

研究解説

マイクロ生化学システムの開発と深海微生物探査への応用

Development of a Microbiochemical System and Its Application to Deep Sea Biological Exploration

藤井輝夫*

Teruo FUJII

1. はじめに

生化学実験や分析に用いるチューブ(試験管)をどんどん小さくしていくとどのようなことがおこるだろうか。マイクロファブ리케이션を利用して、微小な構造をもつマイクロチップを作り、そこで生化学反応や分析を行うと、微小化に伴う様々な効果があらわれ、処理の高速化、高精度化が期待できる。海中工学研究センター藤井研究室では、そのようなシステムを「マイクロ生化学システム」と呼び、海中を含む幅広い応用分野を想定した基盤技術の開発を進めている。本稿では、マイクロ生化学システムの基本概念とこれを支える製作技術および具体例を紹介するとともに、海中分野における応用の見通しについて述べる。

2. マイクロ生化学システム

生化学実験にかかわる反応や分析プロセスをマイクロチップ上に集積したマイクロ生化学システム概念図を図1に示す。同一のマイクロチップ上に、反応に必要な試薬のリザーバ、リアクター、ヒーターデバイス、分離チャンネルなどが集積化され、反応から分析にいたる一連の操作が自動的に行われることを想定したものである。チップはマイクロファブ리케이션によって製作するので、比較的容易にチップを並列化したり、大量生産化することも可能である。マイクロ生化学システムは、以下に挙げるように数多くのメリットを有する。

- 1) サンプル、試薬および廃液が微量ですむ。
- 2) 高速、高精度、高効率の処理を行うことができる。
- 3) 処理の自動化、並列化、低コスト化が容易である。
- 4) システムの小型軽量化が可能である。

これらのうち、2)については、スケールを小さくすることによる表面積/体積比の増大ならびに分子拡散効果の相対的増大などによるもので、その他については、システム概念およびその製作技術によるところが大きい。たとえ

*東京大学生産技術研究所 海中工学研究センター

ば医療分野への応用を考えると、サンプル量が微量でよい。ため、検査を低侵襲化できると同時に、多量の検体について高速に処理を行うことが可能になる。特に遺伝子レベルの診断においては、ヒトゲノム計画によって近い将来、遺伝情報に基づく医療が現実化する時代を控え、高速に多数のサンプルを分析処理する技術の開発は必要不可欠である。こうした観点から、マイクロスケールで分析を行う技術は、近年国際的にも大きな注目を集めており、例えば μ TAS (Micro Total Analysis Systems)¹⁾やHPCE (Microscale Separations and Analysis)²⁾などの国際会議は、年々規模を拡大している。

一方、マイクロ生化学システムと同じ技術の応用として、化学合成分野においても、微小空間の特性を積極的に活かしたマイクロリアクターが、新しい化学プロセスの形態として注目されている³⁾。マイクロリアクターの場合、微小空間効果による混合効率の増大だけでなく、従来のプロセスに比べて温度の制御などを正確かつ一様に行うことがで

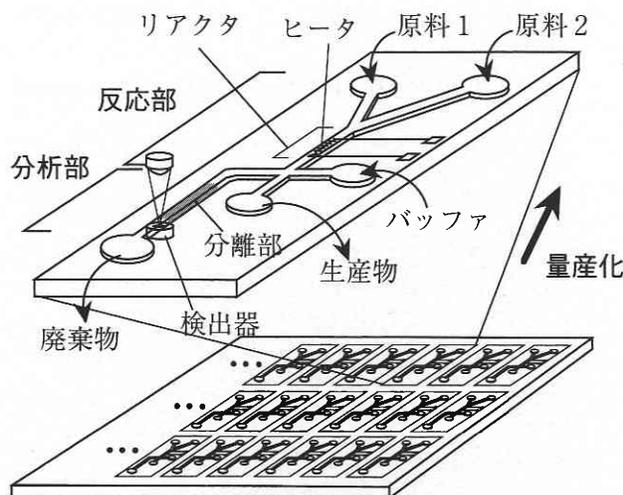


図1 マイクロ生化学システム概念図

きるため、年間の生産スケールがもともと小さく付加価値の高いファインケミカルなどの分野で、高収率のプロセスとして期待されている。

3. ソフトリソグラフィ

マイクロ生化学システムを製作する基盤技術として、藤井研究室では、ソフトリソグラフィと呼ばれるシリコンゴムを材料としたマイクロファブリケーションの研究を進めている。分析用マイクロチップの材料としては、ガラスが最も広く使用されている⁴⁾。これは、例えばチップ上でのキャピラリー電気泳動分析を行う場合に、レーザー等を用いた光による検出を行うことが多いため、特に紫外光領域の吸収を利用する場合には、石英ガラスが用いられる⁵⁾。しかし、ガラスチップ上にマイクロスケールの構造（マイクロチャンネルなど）を形成する場合、フッ酸等によるウェットエッチングを行わなければならない上に、構造を流路としてシールするためには、溶融接合などの高温を用いるボンディングプロセスが必要となる。これに対して、ソフトリソグラフィでは、シリコンゴムを材料に用いるため、モールドイングによって簡単にチップを製作することが可能で、接合についても、内圧を加えない場合には、フラットな基板にはりつけるだけで使用することができる。

図2に単層ソフトリソグラフィによるマイクロチップのファブリケーションプロセスを示す。モールドイングを行うための鋳型として、ここではシリコンウェハ上にフォトレジストをパターニングしたものを使用する。まず、シリコンウェハ上にフォトレジストをスピコートし、これを

