

マイクロ流体制御技術に基づく
標的遺伝子の多検体・多項目同時定量診断システム
(A Microfluidic-Based Quantitative Analysis System
for the Simultaneous Detection
of Multiple Nucleic Acid Targets in Multiple Samples)

2023年7月

博士（工学）

夏原 大悟

豊橋技術科学大学

2023年 7月 7日

機械工学専攻	学籍番号	第 173154 号	指導教員	柴田 隆行
氏名	夏原 大悟			永井 萌土

論文内容の要旨 (博士)

博士学位論文名	マイクロ流体制御技術に基づく標的遺伝子の多検体・多項目同時定量診断システム
---------	---------------------------------------

(要旨 1,200 字程度)

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的な大流行 (パンデミック) が引き起こしたように、ウイルス感染症がもたらす人々への恐怖や、経済活動へ与える影響は計り知れない。感染の拡大防止には、迅速かつ正確な診断技術が必要となる。本論文では、マイクロ流体チップテクノロジーと等温遺伝子増幅法 (LAMP法) を組み合わせることで、1回の作業工程で、標的遺伝子の多検体・多項目同時定量診断が行えるシステムを開発した。

はじめに、提案するマルチプレックス遺伝子診断デバイスの基本原理として、横型相ガイドによる複数の反応容器への検体・試薬の分注技術、横型ミキサによる高効率な混合、蛍光LAMP法による多項目同時遺伝子診断を示した。しかし、実用化向けの技術的課題として、多段階の作製プロセスが必要なこと、迅速診断が困難であること、蛍光観察のための特殊な装置が必要であることが挙げられた。

次に、分注操作における受動バルブの決壊圧力の向上を目的とし、縦型相ガイドを考案し、導入流量の向上を実現した。また、本デバイスの分注理論を構築し、各反応容器に設置した2個1組のバルブに必要な決壊圧力の設計指針を明らかにした。さらに、受動バルブを空気排出流路内に配置したエアープラグインバルブ構造を考案し、導入流量のさらなる向上を実現した。反応容器への充填が完了すると、対向する受動バルブ間に捕捉された空気を介して液体が互いに押し合い、受動バルブに印加される圧力が減殺できることを示した。その結果、最大導入流量70 $\mu\text{L}/\text{min}$ の導入を可能にした。

続いて、混合部において、1回のプロセスで簡易に作製できる高効率な受動ミキサ (P-ACEミキサ) を開発した。流路長手方向に対し、左右非対称な障害物構造を流路壁面に設けることで、2液が流路幅方向に対して交互に入れ替りながら混合が促進されることを示した。その結果、広いレイノルズ数の範囲 ($Re=0.13\sim 13$) において高い混合性能を実現した (送液距離20mmで混合効率90%以上)。

現場即時検査を目的として、デバイス上で比色指示薬を用いた遺伝子増幅実験を行った。節足動物媒介性ウイルス、有毒植物、ヒト感染性ウイルス、農作物病害虫、植物性食物アレルギー物質の多項目同時診断を実現し、反応容器の色の変化による定性診断が可能であることを示した。さらに、遺伝子増幅中のデバイス画像を取得するタイムラプス撮影装置と、取得画像から反応容器の色相変化を解析するプログラムを開発し、比色指示薬を用いた検体中の標的遺伝子の定量診断手法を確立した。ヒトヘルペスウイルスの遺伝子定量診断に適用し、その有効性を実証した。

多検体の同時遺伝子診断を実現するために、遠心力によって送液が可能なデバイスを開発した。遠心力による流体操作に適した流路デザインを検討し、複数の反応容器への逐次的な分注を行うための遠心分注理論を構築した。開発した遠心送液型デバイスを用いて、食物アレルギー物質の4検体・4項目同時定量検査を実現した。

Date of Submission (month day, year) : July 7, 2023

Department of Mechanical Engineering	Student ID Number D173154	Supervisors Takayuki Shibata Moeto Nagai
Applicant's name Daigo Natsuhara		

Abstract (Doctor)

Title of Thesis	A Microfluidic-Based Quantitative Analysis System for the Simultaneous Detection of Multiple Nucleic Acid Targets in Multiple Samples
-----------------	---

Approx. 800 words

A risk management strategy to address emerging and reemerging viral infectious diseases is a pressing global public health challenge. Early detection of viruses through rapid and accurate diagnostic technologies is preventing the spread of infection. Therefore, a microfluidic-based quantitative analysis system has been developed for the multiplexed genetic diagnosis of multiple nucleic acid targets in multiple samples in a single operation by combining the microfluidic technology and the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method.

The basic principle of the multiplex genetic diagnosis device, including liquid dispensing into an array of microchambers, highly efficient liquid mixing, and multiplexed genetic diagnosis based on a fluorescent LAMP method, was presented. However, several technical challenges remain for practical application, such as the need for a two-step fabrication process, the difficulty of rapid diagnosis, and the need for the fluorescence observation setup.

To address such issues, a vertical-type phaseguide structure was introduced to improve the burst pressure of the passive valve in the dispensing region, thus resulting in an increase in flow rate to be dispensed into microchambers. Moreover, a microfluidic flow control theory was developed to provide design guidelines for a pair of passive valves. To further improve the maximum flow rate, a passive valve configuration with high pressure resistance performance, termed an “air plug-in valve”, was proposed. By implementing the air plug-in valve, a maximal allowable flow rate of 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ could be achieved for sequential liquid dispensing into 10 microchambers.

In a mixing region, an efficient micromixer with a simple geometrical feature, termed a “P-ACE mixer”, was developed. The P-ACE mixer with vertical obstacle structures asymmetrically arranged on both sidewalls, which can be easily fabricated via only a single-step photolithography process, exhibited a high mixing efficiency of 90% or more within a microchannel length of 20 mm over a wide range of Reynolds numbers ($Re = 0.13\text{--}13$).

With the aim of enabling on-site diagnostics, LAMP assays were performed using a colorimetric indicator on the fabricated devices. Simultaneous diagnoses of arbovirus infections, toxic plants, human viral infections, agricultural pests, and plant food allergens were demonstrated. A qualitative detection was made possible by a color change in a positive reaction chamber. Moreover, a microfluidic-based quantitative analysis system was developed; it consists of a time-lapse imaging equipment to acquire the device image during DNA amplification reaction and a program to analyze the hue change of reaction chambers from the obtained images based on the colorimetric LAMP assays. Using this system, a quantitative genetic diagnosis of human herpesvirus with high accuracy was successfully demonstrated.

To realize simultaneous genetic diagnosis of multiple samples, a newly designed centrifugal microfluidic device capable of sequential dispensing of multiple samples was developed. In addition, the design guideline was proposed to sequentially dispense a liquid into multiple microchamber in a centrifugal pumping system. Furthermore, a quantitative diagnosis of four food allergens was performed simultaneously for four food samples.

目次

第1章	緒論	1
1.1	マイクロ化学分析システムの歴史的背景とその重要性.....	1
1.2	マイクロ流体チップテクノロジーを応用した遺伝子診断技術.....	4
1.3	マルチプレックス遺伝子診断技術への応用.....	9
1.4	本研究の目的と本論文の構成.....	10
	参考文献.....	15
第2章	マルチプレックス遺伝子診断デバイスの基本原理の提案	26
2.1	緒言.....	26
2.2	デバイスの概要.....	26
2.3	デバイスの作製方法.....	27
2.4	横型相ガイドによる分注技術の検討.....	30
2.4.1	分注理論の提案.....	30
2.4.2	分注実験方法.....	31
2.4.3	分注実験結果.....	31
2.5	横型ミキサの最適形状の検討.....	34
2.5.1	数値流体解析による混合効率の評価.....	34
2.5.2	横型ミキサの混合効率の評価方法.....	37
2.5.3	蛍光観察による混合効率の評価.....	38
2.6	蛍光 LAMP 法による農作物病害の遺伝子増幅実験.....	40
2.6.1	蛍光 LAMP 法による遺伝子増幅実験方法.....	40
2.6.2	蛍光観察条件最適化実験.....	43
2.6.3	蛍光 LAMP 法による多項目同時診断実験.....	44
2.7	実用化に向けた技術的課題.....	49
2.8	結言.....	50
	参考文献.....	50
第3章	逐次分注操作を実現するためのマイクロ流体制御理論の提案	52
3.1	緒言.....	52
3.2	実験方法.....	52
3.3	縦型相ガイドによる逐次分注技術の提案.....	53
3.3.1	原理検証実験.....	53
3.3.2	決壊圧力に及ぼす縦型相ガイドの角部半径の影響.....	55
3.4	逐次分注理論モデルの構築.....	59
3.4.1	永久障害バルブ決壊圧力の設計指針.....	59
3.4.2	一時障害バルブ決壊圧力の設計指針.....	61

3.4.3	デバイス設計における自由度の検証.....	63
3.5	永久阻害バルブの耐圧性能の向上.....	65
3.5.1	二面縦型相ガイド構造の検討.....	65
3.5.2	エアープラグインバルブ構造の提案.....	67
3.5.3	空気排出流路内への液漏れ現象の考察.....	70
3.6	結言.....	75
	参考文献.....	76
第4章	非対称構造を有する高効率マイクロミキサの開発	77
4.1	緒言.....	77
4.2	実験方法.....	79
4.2.1	数値流体解析方法.....	79
4.2.2	混合効率および圧力損失の評価方法.....	79
4.3	数値流体解析によるミキサ構造の検討.....	80
4.4	混合効率の実験的評価.....	82
4.5	混合効率に及ぼす混合ユニット数の影響.....	85
4.6	混合ユニット形状の最適化.....	87
4.7	圧力損失の実験的評価.....	94
4.8	混合メカニズムの考察.....	95
4.9	結言.....	100
	参考文献.....	101
第5章	比色指示薬を用いた目視判定による標的遺伝子の定性診断	103
5.1	緒言.....	103
5.2	実験方法.....	103
5.2.1	ワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法.....	103
5.2.2	デバイスの送液方法.....	110
5.3	比色 LAMP 法による標的遺伝子の多項目同時診断.....	111
5.3.1	節足動物媒介性ウイルス.....	111
5.3.2	有毒植物.....	114
5.3.3	ヒト感染症ウイルス.....	116
5.3.4	農作物病害虫.....	118
5.3.5	食物アレルギー物質.....	120
5.4	結言.....	125
	参考文献.....	126
第6章	画像色解析手法に基づく遺伝子定量解析システムの開発	129
6.1	緒言.....	129
6.2	実験方法.....	129

6.2.1	タイムラプス撮影装置.....	129
6.2.2	画像色解析方法.....	131
6.3	画像色解析アルゴリズムの構築.....	131
6.3.1	反応容器の自動識別手法の検討.....	131
6.3.2	色相角度変化による遺伝子増幅曲線の取得.....	133
6.3.3	データフィッティング関数の最適化.....	136
6.3.4	定量解析のための閾値到達時間の定義.....	138
6.4	ヘルペスウイルス遺伝子量の定量診断.....	139
6.5	結言.....	141
	参考文献.....	142
第7章	遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発.....	144
7.1	緒言.....	144
7.2	実験方法.....	145
7.2.1	デバイスの概要.....	145
7.2.2	遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの作製方法.....	147
7.2.3	遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの実験方法.....	150
7.3	外向き分注技術の検討.....	151
7.4	内向き分注技術の開発.....	152
7.4.1	一時障害バルブ外側配置構造.....	152
7.4.2	一時障害バルブ内側配置構造.....	155
7.5	遠心送液型デバイスにおける逐次分注理論モデルの構築.....	157
7.5.1	一時障害バルブ決壊圧力の設計指針.....	157
7.5.2	永久障害バルブ決壊圧力の設計指針.....	159
7.6	食物アレルギー物質の多検体・多項目同時定量診断.....	161
7.7	結言.....	165
	参考文献.....	166
第8章	結論.....	169

第1章 緒論

1.1 マイクロ化学分析システムの歴史的背景とその重要性

マイクロ化学分析システム (Micro total analysis system, μ TAS) は、チップ上に微小流路やセンサなどを設けることによって、化学分析に必要な動作 (サンプリング, サンプル送液, ろ過, 希釈, 化学反応, 分離, 検出) などを自動化するデバイスのことを指す。このようなデバイスは、実験室で行う複数の作業工程を 1 つのチップ上に集約して実現することができるため、ラボオンチップ (Lab on a chip, LOC) とも呼ばれている (図 1.1)。

μ TAS は半導体製造技術や微細加工技術の進展に伴って発展してきた。 μ TAS の起源となったのは、1979 年に Terry ら¹⁾によって分析用小型デバイスとして直径 50 mm のシリコン (Si) ウエハ上でガスクロマトグラフィ実現したことがはじまりであり、先駆的研究と位置づけられている。このデバイスでは、ガス導入用の流入口および流出口、バルブと 1.5 m の分離カラムが 1 枚のウエハ上に組み込まれており、導入したガスによってカラムを通過する時間が異なるため、それぞれのガスを分離させることができる。さらに、もう一枚のウエハ上には、熱伝導率を検出するセンサが組み込まれており、熱伝導率の違いから特定のガス (窒素, ペンタン, ヘキサン) を 10 秒以内で検出することを実証している。このデバイスは、小さなチップ上で高い分離性能を示したが、分野が確立されていなかった当時は科学界に大きなインパクトは示さなかった。一方で、微小電気機械システム (Micro Electro Mechanical Systems, MEMS) 分野は活発に研究開発が進められており、Si ウエハ上での微小なマイクロポンプ、マイクロバルブ、化学センサなどの機械要素が開発されていた²⁾。

1988 年に Verheggen ら³⁾によって、複数のバルブを用いた溶液の一定量の抽出を可能とする T 字型流路のデザインが提案されて以来、分析用のマイクロ流体デバイスとして、1989 年に Transducers '89 国際学会および翌年 1990 年に Manz ら⁴⁾によって μ TAS のコンセプトが提唱された。Manz らは、5 mm \times 5 mm のチップ上に中空カラム (幅 6 μ m, 深さ 2 μ m, 長さ 15 cm) を実装し、高速液体クロマトグラフィ法 (HPLC) をシリコンチップ上で実証した。当時はセンサの選択性や寿命の点において、十分な性能を発揮できなかったため、化学センシングの新しいコンセプトとして構想されたものであった。そのため、当初は装置の小型化を実現するためではなく、分析性能の向上を目的としていた。しかし、小型化によるサンプルの消費量低減という利点は認識されていた。また、このとき Manz らは μ TAS を Miniaturized total chemical analysis system の略として示していたが、後にこの分野での研究が進むにつれて、より正確な用語が必要となり、Micro total analysis system という用語で 1994 年の μ TAS '94 ワークショップ (後の μ TAS 国際学会) の開催に伴い改正された⁵⁾。

1992 年には、Manz らによって Si ウエハとガラス基板を使用した 15 cm \times 4 cm のチップ上に設けられた流路 (幅 30 μ m, 高さ 10 μ m) を用いて、電気浸透流ポンプとキャピラリー電気泳動が実証された⁶⁾。145 pL の 2 種類の蛍光試薬を含むサンプルを 500 V 印加すること

でマイクロ流路へ導入し、3000 V を印加することでキャピラリー電気泳動を行ったところ、10 分以内に 2 種類の蛍光試薬の違いを示す電気泳動図を取得することができた。この時期より、生体分子や細胞の反応へのアプローチ手法としての μ TAS を用いた応用研究も始まっており、1993 年には、Northup らによるポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) による DNA 増幅のための Si 基板上でのマイクロチャンバ作製手法の提案もなされた⁷⁾。

1994 年からは、 μ TAS '94 ワークショップの開催に伴い、多くの研究グループが μ TAS 分野に参画したため、関連する論文数が急激に増えた。Branebjerg ら⁸⁾は 2 種類の液体を T 字直線流路やジグザグ形状のマイクロ流路 (幅 300 μ m, 高さ 600 μ m, 長さ 100 mm) へ導入し、混合効率を調査した。ジグザグ形状流路の場合、低レイノルズ数 ($Re=1.85$) では送液距離 100 mm 通過後も流路中央の二液の界面でのみ部分的に混合されていたのに対し、比較的高レイノルズ数 ($Re=148$) では流路長 1/3 通過時点で二次流れや局所的な乱流に起因して、均一に混合されていることを報告している。なお、T 字直線流路では、高レイノルズ数 ($Re=148$) でも層流を示しており、混合は認められなかった。

このワークショップでは演題 40 件のみであったが、ワークショップ以降、 μ TAS 分野は盛況を見せ、爆発的に研究者の数を増やすこととなった。同年、オリゴヌクレオチド (短鎖ヌクレオチド)⁹⁾、DNA¹⁰⁾、アミノ酸¹¹⁾の分離や電解による細胞操作¹²⁾も実証された。これらの研究成果は、後に Caliper 社、Agilent 社、島津製作所、日立製作所による様々な検査機器に繋がり市販されるに至っている。同年、Seller らはガラスチップ上の交差するマイクロ流路ネットワーク内で電気浸透流ポンプを使用して、流路抵抗と流量の関係がキルヒホッフの法則より予測することができることを明らかにし¹³⁾、後発の研究へ設計指針を与える成果となった。このように、1994 年は μ TAS 分野での革新的な年であり、現在の研究における基盤ともいえる重要な研究成果が多く生まれた年であった。

1995 年以降は、Si 基板上で作製する μ TAS に代わり、ゴム材料によるマイクロコンタクトプリンティング法が次第に使われるようになった¹⁴⁾。この手法は、1989 年に Whitesides ら¹⁵⁾によって提案された自己組織化単分子膜を用いた有機表面の形成手法が基となっており、1993 年にシリコーン樹脂であるポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane, PDMS) を用いて微細パターンを型取る作製手法が提案された¹⁶⁾。後にこの手法は、Si 基板やガラス基板を用いた従来のリソグラフィ技術と対比してソフトリソグラフィと呼ばれるようになった^{17,18)}。

1997 年に Lorenz ら¹⁹⁾は、厚膜ネガ型フォトレジストである SU-8 (MicroChem 社) を用いて高アスペクト比の微細構造をフォトリソグラフィにより作製し、機械特性の評価を行った。SU-8 を用いた流路モールドの作製および PDMS へのパターン転写は、現在の μ TAS 分野におけるデバイスの作製手法の標準プロセスになっており、多くのマイクロ流体デバイスにおいて用いられている²⁰⁻²²⁾。

2000 年には、Kawakatsu ら²³⁾によってマイクロ流路内で水相と油相の 2 種類の液体を使

うことで、せん断力によって微小な液滴を生成する液滴マイクロ流体デバイスが提案された。さらに、その後、2001年にQuakeら²⁴⁾によって十字流路に同時に流すことで、液滴サイズを均一にする手法が提案された。この微小な液滴を用いる手法は、生化学分野へ多く応用され、現在では、1細胞計測²⁵⁻²⁷⁾や1分子計測²⁸⁻³⁰⁾への応用へと展開している。

2004年以降には、マイクロ流体デバイス内で細胞培養を行う研究が盛んに行われるようになってきた³¹⁾。特に、特定の細胞間相互作用を容易にカスタマイズできるため、フラスコやシャーレ内で行う従来手法に代わるものとして研究が進められた^{32,33)}。また、マイクロ流路内での層流現象は、生体内の流体力学を正確に模倣していることから、マイクロスケールでの培養の方が適切であるという利点も報告されている³⁴⁾。その中で、2010年にIngberら³⁵⁾によって、人体の臓器を模倣する、Organ-on-a-chip (臓器チップ) のコンセプトが提唱された。このとき、細胞培養を行う流路とその流路を左右から伸縮させるための空圧流路を組み合わせることで肺を模倣するデバイスを実証している。その後、胃 (Gut-on-a-chip)³⁶⁾、腸 (Intestine-on-a-chip)^{37,38)}、筋肉 (Muscle-on-a-chip)³⁹⁾、骨髄 (Bone marrow-on-a-chip)⁴⁰⁾ を模倣するデバイスが提案されている。現在では、人体全体を模倣する“Body-on-a-chip”の実現を目指しており⁴¹⁻⁴⁴⁾、新薬開発時の動物実験に代わる手法として注目されている。

2007年には、Martinezらが紙製の μ TASを報告した⁴⁵⁾。この紙製デバイスは、セルロースなどの親水性材料をデバイスに用いることで、毛細管現象によって入口から目的の位置まで液体を自律的に送液することができる⁴⁶⁻⁴⁸⁾。このため、外部装置を必要としないという利点がある。この紙製デバイスは、従来のフォトリソグラフィ技術に加え、ワックスプリンタ⁴⁹⁻⁵¹⁾、インクジェットプリンタ⁵²⁻⁵⁴⁾などを使用することで安価に作製が可能である。さらに、可搬性があり、かつ使い捨てが容易という利点から、医療診断システムへの応用が期待されている。

2020年には、Isozakiら⁵⁵⁾が人工知能 (AI) 技術を μ TASへ応用した、AI-on-chipというデバイスへ展開された。AI技術により、ハイスループットな画像処理を可能とし、細胞選別技術や、DNA/RNAシーケンスと組み合わせることで、従来の計算ツールでは複雑で解析困難であった大規模かつ高速な計算を可能とした^{56,57)}。

近年では、 μ TASやマイクロ流体技術は様々な機器へ実装されている。一例として、細胞を一行に並べ高速で流路に流し、レーザーを照射することで特定の細胞 (がん細胞など) やその数を検出するフローサイトメトリー技術⁵⁸⁻⁶⁰⁾は、細胞解析を行うバイオ研究においては不可欠な装置である。さらに、新型コロナウイルス感染症 (SARS-CoV-2) の影響により、診断機器の開発が急激に進められ、試薬量や検体サンプルの削減、操作の自動化が行える装置の開発が急速に進められている⁶¹⁻⁷⁰⁾。

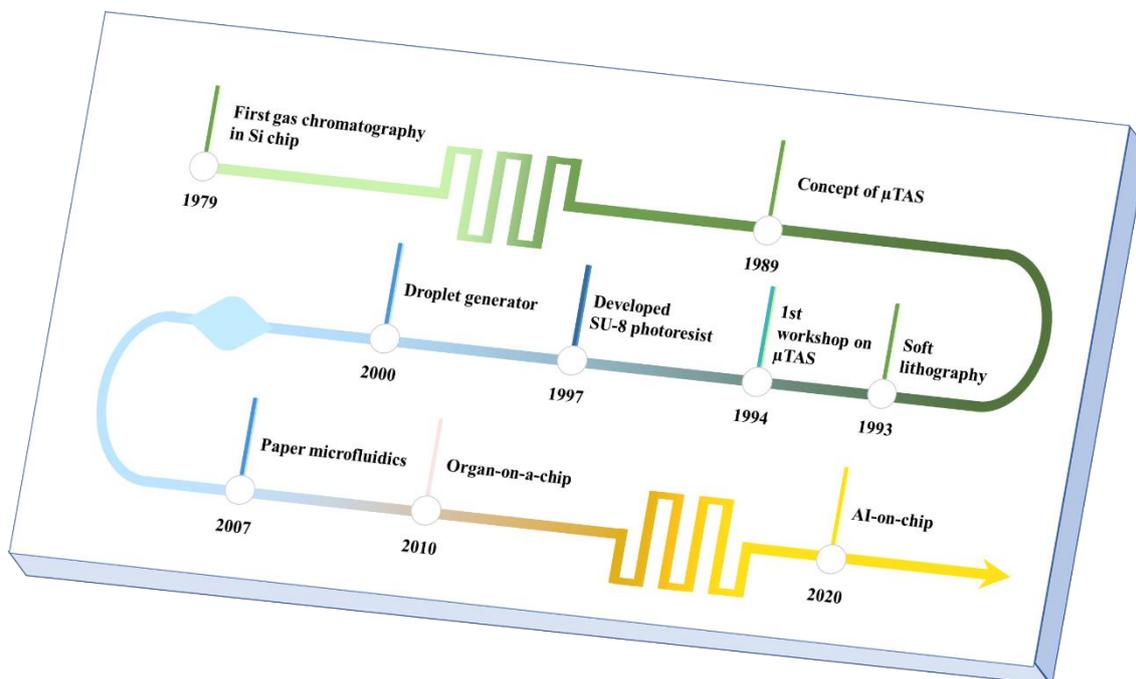


図 1.1 μTAS の歴史

1.2 マイクロ流体チップテクノロジーを応用した遺伝子診断技術

μTAS はマイクロ流路が微細であるため、省サンプルでの検査が可能で、チップ自体が非常に小さく現場（オンサイト）で即時検査が可能であることから、遺伝子診断技術への応用が多く行われてきた。遺伝子診断技術は、PCR 法⁷¹⁾を代表とするような遺伝子増幅手法が主に用いられている。図 1.2 (a) に示すように、PCR 法では、はじめに検体サンプルから細胞膜などのタンパク質を除去することで核酸を抽出する。その後、遺伝子増幅試薬と混合させたものを 3 種類の温度条件（94~96°C, 55~60°C, 72°C）で一定時間、繰り返して加温することで二本鎖の DNA を解離、プライマー（標的遺伝子を増幅するための短鎖 DNA）のアニーリング、伸長を行い、DNA 増幅を行う^{72,73)}。増幅された DNA は、電気泳動により塩基長に依存して分離することで検出を行うのが一般的であった。

その後、図 1.2 (b) に示すように、蛍光試薬を用いることで、DNA の伸長反応中に塩基対間に平行挿入（インターカレート）させ、蛍光強度の変化を計測するリアルタイム PCR 法⁷⁴⁾が提案された。リアルタイム PCR 法は、遺伝子増幅反応中の蛍光強度を計測することで、DNA 濃度が高いと増幅反応の開始温度サイクル数（閾値到達サイクル数： C_t 値）が短くなることを明らかにした。また、 C_t 値と DNA 濃度の関係を示す検量線を取得することで、検体サンプル中に含まれる DNA 濃度が不明な場合でも C_t 値から推定することを実証した⁷⁵⁻⁷⁸⁾。

さらに、図 1.2 (c) に示すように、fL~pL オーダの大量のマイクロウェルにサンプルと

遺伝子増幅試薬の混合液を導入し、遺伝子増幅反応を行うデジタル PCR 法が開発された⁷⁹⁾。この手法では、極微量のマイクロウェルに溶液を分配することで、ウェル内に DNA が 1 コピーまたは 0 コピーとなるようにサンプルを希釈し、遺伝子サンプル濃度を調整する。マイクロウェルへの導入後、遺伝子増幅反応を行い、反応した容器の個数を計測することで、導入したサンプルに含まれる DNA 量を定量することができる^{80,81)}。この手法は、予め C_t 値と DNA 濃度の検量線を取得する必要がなく、一度の増幅反応の結果からポアソン分布に従って各マイクロウェルへの DNA の導入量を補正することで、DNA 濃度の絶対定量が可能となる。

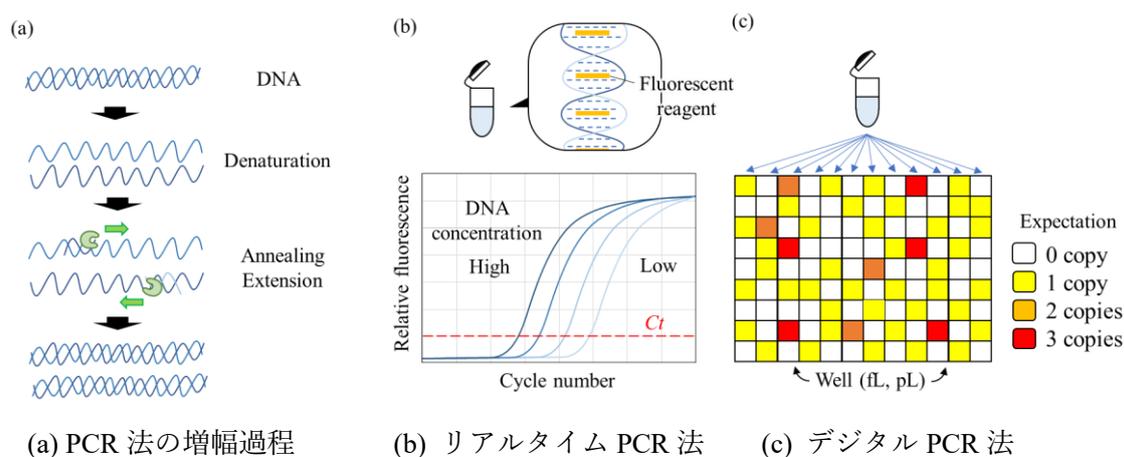
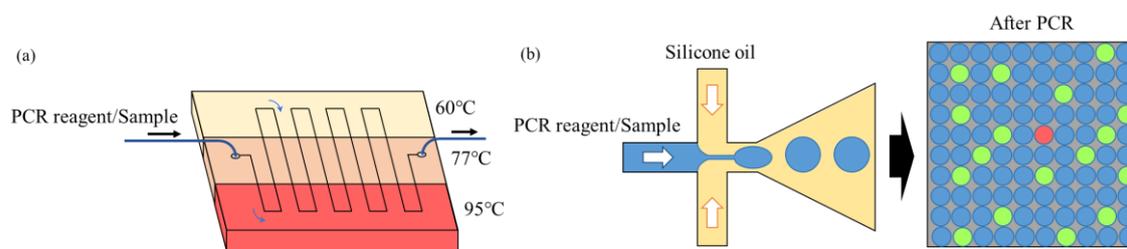


図 1.2 PCR 法による遺伝子診断法

1998 年に Manz ら⁸²⁾は、図 1.3 (a) に示すように、3 種類 (60°C , 77°C , 95°C) のサーマルブロック上に設けたマイクロ流路に試薬とサンプルをシリンジポンプによって定流量で導入することで、自律的な温度変化を可能にし、18.7 min 以内の PCR 反応 (20 サイクルで 176 塩基の DNA を増幅) を実証した。この手法は Continuous-Flow PCR (連続流 PCR) と呼ばれており、従来のマイクロチューブ内での PCR 法と比べ、マイクロ流路内では表面積と体積の比率が高いことから放熱性能が向上し温度サイクルを短くすることができ、結果として、短時間で PCR 反応を行うことができることを示した⁸³⁻⁸⁸⁾。以降、PCR 法の開発の変遷に伴い、マイクロ流路内でリアルタイム PCR 法⁸⁹⁻⁹²⁾、デジタル PCR 法⁹³⁻⁹⁸⁾を行うデバイスが開発されてきた。例えば、Cady ら⁹⁹⁾は、連続流 PCR デバイス内に蛍光試薬である SYBR Green I を含む遺伝子増幅試薬と検体サンプルを導入し、遺伝子増幅反応中の溶液の蛍光強度を 480 nm の波長をもつ LED 光源と 520 nm の蛍光波長を検出する光電子増倍管 (PMT) を用いてリアルタイム PCR 法による定量検出を実証した。Ottesen ら¹⁰⁰⁾は大量 (1176 個) のマイクロウェル (容積: 6.25 nL) を設けたデバイスを用いて、細菌の DNA 量を絶対定量するデジタル PCR 法を実現した。さらに、1 コピーずつ取り分けるデジタル PCR では、大量の DNA に紛れてしまい、通常遺伝子増幅反応を阻害してしまう希少な DNA の検

出も可能となる。そのため、一度の遺伝子増幅反応によって、2種類のバクテリアの DNA を識別できることを実証した。

さらに、マイクロ流体チップテクノロジーを応用した例として、図 1.3 (b) に示すように、ドロップレットデジタル PCR 法¹⁰¹⁻¹⁰⁵⁾という手法がある。十字形状をしたマイクロ流路内に、水相（遺伝子増幅試薬）と油相（シリコンオイル）を同時に導入する。すると、界面張力の差から、流体の流量条件により、層流ではなく、水相が油相中に球状の微小液滴（ $\text{fL} \sim \text{pL}$ ）を形成して流れる。このため、遺伝子増幅反応を微小空間内で一度に大量に実現できるため、デジタル PCR 法が可能となる。Pekin ら¹⁰⁶⁾は、ドロップレットデジタル PCR デバイスを用いて、非変異遺伝子が 200000 倍過剰に存在する中で腫瘍に起因する変異遺伝子を検出し、さらに、各遺伝子の絶対定量解析を実証した。



(a) 連続流 PCR デバイス (b) ドロップレットデジタル PCR デバイス

図 1.3 マイクロ流体チップテクノロジーを応用した PCR 用デバイス

この遺伝子増幅反応を介した診断技術は、PCR 法の他にも、増幅反応に使用する酵素の種類、反応が進行する温度条件などが異なる様々な手法が開発されてきた¹⁰⁷⁻¹¹⁰⁾。その中で、温度変化を必要とせず、一定の温度で加温することで遺伝子増幅反応が行える等温遺伝子増幅法（Loop-mediated isothermal amplification : LAMP 法）がある¹¹¹⁾。LAMP 法は、表 1.1 に示すように、鎖置換活性を有する酵素（*Bst* DNA polymerase）と標的遺伝子の 6 領域に対して 4 種類のプライマーを用いることで、 $60 \sim 65^\circ\text{C}$ の一定温度の加温で遺伝子を増幅させる技術である。一定温度での増幅に伴い、増幅時間が PCR 法と比べ短縮され、30 分～1 時間で標的遺伝子を $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅することができる¹¹²⁻¹¹⁵⁾。さらに、追加で 2 種類のループプライマーと呼ばれるプライマーを遺伝子増幅反応に使用することで、様々な長さの塩基対を同時に増幅させることが可能となり、反応速度の向上を図ることが可能となる。

LAMP 法で増幅した標的遺伝子を確認する方法としては、大別すると、表 1.2 に示すように、増幅中の DNA の二本鎖へ蛍光色素をインターカレートさせる直接法と、遺伝子増幅反応に伴う比色指示薬の色の変化を観察する間接法がある¹¹⁶⁾。図 1.4 (a) に示すように、直接法として主に用いられる SYBR Green I や EvaGreen などの蛍光試薬は、基底状態にある物質が DNA 中にインターカレートしたことで、遷移エネルギーが減少する。ここに、光エネルギーが加わることで励起状態へと遷移するため、蛍光強度を計測することで、生成される

DNA の増幅量を定量的に評価することができる。

一方、図 1.4 (b) に示すように、間接法で主に用いられる比色指示薬では、LAMP 反応が進むにつれ溶液の pH (水素イオン指数) が初期状態での約 8.8 から、反応後 6.0~6.5 へと変化することを利用し、pH 指示薬 (フェノールレッドなど) で判定する¹¹⁷⁻¹²⁸⁾。また、金属指示薬であるヒドロキシナフトールブルー (HNB) を用いる判別方法もある。LAMP 反応では、式 (1.1) および式 (1.2) に示すように、DNA 増幅反応の進行に伴い、副産物であるピロリン酸イオンが多量に生成される。ピロリン酸イオンは金属イオンと反応するため、遺伝子増幅試薬中の Mg^{2+} イオンと結合し、不溶性の沈殿物であるピロリン酸マグネシウム ($Mg_2P_2O_7$) が生成される。この際、HNB は Mg^{2+} イオンを脱離するため、溶液の色が紫色 (陰性) から水色 (陽性) へと変化する。このように、間接法では、蛍光検出のための外部機器 (イルミネーターなど) が不要であるため、低コストでシステムが構築可能である。一方で、定性的な評価に限られているという欠点をもつ。

なお、一般的な LAMP 法の検出方法としては、ピロリン酸マグネシウムによる濁度検出法が用いられている。濁度検出法は蛍光検出法と異なり、マイクロチューブ内液中で生成されるピロリン酸マグネシウムを確認するため、時間経過での沈殿に伴い、濁度のピークが下がるグラフが生成される。

表 1.1 PCR 法と LAMP 法の比較

	PCR	LAMP
Reaction time	2~3 hours	30~60 min
Reaction temperature	Repeating: 55°C→75°C→95°C	Constant: 60~65°C
Sensitivity	10 µg/g	10 µg/g
On-site diagnosis	Impossible	Possible
Detection method	Equipment	Visualization or Equipment

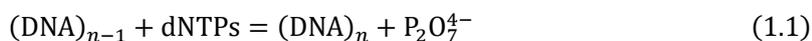
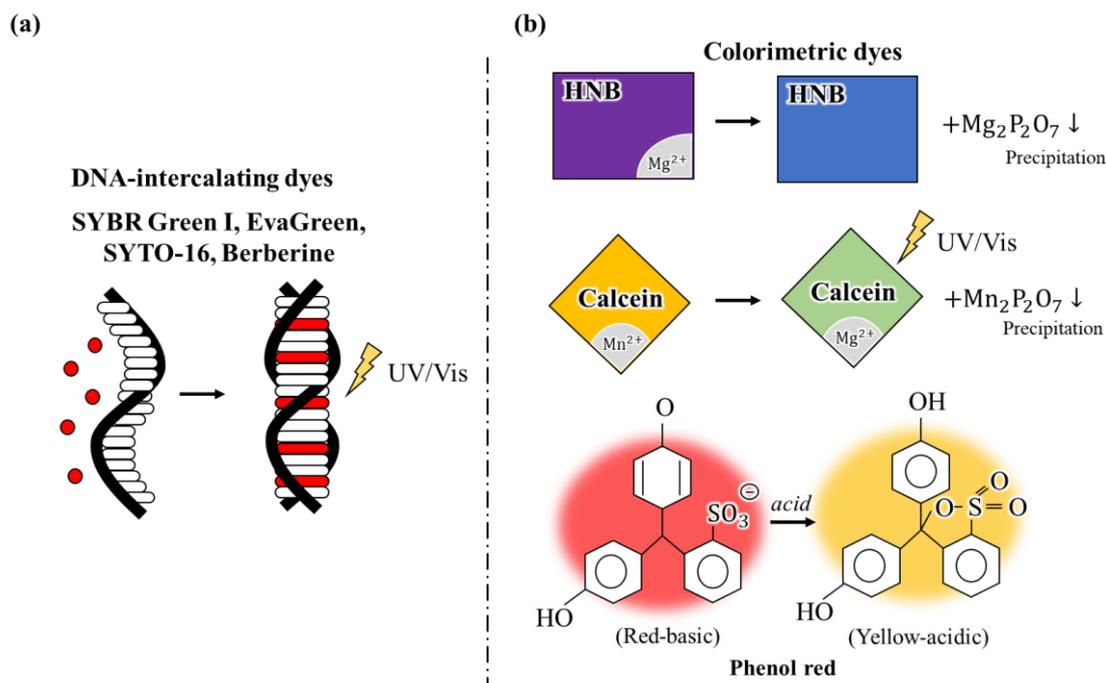


表 1.2 LAMP 法に用いる色素とメカニズムおよび色の变化

Dye	Mechanism	Color before and after amplification
Metal ion indicators, fluorescence		
Calcein	enhancement with the displacement of Mn^{2+}	Orange / Green
Hydroxynaphthol blue (HNB)	Metal ion indicators Mg^{2+}	Purple / Blue
Phenol red	pH indicator	Red / Yellow
Berberine	Intercalation of dsDNA	Orange / Green
SYBR Green I	Intercalation of dsDNA	Dark orange / Green
EvaGreen	Intercalation of dsDNA	Orange / Green



(a) 直接法による DNA 増幅指示薬 (b) 間接法による DNA 増幅指示薬

図 1.4 LAMP 法を用いた検出方法

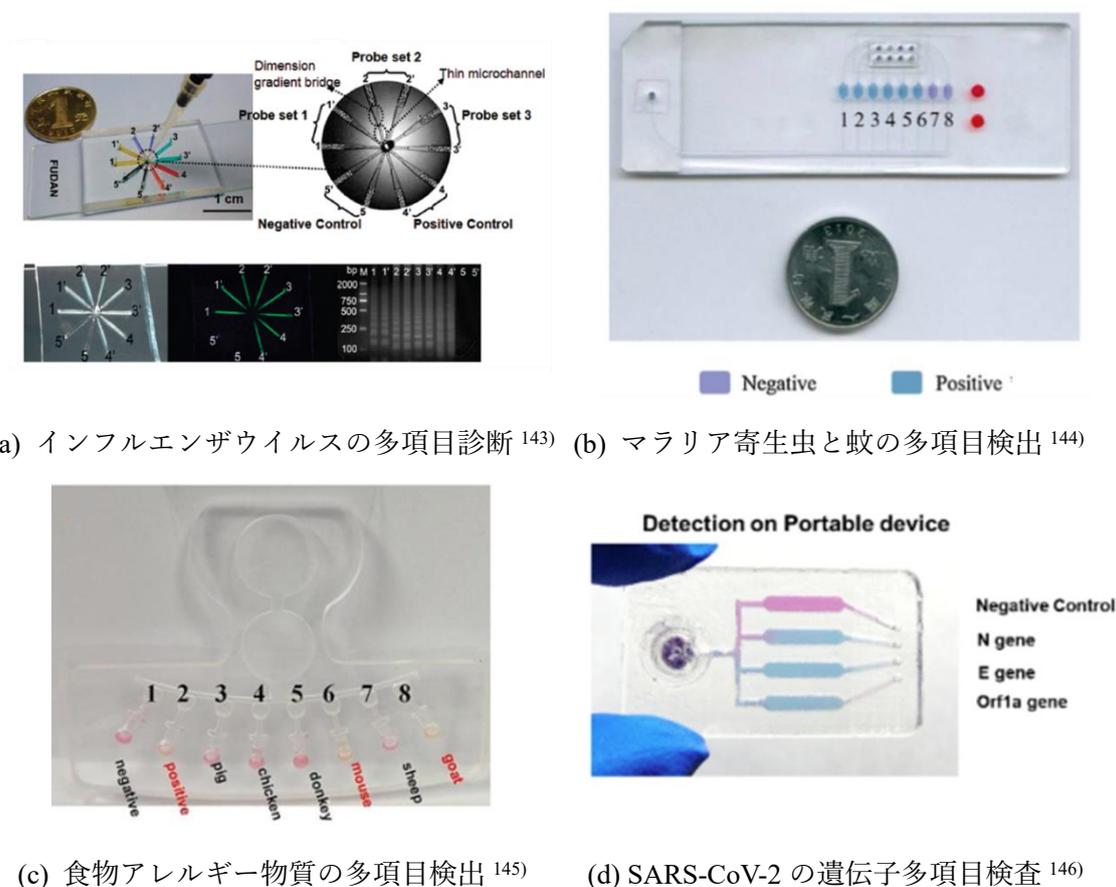
マイクロ流体デバイス上での LAMP 法を用いた診断技術は、前述の PCR 法と同様、研究開発が進められてきた¹²⁹⁾。遺伝子増幅反応後に電気泳動により検出する手法¹³⁰⁾や、蛍光試薬を用いてリアルタイムに検出する方法¹³¹⁾、ドロップレットを用いることでデジタル検出を行う方法¹³²⁾が検討されてきた。さらに、LAMP 法特有の比色指示薬を用いた検出も実証されている¹³³⁾。前述の通り、LAMP 法には、PCR 法のような温度変化を必要としないことに加え、比色指示薬を用いることで、目視での陽性・陰性判定が可能となるため、システム

全体を簡易かつ安価に構築することができる¹³⁴⁻¹³⁷⁾。そのため、現場（オンサイト）で即時検査を行う診断機器の開発も進められており、新興感染症の感染拡大対策などでの活用が期待されている^{138,139)}。

1.3 マルチプレックス遺伝子診断技術への応用

新興感染症の発生時や、再興感染症の流行時などでは、迅速な診断技術が求められる一方、他の感染症との識別技術も必要となる。すなわち、多項目を一度に診断できるマルチプレックス診断が求められている。通常の PCR 法や LAMP 法などの検査技術では、マルチプレックス診断を行うためには、その分の試薬量や、検査技師の操作量が必要となり、コストが高く、かつ長時間の検査となってしまう。2019 年より発生した新型コロナウイルス感染症（SARS-CoV-2）の検査では、検査技師の不足や、試薬の不足が社会問題となり、さらに検査結果が得られるまでに長時間を要することが課題であった。

そこで、前述の課題を解決するために、マイクロ流体チップテクノロジーを応用し、マルチプレックス診断技術を実装した μ TAS が開発されてきた¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾。図 1.5 に LAMP 法を実装した μ TAS の例を示す。図 1.5 (a) は、季節性インフルエンザ H1N1 型ウイルス、A 型インフルエンザウイルス、パンデミック型インフルエンザ H1N1 型ウイルスの多項目診断を行うデバイスである¹⁴³⁾。遺伝子増幅反応中に光ファイバセンサを用いて各流路の濁度を計測することで、リアルタイム診断を行っている。季節性インフルエンザ H1N1 型ウイルスの DNA を 3.2×10^2 fg/ μ L、A 型インフルエンザウイルスの DNA を 2.87×10^2 fg/ μ L、パンデミック型インフルエンザ H1N1 型ウイルスの DNA を 2.47×10^2 fg/ μ L を検出できることを実証した。図 1.5 (b) に示すのは、マラリアを感染させる寄生虫と媒介する蚊の多項目遺伝子診断を行うデバイスである¹⁴⁴⁾。8 個の反応容器の内、6 個にシマハマダラカなどの遺伝子に起因するプライマーが固定されており、複数種類の同時検査を可能にしている。デバイスへの導入後、ウォーターバス内 62°C で 45 min 加温する。導入したサンプルとプライマーが対応した場合、遺伝子増幅反応が生じ、試薬に混合されている HNB の色が紫色から水色へと変化し、6 種類すべての遺伝子を検出できることを実証した。図 1.5 (c) は、現場での食肉の種類を判定するためのマイクロ流体デバイスである¹⁴⁵⁾。このデバイスでは、手動でサンプルと遺伝子増幅試薬を導入することが可能であるため、大掛かりなポンプなどのシステムが不要である。このデバイスでヤギ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、ロバ、マウスの 6 種類を 60 min 以内に同定することを実証している。図 1.5 (d) は、3D プリンタによって作製した μ TAS である¹⁴⁶⁾。本デバイスでは、導入口が多層構造を有しており、デバイス上での核酸抽出、増幅反応、比色検出機能が統合されている。本デバイスを用いて、60 min 以内に排水中に含まれる新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）とヒト腸管病原体をそれぞれ 100 ゲノム/mL と 500 CFU/mL の感度で検出が行えることを実証している。さらに、スマートフォンを組み合わせた携帯型簡易診断装置への実装も実現している。



(a) インフルエンザウイルスの多項目診断¹⁴³⁾ (b) マラリア寄生虫と蚊の多項目検出¹⁴⁴⁾

(c) 食物アレルギー物質の多項目検出¹⁴⁵⁾ (d) SARS-CoV-2 の遺伝子多項目検査¹⁴⁶⁾

図 1.5 LAMP 法を実装した μ TAS

このように、複数項目の遺伝子診断技術は、SARS-CoV-2 のようなヒト感染症のみならず、臨床微生物学（ヒト免疫不全ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスなど）や、食品細菌検査（リステリア、サルモネラなど）、遺伝子治療における発現診断、法医学、農学、アレルゲン物質検査のなど多くの領域で用途があり、高度な社会問題に直結する技術である¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾。そのため、ポータブルで、安価なデバイスで、迅速かつマルチプレックスに診断ができる μ TAS はこれらの課題へのブレイクスルーとなり得る可能性がある。

1.4 本研究の目的と本論文の構成

前述の通り、PCR 法や LAMP 法のマルチプレックス診断には、検査項目数分の試薬量や検査技師による操作が必要となる。具体的には、患者などから採取した検体から DNA 抽出（精製）を行い、調整した試薬と混合し、一定時間加温することで遺伝子増幅反応を行い、検出をする。しかし、このとき検査項目ごとに、これらの操作を行う必要があり、長時間かつ高コストな検査となってしまう。さらに、検体サンプル数が増えた場合には、その数の操

作回数が必要となるため、膨大な操作量となる。

そこで、本研究では、図 1.6 に示すように、迅速かつ簡便に多検体・多項目の同時診断を行えるデバイスを開発することを目的とし、マイクロ流体チップテクノロジーと LAMP 法を組み合わせたマルチプレックス遺伝子診断システムを開発する。作業者は、検体サンプルと試薬の混合液を導入口より送液するだけで、複数項目の遺伝子診断が可能となり、大幅な検査時間の短縮を図ることができる。さらに、多検体を同時に診断できるようにすることで、検査のスループット向上を実現する。

本研究の目的が達成できれば、感染症ウイルスから人の暮らしの安心を守り、食品検査を通じて食の安全を守り、農作物や畜産における病害検査により食料の安定供給を守ることによって、安心・安全な社会を実現することが可能となる。

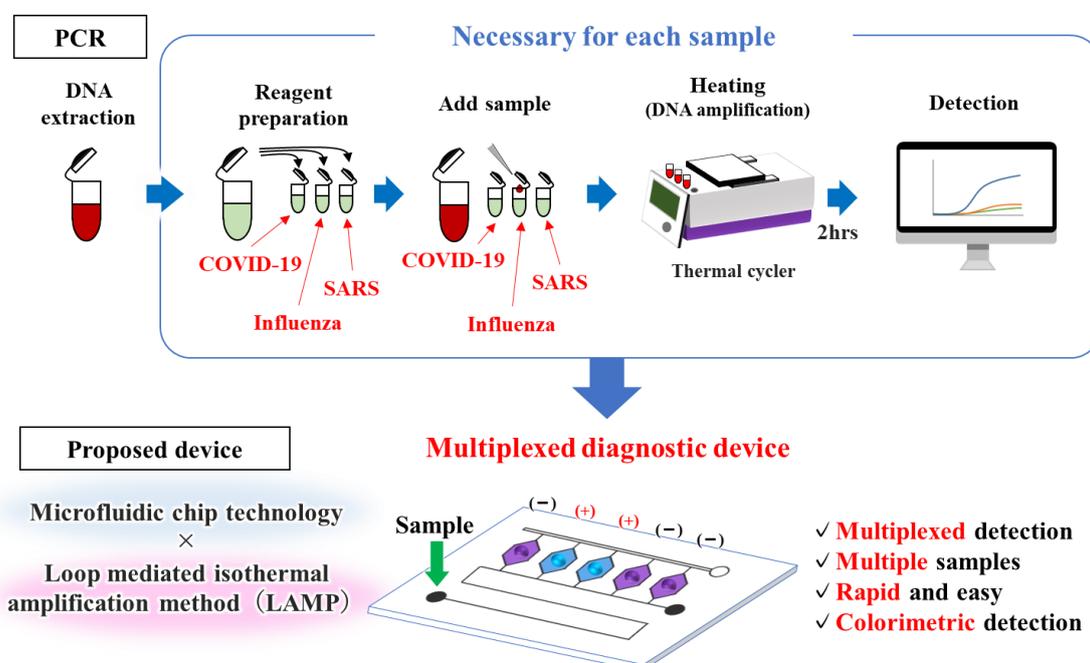


図 1.6 従来の遺伝子診断手法と本研究で提案するマルチプレックス遺伝子診断システム

本研究は、感染症ウイルス、食物アレルギー物質などの標的遺伝子を迅速・簡便に検査することができる、多検体・多項目同時定量診断システムの開発を目的として実施したものである。本論文は、図 1.7 に示すように全体で 8 章からなっている。

第 1 章は緒論であり、最初に μ TAS の歴史的背景とその重要性について述べた。次いで、マイクロ流体チップテクノロジーを応用した遺伝子診断技術ならびにマルチプレックス診断における研究開発動向ならびに周辺技術について述べるとともに、本研究で開発するデバイスの必要性とその目的について述べた。

第 2 章では、マルチプレックス遺伝子診断デバイスの基本原理を提案した。デバイスの構成要素の一つである分注部には、3 個 1 組の横型相ガイド (受動バルブ) を実装することで

複数の反応容器への溶液の自律的な分注が可能であることを示した。また、分注部の前段に配置した混合部には、横型ミキサを実装することで溶液の高効率な混合が可能であることを示した。さらに、開発したデバイスに蛍光LAMP法を実装し、複数種類の農作物感染性ウイルスの多項目遺伝子診断に適用し、その有用性を示した。しかし、実用化に向けての技術的課題として、2層構造を有するデバイスの作製プロセスが複雑であり再現性が低いこと、横型相ガイドの決壊圧力の制約条件からデバイスへの検体・試薬の充填速度に制限があること、蛍光観察のための大がかりな装置が必要となり現場即時検査には適さないことが挙げられた。

第3章では、第2章で実用化に向けての課題となったデバイス作製プロセスの簡略化と受動バルブの耐圧性能の向上を目的とし、横型相ガイド構造と比較して決壊圧力の設計自由度が高い縦型相ガイド構造を提案した。個々の反応容器に設けた2個1組の縦型相ガイド（受動バルブ）に必要な決壊圧力の設計指針を明らかにし、最大導入流量および分注可能な反応容器の個数を予測するための分注理論を提案した。さらに、導入流量のさらなる向上を目的とし、受動バルブを空気排気流路内に対向して配置するエアープラグインバルブ構造を考案した。反応容器への充填が完了することで、対向する受動バルブ間に捕捉された空気を介して液体が互いに押し合い、受動バルブに印加される圧力が減殺できることを示した。その結果、デバイスに導入可能な最大流量の大幅な向上を実現し、さらに、分注可能な反応容器数の制約を排除し、検査項目数の増加が可能になることを示した。

第4章では、第2章で検討された横型ミキサの作製プロセスを簡略化するために、1回のプロセスで作製が可能で、かつ流路デザインを損なうことなく実装が可能な汎用性の高い縦型ミキサを提案した。流路長手方向に対して障害物構造を非対称に配置することで、広いレイノルズ数の範囲において高い混合効率を実現できることを示した。さらに、最適形状の調査を行うとともに、混合メカニズムを明らかにした。

第5章では、ワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法を適用し、デバイス作製プロセスの再現性を高めることで、反応容器内への液体充填時の空気の混入を防止できることを実証した。また、検体・試薬の送液に電動ピペットを使用した診断プロセスの簡略化が実現した。さらに、現場即時検査を目的として、遺伝子増幅反応の陽性・陰性判定を目視で行える比色指示薬を用いたLAMP法によって、節足動物媒介性ウイルス、有毒植物、ヒト感染性ウイルス（新型コロナウイルスなど）、農作物病害虫、食物アレルギー物質の多項目遺伝子定性診断が可能であることを実証した。また、遺伝子増幅反応後の反応容器の色の変化を画像解析することで、エンドポイントでの陽性・陰性判定が行えることを示した。

第6章では、検体中の遺伝子の定量診断を目的とし、遺伝子増幅反応中の比色指示薬の色の変化をモニタリングするタイムラプス撮影装置ならびに取得画像から反応容器の色の変化を解析する色解析プログラムを開発した。本手法によって、遺伝子増幅曲線の自動取得が可能となり、さらに、理論関数へのフィッティング処理を介して遺伝子増幅反応の立ち上がり時間を算出することが可能となった。開発した遺伝子定量解析システムを用いて、ヒトヘルペスウイルスを標的とした検体ウイルス遺伝子濃度の定量診断に適用し、その有効性を

実証した。

第7章では、複数検体の同時診断を目的とし、遠心力を用いて多検体を同時に送液できる遠心送液型デバイスを開発した。遠心力下においても、個々の反応容器に2個1組の縦型相ガイドを設置することで、自律的な分注操作が行えるデバイスデザインを提案し、遠心力と受動バルブの耐圧性能の関係から、デバイスの設計指針を明らかにした。さらに、食物アレルギー物質の4検体・4項目の同時診断に適用し、開発したデバイスの有効性を実証した。

第8章は、結論であり、本研究で得られた成果を統括し、今後の展望を述べた。

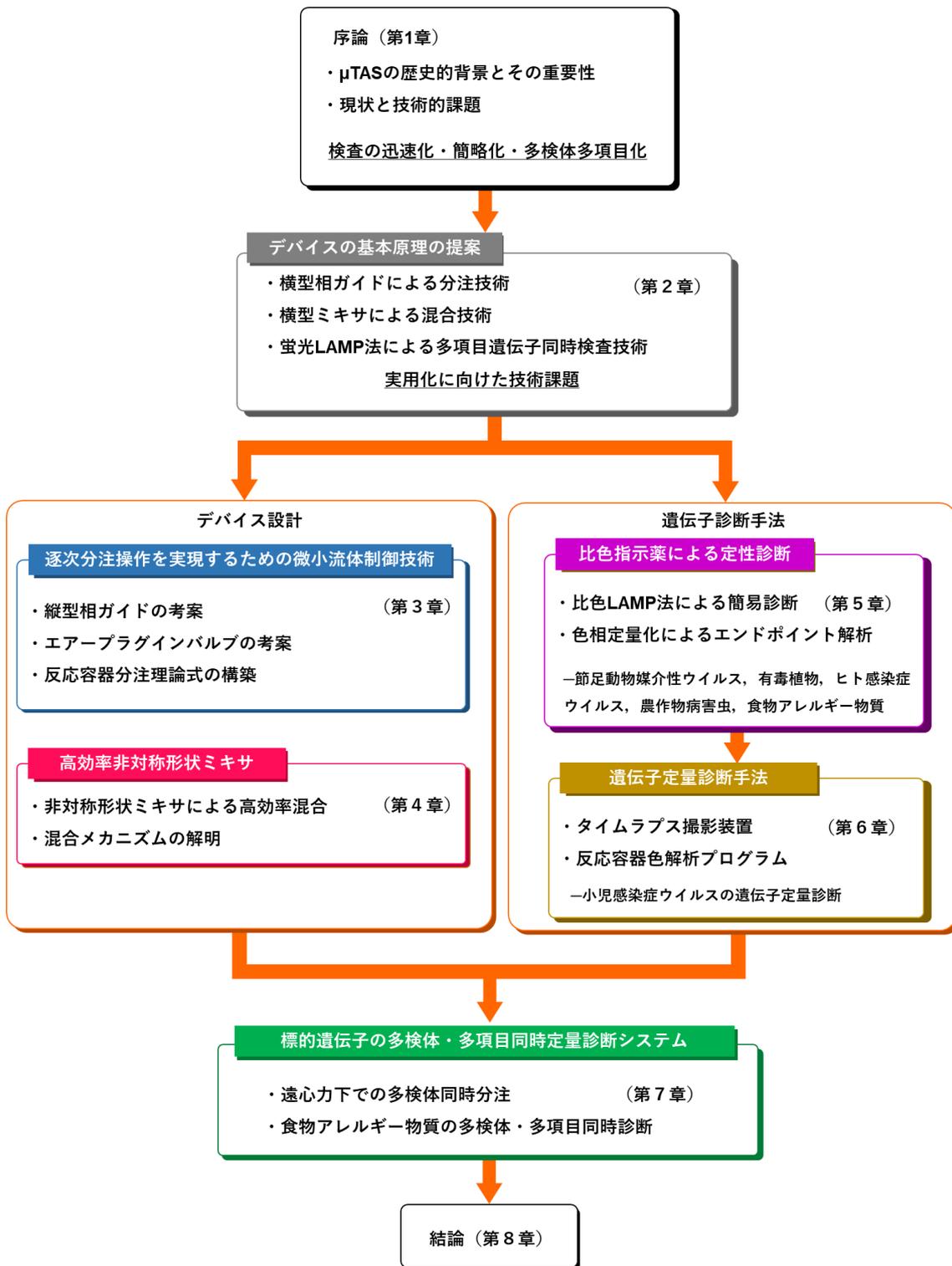


図 1.7 本論文の構成

参考文献

- [1] S. C. Terry, J. H. Jerman, and J. B. Angell, "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer", *IEEE Trans. Electron. Devices*, 26(12), 1880-6, (1979)
- [2] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, and A. Manz, "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology", *Anal. Chem.*, 74, 2623-36, (2002)
- [3] T. Verheggen, J. L. Beckers, and F. M. Everaerts, "Simple sampling device for capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr.*, 452, 615-22, (1988)
- [4] A. Manz, N. Graber, and H. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing", *Sens. Actuators B Chem.*, 1, 244-8, (1990)
- [5] P. Bergveld, "The challenge of developing μ TAS", *Proc. Micro Total Analysis Systems*, 1-4, (1994)
- [6] A. Manz, D. J. Harrison, E. M. J. Verpoorte, J. C. Fettinger, A. Paulus, H. Lüdi and H. M. Widmer, "Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems", *J. Chromatogr.*, 593, 253-258, (1992)
- [7] M. A. Northup, M. T. Ching, R. M. White, and R. T. Watson, "DNA amplification in a microfabricated reaction chamber", *Proc. 7th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators (Transducers '93)*, 924-926, (1993)
- [8] J. Branebjerg, B. Fabius, and P. Gravesen, "Applocation of miniature analyzers: from microfluidic components to μ TAS", *Proc. Micro Total Analysis Systems*, 141-151, (1994)
- [9] C. S. Effenhauser, A. Paulus, A. Manz, and H. M. Widmer, "High-speed separation of antisense oligonucleotides on a micromachined capillary electrophoresis device", *Anal. Chem.*, 66(18), 2949-53, (1994)
- [10] A. T. Wooley, and R. A. Mathies, "Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips", *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.*, 91(24), 11348-52, (1994)
- [11] Z. H. Fan, and D. J. Harrison, "Micromachining of capillary electrophoresis injectors and separators on glass chips and evaluation of flow at capillary intersections", *Anal. Chem.*, 66(1), 177-84, (1994)
- [12] G. Fuhr, and B. Wagner, "Electric field mediated cell manipulation characterization and cultivation in highly conductive media", *Proc. Micro Total Analysis Systems*, 209-14, (1994)
- [13] K. Seller, Z. H. Fan, K. Flurl, and D. J. Harrison, "Electroosmotic pumping and valveless control of fluid flow within a manifold of capillaries on a glass chip", *Anal. Chem.*, 66(20), 3485-3491, (1994)
- [14] M. Mrksich, and G. M. Whitesides, "Patterning self-assembled monolayers using microcontact printing: a new technology for biosensors?", *Trends Biotechnol.*, 13(6), 228-235, 1995

- [15] C. D. Bain, and G. M. Whitesides, "Modeling Organic Surfaces with Self-Assembled Monolayers", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 28 (4), 506-512, (1989)
- [16] A. Kumar, and G. M. Whitesides, "Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol "ink" followed by chemical etching", *Appl. Phys. Lett.*, 63(14), 1993
- [17] Y. Xia, and G. M. Whitesides, "Soft lithography", *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 28, 153-84, (1998)
- [18] Y. Xia, and G. M. Whitesides, "Soft lithography", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 550-575, (1998)
- [19] H. Lorenz, M. Despont, N. Fahrni, N. LaBianca, P. Renaud, and P. Vettiger, "SU-8: a low-cost negative resist for MEMS", *J. Micromech. Microeng.*, 7, 121-124, (1997)
- [20] G. G. Morbioli, N. C. Speller, A. M. Stockton, "A practical guide to rapid-prototyping of PDMS-based microfluidic devices: A tutorial", *Anal. Chim. Acta*, 1135, 150-74, (2020)
- [21] R. Zaouk, B. Y. Park, and M. J. Madou, "Fabrication of polydimethylsiloxane microfluidics using SU-8 molds", *Methods Mol. Biol.*, 321, 17-21, (2006)
- [22] P. Abgrall, V. Conedera, H. Camon, A.-M. Gue, and N.-T. Nguyen, "SU-8 as a structural material for labs-on-chips and microelectromechanical systems", *Electrophoresis*, 28(24), 4539-51, (2007)
- [23] T. Kawakatsu, G. Trägårdh, Y. Kikuchi, M. Nakajima, H. Komori, and T. Yonemoto, "Effect of microchannel structure on droplet size during crossflow microchannel emulsification", *J. Surf. Deterg.*, 3(3), 295-302, (2000)
- [24] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, and S. R. Quake, "Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device", *Phys. Rev. Lett.*, 86(18), 4163-6, (2001)
- [25] E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchison, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perrimon, and M. L. Samuels, "Droplet microfluidic technology for single cell high-throughput screening", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(34), 14195-200, (2009)
- [26] H. N. Joesson, and H. A. Svahn, "Droplet microfluidics—A tool for single-cell analysis", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51(49), 12176-92, (2012)
- [27] K. Matuła, F. Rivello, and W. T. S. Huck, "Single-cell analysis using droplet microfluidics", *Adv. Biosyst.*, 4(1), e1900188, (2020)
- [28] D.-K. Kang, M. M. Ali, K. Zhang, E. J. Pone, and W. Zhao, "Droplet microfluidics for single-molecule and single-cell analysis in cancer research, diagnosis and therapy", *Trends Analyt. Chem.*, 58, 145-153, (2014)
- [29] Y. Ding, J. Choo, and A. J. deMello, "From single-molecule detection to next-generation sequencing: microfluidic droplets for high-throughput nucleic acid analysis", *Microfluidics Nanofluids*, 21,58, (2017)
- [30] F. Lan, J. R. Haliburton, A. Yuan, and A. R. Abate, "Droplet barcoding for massively parallel single-molecule deep sequencing", *Nat. Commun.*, 7, 11784, (2016)

- [31] W. Gu, X. Zhu, N. Futai, B. S. Cho, and S. Takayama, "Computerized microfluidic cell culture using elastomeric channels and Braille displays", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(45), 15861-6, (2004)
- [32] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. G. Sjöberg, R. M. T. Fleming, "Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices", *Biosens. Bioelectron.*, 63, 218-231, (2015)
- [33] E. Berthier, E. W. K. Young, and D. Beebe, "Engineers are from PDMS-land, biologists are from polystyrenia", *Lab Chip*, 12(7), 1224-37, (2012)
- [34] E. Cimetta, and G. V.-Novakovic, "Microscale technologies for regulating human stem cell differentiation", *Exp. Bio. Med.*, 239(9), 1255-1263, (2014)
- [35] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. M.-Zavala, H. Y. Hsin, and D. E. Ingber, "Reconstituting organ-level lung functions on a chip", *Science*, 328(5968), 1662-8
- [36] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, and D. E. Ingber, "Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow", *Lab Chip*, 12(12), 2165-74, (2012)
- [37] P. de Haan, M. A. Ianovska, K. Mathwig, G. A. A. van Lieshout, V. Triantis, H. Bouwmeester, and E. Verpoorte, "Digestion-on-a-chip: a continuous-flow modular microsystem recreating enzymatic digestion in the gastrointestinal tract", *Lab Chip*, 19(9), 1599-609, (2019)
- [38] S. J.-Firoozinezhad, F. S. Gazzaniga, E. L. Calamari, D. M. Camacho, C. W. Fadel, A. Bein, B. Swenor, B. Nestor, M. J. Crouce, A. Tovaglieri, O. Levy, K. E. Gregory, D. T. Breault, J. M. S. Cabral, D. L. Kasper, R. Novak, and D. E. Ingber, "A complex human gut microbiome cultured in an anaerobic intestine-on-a-chip", *Nat. Biomed. Eng.*, 3(7), 520-31, (2019)
- [39] G. Agrawal, A. Aung, and S. Varghese, "Skeletal muscle-on-a-chip: an *in vitro* model to evaluate tissue formation and injury", *Lab Chip*, 17(20), 3447-3461, (2017)
- [40] Y. Torisawa, C. S. Spina, T. Mammoto, A. Mammoto, J. C. Weaver, T. Tat, J. J. Collins, and D. E. Ingber, "Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology *in vitro*", *Nat. Methods*, 11(6), 663-9, (2014)
- [41] S. N. Bhatia, and D. E. Ingber, "Microfluidic organs-on-chips", *Nat. Biotechnol.*, 32(8), 760-72, (2014)
- [42] E. W. Esch, A. Bahinski, and D. Huh, "Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery", *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 14(4), 248-60, (2015)
- [43] C. M. Leung, P. de Haan, K. R.-Bouchard, G.-A. Kim, J. Ko, H. S. Rho, Z. Chen, P. Habibovic, N. Li Jeon, S. Takayama, M. L. Shuler, G. V.-Novakovic, O. Frey, E. Verpoorte, and Y.-C. Toh, "A guide to the organ-on-a-chip", *Nat. Rev. Methods Primers*, 2, 33, (2022)
- [44] M. B. Esch, T. L. King, and M. L. Shuler, "The role of Body-on-a-Chip devices in drug and toxicity studies", *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 13, 55-72, (2011)

- [45] A. W. Martines, S. T. Phillips, M. J. Butte, and G. M. Whitesides, "Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassay", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46(8), 1318-1320, (2007)
- [46] W. Martinez, S. T. Phillips, B. J. Wiley, M. Gupta, and G. M. Whitesides, "FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices", *Lab Chip*, 8(12), 2146-2150, (2008)
- [47] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Electrochemical detection for paper-based microfluidics" *Anal. Chem.*, 81(14), 5821-5826, (2009)
- [48] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices", *Anal. Chim. Acta*, 674(2), 227-233, (2010)
- [49] E. Carrilho, A. W. Martinez, and G. M. Whitesides, "Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-based Microfluidics", *Anal. Chem.*, 81, 16, (2009)
- [50] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing", *Analyst*, 136(1), 77-82, (2011)
- [51] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, and B. Lin, "Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost portable bioassay", *Electrophoresis*, 30(9), 1497-1500, (2009)
- [52] X. Li, J. Tian, G. Garnier, and W. Shen, "Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing", *Colloids Surf. B*, 76(2), 564-570, (2010)
- [53] K. Maejima, S. Tomikawa, K. Suzuki, and D. Citterio, "Inkjet printing: an integrated and green chemical approach to microfluidic paper-based analytical devices", *RSC Advances*, 3, 9258-9263, (2013)
- [54] K. Yamada, T. G. Hanares, K. Suzuki, and D. Citterio, "Paper-based inkjet-printed microfluidic analytical devices", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54 (18), 5294-5310, (2015)
- [55] A. Isozaki, J. Harmon, Y. Zhou, S. Li, Y. Nakagawa, M. Hayashi, H. Mikami, C. Lei, and K. Goda, "AI on a chip", *Lab Chip*, 20(17), 3074-90, (2020)
- [56] A. Isozaki, H. Mikami, H. Tezuka, H. Matsumura, K. Huang, M. Akamine, K. Hiramatsu, T. Iino, Takuro Ito, H. Karakawa, Y. Kasai, Y. Li, Y. Nakagawa, S. Ohnuki, T. Ota, Y. Qian, S. Sakuma, T. Sekiya, Y. Shirasaki, N. Suzuki, E. Tayyabi, T. Wakamiya, M. Xu, M. Yamagishi, H. Yan, Q. Yu, S. Yan, D. Yuan, W. Zhang, Y. Zhao, F. Arai, R. E. Campbell, C. Danelon, D. D. Carlo, K. Hiraki, Y. Hoshino, Y. Hosokawa, M. Inaba, A. Nakagawa, Y. Ohya, M. Oikawa, S. Uemura, Y. Ozeki, T. Sugimura, N. Nitta, and K. Goda, "Intelligent image-activated cell sorting 2.0", *Lab Chip*, 20(13), 2263-73, (2020)
- [57] Y. Zhao, A. Isozaki, M. Herbig, M. Hayashi, K. Hiramatsu, S. Yamazaki, N. Kondo, S. Ohkuni, Y. Ohya, N. Nitta, and K. Goda, "Intelligent sort-timing prediction for image-activated cell sorting", *Cytometry A*, 103(1), 88-97, (2023)
- [58] B. Barlogie, M. N. Raber, J. Schumann, T. S. Johnson, B. Drewinko, D. E. Swartzendruber, W. Göhde, M. Andreeff, and E. J. Freireich "Flow cytometry in clinical cancer research", *Cancer*

