

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12729

研究課題名（和文）マイクロPADs技術を用いた血液粘度測定用紙媒体検査チップの研究

研究課題名（英文）Research on Paper-Based analytical Chip for Blood Viscosity Using micro PADs Technology

研究代表者

坂本 憲児（Kenji, Sakamoto）

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授

研究者番号：10379290

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）：医療費増加の大きな原因となっている生活習慣病の予防を目的とし、そのリスク評価指標である血液および血漿の電気伝導率および粘度を、簡便に測定できる紙で作製された微量血液向け紙媒体検査チップ（ $\mu$ PADs検査チップ）の研究を行った。本研究により、約25 $\mu$ Lの微量サンプルで測定可能な電気伝導率測定用紙媒体チップの作製に成功した。紙媒体の特徴を活かし、毛細管現象によるサンプル移送を行い、流路・櫛歯微細電極形成による定量電気的センシングを実現している。研究で得られた紙媒体チップを用いて基礎化学薬品の電気伝導率測定の検証を行い、ヒト血液サンプルでの測定の可能性について評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紙媒体マイクロ流体チップの研究において、流路形成プロセス、電極形成プロセス、電気伝導率測定方法の構築を行った。これは、既存の紙媒体マイクロ流体チップとは異なる新規な手法により達成できた。また得られた紙媒体チップより、基礎化学薬品の電気伝導率測定を実施することが出来たため、安価な電気伝導率測定チップの提案を行う事ができた。またヒト血液サンプルでも電気伝導率の測定を行う事が出来たため、ヘルスケア向けの体液検査チップの可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：With the aim of preventing lifestyle-related diseases, which are a major cause of increased medical costs, we conducted research on a paper media test chip for trace amounts of blood ( $\mu$ PADs test chip) that can easily measure the electrical conductivity and viscosity of blood and plasma, which are risk assessment indicators for such diseases. Through this study, we succeeded in fabricating a paper media chip for measuring electrical conductivity that can be measured with a microvolume sample of approximately 25  $\mu$ L. Taking advantage of the characteristics of paper media, sample transfer by capillary action and quantitative electrical sensing by flow path and comb microelectrode formation are realized. The paper media chip obtained in the research was used to validate the electrical conductivity measurement of basic chemicals, and the feasibility of measurement with human blood samples was evaluated.

研究分野：マイクロ流体工学

キーワード：紙媒体マイクロ流体チップ microTAS microPADs 血液物性値測定 ヘルスケア

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の糖尿病や動脈硬化では、患者と健常者において血液粘度を比較すると、前者の血液粘度が高い値を示すことが報告されている(参考1)。血液粘度と生活習慣病の関係は様々な医学論文で報告されており、生活習慣病リスクの指標になると考えられている。物理法則であるWalden 法則によると、血液のように電解質濃度が大きく変動しない低粘度サンプルでは、精度よく「粘度×電気伝導率＝一定値」が成り立つ事が知られている(参考2)。そのため、標準サンプルとの相対測定より血液の粘度や電気伝導率を評価できれば、血液の新たな医療検査指標を創出することができる。またその測定が簡単であれば、血液粘度を指標とした自己健康管理(セルフメディケーション)や生活習慣病予防に大きく貢献すると考えられている。しかし、既存の粘度測定装置は、サンプル溶液中でコマを回し回転速度の減衰により評価する方法(回転法)など、古典的な物が未だに使われており、測定に必要なサンプル量は多い(表1)。個人が簡単に取れる血液の液量は、例えば針を指に刺して採取できる一滴(数 $\mu\text{L}$ )等、液量が少ないため個人の測定には向いていない。近年では、少量サンプル向けにEMS粘度計が研究開発されている(参考3)。しかし、液量は300 $\mu\text{L}$ とまだ多く、血球細胞などを含む血液の測定には測定原理的に不向きである。また血液サンプルを用いた測定は、感染病予防の観点から使い捨てが望ましいが、これも装置に限られる。故に現在まで微量血液に特化した簡易粘度測定装置は存在しない。

