

## Bio-MEMS を利用したダイオキシン類の連続分析システム

○清水博弥 伊東哲 加藤明彦 澤崎毅

東亜ディーケーケー株式会社

概要：ダイオキシン類による環境汚染は深刻な問題であり、主な発生源である焼却炉排ガスの規制強化のため現場でのダイオキシン類分析のニーズが高まっている。そんな中でダイオキシンの毒性分析ができる生物学的分析法が開発され、近年注目を集めている。また、分析化学の分野ではマイクロ化技術(MEMS 技術)が急速に進歩し、すでに実用化されているものもある。そこで、我々はダイオキシン類の生物学的検出法(Bio)とマイクロ化技術(MEMS)を融合(Bio-MEMS)させることにより従来にはない迅速かつ安価な連続分析システムについて検討した。具体的な手法としては表面に反応試薬を固定化したマイクロビーズとMEMS 技術を利用したマイクロチップを用い、ダイオキシン類の連続分析システムについて検討した。その結果分析時間は市販キットの 1/10 以上に短縮され連続分析システムにも対応が可能となった。

キーワード：マイクロチップ、試薬固定化マイクロビーズ、Ah-イムノアッセイ法、連続分析システム、蛍光検出

### 1. はじめに

現在、ダイオキシンを発生させる恐れのある事業所に対して、ダイオキシン類特別措置法によるダイオキシン類の測定が義務付けられている。しかし、これまでの測定法ではダイオキシン測定用試料の前処理にかかる時間的コストや機器分析による経済的コストが大きいのしかかりダイオキシン発生を予測するための日常管理がおろそかになっていることは否めない。すなわちダイオキシンの機器による分析では約1億円と高価である高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計を用いることが必須であり、またマトリックス(夾雑物)を多く含む分析用試料からこれらの測定妨害物質を除去して測定サンプルを調整するためには多くの時間を要する。以上のような状況下でゴミ焼却施設からのダイオキシン類の発生を“その場で、高速で”モニタリングできる“低価格の”測定システムが要望されている。

そんな中でダイオキシン類の簡易分析法として、ダイオキシン類の毒性発現現象を利用したり、特定のダイオキシン類を測定したりする生物学的検出法が注目を集めている。生物学的検出法の特徴は安価・迅速であると同時に包括的にダイオキシン類を捉えることが出来る点にあり、画期的な方法であるといえる。

また、技術の先進性という観点からみると、現在MEMS(Micro Electro-Mechanical System)研究分野では分析計のマイクロ化( $\mu$ -TAS ; Micro Total Analytical System あるいは Lab-on-a-chip などと呼ばれる)の動きがタンパク質、遺伝子、生化学などの分析分野に波及し、研究が進められている。

そこでダイオキシン類の生物学的検出法とMEMS 技術を融合させ、社会のニーズにあった製品を開発すべく地域新生コンソーシアム研究開発事業「BioMEMS を利用した煙道中のダイオキシン測定システムの開発」が経済産業省プロジェクトとして認められ、平成13年7月に研究がスタートした。研究参加機関は広域多摩地域の中堅・中小企業と同地域の大学・研究所であり、タマティーエルオー株式会社が管理法人として総括を行っている。Table 1 に研究参加機関を示す。

東京都立大学	(株)環境管理センター
産業技術総合研究所 機械システム研究部門	東亜ディーケーケー(株) (株)エリオニクス
東京薬科大学	横河電機(株)
東京工業大学	(株)横河総合研究所
神奈川県産業技術総合研究所	(株)クボタ

Table 1 プロジェクト参加機関

## 2. ダイオキシン類の生物学的分析法

簡易的なダイオキシン類測定法として生物学的検出法が開発され、注目されている。これは大きく分類すると、ダイオキシン類の毒性発現メカニズムを利用したバイオアッセイと特定のダイオキシンの異性体を検出する免疫測定法がある。さらに現在開発されている手法は使用する DNA の種類や検量方法などによりいくつか分類される。Table 2 に生物学的検出法の比較を示す。

