

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13731

研究課題名(和文)位置選択的表面化学修飾のための微小化学描画装置

研究課題名(英文)Micro Chmical modification tool for region selective surface treatment

研究代表者

内山 一美(Uchiyama, Katsumi)

首都大学東京・都市環境科学研究科・教授

研究者番号：40151899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ・ナノスケールの表面化学修飾法として、フォト・ディップペンリソグラフィやマイクロ流体を利用したものが知られている。これらは固体表面の機能化に用いられる。前二者は開放系の反応場で用いられるが、後者では溶液中での反応が可能であることから多くの注目を集めている。しかし、位置選択的微小化学修飾法は未だ報告がない。本研究では液体の微小流れを利用した位置選択的表面化学修飾のための化学ペンを開発した。本ペンは微小な層流を利用したもので、層流の重なり部分が化学反応部位となる。無機化学反応、高分子合成、電気化学、生化学試料の微小位置選択的化学修飾を初めて達成した。

研究成果の概要(英文)：Various micro/nano surface-modification techniques such as photolithography, dip-pen lithography and micro-fluidic systems have been developed. And they were used to extend the functionalities of solid surfaces. While those approaches work in the "open space", push&/pull systems which work in solutions have recently drawn considerable attention. While microscale, region-selective chemical reactions have remained unattainable. This work reports a micro-chemical pen that enables region-selective chemical reactions for the micro/nano surface modification. The chemical pen is based on the principle of microfluidic laminar flows. The micro scale diffusion layer performs as the working region of the surface modification. This work is the first demonstration of an open micro reactor. The characteristics of the micro chemical pen are confirmed by different types of reactions, including inorganic chemistry, polymer science, electrochemistry and biological sample treatment.

研究分野：分析化学

キーワード：微小化学反応描画ツール ケミカルファブリケーション

## 1. 研究開始当初の背景

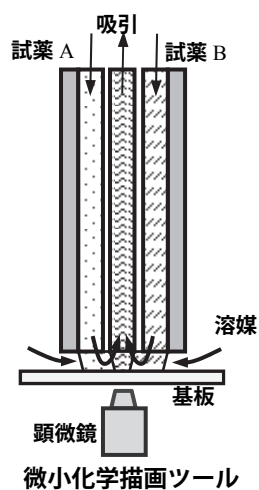
材料表面に、任意の分子の微小化学パターンニングが可能となれば、生化学研究のためのマイクロアレイ作製、有機エレクトロニクス、マイクロマシン、分子機械を利用したデバイス作製等の基盤技術になる。申請者は予備的に図のような微小化学描画ツールを試作し、約  $20\ \mu\text{m}$  の線幅での化学描画に成功している。このタイプの描画装置の中で現在世界最高分解能である。

材料表面のパターニングには、自己集合性有機分子を金膜の表面にパターニングするディップペンリソグラフィ、微小ノズルを用いて高分子インクを塗布する直接描画法、PDMS 製マイクロプローブなどが知られる。ディップペンリソグラフィ、直接描画法で

は限られた種類の分子のみが修飾可能である。PDMS 製マイクロプローブでは材料表面の微小目的位置に試薬を送達可能であるが、最小スポット径は  $100\ \mu\text{m}$  程度で、反応性試薬を送達することはできない。いずれの方法とも表面修飾は物理吸着、あるいは 1 段階の化学吸着反応に限られ、多段階にわたる反応や異なった分子を位置選択的に化学修飾することはできない。

## 2. 研究の目的

材料表面に、望みの分子構造を数  $\mu\text{m}$  の任意パターンで塗り分けて描画する新規微小描画ツールを開発する。材料表面に任意の微小化学パターンニングが可能となれば、マイクロアレイ作製や有機エレクトロニクスの基盤技術とな



る。しかしこのようなツールは未だにない。申請者は最近複数のキャピラリーチューブを束ねその端面を、溶媒中に浸した材料表面に近接させ、一方のキャピラリーから反応試薬を吐出し、他方から反応試薬と溶媒を吸引すると数十  $\mu\text{m}$  の分解能で表面化学修飾が可能なることを見いだした。又流路を工夫することにより更に小さな領域を選択的に化学修飾できることもわかった。本研究では新規微小化学描画装置を更に高度化し、材料表面に最小線幅数  $\mu\text{m}$  の化学描画を行うツールを開発する。

