

フォーカス 26 <第 26 回> : 成果事例クローズアップ (中部地区ナノテク総合支援 : ナノ材料創製加工と先端機器分析)

## 単一分子検出マイクロ流路チップの開発

(株) ESPINEX 中野圭洋, 安池雅之  
豊田工業大学 梶原 建



(左から) (株) ESPINEX 中野圭洋, 安池雅之, 豊田工業大学 梶原 建

### 1. はじめに

近年, 分子生物学や微細加工技術の進歩に伴い, ナノバイオテクノロジーという新たな学問領域が生まれ活発に研究が行われており, その知見や技術は医療・環境分野等への応用が期待されている。また, 少子高齢化, 環境問題の深刻化等が要因となり, より高度な医療技術や環境保全技術の開発といった市場ニーズが急速に高まっている。しかしながら現段階では, それらの知見や技術といった技術シーズを事業化するには様々な困難や障壁があり, 市場ニーズを十分に満足させているとは言えない状況である。その原因の一つには, 優れた技術シーズを有し事業化に向けて製品開発やマーケティングを担うベンチャー企業が少ない事が挙げられ, それらベンチャー企業の増加が望まれている。そこで当社は, ナノバイオテクノロジー分野における豊富な研究実績を基にした技術シーズを事業化し, 画期的な応用製品やサービスにより顧客に新たな価値を提供する事を目的として研究開発を進めている (図 1)。

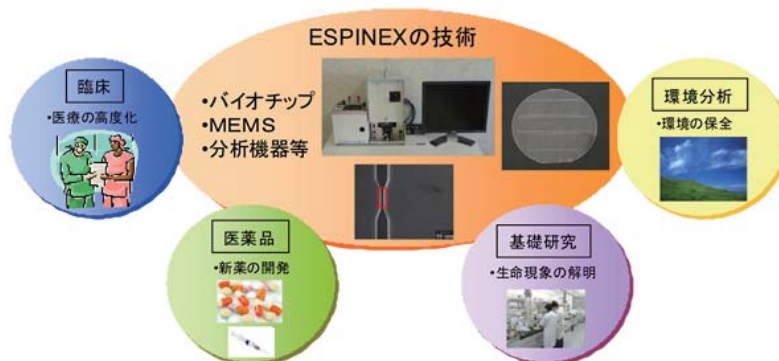
例えば, 図 2 に示したバイオチップと呼ばれる生化学分析用のデバイスの研究が近年盛んに行われており, バイオチップでは試料の送液や検体の検出のためにマイクロ流路とよばれる微小な流路系を加工したマイクロ流路

チップが主に用いられている。極微細な加工が要求されるマイクロ流路チップの製造には, フォトリソグラフィーやエッチングなどの半導体製造用の超微細加工技術の応用が不可欠であり, (株) ESPINEX は豊田工業大学のナノテク総合支援を受け, 石英ガラスなどバイオに適した素材へのマイクロ流路加工技術の確立, 流路の微細化, 加工精度や貼り合せ技術の向上に取り組んできた。ここではそのマイクロ流路チップの加工方法, マイクロ流路チップを使った応用製品である単一分子検出チップの検出原理及び結果, さらにマイクロ流路チップの他の応用例について紹介する。

### 2. 研究の背景

今回の研究で作成したマイクロ流路チップを含む単一分子検出システムは, 米国 MD アンダーソン癌センターの Hung 教授と Texas A&M 大学の亀岡准教授との共同研究 [1][2][3][4] で開発されており, 新規生命現象の解明につながる画期的な発明として, 図 3 に示す癌のメカニズムの解明や効果的な抗癌剤の創薬, あるいは抗がん剤のレジスタンスのメカニズムの解明などへの応用が期待されている。このシステムで使用されるマイクロ流路チップは最小流路幅数  $\mu\text{m}$  以下の高精度な流路形状が要求され, 原理上石英ガラスを用いる必要があるため, 半導体産業で用いられる単結晶シリコンより, 寸法精度, 微細化, 貼り合せ技術, および製造コストといった技術面での課題が多い。しかし, 図 4 のマイクロ流路の加工例に示されるように, 当社では石英ガラスを含む様々な素材及び形状のマイクロ流路加工技術の研究開発に注力してきた

