

Figure 2. Standard structure of microglucose sensor.

グルコースがグルコースオキシダーゼ(GOD)によりグルコノラクトンへ酸化される際に消費される酵素量を、クラーク型酸素電極を用いて、 $-0.65\text{ V vs. Ag/AgCl}$ での電流値から測定する方法、もしくは生成される過酸化水素の酸化電流を、 $+0.6\text{ V vs. Ag/AgCl}$ の電位で測定する二つのタイプがある。本ヘルスケアチップでの採血量は、数 μL 以下といった微量血液による分析を行うため、クラーク型酸素電極による検出では、サンプリングされた血液中の溶存酸素量により測定値が律速されるという問題点がある。さらに過酸化水素検出型の電極においては、血液中アスコルビン酸や尿酸が妨害物質として働き検出精度が得られないという問題点がある。さらに、グルコースセンサーが設置されているキャピラリー内は、数十 nL の微量血しょう中からの微量グルコース濃度を測定することになる。そこでここでは酵素の酸化還元反応を、直接電子受容体を介して検出するメディエーター型のグルコースセンサー⁷⁾を用いた。この検出反応は、溶存酸素濃度や、血液中のアスコルビン酸や尿酸などの妨害を受けないという特徴をもつ。メディエーターとして、本研究ではフェロセンを用いた。Figure 2にグルコースセンサーの基本膜構成を示す。GOD(1500 unit/mL)は、ポリアニオン(Poly(Sodium 4-styrene-sulfonate): PSS, 20 mmol dm^{-3})とポリカチオン(Poly(L-lysine Hydrobromide): PLL, 20 mmol dm^{-3})のポリイオンコンプレックス(PIC)により、フェロセン層上部に固定化した。PSS, GOD, PLL 溶液は、それぞれ 50 nL 滴下した。PIC 層により酵素固定化を行った後、0.3 wt% の PMB をコーティングした。センサーは、一晚 4°C の条件下で乾燥させた。その後、 $\text{pH}: 7.4$ リン酸緩衝液(PBS)中にグルコースを所定量溶解させたグルコース標準液を用いて、 $0.35\text{ V vs. 飽和カロメル電極(SCE)}$ に対するフェロセンの酸化電流値を測定した。

2.3 チップ操作手順および流路デザイン設計

このチップの使用方法は、まず無痛針により全血を約 $4\mu\text{L}$ 採取する。採取された全血を、10000 rpm, 1 min の遠心分離により血球と血しょうに分離する。チップには血球成分のみを溜める円形のポケットが形成されている。遠心分離後の血球成分は、血球だめ部分に、血しょう成分は上部の U 字キャピラリー一部分に分離される。

その後血しょうのみを外部ポンプで電気化学センサーまで引き込み、7組のマイクロ電極により分析を行う。

7組の電極は、ある電極上での反応生成物が別のセンサーへ及ぼす相互作用を考慮して設置した⁸⁾。たとえば、BUN センサーは、式(1)の反応過程に従い、水素イオンが減少し、アンモニウムイオンが生成する。実際にこのチップを用いて、流路内上流部の電極に BUN センサーを、下流部の電極に pH センサーを配置した場合、酵素反応で生じる pH 変動が、下流部に設置した pH センサーにおいても検出され、pH 値が 7.4 から 8.6 まで上昇した。このとき溶液は上流部より挿入され、すべての流路内に溶液が満たされた時点で外部ポンプを停止させ、静止状態で測定を行った。また上流部に pH センサーを、下流部に BUN センサーを配置した場合においても、pH 7.4 の PBS 緩衝液の pH が 7.8 まで増加した。そこでこのような相互作用を及ぼす BUN センサーと pH センサーを別の流路に形成すると、pH センサー値は尿素濃度に因らず一定の値を示し、BUN センサー電極で生成した水素イオンの妨害なく測定が可能となった。Na⁺ センサーや、K⁺ センサーのように、測定において相互作用を及ぼさないセンサーについては、同一流路内に複数設置できることを確認している。各センサーはこのような相互作用を考慮して設置した。

3 実験結果

3.1 フェロセンの分散性の向上

Figure 2 に示す膜構成の中で、測定感度・精度に影響を及ぼす因子は、メディエーターの固定化密度、酵素の固定化方法、血しょう中タンパク質の電極表面への付着などが考えられる。そこで、それぞれについて検討を行った。まず、フェロセンのカーボン電極上への固定化密度の制御について検討を行った。純水中にメディエーターとしてフェロセンを分散させ、それをカーボン電極上に固定化した電極を用いてグルコース濃度の測定を行うと、Figure 3 に示すように、電極間のバラツキが大きく、さらに高濃度の血糖値の測定が不可能であった。この原因は、電極上に固定化されたフェロセン粒子の分散度に依存すると考えられる。実際、純水中で分散させたフェロセン粒子は凝集しやすく、電極表面に塗布した状態では、Figure 4(a)の光学顕微鏡写真に示されるように、不均一に分散した状態で固定化されていた。ここでは、電極サイズが約 $300\mu\text{m}\phi$ というマイクロサイズの電極を用いているため、電極間のバラツキは、フェロセン粒子が固定化されている電極と、固定化されていない電極が存在するためと考察できる。そこで、フェロセンを高濃度に電極上に固定化することを試みた。分散溶媒として、純水、エタノール(EtOH)、テトラヒドロフラン(THF)、ジクロロメタン(DCM)を用いた。溶媒によりフェロセ

ン粒子の形状が大きく異なり、DCMのような無極性溶媒を用いることにより、フェロセン粒子の微細化、高密度化が可能となっていることがわかる。この結果をふまえて、DCMを溶媒に、ポリビニル系樹脂存在下フェロ

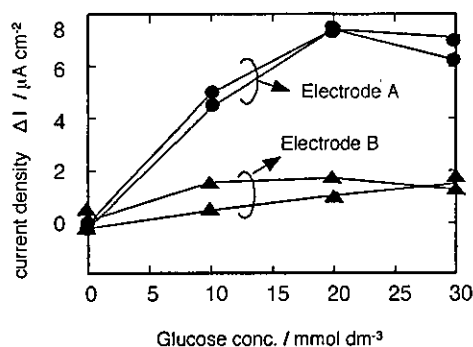


Figure 3. Characteristics of representative microglucose sensor.

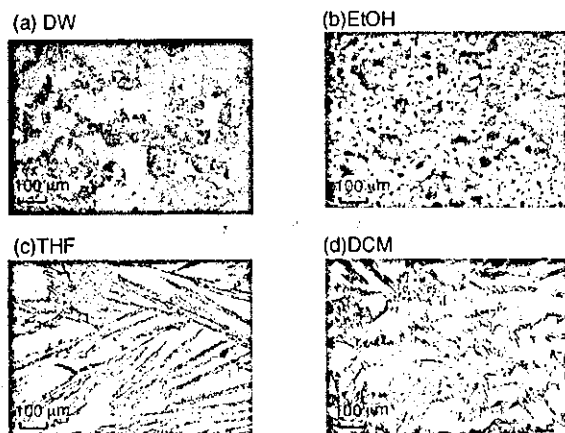


Figure 4. Optical microscopic images of ferrocene particle size as a function of solvent. (a) distilled water (DW), (b) ethyl alcohol (EtOH), (c) tetrahydrofuran (THF), and (d) dichloromethane (DCM).

センを電極上に均一分散させた電極構造のグルコースセンサーを用いて、個々の電極間のバラツキについての検討を行った。Figure 5(a)にDCMを溶媒に用い、ポリビニルブチラル(PVB)に分散させたフェロセン固定化電極の光学顕微鏡像を示す。またFigure 5(b)にグルコースセンサーの特性を示している。Figure 5(b)より電極A, Bともに同じ出力特性を示し、フェロセン粒子を高密度に均一に電極表面に分散させることにより電極間のバラツキが抑制されたことがわかる。

一方健康な人の空腹時の血糖値は、70~110 mg/dL、食後一時間後血糖値は100~160 mg/dLである。空腹時血糖値が126 mg/dL以上で糖尿病と診断される。また、200 mg/dL以上と高血糖値を示す患者において、糖尿病性網膜症などの合併症の発病頻度が高い。したがって、医療診断用にグルコースセンサーを用いるためには、高濃度のグルコース濃度測定が要求される。酵素固定化電極を用いた酵素-基質反応は、基質濃度が低い場合、固定化酵素膜中への基質の拡散が律速となり、濃度と反応速度が比例関係を示す。より高濃度まで測定可能にするためには、この直線領域を高濃度領域まで拡張できる膜構造となることが望ましい。先述したフェロセン粒子の固定化層としてPVBを用いた電極においては、電極間のバラツキを抑制しただけでなく、50 mMの高グルコース濃度まで濃度と出力電流値が比例関係を示した。これは、渡邊らの報告^{9),10)}にも示されているように、疎水性ポリマーをバインダーとして用いることで、出力電流値は低下するが、高濃度まで出力電流値が直線性を示すという結果と同様であった。つまりカーボン電極上に高密度にフェロセン粒子を疎水性ポリマーで固定化した構造により、電極間のバラツキが抑制され、かつ高濃度領域までグルコース濃度測定が可能であることがわかった。フェロセン粒子が分散されているPVB層を1 μmとしたグルコースセンサーの測定結果をFigure 6に示してい

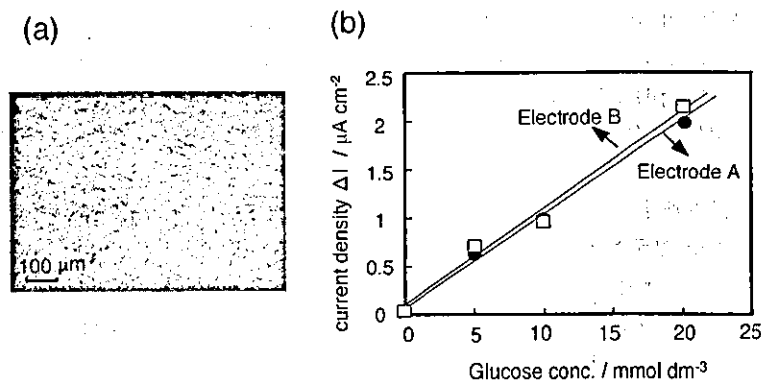


Figure 5. Optical microscopic image of ferrocene-modified electrode with poly(vinyl butyral) (a), and characteristics of microglucose sensor with improved ferrocene layer (b).

