

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 16 年度採択研究代表者

生田 幸士

名古屋大学大学院工学研究科・教授

光駆動ナノマシンを用いた新原理バイオ計測ツールの研究

1. 研究実施の概要

本研究の最終目的は、申請者らが基本概念を独自に提案し、作製技術と実証モデルの開発に成功している「光駆動マイクロ・ナノマシン」技術を基盤とした「細胞生物学研究用のナノマニピュレータ」と、同様に概念提案を起点として研究を進めてきた「新原理バイオ化学 IC チップ群」の実現にある。

前者に関し、すでに実証まで到達している生細胞の個別操作に加え、細胞の力学特性を精密計測する新手法と、 pN 以下の超微小力のキャリブレーション法の開発、さらにリアルタイム力計測システムを構築し、細胞生物学への光駆動ナノマシンの応用基盤を築いた。

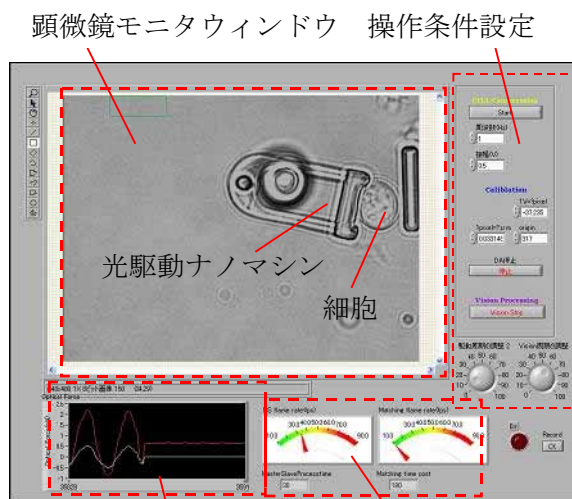
後者、バイオ化学 IC チップは、指の上に乗るサイズの合成用、分析用の汎用化学装置のマイクロ化を目的としている。欧米のラボオンチップやマイクロTASと違い、輸液装置や検出装置などすべてをマイクロチップ化してきた。すでに30種近い化学 IC チップが開発済みである。本年度は、細胞機能解析用化学 IC チップ群をさらに高機能化した。各種温度制御チップを開発し、PCRのマイクロ化とインキュベータ不要で各種生化学実験が可能となった。生化学の全工程を微小化する「真のマイクロ化」が進展しつつある。

2. 研究実施内容

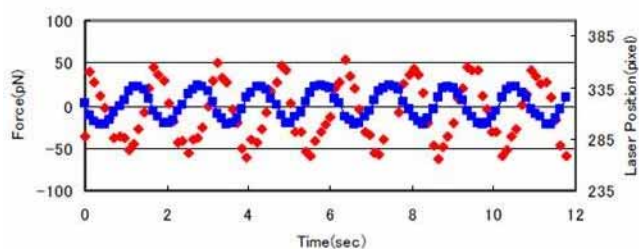
1. 「光駆動ナノマシン」のリアルタイム力計測システムの実現

光駆動ナノマシンの一種の「ナノムーバ」を開発し、液中の生細胞を遠隔操作すると同時に、細胞など操作対象の力学特性をリアルタイム計測できる力計測システムの構築に成功した。具体的には、光学顕微鏡から得られるCCD画像上の光駆動ナノマシンのレーザトラップ点のレーザー焦点からの変位をリアルタイムに画像処理して算出し、事前にキャリブレーションしておいた精密な変位-光駆動力関係から、細胞の弾性変形に付随する反力をリアルタイムに計算、表示できる。

現在、本手法を多くの生体素材に適用し、システムの妥当性を検証中である。



リアルタイム力算出グラフ

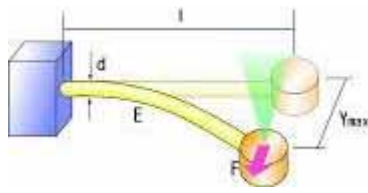


光駆動ナノマシン力計測システムと細胞反力データ

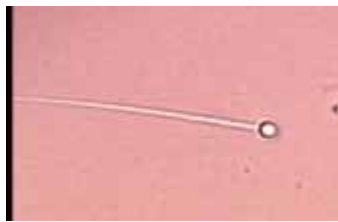
2. 光駆動ナノマシンの微小力キャリブレーション手法の開発

従来、光トラッピング力のキャリブレーションには、既知の流速内に置かれたマイクロビーズの流体抵抗の公式を用いて算出されていた。一般に流体計測実験では、液体の粘性や流速などの精密測定が困難であるため、算出モデル式と実験誤差が大きく、誤差を10パーセント以内に押さえることは非常に困難であった。そこで、本研究では、より高い精度が得やすい固体力学を用いることを前提とし、ナノスケールのキャリブレーション用デバイスを考案試作した。片持梁を2光子ナノ光造形法で作製し、先端に付けたマイクロビーズを光駆動した時の、片持梁のたわみから発生力を校正する手法である。結果、光駆動力の計測精度を大幅に向上することができた。

