

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350517

研究課題名(和文)濡れ性に基づく流体制御技術の構築とバイオセンサの迅速・高感度化

研究課題名(英文) Application of Hydrophobic Micropatterns to Immunosensor with Fluid Control Mechanism for Improving Sensitivity

研究代表者

山口 昌樹 (YAMAGUCHI, Masaki)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：50272638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微細周期構造を分子識別素子や信号変換素子に採用し、バイオセンサの流体制御技術を構築することを目的として、遠心流体弁の考案・試作、微細周期構造の付与と、試作したイムノセンサの総合評価を行った。まず、複数の槽を微細流路で繋いだ流体制御機構を有するディスク・チップを試作した。流路に3種類の微細周期構造を付与し、模擬唾液と模擬血液溶液を用いて流体弁の機能を比較した。ピッチ48ミクロンの並行型微細周期構造することによって、移動サンプル量が20%向上し、タンパク濃度が高くなるほどその効果が顕著になった。以上により、コルチゾール濃度を高感度に自動分析できるセンサシステムの開発を完了した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the effectiveness of periodic structure applied to this type of fluid control mechanism to improve the sensitivity of biosensors. We evaluated the functionality of centrifugal fluid valve with micrometer sized periodic structure in the micro-flow channel. A disposable compact disc-based chip with centrifugal fluid valve was designed for this evaluation. In this case, parallel pillars showed higher hydrophobicity than cross-shaped pillars. The transferred volume ratio increased by 20% compared to that without a micro-periodic structure when a protein solution with a similar concentration to that in saliva and plasma was used. It was shown that the static hydrophobicity dominates the switching characteristics in the proposed centrifugal fluid valve. Our study suggests that applying periodic structure to fluid control mechanisms is an effective means of realizing hydrophobic surfaces.

研究分野：生体医工学

キーワード：計測工学 生物・生体工学 分子認識 流体工学 ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的背景

疾患の診断指標に用いられる生化学物質、すなわちバイオマーカーの分析には、使用目的に即したバイオセンサ、イムノクロマト法、酵素標識免疫測定 (ELISA) 法などの化学分析方法が研究開発されている。ELISA 法は高感度であるが、専用の大型で高価な分析装置が必要となる。イムノクロマト法は簡便であるが、定量分析が極めて困難である。

それに対して、濃度を測定するバイオセンサは、その使用の容易さ、コンパクトなサイズ、短時間での測定、分析の自動化が可能といった長所がある。つまり、臨床現場での即時診断には、高感度で自動分析が可能なバイオセンサの開発が求められている。

(2) 学術的背景

高感度なバイオセンサに共通しているのは、分子識別素子に抗原 - 抗体反応 (イムノアッセイ) を用いていることである。分析したいバイオマーカーを抗原に見立て、抗体の優れた分子認識能力を用いてサンプル中のバイオマーカーを選択的に捕捉する。信号変換素子では、標識試薬を用いて競合反応させ、バイオマーカーの濃度に比例した電気化学反応や光学特性の変化に変換する。

バイオセンサでは、極微量なサンプルからバイオマーカーを補足・検出する構造として、微細な流路システム ( $\mu$ TAS) が用いられる。分子識別素子では、送液に流路の撥水性と遠心力を利用した流体弁が、反応領域の制御に疎水性コーティング剤が用いられる。信号変換素子では、未反応な標識試薬の残留や夾雑タンパクの非特異吸着が、検出電流の基準値を上昇させて感度幅を小さくしてしまうという課題があり、化学的な親水性処理や表面コーティング等が用いられている。すなわち、親水性や撥水性といった濡れ性の制御が、バイオセンサの迅速・高感度化の鍵となる。低侵襲化のために必要サンプル量を更に少なくしたり、一層の高感度化を図るためには、接触角が  $150^\circ$  を超える超撥水性や、 $0^\circ$  に近い超親水性が求められるが、材質 (表面自由エネルギー) の選択だけでは不可能に近い。