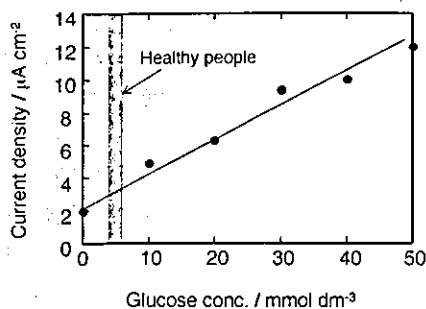


Figure 6. Calibration curve of microglucose sensor under high glucose concentration region.

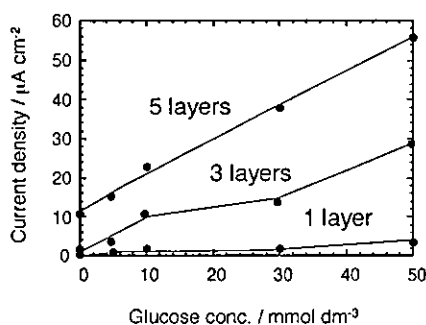


Figure 7. Improvement of response current with increasing PIC layers.

るが、この図から、糖尿病患者にも使用可能な高濃度領域まで直線領域が広がっていることがわかる。

3.2 PIC層の積層化による出力電流値の増大

次に、出力電流値の向上を目的に検討を行った。グルコース濃度変化に対し出力電流の変化量が大きいほど、誤差が少なく感度の良いセンサーと言える。そこでまず、酵素固定化量を増加させることを試みた。GODはPLLとPSSのPIC層で固定化されているが、この時のPLL、PSSの各ポリマー濃度、活性酵素量を変化させることによる応答出力について検討を行った。この系では、出力電流値の増加の傾向は認められたが、高濃度領域で安定した特性が得られなかった。この原因は、静電相互作用により固定化される酵素量に限界があり、単層のPICにより固定化した場合では、固定化されていない酵素が測定溶液へ溶出したためであると考えられる。そこで、酵素固定化層の積層化を試みた。PLL/GOD/PSSのPIC層を1層とし、PIC層が2層、5層の場合について検討を行った。Figure 7にPIC積層化の結果を示している。PIC層を1層から5層と酵素固定化量を増加させたことにより、出力電流値の増加、および濃度に対する出力電流値の傾きが増加していることがわかる。これは、PICの積層化により、より強固な静電相互作用が得られ、より多くの酵素が電極表面上に安定に固定化されたものと考察される。つまり、酵素固定化量

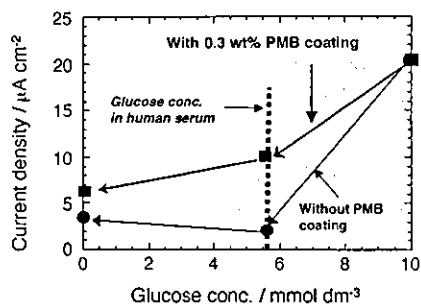


Figure 8. Effect of PMB coating on glucose sensor surface.

の増加により、同じ基質濃度に対する出力電流も増加し、精度の高い測定が可能となることが確かめられた。

3.3 MPC-co-BMA コーティングによる血しょうタンパク質の付着抑制

以上の検討により高濃度範囲で電流増加量の大きな安定なグルコースセンサーの膜構造についての指針が得られた。そこで、血液分析用のグルコースセンサーとしての特性を評価するために、血しょうタンパク質の電極表面への付着が、特性へ及ぼす影響について検討を行った。電流応答型のセンサーにおいて、その応答電流は電極面積に依存し、電極面積が大きいほど高い出力電流が得られる。血液中の血球およびタンパク質は、材料表面に非特異的に吸着するため、電極表面への血しょうタンパク質の付着が起こり、実効的な電極面積が減少し、出力電流値が低下することが容易に予想される。Figure 1に示したヘルスケアチップでは、測定前に血球成分を分離した後、血しょう中の成分分析を行う測定手順のため、センサー表面への血球成分の付着はなく、血しょう中タンパク質の付着が問題となる。このような血しょう中タンパク質の付着によるセンサーの出力特性劣化が、PMBの被覆により改善された結果をFigure 8に示す。ここでの被覆条件は、0.3 wt% PMB エタノール溶液を、PICで酵素固定化した電極表面に50 nL 滴下した。PMBを被覆した電極は、電極1および2、被覆されていない電極は、電極3および4である。測定手順は、まず、PBS中10 mMのグルコース濃度の測定を行い、次にヒト血清中の濃度測定を行った。ここで用いたヒト血清中のグルコース濃度は5.6 mMである。最後にPBS中での測定を行った。グルコース濃度10 mMの測定において、作製した4個の電極とも同じ出力電流値を示している。この4個の電極を用いてヒト血清中のグルコース濃度を測定した電流値を比較すると、PMB被覆電極と被覆されていない電極では、ヒト血清中で測定した出力電流値が大きく異なっている。被覆した2個の電極と比較して、被覆していない電極ではまったく出力電流が得られず、測定不可能となっていることがわかる。この一連の測定により、PMBが被覆されていない電極にお

ける測定電流値の減少の原因は、血清中のタンパク質が酵素固定化電極上に吸着したことにより、実効的な電極面積の減少を引き起こしたためと考察される。PBS中のグルコース濃度の測定電流値と比較し、血清中グルコース濃度の測定値は数%の低下が認められるものの、マイクロサイズの電極を用いた血しょう中グルコース濃度の測定には、タンパク質の付着を抑制するポリマーのコーティングが不可欠であると言える。

4 ま と め

在宅で健康診断ができる同時多項目測定用のヘルスケアチップの創製を目指し、このチップに搭載する直径300 μm の電極開孔部をもつマイクロサイズのグルコースセンサーの創製を行った。ここでデザインされたヘルスケアチップでは、グルコース測定に用いる血しょうは、数十nL程度となる。このような微量な血しょう中に存在する微量グルコースを高感度に測定するために、メディエーター型のグルコースセンサーの構造を用いた。メディエーターとしてフェロセンを用い、グルコースオキシダーゼ(GOD)は、ポリイオンコンプレックス(PIC)より固定化した。この膜構造において、フェロセン粒子を、疎水性のポリビニル系樹脂で高密度に固定化することで、個々の電極間のバラツキを抑制できた。さらにグルコースの電極固定化膜への拡散が律速となる膜構造が実現でき、健常人から糖尿病患者にわたる幅広いグルコース濃度の測定が可能となった。

より高精度な測定に向けて、グルコース応答電流値の増加を、酵素固定化PIC層の積層化により試みた。PIC層を積層化することにより、固定化酵素量が増加し応答電流値の増加が認められた。最後に、血しょう中のグルコース測定に向けて、ヒト血清を用いてタンパク質の電極表面へ付着抑制について検討を行った。タンパク質の付着を抑制可能なポリマーとして、リン脂質極性基をもつMPCとBMAの共重合ポリマー(MPC-co-

BMA: PMB)を用いた。酵素固定化電極上に0.3 wt%のPMBを塗布することにより、血清中タンパク質の付着が抑制され、血清中グルコース濃度の測定が可能となった。マイクロサイズの電極上にフェロセン粒子を均一に固定化し、PICの多層化による酵素固定化量の増加を行い、さらにタンパク質の付着を抑制する被覆層を構築することで、微量な血しょう中のグルコース濃度を高精度・高感度に測定するグルコースセンサーの創製が可能となった。

謝 辞 本研究は、科学技術振興事業団、ヘルスケアチッププロジェクトの一環として行われた。

文 献

- 1) A. Oki, S. Adachi, Y. Takamura, K. Ishihara, H. Ogawa, Y. Ito, T. Ichiki, and Y. Horiike, *Electrophoresis*, **22**, 341 (2001).
- 2) A. Oki, M. Takai, H. Ogawa, Y. Takamura, T. Fukasawa, J. Kikuchi, Y. Ito, T. Ichiki, and Y. Horiike, *J. Jpn. Appl. Phys.* **43**, 3722 (2003).
- 3) H. Ogawa, M. Nagai, J. Kikuchi, and Y. Horiike, *Proceedings of micro-TAS 2003*, Vol. 1 (October 2003, California), p. 741.
- 4) K. Ishihara, H. Oshida, Y. Endo, T. Ueda, A. Watanabe, and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 1543 (1992).
- 5) T. Osaka, T. Momma, S. Komaba, and H. Kanagawa, *J. Electroanal. Chem.*, **372**, 201 (1994).
- 6) S. Yabuki, F. Mizutani, and Y. Hirata, *J. Electroanal. Chem.*, **468**, 117 (1999).
- 7) A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, H. A. O. Hill, L. D. L. Scoot, and A. P. F. Turner, *Anal. Chem.*, **56**, 667 (1984).
- 8) M. Takai, S. Satomi, H. Ogawa, A. Oki, M. Nagai, and Y. Horiike, *Proceedings of micro-TAS 2003*, Vol. 1 (October 2003, California), p. 403.
- 9) T. Saito and M. Watanabe, *React. & Funct. Polym.*, **37**, 263 (1998).
- 10) T. Saito and M. Watanabe, *Polym. J.*, **31**, 1149 (1999).