\* 問い合わせ :  
中部地区ナノテク総合支援 : ナノ材料創製加工と先端機器分析  
豊田工業大学  
〒468-8511 愛知県名古屋市長久方 2-12-1  
電話 : 052-809-1725  
Email: nanonet\_office@toyota-ti.ac.jp



ナノバイオテクノロジーによる先端生化学・環境分析システムの開発

図1 ESPINEXの事業領域

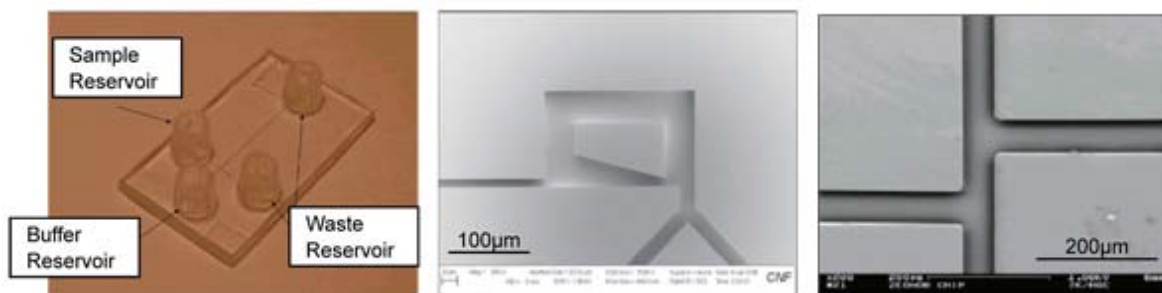


図2 (左から) (a) バイオチップ, (b) 試料混合チップ, (c) 電気泳動チップ

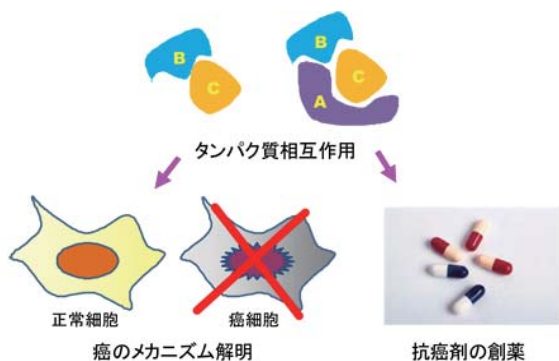


図3 単一分子検出システムの意義

加工方法	詳細
流路形成	溝加工, 深溝加工, 二段構造
穴加工	プラスト用マスク, 流路形成済みガラス, プランクのガラス
基板接合	流路・導入穴形成済みガラス

図4 ESPINEXのマイクロ流路加工技術例

こともあり、高い技術力を有しているため、流路の微細化、高精度なマイクロ流路の加工、及び安定した貼り合せ技術の確立を上記大学より依頼された。

### 3. 単一分子検出マイクロ流路チップの加工方法

図5はマイクロ流路の加工工程を示している。まず、溶融石英ガラス基盤上にポジティブ型レジストをスピコートし (b)、プリベイクした後、最小流路幅2µmの流路パターンが描画されたガラスマスクを用いてマスクアライナーで露光後に現像する (c)。その後、ドライエッチングで深さ0.5µmの流路を形成し (d)、アッシングによりレジストを除去する (e)。その後、サンドブラスト

加工によりマイクロ流路への導入口を加工し (f)、蓋材の石英ガラス板と熱溶着し (g)、1基板上に多数の流路を有するマイクロ流路デバイスを作製した (i)。図6はマイクロ流路中心部の走査電子顕微鏡 (SEM) 画像である。図6に示した様に最少流路幅2µm×流路深さ0.5µmの超微細加工が高精度で可能であることが実証された。

### 4. 単一分子検出システムの検出原理

単一分子の検出原理は、図7に示すように、試料中の量子ドットで修飾したタンパク質をマイクロ流路の検出部に流し、図8に示す光学系を用いて励起光を検出部にスポット状に導入し、そのスポットを通過したタンパク

質の反射光をアバランシェフォトダイオード (APD) により検出している。検出部は極めて微細に加工されており、励起光スポットも十分に小さい上、APDも十分な感度を有しているため、単一分子レベルの検出が可能となった。また、波長毎に複数のAPDを光学系に組み込むことで複数のタンパク質の相互作用も定量的に解析が可能となった。