2. 研究の目的

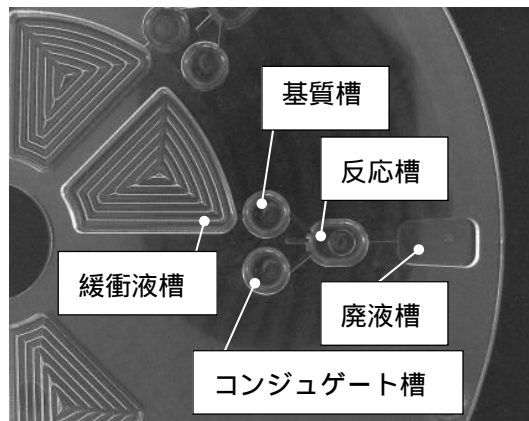
本研究では、物質表面のマイクロメートルからナノメートル領域の微細周期構造を設けることが、超撥水性・超親水性といった濡れ性の制御に有効であることを、分子識別素子の流路機構設計や、信号変換素子の洗浄機構に取り入れ、バイオセンサの流体制御技術を構築する。これを、ストレスマーカーの分析に応用することで、必要とされる高感度と、5 分以内の迅速分析を同時に達成し、臨床現場での即時分析ツールとなり得るバイオセンサを開発する。

具体的には、迅速・高感度化を図ったバイオセンサを開発することを目的として、下記

の 4 項目を行う。

- 1) 微量液体の送液: 撥水性と遠心力を利用してサンプル溶液を反応室へ移動させ、標識試薬と反応させる流体弁を高性能化する。超撥水性を発現する微細周期構造と、ディスク状センサの遠心機構を組み合わせ、僅か数  $\mu$ L のサンプルでも弁の開閉が機能する条件を見出す。
- 2) 反応領域の制御: 異なる濡れ性を発現する微細周期構造を反応室に適用し、わずか数

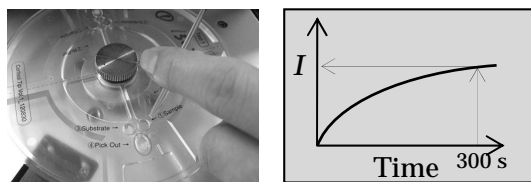
A



B

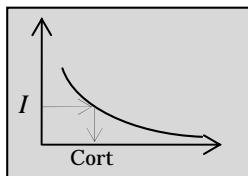


C

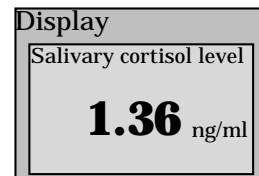


i. 唾液検体の滴下

ii. 発光強度の計測



iii. 検量線による唾液コルチゾール濃度への換算



iv. 測定結果の表示

図1 試作した唾液コルチゾール分析用イムノセンサ

μL のサンプルを効率的に分子識別素子へ収集することで、高感度な分析精度を実証する。

- 3) 迅速・完全な洗浄機構：流体弁と、微細周期構造を施した反応室を組み合わせた洗浄機構を新たに開発する。壁面へのタンパクの非特異吸着を防止し、サンプル中の夾雑物質や使用済み試薬を 90% 以上除去できる条件を見出す。
- 4) コルチゾールバイオセンサの迅速・高感度化：3 つの流体制御技術を、バイオセンサに適用し、血液に比べて濃度が一桁小さい唾液コルチゾール濃度 0.1 - 10 ng/mL を、サンプル量 5 μL、感度 10 pg/mL で 5 分以内に定量分析できるバイオセンサを開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 微量液体の送液

まず初めに、フォトリソグラフィーでシリコン型 (Si モールド) を試作し、実験と理論の両側面から濡れ性表面の設計技術の構築を行った。Wenzelモデルの3次元展開を行い、みかけの接触角の定量設計が可能であることを示した。

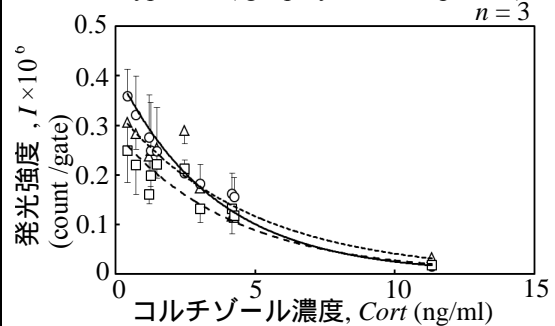
次に、使い捨て式のディスク形状センサ (ディスク・チップ) に流路と反応室を配置することで、撥水性と遠心力を利用してサンプル溶液の移動を制御する流体弁を考案・試作した (図1A)。ディスク・チップは、中央に固定穴を設けたディスク形状とし、同心円状に2ないし4つの分析部を配置することで、1枚で複数の同時分析を可能とした。1つの分析部は、緩衝液槽、サンプル・コンジュゲート槽、基質槽、反応槽、廃液槽を微細流路で繋いだ構造である。サンプル・コンジュゲート槽は、サンプル滴下口を兼ねている。

