

「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

1. ナノパターンニング手法の検討

培養細胞の機能発現や生死制御は、足場への接着機構・形態の理解が重要である。平成 17 年度までには、トップダウン的に加工した数百 nm サイズの金属ナノパターン(チタン-金)上に、ボトムアップ的手法によってナノ構造体の表面に自己組織化膜を形成させることで、その表面上へ選択的に培養細胞が接着・伸展できるデバイスを開発した。本年度は、金属ナノパターンの幅およびパターン間隔を変化させた表面を作製し、パターン表面に 1-オクタデカンチオール(ODT)、ガラス表面には細胞接着を抑制できる 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーを固定することで、物理化学的に極めて高コントラストなナノパターンを作製することに成功した(図 1)。これによって、細胞

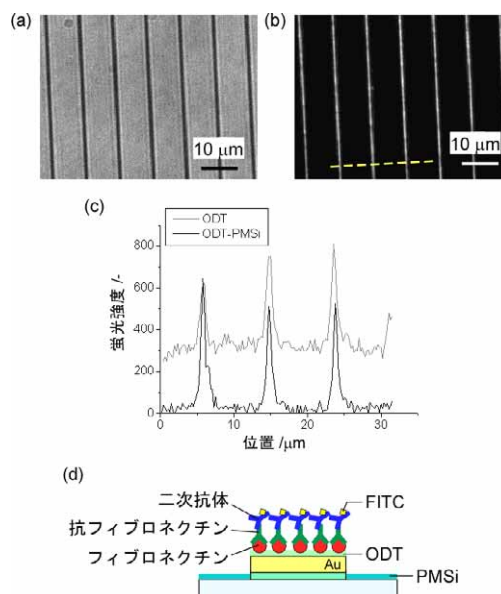


図 1 (a,b)ODT, MPC で修飾したナノパターン表面の同位置の顕微鏡画像 ((a)位相差像, (b)蛍光画像). (c) ナノパターンの蛍光強度スキャンプロファイル. (d)ODT, MPC で修飾したパターン表面でのタンパク質吸着の模式図.

の接着斑に近いサイズで細胞接着挙動を解析することが可能となるため、細胞-基材表面間の相互作用や機能発現研究のための新しい方法論となりうる。この成果は、*Analytical Sciences* 誌 23(3), 245-247 (2007)に掲載された。(なお、MPC ポリマーは東京大学マテリアル工学専攻石原教授から提供頂いた。)

2. チャンネル内マイクロ空間における細胞培養・制御法の開発

ナノ構造特有の機能をマイクロ流路内に持ち込み、ナノ生物物理化学アーキテクチャの創製を実現するためには、1) ナノ構造体表面への接着挙動解析、2) せん断応力と細胞機能との関係解明、3) 心筋細胞を用いたマイクロ流体制御デバイスの開発が重要な要素となる。平成 17 年度までには、細胞パターンニングした 100nm オーダーの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細胞の生命維持・機能維持を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。また、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ンネル内の流体を駆動することに成功した。本年度は、下記に示す結果を得た。

2-1. ナノ構造体表面への接着挙動解析

パターン化ナノ構造体のサイズおよびパターン間隔を制御し、サイズ変化に伴う繊維芽細胞の接着形態・増殖挙動を解析した。ストライプ状に作製したナノパターンでは、細胞はストライプ方向に沿って表面に接着・伸展する様子を観測した。この配向性接着挙動は、パターン間隔に依存しないことから、初期接着した領域周辺の細胞接着性を細胞が認識・選択して伸展過程に移行していくことが考えられる。また、パターン幅 450nm 以上かつパターン間隔 18 μm 以上の場合、図 2 に示すように、1 本のストライプラインに接着する細胞が観察された。このパターン間隔は浮遊状態の細胞より大きい。反面、250nm 幅のナノ構造体ではパターン間隔サイズに関わらず細胞接着は見られなかった。以上より、細胞の接着状態の維持には細胞接着に関わるタンパク質が集合した接着斑と同等サイズの接着表面が必須であり、それ以上の接着表面であれば自由度高く細胞骨格を変化できることが示唆される。

