

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成 14 年度採択研究代表者

北森 武彦

(東京大学大学院工学系研究科 教授)

「ナノ生物物理化学アーキテクチャの構築と応用」

1. 研究実施の概要

研究代表者らは化学システムをマイクロチップに集積する技術を開発してきた。本研究では、この μm スケールの化学システムに、物理化学や生物化学を活用したボトムアップナノテクを融合し、マイクロの建屋にナノのインフラを構築することを目的とする。これにより、ナノ空間領域の物理化学を究明し、化学・バイオ機能の発現機序となる秩序性や階層構造を人為構築し、高度疾病センサーや選択的機能人工臓器デバイスなど高機能化学・バイオ素子の創出を目指す。平成 17 年度には、トップダウン的加工技術を用いて作製したマイクロ・ナノ複合構造内で流体を制御し、溶液の混合・反応に成功した。この技術を用いることで、ナノ空間での合成反応、抗原抗体反応等が実現できると期待される。ナノ空間中の水物性については、核磁気共鳴(NMR)測定および蛍光測定より、水分子間のプロトン移動機構が物性の空間サイズ効果に重要な役割を果たしていることを見出した。今後は、新規分光法を利用し、ナノ空間溶液の物理化学現象の更なる解明を目指す。また、100nm オーダーのナノパターン上への自己組織化単分子膜および細胞接着性タンパクの選択的な修飾に成功し、細胞の形態がナノパターンのサイズや形状に依存することを明らかにした。今後は、細胞が本来の機能を保持して生育するのに最適な流速・表面・形状を検討し、細胞の機能発現とナノ構造との相関を明らかにすると共に、マイクロ空間に化学・バイオ機能を組み込んだ高機能ナノ流体デバイスの基礎検討を行う。

2. 研究実施内容

A) ナノ流体デバイスの開発

平成 17 年度までには、トップダウン的加工技術を用いて加工領域・精度が 3 桁のオーダーで異なるマイクロとナノ流路を融合し、マイクロ・ナノ流体デバイス開発の検討を行った。具体的には、マイクロチャネルの一部分に溶液混合機能を持つナノチャネルを加工することで、ナノチャネル内での安定な流体導入および制御を実現した。また、マイクロ・ナノ空間への溶液導入法として、 CO_2 置換導入法および背圧調整器を用いたナノ流体制御法を確立した。これにより、ナノチャネル内溶液に $\mu\text{l}/\text{min}$ から pl/min オーダーの広範囲な流量で安定した圧力をかけることが可能となった。

B) チャンネル内マイクロ空間で用いるボトムアップ手法の検討

平成 17 年度には、流路壁面への高分子や機能性分子の化学修飾を行い、マイクロ空間におけるソフトマテリアル作製法の基礎検討を行い、流路壁面の化学修飾技術を確立した。これは、一つのマイクロチャンネル内を深さの異なる二種類のチャンネル(深いチャンネルと浅いチャンネル)に分ける加工をした後、毛細管現象を利用して、浅いチャンネルのみに疎水性溶媒を導入することで、親水・疎水面の塗り分けを可能とする手法である。この手法を利用すれば、流路面の機能を自在に制御できることになり、ボトムアップ手法の基盤となりうる。今後は、生体分子の修飾などに適用していく予定である。

C) ナノパターニング手法の検討

平成17年度には、様々な形状の金属ナノパターニングの作製および、マイクロ・ナノ電極上での自己組織化・電析など、ガラス基板上へのナノ材料のパターニングを実現した。また、これらナノパターン上への自己組織化単分子膜および細胞接着性タンパクを選択的に化学修飾することに成功した。さらに、ナノパターン上での自己組織化膜の特徴を明らかにするために、電子顕微鏡 (SEM) や原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた単分子膜の直接観察および飛行時間型二次イオン質量分析測定 (TOF-SIMS) を行い、ナノパターン上での化学修飾について定量的評価を行った。現在、そのナノパターンの特徴を細胞培養に利用するための最適条件検討を進めている。

D) チャンネル内マイクロ空間における細胞培養・制御法の検討

マイクロ空間で細胞を利用するためには細胞培養技術の確立が不可欠である。バルクとは異なり、細胞生育に必要な酸素および栄養素の供給、および老廃物の除去が困難となる。平成17年度までには、100 μ m オーダーのマイクロチャンネル内で細胞の生命維持・機能維持する方法を確立した。特に、接着細胞に対する流体の剪断応力の影響を初めて定量的に評価した。また、100nm オーダーにナノパターニングした接着分子上で細胞培養を行い、細胞の形態がパターンサイズやパターン形状に依存することを見出した。さらに、細胞パターニングしたナノ構造体をマイクロチャンネル内に組み込み、マイクロチャンネルに培養液を送液しながら、ナノ構造体上の細胞を培養することに成功した。これによって、細胞刺激とその応答をその場観測することが可能となった。しかしながら、ナノパターン上の表面性状や自己組織化ドメインの構造と細胞機能発現との関係および、流体の剪断応力との関係は未だ不明である。今後は、作製したパターン上に様々な細胞を培養し、接着細胞の形状と生存率を観測する。さらに、細胞内染色法による骨格・細胞内タンパク質の分布変化の確認と内分泌成分測定およびインテグリン分布計測を行う。これらの結果より、細胞が本来の機能を保持して生育するのに最良なナノ表面を明らかにし、細胞の機能発現とナノ構造との相関を明らかにしていく予定である。

