

## 遠心流体弁への微細周期構造の付与によるイムノセンサの感度化

## Micropatterns on Centrifugal Fluid Valve Enhanced Sensitivity of Immunosensor

○嶋倉 知希 (信州大学 大学院) 町田 佑介 (信州大学 大学院) 山口 昌樹 (信州大学 大学院)

Tomoki SHIMAKURA, Graduate School of Science and Technology, Shinshu University

Yusuke MACHIDA, Graduate School of Science and Technology, Shinshu University

Masaki YAMAGUCHI, Graduate School of Science and Technology, Shinshu University

**Abstract:** Optimizing the use of micro-flow channels as fluid control mechanisms is an effective means of increasing the sensitivity and selectivity of biosensors. The purpose of this study is to clarify the effectiveness of periodic structure applied to fluid control mechanism to improve the hydrophobicity. We evaluated the functionality of centrifugal fluid valve with micrometer sized periodic structure in the micro-flow channel. A disposable compact disc-based chip with centrifugal fluid valve was designed for this evaluation. Cortisol sample and ALP-labelled antibody conjugate solution were dropped simultaneously, afterwards, chemiluminescent substrate was dropped. The substrate was hydrolysed by the ALP and the resultant intensity was measured using an optical reader. The relationship between the intensity,  $I$ , and the cortisol concentration,  $Cort$ , was given by  $I = 12.4 \times 10^5 e^{-0.067Cort}$  (count/gate). Our study suggests that the sensitivity of the cortisol immunosensor was improved by adding the micro-periodic structure on the flow channel.

**Key Words:** Biosensor, Periodic Structure, Hydrophobicity, Fluid Valve, Fluid Control

## 1. 序論

## 1.1 背景

今般、臨床現場での即時診断 (Point of Care Testing : POCT) を可能とするため、小型化された自動分析装置への需要が高まってきており、その実現化のためには、バイオセンサの高性能化が必要とされ、遠心流体制御機構の研究が進められている<sup>(1)(2)</sup>。更に、その技術を応用したバイオセンサの商用化も進められている<sup>(3)(4)</sup>。

しかしながら、一般的な遠心流体弁では、その開閉が素材自体の撥水性に依存しているために、意図的に制御することが難しく、遠心流体機構を構築する場合、遠心流体弁の開閉を構造的または物理的に制御できる機能を遠心流体弁に設置することが必要である。

## 1.2 撥水性制御方法

固体表面の撥水性を制御する方法としては、固体表面に疎水性高分子または界面活性剤を塗布する「化学的」な方法が挙げられる<sup>(5)(6)</sup>が、塗布した被膜自体が剥離することから長期的に撥水性を保持することが難しく、更には塗布した化学物質自体がサンプル溶液に溶解することから化学反応に影響を及ぼすという課題がある。

そこで、固体表面を粗くする「物理的」な方法の研究が進められており、その固体表面に周期構造を付与することで、物理的に撥水性を向上させることが研究されている<sup>(7)</sup>。この物理的に付与した撥水性は、撥水性表面の象徴としてハスの葉が挙げられることから、ロータス効果と呼ばれている<sup>(8)</sup>。またプラスチック樹脂を用いることで、固体表面の周期構造を簡便に補正できると考えられる。

## 1.3 研究目的

本研究では、遠心流体弁による切替特性およびサンプル移動量の向上を図るため、流路に微細周期構造を付与することにより、物理的に撥水性の向上を試み、その有効性の評価を行った。更にはストレス評価の指標とされるコルチ

ゾールに着目し、ヒトの唾液に含まれるコルチゾール濃度基準である 0.1 – 10 ng/mL の範囲で分析することにより、遠心式イムノセンサとしての有用性の評価を行った。

## 2. 実験方法

## 2.1 遠心流体弁

射出成形機 (SD50E, Sumitomo Heavy Industries Ltd.) を用いてコンパクトディスク (CD) 型チップを作製した。CD 型チップは同体積の液槽 2 槽 (幅 5.5 mm, 深さ 0.8 mm, 面積 38.2 mm<sup>2</sup>, 体積 30.5 mm<sup>3</sup>)、空気穴、および微細周期構造を付与した遠心流体弁 (幅 100 μm, 深さ 10 μm, 長さ 4 mm) で構成される (Fig. 1)。