流路形状の長さ  $l$ 、幅  $w$ 、溝深さ  $d$  をパラメータとして最適化を図ったところ、唾液サンプルにおいて、回転数 (遠心力) の制御のみで開閉を制御できる流体弁を実現した。

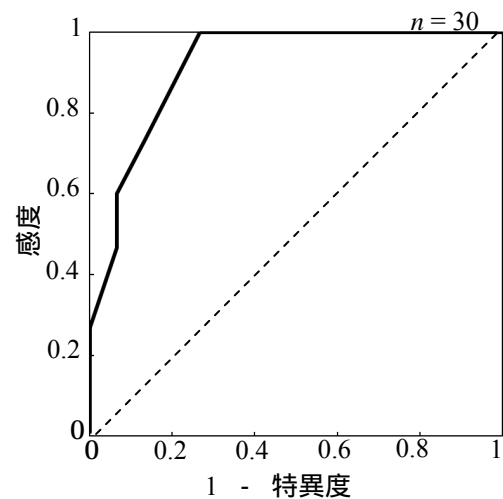
#### (2) 反応領域の制御

コルチゾールの分析原理は、サンプルである唾液検体を、ディスク・チップのコンジュゲート槽に滴下すると、コンジュゲートがそれに溶け込む (コンジュゲート溶液)。分析チップを所定回転数で回転させると、遠心力でコンジュゲート溶液が流体弁Aを通過できるようになり、反応槽に移され競合反応が起こる。ただし、寸法形状が異なるため、流体弁Bは通過できない。一定時間反応させた後に、分析チップを所定回転数で回転させると、遠心力でコンジュゲート溶液が流体弁Bを通過できるようになり、余分な液体が廃液槽に除去される。その後、基質槽から発光基質を反応槽へ流入させると、反応槽のコンジュゲートと発光基質が反応し、コンジュゲート濃度に比例した発光強度が観察される。

- △- : Type B-B (BSA-BSA)
- : Type I-B (IgG polymer-BSA)
- : Type I-M (IgG polymer-Milk protein)



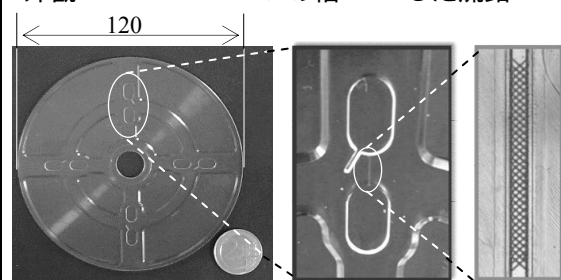
(A) 表面処理条件による検量線の比較



(B) 唾液分析におけるイムノセンサの ROC 曲線 (閾値: 2 ng/ml)

図 2 イムノセンサの感度特性

- |                         |                        |                         |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| A: ディスク<br>周・チップの<br>外観 | B: 流路で<br>結ばれた<br>2つの槽 | C: 微細周<br>期構造を施<br>した流路 |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|



D: 遠心流体弁の形状寸

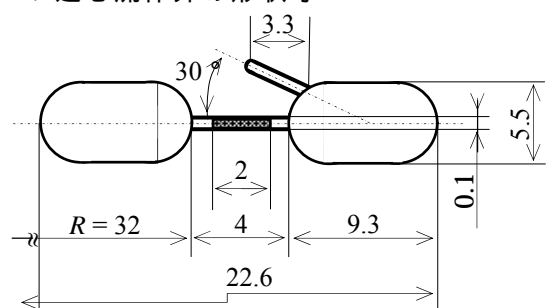


図 3 遠心流体弁を有するディスク・チップへの微細周期構造の付与 (単位: mm)

サンプル・コンジュゲート槽には酵素標識抗コルチゾール抗体を固相化したコンジュゲート・パッドを、基質槽には蛍光基質をそれぞれ導入した。コンジュゲート・パッドを採用した結果、反応領域を制御できることを示すことができた。

