

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号

WO 2010/041560 A1

(43) 国際公開日
2010年4月15日(15.04.2010)

PCT

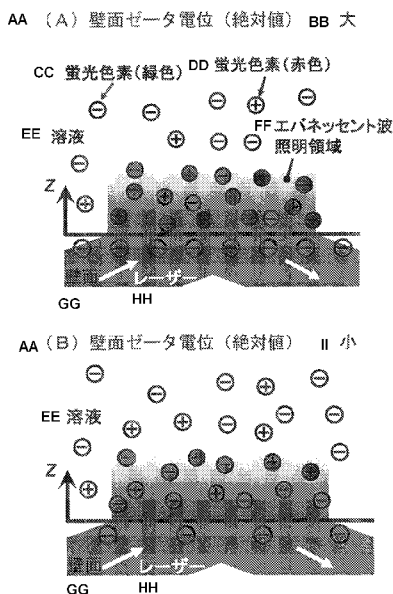
- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) G01K 11/20 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/066652
- (22) 国際出願日: 2009年9月25日(25.09.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-263639 2008年10月10日(10.10.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人 慶應義塾 (Keio University) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤 洋平 (SATO, Yohei) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉三丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 嘉副 裕 (KAZOE, Yutaka) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉三丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 宮川 修 (MIYAKAWA, Shu) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉三丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 高矢 諭, 外 (TAKAYA, Satoshi et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木二丁目10番12号 南新宿ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: QUANTITATIVE EVALUATION METHOD AND DEVICE FOR ZETA POTENTIAL, pH OR TEMPERATURE DISTRIBUTION AT WALL SURFACE, AND QUANTITATIVE VISUALIZATION METHOD AND DEVICE FOR SURFACE MODIFICATION

(54) 発明の名称: 壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価方法、装置、及び、表面修飾の定量的可視化方法、装置

[図1]



- AA Wall surface zeta potential (absolute value)
- BB Large
- CC Fluorescent dye (green)
- DD Fluorescent dye (red)
- EE Solution
- FF Evanescent wave
- GG Wall surface
- HH Laser
- II Small

(57) Abstract: Multiple fluorescent dyes having different amounts of charge or charge characteristics and different fluorescent wavelengths are mixed into a solution, and the solution is allowed to flow over a surface to be measured. The fluorescent intensity distribution of multiple colors corresponding to the concentration distribution of the individual fluorescent dyes is produced by exciting the surface to be measured using an evanescent wave. The ratio of the fluorescent intensities of the multiple colors is calculated by measuring the fluorescent intensity at the surface to be measured using a two-dimensional imaging element that can be obtained by separating the intensities of the multiple fluorescent colors by color, and the ratio is converted into the two-dimensional distribution of zeta potential, pH or temperature at the wall surface using a relational expression, which has been formulated beforehand, between the ratio of the fluorescent intensities and the zeta potential, pH or temperature at the wall surface. Thus, surface modification or the two-dimensional distribution of zeta potential, pH or temperature at the wall surface can be visualized in real time, and can also be evaluated quantitatively.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2010/041560 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数の蛍光色素を溶液に混入させ、該溶液を測定対象面に流し、前記測定対象面をエバネッセント波によって励起することにより、各蛍光色素の濃度分布に応じた複数色の蛍光強度分布を生成させ、前記蛍光の複数色の強度を各色に分離して取得可能な 2 次元撮像素子を用いて、測定対象面の蛍光強度を測定することにより、前記複数色の蛍光強度の比を計算し、あらかじめ作成しておいた、前記蛍光強度の比と壁面におけるゼータ電位、pH 又は温度との関係式を使って、壁面におけるゼータ電位、pH 又は温度の 2 次元分布に変換する。これにより、壁面におけるゼータ電位、pH 又は温度の 2 次元分布や表面修飾をリアルタイムに可視化し、更に定量的に評価可能とする。

明 細 書

発明の名称：

壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価方法、装置、及び、表面修飾の定量的可視化方法、装置

技術分野

[0001] 本発明は、壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価方法、装置、及び、表面修飾の定量的可視化方法、装置に係る。特に、細胞生物分野、電気化学分野、マイクロ・ナノスケール熱流体工学分野に用いるのに好適な、壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価方法、装置、及び、これを利用した表面修飾の定量的可視化方法、装置に関する。

背景技術

[0002] 表面科学の分野において、吸着性や濡れ性といった物質表面の性質について多くの研究が行われてきた。更にSAMs (Self-assembled monolayers) (Whitesides, G. M. et al., Annu. Rev. Biomed. Eng., 3, 335-373, 2001. [以下、非特許文献1] 参照) と呼ばれる、有機物の単分子膜を物質表面に形成させる表面修飾技術が考案され、物質表面の性質を能動的に変化させる試みも多く行われてきた。

[0003] 近年、試料の分離・混合・反応・検出といった機能を集積化したマイクロ流体デバイスの発展に伴い、固液界面の電位であるゼータ電位 (Kirby, B. J. et al., Electrophoresis, 25, 187-202, 2004. [以下、非特許文献2] 参照) が、これらの動電学を利用したデバイスの性能を決定する重要なパラメータの一つとなった。電気化学、生物化学の分野では、マイクロ流体デバイス内に表面修飾をパターン状に施し、濡れ性や物質吸着性を制御する研究が盛んに行われている。

