マイクロ TAS 接続に適したマイクロ質量分析装置の創製

Development of a micro time-of-flight mass spectrometer suitable for micro total analysis system (micro TAS)

東京都立大学大学院理学研究科

伊永 隆史 Takashi KORENAGA

Key words: lab-on-a-chip; micro fabrication; micro total analysis system (micro TAS); monolith column interface; time-of-flight mass spectrometer (TOF-MS)

1. はじめに

近年、バイオサイエンス・生命医療分野における研究が大きな注目を集めている。国の科学技術基本計画では、情報通信、ライフサイエンス、環境、ナノテクノロジー・ナノ材料の4分野を重点四分野と定め、基礎・基盤研究のみならず実用化研究まで開発資金が積極的に投入されつつある。マイクロチップ化学システムについては、東京大学・北森教授らの先導により、バイオテクノロジー (BT)・ナノテクノロジー (NT) 国家戦略の基盤ツールとして、本格的な国策プロジェクトが平成14年度からスタートしている。

質量分析装置 (MS) は、電子顕微鏡 (SEM)、核磁気共鳴装置 (NMR) と並ぶ BT・NT 先端研究における三種の神器的存在でありながら、わが国分析機工業界の開発力が世界的にみて高くないことが懸念されている。なかでも、飛行時間型質量分析装置 (TOF-MS) はポストゲノム解析の最重要課題であるプロテオーム・グライコーム・メタボローム解析などに加え、環境バイオ物質の超微量分析や代謝産物分析、フラーレン・カーボンナノチューブなどナノ材料の品質管理分析など、重点四分野の研究で要の解析ツールとなる分析機器である。しかしながら、国産 MS の世界シェアは約16%と低く、加えて国産品にも海外製品の OEM や海外特許をもとに製品開発したものが多数含まれており、特に TOF-MS では欧米に著しく遅れをとっているのが現状である。

今後、重点四分野を含む科学技術戦略で日本が欧米に先んずるためには、2002年度ノーベル化学賞の(株)島津製作所・田中耕一氏の MALDI ソフトイオン化法を先導に、BT・NT・環境分野などの最先端科学技術開発で SEM、NMR と並んで有用性の高い TOF-MS 開発研究で欧米を追跡、日本発の独自技術で凌駕することが BT・NT 国家

戦略における急務の課題であろう。しかしながら、日本の大学・研究機関などにおける MS 関連研究はユーザーの立場に集中し、分析機器のメーカーサイドに立った基盤技術研究は、大阪大学、東京大学ほかいくつかの国立大学および東京都立大学で小規模に行われているに過ぎない。他方、米国では BT 産業関連の TOF-MS 開発研究はもとより、国防総省が軍事・セキュリティ対策ツールとしての小型 MS 開発研究を積極的に支援してきたため、大学・研究機関などに莫大な研究資金が投入され続け、一例として Johns Hopkins 大学 Cotter 教授による優れた TOF-MS 成果物や数々の基本特許が排出されてきた経緯も見逃せない。

2. マイクロ MS 開発研究の着眼点

最近、環境汚染物質の排出・移動登録 (Pollutant Release and Transfer Register) 法施行、いわゆる PRTR 制度により薬品購入時から使用、廃棄までの物質移動を記録し報告することになり、化学物質のうち第一種指定化学物質として354物質が指定された。10万以上にのぼる事業所がこれらの有害化学物質を使用し、大気・排水への放出量、廃棄物として排出・処理される量、製品などへの使用量などの届出が義務化された。このような法的背景を踏まえ、PRTR 制度で規定された有害化学物質のオンサイト測定にも適用可能で、あらゆる化学反応の単位操作を微細加工技術によりラボオンチップ化したマイクロ TAS とインターフェイスを介して接続するのに適し、微少サンプル量で高感度検出可能な MS の小型化研究に着眼した。こうして、那珂インストルメンツ(株)を窓口企業にして、小型質量分析装置 (マイクロ MS) を平成13年度から新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の基盤技術研究促進事業で開発することとなった¹⁾。

ところが MS 小型化に当たっては、日本には四重極型質量分析装置 (Q-MS) の産業基盤しかなかったため、当初は Q-MS の小型化で申請を行った。しかし、欧米では BT 関連最先端産業分野で発展性がある TOF-MS 開発研究が Q-MS を凌駕していたことから、実施計画段階において

NEDO と調整したうえで TOF-MS 小型化に絞って基盤技術開発を行うことになった経緯がある¹⁾。

3. マイクロ総合化学分析システム (マイクロ TAS)