2-2. せん断応力と細胞機能との関係解明

血管内皮細胞は、血流の変化に応じて細胞の機能を変化させることで、血液循環の恒常性を保持する性質を持っている。すなわち、マイクロ空間内に培養した血管内皮細胞のずり応力や刺激物質に対する応答を調べることは、血管内の流れと細胞機能との関係を模擬することに他ならない。そこで、血管内皮細胞における白血球接着挙動をマイクロチャンネル内で調べた。炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ で刺激した血管内皮細胞には、白血球細胞株 HL-60 が顕著に接着するのに対し、通常の条件下で培養した血管内皮細胞には殆ど HL-60 細胞は接着しないことが分かった。この結果は、炎症が起きている血管内皮細胞に白血球が接着することが動脈硬化の原因とされている生体内と同様の挙動である。本研究成果は、*Analytical Science* 誌 23(3), 261-266 (2007)に掲載された。

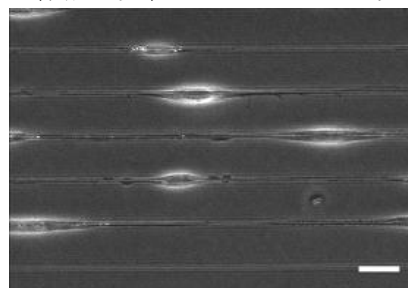


図 2. ストライプ状ナノ構造体表面上で培養した繊維芽細胞の位相差像。パターン幅: 450nm, パターン間隔: 18 μm 。スケール: 30 μm 。

2-3. 心筋細胞を用いたマイクロ流体制御デバイスの開発

これまでに、自発的に拍動する心筋細胞を駆動素子として利用する様々なバイオマイクロアクチュエーターを開発してきた。本年度は、ポリジメチルシロキサン PDMS (シリコーンゴム) の中空球を作製し、その外側に心筋細胞シート (東京女子医大岡野研究室より提供) を巻き付けることで、心臓を模擬した中空球型心筋ポンプの開発に成果で始めて成功した (図 3)。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。この成果は、Lab on a Chip, 7(2), 207-212 (2007) に掲載され、Chemical Science 誌 highlight として取り上げられた。

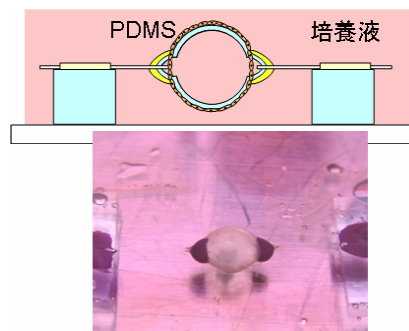


図 3. 擬心臓型流体駆動デバイス. 上が模擬図で、下が培養液中の写真。

3. ナノ物理化学現象の解明

平成 17 年度までには、石英ガラス基板上に作製した 100nm スケール空間中 (拡張ナノ空間) の水の物性について各種分光測定を用いて解析した。核磁気共鳴(NMR)法からは、水の構造は変化せず、分子間相互作用・プロトン電荷分布・プロトン移動性に空間サイズ効果が出現することを明らかにした。これらの結果から、拡張ナノ空間では、ガラス壁面電荷との相互作用によって水分子同士がルーズに結合した配向性の高い水分子相 (プロトン移動相) が、壁面から 100nm 程度の領域で存在しているモデルを提案した。本年度は、10nm サイズの拡張ナノ空間加工法を開発し、その内部に導入した水の NMR 測定を行うことで、拡張ナノ空間水から 1nm サイズのナノポア水へどのようなメカニズムで状態変化していくかに関する知見を得ることとした。水の $^1\text{H-NMR}$ 緩和速度 ($1/T_1$) サイズ依存性は、800nm 近傍から 200 nm までサイズ減少に伴い急激に増加するが、40 - 200 nm の領域で一定の値に収束する傾向を示した。また、4 nm シリカポアまで空間サイズを小さくすると、 $1/T_1$ 値は再び増加に転じることが分かった。これらの結果から、拡張ナノ空間内の水分子挙動はバルク相、プロトン移動相、壁面吸着相の三相の重み平均に依存していることが示唆された (図 4)。実際、三相近似した式を実験値と比較したところ、互いに良く一致することを確認した。この成果は、Angew. Chem. Int. Ed., 46, 1180 (2007) に "Highlighted in the inside cover" として掲載された。

また、これら拡張ナノ空間内の特異物性は化学反応や化学平衡に影響を与えると考えられる。そこで本年度には、NMR スペクトルの積分比を利用し、アセチルアセトン (Hacac) の keto-enol 互変異性化反応の空間サイズ効果を解析した。一般に、Hacac の keto-enol 平衡