[0004] こうした物質表面に関する研究を受けて、表面の性質を評価しようとする計測技術が考案されてきた。電子顕微鏡を用いて物質表面の構造を可視化し

た手法 (Lopez, G. P. et al., *Langmuir*, 9, 1513-1516, 1993. [以下、非特許文献3] 参照)、SAMsの膜厚や内部に含まれる分子の種類によって表面修飾を評価する手法 (Yang, X. M. et al., *Appl. Phys. Lett.*, 69(26):4020-4022, 1996. [以下、非特許文献4] 参照)、あるいは、濡れ性を用いて表面の性質を評価した手法 (Lopez, G. P. et al., *Science*, 260, 647-649, 1993. [以下、非特許文献5] 参照) などが提案されてきた。

- [0005] 前記のようなマイクロ流体デバイスの性能評価や最適設計に向けて、デバイス内流路表面のゼータ電位の定量的な計測が有効である。即ち、デバイス内流路の壁面に施された表面修飾パターンや、液体試料混合により発生するゼータ電位の2次元分布を定量的に可視化すれば、デバイス性能への寄与を評価することが可能となる。
- [0006] 従来までのマイクロ流動場におけるゼータ電位の計測法としては流動電位法 (Oldham, I. B. et al., *J. Colloid Sci.*, 18, 328-336, 1963. [以下、非特許文献6] 参照)、電流モニタリング法 (Sze, A. et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 261, 402-410, 2003. [以下、非特許文献7] 参照)、あるいは、電気浸透流速度を計測してHelmholtz-Smoluchowskiの式を用いて算出する方法 (Sinton, D. et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 254, 184-189, 2002. [以下、非特許文献8] 参照) などが考案されてきたが、いずれも流路全体の平均としてのゼータ電位の計測法であった。
- [0007] 一方、発明者のうち二人が開発したナノ・レーザ誘起蛍光法 (Kazoe, Y. and Sato, Y., *Anal. Chem.*, 79, 6727-6733, 2007. [以下、非特許文献9] 参照) によって、初めてデバイス内におけるゼータ電位の2次元分布の計測が可能となった。このナノ・レーザ誘起蛍光法は、水溶液中で陰イオン化する蛍光色素 (赤色)、および屈折率の異なる界面における光の全反射によって発生するエバネッセント波 (Axelrod, D. et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 13, 247-268, 1984. [以下、非特許文献10]、特開2007-85915号公報 [以下、特許文献1] 参照) を用いている。エバネッセント波は、強度が界面からの距離に対して指数関数的に減衰するため、これを流路

壁面において発生させることにより、壁面からの距離数百ナノメートル程度の壁近傍の範囲を照明することができる。蛍光色素を水溶液に混入して流路内に流入すると、負極に帯電した蛍光色素の壁面近傍の濃度分布は、壁面ゼータ電位に依存して変化する。よって、エバネッセント波により励起した際の蛍光強度もゼータ電位に依存する。従って、蛍光強度の分布からゼータ電位分布を知ることができる。

[0008] なお、ゼータ電位以外にも、pHの分布を得る技術が、J. Coppeta et al., Experiments in Fluids 1-15, 1998 [以下非特許文献11]に記載され、温度の分布を得る技術が、Y. Sato et al., Meas. Sci. Technol. 14, 114-121, 2003 [以下、非特許文献12]に記載されている。

[0009] 前記ナノ・レーザ誘起蛍光法によりゼータ電位の2次元分布を取得するためには、CCDカメラにより蛍光強度画像を取得するが、取得画像は励起光強度の分布に起因する蛍光強度分布を含んでいるため、リファレンス画像を取得して補正を行う必要がある。そのため、CCDカメラで撮像される画像自体からはゼータ電位の2次元的な分布を可視化することは困難であり、リアルタイムでの計測には不向きである。また計測位置や流路形状が異なる際においても再度補正を行う必要があり、位置のずれに起因する計測誤差や、計測手法の煩雑さなどに難点があった。

発明の開示

[0010] 本発明は、前記従来の問題点を解消するべくなされたもので、マイクロ流体デバイス内等における壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の2次元分布や表面修飾を、リアルタイムに可視化し、更に、定量的に評価可能とすることを課題とする。

[0011] 本発明は、壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価に際して、

帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数の蛍光色素を溶液に混入するステップと、

該溶液を測定対象面に流すステップと、

前記測定対象面をエバネッセント波によって励起することにより、各蛍光色素の濃度分布に応じた複数色の蛍光強度分布を生成させるステップと、
前記蛍光の複数色の強度を各色に分離して取得可能な２次元撮像素子を用いて測定対象面の蛍光強度を測定するステップと、
前記複数色の蛍光強度の比を計算するステップと、
あらかじめ作成しておいた、前記蛍光強度の比と壁面におけるゼータ電位、pH又は温度との関係式を使って、前記蛍光強度の比の分布を、壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の２次元分布に変換するステップと、
を備えるようにして、前記課題を解決したものである。

[0012] 本発明は、又、

帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数の蛍光色素を溶液に混入する手段と、

該溶液を測定対象面に流す手段と、

前記測定対象面をエバネッセント波によって励起することにより、各蛍光色素の濃度分布に応じた複数色の蛍光強度分布を生成させる手段と、

前記蛍光の複数色を強度を各色に分離して取得可能な２次元撮像素子と、

該２次元撮像素子を用いて測定した複数色の蛍光強度の比を計算する手段と、

あらかじめ作成しておいた、前記蛍光強度の比と壁面におけるゼータ電位、pH又は温度との関係式を使って、前記蛍光強度の比の分布を、壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の２次元分布に変換する手段と、

を備えたことを特徴とする壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価装置を提供するものである。

[0013] ここで、前記蛍光強度比と壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の関係を較正することができる。

