

北森武彦

東京大学大学院工学系研究科 教授

拡張ナノ空間特異性を利用した革新的機能デバイスの創成

§1. 研究実施の概要

数 10-数 100 nm の「拡張ナノ空間」は界面領域のみで形成される特異空間であり、流体物性や化学特性に特異性が発現することを研究代表者らは見出してきた。また、この特異性を活用することで、マイクロ・ナノ科学と技術に新展開が期待できることを示してきた。本研究では「拡張ナノ空間」の特異性を活用した新しいデバイス工学に焦点を絞り、化学、バイオ、エネルギーなどに貢献する新機能次世代ナノデバイスを実現することを目的としている。デバイス創成の基本戦略として、これまでに確立してきたマイクロ空間での各単位操作(デバイスの部品に相当)を拡張ナノ空間に移行する必要があるが、新たな機能をもつデバイスを開発するには、拡張ナノ空間の特異性を利用した新規操作の確立が求められる。平成 22 年度は、前年度までの成果に基づき、機能実証のための基盤技術の開発を行った。具体的には、拡張ナノ空間内における、①単一細胞インターフェースの開発(単一細胞・単一分子分析)、②極微量インジェクション法の開発とカラム分離への応用(スーパークロマトグラフィー)、③毛管凝縮現象の定量的解析(ヒートパイプ)、④光燃料電池・燃料生成部の原理実証(光燃料電池)をそれぞれ検証した。今後、単位操作の最適化・性能実現を経て、これらを集積部品としたデバイス化、さらに機能実証へと進める予定である。

§2. 研究実施体制

(1)「共通技術・エネルギーデバイス」グループ

①研究分担グループ長:北森 武彦(東京大学工学系研究科、教授)

②研究項目

デバイス開発の共通基盤技術として、マイクロ空間と拡張ナノ空間を繋ぐマイクロ拡張ナノインターフェースとして、試料定体積秤量システムおよび光あるいは熱応答性のゲルを用いた拡張ナノ開閉バルブを創成し、また、拡張ナノ空間に機能を持たせるため、室温での基盤接合技術を整備

する。さらに、無電力冷却デバイス、光燃料電池の各デバイスを創成・最適化する。さらに、共同研究グループを統括し、デバイス開発の中核をなす。

(2)「バイオデバイス」グループ

①研究分担グループ長:佐藤 香枝(日本女子大学理学部、准教授)

②研究項目

単一細胞・単一分子分析デバイス創成のために、分析の前処理となる単一細胞の培養・刺激・破砕などの操作法を開発し、本デバイスを利用した細胞内の DNA やタンパクなどの分析法を開発する。さらに、本手法を単一細胞プロテオミクスやメタボロミクスなど次世代の医療診断・バイオ分析システムへ展開する。

(3)「ナノ流体デバイス」グループ

①研究分担グループ長:塚原 剛彦(東京工業大学原子炉工学研究所、助教)

②研究項目

本プロジェクトで開発する光燃料電池は、拡張ナノ空間中プロトン移動層のプロトン輸送への寄与という我々の基礎知見を活かし、ボトムアップ手法によりプロトン輸送効率を最大化して、拡張ナノ空間を擬似プロトン移動膜とする。拡張ナノプロトン輸送については、流動電位法により実際にプロトン輸送に寄与することがわかっているが、輸送速度やサイズ依存、表面化学修飾の効果など不明瞭であるため、実験データを拡充し、現象の理解を深め、イオン輸送操作を確立する。

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

§1でも述べたように、平成 22 年度は、各デバイスについて、機能実証のための基盤的技術を確立した。具体的には、拡張ナノ空間内における、①単一細胞インターフェースの開発、②極少量インジェクション法の開発とカラム分離への応用、③拡張ナノヒートパイプ実証のための毛管凝縮現象の定量的解析、④光燃料電池・燃料生成部の原理実証を検証した。これらについて、詳細を述べる。

①単一細胞インターフェース(単一細胞・単一分子計測システム)

