

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26790028

研究課題名(和文) 超集積型高耐久化技術による浮遊ウイルスモニタリングセンサの構築

研究課題名(英文) On demand micro chemical storage chip for long life virus monitoring sensor

研究代表者

佐々 文洋 (Sassa, Fumihiro)

九州大学・システム情報科学研究科(研究院・助教)

研究者番号：30722681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：浮遊ウイルスモニタリングのための、従来とは桁違いの繰り返し寿命を持つ超高耐久化学センサの開発を目的とし、化学物質を自在に格納・長期保存し、いつでも放出可能なマイクロフルイディックデバイス「オンデマンド化学ライブラリーチップ」を開発した。デバイスは9 nL微量液体・気体を任意のタイミングで密閉保存し、また放出可能という従来にない性質を持つ。これまで、人の手を介し $\mu$ Lオーダー以上で行われていたチップ外溶液操作を、nLオーダーのままシームレスにチップ内で行うことができる。本デバイスで多数の小分けされた分析用試薬・洗浄液を適時センサーへ供給すれば、チップ単体で長期にわたる繰り返し測定が可能となる。

研究成果の概要(英文)：We developed a microfluidic device which can be preserved chemicals including gas/liquid/dried powder for long term. It can collect and seal chemicals for preservation and discharge it on demand by electrical control. This device can be used as micro smart chemical cabinet for connecting to other chemical MEMS which can bring many various chemical/biological reagents and sample to anywhere.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：マイクロフルイディックデバイス MEMS Lab on a chip  $\mu$ -TAS 長寿命・高耐久化 バイオセンサ  
長期保存

1. 研究開始当初の背景

(防疫の観点から) 病原性ウイルスのパンデミック(世界的流行)は人類の歴史において、最も多くの死者が発生する災害である。WHOの予測によれば現在、高病原性新型インフルエンザのパンデミックが発生した場合、全世界で2億人が感染し、740万人が死亡するとされている(WHO, 2005)。有望な対策は集団感染を早期発見し、まだ少数の患者を隔離・治療することである。近年、早期発見の試みとして「インターネット上の、発症者のものと推定される書き込み情報」を自動で統計分析し、集団発生を検知する技術が提案され注目を集めた(J. Ginsberg, Nature, 2008)。しかし、その技術においても、検知時にはすでに複数名が発症しており、発症前より始まる病原体拡散によって感染は広がっている。もし、ここで感染のハブとなる、病院・学校・空港等において、「発症前」の集団感染を、空气中を浮遊するウイルスを連続モニタリングすることにより検知できれば防疫上革新的なアドバンテージを持つこととなる。

(バイオセンサの観点から) 上記のようなモニタリングを現実的なコストで実施するためには小型の集塵装置と連続測定可能なバイオセンサチップによる自動観測システムが最適と考えられる。しかし、通常、一度開封されたバイオセンサはセンサ表面の汚染や試薬の酸化・腐敗等の影響により、長期間の繰り返し測定を行うのは難しい。特にウイルスのような微量の生体分子の検出にはEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 等、高感度の分析法が用いられるが、通常ELISAでは1測定ごとに抗体・基質など試薬を使い捨てる必要がある。つまり、一つのセンサでの連続測定は不可能である。

2. 研究の目的

本研究では個別に密閉封止された膨大な数の使い捨てのバイオセンサを一つのチップ上に集積化し、これらを一つずつ使いつづしながら使用する超集積型高耐久化技術を提案する。各センサ内の試薬・溶液は密閉/真空チャンバー内に脱酸素状態で個別に格納・保存され、使用時に一つずつ解放・再封止されていく。この技術により、1チップで長期間・連続でのウイルスモニタリングが可能となる。

3. 研究の方法

3.1 デバイス構造と動作原理

デバイスの構造と動作原理を図1に示す。デバイスは微細加工技術で形成したガラス流路及びガラス製電極チップを張り合わせるにより作製した。本デバイスの基本素子となる試薬保存マイクロユニットは一對の真空チャンバーおよび圧縮空気チャンバーから構成される。各チャンバー間は低融点合

