

機関番号：24506

研究種目：基盤研究（C）（2）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20510015

研究課題名（和文）3次元マイクロ流路を用いた多検体超高感度の
可搬式 ELISA 環境計測システムの研究研究課題名（英文）Research on high sensitive handy ELISA system
for multi- environmental analysis using 3D micro fluidic networks

研究代表者

内海 裕一（UTSUMI YUICHI）

兵庫県立大学高度産業科学技術研究所准教授

研究者番号：80326298

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、代表者が提案した ELISA マイクロ積層システムの高感度化と多検体化のための 3 次元集積化を検討し、システム内における全ての流路を同時駆動し、可搬式への展開が可能な超高感度で多検体分析可能な ELISA 環境分析システムを実現することにある。複数の被検物質及び薬液投入→混合→抗体固定化→反応→検出に至る一連の操作が 1 システム上で連続的に行われるための、液体保持、送液、混合、抗体固定化の効率的な制御方法として、各単位化学操作毎に対応した水平/垂直流路を Compact Disk 内に配置し、遠心力で一括送液する 3 次元送液システムを実現した。さらにポリ塩化ビフェニルの多検体同時分析を高感度にて実現した。

研究成果の概要（英文）：There have been paid much attention to the lab-on-a-CD for the use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), due to its convenience for the automation of multiple microreactors [1-2]. However it is difficult to simultaneously realize the performance and integration of multiple reactor units due to the limited chip area. One of the biggest problem arise from the limitation is inadequate sensitivity due to shortage of surface area for the immobilization of antibody. we propose a new type lab-on-a-CD concept based on three-dimensional (3D) microchannel network. This paper reports high-sensitive detection of poly-chlorinatedbiphenyl (PCB) by using bundle-like capillary structure on a 3D lab-on-a-CD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：環境分析、チップ分析、生体分析、マイクロメカトロニクス、バイオリアクター

1. 研究開始当初の背景

近年、内分泌攪乱化学物質(EDCs)が生態系に及ぼす深刻な影響が明らかになり、各環境レベルでの多角的なモニタリングが急務

となっている。このため、環境中の様々な化学物質を高速・高感度に測定する多検体・多成分の分析技術が求められている。一方、主に医学・臨床の分野で実用化が進んでいる簡

便な分析手法として酵素免疫測定法（ELISA法）が挙げられるが、従来のプレートキットや試験管を用いる方法では、洗浄機や読込み機など複数の機器が必要で、分析時間は数日を要し、微量環境分析には感度が不十分という問題があった。

我々は、この課題を解決するために、混合槽、免疫マイクロリアクター（抗原抗体反応槽）、光検出槽（UV吸光度又は蛍光検出）の各機能槽を積層したELISA環境分析マイクロ積層システムを提案した。ここでELISAは放射光で微細加工した、マイクロキャピラリー集合体を用いる。これ抗体固体化の表面積を飛躍的に増大させるのみならず、垂直流体フィルターの働きも有し、各槽間の仕切バルブとなって流体制御を行うものである。本研究では、高いアスペクト比、もしくは、キャピラリーがクロスリンクした構造を用いて薬液の混合効率を高めることも試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、代表者が提案したELISAマイクロ積層システムの高感度化と多検体化のための3次元集積化を検討し、システム内における全ての流路の同時駆動法を提案することにより、可搬式への展開が可能な超高感度で多検体分析可能なELISA環境分析マイクロ積層システムを実現することにある。積層システム中の流体を送液する方法として、新たに遠心力を利用した回転式の3次元送液方法を提案する。抗原抗体反応は、マイクロ抗体キャピラリー集合体を用いるために回転基板内に大幅な集積化が可能となり、同一面積で従来の数十倍の検体処理が可能となり、蛍光検出との併用により、数百倍の感度向上が見込める。しかも、送液用のポンプやバルブが不要であり、簡便で安価な可搬式小型システムの構築が可能となる。本研究では上記システムの適用対象として内分泌攪乱化学物質であるノニルフェノールなどのアルキルフェノール類の分析に適用する。

3. 研究の方法

本研究では上記システムの適用対象として、海底への蓄積が進む代表的な内分泌攪乱化学物質であるノニルフェノールなどのアルキルフェノール類に着目する。これらの多検体微量環境分析を実現するために、以下の方法、手順によって研究を進める。

