

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23226010

研究課題名(和文) マイクロフルイディックエンジニアリングの深化と生体分子高感度定量計測への展開

研究課題名(英文) Advanced Micro Fluidic Engineering and Its Applications for High Sensitive Quantitative Measurements of 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 166,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小発光サンプルの光学的超高感度定量計測を可能とすべく、以下の新規マイクロ流体デバイス要素技術を開発した。1)自由なサイズの液滴作製技術の構築、2)自由な流れのコントロール技術の構築、3)液滴のパッシブソーティング技術の構築。次に要素技術をシステム化することにより、微小発光サンプルの計測を実現した。1)液滴に生体サンプルを個別に抱合して環境微生物個々の遺伝子を解析、2)個別に抱合された細胞の成長を観察して酵素反応活性を評価。本研究の遂行により、従来定性的観察のみ可能であった光学信号が高感度な定量的計測結果を得るのに十分なレベルに増幅され、光学的定量計測が実現された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the noble microfluidic device technology was developed in order to enable the optical high sensitive quantitative measurement of the micro luminescent sample as follows. 1) The micro droplet manufacturing technology of the various size. 2) The control technology of the micro flow. 3) The passive sorting technology of the micro droplet. Next, the measurement of the micro luminescent samples by systematizing microfluidic device was realized. 1) Insert a living cell to a droplet one by one, and analyze the gene of the environmental microbe. 2) Observation cellular growth and evaluate enzymatic reaction activity. Optical quantitative measurement was realized by this study.

研究分野：計測工学

キーワード：計測システム

1. 研究開始当初の背景

対象サンプルが微小化し、「光学的定量計測」に必要な光量が十分に確保出来ない場合、マイクロ流路内での化学反応系の検討や、既存光学観察機器の更なる高機能化だけでは定量計測可能な光量の確保が十分でない事が予想された。そこで、マイクロ流体デバイス内の微小光学信号を外部光学機器で定量的に計測する際、on demand 型の光学的増幅機能をマイクロ流体システム内に形成するための要素技術開発が必須であるとの背景を受けて本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、MEMS およびナノテクノロジーをマイクロスケールの流体に応用することにより実現するマイクロフルイディックエンジニアリングで培われた技術を活用し、微小発光サンプルの光学的超高感度定量計測を可能とすべく、on demand 型の光学的増幅機能を組み込んだマイクロ流体デバイスを開発する。その実現の為、マイクロ流体内部超高感度光学観察場の on demand 構築技術及びそれをサポートする周辺技術の構築、並びに超高感度光学的定量計測に適した微小サンプル前処理技術を開発し、超高感度光学定量計測を実現する事を目的とする。(図1)

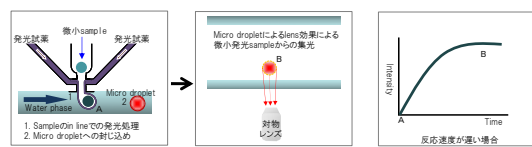


図1-1: 光学的定量計測に適したサンプル前処理技術の概念(反応速度を勘案してタイミングをコントロール)

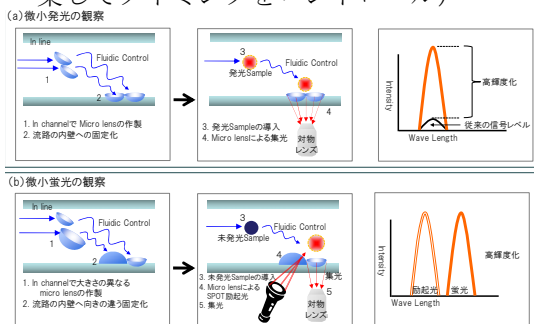


図1-2: マイクロ流体内部超高感度光学観察場の on demand 構築の概念とその利点(発光計測と蛍光計測で必要に応じ In Channel で Micro Lens の光学特性を制御可能)

図1: 本研究の概念図

3. 研究の方法

本研究では、マイクロ流体デバイスを使用した超高感度光学定量計測を実現するため、まず既に確立済の要素技術について、現状の問題点の洗い出しと改良を行った。次にシス

テムとして要素技術を集約・構築し、開発した要素技術が妥当であるかどうかの検証を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体内部超高感度光学観察場の on demand 構築技術及びそれをサポートする周辺技術の構築

