

遠心マイクロ流体デバイスにおける
自律制御型流体回路理論の構築と
POCT 装置応用に関する研究

山梨大学大学院
医工農学総合教育部
博士課程学位論文

2021 年 3 月

岡本 俊哉

目次

序章 緒論	- 1 -
第 1 章 自律制御型流体回路理論の基礎制御理論の構築	- 5 -
1.1 緒言	- 5 -
1.2 実験方法	- 8 -
1.2.1 自律液体注入開始時間制御機構の実証	- 8 -
1.2.2 定常回転下における液体置換条件の検討	- 10 -
1.3 実験結果および考察	- 11 -
1.3.1 自律液体注入開始時間制御機構の実証	- 11 -
1.3.2 定常回転下における液体置換条件の検討	- 16 -
1.4 結言	- 20 -
第 2 章 自律制御型流体回路理論に基づく ELISA デバイスの開発	- 21 -
2.1 緒言	- 21 -
2.2 実験方法	- 22 -
2.2.1 自律制御型流体回路理論による ELISA デバイスの作製と動作実証	- 22 -
2.2.2 ELISA 試薬の調製	- 24 -
2.2.3 自律制御型 ELISA デバイスにおける 1 次抗体固相条件の検討	- 25 -
2.2.4 自律制御型 ELISA デバイスを用いた分析系の評価	- 26 -
2.3 実験結果および考察	- 27 -
2.3.1 ELISA 実行デバイスの動作検証	- 27 -
2.3.2 自律制御型 ELISA デバイスの固相条件の検討	- 29 -
2.3.3 自律制御型デバイスを用いた分析系の評価	- 31 -

2.4 結言	- 33 -
第 3 章 自律制御型分注機構の開発	- 34 -
3.1 緒言	- 34 -
3.2 動作原理および設計	- 35 -
3.3 実験方法	- 38 -
3.4 実験結果および考察	- 39 -
3.5 結言	- 41 -
第 4 章 分注機構を実装した複数検体同時微量 ELISA デバイスの開発	- 42 -
4.1 緒言	- 42 -
4.2 複数検体同時微量 ELISA デバイスの設計	- 43 -
4.3 実験方法	- 45 -
4.3.1 デバイスの作製と動作検証	- 45 -
4.3.2 ELISA の実行	- 46 -
4.4 実験結果および考察	- 47 -
4.4.1 複数検体同時微量 ELISA デバイスの動作検証	- 47 -
4.4.2 複数検体同時微量 ELISA デバイスによる ELISA 実行と評価	- 49 -
4.5 結言	- 51 -
第 5 章 両面成形型自律分注機構の開発	- 52 -
5.1 緒言	- 52 -
5.2 実験方法	- 54 -
5.2.1 両面成形型分注機構の作製と分注量評価	- 54 -
5.2.2 自律制御型分注機構の動作安定性の評価	- 56 -

5.3 実験結果および考察	- 57 -
5.3.1 両面成型型分注機構の動作実証と分注量の精度評価	- 57 -
5.3.2 動作安定性の検証	- 58 -
5.4 結言	- 62 -
第 6 章 両面成型型分注機構を実装した複数検体同時微量 ELISA デバイスの開発	- 63 -
6.1 緒言	- 63 -
6.2 複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスの設計	- 64 -
6.3 実験方法	- 65 -
6.3.1 デバイスの作製方法	- 65 -
6.3.2 緻密な注入時間制御実現のための CLOCK 設計とフローコントロールの実証	- 66 -
6.3.3 複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスによる ELISA 実行	- 67 -
6.4 実験結果および考察	- 68 -
6.4.1 CLOCK 設計と複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスの動作実証	- 68 -
6.4.2 複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスによる ELISA の検討と評価	- 71 -
6.5 結言	- 75 -
第 7 章 総括	- 77 -
参考文献	- 81 -
謝辞	- 87 -

序章 緒論

POCT (Point Of Care Testing : 臨床現場即時診断) とは、小型で可搬性を有した分析装置を用いて被験者の傍らで検査を行い、その結果から治療等の方針を決めるまでの一連の行為を示す概念である^[1,2]。大型で高価な臨床検査機器を導入するのが困難な街の無床診療所 (入院設備を有していない医療施設) では、血液検査等の高度な分析が必要な検査は、検体採取後、後日に再度通院し、検査結果の告知および診断を受けることが一般的となっていることから、検体の採取から分析結果の出力まで数十分程度で完了する POCT 対応機器の導入により、被験者の負担軽減や、疾病の早期発見による迅速な治療開始に貢献できる。また、災害時医療や発展途上国など、大型の検査装置を持ち込むことができない環境で POCT 対応機器を活用することで、限られた環境においても医療体制の充実が期待できる^[3]。このほか、2020 年は感染症 (COVID-19) の世界的な拡大が問題になっており、新たな日常 (生活様式) として、不必要な人と人の接触を減らす試みが多く分野でなされている。医療分野では、その 1 つとして、遠隔医療の活用が進められている。遠隔医療はオンライン診療などとも呼ばれ、医療者と患者が距離を隔てたところで、情報通信機器を活用して面会せずに診療を行うことである。オンライン診療では、現在はビデオ通話などを利用し、医療者と患者が会話することで診療を行うことに留まっているが、小型で安価な POCT 対応機器が実現すれば、そのような日常的に検査、診療が必要な患者の家庭に分析機器を配備することが可能となる。そうなれば、通院に匹敵する検査体制を家庭で構築することでできて、体調のモニタリングが容易になり、患者の健康維持や通院の負担軽減のほか、医療者の負担軽減や社会保障費の低減が期待できる^[4,5]。

このように POCT は、従来の大型の病院の検査室で行う検査とは異なり、水や試薬、また電力等が十分でなく、制限のある分析環境で活用されることが想定される。そのため、試薬の使用量を最小限にすることが重要で、サンプル (血液) の微量化も必要となる。また、遠隔医療で血液検査を行うには、自己採血しなければいけないことから、サンプル量の微量化は必須である。現在、POCT で測定可能な例として血糖値等があるが、より複雑な試薬操作が必要な心疾患マーカー値等の測定についても POCT に対応し始めており^[4]、従来の病院の検査室で受けられる血液検査と同等の検査項目の充実が理想である。さらにこれまでの POCT 対応機器は、1 度に測定できるサンプルは 1 サンプルのみのため、医師らの負担軽減のため、複数サンプルの同時測定の実現が望まれている^[6-8]。

血液検査には、血球数の計測等を行う血液学検査や、総コレステロール値や総タンパク値を分析する生化学検査、免疫グロブリン値を分析する免疫血清学検査等がある。その中で免疫血清学検査は、酵素免疫測定法 (ELISA) が基盤技術となっている。ELISA は、抗原抗体の特異的な反応と、検出時のシグナルとなる酵素の発色が増強反応により、増幅されるため、検出感度が高いことが特徴である^[9]。その一方で、検出時のノイズ低減のため、反応器を十分に洗浄する必要があるため、試薬の操作が煩雑となる。このため POCT に適応する分析機器の実現には、少ないサンプルや試薬で、この煩雑な作業を簡便に実行する技術が求められる。

マイクロ流体システムは、微量の試薬を簡便に扱う手法として研究されている^[10]。微小空間で溶液を簡便に操作でき、反応の高速化が可能であることから、ELISA 等の化学分析プロセスの微量分析と相性が良く多くの研究が行われている^[11-22]。その中でマイクロ流体システムは、流体の送液方式で大きく3つに分けることが出来る。1つ目はアクチュエータを用いない方式である。重力や毛管力の作用を利用して送液を行う。アクチュエータを用いないため、最も安価で簡便な溶液操作手法ではあるが、溶液の置換等の複雑な操作には、使用者の技術が求められる^[19,23-27]。2つ目は、シリンジポンプや、ダイヤフラムポンプなど、外部のポンプと接続し、送液を行う方式である。ポンプでアクティブに送液を行ったり、バルブを制御したりすることが可能で、システムの設計の自由度が大きいことが特徴で、主に実験室で細胞の取り扱いや再現性および定量性が求められる実験等に用いられている^[28-31]。3つ目は、遠心方式である。遠心方式は、ディスク状のデバイスを回転させることにより、遠心力によって送液を行う手法である^[32-42]。送液は簡便である一方で、液体の置換など高度な溶液操作には課題が残る。この中で、アクチュエータを用いない方式は、毛管力の影響を顕著に受けるため、再現性が良くなく、定量的な分析を実行する臨床検査機器への応用には不適であると考えられる。また、ポンプで送液する方式は、ポンプを接続する作業が煩雑なほか、ポンプを実装もしくはポンプ持ち運ぶ必要があるため、可搬性が求められる POCT の分析機器には不向きであると考えられる。

一方で遠心方式は、高重力化で溶液を操作するため、毛管力の影響を低減でき、液面が安定するほか、流路内に液滴が残りにくく、また、反応系を並列化し1度に複数の反応を同時に実行することができるため、ELISA 等のバイオアッセイに向いていると考えられる^[43-45]。しかしながら上述したように、遠心式のマイクロ流体システムは溶液操作手法に課題が残り、簡便な操作手法が確立されていないのが現状である^[46-48]。このため、遠心マイクロ流体システムを POCT 対応機器に応用するには、簡便な溶液操作手法の開発が必須であるといえる。

これまでに提案されている遠心マイクロ流体デバイスの溶液操作手法を紹介する。まず、毛管力利用したキャピラリーバルブで液体をチャンバ内で保持し^[49]、回転数を上げることでバルブを開放し、液体を順次注入していく手法である^[12,15,50,51]。キャピラリーバルブは、流路表面と液体の界面に生じる毛管力を利用し、液体を保持する。毛管力より大きな遠心力を、回転数を上げて負荷することで、目的のタイミングで液体を注入することが可能となる。また、このキャピラリーバルブの原理とサイフォンバルブや空気圧の作用を組み合わせた手法も提案されている^[52-58]。キャピラリーバルブとともにサイフォンバルブは遠心式のマイクロ流体デバイスで広く用いられるバルブである。キャピラリーバルブは毛管力の作用を利用しているため、不安定な一方で、サイフォンバルブは比較的安定している。しかし、回転数の切り替えでサイフォンバルブを操作する方式^[59]では、回転数を下げ、毛管力による水位上昇にてバルブを開放するため、毛管力の影響により、制御が不安定になることは避けられない。そこで、毛管力の作用を用いない制御方式が提案されている。まずは、回転数を切り替え、密閉されたチャンバ内の空気圧を制御することにより、注入時間を制御する方式

である^[60-64]。回転数の切り替えのほかに、外部からの加熱により、空気圧を変化させる方式^[65-68] やサイフォンを併用した方式^[69-72]が報告されている。また、ベントに外部から空気を吹き付けることにより、液体の順序を制御する方式が提案されている^[73-75]。マイクロ流体デバイスは、流路やチャンバのサイズが小さく、体積（圧力）の制御が容易でかつ顕著に流体挙動に影響するため、圧力のコントロールによる溶液操作手法が多く提案されている。このほか、多く用いられている手法として、ワックスと加熱を用いた手法がある。流路内に予めワックスを詰め、回転中に外部からレーザーの照射等で加熱してワックスを溶かし、溶液を操作する手法が提案である^[76-82]。またその他のアプローチとして、遠心式のマイクロ流体デバイスにポンプを実装するもの^[83]、デバイスに重りを取り付け、回転数の切り替えにより、メンブレンバルブを機械的に開閉するもの^[84-86]、デバイスに磁石を実装し、外部から磁力によりその磁石を非接触で動かしバルブを開閉する手法^[87]、回転数を切り替えて、慣性により液体を注入する方法^[88]が提案されている。これらの手法はいずれも、回転数の切り替えやレーザーの照射といった操作（外部トリガー）が必要となる。回転数の切り替えを行うには、カスタマイズした専用の遠心機が必要で、またデバイスを加熱するには、遠心機のほかに外部装置が必要となる。これらは装置を大型化し、また、高額化する要因となるため、可搬性が必要な POCT 機器には向かず、普及にはつながらないと考えられる^[89]。そこで、外部装置（外部トリガー）が不要な内部トリガー型の溶液操作手法が提案されている^[90-92]。これらは流路内に溶解フィルムや溶解ゲルを実装することで、外部トリガーなく自律的に溶液操作を実行することが可能となる^[93]。しかし、溶解フィルムやゲルは、試薬に溶解した際、反応系に影響を及ぼす恐れがある。また、影響がない場合においても、フィルムやゲルを実装する必要があるため、安価なディスポーザブル臨床検査デバイスの実現は困難であると考えられる。

そこで本論文では、安価で可搬性のある POCT 対応機器の実現を目標に、外部トリガーが不要で、かつ、複雑な内部構造を有さない溶液操作手法として、自律制御型流体回路の制御理論を一から構築する。そして、それに基づいたデバイス設計を行い、定常回転で ELISA を自動実行する遠心マイクロ流体デバイスの開発を目的とする。

第 1 章では、化学分析の実行に必要な液体の注入時間制御や、液体置換を定常回転で自律的に実行するための基礎的な制御理論を提案する。分析デバイスでは、高い動作精度や安定性が求められることから、注入時間の制御精度に影響を及ぼす因子の検討や、安定性向上のため設計指針について考察を行う。

第 2 章では、1 章で構築した自律制御型流体回路理論に基づき、定常回転にて酵素免疫測定法（ELISA）を実行するデバイスを作製し、バイオアッセイを実行する。定常回転下という自律制御型流体回路理論の特殊な条件下では、液体の攪拌は乏しく、化学反応の効率が低下することが想定される。このため、本理論に最適な 1 次抗体の固相条件について検討を行う。そして ELISA を実行し、本理論を用いた分析系の有用性の考察と、従来の手作業による分析と比較による評価を行う。

第 3 章では、分析デバイスの集積化や微量化を目的に、新たな分注機構を提案する。この

分注機構は、自律制御型流体回路理論に基づいた分析デバイスへ実装可能とするため、自律的に液体の計量および注入が実行される設計となる。また、この分注機構の評価として、分注量の精度について検討を行う。

第4章では、2章で提案したELISAデバイスと第3章で提案した自律分注機構を統合した複数検体同時微量分析デバイスを提案する。このデバイスが動作実証を行い、ELISAの実行に必要なフローコントロールが実行されていることを確認する。そしてELISAを実行し、このデバイスの有用性に関する検討や、2章の単検体および従来の手作業による分析と比較、評価を行い、考察する。

第5章では、複数検体同時微量分析デバイスの動作安定性の向上や、流路表面の濡れ性の制限を受けない分注機構の実現を指向し、流路を立体的に交差させた両面成形型の自律分注機構を提案する。そして3章と同様に動作実証と分注量の評価を行う。また、3章で開発した分注機構と合わせて、繰り返し分注に対する動作安定性の評価を行い、考察する。

第6章では、5章で提案した両面成形型分注機構を実装し、かつ2度の抗原抗体反応をデバイス上で実行する複数検体同時微量サンドイッチELISAデバイスを提案する。ここまでで提案したほかのELISAデバイスと同様にフローコントロールの実証を行い、そしてELISAを実行し、このデバイスの有用性に関する検討や定量評価を行う。また、より実用を指向した検討して、簡素で安価な回転制御装置とスマートフォンを用いた比色法と組み合わせたローコストなシステム構成でELISA実行し、その有用性について検証および考察する。

第7章では、提案した手法についての総括と、本論文記載の技術による今後の展望について述べる。

第 1 章 自律制御型流体回路理論の基礎制御理論の構築

1.1 緒言

血中のタンパク質量を定量する分析手法の1つに、酵素免疫測定法(ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)がある。ELISAは、血液検査に用いられる分析手法の中で、最も煩雑な操作を必要とされる分析手法の1つである。図1.1に示すのは、ELISAの分析手法の中で最も一般的なサンドイッチELISAの操作手順の例である。ELISAではまず、タンパク質等の被検物質(抗原)と特異的に反応する抗体(1次抗体)が固相化された反応器に、分析したいサンプルを注入し、抗原と抗体を反応させる。抗原以外の物質を排除するために洗浄プロセスを経た後、さらに、検出用の標識抗体を修飾した2次抗体を反応器に注入し、抗原と反応させる。そして抗原と反応していない余分な2次抗体などを排除するために再度洗浄プロセスを行い、最後に検出用の発色基質を反応器に注入し、2次抗体の標識を反応させ、ある吸収波長の吸光度を測定する。サンプルに含まれる抗原濃度で、基質の発色量が変化することから、抗原濃度の定量が可能となる。

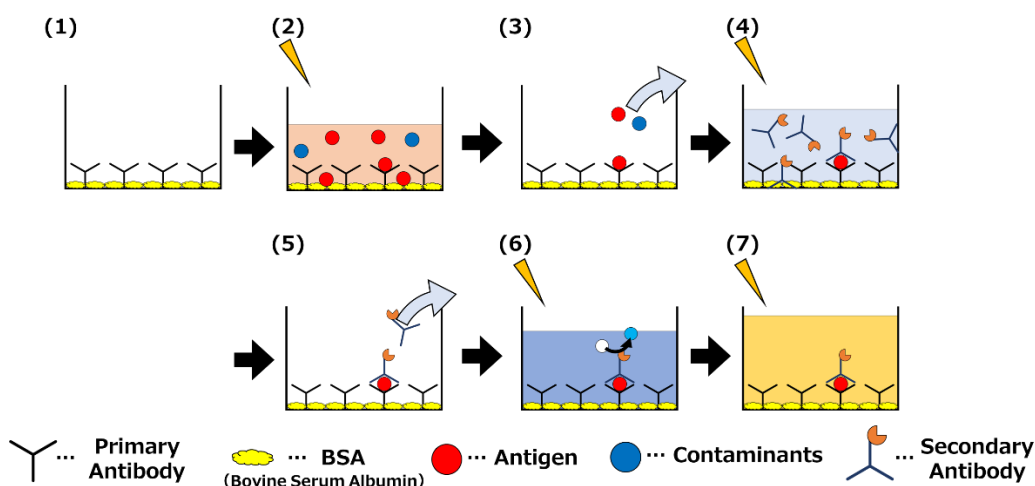


図 1.1 サンドイッチ ELISA の操作手順の例

- (1) 反応器表面へ1次抗体を固相化し、ブロッッキングする
- (2) サンプルを注入する
- (3) 反応器を洗浄する
- (4) HRP 標識抗体(2次抗体)を注入する
- (5) 反応器を洗浄する
- (6) TMB(発色基質)を注入する
- (7) 反応停止液を注入する

ELISAは、抗原抗体反応の高い特異性と、酵素反応によるシグナル増幅により、比較的高感度で被検物質を定量できることが特徴である。その一方で、一連のプロセスの中で、複数の試薬の注入や反応時間の管理、複数の洗浄プロセスを実行する必要があるため、マイクロ流体システム上でELISAを実行するには、これらを正確にコントロール可能であることが求められる。

そこで本章では、ELISAの実行に必須となる、液体の液体注入時間制御と、液体置換を実

行するための自律制御型流体回路の開発と、その実証を行う。

図 1.2 に、定常回転で動作する自律制御型流体回路の液体注入時間制御機構の動作原理を示す。本図では、赤と青の 2 つの液体を 1 つのチャンバ (Receiving chamber) へ、時間差を有して逐次的に注入する様子を示している。本液体注入時間制御機構 (以下、注入制御機構) は、操作する試薬を投入する Primary reservoir と、注入先となるチャンバの間に、抵抗流路 (Resistant channel) と二次槽 (Secondary reservoir) およびサイフォンバルブを配置する。そしてこのサイフォンバルブが開放されるまでの時間を、Secondary reservoir に流入する液体の流量を抵抗流路の抵抗を調整することによって制御する。

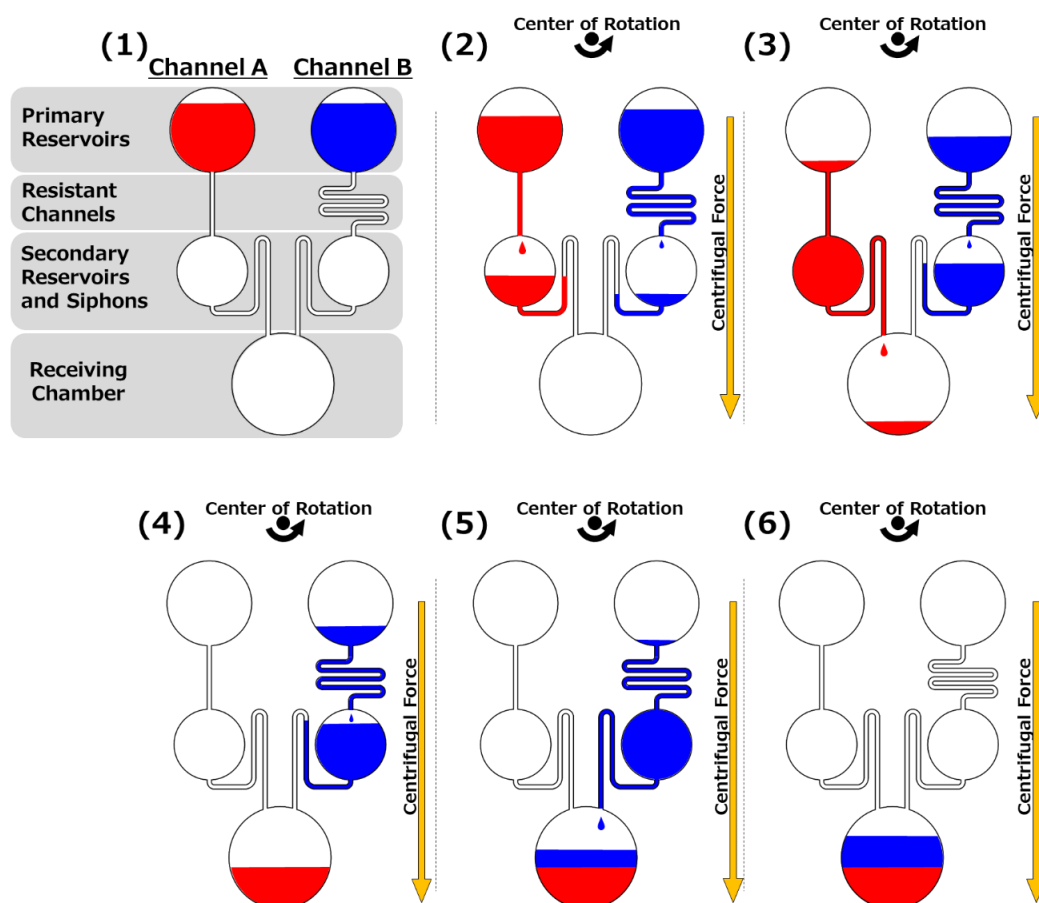


図 1.2 液体注入時間制御機構の動作原理

(1) 初期状態。上流から Primary reservoir、Resistant channel、Secondary reservoir、Siphon で構成される。(2) 回転開始後、遠心力が印加されることで、Primary reservoir 内に投入した液体が Resistant channel へと流れ、そして Secondary reservoir に蓄積し始める。(3) Resistant channel 部の抵抗が小さく、流量が大きい Channel A が先にサイフォンバルブが開放され、Receiving chamber へと液体が注入される。(4) Channel A の液体の注入が完了する。(5) Channel B のサイフォンバルブが開放され、Receiving chamber への注入が始まる。(6) Channel B の液体の注入が完了する。

1.2 実験方法

1.2.1 自律液体注入開始時間制御機構の実証

前節で提案した注入制御機構を実証するため、図 1.3 に示す遠心マイクロ流体デバイスを設計した。このデバイスは、4 つの独立したマイクロ流路が配置され、それぞれ上流から、Primary reservoir、Resistant channel (抵抗流路)、Secondary reservoir、siphon、Receiving chamber から成る。この 4 つの流路の違いは、抵抗流路の流路長のみで、流量が抵抗流路長に反比例することから、4 段階の注入開始時間が創成される。

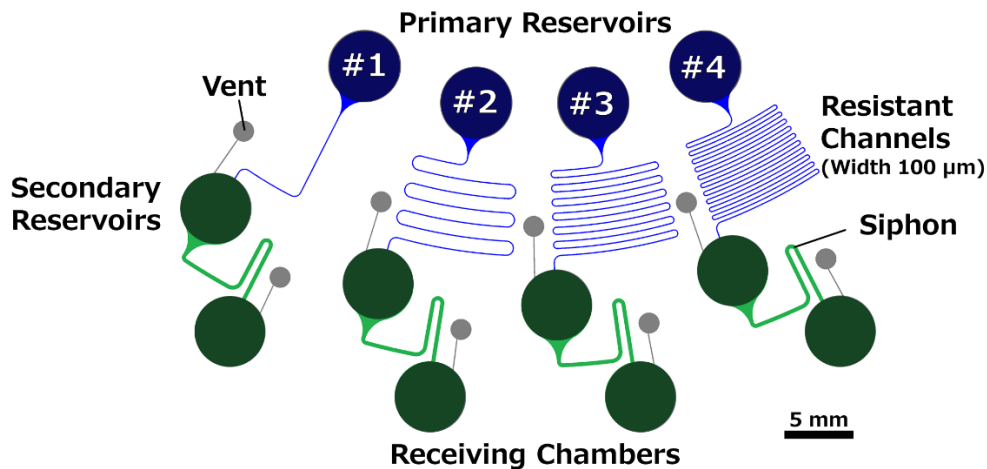


図 1.3 液体注入時間制御機構の動作原理

この設計したデバイスを、Polydimethylsiloxane (PDMS) で作製した。マイクロ流体チップは、一般的なソフトリソグラフィにて成形し、そのモールドはフォトリソグラフィにて作製した^[95] (図 1.4)。

まず、4 インチのシリコンウエハにネガ型のフォトレジストである SU-8 (Nippon Kayaku Co., Ltd., Japan) を、スピコートで膜厚が 100 μm となるよう塗布した。95°C で加熱し、ソフトベイクした後、図 1.3 の流路がパターンニングされたフォトマスクを置き、紫外線に露光させた。65°C で 1 分加熱後、さらに 95°C で 5 分加熱し、ポストベイクを行った。そして SU-8 Developer に浸漬し、現像した。PDMS ((SILPOT 184; Dow Corning Toray Co., Ltd., Japan) は、モノマーと架橋剤を 10:1 (W:W) となるよう調製し、3 mm 厚となるようシリコーンゴムで土手を作ったモールドに流し入れた。真空脱泡後、PET シートで封をし、平らにした状態で 75°C に加熱し、PDMS を硬化させた。同様に、厚さ 0.5 mm のフラットな PDMS を作製した。マイクロ流体チップは硬化後、離型し、各チャンバをポンチで打ち抜いて加工した。また、ベント穴は加工した 18G の針で打ち抜き、外形はカッターナイフで切り落とした。酸素プラズマ等の流路の表面処理は行っていない。これらの組み立ては、マイクロ流体チップとシートをそれぞれエタノールとイオン交換水で超音波洗浄したあと、90 分間真空乾燥を行ってから行った。マイクロ流体チップは、直径 12 cm の CD 基板に、シート、本体の順

に、PDMS の自己吸着により固定した。さらにその上に透明な粘着テープ（640PFD-50; NICHIBAN Co., Ltd., Japan）を貼ることで各チャンバの封をした。液体を投入するためのピペット挿入口は、チャンバにかかった粘着テープの一部を切り取ることで作製した。

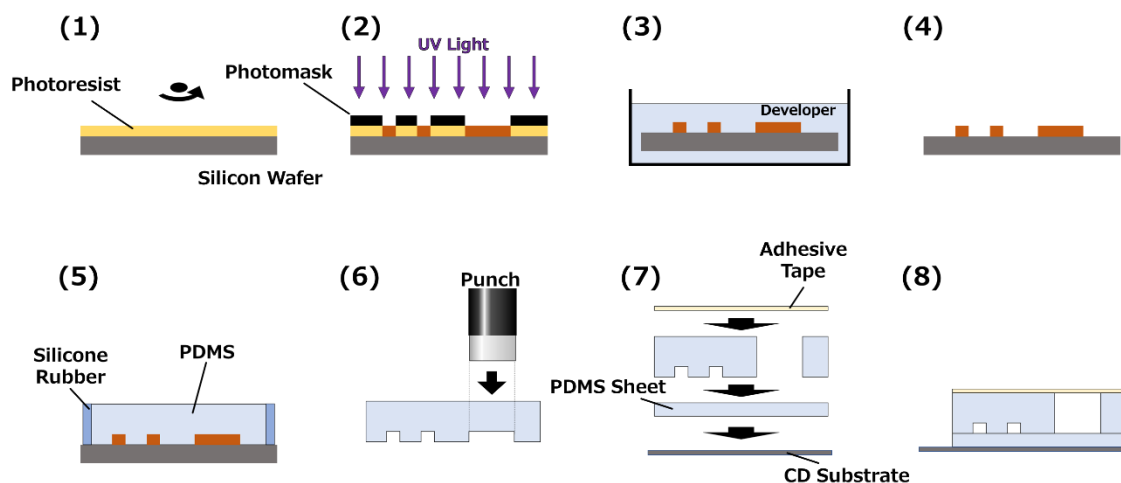


図 1.4 マイクロ流体デバイスの作製方法

(1) シリコンウエハにフォトレジストをスピコートし、ソフトベイクする。(2) 図 1.3 の流路をパターンニングしたフォトマスクをフォトレジスト上に置き、紫外線を露光する。(3) ポストベイク後、Developer に浸漬し、現像する。(4) IPA でリンスして、モールドの完成。(5) モールドの縁にシリコーンゴムで土手を作り、そこに液状の PDMS を流し入れ、加熱して PDMS を硬化させる。(6) モールドから PDMS を離型し、チャンバ部分などをポンチで打ち抜く。(7) CD 基板に、PDMS のフラットなシート、チップ本体の順に取り付け、さらにチャンバ部に透明なテープを貼り、封をする。(8) 遠心マイクロ流体デバイスの完成