（1）多検体ELISA環境分析マイクロ積層システムの設計

数値流体力学解析（CFD）を用いて複数（5～10検体）の被検物質の同時測定が可能なELISAシステムの流路構成と流体制御法の検

討を行い、環境分析システムを試作する。代表者が新規に開発した放射光を用いた3次元ナノプロトタイプング法により、樹脂（PMMA、PTFE等）のマイクロ抗体キャピラリー集合体を作製する。これに検体と試薬導入、分注・混合、及び光（UV吸収・蛍光）検出の各機能槽を積層して連続化学操作可能な集積化システムを試作する。

（2）遠心力駆動3次元マイクロELISAシステムの提案と試作

システムの集積度をさらに大幅に向上させるために、遠心力を利用した回転式の3次元送液方法を検討する。マイクロキャピラリー集合体構造と平面流路構造を用いて、垂直方向および面内方向に任意に連続送液を可能とする流路構造、制御方法を検討する。

（3）3次元マイクロELISAシステムを用いた、高感度分析の実現。

2)で提案したシステムを用いて、微量環境物質の高感度分析を実現する。この際、被検物質のELISAの感度を従来の数百倍に高めるために、マイクロ免疫応答場の微細化と3次元集積化を試み、抗体固定化表面積をさらに増大させると同時に抗原抗体反応時の拡散律速反応時間を大幅に短縮する。

4. 研究成果

（1）多検体ELISA環境分析マイクロ積層システムの

申請者が提案し性能実証した垂直ELISAシステムを集積化し、5検体の被検物質についての同時測定が可能な環境分析システムを作製した。数値流体力学解析（CFD）を用いて複数の被検物質の同時測定が可能なELISA環境分析システムの流路構成と流体制御法を検討し、構造・制御パラメータを最適化した。さらに、代表者が開発した波長可変型の放射光ディープX線リソグラフィとナノインプリント技術を統合した3次元ナノプロトタイプング法によりマイクロ抗体キャピラリー集合体の集積化を行った。マイクロ抗体キャピラリー集合体は、垂直流体フィルターの働きも有し、各槽間の仕切バルブとなって流体制御を行うものである。本研究では、高いアスペクト比、もしくは、キャピラリーがクロスリンクした構造を用いて薬液の混合効率を高めることに成功した。さらに被検物質と試薬の高速攪拌槽、及び光（UV吸収）検出槽を併行して作製し、これらを積層してELISA環境分析システムの試作を行った（図1）。

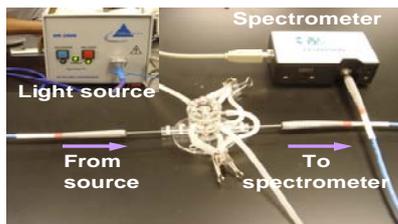


図1 試作したELISA環境分析マイクロ積層システム

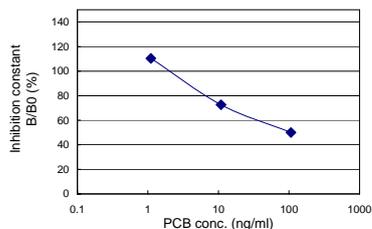


図2 ELISA環境分析マイクロ積層システムを用いて得られたPCBの検量線

また、図2に、有機溶媒用のテフロン材質からなるマイクロキャピラリー集合体を用いて、発ガン物質のポリ塩化ビフェニル (PCB) の濃度を測定した結果を示す。データの定量性の点で改善すべき余地があるが、PCB濃度との優れた相関があり競合的ELISAによる高感度な環境分析の可能性を示すデータと言える。

(2) 遠心力駆動3次元マイクロELISAシステムの提案と試作

システムの集積度をさらに大幅に向上させるためには、試料と試薬の送液方法をより簡便なものにする必要がある。圧力空気に代わる送液方法として、遠心力を利用した回転式の3次元送液方法を検討した。具体的には、異なる単位化学操作機能毎に異なる水平/垂直流路を回転基板内に配置し、それらを積層したシステムを設計し、試作した(図2)。動作試験の結果、複数の被検物質及び薬液投入から、混合、免疫反応、基質導入、酵素反応、反応停止、吸光度検出に至る各操作に対応した逐次送液を回転数の制御のみによって可能なことを検証した。

