

超微量分析・精密合成を可能にする マイクロ化学チップ

*財神奈川科学技術アカデミー光科学重点研究室マイクロ化学グループ

**東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻

***東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

渡慶次 学*・火原 彰秀**・佐藤 記一***・上野 雅晴**・北森 武彦*,**

Micro chemical-chips enable us to carry out ultramicroanalysis and fine organic synthesis

Manabu Tokeshi*, Akihide Hibara**, Kiichi Sato***,
Masaharu Ueno**, Takehiko Kitamori*,***

*Kanagawa Academy of Science and Technology, Special Research for Optical Science, Micro Chemistry Group

**The University of Tokyo, Graduate School of Engineering, Department of Applied Chemistry

***The University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Department of Applied Biological Chemistry

1. はじめに

近年、化学研究の分野では化学システムのマイクロ化・集積化の研究が注目されている¹⁾。これは数 cm 角程度のガラスやシリコン、プラスチック基板上に数十～数百 μm の流路（マイクロチャンネル）を作製し、そのマイクロチャンネルを反応槽や分離槽などに利用するものである。そのマイクロチャンネルが作製された小さな基板（チップ）は、マイクロ化学チップと呼ばれている（図 1）。マイクロ化することで試料量・廃液量の低減、反応の高効率化・分析時間の短縮のみならず、操作の簡便化、並列処理・自動化などが実現されている。

本稿では、マイクロ化学チップに関する筆者らの研究成果の一部を紹介する。最初にマイクロ化学チップシステムの構築法について説明し、超微量分析と精密合成の応用例について紹介する。

2. マイクロ化学チップシステムの構築法

筆者らは、マイクロ化学システムを構築するために、化学工学のシステム設計に用いられる単位操作（Unit Operation）という概念をマイクロ化したマイクロ単位操作（Micro Unit Operation: MUO）を考案した²⁾。マイクロ化学システムにおいてもマクロシステムと同様に、マイクロ単位操作を複数組み合わせることで、複雑な化学プロセスを任意に設計・集積化できると着想した。つまり、システムを構成する各パーツを小型化するのではなく、各パーツと同じ機能を持つマイクロ単位操作を組み合わせることでシステム

〒213-0012 川崎市高津区坂戸 3-2-1 KSP 東棟 307

財団法人 神奈川科学技術アカデミー

光科学重点研究室マイクロ化学グループ

TEL 044-819-2037

FAX 044-819-2092

E-mail: tokeshi@pop12.odn.ne.jp

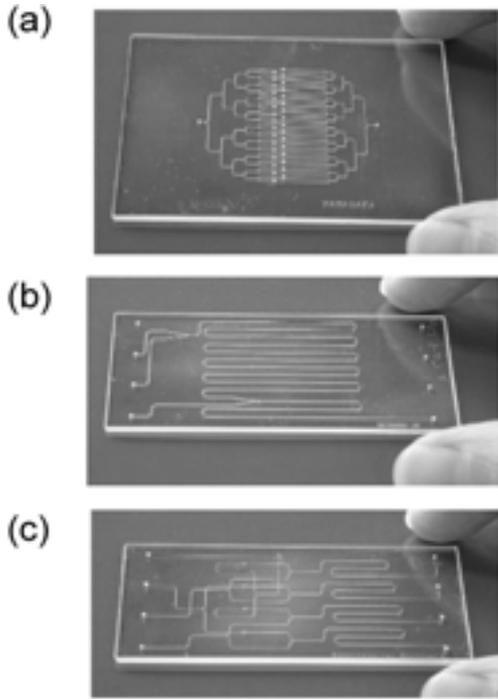


図1 マイクロ化学チップの例
 (a)イムノアッセイ用チップ, (b)合成用チップ,
 (c)コンビナトリアル化学チップ

を構築する。筆者らがこれまでに実現してきたマイクロ単位操作の例を図2に示す。この中で、溶媒抽出^{3),4)}、レーザーによる局所加熱⁵⁾、濃縮⁶⁾は世界で初めて筆者らが実現したものである。

個々のマイクロ単位操作は、性質の異なる複数の流体をチャンネル内で連続的に流して形成させた多相流ネットワークを利用してつないでいく。この手法を筆者らは Continuous Flow Chemical Processing (CFCP) と名付けた²⁾。このCFCPは微小空間の流体の特徴を上手く利用した方法で、マイクロ化学システムを構築する上で極めて有効な手法である。

