

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14140

研究課題名（和文）超短パルスレーザー誘起表面微細構造を利用した抗体タンパク質の固定化と原理解明

研究課題名（英文）Femtosecond laser surface modification of a capillary flow immunoassay microchip for spatially-selected antibody immobilization and its mechanism

研究代表者

合谷 賢治（Kenji, Goya）

秋田県立大学・システム科学技術学部・助教

研究者番号：40757332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、血液生化学分析用のマイクロチップ上に抗体タンパク質を固定化するためのフェムト秒短パルスレーザー表面改質技術の開発とその固定原理の解明である。レーザー照射条件を変化させた際の改質領域の機械的・化学的特性の変化と抗体固定化量を調べ、どのようなメカニズムで抗体固定化がなされているのかを明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生化学分析法の技術向上に資する技術であると期待する。特に抗体検査においては、本技術は樹脂材料表面にレーザー照射をするだけで高精度な抗体固定化を達成するため、クリーンで低コストでありながら、マイクロ流体チップのような狭い空間に検出点を集積可能であるため、特定の検査項目については大きな利点が見られる。また、レーザー照射が材料表面を改質した際の機序を明らかにすることでレーザー加工技術の高度化・メカニズム解明に貢献する。

研究成果の概要（英文）：We have developed a localized antibody immobilization technique using by femtosecond laser micro-grooving. To be clear the immobilization mechanism, the mechanical and chemical properties and the amount of immobilized antibody varying with laser irradiation parameters have experimentally been investigated.

研究分野：レーザー加工

キーワード：フェムト秒レーザー加工 表面改質 抗体固定化 マイクロ流体チップ 超親水性

1. 研究開始当初の背景

血液生化学分析は、健康管理や疾病の診断・病態把握から治療方針決定補助に重要な役割を果たす。検査方法としては、抗原抗体反応を利用した ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 法が高感度に定量検査可能な測定法として採用されている。抗原抗体反応を利用する場合、血中のタンパク質抗原に特異的に反応する 1 次抗体を反応場となる担体表面にあらかじめ固定する。さらに特異的に反応した抗原と、発光酵素で標識した 2 次抗体を反応させ、化学発光量を計測することで、目的の生体情報が得られる。近年では、分析システムの小型化・効率化のためにマイクロチップを用いた分析システムが提案されている。マイクロチップ上の分析では、チップ上の微小な流路に抗体を固定化する技術が必要である。微小流路への抗体固定化方法は、担体に吸着層と非吸着層を積層させ、外側の非吸着層のみを局所的に除去することで、剥き出しになった吸着層に抗体を塗布する。国内外においても、非吸着層の除去の手段として、リソグラフィ、電子線照射、レーザー照射が用いられており、本質的には、吸着層と非吸着層の交互積層法が主流である。いずれの従来手法においても、非吸着層の微小面積除去と、微小空間に滴下された液滴の位置・形状の不安定性が測定精度を劣化させている。

これまでの研究で、マイクロ流体チップの微小な流路にフェムト秒レーザーの特徴的な改質プロセスによって作製した微細な溝構造を利用して、カップリング剤などの表面修飾法を一切用いずに抗体の局所固定化に成功している。さらに ELISA 法による発光観察を行ったところ、実用的な検出感度と測定再現性を有することを示した。この提案手法では、レーザー照射だけで抗体タンパク質に対する固定化能を安定的に発現させ、化学的な前処理が不要なため、様々な担体の形状や寸法に対して汎用的で頑健な抗体固定化技術の実現が期待できる。一方で、抗体固定化のメカニズムは、レーザー照射面の表面元素の結合状態や濡れ性変化、機械的構造に依存すると考えられるが、詳細なメカニズムは未解明である。これらの改質表面の状態は系統的且つ段階的に調査する必要がある、さらなる実験が不可欠である。本研究課題においては、プラスチック (PMMA、ポリメタクリル酸メチル) を材料とするマイクロチップへのフェムト秒レーザー表面改質技術による抗体タンパク質固定化の原理解明に主眼を置き、表面改質方法の設計指針の確立を目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血液生化学分析用のマイクロチップ上に抗体タンパク質を固定化するためのフェムト秒短パルスレーザー表面改質技術の開発とその固定原理の解明である。提案するフェムト秒レーザー表面加工技術による抗体固定化手法は、既存の課題を大幅に改善し、高再現性、高スループット、高測定信頼性を提供可能である。現状ではレーザー照射による改質領域に抗体が固定される詳細なメカニズムは未解明であるが、抗体タンパク質へのレーザー照射領域の作用メカニズムが明らかになれば、提案技術を利用した抗体固定手法の設計指針が得られ、実用的な抗体固定化手法が実現される。

