

# ナノ流路作製技術とバイオデバイスへの応用

国立大学法人 東京大学 田端和仁<sup>1</sup>・杉山正和<sup>2</sup>  
光電子技術研究所 山本敏<sup>3</sup>・額賀理<sup>4</sup>・末益龍夫<sup>5</sup>

## Nano-Channel Fabrication Technology and Its Application to Bio Devices

K. V. Tabata, M. Sugiyama, S. Yamamoto, O. Nukaga, and T. Suemasu

石英ガラス内部に高アスペクト比なナノオーダーの流路を作製する技術を開発した。本技術は、フェムト秒レーザによる石英ガラス内部の改質加工と、形成した改質部のウェットエッチングをベースとしており、フェムト秒レーザ照射によって誘起されるナノ周期構造を制御することで、ナノオーダーの流路を作製することができる。本技術により、幅が 100 nm 以下、深さが 2 mm 以上と非常に高アスペクト比 (20000 以上) の流路を石英ガラス内部に作製することに成功した。本論文では、作製したナノ流路を利用したバイオ用途のデバイスを作製し、評価した結果について報告する。

A fabrication technology of nano-ordered flow channels with high aspect ratio has been developed. This technology is based on both an internal modification of silica glass by femtosecond laser irradiation and a wet chemical etching of the internal modification. By controlling nano periodic structure generated by the irradiation, nano-ordered flow channels can be obtained inside the silica glass. Using this technology, nano-channels, which width is less than 100 nm and length is more than 2 mm respectively (therefore the aspect ratio is more than 20000), were successfully demonstrated. In this study, some bio devices utilizing the nano-channels are attempted and evaluated.

### 1. ま え が き

ガラスやシリコン、樹脂などの基板に数十～数百  $\mu\text{m}$  幅の流路を形成し、液体などの媒体を流すことができるマイクロ流路技術は、微小域での効率的な化学反応や混合、分析が可能であり、 $\mu\text{-TAS}$  (Micro-Total Analysis System) などへの応用が期待できるため、世界中で活発に研究開発されている<sup>1)2)3)</sup>。マイクロ流路の作製法としては、半導体微細加工技術を利用した化学エッチングやレーザによる物理加工、型を使った押印 (インプリント) などが知られている。

フジクラは、フェムト秒レーザとウェットエッチングを用いてガラス基板の内部に微細孔を形成する、いわゆるフェムト秒レーザアシストエッチング技術を有しており、貫通配線への応用を検討している<sup>4)</sup>。従来のフェムト秒レーザアシストエッチングでは、作製できる微細孔の最小径は数  $\mu\text{m}$  であった。われわれは、フェムト秒レーザ照射によって形成されるナノ周期構造を制御することで、石英ガラス基板内部にナノオーダーの微細孔を形成

できることをあらたに見出した。この技術を流路作製に応用すれば、マイクロ流路だけでなく、さらに微細なナノ流路を形成できるため、新たな機能や付加価値を盛り込んだ様々なデバイスを実現できる可能性がある。そこで本研究では、石英ガラス基板内部にナノ流路を作製し、いくつかのバイオ用途デバイスへの応用を試みた。本論文では、ナノ流路の形成方法とそれを用いたバイオデバイスの作製、および評価結果について述べる。

### 2. フェムト秒レーザアシストエッチングによる石英ガラス基板内部へのナノ流路作製

フェムト秒レーザ照射による材料改質では、レーザの偏光に依存して周期性を持つナノオーダーの周期構造が形成されることが知られている<sup>5)</sup>。石英ガラスの場合この周期構造は、酸素濃度が 20 % 程度低くなった領域が周期的に発現することで形成される<sup>6)</sup>。周期構造が形成されるメカニズムについてはいくつかのモデルが提案されており<sup>6)7)</sup>、現在でも定説となっているものはないが、いずれのモデルにおいてもレーザ照射により励起されたプラズマ密度の周期的な変調が寄与している点で一致している。われわれはこの周期構造をレーザの照射条件を変えることにより制御することを試みた。

