

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、動作が不安定化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段階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

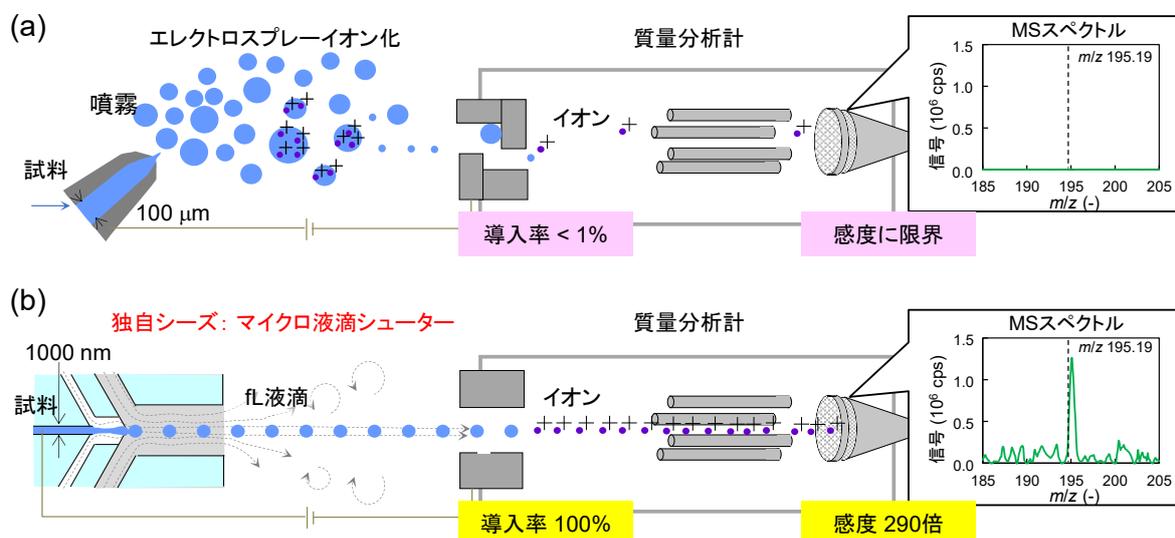


図 1. 質量分析 (MS) インタフェース : (a) エレクトロスプレーイオン化法、(b) マイクロ液滴シューター

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 μL 液滴の安定生成・射出の検証と質量分析の実証に取り組む。

令和6年度は、研究項目1については3Dプリンタ及びナノインプリントそれぞれの加工プロセスを構築し、サイズが 1000 nm ～数 $10\text{ }\mu\text{m}$ で3次元形状の流路加工を達成することを目的とした。また、研究項目2についてはマイクロ液滴シューターの数値解析モデルを構築して、液滴生成・射出の安定化のための流路設計を検討することを目的とした。

2. 研究成果

2.1 研究項目1の成果

本研究で構築するマイクロ・ナノ流路加工プロセスを図2に示す。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、図2(b)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提案した。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。以下、令和6年度の研究成果について述べる。

(1) 3Dプリンタによる加工プロセスの構築:2光子重合3Dプリンタ (Photonic Professional GT2、Nanoscribe社)を用いて、微小流路の鋳型作製のための加工プロセスを構築した。サイズが 1000 nm ～数 $10\text{ }\mu\text{m}$ の流路パターンを造形することを踏まえて最適な光硬化樹脂を選定し、3Dプリンタによるサイズ・形状制御の条件を検討した。作製した矩形構造体の電子顕微鏡 (SEM) 写真、設計サイズと造形された構造体サイズとの関係を図3(a)に示す。これにより、最小で 3000 nm の構造体造形を実現した。また、造形した構造体を鋳型として用いるには、基板と構造体が強固に密着していることが要求される。そこで、構造体の密着性増強のために基板の表面修飾と構造体のコート処理を検討した。以上により、図3(b)に示すように、マイクロ液滴シ

