

研究課題別評価

1. 研究課題名

生体・溶液系ナノデバイス研究の為に微小流体チップ開発

2. 氏名

高村 禪

3. 研究のねらい

生命現象を分子ナノマシンの集合として理解し、工業的に応用しようとする研究が盛んである。細胞一つ一つの違いを分子レベルで解析するためには、数個の生体分子を拡散や吸着で失うことなく操作する技術や、多数の微量な細胞・液滴の効率的なハンドリングが重要となりつつある。本研究は、微細加工された流路や構造を用い、特に(I)テーパ状流路を用いた生体分子のトラップ・抽出・濃縮技術、(II)高密度集積化可能な液体駆動技術の研究を通して、(III)細胞、液滴、分子を選択的に操作・検出する高機能高集積微小流体システムを構築を目指し、生体・溶液系ナノデバイス研究に新手法を提供することを目的とする。

4. 研究成果

4-1. テーパ状流路を用いた生体分子のトラップ・抽出・濃縮

図1のようなテーパ状の狭小部を持つ流路に DNA を流し、圧力流による力と、電界による力を逆向きに作用させると、狭小部に DNA がトラップされる。様々な大きさ、形状の流路で、DNA・RNA・ミトコンドリア・核・たんぱく質のトラップを試みたところ、ほぼ全ての組み合わせでトラップが観察された。

RNA・たんぱく質では、変性させること

によりさらに容易にトラップされ、線状分子がトラップに有利であることが分かった。狭小部の大きさは当初サブミクロンであったが、10 μm 程度でもトラップ可能であることが判明し、詰まりにくいという観点から、大きい方がより実用的である。

図2は、DNA のトラップ確率とトラップ条件を示している。この図からトラップするには圧力流からの力と、電場からの力がある程度つりあうことが必要であることが分かる。すなわち分子選択性があり、抽出に利用できる。また、サイズ依存性があり、トラップ条件は入れ子になっており、長鎖分子ほど容易にトラップされることも分かる。よって動的に条件を変え、まず全てをトラップし、短いものからリリースするといった使い方が可能である。

図3(上)は、DNA のトラップ位置が、電圧の変化により移動することを示しており、これは図3(下)の数値シミュレーションにおける、圧力流れと電界からの 2 つの力のつりあいの位置変化に対応していることが分かった。この結果と、トラップ中の分子の動きから、本トラップは、分子が圧力流と

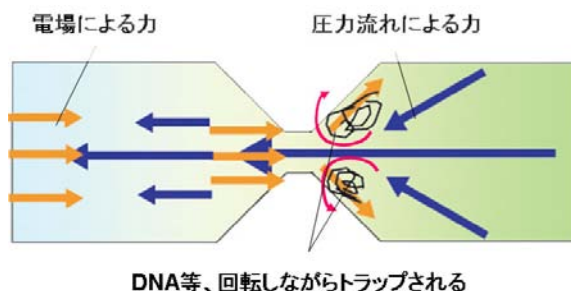


図1 電場と圧力流による DNA トラップ

電場からの力の合力により、そのつりあい位置を中心に周期的な運動をすることによりトラップされるものと考えられる。本トラップは、誘電泳動と異なり、比較的大きな構造でも有効で、分子選択性も強く、また壁から離れた液中にトラップ中心がある。従って、多段階プロトコルのステップ間の精製に利用できる他、生体分子を壁から離れて液体中に保持、濃縮でき、拡散や吸着による損失の抑制にも効果がある。

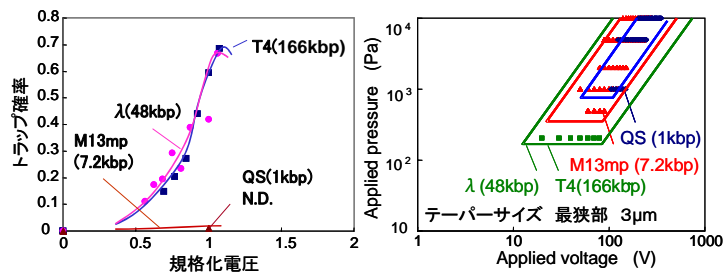


図2 DNA のトラップ確率の電圧依存性(上)とトラップ条件(下)

