

近接場光学顕微鏡用機能性プローブの開発

Development of functional probes for near-field optical microscope

研究代表者 神奈川科学技術アカデミー 研究員 栗原 一嘉
Kanagawa Academy of Science and Technology,
Kazuyoshi Kurihara

Functional probes for near-field optical microscope, especially chemical sensing probes, are described. The probe has a micrometer-sized ion-selective sensor on the tip of an optical fiber probe. The sensor is a plasticized poly(vinyl chloride) membrane incorporating a neutral ionophore and an anionic dye. It works on the fluorescence mode of the ion exchange principle. The 3- μm -sized chemical sensing probe based on a sodium-selective tailed-ionophore was prepared with the micropipette fixation method and characterized with time-resolved photon-counting method. The dynamic responses were analyzed with theoretical calibration curve.

1. 研究目的

近接場光学顕微鏡は、従来の光学顕微鏡の空間分解能の限界を超える光学顕微鏡として最近注目されている。近接場光学顕微鏡を使うと、回折限界に制限されないイメージングや局所分光が可能になる。本研究では、機能を持ったプローブを作成することにより、近接場光学顕微鏡の応用範囲を拡大することを目指す。特に、化学センシングの機能を持つプローブを詳細にする。このような化学センシング・プローブを用いれば、生きた細胞内の生体内の生体物質の分布や、局所的な生体物質の時間変化を測定できる。

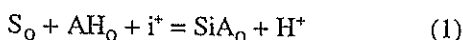
2. 研究経過

2.1 マイクロピペット固定化法

近接場光学顕微鏡に使う光ファイバー・プローブ作成法の一つは、通信に使われる光ファイバーをレーザー・プレーを使って融解しながら引くことにより先鋭化する方法である。このプローブ先端に機能性材料を固定する方法は、今まで光重合を使う方法しか知られていなかった。今回我々が提案する方法は、生命科学の分野、特に、遺伝子組み換えで使われている方法を応用することである。それは、マイクロピペットをマイクロマニピュレータで操作することにより、1 μm 寸法程度の機能性材料をプローブ先端に固定化する。この方法は、材料の粘性にも依存するが、0.3 μm から 10 μm 以上の機能性材料を固定化することを可能とする。

2.2 化学センシングの原理

マイクロピペット固定化法は、固定する化学センシング材料を制限する。その制限された材料の中で有望なセンシング材料は、可塑化ポリ塩化ビニル膜などの油相膜に基づいたイオンセンサーである。油相膜には、イオンを選択的に検出するイオノフォア S とアニオン性蛍光色素 AH が含まれており、イオン交換原理に基づく蛍光変化によりイオン濃度をモニターする。化学式で記述すると、



となる。ここで、下付き文字 o は油相中に存在すること、 i^+ は検出対象イオン、 H^+ は水素イオン、 SiA は会合体を意味をする。式(1)の熱平衡定数 K 、膜中のイオノフォア S の濃度 $[S]$ 、色素の濃度 $[C]$ 、色素 AH の脱プロトンの割合 α 、水溶液の水素イオン濃度 $[H^+]$ とすると、水溶液中の検出対象イオン濃度 $[i^+]$ は、

$$[i^+] = [H^+] \alpha \{ K (1 - \alpha) ([S] - [C] \alpha) \}^{-1} \quad (2)$$

と書ける。蛍光強度 F を検出する場合、 α は、

$$\alpha = \frac{F - F_N}{F_A - F_N} \quad (3)$$

で与えられる。ここで、 F_N はアニオン性色素がすべて中性型の場合の蛍光強度、 F_A はアニオン性色素がすべてアニオン型の場合の蛍光強度を示す。式(3)を式(2)に代入すれば、蛍光強度によりイオン濃度を検出する場合の応答理論式

$$[i^+] = \frac{[H^+]}{K_{\text{exch}}} \times \frac{(F - F_N)(F_A - F_N)}{(F_A - F)}$$

$$\frac{1}{([S_{\text{tot}}]F_A + ([A_{\text{tot}}] - [S_{\text{tot}}])F_N - [A_{\text{tot}}]F)} \quad (4)$$

が得られる。

2.2 化学センシング材料

可塑化ポリ塩化ビニル膜として、66wt% の可塑剤 bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS) と 33wt% のポリ塩化ビニル (PVC) を主成分とするコポリマー (OH-PVC) を混合したものを使用した。OH-PVC の成分は、90wt% の塩化ビニル、6wt% のビニルアルコール、4wt% のビニルアセテートからなるコポリマーである。PVC の代わりに OH-PVC を用いたのは、光ファイバプローブの先端にセンシング材料を吸着するのを容易にするためである。イオノフォアとして、クラウンエーテル、tetradecyl-doubletetrathemethyl-16-crown-5 (C14-DTM16C5)、アニオン色素は、4',5'-dibromofluorescein-octadecyl-ester を用いた。図 1 に、クラウンエーテル C14-DTM16C5 の化学構造式を示す。このイオノフォアはナトリウムをキャビティーの中に取り入れ、分子認識

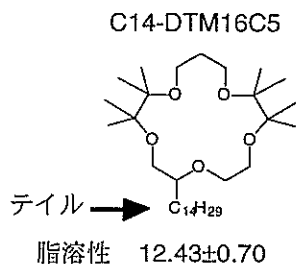


図1. ナトリウムに選択性のあるイオノフォアの化学構造式。ナトリウムをキャビティー内に取り込むことにより分子認識する。テイルが、微小化による溶出を減少させている。

をする。そして、ナトリウムに対し、他のイオンと比較して、100 倍以上の選択性を持つ。クラウンエーテルのテイルは、脂溶性を高めるとともに、 μm 寸法における溶出を防ぐ役割を果たしている。