パターニングする。マイクロチャンネルなどで深さを必要とする場合には、フォトレジストの層を厚くする必要があるので、超厚膜レジストのSU-8などがよく用いられる。これにより、シリコンウェハ上には、実際に作りたい構造の凸型の構造を形成する。この鋳型に対して、未重合のシリコンゴムと重合開始剤を混合したものを流し込み、これに熱を加えて硬化させる。光で検出を行う際に重要となる光学的な性質や生体に対する影響が小さいことなどから、藤井研究室では、比較的単純な構造のシリコンゴムであるPDMS (polydimethylsiloxane) を用いている。なお、シリコンゴムを流し込む前に、モールドリリースを容易にする目的で、鋳型に対して、 CHF_3 などのフルオロカーボンによるプラズマ処理を行っている⁶⁾。最後に、硬化したシリコンゴム製マイクロチップを鋳型から引き剥がし、ガラス基板などのフラットな表面にはりつける。シリコンゴムはフラットな表面に対して自己接着性があるため、さほど大きな内圧を必要としない使用目的の場合には、これで十分である。この場合、目的に応じてチップを引き剥がして洗浄したり、再使用したりすることも可能である。さらにガラス基板などに強く接着したい場合には、あらかじめシリコンゴムの接着面を O_2 プラズマで処理した上で、基板にはりつけることにより、半永久的な接合も可能である⁷⁾。

以上のように、ソフトリソグラフィを用いると、フォトレジストのパターニングを行うだけで、マイクロ構造を持つシリコンゴムチップを製作することができる^{8, 9)}。単層のものの場合には、平面的な構造しか実現できないが、最近では、これを多層化して3次元的な構造をつくることも試みられている^{10, 11)}。次節以降では、この方法を用いて製作したマイクロ生化学システムの構成要素となる具体的なマイクロチップを紹介する。

4. マイクロリアクター

マイクロ生化学システムを構成する一つのコンポーネントとして、藤井研究室では、生体外タンパク質合成用のマイクロリアクターの開発を進めている¹²⁻¹⁵⁾。生体外タンパク質合成とは、我々の体の細胞の中でタンパク質が作られているのと同様の反応を生体外で行うもので、DNA上の遺伝情報をRNAに転写したものに基づいて、タンパク質を合成するという転写、翻訳の一連の反応をマイクロリアクター内で行うことを試みている。近年、ヒトの遺伝情報をすべて解読することを目的とした国際的なプロジェクトとしてヒトゲノム計画が進行中で、近々には全遺伝情報のドラフトが発表される見通しである。しかしながら、ヒトのDNA上のATGC 4種類の塩基配列が解読されたとしても、具体的にその配列がどのような意味を持っているのか、あるいはどのような種類のタンパク質をコードしているの

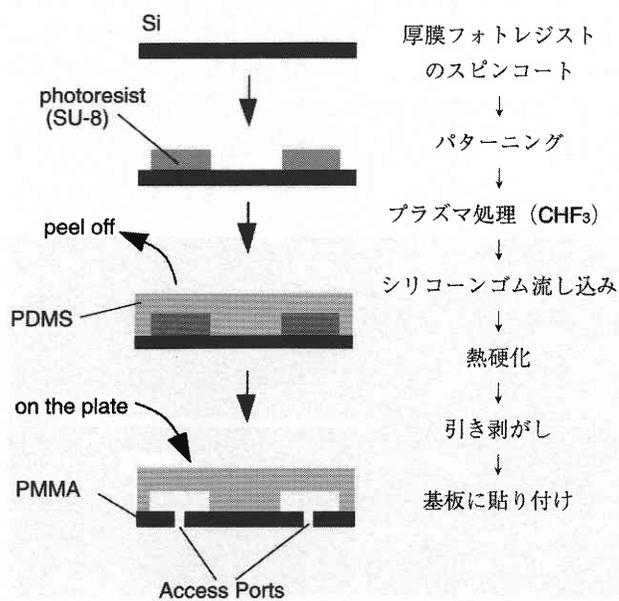


図2 単層ソフトリソグラフィのプロセス

かといったことを明らかにする作業が残されている。遺伝子からタンパク質を発現させて、その性質を調べる際には、その遺伝子を大腸菌などの菌体に組み込んで、タンパク質を作らせるという方法が一般的である。しかしながら、この方法では、菌体の生育条件を細かく制御することが困難であると同時に、元来生体に対して毒性を持つようなタンパク質を大量発現させることができない。これに対して、マイクロリアクターのような人工の入れ物の中でタンパク質を発現させることが可能となれば、反応条件を制御しながら、毒性のあるタンパク質すらも合成できる可能性がある。

