

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00850

研究課題名（和文）10-100nmナノ流体工学の検出法の創成と単一細胞プロテオミクスへの応用

研究課題名（英文）Detection method for 10-100nm nanofluidic engineering and application to single cell proteomics

研究代表者

馬渡 和真（Mawatari, Kazuma）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：60415974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,500,000円

研究成果の概要（和文）：マイクロ流体工学は化学、バイオ、医療など広く使われており、ナノスケールの極限サイズへと向かっているが、極限サイズになると検出が極めて困難になる。そこで、本研究では最もよく利用される吸光をベースに標識せずにナノ空間で超高感度な分析を可能にする新しい原理の検出方法、すなわち光熱変換光回折（POD）法を創成した。提案した原理を確認最適化し、70nm空間で10分子という極限レベルの検出を達成した。そして、fLレベルの分離分析（クロマトグラフィ）を実現した。これはピコリットルである単一細胞より桁違いに小さく、単一細胞レベルの分離分析の基盤技術である。以上、液相極限空間の検出法と分離分析法を創成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コロナウイルスなどナノレベルの物質を1個で分析するための極限分析手法が求められている。しかし、フラスコやピーカーなど従来のツールでは大きすぎて高感度分析は困難である。そこで、本研究では液体を扱う容器としては極限的に小さい10-100nm空間（ナノチャネル）で分析するプラットフォームを構築した。光吸収・発熱を利用して分子を10分子レベルで検出するPOD法を実現し、最小70nm空間での極限分析が可能となり、新しい学術ツールを創成できた。今後、本成果を用いて、ウイルス1個の検出やがんの原因であるエキソソーム（ナノ物質）1個を分析するツールになると期待され、医学や生物学に大きな貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Microfluidic engineering is widely used in chemistry, biology, and medicine and is now moving to an extreme size space, nanoscale. However, the detection is extremely difficult due to the small size. In this study, new detection method, photothermal optical diffraction (POD) was created for the space, which is based on the popular detection principle of light absorption. The proposed principles were confirmed, and the detection system was optimized. As a result, ultrasensitive detection (10 molecules) was realized in a 70 nm nanochannel. Then, separation analysis was integrated into the 70 nm nanochannels. The sampling size is fL scale which is much smaller than single cell volume, and the established technology will be a platform for single cell analysis. Overall, ultrasensitive detection and separation method in extreme size region below 100 nm were realized for the first time.

研究分野：分析化学、マイクロナノ流体工学

キーワード：ナノ流路 光回折 分析化学 単一細胞 クロマトグラフィ

1. 研究開始当初の背景

数 cm 角の基板上に作製した 10-100 μm スケールの空間に化学を集積化するマイクロ流体工学が発展して世界的な研究開発競争が繰り広げられている。最近では、図 1 に示すように、10-100 nm スケールのナノ空間 (ナノ流体工学) へと展開されている。ナノ空間は分子とバルク液相をつなぐ空間として液体の本質や細胞内外の反応を調べる基礎学術ツールとして期待されている。また、デバイス応用の観点からは体積は aL-fL であり、単一細胞体積 pL よりも桁違いに小さく、単一細胞や単一分子スケールの極限分析が実現できると期待される。しかし、ナノ空間の化学には、加工・流体制御・検出法などの高度な技術と方法論が不可欠である。特に検出法は挑戦的であり、微量で標識も困難な 10-100nm の超微小空間での汎用的な方法論が必要である。

これまで我々は、図 2 に示すように、標識を必要とせず、光吸収後に発生するナノスケールの発熱と屈折率変化を光干渉により超高感度に検出する微分干渉熱レンズ顕微鏡 (DIC-TLM) を提案・実証して、800nm 空間で 10^2 分子レベルの検出限界を実現した。そして、aL-fL スケールでの超高感度免疫分析デバイスや分離分析デバイスなどナノ空間ではじめて分析デバイスを実現した。

