

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286038

研究課題名(和文)ハイブリッドフェムト秒レーザー加工によるボトルシップ型バイオチップの作製

研究課題名(英文)Fabrication of ship-in-a-bottle biochips by hybrid femtosecond laser processing

研究代表者

杉岡 幸次 (SUGIOKA, Koji)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・ユニットリーダー

研究者番号：70187649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：新しいタイプの高機能バイオチップ(ボトルシップ型バイオチップ)を作製することを目的として、ガラス内部3次元加工技術と2光子マイクロ/ナノ光造形技術を融合したハイブリッドフェムト秒レーザー加工技術の開発を行った。開発した技術により、3次元ガラスマイクロ流体構造内に、複合機能素子を集積化し、マイクロチャンネル内でマイクロ粒子の選別ならびに効率的な2液混合を同時に行うことに成功した。さらに、センターパスユニットと組み合わせたマイクロレンズアレイを集積化したボトルシップ型バイオチップの作製により、100%の細胞を並列に検出、計数することを実現した。

研究成果の概要(英文)：To fabricate a new type of biochips possessing high functionalities referred to as ship-in-a-bottle biochips, we developed hybrid femtosecond laser processing, in which three-dimensional (3D) glass micromachining and two-photon micro/nano polymerization were successively carried out. The developed technique allowed us to integrate multifunctional components into the 3D glass microfluidic structures for filtering microparticles and efficiently mixing two kinds of fluids in the microchannel at the same time. Furthermore, integration of a microlens array combined with center-pass units realized the ship-in-a-bottle biochip enabling parallel detection and counting of biological cells with the 100% success rate.

研究分野：レーザープロセッシング

キーワード：先端機能デバイス マイクロナノデバイス レーザー加工 ナノマイクロファブリケーション バイオチップ

1. 研究開始当初の背景

従来の生物化学実験室の機能を、手のひらサイズのマイクロチップ上に集積化したバイオチップ (Lab-on-a-Chip, μ -TAS, Optofluidics 等) は、バイオ・化学物質の高速・高感度・高効率の反応、分析、検出、分離、精製を実現する。さらに用いる試薬量の低減を可能にし、環境にもやさしい。そのため、近年その製造技術はもとより利用技術の研究開発が盛んになっている。

バイオチップの作製法は、PDMS(polydimethylsiloxane)を用いたソフトリソグラフィが一般的である。ソフトリソグラフィは簡便かつ安価な手法であるが、バイオチップの基板となる3次元流体構造を実現するには基板を貼りあわせる工程が必要となる。もう一つの一般的な手法はガラスや Si 基板を用いた半導体プロセスであるが、これも3次元流体構造作製には基板の貼りあわせが必要である。さらに双方とも機能的なバイオチップを構築するには、他の機能素子を集積化する別のプロセスが要求される。

我々はフェムト秒レーザーを用いることにより、基板を貼りあわせることなく、ガラス内部に直接3次元マイクロ流体構造を形成する技術を開発した。ガラス内部3次元加工技術は、マイクロ流体デバイス作製において有用な手法であるが、フッ酸エッチングを伴うため 10 μ m をきる解像度でその内部に3次元構造体を作製することは困難であった。一方フェムト秒レーザーを用いた2光子光造形法を用いれば、100 nm 程度の加工解像度で、3次元マイクロ・ナノ構造を作製することができる。しかし2光子光造形法のみでバイオチップを作製することは、材料(ネガ型レジスト)自体の強度および化学的安定性がバイオチップ基板としては十分ではない、また3次元流体構造を作製するのは容易ではない、といった問題点があった。

2. 研究の目的

本研究は、フェムト秒レーザーによるガラス内部3次元加工技術と2光子マイクロ・ナノ光造形技術の利点を融合(ハイブリッドフェムト秒レーザー加工)し、新しいタイプの高機能バイオチップ(ボトルシップ型バイオチップ)作製に応用することを目的とした。

そのためにまず、ガラス内部に作製した3次元流体構造内部に、2光子光造形により3次元マイクロ・ナノ構造体を内包させる技術の開発を行った。開発した技術を駆使し、マイクロ流体デバイス内に機能素子を集積化した高機能バイオチップを作製し、実際のバイオ化学実験に応用した。

本研究は、新規製造法による新規バイオチップ作製を提案したもので、学術的にも独創性があり、作製したバイオチップが多様な分野で利用できることから社会的にも意義が大きい。

