

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：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560365

研究課題名(和文)蚊を模倣した超低侵襲採血機能を有するバイオセンシングチップの構築

研究課題名(英文)Development of a biosensing chip with minimally invasive blood sampling function that imitates a mosquito

研究代表者

鈴木 博章 (SUZUKI, HIROAKI)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：20282337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：超低侵襲血液分析を目的として、蚊を模倣したマイクロセンシングシステムの開発を行った。白金黒電極上で水素バブルを生成・消滅を利用したマイクロポンプを作製した。絶縁体である水素バブルの蓄積に伴う影響を低減するため、壁構造を電極上に形成した。また、微小針を通して全血のサンプリングを行った。さらに、ここにグルコースセンサを集積化し、その応答を調べた。

研究成果の概要(英文)：Towards minimally invasive blood analysis, a micro sensing system that imitates a mosquito was developed. A micropump was fabricated based on the growth and shrinkage of hydrogen bubbles on a platinum black working electrode. A whole blood sample could be withdrawn through a microneedle. A glucose sensor was integrated on the same chip and the performance was characterized.

研究分野：センサ・マイクロマシン

キーワード：蚊 超低侵襲計測 血液分析 マイクロポンプ 水素バブル グルコースセンサ

1. 研究開始当初の背景

東京オリンピックに向け、科学的選手強化のための疲労、ストレス、ドーピング関連物質の濃度測定が緊急の重要課題となっている。検体としては、血液、尿、汗、唾液等が考えられるが、人体への負担を考えると、可能な限り低侵襲であることが望ましい。この点、尿、汗、唾液は都合が良いが、これらの分泌量は体内の水分量、気温、運動状態に依存する上、これらに排出される検出対象物質はある時間内に蓄積されたものとなる。したがって、時々刻々変化する濃度を正確に測定しようとする、結局血液を検体とせざるを得ない場合が多い。数 mL の採血は健康診断等で誰もが経験する。このような採血も年 1 回であれば気にならないが、高頻度に行う場合には、肉体的にも精神的にも非常に負担がかかる。超低侵襲で血液分析がその場で行えるようになると、選手強化の点でも非常に有益であることは間違いない。

2. 研究の目的

上記の問題を解決するために、本研究では蚊を模倣し、超低侵襲的に採血し、血液分析を行うデバイスの作製を目的とする。この目的を達成する上で必要な技術は、低コストで使い捨てが可能なマイクロポンプである。この実現には MEMS 技術が有用である。MEMS (Micro Electro Mechanical System) 技術は、半導体デバイスの作製に用いられる微細加工技術を応用し、微細な $\mu\text{m}\sim\text{nm}$ オーダーの 3 次元構造体を形成する技術である。これを用いることにより、構造の微小化だけでなく、一括大量生産およびこれに伴う低コスト化も可能になる。これまで MEMS 技術を応用した様々なマイクロポンプが提案されてきたが、構造・動作が複雑になりがちで、実用レベルでのセンサチップとの集積化は期待通りに進んでいない。この点において、電気化学的原理に基づくポンプは有望である。当研究グループでは、既に水素バブルの生成・消滅に伴う体積変化を利用した双方向送液可能なポンプを報告している。本研究ではこのマイクロポンプの実用化を目指し、より安定に、再現性良く送液を行うための検討を行った。また、これに微小針とバイオセンサを組み込み、超低侵襲分析の可能性を探った。

3. 研究の方法

3.1 デバイスの作製

Fig. 1 に作製したデバイスの構造を示す。このデバイスは、水素バブルの生成・消滅に伴う体積変化を利用して双方向送液を行う。ガラス基板上に白金黒作用極、銀/塩化銀参照極、白金対極からなる 3 電極系を形成した (Fig. 1(A))。作用極には壁状構造を形成し、作用極容器中に水素バブルが充満した場合でも壁間あるいは壁底部に表面張力により電解液が残るようにし、回路が切れないように

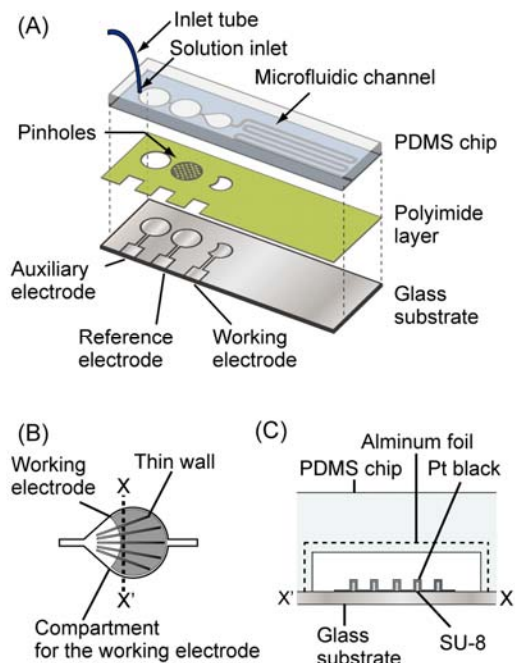


Fig. 1 電気化学的マイクロポンプ. (A)分解図. (B)作用極構造. (C)(B)で X-X'に沿っての断面図.

