

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750063

研究課題名（和文） コンパクトディスク型表面プラズモン共鳴センサの開発

研究課題名（英文） Development of Compact Disk Type Surface Plasmon Resonance Sensor

研究代表者

中嶋 秀 (NAKAJIMA HIZURU)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号：10432858

研究成果の概要（和文）：本研究では、CD型マイクロチップとその回転装置を開発し、CDの回転による遠心力を利用した送液法を開発した。これにより、ポンプレス・バルブフリーの送液を実現した。また、反射型グレーティング方式のSPR光学系を開発し、開発したCD型SPRセンサによるIgAの測定に成功した。本研究で開発したCD型SPRセンサは、ポンプ不要でシステム全体の小型化が可能なので、オンサイトでの環境測定やベッドサイドでの医療検査に極めて有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A compact disk (CD) type microfluidic device and a rotation device were developed and the flow control based on centrifugal force was evaluated. The introduction sequence of the several solutions into the microchannel could be controlled by changing the rotation speed of the CD. An SPR sensor based on grating coupler was developed and the sensor was successfully applied to the determination of IgA. The SPR sensor developed in this study does not require expensive prism and matching oil. Since the pumps and valves are unnecessary, the sensor would be useful for on-site analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：チップ分析

## 1. 研究開始当初の背景

我々人間社会を豊かで安全で住みよいものにするには、科学技術研究に携わるもの使命である。近年、人類が作り出した数々

の化学物質の中には人体に有害であるものも多く、ダイオキシンをはじめとする有害化学物質による環境汚染が社会問題になっている。また、食生活に目を向けると、食の安

全性を脅かす農薬や O-157 などの細菌による食品の汚染,あるいは食品の銘柄や産地を偽装した事件などが次々と明らかになっている。また、医療の分野では、新型インフルエンザなどの新興感染症が世界的に流行し、人類に脅威を与えている。

河川等において汚染物質を迅速に測定できれば、環境汚染の防止対策が迅速に行える。また、食品分析を迅速に行えれば、食品(特に輸入食品)の全検査が可能となり、食の安全を確保できると考えられる。また、感染症への感染の有無を迅速に検査できるシステムがあれば、それを空港等に設置することにより感染症の日本への流入を未然に防止できる可能性がある。

しかし、これらの分析や検査において使用される市販の装置は高価であるものが多く、測定に時間を要し、またオンサイトで測定できるようなポータブルではない。このため、現場で、誰もが、簡便、迅速かつ高感度に測定できる新しい分析システムの開発が求められている。

## 2. 研究の目的

著者らはこれまでに、小型でポータブルな表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサ(170 mm (w) × 110 mm (D) × 150 mm (H), 約 1.5 kg)を開発している<sup>1-3)</sup>。本センサは、一つの LED 光源からの光を線焦点としてセンサチップに入射し、その反射光をリニア CCD で検出することにより、線焦点上の多点での同時計測を可能にした、屈折率感度  $10^{-6}$  RIU を有する高感度センサである。しかし、センサそのものは小型であるものの、複数のセンシングポイントに試薬や試料を送液するためには、多数のポンプとバルブが必要になるので、システム全体としては大型化する。このため、オンサイトでの使用にはなお問題を残していた。

そこで本研究では、ポンプやバルブを全く使用しない、真にポータブルなマイクロ化学分析システムを開発することを目的として、コンパクトディスク(CD)型マイクロチップを用いる SPR センサについて検討を行った。すなわち、CD 上に多数の溶液溜めとマイクロチャネルを作製し、CD の回転による遠心力を利用してマイクロチャネル内に試薬及び試料を導入し、試料中の各成分をマイクロチャネル内壁に固定した種々のレセプタータンパク質との相互作用により分離した後、SPR 現象を利用して多成分を同時に検出する、新規オンサイト測定用マイクロ化学分析システムを試作し、その性能を評価した。

