

令和元年5月17日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02349

研究課題名(和文)細胞内微小サンプル計測を目的としたマイクロ・ナノドロップレットハンドリング

研究課題名(英文)Micro-nano droplet handling for the measurement of biological samples

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) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「微小サンプルのハンドリングに関する要素技術」に着目し、その要求仕様の抽出と実現を図ることを目的とした。本研究の結果、以下の技術の確立に成功した。1) 微小なスケール(数ミクロン～サブミクロン)のマイクロドロップレットの安定的作製技術の確立。2) 微小サンプルのドロップレット内への内包技術およびドロップレット内での反応技術の確立。3) マイクロドロップレットの選択的ハンドリング技術の確立。さらに本研究の派生効果として「フレキシブルなITO電極の作製による有機ディスプレイの自由な湾曲化」や、「遺伝子論理チップ」の作製に道を開いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来は、多数の同種のサンプルの中から特殊な機能を発現したサンプル(細胞・細菌・化学物質等)だけをピックアップし、さらにそれらを培養・観察してその機能解析を行う事や、分解・抽出してさらにこれを利用するためには、必要な作業を手動で行う以外方法は無かった。本研究の成果により可能となった、マイクロ流体デバイスを利用した微小液滴の作製と、その受動的な微小流れの制御を応用することにより、特定の微小サンプルをピックアップして取り扱う、システムとしての自動制御に道が開かれた。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we defined required specs and established fundamental technologies for “handling of micro samples” in micro scale channels. We developed following technologies through this research, 1) stable and reproducible micro droplets generation ranged from several microns to sub-micron in diameter, 2) sample collection into a micro droplet and/or control of chemical reaction in the micro droplets, 3) selective handling of the specific micro droplet. In addition to these achievements, we developed bendable ITO electrodes for flexible electronic devices as well as basic technologies to realize “Integrated Gene Logic-Chip”.

研究分野：マイクロ・ナノデバイス計測工学

キーワード：計測システム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

メディカルおよびバイオメディカル分野からの喫緊の要望として、多数の同種のサンプルの中から特殊な機能を発現したサンプル（細胞・細菌等）だけをピックアップし、さらに培養・観察してその機能解析を行う事や、分解してDNAを抽出しPCRで増殖させること等が必要とされていたが、研究開始当初はこれを手動で行う以外方法は無かった。研究代表者はこの煩わしい工程を無くす為、これまでマイクロ流体デバイスを用いた高速セルソーティングシステム等を開発してきた。しかし、光学検出系に依存するアクティブソーティングシステムは、対象物の大きさや性状に光学的分解能の限界があり、ある大きさ以下のもの、および固体以外のもは基本的にはソーティングが不可能であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに研究代表者が文部科学省科研費基盤S「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」を推進してきた結果として顕在化してきた新たなニーズである「微小サンプルのハンドリングに関する要素技術」に着目し、その要求仕様の抽出と実現を図ることで、「生体分子高感度定量計測」を完成に導くことを目的とした。具体的には、「現在取り扱っているサンプルのスケール（数百～数十マイクロスケール）を一桁から二桁小さくした微小なスケール（数マイクロン～サブマイクロン）の壊れやすい生体サンプル等を、マイクロ流体デバイス内を安全に搬送し、所定の位置で刺激を与えることが可能な要素技術を確認するとともに、システム化を想定した場合に必要な問題点を洗い出す事を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、微小なスケールのマイクロドロップレットを安定に作成するための要素技術の検討と確立を行った。次に、マイクロドロップレットを安定に搬送するための流体制御技術の確立を行った。さらに、マイクロドロップレットのサイズや物性で分別する技術を確認した。最後に要素技術の応用として、化学反応やバイオ分野への応用を試みた。

### 4. 研究成果

1) 微小なスケール（数マイクロン～サブマイクロン）のマイクロドロップレットの安定的な作製技術の確立。

まず、イオンビームでSiに直接50nm程度の多チャンネル流路を形成する方法でデバイスを作製し、3マイクロン程度のドロップレットの多量かつ安定な作製に成功した。(図1: [T. Sekiguchi, S. Shoji et al., IEEE NANO 2016](#))

