研究課題別評価

1　研究課題名：

微細加工によるナノバイオ情報解析デバイス創製

2　研究者氏名：一木　隆範

研究員：大益　史弘　（研究期間　H.15.4～H.16.7）

技術員：加瀬　聖悟　（研究期間　H.15.4～H.17.3）

3　研究のねらい：

本提案研究は、半導体産業で培われた 10nm から 100μm に亘る高精度微細加工技術を応用して作製されるバイオチップ（マイクロエレクトロニクス、マイクロマグネティクス等とマイクロ流体デバイス、マイクロアレイチップの複合集積デバイス）を中核とし、更に光学顕微鏡、走査型プローブ顕微鏡等を利用した顕微画像計測技術を組み合わせて個々の細胞の直接的な操作・分析を可能にする従来に無い新しい細胞分析システムならびに分析手法の開発を目指した。即ち、近年進捗が著しいバイオイメージング技術の利点を最大限に活かしつつ、さらにイメージングのみでは達成できないバイオ研究の手段をバイオチップ技術により提供することで、将来のバイオ基礎研究、医療、創薬産業において有要な単一細胞レベルでの生命活動を精密に計測するための新規なプラットフォームの構築に繋げることが目的である。

4　研究成果：

（1）マイクロ流体デバイスのための微細加工技術の開発

細胞を扱うデバイスには 10μm～100μmレベルの微細加工が要求される。また、基板材料も半導体デバイスのようなシリコンウエファに留まらず、透明なガラスやプラスチックがしばしば用いられる。そのため、シリコン半導体デバイスの微細加工技術を基盤としつつも、異種材料への展開や加工速度の劇的な高速化を図った。ガラス加工技術、プラスチック製流体デバイス製造に関するプラズマ応用技術、高気圧微小プラズマによる超高速シリコンエッチング技術を研究し、ここで構築した独自のデバイス加工技術を応用して種々のデバイスの試作開発を行った。

（2）微細加工チップを用いた細胞の機能評価、分取システムの開発

多数の細胞試料の中から必要な細胞だけをマイルドに分取するセルソート技術はこれからの細胞研究において必要不可欠な技術である。本研究では光学顕微鏡上による細胞の画像情報に基づき、ソーティングを行うためのセルソーターの開発を行った。シリカガラス製のマイクロ流体デバイスに微小電極を集積化し、交流電界を利用した誘電泳動方式ならびに直流電界を利用した電気泳動方式により複数の流路への細胞の振り分けを可能にするセルソータチップの試作開発と赤血球細胞を用いたデバイス動作の確認・評価を行い、それぞれの方式の動作特性をスケーリングの観点から考察した。交流電界による誘電泳動方式は電気的に中性な粒子にも適用可能と

いう利点を持つが、細胞のサイズの2乗に反比例する電圧の印加が必要で、一方の直流電界による電気泳動方式では細胞のサイズではなく、細胞のζ電位により動作条件が決まる。誘電泳動方式で動作電圧の高電圧化を避けるためにはソーティング対象のサイズに合わせてデバイス全体を縮小するという方針も可能である。そこで、更に、流路寸法をサブμm領域に縮小したナノ流体デバイス技術への拡張による分離対象物の更なる微小化についても検討した。高抵抗 Si 薄膜をガラス基板で挟む構造の流体デバイスを提案し、イオン注入による自己整合電極形成技術と陽極接合によるデバイス封止技術の併用により、電極をナノフルイディクスに精度良く集積できるようになった(Fig. 1)。当該技術を用いた細胞小器官分取デバイス作製プロセスを提案した。

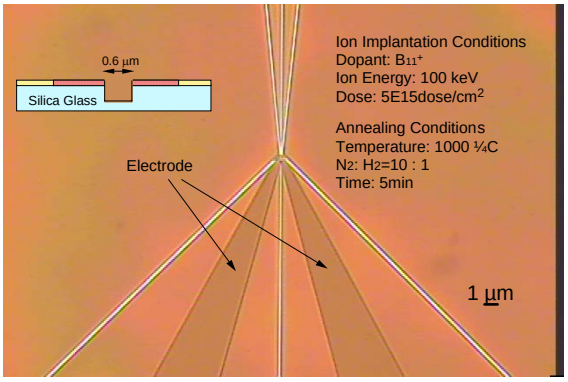

Fig. 1 ナノフルイディクスに電極を自己整合プロセスで付与したナノソーターデバイス.

