、細胞内外の分子の存在の確認、同定は達成されたものの、分子濃度の経時変化の測定は依然としてチャレンジングな課題として残っている。

この実現に向けた有望技術の一つはマイクロフルイディクスである。これは、チップ上に形成された微小流路中で微量溶液を操作する新技術であり、混合操作等を経て、短寿命の化学反応を解析したり、微量成分の化学分析を行う上で威力を発揮する。溶液量の桁違いの微量化により、高価な試薬を無駄なく使用できるだけでなく、高速でハイスループットな処理も可能になる。現在、ナノリットル(nL: 10^{-9} L)、ピコリットル(pL: 10^{-12} L)の微量溶液を処理するデバイスが作られており、技術的にはさらに下のフェムトリットル(fL: 10^{-15} L)の溶液を扱うデバイスも実現可能である(直観的な理解のため、 $1\text{ nL}=(100\text{ }\mu\text{m})^3$ 、 $1\text{ pL}=(10\text{ }\mu\text{m})^3$ 、 $1\text{ fL}=(1\text{ }\mu\text{m})^3$ であり、典型的には動物細胞は $10\text{ }\mu\text{m}$ 、微生物細胞は $1\text{ }\mu\text{m}$ のオーダーである)。このような微量溶液中の成分の検出には、電気化学方式と光学方式が代表的であるが、それぞれ一長一短がある。光ファイバー、プラズモニクス、干渉型導波路を用いた光学的センサは、その高い検出感度に加え、リアルタイム、非破壊での測定が可能などの利点から、注目を集めている。その中でもマッシュツェンダー(MZ)やヤングの干渉計に代表される干渉型導波路センサの一つである方向性結合器(Directional Coupler: DC)は、センサの微小化・高感度化や流路構造との複合化を容易にすることが期待される。MZ型干渉計型センサとしては、片方のブランチのみ位相変調するサイズ(10 mm^2)の個別チップを大規模に集積した例が報告されているが、DC型干渉計センサはそのデザインや測定が簡易になる。既存のDCセンサでは、2本の平行導波路の内一方をセンサ領域、他方を参照領域とするため、コアとの屈折率差が小さい材料を用いた弱結合型DCで構成され、センシング部が大きくなりがちであった。そこで、本研究では、 $(1\text{ mm})^2\sim(100\text{ }\mu\text{m})^2$ 領域の1細胞

検出が可能な集積化センサを実現するため、高い屈折率差を持つ材料を用いた強結合DCに着目した。本研究では、DC型光線導波路における2つの固有モードの位相干渉を利用する方式を用いた。本構造の中央部で、被検細胞を含んだ微小溶液流路の一部が導波路表面に接している。導波路を伝搬する光の表面染み出し電場(近接場)が、界面または近傍に付着・浮遊する被検分子をよぎる際に受ける位相変化(誘電率または屈折率変化に起因)に伴うモード間の位相干渉が発生し、出射強度の変化が起こる。

2. 研究の目的

本研究では細胞から分泌される分子の検出を最終目標に、マイクロフルイディックデバイスと一体化したDC型センサの作製を目標とした。まずポリマー導波路で動作確認を行った後、微細化、低S/N比達成、分子吸着検出における安定した信号を得るために、平滑な導波路表面が期待される窒化シリコン(SiN)をコア材料として用いた。

3. 研究の方法

3.1 検討したDCセンサの構造

Fig. 1に本研究で検討したDCデバイスの構造を示す。DCは近接した2本の導波路から構成される。DC表面の屈折率変化に伴い、2本の導波路を伝播する光の位相が変化する。これに伴い、双方の導波路から出射する光の強度が変化する。DCではこの出射光強度の比を取ることで、他の干渉型デバイスで問題となる入射時や伝搬時の光減衰に起因する出射光強度のばらつきの影響を低減することができる。

3.2 DCセンサの原理

導波路が近接した領域に光が到達すると、2本の導波路間で光パワーの周期的な交換を行う。これは、平行導波路内に存在する2つの固有モード(対称モードと非対称モード)間の干渉により生じる。コア表面に接するク

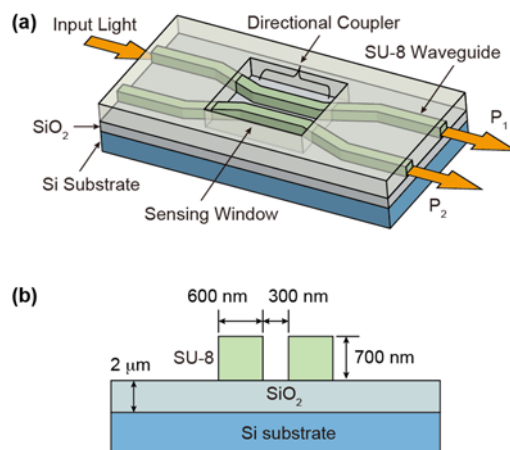


Fig. 1. (a) DC型センサの外観図. (b) 導波路近接部の断面図.