しかし、図 3 に示すように 800nm 以下になると壁への熱拡散の影響が顕著になり適用できない。すなわち、分子により吸収された熱がガラスに拡散してガラスで屈折率変化 Δn が起こる。屈折率の温度変化 (dn/dT) は、液体で負、壁を構成する固体 (ガラスなど) で正となる。つまり、液体と固体で一般的に屈折率変化は逆であるので、壁だらけの空間となる 10-100nm のナノ空間では Δn が相殺され、検出感度が大きく低下する。

すなわち、液相極限空間であるナノスケールに展開するためには、壁面への熱拡散に影響されない新しい分析法が必要である。

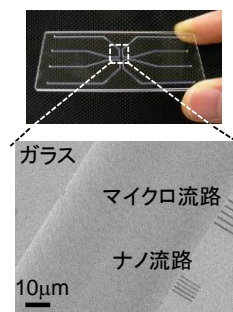


図 1. マイクロ流路とナノ流路

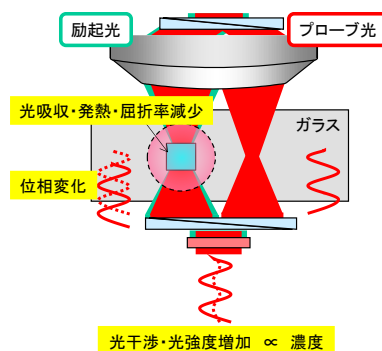


図 2 DIC-TLM による定量の原理

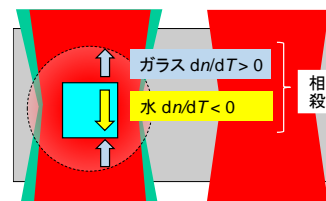


図 3 壁への熱拡散の影響

2. 研究の目的

そこで、壁面の影響が大きくなる 10-100nm 空間でも影響を受けない新しい原理を考案することで、10-100nm 空間の検出法を実現して、分子からバルク液相に至る化学や流体の基礎学術や極限分析などのデバイス技術に貢献すること着想した。すなわち、光吸収後の発熱・熱拡散・液体と固体での屈折率変化を光回折として検出する方法を考案した (光熱変換光回折検出法, photothermal optical diffraction (POD))。光回折は対象が波長スケールになると顕著になるのでナノ流路は最適である。また、発熱・熱拡散により液体と固体 (ガラス) の屈折率差 Δn は拡大するが、液体/固体界面で発生する光回折強度は Δn に比例するので、ガラスに拡散した熱による屈折率変化は、DIC-TLM と異なり、逆に感度上昇へ大きく寄与する。また、サイズが小さくなるほどこの効果は大きくなるので、液体としての極限である 10¹nm スケールまで展開することができると期待される。研究目的は以下の通りである。

- (1) 光回折を利用した 10-100nm 空間の非蛍光性の単一分子検出法の実現
- (2) 単一細胞プロテオミクスに向けた 10-100nm 空間での超高分離と超高感度検出の実証

3. 研究の方法

今回提案する POD 法の原理を試料が水溶液の場合を想定して図 4 を用いて説明する。検出のためのレーザー (プローブ光) を同軸にして対物レンズに導入して、ナノ流路に照射する。ナノ流路には屈折率 1.33 の水が、壁面には屈折率 1.46 のガラスが存在する。従って水中の光の速度はガラス中の速度よりも速く、従ってホイヘンスの 2 次波が大きくなる。この差により波面の歪みが生じて回折光が生じる。そして、光吸収のためのレーザー (励起光) を入れると、溶液の光吸収/発熱/熱拡散による温度 (T) が上昇する。水の $dn/dT < 0$ 、ガラスの $dn/dT > 0$ であるので、屈折率差 Δn が増大する。その結果波面の歪みが大きくなり、回折角が大きくなって (光回折が強くなる)、スリットを通過する光強度 P_0 が増加 (ΔP_0) する。 ΔP_0 は発熱量、すなわち試料の光吸収に比例するので、この強度変化からナノ空間の分子の吸収を測定でき、非蛍光性分子を標識せずに超高感度に検出可能である。この方法はナノ流路の光回折を利用するので流路幅が小

