



# 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  $\mu$ -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  $\text{SiO}_2$  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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>、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  $\mu$ -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<sup>3,4)</sup>。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  $1 \mu\text{m}$  程度であるのに対し、マイクロ流路

は幅数十  $\mu\text{m}$  と広いが、深さも数十  $\mu\text{m}$  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、 $\text{Cl}_2/30\%\text{O}_2$  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<sup>5)</sup>。また、後者の経時変化を抑えるために、 $\text{C}_2\text{F}_6$  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  $90^\circ\text{C}$ 、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、 $\text{SiO}_2$  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)

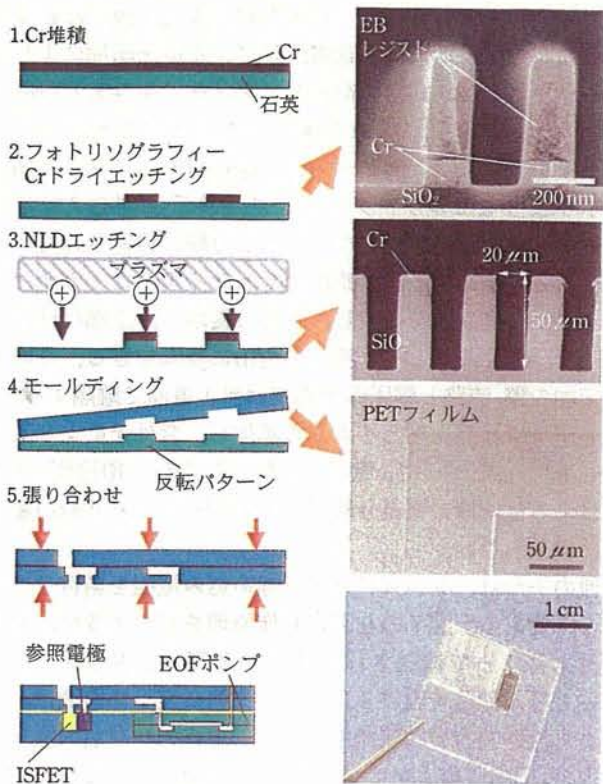


図1 初期のヘルスケアチップの作製プロセス。形成された各パターンも添付した。

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  $10\text{ nm}$  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<sup>6,7)</sup>。

### 3. 電気浸透流ポンプ

$\mu$ -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<sup>8)</sup>、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

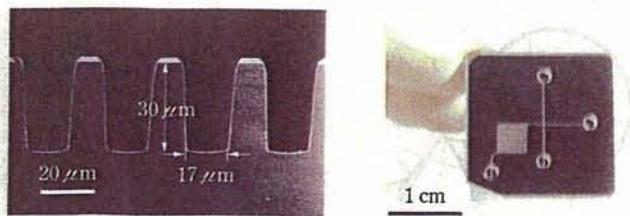


図2 バイレックスへの高アスペクト比の流路形成とチップ写真。2枚のガラスは a-Si を介して陽極接合で貼り付けられた。

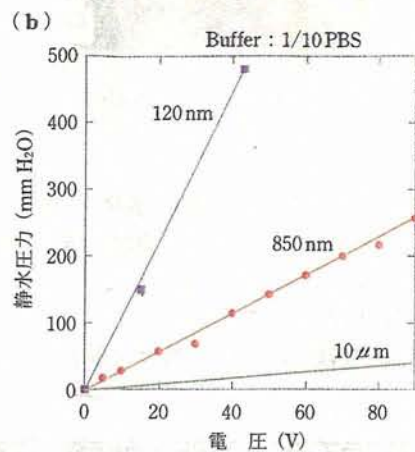
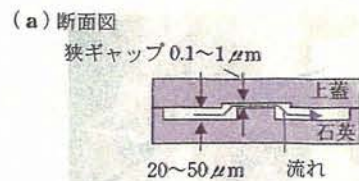


図3 低電圧駆動電気浸透流ポンプ。(a)は断面図、(b)はギャップ変化に対する静水圧と印加電圧特性。

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、 $120\text{ nm}$  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、-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<sup>9)</sup>。

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<sup>10)</sup> 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内壁へのフッ化炭素重合膜のたい積、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<sup>11)</sup>。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

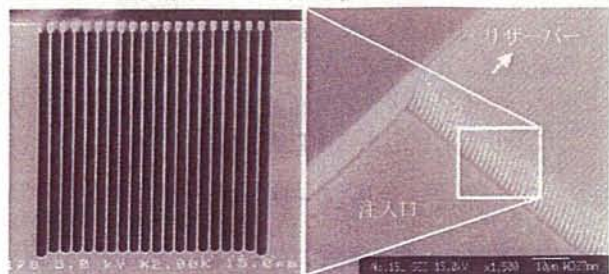


図4 改良 Bosch 法による Si の深堀構造と EOF ポンプ。

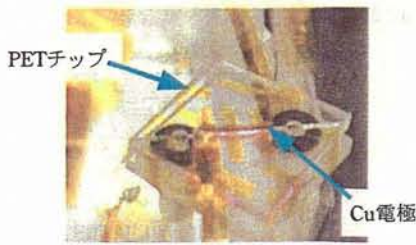


図5 PET板に形成した流路内に生じた大気圧マイクロプラズマ。

(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-FET<sup>12)</sup>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%O<sub>2</sub>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%O<sub>2</sub>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<sup>13)</sup>。

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)+O<sub>2</sub>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<sup>14)</sup>。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<sup>9)</sup>。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

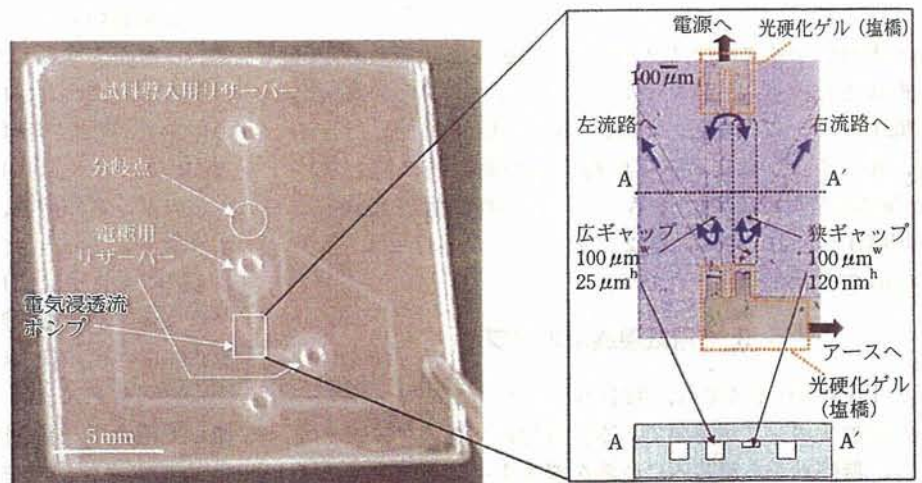


図6 電気浸透流ポンプ(EOF)駆動セルソーターチップとEOFポンプ領域。

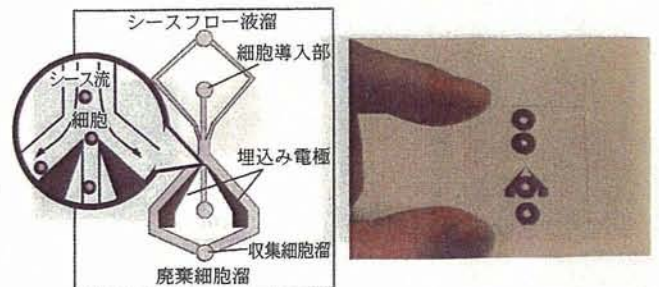


図7 シースフロー型セルソーターチップの分集原理。

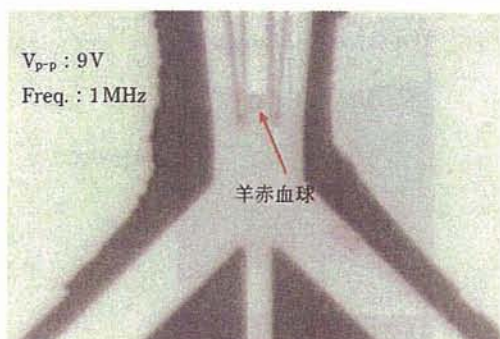


図8 羊赤血球細胞の分集中の写真。

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<sup>15)</sup>。

## 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、Craighead<sup>16)</sup>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<sup>17)</sup>。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  $\mu\text{m}$  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<sup>18)</sup>。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  $\lambda$  DNA (48 kbp) の混合を分離したとこ

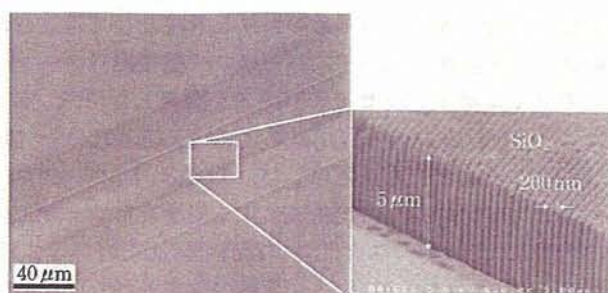


図9 石英基板に作製したナノピラーとその流路写真。

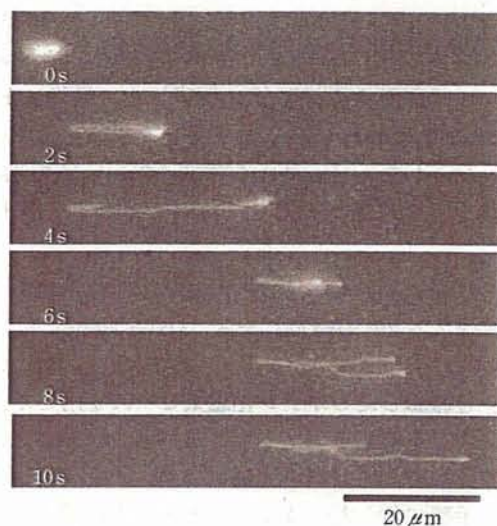


図10 T4 DNA がナノピラー中で電気泳動する様子。

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  $\mu\text{m}$ ~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 10~10<sup>6</sup> 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<sup>19,20</sup>。本デバイスの作製にはCO/H<sub>2</sub>/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、H<sub>2</sub> 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<sup>+</sup> 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徐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応用される 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<sup>21</sup>。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。ナノ流路では低い

