

超高感度質量分析に向けたマイクロ流体技術の開発

研究代表者：慶應義塾大学 嘉副 裕

【基本構想】

質量分析は、様々な分野における分析・検査に利用されており、近年では単一細胞プロテオミクスなどの超微量・超高感度分析への応用も期待されている。しかし、現状では分析対象である液体試料を質量分析計に導入・イオン化・検出する際に試料を噴霧するため、大部分が飛散してしまい、質量分析計への導入率が1%以下に留まり感度に限界があるという原理的な問題がある。当グループは、独自のマイクロ・ナノ流体工学の方法論と技術に基づき、2段階気液合流の流路構造を用いて液体試料を体積 fL の微小液滴に連続的に変換し方向制御して射出するマイクロ液滴シューターを創出し、質量分析計への試料導入率100%と分析の2桁高感度化を達成した。しかし、従来の2次元微細加工ではデバイスの製造が難しく、更に、動作が不安定であるため液滴生成・射出の持続時間が短く、実用化に至っていない。本研究では、超微量・超高感度質量分析の実現とその応用に向けて、3次元微細加工によるマイクロ・ナノ流体デバイス製造法を開発し、マイクロ液滴シューターにおける流体制御の問題を解消して安定な fL 液滴生成・射出を検証する。

1. 研究目的

質量分析 (MS) は、バイオ、製薬、環境、食品など様々な分野の分析・検査に利用される分析法であり、近年では、難病の病態解明のために細胞が産生するタンパクを1細胞レベルで網羅的に解析する単一細胞プロテオミクスへの応用も期待されている。本分析法では、液体試料をイオン化して質量分析計に導入する MS インタフェースが重要であり、図1(a)に示すエレクトロスプレーイオン化法が広く用いられてきた。しかし、試料を噴霧するため、質量分析計への導入率が1%以下に留まり、感度に限界がある。そこで当グループでは、独自シーズとして、図1(b)に示すように、数1000 nm-数10 μm の2段流路構造を用いた気液流体制御により液体試料を体積 fL の超微小液滴に変換

して軌道を制御して発射するマイクロ・ナノ流体デバイス (マイクロ液滴シューター) を開発した。これを MS インタフェースに用いることで、試料を逃さず全て質量分析計に導入し、290倍もの高感度化を達成した[1-3]。

しかし、マイクロ液滴シューターの動作が不安定化しやすく、液滴生成・射出の持続時間が数10分程度に留まり、実用化は依然として困難である。よって、この問題の解消が必要であるが、現状のリソグラフィ及びエッチングによる微細加工ではデバイス1つの製造に長時間 (2週間程度) を要し、不安定化の因子を特定する研究の妨げとなっている。また、流路が2次元形状に限定されるため、最適設計を追求する上で流路形状に制約がある。