キャピラリー電気泳動 (CE) を利用したバイオチップ研究は、ここ 10 年余に欧米で急速に進展し、約 500 に及ぶ基本的な特許が生まれ、マイクロ総合化学分析システム (マイクロ TAS) の発展に大きく貢献した。日本で北森ら、伊永らが開発を急いでいるのはフローインジェクション分析 (FIA) のマイクロチップ化であり、試料の前処理、反応、分離、検出などの分析操作をガラスプレート上に構築できるので、マイクロ化学システムの用途拡大に寄与し、ガラスチップを用いてあらゆる化学分析の単位操作を行うことが可能になった。

FIA は 1975 年 Ruzicka, Hansen により提唱されて以来、分離分析を目的とした液体クロマトグラフィー (LC) にはない簡便性と実用性が広く受け入れられて急速に普及した。筆者は 1978 年に FIA を環境計測へ応用するための基礎・応用研究を開始、独自に製作した流動状態解析装置を用いて応答ピークの形状・特性解析を行い、1988 年に S^4 - μ FIA の考え方を発表した²⁾。 S^4 は Small tube-bore, Short tube-length, Slow flow-rate, Small cell-volume を意味した微小 FIA システムの最適化設計指針であり、フロー分析法に共通した中空キャピラリー内反応モデルの対流拡散解析により分子化学工学研究を重ねたことから、マイクロ TAS の微細流路設計にも準用できると考えられた。

マイクロマシーニング技術の進展に伴い、半導体製造技術に依拠してシリコンチップ上にガラス反応器を刻み込んでしまう考え方が生まれ、化学反応操作を単一チップ上に構築し、流路のみならず、ポンプ、インジェクター、バルブ、検出器などをオンチップで実装したマイクロ TAS の概念は Manz によって 1990 年に提唱された³⁾。この手法はサンプルの前処理、反応、分離、検出など実験室・研究室で行われている化学分析の反応操作をすべてシリコン基板上に構築するものである。ラボオンチップ (lab-on-a-chip) とも言われ、化学操作の微細化・集積化により試薬量、エネルギーなどをシナジーに削減でき、環境負荷を低減可能である。マイクロ TAS を組み込んだデバイス本体の小型化により、携帯性に優れ、オンサイト、リアルタイム測定に適した低環境負荷の小型分析機器を創製できる。

(1) 大気分析マイクロ TAS

大気分析に必要な複合機能を搭載したマイクロ TAS は、水質分析マイクロ TAS より達成困難にもかかわらず実際は先んじて開発された^{4)~14)}。多孔質ガラスを用いたチ

ップは世界初で、石英ガラス基板よりも耐圧強度が低いので、それに配慮しながら微細流路内の圧力分布を考慮して流路設計を行う必要があった²⁾。

大気分析マイクロ TAS を搭載したマイクロデバイスは、1~150 ppbv の都市生活環境レベル NO_2 濃度をオンサイトで、リアルタイム連続測定することができる。マイクロ TAS の大きさは長さ 50 mm、幅 26 mm、厚さ 2.0 mm で、石英ガラス基板上にマイクロチャネルを形成している (図 1)。このマイクロ TAS には①サンプリング部に埋め込んだ多孔質ガラスを介して気体成分を捕集、②蛍光試薬と混合して誘導体化反応、③蛍光物質を高感度検出する 3 機能を一体化して集積化したものである。ガス捕集液および試薬溶液は外付けのシリンジポンプにより送液される。マイクロ TAS を組み込んだデバイス本体の大きさは幅 320 mm、奥行 230 mm、高さ 177 mm で、ポンプは外付けである。

(2) 水質分析マイクロ TAS

環境水中の NO_2^- は共存する物質、微生物などの影響により短時間で分解し濃度が激減する場合があります。オンサイト、リアルタイム分析の必要性が高い。 NO_2^- 水質分析マイクロ TAS を図 2 に示す¹³⁾。チップ材料には石英基板を用い、フォトリソグラフィーおよび湿式エッチングにより幅 500 μm 、深さ 100 μm のチャネルを形成した。

河川水を採取してシリンジフィルター (ADVANTEC, 孔径 0.2 μm) でろ過してから、チップ上で NO_2^- の蛍光検

図 1 ラボオンチップによりガス捕集・化学反応・光学検出の 3 機能を搭載した大気分析マイクロ TAS

図 2 水質分析マイクロ TAS 用チップ

出を行い、公定法のザルツマン吸光光度法による測定値とほぼ同一測定値を得た。この水質分析マイクロ TAS を用いれば、サンプルや試薬が公定法に比べ 1/100 以下で済むことから、水中の微量 NO_2^- 濃度を相対誤差 3~10% 以内で、廃液などの環境負荷を低減しつつ十分な測定機能が得られることが示された。

