

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成26年 6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：特別推進研究

研究期間：2009～2013

課題番号：21000007

研究課題名(和文) 拡張ナノ空間流体工学の創成

研究課題名(英文) Creation of fluid engineering in extended-nano space

研究代表者

北森 武彦 (KITAMORI, Takehiko)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：60214821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 418,800,000円、(間接経費) 125,640,000円

研究成果の概要(和文)：単一分子から凝縮相への過渡的空間である 10-100 nm 空間(以下、拡張ナノ空間と称する)において、トップダウン・ボトムアップ加工、aL-fL 流体制御、独自の分光法である DIC-TLM(後述)など世界に先駆ける方法論を実現し、拡張ナノ空間流体工学を拓くことができた。これを用いて、拡張ナノ空間ではじめて発現する物性変化や流体現象を見出した。これにより、表面から 50 nm、即ち数百分子層もの水分子集団が構造化して物性や流体現象に影響するという、流体科学など様々な学術分野において極めて重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We created new fluid engineering field for 10-100 nm spaces (extended-nano space) in a transitional regime between single molecules and condensed phase. Novel methodologies were established for the first time, such as top-down/bottom-up fabrication, aL-fL fluid control, and DIC-TLM. By using these methods, we revealed unique liquid properties and transport phenomena in extended-nano space. These results indicate that liquid molecules near interface within 50 nm, which correspond to layer of several hundred molecules, are structured and affect transport phenomena. This study will greatly contribute to fluid science in extended-nano space and other fields.

研究分野：流体工学、マイクロ・ナノデバイス

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：拡張ナノ空間、マイクロ化学システム

## 1. 研究開始当初の背景

量子効果や近接場効果が発現する数 nm の空間を利用するナノテクは、エレクトロニクスやフォトニクス等における学術と技術に新しい展開をもたらしてきた。一方、我々は数  $\mu\text{m}$  以上の空間において、ガラス基板上にマイクロ流路を作製し、そこに反応・抽出等の化学操作を集積化するマイクロ化学システムの研究を進めてきた。小さいが故に表面の化学的・物理的特性が流体挙動に大きく影響する空間特性を利用し、短時間・高効率に化学プロセスを完了するマイクロ化学チップの技術を世界に先駆けて開発し、診断分析等に応用してきた。

図1に示すように、こうした直近の先端技術をサイズスケールで整理すると、10-100 nm の空間(拡張ナノ空間と定義)はナノテ

クからマイクロ化学チップへの移行領域であり、また、孤立系の単一分子から凝縮相への過渡的空間である。しかし、この空間は科学的・技術的に重要であるにもかかわらず、これまで有効な実験ツールがなく、科学としても技術としても比較的未踏の領域であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が培ってきたマイクロ化学の技術を基盤に拡張ナノ空間の研究ツールを創成し、これをもとに拡張ナノ領域で初めて発現する流体の物理と化学を明らかにして、「拡張ナノ空間流体工学」を創成する。それにより、拡張ナノ空間を利用した将来の革新的デバイス創成のための基礎を構築することを目的とする。

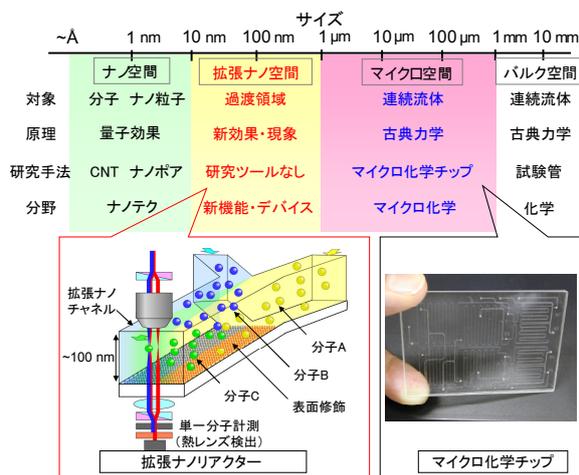


図1 研究の構想

### 3. 研究の方法

#### 研究項目 A：拡張ナノ空間の基盤技術

##### (A-1) 拡張ナノ空間極限加工法の開発

拡張ナノ空間特有の原理を利用した表面修飾や構造体のボトムアップ加工法を開発し、トップダウン加工法との組み合わせによる機能性拡張ナノ空間の創出法の基礎を確立する。

##### (A-2) 拡張ナノ空間の流体制御法の開発

親水・疎水等、表面濡れ性を空間的に制御することによって、機械的流体制御デバイスを持ち込めない拡張ナノ空間内で高度な流体制御法を提供する。一方で、我々独自の圧力流体駆動法を発展させて超微量流体制御法を開発する。

