

マイクロ分析システムに関する研究 (第3報)

山田 博之・萩原 茂・小松 利安・寺澤 章裕・吉田 善一*1・寺田 信幸*2

Study on Micro Total Analysis System (3rd Report)

Iiroyuki YAMADA, Shigeru HAGIHARA, Toshiyasu KOMATSU,
Akihiro TERASAWA, Yoshikazu YOSHIDA*1 and Nobuyuki TERADA*2

要 約

マイクロ加工技術を応用した μ TAS (Micro Total Analysis System) について研究を行った。これまでにレーザー加工と樹脂フィルムラミネート法を用いたマイクロ流体デバイスの作製について検討した。さらに、微細流路内を一直線上に流れている血球の数を計測するために、小径ファイバとレーザー光を用いた検出機構を提案し、第1段階としてラテックスビーズを用いた予備実験を行った。本報では、分析チップを垂直な状態にすることによって、微細流路内の液体に加わる重力を利用して血液を駆動する方法について検討を行った。さらに、レーザーを用いてフッ素樹脂フィルムに擬似毛細血管流路を加工し、赤血球変形能の観察について検討を行った。その結果、重力の力によって血液の流れ幅を絞ることができ、さらに赤血球が出口直径 $5\mu\text{m}$ の擬似毛細血管を詰まることなく通過することが確認できた。また、前報で提案した検出機構について、血液を用いた検出の予備実験を行ったので報告する。

Abstract

A μ TAS (Micro Total Analysis System) which applied micro fabrication technology is studied. Fabrication of the micro fluidic device using ultraviolet pulse laser ablation and resin film lamination had been examined. The detection mechanism which used laser beam and optical fibers with a diameter of $140\mu\text{m}$ was proposed for the purpose of measuring the number of blood cells which was flowing in a row formation at a microchannel. And the preliminary experiment using the latex bead was examined as the 1st phase. In this report, we examined a method to move the liquid using the gravity applied to a liquid in the microchannel, when the chip stands upwards facing the reservoirs. Moreover, an artificial capillary vessel was fabricated on the fluoro-resin film by laser ablation, and we tried to observe blood cell deformation. As a result, we had confirmed that the flow width of blood had been focused and that red blood cells had passed through the vessel with exit diameter of $5\mu\text{m}$ without blockading the capillary. And, the preliminary experiment using blood cells was examined in the detection mechanism proposed on 2nd report.

1. 緒 言

現在、半導体関連産業やIT関連産業、精密機器製造産業をはじめとして様々な分野において、各種材料を対象にしたマイクロ加工に取り組んでいる企業や研究機関が増加してきている^{1), 2)}。

また、血液検査やDNA分析など多くの分野において微量流体の成分分析を精度良く、迅速に行いたいという要求が高まっている。そこで流体試料の注入、混合、攪拌、分離、抽出を行う機構部品や流路、溜池などの流体分析に必要な要素を小型・集積化した μ TAS (Micro

Total Analysis System) というマイクロ流体デバイスが注目されている^{3), 4)}。 μ TASはカードサイズで作製できるため、測定試料が微量で済むだけでなく、試薬や廃液の量も低減でき、さらに分析時間の短縮も期待できる。

本研究において μ TASの流路幅は、数 μm ～数百 μm の大きさを考えている。流路の作製方法には、半導体製造プロセスを応用しシリコンや石英ガラスに微細溝を形成する方法、熱転写や成形で樹脂やシリコンゴムに溝を形成する方法、レーザーで樹脂に直接加工する方法などが報告されている^{5) - 9)}。著者等は、樹脂材料に対しアブレーション加工が可能な紫外線レーザーに着目し、レーザー加工による微細溝加工をはじめとするマイクロ加

*1 東洋大学 工学部 機械工学科

*2 東洋大学 工学部 機能ロボディスク学科

工技術の検討を行った。本研究では、マイクロ流体デバイス（マイクロ分析チップ）の作製方法として、共同研究者の吉田が提案している樹脂ラミネート法に着目した^{10), 11)}。現在、多くの研究グループが μ TASに関する研究開発を行っている^{12)–16)}。しかし、液体試料を流す方法は十分に確立されておらず、また分析チップは非常に小さいが、対照的に送液用ポンプや接続チューブのように周辺装置は非常に大型である。そこで、我々はポンプや電気泳動力などを使用せずに液体を送液する方法として、重力を利用した駆動方法を提案した¹⁷⁾。

これまでに我々は、マイクロ加工技術を用いた μ TASへの応用の第1段階として、三叉構造の微細流路をもつマイクロ流体デバイスや、小径パイプを挿入した立体流路をもつマイクロ流体デバイスなどを作製した。これら微細流路に血液を送液する実験を行い、血球を一直線上に並べて流すことができた^{18), 19)}。また、流路内を一直線上に流れている血球数を計測するために小径ファイバとレーザー光を用いた検出機構を提案し、第1段階として小径ラテックスビーズを用いた検出の予備実験を行った²⁰⁾。

本報では、分析チップを垂直な状態にすることによって、微細流路内の液体に加わる重力を利用して血液を駆動する方法について検討を行い、さらに血球が毛細管を通過する時の赤血球変形能の観察について検討を行った。また、流路内を一直線上に流れている血球数を計測することを目的として、前報で提案した検出機構について、血液を用いた検出の予備実験を行ったので報告する。

