PCRのためのマイクロリアクターの開発

非会員 近藤聖二*

非会員 森本伸彦

非会員 堀邦夫

会員 篠原悦夫

非会員 狩野恭一

(オリンパス光学工業)

Development of a Microreactor for PCR

Seiji Kondo, Nobuhiko Morimoto, Kunio Hori,

Etsuo Shinohara and Kyoichi Kano (OLYMPUS OPTICAL CO., Ltd.)

Abstract

We have developed a microreactor for Polymerase Chain Reaction (PCR) by means of microfabrication technologies. The microreactor has been constructed to amplify DNAs, which was much faster than a conventional apparatus. Its size was 30 x 16 mm, in which a reaction chamber with 10 mm square and 300 μ m depth was constructed. It was found that this microreactor requires only 20 minutes to perform 40 cycles of a shuttle PCR, 3 times faster than conventional apparatus.

キーワード : PCR、DNA、RNA、マイクロリアクター、マイクロファブリケーション

1. まえがき

医学の急速な発展に伴い、様々な病気の遺伝子解析を迅速に行う技術が要求されている。そして遺伝子解析技術の発展は核酸 (DNA、RNA) 抽出技術とポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction: PCR) による DNA 増幅技術の発展に負うところが大きい。我々は無担体電気泳動法 (フリーフロー電気泳動法) による核酸抽出⁽¹⁾⁻⁽³⁾とマイクロチャンバー方式による高速 PCR 増幅の研究開発を進め、さらにこれらの自動化システムの開発も進めている⁽⁴⁾⁻⁽⁵⁾。本稿では高速 PCR 増幅の研究について発表する。

PCR は DNA の任意の配列の部分を数百万倍にも増幅することが可能な技術である。PCR には高熱にも安定なポリメラーゼ、DNA 伸長反応の材料となる 4 種類の dNTP、鋳型 DNA として一対のプライマー (DNA オリゴマー) が必要である。これらの物質はマグネシウムイオンを含むバッファー中で混和され、温度変化のサイクルが数十回繰り返される。温度変化のサイクルとは、熱変性 (93~95°C)、アニール (55~72°C)、および伸長ステップの各温度に一定時間保持することを 1 つのサイクルとし、それぞれのステップの条件は増幅させたい DNA の配列の長さ、ポリメラーゼの活性特性、プライマーの構造などによって最適な温度と保持時間が決まってくる。一般にはアル

ミニウム製のヒートブロックを用いて熱サイクルをかける。この熱サイクルにおいては温度上昇・下降の過程よりむしろ所定温度におけるインキュベーションを重要視している。したがって、従来は温度上昇・下降時間を短縮するために肉厚の薄い試料容器を用いることにより、熱伝導性を高め全体の増幅時間を短縮するよう工夫されている。

このような従来の手法を置き換え、さらに発展させる物としてマイクロファブリケーション技術を応用して、シリコンウェハ上に試料容器とヒーターと温度センサーを一体に形成させる試みが既に始まっている⁽⁶⁾⁻⁽⁹⁾。マイクロ

図-1 温度変化のサイクルの比較
(a) 市販の装置の例
(b) マイクロリアクターの例

Fig.-1 Comparison of a conventional apparatus (a) and the microreactor (b).

リアクターはシリコン製の反応容器を有するため、シリコンの高い熱伝導率によって加熱性能、温度均一性に優れ、さらに反応容器のすぐ近傍に温度センサー及びヒーターが形成されているため、温度センサーによって検出される温度が設定値に達してから反応容器内の試料溶液が実際に設定温度に達するまでのタイムラグがほとんど無視できることが期待できる。図-1 に従来から市販されている装置とマイクロリアクターとの温度変化のサイクルの様子を模式的に示す。このようにマイクロリアクターを用いることによって、反応時間の短縮が期待できる。我々は、温度サイクル速度を高め且つ、高精度な温度制御を可能としたマイクロリアクターを製作した。

2. マイクロリアクターの製作

我々の製作したマイクロリアクターの構成図を図-2 に示す。

図-2 Illustrations of the microreactor.

図-2(a)に示されるマイクロリアクターは2枚のシリコンウエハ部材からなり、片方のシリコンウエハに反応容器と流路が形成され、流路の先端には貫通孔が開き、試料溶液を注入、回収するチューブを接続するためのジョイントが設けられている。ジョイントが設けられている面にはヒーター及び温度センサーが一体形成されており、電気接点に配線が接続されている。反応容器は検討のために種々の形状のものを製作した。図-2(b)は後述の温度分布評価に用い

図-3 マイクロリアクター拡大図

Fig.-3 Magnified illustrations of the microreactor.