3. 超微量分析の例1 コバルト湿式分析システム

最近では単純な分析システムであれば1枚のマイクロチップに集積化することができるようになってきた^{7),8)}。しかし、単位操作がいくつ

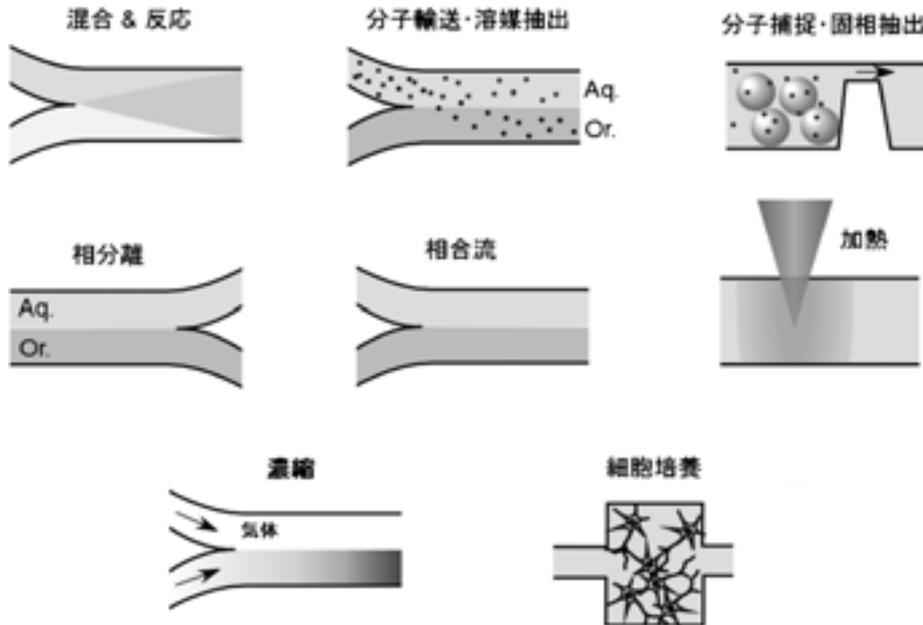


図2 ミクロ単位操作の例

も必要な複雑な化学システムを集積化するのには現在でも非常に難しい。

ここでは、筆者らが考案した CFCP を用いることで非常に複雑なコバルト湿式分析システムを構築した例を紹介する²⁾。コバルト湿式分析は、錯形成反応、溶媒抽出、共存金属錯体の分解・除去、コバルトの定量からなり、これらを単位操作に分解すると約 40 操作分に対応する。通常は分液漏斗などを用いて煩雑な操作を繰り返す行わなければならない、コバルトを定量するのに数時間要する。特に共存金属錯体の分解・除去は塩酸、水、水酸化ナトリウム水溶液をそれぞれ 3 回以上作用させる必要があり、操作の簡略化が望まれる。図 3 にコバルト湿式分析に必要な全プロセスを CFCP でデザインした模式図を示す。このシステムは錯形成反応・溶媒抽出と、共存金属錯体の分解・除去を行う 2 つの領域から構成される。前半の反

応・抽出領域で生成・抽出された金属錯体を含む有機相を後半の分解・除去領域に導入し、塩酸と水酸化ナトリウム水溶液を両側から接触させてコバルト以外の金属錯体を分解・除去する。これはコバルト錯体が非常に安定で塩酸と接触しても分解されないのに対して、他の共存金属（銅、鉄、鉛など）錯体は分解されることを利用したものである。分解された金属イオンは塩酸に、配位子は水酸化ナトリウム水溶液に抽出される。このシステムで塩酸と水酸化ナトリウム水溶液を同時に作用させることができるのは（従来法では、塩酸と水酸化ナトリウムを同時に作用させると中和反応が起こる）、CFCP の大きなメリットの 1 つである。CFCP の利点は単にマイクロ分析システムを実現するだけでなく、操作の簡略化も同時に実現することにある。チップは試料、反応試薬（2-ニトロソ-1-ナフトール）、有機相（*m*-キシレン）、

