

総合論文

マイクロチップを用いる新規化学センシングシステムの開発

久本 秀明¹Development of Novel Chemical Sensing Systems Based on
Microfluidic DevicesHideaki HISAMOTO¹¹ Graduate School of Material Science, University of Hyogo, 3-2-1, Kouto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-1297

(Received 6 December 2004, Accepted 31 January 2005)

A recent microfabrication technology opened the new application field such as micro total analysis systems (Micro TAS) or microreactors. These systems employed physical characteristics provided by the liquid microspace, involving short diffusion distance, large surface to volume ratio, or small heat capacity. In contrast to these works, we focused on the chemical functions of highly-selective molecular recognition molecules or functional dyes of which we have been developed, to be integrated into microfluidic chemical sensing systems. The present paper describes our recent results concerning chemical sensing systems based on microfluidic devices. Here, a multi ion sensing system based on the intermittent reagent pumping and ion-pair extraction, a new biosensing scheme based on the enzyme-immobilized polymer membrane, and a novel multi ion sensing scheme based on capillary-assembled microchip, are presented.

Keywords : chemical sensing; ion sensor; microchip; microfluidic device; micro total analysis systems.

1 緒 言

マイクロチップ集積化化学システムは、ガラスやシリコン、プラスチックなどの基板上に幅・深さ数十～数百ミクロン程度の溝（マイクロチャネル）を作製し、試薬溶液を導入することによって混合・反応・分離等、様々な化学操作を集積したものである¹⁾²⁾。このシステムは、微小な空間が提供する物理的特徴（短い分子拡散距離、大きな比表面積、小さな熱容量）や、微小流体の特徴（多相流形成）を積極的に活用することにより、分析化学のみならず、生化学、物理化学、有機合成など、実に多彩な科学分野へ応用可能なデバイスを作製することが可能である³⁾。

一方、分析化学の分野では、キャピラリー電気泳動やフローインジェクション分析、化学センサー開発など、装置の小型化が重要となる分野が多くあり、マイクロチップが

持つ「小さい」という特徴が注目されるバックグラウンドがあった。しかしながら、マイクロチップを用いた分析法開発において持つべき最も本質的な着眼点は、単に「小さい」あるいは「微量」といった一見の特徴ではない。微小な空間が化学反応に及ぼす特徴や、微小な空間で形成される流体の特徴をいかに使うか、という視点が最も重要である^{4)~8)}。更に最近では、上記の物理的な特徴に加えて高機能分子やポリマーの持つ化学的な特徴をいかに生かすか、という点も重要になってきており、この数年でマイクロチップの持つ機能は飛躍的に向上してきた。

著者らはこれまでに、高選択性イオン認識分子、高機能性色素分子及びそれらの分子が有効に機能発現できるセンシング場を分子レベルで設計することにより、多彩な化学センシングシステムを構築してきた^{9)~17)}。

本稿では著者らが開発してきた高機能性分子の特徴と、マイクロ流路の提供する微小空間・流体特有の特徴を積極的に活用した新しいマイクロ化学センシングの方法論を紹介

¹ 兵庫県立大学大学院物質理学研究科: 678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

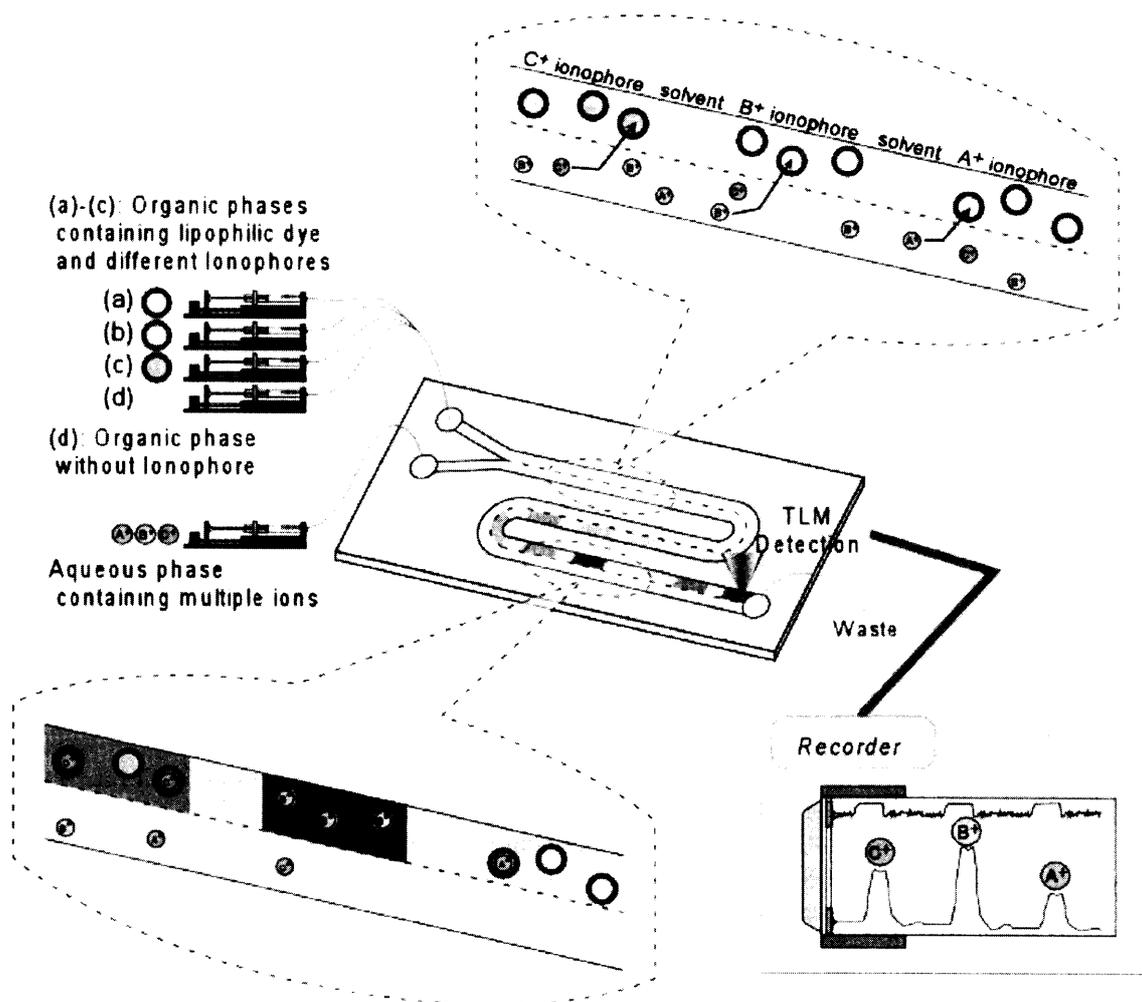


Fig. 1 Concept of sequential ion-sensing system using single microchip

Reprinted with permission from ref. 19, Copyright 2001 American Chemical Society

介する。

2 マイクロ多相流を活用したマルチイオンセンシング^{18)~20)}

2.1 はじめに

平面マイクロ流路を用いる集積化システムの特徴の一つとして、マイクロ流路に有機相・水相を導入・合流した際に形成される油水多相流がある。本研究では、この油水多相流のうち有機相側をセグメント化する新しい微小流体形成法を開発し、ここに機能性色素分子・イオン認識分子を用いたイオン対抽出機構を適用することによって、マイクロ流路の特徴と機能分子の特徴を兼ね備えた全く新しいマルチイオンセンシングシステムを開発することを着想した。

Fig. 1にコンセプトを示す。Y字型の合流部を持つマイクロチップの片方から、異なるイオノホア分子を含有する有機相をセグメント状に導入する。もう一方の導入口から

は複数のサンプルイオンを含有する水溶液を導入する。この場合、それぞれの有機相セグメントに含まれるイオノホア分子の選択性に依じて、異なるイオンが異なる有機相セグメントに抽出されるため、それを下流において検出すれば、複数のイオンを含む水溶液中の異なるイオンを連続的かつ選択的に検出することが可能となる。

