

# バイオチップ製造プロセスのベストプラクティスを指向した レーザ表面改質分子認識界面の創製

国立研究開発法人産業技術総合研究所 健康工学研究部門  
主任研究員 潤脇 雄介  
(平成 25 年度一般研究開発助成 AF-2013210)

キーワード：バイオチップ，フェムト秒，分子認識

## 1. 研究の目的と背景

### 1.1 マイクロ流路を利用した微量診断システム

平成 25 年に閣議決定された科学技術イノベーション総合戦略-新次元日本創造への挑戦-のなかで、「国際社会の先駆けとなる健康長寿社会の実現」が明記されており、「治す医療」から「予防する医療」が待望されている。発症前診断等に基づき早期に治療を行う先制医療や、効率的な個別化医療の実現は、大型の病院や検査機関、又はクリニックや在宅医療においても適用範囲の拡大が期待されている。このような背景のもと小型で低侵襲なバイオマーカーを測定・診断するシステムとして、手軽に扱えるバイオチップへの期待が大きい。

マイクロ流路を利用したバイオチップは、ガラスやプラスチック製の基板に数十～数百  $\mu\text{m}$  幅の流路を作製して、その流路のなかで微量検体の検出や測定を行う。なかでも前処理や分離、検知等の最新技術は日本が世界をリードしている。バイオチップは「もの」自体が小型・安価であることから検知にかかる所要時間を短縮でき、感度や検出限界の向上が期待できる。また、検知にかかる検体量が微量で済むことから、患者への負担を軽減できることに加え、安価なためチップを使い捨てにするなど目的に応じた展開も期待できる。

本研究開発では安価なプラスチック製の板に(縦×横×厚み：30 mm × 60 mm × 2 mm)、微細加工技術によりマイクロ流路(幅×深さ：0.3 mm×0.1 mm)を作製し、インクジェット印刷で抗体を流路上へ塗布した。これにより抗原抗体反応に伴う診断のためのチップを作製した。

塗布した抗体はマイクロ流路上に暫く放置するだけで、自然に抗体が固定化されるよう調製した。抗体は検体液中のバイオマーカーを特異的に捕捉するため、この部分を本研究では分子認識界面と呼んでいる。使い方は、マイクロリットルあるいはミリグラム程度以下の微量の検体液や試薬を、マイクロ流路の入り口の細孔部に滴下すると、毛管力によって液が自然にマイクロ流路内へ流動していく。検体液中のバイオマーカーは、分子認識界面の抗体と特異的に反応し、その後、洗浄液を使って未反応の分子を洗浄除去する。測定試薬と洗浄液を順次流路内へ流動させ、最後に検出用試薬を流動させると、酵素反応にともなう化学発光の測定が可能になる。光量の値からバイオマーカーの濃度を定量する。

### 1.2 微量診断システムのレギュラトリーサイエンス

実用的な診断システムを目指すうえで、薬機法等の規制に対する研究開発の位置づけを考慮しておくことは重要である。マイクロ流路を利用した診断システムは、一般的には、反応系に関わる試薬等を有するチップの部分と、シグナル解析を行う分析機器を組み合わせた構成から成る(体外診断用医薬品あるいは医療機器等に該当)。

本構成が薬機法等に基づき評価される場合、厚生労働省からの通知や既承認品等に習えば、原則的には個別に評価されるが、新規品目であれば、臨床性能試験を経て臨床的意義を説明することになる。また、類似のシステムであっても使い方が異なる場合は、規制上の位置づけが変わるので、この点も留意しておく必要がある。

マイクロ流路を有する診断システムは、ガイドライン等による基準がないため(2016年現在)、製造販売業者は品質・性能にかかわる規格の設定に苦慮するが、現時点では社内担保や CLIA、或いは FDA での先行例等を参考に、個別に説明することが一案と考えられる。

審査上は、分析的性能が予め担保されていることを前提に臨床的性能が重視される。たとえば、既承認品との差分等を比較する対照法や公知な分析的方法との比較試験等によって、臨床的性能の位置づけを明らかにしていく。しかし、マイクロ流路を利用した診断システムは、本邦では承認・認証の実績が少ないため、開発初期の段階から規制上の位置づけや基本要件基準等を考慮し、一定の品質を担保した製造プロセスを適用していくことが望ましい。

本研究では手技・手法に依らず、デジタル制御によるレーザ改質を適用することで、一定の品質を担保してバイオ分子を固定化することを検討した。これにより、化学的不安定な架橋剤や操作上の影響を受けずに、高精度かつ高効率なバイオチップ製造プロセスの創製を図った。