拡張ナノチャンネル内で単一細胞を分析するには、図 1 に示すように、単一細胞操作のためのマイクロ空間(nL~pL)とタンパク質を定量する拡張ナノ空間(fL~aL)を接続するインターフェースが必要である。これは、(1)細胞導入のためのマイクロチャンネル、(2)単一細胞操作のためのチャンバー、(3)タンパク質定量分析のための拡張ナノチャンネルからなる。本項では白血病細胞を用い、単一細胞捕獲・分離、細胞溶解、試料の拡張ナノチャンネルへの導入を実証した。

きわめて微小な空間での細胞操作を実現するため、拡張ナノ流体操作技術を応用した。圧力駆動により細胞懸濁液を導入し、流体力によって単一細胞をチャンバー内に捕獲し、マイクロチャンネルを空気で置換してチャンバー内に単一細胞を保持したまま溶液を切り取ることで、チャンバー内に単一細胞を分離できた。次に、

蛍光色素で細胞膜を染色し、細胞溶解液を拡張ナノチャンネルからチャンバー内に導入したところ、図 2 のように数分で細胞膜の蛍光が消え、単一細胞の溶解が確認できた。これによって、容量 mL のマイクロチューブと容量 μL のマイクロピペットでの細胞操作が、容量単一細胞スケール(pL)のチャンバーとfLの拡張ナノチャンネルで可能となり、世界最小の前処理操作が確立できたといえる。また、タンパク非接着高分子の表面部分修飾によりこのような微小閉空間にDNA¹や細胞³をパターニングする手法も確立しており、拡張ナノ空間を用いた極限分析に必要な要素技術を確立し、単一細胞デバイス原理検証の見通しができた。

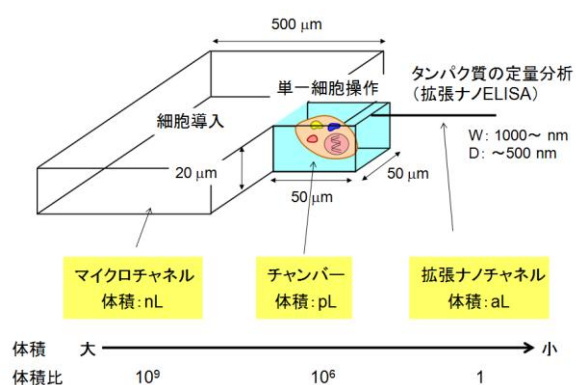


図 1 インターフェースの概念図

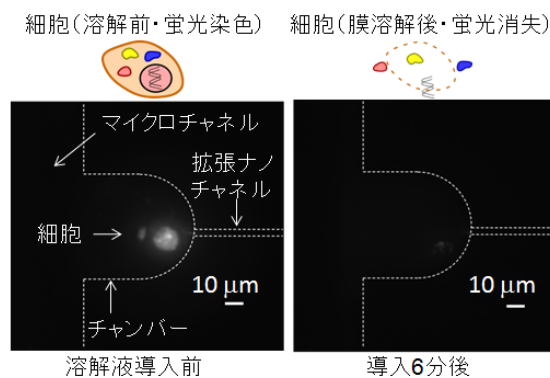


図 2 蛍光染色による単一細胞溶解の可視化

②少量インジェクション法の開発とカラム分離への応用(スーパークロマトグラフィー)

様々な物質を分離・精製できるクロマトグラフィー法は試料分析に必要不可欠な技術である。これまで、拡張ナノ空間の極めて大きな比界面積と表面相互作用の違いを利用して分子を高効率に分離するスーパークロマトグラフィーにおいては、極微量体積(aLオーダー)の試料インジェクションの再現性が問題となっていた。そこで本年度は、高压制御により高速応答可能なナノ流体制御システムの設計・開発を行った。開発した手法により、従来のHPLCにおけるインジェクション量より11桁少ない550 aLの極少量試料のインジェクションを、バンド幅の広がりを抑制し再現性良く行えることを確認できた。さらに、本インジェクション手法を用い、順相の分離モードで蛍光色素分子(Coumarin460 および Pyromethene597)の分離に成功した。本分離におけるPyromethene597の最大理論段数は510,000段/mであり、従来のHPLCカラムの10倍以上大きい値を達成し、極少量の生体試料の高効率な分離へ応用することが可能となった。今後、様々な物質の分離へ展開する予定である。