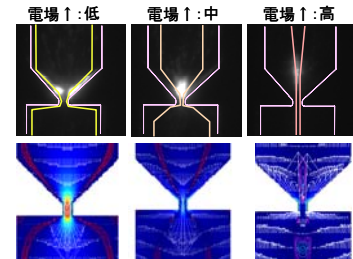


図3トラップパターン遷移

本トラップは、分子選択性があるため、細胞から DNA や RNA を抽出することに利用できると考えられる。特に、RNA を抽出することができれば、遺伝子の発現解析に利用でき、大変興味深い。しかし RNA は DNA と違い、単鎖であり、分子内で結合することによりコンフォメーションをとっており、トラップ上不利と考えられる。そこで RNA をマイルドに変成させる泳動液を新たに開発し、短い RNA も高効率でトラップできることを証明した。図4に示すように、現在 RNA では 10μm の狭小部を用いて 10-100 塩基程度までのトラップを確認している。

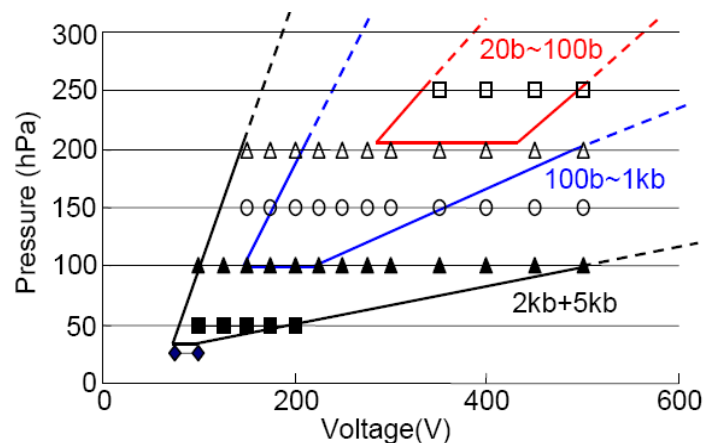


図4 変性泳動液を用いた短鎖 RNA のトラップ

4-2. 高密度集積化可能な液体駆動技術の開発

小型化すればするほど性能が良くなる電気浸透流ポンプの安定化と、その集積化プロセスの開発を行った。まず銀/塩化銀電極と塩橋を併用することによりポンプの安定性が飛躍的に向上し、これを用いたリニアステップングアクチュエータは数時間安定に動作した。さらにこのポンプを、図 5(a)の構造により集積化することに成功した。加えて図 5(b)に示す空圧制御の簡易バルブ・ポン

プを考案した。これは通常の PDMS を用いた微小流体デバイス作成プロセスに、わずかの追加工で実現でき、液体を選ばず、俊敏に動作し、死容積が少なく、使い勝手の良いものである。

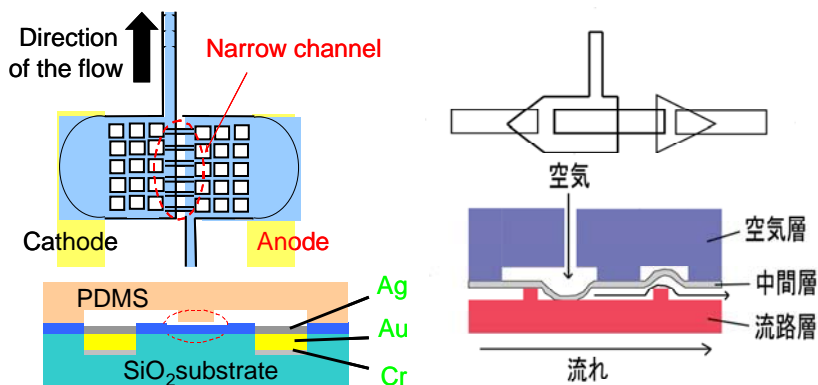


図 5 集積化ポンプ(a)電気浸透流型(b)空圧制御型

4-3. 細胞、液滴、分子を選択的に操作・検出する高機能高集積微小流体システムの開発

4-3-1 細胞から核酸を抽出するチップ開発

これまでの微小流体デバイスは、一つの反応を扱うシンプルなものが多かった。これは、複数の反応ステップを1チップで扱う場合、ステップ間でのサンプルの精製・濃縮や、ステップ毎に区切ってサンプルを輸送することが困難だったからである。従って、本研究における I と II の技術は、細胞、液滴、分子の選択的操作の他、複数ステップ化、高集積化にも貢献する。一例として DNA チップの前処理の一体化を想定し、細胞からの DNA 抽出チップを作成した。図 6 は、その構造と、それによって抽出した DNA の PCR 結果である。I の DNA トラップと、II のバルブを組み合わせであり、抽出液を精査することにより、50%以上の収率と、PCR 阻害の回避、DNA 濃縮を確認した。実際に、細胞破碎液から DNA が濃縮・抽出され、回収流路に回収される様子を図 8 に示す。

