

レーザー微細加工・表面改質技術を用いたバイオチップデバイスの開発に関する研究

弘前大学 知能機械システム工学科
准教授 花田修賢

(平成 24 年度一般研究開発助成 AF-2012203)

キーワード：汎用レーザー，微細加工，低屈折率ポリマー

1. 研究の目的と背景

近年、「個々の細胞には個性がある」という概念が生物・医用分野においてトレンドとなっており、個々の細胞をバイオチップ上で制御・観察する手法へのニーズが高まっている。バイオチップ上で細胞を運動制御する際には、透明材料基板に微細構造や微小流路、加工溝をレーザー微細加工により作製し、細胞を運動制御する技術が検討されている。しかしながら、バイオチップ基板材料には、ガラスやポリジメチルシロキサン(PDMS)等の比較的高い屈折率を有する透明材料が用いられている。そのため、顕微鏡下で細胞を観察する際には、基板と培地(水)との屈折率差から微小流路壁面や微細構造近傍では、像がぼやける、影ができる等の問題が発生する。よって、バイオチップ内流路壁面近傍等の固体表面でユニークな運動をする微生物の詳細な観察・分析はこれまで行われてこなかった。

よって、本研究課題では、水の屈折率にほぼ等しい低屈折率ポリマーCYTOP²⁾による機能集積型バイオチップデバイスを、汎用レーザー加工技術を駆使する事で作製し、バイオチップを用いた鮮明な細胞の運動状態遷移を観察する事を目的とする。フッ素ポリマー全般に言えることであるが、CYTOP のマイクロスケール以下の微細加工は、ポリマーの高い透過性や化学的安定性等、優れた特徴のため困難とされており、シンクロトロン放射光やイオンビーム、真空紫外波長の F₂ レーザーを用いた微細加工技術に限られている³⁾。これら量子ビームを用いたフッ素ポリマー微細加工技術は装置の安定性やコストの面から、現状、産業応用には至っていない。よって、本実験では汎用レーザーとして、YAG レーザーを使用したポリマーの微細加工技術の確立を行う。加工技術確立後、バイオチップ作製に関しては、細胞が移動できる程度の大きさの微小流路を汎用レーザーにより作製し、流路壁面近傍にある細胞を、顕微鏡を用いたタイムラプス観察する。最終的にはバイオチップを用いた新しい細胞の運動制御及び観察方法を確立する。

2. 実験方法及び加工技術の確立

実験では、Nd:YAG レーザー(波長 532 nm, パルス幅 500 ps, 繰り返し周波数 1 kHz)を使用し、対物レンズ(×20, NA:0.46)を介して、ポリマー基板表面に集光照射し、アブレーション加工を行った。レーザー出力は ND フィルターにより調節する。図 1 に実験装置の概略図を示す。

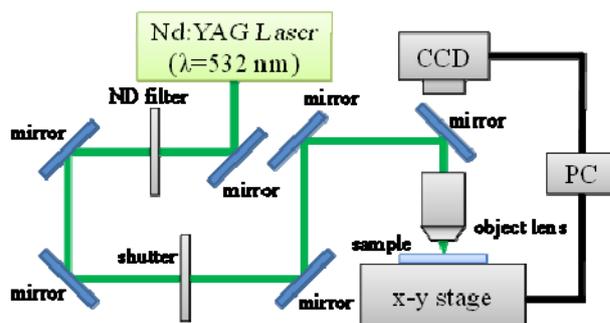


図 1 実験装置概略図

ポリマー基板を乗せる 2 軸ステージは、コンピュータ制御によりマイクロオーダーの精度で駆動する。大面積加工を行う際は、図 2 に示すように、x 方向に一定のピッチ間隔でずらし、(1)レーザー光を多重走査し、直接描画を行う。

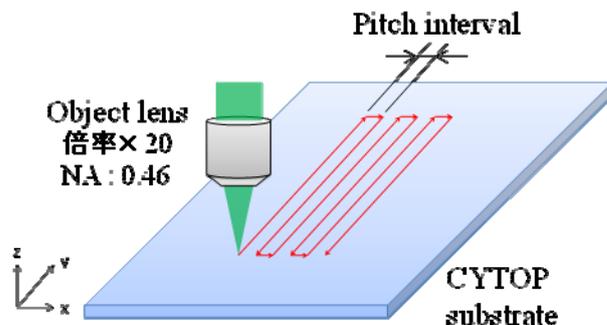


図 2 大面積アブレーション加工方法概略図

その際、レーザー照射領域にはアブレーションによる残留物質が堆積するが、後に行うウェットエッチングにより除去することが可能となる。レーザーアブレーション後の(2)フッ素溶媒を用いたウェットエッチングでは、初めにレーザー照射領域の残留物質のみを選択的エッチングするエッチング溶媒を検討した。表 1 に検討を行ったエッチング溶媒を示す。ポリマーの溶解性を示す溶媒選択の際には、一般的に Hansen 溶解度パラメーターが用いられるが、フッ素ポリマーに関しては本パラメーターが使用できないことが知られており、不透明な部分が多い⁶⁾。よって、表 1