$\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COCH}_3(\text{keto})]$ は、溶媒極性に大きく依存する。1.6M に調整した Hacac 水溶液の keto-enol 平衡の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルから、keto 体の $-\text{CH}_3$ 基と enol 体の $-\text{CH}_3$ 基とのピーク面積比 ($K_{EQ} = [\text{keto}]/[\text{enol}]$) を調べたところ、3000nm から 500nm 付近までは K_{EQ} 値は一定であったが、500 nm 以下になるとサイズ減少に伴い K_{EQ} の値は急激に増大した。これは、Hacac の keto 体が増加していることに対応する。この現象を説明する為に、 K_{EQ} 値の温度依存を調べ、van't Hoff's プロット ($\ln K_{EQ} = -\Delta H/RT + \Delta S/R$) に基づき活性化エンタルピー (ΔH) および活性化エントロピー (ΔS) という熱力学パラメータを算出した。その結果、

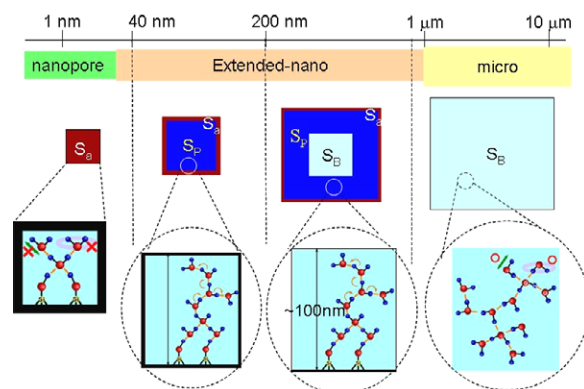


図 4. 水の相状態の空間サイズ依存. S_B, S_P, S_a はそれぞれ、バルク相、プロトン移動相、壁面吸着相に対応する。

3000nm において $\Delta H=9.0$ (kJmol⁻¹K⁻¹), $\Delta S=40.8$ (Jmol⁻¹K⁻¹) を取った値が、サイズ減少に伴って減少し、202nm では $\Delta H=3.6$ (kJmol⁻¹K⁻¹), $\Delta S=24.5$ (Jmol⁻¹K⁻¹) までそれぞれ減少することが分かった。この結果は、拡張ナノ空間において Hacac の keto 体がエネルギー的にも構造的にも安定に存在する事を意味しており、バルク空間内の Hacac と水分子は水和構造を取るが、拡張ナノ空間内では Hacac のカルボニル基と水分子が構造化した水素結合ネットワークを形成していることが要因として考えられる。以上より、拡張ナノ空間の特異な水物性は化学平衡に影響することを始めて見出し、定性的ではあるが、その反応メカニズムについて解析することができた。

拡張ナノ空間の物理化学現象の更なる高度解析を行うためには、単一クラスターレベルの分析が可能な高感度顕微分光法が必要であると考えられる。そこで本年度には、新規分光法として、「ナノ交互回折格子分光法」の原理検証と開発を行った。これは、マイクロチップ内に試料用ナノチャンネルと参照用ナノチャンネルを一定の周期になるよう格子状に配置し、照射したレーザー光から生じる回折光（ここでは 2.5 次光）の強度変化から試料の屈折率変化を検出できるという手法である。試料チャンネルに純水、参照チャンネルに空気を導入し、拡張ナノ空間内の水のフェムト秒時間分解計測を行ったところ、石英ガラス由来の信号などが出現することなく、水由来のみの Kerr 効果信号を検出することができた。以上より、本装置は、試料・参照ナノチャンネル間の状態の差のみを回折光として検出することが出来るため、ナノ空間溶液の高感度なダイナミクス計測装置として有効であると言える。

4. ナノ流体デバイス開発

平成 17 年度までに、背圧制御法を用いることで、3 桁のオーダーで異なるマイクロ・ナノ複合構造への溶液導入・混合法を開発し、ナノチャンネル内溶液を pl/min オーダーの低流量で制御する事を可能とした。本年度は、反応時間制御可能なナノ流体制御装置を作製し、ナノチャンネル内での生体関連分子の反応（酵素および抗原抗体反応）を実現することを目的とした。

4-1. 新規ナノ流体制御装置の開発

電子線描画及びプラズマエッチングによって、石英基盤上に Y 字型ナノチャンネルと U 字型マイクロチャンネルを作製しナノ反応チップとした。圧力コントローラーを用いてバイアル瓶内の試料溶液に加圧しチャンネル内への溶液導入をすることとした。Y 字型ナノチャンネルの二つの入口から、バッファー溶液のみおよびバッファーによって pH 調整した 10⁻⁵M のフルオレセイン誘導体 (2-Me-4-OMe tokyogreen; TG) 溶液をそれぞれ導入し、入口と合流チャンネルの蛍光強度比からチャンネル内の溶液混合を比較したところ、Y 型ナノチャンネル内での異なる二液が等量混合できていることが確認できた (図 5)。