初めに、切削加工機 (ROBONANO α-01B, Fanuc Co.) を用いて金型鋼 (STAVAX, Böhler-Uddeholm Precision Strip AB) 表面に微細周期構造を保有する試験金型を作製した。次に、試験金型の表面パターンをナノインプリント技術<sup>(9)</sup>によりシクロオレフィンポリマー (COP : 1060R, Zeon Co.) に転写することで、遠心流体弁に微細周期構造 (ピッチ幅 48 μm, 深さ 1.4 μm, 歯幅 13 μm) を付与させた。またネガティブコントロールとして、流路内に微細周期構造を付与させていない遠心流体弁を同様に作製した。

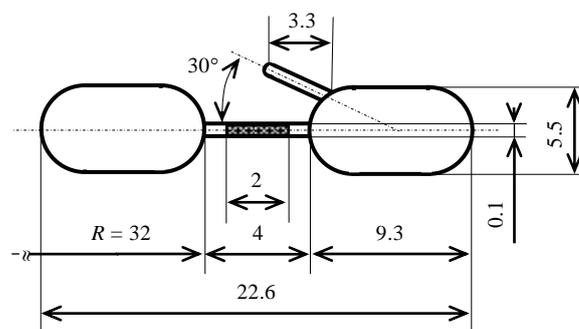


Fig. 1. External view of a centrifugal fluid valve with a micro-periodic structure (units in mm).

## 2.2 遠心流体弁の理論式

遠心流体弁に付与させた流路に遠心力を与えた際，その遠心力が流路に働いている表面張力を上回ることによって，液槽（導入槽）の液体は流路を介し，隣の液槽（反応槽）に移動する原理を利用した。その関係性は次式 (1) で示される。

$$dP / dr (\Delta P) = \rho \omega^2 r \quad (1)$$

$P$  : 表面張力による圧力 [N],

$r$  : CD型チップ中心から流路入口までの距離 [m],

$\rho$  : 密度 [kg/m<sup>3</sup>],

$\omega$  : 角速度 [rad/s]。

式 (1) から圧力損失 ( $\Delta P$ ) が算出でき，流量 ( $Q$ ) はこの圧力損失に比例する。その関係性は次式 (2) で示される。

$$Q = AD^2 \Delta P / 32 \eta L \quad (2)$$

$A$  : 流路における断面積 [m<sup>2</sup>],

$D$  : 流路における直径 [m],

$\eta$  : 蒸留水における粘度係数 [Pa·s],

$L$  : 流路における長さ [m]。

式 (2) から液体の移動時間が算出できると考えられた。

## 2.3 遠心式イムノセンサ

本研究では，抗原抗体反応を用いた高感度な分析方法である免疫測定法を利用した遠心式イムノセンサを提案する。免疫測定法の中でも酵素標識免疫吸着測定 (Enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) 法の競合法に着目した。

初めに，ポリスチレン製パッド (PSパッド : 直径 3 mm, 厚さ 0.5 mm) 表面にコルチゾールおよびウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin : BSA) を混合させた後，4 °C で一晩静置させ，洗浄溶液により未反応物質を除去した。その後，ブロッキング溶液により 37 °C で 1 時間インキュベーションさせ，洗浄溶液により未反応物質を除去した。その PS パッドを乾燥後，CD型チップ上の液槽 1 槽 (反応槽) に設置した。

次に，サンプル溶液 (被測定物質 : コルチゾール) 10  $\mu$ l, およびアルカリホスファターゼ (Alkaline Phosphatase : ALP) を標識させた抗コルチゾール抗体 (ALP 抗体) 10  $\mu$ l を室温で 1 分間混合させた。その後，遠心送液することにより，PSパッド上での競合反応を室温で 1 分間行い，洗浄溶液により未反応物質を除去した。

最後に，発光基質液を 20  $\mu$ l 滴下し，光電子増倍管 (H8259, Hamamatsu Photonics K.K.) を用いて ALP との化学反応による発光強度を 3 分間 (5 - 185 秒間) 測定した (Fig. 2)。本研究で考案した測定システムは，光電子増倍管，0.36 ° のステッピング角を保有するステッピングモーター (PK525HPMA, Oriental Motor Co.) を組み込んでいる遠心装置，および遠心制御装置で構成される。