### 1.3 研究の目的

先の奨励研究助成(平成 23 年度奨励研究助成 AF-2011220)でプラスチック製基板のマイクロ流路表面に、ナノ秒のパルス波のレーザ照射をすると、ドライプロセス下でも大量かつ高精度に抗体を固定化できることを報告した<sup>1-3</sup>。しかし抗体固定化面積を一定にすることや、マイクロ流路中での液の入れ替えの精度がまだ十分ではなかったため、本研究ではナノ秒ではなくフェムト秒レーザを活用することで加工精度が向上するため、これらの問

題の解決をはかり、製造上のベストプラクティスの可能性を検討した。また抗体の吐出はインクジェット法を用いた。

一般的に医療機器・体外診断薬は医薬品と異なり製品のサイクル期間が短く、被験者のニーズに従った形で日々技術の改良・進歩がはかられている。また基礎研究で抗体を固定化する機能の改善の成果が、上市を目指すフェーズに入ると、プロトコル・専門性・コスト・スピード・人材・設備などといった製造プロセス上の制限を大きく受ける。よって、基礎研究の成果を産業界へスムーズに拡大していくには、製造プロセス上の問題も同時に解決することが望ましい。そこで本研究では、インクジェット法による迅速・正確な抗体の定点吐出と、フェムト秒レーザーによる改質技術及び固定化面積の確保を目的に検討を行った。

一般論として、実用的なバイオチップに求められる概念的な要求事項は、臨床的な意義や分析性能だけでなく、品質や安全性など他にもたくさんあるが、本研究開発では微量診断システム特有の、マイクロ流路中での抗体固定化能に焦点をあて検討することとした。

## 2. 実験方法

### 2.1 マイクロ流路への抗体固定化

マイクロ流路を有するバイオチップは、ポリメチルメタクリレート樹脂(PMMA)基板と、表面にタンパク質固定用の表面処理が施された、環状ポリオレフィン (COC、住友ベークライト社製) 基板を用いた。共に基板の表面には、幅 300  $\mu\text{m}$ 、深さ 100  $\mu\text{m}$ 、長さ 60  $\mu\text{m}$  の直線流路がデザインされており、その両端には直径 1 mm の貫通孔がある。

表面改質の条件は、フェムト秒レーザーのフルエンスを 0~5.1 J/cm<sup>2</sup>、周波数 1kHz、走査速度 100  $\mu\text{m}/\text{s}$  の範囲で検討した。インクジェット法は、ピエゾ駆動型の実験機(クラスターテクノロジー) を用いて、チップ上のマイクロ流路底面に、一流路あたり複数点を吐出し、抗体の固定化を行った (図 1)。

吐出・固定化された抗体溶液量は、吐出された液滴の顕微鏡拡大像をストロボ撮影し、画像の直径と液滴数から算出した。今回の実験では、いずれも直径は 56  $\mu\text{m}$  で体積は 92 pl であった。固定化の際には 200 回の吐出を行っており、1 点あたりの抗体溶液量は 18.4 nl である。

### 2.2 流路カバーと測定手順

流路底面に抗体を吐出固定化したあとは、粘着塗布フィルム (東洋インキ) により、流路をカバーし、両端の貫通孔をそれぞれ試料導入用と排出用のポートとする評価用チップを構成した。測定モデル抗原として、特異性の高い抗体が市販されている骨粗鬆症や癌転移のバイオマーカーである、血中 I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (PICP) を用いた。抗体は、PICP 用モノクローナル抗体 (タカラバイオ) を使い、緩衝液で 0.1mg/ml に希釈した。

検出用チップのフィルム面を下にして、マイクロプレー

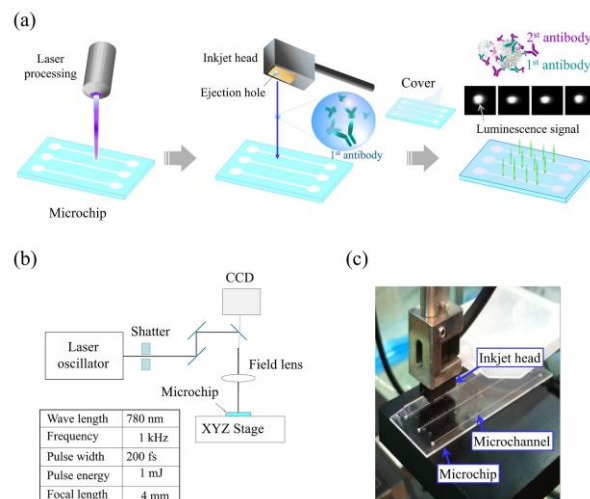


図 1 マイクロ流路上への分子認識界面の作製: a) レーザ表面改質とインクジェット印刷による抗体固定化の手順, b) フェムト秒レーザーシステムの概略図, c) マイクロ流路への抗体固定化