に示すように幾つかの種類のフッ素溶媒を検討し、溶媒の濃度を調整する希釈剤についても検討した。

表 1 エッチング用各種フッ素溶媒

	AC-6000	AK-225	CT-50LV180
Molecular weight [kg/mol]	348.11	202.94	Ave. ca. 150 thousand
Solubility (Undiluted)	○	○	○
Chemical formula	$C_2H_2F_{12}$	$C_2HCl_2F_2$	$(C_{12}F_{22})_n$
Water	x	x	x
Acetone	○	○	x
Ethanol	○	○	x

各種フッ素溶媒を試したところ、(株)旭硝子社から市販されている AC-6000 をアセトン希釈することで、選択的エッチングを実現した。エッチング後、アブレーションによる残留物質は除去できるが、レーザー照射領域には表面粗さが残る。そこで、(3)ポリマーの持つ流動性を利用し、ガラス転移温度を超えた熱処理を行った。その結果、加工領域の表面粗さが改善され、後に行う細胞の動態観察に耐えうる結果となった。フッ素ポリマーの微細加工技術を確立した後に、張り合わせによる 3 次元流体構造を含むバイオチップ作製を行った。

3. 実験結果および考察

3. 1 フッ素ポリマーアブレーション加工

図 3 に、異なるレーザーエネルギーでレーザー光を 1 回走査した際のアブレーション加工痕の透過顕微鏡像を示す。図 1(a)はレーザー出力 30 mW、(b)は 14 mW である。ステージ走査速度は 300 $\mu\text{m/s}$ 一定とした。図 3 より、レーザー出力を適当に調節することで、熱影響によるクラックやひび割れを最小限に抑えることが可能である。

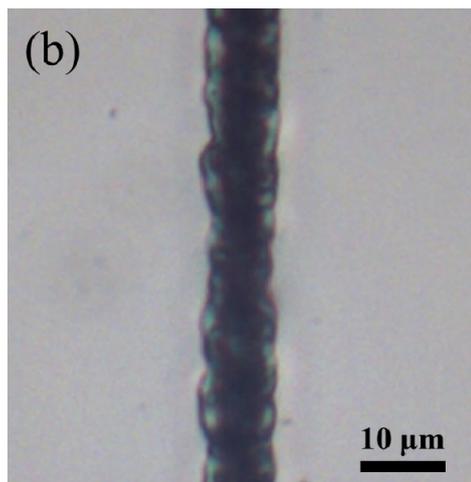
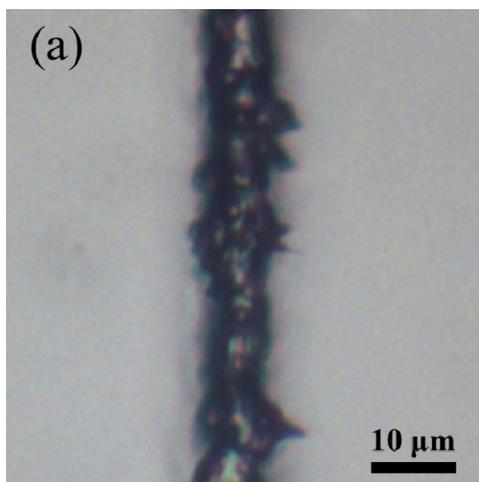
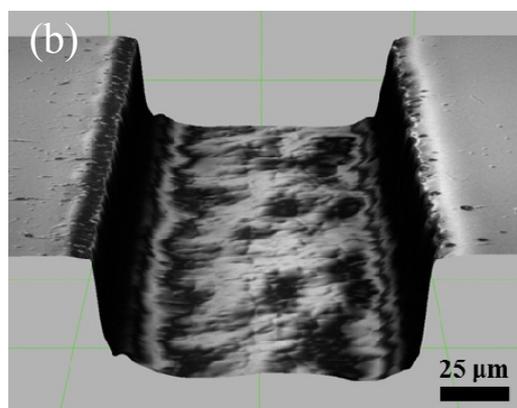
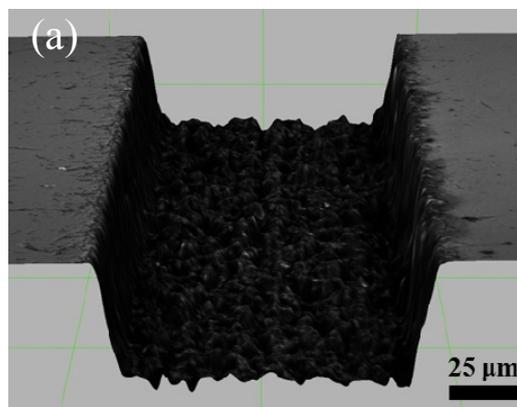