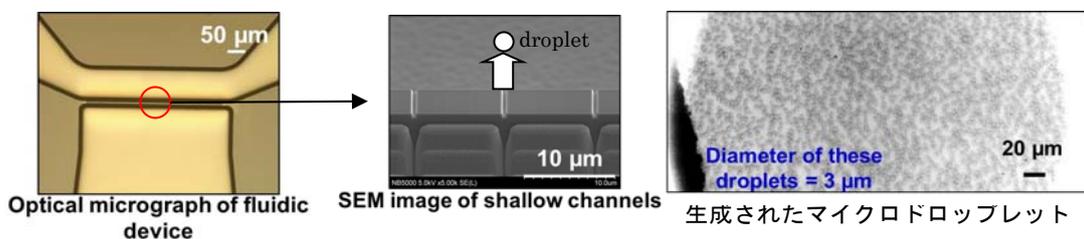


図1：マイクロドロップレットを同時かつ多量に生成可能なデバイス

次に、流路内壁面の性質の影響の少ないノズル型流体デバイスを設計してドロップレットの生成を試み、これに成功した。さらに、各種条件のうち何が微小ドロップレットの安定的生成に寄与するのかの基礎的解明とその結果に基づいたデバイスの改良を行った。検討の結果、デバイス表面に対する溶液の濡れ性が主要なパラメータの一つとなっていることが判明したので、ノズル型デバイスの更なる改良を行い、三次元フォーカシングデバイスと一体化することで、W/O/W ドロップレットの安定かつ微小な作製に成功した。(図2: [T. Sekiguchi, S. Shoji et al., Micromachines 2018](#))

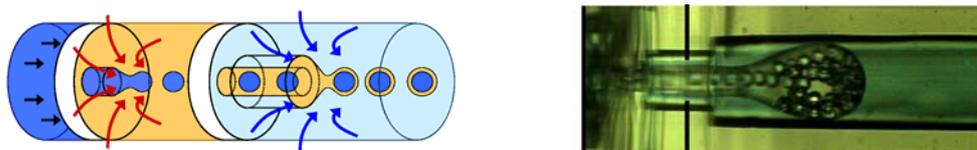


図2：三次元フォーカシングを実現し、かつW/O/Wドロップレットの安定かつ微小な作製が可能なノズル型マイクロ流体デバイス

②微小サンプルのドロップレット内への内包技術およびドロップレット内での反応技術の確立  
まず、油層/液相の2層からなる微小ドロップレットの薬理への応用を試みた。プライマーでコーティングされた微小磁気ビーズを油層/水層の2層からなるドロップレットにDNAとともに

に個別に内包したのち、ドロップレット内で DNA と各種薬品を反応させその様子を観察することにより、特定の薬品にのみ反応し特殊なたんぱく質を分泌する DNA 配列の特定に成功した。(図 3 : [T.Sekiguchi, S. Shoji et al.,  \$\mu\$ TAS 2016](#))

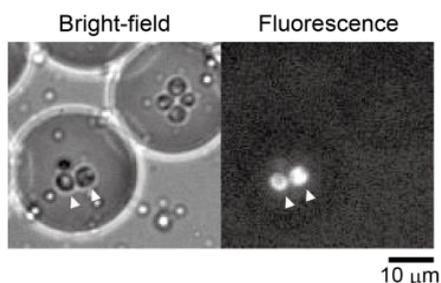


Table 1. Amino acid sequences of parent and selected peptides

Peptide	Sequence
Parent SST	MAGCKNF <b>FWK</b> TFTSC
P1	MAGCKNF <b>VAV</b> AFTSC
P2	MAGCKNF <b>FRYY</b> WFTSC
P3	MAGCKNF <b>WFVS</b> TFTSC