## 3. 研究の方法

現有の装置を用いたマイクロ化学描画装置の基礎的な特性を詳細に検討する。この結果に基づいてパターンの微細化、多機能表面化学マイクロデバイスを作製する。

①マイクロ描画ノズルの流体力学的シミュレーションおよび最適化: 試薬を送液するキャピラリーとして内径  $10\sim 250\ \mu\text{m}$  のガラス毛细管を用い流体力学的シミュレーションを行う。ノズル形状、試薬流量及び吸引流量、表面試薬流れ、スポット形状をシミュレートする。マイクロノズルを作製し、シミュレーションとあわせ最適化。

②マイクロ描画装置を用いた表面化学修飾装置の高精度化・最適化: 現有の装置の概略を右下図に示す。被修飾材料基板はシャーレ内の溶媒中に浸し、倒立顕微鏡の電動ステージ上におく。化学修飾パターンを得るため、電動  $x,y$ -ステージをコンピュータ制御し、任意形状の表面化学パターンニングを行う。マイクロ描画デバイスの反応試薬流量、被修飾物との距離、反応試薬の濃度、外側管の吸引流量などの種々のパラメータと位置分解能について検討する。被修飾物上に噴射される反応試薬の反応面の形状は、被修飾物であるガラスに導波したレーザーのエバネッセント波を用いた蛍光測定によ

り評価する。このため蛍光性色素をガラス表面に送液し、エバネッセント光により発生する蛍光信号を倒立型顕微鏡に付属の CCD カメラ(現有)により画像化し、種々の条件下でのスポット形状を測定・評価する。

③銀鍍金をモデル反応としたマイクロ修飾パターンの作成と評価:モデル反応として銀鏡反応を用い、ガラス基板上に銀パターンを描画する。ガラス基板は予め塩化スズで処理後、水中に静置する。マイクロ描画デバイスノズルからトレンス試薬及び還元剤を一定流量で吐出し、ノズルをx, y方向に走査することにより導電性銀パターンを描画する。この際の反応時間・温度を最適化し、高分解能で再現性の高いパターンニング方法を確立する。パターンの分解能の評価には元素選択的なイメージング検出器が必要である。これには現有の走査型電子顕微鏡に備えたエネルギー分散型 X 線分析装置(SEM/EDX)又は現有のAFMを用い、特にパターンエッジでの付着挙動・均一性を評価する。次に銀パターンを電極として金薄膜をメッキしたガラス基板を用い、チオール基を有する分子の金薄膜への結合・自己集積化を利用して、位置選択的な自己集積化単分子薄膜を形成する。

④酵素・抗体アレイの作製と評価:酵素・抗体などのタンパク質のガラス表面への固定化を行うための予備的検討として、タンパク質のパターンニングを行う。活性エステルを予め化学修飾したガラス表面にタンパク質及び蛍光ラベル化試薬を流すことによりアレイ状のスポットを形成する。タンパク質とラベル化試薬の吐出流量、試薬及び溶媒の吸引流量、描画装置とガラス板の距離を最適化する。この検討を元に酵素・抗体アレイを作製する。現有の描画装置を用いて予備的にタンパク質をパターンニングすると、ガラス板上に固定化されたタンパク質のスポット径

約  $90 \mu\text{m}$ 、スポット間隔は  $1\text{mm}$  であった。描画装置の最適化、ノズルの微小化によりスポット径  $10 \mu\text{m}$ 、間隔  $100 \mu\text{m}$  を目標とする。

⑤アレイ状マイクロ電極の作製と抗体の位置選択的的化学修飾による電気化学センサの作製:本描画装置によりガラス板上に銀薄膜をアレイ状に形成し、さらに金鍍金後、抗体を金膜上に微小パターンニング・結合する。金薄膜パターンはSEM/EDSにより、抗体の結合の様子はAFMにより評価する。また、多段階にわたる位置選択的なマイクロ化学修飾を検証するため、結合した抗体に、抗原、第2抗体を段階的に反応・塗り分け、同様にAFMで観察し反応の様子を観察する。第2抗体まで結合させたものは、第2抗体の標識酵素活性に対する蛍光基質を加え、蛍光顕微鏡画像で評価する。