| 粘度測定法      | サンプル量              | 使い捨て     | 備考     |
|------------|--------------------|----------|--------|
| 回転法        | >5 mL              | 不可       |        |
| 細管法        | >5 mL              | 不可       |        |
| EMS法       | >300 $\mu\text{L}$ | 可(消耗品高額) |        |
| マイクロ流体チップ法 | 数 $\mu\text{L}$ 程度 | 可(消耗品高額) | 申請者別研究 |
| 紙媒体検査チップ法  | 数 $\mu\text{L}$ 程度 | 可(消耗品安価) | 今回提案手法 |

表1：従来の粘度測定方法と本研究の比較

微量血液かつ安全に使い捨てで使用できる簡便な検査チップとして、「紙」に撥水コートやワックス印刷を行い微細な流路を作製し、含有させた試薬と反応測定を行う $\mu\text{PADs}$ (Micro paper-based analytical devices)の研究が行われている(参考4-6)。これらの研究は化学反応を光学的に計測するグルコースアッセイや全血透過率測定などが主流である。一部には電気化学的な計測も行われているが、流路サイズは大きく、必要液量の多いイオン濃度測定である。またワックス印刷などの手法で流路が作られており、紙の浸透性を利用し送液している。そのため紙基材内部への染み出しが多く、測定サンプルの抽出量が安定せずに測定誤差が大きくなる(参考6)。また紙媒体上の電極は、微小な断線や紙繊維の介在などの影響で高抵抗になる。低抵抗にするために電極を厚く大きく作製されており、多量サンプル向けである。本件のように、1 $\mu\text{L}$ 以下の微量サンプルの抽出や微小電極による計測には至っていない。

### 【参考文献】

- (1) L. J. Tamariz, et al., Am. J. Epidemiol. **168**, 1153 (2008). and A. J. Lee et al., Circulation. 1998;97:1467-1473
- (2) Walden, P. Z. Phys. Chem. 1906, 55, 207., and C. Schreiner et al, J. Chem. Eng. Data 2010, 55, 1784-1788
- (3) EMS粘度計<https://www.kyoto-kem.com/ja/product/ems1000s/>
- (4) R. H. Müller and D. L. Clegg, Anal. Chem. 21(9), 1123 (1949). A.
- (5) W. Martinez et al., Chem., Int. Ed. 46(8), 1318 (2007).
- (6) Yamada, K. et al., Lab on a Chip, Volume 17, Issue 7, 7 April 2017, Pages 1206-1249

## 2. 研究の目的

本研究の目的である「簡便に血液一滴で粘度評価をする」方法としては紙媒体を用いた $\mu\text{PADs}$ 技術が適している。計測ではサンプル定量が測定精度に影響するため重要であるが、従来の $\mu\text{PADs}$ 研究では微量定量化は困難であり測定誤差も大きい。また微量測定のためには微細電極センサが必要であるが、従来技術では微小電極形成・電気計測は困難である(図1)(研究課題の核心をなす学術的課題)。本研究では、ミクロンサイズの微細加工を紙媒体 $\mu\text{PADs}$ チップに行い、これらの学術的な問題の

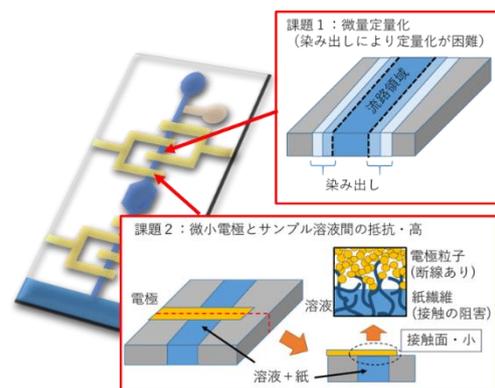


図1： $\mu\text{PADs}$ チップの学術的課題

解決を行うとともに、微量血液粘度の測定を可能にする（本課題の目的）。本研究期間では、血液粘度測定用  $\mu$  PAD s チップの核心となる①微量サンプルの定量化を、マイクロエンボス加工により実現する。また②紙基材に金属粒子を浸透・固定する手法で低抵抗の微細電極センサを集積化する研究を行い、電気伝導率・粘度の測定を実現する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 定量サンプルの分離

