

生体分析マイクロチップの高機能化を目的とした フェムト秒レーザー表面加工による分子捕捉界面の創出

大阪大学 レーザー科学研究所
特任研究員 合谷 賢治
(平成 28 年度 奨励研究助成 AF-2016232)

キーワード：フェムト秒レーザー加工、樹脂表面加工、抗体固定化、マイクロ流体チップ

1. 研究の目的と背景

微小分析システム (μ TAS, micro total analysis system) や Lab-on-a-chip (チップ上の実験室) のように、小さなチップ上で検体や試薬を操作し、分析や観察に応用する技術が開発されている。これらは、実験環境の効率化だけでなく、患者の近くで行うベッドサイドモニタリングに必要な技術として注目され、検査時間短縮、高価な試薬の少量化、手順の簡略化、さらには患者の検査ストレス軽減といった効果が期待されている。しかし、既存の技術においては検体や試薬を制御するために送液機構や検出系などの外部装置を用いており、チップに多数の配線が必要 [1] となるため、多くの周辺装置と煩雑な操作が要求されるといった課題が残されており、技術普及のボトルネックとなっている。一方で、妊娠検査キットやインフルエンザキットのように、紙素材をベースとした定性検査チップは、紙の多孔性構造に起因する自然エネルギー (毛細管力、親水性官能基の作用、界面張力、繊維構造による分子捕捉) を駆動力として利用することで、外部装置をほとんど必要とせず、安価で即時応答性にも優れた検査方法として実用的に用いられている。しかし、不規則なセルロースの繊維構造を利用しているため、定量性に向かないことや環境の温度変化や湿気に対する脆弱性が指摘されている。プラスチックと紙材料は、光学的特性と液体への接触応答がまったく異なる (表 1)。プラスチックは、比較的に光透過性に優れ、形状が安定的なため定量検査に向いている。一方で紙材料は、液体の自己吸引・保持能力という特徴により操作性の良い簡易検査システムの構築が可能である。両者の特徴を効果的に利用すれば、それぞれの技術課題を同時に解決可能であると考えられる。そこで本研究は、プラスチックチップ表面に紙材料を模した多孔性構造を構築することで、プラスチックの検査定量性と紙材料の液体吸引・保持能力を同時に活用した新たなハイブリッドチップの開発を目指す。本研究課題ではフェムト秒レーザーを利用して、チップ表面の化学的及び機械的な構造を制御し、微細な表面構造によって微小領域における液滴操作 [2、3] を行い、分子捕捉界面の作製を試みた。

2. フェムト秒レーザーによる局所界面改質

フェムト秒レーザーは、非熱的なプロセスで加工対象を改質することが可能である。発振されるパルス光の立ち上が

り幅が材料の熱拡散時間 (数ピコ秒) よりも十分に短く、熱的プロセスによる加工を利用した場合に比べて、溶融ムラやバリなどによる不均一さを極限まで軽減する。また、パルス幅が短いことから、単位時間当たりのピークパワーが非常に高く、エネルギーを多光子過程によって材料に供給するため、あらゆる材料を改質し、その加工領域を回折限界以下に制限することが可能である。マイクロチップを用いた検査においては、チップの作製精度が検査結果の再現性に直接影響するため、微小空間の改質は再現性の良い加工方法が必須である。そのため、マイクロチップの微小空間に対して、加工部以外への不規則な損傷やウェットプロセスによる残留試薬による汚染を許容できない。そこで、加工手段としては、ドライプロセスで、加工部周囲への損傷が限りなく少なく、微小な流路を空間選択的に改質が可能な優れた加工特性をもつフェムト秒レーザー加工が不可欠である。

3. フェムト秒レーザー改質面への抗体固定化

本実験で用いたマイクロ流体チップは PMMA (ポリメタクリル酸メチル) を材料としており、図 1 に示すように、チップの寸法は $70\text{mm} \times 30\text{mm} \times 1.0\text{mm}$ (幅 \times 長さ \times 厚み) で設計した。また、マイクロ流路は、 $0.3\text{mm} \times 60\text{mm} \times 0.1\text{mm}$ (幅 \times 長さ \times 深さ) である。