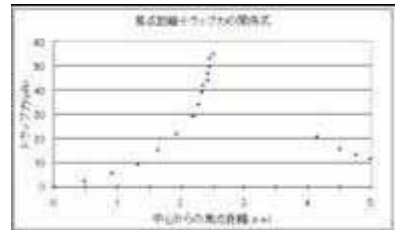
本手法は、光駆動ナノマシンの発生力キャリブレーション用だけでなく、AFM等が不得意とするメゾスコピック領域の力や、液中での水平方向の微小力を計測する新たなデバイスとして、マイクロ領域の力計測全般に適用可能な手法である。



片持梁による水平力精密測定手法の概念図



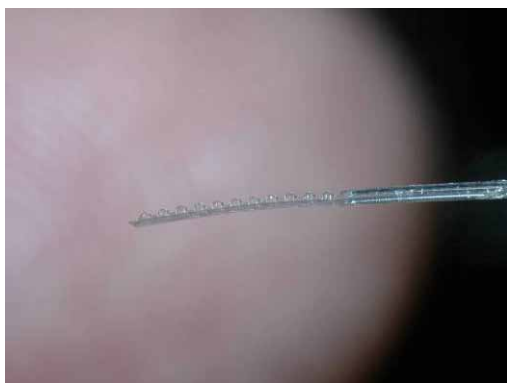
ナノ片持梁による光トラップ力計測実験(直径 200nm)



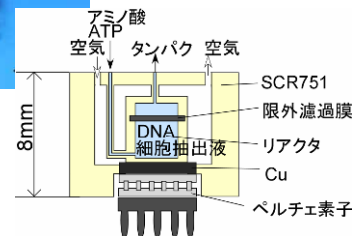
計測したレーザー変位 - 光トラップカグラフ

3. 新 MeME 法による世界最小径水圧方式能動カテーテルの開発

水圧で屈曲する直径 $300 \mu\text{m}$ の能動カテーテル機構を考案し、本研究室で開発したポリマ薄膜マイクロ流路作製処方である「MeME プロセス」にエキシマレーザーカッティングの工程を導入した「MeME-X プロセス」を考案し、カテーテル先端の水圧空気圧で屈曲するベローズを微細造形した。脳内など毛細血管の分岐部で任意の方向を選択できる。微細な動脈瘤の治療などへの応用される。



世界最小径の水圧能動カテーテル



温度制御バイオ化学ICチップと無細胞蛋白合成系

4. バイオ化学ICチップの進展

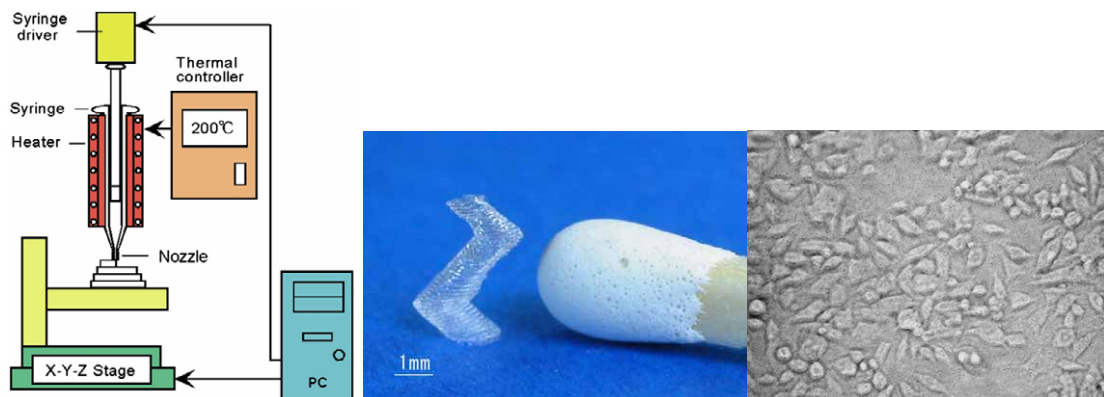
すでに30種近い化学 IC チップが開発されてきたが、大半の生化学実験はインキュベータ (恒温槽) の中で実験してきた。将来、戸外や体に装着して使用するマイクロ化学デバイスの実現には、大型のインキュベータは不適用である。そこで、温度制御機能を内蔵したリアクタチップを開発した。従来の化学 IC チップと整合性も持つため、すでに開発した他の化学 IC チップと結合して、合成系や分析系を構成できる。