- Res.*, 43(9), 3982-97, (1983)
- [59] K. M. McKinnon, "Flow cytometry: an overview", *Curr. Protoc. Immunol.*, 120, 5.1.1-5.1.11, (2018)
- [60] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, and A. Nalbant, "Flow cytometry: basic principles and applications", *Crit. Rev. Biotechnol.*, 37(2), 163-76, (2017)
- [61] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics", *Nature*, 442, 368-73, (2006)
- [62] D. Figeys, and D. Pinto, "Lab-on-a-Chip: A revolution in biological and medical sciences", *Anal. Chem.*, 72, 330A-335A, (2000)
- [63] N. Azizipour, R. Avazpour, D. H. Rosenzweig, M. Sawan, and A. Ajji, "Evolution of bochip technology: A review from Lab-on-a-Chip to Organ-n-a-Chip", *Micromachines*, 11, 599, (2000)
- [64] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten, and R. Zengerle, "Microfluidic lab-on-a-chip platforms; Requirements, characteristics and applications", *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1153-1182, (2010)
- [65] H. Craighead, "Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules", *Nature*, 442, 387-93, (2006)
- [66] P. Pattanayak, S. K. Singh, M. Gulati, S. Vishwas, B. Kapoor, D. K. Chellappan, K. Anand, G. Gupta, N. K. Jha, P. K. Gupta, P. Prasher, K. Dua, H. Dureja, D. Kumar, and V. Kumar, "Microfluidic chips: recent advances, critical strategies in design, applications and future perspectives", *Microfluidics Nanofluidics*, 25, 99, (2021)
- [67] J. R. M.-Salazar, K. R. Cruz, R. M. M. Vásques, and O. N. de Oliveira Jr., "Microfluidic point-of-care devices: new trends and future prospects for ehealth diagnostics", *Sensors*, 20(7), 1951, (2020)
- [68] R. Dragone, G. Grasso, M. Muccini, S. Toffanin, and G. Grasso, "Portable bio/chemosensoristic devices: Innovative systems for environmental health and food safety diagnostics", *Front. Public Health*, 5, 80, (2017)
- [69] J.-Y. Yoon, and B. Kim, "Lab-on-a-Chip pathogen sensors for food safety", *Sensors*, 12, 10713-41, (2012)
- [70] P. S. Dittrich, and A. Manz, "Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery", *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, 210-8, (2006)
- [71] K. B. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.", *Methods Enzymol.* 155, 335-350, (1987)
- [72] R. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science*, 239(4839), 487-491, (1988)
- [73] K. B. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction", *Cold Spring Harb. Symp. Quant.*

- Biol.*, 51(1), 263-73, (1986)
- [74] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams, "Real Time Quantitative PCR", *Genome Res.*, 6(10), 986-94, (1996)
- [75] I. M. Machay, K. E. Arden, and A. Nitsche, "Real-time PCR in virology", *Nucleic. Acids Res.*, 30(6), (2002)
- [76] M. Mackay, "Real-time PCR in the microbiology laboratory", *Clin. Microbiol., Infect.*, 10, 190-212, (2004)
- [77] M. A. Valasek, and J. J. Repa, "The power of real-time PCR", *Adv. Physiol. Educ.*, 29, 151-59, (2005)
- [78] M. Arya, I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H. RH Patel, "Basic principles of real-time quantitative PCR", *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 5(2), 209-19, 2005
- [79] B. Vogelstein, and K. W. Kinzler, "Digital PCR", *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.*, 96 (16):9236-9241, (1999)
- [80] G. Pohl, and I.-M. Shih, "Principle and applications of digital PCR", *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 4(1), 41-7, (2004)
- [81] J. F. Huggett, S. Cowen, and C. A. Foy, "Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool", *Clin. Chem.*, 61(1), 79-88, (2015)
- [82] M. U. Kopp, A. J. de Mello, and A. Manz, "Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip", *Science*, 280(5366), 1046-8, (1998)
- [83] M. Hashimoto, P.-C. Chen, M. W. Mitchell, D. E. Nikitopoulos, S. A. Soper, and M. C. Murphy, "Rapid PCR in a continuous flow device", *Lab Chip*, 4(6), 638-645, (2004)
- [84] N. Crews, C. Wittwer, and B. Gale, "Continuous-flow thermal gradient PCR", *Biomed. Microdevices*, 10, 187-195, (2008)
- [85] N. Crews, C. Wittwer, R. Palais, and B. Gale, "Product differentiation during continuous-flow thermal gradient PCR", *Lab Chip*, 8(6), 919-924, (2008)
- [86] H. Tachibana, M. Saito, K. Tsuji, K. Yamanaka, L. Q. Hoa, and E. Tamiya, "Self-propelled continuous-flow PCR in capillary-driven microfluidic device: Microfluidic behavior and DNA amplification", *Sens. Actuators B Chem.*, 206, 303-310, (2015)
- [87] M. B. Kulkarni, and S. Goel, "Miniaturized DNA amplification platform with soft-lithographically fabricated continuous-flow PCR microfluidic device on a portable temperature controller", *Microfluidics Nanofluidics*, 25(69), (2021)
- [88] Y. Schaerli, R. C. Wootton, T. Robinson, V. Stein, C. Dunsby, M. A. A. Neil, P. M. W. French, A. J. deMello, C. Abell, and F. Hollfelder, "Contrinuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets", *Anal. Chem.*, 81(1), 302-306, (2009)
- [89] A. S. Whale, J. F. Huggett, S. Cowen, V. Speirs, J. Shaw, S. Ellison, C. A. Foy, and D. J. Scott, "Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy

- number variation”, *Nucleic Acids Res.*, 40(11), e82, (2012)
- [90] E. A. Oblath, W. H. Henley, J. P. Alarie, and J. M Ramsey, “A microfluidic chip integrating DNA extraction and real-time PCR for the detection of bacterial in saliva”, *Lab Chip*, 13(7), 1325-32, (2013)
- [91] H. Tachibana, M. Saito, S. Shibuya, K. Tsuji, N. Miyagawa, K. Yamanaka, and E. Tamiya, “On-chip quantitative detection of pathogen genes by autonomous microfluidic PCR platform”, *Biosens. Bioelectron.*, 74, 724-30, (2015)
- [92] T. Houssin, J. Cramer, R. Grojsman, L. Bellahsene, G. Colas, H. Moulet, W. Minnella, C. Pannetier, M. Leberre, A. Plecis, and Y. Chen, “Ultrafast, sensitive, and large-volume on-chip real-time PCR for the molecular diagnosis of bacterial and viral infections”, *Lab Chip*, 16(8), 1401, (2016)
- [93] H. C. Fan, and S. R. Quake, “Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction”, *Anal. Chem.*, 79(19), 7576-7579, (2009)
- [94] H. C. Fan, Y. J. Blumenfeld, Y. Y. El-Sayed, J. Cheh, and S. R. Quake, “Microfluidic digital PCR enables rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidy”, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 200(5), 543.e541-47, (2009)
- [95] M. C. Strain, S. M. Lada, T. Luong, S. E. Rought, S. Gianella, V. H. Terry, C. A. Spina, C. H. Woelk, and D. D. Richman, “Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR”, *PLoS One*, 8, e55943, (2013)
- [96] A. D. Tadmor, E. A. Ottesen, J. R. Leadbetter, and R. Phillips, “Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR”, *Science*, 333(6038), 58-62, (2011)
- [97] J. E. Kreutz, T. Munson, T. Huynh, F. Shen, and W. Du, “Theoretical design and analysis of multivolume digital assays with wide dynamic range validated experimentally with microfluidic PCR”, *Anal. Chem.*, 83(21), 8158-8168, 2011
- [98] P.-L. Quan, M. Sauzade, and E. Brouzes, “dPCR: A technology review”, *Sensors*, 18(4), 1271, (2018)
- [99] N. C. Cady, S. Stelick, M. V. Kunnavakkam, and C. A. Batt, “Real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* using an integrated microfluidics platform”, *Sens. Actuators B Chem.*, 107(1), 332-341, (2005)
- [100] E. A. Ottesen, J. W. Hong, S. R. Quake, and J. R. Leadbetter, “Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental”, *Science*, 314(5804), 1464-1467, (2006)
- [101] C. M. Hinson, J. R. Chevillet, H. A. Briggs, E. N. Gallichotte, I. K. Ruf, B. J. Hindson, R. L. Vessela, and M. Tewari, “Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR”, *Nat. Methods*, 10 (10), 1003-5, (2013)
- [102] X. Bian, F. Jing, G. Li, X. Fa, C. Jia, H. Zhou, Q. Jin, and J. Zhao, “A microfluidic droplet digital PCR for simultaneous detection of pathogenic *Escherichia coli* O157 and *Listeria*

- monocytogenes*”, *Biosens. Bioelectron.*, 74, 770-77, (2015)
- [103] Y. Fu, H. Zhou, C. Jia, F. Jing, Q. Jin, J. Zhao, and G. Li, “A microfluidic chip based on surfactant-doped polydimethylsiloxane (PDMS) in a sandwich configuration for low-cost and robust digital PCR”, *Sens. Actuators B Chem.*, 245, 414-22, (2017)
- [104] C. Wei, C. Yu, S. Li, J. Meng, T. Li, J. Cheng, and J. Li, “A droplet-based multivolume microfluidic device for digital polymerase chain reaction”, *Sens. Actuators B Chem.*, 371, 132473, (2022)
- [105] D. Xu, W. Zhang, H. Li, N. Li, and J.-M. Lin, “Advances in droplet digital polymerase chain reaction on microfluidic chips”, *Lab Chip*, 23(5), 1258, (2023)
- [106] D. Pekin, Y. Skhiri, J.-C. Baret, D. L. Corre, L. Mazutis, C. B. Salem, F. Millot, A. E. Harrak, J. B. Hutchison, J. W. Larson, D. R. Link, P. L.-Puig, A. D. Griffiths, and V. Taly, “Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics” *Lab Chip*, 11(13), 2156-66
- [107] P. Gill, and A. Ghaemi, “Nucleic acid isothermal amplification technologies-A review”, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 7(3), 224-43, (2008)
- [108] A. Niemz, T. M. Ferguson, and D. S. Boyle, “Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases”, 29(5), *Trends Biotechnol.*, 240-50, (2011)
- [109] P. Craw, and W. Balachandran, “Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review”, *Lab Chip*, 12(14), 2469-86, (2012)
- [110] M. Shen, Y. Zhou, J. Ye, A. A. A. Al-Maskri, Y. Kang, S. Zeng, and S. Cai, “Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus”, *J. Pharm. Anal.*, 10(2), 97-101, (2020)
- [111] T. Notomi, H. Okayama, H. Masabuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase, “Loop-mediated isothermal amplification of DNA”, *Nucleic Acids Res.*, 28(12), e63, (2000)
- [112] Y. Mori, and T. Notomi, “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases”, *J. Infect. Chemother.*, 15(2), 62-69, (2009)
- [113] N. Tomita, Y. Mori, H. Kanda, and T. Notomi, “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products”, *Nat. Protoc.*, 3(5), 877-82, (2008)
- [114] Y. Mori, H. Kanda, and T. Notomi, “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development”, *J. Infect. Chemother.*, 19(3), 404-11, (2003)
- [115] T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita, and H. Kanda, “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects”, *J. Microbiol.*, 53(1), 1-5, (2015)
- [116] A. T. Scott, T. R. Layne, K. C. O’Connell, N. A. Tanner, and J. P. Landers, “Comparative evaluation and quantitative analysis of loop-mediated isothermal amplification indicators”, *Anal.*

- Chem.*, 92(19), 13343053, (2020)
- [117] M. Goto, E. Honda, A. Ogura, A. Nomoto, and K. Hanaki, "Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue", *Biotechniques*, 46(3), 167-172, (2009)
- [118] M. Goto, K. Shimada, A. Sato, E. Takahashi, T. Fukasawa, T. Takahashi, S. Ohka, T. Taniguchi, E. Honda, A. Nomoto, A. Ogura, T. Kirikae, and K. Hanaki, "Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* in mouse faces by colorimetric loop-mediated isothermal amplification", *J. Microbiol. Methods*, 81(3), 247-52, (2010)
- [119] Y.-L. Lau, M.-Y. Lai, B.-T. Teoh, J. A.-Jamil., J. Johari, S.-S. Sam, K.-K. Tan, and S. AbuBakar, "Colorimetric detection of dengue by single tube reverse-transcription-loop-mediated isothermal amplification", *PLoS One*, 10(9), e0138694, (2015)
- [120] C. Amaral, W. Antunes, E. Moe, A. G. Duarte, L. M. P. Lima, C. Santos, I. L. Gomes, G. S. Afonso, R. Vieira, H. S. S. Teles, M. S. Reis, M. A. R. da Silva, A. M. Henriques, M. Fevereiro, M. R. Ventura, M. Serrano, and C. Pimentel "A molecular test based on RT-LAMP for rapid, sensitive and inexpensive colorimetric detection of SARS-CoV-2 in clinical samples." *Sci. Rep.*, 11, 16430, (2021)
- [121] Y. Shi, M. Xu, X. Duan, S. Li, J.-w. Ding, and L. Chen, "WarmStart colorimetric loop-mediated isothermal amplification for the one-tube contamination-free and visualization detection of *Shigella flexneri*", *Int. J. Infect. Dis.*, 112, 55-62, (2021)
- [122] L. Bokelmann, O. Nickel, T. Maricic, S. Pääbo, M. meyer, S. Borte, and S. Riesenber, "Point-of-care bulk testing for SARS CoV-2 by combining hybridization capture with improved colorimetric LAMP", *Nat. Commun.*, 12(1), 1467, (2021)
- [123] V. L. D. Thi, K. Herbst, K. Boerner, M. Meurer, L. PM Kremer, D. Klrrmaler, A. Frelstaedter, D. Papaglannldls, C. Galmozzi, M. L. Stanlfer, S. Boulant, S. Klein, P. Chlanda, D. Khakkd, M. Knop, and S. Anders, "A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples", *Sci. Transl. Med.*, 12(556), eabc7075, (2020)
- [124] M. A. Lalli, J. S. Langmade, X. Chen, C. C. Fronick, C. S. Sawyer, L. C. Brucea, M. N. Wilkinson, R. S. Fulton, M. Heinz, W. J. Buchser, R. D. Head, R. D. Mitra, and J. Milbrandt, "Rapid, and extraction-free detection of SARS-CoV-2 from saliva by colorimetric reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification", *Clin. Chem.*, 67(2), 415-424
- [125] A. E. Calvert, B. J. Biggerstaff, N. A. Tanner, M. Lauterbach, and R. S. Lanciotti, "Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)", *PLoS One*, 12(9), e0185340
- [126] "D. H. Tran, H. T. Tran, U. P. Le, X. D. Vu, T. B. N. Trinh, H. D. K. Do, V. T. Than, L. M. bui, V. V. Vu, T. L. Nguyen, H. T. T. Phung, and V. P. Le, "Direct colorimetric LAMP assay for rapid detection of African swine fever virus: A validation study during an outbreak in Vietnam",

- Transbound. Emerg. Dis.*, 68(4), 2595-2602, (2021)
- [127] S. Azinheiro, F. Roumani, M. Prado, and A. G.-Maestu, "Rapid same-day detection of *Listeria monocytogens*, *Salmonella spp.*, and *Escherichia coli* O157 by colorimetric LAMP in daily products", *Food Anal. Methods*, 15, 2959-2971, (2022)
- [128] Y. Wang, J. Dai, Y. Liu, J. Yang, Q. Hou, Y. Ou, Y. Ding, B. Ma, H. Chen, M. Li, Y. Sun, H. Zheng, K. Zhang, A. K. Wubshet, A. D. Zaberezhny, T. I. Aliper, K. Tarasiuk, Z. Pejsak, Z. Liu, Y. Zhang, and J. Zhang, "Development of a potential penside colorimetric LAMP assay using neutral red for detection of African swine fever virus", *Front. Microbiol.*, 12, 609821, (2021)
- [129] H. Zhang, Y. Xu, Z. Fohlerrova, H. Chang, C. Iliescu, and P. Neuzil, "LAMP-on-a-chip Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification", *Trend Analyt. Chem.*, 113, 44-53, (2019)
- [130] K. Hsieh, A. S. Patterson, B. S. Ferguson, K. W. Plaxco, and H. T. Soh, "Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51(20), 4896-900, (2012)
- [131] X. Fang, Y. Liu, J. Kong, and X. Jiang, "Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens", *Anal. Chem.*, 82(7), 3002-06, (2010)
- [132] F. Schler, C. Siber, S. Hin, S. Wadle, N. Paust, R. Zengerle, and F. von Stetten, "Digital droplet LAMP as a microfluidic app on standard laboratory devices", *Anal. Methods*, 8, 2750, (2016)
- [133] X. Fang, H. Chen, L. Xu, X. Jiang, W. Wu, and J. Kong, "A portable and integrated nucleic acid amplification microfluidic chip for identifying bacteria", *Lab Chip*, 12(8), 1495, (2012)
- [134] A. Sayad, F. Ibrahim, S. M. Uddin, J. Cho, M. Madou, and K. L. Thong, "A microdevice for rapid, monoplex and colorimetric detection of foodborne pathogens using a centrifugal microfluidic platform", *Biosens. Bioelectron.*, 100, 96-104, (2018)
- [135] K. Kaarj, P. Akarapipad, and J. Y. Yoon, "Simpler, faster, and sensitive zika virus assay using smartphone detection of loop-mediated isothermal amplification on paper microfluidic chips" *Sci. Rep.*, 8, 12438, (2018)
- [136] X. Li, X. Zhao, W. Yang, F. Xu, B. Chen, J. Peng, J. Huang, and S. Mi, "Strech-driven microfluidic chip for nucleic acid detection", *Biotechnol. Bioeng.*, 118, 3559-3568, (2021)
- [137] S. G. Yedire, H. Khan. T. AbdelFatah, R. S. Moakhar, and S. Mahshid, "Microfluidic-based colorimetric nucleic acid detection of pathogens", *Sens. Diagn.*, advance article (2023)
- [138] G. Papadakis, A. K. Pantazis, N. Fikas, S. Chatziioannidou, V. Tsiakalou, K. Michaelidou, V. Pogka, M. Magariti, M. Vardaki, K. Giarentis, J. Heaney, E. Nastouli, T. Karamitros, A. Mentis, A. Zafiroopoulos, G. Sourvinos, S. Agelaki, and E. Gizeli, "Real-time colorimetric LAMP device

- for rapid quantitative detection of nucleic acids in crude samples”, *Sci. Rep.*, 12, 3775, (2022)
- [139] S. V. Kaymaz, A. F. Ergenç, A. O. Aytakin, S. J. Kucas, and M. Elitas “A low-cost, portable, and practical LAMP device for point-of -diagnosis in the field”, *Biotechnol., Bioeng.*, 119(3), 994-1003, (2022)
- [140] M. Dou, D. C. Dominguez, X. Li, J. Sanchez, and G. Scott, “Multiplexed instrument-free meningitis diagnosis on a polymer/paper hybrid microfluidic biochip”, *Biosens. Bioelectron.*, 87, 865-73, (2017)
- [141] W. Chen, H. Yu, F. San, A. Ornob, R. Brisbin, A. Ganguli, V. K. Vemuri, P. Strzebonski, G. Cui, K. J. Allen, S. A. Desai, W. Lin, D. M. Nash, D. Hirschberg, I. Brooks, R. Bashir, and B. T. Conningham, “Mobile platform for multiplexed detection and differentiation of disease-specific nucleic acid sequences, using microfluidic loop-mediated isothermal amplification and smartphone detection”, *Anal. Chem.*, 89(21), 11219-26, (2017)
- [142] Y. Yao, N. Zhao, W. Jing, Q. Liu, H. Lu, W. Zhao, W. Zhao, Z. Yuan, H. Xia, and G. Sui, “A self-powered rapid loading microfluidic chip for vector-borne viruses detection using RT-LAMP”, *Sens. Actuators B Chem.*, 333, 129521 (2021)
- [143] X. Fang, H. Chen, S. Yu, X. Jiang, and J. Kong, “Predicting viruses accurately by a multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification chip”, *Anal. Chem.*, 83(3), 690-5, (2011)
- [144] R. Mao, G. Ge, Z. Wang, R. Hao, G. Zhang, Z. Yang, B. Lin, Y. Ma, H. Liu, and Y. Du, “A multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification array for detection of malaria-related parasites and vectors”, *Acta Tropica*, 178, 86-92, (2018)
- [145] B. Xiao, R. Zhao, N. Wang, J. Zhang, X. Sun, F. Huang, and A. Chen, “Integrating microneedle DNA extraction to hand-held microfluidic colorimetric LAMP chip system for meat adulteration detection”, *Food Chem.*, 441, 135508, (2023)
- [146] K. Yin, X. Ding, Z. Xu, Z. Li, X. Wang, H. Zhao, C. Otis, B. Li, and C. Liu, “Multiplexed colorimetric detection of SARS-CoV-2 and other pathogens in wastewater on a 3D printed integrated microfluidic chip”, *Sens. Actuators B Chem.*, 344, 130242, (2021)
- [147] X. Han, Y. Liu, J. Yin, M. Yue, and Y. Mu, “Microfluidic devices for multiplexed detection of foodborne pathogens”, *Food Res. Int.*, 143, 110246, (2021)
- [148] O. Mayboroda, I. Katakis, and C. K. O’Sullivan, “Multiplexed isothermal nucleic acid amplification”, *Anal. Bioche.*, 545, 20-30, (2018)
- [149] I. H. K. Basha, E. T. W. Ho, C. M. Yousuff, and N. H. B. Hamid, “Towards multiplex molecular diagnosis—A review of microfluidic genomics technologies”, *Micromachines*, 8(9), 266, (2017)

第2章 マルチプレックス遺伝子診断デバイスの基本原理の提案

2.1 緒言

本章では、本研究で開発するマルチプレックス遺伝子診断デバイスの基本原理である自律的な混合、分注および、遺伝子診断手法を提案する。

遺伝子診断のためのデバイスは、検査毎に使い捨てされることが想定される。そのため、大量生産を想定した安価に作製可能なデバイスが求められる¹⁾。これまで、短時間(～15 min)で簡易に検出できる手法としてイムノクロマト法²⁾などが提案されているが、感度が低いことから、ウイルス量の少ない発症直後では偽陰性を示すことが課題であった。一方で、検査の標準手法となっている PCR 法は、検出感度は高いものの、2～4 時間程度の長時間を要するといった課題がある。

PCR 法に代わる手法として提案されている LAMP 法では、比較的、短時間 (30～60 min) で極微量なウイルスでも検出できることから、検査手法の課題を解決するブレイクスルーになり得ると考えられている³⁾。さらに、LAMP 法とマイクロ流体チップテクノロジーを組み合わせることで、簡便かつ迅速に、高感度で検査可能なデバイスの開発が進められている⁴⁾。しかし、デバイス上での溶液操作には、可動部を実装することで行うものが多く提案されており⁵⁾、可動部を実装するとデバイスのコストがかかり、感染症診断などでの使い捨てデバイスには向いていない。

そこで、本研究では、流路デザインのみで高精度な流体制御を行うことができる可動部を要さないデバイスの開発を目標に実施した。サンプル/遺伝子増幅試薬を複数の反応容器へ分注するために、各反応容器に 3 個 1 組の異なる角度を設けた横型相ガイドを実装し、自律的な分注が可能であることを示した。前段のサンプル/遺伝子増幅試薬の混合操作には流路内に段差構造を設けた横型ミキサを実装することで、短い流路長で高効率な混合を達成した。さらに、デバイス上での遺伝子診断性能評価として、蛍光 LAMP 法を用いた農作物に感染する病害ウイルスの遺伝子増幅実験を実施した。トマトに感染するウイルス(トマト黄化えそウイルス (TYLCV)) のプラスミド DNA 1 種類と、ウリ類に感染するウイルスであるメロン黄化えそウイルス (MYSV)、ウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV)、キュウリ緑斑モザイクウイルス (KGMMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV) の 4 つのウイルス RNA の同時診断を実証した⁶⁾。

2.2 デバイスの概要

本研究で開発したシリコーン樹脂 (ポリジメチルシロキサン, PDMS) 製のポンプ送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの外観写真の一例を図 2.1 に示す。遺伝子増幅反応を行うための反応容器 (各 3 μ L) を 5 個一列に配置し、マイクロ流路 (幅 200 μ m, 高さ 68

μm) によって接続している。本デバイスは、大きく分けて①混合部と②分注部で構成されている。導入口より遺伝子サンプルと遺伝子増幅試薬 (LAMP 試薬) を導入し、混合部を通過させることで高効率に攪拌する。その後、混合液を分注部にて各反応容器へ分注を行う。最後に各反応容器 (検出項目数に相当) にて遺伝子増幅反応 (LAMP 反応) を実施する。各反応容器 (Ch1~Ch5) には、標的遺伝子を増幅させるための起点となるプライマー (短鎖 DNA) を予め固定化しており、導入したサンプル中に含まれる遺伝子に特異的に結合することで、遺伝子増幅が行われる。このように、サンプルと試薬の混合液を導入する 1 回の作業工程のみで一度導入する工程のみで、多項目同時診断 (マルチプレックス診断) が可能となる。

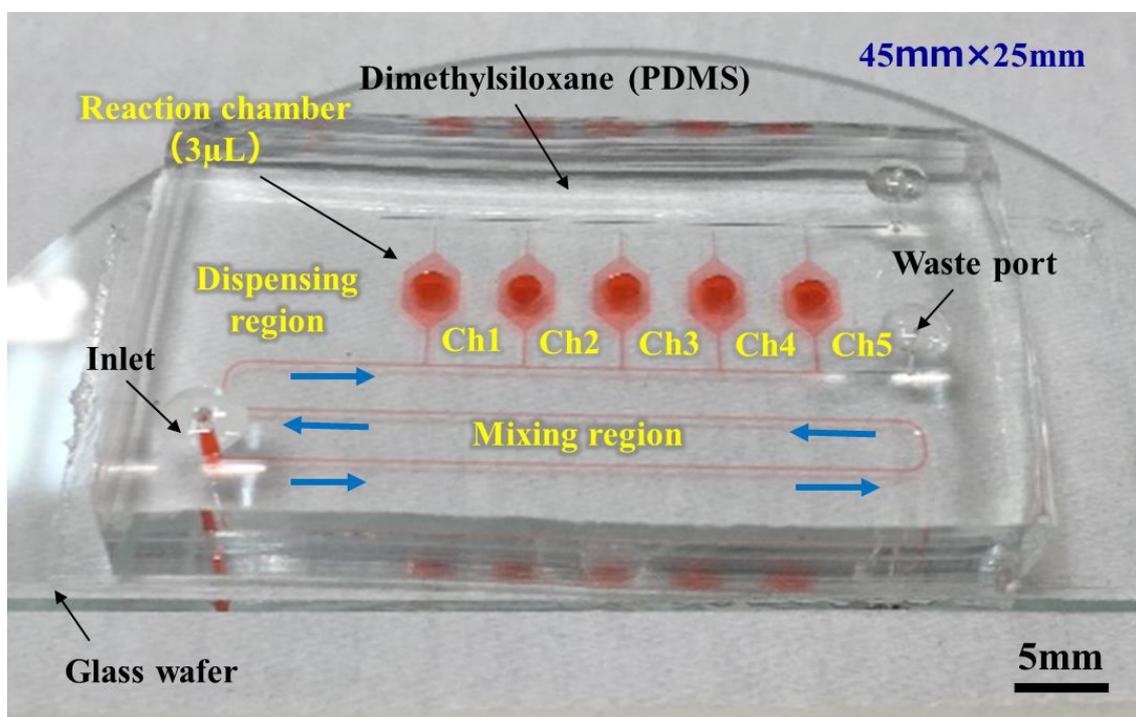


図 2.1 ポンプ送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの外観写真

2.3 デバイスの作製方法

デバイスの作製方法には、反応容器を局部的に深くするために、半球ビーズ援用ソフトリソグラフィ法を用いた。作製方法を以下に示す。また、フォトリソグラフィによる流路モールドの作製条件の詳細を表 2.1 に示す。半球ビーズ援用ソフトリソグラフィ法によるデバイスの作製プロセスの概略図を図 2.2 に示す。

- (1) 単結晶シリコンウエハ (イープライズ, n 型<100>, 直径 4 inch, 厚さ 525 μm ; 以

下, Si 基板) の表面をアセトン (関東化学, 純度 99.5%), イソプロピルアルコール (関東化学, 純度 99.7%; 以下, IPA) の順で洗浄 (かけ流し) し, N₂ ブローを行い乾燥させる.

- (2) 低温灰化装置 (ジェイ・サイエンス・ラボ JPA300) を用いて Si 基板表面に空気プラズマ処理を行う (150 W, 3 min).
- (3) スピンコータ (ミカサ MS-A100) を用いて, ネガ型厚膜フォトレジスト SU-8 3050 (MicroChem 社, 動粘度 12000 cSt) を Si 基板表面にスピンコートする.
- (4) ホットプレート (アズワン EC-1200N) を用いて SU-8 を塗布した Si 基板のプリベークを行う.
- (5) 両面マスクアライナ (ユニオン光学 PEM-800) で露光を行い, マスクパターンを Si 基板上のフォトレジストに転写する. なお, 実験前に, ウエハ上の 5 点の光強度を紫外線照度計 (ウシオ電機, 本体 UIT-101, i 線用センサ UVD-365PD) によって測定し, その平均値 (約 5 mW/cm²) から所望の露光時間を決定した.
- (6) ホットプレートを用いて流路形状を転写したフォトレジストのポストベークを行う.
- (7) 現像液 (酢酸 2-メトキシ-1-メチルエチル; 富士フィルム和光純薬, 純度 97.0%) にポストベーク後のフォトレジストを 10 min 浸漬させ, 現像を行う.
- (8) 現像した Si 基板をアセトンおよび IPA で洗浄し, N₂ ブローで Si 基板表面の水滴を除去する. (図 2.2 (a))
- (9) 直径 2 mm の半球樹脂ビーズ (紗や工房) をエポキシ系接着剤 (ハンツマン・ジャパン Araldite RT30) で SU-8 流路パターンの反応容器箇所に接着し, 24 h 硬化させた. これをマスターモールドとした. (図 2.2 (b))
- (10) 真空チャンバ (サンプラテック PC-250KG) にビーズ接着を行ったマスターモールドを入れ, トリクロロシラン (トリクロロ(1H,1H,2H,2H-パーフルオロオクチル)シラン; Sigma-Aldrich 社, 純度 97%) を 10 μL 滴下する.
- (11) 0.07 MPa まで減圧し, 減圧状態を 60 min 維持し, マスターモールド表面にシラン化処理を行う.
- (12) シリコーン樹脂 (東レ・ダウコーニング SILPOT 184; 以下, PDMS) の主剤および硬化剤を 10:1 の割合で 60 g 混合し, 真空攪拌脱泡ミキサー (EME 社 V-min 300) を用いて 3 min 攪拌する.
- (13) 攪拌後, マスターモールドへ流し込み, ホットプレートを用いて 85°C で 40 min 加熱し, 硬化させる.
- (14) 硬化後, 医療用ディスポメス (貝印 511-A) を用いて PDMS を切り出し, 離型する. (図 2.2 (c))
- (15) 切り出した PDMS の流入口および, 流出口をパンチ (貝印 BPP-10F) を用いて, 直径 1mm の穴をあけ, シリコーン系両面テープ (3M 社 91022) を用いてガラス

ウエハ（東新理興，AS-3，厚さ 1.1 mm）と接着させる。（図 2.2（d））

表 2.1 フォトリソグラフィ条件

SU-8 spin-coating	1st layer: slope(5s)→500rpm(10s)→slope(10s)→3000rpm(60s)→slope(10s) 2nd layer: slope(5s)→500rpm(10s)→slope(10s)→4000rpm(60s)→slope(10s)
Pre-bake	65°C(2min)→95°C(15min)→65°C(2min)→室温(5min)
Exposure	250mJ/cm ²
Hard-bake	65°C(2min)→95°C(5min)→65°C(2min)→Room temperature(5min)

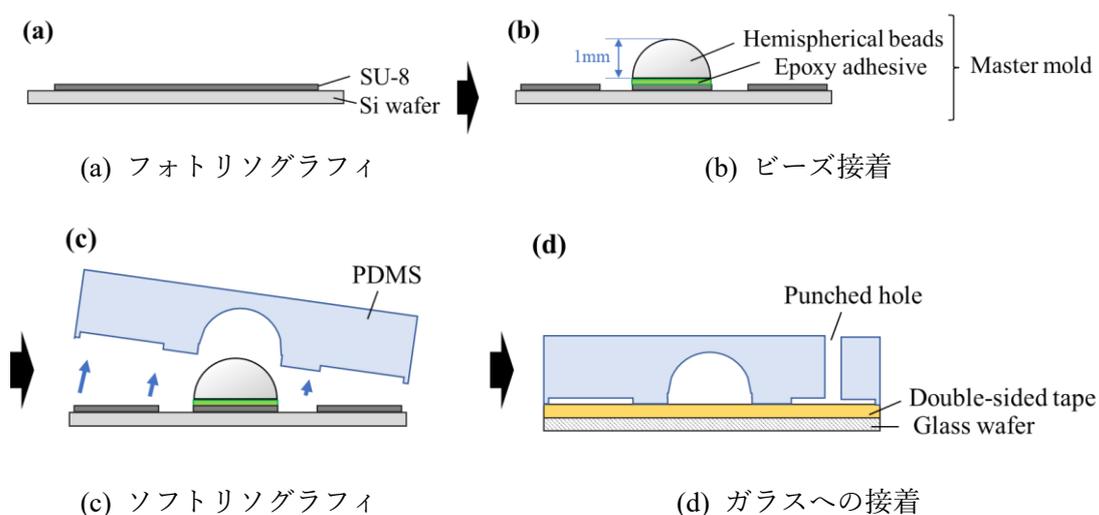


図 2.2 半球ビーズ援用ソフトリソグラフィ法によるデバイスの作製プロセス

図 2.3 に半球ビーズ援用ソフトリソグラフィ法を用いて作製した Si ウエハ上の SU-8 流路モールドと半球ビーズを接着した反応容器の写真を示す。

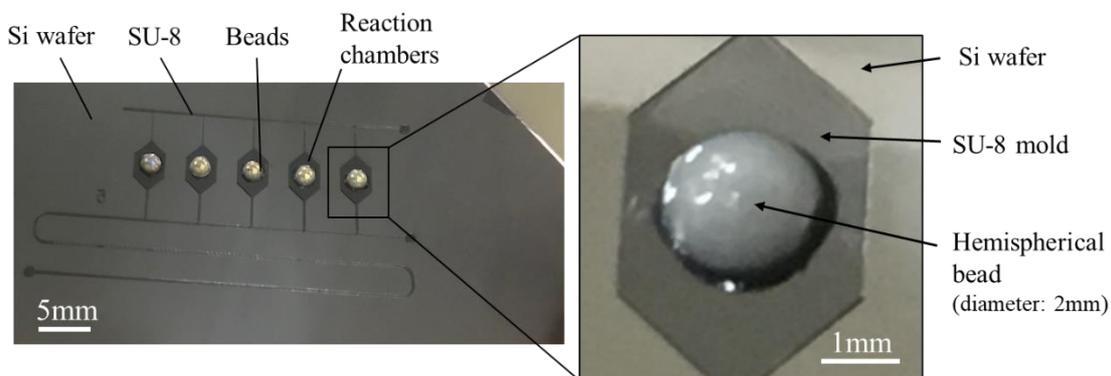


図 2.3 半球ビーズを接着した Si 基板上的 SU-8 流路モールド

2.4 横型相ガイドによる分注技術の検討

2.4.1 分注理論の提案

複数項目の診断には検体サンプルと LAMP 試薬を複数個の反応容器に分注することが必要である。そこで、図 2.4 に示すような反応容器に 3 個 1 組の受動バルブ（横型相ガイド）と呼ばれる凸構造を設けることで可能にする方法を提案した。この横型相ガイドは気液界面に生じる表面張力を利用した受動バルブで⁸⁻¹²⁾、凸構造の端部で液体がピン止めされているときに最も決壊圧力（流体が乗り越えるために必要な圧力）が高くなる。このとき、流路幅方向に対して角度を付けることで決壊圧力を制御することができ、流路幅方向に対して平行なとき ($\alpha=0^\circ$) が最も決壊圧力が大きくなる。流入口から流入してきた液体は、まずバルブ S_1 ($\alpha=15^\circ$) によって一旦停止する。行き場を失った流体は流れの方向を変えて、反応容器方向へと流入するが、再度バルブ S_2 ($\alpha=30^\circ$) によって停止する。しかし、この時、バルブ S_2 の決壊圧力 P_2 (2.11 kPa) は、バルブ S_1 の決壊圧力 P_1 (2.14 kPa) よりも小さいため、流体はバルブ S_2 を乗り越えて反応容器内へと流入される ($P_1 > P_2$)。液体が反応容器を満たすと、再び、バルブ S_3 (決壊圧力 P_3) へ到達し、再び停止する。バルブ S_1 の決壊圧力 P_1 (2.14 kPa) は、バルブ S_3 ($\alpha=0^\circ$) の決壊圧力 P_3 (2.37 kPa) よりも小さく設計されているため、流体はバルブ S_1 を乗り越えて次の反応容器へと向かう ($P_3 > P_2$)。この動作を繰り返すことで、複数個の反応容器へ自律的に分注させることが可能になっている。なお、反応容器への分注挙動には、バルブ S_1 とバルブ S_3 の 2 個 1 組のみで実現できるが、本デバイスでは、バルブ S_2 は逆流防止を目的として設計した。

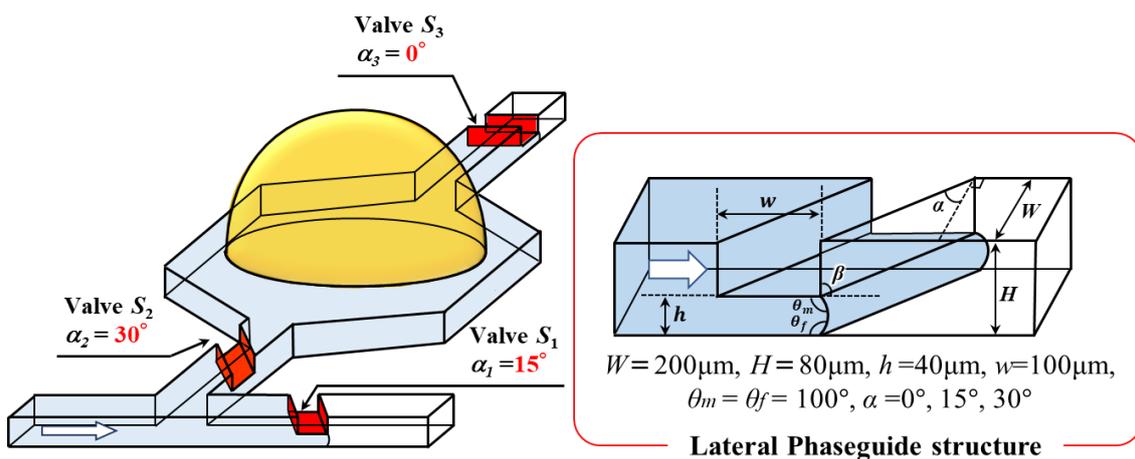


図 2.4 3 種類の角度 ($\alpha=0^\circ$, 15° , 30°) を設けた横型相ガイドと相ガイドの概要

この横型相ガイドの決壊圧力はヤング・ラプラスの式 (2.4) を変形させることで次式 (2.5) を用いて求めることができる。

$$\Delta P = -\gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (2.4)$$

$$P(\alpha) = -\gamma \left(\frac{2\cos\theta_m \cos\alpha}{W} + \frac{\cos\theta_f + \cos(\min(\theta_m + \beta, 180^\circ))}{H - h} \right), \alpha \neq 90^\circ \quad (2.5)$$

このとき、 γ は表面張力 ($\gamma = 0.73 \text{ mN}$)、 W はピン止めされている点での流路幅 (バルブ S_1 および $S_2: 200 \mu\text{m}$, $S_3: 100 \mu\text{m}$)、 H は流路高さ全体 ($= 67 \mu\text{m}$)、 h は凸構造の高さ ($= 26 \mu\text{m}$)、 θ_m は流路壁面の接触角 (PDMS/水: 108°)、 θ_f は流路底面の接触角 (3M社 両面テープ 91022 シリコン接着面/水: 97°)、角度 α は流路に対しての角度、 β は凸構造の立ち上がりの角度 ($= 90^\circ$) である。

そのため、本提案の横型相ガイド P_1 , P_2 , P_3 ($\alpha = 0^\circ, 30^\circ, 15^\circ$) の決壊圧力の理論値は、 $P_{L1} = 2.14 \text{ kPa}$, $P_{L2} = 2.11 \text{ kPa}$, $P_{L3} = 2.37 \text{ kPa}$ と算出できる。

2.4.2 分注実験方法

分注実験方法の模式図を図 2.5 に示す。シリンジポンプ (New Era 社 NE-1000X) を用いて、1 mL シリンジ (MonotaRO MDS-1mL, PP 製) に 22G ノンベベル針 (テルモ NN-2238N) を取り付け、ビニルチューブ (イワセ EXLON-PVC, 内径 0.55 mm, 標準肉厚 0.40 mm) を先端に接続し、赤色着色液 (赤色 3 号, 0.1% w/v) を各流入口より導入流量 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 1.2$) で導入した。観察にはスマートフォンを用いて実験の様子を撮影した。

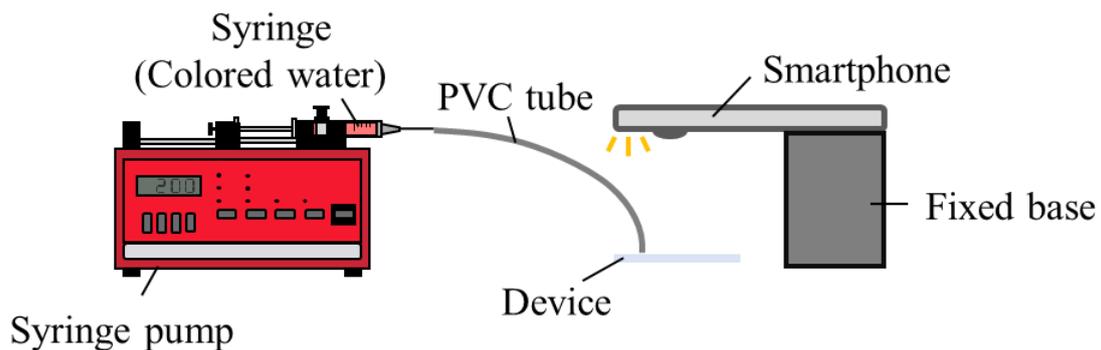


図 2.5 分注実験セットアップ

2.4.3 分注実験結果

作製した横型デバイスに着色液を導入し、反応容器への分注実験を行った。使用したデバ

イスは、図 2.1 で示したデバイスを用いた。図 2.6 にシリンジポンプを用いて流量 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ で赤色着色液を導入した結果を示す。図 2.6 から、着色液はバルブ S_1 と S_2 で一旦停止し、 S_2 を乗り越えて反応容器を満たした後、バルブ S_3 に達すると、バルブ S_1 を乗り越えて次の反応容器へと逐次的に導入されている様子が分かる。さらに、導入後の反応容器からの漏れは確認されず、期待通り複数の反応容器に分注できることを示した。なお、図 2.6 中に示すように、本実験で使用したデバイスの寸法設計値は、反応容器間の長さ $L_1 = 5 \text{ mm}$ 、メイン流路から反応容器までの分岐流路の長さ $L_2 = 2.25 \text{ mm}$ 、反応容器からバルブ S_3 までの長さ $L_3 = 1.25 \text{ mm}$ 、反応容器の幅 $C_w = 3.0 \text{ mm}$ 、反応容器の長さ $C_l = 5.35 \text{ mm}$ であった。

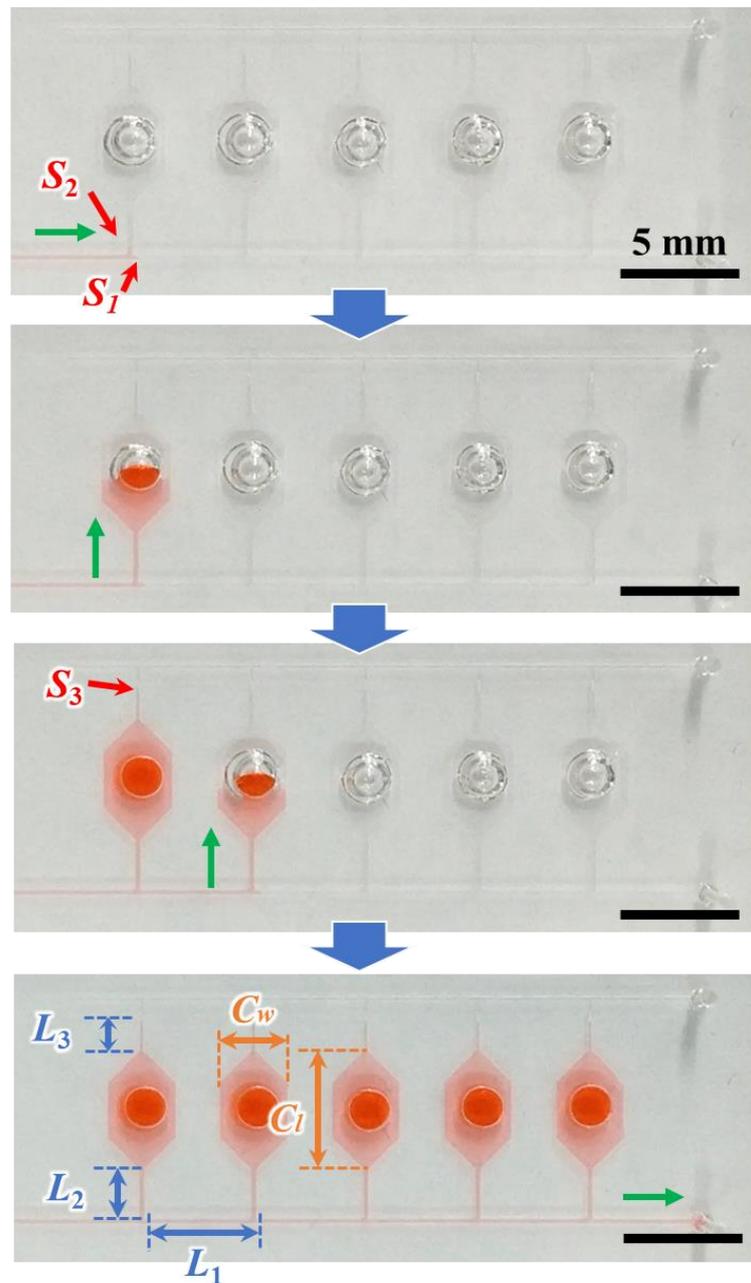


図 2.6 横型相ガイドを組み込んだデバイスへ赤色着色液を導入流量 $5\mu\text{L}/\text{min}$ で導入したときの実験結果

2.5 横型ミキサの最適形状の検討

2.5.1 数値流体解析による混合効率の評価

標的遺伝子サンプルと LAMP 試薬の混合は、遺伝子診断性能を左右する重要な工程である。そこで、本デバイスの混合部には、流路中を溶液が流れるだけで混合される受動ミキサを実装した。受動ミキサは、可動部や回路素子を実装するアクティブミキサとは異なり、流路中の障害物や流路形状によって自律的に混合される。本デバイスでは、受動ミキサとして代表的なカオティックミキサ（横型ミキサ）を実装した^{13,14}。横型ミキサは、流路中に周期的に凸構造を設けることで、流路断面幅方向の流れを発生させることで高い混合性能を示すことができる。本実験では、横型ミキサの最適形状を数値流体解析ソフト（COMSOL Multiphysics version 5.4）を用いて解析することにより検討した。図 2.7 および図 2.8 に示すように、流路幅 200 μm 、流路高さ 67 μm 、凸構造の高さ 26 μm 、幅 100 μm 、ピッチ 200 μm 、10 個 1 組を 2 セット組み込んだ長さ 5 mm の 3D 流路モデルを作成し、斜め形状、対称 V 字形状、非対称 V 字形状の 3 種類の凸形状の混合効率を比較した。凸構造は流路幅方向に対し 135° の角度を有しており、非対称 V 字形状は流路幅方向 1/3 の箇所でも V 字になるように設計した。なお、斜め形状と非対称 V 字形状の凸構造は 1 組毎に流路幅方向に対し上下を反転させて設計した。また、基準となる結果を得るために、凸構造を設けていない矩形流路を解析に用いた。計算資源と計算時間を削減するため、メッシュ要素数（解析時間に影響）は 80,000 程度とした。解析条件としては、単相流モジュールと希釈種輸送モジュールを連成させて定常条件下で解析した。流体は非圧縮性と仮定し、流路壁面はすべりなしとした。また、流体は水と仮定し、密度と動粘度をそれぞれ $1.0 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ kg/m} \cdot \text{s}$ とした。2 液の混合状態を解析するため、2 液の濃度を 0 mol/m^3 （青色）、および 1 mol/m^3 （赤色）とし、同一の 0.0128 m/s の流速でマイクロ流路内に導入し、流出側の圧力は大気圧と設定した。なお、溶液の拡散係数はフルオレセインの $4.25 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (25°C) を使用した¹⁵。図 2.9 に数値流体解析結果を示す。図 2.9 (a) より、凸構造のない単純矩形流路では、2 液は層流を描いており、混合していないことがわかる。また、対称 V 字形状ミキサ（図 2.9 (c)）でも、図 2.9 (a) の結果と比較すると混合されているが、2 液は層流を描いていることがわかる。一方、斜め形状ミキサ（図 2.9 (b)）および、非対称 V 字形状ミキサ（図 2.9 (d)）では、2 液はらせん状の流れを示していることがわかる。

図 2.10 には、各ミキサの $y=0.45 \text{ mm}$ の箇所における流路横断面 (xz 平面) とその流線を示す。斜め形状ミキサは流路幅方向全域にわたって大きく横断しているのに対し、対称 V 字ならびに非対称 V 字ミキサは V 字凸形状の頂点を境に二液が小さく逆向きに横断していることがわかる。図 2.11 には、数値流体解析によって得られた結果から算出した各ミキサの流路長に対する混合効率を示す。図 2.11 より、流路断面幅方向に大きく横断する斜め形状ミキサが最も混合効率が高いことが分かった。

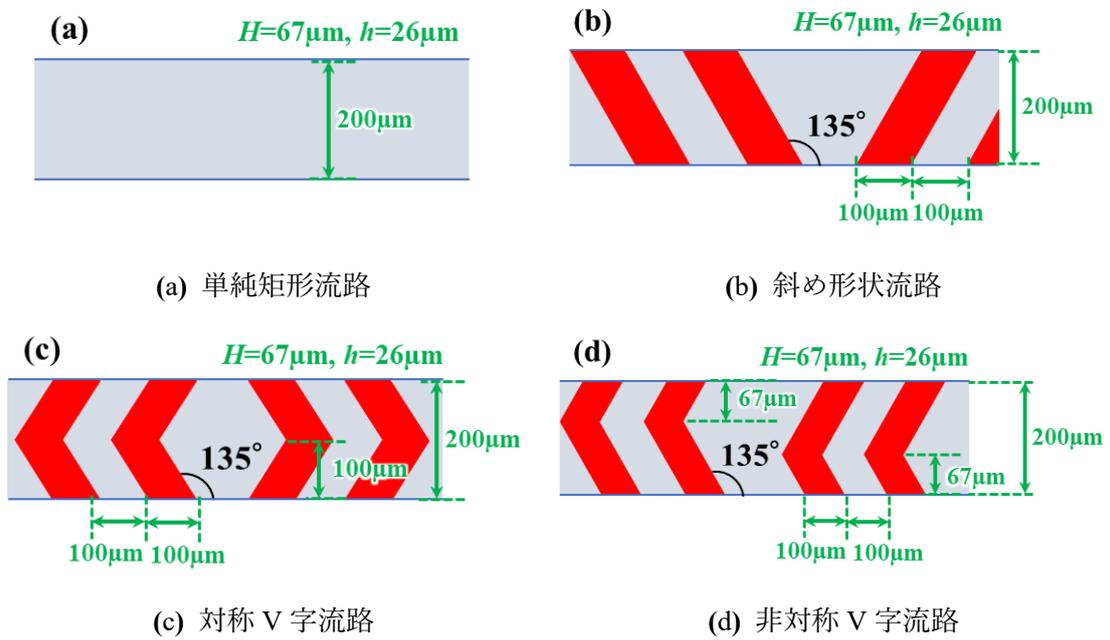


図 2.7 流路デザイン

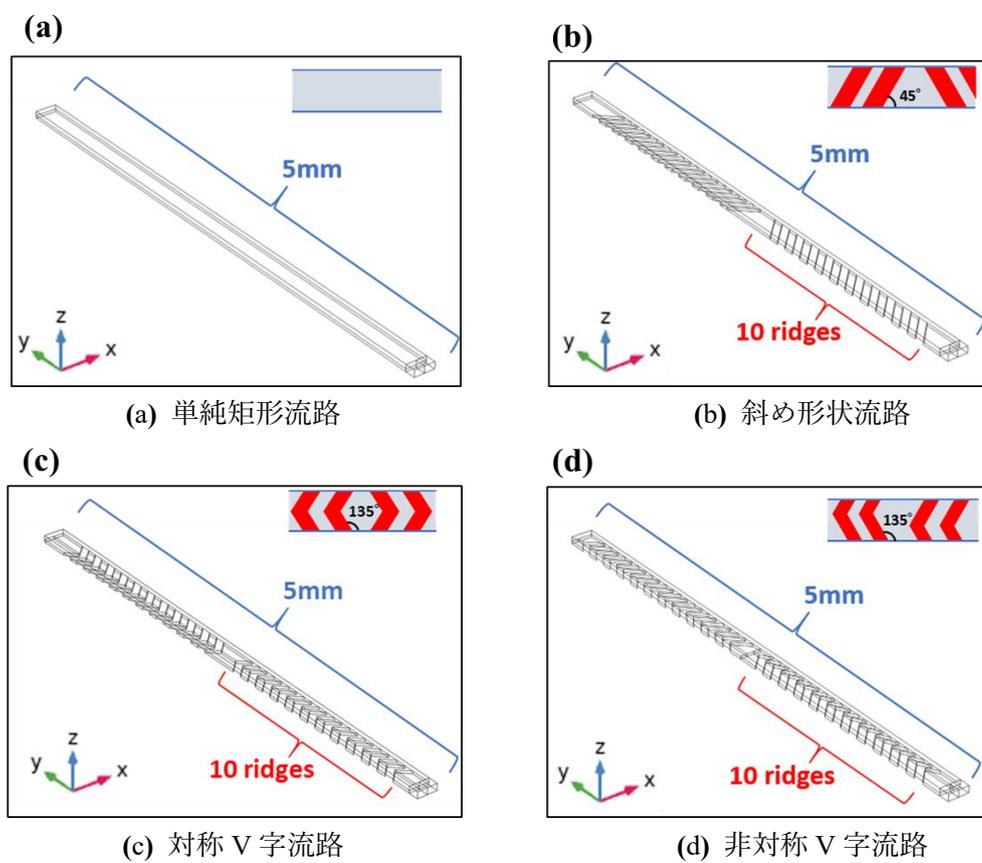


図 2.8 横型ミキサの数値流体解析モデル

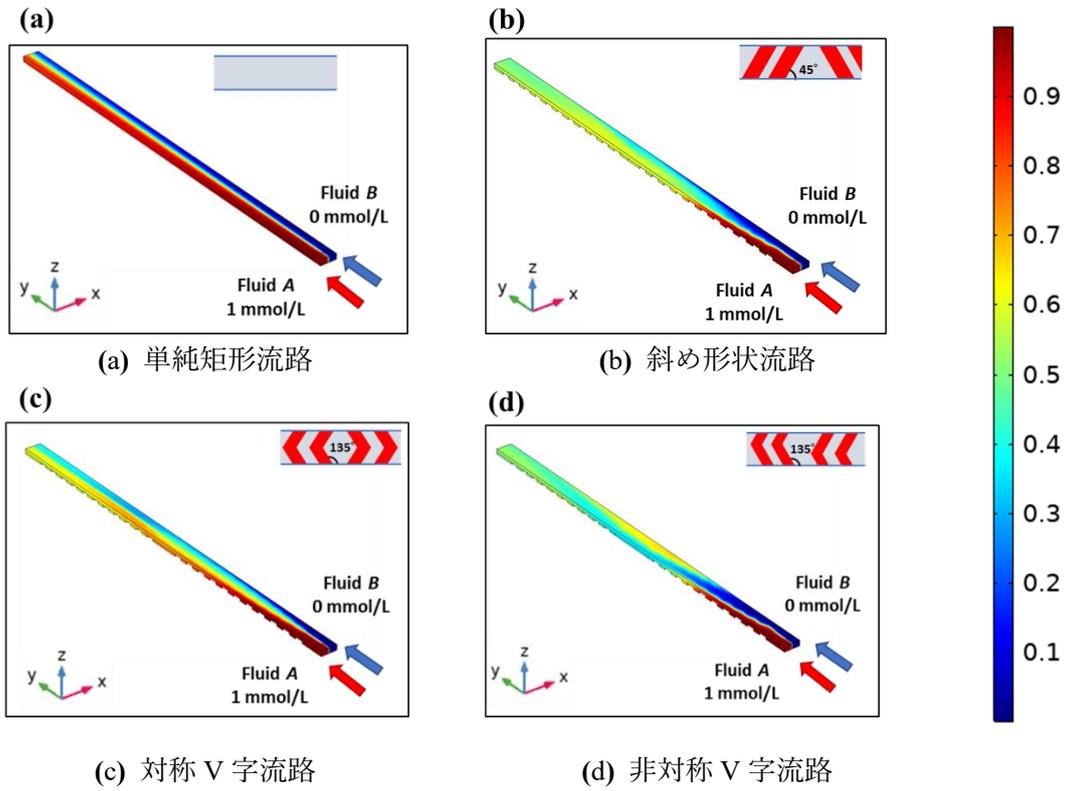


図 2.9 横型ミキサの数値流体解析結果

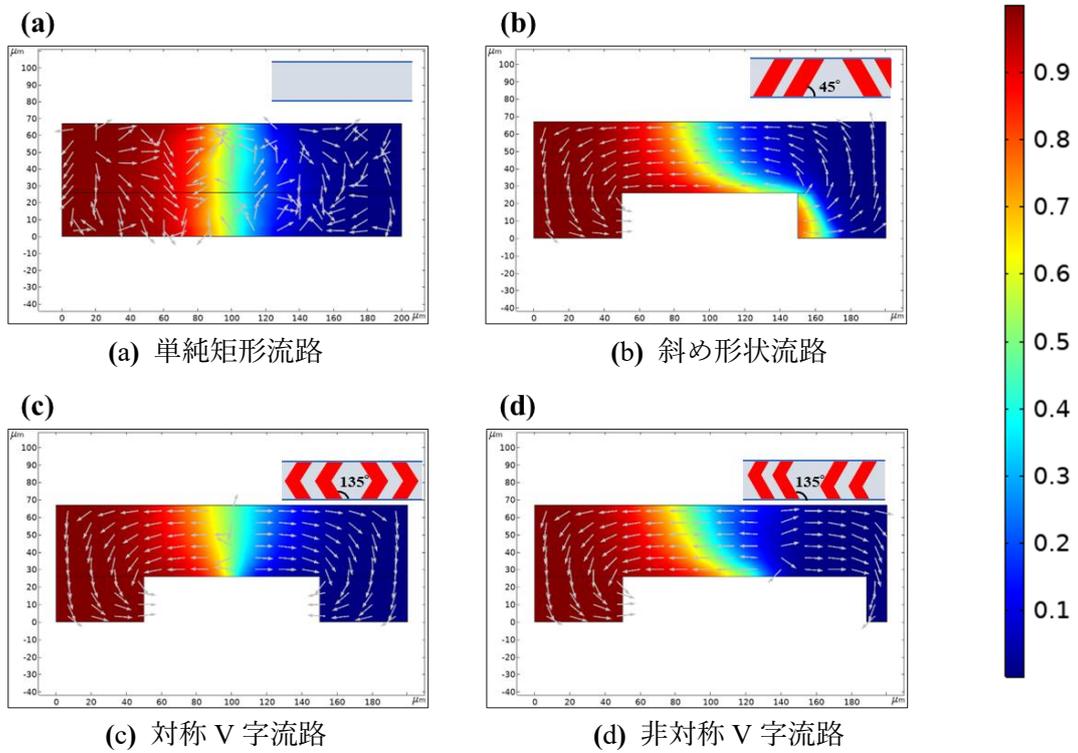


図 2.10 各ミキサの xz 断面図 ($y = 0.45 \text{ mm}$) および流線

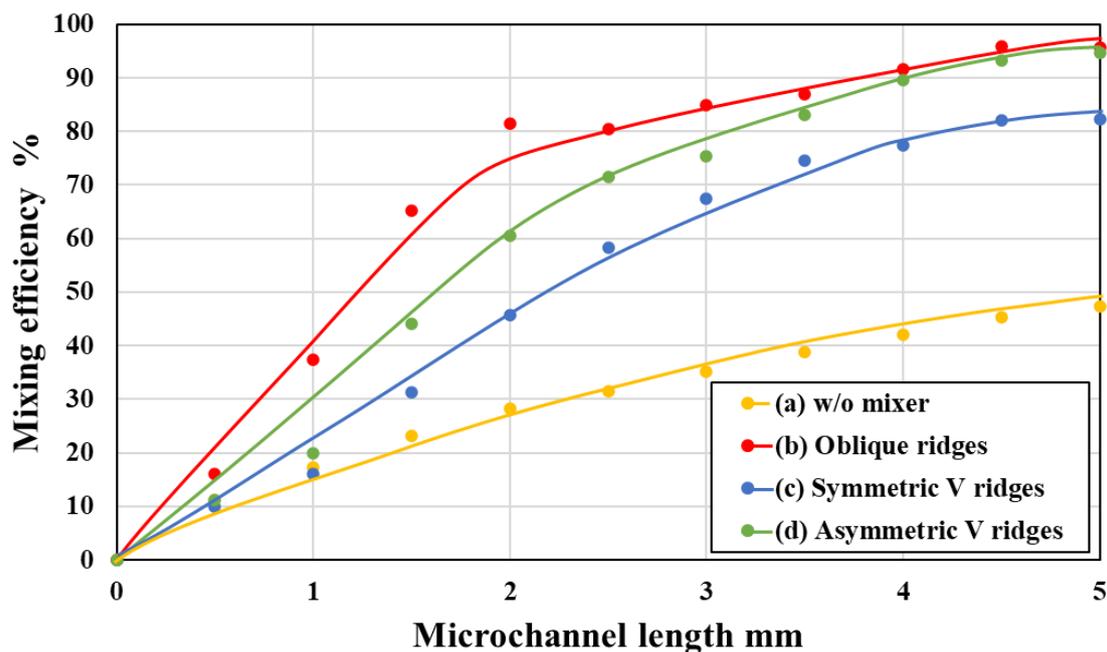


図 2.11 横型ミキサの数値流体解析による混合効率解析結果

2.5.2 横型ミキサの混合効率の評価方法

マイクロミキサの混合効率の評価実験には、図 2.12 に示すように、2 台のシリンジポンプ（ワイエムシイ, YSP-201）を用いて、1 mL シリンジ（MonotaRO MDS-1mL, PP 製）に 22G ノンベベル針（テルモ NN-2238N）を取り付け、ビニルチューブ（イワセ EXLON-PVC, 内径 0.55 mm, 標準肉厚 0.40 mm）を先端に接続し、純水ならびにフルオレセイン（東京化成工業 Acid Yellow 73） 0.1 mol/m^3 (0.1 mM) を各流入口より導入流量 $5 \mu\text{L/min}$ ($Re = 1.2$) で導入した。蛍光観察には、倒立蛍光顕微鏡（ニコン TE2000-U）を使用し、水銀ランプ（ニコン C-SHG-1）およびロングパス蛍光フィルター（ニコン B-2A, EX: 470/40 nm, DM: 455 nm, BA: 460 nm）、CCD カメラ（ニコン Digital Sight DS-Fi2）を用いて観察した。得られた画像は、画像解析ソフト ImageJ（National Institutes of Health 社 バージョン 1.53e）を用いて、マイクロ流路上面（流路幅方向 $200 \mu\text{m}$ × 流路長手方向 $100 \mu\text{m}$ ）の蛍光強度の標準偏差を解析した。

各計測点における標準偏差から式(2.1)を用いて混合効率を算出した。

$$ME [\%] = \left(1 - \frac{SD_x}{SD_0}\right) \times 100 \quad (2.1)$$

ここで、 SD_0 と SD_x はそれぞれ、ミキサ構造の直前 ($x = 0 \text{ mm}$) および出口（流路長手方向の任意の位置）における流路断面全体の濃度の標準偏差を示す。

なお、矩形流路内のレイノルズ Re 数を算出するにあたって、水力直径（等価直径） D_H は次式（2.2）を用いて算出した。

$$D_H = \frac{4A}{P} \quad (2.2)$$

ここで、 A は流路の断面積、 P は潤辺（周長）である。得られた等価直径を用いて、次式（2.3）から、 Re 数を算出した。

$$Re = \frac{QD_H}{\nu A} = \frac{4Q}{\nu P} \quad (2.3)$$

ここで、 Q は体積流量、 ν は動粘性係数（水： $1 \times 10^{-6} \text{m}^2/\text{s}$ ）である。例えば、導入流量 $Q = 10 \mu\text{L}/\text{min}$ における Re 数は $Re = 1.2$ と算出される。

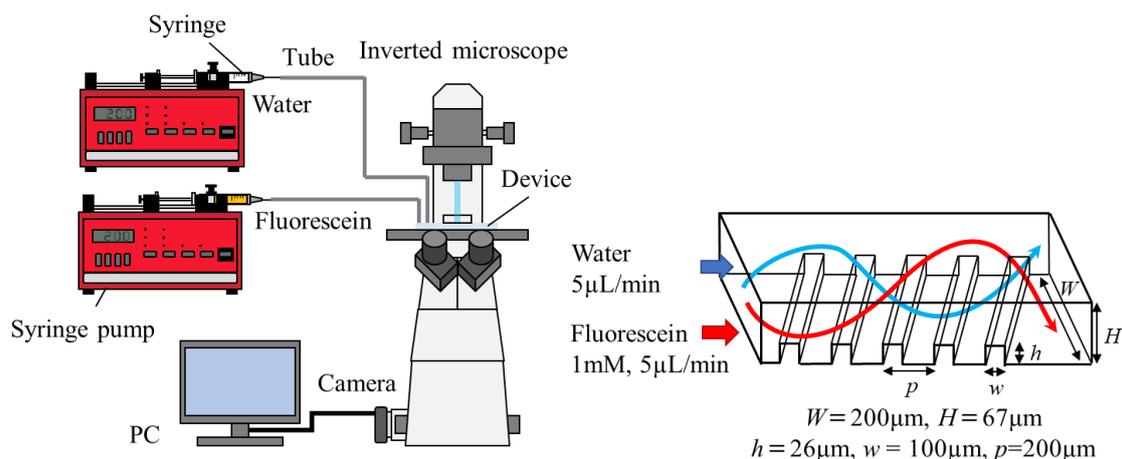


図 2.12 実験セットアップ

2.5.3 蛍光観察による混合効率の評価

続いて、横型ミキサを組み込んだマイクロ流路を作製し、混合効率を実験的に評価した。実験には、流路幅 $200 \mu\text{m}$ 、流路高さ $67 \mu\text{m}$ 、凸構造の高さ $26 \mu\text{m}$ 、幅 $100 \mu\text{m}$ 、ピッチ $200 \mu\text{m}$ 、流路幅方向に対して 135° の角度を有する斜め形状、対称 V 字形状、非対称 V 字形状の 3 種類の凸形状を 25 個 1 組、計 4 セット組み込んだデバイスを使用した。なお、数値流体解析で使用したミキサ形状（図 2.8 参照）と同様に、斜め形状と非対称 V 字形状の凸構造は 1 組毎に流路幅方向に対し上下を反転させている。シリンジポンプを用いて、各流入口から 1mM のフルオレセイン溶液と純水を各 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 1.2$) で導入し、倒立顕微鏡を用