そこで本研究では、マイクロ液滴シューターの実用化に

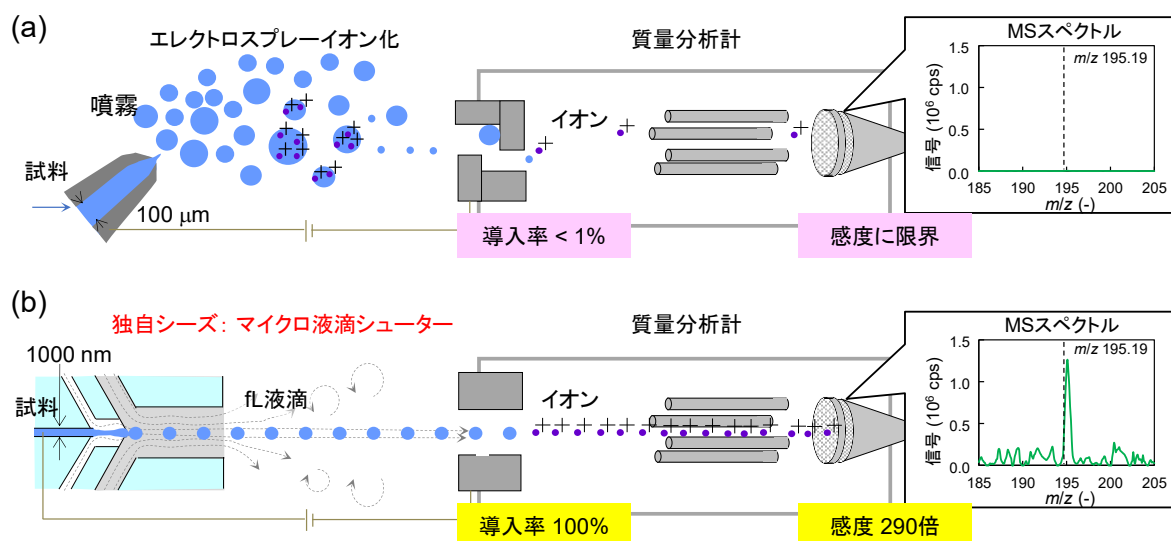


図1. 質量分析 (MS) インタフェース: (a) エレクトロスプレーイオン化法、(b) マイクロ液滴シューター

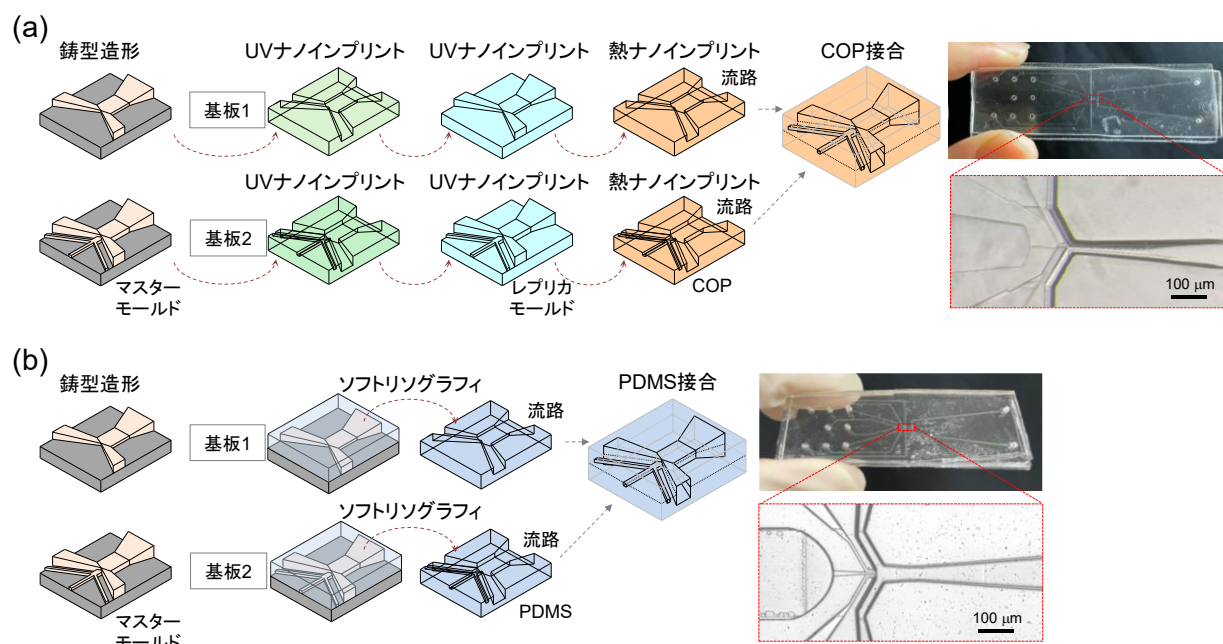


図 2. 3D 流路形状を有するマイクロ流体デバイスの作製 : (a) 2 光子重合 3D 造形およびナノインプリントによるデバイス作製プロセス、(b) 2 光子重合 3D 造形およびソフトリソグラフィによるデバイス製造プロセス