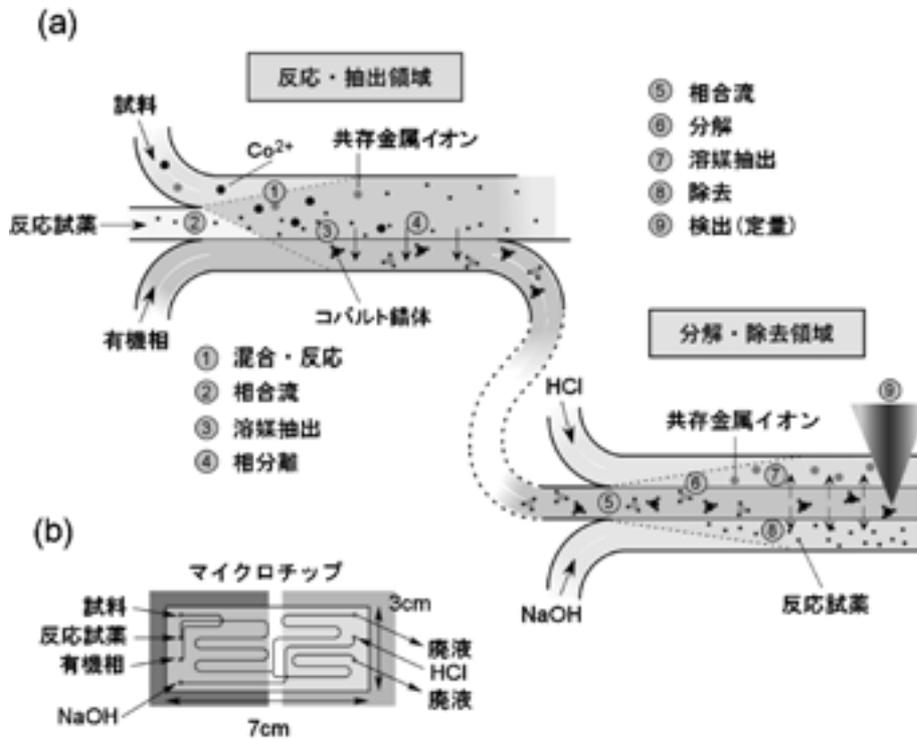


図 3 (a)CFCP によるコバルト湿式分析システム, (b)マイクロチップの概略

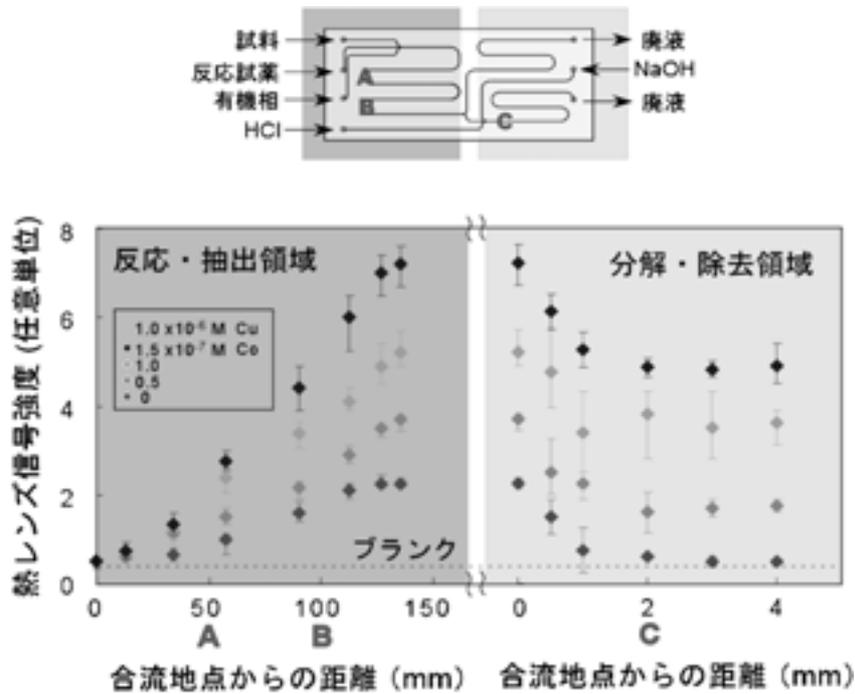


図4 熱レンズ信号の測定位置依存性

塩酸、水酸化ナトリウム水溶液を導入する5つの導入口と2つの排出口を持つ(図3(b))。それぞれの溶液はマイクロシリンジポンプで流速を制御しながらマイクロチャンネル内に導入する。共存イオンとして銅イオン ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) を含むコバルトイオン ($0 \sim 1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$) 水溶液を分析対象とし、有機相に抽出された金属錯体をマイクロチャンネルに沿って熱レンズ顕微鏡で測定した結果を図4に示す。熱レンズ顕微鏡は筆者らが独自に開発した超高感度検出器である。紙面の都合上、ここでは熱レンズ顕微鏡の測定原理および性能については説明しないが、興味のある読者は他を参照されたい⁹⁾。前半の反応・抽出領域では試料、反応試薬、有機相の合流地点から下流に行くにしたがって信号強度が強くなり、コバルトと銅イオンが共に錯体を形成し、有機相に抽出されていることがわかる。後半の分解・除去領域のはじめの部分では銅錯体が塩酸と水酸化ナトリウム水溶液によ

り分解・除去されるので信号は減少するが、コバルト錯体は分解されないため合流地点から約2 mm 下流以降では信号は一定値になる。合流地点から3 mm 下流の結果を用いて作成された検量線は良好な直線関係を示し、このシステムでコバルトの定量ができています。また、このシステムにおける1サンプル当たりの分析時間は約50秒であり、従来の2~3時間と比較して大幅な分析時間の短縮が実現している。また、試料、試薬、抽出溶媒の使用量はそれぞれ数 μl で、従来法に比べて大幅な使用料の低減も実現している。

4. 超微量分析の例2 イムノアッセイ

イムノアッセイは様々なタンパク質からホルモンなどの低分子まで生体関連物質の選択的高感度分析に利用されており、医療診断分析や生化学研究の分野では必須の分析法である。