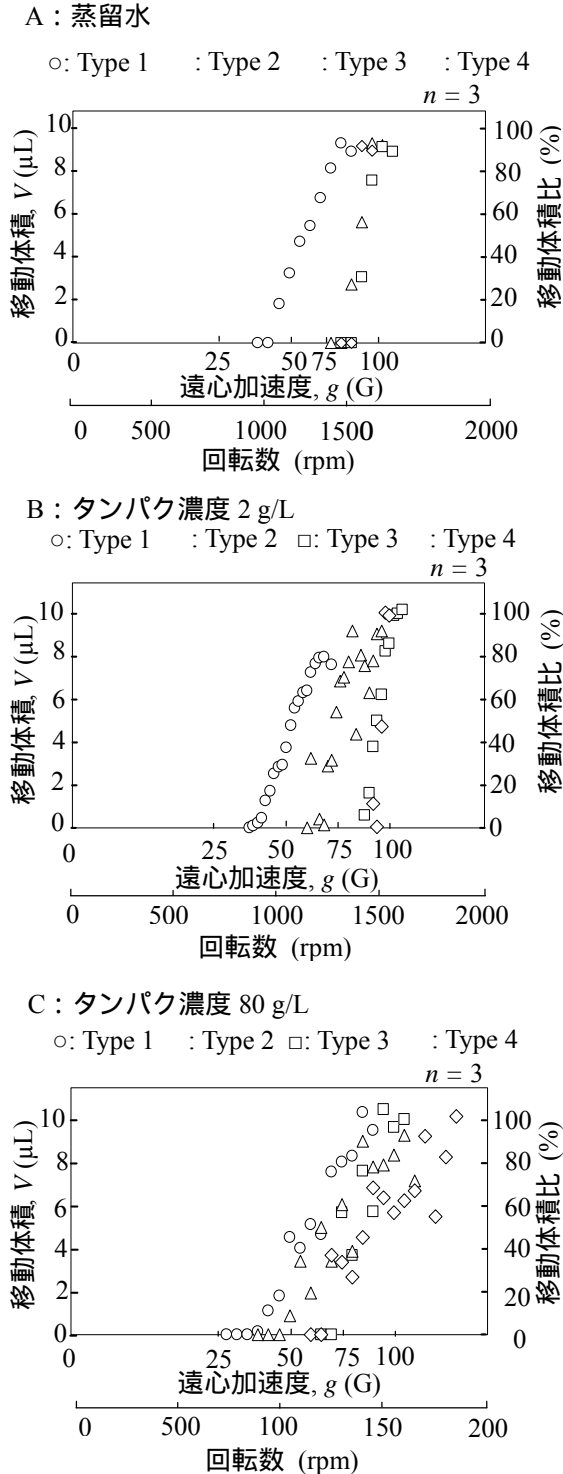


図 4 ディスク・チップにおける微細周期構造の有無による移動体積と遠心加速度の関係

### (3) 迅速・完全な洗浄機構

ストレスマーカーであるコルチゾール分析に必要な複数の層や流路から構成される流体制御機構を考案・試作した (図1B, C)。流体制御機構への前処理の影響を明確化するために、BSA-PBS-T (B), milk protein (M), IgG polymer (I) の3種の前処理剤の有無による分析感度への影響を、唾液検体を用いて比較した (図2A)。その結果、コンジュゲート・パッドに IgG polymer, ディスク・チップにmilk protein を用いた条件において最も感度が向上した。この時、コルチゾール濃度 0.4 - 11.3 ng/mL の範囲を相関係数 0.92, CV値38.7%で分析できた。

唾液分析におけるイムノセンサのROC 曲線を求めた (図2B)。閾値: 2 ng/mL としたとき、AUCは0.89となり良好な判別能が確認された。

以上のように、唾液を用いてイムノセンサの性能検証を行い、ストレスマーカーであるコルチゾールの濃度分析に使用可能であることを実証した。

### (4) バイオセンサの迅速・高感度化

サンプル槽と反応槽を繋ぐ流路に3種類の微細周期構造パターンを施した濡れ性評価用ディスク・チップを試作し、流体弁の性能を未加工品と比較した。流体制御機構の構造は、2つの槽を1本の流路がつかなく他基本形状とした (図3A, B, C)。槽の容量は 30 μL, 流路の長さは 4 mm とした (図3D)。高精度微細加工機でディスク・チップの金型を製作し、射出成形によってディスク・チップを試作した。

模擬唾液 (2 g/L), 模擬血液 (80 g/L) 溶液を用いて流体弁の機能を比較した (図4)。ピッチ 48 μm の並行型微細周期構造することによって、移動サンプル量が 20%向上した。また、タンパク濃度が高くなるほど微細周期構造が流体遠心弁の切り替え性能に与える効果が顕著になった。以上により、微細周期構造の付与によるイムノセンサの迅速・高感度化を完了した。

