

コンパクトディスク型マイクロチップを用いた マイクロ生化学分析システムの開発

Development of Micro Biochemical Analysis System on a Compact Disk-Like Microfluidic Device

研究代表者 九州大学大学院 工学研究院 助教 中嶋 秀
(現 首都大学東京大学院 都市環境科学研究科 准教授)

【研究の目的】

我々人間社会を豊かで安全で住みよいものにするには、科学技術研究に携わるものの使命である。近年、人類が作り出した数々の化学物質の中には人体に有害であるものも多く、ダイオキシンをはじめとする有害化学物質による環境汚染が社会問題になっている。また、食生活に目を向けると、食の安全性を脅かす農薬や O-157 などの細菌あるいはそば粉などのアレルギー物質による問題が深刻になっている。しかし、これらの物質を計測する従来の分析システムは高価であるものが多く、測定に時間を要し、またオンサイトで計測できるようなポータブルではない。

著者らはこれまでに、小型でポータブルな表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサ(170 mm (w) × 110 mm (D) × 150 mm (H), 約 1.5 kg)を開発している。本センサは、一つの LED 光源からの光を線焦点としてセンサチップに入射し、その反射光をリニア CCD で検出することにより、線焦点上の多点での同時計測を可能にした、屈折率感度 10^{-6} RIU を有する高感度センサである。しかし、センサそのものは小型であるものの、複数のセンシングポイントに試薬や試料を送液するためには、多数のポンプとバルブが必要になるので、システム全体としては大型化する。このため、オンサイトでの使用にはなお問題を残している。

そこで本研究では、ポンプやバルブを全く使用しない、真にポータブルな化学分析システムを開発することを目的として、コンパクトディスク(CD)型マイクロチップを用いる SPR センサについて検討を行った。すなわち、CD 上に多数の溶液溜めと微細流路(マイクロチャネ

ル)を作製し、CD の回転による遠心力を利用してマイクロチャネル内に試薬及び試料を導入し、試料中の各成分をマイクロチャネル内壁に固定した種々のレセプタータンパク質との相互作用により分離した後、SPR 現象を利用して多成分を同時に検出する、新規マイクロ生化学分析システムについて検討を行った。

【研究の内容、成果】

1. CD 型マイクロチップ

シリコン基板上にネガ型フォトレジスト(su-8)を塗布し、500 rpm で 20 秒間回転させた後、さらに 2000 rpm で 20 秒間回転させた。この基板を 95℃ で 10 分間ベークした後、目的流路(図 1)を描写したフォトマスクを重ね、紫外線を露光した。次に、95℃ で 3 分間ベークした後、専用現像液で現像し、さらに 200℃ で 3 分間ベークして、マイクロチャネル(幅 500 μ m, 深さ 50 μ m)の鋳型となる凸型テンプレートを作製した。このテンプレート上に触媒を添加したポリジメチルシロキサン(PDMS)プレポリマーを流し込み、60℃ で 1 時間ベークして硬化させた。これをテンプレートから剥離し、溶液溜め用の穴を開けた後、PET 基板と張り合わせ、図 2 に示す CD 型マイクロチップ(直径 12 cm)を作製した。

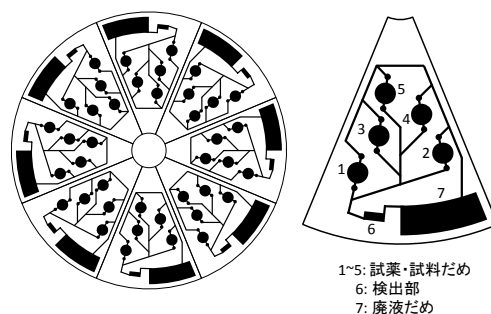


図1 マイクロチャネルのデザイン



図2 作製したCD型マイクロチップ

2. 遠心力を利用した送液

CDの回転により生じる遠心加速度 g_c は次式で表される。

$$g_c = R\omega^2 \quad (1)$$

ここで、 R は回転半径、 ω は角振動数である。一方、溶液溜め出口を溶液が流れ出るために必要な加速度 g_s は次式で表される。

$$g_s = \frac{-2\gamma \cos \theta}{r\rho h} \quad (2)$$

ここで、 γ は表面張力、 θ は接触角、 r は溶液溜め出口の換算半径、 ρ は溶液の密度、 h は液高さである。したがって、①式および②式から溶液が流れ出る回転数 f (rpm)は次式で表される。