[0014] 又、壁面におけるゼータ電位の分布を得る際に、前記複数の蛍光色素として、陽イオンである赤色発光のジクロロトリ（１，１０－フェナントロリン）ルテニウム（II）ハイドレート（Dichlorotris(1,10-phenanthroline)ru

thenium(II)hydrate) と、陰イオンである緑色発光のAlexa Fluor (登録商標) 488を用いることができる。

[0015] 又、壁面における pH 又は温度の分布を得る際に、前記複数の蛍光色素として、LDS 698 (登録商標) 及びフルオロセインを用いることができる。

[0016] 又、前記 2 次元撮像素子を、一台の 3 CCD カメラとすることができる。

[0017] 本発明は、又、

帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数の蛍光色素を溶液に混入するステップと、

該溶液を、表面修飾によってゼータ電位、pH、又は温度が局所的に分布している測定対象面に流すステップと、

前記測定対象面をエバネッセント波によって励起することにより、各蛍光色素の濃度分布に応じた複数色の蛍光強度分布を得るステップと、

前記蛍光の複数色の強度を各色に分離して取得可能な 2 次元撮像素子を用いて、測定対象面の蛍光強度を測定するステップと、

前記複数色の蛍光強度の比を計算するステップと、

あらかじめ作成しておいた、前記蛍光強度の比と壁面におけるゼータ電位、pH 又は温度との関係式を使って、前記蛍光強度の比の分布を、壁面におけるゼータ電位、pH 又は温度の 2 次元分布に変換することにより、表面修飾パターンを可視化するステップと、

を備えたことを特徴とする表面修飾の定量的可視化方法を提供するものである。

[0018] 本発明は、又、

帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数色の蛍光色素を溶液に混入する手段と、

該溶液を、表面修飾によってゼータ電位、pH 又は温度が局所的に分布している測定対象面に流す手段と、

前記測定対象面をエバネッセント波によって励起することにより、各蛍光

色素の濃度分布に応じた複数色の蛍光強度分布を生成させる手段と、
前記蛍光の複数色の強度を各色に分離して取得可能な２次元撮像素子と、
該２次元撮像素子を用いて測定した複数色の蛍光強度の比を計算する手段と、
あらかじめ作成しておいた、前記蛍光強度の比と壁面におけるゼータ電位、
pH又は温度との関係式を使って、前記蛍光強度の比の分布を、壁面におけるゼータ電位、
pH又は温度の２次元分布に変換することにより、表面修飾パターンを可視化する手段と、
を備えたことを特徴とする表面修飾の定量的可視化装置を提供するものである。

[0019] ここで、前記表面修飾が、オクタデシルトリクロロシランによって行われるものとすることができる。

[0020] 本発明によれば、発明者の一人が開発したナノ・レーザ誘起蛍光法に、帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数の蛍光色素、及び、該蛍光の複数色を各色に分離して取得可能な２次元撮像素子を導入することにより、より簡易な方法で、マイクロ流体デバイス内等における表面修飾等によるゼータ電位、pH又は温度の２次元分布を可視化して、定量的計測をリアルタイムで行うことが可能になる。

[0021] 又、従来手法に比較して、計測手順の大幅な軽減や、計測過程における計測誤差の低減をもたらすことができる。

[0022] 更に、本発明を用いることによって、マイクロ流体デバイス内等において、表面修飾パターンや液体試料の混合・反応によって起こる複雑なイオン挙動の２次元分布等を定量的に可視化することができる。そのため、マイクロ熱流体システム内等の複雑な流動場についての様々な知見を得ることができる。例えば、ゼータ電位に依存して形成される電気浸透流動場は、ゼータ電位分布を把握することにより解析することができる。又、細胞やたん白質の吸着性の制御、あるいは、壁面の濡れ性の制御等を目的としたデバイスの性能評価や最適設計の際に有用である。その他にも、細胞生物分野や電気化学

、更にはマイクロ流体工学分野等の幅広い分野にわたる応用が期待される。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]本発明の原理を示す図

[図2]本発明を実施するための計測システムの一例の全体構成図

[図3]図2の計測流路部分を拡大して示す斜視図

[図4]本発明の実施形態における蛍光強度比とゼータ電位の関係の例を示す図

[図5]同じく (A) 3 CCDカメラにより撮像した、OTSパターンを $100 \times 100 \mu\text{m}$ のタイル状に表面修飾した石英ガラスのゼータ電位分布の例と、(B) 較正曲線を用いたゼータ電位分布の定量的評価の例を示す図

[図6]同じく (A) 3 CCDカメラにより撮像した、OTSパターンを一辺 $50 \mu\text{m}$ の正三角形状に表面修飾した石英ガラスのゼータ電位分布の例と、(B) 較正曲線を用いたゼータ電位分布の定量的評価の例を示す図

発明を実施するための最良の形態

[0024] 以下図面を参照して、本発明の実施形態を詳細に説明する。

[0025] 壁面におけるゼータ電位分布を求める際に適用した本実施形態で用いた蛍光色素は、水溶液中で陽イオン化する赤色の蛍光色素としてのジクロロトリ(1, 10-フェナントロリン)ルテニウム(II)ハイドレート(Dichlorotris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II)hydrate) (励起波長 449 nm 、蛍光 582 nm)、および、陰イオン化する緑色の蛍光色素としてのAlexa Fluor (登録商標) 488 (励起波長 495 nm 、蛍光 519 nm)である。