微量血液サンプルを正確にセンシングするためには、紙媒体上での微量サンプルの定量抽出が必要となる。また血漿の粘度測定を行うには血球を除去する必要がある。これら二つの小課題を解決するために、 $\mu$  PAD s チップの利点である紙の繊維間に生じる毛細管現象を用いて送液・抽出を行い、繊維のフィルター効果を用いて血球成分除去を実現する。本研究の検査チップにはクロマトグラフィー測定に用いられる濾紙が最適である。ただし、濾紙は浸透性が高く抽出量が多くなり、流路外への染み出しにより液量が安定しない問題がある。本申請研究では、Si 微細加工（深堀 Si エッチング）やステンレスエッチングを用いて流路鑄型を作製し、濾紙への高圧プレスによるマイクロエンボス加工（図2）+選択的撥水処理で、測定チップ内のマイクロ流路作製およびサンプルの精密定量的抽出の研究を行う。例えばサンプル液量  $1\mu\text{L}$  の場合、送液のための損失液量、固体成分除去のフィルター領域を考慮すると約  $0.1\mu\text{L}$  程度が測定サンプルになり、測定領域は  $0.1\text{mm}\times 0.1\text{mm}\times 10\text{mm}$ （長さ）になる。この微細領域を実現するために、微細エンボス加工+選択的撥水処理を行いサンプル吸湿領域の制限を行う。半導体加工のスパインコート技術を用いると、鑄型表面のみに微量の薬剤を塗布することが可能である。高圧プレス時には繊維層が密着し、浸透性が高くなる性質を利用して、微量の撥水剤を選択的に浸透・固定化し精密に撥水領域・吸湿領域の作製を行い、定量化を図る。

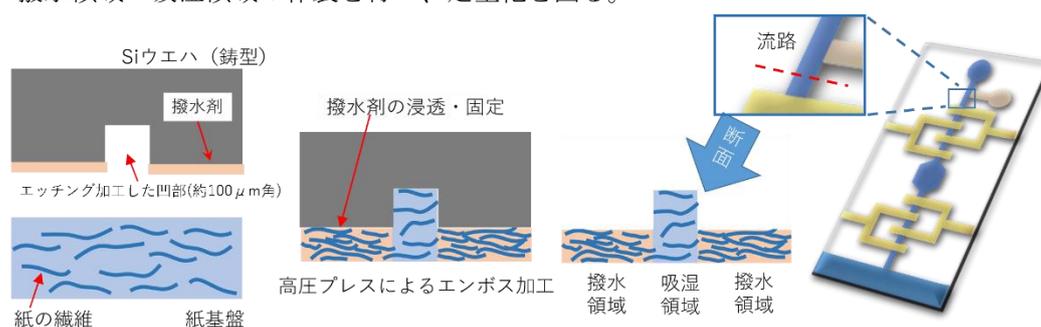


図2：エンボス加工による紙媒体検査チップのマイクロ流路作製

#### (2) 電極センサの集積化と測定

定量サンプルの分離①で得られた紙基材上のマイクロ流路に対して、微量サンプルで測定するための電極センサを構築する。サンプル溶液に電流を流し電気伝導率を測定した後に、Walden 則より粘度を導出する。微細な流路上のサンプルをセンシングするためには、流路上に微細な電極センサを集積化する必要があり、その手法を検討する。