図 2 はマイクロ流路の加工の様子について説明しており、(a) が改質した領域の光学顕微鏡画像で、(b) は加工方法について示した。加工に用いたフェムト秒レーザーは、パルス幅 158fs、繰り返し周波数 1kHz、波長 779nm を使用した (Cyber Laser 社製、IFRIT 1.0W)。レーザー改質面の機械的構造は、図 2 (b) のように凹凸構造となっており、この構造により、改質面の濡れ性が構造している。

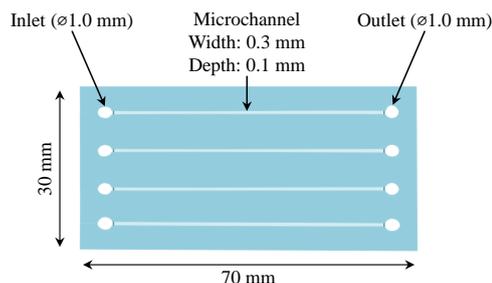


図1 マイクロ流体チップの概要

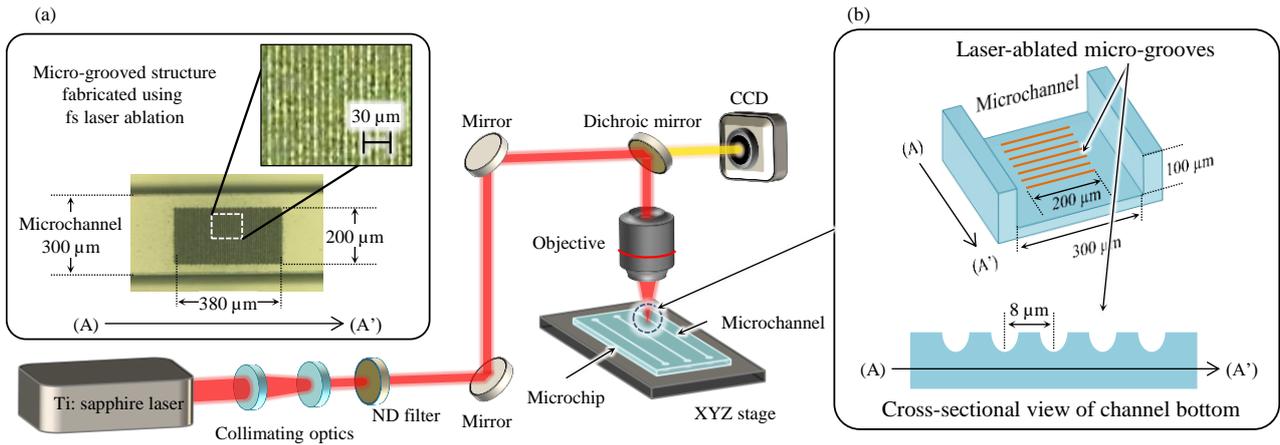


図2 フェムト秒レーザー加工システムと改質面の様子

図3は、改質面の濡れ性を評価するために行った実験結果で、レーザー照射フルエンスと改質面の接触角を示した。グラフの通り、フルエンスを 5.1 J/cm^2 の場合、接触角