3. 研究の方法

フェムト秒レーザーによるガラス内部3次元加工技術と2光子光造形法を組み合わせたハイブリッドフェムト秒レーザー加工技術を開発し、ガラスマイクロ流体素子に3次元ポリマーマイクロ・ナノ構造体を内包する新しいタイプ(ボトルシップ型)の高機能バイオチップを作製した。具体的な実験手順を図1に示す。まず図1(a)に示すように、ガラスに対してフェムト秒レーザー直描を行なう。用いたフェムト秒レーザーはガラスには吸収がないが、ピーク強度がきわめて高いため多光子吸収を生じさせることができる。ここでレーザー光を適当な強度でガラス内部に集光すると、集光点でのみ多光子吸収を誘起でき、図1(b)に示すように材料内部の3次元改質を行うことができる。レーザー改質領域はレーザー未照射領域と比較してフッ酸水溶液に対し50倍程度大きいエッチング速度を有する。その結果、フッ酸エッチングによりレーザー照射領域を選択的に除去することができ、図1(c)に示す3次元マイクロ流体構造をガラス内部に形成することができた。引き続き、形成された流体構造にフォトレジスト(SU-8)を充填し(図1(d))、プリベーク後フェムト秒レーザー2光子光造形により3次元マイクロ・ナノパターンを描画する(図1(e))。ポストベーク後未反応のフォトレジストを除去することにより、流体構造内部に3次元ポリマーマイクロ・ナノ構造体(ボトルシップ構造)を内包させた(図1(f))。

開発した技術を用いて、マイクロ流体素子に流体フィルターや流体ミキサーといった機能素子を組み込んだ高機能バイオチップの作製を行ない、その機能を実証した。

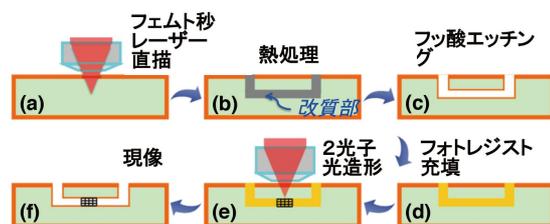


図1 ハイブリッドフェムト秒レーザー加工によるボトルシップ型バイオチップの作製手順。

4. 研究成果

(1) マイクロミキサー/マイクロフィルター複合機能素子の集積化

開発したハイブリッドフェムト秒レーザー加工技術により、埋め込み型ガラスマイクロ流体構造内に、マイクロミキサーとマイクロフィルターの機能を合わせ持つ複合機能素子を集積化すること試みた。図2は、2光子光造形によって作製したマイクロミキサー/マイクロフィルター複合機能素子(図2

(a) を、ガラス内部に形成した Y 字型マイクロチャンネル内に集積化した結果を示す。マイクロミキサーを集積していない単純なマイクロチャンネルでは、異なる種類の溶液を混合するのは困難であり、層流が形成される (図 2 (c))。一方マイクロミキサーを集積したマイクロチャンネルでは、非常に短い距離で 2 液を効率よく混合することができた (図 2 (b))。マイクロチャンネル内の 2 液混合はこれまでも多くのグループで試みられているが、2 液を混合するのにチャンネル幅に対して 20~100 倍の長さを要していた。一方作製したボトルシップ型バイオチップで混合に要する距離は約 270 μm であり、チャンネルの幅とほぼ同じ距離で効率よく混合することに成功した。集積化した複合機能素子は、図 2 (a) で見られるようにその両端にフィルター構造が形成されている。その結果、図 2 (b) 左上の挿入写真から分かるように、ある寸法以上の粒子の流入を阻止するフィルタリング機能も有している。

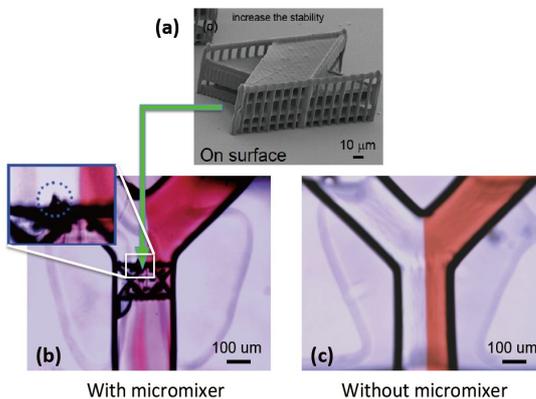


図 2 2 光子光造形によって作製したマイクロミキサー/マイクロフィルター複合機能素子(a)を、ガラス内部に形成した Y 字型マイクロチャンネル内に集積化したバイオチップ。マイクロミキサーを集積したマイクロチャンネルでは、2 液を効率よく混合することができる(b)が、集積していないマイクロチャンネルでは、2 液はまったく混合されない。

