

1. 緒言

1990年代中頃より、ガラスやプラスチックの基板の上に作製した深さ数十～数百 μm 程度の微細な流路(マイクロチャンネル)を利用して、前処理、反応、分離、検出などの一連の化学分析操作を、手のひらサイズの1枚の基板(マイクロチップ)に集積化する研究が注目されはじめた。これらは、 μTAS あるいは Lab-on-a-chip と呼ばれ、装置の小型化、試薬・試料・廃液量の低減、測定時間の短縮など多くの優れた特徴を有することから、革新的な新技術として将来の発展が期待されている。近年、ベットのサイド臨床検査などの社会的なニーズの高まりを反映して、この μTAS 技術を生化学分析に適用したマイクロ生化学分析システムの研究開発が急速に進展している。しかし、従来の分析装置の小型化の例のように、装置を構成している各パーツを小型化して、これらを組み合わせて装置を小型化するという手法をそのままマイクロ生化学分析システムに適用することは困難で、現時点では必要な構成要素がすべて集積化された高度なマイクロ生化学分析システムは存在していない。

そこで本研究では、真のマイクロ生化学分析システムを実現するための集積化方法の開発を目的として、①反応部の集積化、②マイクロチャンネルの機能集積化、③検出システムの集積化、に焦点をあて検討を行った。まず、マルチチャンネルマイクロチップイムノアッセイシステムを構築し、従来長時間要していたイムノアッセイの超高速化を達成した。次に、 μTAS の更なる機能集積化を目指して、マイクロチャンネル内の集積化を行った。すなわち、光化学反応を利用してマイクロチャンネル内壁に多種類のタンパク質を位置選択的に固定し、1つのマイクロチャンネル内に異なる機能を発現させた。さらに、光ファイバーとLEDをオンチップ化し、装置全体の小型化を図った。

2. 反応部の集積化

～マルチチャンネルマイクロチップを用いる高速ELISAシステムの開発～

酵素免疫測定法(ELISA)は96穴マイクロプレートのウェル壁面に固定された抗体と試料(抗原)との特異的な反応を利用した分析法である。血液や尿などの生体試料中の微量成分を高感度に測定できることから、医学や生化学の分野で広く利用されている。しかし、反応がプレートの固液界面に局在するため、試料の拡散が律速となり、測定に数時間から数十時間要する。

一方、マイクロチャンネルにおいては、その短い分子拡散距離と大きな比表面積により反応が高効率に進行することから、マイクロチャンネルをELISAの反応場とすることで測定時間の大幅な短縮が期待できる。これまでに、マイクロビーズを用いるELISAチップが開発されているが、操作が煩雑でビーズの充填状態が結果に大きく影響するため実用化には限界があった。そこで、マイクロチャンネル表面を利用するELISAを考案した。マルチチャンネルマイクロチップを用いる独自のフロー型ELISAシステムを構築し、ELISAの高速化と自動化を図った。これを唾液中心イムノグロブリンAの定量に応用した。

マイクロチップは安価で作製の容易なポリジメチルシロキサン(PDMS)製のものを用い、マイクロチャンネルは幅1 mm、長さ40 mm、深さ20 μm のものを使用した。予めチャンネル内壁に第一抗体を吸着させたマイクロチップをFig. 1に示す装置に接続し、ブロッキング溶液、試料(抗原)とHRP標識第二抗体との混合溶液、および基質溶液を順次サンプルインジェクターから注入した。反応時間はキャリアー溶液の流量により制御し、検出はウォブリング機能を有する独自の蛍光検出器により行った。

抗原-抗体反応時間24秒、酵素-基質反応時間2.4秒における検量線は30～250 ng/mLの濃度範囲で良好な直線関係を示した。従来の96穴マイクロプレートを用いる方法では測定に150分を要するが、本法では10分以内で測定可能であり、ELISAの迅速化を達成できた。また、試薬量も1/10に削減できた。薬局や医療現場での簡易検査装置としての実用化が期待される。