いて、蛍光観察を行った（ゲイン 1 倍，露光時間 2s，B-2A 蛍光フィルター）．図 2.13 に横型ミキサの混合実験結果を示す．

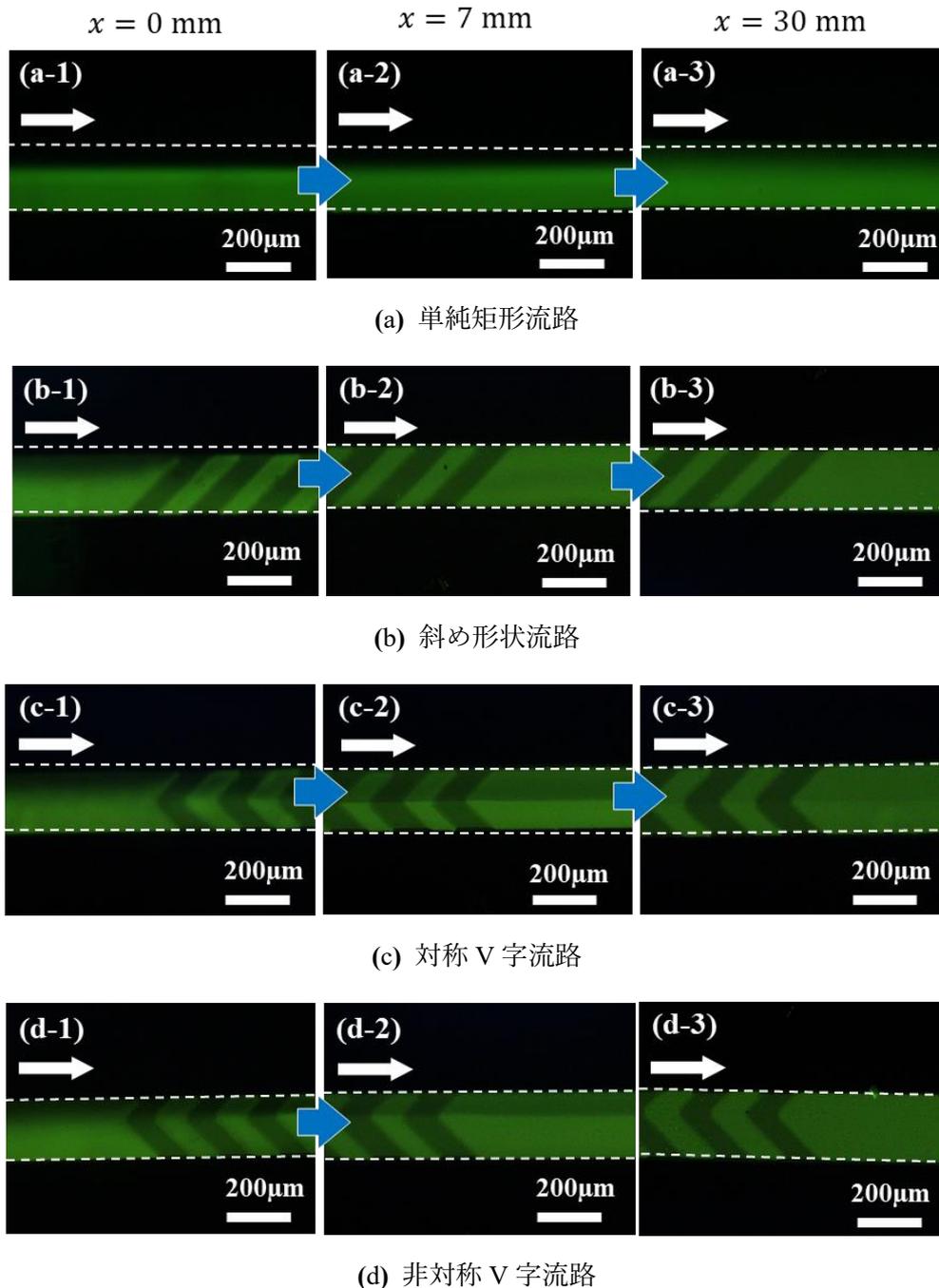


図 2.13 横型ミキサの混合効率解析実験結果（導入流量： $10\mu\text{L}/\text{min}$ ）

蛍光画像から，ミキサのない単純矩形流路（図 2.13 (a)）では送液距離 30 mm を通過した時点でも 2 液の界面が確認でき，混合していないことがわかる．一方で，凸構造を設けた

3種類のみキサは、送液距離 30 mm 時点では、画像内が均一な明るさを示していることから、十分に混合されていることがわかる。取得した画像より、画像解析ソフト ImageJ を用いて流路幅方向の輝度値の標準偏差を算出した。混合効率の計算には、式(2.1)を使用した。流路長手方向の長さに対する混合効率を図 2.14 に示す。なお、実験は3回繰り返して行い、グラフ中の各点は平均値と標準偏差を表している。実験結果から、斜め形状の横型みキサが送液距離 10 mm で 85%以上の混合を示し、最も高い混合効率を有することがわかった。一方で、みキサのない矩形流路では、送液距離 30 mm でも混合効率が最大でも約 40%であり、凸構造がないと十分に混合されていないことがわかる。

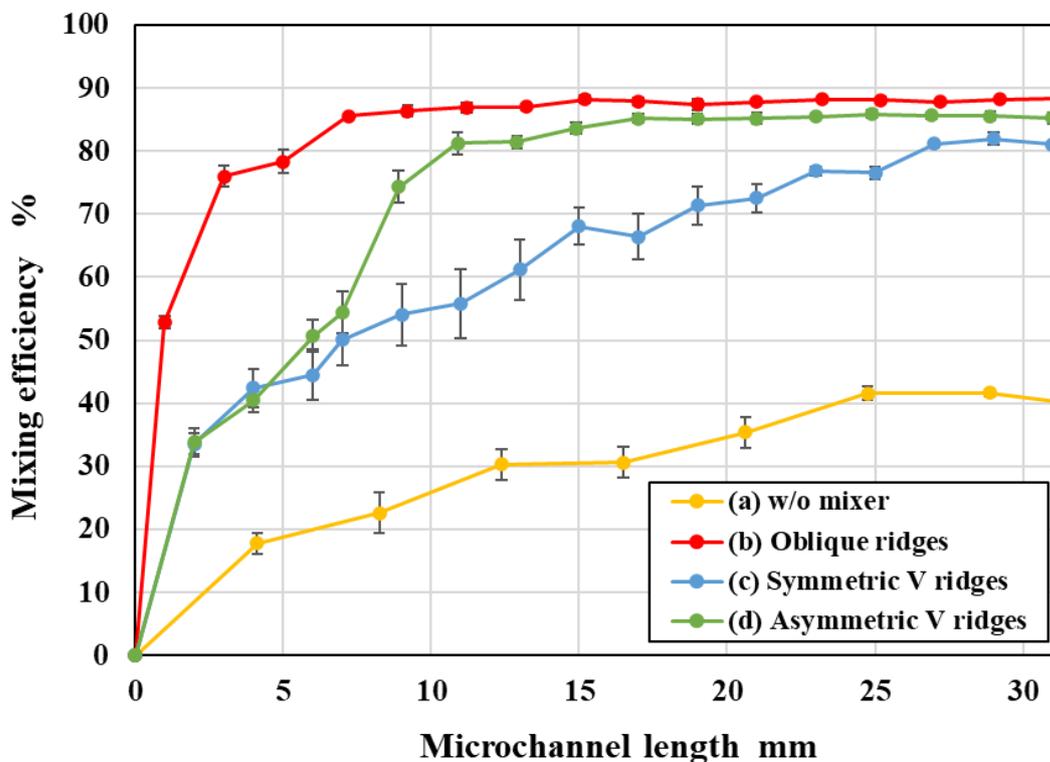


図 2.14 横型みキサの実験による混合効率解析結果

2.6 蛍光 LAMP 法による農作物病害の遺伝子増幅実験

2.6.1 蛍光 LAMP 法による遺伝子増幅実験方法

本診断デバイスを用いた蛍光 LAMP 法による遺伝子増幅実験の手順を以下に示す。また、実験手順の模式図を図 2.15 に示す。

- (1) PDMS デバイスのそれぞれの反応容器内 (3 μ L) に各標的遺伝子に対応したプライ

マーをマイクロピペットで 0.5 μL 滴下する。

- (2) ホットプレート上で 80°C, 5 min 加熱し, 乾燥・固定化させる。(図 2.15 (a))
- (3) PDMS デバイス (流路面) を両面テープ (3 M 社 91022) でガラスウエハ (東新理興, AS-3, 厚さ 1.1 mm) に接着させ, マイクロ流路を封止する。(図 2.15 (b))
- (4) シリンジポンプを用いて, ビニルチューブ内に検体サンプルと試薬の混合液を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で吸引したのち, チューブ先端を PDMS デバイスの導入口に接続し, 導入流量 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ でデバイス内に導入する。(図 2.15 (c))
- (5) 混合液の導入後, 両面テープ (日東電工, 5303W) で導入口, 流出口, 排気口を封止する。
- (6) ガラスウエハを介してクリップでデバイスを機械的に固定する。(図 2.15 (d))
- (7) ウォーターバス (アズワン TB-2N) 内で 60 min 加温し, LAMP 反応を行う。(図 2.15 (e))
- (8) 加温前後の反応容器 (深さ 1mm の半球ビーズ転写箇所) の蛍光画像を倒立顕微鏡 (ニコン, TE2000-U) を用いて取得した。(図 2.15 (f))

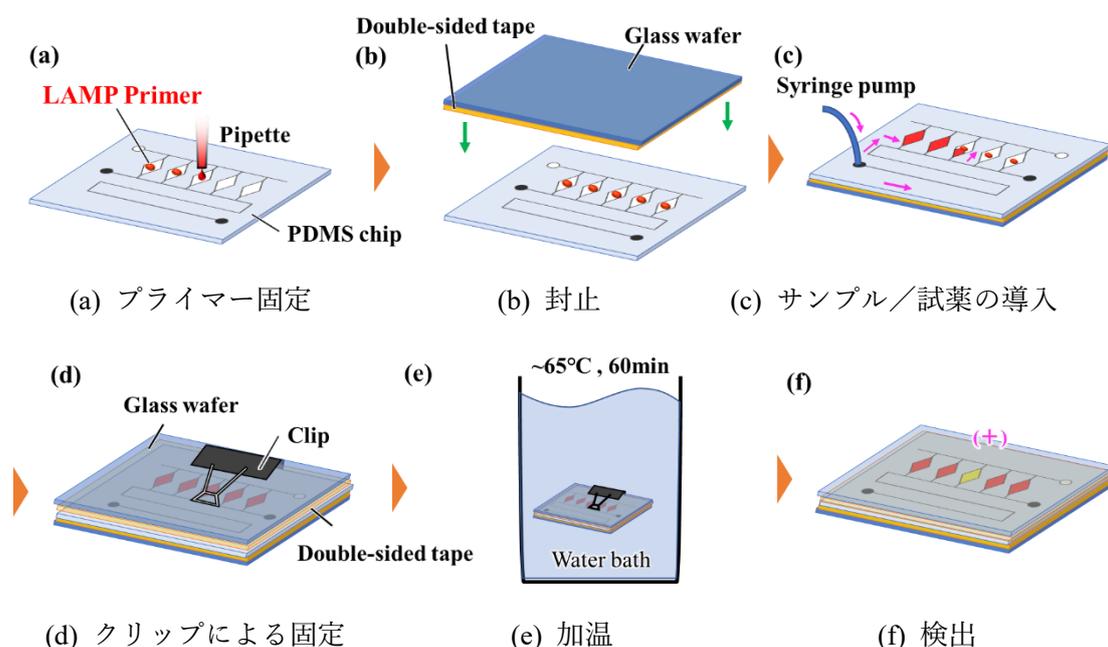


図 2.15 遺伝子増幅実験の手順

続いて, マルチプレックス遺伝子診断デバイスへ導入する試薬を示す. 表 2.2 に標的 DNA (トマト黄化えそウイルス (TYLCV)) の遺伝子増幅実験に用いた試薬を示す. TYLCV サンプルは, 大腸菌 (*E. Coli*) を用いて複製したプラスミド DNA¹⁶⁾を使用した. 表 2.3 に標的 RNA (メロン黄化えそウイルス (MYSV), ウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV), キュウリ緑斑モザイクウイルス (KGMMV), キュウリモザイクウイルス (CMV)) の遺伝子増幅実験に

用いた試薬を示す。RNA ウイルスサンプルは愛知県内で発生、収集したウリ類の葉から抽出したものを使用した。サンプルの RNA 濃度は、Qubit Fluorometer 4 (Thermo Fisher 社) を用いて計測した。

表 2.2 標的 DNA の遺伝子増幅実験における流入試薬

	Manufacturer	Concentration	Amount μL	
LAMP reagents	FUJIFILM Wako Pure Chemical	Tris-HCl (pH 8.0): 20 mM KCl: 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ : 10 mM MgSO ₄ : 8 mM Betaine: 0.8 M	12.5	
	GE Healthcare	dNTP: 1.0 mM each		
	<i>Bst</i> Polymerase	Nippon Gene	8 U	1.0
	Berberine chloride hydrate	FUJIFILM Wako Pure Chemical	180 μM	2.5
	DNA sample	Provided by Aichi Agricultural Research Center	—	1.0
Distilled water	—	—	8.0	
Total			25.0	

表 2.3 標的 DNA の遺伝子増幅実験における流入試薬

	Manufacturer	Concentration	Amount μL	
LAMP reagents	FUJIFILM Wako Pure Chemical	Tris-HCl (pH 8.0): 20 mM KCl: 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ : 10 mM MgSO ₄ : 8 mM Betaine: 0.8 M	12.5	
	GE Healthcare	dNTP: 1.0 mM each		
	<i>Bst</i> Polymerase	Nippon Gene	8 U	1.0
	AMV reverse transcriptase	Promega	1 U	1.0
	Berberine chloride hydrate	FUJIFILM Wako Pure Chemical	180 μM	2.5
RNA sample	Provided by Aichi Agricultural Research Center	MYSV: 22.2 ng/ μL	1.0	
		CCYV: 19.3 ng/ μL		
		KGMMV: 3.0 ng/ μL CMV: 17.6 ng/ μL		
Distilled water	—	—	8.0	
Total			25.0	

2.6.2 蛍光観察条件最適化実験

はじめに、マルチプレックス遺伝子診断デバイス上で蛍光観察条件を最適化するための遺伝子増幅実験を行った。実験には、図 2.1 に示すデバイスを用いて、表 2.2 に示す試薬を用いて、トマト黄化えそウイルス (TYLCV) のプラスミド DNA の遺伝子増幅実験を実施し、蛍光試薬 (インターカラーター) と蛍光フィルターキューブの最適な組み合わせ条件を調査した。蛍光試薬には、塩化ベルベリンと硫酸ベルベリンを用いた。倒立顕微鏡 (ニコン, TE2000-U) で観察に用いた蛍光フィルターキューブには、UV-2A (EX 330-380, DM 400, BA 410), BV-2A (EX 400-440, DM 455, BA 460), BV-2A (EX 450-490, DM 505, BA 510) の 3 種類を評価した。LAMP 試薬および DNA サンプルの混合液を導入し、ウォーターバス内 65°C で 60 min 加温を行い、遺伝子増幅を実施し、倒立顕微鏡を用いて加温前 (0 min), 加温 30 min 後, 60 min 後の画像を取得した。

図 2.16 に、加温前 (0 min) と 60 min 加温後の反応容器の蛍光画像 (ゲイン 1 倍, 露光時間 2 s) を示す。図 2.16 中、蛍光フィルターキューブ BV-2A を用いた場合には、加温前後で蛍光強度が大きくなっていることがわかる。一方、蛍光フィルターキューブ UV-2A および、B-2A を用いた場合には、60 min 加温後も蛍光がほぼ確認ができなかった。

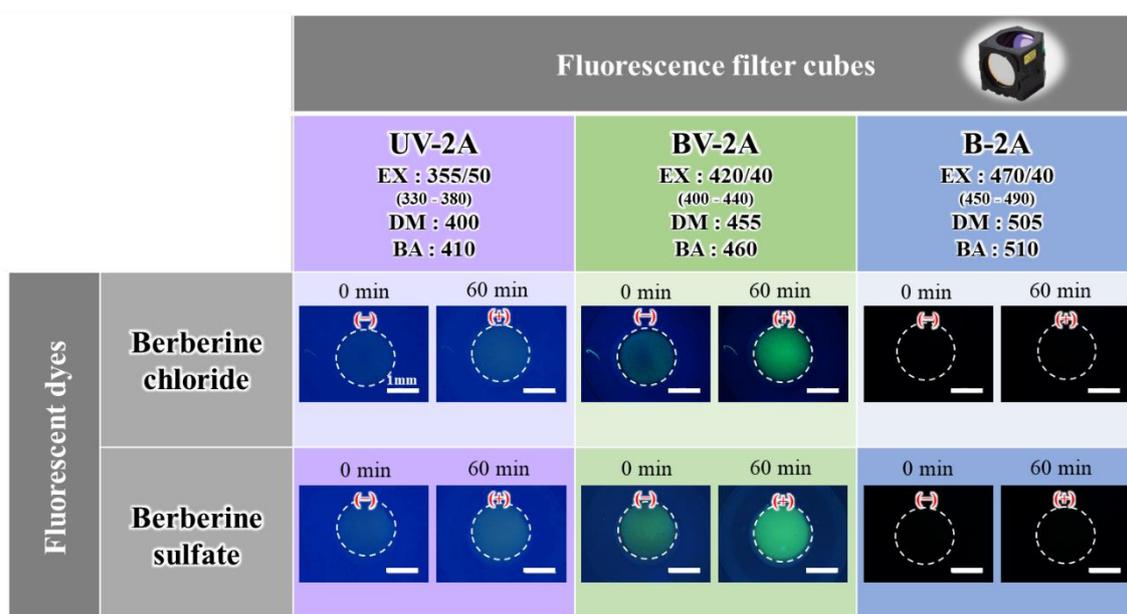


図 2.16 蛍光試薬 2 種類 (塩化ベルベリン, 硫酸ベルベリン) と蛍光フィルターキューブ (UV-2A, BV-2A, B-2A) を用いたトマト黄化えそウイルスの遺伝子増幅実験結果

取得した蛍光画像から、ImageJ (National Institutes of Health, version 1.52a) を用いて蛍光強度を測定した。測定には、取得画像を RGB 成分の各画像に分割し、G 値を解析した。図 2.17 に各実験条件における加温前, 加温 30 min 後, 加温 60 min 後の反応容器の蛍光強度の

解析結果を示す。また、遺伝子増幅反応が起こった反応容器（陽性反応）と起こっていない反応容器（陰性反応）の蛍光強度の比（P/N比）をグラフ中に示している。結果より、塩化ベルベリンと BV-2A の組み合わせが P/N 比が 1.96 と高く、さらに、蛍光画像の視認性が高いことが分かり、最適な観察条件とした。

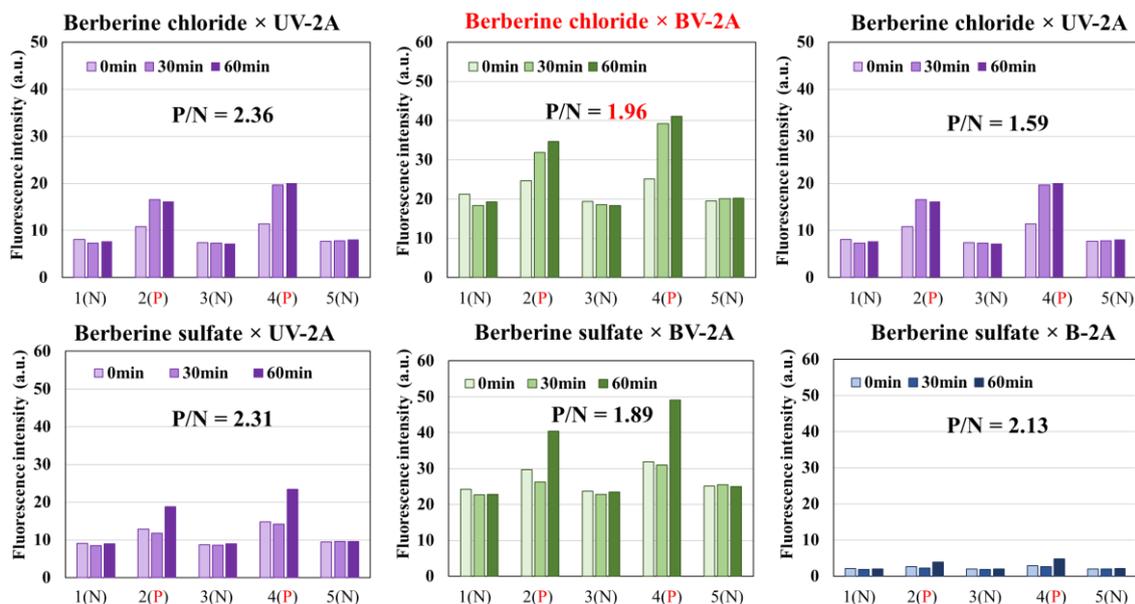


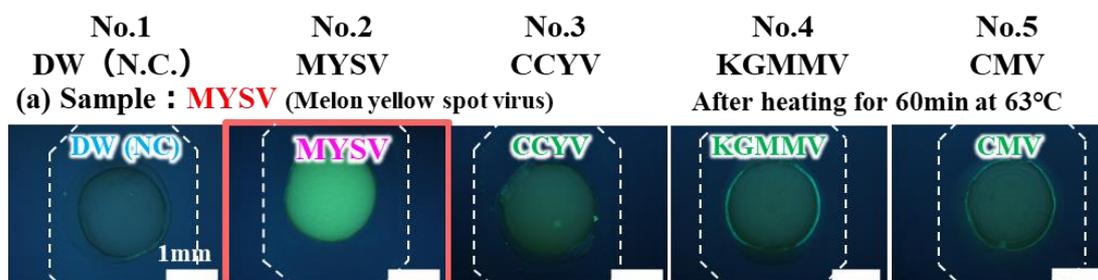
図 2.17 蛍光強度解析結果（N：陰性反応容器，P：陽性反応容器を示す）

2.6.3 蛍光 LAMP 法による多項目同時診断実験

続いて、ウリ類の農作物に感染する感染性ウイルスの遺伝子増幅実験を実施した。実験には、図 2.1 で示したデバイスを用いた。サンプルには、罹患したキュウリの葉から採取した、メロン黄化えそウイルス (MYSV)¹⁷⁾、ウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV)、キュウリ緑斑モザイクウイルス (KGMMV)¹⁸⁾、キュウリモザイクウイルス (CMV) の 4 種類のウイルス RNA を用いた。反応容器 2 番には、MYSV プライマー、反応容器 3 番には、CCYV プライマー、反応容器 4 番には KGMMV プライマー、反応容器 5 番には CMV プライマーをそれぞれ固定した（図 2.1 参照）。LAMP 試薬および DNA サンプルの混合液を導入し、ウォーターバス内 63°C で 60 min 加温を行い、遺伝子増幅実験を実施した。加温 20 min 以降は、10 min 毎に反応容器の蛍光画像を取得した。図 2.18 に加温 60 min 後の蛍光画像を示す。図 2.18 より、導入したサンプルに対応するプライマーを固定した反応容器のみ、蛍光が強まっていることがわかった。さらに、反応容器間でのクロスコンタミネーションは生じないことを確認した。

図 2.19 に蛍光画像から ImageJ を用いて測定した蛍光強度の解析結果を示す。MYSV では加温 40 min、CCYV、KGMMV、CMV では、加温 30 min で遺伝子増幅が始まっていること

がわかった。また、反応開始直後に蛍光強度が下がる結果が見られた。これは、反応容器内に固定したプライマーが1本鎖のDNAであるため、塩化ベルベリンが結合し、蛍光しているものと考えられる。20 min 加温後は、プライマーが反応容器の溶液全体に拡散することで蛍光強度が下がっているものだと考えられた。



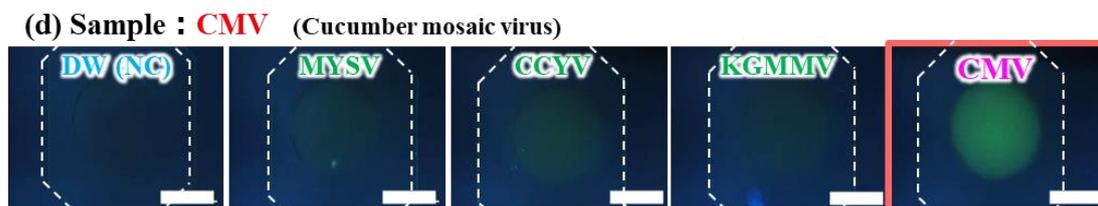
(a) メロン黄化えそウイルス (MYSV)



(b) ウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV)

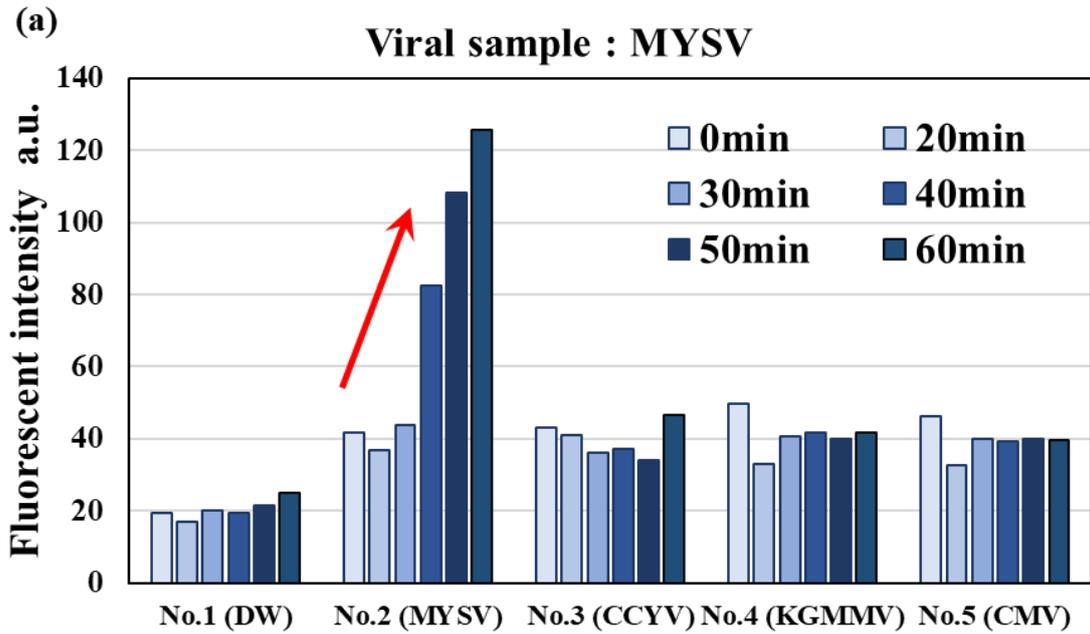


(c) キュウリ緑斑モザイクウイルス (KGMMV)

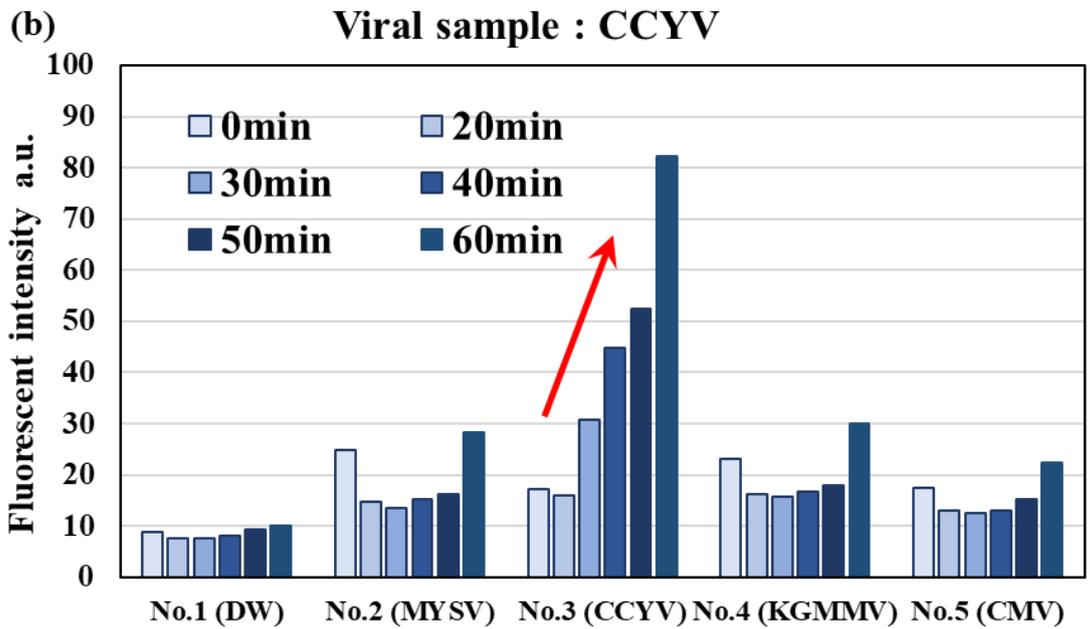


(d) キュウリモザイクウイルス (CMV)

図 2.18 ウリ類感染性ウイルスの遺伝子増幅実験結果

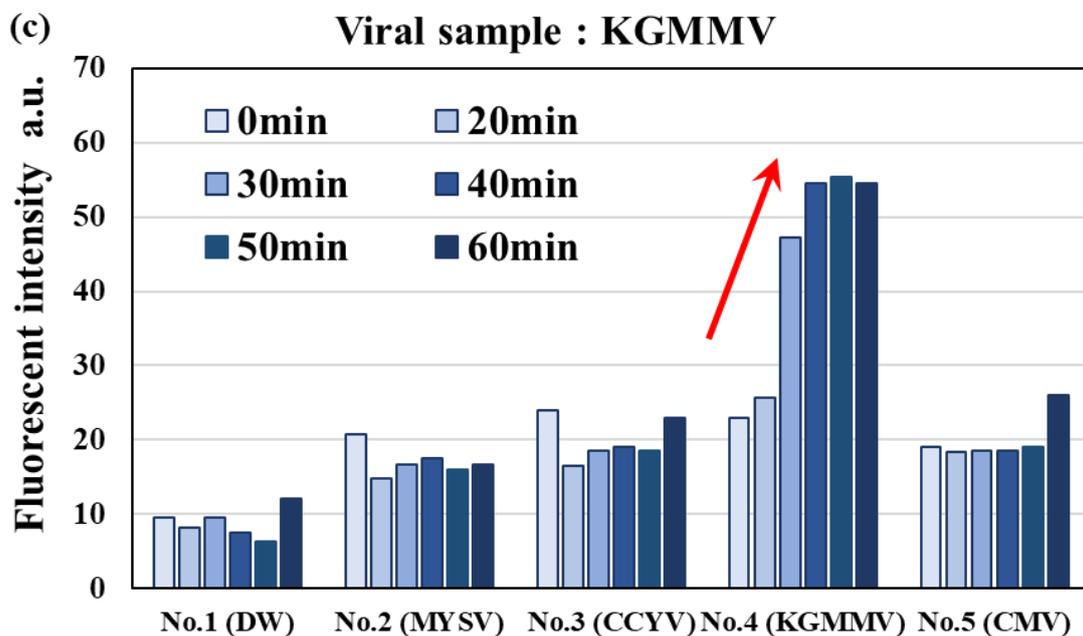


(a) メロン黄化えそウイルス (MYSV)

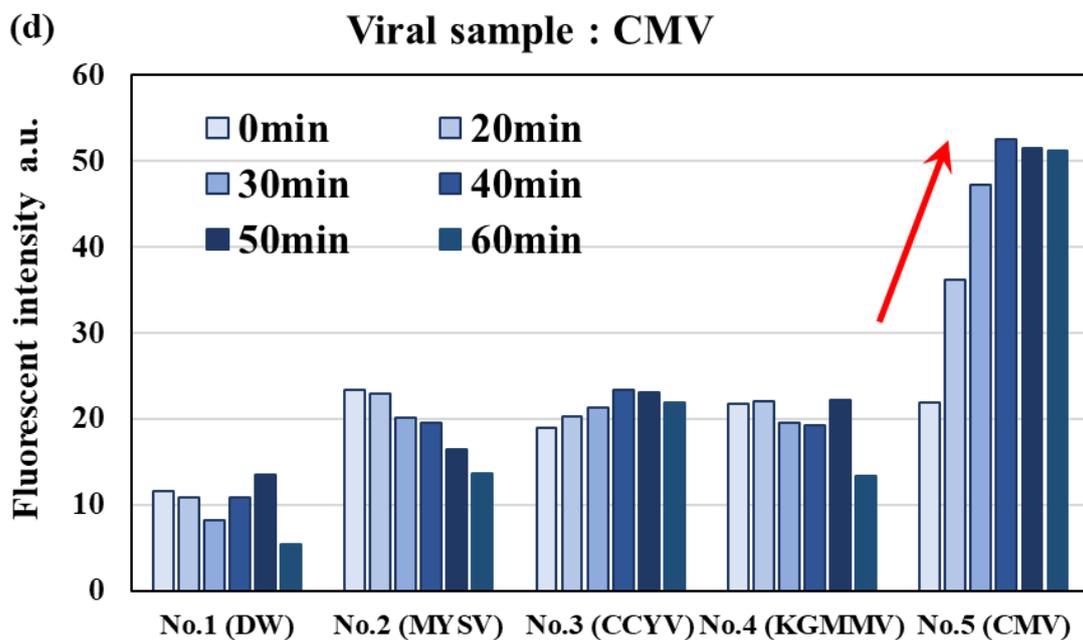


(b) ウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV)

図 2.19 蛍光強度解析結果



(c) キュウリ緑斑モザイクウイルス (KGMMV)



(d) キュウリモザイクウイルス (CMV)

図 2.19 蛍光強度解析結果

次に、メロン黄化えそウイルス (MYSV) とウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV) の混合サンプルを用いて複数のウイルスの同時診断実験を行った。実験に使用した MYSV サンプル

の RNA 濃度は 2.22 ng/μL, CCYV サンプルの RNA 濃度は 1.93 ng/μL であった. 図 2.20 に加温前, 加温 30 min 後, 加温 60 min 後の蛍光画像を示す. 図 2.20 から, 加温 30min 後には, CCYV のプライマーを固定した反応容器のみの蛍光が強まっていることがわかり, 加温 60 min 後には MYSV のプライマーを固定した反応容器も蛍光が強まっていることがわかる. さらに, 他の反応容器へのクロスコンタミネーションは確認されなかった. 図 2.21 に取得画像から解析した蛍光強度解析結果を示す. 図 2.21 より, CCYV が加温後 30 min から先に遺伝子増幅反応が始まり, MYSV が 40 min から遅れて遺伝子増幅反応が始まることがわかった. これは, 図 2.19 (a) および図 2.19 (b) で示した単一項目での実験結果と同程度の結果であり, 複数項目のウイルスがサンプル内に混在する場合でも遺伝子増幅反応への影響は少ないということがわかった.

Sample : MYSV & CCYV

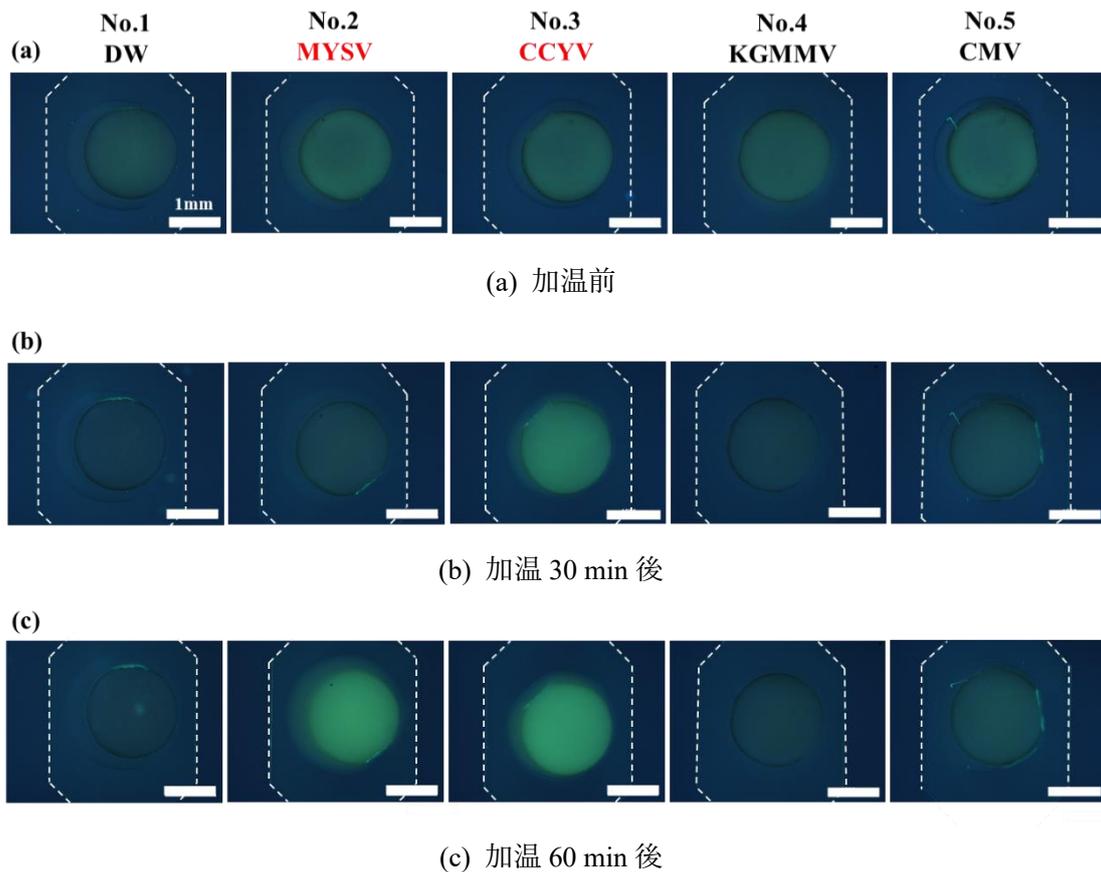


図 2.20 メロン黄化えそウイルスとウリ類退緑黄化ウイルスの混合サンプル検出結果

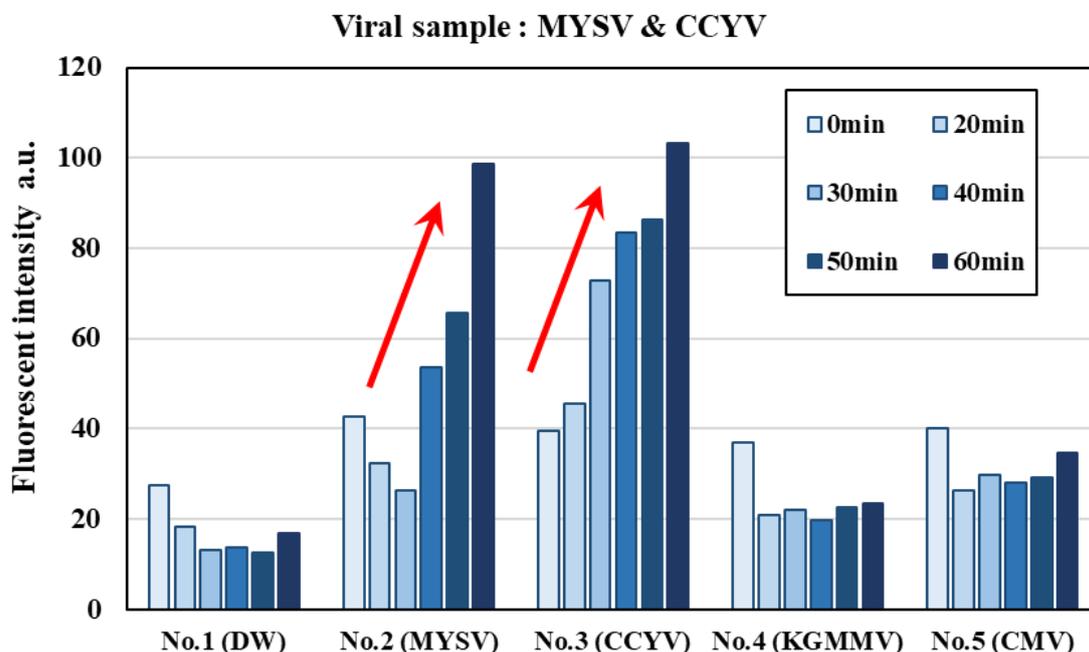


図 2.21 蛍光強度解析結果

2.7 実用化に向けた技術的課題

本節では、本章で開発したデバイスの実用化に向けた技術的課題について考察する。本デバイスでは、自律的な分注操作のために3個1組の横型相ガイドを実装した(内1つは逆流防止を目的に設計)。しかし、このデバイスでは、最大導入流量が5 $\mu\text{L}/\text{min}$ と小さいため、導入工程に時間を要してしまい、迅速な診断が困難であった。これは、反応容器前後に設けた2個の相ガイド間の決壊圧力がそれぞれ、 $P_{L3}=2.37\text{ kPa}$ 、 $P_{L1}=2.14\text{ kPa}$ と設計されており、両者の比 ($P_{L3}:P_{L1} = 1:0.90$) の差が小さいことが原因であると考えられた。さらに、横型相ガイドの作製には2段階のプロセスが必要であることから、段差構造の再現性が低いことが問題として考えられる。作製したデバイスの再現性は、分注挙動へ影響することが予測され、診断デバイスの信頼性を左右する。

混合操作のためには、横型ミキサを実装し、溶液の高効率な混合性能を示したが、横型相ガイドと同様、横型ミキサを形成するためには多段階の作製プロセスを要することから、デバイスの再現性が低いことが課題として挙げられた。

遺伝子診断性能評価では、多項目のウイルスの同時遺伝子診断を実証したが、蛍光試薬による検出方法は倒立顕微鏡などの大掛かりな観察装置を必要とし、簡便な診断、特にオンサイト診断には不向きであるといった課題が考えられた。

2.8 結言

本章では、本研究で開発するマルチプレックス遺伝子診断デバイスの基本原理を提案し、分注部、混合部、遺伝子診断手法について基本性能を示した。得られた結果をまとめると次のとおりである。

- (1) 分注部では、3個1組の角度の異なる横型相ガイドを各反応容器に対し、実装することで、自律的な溶液の反応容器への分注操作が可能であることを示した。
- (2) 混合部では、横型ミキサを実装することで高効率に混合できることを示した。さらに、最適形状を調査したところ、斜め形状が送液距離 10 mm で混合効率 90%程度の高い混合性能を示すことが分かった。
- (3) 農作物病害を標的として、トマトに感染する DNA ウイルス (TYLCV) の遺伝子診断が可能であることを示し、ウリ類に感染する RNA ウイルス (MYSV, CCYV, KGMMV, CMV) の同時診断が可能であることを実証した。
- (4) 開発したデバイスの実用化に向けた技術的課題を考察し、診断プロセスの迅速性、作製プロセスの煩雑さ、診断手法の煩雑さに対し課題を挙げた。

参考文献

- [1] W. Su, X. Gao, L. Jiang, and J. Qin, "Microfluidic platform towards point-of-care diagnostics in infectious diseases", *J. Chromatogr. A*, 1377, 13-26, (2014)
- [2] Y. Pan, X. Li, G. Yang, J. Fan, Y. Tang, J. Zhao, X. Long, S. Guo, Z. Zhao, Y. Liu, H. Hu, H. Xue, and Y. Li, "Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients", *J. Infect.*, 81(1), e28-32, (2020)
- [3] M. Parida, S. Sannarangaiah, P. K. Dash, P. V. L. Rao, and K. Morita, "Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases", *Rev. Med. Virol.*, 18(6), 407-21, (2008)
- [4] H. Zhang, Y. Xu, Z. Fohlerrova, H. Chang, C. Iliescu, and P. Neuzil, "LAMP-on-a-chip Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification", *Trend Analyt. Chem.*, 113, 44-53, (2019)
- [5] R. Mao, G. Ge, Z. Wang, R. Hao, G. Zhang, Z. Yang, B. Lin, Y. Ma, H. Liu, and Y. Du, "A multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification array for detection of malaria-related parasites and vectors", *Acta Tropica*, 178, 86-92, (2018)
- [6] J. A. Weaver, J. Melin D. Stark, S. R. Quake, and M. A. Horowitz, "Static control logic for

- microfluidic devices using pressure-gain valves”, *Nat. Phys.*, 6, 218-223, (2010)
- [7] D. Natsuhara, K. Takishita, K. Tanaka, A. Kage, R. Suzuki, Y. Mizukami, N. Saka, M. Nagai, and T. Shibata, “A microfluidic diagnostic device capable of autonomous sample mixing and dispensing for the simultaneous genetic detection of multiple plant viruses”, *Micromachines*, 11(6), 540, (2020)
- [8] E. Yildirim, S. J. Trietsch, J. Joore, A. V. D. Berg, T. Hankemeier, and P. Vulto, “Phaseguides as tunable passive microvalves for liquid routing in complex microfluidic networks”, *Lab Chip*, 14, 3334–3340, (2014)
- [9] P. Vulto, S. Podszun, P. Meyer, C. Hermann, A. Manz, and G. A. Urban, “Phaseguides: a paradigm shift in microfluidic priming and emptying”, *Lab Chip*, 11(9), 1596-602, (2011)
- [10] C. Phurimsak, E. Yildirim, M. D. Tarn, S. J. Trietsch, T. Hankemeier, N. Pamme, and P. Vulto, “Phaseguide assisted liquid lamination for magnetic particle-based assays”, *Lab Chip*, 14(13), 2334-43, (2014)
- [11] S. Hakenberg, M. Hügler, M. Weidmann, F. Hufert, G. Dame, and G. A. Urban, “A phaseguided passive batch microfluidic mixing chamber for isothermal amplification”, *Lab Chip*, 12(21), 4576-80, (2012)
- [12] F. Garbarino, K. Kistrup, G. Rizzi, and F. Hansen, “Burst pressure of phaseguide structures of different heights in all-polymer microfluidic channels”, *J. Micromech. Microeng.*, 27, 125015, (2017)
- [13] A. D. Stroock, S. K. W. Deringer, A. Ajdari, I. Mezić, H. A. Stone, and G. M. Whitesides, “Chaotic mixer for microchannels”, *Science*, 295(5555), 647-51, (2002)
- [14] M. A. Ianovska, P. P. M. F. A. Mulder, and E. Verpoorte, “Development of small-volume, microfluidic chaotic mixers for future application in two-dimensional liquid chromatography”, *RSC Adv.*, 7, 9090-99, (2017)
- [15] C. T. Culbertson, “Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices”, *Talanta*, 56(2), 365–373, (2002)
- [16] R. Suzuki, M. Kato, S. Fukuta, T. Oyabu, and N. Saka, “Selection of resistant tomato strains by simple inoculation method using Tomato yellow leaf curl virus infectious clones.” *Hortic. Res. (Jpn.)* 18, 363–371. (2019)
- [17] Y. Takeuchi, S. Fukuta, and T. Oya, “Detection of melon yellow spot virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification.” *Res. Bull. Aichi Agric. Res. Cent.*, 38, 57–63, (2006)
- [18] S. Fukuta, K. Takeyama, M. Suzuki, A. Shichi, K. Ichikawa, and H. Nakanishi, “Detection of kyuri green mottle virus from soil by immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification reaction.”, *Plant Pathol. J.* 11, 51–59, (2012)

第3章 逐次分注操作を実現するためのマイクロ流体制御理論の提案

3.1 緒言

従来, 複数の微小な容器に溶液を導入する技術は検討されており¹⁻³⁾, その応用例として, 複数のウイルスを同時診断する遺伝子診断デバイスの開発は進められてきた. Liu ら⁴⁾は, 複数の反応容器を備えた μ TAS でマラリアを伝搬する蚊の遺伝子型を迅速に識別できることを報告した. デバイスの 3 つの反応容器が設けられており, サンプル/遺伝子増幅試薬の混合液を導入後, 63°C で加温することで 60 min 以内にサンプルに含まれる蚊の種類を同定することができる. しかし, このデバイスでは, それぞれの反応容器に対して導入口と排出口が設けられており, 複数回の試薬とサンプルの混合液の導入が必要な構造であった. そのため, 操作性が必ずしも良いとは言い難い. 一方で, Hagemeyer ら⁵⁾は, 微小容器の各出口に受動バルブを設けることで, 1 個の導入口から溶液を導入すると複数の容器に分注することができることを示した. しかし, 各容器へ接続されている流路には, 流路抵抗を等しくするために左右対称な形状が必要であり, デバイスの流路デザインの設計には制約があることが課題であった.

そこで, 本章では, 2 章で示した分注構造の作製プロセスを簡略化させ, 分注性能のための耐圧性能を向上させる縦型相ガイドを考案し, 導入流量の向上を実現した. さらに, 反応容器への分注挙動にかかる各バルブの設計制約について解明し, 微小流体の制御理論を提案し, 実験結果と比較し, その妥当性を検討した⁶⁾. また, 導入流量のさらなる向上ならびに逐次分注操作が可能な反応容器の個数の増加を目的とし, エアープラグインバルブを開発した⁷⁾.

3.2 実験方法

本章で使用したデバイスは, 2.3 節で示した手順で作製した. なお, 表 3.1 に示す 1 層のフォトリソグラフィ条件にて作製した.

表 3.1 フォトリソグラフィ条件

SU-8 spin-coating	slope(5s)→500rpm(10s)→slope(10s)→1750rpm(60s)→slope(10s)
Pre-bake	65°C(2min)→95°C(15min)→65°C(2min)→室温(5min)
Exposure	250mJ/cm ²
Hard-bake	65°C(2min)→95°C(5min)→65°C(2min)→Room temperature(5min)

実験には, PDMS デバイスをシリコーン/アクリル系両面テープ (日東電工 5303W) を用いてスライドガラス (松浪硝子 S9213) と接着させたデバイスの他に, PDMS デバイスと

シリコン系粘着剤両面テープの界面における空気漏れの影響を調べるため、4 インチガラスウェハ（東新理興 AS-4 厚さ 1.1 mm）上に PDMS 薄膜をスピコートし、大気プラズマによって表面処理（150 W, 45 s）を行い、共有結合により接合させたデバイスを作製した。

さらに、本章で示す実験では、図 2.12 で示したシリンジポンプ（ワイエムシイ, YSP-201）を用いたほか、図 3.1 に示す流量センサ（Fluigent 社 Flow Unit M）を備え付けた圧力駆動マイクロポンプ（Fluigent 社 Flow EZ 7000 mbar）を使用した。マイクロポンプはマイクロ流路に導入される青色着色液（0.1% w/v）または、緑色着色液（0.1% w/v）の流量を制御するために使用した。

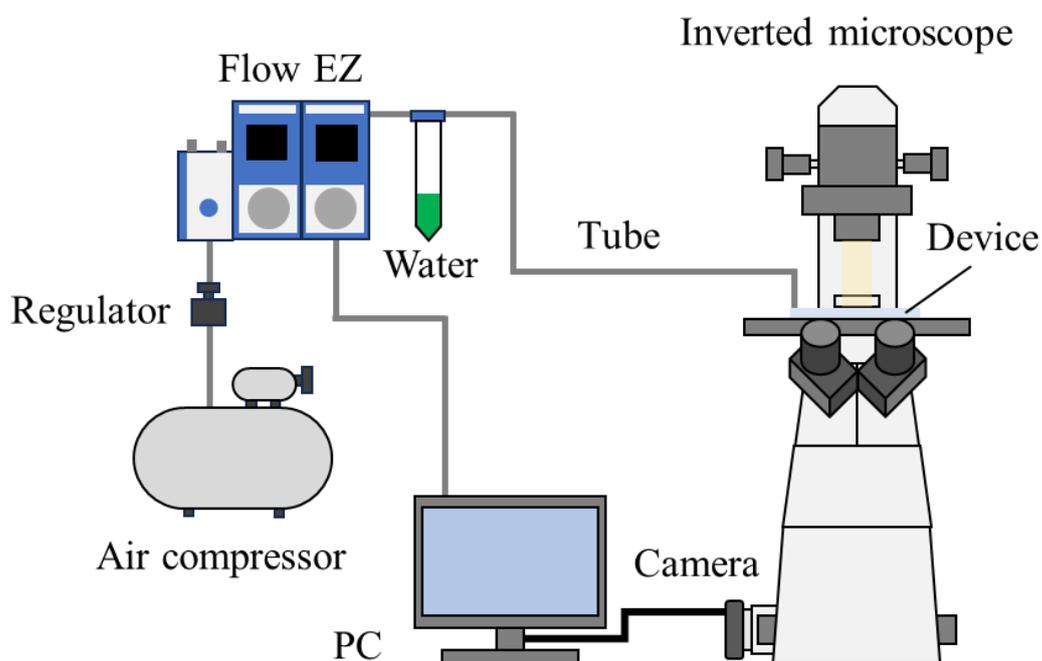


図 3.1 圧力駆動ポンプを用いた実験セットアップの概略図

3.3 縦型相ガイドによる逐次分注技術の提案

3.3.1 原理検証実験

2.7 節で述べた横型相ガイドの問題に対し、受動バルブの性能向上ならびに作製プロセスの簡略化を目的とした横型相ガイドを縦に起こしたバルブ形状（以下、縦型相ガイド）を新規に考案した。図 3.2 に作製した二個一組の縦型相ガイドを組み込んだ反応容器の概略図を示す。この縦型相ガイドは、流路壁面に凸構造を設けることで、壁面からのギャップ長を調整することによって決壊圧力を制御することができる。さらに、この縦型相ガイドは、流路

内に横型相ガイドのような段差構造が不要であるため、1段階の作製プロセスで作製可能である。

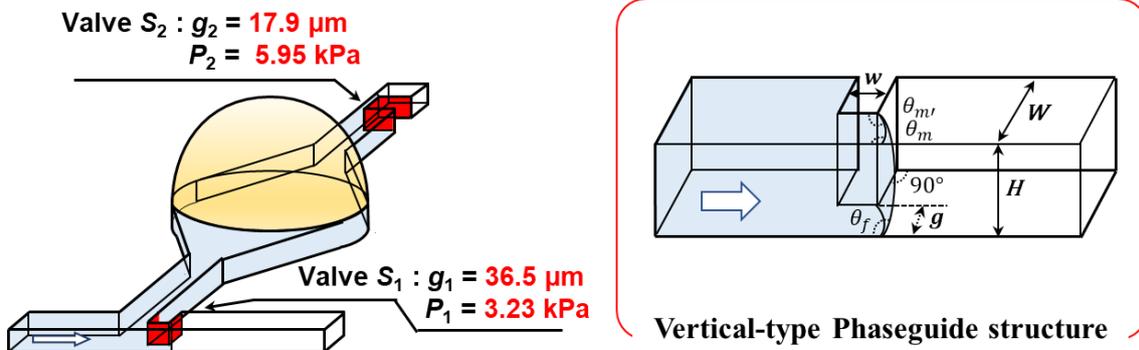


図 3.2 縦型相ガイドを組み込んだ反応容器の概略図

この縦型相ガイドの決壊圧力の理論値は式 (2.5) で示した横型相ガイドにおける流路幅方向の項 (W) をギャップ長 (g) として代替することで、次式で求めることができる。

$$P(g) = -\gamma \left(\frac{\cos(\min(\theta_m + \beta, 180^\circ)) + \cos\theta_m}{g} + \frac{\cos\theta_m + \cos\theta_f}{H} \right) \quad (3.1)$$

このとき、 γ は液体の表面張力（水：0.73 mN）、 g は流路壁面からのギャップ長、 H は流路高さ（= 50 μm ）、 θ_m は流路壁面の接触角（PDMS/水：108°）、 θ_f は流路底面の接触角（日東電工両面テープ No.5303W シリコン接着面/水：102°）、 β は凸構造の立ち上がりの角度（= 90°）を示す。

図 3.2 に示される作製した縦型相ガイド（ $g_1 = 36.5 \mu\text{m}$, $g_2 = 17.9 \mu\text{m}$ ）の決壊圧力は、式 (3.1) によれば、 $P_2 = 4.45 \text{ kPa}$, $P_1 = 2.71 \text{ kPa}$ と算出でき、両者の圧力比は、 $P_2:P_1 = 1:0.61$ となる。2.4.1 節で示されたように、横型相ガイドでは、 $P_{L3} = 2.37 \text{ kPa}$, $P_{L1} = 2.14 \text{ kPa}$, $P_{L3}:P_{L1} = 1:0.90$ となるので、決壊圧力の向上、圧力比の改善ができた。図 3.3 にシリンジポンプを用いて縦型相ガイドデバイスへ導入流量 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で導入した実験結果を示す。図 3.3 の実験で使用したデバイスの寸法設計値は、反応容器間の長さ $L_1 = 4 \text{ mm}$, メイン流路から反応容器までの分岐流路の長さ $L_2 = 1 \text{ mm}$, 反応容器からバルブ S_3 までの長さ $L_3 = 0.2 \text{ mm}$, 反応容器の幅 $C_w = 2 \text{ mm}$, 反応容器の長さ $C_l = 5.3 \text{ mm}$ である。横型相ガイドでは導入流入量が 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ が限界であったのに対し、縦型相ガイドでは 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ まで流入が可能となった。

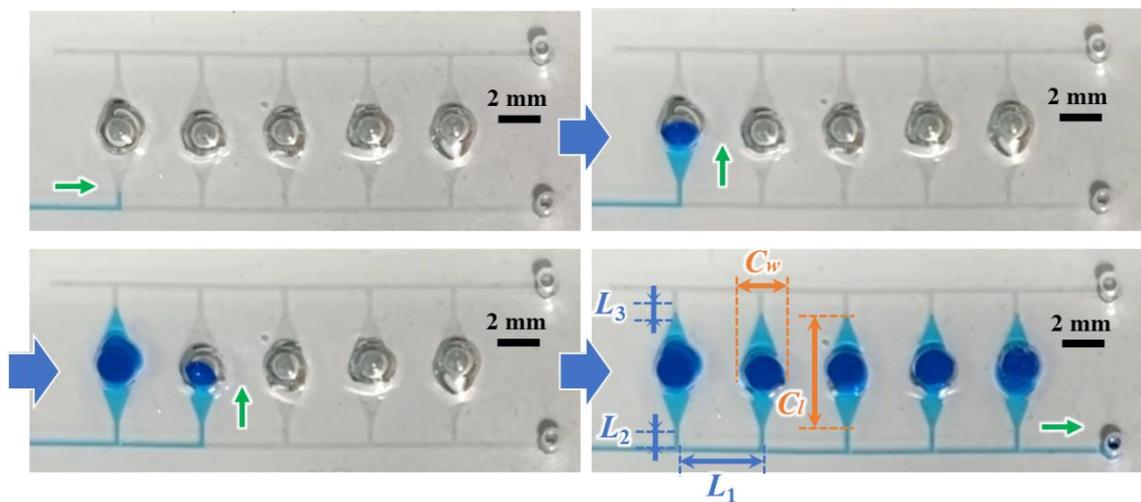
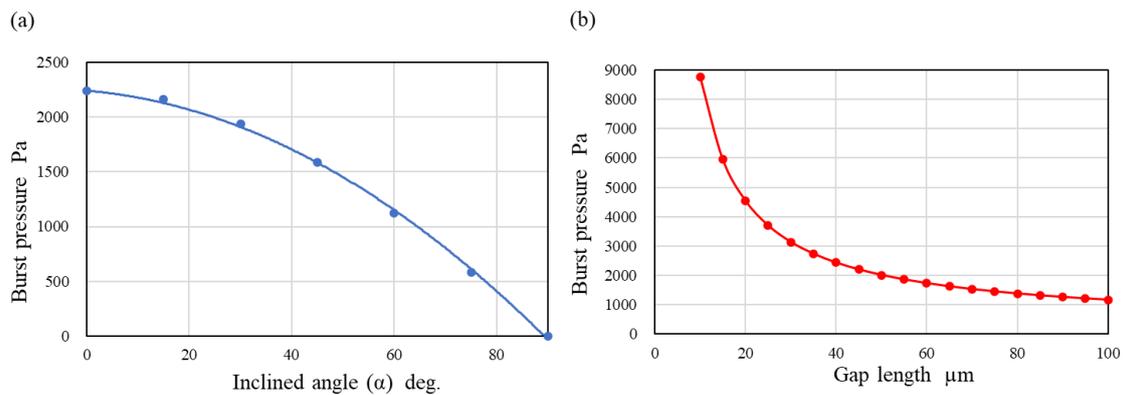


図 3.3 縦型相ガイドを組み込んだデバイスへ導入流量 $10\mu\text{L}/\text{min}$ で導入した実験結果

流路幅 $200\mu\text{m}$ 、流路高さ $80\mu\text{m}$ （横型凸構造 $40\mu\text{m}$ ）としたときの横型相ガイドの角度に対する決壊圧力の相関と、縦型相ガイドの流路壁面とのギャップ長に対する決壊圧力の相関を図 3.4 に示す。図 3.4 より、横型相ガイドでは、角度変化に伴い決壊圧力が緩やかに変化するのに対して、縦型相ガイドではギャップ長 $0\sim 30\mu\text{m}$ までの範囲で決壊圧力が急激に変化することが分かる。そのため、2 個の相ガイド間の圧力比を大きくすることができる。



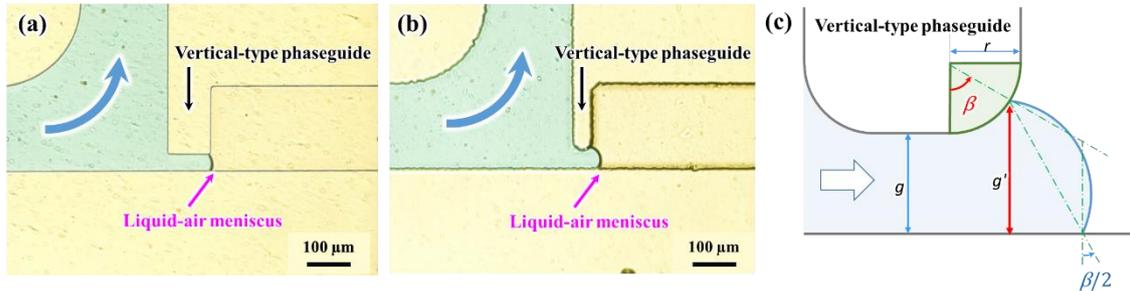
(a) 流路幅方向への角度に対する横型相ガイドの決壊圧力 (b) 流路壁面からのギャップ長に対する縦型相ガイドの決壊圧力

図 3.4 各相ガイドの理論決壊圧力の相関図

3.3.2 決壊圧力に及ぼす縦型相ガイドの角部半径の影響

3.3.1 節で示した縦型相ガイドの決壊圧力の理論式 (3.1) は、ピン止めされている縦型相

ガイドの角部が直角であることを想定している．一方，作製したデバイスは，角部が丸まって作製されてしまうことがある．特に，狭窄部の幅方向に対する流路高さのアスペクト比が高いときには作製プロセス（フォトリソグラフィ，ソフトリソグラフィ）の精度からこういった問題が生じる．作製した縦型相ガイドの例として，図 3.4 (a) ならびに (b) に倒立顕微鏡を用いて取得したギャップ長 $g = 40 \mu\text{m}$ に対して，角部半径 $r = 8 \mu\text{m}$ ならびに $r = 25 \mu\text{m}$ で作製された縦型相ガイドでピン止めされている気液界面の画像を示す．また，図 3.5 (c) に角部半径 r を考慮した縦型相ガイドの理論モデルを示す．



(a) $r = 8 \mu\text{m}$ (b) $r = 25 \mu\text{m}$ の角部半径 (c) 縦型相ガイドの理論モデル

図 3.5 角部半径を有する縦型相ガイドでピン止めされた気液界面の顕微鏡画像と角部半径 r を考慮した縦型相ガイド理論モデル

図 3.5 (a) および (b) より，角部半径 r が大きい縦型相ガイド ($r = 25 \mu\text{m}$) では，ピン止めされた液面が前傾に倒れ込むことが分かる．これは，図 3.5 (c) で示すように，角部半径 r によって流路壁面とのギャップ長が広くなる一方，ピン止めされている点における縦型相ガイドの角度 β が起因して，決壊圧力の最大箇所が決まることが原因と考えられる．そのため，縦型相ガイドの決壊圧力の理論式 (3.1) は，角部半径 r を考慮することで，次式のよりに修正することができる．

$$P(g, r, \beta) = -\gamma \left(\frac{\cos(\min(\theta_m + \beta, 180^\circ)) + \cos\theta_m}{g + r(1 - \cos\beta)} + \frac{\cos\theta_m + \cos\theta_f}{H} \right) \quad (3.2)$$

このとき， r は縦型相ガイドの角部半径， β はピン止めされた液面と縦型相ガイドの角部によってなす角度を示す．

図 3.6 に式 (3.2) で求められる縦型相ガイドのギャップ長 $g = 40 \mu\text{m}$ ，角部半径 $r = 25 \mu\text{m}$ ，流路高さ $H = 50 \mu\text{m}$ における，角度 β に対する決壊圧力とギャップ長 g' の関係を示す．図 3.6 より，ギャップ長 g' が増加するにつれ決壊圧力が小さくなる一方，ピン止めされた角度 β が大きくなるため，決壊圧力は山なりのカーブを描く．今回のケースでは， $\beta = 45^\circ$ の場合， $g' = 45 \mu\text{m}$ ， $P = 2.61 \text{ kPa}$ となり，最も決壊圧力が高くなることが分かった．

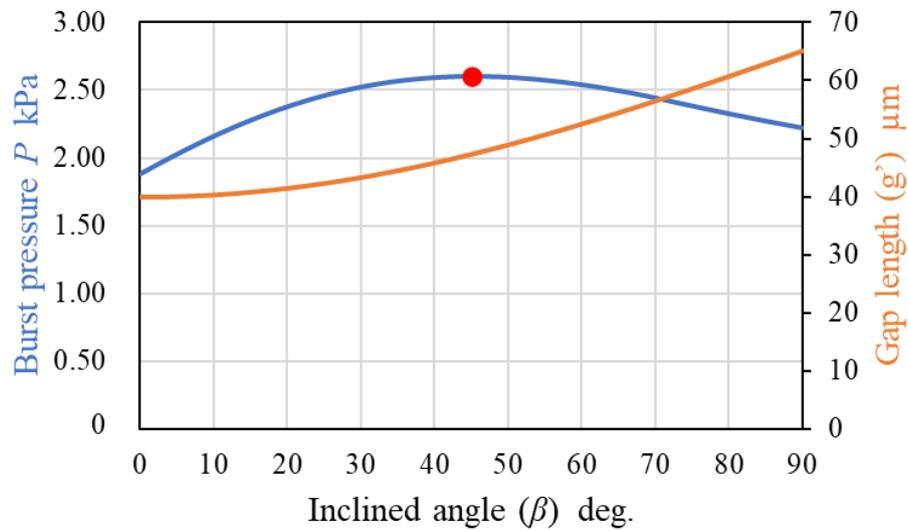
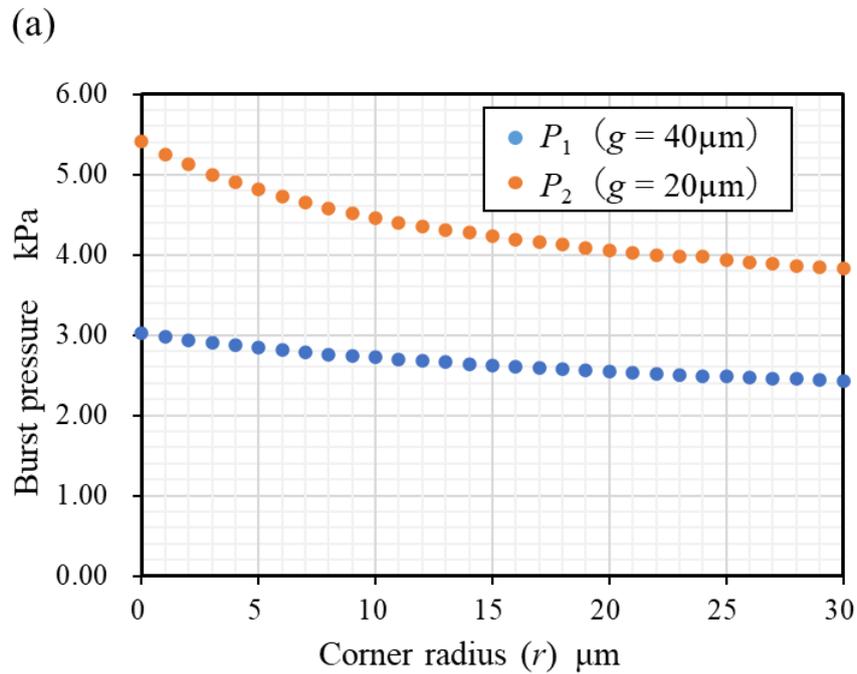


