

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19206046

研究課題名（和文）生体一分子リアルタイム機能解析のためのマイクロ流体システムの構築

研究課題名（英文）Development of Micro Fluidic Systems for Real Time Function Analysis of Single Biomolecules

研究代表者

庄子 習一（SHOJI SHUICHI）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：00171017

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞から生体一分子を抽出・分離・集積し、その機能観察及び計測をリアルタイムに行える新しいマイクロ流体システムの構築を目指した。その結果として、1細胞単位で多数の細胞をトラップし長期培養できるデバイス、ダメージが少ない状態で細胞内内容を抽出する細胞破碎デバイス、生体分子の高速分離・収集システム、高感度生体分子分析マイクロチップおよび多サンプル同時処理のためのマイクロ流体制御システムの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Micro fluidic Systems for real time function analysis of single biomolecules were proposed and demonstrated. By applying MEMS and μ TAS technologies, functional particular cell trapping and culture micro flow systems, a damage free cell rapture device, high through-put bio molecules sorting systems and high performance biomolecules analysis chips have been developed. Multi sample treatment and handling system technologies are also proposed and demonstrated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
年度			
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：計測システム、微細プロセス技術、バイオデバイス

1. 研究開始当初の背景

MEMS、 μ TAS、Lab-on-a-Chip、BioMEMS等国際会議が開かれ多くの報告が行われるなど、化学・生化学応用を目的としたマイクロシステムの研究開発は、当該研究

者のグループを含め、国内外で盛んに研究され、DNA・プロテイン分析の必要性から、その目的に特化したデバイスも市販されるようになってきていた。さらに、光学的検出技術の進歩により、蛍光や発光を用いて生体一

分子レベルで観察を行うことも可能となってきた。しかし、POCT(Point of Care Testing)に適用できるような、小型なシステムとして運用可能なマイクロ流体システムの開発は、生体分子をターゲットとしてみた場合には未だ未着手であった。本研究は、マイクロ流体システムを利用して、ある程度多数の細胞から生体分子を同時に抽出・分離・集積化し、流路内で直接観察する事まで IN LINE システムで実現しようとする野心的なものである。特に μ TAS 技術等を応用したマイクロバルブ、マイクロ流路等の素子を、前処理から観察までの一連の流れを一体化したシステムに統合し、実用的なシステムを実現しようとする点が従来の研究と比べて大きな特徴である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞から生体一分子を、機能を損なうことなく抽出・分離・集積し、その機能観察及び計測をリアルタイムに行う、新しいマイクロ流体システムの構築を目的とする。この目的の実現のため、細胞からオルガネラ/タンパク質を、機能は維持したまま取り出す技術の構築、細胞及びオルガネラ/タンパク質の機能を維持したまま分離するソーティング技術の構築、多サンプルの同時処理のためにマイクロ流路を三次元化する技術の構築、および、生体分子の機能を維持したまま外界刺激が可能で、ある期間生体分子の機能が維持される IN LINE 観察場の構築に関する要素技術の確立と、それら要素技術を集積化したマイクロ流体システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、今までに研究代表者が構築してきたナノエレクトロニクスの加工技術をバックグラウンドとし、Micro electro Mechanical Systems:MEMS および Micro Total Analysis Systems: μ TAS 技術を応用した機能デバイス・システムの開発を行った。特に多サンプルをターゲットとした総合的なマイクロ流体システムの実現、およびシステムの中での生体一分子のリアルタイム機能解析に目的を絞り、研究を遂行することで、従来の実験系を置き換える「生体一分子機能解析・処理システム」を実現することを目指した。そのために、従来の要素技術についてシステム化の観点から見直し、系統的に生体一分子の観察・計測が可能な実験系の構築を図った。

4. 研究成果

(1) 一細胞培養デバイス

対象とする細胞を1個単位でトラップし、培養できるマイクロ流体システムについて

研究を行い、マイクロ流路に半円型の細胞トラップ構造を設けることにより、1細胞単位で培養できるデバイスを試作した。また、細胞導入流路と培養液流路を分離し膜で隔てる構造にすることで長時間の安定な培養が行えるデバイスを実現した。さらに効率化をはかるため多数の細胞を1個単位でトラップし、培養できるマイクロ流体システムについて研究を行った。(図1)流路の構造や並列化構成を最適化することにより、512個のトラップ構造に80%以上の確率で細胞を固定できた。細胞導入流路に蛍光ラベル剤や界面活性剤を流すことにより、識別可能な生体分子の抽出が効率的に行えることを確認した。