2. 実験方法

2-1 材料

マイクロ流体デバイスには2種類の樹脂フィルムを使用した。1つは熱硬化性ラミネートフィルムで、熱硬化性樹脂にはポリアミドを選択し、接着層を含む総厚さは $45\mu\text{m}$ である（厚さ $25\mu\text{m}$ のポリアミド層と厚さ $20\mu\text{m}$ のエポキシ接着層）。もう1つはフッ素樹脂フィルム（ダイキン工業（株）製ネオフロン EFEP）であり、フィルムの厚さは $100\mu\text{m}$ である。このフッ素樹脂フィルムは無色透明で、撥水性や耐薬品性に優れている。基板には、 $24\times 60\times 0.23\text{mm}^3$ のカバーガラスを用いた。加工実験およびマイクロ流体デバイスの試作に用いた材料の種類と厚さを表1に示す。

2-2 実験装置

本実験では Exitech 社製のエキシマレーザー加工機 PS2000（発振器：LAMBDA PHYSIK 社製 LPX200i）を用いた。波長は 248nm と 193nm 、発振周波数は

表1 材料の種類と厚さ

材 料	厚さ [μm]
ポリアミド+エポキシ系接着層 （ニッカン工業(株) 製）	25+20 (総厚: 45)
フッ素樹脂 ネオフロン EFEP （ダイキン工業(株) 製）	100
カバーガラス （松波硝子工業(株) 製）	230

表2 樹脂フィルムの加工条件

加工装置	Exitech 社製エキシマレーザー加工機 PS2000 LAMBDA PHYSIK 社製発振器 LPX200i	
レーザー波長	248 [nm]	193 [nm]
縮小光学系倍率	10倍レンズ系	30倍レンズ系
フルエンス	0.75 [J/cm^2]	7.5 [J/cm^2]
発振周波数	100 [Hz]	100 [Hz]
ビーム形状	$50\times 50 [\mu\text{m}^2]$, $100\times 100 [\mu\text{m}^2]$	$\phi 17 [\mu\text{m}]$

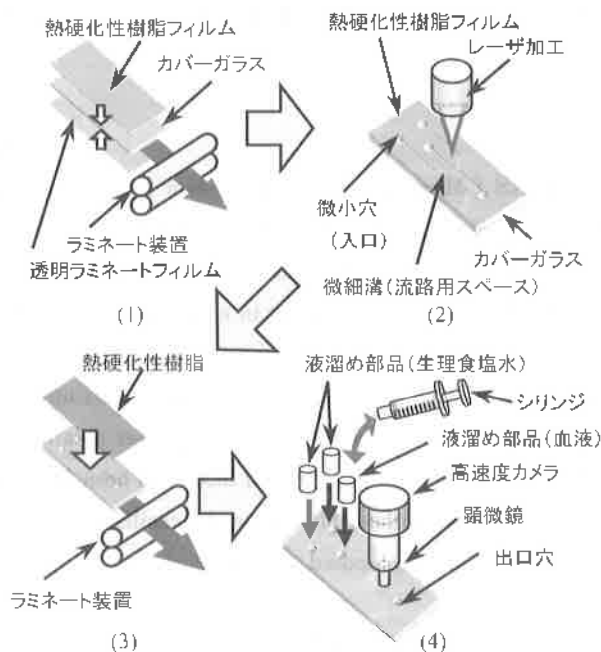


図1 マイクロ流体デバイスの作製プロセス

100Hz 、パルス幅は 20nsec 、発振器の1パルスあたりのレーザーパワーは 150mJ とした。また、ビームは光学系にアパーチャを挿入して成形し、縮小光学系レンズによって集光した。溝加工ではステージを移動させて加工を行った。微細流路の加工条件を表2に示す。また、ラミネータは、一般的な事務機器であるコクヨ製パウチ KLM-HA110を用いた。

2-3 マイクロ流体デバイスの作製方法

図1にマイクロ流体デバイス（マイクロ分析チップ）

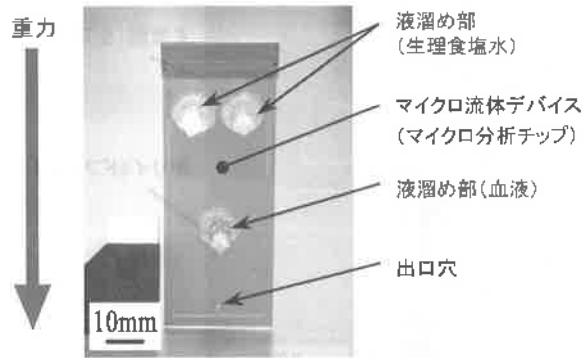


図2 作製したマイクロ流体デバイスの外観写真

の作製プロセスを示す。はじめにカバーガラスにポリイミドの熱硬化性ラミネートフィルムをラミネート接着し(図1 (1)), レーザ加工によって樹脂部分に微細溝や穴を形成する(図1 (2)), 多層化させる場合は, 樹脂フィルムをさらにラミネート接着し, レーザ加工によって溝などを形成することにより多層化させる。最後に樹脂フィルムをラミネート接着して覆う(図1 (3))。重力駆動による送液の場合は液溜め用のリザーバ部品を接着し, 所定の位置に血液と生理食塩水を充填する(図1 (4))。