また微量サンプルを精度よく測定するために、櫛歯構造の電極を作製し、サンプル溶液を介した並列回路を形成する。サンプル流動が起こった時に区間ごとの電気伝導率を測定でき、一度の測定で N 回の測定が可能になる。ここでの課題は、電極-紙基材-サンプル間の電氣的接触において、紙を挟んでいるため電気抵抗が高くなる点である。微細電極で抵抗が高いとサンプルとの接触不良状態になり電気伝導率測定の阻害になる。この課題を解決するために、流路内部での電極の構成を行い、電極-サンプル接触面を増やし抵抗を下げる研究を行う。

作製した測定用紙チップを用いて、血液を模した疑似サンプルの粘度評価を行う。サンプル溶液には生理食塩水を用い、疑似細胞（混濁物）としてコーンスターチ（または細胞サイズのラテックスビーズ）を含有させて行う。測定チップに対して、サンプルの液滴、サンプルの送液、疑似細胞の除去、サンプルの電気化学的センシング、の一連の測定動作を通して行い、サンプル溶液の粘度評価を実用に近い形で行う。この年度では、同時に簡易な測定系を組むことも実施する。本課題解決後には、医療系大学の協力のもと、血液粘度測定 of 初期実験を行う予定である。

### 4. 研究成果

## (1) 定量サンプルの分離

本研究では、紙媒体の選定を行い、候補となった紙媒体(ろ紙)に対してエンボス加工を行った。エンボス加工の鋳型はステンレスエッチングで作製した幅 3mm、1mm サイズの物と、フォトリングラフィ工程と深堀エッチングで作製した 100  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$  サイズの計 4 種類を用意して実験を行った。

高圧プレス機 (アズワン (株)、小型熱プレス機 H300-01) にて条件選定の実験を行い、プレス面上部温度 150 $^{\circ}\text{C}$ 、下部温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、プレス圧力 0.7t、プレス時間 90 秒の最適条件を得る事が出来た (図 3)。この結果、ステンレスエッチングで作製した幅 3mm、1mm サイズの鋳型の形状は、ろ紙媒体上へ十分に形状転写することが可能になった (図 4、5)。深堀エッチングで作製した幅 100  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$  サイズの鋳型の形状も、ろ紙に転写することは可能であったが、その鋳型深さ(転写時の構造物高さ)が浅く流動性の低いものになった。これはろ紙の繊維サイズに比べて、マイクロサイズの鋳型が小さく、流動性が確保できない事が原因であった。

また、幅 1mm、3mm サイズの鋳型の高圧プレスを行った流路では、プレスされた繊維(疎水部)の隙間を通して液体のリークが多く発生するため、形状変化のみの吸水量制限は不可能であった。そのため、撥水処理を加えることによる撥水加工を行った。各種撥水薬品による実験を行い、撥水材の選定と、撥水材のコーティング手法の条件出しを行った。これらの実施により、約 5  $\mu\text{L}$  程度の吸水量制限を実施できた (図 4)。

紙媒体上に流路幅 1mm(吸水量約 5  $\mu\text{L}$  程度)の吸水領域の作製に成功したことにより、初期の目標「定量サンプルの分離」は達成できた。最終目標の極微量(約 1  $\mu\text{L}$ )に関しては、さらなる微調整が必要ではあるが、実用的には十分に少量のサンプル液体での流動を確保できた。

また、ステンレス鋳型を用いた

流路作製手法をベースに、サンプル流動速度と、吸水量の安定化を研究した。流動速度は Washburn の原理に基づき流路が小さい方が遅く流れる。流動速度が遅いとサンプルの蒸発が起こるため、蒸発を避ける観点から実用的な流路幅は約 3mm 以上が必要であった。また流路上面底面にマスキングテープを貼る事で蒸発を防ぎ、吸水量約 20  $\mu\text{L}$  で誤差は約 5%に制御することが出来た。また 5  $\mu\text{L}$  以下の吸水量制限には、本技術のステンレス鋳型の手法を微細化および紙媒体の基材変更による対応を考えており、今後も研究予定である。また本研究のサンプル流動速度については、矩形流路内の流体挙動が重要になる。このため矩形流路中での流体挙動に関する解析研究を行い、その成果を応用物理学会で発表した。

