

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年～2011 年

課題番号：22760243

研究課題名（和文）液体誘電泳動を利用したフェムトリットル液滴の搬送・混合デバイス開発

研究課題名（英文）Development of droplet-based microreactor using liquid-dielectrophoresis

研究代表者

久米村 百子（KUMEMURA MOMOKO）

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

研究者番号：50533642

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまでのマイクロアレイ、マイクロ流体デバイスとは異なる、電気的な液体搬送方法による微量溶液の混合・反応システムを開発し、その有効性を検証した。主な成果は以下の2点である。(1) 作製した電気デバイス上で、フェムトリットルからピコリットルオーダーの微小液滴を形成した。(2) 形成した液滴を混合反応させ、酵素反応が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Droplet manipulation using liquid-dielectrophoresis has large potential for biological/chemical applications with micro-scale reactions. In this research, I have developed a droplet-based microreactor and optimized the device materials. The main results are as follows; (1) Droplet formation in the range of femto – pico liters (2) Demonstration of an enzyme reaction with 200 pico liter droplets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・電子デバイス・電子機器

キーワード：液体誘電泳動、液体搬送、オープンマイクロデバイス、バイオリアクタ

1. 研究開始当初の背景

分析化学やバイオ分野において、マイクロ化学チップの研究が進んでいる。一般的に、数十から数百マイクロメートルの空間で、対象物質や試薬を取り扱い、物質の高速な分離や高感度な検出が可能である。現在のマイクロ化学チップの研究は、チャンネルへ液体を連続的に送液するような閉鎖系システムが主流である。

しかし、マイクロチップによって試薬量が激減したと言っても、連続的な送液方法では数ミリリットルのサンプルが必要であり、同時に複数種類のサンプルを取り扱うには、その数のチャンネルが必要である、また、反応させた物質を回収する方法については、未解決の部分があり、マイクロチップに接続したチューブから取り出す例が一般的である。一方で、マイクロアレイを用いた場

合は、数マイクロリットルの試薬量で十分な分析ができるが、反応後の溶液を自由に搬送したりすることは難しい。

液体誘電泳動 (Liquid Dielectrophoresis, LDEP) は、Jones らによって考案された現象で、2つの電極間に、静電気的な電界の変化を与えることにより、基板の見かけ上のぬれ性を変化させて、液体を移動させる方法である(図1)。これを用いれば、開放系において電極上で、自由に液体を搬送させることができる。電極を複数本配置することによって、複数の液体を搬送して、混合を行うこともできる。本研究では、開放系において、ピコリットルオーダーの液体を自由に搬送、混合する統合的なマイクロデバイスの開発を目標として、液体誘電泳動を利用する。化学・バイオ反応も可能な汎用的デバイスとすることも目指す。

2. 研究の目的

- (1) 液滴サイズは、電極のライン幅に依存するため、幅数マイクロメートルの微小電極を作製し、体積数百フェムトリットルの微小液滴形成を達成する。
- (2) 形成した液滴を混合し、反応させるようなデバイスの開発とバイオ実験応用を行う。さらに、低電圧でバイオフィューセルなどの導電物質を含む溶液を搬送できる条件を導く。

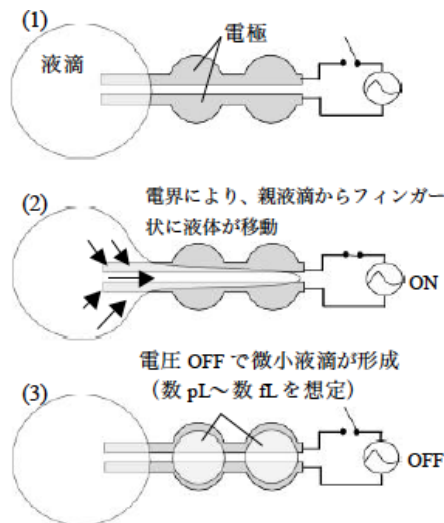


図 1 液体誘電泳動による液体搬送と液滴形成の概念図

3. 研究の方法

開放系において、液体を自由に搬送、混合する統合的なマイクロデバイスの開発と実証を確実に行うために、(1) デバイスの最適化、(2) バイオ反応のための液体誘電泳動デバイスの作製と実証、の2項目を行った。具体的には、(1)