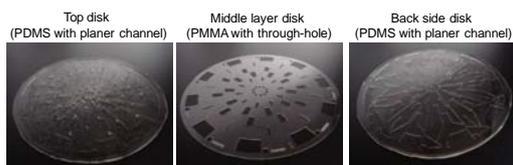


図3 試作した多検体ELISA環境分析マイクロ積層システム

(3) 3次元マイクロELISAシステムを用いた、高感度分析への適用。

競合法ELISAを想定した流路構成を設計し、ディープX線リソグラフィとUVフォトリソグラフィを用いて実際のCD型マイクロ積層システムを作製し、分析特性を評価した。競合法ELISAを用いてポリ塩化ビフェニルを定量分析した。試作ディスクは、6検体同時に定量分析が可能で、約0.01 ng/mlの高い感度を得た。図4に得られた検量線を示す。

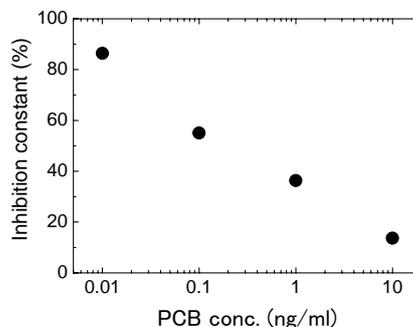


図4 PCBの検量線

さらに、免疫反応ディスクと光学検出ディスクの2枚を積層したディスクを用いて、濃度の異なるマウス免疫グロブリンGを6検体同時にサンドイッチELISAにて測定することに成功した。この測定ではディスクの回転数を1500rpmまで5段階に逐次変化するのみでELISA測定の実現した。また、数ng/mlという高い測定感度を得た。

以上、本研究ではこれまで提案してきた垂直型マイクロリアクターの新たな展開を示した。これは3次元流路ネットワークを用いることで、平面型Lab-on-a-chipが有する機能と、垂直型マイクロリアクターの機能の融合を図ったものである。即ち積層構造と3次元流路ネットワークを形成することで複数の機能要素をシームレスにインターコネクションし、物理的にも単位科学的にもシームレスな系を構築できることを実証した。これにより、Lab-on-a-CDという制約の大きなプラットフォームにおいても、3次元流路ネットワークによる多様な機能とのカップリングが可能となることが示唆された。

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12件)

- ① Yoshiaki Ukita, Mitsuyoshi Kishihara, Yuichi Haruyama, Kazuhiro Kanda, Shinji Matsui, Kozo Mochiji, and Yuichi Utsumi, "Fabrication of Polytetrafluoroethylene microparts by High-Energy X-ray Induced Etching",

