インクジェット式積層造形法によるマイクロ投入 ポートを有するマイクロ流体チップの製作と評価*

新井 史人^{*1}, 前田 憲利^{*2}, 福田 敏男^{*1}

Fabrication of Micro Fluidic Chip with Micro-Injection Port by Ink-Jet Rapid Prototyping Method and Its Evaluation

Fumihito ARAI^{*3}, Kazutoshi MAEDA and Toshio FUKUDA

^{*3}Department of Micro System Engineering, Nagoya University,
1 Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi, 464-8603 Japan

It is important to reduce consumption of biomedical reagent, since some of them are quite expensive or some may cause environmental pollution. There have been reported on the biochemical micro-chips in the field of μ -TAS (micro total analysis systems), and they contributed to reduce the amount of sample liquids as well as reagent. However, most of the reagents are injected into the chip from outside through a tube. There is large dead volume in such operation. Therefore, here we propose a novel micro-injection port to minimize the dead volume. We employed a micro-valve which utilizes thermal sol-gel transformation of thermosensitive hydrogel. The valve is closed by heating the microelectrode. The three-dimensional microchannel structure is fabricated by the newly developed microfabrication technique employing the Ink-jet Rapid Prototyping Method. We succeeded in reducing consumption of reagent for more than 99% compared with the conventional operation.

Key Words: Bio-MEMS, μ -TAS, Injection, Poly(N-isopropylacrylamide), Ink-Jet Rapid Prototyping, PDMS, Valve

1 序論

医療や農業などに代表される広範な分野においてバイオテクノロジーを活用した研究が行われているが、とりわけ細胞の集団の中から単一細胞を取り出して試薬などの条件を与えることで、その特性を調査することが望まれている。フローサイトメトリー(FCM)や蛍光セルソーター(FACS)は高速に細胞を分離することができる装置として広く用いられている¹が、大掛かりになりがちであった。近年その小型化やマイクロチップを用いた研究が盛んになっている^{2,5}。我々が提案するオンチップバイオシステムは、従来とは異なる原理に基づき目標細胞の分離を分離チップ内で行い、その場での観察機能を有する⁶。

分離チップは内部のマイクロ流路とポートを有する

ことで、微量の試薬やサンプルの使用を可能にしている。しかし、実際には外界(マクロ領域)からチップ内(マイクロ領域)に試薬を導入する際に損失が発生してしまう。例として、これまで我々が研究してきた分離チップ⁷では、試薬を外付けのチューブを経由して流路内に供給しているために試薬が余分に消費されてしまう。実際に必要な量は流路内に満たされる部分の一部だけであり、少なくともチューブの体積分は余分となる。例えば、図1に示す例では、試薬が流れるT字流路の斜線部分(図1(a))とチューブ($\phi 1$ mm, 長さ 10 cm)を加えた流路(図1(b))の体積より、少なくとも99%以上もの試薬が余分に浪費されてしまうことになる。チューブにはバルブを設置する必要性から、チューブを単純に短くできない。一方、チューブを全く用いないで必要量の試薬をチップ内部に導入する手段としては、ディスペンサーから微量の試薬を外部から滴下するシステム^{8,9}があるが、これまでマイクロリアクターでの試薬の反応を実証した研究はなされていない。

試薬には高価なものや、廃液が環境に悪影響を及ぼすものが多く、消費量を削減することはコスト面や環

* 原稿受付 2004年3月5日。

^{*1} 正員、名古屋大学大学院工学研究科(〒464-8603 名古屋市千種区不老町1)。

^{*2} 名古屋大学大学院工学研究科。

E-mail: arai@mein.nagoya-u.ac.jp

境面において有効である。そこで我々は図 2 に示す、マイクロ投入ポートとマイクロバルブを有する新しい分離チップを提案した¹⁰。これは試薬をマイクロピペットの先端部からマイクロ投入ポートに投入することにより、余分な経路を通らずに少量で試薬投入を行うための投入口である。並列培養のような多数の試薬投入口を必要とする際には、マイクロ投入ポートを採用することでかさばるチューブ数を減少でき、省スペースなチップを製作できる。