## 3. 研究の方法

### (1) CD 型マイクロチップ

図 1 に CD 型マイクロチップの鋳型となる凸型テンプレートの作製方法を示す。

シリコン基板上にネガ型フォトレジスト(SU-8)を滴下し、500 rpm で 20 秒間回転させた後、さらに 2000 rpm で 20 秒間回転させた。この基板を 95°C で 10 分間ベークした後、目的流路を描写したフォトマスク(図 2)を重ね、紫外線を露光した。次に、95°C で 3 分間ベークした後、専用現像液で現像し、さらに 200°C で 3 分間ベークして、マイクロチップの鋳型となる凸型テンプレートを作製した。

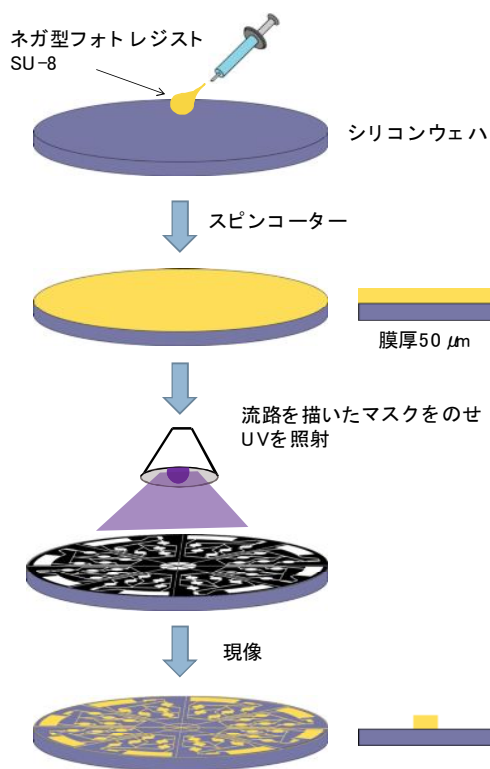


図 1 CD 型マイクロチップのテンプレートの作製方法

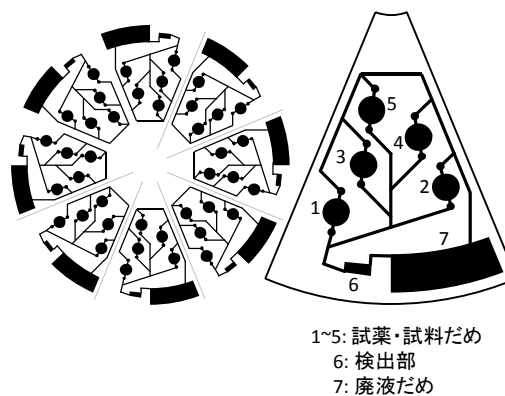


図 2 フォトマスク

このテンプレートをを用いてポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロチップを作製した。図 3 にマイクロチップの作製方法を示す。テンプレート上に触媒を添加した PDMS プレポリマーを流し込み、60°C で 1 時間ベークして硬化させた。これをテンプレートから剥離し、溶液溜め用の穴 (直径 4mm) を開けた後、金を蒸着した (100nm) グレーティングフィルム (1000 本/mm) を貼ったポリカーボネートディスクと張り合わせ、図 4 に示すような CD 型マイクロチップ (直径 12 cm) を作製した。マイクロチャネルの幅は 500  $\mu\text{m}$ 、深さは 50  $\mu\text{m}$  である。

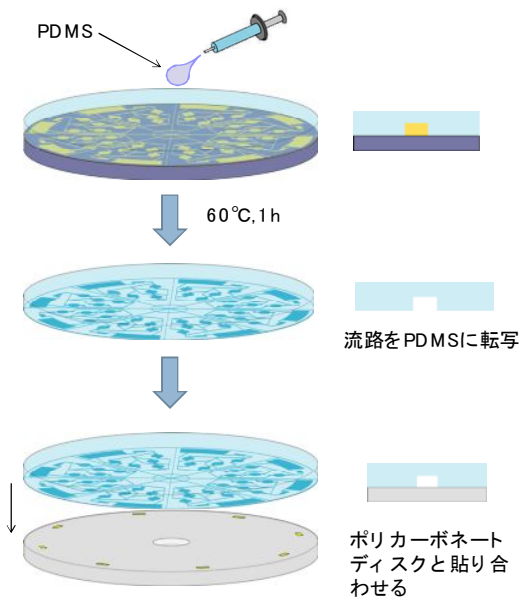


図 3 CD 型マイクロチップの作製方法



図 4 作製した CD 型マイクロチップ

#### (2) ターンテーブル

CD 型マイクロチップを回転させるためのターンテーブルを作製した。図 5 に示すように、本ターンテーブルは電圧を変化させることにより回転数を 60 rpm から 7895rpm まで制御できる。