(図2)この研究により、特定細胞の同時長期培養が可能となり、この点が国際会議で評価された。

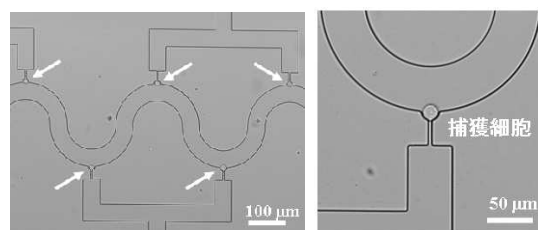


図1 単一細胞捕獲・培養デバイス

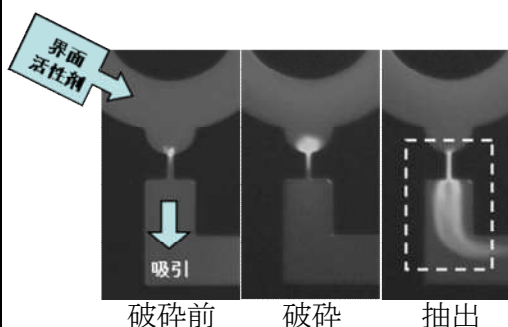


図2 細胞単位の破碎・内容物抽出

(2) 細胞内生体分子抽出デバイス

特定の細胞より生体分子を機能維持した状態で抽出するデバイスについては、マイクロバルブ構造を応用し、ナノスケールの突起構造を用いる方式を考案した。このデバイスにより従来の物理的破碎および化学処理では難しかったオルガネラ・リポソームの形状の維持および抽出効率の向上が可能となった。

(3) 生体分子分離・集積デバイス

細胞・生体分子の分離・集積を目的とした1入力2出力型マイクロソータとして、温度感応性ハイドロゲルをキャリア流体として用い、収束赤外線光で駆動する方式を採用することにより、分離速度5msecで分離制度93%以上を実現した。(図3)このソータにより60時間で150万個のミトコンドリアを分離できることを確認した。

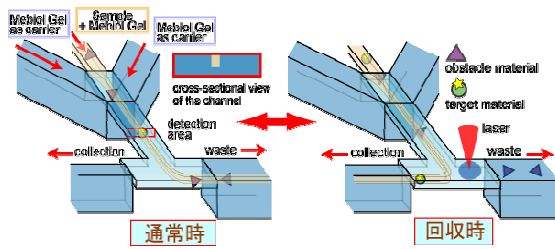


図3 温度感応性ハイドロゲルソータの原理図

また、高スループット分離を目的として上記ソータの並列化・最適化について研究を進め、PDMS 2層+ガラス基板の構造に3次元並列流路を形成した8並列構造のマイクロ流体システムを作成した。これにより、E. coli Cell の分離について応答速度 10-20msec、成功率 85-95%を実現できた。さらに、同時に多種類の生体分子を分離・集積可能な1入力-4出力マイクロソータを試作した。3種類の分離を応答速度 10-20msec、成功率 80%以上で実現できた。(図4) これらの方式は、10nm~数 μm の小さな生体分子の分離・収集方法として汎用性が高く、実用化に向けて研究を続けている。

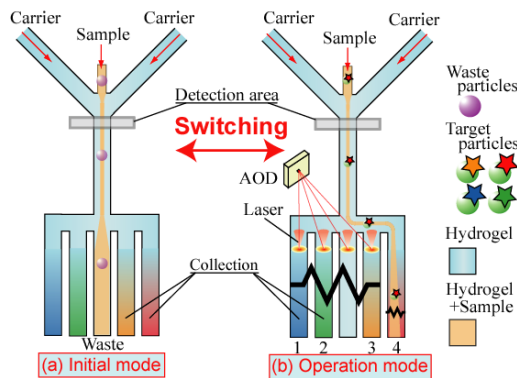


図4 並列生体分子分離ソータの概念図

(4) 高感度生体分子分析チップ

オルガネラやタンパク質等の生体分子の高速高効率分析を目的として、電気泳動分離チャンネルと質量分析器への導入部分となるイオン化電極を一体化したマイクロチップ (MCE-MS) を作製し、従来よりも高分解能で分析時間の短縮が図れることを実証した。(図5)