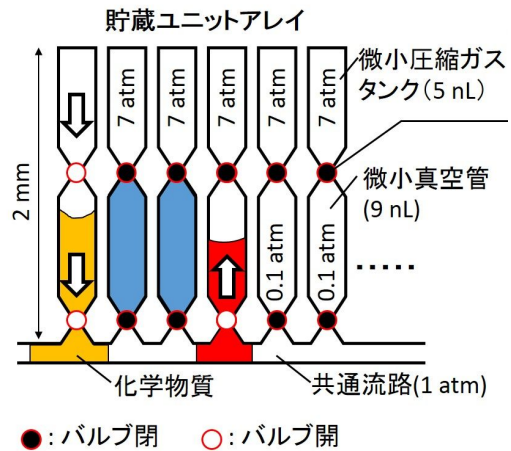


図1. 貯蔵ユニットの構造と動作原理。白矢印はガス・液体の流れを示す。

金 (Bi/Sn/In,  $T_m=62$  ) によって密閉封止され動力なしで半永久的に開閉状態を保持し続ける。この低融点合金は直下に配置されたマイクロヒーターにパルス電流を印加し加熱することで、一時的に溶融し気圧差によりバルブとして開閉する。同時にそれぞれ一回使用の強力な吸引・排出ポンプとして働く。デバイス中の共通流路に導入された溶液は真空チャンバー下部のバルブを解放することで溶液を吸引し、再加熱することで、再封止する。溶液使用時には圧縮ガスチャンバーのバルブ(上部)と真空管のバルブ(下部)を同時に解放することで、保存していた溶液を共通流路に送り出す。その後他のユニット使用の為に、使用済みバルブを加熱・再封止し、1ユニットの動作を完結する。デバイスの駆動は自作の制御回路及びソフトウェアにより行われ、電気的接続以外のいかなる外部動力供給を必要としない。各チャンバーの真空、圧縮ガスの充てんは、それぞれ真空デシケータ、圧縮ガスチャンバー内にチップを設置し内部でそれぞれの対応したバルブを解放することで、一括して事前充填される。

3.2 デバイス作製

ガラス流路チップはクロム/金スパッタ膜、及びポジティブフォトリソレジストをエッチングマスクとし25%HFウェットエッチングにて作製した。その後、このウェハに低融点合金付着箇所であるメタルパッド(クロム/金)パターンをリフトオフ法により形成。100 mM HClを満たした低融点合金槽にディップコート(3)することで、低融点合金パターンを得た(図2)。

電極チップは通常の写真リソグラフィにより白金によるパターンを形成、その後スピニングガラスにて絶縁層を形成し、コンタクトパッド部のみをRIEにより露出させた。二つのチップはスピニングコート法で形成したエポキシ樹脂薄膜層(SU-8)によりバネクラ

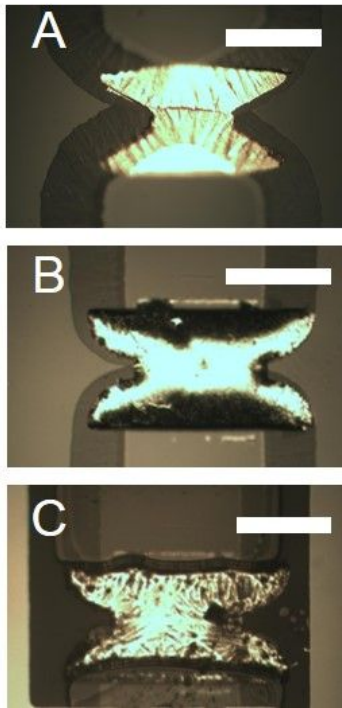


図 2. 低融点合金バルブの形成プロセス。(A)ガラス流路チップに合金接着用の金メタルパッド形成された様子。(B)低融点合金ディップコート後。(C)マイクロヒーターチップボンディング後、見易さの為にヒーター位置はずらしてある。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