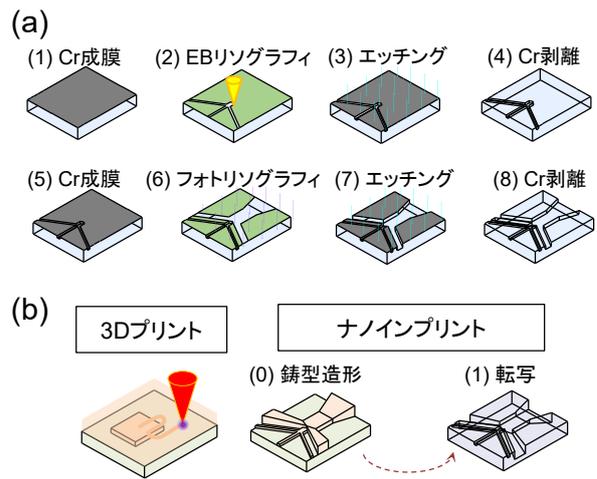


図2. 2段マイクロ流路の作製プロセス:(a) 従来の2次元微細加工、(b) 本研究の3次元微細加工

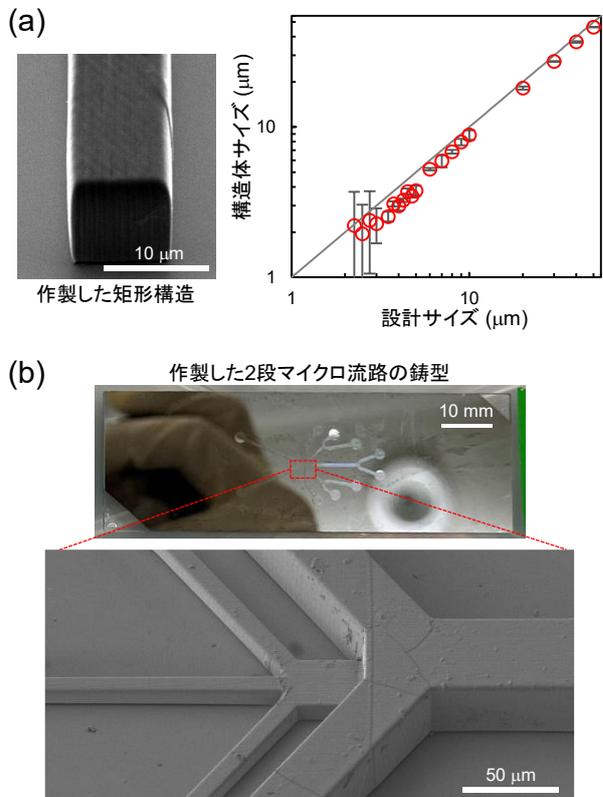


図3. 2光子重合3次元造形による微小流路の鋳型作製:(a) 矩形構造体の造形によるサイズ・形状制御の検討結果、(b) 作製した2段マイクロ流路の鋳型

ューターの2段マイクロ流路の鋳型作製を検証した。

(2) ナノインプリントによる加工プロセスの構築:UV/熱ナノインプリント装置 (X-300、SCIVAX株式会社)を用いて、鋳型から微小流路を作製する加工プロセスを構築した。図4(a)に示すように、まず、微小流路の鋳型 (マスターモールド) を準備し、この流路構造を反転・転写したレプリカモールドを作製する。このとき、微細構造パターンの転写に優れるUVナノインプリントを用いる。更に、レプリカモールドから樹脂基板に流路構造を転写することで、所望の微小流路を作製する。このとき、材料の熱変形

