

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03827

研究課題名(和文) ゲルポンプ内蔵マイクロチップ分析システムの創生

研究課題名(英文) Development of gel-pump microchip analysis system

研究代表者

山口 佳則 (Yamaguchi, Yoshinori)

大阪大学・工学研究科 招へい教授

研究者番号：20386634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：液体クロマトグラフィーに類する分離分析をマイクロチップ内で完結できるプラスチック片を新規に開発することで、社会生活における多くの場面でのその場分析が可能になる。液相の送液のためのポンプ技術を含む液体クロマトグラフィーの技術をマイクロチップ内に集積化するためには、マイクロチップ内に送液ポンプを内蔵することが必要である。本研究においては、マイクロチップ内に自励振動ゲルを内蔵し、自励振動ゲルを周期的に振動することによって、ポンプとして動作させ、自励振動ゲルの反応槽とは隔離されたマイクロチャンネル移動相の溶媒を3日持続的に約400nL/minの速度で送液することを可能とした。

研究成果の概要(英文)：In chemical analysis including the synthesis and separation, the system for generating a solution flow, which is called “pump system” is required. Thus, the pump system is required to be miniaturized to adapt to the microchip system. To miniaturize the physical or mechanical pump, it is strong disadvantages that conventional mechanical pump is need to be architected by moving parts. And the source of the reactor which generate the force of pump should also be miniaturized to integrate in microfluidic system. Therefore, the lack of cheap and easy-to-integrate micro-pump including the power source was the fetal limitation for microfluidic system. In this study, we adopted the self-oscillating gel (BZ-gel) embedded into the microfluidic channel as the power source of the micro-pump. The self-oscillation of BZ gel generated sufficient physical forces to flow the solution in microchannel. We, here, proved that the simple oscillating BZ gel works for micro-pump for microfluidic system.

研究分野：分析化学

キーワード：分析化学 ナノ・マイクロデバイス 自励振動ゲル クロマトグラフィー マイクロチップ キャピラリー電気泳動 ワンプッシュ分析

### 1. 研究開始当初の背景

液体クロマトグラフィーに類する分離分析をマイクロチップ内で完結できるプラスチック片を新規に開発することで、社会生活における多くの場面での分析技術が必要になる懸念事項、たとえば、残留農薬の検出、害害低分子化合物の分析、環境汚染物質の分析などをその場で、低価格にて測定、検出を行うことが可能となる。加えて、マイクロチップで送液を含む液体クロマトグラフィー分析が完結できるので、使い捨て、環境負荷の軽減、外部の汚染の軽減、液相に使用する劇物溶媒の微量化、溶媒に使用する劇物溶媒の使用が極微量になることで、測定環境の汚染の防止、などの多くの分析による問題を解決できる。

マイクロチップを利用した分析では、従来の研究所や研究施設で使用されてきた大型の液体クロマトグラフィー装置と同等の分析効果をその大きさが数 cm でかつ、プラスチックで製作された、使い捨て可能なプラスチック片で完結できるので、まさに汚染が進む現場での測定、料理前の野菜や食物のその場での分析を可能とする。

マイクロチップ分析はその場での安全安心を担保できる技術ではあるが、特に、液体クロマトグラフィーの技術を応用した場合には、液相への溶媒の送液について外部からのポンプ機構を利用した方法が一般的で、ポンプ機構をマイクロチップ内に内蔵したマイクロチップ分析はまだない。したがって、その場における、例えば、野菜の洗いを分析するだけで残留農薬が測定できるなどの分析が達成できていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、自励振動ゲルをマイクロチップ内に設置し、自励振動ゲルの酸化・還元による膨張を利用することで、マイクロチップ内の送液を行い、その場での分析、特に液体クロマトグラフィー分析を可能するための原理を追求し、開発、研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

