

令和 4 年 11 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05971

研究課題名(和文)超ハイスループットー分子計測にむけたデジタルナノ流体及び高速計測技術開発

研究課題名(英文)Development of digital microfluidics technology for high throughput measurements

研究代表者

太田 禎生(Ota, Sadao)

東京大学・先端科学技術研究センター・准教授

研究者番号：70731214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：高感度・並列集積化バイオアッセイの実現に向け、まずデジタルマイクロ流体技術とマイクロチャンバーアレイを融合したデバイス構造を設計・作製し、機能を検証し、さらに溶液の入れ替えを行うことにより繰り返しデジタル計数法を検証した。また流路壁形状を非対称にすることにより、新規ラチェット機構による液滴の整流機構を実現した。さらに電極形状を工夫することにより、流路壁の表面や形状のばらつきに伴う影響を無くし、よりロバストで汎用的な、ラチェット機構に基づいた並列な液的輸送機構を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、まずデジタルマイクロ流体技術とマイクロチャンバーアレイを融合する事で、デジタル計数法における計測可能なアクター数を原理的に向上した。高感度な分子検出や、進化分子工学的への応用が期待される。一方、従来のデジタルマイクロ流体技術においては電極の配置が液滴の密度や個数などを規定してしまっていたが、本研究では新規ラチェット機構を提案・開発することにより、ロバストかつ汎用的な形で並列な液的輸送機構を実現した。これにより、デジタルマイクロ流体デバイスでも大量の液滴を同時に扱う事ができるようになり、従来マイクロ流体デバイスよりもコンパクトで扱いやすい自動アッセイ装置などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Towards realization of highly sensitive and parallel bio-assays, we first achieved integration of a digital microfluidic (DMF) device with a dense microchamber array. Using this integrated platform, we exchanged the contents of microreactors in the microchambers and demonstrated digital counting assays repeatedly. On the other hand, we proposed and demonstrated ratchet-based one-way transport of droplets in the DMF by fabricating channel walls that create asymmetric potential for the droplets. We then showed that, instead of asymmetric channel walls, a new design of micro-electrodes in the DMF device allows us to achieve the ratchet-based one-way transport of multiple droplets in more robust manner with more flexibility for realizing highly integrated digital microfluidic circuits.

研究分野：マイクロ流体技術

キーワード：デジタルマイクロフルイディクス マイクロ液滴技術 ラチェット

## 1. 研究開始当初の背景

未来の高感度な1分子・1細胞の検出解析には、高感度な検出と同時に、高速・並列なスクリーニングの両立が期待されている。そのための有力なアプローチの1つが、2005年に野地らにより発明された、微小体積の液滴に少数分子を閉じ込めることで反応生成物を短時間で高濃度に液滴内に蓄積し、高速・高感度に1分子活性を計測する手法である。この技術は、多様な酵素・核酸をターゲットとして医療診断や進化分子工学に重要度を高めている。また近年、このような微小区画に閉じ込めてそれぞれの計測対象を1つ1つ測る方法は、分子だけでなく各細胞の内包物や活性を測る為にも急速に進展を遂げており、様々なアプリケーションが模索されている。しかし、動かない液滴デバイスのチャンバーの数向上はデバイスサイズに規定され、また目標分子の入った液滴の回収や、溶液の入れ替えは基本的に人力で行われており、スループットの改善は容易ではなかった。一方、動的な液滴解析技術の代表であるフローサイトメトリーは、一点を一度だけ通過する液滴に対する計測技術であり、時系列変化を計測できず、並列操作性にも欠けているという弱点があった。

他方、デジタルマイクロ流体技術 (DMF: Digital Microfluidics) の研究開発が、近年活発化している。DMF は、各微小液体を操作しようとする多数のシリンジポンプやバルブの操作を必要とする従来マイクロ流体技術に比べると、電極にかける電圧により液滴の並列操作を実現しており、自動化 (簡便化・汎用化) 複数の分析が可能となることと言った大きな利点が存在する。しかし従来 DMF 技術においては、各電極に独立にアクセスする電子配線が必要であるがために集積化は容易でなく、液滴のサイズもマイクロリッターと大きいものであった。そのため、同時に計測可能な液滴数は制限されていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、電極の数に制限されない動的な微小液滴アレイを用いた、未踏の高速・大量・高感度な自動スクリーニング機構実現を目指して始まった。DMF 流体技術を用いて、高速で、分子活性や細菌動態を高感度に連続計測し、最終的には計測結果に基づいて目標液滴を回収できる機構の開発を目指した。新規ラチェット整流機構を融合したデジタルマイクロ・ナノ流体技術を開発し、電気的に同期して一方向に動く、大規模微小液滴アレイの作製とその利用を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1)DMF デジタルマイクロ流体デバイスとマイクロチャンバーアレイの融合