### 4. 研究成果

本研究では、遠心流体弁の考案・試作、それへの微細周期構造の付与と、試作したイムノセンサの総合評価を行った。緩衝液槽, サンプル・コンジュゲート槽, 基質槽, 反応槽, 廃液槽を、微細流路で繋いだ流体制御機構を有するディスク・チップを試作した。流路に3種類の微細周期構造を付与し、模擬唾液と模擬血液溶液を用いて流体弁の機能を比較した。ピッチ 48 μm の並行型微細周期構造することによって、移動サンプル量が 20%向上し、タンパク濃度が高くなるほどその効果が顕著になった。以上により、唾液コルチゾール濃度を自動分析できるセンサシステムの開発を完了した。

## 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 13 件, うち査読付論文計 12 件)

- [1] 山口 昌樹, 平岡 仁: 微細周期構造の付与で検出特性を改善した気泡センサ, 電気学会論文誌 E, **Vol.136-E**, No.4 (2016) in press (査読有)
- [2] 山口 昌樹: 唾液バイオマーカーはストレスを発信する, ストレス科学, **Vol.29**, No.4 (2015) pp.355-365
- [3] Tomoki Shimakura and Masaki Yamaguchi: Application of hydrophobic micropatterns to centrifugal fluid valve in flow channel, Journal of Adhesion Science and Technology, **Vol.29**, No.23 (2015) pp.2565-2575 (査読有)
- [4] Masaki Yamaguchi, Yuki Tezuka, Kazunori Takeda, and Vivek Shetty: Disposable Collection Kit for Rapid and Reliable Collection of Saliva, American Journal of Human Biology, **Vol.27** (2015) pp.720-723 (査読有)
- [5] Masaki Yamaguchi, Shinya Sasaki, Shojiro Suzuki, Yuki Nakayama: Injection-molded Plastic Plate with Hydrophobic Surface by Nano-periodic Structure Applied in Uniaxial Direction, Journal of Adhesion Science and Technology, **Vol.29**, No.1 (2015) pp.24-35 (査読有)
- [6] Masaki Yamaguchi, and Yuta Kimura: Proposal for a Power Supply Line-free Mass Sensor for Measuring Total Protein in Human Saliva, Sensor Letters, **Vol.12** (2014) pp.1186-1189 (査読有)
- [7] Masaki Yamaguchi, Hiroki Katagata, Yuki Tezuka, Daisuke Niwa, Vivek Shetty: Automated-immunosensor with centrifugal fluid valves for salivary cortisol measurement, Sensing and BioSensing Research, **Vol.1** (2014) pp.15-20 (査読有)
- [8] Takashi Yonekura, Kazunori Takeda, Vivek Shetty, Masaki Yamaguchi: Relationship between Salivary Cortisol and Depression in Adolescent Survivors of a Major Natural Disaster, The Journal of Physiological Sciences, **Vol.64**, No.4 (2014) pp.261-267 (査読有)
- [9] Masaki Yamaguchi and Yuki Nakayama: Photomask Patterning for Slope-Form Deep-Etching Using Deep-Reactive-Ion Etching and Gradation Exposure, Sensors and Materials, Vol. 26, No.1 (2014) pp.31-37 (査読有)
- [10] Theodore F. Robles, Rassilee Sharma, Lauren Harrell, David A. Elashoff, Masaki Yamaguchi, Vivek Shetty: Saliva Sampling

Method affects Performance of a Salivary  $\alpha$ -Amylase Biosensor, The American Journal of Human Biology, **Vol.25**, No.6 (2013) pp.719-724 (査読有)

- [11] Megumi Mizawa, Masaki Yamaguchi, Chieko Ueda, Teruhiko Makino, Tadamichi Shimizu: Stress evaluation in adult patients with atopic dermatitis using salivary cortisol, BioMed Research International, **Vol.2013** (2013) pp.1-5 (査読有)
- [12] 中野 敦行, 長山 優, 山口 昌樹: 香辛料により引き起こされる生理反応の唾液バイオマーカーを用いた評価, ライフサポート, **Vol.25**, No.2 (2013) pp.63-67 (査読有)
- [13] 中山 友紀, 長山 優, 山口 昌樹: 30種の精油を用いた嗜好性の個人差に関する実態調査, アロマセラピー学雑誌, **Vol. 13**, No.1 (2013) pp.21-28 (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件, うち招待講演計 6 件)