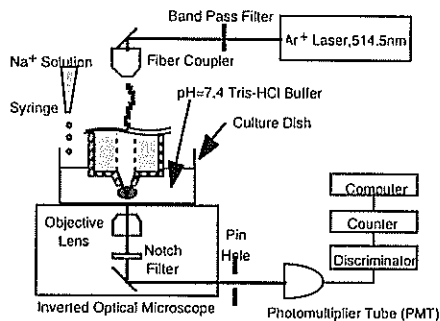


図2 実験配置

2.3 測定装置

図2に、測定系を示す。溶液系は、化学センシング・プローブの先端が、倒立顕微鏡上の pH=7.4 の Tris-HCl 緩衝溶液が入った容器に浸されており、スポイトにより Na^+ 溶液を加えることにより容器の Na^+ 濃度を変化させる。一方、光学系は、光源として Ar^+ レーザー 514.5nm を使い、ファイバーカップラーにより化学センシング・プローブの光ファイバーに光を入れる。レーザー光は光ファイバーを伝播し、化学センシング・プローブのセンサー部の色素を励起する。色素の蛍光は、倒立顕微鏡の対物レンズにより集光し、フィルターによりレーザー光をカットした後、フォトンカウンティングにより計測される。 Na^+ 溶液を加えるとき、懐中電灯を用いて、滴下を確認しているため、滴下の印として懐

中電灯の光が信号に乗っている。

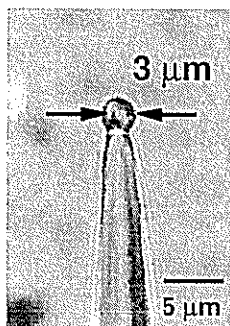


図3 3 μm 寸法の化学センシングプローブの光学顕微鏡写真

3. 研究成果

3 μm 寸法の化学センシング・プローブをマイクロピペット固定化法により作成した。図3に、光学顕微鏡による写真を示す。光ファイバー・プローブの先端に 3 μm 寸法のセンシング材料が固定されていることが確認できる。光ファイバー・プローブには、金属コーティングやシラン化処理など

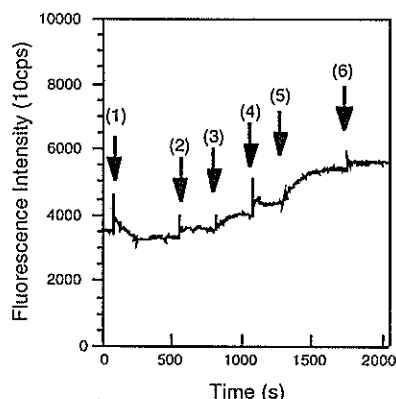


図4 Na^+ 濃度変化に対する 時間応答。溶液は pH 7.4 の緩衝溶液で、 Na^+ 濃度は、初期 0M; (1) $3.8 \times 10^{-4} \text{M}$; (2) $4.1 \times 10^{-3} \text{M}$; (3) $2.2 \times 10^{-2} \text{M}$; (4) $4.0 \times 10^{-2} \text{M}$; (5) $1.9 \times 10^{-1} \text{M}$; (6) $2.9 \times 10^{-1} \text{M}$ 。

は行われていない。図4は、ナトリウムイオンに対する時間応答である。矢印においてナトリウムイオンが変化をしている。応答時間は、10秒から200秒であり、濃度に依存している。図5は、ナトリウムイオンに対する光学応答を、理論式(5)でフィティングしたものである。パラメータは、 $F_N=3.2 \times 10^4$ 、 $F_A=6.2 \times 10^4$ 、 $K_{\text{exch}}=2.65 \times 10^{-5}$ である。また、DOSの比重 0.914 g/cm^3 、アニオン色素の分子量 742.59 を使った。データ点と理論曲線の一致は、理論式(5)が光学応答を良く説明をしていることを示している。これは、理論モデルの妥当性を示すものである。

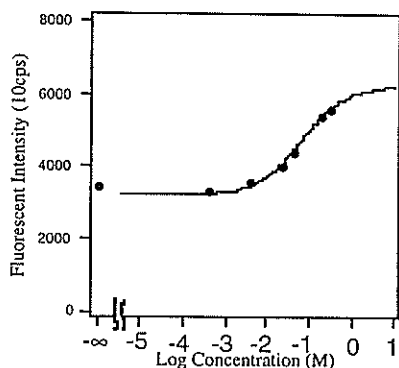


図5 Na^+ 濃度変化に対する光学応答と校正曲線。

4. 今後の課題と発展

ナトリウムイオンに対して選択性のある化学センシングプローブを、 $3 \mu\text{m}$ 寸法において作成し、時間分解単一光子測定を行った。本実験における可塑化塩ビ膜に基づくセンシング機構の理論を展開し、実験より得られた光学応答を十分に説明をした。 $3 \mu\text{m}$ 寸法より小さい化学センシングプローブには、可塑剤の溶出などを解決する

必要がある。

今後の展開として興味深いのは、サブミクロン寸法の化学センシングプローブを作成すること、そして、イオノフォアを交換することにより他のイオンに選択性のある化学センシングプローブを作成すること、この2つである。

5. 発表論文リスト

[1]K.Kurihara et.al, Anal.Chem., submitted.

[2]K.Kurihara, Chap.7 in *Near-field nano/atom optics and technology* edited by Ohtsu,M.; Springer, 1998.

[3]栗原一嘉 他、近接場光学研究グループ第7回研究討論会予稿集、1998、p78-p82.

[4]K.Kurihara et.al. the proceedings of Europt(r)ode IV, 1998, p49-50.

[5]栗原一嘉 他、近接場光学研究グループ第6回研究討論会予稿集、1997、p22-p27.