

技術論文

レーザ加工によるラミネート樹脂製血液検査用 マイクロ流体デバイスの作製

山田博之^{*} ^{**} 吉田善一^{**} 寺田信幸^{**} 田原烈^{**} 山田潤^{*}

Fabrication of Blood Test Micro-Fluidic Device of Laminated Resin-film by Laser Ablation

YAMADA Hiroyuki, YOSHIDA Yoshikazu, TERADA Nobuyuki,
TAHARA Retsu and YAMADA Jun^{*}山梨県工業技術センター (〒400-0055 山梨県甲府市大津町 2094)^{**}東洋大学 (〒350-8585 埼玉県川越市鯨井 2100)

yamada@yitc.go.jp

(原稿受付 2005年7月15日)

A micro-channel is fabricated in resin by ultraviolet pulse laser ablation. A number of thermosetting resin-films are layered on a soda glass. A laser fabricates a part of the channel on each film for every lamination. The channels are 30-180μm in depth and 10-300μm in width. We fabricated three types of micro-channels. The 1st type is a three-pronged micro-channel. The 2nd type is a capillary pipe inserted a three-dimensional channel. The 3rd type is a three-dimensional multi-capillary structure micro-channel. We tested these micro-fluidic devices for blood transportation and blood-cell observation.

Key words: μ-TAS, UV laser ablation, lamination, resin-films, micro-channel, blood test

1. 緒 言

近年、血液検査やDNA分析など多くの分野において微量流体の成分分析を精度良く、迅速に行いたいという要求が高まっている。そこで流体試料の注入、混合、攪拌、分離、抽出を行う機構部品や、流路、溜池などの流体分析に必要な要素を小型・集積化したμ-TAS (Micro Total Analysis System) というマイクロ流体デバイスが注目されている。¹⁾ μ-TASは小型・集積化により、試料・試薬・廃液の低減、測定時間の短縮、省電力化、携帯性の向上などが期待されている。粒子の識別、光による細胞検出、マイクロ流体光導波路による細胞検出、インピーダンス測定による細胞モニタ、細胞マニュピレーションなどμ-TASに関する様々な研究がなされている。

一方、現在行われている血液検査には、血球計測、変形能測定、形成時間測定、凝固時間測定などがある。血球計測は血液中の血球数やリンパ球数を把握することであり、多血症、血液濃縮、貧血、白血病などの診断に不可欠である。また、変形能測定は赤血球の物理的・化学的性状変化を把握することであり、糖尿病、心筋梗塞、脳血管障害の予防や治療に不可欠である。血液検査機器の1つに、細胞、バクテリア、微粒子の同定やカウントなどの定量測定を行うフローサイトメーターがある。しかし、従来のフローサイトメーターは大型で高価な機器であるため、自宅やケアハウスなどで気軽に検査ができる小型のフローサイトメーターが開発されつつある。²⁾ そこで我々は、Fig. 1に示すようなカードサイズに小型・集積化したマイクロフローサイトメーター(μ-FCM)の作製を目指している。

本研究の目的は、血液検査用μ-FCMを作製することであ

り、その手法としてレーザによるマイクロ加工及び樹脂ラミネート法³⁾を用いる。この樹脂ラミネート法は、マイクロ機構部品や電極を組み込んだ基板上に、熱硬化性フィルムをラミネート接着により積層化することによって樹脂部分を形成し、この樹脂部に流路や反応用溜池などを作製する方法である。これにより、使用後は汚染された流路等のある樹脂部分のみを洗浄・除去し、各種部品が組み込まれた基板部は再利用ができるため低価格化、洗浄・交換の簡素化、衛生的であるなどの効果が期待できる。⁴⁾

本報では、UVレーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、血液検査用μ-FCMの構成要素となる3種類のマイクロ流体デバイスを作製した。これらのマイクロ流体デバイスは、血球を一列に並べて流すための三叉構造の流路、及び小径パイプを挿入した立体構造の流路であり、また赤血球変形能を測定するための微小孔群の流路である。さらに、それぞれに血液を流し血球の観察を行ったので報告する。