図 3 : マイクロドロップレット内への DNA の内包とシーケンス結果

次に、化学反応への応用として、ドロップレット内部での化学反応の確立、および結晶化について検討を行った。その結果、今まで困難だったタンパク質反応条件の確立およびドロップレットを利用したたんぱく質の結晶化に成功した。(図 4 : [T.Sekiguchi, S. Shoji et al., MFHS2016](#))

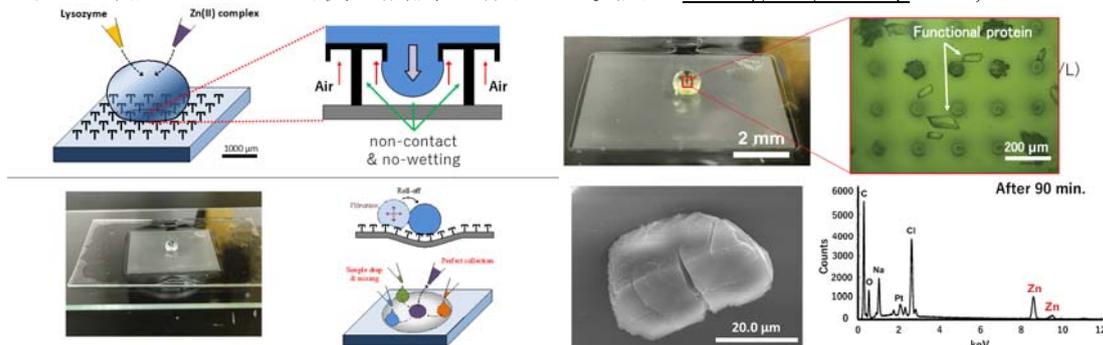


図 4 : 超撥水表面での金属含有たんぱく質の合成と結晶化

さらに、微小サンプルのドロップレット内への内包技術を応用し、アゾ配位子の合成をマイクロ流体デバイスで作製したマイクロドロップレット内で行い、ドロップレット内でのアゾ配位子の高速かつ高効率な作製に世界で初めて成功した。(図 5 : [T.Sekiguchi, S. Shoji et al., 日本化学会 2018](#))

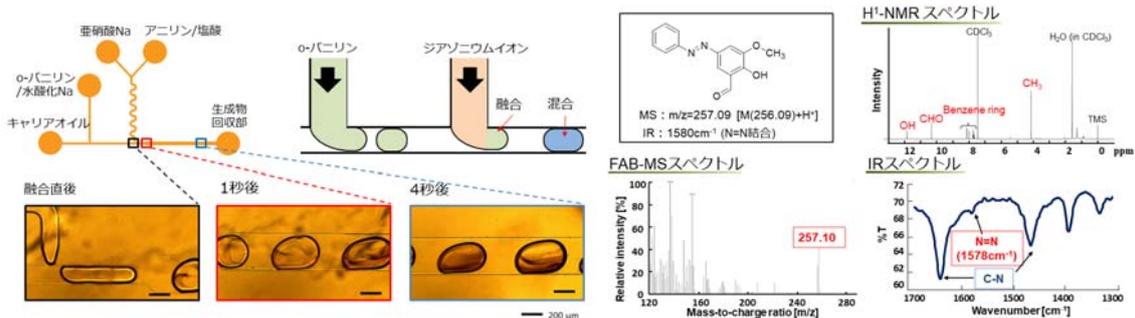


図 5 : ドロップレット内でのアゾ配位子の合成と分析結果

### ③ マイクロドロップレットの選択的ハンドリング技術の確立

微小なスケール (数ミクロン~サブミクロン) かつ壊れやすい生体サンプルや化学サンプルをマイクロ流体デバイス中でハンドリング・選択するためには、サンプルに無用な力がかかる可能性がある従来のアクティブなハンドリング方法ではなく、パッシブな方法によるハンドリングが行われることが望ましい。そのため、まず数十ミクロン程度のドロップレットのパッシブな方法での分別を試み、これに成功した。(図 6 : [T.Sekiguchi, S. Shoji et al., RSC Advances, 2017](#))