2-4 血液送液実験方法

血液送液実験では, 抗凝固薬を混ぜ, 生理食塩水で希釈した人間の血液を用いた。送液実験では, 流路の入口穴に接着された液溜め部に, 生理食塩水で希釈した血液, または生理食塩水を注入した。液溜め部は大気開放されている。重力駆動による送液実験では, 図2に示すように, 液溜め部を上方にしてチップを垂直な状態にした。血液と生理食塩水は出口穴から外部へ流出させた。また, 血液の流れや血球の状態は, 光学顕微鏡に取り付けた高速度ビデオカメラを用いて観察を行った。

3. 結果および考察

3-1 重力駆動による血球整列

マイクロ流路内の液体に加わる重力を利用して, 血球を一列に並べて流すことを試みた。図3は, マイクロ流体デバイスの概念図である。図4は, レーザ加工によって作製した三又流路の電子顕微鏡観察写真の一例である。液溜め部を上方にしてチップを垂直な状態にすることによって, マイクロ流路内の液体に加わる重力を利用して, 液体を駆動(送液)することができた。三又流路の合流位置における光学顕微鏡観察写真を図5に示す。試料がシース液に包まれた状態で流れるシースフロー現象を応用して, 三又流路の合流位置で生理食塩水の流れによって血液の流れ幅が絞られた状態で流れることが確認できた。次に, 三又構造の微細流路について, 流路形

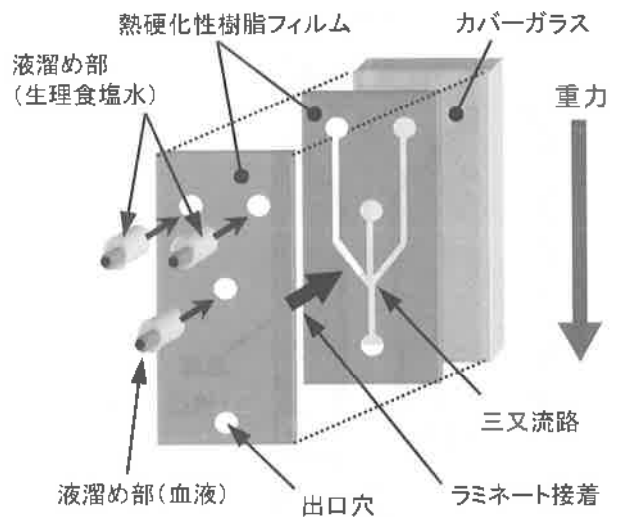


図3 重力駆動用マイクロ流体デバイスの概念図

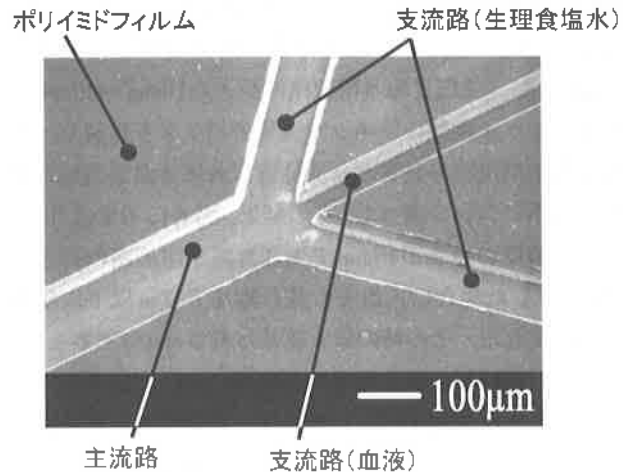


図4 三又構造の微細流路の電子顕微鏡観察写真

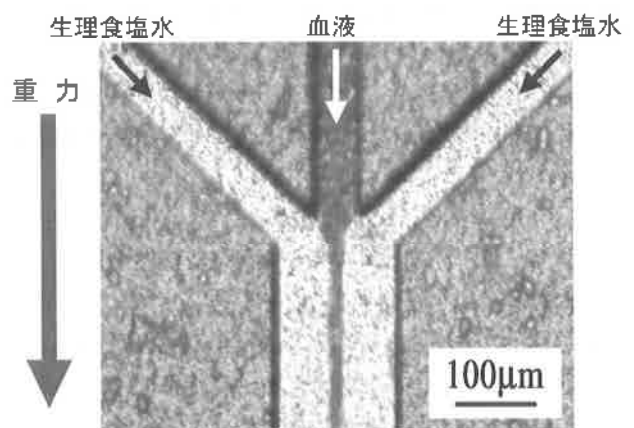


図5 重力駆動による三又流路における血液の流れ

状と合流位置における血液の流れ幅との関係について調べた。主流路および支流路の幅寸法を $50\mu\text{m}$ ~ $150\mu\text{m}$ に変化させた5種類の流路形状のマイクロ流体デバイスを作製した。送液実験の結果, 主流路および支流路の幅寸法がいずれも $50\mu\text{m}$ である図6に示すような三又

