

## 4P070

### 超高感度バイオセンシングを目指した単一微小液滴顕微分光装置の開発 (九大院理) ○迫田憲治, 関谷博

#### A single microdroplet levitation apparatus combined with microscope for ultimate biosensing (Kyushu Univ.) Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya

##### 【はじめに】

直径が数~数十 $\mu\text{m}$ の微小液滴の気液界面において、光の全反射条件が満たされると、微小液滴内で発生した蛍光やラマン散乱光の一部は液滴内部に閉じ込められる。このとき、液滴の外周の長さが光の波長の整数倍に一致すると、液滴内に定在波が形成される。このように、微小液滴は極めて小さな光共振器としての機能をもっており、その性質が詳しく調べられてきた。微小光共振器中では、自由空間と比べて電磁場モードの状態密度分布が変化するため、光と分子の相互作用が大きく変化する場合がある。なかでも興味深いのは、分子（原子）の励起状態準位と真空場との相互作用である自然放出の速度が、微小共振器中では増強されたり抑制されたりする点（Purcell 効果）である。

また、空間中に捕捉された単一微小液滴は、表面張力の働きによってほぼ完全な球体を形成するため、共振器の光閉じ込め能力を表わす Quality factor (Q 値) が極めて高くなる。よって、微小液滴内に溶存する分子を光ポンピングすると、極めて低いしきい値でレーザー発振に至る。これまで、ローダミンのような色素分子に加えて、普通はレーザー媒質とは見なされていない生体分子（ビタミン類や核酸類似分子など）からのレーザー発振も確認されている。よって、微小液滴からの超低しきい値レーザー発振や上述の Purcell 効果を上手く利用することによって、これまでにない感度で生体分子を検出できる可能性がある。我々は最近、超高感度バイオセンシングを目指した単一微小液滴顕微分光装置を開発している。本発表では、実験装置の概要を紹介するとともに、テスト計測として行った単純な色素分子間のフェルスター励起エネルギー移動 (FRET) に関する実験結果について報告する。

##### 【実験装置の概要】

エレクトロスプレー法によって生成した微小液滴（直径 2~10 $\mu\text{m}$  程度）は、平行平板型イオントラップによって空間捕捉される。このとき、微小液滴同士の静電反発によって単一の微小液滴のみがトラップ内に捕捉される。平行平板型イオントラップの内側 2 枚の電極には液滴をトラップするための方形波（1.2~3.0 kV<sub>pp</sub>, 150~1000Hz）を印加し、最下部の電極には重力による落下を補正するための DC 電圧を印加する。最上部の電極は通常、地絡させている。長作動距離の無限遠補正対物レンズを通して微小液滴にレーザーを照射し、液滴からの蛍光やラマン散乱を同じ対物レンズを用いて捕集する。これらはビームスプリッターによって 2 つに分けられる。一方の光は液滴の顕微画像を得るために CMOS カメラに結像され、もう一方の光はスペクトルを計測するために分光器へと送られる。

FRET の実験では、ドナー分子としてローダミン 6G (R6G), アクセプター分子としてローダミン 700 (R700) を用いた。溶媒はメタノールとグリセロールの混合溶媒 (50 vol%) を用いた。

##### 【結果・考察】

図 1 に通常のセルを用いて測定した R6G (ドナー) および R700 (アクセプター) の混合溶液の蛍光スペクトルを示す。図 1 から明らかなように、アクセプター分子の濃度が高くなるにしたがって、560nm

付近に観測されているドナー分子からの蛍光が弱くなっている。これは、電子励起状態において、ドナー分子からアクセプター分子に FRET が生じたため、ドナー分子からの蛍光が消光しているからである。