この遠心マイクロ流体デバイスの各 Primary reservoir に水を投入し、自作の遠心機^[96]で定常回転を与え、その挙動をリアルタイム観察した。水は可視化のため、0.2%ビクトリアブルー B(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)含有イオン交換水を用いた。観察には回転と同期撮影が可能なストロボシステム^[41]を用いた。目標の回転数までの加速と、停止時の減速は 1500 rpm/s とした。

1.2.2 定常回転下における液体置換条件の検討

サイフォンを利用した液体置換機構の置換条件について検討を行った。この液体置換を実現するには、図 1.5 に示すように、前液の排液後にサイフォン流路内に液体が残っていないことが必要条件であると仮定できる。また、サイフォン流路内に残る液体はこの流路出口である Waste chamber（排液槽）との接続部に生じる毛管力などにて保持されていると考えられ、この残留液の水位が、サイフォン頂点より手前の流路の最下部より高い場合に、サイフォン流路内全体に液体が残ると考えられる。このため、置換する前液の排液後の状態を再現するデバイスを設計、作製し、前液の排液時のサイフォン流路出口の残留液の水位と流路の幾何的な構造や遠心力との関係について検討を行った。

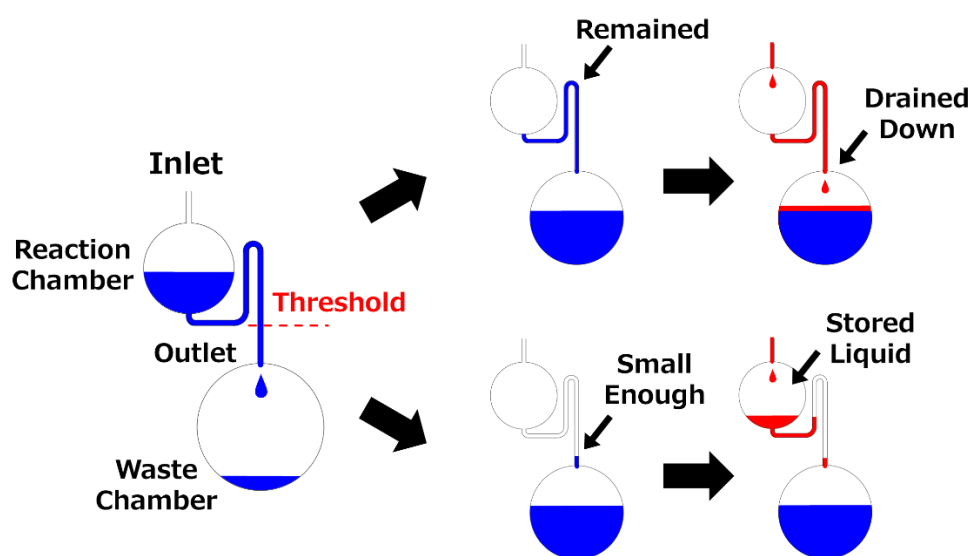


図 1.5 サイフォンを利用した液体置換機構の置換条件

1.3 実験結果および考察

1.3.1 自律液体注入開始時間制御機構の実証

図 1.6 に注入制御機構の実証実験の結果を示す。これらの画像は回転中の様子を同期撮影したもので、デバイスは常に 1500 rpm で回転している。まず回転開始までは、デバイスに投入した液体が Primary reservoir に保持されており（図 1.6(1)）、回転が開始し、遠心力が印加されると液体が Resistant channel（抵抗流路）に流れ始めた。回転開始から 25 秒後、#1 の液体のメニスカスがサイフォンの頂点を超え、その Receiving chamber に液体が注入され始めた（図 1.6(2)）。さらに 78 秒後、今度は #2 のサイフォンが開放され、その Receiving chamber へと注入が開始された（図 1.6(3)）。続いて #3、#4 の流路についても逐次的に液体が Receiving chamber へと注入され（図 1.6(4)、(5)）、最終的にはすべての液体が、それぞれの Receiving chamber に注入された（図 1.6(6)）。以上により、提案した注入制御機構が、定常回転にて各液体の注入時間制御が実行可能であることが実証された。

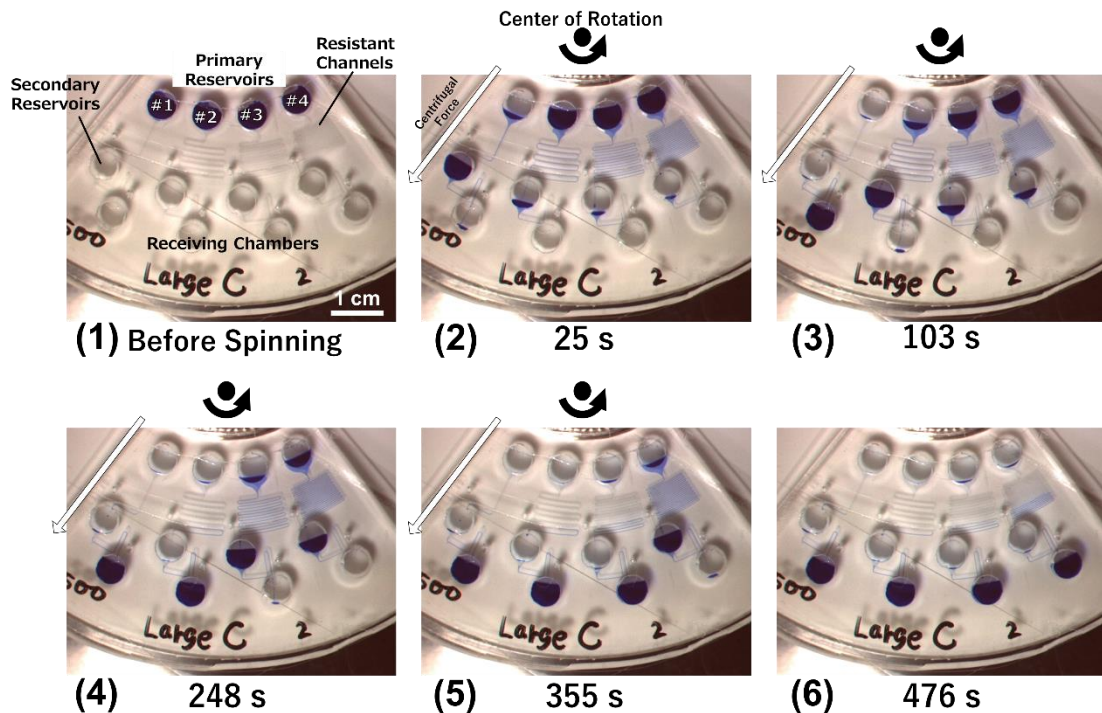


図 1.6 注入制御機構の実証実験で観察された主な液体の挙動

図 1.7 は各流路の液体の注入開始時間と Primary reservoir が空になるまでの時間を計測した結果である。3 度同様の実験を行った平均値を折れ線グラフでプロットし、標準偏差をエラーバーに、CV（変動係数）を棒グラフで示している。また、図 1.8 は、同様に作製したデバイスにおいて、動作させる回転数を変えて、注入開始時間を測定した結果である。

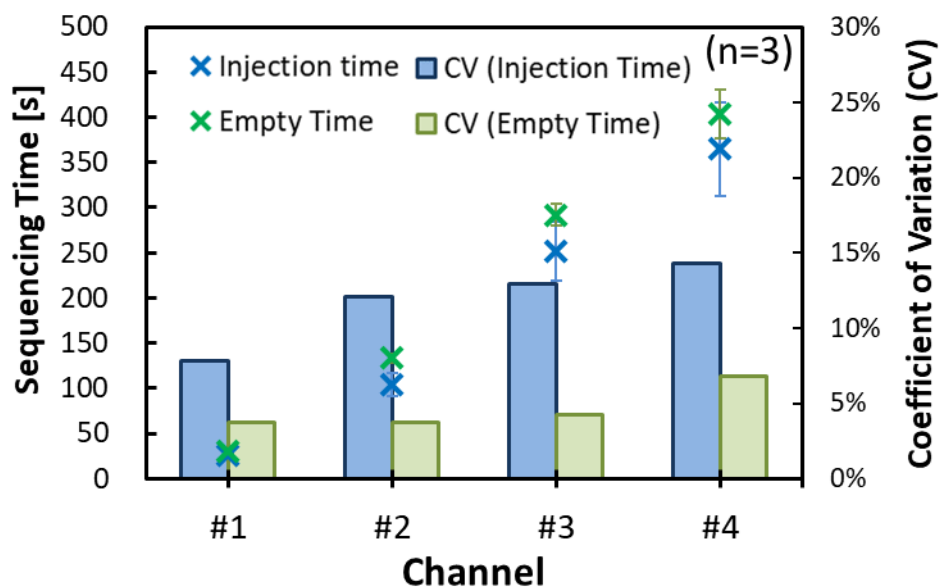


図 1.7 各流路の液体注入開始時間と Primary reservoir が空になるまでの時間

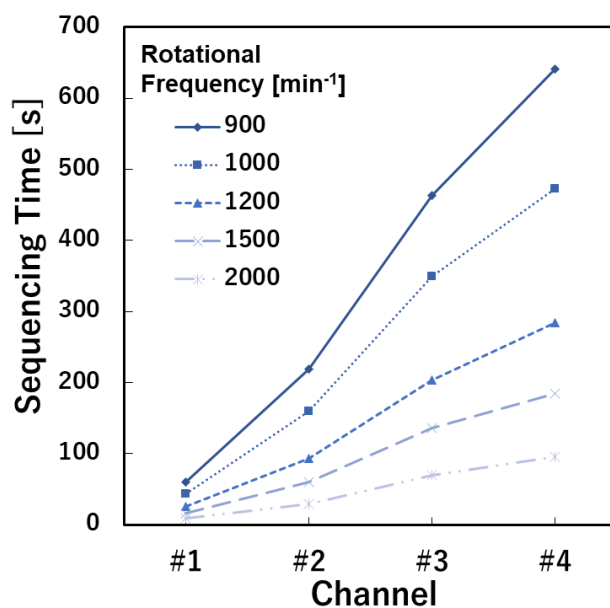


図 1.8 各回転数における各流路の液体注入開始時間

3度行った実験の中で、注入順序の逆転といったエラーは確認されず、いずれの実験においても、抵抗流路の流路長が短い、つまり抵抗流路の抵抗が小さく、流量が大きい順に注入が実行された。また、動作させる回転数を変えることで、液体の注入開始時間を調整可能であることがわかる。回転数は流量を決定するパラメータの1つであり、回転数や流路長などを調整することで、化学プロセスの実行に必要となると考えられる10分以上の注入制御が可能であるということが示された。

一方、各液体の注入開始時間は、各実験においてバラつきが大きく、CVで7.8-14.3%とな

った。Primary reservoir が空になるまでの時間については、CV が 3.7-6.8%と大きくないことから、流量の再現性は高く、Secondary reservoir のサイフォンバルブが開放されるタイミングのバラつきであると考えられる。

サイフォンバルブは、メニスカスがサイフォン頂点の逆 U 字管より高くなると開放されるメカニズムである。そしてこのメニスカスは、それに付随するチャンバの水位と連動して上昇するが、マイクロ流路内では毛管力の影響を受け、チャンバ内の水位と多少上下する (図 1.9)。(例えば今回の実験系では、流路が疎水性であると推測されることから、毛管力は、メニスカスが進むのとは逆行する方向に働いていると考えられ、サイフォン流路内のメニスカスは、チャンバ内の水位より低い位置にあると推測される。) しかしながら、この毛管力は、接触角や表面張力の変化により、容易に変化し、再現性が乏しい。このため、逆 U 字管を超えるためのチャンバ内の水位が、各実験でばらついており、注入開始時間のバラつきに影響したと考えられる。

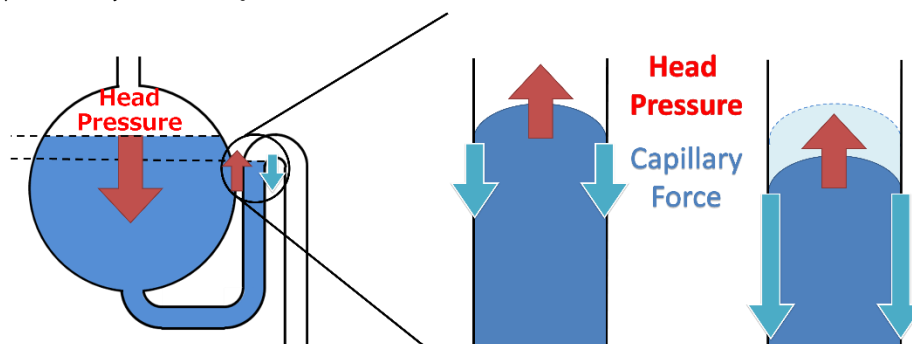


図 1.9 流路内の液体に働く力

そこで、注入開始時間の安定化を目的に 2 つの検討を行った。上述の通り、サイフォン流路内の水位は、遠心力つまり水頭圧と毛管力のつり合いから決定されることがから、1 つは、不安定な毛管力の影響を小さくする設計を検討し、もう 1 つは、印加する水頭圧を、メニスカスが逆 U 字管を超える前後で急峻に変化させ、水頭圧を支配的に印加する設計を検討した。具体的には、毛管力は、流路断面の等価直径に反比例することから、サイフォン流路の流路径を太くしたデバイスを検討した。もう 1 つは、サイフォンの高さをチャンバの最上面の高さより高くしたデバイスである。サイフォンをチャンバの最上部より高くすることで、チャンバ内の水位が満たされるまでは、流路内のメニスカスには大きな水頭圧がかからず、満たされることでチャンバ内の水位が急峻に上昇し、瞬間的に大きな水頭圧が印加することができる (図 1.10)。なお、今回の検討では、チャンバの大きさを直径 5 mm から 4 mm に縮小することで、この条件を実現した。

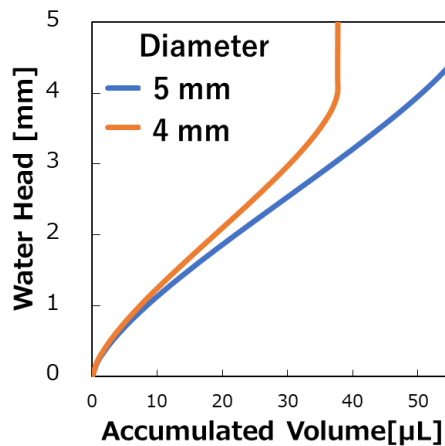


図 1.10 Secondary reservoir への蓄積量とメニスカスにかかる水頭圧の関係

以上の 2 条件のデバイスで各流路の注入開始時間を測定した結果を図 1.11 および図 1.12 に示す。各流路の注入開始時間のバラつきは、サイフォン流路幅を拡張したデバイスでは CV で 3.0-6.2%、Secondary reservoir の直径を小さくしたデバイスでは、4.0-6.2%となった。各液体の注入開始時間は、流路や Secondary reservoir の容積が異なることから、これらの比較はできないが、注入開始時間のバラつきは、上述したオリジナルのデバイスでは 7.8-14.3%だったことから、上記の幾何学的な設計の改良が、注入時間制御の安定性向上に寄与したと言える。

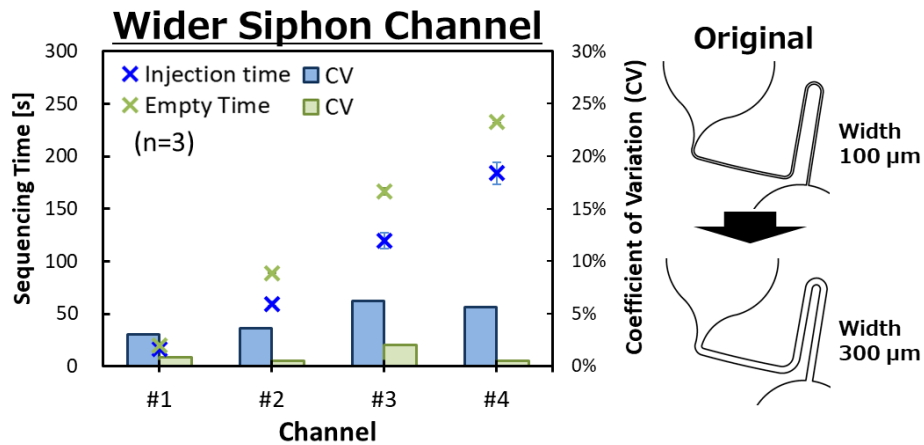


図 1.11 サイフォン流路の幅を拡張したデバイスにおける液体注入開始時間と Primary reservoir が空になるまでの時間

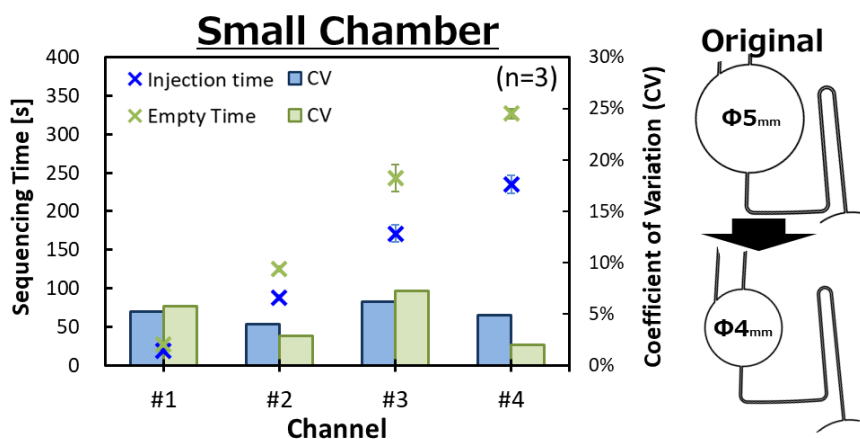


図 1.12 Secondary reservoir の直径を縮小したデバイスにおける液体注入開始時間と Primary reservoir が空になるまでの時間

その中で、流路幅を拡張したデバイスでは、全流路において Primary reservoir が空になるまでの時間のバラつきより、注入時間のバラつきが大きくなっていることから、依然毛管力の不安定性の影響を受けていることが示唆される。一方、Secondary reservoir の直径を小さくしたデバイスでは、それらのバラつきの差は小さく、注入開始時間の誤差は、毛管力の影響より、流量のバラつきの影響が大きいことが示唆される。流量のバラつきは、各実験において、温度変化による液体の粘度の変化や、マイクロチップを CD 基板に取り付ける際の位置ずれに起因するものだと考えられる。その中で今回の実験を通しての Primary reservoir が空になるまでの時間、つまり流量のバラつきは CV で平均 3.4%と算出され、安定していることが分かった。また、今回の検討では、流路幅の拡張と相対的なサイフォン高さの変更による影響を調べるため、それぞれ一方のみを変更して検討を行ったが、これらを組み合わせることで、更なる安定性の向上が期待でき、本原理にて、化学プロセスの実行に必要な長時間の安定的な注入時間制御を実行可能であると考えられる。

1.3.2 定常回転下における液体置換条件の検討

図 1.13(1)に、本検討に使用したデバイスの構造を示す。このデバイスの各流路の深さは約 100 μm で統一されており、主として Waste chamber と接続する流路の幅のみが異なる。そして図 1.13 (2) 及び図 1.13 (3)に、反応槽から液体を排出したときの液体の様子と、流路内に残った液体(プラグ)の高さの測定結果を示す。流路幅が細いほどプラグの水位が高く、太くなるにつれ、水位が低くなった。プラグは、流路出口のメニスカスと後端のメニスカスのそれぞれに生じる表面張力由来の差圧によるそこに留まろうとする圧力によって生成される。この圧力は、プラグの水位にはよらず一定で、濡れぶち長さといったメニスカスが形成される流路の断面形状に影響される。一方でプラグには遠心力由来の液体を下方へ排出させようとする圧力(水頭圧)がかかっている。この水頭圧はプラグ水位の2乗に比例し、水位により変化することから、液体排液時には、これらの圧力が釣り合う位置まで水位が下がり、プラグ水位が決定されると考えられる。

ここで、水頭圧は今回の実験系のように、流路の軸方向に流路断面の変化がない場合には、水頭圧[Pa]は、水頭[m]の2乗に比例し、流路幅や流路の断面積によらない。このため、各流路は流路幅が異なるが、流路出口にかかる水頭あたりの水頭圧は等しい。一方表面張力由来の圧力は、流路壁面とメニスカスの濡れぶち長さに比例し、流路断面の面積に反比例する。つまり、等価直径(= $4x$ 断面積/濡れぶち長さ)に反比例する。このため、今回のデバイスでは、流路幅が小さいほど表面張力由来の圧力は大きくなっており、流路幅が小さいほど、水頭圧に比べ表面張力由来の圧力が相対的に大きくなったことで、プラグの高さと流路幅が負の相関を持ったと考えられる。

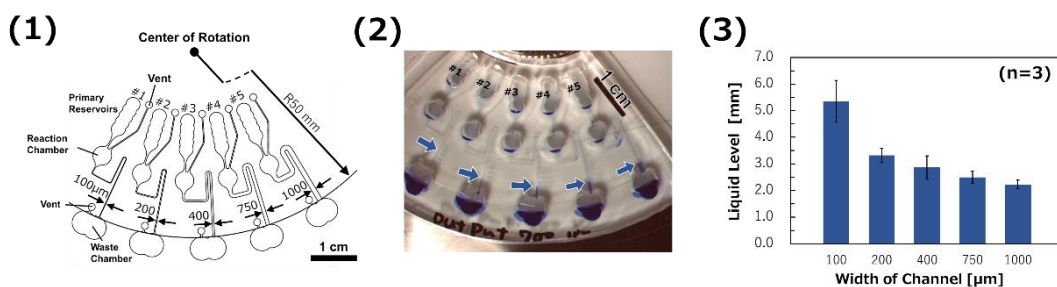


図 1.13 各回転数における各流路の液体注入開始時間

- (1) デバイスの構造 (2) Reaction chamber から液体排出直後の様子
- (3) サイフォン流路と Waste chamber の接続部に残留した液体(プラグ)の高さ

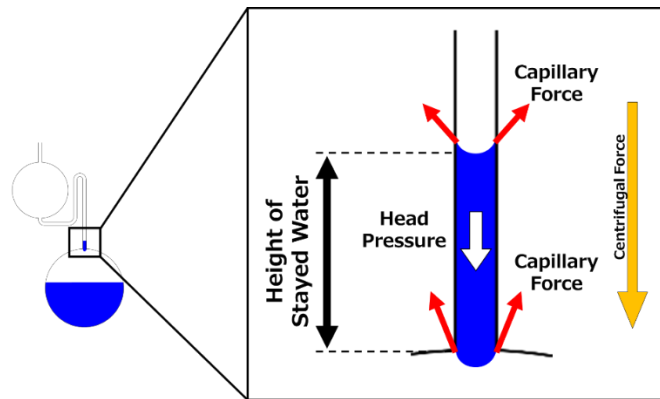


図 1.14 流路出口に残留する液体（プラグ）に生じる力

また、図 1.15 に Waste chamber の位置を回転中心より 4 mm 移設したデバイスで同様の実験を行った結果を示す。上述の実験では、いずれの流路においてもサイフォンの頂点に液体が残ることはなかったが、Waste chamber を 4 mm 移設したデバイスでは、同じ 700 rpm においてはすべての流路で液体がサイフォン流路全体に残留した。一方で印加する回転数を 900 rpm に上げることで、流路幅が 750 μm 以上の流路では、液体が残留しなくなった。そして 1200 rpm ではすべて流路において液体が残留しなかった。以上の結果から、液体は流路幅が細いほど、また遠心力が小さいほど液体が残りやすいといえ、これは上述した理論と一致する。以上により、サイフォンを用いた置換機構は、流路を太く、かつ印加される遠心力が大きくなるような構造にすることで、安定に液体置換を実行可能な流路設計が可能であると考えられる。

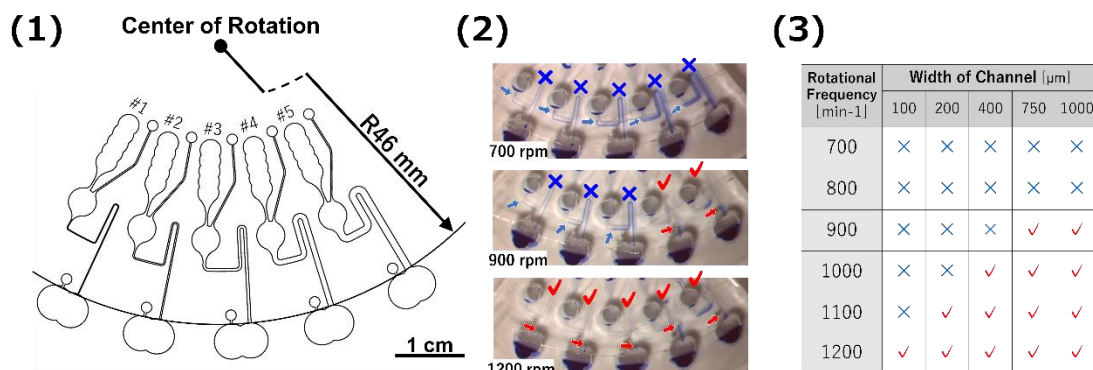


図 1.15 サイフォン流路全体に液体が残る条件の検討結果

以上の検討をもとに試作した液体置換デバイスを図 1.16 に示す。また、これを用いて行った実験結果を図 1.17 に示す。デバイスは、上述した実験と同様にフォトリソグラフィおよび、ソフトリソグラフィにて作製し、作動流体には、ビクトリアブルーで染色した水を用いた。回転数は 1200 rpm の定常回転とした。

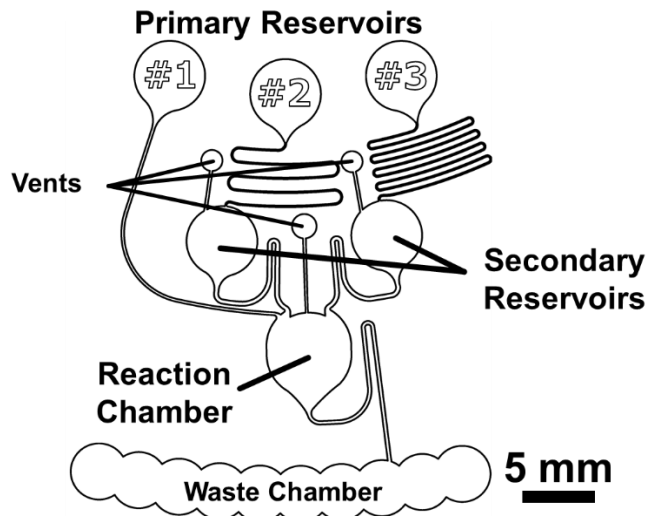


図 1.16 液体置換機構検討デバイス

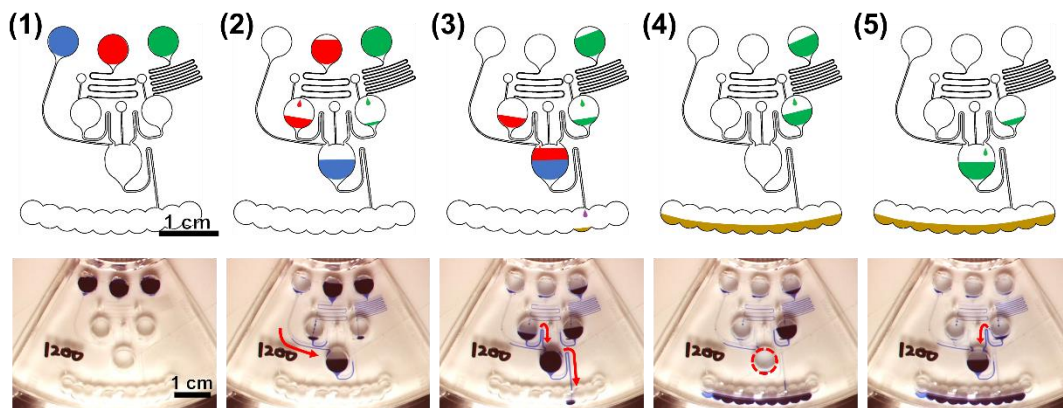


図 1.17 液体置換機構の実験結果（下段）とその挙動の模式図（上段）

まず、回転開始後、遠心力が印加されることで、#1 の液体が Reaction chamber（反応槽）へ注入された（図 1.17(2)）。次に、#2 の Secondary reservoir が満たされると、そこから反応槽へ液体が注入された（図 1.17(3)）。これにより反応槽も満たされ、そのサイフォンバルブがオープンとなり、反応槽内の液体がすべて Waste chamber（排液槽）に排出され、反応槽は空になった（図 1.17(4)）。そして、#3 の Secondary reservoir が満たされ、その液体が反応槽に注入され、そこでその液体が保持された（図 1.17(5)）。以上により、定常回転下にて液体置換が実証されたといえる。

また図 1.18 に、この実験及び回転数をパラメータに各液体の注入開始時間を測定した結果を示す。1000 rpm から 1300 rpm で行った全 33 回の実験において、各液体の注入順序の逆転や液体置換機構の不調は確認されず、置換成功率は 100% となった。一方で 900 rpm では、Secondary reservoir からの注入が実行されなかったことが原因で、液体置換が実行されず、この回転数では成功率は 20% となった。低回転数になるほど、表面張力の影響が支配的に大きくなることから、成功率が低下したと考えられる。一方で 1000 rpm 以上では、今回の