- Japanese Journal of Applied Physics, 47, 337-341 (2008).
- ② Yoshiaki Ukita, Toshifumi Asano, Kuniyo Fujiwara, Katsuhiro Matsui, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, Tomohiko Kanie, Makoto Katayama, and Yuichi Utsumi, "Application of vertical microreactor stack with polystyrene microbeads to immunoassay", Sensors and Actuators A, 145-146, 449-455 (2008).
- ③ Yuichi Utsumi, Toshifumi Asano, Yoshiaki Ukita, Katsuhiro Matsui, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, "High sensitive immunoassay for endocrine disrupting chemicals using antibody immobilized microcapillary bundle structure" Microsystem Technologies, 14, 1399-1403 (2008).
- ④ Yoshiaki Ukita, Toshifumi Asano, Kuniyo Fujiwara, Katsuhiro Matsui, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, Makoto Katayama, Tomohiko Kanie, and Yuichi Utsumi, "Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay using vertical Microreactor Stack with Microbeads" Microsystem Technologies, 14, 1573-1579 (2008).
- ⑤ Kuniyo Fujiwara, Yoshiaki Ukita, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, Tomohiko Kanie, Makoto Katayama, and Yuichi Utsumi, "High Efficiency Mixing by the Use of Cross-Linked Micro Capillary Fluid Filter" Microsystem Technologies, 14, 1411-1416 (2008).
- ⑥ Saki Kondo, Yoshiaki Ukita, Kuniyo Fujiwara, Yuichi Utsumi, "A Novel Micromixer with Three-Dimensionally Cross-Linked Capillary Array Structure Fabricated by Deep X-ray Lithography" IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems, 129, 2, 277-281 (2009). (日本語論文)
- ⑦ Yuichi Utsumi, Shigeaki Yamamoto, Tomoyuki Kuroki, and Masaaki Okubo "Direct bonding of PFTF sheets assisted by synchrotron radiation induced surface modification" Microsystem Technologies, 16, 8-9, 1495-1500, (2010).
- ⑧ Yoshiaki Ukita, Saki Kondo, Chiwa Kataoka, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, and Yuichi Utsumi, "Immunoassay using poly-tetrafluoroethylene microstructure in organic solvent" Microsystem Technologies, 16, 8-9, 1465-1470, (2010).
- ⑨ Saki Kondo, Tsukasa Azeta, Yoshiaki Ukita, Yuichi Utsumi, "Vertical Liquid Transportation Through Capillary Bundle Structure Using Centrifugal Force" Microsystem Technologies, 16, 8-9, 1577-1580 (2010).
- ⑩ Saki Kondo, Tsukasa Azeta, Yoshiaki Ukita, Chiwa Kataoka, and Yuichi Utsumi "Immunoassay System Using Three-dimensional Micro Fluid Network" IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems, 130, 10, 1844-1816, (2010). (日本語論文)
- ⑪ Yoshiaki Ukita, Saki Kondo, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, Chiwa Kataoka, Yuichi Utsumi, "Vertical Microreactor Stack Consist of poly-(tetrafluoroethylene) Microfluidics for Immunoassay" IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems, 130, 10, 1756-1761 (2010). (日本語論文)
- ⑫ Saki Kondo, Yoshiaki Ukita, Kuniyo Fujiwara, Yuichi Utsumi, "A Novel Micromixer with Three-Dimensionally Cross-Linked Capillary Array Structure Fabricated by Deep X-ray Lithography", Accepted for publication on 20th, Sep, 2010, Electrical Engineering in Japan, (2010).
- [学会発表] (計 16 件)
- ① Yoshiaki Ukita, Saki Kondo, and Yuichi Utsumi, "Vertical microreactor stack with cross-linked capillary structure for high-sensitive ELISA", 34th International Conference on Micro and Nano Engineering 2008, 7C-2, Greece, September 15- 18, 2008
- ② Yoshiaki Ukita, Tomoya Omukai, Saki Kondo, and Yuichi Utsumi, "The Advantages of Vertical Microreactor with Multifunctional Fluid Filter for Immunoassay", International Conference on Electronics Packaging 2008, 12B1-3, JAPAN, June 10- 12, 2008
- ③ [基調講演] Yuichi Utsumi "Development of 3D Micro Prototyping using Synchrotron Radiation and Its Application to Bio Micro Systems" The 7th International Conference on Machine Automation 2008 (ICMA2008), JAPAN, September 24 (Wednesday)-26 (Friday), 2008
- ④ Yuichi Utsumi, Tsunemasa Saiki, and Katsuhide Okada "Proposal of a novel continuous flow pumping operated by