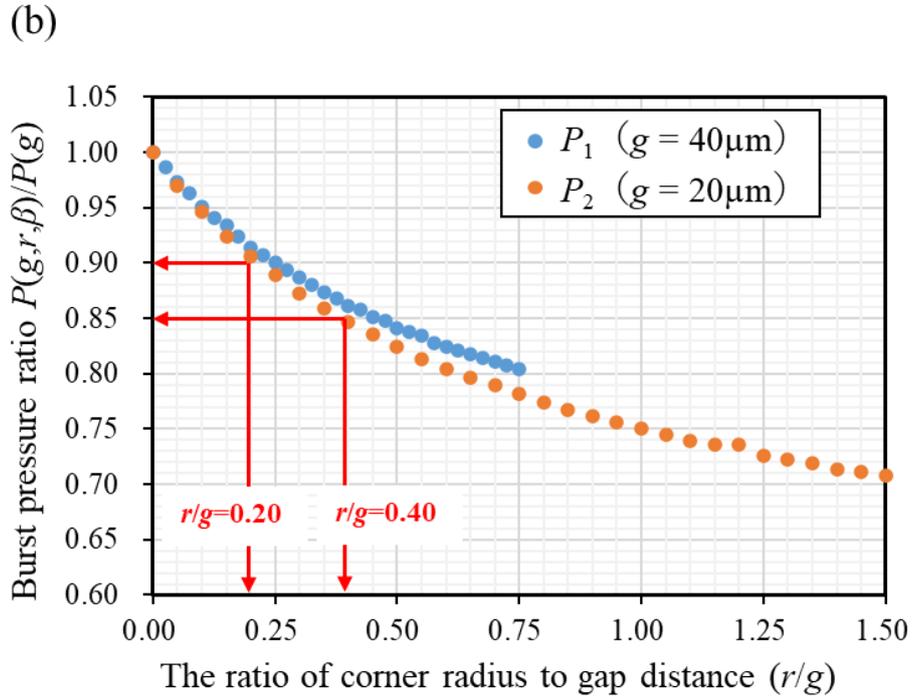
図 3.6 ピン止めされた液面の角度 β に対するギャップ長 g' と決壊圧力 P の関係

続いて、角部半径を変えて、縦型相ガイドのギャップ長 $g = 40 \mu\text{m}$ および $g = 20 \mu\text{m}$ 、流路高さ $H = 50 \mu\text{m}$ の場合における、決壊圧力を解析した。図 3.7 に角部半径 r を変化させた際の決壊圧力と、角部半径を考慮しない決壊圧力（式 (3.1)）に対する角部半径を考慮した決壊圧力（式 (3.2)）との比を示す。

図 3.7 (b) において、ギャップ長 g と角部半径 r の比を無次元化したことで、二種類のギャップ長の縦型相ガイドのグラフのデータはほぼ重なっていることが分かる。結果より、 $r/g = 0.20$ の場合、決壊圧力が約 90%まで低下することがわかった。一般的なフォトリソグラフィ工程における厚膜ネガ型フォトレジスト (SU-8) パターンの寸法精度を考慮すると、縦型相ガイドの角部半径を少なくとも $r/g = 0.40$ 以下にすることが望ましく、それにより、理論決壊圧力 $P(g)$ の 85%以上を保証できることがわかった。



(a) ギャップ長 $g = 40\ \mu\text{m}$ ならびに $g = 20\ \mu\text{m}$ の縦型相ガイドにおける角部半径 r に対する決壊圧力



(b) ギャップ長に対する角部半径の無次元比 (r/g) と決壊圧力の比との関係

図 3.7 角部半径, ギャップ長と決壊圧力の関係

3.4 逐次分注理論モデルの構築

3.4.1 永久阻害バルブ決壊圧力の設計指針

反応容器の個数を増やすことは本研究で目標とする多項目診断の性能向上に繋がる。そこで、前節で開発したデバイスの反応容器を 10 個に増加した 1 列 10 連デバイスを作製した。図 3.8 に作製した 1 列 10 連デバイスに導入流量 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で青色着色液を導入したときの実験結果を示す。本実験で使用したデバイスの寸法設計値は、反応容器間の長さ $L_1 = 5 \text{ mm}$ 、メイン流路から反応容器までの分岐流路の長さ $L_2 = 1.25 \text{ mm}$ 、反応容器からバルブ S_3 までの長さ $L_3 = 0.2 \text{ mm}$ 、反応容器の幅 $C_w = 2.0 \text{ mm}$ 、反応容器の長さ $C_l = 5.45 \text{ mm}$ である。

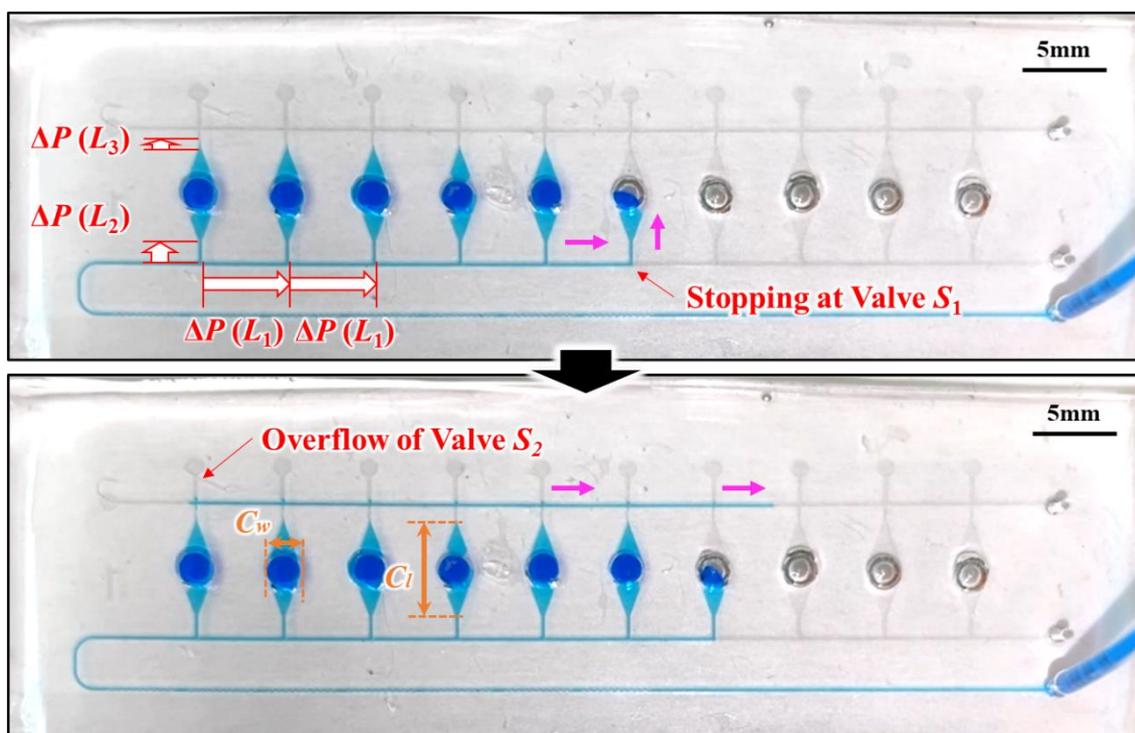


図 3.8 1 列 10 連デバイスへ導入流量 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で導入した実験結果

図 3.8 より、6 個目の反応容器に分注したあと、1 番目の反応容器の永久阻害バルブ S_2 が決壊した。これは、反応容器の個数の増加に伴い、流路長が伸びたことで、流路内で損失する圧力が 1 番目の反応容器の永久阻害バルブ S_2 に負荷としてかかっていると推測された。そのため、分注可能な反応容器数は次の式 (3.3) により算出することができると分かった (以下、式 (3.3) を反応容器分注理論式と呼ぶ)。

$$P_2 > P_1 + (m - 1)\Delta P(L_1) + \Delta P(L_2) + \Delta P(L_3) \quad (3.3)$$

ここで、 P_2 は1番目の反応容器の永久阻害バルブ S_2 の決壊圧力、 P_1 は一時阻害バルブ S_1 の決壊圧力、 $\Delta P(L_1)$ 、 $\Delta P(L_2)$ 、 $\Delta P(L_3)$ は図3.8中の各流路長で損失する圧力、 m は反応容器の個数を示す。

まず、1つ目の反応容器を満たした後、一時阻害バルブ S_1 を乗り越える際に要する決壊圧力の圧力 S_1 が永久阻害バルブ S_2 に作用する。その後、反応容器間の流路長 L_1 および、満たしている反応容器の永久阻害バルブ S_2 までの流路長 L_2 、 L_3 による圧力損失の負荷が1番目の反応容器の永久阻害バルブ S_2 に蓄積される。このとき、2番目以降の反応容器を満たした後、反応容器間の流路長 L_1 のみが累積されることを示している。なお、矩形流路による圧力損失 ΔP は、次式を用いて算出することができる⁸⁾。

$$\Delta P(L) = Q \cdot R(L) = Q \cdot \frac{12\eta L}{H^3 W} \left(1 - 0.630 \frac{H}{W}\right)^{-1} \quad (3.4)$$

このとき、 Q は流量、 $R(L)$ は流路長 L の流路抵抗、 η は粘度、 H は流路高さ、 W は流路幅を示す。ただし、この式は、断面図の流路幅が流路高さに十分大きいものとして仮定されている ($H = W$ の時の誤差は13%以下、 $H = W/2$ の時では0.2%程度の誤差が生じる)。

この理論式から、より多くの反応容器への流入を可能にしつつ、導入流量を増加させるには、①永久阻害バルブ S_2 の決壊圧力 P_2 を大きく設計すること、②一時阻害バルブ S_1 の決壊圧力 P_1 を小さく設計する事、③各流路長 L_1 、 L_2 、 L_3 を短く設計し、流路抵抗を小さくすることが有効であることが分かる。なお、式(3.4)において、反応容器内は局所的に広く深い構造になっていることから反応容器内での圧力損失を無視している。

構築した反応容器分注理論式を実証するため、新たに、反応容器をくし歯形状に配置することで、反応容器間の長さ L_1 を5mmから2.5mmに短く設計した2列10連デバイスを作製した。図3.9に作製した2列10連デバイスに青色着色液を導入流量10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で導入した実験結果を示す。図3.9より、流路長が短くなったことで、10個全ての反応容器へ分注することが可能となった。

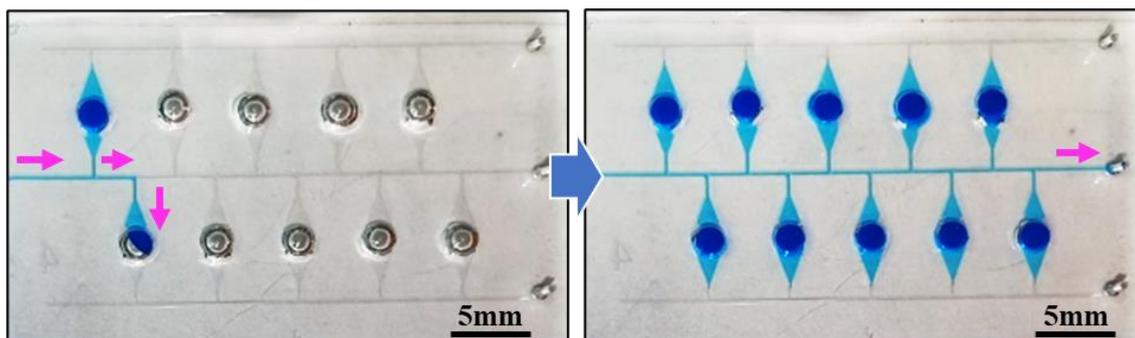


図 3.9 2 列 10 連デバイスへ導入流量 $10\mu\text{L}/\text{min}$ で導入した実験結果

さらに、式 (3.4) から分かるように、流量が増えるにつれて圧力損失は大きくなる。そこで、1 列 10 連デバイスと 2 列 10 連デバイスへ導入流量を変化させた際の式 (3.3) により求められる分注数 m_{th} と実験結果 m_{ex} を比較した。表 3.2 に導入流量に対する反応容器への理論分注数と実験値の比較を示す。なお、この時使用したデバイスの寸法は、一時阻害バルブ S_1 のギャップ長 $g_1 = 36.5\ \mu\text{m}$ 、永久阻害バルブ S_2 のギャップ長 $g_2 = 17.9\ \mu\text{m}$ 、流路高さ $H = 51.4\ \mu\text{m}$ 、1 列 10 連デバイスの $L_1 = 5\ \text{mm}$ 、2 列 10 連デバイスの $L_1 = 2.5\ \text{mm}$ 、 $L_2 = 1\ \text{mm}$ 、 $L_3 = 0.2\ \text{mm}$ であった。実験は 10 回繰り返して行い、分注が可能であった反応容器の個数の平均値と標準偏差を求めた。

表 3.2 より解析値と実験結果の分注数がよく一致していることが分かる。そのため、本提案の分注理論式 (3.3) が妥当であることが明らかになった。

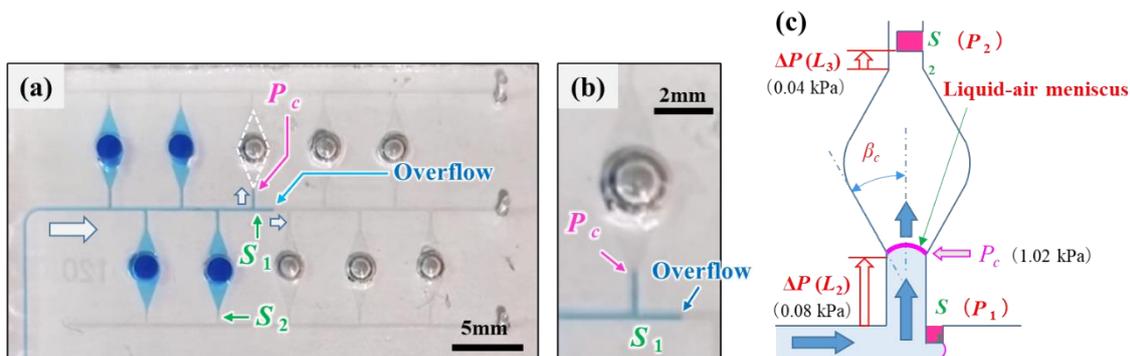
表 3.2 1 列 10 連デバイスおよび 2 列 10 連デバイスへの分注可能な反応容器の理論値 (N_{ex}) と実験値 (N_{th}) の比較 ($n=10$)。

Flow rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Single-row format ($L_1 = 5.0\ \text{mm}$)		Two-row format ($L_1 = 2.5\ \text{mm}$)	
	Theoretical number (m_{th})	Experimental results (m_{ex})	Theoretical number (N_{th})	Experimental results (N_{ex})
5.0	10	9.8 ± 0.4	10	10.0 ± 0.0
7.5	8	7.8 ± 0.6	—	—
10	6	6.1 ± 0.7	10	9.5 ± 1.0
15	4	4.7 ± 0.8	8	7.4 ± 1.0
20	3	4.2 ± 0.4	6	6.4 ± 1.1
30	—	—	4	4.5 ± 0.5

3.4.2 一時阻害バルブ決壊圧力の設計指針

反応容器分注理論式 (3.3) で示されたように、一時阻害バルブ S_1 の決壊圧力 P_1 を小さくすることは分注性能の向上に繋がる。そこで、一時阻害バルブ S_1 の設計にかかる制約条件を調

査した. 新たに, 一時障害バルブ S_1 のギャップ長 $g = 122.8 \mu\text{m}$ に変更したデバイスを作製した ($W = 199.1 \mu\text{m}$, $H = 54.4 \mu\text{m}$). 導入流量 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で青色着色液を導入した実験結果を図 3.10 (a) および (b) に示す. このとき, 一時障害バルブ S_1 の決壊圧力は式 (3.1) より, 1.36 kPa と予測される. また, 図 3.10 (c) に一時障害バルブ S_1 の設計最適化のための理論モデル概略図を示す.



(a) 2列10連デバイスの5個目の反応容器への導入中の一時障害バルブ S_1 の決壊 (b) 5個目の反応容器の拡大図 (c) 一時障害バルブ S_1 の理論モデル

図 3.10 一時障害バルブ S_1 のギャップ長 $g = 122.8 \mu\text{m}$ を用いた青色着色液の $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 導入実験結果

図 3.10 (a) より, 5個目の反応容器への分注直前に一時障害バルブ S_1 が決壊し, 流体は6個目の反応容器方向へと向かった. 図 3.10 (b) より, この予期せぬ挙動は, 反応容器に入る直前に急激に広がるため, 表面張力が作用したことで一時障害バルブ S_1 が決壊したことがわかる. そこで, 図 3.10 (c) の理論モデルを用いて考察すると, 反応容器に入るためにかかる表面張力は次式を用いて算出することができる.

$$P_c = -\gamma \left(\frac{2 \cos(\min(\theta_m + \beta_c, 180^\circ))}{W + 2r_c(1 - \cos\beta)} + \frac{\cos\theta_m + \cos\theta_f}{H} \right) \quad (\beta \leq \beta_c) \quad (3.5)$$

ここで, γ は表面張力 ($= 0.73 \text{ mN}$), W は流路幅 ($= 199.1 \mu\text{m}$), r_c は反応容器入口の角部半径 ($= 39.4 \mu\text{m}$), H は流路高さ ($= 54.4 \mu\text{m}$), θ_m は流路壁面の接触角 (PDMS/水: 108°), θ_f は流路底面の接触角 (日東電工両面テープ/水: 102°), β_c は反応容器入口の広がり角度 ($= 19.9^\circ$) を示す.

なお, β は反応容器入口でピン止めされたときの決壊圧力が最大となる液面の傾斜角度を示している. 広がり角度が十分に大きい場合, $\beta = 56^\circ$ の角度をなすときに表面張力の最大値 1.18 kPa が生じると予測される. しかし, 反応容器の形状の設計上, 広がり角度が最大となる, $\beta = 19.9^\circ$ が適応され ($\beta \leq \beta_c$), 反応容器に導入する際に生じる表面張力 P_c は 1.02

kPa であることがわかった。以上より、一時阻害バルブ S_1 の決壊圧力 P_1 は次式の制約があることがわかった。

$$P_1 > \Delta P(L_2) + P_C + \Delta P(L_3) \quad (3.6)$$

続いて、図 3.10 (a) で示したデバイスデザインに対して、一時阻害バルブ S_1 のギャップ長 $g=45.3, 85.0, 122.8, 162.1 \mu\text{m}$ とした4種類のデバイスを用意し、シリンジポンプを用いて各流量 (2.5, 5.0, 10, 15 $\mu\text{L}/\text{min}$) で導入したときの一時阻害バルブ S_1 での挙動を調査した。表 3.3 に一時阻害バルブ S_1 の理論決壊圧力 P_1 が分注性能に及ぼす影響を調査した実験結果を示す。表中、「Succeeded」はそれぞれ導入実験中に、全ての反応容器を満たすまで一時阻害バルブ S_1 で流体を止められたこと、「Failed」は一時阻害バルブ S_1 で止められず決壊したことを示している。表中の理論圧力は、式 (3.6) を用いて算出された値を示している。

表 3.3 一時阻害バルブ S_1 の理論決壊圧力 P_1 が分注性能に及ぼす影響

Gap distance g (μm)	Burst pressure P_1 (kPa)	Flow rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)			
		2.5	5.0	10	15
45.3	2.69	—	Succeeded	Succeeded	Succeeded
85.0	1.70	—	Succeeded	Succeeded	Succeeded
122.8	1.36	Failed	Failed	Failed	—
162.1	1.17	Failed	Failed	Failed	—
Theoretical total pressure (kPa)		1.05	1.07	1.13	1.19

表 3.3 より、ギャップ長 45.3 μm および、85.0 μm のデバイスでは 5.0 ~ 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ の導入流量すべてにおいて正しく一時阻害バルブ S_1 が挙動した。それぞれのギャップ長に対する理論決壊圧力 (2.69 kPa ならびに 1.70 kPa) はいずれも式 (3.6) より予測された圧力損失よりも約 1.5 倍であったため、期待通りの結果となった。一方、ギャップ長を 122.8 μm および 162.1 μm のデバイスでは、流量 2.5 ~ 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ のいずれの場合でも一カ所以上が決壊したことを確認した。これは、縦型相ガイドの上面と両面テープの接着界面が完全に封止されていなかったため、実際の決壊圧力が理論値よりも低下したことが原因と考えられる。なお、各流路長における圧力損失 $\Delta P(L_2)$ 、 $\Delta P(L_3)$ はそれぞれ、0.019 ~ 0.113 kPa, 0.009 ~ 0.055 kPa であり、反応容器入口での決壊圧力 $P_C = 1.02 \text{ kPa}$ に対して非常に小さい値である。したがって、一時阻害バルブ S_1 の決壊圧力 P_1 は決壊圧力 P_C よりも 1.5 倍程度、大きく設計する必要があることがわかった。

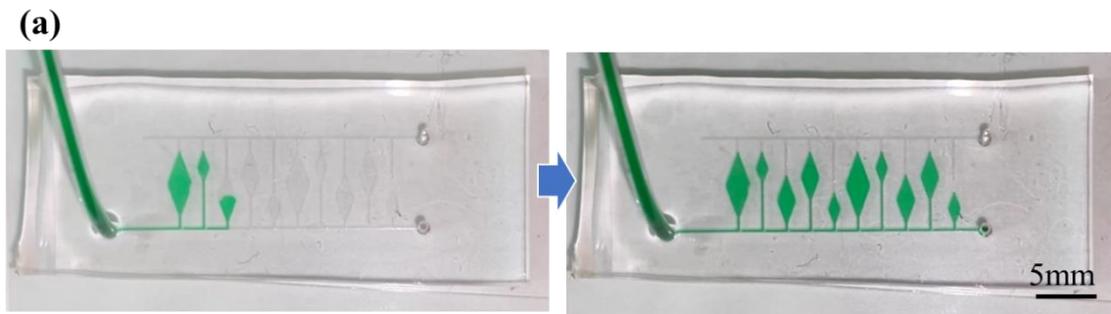
3.4.3 デバイス設計における自由度の検証

開発した反応容器への分注方法ならびに考案した反応容器分注理論はマイクロ流体デバイスの高い設計自由度を実現した。Hagmeyer ら⁴⁾によれば、複数の反応容器へ自律的に分

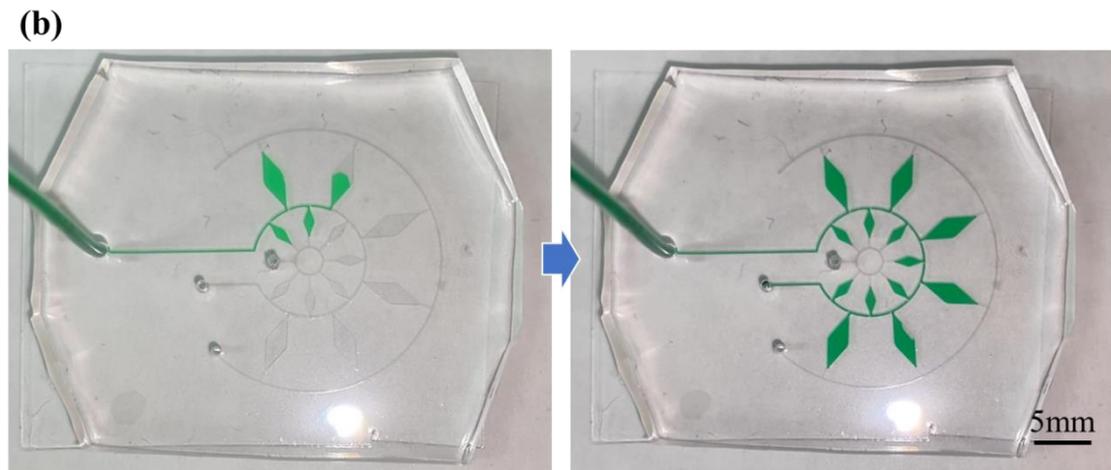
注させるためには、各容器までにかかる圧力損失を等しくするために、反応容器の配置とネットワークを形成するマイクロ流路を左右対称に配置しなければならないとされている。

これに対し、提案した反応容器分注理論式 (3.3) を用いた設計手法はシンプルかつ連続的に液体を分注するため、マイクロ流体デバイスの設計に高い自由度をもたらす。また、液体を分注した反応容器の出口側から液体が漏出しないことも本設計手法の利点である。そのため、本診断デバイスにおいては、反応容器内に予め固定していた LAMP プライマー（標的遺伝子を増幅させるための起点となる短鎖 DNA）が流出することを防ぐことができる。

本手法を用いて、反応容器の大きさや位置が異なるよう設計したデバイスの例を図 3.11 に示す。シリンジポンプを用いて緑色着色液 (0.1 w/v%) を導入流量 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で導入している。図 3.11 より、本提案の設計手法は、高い設計自由度を有することを示した。



(a) 主流路から離れた位置に 3 種類の異なる大きさの 10 個のマイクロチャンバを設けたデバイス



(b) 2 種類の大きさの 13 個のマイクロチャンバを円周上に配置したデバイス

図 3.11 マイクロチャンバへの分注実験結果

3.5 永久阻害バルブの耐圧性能の向上

3.5.1 二面縦型相ガイド構造の検討

相ガイドは形状の特性上、液体がピン止めされている角の数が増えると決壊圧力が向上する。そこで、これまで、図 3.2 で示した流路壁の片側から突出させることで狭めていた永久阻害バルブ S_2 を流路壁の両方向から狭めた縦型相ガイドに改良することを考案した（以下、二面縦型相ガイド）。図 3.12 に永久阻害バルブ S_2 を二面縦型相ガイドに改良した反応容器の概要ならびに、青色着色液を導入した際に各バルブによってピン止めされている液面の顕微鏡観察画像を示す。

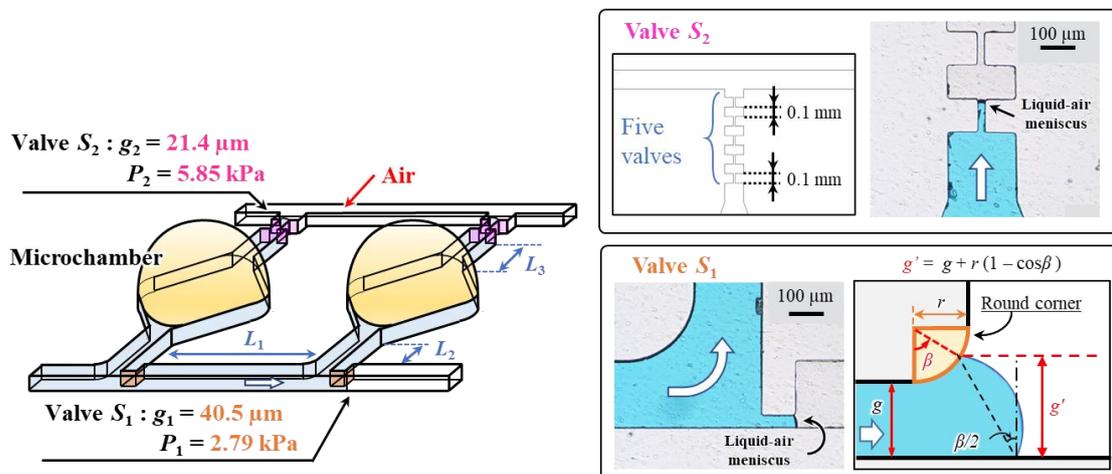


図 3.12 永久阻害バルブ S_2 に二面縦型相ガイドを組み込んだ反応容器形状

この二面縦型相ガイドの決壊圧力の理論式は、一面縦型相ガイドの決壊圧力理論式 (3.2) を用いて次式を導くことができる。

$$P(g) = -\gamma \left(\frac{2\cos(\min(\theta_m + \beta, 180^\circ))}{g + 2r(1 - \cos\beta)} + \frac{\cos\theta_m + \cos\theta_f}{H} \right) \quad (3.7)$$

このとき、 γ は表面張力 ($\gamma = 0.73 \text{ mN}$)、 g は流路壁面からのギャップ長 ($= 21.4 \text{ }\mu\text{m}$)、 r は縦型相ガイドの角部半径 ($= 6.4 \text{ }\mu\text{m}$)、 H は流路高さ ($= 59.0 \text{ }\mu\text{m}$)、 θ_m は流路壁面の接触角 (PDMS/水: 108°)、 θ_f は流路底面の接触角 (日東電工両面テープ/水: 102°)、 β は角部でピン止めされているときの液面の流路幅方向に対する傾斜角度を示す。

永久阻害バルブ S_2 が一面縦型相ガイドの場合では、 4.47 kPa となるところを、二面縦型相ガイドでの決壊圧力は 5.58 kPa となり、1.3 倍に向上することができる。作製した二面縦型相ガイドを組み込んだ 1 列 10 連デバイスに青色着色液を圧力駆動ポンプによって導入した

ときの実験結果を図 3.13 に示す。なお、このとき使用したデバイスの寸法は流路幅 $W = 205.5 \mu\text{m}$ 、一時阻害バルブ S_1 のギャップ長 $g_2 = 40.5 \mu\text{m}$ 、 $L_1 = 5 \text{ mm}$ 、 $L_2 = 1 \text{ mm}$ 、 $L_3 = 0.2 \text{ mm}$ 、反応容器の幅 $C_w = 2.0 \text{ mm}$ 、反応容器の長さ $C_l = 5.3 \text{ mm}$ であった。

結果として、3.4.1 節で示した永久阻害バルブ S_2 が一面縦型相ガイドのデバイスでは導入流量 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ のとき 6 個しか分注できなかったのに対し、永久阻害バルブ S_2 を二面縦型相ガイドに改良したデバイスでは 10 個の反応容器に分注することが可能となった (図 3.13 (a))。このように、バルブのギャップ長を変えずに分注性能を改善できるため、作製コストが変わらないことを示している。しかし、図 3.13 (b) に示すように導入流量を $20 \mu\text{L}/\text{min}$ に上げた場合では、5 個の反応容器のみに、図 3.13 (c) に示すように導入流量 $50 \mu\text{L}/\text{min}$ では 2 個の反応容器のみしか分注することはできなかった。なお、この時の分注できた反応容器の数は、反応容器分注理論式 (3.3) に従って算出した理論分注数と一致している。

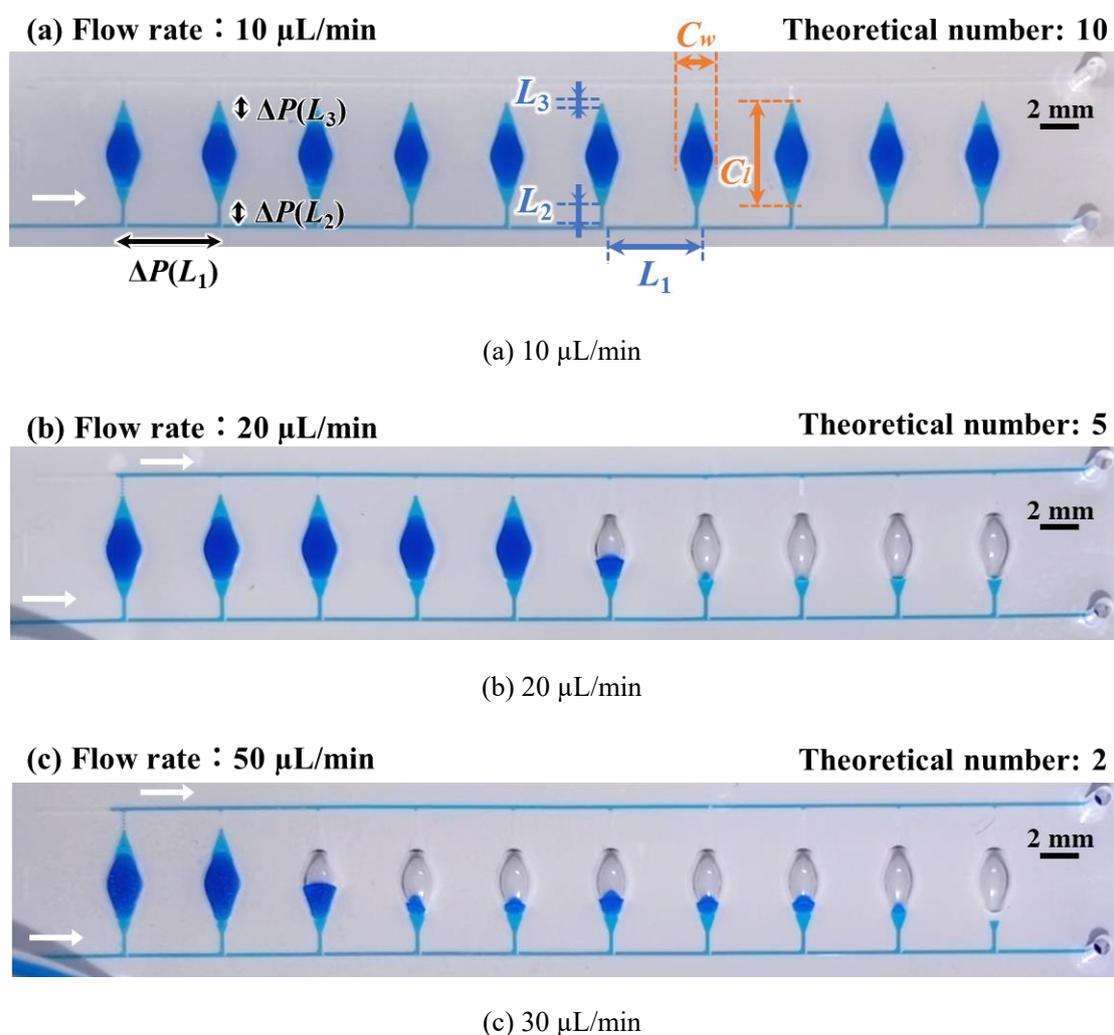


図 3.13 二面縦型相ガイドデバイス ($P_1 = 2.79 \text{ kPa}$, $P_2 = 4.47 \text{ kPa}$, $L_1 = 5 \text{ mm}$, $L_2 = 1 \text{ mm}$, $L_3 = 0.2 \text{ mm}$) への青色着色液の導入実験結果

3.5.2 エアープラグインバルブ構造の提案

前節 3.5.1 節では、永久障害バルブを 2 面相ガイドに改良したことで、導入流量の改善はできたものの、流路長 $\Delta P(L_1)$ の伸長に伴う圧力損失の増加は防ぐことができず、導入流量の増加ならびに導入可能な反応容器の個数には制約があることを示した。そこで、制約を排除するために、図 3.14 に示すように、空気の排出流路内に永久障害バルブ S_2 を設置し、個々の反応容器には左右 2 箇所バルブ構造を配置した流路デザインを考案した（以下、エアープラグインバルブ）。

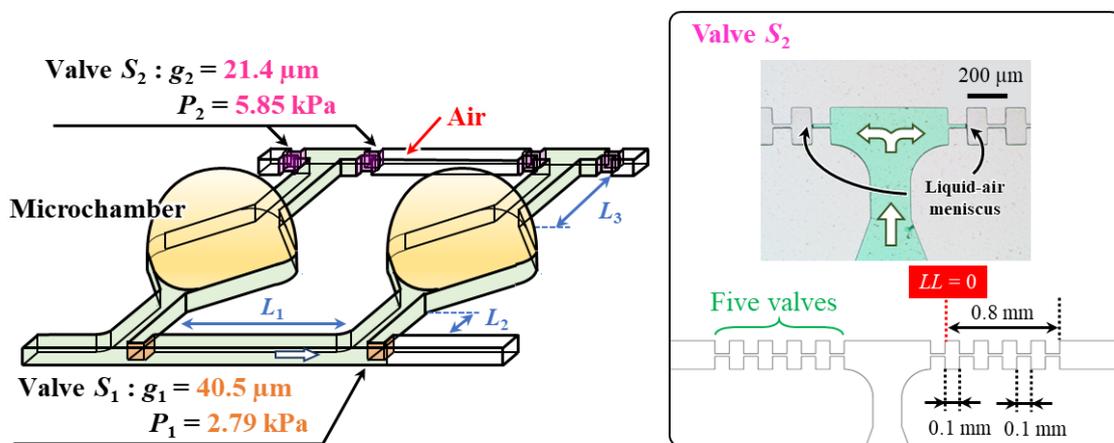


図 3.14 エアープラグインバルブを組み込んだ反応容器の概略図

このエアープラグインバルブは、隣接する反応容器が液体で満たされると、対向する永久障害バルブ S_2 間に空気を封入することができる。このとき、対向する永久障害バルブ S_2 に到達した液体は空気を介して左右から互いに押し合うため、永久障害バルブ S_2 にかかる圧力が減殺される。このため、永久障害バルブ S_2 の決壊圧力 P_2 は、次の反応容器を充填するまでに必要な次式の耐圧性能に設計すればよいことになる。

$$P_2 > P_1 + \Delta P(L_1) + \Delta P(L_2) + \Delta P(L_3) \quad (3.8)$$

ここで、 P_2 は反応容器の永久障害バルブ S_2 の決壊圧力(= 5.85 kPa)、 P_1 は一時障害バルブ S_1 の決壊圧力(= 2.79 kPa)、 $\Delta P(L_1)$ 、 $\Delta P(L_2)$ 、 $\Delta P(L_3)$ は図 3.14 中の各流路長で損失する圧力を示している。

さらに、前述の通り、対向する永久障害バルブ S_2 の間で空気が封入されると、永久障害バルブ S_2 の耐圧性能は次式の条件まで減殺されることになる。

$$P_2 > \Delta P(L_1) \quad (3.9)$$

すなわち、本提案のエアープラグインバルブにすることで、反応容器の個数に依存しないことになる。このため、永久阻害バルブ S_2 が式(3.8)の耐圧性能を満たす最大流量以下では、理論上は無数個の反応容器への分注が可能となる。

図3.15に導入流量 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で反応容器10個を満たしたあとの各反応容器の永久阻害バルブ S_2 にかかる印加圧力の関係を示す。1番目の反応容器の永久阻害バルブ $S_2(1)$ には 11.02 kPa が印加されているが、対向する2番目の反応容器の永久阻害バルブ $S_2(2)$ に 10.13 kPa が印加されており、バルブ $S_2(1)$ 方向に空気を介して押し返している。そのため、永久阻害バルブ $S_2(1)$ への圧力は減殺され、結果として 0.89 kPa が印加されているということがわかる。この動作を繰り返すため、どの永久阻害バルブ S_2 の場所においても印加圧力は等しくなる。

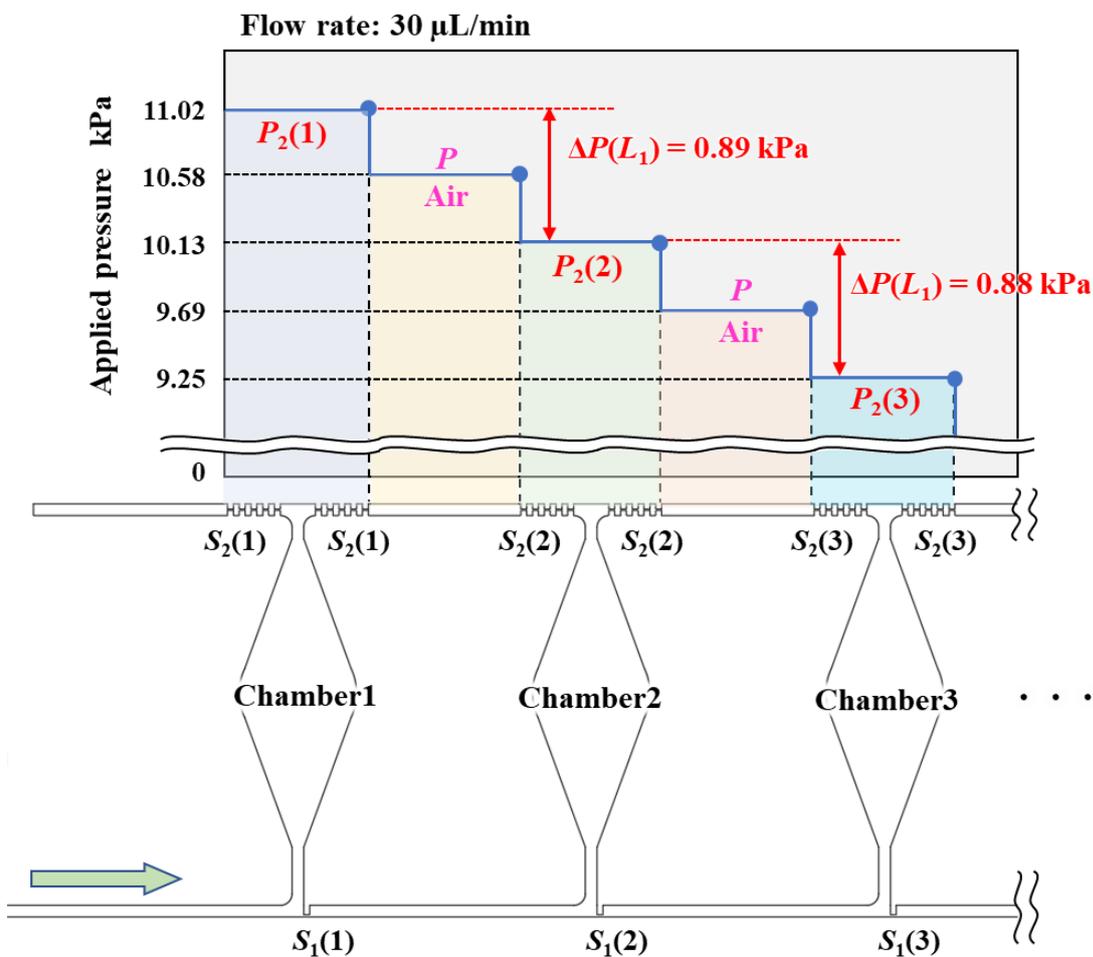


図 3.15 各バルブにかかる圧力の理論値 (バルブ間の空気を介して左右から液体が押し合うため圧力が減殺され、各バルブにかかる印加圧力は全て等しくなる)

図 3.16 にエアープラグインバルブを実装した 1 列 10 連デバイスへ圧力駆動ポンプを用いて導入流量 10, 30, 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ で緑色着色液を導入したときの実験結果を示す. このとき, 一時阻害バルブ S_1 のギャップ長 $g_1 = 39.6 \mu\text{m}$, 永久阻害バルブ S_2 のギャップ長 $g_2 = 20.9 \mu\text{m}$, 流路高さ $H = 59.0 \mu\text{m}$, $L_1 = 5 \text{ mm}$, $L_2 = 1 \text{ mm}$, $L_3 = 0.2 \text{ mm}$ のデバイスを使用した. 実験結果から, 導入流量 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ でも導入することができることを示した. この流量は, 本実験のデバイスにおいて反応容器分注理論式(3.3)で計算される最大流量であり, 理論式の妥当性を示した. これにより, 10 個の反応容器を満たすことのできる最大導入流流量が 2 面縦型相ガイドを組み込んだデバイスへの導入流量の 7 倍 (10 $\mu\text{L}/\text{min}$), 2 章で示した横型相ガイドを組み込んだデバイスの導入流量の 14 倍 (5 $\mu\text{L}/\text{min}$) の向上を実現した.

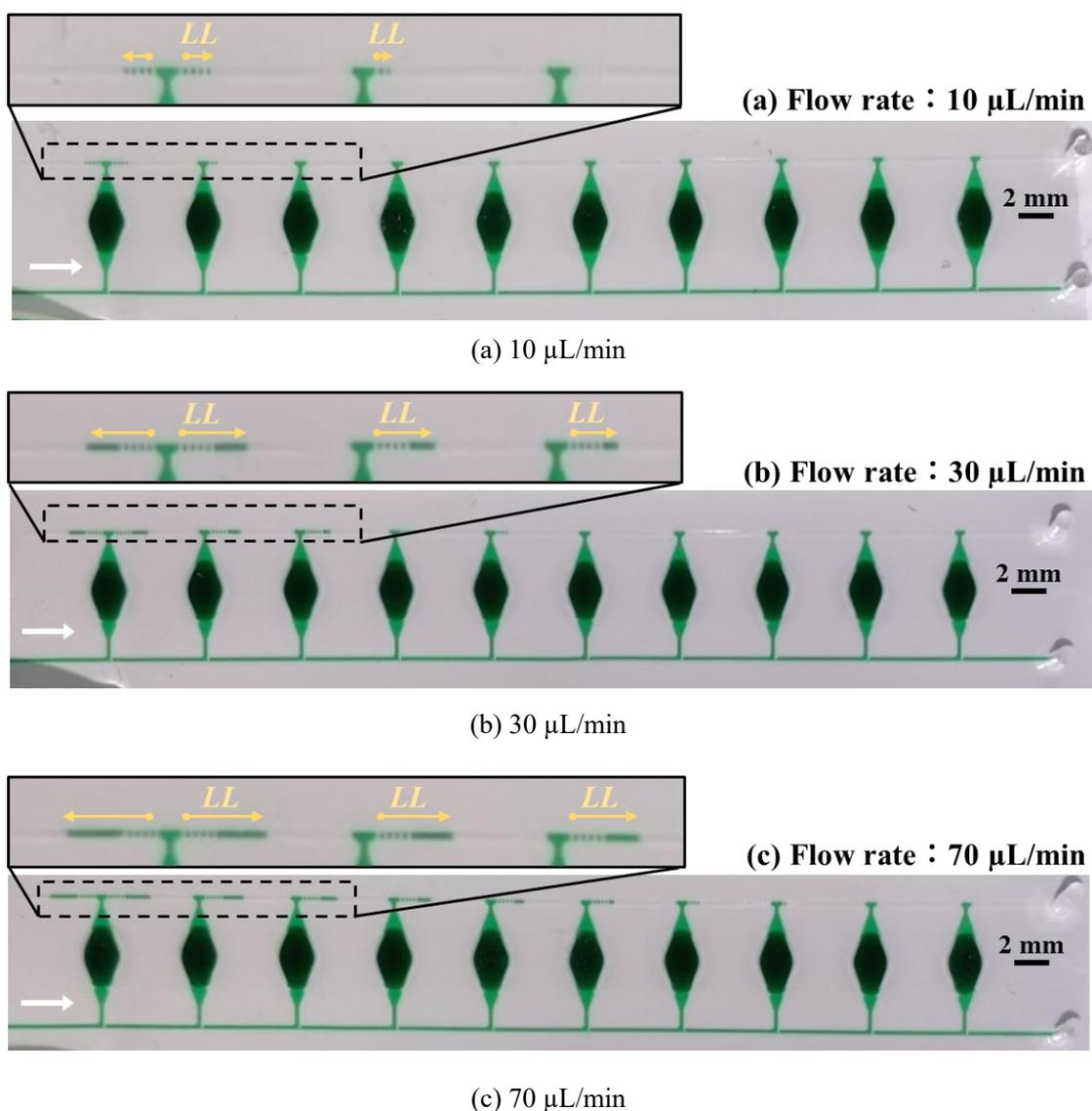


図 3.16 エアープラグインバルブを実装した 1 列 10 連デバイスへの緑色着色液の導入実験結果

従来, 図 3.13 で示したデバイスでは, 反応容器分注理論式 (3.3) で示したように, 永久阻害バルブ圧力 S_2 の決壊圧力と流路長による圧力損失の関係から, 駆動ポンプやシリンジポンプによって $10 \mu\text{L}/\text{min}$ と小さい導入流量で導入する必要があった. しかし, 図 3.17 に示すように, エアープラグインバルブを実装したことで, 耐圧性能が向上し, 結果として, 本デバイスへ手動による液体の導入が行えることを実証した (推定平均流量: $\sim 40 \mu\text{L}/\text{min}$).

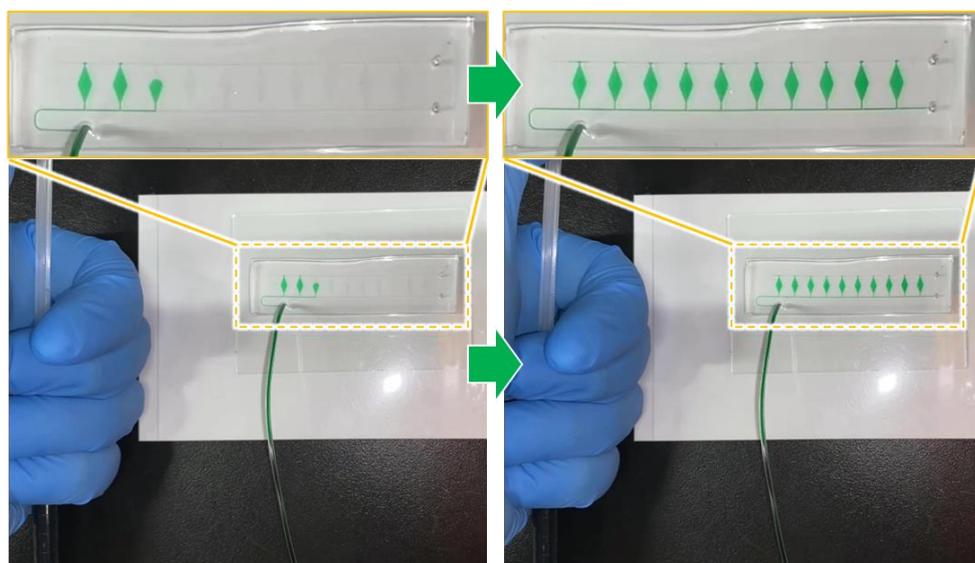


図 3.17 エアープラグインバルブを実装したデバイスへの手動による導入実験 (推定平均流量: $\sim 40 \mu\text{L}/\text{min}$)

3.5.3 空気排出流路内への液漏れ現象の考察

前節の図 3.16 の実験中, 黄色の矢印で示した箇所で永久阻害バルブ S_2 からの液漏れを確認した. これは, デバイス素材に用いた PDMS の高い透過性によって, 封入した空気が内圧の上昇に伴い漏出したと推察される⁹⁻¹³⁾.

そこで, 液体導入後のデバイスの写真から画像解析ソフト (ImageJ) を用いて, 各反応容器における長さ LL (リーク長と定義) を解析した. なお, PDMS デバイスと両面テープ (シリコーン接着面) との界面における空気漏れの影響を調べるため, PDMS 薄膜をコーティングした 4 インチガラスウエハ上に大気プラズマによって接合した PDMS デバイスを作製し, 比較を行った. 図 3.18 にその結果を示す. なお, 導入実験は 3 回繰り返し行い, グラフ中の各データ点は 3 回の平均値および標準偏差を示している. 図 3.18 より, 2 種類のデバイスの間には有意な差がないことがわかる. そのため, PDMS デバイスと両面テープの界面での空気漏れは無視できるものとした. また, 1 番目と 2 番目の反応容器の間に封入された空気内へのリーク長 LL は下流に位置する他の封入された空気内よりも長いことを確認した. これは, 隣接する永久阻害バルブ S_2 の間に空気を封入した後, すべてのバルブ S_2 には式 (3.9)

で示す圧力 $\Delta P(L_1)$ が、みかけ上作用しているが、封入された空気には、式 (3.3) で示す内圧 $P_1 + (m - 1)\Delta P(L_1) + \Delta P(L_2) + \Delta P(L_3)$ が作用していることが原因であると考えられる (図 3.14 参照)。したがって、リーク長 LL は、エアープラグインバルブがより上流に位置するだけでなく、より高い導入流量による圧力損失の増加によっても長くなる結果からもわかる。

図 3.19 は PDMS 薄膜をコートした 4 インチガラスウエハとプラズマ接合したデバイスを用いた実験結果を各封入空気にかかる内圧 (P) と時間の自然対数 ($\ln(t)$) の積の関数としてプロットしているグラフである。このとき、内圧 P は式 (3.3) により予測された値、 t は 10 個の反応容器を完全に満たした時点での経過時間とした。グラフに示すように、リーク長 $LL \geq 0.8 \text{ mm}$ の条件下において、次式で近似できることがわかった。

$$LL \propto P \times \ln(t) \quad (3.10)$$

したがって、マイクロ流体デバイスの設計段階においてもリーク長 LL を理論的に予測することができる。なお、ポンプでのマイクロ流体デバイスへの液体の流入を停止した後、導入口に挿入したチューブを取り外すとマイクロ流路の内圧が大気圧まで直ちに低下するため、エアープラグインバルブへのリーク速度が大幅に減少する。この液漏れの問題を解決する根本的な方法としては、PDMS をポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリカーボネート (PC)、シクロオレフィンポリマー (COP) など、ガス透過性の低いプラスチック材料に置き換えることが有効である。

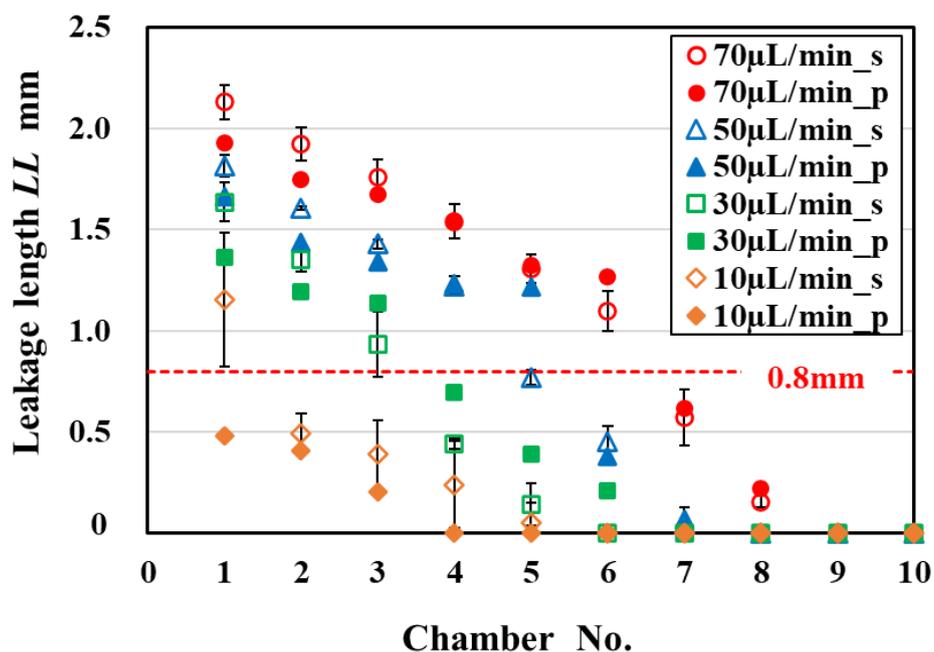


図 3.18 各導入流量における各反応容器の永久障害バルブ S_2 からのリーク長 (LL)

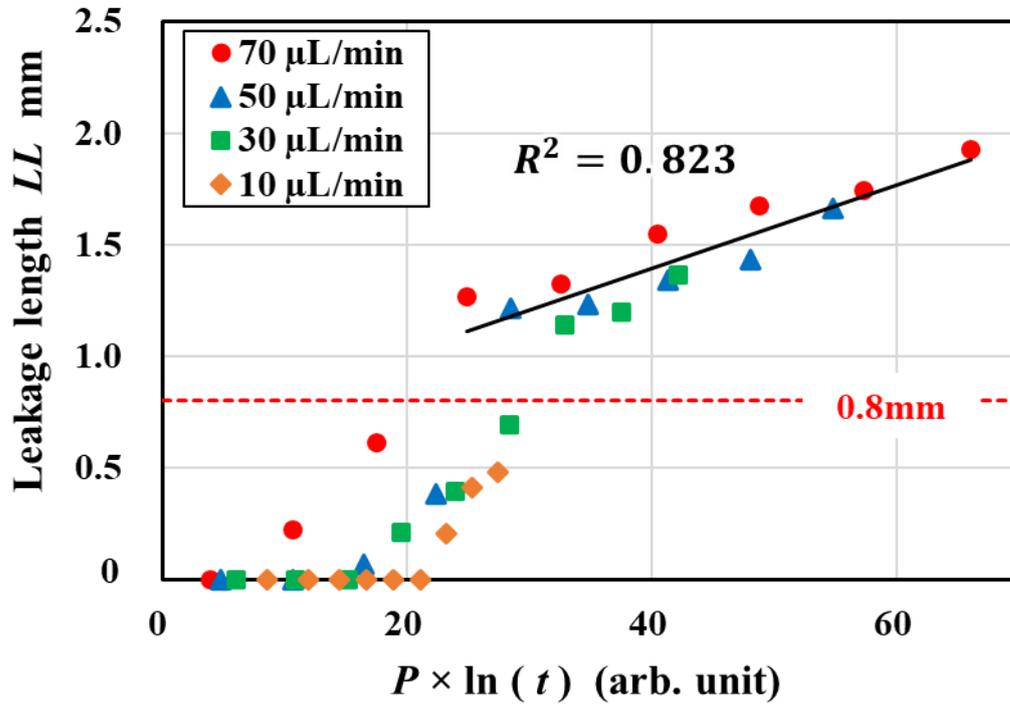


図 3.19 各流量における液漏れ長さ LL の解析結果

表 3.4 に各反応容器におけるリーク長 LL の実測値と印加圧力の計算結果を示す。

表 3.4.4 インチガラスウエハ上に製膜した PDMS 薄膜と共有結合した PDMS を用いたリーク長 LL および導入流量に対する印加圧力の解析結果

Flow rate: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$

Chamber No. (n -th)	LL (mm)	$P_2(n)$ (kPa)	$P_2(n+1)$ (kPa)	P (kPa)	t (s)	$P \times \ln(t)$
1	0.48	5.53	5.24	5.39	162.0	27.40
2	0.41	5.24	4.94	5.09	144.0	25.30
3	0.20	4.94	4.65	4.80	126.0	23.19
4	0	4.65	4.35	4.50	108.0	21.07
5	0	4.35	4.06	4.21	90.0	18.92
6	0	4.06	3.76	3.91	72.0	16.72
7	0	3.76	3.47	3.61	54.0	14.42
8	0	3.47	3.17	3.32	36.0	11.90
9	0	3.17	2.79	2.98	18.0	8.62
10	0	2.79	0	1.40	0	—

Flow rate: 30 $\mu\text{L}/\text{min}$

Chamber No. (n -th)	LL (mm)	$P_2(n)$ (kPa)	$P_2(n+1)$ (kPa)	P (kPa)	t (s)	$P \times \ln(t)$
1	1.37	11.02	10.13	10.58	54.0	42.19
2	1.20	10.13	9.25	9.69	48.0	37.51
3	1.14	9.25	8.36	8.80	42.0	32.91
4	0.69	8.36	7.48	7.92	36.0	28.38
5	0.39	7.48	6.59	7.03	30.0	23.92
6	0.21	6.59	5.71	6.15	24.0	19.54
7	0	5.71	4.82	5.26	18.0	15.21
8	0	4.82	3.93	4.38	12.0	10.88
9	0	3.93	2.79	3.36	6.0	6.02
10	0	2.79	0	1.40	0.0	—

表 3.4 4 インチガラスウエハ上に製膜した PDMS 薄膜と共有結合した PDMS を用いたリーク長 LL および導入流量に対する印加圧力の解析結果

Flow rate: 50 $\mu\text{L}/\text{min}$

Chamber No. (n -th)	LL (mm)	$P_2(n)$ (kPa)	$P_2(n+1)$ (kPa)	P (kPa)	t (s)	$P \times \ln(t)$
1	1.66	16.50	15.03	15.77	32.4	54.84
2	1.44	15.03	13.55	14.29	28.8	48.02
3	1.34	13.55	12.08	12.81	25.2	41.35
4	1.23	12.08	10.60	11.34	21.6	34.84
5	1.22	10.60	9.12	9.86	18.0	28.50
6	0.38	9.12	7.65	8.39	14.4	22.37
7	0.07	7.65	6.17	6.91	10.8	16.44
8	0	6.17	4.70	5.43	7.2	10.73
9	0	4.70	2.79	3.74	3.6	4.79
10	0	2.79	0	1.40	0	—

Flow rate: 70 $\mu\text{L}/\text{min}$

Chamber No. (n -th)	LL (mm)	$P_2(n)$ (kPa)	$P_2(n+1)$ (kPa)	P (kPa)	t (s)	$P \times \ln(t)$
1	1.93	21.99	19.92	20.96	23.4	66.07
2	1.74	19.92	17.86	18.89	20.8	57.33
3	1.67	17.86	15.79	16.82	18.2	48.81
4	1.55	15.79	13.72	14.76	15.6	40.54
5	1.33	13.72	11.66	12.69	13.0	32.55
6	1.27	11.66	9.59	10.62	10.4	24.88
7	0.62	9.59	7.52	8.56	7.8	17.58
8	0.23	7.52	5.46	6.49	5.2	10.70
9	0	5.46	2.79	4.12	2.6	3.94
10	0	2.79	0	1.40	0	—

このとき、 LL は実験結果より得られたリーク長、 P は排気流路内に向かい合う永久阻害バルブ S_2 間に捕捉された空気に印加される圧力の理論値 $\{P_2(n) + P_2(n+1)\}/2$ 、 t はその反応容器が分注されてから、10 個目の反応容器が満たされるまでの時間を示している。

3.6 結言

本章では、反応容器へ逐次分注するための流路デザインの課題に対し、流路幅方向のギャップ長で決壊圧力を制御する縦型相ガイドを開発した。これにより、1段階のプロセスによって作製が可能となっただけでなく、一時阻害バルブと永久阻害バルブの決壊圧力比も改善された。また、反応容器分注理論式を構築したことで、各バルブの設計制約を明らかにし、実験による理論検証を行った。さらに、エアープラグインバルブを開発したことで、反応容器への最大導入流量の飛躍的な向上を実現し、分注可能な反応容器の個数の制約を理論上排除することができた。得られた結果をまとめると次のとおりである。

- (1) 新規に流路幅方向のギャップ長で決壊圧力を制御する縦型相ガイドを考案し、作製プロセスの簡略化、一時阻害バルブ S_1 と一時阻害バルブ S_2 の決壊圧力比を改善することができた。
- (2) 反応容器への分注理論を構築し、各バルブにかかる設計制約を明らかにした。
- (3) 永久阻害バルブ S_2 を空気排出流路内に配置したエアープラグインバルブを考案した。エアープラグインバルブを実装することで、最大導入流量 $70 \mu\text{L}/\text{min}$ を実現した（従来比 14 倍）。さらに、理論式より反応容器の個数の制約を排除することができ、診断項目数の増加を可能にした。
- (4) デバイス材料（PDMS）に起因する封入した空気への液漏れを調査したところ、空気への内圧と印加時間によりリーク長を予測できることを示した。

参考文献

- [1] M. Yamada, and M. Seki, "Nanoliter-sized liquid dispenser array for multiple biochemical analysis in microfluidic device", *Anal. Chem.*, 76(4), 895-899, (2004)
- [2] F. Sun, A. Ganguli, J. Nguyen, R. Brisbin, K. Shanmugam, D. L. Hirschberg, M. B. Wheeler, R. Bashir, D. M. Nash, and B. T. Conningham, "Smartphone-based multiplex 30-minute nucleic acid test of live virus from nasal swab extract", *Lab Chip*, 20(9), 1621-27, (2020)
- [3] M. Dou, D. C. Dominguez, X. Li, J. Sanchez, and G. Scott, "A versatile PDMS/Paper hybrid microfluidic platform for sensitive infectious disease diagnosis", *Anal. Chem.*, 86(15), 7978-86, (2014)
- [4] B. Hagemeyer, F. Zechall, and M. Stelzle, "Towards plug and play filling of microfluidic devices by utilizing networks of capillary stop valves", *Biomicrofluidics*, 8(5), 056501, (2014)
- [5] C. Liu, M. G. Mauk, R. Hart, M. Bonizzoni, G. Yan, and H. H. Bau, "A low-cost microfluidic chip for rapid genotyping of malaria-transmitting mosquitoes", *PLoS One*, 7(8), e42222, (2012)
- [6] D. Natsuhara, R. Saito, H. Aonuma, T. Sakurai, S. Okamoto, M. Nagai, H. Kanuka, and T. Shibata, "A method of sequential liquid dispensing for the multiplexed genetic diagnosis of viral infections in a microfluidic device", *Lab Chip*, 21(24), 4779-90, (2021)
- [7] D. Natsuhara, S. Misawa, R. Saito, K. Shirai, S. Okamoto, M. Nagai, M. Kitamura, and T. Shibata, "A microfluidic diagnostic device with air plug-in valves for the simultaneous genetic detection of various food allergens", *Sci. Rep.*, 12, 12852, (2022)
- [8] H. Bruus, "Theoretical microfluidics", *Oxford master series in condensed matter physics (Oxford Univ. Press)*, 18, (2008)
- [9] L. Xu, H. Lee, D. Jetta, and K. W. Oh, "Vacuum-driven power-free microfluidics utilizing the gas solubility or permeability of polydimethylsiloxane (PDMS)", *Lab Chip*, 15(20), 3962-79, (2015)
- [10] A. Singh, B. D. Freeman, and I. Pinnau, "Pure and mixed gas acetone/nitrogen permeation properties of polydimethylsiloxane [PDMS]", *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.*, 289-301, (1998)
- [11] L. Xu, H. Lee, K. and W. Oh, "Syringe-assisted point-of-care micropumping utilizing the gas permeability of polydimethylsiloxane", *Microfluidics Nanofluidics*, 17, 745-50. (2014)
- [12] M. A. Eddings, and B. K. Gale, "A PDMS-based gas permeation pump for on-chip fluid handling in microfluidic devices", *J. Micromech. Microeng.*, 16, 2396-2402, (2006)
- [13] N. B. Trung, M. Saito, H. Takabayashi, P. H. Viet, E. Tamiya, and Y. Takamura, "Multi-chamber PCR chip with simple liquid introduction utilizing the gas permeability of polydimethylsiloxane", *Sens. Actuators B Chem.*, 149(1), 284-90, (2010)

第4章 非対称構造を有する高効率マイクロミキサの開発

4.1 緒言

マイクロ流路内では、レイノルズ数 Re が低いため、流体は層流になってしまう。そのため、2液を導入したさいに効率よく混合させるマイクロミキサの研究は、 μ TAS 分野の黎明期から活発に研究がなされてきた¹⁻³⁾。マイクロミキサは、その混合の方法から能動ミキサ（アクティブミキサ）と受動ミキサ（パッシブミキサ）に大別される⁴⁻⁶⁾。

アクティブミキサの場合、圧電素子を流路中に組み込むことで発生する音響波や、くし歯形状の電極を組み込むことによる表面弾性波、振動子を組み込むことによる振動波などを活用する。アクティブミキサは、広いレイノルズ数範囲 ($0.01 < Re < 100$) において、短い流路長および混合時間で 90% 以降の高い混合効率を実現することができる。しかし、これらは、素子の組み込みのためにデバイスのコストが高くなってしまい、なおかつ、素子を駆動するための設備を必要とするため、システム全体が大きくなってしまう。一方、パッシブミキサは、マイクロ流路へ液体を導入するポンプ以外の外部機器を必要としない。そのため、使い捨ての診断デバイスにはパッシブミキサが適している。しかし、パッシブミキサは、アクティブミキサと比較して、一般的に混合性能が低く、混合プロセスは主に分子拡散または、カオス流れに依存している。

パッシブミキサの中には、さらに 2 次元 (2D) 構造と、3 次元 (3D) 構造の 2 種類の形状がある。代表的なパッシブミキサの形状と混合効率を表 4.1 に示す。2D 構造では、T 字型や Y 字型のマイクロミキサが最も単純な形状をしている。しかし、効率よく混合できるのは高いレイノルズ数 ($Re > 400$) 条件下に限られている。他にも、曲線形状や、ジグザグ形状、流路内に障害物が設けられたマイクロミキサなどが提案されてきたが、極めて低いレイノルズ数 ($Re < 1$) の条件下あるいは、比較的高いレイノルズ数条件下でのみ混合効率が高いことを示している。一方、診断デバイスなどの実用上の流量相当のレイノルズ数 $Re = 1 \sim 10$ の流れでは混合が困難であることが分かる。一方で、3D 構造では、Strook ら²¹⁾が提案したカオティックミキサはマイクロ流路内に周期的な段差形状を設けることでカオス流れを起こすことができる。斜め向きの凸構造または、ヘリンボーン形状の凸構造をマイクロ流路の底面に作製し、断面横断方向の流れを生成できることを示した。Lanovska ら²²⁾は、ヘリンボーン形状の凸構造を設けることで広いレイノルズ数 ($0.3 < Re < 90$) の条件下において送液距離 10mm で 90 % 以上の混合効率を示すことを実証した。しかし、このカオティックミキサは作製工程に凸構造を形成するために 2 段階のプロセスを必要とするため、長時間を要し、診断デバイスへの実装を想定すると費用対効果が低い。

そこで本章では、1 回のプロセスで作製可能な 2D 構造のマイクロミキサ形状を検討し、流路長手方向中心線に対し、非対称な形状のミキサが広い Re 数条件下で高い混合性能を示すことを明らかにした。さらに、開発した非対称形状ミキサの混合メカニズムを考察した²⁴⁾。

表 4.1 代表的な受動マイクロミキサの混合効率

Dimension	Categories	Characteristics	Re	Mixing efficiency (max.)	Mixing efficiency (min.)	Ref.	
2D	Lamination	T-shaped	100–1400	~100% ^f ($Re = 400–500$)		[7] ^c	
		T-shaped	0.5–550	~98% ^f ($Re > 300$)	10% ($Re = 3–35$)	[8] ^a	
		Modified 2D Tesla	0.1–10	~90% ^f ($Re = 5–10$)		[9] ^c	
		Modified 2D Tesla	0.05–40	80–90% ^d ($Re = 0.05, Re = 40$)	< 40% ($Re = 2$)	[10] ^b	
	Serpentine	Asymmetric split-and-recombine (P-SAR)	1–100	86% ^d ($Re = 80$)	< 20% ($Re = 10$)	[11] ^c	
			Curved, square-wave, and zigzag	0.267–267	90% ^d ($Re = 267$)	10% ($Re = 5–15$)	[12] ^b
			Curved, square-wave, and zigzag	0.1–100	95% ^c ($Re = 100$)	40–50% ($Re = 1$)	[13] ^c
		Zigzag	0.309–309	90% ^c ($Re > 100$)	40% ($Re = 30$)	[14] ^a	
			Ellipse-curved	0.1–100	90% ^d ($Re = 0.1, Re > 80$)	25% ($Re = 1–10$)	[15] ^c
			Logarithmic spiral	1–70	80–86% ^f ($Re = 1, Re = 67$)	53% ($Re = 15$)	[16] ^c
		Obstacle	Triangle baffles	0.1–500	86% ^d ($Re = 0.1$)	58% ($Re = 500$)	[17] ^c
				Parallelogram	0.29	80% ^d ($Re = 0.29$)	
			3D	Lamination	3D Tesla	0.1–100	95% ^c ($Re = 0.1–100$)
Sifted trapezoidal blades	0.5–100	80–95% ^c ($Re = 0.5–100$)				[20] ^c	
Obstacle (Chaotic mixer)	Staggered herringbone (SHM)	0.2–90		90% ^d ($Re = 0.2–90$)		[21] ^a	
	Staggered herringbone (SHM)	0.3–90		90% ^d ($Re = 0.3–90$)		[22] ^a	
	Barrier-embedded (BEM)	0.2–2		80–90% ^f ($Re = 0.2–2$)		[23] ^a	

^a Research including only experimental results. ^b Research including only numerical simulation results. ^c Research including experimental and numerical simulation results. ^d Mixing efficiency (ME) is defined as follows:

$ME = 1 - \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (c_i - \bar{c})^2}}{SD_0}$, where N is the total number of sampling points across the width of the microchannel, and c_i and \bar{c} are the point concentration (or pixel intensity) and the mean concentration (or pixel intensity), respectively. SD_0 is the maximum standard deviation in the non-mixing region at the inlet of the microchannel. ^e

Mixing efficiency (ME) is defined as follows: $ME = 1 - \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (c_i - \bar{c})^2}}{\bar{c}}$. ^f Mixing efficiency is defined in different ways.

