

## 【助成 38 -02】

### マイクロ流体デバイスによる環境中マイクロ・ナノプラスチック検出技術の開発

研究者 九州大学大学院工学研究院応用化学部門 教授 加地 範匡

#### 〔研究の概要〕

本研究では、環境中マイクロ・ナノプラスチックを一個体レベルで正確に大きさ・形状を測定するとともに、その個数をカウントするために、マイクロ流路とイオン電流計測法を組み合わせた高感度検出法を開発した。これらを実現するために、様々な大きさと比重を有するマイクロプラスチックを検出可能なマイクロ流路形状や溶媒条件を検討した。また、実サンプルとして電気ケトルならびにポリプロピレン製乳幼児ほ乳瓶から回収した純水を測定したところ、極微量ではあるもののマイクロプラスチックが検出された。さらに本研究を通して開発したマイクロ流路とイオン電流計測法を組み合わせた検出技術を単一細胞分析に応用することで、細胞の機械的特性を単一細胞レベルで計測できることを明らかとした。

#### 〔研究経過および成果〕

マイクロプラスチックは、海洋を始めとした環境中に存在するマイクロメートルサイズの微小なプラスチック粒子であり、それ自体の蓄積はもちろんのこと、PCBなどの有害物質を吸着する性質を有することから、環境及び生体への潜在的影響の検証が喫緊の課題となっている。しかしながら、現状では300  $\mu\text{m}$ 以下のマイクロ・ナノプラスチックの存在量が過小評価されていることから、300  $\mu\text{m}$ 以下のマイクロ・ナノプラスチックを簡便・迅速かつ正確に定性的・定量的に解析する手法の開発を目的に、イオン電流計測システムの最適化と実サンプルの分析、さらには単一細胞分析への応用展開を行った。

#### 1. マイクロプラスチック測定に向けたイオン電流計測システムの最適化

モデル粒子として、直径 10  $\mu\text{m}$  の単分散ポリスチレンビーズ (PS) (Polysciences, Inc.) および中位径 11  $\mu\text{m}$  の多分散ポリエチレンビーズ (PE) (住友精化株式会社) を用いてイオン電流計測を行った。PS に関して

は安定的に測定ができたが、PE に関しては水中に安定して分散せずに浮上して凝集してしまった (図 1)。これは溶媒との密度差 (PS: 1.04-1.09  $\text{g}/\text{cm}^3$ , PE: 0.91-0.92  $\text{g}/\text{cm}^3$ ) が原因であると考え、PE に近い密度を有するメタノール (0.79  $\text{g}/\text{cm}^3$ ) を溶媒として用いる系と、界面活性剤 (SDS: Sodium Dodecyl Sulfate) を添加して安定的に分散させることを試みた。その結果、メタノール-酢酸緩衝液系では 2-4 nA の電流シグナル (ノイズレベル: 2 nA) を計測することができた。また、水溶媒に 0.2(wt)% SDS を添加して電流計測を試みたところ、4-8 nA の電流シグナル (ノイズレベル: 7 nA) を計測することができ、異なる材質のマイクロプラスチックを検出可能であることが示された (図 1)。

#### 2. 実サンプルの分析

電気ケトル (A 社) とポリプロピレン製乳児用ほ乳瓶 (B 社) から回収したマイクロチップを電流計測デバイスにて測定しようとしたところ、マイクロ流路部分に詰まる現象が観察された。この状態では電流計測による計測は困難と考え、顕微レーザーラマン分光、走

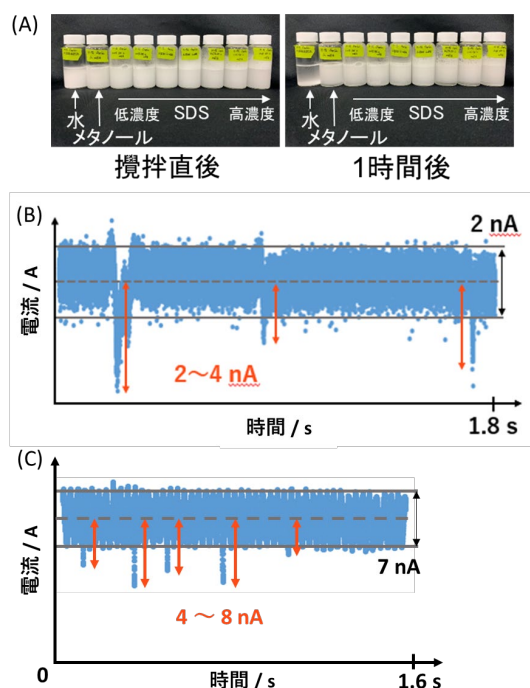


図 1. (A)各種溶媒に PE を添加・攪拌後の様子、(B)メタノール溶液、(C) 0.2(wt)% SDS 水溶液における PE の電流計測シグナル

査型電子顕微鏡 (SEM)、エネルギー分散型 X 線分光にて測定を行った。その結果、電気ケトルからは直径 5-20  $\mu\text{m}$  のものが、ほ乳瓶からは直径 2-20  $\mu\text{m}$  のものが大多数を占めており、大きいものでは直径が 50  $\mu\text{m}$  に達したことから、このような巨大マイクロプラスチックの存在が、マイクロ流路閉塞の原因となっていることが分かった。また、両サンプルとも、800  $\text{cm}^{-1}$  (C-C 結合)、1600  $\text{cm}^{-1}$  (C=C 結合)、3000  $\text{cm}^{-1}$  (C-H 結合) 付近にラマンシグナルのピークが検出されたことから、回収された粒子はマイクロプラスチックであることが確認された。電気ケトルからは、C、O に加え、ほ乳瓶からは検出されなかった Ti、N 成分が検出されたことから、電気ケトル内側底面部分のステンレス部分からマイクロプラスチックが発生した可能性も示唆された。

### 3. 単一細胞分析への応用展開

本研究で構築したイオン電流計測デバイスを用いて、各種細胞のサイズ計測を単一細胞レベルで

行った。その結果、細胞のサイズは細胞種ごとに幅広い分布を有することが分かった。また、同一細胞種内での不均一性を検出するために、細胞の直径よりも小さな狭窄流路を用いることで細胞の機械的特性に基づいた多能性評価を行った。HT-29 (結腸腺がん由来) は、多能性が高い細胞を多く含む細胞種であることが知られていることから、イオン電流計測デバイスにより細胞の大きさと機械的強度を単一細胞レベルで測定することとした。また、多能性の高い HT-29 細胞は、細胞表面に CD44-v9 を多く発現していることが知られている。抗 CD44 や抗 CD44-v9 といった抗体を利用して生化学的に多能性の高い HT-29 細胞を識別するとともに、抗体修飾による細胞サイズ変化を電流計測デバイスで検出できるかどうか検討を行った。その結果、CD44-v9 高発現の HT-29 細胞は、低発現の細胞よりもより高い機械的強度を有していることが明らかとなった [1, 2]。

以上、本計測システムは単一細胞分析に応用することが可能であることから分かつとおり、環境分析やバイオ分析に限らず様々な分野での応用計測が期待されるため、今後も基礎検討と応用展開を力強く推進していく。

[発表論文]

1. M. Terada, S. Ide, T. Naito, N. Kimura, M. Matsusaki, N. Kaji; Label-Free Cancer Stem-like Cell Assay Conducted at a Single Cell Level Using Microfluidic Mechanotyping Devices, *Anal. Chem.*, **93**, 14409-14416, 2021.
2. N. Kaji; A single cell mechanical assay on a chip, e-MSB 2021 (on line), 2021/7/14, 招待講演