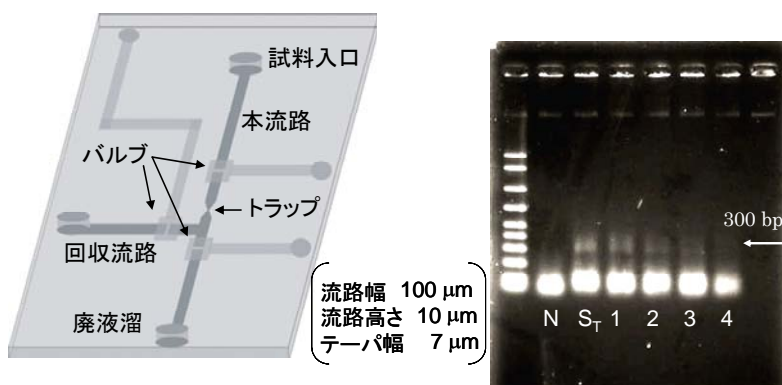


図 6 細胞からの DNA 抽出と濃縮

4-3-2 流路中のプラズマによる元素分析装置開発

また、高機能・高集積化のためには一つの原理で多種類を計測できる、即ち汎用性が高かつ

高感度な検出技術が必須である。なぜなら集積化するほど微量多種のものを測定する必要がでてくるが、それぞれ異なる原理では作成プロセスが膨れ上がるからである。本研究では、この点でも2つのブレークスルーがあった。ひとつは、電気浸透流ポンプの研究中に偶然見つかったものであり、狭小部での高電界領域に発生するプラズマを用いた汎用元素分析技術である。初年度に特許化し、Cd で数十 ppb の感度を持つ超小型検出器として単独製品化が進められている。

4-3-3 カーボンナノチューブを用いた汎用高感度生体分子測定

汎用性が高くかつ高感度な検出技術として電極上に成長させたカーボンナノチューブを用いた DNA・たんぱく質の非標識電気化学測定法の開発を大阪大学の松本和彦先生の研究室と行っている。このひとつは、アンペロメトリックな測定方法であり、ウエハー上にパターニングしたメタル電極上に直接カーボンナノチューブを成長させ、これを、高感度・安定な電極として用いるものである(図 7)。この方法では、検体をセンサーに曝した後、必ず洗い流す処理が必要である。この洗いの処理に、本研究で開発したバルブ・ポンプも用いる。集積化可能であり、同一の原理でほぼすべてのたんぱく質・DNA を特異的に検出可能である。これまでに、アミノ酸、タンパク質、CPT などの非標識検出・測定に成功している。

また、ポテンシオメトリックな測定として single wall carbon nanotube を FET に用いたセンサーの開発も行っている(図11)。このようなナノワイヤーを用いた FET では、分子選択性を持たせるため比較的大きな分子である抗体を表面に修飾し、デバイ遮蔽の効果を除くため純水に近い低イオン強度の溶液中で測定し、またナノワイヤーと溶液の間に絶縁膜を設けるのが常であった。我々は、低電圧では絶縁膜を用いなくても電気化学的電流がほとんど流れないことに注目し、絶縁膜のないカーボンナノチューブを裸で用いることにより、素子径を下げ、選択性を持たせる分子として抗体より小さなアプタマーを用いることにより、生理的条件に近い高いイオン強度で動作させることに成功したことに大きなオリジナリティーと意義がある。