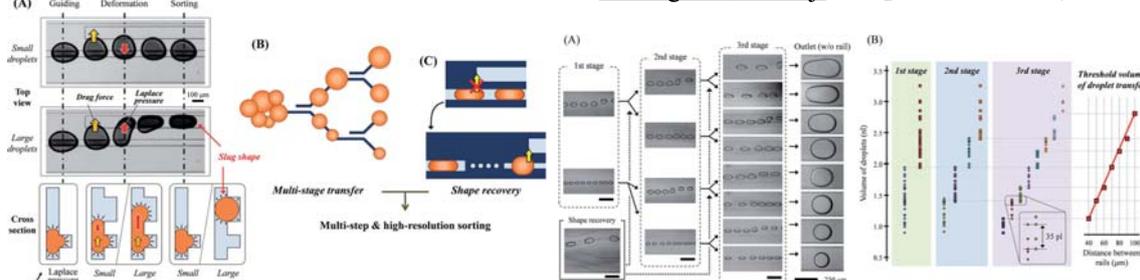


図 6 : マイクロドロップレットのサイズの違いによる分別

本検討をさらに進め、ドットレールを用いたドロップレットの大きさや物性（粘度等）の違いによるソーティング技術の確立にも成功した。(図7: [T.Sekiguchi, S. Shoji et al., Micromachines 2018](#))

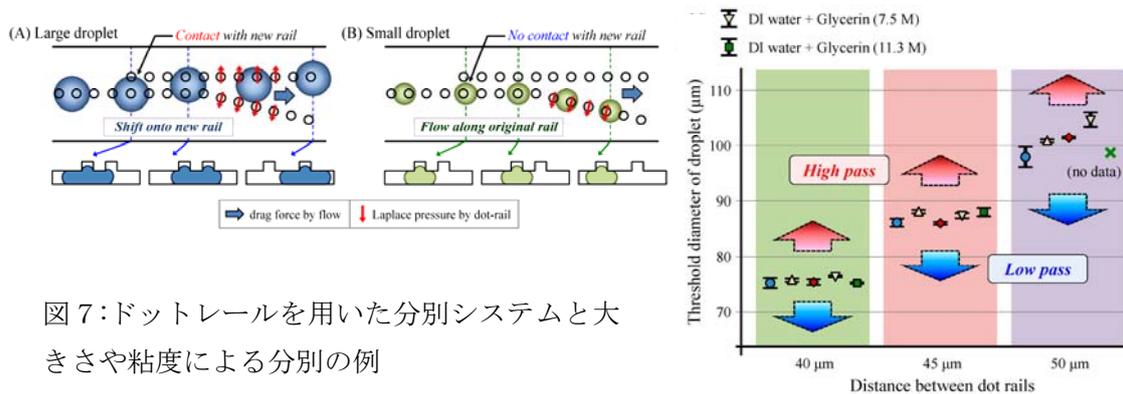


図7:ドットレールを用いた分別システムと大きさや粘度による分別の例

④派生效果

マイクロ流体デバイスの開発の過程で、フレキシブルなITO電極の作製に成功し、本成果はNATURE Scientific Reports に採択された。(図8: [J. Mizuno, S. Shoji et al., Scientific Report, 2018](#))