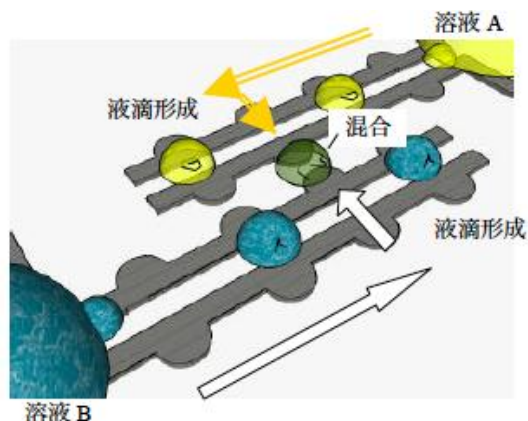


図2 液滴による混合・反応デバイスの概念図

液体誘電泳動では、高電圧を電極に印加するため、基本的に電解質溶液を使うことができない。ただしこれは、基板表面の誘電率特性に依存する。導電性が異なるいくつかの種類のコートング材を試験して、誘電層の最適化を行う。次の課題であるバイオ実験に用いるタンパク質溶液や、酵素を含む溶液が、充分誘電泳動できる条件を求める。(2) 異なる2液を反応させるデバイスを設計・作製する。電極を平行に配列し、2液をそれぞれ液滴にしたのちに、電界変化によって、平行に向かい合った液滴を混合させる。本研究で想定する液滴サイズは pL 以下あり、非常に少ない数の分子を液滴間に閉じこめることができると考えている。微小液滴に閉じこめた物質同士の数分子または一分子反応を観察・計測できる。バイオ実験には、ベータガラクトシターゼなどの微量酵素反応を蛍光顕微鏡で検出できるような実験を、作製するデバイスを用いて行う。

4. 研究成果

デバイスは、ガラス基板上にアルミニウムをリフトオフプロセスによってパターンニングすることで作製した。幅 $20\mu\text{m}$ 、電極間のギャップ $20\mu\text{m}$ の電極を持つデバイスについて、純水を搬送できることを確認した。また、 200pL の微小液滴が形成できる事も確認した。液滴搬送の駆動電圧は、 200Vrms 、 100kHz であった。

次に、平行に配列した電極を2組隣合わせ、それぞれの電極上で液滴を生成させたのち、電界変化により2組の液滴を混合させるデバイスの作製と実験を行った。液体誘電泳動では、電圧により液体を移動させるため、導電率の高い溶液を用いると、電極が電圧崩壊する問題がある。バイオ試料の混合を行うために、搬送させたい溶液の導電率について検討した。導電率の異なる塩化カリウム溶液をそれぞれ調整し、 84 S/m 、 0.2mS/m 、 1.6mS/m において液体誘電泳動が可能か試験した。その結果、 84 S/m 、 0.2mS/m の溶液は駆動できたが、 1.6mS/m の溶液はほとんど液体の動きが観察できなかった。電極とデバイスコーテ

イング面において電界崩壊が起きているのではないかと考察する。また、溶液の導電性と駆動電圧の周波数についての関係性も得た。

上記の結果をもとに、酵素であるベータガラクトシダーゼと基質(FDG)を含む微小液滴の形成と混合を行った。FDGの導電率は、 $170 \cdot \text{S/m}$ としたが、ベータガラクトシダーゼは希釈して導電率を下げすぎると、反応が起きないため、導電率 $1 \cdot \text{mS/m}$ の溶液を用いる事とした。200pLほどの酵素、基質を含む液滴を生成させることができた。また、成功率は低いものの、それぞれ形成された液滴を混合し、酵素反応を蛍光顕微鏡により確認することができた。液滴生成過程で、電極が電圧崩壊してしまう現象が見られたため、より低電圧で導電性溶液を搬送できるデバイスの最適化が必要であるとわかった。

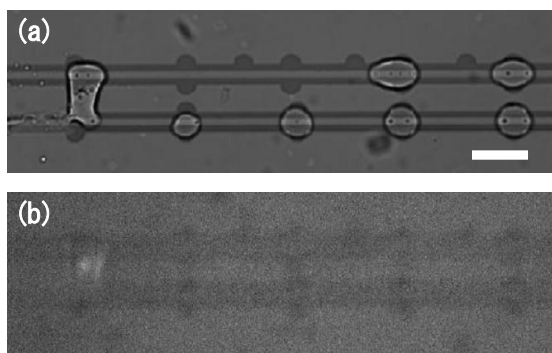


図3 液体誘電泳動デバイスを用いた、ベータガラクトシダーゼと基質の酵素反応。(a) 上方の電極に並ぶ液滴が基質液滴、下方がベータガラクトシダーゼの液滴。左端の液滴は2液滴が混合されたもの。右端の2組の液滴は形成できたものの、混合することができなかった。白いバーは、長さ $50\mu\text{m}$ 。(b) (a)の蛍光写真。混合した液滴のみから蛍光が観察できた。酵素反応が生じていることを表す。