##### (A-3) 拡張ナノ空間の計測法の開発

拡張ナノ空間における単一分子検出法を、我々独自の非蛍光性分子超高感度検出器・熱レンズ顕微鏡 (TLM) を発展させて実現する。また、拡張ナノ空間で発現する物性を評価するための測定法を開発する。

#### 研究項目 B：拡張ナノ物理・化学特性の解明

##### (B-1) 拡張ナノ空間の基礎物性の解明

研究項目 A で開発したツールを用いて、分子論の観点から拡張ナノ空間の溶液構造を明らかにし、それに伴い発現する溶液物性および流体特性を明らかにする。図 2 に示すように、我々はこれまでに表面シラノール基と水分子とのプロトン交換によって表面近傍 50 nm の水が緩やかに構造化するという、プロトン移動相モデルを提唱してきた (Angew. Chem. Int. Ed., 2007)。これを作業仮説とし

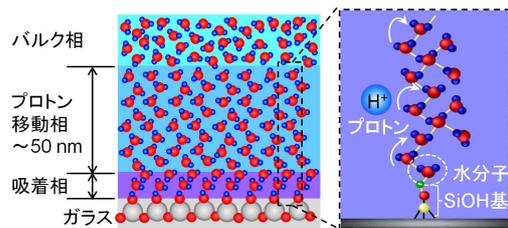


図2 拡張ナノ空間の水分子モデル

て研究に取り組み、拡張ナノ空間特有の事象を見出す。

##### (B-2) 拡張ナノ空間の化学反応特性の解明

拡張ナノ空間特有の物性による化学反応を明らかにする。

##### (B-3) バイオ拡張ナノ空間の溶液化学の解明

特異性が示唆されている細胞間空間の模倣デバイスを創出し、そこで発現する物性を明らかにする。

### 4. 研究成果

本研究を推進するために、国内・国際の両面で研究体制を整備・強化してきた。かわさき新産業創造センター (KBIC) の一区画に「拡張ナノフレイディックセンター」を立ち上げ、拡張ナノ空間の流体の研究体制を整備した。また、本研究とタイアップして、典・瑞・豪・新・米の 5 カ国主要研究機関と連携して JSPS 先端研究拠点事業「最先端マイクロ・ナノ化学国際研究拠点形成」(H21~H24) を推進し、国際共同研究を展開してきた。

研究項目 A では、当初の計画通り、トップダウンとボトムアップを融合する加工法、体積 aL-fl の超微量流体制御、光より小さい空間での非蛍光分子検出法など、いずれの基盤技術においても拡張ナノ空間独自の的方法論を世界に先駆けて構築した。これにより拡張ナノ空間で様々な機能を実現することが可能となり、拡張ナノ空間流体工学を拓いた。

研究項目 B では、開発したツールを用いて、表面近傍 50 nm のプロトン移動相を裏付ける溶液構造および流体特性、それに伴う拡張ナノ空間での水素イオン濃度上昇やプロトン拡散係数上昇など様々な物性変化や流体現象を明らかにした。さらに、当初を上回る成果として、表面化学基-水分子の相互作用の効果や物理的な溶液の閉じ込め効果など、拡張ナノ空間における物性変化の発現機構の解明に迫る知見が得られた。これにより、単一分子から連続体をつなぐ流体科学を体系化するための基礎的な知見を得た。また、拡張ナノ空間に特異的な化学反応速度変化やバイオ拡張ナノ空間での溶液物性変化を見出し、反応化学や生物物理においても極めて重要な知見を得た。