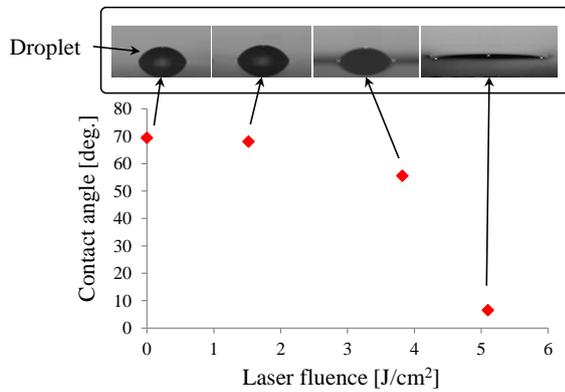


図3 レーザ照射フルエンスと接触角の関係

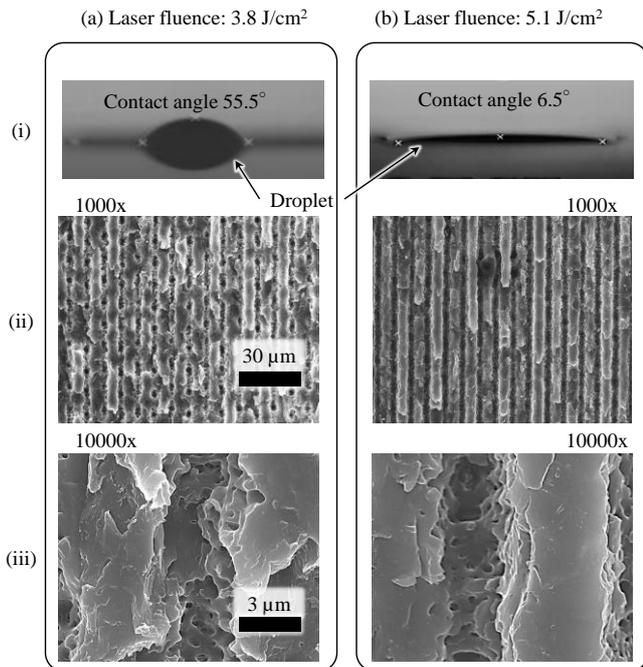


図4 レーザ改質面の電子顕微鏡画像
(照射フルエンス a: 3.8 J/cm^2 , b: 5.1 J/cm^2)

6.5° 程度と、超親水性に近い状態になっていることを確認した。図4は、フルエンス 3.8 J/cm^2 (a) と 5.1 J/cm^2 (b) のときの改質面を電子顕微鏡によって観察した画像を示す。両者の決定的な違いは、微小な溝構造の完全性であり、(a) の場合は、不連続な溝構造となっている。一方で、(b) については比較的均一な溝構造が形成していることが分かる。このことから、超親水性表面の由来が、機械的構造に起因していることが確認された。(b) の場合においては、液滴を滴下すると、微細な溝構造に液滴が侵入し、溝構造の形状によって発生する毛管力によって液体が展開される。表面の化学的特性を調べるために X 線光電子分光装置によって分析を行ったところ、レーザー照射後の表面においては、元素結合のうち、親水性に寄与すると考えられる結合状態が増加しており、文献[4]の傾向性と一致する結果が得られた。

続いて、改質面に抗体タンパク質 (抗アディポネクチン抗体) を固定化するために、図5のインクジェット吐出装置 (Pulseinjector, Cluster Technology 社製) を用いて、抗体を含む固相液の滴下実験を行い、固相液が改質面内でのどのように展開し、固定化するかを観察した。図6は、マイクロ流路に固相液を滴下した様子の顕微鏡画像である。(a) の改質していない状態では、滴下した面内や流路壁面の界面エネルギーに依存して、不規則な状態となる。この原