ンプで圧力を印加し、その状態で 1 時間 90 で加熱することで接着した(4)。接着後の樹脂層の厚みを測定したところ約 200 nm であった。

#### 4. 研究成果

##### 4.1 バルブ動作

バルブの動作の様子を図 3A に示す。ここでは見やすさのため、バルブ位置をヒーター直下から偏心させたデバイスを使用している。初期状態において、上のチャンバーは真空 (0.1 atm) であり、下部のチャンバーは大気に解放されている (約 1 atm)。245 mW, 100 ms のパルス電圧をマイクロヒーターに印加したところ、低融点合金が溶融し圧力差によって大気が真空チャンバー内に流入した。続けてこの状態より再度 245 mW, 100 ms パルス電圧を印加したところ、突起上に突き出た低融点合金は再度溶融し再びチャンバーを封止した。また印加するパワーを 200 mW としたときにはバルブ動作には 250 ms の印加時間を必要とし、155 mW では 500 ms 以上印加しても動作しなかった。

##### 4.2 バルブ動作時の温度分布

またデバイス動作時の他のチャンバー及び他のバルブへの熱的影響を、赤外線熱顕微鏡とシミュレーション (COMSOL) を用いて調べた。245 mW, 100 ms のパルス印加時の熱顕微鏡画像を図 3B に示す。ここでは顕微鏡の特

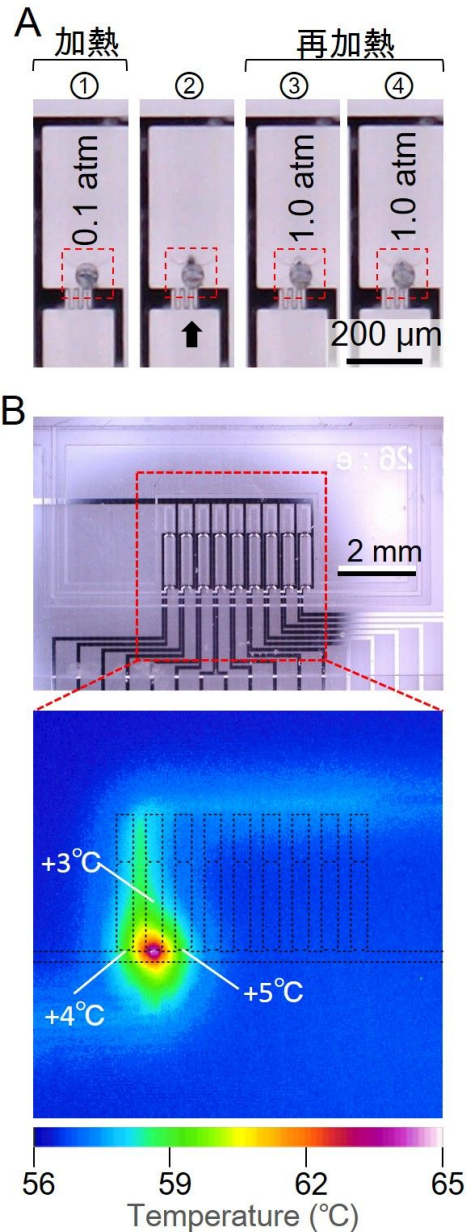


図 3. テスト用アレイデバイス (9 unit) のバルブ動作。(A)真空チャンバーの低融点合金バルブを動作させたときの様子。黒矢印はガスの流入方向を示す。(B)サーモグラフィー顕微鏡によるバルブ動作時の温度分布。図中の白文字は基板初期温度(55 )からの上昇温度を示す。

性上、初期基板温度を 55 と設定している。パルスを印加したヒーター近傍 100  $\mu\text{m}$  の測定点での瞬間最高到達温度は初期基板温度より 10 度程度の上昇に抑えられている。また隣接するチャンバーは最大で 5 度程度のわずかな温度上昇であった。同一条件下における熱シミュレーションを行ったところ、熱分布は同様であり、ヒーター直下の瞬間最大温度は基板温度から 70 の上昇であったであった。いずれも 100 ms 以下の瞬間的温度上昇であり保存試薬への影響は少ないと考えられる。

