

学 位 論 文 題 名

Microspectroscopic Study on Chemical Reactions
in Single-Microparticles under Solution-Flow Conditions

(顕微分光法を用いた溶液フロー条件下での
単一微粒子における化学反応に関する研究)

学位論文内容の要旨

高分子ビーズやマイクロカプセル、油滴・水滴などのマイクロメートルサイズ微粒子は食品、塗料、化粧品など幅広い分野で利用されるだけでなく、化学的にも興味深い対象である。また、生細胞も大きさやかたちの面から一種の微粒子とみなすことができる。従って、微粒子が関わる化学反応の微視的過程を本質的に理解することは、基礎的にも応用の観点からも非常に重要である。これまでに、微粒子の関わる現象は種々の方法により研究されているが、微粒子一個ごとに着目した研究は限られている。そこで本研究では、小型の分離・分析反応場として非常に有用なマイクロ流路を用いた顕微分光システムを作製し、溶液フロー条件下で単一微粒子の化学反応の時間応答を直接測定することにより、微粒子が関わる化学反応や現象に関する、ダイナミクスを含めた詳細かつ新たな知見を得ることを目的とした。

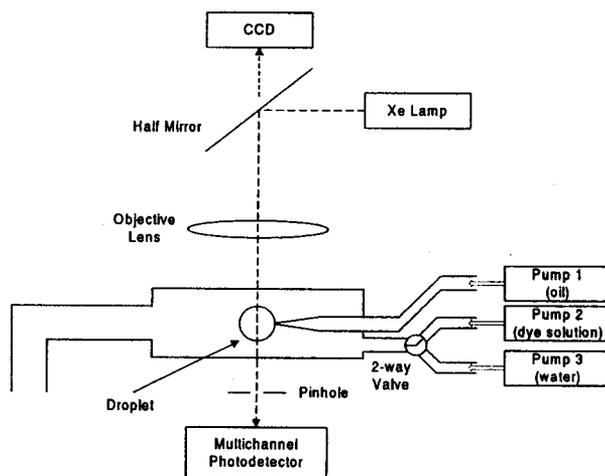
単一イオン交換樹脂への色素吸着反応

マイクロ流路を用いた溶液フロー型の単一微粒子分析システムを作製し、これを用いて単一陽イオン交換樹脂(MCI-GEL)への陽イオン性色素(Rhodamine B, RhB)の吸着過程を直接測定した。光学顕微鏡ステージに設置したマイクロ流路(厚さ 100 μm , 幅 1 mm)を、テフロンチューブによりシリンジポンプと接続した。シリンジポンプにより流路内に樹脂懸濁液をフローし、対物レンズを通して導入したレーザー光(波長 1064 nm)により樹脂 1 個をレーザー捕捉した。他の樹脂は水をフローして排出し、測定対象である樹脂 1 個だけを流路内に残した。ここで三方バルブにより流路を切り替え、RhB 水溶液のフローを開始した。このとき、樹脂に吸着した RhB の吸収スペクトルの時間変化を、顕微吸収法により測定した。得られた結果から、単一樹脂への色素吸着速度を見積もり、吸着速度がフローさせる色素水溶液の流速や濃度に依存することを明らかにした。

単一微小油滴による液/液抽出反応

マイクロ流路を用いた溶液フロー型の単一微小液滴分析システム(図)を作製し、これを用いてリン酸トリブチル(TBP)の単一微小油滴によるアルミニウムキレート錯体(Al-DHAB;