3. 研究の方法

本研究課題においては、下記の 2 項目に分けて実施する。

最初に、1) レーザー照射条件の最適化を行った上で、抗体タンパク質の固定化原理を明らかにするために、2) 固定化機構における表面特性及び作用の解明に取り組む。また、上記の 2 つを相補的に実験を行い、改質領域の設計指針の確立を目指す。

(1) レーザー照射条件の最適化

項目 2) を遂行する際、改質領域を正確に評価するために、再現性の良い改質領域を作製する必要がある。同時に、改質領域の作製精度は、発光強度測定に直接影響を与えるため、作製再現性の高いレーザー照射条件の選定が特に重要である。予備実験においては、抗体固相化面の面積誤差は 1.4%であったのに対して、ELISA 法による測定再現性は 6%程度で、若干の差が見られた。この結果から、固相化面全体の面積誤差は小さいものの、面内の抗体固定化が不均一な分布になっていると推察される。以上のことから、高い面積精度を達成するためには、抗体固相液滴下後の液滴拡がりを空間局所的に制限しつつ、且つ面内に均一展開することである。したがって、選定条件は、改質領域にクラックや溶融物などの作製再現性を劣化させる要因を可能な限り排除しつつ、固定化領域のみを親水性にすることである。具体的に検討する照射条件は、照射フルエンス (J/cm^2) と単位面積当りに照射するパルス数 (パルス/ cm^2) である。レーザー照射条件ごとに、表面の仕上がり状態 (走査型電子顕微鏡) 濡れ性 (接触角計) 面積精度 (光学顕微鏡画像解析) を評価し、照射条件の最適化を行う。さらに固相液を滴下した際の固相液の展開速度、乾燥時間の観察と、ELISA 法によって発光強度分布を観察し、最適なレーザー照射条件を明らかにする。

(2) 固定化機構における表面特性及び作用の解明

フェムト秒レーザー表面改質による抗体固定化の原理を明らかにするために、固定化機構にお

ける表面特性及びその作用を定量的に明らかにする。まずは、項目 1) で得られたレーザー照射条件により作製した改質面の表面元素結合状態を分析する。特に C-O と C=O 結合の増加が濡れ性変化に寄与 [1] しており、適宜文献のデータと比較しつつ評価を行う。つづいて、機械的な構造と接触角を変化させながら、ELISA 法による発光強度計測によって得られる固定化能 (単位面積当りに固定される抗体分子量、 $\text{mol}/\mu\text{m}^2$) の増減を調べる。溝構造の間隔・深さ・幅、改質面の実効的な表面積といった設計条件と、そのときの接触角 (接触角計) についてを計測し、固定化能との相関を明らかにする。最終的に項目 1) 、 2) の取り組みによって得られた知見をもとに、より実用的な設計指針を明らかにする。