酵素溶液の混合・反応実験の結果から、さらに再現性の高い液滴駆動制御のためには、低電圧において導電性の高い溶液を搬送するデバイス開発が必要であるとわかった。そこでデバイス誘電層の誘電率や電極の熱伝導性に着目し、候補とした複数種類のデバイスについて液体駆動を試験した。デバイス表面は、溶液搬送のためにやや疎水性である必要があるため、レジストなどのコーティング剤を塗布しているが、界面活性剤であるTween20を用いたところ、表面張力が 40mN/m となり、 80V の電圧値で駆動できることがわかった(図4)。また、このデバイスにおける液体駆動が可能な溶液の導電性のしきい値を、塩化カリウムを用いて求めた(図5)。

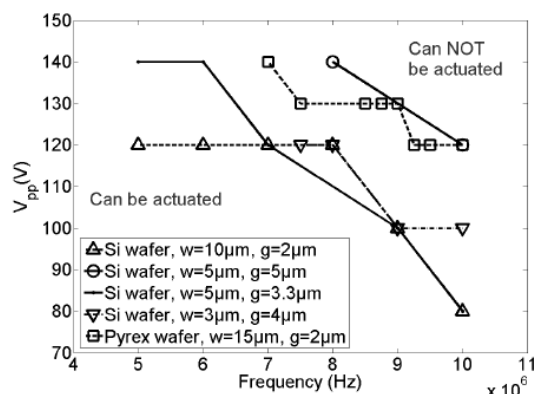


図4 Tween20をコーティングした時の、液体駆動に必要な電圧

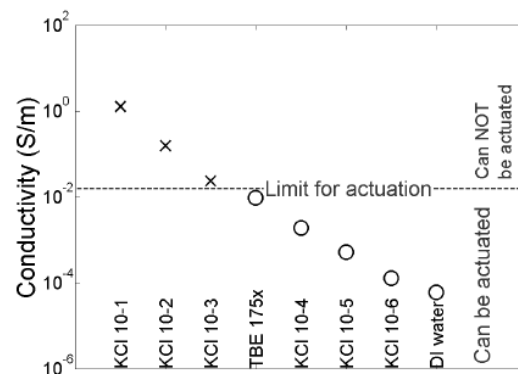


図5 Tween20をコーティングしたデバイスにおいて液体搬送できる溶液の導電率

また、電圧低減のために電極サイズを微細化し、幅 $2\mu\text{m}$ のラインを一般的なホトリソグラフィにより作製し、最小500フェムトリットルの液滴を形成できた。最終的な最適化の結果、 20 mS/m の導電率の溶液を電圧 200 V 程度において駆動させることができた(実験結果のグラフは未記載)。この溶液は、DNAの緩衝液として用いられるTris-EDTAを10倍希釈したものに对应する。すなわち、既往の研究成果よりも100倍程度高い誘電率の溶液搬送を達成し、液体誘電泳動の化学・バイオへの応用可能性を強く示した。

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2件)

(1) R. Renaudot, V. Agache, B. Daunay, P. Lambert, M. Kumemura, Y. Fouillet, D. Collard, H. Fujita, Optimization of LDEP digital microfluidic transduction for biomedical applications, *Micromachines*, vol. 2, 2011, pp.258-273. doi:10.3390/mi2020258 (査読有)

(2) B. Daunay, P. Lambert, L. Jalabert, M. Kumemura, R. Renaudot, V. Agachec and H. Fujita, Effect of substrate wettability in liquid dielectrophoresis (LDEP) based droplet generation: Theoretical analysis and experimental confirmation, Lab on a Chip, vol.12, 2012, pp. 361-368. DOI: 10.1039/c1lc20625g (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

①ドネ・ブルーノ, ランベール・ピエール, ジャラベール・ロラン, 久米村百子, コラール・ドミニク, 藤田博之, バイオ応用を目指した液体誘電泳動による液滴搬送の最適化, 化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2011年6月10-11日、千葉大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米村 百子 (KUMEMURA MOMOKO)
東京大学・生産技術研究所・特任研究員
研究者番号：50533642

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()