Development of a Microglucose Sensor for Healthcare Chip that Allows Multi-Item Measurements

Madoka TAKAI,*¹ Satomi SHINBASHI,*² Hiroki OGAWA,*² Masao NAGAI,*² Kazuhiko ISHIHARA,*¹ and Yasuhiro HORIIKE*³

*¹Department of Materials Engineering, The University of Tokyo (Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan)

*²Japan Science and Technology Corporation (Hon-cho, Kawaguchi 332-0012, Japan)

*³National Institute of Materials Science (Namiki, Tsukuba 305-0044, Japan)

A microglucose sensor for healthcare chip that allows multi-item measurement in an infinitesimal trace of blood (less than one μL) has been developed. The causes of instability (including a low sensitivity and a low accuracy) in microglucose sensor with a small electrode of 300 μm in diameter have been determined to include dispersibility of ferrocene, amount of immobilized GOD, and plasma-protein absorption on sensor surface. To improve the sensitivity and accuracy, we studied these parameters. High packing density of ferrocene particles on carbon electrode has improved piece-to-piece variations of sensor characteristics. Measurements up to 50 mmol dm^{-3} of glucose have been achieved by combination of ferrocene particles with a hydrophobic polymer such as a poly vinyl group. Lamination of poly-ion-complex was a good immobilization method for increasing immobilized enzyme. It led to the increase of the sensitivity and accuracy due to increasing response current. Sensitivity in plasmas has drastically improved by suppression of plasma-protein absorptions on sensor surface using biocompatible MPC-co-BMA polymer coatings.

KEY WORDS Microglucose Sensor / Healthcare Chip / Poly-Ion-Complex / Biocompatible Polymer /

(Received June 14, 2004; Accepted August 27, 2004)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **61**(10), 555-560 (2004)]

4TH ASIAN INTERNATIONAL SYMPOSIUM
ON BIOMATERIALS (AISB4)

and

2ND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
FUSION OF NANO AND BIO
TECHNOLOGIES (FINB2004)

PROCEEDINGS

November 16-18

Tsukuba International Congress Center
(Epothial Tsukuba), Japan

2004



nano

Organized by Japanese Society for Biomaterials,
National Institute for Material Science,
Nanotechnology Researcher Network Center of Japan

BIOSENSING WITH DRY CHEMISTRY IN MICROCHANNEL

Hiroko Koda¹, Chia-Hsien Chang¹, Akio Oki¹, Hiroki Ogawa², Yasuhiro Horiike¹

¹Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-1, Namiki, Tsukuba 305-0044, Japan

²ADBIC Co., 1-1, Namiki, Tsukuba 305-0044, Japan

Introduction

For a home medical diagnosis, we have studied the healthcare chip [1] and the hepatic function examination chip [2] which enable us to check many items from analysis of a trace amount of blood collected by a painless needle. The former and the latter chips need calibration solutions due to the electrochemical detection and substrate buffer solutions due to the calorimetric measurement, respectively. Much care has to be taken to preserve these solutions stably. Hence, we note the calorimetric method using the dry chemistry [3], whose reagents react directly with plasmas and possess a long-term reliability. This paper discusses an application of some gels involving dry chemistry reagents to a microchannel and measurements of glucose and BUN (blood urea nitrogen).

Experimentals

Figure 1 shows a photograph of an experimental chip which laminates several layers made by a polycarbonate (20 x20mm²) plates. The chip for the glucose measurement consists of a cap plate and a lower plate in which micro-channels is fabricated. 2 holes were drilled to the cap plate along the channel to introduce reagents and subsequently plasmas. Optical fibers were connected with both ends of the channel. The inner wall of the channel was coated by an Al film to prevent invasion of a stray light and facilitates propagation of a measurement light. The gelatin containing reagents such as an enzyme of glucose-oxidase and coloring reagents, etc., which were prepared

in advance, were filled in the channel. The absorbed intensity was measured by introduction of a light with 505nm into the fiber.

The chip for the BUN measurement was formed by a multi-layer structure. The upper layers consist of a cap layer with 2 holes and a channel layer, which were used for introduction of the reagent to the channel. The reagent was synthesized by dry-solidification of the gel including an urease solution in hydro-gel polymer. This reagent reacts with plasmas, thus generating NH₃ gas. The gas is introduced into a measurement channel of the lowest layer through a gap layer and a mesh layer. The NH₃ gas reacts with a coloring reagent which is

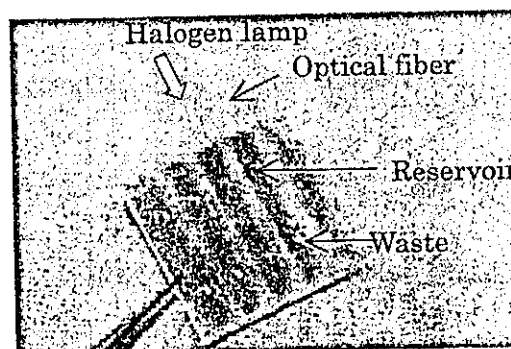


Fig. 1: Photograph of BUN Chip

prepared by mixing solutions which dissolves bromcresolgreen to ethanol and PVB to IPA, generating an color with 620nm.

Result and Discussion

At first, the glucose measurement was carried out using, a home made gelatin. However, we did not obtain linearity for various glucose concentrations. Therefore, the gelatin used for "Dry Chem" (Fuji Photo Film Co. Ltd.) was introduced into the channel. The effective

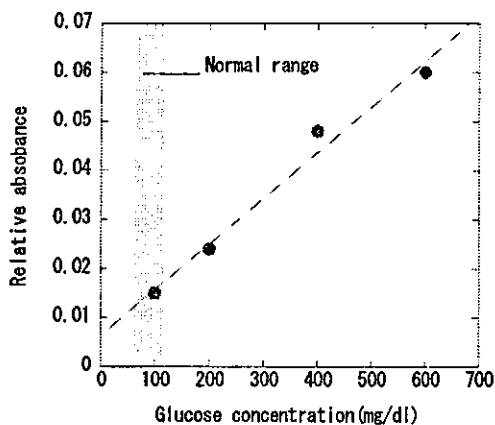


Figure2. Absorbance of 505nm light vs. glucose.

channel length and the cross-section area were 15 mm and 1.2mm x 1.2mm, respectively. This relatively large size resulted from easy injection of the powder like reagent. Figure 2 shows relative absorbance of 505 nm light vs. glucose concentrations. Sufficient linear dependence was obtained for wide range of concentrations. Figure 3 shows relative absorbance of 620 nm light vs. BUN concentrations. Although linearity for measured points is not so good, appreciable correlation was achieved for BUN concentrations.

Conclusion

The calorimetric measurements of glucose and BUN were studied by introducing the dry chemistry reagents to the channels. Although the present channel size is considerably large, this method is expected to provide essentially high

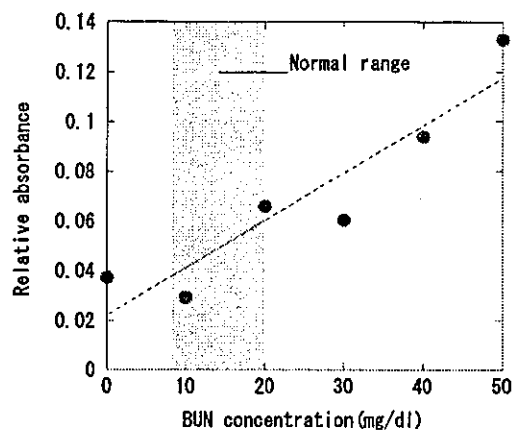


Figure3. Absorbance of 620nm light vs. BUN.

sensitivity even for trace amount of blood due to the measurement at lateral direction along the channel in contrast to the usual detection of the absorption light reflected from a plane in which reagent gels are expanded. To put this advantage to account, we have to establish the injection method of the reagents into smaller channels. Besides, much investigations on the matrix effect of a fundamental issue of the dry chemistry should be done.

References

1. A. Oki, et al., Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 42, (2003), 3722.
2. A. Yokokawa, et al., Proc. μ TAS 2003, Squaw Valley, (2003)895.
3. A. Ohkubo, et al., Vol. 27. No. 7, CLINICAL CHEMISTRY, (1981),1287.

BIOCOMPATIBLE MICROGLUCOSE SENSOR WITH NEWLY DESIGNED PHOSPHOLIPID POLYMER FOR HEALTHCARE CHIP

Madoka Takai¹, Satomi Shinbashi², Hiroki Ogawa², Yasuhiro Horiike³ and Kazuhiko Ishihara¹

¹Department of Materials Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, 113-8656, Japan

²Japan Science and Technology Corporation, 4-1-8 Hon-cho, Kawaguchi, 332-0012, Japan

³Biomaterials Center, National Institute of Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba 305-0044, Japan

Introduction

Checking our daily blood-glucose value is a first step to prevent diseases, that is a typical lifestyle-related disease. A blood glucose analyzer for using of the daily health check should be portable, fast measurement, cheap, and high accuracy from a small amount of blood sample. Under the concept, several kind of healthcare chip having multi-item sensors has been developed [1-3]. In this paper, we report a design of membrane structures with phospholipid polymer on electrochemical microglucose sensor for blood analysis in a small volume less than 1 μ L.