平成 21 年度 5 月の本研究開始からの論文発表数は 69 件、解説・総説は 12 件、国際会議件数は 183 件 (うち招待講演 63 件)、国内学会発表件数は 80 件 (うち招待講演 14 件)、特にマイクロ・ナノ化学分野最大の Micro TAS (採択率 50%以下) での発表件数は 43 件を記録しており、匹敵する研究室はいない。また、本研究の基盤技術や知見を広く普及させるために、国際的にも有名な Imperial College Press から、成果を体系的にまとめた単行本を「Extended-nano Fluidic Systems for Chemistry and Biotechnology」と題して

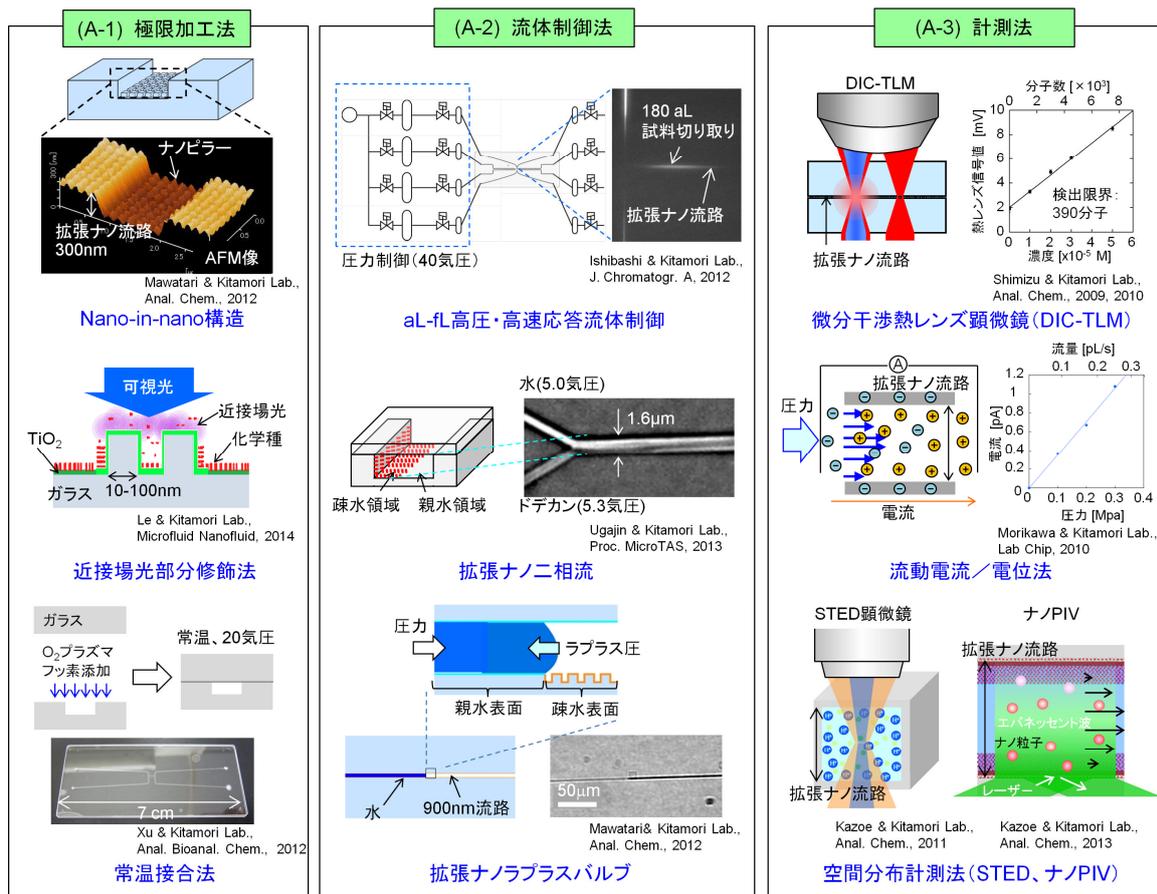


図3 本研究で確立した代表的な拡張ナノ空間の基盤技術 (研究項目 A)

刊行した。さらに、総仕上げとして平成 25 年 3 月に東京大学においてマイクロ・拡張ナノ流体工学の国際シンポジウムを開催し、本研究の成果を広く発信した。海外からの来場者も含めて約 150 名が参加して議論と交流を深め、盛況のうちに終了した。