本研究では，ELISA法の競合法を利用した遠心式イムノセンサを提案するが，その競合法を利用した場合，コルチゾールが低濃度であると，PSパッド上に固定化したコルチゾールと抗原抗体反応する ALP 抗体が多いため，発光強度が高くなる。一方で，コルチゾールが高濃度であると，PSパッド上に固定化したコルチゾールと抗原抗体反応する ALP 抗体が少ないため，発光強度が低くなる。そのため，コルチゾール濃度と発光強度は反比例の関係となる。

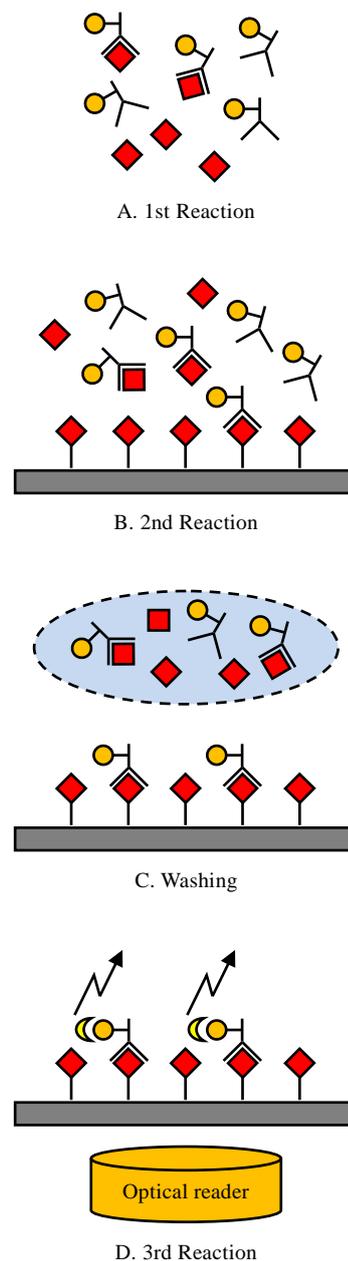


Fig. 2. Principle of an immunoreaction with centrifugal fluid valve.

## 2.4 測定条件

遠心流体弁の流路内に微細周期構造を付与することへの有効性を検証するため，ネガティブコントロールとしての微細周期構造なし (無加工, Type 1), および微細周期構造あり (平行型, Type 2) の計 2 種類とした (Fig. 3)。

血液模擬溶液として，血清 (60 - 80 g/L) の総タンパク量に類似した数値である 80 g/L BSA 溶液に各コルチゾール標準液 (0.1, 1, 3, 10 ng/ml : Salimetrics, LLC.) を混合させた溶液をサンプル溶液とした。

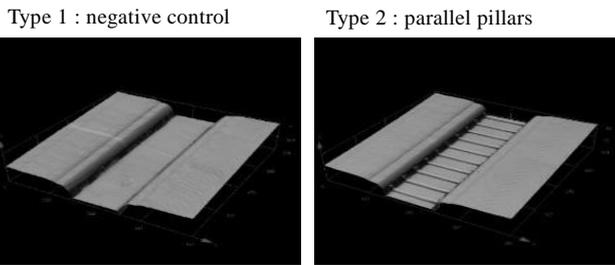


Fig. 3. Two types of flow channels fabricated on a CD-based chip with or without a micro-periodic structure.

### 3. 結果および考察

#### 3.1 サンプル移動量

BSA 溶液におけるサンプル最大移動量は, Type 1 = 69.7% および Type 2 = 87.8% と増加したことから, 微細周期構造を付与することで, サンプル移動量を向上できる可能性が示唆された。

#### 3.2 発光強度

各コルチゾール濃度における3分間の発光強度の差分を算出し, 発光強度 ( $I$ ) およびコルチゾール濃度 ( $Cort$ ) の検量線を作成したところ,

$$\text{Type 1 (無加工)} : I = 9.5 \times 10^5 e^{-0.044Cort} \text{ (count/gate)}$$

$$\text{Type 2 (平行型)} : I = 12.4 \times 10^5 e^{-0.067Cort} \text{ (count/gate)}$$

となり, 発光強度がコルチゾール濃度に反比例する非常に良好な検量線が得られた (Fig. 4)。

また, 各コルチゾール濃度における変動係数 (Coefficient of variation : CV) を算出したところ, Type 1 (無加工) では 16.5–28.3% の範囲に分布した一方, Type 2 (平行型) では 10.9–15.7% の範囲に分布したことから, 微細周期構造を付与することで, バラツキが少なく, 安定した分析が可能なるイムノセンサとなる可能性が示唆された。