トでのサンドイッチ ELISA ( Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法に準じた以下の手順で測定・評価を行った。① 室温で 4 時間放置して自然乾燥、② 洗浄液を 3 回導入、③ 抗原溶液とペルオキシダーゼ標識 2 次抗体の混合液を導入、④ 15 分間放置して化学発光基質溶液を導入、⑤ 発光強度を冷却 CCD カメラを用いて測定を行う (GE ヘルスケア, LAS2000)。

### 2.3 抗体固定化前のエッチング処理

分子認識界面はマイクロ空間中にあり、抗原抗体反応にともなう発光を正確に測定するには、界面が正確に調製されることが求められる。しかしレーザー照射でマイクロ流路表面の改質を行うと、実際には小さな粕やクズなどのデブリが多く発生する。界面上でこのデブリが散乱していると、インクジェットで一次抗体を正確に吐出しても、デブリが邪魔をして、マイクロ流路の表面に正確に抗体を固定化できなくなる。また、検出の過程で未結合の 2 次抗体や抗原、非特異吸着などを洗浄する場合に、部分的にデブリも洗浄液と一緒に除去されてしまう。そこで、プラスチック素材のデブリの除去に効果があるとされている現像液を調製して、エッチングによりデブリの除去を試みた<sup>4</sup>。レーザー照射したサンプルを現像液に浸けて 1 分間超音波洗浄をし、ストッパー溶液に浸けて超音波洗浄を行う。その後、蒸留水で濯ぎ洗いをを行い乾燥させる。その結果、水洗浄後はレーザー照射面にデブリが残存していたのに対し、エッチング後はデブリがきれいに取り除かれていることを確認した。効果としては、検出に伴う発光はレーザー表面処理後と同程度であったが、バラつきは大幅に減少していること

が確認された。このことから、本エッチング方法で洗浄を行ったのち、抗体の固定化を行うこととした。

### 3. 実験成果

#### 3.1 フェムト秒レーザーによる加工・表面改質・抗体固定化

フェムト秒レーザーで PMMA 表面を改質すると濡れ性が変化する。そこで、フェムト秒レーザーのフルエンス強度に対する接触角を調べた (図 2)。その結果、フルエンス値の増加に伴い規則的な凹凸形状がよりシャープになり、全体として黒色へ濃く変色した。そして、フルエンス値が  $5.1 \text{ J/cm}^2$  まで大きくなると、接触角は  $3.3^\circ$  まで小さくなり、超親水化状態になることを確認した。具体的には表面改質は  $206 \text{ フェムト秒}$ 、 $8 \text{ パルス}$  (1 ショット)、 $5.10 \text{ J/cm}^2$  のときに超親水化されて、抗体固定化面積のバラつきが 5% 前後まで低減できた。また、エネルギー密度 ( $5.10 \text{ J/cm}^2$ ) が高いと抗体液が均一に塗れ広がり固定化は促進されるが、エネルギー密度が高すぎると表面粗さも大きくなるため、固定される抗体量のバラつきも大きくなることが分かった。

フルエンス [ $\text{J/cm}^2$ ]	0	1.52	3.82	5.10
接触角	$70.4 \pm 3.4$	$68.0 \pm 1.8$	$55.5 \pm 1.7$	$3.3 \pm 0.4$
液滴の画像				

図 2 フェムト秒レーザーのフルエンス強度に対する接触角の変化

先の奨励研究助成 (平成 23 年度奨励研究助成 AF-2011220) のナノ秒 UV レーザ照射では超親水化状態を作製するにはいたらなかったが、本研究ではフェムト秒レーザー照射を駆逐することにより、超親水化状態を創り出して、微量の抗体液を狙った大きさで正確な位置に吐出・固定化できるようになった。

このような濡れ性の変化は、抗体溶液を正確に定点吐出するうえで極めて重要である。一般的に、微小な空間のマイクロ流路の表面に、抗体を担持させるバイオチップの作製上の課題として、①抗体固定化能の賦与、②抗体液をマイクロ流路上に正確に吐出・固定化するときの歩留まりの向上がある。特に②は、測定値のバラつきの直接的な要因となる。インクジェットで吐出した抗体液がどのように表面に広がるかは、親水性の度合いと表面形状・状態によって大きく左右されるため、本研究開発ではレーザーアブレーションにより、マイクロ流路の表面に超親水性の窪み加工を施し、その窪みのなかに抗体液を吐出することで、液の広がり方を制御・規定する方法をとった。この方法の利点は、窪み加工で一定の表面積を作製・維持できるため、インクジェットにより高粘度の抗体液を定点吐出する場合に多少のバラつきが発生しても、窪みがある部分内のみ