このマイクロミキサーを集積したマイクロ流体デバイスをマイクロリアクターに応用した。作製したマイクロリアクターの走査型電子顕微鏡写真を、図 3 (a) に示す。電子顕微鏡像のため、ガラス内部に作製した流体チャンネルならびにマイクロミキサーは観察することはできないが、それぞれ赤および青の点線でその位置を示してある。一方右上の挿入写真は光学顕微鏡像のため、流体チャンネルとマイクロミキサーがはっきりと確認できる。Inlet 1 から硝酸亜鉛溶液、Inlet 2 からアンモニア水を導入すると、マイクロミキサーにより 2 液が効率よく混合され、マイクロ流体デバイス内で金平糖のような形状の ZnO 微粒子を合成することに成功した (図 3 (b))。

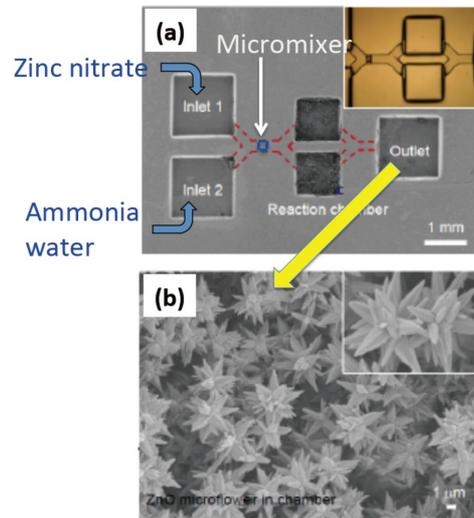


図 3 マイクロミキサーを集積したマイクロリアクターの走査型電子顕微鏡写真 (a)。硝酸亜鉛溶液とアンモニア水を導入することにより、2 液が混合され、金平糖のような形状の ZnO 微粒子が合成される (b)。

(2) 細胞並列検出・計数を実現するオプトフルイデックスの作製

フェムト秒レーザー 2 光子造形では、開口数が 1.4 程度の油浸対物レンズを用いれば、100nm 程度の加工解像度を得ることができる。一方ボトルシップ型集積では、レーザー光が油/ガラス、ガラス/レジストの 2 つの界面を通過するため、球面収差の影響により加工解像度は悪化する。それでも数百 nm 程度の解像度を得ることができるため、きわめて平滑な面を持つ 3 次元構造も作製することが可能である。この特長を利用して、ガラスマイクロ流体構造内部にポリマーマイクロレンズを集積化し、細胞の並列検出・計数を実現するオプトフルイデックスの作製を試みた。

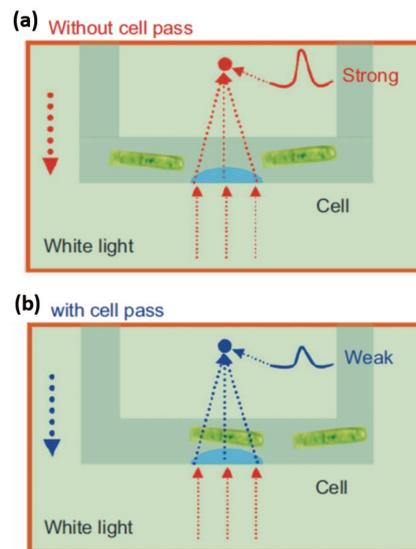


図 4 2 光子造形によるマイクロレンズを集積化したオプトフルイデックスの細胞検出の原理図。

図4に、作製したオプトルイディクスの細胞検出の原理図を示す。本オプトルイディクスでは、ガラスマイクロ流体チャンネルの底面に、2光子造形によりポリマーマイクロレンズが集積化されている。バイオチップ底面より白色光を照射すると、白色光はレンズによってマイクロチャンネルの上部において集光される(図4(a))。このとき生細胞がマイクロレンズの上を通過すると、生細胞による白色光の散乱、反射、吸収等が生じ、集光点における白色光の強度が低下する(図4(b))。従って集光点における白色光の強度の経時変化を観測し、強度の減少を測定することによって、細胞の検出・計数を行うことができる。