Materials and Methods

Microglucose sensor was fabricated on screen-printed carbon electrode on polyester sheet. Electrode window (500 μ m x 700 μ m) was controlled by photolithography. Typical membrane structure of the glucose sensor was illustrated in Figure 1. Ferrocene entrapped with vinyl polymer was used as an electron mediator and glucose oxidase (1500 unit/mL) was immobilized by polyioncomplex (PIC). Poly(sodium 4-stylen-sulfonate) (PSS) and poly-L-lysine hydrobromide (PLL) were used as anionic and cationic polymers, respectively. Finally, phospholipid polymer: poly(MPC-co-n-butyl methacrylate) (PMB) (0.3 wt% EtOH solution) was coated on the PIC layer.

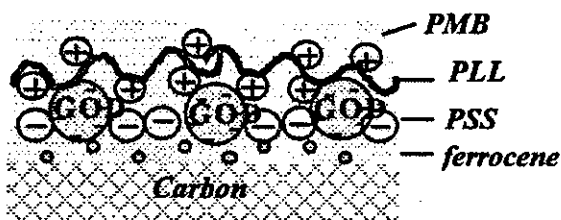


Figure 1: An image of membrane structure on microglucose sensor.

Results and Discussion

In our previous study, it was concluded that effect of PMB coating on microglucose sensor was a suppression of protein absorption in human plasma [4]. Figure 2 shows another

results of PMB coating. Current density measured at 0.35V vs. Ag/AgCl on glucose sensor with PMB coating shows linear response toward glucose concentration even after second measurement. While, current response of the sensor without PMB coating was unstable. Current density in second measurement, furthermore, was drastically decreased comparing with that in the first measurement. In present understanding, it was not clear the cause of obtaining high reliability on the glucose sensor with PMB coating.

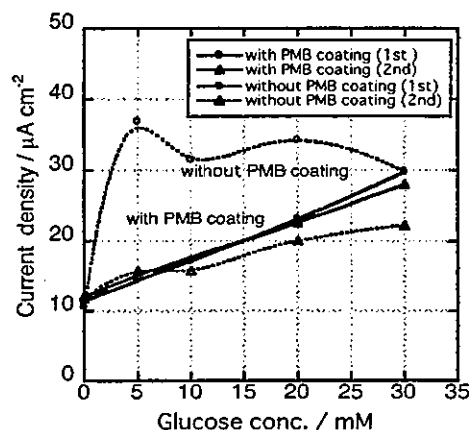


Figure 2: Current responses on microglucose sensors with and without PMB coating.

Conclusion

High reliability and stability on microglucose sensor for healthcare chip were obtained by the PMB coating on the sensor membrane consisted of PLL/GOD/PSS/Ferrocene.

References

- [1] A. Oki et al., (2003) *J. Jpn. Appl. Phys.* **43**(6), 3722
- [2] H. Ogawa et al., (2003) *Proceedings of micro-TAS Vol.1*, p.741-743
- [3] M. Takai et al., (2003) *Proceedings of micro-TAS Vol.1*, p.403-405
- [4] M. Takai et al., (2004) *Abstract of 7th World Biomaterials Cong.*, p.138

DEVELOPMENT OF AMMONIA SENSOR

Chang Chia-Hsien, Masao Nagai, Hiroki Ogawa, Satomi Shinbashi, Hideaki Hisamoto and Yasuhiro Horiike

*Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-1, Namiki, Tsukuba 305-0044, Japan
Department of Applied Chemistry, Keio University, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223-8522, Japan*

Introduction

In the development of biosensor, concept of micro total analytical system (μ -TAS) or lab-on-a-chip system¹ has been emerged as a means to provide vital technological support to make home medical self check-up possible. In our group, researches based on health marker sensors, such as Na^+ , glucose, K^+ have been carried out using integrated ISE^{2, 3}. In this study, focus has been placed on ammonia sensor in terms of stable measurement of low concentration of ammonia using modified chemicals cocktail on PVC membrane^{4, 5}. In addition, this study also aims to use a trace amount of whole blood, selectivity, shape and thickness of the membrane is also observed critical and important to the chip designed by the research group. The chip used in this study is based on previous study^{6, 7}, using disposable poly(ethylene terephthalate) PET plate.

Materials and Methods

Reagents and Solutions. PVC 30 wt%, plasticizers Bis(1-butylphenyl)adipate BBPA and Tris(2-ethylhexyl)trimellitate TOTM 67 wt%, anionic additives Potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate k-TCPB, Sodium tetrakis(4-fluorophenyl)borate Dihydrate TFPB 10 mol%, were bought from Fluka. Ammonia ionophore²² TD19C6 was bought from DOJINDO. All aqueous solutions were prepared with deionized water.

Measurement of ammonia concentration. Potential measurements were made at room temperature (20-25°C) and the data recorded by Labview software were collected by under stopped-flow conditions with NH_4Cl concentrations (ranging from 1mM, 0.01M, 0.1M to 1M).

Results and Discussion

Measurement of ammonia concentration.

In this study, new type of chip has been developed in which only 4 μl of blood is necessary to run the analysis (see Figure 1).

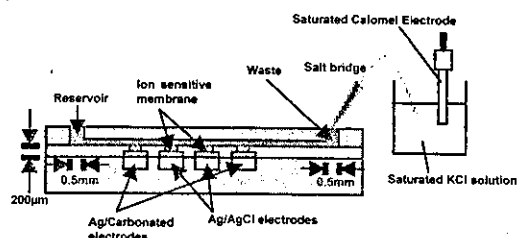


Figure 1: Cross section of a chip fabricated for the evaluation of selectivity.

Stable potential at low concentration of 1mM is achievable during the measurement with inner layer 0.01M ~ 0.2M NaCl and in the presence of 0.5% PVP.

Conclusion

Ammonia sensor has been successfully developed in the presence of inner layer (NaCl and PVP), especially stable measurement at low concentration. Markers like BUN and creatine/creatinine will be further investigated on top of the ammonia sensor in the near future.

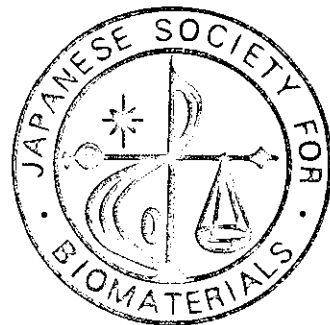
Reference

- ¹ A. Manz, N. Graber and H. M. Widmer: *Sens. Actuat. B* 1 (1990) 244.
- ² Y. Horriike, S. Adachi, Y. Takamura, K. Kataoka, T. Ujiie and T. Ichiki: *Int. Symp. Capillary Chromatogr.*, Gifu, Japan, 1999, OP409.
- ³ A. Oki, S. Adachi, Y. Takamura, K. Kataoka, T. Ichiki and Y. Horriike: *Proc. μ TAS 2000*, Enschede, The Netherlands, 2000, p. 403.
- ⁴ K. Suzuki, D. Siswanta, T. Otsuka, T. Amano, T. Ikeda, H. Hisamoto, R. Yashihara and S. Ohba, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2200-2205.
- ⁵ S. Sasaki, T. Amano, G. Monma, T. Otsuka, N. Iwasawa, D. Citterio, H. Hisamoto and K. Suzuki, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4845-4848.
- ⁶ A. Oki, S. Adachi, Y. Takamura, K. Ishihara, H. Ogawa, Y. Ito, T. Ichiki and Y. Horriike: *Electrophoresis* 22 (2001) 341.
- ⁷ A. Oki, M. Takai, H. Ogawa, Y. Takamura, T. Fukazawa, J. Kikuchi, Y. Ito, T. Ichiki and Y. Horiike, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 42 (2003), 3722-3727.

日本バイオマテリアル学会 シンポジウム2004

第11回つくばバイオマテリアル研究会

予稿集



J S B

- 2004年11月15日 ~ 16日
- つくば国際会議場 エポカル

大会長 田中 順三

ドライケミストリー法のマイクロ流路への適用 によるバイオセンシングの基礎検討

○甲田裕子、張嘉顛、沖明男、小川洋輝、堀池靖浩

(物質・材料研究機構 生体材料研究センター 産学独)

1. 緒言

微量血液の分析から在宅で多項目を診断するヘルスケアチップを開発しているが、これは電気化学バイオセンサを用い、校正液が必要である。そこで血漿と直接反応するドライケミストリー比色法に着目し、薬剤含有ゲルをマイクロ流路に導入することで簡便、高保存性の診断チップの基礎的検討を行った。

2. 実験

図1は試作チップを示す。ポリカーボネイト(20mm 角)に流路を形成した。グルコース測定用は、2層で形成され、下層に流路を設け、その内壁はAlコートされ、流路内に予め秤量されたグルコースオキシダーゼなどの酵素と発色試薬を含有するゼラチンを詰め、流路の両端には光ファイバーを挿入して呈色した505nmで吸光度を測定する。その際、上層基板に流路に沿って2ヶ所の孔を開け、測定用試薬を導入した。BUN測定では、試作チップは多層構造で形成され、測定用試薬の導入用の上層は同様に2ヶ所の孔を開け、その下にNH₃ガス発生層、メッシュなどのギャップ層を兼ねたガス透過層、NH₃ガスが発色試薬を反応させ呈色させる測定用流路の順で積層された。NH₃ガス発生層には、高級水性ポリマーにウレアーゼ溶解液を含ませたゲルを用い、検出系には、ブロムクレゾールグリーンをエタノールに溶かし、PVBをIPAに溶かした溶液と混合して測定用流路に導入し、乾燥固定させ、620nmで測定した。