図 1 は、石英ガラス内部にフェムト秒レーザを集光照

1 国立大学法人東京大学大学院工学系研究科助教 (博士 (理学))  
2 国立大学法人東京大学大学院工学系研究科准教授 (博士 (工学))  
3 シリコン技術研究部グループ長 (博士 (工学))  
4 シリコン技術研究部  
5 シリコン技術研究部部長

略語・専門用語	正式表記	説明
μ-TAS	Micro-Total Analysis System	チップ上に微小な流路や反応室、混合室などを設け、一つのチップもしくはデバイスでさまざまな液体や気体を分析する生化学分析デバイス
バクテリア	bacteria	真正細菌、あるいは単に細菌と呼ばれ、細胞膜を持つ原核生物と定義される分類学上のドメインの一つ
枯草菌	Bacillus subtilis	土壌中や空気中など、自然界に普遍的に存在する真正細菌の一種であり、納豆菌などがその一例
ドロップレット	droplet	液滴
シスロールDPHS	CITHROL DPHS	高分子乳化剤の一種で、クロージャパン株式会社の商品名
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	生化学実験の緩衝液の作製によく用いられる有機化合物
β-ガラクトシダーゼ	β-galactosidase	糖を分解する酵素の一種であり、β-ガラクトシドを加水分解してガラクトースを生成する
FDG	fluorescein di-β-D-galactopyranoside	β-galactosidaseの基質であり、β-galactosidaseと反応して分解し、蛍光フルオレセインを放出する

射した際の模式図 (a) と、それにより形成された改質部の断面 (YZ面) を観察した走査電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscopy) 写真 (b) (c) である。レーザーの照射条件のうち、波長: 800 nm, パルス幅: 160 fs, 繰返し周波数: 200 kHz, 対物レンズN.A.: 0.5, 走査速度: 1 mm/secは一定とし、パルスエネルギーのみ変化させて改質部を形成すると、作製される改質部の周期構造を制御できることを見出した。図 1 (b) は、照射するレーザーのパルスエネルギーを 125 nJとした際の改質部の断面SEM写真である。この条件では、改質部にナノオーダーの周期構造が形成されているのが認められる。ここでは周期構造をより際立たせて観察するために、改質部を 0.5 wt%のフッ酸 (HF) 溶液で 25 分エッチングしており、図 1 (b) で黒く見える部分は周囲と比べて酸素濃度が低くエッチングが速く進む領域 (以下、変質部と称する) であり、幅は約 30 nmである。照射するレーザーのパルスエネルギーを徐々に下げると、周期的なプラズマ密度は中心近傍のみで改質閾値を超えるため、変質部の本数を減らしていくことができる。図 1 (c) は、パルスエネルギー

を 60 nJとして形成した改質部であり、図 1 (a) にあるような周期構造は認められず、各照射部において 1 本の変質部となっている。この変質部をエッチングすることで、ナノオーダーの流路構造を形成することができる。

図 2 に、石英ガラス内部に作製したナノ流路の光学顕微鏡写真と断面SEM写真を示す。幅が 90 nmで長さが 2.3 mm, つまりアスペクト比が 25000 にもなるナノ流路を作製することに成功した。本技術を用い、いくつかのバイオ用途デバイスを検討した。

### 3. バイオデバイスへの応用

#### 3.1 バクテリア培養デバイスへの応用

上述したナノ流路は、微生物の大きさと同程度であることから、生物学や生態学分野に多くの応用があると考えられる。そこでわれわれは、ナノ流路の先端にバクテリアを単体で捕捉し、培養・観察ができるデバイスを考案した。一般にバクテリアは、それぞれがバラバラではなく、お互いに相互作用しながら活動している。例え