本手法では、先にも述べたとおり加工解像度が数百 nm 程度であるため、直径が 30 μm 程度のマイクロレンズを作製することは容易である。さらにガラスマイクロチャンネルの幅は 200~300 μm であるため、チャンネルの幅方向に複数のマイクロレンズをアレイ状に配置することが可能である。それぞれのマイクロレンズの集光点での強度の経時変化を測定すれば、複数の細胞を同時に検出する、並列検出が実現できる。しかしマイクロレンズアレイ構造にした場合、隣接するレンズの境界上を細胞が通過すると、その細胞が検出できない可能性がある。実際7つのレンズからなるマイクロレンズアレイを用いて検出を試みた結果、検出率は93%であった。

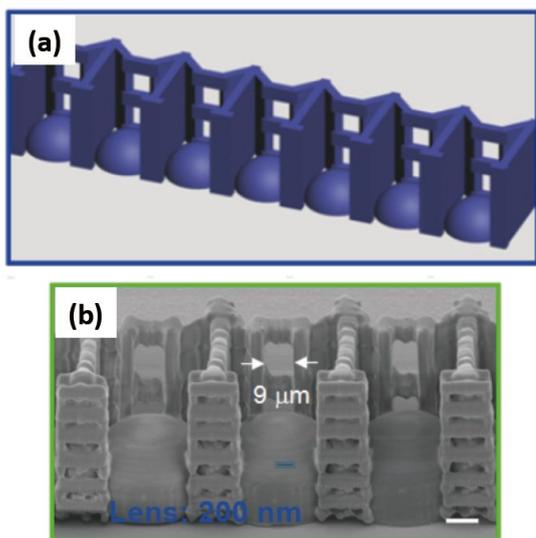


図5 100%細胞検出を行うための、M字型センターパスユニットを組み合わせたマイクロレンズアレイ ((a) 3次元模式図、(b) 電子顕微鏡写真)。

100%の検出を行うために、1つのレンズにM字型のセンターパスユニットを組み合わせたもの7つからなるマイクロレンズアレイを作製した(図5(a) 3次元模式図、(b) 電子顕微鏡写真)。センターパスユニットは、M字の中心部分に直径 9 μm の孔が2つ空いて

おり、ここを通り抜けた細胞が隣接するレンズの境界部分を通過することを妨げている。その結果、すべての細胞はレンズのほぼ中心部分を通過し、白色光に強度変化をもたらすため、100%の検出が可能になる。

図6に、作製したオプトルイディクスを用いて、実際に細胞の検出・計数を行った結果を示す。図6の最下段右端は、作製したオプトルイディクスの光学顕微鏡写真である。生物試料としてミドリムシを30匹流体チャンネルに導入したところ、7つのマイクロレンズにより合計30の白色光の強度変化を観察した。すなわち100%の細胞を並列に検出・計数することに成功した。