ラッド領域の屈折率変化により各固有モード間に有効屈折率（モードの伝搬速度と相関がある）の差が生じ、結果として出射光からの信号 P_1 , P_2 の変化として位相変化 ($\Delta\phi$) を測定することができる。 P_1 および P_2 は結合長 (L_c) の変化に起因する。センサの評価には、次式で定義される相対光強度 I_j ($j=1, 2$) を用いた。

$$I_j = \frac{P_j}{P_1 + P_2} \quad (j=1, 2)$$

これにより出力のデバイス間誤差を減らすことができる。以下の結果においては、この相対光強度を光強度単位 (Optical Intensity Unit; OIU) で表すこととする。

3.3 電磁界シミュレーション

DC 中の伝搬光の電磁界分布シミュレーションによるセンサ設計には 3 次元ビーム伝搬法 (BPM) ソルバー (Rsoft, Synopsis) を用いた。入射光は導波路の端面に入射するガウス分布光を用い、計算を行う際のグリッドの一边は 10 nm とした。DC 領域内の光伝搬方向に沿った光強度分布を定量化するため、導波路中心に沿った軸 (z 軸) に対して垂直な断面における強度の積分値を計算した。

3.4 ポリマーDC センサの作製

厚さ 2.0 μm の SiO_2 層 (屈折率 1.46 ($\lambda = 633 \text{ nm}$)) を形成したシリコン基板上にネガ型フォトリソ SU-8 (MicroChem 製、屈折率 1.59 ($\lambda = 633 \text{ nm}$)) を塗布し、電子線描画することにより、導波路幅 600 nm、高さ 700 nm、導波路間隔 300 nm の DC を作製した。

DNA の検出を行うために、DC 表面に DNA を修飾した。まず、DC 表面へ 1.0 μM アミノ化 DNA を含む 0.1 M HCl 水溶液を滴下し、SU-8 導波路表面のエポキシ基と DNA のアミノ基を酸触媒下における開環縮合反応を経て、固定化した。また、同様の手順でストレプトアビジンの検出を行うため、DC 表面へビオチンを修飾した。

3.5 SiN DC センサの作製

SiN DC 型干渉計センサは、厚さ 1 μm のシリコン酸化膜上に形成された 2 本の SiN 細線導波路 (幅 400 nm、高さ 300 nm) から構成される。DC 領域の導波路は 150 nm のギャップで隔てられている。DC 作製には 300 nm 厚の LPCVD 製 SiN ($n = 2.01$) と 1 μm 厚の PECVD 製 SiO_2 ($n = 1.46$) が成膜されたシリコンウエハを使用した。導波路構造は電子線描画によるレジストパターン形成後、反応性イオンエッチング (RIE) のプロセスにより形成した。はじめに、600 nm 厚の電子線用ポジ型レジストとチャージアップ防止用導電性ポリマー溶液をこの順にウエハに塗布した。レジストは 125 kV 電子線描画装置を用いて描画後、キシレンにより現像した。SiN 層は RIE 装置によりエッチングした (反応ガス CHF_3 、内圧 0.5

Pa, RF 出力 50 W, エッチング時間 20 分)。RIE 後、酸素プラズマ装置によりレジストを剥離した。測定前にウエハを導波路と垂直方向に壁開することで、導波路端面を露出させた。

3.6 測定方法

DC チップは 6 軸精密ステージ上に固定した。ポリジメチルシロキサン (PDMS) からなる微小流路を用いる場合には、これをセンサ直上に直線流路 (幅 1 mm) が交差するように貼り合わせた。TE 偏光の半導体レーザー光 (波長 635 nm, 出力 5 mW) は長焦点対物レンズを通して、導波路端面に入射した。出射端面からの 2 つの信号はもう一方の対物レンズにマウントされた CCD カメラにより記録した。近視野像内に映った 2 つの信号は各導波路の中心をとした直径 10 μm 内の 256 階調の平均値として取得した。信号解析には Image J (NIH) を使用した。