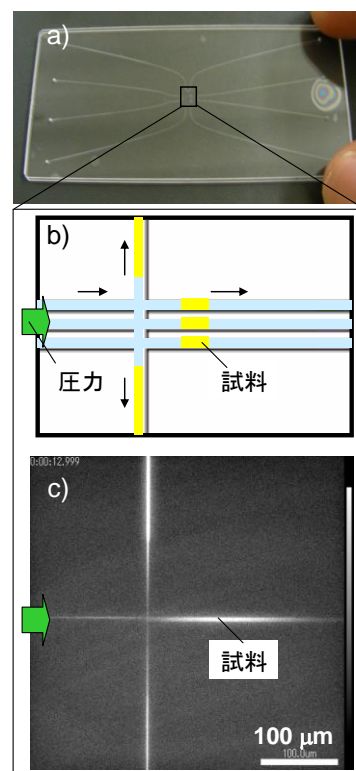


図 3. a) スーパークロマトグラフィーチップ, b-c)aL オーダーの試料インジェクション

③拡張ナノヒートパイプ単位操作実証のためのデバイス作製技術の確立(ヒートパイプ)

無電力冷却デバイスについては、毛管凝縮の定量的に解析した。まず、ナノ加工法の条件を最適化した結果、図4に示した従来のピラーサイズを遙かに下回るサイズの拡張ナノピラーを作製することに成功した(幅・深さ:2000 nm → 500 nm, ピラー間隔:1000 nm → 350 nm)。これにより、従来のナノピラーより多くの量の水をピラー間に凝縮できるようになり、定量的解析が可能となった。定量解析手法としては、図4のように、取得画像の屈折率変化から求め、凝縮速度は0.3 pL/min、冷却部の体積と潜熱から $1.24 \times 10^5 \text{ W/m}^3$ と計算された。これは、従来の熱交換機の冷却効率と同程度であるが、今後デバイスの効率化・最適化により効率を上げる予定である。

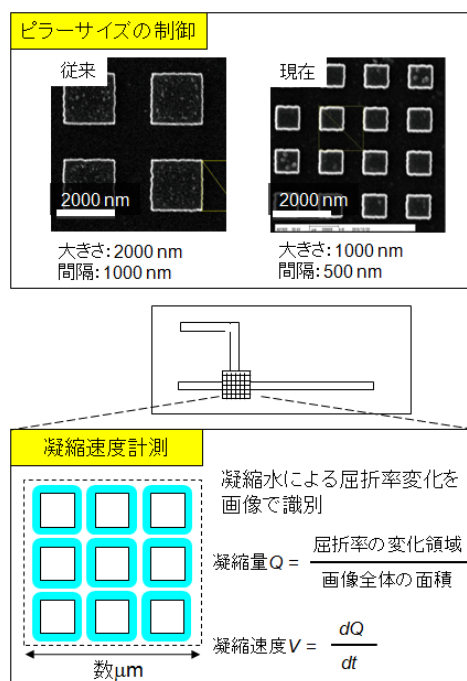


図 4.(上)ナノピラー写真(下)凝縮速度測定原理

④光燃料電池・燃料生成部の原理実証

光燃料電池の実現には可視光応答性の新規な酸化チタン光触媒の構築が望まれる。近年、光とナノ構造体の相互作用に生じる近接場光は従来禁制であるフォノン準位への励起が可能となり、多段励起過程を経て、バンドギャップエネルギー以下のエネルギーの光でもキャリアを励起できるという性質が報告されており、本項では、この近接場光効果を用いる。近接場光を発生させるには、ナノ構造体の制御が必要であるが、酸化チタンナノ構造体の制御は困難である。そこで、新たな手法によりナノロッドを作製した。

