2 複合化学プロセスの マイクロチップ集積化

火原 彰秀, 渡慶次 学, 北森 武彦

1 はじめに

生体試料などを分析する際には、試料量が極微量であることが頻繁に起こる。キャピラリー電気泳動法は、内径数十 μm 程度のキャピラリーの中で電気泳動分離を行う方法であり、必要なサンプル量が微小でよいこと、高い分離能が得られること、分析時間が比較的短いことなど利点を持つため、DNAの分析などに数多く用いられている。近年、このキャピラリー電気泳動法を数 cm 角のガラスやシリコン基板に加工した溝の中で行う研究が進められている¹⁻³⁾。電気泳動法に代表される化学分析法やその他の化学装置を、小さな基板（マイクロチップ）上に集積化する研究は、 $\mu\text{-TAS}$ またはLab-on-a-chipと呼ばれ、分析化学・機械工学・電気工学など分野の研究者が開発を進めている⁴⁻⁶⁾。

このような微小空間を利用した化学は、試料・廃棄物量の低減、高速処理、自動化などの利点をもたらし、化学プラントさえも小型化できる革新的な可能性を持っていると期待できる。我々の研究グループでは、電気泳動による分離や混合などの単一操作だけでなく一般的な化学操作を集積化するという意味で“Integrated Chemistry Lab”と名付け、この集積化技術の研究開発を進めている（Fig.1）⁷⁾。化学装置・化学操作を集積化するには、単位操作という考え方が重要である。単位操作とは、混合・反応・加熱・冷却・抽出・相合流・相分離など化学実験において基本的な操作である。この単位操作を複数組み合わせることにより、一つの化学システムが構築されることは、分析においても合成においても同様であるので、単位操作という観点から微小化技術を研究することにより、より適用範囲の広い技術を確立できると考えている。本稿では、必要な操作の中でも重要な位置を占める検出法について熱レンズ顕微鏡を中心に紹介した後、単位操作を組み合わせるマイクロチップ上に実現できた化学システムについて紹介する。

Fig. 1 Concept of integrated chemistry laboratory.

2 マイクロチップ化学の検出法

マイクロチップを用いた化学においては試料量などが少なくてすむ反面、目的物質を測定する場合必然的に超微量分析となる。超微量分析法として最も多く用いられている手法は、レーザー誘起蛍光（Laser induced fluorescent, LIF）法である⁸⁾。LIF法は、対象と実験条件によっては単一分子すら検出できる超高感度分析法であるが、逆に言うと蛍光量子収率の高い物質のみ測定できる手法である。分析の対象にしようとする目的物質が偶然高い蛍光量子収率を持つ場合を除き、蛍光量子収率の低い非蛍光性分子を対象とするのが一般的である。そのため、光学的手法としては吸光に基づく分析法が広い汎用性を有するといえる。吸光およびその後の無輻射緩和に基づく分光法として光熱変換分光法があり、古くから高感度な分析法として知られている⁹⁾。我々の研究グループでは、光熱変換分光法の1つである“熱レンズ分光法”を顕微鏡下で初めて実現した¹⁰⁾。この“熱レンズ顕微鏡（Thermal lens microscope, TLM）”は、10 μm 程度の光路長があれば吸光度にして 10^{-8} 程度を検出できる能力をもつ手法である。これは吸光光度法に比較すれば3桁以上高感度である。Fig.2にTLMの原理図を示す。励起光とプローブ光の2本の光を同軸に対物レンズを通して試料に照射する。測定試料により吸収された励起光のエネルギーが熱として放出されると、レーザーの強度分布および熱拡散により焦点付近に光軸に垂直な温度勾配を生成する。温度変化が微小である場合、温度変化は屈折率変化と比例の関係にある。このため屈折率は、中心部で最も小さく、光軸から離れるほどが大きくなる。この屈折率分布が過渡的な光学レンズとして作用する。これを熱レンズ効果とよぶ。試料後に設置したピンホール後のプローブ光の光量変化により熱レンズ効果を検出する。ピンホール後の光量変化は熱レンズの度と比例する。また熱レンズの度は発熱量すなわち分子数に比例するため、ピンホール後の光量変化を測定することにより定量分析が可能である。このTLMにより、マイクロチップ中で検出体積に単一分子以

Fig. 2 Principle of thermal lens microscope (TLM).