検討では、置換の失敗はなく、分析デバイスの適用に必要な十分な動作安定性を有していると考えられる。

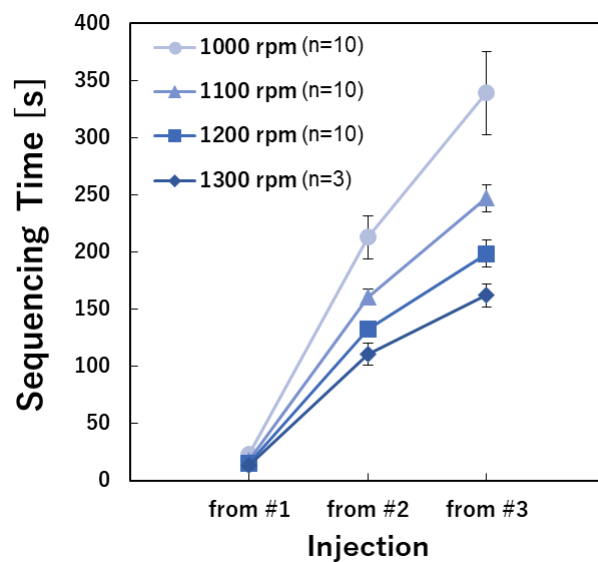


図 1.18 各回転数における液体の注入開始時間

1.4 結言

本章では、化学分析プロセスの実行に必要な液体注入時間制御と液体置換を実行するための自律制御型流体回路の開発とその実証を行った。

液体注入時間制御機構の開発では、提案原理通りに、定常回転下において液体の注入時間を制御可能であることを実証した。また、回転数や流路長を調整することで流量を小さくし、化学分析プロセスの実行に必要であると想定される 10 分以上の注入時間制御を安定に実行可能であることを実証した。

液体置換機構については、サイフォンバルブを用いた液体置換条件について、液体置換が実行されるための最低条件の仮説を立て、その条件を満たすための流路構造や回転数について、実験的に検討を行った。この結果、液体置換を安定に実行するためには、サイフォン流路の出口を太くして、毛管力の影響を小さくすることや、排液槽を半径方向外側に設けたり、動作回転数を上げたりして、液体に印加される遠心力を大きくすることが効果的であることを実証した。

以上の基本原理の検討結果をもとに作製した液体置換機構の検証デバイスでは、1000 rpm 以上の回転数において、置換成功率 100%で安定に液体置換を実行可能であることを実証した。

以上により、これら実証した置換プロセスなどの自律制御型流体回路理論を組み合わせることで、複数の単位操作のある化学分析プロセスを任意のプロトコルで実行可能であると考えられる。

第 2 章 自律制御型流体回路理論に基づく ELISA デバイスの開発

2.1 緒言

前章にて、化学分析プロセスの実行に必要な液体注入時間制御と液体置換の自律制御型流体回路の開発及び実証を行った。本章では、その自律制御型流体回路を組み合わせ、ELISA の実行を目的とする。ELISA を実行するためには、サンプルの注入や洗浄といった各単位操作に相当する流体制御の実行と、抗原抗体反応の制御が求められる。このため、本章では、ELISA の実行に相当するフローコントロールを実行するデバイスの作製及び動作実証と、抗原抗体反応の実行に必要となる 1 次抗体の固相条件の検討を行い、分析システムを構築する。そして、この自律制御型遠心マイクロ流体デバイスを用いた分析システムと、従来のタイタープレートを用いた手作業での分析を比較し、開発したシステムの評価を行う。

2.2 実験方法

2.2.1 自律制御型流体回路理論による ELISA デバイスの作製と動作実証

1 章で提案、実証した自律制御型流体回路理論に基づき、ELISA を実行するため、図 2.1 に示すデバイスを設計、作製した。このデバイスは、①サンプルの注入と反応、②2 度の洗浄プロセス、③発色基質（TMB）の注入と反応を自動的に実行する設計となっている。

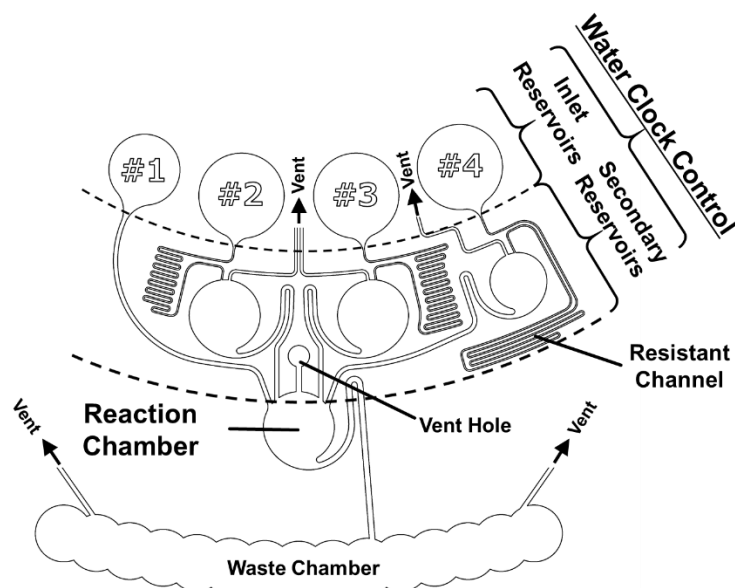


図 2.1 自律制御型流体回路理論に基づく ELISA デバイスの概要

このデバイスを 1 章のデバイスと同様に、フォトリソグラフィにてモールドを作製し、フォトリソグラフィにてその形状を PDMS に転写することで作製した。フォトレジストは単層プロセスで、膜厚が $100\ \mu\text{m}$ となるように塗布した。PDMS マイクロチップは、本体をモールドから $3\ \text{mm}$ 厚となるよう転写した。PDMS のモノマーと架橋剤の混合比は 10:1 (w:w) で、 75°C のオーブンで 90 分程度加熱することで硬化させた。モールドから離型後、各 reservoir や chamber はポンチで、Reaction chamber（反応槽）ベントは加工した 18G の針で打ち抜き加工にて成形した。これをさらに 200°C のオーブンで 30 分間加熱し、チップをアニーリングした。同様に作製した $0.5\ \text{mm}$ 厚の PDMS フラットシートとともに、エタノールおよびイオン交換水で超音波洗浄した後、ブローし、90 分間真空乾燥を行い、CD 基板上にデバイスを組み立てた。親水化処理や、表面活性化接合は行っておらず、PDMS の自己吸着にて固定した。チップの表面は、透明なテープ（640PFD-50; NICHIBAN Co., Ltd., Japan）で封をし、ベント穴や Primary reservoir の試薬注入口となる箇所は、テープをカッターで切り抜いた。

このデバイスに着色水および発色させた TMB を注入し、動作確認実験を行った。#1 にはサンプルの代替として 1% サフラニン（196-00032; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan）含有イオン交換水を $20\ \mu\text{L}$ 、#2 および #3 には $1\ \text{mM}$ フルオレセイン（F6377-100G, Sigma-

Aldrich Japan Co.LLC, Japan) 含有洗淨液 (後述) を 70 μL 、#4 には HRP と反応させて発色させた TMB (05298-80 ; Nacalai Tesque, Inc., Japan) を 50 μL 注入した。回転数は 1500 rpm の定常回転とし、それまでの加速および減速のみ 100 rpm/s の加減速を行った。流体挙動の観察には 1 章と同じストロボシステムを用い、リアルタイム観察を行った。

2.2.2 ELISA 試薬の調製

リン酸緩衝液 (DPBS) は一般的な組成で pH が 7.4 になるよう調製した。ウシ血清アルブミン (BSA; A7030-50G, Sigma-Aldrich Japan Co., LLC, Japan) を DPBS に 1 wt% 溶解させた溶液を、サンプルと 2 次抗体の調製およびブロッキングバッファとして使用した。0.05% の Tween 20 (167-11515, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) 含有 DPBS (v/v) を洗浄液として使用した。イオン交換水で調製した 1M 硫酸を反応停止液として使用した。Goat 抗 mouse IgG 抗体 (Prod. #31164) と mouse IgG (Prod. #31903) は Thermo Scientific Inc. から購入した。HRP 標識された Goat 抗 mouse IgG 抗体 (#074-1806) は Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. から購入した。TMB 基質 (05298-80) は Nacalai Tesque, Inc から購入した。

デバイスを用いた分析では、スタンダードを BSA 溶液で調製し、希釈系列を作成した。それと、Mouse IgG 検出系では、1 mg/mL HRP 標識抗体を 30000 倍希釈した溶媒と、あらかじめマイクロチューブ内で反応させ、Primary reservoir の #1 に 30 μ L 投入した。洗浄液は #2 および #3 にそれぞれ 70 μ L 投入した。TMB 基質は #4 へ 50 μ L 投入した。このデバイスを 1400 rpm で 18 分間回転させた。停止状態から目的の回転数になるまでの加速と、そこから停止までの減速は 100 rpm/s とした。回転停止後、反応槽内に蓄積している液体を 30 μ L 取り出し、タイタープレート (Immunomodule 469914, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) に移した。その液体に同量の硫酸を加えたあと、450 nm の吸光度をプレートリーダー (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Inc.) で測定した。TMB の反応中は、感光を防ぐため、ストロボの発光を停止させた。すべての反応は室温下で行った。また、1 度に分析可能なデバイス数を増やすため、独自のアダプタで CD 基板を積層し、最大で 1 度に 20 個のデバイスを同時に動作させられるようにした。

2.2.3 自律制御型 ELISA デバイスにおける 1 次抗体固相条件の検討

液相で化学反応を実行するには、液体の攪拌は、反応効率に影響を及ぼす重要な要素の 1 つである。しかし定常回転下では、液体はあまり攪拌されず、分子の拡散は主に分子拡散によるものとなり、反応効率が低下することが想定される^[97]。このため、デバイス上で実行される化学反応の効率向上を目的に、ELISA における 1 次抗体 (Goat 抗 mouse IgG 抗体) の固相方法について検討した。比較したのは次の 3 種である。1 つ目はデバイスの反応槽に、抗体を直接固相化する方法である。2 つ目は抗体を固相化したマイクロビーズを反応槽に封入する方法で、3 つ目は抗体を固相化したポリウレタンフォームを反応槽に封入する方法である。これら 3 つの条件それぞれで、抗原 (Mouse IgG) が 100 ng/mL のサンプルを分析し、その吸光度を比較した。それぞれの固相化方法の条件は以下に示す。

反応槽へ抗体を固相化する方法では、物理吸着にて抗体を反応槽表面に固相化した。DPBS で 100 倍希釈した 1 次抗体を組み立てたデバイスの反応槽が満ちるように入れ、室温静置でオーバーナイトでインキュベートした。5 度洗浄したのち、反応槽を再度ブロッキング溶液で満たし、さらにオーバーナイトでインキュベートした。そして 3 度洗浄したのち、デバイスの表面をテープで封をして、分析を行った。

マイクロビーズは、直径が実測平均 338 μm のマイクロビーズ (polystyrene beads, 355-425 μm ; Polysciences, Inc., USA) を使用し、これに 1 次抗体を物理吸着させた。このマイクロビーズを 4 mg 秤量し、反応槽に封入して分析を行った。ビーズは固相化前に、DPBS で 10 度洗浄し、未希釈の 1 次抗体 (1.7 mg/mL) に懸濁したあと、3 日間室温で攪拌しながらインキュベートすることで抗体を固相化させた。インキュベート後は、3 度ビーズを洗浄したあと、ブロッキング溶液中で保存した。そして、そこからビーズのみを取り出して分析に用いた。

ポリウレタンフォーム (DA-465, Dasio Industries Co., LTD., Japan) は、反応槽と同じ直径 5 mm、厚さ 3 mm 程度にカットし、質量を統一して使用した。切り出したポリウレタンフォームは、マイクロビーズと同様に 10 度 DPBS で洗浄した後、DPBS で 10 倍希釈した 1 次抗体に浸漬し、3 日間攪拌しながら室温でインキュベートし、抗体を固相化させた。5 度洗浄したあと、ブロッキング溶液中で保存した。そしてそこから取り出し、遠心することで脱水し、1 つの反応槽当たり 1 つのポリウレタンフォームを封入し、分析を行った。

2.2.4 自律制御型 ELISA デバイスを用いた分析系の評価

市販の ELISA キットを用いて検量線を作成し、デバイスを用いた分析システムを、タイタープレートを用いて手作業で行う従来の分析方法と比較、評価した。Goat 抗ヒトアルブミン抗体 (A80-129A) と HRP 標識 Goat 抗ヒトアルブミン抗体を含む、市販の ELISA キットは、Bethyl Laboratories, Inc.から購入した。また抗原となるヒト血清アルブミン (A9511) は Sigma-Aldrich Co. LLC.から購入した。評価の指標となる手作業での分析は、このキットに則り行った。まずタイタープレートに DPBS で 100 倍希釈した 1 次抗体を 100 μ L 注入し、室温静置で 1 時間インキュベートすることで 1 次抗体を固相化させた。5 度洗浄したあと、ブロッキング溶液を 200 μ L 注入し、30 分間インキュベートすることで、ウェル表面をブロッキングした。5 度洗浄したあと、デバイスの分析系と同様に、抗原と 75000 倍希釈した HRP 標識抗体を反応させたスタンダードを 100 μ L 注入し、室温静置で反応させた。さらに 5 度洗浄したあと、TMB 基質を 100 μ L 注入し、15 分間室温静置でインキュベートさせた。そして硫酸を 100 μ L を加えて発色反応を止めた後、450 nm の吸光度を測定した。

また、本比較の前に、デバイス反応系に最適な HRP 標識抗体濃度を検討した。検討した濃度は、25, 33, 50, 100 ng/mL の 4 濃度である。抗原 (ヒトアルブミン) 濃度が 0 ng/mL のサンプルと、1 ng/mL のサンプルを分析し、その吸光度から、検出下限値などを算出し、最適な HRP 標識抗体濃度を検討した。

2.3 実験結果および考察

2.3.1 ELISA 実行デバイスの動作検証

観察された一連の液体挙動を図 2.2 に示す。まず各 Primary reservoir に投入された液体は、ある程度の遠心力が印加されるまで、Primary reservoir 内で保持されていた (図 2.2 (1))。そして回転が開始して遠心力が印加されることで各試薬が流路へ流れ始め、#1 の液体は反応槽に注入された (図 2.2 (2))。デバイス表面はこれらの液体に対し疎水性のため、毛管力が液体の流れを妨げる方向に働くことで、試薬が Primary reservoir に保持される。回転が始まり、この遠心力と水頭由来の水頭圧がこの毛管力に勝ることで、各液体が流路へと流れ始めたと考察できる。次に回転開始後数秒で反応槽に注入された #1 の液体 (サンプル) は、回転開始から約 280 秒まで反応槽内で保持された後、#2 の液体 (洗浄液) が Secondary reservoir から反応槽へ注入されることで反応槽が満たされ、反応槽のサイフォンバルブもオープンとなり、反応槽内の液体が排液された (図 2.2 (3))。これが抗原抗体の反応プロセスおよび 1 度目の洗浄プロセスとなる。さらに約 120 秒後、今度は #3 の Secondary reservoir から同様に反応槽へ液体が注入され、再度反応槽が液体で満たされたあとで注入されたすべての液体が排液槽へ排液された (図 2.2 (4))。これが 2 度目の洗浄プロセスとなる。最後に空になった反応槽へ、#4 の Secondary reservoir から TMB が注入され、回転停止まで反応槽内で保持された (図 2.2 (5))。これが TMB 基質の反応プロセスとなる。以上により、ELISA の単位操作に相当するフローコントロールを 1500 rpm の定常回転下で実行されたことを確認した。

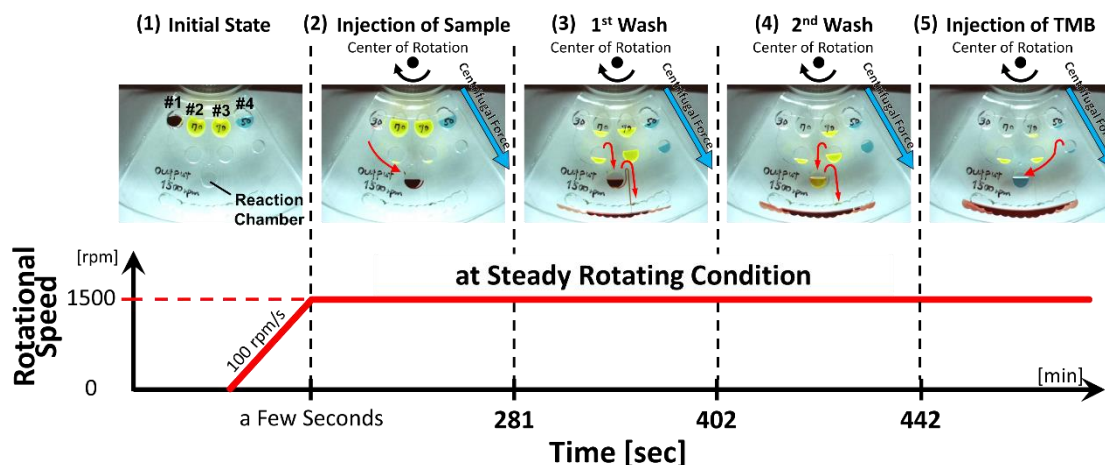


図 2.2 観察された主な挙動と回転数

一方、抗原抗体反応の時間を 5 分とするため、印加する回転数を 1400 rpm として同様の実験を行った場合においても、上記のフローコントロールが実行されることを確認した。また、プロトコル実行の安定性や各試薬の注入時間の安定性を確認するため、同様に作製した 5 つのデバイスを同時に動作させたところ、注入順序の逆転や、試薬が注入されないといっ

たエラーは確認されなかった。各試薬の注入開始時間は、図 2.3 に示す通りで、5つのデバイス間における各試薬の注入開始時間の誤差は CV (変動係数) で 5%以下となった。臨床検査装置に求められる測定結果の許容誤差は、大きいもので 5%以下となっており¹⁹⁸⁾、今回の注入開始時間の誤差が直接分析結果に反映されるわけではないものの、その水準に相当する精度を有していると考えられる。

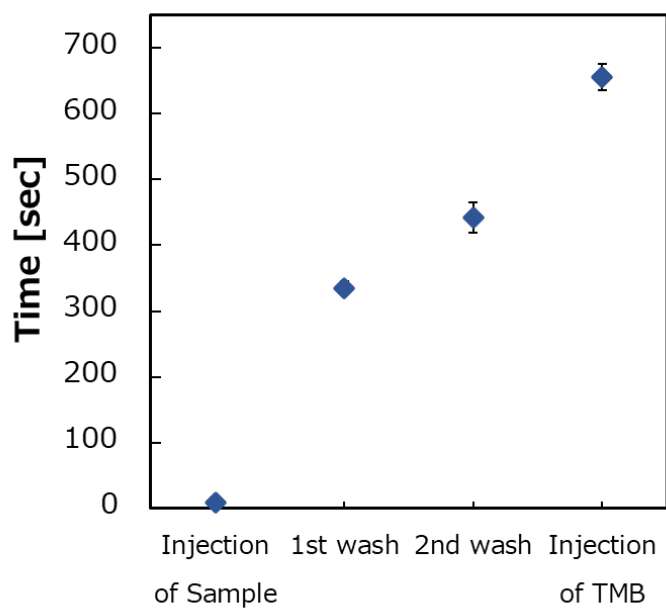


図 2.3 各試薬の注入開始時間

プロットは各デバイスの注入開始時間の平均値を
エラーバーは標準偏差を示している

2.3.2 自律制御型 ELISA デバイスの固相条件の検討

検量線作成前に予備検討として、1次抗体の固相方法について検討を行った。検討したのは、反応槽に直接抗体を固相化する方法、抗体を固相化したマイクロビーズを反応槽内に封入する方法、抗体を固相化したポリウレタンフォームを反応槽内に封入する方法の3種で、これらの条件それぞれで抗原濃度 100 ng/ml のスタンダードを分析し、そのシグナルである吸光度を比較した。その結果を図 2.4 に示す。反応槽に直接固相化する方法が 0.264 と最もシグナルが強く、次いでポリウレタンフォームを使用した方法が 0.197 となり、そしてマイクロビーズを使用した方法が 0.116 と最もシグナルが弱くなった。

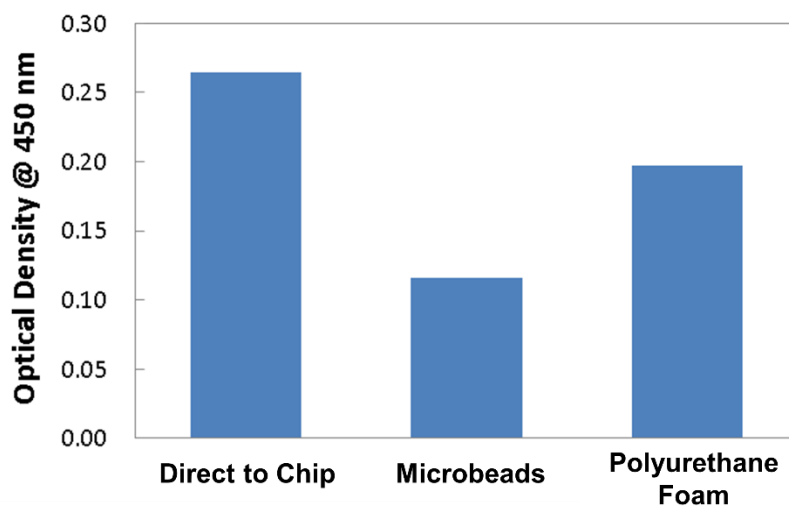


図 2.4 測定された吸光度

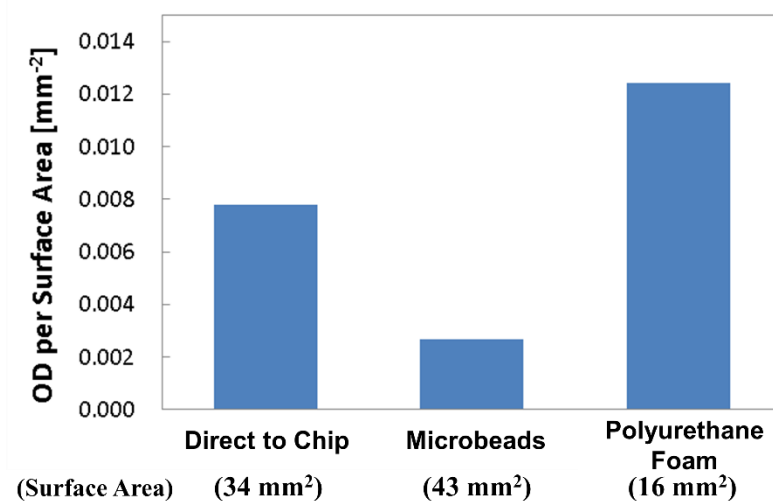


図 2.5 単位反応表面積当たりの吸光度

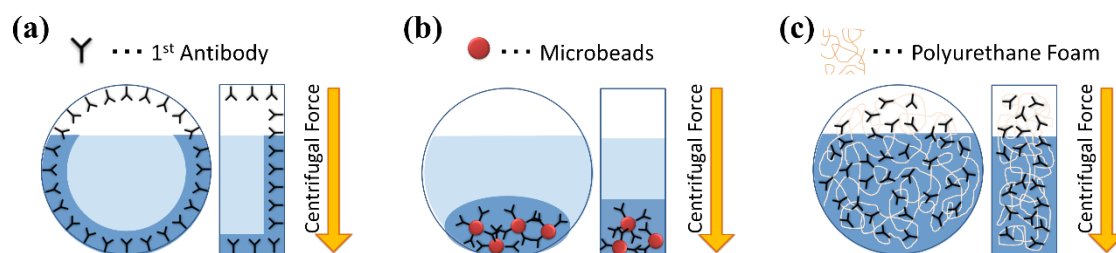


図 2.6 各固相条件における 1 次抗体の状態と反応領域のイメージ

この結果を考察するために、各固相方法における反応の表面積を試算し、図 2.4 の吸光度をその表面積で除した単位反応表面積当たりの吸光度を次の図 2.5 に示す。なお、ポリウレタンフォームの表面積は、複雑に折り重なった繊維を、一本の線状の繊維と仮定して試算した。単位反応表面積当たりの吸光度を比較すると、最も大きな値となったのが 0.0124 mm^2 のポリウレタンフォームを使用した方法で、次いで直接固相化する方法の 0.0078 mm^2 、そしてマイクロビーズを使用した方法が 0.0027 mm^2 と最も小さくなった。

今回の実験系では、反応槽の容積の $59 \mu\text{L}$ や注入されるサンプル量の $30 \mu\text{L}$ に対し、マイクロビーズは 4 mg と、反応槽やサンプル量に対し、マイクロビーズが占める割合は小さく、マイクロビーズは遠心中、反応槽の下部に沈降する。このため、定常回転で反応中の攪拌がほとんどない本デバイスの分析系では、化学反応が局所的となり、シグナルが弱くなったと考えられる (図 2.6 (b))。それに対し、抗体を反応槽に直接固相化する方法や、ポリウレタンフォームを用いた方法では、抗体が反応槽下部以外にも分散しているため、シグナルが大きくなったと考えられる。特に、直接固相化する方法では、1 次抗体は、反応槽の壁面のみ存在するが (図 2.6 (a))、ポリウレタンフォームを用いた方法では、反応槽全体に 3 次元的に 1 次抗体が展開していることで、反応効率が向上したと考えられる (図 2.6 (c))。

今回の検討では、いずれの固相条件においても、デバイスのフローコントロールに影響するようなエラーは見られなかった。その中で最も高いシグナルが得られたのは、1 次抗体を反応槽に直接固相化する方法であった。しかしながら、1 次抗体を反応槽に固相化する方法では、試薬を長時間反応槽内でインキュベートする必要があり、これが流路表面の濡れ性を変化させ、フローコントロールに影響を及ぼす可能性が示唆される。このため、フローコントロールの安定性を考慮すると、ビーズやポリウレタンフォームに 1 次抗体を固相化し、それを反応槽内に封入する方法が、流路表面の濡れ性への影響がないため、望ましい。その中で、ビーズを用いた方法とポリウレタンフォームを用いた方法を比較すると、ポリウレタンフォームを用いた方法のほうが、得られるシグナルと反応効率ともに高く、また、ポリウレタンフォームのほうが 1 つの固体として扱うことができ、取り扱いが容易なことから、検量線作成では、この 1 次抗体を固相化したポリウレタンフォームを反応槽に封入する方法を採用することとした。

2.3.3 自律制御型デバイスを用いた分析系の評価

まず、デバイスを用いたヒトアルブミン検出系における HRP 標識抗体濃度の最適化検討の結果を図 2.7 に示す。検討を行った 4 濃度において、33 ng/mL (1 mg/mL を 3 万倍希釈) の検出下限値が最も優れた結果を得られた。

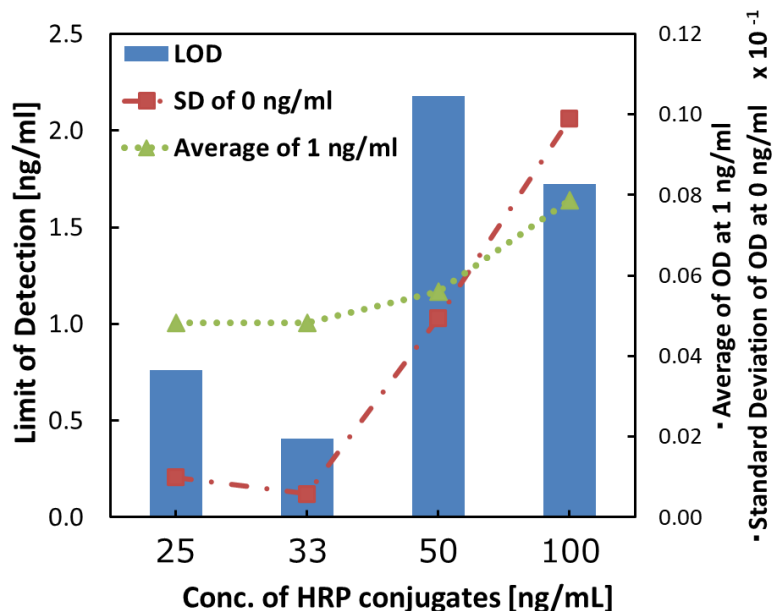


図 2.7 各 HRP 標識抗体濃度における検出下限値

HRP 標識抗体の濃度を高くすることで、シグナルの増強が確認されたが、一方でバックグラウンドとなるシグナルも大きくなり、検出下限値は劣る結果となった。本デバイスの洗浄能では、反応槽の洗浄が十分でないことが要因として考えられる。一方で 33 ng/mL 以下では、バックグラウンドのシグナルの増大は見られなかった。このため、バックグラウンドのシグナル増大のない濃度における最高濃度の 33 ng/mL が本分析系の最適な HRP 標識抗体濃度であると考え、以降の検量線作成においても、この濃度を採用した。

次に、作成したヒトアルブミン検出系の検量線を示す。デバイスを用いて作成した検量線を図 2.8 (a)に、従来のタイタープレートを用いて手作業で分析を行い作成した検量線を図 2.8 (b)に示す。デバイスを用いて作成した検量線では、0-100 ng/mL の範囲で抗原濃度に応じたドーズレスポンスが得られていることや、従来法と比較して、検量線の曲線に大きな差異は見られないことから、反応系を制御できており、ヒトアルブミンの検出系として有効であると考えられる。デバイスのフローコントロールの成功率は約 90%で、この影響で 100 ng/mL の条件のみ n=1 となったが、その他の濃度では、n=3 で吸光度を測定できており、その再現性は CV で 1-7%となった。また、検出下限値 (LOD) は、0.516 ng/mL と算出された。一方従来法の分析において、抗原抗体反応の反応時間をデバイス分析系と同等の 5 分とした場合では、LOD は 0.707 ng/mL となった。デバイス系は、従来法と比較す

ると、同等の反応時間では、同等の以上の検出感度を有していると言える。また、デバイス反応系は、従来法と比較して、サンプル量が 100 μL から 30 μL に削減され、洗浄回数もバックグラウンドのノイズシグナルなしで 5 回から 2 回に削減され、サンプル量や試薬使用量の削減や単位操作数の簡略化を実現したと言える。