## (2) 電極センサの集積化と測定

電極形成は蒸着方法とスクリーン印刷+めっき方法で行った。蒸着方法では、電極形成時の紙媒体の熱変形(焦げつく・反る)が起こり、安定な形成が出来なかった。スクリーン印刷+めっきの方法では、幅 0.5mm サイズの電極形成に成功した。ここで、めっき手法での形成では、紙繊維の内部にまで電極形成が行われる事を確認した (図 6)。これはめっき液が紙媒体に浸透した状態で電極形成が進むためである。これによりサンプル溶液との接触面積を増やし、接触抵抗を減らすことが可能となった。

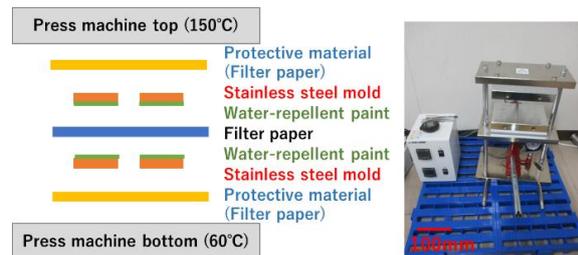


図 3 流路作製に用いたプレス機と実施内容

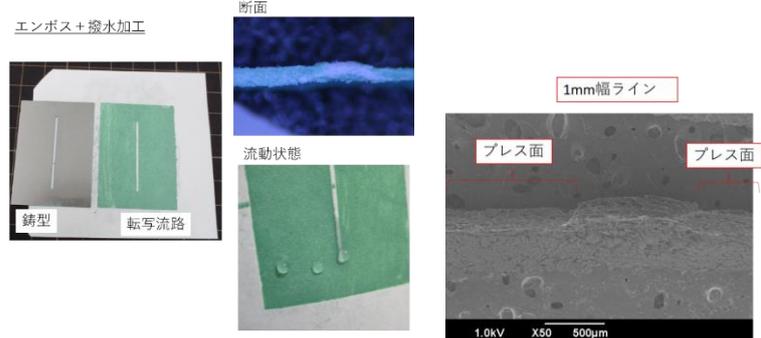


図 4 流路鋳型(幅 1mm)とその転写流路

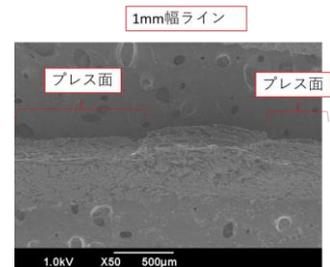


図 5 流路(幅 1mm)の SEM 画像

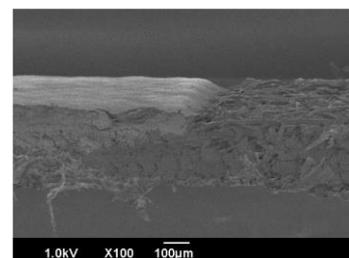


図 6 電極断面の SEM 画像

吸水量制限（約  $20 \mu\text{L}$ ）および電極形成（幅  $0.5\text{mm}$ ）が可能になったため、測定用のチップ試作を行った。紙媒体流路にそって楯歯状に電極を配置し、サンプル流動に沿って電気伝導率を測定できる構造に作製した（図 7、8）。作製した試作チップで NaCl 溶液の電気伝導率の計測を行った。測定は LCR メーター（DE5000, DER EE Electrical Instrument Co., Ltd）を測定チップに繋いで交流抵抗値から評価した。測定条件は、周波数  $1 \text{ kHz}$ 、電極間電圧  $0.5 \text{ V}$  とし、測定間隔は  $1 \text{ 秒}$  で連続測定をした。

