

研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

1. 研究課題名

SHG 顕微鏡とナノ・マイクロ力学試験を融合した非接触光応力測定

2. 研究代表者

吉木 啓介（兵庫県立大学大学院 工学研究科 助教）

3. 研究シーズ探索成果の概要

電気化学法により作製した太さ $100\ \mu\text{m}$ 程度のコラーゲン線維 electrochemically aligned collagen (ELAC) を, Spring-8 による小角 X 線散乱構造解析による評価を行うことで, 組織コラーゲンとの比較を行った. その結果, 架橋による結晶性の欠如が観測されたため, 新たに架橋剤を導入した. また, 結晶性の欠如したコラーゲンにおいても SHG (第 2 高調波発生) を確認した.

次に, シリコン製のマイクロ引張試験機に把持するため, マクロスケールにおいてシランカップリング剤によるコラーゲン線維とシリコンの接着に成功した. また, この線維を SHG (第 2 高調波発生) 顕微鏡上で引張試験し, 歪による SHG 光強度の変化を観察した. このようなマクロスケールでの個別検討の成果をもとにマイクロ力学試験機の設計に改良を加えた. また, 歪分布計測システムの感度を調査し, サブ μm の伸縮変形と 1.6° 以上のねじれ変形の検出を確認した. 課題として, 把持力の強化をさらに行う必要がある.

4. 研究シーズ探索のねらい

本研究は生体組織中の内部応力を非接触, 非侵襲に計測する応力顕微鏡の開発を目的とする. 具体的には, 任意の太さのコラーゲン線維を作成, 把持し, 微小力学試験器によって応力負荷を与えたコラーゲン線維を SHG 光学顕微鏡で観察することにより, 応力-歪み線図と SHG 光信号の相関を求め, SHG 顕微画像を応力分布画像に変換する. また, 高分子の不均質な変形を可視化する歪み分布計測システムを開発し応力-歪み線図の正確さを確保する.

5. 研究シーズ探索の方法と成果

5.1 方法

μm サイズのコラーゲンの引張試験をシリコンチップ上で行うため, ①電気化学的に生体組織に近いコラーゲン線維を生成し, 形状を制御する手法を開発した. また, ②マイクロ引張試験機の設計を行い, コラーゲン線維の把持に必要な接着法を確立した. そして, μ チップ上で SHG を観察するための SHG 顕微鏡を構築し, 光源であるフェムト秒レーザーの構築も行った. また, コラーゲンの変形は不均一であることが予想されるため, ④構築した顕微鏡に偏光モード変換器 (PMC: polarization mode converter) を装着し, 単一分子配向計測を用いて局所的変位を求める機能を実装した.

①コラーゲン線維の電気化学的生成

コラーゲン溶液中に電圧を印加することにより電極間に生じる pH 勾配によってコラーゲンを発生の. マイクロデバイスを設計する前に, マクロスケールでコラーゲンを作成し, 構造の評価を

行った。構造の評価は、偏光顕微鏡、小角 X 線散乱(SAXS: small angle X-ray scattering), SHG 顕微鏡によって行い、生体内コラーゲン(牛筋肉)との違いを調査した。

次に任意の位置に丸形断面をもつコラーゲンを生成するためのデバイスを考案した。

②コラーゲン線維のマイクロ引張試験デバイスの開発

コラーゲンの引張試験を行うためのマイクロデバイスを考案した。本デバイスは引張試験時のコラーゲンの伸びと引張力の変化を計測することができる。また、試験片はデバイス内で電気化学法による生成を行うものとした。

③顕微鏡装置開発

フェムト秒 Ti:S レーザーの構築

SHG は入射光強度の 2 乗に比例するため、高強度なフェムト秒チタンサファイアレーザーを励起光源として構築した。使用したレーザーは半導体励起固体レーザーを励起光源とし、高安定な空気ばね除振台上に共振器を構築した。