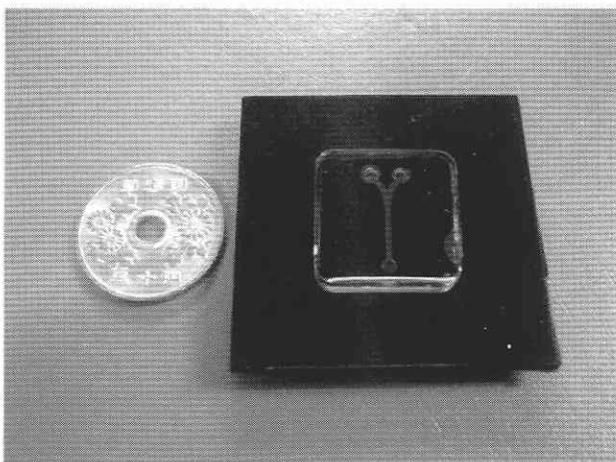
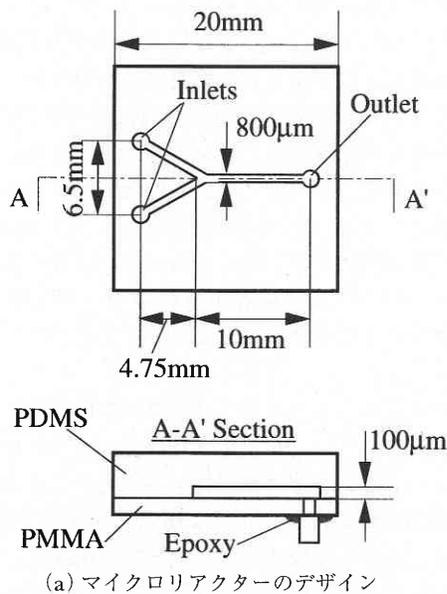
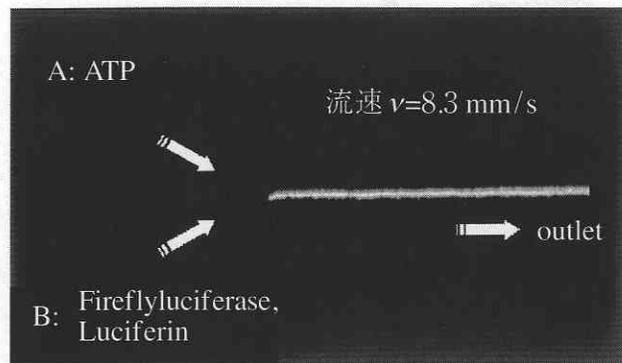


図3 典型的なマイクロリアクターの構造

すなわち、生体外タンパク質合成用マイクロリアクターはポストゲノムシーケンシング時代のタンパク質の人工的な発現系として、重要な意味を持つ。

図3(a)にY字型の溝を持つ2液による反応を行うための典型的なマイクロリアクターの構造を示す。前節に述べたソフトリソグラフィの方法でPDMSチップ上に幅800µm、深さ100µmのチャンネル構造を形成し、これをアクリル板の上に貼り付けてシールした構造となっている。アクリル板にはあらかじめ溶液を注入するためのポートを設けておく。図3(b)が完成写真で、この場合には発光反応の観察を行うための黒いアクリル板を使用している。このような典型的なデザインのリアクターは、微小管路内での液体の挙動や生化学反応の可能性を検討する際に有用である。先に述べたいわゆる微小空間効果¹⁶⁾の確認を行う目的で、実際にホタルの発光反応を行った際の観察結果を図4に示す。Inletの一方からホタルの発光酵素であるLuciferaseと発光素のLuciferinを含む溶液を、もう一方からATP(アデノシン三リン酸)を含む溶液を注入すると、Luciferaseの2基質反応により発光が観察できる。チャンネルの幅や深さなどが、それぞれ異なるリアクターを使うなどして、マイクロチャンネル内における流体の挙動や混合の状態などの検討を進めている^{17,18)}。

マイクロリアクター内における微小空間効果の観察だけでなく、生体外タンパク質合成や遺伝子増幅反応(PCR: Polymerase Chain Reaction)などの生化学的に有用な反応を行うためには、リアクター内の温度制御を正確に行う必要がある。リアクターを専ら反応を行う容器として考える場合には、ペルチェ素子などのデバイスを外部に付加して、間接的に温度制御を行うが⁴⁾、この方法は、リアクター内部の温度を局所的に制御するには適していない。これまでに発表されたPCRのためのマイクロリアクターでは、マイクロファブリケーションの特色を生かして、リアクター直下にヒータ構造を作り込み、局所的な加熱を可能としている^{19,20)}。これに対して藤井研究室では、PDMSチップ



をシールするガラス基板上にヒータおよび温度センサとなる電極構造を形成することにより、局所的な加熱を可能としたハイブリッド構造を提案している (図 5 参照)¹⁵⁾。この構造は、ガラス基板上に 2 層の ITO (Indium Tin Oxide)

を材料とする透明電極を形成することにより、加熱ならびに ITO の温度に依存する抵抗変化に基づく温度計測を同時に行うもので、生体試料の透過光による観察が可能である。また、PDMS チップ部分は使用することにより引き剥がして交換し、比較的ファブリケーションに手間のかかるガラス基板部分については、洗浄して繰り返し使用することができるため、クロスコンタミネーションの可能性が低く、かつコスト的にも有利な構造となっている。実際に、このマイクロリアクターを用いて、クラゲの蛍光タンパクである GFP (Green Fluorescent Protein) の遺伝子 (GFPuv Gene

