

一般財団法人 向科学技術振興財団  
研究助成 成果報告書

名古屋大学  
助教 東 直輝

課題名：サイズ排除クロマトグラフィの原理に基づいたナノ障壁型分離チップの開発

1. 研究の目的

ヒトの体液中には数十 nm から数百 nm の粒径の生体微粒子が存在する。例えば、粒径が 30 nm～150 nm の微粒子であるエクソソームはガンの早期診断への応用が期待されている。一方で、体液中には生体微粒子よりも小さな数 nm のタンパク質や DNA 断片等（ここでは分析阻害粒子と呼ぶ）が多数存在するため、分析の前処理として生体微粒子のみを高精度に分離する技術が不可欠である。これまでは粒子の沈殿速度が粒径によって異なることを利用した超遠心分離法が用いられてきたが、分離に数時間と長い時間を要していた。一方で、微小流路内に形成されたマイクロ・ナノ構造を用いたマイクロチップ電気泳動法によって数十分の高速な分離が達成された。例えば、流路内に挿入された多孔質膜をフィルターとして用いた方法が提案された(H. Woo et al., ACS Nano 11, 1360 (2017))。この方法は、600 nm の直径を持つ膜によってエクソソームと細胞の分離を、20 nm の直径を持つ膜によってエクソソームとタンパク質の分離を実現した。しかし、これらの方法では、粒径が小さいほど分離精度が低下するため、高精度化には原理的な限界があった。

本研究ではサイズ排除クロマトグラフィの原理に基づいた新規な分離チップデバイスの開発を目的とした。サイズ排除クロマトグラフィの原理は、粒子の拡散係数の違いによって分離できる。拡散係数は粒径が小さいほどその差が大きくなるので、粒径が小さな粒子ほど分離精度が向上する可能性がある。一方で、これまでにサイズ排除クロマトグラフィの原理をもつチップデバイスを用いて生体微粒子の分離を実現した報告例はほとんどない。そこで本研究では、理論モデルを用いた分離の実現可能性の検証と微細加工技術を用いた分離チップデバイスの試作、および、生体微粒子を模倣したナノ粒子の流路内の電気泳動の実現をねらいとして研究を進めた。

2. 研究の内容, 成果

2.1 分離の原理

図1は本研究で提案した分離チップデバイス概略図を示す。本チップのマイクロ・ナノ流路は、ナノインプリント技術や電子ビームリソグラフィ技術によって形成した溝の上側を陽極接合によってガラス基板で塞ぐことで作製される。試料導入および電極挿入に用いる4個のリザーバを十字型流路で結ぶ構造とし、各電極の電圧印加による電気泳動や電気浸透流を用いて試料の泳動方向を制御する。試料をリザーバBに導入し、電圧を印加

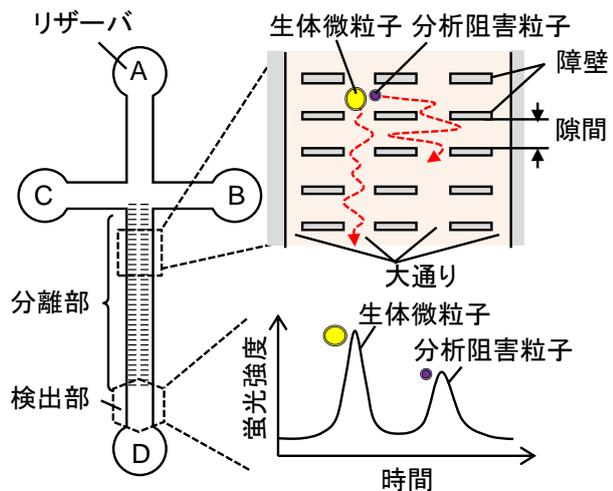


図1. サイズ排除クロマトグラフィーの原理に基づいた分離チップデバイス

してリザーバBとCの間を泳動させる。その後、リザーバAとDの間に電圧を印加することで、十字路の交差部に存在する試料を分離部に導入する。分離部にはナノスケールの障壁構造が多数配列している。流路は泳動方向と平行な“大通り”と垂直な“隙間”からなる。生体微粒子と分析阻害粒子は“大通り”を泳動しながら、拡散によって“隙間”に進入する。このとき、生体微粒子は分析阻害粒子と比べてサイズが大きいため拡散係数が小さい。そのため“隙間”に進入しにくいいため分離部を早く通過する。一方で、分析阻害粒子は拡散係数が大きく“隙間”に進入しやすいため、分離部を遅く通過する。これがサイズ排除クロマトグラフィーの原理である。生体微粒子と分析阻害粒子にあらかじめ蛍光分子を結合し、分離部の末端の検出部で蛍光強度の時間変化を測定すれば、図1のようにそれぞれに対応した2つのピークを得ることができるため分離が実現される。拡散係数は粒径が小さいほどその差が大きくなるので、粒径が小さな粒子ほど分離精度が向上する可能性がある。さらに、本分離法は、生体微粒子が構造にトラップされにくい原理を持つ。そのため、回収率が向上するだけでなく、生体微粒子と構造との相互作用が弱く、生体微粒子の破壊を防ぐことできるメリットを持つ可能性がある。