4.2 実験方法

4.2.1 数値流体解析方法

本研究で開発するマルチプレックス遺伝子診断デバイスに実装するマイクロミキサの数値流体解析手法を示す。解析には、有限要素法 (FEM) による数値流体解析ソフトである COMSOL (COMSOLAB 社 COMSOL Multiphysics ver.5.4) を用いた。混合現象には、COMSOL の单相流および希釈種輸送モジュールを連成させて、定常状態での解析を行った。流体は非圧縮性と仮定し、流路壁面の境界条件は滑りなしとした。解析に使用したマイクロミキサの有限要素モデル (約 18 万要素) は、解析時間を短縮するために混合ユニット数を減らした。導入する流体は水と設定し、2 つの混合する流体の密度は $1.0 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ 、動粘度は $1.0 \times 10^3 \text{ kg/m} \cdot \text{s}$ とした。2 つの流体の混合には、 0 mol/m^3 および、フルオレセイン 1 mol/m^3 とし、拡散係数にはフルオレセインの 25°C における $4.25 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ を使用した³⁾。各流入境界条件は流速をそれぞれ $8.3 \times 10^{-3} \text{ m/s}$ ($5 \mu\text{L}/\text{min}$ に相当) となるよう設定し、流出口の境界条件は圧力がゼロとなるようにした。

混合効率 (Mixing efficiency, ME) の評価には、式 (2.3) を用いた。なお、 SD_0 と SD_x はそれぞれ、マイクロ流路の入口 ($x = 0 \text{ mm}$, 混合ユニットの入口から $270 \mu\text{m}$ 離れた位置) および出口 (流路長手方向の任意の位置) における流路断面全体の濃度の標準偏差を示す。

4.2.2 混合効率および圧力損失の評価方法

マイクロミキサの混合効率の評価実験には、図 2.12 で示したように、2 台のシリンジポンプ (ワイエムシイ, YSP-301) を用いて、1 mL シリンジ (MonotaRO 社 MDS-1mL, PP 製) に 22G ノンベベル針 (テルモ NN-2238N) を取り付け、ビニルチューブ (イワセ EXLON-PVC, 内径 0.55 mm, 標準肉厚 0.40 mm) を先端に接続し、純水ならびにフルオレセイン (東京化成工業 Acid Yellow 73) 0.1 mol/m^3 (0.1 mM) を各流入口より導入流量 $0.5 \sim 50 \mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 0.13 \sim 13$) で導入した。二液の混合挙動を観察するために、倒立蛍光顕微鏡 (ニコン TE2000-U) を使用し、ロングパス蛍光フィルター (ニコン B-2A, EX: 470/40 nm, DM: 455 nm, BA: 460 nm) を用いた。得られた画像は、画像解析ソフト ImageJ (National Institutes of Health 社 バージョン 1.53e) を用いて、マイクロ流路上面の蛍光強度の標準偏差を解析した。各計測点における標準偏差から式 (2.3) を用いて混合効率を算出した。

圧力損失の評価実験には、図 3.1 で示した流量センサ (Fluigent 社 Flow Unit M) を備え付けた最大印加圧力の異なる 2 種類の圧力駆動マイクロポンプ (Fluigent 社 Flow EZ 345 mbar: $1 \sim 10 \mu\text{L}/\text{min}$, Flow EZ 7000 mbar: $20 \sim 100 \mu\text{L}/\text{min}$) を使用した。マイクロポンプはマイクロ流路に導入される青色着色液 ($0.1\% \text{ w/v}$) の流量を制御する。なお、本実験では、2 つある流入口の片側のみを使用し、流路の送液に必要な全体の圧力損失を測定した。

4.3 数値流体解析によるミキサ構造の検討

2次元形状の平面ミキサの最適形状について検討した。はじめに、図 4.1 に示すような(a) 周期形状ミキサ、(b) 対称形状ミキサ、(c) 非対称形状ミキサを数値解析ソフト (COMSOL) で数値流体解析を実施し、混合効率を調査した。周期形状ミキサは、マイクロ流路の両側壁面から向かい合う長方形の障害物構造 (幅 $50\ \mu\text{m}$, 長さ $60\ \mu\text{m}$) が規則的に配置され、 $80\ \mu\text{m}$ という狭い隙間が形成されている。対称形状ミキサは、ギャップ長が $40\ \mu\text{m}$ と $120\ \mu\text{m}$ を繰り返すように障害物を交互に配置している。なお、ギャップ間の距離の和は周期形状ミキサと等しくなるようにした。非対称形状ミキサは対称形状ミキサと同じギャップ長であるが、ギャップの中心位置が障害物構造ごとに異なるように設計している。

2液の液体 (フルオレセイン溶液 $1\ \text{M}$ と純水) を導入流量 $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 1.3$) となるよう導入したときの濃度コンター図および流線の解析結果を図 4.1 に示す。図 4.1 (a) の周期形状の流線はほぼ層流のパターンを示している。また、濃度コンター図では層流による2液の界面が見えており、流路長 $1.35\ \text{mm}$ で混合効率が 47% であることを示した。なお、FEMシミュレーションで自動生成された3次元メッシュモデルが流路長手方向の中心線に対して完全に対称ではないため、2液の流線は非対称となっている。図 4.1 (b) の対称形状ミキサでは、ギャップ長が $40\ \mu\text{m}$ と $120\ \mu\text{m}$ の箇所では規則的に流速が変化し、2つの液体は流路断面によって収縮と拡大を繰り返したため、混合効率が 68% に向上した。さらに、図 4.1 (c) の非対称形状ミキサでは、対称形状ミキサと同様に流速が変化することに加え、2つの流体の流れ方向を意図的に変えることができる。そのため、この非対称の障害物構造によって引き起こされる非対称な流れによって混合を顕著に促進し、混合効率を最大 84% まで大幅に向上させることが明らかとなった。

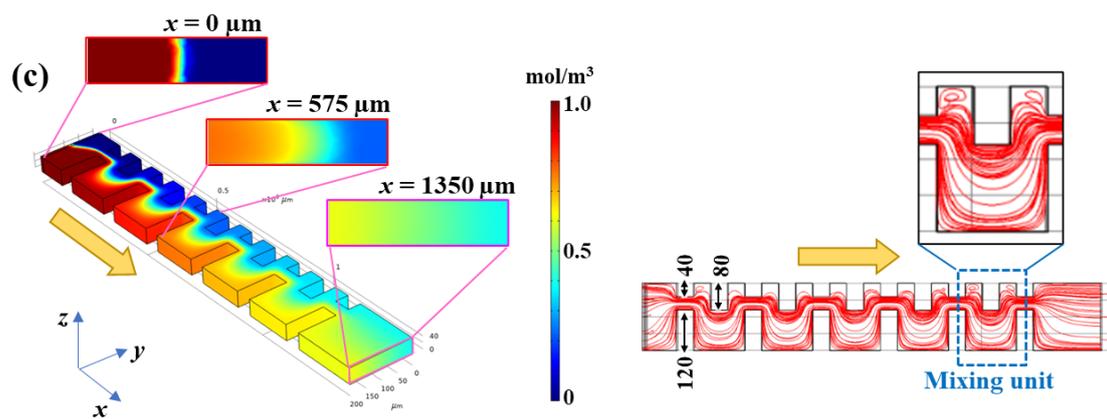
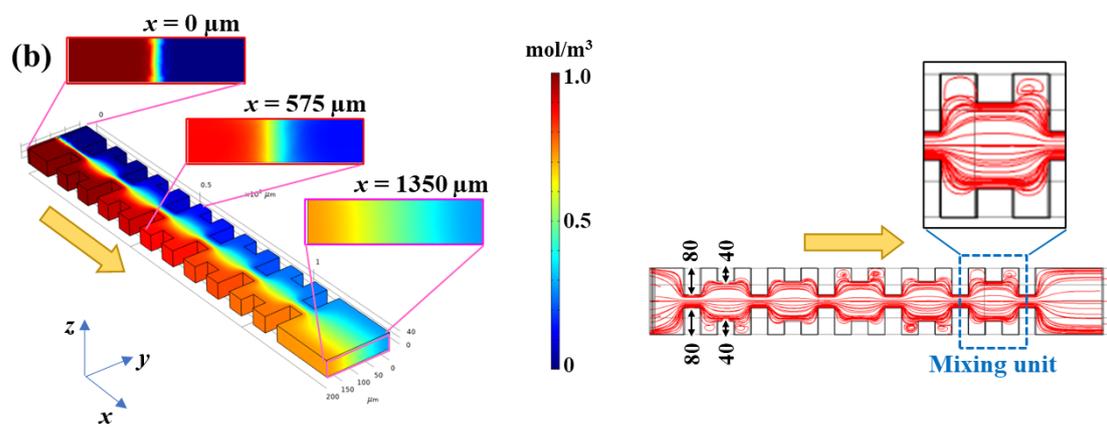
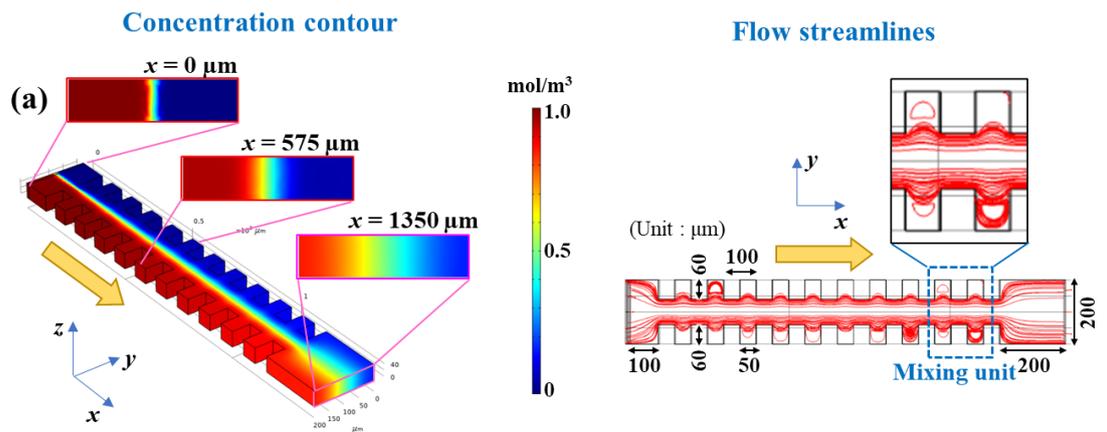


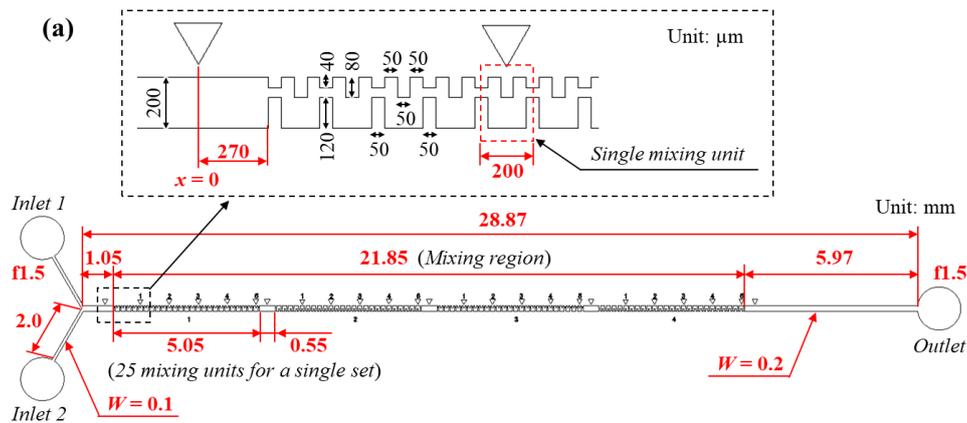
図 4.1 2D 平面ミキサの数値流体解析による濃度コンター図および流線分布

4.4 混合効率の実験的評価

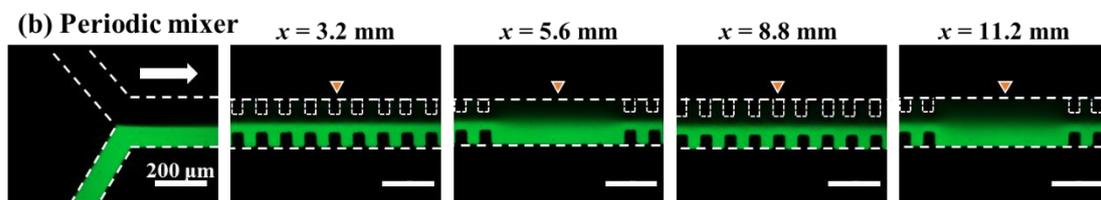
4.3 節のシミュレーション結果を検証するために、非対称ミキサの3種類の形状について（周期形状，対称形状，非対称形状）混合効率を実験的に調査した。

図 4.2 (a) に示すように、実験に用いた非対称ミキサは2種類の液体を2つの流入口に導入させ、Y字の形状をした長さ 28.87 mm の矩形断面形状のマイクロ流路を通過し、1つの排出口より吐出させるようにした。混合領域には、PDMS マイクロ流路（幅 200 μm ，高さ 54 μm ）内には25個1組の混合ユニットが4セット設けられている。合計100個の混合ユニットは各セット間の距離 0.55 mm を含めて、全体で 21.85 mm を有している。さらに、非対称形状ミキサの向きは1セット毎に、流路流れ方向に対して逆になるよう作製した。周期形状ミキサおよび対称形状ミキサも同様の構成で作製したが、幾何学的にはマイクロ流路長手方向の中心線に対して対称とした。

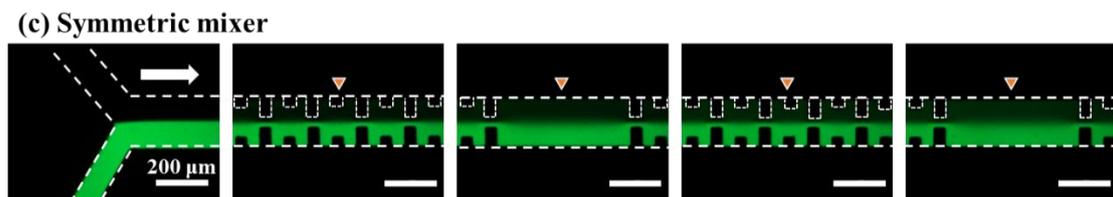
図 4.2 (b-d) に、2液（フルオレセイン溶液 100 μM および純水）をシリンジポンプにより導入流量各 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で導入したときの蛍光顕微鏡画像を示す。はじめ2セット（50個の混合ユニット）での5個の混合ユニットでの画像である。なお、本実験では、図 4.2 (a) で示すように、ゼロ位置（非混合の初期位置として $x = 0$ mm）を最初の混合ユニットの入口から 270 μm 離れた位置に設定した。蛍光画像中の逆三角形の箇所はゼロ位置からの距離 x mm を示している。



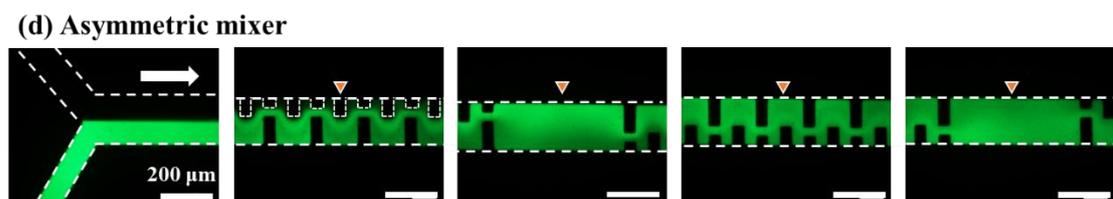
(a) 設計詳細



(b) 周期形状ミキサ



(c) 対称形状ミキサ



(d) 非対称形状ミキサ

図 4.2 マイクロミキサの設計詳細，蛍光試薬と純水を導入流量各 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ で導入したときの蛍光顕微鏡画像

シミュレーションの結果 (図 4.1) から予測されたように，図 4.2 (b) の周期形状ミキサでは，マイクロ流路壁面両側に障害物がないかのように，2つの流体は混合することのない層流を示した。図 4.2 (c) の対称形状ミキサでは，狭いギャップ長と広いギャップ長 ($40 \mu\text{m}$ および $120 \mu\text{m}$) の2種類を交互に通過し，流速は変化し，2液は収縮と拡大を繰り返してい

ることが予測されるものの、2つの流体は混合せず、安定した層流が維持されていた。一方、図 4.2 (d) の非対称形状ミキサでは、25 個の混合ユニット ($x = 5.6 \text{ mm}$) を通過した時点でも流路幅全体にフルオレセイン溶液による緑色蛍光が分布していることより、2液は十分に混合されていることが明らかになった。

図 4.3 に ImageJ を用いた画像解析によって得られた 3 種類のミキサの送液距離に対する混合効率を示す。なお、実験は 3 回繰り返して行い、グラフ中の各点は平均値と標準偏差を表している。また、コントロールとして、ミキサを設けていない矩形流路での解析結果も示している。結果より、ミキサのない矩形流路では、送液距離 20 mm に対し、わずか 10% の混合効率を示した。また、流路長手方向の中心線に対して対称な形状を有する周期形状ミキサおよび対称形状ミキサも送液距離 20 mm の時点でそれぞれ約 25 % と約 45 % と低い混合効率を示した。一方、非対称形状ミキサでは、送液距離 10 mm (25 個の混合ユニットの最初の 2 セットを通過後) で混合効率 80 % 以上を示し、その後、送液距離 15 mm (混合ユニット 3 セットを通過後) で 90 % 以上と非常に高い混合性能を示した。

これらの結果より、マイクロ流路の長手方向の中心線に対して非対称に配置された障害物によって 2 つの流体の流速と流れ方向が変化するという相乗効果により、非対称の幾何学的形状が混合性能を高めることが明らかとなった。

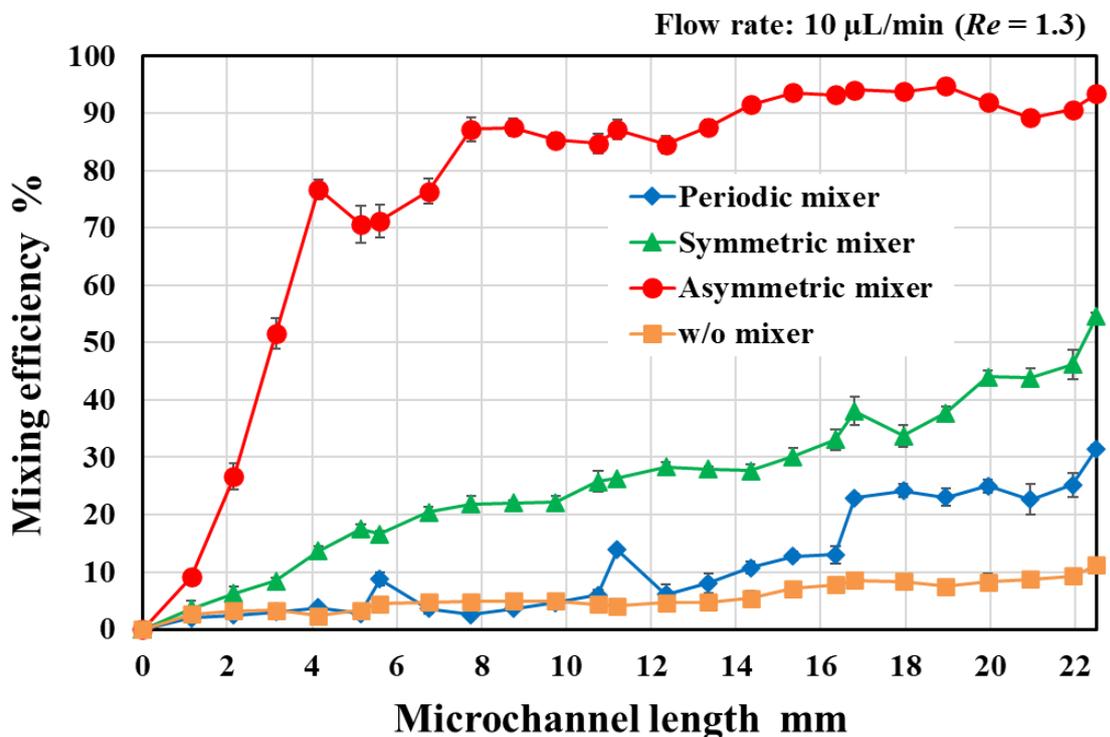


図 4.3 混合効率解析結果

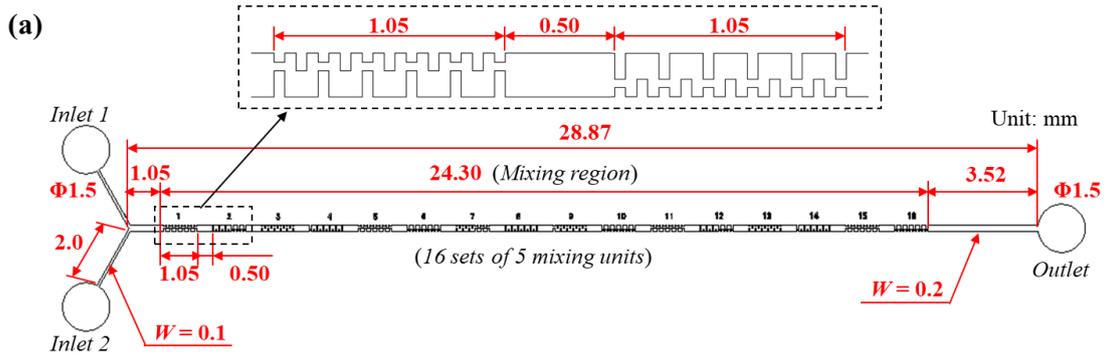
4.5 混合効率に及ぼす混合ユニット数の影響

非対称形状ミキサの 1 セット内での混合ユニット数が及ぼす混合効率への影響を実験的に調査した。図 4.4 (a) に、混合領域に 5 個の混合ユニットを 1 セットとし、16 セットで構成された非対称形状ミキサを示す。本実験では、図 4.3 (a) のミキサと同じ形状のミキサを使用した。ただし、各セット間には 0.50 mm の間隔を設け、マイクロ流路全体で 24.30 mm の長さを有している。非対称の障害物構造は 1 セット (5 個 1 組の混合ユニット) ごとに流路長手方向中心に対し逆転させた。

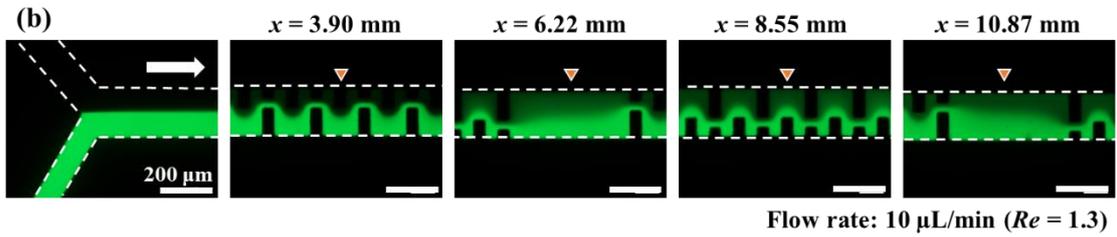
図 4.4 (b) に純水とフルオレセイン溶液をシリンジポンプによりそれぞれ 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (合計 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ $R_e = 1.3$) で導入したときの蛍光顕微鏡画像を示す。実験結果より、5 個 1 組の混合ユニットを 7 セット通過後 ($x = 10.87$ mm) も、2 つの流体は界面が徐々に消失したものの、界面は正弦波状にうねるだけで、安定した層流を維持した。また、マイクロ流路の幅方向で 2 つの流体の流れが交互に変化し、混合する挙動は見られなかった。

図 4.5 には、5 個 1 組の混合ユニットを 16 セット、25 個 1 組の混合ユニットを 4 セット、100 個 1 組の混合ユニット 1 セットを組み込んだ非対称形状ミキサでの混合実験結果を示す。25 個 1 組の混合ユニットを 4 セットと 100 個 1 組の混合ユニット 1 セットのミキサでは、混合効率に大きな差はなかった。一方で、5 個 1 組の混合ユニットを 16 セットでは効率的な混合が行えていないことがわかる。この結果より、非対称形状の障害物構造による混合が十分に進む前に障害物構造の向きをマイクロ流路の流れに対して反転させてしまうと、混合効率が低下することが示唆された。

この 5 個 1 組の混合ユニットを 1 個の混合ユニットとしてみなすと、ミキサ形状は流路長手方向中心に対して左右対称な形状になっていると考えられ、混合効率が低下したと考察できる。また、混合効率の解析結果より、混合ユニットの非対称な向きは少なくとも 4 mm の長さを維持する必要があると考えられ、約 20 個 1 組の混合ユニットを構成する必要があることがわかった。以上より、非対称形状ミキサを適切な流路長を超えるユニット数を構成すれば、混合を促進することができることを明らかにした。



(a) 5 個 1 組の混合ユニットを 16 セット実装した非対称形状ミキサの設計



(b) 純水とフルオレセイン溶液を 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で導入したときの蛍光顕微鏡画像

図 4.4 混合ユニット数を変えた非対称形状ミキサの設計と混合実験結果

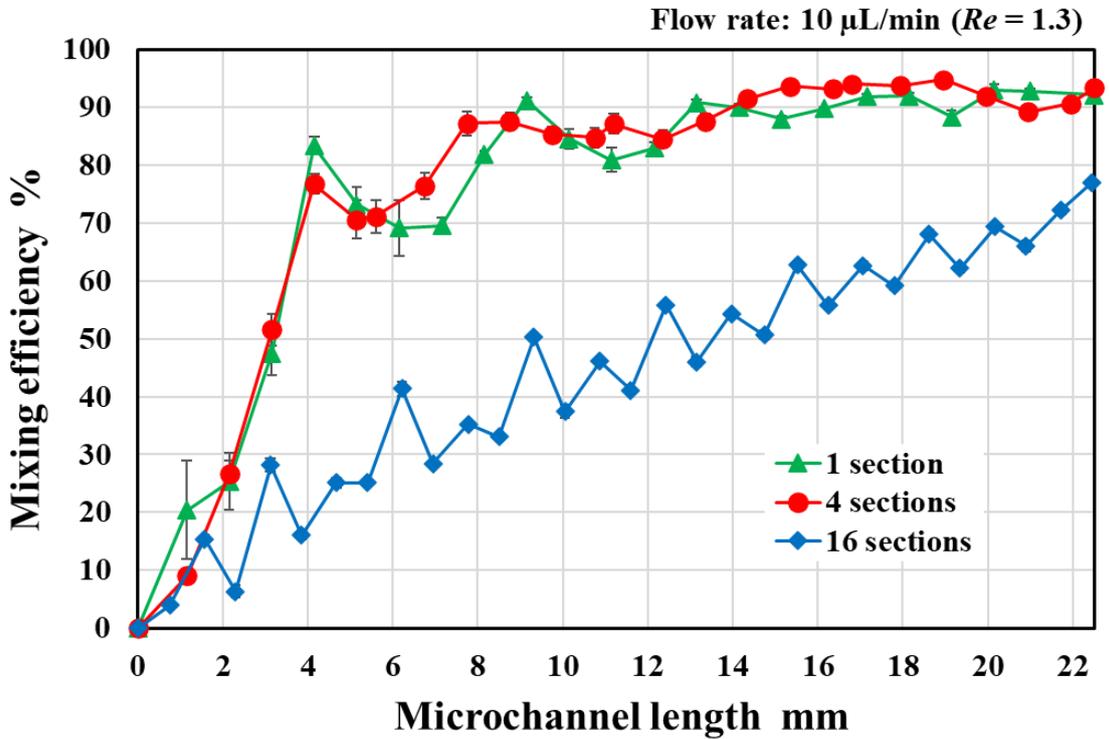


図 4.5 混合ユニット数の異なる 3 種類 (100 個 1 組, 25 個 4 組, 5 個 16 組) の非対称形状ミキサの混合効率解析結果

4.6 混合ユニット形状の最適化

本節では、レイノルズ数 R_e 0.13~13（総流量 1~100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）の範囲において、非対称形状ミキサの幾何学的形状が混合効率に及ぼす影響を実験的に調査した。マイクロ流路（幅 200 μm 、高さ 54 μm ）内に 6 種類（M1~M6）の形状を有する 100 個 1 組の混合ユニットを作製した。また、比較のために、マイクロ流路の長手方向の中心線に対して、対称な混合ユニットを持つ蛇行ミキサ（M7）も作製した。

図 4.6 に実験に使用した非対称形状ミキサの混合ユニットの例として M1, M4, M7 の寸法を示す。ここで、1 つの混合ユニットにおける流路幅方向の中心位置を結ぶ距離の合計をユニット流路長（UL）と定義した。ユニット流路長 UL の例を図 4.6 中、赤線で示す。表 4.2 にすべてのミキサの障害物構造（BL1~BL4 ならびに UL）の寸法を示す。

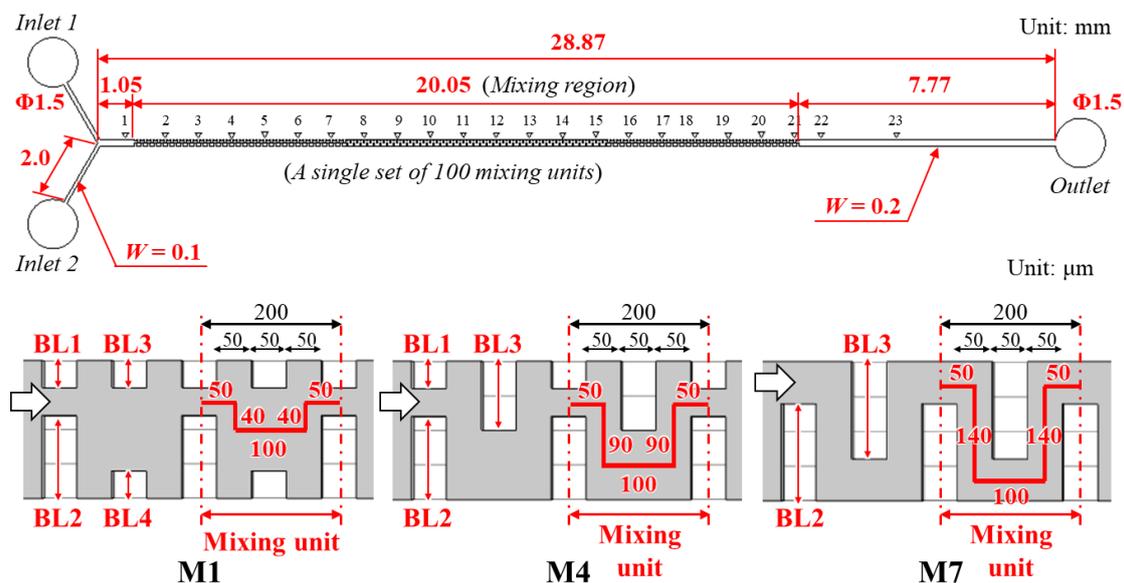


図 4.6 デザイン最適化のための 100 個 1 組の混合ユニットからなる非対称形状ミキサ（赤線はユニット流路長 UL を示す）

表 4.2 非対称形状ミキサ（M1~M6）と対称形状の混合ユニットを有する蛇行型ミキサ（M7）の障害物構造の設計寸法

Mixer	BL1 (μm)	BL2 (μm)	BL3 (μm)	BL4 (μm)	UL (μm)
M1	40	120	40	40	280
M2	40	120	60	20	320
M3	40	120	80	0	360
M4	40	120	100	0	380
M5	40	120	120	0	400
M6	40	120	140	0	420
M7	0	140	140	0	480

図 4.7 に、マイクロ流路（幅 $200\ \mu\text{m}$ 、高さ $54\ \mu\text{m}$ ）にシリンジポンプを用いて、純水およびフルオレセイン溶液（ $0.1\ \text{mol}/\text{m}^3$ ）を総流量 $1\ \mu\text{L}/\text{min}$ （ $Re = 0.13$ ）で導入したときの蛍光顕微鏡画像を示す。非対称形状ミキサ（M1～M6）の混合プロファイルは、送液距離 $x = 4.2\ \text{mm}$ 以内（20 個のミキシングユニットを通過した後）では、2 液は混合することなく層流を示した。これは、 $Re = 0.13$ という極めて低いレイノルズ数であるため、分子拡散による混合が支配的であるためと考えられる。しかし、マイクロチャネルの片側の側壁に沿った狭い空間では、図 4.7 中の矢印で示すように、混合効率が悪くなった。一方、対称型蛇行マイクロミキサー（M7）では、非対称形状ミキサ（M1～M6）に比べて優れた混合性能を示し、 $x = 8.2\ \text{mm}$ （混合ユニット 40 組通過後）において流路幅方向の緑色の蛍光強度がほぼ均一であることがわかった。これは、蛇行形状の場合、どの箇所においても流路幅は同じであり、流路内に狭い空間が存在しないことが原因と考えられる。

図 4.8 に総流量 $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ （ $Re = 1.3$ ）の場合の混合実験結果を示す。ミキサ M1 の場合、マイクロ流路に沿って混合が進むと、フルオレセイン溶液がマイクロチャネル幅方向に徐々に広がっていくことがわかった。しかし、混合ユニット 40 個を通過した後（ $x = 8.2\ \text{mm}$ ）でも、2 つの流体の界面ははっきりと確認された。ミキサ M2 は、ミキサ M1 に比べ、混合性能が向上しており、 $x = 8.2\ \text{mm}$ （混合ユニット 40 個）において、流路幅方向の蛍光が比較的均一に分散していた。しかし、ミキサ M3～M5 では、異なる混合挙動を示した。 $x = 4.2\ \text{mm}$ （混合ユニット 20 個）でフルオレセイン溶液と水からなる別の層状パターンが出現していることがわかる。その後、流路の長手方向に対して左側の蛍光強度は、 $x = 6.2\ \text{mm}$ （混合ユニット 30 個）で右側の蛍光強度よりも強くなった。さらに、 $x = 8.2\ \text{mm}$ （混合ユニット 40 個）ではほぼ均一な混合を達成している。このように非対称の混合ユニットによる流れの位置の変化が混合を促進することが確認された。

一方、M6 ミキサでは、 $x = 8.2\ \text{mm}$ （混合ユニット 40 個）においても、2 液の界面が維持された。これは、M6 ミキサの混合ユニットの幾何学的形状がマイクロ流路の長手方向の中心線に対しては非対称であったが、混合ユニット M3～M5 と比較して対称な形状に近づいたためであると考えられる。この仮説は、完全に対称な混合ユニットを持つ蛇行ミキサ（M7）が最も低い混合性能を示していることから妥当であると考えられる。

図 4.9 は、総流量 $100\ \mu\text{L}/\text{min}$ （ $Re = 13$ ）の場合の混合実験結果を示す。ミキサ M1～M3 では、流体挙動と混合挙動はほぼ同じであった。2 液の流れる位置が交互に変化させられることで混合が進行していることがわかる。さらに、M4～M6 では、 $x = 2.2\ \text{mm}$ （混合ユニット 10 個）で別の層状パターンが出現した。最終的に、 $x = 6.2\ \text{mm}$ （混合ユニット 30 個）では、2 つの流体の間に識別可能な界面が存在しないことがわかった。M1～M3 と M4～M6 で異なる混合挙動を示したのは、BL1 と BL2 の間の狭いギャップ（ $40\ \mu\text{m}$ ）から収縮した流体が流れ出るときに、長さが異なる（ $40\sim 140\ \mu\text{m}$ の範囲）障害物構造 BL3 によってもたらされる物理的な障害の程度に依存していることが考えられる。一方、蛇行ミキサー（M7）では、 $x = 8.2\ \text{mm}$ （混合ユニット 40 個）でも層流を示したが、流路に沿って混合が進むにつ

れて2液間の界面は徐々に消失することを確認した。

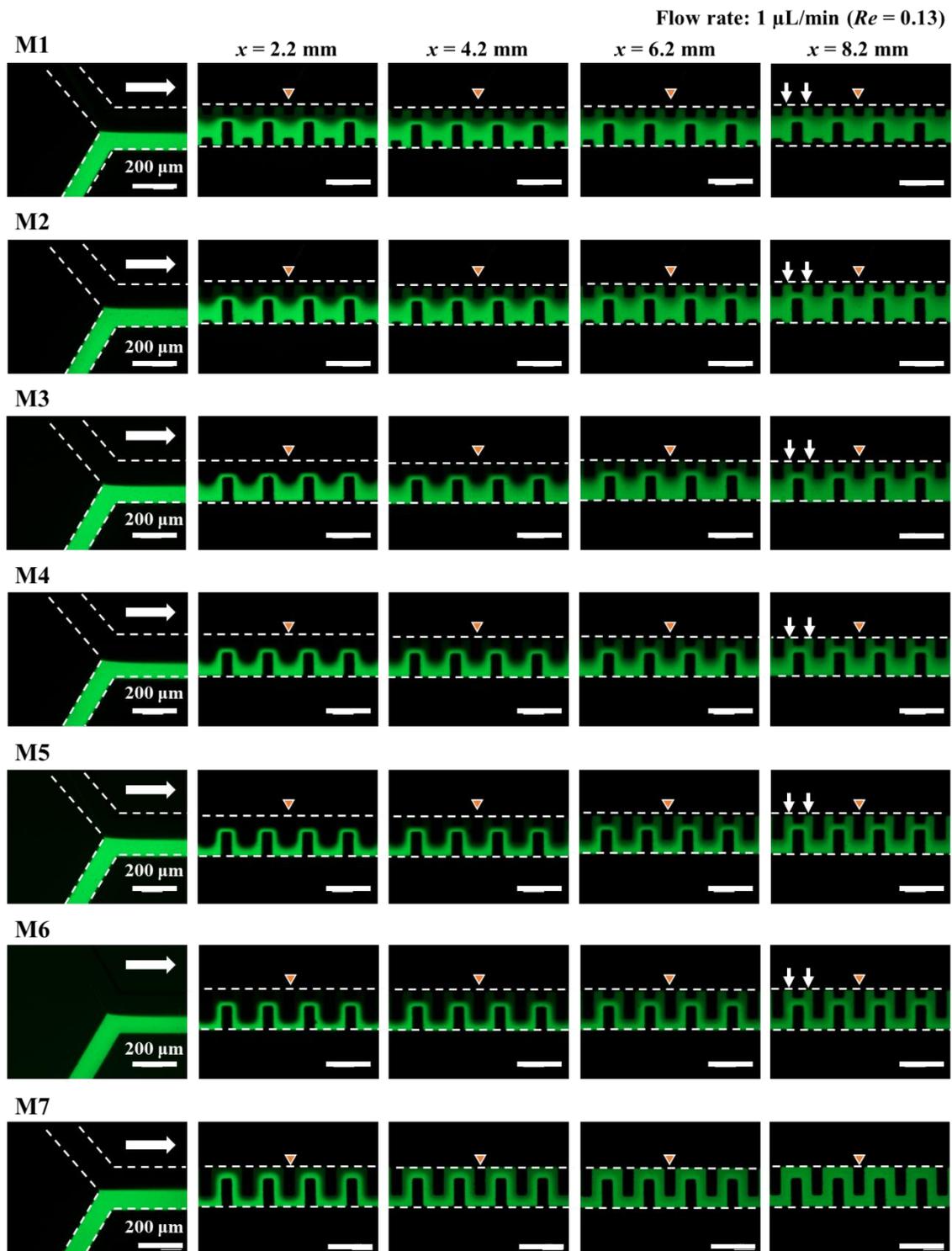


図 4.7 総流量 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 0.13$) の混合実験結果

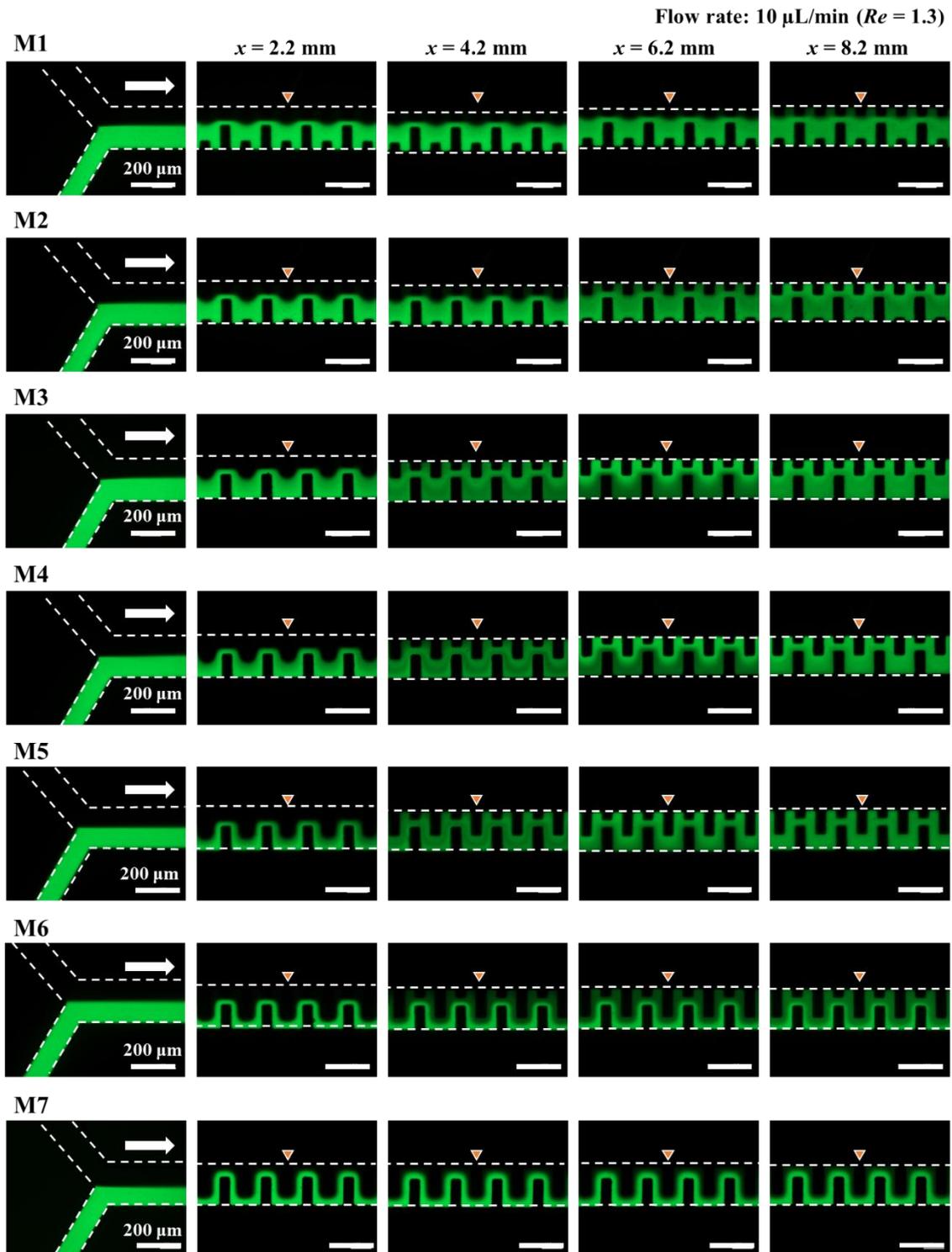


図 4.8 総流量 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 1.3$) の混合実験結果

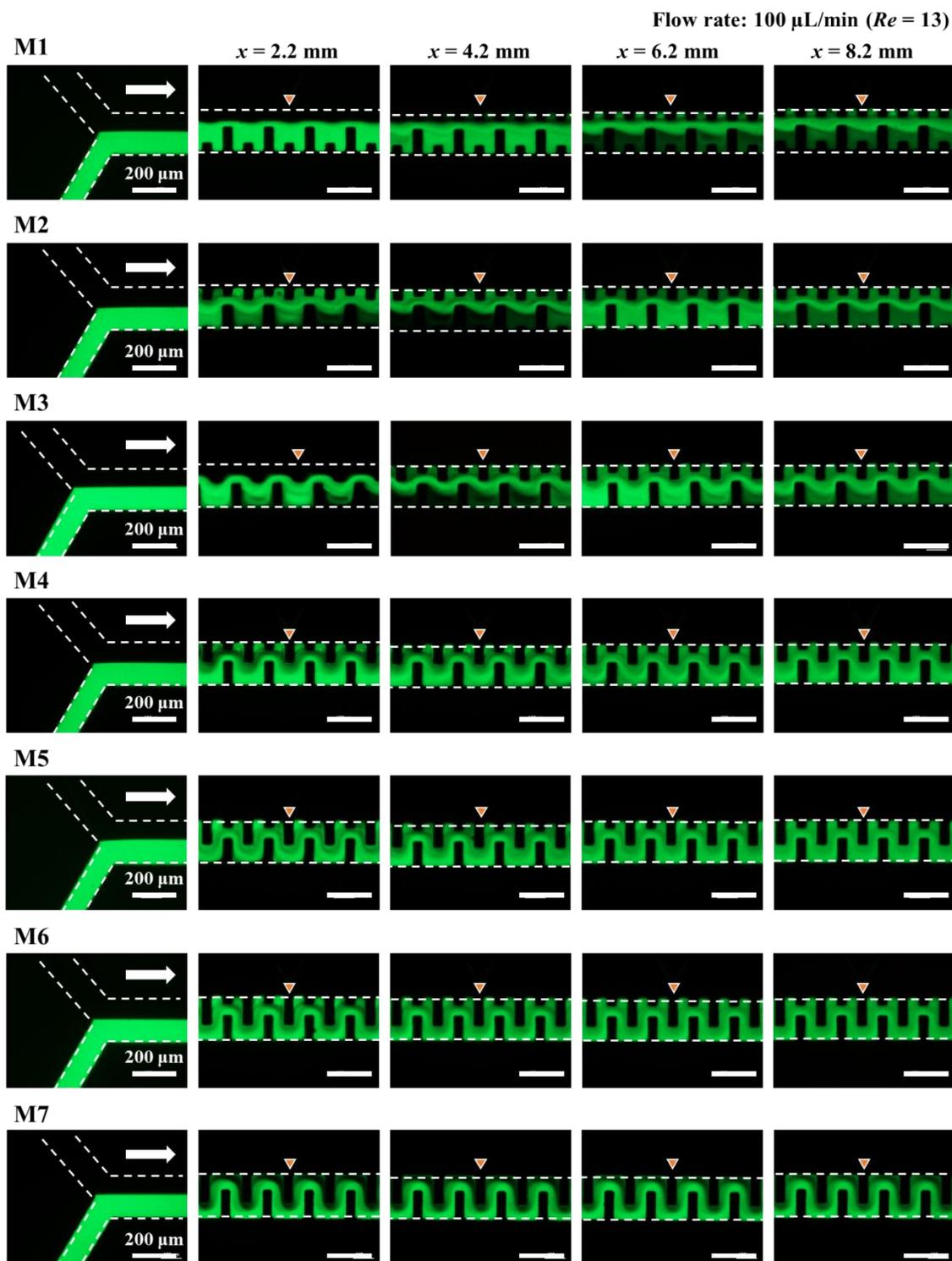


図 4.9 総流量 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 13$) の混合実験結果

図 4.10 に、非対称形状ミキサ (M1~M6) および対称形状蛇行ミキサ (M7) の送液距離 x に対する混合効率を示している。実験はそれぞれ 3 回繰り返して行い、式 (2.1) より算出された混合効率の平均値と標準偏差をグラフに示している。

図 4.10 (a) に示すように、ミキサ M1 の混合速度が他の非対称形状ミキサ (M2~M6) に比べてわずかに遅れている。これは、ユニット流路長 UL が最も短いことに起因すると考えられる。しかし、送液距離 $x = 10 \text{ mm}$ (混合ユニット 50 個通過後) では、すべての非対称形状ミキサ (M1~M6) の混合効率は 80% 以上に達した。この結果から、非対称形状ミキサの幾何学的特徴は分子拡散が支配的な極めて低い Re 数条件下 ($=0.13$) では、混合効率に大きな影響を与えないことがわかった。マイクロ流路内に狭い空間がなく、常に流路幅方向の長さが一定の対称蛇行ミキサ (M7) は非対称ミキサよりも優れた混合性能を示したものの、すべてのミキサにおいて、 $x = 20 \text{ mm}$ (混合ユニット 100 個通過後) で約 90% の混合性能を示したため、両者に有意な差は見られなかった。

しかし、図 4.10 (b) に示すように、 Re 数を 1.3 まで増加すると混合性能はミキサの幾何学的形状に強く依存するようになった。対称蛇行ミキサ (M7) の混合効率は、非対称形状ミキサ (M2~M6) の混合効率と比較して著しく低下した。非対称形状ミキサのうち、M3~M5 ミキサは他の非対称形状ミキサ (M1, M2, M6) と比較して、非常に高い混合効率 (混合ユニット 20 個通過後の $x = 4 \text{ mm}$ で約 80%) を達成した。しかし、すべての非対称形状ミキサは、下流に進むにつれ、混合効率の差が小さくなり、最終的に $x = 20 \text{ mm}$ (混合ユニット 100 個通過後) で約 90% に達した。一方、対称蛇行ミキサ (M7) の混合効率は約 80% で留まった。

さらに、図 4.10 (c) に示すように、 Re 数を 13 まで増加させると、混合性能は非対称形状ミキサ M1~M3 と M4~M6 の 2 つのグループに大別された。これらの結果は、蛍光顕微鏡で観察された混合パターンの特徴とも一致する (図 4.9)。M4~M6 ミキサは、 $x = 6 \text{ mm}$ (混合ユニット 30 個通過後) で 80% 以上の高い混合効率を示し、 $x = 20 \text{ mm}$ (混合ユニット 100 個通過後) では、約 90% の混合効率を達成した。しかし、M1~M3 ミキサは 80% の混合効率に留まった。また、対称蛇行ミキサ (M7) も、非対称形状ミキサ (M4~M6) と比較して混合性能が低いことがわかった。なお、非対称形状ミキサ (M6) は、対称形状蛇行ミキサ (M7) と幾何学的形状が似ているにもかかわらず、高い混合性能を示した。実験結果より、非対称ミキサ M5 が広い Re 数の範囲 ($0.13 \leq Re \leq 13$) で最も高い混合性能を示し、ミキサ M4 がそれに続く混合性能を示したが、他の非対称ミキサは特定の Re 数での範囲でしか十分な混合性能を示さないことがわかった。

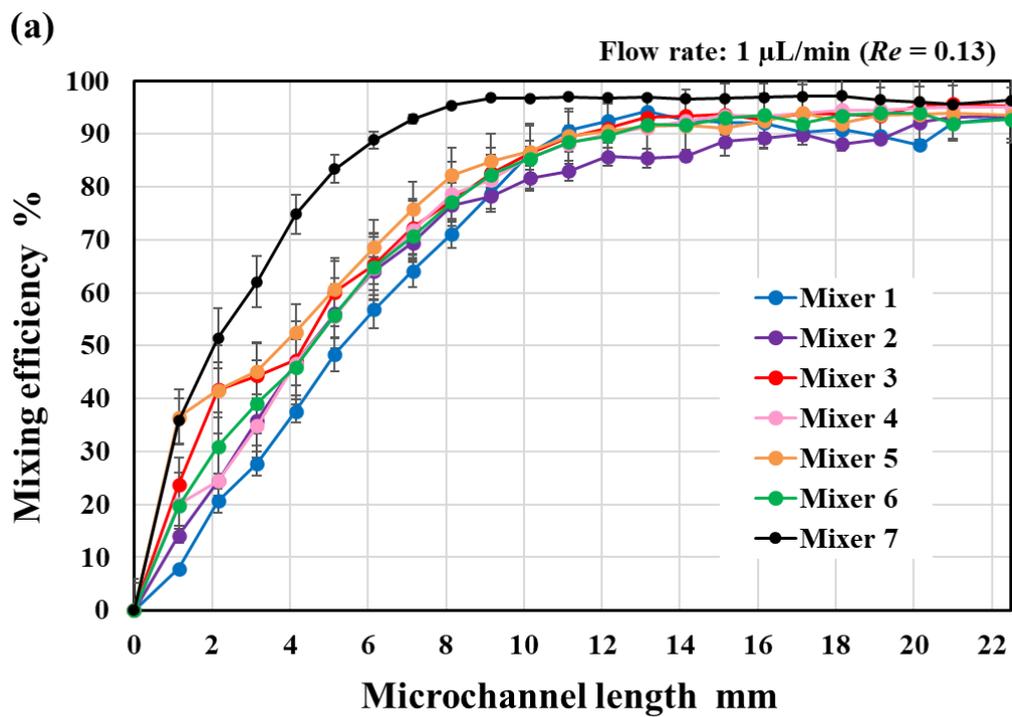
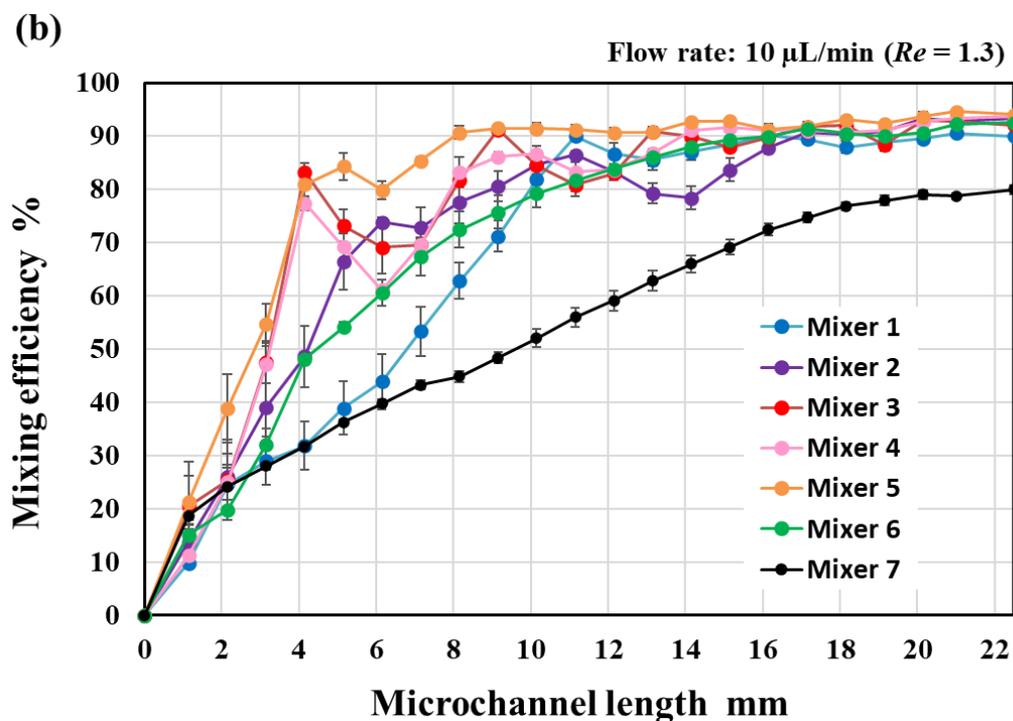
(a) 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 0.13$)(b) 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 1.3$)

図 4.10 非対称形状ミキサ (M1~M6) と対称蛇行ミキサ (M7) の混合効率解析結果

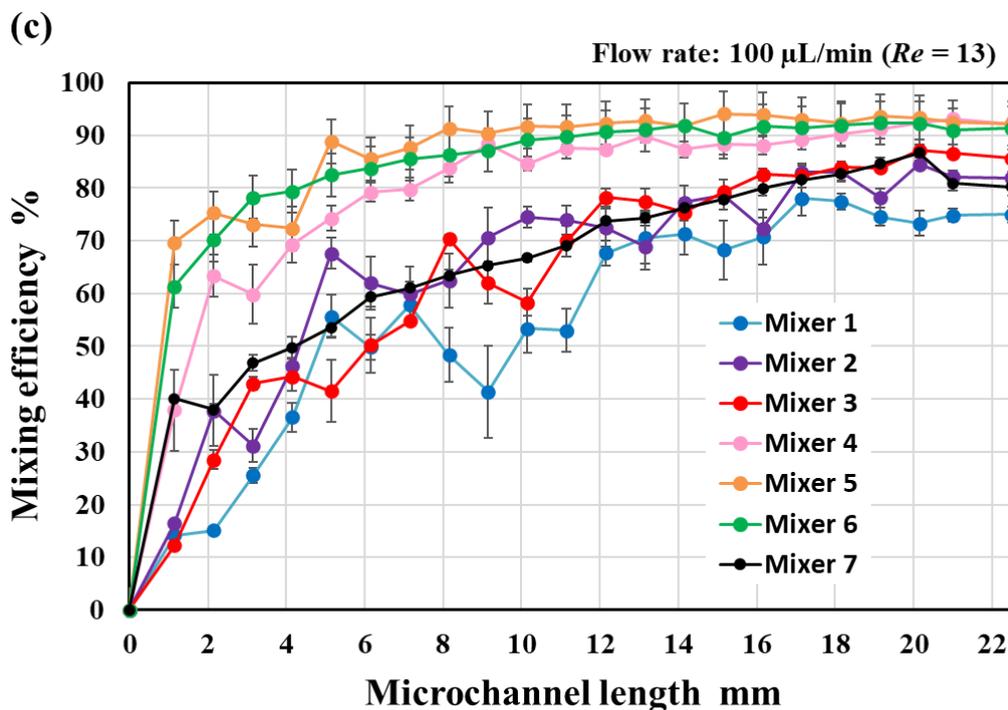
(c) 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 13$)

図 4.10 非対称形状ミキサ (M1~M6) と対称蛇行ミキサ (M7) の混合効率解析結果

4.7 圧力損失の実験的評価

非対称形状ミキサ (M1~M6) の圧力損失を実験的に調査し、対称蛇行ミキサ (M7) および矩形流路 (流路幅 200 μm , 高さ 54 μm) の圧力損失と比較した。実験では、青色着色液 (0.1% w/v) のみを二個の流入口のうち一方を塞いで、圧力ポンプ (Fluigent 社製, Flow EZ) で導入した。図 4.6 および表 4.2 に示すミキサ形状で、100 個の混合ユニット 1 セットを有するデバイスを使用した。マイクロ流路の全長は導入口から 2 液の合流箇所までの流路幅 100 μm , 長さ 2mm, 合流後の流路幅 200 μm , 長さ 28.87 mm, 流路高さ 54 μm であった。

図 4.11 に示すように、すべての実験において、圧力損失は流量の増加と共に直線的に増加した。原点を通る直線回帰線の傾き ($\text{kPa}/(\mu\text{L}/\text{min})$) と決定係数 (R^2) を表 4.3 に示す。表から、極めて強い相関が得られたことがわかる。混合ユニットのない矩形流路では流量 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 13$) で圧力損失は 27 kPa に達した。なお、式 (3.4) で示される矩形流路の圧力損失は 26 kPa と計算できることから、理論値と実験値はよく一致していた。

非対称形状ミキサ M5 と M6 の圧力損失は、最も長いユニット流路長 UL を有する対称蛇行ミキサ M7 よりも高い圧力損失を示した。一方、他の非対称形状ミキサ (M1~M4) は対称蛇行ミキサ M7 よりも低い圧力損失となった。そのため、混合効率と圧力損失の比を示す、混合コスト⁶⁾ ($M/\Delta P$) の観点から考察すると、非対称ミキサ M4 は、広いレイノルズ

数範囲 ($0.13 \leq Re \leq 13$) において、最も混合効率の良いマイクロミキサであることがわかった。

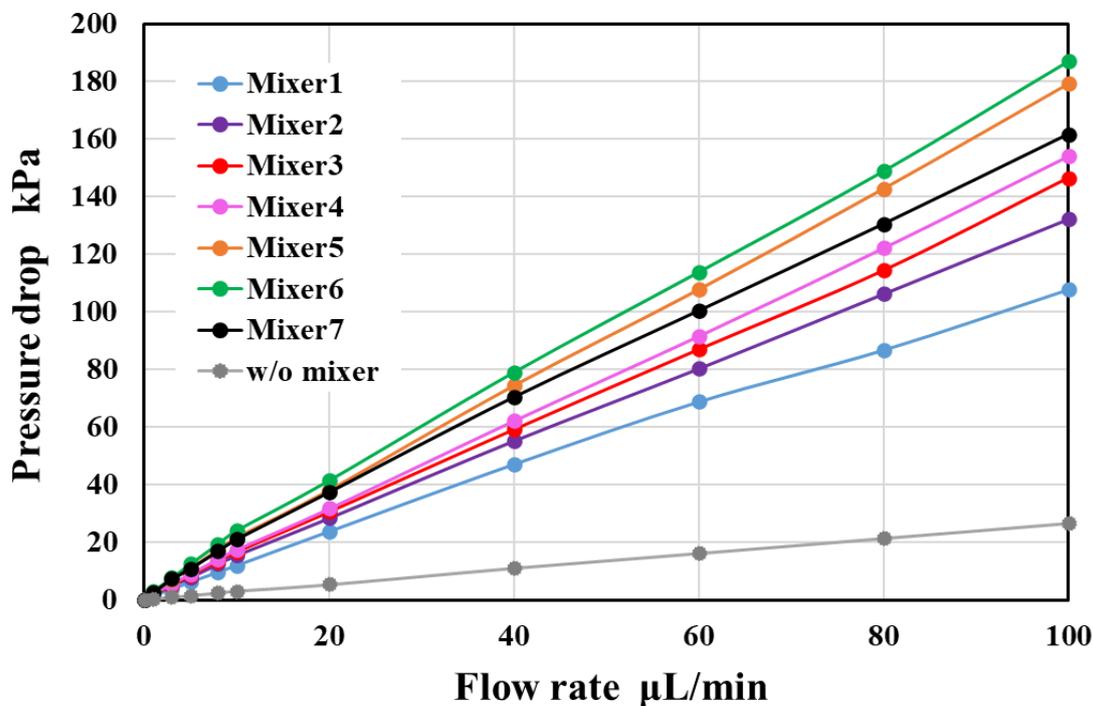


図 4.11 導入流量 (1~100 $\mu\text{L}/\text{min}$) に対する 6 種類の非対称形状ミキサ (M1~M6) およびミキサのない矩形流路の圧力損失計測結果

表 4.3 導入流量(1~100 $\mu\text{L}/\text{min}$)に対する 6 種類の非対称形状ミキサ(M1~M6)の圧力損失との関係 (原点を通る直線回帰線の傾きと決定係数 R^2)

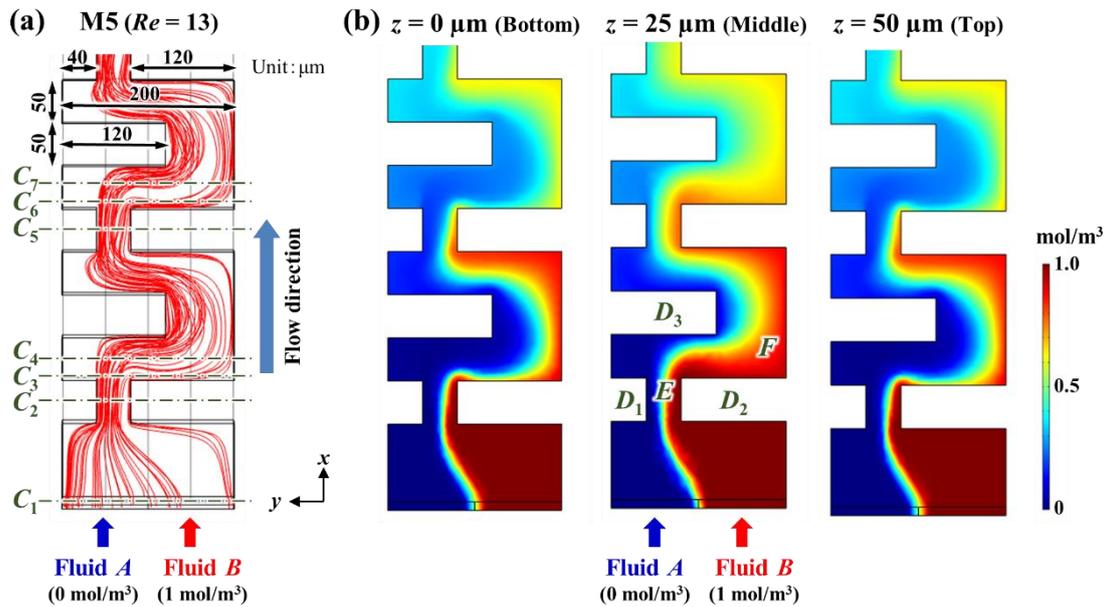
Mixer	Slope (kPa/($\mu\text{L}/\text{min}$))	R^2
M1	1.10	0.9986
M2	1.33	0.9997
M3	1.46	0.9996
M4	1.54	0.9998
M5	1.80	0.9996
M6	1.89	0.9992
M7	1.65	0.9983
w/o	0.27	0.9996

4.8 混合メカニズムの考察

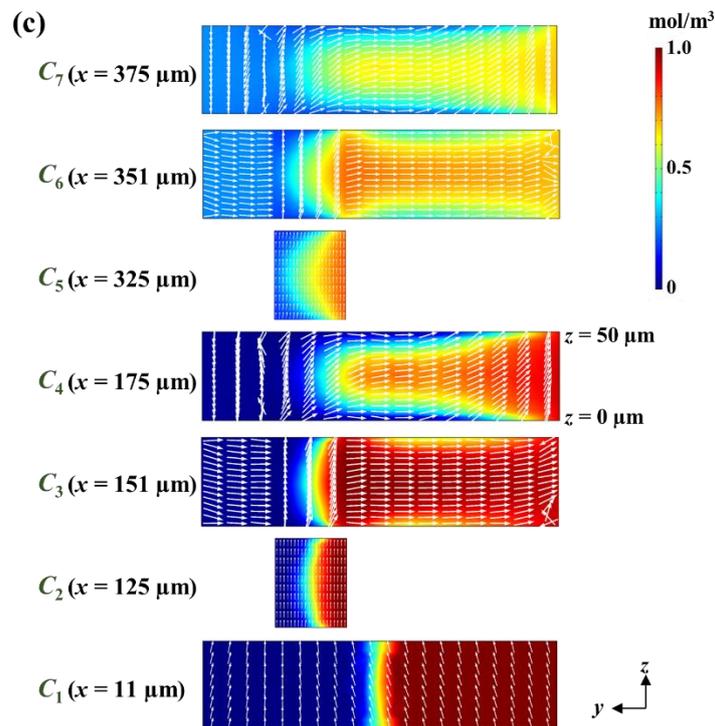
本節では、数値流体解析を用いて非対称形状ミキサの混合メカニズムについて考察した。図 4.12 は、非対称形状ミキサ (M5) における混合現象の数値解析結果である。図 4.12 (a)

に示すように、流体 A (0 mol/m^3) と流体 B (1 mol/m^3) をマイクロ流路 (FEM モデル幅 $200 \mu\text{m}$, 高さ $50 \mu\text{m}$, 長さ $1350 \mu\text{m}$) にそれぞれ $50 \mu\text{L/min}$ 相当の流速 $8.3 \times 10^{-2} \text{ m/s}$ (合計流量 $100 \mu\text{L/min}$, $Re = 13$) で導入した。

図 4.12 (b) に示されるように、流体 A と B はマイクロ流路長手方向の中心線に対して非対称な位置にある 2 つの障害物 (D1 と D2 とする) によって収縮する。マイクロ流路の左側にある狭い隙間 (E) から流出した流体 A, B はマイクロ流路の長手方向の中心線を挟んで左から右に流れ方向を変えて広い空間 (F) を急速に拡大し、障害物構造 (D3) を迂回する。このとき、流体 B は広い空間 F に容易に展開でき、その後、流体 B の流速が急激に低下することにより、空間 F を占有する可能性が高いが、流体 A は流入する空間が不足するため、展開が困難である。図 4.12 (c) に示すように、マイクロ流路の高さ方向の中央部 ($z = 25 \mu\text{m}$ 付近) では流体 B が支配的であるが、流体 A は流体 B を避けて上 ($z = 50 \mu\text{m}$ の上面方向) および下 ($z = 0$ の下面方向) へと流れる。これは、圧力流体の放物線状の流速分布に従って、マイクロチャネル内の上面および下面に向かって流速が低下すること、すなわち、流体 A は流体 B よりも流速の低い空間に流入する可能性が高いことに起因すると考えられる。この流れは、2 流体間の界面接触面積を増大させ、非対称形状ミキサの効果的な混合を促進すると結論づけることができる。このような非対称型ミキサの混合メカニズムから、我々はこのミキサを P-ACE マイクロミキサと呼んでいる。