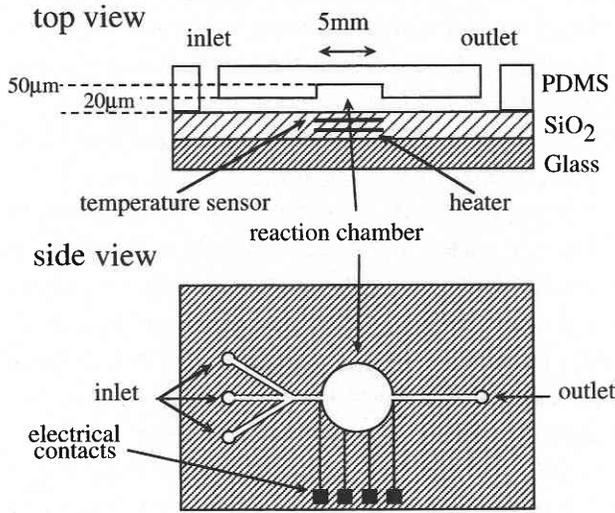
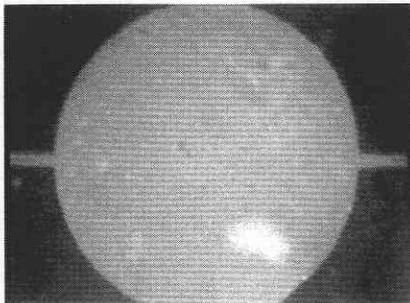
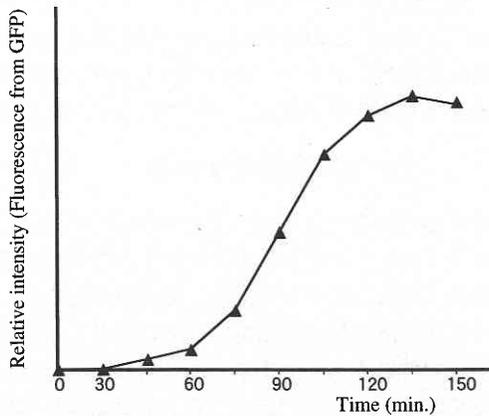
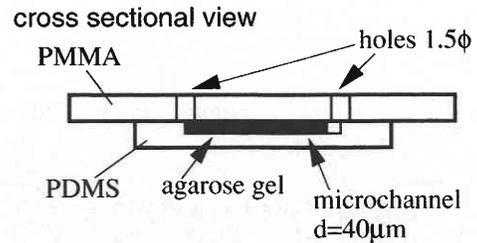
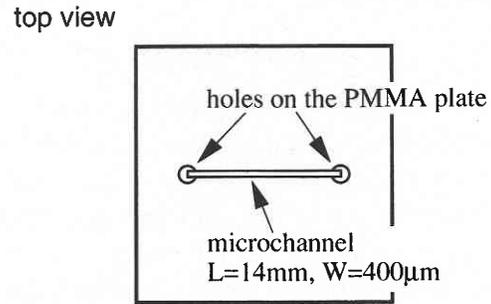


図 5 PDMS - ガラスのハイブリッド構造

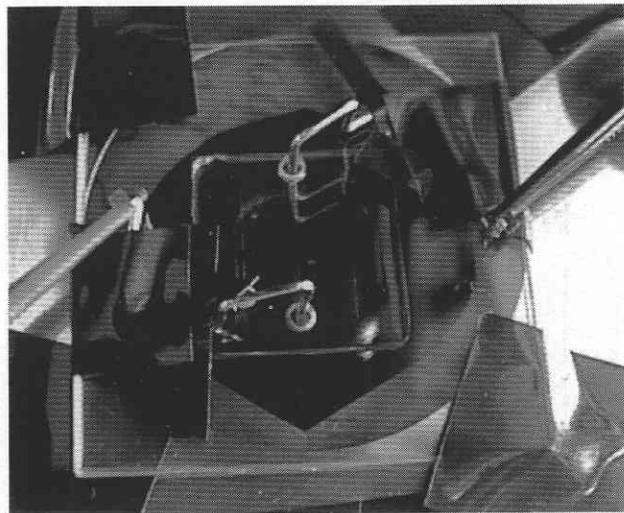


After 2 hours

図 6 ハイブリッドマイクロリアクターにおける GFP の合成



(a) 電気泳動チップのデザイン



(b) 電気泳動チップのセットアップ写真

図 7 キャピラリ電気泳動用マイクロチップ

に基づくタンパク質の合成を試み、図6に示すように、その蛍光を観察することに成功している¹⁵⁾。現在までのところ、こうしたマイクロリアクターは、外部から溶液を導入することによって、反応そのものを微小な空間で行うことそのものが重視されているが、近い将来には、これらのリアクターを並列化して、例えば複数の変異遺伝子の翻訳反応を同時に多数処理するなどといった応用が想定されている。そのためにはマイクロリアクター自体をアレイ化する技術はもちろん、多種類の溶液をリアクター内に導入するための外部とのインタフェースや送液を行うシステムなど、リアクターの周辺機器の自動化、並列化を含めた技術的な検討が求められる。

5. キャピラリ電気泳動チップ

一般に、反応産物を具体的に同定するためには、電気泳動などの方法によって反応溶液から、反応産物を分離し、分子サイズを特定しなければならない。しかしながら、マイクロ生化学システムでは、取り扱う溶液の体積がnL(ナノリッター)からpL(ピコリッター)のスケールであるため、例えばマイクロリアクターにおける反応産物を人間がピペットなどでハンドリングして電気泳動操作を行う