このコンセプトを実現するためには、以下の基礎検討が必要不可欠である。

- (1) イオン対抽出過程の基礎検討
- (2) 微小流体制御の基礎検討

そこで、(1)ではマイクロチップ内イオン対抽出反応に必要なチャンネル長さを決定するために、イオン対抽出平衡に達する距離を検討する。また、(2)では複数のイオン種を検出するために重要な微小流体の切り取り技術(セグメントフローインジェクション)を検討し、これら2つの基礎検討を踏まえた、多種類イオン連続分析システム開発を紹介する。

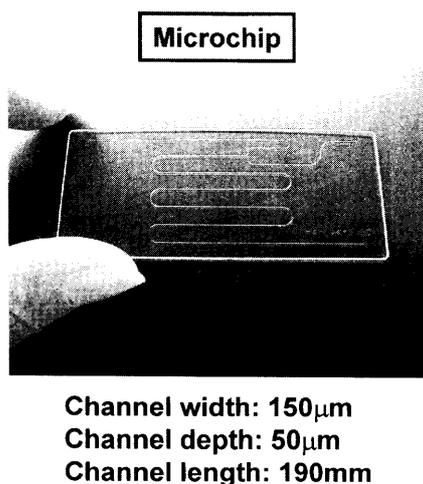


Fig. 2 Glass microchip used in this study

2.2 イオン対抽出過程の基礎検討

実験に用いたマイクロチップを Fig. 2 に示す。幅約 150 μm 、深さ約 50 μm のチャンネルに片方の導入口から K^+ を 10^{-2} M 含む水溶液を導入する。もう一方の導入口からは脂溶性 pH 指示薬 (KD-A3) と K^+ イオノホア分子 (valinomycin) を含む有機相を導入した。流量はそれぞれ 0.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、1 $\mu\text{l}/\text{min}$ である。有機相と水相が合流すると、イオン対抽出反応が始まる。有機相中のイオノホア分子が水相の目的イオンを抽出すると、有機相中の電気的中性を保つために、有機相中に存在する脂溶性 pH 指示薬のプロトンが水相に放出されるため、有機相が変色する。この変色の度合いを熱レンズ顕微鏡 (励起光波長: 514.5 nm, プローブ光波長: 633 nm) の焦点を有機相側に合わせて検出した。

ここではまず、合流点からの距離と熱レンズ信号強度の関係を検討した。Fig. 3 に結果を示す。距離の増加とともに信号強度が増加し、合流点からの距離が約 100 mm 以上では信号がほぼ飽和した。これはイオン対抽出平衡に達したためと考えられる。流体がこの地点に到達するのに必要な時間は約 26 秒程度であった。これはチャンネル幅から考えられる分子拡散時間に一致していることから、この反応は分子拡散に支配されていることが分かる。

以上の検討から、抽出距離は約 100 mm 以上であれば、イオン対抽出平衡に達した信号を得ることができることが分かった。

2.3 微小流体制御の基礎検討

有機相導入口にキャピラリーを 2 本接続し、KD-A3 と valinomycin を含む有機相、及び valinomycin を含まない有機相を交互に導入し、有機相のセグメントフローインジェクションを検討した。水相には K^+ を 10^{-2} M 含む水溶

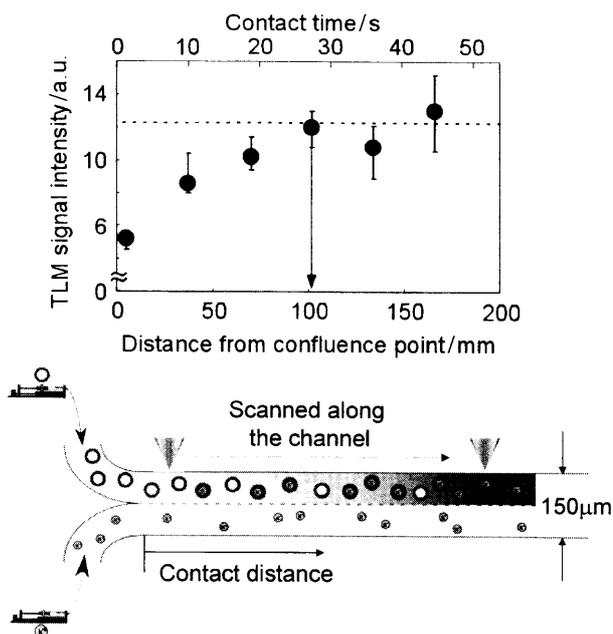


Fig. 3 Position dependence of thermal lens signal intensity upon introduction of butylacetate containing KD-A3 and valinomycin, and 10^{-2} M potassium ion solution

Error bars indicated the variation of TLM signal during the measurement. Plots were the averaged signals obtained in the experiment. Reprinted with permission from ref. 19, Copyright 2001 American Chemical Society

液を用いた。それぞれの有機相導入時間を 2 分、熱レンズ顕微鏡による検出位置を合流点から 166 mm とした場合の結果を Fig. 4 に示す。それぞれの有機相セグメントにイオンが抽出されていることが分かる。到達する信号強度の再現性は極めて高く、10 回の連続導入実験における相対標準偏差は 2.5% 以下であった。

次に、有機相セグメントの導入時間を検討した結果を Fig. 5 に示す。導入時間は有機相体積にほぼ比例するため、導入時間を短くすることができれば高価なイオノホア分子や脂溶性 pH 指示薬の使用量を微量化することが可能である。Fig. 5 より、セグメント導入時間が 30 秒以上であれば、有機相セグメント間の希釈などの影響を受けずにイオン対抽出平衡に到達した信号を得ることができることが分かった。セグメント導入時間 30 秒における有機相導入体積は約 500 nl であり、1 セグメントに含まれるイオノホア及び脂溶性 pH 指示薬量はそれぞれ、2.8 ng 及び 1.7 ng である。通常のイオンセンサーでは数 mg の高価な試薬を用いてセンサー膜を作製するが、その膜を繰り返して使用するために測定ごとに応答が劣化してくる、という欠点があった。しかしながら、今回のシステムにおいて同じ量の試薬を用いれば、原理的に 10^6 セグメントにも及ぶ新

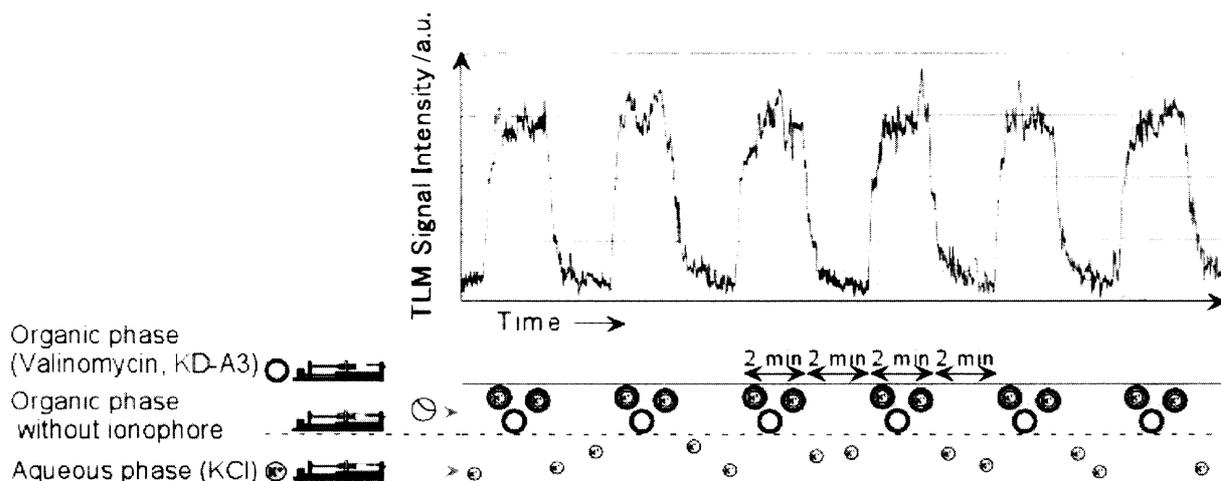


Fig. 4 Response profiles obtained by segmented flow injection of organic phase. Introduction times of organic phases were fixed at 2 minutes

