

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760104

研究課題名（和文）毛細管力を利用した血漿分離チップの開発

研究課題名（英文） Plasma separation chip driven by capillary force

研究代表者

坂元 博昭（SAKAMOTO HIROAKI）

立命館大学・総合理工学研究機構・ポスドクトラルフェロー

研究者番号：70552454

研究成果の概要（和文）：

本研究では、1 滴の血液から高効率に血漿分離を行うことを目的とし、毛細管力のみを駆動力とした血漿分離チップの開発を行った。2 μ m の隙間を微細加工技術により形成させ赤血球と血漿を分離することを企図した。作製したマイクロデバイスへ血液を導入すると 3 分以内に 200 ナノリットルの血漿を得ることに成功した。本デバイスは、毛細管力を駆動力とするためシステム全体の小型化およびポータブル装置として最適である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, a microdevice driven by capillary action has been developed for the high-throughput on-chip separation of plasma from a drop of blood. In order to separate plasma from blood, we designed 2 μ m deep array channels to filter the red blood cells. After injection of a blood sample, the plasma flowed rapidly and arrived at the outlet within 3 min, demonstrating a 100% separation ratio of red blood cells. Because the proposed blood separation device is driven solely by capillary action, it is possible to miniaturize it as an entire system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学、生産工学・加工学

キーワード：血漿分離、マイクロ流路、微細加工、マイクロ TAS、電気化学、血液検査、表面処理

1. 研究開始当初の背景

1989年、Manzらにより分析に必要な一連のプロセスをチップ上に集積することによって網羅的・高効率に分析する μ TAS(Micro Total Analysis System)という概念が提唱された。 μ TASの概念は、医療分野におけるDAN、タンパク質、細胞の機能解析ツールとして期待されている。特に血液成分の解析は、健康状態を把握する上で重要な情報となることから、様々なデバイス開発が先駆的に行われてきた。

医療分野、特に血液検査へ目を向けると、これまで血液検査は、特定の病院もしくは試験場においてのみ検査が可能であり、検査時間を要した。この血液検査を μ TASとして応用することができれば、患者宅や救急現場などあらゆる場所で、迅速、簡便に精度の高い診断を可能とするPOCT(Point of Care Testing)や個別化医療が実現する。そして、現在、国の方策でも開業医、往診などでの患者近くの医療推進や小型検査装置の開発へ重点が置かれている。

血液分析は、患者からの採血、分離、分析というプロセスが必要である。血液は、赤血球と血漿に大別され、健康状態を示す分子マーカーの多くは血漿中に多く含まれる。よって、血液成分を正確に分析するためには、血液から血漿を分離しなければならない。血漿分離を行うため、患者から採取した血液をチップ上で遠心力、誘電泳動、ポンプ圧により分離し、計測することで、分子マーカーの有無を分析するバイオチップがこれまでに報告されている。そして、一部のデバイスは現在市販され医療現場で利用されている。しかし、外部からの駆動力を必要とするため装置が大型化し、往診・その場(オンサイト)分析に不向きである。

2. 研究の目的

オンサイト(その場)分析を可能とする小型分析チップは日々の健康管理、予防、早期発見といった医療への貢献が期待される。これまでに報告されている血液検査チップは、外部駆動力を必要とするためポンプ、シリンジ、電源が必要であるため、携帯性に問題がある。本研究では、毛細管力に着目し、外部駆動力を使わず、自発的に送液させることを可能とした新規血漿分離チップの開発を目的とした。同時に、分離された血漿中に含まれる血液成分分析を可能とする電気化学センサも開発する。近年患者が増加傾向であり痛風・腎障害の原因物質である尿酸(uric

acid)を測定対象とした。

3. 研究の方法

(1) デバイス設計

本デバイスシステムは、「血漿分離ユニット」「スクリーニングユニット」「出力ユニット」の3つのユニットから構成される。血漿分離ユニットは微細加工技術により作製したマイクロフィルターを用いて赤血球と血漿を分離する。スクリーニングユニットでは、尿酸測定において夾雑物となるアスコルビン酸やタンパク質の影響を除去するための電気化学処理および電流計測を行う。出力ユニットは電気化学測定用の小型ポテンショスタット装置であり、電流値の演算・出力を担う。

赤血球の大きさは、直径 $7\mu\text{m}$ 、高さ $2\sim 3\mu\text{m}$ である。そこで、 $2\mu\text{m}$ の隙間を形成させることで赤血球と血漿を分離できるのではないかと考えた。したがって、柱の高さを $2\mu\text{m}$ に制御した構造体を設計した。

本研究の「血漿分離・電気化学センサ」チップは、毛細管力をポンプ駆動力としているため外部からの駆動力を必要としないという特徴がある。これまでに報告されている血漿分離マイクロ流路は、遠心力、誘電泳動、ポンプ圧を駆動力としている。しかしながら、外部駆動力を必要とした場合、シリンジポンプ、チューブ、電源などを必要とするためシステム全体が大型化してしまい、POCTには向いていないと考えられる。