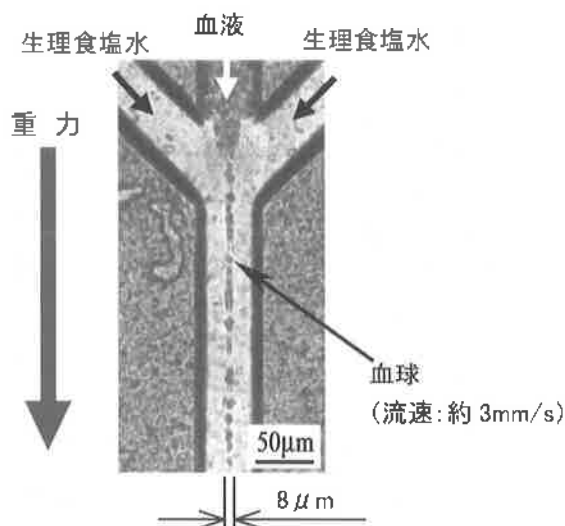


図6 流れ幅が絞られた血液の流れ

流路が血球整列に対して良好な形状であった。さらに、血液用流路の長さ、すなわち血液用液溜め部の高さを10mmとし、生理食塩水用流路の長さを10mm～40mmに変化させた4種類のマイクロ流体デバイスを作製し、生理食塩水用流路の長さと同流位置における血液の流れ幅との関係について調べた。その結果、図6に示すように、血液用流路の長さが10mmで生理食塩水用流路の長さが40mmとした場合に、血液の流れ幅を8µm以下に絞ることができた。その時の最大流速は約3mm/sであった。

次に、血液と生理食塩水の合流部において血液の流れの全周を生理食塩水のシーズフローで覆うことを目的として、図7に示すような小径パイプを挿入した立体流路を作製した。小径パイプは、外径100µm、内径30µmである。チップを垂直な状態にすることによって、マイクロ流路内の液体に加わる重力を利用して液体を送液することができた。さらに、図8に示すように血液と生理食塩水の合流部分において、血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、血球が1列に並ぶ状態が確認できた。

3-2 フッ素樹脂への擬似毛細血管流路の作製

赤血球変形能を観察することを目的として、樹脂フィルムへ微小穴の加工を行い、この微小穴を擬似毛細血管流路に応用することを試みた。擬似毛細血管流路を形成する層には撥水性や耐薬品性に優れたフッ素樹脂フィルムEFEPを適用することとした。そこで、レーザーによってフッ素樹脂フィルムへ微小穴を加工する条件を検討した。一般的に人間の毛細血管の最小径は約4µmとされているため、それに近い開口径を有する微小穴を加工する条件を検討した。

図9は、厚さ100µmのEFEPフィルムに、レーザー波長193nm、フルエンス7.5J/cm²、照射回数1100pulse、集

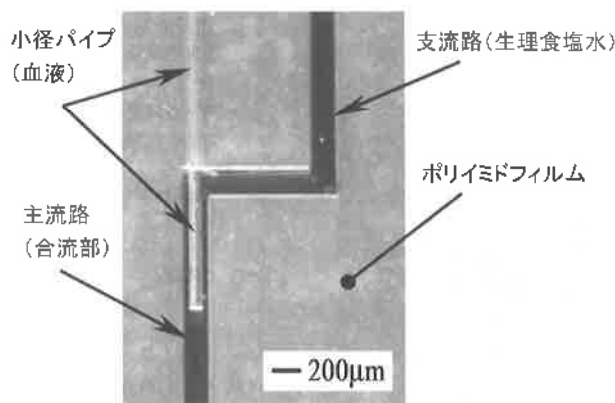


図7 小径パイプを挿入した流路の光学顕微鏡観察写真

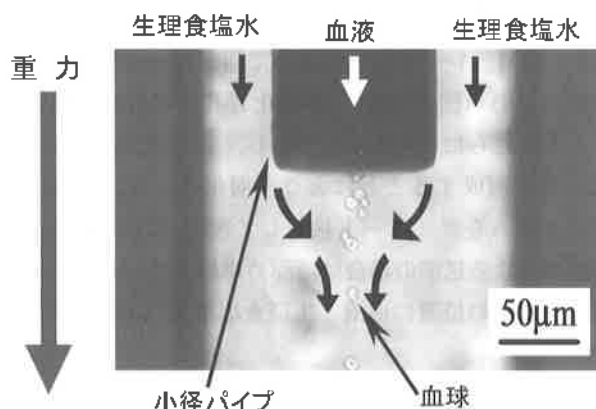


図8 重力駆動による小径パイプ流路での血球の流れ

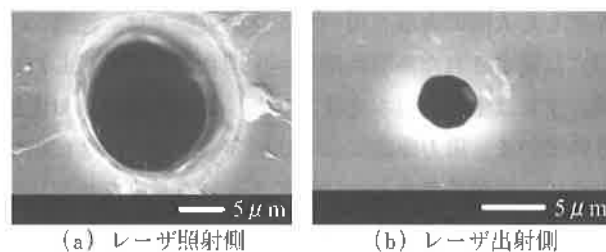


図9 フッ素樹脂への微細穴加工部の電子顕微鏡観察写真

光とアパーチャによるビーム直径17µmの条件で加工した貫通穴の電子顕微鏡観察写真であり、図9(a)はレーザー照射側、図9(b)はレーザー出射側から観察した結果である。また、フィルム端部の近傍に穴を加工した後に、そのフィルムを樹脂に埋め込み、樹脂とともに穴部分までフィルムを研磨加工し、穴の断面形状を電子顕微鏡で観察した写真を図10に示す。貫通穴は直線的なテーパ形状である。また、穴を軸方向に切断した後に穴の側面、すなわちレーザー加工面を観察した電子顕微鏡写真を図11に示す。電子顕微鏡による観察結果から、穴側面の加工面状態は、毛細管として使用可能な範囲であると考えられる。入口の直径が20µmで、出口の直径が約5µmの擬似毛細血管流路としてこの微小穴を利用する。