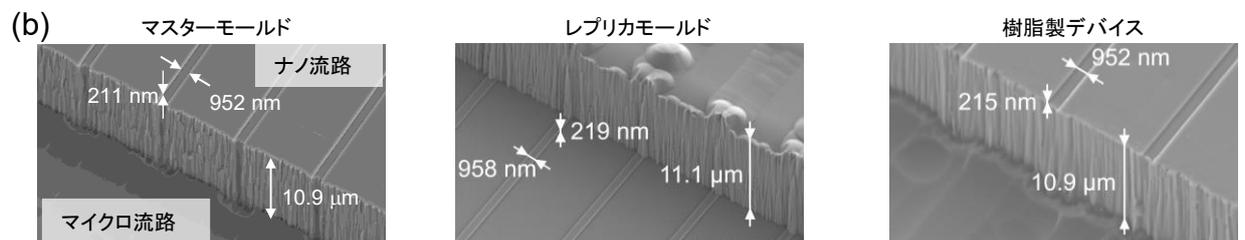
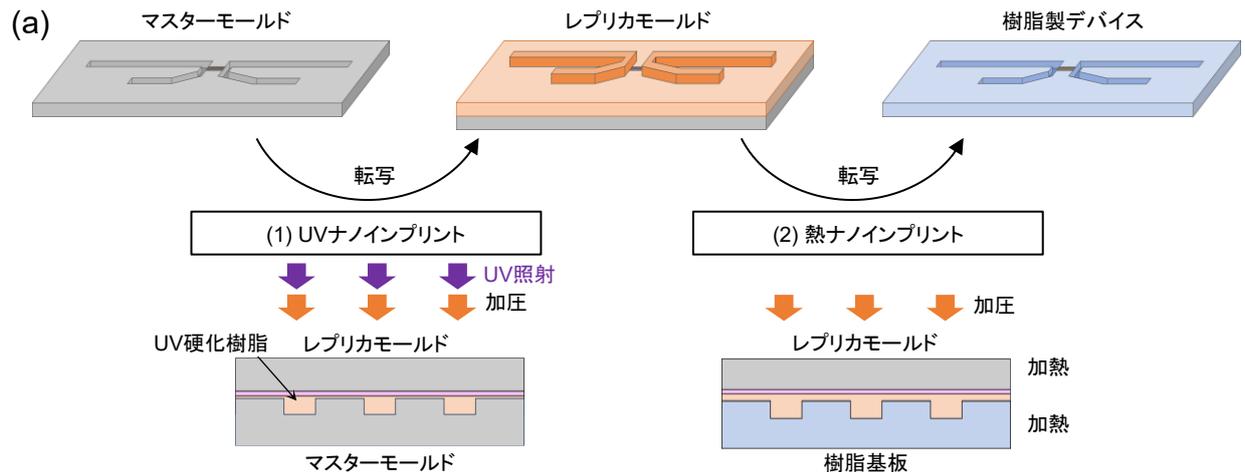


図4. ナノインプリントによる微小流路の作製: (a) UV ナノインプリント及び熱ナノインプリントによる樹脂製微小流路の加工プロセス、(b) ガラス製マイクロ・ナノ流路をマスターモールドとして用いたときの検証結果