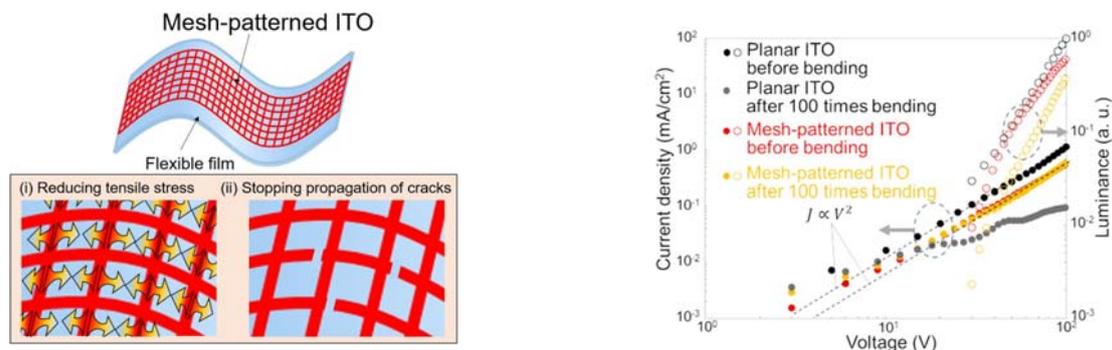


図8: 有機LEDをターゲットとしたフレキシブルなITO電極

また、本研究の成果の応用として、「遺伝子論理チップ」の作製に成功し、その成果は「Nature Nanotechnology」に掲載された。(図9: [T.Sekiguchi, S. Shoji et al., Nature Nanotechnology, 2018](#))

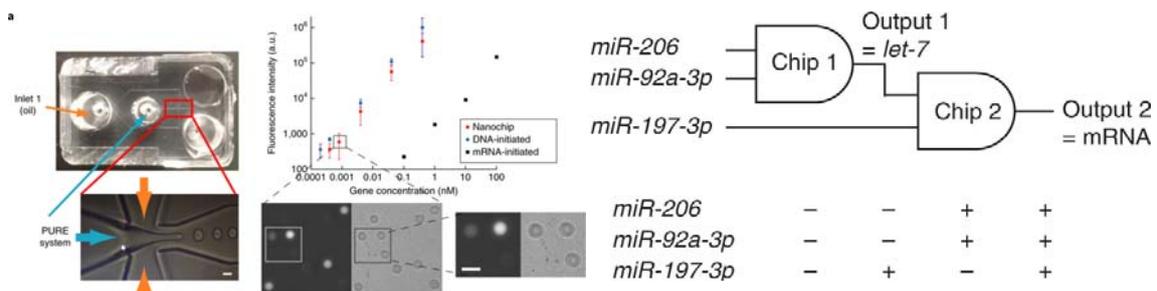


図9: マイクロ流体デバイスを応用した遺伝子論理チップ

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)  
(下記を含めすべて査読あり)

- ① T. Masubuchi, M. Endo, R. Iizuka, A. Iguchi, D.H. Yoon, [T. Sekiguchi](#), H. Qi, R. Iinuma, Y. Miyazono, [S. Shoji](#), T. Funatsu, H. Sugiyama, Y. Harada, T. Ueda, H. Tadakuma, “Construction of Integrated Gene Logic-Chip”, Nature Nanotechnology Letters (2018), 7 pages, DOI: 10.1038/s41565-018-0202-3
- ② K. Sakamoto, H. Kuwae, N. Kobayashi, A. Nobori, [S. Shoji](#), [J. Mizuno](#), “Highly Flexible Transparent Electrodes Based on Mesh-Patterned Rigid Indium Tin Oxide”, Scientific Reports 8 (2018) 2825 (8 pages), DOI: 10.1038/s41598-018-20978-x
- ③ D. Tanaka, S. Sawai, D.H. Yoon, [T. Sekiguchi](#), T. Akitsu, [S. Shoji](#), “Synthesis of an Azo-Mn(II)

- Complex with Mild pH Control Using a Microfluidic Device”, RSC Advances 2017, 7 (2017) pp.39576-39582, DOI: 10.1039/C7RA06089K
- ④ D.H. Yoon, Z. Xie, D. Tanaka, T.Sekiguchi, S. Shoji, “A High-Resolution Passive Droplet-Phase Sample Sorter Using Multi-Stage Droplet Transfer”, RSC Advances 2017, 7 (2017) pp.36750-36754, DOI: 10.1039/C7RA05556K
- ⑤ D.H. Yoon, D. Tanaka, T. Sekiguchi, S. Shoji, “Microfluidic Stamping on Sheath Flow”, Small, Vol. 12, No.24 (2016) pp. 3224-3228, DOI: 10.1002/sml.201600552