(3) 微粒子状物質分析マイクロ TAS

ディーゼル排気微粒子に含まれる 24 種之多環芳香族炭化水素 (PAHs) のうち、代表的 PAHs であるベンゾ[a]ピレン (B[a]P) を分別測定可能なプロトタイプ装置の開発および B[a]P 蛍光測定におけるクリーンアップ前処理操作のオンチップ集積化に成功した^{15), 16)}。

ディーゼル排気微粒子から PAHs を溶出させるクリーンアップ用には、マイクロチャンネル内に約 20 μm のせき止め部を作り、シリカゲルを充填することでマイクロカラムを作製した。実際の抽出液に適用したクリーンアップ操作の結果、従来法と高い相関性が得られ、クリーンアップの作業時間が 1/10 以下に短縮された。

(4) 環境バイオ分析マイクロ TAS

花粉症、アトピー性皮膚炎、シックハウス症候群、化学物質過敏症などが社会的に大きな問題となっている。この

分野では、MS を用いる高感度検出、定性定量分析が研究成果を左右することが多いと考えられる。環境化学物質が内分泌・アレルギー・免疫系などの活性に及ぼす影響を評価解析するようなライフサイエンス分野において、生体内における環境バイオ物質の動態解析ツールの開発研究は重要である^{16)~18)}。

筆者らは、B[a]P がアレルギー誘発関連サイトカインであるインターロイキン (IL-4, IL-5 など) の発現量を変動させるとともに、免疫発生器官の胸腺を著しく退縮させることを明らかにした¹⁶⁾。ディーゼル排気微粒子でこれまで注目されなかった B[k]F が強い免疫かく乱作用をもつことも明らかにし、B[a]P, B[k]F などの多環芳香族炭化水素が免疫系をかく乱してアレルギー亢進作用をもたらすのかを明らかにするべく、細胞内アリルヒドロカーボン受容体欠損マウスやマイクロソームエポキシド加水分解酵素欠損マウスを用いた免疫かく乱作用の解析を進めている。これらの研究成果に基づき、免疫かく乱メカニズムを解析する高速処理統合型マイクロ TAS の基本構想設計も可能になった¹⁶⁾。

環境リスクの動態解析のみならず、生体影響予知診断の可能なコンビナトリアル化学への発展性を含んだ特性評価

図 3 マイクロ TOF-MS のプロトタイプ装置

解析マイクロ TAS もチップ開発上興味深い。

4. マイクロ TOF-MS

マイクロ TOF-MS^{11, 18)} の開発に成功すれば、PRTR 制度に規定された有害化学物質のみならず、内分泌かく乱作用の疑われている化学物質などのオンサイト・モニタリングにも応用可能である。また、健康・美容・快適な生活 (QOL) などに関する国民生活の質の向上を可能にするモニタリングへも展望が開ける。一例として、モデル居住空間における香り成分など超微量物質のモニタリング手法を提供でき、しかも試薬補給や排液回収・処理工程が不要で、メンテナンスフリーのプロセスモニターとしての利用可能性を指摘できる。

マイクロ TOF-MS の真空排気系には、到達真空度 10^{-4} Pa を必要とするため、補助ポンプとして到達真空度 10 Pa 以下のスクロール式オイルフリー真空ポンプを開発し、世界最小サイズの試作機を完成した。このスクロールポンプは設計排気量 10 L min^{-1} 、モータ、制御部を含む占有体積 3 L である。スクロールポンプに小型ターボ分子ポンプをシリーズ連結すれば、マイクロ TOF-MS に必要な 10^{-4} Pa の真空度を実現できることを確認した。イオン源実験用 TOF-MS を別途製作し、測定対象試料にダイオキシンに近い質量数をもつ B[a]P やフラレーンを用いてレーザーディソープション法によるイオン化実験を行い、フラグメンテーションフリーのイオン化に成功した。引き続きマイクロ TOF-MS に最適なイオン化方法を探索する目的で種々のイオン化法を検討し、さまざまな分析対象物質を測定可能にするための実験を行っている。

マイクロ TOF-MS は図 3 に示すとおり、サイズ $\phi 80 \times 295 \text{ mm}$ の真空チャンバー、真空ポンプ系、小型高圧電源、波形発生器などを組み込み、目標としたアタッチケースサイズ ($450 \times 350 \times 150 \text{ mm}$) のプロトタイプ装置を試作した^{11, 18)}。さらなる小型化・高分解能化のため、非破壊検出、位置有感検出などの検討を進めている。