(a) 流線 (b) マイクロ流路の底面 ($z=0$), 中間 ($z=25\mu\text{m}$) 上面 ($z=50\mu\text{m}$) における流体 B の濃度コンター図 ($Re = 13$)



(c) 異なる位置での流路断面の濃度コンター図および横断方向の速度場 (矢印)

図 4.12 非対称形状マイクロミキサ (M5) の数値解析結果

続いて、共焦点顕微鏡（ニコン A1R MP）を用いた混合実験を通じて、非対称形状ミキサの混合メカニズムについて考察した。図 4.13 にマイクロ流路（幅 $200\ \mu\text{m}$ 、高さ $54\ \mu\text{m}$ ）内に純水とフルオレセイン溶液（ $0.1\ \text{mol}/\text{m}^3$ ）を各 $5\ \mu\text{L}/\text{min}$ （総流量 $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ ($Re = 1.3$)) で導入したときの非対称形状ミキサ M5 の混合挙動を共焦点顕微鏡で撮影した様子である。マイクロ流路の高さ方向 (z 方向) で $10\ \mu\text{m}$ ごとに xy 平面を合計 5 枚の画像を取得した。25 個の混合ユニットを通過後の位置 ($x = 5.2\ \text{mm}$) で撮像を行い、 $z = 0\ \mu\text{m}$ を中間面、 $z = -20\ \mu\text{m}$ を底面 (PDMS 面)、 $z = +20\ \mu\text{m}$ を上面 (両面テープ面) とした。図 4.13 より、 $z = 0\ \mu\text{m}$ とした画像の蛍光強度は $z = -20\ \mu\text{m}$ 、 $z = +20\ \mu\text{m}$ で取得した画像よりも高いことがわかる。これは、フルオレセイン溶液を避けるために純水が流路高さ方向に対して、上面側および下面側に向かって回り込むためと考えられる。このような混合の様子は数値解析によるシミュレーション結果ともよく一致している (図 4.12)。また、 $z = -20\ \mu\text{m}$ では、マイクロ流路の流れ方向に対して右側壁面の蛍光強度が他の領域よりも高く、 $z = 0\ \mu\text{m}$ 以上では、2 つの流体の流れの位置が変化し、マイクロ流路の流れに対して左側の蛍光強度が高くなっていることがわかる。その結果、マイクロ流路の断面 yz 平面において、非対称な障害物構造によって二次流れが発生していることが明らかとなった。

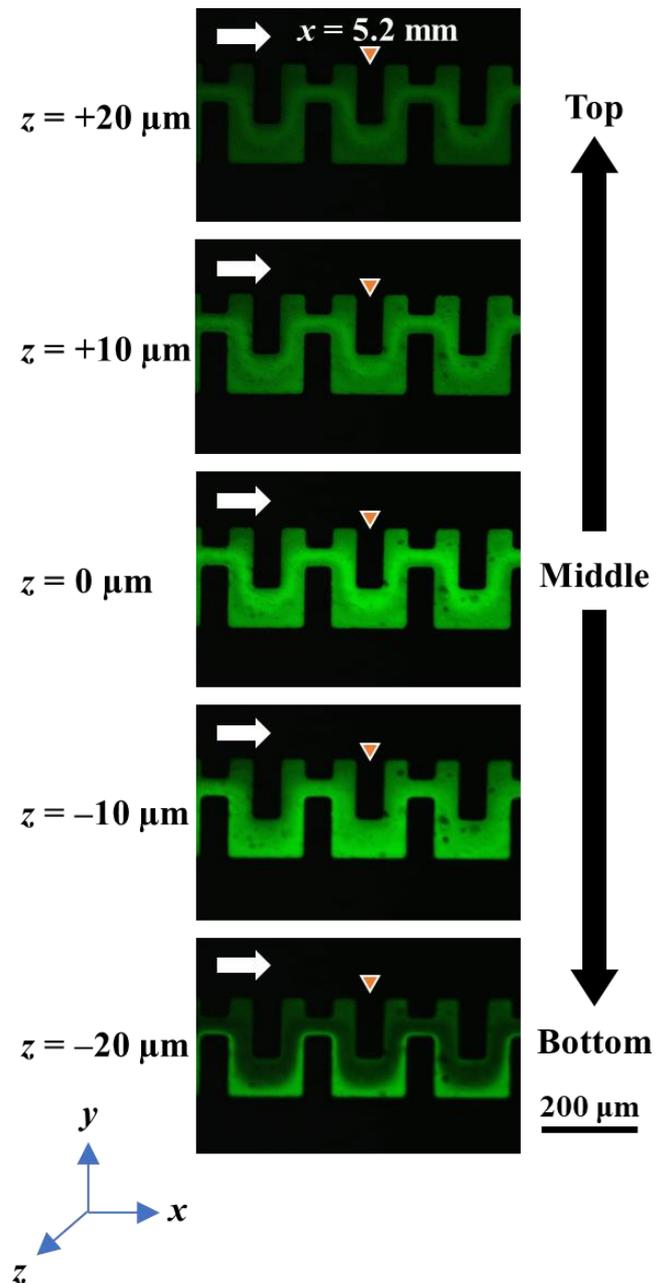


図 4.13 純水とフルオレセイン溶液を各 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ で非対称形状ミキサ(M5)に導入したときの高さ方向 (z 軸) の距離が $10 \mu\text{m}$ 異なる共焦点顕微鏡画像 ($z = 0 \mu\text{m}$ はマイクロ流路の高さの中央面, $z = -20 \mu\text{m}$ ならび $z = +20 \mu\text{m}$ はそれぞれマイクロ流路の上面および下面を示している)

4.9 結言

本章では、2.7節で挙げた横型ミキサの作製には段差構造を形成するために二段階のプロセスを要し、デバイスの再現性が低いという課題に対して、1回のプロセスで作製可能な非対称形状ミキサ (P-ACE ミキサ) を考案し、最適な幾何学形状ならびに混合メカニズムについて調査した。この開発した P-ACE ミキサは、マイクロ流体デバイスへの組み込みが容易でデバイス設計全体を変更せずに、実装することが可能である。得られた結果をまとめると次のとおりである。

- (1) 1回のプロセスで作製可能な2次元平面ミキサの混合性能を数値流体解析により調査したところ、流路長手方向の中心線に対して非対称な幾何学形状を有するミキサが高い混合性能を示すことがわかった。
- (2) 非対称形状ミキサの混合実験結果より、一定の流路長の非対称の障害物構造を設けることで、導入した2種類の流体が流路幅方向に対して上下が連続的に入れ替わることで高い混合性能を示すことを明らかにした。
- (3) 非対称ミキサの形状最適化を行ったところ、広いレイノルズ数範囲 ($0.13 \leq Re \leq 13$) で高い混合性能を示し、送液距離 10 mm で 80 % 以上、20 mm で約 90 % の混合効率を達成した。
- (4) 非対称ミキサの混合メカニズムを調査したところ、流路長手方向中心線に対し、狭い空間の流体が広い空間側の液体の上下に回り込むことで界面が増えることで高効率に混合されていることを明らかにした。

参考文献

- [1] N.-T. Nguyen, and Z. Wu, “Micromixers—A review”, *J. Micromech. Microeng.*, 15, R1–R16, (2005)
- [2] C.-Y. Lee, C.-L. Chang, Y.-N. Wang, and L.-M. Fu, “Microfluidic mixing: A review”, *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 3263–3287, (2011)
- [3] G. Cai, L. Xue, H. Zhang, and J. Lin, “A review on micromixers”, *Micromachines*, 8, 274, (2017)
- [4] M. Bayareh, M. N. Ashani, and A. Usefian, “Active and passive micromixers: A comprehensive review.” *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 147, 107771, (2020)
- [5] C.-Y. Lee, W.-T. Wang, C.-C. Liu, and L.-M. Fu, “Passive mixers in microfluidic systems: A review”, *Chem. Eng. J.*, 288, 146–160, (2016)
- [6] W. Raza, S. Hossain, and K.-Y. Kim, “A review of passive micromixers with a comparative analysis”, *Micromachines*, 11, 455, (2020)
- [7] S. H. Wong, M. C. Ward, and C. W. Wharton, “Micro T-mixer as a rapid mixing micromixer”, *Sens. Actuators B Chem.* 100, 359–379, (2004)
- [8] W. Wang, S. Zhao, T. Shao, Y. Jin, and Y. Cheng, “Visualization of micro-scale mixing in miscible liquids using μ -LIF technique and drug nano-particle preparation in T-shaped micro-channels”, *Chem. Eng. J.*, 150, 252-61, (2012)
- [9] C.-C. Hong, J.-W. Choi, and C. H. Ahn, “A novel in-plane passive microfluidic mixer with modified Tesla structures”, *Lab Chip*, 4, 109–113 (2004)
- [10] S. Hossain, M. A. Ansari, A. Husain, and K.-Y. Kim, “Analysis and optimization of a micromixer with a modified Tesla structure”, *Chem. Eng. J.*, 158, 305–314, (2010)
- [11] J. Li, G. Xia, and Y. Li, “Numerical and experimental analyses of planar asymmetric split-and-recombine micromixer with dislocation sub-channels”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 88, 1757–1765, (2013)
- [12] S. Hossain, M. Ansari, and K.-Y. Kim, “Evaluation of the mixing performance of three passive micromixers.”, *Chem. Eng. J.*, 150, 492-501, (2009)
- [13] X. Chen, T. Li, H. Zeng, Z. Hu, and B. Fu, “Numerical and experimental investigation on micromixers with serpentine microchannels”, *Int. J. Heat Mass Transf.* 98, 131–140, (2016)
- [14] C.-H. D. Tsai and X.-Y. Lin, “Experimental study on microfluidic mixing with different zigzag angles” *Micromachines*, 10, 583, (2019)
- [15] X. Wang, Z. Liu, Y. Cai, B. Wang, and X. Luo, “A cost-effective serpentine micromixer utilizing ellipse curve”, *Anal. Chim. Acta*, 1155, 338355, (2021)
- [16] T. Scherr, C. Quitadamo, P. Tesvich, D. S.-W. Park, T. Tiersch, D. Hayes, J.-W. and Choi, K. Nandakumar, and W, T, Monroe, “A planar microfluidic mixer based on logarithmic spirals”, *J. Micromech. Microeng.*, 22, 055019, (2012)

- [17] L. Wang, S. Ma, X. Wang, H. Bi, and X. Han, "Mixing enhancement of a passive microfluidic mixer containing triangle baffles", *Asia-Pac. J. Chem. Eng.*, 9, 877-85, (2014)
- [18] Y. Fang, Y. Ye, R. Shen, P. Zhu, R. Guo, Y. Hu, and L. Wu, "Mixing enhancement by simple periodic geometric features in microchannels", *Chem. Eng. J.*, 187, 306–310, (2012)
- [19] A.-S. Yang, F.-C. Chuang, C.-K. Chen, M.-H. Lee, S.-W. Chen, T.-L. Su, and Y.-C. Yang, "A high-performance micromixer using three-dimensional Tesla structures for bio-applications", *Chem. Eng. J.*, 263, 444–451, (2015)
- [20] H. Le The, H. Le Thanh, T. Dong, B. Q. Ta, N. Tran-Minh, and F. Karlsen, "An effective passive micromixer with shifted trapezoidal blades using wide Reynolds number range", *Chem. Eng. Res. Des.*, 93, 1–11, (2015)
- [21] A. D. Stroock, S. K. W. Deringer, A. Ajdari, I. Mezić, H. A. Stone, and G. M. Whitesides, "Chaotic mixer for microchannels", *Science*, 295(5555), 647-51, (2002)
- [22] M. A. Ianovska, P. P. M. F. A. Mulder, and E. Verpoorte, "Development of small-volume, microfluidic chaotic mixers for future application in two-dimensional liquid chromatography", *RSC Adv.*, 7, 9090-99, (2017)
- [23] D. S. Kim, S. W. Kee, T. H. Kwon, and S. S. Lee, "A barrier embedded chaotic micromixer", *J. Micromech. Microeng.* 14, 798–805, (2004)
- [24] D. Natsuhara, R. Saito, S. Okamoto, M. Nagai, and T. Shibata, "Mixing performance of a planar asymmetric contraction-and-expansion micromixer", *Micromachines*, 13(9), 1386, (2022)

第5章 比色指示薬を用いた目視判定による標的遺伝子の定性診断

5.1 緒言

本章では、簡便なオンサイト診断を実現するために、蛍光 LAMP 法に代わる安価かつ簡便な検査手法として、比色指示薬を用いた定性診断手法を示す。比色指示薬を用いる比色 LAMP 法は、蛍光 LAMP 法のような観察のための装置（倒立顕微鏡など）が不要であるため、低コストで検査が可能となる¹⁻²⁾。例えば、Dan ら³⁾は、遺伝子増幅反応による pH の変化に伴って、溶液の色が黄色から赤色に代わる比色指示薬を用いることで、マイクロ流体デバイス上で、3 種類の食物アレルギー物質（落花生、ゴマ、大豆）の多項目同時診断を実証している。Xiao ら⁴⁾は、pH の変化により溶液の色が赤色から黄色に変わる比色指示薬を用いることで、6 種類の動物（ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ブタ、マウス、ロバ）の特定を行うマイクロ流体デバイスを開発し、定性診断を実証している。しかし、これらの比色指示薬は、LAMP 反応に伴う水素イオン（pH）の変化をモニタリングしているため、検体サンプルに唾液などの酸性のサンプルを用いる場合、偽陽性を示す可能性がある⁵⁾。

そこで、本章では、金属指示薬であるヒドロキシナフトールブルー（HNB）を用いた。HNB は、LAMP 反応中の溶液中のマグネシウムイオンの減少をモニタリングし、溶液の色が紫色から水色へと変化する。はじめに、マイクロ流体デバイス上で HNB を用いた標的遺伝子の定性診断結果を示した。次に、増幅後の色を解析することにより陽性と陰性の反応容器を識別できることを示した。

5.2 実験方法

5.2.1 ワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法

2.3 節で示した半球ビーズ援用ソフトリソグラフィ法では、半球樹脂ビーズをエポキシ系接着剤で接着を行った。しかし、接着剤が一樣に塗布できていない場合、図 5.1 (a) の矢印にて示すように半球樹脂ビーズの下に PDMS が回り込み、反応容器内に薄膜が形成されてしまう。このような作製プロセスの問題により、図 5.1 (b) に示すように反応容器内に予期せぬ気泡が捕捉されることがあった。これは、反応容器入口での段差形状によって流れが不均一になったことが原因である可能性が高い。20 個のデバイス（合計 100 個の反応容器）へ LAMP 試薬を導入した結果、気泡が反応容器内に残留しない確率は 87.0%であった。

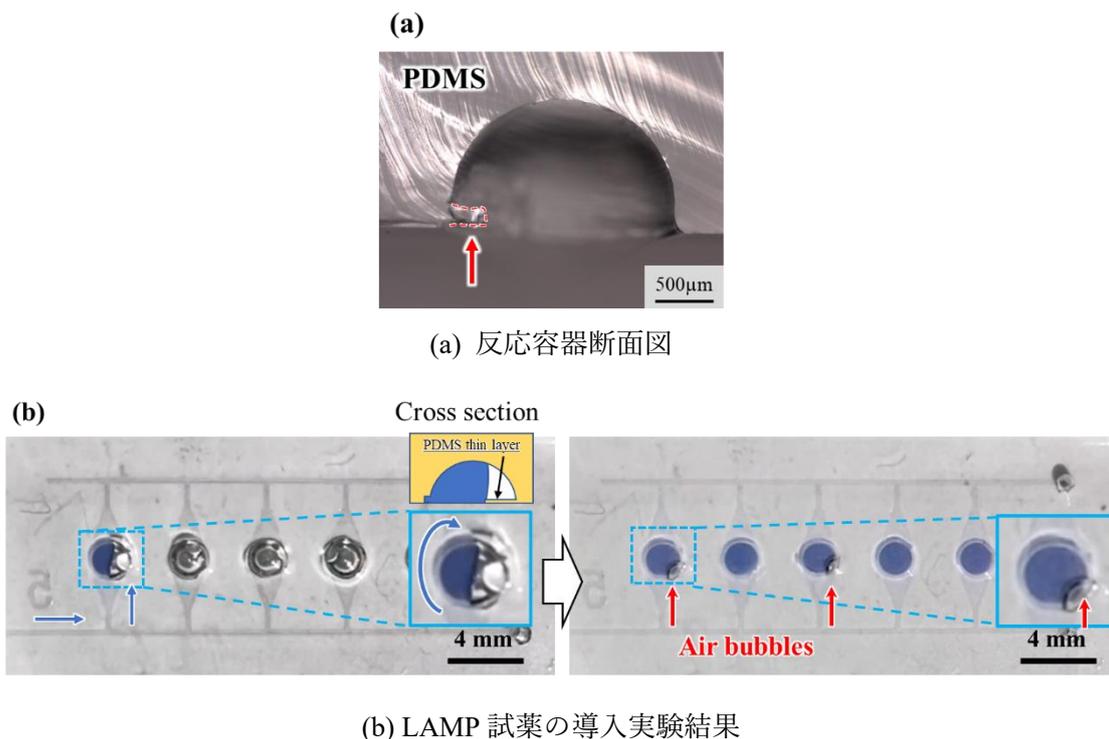


図 5.1 半球ビーズ援用ソフトリソグラフィ法で作製した反応容器への気泡の噛みこみ

そこで、半球ビーズ援用ソフトリソグラフィ法での問題に対し、デバイスの作製手法にワックスリフロー⁶⁾を適用した。本方法では、材料の表面張力を利用したリフローによるものであるため、作製者によらない技術となっており、また、再現性が高いといった利点がある。ワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法を以下に示す。また、ワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法によるデバイスの作製プロセスの概略図を図 5.2 に示す。また、ソフトリソグラフィによる流路モールドの作製条件について、表 5.1 に示す。

- (1) 単結晶シリコンウエハ（イープライズ， n 型<100>，直径 4 inch，厚さ 525 μm ；以下，Si 基板）の表面をアセトン（関東化学，純度 99.5%），イソプロピルアルコール（関東化学，純度 99.7%；以下，IPA）の順で洗浄（かけ流し）し， N_2 ブローを行い乾燥させる。
- (2) 低温灰化装置（ジェイ・サイエンス・ラボ JPA300）を用いて Si 基板表面に空気プラズマ処理を行う（150 W，3 min）。
- (3) スピンコータ（ミカサ MS-A100）を用いて，ネガ型厚膜フォトレジスト SU-8 3050（MicroChem 社，動粘度 12000 cSt）を Si 基板表面にスピンコートする。
- (4) ホットプレート（アズワン EC-1200N）を用いて SU-8 を塗布した Si 基板のプリベークを行う。
- (5) 両面マスクアライナ（ユニオン光学 PEM-800）で露光を行い，マスクパターンを

SU-8 に転写する。なお、実験前に、Si 基板上の 5 点の光強度を紫外線照度計（ウシオ電機，本体 UIT-101，i 線用センサ UVD-365PD）によって測定し，その平均値（約 5 mW/cm^2 ）から所望の露光時間を決定した。

- (6) ホットプレートを用いて流路形状を転写した SU-8 のポストベークを行う。
- (7) 現像液（酢酸 2-メトキシ-1-メチルエチル；富士フィルム和光純薬，純度 97.0%）にポストベーク後の SU-8 を 10 min 浸漬させ，現像を行う。
- (8) 現像した Si 基板をアセトンおよび IPA で洗浄し，N₂ ブローで Si 基板表面の水滴を除去する。
- (9) 4 インチ角シャーレ（Greiner Bio-One 社 688161，PS 製，120 mm×120 mm×17 mm）を用いて厚さ 2 mm の PDMS を用意し，パンチ（カイインダストリーズ BPP-10F）で直径 2 mm の穴を 20 個開ける。（図 5.2 (a)）
- (10) ワックス（Freeman Manufacturing & Supply Company 社 Ferris File-A-Wax ブルー）を上記(9)の PDMS の上に設置し，ホットプレート上で 195°C 10 min 加熱し，直径 2 mm の円柱形状のワックスを作製する。（図 5.2 (b)）
- (11) 円柱形上のワックスを電子天びん（島津製作所 AP125WD）とディスポメスを用いて 2.7 mg に切り出す。
- (10) ひょう量した上記(9)のワックス（2.7 mg）と流路 SU-8 モールドを同時に空気プラズマ処理（150 W，2 min）し，ワックスを SU-8 モールドの反応容器中央に乗せる。（図 5.2 (c)）
- (11) ホットプレート上で 135°C 3 min 加熱し，ワックスを融解させる。（図 5.2 (d)）
- (12) 十分にワックスが融解していることを確認し，室温まで徐冷させ，ワックスを再び凝固させ，マスターモールドとした。
- (10) 真空チャンバ（サンブラテック PC-250KG）にマスターモールド（Si 基板）を入れ，トリクロロシラン（トリクロロ（1H,1H,2H,2H-パーフルオロオクチル）シラン；Sigma-Aldrich 社，純度 97%）を 10 μL 滴下する。
- (11) 0.07 MPa まで減圧し，減圧状態を 60 min 維持し，マスターモールド表面のシラン化処理を行う。
- (12) シリコーン樹脂（東レ・ダウコーニング SILPOT 184；以下，PDMS）の主剤および硬化剤を 10:1 の割合で 60 g 混合し，真空攪拌脱泡ミキサー（EME 社 V-min 300）を用いて 3 min 攪拌する。
- (13) 攪拌後，マスターモールドへ流し込み，ホットプレートを用いて 85°C で 40 min 加熱し，硬化させる。
- (14) 硬化後，医療用ディスポメス（カイインダストリーズ 511-A）を用いて PDMS を切り出し，離型する。（図 5.2 (e)）
- (15) 切り出した PDMS の流入口および，流出口をパンチ（貝印 BPP-10F）で，直径 1mm の穴をあけ，シリコーン/アクリル系両面テープ（日東電工 5303W）を用いて塩化

ビニル板（光 EB235-5, 厚さ 0.5 mm）と接着させる。（図 5.2 (f)）

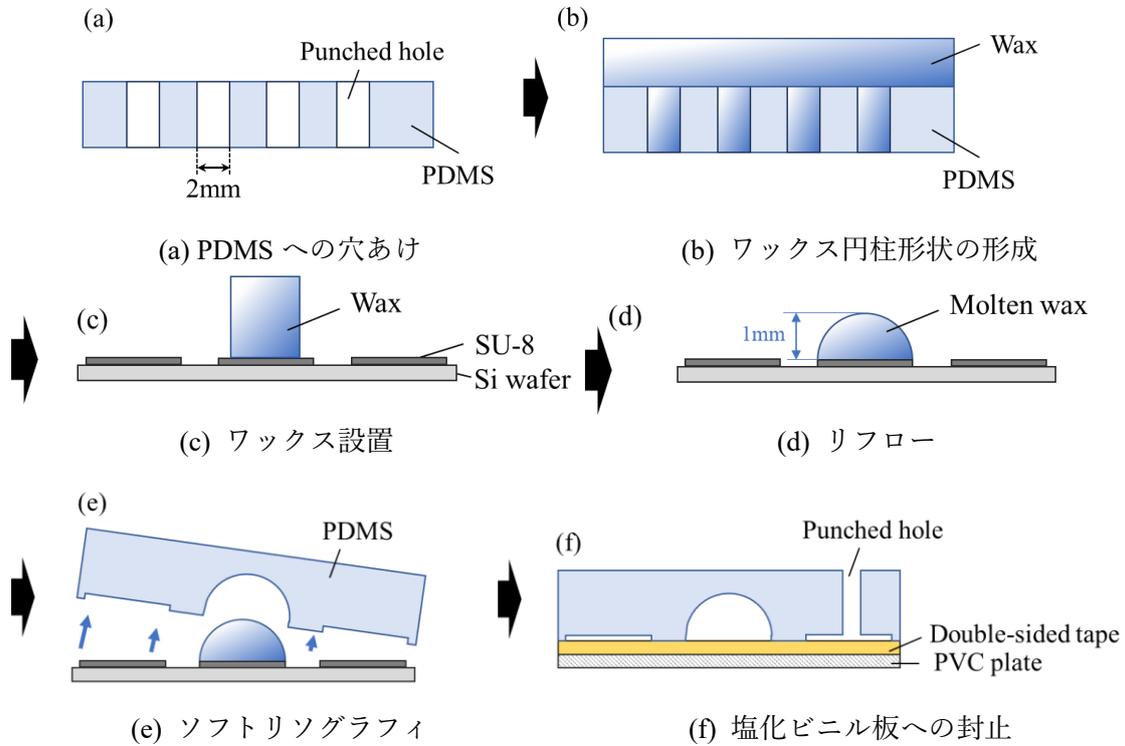


図 5.2 ワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法によるデバイスの作製プロセス

表 5.1 フォトリソグラフィ条件

SU-8 スピンコート条件	slope(5s)→500rpm(10s)→slope(10s)→1750rpm(60s)→slope(10s)
プリベーク条件	65°C(2min)→95°C(15min)→65°C(2min)→室温(5min)
露光条件	積算光量：300mJ/cm ²
ポストベーク条件	65°C(2min)→95°C(5min)→65°C(2min)→室温(5min)

続いて、液滴シミュレーションソフト HyDro（産業技術総合研究所）を用いて、反応容器の流路高さ 1mm を形成するために必要なワックスの体積を解析した。本シミュレーションでは、液滴はエネルギーが最小の状態安定するという基本原理に基づき、解析され、接触角等のパラメータから液滴形状の解析が行われる。SU-8 モールドの反応容器（幅 2mm, 長さ 5.3mm）上にワックスをリフローしたときの解析結果を図 5.3 に示す。このとき、ワックスと SU-8 3050 との接触角は 41.3° , 表面張力 23 mN/m, 密度 0.809 g/cm³, 滴下量 3.5 μ L とした。図 5.3 より、3.5 μ L のワックス (2.7 mg) をリフローすると流路高さ 1.028 mm が形成できることが分かった。

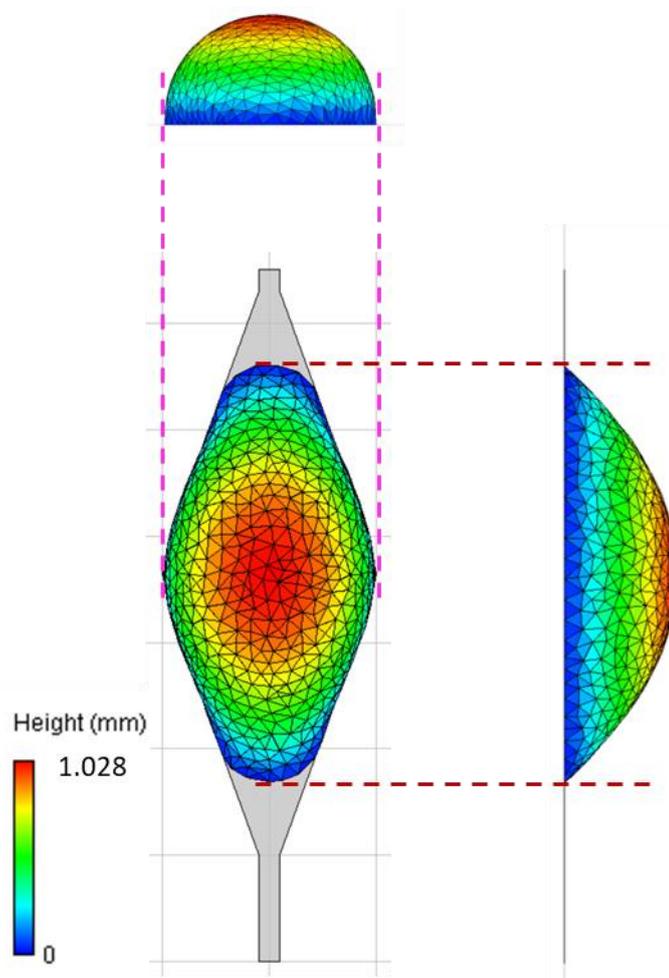
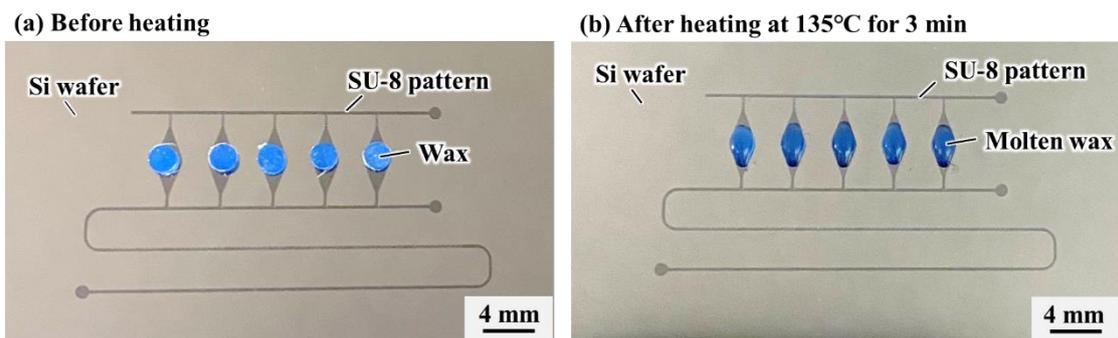


図 5.3 液滴シミュレーション結果

続いて、実際に SU-8 モールド上にワックスリフローにより反応容器のモールドを作製した。図 5.4 に加熱前および、加熱後のモールドの写真を示す。SU-8 モールドから溢れることなく、均一な液滴形状が形成されていることが分かる。図 5.5 にワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法により作製した PDMS の反応容器を示す。断面図より、反応容器の流路高さ最大値は、 $1041.2 \pm 32.2 \mu\text{m}$ ($n=5$) であった。この結果より、シミュレーション結果が妥当であることがわかり、概ね 1 mm の反応容器の流路高さを作製することができた。さらに、図 5.5 の反応容器の断面図より、SU-8 モールドとワックスの界面に PDMS 薄膜が形成されていないことが確認できた。



(a)加熱前, (b)135°C 3min 加熱後

図 5.4 ワックスリフローによる反応容器の作製

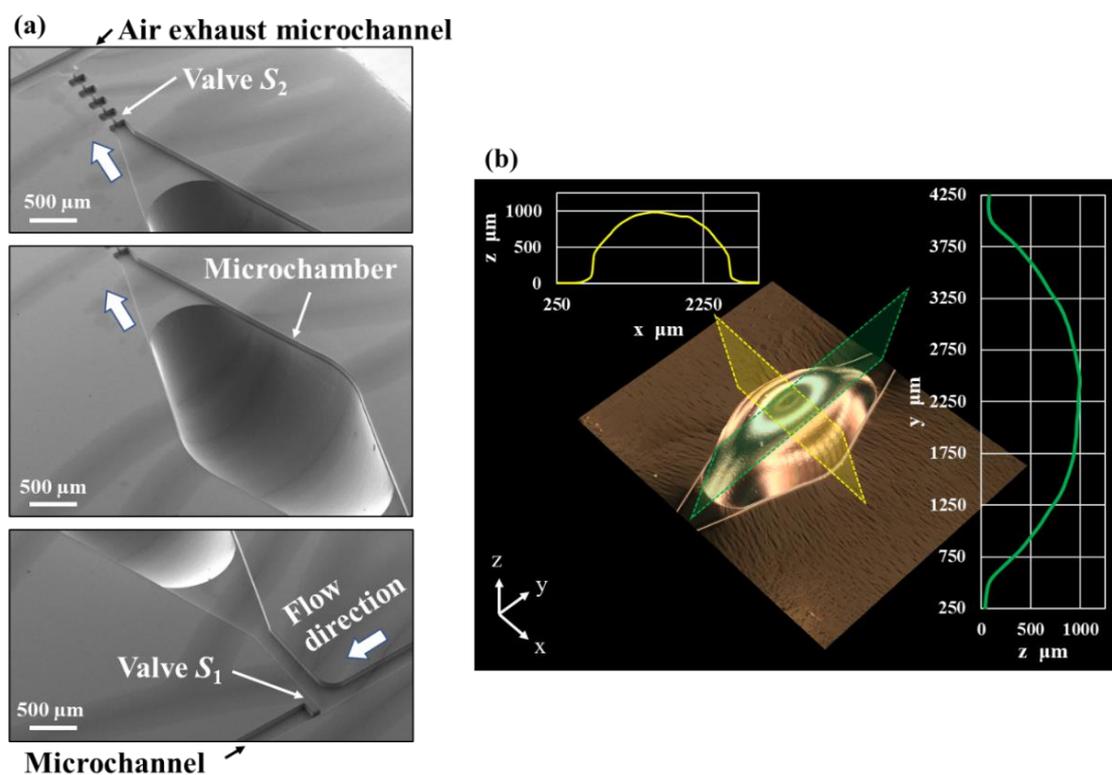


図 5.5 ワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法により作製した反応容器

図 5.6 (a) に、走査型電子顕微鏡（日立製作所, S-3000N）を用いて撮影した PDMS マイクロ流路の画像と図 5.6 (b) にワックス援用ソフトリソグラフィ法により作製した反応容器をデジタルマイクロスコプ（KEYENCE 社製, VHX-7000）を用いて取得した 3D 立体画

像を示す。なお、SEM 観察には予め卓上スパッタ装置（サンヨー電子社製，SC-701AT）を用いて目標膜厚設定 500 \AA で Au を PDMS 表面に成膜している。図 5.6 (a) および、図 5.6 (b) から、SU-8 モールドとワックスリフローによって作製した反応容器は段差構造がなく、なめらかな曲線をなして、作製されていることがわかった。

図 5.7 に LAMP 試薬を導入した結果を示す。左右対称に均一に導入されていることがわかる。作製した 20 個のデバイス（合計 100 個の反応容器）への LAMP 試薬の導入実験結果、反応容器内の空気の排除率を 100% まで大幅に向上させることができた。



(a) マイクロ流路および反応容器の SEM 画像 (b) デジタルマイクロスコープで取得した反応容器の 3D 画像ならびに反応容器高さ計測結果

図 5.6 マイクロ流路および反応容器の計測結果

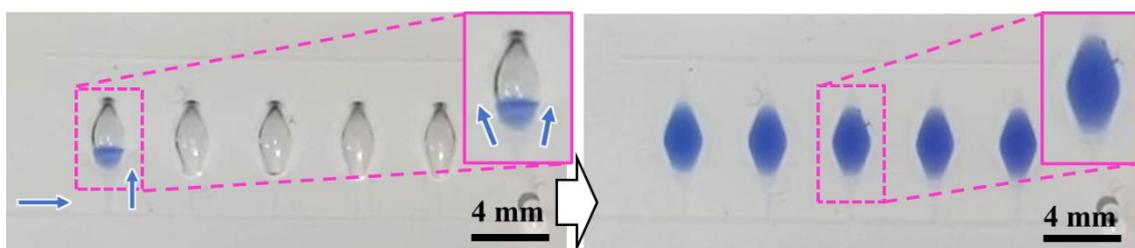
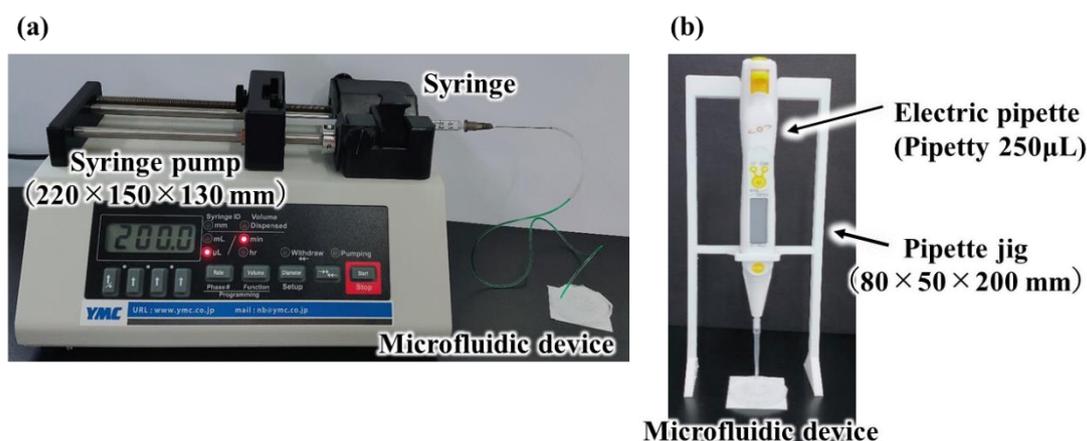


図 5.7 反応容器への LAMP 試薬の導入実験結果

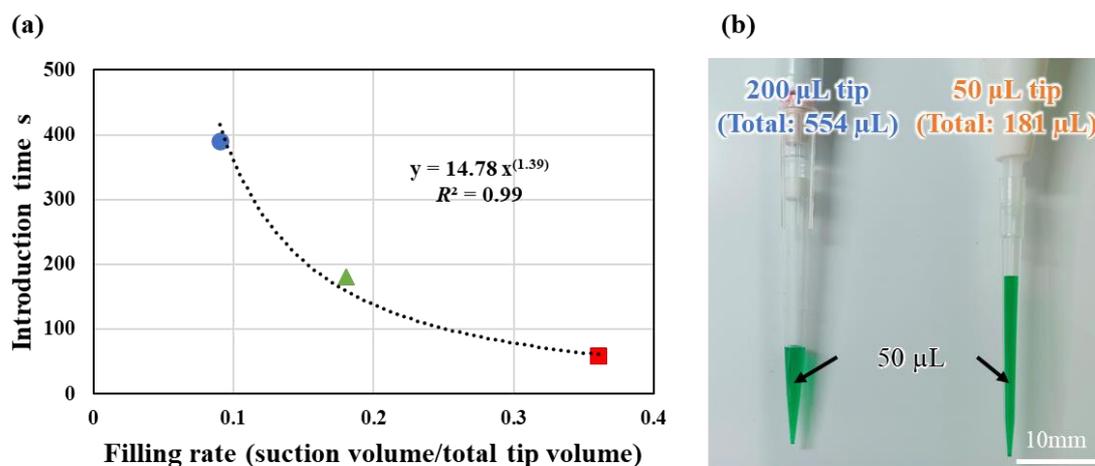
5.2.2 デバイスの送液方法

ポンプ送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスを用いた実験方法を示す。サンプルと LAMP 試薬の混合液の導入には、図 5.8 に示すようにシリンジポンプ(ワイエムシイ YSP-201)もしくは、電動ピペット(アイカムス・ラボ pipetty 250 μ L, MSIC01-03-250, 吐出範囲 1~250 μ L, 特注品)を用いた。図 5.8 (a) に示すようにシリンジポンプには、1 mL のシリンジ (MonotaRO 社 MDS-1mL, PP 製) および、針 (テルモ NN-2238N, 22G) を取り付け、先端にビニルチューブ (イワセ EXLON-PVC, 内径 0.55 mm, 標準肉厚 0.40 mm) を接続した。一方、図 5.8 (b) に示すように、電動ピペットを用いた場合は、混合液をピペットで吸引した後、ピペットチップの先端を診断デバイス流入口に差し込み、ピペットを吐出することで送液を行った。送液中は、3D プリンタ製の治具に固定した。電動ピペットを用いてデバイスに導入した際、ピペットチップ内に残留する空気の体積量によって導入時間が変わる。図 5.9 (a) に、200 μ L のピペットチップ (体積総量 554 μ L) に対し、200 μ L (充填率 36.1%), 100 μ L (充填率 18.1%), 50 μ L (充填率 9.0%) の緑色着色液を導入したときの実験結果を示す。なお、本実験では、容量 200 μ L のピペットチップ (Watson 社 1252P-703CS, 容量 200 μ L) を使用している。図 5.9 (a) から、遺伝子診断実験では 50 μ L の試薬を導入するためには、390 s を要することがわかる。そこで、図 5.9 (b) に示すように、電動ピペットの先端を加工し、低容量のピペットチップ (Thermo scientific 社 Finntip™ 50, 容量 50 μ L) が装着できるように取付部を改造した。このピペットチップを用いた場合、50 μ L (充填率 27.6%) を 90.3 ± 4.9 s ($n=6$) で導入ができることがわかった。



(a) シリンジポンプ, (b) 電動ピペット

図 5.8 ポンプ送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの実験方法



(a) ピペットチップ内充填率と送液時間 (b) ピペットチップへ 50 μ L の着色液を吸引した写真 (左:改造前 200 μ L のピペットチップを使用, 右:改造後 50 μ L のピペットチップを使用)

図 5.9 電動ピペットによるチップ充填率と送液時間

5.3 比色 LAMP 法による標的遺伝子の多項目同時診断

5.3.1 節足動物媒介性ウイルス

デング熱, チクングニヤ熱, ジカ熱のようなネッタイシマカ, ヒトスジシマカなどの節足動物が媒介する感染症 (アルボウイルス) は世界各国で毎年大きな被害が報告されており, 交通手段の発達に伴い感染拡大が急速に広がる傾向にある⁷⁻¹¹⁾. デング熱は世界中で年間 5,000 万人が感染していると推測されており⁵⁾, 妊婦がジカ熱に感染した場合, 胎児へ影響が出る可能性が大きく, 小頭症や先天性の病気を抱えるケースが多い. さらに, カ \rightarrow ヒト \rightarrow カの感染環が成立しているアルボウイルスは感染拡大前の水際対策が課題として挙げられ, 迅速な感染症診断が重要な手法として考えられている⁶⁾. さらに, デングウイルスはフラビウイルス科の中で 1 型から 4 型まであり, 非致死性の熱疾患に繋がるデング熱と, 重症型のデング出血熱やデングショック症候群の 2 つの病態があり, ウイルスの迅速な特定は早急な処置へと繋がる.

アフリカ等での現場即時診断を想定し, 本研究のマルチプレックス遺伝子診断デバイスでデング 2 型ウイルス (DENV-2) およびジカウイルスの遺伝子増幅実験を実施した. なお, 本実験では, デング 2 型ウイルスの遺伝子増幅実験ではプライマーの最適温度である 58 $^{\circ}$ C, ジカ熱ウイルスの検出実験では 62 $^{\circ}$ C の湯中で加温を実施した¹²⁾. また, 2 種のウイルスを使用した実験では中間の温度である, 60 $^{\circ}$ C の湯中で加温を行った.

図 5.10 に 60 min 加温後のデバイスをスマートフォンで撮影した画像を示す. 本実験では, 反応容器 2 番にデング 2 型ウイルスに起因するプライマーを固定し, 反応容器 3 番にはジ

カ熱ウイルスに起因するプライマーを固定した。図 5.10 (a) に示すように、デング 2 型ウイルスを含む混合液を導入した場合、デング 2 型ウイルスに起因するプライマーを固定した反応容器 2 番が遺伝子増幅反応（陽性）を示す紫色から水色へと変化した。同様に、図 5.10 (b) に示すように、ジカ熱ウイルスをサンプルに使用した実験では、反応容器 3 番の色が水色へと変わった。さらに、デング 2 型ウイルスとジカ熱ウイルスを混合させたサンプルを導入したところ、それぞれのウイルスに対応するプライマーを固定した反応容器 2 番と 3 番が陽性反応を示した。他の反応容器での色の変化が認められなかったため、反応容器間でのクロスコンタミネーションは生じていないことが分かった。このように、本デバイスにより、比色指示薬を用いることで、定性診断が可能であることを実証した。

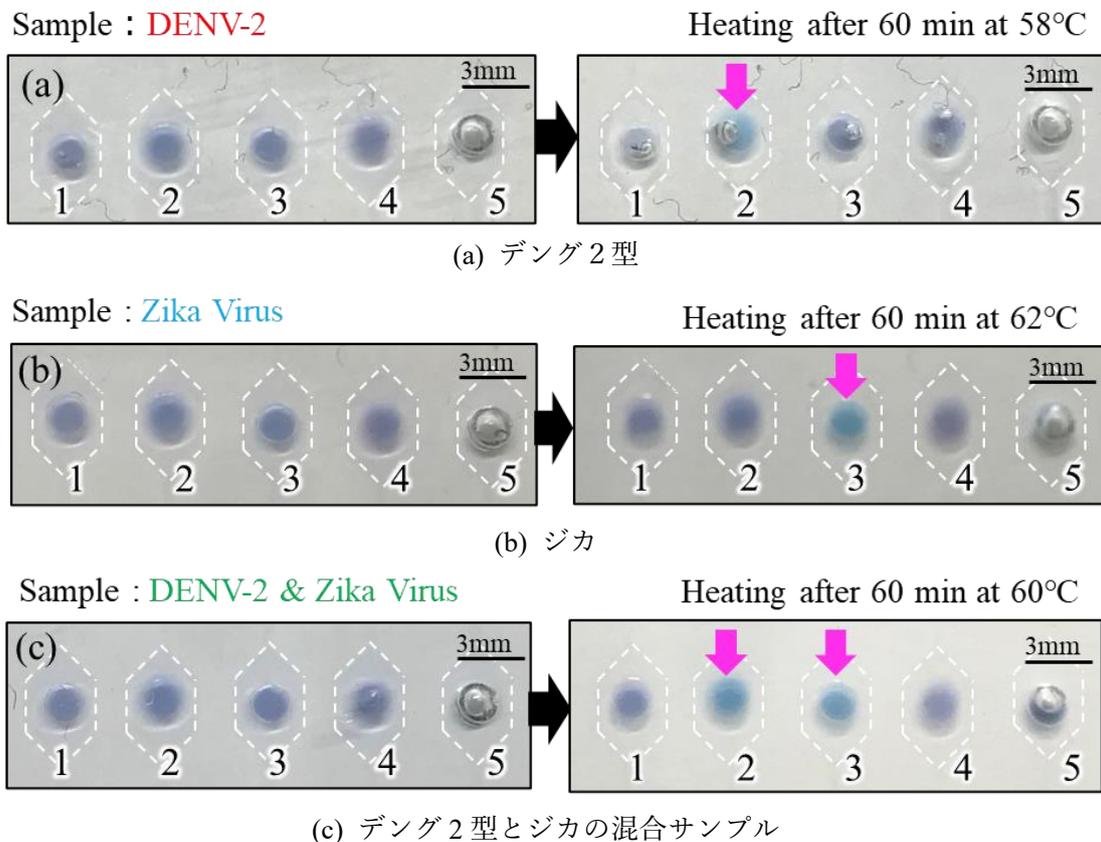


図 5.10 節足動物媒介性ウイルスの検出結果

続いて、取得した画像から反応容器の色を解析した。日本人男性の 10 人に 1 人は紫色と水色の識別が困難であると言われており、色の識別を定量的に陽性反応と陰性反応を区別する必要がある。そこで、人間が知覚する色差と同じになるよう設計された CIE- $L^*a^*b^*$ 色空間¹³⁻¹⁶⁾を用いた。図 5.11 に $L^*a^*b^*$ 色空間の模式図を示す。 L^* は明度、 a^*-b^* 平面は色相と彩度を表している。画像解析ソフト ImageJ を用いて、取得した画像の各反応容器内の RGB 値（赤、緑、青成分）を取得し、XYZ 表色系と呼ばれる色空間座標へ変換後、 $L^*a^*b^*$ 色

空間にプロットした。色空間座標への変換には、次式を用いた¹⁷⁾。

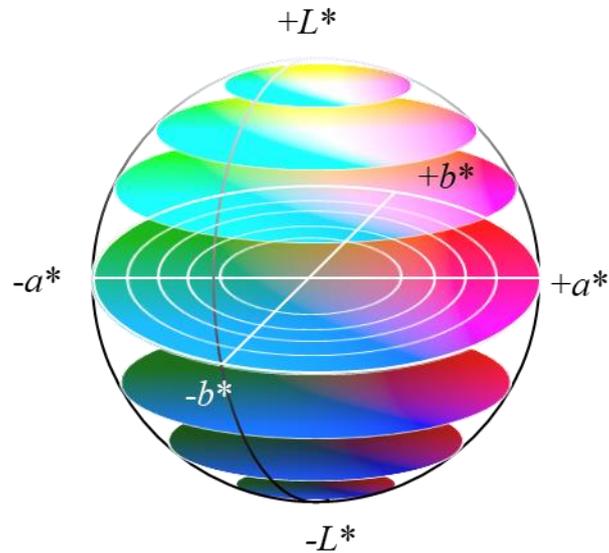


図 5.11 $L^*a^*b^*$ 色空間の模式図

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.4124 & 0.3576 & 0.1805 \\ 0.2126 & 0.7152 & 0.0722 \\ 0.0193 & 0.1192 & 0.9505 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (5.1)$$

$$x = \frac{X}{X+Y+Z}, \quad y = \frac{Y}{X+Y+Z} \quad (5.2)$$

$$L^* = 116f\left(\frac{y}{y_n}\right) - 16 \quad (5.3)$$

$$a^* = 500 \left\{ f\left(\frac{x}{x_n}\right) - f\left(\frac{y}{y_n}\right) \right\} \quad (5.4)$$

$$b^* = 200 \left\{ f\frac{y}{y_n} - f\frac{z}{z_n} \right\} \quad (5.5)$$

$$f(t) = \begin{cases} t^{\frac{1}{3}} & \left(t > \left(\frac{6}{29} \right)^3 \right) \\ \frac{1}{3} \left(\frac{29}{6} \right)^2 t + \frac{4}{29} & \text{(otherwise)} \end{cases} \quad (5.6)$$

ここで, x_n, y_n, z_n は基準となる白色点を示しており, D65 光源の場合, $(X_n, Y_n, Z_n) = (95.039, 100, 108.88)$, $(x_n, y_n, z_n) = (0.313, 0.329, 0.358)$ である.

図 5.12 に加温 60 min 後の取得画像の反応容器を解析し, a^*-b^* 色度図上にプロットした結果を示す. 陽性の反応容器 (水色) は, 第 3 象限側に, 陰性の反応容器 (紫色) は第 4 象限側にあることがわかり, 陽性と陰性の反応容器をグループ化することができた. 以上より, 陽性と陰性の反応容器を a^*-b^* 色度図上で識別できることがわかった.

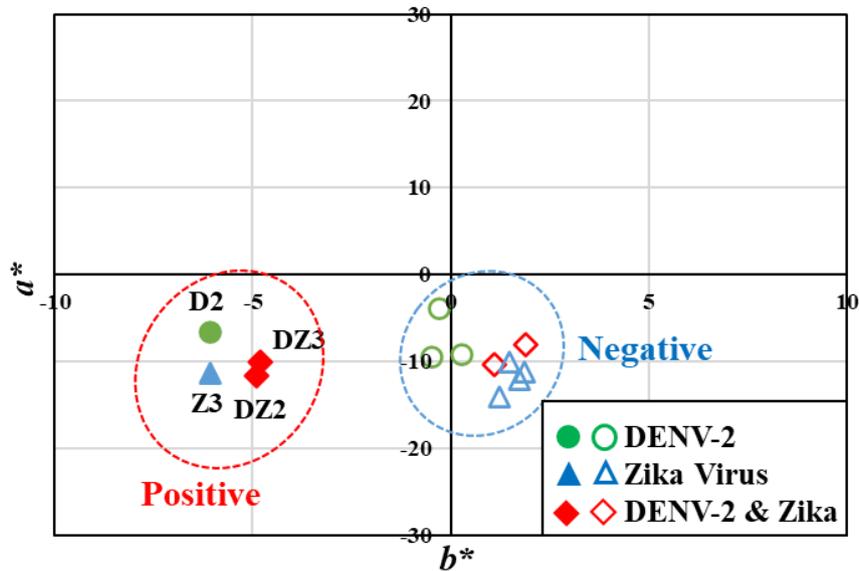


図 5.12 $L^*a^*b^*$ 色空間での解析結果

5.3.2 有毒植物

有毒植物の誤食事故は日本国内で報告されており, 2009 年から 2018 年では, 19 人のイヌサフランの誤食事故が起き, その内 8 人が死亡している. イヌサフランは山菜採りで代表的なギョウジャニンニクと酷似しているため誤食が起こっている.

他にもスイセン (有毒) とニラ (可食) や, トリカブト (有毒) とニリンソウ (可食) などの誤食事故も報告されており, 全身麻痺, 嘔吐, めまい, 動機, 昏睡などの重篤な中毒症状に陥るケースが多い. そのため, 誤食した有毒植物の迅速なスクリーニング検査は救急医療には重要であると言える¹⁸⁾. 通常, 検査には中毒症状患者の胃の内容物から植物片を採取し高速液体クロマトグラフィーなどで特定を行う¹⁹⁾. 最近では, PCR 法による方法²⁰⁾も提案されているが, これらの分析方法では, 長い処理時間と大掛かりな機器が必要であるため, 短時間で簡便な装置で診断が可能な本提案のマルチプレックス遺伝子診断デバイスによる検査手法は有効であると言える.

救急医療での使用を想定し、本研究のマルチプレックス遺伝子診断デバイスで有毒植物の遺伝子増幅実験を実施した。反応容器 2 番と 5 番にはイヌサフランに起因するプライマーを固定した。反応容器 3 番には植物に共通する遺伝子を増幅させるプライマー（ポジコン）を固定した。なお、反応容器 1 番および 4 番にはネガティブコントロールとして、プライマーは固定しなかった。本実験では、ギョウジャニンニクとイヌサフランから簡易抽出キット（カネカ 簡易 DNA 抽出キット version2）を用いて抽出した遺伝子サンプルを使用した。

図 5.13 に 63°C 60 min 加温後のデバイスを撮影した画像を示す。図 5.13 (a) に示すように、ギョウジャニンニクの DNA を導入した場合には、植物共通プライマーを固定した反応容器 3 番のみが陽性反応を示した。一方、図 5.13 (b) に示すように、イヌサフランの DNA を導入した場合、反応容器 3 番に加えて、イヌサフランの遺伝子を増幅させるプライマーを固定した反応容器 2 番と 5 番が陽性反応を示した。他の反応容器では、遺伝子増幅反応は見られず、反応容器間のクロスコンタミネーションは認められなかった。

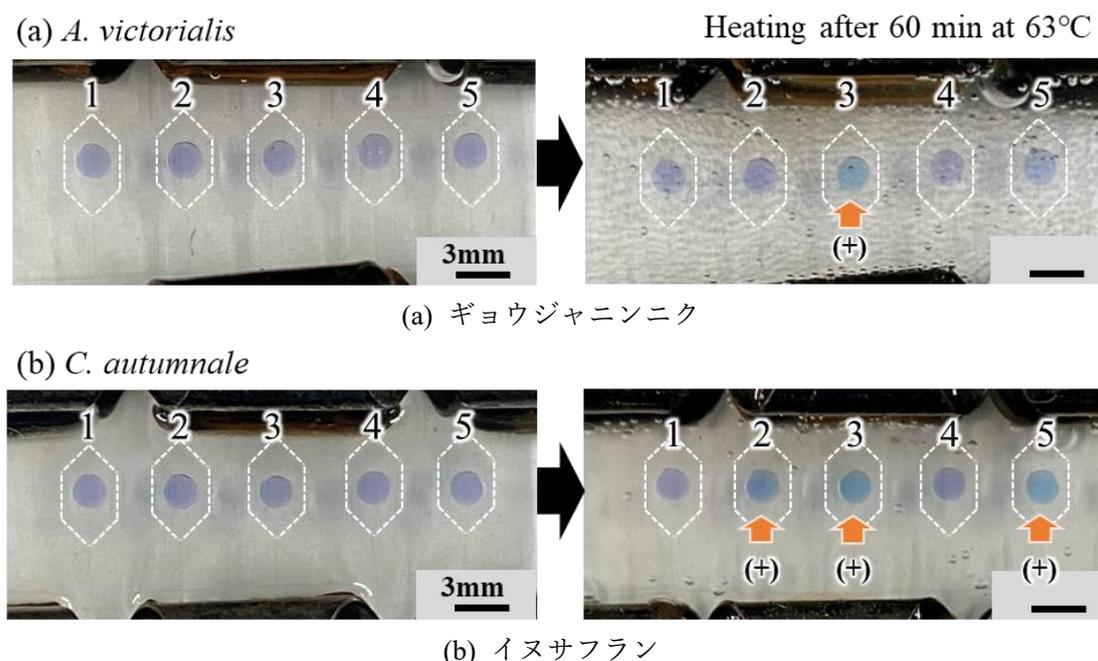


図 5.13 有毒植物の検出結果（加温前および 63°C 60 min 加温後）

続いて、取得した画像から反応容器の色を解析した。図 5.14 に加温 60 min 後の画像の反応容器を解析し、 a^*-b^* 色度図でプロットした結果を示す。図から、陽性反応容器および陰性反応容器を明確にグループ化して区別することができ、色度図上で識別できることを示した。

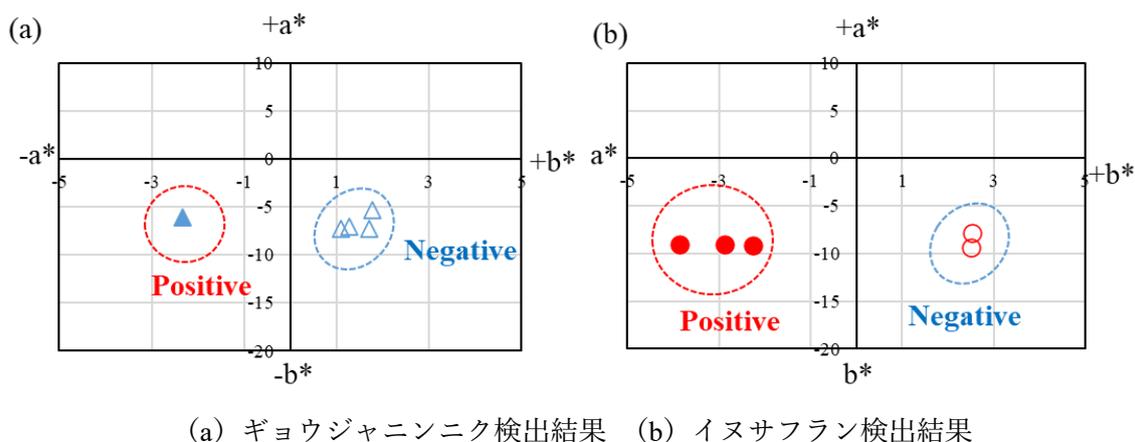


図 5.14 $L^*a^*b^*$ 色空間での解析結果

5.3.3 ヒト感染症ウイルス

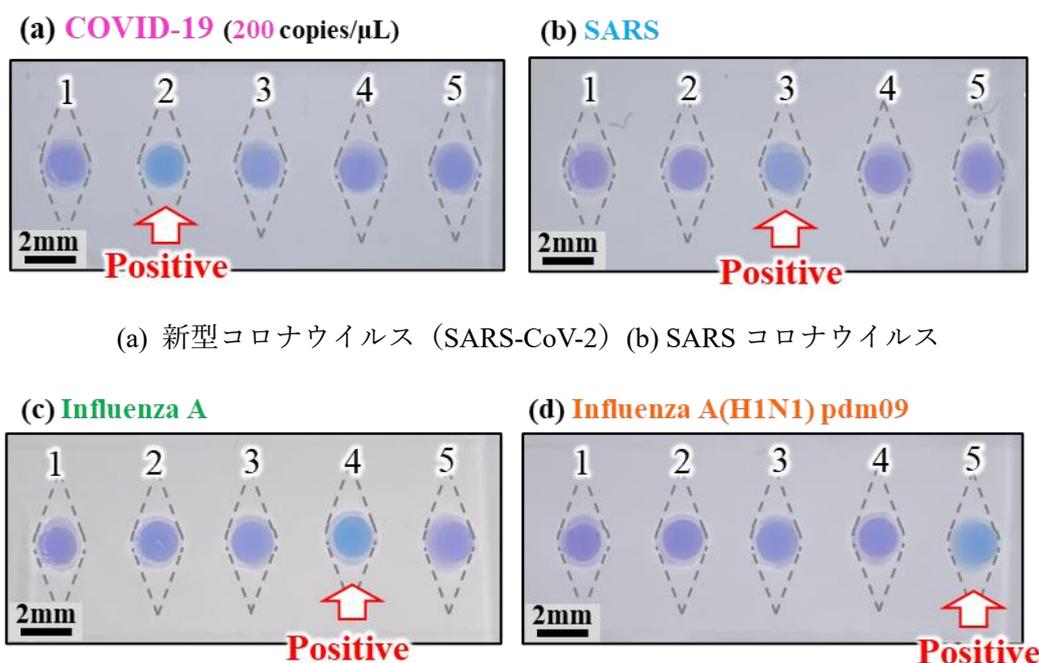
新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は SARS-CoV-2 がヒトに感染することによって発症する気道感染症である²¹⁻²⁵⁾。COVID-19 は、2019 年 12 月に中国、武漢にて最初の症例が報告されて以降、急速に世界中に広がった感染性の高い感染症である。感染者数は、累計 6 億人を超え、世界的流行 (パンデミック) を引き起こした。COVID-19 の大流行は、医療、経済、社会システムに前例のない混乱を引き起こし、人々の生命、生活を脅かした。COVID-19 の蔓延を防ぐためには、SARS-CoV-2 のタイムリーかつ正確な診断および、積極的な調査、早期発見が重要な第一歩である。

そこで、本研究のマルチプレックス遺伝子診断デバイスを用いて、SARS-CoV-2 を含む 4 種類のヒト感染症ウイルス (SARS-CoV-2, SARS, A 型インフルエンザウイルス, A 型インフルエンザウイルス H1N1 pdm09 型) の同時迅速診断を行った。反応容器 2 番には新型コロナウイルス (SARS-CoV-2), 反応容器 3 番には SARS コロナウイルス, 反応容器 4 番には A 型インフルエンザウイルス, 5 番目には A 型インフルエンザウイルス H1N1 pdm09 型に起因するプライマーを固定した。なお、なお、反応容器 1 番にはネガティブコントロールとして、プライマーは固定しなかった。導入するサンプルには、新型コロナウイルス (RNA, 最終濃度 200 copies/ μ L), SARS コロナウイルス (栄研化学 検出キット内ポジコン cDNA), A 型インフルエンザウイルス (栄研化学 検出キット内ポジコン cDNA), A 型インフルエンザ H1N1 pdm09 型 (栄研化学 検出キット内ポジコン cDNA) を使用した。なお、LAMP 試薬には、全 4 回の実験で共通して RT-LAMP 試薬 (栄研化学) を使用した。

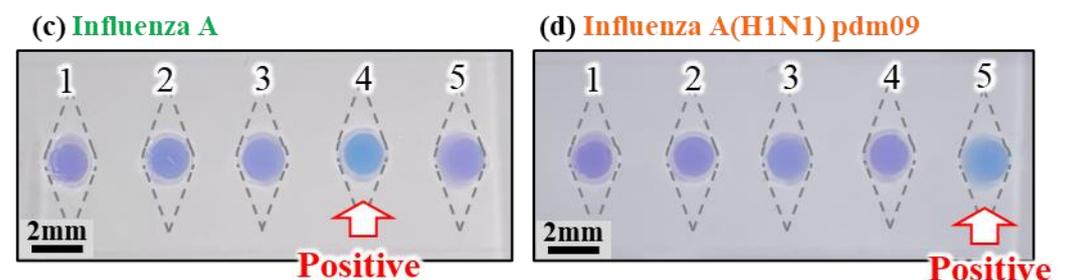
遺伝子サンプルと LAMP 試薬を調整後、シリンジポンプを用いてデバイス内に 10 μ L/min で導入した。導入後は流入口および流出口を両面テープで封止後、クリップで固定し、ウォーターバス (58 $^{\circ}$ C) で 60 min 加温した。

図 5.15 に加温 60 min 後のデバイスを撮影した画像を示す。図 5.15 (a) に示すように、新

型コロナウイルスを含む混合液を導入した場合、新型コロナウイルスに起因するプライマーを固定した反応容器 2 番が紫色から水色へと変化し、遺伝子増幅反応（陽性反応）を示した。同様に、図 5.15 (b) SARS コロナウイルス、図 5.15 (c) A 型インフルエンザウイルス、図 5.15 (d) A 型インフルエンザウイルス H1N1 pdm09 型をデバイスに導入した実験では、それぞれのウイルスに対応するプライマーを固定した反応容器が陽性反応を示した。また、他の反応容器での色の変化が認められなかったため、反応容器間でのクロスコンタミネーションは生じていないことが分かった。



(a) 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) (b) SARS コロナウイルス



(c) A 型インフルエンザウイルス (d) A 型インフルエンザウイルス (H1N1) pdm09 型

図 5.15 ヒト感染性ウイルスの検出結果 (58°C 60 min 加温後)

続いて、取得した画像から反応容器の色を解析した。図 5.16 に加温 60 min 後の画像の反応容器を解析し、 a^* - b^* 色度図でプロットした結果を示す。図から、陽性反応容器および陰性反応容器を明確にグループ化して区別することができ、色度図上で識別できることを示した。

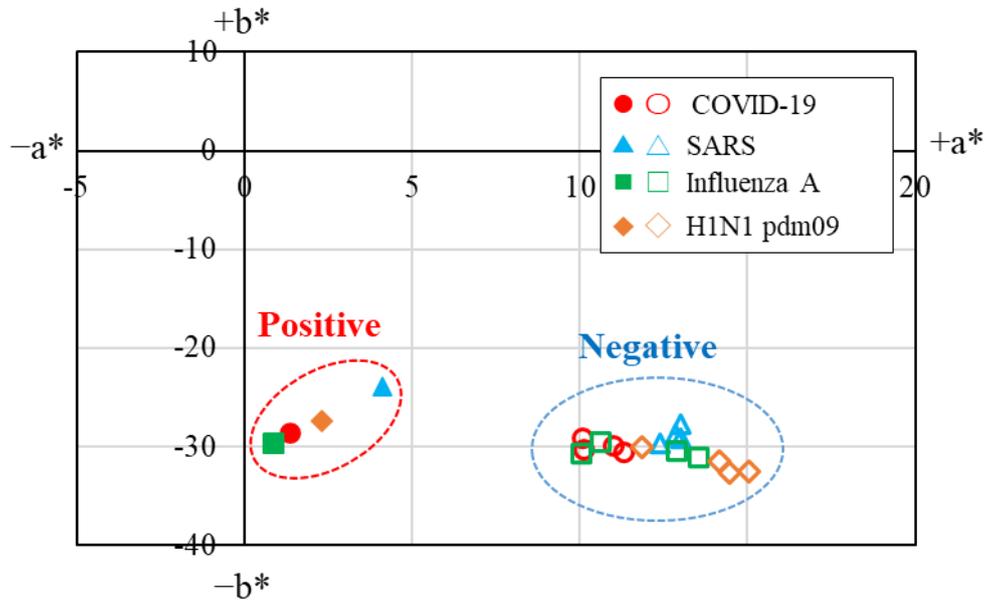


図 5.16 $L^*a^*b^*$ 色空間での解析結果

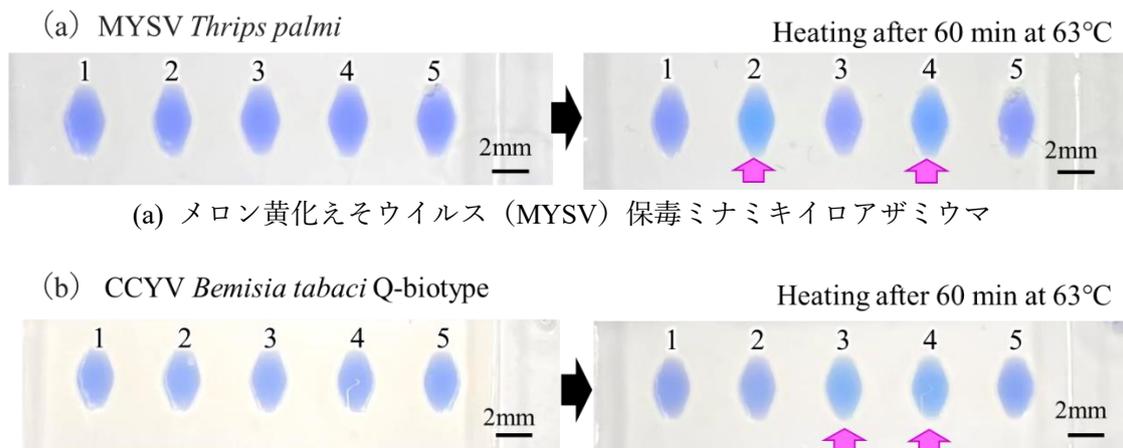
5.3.4 農作物病害虫

メロン黄化えそウイルス (MYSV) やウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV) は、キュウリ、メロン、スイカなどのウリ類の農作物に感染し、葉が黄色く退色する症状を引き起こす。その結果、草勢が低下し、収穫量や果実等の品質に影響をおよぼす。これらの感染症は、生育不良との見分けが困難であり、早期の原因特定が求められている。さらに、これらの病害ウイルスは、数 mm 程度の病害虫 (アザミウマやコナジラミ) によって伝搬されるが^{26,27)}、病害虫の種類 (バイオタイプ) によって伝搬するものとしめないものがあるため、病害虫の識別は重要であるといえる。

そこで、本研究のマルチプレックス遺伝子診断デバイスを用いて、愛知県内で捕獲した病害虫から抽出した遺伝子サンプルを用いて遺伝子増幅実験を実施した。反応容器 2 番には、メロン黄化えそウイルス (MYSV)、反応容器 3 番にはウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV)、反応容器 4 番にはミナミキイロアザミウマ、反応容器 5 番にはミカンキイロアザミウマの遺伝子に起因するプライマーを固定した。なお、反応容器 1 番にはネガティブコントロールとして、プライマーは固定しなかった。

ミナミキイロアザミウマから抽出した遺伝子サンプルを用いた実験結果を図 5.17 (a) に示す。63°C、60 min 加温後、反応容器 4 番の色が陽性反応を示す水色へと変化し、ミナミキイロアザミウマの遺伝子が検出できていることを示した。さらに、反応容器 2 番も水色に変化していることから、ミナミキイロアザミウマの体液に含まれていた MYSV も同時に検出できたことがわかる。同様に、タバココナジラミ (バイオタイプ Q) から抽出した遺伝子サ

サンプルを用いた遺伝子増幅実験結果を図 5.17 (b) に示す。このとき、反応容器 2 番には MYSV、反応容器 3 番には CCYV、4 番目にはタバココナジラミ (バイオタイプ Q)、5 番目にはタバココナジラミ (バイオタイプ B) の遺伝子に起因するプライマーを固定した。なお、反応容器 1 番にはネガティブコントロールとして、プライマーは固定しなかった。実験結果から、反応容器 4 番が陽性反応を示していることからタバココナジラミ (バイオタイプ Q) を正しく検出できていることがわかる。さらに、タバココナジラミの体液に含まれていた CCYV を同時に検出できていることがわかった。



(b) ウリ類退緑黄化ウイルス (CCYV) 保毒タバココナジラミ バイオタイプ Q
 図 5.17 農作物病害ウイルス保毒病害虫の検出結果 (加温前および 63°C 60 min 加温後)

続いて、取得した画像から反応容器の色を解析した。図 5.18 に加温 60 min 後の画像の反応容器を解析し、 a^* - b^* 色度図でプロットした結果を示す。図から、陽性反応容器および陰性反応容器を明確にグループ化して区別することができ、色度図上で識別できることを示した。

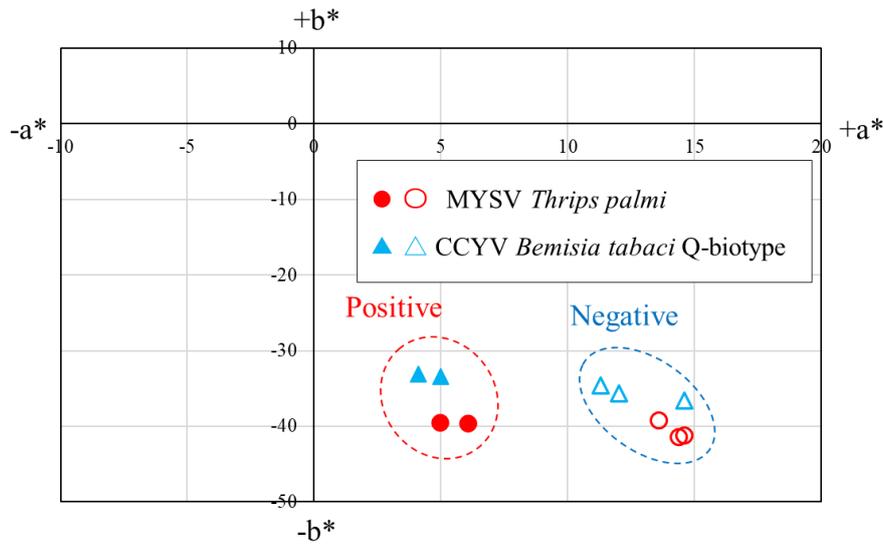


図 5.18 $L^*a^*b^*$ 色空間での解析結果

5.3.5 食物アレルギー物質

食物アレルギーは特定の食品に含まれるたんぱく質の吸入あるいは接種によって引き起こされる免疫性の反応である²⁸⁻³⁰⁾。食物アレルギー反応の発症率および有病率はここ数十年で増加し、世界的な健康問題となっている。アレルギー反応は、皮膚（じんましん）、呼吸器（喘鳴、咳）、消化器（吐き気、嘔吐、下痢）などの急性アレルギー反応だけでなく、アナフィラキシーなどの重篤な状態を引き起こすことがある^{31,32)}。現在、多くの国で食物アレルギーの表示が義務化され、法制化されている。日本では、小麦、そば、落花生、卵、エビ、カニの7種類の特定原材料を含む加工食品について、食品アレルギー表示規制が行われている。このガイドラインでは、アレルギーとなるタンパク質を含む食品は、その濃度が10 mg/kg (ppm)³³⁾を超える場合に表示しなければならないと規定されている。食物アレルギーを持つ消費者にとって、アレルギーは微量であってもアレルギー反応を引き起こす可能性がある。したがって、アレルギー物質が誤って混入した加工食品を迅速かつ容易に特定することは、食品加工業界におけるリスク管理戦略上、食物アレルギー事故を効果的に防止するために極めて重要である。

そこで、開発したデバイスを用いて、食物アレルギー物質の検出を行った。10個の反応容器を半径20 mmの円周上に配置したデバイスを用いて、植物性の食物アレルギー物質3種（小麦、そば、落花生）の60 min以内の多項目同時診断を実証した。LAMP法を用いて植物性の食物アレルギー物質の多項目同時診断実験を行った。図5.19に示すように、新たに10個の反応容器を直径20 mmの円周上に配置したデバイスを作製し、実験に供した（導入流量30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で緑色着色液を導入後の写真）。円形にすることで直列にならべたデバイスと比較してコンパクトにすることを可能にした。なお、本デバイスの各寸法は、反応容器

間の長さ $L_1 = 1.52$ mm, メイン流路から反応容器までの分岐流路の長さ $L_2 = 0.80$ mm, 反応容器から永久阻害バルブ S_2 までの長さ $L_3 = 0.89$ mm, 一時阻害バルブ S_1 のギャップ長 $g_1 = 40.5$ μm ($P_1 = 2.79$ kPa), 永久阻害バルブ S_2 のギャップ長 $g_2 = 21.4$ μm ($P_2 = 4.47$ kPa), 一時阻害バルブ S_1 の角部半径および, 永久阻害バルブ S_2 の角部半径 $r_1 = r_2 = 6.4$ μm であり, 導入流量 160 $\mu\text{L}/\text{min}$ まで可能となる.