図-4 マイクロリアクター外観写真

Fig.-4 A photograph of microreactor.

た。

(1)本マイクロリアクターの特徴

シリコンウエハをマイクロファブ리케이션技術によって加工したPCR用のマイクロリアクターはシリコンウエハの高い熱伝導性によって加熱速度や温度均一性等の向上が期待される。しかし、ヒーター部まで深くエッチングしたシリコン底面は強度的に不安がある。例えば、PCRの様に90°C以上まで試料溶液を加熱すると、反応容器内部の圧力が上昇し、エッチングによって薄くなった反応容器を破壊する恐れがある。本マイクロリアクターは反応容器底部に補強用のポリイミド膜をコーティングし、同時に膜内部にヒーターと温度センサーを形成する構造とした。柔軟なポリイミド膜は、反応容器底面のシリコン部分を効果的に補強するため、圧力変化による反応容器の破損を防止する効果がある。

(2)製作方法

シリコンウエハ部材の拡大断面図を図-3に示す。ヒータ

一および温度センサーはポリイミド膜を絶縁層としてシリコンウェハに積層されており、その反対の面に異方性エッチングによって反応容器となる形状が形成されている。各層のポリイミド膜は日立化成社製 PIX-L110SX を使用し、スピンコーティング法にて塗布した。その後、150℃でプレキュアし、フォトリソグラフィの技術で電気コンタクト部分を設け、350℃でキュアした。ポリイミド膜の1層分の膜厚は約1.5μmであった。ヒーターおよび温度センサーはチタン膜をバターンニングして製作されており、チタン膜をスパッタ法でポリイミド膜上に形成した後、フォトリソグラフィ技術を用いてウェットエッチングでバターンニングした。反応容器部は4000Åの窒化シリコン膜をマスクとして水酸化カリウム水溶液を用いた異方性エッチングにより形成した。シリコンウェハはエッチアウトせず、約50μmの膜厚でシリコンウェハを残すようにした。ウェットエッチング後、マスクである窒化シリコン膜をRIE(Reactive Ion Etching)によって除去し、酸化シリコン膜をスパッタ法によって500Å成膜した。もう一方のシリコンウェハ部材の表面は熱酸化シリコン膜で覆い、その上にバイレックスガラス(コーニング No.7740)をスパッタ法によって成膜した。上記2枚のシリコンウェハをアライメントして重ね合わせ、300℃に加熱しながら100Vの電圧をかけ、陽極接合を行った。このモジュールはジョイント、チューブ、配線を除いて30mm(W)×16mm(D)×1mm(H)の形状となる。反応容器の大きさは約30μlの容量がある。(図-4)

(3)制御装置

このモジュールの温度コントロールはモジュールの温度センサーの抵抗値の変化を読み取り、DC電圧出力をヒーターにフィードバックしながら印加する。フィードバックは最短で20msec.を1サイクルとしてPID制御する。コントローラーとして抵抗値測定はAdvantest社製デジタルマルチメーターR6551、電圧印加用電源は高砂製作所社製4象限バイポーラ電源BWS120-2.5を使用した。パーソナルコンピュータとデジタルマルチメーターはGPIBで、電源とはD-Aコンバータを介したアナログ接続をし、PID演算及びシーケンスコントロールには日本ナショナルインスツルメンツ社製LabViewで行った。

3. 実験結果および考察

3-1.ふた材質の検討

このモジュールを用いて実験をする前段階として、ふたとなる基板材質を検討した。準備したモジュールは図-2(b)に示される流路部分の無い反応容器のみで構成した。デバイスのふたとして厚さ0.3mmのシリコンウェハ切断片と厚さ0.15mmのマツナミガラス社製のカバーガラスを使用した。反応容器内に純水を入れ、この2枚のふたをそれぞれ載せた状態で温度を60℃になるように制御した時の反応容器内の温度分布をAVIO社製サーモビューアーTVS-

2000MkIIによって測定した。温度分布測定結果を図-5に示す図-5(a)はカバーガラスをふたにした場合図-5(b)はシリコンウェハをふたにした場合である。カバーガラスをふたにした場合、中心の温度が約80℃、周辺の温度が約50℃と温度分布が大きいのに比べ、シリコンウェハをふたにした場合、中心と周辺部分の温度差が約3℃と大変小さいことが分かった。ふたの材料の熱伝導率はガラスで0.64~0.73(kcal/m·hr·deg)、シリコンで168(kcal/m·hr·deg)とシリコンの熱伝導率が大変高い。シリコンウェハの高熱伝導性が反応容器内の中心部と周辺部の温度差をうまく分散しているため温度分布が良好であると考えられる。