下の期待値しかない溶液の定量に成功した¹¹⁾。TLM は非蛍光分子の超高感度分析法として、マイクロチップ化学の研究に欠かせないものである。次節以降、目的物質は全て TLM で検出した。

3 化学プロセスの集積化

3.1 多層流ネットワークの構築

化学プロセスの中で分離と分子輸送は、最も重要な技術の一つである。例えば、実験室レベルの実験において、反応生成物を極性の違いなどによって分離するために分液漏斗を用いた液液抽出やゲル充填カラムを用いたカラムクロマトグラフィーなどが頻繁に用いられる。マイクロチップ化学における連続プロセスでは、フロー中の分離が必須の操作となると考えられる。そこで我々は、フロー中の分離操作のための要素技術として、不溶な複数液体の多層流をマイクロチップ中で実現した¹²⁾。Fig. 3 にマイクロチップ中に形成した水/酢酸エチル/水の多層流を示す。Fig. 3 に示すマイクロチャンネル（微小流路）の幅・深さは、それぞれ $150\ \mu\text{m}$ ・ $70\ \mu\text{m}$ である。このようなスケールの空間においては、液体の比重差による重力エネルギーよりも界面張力エネルギーのほうが 1,000 倍程度大きい。そのため液液界面は合流順序に従い形成され、バルクスケールの実験では実現困難な重液/軽液/重液のような多層流も形成可能である。また、マイクロチャンネル形状の工夫により、液体同士の完全な相分離も実現している。このことは、“相合流”“相分離”という単位操作を繰り返す多段化学操作への道が拓かれたことを意味している。

多層流を用いた分離の例として、Fe(II)-バソフェナントロリンスルホン酸ナトリウムの抽出¹³⁾、Co(III)-2-ニトロソ-5-ジメチルアミノフェノールの抽出^{12, 14)}、Ni(II)ジメチルグリオキシムの抽出¹⁵⁾などの操作の集積化に成功している。多層流の特性を活かした実験として、複合操作である Co(II)とニトロソナフトールの錯形成反応・抽出および共存金属除去のための相洗浄¹⁶⁾、メチルレッド色素の液膜輸送¹⁷⁾などにも成功している。ここで単位操作としては、“反応”“液液抽出（または分子輸送）”が集積化できた。多層流を利用すれば pH の異なる水相を同時に有機相に接触させるなどといったバルクスケールでは不可能な操作も実現できる。

3.2 イオン対抽出システムの集積化

マイクロチップ内の液液界面は分離の場として重要であることを前節で述べたが、液液界面は選択的の化学検出という意

Fig. 3 (A) Microchannel pattern for a multilayer flow system. Inlet flows from 1, 2 and 3 join at the junction (point a). The folded part (point c) has a curvature radius of 1 mm. Another inlet flow from 4 joins to the main channel. (B) Water/ethylacetate/water (WEW) flow at the junction (point a). (C) WEW flow at downstream (point b). (D) WEW flow at the curved channel (point c). (E) WEW flow at another junction (point d).

Fig. 4 Schematic illustration of highly selective ion sensing system and principle of ion pair extraction.

味においても重要である。我々は、マイクロチップ内の液液界面を利用した高選択的イオン検出システムを開発した¹⁸⁾。Fig. 4 にシステムの概要と原理を示す。このシステムでは、有機相にプロトン化した色素と特定のイオンと選択的に錯形成するイオノフォアを加える。水相に目的イオンが存在する場合には、イオンが有機相に抽出されてイオノフォアと錯形成反応する。このとき同時に系の電気的中性を保つため色素のプロトンが水相に抽出され、有機相中の色素が呈色する。この色素の吸光度変化を測定することにより水相中の目的イオンが定量できる。この原理はイオン対抽出法と呼ばれ、従来高分子膜を有機相として用いたセンサーが研究されている。従来法に比べマイクロチップを用いた方法では、必要な試薬量が微小であるため試薬を使い捨てにできるので応答の劣化がない、微小液体であるので拡散が迅速に起こり応答が速いなどの利点がある。