ポリマーDC による DNA の検出は、QD-DNA を含む 0.1 M NaCl 溶液を滴下し、DNA ハイブリダイゼーションに伴うシグナル強度変化を測定することにより行った (Fig. 2 (a), (b))。測定には DC 長 (L) が 20~1540 μm の異なる 16 種のデバイスを用いた。ストレプトアビジン (SA) の検出では、これを含む標準液を流速 1 mm/s で流し、SA のビオチンへの非特異吸着に伴うシグナル強度変化を測定した。また、得られた規格化光強度変化から結合長変化量を計算し、結合長変化量と SA 濃度の関係を確認した。SA の測定には DC 長 616 μm のデバイスを用いた。

SiN DC のバルクでのセンサ感度を評価するために、異なる濃度のグリセリン水溶液をシリンジポンプにより送液した。表面センシング評価には、ビオチン・ストレプトアビジン

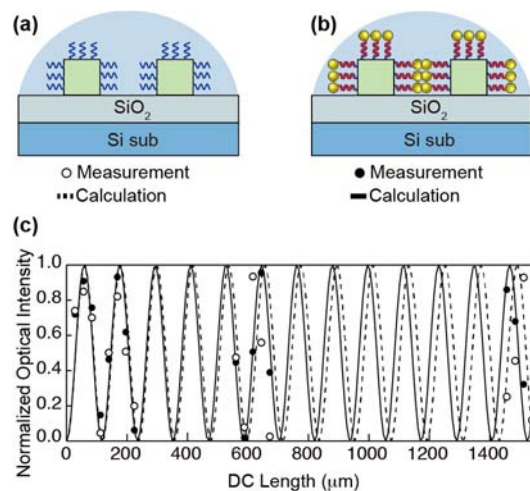


Fig. 2. QD の表面吸着の測定. (a) 一本鎖 DNA の修飾した DC 断面図. (b) DNA ハイブリダイゼーションによる QD-DNA の DC 表面への吸着. (c) 測定値の DC 長に対するプロット及びフィッティングカーブ.

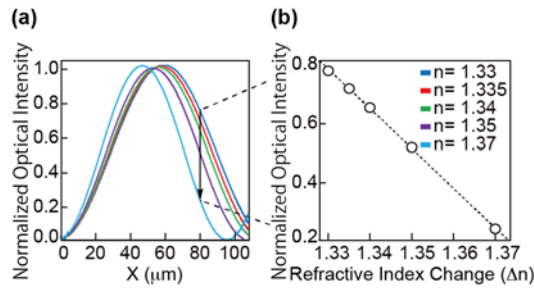


Fig. 3. シミュレーション結果. (a) 異なる周辺屈折率における $P_2/(P_1 + P_2)$ の変化. (b) $X = 80 \mu\text{m}$ における $P_2/(P_1 + P_2)$ と屈折率の関係.

ン反応をモデルとして用いた。SiN 表面をビオチン化するために、シランカップリング剤 3-Aminopropyl triethoxysilane (APTES) と EZ-Link NHS-biotin の表面修飾をこの順で行った。APTES 修飾には気相法を用いた。酸素プラズマによる窒化膜表面洗浄後、クロロホルムでリンスした。アルゴンガスが満たされたデシケーター内で APTES およびトリエチルアミンを常温で揮発させ、デシケーターの裏蓋に固定した SiN DC チップ表面へ APTES を形成した。続いて、1 mg/mL NHS-biotin 水溶液に SiN チップを浸漬させ、表面のビオチン化を行った。最後に 0.1% 牛血清アルブミン(BSA) 溶液へ SiN DC チップを浸漬させ、表面ブロッキング処理を行った。

4. 研究成果

4.1 ポリマーDC の特性

Fig. 3 (a) に表面屈折率(n_{clad})変化に対する伝搬光の規格化光強度(Fig. 1 における $P_2/(P_1 + P_2)$)変化のシミュレーション結果を示す。計算では、 n_{clad} を 1.33 - 1.37 間で変化させ、DC 内の光強度を測定した。DC では、伝搬光が隣り合う導波路に完全に移るまでの距離を完全結合長 L_c と呼ぶ。グラフより n_{clad} が増加するにつれて L_c が短くなることが確認された。また、DC 長 $L = 80 \mu\text{m}$ におけるシグナル強度を Fig. 3 (b) に示す。表面屈折率とシグナル光強度の間に直線的な関係が認められた。

