

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25249027

研究課題名(和文)ペーパーマイクロ検査チップ及びシステム化技術に関する研究

研究課題名(英文)Study on paper micro analysis chip and the system integration

研究代表者

三宅 亮 (Miyake, Ryo)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50417052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,500,000円

研究成果の概要(和文)：低コスト化と医療廃棄物処理負荷軽減を可能とする「紙」を基材とした検査チップ技術基盤の創出を目指す。特にチップ上の極微量液の検出技術の開発や、検査装置を試作し、実用化に向けての課題抽出と解決策導出を目的とした。これに対して微量液の吸光度測定のために、熱レンズ効果向光透過セルを創案・試作、また電解質濃度測定のために、交流インピーダンス測定系(10 kHz)用の金薄膜電極(膜厚100~150nm)付流路(40um x5mm)を創案・試作した。これらを用いて極微量液(~1uL)の吸光度(644nm)や電解質濃度(Naイオン)の計測が可能であることを示した。さらに検査装置を試作し、一連の動作を確認した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to enhance analysis-chip technologies based on paper material to allow us to reduce manufacturing cost and environmental load caused by medical wastes. We were aiming at developing a detection method for small amount of sample on a paper analysis chip and prototyping an automatic analysis system in order to envision problems and propose solutions towards practical use. Consequently, a micro detection cell for an absorptiometry with thermal lens effect and thin gold electrodes ($t=100\sim 150\text{nm}$) for an alternating current impedance measurement (10kHz) were designed and fabricated on paper chips. They allowed us to measure an absorbance (644nm) of trace amount of sample (~1uL) and signal related to electrolyte (Na^+) in the sample. In addition, we prototyped an automatic analysis system with including newly developed detectors, reagent dispensers, paper-chip precision positioning mechanism etc. This system successfully demonstrated cooperative automatic operation.

研究分野：MEMS

キーワード：マイクロ流体デバイス 紙 医用検査装置 情報機構

1. 研究開始当初の背景

MEMS 技術は微小なセンサの実現や微量液操作に有利であることから、当初から医療分野、特に問診や往診先などの現場、災害など救急現場等が重要な応用先と目されてきた。しかしながら真に実用的な検査チップを提供するためには、①大型の検査装置に匹敵する分析性能、②非熟練者でも扱えるように検査の全自動化、③感染防止のために使い捨て、材料・製造コストを極めて低廉に、④診断チップの無害化容易、環境に優しい廃棄処理といった特徴を持たせることが不可欠である。特に④に関して、近年プラスチックへの転写成形等による MEMS 製造技術が開発され、微細な構造を持つ使い捨て検査チップの製造が可能になりつつあるが、血液試料を内包したチップでは採血管などと同様に無害化処理に多大な手間と処理コストが必要となる。現在国内での医療廃棄物の年間発生量は少なく見積もっても 10 万トン以上に上っており、これに検査チップが現場に上積みされることを想定すると、早期に解決しておかねばならない喫緊の課題である。これに対して、応募者らは、プラスチックに代わり、焼却性がよく環境への影響も少ない「紙」を基材としたペーパー検査チップを提案し、それに好適な新しい製造技術・デバイス技術の開発を科研費(挑戦的萌芽研究、平成 21 年度~22 年度)の中で実施してきた。ペーパー検査チップを実用化するためには (i) 紙の不得意とする液状試薬を送液可能とすること、(ii) 紙チップ上で試料の秤量や試薬との混合反応など全自動化、(iii) 安定した分析性能の 3 つが要件である。なお紙素材でペーパー検査チップを実現しようという研究は、ここ数年、世界的に起こりつつあるが、紙の吸水性を利用して液体を流動化させるというものであり、これは従来のペーパークロマトグラフィ同様、紙繊維の組成や、液体の濡れ性、湿度などの環境条件により液体の移動度が大きく変動するため、医用検査にとって不可欠な要件である定量性(定流量送液、秤量)の観点から、現状では不適合と言わざるをえない。応募者らは (i) の要件に対して、耐水性フィルム(ポリプロピレン:厚み 20 μ m)を表面にコートする紙構造を選定した。またマイクロ流路の形成には上記紙構造に適したインプリント技術(深掘りドライエッチングで凹凸状にした Si 型でコート紙面を加熱・加圧してマイクロ流路を形成、ロール・ツー・ロール(RTR)大量生産に好適)を開発した(図 1 ①参照)。(ii) の要件に対しては、樹状マイクロ流路網をインプリント形成し、そこに濡れ性一定の吸引専用駆動液を導入し分節空気を介して物性の異なる試料・試薬を安定的に吸引するキャピラリーポンプを考案した(図 1 ②参照)。なお試料・試薬の流動制御には能動バルブ機能が不可欠だが、吸水性ポリマーを紙層に含有させた機能性紙材料及びその製法を新たに開発し、さらに水