した (Fig. 1(B), (C))。電極を形成したガラス基板と微小流路を形成したポリジメチルシロキサン (PDMS) 基板と張り合わせることでデバイスを完成させた。また、流路末端に微小針を取り付け、外部溶液の吸引を試みた。さらに、より高度な化学分析を念頭に、2 つのマイクロポンプと T 字流路とを統合したデバイスを作製した (Fig. 5 参照)。

3.2 実験方法

微小流路およびそれぞれの電極の容器には 0.5 M HCl を満たした。ポテンショスタットにより参照極に対し作用極に一定の電位を印加し、水素バブルを生成・消滅させた。水素バブルの生成・消滅に伴う流路内のメニスカスの変位を測定した。T 字型流路内での溶液プラグ操作にあたっては、マイクロポンプ内部を電解液で満たした後、流路に 2 つの色素プラグを導入した。2 つのマイクロポンプを個別に制御することにより、プラグの入れ替え操作を行った。

4. 研究成果

-0.6 V から -1.6 V までの範囲において、電位をより負にするほど水素ガスの生成速度が増大することが確認された (Fig. 2(A))。逆に、水素バブル生成後、+0.4 V から -0.4 V までの範囲でバブルを消滅させたところ、電位をより正にするほど消滅速度が増大することが確認された (Fig. 2 (B))。

ここで、水素バブル消滅時に断線してもバブルが電位印加時と同程度の速度で自発的に収縮する奇妙な現象が認められた。この原因として水素バブルの電解液中への溶解、

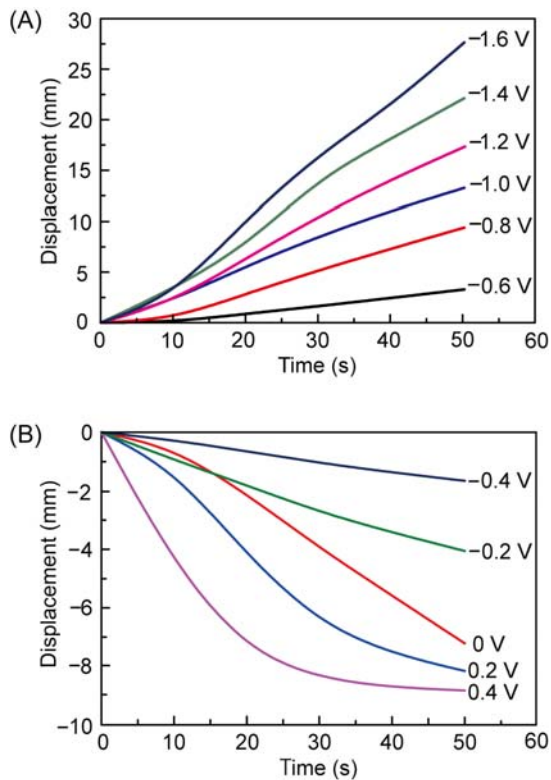


Fig. 2 水素バブルの生成(A)消滅(B)に伴うメニスカスの変化の作用極電位依存性.

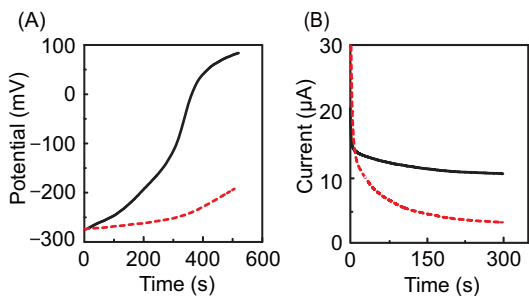


Fig. 3 溶存酸素の影響. (A)作用極電位の変化. (B)電流値の変化. 赤: アルミホイル有. 黒: アルミホイルなし.