Reprinted with permission from ref. 19, Copyright 2001 American Chemical Society

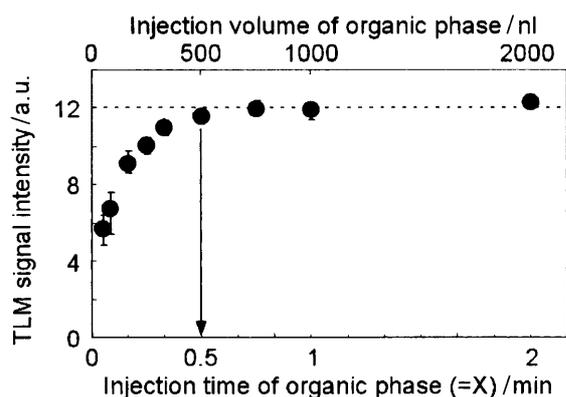


Fig. 5 Introduction time dependence of the TLM signal measured at the organic phase, 166 mm downstream from the confluence point

Reprinted with permission from ref. 19, Copyright 2001 American Chemical Society

しい有機相をチャンネル内に導入することができ、応答の劣化を考慮する必要は一切ない。したがって、センサー応答の点からも飛躍的な応答性向上を達成できることが期待される。

現在限界となっている 500 nl の試料量は、キャピラリー接続部のデッド・ボリュウムの溶液入れ替え体積に起因していると考えられる。実際、今回用いたマイクロチップの導入穴（直径 500 μm 、深さ 700 μm ）、及び O リング（直径 740 μm 、深さ 1000 μm ）の内容積の和は約 400 nl となっており、今回得られた限界値とよく一致する。このことは、キャピラリー接続部の形状を工夫することにより、より少ない有機相の切り取りが実現できる可能性があ

ることを示しており、今後の改善によって更に少ない量での分析が可能になると考えられる。

2.4 複数イオンの連続測定

以上の結果を踏まえ、複数イオンの連続測定を行った。有機相導入口にキャピラリーを 3 本接続し、脂溶性 pH 指示薬 (KD-A3) と Na^+ イオノホア分子 (DD16C5)、及び KD-A3 と K^+ イオノホア分子 (valinomycin) を含む有機相を、イオノホアを含まない有機相を間に挟む形で交互に一定の流量及び導入間隔 (1 $\mu\text{l}/\text{min}$, 2 min) でセグメント導入した。水相には 10^{-2} M K^+ 水溶液、 10^{-2} M Na^+ 水溶液及び K^+ , Na^+ を 10^{-2} M ずつ含む水溶液の 3 種類を用いた。その結果を Fig. 6 に示す。 K^+ , Na^+ をそれぞれ単独で含む水溶液をサンプルに用いた場合には、それぞれ K^+ イオノホア分子を含むセグメント、 Na^+ イオノホア分子を含むセグメントが流れてきた場合にのみイオン対抽出反応が起こっている。これに対し、両方のイオンを含む水溶液を用いた場合には、両方のイオンが別々の有機相セグメントに選択的に抽出されていることが分かる。以上の結果から、1 枚のマイクロチップを用いて、多成分のイオンを同時分析可能なシステムが構築できることが明らかとなった。

3 チップ内化学機能高分子膜の作製による膜透過・酵素反応型バイオセンシング²¹⁾²²⁾

3.1 はじめに

マイクロチップ集積化システムは、「マイクロ流体デバイス」と別称されるほど流体に特化したシステムであり、これまでのシステムは微小空間を流れる流体の物理的特徴

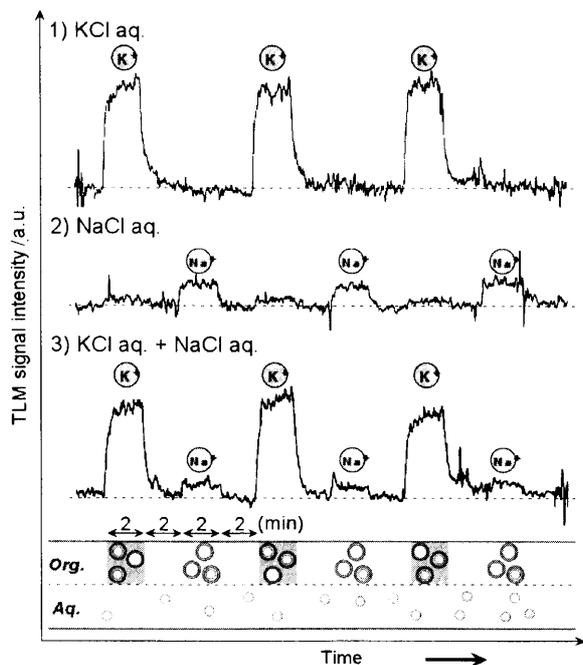


Fig. 6 Response profiles for different aqueous solutions obtained by segmented flow injection of organic phase

(a) Aqueous solution containing 10^{-2} M KCl. (b) Aqueous solution containing 10^{-2} M NaCl. (c) Aqueous solution containing both 10^{-2} M KCl and 10^{-2} M NaCl. Introduction times of organic phases were fixed at 2 minutes. Reprinted with permission from ref. 19, Copyright 2001 American Chemical Society

を活用したシステムが多かった。一方、高分子化学の分野では、多くの機能性高分子膜が知られており、特定物質の選択的分離など、複雑な化学操作の実現に適用されている。また、高分子膜は酵素などの高機能分子固定化媒体としての機能も有する。したがって、機能性高分子膜をマイクロチップ内に作製することができれば、微小空間内の多相接触あるいは選択分離のみならず、高機能分子の固定化により、単純な単位操作の集積のみでは実現できない複雑な化学プロセスが集積化できると考えられる。

マイクロチャンネル内に高分子膜を作製する方法として、著者らはマイクロチャンネル内液液界面を利用した界面重合法に着目した。著者らはこれまでに、マイクロチャンネルに有機相と水相を導入した際に形成される液液界面を利用した様々な分析システムや合成システムの構築に成功してきた^{18)~31)}。重力よりも表面張力が支配的因子となる液相微小空間では、短い分子拡散距離、大きな比界面積などの特徴に基づく迅速な物質移動が可能となるのみならず、マイクロチップ面に垂直方向に液液界面を形成することが可能となる。したがって、マイクロチャンネル内に形成される液液界面において界面重合法を適用すれば、チャンネルの軸方

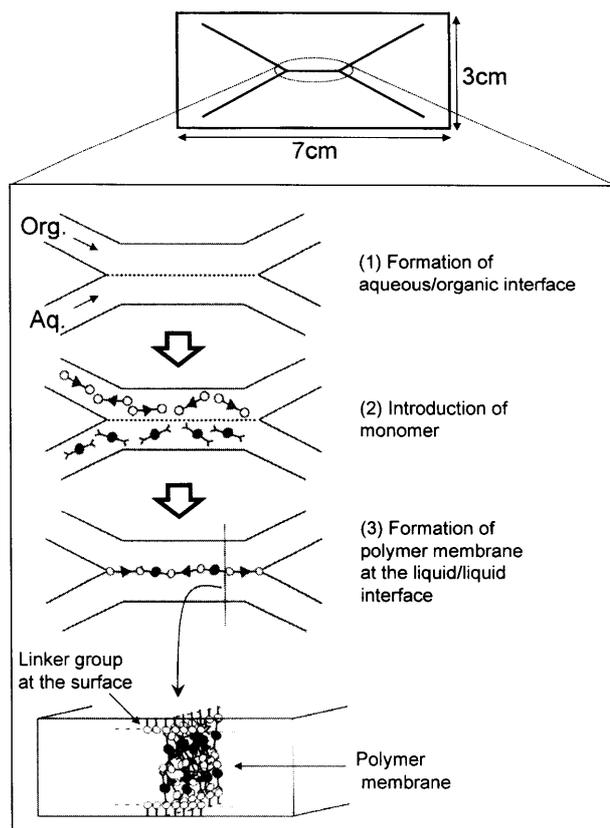


Fig. 7 General idea of polymer membrane formation under organic/aqueous two phase flow in an X-shaped microchannel