向けて新たな基盤を構築することを目的とする。具体的には、デバイス製造法を 2 次元加工から 3 次元加工へと転換し、3 次元流路形状によるマイクロ・ナノ流体工学の新たなプラットフォームを創出する。3 次元造形の自由度が高い 3D プリンタおよび大量生産に適したナノインプリントによるデバイス製造プロセスを開発して、製造時間を数日にまで短縮し、歩留まりの問題を解決する。更に、3 次元流路形状を利用したデバイスの最適設計により流体制御の問題を解決し、マイクロ液滴シューターの安定・長時間動作を達成する。具体的には、研究項目 1) 3 次元加工技術に基づくマイクロ・ナノ流体デバイス製造法の開発、研究項目 2) 最適設計による fL 液滴の安定生成・射出の検証に取り組む。

令和 7 年度は、研究項目 1 については令和 6 年度に構築した 3D プリンタ及びナノインプリントによるマイクロ・ナノ流路作製法に基づき、流路の耐薬品性確保と基板接合のためのプロセス構築、更にプロセス統合によるデバイス製造の検証を目的とした。研究項目 2 については、数値計算によるマイクロ液滴シューターの設計の検討、設計に基づくデバイス作製と液滴生成・射出の検証を目的とした。

2. 研究成果

2.1 研究項目 1 の成果

令和 7 年度の成果の内、本研究で構築した加工プロセスの統合によるデバイス製造の検証について述べる。

従来の 2 次元微細加工では、マイクロ液滴シューターの 2 段流路作製のためにリソグラフィとエッチングの繰り返しが必要であり、工程数と製造時間が増加する要因となっている。そこで本研究では、図 2(a)に示すように、2 光子重合 3 次元造形とナノインプリントを用いた加工プロセスを構築してきた。まず、3D プリンタにより 2 段流路

構造を造形する。ここで、2 光子重合により超微細な 3 次元構造を造形できる一方、デバイス全体を造形するための時間が長く生産性が低いという欠点がある。また、流路の材料も耐薬品性が低い光硬化樹脂に限定される。そこで、3D プリンタで造形した超微細構造を鋳型として、ナノインプリントにより樹脂製基板に構造を転写し流路を作製する。これにより、1 工程で複雑な 3 次元形状を有する流路の作製が可能となり、デバイスの生産性向上につながる。

2 光子重合 3D プリンタ (Photonic Professional GT2、Nanoscribe 社) 及び UV/熱ナノインプリント装置 (X-300、SCIVAX 株式会社) を用いて、マイクロ・ナノ流体デバイスを作製した。尚、デバイスの材料には耐熱性・耐薬品性に優れた環状オレフィンポリマー (COP) を用いた。図 2(a)のように、2 光子重合 3 次元造形により 2 段マイクロ流路を反転させた構造を有する鋳型を作製し、UV ナノインプリントにより光硬化樹脂に鋳型の構造を転写した。更に、UV ナノインプリントにより流路構造を熱耐性を有する光硬化樹脂に転写することでレプリカモールドを作製し、これを用いた熱ナノインプリントにより COP 基板上に 2 段マイクロ流路を作製した。O₂ プラズマにより表面を活性化して基板を貼り合わせ、110°C・5000 N で 10 分加圧し、ガラス転移点 (138°C) 以上の 145°C・200 N で 10 分アニールして接合した。これにより、COP 製のマイクロ流体デバイスの作製に成功した。更に、図 2(b)に示すように、マイクロ流体工学で一般的なソフトリソグラフィ法[4]を用いて、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 製デバイスを作製するプロセスも構築した。2 光子重合 3D プリンタにより作製したマスターモールドに硬化前の PDMS を注いで硬化させることで流路を作製した後、O₂ プラズマにより表面を活性化して基板を貼り合わせ接合した。PDMS は耐薬品性が低い、水溶液を用いた簡易検討には有効である。