ELISA（酵素免疫検定法）をはじめとする従来の固相化イムノアッセイでは、煩雑なピペティング操作手順を要する上に、数時間から1日程度の極めて長い時間が必要である。それは、試料を吸着させた固相表面においてのみ反応がおこるため、反応固相から遠い位置にある分子が反応に加わることが難しく、効率的でない上に反応が平衡に達するまでに要する時間が長くなるためである。

しかしながら、例えば医療診断の分野では、手術中もしくは患者のベッドサイドなどのその場（POC: point-of-care）での診断、さらには一般家庭での予備的診断にも利用できるような迅速で簡便な分析法が待ち望まれている。そこで、筆者らはマイクロチップ技術を利用することにより、これらの問題点を克服した分析システムの開発を試みた^{10)~12)}。

通常、イムノアッセイでは反応はポリスチレン製容器の固相表面で行われるが、反応固相は一度しか使えないので、筆者らはガラス製のマイクロチップ中にポリスチレンビーズを導入してそこで反応を行い、分析終了後に充填したポリスチレンビーズのみを取り出し、チップは再利用する方法を考案し、図5に示すように中

央部にビーズのせき止め領域を持つガラスチップを作製した。チップはフォトリソグラフィとウェットエッチングを組み合わせた方法や、あるいは、レーザーアブレーションとドライエッチングを組み合わせた方法など、様々な方法で作製可能である。

このチップを用いて消化器系のがんの診断に用いられる代表的腫瘍マーカーであるがん胎児性抗原（CEA）を定量した例を示す。マイクロチャンネル中に、抗CEA抗体を吸着させたポリスチレンビーズを導入し、ここにCEAを含むヒト血清試料を導入して一定時間反応させた。反応後洗浄してから一次抗体、続いて金コロイドを結合した二次抗体の順でチャンネルに導入して反応させた。反応後PBSを送液する事により洗浄し、ポリスチレンビーズ表面に抗原抗体複合体を介して結合した金コロイドを熱レンズ顕微鏡により測定した。

その結果、従来反応の終結まで15時間かかっていた抗原抗体反応をマイクロチャンネル内で行うことにより10分程度、すなわち反応時間をおよそ90分の1にまで短縮できることが明らかとなった（図6）。システムのマイクロ化によって反応時間の大幅な短縮が達成された