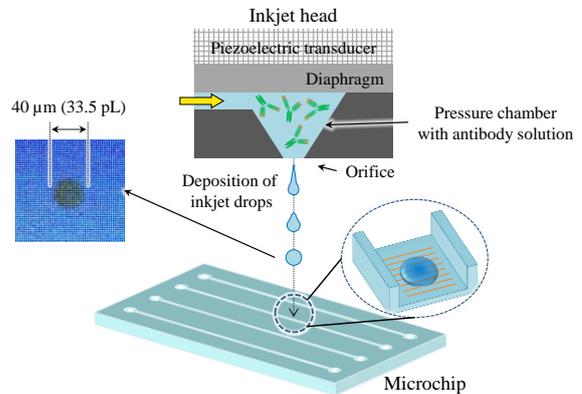


図5 インクジェット吐出装置と抗体滴下方法

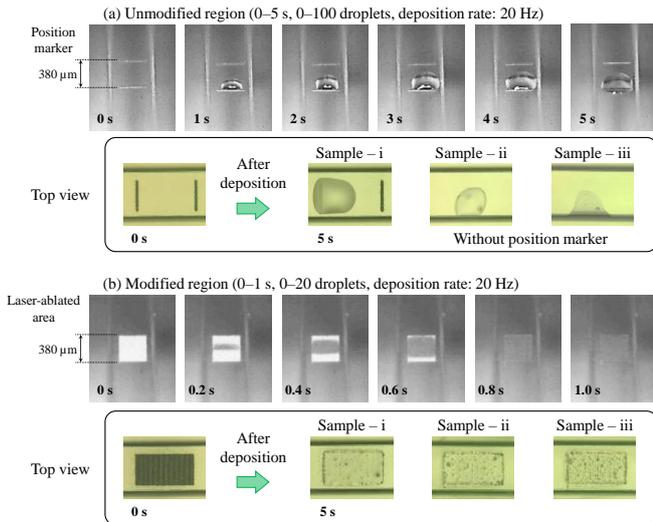


図6 抗体固相液滴下後の展開の様子(a:未改質領域、b:レーザ改質領域)

因は、壁面の界面エネルギーはもちろんであるが、インクジェット吐出装置から吐出された液滴の着地位置の揺らぎが大きな原因である。同様の実験をレーザ改質面(b)で行ったところ、改質面内のみ固相液が展開されていることがわかる。ただし、面内を詳しく観察すると、展開して乾燥した固相液の面内及び外周部分については、レーザ照射時に発生したデブリによって、大小の気泡が発生していることが確認された。

本手法の実用性評価のために、実際の分析手法として用いられている ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法によって、抗体の固定化状態を化学発光状態から調べた。図 7 (a) は、4 つのマイクロ流路上にレーザ改質面と未改質領域を設け、そこに前述のように抗体固定化を行った。図 7 (b, c) は、化学発光分析装置によって取得した発光画像と測定値を示す。未改質領域については、抗体が固定化されていないことが確認できる。また各流路に導入する検出対象 (アディポネクチン抗原) の濃度を変化させたところ、濃度に依存して発光強度が増加していることを確認した。実験結果から、抗原濃度 20pg/ml において

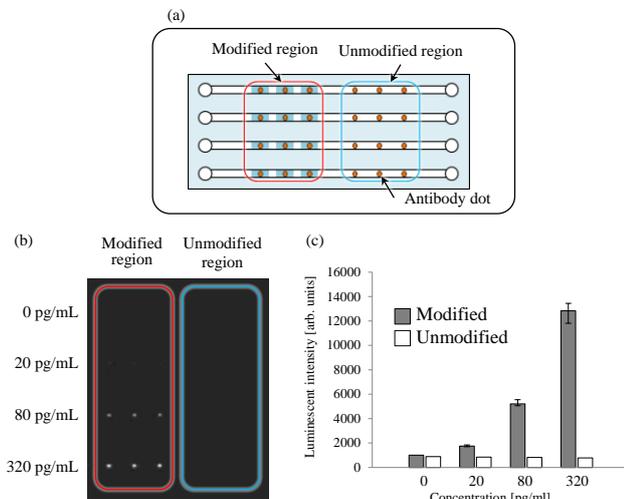


図7 ELISA法による化学発光観察(a:抗体の滴下領域、b:化学発光の様子、c:抗原濃度と発光強度)

も未改質領域と比較して判別可能である。一般的なアディポネクチンのヒト検体中の含有濃度は、血中が数 μg/ml、尿中が数重 pg/ml 程度である。実検体においては多くの夾雑物が存在するため、単純な評価はできないが、濃度だけを見れば本手法は尿中の濃度であっても検出可能範囲であるということを示唆している。