研究代表者が設計したチップは、数ミクロンスケールの非常に細い流路であり、さらに流路表面へ親水化処理を施しているため、強い毛細管力が働く。血漿分離からスクリーニング(電気化学処理)の一連のプロセスにおいて、毛細管力をポンプとするために自動的に送液され外部駆動力を必要としない。したがって、本デバイスシステムは、小型化およびポータブル型に適していると考えられる。

(2) デバイス作製

デバイス材料は、安価で成型が容易なPMMA(ポリメタクリル酸メチル)を用いた。予めフォトリソグラフィおよびドライエッチングにより作製したSiウェハを鋳型として、Hot embossing ProcessによりPMMAデバイスを成形した。PMMAとSi型をチャンバー内へ固定しチャンバー内を 150°C にする(PMMA $T_g=105^\circ\text{C}$)。その後、 1000N でSi型をPMMAへ押し込み、チャンバー内を 80°C まで冷却後Si型を引き上げることでPMMA成形を行った(Fig. 1)。PMMA成形品へ酸素ブ

ラズマ照射を行うことにより PMMA 表面の親水化処理を行い、PMMA のフタを接合せさることによって血漿分離ユニットを作製した。さらに、0.1%の Poly-L-Lysine を PMMA 表面へ吸着させることによって流路内の親水性を向上させた。

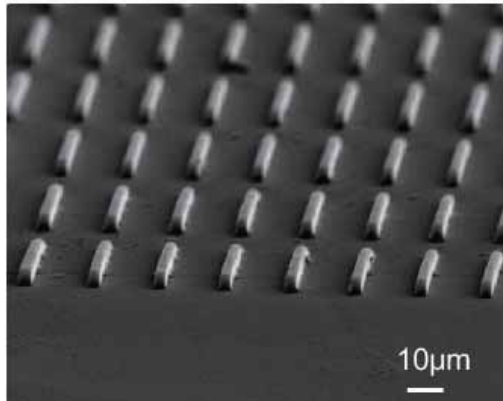


Fig.1 SEM images of PMMA microfluidic device

(3)尿酸センサの開発

マイクロ流路によって分離された血漿中には、測定対象となる尿酸以外に様々な物質（無機イオン、タンパク質、脂質など）が混在している。血漿中の尿酸濃度を正確に測定するためには、血漿中から尿酸を抽出してくるスクリーニング(ふるい)プロセスが必要である。一般に尿酸測定法は、比色定量法、分光計測、クロマトグラフィー、電気化学測定などが用いられている。本研究では、デバイス化が容易で迅速な尿酸量が可能な電気化学測定を用いた。血漿中の尿酸濃度を電気化学的に測定する場合、アスコルビン酸(Ascorbic acid) (ビタミンC)の影響を受ける。アスコルビン酸は、尿酸と非常に酸化電位が近いため測り分けが困難である。

本研究では、 Cu^{2+} がアスコルビン酸を選択的に酸化することに着目した尿酸センサを開発した。尿酸とアスコルビン酸が共存した溶液中で、 Cu^{2+} は尿酸を酸化せずに、アスコルビン酸へ選択的酸化反応がおこることが知られている。この反応を利用して、アスコルビン酸を予め酸化させて尿酸だけを電極で測定することを企図した。

尿酸診断値である 8 mg/dL の尿酸溶液とアスコルビン酸とを溶解したリン酸緩衝液(pH 7.2)を測定溶液とした。あらかじめ、1 mM 銅溶液中で還元電解により銅を析出させたカーボン電極を作用電極とし、対極には Pt コイ

ル電極、参照電極として Ag/AgCl の三電極系により電気化学測定を行った。電解条件は、LSV(Linear Sweep Voltammetry)により 0mV ~ +900mV まで 100 mV/s で電位走査させ、尿酸の酸化電流を測定した。

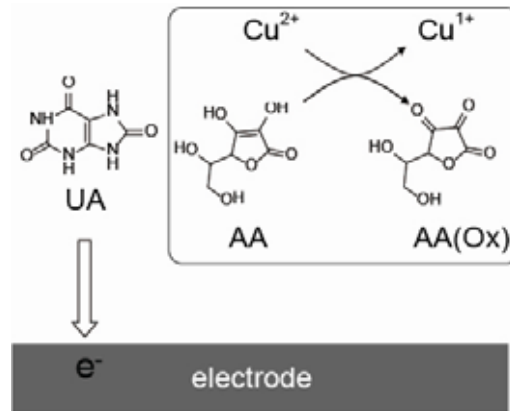


Fig.2 Hypothetical illustration of uric acid detecting system, based on selective oxidation of ascorbic acid by Cu(II)