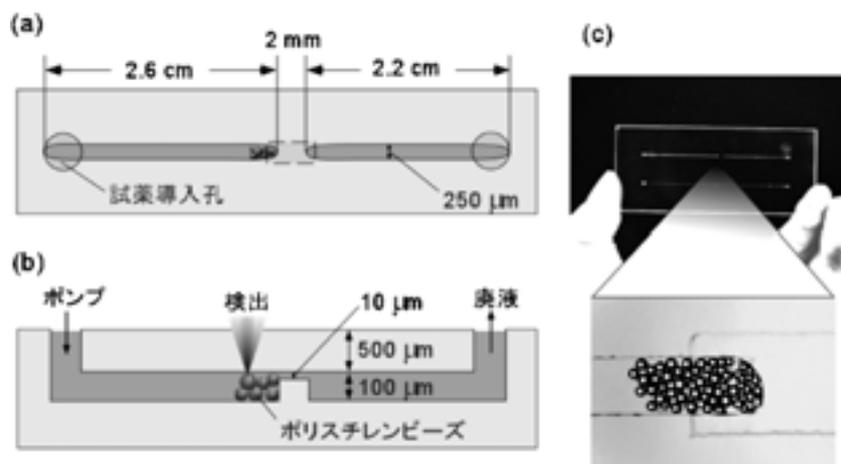


図5 イムノアッセイマイクロチップ
(a)上面図, (b)断面図, (c)全体写真およびビーズせき止め部顕微鏡写真

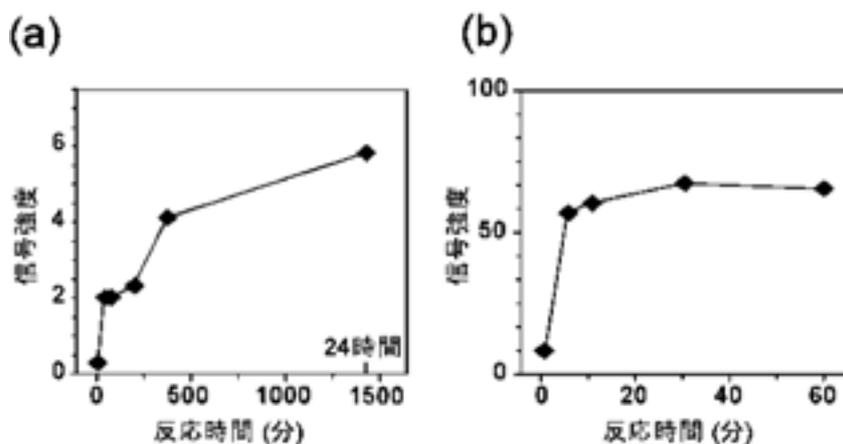


図6 反応の経時変化の比較
(a)従来法における経時変化, (b)マイクロチップ法における経時変化

が, その理由としては, 集積化によって反応する分子の拡散距離がおよそ 100 分の 1 程度まで短くなり, それによって拡散に要する時間が理論上最高 1 万分の 1 程度まで短縮したことがあげられる。さらに反応領域における比面積積すなわち体積あたりの反応固相の表面積が通常の系に比べて 40 倍程度大きくなっているために, 反応の場が多くなっていることも反応速度の向上に関与しているものと思われる。

このシステムを用いることにより血清中の CEA に対する良好な検量線が得られた。大腸がんの診断基準値 (カットオフ値) は通常 5 ng/ml に設定されており, 従来法の ELISA では検出限界は 1 ng/ml といわれているのに対し, 本システムでは 0.1 ng/ml 以下まで十分に検出可能であり, 従来法にかわる分析法として, 優れた性能を有していると結論できる。

このように免疫アッセイをマイクロチップに集積化することにより大幅な分析時間の短縮と高感度化を実現している。現在ではタンパク質だけではなく薬物やホルモンのような低分子まで測定することが可能となっており, 今後様々な応用が期待できる。さらに標識物質を酵素に代えた ELISA 法の採用, さらにスループットを向上させるためのマルチチャンネル化などに

より, 近い将来実用的なシステムへと発展していくことが期待できる。

5. 精密合成の例

マイクロ化学チップは, 微量分析だけでなく, 合成化学への展開も期待されている。チップ内のマイクロチャンネル空間は, 通常合成反応に用いられるフラスコのような反応容器と比べて, 次に上げる 2 点の物理的特徴が大きく異なる。