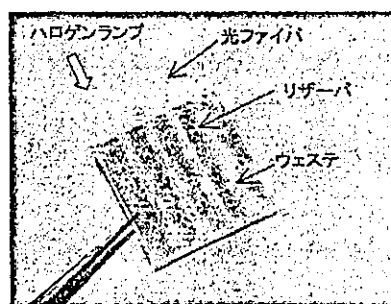


図1 BUN 検出チップ

3. 結果と考察

グルコース測定では、上述の調製した自家製ゼラチンでは線型性が得られなかったため、「ドライケム」(富士写真フィルム製)用のゼラチンを導入し、得られた結果を図2に示す。BUN測定は図3に示すように、ドライ試薬法により十分な発色、吸光度と濃度勾配の相関が得られた。微量な血漿試料に対しマ

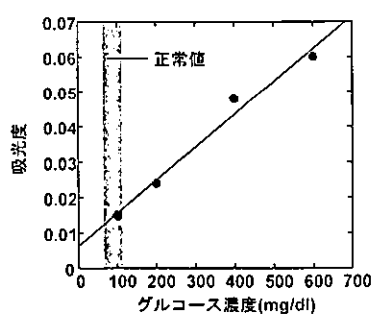


図2 グルコース濃度—吸光度

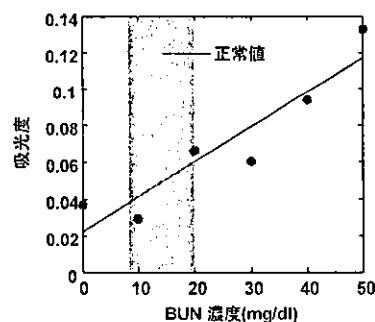


図3 尿素濃度—吸光度

イクロ流路内では反応試薬も相応に微量となり発色強度が減少したがゲルに含ませる試薬を濃縮することとチップ構造で光路長を稼ぐことで発色を充分にした。またマイクロ流路内で試料の均一な誘導、展開とドライケミストリーの弱点のマトリックス効果については継続研究を必要とする。

Basic investigation of biosensing on micro-capillary chip employing dry chemistry method

BMC, National Institute for Materials Science

○Hiroko Koda, Chia-Hsien Chang, Akio Oki, Hiroki Ogawa, Yasuhiro Horiike

Biosensors & Biomaterials Workshop 2005

(Biosensors 2005)

ABSTRACTS

Tsukuba International Congress Center,
Tsukuba, Japan

March 7 (Mon) - 9 (Wed), 2005

Organized by

The organizing committee of "Biosensors & Biomaterials Workshop 2005"

In Cooperation with

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Development of Clinical Chips Checking Life Style-Related Diseases

Y. Horiike¹, A. Oki¹, H. Ogawa², M. Nagai², M. Takai³, C.C-Hsien¹, H. Hisamoto⁴
and K. Koda¹

¹ National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaragi 305-0044, Japan

² Advic Corp. 2-1-6 Sengen, Tsukuba, Ibaragi 305-0047, Japan

³ Department of Material Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-8656, Japan

⁴ Graduate School of Material Science, University of Hyogo, 3-2-1 Kouto, Kamigouri,
Akou-gun, Hyogo, 678-1297, Japan

...
E-mail: HORIIKE.Yasuhiro@nims.go.jp

We are studying clinical chips allowing the home medical diagnosis from a trace amount of a blood as an application of miniaturized analysis systems. For the goal, first of all, even armature has to collect the blood without any pains at home. Both sharp edge and smooth inner wall of a SUS tube with 150 μm in diameter led to a painless needle. Besides irradiation of NIR (near infra-red) to an arm and potential measurement between the arm surface and the needle enabled us to silhouette the blood vein and to detect its depth, thereby developing the electronic blood collection system. The blood is separated to cells and plasmas by centrifugal force on a chip. The chip called "healthcare chip" measures electrochemically pH, Na^+ , K^+ , glucose, BUN and creatinine. The fluidics of the blood in the micro-channel was controlled by a centrifugal force [1]. Recently, sensing of glucose has advanced considerably by improving the chemical cross linking of GOD (glucoseoxidase) using Glutaraldehyde over a polymeric mediator of VFc-co-HEMA on a carbon electrode. High sensitive measurement of BUN using ammonia ions was also achieved. A hepatic function examining chip for γ -GTP, GOT and GPT were studied. A new multi-staged H shaped-mixer of plasmas with substrate buffers achieved wide range measurements of activities of three enzymes successfully [2]. However, it was difficult to meter and introduce definite volumes of both plasmas and buffer solutions for the calorimetric type chip. Therefore, we are now developing another calorimetric type chip which uses the dry-chemistry. In this method, reagents which are dissolved in a gel and freeze-dried are react with plasmas in a channel and then measured. At present, glucose, BUN, γ -GTP, GOT and GPT are measured. These clinical chips lead to preventions of a life-related diseases such as diabetes, kidney trouble and a liver disease. When such home medical diagnosis is realized by various clinical chips, and diagnostic data are communicated to clinical systems through a medical network, not only the medical treatment, but the society system is expected to be changed greatly.

References

1. A. Oki, H. Ogawa, M. Nagai, S. Shinbashi, M. Takai, A. Yokogawa, and Y. Horiike, Mat. Sci. & Eng. C 24 (2004)837-843.
2. A. Yokogawa, A. Oki, T. Shimasaki, H. Takasu and Y. Horiike, Proc. μ TAS2003, Squaw Valley,USA, (2003) 895-897.

プラズマプロセスによるバイオチップの 開発と展望

堀池 靖浩 ・ 一木 隆範 ・ 沖 明男



プラズマプロセスによるバイオチップの開発と展望

堀池 靖浩* · 一木 隆範** · 沖 明男*

従来の分析機器をマイクロサイズにした μ -TAS (micro-Total Analytical System) 技術の一つの出口として、使い捨て型医療用バイオチップの開発が展開されている。プラズマプロセス、特にエッチング技術は血液、たんぱく質、DNA などの分析用流路・構造や部品の形成に活躍している。本稿は、石英板微細加工によるヘルスケアチップ、電気浸透流ポンプ、セルソーターチップ、ナノピラーを用いた DNA 高速電気泳動分離チップ、パーマロイ加工による流路と磁気ビーズを用いたアフィニティアッセイチップなどのわれわれの最近の技術を紹介し、最後に今後の展開を述べる。

Keywords : plasma etching, biochip, glass, DNA, cell sorter, electrophoresis, electroosmosis

1. ま え が き

本著者らは、長年プラズマによる微細加工技術を研究してきた中で、大気温暖化対策用フロロカーボンガスを用いた高密度プラズマによる SiO₂ エッチングを行い、20 nm 幅で高アスペクト比溝の形成に成功した¹⁾。その応用として、石英基板にマイクロキャピラリを作製し²⁾、極微量の血液から病状を分析する医療応用を提案した。この研究は、近年研究が急速に進み始めた μ -TAS (micro-Total Analytical System) や Lab on a Chip などと呼ばれる分野に属することが後にわかった。少子高齢化社会が急激に進行し始めたわが国の昨今の状況に対処すべく、高齢者が元気で毎日を過ごすためには予防が大切と考え、多項目を同時・迅速に診断するヘルスケアチップの開発を始めた^{3,4)}。当初から在宅診断を目標にしたが、最近、この必要性がようやく広く認知され、在宅診断を目指した種々のバイオチップ開発が行われるようになった。本稿では、プラズマ微細加工技術がこれまでのわれわれの先進バイオチップの開発にいかにも適用され、特長のある効果を生み出してきたかを述べ、最後に今後の本技術について展望する。

2. 石英、ガラスエッチングとバイオチップ作製

ヘルスケアチップは、1回の診断後は廃棄すべきなので安価でなければならず、石英板に血液導入用のマイクロ流路を形成後、それを鋳型としてポリマー基板に転写モールドを行うことにした。しかし、半導体の微細パターンでは深さはただか 1 μ m 程度であるのに対し、マイクロ流路

は幅数十 μ m と広いが、深さも数十 μ m 以上が要求される。問題は、マスクとして耐プラズマ性金属を用いなければならないことと、長時間放電によるフロロカーボンプラズマから生成した重合膜の反応容器内壁へのたい積による加工条件の経時変化である。そこで、前者の問題は、金属膜として Cr を選び、Cl₂/30%O₂ の ICP (誘導結合プラズマ) を用いて解決した。Cr は Cl ラジカル支配で、マスクレジストはイオン支配でエッチングされるので、ICP アンテナより 20 cm も離れた電極位置で微細加工することに成功した⁵⁾。また、後者の経時変化を抑えるために、C₃F₈ のようなたい積膜を生じ難いガスを選択した。このようにして作製した石英製の逆流路パターンは、PET (ポリエチレンテレフタレート) 板に 90°C, 1.5 MPa の条件で転写モールドし、さらに他の PET 板と熱接着し流路を形成した。図 1 は、このヘルスケアチップの作製プロセスを示し、形成された各パターンも添付した。現在のチップは、量産を前提に金型を起こし、射出成型で行っているが、実験用チップは、微細パターンが要求される場合には本方法を、広いパターンには SU-8 レジストパターンのモールドを活用している。約 2 日でチップは作製できる。

しかし、ポリマー基板へのモールド加工では、微細性に限界があり、安価なホウケイ酸ガラス基板のプラズマエッチングによる微細加工も研究した。種々のホウケイ酸ガラス加工を研究したが、中でもコーニング 7740 (パイレックス) は、B と Al と Na の各酸化物が添加されているが、SiO₂ の含有率が 80.9% 高い。しかし、低イオンエネルギー衝撃では、Al や Na などのフッ化物が低揮発性のため、

* 独立行政法人物質・材料研究機構 〒305-0044 つくば市並木 1-1, e-mail: HORIIKE.Yasuhiro@nims.go.jp 分類番号 11.3, 9.3