図 3 アブレーション加工溝。
レーザー出力(a)30mW 及び(b)14mW

3. 2 アブレーションによる大面積加工

図 4 に、ポリマー基板表面に流体構造を作製する際の各工程(a)アブレーション(b)ウェットエッチング(c)熱処理における加工痕底面のレーザー顕微鏡像を示す。図 4(a,b)より、ウェットエッチングによりアブレーション加工領域のみが選択的に除去されることが確認できる。また、図 4(c)より、エッチングを行ったポリマー基板を熱処理することで、エッチング後の加工痕底面やエッジ部分の表面粗さが改善されたことが確認できる。



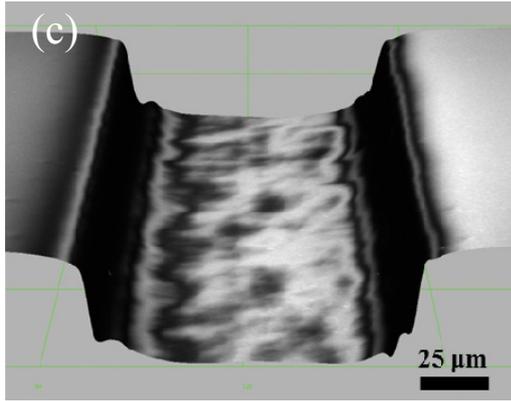


図 4 (a)アブレーション加工後,(b)エッチング後及び(c)熱処理後のレーザー顕微鏡像

エッチング後及び熱処理後の加工痕底面を透過型顕微鏡で観察した結果を図 5 に示す。図 5(a,b)より、熱処理後の加工領域はウェットエッチング後に比べ表面粗さが改善し、透過性が向上した。

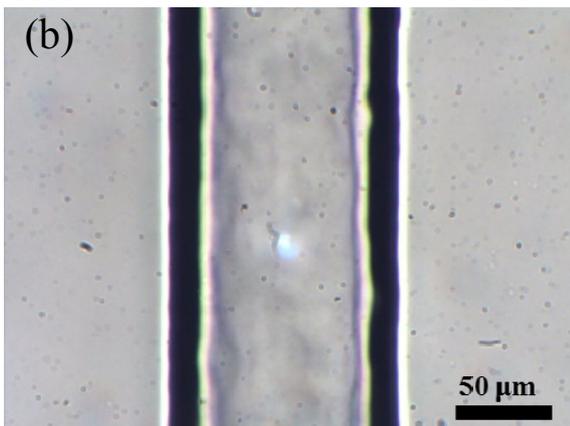
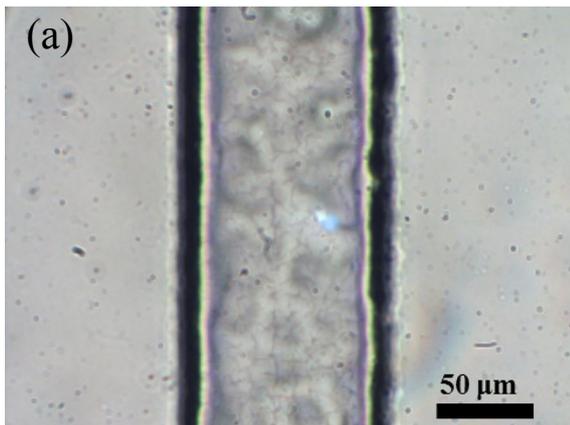


図 5 (a)エッチング後,(b)熱処理後の加工痕透過顕微鏡像

3. 3 微生物観察用バイオチップ作製

これまでの加工結果を元に、流路壁面近傍における微生物の動態観察を目的とした低屈折率ポリマー基板内部に 3 次元流体構造を含むバイオチップを、張り合わせを行うことで作製した。図 6 に、作製したバイオチップの概略図を示す。