試料としてフラレーンを用いた特性評価結果から、質量範囲 1000 amu、分解能 $M/\Delta M = 750$ の性能を得た。また、B[a]P 測定では $m/z = 252$ の主ピークと安定同位体のピークが完全に分離したマススペクトルが得られ、B[a]P を標準試料とし検出感度約 7 ppb を達成した。

5. おわりに

マイクロ TAS や汎用分析機器をマイクロ TOF-MS と接続する場合、液体試料を効率良く真空度を下げずに真空チャンバー内に導入するためインターフェースにより圧力勾配を精密に制御する必要がある。この MS インターフェ

イスにはモノリス構造を有するキャピラリーカラムを用いて開発を行い、nL オーダーの超微量送液が可能であることを確認した¹⁸⁾。現在モノリスの空隙率、カラム長などについて検討し、モノリスキャピラリーの圧力制御性能について評価を進めている。

既存ポンプやヒエゾ式ポンプでは $1 \mu\text{L min}^{-1}$ 前後のごく低流量域における吐出圧や脈流、流量精度などが未解決で、マイクロ TAS の液体駆動系としてはまだ使用に耐えない。中空のマイクロチャネルを使う FIA に加え、分離カラムを使う LC をオンチップ化し、分離剤を充填したマイクロチャネルを構築した¹⁶⁾。このカラム内で液体を移動させる場合に必須の液体駆動装置、すなわち従来にない超小型で、ごく微量を高精度で、かつ中圧・無脈流・連続送液が可能なマイクロポンプの創製はマイクロ TAS/MS に直結した要素技術として急を要する開発課題である。

- 1) 伊永隆史：ダイオキシン等有害化学物質のオンサイト測定・リスク評価基盤技術の開発、新エネルギー・産業技術総合開発機構基盤技術研究促進事業平成 13 年度成果報告書、2002, pp. 1-77.
- 2) 伊永隆史：ぶんせき、1995, 145-151.
- 3) A. Manz, N. Grabner, and H. W. Widmer: *Sens. Actuators*, **B1**, 244-248 (1990).
- 4) 伊永隆史：日本学術会議 50 周年記念環境工学連合講演論文集、14, 25-32 (1999).
- 5) 伊永隆史：微量環境物質測定デバイスの開発、平成 10 年度地域コンソーシアム研究開発事業成果報告書、新エネルギー・産業技術総合開発機構、2000, pp. 1-191; 同、要素技術資料集、2000, pp. 1-369.
- 6) 伊永隆史：日本分析化学会中国四国支部第 37 回分析化学講習会、2000, pp. 63-68.
- 7) 伊永隆史、小竹玉緒、小野康成、栄 龍：分析化学、49, 423-427 (2000).
- 8) T. Korenaga, T. Odake, R. Long, M. Tabuchi, Y. Ono, N. Sonoda, K. Yamamoto, T. Sato, H. Susaki, Y. Fujiyama, and H. Nakanishi: *Chromatography*, **21**(2), 99-102 (2000).
- 9) T. Odake, M. Tabuchi, T. Sato, H. Susaki, and T. Korenaga: *Anal. Sci.*, **17**, 535-538 (2001).
- 10) 佐藤隆宣、須崎寛則、岩田哲郎、山本賢太郎、小竹玉緒、伊永隆史：電気学会論文誌、E121, 507-512 (2001).
- 11) 伊永隆史：ぶんせき、2002, 233-237.
- 12) Y. Takabayashi, K. Aoki, T. Odake, and T. Korenaga: *Anal. Chem.*, **75**, in press (2003).
- 13) 伊永隆史：超機能グローバルインテグレーション研究会講演予稿集、2003, pp. 97-100.
- 14) 伊永隆史：マイクロケモメカトロニクス創成、科学研究費特定領域研究 (B) 平成 14 年度成果論文集、藤田博之編、2003, pp. 337-347.
- 15) 伊永隆史：内分泌かく乱物質研究の最前線、季刊化学総説 No. 50, 日本化学会編、学会出版センター、2001, pp. 163-165.
- 16) 伊永隆史：多環芳香族化合物等環境物質のアレルギー亢進作用評価技術の開発、文部科学省産学官連携イノベーション創出事業費補助金総合研究成果報告書、2003, pp. 1-200.
- 17) 小松剛司、内山堅慈、伊藤正善、伊永隆史：LC テクノプラザ講演要旨集、2003, pp. 132.
- 18) 伊永隆史：日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集、2003, pp. 338.