

# レーザー表面改質技術による次世代診断用チップの 臨床への橋渡し技術の創製

国立研究開発法人産業技術総合研究所 健康医工学研究部門

主任研究員 瀧脇 雄介

(平成 29 年度 一般研究開発助成 AF-2017208)

キーワード：表面改質，診断用チップ，橋渡し

## 1. 研究の目的と背景

2020 年の新型コロナウイルス禍に見られたようにその場で抗原抗体反応による迅速・精密な定量検査が出来る診断用のデバイス（抗原検査・抗体検査等）の開発は、早期の実用化が望まれている。これまで普及している迅速検査は妊娠検査薬やインフルエンザ検査薬等で見られるように、セルロース膜上に判定ラインが表示されて陽性か陰性かを判読するものであり、簡便ではあるものの精度が低いという問題があった。これに対してより精密な定量検査法として、実験室等で専任のスタッフがマイクロプレート等を用いて酵素免疫抗体（EIA）法による検査を行う方法があるが、煩雑で時間がかかる。そのため最近ではこれら実験室で行う測定を一枚のガラス又はプラスチック上で実現する、マイクロ流体デバイスという技術が注目されている。基板上に作製された数  $\mu\text{m}$ ～数百  $\mu\text{m}$  幅程度の流路空間で微量検体の分析をその場で行うことを目指した技術である。

マイクロ流路は、流路体積に対する比表面積が大きいいため、予め流路表面に固相化された分子の反応は、流路内を流れる分子自身の拡散によって反応時間が決まる。つまり流路内を流れる分子は、反応物質が固相化された流路表面との接触面積が大きいほど短時間に反応が完結するため、マイクロ流路空間が小さくなると迅速に反応が終了する。抗原抗体反応においてもマイクロ流路空間内での反応速度は流路内を流れる分子の拡散が律速になるため、この拡散時間は拡散距離の 2 乗に比例する。したがってマイクロ流路の空間がより微小化されるに従って理論上は検査に要する時間が短くなる。

しかし課題はマイクロ流路のような微小空間では層流下で反応が進行していくため、抗体固相化界面は精密な反応制御を行う必要がある。マイクロ空間で支配的な物理量として界面張力と固体壁面への付着性が強く作用することから、流路壁面に固相化された抗体分子の分子活性が異なる場合、流路毎のシグナルのバラつきは制御できなくなる。このことは臨床現場等での製品化を目指した安定性のある診断用チップの開発を妨げる要因になる。

流路毎の抗体分子の活性を出来る限り同じにするため、流路基板として用いられるプラスチックやガラス等の流路表面に、化学的に官能基を導入して抗体分子を均一に固定化する方法がある。しかし分子自己組織化膜を利用した

生化学的な表面処理は煩雑なプロセスと、長時間（自己組織化のための静置時間）ウェットな環境下での生化学反応による分子のゆらぎなどの問題があり、チップごとの歩留まり向上に問題を生じさせるケースが多い。

これに対して我々は先の研究助成で得た要素技術として、プラスチック表面にパルスレーザーを照射することで、プラスチック表面が化学的に改質されて、抗体等の生体分子が安定して結合し易くなることを見出した（平成 25 年度一般研究開発助成 AF-2013210）。そこで本研究ではレーザー表面改質技術と、高価な抗体液を連続・高精度に塗布できるインクジェット印刷技術を用いて、新たな診断用チップの作製と産業界への展開を目指した製造プロセス法の検討を行った<sup>1-6)</sup>。

具体的には、異なる条件でのレーザー改質をプラスチック表面に行った後、続けて直ぐにインクジェット印刷により抗体分子の液を改質表面に塗布・印刷する。作製された診断用チップが量産製造工程に展開することが技術的に可能であることと、診断用チップから得られるデータが臨床上の分析的妥当性を満たしているかどうかについて、既存のマイクロプレートを用いた EIA 法との比較試験から評価することで検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2・1 抗体固定化条件の検討

診断用チップは光学的な測定によって解析を行うため、安価で透明性に優れているプラスチック基板のアクリルを用いた。何も表面処理していないアクリル基板の表面には抗体液を塗布しても抗体が安定に固定化されることはないため、表面をレーザー改質する。先の研究助成でレーザー改質されたアクリル基板の局所領域には規則的な周期構造と照射エネルギーに応じた親水性のカルボニル基が賦与されることがわかっている。そのためまずはレーザー照射条件と抗体固定化量の相関について検討を行った。

レーザー照射条件は 1kHz のサファイアレーザー (IFRIT 1.0W Cyber Laser Inc.、1.0 mJ / pulse、 $\lambda = 779 \text{ nm}$ ) から 158 fs パルス波をマイクロ流路表面に照射することで、あらかじめ選択された領域のみを化学的に改質して親水性表面にするを行った。最適なレーザー照射のためのパラメータの条件設定として、レーザーフルエンスとスキャ

ン速度を 1.5-10 J/cm<sup>2</sup> と 20-1000µm/s の範囲で検討を行った。その結果、1.5 J/cm<sup>2</sup>/で 100µm/s のときに最も良好な結果を得た。

抗体液の基板への塗布と固定化についてはクラスタテクノロジー社製（日本）のインクジェット印刷装置（Pulseinjector®）を用いた。塗布する抗体は高価で高濃度なため、塗布する量と塗布される位置は精密に制御される必要がある。本法では、流路幅が数百 µm-数 mm の流路内に正確かつハイスループットに高粘度の抗体溶液を塗布していくことから、使用できるインクジェット印刷装置はこれらの要求を満たす必要がある。Pulseinjector はピエゾ駆動により高粘度の液を塗布することができ、マイクロスコープを用いて塗布されている様子を常時観察することができる。また高濃度の抗体溶液は高価であることから、使用後にノズル内に残った抗体溶液は回収できることが望ましい。本 Pulseinjector は、抗体液を容易に回収できるノズル構造であることから、繰り返し高価な抗体溶液を用いることを可能にした（図 1）。

## 2・2 測定条件の検討

マイクロ流路表面に高濃度の抗体を塗布した後、圧力感受性の透明の粘着フィルムを貼り付けて流路表面をカバーした。その後、流路の両端に貫通孔を設けて、片方の端に検体や試薬を滴下した場合、毛管力によって液がマイクロ流路内を流動するようにした。モデル抗原として、骨粗鬆症やがん転移のバイオマーカーとして知られている、血中 I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (PICP) を用いた。抗原をマイクロ流路中で補足するための抗体と、シグナルを出すための標識抗体は PICP 用のモノクローナル抗体（タカラバイオ）を使い、リン酸緩衝液で 0.1 mg/ml に希釈して使用した。また抗原抗体反応に依らない、マイクロ流路表面への非特異的吸着を抑制するためブロッキング試薬（StabilCoat, XLC 社製・アイルランド）を用いた。ブロッキング試薬は、マイクロ流路表面への抗体や抗原の非特異的な吸着を抑制することを目的に用いられる。非特異的な吸着はバックグラウンドを高くするため、S/N 比が小さくなり微弱なシグナルは検出できない。加えて本

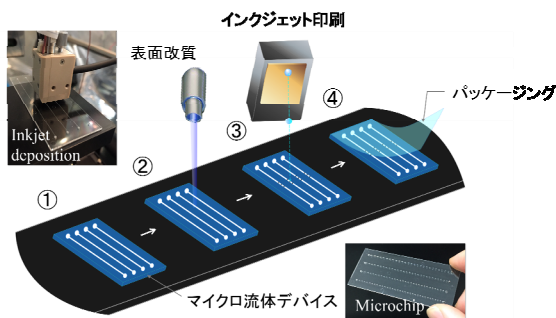


図 1 レーザ照射による表面改質とインクジェット印刷による免疫アッセイ用診断チップの連続作製

研究では、このブロッキング試薬を抗体固定化時に適用することで、抗体の保存安定性を長期間安定化させることに成功した。また使用される試薬は全て 4°C の冷蔵庫に保存して、使用するときは室温に戻してから使用した。

チップの作製はレーザで表面改質を行った後、ピエゾ駆動の Pulseinjector でマイクロ流路表面（幅×高さ：300µm×100µm）へ 30nL の抗体液を連続的に塗布して印刷を行う。表面改質とインクジェット印刷の部位についてマイクロスコープで予め位置決めをしておくことで、スループットに抗体固定化の界面の作製が可能となった。その後、ブロッキング液を流して室温で 4 時間放置して自然乾燥させた後、使用するまで診断チップは 4°C で保存した。

測定の操作は、診断用チップのフィルムカバー面を下にして、貫通孔の上部に液を滴下する。毛管力によって液がマイクロ流路内へ流動した後、流路内の液を除去して再度新たな液を貫通孔の上部に滴下する。原理は EIA 法によって行い、必要な試薬を順次滴下していく。これらの操作はポンプ等の外部装置は必要としない。

操作者は、①チップに洗浄液を 2 回滴下する、②検体液を滴下して 10 分間放置・固定化した抗体と検体中の抗原を反応させる、③洗浄液を 2 回滴下して反応していない抗原液と夾雑物を洗浄除去した後、ペルオキシダーゼ標識抗体を滴下、④5 分放置・反応していない標識抗体を除去するため洗浄液を滴下、⑤化学発光基質液を滴下して 10 分後発光強度を測定する（図 2）。

## 2・3 超音波と界面活性剤によるデブリの除去

アクリル表面へレーザ照射した際に発生するデブリは、抗体をマイクロ流路の基板表面へ安定的に固定化す際にバラつきを生む主な要因となる。前回の研究助成では、エッチング液を使用することで、デブリの除去を可能にしたが、この方法ではレーザ改質された基板表面の官能基も除去してしまう。具体的にはパルス波のレーザ照射でアクリル基板の局所領域に規則的な周期構造と照射エネルギーに応じた親水性のカルボニル基が賦与されるため、エッチング液を用いると、デブリの洗浄除去に加えて、カルボニル基の表面も洗浄される。そのためアミノ基を有する抗体分子を基板表面に固定化することが困難になると考えた。

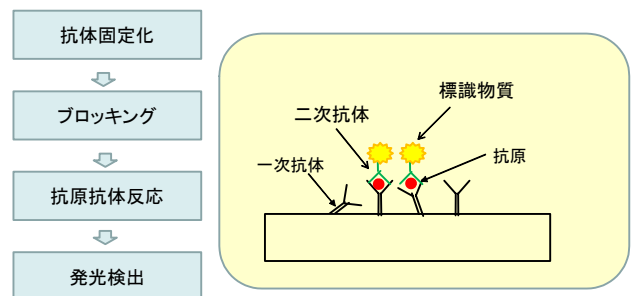


図 2 プラスチック基板表面でのサンドイッチ免疫アッセイ法による抗原抗体反応の原理

そこで本研究では、非特異的吸着を洗浄除去する際に使用する同じ界面活性剤を用いることで、マイクロ流路表面のデブリを超音波洗浄できないかと考えた。これまでデブリが散乱している状態のマイクロ流路は、流路内での液の流れを安定に保つことが困難であったため、洗浄除去できたかどうかは、実際に液を流動させて問題無く流れることを確認することで条件を得た。結果として 0.5% の Tween20 の界面活性剤を含むリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて超音波洗浄を 15 分間行ったところ、マイクロ流路内を液が留まることなくスムーズに流れる結果を得た。

### 3. 実験成果

#### 3.1 簡便な診断用チップの作製法

これまで毛管力で液を流動させることで、マイクロポンプ等を必要としない診断用チップを作製してきた。しかし毛管力を駆動力として用いるマイクロ流路チップのデメリットは、流路表面の濡れ性が疎水性の場合、液が流路内に留まる力も強く作用してしまうため、一度液を流動させると、別の新しい液を再びマイクロ流路内に流動させることが困難になる点である。そこでマイクロ流路内に規則的な周期構造を設けることで、マイクロ流路の入口に液を滴下すると微小空間でも液がスムーズに親水性を維持しながら流動していくことを見出した。実際にレーザ表面改質を行ったときと、表面改質を行っていないときの接触角を調べると、改質表面では接触角が  $10^\circ$  以下になり、親水性を保たれていることが示された (図 5)。更に液の流れ方向に対して周期構造を設けるとスムーズに液が流動するため、新しい試薬をマイクロ流路内に毛管力で流動させるときは、片方の貫通孔に吸収紙を押し付けるだけでマイクロ流路内の液を簡単に除去することができるようになった (図 6)。これまで、吸収紙を貫通孔の入口部に押し当てても、吸収紙の毛管力とマイクロ流路内の毛管力が共に強く作用するため、貫通孔の入口部に空気が流動してエアギャップが発生し易くなることにより、流路内の液を取り除くことが出来なかった。そのため本法により簡便な取り扱いが可能になった。

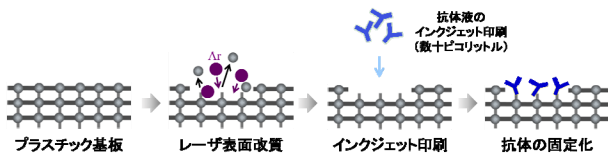


図 3 レーザ改質とインクジェット印刷によるプラスチック表面への抗体分子の固定化

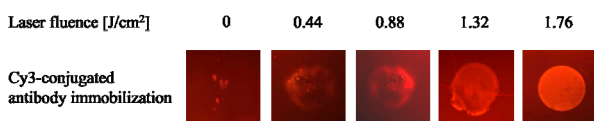


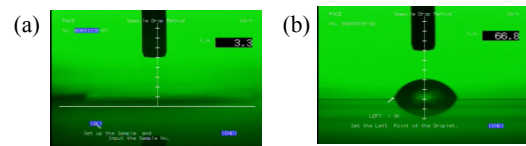
図 4 異なるレーザフルエンスでのレーザ改質に伴う Cy3 標識抗体の固定化とその状態

#### 3.2 診断用チップの性能

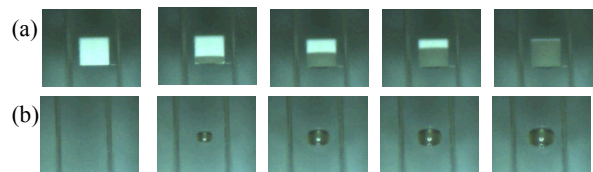
本法によって作製された診断用チップを用いて、マイクロプレートを用いた EIA 法との性能比較を行った。当初は炎症性バイオマーカーとして知られている CRP をモデルタンパクとして用いることを予定していたが、CRP の臨床基準値は 0.3 mg/dL と高濃度であることから、本マイクロ流路チップとマイクロプレート EIA 法による性能について大きな差は認められなかった。低濃度域での性能比較を行うことも考えられたが、健康人の CRP の僅かな変動を見ることについては臨床的有効性が認められないため、CRP ではなく骨粗鬆症やがん転移のバイオマーカーとして知られている、血中 I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (PICP) を用いることとした。

マイクロプレート EIA では抗原添加時に抗体と反応させる最短時間が 30 分以下になると、抗原抗体反応に伴う特異的なシグナルが見られなかった。また標識抗体をウェルに添加して 20 分以上が経過しないと、特異的なシグナルを得ることが困難であった。これに対して診断用チップでは、抗原添加時に抗体と反応させる時間が 15 分程でも、抗原抗体反応に伴う特異的なシグナルが見られた。また標識抗体をチップに添加して 10 分間反応させると特異的なシグナルを得ることができた。このことから診断用チップは短時間で検査を終えることができることが確認された。

またマイクロプレート EIA との相関性についても、PICP の濃度が 0-800 ng/mL の範囲で化学発光シグナルの増加率に大きな差は認められなかった。



PMMAへのfsレーザ表面処理あり(a),なし(b)に対する接触角



レーザ表面処理あり(a),なし(b)に対する抗体溶液の広がる様子

図 5 マイクロ流路表面へのレーザ改質による親水性の賦与と抗体溶液の広がる様子

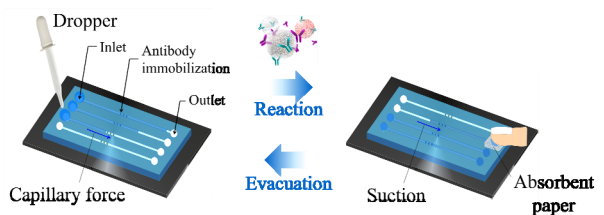


図 6 簡便な取り扱いで測定ができるマイクロ流路型の診断用チップ

### 3.3 反応評価（感度試験、正確性試験、同時再現性試験）

感度試験として検体中の対象物質である PICP を検出する能力を正確に規定することを行った。臨床への橋渡しを実現することを想定して、異なる日に作製された3つの診断チップを用いて、予め濃度既知の複数の管理用検体の液を準備しておき測定を行った。各チップ間での測定値がどの程度一致しているかどうかについて確認を行ったところ、PICPが150ng/mlを管理用検体として測定したときの発光シグナルは0.29-0.31 ( $\times 10^5$ )、PICPが320ng/mlを管理用検体として測定を行ったときの発光シグナルは、0.60-0.62 ( $\times 10^5$ )であり、実験室で行ったマイクロプレートEIA法の結果とほぼ一致した。

正確性試験では、同じ日に作製された3枚のチップについて、同じ濃度既知の管理用検体の液を用いて3回測定を行い、同じデータが得られるかどうかについて検討を行った。この検討は異なる日に作製された3つの診断用チップを用いて進めることで、本法で作製した診断用チップが正確に検査を行えるかどうかについて検討を行う。その結果、PICPが150ng/mlを管理用検体として3回測定したときの発光シグナルは何れも0.29-0.31 ( $\times 10^5$ )、PICPが320ng/mlを管理用検体として3回測定を行ったときの発光シグナルは何れも0.60-0.62 ( $\times 10^5$ )であり、チップ間での誤差は見られなかった。

次に同時再現性試験として、正確性試験で行った試験の3重測定をそれぞれ3回行った。同じようにPICPが150ng/mlを管理用検体として測定を行ったときにはすべて0.29-0.31 ( $\times 10^5$ )であり、320ng/mlを管理用検体として測定を行ったときにはすべて0.60-0.62 ( $\times 10^5$ )であった。またPICPの濃度が0-800 ng/mLに対する回帰曲線の傾きが0.9-1.1以内であったことから、臨床への応用を目指した診断用チップとして十分な性能を有していることが示された。

## 4. まとめ

レーザ改質と印刷技術を駆使することで、臨床で求められる性能を十分に満たした診断用チップを作製することができた。またレーザ改質を用いることで、マイクロ流路表面を親水性に改質できるだけでなく、抗体溶液を塗布すると流路表面に固定化されて、検体液中の抗原を流路内で補足することを可能とした。感度試験・正確性試験・同時再現性試験では、従来の実験室で専任のスタッフが行うマイクロプレートEIAを用いた測定が2時間以上を要したのに対して、本法は最短20分（最長40分）で検査結果を得ることができた。そのため本製造法の標準化をはかることで、製造プロセスにおけるレーザ改質技術の優越性と臨床適用への早期導入が期待される。今後の課題は全血検体を用いたときに、血球分離等を行わずにそのまま測定ができるようにするため、血球が破裂しない新たな流路環境を作製することを検討したい。

## 5. 結び

2020年の新型コロナウイルス禍で明らかになったように、現場で早期かつ高感度・簡便に診断できるチップデバイスの開発は喫緊の課題であると言える。現在市場にある簡易型の診断用チップは多くが定性法であり、偽陽性・偽陰性の発生頻度が高いと言われている。これに対してマイクロ流路を用いた診断用チップはそのポテンシャルが長年注目されてきたものの、実際に臨床の現場で使用するとすると、機能欠如や、量産化工程に移行する際には性能不足に陥る等、殆ど役に立たないデバイス開発となっているケースが多かった。そこでこれらを解決するため本研究ではドライ工程でレーザ改質により診断用チップを連続的に作製する手法の検討を行った。本研究で検討したノウハウを産業界へ移行するうえでレーザ改質は管理しやすく、ロット毎に診断用チップの性能を落とすリスクが少ないということが利点と考えている。また、規制産業である医療診断用のデバイス開発は、直接医療現場から産業課題や技術課題をフィードバックされることが重要であり、現場の研究者や技術者はそれらに添えていくことが望ましい。2020年の新型コロナウイルスのパンデミックで、現在の抗原検査や抗体検査における簡易検査デバイスは検出感度や信頼性が十分でないことが明らかになった。しかしマイクロ流路チップの研究開発が盛んに行われて既に20年以上が経過しているが、未だに精度の低い検査薬や診断法で陽性・陰性判定を行う手法しか持ち合わせていないことを考えると、この分野の技術的なブレイクスルーとして、本助成で進めたレーザ技術を利用した研究開発は今後に大きな可能性を与えるものと考えている。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご協力をいただきました国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康医工学研究部門の田中正人博士、秋田県立大学の合谷賢治博士にはひとかたならぬお世話になり、感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) Yusuke Fuchiwaki, Kenji Goya, Masato Tanaka: Anal. Sci., 57-63 (2018), 34(1)
- 2) Kenji Goya, Yusuke Fuchiwaki: Anal. Sci., 33-38 (2018), 34(1)
- 3) 瀧脇雄介・田中正人・藤原貴久・兼田麦穂・山村昌平: Chemical Sensors, 25-27 (2018), 34(Suppl. B)
- 4) 瀧脇雄介: 紙パルプ技術タイムズ, (2018), 61, (株) テックタイムズ
- 5) 瀧脇雄介: Bioindustry, (2018), 35(4), シーエムシー出版
- 6) 瀧脇雄介: ぶんせき, (2017), (12) 583., 公益社団法人日本分析化学会