の滴下をトリガーとしてポリマーの膨張が起こり、ポートが自動で閉まる Normally Open (NO)バルブや同様の原理の Normally Closed (NC)バルブを開発済である。

2. 研究の目的

本提案は、圧倒的な低コスト化と医療廃棄物としての処理負荷軽減を可能とする、「紙」を基材としたペーパー検査チップ技術基盤の創出に関するものである。特に図 1 に示す③極微量液対応の検出技術、④試薬ディスペンサ(試薬滴下機構)、⑤高精度位置決め機構、⑥検出機構、また現場で利用が可能なペーパー検査チップ専用の卓上型検査装置を試作し、実用化に向けてのボトルネック課題の摘出と解決策を見出すことを目的とする。

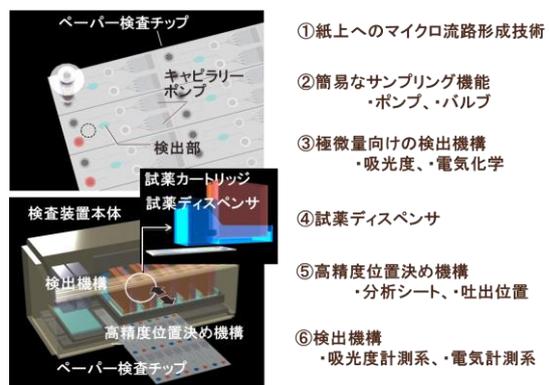


図 1. 研究開発項目

3. 研究の方法

紙面上の流路における試料・試薬の反応を検出するための計測系技術(吸光度、電気化学)、ペーパー検査チップ要素の最適構成・配置等の設計技術に関する研究を行う。

まず、光計測系に対しては、フローセルの底部に微小なライン状の凹凸をインプリント加工により施し、その上に反射膜を蒸着、グレーティングを形成し、底面で反射する際に分光させ、スペクトル全体の変化を捉えることで感度を向上させる方法について検討する。またフローセル上部の光源や光検出器から成る検出光学系(特定波長測定あるいは分光スペクトル測定)も最適化する必要がある。変形しやすい紙面上のフローセルとのアライメント方法や比較測定のための光学配置も見出す。一方電気化学測定に関しては、フローセル底部に薄膜の電極を形成する技術について研究する。紙素材表面へ導電性インクによる電極作成あるいは蒸着による形成などを試みる。次にマイクロ流路、キャピラリーポンプ、NOバルブ、NCバルブ、混合部&フローセルなどペーパー検査チップの要素の構造・配置の最適化を行うことで設計技術の蓄積を図る。安定した分析性能を確保するためには、試料の秤量や試薬との混合比の安定化が必要であり、試料秤量部の流路容