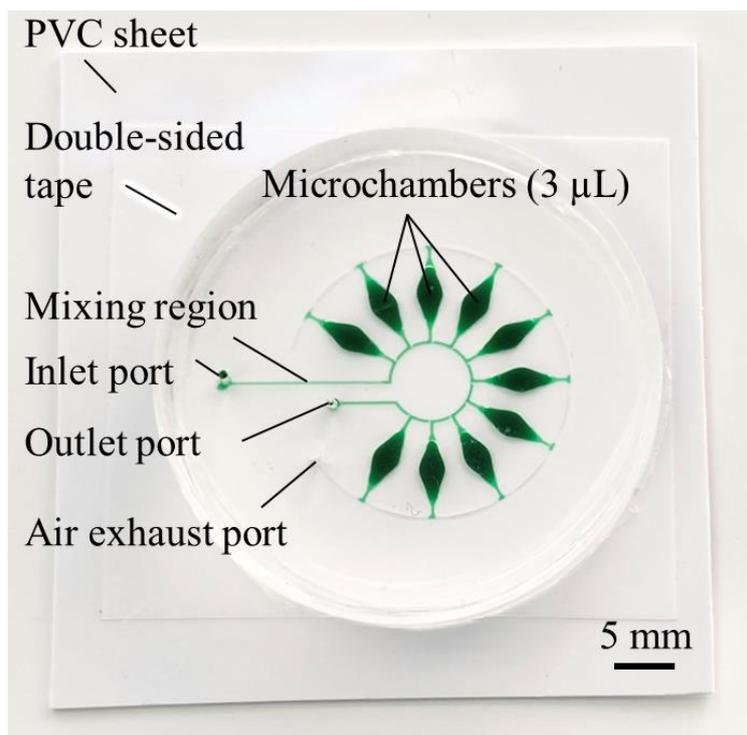


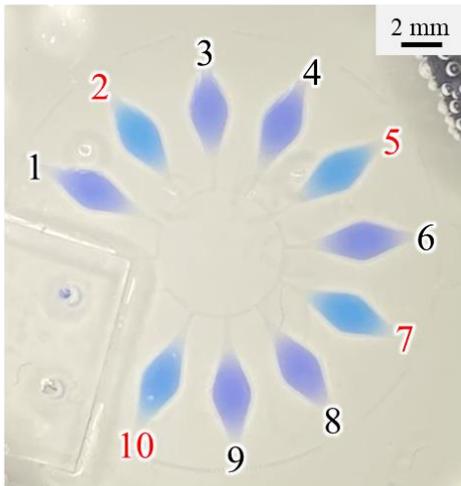
図 5.19 緑色着色液を 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で導入した 10 連円周デバイス

本実験では, 検体サンプルに小麦, そば, 落花生, チャノキの DNA (最終濃度 各 1 ng/ μL) を使用した. 使用した DNA は遺伝子抽出キット (タカラバイオ TaKaRa NucleoSpin Plant II) を用いて精製した. 反応容器 2 番, 7 番は小麦, 反応容器 3 番, 8 番にはそば, 反応容器 4 番, 9 番には落花生の遺伝子に起因するプライマーを 0.5 μL 滴下し固定した. 反応容器 5 番と 10 番にはポジティブコントロールとして植物に共通する遺伝子に起因するユニバーサルプライマーを固定した. 反応容器 1 番, 6 番はネガティブコントロールとして, プライマーは固定しなかった.

検体サンプルと試薬の混合液を導入後, ウォーターバス (60°C) で 60 min 加温後のデバイスの画像を図 5.20 に示す. 図 5.20 (a) から, 小麦の DNA を含む混合液を導入したときには小麦に対応するプライマーを固定した反応容器 2 番と 7 番に加え, ユニバーサルプライマーを固定したポジティブコントロールの反応容器 5 番と 10 番の溶液の色が陽性反応を示し, 紫色から水色へと変化し, 正しく遺伝子増幅反応を示した. 図 5.20 (b) から, 小麦

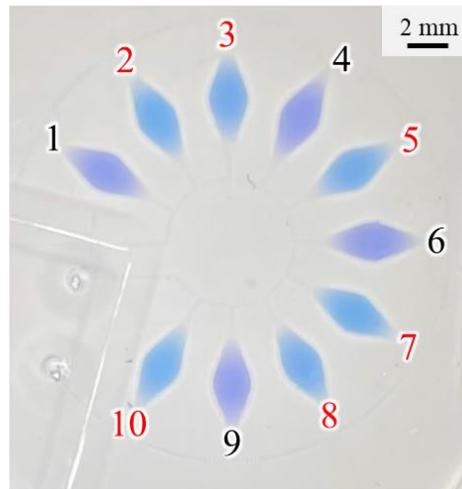
とそばの DNA サンプルを混合させて導入した場合、前述の反応容器に加え、そばの DNA に起因するプライマーが固定された反応容器 3 番と 8 番も陽性反応を示した。さらに、図 5.20 (c) から、小麦、そば、落花生の DNA サンプルを混合させて導入した場合には、同様に、落花生の DNA に起因するプライマーが固定された反応容器 4 番と 9 番も期待通り陽性反応を示した。一方で、図 5.20 (d) に示すように、チャノキの DNA を含む混合液を導入した際には、植物共通のユニバーサルプライマーを固定した反応容器 5 番と 10 番のみが反応した。すべての実験において、反応容器間のクロスコンタミネーションは見られなかった。

(a) Wheat



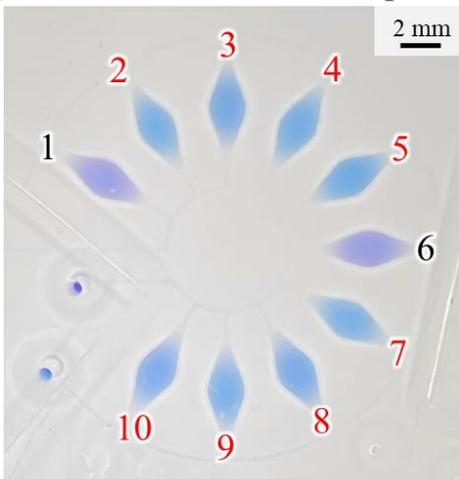
(a) 小麦

(b) Wheat and buckwheat



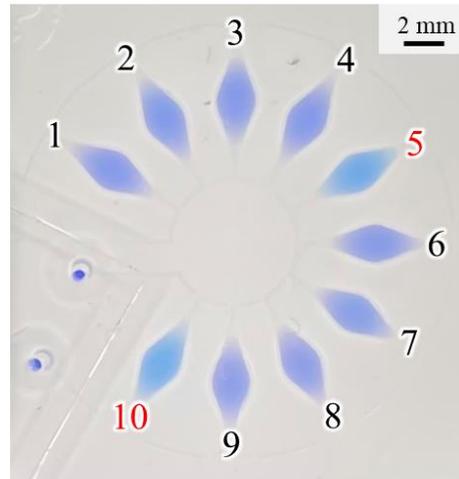
(b) 小麦とそば

(c) Wheat, buckwheat, and peanut



(c) 小麦, そば, 落花生

(d) Tea plant



(d) チャノキ (ネガティブコントロール)

図 5.20 植物性食物アレルギー物質の遺伝子増幅実験結果

また、加温 60 min 後に取得した画像の反応容器の色を画像解析ソフト (ImageJ) で取得し、CIE- $L^*a^*b^*$ 色空間を用いて解析したところ、期待通り、陽性の反応容器と陰性の反応容器を明確にグループ化して区別することができた。加温 60 min 後の各反応容器を a^*-b^* 平面上にプロットしたグラフを図 5.21 に示す。

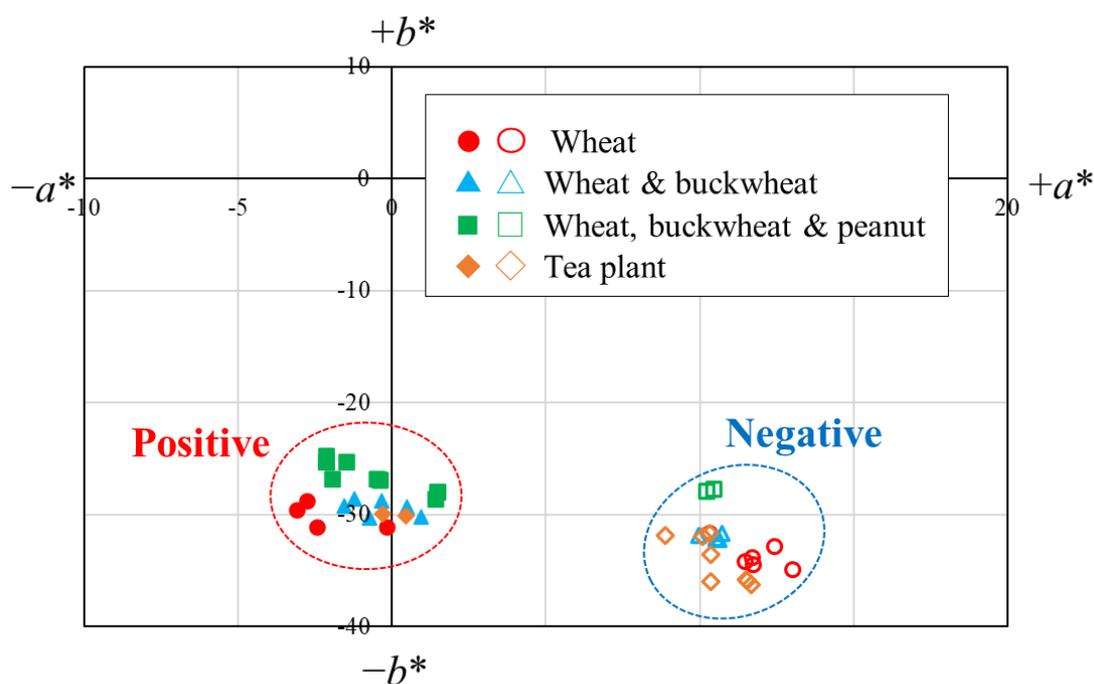
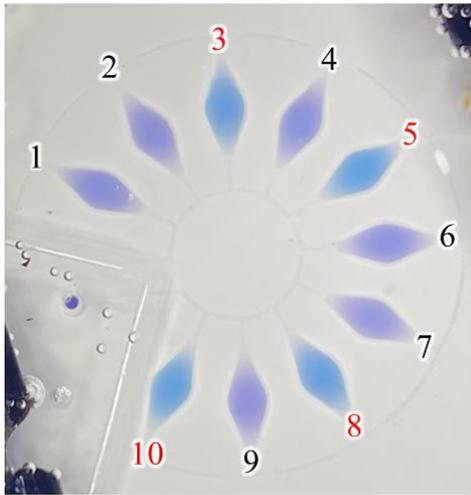


図 5.21 $L^*a^*b^*$ 色空間での解析結果

また、図 5.22 (a) にそば DNA サンプル、図 5.22 (b) に落花生 DNA サンプル、図 5.22 (c) に小麦と落花生 DNA サンプルの混合液、図 5.22 (d) にそばと落花生 DNA サンプルの混合液を使用した遺伝子増幅実験結果 (60 °C 60 min 後) を示す。すべての実験において、正しく対応するプライマーを固定した反応容器のみで遺伝子増幅反応が生じ、反応容器間でのクロスコンタミネーションは見られなかった。

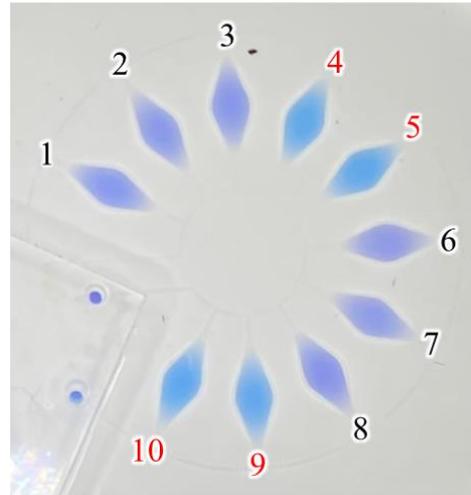
本実験結果で得られた画像においても反応容器内の色を解析したところ、図 5.23 に示すように期待通り、陽性を示した反応容器と陰性の反応容器で明確にグループ化し区別することができることを明らかにした。

(a) Buckwheat



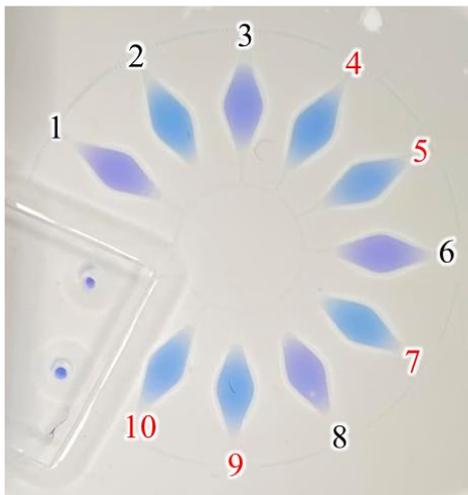
(a) そば

(b) Peanut



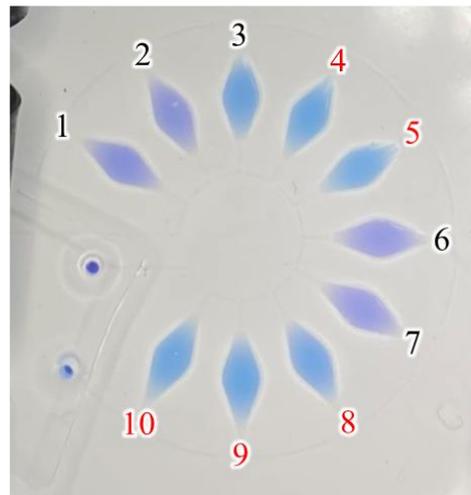
(b) 落花生

(c) Wheat and peanut



(c) 小麦と落花生

(d) Buckwheat and peanut



(d) そばと落花生

図 5.22 植物性食物アレルギー物質の遺伝子増幅実験結果

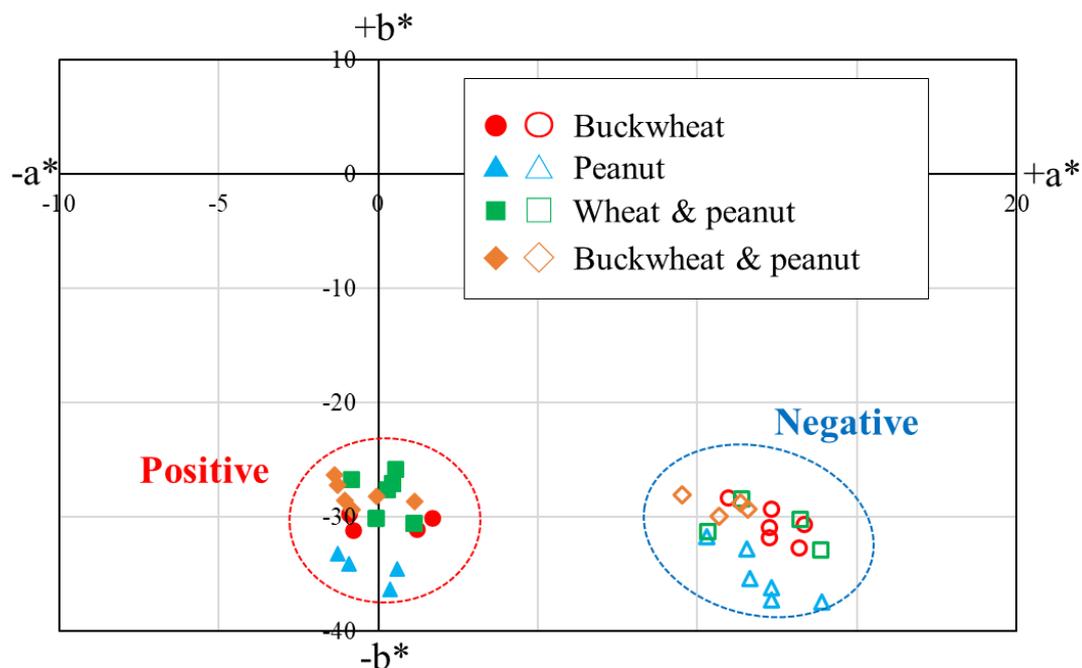


図 5.23 $L^*a^*b^*$ 色空間での解析結果

5.4 結言

本章では、はじめにデバイスの作製方法にワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法を適用し、反応容器への一様な溶液の流入を可能にした。続いて、電動ピペットを用いた送液方法に改良し、装置の小型化ならびに診断手順の簡略化を図った。最後に、比色指示薬を用いたマルチプレックス遺伝子診断デバイス上での定性診断を示した。得られた結果をまとめると次のとおりである。

- (1) ワックスリフロー援用ソフトリソグラフィ法を適用したことで、作業者によらない作製プロセスに改良し、反応容器内の気泡が残留しないように改良した。
- (2) 電動ピペットを用いることで、診断プロセスの簡略化を実現した。さらに、電動ピペットに装着するピペットチップ内の空気の容積を少なくすることで、送液時間の短縮が可能であることを示した。
- (3) 節足動物媒介性ウイルス、有毒植物、ヒト感染性ウイルス、農作物病害ウイルス、農作物病害虫、食物アレルギー物質の比色指示薬を用いた簡便な定性診断を実施した。さらに、反応容器の色を解析することで、陽性と陰性の反応容器を識別できることを示した。

参考文献

- [1] P. Choudhary, P. Rai, J. Yadav, S. Verma, H. Chakdar, S. K. Goswami, A. K. Srivastava, P. L. Kashyap, and A. K. Saxena, "A rapid colorimetric LAMP assay for the detection of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA causing sheath blight of rice", *Sci. Rep.*, 10, 22022, (2020)
- [2] M. Goto, K. Shimada, A. Sato, E. Takahashi, T. Fukasawa, T. Takahashi, S. Ohaka, T. Taniguchi, E. Honda, A. Nomoto, A. Ogura, T. Kirikae, and K. Hanaki, "Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* in mouse feces by colorimetric loop-mediated isothermal amplification", *J. Microbiol. Methods*, 81(3), 247-52, (2010)
- [3] Y. Dan, K. Jilie, L. Xinxin, F. Xueen, and C. Qin, "Colorimetric LAMP microfluidic chip for detecting three allergens: peanut, sesame and soybean", *Sci. Rep.*, 8, 8682, (2018)
- [4] B. Xiao, R. Zhao, N. Wang, J. Zhang, X. Sun, F. Huang, and A. Chen, "Integrating microneedle DNA extraction to hand-held microfluidic colorimetric LAMP chip system for meat adulteration detection", *Food Chem.*, 411, 135508, (2023)
- [5] C. U.-Alvarez, Q. Lam, D. A. Baldwin, and J. Chernoff, "Low saliva pH can yield false positives results in simple RT-LAMP-based SARS-CoV-2 diagnostic tests", *PLoS One*, 16(5), e0250202
- [6] S. Okamoto, and Y. Ukita, "Reflow process using wax for fabricating curved shaped molds of PDMS microchannels and chambers", *Micro Nano Eng.*, 8, 100055, (2020)
- [7] S. B. Halstead, "Dengue", *Lancet*, 370(9599), 1644-1652, (2007)
- [8] K. R. Gurukumar, D. Priyadarshini, J. A. Patil, A. Bhagat, A. Singh, P. S. Shah, and D. Cecilia, "Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses", *Virology*, 6(10), (2009)
- [9] L.-J. Chien, T.-L. Liao, P.-Y. Shu, J.-H. Huang, D. J. Gubler, and G.-J. J. Chang, "Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses" *J. Clin. Microbiol.*, 44(4), 1295-1304, (2006)
- [10] C. P. Simmons, J. Farrar, V.V.C Nguyen, and W. Bridget, "Dengue", *N. Engl. J. Med*, 366(15), 1423-32, (2012)
- [11] G. A. Santiago, J. Vázquez, S. Courtney, K. Y. Matías, L. E. Andersen, C. Colón, A. E. Butler, R. Roulo, J. Bowzard, J. M. Villanueva, and J. L. Muñoz-Jordan, "Performance of the triplex real-time RT-PCR assay for detection of zika, dengue and chikungunya viruses", *Nat. Commun.*, 9(1), 1391, (2018)
- [12] H. Aonuma, I. Iizuka, J.-C. Li, M. Ote, S. Tajima, M. Saijo, C.-H. Chen, and H. Kanuka, "LAMP detection of virus-derived DNA of zika virus in vector mosquito", *Front. Trop. Dis.*, 3, 759375, (2022)
- [13] C. Connolly, and T. Fliess, "A study of efficiency and accuracy in the transformation from RGB to CIELAB color space", *IEEE Trans. Image Process.* 6(7), 1046-8, (1997)

- [14] I. L. Weatherall, and B. D. Coombs, "Skin color measurements in terms of CIELAB color space values", *J. Invest. Dermatol.*, 99 (4), 468-73, (1992)
- [15] N. A. Ibraheem, M. M. Hasan, R. Z. Khan, and P. K. Mishra, "Understanding color models: A review", 2(3), *J. Sci. Technol.*, 265-75, (2012)
- [16] M. Tkalčič, and J. F. Tasič, "Colour spaces – perceptual, historical and applicational background", *EUROCON 2003. Computer as a tool. The IEEE region 8*, 1, 304-308 (2003)
- [17] E. Saldaña, R. Siche, W. Castro, R. Huamán, and R. Quevedo, "Measurement parameter of color on yacon (*Samolanthus sonchifolius*) slices using a computer vision system", *LWT—Food Sci. Technol.*, 59, 1220-26, (2014)
- [18] M. Kitamura, A. Kazato, T. Yasumoto, H. Ando, Y. Sasaki, R. Suzuki, and Y. Shirataki, "Rapid identification of Aconitum plants based on loop-mediated isothermal amplification assay", *BMC Res. Notes*, 12(1), 408, (2019)
- [19] I. Bruni, F. D. Mattia, A. Galimberti, G. Galasso, E. Banfi, M. Casiraghi, and M. Labra, "Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach", *Int. J. Legal Med.*, 124(6), 595-603, (2010)
- [20] S. Matsuyama, and K. Nishi, "Genus identification of toxic plant by real-time PCR", *Int. J. Legal Med.*, 125(2), 211-217, (2011)
- [21] B. Hu, H. Guo, P. Zhou, and Z.-L. Shi, "Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19", *Nat. Rev. Microbiol.*, 19(3), 141-154, (2021)
- [22] O. Vandenberg, D. Martiny, O. Rochas, A. van Belkum, and Z. Kozlakidis, "Considerations for diagnostic COVID-19 tests", *Nat. Rev. Microbiol.*, 19(3), 171-183, (2021)
- [23] C.-C. Lai, T.-P. Shih, W.-C. Ko, H.-J. Tang, and P.-R. Hsueh, "Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges", *Int. J. Antimicrob. Agents*, 55(3), 105924, (2020)
- [24] D.-C. Vodnar, L. Mitrea, B.-E. Teleky, K. Szabo, L.-F. Călinoiu, S.-A. Nemeș, and G.-A. Martău, "Coronavirus disease (COVID-19) caused by (SARS-CoV-2) infections: A real challenge for human gut microbiota", *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10, 575559, (2020)
- [25] D. N. Valencia, "Brief review on COVID-19: The 2020 pandemic caused by SARS-CoV-2", *Cureus*, 12(3), e7386, (2020)
- [26] S. Adachi-Fukunaga, Y. Tomitaka, and T. Sakurai, "Effects of melon yellow spot orthotospovirus infection on the preference and developmental traits of melon thrips, *Thrips palmi*, in cucumber", *PLoS One*, 15(6), e0233722, (2020)
- [27] S. Lu, M. Chen, J. Li, Y. Shi, Q. Gu, and F. Yan, "Changes in Bemisia tabaci feeding behaviors caused directly and indirectly by cucurbit chlorotic yellows virus", *Viol. J.*, 16(1), 106, (2019)
- [28] S. H. Sichere, "Food allergy", *Lancet*. 360(9334), 701-710, (2002)
- [29] S. H. Sichere, and H. A. Sampron, "Food allergy: A review and update on epidemiology,

- pathogenesis, diagnosis, prevention, and management.” *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 41–58 (2018).
- [30] J. L. Turnbull, H. N. Adams, and D. A. Gorard, “A review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances”, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 41, 3-25, (2015)
- [31] L. Tordesillas, M. C. Berin, and H. A. Sampson, “Immunology of food allergy”, *Immunity*, 47, 32-50, (2017)
- [32] M. Ebisawa, K. Ito, and T. Fujisawa, “Japanese guidelines for food allergy 2020”, *Allergol. Int.* 69, 370-86, (2020)
- [33] H. Akiyama, T. Imai, and M. Ebisawa, “Japan food allergen labeling regulation—history and evaluation”, *Adv. Food Nutr. Res.*, 62, 139-71, (2011)

第6章 画像色解析手法に基づく遺伝子定量解析システムの開発

6.1 緒言

5.3 節では、比色指示薬の定性診断について述べた。しかし、サンプル中に含まれる遺伝子濃度の定量解析は遺伝子診断や臨床の分野で重要な役割を担っている。例えば、ヒトヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は、幼少期から青年期にかけて感染し、顔面や上半身、特に口唇に発赤性の水疱症状等を発症する^{1,2)}。また、ヒトヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) は、世界中で最も有病率の高い性感染症の一つであり、HSV-1 同様、性器や臀部に水疱症状などが生じる³⁾。しかし、これらのウイルスは、稀に血行性として全身に広がり、脳炎などの重篤な症状を引き起こすことがあり、脳炎を発症した場合には、抗ウイルス薬の効果を検証するためにウイルス量の定量化は必要な技術である。

これまで、比色指示薬の色の変化をモニタリングすることで LAMP 法における遺伝子増幅を定量解析する研究は行われてきた^{4,6)}。Van ら⁷⁾は、ヒドロキシナフトールブルー (HNB) を用いた比色 LAMP 法において、遺伝子増幅反応に伴う溶液の色の変化を 640 nm の波長を計測することによってサンプル中に含まれる遺伝子濃度の定量解析できることを示した。González-González ら⁸⁾は、赤色から黄色に変わる比色指示薬を用いた比色 LAMP 法において、 $L^*a^*b^*$ 色空間での色差を解析することによって、サンプル中に含まれる遺伝子濃度の定量解析を実証した。しかし、これらの解析システムは得られたデータを直接プロットしていくことで遺伝子増幅曲線を取得するため、外乱に対するロバスト性 (堅牢性) が低く、一定の条件下において正しい解析結果が得られないことが予想された。

そこで、本章では、遺伝子増幅反応中のデバイスの画像を取得するタイムラプス撮影装置と、取得した画像から反応容器の色の変化を解析するプログラムを開発することで、デバイス上での遺伝子定量解析手法を開発した。さらに、外乱の影響を小さくするために、得られたデータを理論曲線にフィッティングすることで、システムの信頼性の向上を図った。開発した解析システムを実証するために、ヒトヘルペスウイルスを用いた遺伝子診断実験を行い、定量解析が可能であることを示した。

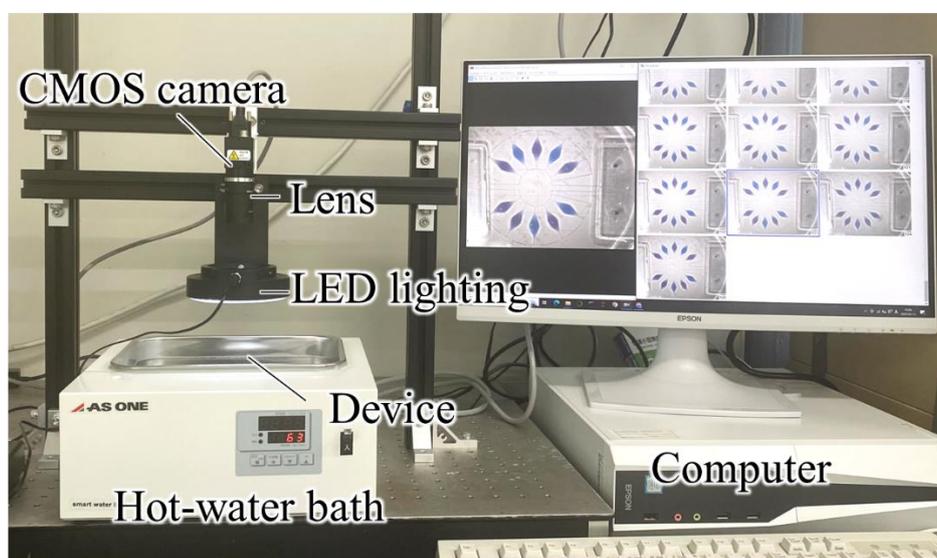
6.2 実験方法

6.2.1 タイムラプス撮影装置

恒温槽内 (湯中) に設置した遺伝子増幅反応中のデバイスの個々の反応容器の色相変化を解析するために、一定時間間隔で画像の連続取得を行うタイムラプス撮影装置を構築した。図 6.1 に構築したタイムラプス撮影装置ならびに、治具でデバイスを固定した様子、治具の構成を示す。恒温槽内には、診断デバイスを固定する治具を設置し、CMOS カメラ (オムロ

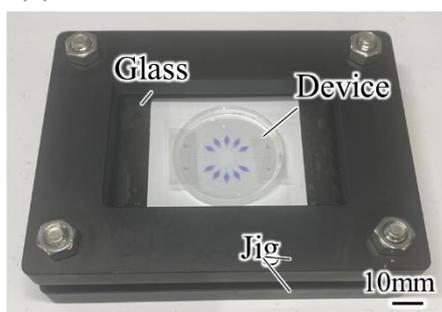
ン社製 STC-MCS163U3V) および単焦点レンズ (TAMRON 社製 M117FM35) によって撮影を行った。なお、デバイス上方に LED リング照明 (アームシステム社製 LED-R48) を設置し、撮影中の照明条件を一定とした。CMOS カメラから得られた映像は、コンピュータ上でマクロプログラムを用いて 30 s ごとに 1 枚の画像として保存した。治具は、アルミニウム製であり、デバイス上面側からアクリル板 (クラレ, 幅 52 mm×長さ 76 mm, 厚さ 2 mm), デバイス下面側は接着したポリ塩化ビニル板の下にスライドガラス (松浪硝子, S9213) を挟んで固定している。

(a)



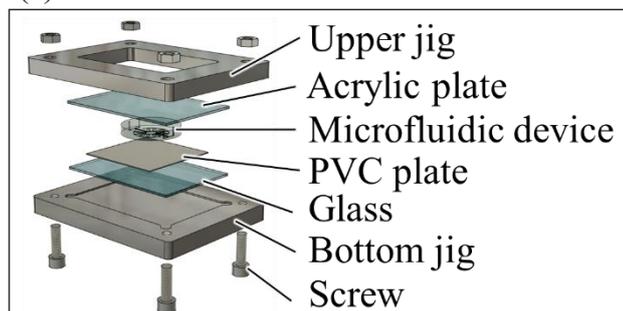
(a) 構築したタイムラプス撮影装置

(b)



(b) 治具で固定したデバイス

(c)



(c) 治具の構成

図 6.1 タイムラプス撮影装置とデバイス固定用治具の外観図

6.2.2 画像色解析方法

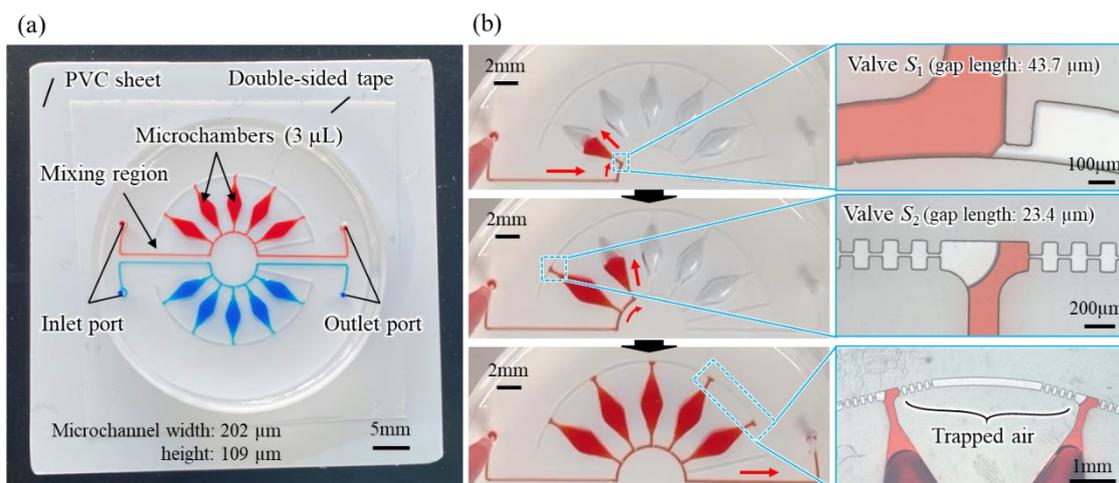
本実験では、Visual Studio Code (version 1.79.2) を用いて、画像色解析プログラムを開発し、解析を実行した。反応容器の色相変化を解析し、遺伝子量を定量解析するためには次の解析フローが必要となる。取得画像から、①反応容器を識別し、②取得した RGB 値を変換し、 $L^*a^*b^*$ 色空間にプロット、③色相角度変化量を計算し、④理論曲線にフィッティング、⑤閾値到達時間を算出する。

画像色解析プログラムには、Python を言語として使用した。また、OpenCV, NumPy, math, os, copy, statics を拡張モジュール、matplotlib, pandas, openpyxl, tqdm, SciPy を追加ライブラリとして使用した。

6.3 画像色解析アルゴリズムの構築

6.3.1 反応容器の自動識別手法の検討

本実験では、図 6.2 (a) に示されるように、上下 2 か所に各 5 個の反応容器を設けた 2 検体 5 項目診断デバイス（流路幅 $202\ \mu\text{m}$ 、流路高さ $109\ \mu\text{m}$ ）を新たに作製し用いた。なお、導入には、図 5.8 (b) に示した電動ピペット（アイカムスラボ pipetty）を使用し、各導入口から $32.5\ \mu\text{L}$ ずつ導入した。図 6.2 (b) に電動ピペットによる赤色着色液（ $0.1\ \text{w/v}\%$ ）をデバイスへ導入したときの分注挙動を示す。反応容器の前後には、一時阻害バルブ S_1 （ギャップ長 $g = 43.7\ \mu\text{m}$ ）、永久阻害バルブ S_2 （ギャップ長 $g = 23.4\ \mu\text{m}$ ）が 2 個 1 組ずつ実装されており、逐次分注を実現している。



(a) 2 検体 5 項目診断デバイス (b) 電動ピペットによる赤色着色液の導入実験結果

図 6.2 2 検体 5 項目診断デバイスの外観写真と赤色着色液の導入実験結果

本実験では、ヒトヘルペスウイルス1型 (HSV-1) ならびに2型 (HSV-2) のプラスミド DNA を使用した¹⁰⁻¹²⁾。図 6.3 にタイムラプス撮影装置で取得した HSV-1 および HSV-2 の遺伝子増幅実験結果を示す。反応容器 1, 3, 6, 8 には HSV-1 に対するプライマー, 反応容器 2, 4, 7, 9 には HSV-2 に対するプライマーを 0.5 μL 滴下し, 加熱乾燥させ, 固定した。加温 20 min 後に HSV-1 のプライマーを固定した反応容器 1 および 3 の色が紫色から水色へ変化し, 陽性反応を示した。続いて, 加温 30 min 後に HSV-2 のプライマーを固定した反応容器 7 および 9 の色が紫色から水色へと変化し, 陽性反応を示した。

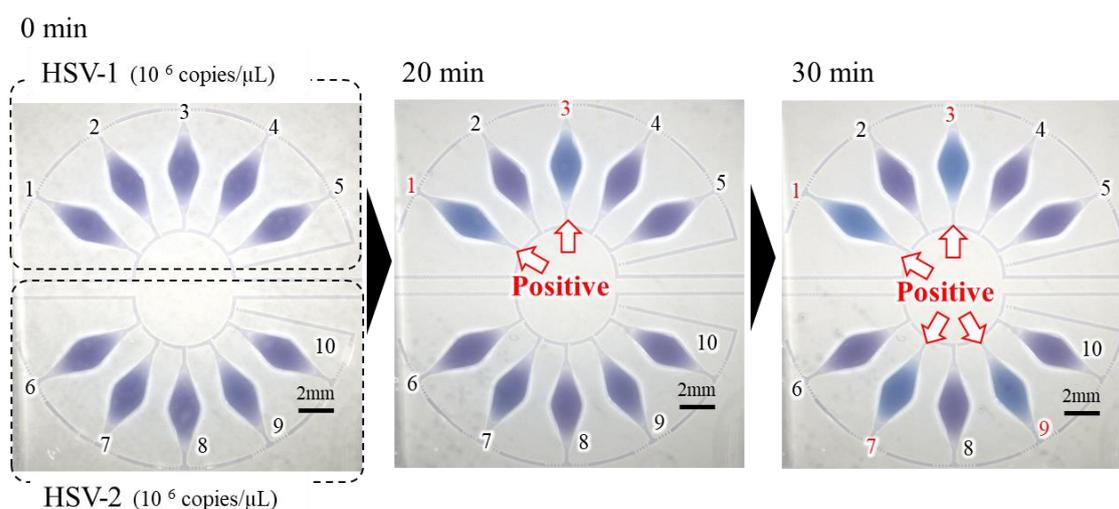
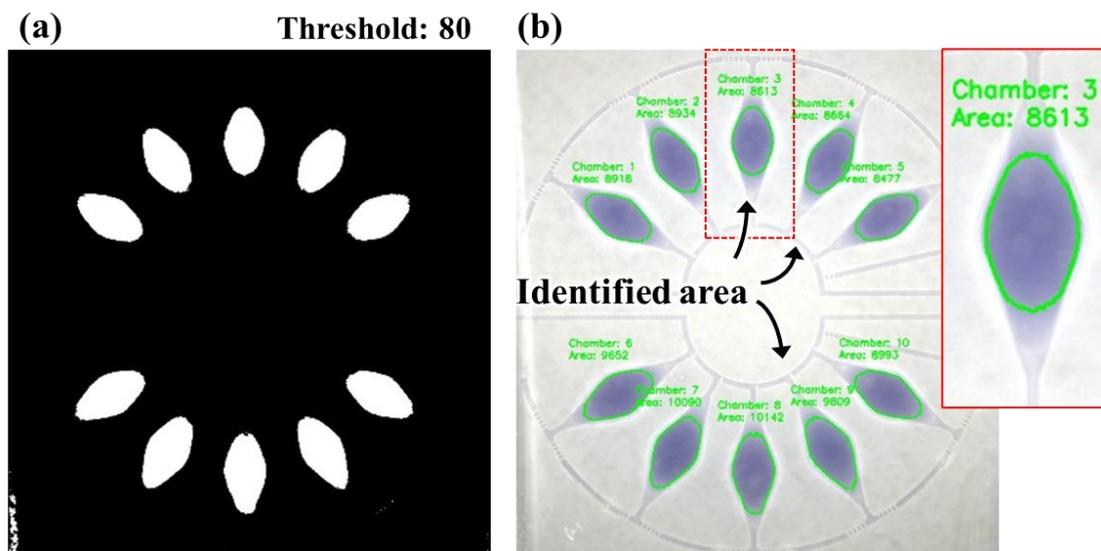
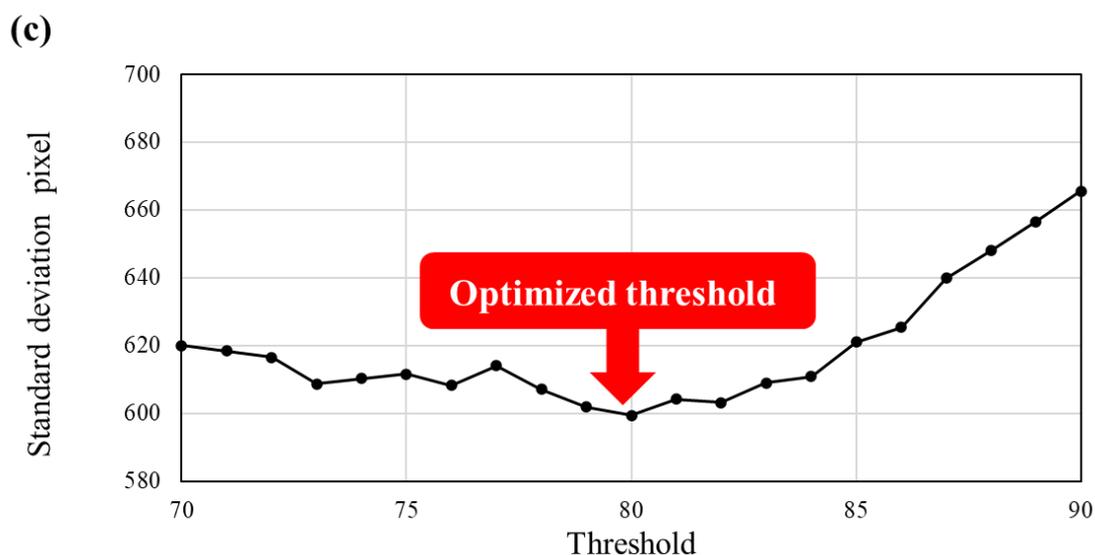


図 6.3 タイムラプス撮影装置で取得した HSV-1 および HSV-2 の遺伝子増幅実験結果

続いて, 画像色解析プログラムのうち, 反応容器の識別手法の検討を行った。反応容器の識別には二値化処理を用いた。二値化処理は, 画像をグレースケール (0~255) に変換し, 指定した閾値を超えた箇所を白黒画像として抽出する画像処理方法である^{13,14)}。図 6.4 (a) に二値化処理によって取得した白黒画像を示す。次に, 閾値を超えた箇所の内, 一定の面積 (本実験では, ピクセル数 5000 以上, 12000 以下とした) の範囲内にある箇所を反応容器として識別した。図 6.4 (b) に識別した反応容器を示す。このとき, 閾値の選定は安定した反応容器の識別には重要である。閾値が小さい場合, 反応容器以外の影なども抽出してしまい, 一方で, 閾値が高い場合, 抽出できる領域が小さいことから反応容器毎のピクセル数にバラつきが生じてしまう。そこで, 識別した全ての反応容器の面積の標準偏差が最小値となる閾値を最適閾値とした。図 6.4 (c) に閾値に対する反応容器の面積の標準偏差を示す。本実験の場合, 閾値 80 が最も反応容器間の面積の差が小さく, 安定した抽出ができていると考えられる。本手法により, 撮影時の照明環境やウォーターバスによる湯気, 液面の泡などの影響を最小限に抑えて, 反応容器を安定して識別することが可能となった。



(a) 二値化処理後の画像例 (閾値 80) (b) 識別された反応容器



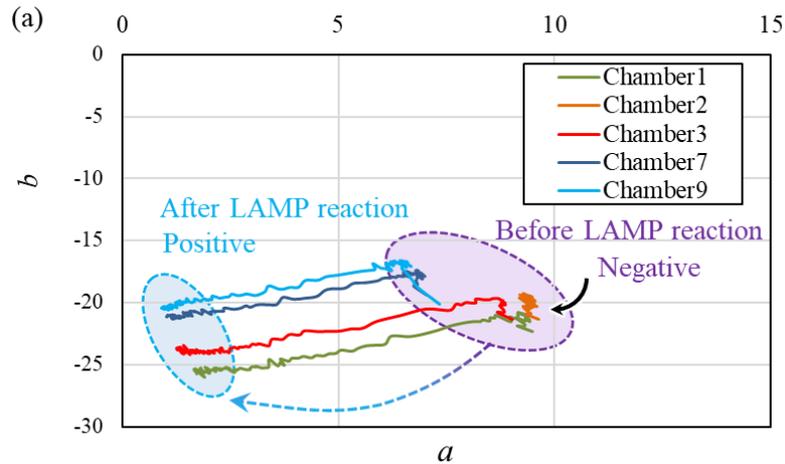
(c) 閾値に対する全 10 個の反応容器の面積の標準偏差

図 6.4 反応容器の認識と最適閾値

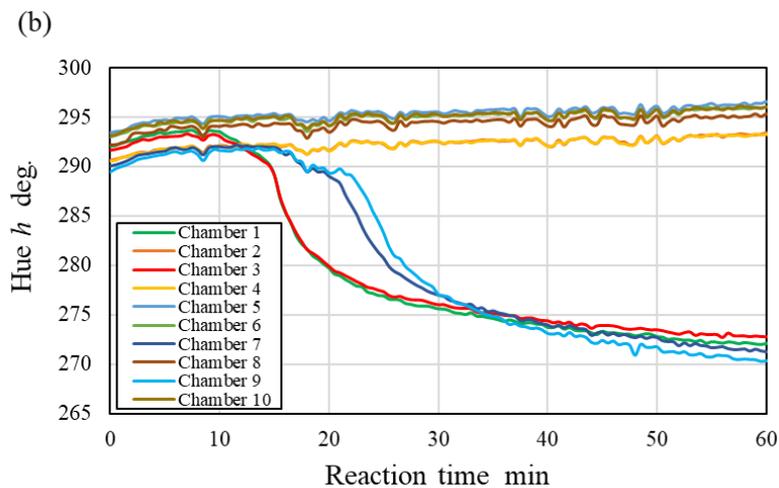
6.3.2 色相角度変化による遺伝子増幅曲線の取得

識別した各反応容器の色から RGB 値を取得し、 $L^*a^*b^*$ 色空間内にプロットした。算出方法には式 (5.1) ~ (5.6) を使用した。図 6.5 (a) に図 6.3 で得られた画像の内、反応容器 1, 2, 3, 7, および 9 を抜粋し、 a^*-b^* 平面にそれぞれの色の時間変化に従ってプロットしたグラフを示す。図 6.5 (a) より、 a^*-b^* 平面上では、時間変化に伴い、陽性反応を示した反応容器 1, 3, 7, 9 内の色は a^* および b^* の値が減少する (水色方向) へと進んでいることが分かる。図 6.5 (b) には、図 6.3 で得られた画像の全ての反応容器の LAMP 反応中の色相角

度 h ($= \tan^{-1}(b^*/a^*)$) の時間変化を示す. 図 6.5 (b) より, 観察開始直後から 5 分間程度は, 全ての反応容器で, ウォーターバスの加温によって反応容器内の試薬に含まれる Tris-HCl が温度変化によって pH が下がるために, 色相角度が同じように上昇した. その後, 陽性反応を示した反応容器 1, 3, 7, 9 の色相角度が減少し, 他の容器では変化がないことがわかる.



(a) a^* - b^* 平面上での反応容器 1, 3, 7, 9 の色の変化



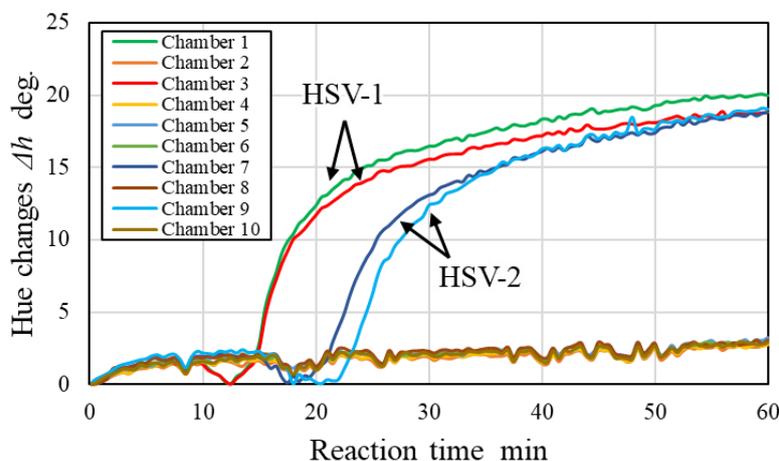
(b) 反応時間における反応容器の色相変化の推移

図 6.5 色相変化解析結果

図 6.6 (a) に観察開始直後 (加温 0 min) からの色相角度の変化量, 図 6.6 (b) に加温 5.5 min 後からの色相角度の変化量を解析したグラフを示す. 図 6.6 から見てわかる通り, HSV-1 と HSV-2 の反応容器で色相角度変化のグラフの変化開始時間が異なっていることが分かる. さらに, 同じプライマーを固定した 2 つの反応容器はほぼ同じ時間で反応が開始してお

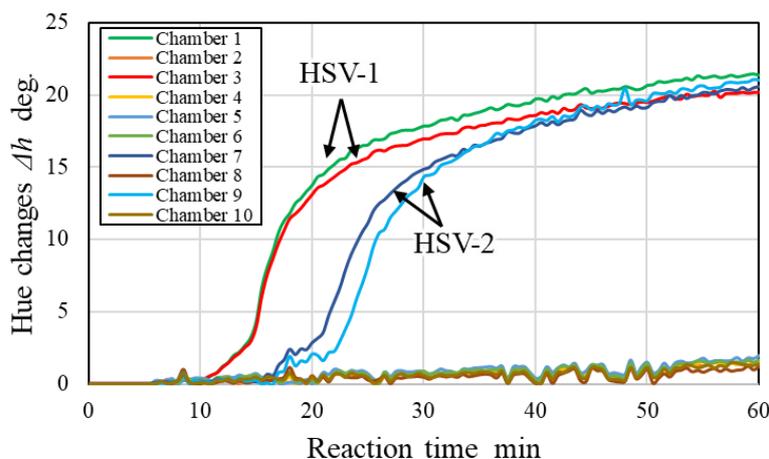
り，反応容器毎で反応の再現性が高いことがわかった。

(a) Difference from 0 min



(a) 観察直後 0 min からの色相角度変化量

(b) Difference from 5.5 min



(b) 加温 5.5 分後からの色相角度変化量

図 6.6 色相角度変化量解析結果

図 6.6 に示した通り，初期の変化量が色相角度で正の方向に対してあるため，負の方向に進む遺伝子増幅した反応容器では一度グラフが下がるのが分かる．そこで，初期から 5 点の標準偏差に対して，各計測点から 5 点の標準偏差が一定の値以内に入った点を加温が完了した時間 (t_s) とした． t_s の算出方法を次式に示す．

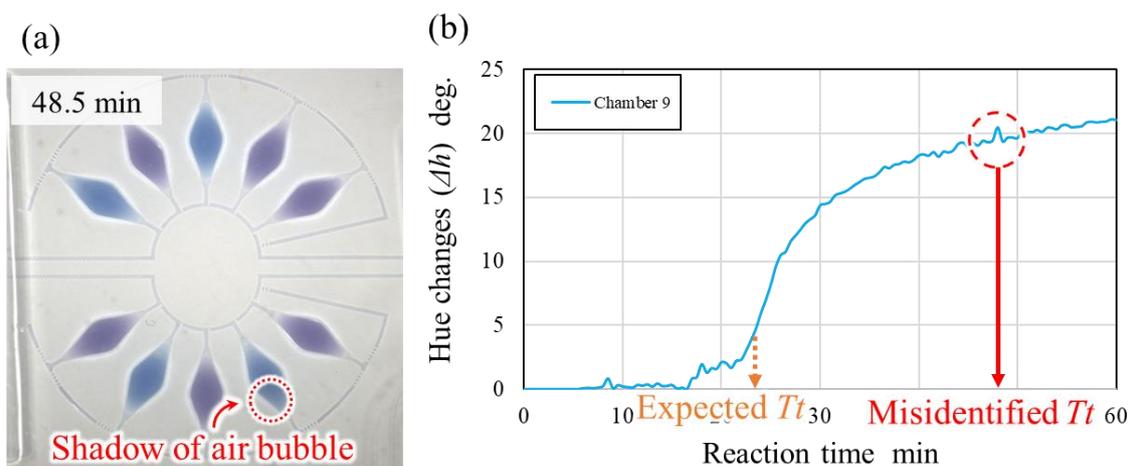
$$\sigma(\Delta h(t_s) \sim \Delta h(t_{s+4})) \leq N \cdot \sigma(\Delta h(t_0) \sim \Delta h(t_4)) \quad (6.1)$$

ここで $\Delta h(t_s)$ 加温が完了した時間における色相角度, $\Delta h(t_0)$ は観察開始直後の色相角度, N は定数を示す. なお, 本実験では, $N = 0.3$ を用いた.

図 6.6 (a) の実験結果では, 実験開始後 5.5 min で範囲内に収まり, 加温が完了したものとした. 図 6.6 (b) は開始 5.5 min を初期値としてそこからの変化量を解析したグラフである. なお, 5.5 min までの変化量を無視し, ベースラインを補正した. このように初期値を補正することで, 図 6.6 (a) と比較して遺伝子増幅反応の立ち上がり開始時間を明確に示すことができ, 一般に遺伝子増幅曲線と呼ばれる遺伝子増幅を示すグラフを取得することが可能となった.

6.3.3 データフィッティング関数の最適化

得られた遺伝子増幅曲線から, 閾値到達時間 (T_t 値) を算出することでサンプル内の遺伝子量を定量解析することができる¹⁵⁾. しかし, 図 6.7 (図 6.6 反応容器 9 番のグラフを抜粋) に示すように, 加温中のウォーターバスの液面の泡などの影響によって遺伝子増幅曲線にノイズが生まれてしまう. そのため, ノイズによって誤った T_t 値を算出することが問題として挙げられた.



(a)ウォーターバスの水面上の気泡による影 (b)影による遺伝子増幅曲線内のノイズおよびそれに伴う誤認識した閾値到達時間

図 6.7 周囲の環境によるノイズが及ぼす閾値到達時間算出への影響

そのため, 正しい T_t 値を算出するためには, 得られた遺伝子増幅曲線を理論カーブにフィッティングする必要がある. そこで, 従来 PCR 法のカーブフィッティング手法に用いられているシグモイド関数を用いてフィッティングを試みた. シグモイド関数は, 一般的な遺伝子増幅曲線に見られるような S 形状のカーブである¹⁶⁻²⁰⁾. 次式にシグモイド関数を示す.

$$y = \frac{C}{1 + e^{-(At-B)}} \quad (6.2)$$

ここで、 A 、 B 、 C は実験結果をフィッティングすることにより求められる係数である。

図 6.8 にシグモイド関数を用いてフィッティングしたカーブと各データを示す。図を見てわかる通り、理論カーブと実験値の遺伝子増幅曲線の形状が異なっており、期待通りのカーブフィッティングはできなかった。そこで、フィッティングの精度を定量的に評価するために平均絶対誤差 (MAE: Mean absolute error) を用いた²¹⁻²³⁾。平均絶対誤差の算出式を式 (6.3) に示す。

$$\text{MAE} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\hat{y}_i - y_i| \quad (6.3)$$

ここで、 \hat{y}_i は理論カーブ上の予測値、 y_i は実験値を示している。観察開始 0 分から 60 分までのデータ (121 点) に対して MAE は 0.79 となり、これは各時間において、色相角度変化量が 0.79° 誤って算出されることを示している。

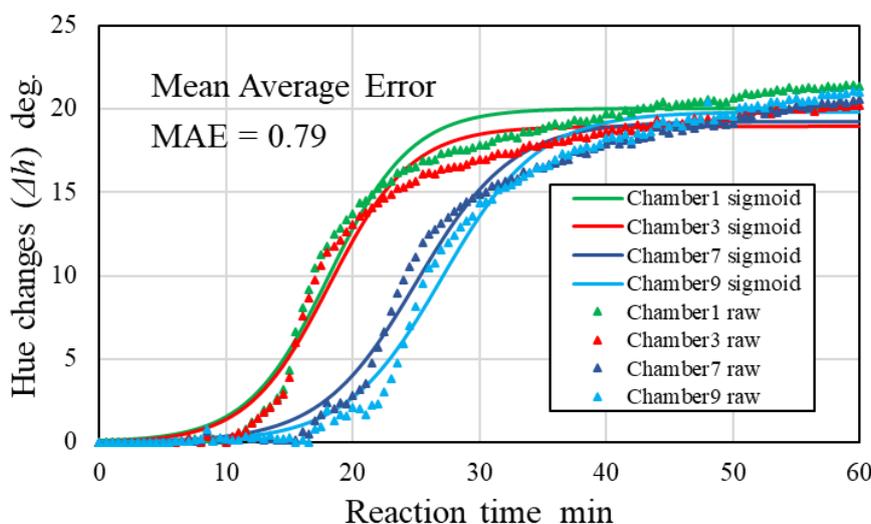


図 6.8 従来のシグモイド関数を用いたフィッティングカーブ

本デバイスの遺伝子増幅実験で使用している比色指示薬であるヒドロキシナフトールブルー (HNB) は、主に LAMP 反応に伴うマグネシウムイオンの脱離によって色の変化が生じている。そのため、LAMP 法の一般的な計測手法である濁度計測で得られるようなグラフ形状をしており、単純な S 字形状を示さない。そこで、新たに式 (6.4) に示す関数を考案した (以下、比色 LAMP シグモイド関数)。表 6.1 に式 (6.4) を用いたカーブフィッティングにより得られた陽性反応容器の各データに対するパラメータを示す。図 6.9 に比色 LAMP

シグモイド関数でカーブフィッティングした結果を示す。フィッティング結果より、理論曲線が実験値の遺伝子増幅曲線の形状とよく一致した。さらに、平均絶対誤差を計算すると、 $MAE = 0.19$ となり、フィッティング精度の向上を実現した。

$$y = \frac{C + (F \cdot t)}{1 + e^{-(At-B)} + e^{-(Dt-E)}} \quad (6.4)$$

ここで、 A , B , C , D , E , F は実験結果をフィッティングすることにより求められる係数である。

表 6.1 フィッティング結果の各パラメータ

	A	B	C	D	E	F
Chamber 1	0.104	1.016	18.593	0.781	12.508	0.048
Chamber 3	0.102	1.023	18.009	0.783	12.592	0.038
Chamber 7	0.432	9.903	11.347	7.842	39.973	0.156
Chamber 9	4.832	25.647	11.556	0.409	10.251	0.161

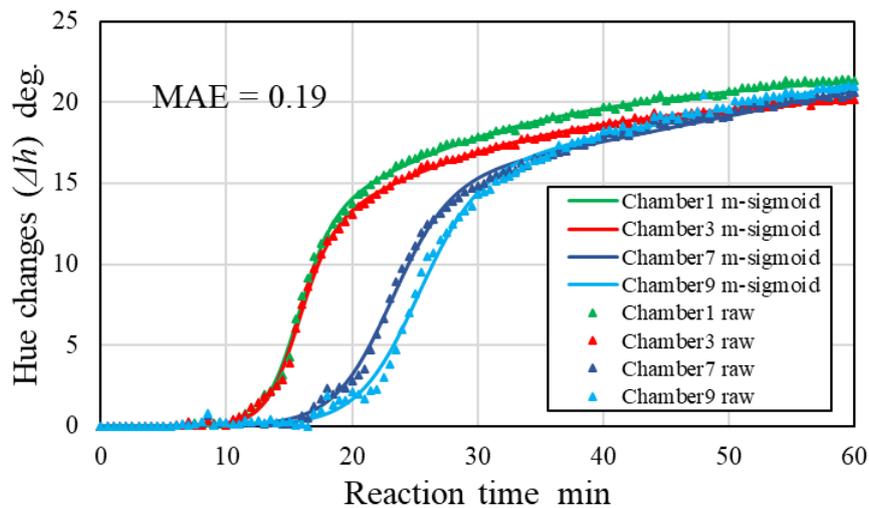


図 6.9 色相シグモイド関数を用いたフィッティングカーブ

6.3.4 定量解析のための閾値到達時間の定義

前述の通り、得られた遺伝子増幅曲線から、閾値到達時間 (T_t 値) を算出することでサンプル内の遺伝子量を定量解析することができる。 T_t 値は、PCR 法で C_t 値 (サイクル数到達時間) の算出によく用いられる二次導関数の最大値となる時間とした^{24,26)}。なお、計算の分解能は 0.1 min として、近似曲線から T_t 値を算出した。図 6.9 の結果では、HSV-1 を検出した反応容器 1, 3 の T_t 値は、13.9 min および 14.0 min となり、HSV-2 を検出した反応容器 7, 9 では 20.1 min および 22.0 min となっており、概ね同じ値を示した。

6.4 ヘルペスウイルス遺伝子量の定量診断

開発した色解析システムを実証するために、ヒトヘルペスウイルス1型 (HSV-1) の定量解析を行った。導入するサンプルに含まれる HSV-1 の DNA 量を $10^2 \sim 10^7$ copies/ μL に変化させた。図 6.10 に DNA 濃度を検出したときの遺伝子増幅曲線の実験結果を示す。図 6.10 より、サンプルに含まれる DNA 濃度が高いほど遺伝子増幅は早く開始していることが分かる。この遺伝子増幅曲線より、閾値到達時間 (T_t 値) を算出する。 T_t 値は各グラフの二次導関数の最大値に達した時間とした。

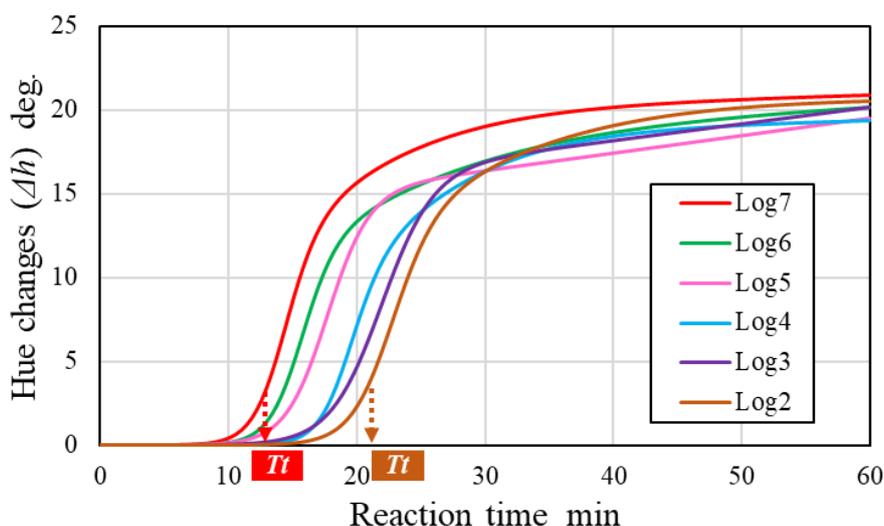


図 6.10 HSV-1 の遺伝子増幅曲線の実験結果 (Log [DNA] = 2-7)

図 6.11 に各 DNA 濃度に対する閾値到達時間 (T_t 値) の検量線を示す。このとき、マルチプレックス遺伝子診断デバイスを用いて解析したものを●($n = 4$)で示しており、通常の PCR マイクロチューブ (25 μL) で濁度計測器 (栄研化学社製 LoopampEXIA) を用いて計測した T_t 値を図中▲($n = 3$)で示している。

図 6.11 より、マルチプレックス遺伝子診断デバイスを用いて解析した検量線は線形性を示し、高い相関係数を示した ($R^2 = 0.970$)。この検量線を用いることで、検体サンプルに含まれる DNA 量が不明な場合でも T_t 値から DNA 量を推定することができる。さらに、PCR チューブで実施した検量線ともよく一致しており、マルチプレックス遺伝子診断デバイスを用いた場合でも T_t 値は変わらないことを示し、同等の感度であることを実証した。

従来研究で、Curry ら²⁷⁾は、PCR 法を用いて試薬量を変化させた際の C_t 値 (サイクル数到達時間) への影響を調査しており、 C_t 値は溶液中の検出対象の DNA 濃度に依存することを示している。そこで、HSV-1 (10^7 copies/ μL) を用いて、PCR チューブ内の溶液の全量を 12.5, 25.0, 50.0 μL に変化させた際の、遺伝子増幅実験を行った。図 6.11 に濁度計測結果を示す。

図 6.12 からわかるように、LAMP 法においても PCR 法同様、溶液の全量および溶液中に含まれるウイルス量の絶対量は増幅時間に影響せず、DNA 濃度に依存することとなることがわかり、図 6.10 のデータが妥当であるといえる。ただし、溶液の全容量が異なることから、診断デバイス上 (3 μL) での検出限界は PCR チューブ (通常 25 μL) での検出限界に対し、約 1/8 になると推測される。