DMF 法は、電圧を印加すると液滴と表面との間の接触角が変化する Electrowetting 効果を利用している。この効果により、例えば疎水厚膜の間に液滴を挟み、並べた微小電極に逐次電圧をかけて行くと、電圧をかけた電極上での接触角が変化して液滴を移動して行くことができる。本研究では、まず、オープンソース情報としてトロントのグループより提供されている Drop Bot (<http://microfluidics.utoronto.ca/dropbot/>) からシステム開発に必要な情報を学び、修正を加えつつ適用することで、DMF 技術を導入した。

本研究において、当初は DMF デバイスの微細化を進めることで、DMF により操作する液滴自体の大きさを縮小しようとしたが、スケールダウンに伴って液滴が切れにくくなる事象が発生したため、同様の目的 (計測できる液滴数を増加させる) を達成するために、DMF デバイスと従来微小静的マイクロチャンバーアレイの融合を図った。図 1A の模式図にあるように、作成した融合デバイスは、上面・下面に分かれている。上面には、導電性のある ITO ガラスの上に、疎水性ポリマーである CYTOP でできた、径・厚みともに数マイクロメートルのオーダーの微小チャンバーアレイを作製した。また、下面には溶液を動かすのに必要な作動電極を配置した。電極は厚み 100nm 程度の金でできており、その上に誘電層としてパリレン C が 3 $\mu$ m、さらにその上には疎水性層として CYTOP を 100nm 塗布した。パリレン C は高い誘電率を持ち、電気的に耐久性が高く、デバ

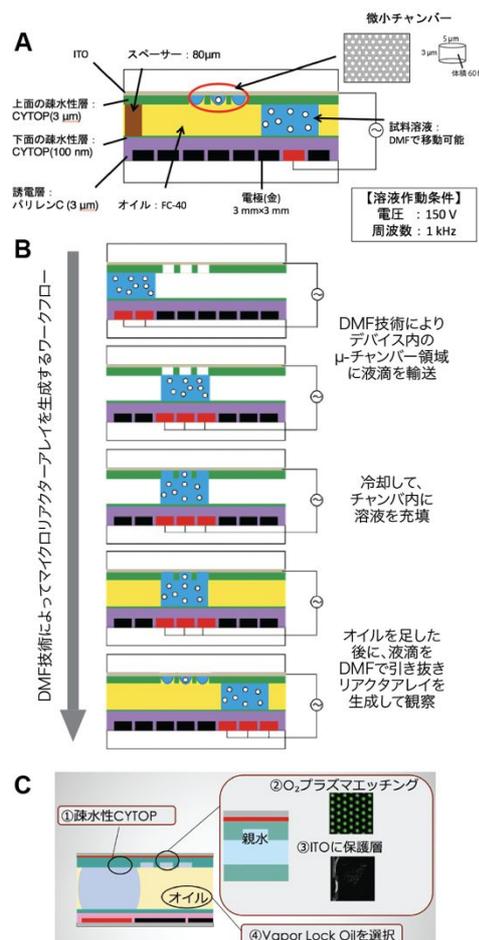


図1 デジタルマイクロ流体(DMF: Digital Microfluidics) 技術とデジタルバイオアッセイの融合  
 A DMFデバイスとマイクロチャンバーアレイの融合  
 B 微小チャンバーへの溶液導入の方法  
 C 安定した駆動に向けて行われた構造改善