量やキャピラリーポンプでの吸引容量、駆動液滴下のタイミングなどの最適化が不可欠である。

その後、具体的な分析項目を定め、それに対応したペーパー分析チップの構造設計及び検査装置の試作を行う。吸光度計測では、メタボリック症候群を対象とした測定（グルコース、トリグリセリド、コレステロール等）、電気化学計測では、凝固活性（主としてプロトロン時間）の測定を想定する。また試薬・駆動液の安定滴下技術・機構に関する研究を行う。通常の描画用 Ink-Jet と比べて3桁以上（ $1\mu\text{L}$ 以上/shot）の滴下が必要である。本研究では、まず上記測定項目で用いられる典型的な試薬の物性（粘性、比重、濡れ性など）の範囲を調査し、それらに対応可能なポンプ、ノズルの構造・材料等を選定し試作を行う。さらに検出機構や試薬・駆動液滴下機構を備えた Ink-Jet プリント型検査装置の構成に関する研究を行う。具体的には検査装置のプロトタイプを試作することで、実用化に対してボトルネックとなる課題の抽出と改良策の提案を行う。紙送り機構の高精度化や、検出機構、試薬・駆動液滴下機構との相対位置ズレ、また動作中の紙面変形による定量性阻害などが課題として挙げられる。紙を対象とすることで初めて出現する課題を明確にし、その解決策を見出す。

最後に実試料を用いて一連の動作の検証を試みる。実用化に対してボトルネックとなる課題の抽出と改良策の提案、必要に応じてチップ設計へのフィードバックを行う。

4. 研究成果

まず、紙面上の流路における試料・試薬の反応を検出するための検出技術（吸光度、電気化学）、ペーパー検査チップ要素の最適構成・配置等の設計技術に関する研究を実施した。具体的には、吸光度系に対しては、フローセル底部への反射型グレーティングの形成に向けて、蒸着装置の適用可能性評価（紙材料への蒸着試験等）を経て選定（サンヨー電子製 SVC700TMSG）を行い、反射膜材料（アルミ、銅、金等）の検討と蒸着条件の探索（膜厚、紙面へのダメージ、紙面からの剥離防止策等）を実施した。さらに試料・試薬の更なる微量化（ $1\mu\text{L}$ 以下）対応として、熱レンズ効果による吸光度測定技術に着目し、その応用可能性を評価・確認（～測定体積 $0.1\mu\text{L}$ で安定計測可能）するとともに、フローセル部の設計・製作（レーザ加工により直径 1mm のマイクロフローセルを紙面上に形成）及び光学配置（ファイバ型センサを用いた密着配置）に関する概念設計を行った。次に凝固反応向けの電気化学測定に関しては導電率を基準に電極材料の選定（金薄膜）と紙面への形成方法（蒸着、レーザアブレーション等）の検討を実施した。またインピーダンス分光測定（ $100\text{Hz}\sim 50\text{MHz}$ ）による凝固反応の検出可能性（エンドトキシン標準+リムルス試

薬を使用）を評価するために電極セルを試作（直径 6mm 容器、底面に電極）、それを用いて従来の目視法に比して短時間（30分～5分以内、ただし試料量： $\sim 30\mu\text{L}$ 、濃度： $5.0\sim 10\text{IU}$ ）で凝固反応の検出が可能であることを確認すると共に、紙チップへのセンサ実装に向けての条件探索（周波数、反応液量、時間）を実施した。ペーパー検査チップ要素の最適構成・配置等の設計技術に関しては、図2に示すように、マイクロ流路内での毛細管力による試薬・試料の流動に関する基本モデル（細管内気相/液相流れ、プラットフォーム：MATLAB/Simulink）を作成、それを基に4流路-16流路-32流路分岐型毛細管ポンプ設計ツールを開発、流路の寸法や長さ、表面状態等による流動への影響予測を可能とした。また本設計ツールを用いて、流量安定かつ所定時間内（～10分）、所定量の吸引が可能なる分岐流路の長さ、流路幅、合流部、バルブ配置等について設計を行い、対応する紙チップ（試料液ポート1、駆動液ポート1、ポンプ部：4流路-16流路-32流路の順に流路幅 $300\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ ）を試作、模擬試料を用いて流動実験を行い、所定時間内で安定した吸引動作が可能であることを確認した。