① マイクロレンズの作製技術の確立

マイクロドロップレット生成デバイスを応用して様々な倍率のマイクロレンズの作製に成功した。またこれをアレイ上に配置することにより、インラインでの集光を実現した。(図2) (D.H.Yoon, T.Sekiguchi, S.Shoji, (ISMM 2012))

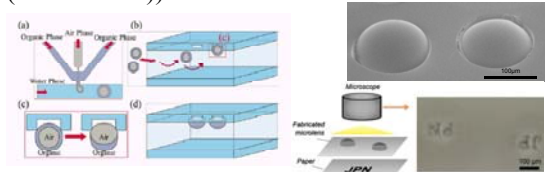


図2: マイクロドロップレットを利用したマイクロレンズの作製法

② 三次元シースフローコントロール技術の深化

簡単な構造の流体デバイスで三次元シースフローを実現し、それを流体断面に対して自由な位置・サイズでコントロールすることに成功した。(図3) (D. H.Yoon, T.Sekiguchi, T.Funatsu, S.Shoji, (μ TAS2011))

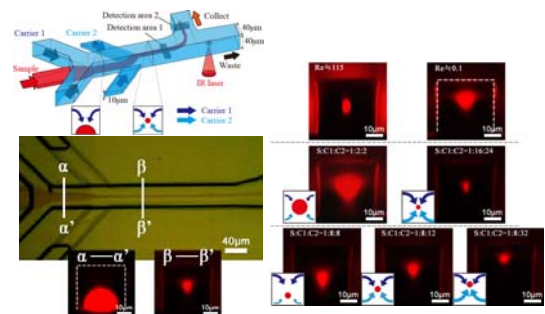


図3: シンプルなデバイスでの三次元シースフローのコントロール

③ 任意のサイズのマイクロドロップレットの作製技術の確立

流路抵抗の変化を応用して一つのデバイスで大きさの異なる微小液滴の作製を可能とした。また、液滴の生成速度を工夫することで1 μm以下の微小液滴の作製にも成功した。(図4) (D. H.Yoon, T.Sekiguchi, S.Shoji, (Micromachines 2013)), (D. H.Yoon, T.Sekiguchi, H.Takeyama, S.Shoji, (μTAS2015))

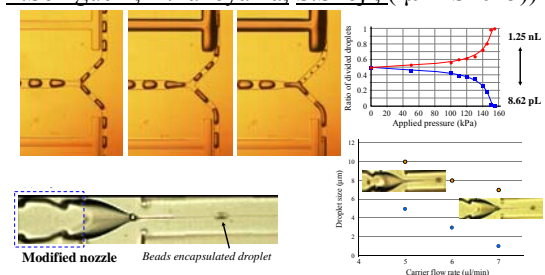


図4: 任意のサイズのマイクロドロップレットの作製例

④マイクロドロプレットのパッシブソーティング技術の確立

マイクロドロプレットに外力を加えることなく、その大きさの違いや表面エネルギーの差で流し分けるパッシブソーティングの手法を確立した。(図5) (D.H.Yoon, T.Sekiguchi, S.Shoji, (RSC Adv., 2014))

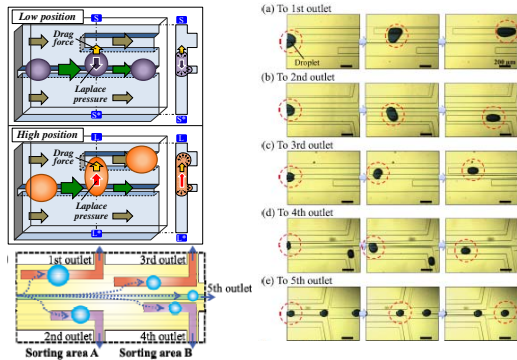


図5：パッシブソーティングデバイスによるマイクロドロプレットの流し分け

⑤マイクロドロプレットの融合技術

微小サンプルに任意の場所で刺激を与えるためには、マイクロドロプレットの融合技術が重要である。本研究では、図6に示すように、特定の位置でマイクロドロプレットの流れるスピードを落とし、融合することに成功した。これにより、ドロプレットに含まれたサンプルを試薬等で刺激する事が可能となった。(図6) (D.H.Yoon, T.Sekiguchi, S.Shoji, (Micromachines 2013))