- 1) 比表面積と比界面積が大きいため, 分子拡散距離が短く, 拡散律速反応は劇的に高速化される。また, 固/液界面, 液/液界面が関わる物質移動や反応が効率化される。
- 2) 熱容量の小さな反応場であるために, 高速な温度の制御や反応熱の除去などが可能となる。

1)の特徴を活かした例として, 液/液界面相間移動反応や気/液/固 3 相間移動反応が開発されている。幅・深さがそれぞれ $250 \mu\text{m}$, $100 \mu\text{m}$ のマイクロチャンネルに, 油水 2 相をシリンジポンプによる圧力駆動で導入し安定界面を形成させると, この油水界面の体積に対する比 (比界面積) は約 80 cm^{-1} であり, 通常の反応

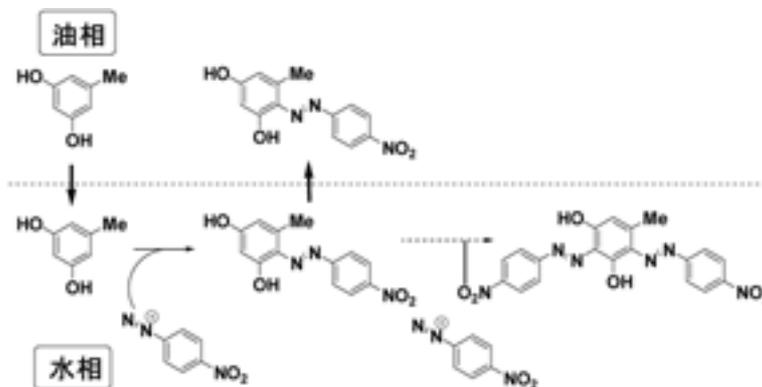


図7 相間移動ジアゾカップリング反応

容器で激しく攪拌を行って油水2層を懸濁したときよりも大きくなっている。従って相間移動を伴う反応には非常に有利な条件である。1例として液/液界面相間移動ジアゾカップリング反応の例を示す(図7)¹³⁾。この反応は油相のレゾルシノール誘導体が水相に分配され、ジアゾカップリング反応した後に主生成物が再び油相に抽出される反応系である。通常ガラス容器を用いた場合反応が完結するまで10分程度かかり、収率も最高80%であったのに対し、マイクロチャンネル内でこの反応を行うと、油/水界面の接触時間即ち反応時間がわずか2.3秒でしかないのにほぼ100%の収率で目的物が得られた。バルク系の収率低下の原因は目的物の過剰反応による副生成物の生成であったが、マイクロチャンネル内合成では大きい比界面積のため主生成物の効率的な合成と油相への抽出が実現でき、反応収率が向上したものと考えられる。微小空間の特徴を利用することで副生成物の少ない高収率な合成が可能であることを示した好例である。同様の傾向が、相間移動触媒を用いた炭素-炭素結合生成反応にも見られており¹⁴⁾、液/液界面間で物質移動を伴う化学反応に効果的であるといえる。

ごく最近、微小空間内での比界面積の向上を積極的に利用した例として、気/液/固3相間移動水素還元反応が開発された¹⁵⁾。マイクロ

チャンネルに気体と液体を導入し、気体流量を徐々に大きくしていくと、ガラス壁面への濡れ性の違いと圧力バランスの違いから、液体がチャンネルのガラス壁面を完全に覆うような形で流れ、気体はチャンネルの中央を流れるような液体のパイプが形成される。ガラス壁面に触媒を担持させておいた条件下であれば、数 μm の液膜を挟んで固体触媒と基質と気体分子が容易に接触できる環境になる。即ち触媒と基質の比界面積、気体と基質の比界面積の両方がバルクでの条件に比べ飛躍的に大きくなっている。高分子固定化マイクロカプセルパラジウム触媒をガラス壁面に担持し、気相として水素を流したところ、アルケンやアルキンの還元、ベンジル保護したアルコールの選択的脱保護やベンゾイルカルバメート保護したアミンの選択的脱保護などが2分の反応時間で定量的に進行することを報告している。