作製手法は、斜方物理的蒸着法 (GLAD) を用いた。これは、蒸着条件によりロッドの形状やサイズを簡単に制御できる。酸化チタンナノロッドは透明伝導基板上に成長させ、これを電極として光電気化学測定を行った。

図 5 に作製したナノロッド表面の画像を示す。ナノロッド(直径 250 nm)の作製とサイズの制御に成功した。図 6(A), (B) に、UV(355 nm)と

可視光(488 nm)照射時の光電流を示す。UV 照射下ではナノロッドの試料はナノ構造体を有しない薄膜試料と比べ、2 倍光電流が向上した。これは比表面積向上のためと考えられる。一方、可視光照射下では 12 倍以上向上した。これはナノロッドによる近接場光効果のためと考えられる。このように、酸化チタン薄膜にナノロッドを作製することで可視光応答性が得られ、光燃料電池の燃料生成部分の原理が検証でき⁹、今後燃料分離部とも併せてデバイス全体を実証する。

【購入備品】

平成 22 年度は、引き続きデバイス創成の基盤整備とデバイス評価の為に必要となる設備・備品を購入したので、主な備品を表 1 にまとめる。電子線露光装置やドライエッチング装置などの高度ナノ加工装置は、学内の施設を利用する。

表 1 今年度 CREST 予算で購入した主な備品

備品	目的	価格(千円)
電気化学分析装置一式	エネルギーデバイス評価用	2,800
アンモニアモニター	加工部屋の環境整備用	8,000
バラック機パーツ	加工部屋の環境整備用	4,500
ナノチャンネル加圧装置	流体制御用	7,500
GLAD(Glancing Angle Deposition) 加工用		6,500
		合計 29,300