Reprinted with permission from ref. 22, Copyright 2003 American Chemical Society

向に向かって高分子膜を形成することができ、チャンネルを仕切る隔膜を作製できると考えた (Fig. 7)。

ここではチャンネル内界面重合に基づくマイクロチャンネル内高分子膜の作製、及びその膜表面の化学修飾に基づくチャンネル内物質透過・酵素反応型バイオセンシングシステムの開発を紹介する。

3.2 マイクロチップ内界面重合に基づく高分子膜の作製

Fig. 8 に用いたマイクロチップの写真を示す。チャンネルパターンは、4つの導入口を有するものとした。(1)と(2)は有機相の導入、(3)と(4)は水相の導入に用いた。(1)と(4)はそれぞれ、1,2-ジクロロエタン及び0.1 M NaOH 水溶液、(2)と(3)はそれぞれ、0.01 M アジピン酸クロリド (1,2-ジクロロエタン溶液) 及び0.01 M ヘキサメチレンジアミン (0.1 M NaOH 水溶液) の導入口とした。作製する高分子膜をチャンネル内壁と化学結合によって接着させるため、チャンネル内壁はあらかじめ3-アミノプロピルトリエトキシシランを用いて化学修飾を施した。まず導

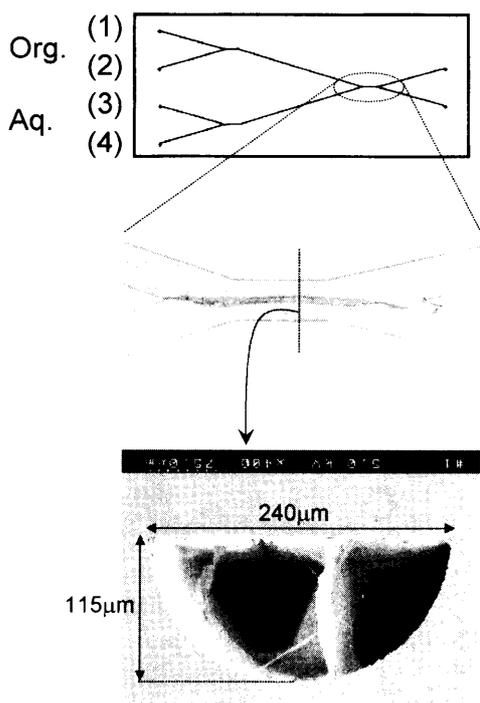


Fig. 8 Channel patterns and top and cross-sectional views of the nylon membrane prepared inside the microchannel

Reprinted with permission from ref. 22, Copyright 2003 American Chemical Society

入口 (1) と (4) から、高分子膜原料を含まない有機相及び水相を一定流量 (20 $\mu\text{l}/\text{min}$) で導入した。製膜地点における安定な液液界面の形成を顕微鏡で確認した後、溶液導入を (2) と (3) の導入口に切り替えると、液液界面付近における 6,6-ナイロン高分子膜の形成が顕微鏡で確認できた。Fig. 8 の写真から、チャンネル内界面重合によって作製した高分子膜はチャンネル内壁に接着した状態になっており、1 本のマイクロチャンネルを 2 つに仕切る隔膜構造となっていることが分かる。SEM 写真から読み取れる膜厚は約 11 ミクロンと見積もられた。6,6-ナイロン高分子膜を界面重合によって作製する場合、いったん高分子膜が形成されるとそれ以後のモノマー供給が膜によって阻害される。反応初期のモノマー供給はモノマーの濃度に依存するため、膜厚は反応初期に供給されるモノマーの量、つまりモノマー濃度によって決定されるものと考えられる。実際、膜作製時のモノマー溶液供給速度 (流量) を遅くしていても大きな膜厚変化は見られなかった。

Fig. 9 に、高分子膜を介して片方に水、もう片方に気泡を導入した場合の連続写真を示す。気泡は高分子膜によって仕切られた片側のチャンネルを通り抜けていき、反対側のチャンネルに導入してある水のリークは見られなかった。

以上の結果から、今回作製したマイクロチャンネル内高分

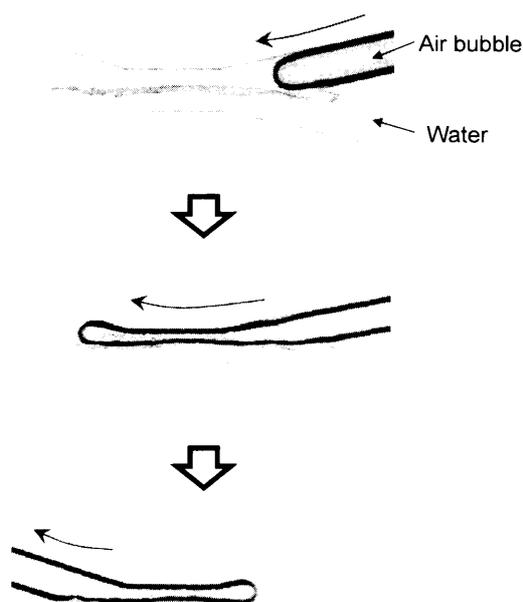


Fig. 9 Sequential photographs showing an air bubble passing through one side of microchannel separated by the nylon membrane 3D structure

Reprinted with permission from ref. 22, Copyright 2003 American Chemical Society

子膜が気相と液相を仕切る隔膜として機能することが分かり、マイクロチャンネル内界面重合法がマイクロチャンネル内隔膜作製に有効な手法であることが分かった。

3.3 マイクロチップ内高分子隔膜を利用したガス透過実験

3.2 において作製したマイクロチャンネル内高分子隔膜の応用例の一つとして、隔膜を介したガス透過実験を試みた。実験の概念図を Fig. 10(a) に示す。このシステムは、チャンネル内高分子隔膜を介して片方のチャンネルに 10^{-1} M フェノールフタレイン水溶液を導入し、反対側のチャンネルには 10^{-1} M 塩化アンモニウムと 10^{-1} M NaOH 水溶液の混合液を導入する。溶液内で発生したアンモニアガスが膜を透過してフェノールフタレイン相の pH が上昇し、色素が変色する様子を当研究室で開発した熱レンズ顕微鏡を用いて検出する、というものである。

Fig. 10(b) にガス透過実験の結果を示す。試薬溶液を一定流量で導入し、シリンジポンプをストップして反応を開始した。ここでは比較のため、塩化アンモニウムを含まない 10^{-1} M NaOH 水溶液のみを導入した際の結果も併せて示した。塩化アンモニウムを含まない溶液を導入した場合には熱レンズ信号強度が大きく変わらないのに対し、

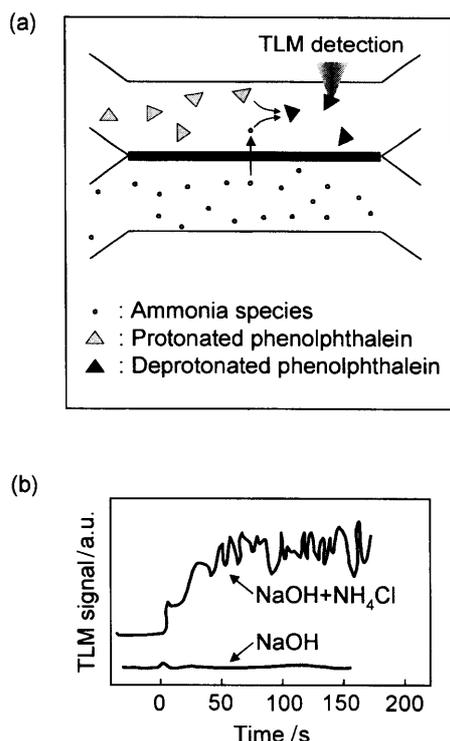


Fig. 10 Ammonia species permeation experiment
(a) Schematic illustration of experimental system.
(b) Time course of the TLM signal just after stopping the syringe pump. Reprinted with permission from ref. 22, Copyright 2003 American Chemical Society