## 5. 結果

製作されたマイクロ流路チップは、MD アンダーソン癌センターと Texas A&M 大学にて、チップを含むシステム全体の検証、タンパク質の相互作用の解析を目的とした実験に使用された。その結果、当システムの実用性が立証されると共に、これまで解析できなかった生体内部におけるタンパク質の結合比率が解明された。例えばEGFRタンパク質は、EGFからの刺激を受ける前後で

は40%ほどEGFRの結合比率が上がる事が確認された。これらのタンパク質の結合比の解明は、複雑な癌の発生メカニズムを理解する上で非常に重要であり、癌治療にむけた大きな前進といえる。

## 6. その他の応用例

石英ガラスの光学的特性は非常に優れており、それを用いたマイクロ流路チップは光学的検出装置による生体分子や化学物質の検出や分析に広く用いられている。この研究により開発された石英ガラスの微細加工技術は単一分子検出以外の応用にも幅広く適用が可能であり、例えば、図9に示した表面増強ラマン散乱分光法(SERS)チップによるタンパク質のコンフォメーション解析への応用が可能である。Texas A&M大学のCote教授と亀岡准教授はこの技術を使い、アミロイドベータタンパク質のコンフォメーションの変化を検出している [5][6][7]。









Side View	Fabrication Flow
(a)  ← fused silica wafer	4inch fused silica wafer
(b)  ← photoresist	Spin coat photoresist
(c) 	UV exposure and develop
(d) 	Dry etch to 500nm
(e) 	Remove photoresist
(f) 	Sand blasting inlet and outlet holes
(g)  ← Upside down fused silica wafer	Bond with another wafer
(h) 	Top View of fig(g)

図5 マイクロ流路製作工程 (a) - (h)

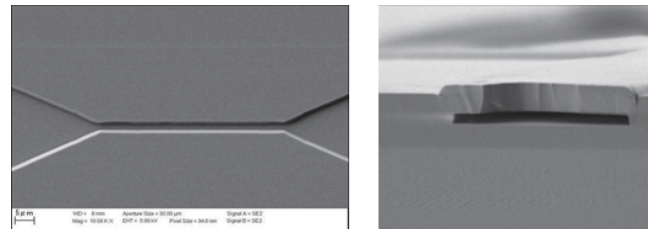


図6 マイクロ流路中心部 (幅2 $\mu$ m, 深さ0.5 $\mu$ m)のSEM画像

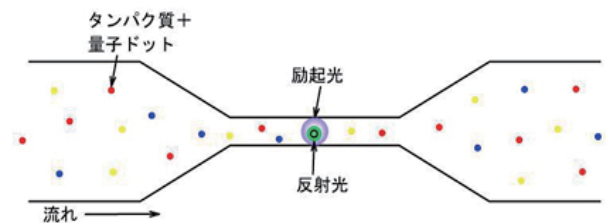


図7 単一分子検出システムの検出原理

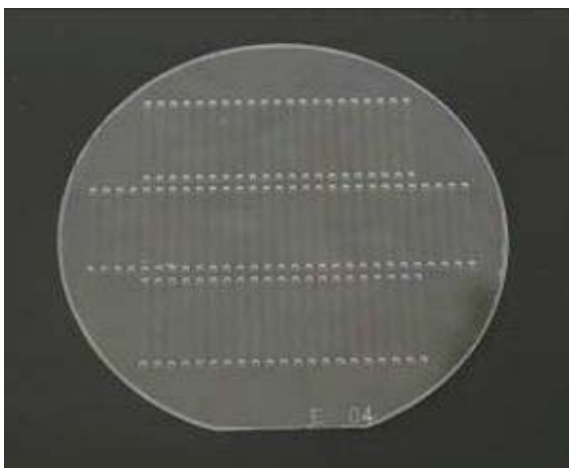


図5 マイクロ流路チップ (i)