スの耐久性向上と作動電圧低減のため選択された。実証実験においては、図 1B に示すように、微小チャンバーへの溶液導入プロセスを確立した。まず、試料溶液を 1~2  $\mu\text{L}$  程度とって下面電極プレート上におき、次に CYTOP チャンバー付きの上面プレートをかぶせ、DMF デバイス中の電極に電圧を印加することで液滴を CYTOP チャンバーの真下まで移動させた。そして効率よくチャンバー内の空気を抜き溶液を導入するため、デバイスを冷却した。その後、上下プレートの間にオイルを流し込み、最後にチャンバーの真下から液滴を移動させることで、チャンバー内に微小リアクターアレイを形成した。これをシステム 1 と呼ぶ。

また上記デバイス構造をさらに工夫し、チャンバー内の繰り返し溶液により、繰り返しデジタル計数法を行うことにより、原理的に計測できるリアクター数の向上を試みた。具体的に、デバイス設計に求められた改善と効果は、まず液滴動作部分には CYTOP (疎水樹脂) を使用することで DMF 液滴の安定動作が可能となり、 $\text{O}_2$  プラズマエッチングによるアレイ作成を行うことでチャンバー内に微小液滴を安定生成できるようになり、CYTOP を保護層としてチャンバー底部に残す構造を取ることで電気分解を抑制し、Vapor Lock Oil をオイルとして使う事で DMF の作動と疎水性樹脂の溶解防止を両立した (図 1C)。これを、システム 2 と呼ぶ。

## (2) ラチェット機構の開発

ラチェット機構による大規模集積化のアイデアを示す。従来技術では全電極に独立したアクセス・操作が必要とされていたが、本研究では、一点接続でまとめて並列操作できる櫛形の電極グループが向かう合う形で配置され、二組の櫛のオン・オフを交互に繰り返すだけで液滴が一方方向に大量並列輸送される仕組みを考案した (図 2A)。整流は、まず疎水性レジストでできた流路壁を非対称に作り込み、櫛形電極を配置することで、動的な非対称平衡状態を作る事で実現しようとした。図 2B のように電場が存在しない場合、液滴は疎水性壁面の狭い部分を嫌って、前方へ移動する (図 2B 内では下方の電極上に移動)。この状態で、片方の櫛形電極をオンにすると、液滴は下方の電極に引き寄せられ、さらに前方に進むという仕組みである。本デバイスは上記デバイスと同じく、金電極が用いられ、パリレン C を誘電層として用い、SU-8 をフォトリソグラフィーによりパターンして流路壁として用い、表面を疎水化して検証された。これをシステム 3 と呼ぶ。

流路壁に動作機構が依存していたシステム 3 では、流路壁の疎水度や作製上のばらつきにより、液滴の動作挙動に差が生まれてしまう動作の不安定性が発生した。また、拡張性にも限界があった。そのため、液滴駆動 (エレクトロウェットング) 電極の形状により整流効果を作り出す事を考案した。具体的な仕組みを図 2C に示す。これを、システム 4 と呼ぶ。

流路壁に動作機構が依存していたシステム 3 では、流路壁の疎水度や作製上のばらつきにより、液滴の動作挙動に差が生まれてしまう動作の不安定性が発生した。また、拡張性にも限界があった。そのため、液滴駆動 (エレクトロウェットング) 電極の形状により整流効果を作り出す事を考案した。具体的な仕組みを図 2C に示す。これを、システム 4 と呼ぶ。

## (3) 安定化に向けた溶液導入の工夫

さらに、安定化に向けた導入の工夫を行った。システム 3、システム 4 において、大きな技術的困難の 1 つは、液滴輸送の前に液滴の安定生成が難しいという点にあった。主要な要因として、溶液の導入時点で溶液量が安定しないことと、体積の大きな溶液から微小な液滴の生成が安定しない点にあった。そのため、自作した簡易な手動シリンジプランジャーによって、シリンジから一定量の溶液を、デバイスのガラス面に開けた穴を通して導入する機構を作製した。また、デバイス内部においても、段階的に小さな液滴へと切り出していく設計を導入・作製し、システム 4 に取り入れた。