4-2. 酵素反応

ナノ空間中において、酵素 β -galactosidase による基質 tokyogreen- β -galactoside (TG- β -gal) の酵素加水分解反応を行った。様々な濃度の基質 TG- β -gal において、反応で生成する TG の蛍光強度は時間経過と共に増加する傾向を観測した。この蛍光強度の傾きは酵素反応の初速度と関係付けられるので、ミカエリス・メンテン式に基づき酵素反応の速度パラメータを求めた。ナノ反応における一次速度定数は 0.16 /sec となり、バルクの約二倍の値を取った。この反応速度変化はナノ空間の特異な溶液物性が関係していることを示唆するものである。

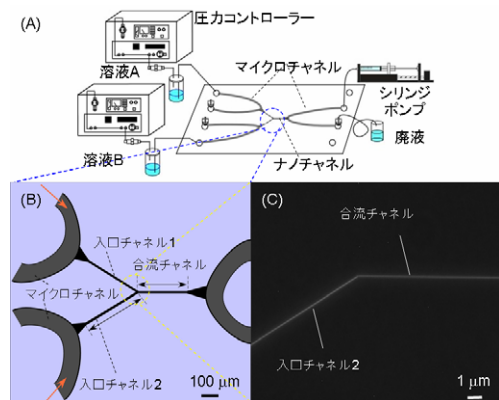


図 5 (A) ナノ流体制御装置図. (B) マイクロ・ナノチャンネル配置図 (入口チャンネル 1,2; 幅 400nm, 深さ 250nm, 合流チャンネル; 幅 600nm, 深さ 250nm). (C) ナノチャンネル内の tokyogreen 溶液の蛍光画像.

4-3. 抗原抗体反応

本年度は、拡張ナノ空間における単一分子免疫分析法（ELISA 法, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）の基盤技術を確立することを目的とした。具体的には、（1）チップの設計・製作、（2）ELISA のためのナノ流体制御法の開発、（3）拡張ナノ空間の ELISA 法の原理実証を行った。抗原には AFP を、二次抗体には HRP 標識抗 AFP ウサギポリクローナル抗体を蛍光標識キットで標識して用い、ナノチャンネル内での蛍光画像観察を行った。その結果、抗原を導入すると、明らかに蛍光強度が高く、抗原抗体反応による信号を始めて観測した。さらに、無標識での高感度分析を実現するため、TLM 測定を実施したところ、約 800 分子の検出を $S/N=96$ 程度で測定することができた。1桁程度の高感度化で単一分子測定が可能なレベルに到達しつつある。この要因として、拡張ナノ空間による酵素増幅反応時の生成物の閉じ込め効果および溶液の粘度増加に伴う拡散速度の減少が、反応生成物を高濃度に蓄積できることが挙げられる。今後は、基質の濃度や反応時間など単一分子測定のための条件を確立して、単一分子 ELISA 反応の TLM 測定を実現するとともに、拡張空間での抗原抗体反応の速度や分子認識能を明らかにしていく。

以上のように平成 18 年度は、細胞接着制御可能なナノ構造体の作製に成功し、ナノ構造体表面への接着挙動解析やせん断応力と細胞機能との関係に関する知見を得た。また、拡張ナノ空間溶液物理化学現象、特に、ナノ空間の溶液平衡の空間サイズ効果に関する知見を得た。また、拡張ナノ空間を利用した生体関連分子の化学反応を世界に先駆け実現すると同時に、拡張ナノ空間内溶液の高感度分光法の構築に成功した。今後は、これらの知見と技術を組み合わせ、マイクロ・ナノ構造内に化学・バイオ機能を組み込んだナノ生物物理化学アーキテクチャの構築およびその機能評価を行う。また、細胞培養とナノパターンニング・マイクロ・ナノ流体との関係解明を進める。

