

## 微小スケールの液体界面と分析操作

火原 彰 秀\*

### 1. はじめに

分析操作を微小化・デバイス化し、分析の自動化・高速化・高度化を目指す MicroTAS (マイクロタス) あるいは Lab on Chip (ラボオンチップ) という研究分野が大きく発展している<sup>1)</sup>。リソグラフィやエッチングといった先端的なマイクロ・ナノ加工技術により、微細な構造をつくることで試料サンプリング、分析前処理、検出などの操作が集積化されている。

高度分析の集積化という観点からは、薬剤候補物質の高速スクリーニングや、DNA ライブラリーから合成されたタンパクの機能を評価するタンパク工学的な手法の集積化など、従来大規模な装置で長時間かかった分析を、微量試料で高速に高精度に計測すると言うことが実現しつつある<sup>2)</sup>。

簡易分析という観点でも、Paper Microfluidics (紙の上のマイクロ流体) という分野が進展しており、緊急医療の補助的手段や、途上国における診断補助としての発展が期待されている<sup>3)</sup>。

本稿では、上述のように応用デバイスが注目されるマイクロ分析の基礎/基盤として重要な働きをしている、「微小スケール界面」に注目してその特性を明らかにする研究や、特性を上手く利用した分析法などについてまとめる。

### 2. 溶液の体積・界面の微小化

マイクロ化学では、微小体積の液体を取り

扱う<sup>4)</sup>。例えばよくある状況として、幅・深さ 50 $\mu\text{m}$ 、長さ 100mm の流路を考えると、デバイス内部の液体体積は 250nL である。通常の実験室スケールの実験と比較すると桁違いに小さな空間であることがわかる<sup>5,6)</sup>。

さらにこのようなマイクロ流路中で液滴 (水中油滴や油中水滴) を生成すると、図 1 のように径のばらつきの小さな液滴が、高速に (1 流路あたり 1,000 個毎秒程度) 生成可能である<sup>7)</sup>。

この液滴は隣接する水滴と油相で隔てられており、孤立した反応場・分析場として考えることができる。例えば図 2 のように、1fM ( $10^{-15}\text{M}$ ) の溶質を含む水溶液を考える。通常の実験室スケールである 1mL では  $6 \times 10^6$  個の分子が存在するのに対し、直径 14 $\mu\text{m}$  (1pL,  $10^{-12}\text{L}$ ) の液滴では分子数は  $6 \times 10^3$  個となる。このような状況では、分子は Poisson 分布に従い液滴に分配される。大部分の液滴はこの分子を含まず、0.6% の液滴は分子を 1 個含み、分

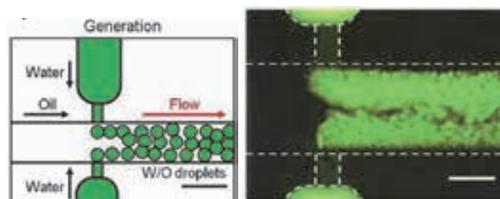


図 1 液滴生成の例。左から油相 (連続相) が流れ、その中に上下から水相 (分散相) が導入されている。粘性と張力の関係により液滴化する。写真のスケールバーは 100 $\mu\text{m}$ 。Adapted with permission from Ref.<sup>7)</sup>。Copyright (2006) The Japan Society for Analytical Chemistry.

\*東京工業大学大学院理工学研究科准教授

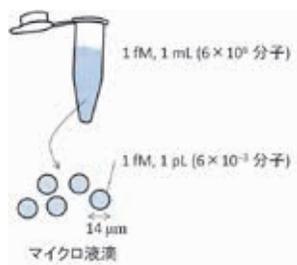


図2 実験室スケール (mL) とマイクロ液滴のスケール (pL) の比較。

子を2個以上含む確率は0.002%以下である。液滴内に分子を含む液滴を数えることにより、分子カウンティングを実現できる。計測法としては蛍光法が想定される。

次に、図2aのようなある体積の液体界面への分子Aの吸着平衡を考える。溶液の体積が小さくなるほど、体積に対する表面積の割合が大きくなる。そのため、液体体積が小さくなるほど、吸着分子数の割合が増加していくと予想される。界面活性剤分子であるSDSの1mM水溶液を考えると、従来の研究の知見から水面には $1\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 程度の密度でSDSが吸着することが知られている。この濃度と密度が一定と仮定して、サイズ効果を考えると、1cmサイズの空間では溶液中に $6 \times 10^{17}$ 分子、界面に $6 \times 10^{13}$ 分子が存在する。溶液中に圧倒的多数の分子が存在することで平衡が達成されていることがわかる。一方で10nmサイズの空間では溶液中に $6 \times 10^1$ 分子、界面に $6 \times 10^1$ 分子という結果となる。溶液中にほとんど分子が存在しないで、界面に分子が局在する状態となると解釈できる。単一分子程度の濃度を仮定すると、SDS分子は多くの時間界面に吸着し、時々脱着して溶液中に存在するというような現象が期待される。このような興味深い現象が本当に起こるのか、計測に基づき議論をしたいが、そのためには特殊な計測法が必要になる。