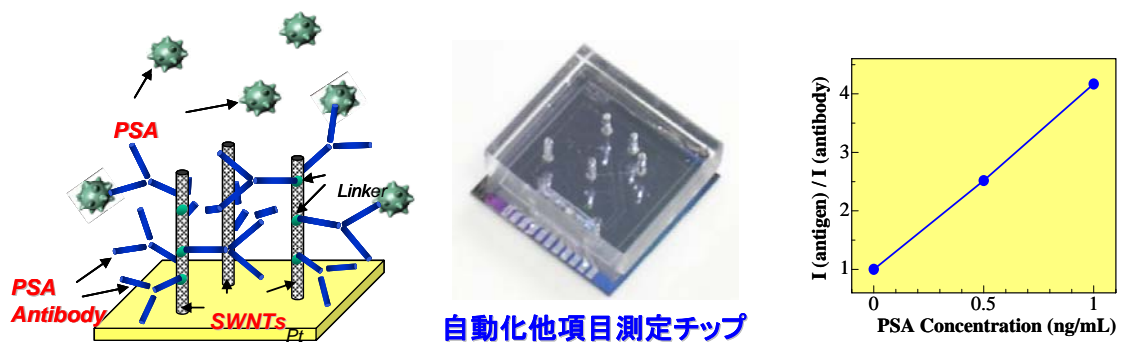


図10 CNT 電極を使ったタンパク質の非標識検出

5. 自己評価

テーパ状流路を用いた生体分子トラップでは、メカニズムを含む本法のオリジナリティーと特性が明らかになった。一細胞からの RNA 抽出が可能になったことは、トランスクリプトームの強力な手

段となりえるため、微小流体デバイスの発展のみならず、生命の研究や医療・診断の分野に大きな発展が期待でき、その道筋を作ったということは大きく評価できる。しかしながら、実際に現場で使えるチップまでたどり着けなかったことは残念である。達成度の自己評価は90%である。

電気浸透流に基づいた集積化学チップの開発は、大きな課題であった集積化と安定化についてある程度の解決を得た。しかし、液滴の計量や混合の操作までたどり着けなかった。この項目の達成度は40%程度と自己評価する。その代わりに、使いやすく、生産性の高い簡易ポンプを開発した。これは、今後微小流体デバイスのいろいろな局面で利用される可能性が高く、すでに多項目測定健康診断チップや、免疫医療用チップと組み合わせられた研究が進んでおり、流体のハンドリングという意味ではこの分野にある程度の貢献ができたと考える。

高機能高集積微小流体システムの開発においては、上記流体や分子のハンドリングに加え、集積化可能で汎用高感度なセンシング方法が必須である。この部分は、当初の計画ではあまり強調してされていなかったのは、予測が難しかったからであるが、隠れた重要なポイントであった。この項目では、予想以上の進展が見られた。本研究の遂行中に見つかった流路中のプラズマによる発光元素分析方法は、単独で製品化が進められているが、このように微小流体デバイスの一部として用いたときに真価を発揮すると考えられ、この方面の研究開発が期待できる。また、カーボンナノチューブを用いたアンペロメトリーや CNT-FET によるセンシングは、競争の激しい分野にもかかわらず、絶縁膜のない FET 構造や、アプタマーの利用などでオリジナリティーを確保しており、生理的条件下での一分子センシングの可能性など、大きな可能性が考えられる。この項目の達成度の自己評価は150%である。

6 研究総括の見解:

生命科学の研究や医療の分野で生体分子を選択的に捕獲、分離する技術は重要であり、特に微量の液体中の生体物質を対象とする場合、分離装置自身も微小化が要求される。微小流体チップの開発を目標に新しい方法を提案し、試作によって有効性を評価した。

主たる成果としては次の 3 点が重要である。(1)テーパ流路を用いた生体分子のトラップ・抽出・濃縮(テーパ状流路を流れる DNA 等に圧力勾配と逆向きの電場勾配を設け、釣合い条件下でトラップ);(2)集積化に適する電気浸透流型および空圧制御型微小ポンプの開発(電気浸透流型ポンプの銀/塩化銀電極と塩橋の併用による安定化など);(3)カーボンナノチューブを用いた高感度非標識のたんぱく質、DNA 電気化学測定法開発(金属電極上に成長したカーボンナノチューブを電極として得られる被検物質に特異な電流パターンを利用したセンシング。微小ポンプとの組み合わせで繰返し測定可能)。これらトラップ、ポンプ、バルブを組み合わせる DNA 抽出チップを試作し、有望な実験結果を得ている。

流体系の生体分子自動検出集積化チップを最終目的として要素技術の改良を行い、組み合わせ実験にも成功しており、将来の発展が期待される。一方で、流体中の分子のトラップは複雑な現象であり、設計論に耐える動作モデルを確立するには良く計画された系統的な実験が必要であると思われ、上記の結果はその初期的成果と考えられる。

これらの結果の一部は 3 篇の採択済み原著論文と 1 篇の投稿中論文にまとめられているが、論

文として公表していない成果も多い。その他解説論文 1 篇、公開された特許 3 件、国際会議口頭発表 17 件を数える。

全体として大きな構想を持った意欲的な研究であり、オリジナルな発想も豊富である。ただし、複雑な現象を定量的に理解し、制御するには多くの課題が残されており、系統的な検討が求められるが現状ではおおづかみの理解が得られたのに過ぎない。期待した研究の水準にもう一步という段階であると判断する。