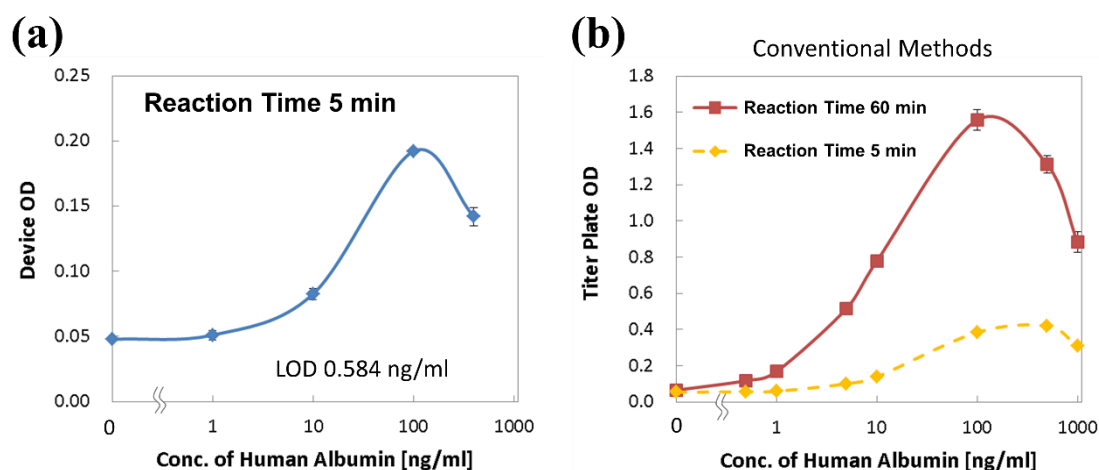


図 2.8 得られたヒトアルブミン検出系の検量線

デバイス系で作成した検量線では、400 ng/mL の吸光度が 100 ng/mL の吸光度より小さくなっているが、これは従来法でも見られる傾向である。これは今回の ELISA の反応系では、抗原を予め HRP 標識抗体と反応させていることに起因し、抗原濃度が大きい領域では、HRP 標識抗体と反応していない抗原の割合が増加し、その反応していない抗原が反応器内で 1 次抗体と反応しているためだと考察させる。このことから、この高濃度域での吸光度の低下は、デバイスを用いた反応系由来の問題ではないと考えられる。一方、従来法で反応時間をキットに指定された 60 分とした場合においては、LOD は 0.0665 ng/mL と算出され、デバイス反応系はこれより、1 桁劣っているという結果となったことから、更なる検出感度の向上が今後の課題である。

2.4 結言

本章では、1章で開発した自律制御型流体回路理論をもとに酵素免疫測定法（ELISA）を実行するデバイスを設計、作製し、そのデモンストレーションを行った。動作検証では、ELISAの各単位操作に対応するフローコントロールを1500 rpmの定常回転下で実行可能であることを示した。また回転数を調整することで、反応時間等を制御可能であることを確認し、複数のデバイスを用いた動作検証では、各試薬の注入時間制御の誤差が5%と高い制御精度を有していることを確認した。

ELISAにおける1次抗体の固相条件の検討においては、定常回転下で化学反応が実行され、液体が攪拌されず、分子の拡散が乏しいという本理論特有の条件下において、3次元的に1次抗体を展開可能なポリウレタンフォームを採用することで、化学反応の効率が向上することを実証した。

ヒトアルブミン検出系によるデバイス分析系の評価では、従来の手作業による分析系と同様に、反応系が制御できており、デバイスを用いた分析系がヒトアルブミン検出系として有効であることを示した。従来法と、抗原抗体反応の反応時間を統一して比較した場合には、デバイス分析系が、従来法と同等以上の検出感度を有していることを確認した。また、サンプル量や使用試薬量の削減と洗浄回数の削減も実現した。一方で従来法において抗体反応の反応時間をキット通りに60分間とした場合においては、それと比較してデバイス分析系は、検出感度が1桁劣る結果となり、検出感度の向上は課題といえる。

第3章 自律制御型分注機構の開発

3.1 緒言

前章にて、自律制御型流体回路理論に基づく、ELISA デバイスを作製し、ヒトアルブミン検出系として有効であることを実証した。その一方で ELISA は、分析対象のサンプルを同条件で分析して作成した検量線と比較することで、抗原濃度が定量できる。このため、実際の臨床現場などで ELISA を実行することを想定した場合には、温度といった分析環境や試薬の状態を、検量線作成を行った環境と同条件にすることが求められる。これらを同条件にするためには、環境を統一するために温調といった装置や、試薬の管理が必要となり、装置の大型化や高価格化、試薬の管理コストなどが課題となる。一方で、現場において、分析対象のサンプルの分析と同時に検量線を作成して比較することで、これらの条件は、必然的に統一され、温調といった装置や、厳密な試薬管理は不要となる。しかしながら、2章で作製した ELISA デバイスで検量線を作成するには、十数個のデバイスが必要となり、さらにその各 Primary reservoir に試薬を投入する煩雑な作業が必要となり、現実的ではない。そこで、1つの試薬注入槽から複数の試薬注入槽へ自動的に試薬を分配する機構（分注機構）を分析デバイスに実装することで、デバイスの集積化が可能で、使用者の負担を増やすことなく、分析可能な検体数を増やすことができると考えられる。

分注機構には、試薬などを計量した後、同時に目的のチャンバへ注入を実行するという機能が求められる。また、2章で開発した ELISA デバイスは、定常回転で動作することが特徴の1つである。このため、このデバイスに実装する分注機構においても、上記の機能を定常回転で動作することが求められる。しかしながら、これまでに報告されている分注機構は、キャピラリーバルブを用いて、液体を一旦溜めて計量したのち、回転数を上げたり、加熱して加圧したりすることによりバルブを開放させ分注させる方法^[63, 65, 99-104]が一般的である。このほかワックスバルブで閉じられたチャンバで計量後、ワックスバルブを加熱し、そのバルブを開放することにより分注を実行する方法^[80, 105]やこれらを併用した方法^[81]報告されているが、定常回転で自律的に動作する分注機構の報告例はない。このため、本章では、2章で開発した ELISA デバイスに実装可能な、定常回転で動作し、かつ高精度な自律分注機構の開発を行う。

3.2 動作原理および設計

図 3.1 に提案する自律分注機構の模式図と動作原理を示す。本分注機構は、特殊なサイフォンバルブと、自律分注トリガー機構から構成される。図 3.1 にその動作原理を示す。

まず、分注機構に導入された液体は、Metering chamber に蓄積し、計量が始まる（図 3.1 (c)）。1 つ目の Metering chamber が満たされると、液体はオーバフローし、右の Metering chamber へと流れ、各 chamber で計量が行われていく。この時、Metering chamber の下流に位置するサイフォンは、その頂点がオーバフローする水位より低くなっているが、液体に対し疎水性を示す流路表面でかつ、流路を細くすることで毛管力の作用を利用し、メニスカスがサイフォン頂点を越えずバルブが開放されない仕組みとなっている（図 3.1 (d)）。すべでの Metering chamber が満たされ、計量が完了すると、分注機構内の水位が上昇する。この時に Metering chamber 上部の容積を小さくすることで、分注機構へ導入される液体の流量の変化を伴うことなく、各サイフォンに急激に水頭圧を印加することができ、各バルブが同時に開放され、液体の注入が開始される（図 3.1 (e)）。これが自律トリガーの仕組みである。注入が開始されたバルブは、一般的なサイフォンバルブと同様に、Metering chamber が空になるまで、液体が注入され続ける（図 3.1 (f), (g)）。以上が定常回転にて計量および分注を実行する動作原理である。

毛管力を利用したサイフォンバルブの保持力は、毛管力に依存するため、流路の太さで保持力を調整することが可能である。今回の設計では次に示す (3.1) [15]を用いて、サイフォンバルブの開放に必要な水位が、Metering chamber 上部のベント流路の途中となるよう、サイフォンバルブの流路を設計した。

$$f_b = \left(\frac{\gamma \sin \theta}{\pi^2 \rho \Delta R \bar{R} d_H} \right)^{1/2} \dots \dots \dots (3.1)$$

ここで、 f_b は動作回転数、 γ と θ と ρ は作動流体の表面張力と流路との接触角、及び密度を示している。 ΔR はここでは、サイフォンバルブの頂点と、バルブが破断するために必要な分注機構内の水位の半径方法の高低差として扱い、 \bar{R} は回転中心からその水位までの距離と、回転中心からサイフォンバルブの頂点までの距離の平均値とした。 d_H はサイフォン頂点の流路の等価直径である。

分注機構に導入される流量が少ない場合は、サイフォンバルブが開放されず、分注が実行されない。一方で分注機構に過剰に液体が導入された場合は、動作が不正確になる恐れがある。このため、分注機構の上流に導入量を調整するチャンバ (Secondary reservoir) を配置した（図 3.1 (a)）。この Secondary reservoir はその下流のサイフォンバルブにより液体の保持及び排出を制御しており、そのサイフォンバルブの頂点は Secondary reservoir の最高部と同じ高さとなっている。そのため、チャンバが液体で満たされることで、そのサイフォンバルブは開放され、液体が分注機構に導入される。その結果、Secondary reservoir の容積と同等の体積の液体を注入されるため、分注機構への導入量のコントロールができる。この効果により、エンドユーザーが液量を正確に計量できる環境でない場合においても、正確な液量を分

注機構に導入することが出来る。

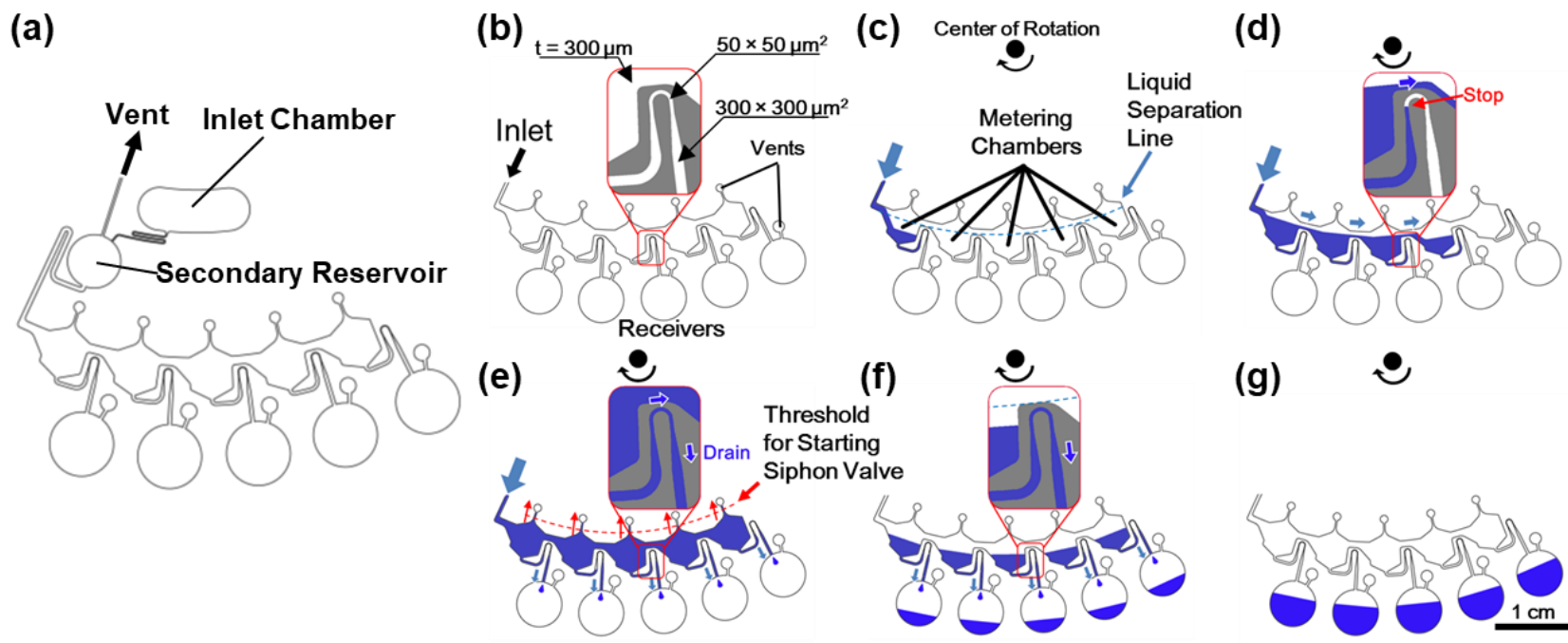


図 3.1 自律分注機構の模式図と動作原理

3.3 実験方法

提案した自律制御型分注機構の原理の実証実験と、分注量の定量評価を行った。マイクロチップは、1章および2章の実験と同様にPDMSを用いて作製した。このモールドは、サイフォン頂点の狭小部と、Metering chamberの深層部を両立するため、3段露光プロセスにて作製した。1層目はフォトレジスト (SU-8, Nippon Kayaku Co., Ltd., Japan) を厚さが50 μm となるよう塗布し図3.1(b)に示すように、サイフォンバルブ頂点付近の狭小部をパターンニングした。2層目は、さらに50 μm 塗布し、厚さが計100 μm となるようにした。2層目は、サイフォン頂点付近の狭小部と Metering chamber を繋ぐ流路の接合部、および Inlet 上流の蛇行流路をパターンニングした。3層目はさらに200 μm 塗布し、計300 μm となるようにした。3層目は、Metering chamber、および Receiver とその前後の流路をパターンニングした。そこに、PDMSを流し、硬化させた。PDMSモノマーは架橋剤と10:1 (W:W) で混ぜ、液体状のPDMSを3 mm厚になるようモールドに流し硬化させた。モールドからPDMSを剥がし、ナイフで外形を整え、Receiverは直径6 mmのパンチにて穴あけ加工を行った。ベントは加工した20 Gの針で穴あけ加工を行った。また、酸素プラズマといった表面処理は行っていない。マイクロチップのCD基板の上への取り付けは、マイクロチップを水とエタノールで超音波洗浄し、真空乾燥させたのち、同様に作製した0.5 mm厚のPDMSシートをCD基板に自己吸着にて貼り付けた上に、本体のPDMSのマイクロチップを重ね、自己吸着により接合した。各チャンバは透明な粘着テープ(OPP PACKING TAPE, NICHIBAN Co., Ltd., Japan) で封をした。

作製したデバイスの動作の観察および分注量を測定するために、作動流体には0.2%ビクトリアブルー含有イオン交換水(w:w)を用い、Inlet chamberに注入した。また、Receiverには、それぞれ50 μL のイオン交換水を入れた。そしてこのデバイスを回転制御装置にセットし、1500 rpmまで500 rpm/sで加速させたのち、一定の速度で回転させた。回転中の流体の挙動は、モータと同期したストロボシステムを用いて、リアルタイムで観察した。回転停止後、Receiver内の着色された液体を50 μL 取り出し、200 μL のイオン交換水が入ったマイクロタイタープレートに入れ攪拌し、616 nmの吸光度を測定した。そして同様に調整した標準液の吸光度と比較することで、分注量を算出した。

3.4 実験結果および考察

図 3.2 に観察された液体の挙動を示す。まず、上流からの液体供給開始（図 3.2 (1)）後、一番左の Metering chamber から液体の計量が実行された。次に、下流へ液体の分注が開始されることなく、液体が右の Metering chamber に流れていき、各 Metering chamber で液体が計量されることが確認された（図 3.2 (2)）そして、5つの Metering chamber が満たされたのち、その水位が上がるによりサイフォンバルブが5つ同時に開放され、分注が開始される（図 3.2 (3)）、計量された液体はそれぞれの Receiver に注入されることが確認された（図 3.2 (4)）。

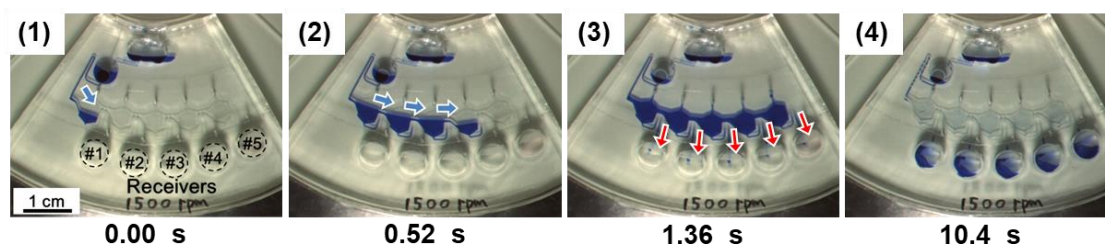


図 3.2 自律分注機構で観察された挙動

次に、液体の吸光度から算出した各 Receiver への分注量を図 3.3 に示す。本提案手法の分注量は、6.14-6.61 μL となり、標準偏差は 0.214 μL 、変動係数 (CV) は 3.35%であった。臨床検査装置の分析結果における許容誤差限界は、5%以下であることが求められるため、この分注機構はそれに値する分注精度を有していると思われる。以上により、提案した自律分注機構が、定常回転にて計量および同時注入が実行可能で、高い分注精度を有していることを実証したといえる。

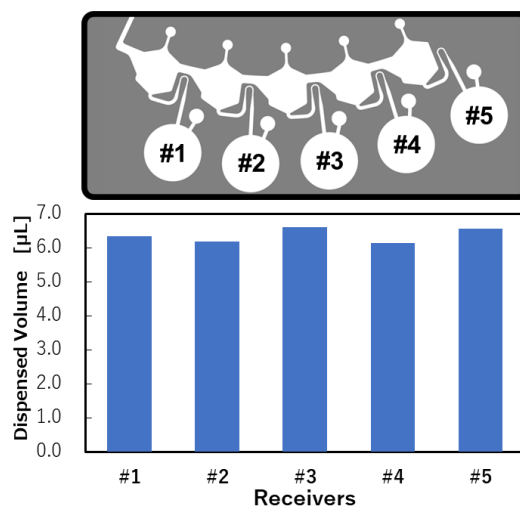


図 3.3 測定された各 Receiver への分注量 (毛管力型)

分注機構の分注量の誤差の共通の原因としては、分注開始直後、分注機構内の水位が図 3.1 中の Liquid separation line より上部にある間は、全ての Metering chamber が導通している

ため、その間の各分注量はそれぞれの流量に依存することから、その流量の差により分注量の誤差が大きくなった可能性が考えられる。そのため、Liquid separation line より上方の容積を、下方の Metering chamber より相対的に小さくすることで分注量の誤差は低減できると考えられる。逆に、Liquid separation line より上方の容積を維持したまま、Metering chamber の容積を大きくすることで、誤差を抑制しながら分注量を増大できる。

本分注機構は、サイフォンバルブの開放に必要な水位を超えるための液量を導入することで分注が実行される。体積は、粘度等に比べ、温度といった環境の変化を受けにくいいため、安定に分注が実行できることが特徴である。一方、分注機構へ適正な液量を導入することが、分注量の誤差低減に寄与することから、分注機構の上流に計量機能を備えた Secondary reservoir を配置したが、分析デバイスへの実装の際においても、これとセットで実装する必要があると想定される。

3.5 結言

本章では、定常回転にて動作する自律制御型の分注機構を提案した。そして定常回転にて液体の保持および計量を行い、計量後、受動的に分注を実行することを実証した。変動係数 (CV) はおよそ 5%以下で、医療検査機器に応用可能な精度を有していると思われる。

本機構は、液体の計量、加圧、注入が定常回転にて受動的に実行される仕組みでかつ、繰り返し分注に対しても、高い動作安定性を有していることが確認されたため、本機構を前節で開発した定常回転で動作する ELISA デバイスなど、煩雑な化学分析プロセスを実行するデバイスに実装可能となる。1つの試薬注入槽から複数の反応槽に洗浄液等の試薬を、同時に均一に注入することが可能となり、デバイス構造の高集積化とともに、使用試薬の削減やハンドリングの煩雑さの解消が期待できる。また、1サンプルあたりの分析コストを抑えられるため、サンプルの分析と検量線の同時作成が容易となり、分析結果の信頼性の向上が期待できる。さらに、各反応槽の試薬の注入時間や反応時間が統一されるため、条件の統一性が向上し、分析精度の向上が期待できる。

第 4 章 分注機構を実装した複数検体同時微量 ELISA デバイスの開発

4.1 緒言

前章にて、定常回転にて動作する自律制御型分注機構を開発し、高い分注精度と動作安定性を有していることを確認した。本章では、2 章で実証した ELISA デバイスとこの分注機構を統合した複数検体同時 ELISA デバイスを設計、作製し、その評価を行う。

3 章の緒言で述べたように、ELISA ではサンプルの定量には、サンプルの分析結果と、同条件で分析して作成した検量線とを比較する必要がある。これを使用者の負担を増やさず実現するため、分注機構を分析デバイスに組み込み、1 デバイス当たりの試薬注入操作を増やすことなく、分析可能検体数を増やすことが集積化デバイスの目的である。

4.2 複数検体同時微量 ELISA デバイスの設計

図 4.1 に設計した複数検体同時 ELISA デバイスを、図 4.2 にそのデバイスで実行される一連のフローコントロールを示す。階層構造となっており、2 章で実証した単検体の ELISA デバイスにおける Secondary reservoir と Reaction chamber（反応槽）の間に、3 章で開発した分注機構を実装することで、試薬をタイマー機構から 6 つの反応槽へ分注する設計となっている。なお、実行される ELISA のプロトコルは、2 章の単検体デバイスと同様で、Inlet reservoir の#1 から#3 には洗浄液を、#4 には TMB 基質を投入し ELISA が実行される。しかしながら、3 章で考察した通り、この自律分注機構は 1 度の分注で高精度に分注可能な液量が決まっている。一方で ELISA のプロトコルでは、洗浄液といった液体が反応槽から排液されるフローコントロールと、TMB 基質といった液体を反応槽で液体を保持しなければいけないフローコントロールが混在している。自律制御型流体回路理論では、液体を排液するか保持するかは、サイフォンバルブの開閉の制御と対応しており、このサイフォンバルブの開閉は、そのチャンバ内の水位が満水になるか否かで制御されている。つまり、排液される洗浄液の分注と、保持される TMB の分注では、分注量すべき液量が異なることから、分注量が異なる 2 つの分注機構が必要となる。しかし、2 つの分注機構の実装は、流路構造が複雑化し、マイクロチップを容易に作製できなくなる可能性がある。そこでこのデバイスでは、排液される洗浄液の分注について、一度の分注で反応槽を満水にして排液するのではなく、満水にする過程を 2 度の分注に分けることで、各分注機会の分注量を同等にして、実装する分注機構を一基となるようにした。このため、洗浄プロセスは 2 回実行されるが、洗浄液の分注は 3 度実行され、2 度目の洗浄プロセスは、#2 から分注された後、#3 が分注されることで完了する設計となっている。

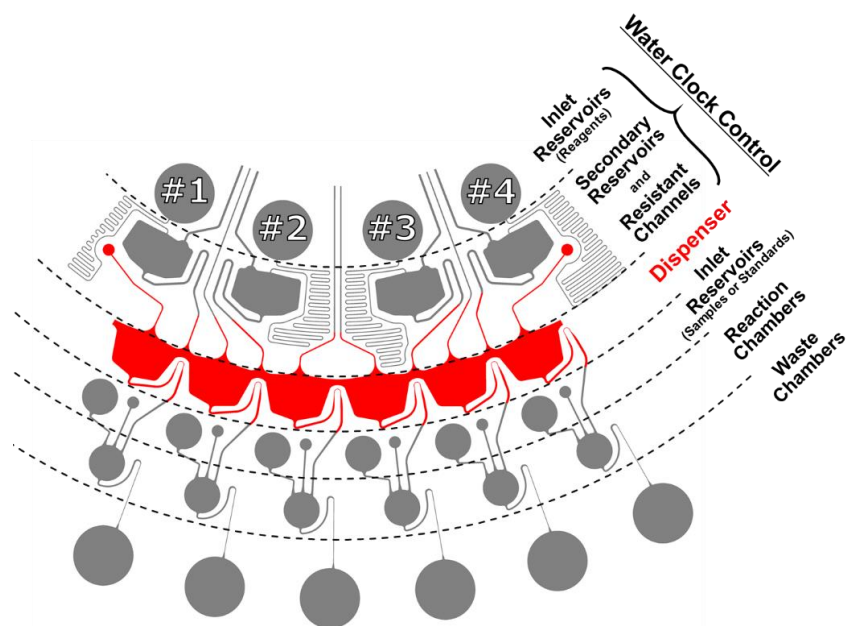


図 4.1 分注機構実装複数検体同時分析デバイス

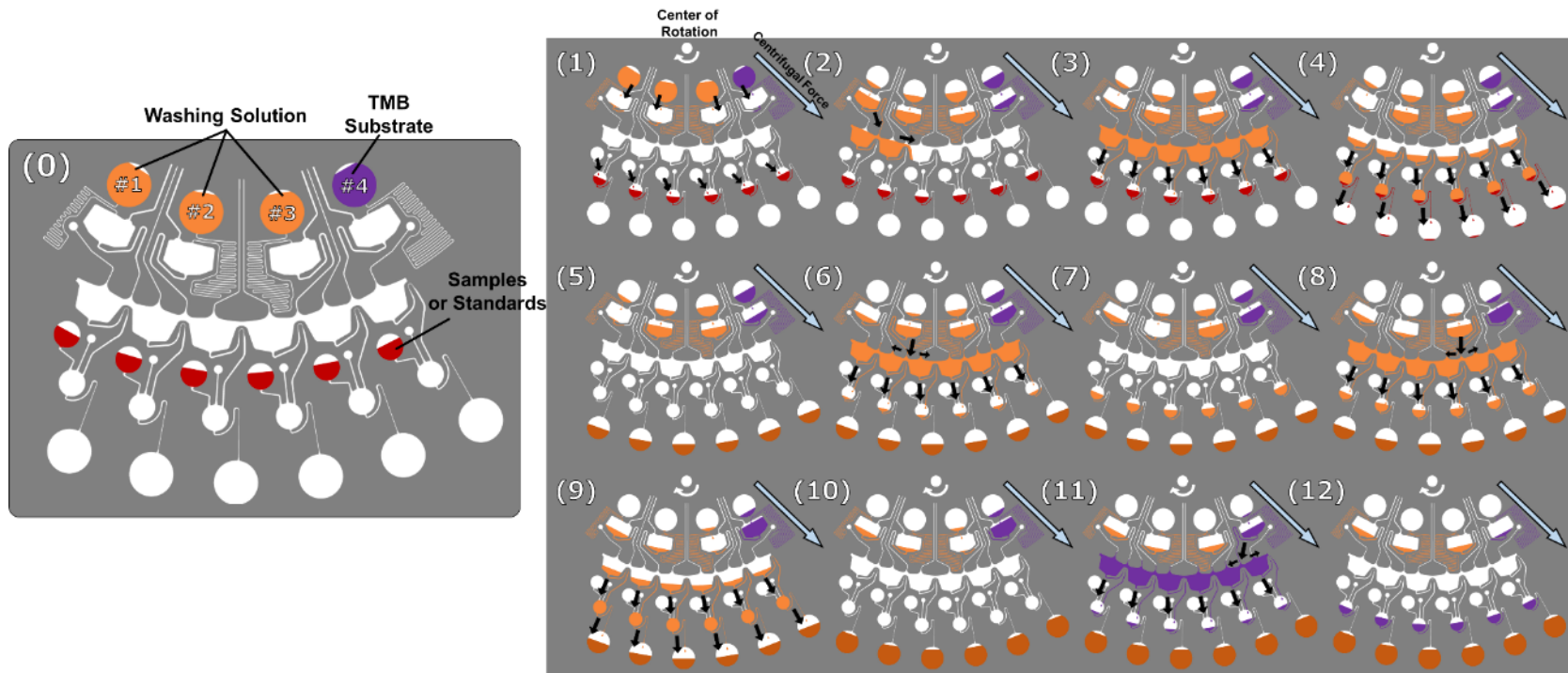


図 4.2 複数検体同時微量 ELISA デバイスで実行されるフローコントロール

4.3 実験方法

4.3.1 デバイスの作製と動作検証

これまでの実験と同様にモールドからソフトリソグラフィにて PDMS 製のマイクロチップを作製して実験に用いた。マイクロ流路はこれまでと同様に、ソフトリソグラフィにて成形したフォトレジストの凸型を転写することで成形した。各 Reservoir や Chamber はそれぞれで異なる成形方法にて作製した。各種 Inlet reservoir および Waste chamber は、ソフトリソグラフィにて PDMS チップを成形後、ポンチにて打ち抜き加工で成形した。そのほかの Reservoir および Chamber は、凸型を成形し、ソフトリソグラフィにて成形した。Secondary reservoir の凸型は、レジストでパターンニングした上に、レーザ加工で目的の形状（特に体積）に成形したアクリルを、両面テープ（Cat #665-3-24, 3M Company, USA）を用いて固定することで成形した。Dispenser は、レジストパターンのみで凸型を成形した。Reaction chamber は、レジスト上でワックスのリフロープロセス^[106]にて凸型を成形した。このように作製したモールドに、PDMS を流し、硬化させた。PDMS モノマーは架橋剤と 10:1 (W:W) で混ぜ、液体状の PDMS を 3 mm 厚になるようモールドに流し硬化させた。モールドから PDMS を剥がし、ナイフで外形を整え、Receiver は直径 6 mm のパンチにて穴あけ加工を行った。ベントは加工した 18 G の針で穴あけ加工を行った。エタノールおよび超純水で超音波洗浄した後、この本体と同様に作製した 0.5 mm 厚のフラットな PDMS とをプラズマクリーナを用いて表面活性化接合し、流路の封をした。マイクロチップの CD 基板の上への取り付けは、マイクロチップを水とエタノールで超音波洗浄し、真空乾燥させたのち、CD 基板に自己吸着にて貼り付けた。そしてその表面に透明な粘着テープを貼り、ベント穴やピペット挿入口などはテープを切り取った。