加熱冷却にはペルチェ素子を用い、温度センサも内蔵している。主要部分はマイクロ光造形法で作製されている。このチップを他の化学 IC と組み合わせれば、将来、ポータブルな環境センサや毒物検査装置、ウェアラブルな健康モニタや DDS など多くの生体医用応用が容易に構築可能となる。

5. 生分解性樹脂微細積層造形技術の開発

生分解性樹脂は、初期段階では通常の樹脂と同等の機能を有するが、生体内に埋め込むと、加水分解、及び酵素的分解を受けて、最終的には消滅する。よって、埋め込んだ装具の除去手術が不要となる。従来、縫合糸やボルトなど単純な形状の装具は存在したが、微細構造を作製できないため、更なる応用の展開が妨げられていた。

我々は、熱溶解積層造形の原理を微細領域に適用し、高精細ノズルの開発と、積層条件の最適化を行い、生分解性樹脂に適用できる新たな微細積層造形技術を開発した。本造形技術の分解能は、従来手法より1桁優れた、 $4.5\ \mu\text{m}$ を達成している。また、微細かつ複雑な構造をCADデータを元に、僅か数分で作製可能である。さらに、本造形技術では、溶媒を用いないため、細胞適合性も良好である。今後、本造形技術を発展させ、体内埋め込み型化学ICなど、具体的なデバイスへの応用を図る。



熱溶解を利用した生分解性樹脂微細積層造形技術による3次元微細構造物と細胞培養試験

3. 研究実施体制

(1)「生田幸士」グループ

① 研究分担グループ長: 生田 幸士(名古屋大学大学院、教授)

② 研究項目

- ・細胞小器官操作のための光駆動ナノマニピュレータ・光駆動バイオ化学ICの開発
- ・開発したデバイスの生命現象解明手段としての適用
- ・近接場細胞観察手法を用いた計測システムの構築

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. A. Yamada, F. Niikura, K. Ikuta, A three-dimensional microfabrication system for biodegradable polymers with high resolution and biocompatibility, *J. Micromech. Microeng.*, 18, 025035 (9pp), 2008
2. 長谷川忠大, 中嶋健一郎, 尾松史之, 生田幸士, 多分岐切換用ロータリー型マイクロバルブチップ(第2報) ソレノイドを利用した自動切換え機構の提案, 日本機械学会論文集 C編 73(731), 193-199, 2007
3. Tadahiro Hasegawa, Kenichiro Nakashima, Fumiyuki Omatsu, Koji Ikuta, "Multi-directional micro-switching valve chip with rotary mechanism", *Sensors and Actuators A .Physical*, 14, pp.390-398, 2008
4. M. Iwata, K. Hayakawa, T. Murakami, K. Naruse, K. Kawakami, M. Inoue-Miyazu, L.Yuge, S. Suzuki, Uniaxial cyclic stretch-stimulated glucose transport is mediated by a ca-dependent mechanism in cultured skeletal muscle cells, *Pathobiology* 74(3), 159-68, 2007
5. S. Mohri, M. Nakamura, K. Naruse, Automation of pH measurement using a flow-through type differential pH sensor system based on ISFET, *IEEEJ Transactions on Sensors and Micromachines*, 127E(8), 367-370, 2007
6. S. Ito, H. Kume, K. Naruse, M. Kondo, N. Takeda, S. Iwata, Y. Hasegawa, M. Sokabe, A Novel Ca²⁺ Influx Pathway Activated by Mechanical Stretch in Human Airway Smooth Muscle Cells, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38, 407-413, 2008
7. Y. Katanosaka, J-H. Bao, T. Komatsu, T. Suemori, A. Yamada, S. Mohri, K. Naruse, Analysis of cyclic-stretching responses using cell-adhesion-patterned cells, *J. Biotechnol.*, 133, 82-89, 2008
8. F. Yasui, M. Miyazu, A. Yoshida, K. Naruse, A. Takai, Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using a G_{q/11} protein-inhibitor, YM-254890, *Br J Pharmacol*, in press, 2008, published online 21 April, 2008
9. Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M., Mechano-sensitive channels regulate the stomatal aperture in *Vicia faba*, *Biochem Biophys Res Commun*, 366, 758-762, 2008.
10. Toyota M, Furuichi T, Tatsumi H, Sokabe M., Cytoplasmic calcium increases in response to changes in the gravity vector in hypocotyls and petioles of *Arabidopsis* seedlings, *Plant Physiol*, 146, 505-514, 2008

11. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M., Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels, *J Cell Sci*, 121, 496-503, 2008.

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数:0 件 (CREST 研究期間累積件数:1件)