測定サンプルは NaCl 溶液を、生理食塩水（ $0.9\text{w/v}\%$ ）を基準に  $\pm 0.2 \text{ w/v}\%$  の濃度で 3 種類評価した（ $0.7, 0.9, 1.1 \text{ w/v}\%$ ）。これは血液中の標準的な NaCl 濃度  $0.9 \text{ w/v}\%$  を基準に異常値の  $\pm 0.2 \text{ w/v}\%$  までの評価に相当する。

NaCl 溶液について LCR メーターで電気抵抗を測定した例（ $0.7 \text{ w/v}\%$  の測定例）が図 9 である。流動にそって電気抵抗が下がっているのが確認できる（赤色矢印の点で次の電極に到達）。安定化がみられる  $3\sim 9$  区間の電極部で測定値を評価した。食塩水の  $0.7, 0.9, 1.1\text{w/v}\%$  の電気抵抗値はそれぞれ  $3.99 \pm 0.05$ 、 $3.53 \pm 0.17$ 、 $2.78 \pm 0.18 [\Omega \cdot \text{m}]$  であった。これらの電気抵抗率は濾紙を含んだ値であり、ろ紙の電気抵抗と電極の表面積に依存する電極とサンプルの接触抵抗を含んでいる。3 種のサンプルの評価値が適切な値かを評価するため、同サンプル溶液を既存の電気伝導率計（HORIBA, D-210C-S）を用いて測定した値と、紙媒体チップで評価した値を比較した（図 10）。測定値は異なる値を示すが、相関係数は  $0.967$  となっており各サンプルは 1 対 1 の比例対応を見ることができている。すなわち相対値の評価が可能である事を示すことが出来た。

基礎化学薬品で電気伝導率が評価可能な事を示せたため、体液（血液）での本紙媒体チップの評価に進んだ。

宮崎大学医学部と連携し同大学倫理委員会の承認を得た後に、ヒト血液を用いた紙媒体チップの測定実験を実施した。本実験では、基礎的な血液検査と紙媒体チップ測定を並行で実施した。紙媒体チップでは、全血の電気伝導率を測定した。また血液検査で得られた値から WBV（whole blood viscosity）を評価し、WBV と全血の電気伝導率の間の相関を調べる事ができた（この結果は、2024 年度の国際学会 IEEE Sensors へ投稿中であり、査読審査中のためデータの公開を控える。）ヒト血液での実験では、そのフィルター効果は得られない事が判明した。これは赤血球の変形が起こったため、紙基板中に流れた状態である。そのため、紙媒体チップ単体での血漿分離は不可能であり、追加で分離用フィルターを追加するなど、別手法を検討する必要がある事が分かった。

なお、本チップの歩留まりが悪い事が判明した。向上について原因究明をすすめ、現在歩留まり率  $30\%$  程度まで向上させることに成功した。測定実験および実用にはまだ低い歩留まりのため、さらなる改善が必要である。これは今後の課題となった。