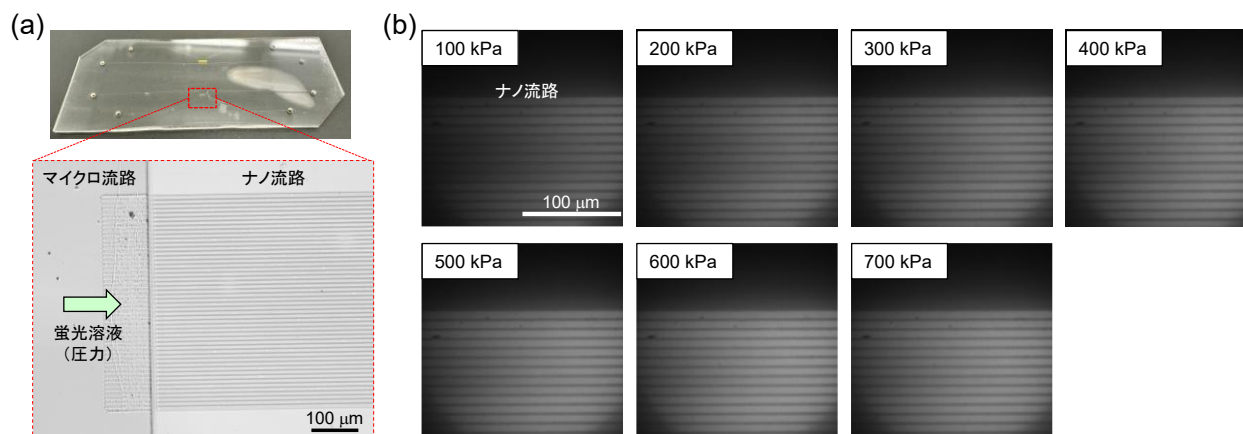


図 3. COP 製マイクロ・ナノ流体デバイスの液漏れ評価：(a) 作製したマイクロ・ナノ流体デバイス、(b) 蛍光溶液を用いた液漏れ耐圧の評価結果

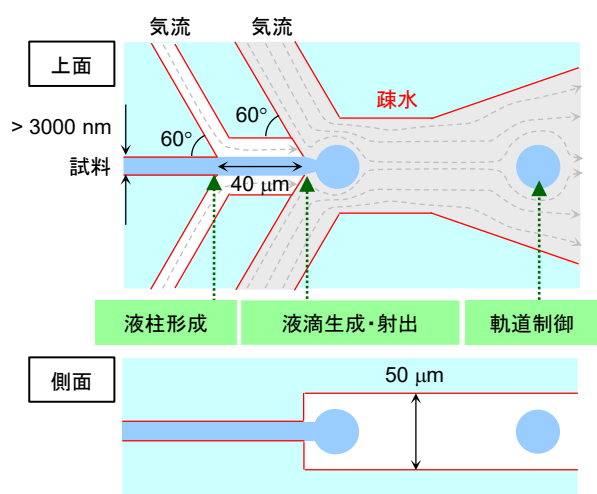


図 4. マイクロ液滴シューターの構造および原理と現行設計

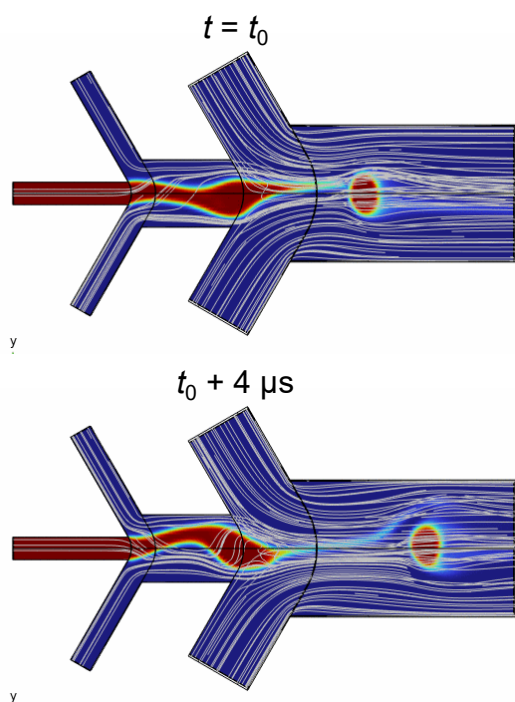


図 5. 流体の慣性力を考慮した数値計算により得られたマイクロ液滴シューターにおける気液二相流挙動

本研究で開発した製造法により作製したマイクロ・ナノ流体デバイスの実用性を検証するため、デバイスの液漏れ耐圧および接合強度を評価した。図 3 のように、幅 $6 \mu m$ ・深さ 200 nm のナノ流路を加工した COP 製ナノ流体デバイスに蛍光溶液（フルオレセイン $100 \mu M$ ）を流した。液体駆動のための印可圧力を増加したところ、 700 kPa まで上昇させても液漏れがなかった。よって、マイクロ・ナノ流体デバイスにおける実用的な圧力 $100 \sim 500 \text{ kPa}$ を上回る耐圧性能を検証した。更に、接合強度試験（ブレードテスト）を行ったところ、接合強度は 0.42 J/m^2 となり、マイクロ・ナノ流体デバイスで要求される 0.3 J/m^2 よりも高かった。以上から、実用的な耐圧性能を有する COP 製マイクロ・ナノ流体デバイスの作製に成功した。