[0026] 2種の蛍光色素を含む溶液(溶液中濃度はジクロロトリ(1, 10-フェナントロリン)ルテニウム(II)ハイドレート: $50 \mu\text{mol/l}$ 、Alexa Fluor (登録商標) 488: $5 \mu\text{mol/l}$)を流路内に流入すると、それぞれの蛍光色素の壁面近傍の濃度分布は壁面ゼータ電位に依存する。負の値を有する壁面ゼータ電位の絶対値が比較的大となる場合、図1(A)に例示する如く、陽イオンである赤色発光の蛍光色素の壁面近傍濃度が、緑色発光の蛍光色素のそれと比して大となる。逆に壁面ゼータ電位の絶対値が比較的小となる場合、図1(B)に例示する如く、相対的に緑色発光の蛍光色素の壁

面近傍の濃度が大きくなる。

- [0027] 従って、表面修飾によってゼータ電位が局所的に分布している流路壁面近傍をエバネッセント波によって励起することにより、2色の蛍光色素の濃度分布に応じた蛍光強度分布が得られる。この蛍光を、例えば3CCDカメラを用いて撮像することにより、赤・緑2色の蛍光強度比の分布として壁面ゼータ電位の2次元分布を可視化することができる。これによって表面修飾パターンを可視化することができる。
- [0028] 壁面ゼータ電位は、2色の色素の蛍光強度比で一意に決定するため、励起光強度の分布に依存することなくリファレンス画像による補正は不必要になる。そのため、3CCDカメラの画像によってリアルタイムに表面修飾のパターンを可視化することが可能となる。またリファレンス画像を取得する際に発生する位置ずれに起因する計測誤差を除去することができ、更に計測手法の簡易化にもつながる。
- [0029] 上述のエバネッセント波光学計測を実現するために、図2に示すような計測システムを構築した。このシステムでは、レーザー10から発振される例えば波長 $\lambda = 488 \text{ nm}$ のレーザー光を、光軸中心近傍の光を使って強度分布を一様に近づけるためのピンホール12及びミラー14を経て、図3に詳細に示す如く、プリズム16を介して計測流路18の壁面のガラス18a内に入れ、界面における全反射によって流路内にエバネッセント波を発生させた。エバネッセント波によって励起された蛍光色素からの蛍光は、例えば倍率20倍、開口0.45の対物レンズ30によって拡大し、蛍光以外のバックグラウンド光を除くためのフィルター32、ミラー34、及び、例えば、1.4倍の拡大レンズ36を通して3CCDカメラ38により撮像した。
- [0030] 図において、20は、ガラス表面でレーザーが乱反射することにより発生する散乱光を防止するため、ガラス18aの厚さの違いに対応するレーザーの出射光路を作るための可動式プリズムである（特許文献1参照）。
- [0031] 更に、計測される2色の蛍光色素の蛍光強度比および壁面ゼータ電位の較正を行うことにより、表面修飾による壁面ゼータ電位分布を定量的に評価す

ることが可能となる。表 1（較正に用いた溶液）および表 2（較正に用いた流路壁面の材質）に示したように、溶液中のイオン種や壁面の材質を様々に変えた条件において蛍光強度比および壁面ゼータ電位を計測し、その関係を図 4 に示した。

[0032] [表1]

	pH (-)	c (mmol/L)
KCl	7.06	2.5
NaCl	7.13	2.5
CaCl ₂	7.14	0.8

[0033] [表2]

ホウケイ酸ガラス (BG)
石英ガラス (SG)
オクタデシルトリクロロシラン (OTS)

[0034] 図 4 から、非特許文献 9 に記載した従来のナノ・レーザ誘起蛍光法では不可能であった広い範囲にわたり良好な直線性が得られていることが分かる。従って、図 4 のグラフから、例えば、最小二乗法により近似曲線を用いて較正曲線を引き、蛍光強度比および壁面ゼータ電位の関係を求めることにより、蛍光強度比の 2 次元分布から壁面ゼータ電位分布を定量的に算出することができる。ゼータ電位の計測には、直径 500 nm の蛍光粒子を溶液中に混入し、壁面近傍での電気浸透流速度を計測することによって、以下に示す（1）式（Helmholtz-Smoluchowski の式）を用いて壁面ゼータ電位を算出した。

[数1]

$$\zeta = -\frac{\mu}{\varepsilon E} u_{eof} \quad \dots (1)$$

ここで、 ζ はゼータ電位 [V]、 μ は粘性係数 [Pa · s]、 ε は誘電率 [C/V · m]、 E は電界強度 [V/cm]、 u_{eof} は電気浸透流速度 [m/s] を表す。

実施例

- [0035] 図5に、オクタデシルトリクロロシラン（OTS）を $100 \times 100 \mu\text{m}$ のタイル状に表面修飾した石英ガラスに本計測法を適用して、ゼータ電位のリアルタイムの可視化および、定量的評価を行った結果を示す。本手法により、図5（A）に示す如く、ガラス壁面に施した表面修飾によって形成されたゼータ電位の2次元分布の可視化が可能となった。更に較正曲線を適用して、図5（B）に示す如く、ゼータ電位の2次元的な分布を定量的に評価することが可能となった。
- [0036] 図6（A）（B）に、OTSを一辺 $50 \mu\text{m}$ の正三角形状のパターンに表面修飾した例を示す。
- [0037] なお前記実施形態においては、陽イオンの色素として、赤色発光のジクロロトリ1,10-フェナントロリン）ルテニウム（II）ハイドレートを用い、陰イオンの色素として、緑色発光のAlexa Fluor（登録商標）488を用いたが、イオンの種類はこれに限定されず、例えば陰イオンの色素として、フルオレセイン（Fluorescein）（励起波長 494 nm 、蛍光波長 518 nm ）を用いることも可能である。
- [0038] 又、蛍光色の組合せも赤と緑に限定されず、他の2色又は3色以上の組合せを用いることができる。
- [0039] 更に、2次元撮像素子も3CCDカメラに限定されず、MOSを用いたカメラや、例えばフィルタを用いて各色を分離撮像可能とした複数台のカメラを用いることも可能である。色数も3色に限定されず、蛍光色に対応する色数（実施形態では2色）を分離して撮像可能であれば良い。
- [0040] 又、各色素の励起波長に合わせて、レーザーを複数台設けることも可能である。
- [0041] 更に、本発明の評価／可視化対象は、ゼータ電位分布に限定されず、非特許文献11に記載されたpH分布を得る技術や、非特許文献12に記載された温度分布を得る技術に、本発明による2色の比を用いる技術を適用して、pH分布や温度分布を評価／可視化することも可能である。これらの場合に