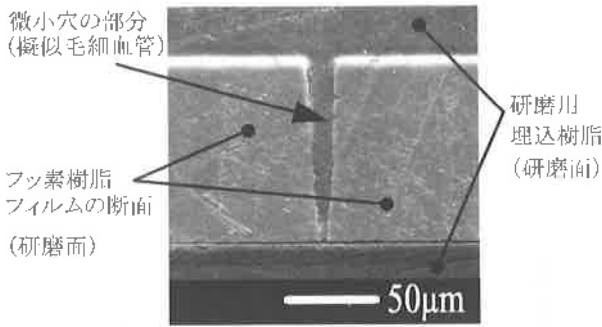


図10 微小穴加工部 (擬似毛細血管流路) の断面形状を観察した写真



図11 微小穴の側面 (加工面) の電子顕微鏡観察写真

3-3 フッ素樹脂へのレーザー加工面の評価

エキシマレーザーによって加工した面の改質の有無を調べることを目的として、はじめに日本分光製のフーリエ変換顕微赤外分光光度計を用いてFTIR (フーリエ変換赤外分光法) による加工部の評価を行った。図12はFTIR分析における透過法によってEFEPのフィルムを測定した結果であり、未加工のフィルムを測定した結果、および波長193nmのレーザーで厚さ30µm程度までフィルムの両面から加工したサンプルについて測定を行った結果である。加工時にフィルム内部で気泡が発生するような加工状態から考えて、樹脂表面だけではなく樹脂内部でのレーザーの吸収もあると判断されるが、分析結果の両者を比較すると透過スペクトルに大きな違いはなく、レーザー加工による大きな改質はないと考えられる。

また、加工部を流路に応用することから、加工面は濡れ性が重要である。そこで、濡れ性試験によるレーザー加工面の評価を行った。図13に示すように、液滴が膨張する時の接触角である前進接触角と液滴が収縮する時の接触角である後退接触角を測定した。液体は純水を使用し、水滴の液量は3µL以下、液量の変化率は1.5µL/minとした。EFEPの未加工面の前進接触角は85°であり、後退接触角は15°であった。一方、EFEPのレーザー加工面の前進接触角は87°であり、後退接触角は21°であった。EFEPの未加工面とレーザー加工面との接触角の測定結果を比較すると、表面粗さの影響と思われる僅かな差があ