E) 心筋細胞を用いた流体制御デバイスの開発

化学プロセスにおいて、圧力駆動型のポンプではなく化学エネルギーのみで微小空間の流体を駆動できるデバイスが期待されている。我々は、心筋細胞の拍動を利用した微小空間内の流体駆動法に着想した。平成17年度には、心筋細胞シートを付着させたダイアフラムをマイクロチップに組み込むことで、心筋細胞の拍動を利用してマイクロチャネル内の流体を駆動することに成功した。現状、2nl/min の流速で制御可能である。しかしながら、逆流が生じる等の問題があるため、現在、チェックバルブの機能向上等更なる改善を進めている。

G) 気液界面の観察および気液界面安定化技術の開発

気液反応・気液抽出・濃縮・蒸留・凝縮・気液分離など、これまで成されていない化学プロセスの実現を目指し、マイクロ・ナノチャネルの構造や化学的性質の制御技術を検討した。具体的には、親水・疎水塗り分け法を利用して、混合溶媒の気液分離・濃縮デバイスおよびナノ構造体を利用した蒸留デバイスの基礎検討を行った。

親水・疎水の塗り分けをしたチャネル上に安定な気液界面が存在すると、その部分をヒーターで加熱することで、蒸発した液体は気体側に分離できる。この操作を流体駆動下で続けると、蒸発した液体は徐々に気体の方に濃縮されていくことになる。さらに、気体側のマイクロチャネル上の後段にナノピラー構造体を組み込むと、マイクロチャネル内を流れてきた気体はナノピラー空間において、その小さい飽和蒸気圧のため毛管凝縮現象が起こる。その結果、分離後の気体を凝集液体として回収することが可能となる。実際、蒸気／液体分離部を加熱し、蒸気／液体分離部に 10w% エタノール水溶液を流したところ、蒸気分離後の蒸気凝縮部で凝縮液体が確認できた。凝縮液体が微量であるため組成は未確認であるが、毛管凝縮現象を利用したマイクロチップ蒸留操作が実現できたことを示唆している。

H) ナノ物理化学現象の特性評価と現象解明-1

平成17年度には、40 - 5000nm の拡張ナノ空間中の水物性について核磁気共鳴(NMR)法により解析した。水は液体構造を保持するが、水の並進運動とプロトン移動度が変化することを明らかにした。これらの結果は、拡張ナノ空間水は、バルク相・吸着相に加え、ガラス壁面電荷の影響を受けた 100nm スケールのプロトン移動相が存在することを示唆している。三相状態モデルで定量的な評価を行ったところ、このモデルが妥当であることが分かった。

この推察の妥当性を評価するために、蛍光測定による励起状態プロトン移動反応を行ったところ、ナノ空間でのプロトン移動速度にサイズ効果の発現が見られた。一方、最も単純な二分子反応モデルとして光電子移動反応の空間サイズ依存を測定し、拡散係数という観点からは空間サイズ効果が検出されないことを見出した。これらの結果は、ナノ空間では水のプロトン拡散が変化するが、流体力学的な項である自己拡散・回転拡散は空間サイズの影響を受けないことを示している。より詳細な検討が必要であるが、現状、ナノ空間の水は高いプロトン移動度、つまり pH がバルク水とは異なることを示唆している。

I) ナノ物理化学現象の特性評価と現象解明-2

ナノ空間の特異な水物性が、化学反応にどのように影響するのかを明らかにすることは、ナノ化学プロセスを実現する上で極めて重要である。平成17年度には、圧力駆動による溶液導入法を用い、化学反应用 Y 字型ナノチャネル内へ二つの異なる溶液を導入・混合することに成功し、ナノ空間での酵素反応を実現した。蛍光顕微鏡による観測から酵素反応時間の依存性の評価を行ったところ、ナノ空間中では溶液の pH が変化していることを示唆する結果を得た。現在、反応速度論的解析を進めている。さらに、圧力駆動実験によりナノ流体の圧力－流量関係を調べたところ、ハーゲンポアズイユの式から予測される理論値より 2～3 倍程度の流量減少が確認された。この結果はナノ流体の粘性増加に対応する。今後は、Y 字ナノチャネル内での合成反応、抗原抗体反応への展開を進めている。