$$f = \frac{60}{2\pi} \sqrt{\frac{2\gamma \cos \theta}{Rr\rho h}} \quad (3)$$

熱流体解析ソフトウェアFLUENT6.2を用いたシミュレーションにより、CDの回転数を変化させることによりCD上の各溶液溜めから溶液が流れだす順番を制御できることがわかった。そこで、作製したCD型マイクロチップの溶液溜めにローズベンガル水溶液を中心に近い液溜めより5, 10, 15, 20, 25 μL ずつ加えてチップを回転させたときの溶液の流れを観察した。図3に溶液が流れる様子を、また、図4に溶液溜めの位置と流出開始時の回転数の関係を示す。回転数が増加するにしたがって、CD型マイクロチップの外側の溶液溜めから溶液が順番に流れだすことを確認した。

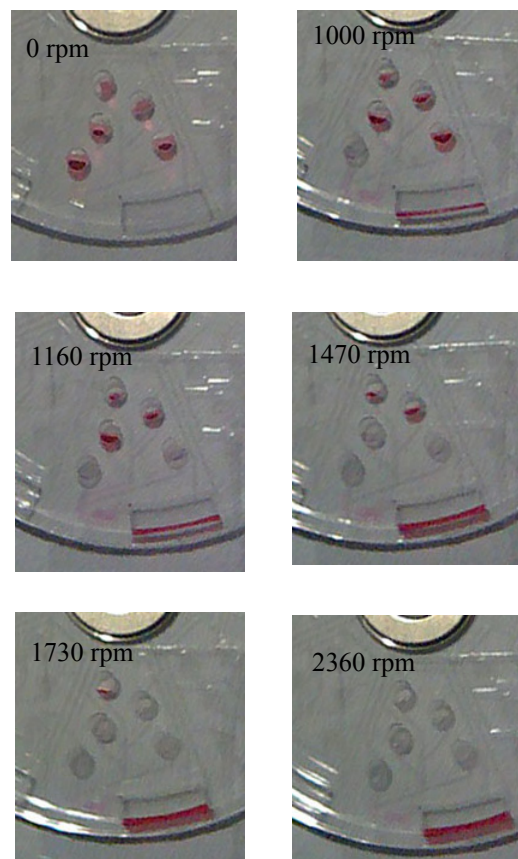


図3 CDの回転により液溜めから溶液が流れる様子

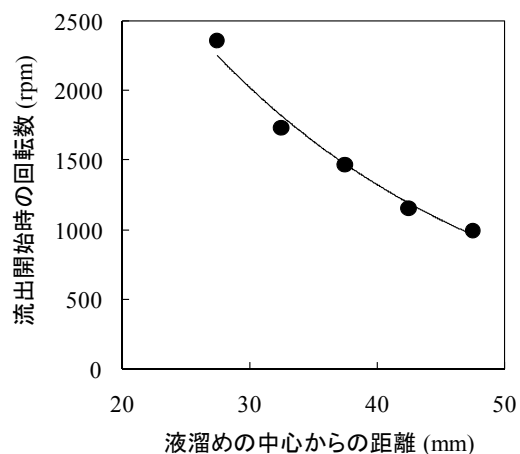


図4 溶液溜めの位置と流出開始時の回転数の関係

3. SPR 光学系

SPR センサの光学系としてはクレッチマン型配置の光学系が汎用されているが、センサチップとプリズムを密着させるためにマッチン

グオイルなどが必要である。また、この光学系を回転型 SPR に展開する場合、高価なプリズム部分も CD 上に形成する必要があるため、低コスト化は困難である。そこで、図 5 に示すような反射型グレーティング方式の SPR 光学系を考案した。この光学系は、マッチングオイルとプリズムが不要なので、安価にセンサチップを作製できるという利点を有している。