さくなるほど回折角が大きくなり、ナノになるほど測定が有利になる、すなわち壁面への熱拡散が感度上昇に寄与するこれまでの方法とは全く異なる原理と考えられる。

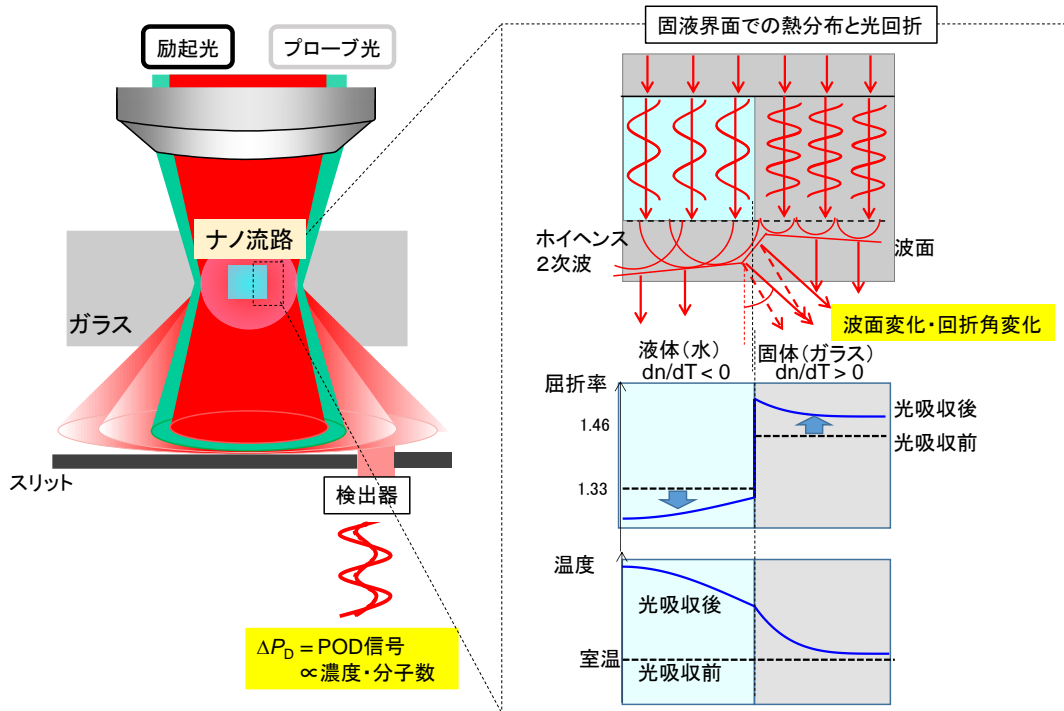


図4 ナノ流路の非標識分子検出法の原理：光熱変換回折法（POD）

4. 研究成果

(1) POD 原理の検証

最初に提案した POD の原理を検証するために、装置を設計・製作した（図5）。励起光とプローブを同軸にして、対物レンズによりナノ流路へ集光する。ナノ流路からの光回折光のうち、プローブ光のみを励起光カットフィルタを利用して透過させ、スリットとフォトダイオードで検出する。温度変化は mK 以下の非常に微弱な変化であるので、励起光をチョップにより変調して、フォトダイオードの出力から同期成分（振幅）のみを抽出して POD 信号とした。