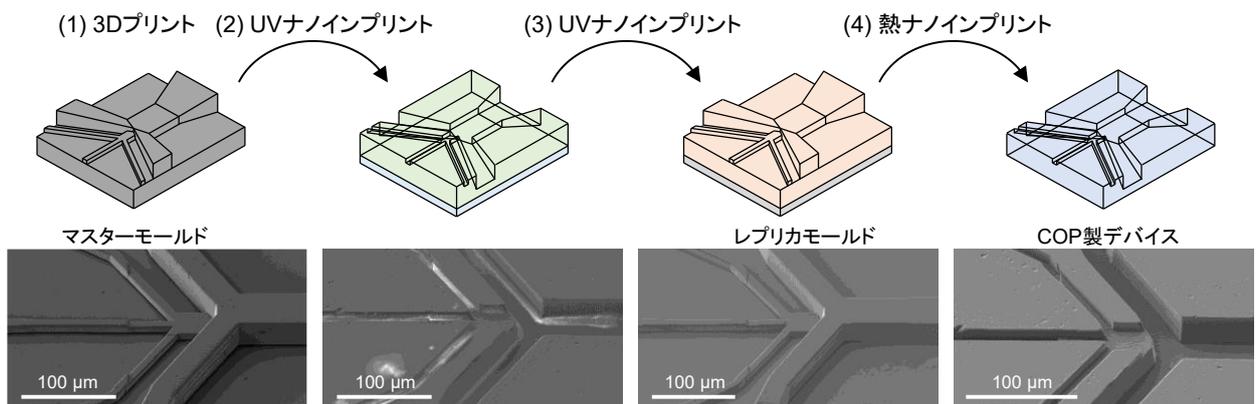


図5. 3Dプリントとナノインプリントを統合した加工プロセスによる2段マイクロ流路の作製結果

を利用した熱ナノインプリントを用いる。本研究では、微小流路の材料を耐熱性・耐薬品性に優れた環状オレフィンポリマー (COP) とし、COP 基板に流路構造を転写するためのプロセスを構築した。

UV ナノインプリントでは、離型処理したマスターモールドを UV 硬化樹脂に押し付けて加圧することで流路構造を転写し、その後に UV 光を照射して樹脂を硬化させる。このとき、最適な UV 硬化樹脂を選定し、離型処理および加圧条件を検討した。一方、熱ナノインプリントでは、離型処理したレプリカモールドを加熱条件下で COP 基板に押し付け加圧することで流路構造を転写する。このとき、COP 基板のガラス転移点を考慮してレプリカモールド及び基板それぞれの加熱温度を検討し、また、加圧条件も検討した。構築したプロセスに基づき、ガラス製マイクロ・ナノ流路を COP 基板に転写した結果を図 4(b)に示す。以上により、200 nm ナノ流路と 10 μm マイクロ流路の2段

構造を COP 基板に同時作製することに成功した。

(3) 2段マイクロ流路作製の検証: 構築した3Dプリント及びナノインプリントの加工プロセスを統合して、マイクロ液滴シューターの2段マイクロ流路作製を検証した。図5に示すように、2光子重合3次元造形によって流路を反転させた鋳型を作製した後、2回のUVナノインプリントによってレプリカモールドを作製した。このレプリカモールドを利用することで、COP基板上に2段マイクロ流路を作製することに成功した。鋳型の流路構造が正確に転写されていることが判る。レプリカモールドを繰り返し利用することで2段マイクロ流路を1日で製造することが可能であり、デバイス製造時間の短縮にも成功した。

2.2 研究項目2の成果

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6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 – 10^2 m/sの