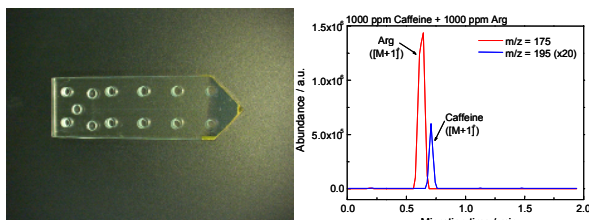


図5 MCE-MS チップと分離分析結果

また、液体クロマトグラフィーの分離コ

ラムをシリコンの微細加工技術によるピラーレイを用いて実現し、流路構造を最適化することにより、MEMSで作製されたマイクロチップでは初めて、従来のLCと遜色のない理論段数を得るとともに、大幅な分析時間の短縮を実現した。

(5) 多サンプル同時処理のためのマイクロ流体制御システム

集積回路のメモリのアドレスラインの考え方を応用して少ない圧力空気のコントロールラインで多数のバルブを独立に制御できるニューマチック型マイクロバルブアレーを開発した。256個の集積化マイクロバルブアレーのプロトタイプをPDMS 3層構造で作製し、大規模マイクロ流体システムの制御プロトコルを確認した。(図5)

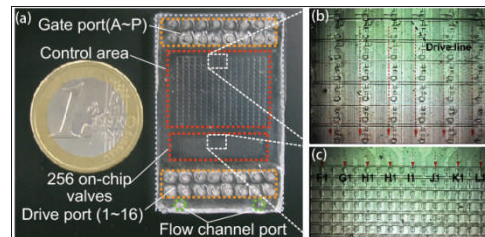
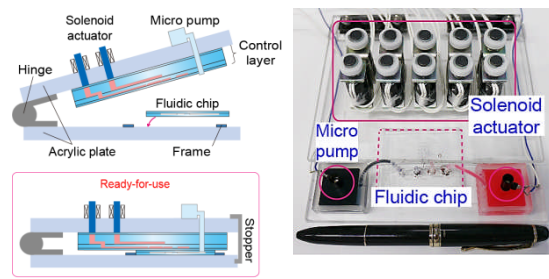


図5 集積化マイクロバルブアレー

また、従来、外部接続のシリンジポンプや空気圧供給源を小型EOFポンプと小型ソレノイドアクチュエータによる圧力制御バルブに置き換えることにより、システム全体の大幅な小型化を実現した。(図6) この構造の確立により、実用化の妨げとなっていた外部との接続チューブが不要となり、電気的接続のみで使用できるスタンドアロンシステムを世界に先駆けて実現した。



(a) システム構成 (b) システム外観図

図6 集積化マイクロ流体システム

上述した基盤技術により、従来の細胞機能解析技術に置き換わる、新しいツールが実現でき、個々のデバイスを集積化する技術の研究により「生体一分子機能解析・処理システム」の実現に近づいた。今後、目的とする生体分子に合わせたデバイス・システムの再構成が必要であるが、従来適切なツールがない為に発展が遅れていた、分子細胞生物学における細胞研究/生体一分子計測の研究加速が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(合計 14 件)

