

新しい集積型バイオチップの開発と応用

バイオチップを用いた臨床診断の実用化への道を開く

射出形成法を用いてプラスチック（PMMA）製の10チャンネルの電気泳動バイオチップを作製することに成功した。X線リソグラフィ法を用いて鋳型を作る際に、各チャンネルの側壁に傾斜をつけることによって、鋳型からバイオチップを外すときにチャンネル構造を破壊しないですむようになり、効率よくバイオチップを作製することができるようになった。さらに、PMMAのフィルムでチップをカバーする新しい方法を開発した。この方法でカバーをすることによって、試作したバイオチップが実際に使用できるようになった。

Replica biochips for capillary array electrophoresis with 10 separation channels (50 μm width, 50 μm depth and 100 μm pitch) were successfully fabricated on a poly(methyl methacrylate) (PMMA) substrate using injection molding technique. The current fabrication method used moving mask deep X-ray lithography to fabricate an array of channels with inclined channel sidewalls. A slight inclination of channel sidewalls is highly required to ensure the release of replicated biochips from a mold. Moreover, the sealing of molded PMMA multichannel chips with a PMMA cover film was achieved using a novel bonding technique involving adhesive printing.

石川 満 Mitsuru Ishikawa

ishikawa-mitsuru@aist.go.jp

健康工学研究センター
生体ナノ計測研究チーム 研究チーム長

2002年5月より、企業から産総研に転職し、同年10月からは四国センターで「単一分子生体ナノ計測研究ラボ」の立ち上げに参画しました。2005年4月からは、ラボにおける研究・開発を発展させて、引き続き健康工学研究センターで光計測を主体として生体分子の分析化学をナノテク化する研究に従事しています。ここで紹介した研究は、当研究センターの目指す方向を端的に示した内容です。今後目指すべき方向は、光源および光検出器もバイオチップに合わせてコンパクト化して、現在まだ大型の光学定盤を占有している装置をノートパソコン程度のサイズにすることです。



研究内容

近年、バイオチップの研究の進歩は目覚ましい。しかし、チップの作製に要する高コストが実用化と普及を妨げていた。健康工学研究センター 生体ナノ計測研究チームの党福全 (Dang Fuquan) 研究員らは、京都大学大学院工学研究科・田畑修教授およびスターライト工業(株)と共同で低コストで作製できるプラスチック (PMMA) 製の10チャンネル電気泳動バイオチップを開発した(図1)。さらに、このバイオチッ

プを実際に使用するために必須で、効率よくチップをカバーする新しい技術を開発して、10種類の遺伝子を同時に迅速に解析することに成功した。わずか3 μL の血液試料から、16分(試料の調製時間13-14分、測定時間2-3分)という短時間でがん診断が可能であることを示した。

新しい技術開発の要点

新しい10チャンネルのプラスチック製バイオチップ技術の開発とその応用の

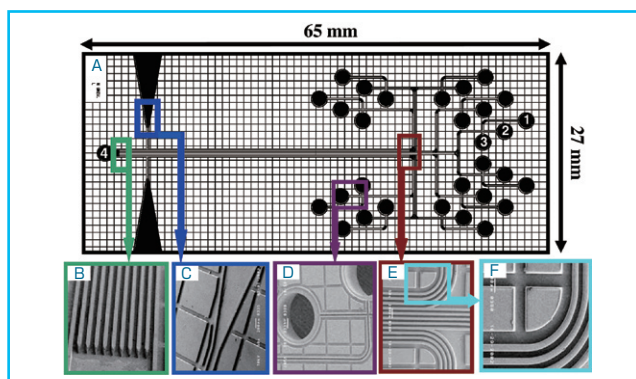


図1 プラスチック (PMMA) 製の10チャンネルバイオチップの構成

(A) 全体図、(B)～(E)はチップの各場所(矢印)の拡大図。(F)は(E)の一部の拡大図。幅50 nm、深さ50 μm のチャンネル10本が50 μm 間隔で並べられている(B参照)。3つの液だめ①～③を1組として使い、試料溶液、緩衝液、試料が壁面に吸着することを防ぐポリマー水溶液を入れる。測定を終えた試料は液だめ④に移動する。

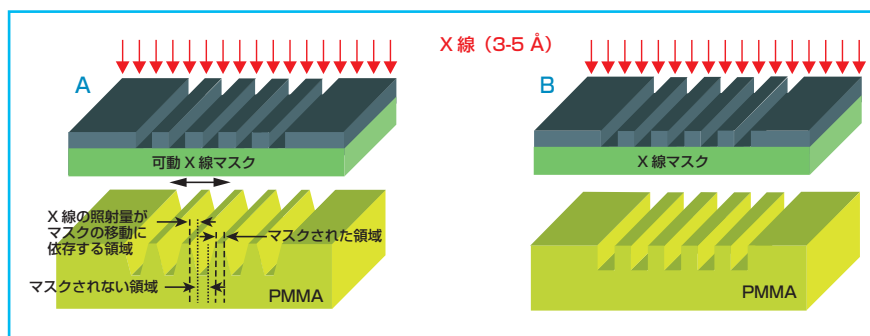


図2 (A) 移動マスク X線リソグラフィ

この方法では、マスクが左右に移動する。その結果、(i) 常に X 線が照射されている領域、(ii) X 線の照射量がマスクの移動に依存する領域 (iii) 常に X 線から遮蔽されている領域に分類される。領域 (ii) に傾斜ができる。(B) 通常の X 線リソグラフィ。