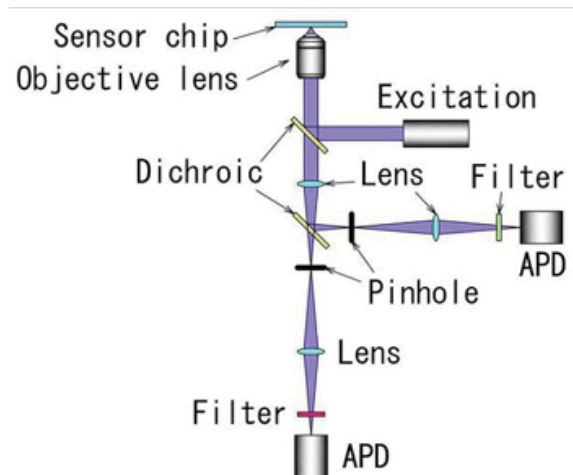


図8 単一分子検出システムの光学系概略図

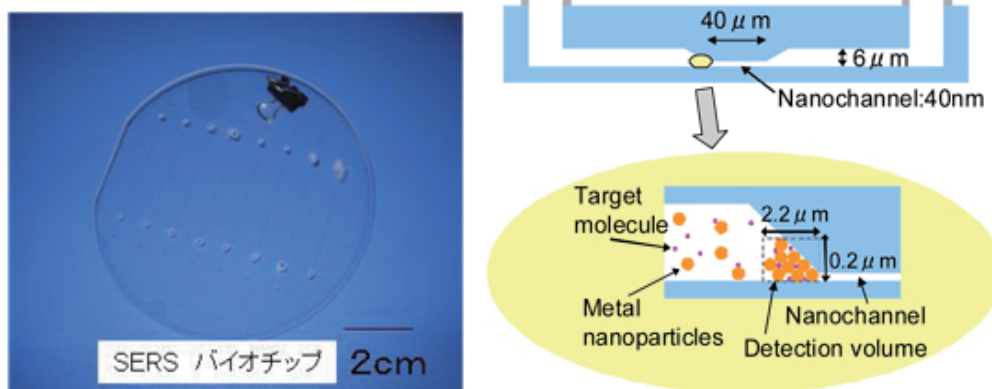


図9 SERSチップの概要

## 7. まとめ

この研究により、当初困難であった極微細なマイクロ流路、高度な寸法精度、安定した貼り合せが実現できたため、実験に使用するのに十分な品質のマイクロ流路チップの供給が可能となり、タンパク質研究の推進に大きな一歩となった。また、当加工技術はマイクロ流路チップのさらなる高精度、微細化につながり、上記の応用例のみならず、新規分析方法の開発や他の既存分析方法の高感度化に寄与するものと期待される。ただ、生化学分析用のデバイス材料としての石英ガラスは、他の有機材料より化学的安定性、高透過率、親水性、蛍光の自己発光が無い点で優れているが、高価格であるため、今後さらなる低価格化を図り、汎用性を高めるといった課題についても研究を進めていく。

## 謝辞

本報告にある単一分子検出マイクロ流路チップの開発は、文部科学省の「ナノテクノロジー・ネットワーク」委託事業の一環として豊田工業大学のご支援のもと行われました。また本成果はH21年度委託事業の5大成果の一つに選定されました。ここに関係各位に深く感謝の意

を表します。

## 参考文献

- [1] Nick Jing, Jun Kameoka, Journal of Photopolymer Science and Technology, 21, 531-536, (2008)
- [2] Nan Jing, Chin B. Su, Chao-Kai Chou Mien-Chie Hung and Jun Kameoka, SPIE, 71850W, (2009)
- [3] Chao-Kai Chou, Nan Jing, Hirohito Yamaguchi, Pei-Hsiang Tsou, Heng-Huan Lee, Chuu-Te Chen, Ying-Nai Wang, Sungmin Hong, Chin Su, Jun Kameoka and Mien-Chie Hung, Lab Chip, 10, 1793-1798 (2010)
- [4] Chao-kai Chou, Nick Jing\*, et al, Jun Kameoka, Analyst, 135, 2907-2912, (2010)
- [5] Miao Wang, Nan Jing, I-Hsien Chou, Gerard L Cote and Jun Kameoka, Lab Chip, 7, 630-632 (2007)
- [6] I.Hsien Chou, et al Jun Kameoka, Nano Letter, 5, 1729-1735, (2008)
- [7] Miao Wang\*, Nick Jing\*, et al, Jun Kameoka, Microfluidics and nanofluidics, 6, 411, (2009)

(豊田工業大学 梶原 建)