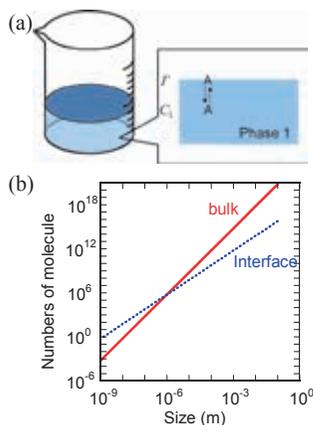


図3 水溶液中の分子数と界面吸着した分子数の関係のサイズ依存。(a) 溶液中の分子と吸着分子の吸着平衡の模式図。(b) 溶液中分子数と吸着分子数の比較。

### 3. 微小界面の光計測

#### 3.1 準弾性レーザー散乱 (QELS) 法

光を用いて界面張力を測定する方法に準弾性レーザー散乱法 (Quasi-Elastic Laser Scattering Method, QELS法) がある<sup>8,9)</sup>。図3で考えたような自由表面に発生している界面張力波による光散乱を光ヘテロダイン法により測定する方法である。界面張力波は、熱的に様々な波数・振動数の波がランダムに発生・伝搬・減衰する横波であり、振幅は数オングストローム程度である<sup>10)</sup>。

低粘度での界面張力波の波数 $k$ と振動数 $f$ との分散関係式は、Navier-Stokes式から導かれるLamb式により与えられる<sup>11)</sup>。

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\gamma k^3}{\rho_1 + \rho_2}} \quad (1)$$

ここで $\gamma$ は界面張力、 $\rho_1$ および $\rho_2$ は界面を形成する流体1および2の密度である。2流体界面に波数 $K$ のレーザー光を入射すると、光は界面張力波により散乱を受ける。この散乱は、運動量 $\hbar k$ の界面張力波の準粒子 (リブロン)

による運動量  $hK$  の光子の散乱と見ることができ、散乱の条件は、

$$k = K \sin\theta \quad (2)$$

である。このとき入射光（波数  $K$ ）の光周波数を  $F$  とすると、界面張力波周波数  $f$  によりドップラーシフトを受け、散乱光の周波数は、 $F \pm f$  となる。この散乱光のうちドップラーシフト分 ( $f$ ) を、参照光（非散乱光）との混合を用いた光ヘテロダイン法によりうなりとして測定し、Eq. (1) と Eq. (2) から界面張力を得る。図 4 (a) に QELS 測定装置の例を示す<sup>12)</sup>。図のように二光束を用いる実験装置では、Eq. (2) 中の角度  $\theta$  を定めるために、参照光と入射光の角度を規定する必要がある。図 4 (a) の例では、回折格子を用いて散乱角を決定している<sup>13)</sup>。図 4 (b) にピーカー中の水/ニトロベンゼン界面を測定したドップラスペクトルの例を示す。6.5kHz に中心周波数をもつスペクトルが得られ、この周波数を  $f$  として解析する。

従来の QELS 法には、二光束法<sup>12)</sup> や一光束法<sup>14)</sup> などいくつ可能方法が報告されているが、いずれも角度を決定することが、解析のポイントとなっていた。ここでフタのないマイクロ流路中の液面のように、界面が二次元方向に無限

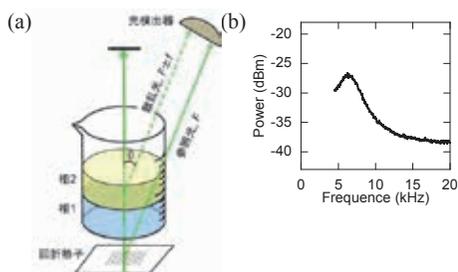


図 4 (a) 準弾性レーザー散乱法の原理. (b) スペクトルの例. Adapted with permission from Ref.<sup>13)</sup>. Copyright (2006) The Japan Society for Analytical Chemistry.