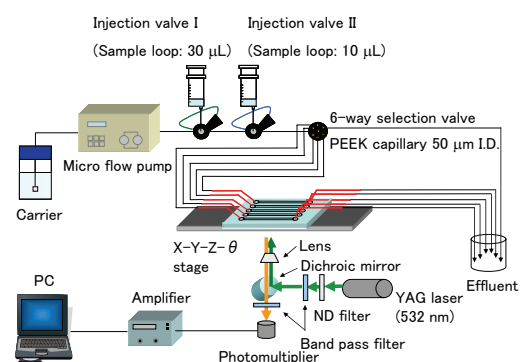


Fig. 1 Schematic diagram of the analysis system.

3. マイクロチャネルの機能集積化

～光化学反応を利用したマイクロチャネル内壁への位置選択的タンパク質固定～

マルチチャネル化は、多成分同時分析や多検体同時分析に最も簡便で有効な方法の1つである。しかし、多数のポンプやバルブが必要となり、システム全体としては大掛かりなものとなる。この問題を解決する方法として、1つのマイクロチャネル内に多機能を集積化する方法が挙げられる。例えば、1つのチャネル内に多種類の抗体を固定化すれば、1流路でのマルチ免疫アッセイが可能となり、多種類の酵素を固定化すれば酵素リアクターや酵素センサが実現できる。これまでに、バルブなどのメカニカルなパーツを使用して多種類のタンパク質を固定化する方法が報告されているが、高度な集積化は困難である。そこで、光化学反応を利用してタンパク質をマイクロチャネル内の任意の位置に微細なパターンとして固定化する方法を開発した。すなわち、Fig. 2に示すように、一方に光反応部位を、他方にタンパク質との反応部位を有する光架橋剤を用いて、予め光反応部位を有するタンパク質を調製しておき、これをチャネル内に導入し外部から紫外光を照射することにより、タンパク質をチャネル表面に位置選択的に固定化した。本法をグルコースセンサに応用した。

マイクロチップはPDMS製のものを使用し、マイクロチャネルは幅300 μm 、長さ40 mm、深さ20 μm のものを用いた。PDMSはタンパク質の吸着性に富むため、前処理としてチャネル内壁を牛血清アルブミンによってブロッキングを行った。予め光架橋剤である4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid succinimidyl ester (ATFB-SE)を、グルコースオキシダーゼ(GOD)と西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)にそれぞれ反応させ、各々の溶液をブロッキング済みマイクロチャネルに満たした。マイクロチャネルの所定の位置にHe/Cdレーザー(325nm, 200mW, ビーム直径約1mm)を10分間照射し、チャネル上流側にGODを、下流側にHRPを固定化した。このように作製したマイクロチップを用いてグルコース分析を行った。Fig. 3にその原理を示す。Amplex[®] Redを含むグルコース溶液をチャネルに流すと、グルコースとチャネル上流部に固定化されたGODとが反応して過酸化水素を生成する。この過酸化水素が下流に固定されたHRPによりAmplex[®] Redと触媒的に反応して蛍光物質であるResorufinを生成する。チャネル最下流部における蛍光強度を測定することによりグルコースの定量を行った。

Amplex[®] Redを含むグルコース溶液を10 $\mu\text{L}/\text{min}$ でチャネルに流しながら、チャネル内の蛍光強度を測定した。Fig. 4にマイクロチャネル内の蛍光強度の変化を示す。蛍光強度はHRP固定化部よりも下流で大幅に増加した。この結果はマイクロチャネル内に酵素が位置選択的に固定化されていることを示している。グルコース濃度が増加すると下流における蛍光強度も増加したが、検量線を作成することはできなかった。

これは、GODとHRPの固定化量が少ないためと推測される。そこで、マイクロチャネルの幅を1 mmに広げ、さらにGODをチャネル全体に物理吸着させた後、下流20 mmの範囲に殺菌灯(東芝GL15)を用いてHRPを光化学固定化した。その結果、反応時間4.8秒における検量線は8~130 μM の範囲で良好な直線関係を示し、光化学固定法により作製したマイクロチャネルを用いてグルコース分析が可能であることが確認された。