更に, Type 2 (平行型) では, Type 1 (無加工) と比較し, 感度勾配が 30% 増大したことから, 微細周期構造を付与することで, イムノセンサの高感度化に有用であると示唆された。

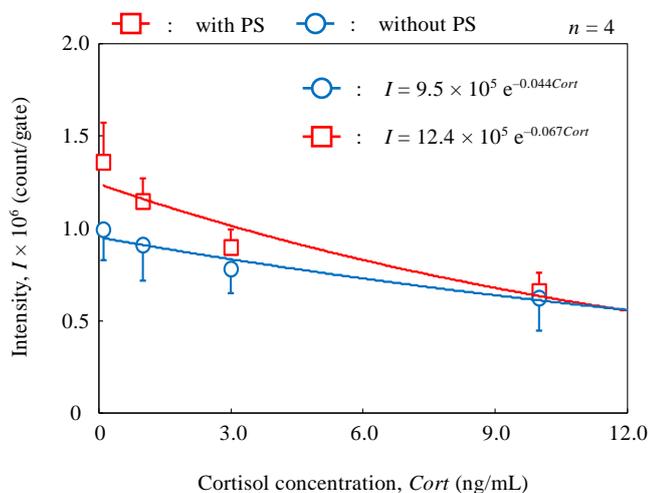


Fig. 4. Comparison of calibration curves between two types centrifugal fluid valves with or without the micro-periodic structure (PS : periodic structure).

### 4. 結論

遠心流体弁に微細周期構造を物理的に付与し, その撥水性を評価し, 更に遠心式イムノセンサの有用性を評価した結果, 以下の事項が明らかとなった。

- (1) 平行型の微細周期構造を付与することで, サンプルの移動量が向上した。
- (2) 平行型の微細周期構造を付与することで, バラツキが少なく, 安定した分析が可能となった。
- (3) 平行型の微細周期構造を付与することで, ヒトの唾液に含まれるコルチゾール濃度である 0.1–10 ng/mL の範囲において, 感度勾配が 30% 増大した。

本研究により, 流体制御機構に物理的な微細周期構造を付与することで, 遠心流体弁を化学的に処理することなく, 遠心式イムノセンサを高感度化できることが示唆された。今後の検討課題として, 煩雑な作業の簡素化, かつ測定時間の短縮化, 更にはヒトの唾液の範囲である 1–3 g/L の BSA 溶液での分析という更なる研究が必要である。

将来的には, 臨床現場での即時診断を可能とする POCT センサへの応用が期待される。

なお本発表は, 論文 ”Tomoki Shimakura and Masaki Yamaguchi : Application of hydrophobic micropatterns to centrifugal fluid valve for biosensor., *Journal of Adhesion Science and Technology*, Vol.29, 23, pp.2565–2575, 2015” のデータを一部引用した。

### 参考文献

- (1) R. Gorkin *et al.* : “Centrifugal microfluidics for biomedical applications”, *Lab on a Chip*, 10, pp.1758–1773, (2010)
- (2) T.H. Kim, *et al.* : “Fully integrated centrifugal microfluidic platform for electrochemical biomarker detection”, *15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, pp.1668–1670, (2011)
- (3) M. Madou *et al.* : “Lab on a CD”, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8, pp.601–628, (2006)
- (4) K. F. Lei : “Microfluidic systems for diagnostic applications: A review”, *Journal of Laboratory Automation*, 17, pp.330–347, (2012)
- (5) V. Biju : “Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy”, *Chemical Society Reviews*, 43, pp.744–764, (2014)
- (6) E. S. Redeker *et al.* : “Protein Engineering For Directed Immobilization”, *Bioconjugate Chemistry*, 24, pp.1761–1777, (2013)
- (7) R. Fürstner *et al.* : “Wetting and self-cleaning properties of artificial superhydrophobic surfaces”, *Langmuir*, 21, pp.956–961, (2005)
- (8) A. Solga *et al.* : “The dream of staying clean: Lotus and biomimetic surfaces”, *Bioinspiration and Biomimetics*, 2, pp.126–134, (2007)
- (9) C.C. Yu, *et al.* : “Nanoimprint technology for patterning functional materials and its applications”, *Microelectronic Engineering*, 132, pp.98–119, (2015)