#### 4. 研究成果

Figure 1 に作製したマイクロ化学ペンの外観(e)、試薬流れとそれを利用した化学反応の原理(a,c)、化学修飾する材料表面とマイクロ化学ペ

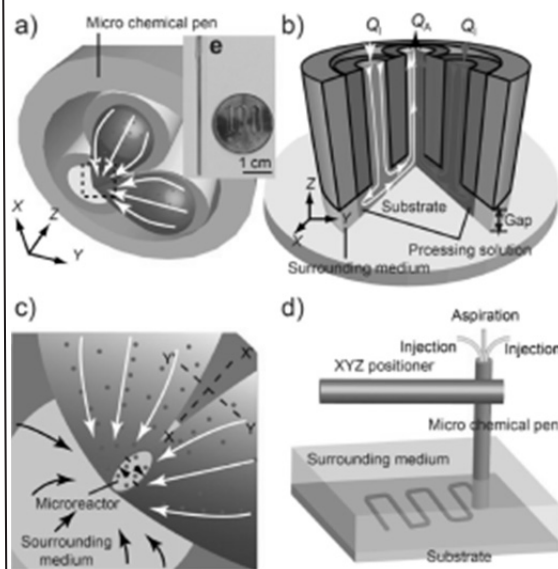


Fig.1 Microchemical pen. a) Structure. b) Flow stream state. c) Bottom view and microreactor region. d) Selectively surface treatment using the pen. e) Photo of microchemical pen.

んの配置(b)、マイクロ化学ペンによる描画方法

(d)を示した。マイクロ化学ペンは内径  $250 \mu\text{m}$  の石英製キャピラリー三本からなり、隣り合う二本のキャピラリーから反応試薬を吐出し、残りの一本から試薬と溶媒を吸引する。キャピラリー開口部(ノズル)は、溶媒中に沈めた材料表面に近接させ、二本のキャピラリーから反応試薬を吐出するとき、吸引口付近で拡散によりオーバーラップする領域が生じる。この領域は試薬と触媒及び試料と反応性試薬が重なる領域で、材料表面で化学反応を位置選択的に起こすことができる。また化学ペンは Fig1.(d)のように、材料表面に近接して配置して固定化し、材料を倒立型顕微鏡に備えた微小  $x,y$  ステージ上を走査

マイクロ化学ペンの二本のノズルから反応性試薬を吐出し微小な反応を起こすとき、二つの流れが重なった領域の形状、大きさは位置選択性や分解能に大きく影響する。そこで、材料表面に近接させたマイクロ化学ペン近傍の流れをシミュレーションによって解析し、その結果を Figure 2 に示した。図からわかるように、ノズルから吐出された試薬の流れは、吐出口から吸引口に向かってすばまるように流れ、吸引口の一点に集中した形状となっている。このとき 2 つの流れは吸引口付近で一部重なり、この形状は試薬溶液の流れと、試薬分子の拡散によって生じている。また、表面付近の剪断力は吸引キャピラリーの壁付近で最大となり、管の中央では殆ど発生していない。吐出側のキャピラリーでも同様で、吐出口壁付近の剪断力が大きいことがわかる。これは細胞などストレスを受けやすい材料を化学修飾する際に重要な指標となる。剪断力の最大値は、吸引流量/吐出流量の比に依存して大きくなった。

作製した化学ペンを用いて、種々の微小化学描画を行い、その結果を Fig. 3 に示す。陽イオン性高分子(0.02%臭化ヘキサジメチリン)と陰イオン性高分子(0.05% 4-スチレンスルフォネート)を用い、ガラス基板表面に幅約  $20 \mu\text{m}$ 、長さ約  $500 \mu\text{m}$  の直線状高分子構造体が形成することができた。次に、銀鏡反応を利用した金属銀による描画を行った(Fig. 3b)。ノズルの一方から Tollen's 試薬を、他方から還元剤を吐出し、基板を  $x,y$  走査することにより表面に TMU の文字を描画した。また、これを利用して 3 電極を構成する銀電極を描画した(c)。フェリ/フェロシアン化カリウムのサイクリックボルタムメトリーを行ったところ、通常の銀電極と同様のボルタモグラムを得ることができた。同様にバイオフィルム上に、蛍光ラベル化試薬である OPA を、還元剤として