** 東京大学大学院工学系研究科総合研究機構 〒113-8656 東京都文京区弥生 2-11-16.

Development of biochips employing plasma process and its future prospect. Yasuhiro HORIIKE*, Takanori ICHIKI** and Akio OKI*

* National Institute for Materials Science (NIMS) (1-1 Namiki, Tsukuba 305-0044)

** School of Engineering, The University of Tokyo (2-11-16 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656)

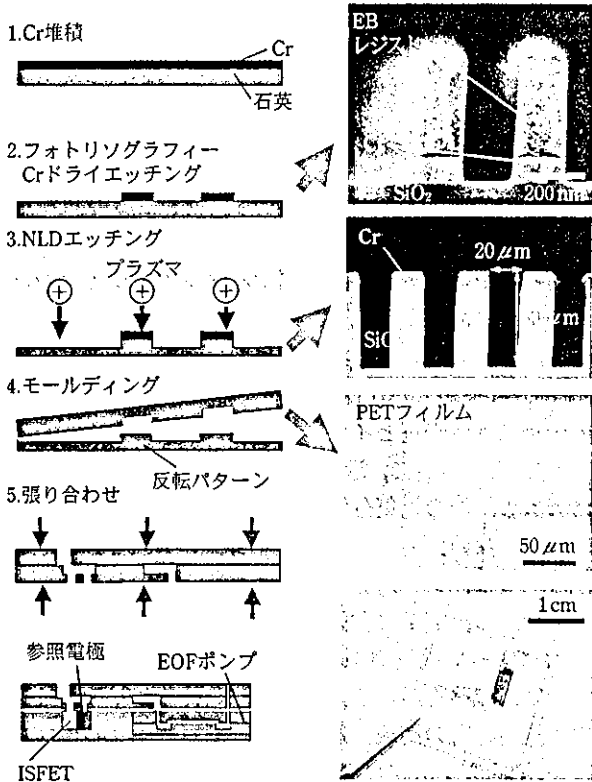


図1 初期のヘルスケアチップの作製プロセス。形成された各パターンも添付した。

加工表面にマイクロマスクを生じ、先鋭化した無数の突起が形成されやすい。高エネルギー下ではマスクとの選択比が低下する。この克服のため、 SF_6 に Ar を添加したところ、 Ar^+ イオンによるフッ化物除去が効果的に起こり、Ar 50%、基板バイアス 18 W のとき、基板表面が 10 nm の平坦度が得られ、さらに図2に示すように幅 $17 \mu\text{m}$ 、高さ $30 \mu\text{m}$ の形状が達成された^{6,7)}。

3. 電気浸透流ポンプ

$\mu\text{-TAS}$ デバイスでは、流路のほか、バルブやフィルターなどに加えポンプが重要である。当初のヘルスケアチップでは、無痛針から流路内に血液を導入するため電気浸透流 (electroosmosis flow; EOF) ポンプを研究した。従来の EOF ポンプは数 kV を要していたが⁸⁾、人間の皮膚に接したり在宅診断などのチップに適用するためには、10 V 程度

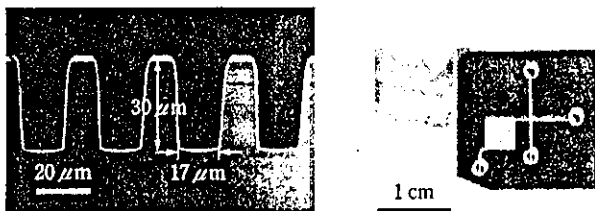


図2 バイレックスへの高アスペクト比の流路形成とチップ写真。2枚のガラスは a-Si を介して陽極接合で貼り付けられた。

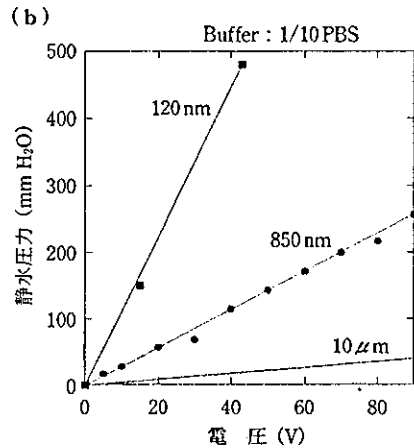
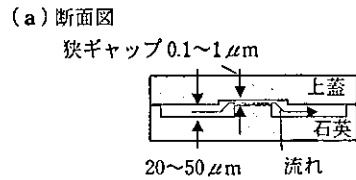


図3 低電圧駆動電気浸透流ポンプ。(a)は断面図、(b)はギャップ変化に対する静水圧と印加電圧特性。

でポンプ作用が要求される。われわれは、図3(a)の断面に示すように、 SiO_2 エッチングでナノ寸法の狭いギャップを形成すると、120 nm の薄さで強力なポンプ作用を得られることを見いだした(図3(b))。理由は、ギャップが広いと、一電極に移動した電解液が再び中心部を通って+電極に戻るが、狭いと、内壁のカチオンの移動が優勢になるためである。流量を増すには、ギャップ領域を図2(a)の紙面方向に長くすればよい⁹⁾。

このポンプ作用は、溶液の入口と出口の間に図4に示すような Bosch 法¹⁰⁾ による Si の深堀構造を形成しても得られる。Bosch 法は、① Si の等方性エッチング、②内壁へのフロロカーボン重合膜のたい積、③異方性エッチングによる底部重合膜の除去の1サイクルを繰り返す。われわれは、Bosch 法をサイクルごとに灰化工程と引き続き水素を添加して重合膜を内壁に均一にたい積させることで改良した¹¹⁾。この深堀構造をウェット酸化し、入口と出口の間に電圧を印加すると、溝内壁のカチオンの移動によりポンプ作用が得られる。欠点は、数十 V の印加で酸化膜が絶縁破壊を起こすことである。しかし、この構造は、入口をソース

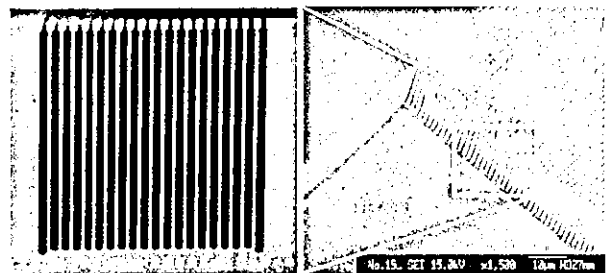


図4 改良 Bosch 法による Si の深堀構造と EOF ポンプ。



図5 PET板に形成した流路内に生じた大気圧マイクロプラズマ。

(S), 出口をドレイン(D), Si裏面の酸化膜を除去し電極を付けゲート(G)とすると, Gの電圧印加で酸化膜の表面電位を変えることによりアニオンとカチオンの流れを制御できる一種のFETになることに気づいた。しかしこれはFlow-FET¹²⁾と呼ばれ, 気づく数カ月前に報告されていた。

4. マイクロプラズマによるPET製流路内壁表面改質

高いEOFポンプ力を得るには石英のようなゼータ電位の高い材料を用いなければならないが, 電解液中のカチオンやアニオンのみを抽出するためにはゼータ電位を極力下げ, EOF効果を減じて電気泳動が必要になる。チップの流路は両方の効果を共存させるには, 内壁表面のゼータ電位制御が求められる。その一つとして, 図5に示すように, PET板に形成した0.5 mm×0.5 mm×15 mmの流路を平行平板電極で挟み, 13.56 MHz電力を印加してHeやHe+3%O₂ガスの大気圧マイクロプラズマを形成した。その結果, He+3%O₂の6 W, 2分の放電によって未処理に比べ約3倍のEOF移動度を得ることができた¹³⁾。

また, PET板流路内にゼータ電位の低い電気泳動領域とEOFポンプを設けるゼータ電位の高い領域を形成するため, その領域に電極を設け, TEOS(テトラエトキシシラン)+O₂に100倍のHeを添加してマイクロプラズマを生成して, 流路内壁に酸化膜をCVDすることも試みた。その結果, 局所的にたい積ができ, やはり未処理に比べ約3倍のEOF移動度を達成した。このように, マイクロプラズマを特定の流路の内壁へ生成することにより表面状態を自由自在に制御できる。

5. セルソーターチップ

セルソーターは, 単一細胞レベルで細胞を培養や分画し, 細胞のDNAやmRNAなどの成分を分析し, 個々の細胞中の遺伝子発現から病原を探し出すために不可欠であ

る¹⁴⁾。そしてセルソーターも基本的には使い捨てにしなければならない。従来は, 誘電泳動による電圧印加により分離されてきたが, 細胞に電氣的にダメージを与える可能性がある。われわれはこれを配慮した2種のセルソーターチップを開発した。その一つは, 上述のEOFポンプを図6に示すようなセルソーターチップの逆Y字型の2分岐間に適用した。拡大図に示すように, 2分岐に接続された一本のチャンネル中に, 下図の断面図でわかるように1カ所だけナノギャップ流路を構成し, 下部は接地し, 上部には±の電圧を印加することで, 流れを自由に制御できる。この電圧印加の際, 流路と電圧印加領域はゲル電極で隔離するが, このゲルには感光剤とイオンを添加し, 紫外光により硬化させる⁹⁾。したがって, 電圧は印加されるが, 電圧印加用電極による電解液の電気分解で生じる酸やアルカリ液が流路内に侵入しない。

他の一つは, シースフローと埋め込み電極を結合させたチップである。図7の左図に動作原理を示すように, 細胞が圧力によって輸送される流路の両側に2本のシースフローと呼ぶ流路を設ける。この3流路に流した溶液は, マイクロ流路特有の層流作用により, それぞれ左右の廃棄用および, 細胞収集流路に混ざることなく流入する。したがって, この状態では中央部の流路に導入した細胞も細胞収集流路に入ってしまうことになる。細胞を分集(sorting)す