マイクロ投入ポートを組み込むには、三次元的なマイクロ流路をチップ内に作成する必要がある。我々は立体的なマイクロ流路を有するマイクロ流体チップを、PDMS (polydimethylsiloxane) に転写した凸型と、インクジェット式積層造形法で製作した部材を組み合わせ、型取りし、最終的に部材をロストワックスすることで作成した。提案手法により複雑な三次元マイクロ流路を比較的容易に製作することができた。本論文では、マイクロ投入ポートをもつマイクロ流体チップ（以下、チップ）を製作し、試薬の投入実験と評価を行ったので報告する。

Fig. 1 Comparison of consumption of reagent

Fig. 2 Concept of micro-injection port

2 マイクロ投入ポート

2.1 マイクロバルブ

試薬投入時はポンプを用いてチップ流路内に負圧を

かけている。ポンプを止めても試薬の吸引が続いてしまうためにチップ内部に気泡が混入してしまう可能性が高い。これを防止するために、マイクロ投入ポートにはマイクロバルブが必要不可欠である。

マイクロバルブに関する研究は数多く発表されており、電磁式^{11,12}、空気圧変化式¹³、パラフィンの温度変化による形状変化によるもの¹⁴や流路表面に紫外光を当てて濡れ性を変化させるもの¹⁵がある。またハイドロゲルの pH を変化させることで膨潤させたり¹⁶、熱ゲル化物質を赤外線レーザーで加熱することによりバルブ機能をもたせているもの¹⁷もあり、特に熱ゲル化物質を用いる方式は複雑な機構を必要としないという利点を持つ。

本論文では、内部流体に熱ゲル化物質を混合させておき、電極を通電加熱することでゲル化させてバルブ機能をもたせる手法^{10,18,19}を用いた。電極を採用することにより、レーザーに比べて低コストに、視野外でもバルブの開閉ができるようになる。これによってバルブを閉じつつ細胞観察を行えるようになった。図 3 に提案したバルブ（以下、熱ゲルバルブ）の開閉動作の概要を示す。

図 3(a)より、透明 (ITO) 電極を通電させている間、熱ゲル化物質は局所的に加熱されてゲル化する。これが弁となって流路内外を隔てる。また図 3(b)より、ITO 電極への通電を切ると冷却されてゾル化するため、流路に負圧をかけることで試薬を投入することができる。

Fig. 3 Closed and open state of thermal gel valve

2.2 熱ゲル化物質

本論文では熱ゲル化物質にポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAAm)を用いた。PNIPAAm は低温では水溶性であるが、加熱すると約 32℃で急激な脱水和を生じ、疎水性相互作用により高分子鎖が凝集して相分離を起こす。また、架橋によって不溶化した PNIPAAm ゲルでは、32℃よりも低温側で膨潤し、それよりも高温側では収縮する²⁰。図 4 に PNIPAAm の各温度における粘度のグラフを示す。

Fig. 4 Viscosity of PNIPAAm (10 wt% solution)

今回の実験では10%濃度のPNIPAAmを用いた。図4のグラフより、PNIPAAmの完全ゲル化温度がおおよそ32°C以上、完全ゾル化温度が20°C以下であることが推測される。また、ゾル-ゲル反応が可逆性をもっていることも分かる。

このPNIPAAmゲルは、表面に緻密なスキン層ができることにより、高温で物質透過性が低下するためバルブに応用しやすい。この特徴は薬物治療において、放出を制御したターゲット部位に選択的に薬物を運ぶ新しい薬物送達法(DDS)としても期待されている。