プラスチック (PMMA) を切削、切断することで作成したマイクロチップにゲルアクチュエータを内蔵する反応槽を製作し、反応槽とは隔離された部分に移動相となる溶媒を流すことの出来るマイクロチャンネル (移動相チャンネル) を持つ分析用のマイクロチップを製作し、移動相を数マイクロリットルの微量にした際に起こる移動相溶液拡散を定量化し、移動相の溶媒の容量が数マイクロリットルに制限した際の分離分析の機構について、固定相の表面における化学的な相互作用を拡散係数の科学的現象と捕らえ、数マイクロリットルの移動相での分析の原理を追検討した。原理検証には画像分析の手法を利用し、移動相チャンネルを流れる溶液の速さを定量化した。

クロマトグラフィー分析のための移動相が流れることの出来るマイクロチャンネルの直径を 10x10 マイクロから 100x100 マイクロの大きさにすることによって、分析に必要な移動相の全体の容量が数マイクロでも十分な分析機構を持つマイクロチャンネルを考案する。加えて、マイクロチャンネル内を流れる移動相の安定した流れを作り出す機構として新規にマイクロピストン型の動力機構を考案し、自励振動ゲルの振動による動力が欠損無くクロマトグラフィー分析に十分な送液を実現する。これらの一連の基礎研究は、移動相の全体の容量を数マイクロリットルにすること流体による分離分析原理の実験的検証を含む。具体的には固定相に微細な球形粒子を利用することによって起こるマイクロ対流、移動相の流量をマイクロリットルにすることによる、移動相の粘度、固定相表面の化学分子との相互作用による理論段数を評価し、分離能を検討した。検証実験には、プラスチック上に加工した流路を利用して行い、また、通常のポンプに変わる直動式アクチュエータを考案し、検証実験に対応した装置を新規に開発した。

さらに、自励振動ゲルの振動による送液をマイクロチップ内での流量を大きくすることを実現するために、大きさが数 mm の自励振動をする完全化学合成の自励振動ゲルアクチュエータをマイクロピストン型の動力源に変わるエネルギー源として新規合成する。合成した自励振動ゲルアクチュエータの物理特性、例えば、それ自身の強度、振動周期、弾性強度、弾性限界、弾性余効を調べる。合成には Ru 化合物を利用し、架橋化学分子についても、新規の合成が可能であるかを検討する。

### 4. 研究成果

プラスチック製 (Polycarbonate 製) のマイクロチップを考案し作製しました。作製したマイクロチップは内部に移動相の溶媒及び、固定相になる微細な球形粒子を内蔵でき、さらに、ワンプッシュでの移動相を送液することができます。大きさは 15cm (長さ) X 3cm (幅) x 2mm (厚) です。移動相が流れることの出来るマイクロチャンネルの直径を 10x10 マイクロから 100x100 マイクロに大きくすることによって、分析に必要な移動相の送液が安定して十分な分析機構を持つマイクロチャンネルを内部に構成できるように設計しました。開発したマイクロチップは内部にポンプの原動力となる自励振動ゲルを充填することが出来るものである。加えて、本研究では、考案したマイクロチップ内に集積化した移動相の溶液をワンプッシュで安定した流れを作り出す機構をもつマイクロチップ分析装置を開発した。開発したマイクロチップ分析装置はマイクロピストン (直動式アクチュエータ) の動力機構をもち、約 3 日間の間、自励振動を繰り返すことで移動相チャンネルの送液を行うことができる。

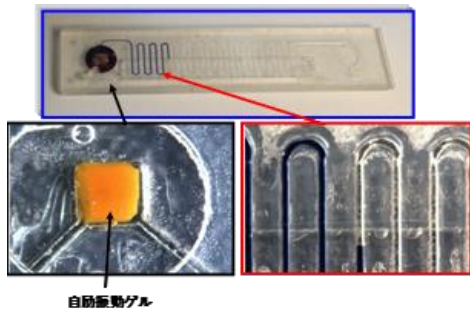


図1. マイクロチップ内に自励振動ゲルを内蔵し、ポンプとして利用した。

ピストンの運動について、たとえば、加速したり、初速度を速めたり、など、反応溶液の濃度や混合比を変化させることで、動作の制御を試みた。最適化の方法は移動相マイクロチャンネルを流れる溶液の画像分析によって、実験的に送液を最適化することを試みた。このマイクロチップはクロマトグラフィー分析を外部からの送液のみならず、外部からの実験補助を必要とせず、外部への汚染の全く無いマイクロチップとして意図したマイクロチップとして、送液を持続的に行うことの出来るポンプ内臓のマイクロチップとして、装置の基本的な機構の動作確認を行い、再現性が高く、マイクロ送液を実現するマイクロチップとして完成度の高いものを研究、開発をした。