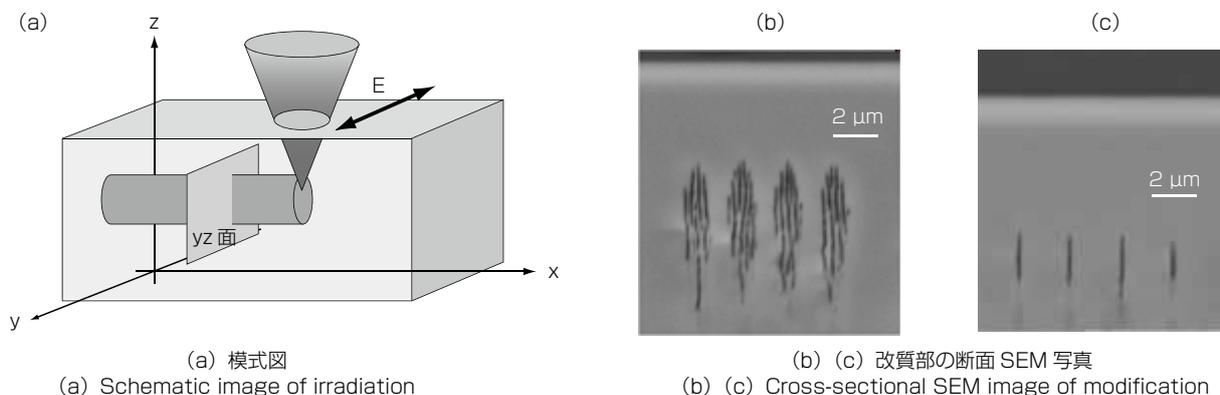


図1 フェムト秒レーザーによる石英ガラスの内部改質  
Fig. 1. Internal modification of silica glass by femtosecond laser.

ば、バクテリアがある密度以上になると、それに応じてある種の化学物質の分泌量が一定以上となり、突如バクテリアが活性状態になるなど、個と集団で全く異なった振る舞いを示すことが知られている<sup>8)</sup>。元来バクテリアは集団で活動するため、それらの生態も自ずと集団的な振る舞いで評価せざるを得ないのが現状であり、バクテリア単体を連続的かつ長時間にわたって評価することは大変難しい。それに対してわれわれの提案するデバイスは、バクテリアを単体で捕捉できるため、周囲のバクテリアによる相互作用を完全に除去した状態での生体反応の観察を可能にする。

図3に、開発したデバイスの構造模式図を示す。石英ガラス基板に複数のマイクロ流路が設けられており、それらを連通するようにナノ流路が形成されている。マイクロ流路Aにバクテリアを含む試料を流し、マイクロ流路Bを陰圧にすることでナノ流路先端にバクテリアを単体で吸引捕捉できる。図4に、実際に作製したデバイスの上面から眺めた光学顕微鏡写真(a)と、ナノ流路の開き口を斜

めから眺めたSEM写真(b)を示す。幅が60μm、深さが10μmのマイクロ流路Aの側壁に、幅が200nmのナノ流路が片側5本、計10本形成されており、マイクロ流路Bをかいて吸引できるようになっている。

本デバイスを用いて、バクテリアを単体で捕捉し培養する実験を試みた。捕捉するバクテリアには、ナノ流路のサイズを考慮して枯草菌(Bacillus subtilis)を用いた。枯草菌の一般的な大きさは500nm×4μm程度であるため、作製したデバイスを用いて単体で捕捉できる可能性がある。マイクロ流路Aに枯草菌を含む試料を流し、マイクロ流路Bを陰圧にしてナノ流路に枯草菌を吸引捕捉した。図5に、枯草菌を捕捉した写真を示す。