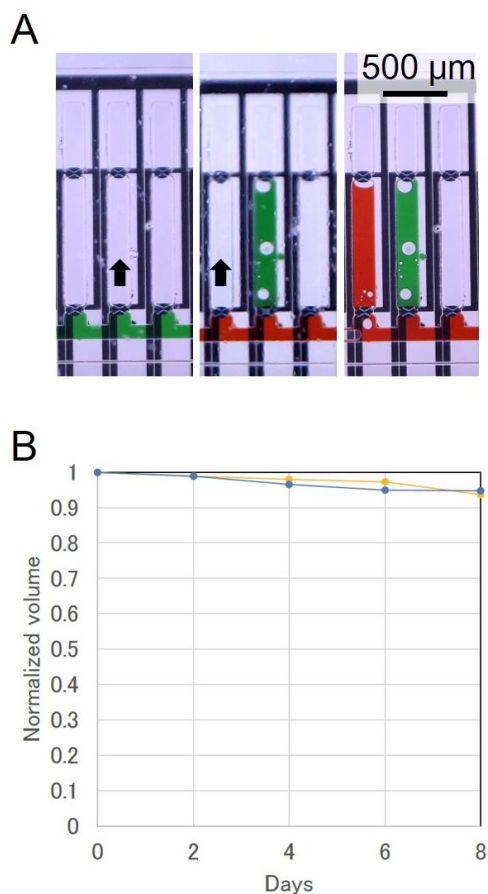


図 4. デバイスの動作と保存性能。(A)溶液(食用色素)格納の様子。黒矢印は溶液移動の方向を示す。(B) 50% ethanol 溶液を 8 日間保存した時の液量変化。

#### 4.3 試薬の吸引・保存・排出

食用色素で着色した純水を用いて液体操作の実験を行った。初期状態で圧縮空気チャンパーおよび真空チャンパーの気圧はそれぞれ 7 atm, 0.1 atm に事前充填されている。この時の様子を図 4A に示す。初め全バルブは封鎖されており、共通流路中に導入された緑の溶液は、チャンパー内には入らない。対応するバルブに駆動パルスを加えると瞬間的に真空チャンパーに吸引された。その後封止のため再度パルスを加え、赤い水溶液を導入したところ、相互にまじりあわないことが確認できた。赤い水溶液を吸引し同様に封止を行った。この実験では再封止時の体積変化によるエラーを防ぐため、微小真空管は 0.1 atm 程度で減圧し、わずかにガスを残している。このため、吸引した液体には気泡が含まれる。過去に多くの微小流路中の気泡除去構造が開発されており、この気泡が問題となる場合には、デバイス供給口あるいは、分析チップ側に搭載することで対応可能と考えられる。

保存後 2 日経過した各対象とするチャンパーのメイン流路側のバルブと圧縮空気チャンパーのバルブを同時に解放することで、圧縮空気が水溶液を押し出し瞬間的にメイン流路に順次供給された。排出の度に共通流路が

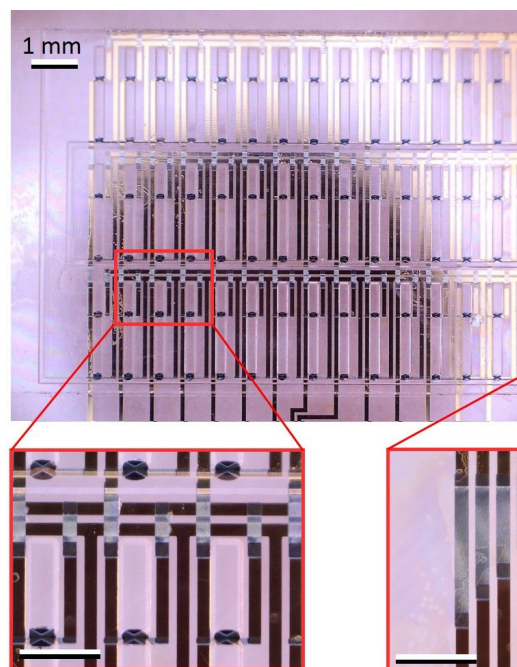


図 5. 試作中のマトリクス様回路による 42 unit アレイチャンパーチップ。拡大図中スケールバーは 500 μm。

使用試薬・サンプル・廃液等で汚染されることが懸念されるが、これにはチップ内に洗浄液を事前に保存しておき、必要に応じて被供給側チップ内部を含め洗浄することで解決可能と考えられる。