DHAB = 2,2'-dihydroxyazobenzene)の液/液抽出過程を直接測定した。光学顕微鏡下に設置したマイクロ流路(厚さ 400 μm , 幅 1 mm)をガラスキャピラリーによりシリンジポンプ(Pump 1)と接続した。キャピラリー先端はあらかじめ細く加工した(内径 $\sim 1 \mu\text{m}$)。マイクロ流路を水で満たしたのち、キャピラリーに TBP をフローし、その先端に直径 10-100 μm の単一 TBP 油滴を生じさせ、そのまま保持した。ここでマイクロ流路内に Al-DHAB 水溶液をフローし、油滴へ抽出される Al-DHAB の吸収スペクトルの時間変化を、顕微吸収法により測定した。得られた結果から、単一 TBP 油滴への Al-DHAB の抽出速度を見積もることができた。同じサイズの油滴では、抽出速度は Al-DHAB 水溶液の流速に比例して速くなることから、この抽出反応が境界拡散律速過程であることを明らかにできた。また、Al-DHAB 水溶液の流速が同じ場合、油滴のサイズが小さくなると抽出速度が速くなることを示した。これは、油滴サイズの減少に伴い、その体積に対する表面積の割合、すなわち比表面積が増大することによるものであることを明らかにした。



単一細胞の蛍光染色過程

マイクロメートルサイズの微粒子の中でもっとも興味深い分析対象は生細胞である。そこでマイクロ流路を用いた溶液フロー型の単一細胞分析システムを作製し、これを用いて単一酵母細胞(*Saccharomyces cerevisiae*)の蛍光色素 FUN-1 による染色過程を直接測定した。温度制御可能な光学顕微鏡ステージに設置したガラス製のマイクロ流路(厚さ 100 μm , 幅 1 mm)中に酵母細胞懸濁液を導入し、細胞(大きさ $\sim 10 \mu\text{m} \times \sim 6 \mu\text{m}$)を流路底面に付着させた。ここでマイクロ流路内に FUN-1 水溶液をフローし、FUN-1 で蛍光染色された単一細胞の蛍光スペクトルの時間変化を顕微蛍光法により直接測定した。あらかじめエタノールにより固定化した細胞は FUN-1 により染色されると緑色の蛍光(極大波長 $\sim 545 \text{ nm}$)を発した。一方、生細胞(エタノール未処理)も FUN-1 により染色されると始めは緑色の蛍光を発したが、細胞内で FUN-1 が代謝されるため、時間とともに赤色の蛍光(極大波長 $\sim 600 \text{ nm}$)を発するようになった。この蛍光スペクトルの時間変化率をもとに単一細胞の代謝速度の指標となる値を見積もり、代謝速度が温度に依存することを明らかにした。

本論文では、マイクロ流路を用いた顕微分光システムを作製し、溶液フロー条件下で単一微粒子の化学反応の時間変化を直接測定した。その結果、イオン交換樹脂への色素吸着速度、油滴による液/液抽出速度、細胞の代謝速度など、これまで多数の微粒子の平均値としてしか報告されていなかった化学反応の速度を、単一微粒子の測定結果にもとづき初めて見積もるとともに、単一微粒子分析における本システムの有用性を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜多村 昇
副 査 教 授 佐々木 陽 一
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 下 村 政 嗣

学 位 論 文 題 名

Microspectroscopic Study on Chemical Reactions in Single-Microparticles under Solution-Flow Conditions

(顕微分光法を用いた溶液フロー条件下での
単一微粒子における化学反応に関する研究)

高分子ビーズやマイクロカプセル、油滴・水滴などのマイクロメートルサイズ微粒子は食品、塗料、化粧品など幅広い分野で利用されるだけでなく、化学的にも興味深い対象である。また、生細胞も大きさやかたちの面から一種の微粒子とみなすことができる。従って、微粒子が関わる化学反応の微視的過程を本質的に理解することは、基礎的にも応用の観点からも非常に重要である。これまで微粒子が関わる現象は種々の方法により研究されているが、微粒子一個ごとに着目した研究は限られている。

本研究は、小型の分離・分析反応場として非常に有用なマイクロ流路を用いた顕微分光システムを新たに作製し、溶液フロー条件下においてイオン交換樹脂、油滴、生細胞などの単一微粒子の化学反応の時間応答を直接測定することにより、微粒子が関わる化学反応や現象に関する、ダイナミクスを含めた詳細かつ新たな知見を得ることを目的としたものである。