アンモニアガスが発生する場合にはその信号強度が大きく変化し、マイクロチャンネル内高分子隔膜がガス透過膜として機能していることが分かった。

3.4 マイクロチップ内高分子膜表面への酵素固定化と基質透過・酵素反応型バイオセンシング

ここではチャンネル内ナイロン膜を作製し、酵素による膜表面の化学修飾を検討した。Fig. 11(a) にチャンネルパターンと実験の模式図を示す。この膜で仕切られた片方のチャンネルに酵素（ペルオキシダーゼ）水溶液を導入し、グルタルアルデヒド法によって酵素を片側の膜表面に固定化した。次に、過酸化水素との酵素反応によって色素を生成する基質（4AA, TOOS, 10^{-3} M）を酵素修飾側チャンネルに、過酸化水素水溶液（ 10^{-4} M）をもう一方のチャンネルに導入し、過酸化水素の膜透過に基づく酵素修飾側膜表面での酵素反応を熱レンズ顕微鏡によって検出した。酵素修飾側チャンネル及びナイロン膜を介して反対側のチャンネルの2点において熱レンズ顕微鏡検出を試みた結果を Fig. 11(b) に示す。酵素修飾側チャンネル（detection point A）では色素生成に基づく熱レンズ信号が確認されたのに対し、過酸化水素供給側のチャンネル（detection point B）では熱レン

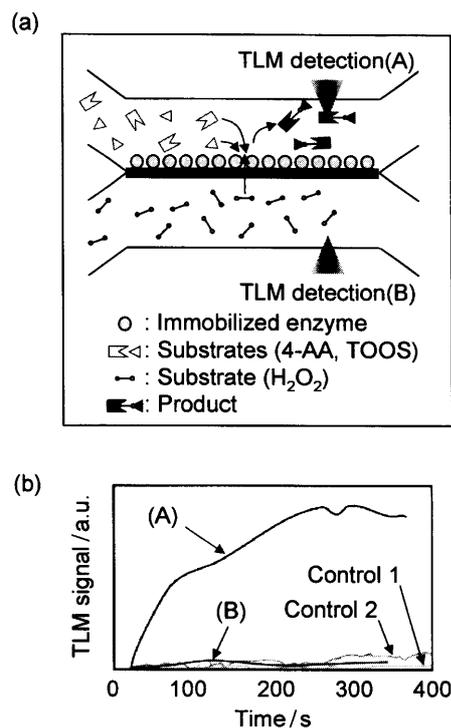


Fig. 11 Substrate permeation and subsequent enzyme reaction experiment

(a) Schematic illustration of experiment system. (b) Time course of the TLM signal just after stopping the syringe pump (for details, see the experimental section). TLM detection points (A) and (B) indicate detection points in the microchannel separated by the inner channel membrane, shown in Figure 11(a). (A) Enzyme immobilized side. (B) Hydrogen peroxide supplying side. Control 1 and 2 were obtained at the detection point (A). Reprinted with permission from ref. 22, Copyright 2003 American Chemical Society

ズ信号強度の増加が見られなかった。また、コントロールとして、過酸化水素を供給しない実験（control 1）及び酵素固定化膜がない状態での基質溶液導入実験（control 2）を行っても信号強度の上昇はほとんど見られなかった。これらのことから、本実験では、4AA, TOOS 及び生成する色素はイオン性であるために膜を透過しにくいのに対し、電気的に中性な過酸化水素はナイロン膜を透過することができるために、膜を介する過酸化水素透過によって、膜で仕切られた片方のチャンネルのみで酵素反応が進行したと考えられる。

以上の結果から、マイクロチップ内界面重合法及び酵素固定化に基づいた、チップ内基質透過・酵素反応型バイオセンシングシステムの構築に成功した。

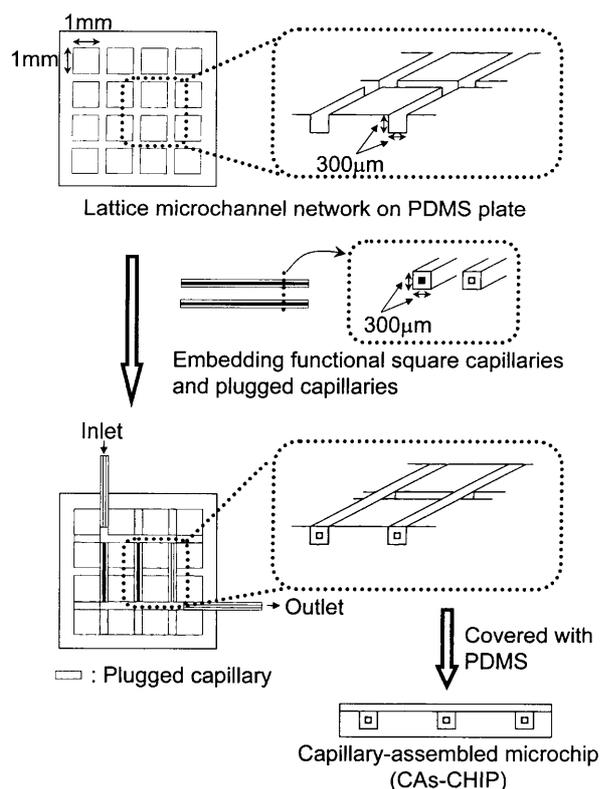


Fig. 12 General concept for fabricating CAs-CHIP by embedding square capillaries into the lattice microchannel network

Reprinted with permission from ref. 32, Copyright 2004 American Chemical Society

4 キャピラリーアセンブルド・マイクロチップに基づくマルチセンシング³²⁾

4.1 はじめに

これまでのマイクロチップ集積化化学システムの研究は、基本的にマイクロチャンネルのような微小な空間が提供する物理的特徴（短い分子拡散距離、大きな比界面積、小さな熱容量など）を活用し、高効率な混合・反応・分離などの化学プロセスを実現したものであった。それに対し、近年、高機能分子の持つ化学的な機能を積極的に活用するマイクロチップ集積化化学システムの研究が注目され始め、次世代マイクロチップ開発につながる技術として、*Nature* 誌、*Science* 誌をにぎわしている³³⁾³⁴⁾。これらの研究は、フォトリソグラフィ・多相流パターンニングなどの手法を用い、マイクロチップ内の特定の位置で高機能分子の位置選択的固定化を実現したものであり、多種類の化学機能を集積できれば連続的・化学処理による化学プロセスの迅速化、あるいは、従来の前処理で失われていた化学情報を得ることができると期待されている。しかしながら、これらの方法は単機能の集積には極めて有効な方法である一方、多機能集積においては実験技術的に困難を極める。な

ぜなら、これらの方法では、チャンネルの一部を化学修飾する場合にも“すべてのチャンネル”を機能分子含有液体で満たさなければ化学修飾不可能であるため、多種類の化学機能を集積する場合には、既に固定化された分子と2種類目以降の分子の溶液が混ざってしまい、コンタミネーションによる機能劣化が大きな問題となる。したがって、これらの方法に基づく「多機能集積」は技術的に非現実的であり、高度な化学処理をチップで実現する上で極めて本質的な問題と考えられる。