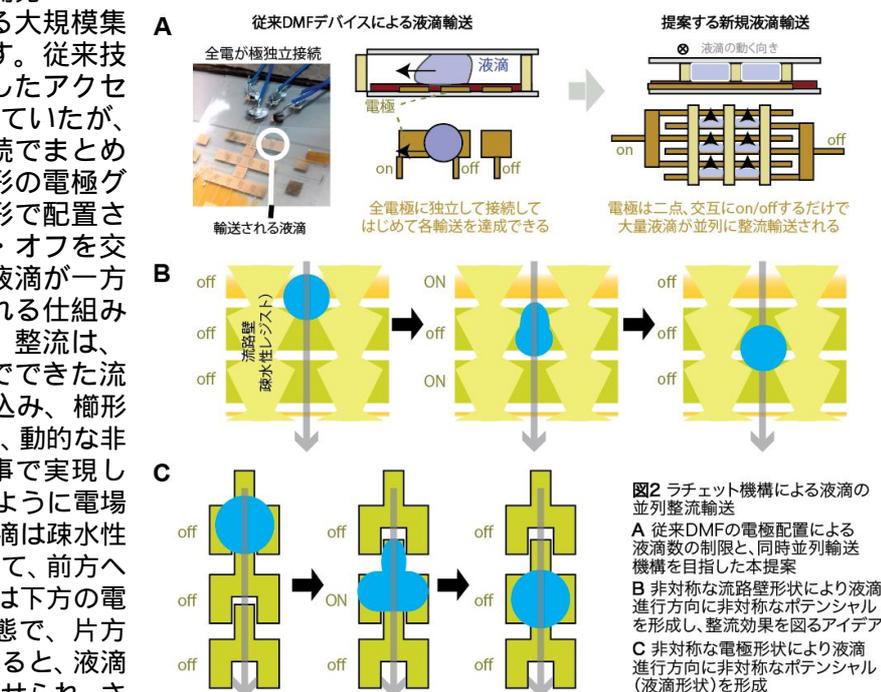


図2 ラチェット機構による液滴の並列整流輸送  
A 従来DMFの電極配置による液滴数の制限と、同時並列輸送機構を目指した本提案  
B 非対称な流路壁形状により液滴進行方向に非対称なポテンシャルを形成し、整流効果を図るアイデア  
C 非対称な電極形状により液滴進行方向に非対称なポテンシャル(液滴形状)を形成

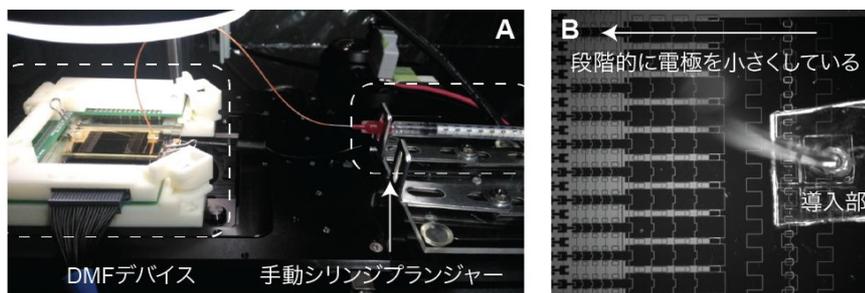


図3 安定化に向けた溶液導入の工夫  
A 自作手動シリンジプランジャーとDMFデバイスの結合 B 微小な液滴形成のための段階的切り出し設計

#### 4. 研究成果

##### (1) デジタルマイクロ流体デバイスの開発とデジタル計数法の融合

システム 1 を用いて、DMF 技術を用いたデジタル計数法の検証を行った。具体的には、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを利用した酵素反応デジタルカウンティングを行った。この系においては、チャンパー内に  $\beta$ -gal が含まれれば、FDG 基質は  $\beta$ -gal によって加水分解され、蛍光物質であるフルオレセインを生成される。蛍光はイメージングで検出することができ、輝点数を数えることで  $\beta$ -gal 溶液の濃度を求めた。図 4A に示すのは、50 fM、500 fM、5 pM と 3 つの異なる濃度の  $\beta$ -gal 溶液を用意して、DMF によりリアクターアレイ内に閉じ込めた際の、イメージング結果である。 $\beta$ -gal の濃度によって輝点数が異なることが分かる。このデータをもとに  $\beta$ -gal 溶液の濃度と輝点数の割合を両対数のグラフとしてプロットしたのが図 4B であり（赤い線はチャンパーの体積と濃度から求めた理論線）理論値に近い結果が得られた。また、バッファーのみの溶液でも測定を行い、検出限界値として 20 fM 程度を求めた。本結果により、DMF 技術を用いたデジタルカウンティングの実証がなされた。