本研究への取り組みは若手育成の成果としても着実にあらわれ、分担者である馬渡和真博士が化学とマイクロ・ナノシステム学会奨励賞を受賞するなど、若手研究者が国内・国際賞 20 件を受賞した。また、分担者である嘉副裕博士は研究員として着任して助教に昇任するなど、12 名の若手研究者の昇進につながった。以上のように、研究成果と育成の両立が達成されており、次世代を担う若手研究者が輩出されると期待している。

以下、それぞれの研究項目の成果の詳細について述べる。

#### 研究項目 A : 拡張ナノ空間基盤技術の確立

##### (A-1) 拡張ナノ空間極限加工法の開発

拡張ナノ空間で様々な機能を実現するための基盤として、トップダウンとボトムアップを融合した極限加工法を開発した。

トップダウン加工法として、図 3 に示すように拡張ナノ流路中に高さが数 10 nm のピラーや段差をつくる Nano-in-nano 構造の構築法を確立した (Anal. Chem., 2012)。これ

により、後述するナノ構造を利用した表面部分修飾や濡れ性制御、さらには化学反応を実現することがはじめて可能となった。

一方、ボトムアップ法として、ナノピラーに酸化チタンを成膜して化学種を修飾し、その表面に近接場光を誘起して化学種を局所的に分解する独自の光化学手法を開発した。近接場光強度を制御することで、光の波長より小さい最小 40 nm の表面部分修飾を達成した (Microfluid Nanofluid, 2014)。

上述のトップダウンとボトムアップとを融合するために、ガラス基板同士の常温接合法の基礎を構築した。表面への酸素プラズマ照射・フッ素添加により表面親水性を調整することで、常温・20 気圧の条件下でガラス基板を接合できることを明らかにした (Lab Chip, 2013)。これにより、ナノ電極や機能分子といった熱に弱い構造体を流路に局所的に組み込むことがはじめて可能になった。

##### (A-2) 拡張ナノ空間の流体制御法の開発

我々が確立してきた圧力駆動流体制御法をさらに発展させて、流体抵抗が飛躍的に増大する拡張ナノ空間で体積 aL-fL の超微量流体制御法を確立した。

図 3 に示すように、最大 40 気圧の圧力印加および 10 ms オーダでの切り替えが可能で、高圧・高速応答ナノ流体制御システムを開

発した。これにより、拡張ナノ流路で最小 180 aL の試料切り取り・送液をはじめて実現した (J. Chromatogr. A., 2012)。

一方、集束イオンビームを用いて表面に疎水性分子をパターンニングすることで、サイズが 800 nm の拡張ナノ流路で有機相と水相の平行二相流をはじめて実現した (Proc. MicroTAS, 2013)。また、上述の Nano-in-nano 構造表面への疎水性分子修飾により超撥水性を発現させて、気液界面のラプラス圧により 3 気圧の耐圧性能を有する化学のバルブを実現した。これを用いて、体積 1.7 fL の液滴切り取りにも成功した (Anal. Chem., 2012)。これらにより、拡張ナノ空間で二相流を用いた反応・抽出といった単位操作がはじめて可能になった。

### (A-3) 拡張ナノ空間の計測法の開発

我々が開発してきた非蛍光分子検出法である TLM は、その原理である熱レンズ効果が幾何光学にもとづくため、光の波長より小さい拡張ナノ空間では信号強度が低下し適用が困難であった。そこで、図 3 に示すように、TLM に波動光学の原理を用いた微分干渉 TLM (DIC-TLM) を開発した。これにより、サイズが 500 nm の拡張ナノ流路で非蛍光 390 分子の定量を達成した。さらに、タンパクなどの単一分子検出も可能であることを示した (Anal. Chem., 2009, 2010)。

拡張ナノ空間の物性測定法として、イオン流動に伴う超微弱電流/電位を検出する流動電流/電位法を開発した。これにより、蛍光分子・イオンといったプローブ分子の添加なしで拡張ナノ空間の流量、誘電率、導電率といった溶液物性を測定することがはじめて可能となった。また、pL/s の超微量流量計としても利用できることを実証した (Lab Chip, 2010)。