4 . 研究成果

300 μm のマイクロ流路上にフェムト秒レーザー照射によって微細な溝構造を作製し、抗体タンパク質の局所固定化を目指す。準備として、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) 基板上へのレーザー照射と表面の機械的・化学的特性変化について調べた。レーザーの照射条件の選定を行う際に、レーザー加工システムに焦点位置観察用のレーザー変位計を導入することで再現性良い実験が可能となった。レーザー光を基板上に走査することで数 μm の溝を作製する。その際の走査速度は、500 $\mu\text{m}/\text{s}$ 未満に設定すると、再現性良く構造化することを確認した。レーザーの照射フルエンスを 1.5 J/cm^2 ~ に設定したとき、未処理の場合と比べて、抗体固定化量が大幅に増加することを確認した。しかし、フルエンス 4.5 J/cm^2 未満に設定した場合、溝の構造化に対する照射エネルギー不足による不均一な溝構造となることから、本研究では、フルエンスを 5.0 J/cm^2 以上で抗体固定化領域の作製を行う。また、溝同士の間隔は、改質領域に滴下された抗体固相液の滴下後の接触角に大きく影響し、ある条件で溝構造を配列すると超親水性の界面が得られることを確認した。このようにレーザー照射条件を選定する過程で、PMMA (ポリメタクリル酸メチル) 基板上のレーザー改質面を親水化させる条件を選定することで、改質面を流れる液体の流速が制御可能 (図 1、 2) であることを見出し、学術論文として報告した。

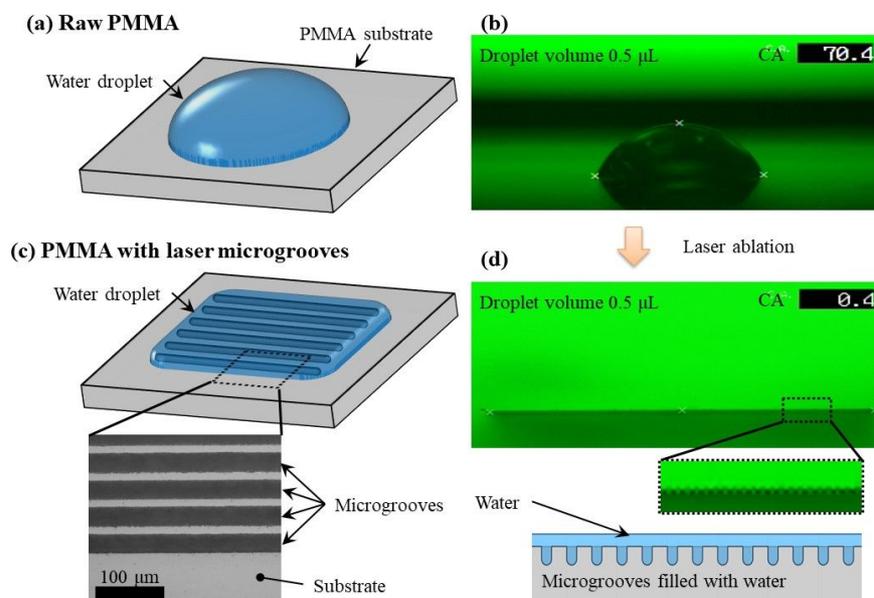


図 1 改質領域の模式図 (a , c) と接触角変化の様子 (b , d)

図 1 は改質領域の光学顕微鏡写真と接触角を示しており、レーザー照射による溝構造の配列により超親水性界面を任意の領域に作りこむことが可能である。また、図 2 に示すように溝構造の配列方法やレーザー照射条件を変化させることで、微小流体の流量制御が再現性良く制御可能であることを確認した。