532nm の励起レーザー光はチタンサファイア結晶に集光し、発生した近赤外光を共振器により増幅したその結果、エネルギーの変換効率は 10% となった。次にプリズムペアの挿入によって屈折率分散を補正し、パルシングを確認した。レーザーの外観、および光学配置を Fig. 1 に示す。中心波長は 796nm, パルス列の周波数は、86MHz となった。

レーザー走査顕微鏡の構築

このレーザーを顕微鏡に導入し SHG 顕微鏡を構築した。SHG 顕微鏡はレーザー走査が必要なため、そのための光学設計を行った。顕微鏡側の結像レンズは変更不可能なため、走査ミラー側の結像凹面鏡の焦点距離を 650mm とすることで走査光学系を構築した。

また、試料上の集光点から発生した SHG 光は、反射、透過、両方で検出す仕様とした。検出器は冷却式高電子増倍管を用い、構造化が不完全なコラーゲンゲルからの SHG 光も検出可能な仕様とした。SHG 光強度は、AD ボードで集録し、走査ミラーの制御情報を用いて画像化した。

④歪分布計測法の開発

SHG 顕微鏡に PMC を挿入することによって、コラーゲン上の歪分布を計測するための変位検出を実現した。PMC は大阪大学において、研究代表者らが開発した偏光デバイスで、現在製品化に取り組んでいる。顕微鏡上の試料に蛍光分子を単一分子状態で散布することで位置を検出するマーカーとする。マーカーからの蛍光は対物レンズによって受光されるが、レンズ瞳面での偏光分布(偏光モード)はマーカーの立体的な分子配向に依存する。PMC はこの偏光モードを選別する偏光モードゲートとして機能する。そのため、マーカーの分子配向の x, y, z 成分を検出することができるため、分子の座標はもちろん、立体配向も位置情報として検出できる。これらの情報を

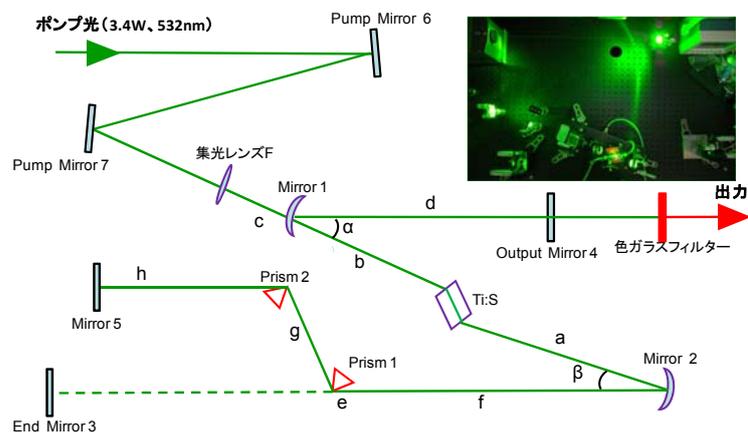


Fig. 1 フェムト秒チタンサファイアレーザー

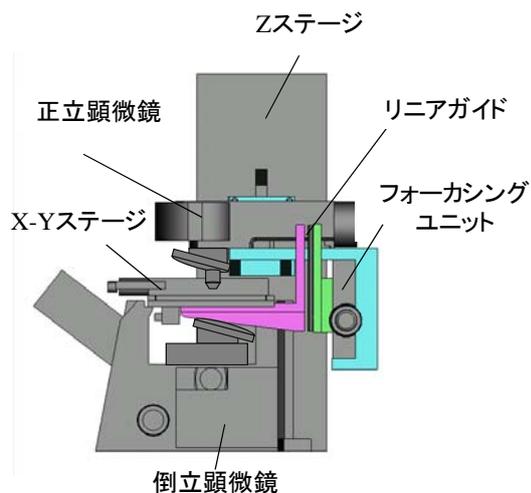


Fig. 2 倒立-正立顕微鏡

散布した分子一つ一つについて解析することでローカルな伸び、ねじり等の変形を評価することができる。本実験では、分子1つに着目し、コラーゲン分子の代わりにマイクロシリコン梁を使用し、ねじりを加えた時の変形に対する感度を計測した。