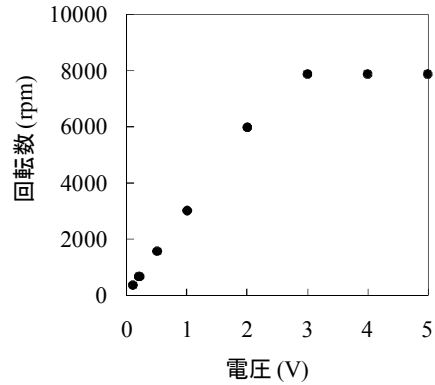


図 5 ターンテーブルの電圧と回転数の関係

#### 4. 研究成果

##### (1) 遠心力を利用した送液

CD 型マイクロチップを回転させたときの溶液溜め内の力の釣り合いを図 6 に示す。

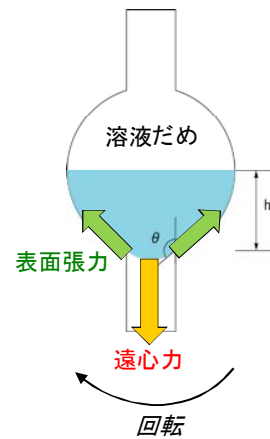


図 6 CD 型マイクロチップを回転させたときの溶液だめ内の力の釣り合い

いま、CD 型マイクロチップを角振動数  $\omega$  で回転させたとき、中心から距離  $R$  にある溶液溜めにかかる遠心力による重力加速度  $g_c$  は次式で表される。

$$g_c = R\omega^2 \quad (1)$$

しかし、流路が疎水性の場合、溶液は表面張力により流れ出ることにはできない。溶液溜めの出口の形状を円と仮定し、出口の換算半径を  $r$  としたとき、溶液溜め出口にかかる表面張力  $\gamma$  は次式で表される。

$$\gamma = 2\pi r \cos \theta \quad (2)$$

ここで、 $\theta$  は接触角である。一方、溶液に加速度  $a$  がかったとき、溶液

溜め出口にかかる力 $P$ は次式で表される。

$$P = \pi r^2 \rho a h \quad (3)$$

ここで、 $\rho$ は溶液の密度、 $h$ は溶液の遠心方向における深さ(厚さ)である。 $\gamma = P$ のとき、溶液溜めが溶液を保持できる限界である。したがって、式②と式③より、溶液が流れ出るために必要な加速度 $a$ が求められ、次式で表すことができる。

$$a = \frac{-2\gamma \cos \theta}{r \rho h} \quad (4)$$

$a_c = a$ のとき、図5のように溶液にかかる力が釣り合い、 $a_c > a$ のとき、溶液は溶液溜めより流れ出る。したがって、式①と式④より溶液の流れ出る回転数 $f$  (rpm)を計算すると、次式が導かれる。

$$f = \frac{60}{2\pi} \sqrt{\frac{2\gamma \cos \theta}{R r \rho h}} \quad (5)$$

したがって、回転数を制御することにより、CD上の各溶液溜めからの溶液の溶出順を制御できると考えられる。

そこで、熱流体解析ソフトウェア FLUENT6.2 を用いて、遠心力による送液のシミュレーションを行った。その結果、図7に示すように、CDの回転数を変化させることにより溶液の流れを制御できることがわかった。