上述のセルソーターシステムは、顕微画像から細胞選択の基準となる情報を抽出することを前提に開発したが、個々の細胞の状態の判定に利用できる物性値は画像情報に限られるものではない。細胞の表面電位(ゼータ電位)を計測する細胞電気泳動法は、ゼータ電位が細胞膜表面のタンパクや糖タンパク等の状態を反映する特性値であることや、非侵襲的に測定できることから、細胞の種類や状態の判別に有用であると考えられる。そこで、我々はマイクロキャピラリー電気泳動(μCE)チップと高速度カメラを搭載した顕微光学系、実時間粒子画像処理ソフトウェアから構成される高効率細胞表面電荷評価システムを開発した。この技術は上述のセルソータチップの細胞評価判定基準として組み込むことも可能である。μCE チップ流路内壁への細胞の非特異吸着の問題、ならびに、壁と細胞間の相互作用が泳動挙動に及ぼす影響を検討するためにチップ流路内壁に複数の異なる材料で被覆を施し、異なる環境 pH における細胞電気泳動度の値を比較、評価した。内壁被覆材料の違いは流露内壁のゼータ電位の変化をもたらすために、電気浸透流(EOF)の挙動、ひいては細胞の泳動挙動に著しい変化をもたらすが、最終的に得られる正味の電気泳動度の値には何らの影響も及ぼさないことが判明し(Fig. 2)、チップを用いた細胞電気泳動度測定の広範な pH条件域における高い信頼性が示された。さらに、当該システムを用いて HL60 の細胞周期同調剤への応答を評価し、細胞周期に伴う細胞の状態変化を追跡可能なことを示した(Fig. 3)。

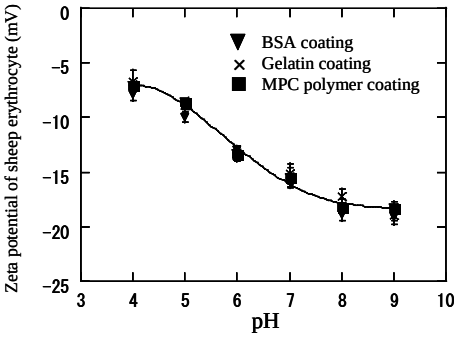

Fig. 2 赤血球のζ電位のpHによる変化. 流路内壁の被覆法を変更に依らず電気泳動チップにより算出される細胞ζ電位は広いpH領域においてよく一致する.

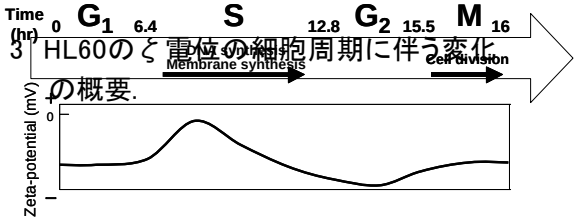

Fig. 3 HL60のζ電位の細胞周期に伴う変化の概要.

（3）磁気ビーズ操作機能を有するマイクロ流体デバイス、マイクロリアクターアレイチップの開発

微細パターン化磁性材料を集積化したマイクロ流体デバイスとそのアフィニティアッセイへの応用

細胞や蛋白質、核酸の分離、精製を高効率化するために、超常磁性微粒子を高分子ポリマーで被覆した磁気ビーズの表面を抗体等で修飾し、目的の細胞や生体分子を固定化し、磁石で操作する磁気ビーズ法が用いられている。この磁気ビーズは担体として利用すると、通常は物理的操作が困難な生体分子の操作も可能になる。そこで、微細パターン化したパーマロイ薄膜をマイクロ流体デバイス上に集積化した磁気ビーズ操作デバイスを開発・試作し、ビオチンで表面修飾した磁気ビーズをモデル系として用いて、生体分子の特異的アフィニティを利用した生体物質の検出、収集デバイスの実証動作を行った（Fig. 4、Fig. 5）。電磁石によりデバイス外部から導入した磁力線がパターン化した磁性薄膜により局所的に集中し、磁場の不均一性によりマイクロ流体デバイス上で磁気ビーズの固定、開放の制御を可能にした。このデバイスの試作開発のためにはパーマロイ薄膜の水素と一酸化炭素のプラズマケミストリーを用いた微細加工技術を独自に開発して用いた。また、パーマロイで試作したデバイスでは僅かな残留磁化がビーズの操作にわずかに影響したため、発展的に、ナノ磁性微粒子を分散したポリマー薄膜をパターニングして集積化するデバイス要素技術も提案した。また、派生の成果として、マイクロリアクターに磁性薄膜を付与する技術により、膨大量の磁気ビーズをセルフアセンブルで配置するマイクロリアクターアレイチップ技術も開発した。