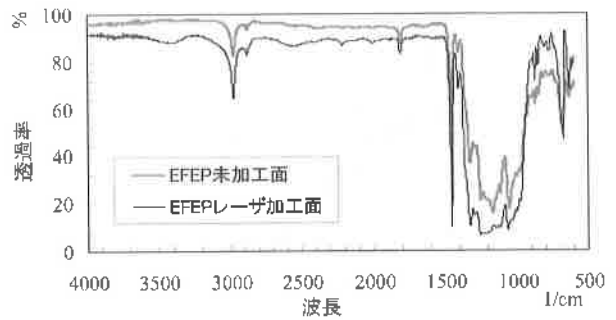


図12 FTIRによるレーザー加工部の測定結果

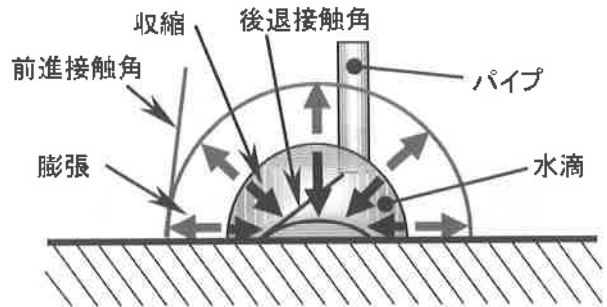


図13 濡れ性試験の模式図

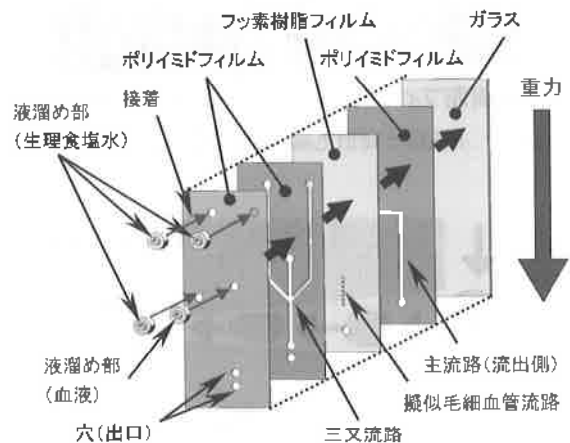


図14 赤血球変形能マイクロ流体デバイスの概略図

るだけで、濡れ性に大きな違いはみられなかった。

3-4 重力駆動による赤血球変形能の観察

赤血球変形能を観察することを目的とし、チップを垂直な状態にすることによって、微細流路内の液体に加わる重力を利用して、赤血球が擬似毛細血管流路を通過するかを調べた。エキシマレーザーを用いてフッ素樹脂フィルムに入口の直径が20µmで、出口の直径が5µmに加工した微小穴を一系列に加工し、これらの微小穴を長さ100µmの擬似毛細血管流路として応用し、さらに三又流路と擬似毛細血管流路を複合した立体流路を作製した。図14に赤血球変形能観察用マイクロ流体デバイスの概略図を示し、図15に複合立体流路の概略図を示す。図16は擬似毛細血管流路から血液が流出する側の矩形