7. 主な論文等:

(1)論文(原著論文)発表

1. Jun Okuno, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Kagan Kerman, Yuzuru Takamura, and Eiichi Tamiya, "Single-walled carbon nanotube-arrayed microelectrode chip for electrochemical analysis", *Electrochemistry Communications* 9, 13-18 (2007)
2. Jun Okuno, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Kagan Kerman, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, "Label-free immunosensor for prostate specific antigen based on single-walled carbon nanotube array modified microelectrodes", *Biosensors and Bioelectronics*, published on web, (2006).
3. Kenzo Maehashi, Taiji Katsura, Kagan Kerman, Yuzuru Takamura, Kazuhiko Matsumoto, and Eiichi Tamiya, "Label-Free Protein Biosensor Based on Aptamer-Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistors", *Analytical Chemistry*, Published on Web, (2006).

(2)特許出願

研究期間累積件数:8 件(国内出願 4 件、外国出願 4 件)

(公開されているもの)

1. 発明者:高村禪、民谷栄一、西村尚樹
発明の名称:流路における流体の通過を検出する方法および流体の流れを制御する方法
出願人:独立行政法人科学技術振興機構、高村禪
出願番号(出願日):特願 2004-093534(平成 16 年 3 月 26 日)
公開番号(公開日):特開 2005-283163(平成 17 年 10 月 13 日)
2. 発明者:高村禪、民谷栄一、富沢祐一、結城興仁
発明の名称:試料から荷電物質を濃縮および/又は抽出する方法及びそのためのデバイス
出願人:独立行政法人科学技術振興機構、高村禪
出願番号(出願日):特願 2004-093484(平成 16 年 3 月 26 日)
公開番号(公開日):特開 2005-278418(平成 17 年 10 月 13 日)
3. 発明者:高村禪、飯塚亜紀子、民谷栄一

発明の名称:プラズマ発生装置

出願人:北陸先端科学技術大学院大学

出願番号(出願日):特願 2004-127380(平成 16 年 3 月 25 日)

PCT公開番号(公開日):WO/2005/093394(平成 17 年 10 月 6 日)

(3)受賞

なし

(4)招待講演等

(学会発表)

国際学会 17、国内学会55、展示会4、研究会5、(内研究会や Workshop への招待6)

1. Kunimitsu Ueno, Wako Nagasaka, Yuichi Tomizawa, Yoshiteru Nakamori, Eiichi Tamiya, and Yuzuru Takamura, "RNA trap using microfluidic chip with taper shaped channel", 2006 International Conference on Solid State Devices and Materials, 874, Yokohama, (2006).
2. Isao Kumagai, Hirokazu Matumoto, Tamotu Yamamoto, Eiichi Tamiya and Yuzuru Takamura, "Numerical analysis and mineral water measurement in confined liquid electrode plasma-optical emission spectrometry", *Micro Total Analysis Systems 2006*, 497, Tokyo, (2006).
3. Yuichi Tomizawa, Hiroaki Oose, Kunimitsu Ueno, Md Shameen Ahsans, Naoki Nagatan, Eiichi Tamiya and Yuzuru Takamura, "Biomolecule and cell organelle trapping using electric and hydrodrag forces in tapered shaped microchannel", *Micro Total Analysis Systems 2006*, 900, Tokyo, (2006).
4. T. Shimomura, E. Tamiya, Y. Takamura, "Simple constant volume injection pump for droplet separation in massively parallel microfluidic devices", *Proceedings of microTAS 2005 Conference*, 2, pp 1099-1101, Boston. Transducer Research Foundation (2005).
5. A. Iiduka, Y. Morita, E. Tamiya, Y. Takamura, "Optical emission spectrometer of aqueous solution samples employing liquid electrode plasma", *Micro Total Analysis Systems 2004*, 1, pp 423-425, Cambridge. The Royal Society of Chemistry (2004).
6. Y. Tomizawa, K. Yuhki, Y. Morita, E. Tamiya, Y. Takamura, "Quantitative analysis of molecular trap employing electric and hydro drag force field", *Micro Total Analysis Systems 2004*, 1, pp 659-661, Cambridge. The Royal Society of Chemistry (2004).
7. K. Yuhki, Y. Tomizawa, Y. Morita, E. Tamiya, Y. Takamura, "Automated extraction and purification device of DNA from cells employing electric and hydro drag force field", *Micro Total Analysis Systems 2004*, 2, pp 294-296, Cambridge. The Royal Society of Chemistry (2004).