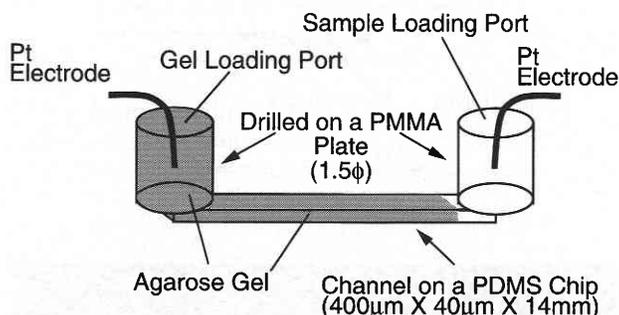


図8 マイクロチップにおける電気泳動のセットアップ

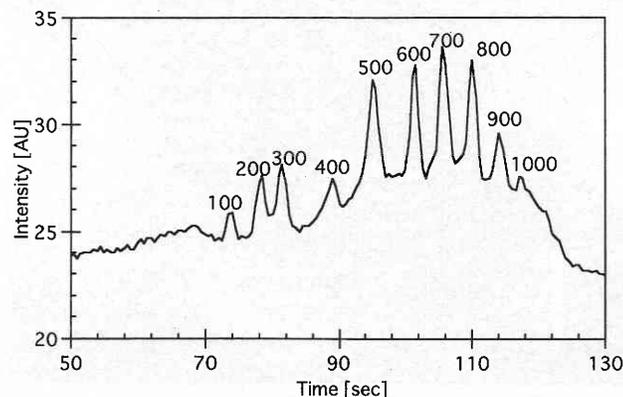


図9 マイクロチップにおける電気泳動の結果
(2.0% agarose in 1×TBE, 1100 bp DNA ruler, 71.4 V/cm)

ことは、ほぼ不可能である。そのため、藤井研究室では電気泳動の操作自体もこれまで述べてきたPDMS製のマイクロチップ上で行うことを試みている^{21,22)}。

図7にキャピラリ電気泳動用のPDMSマイクロチップの構造とその写真を示す。チップ上に、前述のソフトリソグラフィによって幅400μm、深さ40μm、長さ14mmのI字型のチャンネルを形成し、このチップをアクリル板に貼り付けた構造を用いる。アクリル板には1.5φの穴を2カ所あけ、これをサンプルローディングおよびゲルローディングのポートとして用いる。チャンネル内に分離用のマトリクスとなるアガロースゲルを充填する。その際、サンプルプラグを形成するために、図8に示すようにチャンネルの片側については、末端までゲルをロードせずに空隙を残す。アクリル板上のポート内に白金電極を差し込むことにより、チャンネル内に電場を発生して、電気泳動を行う。図9にFITC (Fluorescein Isothiocyanate) でラベルされた100 bp DNA rulerを分離した結果を示す。この場合、100 bpから1 kbpまで、100 bpおきに長さの異なるフラグメントが含まれるが、それらがそれぞれピークとなって検出されている。この種の電気泳動を通常のスラブゲルで行う場合には数十分の時間を要するが、マイクロチップで行う場合には、わずか2分程度で分離を行うことができる。

前述の通り、チップ上で電気泳動分離を行うメリットの一つは、反応後の産物を直ちに分離し、その同定を行うことである。現在は、この電気泳動チップを発展させて、遺伝子増幅反応のリアクターを同一のチップ上に配置した集積化チップを開発中である。

6. 微量液体操作

これまで述べてきたようにマイクロ生化学システムは、マイクロリアクターや電気泳動チップなど複数の処理パートから構成されるシステムであり、処理対象となる、ごく微量のサンプル溶液や試薬類を、必要に応じて特定の処理パートから次の処理パートまで運ぶための、液体操作技術は重要な基盤技術の一つである。ここでは筆者らの研究グループで開発を進めている液滴ハンドリングを基本とした微量液体操作法を紹介する。

マイクロリアクターやマイクロチップ上での電気泳動などにおける液体操作方法は、連続流動式のものが多い。連続流動式とは、リアクター内やチップ上のチャンネル内をすべて液体で満たし、外部から液を連続的に送り込むもので、液体は静水圧や電気浸透流などによって駆動される。例えば前述のマイクロリアクターでは、この連続流動式の方法で反応溶液をリアクターに送り込んでいる。この方式では、一般に、

- ・動作流体そのものがサンプルや試薬の溶液となるためデッドボリュームが大きい。

- ・連続条件のために、特定の場所に溶液を自由に滞留させることができない。
- ・気泡などが発生すると流れの障害になるだけでなく、取り除くのが困難である。

などのデメリットを考慮する必要がある。これに対して、図 10 に示すように、流路内に空気で区切られた液体プラグ（液滴）を形成し、これを空気圧で駆動して移動させることにより、流路内のある場所からある場所へ必要な溶液を運ぶことが可能となる。図では流路内の末端に液滴を運ぶ操作（Positioning）、2つの液滴を合体させる操作（Mixing）の2通りの例を示している。この場合、図中にもあるように流路内の空気を外部に抜くためのベントを設けることが重要な課題となるが、先にも述べた PDMS の表面が疎水性であることを利用すると空気抜きベントをマイクロ構造で実現することができる。例えば図 11 に示すように流路の末端に、流路構造に対して極端に断面積の小さいキャピラリ構造を設ければ（図中では $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ ）、PDMS の表面の疎水性により、いわゆる毛細管現象の逆の効果を得ることが可能で、ある程度の圧力まで（このデザインの場合には、おおよそ $30\ \text{kPa}$ ）液体の浸入をブロックすることができる。これに対して、空気はキャピラリ内を自由に通り抜けられるため、このキャピラリ構造を空気抜きベントとして用いることができる。この構造を HMCV（Hydrophobic Microcapillary Vent）と呼ぶ²³⁾。HMCV の製作プロセスを図 12 に示す。先に紹介した単層ソフトリソグラフィのプロセスでは、鋳型構造を作るのにフォトリソグリストを使用した。HMCV の構造はかなり微細であるため、HMCV 部分についてはシリコンウェハを RIE（Reactive Ion Etching：反応性イオンエッチング）と呼ばれるドライエッチング法によって加工し(a)、残りの流路部分の構造にのみフォトリソグリストを用いている(b)。