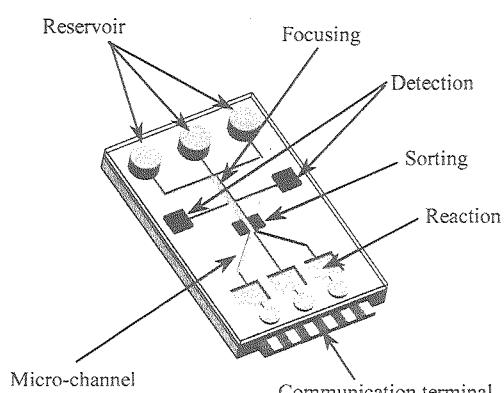


Fig. 1 Concept of a micro flow cytometer

2. 血球計測用マイクロ流体デバイスの作製

2.1 実験方法

レーザ加工には Exitech 社製のエキシマレーザ加工機 PS2000 (発振機: LAMBDA PHYSIK 社製 LPX200i) を用いた。加工条件は波長 248 nm, 発振周波数 100 Hz, パルス幅 20 nsec, 発振エネルギー 150 mJ とした。

Fig. 2 にマイクロ流体デバイスの作製プロセスを示す。はじめにカバーガラスに熱硬化性樹脂フィルムをラミネート接着し、レーザ加工により樹脂部分に微細溝や微小穴を形成する。基板には $24 \times 60 \times 0.23$ mm の MATSUNAMI 製カバーガラスを用いた。熱硬化性樹脂フィルムには厚さ 25 μm のポリイミドを用い、厚さ 20 μm の接着層も含めたラミネートフィルムの総厚さは 45 μm である。多層化させる場合は、さらに樹脂フィルムをラミネート接着しレーザ加工により微細溝を形成する。最後に樹脂フィルムをラミネート接着することによりそれらを覆い送液用のチューブを接着する。

送液実験にはシリンジポンプを用い、流れの観察は光学顕微鏡と高速度ビデオカメラを用いた。

2.2 エキシマレーザ加工実験

微細穴や微細溝の加工形状の向上や流路壁面の面粗さ向上を目的として、エキシマレーザによる加工条件について検討した。ビーム形状は焦点位置において $\phi 53 \mu\text{m}$ と $103 \times 103 \mu\text{m}$ のレーザを使用した。加工面の評価には、レーザ顕微鏡による形状・寸法測定とビデオマイクロスコープや電子顕微鏡による表面観察結果を用いた。

はじめに、レーザによってカバーガラスにダメージを与えないエネルギーの上限値を調べた結果、Fig. 3 に示すようにフルエンスが約 0.75 J/cm^2 以下ではカバーガラスは加工されないことがわかった。