なお、本研究で得られた測定技術およびチップ形状・作製技術に関しては独創性・新規性の高い知財のため、特許を出願した。

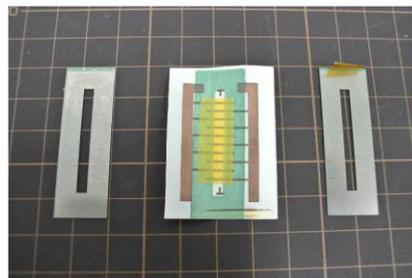


図 7 作製した測定用紙媒体チップとその流路形成用鋳型

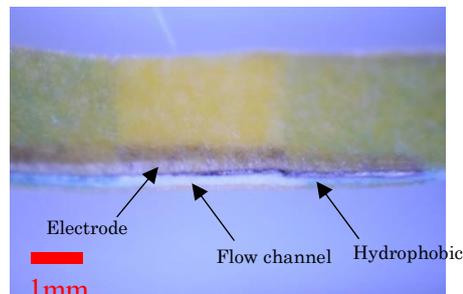


図 8 測定用紙媒体チップ断面

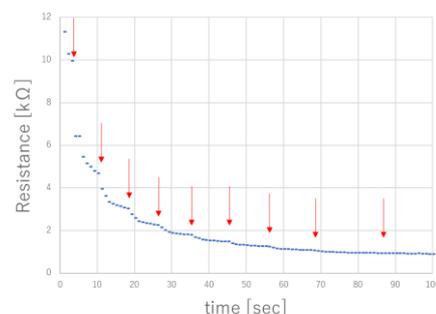


図 9 NaCl 溶液の電気抵抗測定例（赤矢印部が次の電極への到達点）

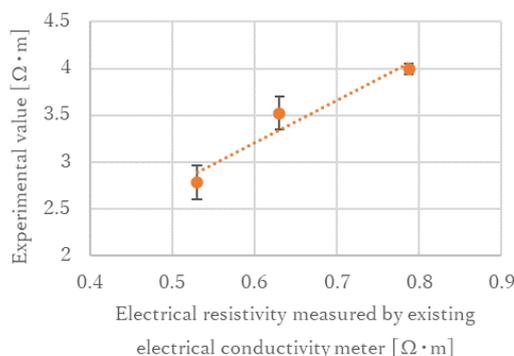


図 10 既存装置との電気抵抗測定結果の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sakamoto Kenji, Hachiya Yuriko, Kobayashi Koichiro, Yoshitama Kazuo             | 4. 巻<br>143             |
| 2. 論文標題<br>Prototype Paper-Based Microfluidic Chip for Electrical Resistivity Measurement | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines                                  | 6. 最初と最後の頁<br>269 ~ 273 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1541/ieejsmas.143.269                                      | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sakamoto Kenji, Hachiya Yuriko, Kobayashi Koichiro | 4. 巻<br>143             |
| 2. 論文標題<br>マイクロ流体チップによる血漿模擬サンプルの電気伝導率評価                      | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines     | 6. 最初と最後の頁<br>132 ~ 136 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1541/ieejsmas.143.132         | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                       | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>古川 雄登, 坂本 憲児, 小林 孝一朗   |
| 2. 発表標題<br>矩形型マイクロ流路内流動における解析解の比較 |
| 3. 学会等名<br>第70回応用物理学会 春季学術講演会     |
| 4. 発表年<br>2023年                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>坂本 憲児, 八谷 百合子, 小林 孝一朗                     |
| 2. 発表標題<br>マイクロ流体チップを用いた電気伝導率測定および Walden 法則を用いた粘度評価 |
| 3. 学会等名<br>第38回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム            |
| 4. 発表年<br>2021年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小林 孝一郎, 坂本 憲児                  |
| 2. 発表標題<br>電気抵抗率測定のための紙媒体マイクロ流体チップの流動解析   |
| 3. 学会等名<br>第40回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム |
| 4. 発表年<br>2023年                           |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>宇野 真由美, 小森 真梨子, 小林 孝一郎, 坂本 憲児  |
| 2. 発表標題<br>不織布上でのマイクロ流路作製と溶液の電気伝導度測定への応用  |
| 3. 学会等名<br>第40回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム |
| 4. 発表年<br>2023年                           |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                                 |              |                     |
|---------------------------------|--------------|---------------------|
| 産業財産権の名称<br>電気伝導性測定装置及びその製造方法   | 発明者<br>坂本憲児  | 権利者<br>国立大学法人九州工業大学 |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2022-078911 | 出願年<br>2022年 | 国内・外国の別<br>国内       |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                            | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                      | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 小林 孝一郎<br><br>(Kobayashi Koichiro)<br><br>(10781776) | 大島商船高等専門学校・商船学科・准教授<br><br><br><br>(55502) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|