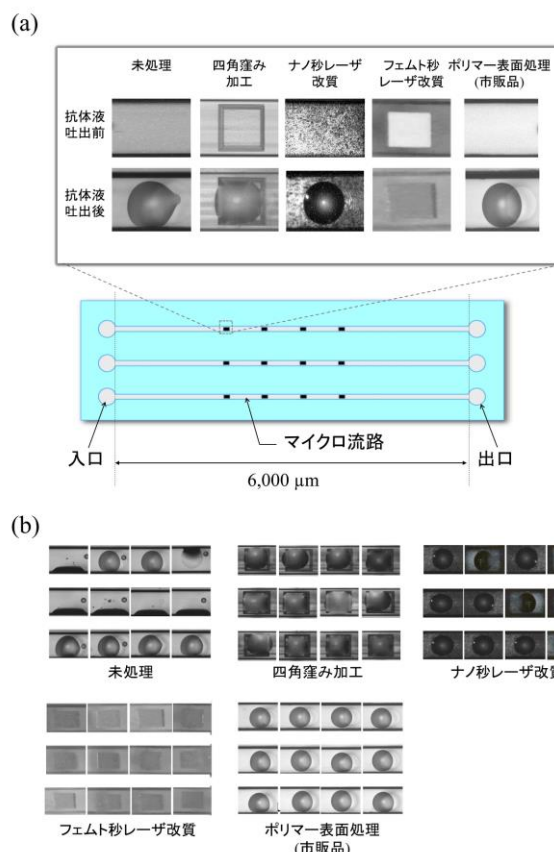


図 3 マイクロ流路の表面処理加工の違いに応じた抗体液固定化形状の比較: a) 未処理・四角窪み加工・ナノ秒レーザー改質・フェムト秒レーザー改質・ポリマー表面処理したときの抗体吐出前と後の比較, b) 抗体固定化時の形状

抗体液が濡れ広がって固定化面積が形成・維持されるため、歩留まりの向上に大きく貢献する。そこで実際に未処理、四角窪み形状、ナノ秒レーザー改質、フェムト秒レーザー改質、市販のポリマー被覆のマイクロ流路表面を使って、インクジェットによる抗体の吐出・固定化の状態を比較した (図 3)。その結果、表面改質を行っていない四角の窪み形状では、吐出された抗体液が濡れ広がらず、一定の固定化面積を形成・維持できなかった。これに対して、フェムト秒レーザーにより超親水化状態を調製した分子認識界面では、窪み加工の表面に均一に抗体液が濡れ広がり、一定の固定化面積を形成・維持するに至った。

マイクロ流路上の窪み加工のもう一つの課題点として、毛管力により検体や試薬などを順次流して液の入れ替えを行う場合、窪みの形状があるため、毛管力で液をスムーズに入れ替えることが難しくなる場合がある。また、液の入れ替えがスムーズにできたとしても、窪みの中に前の試薬や抗体などが、たとえば窪み内で液の滞留などが発生すると前の成分が残ってしまい、コンタミネーションの原因となる。そこでこのようなことが無いよう、確認としてフ

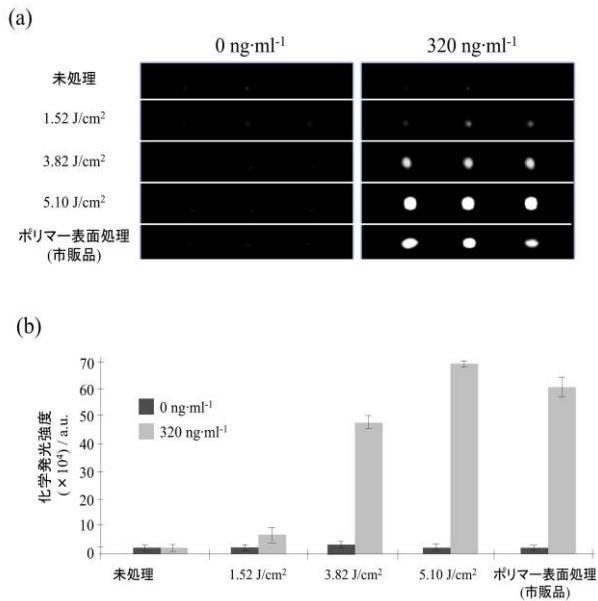


図4 フェムト秒レーザーのフルエンス強度とポリマー表面処理したときのマイクロ流路上での ELISA : a)濃度が 0 ng/ml と 320 ng/ml 時でフルエンス強度が 1.52J/cm<sup>2</sup>・3.82J/cm<sup>2</sup>・5.10J/cm<sup>2</sup> とポリマー表面処理時の化学発光分析画像, b)化学発光強度値の比較