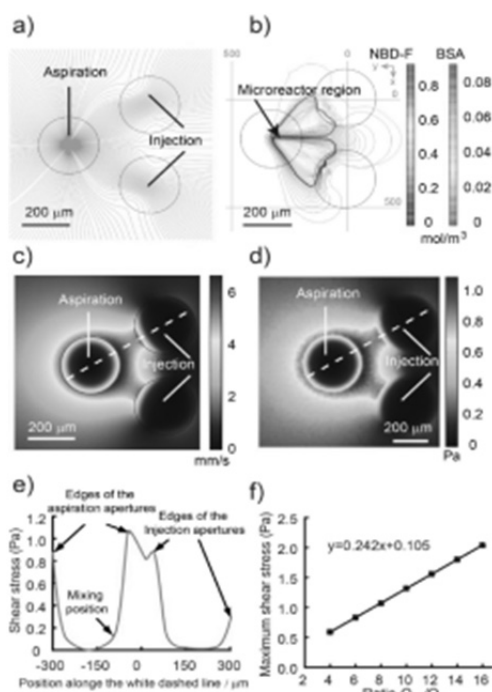


Fig 2. Microreactor region formed underneath the microchemical pen. a) Streamline fields. b) Microreactor region of the simulation results. c) Velocity field at mid-plane. d) Calculated shear stress at the substrate surface. e) Shear stress profile at the substrate along the line connecting the injection aperture and aspiration aperture (white dotted line shown in d). f) Effect of the  $Q_A/Q_I$  ratio on maximum shear stress.

することにより任意の化学反応パターンを得た。



亜硫酸イオンをノズルから吐出し、タンパク質の局所蛍光ドットパターンを作製した(Fig 3f)。

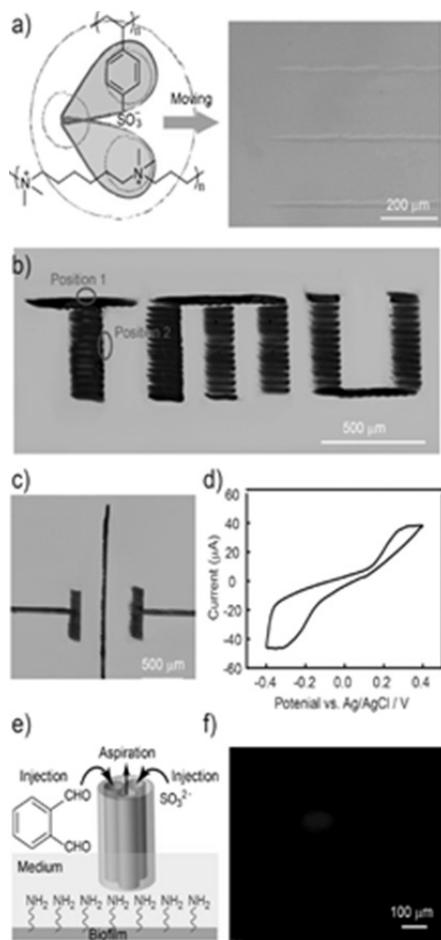


Fig.3. Multiple applications of microchemical pen. a) Optical micrograph of a polymeric structure deposited on glass at the micro-reactor region of 0.05% aqueous solution of poly (sodium 4-styrenesulfonate) and 0.02% aqueous solution of hexadimethrine bromide. b) Printing characters “ TMU ” on glass slide. c) Fabrication of micro- electrode system. d)Cyclic voltammogram of 5 mL of K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] in water (1mm, 0.1mM KCl electrolyte) as recorded with the three-electrode system (10 mVs<sup>-1</sup>). e)The illustration of OPA-sulfite derivatization on biofilm. f) Fluorescence image of selectively modification on egg membrane by OPA and sulphite.

描画線幅の更なる微小化を行うため、拡散係

数の小さい高分子反応に着目し、濃度、流量、粘度などを最適化したところ約 800 nm 線幅で高分子ワイヤを描画することに成功した。このような例はなく、また得られた線幅は世界最小である。更にノズル孔径を小さくすると銀鏡反応において 100 nm の銀ワイヤの描画も確認された。

研究方法の項で示した項目については、抗原抗体反応の可視化を除き、殆どが達成された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](1件)

①S. Mao, C. Sato, Y. Suzuki, J. Yang, H. Zeng, H. Nakajima, M. Yang, J.-M. Lin, K. Uchiyama, ChemPhysChem., 査読有り, 2016, 17, 3155-3159.

DOI: 10.1002/cphc.201600857

[学会発表]計3件

[その他]

ホームページなど

<http://www.comp.tmu.ac.jp/~uchiyama>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

内山 一美 (UCHIYAMA, Katsumi)

首都大学東京・都市環境科学研究科・教授

研究者番号:40151899