マルチ抗原検出マイクロチップ用レーザ表面処理技術の開発

Laser Surface Treatment of Plastics for a Single-Channel Multiple Immunoassays Chip

大家利彦*・田中正人*・山瓶子勇次*・中原伴徳*・阿部佳織*・片岡正俊*

Toshihiko OOIE, Masato TANAKA, Yuji YAMACHOSHI, Tomonori NAKAHARA,
Kaori ABE and Masatoshi KATAOKA

(Received March 9, 2011)

A novel micro immunoassay chip for detecting biomarkers in blood plasma has been developed by using an injector-based antibody immobilization. Since multiple detectors were made in a single channel, the chip was able to detect various biomarkers simultaneously. UV Laser processing of the substrate was performed to enhance immobilization of the antibody. In P1CP, which is a biomarker for osteoporosis, this simple plastic chip requires only 1 micro liter per lane of blood plasma and 30 min of reaction time, one twentieth the sample volume required for the ELISA-kit and six times the throughput.

Key Words: Microfluidic, Microchannel, Cover Film, Injection Mold, ArF Excimer Laser, Injector, Inkjet, PMMA, COC, Biomarker, Antibody, Antigen

1. 緒言

ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法は極微量の抗体、あるいは抗原の濃度を検出するのに用いられる。特異性の高い抗原抗体反応を利用し、酵素反応に基づく発色・発光等を測定することで、多種のタンパク質が混在する生体試料中から特定のタンパク質を検出・定量することができるが、マイクロプレートを用いる血液検査では、1項目あたり20～100 μl のサンプルが必要で、測定に数時間を要する。医療現場や在宅でのその場診断、すなわちPOCT(Point Of Care Testing)¹⁾用途では、必要サンプル量の低減と測定時間の短縮が不可欠である。我々は、インジェクタを用いて、プラスチック基板上のマイクロ流路底部に抗体溶液を吐出・固定化する独自の技術を用いて、マイクロ流路内でサンドイッチELISAを実現し、極微量サンプルでの抗原検出に成功した²⁻³⁾。これは、大型の分析装置を小型化しようとするMicro Total Analysis System (micro-TAS)⁴⁻¹⁰⁾の流れとは異なったアプローチであり、低コスト化が容易な点が特徴である。本手法における、抗体固定化面の表面処理としては、市販のマイクロプレートと同じポリマーコーティングを用いているが、ウェットプロセスであることから、(1)溝底面エッジ部の処理が不均一となりやすい、(2)処理に時間を要する等の課題がある。本研究では、UVレーザ照射による表面処理で、これらの課題を解決することを目的とする。

2. 実験方法

2.1 基板の加工及び表面処理方法

本研究においては、主として(1)環状ポリオレフィン(COC)射出成形基板に市販マイクロプレートと同一のポリマーコーティングを行ったもの(住友ベークライト(株)製、BS-X2321:特注品、厚さ0.7 mm)ならびに、(2)これと同一形状でコーティングのないものを用いた。共に、基板表面には幅300 μm 、深さ100 μm 、長さ60 mmの直線流路が4本あり、その両端は直径1 mmの貫通孔がある(Fig.1)。また、COCに加えて、基板材料に関する比較検討用として(3)射出成形PMMA¹¹⁻¹²⁾基板でも実験を行った。なお、

Fig.1 Injection molded base-chip for on-chip detection of P1CP.

* (独)産業技術総合研究所 四国センター健康工学研究部門 (〒761-0395 香川県高松市林町 2217-14)
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Health Research Institute
(2217-14 Hayashi-cho, Takamatsu, Kagawa 761-0395 Japan)

Fig.2 Schematic diagram of laser system used for the modification of chip surface.

Fig.3 Laser irradiation area on the bottom surface of microgroove.

PMMA 基板については、入手可能な基板の制約から流路深さはCOC基板と同じ $100\ \mu\text{m}$ だが、流路幅が $500\ \mu\text{m}$ と若干広めとなっている。

Fig.2 にレーザ照射用光学系の構成を示す。発振器からの出力ビームはホモジナイザで強度を均一化した後、マスクで中央部を切り出し、倍率 1/10 の縮小光学系で基板上的の流路底面に結像させた。レーザ照射範囲は Fig.3 に示すように、流路中の抗体固定化部位を中心に、幅 $350\ \mu\text{m}$ × 長さ $1\ \text{mm}$ の領域とした。なお、Fig.3 の上部にある正方形部は抗体吐出の際の位置決め用いるポジションマークである。

後述するように、市販のポリマーコーティングを施した基板 (1) を基準として、(2) 及び (3) の基板について、そのまま抗体固定化を行った場合と、所定のフルエンスの ArF エキシマレーザ照射をした後で抗体を固定化した場合について、抗原検出能力を比較した。

2.2 抗体固定化と流路化カバー

本実験では I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (PICP)¹³⁻¹⁴⁾ 用モノクローナル抗体 (タカラバイオ(株)製) を固定化液 (住友ベークライト(株)製) で $0.1\ \text{mg/ml}$ に希釈し

Fig.4 Imaging of ejected droplets using a CCD camera equipped with synchronized strobe light.

Fig.5 Images of ejected droplets. Antibody solution for PICP, (a) and for H-FABP, (b).

た後、圧電駆動型インジェクタ (クラスターテクノロジー(株)製、パルスインジェクター) を用いて、チップ上のマイクロ流路底面に一流路あたり複数点に対して吐出・固定化を行った。また、抗ヒト心臓由来脂肪酸結合蛋白 (H-FABP) 抗体を同じ流路内に抗 PICP 抗体と同様に吐出・固定化し、PICP 検出におけるネガティブコントロールとして用いた。吐出・固定化された抗体溶液量は、Fig.4 に示すように、吐出液滴の顕微鏡拡大像をストロボ撮影し、直径と液滴数により算出した。PICP ならびに H-FABP の吐出液滴画像の例を Fig.5 に示す。この例ではいずれも液滴の直径は $56\ \mu\text{m}$ 、体積は $92\ \text{pl}$ である。固定化の際には $50 \sim 200$ 回の吐出を行っており、1 点あたりの抗体溶液量は $4.6 \sim 18.4\ \text{nl}$ となる。

流路底面に抗体を吐出・固定化した後は粘着剤塗布フィルム (東洋インキ製造(株)製、特注品) により、流路をカバーし、マイクロ溝を流路、両端の貫通孔をそれぞれ試料導入・排出ポートとする評価用チップを構成した。

2.3 抗原検出能の評価

評価用チップのフィルム面を下とし、マイクロプレートでのサンドイッチ ELISA に準じた下記のプロトコルにより PICP の検出を行った。

- (1) 室温で4時間放置し、自然乾燥
- (2) 洗浄液導入
- (3) ブロッキング処理（住友ベークライト㈱製試薬）
- (4) 洗浄液導入
- (5) P1CP 溶液とペルオキシターゼ標識化2次抗体の混合液を導入
- (6) 30分間放置
- (7) 化学発光基質導入
- (8) 発光強度測定

発光強度の測定には、冷却 CCD カメラによる画像解析装置（GE ヘルスケア㈱製、LAS4010）を用いた。

3. 実験結果と考察

3.1 レーザ照射に伴う流路底面の変化

COC マイクロ流路に対し種々のフルエンスで1パルスのレーザー照射を行った後の流路外観を Fig.6 に示す。0.44 J/cm² では外観上の変化が見られないが、0.88 J/cm² では、周辺部の透明度が低下しはじめ、フルエンスの上昇に伴い中央部に広がっている。顕微鏡観察の結果、透明度低下領域では表面での微細凹凸の形成と微粒子付着が認められた。COC、PMMA ともにレーザー照射基板については、蒸留水を用いた超音波洗浄を行った後に抗体の固定化を行っている。

3.2 COC 基板における固定化と抗原検出

(1) 未処理、(2) フルエンス 0.44 J/cm² の1パルス照射によるレーザー処理、(3) ポリマーコート of 3 種類の COC 基板に対し、それぞれ、50 滴 (4.6 nl) の吐出を行った際の付着

Fig.6 Photographs of microgrooves after laser irradiation at various fluences.

液滴の外観を Fig.7 に示す。

ポリマーコート面では P1CP の液滴が流路幅一杯に広がっているのに対し、H-FABP は小さなドット状となっており、ポリマーコート面に対する濡れ性に大きな違いが見られる。これに対して、未処理面では2種類の抗体溶液で差は見られない。レーザー処理面と未処理面の間でも差は認められない。

それぞれ固定化した抗体について、640 ng/ml の P1CP 溶液を導入し、さらに発光強度測定段階に至った際の画像が Fig.8 である。図中には3種類の基板それぞれについて、ネガティブコントロールとしての H-FABP 検出点が1カ所(左側の四角内)と P1CP 検出点が4カ所存在する。それぞれ検出点の信号を積分し、その数値と標準偏差を求めた結果

	P1CP	H-FABP
Untreated		
Laser processed		
Polymer coated		

Fig.7 Photographs of ejected droplets on the bottom surface of microgrooves.

Fig.8 An image of chemiluminescence from detection dots with a P1CP antigen solution of 640 ng/ml in density. Exposure time was 20 min.

を Fig.9 に示す。フルエンスわずか 0.44 J/cm^2 と低強度のレーザを 1 パルス照射するだけで、未処理面と比べて PICP 検出感度の向上が認められ、信号のばらつきも抑制されることがわかった。

検出感度向上に向け、吐出液滴数を 200 (18.4 nl) として、種々のレーザフルエンスでの処理面に対し抗体溶液の吐出を行った時の液滴画像を Fig.10 に示す。200 滴の吐出では液滴が広がりやすいポリマーコート面の場合、ほとんどのケースで吐出中に液滴が壁面と底面のエッジ部に移行してしまい、安定した固定化が難しい。これに対し、前述のようにレーザ照射面では液滴の広がりが小さく、壁面に付着しにくいため、比較的安定した固定化が可能であった。レーザフルエンスが 1.76 J/cm^2 まで増大しても、付着抗体液滴の大きさ、形状は未照射面とほとんど差が見られない。これに対して、PICP 検出信号については、レーザフルエンスの増大に伴って数値が上昇し、同時にばらつきが縮小す

Fig.9 Comparison of signal level and relative standard deviation of each chip.

るという結果が得られた。 1.76 J/cm^2 ではほぼポリマーコートに匹敵する信号レベルとなっている。

3.3 PMMA 基板における固定化と抗原検出

ArF エキシマレーザ照射による表面処理ののち抗体を吐出・固定化することで COC 表面での PICP 検出感度が向上することがわかったため、COC と比べてより親水性の樹脂である PMMA について、同様の検討を行った。PMMA では COC よりも低いレーザフルエンスで表面の除去が起るため、レーザフルエンスは COC を用いた実験での最小値よりもさらに低い 0.36 J/cm^2 とした。

Fig.11 Effect of laser fluence on signal level in PICP detection by using sandwich ELISA method in microchannel.

	Untreated	Laser fluence (J/cm^2)				Polymer coated
		0.44	0.88	1.32	1.76	
P1CP						
H-FABP						

Fig.10 Antibody dots for P1CP and H-FABP on untreated, laser irradiated and polymer coated COC chip.

Fig.12 Images of immobilized antibody on the bottom surface and their signal levels in P1CP detection.

Fig.12 は PMMA 流路底面での抗体液滴画像と P1CP 抗原 (640 ng/ml) 導入時の検出信号強度をポリマーコート COC と比較して示している。ポリマーコート面と比べて未処理面とレーザー照射面の広がり小さいこと、未処理面とレーザー照射面で広がり差が認められないことは COC の場合と同様であるが、レーザー照射面での抗 H-FABP 抗体の広がり小さめである点が異なっている。信号強度はレーザー照射により 3 倍以上に向上し、大幅な感度向上が確認できた。実験のために用意できたチップの流路幅の違いから、反応に関与する P1CP ならびに 2 次抗体の数異なるためポリマーコーティングとの直接比較はできないが、流路幅の比 (1.7) 以上の信号レベルが得られており、COC の場合と同様、ポリマーコーティングと同等以上の効果があるものと推察される。

3.4 検出感度向上因子

同一抗体による P1CP 検出感度に関わる因子としては、

- (1) 抗体固定化密度の向上
- (2) 抗体固定化面積の拡大
- (3) 抗体認識部位の配向性
- (4) 抗体の活性度
- (5) 非特異吸着によるバックグラウンド上昇

といったものがあるが、このうち、(5) については、実際の発光信号測定においてレーザー照射に伴う変化は認められない。同一条件での吐出固定化で、かつ物理吸着であることから (4) も除外される。特定の官能基を導入している訳ではないため、(3) の可能性も低い。レーザーフルエンス増大時の表面形状の変化との対応から (2) の影響は少なからず存在するが、光学的に変化がない 0.44 J/cm^2 でも明確な効果が得られていることから、主要因とは言えない。

残るは (1) の固定化密度の向上である。ArF ならびに KrF エキシマレーザの照射に伴い、分子鎖が切断されて、溶媒に対する感受性が向上することが知られており¹⁵⁾、レー

ザ照射により基板表面に露出した分子鎖末端が増えることで、抗体の物理吸着サイトが増えたのではないかと推察している。

4. 結論

本研究では、インジェクタを用いてマイクロ流路内に抗体を直接固定化して抗原を検出する新しい流路型マイクロチップに向け、レーザー表面処理を提案し、P1CP 濃度測定チップにおけるその効果を市販のマイクロプレートに使われるポリマーコーティングと比較した。

疎水性の COC、親水性の PMMA いずれについても波長 193 nm の ArF エキシマレーザを照射することで P1CP 濃度測定チップの感度はポリマーコーティング時と同等あるいはそれ以上に向上した。必要なレーザーフルエンスは非常に低く、1 パルスの照射で済むため高スループットが実現できる。ドライプロセスであることから、流路形状による処理の偏りが生じにくく、狭隘部での表面張力の影響がないなど、流路型マイクロチップに適した表面処理法である。

引用文献

- 1) E. Eteshola, D. Leckband: Sensors and Actuators B-Chemical, 72, (2001) 129.
- 2) M. Kataoka, S. Yatsushiro, S. Yamamura, M. Tanaka, T. Ooie: Synthesiology, 3(1), (2010)43.
- 3) 片岡正俊、八代聖基、日野真美、木戸淳一、板東美香、大家利彦: 歯学展望、113(4), (2009)654.
- 4) B. Graß, R. Hergenröder, A. Neyer and D. Siepe: J. Sep. Sci. 25, (2002) 135.
- 5) J. Wang, M. Pumera, M. P. Chatrathi, A. Escarpa, R. Konrad, A. Griebel, W. Dörner and H. Löwe: Electrophoresis 23, (2002) 596.
- 6) R. M. Mc Cormick, R. J. Nelson, M. G. Alonso-Amigo, D. J. Benvegnu and H. H. Hooper: Anal. Chem. 69, (1997)2626.
- 7) X. M. Zhou, Z. P. Dai, X. Liu, Y. Luo, H. Wang and B. C. Lin: J. Sep. Sci. 28, (2005) 225.
- 8) J. Brandrup and E. H. Immergut, Polymer Handbook 3rd ed. ISBN 0-471-812447-7, V/77.
- 9) B. Crist, M. E. Marhic, G. Raviv and M. Epstein: J. Appl. Phys., 51(2), (1980) 1160.
- 10) K. Shimura, Y. Koyama, T. Kitamori: Molecular & Cellular Proteomics, 5(10), (2006)S311.
- 11) E. Tamaki, A. Hibara, H. Kim, M. Tokeshi, T. Kitamori: J. Chromatography A. 1137(2), (2006)256.
- 12) A. Oki, M. Takai, H. Ogawa, Y. Takamura, T. Fukasawa, J. Kikuchi, Y. Ito, T. Ichiki and Y. Horiike: J. Appl. Phys 42, (2003)3722.
- 13) Taubman, M.B., Goldberg, B., Sherr, C. J.: Radioimmunoassay for human procollagen, Science, 186, (1974) 1115.
- 14) Savolainen, E. R., Goldberg, B., Leo, M. A., et al., Alcoholism: Chemical and Experimental Research, 8, (1984) 384.
- 15) H. Miyashita, T. Ooie, T. Nakahara, Y. Baba: J. Micronano Eng., 3(2), (2008)88.