PDMS を通しての散逸が考えられたが、これらの影響はバブルの体積変化に要する時間内では小さかった。特に、電極上にあるバブルの収縮が顕著であったため、作用極容器下面にアルミ箔を埋め込み(Fig. 1(c))、酸素の流入を抑制した。水素バブルを生成させた後、エレクトロメータを用いて市販の銀/塩化銀電極に対して作用極電位の変化を測定した。アルミ層がない場合、 -270 mV から $+80$ mV (vs. on-chip Ag/AgCl) まで大幅な電位変化が認められたが、アルミ層を形成した場合、電位変化は -270 mV から -200 mV と大幅に減少した(Fig. 3(A))。さらに 3 電極系を酸素センサとして機能させて、アルミ層の有無による容器内の酸素濃度を調べたところ、アルミ層の有無に対応し、電流値はそれぞれ $3 \mu\text{A}$ 、 11

μA に落ち着いた(Fig. 3(B))。これにより、アルミ層により PDMS を通しての酸素の流入を抑制できることを確認した。この結果より、溶存酸素が水素バブルの消滅に関与していることが示唆された。これは一見問題であるようにも思われるが、これを積極的に利用し、電位印加なしで外部液を吸引することも可能である。

このデバイスの応用として、流路末端に微小針を取り付け、外部液の吸引を試みた。Fig. 4 は 27G の微小針 (内径 $210 \mu\text{m}$) から全血を吸引している様子を示す。水素バブルの収縮に伴い、約 500 nL の外部液の吸引を確認した。34G (内径 $70 \mu\text{m}$)、33G (内径 $110 \mu\text{m}$)

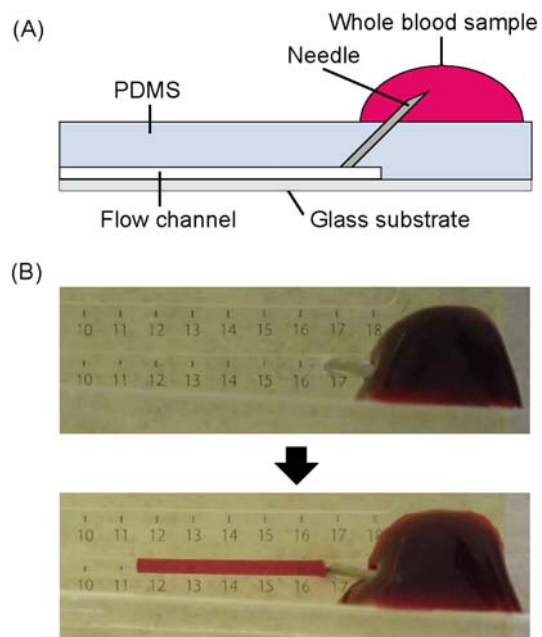


Fig. 4 微小針を通しての全血の吸引. (A) 微小針と全血の位置関係. (B) 吸引前後の変化.

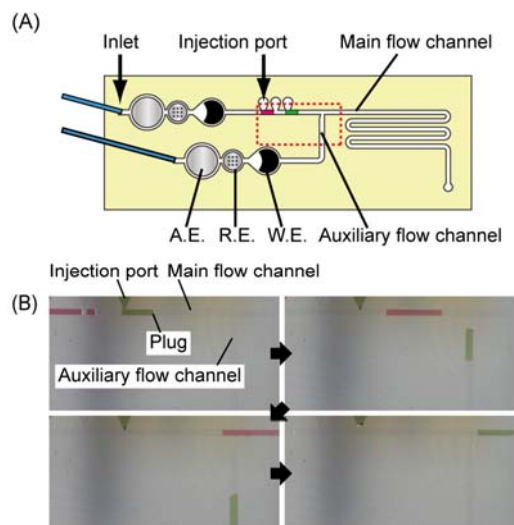


Fig. 5 2つの集積化ポンプによる T 字型構造でのプラグの入れ替え. (A) ポンプと流路の位置関係. (B) プラグの移動の様子.

の微小針を通してのサンプリングも試みたが、これらについては全血の吸引はできなかった。より細い針での吸引が今後の課題である。

また、Fig. 5 に集積化ポンプによるプラグの入れ替えの様子を示す。2つの流路に接続されたポンプを用いて順次正負の圧力を加えることにより、左右のプラグの位置を入れ替えることができた。

このポンプを実用的に使用する場合、吸引・排出量の制御が必要となる。これを行うために、Fig. 6 のようなエアイベント構造を導入した。ここでは、水素の生成・消滅に用いる電解液（左端）および排出・吸引される溶液（右端）の他に、制御用プラグ（中央）を用いる。Fig. 6 にはその動作も示す。制御用プラグははじめに図のエアイベントの左側にある。ここで、水素バブルが生成すると、このプラグは右に移動するが、プラグの右端がエアイベントにかかるまでは、排出・吸引される溶液には圧力がかからない。しかし、制御用プラグがエアイベントを塞ぐと、排出・吸引する溶液にも圧力がかかり、これは右に移動する（排出される）。制御用プラグがエアイベントを通過すると、このプラグにはもう圧力がかからないため、送液は停止する。流路中に三角形の構造があるが、これにより左からの圧力が弱まると、制御用プラグは自発的にエアイベントを塞ぐ。この状態で水素バブルを収縮させると、制御用プラグおよび排出・吸引される溶液は吸引される（左に移動する）。しかし、制御用プラグ右端がエアイベントよりも左に移動すると、排出・吸引される溶液にはもはや圧力がかからなくなり、このプラグは停止する。

