

生体・溶液系ナノデバイス研究の為の微小流体チップ開発

高村 禪

北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科

1. 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。

2. 研究成果と考察

I. 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

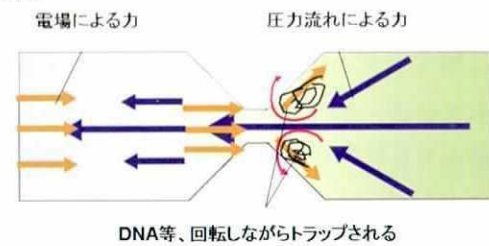


図1 電場と圧力流による DNA トラップ

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、 $10\mu\text{m}$ 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う使い方が可能である。短い DNA/RNA も電圧と圧力を増加することによりトラップでき、現在 RNA では $10\mu\text{m}$ 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。

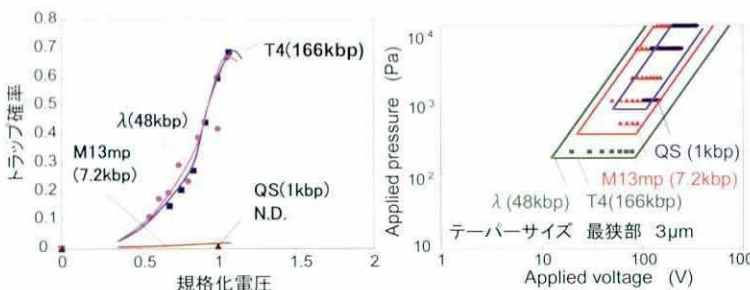


図2 DNA のトラップ確率の電圧依存性(上)とトラップ条件(下)

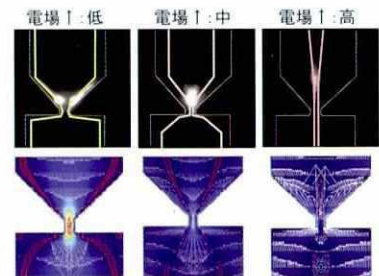


図3 トラップパターン遷移

II. 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4(a)の構造により集積化することに成功した。加えて図4(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。

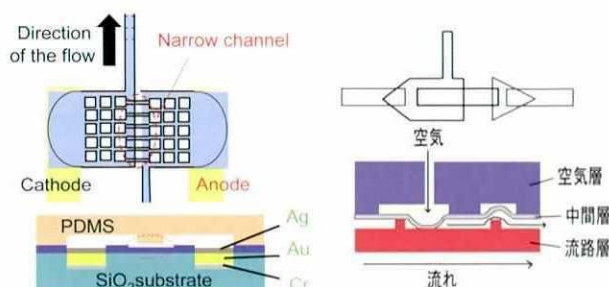


図4集積化ポンプ(a)電気浸透流型(b)空圧制御型

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の開発

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5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てあり、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。

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、即ち汎用性が高く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。もうひとつは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である。洗いの処理に、II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。

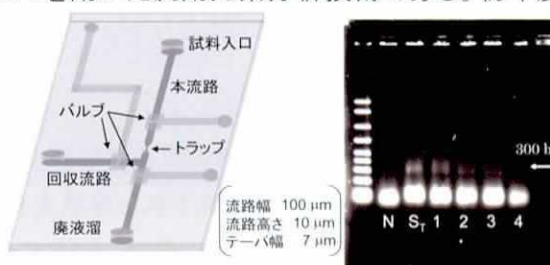


図5細胞からの DNA 抽出と濃縮

3. 主な論文

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* (in press).
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*, (in press).

4. その他

特許

特開 2005-278418 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
 特開 2005-283163 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
 他に出願中 2 件、内 1 件はPCT出願中