

特集 流体MEMSのすべて

——マイクロ流体デバイスの応用展開とその実用化——

μ-TAS応用による バイオセンサ式ヘルスケアチップ

小川 洋輝* 長井 政雄** 堀池 靖浩***

MicroTASの1つの応用として、微量の血液から多項目分析を行うヘルスケアチップについて概説した。本チップは、外径150μmの無痛針により静脈より採取した約6μlの血液を、チップの遠心操作により血漿血球分離を行い、この血漿中の電解質イオン、グルコース、尿素窒素をバイオセンサにより測定するというものである。

半導体産業において発達した微細加工技術を援用してガラスやプラスチックの基板の上に溶液が流れる微小な溝（チャンネル）のネットワークを形成し、実験室で行うような生化学・化学の操作や検出を1枚のチップ上に集積化・小型化したMicroTAS (micro total analysis system) は、近年さまざまな分野への応用が盛んに試みられている。その一例として、生体情報の宝庫である血液の多項目分析を行う診断チップが挙げられ、われわれもヘルスケアチップとして研究開発を行っている。昨今の社会的情勢もこのような血液診断チップの出現を促している。すなわち、わが国では近年高齢者層の医療費が増大し続けており、今後の少子高齢化に伴ない、この傾向にますます拍車がかかることは必定である。このような傾向を少しでも緩和するためには、高齢者が元気で毎日を送ることができるように日々の健康管理が重要である。このような

健康管理のツールとして、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血液診断チップの実現に大きな期待が寄せられている。図1に本開発の目的とその展開をまとめたが、種々の診断チップが整うと、計測された多項目のマーク値を医療施設に通信回線で送り、医療ブロードバンドネットワークと高精細ディスプレイを介して医師による問診が在宅で可能になる。さらに、検出マークを増やし、長期間の使用によって、医療施設に多数の方の健康・疾病マークの推移が蓄積されたデータベースが構築され、そのマークと疾病との相関関係を解明が可能になる。また、医師不在の寒村や離島の人々の遠隔診断などが実現され、医療の大変革が期待される。

現在、電気化学的バイオセンサによって多項目を測定するチップとしてi-STAT¹⁾が広く病院で使われているが、100μl程度の血液を必要とし、採血は医師が行わねばならず、在宅では到底使用できない。われわれは、本目的を実現すべく、無

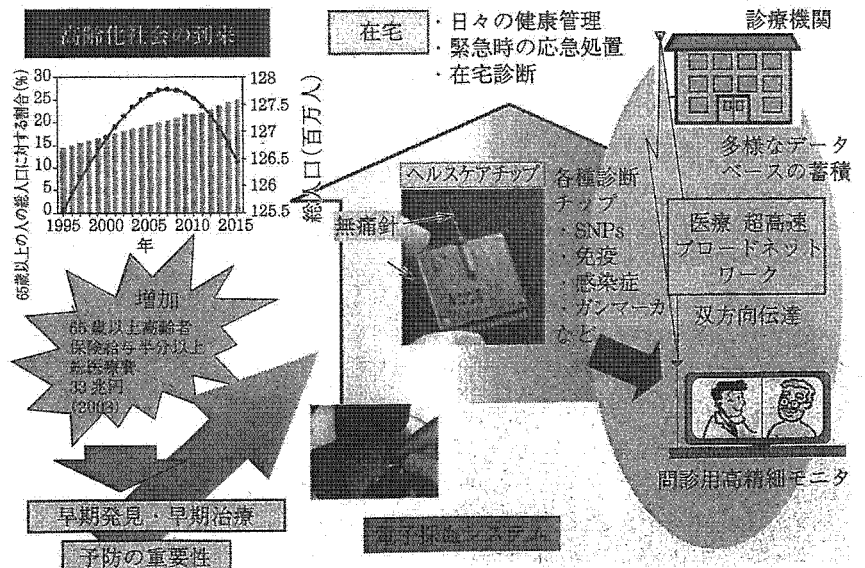


図1 診断チップ・ブロードバンド在宅問診システム

*Ogawa Hiroki
(株)アドビック 代表取締役 工博

**Nagai Masao
同社 取締役

***Horiike Yasuhiro
物質・材料研究機構 フェロー 工博

痛針から微量の血液を採取して、その血漿から電気化学センサによってマーカーを測定するヘルスケアチップ²⁾を開発してきた。ヘルスケアチップは、血管可視化、血管検知機構を援用して無痛針を介し採取した6 μ lという極微量血液より遠心分離によって抽出した約3 μ lの血漿中のNa⁺、K⁺などの電解質イオン、グルコース、尿素窒素などの多項目の健康マーカーの測定が可能である。

無痛針の作製と電子採血

ヘルスケアチップにおいて、検体である血液の採取は不可欠であり、特に在宅での使用を考慮するとほとんど無痛で素人でも簡単に採血できることが求められる。われわれの無痛針は、採血時の剛性を確保し得る最小限の径に近い外径150 μ m、内径100 μ mのステンレスパイプの内壁全体にわたって超平滑化処理を施した後に、端面を3面研磨加工し作製している。写真1のような針を用いることでほとんど痛みを感じずに皮膚に穿刺することができ、また後述するように内壁を平滑化した結果、血液中の血球にダメージを及ぼすことなく、かつポンプを用いることなく血圧のみで血液が採取することが可能となった。さらに、ヘルスケアチップが必要とする血液量が6 μ lと極微量であることも、このような極細針の使用を可能にしている理由である。

このように作製した無痛針を用いて採血を試みたが、静脈の位置が不明瞭のため、採血成功率はそれほど高いものではなかった。そこで血管の可視化機構の検討を行った。一般的に700から

1,000nm程度の波長域の近赤外光 (Near Infrared : NIR) は、その他の波長域の光と比較して、体を構成する水やヘモグロビン、また皮膚のメラニンなどによって吸収されにくく、体内を透過しやすい³⁾。このような光を体内へと導き、体内で拡散、反射を繰り返しながら伝播して再度体外へと放射する時、その放射される部位表面直下の血管中の水やヘモグロビンにより光は吸収されて、それ以外の部分では比較的吸収されることなく体外へと放射されるために、この部分をCCDなどの撮像素子で観察すると血管部分からの光強度は弱いために血管は暗く浮かび上がる。

このような方法を用い血管の2次元的位置を確認できるようになった。しかし、採血針をどの程度の深さまで導くかということはまだ不明である。血液を採取する際には必ず採血針を皮膚に穿刺し、これを血管まで導いていくことになるので、この採血針を積極的にプローブに用いるということ考えた。すなわち針はステンレスのような金属で構成されているので、これを体内へと侵入させていった時、この電位は血管の内外での電解質イオン濃度や水分濃度に依存して変化し、これにより針先端が血管内に到達したかどうかを判断できると推察した。図2には針を静脈へと導いていった時と、血管のないところに導いていった時の針の電位の変化を示している。血管のないところに針を導いていっても針の電位はほとんど変化しないが、静脈へと導いていった時にはその電位があるところで大きく変化することが分かる。そしてこの変化が現れた直後に注射筒内を陰圧としてみたところ、血液を採取することができた。この

結果から、このような電位の変化は針の先端が血管に到達したか否かを反映したものであり、これにより針をどの程度侵入すればよいかが判断できるようになった⁴⁾。

写真2に無痛針を含む採血アセンブリを用い、上腕部の静脈より採血

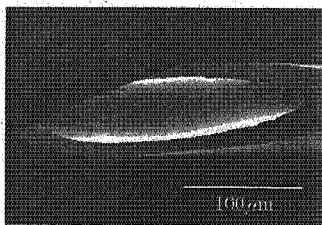


写真1 無痛針の先端

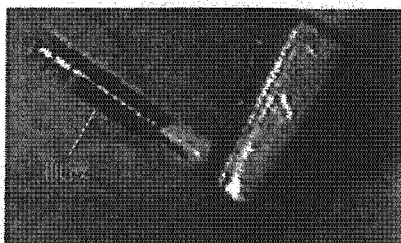


写真2 採血の様子

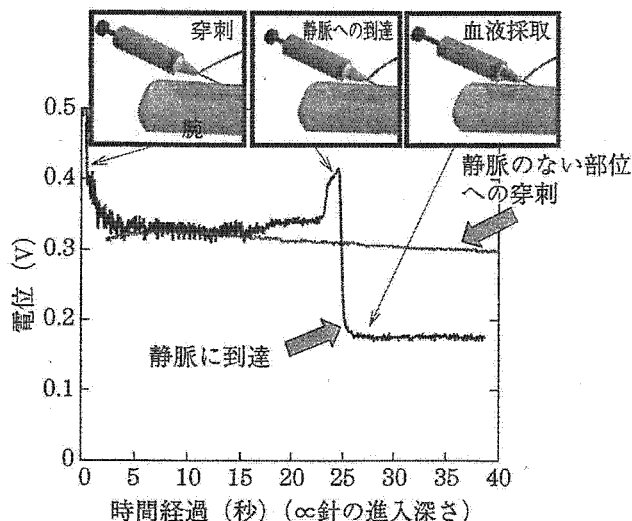


図2 血管到達検知機構

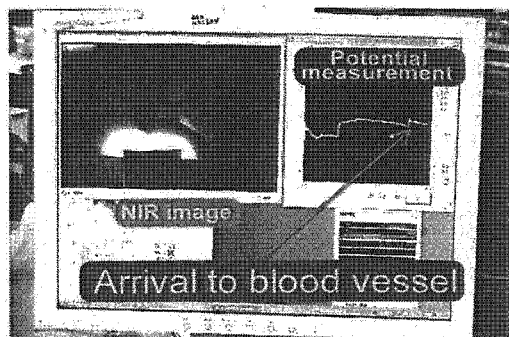


写真3 液晶画面を見ながらNIR像で静脈を探し（左図）、穿刺し、皮膚表面と針の間の電圧を右図で検知する

を行っている様子を示しているが、実際に採血を行っている間はコンピュータ画面上に表示される近赤外血管像と針の電位変化（写真3）を観察しながら行っており、穿刺部を直接見ることはほとんどない。針の電位は穿刺時に上昇し、また血管到達時に再度上昇（図中の矢印）することから、血管に到達したことを検知することができる。そして針内壁研磨の効果は、針を血管に導いた時に血圧のみで血液を針に接続されている蓄血管へと導けるということであり、これにより何らポンプを用いる必要はない。この蓄血管を満たすと約6 μ lの血液が採取できたことを意味し、後述のように採血アセンブリをそのままチップにはめ込み、遠心輸送でチップ内部へと導くことができる。現状では以上のような方法により採血成功率ほとんど100%近くを達成している。