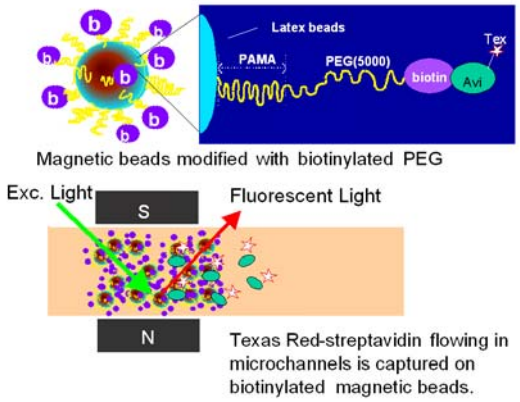

Fig. 4 モデル系としてビオチン修飾磁気ビーズを用いたストレプトアビディンのアフィニティアッセイ.

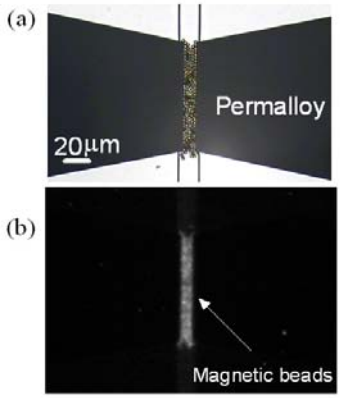

Fig. 5 パーマロイ微細パターン間で固定された磁気ビーズ(上)、ビーズ上に結合したストレプトアビディンの蛍光検出(下).

(4)マイクロ流体デバイス上へのマイクロピペット集積化技術

マイクロファブリケーション技術で形成される微細構造体による細胞の直接的計測、操作(細胞内外への物質抽出、注入、細胞内あるいは細胞膜の電位計測など)の概念を実装化するために、自己支持型シリカ製マイクロニードルのマイクロ流体デバイスへの集積化(Fig. 6)、ならびに、シリカ製プレーナー型マイクロピペットデバイス(Fig. 7)について研究した。前者を作製するために開発された製造プロセスは、ピペットを自立構造にするための犠牲層となるアモルファスシリコン層を利用してほう珪酸ガラス基板に陽極接合する点に特徴がある。流路、マイクロニードルはいずれも可視光域で透明で、顕微鏡下での細胞観察、レーザーピンセットとの併用に適している。マイクロ流路により細胞を自動的にマイクロピペット先端位置に輸送できること、約 1～2μm 径のシリカガラス製マイクロニードルが細胞膜を容易に貫通することが確認された。後者については、厚さ 150μm の溶融石英ガラスに両面からそれぞれ径が 100μm、2μm の孔をアライメントして ICP エッチング加工し、電流を流す貫通孔を形成し、ポリマー製マイクロ流体デバイスに組み込んで用いた。プレーナー型マイクロピペットデバイスの電気的な特性評価の結果、試作チップは現在、通常用いられているガラス管を引き伸ばして作製するマイクロ電極と同程度の良好な性能であることを確認した。我々の試作したこれらのデバイスは、必要に応じて更なる微細化や電極数、形状等のデザインが可能であり、今後、電気生理研究における細胞局所性向上や多点計測等への進歩が期待できる。

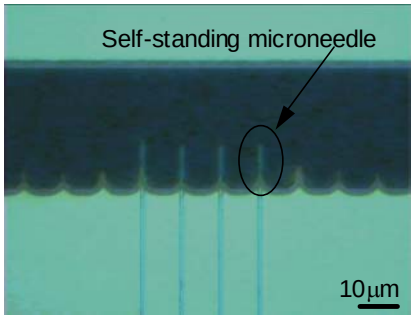

Fig. 6 μ流路に集積化したμニードルアレイ.

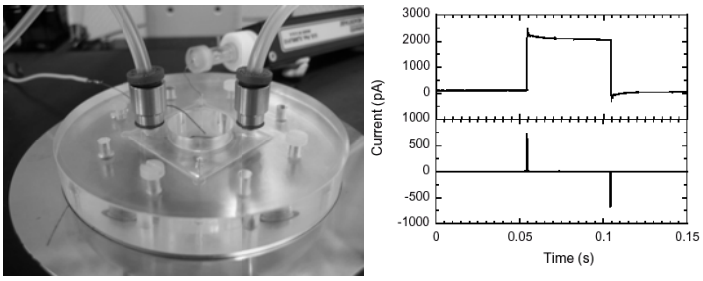

Fig. 7 プレーナーマイクロピペット集積化流体デバイス(左)とその電流応答特性(bath mode と on-cell mode)(下).