3. 研究実施体制

「ナノ加工・バイオ」グループ

①研究分担グループ長：北森 武彦（東京大学大学院工学系研究科、教授）

②研究項目：

- ・ナノ加工設備の整備
- ・チャネル内マイクロ空間で用いるボトムアップ手法の検討
- ・マイクロ空間内における細胞培養・制御法の検討

「ナノ物理化学」グループ

①研究分担グループ長：金 幸夫（東京大学大学院工学系研究科、助教授）

②研究項目：

- ・ナノ物理化学計測に向けた基礎検討
- ・ナノ空間物理化学の解明

「マイクロ加工・流体」グループ

①研究分担グループ長：渡慶次 学（神奈川科学技術アカデミー光科学重点研究室、研究員）

②研究項目：

- ・マイクロナノ複合構造構築に向けた加工法の検討

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- An actuated pump on-chip powered by cultured cardiomyocytes

Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, and T. Kitamori
Lab on a Chip, 6 (3), 362–368 (2006).

Nature, 440, 258–259 (Research highlights).

- Demonstration of a PDMS-based bio-microactuator using cultured cardiomyocytes to drive polymer micropillars
Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, and T. Kitamori
Lab on a Chip, 6(2), 230–235 (2006).
- AC electroosmotic micromixer for chemical processing in a microchannel
N. Sasaki, T. Kitamori, and H.-B. Kim
Lab on a chip, 6(4), 550–554 (2006).
- Micro-multiphase laminar flows for the extraction and detection of carbaryl derivative
A. Smirnova, K. Mawatari, A. Hibara, M. A. Proskurnin and T. Kitamori
Analytica Chimica Acta, 558(1–2), 69–74 (2006).
- Cell Culture and Life Support System for MicrobioReactor and Bioassay
Y. Tanaka, K. Sato, M. Yamato, T. Okano, and T. Kitamori
Journal of Chromatography A, in press.
- Demonstration of a bio-microactuator powered by cultured cardiomyocytes coupled to hydrogel micropillars
K. Morishima, Y. Tanaka, M. Ebara, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, and T. Kitamori
Sensors and Actuators B, Chemical, in press.
- Liquid Filling Method for Nanofluidic Channels Utilizing High Solubility of CO₂
E. Tamaki, A. Hibara, H. B. Kim, M. Tokeshi, T. Ooi, M. Nakao, and T. Kitamori
Analytical Sciences, in press
- Tunable thermal lens spectrometry utilizing microchannel-assisted thermal lens spectrometry
E. Tamaki, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori
Lab on a Chip, 5 (2), 129 – 131 (2005).
- Surface Modification Method of Microchannels for Gas-Liquid Two Phase Flow in Microchips
A. Hibara, S. Iwayama, S. Matsuoka, M. Ueno, Y. Kikutani, M. Tokeshi, T. Kitamori
Anal. Chem., 77(3), 943–947 (2005).
- Photocatalytic Redox-Combined Synthesis of L-Pipecolinic Acid with a Titania-modified Microchannel Chip
G. Takei, T. Kitamori, H.-B. Kim
Catal. Commun., 6, 357–360 (2005)
- Spectroelectrochemical detection using thermal lens microscopy with a glass-substrate microelectrode-microchannel chip
H.-B. Kim, T. Hagino, N. Sasaki, N. Watanabe, and T. Kitamori

- J. Electroanal. Chem., 577(1), 47-53 (2005)
- Development of a Microchip-based Bioassay System Using Cultured Cells
M. Goto, K. Sato, A. Murakami, M. Tokeshi, T. Kitamori
Anal. Chem., 77 (7), 2125-2131 (2005)
 - Rapid proton diffusion in microfluidic devices by means of micro-LIF technique
K. Shinohara, Y. Sugii, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori, K. Okamoto
Experiments in Fluids, 38 (1), 117-122 (2005).
 - Effect of Korteweg stress in miscible liquid two-layer flow in a microfluidic device
Y. Sugii, K. Okamoto, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori
J. Visualization, 8 (2), 117-124 (2005).
 - 酸化チタン薄膜を集積化したマイクロチャネルチップを用いた光触媒反応
竹井豪, 北森武彦, 金幸夫
化学と工業, 58(2), 147-149 (2005).
 - 集積化ガラスチップ
渡慶次学, 菊谷善国
表面技術, 56(3), 132-137 (2005).
 - 液液マイクロ多相流
火原彰秀, 北森武彦
混相流, 19(1), 16-24 (2005).
 - マイクロチャネル内気液二相流を利用した化学プロセス
渡慶次学, 北森武彦
混相流, 19(1), 25-30 (2005).
 - マイクロ化学バイオチップ入門
北森武彦, 田中有希
応用物理, 74(5), 623-627 (2005).
 - マイクロバイオシステム
佐藤香枝, 佐藤記一, 北森武彦
ケミカルエンジニアリング, 50(5), 329-334 (2005).
 - マイクロ化学
上野雅晴, 火原彰秀, 北森武彦
表面科学, 26(2), 74-81 (2005).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 5 件 (CREST 研究期間累積件数 : 19 件)