は、例えば赤い蛍光色を得るための色素としてLDS698（登録商標）を、緑の蛍光色を得るための色素としてフルオレセインを用いることができる。これらの他、非特許文献11の12頁表2に記載されたHPTS、ルシファーイエロー、ローダミンB、Sulforhodamine、Kiton Red、フロキシシンB、1-4DHPN等を用いることもできる。

産業上の利用の可能性

[0042] 本発明は、細胞生物分野、電気化学分野、マイクロ・ナノスケール熱流体工学分野における壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価、及び、表面修飾の定量的可視化に用いることができる。

請求の範囲

- [請求項1] 壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価に際して、
- 帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数の蛍光色素を溶液に混入するステップと、
- 該溶液を測定対象面に流すステップと、
- 前記測定対象面をエバネッセント波によって励起することにより、各蛍光色素の濃度分布に応じた複数色の蛍光強度分布を生成させるステップと、
- 前記蛍光の複数色の強度を各色に分離して取得可能な2次元撮像素子を用いて、測定対象面の蛍光強度を測定するステップと、
- 前記複数色の蛍光強度の比を計算するステップと、
- あらかじめ作成しておいた、前記蛍光強度の比と壁面におけるゼータ電位、pH又は温度との関係式を使って、前記蛍光強度の比の分布を、壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の2次元分布に変換するステップと、
- を備えたことを特徴とする壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価方法。
- [請求項2] 前記蛍光強度比と壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の関係を較正することを特徴とする請求項1に記載の壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価方法。
- [請求項3] 壁面におけるゼータ電位の分布を得る際に、前記複数の蛍光色素として、陽イオンである赤色発光のジクロロトリ(1,10-フェナントロリン)ルテニウム(II)ハイドレート(Dichlorotris(1,10-phenanthroline)ruthenium(II)hydrate)と、陰イオンである緑色発光のAlexa Fluor(登録商標)488を用いることを特徴とする請求項1に記載の壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価方法。

- [請求項4] 壁面におけるpH又は温度の分布を得る際に、前記複数の蛍光色素として、LDS698（登録商標）及びフルオロセインを用いることを特徴とする請求項1に記載の壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価方法。
- [請求項5] 前記2次元撮像素子が、一台の3CCDカメラであることを特徴とする請求項1に記載の壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価方法。
- [請求項6] 帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数の蛍光色素を溶液に混入する手段と、
該溶液を測定対象面に流す手段と、
前記測定対象面をエバネッセント波によって励起することにより、各蛍光色素の濃度分布に応じた複数色の蛍光強度分布を生成させる手段と、
前記蛍光の複数色の強度を各色に分離して取得可能な2次元撮像素子と、
該2次元撮像素子を用いて測定した複数色の蛍光強度の比を計算する手段と、
あらかじめ作成しておいた、前記蛍光強度の比と壁面におけるゼータ電位、pH又は温度との関係式を使って、前記蛍光強度の比の分布を、壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の2次元分布に変換する手段と、
を備えたことを特徴とする壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の分布の定量的評価装置。
- [請求項7] 帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数の蛍光色素を溶液に混入するステップと、
該溶液を、表面修飾によってゼータ電位、pH、又は温度が局所的に分布している測定対象面に流すステップと、
前記測定対象面をエバネッセント波によって励起することにより、

各蛍光色素の濃度分布に応じた複数色の蛍光強度分布を得るステップと、

前記蛍光の複数色の強度を各色に分離して取得可能な2次元撮像素子を用いて、測定対象面の蛍光強度を測定するステップと、

前記複数色の蛍光強度の比を計算するステップと、

あらかじめ作成しておいた、前記蛍光強度の比と壁面におけるゼータ電位、pH又は温度との関係式を使って、前記蛍光強度の比の分布を、壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の2次元分布に変換することにより、表面修飾パターンを可視化するステップと、

を備えたことを特徴とする表面修飾の定量的可視化方法。

[請求項8]

前記表面修飾が、オクタデシルトリクロロシランによって行われたものである請求項7に記載の表面修飾の定量的可視化方法。

[請求項9]