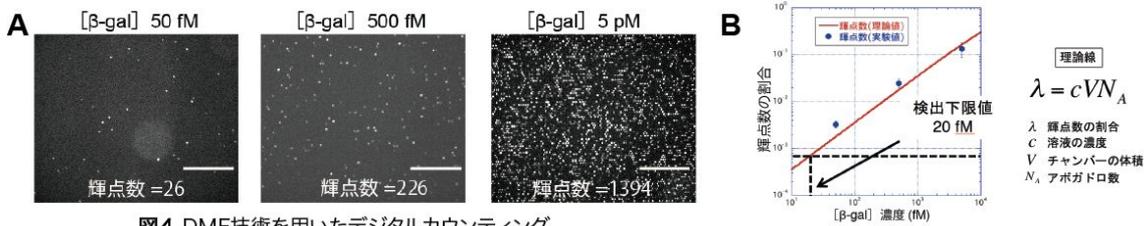


図4 DMF技術を用いたデジタルカウンティング

A 異なる濃度の  $\beta$ -gal を含む溶液をマイクロチャンパーアレイに閉じ込めた際に観察できる輝点の様子

B 本データをもとに  $\beta$ -gal 溶液の濃度と輝点数の割合を両対数グラフとしてプロットしたもの

さらに、改良したシステム 2 を用いて、チャンパーアレイの上を、蛍光色素の入った液滴と、水の入った液滴を交互に通すことにより（図 5A）、チャンパーアレイ内の溶液の繰り返し入れ替えを行った。液滴が通り過ぎた後で、チャンパーアレイ中の蛍光総量を測定し、再現性の高い溶液交換を実証した（図 5B）。さらにこのシステムを利用して、デジタル計数アッセイの複数回繰り返しを実証した（図 5C）。本結果により、DMF 技術によるデジタル計数法において、DMF により新たな溶液が逐次交換され、アッセイを繰り返すことにより、原理的に計測リアクター数を向上でき、より少ない粒子を検出できる可能性を示唆した。

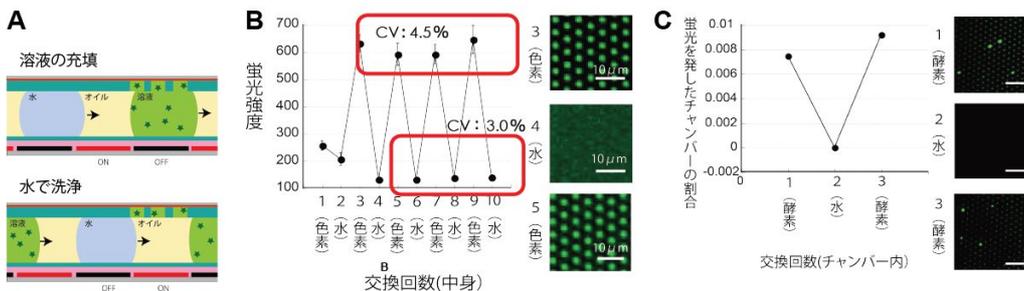


図5 DMF技術を用いたマイクロチャンパー内溶液の繰り返し入れ替え

A 水と蛍光溶液を繰り返し入れ替えた際の、チャンパー内蛍光量の推移

B 前記アッセイ系 ( $\beta$ -gal+FDG) を繰り返し閉じ込めた際の、輝点位置の変化とデジタルカウンティング結果

##### (2) ラチェット機構の開発

図 6 は、システム 3 で、ラチェット機構を用いて液滴の整流（一方向）輸送に成功した結果である。従来 DMF とは原理的に異なり、流路壁を非対称にすることにより、電圧オフの際に液滴進行方向に非対称なポテンシャルを形成し、液滴の進行に整流効果を得た。ところがシステム 3 では、図 2A で計画していたような楕円にまとめた電極での自動並列動作は困難であった。大きな原因として、流路壁の疎水度や作製上のばらつきにより、液滴の動作挙動に差が生まれてしまうことにあった。