HMCV を応用して、複数の液滴を流路内で形成し、それらを互いに合体させる操作を行った実験例を図 13 に示す²⁴⁾。1本の液体流路（Liquid Channel）と4つの圧力ポート（P1～P4）がHMCVによって接続されており、この4つの圧力ポート内の圧力を制御することにより、流路内の液体を操作する構造となっている。まず、圧力ポートP1を減圧することにより、1つ目の溶液を流路内に導入する（図 13 B）。その後P2を加圧することによって、溶液を切り取り、液滴を形成する（図 13 C）。この液滴の容積は、流路および圧力ポートの配置によって予め定めることが可能である。この例の場合には約 $600\ \text{pL}$ の液滴が形成されている。次に圧力ポートP3を減圧して、2番目の溶液を流路内のP3の位置まで導入する（図 13 D）。1つめの液滴と同様にP4から空気を送り込んで、溶液を切り取り、2番目の液滴を形成する（図 13 E）。さらにP2を減圧して液滴間の空気を抜き取ることによって、2つの液滴を合体させる（図 13 F）。合体した液滴は、拡散によって徐々に混合していくが、全体が十分に混合されるのには、かなりの時間（この場合数分）かかる。混合を促進したい場合には、合体した液滴を流路内で行き来させること

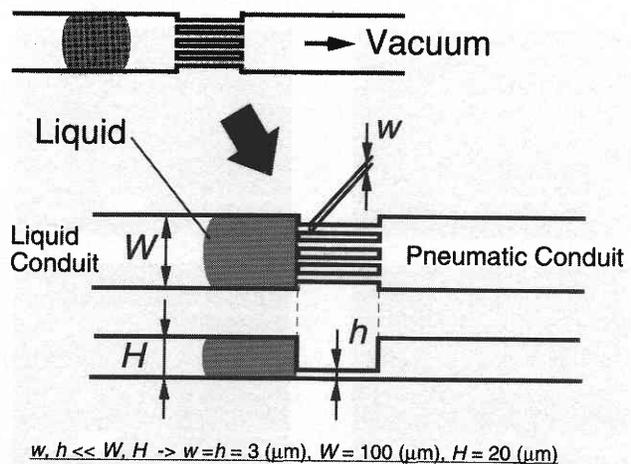


図 11 HMCV の原理

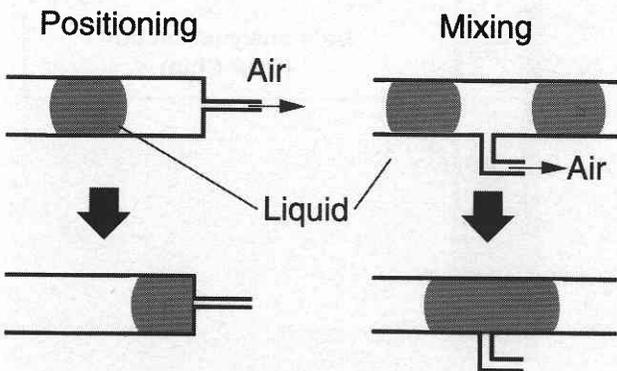


図 10 液滴による微量液体操作

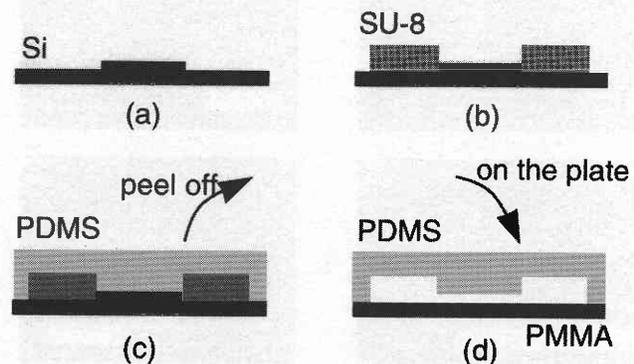


図 12 HMCV の製作プロセス

によって、液滴内部に流れを発生させれば、素早く混合することが可能である(図13G)。以上のように、HMCVを用いるとpL(ピコリットル)オーダーの微量な液体について、決まった体積の液滴を複数形成し、それらを合体、混合できることを確認している。すなわち、この方法を用いると、微量液体同士の反応や微量サンプルの試薬による処理などをマイクロチップ上で行うことが可能となる。

7. 海中での応用へ

前節までに述べたように、マイクロ生化学システムのコンポーネントとして、

- 1) 生化学反応を行うマイクロリアクター
- 2) 反応産物を分離検出する電気泳動用マイクロチップ
- 3) コンポーネント間をつなぐ微量液体操作方式

などの基盤的技術ができあがりつつある。冒頭に述べたように、これらのコンポーネントを集積することにより、小型でかつ自動化されたトータルな処理を行うシステムの実現が期待できる。システムが小型化できることはすなわち、従来実験室内で行われてきた一連の分析操作のための装置