ルオレセインで調整された蛍光液を流す前と、流路内に留めたとき、液を入れ替えた後で窪み加工を施した表面の蛍光値がどのように変化しているかを測定して、入れ替え精度を確認した。その結果、フルエンス値が 5.1 J/cm<sup>2</sup> で窪み加工を行った表面では、毛管力を阻害することがなく完全に液が入れ替わっていることが確認された。

### 3.2 酵素免疫測定法によるバイオマーカの測定と高感度化の諸検討

高濃度の抗体液がレーザー表面改質によって馴染みやすくなり、液が広がる面積を正確に制御できるようになった。そこで実際に、バイオマーカを測定するうえで、本バイオチップの性能評価のための対照品として、予めポリマーで表面処理がされている市販のマイクロ流路のバイオチップと、一般的に幅広く診断分野で行われている 96 穴プレートを利用した ELISA 法の測定値について比較検討を行った。

フルエンス強度は 1.52J/cm<sup>2</sup>、3.82J/cm<sup>2</sup>、5.10J/cm<sup>2</sup> の 3 パターン、周波数 1kHz、走査速度 100 μm · s<sup>-1</sup> の条件下でレーザー照射を行い、一次抗体を固定化して検出を行った。その結果、フェムト秒レーザーによる照射を行った分子認識界面では、フルエンス強度があがるにしたがってシグナル強度も増加した (図 4)。また PICP が 0 ng/ml の場合、フェムト秒レーザーで改質した系でもシグナルが検出されていないことから、分子認識界面に固定化された一次抗体と特異的に反応が進み、非特異的なシグナルは発生していな

いことが確認できた。また、フルエンス強度が大きくなるに従い、改質表面がわずかに黒化していく様子が確認されたが、化学発光強度の測定には影響が見られなかった。一般的に、透明体である PMMA の表面が黒化していくと、PMMA の基板表面で透過光などに伴う光量を正確に測定することは難しくなるが、本研究では黒化に伴う顕著な影響が見られなかったことから、マイクロ流路表面での ELISA 法にともなう化学発光を正確に検出できていることがわかった。

また、96 穴プレートによるサンドイッチ ELISA 法では、PICP の検出限界が 320 ng · ml<sup>-1</sup>、濃度範囲が 150-600 ng · ml<sup>-1</sup> の間で相関係数が 0.9 以上の成果を得た。この濃度範囲は PICP の臨床的基準値の範囲内であり良好な相関を得ることに成功した。

## 4. 結論

本研究では、フェムト秒レーザー改質技術とピエゾインクジェット印刷技術で高濃度の抗体液を吐出することを組み合わせることにより、高精度なバイオチップを産業化へとつなげるための手法を目的に検討した。そして 206 フェムト秒、8 パルス (1 ショット)、5.10 J/cm<sup>2</sup> のときに超親水化され、PICP 濃度の測定においては、臨床的基準値の範囲内で良好な相関性を示した。よって、ドライプロセス下で連続してマイクロ流路内に高濃度の抗体を固定化することに成功した。本法は、レーザー照射とインクジェット技術の強みを最大限に活かした点に着想を置いており、今後、マイクロ空間中で抗体などの生体素子を高精度に配置・固定化するうえで、医工連携によるスループットな製造プロセスへと展開していく予定である。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり終始懇切丁寧な助言を賜りました、国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究副部門長の大家利彦博士、バイオマーカ診断研究グループの片岡正俊博士に感謝の意を表します。また、実験の遂行及び解析にあたり、同じ国立研究開発法人産業技術総合研究所の田中正人主任研究員、阿部佳織博士、合谷賢治博士、山瓶子勇次氏にはひとかたならぬお世話になりました。ありがとうございました。

## 参考文献

- 1) Yusuke Fuchiwaki et al., J. Micromech. Microeng. 25 075008, 8 page (2015)
- 2) Yusuke Fuchiwaki et al., Sensors and Materials, Vol. 27, No. 9 pp. 847-857 (2015)
- 3) Yusuke Fuchiwaki et al., J. Micromech. Microeng. 26 (2016) 045015 (8pp)
- 4) Glashauser, W. and Ghica, G.-V., Method of stress-free development of irradiated polymethylmetacrylate, U.S. Patent 4393129 (1981)