帯電量ないし帯電特性が異なり、且つ、蛍光波長の異なる複数色の蛍光色素を溶液に混入する手段と、

該溶液を、表面修飾によってゼータ電位、pH又は温度が局所的に分布している測定対象面に流す手段と、

前記測定対象面をエバネッセント波によって励起することにより、各蛍光色素の濃度分布に応じた複数色の蛍光強度分布を生成させる手段と、

前記蛍光の複数色の強度を各色に分離して取得可能な2次元撮像素子と、

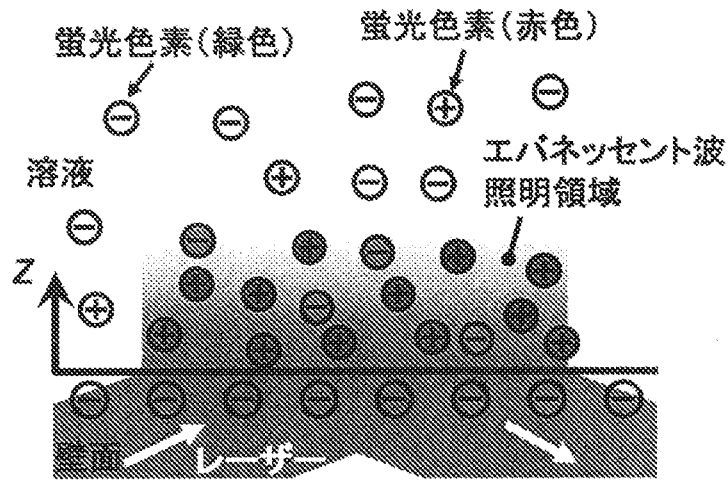
該2次元撮像素子を用いて測定した複数色の蛍光強度の比を計算する手段と、

あらかじめ作成しておいた、前記蛍光強度の比と壁面におけるゼータ電位、pH又は温度との関係式を使って、前記蛍光強度の比の分布を、壁面におけるゼータ電位、pH又は温度の2次元分布に変換することにより、表面修飾パターンを可視化する手段と、

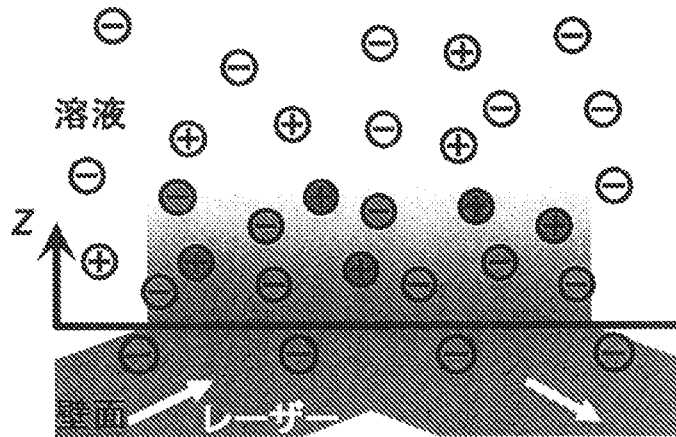
を備えたことを特徴とする表面修飾の定量的可視化装置。

[図1]