この原理を用いれば、イオノフォアを変えるだけで全ての陽イオンが測定でき、イオンごとに検出波長を変える必要がない。この特性により、検出条件を固定したまま他種類のイオンが測定できる。最近では、他種類のイオノフォアを別々にセグメント状にして導入することで他種類同時分析も実現している。ここでは、“層合流”“液液抽出”“セグメント導入”という単位操作が集積化できた。この実験の成功は、安定な液液界面を保持したまま溶質だけを時々刻々変化させるという化学操作と見なせる。この操作は、試薬スクリーニングなどなるべく多種類の反応を広範囲に調べるときの自動化手法、いわゆるコンビナトリアル化学において今後重要になってくると考えられる。

3.3 ビーズ表面反応場を利用した分析

ポリスチレンビーズやシリカゲルをマイクロチップ中に充填し、その表面を反応場として利用することによっても化学操作を集積化することができる。我々は抗体を吸着したビーズをマイクロチャンネル内に導入して、医療診断などで重要な免疫分析を集積化することに成功した^{19, 20)}。Fig. 5 に免疫分析に使用したマイクロチップとそのときの充填ビーズの様子を示す。使用したマイクロチャンネルの幅・深さはそれぞれ $250\ \mu\text{m}$ ・ $100\ \mu\text{m}$ 、ビーズを堰き止めるダム構造の部分は深さ $10\ \mu\text{m}$ となるよう加工した。Fig. 5 では、平均粒径 $41\ \mu\text{m}$ のビーズが堰き止められている。このビーズ表面を利用

Fig. 5 Photographs of packed beads bed in a microchannel (upper) and a microchip using for immunoassay analysis (lower).

Fig. 6 Schematic procedure of CEA analysis.

して大腸癌マーカーである癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen, CEA) を分析する手順を Fig. 6 に示す。CEA に対する抗体を吸着させたビーズを導入し、CEA を含む試料を反応させ (第一反応)、次にサンドイッチ法によりウサギ抗 CEA 抗体を反応させ (第二反応)、さらに金コロイドで標識した抗ウサギ IgG 抗体を作用させ (第三反応)、最後に金コロイドを定量する。この方法により、血清中の CEA の定量に成功した。従来のマイクロタイタプレートと呼ばれるポリスチレン製容器の直径 7 mm 程度の大きさのウェル側面と底面を反応場として利用する方法と比べると、単一の抗原抗体反応が 15 時間から 10 分に短縮でき、全分析過程も 50 時間から 30 分に短縮できた。検出限界も 1 ng/cm^3 から 0.01 ng/cm^3 と 2 桁改善した。従来法との分析値の相関も良好であり、革新的な高速診断分析法として実用化にむけて研究を進めている。この免疫分析の例は、抗原抗体反応を利用した分子 (タンパク) の“固相抽出”“吸着または濃縮”という単位操作と考えられ、今後生化学分析などにおいても重要な操作となると期待できる。