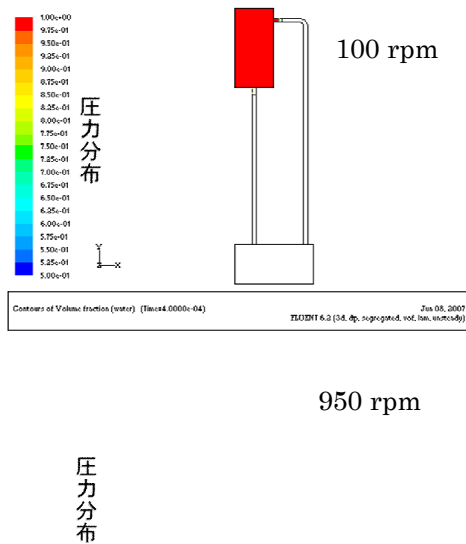


図7 遠心力による送液のシミュレーション

そこで、作製したCD型マイクロチップの溶液溜めに色素溶液を中心に近い液溜めより20, 25, 30, 35, 40  $\mu$ Lずつ加えてチップを回転させたときの溶液の流れを観察した。図8に溶液が流れる様子を、また、図9に溶液溜めの位置と流出開始時の回転数の関係を示す。回転数が増加するにしたがって、CD型マイクロチップの外側の溶液溜めから溶液が順番に流れだすことを確認した。

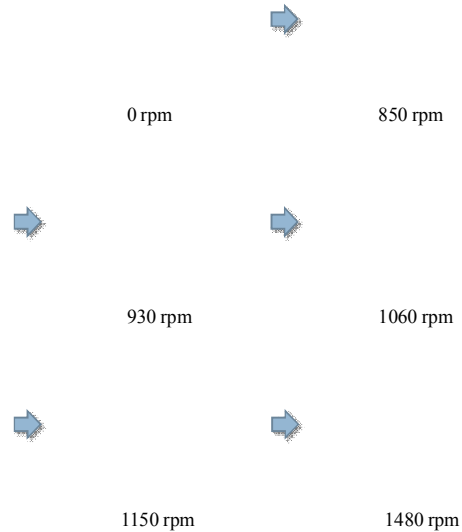


図8 CDの回転により液だめから溶液が流れ出る様子

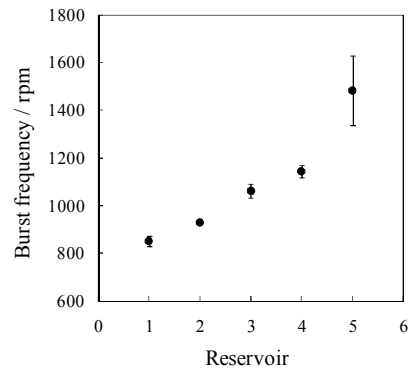


図9 溶液だめの位置と流出開始時の回転数の関係

(2) SPR センサ光学系

SPR センサの光学系としては、図 10 に示すようなクレッチマン型配置の光学系が汎用されているが、センサチップとプリズムを密着させるためにマッチングオイルなどが必要である。また、この光学系を回転型 SPR に展開する場合、高価なプリズム部分も CD 上に形成する必要があるため、低コスト化は困難である。そこで、図 11 に示すような反射型グレーティング方式の SPR 光学系を考案した。この光学系は、マッチングオイルとプリズムが不要なので、安価にセンサチップを製作できるという利点を有している。