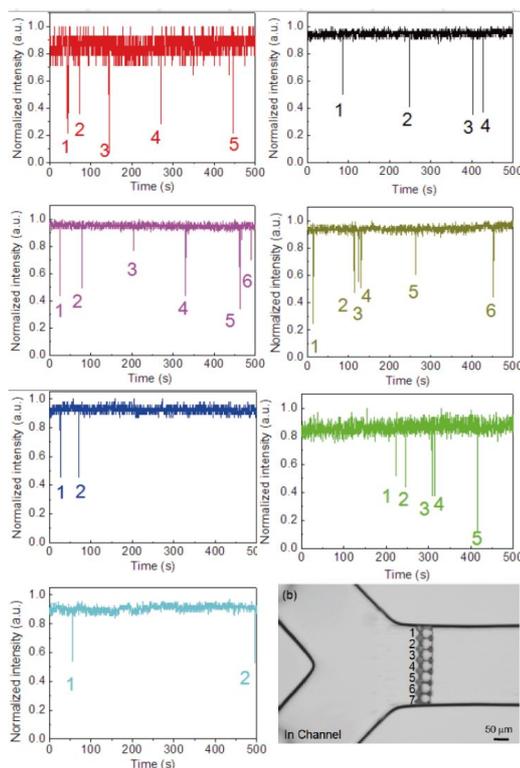


図6 作製したオプトルイディクスを用いて、細胞の検出・計数を行った結果。最下段右端は、オプトルイディクスの光学顕微鏡写真。

(3) 得られた成果の位置づけ、インパクト、今後の展望

近年ガラス3次元加工によるバイオチップの作製は、フェムト秒レーザー加工の重要な応用分野となっている。しかしこれまでは3次元流体構造を形成し、さらに光導波路などの簡単な光学素子を集積化したものしか作製されていなかった。微小な構造を持つ機能素子の集積化は、バイオチップを高機能化する上で必要不可欠であるが、ガラス3次元加工技術のみでこれを実現することは不可能であった。本研究では、ガラス3次元加工と2光子光造形との融合により、全く独創的な手法でバイオチップの高機能化を実現した。本研究で開発した技術により、異なる機

能を持った新しいタイプのバイオチップを、1つのフェムト秒レーザー加工システムで実現することができ、既存のバイオチップ作製技術にはない大きなアドバンテージを提供することができた。このような高機能バイオチップの作製は、化学、バイオ、医療、環境、食品等きわめて広範囲での利用が期待される。なお本研究テーマは現在も継続しており、ガラスマイクロ流体チャンネル内に、3次元ポリマー構造によりさらに細いチャンネルアレイ構造を形成し、癌細胞の転移メカニズムの解明への応用を検討している。

<引用文献>

- M. A. Burns, B. N. Johnson, S. N. Brahma, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, T. S. Sammarco, P. M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C. H. Mastrangelo, and D. T. Burke, An integrated nanoliter DNA analysis device, *Science* **282**, 1988, 484–487.
- D. C. Duffy, J. C. McDonald, J. A. Schueller, and G. M. Whitesides, Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane) *Anal. Chem.* **70**, 1998, 4974–4984.
- T. McCreedy, Fabrication techniques and materials commonly used for the production of microreactors and micro total analytical systems, *Trac-Trends Anal. Chem.* **19**, 2000, 396–401.
- K. Sugioka, Y. Cheng, and K. Midorikawa, Three-dimensional micromachining of glass using femtosecond laser for lab-on-a-chip device manufacture, *Appl. Phys.* **A81**, 2005, 1–10.
- K. Sugioka, Y. Hanada, and K. Midorikawa, Three-dimensional femtosecond laser micromachining of photosensitive glass for biomicrochips, *Laser Photon. Rev.* **3**, 2010, 386–400.
- S. Jeon, V. Malyarchuk, J. O. White, and J. A. Rogers, Optically fabricated three dimensional nanofluidic mixers for microfluidic devices, *Nano Lett.* **5**, 2005, 1351–1356.
- A.W. Martinez, S. T. Phillips, and G. M. Whitesides, Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape, *PNAS* **105**, 2008, 19606–19611.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 8 件)

- B. Xu, W. Du, J. Li, Y. Hu, L. Yang, C. Zhang, G. Li, Z. Lao, J. Ni, J. Chu, D. Wu, S. Liu, and K. Sugioka, “High efficiency integration of three-dimensional functional microdevices inside a microfluidic chip by using femtosecond laser multifoci parallel microfabrication”, *Sci. Rep.* **6**, 19989 (2016).

DOI: 10.1038/srep19989, 査読有り.

D. Wu, L. G. Niu, S. Z. Wu, J. Xu, K. Midorikawa, and K. Sugioka, “Ship-in-a-bottle femtosecond laser integration of optofluidic microlens arrays with center-pass units enabling coupling-free parallel cell counting with 100% success rate”, *Lab Chip* **15**, 1515–1523 (2015). DOI: 10.1039/C4LC01439A, 査読有り.

D. Wu, J. Xu, L. Niu, S. Wu, K. Midorikawa, and K. Sugioka, “In-channel integration of designable microoptical devices using flat scaffold-supported femtosecond-laser microfabrication for coupling-free optofluidic cell counting”, *Light Sci. Appl.* **4**, e228 (2015). DOI: 10.1038/lsa.2015.1, 査読有り.

D. Wu, S. Wu, J. Xu, L. Niu, K. Midorikawa, and K. Sugioka, “Hybrid femtosecond laser microfabrication to achieve true 3D glass/polymer composite biochips with multiscale features and high performance: the concept of ship-in-a-bottle biochip”, *Laser Photon. Rev.* **8**, 458–467 (2014). DOI: 10.1002/lpor.201400005, 査読有り.