センサチップはガラス基板にグレーティングフィルム(1000 本/mm, 深さ 100 nm)を接着し、これに金を 75 nm の厚さで蒸着したものを用いた。光源として白色光を用い、これをマルチモード型光ファイバーに導入してファイバークリメーターにより直径 3 mm の平行光とした後、上記基板に垂直に照射した。反射光として得られた回折光を偏光子を通してリニア CCD センサ上に投影して検出した。

センサチップに種々の濃度のスクロース溶液を導入したときのセンサ応答を図 6 に示す。共鳴波長はスクロース濃度が増加するにしたがって長波長側にシフトした。スクロース濃度と波長変化量をプロットした検量線(図 7)は良好な直線関係を示した。このことから、本光学系を回転型 SPR センサに展開できると考えられる。

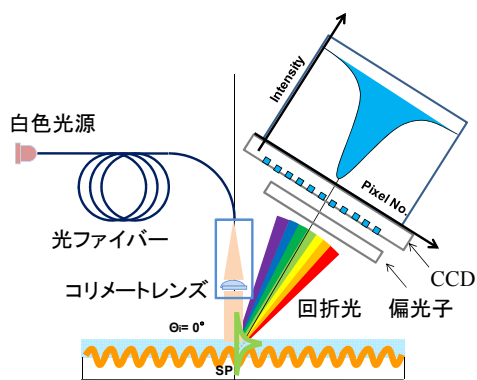


図5 反射型グレーティング方式SPR光学系

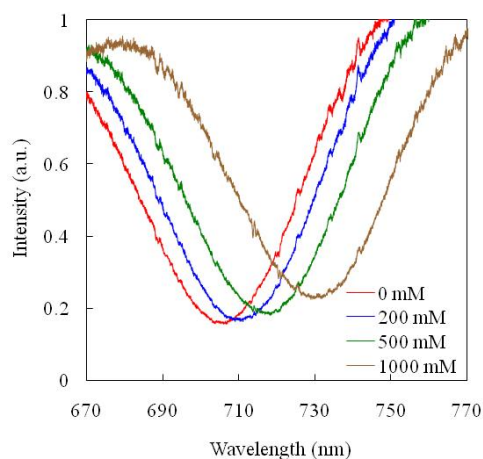


図6 スクロースに対するセンサ応答

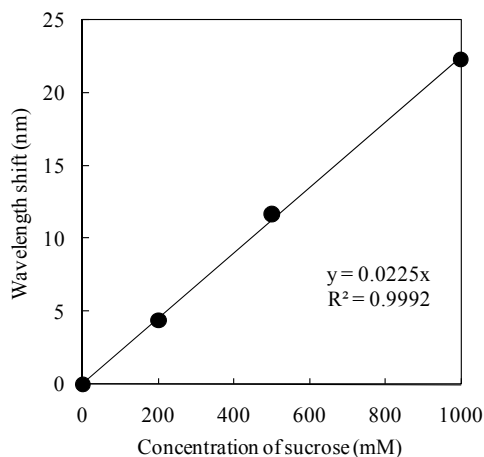


図7 スクロースに対する検量線

[今後の研究の方向、課題]

本研究では、CD 型マイクロチップとその回転装置を開発し、チップ上の溶液溜めからの溶液の流出と回転数の関係について理論と実験の両面から明らかにした。また、SPR センサの光学系については、グレーティング方式の光学系を開発し、共鳴波長は試料の屈折率に依存することを明らかにした。今後は、感度や再現性について詳細に検討するとともに、本分析システムを環境分析や医療検査に応用したいと考えている。