次に、20 bp の一本鎖 DNA のセンシングを行った。相補的な配列を有する DNA で修飾した DC センサ上に 10 nM QD-DNA 溶液 (●) および 0.1 M NaCl 溶液 (○) を滴下した際の結果をそれぞれプロットし、 \sin^2 関数でフィッティングした(Fig. 2(c))。その結果、DC 長 $L = 20 \mu\text{m}$ のデバイスにおいても、相補鎖の結合に伴い、規格化光強度 0.71 から 0.74 への有意な変化が認められた。一方、DC 長 $L = 1540 \mu\text{m}$ のデバイスにおいては、0.32 から 0.94 への大きな変化が測定された。

1 μM SA 溶液による規格化光強度とそれより計算された結合長変化量の時間変化を Fig. 4 (a), (b) にそれぞれ示す。SA 溶液の導入を開始して 380 秒後にシグナルが変化したことから、ストレプトアビジンが DC 表面のビオチンに DC 表面のビオチンに吸着したことがわかる。

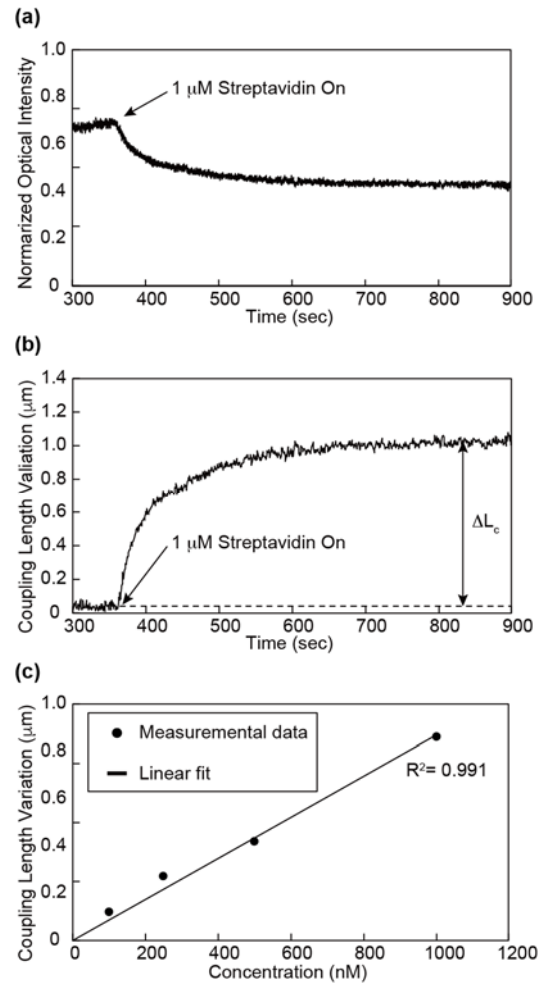


Fig. 4. ストレプトアビジンの検出. (a) 規格化光強度の実時間測定. (b) 測定した規格化光強度(a)より計算された結合長変化量. (c) 異なる濃度 SA による結合長変化量.

SA の吸着前後で、規格化光強度は 0.69 から 0.43 に変化し、結合長変化量は 0.98 となった。また、Fig. 4 (c) に結合長変化量 SA 溶液濃度依存性を示す。両者には直線的な関係が認められた。

4.2 SiN DC のシミュレーション

Fig. 5 はクラッド屈折率 n_{clad} の変動による

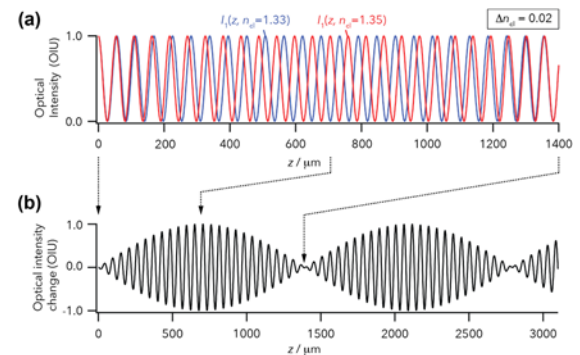


Fig. 5. SiN DC の出射光強度のデバイス長依存性. (a) 屈折率変動前後. (b) 差分.