PNIPAAmの毒性について考えてみると、一般的にアクリルアミドモノマーは神経毒をもつモノマーとして知られているが、*N*-イソプロピルアクリルアミドモノマーはイソプロピル基がアクリルアミドモノマー側鎖に結合しているためにアクリルアミドモノマーの持つ本来の毒性は緩和されている。この*N*-イソプロピルアクリルアミドモノマーを化学反応によりポリマー化すると、モノマー特有の反応性がなくなり毒性も消失する。このポリマーの安全性は化粧品の原料として使えるレベルであることが知られており、今回の実験で使ったイースト菌への影響も見られなかった。

3 マイクロ流体チップ

3.1 PDMS 転写法

我々は立体的なマイクロ流路を有するチップを、PDMSに転写した凸型と、インクジェット式積層造形法で製作した部材を組み合わせてかたどりし、最終的に部材をロストワックスすることで作成した。

PDMSを用いたチップの製作法は、等方性・異方性エッチングやLIGAプロセスによる方法と比べて工程が単純で、低コスト化やディスポーザブル化に対して

有効な手法である^{21, 22}。しかしPDMSは疎水性であるために、疎水性相互作用力等の力により型とPDMSが強く付着してしまい、剥離が困難となる場合がある。

この問題に対しては、型の表面に酸素プラズマ処理を施すことで表面の疎水性を親水性へと改質し、PDMSの剥離性を向上させる方法がある²¹。型材料として、我々はシリコンやPDMSを利用した。酸素プラズマ処理をシリコンやPDMSに施すと表面が親水性へと改質され、疎水性の物質との吸着力が減少した。酸素プラズマ処理を用いたPDMSマイクロ流路の製作工程を図5に示す。

Fig. 5 Process of making microchannel by PDMS

3.2 インクジェット式積層造形法

多品種少量生産のニーズが高まる産業界では、開発期間の短縮と開発費用の削減を迫られている。積層造形法はこのような新製品開発における試作品を、迅速かつ安価に製造する手法として普及した²³。積層造形法の特徴として、CADデータ作成後の工程が自動化されている、複雑な内部形状も造形可能、装置が小規模、といった点が挙げられる。

積層造形法は各種開発されており、代表的なものには光造形法がありその研究も盛んであるが、我々はロストワックス鋳造することで、造形時間の短縮化が可能であるという利点からインクジェット式積層造形法を採用した。図6にインクジェット式積層造形法の概要を示す。

Fig. 6 Process of ink-jet rapid prototyping

光造形法が光硬化性樹脂にレーザを照射して造形を行うのに対し、インクジェット式積層造形法はインクジェットのノズルより加熱溶融したワックスの液滴を連続的に滴下させ堆積固化させる。インクジェットを走査し点状の粒を連ねることにより線状物が形成でき、これを面状に走査することにより薄層をつくることができる。実際の造形機は高さ方向の寸法精度を出すために、薄層を作った後表面の切削加工を行っている。また、サポートとしては2本のノズルを使い一方のノズルで融点の低いワックスを用い、その部分だけ後工程で加熱して除去する。得られたモデルはアセトンで容易に溶けるためロストワックス鑄造に適しており、立体的な流路形状の型抜きを可能とする。

これまで、三次元的なマイクロ流路を有するチップを製作する方法としては、マイクロ光造形による方法²⁴や、PDMSなどのポリマーをシート状に加工して積層する方法²⁵などが知られている。提案するアプローチで三次元的なマイクロ流路をもつマイクロ流体チップを製作した例はこれまでほとんど報告されていない。本手法は、三次元造形する部材の体積が比較的小さいため、造形時間を短縮できる利点を有している。また、シートを組み立てる際の厳密な位置合わせが不要である利点を有している。複雑な三次元マイクロ流路を製作することができるのはいうまでもない。