3-2.基本特性の評価

ふたをシリコンウェハで製作したマイクロリアクターの基本特性を測定した。測定に用いたマイクロリアクターは図-2(a)に示す様に反応容器が六角形状でヒーターの抵抗値は約130Ωであった。流路末端にはポリプロピレン製のジョイントを接着し、ジョイントに接続したチューブを通して純水を注入した。この状態で反応容器内の純水を94℃、55℃、72℃の温度に30sec.保持する温度変化のサイクルを繰り返した。この時ヒーターに印加した電圧は0~36Vの間で可変的に制御した。温度変化の様子を図-6に示す。94℃へ加熱する場合のオーバーシュートが約1.5℃あるが、恒温

図-5 温度分布状態観察

- (a) カバーガラスをふたにした場合
- (b) シリコンウェハをふたにした場合

Fig.-5 Images of thermal distribution in reactors. covered with glass (a) and covered with silicon wafer (b)

図-6 温度変化のサイクル結果

Fig.-6 Control of thermal cycles.

図-7 各温度での温度分布観察結果
(a) 94°C、(b) 72°C、(c) 55°C

Fig.-7 Images of thermal distribution at temperature of 94°C (a), 72°C (b) and 55°C (c)

制御は $\pm 0.2^\circ\text{C}$ できている。加熱速度は約 $20^\circ\text{C}/\text{sec.}$ 、冷却速度は $-2^\circ\text{C}/\text{sec.}$ であった。また図-7 にはそれぞれの温度に保持した時のサーモビューアーでの温度分布状態測定結果を示す。各温度での温度分布も均一で、 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以内を実現した。本マイクロリアクターは加熱が大変高速であり、ヒーターへの電圧印加を更に高くすることでより高速化も可能であるが、オーバーシュート等が大きくなる恐れがある。冷却は自然放冷であるが、ファンなどによる強制空冷を行うことで更に冷却速度を向上することが可能になると思われる。

3-3.PCR 実験

PCR の実験は、宝酒造社製 TaKaRa PCR Amplification Kit を使用した。鋳型 DNA は λ -DNA を使い、Taq ポリメラーゼの濃度を 2.5、5、10、20、50 (U/100 μl) と変えた。MgCl₂濃度を 5mM とし、BSA(Bovine Serum Albumin)を 0.1wt%添加した。温度変化のサイクルは 94°C で 5sec、 68°C で 30sec.それぞれ保持するシャトル PCR 法を採用し、温度変化のサイクルは 40 回繰り返した。使用したマイクロリアクターは図-2(a)に示される物を使用した。今回用いたプライマー 1 および 3 の組み合わせにより、 λ -DNA の 500b.p.を増幅することができる。シャトル PCR 法はアニールと伸長を同温度で行う方法で、 94°C で DNA の 2 本鎖を 1 本鎖に熱変性させた後、 68°C に冷却することでアニール及び伸長を同時に行っている。市販の装置の場合、 94°C での保持時間は 10~60sec.と長い、マイクロリアクターは熱均一性が高く、反応容器内の試料溶液が極めて迅速に設定温度に達するため 94°C での保持時間を更に短縮することができる。PCR 結果はゲル電気泳動法によって評価した。泳動したゲルをエチジウムブロマイドによって染色し、図-8 蛍光像を得た。両端の分子量マーカーから 500b.p.の長さの DNA が全ての Taq ポリメラーゼ濃度において増幅されていることが確認できる。しかし、50U/100 μl の濃度においては電気泳動パターンがスミアになっており、さらにより高分子量のバンドが薄く検出されていることから、非特異増幅が多く、濃度が高すぎることが分かる。この PCR 実験において加熱速度は約 $23^\circ\text{C}/\text{sec.}$ 、冷却速度は $-3^\circ\text{C}/\text{sec.}$ であり、反応に要した総時間は約 35 分間であった。市販の装置の多くは 1 時間以上の反応時間が必要であるため、本マイクロリアクターによって反応時間を半分以下に短縮することができた。

次に更なる高速化を保持時間を種々変更して検討した。 68°C の保持時間を 10sec.とし、総反応時間を約 20 分間とした結果を図-9 に示す。更なる高速化によっても 500b.p.の DNA 増幅は確認できたが、低分子量側に少しバンドが見られ伸長反応が不十分である可能性が示唆されている。ただし、熱サイクルの最終回の 68°C 保持時間を 30sec.以上の長時間に保つことにより、この低分子量側のバンドを無くすることが可能と考えられる。

図-8 電気泳動結果—Taqポリメラーゼ濃度依存性
Taqポリメラーゼ濃度 (U/100 μ l)
a:50, b:20, c:10, d:5, e:2.5

Fig.-8 Results of electrophoresis:
- dependency on Taq polymerase
concentration (U/100 μ l), 50(a),
20(b), 10(c), 5(d) and 2.5(e)

図-9 電気泳動結果—温度保持時間依存性
68℃の温度保持時間、a:30sec., b:10sec.