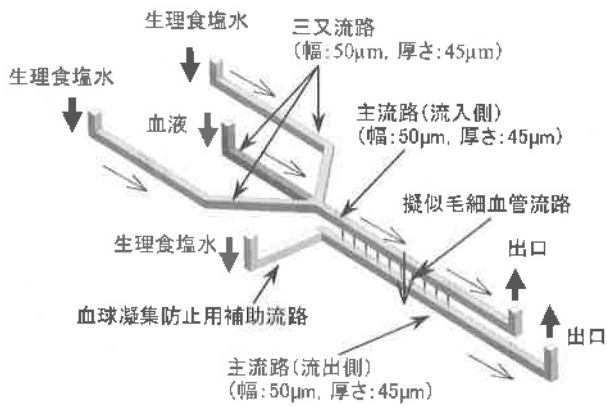


図15 複合立体流路の概略図

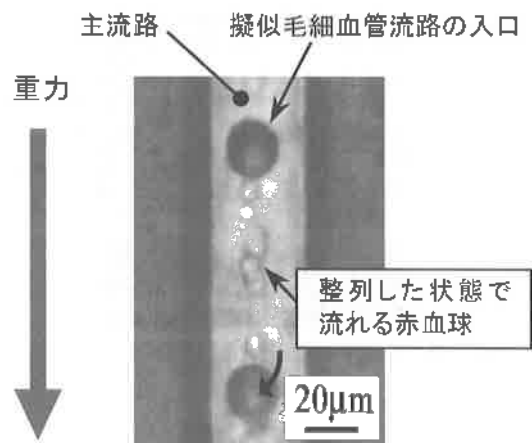


図18 重力駆動による擬似毛細血管の入口での血球の流れ

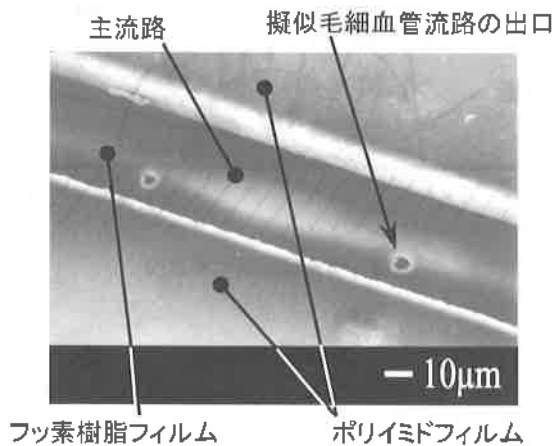


図16 主流路と擬似毛細血管流路出口の観察写真

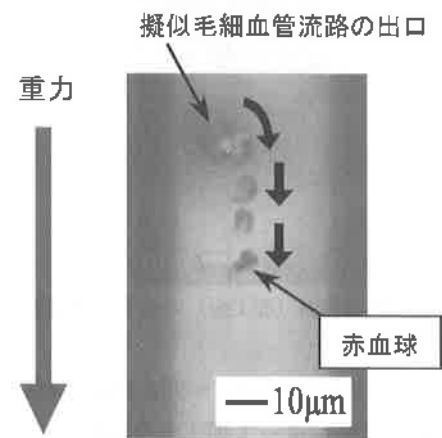


図19 重力駆動によって擬似毛細血管から流出する血球

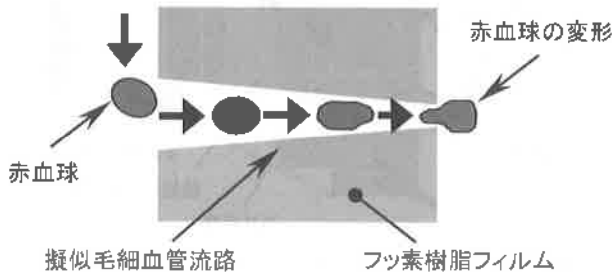


図17 擬似毛細血管流路を流れる血球の断面模式図

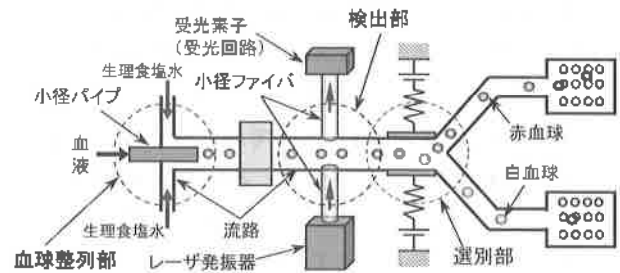


図20 小径ファイバとレーザー光による検出機構の構想図

断面流路の電子顕微鏡観察写真であり、図17は擬似毛細血管流路を流れる血球の模式図である。血液送液実験では、三又流路の中央支流路の液溜め部に、生理食塩水で50倍に希釈した血液を充填した。両サイドの支流路と補助流路の液溜め部に生理食塩水を充填した。送液実験では、液溜め部を上方にしてチップを垂直な状態にした。血液送液実験の結果、三又流路の合流位置で血液の流れ幅が絞られ、その後、整列した血液の一部が擬似毛細血管流路の中に流れ込んだ。図18は三又流路で流れ幅が絞られた血球が擬似毛細血管流路へ流入する主流路の光学顕微鏡観察写真である。図19は擬似毛細血管流路から流れ出る血球を観察した連続写真である。直径約8μmの赤血球が、重力の力によって出口直径5μmの

擬似毛細血管を詰まることなく通過することが確認できた。さらに、三又流路の合流位置で血球が整列しているため、血球が擬似毛細血管流路に対して同一方向から流入し、同一方向へ流出していることが確認できた。血球が擬似毛細血管流路を通過する時に発生する血球の衝突や干渉が軽減された。

3-5 血球検出の予備実験

これまでに、レーザー加工と樹脂ラミネート法を用いて三又構造の流路や小径パイプを挿入した立体流路を作製し、血球を一列に並べて流すマイクロ流体デバイスを検討した。前報では、図20に示すようにこれらの流路の

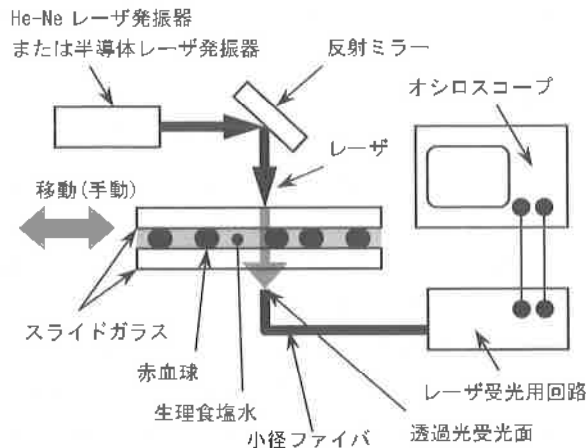


図21 検出予備実験の実験装置概略図

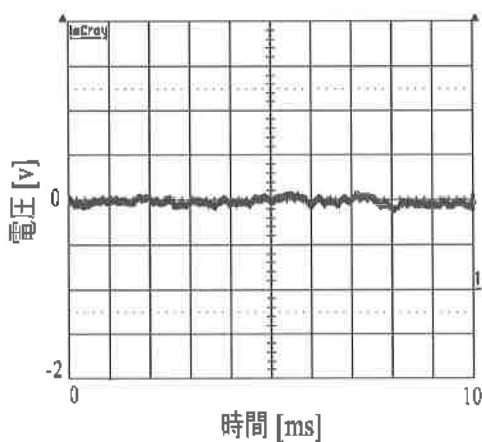


図22 ガラス上の血球をレーザーで検出した電圧波形

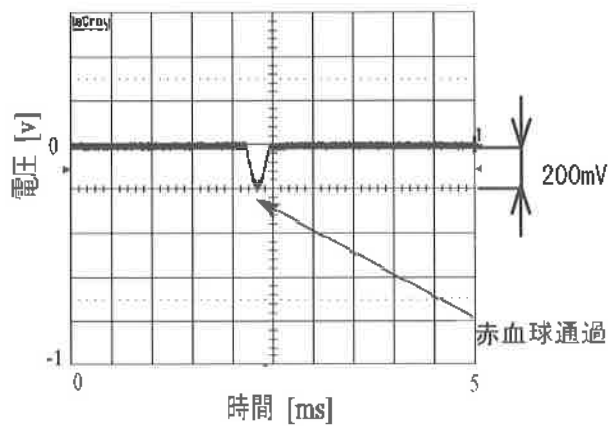


図23 改良した受光用電子回路を用いて検出した電圧波形

下流部に血球計数（カウント）を行うための検出用ファイバを配置し、ファイバでレーザーを照射・受光することによって流路内を流れる血球の検出を行うことを目的とした検出機構を提案した。さらに第一段階として赤血球の大きさに近い平均外径 $10\mu\text{m}$ の小径ビーズを用いた検出の予備実験を行った。本報では、第二段階として血液を用いた検出の予備実験を行った。