3. 4 光による高速温度制御

化学反応時の“温度制御”は、疑いようもなく化学技術において最も重要な単位操作の一つである。マイクロチャンネル内の液体は非常に微量であり熱容量の値は、体積の大部分を占めるガラス・シリコンなどの基板に比べて非常に小さい。このため、基板温度を一定に保っておけば、溶液の温度はマイクロチップに導入した直後から基板温度に一致し、かつ空間的に均一となる。このことは、マイクロチップが理想的な放熱を実現できることを意味しており、バルクスケールでは爆発に至るような反応も、マイクロチャンネル内では安全に行えると考えられる。マイクロチャンネル内液体の小さな熱容量を利用するもう一つの利点として、高速な温度切り替えが考えられる。我々は、レーザー光をチャンネル近傍の吸収体に照射する方法²¹⁾や溶媒の吸収を利用する方法²²⁾により温度を切り替え、反応を制御する研究を進めてきた。両手法とも切り替え時間は、基板も含めた系の熱平衡までの時間で決定されるが、溶媒を直接加熱する場合のほうが溶液自体を熱源とできるため均一度も高く、高速な切り替えが実現できた。ガラスを基板として用い、幅・深さがそれぞれ $250 \mu\text{m} \cdot 100 \mu\text{m}$ のマイクロチャンネル内の水溶液を、水が吸収を持つ波長である $1,470 \text{ nm}$ の半導体レーザーで加熱したところ、熱平衡時間は光強度に依存せず 200 ms であった。このときの上昇温度は、レーザー強度 100 mW に対して 30 K である。この上昇温度・時間 ($1500 \text{ K s}^{-1} \text{ W}^{-1}$) はバルクの実験系では実現が困難であり、今後経路選択的な反応の実現や高速な DNA 増幅反応などへの応用が期待できる。

3. 5 マイクロチャンネルの並列化

化学プロセスにおけるマイクロチップの利点の一つに、処理速度の向上を数で調整できる点がある。従来の反応器では、処理速度を向上させるために反応器自体のスケールアップを必要とし、スケールアップに伴う反応条件等の変化を考慮に入れる必要があった。これに対してマイクロチップでは、マイクロチャンネルの集積度を上げる、つまりマイクロチャンネルの並列化により容易に処理速度向上が実現できる。我々はこのマイクロチャンネルの並列化に対し、大きく分けて 2 つの方向から研究を進めている。

研究の方向の 1 つは、医療診断のように個別処理と共通処理が混在する場合である。例えば、多検体の単一項目を診断する場合、試料は互いに独立したマイクロチャンネルに導入されなければならない。分析試薬等は全てのマイクロチャンネルに導入されなければならない。この場合の例として、多検体医療診断を行うマイクロチップを Fig. 7 に示す²³⁾。Fig. 7 のマイクロチップでは、4 つの診断用マイクロチャンネルが並列に加工されており、それぞれ試料入口を持っている。これとは別個に共通試薬用の入口があり (左端)、試薬が均等に分配してそれぞれの診断用マイクロチャンネルに導入されるよう設計されている。このように分岐構造と並列な導入口の組み合わせにより、処理速度の大幅な向上が期待できる。

研究の方向のもう 1 つは、単一の操作を足し合わせて大量生産をするような場合である。この場合、一枚のマイクロチップで反応に最適な条件を決定した後に、そのマイクロチャンネルパターンの数またはマイクロチップの枚数そのものを必要なだけ増やす。試薬を各マイクロチャンネルに均等に分配することにより、スケールアップの検討なく、必要なものを必要なだけ生産できる。この技術は、従来の反応器の概念に大きな変革をもたらすと期待できる。

Fig. 7 Photograph of multi-channel diagnosis microchip.

4 おわりに

現在、非常に多くの研究者がマイクロチップを用いた電気泳動分析法について報告しており、微量分析・高速分析などの面で大きな成功を収めている。最近では、電気泳動チップと質量分析装置を組み合わせ、高処理速度のタンパク解析を実現しようとする試みも始まっており、今後の進展が期待できる。

冒頭でも述べたように、我々の研究グループでは「電気泳動分離だけ」でも「混合だけ」でもなく、液液抽出・固相抽出・反応など現在では単位操作を組み合わせること、ほとんど自由に化学プロセスをマイクロチップ上で構築できるようになってきた。また微小空間の特性を利用すれば、バルクスケールの実験では実現できない実験ができるはずであると考へ、実際に実現してきた。その典型が本稿で紹介した多層流を利用した液体の接触操作などである。酸・塩基に対して不安定な金属錯体を含む有機相に、酸性水相 ($\text{pH} < 1$) と塩基性水相 ($\text{pH} > 13$) を同時に接触させることにより、ただの分子拡散から予想していたよりもずっと速く錯体の分解が進むことなども見いだしており、我々の切り開いた実験技術により新たな基礎的研究が展開されるかもしれない。応用面においても、検出装置も含めた装置全体の小型化の研究を進めており、近い将来、携帯用の環境ホルモン分析装置や高感度携帯健康診断デバイス、卓上薬品合成装置などが実現されるのも夢でなくなってきた。