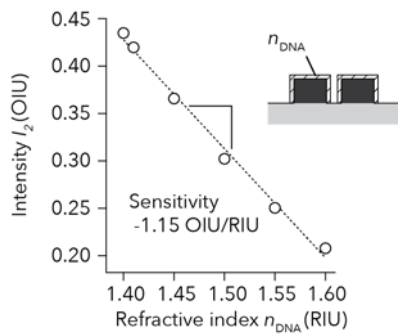


Fig. 6. センサ表面近傍の分子吸着層の屈折率変化に対する信号強度変化 ($L = 98 \mu\text{m}$).

DC 内部での結合光強度のデバイス長依存性を表す。屈折率変動前 ($n_{\text{clad}} = 1.33$) に対し、変動後 ($n_{\text{clad}} = 1.35$, $\Delta n_{\text{clad}} = 0.02$) の場合、 $z = 1400 \mu\text{m}$ において位相が一周分シフトすることが分かる。これに伴い、各位置 z での光強度は Fig. 5(a) のように変化する。Fig. 5 (b) は DC 内部の一方の導波路における光強度分布の変化量を表す。強度変化量のピーク値は z に対して包絡線上にある。本計算での完全結合長 $L_c = 28.2 \mu\text{m}$ の場合、 $z = 700 \mu\text{m}$ およびその奇数倍で強度変化量は極大 (または極小)、偶数倍でゼロとなる。よって本計算例の構造では、 $z = 700 \mu\text{m}$ あるいその奇数倍の全長においてセンサ感度が最大となる。DC 間ギャップの縮小などの DC 設計変更により完全結合長を短縮すれば、最大感度を与えるデバイス長は短く、つまりセンサの微小化が可能となる。

表面センサ感度を見積もるために、SiN 表面に形成された厚さ 10 nm の吸着分子層モデルを考え、その屈折率変動 ($1.4 \sim 1.6$) に対する光強度変化を計算した (Fig. 6)。光強度は

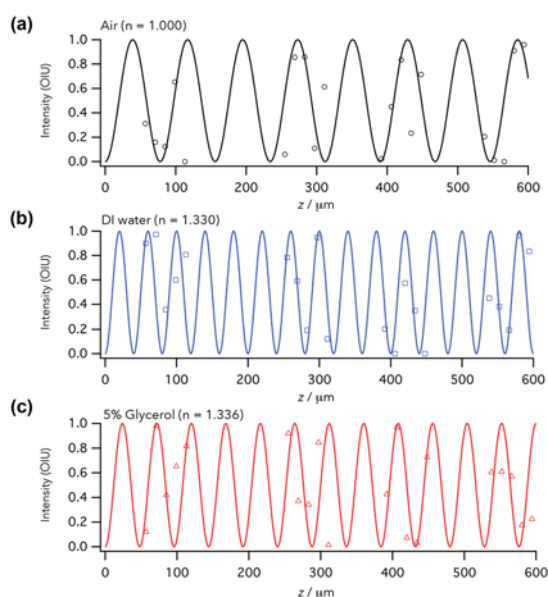


Fig. 7. 相対光強度分布のクラッド屈折率依存性。(a)空気。(b)純水。(c)5%グリセリン水溶液。

0.45 から 0.20 まで線形に変化し、その傾きは -1.15 OIU/RIU であった。

4.3 SiN DC のクラッド屈折率に依存した出射光強度分布

光入射実験においては、デバイス領域長 L を $57 \mu\text{m}$ から $594 \mu\text{m}$ の範囲で 20 種類の異なるデバイスを使用した。各 DC においてクラッド屈折率を空気 ($n = 1.00$)、純水 ($n = 1.33$)、5%グリセリン水溶液 ($n = 1.336$) それぞれの場合での相対光強度を測定した (Fig. 7)。溶液の導入はシリンジポンプ (流速 $10 \mu\text{L/min}$) を用いた。各グラフには $\sin^2(\varphi)$ のフィッティング曲線を示した。この曲線から各屈折率における完全結合長はそれぞれ $39 \mu\text{m}$ 、 $24 \mu\text{m}$ 、 $20 \mu\text{m}$ であることが示された。これらは、BPM シミュレーションにより得られた完全結合長 $50.1 \mu\text{m}$ 、 $28.2 \mu\text{m}$ 、 $25 \mu\text{m}$ にそれぞれ対応する。

4.4 表面センシングの初期検討実験

SiN 表面のビオチン化後の DC チップへ PDMS 流路を張り合わせ、ビオチン・アビジン反応のためのブロッキング処理として用いられる 1%牛血清アルブミン(BSA)を送液し、BSA の物理吸着を経時計測した。DC は $L = 406 \mu\text{m}$ を使用した。10 分間の純水送液後の信号をバックグラウンドとして取得し、30 分間 BSA 水溶液を送液、純水に切り替えて続けて 10 分間送液を行った。BSA 送液開始から 30 分間で I は 0.87 から 0.69 に減少し、たんぱく質の物理吸着を DC により検出できることが示された。