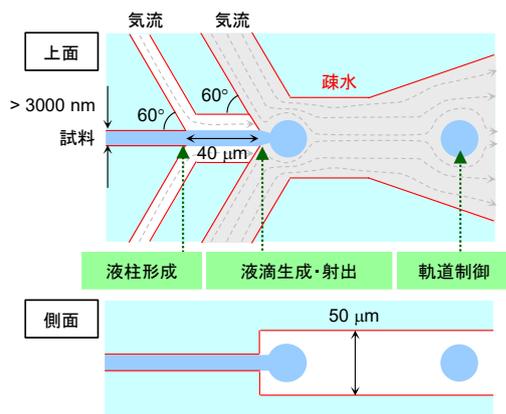


図 6. マイクロ液滴シューターの構造および原理と現行設計

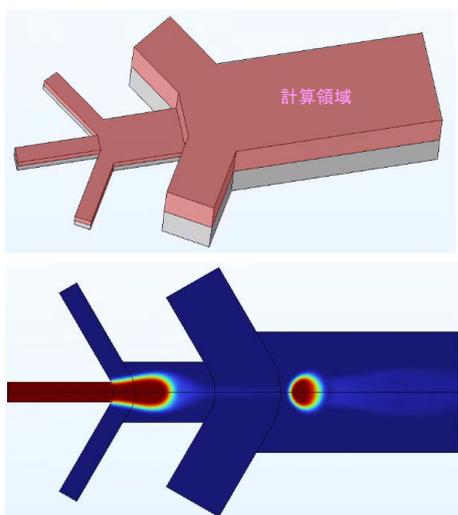


図 7. マイクロ液滴シューターにおける液滴生成・射出の数値計算結果

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。本研究項目では、まずマイクロ液滴シューターの数値計算モデルを構築して現行設計の妥当性を評価した後、得られた指針に基づき 3 次元流路形状を取込んだ新たな設計を検討する。次に、研究項目 1 で開発したデバイス製造法に基づき、実際に新設計のマイクロ液滴シューターを作製して、ロバスト性向上による fL 液滴の安定生成・射出を検証する。更に、開発したマイクロ液滴シューターを用いた MS 高感度化の実証にも取り組む。以下、令和 6 年度の研究成果について述べる。

(1) 数値計算モデルの構築：有限要素法による数値解析ソフトウェア COMSOL を用いて、マイクロ液滴シューターの数値計算モデルを構築した。非圧縮性流れにおけるナビエ・ストークスの式、連続の式を支配方程式として、フェーズフィールド法により 2 段マイクロ流路における液滴生成・射出を計算した。このとき、デバイス構造の対称性

を利用して計算負荷を低減し計算時間を短縮した。現行設計の計算結果を図 7 に示す。得られた液滴サイズは実験結果[1]と一致したことから、構築したモデルの妥当性を確認できた。

(2) 現行設計の妥当性の検証：構築した数値計算モデルを用いて、現行設計の妥当性を評価した。気液界面のレイリー不安定性を利用した液滴生成の原理に着目して、液柱形成に関係する 1 段目の合流角（現行設計：60°）及び液柱長さ（現行設計：40 μm）、界面不安定化に関係する 2 段目の合流角（現行設計：60°）をそれぞれ変化させて数値計算を行った。その結果、数値計算上の理想的な場であれば現行設計は概ね妥当であることが示された。

【まとめ】

以上のように、令和 6 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を開発して、1000 nm～数 10 μm サイズの 3 次元流路加工に成功し、更に従来の 2 次元加工と比較して製造時間の大幅な短縮も達成した。今後は、流路を加工した基板の接合プロセスを構築し、3 次元流路形状によるマイクロ・ナノ流体デバイスを実現する。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モデルを構築して、現行設計の妥当性を評価し、デバイスの設計指針を得た。今後は、3 次元流路形状を取込んだ新たな設計を検討して、開発したデバイス製造法により新設計のマイクロ液滴シューターを作製して、fL 液滴生成・射出の安定化を検証する。

【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).

業績

【口頭発表】

1. 大庭将也、蔣鑫、嘉副裕、並行マイクロ流路における二相流操作を用いた脂質二重膜の安定形成、日本機械学会第15回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2024年11月26日、仙台、日本
2. 渡部勇暉、大穂亮介、蔣鑫、嘉副裕、ナノ流路内超微小液滴を用いた1分子の輸送および濃度定量、日本機械学会第15回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2024年11月26日、仙台、日本
3. 蔣鑫、嘉副裕、マイクロ液滴シューターを用いた気相中ピコリットル液滴生成の計算モデルの構築、日本機械学会第15回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2024年11月26日、仙台、日本
4. Shohei Sugita, Mizuho Koyama, Xin Jiang, Yutaka Kazoe, Development of a hydraulic actuator for integration of nanochannel open/close valves utilizing elastic glass deformation, The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2024), 2024年10月15日, Montreal, Canada
5. Yuki Watabe, Yuki Mita, Xin Jiang, Yutaka Kazoe, Development of a method for liquid injection into femtoliter droplet in a nanofluidic channel utilizing Laplace pressure, The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2024), 2024年10月15日, Montreal, Canada.
6. Masaya Ohba, Xin Jiang, Yutaka Kazoe, Stable formation of lipid bilayer in parallel microfluidic channels utilizing operation of aqueous/organic two-phase flow, The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2024), 2024年10月15日, Montreal, Canada.