要点は以下の通りである。

(1) プラスチックチップの再現性の高い作製技術を確立した。移動マスク X 線リソグラフィ法 (図2A) を駆使して、マイクロチャンネル鑄型の壁面に傾斜 (80-85度) をもたせることにより、多数のマイクロチャンネルを同時に作製する技術を世界で初めて確立した。この方法によって、プラスチックチップ上に10本のチャンネルを同時に、射出形成法を用いて再現性よく (95%以上) 形成することができるようになった。従来法 (図2B) では、鑄型のマイクロチャンネル壁面が垂直のため、鑄型をプラスチック基板からはがすときに、チャンネルが損傷して使えなくなるという問題があった (使えるチップの割合は10%以下)。

(2) プラスチックチップにカバーをかぶせる新しい方法、すなわち印刷におけるインクのように、チップの表面に接着剤を薄くかつ均一に塗布する接着剤プリント法を開発した。従来法では、余分な接着剤がチャンネルをふさぐという問題があり、使えるチップを得ることがきわめて困難であった。接着剤プリント法を用いてはじめて10チャンネルのチップを効率よくカバーすることができた。その結果、1 mm の幅内に幅50 μm 、深さ50 μm のマイクロチャンネルを10本搭載したチップが実際に使用できるようになった。

(3) マイクロチャンネル中を移動する全てのDNAを同時に検出できるレーザー励起ビデオカメラ蛍光検出装置を開発し、この装置を用いて高感度で迅速にがん遺伝子を解析できることを実証した (図3)。

以上の成果は、バイオチップを遺伝子診断の方法として実用化するうえできわめて重要な技術である。今後、大学の医学部の協力を得て、臨床試験を積み重ね、3-5年後をメドに実用化する予定である。

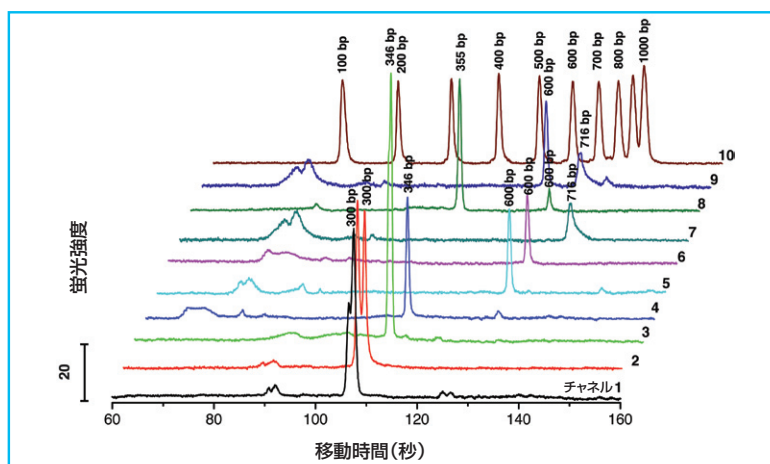


図3 新しく開発した10チャンネルバイオチップ技術を用いた肺がんの発症に関連する遺伝子 (SP-B) 解析の実例

野生型遺伝子は ~ 600 bpに、この遺伝子の挿入型変異は ~ 700 bp、欠失型変異は ~ 350 bpに信号が現れる。チャンネル1、2は、すべての試料に共通して含まれる、SP-Bとは別の遺伝子による信号である。この信号が現れたことは、すべての試料について、DNA試料の抽出とPCR増幅が正しく行われたこと示す。DNAのサイズを校正するための試料をチャンネル10に入れた。チャンネル3-9は7名の検査対象者から取り出した試料を入れた結果である。野生型がチャンネル5、6で検出された (健康者)。欠失型変異がチャンネル3、4で、挿入型変異がチャンネル7で、野生型と欠失型の混合型がチャンネル8で、野生型と挿入型の混合型がチャンネル9で検出された (肺がん患者)。

関連情報：

- 共同研究先：スターライト工業 (株) : <http://www.starlite.co.jp>
- プレス発表：日本経済新聞、「遺伝子解析、16分で診断」、2005年3月16日、他。
- F. Dang, S. Shinohara, O. Tabata, Y. Yamaoka, M. Kurokawa, Y. Shinohara, M. Ishikawa, Y. Baba: "Replica multichannel polymer chips with a network of sacrificial channels sealed by adhesive printing method" *Lab Chip*, 5, 472-478 (2005) .
- F. Dang, O. Tabata, M. Kurokawa, A. A. Ewis, L. Zhang, Y. Yamaoka, S. Shinohara, Y. Shinohara, M. Ishikawa, Y. Baba: "High-performance genetic analysis on microfabricated capillary array electrophoresis plastic chips fabricated by injection molding" *Anal. Chem.*, 77, 2140-2146 (2005) .