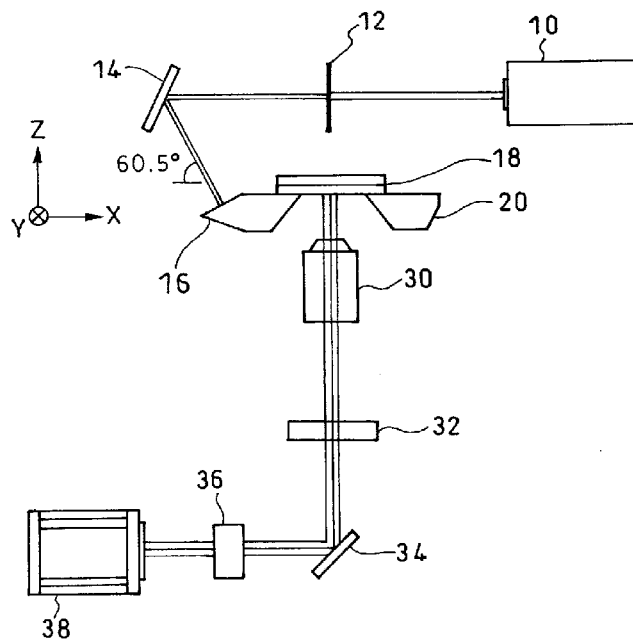
(A) 壁面ゼータ電位 (絶対値) 大



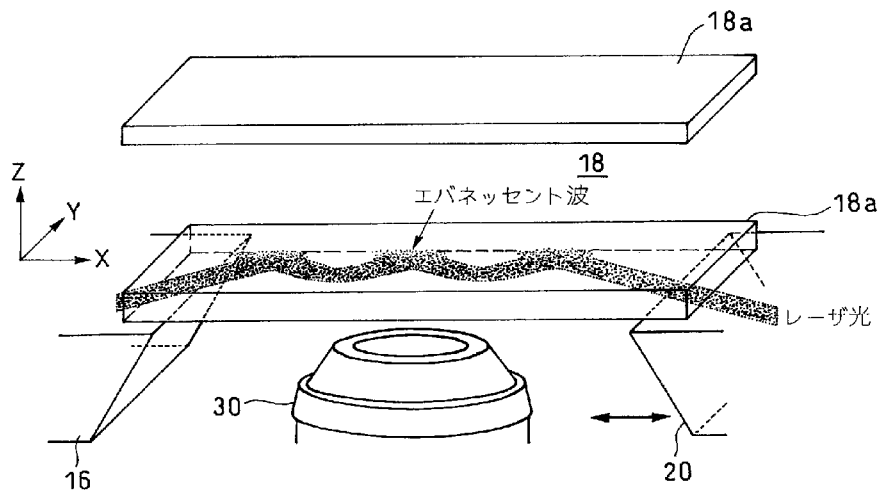
(B) 壁面ゼータ電位 (絶対値) 小



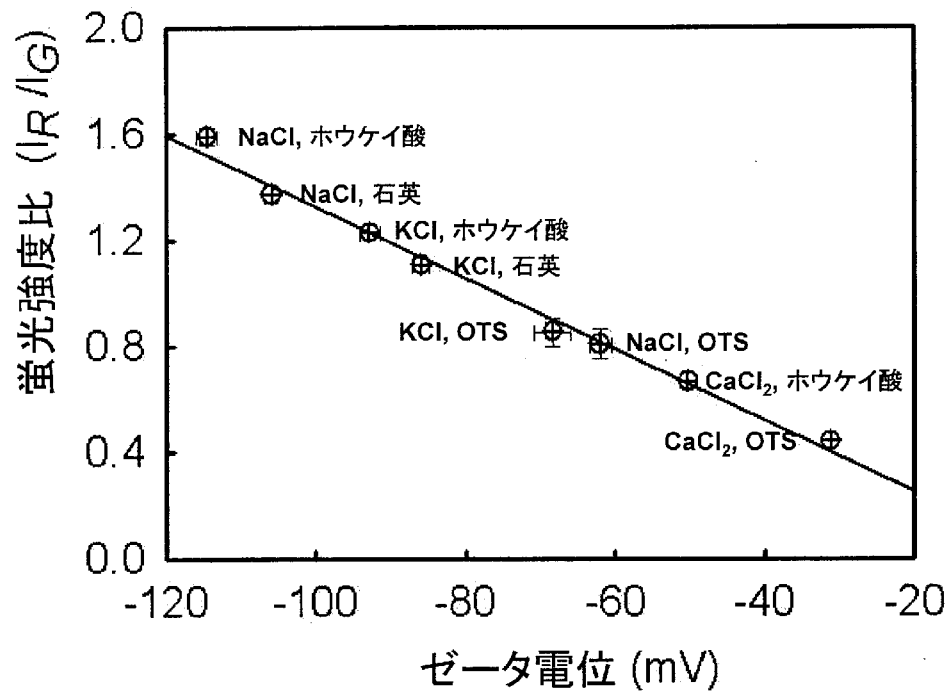
[図2]



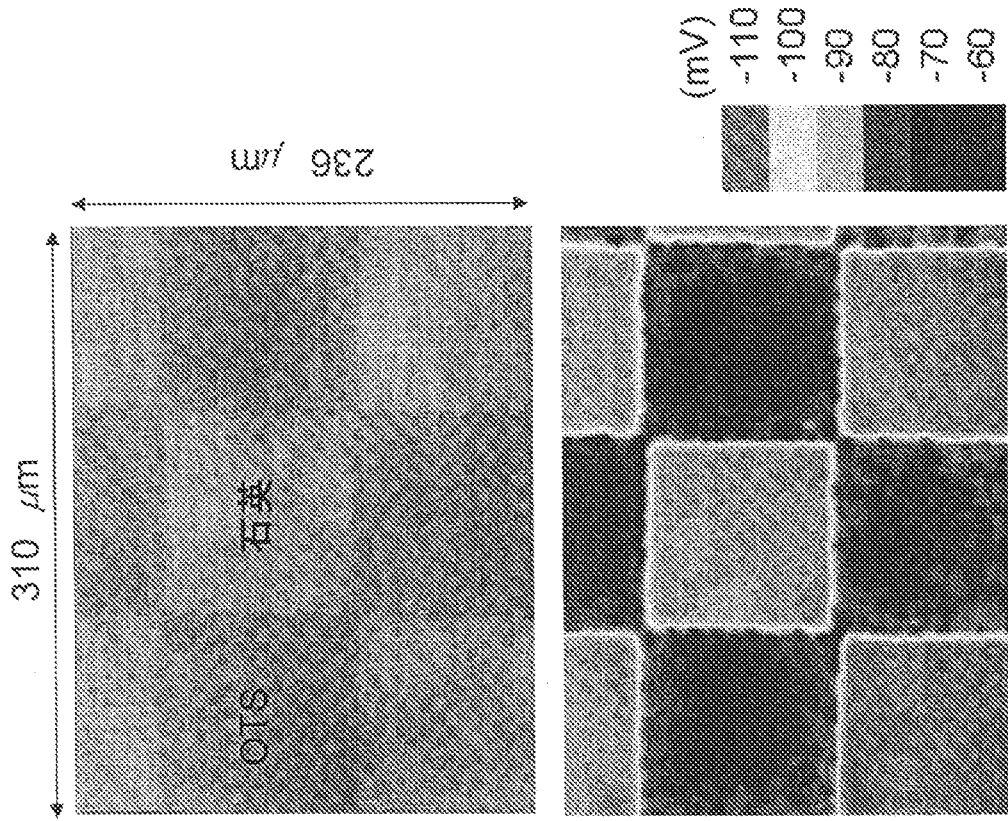
[図3]



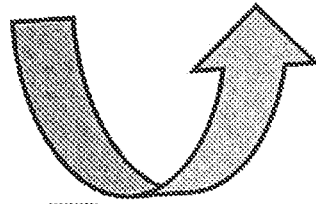
[図4]



[図5]