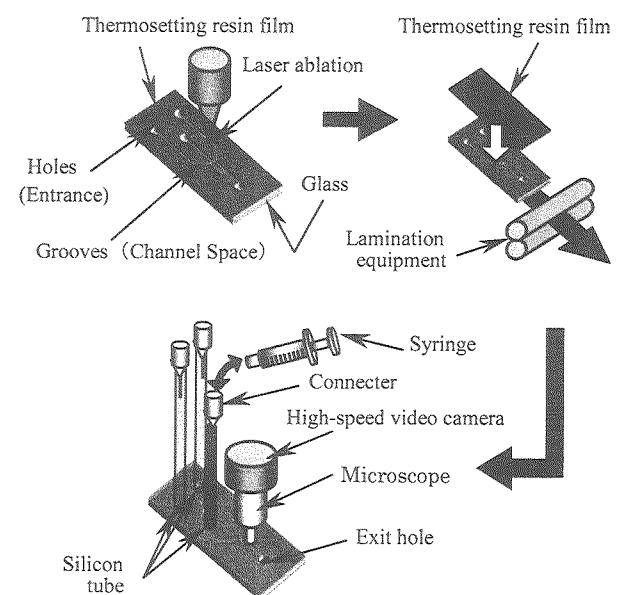


Fig. 2 Simplified process flow of the micro fluidic device

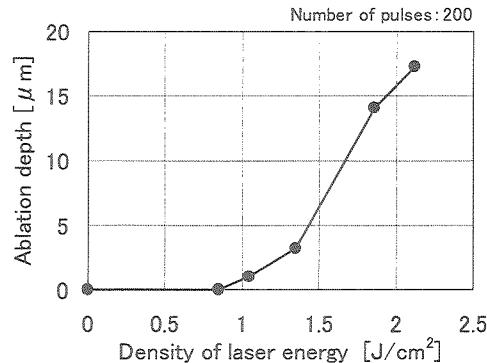


Fig. 3 Relation between density of laser energy and ablation depth of glass

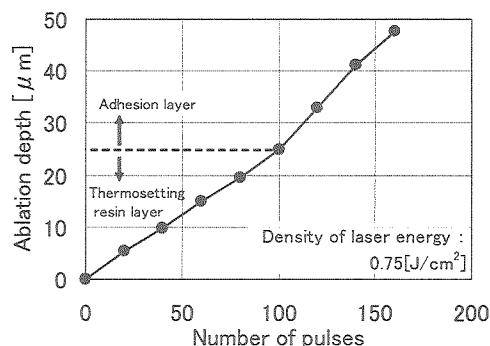


Fig. 4 Relation between number of pulses and ablation depth of resin

次に、ラミネートフィルムに対してフルエンス 0.75 J/cm^2 におけるレーザ照射パルス数と加工深さとの関係を調べた結果を Fig. 4 に示す。同一材料では加工深さと照射パルス数はほぼ比例関係にあり、アスペクト比が 1 前後の加工形状では加工深さの制御が比較的容易な材料であることが確認できた。

2.3 三叉流路の作製と血液送液実験

上記の条件をもとに加工した溝幅 $50 \sim 150 \mu\text{m}$ の三叉構造微細溝の電子顕微鏡観察写真を Fig. 5 に示す。比較的良好な加工形状と面粗さの微細溝が得られていることがわかる。

次に、Fig. 5 に示す溝に樹脂フィルムをラミネートし、流路の出入り口にチューブを接着してマイクロ流体デバイスを作製した。三叉構造の中央の流路に血液を流し、両側の流路に生理食塩水を流した。試料がシース液に包まれた状態で流れるシースフローの現象を利用して血液の流れ幅を変化させる実験を試みた。光学顕微鏡と高速度ビデオカメラを用いて観察した結果を Fig. 6 及び Fig. 7 に示す。両側の流路の圧力を高くすることにより Fig. 6 に示すように血液の流れ幅が絞られ、三叉流路の合流位置から数 mm 離れた下流位置では Fig. 7 に示すように赤血球が一列に並んだ状態で流れることが確認できた。ただし、血液は上下の流れ幅もあり、流路底面を転がるように流れる血球も観察された。

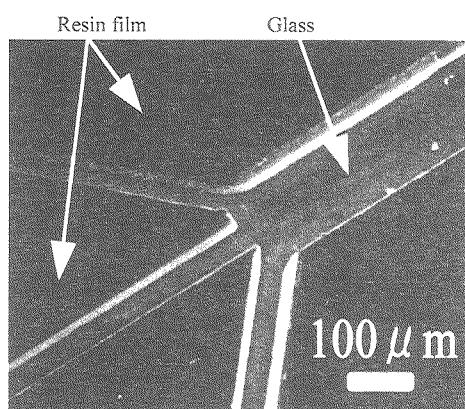


Fig. 5 SEM image of the three-pronged grooves without a cover film

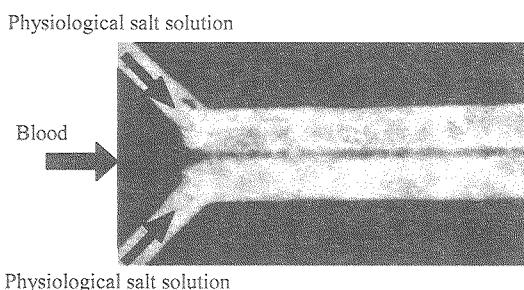


Fig. 6 Photograph of blood pass-through in the three-pronged grooves.
Blood is flowing the center, and physiological salt solutions are flowing from both sides