(5)チップ上で培養･凍結した細胞の原子間力顕微鏡による計測技術の開発

チップ上で培養した細胞を瞬時に凍結させることにより、細胞膜の流動性および内部の生体分子の分布を固定させ、細胞の発現状態を保持したままで原子間力顕微鏡を用いて微視的計測を実現することが目的である。本目的を達成するためには、計測システムの開発に加え、チップ上での低ダメージな細胞凍結、解凍プロトコル、チップ上での細胞の制御培養技術が必要であり、これらの要素技術について並行して研究した。

まず、凍結細胞計測のためのクライオ原子間力顕微鏡の開発について述べる。Fig. 8 のように倒立型位相差顕微鏡ステージ上に雰囲気制御可能な AFM 観察チャンバーが搭載された計測システムを試作した。チャンバー内には液体窒素をフローして冷却可能なサンプルステージを設置され、これはピエゾ素子にて X-Y 方向への移動が可能である。カンチレバーは PZT 薄膜による自己検出型であり、狭隘な光学顕微鏡への組み込みを可能にし、外部検出器や複雑な光学的アライメントも不要である。本装置を用いて氷表面を観察し、像取得動作を確認した。

AFM 計測の信頼性や再現性を得るためには、観察の対象となる細胞試料の位置や形状を人為的に制御することが重要であると考え、チップ上での制御培養技術を検討した。モールドに充填した磁気ビーズを PDMS フィルム上に転写して作製したビーズパターン配列培養プレートを用いると、細胞外マトリクスの物理的形状と化学的性質の相乗的な効果のデザインが可能になる(Fig. 9)。この技術を HeLa 細胞の培養に適用し、位置・サイズ、形状制御、さらにはこれらに起因する増殖速度の制御に応用可能であることを示した。

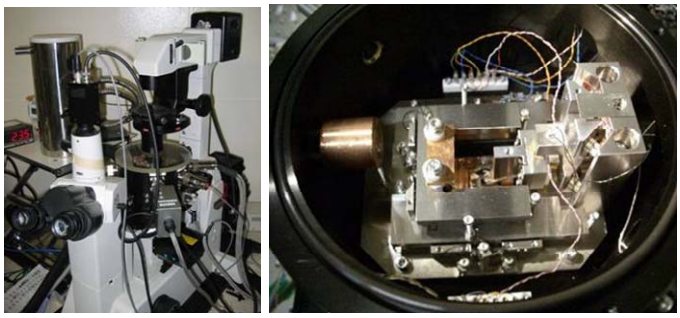

Fig. 8 凍結細胞観察用顕微鏡システム

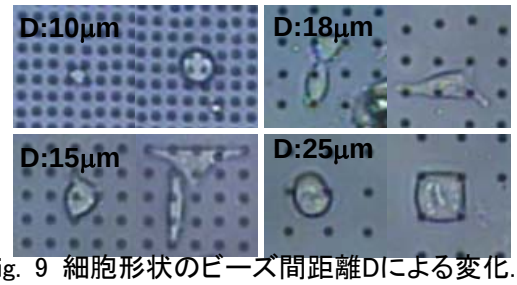

Fig. 9 細胞形状のビーズ間距離Dによる変化.

5 自己評価:

当該研究では、半導体産業で培われたナノマイクロファブリケーション技術をバイオ計測に展開し、特に細胞の操作、計測に有用な新しい手段を提供する手段をデバイス、更にはデバイスを中核とした計測システムとして実装することを提唱した。具体的には、(A)光学計測とデバイス技術により細胞を選別的により分ける技術(10μmテクノロジー)、(B)微細加工構造を利用して1細胞を局所的に計測する技術(μm－サブμmテクノロジー)、(C)走査プローブ顕微鏡との組み合わせによる分子レベル計測(サブμm－nm テクノロジー)の大別して3つのスケール領域において、成果を示すことを初期目標として掲げた。研究は、(A)から(B)、更に(C)へと順に、次のステージへの基盤となる技術を構築しながらスケールダウンしていく形で進めた。また、これらのデバイス開発研究に伴う必要性に応じて適宜、独自のプロセス技術の開発を行った。(A)については微細加工チップを用いた細胞の機能評価、分取システム研究の成果として開発されたシステムが生物学的研究のツールとして利用できる状況に至っており、当初の計画が十分に達成されたと考える。(B)についてはデバイス技術として実装化され、今後、バイオ計測への応用研究へと展開が可能な状況であり、ほぼ達成されたと考える。(C)については独自に凍結細胞計測のための原子間力顕微鏡を開発し、観察用試料作製技術の検討まで進んだが、細胞の凍結観察までは至っていない。本研究の期間内では最終目標まで達していないが、この研究テーマを進める基盤技術は整ってきており、今後も着実に進めていきたい。