自励振動ゲルを利用した送液では450nl/minの流速で約3日間連続で送液が出来ることを発見した。3日間の送液と450nl/minの流速による送液は毛細管現象を利用した送液や、心筋膜を利用した送液と比較して送液持続時間、送液の能力の両方で優れていた。(図2) さらに、溶媒の送液を利用した応用研究として、キャピラリー電気泳動を組み合わせ、ミトコンドリアの検出、DNAの高感度分析、微生物のゲノムの測定など、多くの応用研究を生み出した。

Capillary micro-pump V.S. Gel-integrated micro-pump  
(Conclusions)

	Energy source	Size dependence	Environmental Limitations	Pumping duration	Physical performance	
					Flow Rate	Pressure
Capillary driven	Capillary force	Need Capillary structure	Strongly depended on heat. Atmospheric pressure	< 1 min	< 300 nl/min (not continuous)	< 7.20 kPa
BZ-Gel driven	Chemical reaction (BZ reaction)	> 2mm (Scale universality)	Non (15°C~65°C)	> 3 days	> 450 nl/min (Continuous)	< 0.5 kPa
Cardiomyocyte driven (Heart sheet)	Medium (glucose)	> 5 mm	Strongly depended on culture condition	< 6 hours	2 - 5 nl/min	< 1 kPa

図2. 自励振動ゲルを内蔵し、マイクロチップとして移動相に送液し、その能力を比較した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

① Zhenqing Li, Jiaxin Huang, Bo Yang, Qingxiang You, Shinichi Sekine, Dawei Zhang, Yoshinori Yamaguchi, "Miniaturized Gel Electrophoresis System and Its Application to Fast Genetic Diagnosis of Periodontal Pathogens", *Sensors and Actuators, B chemical*. (2017), Vol. 254, 153-158 | (査読あり)

② Chenchen Liu, Yoshinori Yamaguchi, Shinichi Sekine, Xiaoming Dou, "Precise and simultaneous enumeration of multiplex pathogens using multiplex polymer chain reaction coupled with a novel quantitative capillary electrophoresis", *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 258 :263-269, (2018) (査読あり)

③ Yubin Zhao, Yoshinori Yamaguchi, Chenchen Liu, Shinichi Sekine, Xiaoming Dou, "Quantitative detection of ethanol/acetone in complex solutions using Raman spectroscopy based on headspace gas analysis", *Applied Spectroscopy*, (72), 280-287, (2017), | DOI:10.1177/0003702817738010 (査読あり)

④ Zhenqing Li, Bo Yang, Shinichi Sekine, Dawei Zhang, Songlin Zhuang, Yoshinori Yamaguchi (2018), "Alignment and Counting of Mitochondria based on Capillary Electrophoresis", *Sensors & Actuators B: Chemical*, 265:110-114, (2018) (査読あり)

⑤ Chunxian Tao, Bo Yang, Zhenqing Li, Dawei Zhang, Yoshinori Yamaguchi, "Real-time Tracking DNA Fragments Separation by Smartphone ." *Journal of Visualized Experiments*, March, 20, e55926 (2017) | doi:10.3791/55926 (査読あり)

⑥ Yueping Zhu, Zhenqing Li, Ping Wang, Lisong Shen, Dawei Zhang, Yoshinori Yamaguchi, "Factors affecting the separation performance of proteins in capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography B*, 1083:63-67 (2018) (査読あり)