デモンストレーションでは、サンプルの代わりに 1wt% サフラニン含有超純水をそれぞれの Inlet reservoir に 5 μ L ずつ投入した。試薬の Inlet reservoir には、#1-#3 には、1mM フルオレセイン含有 0.05% Tween20/DPBS を、#3 には HRP と反応させて発色させた TMB 基質をそれぞれ 50 μ L ずつ投入した。このデバイスに 25 分間 1500 rpm の定常回転で回転させ、その挙動をストロボシステムを用いて観察した。なお目標の回転数までの加速と停止時の減速は、500 rpm/s とした。

4.3.2 ELISA の実行

開発したデバイスを用いて ELISA を実行し、反応系の検証を行った。また、タイタープレートを用いて手作業にて分析を行う従来法においても同様の条件で ELISA を行い、本デバイスを用いた反応系の評価を行った。

ELISA は Mouse IgG 検出系を設計した。これまでの ELISA と同様に DPBS は一般的な組成で調製した。これに Tween 20 (#1706531; Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) を 0.05 vol% 溶解した液体を洗浄液として使用した。ブロッキング剤としてブロックエース (UKB80; SB Bioscience Co., Ltd., Japan) を使用し、ブロッキングには、超純水で溶解した 4% (w:v) ブロックエース水溶液を、抗原の調製および HRP 標識抗体の調製には、0.4% (w:v) のブロックエース水溶液を用いた。TMB (5120-0053) は SeraCare Life Sciences, Inc. から購入し、使用した。1 次抗体として使用した Goat 抗 mouse IgG 抗体 (Prod. #31164) と抗原として使用した mouse IgG (Prod. #31903) は Thermo Scientific Inc. から購入した。HRP 標識された Goat 抗 mouse IgG 抗体 (#074-1806) は Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. から購入した。

デバイス反応系では、まず反応槽に DPBS で 100 倍希釈した Goat 抗 Mouse IgG 抗体を入れ、室温静置で数時間インキュベートし、固相化を行った。5 度洗浄した後、オーバナイトで真空乾燥を行い、流路内を乾燥させた。デバイス反応系においては、反応槽のブロッキング処理は行っていない。スタンダードはあらかじめ、抗原と HRP 標識抗体を予め 20 分間反応させたものを 5 μ L 投入した。洗浄液は Inlet reservoir の #1 から #3 にそれぞれ 50 μ L 投入した。#4 には TMB 基質を 50 μ L した。デバイスの回転数は 1620 rpm (27 Hz) の定常回転とし、25 分間回転させた。回転停止後、反応槽内に残った液体を 5 μ L 取り出し、同量の 1M リン酸と反応させたあと、マイクロドロッププレート (N12391; Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を用いて、450 nm と 620 nm (ブランク) の吸光度を測定した。

手作業による従来法の分析では、まずタイタープレートに 100 倍希釈した Goat 抗 Mouse IgG 抗体を 100 μ L 注入し、室温静置で 1 時間インキュベートして 1 次抗体の固相化を行った。300 μ L の洗浄液で 5 度洗浄した後、200 μ L のブロッキング溶液を注入し、室温静置で 30 分間インキュベートして、ウェル表面の非特異的吸着を防ぐためのブロッキングを行った。同様に 5 度洗浄したあと、100 μ L のスタンダードを加えて、1 時間室温静置でインキュベートした。スタンダードは予め抗原と HRP 標識抗体を 15 分間反応させたものとした。検量線の各濃度は、反応 (混合) 後の濃度を表しており、2 万倍希釈 (50 ng/mL) した HRP 標識と 2 倍濃度の抗原懸濁液を 1:1 (v:v) で混合させ、そのスタンダードの濃度とした。その後、ウェルを同様に 5 度洗浄した後、TMB 基質を 100 μ L 加え、15 分間室温静置で反応させた。そして 1M リン酸を 100 μ L 加えて反応を止めたあと、マイクロドロッププレートを用いて 450 nm と 620 nm の吸光度を測定した。

4.4 実験結果および考察

4.4.1 複数検体同時微量 ELISA デバイスの動作検証

図 4.3 に観察された液体の挙動を示す。単検体の分析デバイスと同様に、流路は疎水性のため、ある程度の遠心力が付加され、それによる水頭圧が毛管力に勝るまでは、各液体は、Primary reservoir に保持されていた (図 4.3 (1))。回転開始から約 1 秒後、各液体が流路へと流れ、サンプルは Reaction chamber (反応槽) へ、洗浄液および TMB 基質は Secondary reservoir へ注入され始めた (図 4.3 (2))。サンプルは約 1 秒で全量が反応槽へ注入され、そこで保持される。実際の ELISA では、ここで固相化された 1 次抗体と、サンプル中の抗原が反応する時間となる。回転開始から約 327 秒後、#1 の Secondary reservoir が満たされ、サイフォンバルブが開放され、洗浄液が分注機構に導入された (図 4.3 (3))。導入された洗浄液は、計量が実行され、そのあとに 6 つの反応槽へ同時に注入が実行された (図 4.3 (4))。そしてこの洗浄液の注入により、反応槽が液体で満たされ、そのサイフォンバルブが開放され、この洗浄液とともにサンプルが Waste chamber (排液槽) に排出された (図 4.3 (5))。これが 1 度目の洗浄プロセスとなる。さらに、回転開始から 502 秒後、#2 から洗浄液が分注機構を介して各反応槽に注入され、そこで保持された (図 4.3 (6))。そして回転開始から約 709 秒後、#3 から洗浄液が分注されることで、反応槽が満たされ、下流への排液が実行された (図 4.3 (7))。最後に、空になっている反応槽に #4 から TMB 基質が分注され、反応槽で保持された (図 4.3 (8))。以上により、設計した ELISA のフローコントロールが 6 検体同時に実行されたことを確認した。

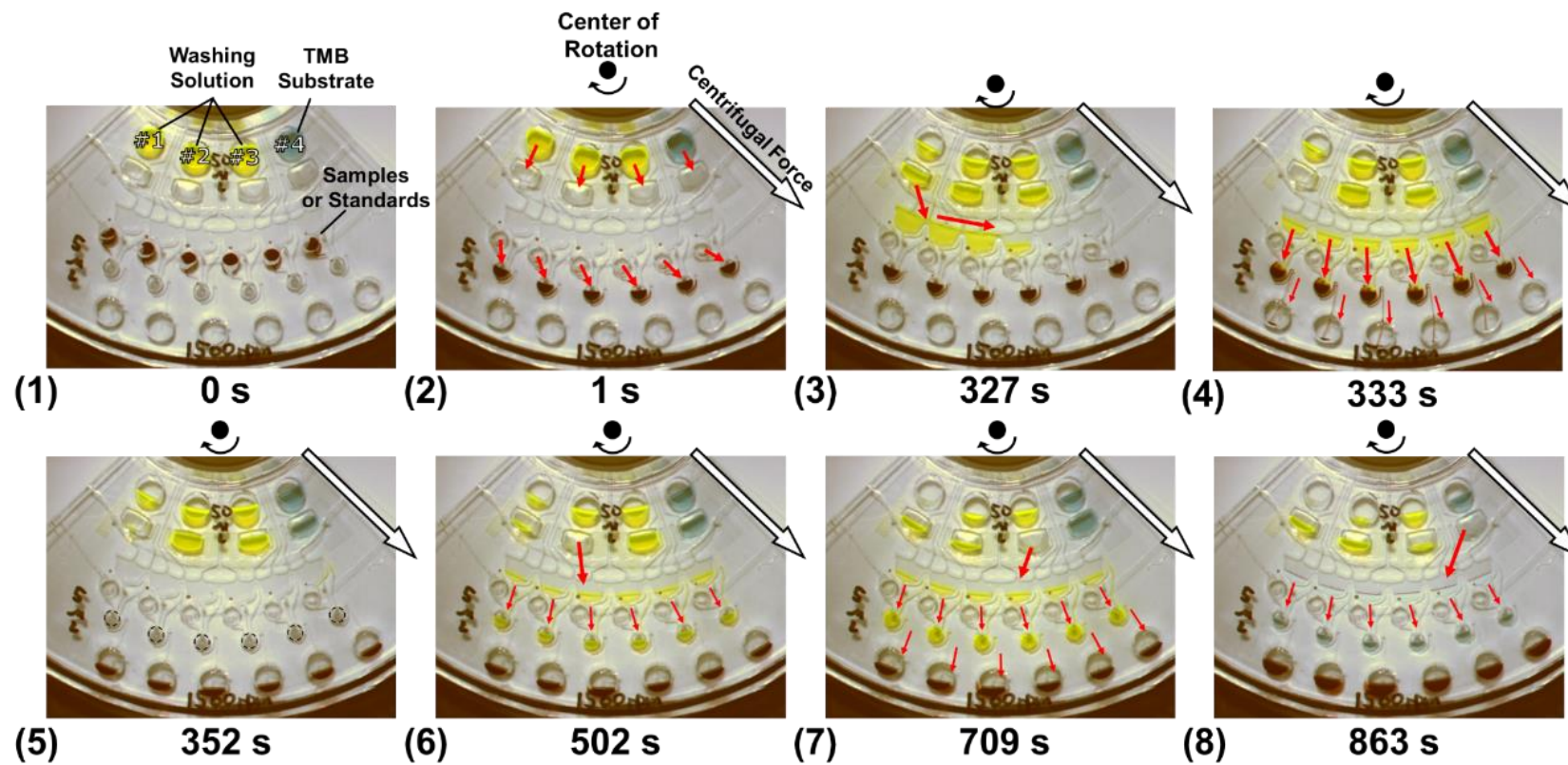


図 4.3 分注機構実装複数検体同時分析デバイス

4.4.2 複数検体同時微量 ELISA デバイスによる ELISA 実行と評価

図 4.4 に本デバイスで実行した ELISA から得られた吸光度 (OD: Optical Density) を示す。この実験では、2つのデバイスを用いて、抗原 (Mouse IgG) の濃度のほかに、1次抗体 (Goat 抗 Mouse IgG 抗体) の有無をパラメータに ELISA を実行した。また、抗体あり (1st Ab.+) の系では、抗原濃度に応じたドーズレスポンスが得られている。一方で、抗体なし (1st Ab.-) の系では、抗原濃度を問わず、吸光度が低くなっていることが確認できる。以上のことから、抗体ありの系では、物理吸着といった非特異的な反応ではなく、抗原抗体反応の特異的な反応により、反応槽内に抗原および HRP 標識抗体が存在しており、これが吸光度として検出されていると言える。ゆえに、この系は、Mouse IgG の検出系として有効であると言える。

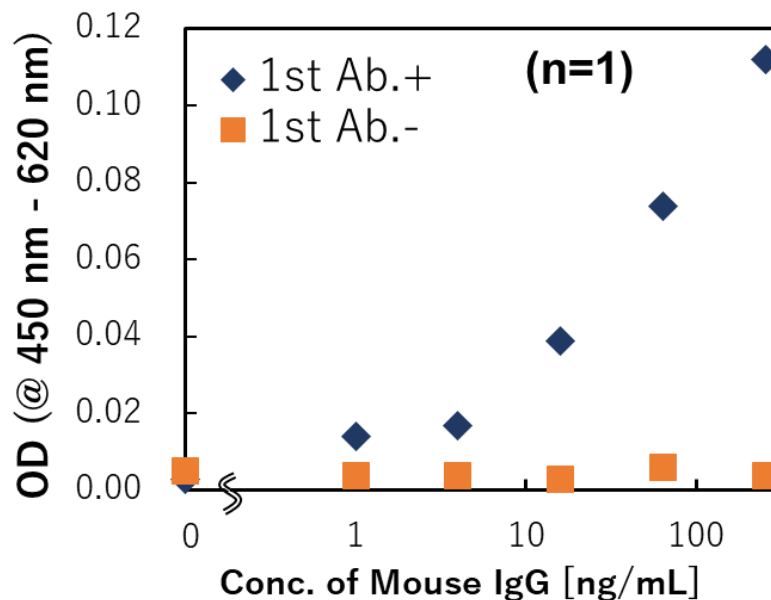


図 4.4 1 次抗体の有無で比較した Mouse IgG の検量線

次に3つのデバイスを用いて6濃度を n=3 で分析し、検量線を作成した結果を図 4.5 に示す。抗原濃度に応じたドーズレスポンスと、サンドイッチ ELISA の検量線で一般に見られるシグモイド曲線が得られていることが確認できる。また、検出下限値 (LOD) は、81.3 pg/mL と算出された。手作業で行った従来法による分析では、同じマイクロドロッププレートを使用して吸光度を測定した場合には、検出下限値は 97.1 pg/mL と算出されたことから、この複数検体同時分析デバイスを用いた反応系は、従来法と同等の検出感度を有していると言える。

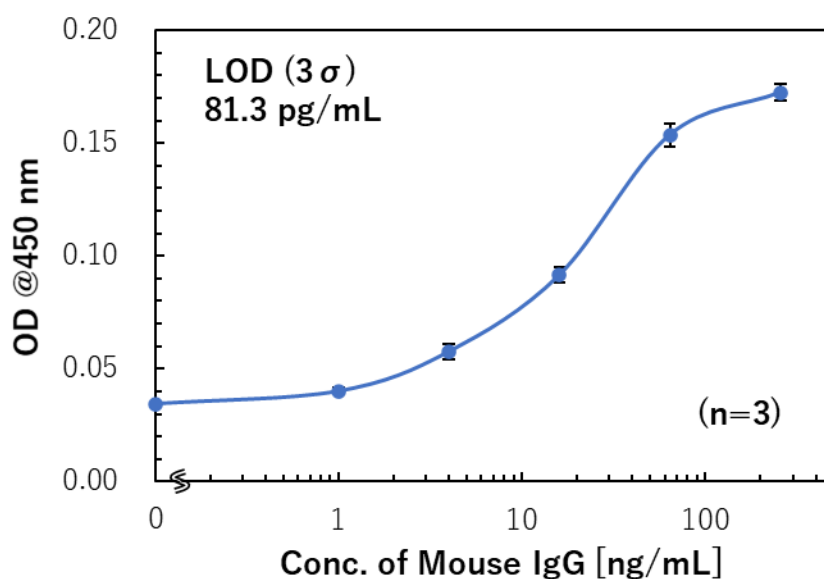


図 4.5 複数検体同時分析デバイスで得られた Mouse IgG の検量線

単検体デバイスと比較した場合においても、検出感度が1桁向上していることが示唆される。単検体デバイスとこの複数検体デバイスは、抗原抗体の反応時間は同等あるいは、後者のほうが短い。その中で検出感度が向上した理由としては、サンプルの微量化や反応槽の微量化（ともに約 1/6）により、比表面積が大きくなり、反応効率が向上したことや、分注機構を実装したことにより、同一のデバイス上では試薬が各反応槽へほぼ同時に注入されることから、各反応槽の条件が統一され、誤差が小さくなったことなどがあげられる。

従来法と比較すると、抗原抗体の反応時間は 60 分から約 4 分半に短縮し、サンプル量は 100 μ L から 5 μ L に削減した。5 μ L というサンプル量は、全血から分離した血しょうをサンプルとして使用することを想定した場合においても、十分に指先からの採血可能な量であると考えられる。また、洗浄回数は 5 度から 2 度に削減され、使用した洗浄液量も 1 件体当たり、1500 μ L から 25 μ L と、大幅な削減を実現した。

4.5 結言

本章では、2章で開発したELISAデバイスと、3章で開発した分注機構を統合した複数検体同時分析デバイスを設計、作製し、ELISAを実行して評価を行った。作製したデバイスのデモンストレーションでは、自律制御型流体回路理論に基づき開発した、単検体のELISAデバイスと分注機構を統合したデバイスが、定常回転でELISAに対応するフローコントロールを6検体同時に実行可能であることを実証し、自律制御型流体回路理論が広く適用可能であることを示した。

1次抗体の有無および抗原(Mouse IgG)濃度をパラメータとしてELISAを実行した実験においては、抗原抗体の特異的な反応でのみシグナルが得られていることを確認し、この複数検体同時分析デバイスを用いた反応系が、Mouse IgGの検出系として有効であることを確認した。

従来法との比較では、反応時間を約12分の1に、洗浄回数を5回から2回に削減しながらも、同等の検出感度を有していることを確認し、サンプル量の100 μL から5 μL への削減を実現した。デバイスの回転時間は、約25分間で、この間に、サンプルの注入と抗原抗体反応や検出用の発色反応までが自動で実行される。この時間であれば、病院で採血後、その場で結果を待つということも十分に想定内で、これまでは、採血から分析結果の通知まで長い時には数日かかっていた小規模な診療所等でのこのデバイスを応用した分析装置の導入で、被験者の負担軽減が期待される。また、サンプルの5 μL というのは、全血からヘマトクリット等を除去した検体の使用を想定した場合においても、指先からの採血で十分に賄える量である。このため、被験者の自己採血で分析可能であることが示唆され、遠隔医療等への活用が期待される。さらに、洗浄液等の廃棄される試薬量は、従来の数mLから十数 μL へと約2桁削減を実現した。これについても、廃棄物が減ることから、遠隔医療のほか、災害時医療や発展途上国での活用が期待される。

このように、定常回転で動作し、かつ高速、省サンプル、省試薬で分析可能な本分析デバイスは、POCTに適応可能な小型高速微量分析装置への応用が期待され、その装置は上述のように、これまでは実現しなかった新たな医療体制の実現に貢献できると考えられる。

第5章 両面成型型自律分注機構の開発

5.1 緒言

前章では、これまで構築した自律制御型流体回路理論に基づき、ELISA デバイスと分注機構を統合した複数検体同時 ELISA デバイスを開発し、ELISA を実行可能であることを示した。しかしながら、このデバイスを量産化という観点からみると課題がある。それは、分注機構に毛管力を利用した機構を含んでいる点である。

3章で開発した分注機構は、液体の計量時にサイフォンバルブの保持力の強化のために毛管力を利用しており、この分注機構の適用条件として、使用する（分注する）液体は流路表面に対して接触角が90度より大きいことが条件となっている。デバイスの量産を指向した場合には、マイクロチップの製造コストを抑えるため、射出成形などの加工方法を用いてプラスチック製のチップを採用することが想定される。

これまでの検討でデバイスの材料として用いてきた PDMS は、マイクロ流体チップの作製に一般に用いられる材料の中では、比較的表面自由エネルギーが低く、試薬に対して接触角は100度以上の大きな値をとり、実験室内の利用においては、大きな問題となることはなかった。一方でプラスチック材料は、これより小さな値をとるものもある。このため、毛管力型分注機構を採用する場合には、接触角が PDMS と同等以上とするために、使用する材料と試薬の組み合わせを検討する必要がある。中には使用できない試薬や材料の制限が生じ、本デバイスの適応範囲が小さくなることが予見される。また、マイクロチップの両面を疎水化する表面処理を行うことも可能であるが、これはマイクロチップの加工コストが大きくなることが推察されるため、実用化および量産化においては、表面処理なく、つまり流路表面の濡れ性に影響されない簡素な機構であることが望ましいといえる。

また、デバイスで実行するフローコントロールについても課題が残る。一般的なサンドイッチ ELISA では、抗原抗体反応は、①1次抗体（固相化抗体）とサンプル中の抗原、②抗原と2次抗体（酵素標識抗体）の2度実行される。一方これまでの ELISA デバイスのプロトコルは主に、サンプルの注入および反応、2度の洗浄プロセス、そして TMB 基質の注入および反応である。つまり2度の抗原抗体反応のうち一方をオフチップで実行する仕様となっている。これらのデバイスの運用を想定した場合には、スタンダードやサンプルを事前に2次抗体と反応させる操作をすることが求められ、これは使用者の負担や、使用者によっては分析精度の低下の原因となることが推測される。このため、より使用者の操作数を減らすために、すべての抗原抗体反応をデバイス上で実行することが望ましいといえる。

すべての抗原抗体反応をデバイス上で実行するには、従来のプロトコルに加え、2次抗体の注入およびその反応プロセスと、それらの洗浄プロセスが必要となり、これらのプロトコル実行に要求されるフローコントロールがさらに高度化する。これらはいずれも全反応槽に同様に実行されるプロセスで、分注機構を通じて試薬注入を実行することが想定される。このため、分注機構においてより一層の動作安定性が求められることとなる。その

中で、分注機構内に不安定になりやすい毛管力の機構を含んでいることは好ましくないと考えられる。

そこで本章では、毛管力に依存しない分注機構として、両面成形型の分注機構を提案する。両面成形型とは、その名の通り、チップの両面に流路を成形するというものである。こうすることで、流路パターンの自由度が大きくなり、流路を立体的に交差させることが可能となる。図 5.1 に示すように、3 章で開発した分注機構（以下、毛管力型分注機構もしくは毛管力型）は、流路を立体交差せずに同一面上にて、サイフォンバルブで液体を保持しながらそれより高い位置に液体を流すことを実現するため、毛管力を利用していた。一方立体的に流路を交差させることで、計量時の分注機構内の水位よりもサイフォンバルブの頂点を高くできるため、毛管力を利用する必要がなくなり、毛管力に依存した機構はなくなる。分注機構のそれ以外の機構に関しては、毛管力を利用したギミックはないことから、毛管力型の機構を踏襲することで、定常回転で動作する分注機構が実現する。

本章ではこの両面成形型分注機構を作製し、デモンストレーションを行う。そして毛管力型分注機構と同様に分注量の定量評価を行う。また、本両面成形型分注機構の開発の目的の1つが動作安定性の向上であることから、毛管力型、両面成形型の両方の分注機構の動作安定性についても定量評価を行う。

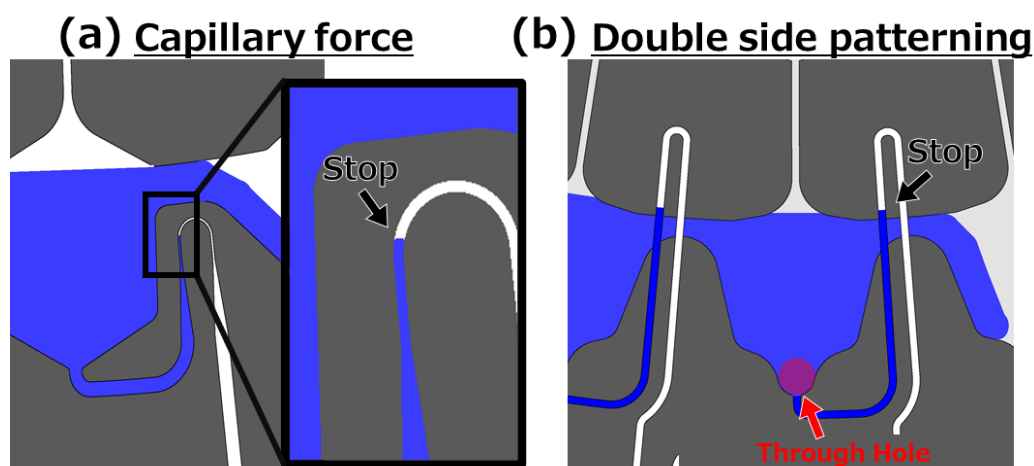


図 5.1 毛管力型分注機構と両面成形型分注機構の構造的な違い

5.2 実験方法

5.2.1 両面成形型分注機構の作製と分注量評価

これまでの章と同様に PDMS 製のマイクロチップを作製して実験に用いた。両面成形型分注機構の構造の模式図を図 5.2 に示す。

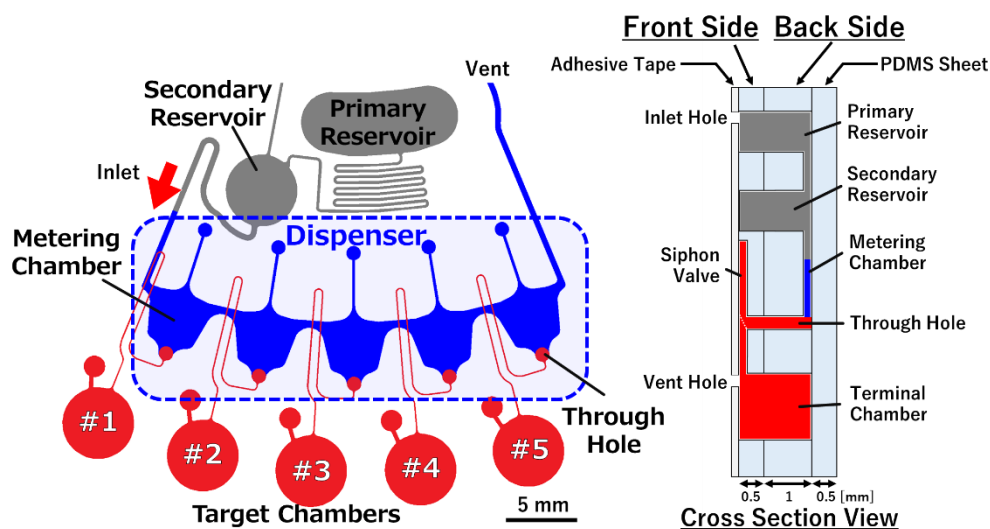


図 5.2 両面成形型分注機構の全体像と構造

Primary reservoir から自律分注機構の metering chamber までの流路はデバイスの背面側を通り、metering chamber 下部に配置した貫通穴を介して流路は前面側に上がり、その貫通穴より下流は、デバイスの前面側を通る流路となる。図 5.3 に両面成形型分注機構の作製方法の概要を示す。背面側のモールドは、フォトレジストの膜厚が $190\ \mu\text{m}$ となるように、前面側のモールドは、膜厚が $150\ \mu\text{m}$ となるようにスピコートした。ソフトベイクしたあと、背面側と前面側のそれぞれの流路をパターンニングし、基板を 95°C でポストベイクした。そして現像することで、背面側と前面側の流路を成形するモールドを得た。これらのモールドから、PDMS 製のマイクロチップをそれぞれ別に作製し、それらを張り合わせてから貫通穴をあけることで、両面成形デバイスを作製する。背面側のチップは、上記のモールドから厚さが $1\ \text{mm}$ になるように、前面側は $0.5\ \text{mm}$ となるように、モールド上にそれぞれの厚さのシリコンゴムシートで土手を作製し、そこに液状の PDMS を流し入れた。脱泡後、上面を気泡が入らないように OHP シート (VF-1410N; KOKUYO Co., Ltd.) で封をし、その上にガラス基板を置くことで、上面をフラットにした。PDMS モノマーと架橋剤は $10:1$ の割合で混合し、 75°C で 1 時間加熱した。硬化後、PDMS をモールドから剥がし、ナイフでチップの外周のシリコンゴムを切り落とし、また、ベント穴や reservoir を、 18G の針やポンチで穴あけ加工した。これらのチップのフラットな上面同士を、大気プラズマ (YHS-R; SAKIGAKE-Semiconductor Co., Ltd) を用いて表面活性化接合にて接合した。背面側のチップと前面側のチップは、それぞれの貫通穴の位置が揃うように、自作の装置でアライメントし

てからコンタクトさせた。コンタクト後は、75°Cに予熱したオーブンで30分間加熱し、反応を促進させた。接合後、貫通穴を18Gの針で穴あけ加工することで、背面側と前面側の流路を開通させた。このチップ（本体）の背面側の流路は、同様に作製した0.5mm厚のフラットなPDMSシートを接合することで、流路を完成させた。これを直径12cmのCD基板にPDMSの自己吸着を利用して固定した。前面側の流路は、ベント穴やinlet reservoirのピペット差込口を除き、透明な粘着テープ（OPP PACKING TAPE, NICHIBAN Co., Ltd.）で封をし、遠心マイクロ流体デバイスを完成させた。

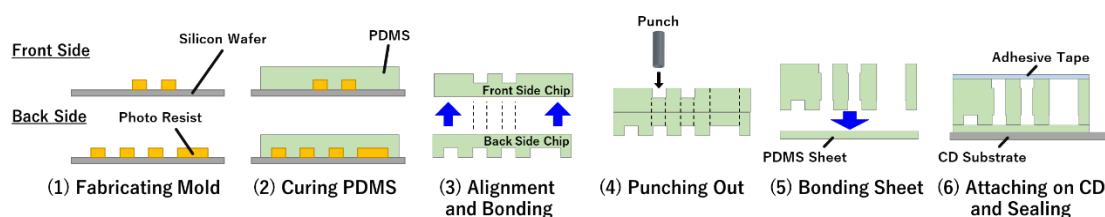


図 5.3 両面成形型分注機構の作製方法

作製したデバイスの動作観察及び分注量の計測を行うために、作動流体には0.1%サフニン（196-00032; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation）含有超純水（w : v）を用い、inlet reservoirに45 μL に搭載した。また、分注先となるreceiverには、超純水をそれぞれ20 μL 搭載した。これにより、分注された染色水は希釈され、分流量に対応した濃度の液体がreceiverに残ることになる。本実験では、この残った液体をそれぞれ10 μL 取り出し、200 μL の超純水で希釈して、その515 nm吸光度を測定することでこの液体の濃度を定量化し、同様に作製した検量線と比較することで分注量を推定した。

デバイスの回転数は、所定の回転数までの加速と停止のための減速（ともに100 rpm/s）を除き、1500 rpmの定常回転とした。回転中の挙動は、モータの回転と同期したストロボシステムを用いて、撮影及び観察した。

5.2.2 自律制御型分注機構の動作安定性の評価

ELISA といった化学分析プロセスでは、試薬の注入が複数回実行される。このような分析装置に実装される分注機構には、繰り返し分注に耐えうる動作安定性が必須となる。このため、毛管力型および両面成形型分注機構に対し、間欠的に繰り返し分注機会を与えたときの動作安定性について評価を行った。