反応原理	種類	検量方法	技術名	開発元	日本での 取り扱い会社	
毒性原理に基づく検出法(Ah-レセプターを介する毒性反応)	レポーター・ジーン・アッセイ	マウス細胞	蛍光発光	Calux	Xenobiotic Detection System	(株)日吉分析センター
		ラット細胞	蛍光発光	DR・Calux	BioDetection Sysetem B.V	(株)カネカ・テクノ・リサーチ
		人間細胞	蛍光発光	EPA method 4425	Columbio Analservices	
	Ah レセプター・バインディングアッセイ	モルモット細胞由来	吸光度法	Ah-Immunoassay	Paracelsain	(株)クボタ
抗原抗体反応による特定物質の検出法	免疫測定法	吸光度法	High Perf Immunoassay	CAPE Technologies	関東科学(株)	
		吸光度法	RISC	SDI	和光純薬工業(株)	
		時間分解蛍光法	DELFLIA	Hybrizyme	富士薬品工業(株)	

Table 2 ダイオキシン類の生物学的検出法の比較

今回の MEMS 技術との融合という条件と実際の利用面において、試薬類の取り扱いが困難でない(細胞を使わないアッセイである)ことと、完成時の市場性から総合的な毒性検出が可能な検出方法が望ましい。さらにマイクロ化によって試薬量が微量になるため「検出感度が高いこと」などが条件になってくる。そこで、Ah-レセプター・バインディングアッセイまたはイムノアッセイが望ましいと考えられるが、特に総合的な毒性評価が可能である点を考慮し、Ah-レセプター・バインディングアッセイが最も望ましい。よって今回は、Ah-イムノアッセイ法(米国 Paracelsain・クボタ製)を対象として研究をすすめていくこととした。Ah-イムノアッセイは毒性分析であること、高感度であること、細胞を使わないアッセイであるなどの特徴にくわえて使用実績・論文が多い。

3. Bio-MEMS エlement(マイクロチップ)の作製と評価

Ah-イムノアッセイ法を連続分析へ応用する手法として、表面に反応試薬を固定化したマイクロビーズとMEMS技術を利用したマイクロチップを用いた間欠連続測定を検討した。すなわちMEMS技術で作製したマイクロチップ内にアビジンコートしたマイクロビーズを挿入し、試料、試薬などを流し、マイクロチップ内で試料-タンパク質の複合体形成を行い、検出をするものである。マイクロチップはSiウェハーにICPエッチングで深さ100 $\mu\text{m}$ のチャンネルを加工し、試料やマイクロビーズの出入り口用の穴加工を施したパイレックスガラスを陽極接合で貼り合わせて作製した。Fig. 1にマイクロチップ作製の概念図を示す。

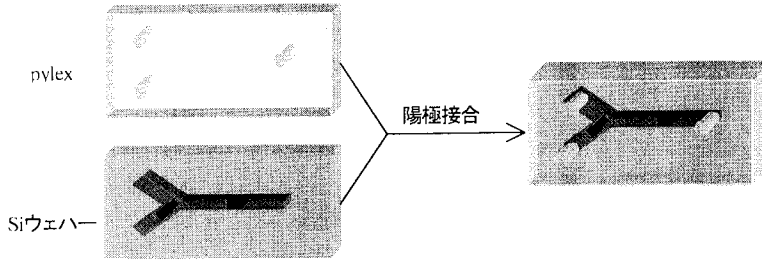


Fig. 1 マイクロチップ作製概念図

チップに挿入するマイクロビーズは表面に反応試薬であるアビジンを固定しており、過剰の試料・試薬を洗浄液で流さなければいけない。よってチャンネル内にはマイクロビーズのみを滞留させ、流体のみが流れるような工夫が必要である。そこでチャンネル内にマイクロビーズの粒子径よりも隙間の小さいスリッドを設けてマイクロビーズのみを堰き止め、液体を流出させるようにした。マイクロビーズの粒子径は $\phi 40\mu\text{m}$ であるためスリッド幅は $30\mu\text{m}$ とした。Fig. 2にマイクロチップの写真を示す。