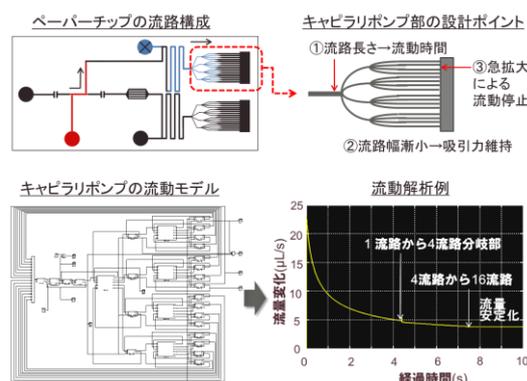


図2. キャピラリーポンプの設計と動作予測

その後、具体的な分析項目を前提に計測系（吸光度、電気化学）を実際に試作し、実装に向けた検証を進めるとともに、試薬・駆動液の安定滴下技術・機構、Ink-Jet プリント型検査装置の構成に関する研究を行った。具体的には、紙チップ上の極微量液（ $\sim 1\mu\text{L}$ ）の吸光度測定を可能とするための方策として反射型グレーティング式、熱レンズ式について比較検証した結果、熱レンズによる間接的な吸光度測定法が最も適応性が高いと判断した。また紙チップ作製プロセスと親和性の高く、マイクロ流路との相対位置精度の高い光透過セルの形成方法・形状を複数案検討した。その結果、レーザにより紙基材に光透過部を穿孔形成した後、インプリント加工でマイクロ流路を形成する方法で、かつレーザ穿孔形状を微小孔（ $\Phi 1\text{mm}$ ）から微小スリット（流路直交方向、長さ 3mm 、幅 $200\mu\text{m}$ ）とする方法により、極めて再現性の良い

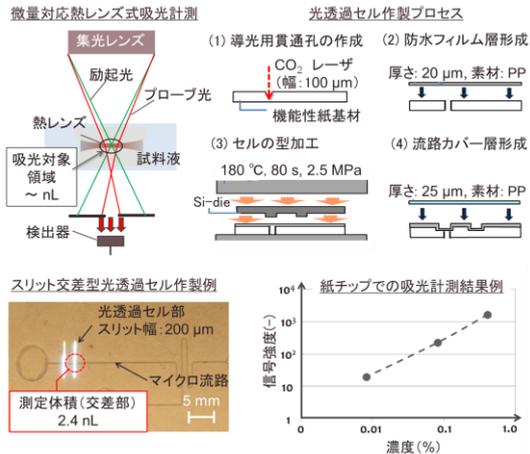


図3. 熱レンズ向光透過セル作製法と評価

紙チップ上へのフローセル製作が可能となった(図3参照)。このセルを用いて、色素試料(最大吸収波長644 nm、中性脂肪項目試薬等に対応)を用いて検量線を求めたところ、微量(測定体積 $\sim 1 \mu\text{L}$ 、実検出部体積: $\sim 1\text{nL}$)、幅広い濃度レンジ(3桁)で安定計測が可能であることを確認した。

次に電気化学計測については、紙チップ上のマイクロ流路(深さ $40 \mu\text{m}$ 、幅 5mm)底部・側壁に電極を形成する方法について複数案(導電性樹脂コート、銀ナノインク塗布、蒸着等)を試行した結果、金蒸着による方法により、紙チップ上に安定した電気特性を持つ電極の形成が可能であることが分かった。形成した金電極(膜厚 $100\sim 150 \text{nm}$ 、 $1.5 \Omega/\text{cm}^2$)を用いて、交流インピーダンス(10kHz)によって電解質濃度(Naイオン; $0.1\sim 1 \text{wt}\%$ 、血中濃度想定)の計測が可能であることを確認した。以上、電気化学計測の紙チップ実装に向けた電極及び電極回りの設計指針(最適周波数、電極形状・サイズ、電極からの信号取得条件)を得た(図4参照)。