4. レーザ誘起多孔性構造での液滴流動制御

3章で行った実験の結果、レーザ照射領域に滴下された液滴は、加工領域面上を展開し、液滴が瞬時にフィルム上の形を形成することを確認した。これは、hemi-wicking 状態と呼ばれ、多孔性の材料や液滴が侵入しうる微小な細密構造を持つ界面で観察できる。その性質の観点から、あたかも紙上に液滴を滴下したかのような振る舞いをするため、そのような構造を形状安定的な樹脂材料に形成し、制御することができれば、高度な液滴流動技術を開発可能であると考えられる。本実験では、液滴の流動制御の基礎実験として、レーザ改質面内を流動する液滴の流量計測を行う。図 8 は、PMMA 基板上に水液を滴下した際の様子を示す。(a) の未改質の基板上では、接触角 70.4° となっているのに対して、(b) のレーザ改質後の面内においては、超親水性の表面状態となっている。図 9 (a) は、本実験で用いた実験構成であり、PMMA 基板上にフェムト秒レーザ照射によってマイクロ流路を形成させた。液滴導入ポートとなる円形部分 (上流部) より水液 1μL を展開し、線上の流路上を流動する。流動した液滴は、下流部側の吸水紙に吸水される。液滴の流動の様子をビデオカメラによる撮影し、液滴展開直後から水液が完全に吸収されるまでの時間を計測した。マイクロ流路は複数の溝構造から形成されており、本実験では、溝数 $N=1 \sim 20$ で変化させた。図 9 (b) は、 $N=10$ のマイクロ流路を電子顕微鏡によって取得した画像であり、各溝底部には、粒界状の構造が形成していることを確認した。図 9 (c) は、溝構造をレーザ顕微鏡によって取得した 3 次元プロファイルで、溝構造が矩形ではなく、底部に向かってテーパになっていることが分かる。図 9 (d) は、本実験で得られた流量効率 (μL/s) を示しており、溝構造を増やすにつれて流量効率が增加している。

