MEMS技術を用いるマイクロフロー型バイオセンサーの開発

民 谷 栄 一*

*北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科 (〒923-1292 石川県能美郡辰口町旭台 1-1)

Development of MEMS Based Microflow-biosensors

Eiichi TAMIYA*

*School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology (1-1, Asahidai, Tatsunokuchi-cho, Nomi-gun, Ishikawa 923-1292)

Key Words : Enzyme Sensor, DNA Sensor, Antibody Sensor, Biochip, Microfabrication Technology

1. はじめに

バイオセンサーとは、抗原-抗体反応や酵素-基質反応の特異性などにみられるように生体の持つ優れた分子認識機能に着目し、これと各種デバイスを組み合わせた測定装置のことを意味する(図1)。最初のバイオセンサーは、アメリカのクラークらによって開発されたグルコースセンサーであった。これは、糖尿病患者の血糖値を迅速に測定するためのものであった。その原理を示すと酵素固定化膜と酸素電極から構成されており、グルコースがグルコースオキシダーゼと反応し、この時消費される酸素を酸素電極で測定しようとするものである。すでに、カード型の在宅診断用のグルコースセンサーも市販されており、糖尿病の診断、治療に大きく貢献している。その他にも抗体を用いたホルモンセンサー、微生物を用いたBODセンサーなども開発商品化されている。こうしたバイオセンサーの特徴としては、生体の持つ優れた分子認識

機能を利用しているため、体液や環境試料といった複雑な成分を多数含んだ混合物試料でも前処理を必要とせず、直接バイオセンサーに導入し、測定することが可能であることである。また、最近では、半導体集積化技術に代表されるチップテクノロジーを利用し、バイオセンサーに関連する各種機能ユニットを一体化したシステムをチップ上に設計、作製することも行われている^{1)~11)}。ここでは、著者らが酵素センサー、遺伝子センサー、抗体センサーなどのバイオセンサーにMEMS技術を応用している。ここでは著者らのマイクロフロー型のバイオセンサーの開発例を示す。

2. 血糖値計測用マイクロフロー型酵素センサー

バイオセンサーの微小化・集積化により、たとえば医療分析では、微量なサンプルで複数の測定が可能になる。すなわち、バイオセンシングシステムを構成する酵素固定化部位、検出用電極やフローセルなど各デバイスの微小化およびそれ

図1 バイオセンサの原理

図2 マイクロフロー型酵素センサーチップ

左図：グルコースオキシダーゼをマイクロ流路内に固定化し、下流の電極にてグルコースを測定

右図：各濃度における時間応答

らの一体化などが重要な研究課題となっている。そこで著者らは、フォトリソグラフィーや異方性エッチングなどのマイクロマシン技術を用いて微小な酵素反応カラムおよび微小電極を作製して、これらをフロー型バイオセンシングシステムに構築した(図2)^{12)~14)}。まず、微小酵素反応カラムはシリコン基板を用い、まず試料導入口とV型微細溝(深さ75 μ m, 全長約1 m)を、フォトリソグラフィーと異方性エッチングを用いて作製した。また検出用微小電極は、パイレックスガラス上にクロムを接着層として金を真空蒸着しフォトリソグラフィーとエッチングを用いて作製した。このシリコン基板とガラスを陽極接合しカラムとした。次に作製したカラムに酵素を固定化するために、カラムの内面に共有結合法でグルコースオキシダーゼを結合させた。流速0.01 ml/minで、デバイス中の金電極により応答を調べたところ、グルコースに対しておよそ1 mM から25 mM 程度での直線的な応答が得られた。この範囲は人の血糖値域とほぼ一致する。また、0.2 μ l という極めて微量な試料での測定が可能であった。なお、こうした血糖値センサーに関しては、直接血液試料を導入しても測定できるため、前処理が不要である。