文 献

- G. H. W. Sanders and A. Manz, *TRAC-Trends in Anal. Chem.*, **19**, 364 (2000).
- R. D. Olechuk and D. J. Harrison, *TRAC-Trends in Anal. Chem.*, **19**, 379 (2000).
- C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **72**, 5814 (2000).
- a) A. van den Berg, W. Olthuis, and P. Bergveld, *Micro Total Analysis Systems 2000*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2000); b) <http://www.rsc.org/is/journals/current/loc/locpub.htm>.
- B. H. Weigl and P. Yager, *Science*, **283**, 346 (1999).
- P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilov, S. Takayama, and G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.*, **33**, 841 (2000).
- M. Tokeshi and T. Kitamori, *Electrochemistry*, **68**, 192 (2000) (in Japanese).
- W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, A. V. Orden, J. H. Werner, and R. A. Keller, *Chem. Rev.*, **99**, 2929 (1999).
- S. E. Bialkowski, *Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis*, John Wiley and Sons, New York (1996).
- a) K. Sato, H. Kawanishi, M. Tokeshi, T. Kitamori, and T. Sawada, *Anal. Sci.*, **15**, 525 (1999); b) M. Tokeshi, M. Uchida, K. Uchiyama, T. Sawada, and T. Kitamori, *J. Lumin.*, **83-84**, 261 (1999); c) K. Uchiyama, A. Hibara, H. Kimura, T. Sawada, and T. Kitamori, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **39**, 5316 (2000).
- M. Tokeshi, M. Uchida, A. Hibara, T. Sawada, and T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **73**, 2112 (2001).
- A. Hibara, M. Tokeshi, K. Uchiyama, H. Hisamoto, and T. Kitamori, *Anal. Sci.*, **17**, 89 (2001).
- M. Tokeshi, T. Minagawa, and T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **72**, 1711 (2000).
- M. Tokeshi, T. Minagawa, and T. Kitamori, *J. Chromatogr. A*, **894**, 19 (2000).
- K. Sato, M. Tokeshi, T. Sawada, and T. Kitamori, *Anal. Sci.*, **16**, 455 (2000).
- M. Tokeshi, T. Minagawa, and T. Kitamori, *Lab On A Chip (Royal Society of Chemistry)*, in press.
- M. Surmeian, H. Hisamoto, A. Hibara, M. N. Slyadnev, and T. Kitamori, preparation for publication.
- H. Hisamoto, T. Horiuchi, M. Tokeshi, A. Hibara, and T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **73**, 1382 (2001).
- K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, and T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **72**, 1144 (2000).
- K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, and T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **73**, 1213 (2001).
- Y. Tanaka, M. N. Slyadnev, A. Hibara, M. Tokeshi, and T. Kitamori, *J. Chromatogr. A*, **894**, 45 (2000).
- M. N. Slyadnev, Y. Tanaka, M. Tokeshi, and T. Kitamori, *Anal. Chem.*, in press.
- K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, and T. Kitamori, *Micro Total Analysis Systems 2000* (Eds. A. van den Berg, W. Olthuis, and P. Bergveld), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 513 (2000).

●著者プロフィール

氏名：火原 彰秀 Akihito HIBARA
 所属：東京大学大学院工学系研究科応用化学
 専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷
 7-3-1)
 役職：助手
 趣味：スポーツ観戦

氏名：渡慶次 学 Manabu TOKESHI
 所属：(財)神奈川科学技術アカデミー イン
 テグレートッド・ケミストリー・プロ
 ジェクト (〒213-0012 川崎市高津区
 坂戸 3-2-1 KSP 東棟 307)
 役職：研究員
 趣味：読書、音楽鑑賞

氏名：北森 武彦 Takehiko KITAMORI
 所属：東京大学大学院工学系研究科応用化学
 専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷
 7-3-1)
 役職：教授
 趣味：ピアノ、スポーツライビング