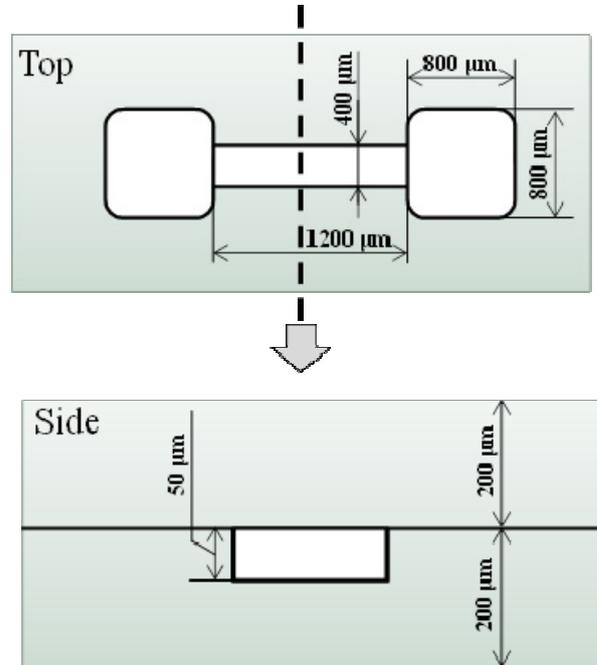


図 6 バイオチップ概略図

バイオチップは 2 つのリザーバー(800×800×150 μm)と CYTOP 表面から 200 μm 下に埋め込まれた中空構造(400×1200×50 μm)の流体構造から成る。なお、基板同士の張り合わせは、150℃で 30 分間の熱処理を行うことで 3 次元流体構造を作製した。

作製したバイオチップを用いた流路壁面近傍における水棲微生物(ミドリムシ)の遊泳観察を行う際には、片方のリザーバーからミドリムシ及び培養液(水)を同時に封入し、流路内を培養液で満たした後、流路壁面近傍を遊泳するミドリムシの顕微鏡タイムラプス観察を行った。図 7(a)に CYTOP バイオチップを使用した際の流路壁面近傍を泳ぐミドリムシの顕微鏡観察結果を示す。また、比較のため、図 7(b)に従来ガラスバイオチップを使用した際の、観察結果を示す。

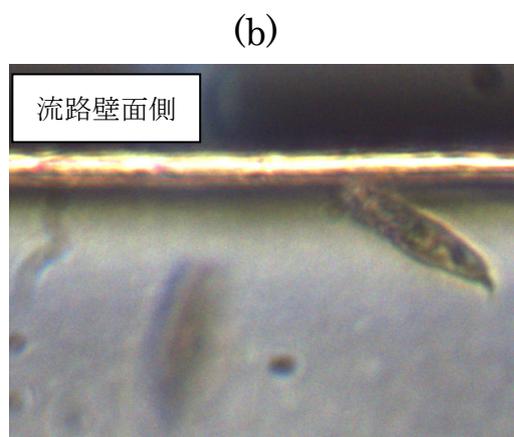


図 7 (a)CYTOP 製及び(b)ガラス製バイオチップを用いた流路壁面近傍のミドリムシ観察像

図 7 より, CYTOP 製バイオチップを使用した場合には, 流路壁面近傍におけるミドリムシの鮮明なタイムラプス観察像を得ることができた. 一方, 従来ガラスバイオチップを使用した場合には, 流路壁面近傍で, 観察像がぼやけ, 影ができる結果となった.

4. 結論

汎用グリーンレーザを用いた低屈折率ポリマー表面微細加工技術を確立し, 本加工技術を用いたバイオチップ作製を行った. 各種レーザを用いたバイオチップ作製は, 国内外の各研究機関や大学によって行われており, 用途に合わせて様々な機能を集積したバイオチップ開発が行われている. その中で, 我々は, 低屈折率フッ素ポリマー (CYTOP) に着目し, 3次元流体構造を含む CYTOP 製バイオチップを作製することで, 固体表面近傍における細胞の動態観察を行った. 今回我々が開発した CYTOP 製バイオチップは, 従来バイオチップでは観察不可能な流路壁面等の固体境界面での細胞観察に威力を発揮すると考えている.

謝 辞

本研究は, 公益財団法人天田財団一般研究開発助成 (AF-2012203) により行われました. ここに心より感謝の意を表します. また, 本研究は, 弘前大学大学院理工学研究科知能機械工学コースの小川達也君にご協力を頂きました. 厚くお礼を申し上げます.

参考文献

- 1) 北森武彦: マイクロ・ナノ化学チップと医療・環境・バイオチップ, 技術教育出版, 東京, (2009) 4
- 2) <http://www.agc.com/kagaku/shinsei/cytop/>
- 3) 澤田英夫: フッ素樹脂の最新動向, シーエムシー出版, 東京, (2013) 57