3. マイクロフロー型遺伝子センサー

著者らは、従来のDNAチップ電気化学測定法の原理とは異なる新規な電気化学測定法を開発した^{15)~17)}。本手法はプローブDNAを電極上へ固定化する必要がなく、チップ作製の工程を簡便にする。さらに、ターゲットDNAとのハイブリダイゼーションを必要としないため、迅速検出を可能にする。また、DNAの増幅反応を利用するため、高感度にターゲットを検出することができる。Bisbenzimidazoleは、DNAのAT配列特異的に結合するだけでなく、DNA凝集剤として働くことが示唆されている。この原理については、原子間力顕微鏡などのナノツールを用いることにより明らかにしている(図3)。それゆえ、DNAに結合したbisbenzimidazoleの拡散量は低下し、電気化学測定において酸化ピークが減少する。本手法は、この拡散係数の変化に着目しており、DNA増幅前後のBisbenzimidazoleの持つ酸化ピークを比較すること

でDNAの増幅量を推測することができる。蛍光測定から、HBV(B型肝炎ウイルスDNA)(1 kbp)1分子に10分子程度のbisbenzimidazoleがDNAに結合していることが分かった。また、0.06 mM-bisbenzimidazoleに10 nMのHBV-DNAを加えた際、拡散係数が約1/2に減少しており、少なくともHBV(1 kbp)1分子あたり、1000分子以上のDNAが相互作用していることが示唆された。従来、bisbenzimidazoleは、DNAのminor grooveに結合するとされてきたが、今回の結果から、はるかに多くのbisbenzimidazoleが結合することが分かった。また、DNA増幅産物が15 nMまでのDNA濃度-bisbenzimidazoleの酸化ピーク(I_{pa})は、直線関係にあり、半定量的に増幅量を推測できることが分かった。

PCRチップの概略図および試作された本チップ用の携帯型の電気化学測定装置を示す。まず、PCR溶液を図4で示すSample injectionより、PCR反応層(PCR chamber)に向かって流す(このとき他の流路およびチャンバーは、リン酸バッファーで満たしておく)。PCR溶液が反応層を満たしたとき、送液を止めPCRを行い、DNAを増幅させる。その後、再び、検出層(PCR sensor)に向かって送液を行う。その際、もう一つの流路(intercalator injection)より、ヘキストを混合し、検出層にて電気化学応答を測定する。同様に、PCR前の溶液も電気化学測定を行い、PCR前後における電流値の減少量を比較し、特定DNAの検出を行えることを示した。

4. マイクロフロー抗体チップを用いたダイオキシンセンサー

ダイオキシン類などの環境汚染物質による生体への影響が危惧されている。そのため、環境中、食品中などからこれらの化学物質の汚染被害を防止し、的確に対処するため、簡便な定量方法が望まれている^{18),19)}。そこで本研究では、生物濃縮が非常に顕著であることが指摘されているコプラナーポリ塩化ビフェニル(Coplanar polychlorobiphenyl: Co-PCB)に特異的なモノクローナル抗体を用いて、マイクロフロー型抗体チップの開発を行った。定量には、測定対象物質が低分

図3 AFMによって明らかになったDNAセンサーの原理

図4 フロー型遺伝子増幅・センサー

子であることから競合法を採用し、酵素免疫検定法(ELISA)をチップ上で行った。測定原理を図5に示す。

まず、Si基板上へフォトリソグラフィーによりSU-8による鋳型を作製した。これをPDMS(polydimethylsiloxane)に転写し、抗体固定化ビーズを一定個数流路中へ配置可能であり、一枚のチップで検量線作製および目的とする試料の定量を可能としたくし型マルチフロー抗体チップの作製を行った。チップは、検量線作製用流路および定量用流路から構成されており、流路構造は深さ100 μm 、流路幅1000 μm で、

流路中に直径90 μm のポリスチレンビーズ表面へ3,3',4,4'-Tetra chlorobiphenyl (TeCB)に対して特異的な抗体を固定化した抗体固定化ビーズが配置可能な構造を有している(図6)。そして、本チップはシリンジポンプを用い、送液による配置を行えるように流路設計を行った。各流路へ抗体固定化ビーズを配置した後、特性評価を行った。特性評価は、HRP標識TeCB誘導体および非標識TeCB誘導体、各種試薬溶液は、シリンジポンプによって送液し、競合法による非標識TeCB誘導体の定量を行った。なお、定量には、蛍