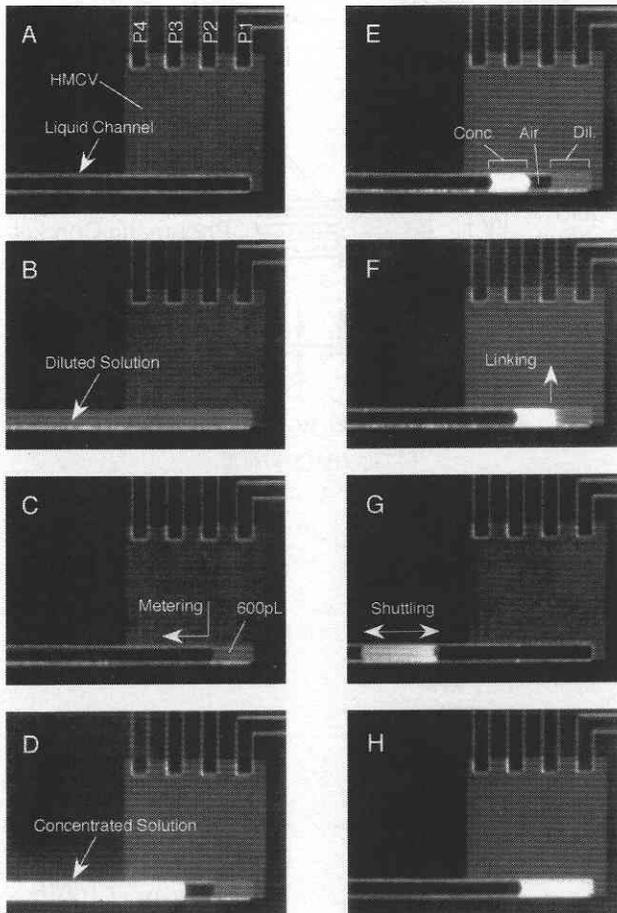


図13 HMCVによる液滴操作の実験結果

群を、可搬型のシステムとして実験室の外の環境へ持ち出せることを意味しており、その究極のケースとして極限環境における化学分析あるいは生物探査といった用途を考慮することができる。