5.2 成果

① 電気化学法によって作成されたコラーゲン線維と生体の腱組織のコラーゲンの電子顕微鏡像と SAXS による構造解析結果を Fig. 3 に示す。電気化学法による生成のみでは、配向は確認されたものの、腱に見られるような結晶性は確認することができなかった。これは、コラーゲン内に架橋反応が生じていないためにおこる。そこで、天然の架橋剤であるゲニピン溶液に浸漬することで架橋構造を作成することにした。また、これらの線維を SHG 顕微鏡観察したところ、架橋剤処理していないゲルからも SHG の発生が確認された。

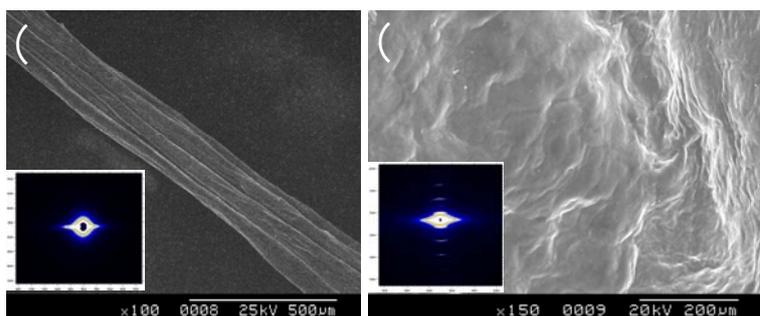


Fig. 3 (a)電気化学法, (b)腱のコラーゲン SEM 画像と SAXS 像

次に、マイクロデバイス上でコラーゲンを生成するための電極形状を考案した。対向する2電極を用いた場合、電圧勾配は直線的となり、シート状のコラーゲン線維ができる。引張試験のために円筒状の線維が望ましいため、多電極を用いたコラーゲン線維の作製手法を考案した。

② ねじり試験機の光学系を Fig.4 に示す。この試料にねじり変形を加え、変形前後のマーカの座標と向きを計測した。その結果、Fig. 5に示すとおり、x, y, z方向にそれぞれ $1\mu\text{m}$, $11\mu\text{m}$, $4.2\mu\text{m}$ の変位を検出し、そこから予想される 1.6° のねじれ変形も、面外配向の大きさを表わすパラメーターの変化によって検出が可能であることが明らかとなり、高い感度を持つことが分かった。