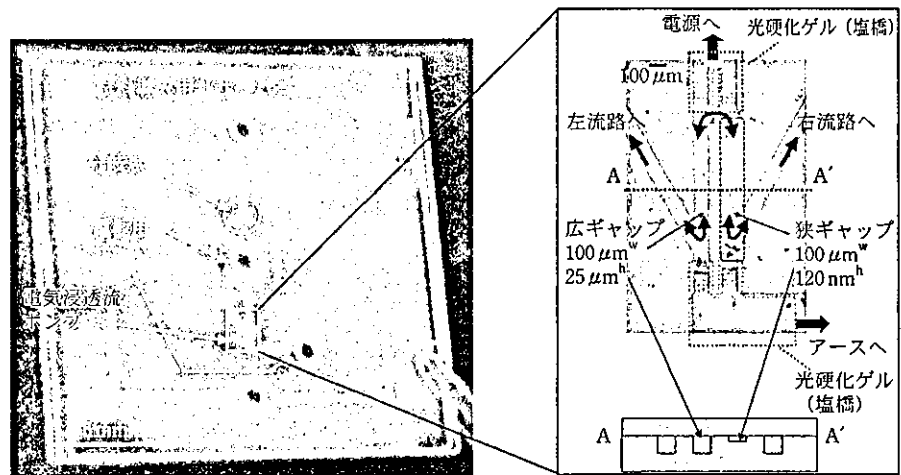


図6 電気浸透流ポンプ(EOF)駆動セルソーターチップとEOFポンプ領域。

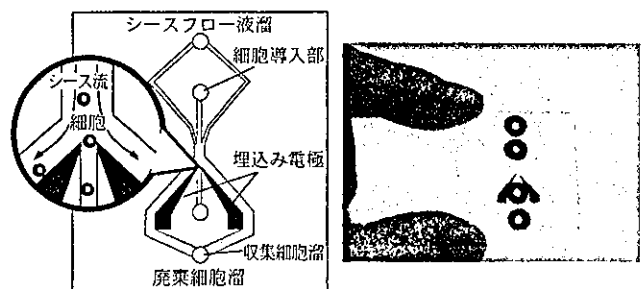


図7 シースフロー型セルソーターチップの分集原理。

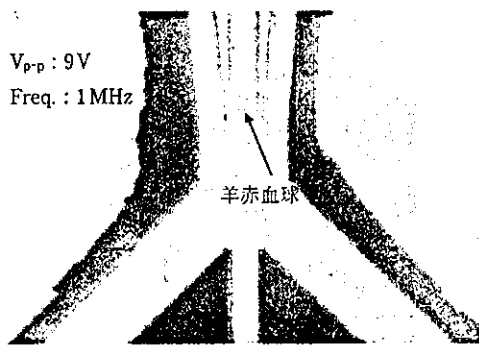


図8 羊赤血球細胞の分集中の写真。

るためには、例えば、分集直前で細胞の形態や蛍光標識などの情報・信号を検出し、廃棄細胞は細胞収集流路の両側の埋め込み電極(図7左図中の黒色領域)に電圧を印加し、誘電泳動で廃棄用流路に導く。電極の埋め込みは、流路内に凹凸をなくし、流れにじょう乱を生じさせないためである。電極細胞も誘電体であり、電極への電圧印加により容易に分集される。もちろん、細胞には電界が印加され、活性を失うと考えられるが、不必要な細胞だけ分集され、生きた細胞は電界の影響を受けず分集される。図8は羊赤血球細胞の分集中の様子を示す¹⁵⁾。

6. ナノピラーを用いた DNA 高速分離チップ

DNA 分離は、従来、キャピラリゲル電気泳動(capillary electrophoresis; CE) が用いられてきたが、チップを用いたシステムによって、CE で印加される電力によるジュール加熱問題が解決され、さらに高速化も果たした。しかし、ゲルの高密度装填は容易でなく、Craighead¹⁶⁾らは、エントロピック・トラップという方法を考案した。これは、広い領域と狭いまたは障害物のある領域を形成すると、長塩基対 DNA は前者では丸くなり、すなわち高エントロピーを有し、後者に入ると小エントロピーを有する。例えば、ピラーのような障害物に DNA が入ると、低塩基対 DNA はそのまま伸張してくぐり抜けるが、高塩基対は先端がピラー領域に入っても、広い領域に残っている尻尾部分が高エントロピー状態になるためピラー領域を通過するのに時間が要するため、結果として分離が可能になる。一方、長鎖の DNA は種々の情報を有するのでその分離が試みられているが、本方法で直流電界を用いた場合には数百塩基対の分離が限度で、100 K 塩基対以上の長鎖 DNA の分離はパルス電界を用いて行われてきた¹⁷⁾。われわれも、ピラー中で DNA が伸張する現象に興味を抱き、図9に示すような 200 nm の間隔、深さ 5 μm のナノピラーを石英基板に作製した。本作製では、電子ビーム露光で 200 nm 径の孔を空け、その中に Ni を通電メッキし、これをマスクにプラズマエッチングを行った¹⁸⁾。T4 DNA (168 kbp) を電気泳動分離したところ、図10に示すようにピラーに引っかかり、その後伸長し、ピラーから外れると丸まることを見いだした。そこで、T4 DNA と λ DNA (48 kbp) の混合を分離したとこ

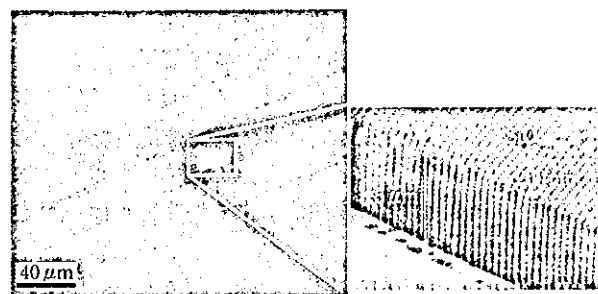


図9 石英基板に作製したナノピラーとその流路写真。

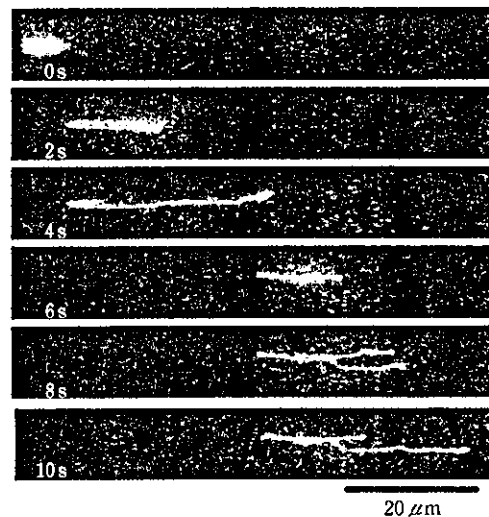


図10 T4 DNA がナノピラー中で電気泳動する様子。

ろ、ゲル CE では数時間要するが、わずか 25 秒で分離することに成功した。さらに、DNA はピラーのない領域では丸まっているが、ピラー領域に進入するとき、伸長するまでのコンフォメーション変化に時間遅れが生じると考え、ピラーのない領域とある領域を交互に並べることを考案した。その結果、1 kbp から 30 kbp の短鎖 DNA も分離可能なことも見いだした。しかし、これらの短鎖 DNA の慣性半径 (gyration radius) はピラーの 200~5000 nm の間隔から比べればその 1/10 以下であり、なぜ分離されたかは現在明確でなく、ピラー流路の両端に印加した電圧から生じる電気力線は、絶縁体のピラー中は通らず、ピラー間に分布する電気力線による誘電泳動や μm ~nm 寸法の流路では水の粘性が向上するなどの効果を考えなければならない。一方、これらの知見を基に研究を展開すれば、ピラーサイズや間隔、構成などパラメーターを変化させてチャンネル形成することにより、近い将来 10^6 ~ 10^9 塩基対 DNA の高速分離チップが実現すると期待される。

7. パーマロイ製流路と磁気ビーズを用いたアフィニティアッセイチップ

近年、表面を特定の官能基で修飾した磁気ビーズがたんぱくなどの生体分子の分離、精製に用いられている。特定

の生体分子種を操作するための有効な手段として確立された磁気ビーズ技術を用いて、パーマロイ製微細パターンによるアフィニティアッセイデバイスを開発した^{19,20)}。本デバイスの作製にはCO/H₂/Arプラズマを使ったパーマロイ薄膜エッチング技術を応用した。CO添加は、パーマロイ表面上のカルボニル化合物生成による炭素または一酸化炭素の消費によりCrマスクに対する高選択比に寄与し、H₂添加は、化学スパッタによる炭素膜の除去と膜たい積の前駆体種の希釈と考えられる。さらに、Ar⁺イオン衝撃がエッチング生成物の除去を促進する。

デバイス作製で、厚さ500 nmのパーマロイを、30×30×0.5 mmのホウケイ酸ガラス基板上にスパッタ成膜し、続いて、ガラス基板上で局所的に強い磁場を発生させるためにパーマロイ薄膜を微細形状に加工した。最後にPDMS (poly(dimethylsiloxane))製のマイクロ流路を有するエラストマーシートを、パーマロイ微細パターンが流路直下に配置するように位置合わせしてガラス基板上に張りつけた。