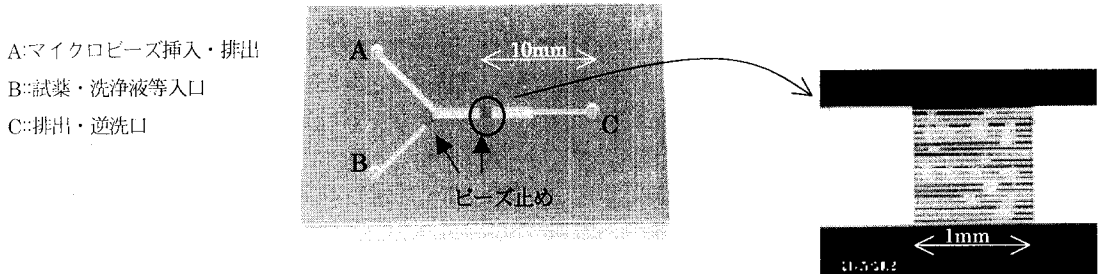
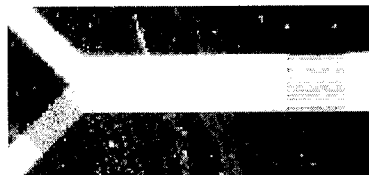


Fig. 2 マイクロチップ

チャンネルに $\phi 40\mu\text{m}$  ポリスチレンビーズを入れて図3のA部から注入したところマイクロビーズは検出槽内の堰で止まり、ここに純水を送液すると純水は堰を通り抜け出口(C部)から排出されることも確認された。マイクロチップに $\phi 40\mu\text{m}$ のマイクロビーズを挿入したときの写真をFig. 3に示す。



\* : マイクロビーズの排出はFig. 2のC部より逆洗にて行う。

Fig. 3 チャンネルへのマイクロビーズ注入

#### 4. 実験システムと結果

Ah-イムノアッセイキットでは検出部に ELISA プレートを用いているが連続分析システムへの適応のためマイクロチップにアビジン固定化マイクロビーズを挿入し、チップ内においてタンパク質と試料の複合体形成を行った。過剰の試料、試薬等は洗浄液でチップから排出した。検出方法には従来の吸光検出にかわり、イムノアッセイ法の第 2 抗体であるアルカリフォスファターゼで加水分解し蛍光発色をする色素(リン酸フルオレセイン:FDP)を用いて、蛍光励起レーザーをマイクロチップ表面に照射し検出する蛍光検出を行った。Fig. 4 に実験システムの概略図を示す。

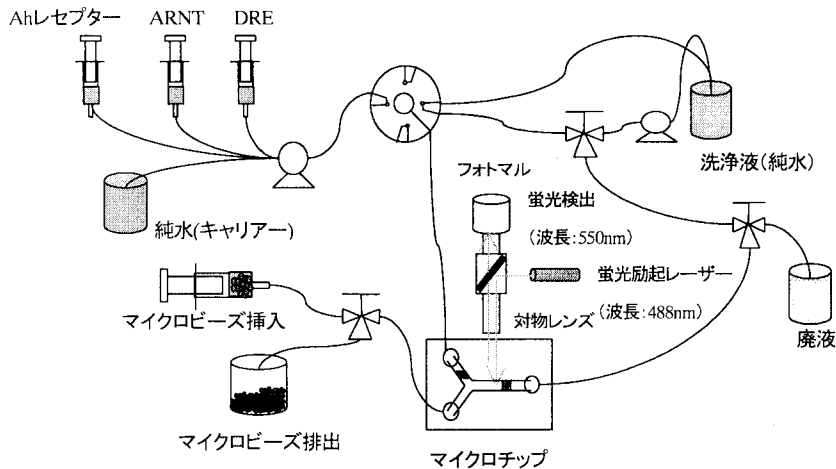


Fig. 4 実験用システムの概略図

システムの装置ブランクを確認後、ダイオキシン代替物質として Benzo(A)Pyrene を用いて Ah-イムノアッセイ法の手順に従って蛍光検出の確認を行った。一次抗体、二次抗体、蛍光試薬はポンプのインジェクターから  $20\mu\text{L}$  を注入し純水をキャリアーとして  $50\mu\text{L}/\text{min}$  で送液した。アビジン固定化マイクロビーズはマイクロシリンジを用いてマイクロチップに挿入させ、測定終了の後、逆洗によって排出させた。

Ah-イムノアッセイ法の市販キットでのインキュベート時間は1~2時間であるが、マイクロ化による拡散・反応速度の促進効果により、数分のインキュベートで検出が確認された。また、試薬量についても従来の1/10程度に削減できた。

今後は具体的なマイクロ効果の確認や検出感度の向上を検討し、ダイオキシン類モニタリングシステムとしての実用化を目指していく予定である。

#### 参考文献

- 1) 地域新生コンソーシアム研究開発「BioMEMS を利用した煙道中のダイオキシン測定システムの開発」初年度成果報告書