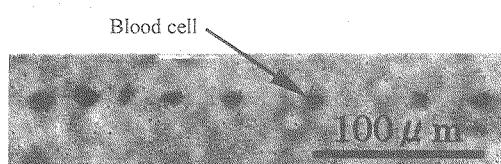


Fig. 7 Photograph of flowing blood cells in the down-stream from the three-pronged grooves

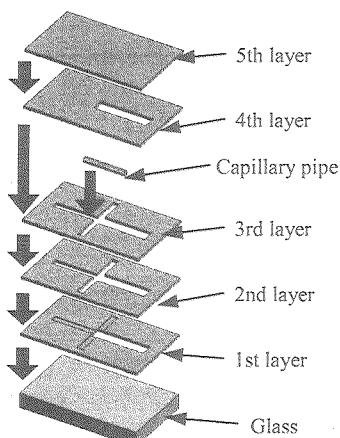


Fig. 8 Schematic diagram of the micro-channel inserted a capillary pipe

2.4 小径パイプ流路の作製と血液送液実験

血液と生理食塩水の合流部において血液の流れの全周を生理食塩水のシースフローで覆うことを目的として, Fig. 8 に示すような小径パイプを挿入した立体流路を作製した。Fig. 9 にマイクロ流体デバイスの概略図を示す。パイプは外径 $\phi 100 \mu\text{m}$, 内径 $\phi 30 \mu\text{m}$, 長さ 5 mm の銅パイプを用い, ラミネートフィルムを積層してレーザ加工した流路の中央に銅パイプを取り付けた構造とした。Fig. 10 は 4 層と 5 層のラミネートを行う前の 3 層目までの構造の電子顕微鏡観察写真である。比較的良好な加工形状と加工面粗さが得られた。

次に、マイクロ流体デバイスを作製し、パイプに血液を流し、サイドチャネルの両側からメインチャネルに生理食塩水を流した。内径 $\phi 30 \mu\text{m}$ のパイプの中に血液を流すことができ、生理食塩水と合流する流路に吐出することができた。さらに、生理食塩水の圧力を高くすることにより Fig. 11 に示すように血液の流れ幅が絞られ、赤血球が一列に並んだ状態で流れることができた。下流では全ての血球が同一速度で流れしており、血液の上下の流れ幅や流路底面を転がるように流れれる血球もないことがわかった。また、Fig. 12 に合流部分の拡大図を示す。血液と生理食塩水の合流部分において、血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、血球が一列に並んでいく状態が確認できた。

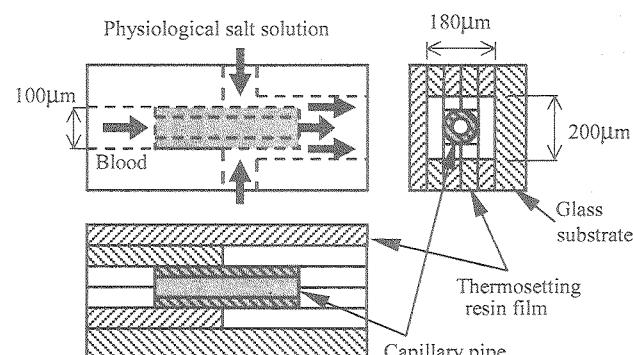


Fig. 9 Schematic diagram of the micro-channel inserted a capillary pipe

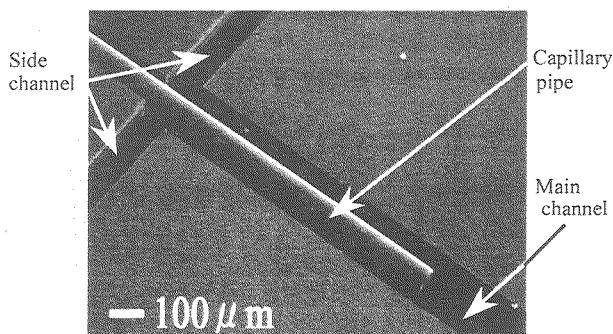


Fig. 10 SEM image of the micro-channel inserted a capillary pipe without a cover film