定常回転下で連続的に分注機構へ繰り返し液体を導入し、複数回の分注機会を与えるため、動作実証で作製したデバイスと比較して、Primary reservoir を大きくしたデバイスを作製し、そこへ投入する液量も増やした。Secondary reservoir とそれに付随するサイフォンバルブは、分注機構への液体の導入タイミングと導入量を制御する機能を有している。Secondary reservoir へは、Primary reservoir が空になるまで上流から液体が供給されるが、サイフォンバルブは閉じているため、液体は分注機構には導入されず、Secondary reservoir に蓄積する。サイフォンバルブの高さは、Secondary reservoir の高さとしておくことで、Secondary reservoir が液体で満たされた瞬間にバルブが開放される仕組みとなっており、開放後は Secondary reservoir が空になるまで液体が下流（分注機構）へ導入される。そして Secondary reservoir が空になるとサイフォンバルブは再度閉じられ、Secondary reservoir に液体が蓄積し始めることとなる。つまり Secondary reservoir が満たされた瞬間に Secondary reservoir の容積と同等の液量が下流（分注機構）に導入されるため、Secondary reservoir の容積とそこに流れこむ流量を調整することで、下流への導入される液体の導入量とタイミングを自律制御することが可能になる。Secondary reservoir へは、Primary reservoir が空になるまで液体が供給されるため、再度 Secondary reservoir が満たされるとサイフォンバルブが再度開放され、分注機構へ液体が導入される。ゆえに Primary reservoir への液体の搭載量を増やすことで、分注機構への液体の導入回数（分注機会）を増やすことができるという原理である。

この設計をしたマイクロチップを、毛管力型、両面成形型ともに、上述の動作実証デバイスと同様に作製した。なお、流路表面の条件を統一するため、両面成形型分注機構のデバイスの表面は、テープではなく、PDMS シートを表面活性化接合にて接合し、封をした。また、両分注機構ともに Primary reservoir となる箇所は、ポンチ及びナイフで加工し、約 400 μL の容積を有する Primary reservoir を得た。

作製したデバイスは両面テープ（NW-N50; NICHI BAN Co., Ltd.）を用いて CD 基板に固定し、Primary reservoir 及び Target reservoir は、液体の注入口を除き、透明な粘着テープで封をした。このデバイスの Primary reservoir に、0.2% サフラニン含有超純水（w : v）を注入し、定常回転を与えた。そして回転数をパラメータにして、連続的に分注機会を与え、その回転数における分注の成功率を検証した。

5.3 実験結果および考察

5.3.1 両面成形型分注機構の動作実証と分注量の精度評価

図 5.4 に両面成形型分注機構で観察された挙動と分注量を示す。両面成形型においても、計量後、自律的に5つ同時に注入が実行されることを確認した。また、貫通穴付近での液体の流れの停滞や漏れは確認されなかった。分注量はそれぞれ 5.98-6.41 μL で、5つの分注量の標準偏差は 0.16 μL 、変動係数 (CV) は 2.61%であった。また、同様の実験をさらに2度行ったところ、CVはそれぞれ 3.40%、5.70%であった。毛管力型分注機構においても同様に再現性を確認したところ、CVは 3.35-5.63%であったことから、両面成形型分注機構は、毛管力型と同程度の分注精度を有しているといえる。

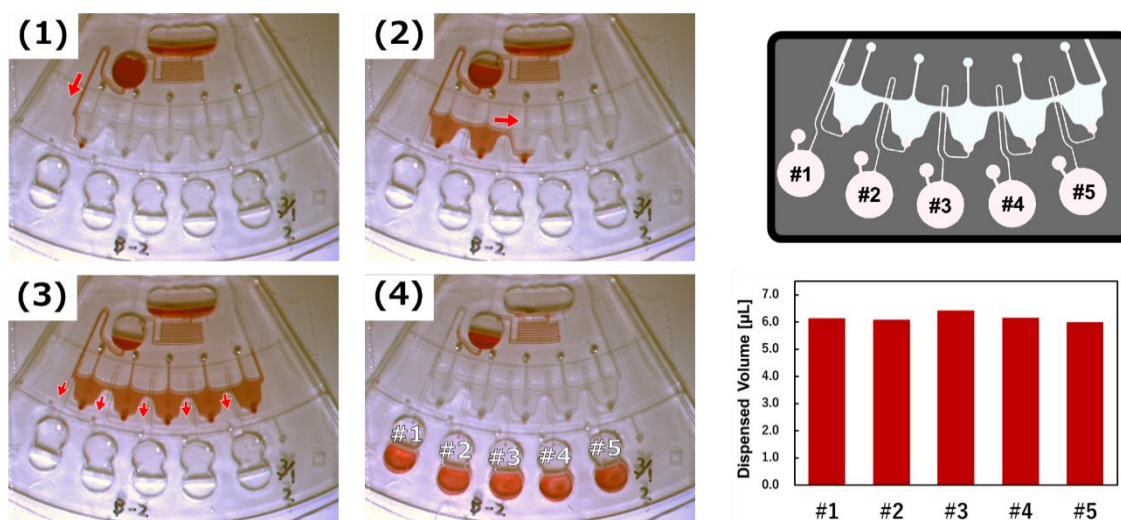


図 5.4 両面成形型分注機構で観察された挙動と分注量

5.3.2 動作安定性の検証

図 5.5 は 1000 rpm から 2000 rpm の全分注機会における分注成功率を示している。ここで成功率とは、液体が分注機構に導入された回数に対する分注が成功した割合である。また分注の成功は、計量が完了してから 5 つ同時（差が 1 秒以内）に液体が下流へ注入開始されることと定義した。全分注機会における分注成功率は、毛管力型が 50% (n=58)、両面成形型が 76% (n=50) であった。(Primary reservoir は手作業で加工しているため、その容積がそれぞれのデバイスで異なっている。そのため、分注機構への液体の導入回数がそれぞれのデバイスで異なっていることから、試行回数（分注機会）が異なる。)

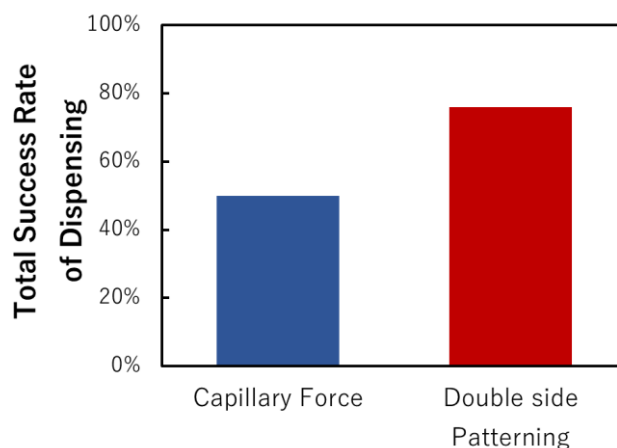


図 5.5 全分注機会における分注成功率

分注の失敗原因は主に 2 種類に分けられる。1 つは計量の失敗である。計量の失敗とは、図 5.6 に示すように、5 つの metering chamber が満たされる（計量される）前に、Target chamber への液体の注入が開始されることである。図 5.6 の例では、#3 の計量中に #1 の注入が開始されている（図 5.6 (3)）。また、#5 の計量中に #2 の注入が開始されている（図 5.6 (4)）。このような不均等な注入開始は、分注量の誤差拡大等の悪影響の原因となるため、失敗として扱った。

もう 1 つの分注の失敗原因は、トリガーの失敗である。トリガーの失敗とは、図 5.7 に示すように、計量終了後、分注機構内の水位が上がり、サイフォンバルブに水頭圧がかかった際に、5 つ同時に注入のトリガーが引かれるのではなく、一部の流路の注入開始が 1 秒以上遅れたり、注入が実行されなかったりすることである。図 5.7 の例では、計量の失敗とは異なり、計量は正常に実行されている（図 5.7 (1)-(3)）。しかしながら、その後、#3 のみトリガーが引かれず（図 5.7 (4)）、metering chamber に液体が残った状態となっている（図 5.7 (5)）。液体が目的のチャンバへ注入されていないことから失敗として取り扱った。

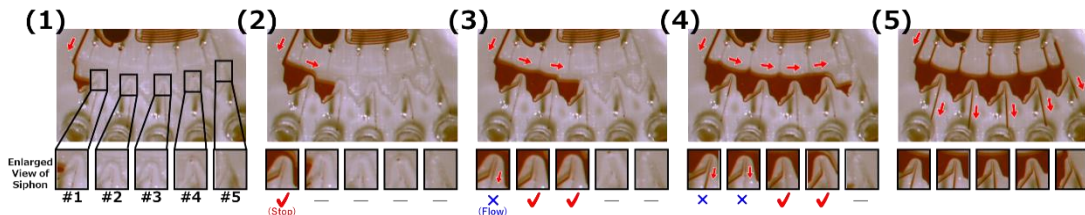


図 5.6 分注における“計量”の失敗例

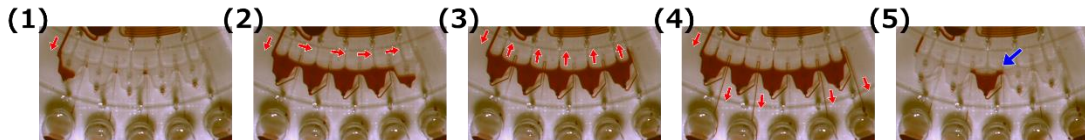


図 5.7 分注における“注入”の失敗例

図 5.8 は各回転数における分注成功率を示している。両面成形型は全体的に 50%以上の分注成功率があり、1400, 1800 rpm では 100%だった。毛管力型は、1400 rpm 以下の低回転数域では、80%以上の高い分注成功率だったのに対し、1600 rpm 以上の高回転数域では 20%以下になり、2000 rpm では分注は 1 度も成功しなかった (n=9)。

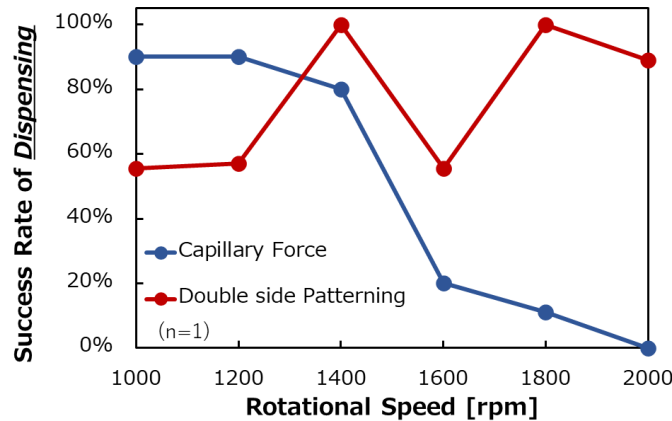


図 5.8 回転数ごとの分注成功率

一方図 5.9 は、各回転数における計量の成功率を示している。両面成形型では、計量の失敗は 1 回のみであり、高い計量成功率を有していることがわかる。一方毛管力型は、高回転数域で成功率が低下していることがわかる。毛管力型の分注失敗原因は主にこの計量の失敗である。

両面成形型では、metering chamber とサイフォンバルブの流路が立体的に交差しているため、サイフォンバルブの頂点を metering chamber より高くすることが可能で、バルブの開放に必要な水頭の閾値を容易に高く設計できる。また、この閾値は遠心力にほとんど依存しないため、高回転数域においても安定に計量可能となったと考えられる。

一方毛管力型は、サイフォンバルブの頂点が計量中の metering chamber 内の水位より低い位置にある。毛管力型分注機構は遠心力由来の水頭圧に対し、表面張力の作用を利用して

サイフォン内の水位の上昇を抑制することで metering chamber 内で液体を保持し、計量を行う原理である。そのため高回転数域では、表面張力由来の抑制圧力に対し、遠心力由来の水頭圧が勝るため、計量中にバルブが開放され、注入が始まったと考えられる。また、表面張力の抑制圧力は、流路の濡れ性（接触角等）に大きく依存する。このため、繰り返し流路に液体を流すことで、濡れやすい（接触角が低下する）状態となり、分注機会を経るごとに抑制圧力が低下し、計量失敗となることが考えられる。毛管力型分注機構において、バルブの保持力、つまり抑制圧力を大きくするには、構造的に流路を細くすることがあげられる。しかし今回作製した分注機構の構造で、2000 rpm で分注可能にするには、流路径を約 20 μm 平方にする必要があり、流路の閉塞等の問題が懸念される。また、流路を細くすることでさらに濡れ性の影響を受けやすくなる。このため、微小な接触角の低下で抑制圧力が大きく低下し、繰り返し分注の成功率の低下が推測されることから、高回転数での利用は好ましくない。

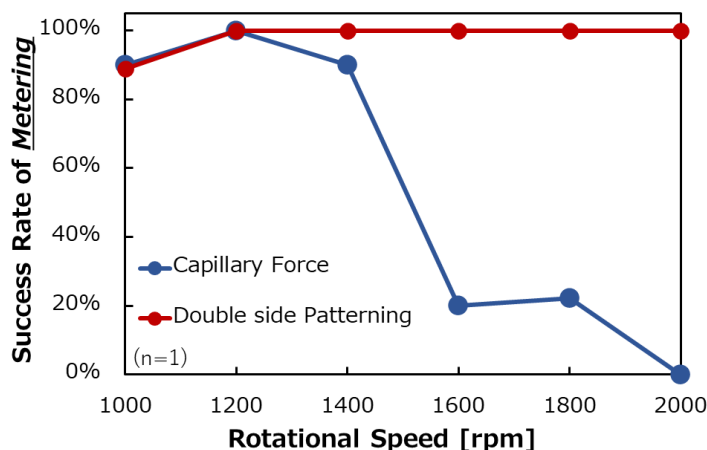


図 5.9 回転数ごとの“計量”成功率

両面成型型の分注の失敗原因は、主にトリガーの失敗であり、すべての分注失敗のうち、その割合は約 92%を占める。トリガーの失敗、つまり注入が実行されなかった原因は、前の分注機会後に、サイフォンバルブの流路内の壁面に残った液滴が次の分注機会までに集結することで流路内でプラグとなり、空気その流路の所々でトラップされたことが考えられる。このプラグは偶発的に発生するが、プラグが形成された流路は、サイフォンバルブの開放に必要な水頭の閾値が大きくなり、metering chamber が満たされた際の水頭上昇ではその閾値を超えられず、注入が実行されなかったと考えられる。

一方、毛管力型分注機構におけるトリガーの失敗の割合は約 13%であった。毛管力型は表面張力の作用を得るためにサイフォンバルブの頂点付近の流路径を細くしているため、流路の抵抗値が大きく、流量が小さい。それと比較し、今回作製した両面成型型分注機構は、流路の途中を細くする必要がないため、毛管力型と比較して流量が大きかった。流量の小さい毛管力型は、比較的遅い速度で液体が流路から排出されるため、プラグの原因となる液滴が流路内に残りにくくなり、トリガーの失敗が少なかったと考えられる。ゆえに、トリガーの失敗原因は、計量時の液体の保持方式に起因するものではなく、両面成型型においても流

量を毛管力型と同程度に小さくすることで、プラグの形成を抑制し、トリガーの成功率を向上させることが可能であると考えられる。

また、遠心マイクロ流体デバイスでは、不安定な表面張力に対し、高回転数で回転させ、遠心力を支配的に負荷することで動作の安定化を図ることができる。そのため、高回転数域においても安定に計量可能な液体の保持方式は、両面成型型分注機構の優位な点であるといえる。その一方で、毛管力型分注機構においても、1500 rpm 以下の比較的低回転数の領域では、安定に分注が実行された。毛管力型分注機構の特徴としては、作製が容易であることである。研究室内でソフトリソグラフィにて作製する場合、両面成型型では、背面側の流路と前面側の流路をアライメントして接合する必要がある。その一方、毛管力型では1つのモールドからワンショットで成形可能である。このため、比較的低回転数で動作させる場合や、1度の分析において分注機会が多くない場合においては、簡便に作製可能な毛管力型分注機構も十分に実用可能であると考えられる。

5.4 結言

本章では、毛管力に依存しない分注機構開発を目的に、流路を立体的に交差させた両面成形型の自律分注機構を提案した。3章で提案した毛管力型分注機構と本章の両面成形型分注機構との違いは、計量時の液体の保持方式の違いで、自律注入機構は同様である。両面成形型分注機構の動作実証では、毛管力型と同様に定常回転にて液体の保持および計量を行い、計量後、受動的に分注が実行されることを実証した。変動係数（CV）もおおよそ5%以下で、ELISA デバイスに実装し、ELISA を実行可能である実績のある毛管力型の CV と同程度であることから、本両面成形型分注機構においても、ELISA デバイスに実装し、ELISA する複数検体同時分析デバイスを実現可能であると期待できる。

繰り返し分注に対する動作安定性の評価では、毛管力型分注機構は、低回転数域において80%以上の高い分注成功率を有していることを確認した。一方、両面成形型は、この検討で行った全分注機会当たりの分注成功率が毛管力型と比べ高いほか、低回転数域では90%以上、高回転数域においては100%と非常に高い安定性で計量が実行されることを確認した。

両面成形型分注機構の試験では、注入が実行されないといった不慮のエラーが多く見られたが、これは流路表面の濡れ現象の揺らぎに起因するものだと考えられ、両面成形型分注機構や分注機構に限らず、マイクロ流路すべてで発生しうるエラーと考えられる。このようなエラーを防ぐ手段の一つとして、より高い回転数で動作させ、揺らぎの影響を遠心力で支配的に制御するという方針が考えられる。このため、高い回転数で安定に計量を実行可能な両面成形型分注機構は、遠心マイクロ流体システムの安定化を図るうえでは優位性を有しているといえる。

第 6 章 両面成形型分注機構を実装した複数検体同時微量 ELISA デバイスの開発

6.1 緒言

4 章の複数検体同時微量 ELISA デバイスは、1 度の抗原抗体反応と洗浄、および TMB 基質の発色反応を定常回転で自律的に実行するデバイスであった。しかしながら、一部の抗原抗体反応をオフチップで実行する必要があることや、分注機構に毛管力を利用した機構があり、これが動作安定性の低下や、量産化にあたってはコスト増加の原因となりうるという課題があった。そこで 5 章にて、動作安定性の向上などを目的に、毛管力に依存しない新たな自律分注機構として、両面成形型分注機構を提案し、動作実証および分注の動作安定性が向上していることを確認した。

本章では、これまでの ELISA デバイスのプロトコルを高度化して、サンドイッチ ELISA の実行に必要なすべての抗原抗体反応をデバイスで実行し、かつ、両面成形型分注機構を実装することで、そのプロセスを複数の反応槽で同時に実行することが可能な、複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスの開発を目的とする。

6.2 複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスの設計

図 6.1 に設計した両面成形型分注機構を実装した複数検体同時サンドイッチ ELISA デバイスを示す。本デバイスも階層構造となっており、分注機構の上流に注入時間制御を担う機構を配置し、分注機構より下流に反応槽や排液槽を配置した。両面成形型分注機構を実装することから、これを実装した分析デバイスも両面成形したデバイスとなり、分注機構より上流を背面側に、下流を前面側に配置した。これらをつなぐ貫通穴は、分注機構の計量チャンバ下部に配置した。4章の複数検体 ELISA デバイスと比較し、2次抗体（HRP 標識抗体）の注入制御機構をデバイスの上部左側に追加した。フローコントロールのプロトコルとしては、サンプルの注入および反応、洗浄、2次抗体の注入および反応、2度の洗浄、TMB 基質の注入および反応である。抗原抗体反応の反応プロセスが増えたことで、洗浄プロセスも増やしたが、使用者の負担軽減を目的に、1つの Inlet reservoir（試薬注入槽）から複数の Secondary reservoir へ分配される設計とした。

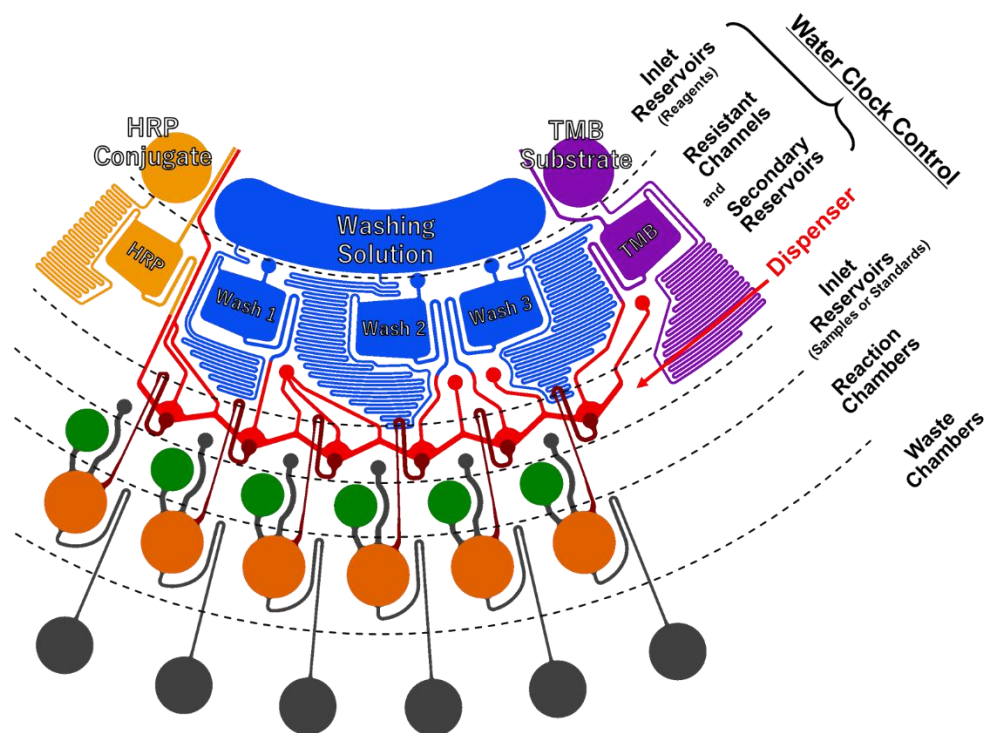


図 6.1 両面成形型分注機構を実装した複数検体同時サンドイッチ ELISA デバイス

6.3 実験方法

6.3.1 デバイスの作製方法

両面成形型分注機構のマイクロチップと同様に、背面側および前面側それぞれのモールドからソフトリソグラフィにてPDMS製のマイクロチップを成形し、それらをアライメントして、接合することでチップを作製した。マイクロ流路はこれまでと同様に、フォトリソグラフィにて成形したフォトレジストの凸型を転写することで成形した。また、試薬の注入槽と Secondary reservoir および反応槽は、フォトレジスト上にグルーを用いたリフロープロセスにて凸型を作製して、ソフトリソグラフィにて成形した。このほかのチャンバやベント穴はポンチや針の打ち抜き加工で成形した。

まずフォトリソグラフィにて、背面側、前面側それぞれの流路の凸型をシリコンウエハにパターニングした。そこに上記に記した箇所のリフロープロセスを施す。秤量したグルー (T098, DAISO INDUSTRIES CO., LTD.) をレジスト上に乗せて一旦 90°C 程度に加熱してリフローさせる。レジストからこぼれないことを確認して 180°C まで昇温したあと冷却して固相化させた。そして PDMS を流し入れ、硬化させる。背面側は 2 mm 厚に、前面側は 0.5 mm 厚となるよう成形した。硬化は 65°C で 90 分間加熱することで行い、室温まで冷却したことを確認してから離型した。背面側のベント穴や貫通穴を 20G の針で、前面側のサンプル注入槽を直径 3 mm のポンチで、同じく排液槽を 4 mm のポンチで加工した後、180°C のオーブンで 10 分間加熱して乾燥させた。そしてそれぞれのチップの流路の成形がされていないフラットな面にプラズマを照射してからアライメントして、その面同士を表面活性化接合にて接着した。貫通穴やベント穴を背面側から同じ 20G の針で貫通させ、また、排液槽も同様に直径 4 mm のポンチで貫通させた。サンプル注入槽は、今度は直径 2 mm のポンチを使って貫通させた。このほか、試薬の注入槽にはその上部にピペット挿入口を、2 次抗体および基質の注入槽には直径 4 mm のポンチを使って、洗浄液のそれには 18G の針を使って加工した。IPA、70% エタノール水溶液、および超純水で超音波洗浄したあと、0.5 mm 厚のフラットな PDMS シートとともに、今度はアニーリングと乾燥を兼ねて 200°C で 30 分間加熱した。そして背面側の流路がパターニングされた側に、同様の表面活性化接合にて、PDMS シートを接合し、背面側の流路を閉じた。外形など余分な箇所をカットした後、70% エタノール水溶液、および超純水で超音波洗浄したあと、オーバーナイトで乾燥させた。これを両面テープを介して CD 基板に固定し、表面には透明なテープを貼り、ベント部やピペット挿入口部分を切り抜くことでデバイスを完成させた。

6.3.2 緻密な注入時間制御実現のための CLOCK 設計とフローコントロー ルの実証

本章の複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスより、洗浄液の注入時間制御機構 (CLOCK) を、1つの試薬の注入槽から複数の抵抗流路および Secondary reservoir に分配する設計とした。これまでの分析デバイスでは、分配はせず、1つの試薬注入槽から1つの抵抗流路および Secondary reservoir に試薬が流れる設計であったことから、加工の結果、流路設計が異なった場合においても、流量や注入開始時間の微調整を注入槽のパンチ位置や注入する容積を調整することで比較的容易に行うことができた。しかし、本章のデバイスではそれが容易ではなく、微調整なしで設計通りに注入時間制御を実現するには、流路の加工誤差を $2\ \mu\text{m}$ 以下に抑制することが求められ、これは現実的ではない。そこで本研究では、自律制御型流体回路理論の注入時間制御の概念式(1.1)の解釈を拡張し、流路のモールド加工後に、一度そのモールド固有の流量を計測してからその結果をもとに流路抵抗値を推定して、Secondary reservoir の容積を調整することで、目的の注入時間となるよう設計する方針とした。

流量の測定は、のちに ELISA デバイスの作製に用いるモールドと同じモールドから、流量測定用デバイスを作製して、実際にそれに液体を流し、Secondary reservoir の容積と Secondary reservoir が満たされるまでの時間や、試薬注入槽が空になった時間から推定した。Secondary reservoir が満たされるまでの時間という測定点を増やすため、流量測定用デバイスの Secondary reservoir の容積は、実際の ELISA を実行するデバイスの数分の一程度となるようグルーの量で調製した。一方試薬注入槽の形状は、流量に影響するため、のちの ELISA デバイスと同一となるようにした。注入時間の制御回路は、背面側のみであることから、背面側のモールドから 2.5 mm 厚で PDMS チップを作製した。また、使用する試薬は、ELISA で使用するものと同じもの (後述) を用いた。デバイスの回転数は 2000 rpm の定常回転とし、リアルタイム観察を行い、流量の推定を行った。

流量測定実験から得られた結果をもとに各流路の抵抗値を推定し、サンドイッチ ELISA を実行するための各試薬の注入時間および注入量の設計、つまり各流路の Secondary reservoir の容積を決定した。そして前節の加工方法にてデバイスを作製し、複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスの動作試験を行った。試薬は、HRP (2次抗体) 流路にはサフラニンで着色した 1%BSA/DPBS を、洗浄液流路にはフルオレセインで着色した 0.05%Tween20/DPBS を、TMB 流路には HRP と反応させて発色させた TMB を用い、それぞれ 20, 100, 20 μL 投入した。また、サンプルの代わりに HRP 流路と同様の液体を各 2.5 μL ずつサンプル注入槽に投入した。

回転数は 2200 rpm の定常回転とし、25 分間回転させた。なお目標の回転数までの加速と、停止のための減速は 500 rpm/s とした。液体の挙動はこれまでと同様にストロボシテムを用いてリアルタイム観察した。

6.3.3 複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスによる ELISA 実行

開発したデバイスを用いて ELISA を実行し、反応系の検証を行った。また、タイタープレートを用いて手作業にて分析を行う従来法においても同様の条件で ELISA を行い、本デバイスを用いた反応系の評価を行った。

ELISA は Mouse IgG 検出系を設計した。これまでの ELISA と同様に DPBS は一般的な組成で調製した。これに Tween 20 (#1706531; Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) を 0.05 vol% 溶解した液体を洗浄液として使用した。ブロッキング剤およびスタンダードの調製と HRP 標識抗体の調製として 1%BSA/DPBS を用いた。TMB (5120-0053) は SeraCare Life Sciences, Inc. から購入し、使用した。1 次抗体として使用した Goat 抗 mouse IgG 抗体 (Prod. #31164) と抗原として使用した mouse IgG (Prod. #31903) は Thermo Scientific Inc. から購入した。HRP 標識された Goat 抗 mouse IgG 抗体 (#074-1806) は Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. から購入した。

デバイス反応系では、チップを CD 基板に固定したあと、表面にテープを貼る前に 1 次抗体の固相化を行った。具体的には、反応槽に DPBS で 100 倍希釈した Goat 抗 Mouse IgG 抗体を入れ、室温静置で 1 時間インキュベートすることで、疎水性相互作用を利用して抗体を物理吸着させた。5 度洗浄した後、オーバーナイトで真空乾燥を行い、流路内を乾燥させたうえで表面にテープを貼り、デバイスを完成させた。反応槽のブロッキング処理は行っていない。

HRP 標識抗体は、実験内容により 100 ng/mL または 250 ng/mL に調製し、デバイスには 20 μ L 投入した。洗浄液は 100 μ L 投入し、TMB 基質は 20 μ L 投入した。スタンダードは各 2.5 μ L 投入した。デバイスの回転数は 2200 rpm または 2400 rpm の定常回転とし、25 分間回転させた。回転停止後、反応槽内に残った液体を 2 μ L 取り出し、同量の 1M リン酸と反応させたあと、 μ Drop Plate または Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を用いて、450 nm と 620 nm または 600 nm (ブランク) の吸光度を測定した。