## 2.2 研究方法

本研究では、ナノスケールの粒子の分離の実現に向けたサイズ排除クロマトグラフィーの原理に基づいた新規な分離チップデバイスの開発を目的とした。これまでにサイズ排除クロマトグラフィーの原理をもつチップデバイスを用いて生体微粒子の分離を実現した報告例はほとんどない。そこで本研究では、第一に、理論モデルを用いた分離の実現可能性の検証を行った。理論モデルによって、分離構造の設計と泳動条件の決定を行った。第二に、微細加工技術を用いて分離チップデバイスを新規に作製した。作製条件を実験的に変えて、ナノ障壁構造の作製時の問題点を解決した。第三に、生体微粒子を模

倣したナノ粒子を用いて、作製したデバイス内の流路内で圧力印加によってナノ粒子の泳動を制御できるかについて実験的に検証した。

## 2.3 研究成果

### 2.3.1 理論モデルに基づく分離実現性の検証

サイズ排除クロマトグラフィの原理に基づくと、試料導入部から検出部に到達するのに要する時間  $t_i$  は、DNA 分子が電気泳動によって大通りを泳動するのに必要な時間と隙間にトラップされる時間の和である。すなわち、時間  $t_i$  は次式で得られる。

$$t_i = \frac{L}{cV} + p_{enter} \times t_{gap} \times N \quad (1)$$

ここで、 $L$  は分離部の長さ、 $V$  は泳動電圧、 $c$  は比例定数、 $p_{enter}$  は隙間への進入確率、 $t_{gap}$  はひとつの隙間にトラップされる平均時間、 $N$  は隙間の個数である。

図2に示すように、ナノ粒子は電気泳動によって大通りを泳動し、ブラウン運動によって隙間に進入する。電気泳動と直交する座標を  $x$  とすると、 $x$  方向のブラウン運動によってナノ粒子が  $x=X_a$  から  $X_b$  の障壁間の隙間  $h$  に進入する確率  $p_{enter}$  は下記で表される。

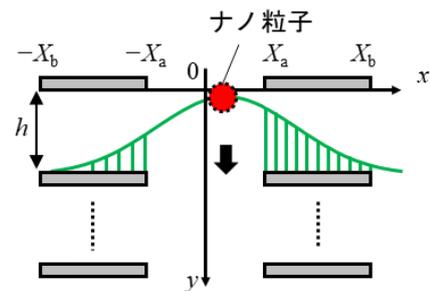


図2 ナノ粒子がすきま $h$ にブラウン運動によって進入する確率

$$p_{enter} = \int_{X_a}^{X_b} \left( \frac{1}{4\pi Dt} \right)^{1/2} \exp\left( -\frac{x^2}{4D \times h/cV} \right) dx \quad (2)$$

$D$  は粒子の拡散係数であり、粒子のサイズに依存する。生体微粒子はサイズが大きいので、拡散係数が小さく、 $p_{enter}$  は小さい。一方で、分析阻害粒子はサイズが小さいので、拡散係数が大きく、 $p_{enter}$  は大きい。これによって、時間  $t_i$  に差が生じるため、分離が実現される。

ピークの標準偏差( $\sigma_i$ )は分子の自己拡散による電気泳動方向の分散が支配的である。したがって、 $\sigma_i$  は次式で表される。

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{2Dt_i}{(cV)^2}} \quad (3)$$

分離の実現可能性の検証のため、生体微粒子と分析障害粒子のそれぞれのサイズが 30 nm と 1 nm の粒子である場合について理論解析を行った。それぞれの拡散係数はアインシュタイン・ストークスの式によって算出した値を用いた。隙間 200 nm の障壁が流路方向に1万個配列した分離部内を 100  $\mu\text{m/s}$  の泳動速度で分離した際の理論解析結果を図3に示す。サイズが 30 nm と 1 nm の粒子に対応するそれぞれのピークが検出されたことから分離の実現性が示された。分離時間は10分以内であり、高速な分離実現の可能性があることが分かった。