Fig.-9 Results of electrophoresis:
- dependency on holding time,
30sec. (a) and 10sec. (b)

4. まとめ

開発したマイクロリアクターはポリイミド膜によって反応容器底面を補強する構造を有している。また、加熱性能、温度均一性に優れ、さらに反応容器のすぐ近傍に温度センサー及びヒーターが形成されているため、温度センサーによって検出される温度が設定値に達してから反応容器内の試料溶液が実際に設定温度に達するまでのタイムラグがほとんど無視できる点が特徴となっている。このため、加熱・冷却の高速化のみならず、保持時間の短縮も可能となり、従来の装置に比べ反応時間を $1/3$ 以下にすることが示された。また、総反応時間の短縮だけでなく、94℃の熱変性時

間を短縮し Taq ポリメラーゼが失活することを防ぐ等の効果もある。マイクロリアクターのアレイ化による HTS (High Throughput Screening) への応用等、今後の更なる応用が期待できる。

5. 謝辞

本研究開発はオリンパス光学工業株式会社が NEDO から委託を受けた「高感度 DNA 光検査装置の開発」として実施したものである。

(平成 11 年 1 月 25 日受付, 平成 11 年 3 月 16 日受付)

参考文献

- (1) 田島信芳:「超小型のデオキシリボ核酸分離装置」, JETI, vol.46, No.7, pp.45, (1998)
- (2) Etsuo Shinohara, Nobuyuki Tajima, Hirobumi Suzuki, Kyoichi Kano: "Free Flow Electrophoresis Module Fabricated With Pyrex Glass", Micro Total Analysis Systems '98, pp.319-322, (1998)
- (3) Etsuo Shinohara, Nobuyuki Tajima, Hirobumi Suzuki, Ryo Ohta, Kyoichi Kano: "Electrophoresis Module for Separation of Components", Proceedings of International Workshop on Microfactories, (in press), (1998)
- (4) 狩野恭一:「DNA 光検査システム」, 医学のあゆみ, vol.181, No.2, pp.152-153, (1997)
- (5) 牧野徹, 狩野恭一:「高感度 DNA 光検査システム」, 計測と制御, vol.37, No.10, pp.730-733, (1998)
- (6) Jing Cheng, Mann A. Shoffner, Georgi E. Hvieh, Larry J. Kricka, Peter Wilding: "Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips", Nucleic Acids Research, vol.24, No.2, pp.380-385, (1996)
- (7) M. A. Northrup, et. al.: "DNA Amplification with a Microfabricated Reaction Chamber", Proc. Transducers '93 Yokohama, pp.924, (1993)
- (8) Lee A. Christel, Kurt Petersen, William McMillan, M. Allen Northrup: "Nucleic Acid Concentration And PCR For Diagnostic Applications", Micro Total Analysis Systems '98, pp.277-280, (1998)
- (9) Martin U. Kopp, Andrew J. Mello, Andreas Manz: "Chemical Amplification: Continuous-Flows PCR on a Chip", SCIENCE, vol.280, 15 MAY, (1998)

近藤聖二（非会員）

1987 年埼玉大学工学部卒、
1987 年オリンパス光学工業(株)入社
現在、基礎技術研究所バイオメディカル
リサーチセンター所属

森本伸彦（非会員）

1993 年東大工学部計数工学科卒
1998 年東大大学院総合文化研究科広域科
学専攻博士課程修了、学術博士
1998 年オリンパス光学工業(株)入社
現在、基礎技術研究所バイオメディカル
リサーチセンター所属

堀 邦夫（非会員）

1987 年早稲田大学大学院物理学および応
用物理学専攻修士課程修了
1987 年オリンパス光学工業(株)入社
1993 年アトムテクノロジー研究体に出向
1997 年オリンパス光学工業(株)に復職。
現在、基礎技術研究所バイオメディカル
リサーチセンター所属

篠原悦夫（会員）

1976 年北海道大学 工学部応用物理学科
卒業
1976 年株式会社 常光入社
1985 年オリンパス光学工業(株)入社
現在、基礎技術研究所バイオメディカル
リサーチセンター所属

狩野恭一（非会員）

1955 年東京大学医学部卒業
1965 年ニューヨーク州立大学医学部助手
1974 年同大学教授
1981 年東京大学医科研免疫学研究部教授
1989 年オリンパス光学工業(株)入社
現在、基礎技術研究所バイオメディカル
リサーチセンター長