1. T. Arakawa, M. Noguchi, K. Sumitomo, Y. Yamaguchi, S. Shoji, “High-Throughput Single-Cell Manipulation System for a Large Number of Target Cells”, *Biomicrofluidics* Vol.5 No.1 (2011) 014114 (査読有)
2. D.H. Yoon, Y.K. Bahk, B.H. Kwon, S.S. Kim, Y.-D. Kim, T. Arakawa, J.S. Go, S. Shoji, “Improvement of Filtration Performance Using Self-Turning of Flow Resistance”, *Japanese Journal of Applied Physics* 50 (2011) 017201 (査読有)
3. K. Ozaki, H. Sugino, Y. Shirasaki, T. Aoki, T. Arakawa, T. Funatsu, S. Shoji, “Microfluidic Cell Sorter with Flow Switching Triggered by a Sol-Gel Transition of a Thermo-Reversible Gelation Polymer”, *Sensors and Actuators B* 150 (2010) pp.449-455 (査読有)
4. H. Sugino, T. Arakawa, Y. Nara, Y. Shirasaki, K. Ozaki, S. Shoji, T. Funatsu, “Integration in a Multilayer Microfluidic Chip of 8 Parallel Cell Sorters with Flow Control by Sol-Gel Transition of Thermoreversible Gelation Polymer”, *Lab on a Chip*, 2010,10 (2010) pp.2559-2565 (査読有)
5. H. Sugino, K. Ozaki, Y. Shirasaki, T. Arakawa, S. Shoji, T. Funatsu, “On-Chip Microfluidic Sorting with Fluorescence Spectrum Detection and Multiway Separation”, *Lab on a Chip* 2009, 2009, pp.1254-1260 (査読有)
6. H. Shinohara, Y. Takahashi, J. Mizuno, S. Shoji, “Fabrication of Post-Hydrophilic Treatment-Free Plastic Biochip Using Polyurea Film”, *Sensors & Actuators A*, Vol.154, 2009, pp.187-191 (査読有)
7. H. Shinohara, T. Suzuki, F. Kitagawa, J. Mizuno, K. Otsuka, S. Shoji, “Polymer Microchip Integrated with Nano-Electrospray Tip for Electrophoresis-Mass Spectrometry”, *Sensors and Actuators B* 132, 2008, pp.368-373 (査読有)
8. K. Kawai, M. Kanai, T. Munaka, H. Abe, A. Murakami, S. Shoji, “Parallel and Passive Distribution to Arrayed Microwells Using Self-Regulating Pinched Flow”, *Sensors and Materials*, Vol.20, No.6, 2008, pp.281-288 (査読有)
9. T. Arakawa, T. Yamamoto, S. Shoji, “Micro-Bubble Formation with Organic Membrane in a Multiphase Microfluidic System”, *Sensors & Actuators A*, Vol. 143 (2008) pp.58-63 (査読有)
10. T. Arakawa, T. Sameshima, Y. Sato, T. Ueno, Y. Shirasaki, T. Funatsu, S. Shoji, “Rapid Multi-Reagents Exchange TIRFM Microfluidic System for Single Biomolecular Imaging”, *Sensors and Actuators B* 128, 2007, pp.218-225 (査読有)

〔国際学会発表〕(合計 50 件)

1. M. Fujii, K. Kawai, D.H. Yoon, S. Shoji, “Volume Controlled High Throughput Picoliter Droplet Generation System Using Cascade Multi-Stage Separation Channel”, *The 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems: MEMS 2011*, 2011.01.24, Cancun, Mexico (2011) pp.1201-1204
2. K. Miyamoto, K. Kawai, S. Shoji, “Partly Disposable Lab-on-a-Chip System Using Electromagnetically-Drive Hydraulic Valves”, *23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference: MNC2010*, 2010.11.12, Fukuoka (2010) 12D-11-123
3. M. Fujii, K. Kawai, D.H. Yoon, S. Shoji, “High Speed Generation of Uniform Femtoliter Volume Droplets Using Cascade Multi-Stage Separation Microfluidic Device”, *23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference: MNC2010*, 2010.11.09-11, Fukuoka (2010) 11C-4-2
4. K. Kawai, F. Yamaguchi, A. Nakahara, S. Shoji, “Fabrication of Vertical and High-Aspect-Ratio Glass Microfluidic Device by Borosilicate Glass Molding to Silicon Structure”, *The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2010*, 2010.10.05, Groningen, The Netherlands (2010) pp.1193-1195
5. D.H. Yoon, T. Arakawa, J.S. Go, S. Shoji, “Size Controllable Polymeric Microlens Fabrication by Using a Multiphase Droplet Including Air Core”, *The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2010*, 2010.10.05, Groningen, The Netherlands (2010) pp.1118-1120
6. D.H. Yoon, D. Wakui, T. Sekiguchi, S. Shoji, “Selective Droplet Sampling Flow System Using Minimum Number of Horizontal Pneumatic Valves Formed by Single Step PDMS Molding”, *The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2010*, 2010.10.05, Groningen, The Netherlands (2010) pp.1085-1087
7. Y. Harada, K. Kawai, S. Shoji, “On-Chip