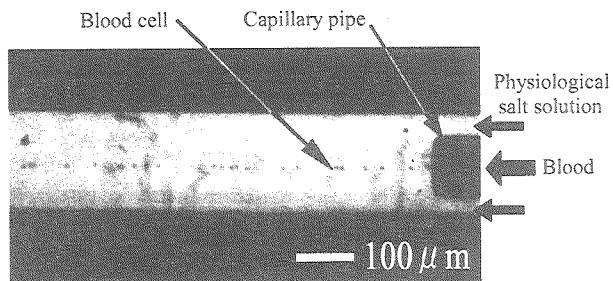


Fig. 11 Photograph of blood pass-through in the micro-channel inserted a capillary pipe.
Blood is flowing from inside the capillary pipe, and physiological salt solution is flowing from the periphery of the capillary pipe

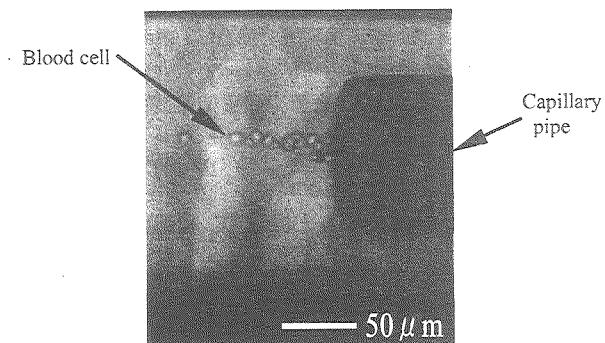


Fig. 12 Enlarged photo of the confluence part of blood and physiological salt solution as shown in Fig.11

3. 赤血球変形能測定用マイクロ流体デバイスの作製

3.1 実験方法

レーザ加工には、パルス Nd:YAG レーザ (Quantel 社製 Brilliant) を用い、加工条件は波長 266 nm、パルスエネルギー 3.1 mJ、パルス幅 4.3 nsec、繰り返し数 10 Hz とした。基板の置いてある XY ステージを動かすことによって加工を行った。また、レンズの焦点距離は 45 mm で、ビームの直径は焦点位置で $\phi 30 \mu\text{m}$ 以下である。

Fig. 2 に示すプロセスでマイクロ流体デバイスを作製した。

3.2 YAG レーザ加工実験と微小孔群流路の作製

Fig. 13 は微小孔群チャネルの断面を示した図である。基板はソーダガラスで、1 層目は長方形流路であり、2・3 層目は微小孔群の部分と出口であり、4 層目は台形流路と出口であり、5 層目は入口・出口となっている。各層ごとにレーザで加工し、ラミネートフィルムを多層化していくことで、微小孔群チャネルは比較的容易に作製できた。

Fig. 14 は微小孔群の 1 つの孔をレーザ顕微鏡で観察した結果で、(a) はレーザ入射側から、(b) はレーザ出射側から観察した結果である。レーザ入射側の孔の直径は $18 \mu\text{m}$ である。この時、ラミネートフィルムの厚さは $90 \mu\text{m}$ であり、1 パルス当たりのレーザ出力は 1mJ である。レーザ出射側の孔の直径は $12 \mu\text{m}$ である。Fig. 14 (a) で孔の周辺にシワ状や波状に見える部分がデブリであり、また Fig. 14 (b) では