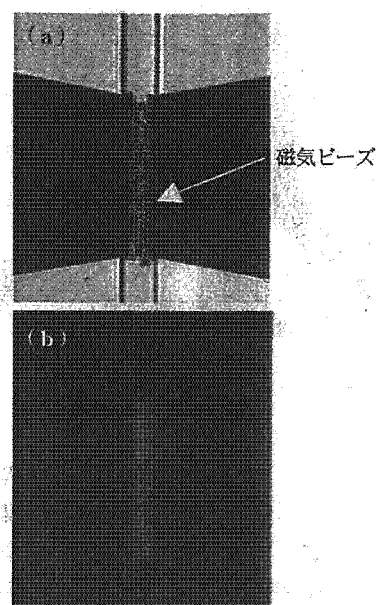


図 11 (a)パーマロイ薄膜流路に捕捉された磁気ビーズ、(b)蛍光顕微鏡により検出された磁気ビーズ上のストレプトアビジン。

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<sup>22</sup>。さらに、ナノ流路では粘性が極端に大きくなり<sup>23</sup>、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<sup>24</sup>。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リコン酸水素の電解液中に浸け、石英表面は負電位となり、液中のカチオンが表面に集まり固定層と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 あきお  
**沖 明男**

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)。

昭和22年8月26日第三種郵便物認可  
電気学会誌 124巻4号  
平成16年4月1日発行(毎月1回1日発行)  
平成16年3月20日印刷 ISSN 1340-5551

# 電気学会誌

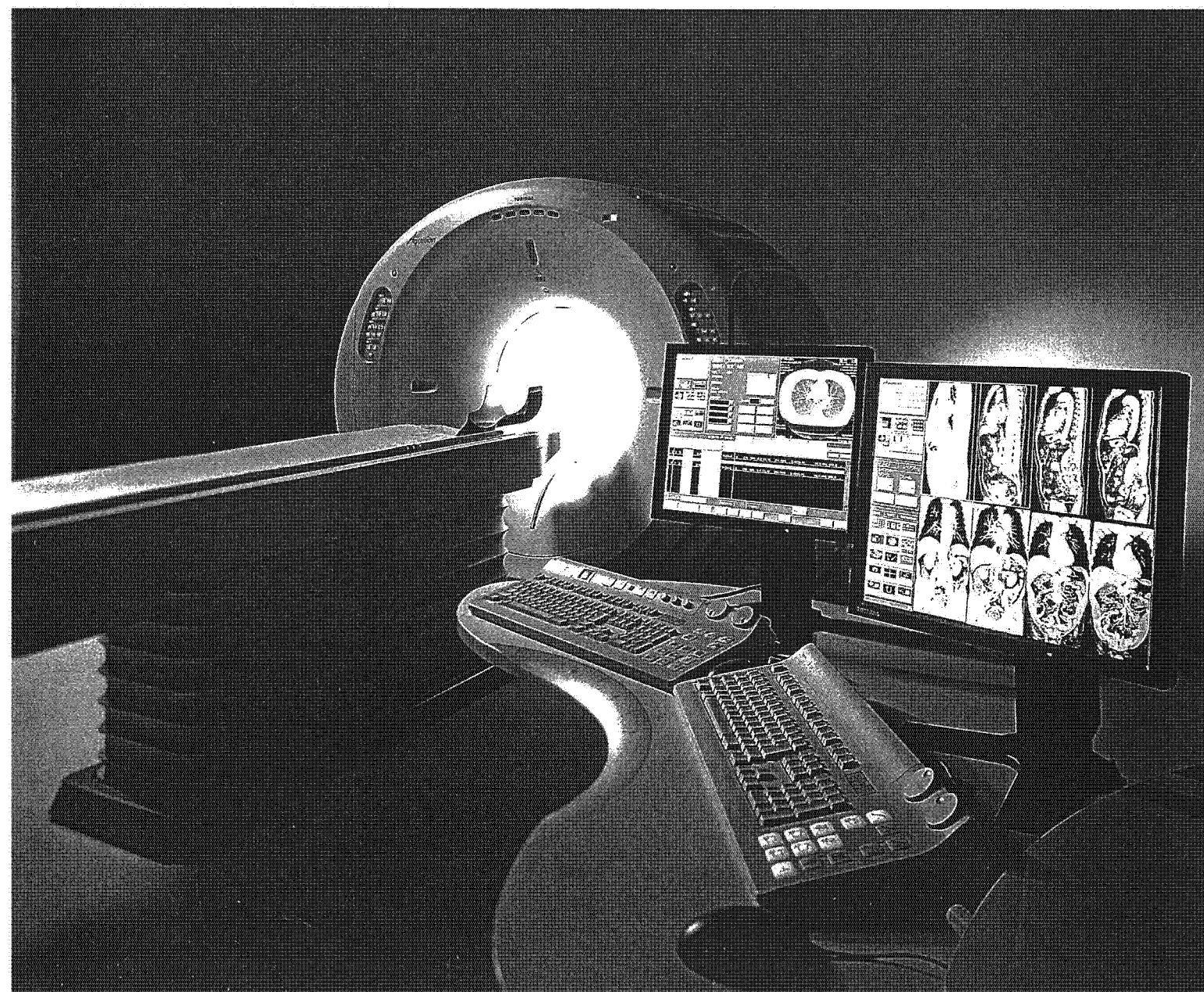
2004  
Vol. 124

4

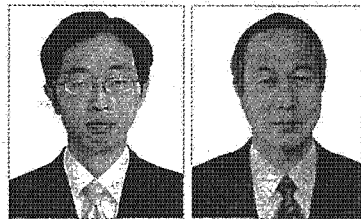
The Journal of The Institute of Electrical Engineers of Japan

## 大特集 医療と電気工学

本会ホームページ <http://www.iee.or.jp>



# 医療用バイオチップの現状と将来展望



沖 明男 堀池 靖浩



バイオチップ, Micro Total Analysis System ( $\mu$ TAS)  
 新たな疾患マーカーの探索, テーラーメイド医療, 在宅診断・治療

## 1. はじめに

近年、半導体の微細加工技術を用いてDNA、タンパク、酵素、抗体などの生体分子や細胞、バクテリアなどを分析するシリコン、ガラス、ポリマー基板製デバイス、いわゆるバイオチップの開発が活発になってきている。現在、我が国が置かれている先進国の中でもまれに見る急速な少子高齢化の状況の中で、いかに激増する医療費を抑制し高齢者の生活の質 (QOL: Quality of life) を向上していくかという課題に対する一つの解決策を、このバイオチップがもたらすとして注目を集めている。これまでの医療は発症後の疾患を治す「治療する医療」が中心であったが、医療費の削減やQOL向上の観点から、21世紀は発病を未然に防ぎ健康増進を図る「予防のための医療」へと重点が移ると予想される。「在宅診断・治療」、「新たな疾患マーカーの探索」、「テーラーメイド医療 (個人の体質, 病状に合わせた投薬, 治療)」がキーワードであるが、バイオチップはこれらに対して大きな威力を発揮する可能性を持っている。本稿ではバイオチップとは何か、そしてバイオチップ開発技術の現状と医療応用について述べる。

## 2. バイオチップとは

バイオチップとはDNA、タンパク、酵素など生体分子や細胞を支持体に固定化し、その固定化された生体分子と調べたい生体分子やそのほかの物質とを接触させて、生じ

た特異的な相互作用を大量に同時並列的に検出し解析するものをいう<sup>(1)</sup>。バイオチップの解析対象はさまざまあり、例えばDNAを構成する4種の塩基 (グアニン(G), チミン(T), シトシン(c), アデニン(A))配列を解析するバイオチップをDNAチップ、タンパクの検出やタンパク同士の相互作用を解析するバイオチップをプロテインチップと呼んでいる。図1に主なバイオチップを列挙した。また、半導体微細加工技術を用いてシリコン、ガラス、ポリマー基板上に100  $\mu$ m程度以下の微小流路を形成し、この微小空間の中で対象物質の分離、生成、反応、検出までを一括して行う、 $\mu$ TAS (Micro Total Analysis System)あるいはLab on a chipの分類されるチップがあるが、検出物質がDNA、タンパクなどの生体分子であれば、本稿ではこれもバイオチップとして含めることとした。これら生体分子解析をチップ化することのメリットは、微量な試料で大量の解析を同時に行えること、システムを小型化できるため省スペース化が可能で、さらには分析装置そのものを携帯することも可能なこと、試薬の省量化、廃棄物の減量による解析コスト削減が期待できることである。

## 3. バイオチップ技術の現状

### 3.1 DNAチップ

DNAチップの解析原理を図2に示す。ガラスやポリマーなどの支持体上に、異なる塩基配列の一本鎖DNAの断片を多種類固定化しておき (プローブDNA)、そこへ調べたい塩基配列の一本鎖DNA (ターゲットDNA)断片

おき・あきお 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。1999年東京大学大学院工学系研究科技官。2003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。同時多項目診断ヘルスケアチップ創製研究に従事。工学博士。

ほりいけ・やすひろ 1968年早稲田大学理工学研究科修了。同年東京芝浦電気(株)(現(株)東芝)入社。1988年広島大学工学部教授。1993年東洋大学工学部教授。1998年東京大学大学院工学系研究科教授。2003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。集積回路プロセス、バイオチップ創製研究に従事。工学博士。