そこで著者らのごく最近、新しい化学機能集積マイクロチップとして、化学修飾角型キャピラリーと格子状チャンネルネットワークを有するポリジメチルシロキサン (PDMS) プラットフォームを組み合わせた“キャピラリーアセンブルド・マイクロチップ (capillary-assembled microchip, CAs-CHIP)”を考案した。これは正方形断面を持つ角型キャピラリーの外側の一辺と同じ幅・高さを有するマイクロチャンネルをPDMS上に格子状に作製し、内壁に化学修飾を施した角型シリカキャピラリーを必要な長さにカットして必要な場所に埋め込むことで、ブロックを組み合わせるように化学機能集積マイクロチップが構築できるというものである (Fig. 12)。この方法では、多種類の化学機能集積が可能、かつ多相流形成などの微小流体デバイスの特徴を活用可能であることから、これまでは困難であったマルチ機能集積チップ構築がほんの指先程度のサイズで実現できる。また、イオンセンシング、酵素・免疫反応などの化学機能をキャピラリー内壁に付与する方法は多数知られており、多彩な集積化化学システムの構築が期待できる。更に、長い化学修飾キャピラリーをカットして使う、という手法から、将来の量産に関しても期待が持てる。ここでは、CAs-CHIPの作製法及び多種類の化学センシングキャピラリー作製に基づくマルチセンシングチップ作製など、CAs-CHIPの応用例について紹介する。

4.2 CAs-CHIPの作製

CAs-CHIPは格子状PDMS基板への角型キャピラリー埋め込みによって作製する。格子状PDMS基板の作製は次のとおりである。ダイシングソーを用いてガラス基板上に幅、深さ300µmの溝をピッチ1mmの格子状に作製し、PDMSモールディングを2回繰り返すことにより、格子状チャンネルをPDMSへ転写して作製した。ここに内辺100あるいは50µm(外辺300µm)の化学修飾角型キャピラリーを埋め込んだ後、使用しないPDMSチャンネルには、液状PDMSモノマーを注入・固化させた角型キャピラリー(プラグキャピラリー)を埋め込んだ。角型キャピラリーは外周の四隅が完全に直角ではないため、PDMSへ埋め込んだ際、四隅での液漏れが生じることが予測される。実際に埋め込んだところ、底面はPDMSが変形して隙間が

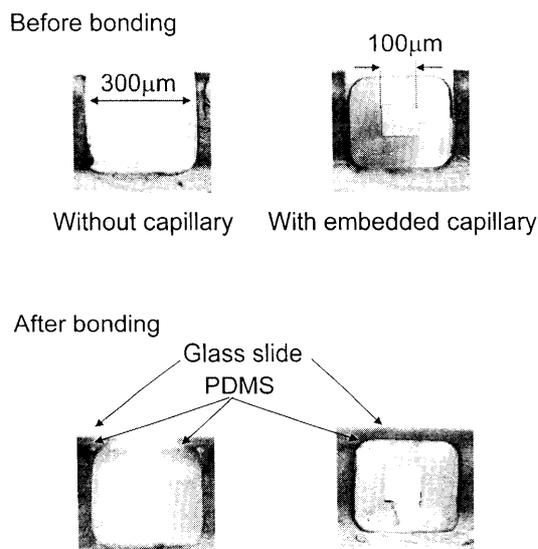


Fig. 13 Typical cross sections of 300 μm and 100 μm channel (capillary) before and after bonding spin-coated PDMS prepolymer plate

Reprinted with permission from ref. 32, Copyright 2004 American Chemical Society

埋まるが、上面の隙間が埋まらないため、通常のボンディング法では液漏れを起こしてしまった。そこでここではPDMSモノマーをスピコートしたガラス板をはって加温する、という方法をとったところ、すべての隙間を埋めることができ、液漏れのないマイクロチップを作製することに成功した (Fig. 13)。この方法で作製したチャンネルパターンの例を Fig. 14 に示す。本法では流路キャピラリーとプラグキャピラリーを組み合わせることで、実に多彩な流路が簡単に作製可能である。しかも角型断面の流路を用いているために、2液の合流点においてマイクロ平面流路の特徴である多相流形成が可能となる (Fig. 15)。

4.3 化学修飾角型キャピラリーの作製とマルチセンシングチップの作製

ここでは CA_S-CHIP の最も単純な応用例の一例として、pH、イオンなどに応答する化学センサー膜を修飾した角型キャピラリーを多種類作製し、それらを埋め込んだマルチセンシングチップの作製を試みた。抽出系センシングメカニズムを用いるイオンセンサーの代表例として、可塑性ポリ塩化ビニル (PVC) 膜型イオン選択性オプトード膜を、また、均一系センシングメカニズムを用いる pH センサーの代表例として、ポリエチレングリコール (PEG) ハイドロゲル薄膜を内径 100 μm の角型キャピラリー内に作製した。イオン選択性オプトード膜の場合、高選択性イオノホア分子 (Ca^{2+})、脂溶性蛍光色素分子、PVC、可塑剤をテトラヒドロフラン (THF) に溶解し、膜材溶液とした。

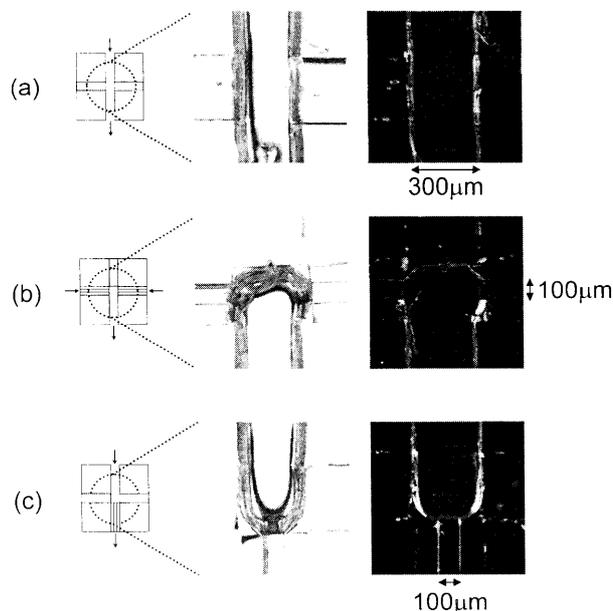


Fig. 14 Microscope images of typical channel structures at crossing points

(a) Through channel. Two channels are blocked by plugged capillaries to form a straight channel. (b) T-junction. Two open capillaries face each other (left and right). The top side of PDMS channel is blocked by a plugged capillary. (c) Straight connection between 300 μm PDMS channel and 100 μm glass channel (capillary). Left and right channels are blocked by plugged capillaries. Reprinted with permission from ref. 32, Copyright 2004 American Chemical Society

これを角型キャピラリーに導入し、次いで空気を導入・乾燥することで膜を作製した。PEG ハイドロゲル薄膜の場合、pH に応答するフルオレセインイソチオシアネート (FITC) とポリエチレンイミンの混合溶液にポリエチレングリコールジアクリレート、重合開始剤、水を加えた溶液を膜材溶液とした。これを角型キャピラリーに導入、引き続き空気注入後、80 $^{\circ}\text{C}$ で2時間加熱することでハイドロゲル膜を内壁に固定し、キャピラリー内を水で十分洗浄して未反応試薬を除去した。これらのキャピラリーを1~2 mm にカットし、格子状PDMSに埋め込んでマルチセンシングチップを作製した。Fig. 16 にイオン選択性オプトード膜修飾キャピラリー及びPEG ハイドロゲル薄膜修飾キャピラリーの蛍光写真を示す。角型キャピラリー内壁での膜作製では、膜材溶液を導入して空気を通じると、粘性