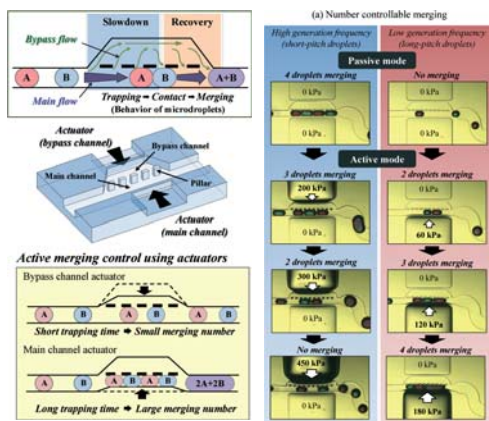


図6：流量コントロールによるマイクロドロプレットの融合

(2) 超高感度光学的定量計測に適した微小サンプル前処理技術の確立

①マイクロドロプレット内部での化学反応技術の確立

ナノ金属粒子をマイクロドロプレットへ内包し、この表面へのたんぱく質の修飾をマイクロドロプレット内部で行い、反応の様子をリアルタイム観察することに成功した。(図7) (T.Fukuda, D.H.Yoon, M.Suzuki, T.Sekiguchi, S.Shoji, Sensors and Actuators B (2014)) また、実際にこのサンプル(バイオプローブ)をあらかじめ細胞に導入しておくことにより、アポトーシスの際、細胞の形態変化よりも細胞死誘引物質の分泌が早いこと

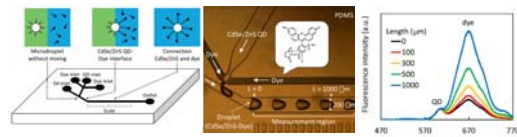


図7：マイクロ流体デバイス内でのナノ金属粒子表面へのたんぱく質の修飾

を立証した。(図8) (Y.Edagawa, M.Suzuki, D.H.Yoon, T.Sekiguchi, S.Shoji, (Transducers 2013))

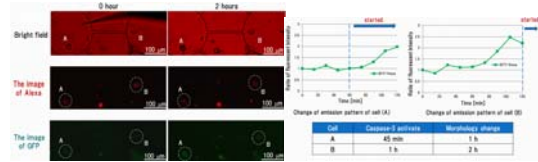


図8：単一細胞アポトーシスの際のバイオプローブの蛍光変化(細胞死と共に赤が弱まり緑が強まる)

(3) デバイスのシステム化と超高感度光学定量計測

①周辺機器を小型化・一体化したマイクロ流体デバイスシステムの実現

マイクロバルブやマイクロポンプを小型化・一体化したインターフェースを作製し、これとマイクロ流体デバイスを一体化することに成功した。(図9)

(S. Shoji, Sensors and Actuators B, (2012))

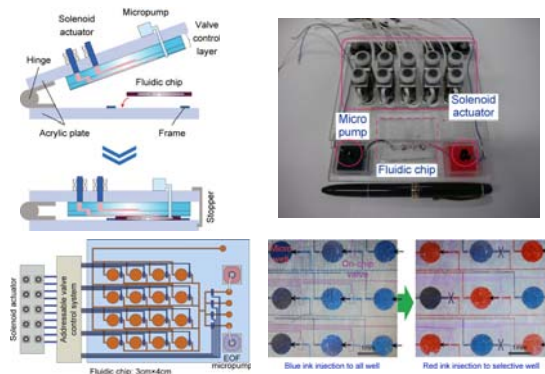


図9：周辺機器を一体化したマイクロ流体システム

②マイクロドロプレットに生体サンプルを内包して解析を行うシステムの実現

マイクロドロプレット作製技術を用いて、個々の液滴に生体サンプルを個別内包させるマイクロ流体デバイスシステムを開発し、これを用いて細胞の酵素反応活性を光学的かつ定量的に測定することに成功した。(図10) (M.Hosokawa, D.H.Yoon, T.Mori, T.Sekiguchi, S.Shoji, H.Takeyama, Biosensors and Bioelectronics (2015))

また、同様の技術を用いて、個別生体サンプルの遺伝子解析を行う事にも成功した。(図11) (D.H.Yoon, T.Sekiguchi, S.Shoji, T.Funatsu, Nature Scientific Reports | (2016),6:22259)