以上、構築した 2 つのデバイス作製プロセスのいずれにおいても、2 光子重合 3 次元造形で加工した 3 次元流路構造の転写に成功し、マイクロ液滴シューターのデバイス作製を達成した。鋳型を繰り返し用いることで、製造プロセスを従来の 14 工程から 5 工程以下にまで短縮し、製造時間も従来の 2 週間から数日にまで短縮した。

2.2 研究項目 2 の成果

令和 7 年度は、数値計算を用いてマイクロ液滴シューターにおける問題点を明らかにして、これを解消する設計を提案し、デバイスを作製して液滴を検証した。以下、それぞれについて概要を述べる。

マイクロ液滴シューターの構造と原理、及び現行設計を図 4 に示す。液滴生成には気液界面のレイリー不安定性を利用しており、 1000 nm スケールの液柱に $10^1 \sim 10^2 \text{ m/s}$ の気流を合流させて界面を不安定化させることで液滴が生成される。この原理に基づき考案されたのが現行設計であり、1 段目の気流合流部で液柱を形成して、2 段目の気流合流部で界面を不安定化させ液滴を生成し、レイノルズ数が 200 程度の層流によって液滴の軌道を制御して外部に射出する。令和 6 年度に、有限要素法による数値計算モデルを構築して、流体の粘性力を考慮した層流条件下において計算を行ったところ、現行設計において不安定化の要因となる問題点はみられなかった。そこで、流体の慣性力を考慮して再度計算を行ったところ、図 5 のように、1 段目

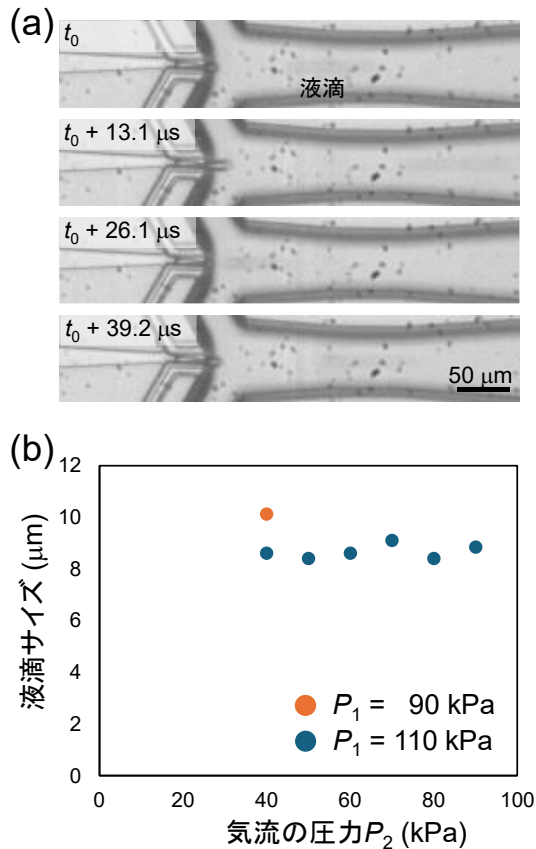


図 6. 新たに設計したマイクロ液滴シューターによる液滴生成結果：(a) 液滴生成時の時系列画像、(b) 1 段目の気流圧力 P_1 、2 段目の気流圧力 P_2 と液滴サイズの関係