[成果の発表, 論文等]

論文

1. M. Tanaka, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, K. Sakamoto, T. Imato, Enhanced Sensitivity of a Surface Plasmon Resonance Immunosensor via In-situ Polymerization of a Protein, *Sens. Lett.*, In press.
2. Y. Li, J. Ren, H. Nakajima, B.K. Kim, N. Soh, K. Nakano, T. Imato, Flow Sandwich Immunoassay for Specific Anti-OVA IgG Antibody by Use of Surface Plasmon Resonance Sensor, *Talanta*, In Press.
3. H. Nakajima, A. Hemmi, K. Furui, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, Development of Portable Surface Plasmon Resonance Sensor with Multi Detection Points, *Proceedings of the μ TAS 2007*, **2**, 1053-1055 (2007).
4. 田中真由美, 阪本一平, 中嶋 秀, 宗 伸明, 中野幸二, Duck-Hwa Chung, 今任稔彦, メチルパラチオン計測のための表面プラズモン共鳴イムノセンサの開発, *分析化学*, **56**, 705-712 (2007).
5. Y. Li, J. Ren, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, T. Imato, Surface Plasmon Resonance Sensor for IgE Analysis Using Two Types of Anti-IgE Antibodies with Different Active Recognition Sites, *Anal. Sci.*, **23**, 31-38 (2007).
6. 伸明, 中野幸二, 山崎吉一, 諸岡成治, 今任稔彦, コンパクトディスク型マイクロチップを用いるポンプレス流れ分析法に関する基礎的検討, *日本分析化学会第 69 回分析化学討論会*, 2008.05.
4. A. Hemmi, K. Furui, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, Surface Plasmon Resonance Sensor with Multi Detection Points and Its Application to Simultaneous Immunoassay for IgA and IgG, *12th International Meeting on Chemical Sensors*, 2008.07.
5. H. Nakajima, A. Hemmi, K. Furui, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, On-Chip Multi-Immunoassay Using a Portable Multi-Channel Surface Plasmon Resonance Sensor and a Micro Sensor Chip Prepared by Photochemical Patterning Method, *PITTCON 2008*, 2008.03.
6. M. Tanaka, K. Sakamoto, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, D.H. Chung, T. Imato, Flow Immunoassays of Methyl Parathion and 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid Using a Portable Surface Plasmon Resonance Sensor, *The 7th East Asian Conference on Chemical Sensors*, 2007.12.
7. Y. Li, J. Ren, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, T. Imato, Flow Immunoassay for Allergy Related Compounds based on SPR Sensor, *The 9th Asian Conference on Analytical Science*, 2007.11.
8. H. Nakajima, A. Hemmi, K. Furui, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, Development of Portable Surface Plasmon Resonance Sensor with Multi Detection Points, *μ TAS 2007*, 2007.10.
9. Y. Li, J. Ren, B. K. Kim, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, T. Imato, Determination of Specific Anti-ovalbumin IgG Antibody by Surface Plasmon Resonance Immunosensor, *The 14th International Conference on Flow Injection Analysis*, 2007.09.

学会発表

1. 本明紘, 辺見彰秀, 飛田達也, 中嶋秀, 宗 伸明, 中野幸二, 山崎吉一, 諸岡成治, 今任稔彦, コンパクトディスク型表面プラズモン共鳴センサの開発, *第 18 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会*, 2008.12.
2. 本明紘, 辺見彰秀, 飛田達也, 中嶋秀, 宗 伸明, 中野幸二, 山崎吉一, 諸岡成治, 今任稔彦, コンパクトディスク型表面プラズモン共鳴センサの開発, *日本分析化学会第 57 年会*, 2008.09.
3. 本明紘, 辺見彰秀, 飛田達也, 中嶋秀, 宗