- Gas Concentration Gradient Formation Using Poreflon™ and Neoflon™ for In Vitro Observation of Cancer Cell”, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2010, 2010.10.04, Groningen, The Netherlands (2010) pp.551-553
8. A. Nakahara, Y. Shirasaki, K. Kawai, O. Ohara, J. Mizuno, S. Shoji, “Fabrication of High-Aspect-Ratio Amorphous Perfluorinated Polymer Structure for Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy”, The 36th International Conference on Micro & Nano Engineering: MNE 2010, 2010.09.21, Genoa, Italy (2010) P-LIFE-68
 9. M. Noguchi, M. Tsunoda, J. Mizuno, T. Funatsu, S. Shoji, “MEMS Fabricated Liquid Chromatography Microchip for Practical Uses”, The 23rd IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems: MEMS 2010, 2010.01.27, Hong Kong (2010) pp.911-914
 10. D. Wakui, S. Takahashi, T. Sekiguchi, S. Shoji, “Multi Channel Droplet Sorting Device with Horizontal Pneumatic Actuation Using Single Layer PDMS Flexible Parallel Walls”, The 23rd IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems: MEMS 2010, 2010.01.26, Hong Kong (2010) pp.144-147
 11. K. Ozaki, H. Sugino, T. Arakawa, Y. Shirasaki, T. Funatsu, S. Shoji, “High Performance Multiple E. Coli Cell Sorting System Using Thermosensitive Hydrogel and Fluorescence Spectrum Detection”, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2009, 2009.11.04, Jeju, Korea, (2009) pp.1856-1858
 12. K. Miyamoto, K. Kawai, T. Sato, M. Kanai, S. Shoji, “Microvalve Integrated All Neoflon Accurate Sample Injector Fabricated by Low Temperature Embossing and Bonding”, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2009, 2009.11.04, Jeju, Korea (2009) pp.1590-1592
 13. Y. Shibata, K. Kawai, M. Kanai, S. Shoji, “Precise Volume Controlled Multi Reagents Injective Microwell Array for Efficient Cell Function Analysis”, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2009, 2009.11.04, Jeju, Korea (2009) pp.1488-1490
 14. D.H. Yoon, T. Arakawa, J.S. Go, S. Shoji, “Generation of Polystyrene Microcapsules as Nanoliter Volume Gas Encapsulants by Using Gas-Organic-Water Multiphase Junction”, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2009, 2009.11.04, Jeju, Korea (2009) pp.1422-1424
 15. M. Fujii, K. Kawai, S. Shoji, “Multi Uniform Picoliter Volume Droplets Generation and Sorting Device for Digital Picoliter Dispenser”, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2009, 2009.11.04, Jeju, Korea (2009) pp.1356-1358
 16. K. Kawai, Y. Shibata, S. Shoji, “100 Picoliter Droplet Handling Using 256 (2^8) Microvalve Array with 18 Multiplexed Control Lines”, The 15th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems: Transducers 2009, 2009.06.23, Denver (2009) pp.802-805
 17. M. Noguchi, T. Arakawa, Y. Yamaguchi, S. Shoji, “Large Scale Micro Fluidic Systems for Sequential Trapping, Labeling and Content Extraction of Single Cells”, The 15th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems: Transducers 2009, 2009.06.22, Denver, USA (2009) pp.628-631
 18. K. Kawai, M. Fujii, S. Shoji, “Precise Titration Microfluidic System Using Sub-Picoliter Droplet Injection”, 22nd IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems: MEMS 2009, 2009.01.27, Sorrento, Italy (2009) pp.519-522
 19. Y. Murakami, T. Arakawa, S. Nomura, Y. Yamaguchi, S. Shoji, “High Performance Microfluidic Device for Sequential Trapping, Labeling and Content Extraction of Single Cells”, The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS2008, 2008.10.12-16, San Diego, USA (2008) pp.1774-1776
 20. K. Kawai, Y. Shibata, M. Kanai, S. Shoji, “Multiplexed Pneumatic Valve Control System for Large Scale Integrated Microfluidic Circuit (LSIMC)”, The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS2008, 2008.10.12-16, San Diego, USA (2008) pp.683-685
 21. K. Ozaki, H. Sugino, T. Arakawa, Y. Shirasaki, T. Funatsu, S. Shoji, “High Performance Multiple Biomolecules Sorting System”, The 12th International Conference