一方、2)の特徴を活かした例として、厳密な温度制御によるニトリル加水分解の高選択化が報告されている(図8)¹⁶⁾。ニトリルを加水分解するとアミドができ、さらに加水分解が進むとカルボン酸となることが知られており、シアノピリジン誘導体からピコリンアミド誘導体を合成する方法として、濃硫酸条件下での加水分解反応が用いられている、この反応は発熱反応のため反応の制御が難しく、過剰反応が容易

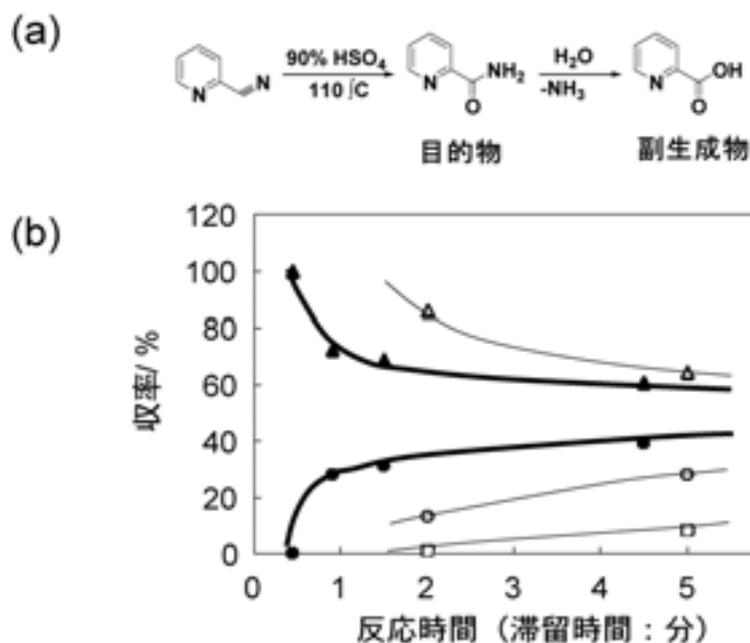


図8 (a)シアノピリジンの酸加水分解反応スキーム, (b)原料および目的物, 副生成物の経時変化: Δ (バルクスケールの原料), \blacktriangle (マイクロチャネル反応での原料), \bullet (マイクロチャネル反応での目的物), \circ (バルクスケールでの目的物), \square (バルクスケールでの副生成物)

に進行してしまう。マイクロチャネル内の溶液は、その体積に比べ外界と接する器壁面積が非常に大きく熱の交換効率が高いため正確な温度制御が行える。2-シアノピリジンと90%硫酸を110°Cの温度調整ステージに載せたマイクロチャネル上で混合し、加水分解反応を行った。比較のためバルクスケールでも同じ反応を110°Cで行った。反応もマイクロチャネルで行う方が速やかに進行する上、過剰反応体である副生成物は検出されなかった。一方、バルクスケールの反応では局所的な温度むらが生じるため、マイクロチャネル合成条件と同じ反応時間であっても過剰反応体である副生成物が検出された。副生成物の抑制は、相対的な目的物の収率向上ばかりでなく、分離・精製操作の手間を省くことにもつながるが、通常行われている反応と同じ条件をそのままマイクロチャネルに適用させるだけで大幅な改善が見られたことは注目に値する。

マイクロ化学合成は短い分子拡散距離、大きな比界面積、小さな熱容量といった微小空間の特性を活かし、正確かつ高速の制御を可能にする。これら、高効率マイクロ化学合成を実際の化学プラントとして稼働させるためには、複数のチャネルの並列稼働によるシステム構築が重要な基礎技術となるが、従来のガラスチップを作成する技術を応用することにより、多層構造を持った多品種少量生産コンビナトリアル合成用マイクロチップ¹⁷⁾や、一品種多量生産用パイプアップリアクター¹⁸⁾を既に実現しており、マイクロ化学プラントの実用運転も計画されている¹⁹⁾。