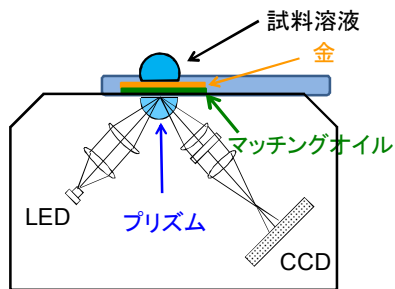


図 10 クレッチマン型配置 SPR 光学系

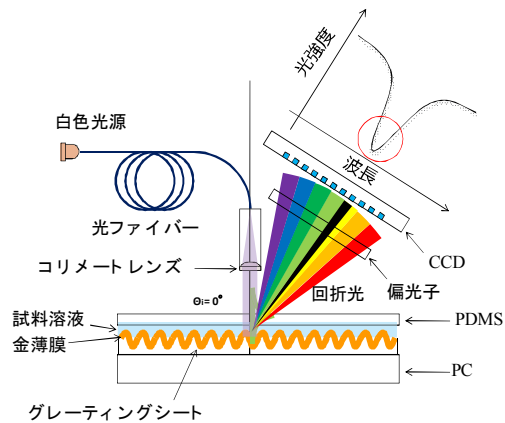


図 11 反射型グレーティング方式 SPR 光学系

光源として白色光を用い、これをマルチモード型光ファイバーに導入してファイバークリメーターにより直径 3 mm の平行光とした後、CD 型マイクロチップの検出部(グレーティング部位)に垂直に照射した。反射光として得られた回折光を偏光子を通してリニア CCD センサ上に投影して検出した。図 12 に開発した CD 型 SPR センサを示す。

CD 型マイクロチップ上の溶液のために 0~

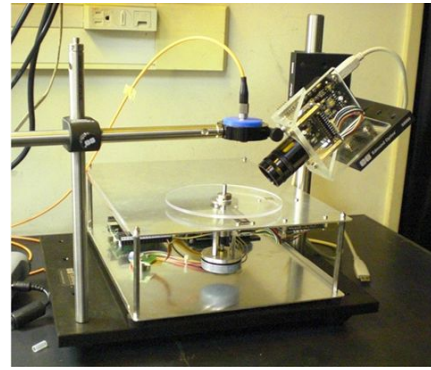


図 12 開発した CD 型 SPR センサ

1000mM のスクロース溶液を入れ、CD の回転数を変化させてこれらの溶液を順次検出部に導入し、測定を行った。図 13 にスクロース溶液に対するセンサ応答を示す。共鳴波長はスクロース濃度が増加するにしたがって長波長側にシフトした。また、スクロース濃度と波長変化量をプロットした検量線は図 14 に示すように良好な直線関係を示し、本光学系と CD 型マイクロチップを用いて SPR 測定が可能なが確認された。

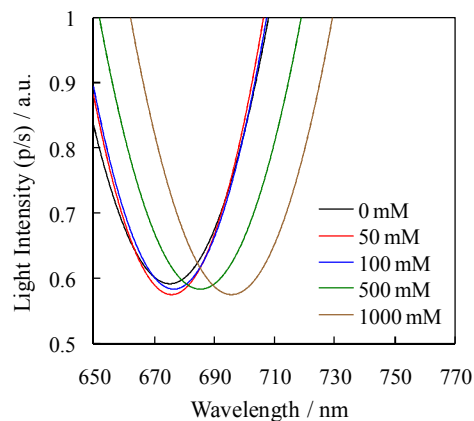


図 13 スクロースに対するセンサ応答

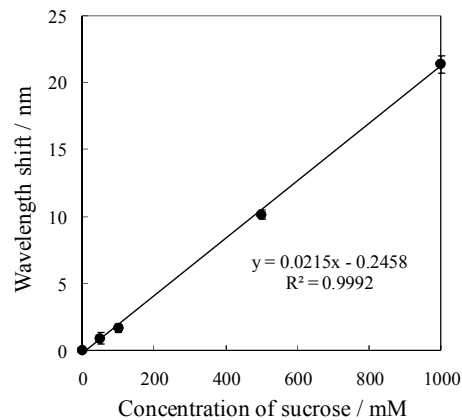


図 14 スクロースに対する検量線

### (3) 免疫測定への応用

ストレスマーカーの一種であるイムノグロブリン A (IgA) の測定を行った。CD を回転させて Tris-HCl 緩衝液, 抗 IgA 抗体, BSA, IgA および Tris-HCl 緩衝液を順次検出部に導入し, SPR 測定を行った。そのときのセンサ応答を図 15 に示す。IgA の吸着に基づく共鳴波長のシフトが観察され, CD 型 SPR センサによる免疫測定に成功した。