６ 研究総括の見解:

新しい微細加工技術も工夫しながら、役に立ちそうな具体的なシステムを実現しており、細胞のソーティングやゼータ電位の評価など数々の有用なツールを創出してきたことが高く評価できる。ただしゼータ電位のモニタリングは実際に何を反映した電位を測定しているのかの検討が必要であり、薬剤処理をしない条件、HL60 以外の細胞系でも再現可能かどうかについても検証が必要である。半導体の加工技術をバイオに応用しようという試みは多くあるが、まだビジネスに結びつくものは無いので、新たなビジネス領域を拓けるように創出してきた技術を1つでも実用化することを期待する。

７ 主な論文等:

【論文】 9 報

F. Omasu, Y. Nakano and T. Ichiki, "Measurement of the electrophoretic mobility of sheep erythrocytes using microcapillary chips", Electrophoresis 26, (2005).

K. Takahashi, A. Hattori, I. Suzuki, T. Ichiki and K. Yasuda, "Non-destructive on-chip cell sorting system with real-time microscopic image processing", J. Nanobiotechnology, 2, 5-12 (2004).

T. Ichiki, R. Taura, and Y. Horiike, “Localized and ultrahigh-rate etching of silicon wafers using

atmospheric-pressure microplasma jets”, J. Appl. Phys. 95, pp. 35-39 (2004).

T. Ichiki, Y.Sugiyama, T. Ujiie and Y. Horiike, “Deep dry etching of borosilicate glass using fluorine-based high-density plasmas for MEMS fabrication”, J. Vac. Sci. Technol. B 21, pp. 2188-2192 (2003).

T. Ichiki, Y. Sugiyama, R. Taura, T. Koidesawa, and Y. Horiike, "Plasma applications for biochip technology", Thin Solid Films 435 (1-2), pp. 62-68 (2003).

【特許】
発明者: 一木隆範
出願人: 科学技術振興機構
名称: マイクロプラズマジェット発生装置
特許番号: 第 3616088 号(2004).
国際出願: PCT/JP2004/10388

【受賞】
第 26 回本多記念研究奨励賞(2005)

【学会、研究会発表】
招待講演(国際学会)9 件
T.Ichiki, "Microdevice technologies for biomolecular and cellular manipulation", The 1st International Symposium on Molecule-Based Information Transmission and Reception (MB-ITR2005), (Okazaki, Japan, March. 3-7, 2005).

T. Ichiki, T. Ideno, H.M.L.Tan, R.Taura, “Microplasma processes for MEMS Applications”Proc. 25th Int. Symp. on Dry Process, (Tokyo, Japan, Nov. 30-Dec. 1, 2004) .

T. Ichiki, "Atmospheric-pressure plasma micro-jet and its applications to plasma processing and micro analytical systems", Gordon Research Conference, August 17, Plymouth, USA, 2004).

T. Ichiki, “Plasma technologies for microfluidics for novel bioanalytical systems”, 51st Int. Symp. American Vacuum Society, (Anaheim, USA, Nov. 16, 2004).

T. Ichiki, “Development of Nano/Microfluidic Devices for the Analysis of Biomolecules”, Fourth Int. Symp. on Biomimetic Materials Processing (BMMP-4), (Nagoya, Jan. 28-30, 2004).

国際学会発表 23 件

Y. Hosoi, K. Takahashi, M. Biyani, N. Nemoto, T. Akagi, and T. Ichiki, "High-throughput screening of mutant AKR enzymes using mRNA display and novel microreactor array chips", Proc. Ninth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2005) (Boston, USA, Oct. 9-15, 2005).

N. Minamino, T. Akagi and T. Ichiki, "Fabrication of micropipette chips for simultaneous electrophysiological and optical measrurement", Proc. Ninth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2005) (Boston, USA, Oct. 9-15, 2005).

T. Akagi, K. Takahashi and T. Ichiki, "Evaluation of cell cycle stage by electrophoretic mobility using a microcapillary electrophoresis chip", Proc. Ninth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2005) (Boston, USA, Oct. 9-15, 2005).

N. Ichikawa, Y. Katsuyama, Y. Nagasaki and T. Ichiki, "Microfluidic devices integrated with permalloy micropatterns for bead-based assay", Eighth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2004) (Malmoe, Sweden, Sept. 26-30, 2004).

T. Ichiki, Y. Sugiyama, S. Kase, and Y. Horiike, "Surface micromachined hollow microneedle array integrated on a microfluidic chip", Seventh International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2003), (Squaw Valley, USA, Oct. 5-9, 2003).

招待講演（国内学会、研究会）13 件

国内学会、研究会発表　44 件