アフィニティによる生体分子のビーズ捕集のモデル実験には、直径2.8 μmの磁気ビーズ (Dynabeads) に、PEG (poly (ethylene glycol))-b-PAMA (poly (allyl) methacrylate) を修飾したビオチン化磁気ビーズを用いた。ターゲット分子となるストレプトアビジンは、テキサスレッドで蛍光標識して光学観察を容易にした。チップの動作評価は以下の手順で行った。まず、ビオチン化磁気ビーズを、微量の界面活性剤を入れた液中に浮遊させ、試作デバイスに注入した。次に、電磁石を用いてパーマロイ微細パターンに磁力線を導入し、パーマロイパターン対で挟まれた流路に局所的に強い磁場を発生させた状態で、マイクロ流路内に磁気ビーズを流し込むと次々にパーマロイパターンの間にビーズが捕捉された(図11(a))。なお、捕捉されたビーズは電磁石をオフにすると開放されるため、試料の回収が可能である。最後にストレプトアビジン水溶液をサンプル導入口より注入し、ストレプトアビジンの挙動を、蛍光顕微鏡により観察した。強い蛍光発光が観測され、マイクロ流路内に固定した磁気ビーズ上でターゲット分子であるストレプトアビジンが固定されていることが確認できた(図11(b))。

8. 今後の展望

PDMSなど接着が難しい高分子板も酸素プラズマ処理で簡単に解決するが、ポンプやバルブなどの部品に应用されるSi深堀構造はプラズマプロセスで初めて達成される。本構造の特長は流路の表面積を大幅に増加させることができ、内壁に抗原や抗体を担持させることにより高感度なアフィニティアッセイに適用できる。このSi深堀エッチングは、金型加工では達成できないナノ幅の高アスペクト構造を含む鋳型の作製にも活躍する²¹⁾。また、リソグラフィとエッチングやFIB加工のトップダウン手法を用いて作成されたナノ流路の研究も始まっている。ナノ流路では低イ

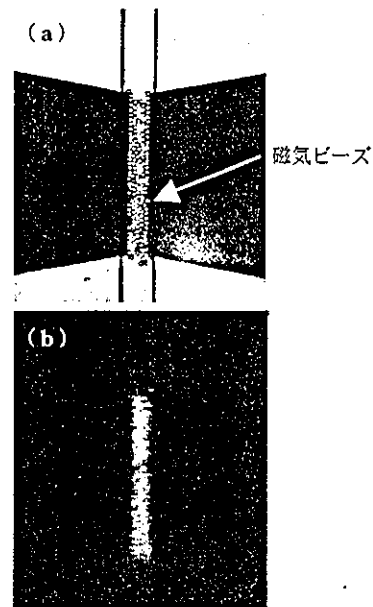


図11 (a)パーマロイ薄膜流路に捕捉された磁気ビーズ、(b)蛍光顕微鏡により検出された磁気ビーズ上のストレプトアビジン。

オン強度電解液中では電気二重層が重なり合って、中心部分の速度が内壁付近より大きくなり、界面電動(electrokinetic)現象が支配的になり、不均一なEOF効果によるDNAの分離も報告されている²²⁾。さらに、ナノ流路では粘性が極端に大きくなり²³⁾、ナノ空間における新物性の発見も期待される。一方、プラズマ重合膜やグラフト重合膜は無機表面への官能基の導入や機能膜の生成に大きな力を発揮する²⁴⁾。現在、プラズマプロセス研究者もバイオ応用にシフトし始め、その応用の拡大が大いに期待される。

謝辞

本稿の執筆は多くの方の賜物であるが、特に高村 禪(北陸先端科学技術大学院大学)、吉木宏之(鶴岡工業高等専門学校)、馬場嘉信(徳島大学)の各氏に深く感謝の意を表す。

文 献

- 1) Y. Chinzei, M. Ozawa, T. Kikuchi, K. Horioka, H. Shindo, T. Ichiki and Y. Horiike: J. Vac. Sci. Technol. A18, 158 (2000).
- 2) T. Ujiie, T. Kikuchi, T. Ichiki and Y. Horiike: Jpn. J. Appl. Phys. 39, 3677 (2000).
- 3) A. Oki, S. Adachi, Y. Takamura, K. Ishihara, H. Ogawa, Y. Ito, T. Ichiki and Y. Horiike: Electrophoresis 22, 341 (2001).
- 4) A. Oki, M. Takai, H. Ogawa, Y. Takamura, T. Fukazawa, J. Kikuchi, Y. Ito, T. Ichiki and Y. Horiike: Jpn. Appl. Phys. 42, 3722 (2003).
- 5) T. Ichiki, S. Takayanagi and Y. Horiike: J. Electrochem. Soc. 147, 4289 (2000).
- 6) T. Ichiki, Y. Sugiyama and Y. Horiike: J. Photopolymer Sci. Technol. 15, 311 (2002).
- 7) T. Ichiki, Y. Sugiyama, T. Ujiie and Y. Horiike: J. Vac. Sci. Technol. B 21, 2188 (2003).
- 8) K. Seiler, Z.H. Fan, K. Fluri and D.J. Harrison: Anal. Chem. 66, 3485 (1994).

- 9) Y. Takamura, H. Onoda, H. Inokuchi, S. Adachi and Y. Horiike: *Electrophoresis* 24, 185 (2003).
- 10) Patent 5501893, Method of anisotropically Etching Silicon.
- 11) T. Kuriyagawa, Y. Tezuka, T. Fukasawa, Y. Takamura and Y. Horiike: *Proc. of Intern. Symp. on Dry Process, Nov., Tokyo*, p.117 (2001).
- 12) R.B.M. Schasfoort, S. Schlautmann, J. Hendrikse and A. van den Berg: *Science* 268, 942 (1999).
- 13) H. Yoshiki, A. Oki, H. Ogawa and Y. Horiike: *Thin solid films* 407, 156 (2002).
- 14) H. Onoda, Y. Takamura and Y. Horiike: *Proc. of Micro Total Analysis Systems 2002, Y. Baba, S. Shoji, A. van den Berg (Eds.)*, p. 955 (Kluwer Academic Publishers, 2002).
- 15) T. Ichiki, T. Ujiie, T. Hara, Y. Horiike and K. Yasuda: *Proc. of Micro Total Analysis Systems 2001, J. M. Ramsey and A. van den Berg et (Eds.)*, p. 119 (Kluwer Academic Publishers, 2001).
- 16) J. Han and H. G. Craighead: *Science* 288, 1026 (2000).
- 17) O. Bakajin, T. A. J. Duke, R. H. J. Tegenfeldt, C-F. Chou, S. S. Chan, E. C. Austin and E. C. Cox: *Anal. Chem.* 73, 6053 (2001).
- 18) N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike and Y. Baba: *Anal. Chem.* 76, 15 (2004).
- 19) N. Ichikawa, F. Omasu, Y. Nagasaki and T. Ichiki: *Proc. of Int. Conf. on Solid State Dev. and Mater. (SSDM 2003)*, Sept., Tokyo, p. 680 (2003).
- 20) N. Ichikawa, F. Omasu, Y. Nagasaki and T. Ichiki: *Proc. of 25th Int. Symp. on Dry Process, Oct., Tokyo*, p. 69 (2003).
- 21) R. A. Buser: *Proc. of Micro Total Analysis Systems 2003, J. M. Ramsey, M. A. Northrup, K. F. Jensen and D. J. Harrison (Eds.)*, p. 1073 (Kluwer Academic Publishers, 2003).
- 22) N. J. Petersen, J. P. Alarie, S. C. Jacobson and J. M. Ramsey: *Proc. of Micro Total Analysis Systems 2003, M. A. Northrup, K. F. Jensen and D. J. Harrison (Eds.)*, p. 701 (Kluwer Academic Publishers, 2003).
- 23) A. Hibara, T. Saito, H-B. Kim, M. Tokeshi, T. Ooi, M. Nakano and T. Kitamori: *Anal. Chem.* 74, 6170 (2002).
- 24) S. Kurosawa, H. Aizawa, M. Nakamura and J. W. M. Park: *Measure. Sci. Technol.* 14, 1882 (2003).

(2004年1月27日 受理)

用語の解説

電気泳動、**電気浸透流**および**ゼータ電位**：石英を用いた場合、表面を覆っているシラノール基の水素が電解液中に溶け、石英表面は負電位になり、液中のカチオンが表面に集まり固定層からなる電気二重層を形成する。この固定層を形成する電位をゼータ電位と呼ぶ。固定層の外側にカチオンが拡散し、負電圧を印加すると、拡散しているカチオンが負電圧方向に引き寄せられ、粘性により電解液も移動する。これを電気浸透流と呼ぶ。したがってポンプを形成できる。一方、電気泳動 (electrophoresis) とは、電解液中のカチオンやアニオンのそれぞれが負と正の電位の方向に移動する現象である。

誘電泳動：電界とそれにより誘導された電気双極子モーメントとの相互作用により、電界の強い方へ、または弱い方へと粒子が駆動される現象である。



ほりいけ やすひろ
堀池 靖浩

1968年早稲田大学理工学研究科修了。同年東京芝浦電気(現東芝)入社。88年広島大学工学部教授。93年東洋大学工学部教授。98年東京大学大学院工学系研究科教授。03年独立行政法人物質・材料研究機構生体材料研究センターフェロー。極端紫外線露光システム技術開発機構(EUVA)顧問。工学博士。



いちき たかのり
一木 隆範

1995年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了。博士(工学)。東洋大学工学部助手、講師、助教授を経て、04年2月より東京大学大学院工学系研究科総合研究機構助教授。02年より科学技術振興機構さきがけ研究を兼任。バイオ分析デバイス、プラズマプロセス工学などの研究に従事。



おき あさお
沖 朝男

1998年北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科博士後期課程中途退学。99年東京大学大学院工学系研究科技官。同時多項目診断ヘルスケアチップの創製研究に従事。03年独立行政法人物質・材料研究機構生体材料研究センターNIMSポスドク。博士(工学)。