図 5 界面張力波共鳴の概念図. 様々な波長の波がランダムに発生する状態から、波長が制限空間スケールと共鳴する波のみが増強される。

に（十分長い距離で）広がるのではなく、流路幅方向に制限されている「制限空間の界面張力波」という観点で考えてみる。まず、図 5 左のように様々な波長（波数）の波がランダムに生成される<sup>15)</sup>。このうち、波長が流路幅と一致する（厳密には半波長の整数倍の）波は共鳴状態にあると考えられ、そのような波が図 5 右のように選択的増強され、非共鳴な波は繰り返し反射により素早く減衰すると考えられる。

実際、図 6 (a) に示すような、様々な角度からの散乱が重畳されるような単一光束の QELS 光学配置で、マイクロ流路中液面を測定すると図 6 (b) のように半波長の整数倍に相当する周波数のピークが現れることをはじめて示した。

この制限空間での界面張力波共鳴を利用した QELS 法では、光学的に厳密な角度設定は必要なく、様々な角度を同時に計測する単純な集光

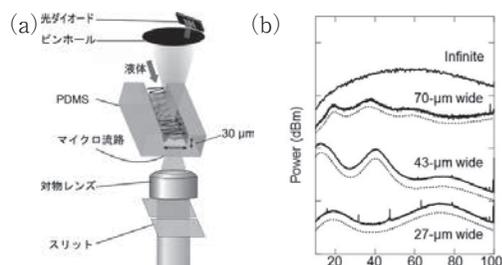


図 6 (a) 単一光束 QELS 法によるマイクロ流路内液面（制限空間界面）の計測. (b) 流路幅 70, 43, 27  $\mu\text{m}$  の流路でのメタノール表面の QELS スペクトル. 比較のために空間制限のない液面. Adapted with permission from Ref.<sup>15)</sup>. Copyright (2012) American Chemical Society.

光学系にて計測可能である。通常はこのような配置では界面張力決定が困難であるが、本法では制限空間での自発的共鳴現象によりピークが現れるので、界面張力が得られる。このような特性は、さらに空間サイズを小さくしたナノメートルサイズ界面の計測や、二次元空間制限界面での計測においても有効になると期待される。今後、ナノサイズ界面計測の実証などが期待される。

#### 4. おわりに

本稿では溶液サイズを小さくした場合に起こる単一分子閉じ込め、その界面で起こりうる界面局在などの現象を紹介した後、光による微小界面計測へのチャレンジを紹介した。単一コピーのDNAの分析は、PCR法による増幅と組み合わせですでに実現している<sup>2,5,6)</sup>。単一酵素分子の反応による蛍光分子生成でも同様に単一分子の検出が可能であることも示されている。これらの考え方は、タンパク工学や薬剤スクリーニングなどでも利用されている。さまざまな変異を導入したDNAライブラリーから細胞外でタンパク生成し、その活性の強いものを繰り返し選抜するような操作や、酵素反応を阻害する物質のスクリーニングなどに微小体積による少数分子化が使われている。これに対して、液体を微小化した時の界面に注目している例はない。しかし、界面への分子の局在などは、細胞内の膜で仕切られた空間での反応などを考えるうえで重要になってくると期待される。このような新しい化学研究のツールの発展が期待される。

#### 謝辞

科研費（基盤研究B、挑戦的萌芽研究）に深く感謝する。

#### 参考文献

- 1) A. Arora, G. Simone, G.B. Salieb-Beugelaar, J.T. Kim, A. Manz, *Anal Chem*, 82 (2010) 4830.
- 2) A. Fallah-Araghi, J.-C. Baret, M. Ryckelynck, A.D. Griffiths, *Lab Chip*, 12 (2012) 882.
- 3) A.K. Yetisen, M.S. Akram, C.R. Lowe, *Lab Chip*, 13 (2013) 2210.
- 4) A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1 (1990) 244.
- 5) A.B. Theberge, F. Courtois, Y. Schaerli, M. Fischlechner, C. Abell, F. Hollfelder, W.T.S. Huck, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010) 5846.
- 6) H.N. Joensson, H. Andersson Svahn, *Angewandte Chemie International Edition*, 51 (2012) 12176.
- 7) M. Fukuyama, A. Hibara, *Anal Sci*, 27 (2011) 671.
- 8) R.H. Katyl, U. Ingard, *Phys Rev Lett*, 20 (1968) 248.
- 9) K. Sakai, P.K. Choi, H. Tanaka, K. Takagi, *Rev Sci Instrum*, 62 (1991) 1192.
- 10) D. Langevin, *Light Scattering by Liquid Surfaces and Complementary Techniques*, Taylor & Francis, 1992.
- 11) H. Lamb, *R. Caflisch, Hydrodynamics*, Cambridge University Press, 1993.
- 12) Z.H. Zhang, I. Tsuyumoto, S. Takahashi, T. Kitamori, T. Sawada, *J Phys Chem A*, 101 (1997) 4163.
- 13) 火原, 北森, *ぶんせき* (2006) 242.
- 14) I. Tsuyumoto, H. Uchikawa, *Anal Chem*, 73 (2001) 2366.
- 15) C. Pigot, A. Hibara, *Anal Chem*, 84 (2012) 2557.