- surface acoustic wave”, Twelfth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2008 (μ TAS2008), October 12-16, 2008, San Diego, California, USA
- ⑤ Saki Kondo, Yoshiaki Ukita, Kuniyo Fujihara, and Yuichi Utsumi, “Cross-linked Capillary Micromixer for High-sensitive Immunoassay” 2008 International Microprocess and Nanotechnology Conference (MNC2008), pp90-91, Oct 27-30, 2008
- ⑥ Yoshiaki Ukita, Saki Kondo, Chiwa Kataoka, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, and Yuichi Utsumi, “Immunoassay using poly-tetrafluoroethylene microstructure in organic solvent” 8th International Workshop on High-Aspect-Ratio Micro-Structure Technology 2009 (HARMST2009), pp143-144, June 25-28, (2009), Saskatoon, Canada
- ⑦ Yoshiaki Ukita, and Yuichi Utsumi, “Fluoroplastic mold for UV embossing fabricated by synchrotron radiation (SR) direct etching process” 8th International Workshop on High-Aspect-Ratio Micro-Structure Technology 2009 (HARMST2009), pp123-124, June 25-28, (2009), Saskatoon, Canada
- ⑧ Saki Kondo, Tsukasa Azeta, Yoshiaki Ukita, Yuichi Utsumi, “Vertical Liquid Transportation Through Capillary Bundle Structure Using Centrifugal Force” 8th International Workshop on High-Aspect-Ratio Micro-Structure Technology 2009 (HARMST2009), pp207-208, June 25-28, (2009), Saskatoon, Canada
- ⑨ [招待講演] Yuichi Utsumi “Development of 3D Micro Prototyping Process using Synchrotron Radiation and Its Application to Bio-Micro-Systems” International Symposium of East Asian Young Scientists Follow-up Program on Environmental- and Bio-Engineering 2009, pp7, September 7-8, (2009), Himeji, Japan
- ⑩ Yoshiaki Ukita, Saki Kondo, Chiwa Kataoka, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, and Yuichi Utsumi, “Environmental analysis by using antibody-bound fluoroplastic 3D capillary bundle microstructures” The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences 2009 (μ TAS2009), pp1931-1932, November 1-5, (2009), Jeju, Korea
- ⑪ Yoshiaki Ukita, Saki Kondo, Chiwa Kataoka, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, and Yuichi Utsumi, “Immunoassay using antibody-bound poly-tetrafluoroethylene capillary-bundle structure for environmental analysis”, Digest of Papers, 2009 International Microprocess and Nanotechnology Conference (MNC2009), pp712-713, November 16-19, (2009)
- ⑫ Yoshiaki Ukita, Tsukasa Azeta, Saki Kondo, Chiwa Kataoka, Shinichi Yusa, Masahiro Takeo, Yuzuru Takamura, and Yuichi Utsumi, “High-Sensitive Detection of Polychlorinated Biphenyl on Three-dimensional LAB-ON-A-CD”, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (μ TAS2010), pp345-347, October 3-7 (2010), Groningen, Netherland
- ⑬ Yoshiaki Ukita, Tsukasa Azeta, Saki Kondo, Chiwa Kataoka, Shinichi Yusa, Masahiro Takeo, Yuzuru Takamura, and Yuichi Utsumi, “High-Sensitive Enzyme-linked immunosorbent assay in Three-dimensional LAB-ON-A-CD”, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (μ TAS2010), pp1475-1477, October 3-7 (2010), Groningen, Netherland
- ⑭ Tsukasa Azeta, Yoshiaki Ukita, Yoshito Hirose, Saki Kondo and Yuichi Utsumi, “Three-dimensional Microfluidics Device Using Centrifugal Force”, Digest of Papers, 2010 International Microprocess and Nanotechnology Conference (MNC2010), 12D-11-107, November 9-12, (2010), Kokura, Japan
- ⑮ Tsukasa Azeta, Yoshiaki Ukita, Yoshito Hirose, Saki Kondo and Yuichi Utsumi, “High-Sensitive Enzyme-linked immunosorbent assay in Three-dimensional LAB-ON-A-CD”, Digest of Papers, 2010 International Microprocess and Nanotechnology Conference (MNC2010), 12D-11-109, November 9-12, (2010), Kokura, Japan
- ⑯ Yoshiaki Ukita, Tsukasa Azeta, Saki

Kondo, Chiwa Kataoka, Shinichi Yusa, Masahiro Takeo, and Yuichi Utsumi, "Three-dimensional Centrifugal Microfluidics for Environmental Analysis", Digest of Papers, 2010 International Microprocess and Nanotechnology Conference (MNC2010), 12D-11-109, November 9-12, (2010), Kokura, Japan

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

特願2008-236461

名称：微小化学システム及び微小化学システム装置

発明者：内海裕一

権利者：兵庫県

種類：

番号：特願2008-236461

出願年月日：2008年9月16日

国内外の別：国内

○取得状況 (計0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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内海 裕一 (UTSUMI YUICHI)

兵庫県立大学高度産業科学技術研究所准教授

研究者番号： 80326298

(2) 研究分担者

武尾 正弘 (TAKEO MASAHIRO)

兵庫県立大学大学院工学研究科准教授

研究者番号： 40236443

根来 誠司 (NEGORO SEIJI)

兵庫県立大学大学院工学研究科教授

研究者番号： 90156159

持地 廣造 (MOTCHIJI KOHZO)

兵庫県立大学大学院工学研究科教授

研究者番号： 40347521

(3) 連携研究者

浮田 芳昭 (UKITA YOSHIAKI)

北陸先端科学技術大学院大学助教

研究者番号： 40578100