4 . 研究成果

(1) 血漿分離評価

血漿分離評価は、ヒト血液を用いて行いデバイス導入口へ 10µl の血液を注入した。その後、流路内をデジタル顕微鏡により観察した。血液導入後、流路入り口で赤血球が分離され、3分で流路出口まで血漿が流れ200nLの血漿を獲得した。流路内を観察したところ、赤血球は一切観察されず、分離効率は 100%であった。この血漿分離チップは、外部からの駆動力を一切必要とせず、毛細管力をポンプとして分離を行っている。

(2) 尿酸センサの開発

銅めっきを施したカーボン電極に対し、+100 mV vs. Ag/AgCl で 5 秒間電位印加することによって電極表面から Cu^{2+} を溶出させた。その後、LSV 測定を行ったところ、アスコルビン酸含有の尿酸溶液においてアスコルビン酸の影響を受けず、尿酸濃度に依存した酸化電流応答が得られた。(Fig. 3)これは、電極表面から溶出した Cu^{2+} によって、アスコルビン酸が酸化体となることで電気化学的に不活性となったため、尿酸だけの酸化電流を検出できたと考えられる。この Cu^{2+} による酸化反応は、尿酸には作用せずアスコルビン酸へ選択的に作用する。本検出法は、電極表面近傍において局所的に Cu^{2+} を供給させることができるため、選択性の向上、高感度化へつながることが期待される。

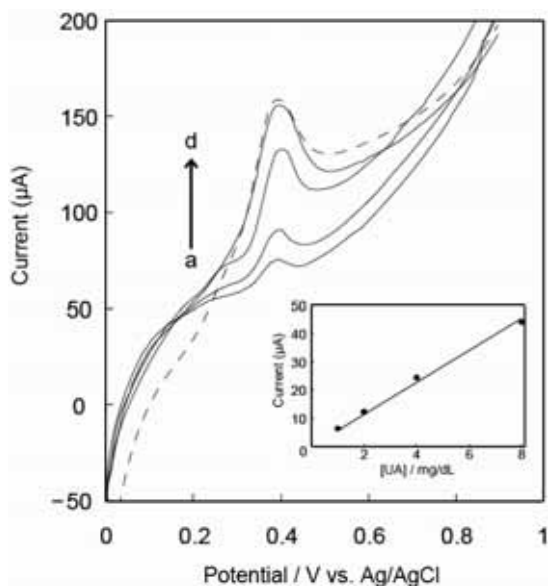


Fig.3 LSVs obtained for the mixture containing different concentrations of UA and AA in PBS (pH 7.4) at copper deposited electrode. AA (10 mg/dL) and UA (a-d: 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/dL) (solid line); AA (5 mg/dL) and UA (8 mg/dL) (dotted line). Inset: Dependence of oxidation peak current for UA on the concentration

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2件)

Hiroaki Sakamoto, Ranko Hatsuda, Kazuhiro Miyamura, and Susumu Sugiyama, "Plasma separation PMMA device driven by capillary force controlling surface wettability", *Micro & Nano Letters*, **7**, (2012), p.64-67 査読有

Hiroaki Sakamoto, Ranko Hatsuda, Kazuhiro Miyamura, Haruki Shiraishi and Susumu Sugiyama, "Electrochemical Selective Detection of Uric Acid Using a Copper-modified Carbon Electrode", *Analytical Science*, **27**, (2011), p.333-335 査読有

[学会発表](計5件)

坂元博昭、初田蘭子、宮村和宏、白石晴樹、杉山進、「電気化学計測を行うマイクロ流路の最適な構造設計」、第28回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、タワーホール船堀(東京都)、2011年9月26日

Hiroaki SAKAMOTO, Ranko HATSUDA, Kazuhiro MIYAMURA, Haruki SHIRAISHI and Susumu SUGIYAMA,

"Blood plasma separation PMMA device using capillary phenomenon and its application for Point Of Care Testing device", Pacificchem2010, 18th 2010.12.18, Hawaii, U.S.A.

Hiroaki SAKAMOTO, Ranko HATSUDA, Kazuhiro MIYAMURA, Haruki SHIRAISHI and Susumu SUGIYAMA, "Design and fabrication blood plasma PMMA chip using capillary phenomenon", 2010 Int'l Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science & Micro-Nano Global COE (MHS2010), 8th November, Nagoya, (愛知県), 2010.10.8.

坂元博昭、初田蘭子、宮村和宏、白石晴樹、杉山進、「銅修飾カーボン電極による尿酸の選択的検出」、日本分析化学会第59年会、東北大学(宮城県)、2010年9月17日

坂元博昭、初田蘭子、宮村和宏、白石晴樹、杉山進、「血漿分離、スクリーニング、検出」を集積したオンサイト型血液診断装置の開発、第20回マイクロエレクトロニクスシンポジウム、立命館大学(滋賀県)、2010年9月10日

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂元 博昭 (SAKAMOTO HIROAKI)

立命館大学・総合理工学研究機構・ポスドク
クトラルフェロー

研究者番号：70552454