手作業による従来法の分析では、まずタイタープレートに 100 倍希釈した Goat 抗 Mouse IgG 抗体を 100 μ L 注入し、室温静置で 1 時間インキュベートして 1 次抗体の固相化を行った。300 μ L の洗浄液で 5 度洗浄した後、100 μ L のスタンダードを加えて、デバイスの反応時間と同様に 4 分間室温静置で反応させた。同様に 5 度洗浄した後、100 ng/mL に調製した HRP 標識を 100 μ L 注入し、これも同様に 4 分間反応させた。その後、ウェルを同様に 5 度洗浄した後、TMB 基質を 100 μ L 加え、15 分間室温静置で反応させた。そして 1M リン酸を 100 μ L 加えて反応を止めたあと、プレートリーダー (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) を用いて 450 nm と 600 nm の吸光度を測定した。

6.4 実験結果および考察

6.4.1 CLOCK 設計と複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスの動作

実証

図 6.2 に流量の計測結果と、それをもとに流量の数値シミュレーションで補間して作成した流量曲線を示す。横軸は回転開始からの時間を、縦軸はその Secondary reservoir に流入した総流量を示している。各プロットが実測点で、曲線は実測点に沿うよう代表値として流路をパラメータにフィッティングを行っている。この結果から各流路の抵抗値を推定し、実際の ELISA に対応するフローコントロールを実行するため、Secondary reservoir の容積を再設計し、そのデバイスを作製した。

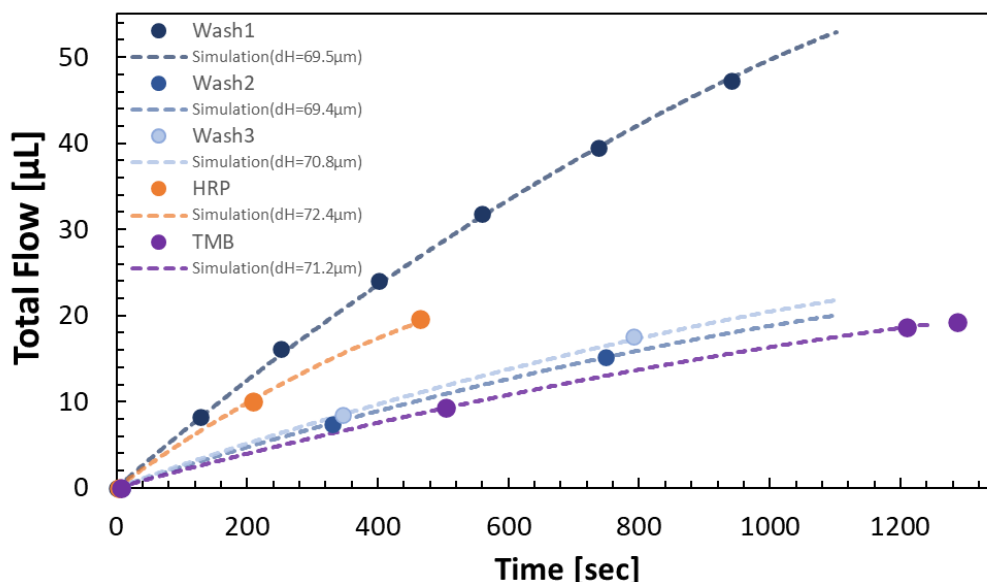


図 6.2 複数検体同時サンドイッチ ELISA デバイスにおける注入時間制御回路の流量

そしてそのデバイスで実行された注入時間制御の結果を図 6.3 に示す。実験値と設計値の差は 10%前後あり、決して小さいとは言えないが、定性的には一致しており、注入順序の逆転は確認されなかった。実験値と設計値の乖離が大きいのには、上記の流量測定の実験時とこの実験時で、実験室内の気温が約 2°C異なっており、その影響で液体の物性、特に粘度が低下したことで流量が大きくなったことが要因として考えられる。

本自律制御型流体回路理論の注入時間制御機構はその原理から、流量の変化は注入時間制御の変動に直結する。このため、理論値と実験値の一致や、日間差を小さくするためには、温調や粘度等の物性値の厳密な把握が必要となる。しかしながら、今回 ELISA の実行に用いている各試薬の粘度の温度依存性は、各試薬間で大差はなく、ほぼ一様に粘度が変化することから、温度が設計時と異なることに由来する注入順序の逆転は発生しにくいと考えられる。また、例えば、温度が設計時より高くなった時には、粘度が低くなり流量が

大きくなることで、各試薬の注入時間が早くなり、反応時間の短縮が推測されるが、一般的に人が生活できる温度範囲であれば、化学反応の効率が向上し、シグナルの増強も同時に起こると推測されることから、温度上昇で極端にシグナルが弱くなることはないと考えられる。

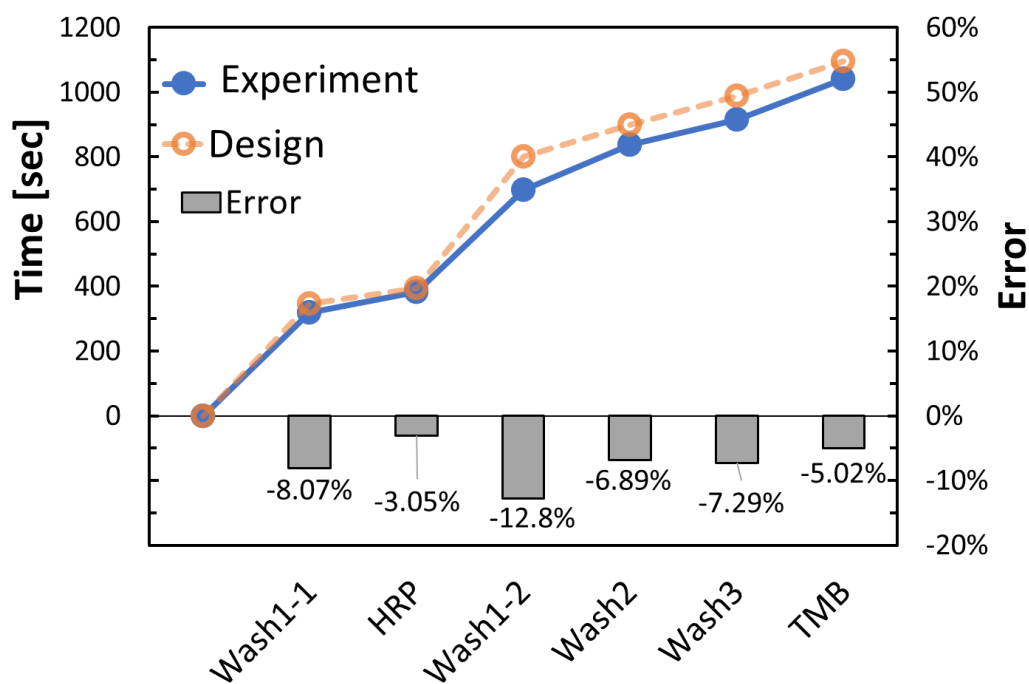


図 6.3 各試薬の注入時間の実験値と設計値の比較

図 6.4 に ELISA を実行するために作製したデバイスのデモンストレーションで観察された主な挙動を示す。

まず、回転開始を開始すると、各試薬がその注入槽から流路へ流れ始め、5 秒後にはサンプルは反応槽に注入された。回転開始から約 243 秒後、Wash 1 の Secondary reservoir から分注機構へ洗浄液が導入された。計量を経た後、各反応槽に同時に分注された。反応槽が満たされることで、この下流のサイフォンが開放され、反応槽内の液体の排液が実行された。そして反応槽は空になった。ここまでが 1 度目の抗原抗体反応と 1 度目の洗浄プロセスとなる。次に HRP 流路の Secondary reservoir が満たされ、そこから分注機構を経て、各反応槽に液体が分注され、そこで保持された。そこから約 4 分後、再度 Wash 1 の Secondary reservoir が満たされ、各反応槽に洗浄液が分注され、反応槽の液体が下流へ排液された。これが 2 度目の抗原抗体反応と 2 度目の洗浄プロセスとなる。続いて Wash 2 および Wash 3 から反応槽に洗浄液が分注され、三度反応槽は空となった。これが 3 度目の洗浄プロセスとなる。最後に TMB 流路から TMB 基質が各反応槽に分注され、そこで回転停止まで保持された。以上により、サンドイッチ ELISA に対応するフローコントロールを定常回転で 6 検体同時に実行されたことが示された。

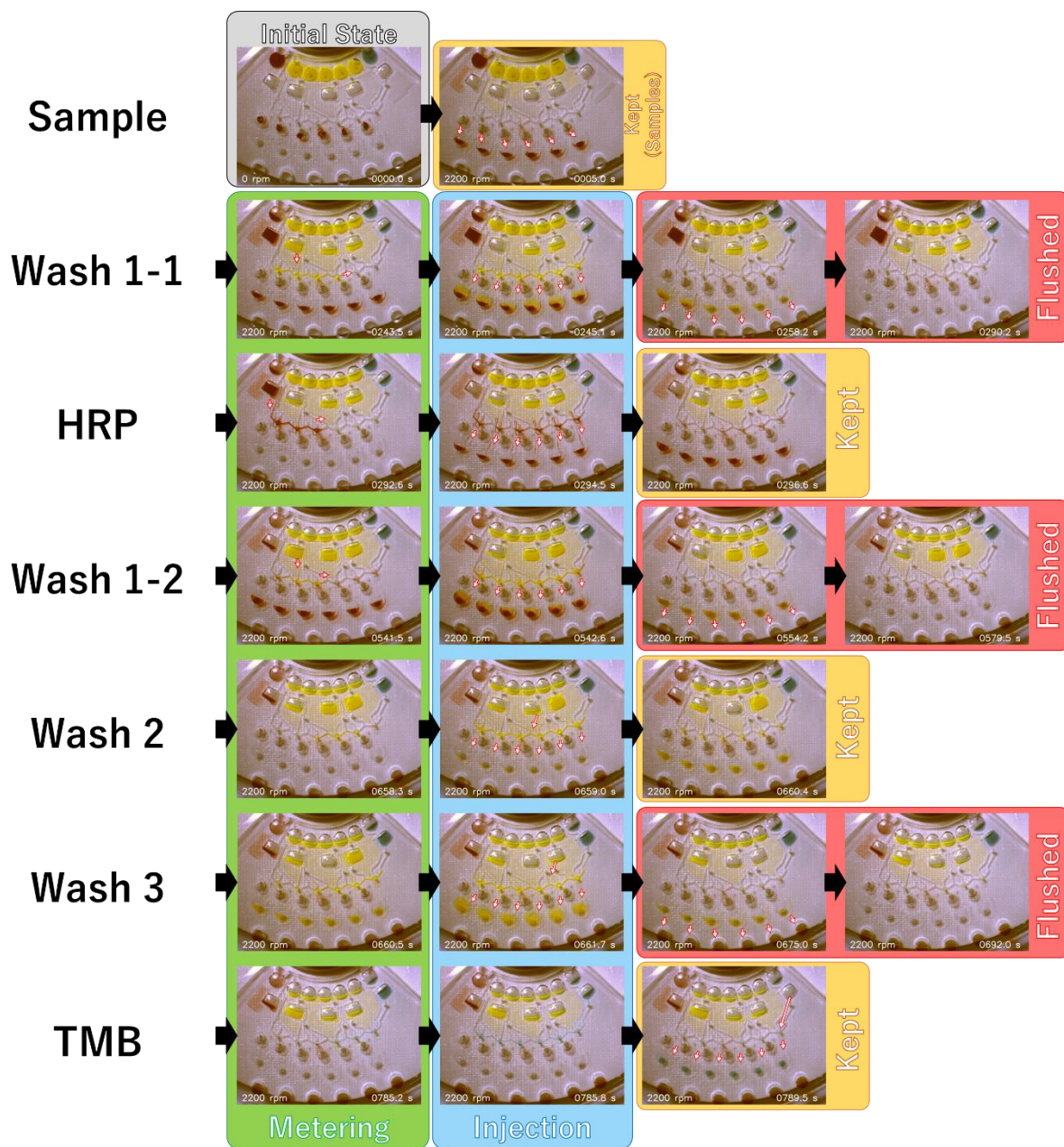


図 6.4 両面成形型分注機構を実装した複数検体同時サンドイッチ ELISA デバイスのデモンストレーションで観察された主な挙動

6.4.2 複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスによる ELISA の検討

と評価

図 6.4 に、複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスを用いて、抗原（100 ng/mL）の有無と、固相化抗体の有無の 4 条件で ELISA を実行した結果を示す。固相化抗体、抗原、2 次抗体のサンドイッチ複合体が存在する条件でのみ大きなシグナル得られていることから、このシグナルは、抗原抗体反応による特異的なシグナルであると考えられる。ゆえに本デバイスは、対応フローコントロールのみならず、サンドイッチ ELISA を実行可能な性能を有しており、かつ Mouse IgG の検出系として有効であると考えられる。

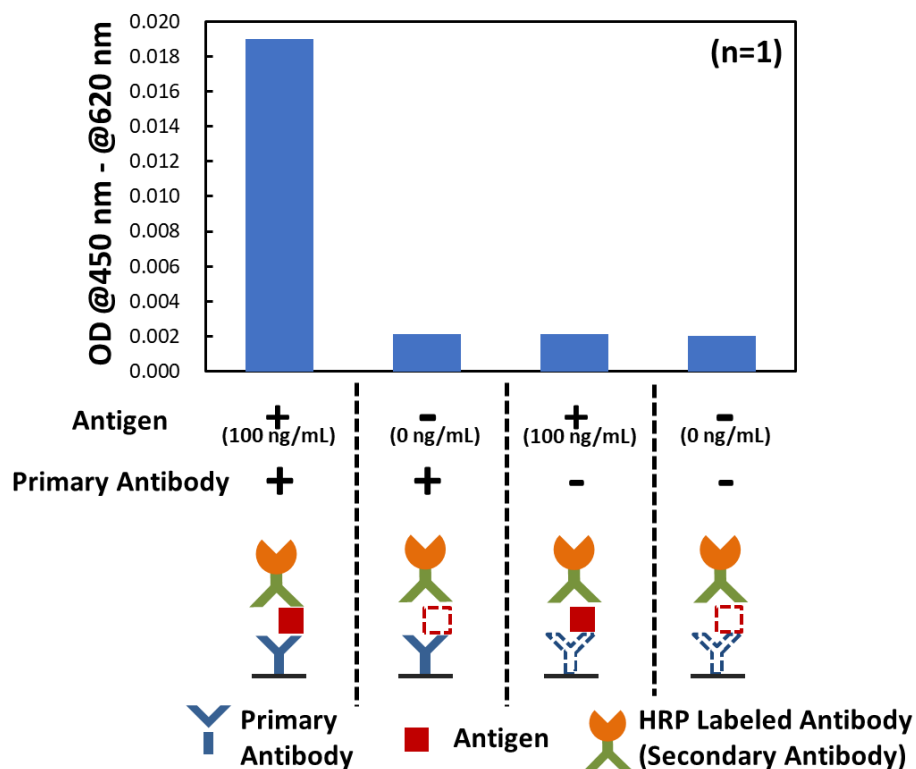


図 6.4 各条件で得られた吸光度

次に図 6.5 に 2 つのデバイスを用いて、抗原濃度および 1 次抗体の有無をパラメータに ELISA を実行した結果を示す。1 次抗体ありの条件（デバイス）では、抗原濃度に応じた吸光度のドーズレスポンスが得られている。一方 1 次抗体を固相化していないデバイスにおいても抗原濃度 1000 ng/mL の条件ではシグナルが検出された。これは 1 次抗体が固相化されていない反応槽であることから、非特異的なシグナルといえる。この原因として考えられるのが反応槽の位置である。この条件はデバイスの最も左に位置する反応槽（#1）で実行された。ほかの実験（図 6.6）においてもこの #1 の反応槽で実行して得られた吸光度は、ほかの反応槽に比べて大きくなる傾向が見られ、反応槽の位置依存の可能性が高いと考えられる。

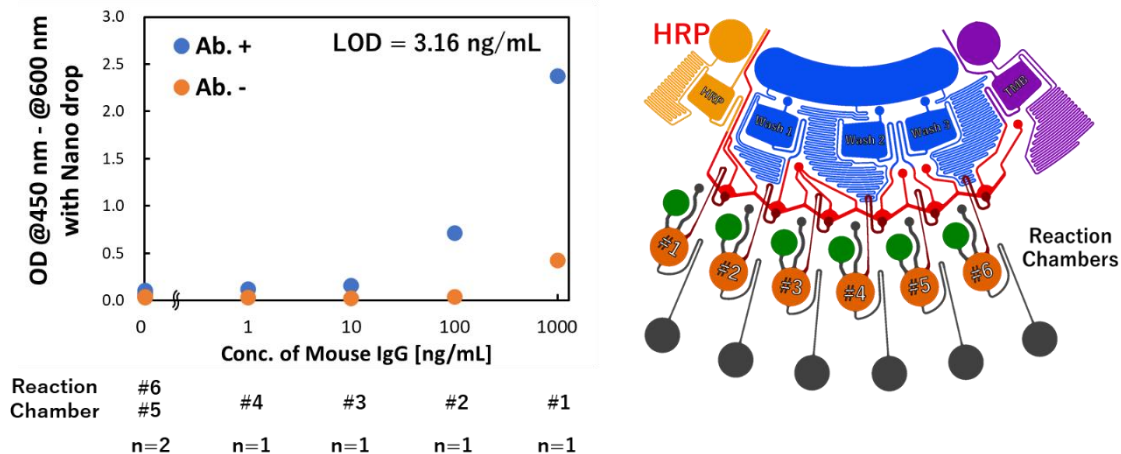


図 6.5 各条件で得られた吸光度と分析を実行した反応槽の位置

#1 の反応槽は、その分注機構の計量チャンバが HRP の注入制御流路と直結しており、そのサイフォン流路に残った HRP 標識抗体を含む液体が計量チャンバに落下していることや、その流路に残った HRP 標識抗体と TMB が反応していることが示唆される。これはデバイスの構造の欠陥であり、分注機構や流路の洗浄回数を増やすなどの改善が必要であるといえる。または、洗浄回数の増加は、分析時間の増加につながることから、この HRP 流路と直結し非特異的なシグナルが顕著な#1 の反応槽を除いた、ほかの 5 つの反応槽の分析結果のみを採用するといった方針をとる必要があるといえる。このため、以下の検討では、#1 の反応槽で分析した結果は参考値として取り扱う。その中で、図 6.5 の結果は、#1 の反応槽の分析結果を除外した場合においても、そのほかの反応槽では、1 次抗体の有無で差が出ており、また、1 次抗体なしの条件では、大きなシグナルは見られないことから、これらの反応槽で得られるシグナルは、抗原抗体反応の特異的な反応によるものだと考えられる。

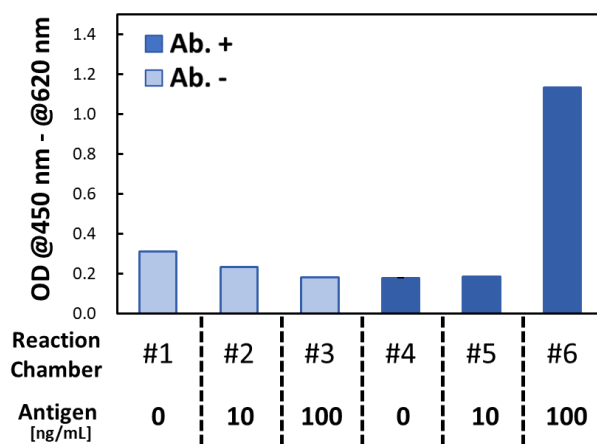


図 6.6 吸光度と分析を実行した反応槽の位置の関係

最後に、これまでの実験では、数十万円のサーボモータを中心とした遠心制御システムを使用して、高精度に定常回転を制御して実験を行ってきた。実際の POCT 適用を想定した場合には、分析装置の小型化および低価格化も重要な要素であり、それを実現するためには、上記のようなサーボモータを用いた高価な回転制御システムを組み込むことはできないと考えられる。そこで当研究室が安価な DC モータを用いて 2 万円以内で作製した簡素な回転制御システム (Bento Box) ^[107] を用いて、本論文で構築してきた自律制御型流体回路理論に基づき設計、作製したこの複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスを回転させ、これまでの実験と同様にフローコントロールを実行可能であるかを検証した。また、ELISA の実行結果についても、これまでは数百万円するプレートリーダーを用いて吸光度を測定することでシグナルの定量を行ってきたが、これも POCT の現場では使用できないと考えられる。そこで同様の遠心マイクロ流体デバイスを用いた ELISA 系において、反応した TMB の吸光度と相関があることが報告されているスマートフォンを用いた画像解析による比色法^[44]を本分析系に適用し、遠心系および検出系を安価なシステムで構築可能であるかを検討した。

図 6.7 に、Bento Box を用いて本複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスを動作させた結果を示す。この Bento Box は回転中の挙動を観察できないため、デバイス内の液体の回転中の挙動は推測となるが、これまでの設計通りに動作したデバイスと比較して、Secondary reservoir の液体の残り方や、排液槽の液体の色、および抗原濃度の大きい条件で分析した反応槽内の液体が青く発色していることから、これまでの高価な遠心制御システムで動作させた場合と同様にフローコントロールが実行されたと考えられる。

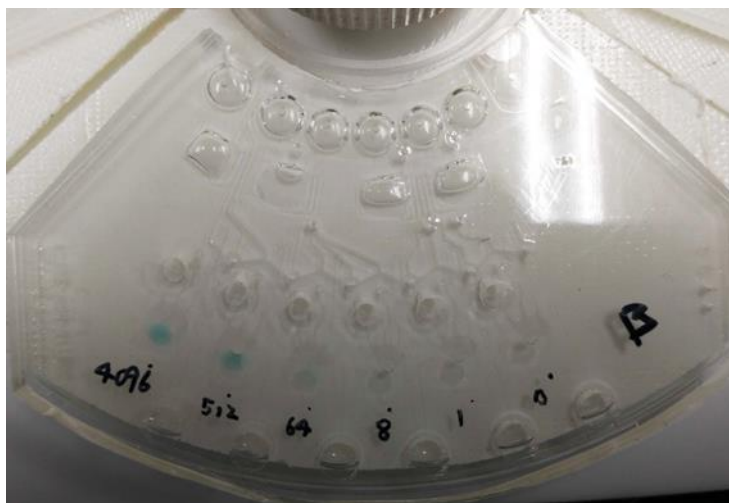


図 6.7 簡素な回転制御システム (Bento Box) を用いて ELISA を実行した結果

図 6.8 にはスマートフォンを用いた比色法による解析結果と、基準となる吸光度の測定結果の比較を示す。まず、吸光度ではドーズレスポンスが得られており、本デバイスはこれまでの高価な回転制御装置を用いずとも、それを用いた場合と同様に ELISA を実行可能

な動作性能を有していると考えられる。また、比色法による解析結果は、吸光度の測定結果と同様のドーズレスポンスが得られており、また、相関があることから、本デバイスを用いた ELISA 系では、高価な計測系が不要でシグナルを測定することも可能であると考えられる。

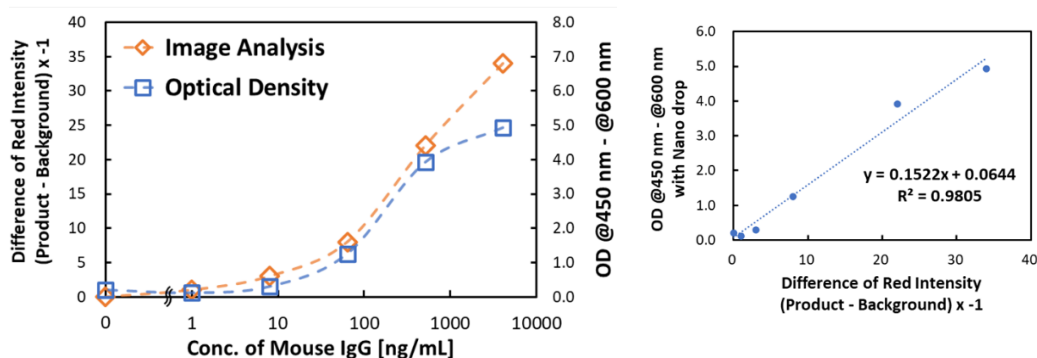


図 6.8 スマートフォンを用いた比色法による解析結果と同一サンプルの吸光度測定結果

図 6.9 には、タイタープレートを用いて作業にて ELISA を実行した結果である。なお、抗原抗体反応の反応時間は、2 度ともにデバイスと同等となるようそれぞれ 4 分とした。このグラフからもデバイスを用いた反応系は、従来の手作業による分析と同様の検量線が得られていることがわかる。このため、本デバイス系は従来の反応系と同様に、反応系をコントロールできていると考えられる。また、従来法の検出下限値は、この反応時間やアッセイ条件を同等した場合には、1.55 ng/mL と算出された。デバイス反応系では図 6.5 に示すように 3.16 ng/mL であることから、わずかに感度は劣るが同じオーダーであり、同程度の検出感度を有していると考えられる。

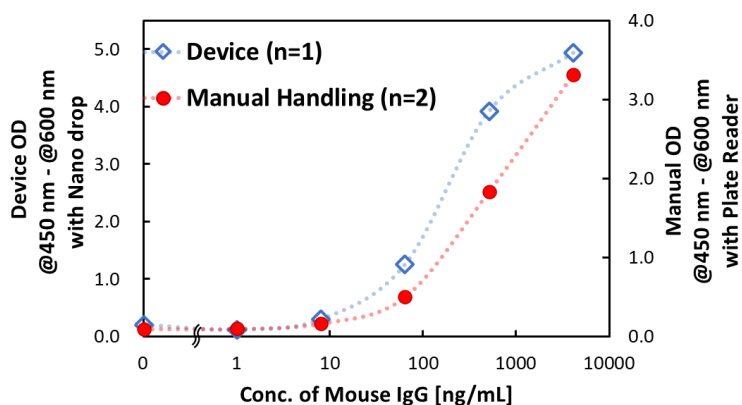


図 6.9 従来法の ELISA の結果
(抗原抗体反応時間各 4 分)

6.5 結言

本章では、両面成形型分注機構を実装し、かつ2度の抗原抗体反応をデバイス上で実行する複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスを提案し、その実証を行った。

デバイスは、自律制御型流体回路理論に基づき、抗原抗体反応と洗浄プロセスを追加したプロトコルを設計した。洗浄プロセスの回数が増えたことで、Secondary reservoir 等の構成要素も増えたが、共通の試薬注入槽を配置し、そこから複数の抵抗流路や Secondary reservoir に洗浄液を分配することで、ピペットの注入操作の低減の低減と、プロトコルの高度化を両立した。これに伴い、流路の加工に要求される精度が高度化した。自律制御型流体回路理論の注入時間制御の基本理論の解釈から、Secondary reservoir の容積で注入開始時間を調整する新たな設計方針を確立することで、この課題を解決し、高度なフローコントロールが定常回転で実行されることを確認した。

1次抗体の有無と抗原 (Mouse IgG) の濃度をパラメータに検証を行った ELISA のシグナルの抗原抗体反応の特異性の検討では、1次抗体、抗原、2次抗体のサンドイッチ複合体が存在する条件でのみ大きなシグナルが得られ、また、本複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスが Mouse IgG として有効であることを示唆する結果が得られた。一方で HRP の制御流路に近い反応槽では、非特異的なシグナルが確認されており、これの解消は必須であり今後の課題といえる。

表 6.1 デバイスと従来法の性能比較

	デバイス	従来法 (手作業)
反応時間	25分	135分
サンプル量	2.5 μL	100 μL
試薬量	23 μL	3100 μL
検出下限値	0.3 ~ 数 ng/mL	0.01 ~ 数 ng/mL
ピペットの注入操作回数	1.5 回	13 回
装置の価格	数万円	数百万円

表 6.1 に本複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスの主な性能を従来法との比較で示す。本デバイスは 25 分間定常回転させるだけで2度の抗原抗体反応と、計3度の洗浄プロセスおよび TMB 基質の発色反応が実行される。分析に必要なサンプル量は 2.5 μL と、従来の手作業による分析と比較して 40 分の 1 に削減した。また、この 2.5 μL という量は、全血から抽出した血漿をサンプルとして用いることを想定した場合においても、指先からの自己採血で十分に採取可能な量である。検出下限値は Mouse IgG 検出系で約 3 ng/mL となった。同等の反応時間として従来法と比較すると、大きな差はないが、一般的な反応時間の従来法と比較すると、およそ 2 桁感度が劣るため、検出感度の向上は今後の

検討課題といえる。しかしながら、1検体当たりの試薬量は23 μ L、ピペット操作回数は1.5回と廃棄試薬量と作業負担の大幅な削減を実現しており、POCTの適応が期待される医療設備の限られた環境での使用や、非医療従事者の使用も十分に想定できる微量集積化を実現していると考えられる。そして本章で開発したデバイスは、DCモータを使用した簡素な回転制御装置で動作させることができ、スマートフォンを用いた比色法にてアッセイ結果を分析できることを実証した。デバイスの加工においても特殊な付加加工が不要であることから、デバイスも安価な加工プロセスで量産可能と考えられる。つまりデバイス、回転制御装置、分析系のELISAに実行に必要なすべての要素を安価に実現可能であると考えられ、本理論を応用したPOCTに適応可能なELISAシステムの早期実現が期待できる。