③高度な微細加工技術を応用した液体クロマトグラフィーチップによる高分解能分析

マイクロ流体デバイス作製の際の要素技術である、深堀エッチングと直接接合技術を

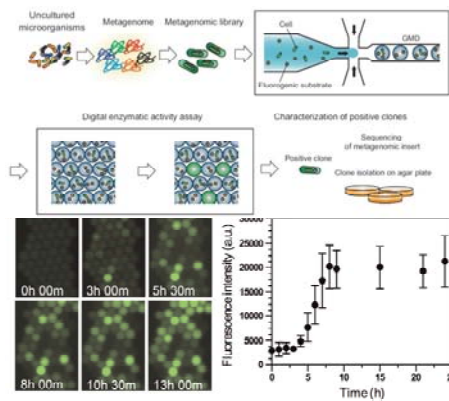


図 1 0 : ドロップレットに内包された個々の細胞の酵素反応活性評価

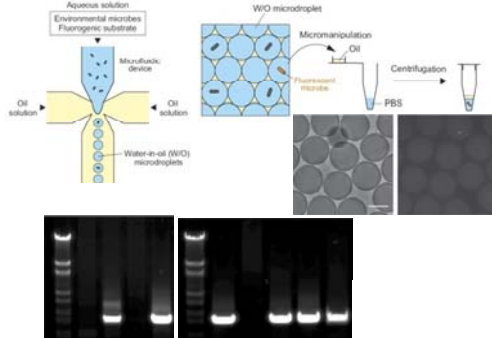


図 1 1 : ドロップレットに内包された個別生体サンプルの遺伝子解析

用いて、高感度かつ小型な液体クロマトグラフィチップを作製・システム化し、これを生体分子に応用することにより、従来技術より高感度な分析結果を得られることに成功した。(図 1 2) (D. H. Yoon, T. Sekiguchi, J. Mizuno, T. Funatsu, S. Shoji, (MEMS2013))

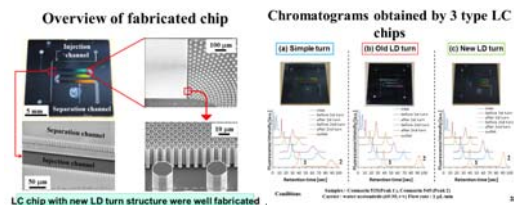


図 1 2 : MEMS LC CHIP により生体物質を高感度分離・検出

#### (4) 派生効果

① 柔らかい基板を用いた流体ディスプレイ  
流体デバイスの作製技術を用いて柔らかい基板を用いた有機 EL ディスプレイの作製に成功した。(図 1 3) (S. Shoji & J. Mizuno, Nature Scientific Reports 5, 14822 (2015))

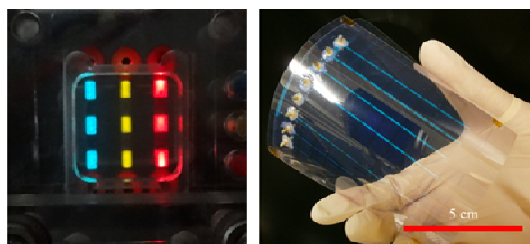


図 1 3 : マイクロ流体デバイスを用いた液体有機 EL ディスプレイ

② 三次元シースフローコントロール技術の人工血管への応用

三次元シースフローを応用したデバイスシステムを実現することにより、所定の長さの人工血管の作製に成功した。(図 1 4)

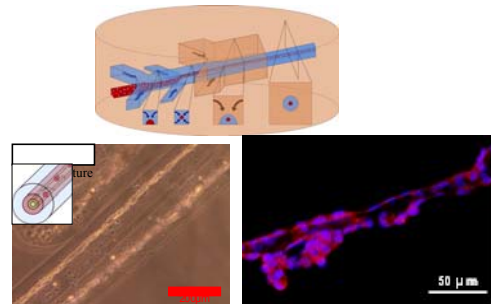


図 1 4 : 血管内皮細胞を培地と共に三次元同軸形状に流すことにより人工血管を作製

③ マイクロフルイディックスを応用した金属含有錯体タンパク質の化学合成

多方面への応用が期待されながら、従来の合成法では安定した作製が難しかった「金属含有錯体タンパク質」を簡単な構造のマイクロ流体デバイスで高効率に合成することに成功した。(図 1 5) (D.H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji, (Transducers 2015))