バイオセンサ

ヘルスケアチップの心臓部は電気化学式バイオセンサである。まず、センサ電極、参照電極として、写真4に示すようにカーボン、銀/塩化銀電

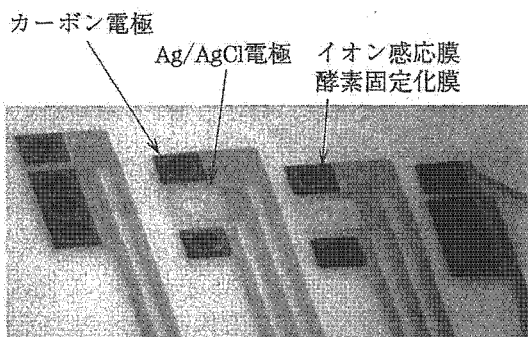


写真4 電気化学測定用電極の写真

極、配線、パッドとして銀ペーストをポリエステル基板にスクリーン印刷法で形成した。センサ材の電極上の塗布に専用の自動デイスペンサも開発した。

Na⁺とK⁺イオンセンサは、それぞれBis (12-crown-4) と Bis (benzo-15-crown-5) のイオン感応膜とアニオン排除剤と可塑剤をTHFで溶解したPVCを電極上に固定化して形成した。図3はNa⁺、K⁺のイオンセンサの種々のNa⁺、K⁺イオン濃度のTris-HCl中での電位応答を示す。出力電位はほぼネルンスト応答 (59mV/dec.) している。VFc-co-HEMA重合メディエータを使用してカーボン電極との固定化を行い、さらにGODの固定化のためグルタルアルデヒド (GA) を用いて化学的架橋を行い、製作した。図4に示すようにGA濃度が3%の時に良好な特性を得ることができた。

尿素態窒素 (BUN) センサは、ウレアーゼの酵素反応により生成されるアンモニアを検知することで検出する。本センサはアンモニアのイオノファであるTD19C6を可塑剤とアニオン排除剤、および0.1M NH₄Cl + 0.5% PVPと共にPVC膜に取り込み、AgCl電極上に固定化し、さらにBUNの

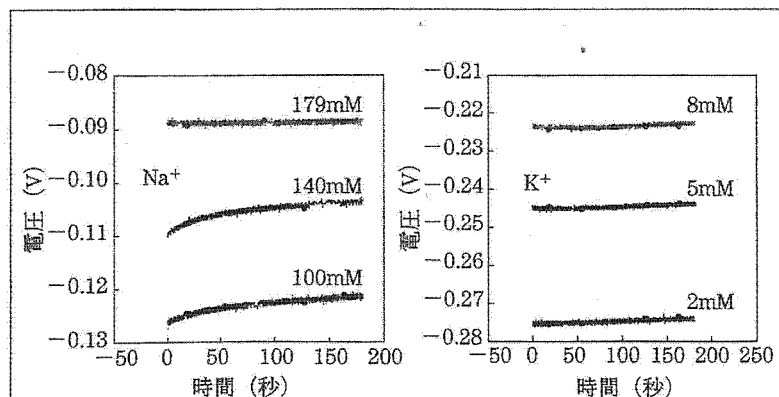


図3 Na⁺とK⁺イオンセンサの応答

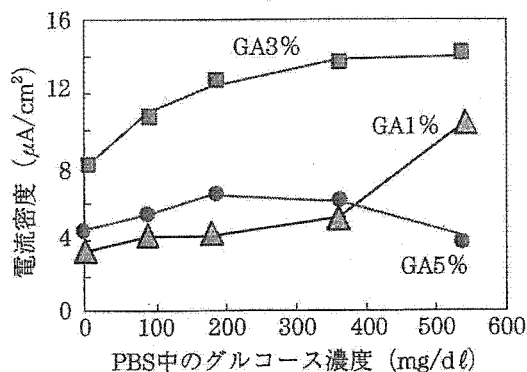


図4 グルタルアルデヒド濃度をパラメータとした時の電流のPBS中グルコース濃度依存性

酵素反応のためウレアーゼとその上に固定化膜としてセルロースアセテートを塗布して形成した。図5は尿素検出の結果を示す。15mV/dec.ほどの感度であるが、濃度に応じた電位応答をしている。

クレアチニンセンサもクレアチニンアミデヒドロラーゼ酵素反応を經由して尿素を生成してアンモニア検出することで測定することを試みているが、まだ0.1mM以下の検出には不安定性が残っている。

チップ構造

写真5(a)に示すヘルスケアチップは、射出成型で形成したポリカーボネート製の流路用基板と、ポリエステル基板上にセンサ電極をスクリーン印刷法で形成したものを貼り合わせて作製した。写真5(b)に示す採血アセンブリで一旦採血後、それを写真5(c)に示すようにチップに挿入し、チップへの血液の輸送と遠心分離を行う構造になっている。遠心分離後にセンサ上は血漿成分のみに接触するように流路が設計されている。本チップの特徴は、すべての血液を含む液体のチップ内での移送には、チップ回転に由来する遠心力を用いている点である。

ヘルスケアチップ計測の動作

電気化学バイオセンサで計測する際には、まず較正操作が必要である。前述のようにチップ流路内の液体の輸送には遠心力を利用している。写真6は、流路の最適設計のために回転中の液体移動の様子をストロボ観察したものである。(a)の較正

液の移送と排出では、(i) 較正液導入口から較正液を導入し、(ii) 写真5(a)の×(1)を中心として遠心力によってセンサ領域に移送して満たし、センサ較正後、(iii) チップを90度反時計回りに回転し、(iv) ×(2)を中心として遠心力によって排液溜めに排出する。(b)の血球分離では、(i) 採血アセンブリを導入し、(ii) 写真5(a)の×(1)を中心として遠心力によって全血がセンサ領域を満たした後、(iii) さらに回転をし続けると、(iv) 血球のみが下方に分離して行き、最終的には血漿がセンサ領域のみに残る。

次に、写真7で試作した計測器によって較正後のチップで測定した例を示す。まず①採血アセンブリをチップに装着し、②チップを計測装置に設置し、③遠心分離用回転器にチップを搬送し、④血球・血漿分離を行い、⑤チップを測定用端子部に搬送し、⑥測定結果が画面に表示される。ここでは、 Na^+ 、 K^+ 、BUN、グルコースの4項目が表示されている。

□

極微量の血液を無痛針を介して静脈より採取して、それを複数のバイオセンサを搭載するヘルスケアチップに導き、遠心分離により抽出した血漿中の健康マーカーを測定した。このような診断チップを家庭に持ち込むためには、チップ本体はもちろんのこと、個人差に関わらず無痛で確実に採血できるシステム、微量血液から正確に健康・疾病マーカーの測定、安価・小型・安全・簡単操作の測定器などが要求される。今後、診断チップの検査項目は現状にコレステロール、中性脂肪なども加え20項目程度は測定できるようにする。さらに、現在廃棄している血球成分から免疫検査、DNA

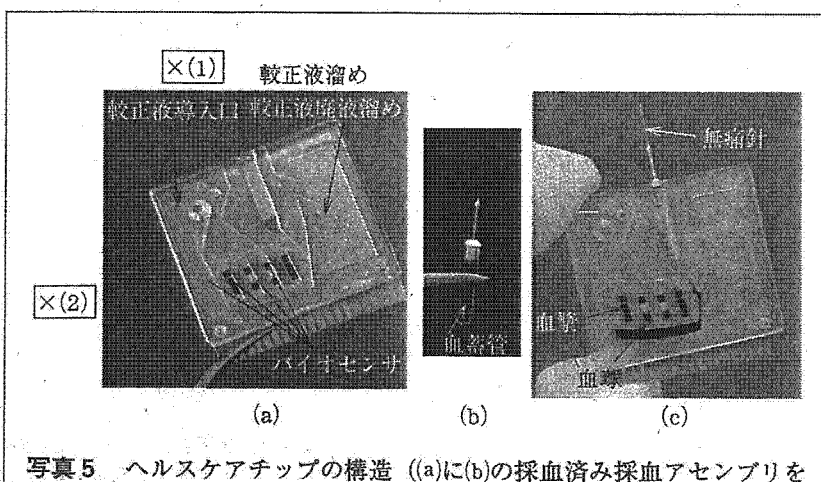


写真5 ヘルスケアチップの構造 ((a)に(b)の採血済み採血アセンブリを挿入して、遠心分離後(c)に示すように血漿と血球が分離される)

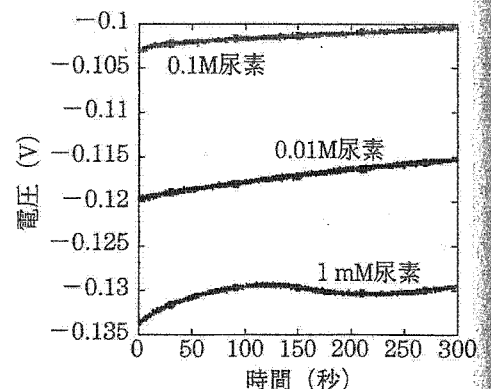
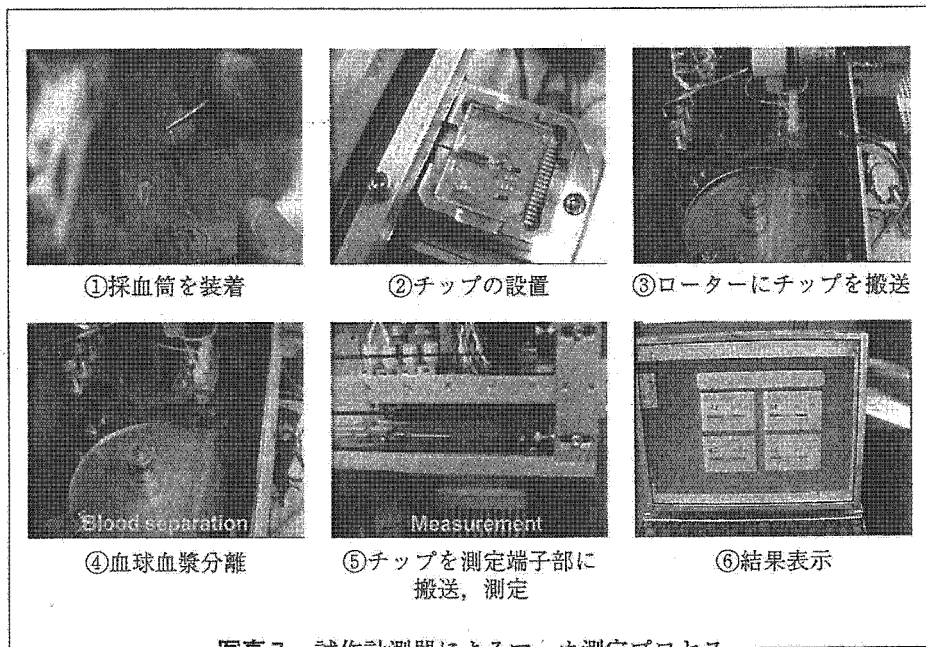
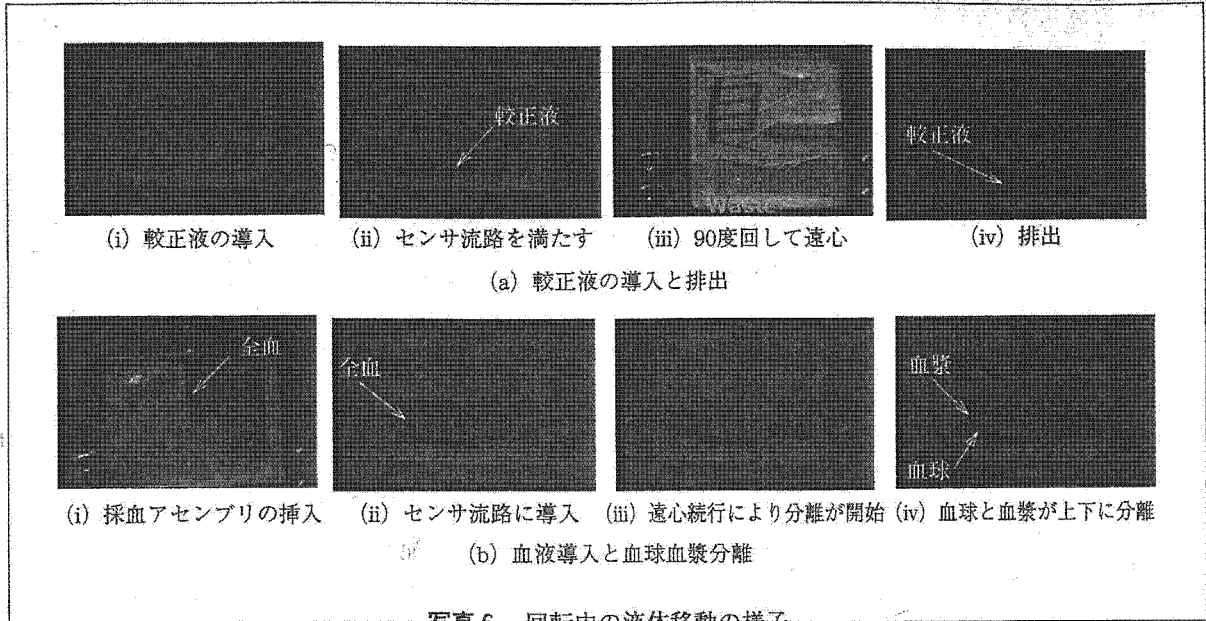