第7章 総括

本論文では、安価で可搬性のある POCT 対応機器の実現を目標に、自律制御型流体回路の制御理論とそれを応用した ELISA デバイスを提案した。

第1章では、化学分析の実行に必要となる液体の注入時間制御や、液体置換を定常回転で自律的に実行するための基礎的な制御理論を提案した。液体注入時間制御機構の開発では、提案原理通りに、定常回転下において液体の注入時間を制御可能であることを実証した。また、回転数や流路長を調整することで流量を小さくし、化学分析プロセスの実行に必要であると想定される10分以上の注入時間制御を安定に実行可能であることを実証した。液体置換機構については、サイフォンバルブを用いた液体置換条件について、液体置換が実行されるための最低条件の仮説を立て、その条件を満たすための流路構造や回転数について、実験的に検討を行った。この結果、液体置換を安定に実行するためには、サイフォン流路の出口を太くして、毛管力の影響を小さくすることや、排液槽を半径方向外側に設けたり、動作回転数を上げたりして、液体に印加される遠心力を大きくすることが効果的であることを実証した。

第2章では、第1章で構築した自律制御型流体回路理論に基づき、定常回転にて酵素免疫測定法 (ELISA) を実行するデバイスを作製し、バイオアッセイを実行した。動作検証では、ELISA の各単位操作に対応するフローコントロールを 1500 rpm の定常回転下で実行可能であることを示した。また回転数を調整することで、反応時間等を制御可能であることを確認し、複数のデバイスを用いた動作検証では、各試薬の注入時間制御の誤差が5%と高い制御精度を有していることを確認した。ELISA における1次抗体の固相条件の検討においては、定常回転下で化学反応が実行され、液体が攪拌されず、分子の拡散が乏しいという本理論特有の条件下において、3次元的に1次抗体を展開可能なポリウレタンフォームを採用することで、化学反応の効率が向上することを実証した。ヒトアルブミン検出系によるデバイス分析系の評価では、従来の手作業による分析系と同様に、反応系が制御できており、デバイスを用いた分析系がヒトアルブミン検出系として有効であることを示した。デバイス分析系の検出下限値 (LOD) は、0.584 ng/mL を実現し、抗原抗体反応の反応時間を統一して比較した従来法と同等以上の検出感度を有していることを確認した。また、サンプル量は 100 μ L から 30 μ L に削減したほか、使用試薬量の削減と洗浄回数の削減も実現した。

第3章では、分析デバイスの集積化や微量化を目的に、定常回転で動作する新たな分注機構を提案した。この分注機構は、定常回転で液体の保持および計量を行い、計量後、自律的に注入が実行される。本章ではこれを実証し、分注量の評価においても、変動係数 (CV) でおよそ5%以下の高い分注精度を有していることを確認した。

第4章では、第2章で提案した ELISA デバイスと第3章で提案した自律分注機構を統合した複数検体同時微量分析デバイスを提案した。動作試験では、自律制御型流体回路理論に

基づき開発した、単検体の ELISA デバイスと分注機構を統合したデバイスが、定常回転で ELISA に対応するフローコントロールを 6 検体同時に実行可能であることを実証し、自律制御型流体回路理論が広く適用可能であることを示した。1 次抗体の有無および抗原(Mouse IgG) 濃度をパラメータとして ELISA を実行した実験においては、抗原抗体の特異的な反応でのみシグナルが得られていることを確認し、この複数検体同時分析デバイスを用いた反応系が、Mouse IgG の検出系として有効であることを確認した。従来法との比較では、反応時間を約 12 分の 1 に、洗浄回数を 5 回から 2 回に削減しながらも、同等の検出感度を有していることを確認し、サンプル量の 100 μL から 5 μL への削減を実現した。

第 5 章では、動作安定性の向上や、流路表面の濡れ性の制限を受けない分注機構の実現を指向し、毛管力に依存しない分注機構として、流路を立体的に交差させた両面成型型の自律分注機構を提案した。3 章で提案した毛管力型分注機構と本章の両面成型型分注機構との違いは、計量時の液体の保持方式の違いで、自律注入機構は同様である。両面成型型分注機構の動作実証では、毛管力型と同様に定常回転にて液体の保持および計量を行い、計量後、受動的に分注が実行されることを実証した。分注量についても変動係数 (CV) はおよそ 5% 以下で、ELISA デバイスに実装し、ELISA を実行可能である実績のある毛管力型の CV と同程度であることを確認した。

繰り返し分注に対する動作安定性の評価では、毛管力型分注機構は、低回転数域において 80% 以上の高い分注成功率を有していることを確認した。一方、両面成型型は、この検討で行った全分注機会当たりの分注成功率が毛管力型と比べ高いほか、低回転数域では 90% 以上、高回転数域においては 100% と非常に高い安定性で計量が行われることを確認した。マイクロ流体システムでは、液体が意図せず停滞してしまうといった表面力の揺らぎに起因するエラーが起こることがあるが、このようなエラーを防ぐ手段の一つとして、より高い回転数で動作させ、揺らぎの影響を遠心力で支配的に制御するという方針が考えられる。その中で、高い回転数で安定に計量を実行可能な両面成型型分注機構は、遠心マイクロ流体システムの安定化を図るうえでは重要な優位性を有しているといえる。

第 6 章では、5 章で提案した両面成型型分注機構を実装し、かつ 2 度の抗原抗体反応をデバイス上で実行する複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスを提案し、その実証を行った。自律制御型流体回路理論の注入時間制御の新たな設計方針の確立により、ピペットの注入操作の低減の低減と、プロトコルの高度化を両立した。そして一般的なサンドイッチ ELISA の実行に必要なフローコントロールが定常回転で実行されることを確認した。

1 次抗体の有無と抗原 (Mouse IgG) の濃度をパラメータに検証を行った ELISA のシグナルの抗原抗体反応の特異性の検討では、1 次抗体、抗原、2 次抗体のサンドイッチ複合体が存在する条件でのみ大きなシグナルが得られ、また、本複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスが Mouse IgG 検出系として有効であることを示唆する結果が得られた。そして本章で開発したデバイスは、DC モータを使用した簡素な回転制御装置で動作させることができ、かつ、スマートフォンを用いた比色法にてアッセイ結果を分析できることを実証

した。

以上の POCT 対応機器の実現を目標とした自律制御型流体回路の制御理論と、それを応用した ELISA デバイスの研究の結果、遠心マイクロ流体デバイスにおける新たな溶液操作手法として、本自律制御型流体回路理論が理論的に液体の注入や保持、置換といった基本的な溶液操作の制御が可能であることと、この理論が ELISA を実行するデバイスへ適用可能な有用性を有していることを示した。

自律制御型流体回路理論は、定常回転で様々な制御が実行可能でかつ、マイクロ流体チップへの付加加工が不要で安価にチップを作製可能であることが特徴である。定常回転で動作するため、特別な回転制御機能のない安価で小型の遠心機で、レーザーの照射機構といった外部装置なく溶液操作を実行でき、POCT 対応機器に求められる可搬性や装置のコストの条件を満たしていると考えられる。またマイクロ流体チップの構造が複雑でないため、射出成形といった安価に量産可能な加工プロセスにてチップを成形可能であることが推定される。このため、シングルユースでの使用が望まれる血液分析チップへの適用が可能で、安価なディスプレイポータブル分析チップの実現が期待される。

また、マイクロ流体システムを用いた分析系の特徴として、検体の微量化と分析の高速化があげられる。本論文で提案した複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスでは、2.5 μL のサンプル量で分析可能で、それにかかる時間は約 25 分と、省検体短時間で分析可能であることを実証した。サンプル量の 2.5 μL というのは、全血からヘマトクリット等を除去した検体の使用を想定した場合においても、指先からの採血で十分に賄える量である。このため本デバイスを応用した POCT 対応分析装置の実現により、被験者の自己採血で分析可能であることが示唆され、遠隔医療等での活用が期待される。また、分析にかかる時間が 30 分程度であれば、病院で採血後、その場で結果を待つということも十分に想定内で、これまでは、採血から分析結果の通知まで長い時には数日かかっていた小規模な診療所等でのこのデバイスを応用した分析装置の導入で、被験者の負担軽減が期待される。さらに、1 検体当たりの使用試薬量は 23 μL と少なく、廃棄物の大幅な削減を実現しており、遠隔医療のほか、災害時医療や発展途上国といった廃棄物処理が懸念されるような環境においても活用が期待される。そして、これまでは実現しえなかった新たな健康状態の把握が可能になり、人々の QOL の向上や、人命救助に貢献できると考えられる。

参考文献

- [1] H. S. PB Lippa, *POCT – Patientennahe Labordiagnostik*. (Springer, 2008).
- [2] P. B. Lippa, C. Muller, A. Schlichtiger, H. Schlebusch; “Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives”, *Trends Analyt Chem*, **30**, 887-898 (2011).
- [3] M. S. Bhamla *et al.*; “Hand-powered ultralow-cost paper centrifuge”, *Nature Biomedical Engineering*, **1**, (2017).
- [4] H. Sakamoto; “Advantages of POCT at Outside the Hospital”, *JJOMT*, **65**, 246-251 (2017).
- [5] M. Urdea *et al.*; “Requirements for high impact diagnostics in the developing world”, *Nature*, **444 Suppl 1**, 73-79 (2006).
- [6] H. Chen, K. Liu, Z. Li, P. Wang; “Point of care testing for infectious diseases”, *Clin Chim Acta*, **493**, 138-147 (2019).
- [7] 谷直人; “POCT (point of care testing) の現状と今後の課題”, *医機学*, **80**, 317-324 (2010).
- [8] N. M. Sumita *et al.*; “Clinical Applications of Point-of-Care Testing in Different Conditions”, *Clin Lab*, **64**, 1105-1112 (2018).
- [9] L. N. Ma *et al.*; “An overview on ELISA techniques for FMD”, *Virol J*, **8**, 419 (2011).
- [10] Q. Lin, J. Wu, X. Fang, J. Kong; “Washing-free centrifugal microchip fluorescence immunoassay for rapid and point-of-care detection of protein”, *Anal Chim Acta*, **1118**, 18-25 (2020).
- [11] N. M. Pires, T. Dong, U. Hanke, N. Hoivik; “Recent developments in optical detection technologies in lab-on-a-chip devices for biosensing applications”, *Sensors (Basel)*, **14**, 15458-15479 (2014).
- [12] S. Guo, R. Ishimatsu, K. Nakano, T. Imato; “Automated chemiluminescence immunoassay for a nonionic surfactant using a recycled spinning-pausing controlled washing procedure on a compact disc-type microfluidic platform”, *Talanta*, **133**, 100-106 (2015).
- [13] S. H. Kim *et al.*; “Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules”, *Lab Chip*, **12**, 4986-4991 (2012).
- [14] H. Chon *et al.*; “On-chip immunoassay using surface-enhanced Raman scattering of hollow gold nanospheres”, *Anal Chem*, **82**, 5290-5295 (2010).
- [15] S. Lai *et al.*; “Design of a Compact Disk-like Microfluidic”, *Anal Chem*, **76**, 1832-1837 (2004).
- [16] E. Eteshola, M. Balberg; “Microfluidic ELISA On-Chip Fluorescence Imaging”, *Biomed Microdevices*, **6**, 7-9 (2004).
- [17] F. Costantini *et al.*; “Lab-on-chip system combining a microfluidic-ELISA with an array of amorphous silicon photosensors for the detection of celiac disease epitopes”, *Sensing and Bio-Sensing Research*, **6**, 51-58 (2015).
- [18] B. Dai *et al.*; “Fully-functional semi-automated microfluidic immunoassay platform for quantitation of multiple samples”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **300**, (2019).
- [19] J. Do, C. H. Ahn; “A polymer lab-on-a-chip for magnetic immunoassay with on-chip sampling and detection capabilities”, *Lab Chip*, **8**, 542-549 (2008).
- [20] S. J. Lee, S. Y. Lee; “Micro total analysis system (micro-TAS) in biotechnology”, *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 289-299 (2004).
- [21] V. T. Upaassana *et al.*; “Highly Sensitive Lab on a Chip (LOC) Immunoassay for Early Diagnosis of Respiratory Disease Caused by Respirable Crystalline Silica (RCS)”, *Anal Chem*, **91**, 6652-6660 (2019).
- [22] J. Wu, M. Dong, C. Rigatto, Y. Liu, F. Lin; “Lab-on-chip technology for chronic disease diagnosis”,

- NPJ Digit Med*, **1**, 7 (2018).
- [23] W. Gao, M. Liu, S. Chen, C. Zhang, Y. Zhao; “Droplet microfluidics with gravity-driven overflow system”, *Chemical Engineering Journal*, **362**, 169-175 (2019).
- [24] E. Berthier, A. M. Dostie, U. N. Lee, J. Berthier, A. B. Theberge; “Open Microfluidic Capillary Systems”, *Anal Chem*, **91**, 8739-8750 (2019).
- [25] A. Olanrewaju, M. Beaugrand, M. Yafia, D. Juncker; “Capillary microfluidics in microchannels: from microfluidic networks to capillary circuits”, *Lab Chip*, **18**, 2323-2347 (2018).
- [26] A.-J. Mäki *et al.*; “Modeling and Experimental Characterization of Pressure Drop in Gravity-Driven Microfluidic Systems”, *Journal of Fluids Engineering*, **137**, (2015).
- [27] A. Bernard, B. Michel, E. Delamarche; “Micromosaic immunoassays”, *Anal Chem*, **73**, 8-12 (2001).
- [28] E. Y. Basova, F. Foret; “Droplet microfluidics in (bio)chemical analysis”, *Analyst*, **140**, 22-38 (2015).
- [29] W. H. Tan, S. Takeuchi; “<A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications.pdf>”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1146-1151 (2007).
- [30] C. T. Lim, Y. Zhang; “Bead-based microfluidic immunoassays: the next generation”, *Biosens Bioelectron*, **22**, 1197-1204 (2007).
- [31] T. Thorsen, S. J. Maerkl, S. R. Quake; “Microfluidic large-scale integration”, *Science*, **298**, 580-584 (2002).
- [32] A. Snider, I. Pirozzi, A. Tripathi; “Centrifugal Microfluidics Traps for Parallel Isolation and Imaging of Single Cells”, *Micromachines (Basel)*, **11**, (2020).
- [33] S. T. Rajendran *et al.*; “Modular, Lightweight, Wireless Potentiostat-on-a-Disc for Electrochemical Detection in Centrifugal Microfluidics”, *Anal Chem*, **91**, 11620-11628 (2019).
- [34] F. Schuler *et al.*; “Digital droplet PCR on disk”, *Lab Chip*, **16**, 208-216 (2016).
- [35] S. Hosseini *et al.*; “Microsphere integrated microfluidic disk: synergy of two techniques for rapid and ultrasensitive dengue detection”, *Sci Rep*, **5**, 16485 (2015).
- [36] R. Burger *et al.*; “An integrated centrifugo-opto-microfluidic platform for arraying, analysis, identification and manipulation of individual cells”, *Lab Chip*, **15**, 378-381 (2015).
- [37] T.-H. Kim, H. Hwang, R. Gorkin, M. Madou, Y.-K. Cho; “Geometry effects on blood separation rate on a rotating disc”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **178**, 648-655 (2013).
- [38] X. B. Zhang *et al.*; “Gravitational sedimentation induced blood delamination for continuous plasma separation on a microfluidics chip”, *Anal Chem*, **84**, 3780-3786 (2012).
- [39] R. Burger *et al.*; “Array-based capture, distribution, counting and multiplexed assaying of beads on a centrifugal microfluidic platform”, *Lab Chip*, **12**, 1289-1295 (2012).
- [40] R. Gorkin *et al.*; “Centrifugal microfluidics for biomedical applications”, *Lab Chip*, **10**, 1758-1773 (2010).
- [41] M. Grumann, T. Brenner, C. Beer, R. Zengerle, J. Ducreé; “Visualization of flow patterning in high-speed centrifugal microfluidics”, *Review of Scientific Instruments*, **76**, (2005).
- [42] M. Grumann, A. Geipel, L. Riegger, R. Zengerle, J. Ducreé; “Batch-mode mixing on centrifugal microfluidic platforms”, *Lab Chip*, **5**, 560-565 (2005).
- [43] W. Espulgar, T. Tadokoro, E. Tamiya, M. Saito; “Utility of Centrifugation-Controlled Convective (C3) Flow for Rapid On-chip ELISA”, *Sci Rep*, **9**, 20150 (2019).
- [44] Y. Ukita, Y. Utsumi, Y. Takamura; “Direct digital manufacturing of a mini-centrifuge-driven centrifugal microfluidic device and demonstration of a smartphone-based colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay”, *Anal Methods-Uk*, **8**, 256-262 (2016).

- [45] C. Y. Koh *et al.*; “Centrifugal microfluidic platform for ultrasensitive detection of botulinum toxin”, *Anal Chem*, **87**, 922-928 (2015).
- [46] C. M. Miyazaki, E. Carthy, D. J. Kinahan; “Biosensing on the Centrifugal Microfluidic Lab-on-a-Disc Platform”, *Processes*, **8**, (2020).
- [47] L. Clime *et al.*; “Active pumping and control of flows in centrifugal microfluidics”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **23**, (2019).
- [48] O. Strohmeier *et al.*; “Centrifugal microfluidic platforms: advanced unit operations and applications”, *Chem Soc Rev*, **44**, 6187-6229 (2015).
- [49] T. H. Thio *et al.*; “Theoretical development and critical analysis of burst frequency equations for passive valves on centrifugal microfluidic platforms”, *Med Biol Eng Comput*, **51**, 525-535 (2013).
- [50] I. Kubo, T. Kanamatsu, S. Furutani; “Microfluidic Device for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Its Application to Bisphenol A Sensing”, *Sensor Mater*, **26**, 615-621 (2014).
- [51] Y. Ukita *et al.*; “Stacked centrifugal microfluidic device with three-dimensional microchannel networks and multifunctional capillary bundle structures for immunoassay”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **166-167**, 898-906 (2012).
- [52] Y. Zhu, Y. Chen, Y. Xu; “Interruptible siphon valving for centrifugal microfluidic platforms”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **276**, 313-321 (2018).
- [53] H. C. Wu, Y. H. Chen, C. H. Shih; “Disk-based enzyme-linked immunosorbent assays using the liquid-aliquoting and siphoning-evacuation technique”, *Biomicrofluidics*, **12**, 054101 (2018).
- [54] C. E. Nwankire *et al.*; “At-line bioprocess monitoring by immunoassay with rotationally controlled serial siphoning and integrated supercritical angle fluorescence optics”, *Anal Chim Acta*, **781**, 54-62 (2013).
- [55] M. Focke *et al.*; “Microstructuring of polymer films for sensitive genotyping by real-time PCR on a centrifugal microfluidic platform”, *Lab Chip*, **10**, 2519-2526 (2010).
- [56] J. Ducrée *et al.*; “The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **17**, S103-S115 (2007).
- [57] D. Mark *et al.*; “Centrifugo-pneumatic valve for metering of highly wetting liquids on centrifugal microfluidic platforms”, *Lab Chip*, **9**, 3599-3603 (2009).
- [58] J. Siegrist *et al.*; “Serial siphon valving for centrifugal microfluidic platforms”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **9**, 55-63 (2009).
- [59] X. Meng *et al.*; “Conditional siphon priming for multi-step assays on centrifugal microfluidic platforms”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **242**, 710-717 (2017).
- [60] F. Schwemmer *et al.*; “A microfluidic timer for timed valving and pumping in centrifugal microfluidics”, *Lab Chip*, **15**, 1545-1553 (2015).
- [61] W. Al-Faqheri *et al.*; “Development of novel passive check valves for the microfluidic CD platform”, *Sensors and Actuators A: Physical*, **222**, 245-254 (2015).
- [62] M. M. Aeinhvand *et al.*; “Latex micro-balloon pumping in centrifugal microfluidic platforms”, *Lab Chip*, **14**, 988-997 (2014).
- [63] O. Strohmeier *et al.*; “Multiplex genotyping of KRAS point mutations in tumor cell DNA by allele-specific real-time PCR on a centrifugal microfluidic disk segment”, *Microchimica Acta*, **181**, 1681-1688 (2013).
- [64] R. Gorkin, L. Clime, M. Madou, H. Kido; “Pneumatic pumping in centrifugal microfluidic platforms”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **9**, 541-549 (2010).
- [65] M. Keller *et al.*; “Centrifugo-thermopneumatic fluid control for valving and aliquoting applied to multiplex real-time PCR on off-the-shelf centrifugal thermocycler”, *RSC Advances*, **5**, 89603-

- 89611 (2015).
- [66] M. Keller, J. Naue, R. Zengerle, F. von Stetten, U. Schmidt; “Automated Forensic Animal Family Identification by Nested PCR and Melt Curve Analysis on an Off-the-Shelf Thermocycler Augmented with a Centrifugal Microfluidic Disk Segment”, *PLoS One*, **10**, e0131845 (2015).
- [67] T. H. Thio *et al.*; “Push pull microfluidics on a multi-level 3D CD”, *Lab Chip*, **13**, 3199-3209 (2013).
- [68] K. Abi-Samra *et al.*; “Thermo-pneumatic pumping in centrifugal microfluidic platforms”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **11**, 643-652 (2011).
- [69] C.-T. Lin *et al.*; “Hand-powered centrifugal microfluidic disc with magnetic chitosan bead-based ELISA for antibody quantitation”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **316**, (2020).
- [70] J. F. Hess *et al.*; “Automation of Amplicon-Based Library Preparation for Next-Generation Sequencing by Centrifugal Microfluidics”, *Anal Chem*, **92**, 12833-12841 (2020).
- [71] D. J. Kinahan *et al.*; “<Automation of Silica Bead-based Nucleic Acid Extraction on a Centrifugal Lab-on-a-Disc Platform.pdf>”, *Journal of Physics: Conference Series*, **757**, (2016).
- [72] S. Zehnle *et al.*; “Pneumatic siphon valving and switching in centrifugal microfluidics controlled by rotational frequency or rotational acceleration”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **19**, 1259-1269 (2015).
- [73] M. C. R. Kong, E. D. Salin; “Micromixing by pneumatic agitation on continually rotating centrifugal microfluidic platforms”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **13**, 519-525 (2012).
- [74] M. C. Kong, E. D. Salin; “A valveless pneumatic fluid transfer technique applied to standard additions on a centrifugal microfluidic platform”, *Anal Chem*, **83**, 9186-9190 (2011).
- [75] M. C. Kong, E. D. Salin; “Spectrophotometric determination of aqueous sulfide on a pneumatically enhanced centrifugal microfluidic platform”, *Anal Chem*, **84**, 10038-10043 (2012).
- [76] Y. Wang *et al.*; “On-board control of wax valve on active centrifugal microfluidic chip and its application for plasmid DNA extraction”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **23**, (2019).
- [77] S. T. Krauss *et al.*; “Objective Method for Presumptive Field-Testing of Illicit Drug Possession Using Centrifugal Microdevices and Smartphone Analysis”, *Anal Chem*, **88**, 8689-8697 (2016).
- [78] L. X. Kong, K. Parate, K. Abi-Samra, M. Madou; “Multifunctional wax valves for liquid handling and incubation on a microfluidic CD”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **18**, 1031-1037 (2014).
- [79] T. H. Kim, J. Park, C. J. Kim, Y. K. Cho; “Fully integrated lab-on-a-disc for nucleic acid analysis of food-borne pathogens”, *Anal Chem*, **86**, 3841-3848 (2014).
- [80] H. Hwang *et al.*; “Lab-on-a-disc for simultaneous determination of nutrients in water”, *Anal Chem*, **85**, 2954-2960 (2013).
- [81] W. Al-Faqheri *et al.*; “Vacuum/compression valving (VCV) using paraffin-wax on a centrifugal microfluidic CD platform”, *PLoS One*, **8**, e58523 (2013).
- [82] J. M. Park, Y. K. Cho, B. S. Lee, J. G. Lee, C. Ko; “Multifunctional microvalves control by optical illumination on nanoheaters and its application in centrifugal microfluidic devices”, *Lab Chip*, **7**, 557-564 (2007).
- [83] L. Clime, D. Brassard, M. Geissler, T. Veres; “Active pneumatic control of centrifugal microfluidic flows for lab-on-a-chip applications”, *Lab Chip*, **15**, 2400-2411 (2015).
- [84] J. Xiang, Z. Cai, Y. Zhang, W. Wang; “Mechanically programmed valving technology and the active flow switching application in centrifugal microfluidics”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **259**, 325-331 (2018).

- [85] J. Xiang, Z. Cai, Y. Zhang, W. Wang; “Wedge actuated normally-open and normally-closed valves for centrifugal microfluidic applications”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **243**, 542-548 (2017).
- [86] Z. Cai, J. Xiang, H. Chen, W. Wang; “Membrane-based valves and inward-pumping system for centrifugal microfluidic platforms”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **228**, 251-258 (2016).
- [87] Z. Cai, J. Xiang, B. Zhang, W. Wang; “A magnetically actuated valve for centrifugal microfluidic applications”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **206**, 22-29 (2015).
- [88] S. Fakhari, E. Pishbin, M. Navibakhsh, M. Maghazeh, M. Eghbal; “Implementing series of dual-chamber units for sequential loading of the liquids in centrifugal microfluidic platforms”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **23**, (2019).
- [89] N. S. Gopal, R. Raychaudhuri; “Detection of Plasmodium Aldolase Using a Smartphone and Microfluidic Enzyme Linked Immunosorbent Assay”, *Malar Res Treat*, **2017**, 9062514 (2017).
- [90] L. Swayne, A. Kazarine, E. J. Templeton, E. D. Salin; “Rapid prototyping of pneumatically actuated hydrocarbon gel valves for centrifugal microfluidic devices”, *Talanta*, **134**, 443-447 (2015).
- [91] R. Gorkin, 3rd *et al.*; “Centrifugo-pneumatic valving utilizing dissolvable films”, *Lab Chip*, **12**, 2894-2902 (2012).
- [92] D. J. Kinahan, S. M. Kearney, N. Dimov, M. T. Glynn, J. Ducree; “Event-triggered logical flow control for comprehensive process integration of multi-step assays on centrifugal microfluidic platforms”, *Lab Chip*, **14**, 2249-2258 (2014).
- [93] D. J. Kinahan *et al.*; “Baking Powder Actuated Centrifugo-Pneumatic Valving for Automation of Multi-Step Bioassays”, *Micromachines (Basel)*, **7**, (2016).
- [94] D. C. Duffy, H. L. Gillis, J. Lin, N. F. Sheppard, G. J. Kellogg; “Microfabricated Centrifugal Microfluidic Systems Characterization and Multiple Enzymatic Assays”, *Analytical Chemistry*, **71**, 4669-4678 (1999).
- [95] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. Schueller, G. M. Whitesides; “Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)”, *Anal Chem*, **70**, 4974-4984 (1998).
- [96] Y. Ukita, Y. Takamura; “A new stroboscopic technique for the observation of microscale fluorescent objects on a spinning platform in centrifugal microfluidics”, *Microfluidics and Nanofluidics*, **18**, 245-252 (2014).
- [97] Y. Ren, W. W.-F. Leung; “Numerical and experimental investigation on flow and mixing in batch-mode centrifugal microfluidics”, *International Journal of Heat and Mass Transfer*, **60**, 95-104 (2013).
- [98] 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会; “生理的変動に基づいた臨床化学検査 36 項目における測定の特容誤差限界”, *臨床化学*, **35**, 144-153 (2006).
- [99] S. Hin *et al.*; “Temperature change rate actuated bubble mixing for homogeneous rehydration of dry pre-stored reagents in centrifugal microfluidics”, *Lab Chip*, **18**, 362-370 (2018).
- [100] F. Schwemmer *et al.*; “LabDisk for SAXS: a centrifugal microfluidic sample preparation platform for small-angle X-ray scattering”, *Lab Chip*, **16**, 1161-1170 (2016).
- [101] S. J. Oh *et al.*; “Fully automated and colorimetric foodborne pathogen detection on an integrated centrifugal microfluidic device”, *Lab Chip*, **16**, 1917-1926 (2016).
- [102] F. Schwemmer *et al.*; “Centrifugo-pneumatic multi-liquid aliquoting - parallel aliquoting and combination of multiple liquids in centrifugal microfluidics”, *Lab Chip*, **15**, 3250-3258 (2015).
- [103] W. Al-Faqheri *et al.*; “Development of a passive liquid valve (PLV) utilizing a pressure equilibrium phenomenon on the centrifugal microfluidic platform”, *Sensors (Basel)*, **15**, 4658-4676 (2015).
- [104] M. La, S. M. Park, D. S. Kim; “Centrifugal multiplexing fixed-volume dispenser on a plastic lab-on-a-disk for parallel biochemical single-end-point assays”, *Biomicrofluidics*, **9**, 014104 (2015).
- [105] A. Sayad *et al.*; “A microdevice for rapid, monoplex and colorimetric detection of foodborne

- pathogens using a centrifugal microfluidic platform”, *Biosens Bioelectron*, **100**, 96-104 (2018).
- [106] S. Okamoto, Y. Ukita; “Reflow process using wax for fabricating curved shaped molds of PDMS microchannels and chambers”, *Micro and Nano Engineering*, **8**, (2020).
- [107] T. Abe, S. Okamoto, A. Taniguchi, M. Fukui, A. Yamaguchi, Y. Utsumi, Y. Ukita; “A lab in a bento box: an autonomous centrifugal microfluidic system for an enzyme-linked immunosorbent assay”, *Anal. Methods*, **12**, 4858-4866 (2020).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究を行うのに必要不可欠な知識のご指導、非常に充実した研究環境、非常に有益な助言を賜りました浮田芳昭准教授に心から深謝の意を表します。また、本研究の討論の場で大変有益なご指導、ご助言を賜りました藤森篤教授、岡澤重信教授、野田善之教授、船谷俊平准教授、桑原哲夫准教授に深く感謝いたします。

そして本研究において様々な視点からのご助言を頂き、また有益な議論を交わした浮田研究室の皆様心から感謝の意を表します。

最後に、ここまでの学生生活に対して、長期間に渡る勉学への理解と惜しみない援助をして頂いた家族に深謝の意を表します。

岡本 俊哉