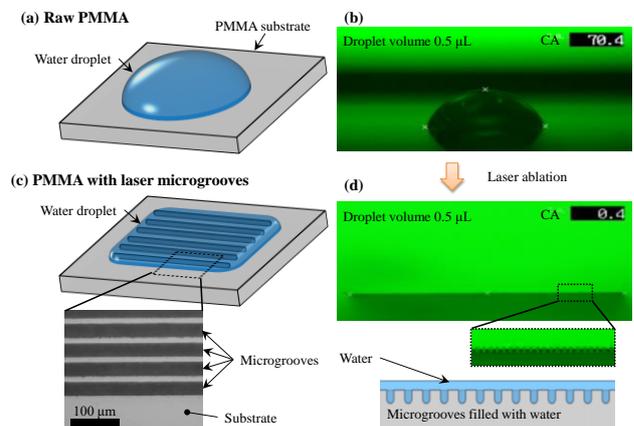


図8 PMMA基板上の水液の接触角

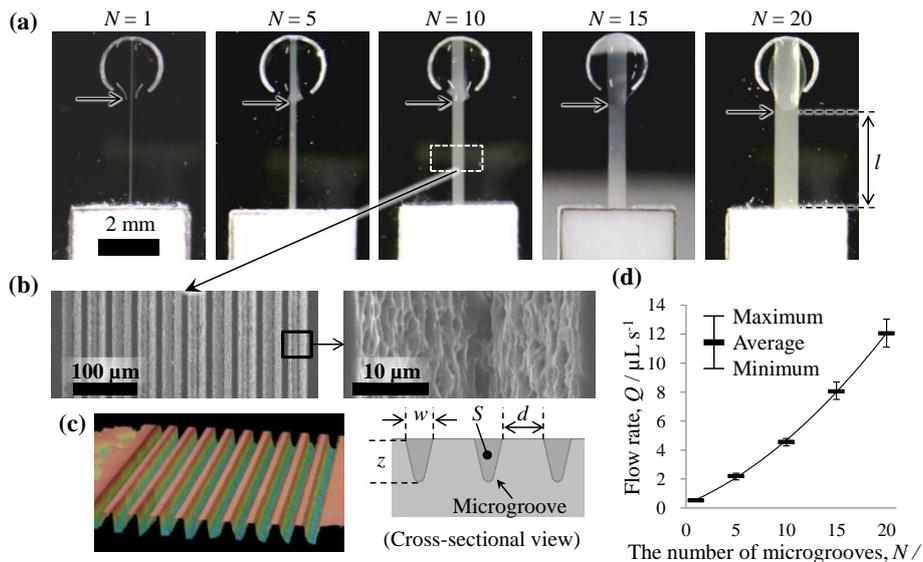


図9 微小溝構造内での液滴流動評価の概要

さらに、フェムト秒レーザの照射フルエンス (J/cm^2) だけを変化させながら、マイクロ流路を作製したところ、図10に示すように流量効率が增加することを確認した。特にフルエンスが $64 J/cm^2$ 未満の場合には、溝構造ごとに液滴の流れを形成するが、フルエンスが $64 J/cm^2$ を超えて、溝構造が一定の寸法 (幅×深さ) を超えた際には、溝構造全体で液滴を流動させるようになり、流量効率が增加することを確認した。

5. まとめ

本研究は、フェムト秒レーザの高い加工再現性と局所的改質能力を活用して実現される表面改質技術を、抗体タンパク質の固定化に応用した。実験によって、固定化した抗体の面積誤差 1.4% を達成し、新たな固定化技術による安定的で実用性の高い手法であることが示された。マイクロ流路のような担体の構造そのものの形状や寸法に起因した加工の難しい材料に対しても、不安定な生化学反応による表面修飾を一切用いず、局所的且つ精確に改質・固定化することが可能である。さらに、微細構造内を流動する液

滴の流量効率が制御可能であることを見出し、その評価を行った。以上のように、樹脂材料の表面局所領域の機械的・化学的特性を制御することで、種々の機能を付与した界面の創出が可能であり、マイクロ流路といった微小なデバイスへの機能付与が可能であることを明らかにした。

謝辞

本研究は、公益財団法人天田財団の奨励研究助成のご支援を受けて実施しました。深く感謝いたします。また共同研究者である産業技術総合研究所 健康工学研究部門の瀧脇雄介 主任研究員、田中正人 主任研究員、大家利彦 副研究部門長に感謝します。そして、実験の遂行にあたり、ご助言を頂きました、片岡正俊研究グループ長に感謝の意を表します。

参考文献

- [1] W.Y. Lin, Y. Wang, H.R. Tseng, Integrated microfluidic reactors, *Nano Today* 4, 470-481, 2009.
- [2] K. Goya, Y. Yamachoshi, Y. Fuchiwaki, M. Tanaka, T. Ooie, K. Abe, and M. Kataoka, Femtosecond laser direct fabrication of micro-grooved textures on a capillary flow immunoassay microchip for spatially-selected antibody immobilization, *Sens. Act. B Chem.*, 239, 1257-1281, 2016.
- [3] K. Goya and Y. Fuchiwaki, Paper-like Surface Microstructure Fabricated on a Polymer Surface by Femtosecond Laser Machining, *Anal. Sci.* 34, 33-38, 2018.
- [4] Z.K. Wang, H.Y. Zheng, C.P. Lim, Y.C. Lam, Polymer hydrophilicity and hydrophobicity induced by femtosecond laser direct irradiation, *Appl. Phys. Lett.* 95, 111110, 2009.

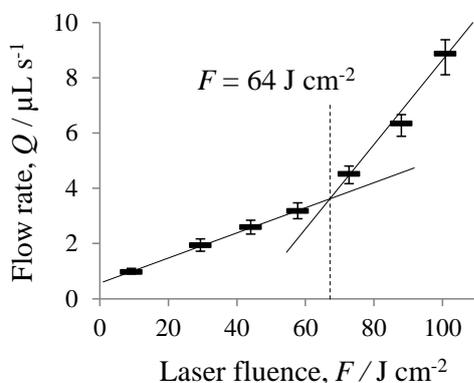


図10 微小溝構造内での流速評価