3.3 マイクロ流体チップの製作

高精度なPDMS転写法とロストワックス鑄造法を組み合わせてチップの製作を行った。まずPDMS転写法でマイクロ流路の凸型を製作し、その表面を酸素プラズマ処理し、同時にチューブ連結部をインクジェット式積層造形法で製作する。それらを組み合わせて凸型を用意する(図7(a))。これをPDMSに転写した後、チューブ連結部をロストワックスして、ITO電極をパターンニングしたカバーガラス(厚さ160 μm)を接着させ

る(図7(b))。これにより高精度かつ立体的な流路形状を容易に得られた。

Fig. 7 Fabrication of micro fluidic chip

4 評価実験

4.1 評価実験に用いたシステム

実験で用いたシステム構成を図8に示す。倒立顕微鏡下の観察にはCCDカメラを用い、XY自動ステージ上にセットしたチップ内部を観察する。また試薬投入の際にはドレインポート(図2)側に備えたチューブポンプ(ISM935, ISMATEC社製)で吸引を行う。蛍光観察時には水銀ランプを光源として励起された光による画像をCCDカメラからモニタに写している。

Fig. 8 Experiment system

4.2 バルブ機能の確認実験

図9に示すようにあらかじめPNIPAAmの10%水溶液を流路内に満たし、3Vの電圧を印加して熱ゲルバルブを閉じドレインポートを開いた状態で、可視化剤として染色液(メチレンブルー)を投入し、メチレンブルーの拡散が抑えられているか確認する実験を行った。本実験ではチューブポンプによる吸引をせず、ドレインポートは常に開放状態とした。

Fig. 9 Detail of thermal gel valve function

投入 1 時間後、熱ゲルバルブ上流では PNIPAAm 水溶液にメチレンブルーが拡散していた。一方熱ゲルバルブ下流では PNIPAAm 水溶液は染色されていなかった。また、染色されている部分とされていない部分で界面が形成されており、界面の前後で染色液の濃度が急激に変化している。これらから熱ゲルバルブはメチレンブルーの拡散を抑えていることがわかる。

次に、熱ゲルバルブを開閉した際の流れの変化を観察し、バルブ機能の確認を行った。図 10 は流線の可視化のために直径 $10\ \mu\text{m}$ のマイクロビーズを混入させて、流路内の 3 箇所での流線と流れ方向の変化を示したものである。この実験ではサンプル導入側のポートからチューブポンプで加圧してマイクロビーズを流した。初期状態では熱ゲルバルブは開放状態にある。3 V の電圧を電極に印加してバルブを閉めると、流れ方向がマイクロ投入ポート方向からドレインポート方向に変わり、熱ゲルバルブがマイクロ投入ポート方向への流れを遮断していることを確認した。また流れ方向が切り替わるまでに 0.5 秒かかることから、熱ゲルバルブの応答時間が 0.5 秒以内であることが推測される。

Fig. 10 Streamlines changed by switching thermal gel valve

4.3 試薬の投入時間の測定

試薬を投入する際は、ドレインポートからチューブポンプで吸引するが、チューブポンプで強く長時間吸引すると試薬が流れ去ってマイクロ投入ポートから空気が混入してしまう。それを防止するためにも試薬が観察領域に到達したらポンプを停止する必要がある。ポンプ停止のタイミングを知るためにマイクロ流路内への試薬投入速度と観察領域への試薬到達時間の関係を調べた。先ほどの実験と同様に、試薬としてメチレンブルーを投入することで可視化する。図 11 に実験の手順を示す。まず状態(1)では、流路内に PNIPAAm 水溶液を満たしておき、熱ゲルバルブは閉じておく。次の状態(2)ではポンプを動作させて、熱ゲルバルブを開けることで、あらかじめマイクロ投入ポートに取り付けておいたピペット先端部内のメチレンブルーが投入されていく。試薬が観察領域に達したらポンプを止め、熱ゲルバルブを閉じることで空気の混入を防止する(状態(3))。このとき、状態(1)から状態(2)でメチレンブルーが観察領域に到達するまでにかかった時間を試薬到達時間とする。実験時の室温は 26°C で、その時の PNIPAAm 水溶液の粘度は 18.5mPas である。

Fig. 11 Process of experiment to measure arrival time of reagent

Fig. 12 Relation of pump speed and arrival time of reagent

図 12 に実験結果および理論値のグラフを示す。尚、実験ではチューブポンプの設定により流量を変化させ、

流速はこの流量を流路断面積で除算することで求めた。また、流速の理論値(点線)は、マイクロ投入ポートから観測地点までの距離 6 mm を各流速で除算したものである。このグラフから、流路内の速度が速くなるにつれて試薬到達時間が理論値と同様に反比例的に短くなっていることがわかり、実験結果は妥当なものと判断できる。

ただし、ポンプ吸引を止めた瞬間は、サンプル導入側からドレイン側にかけて負の圧力勾配が生じており、ポンプを止める前の吸引速度が速くなるほど、ポンプを止めた後も試薬が流れ去りやすいという現象が確認された。しかし、一番遅い流速 $582.5 \mu\text{m/s}$ ならばメチレンブルーが流れ去ることはないので、この速度で試薬投入実験を行うことにする。

4.4 試薬投入実験

マイクロ投入ポートから試薬を投入することでどれだけの消費量削減ができるか調べるため、流路中の微生物サンプルを捕捉して、マイクロ投入ポートから投入した蛍光試薬で蛍光観察を行った。微生物サンプルにはイースト菌を、サンプルの捕捉には光硬化性樹脂である ENT-2000 (関西ペイント) を使用した。光硬化性樹脂とは一般に未架橋の高分子であるモノマーやオリゴマー(プレポリマー)に光増感剤を添加したものであり、特定の波長の光を照射することにより架橋を誘発してポリマー化させることができるものである。今回用いた ENT-2000 は水銀ランプの近紫外光を照射することで硬化する。

実験の手順を図 13 に示す。流路中に光硬化性樹脂とイーストを流し(状態(1))、近紫外光を局所的に照射することでイースト菌を樹脂中に捕捉した後、洗浄する(状態(2))。次に PNIPAAm 水溶液を流して熱ゲルバルブを閉じ(状態(3))、蛍光試薬を投入する(状態(4)、状態(5))。蛍光試薬には CFDA (5 (and 6)-carboxyfluorescein diacetate) (励起波長 494 nm, 蛍光波長 517 nm) を用いた。これは生細胞内でエステラーゼという酵素によって加水分解されることにより蛍光を発する性質のため細胞の生死判定に用いられている。尚、PNIPAAm 水溶液と蛍光試薬単体との反応は実験では見られなかった。

Fig. 13 Experiment process

図 14 に示す通り、固定したイースト菌の蛍光反応を観察することに成功した。蛍光試薬の投入量は 0.5 ml で、図 1(b)のチューブ経由での試薬投入による消費量に対して 99.4%の消費量削減を果たした。

Fig. 14 Experiment of fluorescent dyeing

5 まとめ

本論文では試薬をマイクロピペットの先端部からマイクロ投入ポートに投入することにより、試薬反応実験をオンチップで実施し、試薬消費量を削減することが可能なチップを提案した。三次元のマイクロ流路を有するチップは、インクジェット式積層造形法により作られた型のロストワックス法と PDMS 転写法を組み合わせた手法で製作した。流路内に熱ゲルバルブを設置して気泡混入を防止し、試薬投入時間の計測と試薬投入・反応観察実験を行った。これらの実験から試薬消費量の大幅な削減を達成し、マイクロ投入ポートの有効性を示した。

今回行った試薬投入実験は短時間で反応が分かるものであったが、培養などの長時間の実験を行う場合には拡散の問題も考える必要があり、今後の課題となる。

謝辞

本研究は科学技術振興機構さきがけ研究 2 1 の研究成果の一部である。関係各位に感謝する。

参考文献

- [1] M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn, *Flow Cytometry and Sorting*, Wiley-Liss, New York, USA, 2nd edn., 1991
- [2] G. Fuhr, R. Hagedorn, T. Mueller, B. Wagner and W. Benecke, *Proc. IEEE MEMS*, 1991, 259-264
- [3] T. Schnelle, T. Mueller, G. Gradl, S. G. Shirley, and G. Fuhr, *J. Electrostatics*, 1999, 47, 121-132.
- [4] A. Wolff, U. D. Larsen, G. Blankenstein, J. Philip, and P. Tellemann, *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems 1998 (μ -TAS1998)*, 1998, pp. 77-80
- [5] J. Krueger, K. Singh, A. O'Neill, C. Jackson, A. Morrison, and P. O'Brien, *J. Micromech. Microeng.*, 2002, 12, 486-494
- [6] F. Arai, A. Ichikawa, T. Fukuda and T. Katsuragi, *Analyst*, 2003, 128(6), 547-551
- [7] F. Arai, A. Ichikawa, T. Fukuda and T. Katsuragi, *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems2003 (μ -TAS2003)*, 2003, pp. 757-760
- [8] G. Jesson, G. Kylberg and P. Andersson, *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems2003 (μ -TAS2003)*, 2003, pp. 155-158
- [9] S. Bohm, T. Veenstra, A. v. d. Berg, N. Chiem and J. Gilbert, *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems2003 (μ -TAS2002)*, 2002, pp. 61-63
- [10] 新井史人, 前田憲利, 福田敏男, 微生物反応解析チップのためのマイクロ投入ポートに関する研究, 第8回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 早大, 2003, p.71
- [11] M. Capanu, J. G. Boyd, IV, and P. J. Hesketh, Member, *IEEE, J. Microelectromech.*, 2000, 9(2), 181-189
- [12] B. Bae, N. Kim, H. Kee, S.H. Kim, Y. Lee, S. Lee, and Kyihwan Park, Member, *IEEE, J. Microelectromech.*, 2002, 11(4), 344-354
- [13] A. Dodge, M.C. Jullien, F. Okkels, and P. Tabeling, *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems2003 (μ -TAS2003)*, 2003, pp. 935-938
- [14] E. T. Carlen and C. H. Mastrangelo, Member, *IEEE, J. MICROELECTROMECHANICAL SYSTEMS*, 2002, 11(5), 408-420
- [15] H. Nagai, J. Takahashi and S. Wakida, *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems2003 (μ -TAS2003)*, 2003, pp. 927-930
- [16] R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai and T. Okano, *Nature*, 1995, 374(16), 240-242
- [17] Y. Shirasaki, H. Makazu, K. Tashiro, S. Ikeda, T. Sekiguchi, S. Shoji, S. Tsukita, and T. Fumatsu, *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems2002 (μ -TAS2002)*, 2002, pp. 925-927
- [18] N. Kitamura, Y. Hosoda, C. Iwasaki, K. Ueno, and H. B. Kim, *Langmuir*, 2003, 19, 8484-8489
- [19] B. Stoeber, D. Liepmann, and S. J. Muller, *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems2003 (μ -TAS2003)*, 2003, pp. 183-186
- [20] S. Kidoaki, S. Ohya, Y. Nakayama, and T. Matsuda, *Langmuir*, 2001, 17, 2402-2407
- [21] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4974-4984
- [22] K. Hosokawa and R. Maeda, *J. Micromech. Microeng.*, 2000, 10, 415-420
- [23] 中川威雄, 丸谷洋二, 積層造形システム 三次元コピー技術の新展開, 工業調査会, 1996, 1-10, 95-105
- [24] S. Maruo and K. Ikuta, *Appl. Phys. Lett.*, 2000, 76(19), 2656-2658
- [25] B.-H. Jo, L. M. Van Lerberghe, K. M. Mostegood, and D. J. Beebe, *J. Microelectromechanical Systems*, Vol. 9, No. 1, 2000, pp.76-81