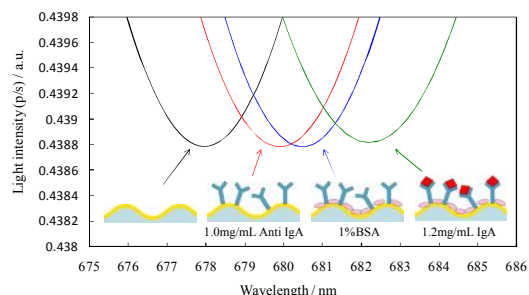


図 15 IgA に対するセンサ応答

### (4) 参考文献

- ① A. Hemmi, T. Imato, Y. Aoki, M. Sato, N. Soh, Y. Asano, C. Akasaka, S. Ohkubo, N. Kaneki, K. Shimada, “Development of palm-sized differential plasmon resonance meter based on concept of Sprode”, *Sens. Actuators B*, **108**, 893-898 (2005).
- ② H. Nakajima, Y. Harada, Y. Asano, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Imato, N. Soh, A. Hemmi, “A palm-sized surface plasmon resonance sensor with microchip flow cell”, *Talanta*, **70**, 419-425 (2006).
- ③ H. Nakajima, A. Hemmi, K. Furui, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, “Development of portable surface plasmon resonance sensor with multi detection point”, *μTAS2007*, 1053-1055 (2007).

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文] (計 4 件)

- ① Hemmi, H. Nakajima, A. Moto, T. Usui, T. Tobita, N. Soh, K. Nakano, K. Uchiyama, T. Imato, A Surface Plasmon Resonance Sensor on a Compact Disk-Like Microfluidic Device, *Proceedings of the μTAS 2009*, 査読有, p. 998-1000 (2009).

#### [学会発表] (計 10 件)

- ① A. Hemmi, T. Tobita, A. Moto, T. Imato, T. Usui, K. Uchiyama, H. Nakajima, A surface plasmon resonance sensor on a compact disk-like microfluidic device, *Pittcon2010*, Orland, Florida, USA, (2010.03.01)
- ② A. Hemmi, H. Nakajima, A. Moto, T. Usui, T. Tobita, N. Soh, K. Nakano, K. Uchiyama, T. Imato, A Surface Plasmon Resonance Sensor on a Compact Disk-Like Microfluidic Device, *μTAS 2009*, Jeju, Korea, (2009.11.3).
- ③ 白井崇, 本明紘, 辺見彰秀, 飛田達也, 宗伸明, 中野幸二, 今任稔彦, 中嶋秀, 内山一美, コンパクトディスク型表面プラズモン共鳴センサの開発, *東京コンファレンス 2009*, 幕張メッセ国際会議場, (2009.09.04).
- ④ H. Nakajima, A. Hemmi, A. Moto, T. Tobita, N. Soh, K. Nakano, T. Imato, A Surface Plasmon Resonance Sensor on a Compact Disk-Like Microfluidic Device, *Pittcon 2009*, Chicago, USA, (2009.03.09).
- ⑤ 本明紘, 辺見彰秀, 飛田達也, 中嶋秀, 宗伸明, 中野幸二, 山崎吉一, 諸岡成治, 今任稔彦, コンパクトディスク型表面プラズモン共鳴センサの開発, *第 18 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会*, 京都大学, (2008.12.09).
- ⑥ 本明紘, 辺見彰秀, 飛田達也, 中嶋秀, 宗伸明, 中野幸二, 山崎吉一, 諸岡成治, 今任稔彦, コンパクトディスク型表面プラズモン共鳴センサの開発, *日本分析化学会第 57 年会*, 福岡大学, (2008.09.10).
- ⑦ 本明紘, 辺見彰秀, 飛田達也, 中嶋秀, 宗伸明, 中野幸二, 山崎吉一, 諸岡成治, 今任稔彦, コンパクトディスク型マイクロチップを用いるポンプレス流れ分析法に関する基礎的検討, *日本分析化学会第 69 回分析化学討論会*, 名古屋国際会議場, (2008.05.15).

#### [その他]

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/uchiyama/>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

中嶋 秀 (NAKAJIMA HIZURU)

首都大学東京・都市環境科学科・准教授

研究者番号: 10432858