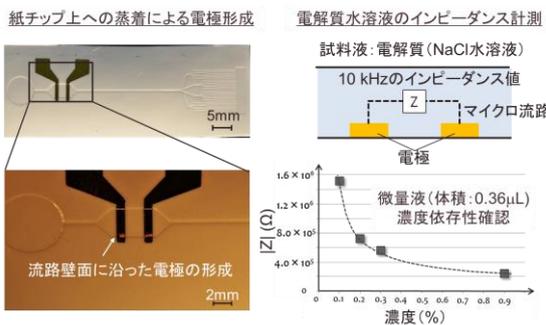


図4. ペーパーチップ上電極センサ評価

また試薬・駆動液の安定滴下技術・機構に関しては、試薬に関する物性情報の調査・実測等の結果、粘性(約 $1\sim 5 \text{cP}$)や濡れ性(接触角)など比較的物性範囲が広範であり、多量の吐出($\sim 10 \mu\text{L}/\text{shot}$)が必要であることから、通常のInk-Jet機構ではポンプ容積、圧電駆動電圧の過大化($> 100 \text{V}$)を伴い簡素化が困難であると判断、代わる吐出機構とし

て超小型の蠕動型ポンプ(3V駆動)を選定し、ポンプ機構の設計、動作の原理確認等を実施し、有用性を確認した。

以上の知見をベースに①検査装置への検出機構(熱レンズ効果を検出するための簡易光学系)の実装、②試薬・駆動液滴下機構の実装、③検出機構及び試薬・駆動液滴下機構を備えた検出装置を試作した(図5参照)。

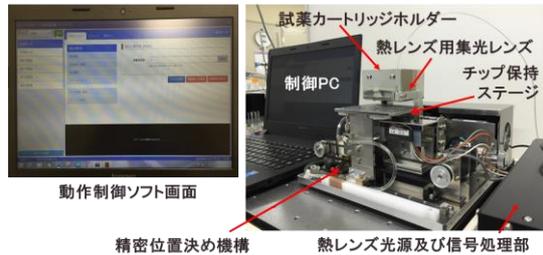


図5. 試作検査装置外観および制御ソフト

また図6に示すように、実用化に対してボトルネックとなる課題の抽出と改良策の提案・実機実装及び評価を行った。

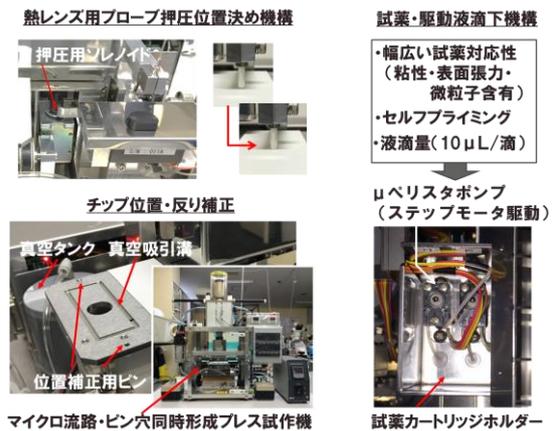


図6. 各種機構及びペーパーチップ補正技術

具体的には、熱レンズ型吸光度測定法のためのファイバプローブ先端とペーパー検査チップに形成されたフローセルの間隔を測定毎に高精度に位置決め可能とするためにプローブを一定圧力で紙面に押圧するための熱レンズ用プローブ押圧位置決め機構を開発し、相対位置誤差が 0.1mm 以下であることを確認した。また試薬・駆動液滴下機構に関しては、入口側に穿孔針、出口側に吐出ノズルを備えた超小型蠕動型ポンプを4列並行に備えた機構を試作、前記ノズル部に直接差し込んで漏れなく着脱可能な液体インターフェースを備えた試薬カートリッジを試作し、ペーパー検査チップの任意の位置に所定量($\sim 10 \mu\text{L}/\text{shot}$)の液の高精度吐出($\sim 0.1 \mu\text{L}/\text{パルス}$)が可能であることを確認した。次にこれらの機構と、ペーパー検査チップを搭載して、各機構間を自動で搬送するためのステージ、及び各機構を連動動作させるための制御部を備えた検出装置及び専用動