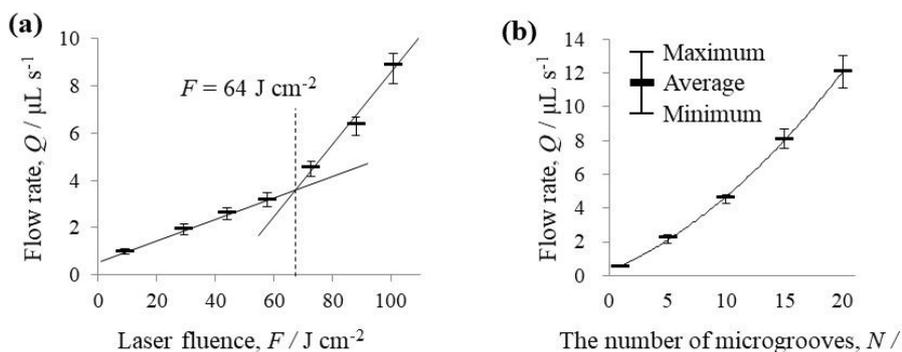


図 2 レーザー改質領域における液滴の流量変化

次にレーザー照射によって改質した領域の表面状態の分析を行った。分析方法は、X線光電子分光計測装置（XPS）を用いて未処理（図3：a）と改質領域（図3：b）の比較を観察した。観察結果から、本実験で作製したサンプルにおいても、文献[1]と同様に親水性官能基が増加しているようすが認められた。一方で文献の結果と比較すると、本実験では、親水性官能基の増加量に対して、改質領域の接触角が大幅に減少していることから、溝構造の機械的な特性も超親水性界面の発現に寄与していると推察した。検証実験を行った結果、溝構造の配列によって発現する超親水性界面は、微細な溝構造内への液滴と溝構造内で発生する毛細管現象が複合的に作用していることが確認された。

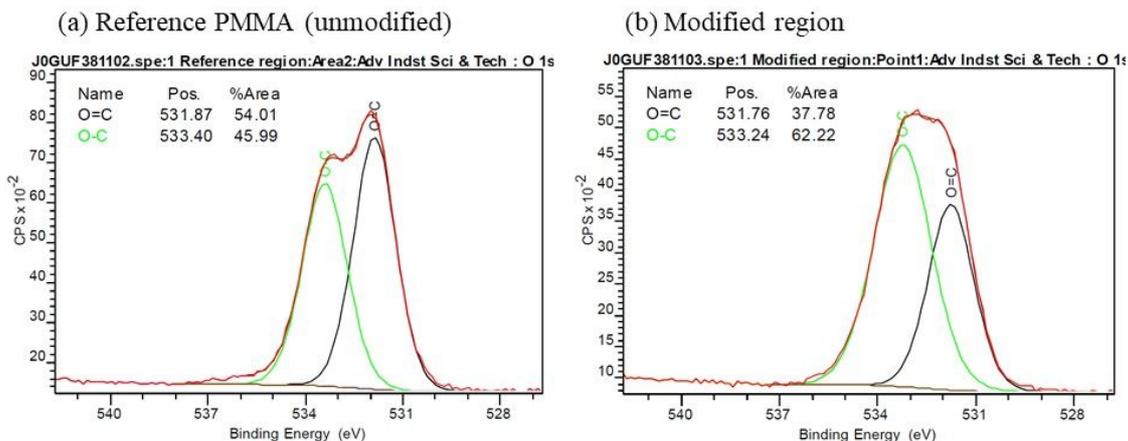


図3 レーザー改質前後のO1s XPS スペクトルの比較

蛍光標識抗体を用いた抗体固定化実験（AIST ロゴ写真）

最後にレーザーの照射条件と抗体固定化量について、蛍光標識抗体を用いて調べた。レーザーの単位面積当たりの照射パルス数を変化させたところ、照射パルス数が多いほど、改質領域底面に表れるLIPSS構造が密になり、抗体固定化量が増加することを確認した。また、レーザーフルエンスを1.7~6.1J/cm²の間においては、フルエンスが小さいほど、単位面積当たりの蛍光強度が強くなり、抗体固定化量が増加している傾向がみられた。レーザー照射条件と抗体固定化量については、より詳しい実験が必要であるが、レーザー底部に形成するLIPSSが固定化量の増加に寄与している可能性を確認した。また、図4の写真のようにレーザー加工が可能な形状であれば、任意の形状に抗体固定化が可能である。