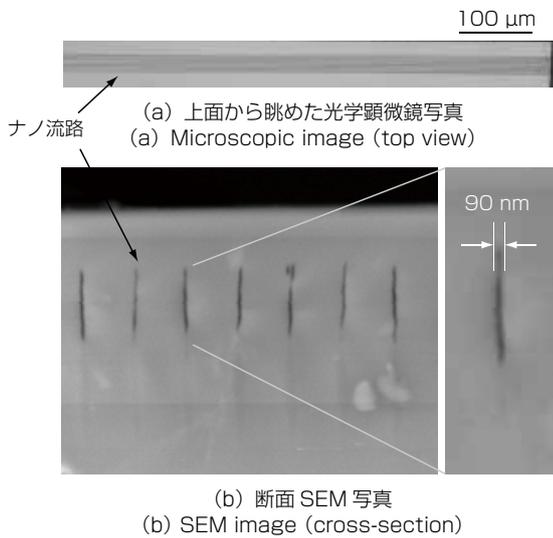


図2 フェムト秒レーザーアシストエッチングにより作製したナノ流路

Fig. 2. Photo of nano-channels fabricated by femtosecond laser assisted etching.

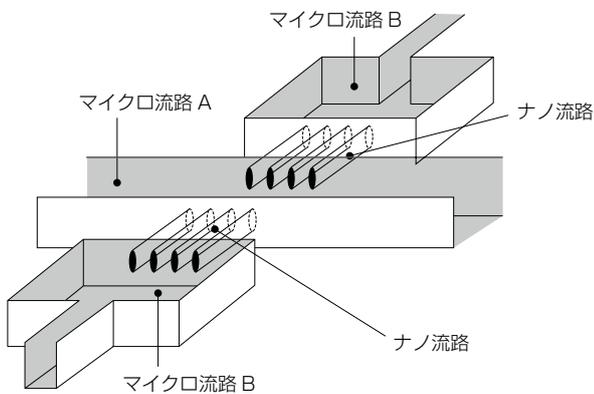
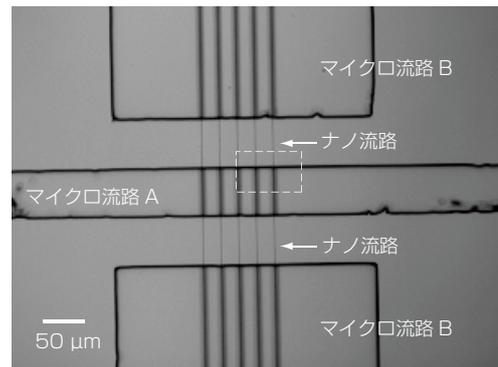
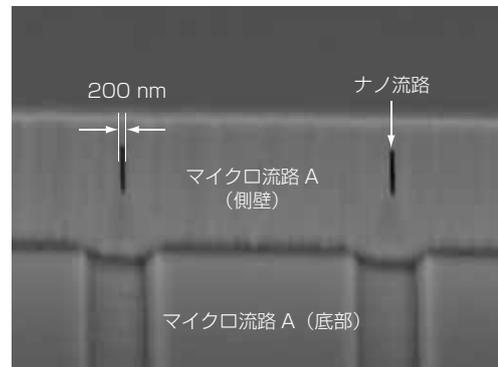


図3 バクテリア培養デバイスの構造模式図  
Fig. 3. Schematic image of single bacterium culture device.



(a) 上面から眺めた光学顕微鏡写真  
(a) Microscopic image (top view)



(b) ナノチャンネル開口部のSEM写真  
(b) SEM image at an opening of nano-channel

図4 作製したバクテリア培養デバイス  
Fig. 4. Photo of single bacterium culture device.