図 2 に R6G と R700 を含む単一微小液滴 ( $\sim 10\mu\text{m}$ ) の発光スペクトルを示す。図 2(a) は、ドナー分子のみを含む微小液滴からの発光スペクトルであり、600nm 付近に観測されているシャープで強い発光はドナー分子からのレーザー発光である。図 2(b) は、ドナー分子とアクセプター分子を含む微小液滴からの発光スペクトルである。図 2(b) では、550nm から 650nm 付近にかけて、ドナー分子からのブロードな蛍光が観測されているが、図 2(a) で 600nm 付近に観測されていたドナー分子からのレーザー発光は完全に消失している。一方、760nm 付近にシャープな発光が観測されており、これはアクセプター分子からのレーザー発光に帰属できる。図 2(c) および (d) は、アクセプター分子の濃度を増加させたときの発光スペクトルである。図 2(b) と同様にドナー分子からのブロードな蛍光は観測されているが、レーザー発光は完全に消失している。一方、760nm 付近に観測されるアクセプター分子からのレーザー発光は、アクセプター分子の濃度が増加するにしたがって強くなっていることがわかる。

図 3 は、ドナー分子からの蛍光およびレーザー発光強度をアクセプター分子の濃度に対してプロットした図である。赤のプロットは通常の溶液におけるドナー分子からの蛍光強度を示しており、アクセプター分子の濃度が増加するにしたがって、徐々にドナー分子からの蛍光が消光されていることがわかる。一方、青のプロットで示した微小液滴の場合、通常の溶液からの蛍光に比べて、ドナー分子からのレーザー発光が急激に消光されていることがわかる。これは定性的には次のように説明できる。通常、色素分子からのレーザー発光は 4 準位系を用いて説明できるが、その場合、3 番目と 4 番目の準位の間で反転分布が形成されてレーザー発振がおこる。ここで、レーザー発振をしているドナー分子の 3 番目 (あるいは 2 番目) の準位とアクセプター分子との間で FRET が生じると、反転分布を維持することが難しくなり、レーザー発光が消光される。以上の結果は、微小液滴中におけるレーザー発光を用いることで FRET を高感度に検出できることを示している。

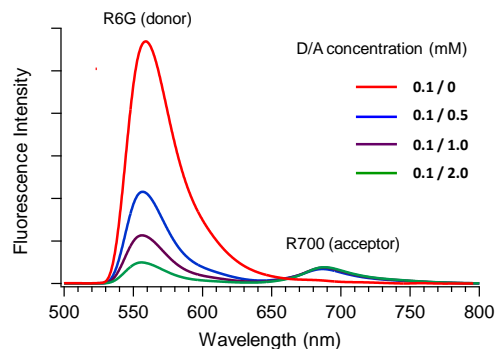


図 1. 532nm の励起波長を用いたときの R6G / R700 混合溶液の蛍光スペクトル。

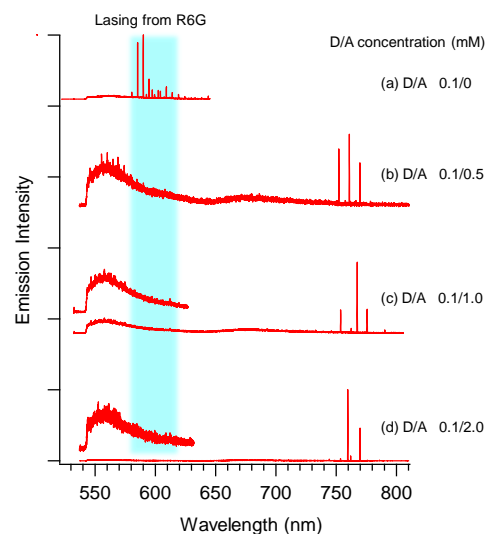


図 2. 微小液滴に溶存した R6G および R700 からの発光スペクトル。

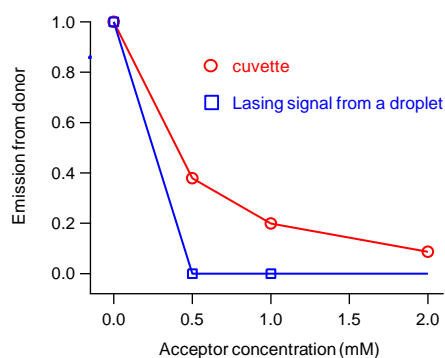


図 3. ドナー分子からの発光強度のアクセプター分子濃度依存性。