の気流合流後に流れが乱れて液柱が不安定化することが判った。この流れの不安定化がマイクロ液滴シューターの動作時間の短さに関連すると考えられる。

上記の結果に基づき、液柱の不安定化を抑制する流路構造を提案し、研究項目 1 で開発した製造法によりマイクロ流体デバイスを作製した。純水の液滴生成を高速度カメラにより撮像した結果を図 6 に示す。8~10 μm (300~500 fL) の液滴が安定に連続生成されていることが判る。また、1 段目の気流圧力によって液滴サイズが変化することも確認された。以上より、新たに開発したマイクロ液滴シューターによる液滴生成・射出に成功した。

まとめ

以上のように、令和 7 年度は、2 光子重合 3 次元造形とナノインプリントによるマイクロ・ナノ流路の加工プロセスによるデバイス作製を検証して、実用的な性能を有することを確認した。また、有限要素法によるマイクロ液滴シューターの数値計算に基づき、現行設計の問題点を解消する設計を提案して、これに基づきデバイスを作製し、安定な fL 液滴生成・射出を実現した。

参考文献

1. Kazoe, Y., Shimizu, Y., Morikawa, K., Terui, Y., Irie, T. and Kitamori, T., *Sens. Act. B*, 340, 129957, (2021).

2. Takagi, Y., Kazoe, Y. and Kitamori, T., *Microfluid Nanofluid*, 25, 74, (2021).
3. Takagi, Y., Kazoe, Y., Morikawa, K. and Kitamori, T., *Anal. Chem.*, 94, 10074-10081, (2022).
4. Whitesides, G.M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X. and Ingber, D.E., *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 3, 335-373, (2001).

業績

【原著論文】

1. Xin Jiang, Masafumi Watanabe, Yutaka Kazoe, *Anal. Sci.*, 42(1), 49-57(2026)

【総説】

なし

【書籍】

なし

【口頭発表】

1. S. Sugita, M. Watanabe, Y. Kazoe
Femtoliter-sample injection by highly-integrated nanofluidic valves and its application to nanochannel chromatography
OIST-Keio Showcase Talk Series 8, 2025 年 12 月, Kanagawa
2. M. Shibahara, M. Tsuda, Y. Kazoe
Measurements of nanoparticle velocity distribution in a square micrometer-channel by defocusing nanoparticle tracking velocimetry
MicroTAS 2025, 2025 年 11 月, Australia
3. M. Watanabe, S. Sugita, Y. Kazoe
Femtoliter-sample injection by highly-integrated nanofluidic valves for nanochannel chromatography
MicroTAS 2025, 2025 年 11 月, Australia
4. S. Noguchi, J. Xin, M. Watanabe, S. Sugita, Y. Kazoe
A fabrication method for three-dimensional microchannels by 3D-printing and nanoimprint lithography
MicroTAS 2025, 2025 年 11 月, Australia
5. Y. Sakurai, M. Watanabe, S. Sugita, Y. Kazoe
Development of a fabrication method for micro and nanofluidic channels by thermal nanoimprint lithography
MicroTAS 2025, 2025 年 11 月, Australia
6. 櫻井悠貴, 杉田昌平, 嘉副裕
熱ナノインプリントリソグラフィによるマイクロ・ナノ流路加工法の開発
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 51 回研究会、2025 年 5 月、大阪
7. 野口翔, Jiang Xin, 杉田昌平, 嘉副裕
3 次元光造形法とナノインプリントリソグラフィによるマイクロ流路加工法の開発
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 51 回研究会、2025 年 5 月、大阪

【特許】

- (1)国内特許出願 0 件
- (2)国際特許出願 0 件