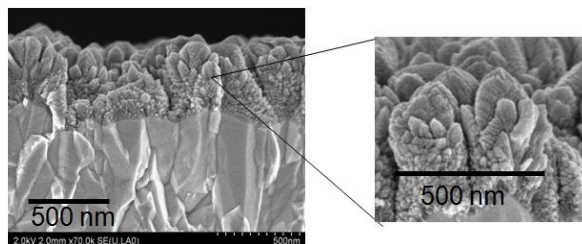


図 5 酸化チタンナノロッドの電子顕微鏡画像

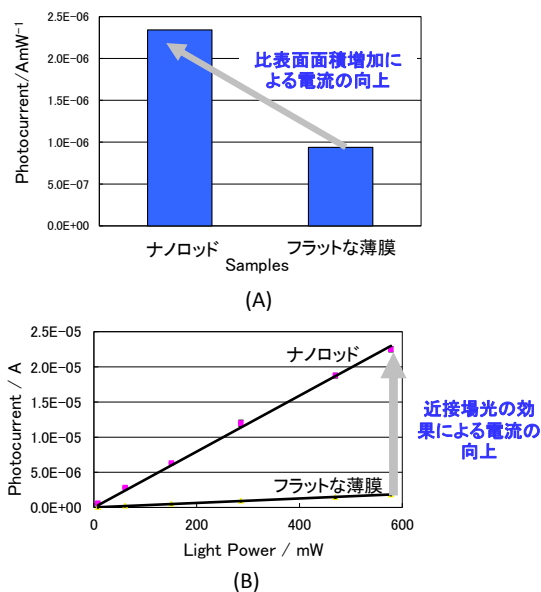


図 6 (A)UV (B)可視光照射した際の光応答電

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

【学術誌原著論文】

1. Yo Tanaka, Hui Xi, Kae Sato, Kazuma Mawatari, Björn Renberg, Mats Nilsson, Takehiko Kitamori, “Single-molecule DNA patterning and detection by padlock probing and rolling circle amplification in microchannels for analysis of small sample volumes”, *Analytical Chemistry*, in press.
2. Tadahiro Yamashita, Yo Tanaka, Naokazu Idota, Kae Sato, Kazuma Mawatari, and Takehiko Kitamori, “Cultivation and recovery of vascular endothelial cells in microchannels of a separable micro-chemical chip”, *Biomaterials*, 32, 2459-2465(2011). (DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.12.012)
3. Kihoon Jang, Yan Xu, Yo Tanaka, Kae Sato, Kazuma Mawatari, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, and Takehiko Kitamori, “Single-cell attachment and culture method using a photochemical reaction in a closed microfluidic system”, *Biomicrofluidics*, 4(3), 032208(2010). (DOI:10.1063/1.3494287)
4. Toshinori Ohashi, Kazuma Mawatari, and Takehiko Kitamori, “On-chip antibody immobilization for on-demand and rapid immunoassay on a microfluidic chip”, *Biomicrofluidics*, 4(3), 032207(2010). (DOI:10.1063/1.3437592)
5. Yan Xu, Kihoon Jang, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, Kazuma Mawatari, and Takehiko Kitamori, “The biological performance of cell-containing phospholipid polymer hydrogels in bulk and microscale form”, *Biomaterials*, 31, 8839-8846(2010). (DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.07.106)
6. Yan Xu, Kae Sato, Kazuma Mawatari, Tomohiro Konno, Kihoon Jang, Kazuhiko Ishihara, and Takehiko Kitamori, “A microfluidic hydrogel capable of cell preservation without perfusion culture under cell-based assay conditions”, *Advanced Materials*, 22, 3017-3021 (2010) (DOI: 10.1002/adma.201000006)

7. Masaki Ihara, Amane Yoshikawa, Yushu Wu, Hiroko Takahashi, Kae Sato, Kazuma Mawatari, Takehiko .Kitamori, and Hiroshi Ueda, "Micro OS-ELISA: Rapid noncompetitive detection of a small biomarker peptide by open-sandwich ELISA integrated into microfluidic device", *Lab on a Chip*, 10, 92-100 (2010) (DOI: 10.1039/B915516C)

【国際会議 Proceedings (査読付き、採択率 60%以下のもの)】

8. H. Akaike, Y. Tanaka, Y. Sugii, T. Kitamori, "Development of insulin delivery devices composed of langerhans islets and cardiomyocytes", *Proceedings of Micro Total Analysis System (μ TAS)*, 2017-2019 (2010)

9. Thu. H. H. Le, K. Mawatari, K. Kitamura, T. Yatsui, T. Kawazoe, M. Ohtsu, T. Kitamori, "Investigation of phonon-assisted optical near-field effect on nanostructured TiO_2 towards on-chip fuel cell application", *Proceedings of Micro Total Analysis System (μ TAS)*, 1889-1891 (2010)

10. J. Wakabayashi, Y. Tanaka, K. Sato, K. Mawatari, Y. Tanaka, M. Nilsson, T. Kitamori, "Development of specific single-cell gene analysis system on a microchip", *Proceedings of Micro Total Analysis System (μ TAS)*, 764-766 (2010)

11. T. Yamashita, Y. Tanaka, Y. Sugii, K. Mawatari, T. Kitamori, "Construction of vascular-mimetic tissue in a separable microchip", *Proceedings of Micro Total Analysis System (μ TAS)*, 1316-1318 (2010)

12. Y. Xu, K. H. Jang, K. Mawatari, T. Konno, K. Ishihara, T. Kitamori, "Cell-based toxin screening integrated with a cell-sustainable hydrogel on chip for onsite and portable applications", *Proceedings of Micro Total Analysis System (μ TAS)*, 1499-1501 (2010)

13. Y. Tanaka, H. Xi, K. Sato, K. Mawatari, B. Renberg, M. Nilsson, T. Kitamori, "Extended-nano channel based rolling circle amplification to detect single molecule DNA", *Proceedings of Micro Total Analysis System (μ TAS)*, 1160-1162 (2010)

14. T. Ohashi, O. Fukahori, H. Tazawa, A. Harano, T. Ebata, K. Mawatari, T. Kitamori, "One-step micro-ELISA for highly sensitive determination of TSH", *Proceedings of Micro Total Analysis System (μ TAS)*, 821-823 (2010)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1 件)

- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)