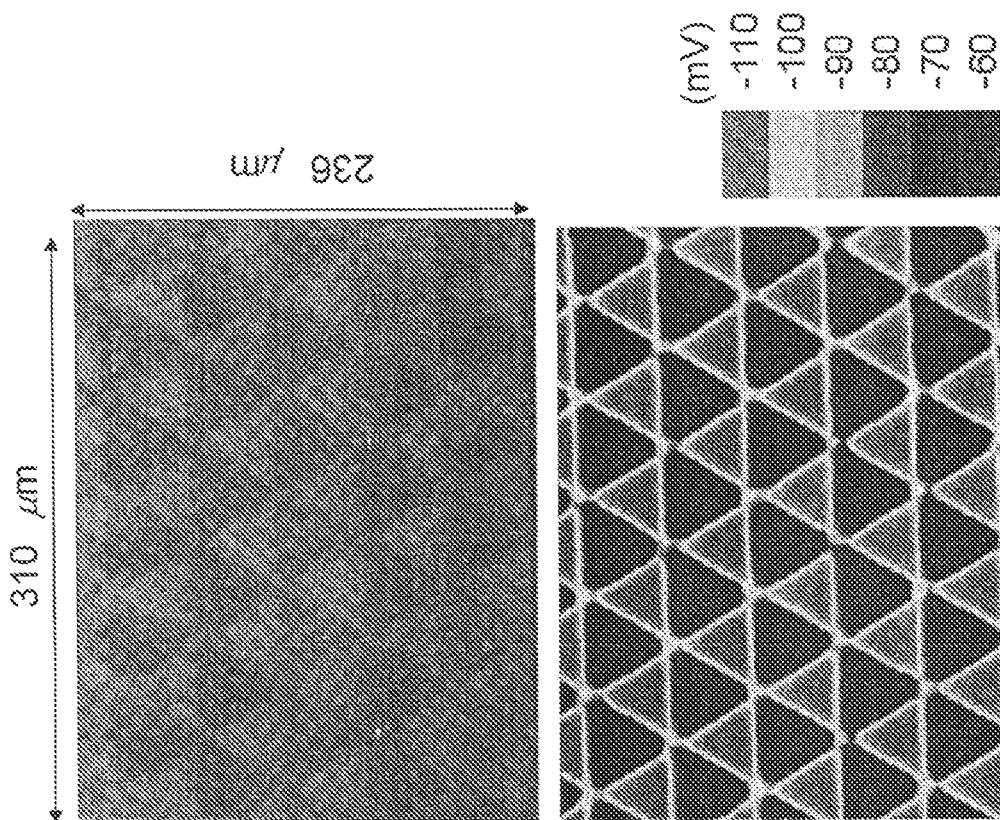
(A) 3CCDカメラにより撮像された蛍光画像



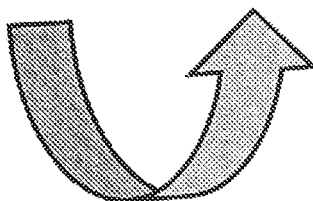
較正曲線を適用

(B) ゼータ電位分布

[図6]



(A) 3CCDカメラにより撮像された蛍光画像



較正曲線を適用

(B) ゼロ電位分布

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/066652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01) i, G01K11/20(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/62-21/83, G01K11/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Yohei SATO, Koichi HISHIDA, "Micro/Nano-Scale Tahenryo Jikukan Bunpu Keisoku Hekimen Kyoku Kinbo no Nagare no Kozo to Ion Kyodo o Toraeru", Journal of the Japan Society of Mechanical Engineers, 05 February 2008 (05.02.2008), vol.111, no.1071, page 88 to 91	1, 2, 4-9 3
Y A	Coppeta J, et.al., Dual emission laser induced fluorescence for direct planar scalar behavior measurements, Experiments in Fluids, 1998.06, Vol.25, No.1, p.1-15	1, 2, 4-9 3
Y	Mitsuhisa ICHIYANAGI, et al., "Micro Channel Hyomen Kaishitsu Patterning ni yoru Denki Shinto Ryudo eno Eikyo", Dai 44 Kai National Heat Transfer Symposium of Japan Koen Ronbunshu, 22 May 2007 (22.05.2007), D231	7-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 December, 2009 (14.12.09)Date of mailing of the international search report
22 December, 2009 (22.12.09)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/066652

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Mitsuhisa ICHIYANAGI, et al., "Hi Ichiyo Zeta Den'i o Yusuru Micro Channel-nai no Ryudo Tokusei", Dai 45 Kai National Heat Transfer Symposium of Japan Koen Ronbunshu, 02 July 2008 (02.07.2008) (received date)	7-9
A	JP 2002-168870 A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 14 June 2002 (14.06.2002), entire text; all drawings (Family: none)	1-9
A	JP 2002-125696 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 08 May 2002 (08.05.2002), entire text; all drawings (Family: none)	1-9
A	JP 2004-502173 A (Carl Zeiss Jena GmbH), 22 January 2004 (22.01.2004), entire text; all drawings & US 2002/0109840 A1 & EP 1266197 A & WO 2002/001222 A2 & DE 10033180 A	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, G01K11/20(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N21/62-21/83, G01K11/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	佐藤洋平、菱田公一、マイクロ・ナノスケール多変量時空間分布計測 壁面極近傍の流れの構造とイオン挙動を捉える, 日本機械学会誌, 2008.02.05, 第111巻、第1071号, 第88頁-第91頁	1, 2, 4-9
A		3
Y	Coppeta J, et.al., Dual emission laser induced fluorescence for direct planar scalar behavior measurements, Experiments in Fluids, 1998.06, Vol.25, No.1, p.1-15	1, 2, 4-9
A		3

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.12.2009

国際調査報告の発送日

22.12.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横尾 雅一

2W

3716

電話番号 03-3581-1101 内線 3292

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	一柳満久、外3名、マイクロチャネル表面改質パターンニングによる電気浸透流動への影響, 第44回日本伝熱シンポジウム講演論文集, 2007.05.22, D231	7-9
Y	一柳満久、外3名、非一様ゼータ電位を有するマイクロチャネル内の流動特性, 第45回日本伝熱シンポジウム講演論文集, 2008.07.02 (受入日)	7-9
A	JP 2002-168870 A (麒麟麦酒株式会社) 2002.06.14, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2002-125696 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2002.05.08, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2004-502173 A (カール ツァイス イエナ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 2004.01.22, 全文、全図 & US 2002/0109840 A1 & EP 1266197 A & WO 2002/001222 A2 & DE 10033180 A	1-9