一方、従来の理論的アプローチではなく、実験的に物性の空間分布情報を取得可能な測定法も開発してきた。蛍光分子の誘導放出による STED 顕微鏡を用いて、分解能 80 nm を有する拡張ナノ空間の水素イオン濃度分布計測法を確立した (Anal. Chem., 2011)。また、光の波長より小さいエバネッセント光とナノ粒子を用いた粒子追跡法を開発し、深さ 400 nm の拡張ナノ流路における流速分布計測をはじめて実現した (Anal. Chem., 2013)。

## 研究項目 B : 拡張ナノ物理・化学特性の解明 (B-1) 拡張ナノ空間の基礎物性の解明

本研究で明らかにした拡張ナノ空間における物性変化や流体现象を図 4 に列挙する。

ラマン分光法を用いて溶液構造を解析し、拡張ナノ空間で構造化した水の割合がバルクに比べて変化していることを明らかにした (Proc. MicroTAS, 2009)。さらに、流動電位の時系列測定から、サイズが 580 nm

の拡張ナノ流路で誘電率がバルクの 1/4 に低下していることが判った (Proc. MicroTAS, 2012)。これは、拡張ナノ空間で水が配向して構造化するという作業仮説を支持している。

流体特性を評価するために、空間をプロトン移動相のみが占めるサイズが 50 nm の拡張ナノ流路を作製して流動電流を測定した。その結果、溶液の粘度は流速に依存しないことが判った。これにより、プロトン移動相はバルクの水と同様にニュートン流体として振る舞うことを明らかにした。また、毛管導入の測定により得られた粘度のサイズ依存性から、プロトン移動相領域の粘度はバルクの 4.4 倍であることが判った (J. Phys. Chem. Lett., 2012)。

流動電流/電位法と STED 顕微鏡法を用いて、水が緩やかに構造化した拡張ナノ空間のプロトン挙動に関する様々な物性を測定した。結果を以下に示す。

- ① 上述のサイズが 50 nm の拡張ナノ流路において、水素イオン由来の流動電流が検出された。
- ② STED 顕微鏡を用いた測定から、サイズが 400 nm の拡張ナノ流路で水素イオン濃度が 19 倍に上昇していることが判った (Anal. Chem., 2011)。
- ③ 流動電流/電位法により、拡張ナノ空間の水の導電率がバルクの 500 倍に上昇していることが判った。
- ④ 蛍光プローブを用いた測定から、サイズが 200 nm の拡張ナノ流路でプロトン拡散定数が 8 倍に上昇していることが判った (Angew. Chem. Int. Ed., 2012)。
- ⑤ 流動電流の測定結果から、拡張ナノ空間ではガラスの等電点が低 pH 側にシフトしていることが判った (Appl. Phys. Lett., 2011)。

以上の知見から、プロトン移動相のプロトンが解離性であり、表面近傍 50 nm の水素結合を介したホッピング伝導に起因するプロトン移動度上昇が導電率・プロトン拡散定数の上昇、さらには表面シラノール基の解離促進に寄与することが明らかになった。

一方、ポアソン-ボルツマン方程式を用いたプロトン挙動の理論解析を行った。その結果、拡張ナノ空間特有のプロトン挙動は、古典的な電気二重層とプロトン移動相の両方を考慮することではじめて説明できることを示した (Anal. Chem., 2012, 2013)。これは拡張ナノ空間の溶液モデルを構築する上で極めて重要な知見である。

これらに加えて、拡張ナノ空間の物性の発現機構に迫る知見を得た。NMR による水分子運動解析から、表面シラノール基が密であるほど拡張ナノ空間の水分子運動が抑制されることが判った。さらに、予想外の知見と