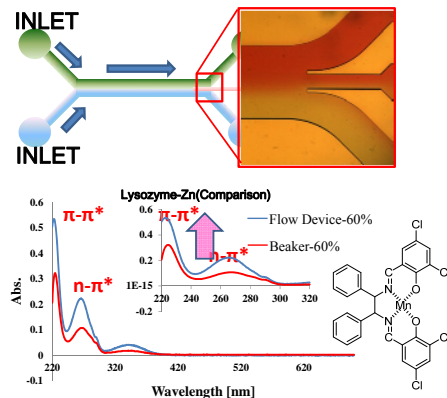


図 1 5 : マイクロ流体デバイスを用いた「金属含有錯体タンパク質」の高効率合成

#### 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 40 件)

(下記を含めすべて査読あり)

- ① K. Nakamura, R. Iizuka, S. Nishi, T. Yoshida, Y. Hatada, Y. Takaki, A. Iguchi, D. H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji & T. Funatsu, “Culture-independent method for identification of microbial enzymeencoding genes by activity-based single-cell sequencing using a water-in-oil microdroplet platform”, Nature Scientific Reports | 6:22259 | (2016), DOI: 10.1038/srep22259
- ② N. Kobayashi, T. Kasahara, T. Edura, J. Oshima, R. Ishimatsu, M. Tsuwaki, T. Imato, S. Shoji & J. Mizuno, “Microfluidic White Organic Light-Emitting Diode Based on

Integrated Patterns of Greenish-Blue and Yellow Solvent-Free Liquid Emitters”, Scientific Reports 5, Article number: 14822 (2015),doi:10.1038/srep14822

- ③ M. Hosokawa, Y. Hoshino, Y. Nishikawa, T. Hirose, D. H. Yoon, T. Mori, T. Sekiguchi, S. Shoji, H. Takeyama, "Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomic library for isolation of microbial enzymes", Biosens Bioelectron. (2015),67,pp.379-85. doi: 10.1016/j.bios.2014.08.059.
- ④ D. H. Yoon, D. Wakui, A. Nakahara, T. Sekiguchi, S. Shoji, "Selective Droplet Sampling Using a Minimum Number of Horizontal Pneumatic Actuators in a High Aspect Ratio and Highly Flexible PDMS Device", RSC Advances 2015, 5 (2015),pp.2070-2074, DOI: 10.1039/c4ra11254g
- ⑤ D.H. Yoon, A. Jamshaid, J. Ito, A. Nakahara, D. Tanaka, T. Akitsu, T. Sekiguchi, S. Shoji, "Active Microdroplet Merging by Hydrodynamic Flow Control Using a Pneumatic Actuator-Assisted Pillar Structure", Lab on a Chip (2014) ,pp.3050-3055, DOI: 10.1039/c4lc00378k

[学会発表] (計 1 2 6 件)

(下記を含めすべて査読あり)

- ① D.H. Yoon, L. Ariyoshi, D. Tanaka, T. Sekiguchi, S. Shoji, "All-Round Micro Sheath Flow Formation to Realize Complex Cross Sections by Simply Stacked PDMS Structures", The 29th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2016), 2016.01.26, Shanghai, China (2016) pp.141-144, DOI:10.1109/MEMSYS.2016.7421578, (ORAL)
- ② D. Tanaka, Y. Murakoshi, E. Tsuda, Y. Mitsumoto, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu, S. Shoji, "High Efficient Synthesis of Manganese(II), Cobalt(II) Complexes Containing Lysozyme Using Reaction Area Separated Micro Fluidic Device", The 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2015), 2015.06.23, Anchorage, Alaska, USA (2015) pp.243-246, DOI:10.1109/TRANSDUCERS.2015.7180907,(ORAL)
- ③ Z. Xie, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, S. Shoji, "Multi-Stage Size Dependent Passive Droplet Sorting Using Droplet Transfer on Cascade Line-Rails and Shape Recovery on Dot-Rails", The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2015), 2015.10.27, Gyeongju, Korea (2015) pp.129-131, [http://www.rsc.org/images/LOC/2015/PDFs/Papers/0129\\_2A2-3.pdf](http://www.rsc.org/images/LOC/2015/PDFs/Papers/0129_2A2-3.pdf),(ORAL)
- ④ M. Ohyama, J. Mizuno, S. Shoji, M.