また、保存性の検討として、有機溶媒として 50% ethanol 溶液の保存を行った結果を図 4B に示す。封止されたチャンパーでは 8 日間の保存での液量の減少は 5% 以下であった。比較のため、一つのチャンパーを、メイン流路側のバルブを再封止せず解放している。封止されていないチャンパーの水溶液は、1 時間のうちに蒸発のため 50% 程度まで減少し、1 日後にはほとんど乾燥状態になった。

また、マトリクス様の回路構成によって 3 行 12 列、42 個の独立したチャンパーアレイを構成し、本デバイスの大規模化の方法を示した(図 5)。

#### 4.4 まとめ

微小化学分析装置の長寿命化・高耐久化を目的とし、化学物質を自在に格納・長期保存し、いつでも放出可能なマイクロフルーイデックデバイス「オンデマンド化学ライブラリーチップ」を開発した。デバイスは 9 nL 微量液体・気体を任意のタイミングで密閉保存し、また放出可能という従来にない性質を持つ。これまで、人の手を介し μL オーダー以上で行われていたチップ溶液操作を、nL オーダーのままシームレスにチップ内で行うことができる。これは、微量測定・迅速性そして大規模集積化といった μ-TAS が本来持つ特性を 100% 発揮させる契機となると考えられる。例えば、数千の小分けされた分析用試薬・洗浄液を適時センサーデバイスへ逐次供給し測定すれば、チップ単体で数百回の長期にわたる繰り返し測定が可能となる。以上

より”個別封止によるバイオセンサ長寿命化”の基礎技術を確立された。

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)

1. 佐々文洋, “ナノリットルでOK. 液滴による化学分析”, 生物工学会誌 93(3), 158, (2015)

2. H. Obata, T. Kuji, K. Kojima, F. Sassa, M. Yokokawa, K. Takekoshi, H. Suzuki. “Electrochemical Bubble-Based Bidirectional Microfluidic Transport”, ACS Sensors, 1, pp 190-196 (2016).

〔学会発表〕(計 3件)

1. 佐々文洋, Klavs F. Jensen, “半導体メモリのように化学物質を展開・格納可能なオンデマンド化学ライブラリーチップ”, 第32回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 朱鷺メッセ, 2015年.

2. 佐々文洋, “微量液滴操作技術と生物/化学MEMS”, 第2回「鉄鋼材料の生物劣化を誘導する影響因子の解明」自主フォーラム研究, 産業技術総合研究所, つくば市, 2015年. (基調講演)

3. Fumihiro Sassa, Hiroaki Suzuki, Kenshi Hayashi, “Programmable droplet processing device for bio/chemical analysis”, EMN Meeting on Droplet 2016, San Sebastian, Spain, 2016年. (招待講演)

〔図書〕(計 1件)

1. 稲葉知大, 尾花望, 清川達則, 吉田圭太郎, 佐々文洋, 尾形敦, 野村暢彦, “集団が生み出す新たな微生物挙動～集団微生物学の勤め”, ソフト・ドリンク技術資料 / 177 (2015年・第3号・174ページ〔産業財産権〕)

出願状況(計 1件)

名称: 細胞培養用デバイス

発明者: 野村暢彦, 鈴木博章, 佐々文洋, 清川達則, 横川雅俊, 豊福雅典, 尾花望, 濱田将風, 稲葉知大

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特開 2015-136318

出願年月日: 2015年7月

国内外の別: 国内

取得状況(計 1件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://o.ed.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々文洋 (Fumihiro Sassa)

九州大学・システム情報科学研究院・助教

研究者番号: 30722681

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: