

論文の内容の要旨

Thesis Summary

論文題目 Creation of Nano-sized Valves for Nanofluidic Device
(ナノ流体デバイスに向けたナノサイズバルブの創成)

氏名 佐野 大樹

(本文)

1. 緒言

数 cm 角の基板上に微小な流路を加工して様々な機能を集積化するマイクロ流体デバイス工学が進展している。北森グループはマイクロ流体デバイス工学を世界に先駆けて創始し、様々な化学操作をマイクロ空間に集積化する方法論(マイクロ単位操作:MUO)を確立した^[1]。これにより、分析の微量化・高速化が実現し、化学・バイオなど幅広い分野への応用が進んでいる。しかし、現状のデバイスの大多数は加工が容易なポリジメチルシロキサン(PDMS)製であるため、耐薬品性、光学特性が低く、水溶液系かつ単純な分析に用途が限定される^[2]。

一方、北森グループは、ガラスを材質とするマイクロ流体デバイスの研究を推進し、ガラスの優れた耐薬品性、光学特性を活かして汎用的かつ高度な分析に研究を展開してきた。さらに、ガラスの剛性の高さに基づき、10-1000 nm のナノ流路を利用するナノ流体デバイス工学も創始し、体積 fL、1 分子という極小の化学操作(ナノ単位操作:NUO)を実現してきた。これら独自の的方法論と技術に基づき、1つのデバイス上に MUO・NUO を階層的に集積化したマイクロ・ナノ統合流体デバイスを創成し、1 個の B 細胞が産生する可算個のサイトカイン分子の定量に成功した^[3]。

しかし、1 細胞プロテオミクス等の極限分析では、10 工程以上の MUO・NUO を集積化するため多数の流路の分岐や複数の試薬が必要となり、個々の単位操作を接続する際に試薬や溶媒を切り替える極めて高度な流体操作が要求される。現状の圧力を用いた流体制御法では、全ての流路間の圧力バランスを調整する極めて困難な操作を要し、熟練者しかデバイスを扱うことができず、再現性も低い。

一方、材料の変形により流路を開閉するバルブを用いれば、現状の流体操作の問題を全て解消し、デバイスの設計概念を根本的に転換できる。剛性の高いガラスでバルブを実現するため、本研究では、空間がナノスケールであればガラスの微小な変形であっても流路を開閉するバルブが可能であると着想し、これによりユーザーが誰でも操作できるマイクロ・ナノ統合流体デバイスが実現すると考えた。

そこで、本研究の目的をガラスの微小変形を用いたナノ流路開閉バルブの開発と単一細胞分析への応用とし、(1)ナノ流路開閉バルブの提案と原理検証、(2)バルブによる流体操作の検証、(3)バルブを集積化したシステムの構築、(4)フェムトリットル極限分析への応用に取り組む。

2. ガラスの微小変形を用いたナノ流路開閉バルブの提案と動作検証

本章では、ガラスの微小な弾性変形によりナノ流路を開閉でき、かつマイクロ・ナノ統合流体デバイスにも実装可能なバルブの構造を提案して、バルブを設計・作製し、基本動作を検証する。

2.1. ガラス変形による流路開閉の原理とバルブの構造の提案

マイクロ・ナノ統合流体デバイスは多数のマイクロ・ナノ流路を作製した厚さ $10^2 \mu\text{m}$ のガラス基板から成る。一方、ガラスの弾性変形により深さ 10^2nm のナノ流路を開閉するバルブのために必要な厚さは $10^1 \mu\text{m}$ と計算される。そこで、デバイスとバルブの機能の両立のため、ガラス基板上の一部にバルブのための変形部を設けた構造を提案した(図 1)。また、隙間なく流路を閉じるため、ガラスのたわみ形状を模した 4 段構造のバルブチャンバーを提案した。

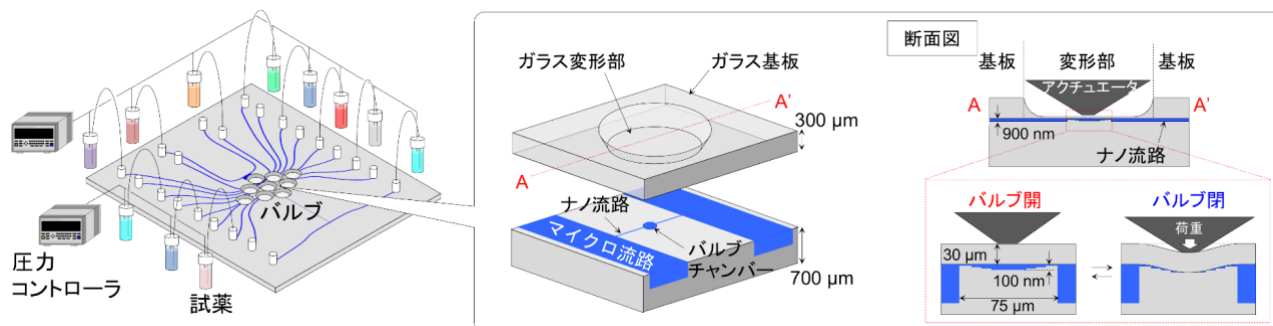


図 1. ガラス変形を用いたナノ流路開閉バルブの構造

2.2. バルブの設計・作製

ナノ流体デバイスを用いた分析を想定し、バルブには(i)流量(バルブ閉/開 $<1\%$)、(ii)応答時間(<1 秒)、(iii)耐久性(開閉回数 >1000 回)の性能が求められる^[4]。(i)流量が断面積の 2 乗に比例するため、バルブ開閉時のチャンバー断面積比が 10 %となるようチャンバーの段差を設計した。(ii)応答が 1 秒以下の piezoelectric actuator を用いた。(iii)変形部に発生する応力がガラスの破壊応力の半分以下となる変形部の厚さを計算し、 $30 \mu\text{m}$ とした。

以上をもとに、ガラスのトップダウンナノ加工によりデバイスを作製した(図 2)。

2.3. バルブの動作検証

バルブ閉の状態では蛍光溶液をナノ流路に導入し、バルブを開けたときの流れを蛍光顕微鏡により観察した。バルブを開けると蛍光強度が瞬時に上昇し、応答時間は要求を満たす 0.9 秒であった(図 3)。また、バルブの繰り返し開閉を 10 万回行っても変形部が破壊しないことを確認した。さらに、バルブ閉時の流量変化を評価するため、変形部に加える荷重と流量の関係の評価した(図 4)。得られた関係からバルブ閉時の流量が 0.1% であることを確認した。

以上より、バルブの基本動作を検証し、分析化学的要求を満たす流路開閉バルブを実現した。

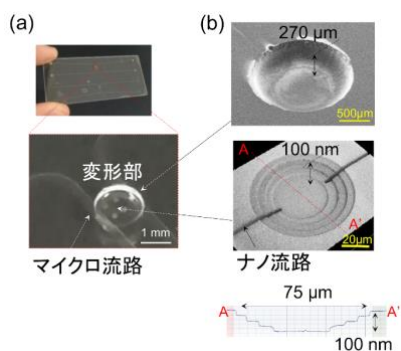


図 2. (a) 作製したデバイス (b) 変形部の SEM 画像およびバルブチャンバーの 3 次元深さプロファイル

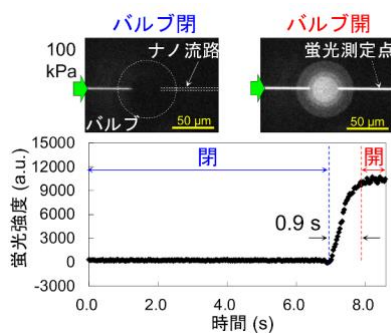


図 3. バルブチャンバーの蛍光画像およびナノ流路での蛍光強度

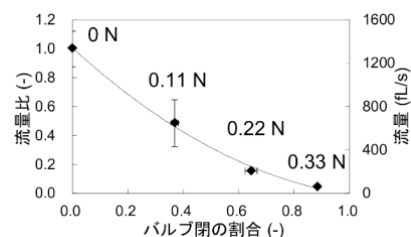


図 4. バルブ開閉の断面積比に対する流量の関係

3. ナノ流路開閉バルブによる基本流体操作の検証

マイクロ・ナノ統合流体デバイスを用いた分析では、濃度の異なる試薬の切り替えおよび保持(液/液操作)、また、液相から気相への置換(気/液操作)といった高度かつ基本的な流体操作が求められる。本章ではこれらの流体操作を検証する。

3.1. 液/液操作

濃度の異なる試薬の切り替え操作はバルブ開閉による流れの停止・開放によって実現する(図 5(a))。一方、濃度の異なる試薬保持のためには、バルブ閉時の溶質の拡散によるリークが 1 %未満(一般的な微量分析の定容誤差)であることが求められるが、4段構造のバルブではバルブ閉時に残る僅かな隙間から溶質が拡散する。そこで、曲面形状のバルブチャンバーを提案した。図 5(b)に示すようにバルブを繰り返し押圧し、撃力により段差部を塑性変形させる曲面加工法を着想した。1.1 N の荷重で 2 万回以上押圧することにより曲面加工を実現した(図 5(c))。

バルブ閉状態で上流のナノ流路に蛍光溶液を導入し、導入 30 分後に下流に拡散した蛍光分子の量を測定した結果、リークは 0.5 %未満であった(図 6(a))。また、バルブ開閉を用いてナノ流路内の流れを蛍光溶液と緩衝液に交互に切り替える操作を検証し、0.5 秒の切替応答速度を実現した(図 6(b))。

3.2. 気/液操作

バルブを介してナノ流路の液相を気相に置換するには、チャンバーを気相で満たし、気相をナノ流路へ供給する必要がある(図 7(a))。しかし、深さ 10^2 nm のチャンバー内の気液界面に働くラプラス圧が \sim MPa であるため、圧力による操作は困難である。そこで、チャンバーを疎水修飾することで、ラプラス圧により液相の侵入を防止し、さらに図 7(a)に示すバルブの開閉動作による空気の圧縮を利用したナノ流路の気/液切り替え操作を提案した。疎水性のオクタデシルシラン(ODS)と水酸化ナトリウム水溶液によりチャンバーのみを疎水化した。500 kPa の駆動圧力で空気を導入し、バルブ開閉に伴う空気圧縮によりナノ流路内の液相を気相に置換する操作を検証した(図 7(b))。これにより、気液二相を用いた反応、濃縮、分離などの化学プロセスの集積化も可能となる。

4. ナノ流路開閉バルブを集積化した流体制御システムの構築

本章では、ナノ流路開閉バルブとこれを駆動する小型アクチュエータをデバイスに集積化することで、バルブ、流体駆動ポンプ、検出器を統合したマイクロ・ナノ統合流体デバイスのための流体制御システムを構築する。

4.1. システムの設計・作製

小型のアクチュエータを集積化し、100 nm の変位を与えてバルブを開閉する(図 8)。このとき、検出部の統合のためにデバイス下部に空間が生じ、バルブ開閉によりデバイス全体が μ m オーダーでたわむため、複数バルブの独立操作ができない。そこで、変形抑制のための補強部を設けることを着想した(図 8(b))。最小限の補強領域を材料力学に基づき設計し、デバイスの最大変形量を 10 nm 以下に抑制した(図 8(c))。この設計に基づきシステムを作製した。

4.2. システムの動作検証

上記のシステムを用いて 2 つのバルブの独立開閉を検証した。一方のバルブを閉じ、他方のバルブの開閉に伴うそれぞれのバルブの開閉状態を蛍光観察により確認した。図 9 に示すように、一方のバルブの開閉操作に影響されず他方のバルブの開閉状態が保たれた。

以上により、作製したシステムによる複数のバルブの独立な開閉動作を検証した。

5. フェムトリットル極限分析への応用

本章では、前章までに開発した流体制御システムを fL 極限分析に応用することを目的とする。

5.1. デバイスの設計

単一細胞が産生する超微量のタンパクの免疫分析(ELISA)を想定し、11 の単位操作を集積化したデバイスを設計した。疎水、親水、非特異吸着防止、捕捉抗体の 4 種の表面により化学操作に必要な機能を実現した。さらに、

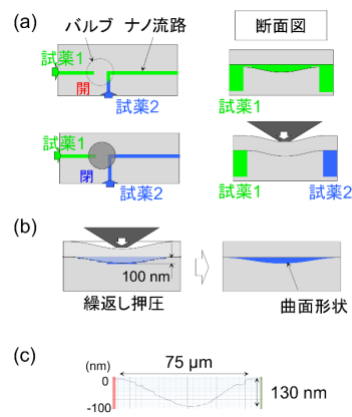


図 5. (a) バルブによる液相の切り替え操作 (b) 曲面加工の原理 (c) 曲面加工後のチャンバー形状

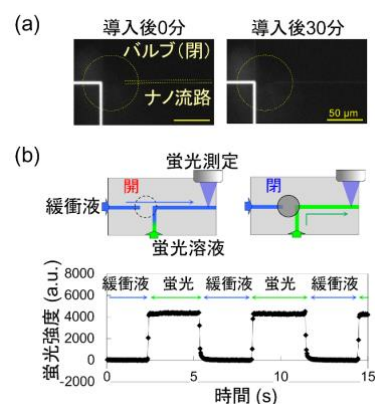


図 6. (a) 曲面形状のバルブを用いた拡散リーク評価の蛍光画像 (b) 試薬の切り替え操作時のナノ流路内蛍光強度

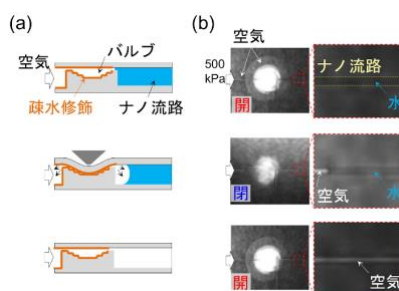


図 7. (a) ナノ流路内の気/液置換操作 (b) ナノ流路内の気/液置換結果

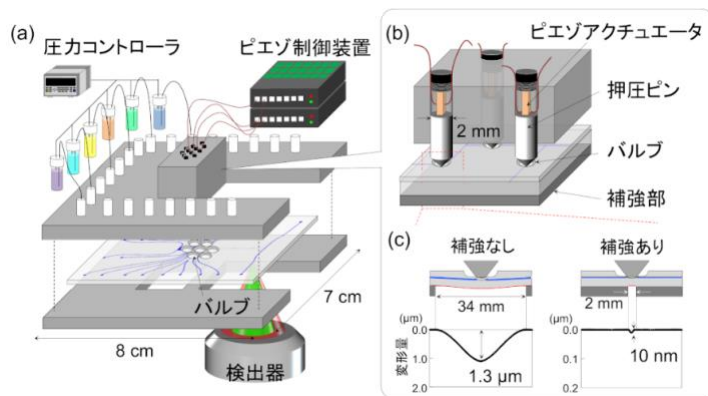


図 8. (a) バルブを集積化した流体制御システム (b) アクチュエータを組み込んだ治具およびデバイス下部に設けた補強部 (c) バルブ開閉に伴うデバイス変形量

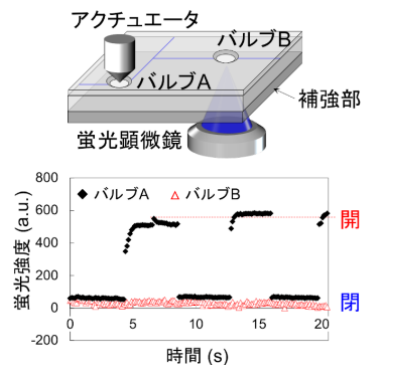


図 9. バルブ A 開閉時のバルブ A およびバルブ B のチャンバーの蛍光強度

MUO・NUO を接続するため、7 個のバルブを集積化した。

5.2. 免疫分析の検証

標準試料として炎症促進性サイトカイン (IL-6) 溶液 (100 pM)、捕捉抗体として抗 IL-6 IgG 抗体、標識抗体として抗 IL-6 HRP 標識 IgG 抗体 (10 nM)、基質としてテトラメチルベンジジンをを用い、流体制御システムによる ELISA の原理検証を行った。図 10 の分析プロセスに従って 25 pL の試料を定容し、IL-6 からの熱レンズ信号を取得した (図 11)。また、ブランクとして PBS 溶液でも同様のプロセスを行い、ブランクと標準試料において優位な差を得た。以上により、IL-6 1500 分子 (2.5 zmol) の検出に成功し、バルブを集積化した流体制御システムによる fL 極限分析を初めて実証した。

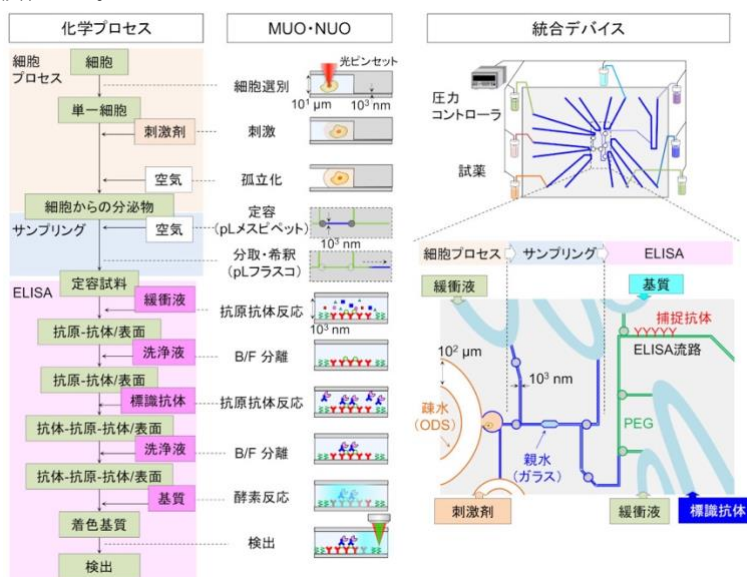


図 10. 単一細胞分析に向けたデバイス設計

6. 結言

本研究では、ガラスの微小変形を用いたナノ流路開閉バルブを開発し、単一細胞分析への応用を目的とした。第 2 章では 4 段階構造のバルブチャンバーおよびガラス変形部を基板に組み込む構造を提案し、バルブを設計・作製および動作検証をした。第 3 章では、バルブを用いた流体操作として液/液の切り替え、気/液の切り替えを検証した。第 4 章では、複数のバルブを集積化したシステムを設計・作製した。第 5 章では、第 4 章で開発した流体制御システムを fL 極限分析に応用した。7 つのバルブを組み込んだデバイスを作製し、体積 25 pL の超微量試料に含まれる IL-6 1500 分子 (2.5 zmol) の検出に成功した。以上、本研究ではナノ流路開閉バルブによる流体制御法を確立し、全てのユーザーが使用可能な極限分析デバイスを初めて実現した。

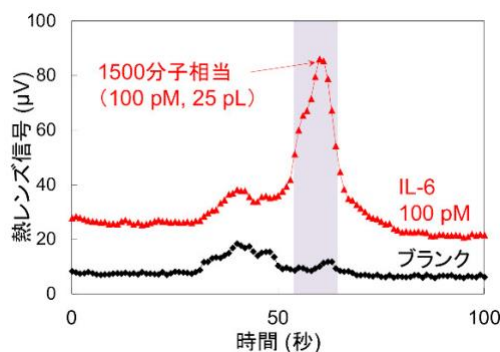


図 11. ELISA により得られた熱レンズ信号

【引用文献】

- [1] M. Tokeshi, et al., *Analytical Chemistry*, **74**, 1565-1571 (2002)
- [2] K. Ren, et al., *Accounts of Chemical Research*, **46**, 11, 2396-2406 (2013)
- [3] T. Nakao, et al., *Analyst*, **144**, 7200-7208 (2019)
- [4] K. Shirai, et al., *Small*, **10**, 8, 1514-1522 (2014)
- [5] R. Ishibashi, et al., *Small*, **8**, 8, 1237-1242 (2012)