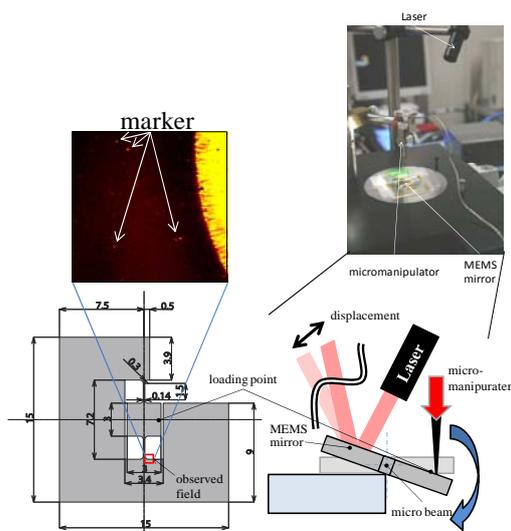


Fig. 4 ねじり試験機

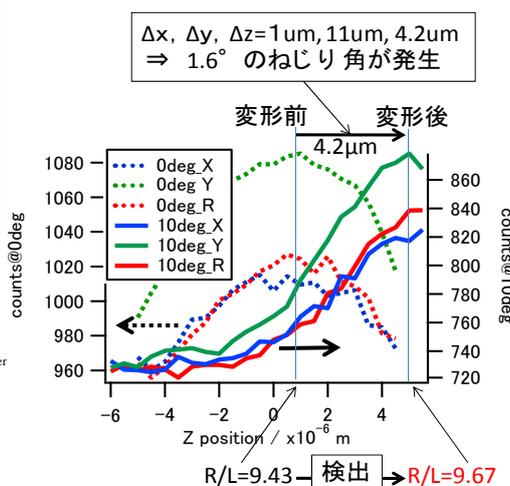


Fig. 5 変形後の蛍光強度変化

このように、各要素技術の開発、検証は終了し、これらを組み合わせることで、応力顕微鏡の実現の可能性は高いと考えている。

6. 自己評価

研究の進行は極めて順調である。コラーゲンの生成、把持のマクロスケールでの検証が終わり、これらの結果からマイクロスケールへの移行対策も練り、当初の設計案から大きく改善された。ただ、実験資材(SOI ウェハ)、実験施設(Spring-8, ICP-RIE 装置等)の利用スケジュールの確保に時間がかかり、マイクロデバイスの作製の段階で期間終了となったことが残念である。しかし、これらも間もなく利用可能となり、本年度中にはマイクロ力学試験を SHG 顕微鏡下で行うことができる。デバイス設計においては、断面形状が制御可能なコラーゲン線維生成法を提案し、特許取得も含めて検討を進めている。

本研究の特徴の一つは、顕微鏡、マイクロデバイス共に自作した点である。軌道に乗るまでに時間がかかるが、その代わり細かい仕様の変更に柔軟に対応することができるため、より質の高い実験を行う事が出来る。特に顕微鏡は顕微鏡の基礎性能の充実はもちろん、独自技術である PMC の実装が可能なおうえ、ラマン、SHG、二光子蛍光等、様々な顕微観察に対応可能な柔軟性を兼ね備えている。顕微鏡を自作できる研究室は限られており、ハードな利用に耐えられる顕微鏡はさらに限られる。本顕微鏡は一発データで終わることなく、多くのデータから信頼性の高い結論を得るために最適の装置として完成した。

7. PO の見解

本研究は光に対する分子の非線形応答を利用し分子配列を観測する SHG 顕微鏡を用いて、生体組織内の応力を観測する装置の開発を目指したものである。応力顕微鏡の構築に求められる光源、立体配向顕微鏡、マイクロ引張試験機等を製作した。コラーゲン試料を用いた実験により、引張り変形と SHG の発生効率に明らかな違いが観測でき、応力変化を捉えることができた。また、生体分子の高次構造を高空間分解能で観測できる可能性があり、小角 X 線散乱観測データとの比較から、それと同等のダイナミックレンジを持つことが示された。

生体内自己組織化と応力の関係を明らかにしており、応用分野は広い。コラーゲンに電解をかけ捻れをつくり繊維としたり、光と力の相互変換機構を用いて生体医用の製品開発などが期待できる。医学、生命科学分野の計測技術開発であり、分野融合の観点からは基礎技術と応用分野の連携で、広く応用を巻き込んだ技術となることを期待する。

8. 研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)口頭発表

①学会

国内 1件、海外 1件

・吉木啓介, 増田恭佑, 橋本守, 橋本信幸, 栗原誠, 生津資大, 井上尚三『立体配向顕微鏡を用いた非接触・非破壊歪み計測』日本機械学会 2010 年度年次大会 (2010)

・K. Yoshiki, S. Yoshida, T. Namazu, N. Araki, M. Hashimoto, M. Kurihara, N. Hashimoto, S. Inoue, "Microscopic Measurement of Strain Distribution on MEMS Device using Three Dimnsional Orientation Microscope", IEEE MEMS2011, (採択)

②その他

国内 0 件, 海外 0 件

(4) その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

なし