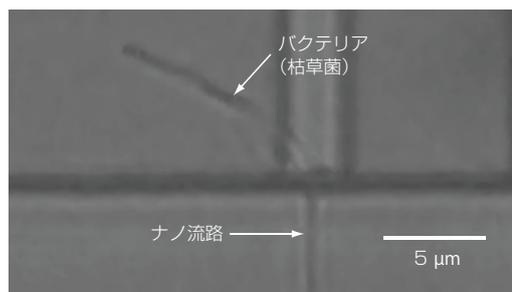


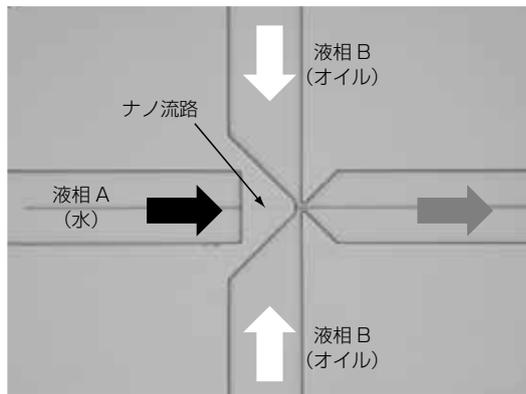
図5 ナノ流路により捕捉された枯草菌  
Fig. 5. Photo of a Bacillus subtilis trapped with nano-channel.

ナノ流路の先端に枯草菌を単体で捕捉できていることが確認できる。捕捉した枯草菌の観察を続けると、ある時間経過した後、細胞分裂が認められた。これまでに本デバイスによって、単体の枯草菌を百時間近く連続で捕捉することに成功し、複数回の細胞分裂が観察できることを確認している。

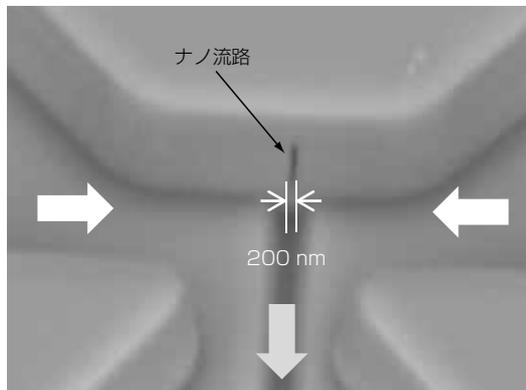
### 3. 2 ドロップレット作製デバイスへの応用

ある液相の中に別の液相からなる微小なドロップレットを作製する技術は、マイクロ/ナノ流体工学の研究分野の一つとして発展している<sup>9) 10)</sup>。特にバイオ化学の分野では、例えばドロップレット内での化学反応や生体分子合成、ドラッグデリバリーなどその応用範囲も広く、世界中で活発な研究がおこなわれている。現在のところ、マイクロ流路を用いて作製したドロップレットは数十 $\mu\text{m}$ ～数百 $\mu\text{m}$ の粒径分布のものがほとんどである。粒径が数 $\mu\text{m}$ 以下の小さいドロップレットとなると、その要旨自体は潜在的に存在するものの、実際にこれらをマイクロ流路で安定的に作製するのは一般に困難である。そこでわれわれは、ナノ流路を用いて数 $\mu\text{m}$ 以下のドロップレットを安定に、高速で、かつ容易に作製することが可能なドロップレット作製デバイスを開発した。

図 6 に、作製したドロップレット作製デバイスを上面



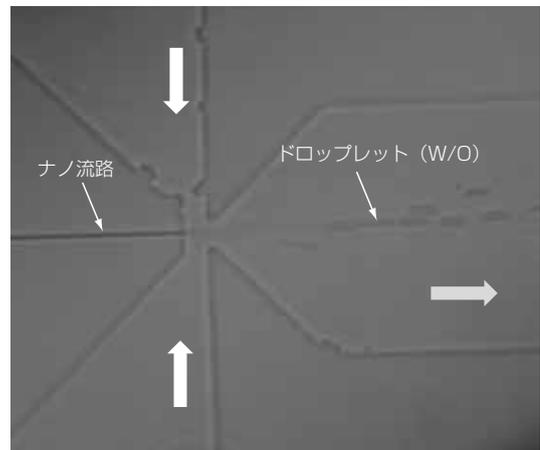
(a) 上面から眺めた光学顕微鏡写真  
(a) Microscopic image (top view)



(b) ナノチャンネル開口部の SEM 写真  
(b) SEM image at an opening of nano-channel

図6 作製したドロップレット作製デバイス  
Fig. 6. Photo of droplet formation device.