Nimura, T. Nonaka, Y. Shinba, A. Shigetou, "Fine-Pitch Hybrid Bonding with Cu/Sn Microbumps and Adhesive for High Density 3D Integration", 2014 International Conference on Electronics Packaging (ICEP 2014), 2014.04. 25, Toyama (2014) pp.604-607,

- DOI:10.1109/ICEP.2014.6826751,(ORAL)
- ⑤ R. Kajiyama, Y. Edagawa, M. Suzuki, A. Nakahara, D.H. Yoon, T. Sekiguchi and S. Shoji " Live Imaging of Cell Apoptosis Using FRET-Based Bioprobes in MEMS Fabricated Microculture Dish " The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2013) Jun. 20, 2013 Barcelona, Spain, DOI:10.1109/Transducers.2013.6627328,(ORAL)

[図書] (計 3 件)

- ① 蜂巢琢磨、水野潤、庄子習一、逢坂哲嗣 『月刊機能材料 2014 年 3 月号 Vol. 34 No. 3』 (株)シーエムシー出版 pp. 9-17
- ② S. Shoji, K. Kawai," Microfluidics, Topics in Current Chemistry", Springer-Verlag Berlin Heidelberg,304,pp.1-25, 2011
- ③ H. Takeyama, T. Mori, S. Shoji, マイクロ流体デバイスのバイオ計測への応用 「ナノ融合による先進バイオデバイス - Advanced interdisciplinary biodevices based on nanotechnology」 民谷栄一 監修、シーエムシー出版、2011, pp. 258 - 267.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ①名称：接合方法、及び接合装置  
発明者：重籐 暁津、水野潤、庄子習一  
権利者：同上  
種類：国内特許  
番号：特願 2 0 1 3 - 1 8 4 4 5 0  
出願年月日：2 0 1 3 年 9 月 5 日  
国内外の別：国内
- ②名称：微細パターンを表面に有する物品およびその製造方法、ならびに光学物品、その製造方法および複製モールドの製造  
発明者：高山公介、坂本寛、海田由里子、石橋健太郎、水野潤、庄子習一  
権利者：同上  
種類：国際特許  
番号：P C T / J P 2 0 1 3 / 0 6 0 6 5 5  
出願年月日：2 0 1 3 年 4 月 8 日  
国内外の別：国外
- ③名称：積層構造体の製造方法  
発明者：庄子習一、水野潤、仁村将次、榎本智之、荻野浩司  
権利者：同上  
種類：国内特許  
番号：特願 2 0 1 2 - 2 5 9 7 3 8

出願年月日： 2012年11月28日  
国内外の別：国内

○取得状況（計2件）

①名称：細胞培養容器及びその容器を用いた細胞培養方法

発明者：務中達也、阿部浩久、叶井正樹、前川平、木村晋也、庄子習一

権利者：同上

種類：国内特許

番号：特許第5703302

取得年月日：2015年02月27日

国内外の別：国内

②名称：フルオロカーボン微小構造体の製造方法、フルオロカーボン微小構造体およびマイクロシステム

発明者：庄子習一、荒川貴博、草川寛之

権利者：同上

種類：国際特許

番号：米国特許第8414782号

取得年月日：2013年4月9日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.all-nano.waseda.ac.jp/kibans/>

## 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

### (2) 研究分担者

① 竹山 春子 (TAKEYAMA, Haruko)

早稲田大学理工学術院教授

研究者番号：60262234

② 水野 潤 (MIZUNO, Jun)

早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構教授

研究者番号：60386737

③ 関口 哲志 (SEKIGUCHI, Tetsushi)

早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構教授

研究者番号：70424819

### (3) 連携研究者

① 細川 正人 (HOSOKAWA, Masato)

早稲田大学・理工学術院助教

研究者番号：60722981

② 尹 棟鉉 (YOON, Dong Hyun)

ナノ理工学研究機構 助教

研究者番号：70711498

③ 鈴木美穂 (SUZUKI, Miho)

埼玉大学 理工学研究科 准教授  
研究者番号：60222064

④ 福田 武司 (FUKUDA, Takeshi)、  
埼玉大学 理工学研究科 助教  
研究者番号：40509121

⑤ 船津 高志 (FUNATSU, Takashi)  
東京大学大学院薬学系研究科 教授  
研究者番号：00190124

⑥ 武田 直也 (TAKEDA, Naoya)  
早稲田大学・理工学術院・准教授  
研究者番号：60338978

⑦ モリ テツシ (MORI, Tetsushi)  
早稲田大学・理工学術院・助教  
研究者番号：00590100

⑧ 枝川義邦 (EDAGAWA, Yoshikuni)  
帝京平成大学 薬学部 教授  
研究者番号：50303607