図5 抗体ビーズを配置したフローチップを用いるコプラナー PCB の測定

図6 マルチフロー型イムノチップ(左)と各フローに設置された抗体固定ビーズ(右)

光基質として AmplexTM red (Ex. 573 nm, Em. 590 nm) を用い、光学検出系により定量を行った。競合法による定量を作製したマルチフロー抗体チップで行った結果、誘導体濃度に応じた蛍光強度が得られ、検量線を作製した後定量用流路へ 0.1 ppb の非標識 TeCB 誘導体である 4-Methoxy-3,3',4'-Trichlorobiphenyl を送液した結果、検量線に乗じた蛍光強度が得られ、一枚のチップ上で検量線作製および目的とする試料の定量が可能であった。また本チップは、決められた微小空間内へ効率的に一定個数抗体固定化ビーズを配置させることができ、定量における時間を短縮させることができた。また、検出限界は 0.1 ppt と高感度に検出可能であり、さらに分析時間の短縮と操作性を向上させることができた。また本チップは 96 穴プレートを用いた定量よりも高感度であっ

た。高感度化された理由として、ビーズを整列させたことによる微小空間の持つ短い拡散移動距離と大きな比界面積という特徴を生かせることが挙げられる。

(2003-9-14 受理)

文 献

- 1) 民谷栄一編；バイオエレクトロニクス（朝倉書店, 1994）
- 2) 民谷栄一（分担執筆）；アドバンスドセンサーハンドブック（培風館, 1994）
- 3) 民谷栄一編；生体機能類似膜，膜学実験シリーズ II 巻（共立出版, 1994）
- 4) 民谷栄一（日本分析化学会編）；機器分析ガイドブック（丸善, 1996）

- 5) 民谷栄一, 森田資隆, 村上裕二, 横山憲二; 21 章バイオセンサー—新規バイオセンサー創成に向けてチャレンジ, 5—化学フロンティア, 生命化学のニューセントラルドグマ, p. 218-227 (化学同人, 2002)
- 6) 民谷栄一; バイオセンサーの急激な進歩を担うスピリット, —先端技術が拓く医工学の未来—(古川俊之編), アドスリー, 160-205 (2002)
- 7) 民谷栄一; 次世代センサーの開発, 次世代バイオセンサー, 12(1), 6-9 (2002)
- 8) 民谷栄一; バイオセンサーチップ, BME, 15(10), 8-16 (2001)
- 9) 民谷栄一; バイオセンシングの最新技術動向, M&E 4, 178-182 (工業調査会, 2003)
- 10) 民谷栄一; バイオセンサーとバイオインフォマティクス先端化学シリーズIII 糖鎖/バイオマテリアル/分子認識/バイオインフォマティクス, p. 233 (丸善, 2003)
- 11) 民谷栄一, 森田資隆; バイオセンサ, 21 世紀版薄膜作製応用ハンドブッカー改訂版(権田俊一編), 1089-1100 (エヌティ・エス, 2003)
- 12) Y. Murakami et al; *Anal. Chem.*, **65**, 2731-2735 (1993)
- 13) Y. Murakami et al; *Electroanal*, **6**, 735-739 (1994)
- 14) 村上裕二, 民谷栄一; マイクロマシン技術で作製したバイオセンサ, ELECTROCHEMISTRY, **4**, 294-297 (2000)
- 15) 民谷栄一, 小林正昭; 総合臨床, **50**(3)433 (2001)
- 16) M. Kobayasi et al; *New Technology Japan*, **29**(6), 11-17 (2001)
- 17) M. Kobayasi et al; *Electrochemistry*, **69**(12), 1013-1016 (2001)
- 18) 民谷栄一; エンバイオー—資源環境対策別冊, Vol. 37, No. 15, p. 21-26 (2001)
- 19) 民谷栄一; 電子情報通信学会誌, Vol. 84, No. 10, p. 701-703 (2001)