から眺めた光学顕微鏡写真 (a) とナノ流路開口部を斜めから眺めたSEM写真 (b) を示す。ナノ流路から吐出された液体を、別の液体が両側から挟み込んでせん断することでドロップレットを作製する、いわゆるフローフォーカス (flow-focus) 型のデバイスとなっている。ナノ流路は、幅が 200 nm、高さが約 3  $\mu\text{m}$  で、45  $\mu\text{m}$  の長さがある。本デバイスを用いて、ドロップレットの作製を試みた。本研究では、油相の中に水相のドロップレット (Water in Oil: W/O) を作製することとし、油相にはミネラルオイルと高分子乳化剤であるシスロールDPHSの混合液を、水相には生化学実験で標準的に使用される緩衝液であるHEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) を水酸化カリウム (KOH) で pH 7.5 に濃度調整した溶液と塩化カリウム (KCl) の混合液をそれぞれ用いた。水相をナノ流路から吐出させ、それをせん断するように油相を流すことでドロップレットを作製した。図 7 (a) に、ナノ流路の吐出部においてドロップレットが作製されている様子を、また図 7 (b) に、作製されたドロップレットがマイクロ流路内を流れていく様子を示す。本デバイスにより、油相内にミクロンオーダーの水相のドロップレットを作製できていることが確認できる。作製したドロップレットの粒径を調べたところ、平均粒径は 1.1  $\mu\text{m}$  であった。



(a) 吐出の様子  
(a) Droplets formation in flow focusing



(b) ドロップレットの光学顕微鏡写真  
(b) Microscopic image of droplets (water in oil)

図7 作製したデバイスにより油相中に形成された水のドロップレット  
Fig. 7. Photo of water droplets generated with the device.

先述したようにドロップレットの応用先として、ドロップレットを反応の場として利用し、ドロップレット内部で化学反応や生体分子合成を行うことが期待されている。われわれのデバイスで作製したドロップレットは粒径が1  $\mu\text{m}$ 程度と非常に微小なため、従来の数十 $\mu\text{m}$ 径のドロップレットに比べて容積が1000分の1以下であり、反応の場をより小さくできる。そのためより迅速な化学反応が期待でき、また、合成された分子や反応生成物が微量であっても相対的な濃度が高くなるため、解析の高感度化も期待できる。そこで作製したドロップレット内部において酵素反応が可能かどうか、さらに酵素反応の有無を解析できるかどうかの検証を行った。ドロップレットを形成する水相に、酵素である $\beta$ -galactosidaseと、その基質であるFDG (fluorescein di- $\beta$ -D-galactopyranoside)を混入し、酵素反応が生じるかどうかを確認した。FDGは、 $\beta$ -galactosidaseの存在によって分解され、無蛍光のFDGから蛍光色素であるフルオロセインに変化するため、蛍光の有無をモニタすることでドロップレット内部で酵素反応が起きたかどうかを確認できる。本実験では、 $\beta$ -galactosidaseが1  $\mu\text{m}$ のドロップレット内に平均0.5個程度存在するようにあらかじめ濃度調整をした。

図8に、作製したドロップレットを光学顕微鏡により明視野モード(図8(a))と蛍光モード(図8(b))で観察した結果を示す。蛍光を発するドロップレットが確認できたことから、ドロップレット内部で酵素反応が生じていることがわかる。また、実線の丸印で囲ったドロップレットのように、明視野モードと蛍光モードの両方で確認できるものと、破線の丸印で囲ったドロップレットのように、明視野モードのみで確認できるものの2種類のドロップレットがあることを確認した。このことは、開発したデバイスによりドロップレット内部で生じた一分子レベルでの反応の観察が可能であることを示唆しており、ドロップレットの蛍光の有無をデジタル的にカウントすることで、高感度な定量解析も実現できると考えられる。