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 3 件)

1) K. Uchiyama, K. Okubo, M. Yokokawa, E. T. Carlen, K. Asakawa, H. Suzuki, Micron scale directional coupler as a transducer for biochemical sensing, Optics Express, Peer Reviewed, Vol. 23, No. 13, 2015, pp. 17156-17168

DOI: 10.1364/OE.23.017156

2) K. Uchiyama, K. Okubo, M. Yokokawa, E. T. Carlen, K. Asakawa, H. Suzuki, Directional-Coupler Interferometer Realizes a Miniaturized and High Sensitive Biosensor, Bio-Optics: Design and Application in Optics in the Life Sciences, Peer Reviewed, BW1A.3, 2015

DOI: 10.1364/BODA.2015.BW1A.3

3) K. Okubo, K. Uchiyama, M. Yokokawa, K. Asakawa, H. Suzuki, Fabrication and characterization of silicon nitride directional coupler interferometer for sensing aptamer hybridization, Proc. SPIE 9725, Frontiers in Biological Detection: From Nanosensors to Systems VIII, 972506 (March 7, 2016);

DOI:10.1117/12.2211899

〔学会発表〕（計 7 件）

（口頭発表 査読有り）

1) K. Okubo, K. Uchiyamada, M. Yokokawa, K. Asakawa, H. Suzuki, Fabrication and characterization of silicon nitride directional coupler interferometer for sensing aptamer hybridization, SPIE Photonics West 2016 BIOS, Proceedings of SPIE, 9725-05, San Francisco, CA, USA (February 2016)

2) K. Uchiyamada, K. Okubo, M. Yokokawa, E. T. Carlen, K. Asakawa, H. Suzuki, Directional-Coupler Interferometer Realizes a Miniaturized and High Sensitive Biosensor, Bio-Optics: Design and Application in Optics in the Life Sciences, BW1A.3, Vancouver, BC, Canada (April 2015)

（ポスター発表 査読有り）

3) K. Okubo, K. Uchiyamada, M. Yokokawa, K. Asakawa, H. Suzuki, Directional-Coupler Type Interferometer for Biochemical Sensing, The Tenth International Nanotechnology Conference on Communication and Cooperation (INC10), Gaithersburg, MD, USA (May 2014)

（口頭発表 査読無し）

4) 内山田健、大久保喬平、横川雅俊、Carlen Edwin Thomas、浅川潔、鈴木博章、光方向性結合型化学センサによる表面吸着物質の検出、第 58 回化学センサ研究発表会、3N20、横浜国立大学、神奈川県横浜市、2015 年 3 月

5) 内山田健、大久保喬平、横川雅俊、浅川潔、鈴木博章、光干渉導波路型微小化学分析デバイスの周辺屈折率に対するシグナル応答評価、第 75 回応用物理学会秋季学術講演会、20p-C7-7、北海道大学 札幌キャンパス、北海道札幌市、2014 年 9 月

6) 内山田健、大久保喬平、横川雅俊、浅川潔、鈴木博章、方向性結合型光導波路を用いた微小化学分析デバイスの作製、第 61 回応用物理学会春季学術講演会、17a-E6-10、青山学院大学、神奈川県相模原市、2014 年 3 月

7) 大久保喬平、内山田健、横川雅俊、浅川潔、鈴木博章、方向性結合器光干渉計による化学センシング、第 56 回化学センサ研究発表会、1O27、関西大学千里山キャンパス、大阪府吹田市、2014 年 3 月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木博章 (SUZUKI HIROAKI)
筑波大学・数理物質系・教授
研究者番号：20282337

(2) 研究分担者

浅川潔 (ASAKAWA KIYOSHI)
筑波大学・数理物質系・客員教授
研究者番号：20375405

杉本喜正 (SUGIMOTO YOSHIMASA)
独立行政法人物質・材料研究機構・先端的
共通技術部門・主席研究員
研究者番号：60415784

尾崎信彦 (OZAKI NOBUHIKO)
和歌山大学・システム工学部・准教授
研究者番号：30344873

横川雅俊 (YOKOKAWA MASATOSHI)
筑波大学・数理物質系・助教
研究者番号：50447885