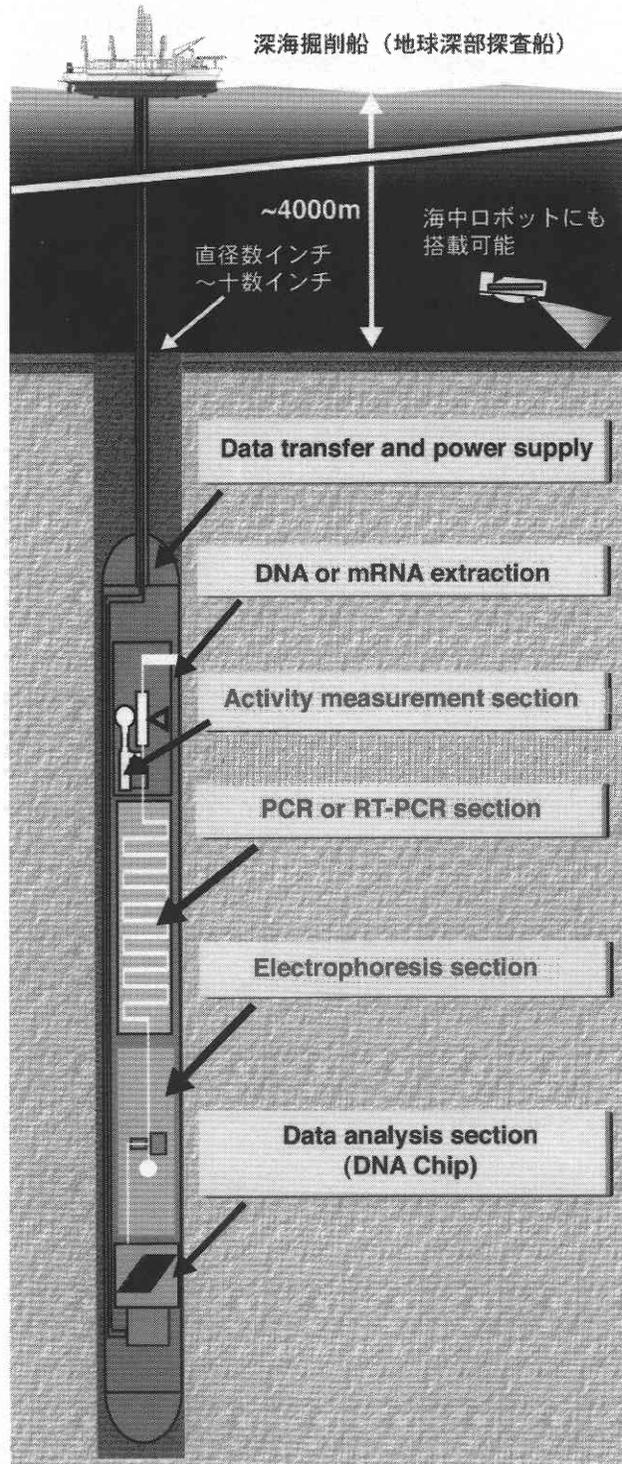


図14 マイクロ現場遺伝子分析システムの概要

筆者の研究室では、こうしたマイクロ生化学システム特有のメリットを活かして、海中ロボットに搭載したり、深海掘削孔内に設置することが可能な小型の現場遺伝子分析システムの開発を進めている。図 14 に深海掘削孔内に設置する現場分析システムのイメージを示す²⁵⁾。システムの構成としては、サンプルを取り込んで核酸 (DNA あるいは mRNA など) を抽出する部分、バイオマス現存量を同定するための計測セクション、遺伝子増幅反応を行うリアクター、反応産物を分離検出するための電気泳動セクション及び将来的な構想として DNA チップを用いて解析を行うセクションなどが一つのシステムの中に組み込まれたものを構想している。これまで、海中の微生物については、主として、海水あるいは泥水をサンプリングし、これを母船上や陸上に持ち帰った上で実験室内で分析する方法がとられてきた。しかしながら、この方法では、サンプリングしてから母船上に引き上げるまでのコンタミネーションや、海水の圧力や温度変化などに伴う微生物の状態変化が避けられないことから、獲得できる情報は限られたものとなっている。こうした従来手法の限界をブレイクスルーし、微生物の遺伝子レベルの動態や空間的な広がりを正確に把握するためには、可搬型の分析システムを開発し、海中の現場において直接分析を行うことが必要不可欠である。

8. おわりに

以上述べてきたように、マイクロ生化学システムの技術は、現在までのところコンポーネント毎の技術開発が行われている段階であるが、今後は具体的な応用を想定して、トータルなシステムを考えることにより、より一層そのメリットを活かしうる。また、海中環境での現場分析の必要性は、現時点においても既に明らかであり、特にこの 5 年程度の間に、観測機器を搭載するプラットフォームとしての、海中ロボットや海底観測ステーションなどの技術は飛躍的に進歩している。また、来るべき 21 世紀においては、国際的なプロジェクトとして深海掘削計画が実行されつつあり、そこでは、掘削孔内に設置した機器による現場計測が、大きな目的の一つとなっている。こうした状況下では、マイクロ生化学システムのような新しい技術を導入することによって、これまで以上に小型かつ高精度、さらに長時間の使用が可能な現場分析装置の開発がきわめて重要である。こうした極限環境の探査を支える技術としてのマイクロ生化学システムの役割にも注目しながら研究開発を進めたいと考える。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は、筆者の前任地である理化学研究所生化学システム研究室との共同研究である。また、深海掘削孔内用現場分析システムの開発は、広島大学生物

海洋学教室の長沼毅助教授と共同で進めている。関係各位に深甚なる謝意を表す。なお、紹介した研究の一部は、生産技術研究所の選定研究として行われたものであることを付記する。

(2000年7月3日受理)

参 考 文 献

- 1) A. van den Berg, et al. eds., *Micro Total Analysis Systems 2000*, Kluwer Academic (2000).
- 2) *HPCE 2000 Book of Abstracts* (2000).
- 3) *Proc. IMRET 4, AIChE* (2000).
- 4) J. M. Ramsey, et al., 第 4 回国際マイクロマシンシンポジウム *Proceedings*, 東京 (1998) pp.113-131.
- 5) H. Nakanishi, et al., *Proc. MEMS '97, Nagoya* (1997) pp. 299-304.
- 6) 藤井輝夫, 電気学会化学センサシステム研究会資料 (1999) pp. 19-22.
- 7) D. C. Duffy, et al., *Anal. Chem.*, 70 (1998) pp. 4974-4984.
- 8) J. L. Wilbur, et al., *Advanced Materials*, No. 7/8 (1994) pp. 600-604.
- 9) E. Delamarche, et al., *Science*, 276 (1997) pp. 779-781.
- 10) M. A. Unger, et al., *Science*, 288 (2000) pp. 113-116.
- 11) D. J. Beebe, et al., *Nature*, 404 (2000) pp. 588-590.
- 12) T. Fujii, et al., *Proc. IEEE-EMBS'97, Chicago* (1997) pp. 2572-2574.
- 13) T. Nojima, et al., *Proc. IEEE-EMBS'98, Hong Kong* (1998) pp. 2978-2980.
- 14) T. Nojima, et al., *Bioprocess Engineering*, Vol.22, Issue 1, Springer (2000) pp. 13-17.
- 15) T. Yamamoto, et al., *Proc. SPIE 2000 Symposium on Micromachining and Microfabrication, Santa Clara* (2000) to appear.
- 16) 北森武彦, 第 19 回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, 東京 (1999) pp. 20-21.
- 17) 金田祥平, 他, 平成 12 年電気学会全国大会論文集 [3], 東京 (2000) pp. 1104-1105.
- 18) 金田祥平, 他, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2000 講演論文集, 熊本 (2000) 1A 1-63-090.
- 19) M.A. Northrup, et al., *Proc. Transducers '93, Yokohama* (1993) pp. 924-926.
- 20) 近藤聖二, 他, 電気学会論文誌 E, Vol. 119-E, No. 10 (1999) pp. 448-453.
- 21) J. W. Hong, et al., *Proc Transducers '99, Sendai* (1999) pp. 760-763.
- 22) J. W. Hong, et al., *Progress in Biotechnology 16, Elsevier* (2000) pp. 69-74.
- 23) K. Hosokawa, et al., *Proc. MEMS '99 Orlando* (1999) pp. 388-393.
- 24) K. Hosokawa, et al., *Anal. Chem.*, Vol. 71, No. 20 (1999) pp. 4781-4785.
- 25) T. Fukuba, et al., *Lab-Chips and Microarrays Japan, Tokyo* (2000).