#### 4. む す び

フェムト秒レーザーアシストエッチングにより石英ガラス基板内部にナノ流路を作製する技術を開発し、細菌培養デバイスとドロップレット作製デバイスに応用した。細菌培養デバイスでは、細菌を単体で長時間捕捉し、複数回の分裂を観察することに成功した。ドロップレット作製デバイスでは、直径1  $\mu\text{m}$ 程度の微小なドロップレットを作製し、内部での酵素反応およびその観察が可能であることを実証した。これらのデバイスは、バイオ分野における重要な要素技術の一つである一細胞・一分子解析に応用でき、バイオメディカ

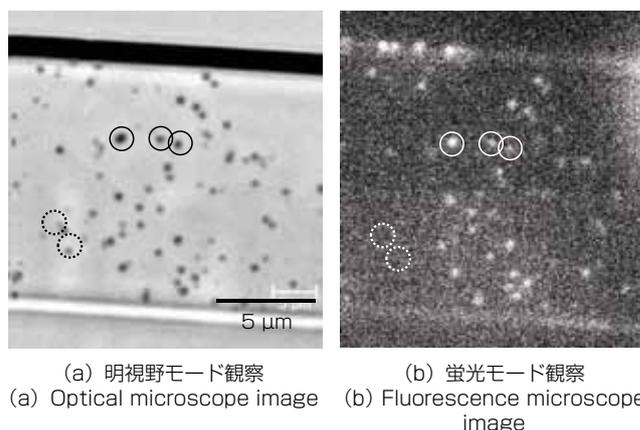


図8 ドロップレット内部での酵素反応  
Fig. 8. Enzyme reaction inside a droplet.

ル分野での活用が期待できるだけでなく、学術的にも意義のある成果の創出に寄与できると考えている。

#### 参 考 文 献

- 1) 一木:「バイオチップ技術の細胞工学, たんぱく質工学への展開」, 応用物理, 第80巻, 第2号, pp.128-132, 2011
- 2) Y. Koyata, et. al: "SEALLESS 3-D MICROFLUIDIC CHANNEL FABRICATION BY SACRIFICIAL CARAMEL TEMPLATE DIRECT-PATTERNING", Proc. of IEEE MEMS 2013, pp.311-314, 2013
- 3) Y. -C. Kung, et. al: "FABRICATION OF 3D MICROFLUIDIC NETWORKS WITH A HYBRID STAMP", Proc. of IEEE MEMS 2013, pp.915-918, 2013
- 4) 山本ほか:「ツール 3次元配線」, フジクラ技報, 第118号, pp.39-45, 2010
- 5) 緑川ほか:「フェムト秒レーザーと物質の相互作用」, レーザ加工学会誌, Vol.8, No.3, pp.195-199, 2001
- 6) Y. Shimotsuma, et. al: "Self Organized Nanogratings in Glass Irradiated Ultrashort Light Pulses", Phys. Rev. Lett, 91, 247405-1-4, 2003
- 7) V. R. Bhardwaj, et. al: "Optically Produced Arrays of Planar Nanostructures inside Fused Silica", Phys. Rev. Lett, 91, 057404-1-4, 2006
- 8) T. Gregor, et. al: "The Onset of Collective Behavior in Social Amoebae", Science, Vol. 328, No. 5981, pp.1021-1025, 2010
- 9) G. M. Whitesides: "The origins and the future of microfluidics", Nature, Vol. 442, pp.368-373, 2006
- 10) S. -Y. Teh, et. al: "Droplet microfluidics", Lab on a Chip, Vol.8, pp.198-220, 2008