次に重要なコンセプトであるナノ流路からの光回折の発生および透過光との分離を確認した。

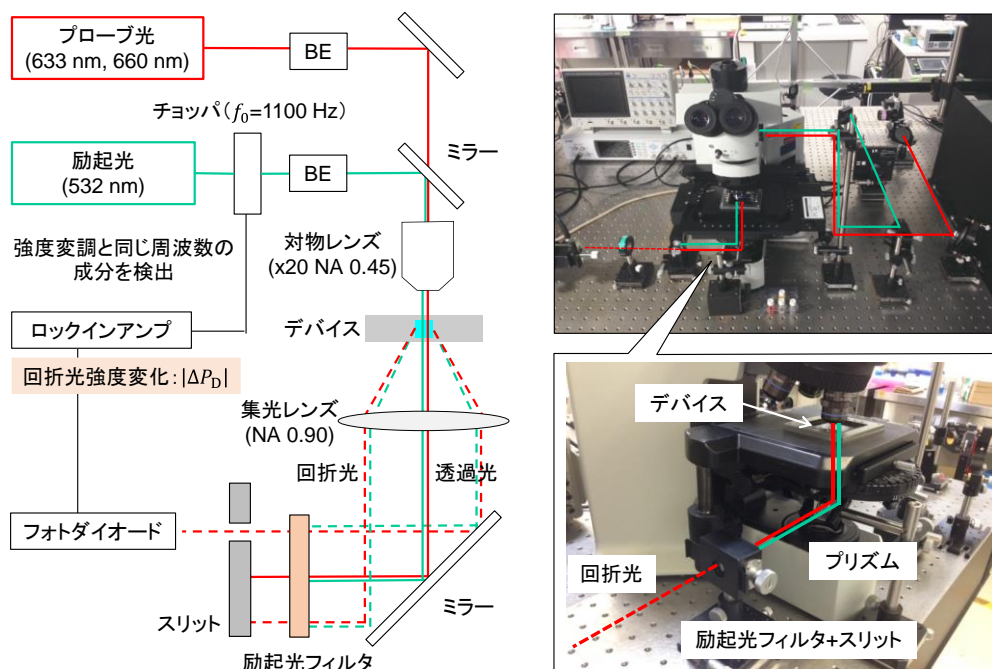
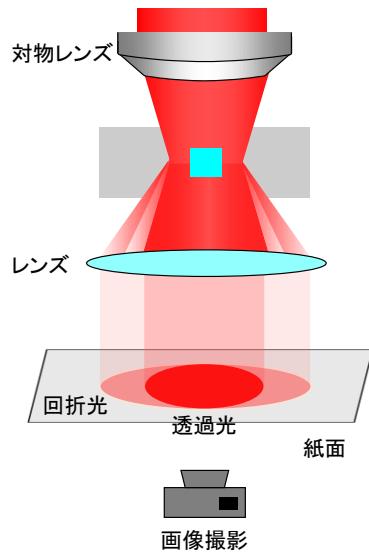
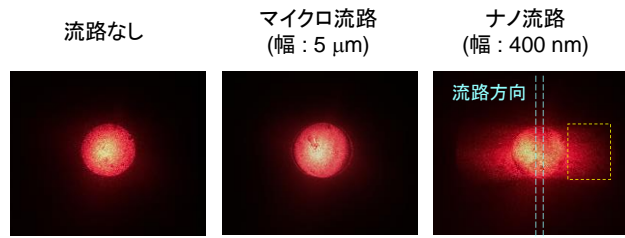