図5 尿素検出の結果



解析などを行うため基礎研究も行っている。種々のバイオチップによって診断機関と直結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。その基盤が確立されると、幼少の頃からのデータの蓄積によって、各人の成長に応じての食事や社会環境などに起因する病気への予防体制が確立され、少子化問題の解決にも寄与する。さらには、発展途上諸国の疾病診断・予防にわが国が大きく貢献できる。この実現には、多くの電子部品・システムが開発されねばならず、バイオとエレクトロニクスが融合する新学問、新技術、新産業が創出される。

【参考文献】

- 1) Eds. R. Edwin Oosterbroek and Albert van den Berg : Lab-on-a-Chip Minuturized System for (Bio) Chemical Analysis and Synthesis, Elsevier B. V. The Netherland (2003) .
- 2) A. Oki, M. Takai, H. Ogawa, Y. Takamura, T. Fukasawa, J. Kikuchi, Y. Ito, T. Ichiki & Y. Horiike : Healthcare Chip Checking Health Condition from Analysis of Trace Blood Collected by Painless Needle, Jpn. Appl. Phys., 42, p. 3722 (2003)
- 3) V. V. Tuchin ed. : Handbook of Optical Biomedical Diagnostics, SPIE press p. 425
- 4) H. Ogawa, M. Nagai, J. Kikuchi & Y. Horiike : Blood Painless Collection System Equipping Detection functions for Search of Vein, in: M. A. Northrup, K. F. Jensen, D. J. Harrison (Eds.), Proc. μ TAS2003, Squaw Valley USA, p. 741 (2003)



2005 第19回「大学と科学」公開シンポジウム講演収録集

人体にやさしい医療材料

主 催：平成17年度文部科学省科学研究費補助金

研究成果公開促進費「研究成果公開発表(A)」補助事業

大阪大学産業科学研究所教授 中嶋 英雄

後 援：(社)軽金属学会／(社)資源・素材学会／(社)日本アルミニウム協会／(社)日本化学会

(社)日本鋼構造協会／(社)日本機械学会／(社)日本金属学会／(社)日本材料学会

(社)日本セラミックス協会／(社)日本塑性加工学会／(社)日本チタン協会／(社)日本鑄造工学会

(社)日本鉄鋼協会／(社)日本表面科学会／(社)表面技術協会／(社)未踏科学技術協会／(社)溶接学会

(財)大阪科学技術センター／(財)金属系材料研究開発センター／国際歯科学研究学会日本部会(JADR)

銅及び銅合金技術研究会／日本医学会／日本口腔インプラント学会／日本再生医療学会

日本材料学会／日本歯科医学会／日本歯科麻酔学会／日本歯科理工学会／日本人工臓器学会

日本バイオマテリアル学会／日本複合材料学会／日本補綴歯科学会

日本マグネシウム協会／日本老年歯科医学会／(株)日本経済新聞社

UIC70

無痛針採血による 在宅健康診断チップ



堀池 靖浩

(独)物質・材料研究機構生体材料研究センターフェロー

私は、2003年3月に東京大学を定年退官後、物質・材料研究機構にきました。物質・材料研究機構は、旧・科学技術庁に属していた無機材料研究所と金属材料研究所が省庁合併によって新しくできた機構で、日本の物質材料を研究するメッカになっています。

日本の国家予算約100兆円の3分の1に相当する33兆円に達し、その半分以上を65歳以上の高齢者への保険給付が占めています。2050年ころには80兆円に達すると推測され、日本の国家予算が破綻してしまいます。一方、2006年ころから総人口は減少し、2015年には65歳以上が4人に1人となり、3030年ごろには、少子化によって日本国には3人しか日本人はいないことになるそうです。

在宅健康診断システムの必要性

図1に示すように、2003年現在、医療費は

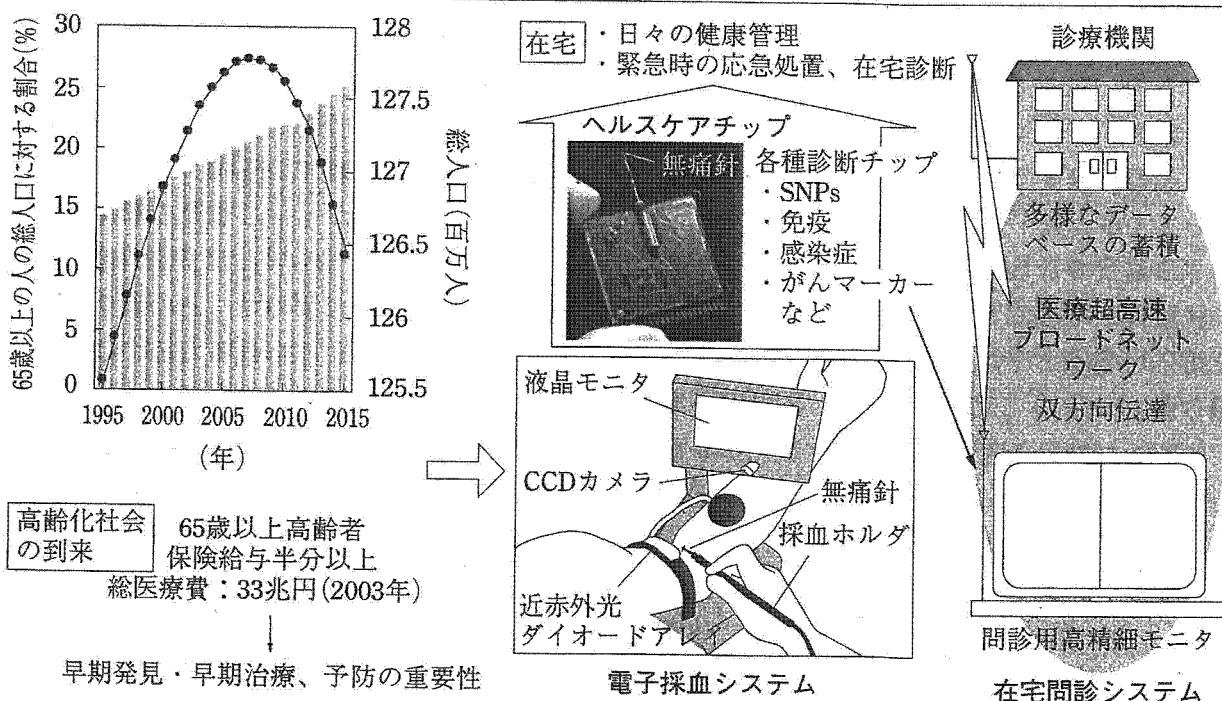


図1 診断チップ・ブロードバンド在宅問診システム

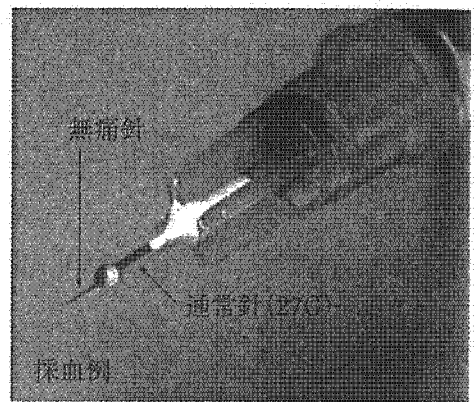
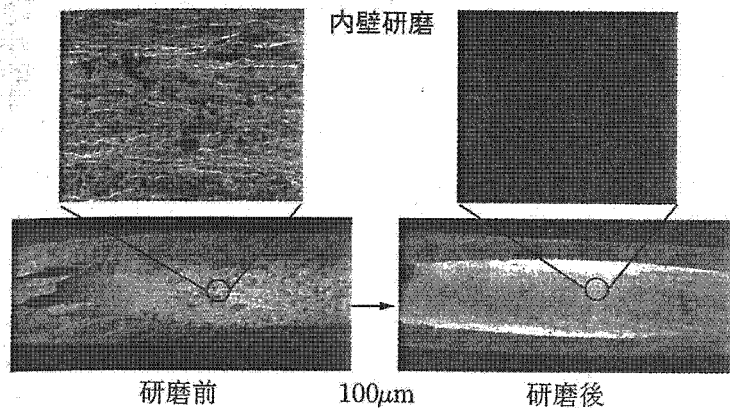
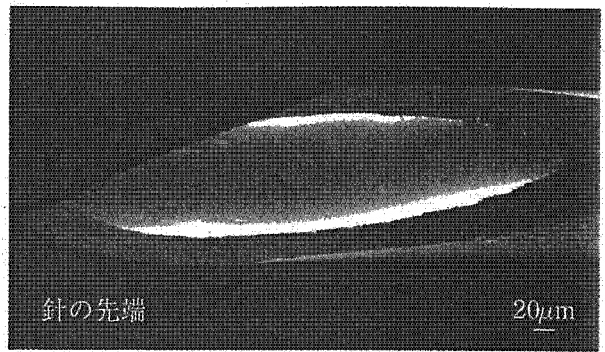
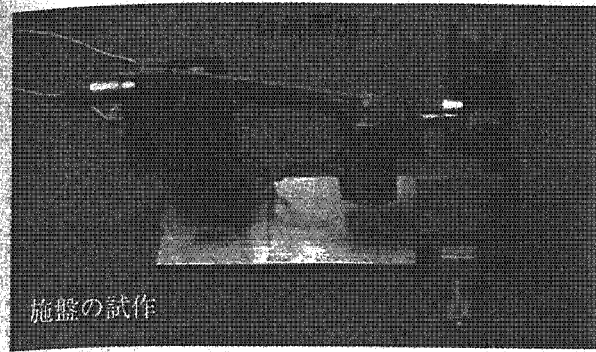


図2 無痛針の製作法

医療費を削減するためには、病気の早期発見・早期治療と、予防が必須です。私たちは数年前から痛くない針（無痛針）を使って、わずかな量の血液を採取して、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を進めています。このようなチップが実現されると、ネットワークを通して医療機関との双方向通信によって、在宅での問診が可能になります。

ヘルスケアチップとは

ヘルスケアチップとは、無痛針を介して血管からごく微量の血液を採取して、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、さらに血漿成分を電気化学バイオセンサに導いて、pH、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、グルコース、BUN（Blood Urea Nitrogen；尿素窒素）、クレアチニン、尿酸、乳酸などの生活習慣病の健康マーカーを検出・計測して、在宅で私たちの健康状態を診断するシステムです。

このヘルスケアチップの開発事項としては、まず、痛みをとまなわず、素人にも採血できることが不可欠です。また、バイオセンサが必須で、その開発にはずいぶん時間がかかりましたが、最近よくなりました。さらに、ヘルスケアチップを安く製造する量産技術を確立しなければなりません。家庭で使うため、小型で安全で、外への通信ができるものでなくてはなりませんし、治験・認可手続きも欠かすことができません。

ところで、痛みは、針を皮膚に刺す際、神経網を切断するときに感じます。そこで、外径0.15mmのステンレス製管の先端を手製の特殊な旋盤に固定して10度に3面研磨し、端面を3面カットし、最後に電解研磨をしました（図2）。また、最初に直径150μmほどのステンレス管を細くして製造しますが、その場合、内部にささくれができると、そこに赤血球などが付着して割れて Na^+ や K^+ が漏出してしまい、生化学の測定ができなくなります。最近、針の内壁を平滑に研磨することに成功

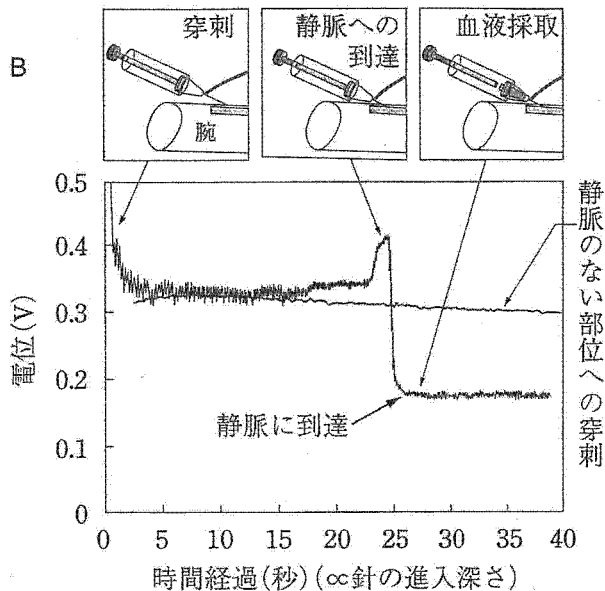
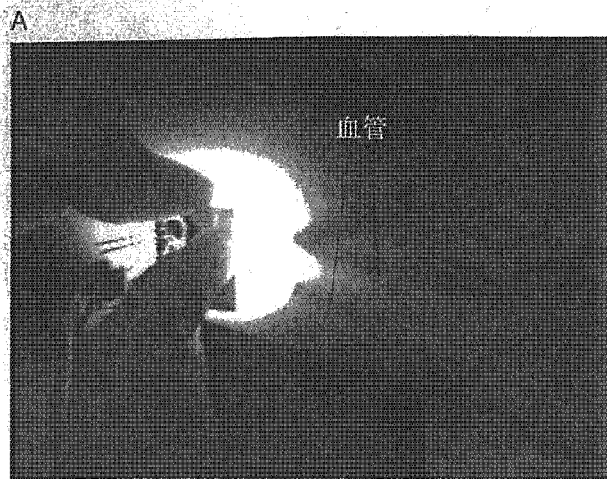


図3 採血の電子化の要素技術 A：近赤外光像、B：針の穿刺時の針と皮膚表面の電位変化

しました。その結果、血液を自分の血圧で採取できるようになりました。この針は、従来の針の外径の4分の1程度ですので、腕に刺しても痛みは感じません。いろいろな人が試していますが、皆、痛くないといえます。

血管の可視化と採血

一般の方が在宅で自分の血管を探しだすことは容易ではありません。針の所在がみえないことが多いからです。しかし、波長850nmの近赤外光を使うと、この光をヘモグロビンが吸収することで血管を可視化することができます。そして、探しだした静脈に正確に針を刺すには、針と腕表面との間に生じる電位の測定をするようにします。静脈のない筋肉

に針を刺しても電位は何ら変化しませんが、血管部に達すると電位が上がり、血管に触れると急激に電位が低下します(図3)。このことから、針が静脈にあたったことがわかります。

また、お医者さんと同じように採血することは難しいことから、電子採血を考えました。図4に示す人は、採血するときに静脈をみず、ディスプレイ画面をみえています。この方法でも6 μ l(1mm角を6つ並べた量)を採取することができます。これくらいの量であれば、かなり多項目の検査が可能です。

ヘルスケアチップの作製工程

私どもはずいぶん前からヘルスケアチップの研究をしています。このごろになってやっと実用化できそうになってきました。これまでの歴史について詳しく触れることはできませんが、最近では図5に示すような、針とチップを分離することができるものを作製しています。針には滅菌するためガンマ線を照射しますが、針とチップを一緒にしているとガンマ線によりバイオセンサが痛むため、それぞれが分離できるようになっているのです。

ここで、ヘルスケアチップの製造法は、ま



図4 無痛針を用いた電子的採血

採取
静脈のない部位への穿刺
0

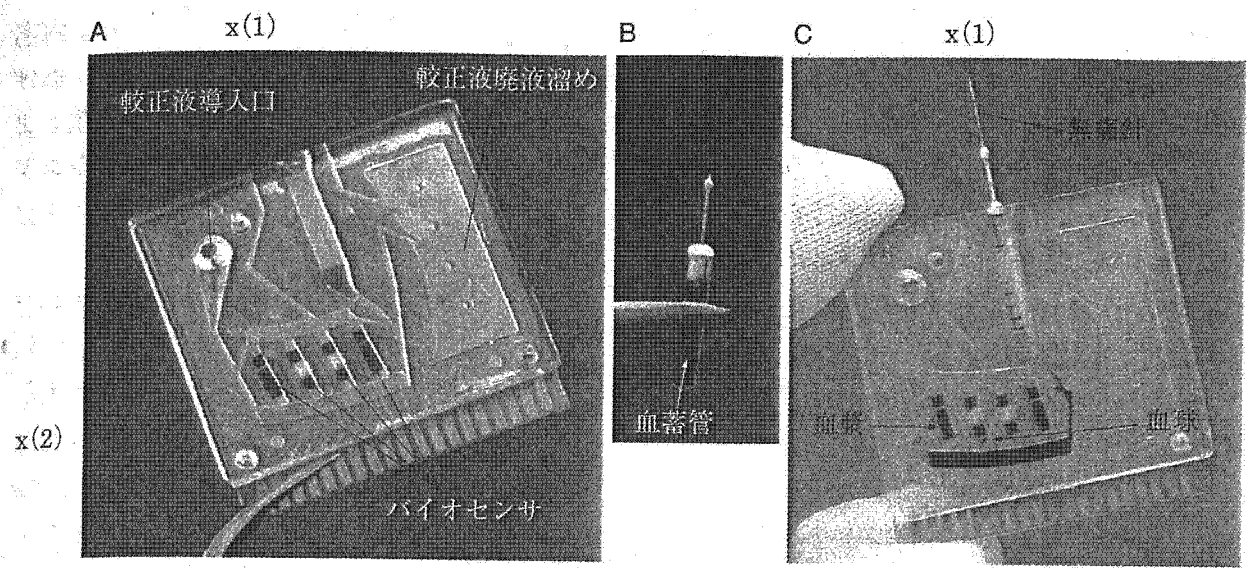


図5 ヘルスケアチップの写真 A：針装着前、B：無痛針による採血後の針アセンブリ、C：血液を導入後、血球と血漿を分離した後のチップ。動作；Aにおいて較正液を導入して、x(1)を中心として回転して遠心力により較正液をバイオセンサ流路に導入。構成後チップを右回りに90度回転し、x(2)を中心に回転して廃液溜めに導入。次に採血後の血血管をチップ上部に挿入して、x(1)を中心として回転して遠心力により血液をバイオセンサ流路に導入すると、血球は流路の底に、血漿はバイオセンサ上を覆い、測定できる

ず、射出成形を用いて金型でポリカーボネート製の流路チップを作製します。一方、ポリエステル基板のなかに炭素やAg/AgClで電極を作製し、また、参照電極としてKClを飽和させた電極も作製し、配線は銀カーボンなどを多層でスクリーン印刷します(図6)。この流路側と電極側とを貼り合わせると完成です。

大量のチップを製造する必要があるので、図6に示す電極上に電気化学的測定用のバイオセンサを作製するためグルコースオキシダーゼなどの酵素膜を多層に塗布し、さらにかなり小さな部分につける必要があることから、自動的に位置決めをして吐出するようにしています。

センサの開発

ヘルスケアチップでは、血液の採取とセンサがもっとも重要です。ナトリウムセンサの開発過程で、さまざまな問題が生まれました。ナトリウムセンサは、Na⁺だけをトラップするような膜を塗ります。それはクラウンエーテルといって、王冠の形状をしたなかにNa⁺が

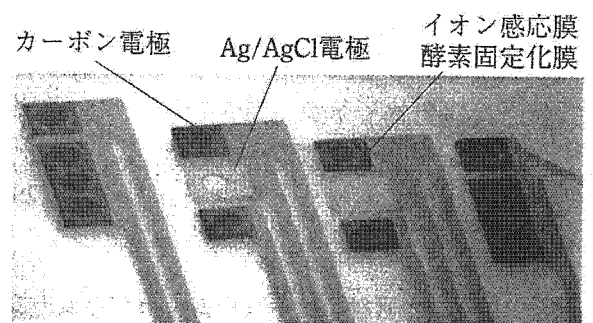


図6 電気化学測定用電極の写真

はいるもので、それをカーボン電極上に固定化します。そこが非常に難しい点です。

そして、製造後、すぐ使用するといろいろな濃度に対して正しく応答しますが、1か月後にはまったく応答しなくなることが起こりました。それは、膜が高抵抗になったことに原因があります。この間、組成比の最適化、AgCl電極の採用、膜厚の均質化、親水性の電解質塩の中間層の挿入といった研究を重ねて、膜質、膜構造の最適化を図って、現在は図7に示すように1か月、2か月たっても安定な特性を示すものが作製できています。

また、腎臓病のマーカになるグルコースや

BUNは、当初は非常にきれいに測定することができましたが、やはり問題がありました。図8は、重合メディエータを用いた新しいグルコースセンサです。グルコースオキシダーゼがグルコースと出会うと反応して電子を放出しますが、このときカーボン上にフェロセン層というメディエータをおいて電子を供与して酸化還元反応を起こさせます。以前は、カーボンの上に酵素をポリイオンコンプレックスという方法によりクーロン力で挟みこんでいましたが、酵素がここからはがれてフェロセンがなくなるため測定できなくなることが判明しました。そこで、新しく設計したボ

リフェマ (VFc-co-HEMA) を重合させて内部でカーボン上につけますが、そのとき、逃げないようにグルタルアルデヒドで固定化します。グルタルアルデヒドが多いとセンシングしませんが、ある濃度になるとグルコースに応答します。

また、BUNを測る場合、ウレアーゼという酵素で反応させるとアンモニアが生成します。このアンモニアを測定するのは容易ではないことから、開発当初は水素濃度を測定するようにしました。しかし、BUN用とpH用のセンサをひとつの流路におくと、尿素を添加していくにつれBUN量がふえ、pHも変化して

しまいます。pHが変化するという事は、死んでいることを意味します。つまり、pHは変化してはいけません。そこで、両方のセンサを2つの流路にわけて配置すると測定することができました。

ただし、水素イオンは血液中にたくさん存在するため干渉しま

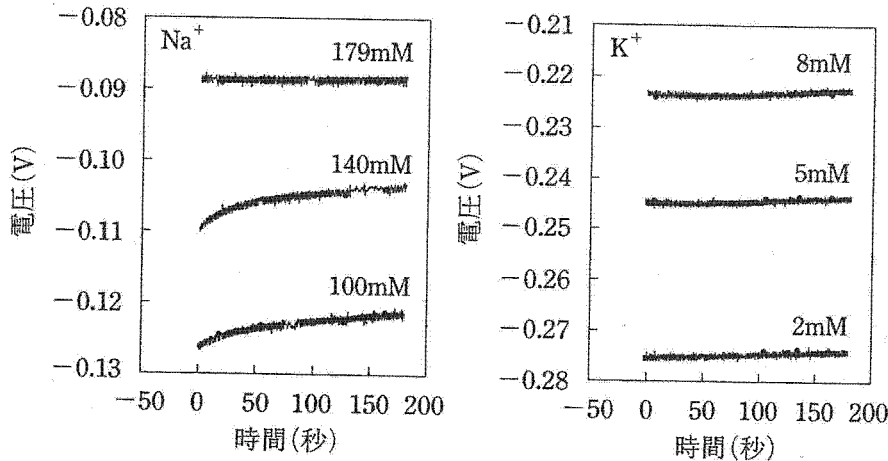


図7 製作1か月後のナトリウム、カリウムセンサの特性

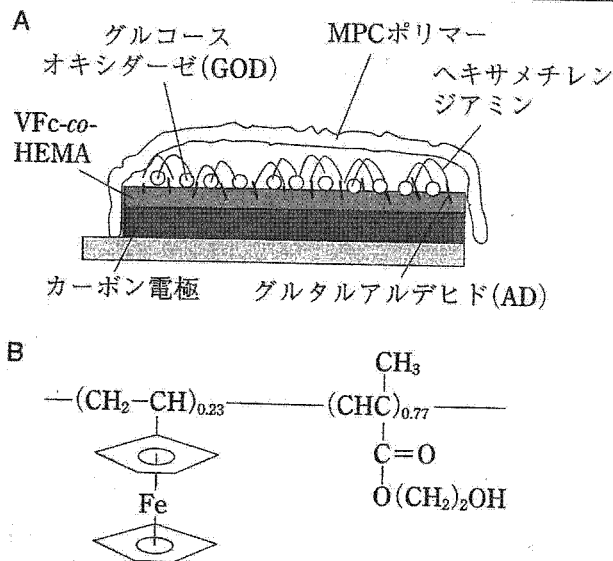
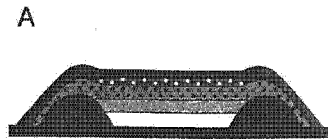


図8 新グルコースセンサ A: 構造、B: VFc-co-HEMA 重合メディエータの構造、C: グルタルアルデヒド濃度変化に対する電流とグルコース濃度の関係

す。そこで現在、アンモニアを測定するためにイオノフォアを用いています。イオノフォアの上に尿素センサとしてウレアーゼ酵素を塗り、その上からセルロースアセテートで固定化すると、濃度が大きくなるにつれてこのBUNチップで測れるようになります(図9)。



- 図の上の層から
- セルロースアセテート
 - ウレアーゼ
 - イオノフォアPVC膜
 - 0.1M NH₄Cl+0.5%PVP
 - スクリーン印刷AgCl層
 - スクリーン印刷Ag電極

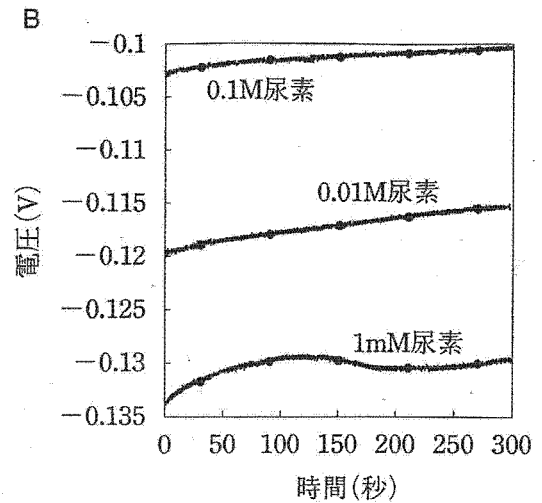


図9 BUN(尿素窒素)センサ Aはその構造、Bは特性

バイオセンサの校正後、図5に示したチップを用い、まずは採血針をつけずにチップのバイオセンサ部に校正液を遠心力で導入します。次に90度回転させ、遠心力で廃液溜めに捨てます。これで校正した後、採血したアッセンプリをチップの上部に挿入し、遠心力をかけると血液が内部にはいり、さらに遠心力をかけると血球と血漿成分が分離します。この血漿からいろいろなマーカーを測定します。バイオセンサがある部分が血漿で埋められるようになることでNa⁺、K⁺、グルコース、BUNを家庭内で測ることができます。

肝機能診断チップ

これは酒飲みの私のために開発したようなもので、アルコール性肝障害などを起こすと、壊れた肝細胞から流出するγ-GTP、GOT、GPTの3つの酵素が血液にはいるので、これらの活性値を血漿から測定するようにしたものです。まず、Na⁺濃度やK⁺濃度などは、先ほどのバイオセンサで測定します。ただし、現在の血液検査では肝機能、腎機能、循環器はすべて比色法で調べています。測定法は、試薬を血漿と10~50:1の比率で混合して、その反応生成物の光の吸収から各酵素の活性値を測ることで肝機能の状態がわかります。たとえばγ-GTPでは、ある試薬を用いると

405nmに発色します。そこで、405nmの光を透過させると吸収されて透過しにくくなるので、その減衰度を測定します。

比色法では混合(ミキシング)が重要です。しかし、100μmほどの小さな流路へ溶液をいれると、奇妙な現象が起こります。通常の場合には、川に赤色のインクをいれると水と混ざり薄くなりますが、マイクロ流路に2つの溶液をいれると、まったく混合せずに流れます。これを層流と呼びます。

そこで私たちは多段構造のマイクロミキサーを開発しました。図10に、このミキサー室の構造を示しましたが、2つの溶液を壁と衝突させて、その後、狭い部分で分子を拡散させて、またぶつけます。急激な方向転換も重要です。最初に、蛍光色素をつけた溶液と、そうでない溶液を混ぜてもまったく混ざりませんが、だんだんと混ざっていく様子がみえ、6段目ではきれいに混ざっているのがわかります。図11にはγ-GTP、GOT、GPTの3つの酵素の測定用のチップを示しますが、これにより、検量線が得られました。それぞれ波長が違いますが、3つを測定することができます。

ただし、家庭で採血して血漿と血球を分離して、さらに人間がピペットで血漿をいれて測定することは難しいことから、先ほどと同

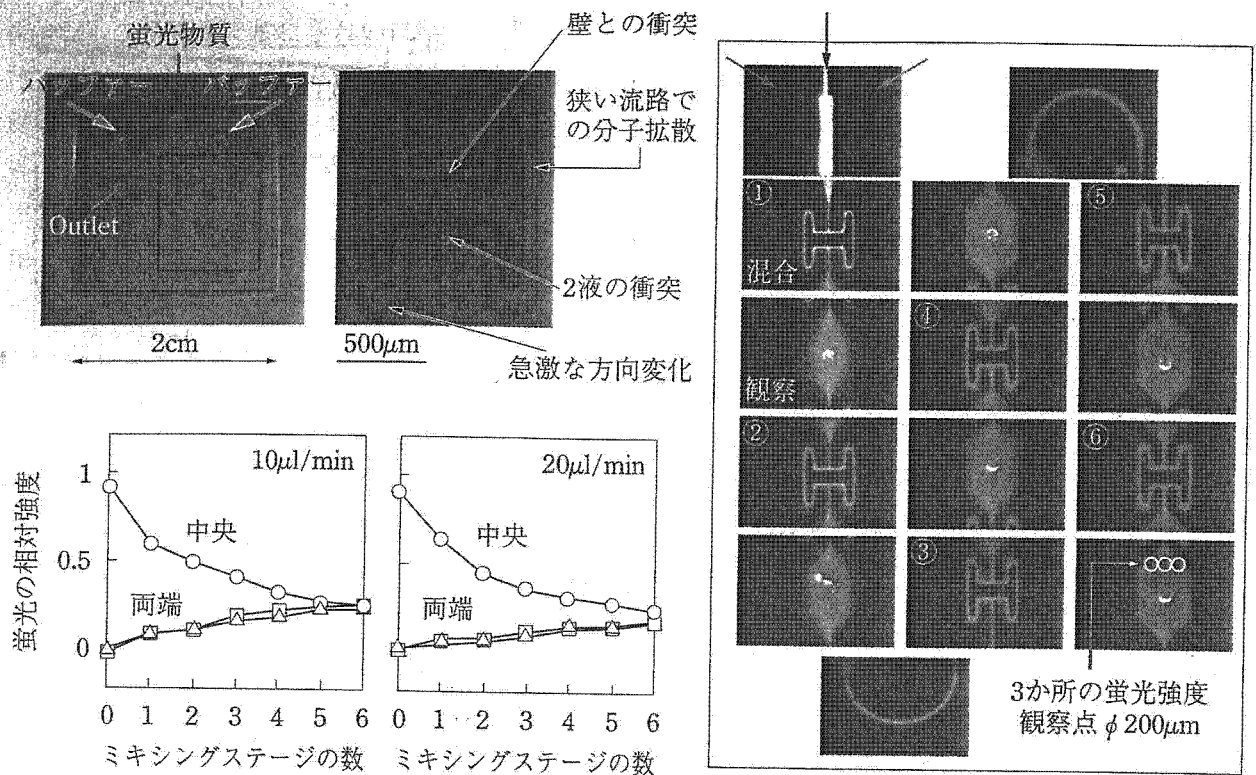


図10 多段構造マイクロミキサーとその混合効果

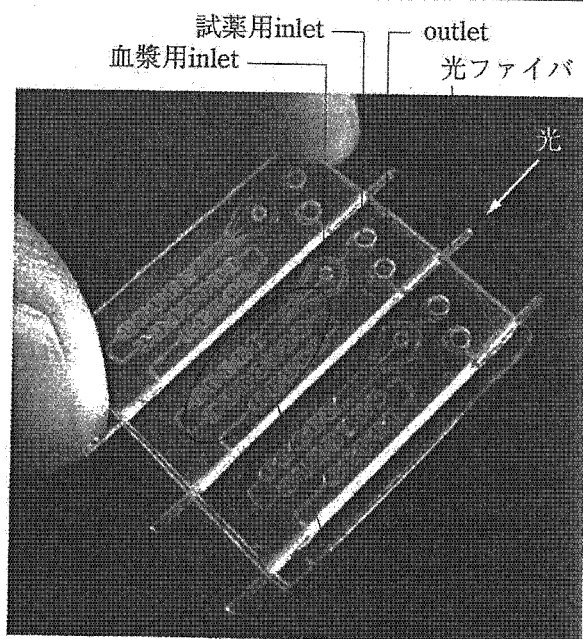
様、採血後は自動的に測定できるようワンチップに検査機能を集積化しています。図12は γ -GTP用のひとつの検査項目ですが、U字管に血液をいれて回転させると血漿が分離され

るので、その血漿を秤量して、その後、試薬を混ぜて比色を測定します。このチップを、(株)ロームと2004年3月までの1年半ほど共同研究しました。

図13は、 γ -GTPを測った例です。これで検量線をよく引きます。いろいろな γ -GTPをいれると少し散らばりますが、現在は改良されてよくなっているはずですが。現在、(株)ロームでは γ -GTP、GOT、GPTの3つを測るために、私たちが考えた方法で研究していると思います。

おわりに

このようなチップは、何に使われるのかとよく聞かれます。私の目的は、高齢者が自宅で測定して病気予防に役立てることです。Na⁺、K⁺濃度などを測ると保険点数でおおの100円程度なのに、このチップは1個1,000円ほどします。それでは儲けにならないので、その使い道を医者に聞いたところ、まず無痛針では未熟児や新生児の採血が難しいが、私



Alコートした検出流路 マイクロミキサー
図11 3項目の肝機能検査用比色チップ

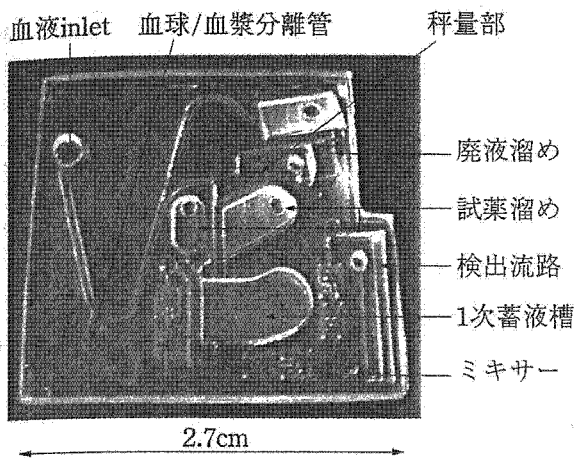


図12 γ -GPT 検査用機能集積化チップ

どもの針は血管がどこにあるかわかるので、その方面で使用できるということでした。また、血液検査では多量の血液が必要ですが、この方法ではごく微量の採血量ですみますし、患者はすぐ結果を知りたいと思いますが、その場で検査することができます。さらに、診療室には大型装置を設置する場所がありませんが、これは非常に小型です。

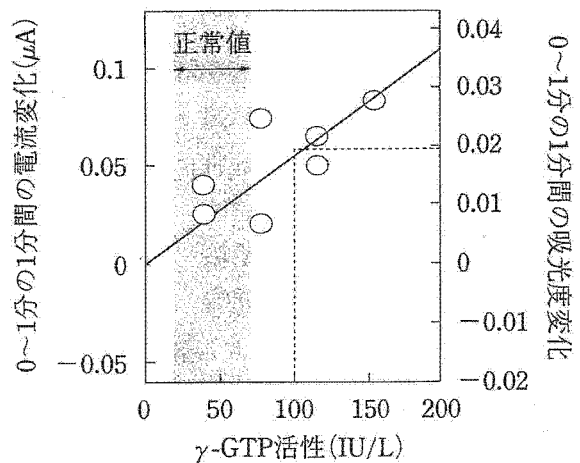


図13 集積化チップによる γ -GTPの検量線取得

スポーツクラブに通って健康に気をつけている多忙な中高年層がたくさんいます。その人たちが肝機能、腎機能、グルコース値(糖尿病)、コレステロール量、中性脂肪量を測定したいという要望があることから、現在、それに向けて開発を進めています。できるだけ早く、ここ半年以内に、なんとかして治験にもっていきたいと思っています。

Q & A

■ Q ■

血液分析は、将来自家で個人でできると考えてよいのでしょうか。

● A ●

それを目指しています。私どもは20項目ほどを目指しており、家庭でほとんど身体検査ができると思います。

■ Q ■

無痛針を使わない方法であれば、現在でも個人で血液の分析ができますか。無痛針の部分は、たぶん医療認可をうけなければいけないと思います。自分で採血して、それを

チップ上で分析することはできるのでしょうか。

● A ●

針がついているものは針の認可が遅れるため、まず、針のついていないチップを医者に渡して「使ってください」とお願いしたいと考えています。その間に認可をうけて、最後は針とチップをつけて販売していきたいと考えています。

■ Q ■

ピンでばちんとやって、指先から1滴血液を採取するようなシステムとセンサとの組み合わせなら、先行してチッ

プを使っていくことは可能でしょうか。

● A ●

ランセットと呼ばれていますが、まず痛いことと、血液だけであればよいのですが、この採取方法ではリンパ液など体液がでて血液が薄まってしまいます。その体液の影響はまだ調べていませんが、個人差があるので、どうなるかわかりません。一般的に、そのうちどのくらいが血液なのか較正して、これだったらできますよということならできると思います。ただし、多項目

の検査には血液量が少し足りません。いろいろな医者に聞いても、自分で採取できる血液の最大量は10 μ lといわれ、私どもは10 μ l程度の量で多項目を測れないとチップの意味がなくなると思っています。

■ Q ■

血漿成分の測定原理は、今まであったものを小型化したというイメージですが、新しい原理に基づくセンシングの研究はどのくらい進んでいますか。

● A ●

今までのものを小さくしたものではないかといわれれば、それまでですが、現在、ドライケミストリーと呼ばれる方法があり、ゼラチンのなかにあらかじめ溶液をいれておいて、溶液は基質緩衝液で固体にします。それに血液があたると色が変わります。それに

要ですが、われわれは現在、ナノリットルで多項目を測れるものを開発しています。それも、そんなに新しくはありません。1項目だけなら特異的に測れるものはありますが、20項目、30項目を測ろうとすると、従来法を用いて、いかに血液量を少なくするかが当面の目的になります。

■ Q ■

血清部の分離サンプルの導入について、遠心分離をしていますが、そのほかの方法はありますか。

● A ●

ガラスフィルタなどを用いて、吸引するだけで血球と血漿を分離させる方法があります。私は微細加工が専門ですから、そのようなものをつくりましたが、引っ張っている途中に血球がつまって、それ以上流れないといった問題がありました。ガラスウールな

どを用いるものは、10 μ lの血液から2 μ lほどの血漿しかとれず、収率がよくありませんし、強引にやると血球が割れてしまいます。遠心分離は大昔からありますが、血球を割らずに血漿を分離するよい方法です。家庭では、回転機器があるため、ちょっと問題もありますが、コンパクトディスクを扱うのと同じように使えばよいと思います。

ただし、微細加工を用いて血球と血漿を分離する方法はさかんに研究されています。何といっても血液には4,000種類の情報があり、血液から出発することは重要です。血漿、血球、血球も白血球、赤血球、白血球もリンパ球と、全部わけていくと、いろいろなことがわかります。私たちはそのような研究も進めています。

Fabrication of nano-pillar chips by a plasma etching technique for fast DNA separation

R. Ogawa*, H. Ogawa, A. Oki, S. Hashioka, Y. Horiike

National Institute for Materials Science (NIMS), Tsukuba, Ibaraki, 305-0044, Japan

Available online 27 November 2006

Abstract

The fabrication of quartz nano-pillars was investigated using dry etching with a Ni mask. The mask diameter increased during etching due to re-sputtering of the Pt/Cr seed layer. However, once the seed layer had been eroded the enlarged mask diameter did not increase any further. Hence, the use of the mask enabled the fabrication of nano-pillars with a high aspect ratio. In situ FTIR–ATR observation of HF quartz plate pressure bonding developed a new bonding technique involving the use of H_2SiF_6 . The nano-pillar chips allowed then to size-separate DNA of 10 kbp and 38 kbp within 20 s.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nano-pillars; Quartz bonding; DNA electrophoresis; DNA size separation

1. Introduction

After 100% of the human genome project was deciphered in 2003, studies in genomics are now advancing towards tailor-made medical treatments according to individual genome information. This goal requires a new DNA separation technique that is between 10^8 and 10^9 times faster than current separation methods such as gel based capillary electrophoresis. In addition, it will be necessary to separate DNA fragments that may be several tens of kilobases in length. Existing techniques such as pulsed-field gel electrophoresis [1–3] suffer from decreased separation resolution as the length of the DNA fragment increases. To overcome these issues, microfluidic devices with nano-structures are being studied as an alternative to gel electrophoresis. For example, Craighead et al. reported a technique for the separation of circular (M13) and linear lambda DNA [4] employing nano-pillars, and the device showed the function as a molecular sieve. Also, the size-separation of DNA [5–7] was reported by Craighead et al., based on entropy trapping employing microfabricated nano-structures. Those devices for DNA separation were fabricated using lithographic techniques. Arrays of self-assembled magnetic bead columns were also investigated and used to separate DNA fragments of tens of kilo base pairs (kbp) [8,9].

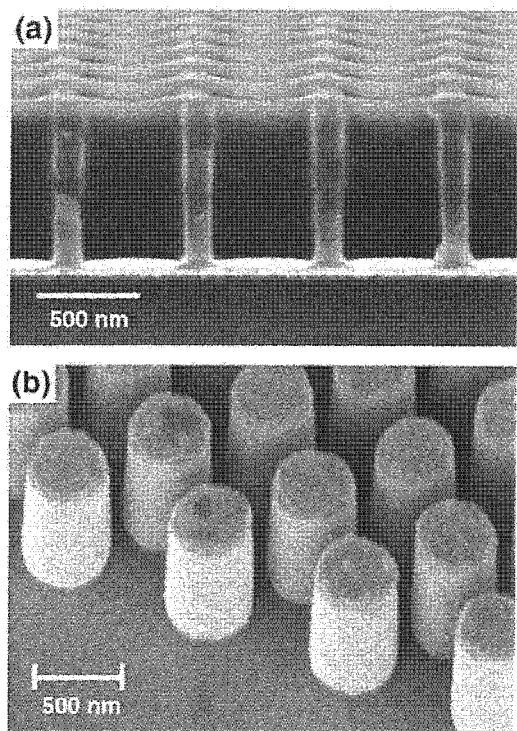


Fig. 1. (a) Cross-sectional SEM picture of the resist hole pattern and (b) of the Ni posts after removal of the resist, viewed at an angle of about 45° .

* Corresponding author.

E-mail address: Ogawa.ryo@nims.go.jp (R. Ogawa).

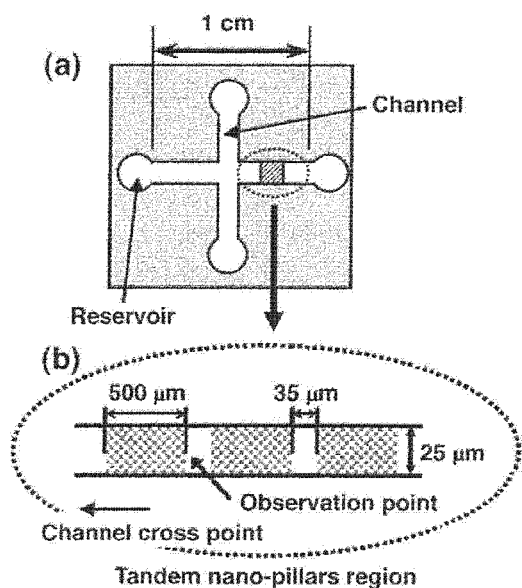


Fig. 2. (a) Schematic of the channel layout and (b) enlarged view of the separation channel, showing regions with and without nano-pillars.

Previously, we demonstrated the electrophoretic separation of DNA in a microchannel containing an array of nano-pillars. With this technique, we were able to reduce the time required

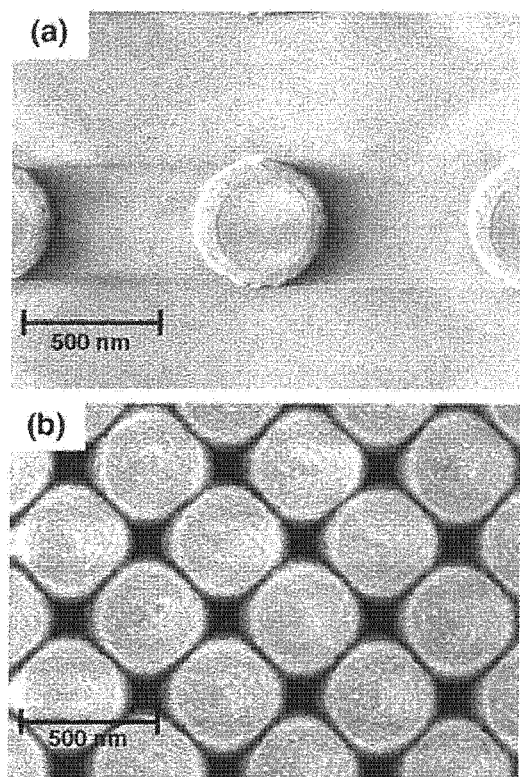


Fig. 3. SEM pictures of quartz nano-pillar patterns after one minute of etching, where the center-to-center distance of the Ni mask was (a) 1 μm and (b) 600 nm. The initial diameter of the Ni masks was 450 nm.

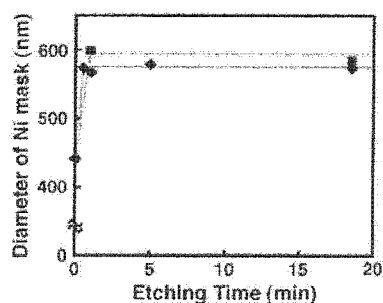


Fig. 4. Ni mask diameter changing with time for a center-to-center distance of 600 nm (\blacklozenge) and those of 1 μm (\blacksquare).

for the separation of T4-DNA (166 kbp) and λ DNA (48.5 kbp) from half a day for conventional gel electrophoresis to just 25 s [10]. Furthermore, by employing a channel with regions with and without pillars permitted the multi-stage separation of DNA fragments from 100 bp to 1 kbp. The microfluidic devices were fabricated using quartz substrates. The use of quartz prevented dielectric breakdown when applying the high electric fields required for the electrophoretic separation of DNA and also permitted the observation of fluorescently labeled DNA molecules excited using ultraviolet light.

This paper describes the technologies involved in the fabrication of nano-pillars on a quartz plate, and a new bonding technique for quartz plates based on elucidation of the mechanism responsible for 1% HF bonding [11] using FTIR-ATR (Fourier transform Infrared-Attenuated Total Reflection). The separation of DNA using these nano-pillar chips is also reported.

2. Experimental

2.1. Nano-pillar fabrication

A 0.5 mm thick quartz wafer was sputter-coated with a Pt/Cr seed layer. The layer thickness ranged from 50 to 70 nm due to

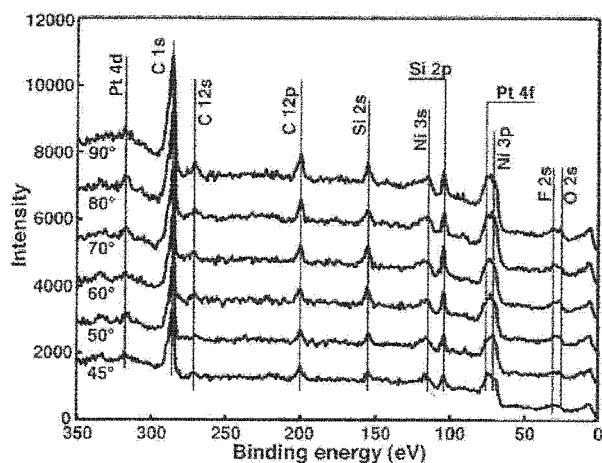


Fig. 5. Angular dependent XPS spectra of a quartz surface with Ni masks after etching for 1 min.

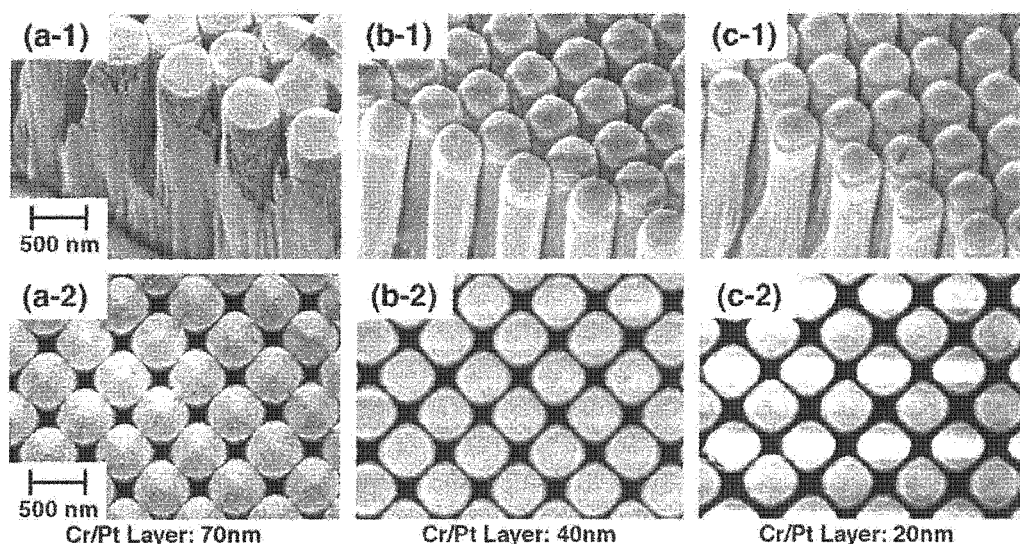


Fig. 6. SEM pictures of nano-pillars formed by the etching of substrates with different Pt/Cr seed layer thicknesses: (a) for 70 nm, (b) for 50 nm and (c) for 20 nm. The top row of figures is viewed at an angle of about 45° while the bottom row of figures is viewed from above.

the instability of our sputter–deposition system. This wafer was then spin coated with an electron beam (EB) resist (ZEP-520A, Nippon Zeon). This resist was patterned with an array of 500 nm diameter holes using EB lithography (ELS-7500, Elionix). Ni was then electroplated into the array of holes left in the resist. The remaining resist was removed, leaving an array of 450 nm diameter Ni pillars (see Fig. 1). The substrate was then etched by employing Neutral Loop Discharge (NLD) [12] with CF_4 . Ni and quartz etch rates were 21.5 nm/min and 238 nm/min, respectively, thus leading to a selectivity of 12 for quartz relative to Ni. After removal of the Ni mask by wet etching, the substrate was pressure bonded to a 130 μm thick quartz top plate that had been dipped into H_2SiF_6 . A pressure of 1 MPa was applied for 12 h at 65 °C.

2.2. DNA electrophoretic separation

A schematic of a fabricated nano-pillar chip with two intersecting channels is shown in Fig. 2(a). Each channel was 1 cm in length, 25 μm in width, and 4 μm in depth. 500 μm long regions of nano-pillars were arranged along the separation channel with a spacing of 35 μm between each region, as shown in Fig. 2(a) and (b). The electrophoretic behavior of individual DNA molecules (T4 DNA, 166 kbp) was observed using a fluorescence microscope with a water immersion lens (see Fig. 10). For these observational experiments, the applied electric field was 25 V/cm. λ DNA was digested into 10 kbp and 38 kbp fragments by *Apa*I. The electrophoretic separation of DNA was investigated by electrically injecting a plug of a sample containing *Apa*I digested fragments into the separation channel of a nano-pillar chip. The DNA fragments were 10 kbp and 38 kbp in length, and the electric field in the separation channel was 100 V/cm. The fluorescent intensity of DNA labeled with YOYO-1 was observed at a point 500 μm downstream from the last nano-pillar region.

3. Results and discussion

3.1. Increase in diameter of Ni pillars after etching

Fig. 3(a) and (b) show overhead views of quartz pillar patterns after etching for 1 min using Ni masks with an original diameter of 450 nm, where center-to-center distances of the Ni masks for (a) and (b) were 1 μm and 600 nm, respectively. The diameter of the quartz pillars in (a) increased to 600 nm. The pillars in (b) formed a pseudo-square shape with a side-to-side width of 520 nm and a diagonal width of 690 nm. In this paper, the inter-pillar gap is defined as the nearest distance between pillars. For example, a center-to-center distance of 600 nm with 500 nm diameter pillars corresponds to a 100 nm gap. Thus in case (b), the gap for the side-to-side direction was about 30 nm.

In order to investigate the origin of the increase in diameter of the quartz pillars after etching, the time-dependent variation of Ni mask diameter was measured for both (a) and (b) as shown in Fig. 4. For case (a), within 1 min, the diameter of the Ni

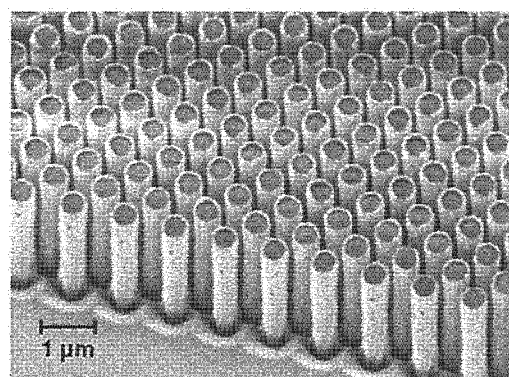


Fig. 7. SEM picture of nano-pillars with a diameter of 500 nm, an inter-pillar gap of 100 nm, and an aspect ratio of 8.

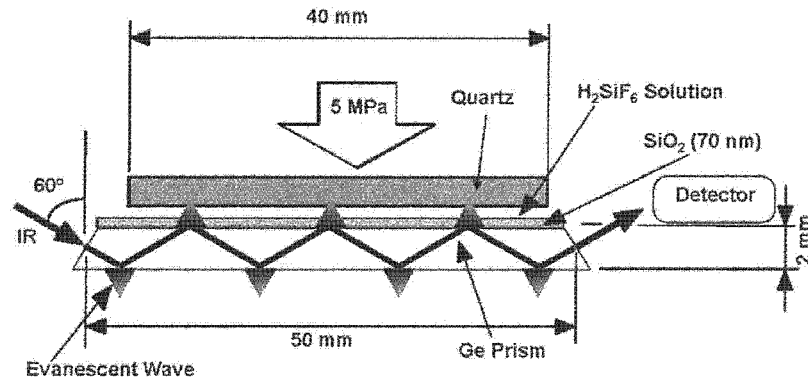


Fig. 8. Schematic cross section of the specimen used for *in situ* FTIR-ATR observation of the pressure bonding process.

pillars increased to 600 nm, and in case (b), within 1 min, the side-to-side width increased to 570 nm. Subsequently they did not increase any further. It is revealed that the increase of diameter in Ni pillar led the diameter of quartz pillar to increase. The entire surface including pillars was analyzed using XPS (X-ray photoelectron spectroscopy, Quantera, PHI). Fig. 5 shows the result of an angular-dependent XPS measurement, where specimen angles were changed from 45° to 90°. Spectra were acquired from substrates that had been etched for 5 min. Peaks corresponding to carbon/fluorine and Ni originating from the etching gas and the mask were clearly detected. Although no significant differences between angular-dependent spectra were observed, the peak at 315 eV was evaluated to result from the 4d orbital of Pt. Hence it is likely that the surface of the Ni mask is covered with the sputtered Pt-Cr seed layer. Peaks from Cr could not be detected because the strong peaks of Cr overlapped with the peaks of oxygen. These results demonstrate that the sputtered Pt-Cr film re-attaches to the sidewalls of the Ni mask in the initial stage of quartz etching. Once the Pt/Cr seed layer has been eroded, there is no more material available for re-attachment and the mask diameters do not change any more (Fig. 4). Therefore the thickness of the Pt/Cr seed layer was altered to see what effect that would have on the morphology of the etched pillars as shown in Fig. 6. When the thickness of the Pt/Cr seed layer was 70 nm, adjacent Ni masks almost overlapped with each other after etching due to re-attachment.

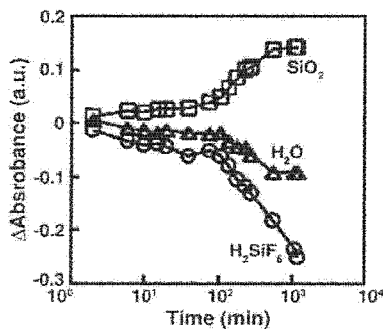


Fig. 9. FTIR-ATR absorbance changes of: SiO_2 (1070 cm^{-1} , \square), H_2O (1650 cm^{-1} , \triangle) and H_2SiF_6 (739 cm^{-1} , \circ).

However, the gaps between Ni masks after etching did not disappear for Pt/Cr seed layer thicknesses of 50 nm and 20 nm. Hence, by using a thinner seed layer, a regular array of high aspect ratio quartz nano-pillars could be fabricated, as shown in Fig. 7 for 500 nm pillars with a 100 nm gap and an aspect ratio of 8.

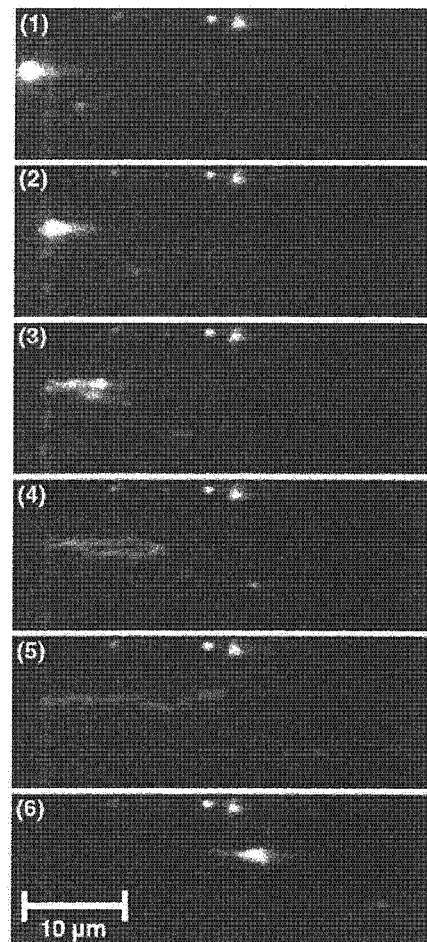


Fig. 10. A series of photographs of the single molecule electrophoretic behavior of T4 DNA (166 kbp) in the nano-pillar chip.

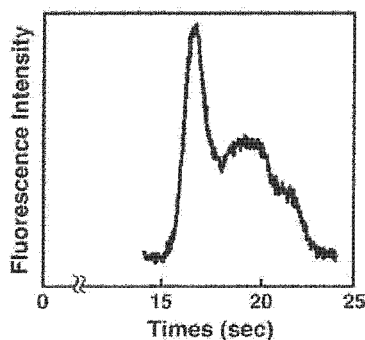


Fig. 11. Electropherogram of the separation of 10 kbp and 38 kbp DNA in the nano-pillar chip.

3.2. Quartz bonding using H_2SiF_6

Fracturing of the quartz plates was often encountered when employing 1% HF dipping and subsequent pressure bonding at 1.3 MPa [11] to bond the 130 μm thick quartz cover plate onto the patterned substrate. In order to improve this bonding technique we investigated the mechanism responsible for bonding. We prepared a FTIR–ATR (Fourier Transform Infrared–Attenuated Total Reflection) system as shown in Fig. 8, in which a SiO_2 layer of 70 nm thickness was sputter-deposited onto the surface of a Ge prism. A quartz plate was dipped in 10% HF and then pressed onto the SiO_2 /Ge surface at 5 MPa. Time-dependent changes of absorbance due to the formation of products were investigated. The results revealed clearly that the interface of the quartz plates was first etched by the HF solution, thereby producing H_2O and H_2SiF_6 as products. Subsequently, SiO_2 was formed at the interface as a result of H_2O and SiF_4 elimination. During measurements, we noted the growth and then diminution of the H_2SiF_6 adsorption peak. It occurred to us that since the H_2SiF_6 was responsible for SiO_2 formation at the interface, then H_2SiF_6 could be utilized directly as a bonding agent. Fig. 9 shows time-dependent changes of the SiO_2 , H_2O and H_2SiF_6 absorption peaks. Both H_2O and H_2SiF_6 peaks decreased as the amount of SiO_2 increased. Based on these results, a quartz plate was dipped in H_2SiF_6 solution and then placed in contact with another quartz plate. A satisfactory bond was achieved when these plates were subjected to a pressure of 1 MPa at 65 °C for 12 h. These conditions were milder than those required for the 1% HF dipping technique.

3.3. DNA size separation

The single molecule behavior of T4 DNA (166 kbp) in the nano-pillar regions was observed and this is shown in Fig. 10. DNA underwent repeated cycles of shrinking, stretching, and hooking. The DNA fragments did not follow a straight path and often changed direction. This behavior suggests that the nano-pillars play a role that is analogous to the sieving effect that occurs when using a polymer matrix in gel electrophoresis. The electrophoretic speed of the DNA fragments in the pillar-covered regions

was 31.4 $\mu\text{m/s}$. The separation of 10 kbp and 38 kbp DNA fragments obtained from *Apa*I digested λ DNA was investigated using a nano-pillar chip with a pillar gap of 100 nm. An electropherogram of this separation is shown in Fig. 11. Two peaks can be observed, indicating the successful separation of 10 and 38 kbp DNA within 20 s.

4. Conclusions

Nano-pillars were fabricated by dry etching using a Ni mask. The mask diameter increased from 450 nm to 570 nm during the etching process. This was caused by reattachment due to sputtering of the Pr/Cr seed layer on the quartz plate substrate. The growth of the Ni mask stopped once the seed layer had been eroded by the etching process and thus nano-pillars with high aspect ratios could be fabricated. An investigation of the quartz HF dip-bonding mechanism with in situ FTIR–ATR led to the development of a more effective bonding method involving the use of H_2SiF_6 . The nano-pillar chip fabricated using these technologies allowed us to separate 10 kbp and 38 kbp DNA fragments within 20 s.

Acknowledgements

The authors would like to express our great thanks to Dr. Alexander Iles of the National Institute for Materials Science who corrected carefully English.

This research was partially supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Grant-in-Aid for Young Scientists (B), 17750078 6822, 2005 and the Advance Nano-Bio Device Project (P03011) supported by NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization).

XPS analysis was supported by the Material Analysis Station of the National Institute for Materials Science.

References

- [1] M. Lalande, J. Noolandi, C. Turnel, J. Rousseau, G.W. Slater, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84 (1987) 8011.
- [2] G.W. Slater, J. Noolandi, J. Rousseau, C. Turnel, M. Lalande, Biophys. J. 53 (1988) A475.
- [3] C. Turnel, E. Brassard, G.W. Slater, J. Noolandi, Nucleic Acids Res. 18 (1990) 569.
- [4] S.W. Turner, A.M. Perez, A. Lopez, H.G. Craighead, J. Vac. Sci. Technol., B 16 (1998) 3835.
- [5] J. Han, S.W. Turner, H.G. Craighead, Phys. Rev. Lett. 83 (1999) 1688.
- [6] J. Han, H.G. Craighead, Science 288 (2000) 1026.
- [7] J. Han, H.G. Craighead, Anal. Chem. 74 (2002) 394.
- [8] P.S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud, J.-L. Viovy, Science 295 (2002) 2237.
- [9] N. Minc, C. Fütterer, K. Dorfman, A. Bancaud, C. Gosse, C. Goubault, J.-L. Viovy, Anal. Chem. 76 (2004) 3770.
- [10] N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, Y. Baba, Anal. Chem. 76 (2004) 15.
- [11] H. Nakanishi, T. Nishimoto, M. Kanai, T. Saitoh, R. Nakamura, T. Yoshida, S. Shoji, Sens. Actuators 83 (2000) 136.
- [12] Y. Chinzei, M. Ogata, H. Shindo, T. Ichiki, Y. Horiike, J. Vac. Sci. Technol., A 16 (1998) 1519.