6. おわりに

ここで紹介した例に用いたマイクロ化学チップは、すべてガラス製(パイレックスや石英)である。筆者らは、耐薬品性、耐熱性、加工の

容易さなどからガラス製のマイクロ化学チップを積極的に使用している。最近では生化学分析など使い捨てが望ましい応用やチップ自身のコストという観点からプラスチック製のマイクロ化学チップを用いている研究者も多い。しかし、環境負荷低減に向けて様々な取り組みが試みられている中で、プラスチック製廃棄物が大量に出るというのは問題となる可能性もある。また、コストについてもプラスチックは金型を用いて大量に同一デザインのチップを作れば安くなるが、デザインの異なるチップを少～中量生産する場合はそれほど安くはならない。ガラス製チップの場合は、リサイクルして再利用することも可能なので、コスト的にはどちらが有利かどうかは検討する必要があるだろう。使用する試料や反応条件によって好適なチップ部材というのががあるので、一概に部材としてどれが良いということはいえないが、ガラスは幅広い応用に適応できる優れた部材といえる。

本稿ではマイクロ化学チップの超微量分析および精密合成への応用について紹介した。筆者らは、その他にも微小空間そのものを対象とした基礎科学研究も行っており、マイクロ化学チップは分析や合成だけでなく、物理化学や生物化学の研究ツールとしても非常に興味深い^{20),21)}。今後の更なる発展が期待される。

参考文献

- 1) “*Lab-on-Chip: Miniaturized Systems for (Bio) Chemical Analysis and Synthesis*”, R. E. Oosterbroek, A. van den Berg, Eds., Elsevier, Amsterdam, (2003).
- 2) M. Tokeshi, T. Minagawa, K. Uchiyama, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **74**, 1724 (2002).
- 3) M. Tokeshi, T. Minagawa, T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **72**, 1715 (2000).
- 4) 渡慶次学, 火原彰秀, 久本秀明, 北森武彦, *ぶんせき*, **257** (2002).
- 5) M. N. Slyadnev, Y. Tanaka, M. Tokeshi, T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **73**, 4037 (2001).
- 6) M. Tokeshi, K. Kanda, A. Hibara, T. Kitamori, “*Micro Total Analysis Systems 2002*”, Y. Baba, S. Shoji and A. van den Berg, Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (2002).
- 7) D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.*, **74**, 2623 (2002).
- 8) P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes, A. Manz, *Anal. Chem.*, **74**, 2637 (2002).
- 9) 渡慶次学, 馬渡和真, 火原彰秀, 北森武彦, *応用物理*, **73**, 741 (2004).
- 10) K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **72**, 1144 (2000).
- 11) K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **73**, 1213 (2001).
- 12) K. Sato, M. Yamanaka, H. Takahashi, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, *Electrophoresis*, **23**, 734 (2002).
- 13) a) H. Hisamoto, T. Saito, M. Tokeshi, A. Hibara, T. Kitamori, *Chem. Commun.*, 2662 (2001). b) A. Hibara, M. Tokeshi, K. Uchiyama, H. Hisamoto, T. Kitamori, *Anal. Sci.*, **17**, 89 (2001).
- 14) M. Ueno, H. Hisamoto, T. Kitamori, S. Kobayashi, *Chem. Commun.*, 936 (2003).
- 15) J. Kobayashi, Y. Mori, K. Okamoto, R. Akiyama, M. Ueno, T. Kitamori, S. Kobayashi, *Science*, **304**, 1305 (2004).
- 16) 太田裕幸, 菊谷善国, 久本秀明, 渡慶次学, 北森武彦, 日本化学会第 81 春季年会, (2002).
- 17) Y. Kikutani, T. Horiuchi, K. Uchiyama, H. Hisamoto, M. Tokeshi, T. Kitamori, *LabChip*, **2**, 188 (2002).
- 18) Y. Kikutani, A. Hibara, K. Uchiyama, H. Hisamoto, M. Tokeshi, T. Kitamori, *LabChip*, **2**, 193 (2002).
- 19) a) A. Kawai, T. Futami, H. Kiriya, K. Katayama, K. Nishizawa, “*Micro Total Analysis Systems 2002*”, Y. Baba, S. Shoji and A. van den Berg, Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 368 (2002). b) K. Nishizawa, M. Fukuda, *化学装置* **45**, 79 (2003).
- 20) A. Hibara, T. Saito, H.-B. Kim, M. Tokeshi, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori, *Anal. Chem.*, **74**, 6170 (2002).
- 21) Y. Tanaka, K. Sato, M. Yamato, T. Okano, T. Kitamori, *Anal. Sci.*, **20**, 411 (2004).