図5 POD 測定システム

▶ 観察方法

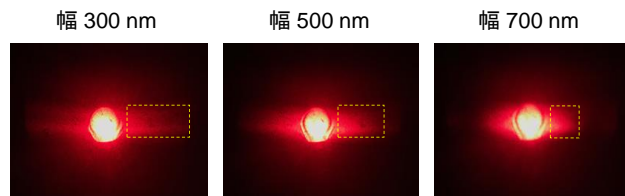


▶ ナノ流路による光回折現象



光回折現象: ナノ流路でのみ発生

▶ 流路サイズによる変化



流路幅が小さくなることで回折光の広がりが増加

図 6 ナノ流路光回折の確認

回折光は透過光の下面より CCD カメラを用いて撮影した。測定結果を図 6 に示す。図 6 右上から、流路なしやマイクロ流路の場合では、透過光と分離した回折光は観測されなかったが、400nm のナノ流路になると明瞭でかつ透過光と分離された回折光が観測された。また、回折理論からは流路が小さくなるほど回折角は大きくなるが、図 6 右下から同様の傾向が観察された。以上から、ナノ流路光回折のコンセプトが有効であることが確認された。

そこで、回折光をスリットにより分離し、励起光を吸収する標準色素溶液を用いて、POD 信号の検量線を取得した。測定結果を図 7 に示す。信号値は目的分子の濃度と良好な直線関係を示し、POD が濃度定量に有効であることが実証された。検出限界を求めたところ 10 分子であり非標識でありながら可算個レベルの超高感度検出性能を有していることもわかった(以下、最適化のプロセスがあるが紙面の都合上省略する)。

次に液相として極限領域であるサブ 100nm 領域で検証した。測定結果を図 8 に示す。70nm 領域においても測定できることが実証された。検量線の傾き (= 測定感度) と流路サイズの関係を探ったところ、流路幅に対しては 1.3 乗、流路深さに対しては 1.5 乗に依存することがわかった。検出感度は検出体積の影響のみであればそれぞれ 1 乗依存であるが、測定アライメントや測定領域外への熱拡散の影響があると考えられる。この点については今後の課題である。一方、これまで壁面への熱の影響が大きい DIC-TLM の方法では 3 乗に依存しており、ナノスケールでは急激に感度が低下して測定できなかった。この比較から本 POD 法が極限液相領域の測定法として非常に優れていることを示している。

(2) 極限液相空間での分離分析(クロマトグラフィ)の実現

上記により POD 法が実現したので、分離分析の代表であるクロマトグラフィの集積化に挑戦

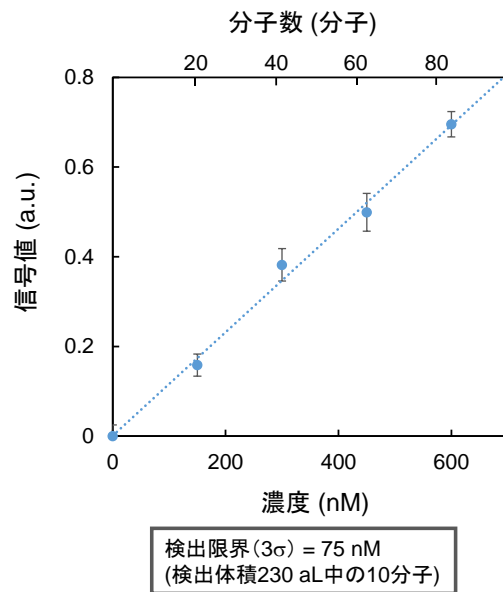


図 7 SudanIV ヘキサン溶液の検量線 (幅・深さ: 400nm)