作制御ソフトを開発し、疑似試料(色素溶液)を用いて、一連の連動動作が可能であることを確認した。一方、チップの位置決めを利用したチップ外縁は、切り出し時に0.1~0.2 mm程度の寸法誤差が発生すること、更に動作検証中に、ペーパー検査チップを構成する紙が湿気や装置からの熱等の影響で徐々に反りが発生し平面方向に~0.2 mm程度の位置ズレが発生する課題が顕在化した。そこで流路をエンボス加工する際に同時に、チップ内の2点にピン孔を形成させるプレス型を新たに試作、さらに測定時にチップ全体を真空吸引する機構を新たに設けた。これらにより寸法誤差、反りが是正され位置決め精度として0.1 mm以下を確保可能となった。

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)

①Keisuke Naktsuka, Hajime Shigeto, Akio Kuroda, Hisakage Funahashi, A split G-quadruplex-based DNA nano-tweezers structure as a signal-transducing olecule for the homogeneous detetion of specific nucleitic acids, 査読有, Journal of Biosensors and Bioelectronics, Vol. 74, 2015, pp.222-226, DOI 10.1016/j.bios.2015.06.055

②三宅亮, 紙ベースのマイクロチップ作製技術、査読無、機能紙研究会誌、52巻、2014、pp.39-42

[学会発表] (計 10 件)

①三宅亮、ペーパー分析チップの作成技術とシステム化、神奈川科学技術アカデミー教育講座(招待講演)、2016年3月10日、川崎市神奈川サイエンスパーク・川崎市・神奈川県

②三宅亮、ペーパー分析チップの作成技術とシステム化、神奈川科学技術アカデミー教育講座(招待講演)、2015年3月3日、川崎市神奈川サイエンスパーク・川崎市・神奈川県

③小谷紘、舟橋久景、黒田章夫、三宅亮、エンドトキシン凝固過程のインピーダンス計測、日本機械学会第6回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2014年10月22日、くにびきメッセ・松江市・島根県

④中原和貴、三宅亮、松垣仁、小谷紘、ペーパーマイクロ分析チップ用電極センサの開発、日本機械学会第6回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2014年10月20日、くにびきメッセ・松江市・島根県

⑤松垣仁、中原和貴、三宅亮、熱レンズセンサによる紙チップ上微量液の吸光度計測、化学とマイクロ・ナノシステム学会第30回研究会、2014年10月3日、北海道大学・札幌・北海道

⑥三宅亮、マイクロ流体技術の魅力と実用化、農工大・多摩小金井ベンチャーポートセミナー

(招待講演)、2014年5月15日、農工大・小金井市・東京都

⑦三宅亮、紙ベースのマイクロチップ作製技術、岐阜県産業技術センター紙業部研究成果発表会(招待講演)、2014年4月15日、岐阜県産業技術センター・美濃加茂市・岐阜県

⑧三宅亮、ペーパー分析チップの作成技術とシステム化、神奈川科学技術アカデミー教育講座(招待講演)、2014年2月24日、川崎市神奈川サイエンスパーク・川崎市・神奈川県

⑨小谷紘、舟橋久景、黒田章夫、三宅亮、マイクロ流路を用いたエンドトキシン凝固反応の計測、日本機械学会第5回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2013年11月5日、仙台国際センター・宮城県・仙台市

⑩三宅亮、紙ベースのマイクロチップ作製技術、第52回機能紙研究会発表講演会(招待講演)、2013年10月24日、あわぎんホール・徳島市・徳島県

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 検査用シート、化学分析装置及び検査用シートの製造方法

発明者: 三宅亮、坂本憲児、石川智弘、岡部修吾

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特許第5688635号

出願年月日: 2010年8月13日

取得年月日: 2015年2月6日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 亮 (MIYAKE, Ryo)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号: 50417052

(2) 研究分担者

舟橋 久景 (FUNAHASHI, hisakage)

広島大学・サステナブル・ディベロップメント実践研究センター・特任講師

研究者番号: 60552429

(3) 連携研究者

黒田章夫 (KURODA, Akio)

広島大学・先端物質科学研究科・教授

研究者番号: 50205241