小径ファイバには外径 $140\mu\text{m}$ 、コア径 $50\mu\text{m}$ の石英

バルクファイバを用い、端面は研磨加工を行った、ファイバ端面のコア部分における表面粗さは $0.032\mu\text{mRa}$ 、 $0.481\mu\text{mPV}$ であり、比較的良好的な加工形状と加工面粗さが得られた。予備実験としてスライドガラス上に赤血球を重複が起らないように付着させ、その後スライドガラスを面方向に移動させることによって、レーザーの光路上を赤血球が通過する時のレーザー光の変化を測定する実験を行った。図21に予備実験で使用した実験装置の概略図を示す。レーザー光には、He-Neレーザーや半導体レーザー（グリーンレーザー）を用いて検討を行った。ガラス上の赤血球がレーザー光を遮光しながら通過した時の受光結果を図22に示す。予備実験の結果、赤血球によるレーザー光の遮光が小さいため、赤血球の通過による電圧波形の変化が僅かであることがわかった。そこで、受光用電子回路の改良を行った。回路改良後の予備実験の結果を図23に示す。受光用電子回路を改良することによって赤血球が通過した時の波形変化を確認することができた。今後は、小径ファイバを挿入したマイクロ流体デバイスを作製し、血球を一直線上に並べて流した後に血球検出を試み、血球計数の可能性について検討を行う予定である。

4. 結 言

マイクロ加工技術を用いて微細流路をもつマイクロ流体デバイスを作製した。さらに、ポンプや電気泳動などを使用せずに、重力を利用した流体駆動方法を提案し、血液送液実験を行った。また、血球数を計測するために、小径ファイバとレーザー光を用いた検出機構を提案し、血液を用いた検出の予備実験を行った。その結果は以下のとおりである。

- (1) 微細流路内の液体に加わる重力の力によって、血液を送液することができ、血球を一直線に並べて流すことができた。
- (2) エキシマレーザーによってフッ素樹脂フィルムEFEPに入口直径 $20\mu\text{m}$ 、出口直径 $5\mu\text{m}$ の微小穴を加工できた。さらに、加工面の改質の有無を調べた結果、大きな改質は確認されなかった。
- (3) 三叉流路と擬似毛細血管流路を複合したマイクロ流体デバイスを作製した。直径約 $8\mu\text{m}$ の赤血球が、重力の力によって出口直径 $5\mu\text{m}$ の擬似毛細血管流路を詰まることなく通過することが確認できた。
- (4) スライドガラス上に赤血球を付着させ、ファイバとレーザー光を用いた血球検出の予備実験を行った。予備実験の結果、赤血球が通過した時の波形変化を確認することができた。

今後は、血球を一直線上に並べて流した後に血球検出を試み、血球計数の可能性について検討を行う予定であ

る。そして、これらのマイクロ流体デバイスを血液検査に応用していきたい。

参考文献

- 1) 平尾一之編：基礎から学ぶナノテクノロジー，東京化学同人，p.197-222 (2003)
- 2) 丸山茂夫ら編：マイクロ・ナノ熱流体ハンドブック，(株)エヌティーエス，(2006)
- 3) 吉田潤一，北森武彦ら：マイクロリアクタテクノロジー～限らない可能性と課題～，(株)エヌティーエス，(2005)
- 4) (株)高分子学会編：ナノバイオー微細加工と計測技術の新展開，(株)エヌティーエス，p.38 (2005)
- 5) 江刺正喜監修：マイクロマシン，産業技術サービスセンター，p.462-501 (2002)
- 6) 日本経済新聞社・日経産業消費研究所編：日経先端技術，Vol.42，p.13-16 (2003)
- 7) T. Ichiki, Y. Sugiyama, R. Taura, T. Koidesawa and Y. Horiike: *Thin Solid Films* 435, p.62 (2003)
- 8) N. Kitamura, H. B. Kim and K. Ueno: *Trans. IEE Jpn.* 121-E, p.169 (2001)
- 9) F. Wagner and P. Hoffmann: *Proc. SPIE* 4088, p.337 (2000)
- 10) Y. Yoshida: *Proc. SPIE*, Vol.5063, p.189-192 (2003)
- 11) 吉田善一：マイクロマシン・センサシステム研究会講演集 (電気学会)，MSS-04, p.49 (2004)
- 12) T. Ichiki, T. Ujiie, T. Hara, Y. Horiike, and K. Yasuda: *Proc. Micro Total Analysis Systems '01*, p.271 (2001)
- 13) Y. Sun, L. C. Ng, S. K. Chua, X. M. Zhang, P. Droge, T. C. Ayi, P. H. Yap and A. Q. Liu: *Proc. Int. Conf. Electrical Engineering 2004*, p.267 (2004)
- 14) E. Maeda, M. Kataoka, Y. Shinohara, N. Kaji, M. Tokeshi and Y. Baba: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, Tokyo, p.813-815 (2006)
- 15) C. Robillot, J. Fitzpatrick, S. Grimmer, B. Kettle, D. Dadic and K. Drese: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, Tokyo, p.1229-1231 (2006)
- 16) Y. Horiike, H. Koda, S.-H. Chang, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Nagai and H. Ogawa: *Proc. Micro Total Analysis Systems 2006*, Tokyo, p.1558-1560 (2006)
- 17) H. Yamada, Y. Yoshida and N. Terada: *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol.44, No.12, p.8739-8741 (2005)
- 18) 山田博之，吉田善一，寺田信幸，藤原和徳，勝又信行：2005年度精密工学会春季大会講演論文集，p.571 (2005)
- 19) 山田博之，萩原茂，寺澤章裕，吉田善一，寺田信幸：山梨県工業技術センター研究報告，No.20, p.27-32 (2006)
- 20) 山田博之，萩原茂，寺澤章裕，吉田善一，寺田信幸：山梨県工業技術センター研究報告，No.21, p.27-32 (2007)