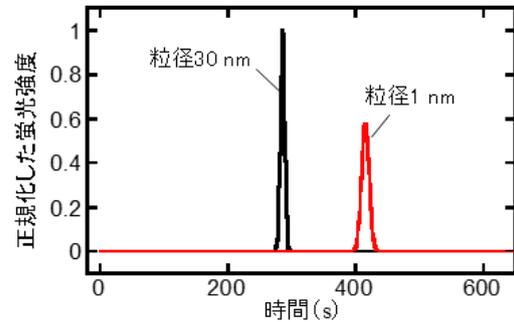


図3. 理論モデルに基づく分離の実現可能性の検証結果

### 2.3.2 微細加工技術によるデバイスの作製

分離チップは、図4に示す作製プロセスによって作製した。まず、レジストをスピコートによって塗布したシリコン基板に、電子ビームリソグラフィを用いてパターニングし、深掘り反応性イオンエッチング(D-RIE)により深さ 600 nm の障壁構造と流路を形成した。残ったレジストをアセトンによって除去した後、熱酸化によって厚さ約 100 nm の酸化シリコン膜を表面に形成した(1057°C, 15 分)。その後、シリコン基板をダイサーによってカットした。最後に、リザーバの位置に貫通穴を開けたガラスを 400°C, 1 kV の条件で 30 分間陽極接合し、障壁構造とその他の流路を封止した。

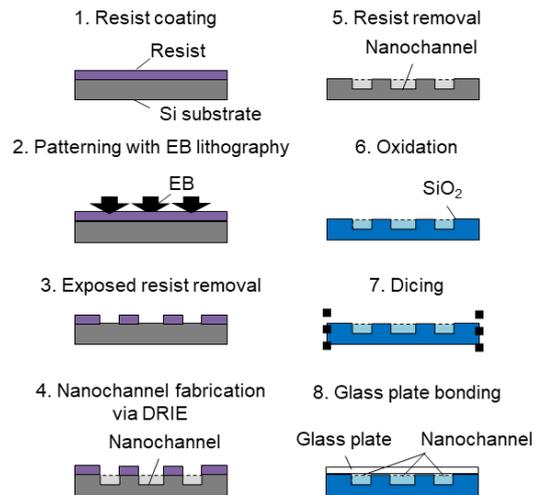


図4. 分離チップデバイスの作製プロセス

図5は作製したナノ障壁とナノ流路の顕微鏡画像を示す。上記の手順で作製した際に、ナノ障壁が破壊されることが多く観察されたが、ダイサー時の装置の水圧が原因であることを突き止め、ダイサーによるデバイスのカットの条件を変更することで、ナノ障壁構造の破壊の少ないデバイスの作製に成功した。



図5 作製したナノ流路とナノ障壁

### 2.3.3 流路内における蛍光ナノ粒子の泳動制御

生体微粒子を模倣したナノ粒子を用いて、作製したデバイス内の流路内で圧力印加によってナノ粒子の泳動を制御できるかについて実験的に検証した。作製したデバイスのリザーバ内に、粒径 100 nm の蛍光ポリスチレン粒子を導入し、電圧を印加することで、流路内に導入させた。図6は、ナノ障壁構造内を泳動したナノ粒子の様子を蛍光顕微鏡によって撮像した蛍光像を示す。電圧印加による電気浸透流によって、作製した流路内の泳動に成功した。ナノ粒子は、障壁間のすきまをブラウン運動によってジグザグに泳動したことが確認された。

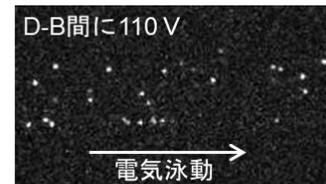
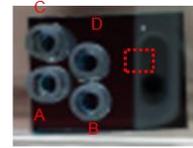


図6 作製したナノ障壁構造内の  
蛍光ナノ粒子の蛍光像

### 3. 今後の研究の方向, 課題

本研究では、新しく提案したサイズ排除クロマトグラフィの原理に基づいた流体デバイスについて、理論モデルを用いた分離の実現可能性の検証と、微細加工技術を用いたナノ流体デバイスの試作を行った。生体微粒子を模倣した 100 nm 直径の蛍光ポリスチレン粒子を流体デバイス内に導入し、作製したナノ流路内とナノ障壁内で電圧制御によって泳動を制御できることを示した。今後の研究として、粒径の異なる蛍光ナノ粒子を作製したデバイスの流路内に導入し、電圧制御によって泳動することで、ナノ粒子を粒径毎に分離できるかを検証する予定である。

### 4. 成果の発表, 論文等

該当なし。