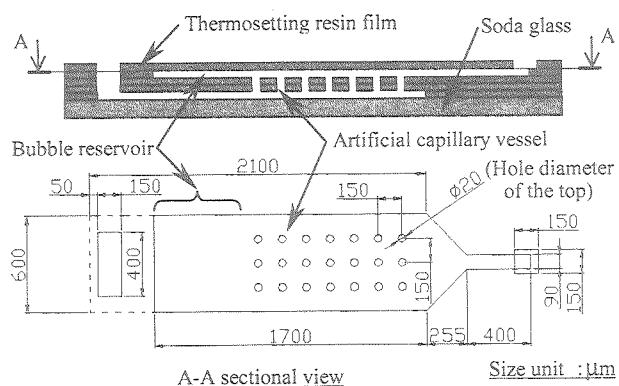
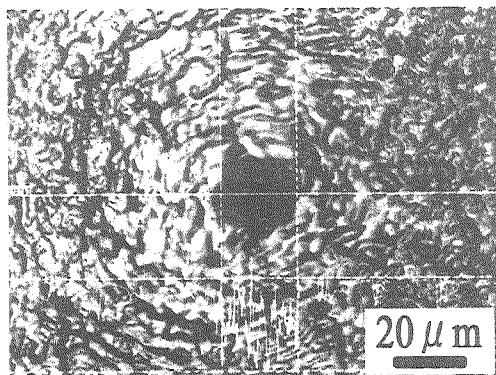
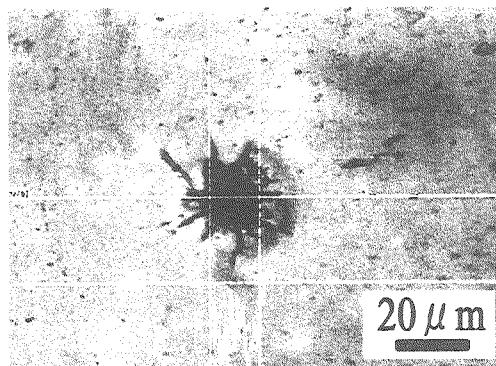


Fig. 13 Schematic diagram of the multi-capillary structure micro-channel



(a) Artificial capillary vessel from top side view



(b) Artificial capillary vessel from bottom side view

Fig. 14 Photographs of one of artificial capillary vessels in the multi-capillary micro-channel

孔の周りに亀裂やはがれのようなヒビ等が観察されるが、送液や観察には問題がなく、比較的きれいな円形の孔を作製することができた。この条件では、孔のサイズに対する熱影響が少ないと考えられる。

3.3 微小孔群流路の血液送液実験

送液が可能かを確認するために生理食塩水を用いて送液実験を行った。ラミネートフィルムの孔あけ加工にレーザを用いることで、径、長さ、形状を自由に変えることができる。微小孔群の 1 つの孔を検査に適した擬似毛細血管として形成することができる。送液実験によるチャネルへのダメージは発生しなかった。また、チャネル内に発生

する気泡は気泡溜めの作製により、送液が止まらないようにしたため、スムーズに送液することができた。赤血球は直径 $8 \mu\text{m}$ の両凹円盤形状で厚さは $1\sim2 \mu\text{m}$ である。観察を考慮し、直径約 $\phi20 \mu\text{m}$ ・長さ $90 \mu\text{m}$ の擬似毛細血管を使用して、赤血球変形能計測を行った。Fig. 15 は擬似毛細血管内を流れる血球を観察した結果で、顕微鏡を通してビデ

オで撮影し、30 コマ/秒に分割した図である、(a)は模式図であり、(b)は流量 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ 、(c)は流量残留圧で実験を行った結果である。流量 $10 \mu\text{l}/\text{min}$ の場合、血球は約 5個/sec で流れしており、2 個ずつや重なって流れている様子を観察することができる。また、流量残留圧では、血球は約 2個/sec で流れしており、血球が孔の中心を 1 個ずつ流れている様子及び変形能を観察することができた。

4. 結 論

UV レーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、マイクロフローサイトメーター ($\mu\text{-FCM}$) の構成要素となる 3 種類のマイクロ流体デバイスを作製し、それぞれに血液を流し血球の観察を行った。得られた結果は、以下のとおりである。