K. Sugioka, J. Xu, D. Wu, Y. Hanada, Z. Wang, Y. Cheng, and K. Midorikawa, “Femtosecond laser 3D micromachining: a powerful tool for the fabrication of microfluidic, optofluidic, and electrofluidic devices based on glass”, *Lab Chip* **14**, 3447–3458 (2014). DOI: 10.1039/C4LC00548A, 査読有り.

K. Sugioka and Y. Cheng, “Fabrication of 3D microfluidic structures inside glass by femtosecond laser micromachining”, *Appl. Phys.* **A114**, 215–221 (2014). DOI: 10.1007/s00339-013-8107-3, 査読有り.

[学会発表] (計 4 8 件)

K. Sugioka, J. Xu, F. Sima, H. Kawano, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, “Hybrid subtractive and additive 3D microprocessing using femtosecond laser for functional biochip fabrication”, The 10th International Conference on Photo-Excited Processes and Applications (ICPEPA-10), Brasov, Romania, 8/29-9/2. (2016). (to be presented). Invited talk.

K. Sugioka, J. Xu, F. Sima, H. Kawano, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, “Hybrid subtractive and additive 3D processing using femtosecond laser”, 2016 Light Conference, Changchun, China, 7/4-8 (2016). (to be presented). Invited talk.

K. Sugioka, J. Xu, F. Sima, D. Wu, and K. Midorikawa, “Manufacture of 3D functional biochips by hybrid additive and subtractive femtosecond laser processing”, 3rd Int. Academy of Photon. and Laser

Engin. (IAPLE) Conference, Honolulu, USA, 8/4-7 (2015). Keynote talk.

K. Sugioka, J. Xu, F. Sima, D. Wu, and K. Midorikawa, "Hybrid femtosecond laser 3D microprocessing consisting of subtractive and additive manufacturing", 23rd Int. Conf. on Advanced Laser Technology (ALT' 15), Faro, Portugal, 9/7-11 (2015). Invited talk.

K. Sugioka, J. Xu, F. Sima, D. Wu, and K. Midorikawa, "Hybrid femtosecond subtractive and additive 3D manufacturing for biochip fabrication", Conf. on Lasers and Electro-Optics (CLEO 2015), San Jose, USA, 5/10-15 (2015). Invited talk.

K. Sugioka, "The state of the art in ultrafast laser processing", Laser World of Photonics China 2015, 10th International Laser Processing and Systems Conference (LPC 2015), Shanghai, China, 3/17-19 (2015). Plenary talk.

K. Sugioka, D. Wu, J. Xu, and K. Midorikawa, "Ship-in-a-bottle integration by hybrid femtosecond laser processing for fabrication of highly functional biochips", 23rd Int. Cong. on Applications of Lasers & Electro-Optics (ICALEO 2014), San Diego, USA, 10/20-24 (2014). Invited talk.

K. Sugioka, J. Xu, D. Wu, and K. Midorikawa, "Femtosecond laser 3D micromachining: reliable tool for fabrication of highly functional biochips", 23rd General Meeting of the International Commission for Optics (ICO-23), Santiago de Compostela, Spain, 8/26-29 (2014). Keynote talk.

K. Sugioka, "Femtosecond laser 3D micromachining and its applications to biochip fabrication", SPIE Photonics WEST - LASE 2014, San Francisco, USA, 2/2-7. (2014). Plenary talk.

K. Sugioka, D. Wu, and K. Midorikawa, "Hybrid femtosecond laser processing for fabrication of highly functional biomicrochips", EUROMAT 2013 Symp. on Ultrafast Laser Processing and Functionalization of Materials for Technological Applications, Seville, Spain, 9/8-13 (2013). Invited talk.

K. Sugioka, D. Wu, and K. Midorikawa, "Hybrid femtosecond laser processing for fabrication of microfluidics and optofluidics", Optofluidics 2013, Hong-Kong, China, 8/15-17 (2013). Invited talk.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ:

http://www.riken.jp/research/labs/rap/extr_photonics/riken_siom/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉岡 幸次 (SUGIOKA, Koji)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・ユニットリーダー

研究者番号: 70187649

(2) 研究分担者

WU Dong (WU, Dong)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・国際特別研究員

研究者番号: 50618775

(平成25~26年度)

(3) 連携研究者

河野 弘幸 (KAWANO Hiroyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 10332256