光化学固定法は、マイクロチャネル表面機能化の基盤技術と成り得るものであり、応用性も極めて高いと考えられる。

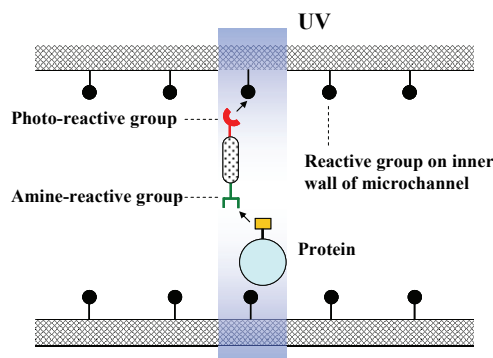


Fig. 2 Photochemical patterning of proteins inside microchannel.

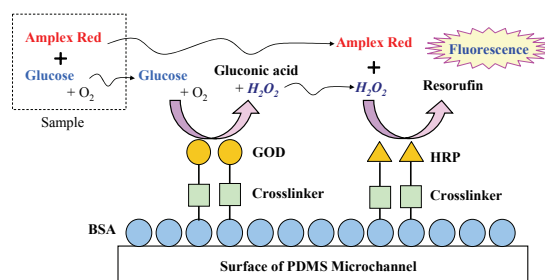


Fig. 3 Strategy for glucose analysis on microchannel.

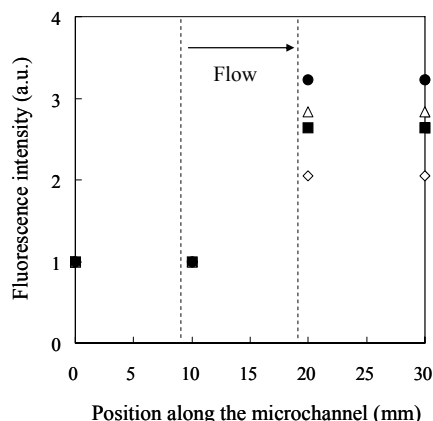


Fig. 4 Variation in fluorescence intensity in the PDMS microchannel on which the GOD and HRP were immobilized. The dotted lines denote the position where the GOD and HRP were immobilized. Concentration of glucose: (●) 100 nM, (△) 10 nM, (■) 5 nM, and (◇) 1 nM.

4. 検出システムの集積化

～オンサイト測定のための検出システム集積化マイクロチップの開発～

システムの小型化により対象試料が極微量となるメリットは、検出の観点からは逆にデメリットとなり、必然的に μ TAS には超高感度な検出法が必要不可欠なものとなる。一般に、レーザー誘起蛍光法(LIF)や熱レンズ法が用いられるが、レーザーや顕微鏡などの周辺装置がマイクロチップそのものに比べて大掛かりであるため、オンサイトで測定することは事実上困難である。そこで、光ファイバーと LED を PDMS マイクロチップにオンチップ化し、装置全体の小型化を図った。

フォトリソグラフィー・ウェットケミカルエッチング法により凸型の流路をもつガラス基板を作製し、倒立型顕微鏡のステージに設置した。チャンネルの検出部位を観察しながら、発光面直前まで研磨しショートパスフィルターを設置した LED、および光ファイバーを、それぞれ垂直になるように配置した(Fig. 5)。この上に PDMS 樹脂を流し込み、室温で 1 晩重合させた。同様に、マイクロチップの液だめに相当する部分にテフロンチューブを固定したガラス板上で PDMS を硬化させ、カバーチップとした。両者をガラス板から剥離後、空気プラズマを照射し接合した。LED により励起された蛍光は光ファイバーによって導光され、ロングパスフィルターで励起光を除いた後に光電子増倍管で検出した。LED は緑色と青色の二種を使用し、電気泳動により検出システムの評価を行った。

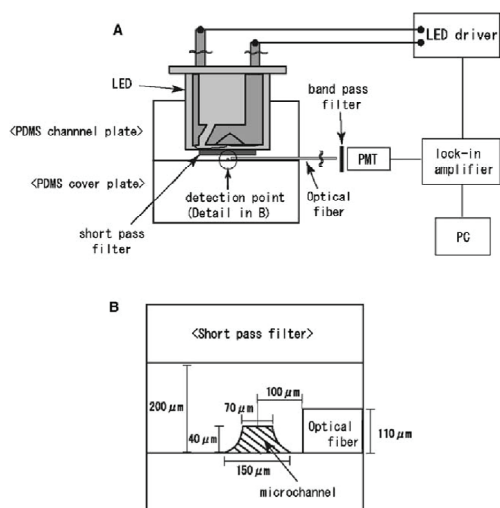


Fig. 5 Schematic illustration of the experimental set-up used (a), and a close-up of the detection point indicating the relative distances of the components of the LED-IF (b).

モデル試料としてスルホローダミン 101 およびフルオレセインを用い、これらの検量線を作成した。緑色 LED を用いたとき、スルホローダミン 101 の検量線は 1~100 μ M の濃度範囲で良好な直線関係を示し、検出限界は 600 nM (240 amol) ($S/N = 3$)であった。一方、青色 LED を用いたとき、フルオレセインの検量線は 0.2~100

μ M の濃度範囲で直線関係を示し、検出限界は 120 nM (50 amol) ($S/N = 3$)であった。本法における検出感度を従来の顕微鏡 LIF と比較したところ、単位光量あたりではほぼ同等の検出感度が得られた。また、本法をアミノ酸誘導体の分離定量に応用し、オンサイト分析への応用を示唆した。

5. 結論

本研究では、総合的なマイクロ生化学分析システムを構築するための簡便かつ強力な方法論を示した。このようなマイクロチップへの高度な集積化およびシステム化の利用価値は極めて高く、他分野への波及効果も極めて大きいものと考えられる。

【略歴】

2001 年 3 月	日本大学生産工学部工業化学科 卒業
2003 年 3 月	日本大学大学院生産工学研究科工業化学専攻博士前期課程 修了
2006 年 3 月	東京都立大学大学院工学研究科応用化学専攻博士課程 修了
2006 年 3 月	博士（工学）取得
2006 年 4 月	九州大学大学院工学研究院応用化学部門 助手

【専門分野】

マイクロ化学分析, 分離分析化学, 化学センサ, バイオセンサ

【研究業績】

▶原著論文

1. R. Zhang, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, T. Masadome, K. Nagata, K. Sakamoto, T. Imato, "Sequential Injection Chemiluminescence Immunoassay for Nonionic Surfactants by Using Magnetic Microbeads", *Anal. Chim. Acta*, submitted.
2. 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.*, in press.
3. A. Hemmi, K. Furui, Y. Li, M. Kobayashi, H. Nakajima, J. Ren, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, K. Shimada, T. Imato, "Development of Portable-type Surface Plasmon Resonance Sensor with Five Detection Points", *Sens. Actuators B*, submitted.
4. H. Nakajima, Y. Harada, Y. Asano, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Imato, N. Soh, A. Hemmi, "A Palm-Sized Surface Plasmon Resonance Sensor with Microchip Flow Cell", *Talanta*, **70**, 419-425 (2006).
5. H. Nakajima, M. Yagi, Y. Kudo, T. Nakagama, T. Shimosaka, K. Uchiyama, "A Flow-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on a Polydimethylsiloxane Microchip for the Rapid Determination of Immunoglobulin A", *Talanta*, **70**, 122-127 (2006).
6. 工藤祐生, 角川淳, 八木麻衣子, 中嶋秀, 中益達朗, 荒井健介, 吉村吉博, 内山一美, "オープンウェル型マイクロチップを用いる酵素免疫測定法の開発", *分析化学*, **55**, 313-316 (2006).
7. H. Nakajima, S. Ishino, H. Masuda, T. Nakagama, T. Shimosaka, K. Uchiyama, "Photochemical Immobilization of Protein on the Inner Wall of Microchannel and Its Application in a Glucose Sensor", *Anal. Chim. Acta*, **562**, 103-109 (2006).

8. K. Saitoh, N. Yamada, E. Ishikawa, H. Nakajima, M. Shibukawa, "On-Line Redox Derivatization Liquid Chromatography Using Double Separation Columns and One Derivatization Unit", *J. Sep. Sci.*, **29**, 49-56 (2006).
 9. K. Miyaki, Y. Guo, T. Shimosaka, T. Nakagama, H. Nakajima, K. Uchiyama, "Fabrication of Integrated PDMS Microchip Incorporated with LED Induced Fluorescence Devices", *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**, 810-816 (2005).
 10. 中嶋秀, 増田裕紀, 石野智美, 中釜達朗, 下坂琢哉, 荒井健介, 吉村吉博, 内山一美, "マイクロチャネルを用いる酵素免疫測定法によるヒト唾液中イムノグロブリン A の迅速定量", *分析化学*, **54**, 817-823 (2005).
 11. H. Nakajima, S. Ishino, H. Masuda, T. Shimosaka, T. Nakagama, T. Hobo, K. Uchiyama, "Photochemical Immobilization of Protein on Inner Wall of Microchannel", *Chem. Lett.*, **34**, 358-359 (2005).
 12. H. Nakajima, K. Kawata, H. Shen, T. Nakagama, K. Uchiyama, "Chiral Separation of NBD-Amino Acids by Ligand-Exchange Micro Channel Electrophoresis", *Anal. Sci.*, **21**, 67-71 (2005).
 13. H. Nakajima, T. Fukuda, M. Takizawa, T. Shimosaka, T. Hobo, K. Uchiyama, "Regioselective Immobilization of Protein on the Surface of Polymeric Microchannel by Photo-Reactive Crosslinker", *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **29**, 947-950 (2004).
 14. M. Shibukawa, H. Terashima, H. Nakajima, K. Saitoh, "Evaluation of the Surface Charge Properties of Porous Graphitic Carbon Stationary Phases Treated with Redox Agents", *Analyst*, **129**, 623-628 (2004).
- ▶ 総説、論評、解説等
1. 中嶋秀, "マイクロチャネル内壁へのタンパク質のパターニング", *J. Flow Injection Anal.*, in press.
 2. 李岩, 任聚杰, 中嶋秀, 宗伸明, 中野幸二, 今任稔彦, "表面プラズモン共鳴現象を用いるアレルギー診断のためのイムノセンサーの開発", *日本分析化学会第55年会冊子「展望とトピックス」*, (2006).
 3. 中嶋秀, 八木麻衣子, 工藤祐生, 中釜達朗, 下坂琢哉, 内山一美, "マイクロチップを用いた超高速健康チェック", *日本分析化学会第54年会冊子「展望とトピックス」*, (2005).
 4. 中嶋秀, "電気化学クロマトグラフィーの高性能化", *化学と工業*, **6**, 708-708 (2005).
 5. 中嶋秀, "マイクロチャネル内壁への酵素の光固定", *ぶんせき*, **5**, 258-259 (2005).
 6. K. Uchiyama, H. Nakajima, T. Hobo, "Detection Method for Micro Chip Separations", *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 375-382 (2004).
- ▶ 国際会議
1. A. Hemmi, K. Furui, H. Nakajima, Y. Li, J. Ren, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, "Development of Portable Surface Plasmon Resonance Sensor with Multi Detection Points", *Pittsburgh Conference 2007*, Chicago, Illinois, USA, February, 2007.
 2. H. Nakajima, Y. Harada, Y. Asano, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Imato, N. Soh, A. Hemmi, "Development and Evaluation of Microchannel Surface Plasmon Resonance Sensor", *Pittsburgh Conference 2006*, Orland, Florida, USA, March, 2006.
 3. K. Uchiyama, H. Nakajima, S. Ishino, H. Masuda, T. Nakagama, Y. Kudo, T. Shimosaka, "Integrated Micro Channel Chip by Chemical and Photochemical Immobilization of Protein for Bio-Analysis", *The 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, Hawaii, USA, December, 2005.
 4. H. Nakajima, M. Yagi, T. Nakagama, T. Shimosaka, K. Uchiyama, "Application of Micro Analytical Chemistry with Microchip to Biological Samples", *7th Symposium on Asian Academic Network for Environmental Safety and Waste Management*, Tokyo, Japan, September, 2005.
 5. H. Nakajima, S. Ishino, H. Masuda, M. Yagi, Y. Kudo, T. Nakagama, T. Shimosaka, K. Uchiyama, "Photochemical Immobilization of Protein on Inner Wall of Microchannel and Its Application to Enzyme Sensor", *TokyoConference 2005 Asia Young Analytical Chemist Sessions*, Chiba, Japan, September, 2005.
 6. A. Hemmi, Y. Harada, H. Nakajima, Y. Asano, T. Nakagama, K. Uchiyama, N. Kaneki, K. Shimada, T. Eguchi, T. Imato, N. Soh, "Development of Palm-Sized SPR Meter for Multi-Measurement", *Pittsburgh Conference 2005*, Orland, Florida, USA, February, 2005.
 7. H. Nakajima, S. Ishino, H. Masuda, T. Shimosaka, T. Nakagama, T. Hobo, K. Uchiyama, "On-line Photo-Immobilization of Protein inside Microchannel", *Pittsburgh Conference 2005*, Orland, Florida, USA, February, 2005.
 8. H. Nakajima, S. Ishino, H. Masuda, T. Shimosaka, T. Nakagama, T. Hobo, K. Uchiyama, "Photochemical Immobilization of Protein on Inner Wall of Microchannel", *China-Japan-Korea Symposium on Environmental Analytical Chemistry*, Beijing, China, October, 2004.
 9. H. Nakajima, S. Ishino, H. Masuda, T. Shimosaka, T. Nakagama, T. Hobo, K. Uchiyama, "On-line Micro Photo-Immobilization of Protein on Inner Wall of Microchannel and Its Application to Multi-Channel Enzyme Sensor", *TokyoConference 2004 Asia Young Analytical Chemist Sessions*, Chiba, Japan, September, 2004.
 10. K. Uchiyama, H. Nakajima, T. Fukuda, T. Nishiyama, T. Shimosaka, T. Hobo, "Position Selective Immobilization of Protein on Inner Wall of Polymeric Microchannel by Photo-Reactive Cross-Linker", *International Symposium on Microchemistry and Microsystem 2003*, Tokyo, Japan, November, 2003.
 11. H. Nakajima, T. Fukuda, M. Takizawa, T. Shimosaka, T. Hobo, K. Uchiyama, "Regioselective Immobilization of Protein on the Surface of Polymeric Microchannel by Photo-Reactive Cross-Linker", *The 8th IUMRS International Conference on Advanced Materials 2003*, Yokohama, Japan, October, 2003.
 12. M. Shibukawa, K. Saitoh, H. Nakajima, H. Terashima, "Modification of Retention Selectivity of Porous Graphitic Carbon by Treatment with Redox Agents", *International Congress on Analytical Sciences 2001*, Tokyo, Japan, August, 2001.
- ▶ 研究資金
1. 2006 年度, 財加藤記念バイオサイエンス研究振興財団, 国際交流助成, 代表, ポータブル型マルチポイント表面プラズモン共鳴センサの開発.
 2. 2006 年度, アンデス電気㈱, 共同研究, 代表, 表面プラズモン共鳴測定装置のセンサチップに関する基礎的検討.
 3. 2006 年度, 独立行政法人 科学技術振興機構 (JST), 地域イノベーション創出総合支援事業重点地域研究開発推進プログラム「シーズ発掘試験」, 分担, マルチポイント表面プラズモン共鳴センサの高性能化と実用化に関する研究.
 4. 2006 年度, 財クリタ水・環境科学振興財団, 研究助成, 代表, マイクロチップを利用した界面活性剤の超高速高感度分析法の開発.