〔学会発表〕 (計 20 件)

(下記を含めすべて査読あり)

- ① C. Tang, D.H. Yoon, T.Sekiguchi, S. Shoji, “Oil-In-Water Droplet Formation in Hydrophobic PDMS Device Using Three-Dimensional Protruded Taper Channel”, The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2018), 2018.11.11-15, Kaohsiung, Taiwan (2018) pp.395-397,(poster)
- ② D. Tanaka, W. Kawakubo, K. Takahashi, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu, S. Shoji, “High Efficiency Synthesis of Br Addition Ligand by Microfluidic Device”, 43rd International Conference on Coordination Chemistry (ICCC 2018) , 2018.07.30-08.04, Sendai (2018) A01139-DT,(oral)
- ③ D. Tanaka, W. Kawakubo, D.H. Yoon, T. Sekiguchi, T. Akitsu, S. Shoji, “Crystallization of Zinc(II) Complex Containing Lysozyme by Super Water Repellent Doubly Reentrant Structure Umbrella Pillar Array”, The 3rd Conference on Microfluidic Handling Systems (MFHS 2017), 2017.10.04-06, Enschede, The Netherlands (2017) pp.132-135,(oral)
- ④ M. Shiozawa, Y. Akiba, K. Uoshima, K. Eguchi, H. Kuwae, W. Fu, S. Shoji, J. Mizuno, “Promoting Proliferation and Elongation of Bone Marrow-Derived Stem Cells via Nano-Grain Deposited Periodic Nanostructures”, 2017 MRS (Materials Research Society) Fall Meeting, 2017.11.26-12.01, Boston, USA (2017) BM01.02.08, p.87,(oral)
- ⑤ Y. Nozaki, T. Kanai, A. Matsuo, D. Tanaka, I. Yuito, T. Takeuchi, T. Sekiguchi, S. Shoji, “Fabrication Process of Fluidic Devices for Producing Fine Droplets”, The 16th International Conference on Nanotechnology, (IEEE NANO 2016), 2016.08.22-25, Sendai (2016) pp.795-798,(oral)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称： フレキシブル透明電極及び有機エレクトロルミネッセンス素子

発明者： 水野潤、庄子習一、坂本暁祐、桑江博之

権利者： 同上

種類： 特許

番号： 2017-076016

出願年： 2017 年

国内外の別： 国内

名称： 微細凹凸構造を表面に有する物品およびその製造方法

発明者： 高山公介、庄子習一、水野潤

権利者： 同上

種類： 特許

番号： PCT/J P 2 0 1 6 / 0 6 5 0 3 8

出願年： 2016 年

国内外の別： 外国

○取得状況 (計 3 件)

名称： ピラーアレイミキサー及びこれを使用した試料処理装置

発明者： 角田誠、船津高志、関口哲志、庄子習一

権利者： 同上

種類： 特許

番号： 特開 2 0 1 8 - 1 2 2 2 9 5

取得年： 2018 年 8 月 9 日

国内外の別： 国内

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：特許  
番号：6157206  
取得年：2017年  
国内外の別：国内

名称：接合方法  
発明者：重藤暁津、水野潤、庄子習一  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：6251935  
取得年：2017年  
国内外の別：国内  
〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：竹山 春子  
ローマ字氏名：TAKEYAMA Harruko  
所属研究機関名：早稲田大学  
部局名：理工学術院  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：60262234

研究分担者氏名：水野 潤  
ローマ字氏名：MIZUNO Jun  
所属研究機関名：早稲田大学  
部局名：ナノ・ライフ創新研究機構  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：60386737

研究分担者氏名：関口 哲志  
ローマ字氏名：SEKIGUCHI Tetsushi  
所属研究機関名：早稲田大学  
部局名：ナノ・ライフ創新研究機構  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：70424819

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。