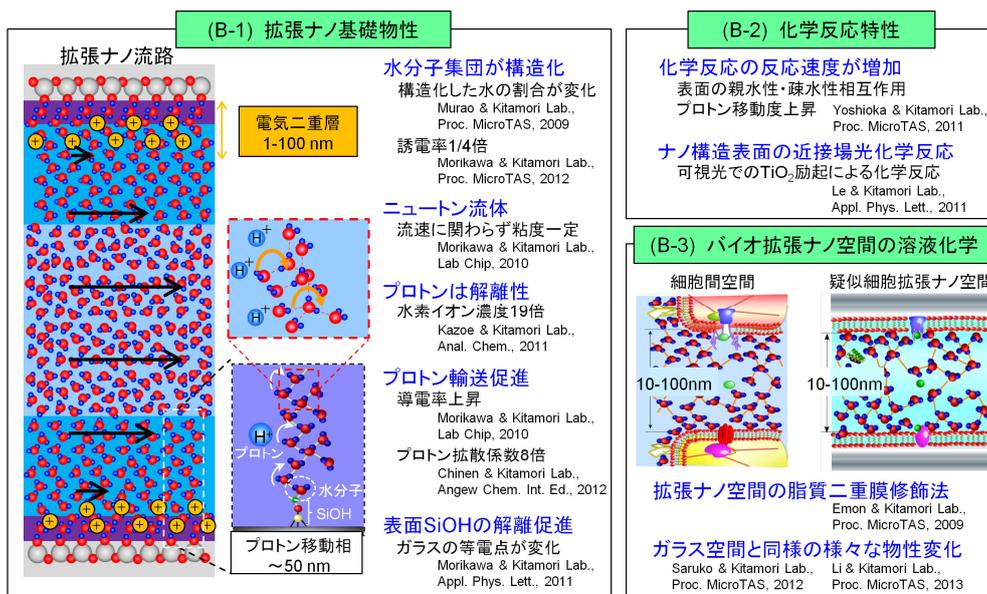


図4 本研究で明らかにした代表的な拡張ナノ空間の物理・化学特性（研究項目 B）

して、粘度上昇、プロトン移動度上昇といった拡張ナノ空間特有の物性が、空間の深さと幅がともに拡張ナノスケールで溶液を閉じ込めた空間のみで発現し、一方で深さが拡張ナノスケールで幅がマイクロスケールの空間では発現しないことを見出した。これらは、表面-分子相互作用と物理的な閉じ込め効果により、表面から 50 nm、即ち数百分子層にも及ぶ水分子集団が構造化して物性が変化することを意味している。これは、表面近傍の数分子層のみで物性が変化するという大多数のグループの知見を覆す極めて重要な知見である。

#### (B-2) 拡張ナノ空間の化学反応特性の解明

図4に示すように、拡張ナノ空間で支配的な表面効果による特異的な化学反応速度変化を見出した。サイズが 340 nm の拡張ナノ流路において、表面と分子の親水性・疎水性相互作用により、Diels-Alder 反応の反応速度が 1.8 倍に増加することが判った (Proc. MicroTAS, 2011)。また、エステル加水分解の反応速度が増加することが判った。これにはプロトン移動相のプロトン解離性とプロトン移動度上昇が寄与すると考えられる。

一方、ナノ構造表面に発生した近接場光による可視光での酸化チタン励起により、水分解反応を誘起できることを明らかにした (Appl. Phys. Lett, 2011)。

#### (B-3) バイオ拡張ナノ空間の溶液化学の解明

近年研究が盛んな生物物理に新たなツールを提供し、生命現象を解明するために極めて重要な知見を得た。

図4に示すように、シナプスやミトコンドリアといった細胞間・細胞内空間の *in vitro* ツールとして、拡張ナノ流路に脂質二重膜を修飾したバイオミメティック拡張ナノ空間

を創成した。ベシクル融合法を応用した脂質二重膜修飾法を開発し、これを実証した (Proc. Micro TAS, 2009)。

研究項目 A で開発したツールを用いて、バイオミメティック拡張ナノ空間における溶液物性を測定した。その結果、粘度上昇、プロトン拡散定数上昇、酵素反応速度上昇といった、いずれもガラスの空間と同様の物性変化を見出した (Proc. MicroTAS, 2012, 2013)。これは、表面リン酸基がプロトン供与体として水分子と相互作用することで、脂質二重膜表面でもプロトン移動相が発現していることを意味している。これらの知見は、生体システムでも拡張ナノスケールの空間ではその大きさと形態により水の物性が通常と異なり、生命現象が発現している液相の物性がバルクと異なることを示唆している。

以上、拡張ナノ空間の基盤技術（加工・流体制御・検出）をはじめて確立して、これにより拡張ナノ空間の分子描像に伴う様々な物性や流体现象を明らかにした。我々の CREST 研究「拡張ナノ空間を利用した革新的機能デバイスの創成」(H22~H27) で実証された通り、確立した拡張ナノ空間流体力学の基盤技術によって単一分子分析や超小型燃料電池などが実現し、拡張ナノ空間デバイス工学の創成につながった。また、得られた知見は単一分子から連続体の過渡空間である拡張ナノ空間の流体科学だけでなく、物理化学、界面化学、反応化学、生物物理など様々な分野に大きく貢献すると期待される。