第1章では、単一微粒子の分析に関わるこれまでの研究例を概観するとともに、単一微粒子分析の重要性を述べている。また、そのための新たな研究の着眼点とアプローチについて詳細に述べている。

第2章では、マイクロ流路を用いた溶液フロー型の単一微粒子分析システムを作製し、これを用いて単一陽イオン交換樹脂への陽イオン性色素(Rhodamine B, RhB)の吸着過程を直接測定した結果について述べている。光学顕微鏡ステージに設置したマイクロ流路をシリンジポンプと接続する。シリンジポンプにより流路内に樹脂懸濁液をフローし、対物レンズを通して導入したレーザー光により樹脂1個をレーザー捕捉する。他の樹脂は水をフローして排出し、流路内に測定対象である樹脂1個だけを残すことができる。RhB水溶液のフローを開始し、樹脂に吸着したRhBの吸収スペクトルの時間変化を顕微吸収法に

より測定する手法を確立した。このような実験から、単一樹脂への RhB の吸着速度を見積もり、吸着速度が RhB 水溶液の流速や濃度に依存することを明らかにした。

第3章では、マイクロ流路を用いた溶液フロー型の単一微小液滴分析システムを作製し、これを用いて単一リン酸トリブチル(TBP)微小油滴によるアルミニウムキレート (Al-DHAB; DHAB = 2,2'-dihydroxyazobenzene)の液/液抽出過程を直接測定した結果について述べている。光学顕微鏡下に設置したマイクロ流路にガラスキャピラリーを介してシリンジポンプと接続する。キャピラリー先端はあらかじめ細く加工する(内径 $\sim 1 \mu\text{m}$)。マイクロ流路を水で満たしたのち、キャピラリーに TBP をフローし、その先端に直径 10-100 μm の単一 TBP 油滴を生じさせ、そのままこれを保持する。ここでマイクロ流路内に Al-DHAB 水溶液をフローし、油滴へ抽出される Al-DHAB の吸収スペクトルの時間変化から TBP 油滴への Al-DHAB の抽出速度を見積もることが可能であることを示した。抽出速度は Al-DHAB 水溶液の流速に比例して速くなることから、抽出過程は境界拡散律速過程であることを明らかにするとともに、抽出速度は油滴サイズに依存することを示した。さらに、第4章では、第3章における実験で見出した単一微小油滴の自励発振現象の特徴とその機構について詳細に議論している。

第5章では、マイクロ流路を用いた溶液フロー型の細胞分析システムを作製し、これを用いて蛍光色素による単一酵母細胞の染色過程を直接測定した結果について述べている。温度制御可能な光学顕微鏡ステージに設置したガラス製のマイクロ流路中に酵母細胞懸濁液を導入し、細胞を流路底面に付着させる。ここでマイクロ流路内に色素水溶液をフローし、染色された単一細胞の蛍光スペクトルの時間変化を顕微蛍光法により直接測定している。あらかじめエタノールにより固定化した細胞は色素により染色されると緑色の蛍光を発するが、生細胞(エタノール未処理)では染色されると緑色から赤色の蛍光を発するようになることを示した。これにより、温度依存生を含めた、細胞内における蛍光色素の代謝過程を詳細に議論することに成功している。

第6章では、本研究で得られた結果を総括するとともに、研究の展望についても言及している。

これを要するに、著者はマイクロ流路を用いた新しい顕微分光システムを作製し、溶液フロー条件下において単一微粒子の化学反応の時間変化を直接測定することに成功している。更に、これに基づきイオン交換樹脂への色素吸着速度、油滴による液/液抽出速度、細胞の代謝速度など、これまで多数の微粒子の平均値としてしか報告されていなかった化学反応の速度を、単一微粒子の測定結果にもとづき初めて見積もり、単一微粒子分析における本システムの有用性を明らかにした。以上の結果は、微粒子に関わる分析化学、コロイド化学などの研究分野にとって極めて重要な手法と知見を与えるものである。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。