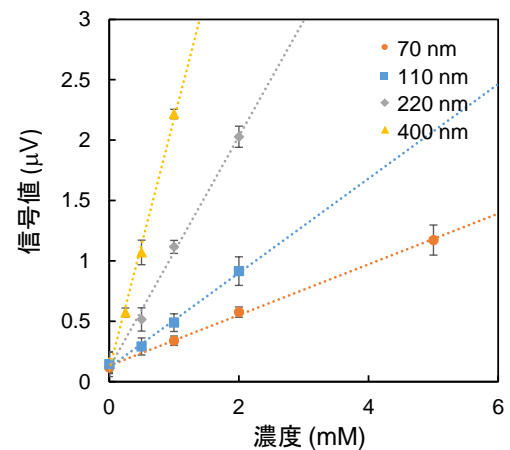


図 8 サンセットイエロー水溶液の検量線

した。集積化手順と実験系を図9に示す。図9左のように、クロマトグラフィで必要となる試料定体積導入（インジェクション）、分離、無標識検出を1枚のナノ流体デバイスに集積化した。そして、図9右のように、圧力コントローラを用いてインジェクション量を fL レベルで制御し、粒子を導入できないほど小さいナノ流路の壁面を固定相として用い、本研究で開発した POD 法を用いることで分離検出を試みた。図10に測定結果を示す。極限空間での分離分析はじめて成功した。インジェクション量は 25fL であり単一細胞体積 pL よりも桁違いの少ない量でできており、単一細胞プロテオミクスのプラットフォームとして非常に有効である。

以上、本研究の目的と概ね達成した。また、紙面の都合上省略するが以下の付加的な成果が得られていることも報告する。

1. ナノ粒子をナノ流路で1個1個カウンティングできること
(エキソソームなどナノ粒子の個別検出法のプラットフォームとして有効)
2. ナノ粒子の光散乱とナノ流路光回折の干渉による高感度ナノ粒子光散乱信号の発見