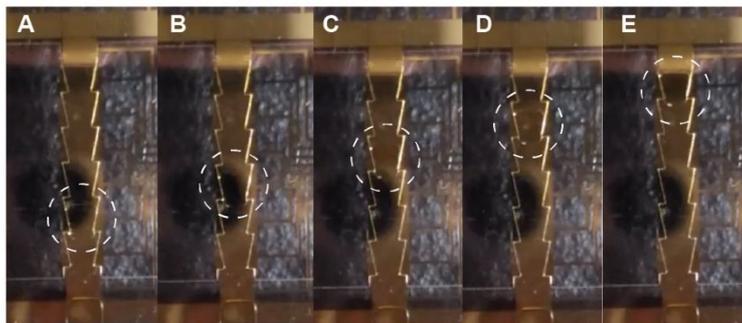


図6A→E 非対称流路壁によるラチェット液滴整流輸送機構

最後に図 7 は、システム 4 によって、液滴を切り出し、そして並列な整流輸送動作を実現している様子である。流路壁が無くとも、エレクトロウェット電極の形状の工夫によりラチェット液滴輸送機構が実現された。これにより、流路壁加工上のバラツキが液滴動作に与える影響を無くし、安定的な輸送を実現できるだけでなく、流路壁の存在に規定されない、より柔軟なバイオアッセイの設計が可能となった。例えば図 7 に示す実験に用いられたデバイスで

は、左右から対向するように液滴を輸送する電極デザインが配置されており、実際に右側と左側からそれぞれの液滴群を生成・輸送し、結果的に隣り合わせに配置する事ができている。そして現在は、各液滴群に異なる内容物を入れて、隣り合わせた後に1つ1つペアとして融合する系に発展させ、大量並列バイオアッセイ観察を実現しようとしている。従来マイクロ流体技術においてはこのような並列系を実現するのは容易ではない。デジタルマイクロ流体デバイスの液滴操作自由度と、ラチェット機構による並列液滴輸送により実現できる興味深い系であり、スケールアップと微小化を進められれば、並列・高感度な有力アッセイ技術へと展開できると期待される。また、本機構の汎用性の高さを利用して、並列輸送部から出てきた液滴を、従来 DMF 技術の選択的液滴操作により回収して行く実装を想定している。

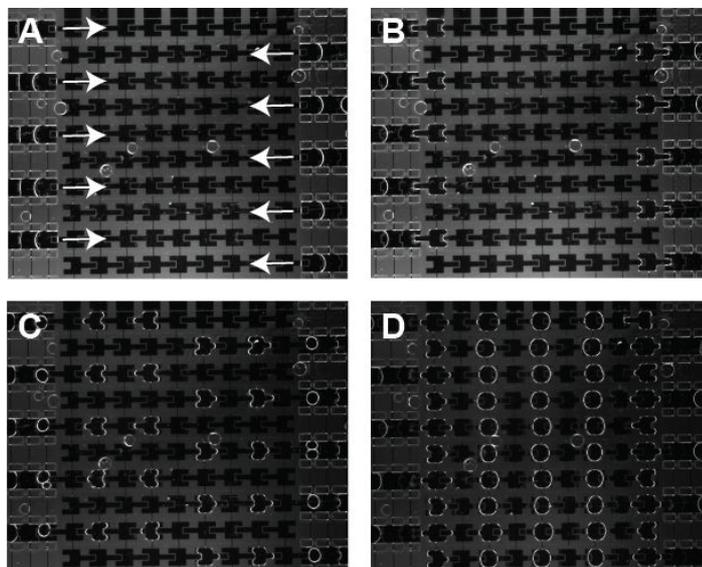


図7A→D 非対称電極デザインによるラチェット液滴整流輸送機構

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

① Ryohei Kobayashi, Sadao Ota, Hiroyuki Noji, “Digital bioassay in digital microfluidic platform (デジタルマイクロ流体技術を用いたデジタルバイオアッセイ)”, International Conference on Single Cell Research, 2016.

② Ryohei Kobayashi, Sadao Ota, Hiroyuki Noji, “Digital bioassay in digital microfluidic platform (デジタルマイクロ流体技術を用いたデジタルバイオアッセイ)”, 日本生物物理学会第 54 回年会, 2016.

〔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〕

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 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

### (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。