3. 研究実施体制

(1)「ナノ加工・バイオ」グループ

①研究者名

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
- ・マイクロ空間内における細胞培養・制御法の検討

(2)「ナノ物理化学グループ」グループ

①研究者名

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

(3)「マイクロ加工・流体グループ」グループ

①研究者名

馬渡 和真 (神奈川県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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Development of an NMR Interface Microchip “MICCS” for Direct Detection of Reaction Products and Intermediates of Micro-syntheses Using a “MICCS-NMR”
Y. Takahashi, M. Nakakoshi, S. Sakurai, Y. Akiyama, H. Suematsu, H. Utsumi, and T. Kitamori
Analytical Sciences, 23(4), 395-400 (2007).
- Pressure Balance at the Liquid-Liquid Interface in Micro Counter-Current Flows in Microchips
Arata Aota, Akihide Hibara, Takehiko Kitamori
Analytical Chemistry, in press.
- Rapid bonding of Pyrex glass microchips
Yoshitaka Akiyama, Keisuke Morishima, Atsuna Kogi, Yoshikuni Kikutani, Manabu Tokeshi, Takehiko Kitamori
Electrophoresis, 28(6), 994-1001 (2007).
- Highly Sensitive Detection of Non-Labeled Peptides Using UV Excitation Thermal Lens Microscope/Liquid Chromatography
Shinichiro Hiki, Manabu Tokeshi, Masaya Kakuta, Kazuma Mawatari, Yoshikuni Kikutani, Kiichi Sato, Akihide Hibara, Kiyohito Shimura, Naoyuki Uchida and Takehiko Kitamori
Bunseki Kagaku, 56(1), 1-8 (2007).
- Nanometer-scale Patterned Surfaces for Control of Cell Adhesion
Makiko Goto, Takehiko Tsukahara, Kae Sato, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, Kiichi Sato, Takehiko Kitamori
Analytical Sciences, 23(3), 245-247 (2007).
- Culture and leukocyte adhesion assay of human arterial endothelial cells in a glass microchip
Yo Tanaka, Yuji Kikukawa, Kae Sato, Yasuhiko Sugii, Takehiko Kitamori
Analytical Sciences, 23(3), 261-266 (2007).
- Flow Velocity Profile of Micro Counter-Current Flows
Arata Aota, Akihide Hibara, Kyosuke Shinohara, Yasuhiko Sugii, Koji Okamoto, Takehiko Kitamori

- Analytical Sciences, 23(2), 131–133 (2007).
- NMR Study of Water Molecules Confined in Extended–Nano Spaces
Takehiko Tsukahara, Akihide Hibara, Yasuhisa Ikeda, and Takehiko Kitamori
Angewandte Chemie International Edition, 46(7) 1180–1183 (2007) (Highlighted in the inside cover).
 - Application of a micro multiphase laminar flow on a microchip for extraction and determination of derivatized carbamate pesticides
A. Smirnova, K. Shimura, A. Hibara, M.A. Proskurnin, and T. Kitamori
Analytical Sciences, 23(1), 103–107 (2007).
 - A micro–spherical heart pump powered by cultured cardiomyocytes
Yo Tanaka, Kae Sato, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Takehiko Kitamori
Lab on a Chip, 7(2), 207–212 (2007).
 - Countercurrent Laminar Microflow for Highly Efficient Solvent Extraction
Arata Aota, Masaki Nonaka, Akihide Hibara, Takehiko Kitamori
Angewandte Chemie International Edition, 46(6), 878–880 (2007).
 - Instantaneous carbon–carbon bond formation using a microchannel reactor with a catalytic membrane
Yasuhiro Uozumi, Yoichi M. A. Yamada, Tomohiko Beppu, Naoshi Fukuyama, Masaharu Ueno, and Takehiko Kitamori
J. Am. Chem. Soc., 128(50) 15994–15995 (2006).
 - Evaluation of effects of shear stress on hepatocytes by a microchip–based system
Yuki Tanaka, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Takehiko Kitamori, Kiichi Sato
Meas. Sci. Technol. 17, 3167–3170 (2006).
 - Pressure–driven flow control system for nanofluidic chemical process
Eiichiro Tamaki, Akihide Hibara, Haeng–Boo Kim, Manabu Tokeshi, Takehiko Kitamori
J. Chromatography A. 1137 (2), 256–262, (2006).
 - Supercooled micro flows and application for asymmetric synthesis
S. Matsuoka, A. Hibara, M. Ueno, T. Kitamori
Lab on a Chip, 6 (9), 1236–1238 (2006)
 - Miniaturized thermal lens and fluorescence detection system for microchemical chips
M. Yamauchi, M. Tokeshi, J. Yamaguchi, T. Fukuzawa, A. Hattori, A. Hibara, T. Kitamori
J. Chromatogr. A, 1106(1–2), 89–93 (2006).

(2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 2 件 (CREST 研究期間累積件数: 21 件)