- (1) 三叉構造の流路をもつマイクロ流体デバイスを作製し、血液送液実験を行った結果、血液の流れ幅を絞ることができ血球を並べて流すことができた。
- (2) 外径 $\phi100 \mu\text{m}$ 、内径 $\phi30 \mu\text{m}$ の小径パイプを挿入した立体流路をもつマイクロ流体デバイスを作製し、血液送液実験を行った結果、血球を一直線に並べて流すことができた。
- (3) 微小孔群流路をもつマイクロ流体デバイスを作製し、血液送液実験を行った結果、直径 $12 \mu\text{m}$ の擬似毛細血管に赤血球を流すことができ、赤血球の変形状態が観察できた。

以上の結果から、これらの流路は血液検査用 $\mu\text{-FCM}$ に適用可能であることが見出せた。

今回は、血球を一直線に並べて流すこと、赤血球変形能を観察することについて検討を行ったが、これら以外にも $\mu\text{-FCM}$ には、検出システムや選別工程などの構成要素が必要である。今後は、これらの要素についても我々の手法を適用して検討していきたい。

参考文献

- 1) Hirao, K.: Nanotechnology learned from the foundation, Tokyo Kagaku Dozin, Tokyo, (2003), pp.197-222. (in Japanese)
- 2) Larsen, U., Ekberg, B., Jensen, M.: A self-contained, disposable cartridge concept for complete blood counts, Proc. of microTAS 2004, Malmo, Sweden, 1, (2004), 46.
- 3) Yoshida, Y.: 3-D micro channels in laminated resins by UV laser ablation, Proc. SPIE, 5063, (2003), 189.
- 4) Yoshida, Y.: Fabricating micro-fluidic devices for blood test by laser ablation and lamination, The papers of Technical Meeting on Micromachine and Sensor System, MSS-04, (IEE Japan, Kyoto, 2004), 49. (in Japanese)

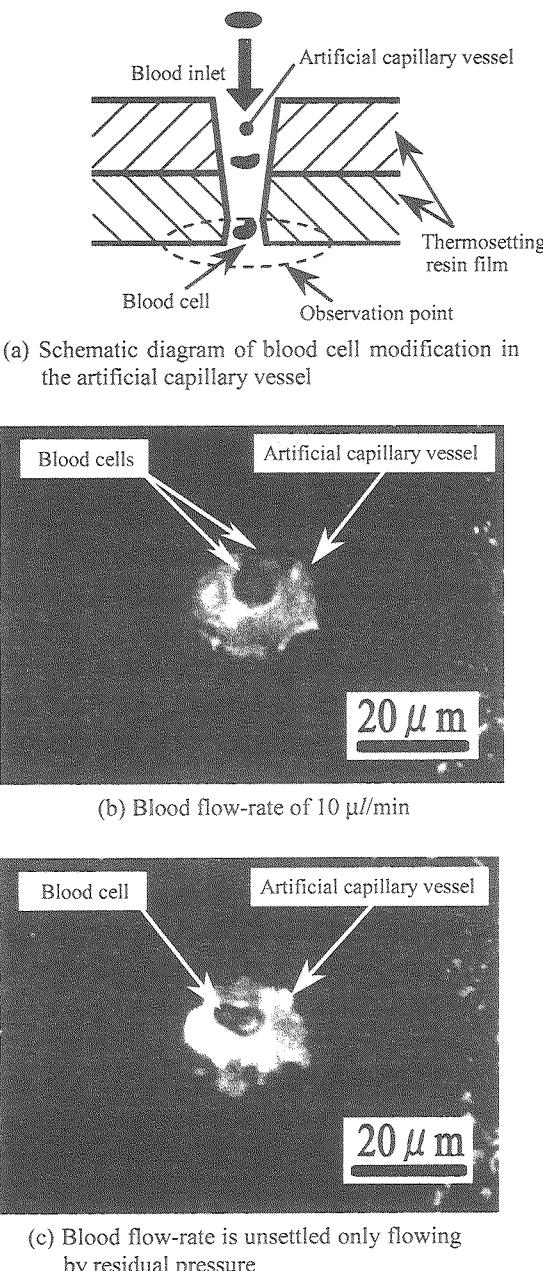


Fig. 15 Photographs of blood cell modification in the artificial capillary vessel