#### 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 8 1 件）

- ① Y. Xu, C. Wang, L. Li, N. Matsumoto, K. Jang, Y. Dong, K. Mawatari, T. Kitamori, Bonding of glass nanofluidic chips at room temperature by a one-step surface activation using an O<sub>2</sub>/CF<sub>4</sub> plasma treatment, Lab Chip, 査読有, Vol. 13, 2013, pp. 1048-1052, DOI: 10.1039/C3LC41345D
- ② L. Li, Y. Kazoe, K. Mawatari, Y. Sugii, T. Kitamori, Viscosity and wetting property of water confined in extended nanospace simultaneously measured from highly-pressurized meniscus motion, J. Phys. Chem. Lett., 査読有, Vol. 3, 2012, pp. 2447-2452, DOI: 10.1021/jz3009198
- ③ Y. Kazoe, K. Mawatari, Y. Sugii, T. Kitamori, Development of a measurement technique for ion distribution in an extended nano channel by super-resolution-laser-induced-fluorescence, Anal. Chem., 査読有, Vol. 83, 2011, pp. 8152-8157, DOI: 10.1021/ac201654r
- ④ K. Morikawa, K. Mawatari, M. Kato, T. Tsukahara, T. Kitamori, Streaming potential/current measurement system for investigation of liquids confined in extended-nano space, Lab Chip, 査読有, Vol. 10, 2010, pp. 871-875, DOI: 10.1039/b916776e
- ⑤ H. Shimizu, K. Mawatari, T. Kitamori, Development of differential interference contrast thermal lens microscope (DIC-TLM) for sensitive individual nanoparticles detection in liquid, Anal. Chem., 査読有, Vol. 81, 2009, pp. 9802-9806, DOI: 10.1021/ac901888u

〔学会発表〕（計 2 6 3 件）

- ① S. Yoshioka, K. Mawatari, T. Kitamori, Reaction analysis in extended-nano space by a novel NMR chip and enhancement of Diels-Alder reaction of cyclopentadiene, MicroTAS2011, 2011年10月2日～2011年10月6日, Seattle (USA).
- ② K. Mawatari, N. Hasumoto, K. Kitamura, T. Yatsui, T. Kawazoe, M. Ohtsu, T. Kitamori, Development of local surface-modification method for fluidic control in extended-nano space using nanopillar and optical near-field, Pacificchem 2010, 2010年12月15日～

2010年12月20日, Honolulu (USA).

- ③ H. Emon, K. Mawatari, T. Tsukahara, T. Kitamori, Surface modification of lipid bilayers in extended-nano space for making artificial intercellular structures, MicroTAS2009, 2009年11月1日～2009年11月5日, Jeju (Korea).

〔図書〕（計 4 件）

- ① A. Aota, T. Kitamori, CRC/Taylor & Francis, Micro- and Nanofluidics in “Nanofabrication Handbook”, 2011, 20.
- ② K. Mawatari, T. Tsukahara, Y. Tanaka, Y. Kazoe, P. Dextras, T. Kitamori, Imperial College Press, Extended-nano Fluidic Systems for Chemistry and Biotechnology, 2011, 180.

〔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

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/kitamori/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北森 武彦 (KITAMORI, Takehiko)  
東京大学・大学院工学系研究科・教授  
研究者番号：60214821

### (2) 研究分担者

馬渡 和真 (MAWATARI, Kazuma)  
東京大学・大学院工学系研究科・准教授  
研究者番号：60415974

杉井 康彦 (SUGII, Yasuhiko)  
東京大学・大学院工学系研究科・准教授  
研究者番号：90345108

嘉副 裕 (KAZOE, Yutaka)  
東京大学・大学院工学系研究科・助教  
研究者番号：20600919

田中 陽 (TANAKA, Yo)  
独立行政法人理化学研究所・生命システム  
研究センター・ユニットリーダー  
研究者番号：405312271

### (3) 連携研究者

なし