- [1] 山口 昌樹: 唾液バイオマーカーはストレスを発信する, 日本ストレス学会学術総会第 30 回記念大会, 日本大学文理学部百周年記念館 (世田谷区), 2014 年 11 月 7 日 (招待講演)
  - [2] 山口 昌樹: 唾液コルチゾール測定器の開発とビッグデータの活用, 第 66 回日本自律神経学会総会, 愛知県産業労働センター (名古屋市), 2013 年 10 月 24 日 (招待講演)
  - [3] Masaki Yamaguchi, Shohei Sasaki, Yuki Tezuka, Makoto Sasaki, Yoshikatsu Imai, Kenji Hamachi, Daisuke Niwa, and Vivek Shetty: Portable Salivary Cortisol Immunosensor with a Centrifugal Fluid Valve, 3rd International Conference on Bio-Sensing Technology, P91, Sitges (Spain), 2013 年 5 月 13 日
- 等, 計 13 件

〔図書〕(計 7 件)

- [1] 山口 昌樹 (分担執筆): 非侵襲的検体検査の最前線, 第 II 編第 4 章 1 節唾液検査のストレス測定への展開, (株)シーエムシー出版, 東京 (2015) pp.46-54 (261p.) ISBN: 978-4-7813-1052-7
- [2] 山口 昌樹 (分担執筆): ウェットプロセスによる精密薄膜コーティング技術, 第 3 章第 6 節[9]フィルム・プラスチックへの微細周期構造の形成と濡れ性の制御, (株)技術情報協会, 東京 (2014) pp.554-561 (561p.) ISBN: 978-4-86104-541-7
- [3] 山口 昌樹 (分担執筆): 次世代ヘルスケア機器の新製品開発, 第 3 章第 7 節唾液バイオマーカーによる診断技術とストレスの可視化, (株)技術情報協会, 東京 (2014) pp.93-101 (684p.) ISBN: 978-4-86104-532-5

- [4] 三林 浩二 監修, 山口 昌樹 (分担執筆): スマート・ヒューマンセンシング, 第1編 第8章 健康回復支援のための唾液ストレスセンサ, (株)シーエムシー出版, 東京 (2014) pp.68-76 (265p.) ISBN: **978-4-7813-0934-7**
- [5] エヌ・ティー・エス 編, 山口 昌樹 (分担執筆): パーソナル・ヘルスケア, 第2編 第6章 第3節 唾液ホルモンから慢性ストレスを可視化するポータブル機器の開発, (株)エヌ・ティー・エス, 東京 (2013) pp.227-233 (359p.) ISBN: **978-4-86469-080-5**
- [6] Kiyoshi Toko Eds., Masaki Yamaguchi and Hajime Nishimiya (分担執筆): Biochemical Sensors - Mimicking Gustatory and Olfactory Senses, Chapter 28: Evaluating the Psychobiologic Effects of Air Conditioner through Biomarkers, Pan Stanford Publishing Pte Ltd., Singapore (2013) pp.495-515 (560p.) ISBN: **978-9-81426-707-6**
- [7] 菅原 隆 編, 山口 昌樹, 清水 忠道 (分担執筆): 皮膚の測定評価法バイブル, 第1部第7章第3節 紫外線による皮膚のダメージ度を皮膚マーカーで評価したい, (株)技術情報協会, 東京 (2013) pp.267-275 (740p.) ISBN: **978-4-86104-480-9**

〔産業財産権〕

出願状況 (計3件)

名称: 三次元造形装置及びワイヤ貫入機構ユニット

発明者: 山口 昌樹

権利者: 岩手大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-139042 号

出願年月日: 2014年7月4日

国内外の別: 国内

名称: マイクロ流路装置

発明者: 千葉 豪, 山口 昌樹

権利者: 大日本印刷, 岩手大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-49331 号

出願年月日: 2014年3月12日

国内外の別: 国内

名称: 心身状態関連情報提供装置, 心身状態関連情報提供方法およびプログラム

発明者: 山口 昌樹

権利者: 岩手大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-29643 号

出願年月日: 2014年2月19日

国内外の別: 国内

取得状況 (計3件)

名称: Resonant type mass sensor

発明者: 山口 昌樹

権利者: 信州大学

種類: 特許

番号: U.S. Pat. No. 9,023,283

出願年月日: 2014年8月21日

取得年月日: 2015年5月5日

国内外の別: 外国 (米国)

名称: 三次元造形装置及びワイヤ張設機構ユニット

発明者: 山口 昌樹

権利者: 岩手大学

種類: 実用新案

番号: 実用第 3193123 号

出願年月日: 2014年7月4日

取得年月日: 2014年8月27日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://fiber.shinshu-u.ac.jp/yamaguchi/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 昌樹 (YAMAGUCHI, Masaki)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号: 50272638