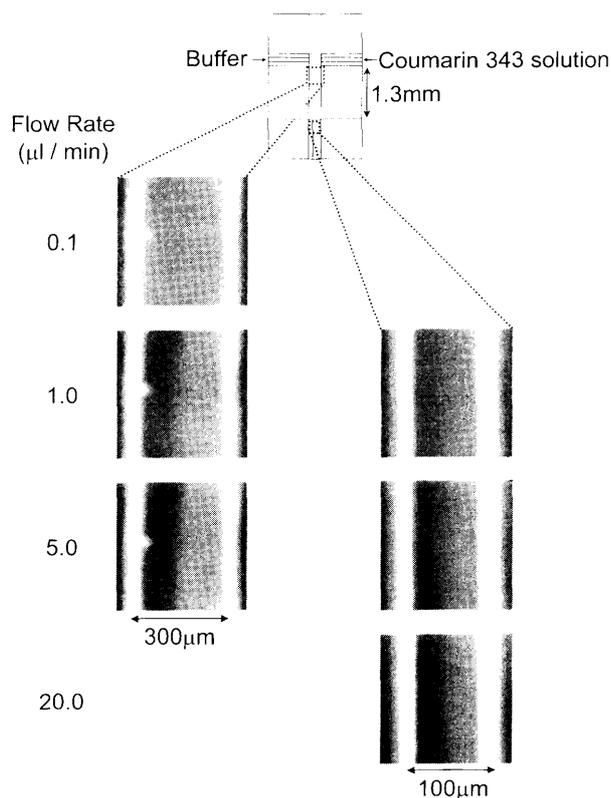


Fig. 15 Design of the T-junction type microchannel and typical fluorescence micrographs obtained 300 μm downstream from the T-junction, and inside the connected 100 μm capillary, when a fluorescent solution and an aqueous buffer solution are mixed at the T-junction with different flow rates

Reprinted with permission from ref. 32, Copyright 2004 American Chemical Society

の関係で細管断面の四隅に膜剤溶液が偏る。したがって、その状態で溶媒を乾燥、あるいは膜材を重合させることによって、角型キャピラリー断面の四隅に製膜することができる。Fig. 16の上面写真 (Fig. 16左) では、いずれのキャピラリーも角型キャピラリー内壁の角の部分に沿って膜が形成されており、また断面写真 (Fig. 16右) から、上記のようにチャンネルの四隅に膜が作製されていることが分かる。ここでは可塑化PVC膜型イオンセンシング膜、PEGハイドロゲル型pHセンシング膜の作製に成功した。

次に、 Ca^{2+} イオン及びpHセンシングキャピラリーを埋め込んだデュアルセンシングチップを作製した。Fig. 17に作製したチップ及びそれぞれの応答曲線を示す。カルシウムイオン及びpHへの応答濃度範囲は、それぞれ $10^{-1} \sim 1 \text{ M}$ 、pH 4~9であった。これは単純なチップでありながら、全く異なる性質の機能膜を1枚のチップに集積した点で、極めて意義深い結果である。

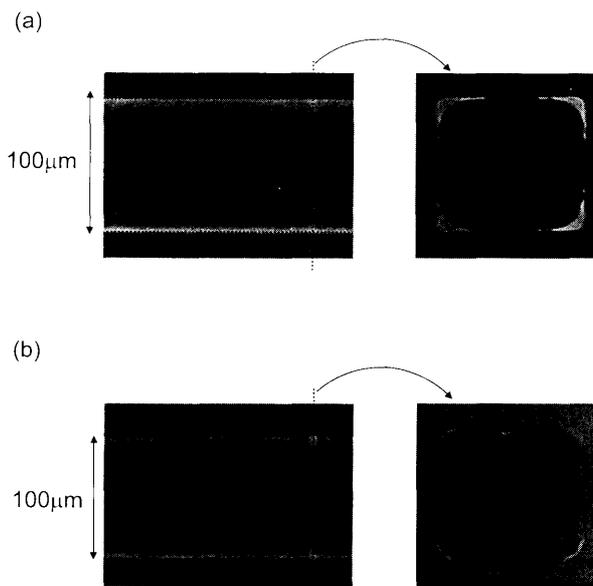


Fig. 16 Top and cross sectional fluorescence images of PVC membrane-attached square capillary (a) and hydrogel-attached square capillary (b)

Reprinted with permission from ref. 32, Copyright 2004 American Chemical Society

5 まとめと今後の展望

本稿ではマイクロチップを用いた新しい化学センシングシステムを紹介してきた。

マイクロ多相流を活用したマルチイオンセンシングでは従来型のイオンセンサーでは実現が困難であったマルチイオンセンシングを、1枚のチップ上で実現した。この実現におけるキーテクノロジーはセグメントフローインジェクション、多相流の形成といった微小流体制御技術、及びニュートラルイオノホアを用いたイオン対抽出技術である。今回実現したマルチイオンセンシングシステムはイオノホア分子を変えるだけでナトリウム、カリウム以外にも多くのイオン種を検出することができる。また、多種類のイオノホアを含有する有機相を導入することで、より多くの種類のイオンを検出することも可能と考えられる。したがって、環境試料、血清試料など、複数イオンの連続分析が要求される分野への適用が期待できる。また本法は、高機能性分子を保持させた微小流体の空間的マニピュレーションによって創出された全く新しい微小流体内化学プロセスであり、マルチイオンセンシングへの適用のみならず、コンビナトリアルスクリーニング、反応経路探索などへの応用も期待できる点が興味深い。

チップ内化学機能高分子膜の作製による膜透過・酵素反応型バイオセンシングでは、チップ内多相流形成と界面重合に基づいて、「化学的に」チップ内高分子膜を作製する

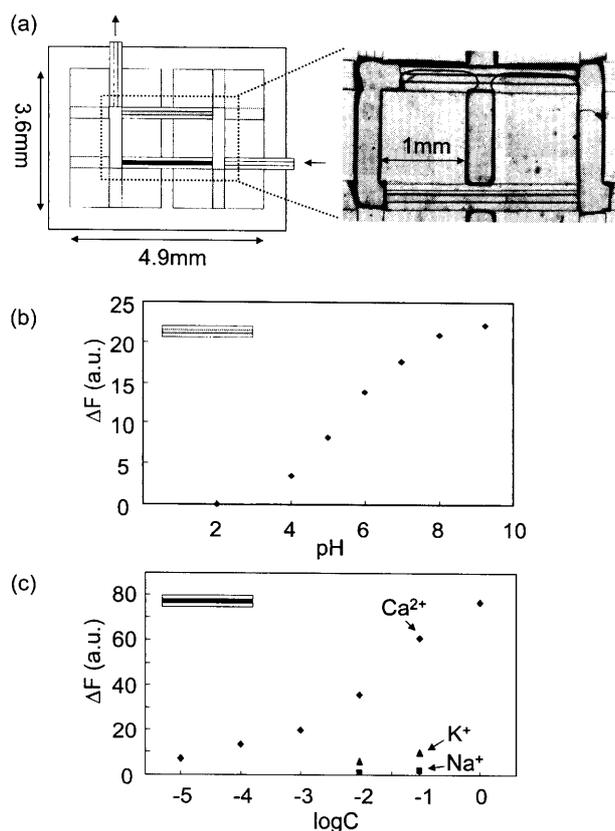


Fig. 17 Dual sensing chip and calibration curves

(a) Design and photograph of the dual-sensing chip. (b) Calibration curve for pH. (c) Calibration curve for calcium ion. (Reprinted with permission from ref. 32, Copyright 2004 American Chemical Society)

ことに世界に先駆けて成功し、更にチップ内高分子膜表面に酵素反応機能を付与することによって、チップ内膜分離・触媒反応というこれまでにない化学プロセスを集積した。これは従来の単純な液体導入・接触にとどまらない新規チップ内バイオセンシングシステムであり、化学的機能を微小空間内に集積していく次世代のマイクロチップ研究に新たな道を開く方法論として極めて意義深いものである。

キャピラリーアセンブルド・マイクロチップに基づくマルチセンシングでは、キャピラリー自体を(1)化学修飾の媒体、(2)流路構成のパーツとして利用することによって、自由自在な流路デザインのみならず、多種類の化学機能集積が可能となり、しかも、これまでのマイクロチップ集積化学システムの研究で培われてきた多相流形成など、マイクロ平面流路の特徴も生かすことが可能であるため、今後、パーツとなる化学機能キャピラリーの種類を増やし、マイクロ平面流路の特徴を組み合わせることで、マルチセンシングのみならず、前処理集積分離分析システム、マイクロ合成・分離システムなど、これまでのチ

ップ技術では実現困難であった多機能集積チップ構築が期待できる³⁵⁾。

分析システムのダウンサイズ化は今に始まったものではなく、これまでも長い分析化学の歴史の中で様々なアプローチが試みられてきている。しかしながら、マイクロチップ集積化システムでは、微小な空間が提供する物理的な特徴やマイクロ多相流形成の利用に加え、高機能分子に基づく化学的な機能の位置選択的固定を利用することによって、これまでにない新しいマイクロ分析システムの構築が期待できる。この数年間の研究で、マイクロ流路を使ったシステムでできること、あるいは困難なことがしだいに浮き彫りになってきた。今後はこれまで用いられてきた混合、抽出といった単位操作に加えて、蒸発、濃縮など、新しい単位操作の開発や、多種類の化学機能・化学プロセス集積チップを作製するための方法論開発が重要な方向になる。これまでは単純な機能の集積に関する研究が多かったが、今後は最終目的をクリアにし、これまでに蓄積されてきた知識を真の意味で“集積化”していくことが、次世代のマイクロ分析化学システム構築、あるいは装置化へとつながっていくものと思われる。

文 献

- 1) T. Vilkner, D. Janasek, A. Manz: *Anal. Chem.*, **76**, 3373 (2004).
- 2) T. Laurell, J. Nilsson, K. Jensen, D. J. Harrison, J. P. Kutter (Eds.): “*Micro Total Analysis Systems 2004*”, (2004), (The Royal Society of Chemistry).
- 3) 北森武彦監修: “マイクロ化学チップの技術と応用”, (2004), (丸善).
- 4) Y. Kikutani, A. Hibara, H. Hisamoto, M. Tokeshi, T. Kitamori: “*Lab-on-a-Chip*”, Edited by R. E. Oosterbroek, A. van den Berg, p. 285 (2003), (Elsevier B. V., Amsterdam).
- 5) 北森武彦監修: “インテグレートド・ケミストリー—マイクロ化学チップが拓く科学と技術—”, (2004), (シーエムシー出版).
- 6) M. Tokeshi, Y. Kikutani, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Electrophoresis*, **24**, 3583 (2003).
- 7) K. Sato, A. Hibara, M. Tokeshi, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 379 (2003).
- 8) T. Kitamori, M. Tokeshi, A. Hibara, K. Sato: *Anal. Chem.*, **76**, 52A (2004).
- 9) H. Hisamoto, K. Watanabe, E. Nakagawa, Y. Shichi, K. Suzuki: *Anal. Chim. Acta*, **299**, 179 (1994).
- 10) H. Hisamoto, N. Miyashita, K. Watanabe, E. Nakagawa, K. Suzuki: *Sens. Actuators B*, **29**, 378 (1995).
- 11) H. Hisamoto, E. Nakagawa, K. Nagatsuka, Y. Abe, S. Sato, D. Siswanta, K. Suzuki: *Anal. Chem.*, **67**, 1315 (1995).
- 12) H. Hisamoto, M. Tsubuku, T. Enomoto, K. Watanabe, H. Kawaguchi, Y. Koike, K. Suzuki: *Anal. Chem.*, **68**, 3871 (1996).
- 13) H. Hisamoto, H. Tohma, T. Yamada, K. Yamauchi, D. Siswanta, K. Suzuki: *Anal. Chim. Acta*, **373**, 271 (1998).

- 14) H. Hisamoto, Y. Manabe, H. Yanai, H. Tohma, T. Yamada, K. Suzuki: *Anal. Chem.*, **70**, 1255 (1998).
- 15) H. Hisamoto, M. Tani, S. Mori, T. Yamada, T. Ishigaki, H. Tohma, K. Suzuki: *Anal. Chem.*, **71**, 259 (1999).
- 16) H. Hisamoto, K. Suzuki: *Trends Anal. Chem.*, **18**, 513 (1999).
- 17) H. Hisamoto, S. Satoh, K. Satoh, M. Tsubuku, D. Siswanta, Y. Shichi, Y. Koike, K. Suzuki: *Anal. Chim. Acta*, **396**, 131 (1999).
- 18) H. Hisamoto, T. Horiuchi, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **73**, 1382 (2001).
- 19) H. Hisamoto, T. Horiuchi, K. Uchiyama, M. Tokeshi, A. Hibara, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **73**, 5551 (2001).
- 20) 久本秀明, 堀内隆之, 火原彰秀, 渡慶次学, 北森武彦: *電気学会誌*, **123-E (4)**, 124 (2003).
- 21) Y. Shimizu, H. Hisamoto, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori: Digest of Papers, 2001 International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2001), p. 20 (2001), (Shimane).
- 22) H. Hisamoto, Y. Shimizu, K. Uchiyama, M. Tokeshi, Y. Kikutani, A. Hibara, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **75**, 350 (2003).
- 23) A. Hibara, M. Tokeshi, K. Uchiyama, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Anal. Sci.*, **17**, 89 (2001).
- 24) M. Surmeian, A. Hibara, M. N. Slyadnev, K. Uchiyama, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Anal. Lett.*, **34**, 1421 (2001).
- 25) H. Hisamoto, T. Saito, M. Tokeshi, A. Hibara, T. Kitamori: *Chem. Commun.*, **2001**, 2662.
- 26) M. Tokeshi, T. Minagawa, K. Uchiyama, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, 1565 (2002).
- 27) A. Hibara, M. Nonaka, H. Hisamoto, K. Uchiyama, Y. Kikutani, M. Tokeshi, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, 1724 (2002).
- 28) M. Surmeian, M. N. Slyadnev, H. Hisamoto, A. Hibara, K. Uchiyama, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, 2014 (2002).
- 29) Y. Kikutani, T. Horiuchi, K. Uchiyama, H. Hisamoto, M. Tokeshi, T. Kitamori: *Lab Chip*, **4**, 188 (2002).
- 30) Y. Kikutani, A. Hibara, K. Uchiyama, H. Hisamoto, M. Tokeshi, T. Kitamori: *Lab Chip*, **4**, 193 (2002).
- 31) Y. Kikutani, H. Hisamoto, M. Tokeshi, T. Kitamori: *Lab Chip*, **4**, 328 (2004).
- 32) H. Hisamoto, Y. Nakashima, C. Kitamura, S.-i. Funano, M. Yasuoka, K. Morishima, Y. Kikutani, T. Kitamori, S. Terabe: *Anal. Chem.*, **76**, 3222 (2004).
- 33) D. J. Beebe, J. S. Moore, J. M. Bauer, Q. Yu, R. H. Liu, C. Devadoss, B. H. Jo: *Nature*, **404**, 588 (2000).
- 34) P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilov, G. M. Whitesides: *Science*, **285**, 83 (1999).
- 35) H. Hisamoto, S.-i. Funano, S. Terabe: *Anal. Chem.*, **77**, (2005) in press.

要 旨

マイクロファブリケーションによって基板上に微細な流路を作製し、化学システムを集積化する研究は、近年 DNA 分析チップを中心に実用化されるまでに至っている。これまでのチップ技術では、微小空間が提供する物理的特徴を利用して、迅速混合、電気泳動分離等へ利用する研究が多かった。著者らは、独自に開発してきた機能性色素分子・イオン認識分子等の高機能性分子の特徴と、マイクロ流路の提供する微小空間・流体特有の特徴を積極的に活用し、新しいマイクロ化学センシングの方法論を開発した。ここではマイクロ多相流を活用したマルチイオンセンシング、チップ内化学機能高分子膜の作製による膜透過・酵素反応型バイオセンシング、キャピラリーアセンブルド・マイクロチップに基づくマルチセンシングについて紹介する。