- on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS2008, 2008.10.12-16, San Diego, USA (2008) pp.489-491
22. T. Arakawa, T. Sameshima, Y. Sato, Y. Sumiyoshi, T. Ueno, Y. Shirasaki, T. Funatsu, S. Shoji, "Dynamic Imaging of Single Biomolecular Interaction Using Flow Control and TIRFM", The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS2008, 2008.10.12-16, San Diego, USA (2008) pp.296-298
 23. T. Arakawa, Y. Shirasaki, D. Yamazaki, T. Funatsu, S. Shoji, "Cell Rupture Microfluidic Device Using Nano Needle Alloy for Damage-Free Extraction of Organelles", The 12th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS2008, 2008.10.12-16, San Diego, USA (2008) pp.215-217
 24. H. Shinohara, Y. Takahashi, J. Mizuno, S. Shoji, "Post-Hydrophilic Treatment Free Plastic Biochip Fabrication Method Using Polyurea Film", 21st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems: IEEE MEMS 2008, 2008.01.13-17, Tucson (2008) pp.367-370
 25. T. Aoki, Y. Shirasaki, T. Arakawa, H. Sugino, T. Funatsu, S. Shoji, "High Speed Organelles Sorting Microsystem Driven by a Single Pressure Source", The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2007, 2007.10.07-11, Paris (2007) pp.224-226
 26. K. Kawai, M. Kanai, S. Shoji, "Efficient Addressable Fluid Control System Using Pneumatic Valve Array", The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences: μ TAS 2007, 2007.10.07-11, Paris (2007) pp.32-34

[国際会議基調・招待講演] (計6件)

1. S. Shoji, "MEMS Based Cell Function Analysis Micro Fluidic Devices and Systems", The 3rd IEEE International Conference on Nano / Molecular Medicine and Engineering: IEEE-NANOMED 2009, 2009. 10. 20, Tainan, Taiwan (2009) p. 16
2. S. Shoji, K. Kawai, H. Shinohara, D.H. Yoon, T. Arakawa, T. Funatsu, "MEMS Based Cell Function Analysis Micro Fluidic Systems", The 11th Korean MEMS Conference: KMEMS 2009, 2009. 04. 03, Jeju, Korea (2009) pp. 1-3

3. S. Shoji, T. Arakawa, K. Kawai, T. Funatsu, "Cell Function Analysis Tools Fabricated by MEMS and Nanotechnology", International Symposium on Surface Science and Nanotechnology: ISSS-5, 2008. 11. 09-13, Tokyo (2008) p. 407

[国内基調・招待講演] (合計21件)

1. 庄子習一, 「MEMS/ナノテクノロジーによるマイクロ/ナノ流体システム構築とバイオ・医療への応用」、第60回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、2010. 11. 26, Vol. 59 No. 9・10 (2010) p. 1157
2. 庄子習一, 荒川貴博、川合健太郎、篠原秀敏、船津高志、「MEMS/NTを応用した細胞機能解析マイクロシステム」、第17回日本コンピュータ外科学会大会、東京女子医科大学、東京、2008. 11. 01 (2008) pp. 213-214

[図書] (計5件)

1. 庄子習一, 川合健太郎, (株)シーエムシー出版、BIO INDUSTRY 第27巻 第3号、2010、7頁、22-28
2. 庄子習一, (株)テクノシステム, 「MEMS/NEMS工学全集 (Fundamentals and Applications of MEMS/NEMS Engineering)」、2009、8頁、727-734
3. 庄子習一, 技術教育出版社、マイクロ・ナノ化学チップと医療・環境・バイオ分析、2009、9頁、16-24
4. 庄子習一, 荒川貴博、川合健太郎、シーエムシー出版、バイオテクノロジーシリーズ 細胞分離・操作技術の最前線、2008、9頁
5. S. Shoji, H. Sato, R. Zengerle, "M41 Micropump: liquid", Comprehensive Microsystems, Elsevier Science Ltd. (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄子 習一 (SHOJI SHUICHI)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：00171017

(3) 連携研究者

1. 関口 哲志
早稲田大学・ナノテクノロジー研究所・准教授
研究者番号：70424819
2. 水野 潤
早稲田大学・ナノテクノロジー研究所・准教授
研究者番号：60386737