Fig. 7 は流路中に置かれたプラグ（Fig. 6 の排出・吸引される溶液）が移動の様子を示す。水素バブル生成・消滅時の電位の印加時間を変えるだけでは、プラグが次第に右に移動する傾向が認められた（Fig. 7(A)）。これはバブル収縮が不完全であることによる。これに対し、エアイベント構造を導入した場合には、

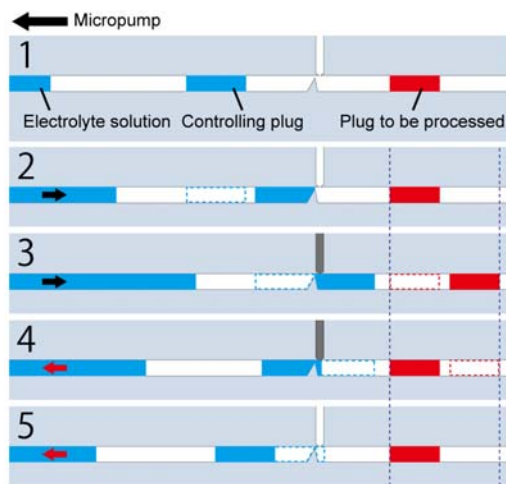


Fig. 6 エアイベント構造による排出・吸引量の制御。

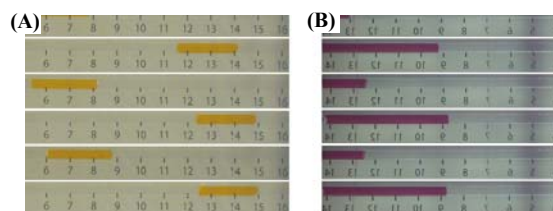


Fig. 7 水素バブルの生成・消滅に伴うプラグの移動. (A)一定の時間間隔で電位を変化させた時のプラグの動き. (B)エアイベント構造を用いた時のプラグの動き.

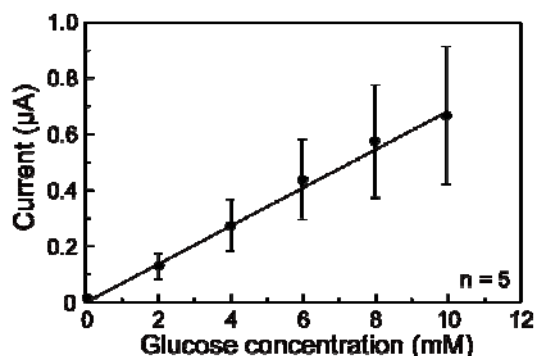


Fig. 8 微小針を通して吸引した標準液中のグルコース濃度と出力電流値の関係。

プラグの移動位置をより正確に制御できるようになった（Fig. 7 (B)）。

このポンプの流路中に電気化学的グルコースセンサを集積化し、微小針を通してグルコース標準液を吸引し、酵素（グルコースオキシダーゼ）反応の結果生成する過酸化水素を検出することにより、グルコース濃度を測定した。Fig. 8 に電流値とグルコース濃度の関係を示す。これらに良好な直線関係が認められた。また、メディエータを用いたグルコースセンサでも同様の検量線が得られた。同様に、全血を吸引して血糖値を測定することも試みたが、現時点では再現性のある結果は得られていない。この点は今後の検討課題である。

今回用いた電極配置、流路構造では、まだ電極間の IR ドロップが無視できない。この点について改良が進めば、今後さらに効率的なマイクロポンプを実現できる余地がある。また、微小針の開発も課題である。今回の研究では市販の微小針を用いたが、無痛での全血のサンプリングに向けて、さらに改良を進めてゆきたい。

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 1 件）

H. Obata, T. Kuji, K. Kojima, F. Sassa, M. Yokokawa, K. Takekoshi, and H. Suzuki,

Electrochemical bubble-based bidirectional microfluidic transport, *ACS Sens.*, **1** (2), 190–196 (2016). (査読有)

〔学会発表〕 (計 1 件)

小幡寛隆、横川雅俊、鈴木博章、化学センシングのためのバブル型双方向マイクロポンプ、2015年電気化学秋季大会 (第59回化学センサ研究会) 2015. 09. 11、埼玉工業大学 (埼玉県深谷市)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木博章 (SUZUKI HIROAKI)
筑波大学・数理物質系・教授
研究者番号： 20282337

(2) 研究分担者

竹越一博 (TAKEKOSHI KAZUHIRO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号： 40261804