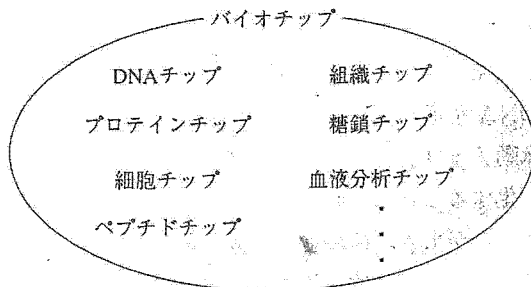


図1 主なバイオチップ



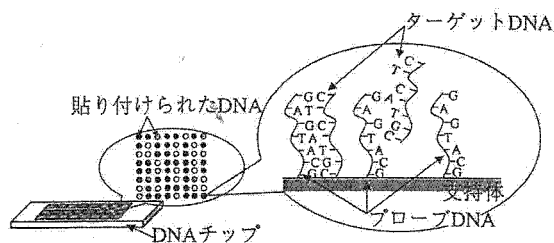


図2 DNAチップの解析原理

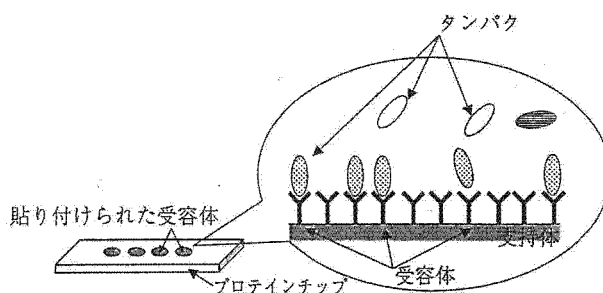


図4 プロテインチップの解析原理

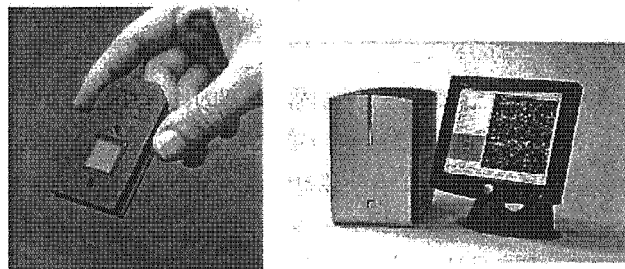


図3 DNAチップと読み取り装置<sup>(2)</sup>

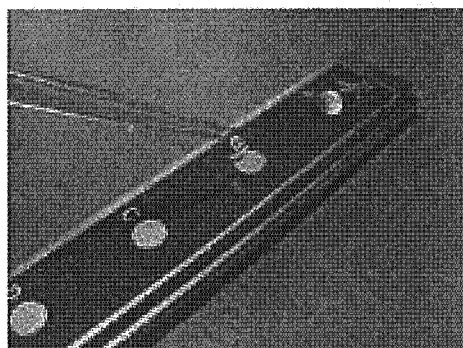


図5 プロテインチップ<sup>(3)</sup>

を接触させると、アデニンはチミンと、グアニンはシトシンとのみ結合するので、ターゲットDNAと相補的なプローブDNAだけが二重らせんを形成する（ハイブリダイゼーション）ことを利用する。プローブDNAの長さは数百～数千bp（塩基対）程度である。ターゲットDNAにはあらかじめ蛍光色素で標識しておいて、二重らせんを形成した時のみ蛍光を発するようにすれば、ハイブリダイゼーションの有無を検出することができる。プローブDNAを支持体上に固定化する方法としては、細い針の先端にプローブDNAを付着させたのち支持体上に貼り付けるスポットティング法や、半導体製造技術である光リソグラフィーを応用してプローブDNAを作製する光リソグラフィー法によって、1枚のチップに数千～数万種類のプローブDNAを固定化する。主なDNAチップメーカーは海外では最大手のアフィメトリクス（アメリカ）、アジレントテクノロジー（アメリカ）、国内では日立ソフトウェアエンジニアリング、タカラバイオ、東洋紡、オリンパスなどがある。図3にDNAチップとスキャナと呼ばれる読み取り装置を示す。

一般にDNAチップというと上述のアレーチップのことを指すが、数センチ程度の基板の上に微細加工技術でマイクロ流路（マイクロキャピラリー）を形成し、マイクロ流路内でDNAを電気泳動させてサイズ分離するキャピラリー電気泳動チップというものもある。キャピラリー電気泳動をチップ化することにより、従来の方法に比べ格段に高速分離することができ、微細加工技術を駆使してマイクロ流路内にさまざまな構造体を作ることによって分離機能を高めることもできる。最近では、細胞からDNAを取り出して前処理

を行った後、検出可能な量までDNAを増幅し、電気泳動分離までを一つのチップで行うという研究もなされている。

### 3.2 プロテインチップ

プロテインチップには、(1)タンパクそのものの存在を検出する用途で用いるチップ、(2)タンパク-タンパク間やタンパク-核酸間などの相互作用を検出するために用いるチップとがある。(1)のプロテインチップの検出原理を図4に示す。支持体上に特定のタンパクを認識して特異的に結合する受容体と呼ばれるものを多種類固定化し、そこへ存在を調べたいタンパク（ターゲットタンパク）を含むサンプルを接触させる。ある特定の受容体のみターゲットタンパクは補そくされるため、それを観測すればターゲットタンパクの有無が分かるというものである。タンパクに特異的に結合する受容体としては、抗体という免疫反応で重要な役割を担う分子がよく用いられる。一方の(2)のプロテインチップは、支持体に非常に多種類のタンパクを固定化し、網羅的にタンパク間やタンパク-核酸間の相互作用を解析する。いずれのプロテインチップも、検出にはDNAチップの場合と同様にターゲットタンパクを蛍光色素で標識する方法や、補そくされたタンパクからのシグナルを酵素を使って増幅する方法がある。しかし、ターゲットタンパクを直接標識するとタンパク自身の性質を変えてしまう場合もあり、タンパクを直接標識しない方式も開発されている。例えば、質量分析法や表面プラズモン共鳴

(SPR: Surface Plasmon Resonance) である。質量分析法は、定量性については標準サンプルとの相対比較になるが、タンパクの同定を同時に行うことができる。また SPR は、結合したタンパクをリアルタイムで高感度に測定できる。プロテインチップのメーカーはサイファージェン(アメリカ)、ザイオミックス(アメリカ)などである。図5にプロテインチップの一例を示す。

### 3.3 細胞チップ

細胞チップと呼ばれるものには、微小流路内に細胞を流して分析するフロータイプと、多数の微小領域内に細胞をそれぞれ1個もしくは少数個配置して分析するアレータイプのものがある。細胞チップの用途は、細胞培養、細胞分別、細胞内の目的分子を取り出すための細胞融解などさまざまあり、個々の細胞生物学的分析を行う。シリコン製の微小容器の中に細胞を配置して薬物に対する毒性評価を行ったり、マイクロチャネル中で細胞の種類によって細胞を分けるセルソート(細胞選別)を行っている例がある。

### 3.4 血液分析チップ

血液中の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  の電解質、グルコース、乳酸、尿素窒素、コレステロール、クレアチニンなどを測定する。実用化されている血液分析チップを検出方法で大別すると電気化学的に測定するチップと光学的に測定するチップがある。電気化学的方法は、1 mm~100  $\mu\text{m}$  程度の微小電極上に特定イオンに高い選択性を示す高分子膜を使ったイオンセンサや、酵素固定化膜を使ったバイオセンサを用いて測定する。一方の光学的に検出する方法は、凍結乾燥させた血液分析用試薬を含むフィルムに血液を点着しその発色を分光学的に計測する(ドライケミストリー)。ここでは電気化学測定血液分析チップのみについて述べる。検出部であるイオンセンサは、一般的には微小電極をリソグラフィ技術やスクリーン印刷技術などを用いて形成し、イオノフォアと呼ばれる特定のイオンを選択的に捕そ

くする分子を含む高分子膜を電極の上から密着させて作製する。イオン濃度測定は、このイオンセンサとマイクロサイズの参照電極との電位差を測定することにより行う。糖尿病患者の増加によって需要が増えているグルコースセンサは、グルコースオキシダーゼと呼ばれる酸化酵素固定化膜を微小電極上に形成して作製する。グルコースが酵素膜中で酸化されて生成する過酸化水素の濃度を電極で検出してグルコース濃度を測定する。上述したバイオチップ以外にも、各種生体組織をアレー化した組織チップや、複数のアミノ酸が結合したペプチドをアレー化したペプチドチップ、細胞表面に多数ある糖鎖(グルコースのような糖が鎖状に連なったもので、病気や感染症にかかわっている分子)と抗体の相互作用などを調べる糖鎖チップなどがある。

## 4. バイオチップの医療応用

バイオチップの医療応用研究として戦略的に進められているのは、健康な人と患者群をそれぞれ比較してガン、糖尿病、高血圧などの疾患に特有の遺伝子やタンパクを探索することと、これらの関連付けられた疾患と遺伝子、タンパクの関係をデータベースとして構築し、これをもとに病気の診断・治療、創薬に利用することである。例えば、疾患などにより遺伝子の発現(遺伝子が mRNA という情報伝達物質に転写されタンパクへと翻訳されていく過程)状況が変化することから、DNA チップを使って病気を診断することができる。また薬の効きやすい人とそうでない人といった体質は、DNA の塩基配列の中でわずかな塩基の違いが体質などの個人差をもたらすといわれており、これが解析できると病気に対する感受性や薬の効きやすさがあらかじめ分かるため、個々の患者の体質に合った副作用の少ない薬を作ることもできるようになる。プロテインチップはもっと直接的で、遺伝子の発現レベルと最終的に生成されるタンパクとの間には、必ずしも1対1の相関関係があるわけではないため、疾患に由来するタンパクをチップで検出し、診断・治療に役立てることを目指している。血液分析チップについては、健康診断や病院での血液検査でなじみのある方も多いと思われるが生体内機能、各臓器の状態を反映する血中の電解質、グルコース、コレステロールの濃度や、GOT, GPT などの酵素活性を、微量の血液から測定することができる。血液分析チップは実際に臨床現場ですでに用いられていて、例えば i-STAT は、100  $\mu\text{l}$  の全血をカートリッジと呼ばれるチップの中に導入して測定器にかけると、8項目程度の測定を校正から結果表示まで約2分で完了する。用途は医療機関での手術室やベッドサイドにおける血液モニターであり、中央検査室に設置され

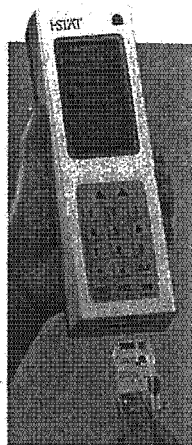


図6 血液分析チップの実用例<sup>(4)</sup>

る従来の自動分析装置に比べて迅速である、メンテナンスフリーなどの利点を有する。図6にi-STATのカートリッジと分析装置を示す。これはバイオチップの特長を生かした一つの実現例といえる。

## 5. 医療用バイオチップの最近開発状況

DNAチップについては、チップと分析装置がまだ高価であるために、将来の臨床診断に用いられることが予想されるが、現段階では研究機関での使用にとどまっている。そこでチップを安価で大量に製造するための技術が近年開発されてきている。例えば、DNAのハイブリダイゼーションを検出する手法に蛍光色素を使わずに、DNA二本鎖の間に入り込むインターカレタを使って電気化学的に検出するECA (Electro Chemical Array) チップや、インクジェットプリンタの印刷技術を応用してプローブDNAを基板に貼り付けるDNAチップ、中空繊維にプローブDNAを固定化して作製する繊維型DNAチップなどである。また、DNAチップの特性を決めるチップ表面の改質やプローブDNAの固定化密度の向上など基盤となる技術は着実に進展してきている。プロテインチップの方はまだ実用的なものが数少ない。その理由はタンパクがDNAに比べて性質が複雑であり、3.2節で述べた抗体のような受容体をなるべく多種類探し出し、それぞれに適した安定な固定化法を見つけなければならないためである。最近抗体以外の新しい受容体も開発されてきており、より高感度の検出方法の開発などと合わせていくつかの課題が解決されれば、DNAチップを凌ぐ強力なツールとなり得る。血

液分析チップの分野では、将来の在宅診断への必要性から、低侵襲で確実に採血を行う技術が一つの鍵である。そこで微細な採血針を有する多項目同時診断チップの開発が現在進められている。

## 6. 将来展望

健康・疾病に関する生体物質を可能な限り分離・分析する、安価で使い捨て型バイオチップを創製するためには、半導体微細加工技術や量産技術といった我が国が得意とする技術が不可欠であり、さらに異分野との密接な連携により、近い将来、病院の検査機能をワンチップ化することも夢ではない。ワンチップで瞬時に多項目同時計測が可能になると、モバイル端末とITネットワークを通じて診療機関に蓄えられた多くの人のデータを参照することにより、在宅で日々の健康・病状を診断できる時代が到来すると期待される。2005年までに世界最先端のIT国家となることを目指して高速ネットワーク整備が進んでいるが、医療ITネットワークの実現のためにも、末端デバイスである医療用バイオチップの開発が急務である。

(平成16年1月22日受付)

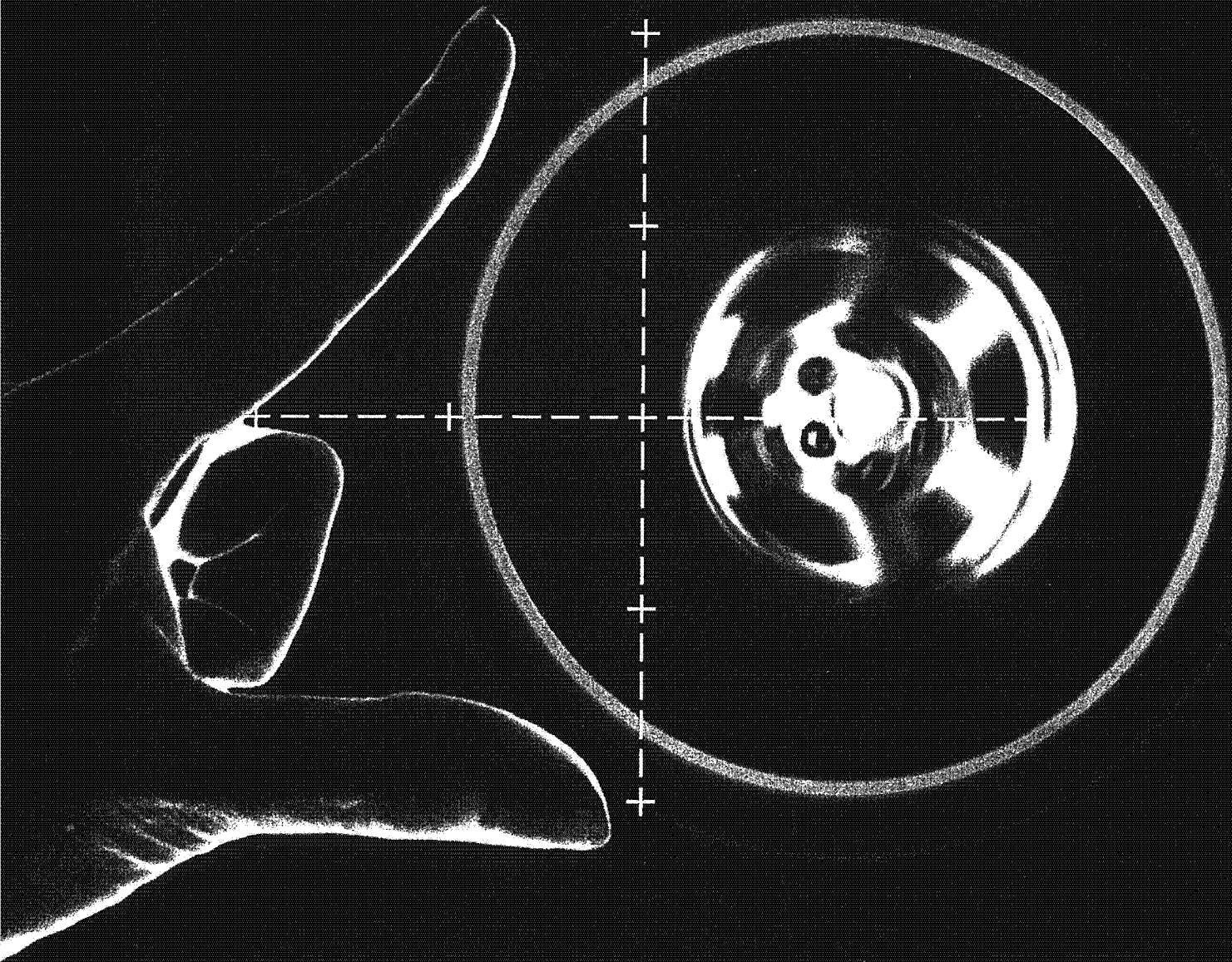
## 文 献

- (1) 堀池靖浩・片岡一則共編：バイオナノテクノロジー, p. 101, オーム社 (2003)
- (2) アフィメトリクス社ホームページ (<http://www.affimetrix.com/>)
- (3) サイファージェン社ホームページ (<http://www.ciphergen.com/>)
- (4) アイスタット社ホームページ (<http://www.i-stat.com/>)

Journal  
of Society of  
Automotive Engineers  
of Japan

# 自動車 技術

Vol.58 **7**  
2004



特集 はかる

URL : <http://www.jsae.or.jp/>

# 超の世界

## 無痛針採血による在宅健康診断チップ\*

A Clinical Chip Checking Our Health from Analysis of Blood Collected by a Painless Needle

(独)物質・材料研究機構 堀池 靖浩

Yasuhiro Horike

### 1. はじめに

わが国では近年高齢者層の医療費が増大し社会問題となっている。高齢者が元気で毎日を送るためには予防が大切である。そのためには、微量の採血から在宅で簡便・確実に同時多項目を診断できる種々の診断用バイオチップの開発に大きな期待が寄せられている。この取組みの一貫として、本稿では、ヘルスケアチップと肝機能診断チップについてわれわれの最近の開発状況を述べる。

### 2. ヘルスケアチップ

ヘルスケアチップとは、無痛針を介して血管から極微量血液を採取し、チップ上で遠心分離によって全血の血球成分と血漿成分の分離を行い、血漿成分を電気化学バイオセンサに導いて、pH、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>などの電解質イオン及びグルコース、尿素窒素(BUN: Blood Urea Nitrogen)、クレアチニン、乳酸などの生活習慣病健康マーカーを検出・計測して、在宅でわれわれの健康状態を診断するチップシステムである。

まず、在宅で健康を診断できるためには、痛みを伴わずに素人にも採血できることが不可欠である。痛みは、針を皮膚に穿刺する際、神経網を切断するときを感じる。そこで、外径0.15mmのステンレス製管の先端を10度に研磨し、端面を3面カットし、最後に電解研磨をした。従来の針の外径の1/4程度なので、腕に刺しても痛みは感じない。さらに、粗い管の内壁を特殊な方法で超平滑化した結果、針を皮膚に刺すと自分の血圧だけで採血可能になった。採血量は6 $\mu$ L(1mm<sup>3</sup>×6)。しかし、静脈から採血する際、その所在が見えない場合が多い。そこで、近赤外光(850nm)を照射して血管を可視化した。さらに、針と皮膚表面との間に生じる電位を測定し、針が血管に

到達したことを検出できるようにした。これらの組合せで、液晶ディスプレイ画面を見ながらわれわれでも採血できるようになった。図1は無痛針でディスプレイ画面を見ながらいわば電子的に採血している様子である。

図2はヘルスケアチップの写真であり、材料は安価・使い捨て可能なポリカーボネート製である。本チップは、無痛針、校正液の導入・排出、血液溜め、カーボンやAg/AgClのスクリーン印刷で形成したバイオセンサと参照電極からなり、各部はマイクロ流路で結合している。なお、チップ内流路表面は血球などの付着を抑制し、生態適合化を図るために生体膜表面を覆っているリン脂質膜を人工的に合成したMPCポリマーを塗布してある。校正液のセンサ群への導入は、図中の×(1)を中心に回転し、排出はチップを×(2)を中心に回転して行う。次に図1の採血後の血液溜めをチップに挿入し、×(1)を中心に回転するとチャンネルの下部に血球が、上部に血漿が分離され、血漿中のマーカーをバイオセンサで計測する。現在、pH、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、グルコース、BUNが検出可能である。

### 3. 肝機能診断チップ

肝機能診断チップは、アルコール性肝障害や肝炎など肝機能障害を起こすと壊れた肝細胞から血液中に流出する $\gamma$ -GTP、GOT、GPTの酵素の活性値を血漿から測定する。測定法は、現在の自動血液検査の大部分を占める

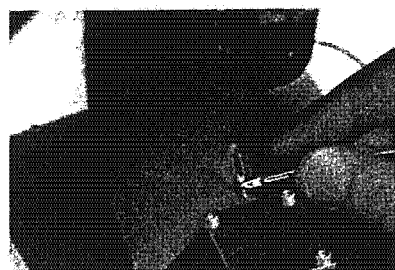


図1 採血者がディスプレイ画面を見ながら無痛針で採血している様子

\* 2004年5月23日受付

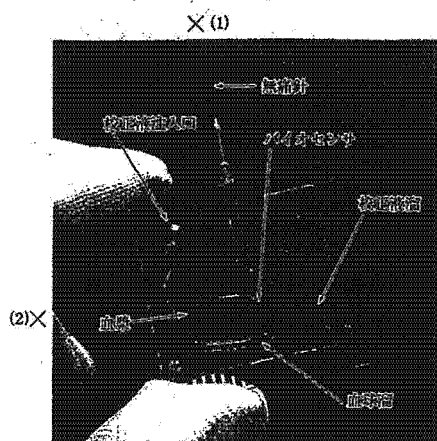


図2 採血針から遠心力で血液をおくり、血球分離後のヘルスケアチップ

測定法の比色法を用いた。比色法では、血清または血漿を基質緩衝液と混合し、たとえば $\gamma$ -GTPの場合は本来含有されている色素の光吸収(405 nm)を、GOTとGPTの場合は基質緩衝液に含まれているNADH(ニコチンアミドジニクレオチド)の光吸収(340 nm)を各酵素活性値に対して測定する。そのため、血漿と基質緩衝液を正確に秤量し、均一に混合することが必須である。しかし、一般にマイクロ流路内では溶液は層流(流体が層をなして秩序正しく流れる状態)となり混合は困難である。そこで多段マイクロミキサという新混合法を開発した。本方法は、2種の溶液を壁と衝突させ、狭い流路で効率良く分子拡散を行い、さらに流体の進行方向を急激に変化させることにより流れを乱すことにある。これを何回も繰り返す。図3は作製したこの3マーカの検査を行う肝機能診断チップを示す。測定は、0.1~0.4  $\mu$ Lの血漿とそれに準じた1~4  $\mu$ Lの基質緩衝液をそれぞれ注入口1と2に滴下し、マイクロミキサで混合後、検出流路に導入し、3種類の酵素の活性値を測定する。比色測定に用いる光量の減少を防止するため、検出流路の内壁はAl膜でコートした。測定は、チップを37 $^{\circ}$ Cに温度制御し、光源には、重水素やハロゲンランプを用い、帯域濾過フィルタで405 nmまたは340 nmの単色光化し、光ダイオードを用いて光の減衰率を測定した。その結果、 $\gamma$ -GTP、GOT、GPTの活性値の正常値から異常値まで広範囲にわたって検量線を得ることができた。

図3のチップはあらかじめ採取した血漿を導入したが、実用化には、無痛針採血、血球分離、秤量、混合、測定を一つのチップで実現する必要がある。図4は、 $\gamma$ -GTPの一項目であるが、その測定チップを示す。まず、U字流路に導入した血液を図中のX(1)を中心に回転し血球を血球溜めに収め、U字流路内に血漿を満たす。次にX



図3 3項目の肝機能マーカの肝機能検査用比色チップ

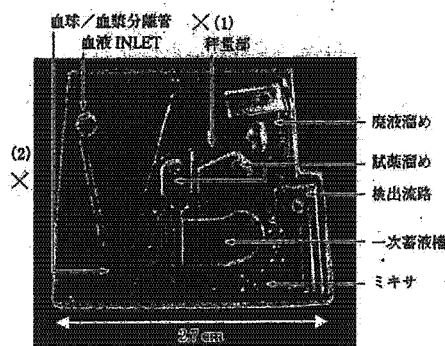


図4 採血から測定までの一連の工程を一チップで実現した $\gamma$ -GTP用測定チップ

(2)を中心に回転し、血漿秤量する。その後、もとのX(1)を中心に回転し、あらかじめ秤量された基質緩衝液の部屋に導入する。その後この2液を、図示した引き口から減圧して、ミキサの中に導入し、検出流路に入れて測定する。現在、3マーカを測定できるチップを開発中である。

#### 4. 今後の展望

在宅診断で重要な無痛採血は古くて新しい人類の夢であり、個人差、年齢差にかかわらず100%の採血率の達成を今後とも追求し、最終的には自動採血を実現する。紹介した両チップの実用化は間近であるが、本チップで生活習慣病の予防が可能となり、今後、コレステロール、中性脂肪などの他の検査項目も追加していく。さらに、現在廃棄している血球成分から免疫検査、DNA解析などを行うため基礎研究もしている。種々のバイオチップによって診断機関と直結した医療ネットワークを介して在宅診断が実現すると、医療、さらには社会システムを大きく変革すると期待される。

謝辞 ヘルスケアチップ開発は、小川洋輝(LST)、新橋里美(JST)、長井政雄(JST)、肝機能診断チップ開発は、沖明男(物材機構)、横川昭徳(ローム)の各氏の努力の賜物であり、またヘルスケアチップ開発は、JSTのプレベンチャー事業の支援を受け、紙面を借りて深く感謝の意を表します。

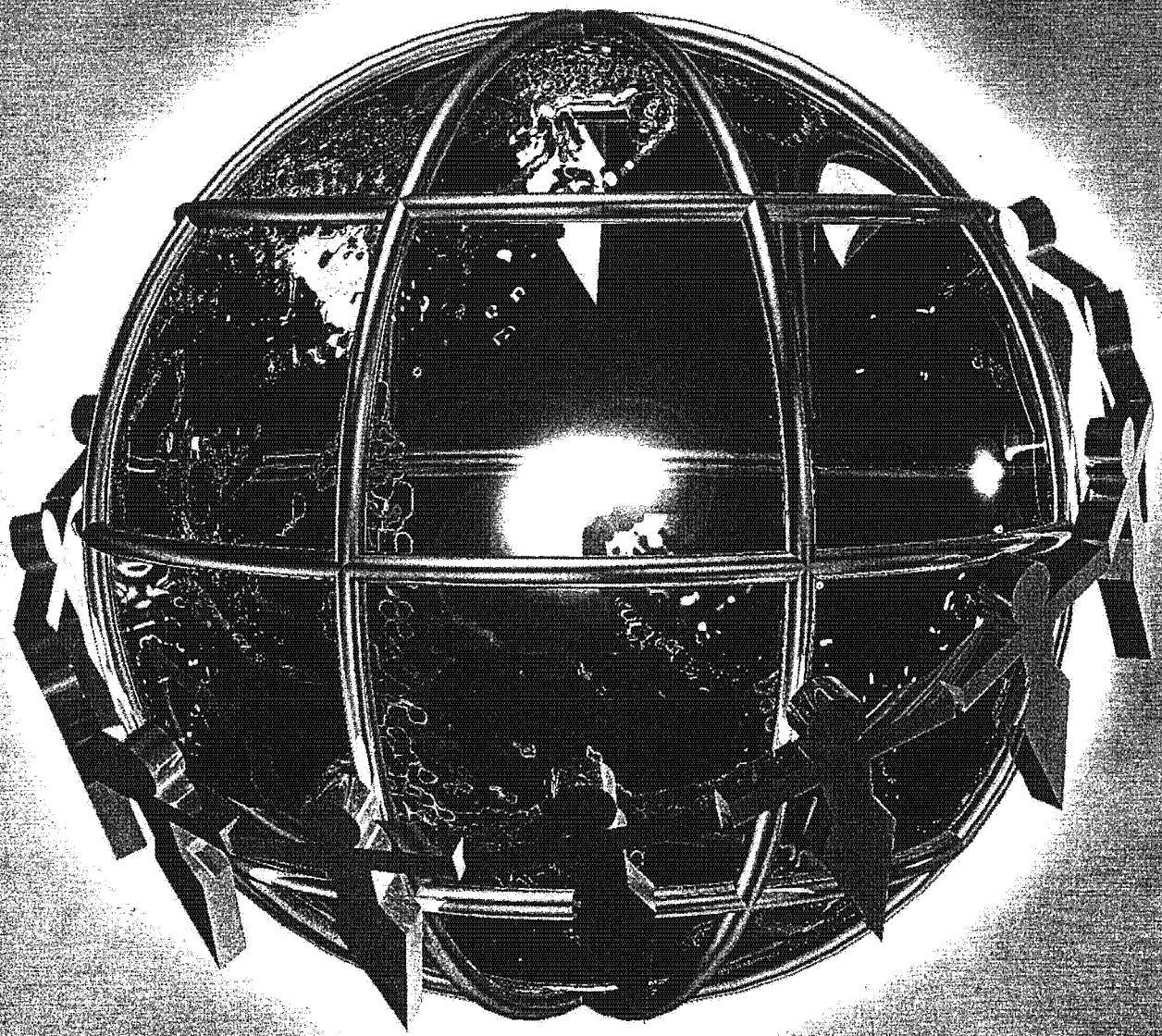
# 表面技術

2004  
VOL.55  
No.6

Journal of The Surface Finishing Society of Japan

HYGIEX 55(6)383-444(2004)

小特集 表面技術のフロンティア  
—バイオテクノロジーが必要とする表面技術



社団法人 表面技術協会  
The Surface Finishing Society of Japan

# 高齢化社会の到来とヘルスケアチップの創製

## —ドライエッチング技術の展開—

堀池靖浩\*, 沖 明男\*, 小川洋輝\*, 高井まどか\*\*, 百瀬 俊\*\*\*, 横川昭徳\*\*\*, 高村 禪\*\*\*\*

\* (独)物質・材料研究機構 (〒305-0044 茨城県つくば市並木 1-1)

\*\* 東京大学大学院 工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

\*\*\* ローム(株) (〒615-8585 京都府京都市右京区西院溝崎町 21)

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

### Advent of the Aging Society and Creation of Healthcare Chip

#### —Development of Dry Etching Technologies—

Yasuhiro HORIIKE\*, Akio OKI\*, Hiroki OGAWA\*, Madoka TAKAI\*\*, Shun MOMOSE\*\*\*,  
Akinori YOKOKAWA\*\*\* and Yuzuru TAKAMURA\*\*\*\*

\* National Institute for Materials Science (1-1, Namiki, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0047)

\*\* Graduate School of Engineering, The University of Tokyo (7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656)

\*\*\* ROHM Co., Ltd. (21, Saiin Mizosaki-cho, Ukyo-ku, Kyoto 615-8585)

\*\*\*\* Japan Advanced Institute of Science and Technology (1-1, Aasahidai, Tatsukuchi-machi, Nobi-gun, Ishikawa 923-1292)

**Key Words** : Microfabrication Technologies, Biochip, Healthcare Chip, Cell Sorter, DNA Trap

### 1. はじめに

21世紀は「生命」の時代と言われている。確かにヒトゲノムの解読以来、昨今のバイオはナノテクノロジーと融合し始め、研究・開発は堰を切った如く猛烈な速度で進み始めている。その目指すところは、「最大公約数的な医療」を脱して、個々の症状にあった適切な治療をほどこす「高度医療化社会」の実現である。この実現が特に我が国において望まれる。すなわち、近年の少子化にともない総人口が早晩減少することによる近未来での労働力の不足と、高齢化の進行とそれにリンクした医療費の増大による国家予算への圧迫とともに我々への負担増が強られる事情がある。この包括的解決の一策は、高齢者が働く意欲のある限り働き、培った知恵と経験を社会に還元できるよう元気で毎日を送れる「健康立国」を世界に先駆け我が国に創り出すことである。このためには予防が大切であり、在宅で簡便・確実な大量・同時多項目を診断できるバイオセンシング技術を早急に確立しなければならない。このための有力な手段として各種バイオチップ化の取り組みが本格化している。バイオチップ創製には、さまざまな工学、医学、薬学の融合によって初めて実現し、その結果、新科学・技術・産業が大いに期待される。本稿では、ヘルスケアチップ、肝機能診断チップ、セルソータチップ、DNA 捕集・分離チップなどの我々の最近研究を報告する。

### 2. ヘルスケアチップ

ヘルスケアチップとは、無痛針から極微量血液を採取し pH, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, グルコース, 尿素窒素(BUN), クレアチニンなどの健康マーカーを検出・計測して、在宅で我々の健康状態を診断するチップシステムである<sup>1)</sup>。安価・使い捨て可能を目指し、PET 基板を用いた。血液の流路となるマイクロキャピラリは、その逆パターンを石英基板にリソグラフィとドライエッチングで形成し、それを PET 基板(20×20 mm<sup>2</sup>)にモールド形成する。キャピラリの内壁を生体適合化するため生体膜と同じ組成を有する MPC ポリマー<sup>2)</sup>をコートする。無痛針は、100 μm の SUS 管の先端を 10 度に研磨し、さらに電界研磨で先鋭化して製作した。実際、痛みは感じない。

研究当初は、図 1 に示すように、流路の最下流に電気浸透流(EOF)ポンプを設けた。まず、針の周りにガイドを設け、それを皮膚に密着させ、その中を減圧にすると、皮膚が盛り上がり、針が皮膚を通して血管を刺し、全血を U 字型をしたキャピラリに注入する。その後、チップ上で遠心分離を行って得た血漿を選択性膜(イオノフォア)を塗布したイオン感応電界効果トランジスタ(ISFET)に導入して pH, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> イオンを測定する。全工程で最下流に設けた EOF ポンプで引き込んだ。EOF ポンプはゼータ電位の高い石英板を用いた。しかし、本チップは使い捨て型なので安価でなければならず、現在は、図 2 に示すように、基板はオールポリマーとし、チップをホルダーに入れて、外部ポンプにより血液を流路に引き込む方式を取っている。しかし、静脈の所在

\* 本会「第 62 回表面技術アカデミック研究会討論会」(2003 年 11 月 12 日)の講演概要より転載



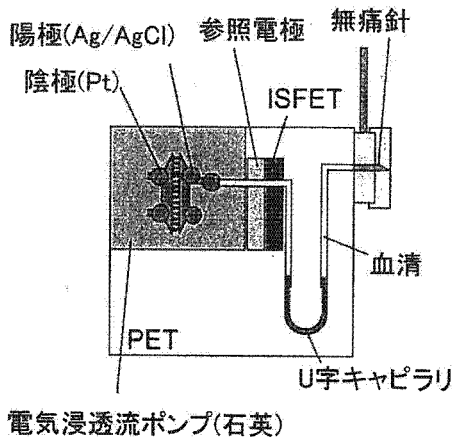


図1 ポンプ内臓型ヘルスケアチップ

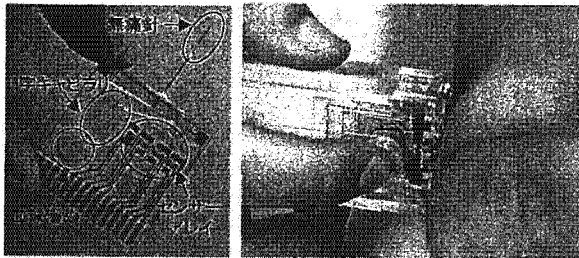


図2 外部ポンプ型ヘルスケアチップ

を肉眼で分かっていても、いざ針を刺す段になると、どこに静脈があるのか分からなくなることがよくあり、また個人差も大きい。これを解決するため、最近近赤外(NIR)光を皮膚に照射することを試みた。その結果、NIR光が皮膚中で拡散すると静脈の所在を可視化することが可能になり、さらに、皮膚の表面から静脈のある深さを検出するため、針が静脈に達したことを電気的に検出できる機構も開発した。

本チップの実現にはバイオセンサーの確立が重要である。現在はカーボン電極上にイオン感応膜、酵素膜を固定化し種々のイオンセンサおよび酵素センサを形成している。まず  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  イオン測定用のイオノフォア膜として、Bis(12-crown-4)あるいは Bis(benzo-15-crown-5)を用い、これらにアニオン排除剤の K-TCPB を PVC に混ぜたものを電極上に固定している。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  と、 $\text{K}^+/\text{Na}^+$  の選択性には、100 と 1000 の十分な値を得た。また BUN とグルコースセンサは、カーボン電極上に絶縁性ポリピロール膜を塗布後ウレアーゼとグルコース/フェロセンの各酵素を塗布し、その上からポリ-L-リシン膜で覆って固定した。また最近上述の SUS 管を用いた針以外に、図3に示すような Si の異方性エッチングによる針のアレーとその底部に血液を外部に引き出す Si の深孔からなる無痛針も開発している。

### 3. 肝機能診断チップ

同様に、微量血液から肝機能診断に重要な GPT, GOT,  $\gamma$ -GTP の 3 マーカを測定するマイクロ比色チップを研究している<sup>3)</sup>。やはり安価・使い捨てが可能な PET 基板を用いている。これらのマーカは比色法で測定する。すなわち、血漿と基質緩衝液を混合し、チャンネルに導入して、混合の結

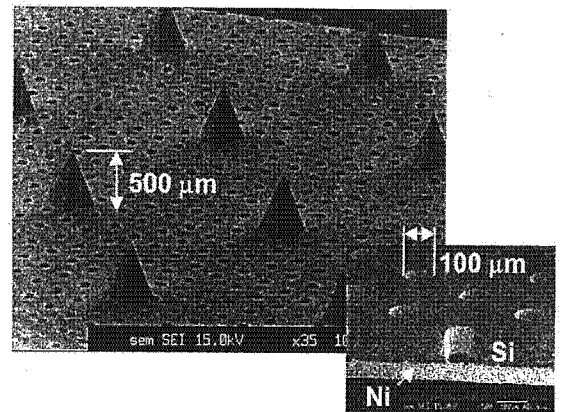


図3 毛細管血採取用 Si ニードルアレー

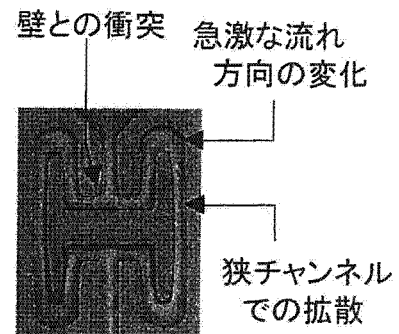


図4 ミキサーの一ユニット

果生じる発色光と同じ波長の光をチャンネル内に照射して、一定時間内の導入光の減衰度から行う。ここでは  $\gamma$ -GTP の検出には 405 nm, GPT と GOT の検出には 340 nm の紫外光を導入する。405 nm と 340 nm の光源は、マイクロ W ランプにフィルターを通して得た。受光は Si ホトダイオードを用いた。したがって、混合することと、チャンネル内での光の全反射が重要となる。

一般に、マイクロやナノサイズのチャンネル内で溶液が流れるときは層流になり、混合に工夫を必要とする。以前は、接触表面積を増すため小流路群を二つ 90 度に配置したチップで、交互に混合液を入れ替え、遠心力により混ぜたところ、良好な混合の結果を得たが、遠心という可動部分が必要になるので、この度、複数の溶液を一つのチャンネルに流すだけで混合できる構造を考えた。図4は、そのミキサーの一ユニットを示す。上部から複数液が導入されると、まず壁と衝突し、両側の上部に上り、急激な曲がりを経て、狭い領域を通過中に分子拡散を起こす。このプロセスは下部の方で対称的な構造でも行われ、真ん中の下部の出口から混合液が、次段の同じ構造に流れ込む。本チップでは 6 段に直列に接続される。この結果、 $10 \mu\text{l}/\text{min}$  ~  $100 \mu\text{l}/\text{min}$  の流速に対して、6 段目では良好な混合が達成された。

図5は、このミキサーと比色測定用チャンネルを集積化し、3 マーカを測定するために 3 つのチャンネルが設けられている。比色測定用チャンネルの内部には光が全反射するようアルミ膜がスパッタ塗布され、さらにその上に MPC ポリマーがコートされている。図6は、ミキシング後に各酵素の活性度の測定した結果を示す。本チップは成人の正常値のみなら

ず、異常値に対しても測定可能なことが分かる。将来的には無痛針、血球分離、ミキサー、比色測定 of 各工程をワンチップに集積する。

4. セルソータとリンパ球分離

個々の細胞の諸性質を高速に決定し、特異な特性を有する細胞を選別(ソート)して抽出し、単一細胞レベルで培養、計測、分画、DNA や mRNA などの細胞の成分評価などは、診断・治療のために極めて重要であり、人血や異常細胞を取り扱うので、ここでも安価・使い捨て型チップの出現が求められる。さらに、これらの作業を連続的に処理するには、セルソータを始めさまざまな機能を有するデバイスを一つのチップ上に集積化することにより高速・高効率化が図られる。細胞をマイクロ流路内で移動させるにはチップ内にポンプを備えることで可能だが、細胞に物理的・化学的ダメージを一切与えないことと、他のデバイスと干渉しないことが求められる。

我々はヘルスケアチップ研究の中で電気浸透流(EOF)ポンプを低電圧・高流量化するため流路内に深さの浅い構造の流路の形成を試み、従来必要であった数キロボルトの1/100に低下させた<sup>4)</sup>。図7は、2本の流路に細胞を分別する石英板(20×20 mm<sup>2</sup>)製セルソータチップの写真を示す。図8は2本の流路と結合したポンプ構造を示す。図7の入口/出口と2本の平行に並んだ深さ120 nmの流路と深さ25 μmの流路は一つの流路で接続されている。流路幅は30 μmである。浅いギャップでは、石英板付近のカチオンが電界で動くのみだが、深いギャップでは、中央付近でEOFと逆方向の戻り

の流れが生じてポンプ力を減じる。2本の流路の出入口側はイオン伝導は行いが溶液は通さないゲル電極を介して接地し、他方の電極は同じゲル電極を介して正負の電圧が印加される。ゲル電極の使用理由は、電気分解によって金属電極表面で発生する気泡のポンプ内への流入によるポンプ圧力の低下の防止と、電解液が電気分解して生じた pH 変化した溶液が流路へ混入するのを防止するためである。正負の電圧を印加すると、両流路に同電圧が印加されるが、EOF ポンプ作用は同方向に働き、一つの流路のポンプ作用としては逆になる。しかし、浅いギャップの流路では深いギャップと比べて圧倒的

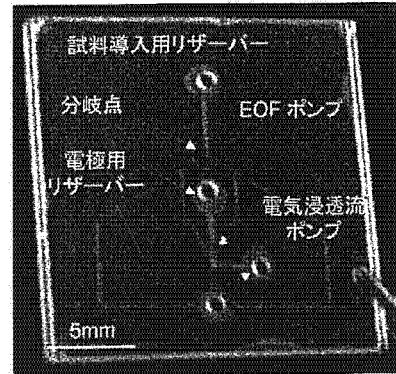


図7 セルソーターチップ

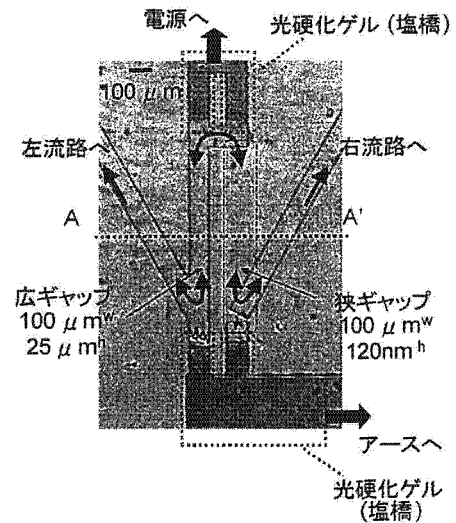


図8 電気浸透流ポンプ

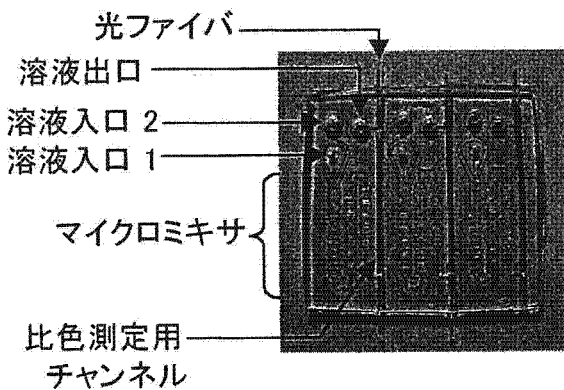


図5 肝機能診断チップ

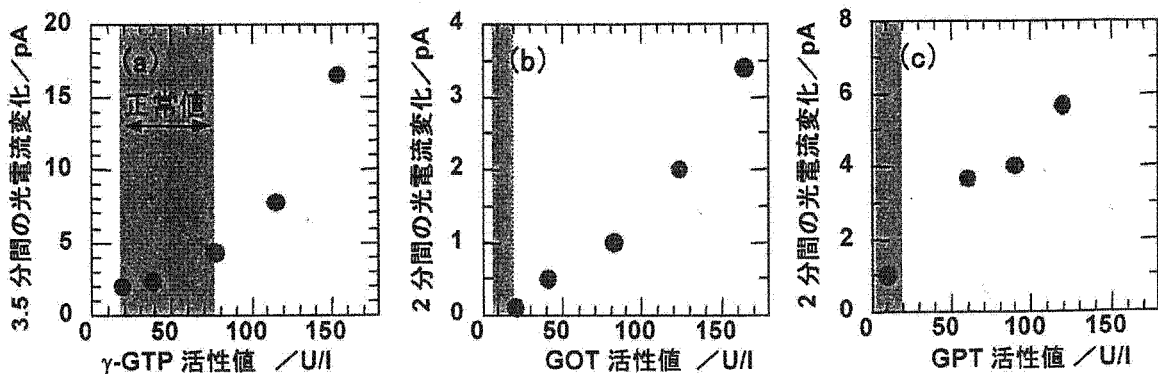


図6 ミキシング後の各酵素活性値の測定結果

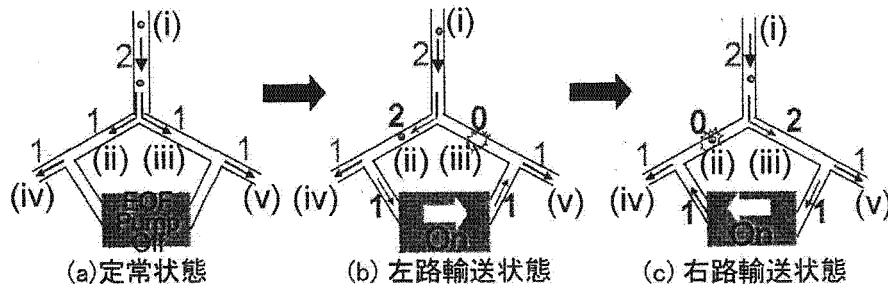


図9 セルソータの動作

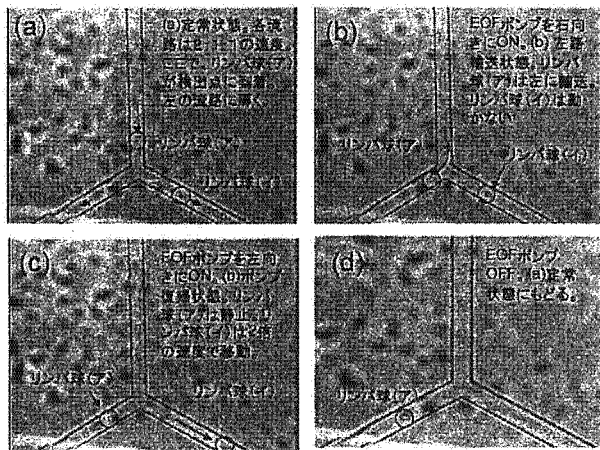


図10 動作中のセルソータの連続写真

に EOF ポンプ作用は強く、一つの流れを浅いギャップのポンプ作用が実質的に支配する。

図9にセルソータの動作原理を示す。まず、状態(a)では EOF ポンプは作動してなく、外部のシリンジポンプによる定常的な流れにより、細胞は移動する。(i), (ii), (iii)の流量比は2:1:1である。次に(b)状態で細胞が分岐点に達したときにポンプを流量1作動させ、細胞を左右に分別する。細胞が取り込まれた後、(c)状態でリザーバ電極での電気分解による pH 変動を防ぐために同時間で逆方向にポンプを作動させる。このとき、(i), (ii), (iii)の流量比はそれぞれ2:2:0, 2:0:2である。いずれの状態でも(i), (iv), (v)の流量比は常に2:1:1で脈流はない。これらのサイクルを繰り返すことにより細胞を分取する。

図10にラットの腸管膜から採取したリンパ球のセルソータ中の連続写真を示す。(b)は図9の状態(b)に相当し、細胞は左路に取り込まれている。このとき、右路中の細胞が移動していない。(c)は図9の(c)状態に相当し、左路中の細胞は移動せず右路中の細胞が移動する。試料導入キャピラリーにおける脈流は5%以内に抑えられた。分岐点での流体の動作は高速、俊敏であり、ポンプのオン、オフから細胞の速度が一定になるまでの立ち上がり時間は60ms以内であった。本チップは30分間安定に作動したが、pH変動による EOF ポンプの性能劣化が抑えられたことが考えられる。現在、さらに多段ソータも形成し、B, T細胞の単一細胞分析と免疫アッセイへの応用に向かって研究を進めている。

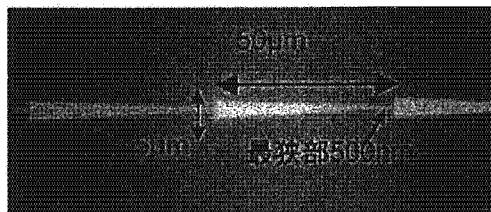


図11 作製したテーパ形状チャネル

### 5. 長鎖 DNA 分析

#### 5.1 長鎖 DNA 捕獲チップ

現在、DNA 分離研究は主に短鎖型で行われ、長鎖型の分離研究は少ない。本目的のため、図11に示すようなテーパ形状チャネルで広い幅で長鎖、狭い幅で短鎖をサイズ分離しようと試みた。本パターンは、長さ50 $\mu\text{m}$ 、幅5 $\mu\text{m}$ –500 $\mu\text{m}$ のテーパ形状(くさび形)を8回繰り返した形状であり、前後に幅100 $\mu\text{m}$ 、長さ3mmの導入流路がリザーバまで接続されている。試料は蛍光色素 YOYO 1 で染色した T4 DNA (166 kbp) を用いた。導入後、両端のリザーバーは、電圧を印加するための白金電極と静水圧を印加するためのチューブを取り付けて密閉される。電圧および圧力により泳動する DNA の様子は、高感度 CCD カメラを取り付けた蛍光顕微鏡により観察した。

まずさまざまな強度の圧力または電場を単独で印加した場合の DNA の泳動挙動を観察した。T4(160k塩基対)DNA は自由空間では熱運動により自然に丸まって直径約5 $\mu\text{m}$ の球状となる。今回のテーパ形状は最も細いところでこれよりも狭い。よって狭部を抜ける際のエントロピー変化により、逆方向の力をうけ、速度が遅くなると考えた。しかし、DNA の大小による速さの違いは見られなかった。これはこの程度の流路幅では、エントロピー変化による力は、電場や圧力場による力に比べて非常に小さいからと考えられる。ところが、圧力と電場を同時に逆向きに印加した場合、圧力と電場がほぼ釣り合い、かつある一定値を超えた時のみ、図12のように DNA が強くテーパ出口にトラップされる現象が観察された。この捕獲は再現性が良く、また両者の力が強いほど顕著に起こる。また、電場と圧力場のバランスをくずすことにより簡単にリリースされる。したがって本トラップは、さまざまな介在物が存在する溶液の中から DNA を選択性良く抽出、濃縮し、回収するような用途に用いられると期待される。図13(a)は一本のチャネルで多段で捕獲する方法を一個のテーパで実現しようとした模式図を示す。図13(b)と

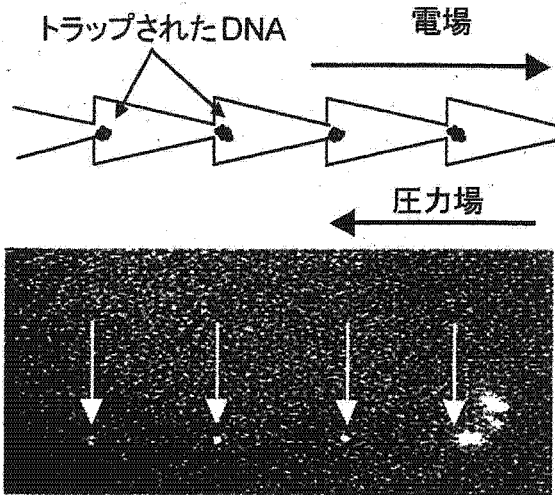


図12 電場と圧力場によるDNAのトラップ

(c)は、このような抽出濃縮の実証実験の蛍光顕微鏡写真である。DNAに作用する力は左→右の電界より右→左の圧力の方が強いいため、DNAは右から流れ込み、次々にトラップされ、抽出・濃縮された。一方残りの液は圧力により左へ流れ去る。最狭部流路幅は $5\mu\text{m}$ でありこのような広い流路でもトラップが確認された。十分濃縮された後、電界を切ることでDNAは図13(c)のように直ちに放出され回収された。

この長鎖DNA捕獲を利用すれば、さまざまな介在物が存在する溶液の中からDNAを選択性良く抽出、濃縮でき、また簡単に回収できる。たとえば、血球分離後、血漿中の感染症ウイルスの壁を破碎後、本方法によりRNA・DNAを抽出・濃縮し、PCRにより感染症由来のDNAを増幅することにより感染症診断が可能になる。

5.2 DNA高速分離チップ

DNA分離には現在ゲルが広く用いられている。しかし、DNAをゲル中のマイクロな孔を通して分離するので、その電気泳動速度は低い。そこで、人工的にゲルに換わるものとして、石英製チャンネル中にナノサイズのピラーを作製する研究をしている。この目的の一つに、従来100塩基対のDNA分離はよく研究されているが、T4のような単位の塩基対の分離の方法がほとんど報告がなく、これを目指している。図14は、 $0.2\mu\text{m}$ 径、深さ $5\mu\text{m}$ 、アスペクト25のピラーを $0.2\mu\text{m}$ の間隔で並べたものを示し、長さ1cmのキャピラリーの中に構成されている。製造法は、電子ビーム露光で作製したレジストパターンをマスクとして下地にNiめっきを行い、これをマスクとして石英をドライエッチングで加工した。その結果、ピラーが無いとDNAは丸まって泳動し、分離は

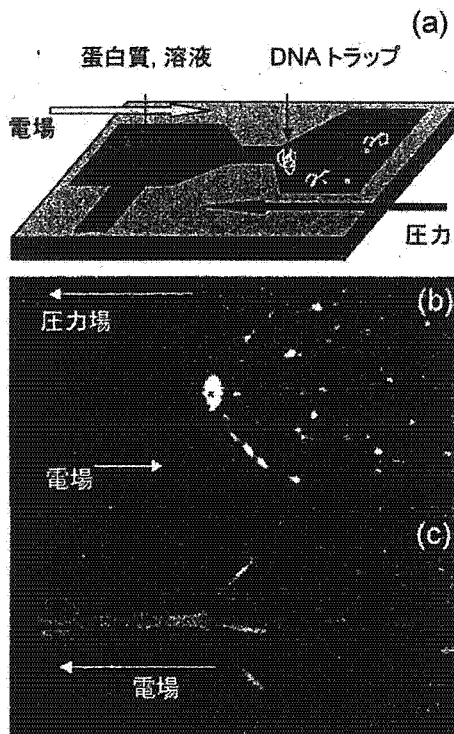


図13 DNAの抽出・濃縮とリリース

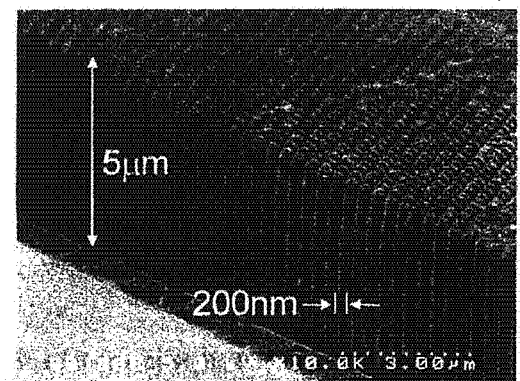
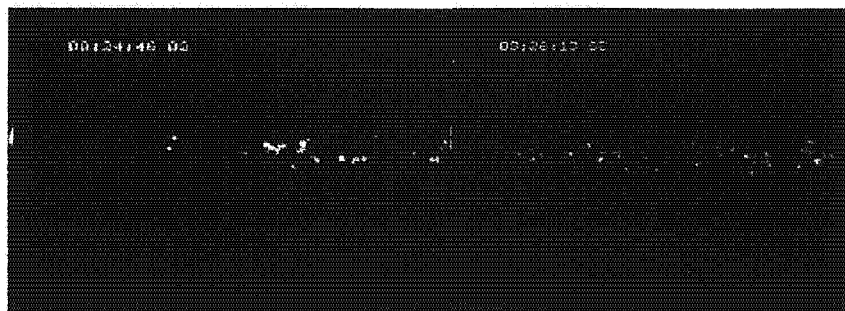


図14 DNA高速分離チップ



(a)ピラーなし (b)ピラーあり

図15 ピラーチップの中を流れるDNA