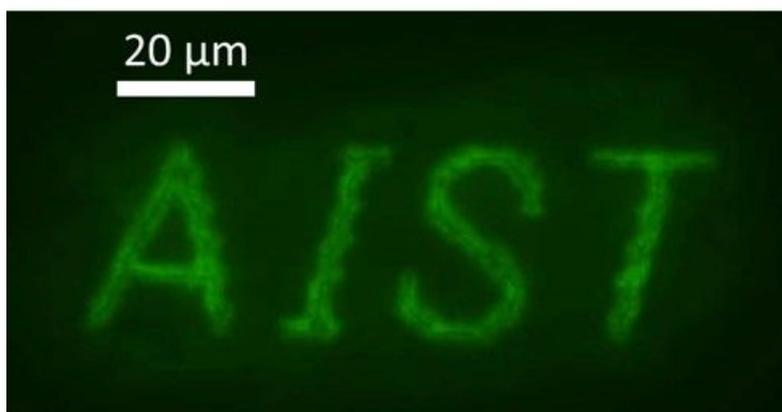


図4 蛍光標識抗体固定化領域の蛍光顕微鏡写真（産総研AISTのロゴ）

引用文献

[1] Z. Wang et al., Appl. Phys. Lett. 95 (2009).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kenji GOYA and Yusuke FUCHIWAKI	4. 巻 34
2. 論文標題 Paper-like Surface Microstructure Fabricated on a Polymer Surface by Femtosecond Laser Machining	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 33-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.34.33	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Goya, Yusuke Fuchiwaki, Masato Tanaka, Toshihiko Ooie	4. 巻 A180
2. 論文標題 Femtosecond laser surface modification of an immunoassay microchip for spatially-localized antibody immobilization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceeding of Laser Precision Microfabrication	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 FUCHIWAKI Yusuke, GOYA Kenji, TANAKA Masato	4. 巻 34
2. 論文標題 Practical High-Performance Lateral Flow Assay Based on Autonomous Microfluidic Replacement on a Film	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 57～63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.2116/analsci.34.57	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Goya Kenji	4. 巻 12
2. 論文標題 Multipoint Measurement Using an Inline Fibre Optic Spectrometer Fabricated with a 400 nm Femtosecond Laser	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Laser Micro/Nanoengineering	6. 最初と最後の頁 120～125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2961/jlmn.2017.02.0013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Goya Kenji, Yamachoshi Yuji, Fuchiwaki Yusuke, Tanaka Masato, Ooie Toshihiko, Abe Kaori, Kataoka Masatoshi	4. 巻 239
2. 論文標題 Femtosecond laser direct fabrication of micro-grooved textures on a capillary flow immunoassay microchip for spatially-selected antibody immobilization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 1275 ~ 1281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fuchiwaki Yusuke, Goya Kenji, Tanaka Masato, Takaoka Hiroki, Kaori Abe, Kataoka Masatoshi and Ooie Toshihiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Flow production of practical and quantitative capillary driven-flow immune sensing chip using a circumferentially-grooved island micro-surface	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal Engineering Research & Science	6. 最初と最後の頁 41-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kenji Goya, Yusuke Fuchiwaki, Masato Tanaka, Toshihiko Ooie
2. 発表標題 Femtosecond laser surface modification of an immunoassay microchip for spatially-localized antibody immobilization
3. 学会等名 The 18th International Symposium on Laser Precision Microfabrication (LPM) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 合谷賢治、淵脇雄介、田中正人、大家利彦
2. 発表標題 フェムト秒レーザーアブレーションを利用した PMMA基板の親水化と抗体タンパク質の局所固定化
3. 学会等名 応用物理学会春季学術講演会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 合谷賢治、淵脇雄介、田中正人、大家俊彦、片岡正俊
2. 発表標題 フェムト秒レーザー加工を利用したマイクロ流体チップの局所親水化と抗体分子の固定化
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会 第40回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 淵脇雄介、田中正人、合谷賢治
2. 発表標題 紙とフィルムでつくる高感度な携帯型多項目生化学検査キットの試作
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 淵脇雄介、合谷賢治、田中正人
2. 発表標題 紙・フィルム・テープでつくる多項目検査キットの開発
3. 学会等名 日本臨床検査自動化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 淵脇雄介、合谷賢治、田中正人
2. 発表標題 紙とフィルムでつくる多項目分析チップと体外診断キットへの応用
3. 学会等名 分析化学会 第66年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----