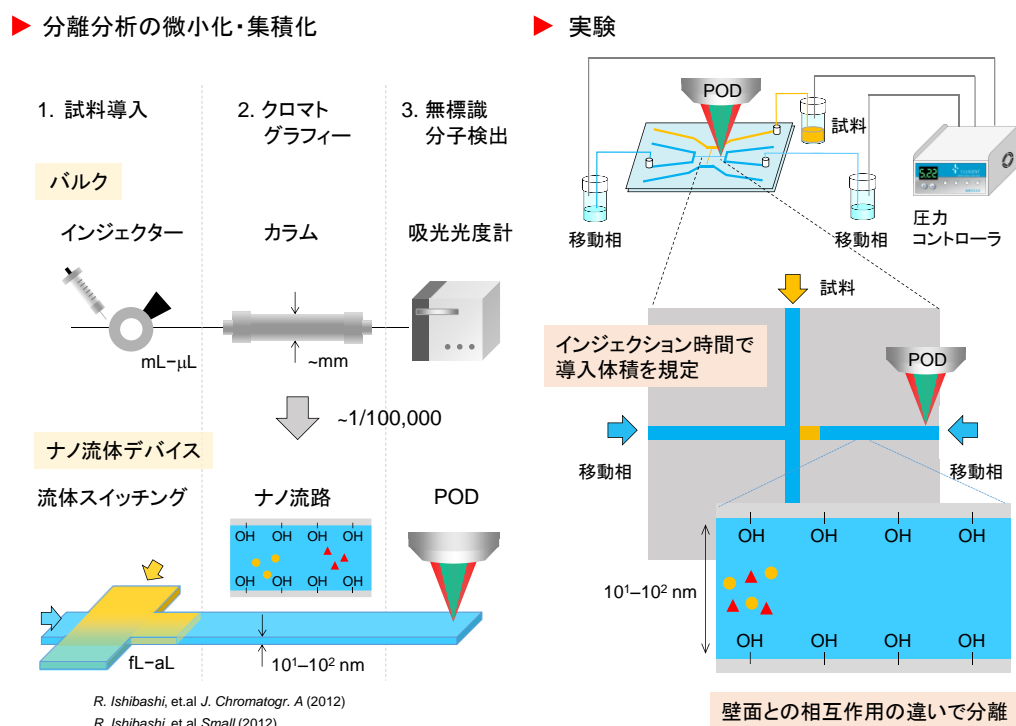


図9 ナノ流路光回折の確認

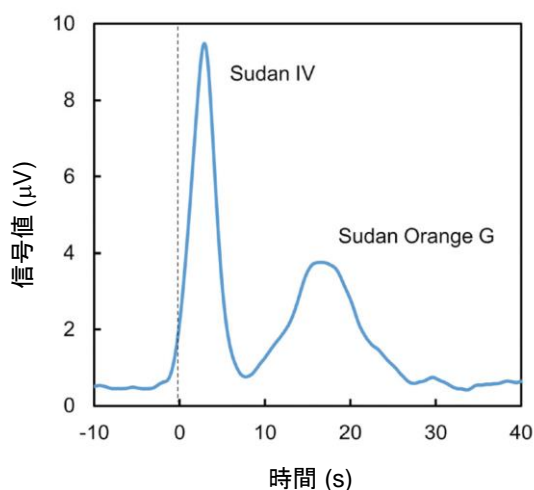


図10 分離分析の結果（幅 820 nm, 深さ 90 nm）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Y. Tsuyama, K. Morikawa, and K. Mawatari	4. 巻 92
2. 論文標題 Concentration Determination at Countable Molecular Level in Nanofluidics by Solvent-enhanced Photothermal Optical Diffraction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14366-14372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c02024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y. Tsuyama, K. Morikawa, and K. Mawatari	4. 巻 1624
2. 論文標題 Nanochannel Chromatography and Photothermal Optical Diffraction: Femtoliter Sample Separation and Label-free Zeptomole Detection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chromatography A	6. 最初と最後の頁 461265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chroma.2020.461265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y. Tsuyama and K. Mawatari	4. 巻 92
2. 論文標題 Detection and Characterization of Individual Nanoparticles in a Liquid by Photothermal Optical Diffraction and Nanofluidics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 3434-3439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b05554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshiyuki Tsuyama and Kazuma Mawatari	4. 巻 15
2. 論文標題 Nonfluorescent Molecule Detection in 102 nm Nanofluidic Channels by Photothermal Optical Diffraction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 9741-9746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b01334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiyuki Tsuyama, Kyojiro Morikawa, and Kazuma Mawatari	4. 巻 13
2. 論文標題 Integration of sequential analytical processes into sub-100 nm channels: Volumetric sampling, chromatographic separation, and label-free molecule detection,	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 8855-8863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0nr08385b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiyuki Tsuyama and Kazuma Mawatari	4. 巻 26
2. 論文標題 Nanofluidic optical diffraction interferometry for detection and classification of individual nanoparticles in a nanochannel	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microfluidics and Nanofluidics	6. 最初と最後の頁 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10404-022-02562-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Y. Tsuyama and K. Mawatari
2. 発表標題 Solvent -enhanced Photothermal Molecule Detection Method for Nanofluidics and Its Application to Femtoliter Normal-phase Chromatography
3. 学会等名 MicroTAS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬渡和真
2. 発表標題 マイクロ・ナノ流体デバイスの学術とデバイス応用
3. 学会等名 次世代医療技術研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬渡和真
2. 発表標題 マイクロ・ナノ流体デバイスの極限を目指して
3. 学会等名 日本分析化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬渡和真
2. 発表標題 マイクロフルイディクスによる分析・診断技術の革新
3. 学会等名 Dermatology学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuma Mawatari
2. 発表標題 Itrasensitive non-label detection method for nanofluidics using nanochannel optical diffraction
3. 学会等名 Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬渡和真
2. 発表標題 ナノ流体工学で明らかにする10-100nm空間の溶液物性と構造
3. 学会等名 液体・非晶質研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuma Mawatari
2. 発表標題 Nanofluidic diffractometry for 10-100 nm nanofluidic science and analytical chemistry
3. 学会等名 The 23rd Annual Meeting of the China Association for Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 光熱変換分光装置及び微量検体検出方法	発明者 馬渡 和真	権利者 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-113575	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 Kazuma Mawatari	発明者 津山慶之、馬渡和真	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-126164	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森川 響二郎 (Morikawa Kyojiro) (20796437)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教 (12601)	
研究分担者	Le ThuHacHuong (Le ThuHacHuong) (60752144)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------