⑦ Jin Chen, Yi Ni, Chenchen Liu, Yoshinori Yamaguchi, Qinmiao Chen, Shinichi Sekine, Xifang Zhu, Xiaoming Dou, "Rapid identification and quantitation for oral bacteria based on short-end capillary electrophoresis" *Talanta*, (2016) (査読あり)

⑧ Wilfred V. Espulger, Masato Saito, Jong-Kook LEE, Yoshinori Yamaguchi,

Eiichi Tamiya, "Non-invasive Video Image-based Analysis Method Coupled to Field Potential Recording for Evaluation of the Drug-induced Effect in Cardiac Tissue" *Electrochemistry*, 84(5), 283-289 (2016) | Doi:10.5796/electrochemistry.84.283 (査読あり)

⑨ Zhenqing Li, Yang Zhao, Dawei Zhang, Songlin Zhuang, Yoshinori Yamaguchi, "The Development of a Portable Buoyancy-Driven PCR System and Its Evaluation by Capillary Electrophoresis" *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 230:779-784 (2016) | DOI: 10.1016/j.snb.2016.02.143 (査読あり)

⑩ Zhenqing Li, Chenchen Liu, Siyao Ma, Dawei Zhang, Yoshinori Yamaguchi, "Analysis of the Inhibition of Nucleic Acid Dyes on Polymerase Chain Reaction by Capillary Electrophoresis" *Analytical Method*, 8:2330-2334 (2016) | DOI: 10.1039/C5AY02705E (査読あり)

⑪ Chenchen Liu, Yoshinori Yamaguchi, Shinichi Sekine, Yi Ni, Zhenqing Li, Xifang Zhu, Xiaoming Dou, "Gene analysis of multiple oral bacteria by the polymerase chain reaction coupled with capillary polymer electrophoresis" *Journal of Separation Science*, 39, 986-992 (2016) | DOI: 10.1002/jssc.201501087 (査読あり)

⑫ Zhenqing Li, Chenchen Liu, Dawei Zhang, Yoshinori Yamaguchi, "Capillary electrophoresis of RNA in hydroxyethylcellulose polymer with various molecular weights." *Journal of Chromatography B*, 1011:114-120 (2016) | DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.12.057 (査読あり)

⑬ Tomoka Nakazumi, Yusuke Hara, "Separation of Small DNAs by Gel Electrophoresis in a Fused Silica Capillary Coated with a Negatively Charged Copolymer" *Separations*, 2017, 4, 28; DOI: 10.3390/separations4030028 (査読あり)

[学会発表] (計6件)

① Yoshinori Yamaguchi, "Capillary electrophoresis", 17th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2017) Shanghai, China; 10-13 November 2017 (Invited)

② Yoshinori Yamaguchi, "Capillary Electrophoresis Separation for 1-bp difference", 16th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2016), Johor Bahru, Johor, Malaysia; 7-10

November 2016. (Invited lecture)

③ Yoshinori Yamaguchi, "Capillary Polymer Electrophoresis for nucleic acid", 2016 International Conference on Nanomaterials, Photoelectronic Devices and Information Technology (NPDIT2016), Changzhou, China, 18-20 November 2016 (Invited, Keynote lecture)

④ Yoshinori Yamaguchi, "Capillary Electrophoresis for siRNA and Bacteria detection", APCE 2015 (TAIWAN), Nov. 15-18, 2015.

⑤ 山口佳則, 「RNA キャピラリー電気泳動」第67回日本電気泳動学会総会、2016年8月26日～27日、釧路観光国際交流センター (招待講演)

⑥ 山口佳則, 「心筋細胞イメージング」日本応用物理学会関西支部「光・ナノ・バイオの融合 基礎から応用: エネルギー～医療まで」、2016年10月7日(金) 関西学院大学西宮キャンパス (招待講演)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 佳則 (YAMAGUCHI Yoshinori)

大阪大学・大学院工学研究科・招聘教授  
研究者番号: 20386634

### (2) 研究分担者

原 雄介 (HARA Yusuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・機能化学研究部門・主任研究員  
研究者番号: 90452135