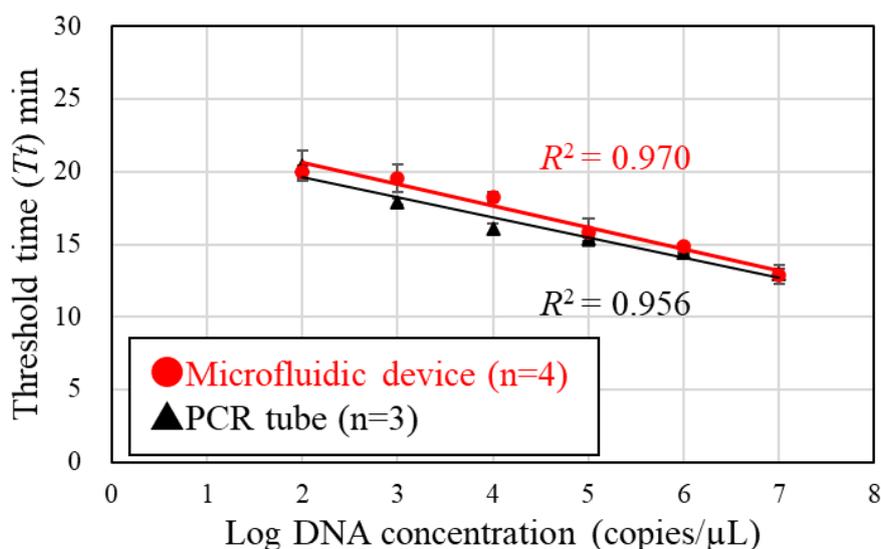


図 6.11 DNA 濃度に対する閾値到達時間 (T_t 値) の検量線

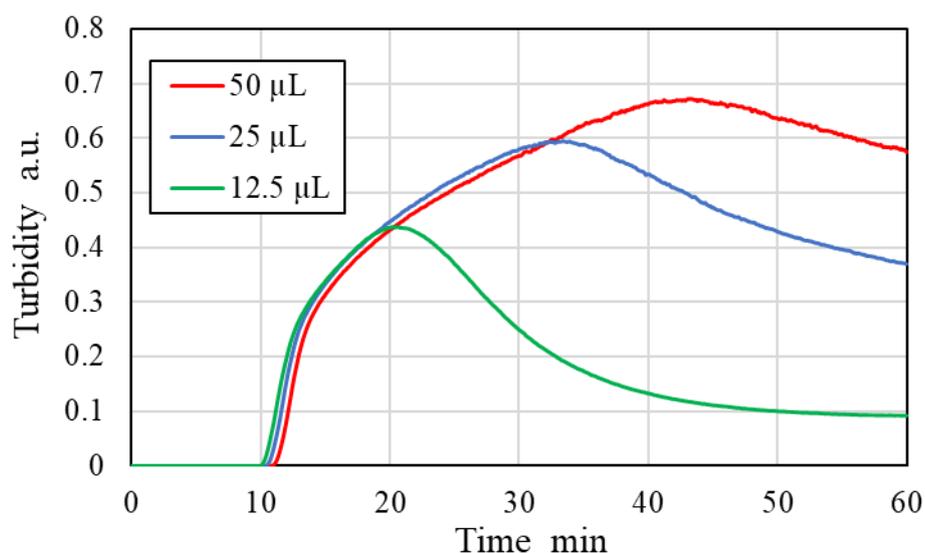


図 6.12 3つの異なる試薬量条件における PCR チューブ内での濁度計測結果

6.5 結言

本章では、診断デバイス上でタイムラプス撮影装置と反応容器の色を解析するプログラムを開発することで比色指示薬を用いた遺伝子定量解析手法を開発した。さらに、ヒトヘルペスウイルスを用いた定量解析を実証した。得られた結果をまとめると次のとおりである。

- (1) 遺伝子増幅反応中のデバイスの画像を取得するタイムラプス撮影装置を開発し、30 s 毎に 1 枚の写真を取得することを可能にした。
- (2) 取得画像から各反応容器の領域を識別する最適手法を開発し、色情報を取得、 $L^*a^*b^*$ 色空間内で色相角度の変化量を解析するプログラムを開発した。色相角度の変化量を求めることで、遺伝子増幅曲線を取得することを可能にした。
- (3) 実験から得られた遺伝子増幅曲線を理論曲線にフィッティングするために、新しく、比色 LAMP シグモイド関数を定義することで、高いフィッティング精度を実現し、取得した遺伝子増幅曲線のデータに含まれるノイズの影響を受けにくいロバスト性の高いシステムを実現した。
- (4) ヒトヘルペスウイルス 1 型の遺伝子サンプルを用いて、検量線の取得ができることを示し、デバイス上で遺伝子の定量解析が行えることを実証した。さらに、従来の PCR チューブ内での結果と比較し、デバイス上でも同等の診断性能を示すことを明らかにした。

参考文献

- [1] J. S. Smith, and N. J. Robinson, “Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review”, *J. Infect. Dis.*, 186 (Suppl 1: S3-28), (2002)
- [2] A. G. Langenberg, L. Corey, R. L. Ahsley, W. P. Leong, and S. E. Straus, “A prospective study of new infections with herpes simplex virus type 1 and type 2”, *N. Engl. J. Med.*, 341(19), 1432-8, (1999)
- [3] K. J. Looker, A. S. Magaret, M. T. May, K. M. E. Turner, P. Vickerman, S. L. Gottlieb, and L. M. Newman, “Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012”, *PLoS One*, 10(10), e040765, (2015)
- [4] H. W. Nguyen, V. D. Nguyen, H. V. Nguyen, and T. S. Seo, “Quantification of colorimetric isothermal amplification of the smartphone and its open-source app for point-of-care pathogen detection”, *Sci. Rep.*, 10, 15123, (2020)
- [5] K. Yin, V. Pandian, K. Kadimisetty, X. Zhang, C. Ruiz, K. Cooper, and C. Liu, “Real-time colorimetric quantitative molecular detection of infectious diseases on smartphone-based diagnostic platform”, *Sci. Rep.*, 10, 9009, (2020)
- [6] H. V. Nguyen, V. D. Nguyen, F. Liu, and T. S. Seo, “An integrated smartphone based genetic analyzer for qualitative and quantitative pathogen detection”, *ACS Omega*, 5(35), 22208-14, (2020)
- [7] N. D. Van, N. V. Hau, and T. S. Seo, “Quantification of colorimetric loop-mediated isothermal amplification process”, *BioChip J.*, 13(2), 158-164, (2019)
- [8] E. G.-González, I. M. L.-Mayorag, I. P. R.-Sánchez, Y. S. Zhang, S. O. M.-Chapa, G. T.-de, Santiago, and M. M. Alvarez, “Colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for cost-effective and quantitative detection of SARS-CoV-2: The change in color in LAMP based assays quantitatively correlates with viral copy number”, *Anal. Methods*, 13(2), 169-178 (2021)
- [9] Y. Enomoto, T. Yoshikawa, M. Ihira, S. Akimoto, F. Miyake, C. Usui, S. Suga, K. Suzuki, T. Kawana, Y. Nishiyama, and Y. Asano, “Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method”, *J. Clin. Microbiol.*, 43(2), 951-5, (2005)
- [10] H. Sugiyama, T. Yoshikawa, M. Ihira, Y. Enomoto, T. Kawana, and Y. Asano, “Comparison of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR, and virus isolation for the detection of herpes simplex virus in genital lesions”, *J. Med. Virol.*, 75(4), 583-7, (2005)
- [11] H. Kimura, M. Ihira, Y. Enomoto, J. Kwada, Y. Ito, T. Morishita, T. Yoshikawa, and Y. Asano, “Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid: comparison between loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR”, *Med. Microbiol. Immunol.*, 194(4), 181-5, (2005)
- [12] O. D. Trier, and T. Taxt, “Evaluation of binarization methods for document images”, *IEEE Trans.*

- Pattern Anal. Mech. Intell.*, 17(3), 312-5, (1995)
- [13] S. Saha, "Automatic localization and recognition of license plate characters for Indian vehicles", *Int. J. Comp. Sci. Emerging Tech.*, 2(4), 520-33, (2011)
- [14] Y. Mori, M. Kitao, N. Tomita, and T. Notomi, "Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA", *J. Biochem. Biophys. Methods*, 59(2), 145-57, (2004)
- [15] C. Ritz, and A.-N. Spiess, "*qpcR*: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis", *Bioinformatics*, 24(13), 1549-51, (2008)
- [16] S. Zhao, and R. D. Fernald, "Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction", *J. Comp. Biol.*, 1047-64, 12(8), (2005)
- [17] Y. Nagai, H. Miyazawa, Huqun, T. Tanaka, K. Udagawa, M. Kato, S. Fukuyama, A. Yokote, K. Kobayashi, M. Kanazawa, and K. Hagiwara, "Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp", *Cancer Res.*, 65(16), 7276-82, (2005)
- [18] R. G. Rutledge, "Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications", *Nucleic Acids Res.*, 32(22), e178, (2004)
- [19] A.-N. Spiess, C. Feig, and C. Ritz, "Highly accurate sigmoidal fitting of real-time PCR data by introducing a parameter for asymmetry", *BMC Bioinformatics*, 9, 221, (2008)
- [20] R. G. Rutledge, and D. Stewart, "Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR", *BMC Mol. Biol.*, 9, 96, (2008)
- [21] S. Swillens, B. Dessars, and H. E. Housni, "Revisiting the sigmoidal curve fitting applied to quantitative real-time PCR data", *Anal. Biochem.*, 373(2), 340-6, (2008)
- [22] G. J. Bogy, and P. J. Woolf, "A mechanistic model of PCR for accurate quantification of quantitative PCR data", *PLoS One*, 5(8), e12355, (2010)
- [23] T. Chai, and R. R. Draxler, "Root mean square error (RMSE) or mean absolute error (MAE)? – Arguments against avoiding RMSE in the literature", *Geosci. Model Dev.*, 7(3), 1247-50, (2014)
- [24] C. J. Willmott, and K. Matsuura, "Advantages of the mean absolute error (MAE) over the root mean square error (RMSE) in assessing average model performance", *Clim. Res.*, 30, 79-82, (2005)
- [25] D. R. Legates, and G. J. McCabe Jr., "Evaluating the use of "goodness-of-fit" measures in hydrologic and hydroclimatic model validation", *Water Resour. Res.*, 35(1), 233-241, (1999)
- [26] J. D. Curry, C. McHale, and M. T. Smith, "Factors influencing real-time RT-PCR results: Application of real-time RT-PCR for the detection of leukemia translocations", *Molecular Biology Today*, 3(3), 79-84, (2002)

第7章 遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発

7.1 緒言

図 5.19 や図 6.2 に示した，これまでに開発したポンプ送液型マルチプレックス遺伝子診断は，サンプルを一つずつ順に導入していく必要があり，多検体のサンプルを用いた遺伝子診断はその分の導入時間が必要となり，長時間な検査となる．さらに，シリンジポンプを用いた場合には，チューブの付け替え時などに遺伝子サンプルがコンタミネーションする可能性があることも課題として挙げられていた．

そこで，本章では，遠心力を用いて多検体のサンプルと遺伝子増幅試薬を同時に導入する遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスを開発した．図 7.1 にポンプ送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスと遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの比較を示す．検体サンプルと試薬はマイクロピペットで各注入リザーバへ注入するだけよいため，検体サンプル間のコンタミネーションのリスクを低減することができる．さらに，遠心力によって送液を行うため，円周上に同一形状の流路デザインを設けることで多検体の同時導入を可能とする．

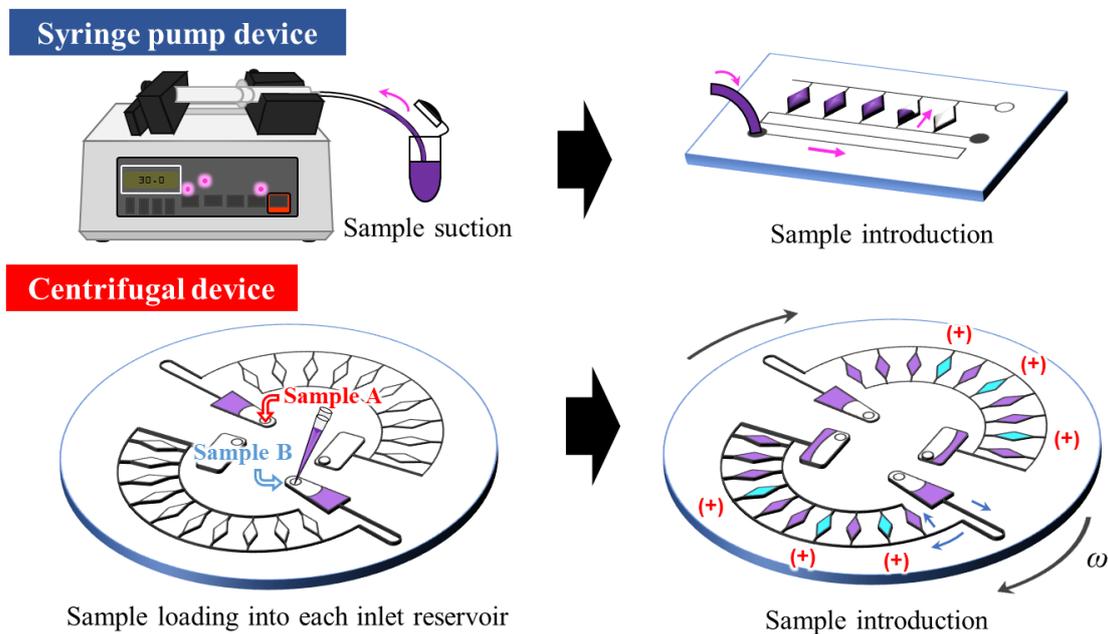


図 7.1 ポンプ送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスと遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの比較

遠心力を用いたマイクロ流体デバイスは，Lab-on-a-Chip に習い，Lab-on-a-CD や Lab-on-a-Disc とも呼ばれている¹⁻⁴⁾．これまで，遠心式マイクロ流体デバイスでは，回転数（遠心

力)を制御することで、試薬の送液、試薬の混合、サンプル溶液の計量などの流体制御技術が検討されてきた。単一細胞解析⁵⁻⁷⁾や、抗原抗体反応を用いたタンパク質分析⁸⁻¹⁰⁾、遺伝子診断¹¹⁻¹⁷⁾への Lab-on-a-Disc の応用が検討されてきた。LAMP 法に限ると、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の診断¹⁸⁻²²⁾、食品検査における細菌検査²³⁻²⁵⁾、食物アレルギー検査²⁶⁾、排水内のレジオネラ菌などの細菌検査²⁷⁾など Lab-on-a-Disc 上で実証されてきた。しかし、これらのデバイスは、各動作 (導入、混合、分注など) に対して回転数や回転方向を切り替えることで、溶液の操作を行う。そのため、制御システムが非常に複雑化するという課題がある。

そこで、本章では、一定回転数で多検体の同時導入、複数の反応容器への迅速分注を行うことを目的とし反応容器への自律的かつ逐次的に分注が行える流路構造を検討し、その設計にかかる理論を明らかにした。さらに、開発したデバイスを用いて、食物アレルギー物質 4 種類 (ニワトリ、ウシ、小麦、落花生) の多項目同時診断を実施し、60 min 以内に検出できることを示した。

7.2 実験方法

7.2.1 デバイスの概要

本研究で開発する PDMS 製の遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの外観写真を図 7.2 に示す。本デバイスは、注入リザーバに遺伝子サンプルと遺伝子増幅試薬 (LAMP 試薬) をマイクロピペットで導入する。その後、デバイスを高速で回転させることで遠心力によって混合液を各反応容器へ分注する。余分な試薬は廃液リザーバと導入される。反応容器への分注後は、ポンプ送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスと同様に、一定時間加温することで LAMP 反応を行い、標的遺伝子を増幅することで検出を行う。この時、円周上に同一形状の流路デザインを設けることで多検体の同時分注を行うことが可能となっている。これにより、多検体・多項目を同時に遺伝子診断することが可能となる。

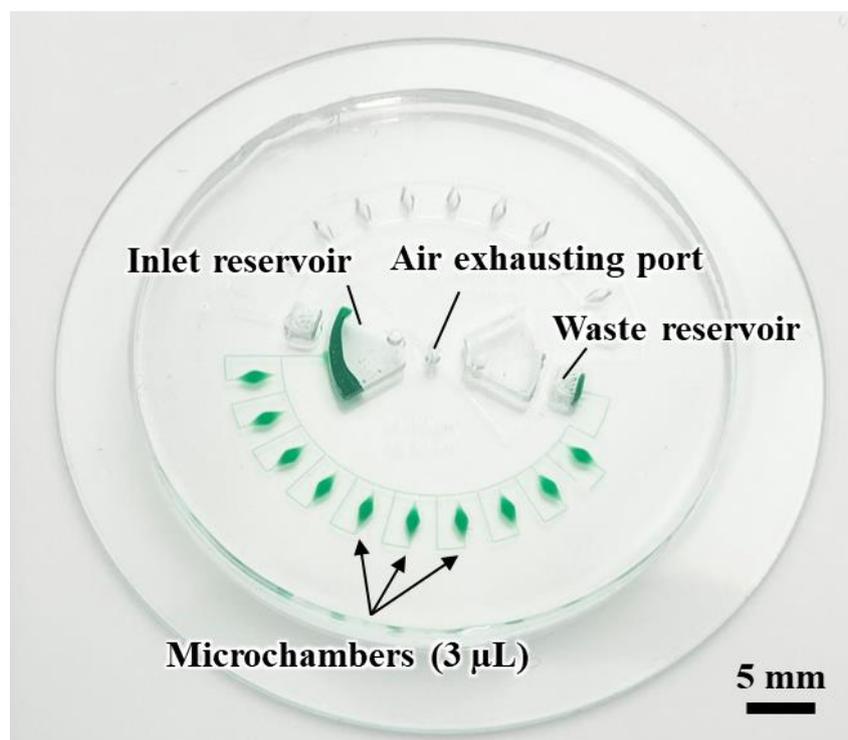


図 7.2 遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイス

図 7.3 に示される理論モデルの遠心送液型のデバイスでは、液体を送液する際の印加圧力（水頭圧）は次式によって算出することができる²⁾。

$$P_h = \rho\omega^2(R_2 - R_1)\left(\frac{R_2 + R_1}{2}\right) = \rho\omega^2\Delta R\bar{R} \quad (2.7.1)$$

ここで、 R_1 、 R_2 は、それぞれ中心から注入リザーバの液面までの距離、中心から圧力が作用している点までの距離である。 ρ は液体の密度（水：1000 kg/m³）、 ω は角速度、 ΔR は R_1 、 R_2 の距離の差で、 \bar{R} は R_1 、 R_2 の距離の平均を示す。遠心力により、注入リザーバ内では液面は回転中心に対して円弧を示す。この円弧の半径 R_1 と導入されている3つ目の反応容器の液面先端までの半径 R_2 から水頭圧 P_h を算出することができる。

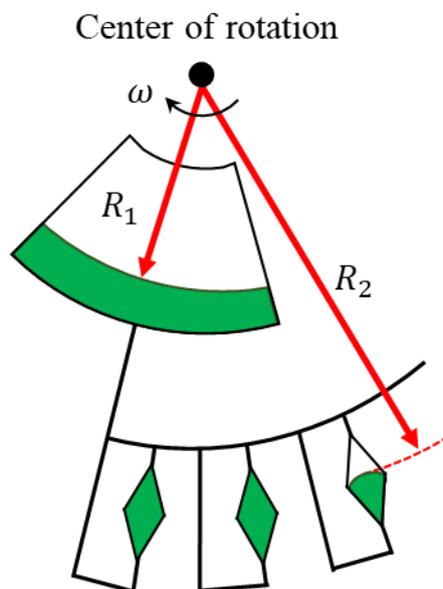


図 7.3 遠心送液型デバイスにおける印加圧力を決定するための理論モデル

7.2.2 遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの作製方法

遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの作製方法を示す。また、作製プロセスの概略図を図 7.4 に示す。

- (1) 単結晶シリコンウエハ（イープライズ，n型<100>，直径 4 inch，厚さ 525 μm ；以下，Si 基板）の表面をアセトン（関東化学，純度 99.5%），イソプロピルアルコール（関東化学，純度 99.7%；以下，IPA）の順で洗浄（かけ流し）し， N_2 ブローを行い乾燥させる。
- (2) 低温灰化装置（ジェイ・サイエンス・ラボ JPA300）を用いて Si 基板表面に空気プラズマ処理を行う（150 W，3 min）。
- (3) スピンコータ（ミカサ MS-A100）を用いて，ネガ型厚膜フォトレジスト SU-8 3050（MicroChem 社，動粘度 12000 cSt）を Si 基板表面にスピンコートする。
- (4) ホットプレート（アズワン EC-1200N）を用いて SU-8 を塗布した Si 基板のプリベークを行う。
- (5) 両面マスクアライナ（ユニオン光学 PEM-800）で露光を行い，マスクパターンを SU-8 に転写する。なお，実験前に，ウエハ上の 5 点の光強度を紫外線照度計（ウシオ電機，本体 UIT-101，i 線用センサ UVD-365PD）によって測定し，その平均値（約 5 mW/cm^2 ）から所望の露光時間を決定した。
- (6) ホットプレートを用いて流路形状を転写した SU-8 のポストベークを行う。
- (7) 現像液（酢酸 2-メトキシ-1-メチルエチル；富士フィルム和光純薬，純度 97.0%）に

ポストベーク後の SU-8 を 10 min 浸漬させ、現像を行う。

- (8) 現像した Si 基板をアセトンおよび IPA で基板を洗浄し、N₂ ブローで表面の水滴を除去する。
- (9) 4 インチ角シャーレ (Greiner Bio-One 社 688161, PS 製, 120 mm×120 mm×17 mm) を用いて厚さ 2 mm の PDMS を用意し、パンチ (カイインダストリーズ BPP-10F) で直径 2 mm の穴を 20 個開ける。
- (10) ワックス (Freeman Manufacturing & Supply Company 社 Ferris File-A-Wax ブルー) を上記(9)の PDMS の上に設置し、ホットプレート上で 195°C 10 min 加熱し、直径 2 mm の円柱形状のワックスを作製する。
- (11) 円柱形上のワックスを電子天びん (島津製作所 AP125WD) とディスポメスを用いて 2.7 mg に切り出す。
- (10) ひょう量した上記 (11) のワックス (2.7 mg) と SU-8 モールドを同時に空気プラズマ処理 (150 W, 2 min) し、ワックスを SU-8 モールドの反応容器中央に乗せる。
- (11) ホットプレート上で 135°C 3 min 加熱し、ワックスを融解させる。(図 7.4 (a))
- (12) 十分にワックスが融解していることを確認し、室温まで徐冷させ、ワックスを再び凝固させることで反応容器を形成した。
- (13) 3D プリンタ (FLASHFORGE 社 Adventure4) を用いて、PLA 樹脂 (ガラス転移温度: 55 °C) 製の注入リザーバおよび廃液リザーバのモールド形状 (高さ 2 mm) を充填率 100%で作製する。
- (14) プリントした PLA 樹脂を SU-8 モールドの注入リザーバおよび廃液リザーバにエポキシ系接着剤を用いて接着し、24 h 硬化させ、マスターモールドとした。(図 7.4 (b))
- (10) 真空チャンバ (サンブラテック PC-250KG) にマスターモールド (Si 基板) を入れ、トリクロロシラン (トリクロロ (1H,1H,2H,2H-パーフルオロオクチル)シラン; Sigma-Aldrich 社, 純度 97%) を 10 μL 滴下する。
- (11) 0.07 MPa まで減圧し、減圧状態を 60 min 維持し、マスターモールド表面のシラン化処理を行う。
- (12) シリコーン樹脂 (東レ・ダウコーニング SILPOT 184; 以下, PDMS) の主剤および硬化剤を 10:1 の割合で 60 g 混合し、真空攪拌脱泡ミキサー (EME 社 V-min 300) を用いて 3 min 攪拌する。
- (13) 攪拌後、マスターモールドへ流し込み、ホットプレートを用いて 85°C で 40 min 加熱し、硬化させる。
- (14) 硬化後、医療用ディスポメス (カイインダストリーズ 511-A) を用いて PDMS を切り出し、離型する。(図 7.4 (c))
- (15) 切り出した PDMS の流入および流出口をパンチ (貝印 BPP-10F) で直径 1mm の穴をあけ、シリコーン/アクリル系両面テープ (日東電工 5303W) を用いて塩化ビニ

ル板（光 EB235-5, 厚さ 0.5 mm）または、ガラスウエハ（東新理興 AS-4 厚さ 1.1 mm）と接着させる。（図 7.4 (d)）

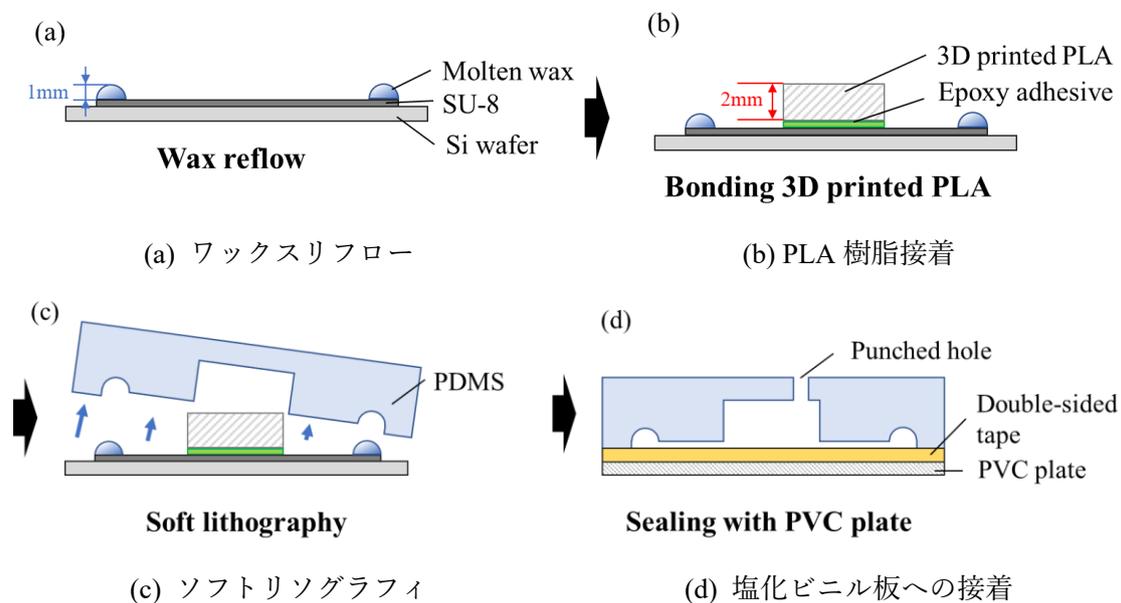
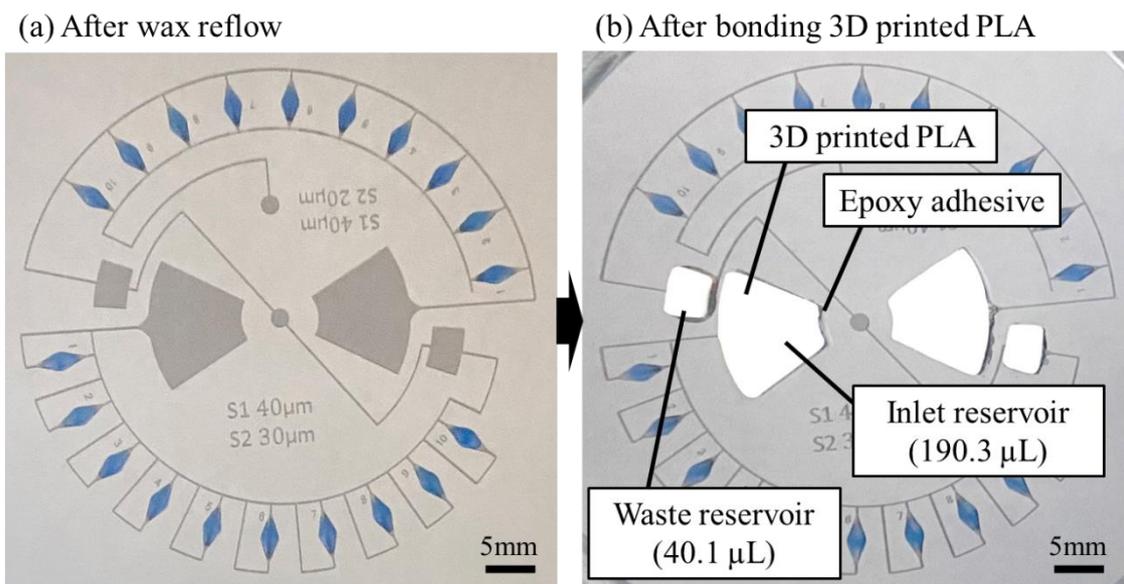


図 7.4 遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの作製プロセス概略図

実際に作製した遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイス用のマスターモールドの写真を図 7.5 に示す。



(a)ワックスリフロー後 (b) 3D プリントした PLA 樹脂の接着後

図 7.5 遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断のモールド

7.2.3 遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの実験方法

作製した遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの観察装置を図 7.6 に示す。スピコータ（ミカサ MS-B100）と真空ポンプ（ULVAC 社 DA-60S）によってデバイスを吸着し、回転数を制御する。デバイスを設置する試料台にはスリット（幅 10 mm）が設けられたフィルムマスク（直径 160 mm）が固定されている。このスリットの通過を透過型フォトインタラプタ（パナソニック CNZ1023）によって検出し、マイコン（Arduino 社 Arduino Leonard）を通じて、CMOS カメラ（Ximea 社 MQ022CG-CM）ならびにストロボスコープ（日進電子工業 CF-15S60）に同時に 5V のアナログ出力を行う。それにより、ストロボスコープはランプハウス（日進電子工業 LH-15M）を発光させると同時に、CMOS カメラは単焦点レンズ（TAMRON 社 M112FM12）を通じて露光をすることができ、1 回転に 1 枚の画像を取得する。このとき、マイコンの駆動電圧（12V）とカメラ、ストロボスコープへの入力電圧（5V）を分けるため、三端子レギュレータ（RECOM Electronic 社 R-78E5.0-0.5）を使用した。また、1 回転中に複数回フォトインタラプタが入力されることを防ぐために、スリット通過後、透過していない箇所を通過したことを確認してから次の入力がフォトインタラプタに行えるように Arduino のプログラムを作成した。

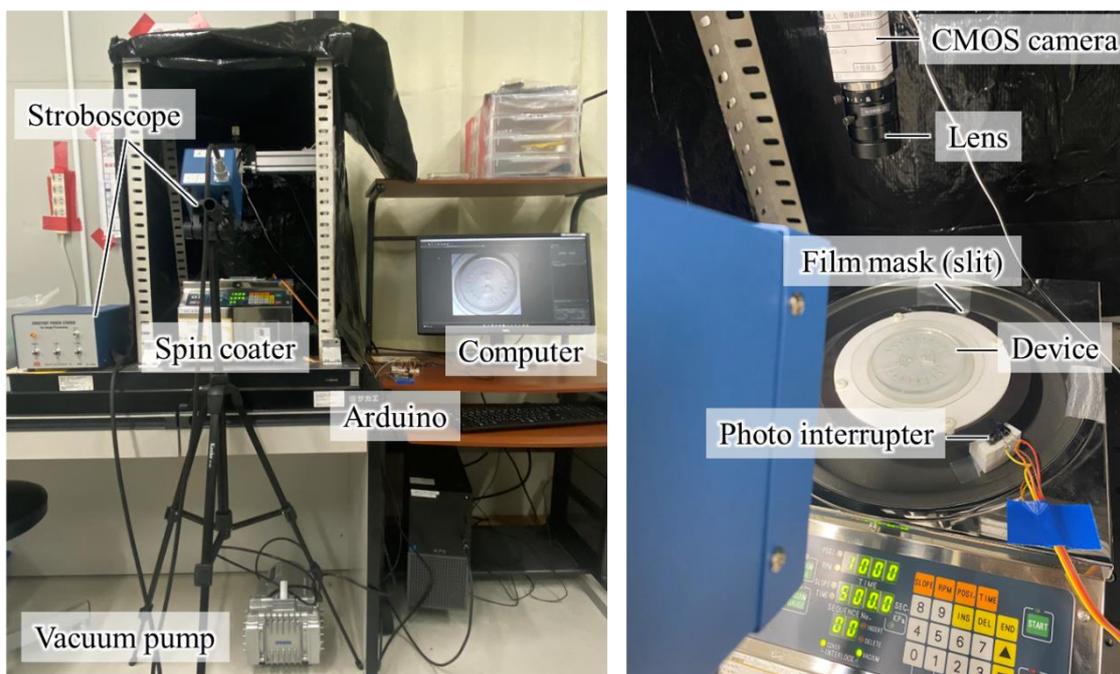


図 7.6 遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの実験観察装置

7.3 外向き分注技術の検討

はじめに、6章までに開発してきたポンプ送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの流路デザイン（エアープラグインバルブ構造）を用いて、遠心送液型デバイスを作製した。各反応容器には、2個1組の受動バルブが組み込まれている。図7.7に流路デザインの概要を示す。なお、図の上方向が回転中心方向である。注入リザーバより導入された液体は一時阻害バルブ S_1 （1面縦型相ガイド）によって流れの向きを変え、遠心力が印加されている方向に沿って反応容器へと流れ込む。反応容器を満たした後は、永久阻害バルブ S_2 に到達し、一時阻害バルブ S_1 が決壊することで次の反応容器へと向かうことを想定して設計されている（以下、外向き分注デバイス）。

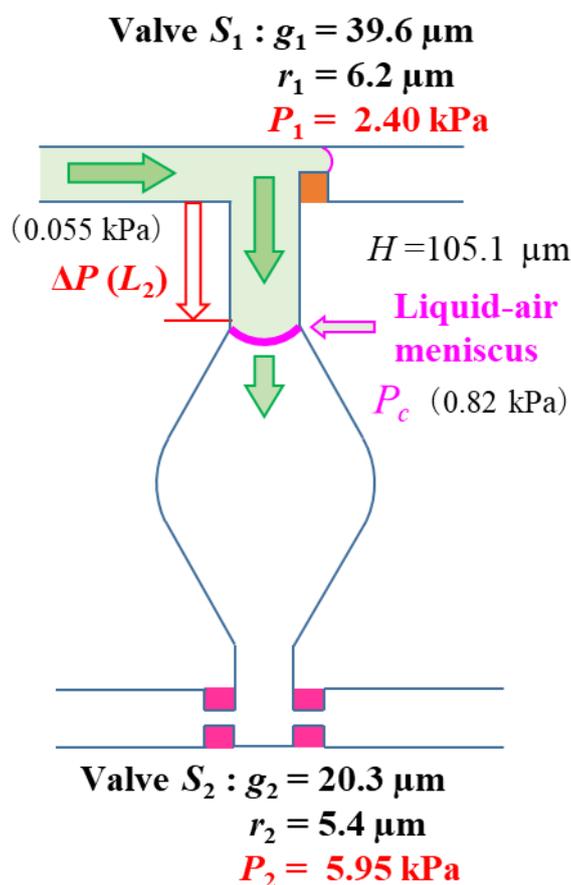


図 7.7 外向き分注デバイスの概要（上方向を回転中心方向とする）

図 7.8 に一時阻害バルブ S_1 のギャップ長 $g_1 = 39.6 \pm 6.2 \mu\text{m}$ ($n = 10$), バルブ S_1 の角部半径 $r_1 = 6.2 \pm 1.5 \mu\text{m}$ ($n = 10$), 永久阻害バルブ S_2 のギャップ長 $g_2 = 20.3 \mu\text{m} \pm 5.4 \mu\text{m}$ ($n =$

10), バルブ S_2 の角部半径 $r_2 = 5.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ($n = 10$), 流路高さ $H = 105.1 \pm 1.0 \mu\text{m}$ ($n = 3$) で作製した外向き分注デバイスへ緑色着色液 (0.1 w/v %) を $100 \mu\text{L}$ 導入し, 回転数 1500 min^{-1} で回転させたときの実験結果を示す. 図 7.8 より, 反応容器へ流入した直後, 液体は途切れてしまい, 液滴として反応容器へ導入された. その後, 遠心力方向へ押し流されてしまい, 永久障害バルブ S_2 に達し, 反応容器内に空気が捕捉された. 5 番目の反応容器までは 1 つ目の反応容器と同様の挙動を示したが, 6 番目の反応容器では, 永久障害バルブ S_2 が決壊した. 決壊後は, 7 番目以降の反応容器には, 遠心力とは逆らう方向に着色液が導入されることを確認した.

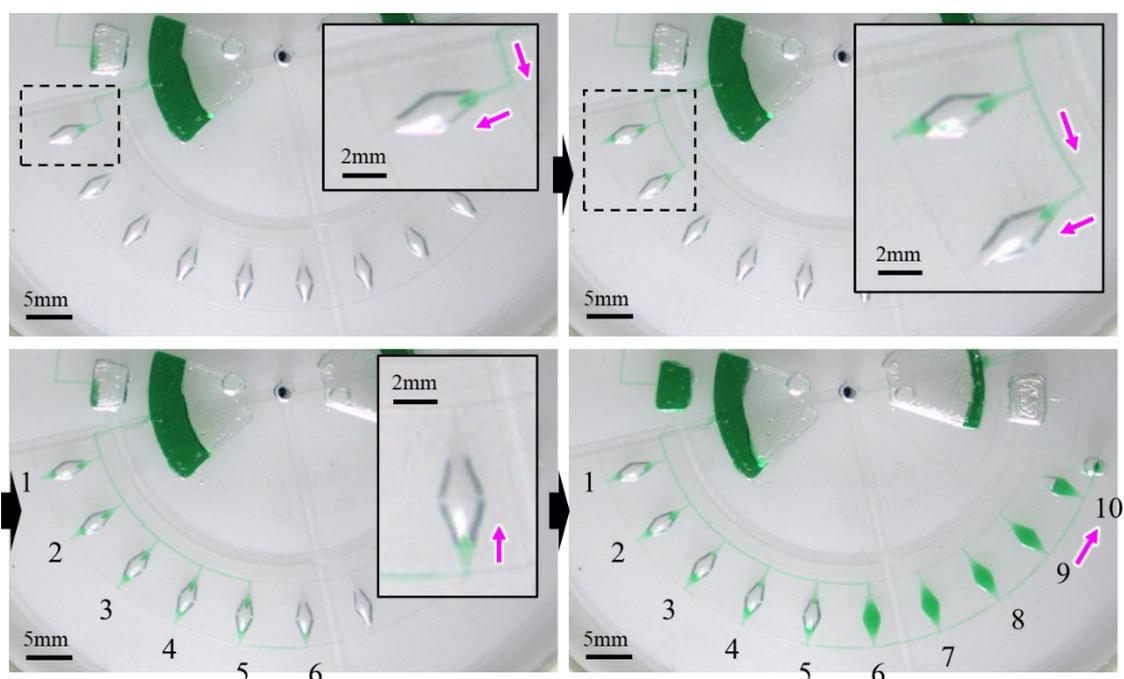


図 7.8 外向き分注デバイスへの分注実験結果

7.4 内向き分注技術の開発

7.4.1 一時障害バルブ外側配置構造

7.3 節の結果より, 遠心力に逆らう方向では反応容器に液体が導入できることを確認したため, 図 7.9 に示すように外向き分注デバイスの流路デザインを上下反転させたデバイスを考案した (以降, 内向き分注デバイス一時障害バルブ外側配置構造). なお, 図の上方向が回転中心方向とする.

図 7.10 に一時障害バルブ S_1 のギャップ長 $g_1 = 43.6 \pm 5.1 \mu\text{m}$ ($n = 10$), バルブ S_1 の角部半径 $r_1 = 5.1 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ($n = 10$), 永久障害バルブ S_2 のギャップ長 $g_2 = 20.0 \mu\text{m} \pm 4.8 \mu\text{m}$ ($n =$

10), バルブ S_2 の角部半径 $r_2 = 4.8 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ($n = 10$), 流路高さ $H = 103.9 \pm 2.7 \mu\text{m}$ ($n = 3$) で作製した内向き分注デバイス一時阻害バルブ外側配置構造へ緑色着色液 (0.1 w/v %) を 100 μL 導入し, 回転数 1000 min^{-1} および 1250 min^{-1} で回転させたときの実験結果を示す. 図 7.10 より, 回転数 1000 min^{-1} では約 164 s で反応容器 10 個全てを充填することが可能であった. しかし, 導入流量を上げようと, 回転数を 1250 min^{-1} に増加した場合には 1 番目の反応容器へ分注中, 一時阻害バルブ S_1 が決壊してしまい, 次の反応容器へ導入されることを確認した.

この結果を踏まえると, 内向き分注デバイス一時阻害バルブ外側配置構造では, 反応容器への分注中, 一時阻害バルブ S_1 は, 次式を満たす必要があることがわかった.

$$P_1 > P_c + \Delta P(L_1) + \Delta P(L_2) + P_h(S_1) - P_h(S_2) \quad (7.1)$$

ここで, P_1 は一時阻害バルブ S_1 の決壊圧力, $\Delta P(L_1)$, $\Delta P(L_2)$, $\Delta P(L_3)$ は図 7.9 に示すの各流路長で損失する圧力, $P_h(S_1)$ は一時阻害バルブ S_1 の位置で印加される水頭圧, $P_h(S_2)$ は永久阻害バルブ S_2 の位置で印加される水頭圧を示している. この式から, 回転数 1000 min^{-1} では, $P_1 = 2.69 \text{ kPa}$ に対し, $P_h(S_1) - P_h(S_2) = 2.62 \text{ kPa}$ となっており, 制約を満足することがわかる. 一方, 回転数 1250 min^{-1} では, $P_h(S_1) - P_h(S_2) = 3.66 \text{ kPa}$ となっていることから, 制約式を満足しないことがわかった.

さらに, この制約式では, $\Delta P(L_1)$ ならびに $\Delta P(L_2)$ が, 0.055 kPa, 0.011 kPa と非常に小さい圧力損失であり, 水頭圧が支配的であることがわかった. そのため, デバイスの流路幅や流路高さを大きくし, 流路抵抗 (圧力損失) を小さくしたとしても, この水頭圧は変わらないため, 回転数の制約が大きく, 本流路デザインではこれ以上の導入時間の短縮は困難であることがわかった.

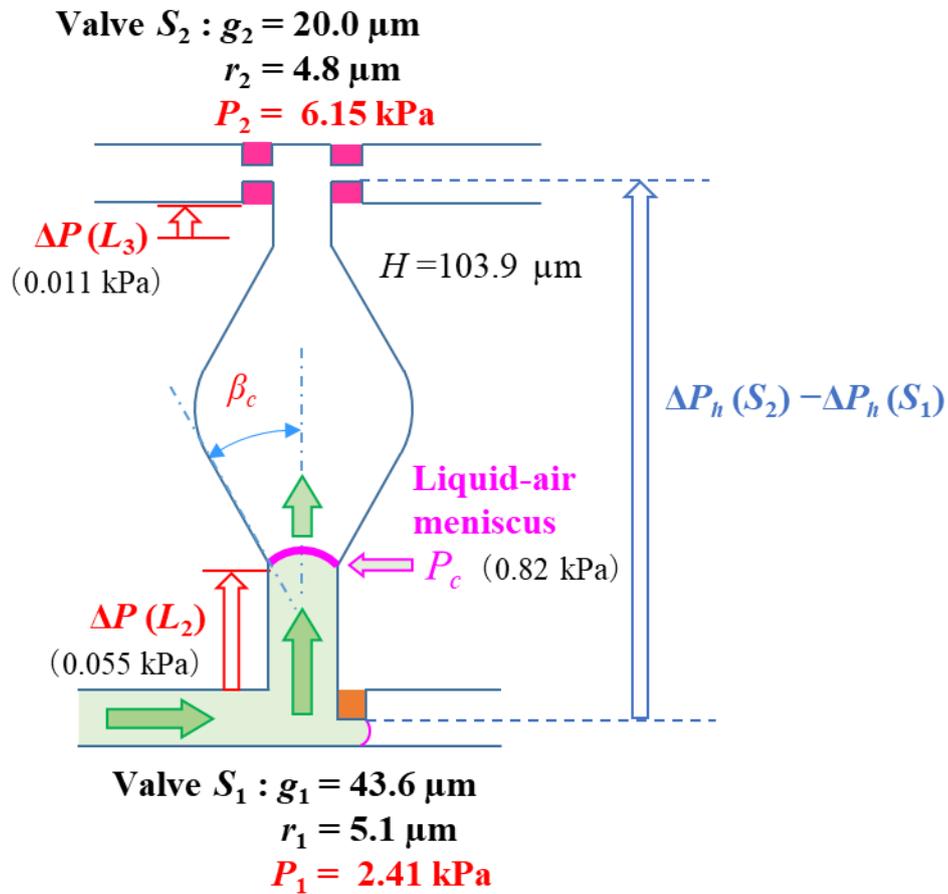


図 7.9 内向き分注デバイスの概要（上方方向を回転中心方向とする）

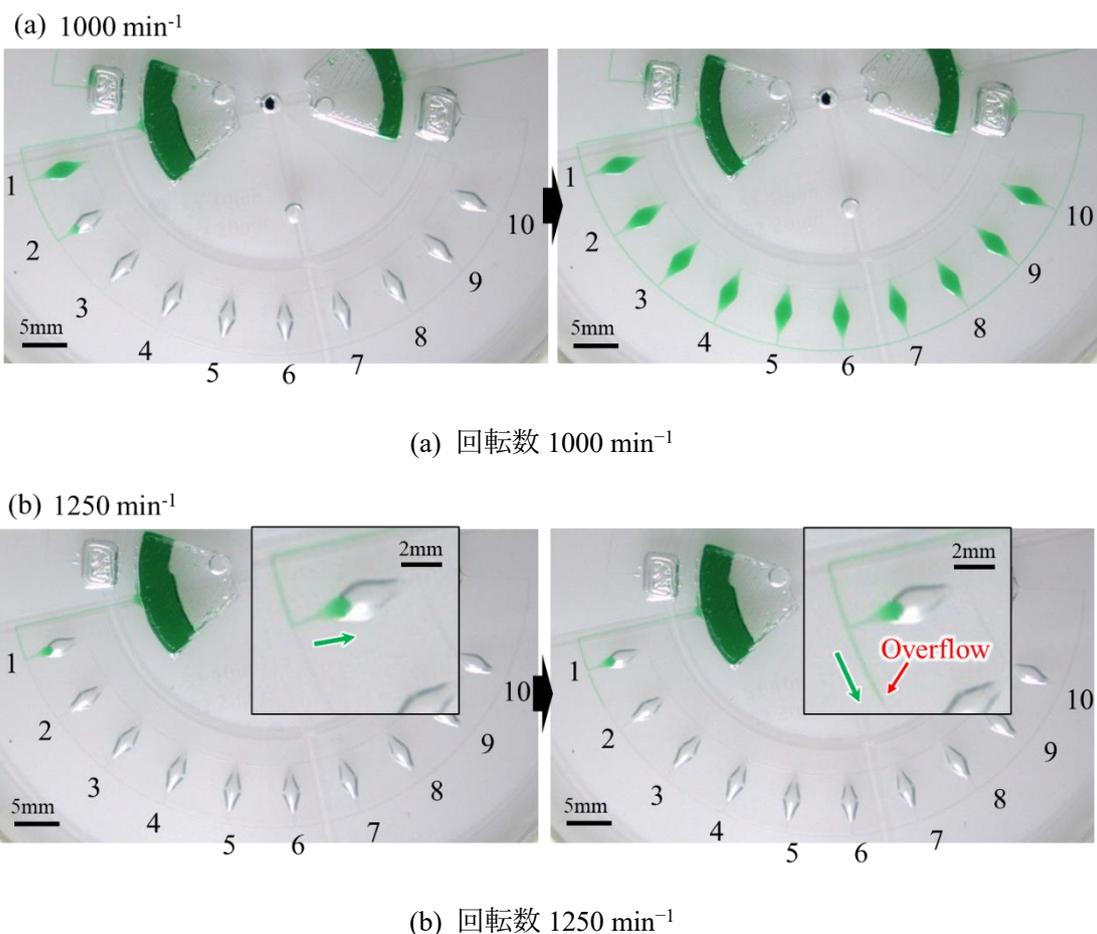


図 7.10 内向き分注デバイス一時障害バルブ外側配置構造($S_1 = 43.6\mu\text{m}$, $S_2 = 20.0\mu\text{m}$)の導入実験結果 (回転数 1500 min⁻¹)

7.4.2 一時障害バルブ内側配置構造

一時障害バルブ外側配置構造では、反応容器への分注中、反応容器の中心方向への長さ分の水頭圧が印加されてしまい、回転数に大きな制限があることがわかった。そこで、一時障害バルブが分注時の回転数の制約条件（上限値）を緩和するために、図 7.11 に示すように一時障害バルブ S_1 を回転中心に対して反応容器よりも内側に配置した、内向き分注デバイス一時障害バルブ内側配置構造を考案した。この構造では、反応容器よりも一時障害バルブ S_1 が回転中心に対して内側に配置されているため、反応容器への分注中、一時障害バルブ S_1 に遠心力による圧力が作用しない構造になっている。さらに、分注完了後には、永久障害バルブ S_2 とメイン流路との間に空気を封入することでエアープラグインバルブとして機能し、反応容器からの液体の漏出を防ぐことが期待される。

図 7.12 に一時障害バルブ S_1 のギャップ長 $g_1 = 46.0 \pm 4.8 \mu\text{m}$ ($n = 10$)、バルブ S_1 の角部半径 $r_1 = 8.4 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ($n = 10$)、永久障害バルブ S_2 のギャップ長 $g_2 = 26.0\mu\text{m} \pm 3.2 \mu\text{m}$ ($n =$

10), バルブ S_2 の角部半径 $r_2 = 8.5 \pm 1.9 \mu\text{m}$ ($n = 10$), 流路高さ $H = 109.8 \pm 6.0 \mu\text{m}$ ($n = 5$) で作製したデバイスへ緑色着色液 (0.1 w/v %) を $100 \mu\text{L}$ 導入し, 回転数 1500 min^{-1} で回転させたときの実験結果を示す. 図 7.12 より, 期待通りの反応容器への分注挙動を示し, 回転数 1500 min^{-1} において約 35 s で 10 個の反応容器すべてに分注することが可能となり, 図 7.10 (a) で示した一時障害バルブ外側配置構造 (回転数 1000 min^{-1}) のときと比較して, 導入時間が約 1/5 倍に短縮することを可能にした.

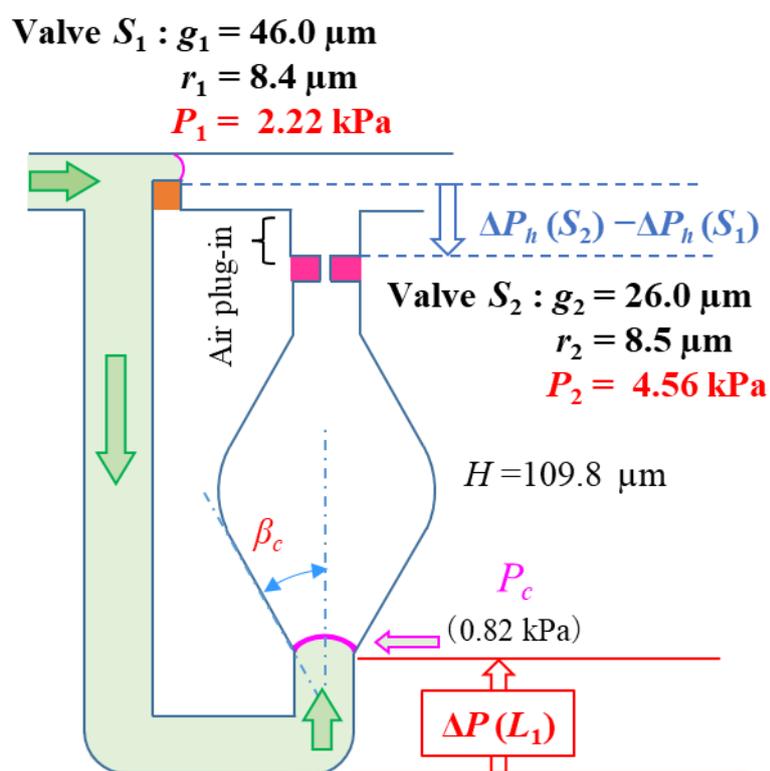


図 7.11 一時障害バルブ内側配置構造の概要

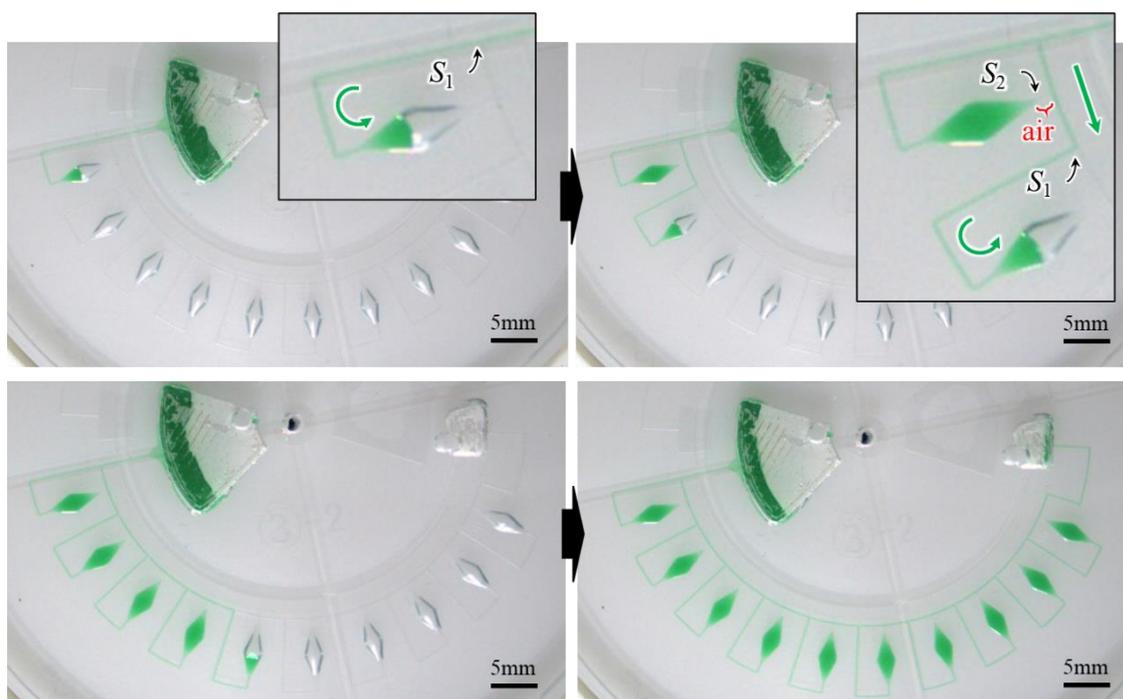


図 7.12 一時阻害バルブ内側配置構造 ($S_1 = 46.0\mu\text{m}$, $S_1 = 26.0\mu\text{m}$) の導入実験結果 (回転数 1500 min^{-1})

7.5 遠心送液型デバイスにおける逐次分注理論モデルの構築

7.5.1 一時阻害バルブ決壊圧力の設計指針

続いて、本提案の内向き分注デバイス一時阻害バルブ内側配置構造において、各バルブ（一時阻害バルブ S_1 および永久阻害バルブ S_2 ）の設計にかかる制約を調査した。はじめに、流路幅 $200\mu\text{m}$ に対して、一時阻害バルブ S_1 のギャップ長 $g_1 = 120.1 \pm 2.7\mu\text{m}$ ($n=10$) とし、バルブ S_1 の角部半径 $r_1 = 6.3 \pm 1.1\mu\text{m}$ ($n = 10$)、永久阻害バルブ S_2 のギャップ長 $g_2 = 19.9.\mu\text{m} \pm 6.1\mu\text{m}$ ($n=10$)、バルブ S_2 の角部半径 $r_2 = 6.1 \pm 1.4\mu\text{m}$ ($n = 10$)、流路高さ $H = 103.2 \pm 2.7\mu\text{m}$ ($n=5$) としたデバイスを作製した。図 7.12 で示したデバイスと比べ、一時阻害バルブのギャップ長を大きくしているため、一時阻害バルブ S_1 の決壊圧力は、 $P_1 = 2.22\text{ kPa}$ から $P_1 = 1.14\text{ kPa}$ に小さくなっている。図 7.13 にデバイスの注入リザーバへ緑色着色液 ($0.1\text{ w/v}\%$) を $100\mu\text{L}$ 導入し、 1500 min^{-1} で回転したときの実験結果を示す。図 7.13 より、回転数 1150 min^{-1} で導入したときには期待通りの反応容器への分注挙動を示した。しかし、回転数を 1500 min^{-1} にあげて導入したところ、反応容器への分注途中で一時阻害バルブ S_1 が決壊し、2~4 番目の反応容器には空気が封入される結果となった。結論として、一時阻害バルブ S_1 の決壊圧力 P_1 は次式 (7.2) を満たす必要があることがわかった。

$$P_1 > P_C + \Delta P(L_1) \quad (7.2)$$

ここで、 P_C は反応容器入口で作用する表面張力(= 0.82 kPa)、 $\Delta P(L_1)$ は図 7.11 に示す流路長での圧力損失を示している。なお、遠心力方向への流路を進むときの圧力損失ならびに円周方向へ進むときの圧力損失は作用していないことが実験結果より推測された。

式 (7.2) によれば、回転数 1150 min^{-1} の場合、一時阻害バルブ S_1 の決壊圧力 $P_1 = 1.14 \text{ kPa}$ に対し、 $P_C + \Delta P(L_1) = 0.99 \text{ kPa}$ であり、制約を満たしているが、回転数 1500 min^{-1} の場合、 $P_C + \Delta P(L_1) = 1.31 \text{ kPa}$ となり、満たしていない。また、この式では、流路抵抗による圧力損失 $\Delta P(L_1)$ を小さくすることは有効であるため、流路幅および高さを大きくすることで回転数の制約を緩和できることがわかった。

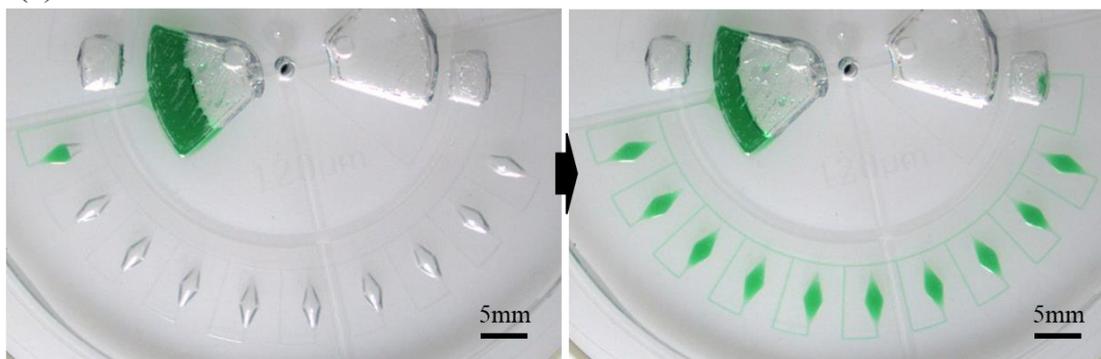
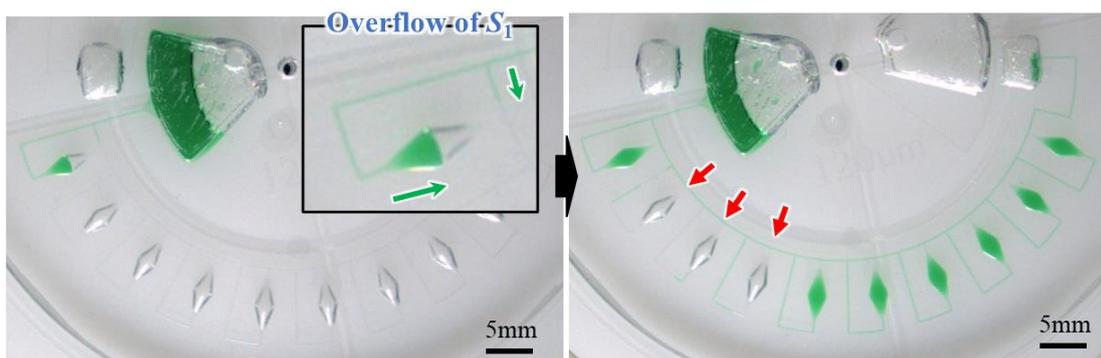
(a) 1150 min^{-1} (a) 回転数 1150 min^{-1} (b) 1500 min^{-1} (b) 回転数 1500 min^{-1}

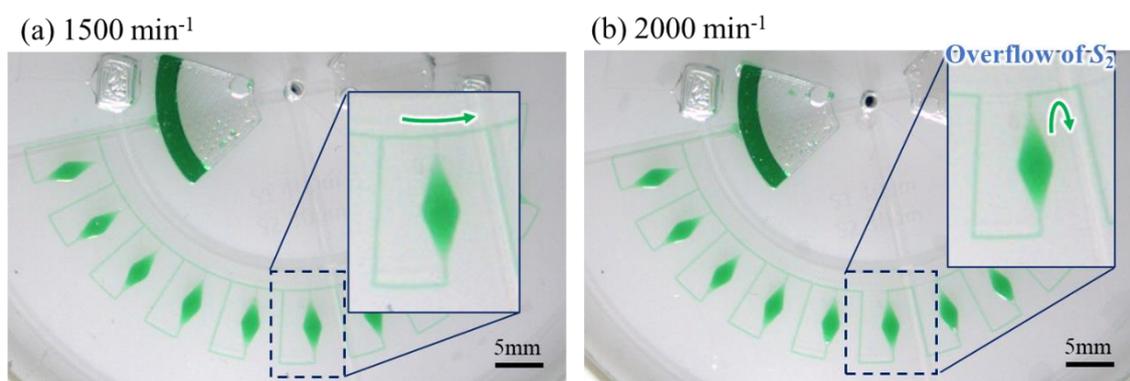
図 7.13 内向き分注デバイス—一時阻害バルブ内側配置構造 ($S_1 = 120.1 \mu\text{m}$, $S_2 = 19.9 \mu\text{m}$) の導入実験結果

7.5.2 永久阻害バルブ決壊圧力の設計指針

続いて、永久阻害バルブ S_2 にかかる設計制約を考察した。一時阻害バルブ S_1 （1面縦型相ガイド形状）のギャップ長 $g_1 = 38.6 \pm 2.2 \mu\text{m}$ ($n = 10$)に対し、永久阻害バルブ S_2 を2面相ガイド形状から1面縦型相ガイド形状に変更し、ギャップ長 $g_2 = 29.9 \mu\text{m} \pm 0.8 \mu\text{m}$ ($n = 10$)としたデバイスを作製した。なお、バルブ S_1 の角部半径 $r_1 = 5.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ($n = 10$)、バルブ S_2 の角部半径 $r_2 = 5.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ($n = 10$)、流路高さ $H = 105.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ($n = 5$)であった。図7.14にデバイスへ緑色着色液（0.1 w/v %）を100 μL 導入し、回転数1500 min^{-1} および、2000 min^{-1} で回転させ、導入した実験結果を示す。図7.14 (a) に示すように、500 min^{-1} で回転させた場合には、期待通りの分注挙動を示したものの、図7.14 (b) より、2000 min^{-1} で回転させた場合には、永久阻害バルブ S_2 が決壊し、反応容器内の溶液が漏れ出してしまうこととなった。この結果を踏まえると、永久阻害バルブ S_2 には次式の制約があることがわかった。

$$P_2 > P_1 + P_h(S_2) - P_h(S_1) \quad (7.3)$$

ここで、 $P_h(S_2) - P_h(S_1)$ は図7.11に示すように、永久阻害バルブ S_2 と一時阻害バルブ S_1 の距離による水頭圧の差を示している。1500 min^{-1} で回転させた場合、 $P_2 = 3.25 \text{ kPa}$ に対し、 $P_1 + P_h(S_2) + P_h(S_1) = 3.01 \text{ kPa}$ であり、制約式を満足している。一方で、2000 min^{-1} で回転させた場合、 $P_1 + P_h(S_2) + P_h(S_1) = 3.35 \text{ kPa}$ であり、制約を満足していないため、永久阻害バルブ S_2 が決壊したと考えられる。



回転数 (a) 1500 min^{-1} (b) 2000 min^{-1}

図 7.14 一時阻害バルブ内側配置構造($g_1 = 38.6 \mu\text{m}$, $g_2 = 29.9 \mu\text{m}$) への導入実験結果

さらに、式 (7.3) の妥当性を検証するために、一時阻害バルブ S_1 と永久阻害バルブ S_2 の形状および長さをほぼ同程度に設計したデバイスを作製した。作製したデバイスの寸法は、一時

阻害バルブ S_1 のギャップ長 $g_1 = 41.3 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ($n = 10$), バルブ S_1 の角部半径 $r_1 = 4.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ($n = 10$), 永久阻害バルブ S_2 のギャップ長 $g_2 = 42.1 \mu\text{m} \pm 1.6 \mu\text{m}$ ($n = 10$), バルブ S_2 の角部半径 $r_2 = 4.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ($n = 10$), 流路高さ $H = 99.8 \pm 2.6 \mu\text{m}$ ($n = 5$), であった. 図 7.15 にデバイスへ緑色着色液 (0.1 w/v %) を $100 \mu\text{L}$ 導入し, 回転数 1500 min^{-1} で導入した実験結果を示す. 図 7.15 から, 全反応容器で永久阻害バルブ S_2 が決壊し, 反応容器の中に溶液を留めることができていないことがわかる. これは, 回転数を変更しようとも永久阻害バルブ S_2 が回転中心に対して, 一時阻害バルブ S_1 よりも外側にあるために水頭圧分高い圧力がかかっていることを示しており, 式 (7.3) が妥当であると考えられる.

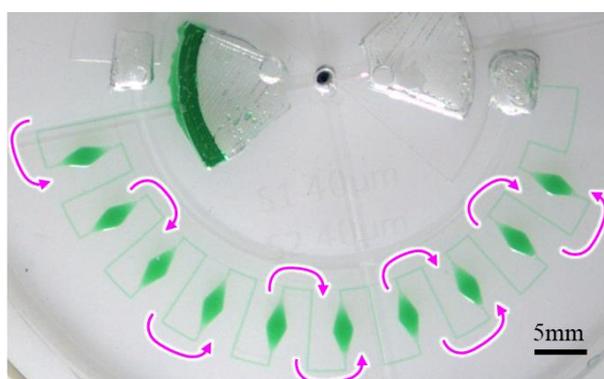


図 7.15 一時阻害バルブ内側配置構造($g_1 = 41.3 \mu\text{m}$, $g_2 = 42.1 \mu\text{m}$)への導入実験結果 (回転数 1500 min^{-1})

7.6 食物アレルギー物質の多検体・多項目同時定量診断

7.5 節までの成果に基づいて作製された遠心式マルチプレックス遺伝子診断デバイス（内向き遠心デバイス一時阻害バルブ内側配置構造）を用いて，食物アレルギー物質の多検体・多項目同時診断を実施した．そこで，新たに図 7.16 に示す 4 検体 5 項目を診断可能な直径 70 mm のデバイスを作製した．注入リザーバー（容量 94 μL ）と廃液リザーバー（容量 31 μL ）が 4 カ所あり，それぞれに 5 個の反応容器が組み込まれている．

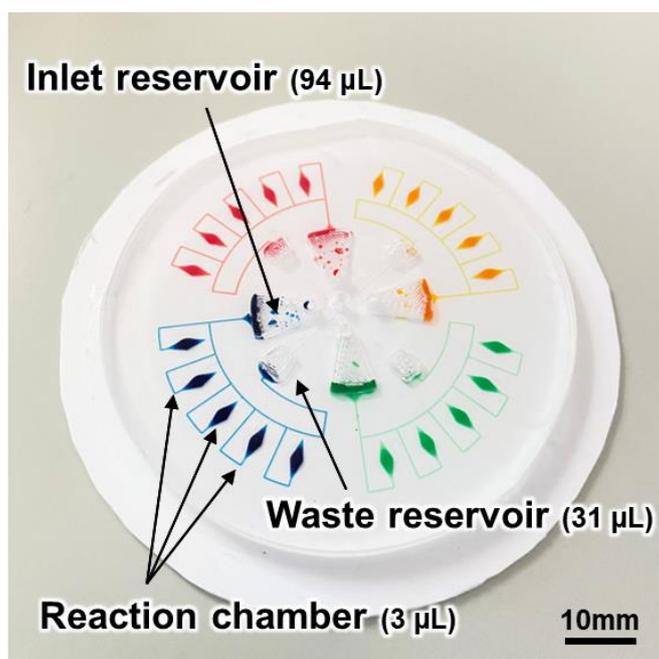


図 7.16 4 検体 5 項目診断用遠心式マルチプレックス遺伝子診断デバイス

図 7.17 に本デバイスへ赤色 (10% v/v, McCormick 社, Assorted FOOD COLOR & EGG DYE), 青色 (10% v/v), 緑色 (10% v/v), 黄色 (15% v/v) 着色液を 40 μL ずつマイクロピペットで導入し, 1500 min^{-1} で回転させたときの実験結果を示す．結果より, 各着色液の導入に反応容器への分注時間の違いなどは見られなかった．このとき, 20 個のすべての反応容器を 12 s で充填することができた．

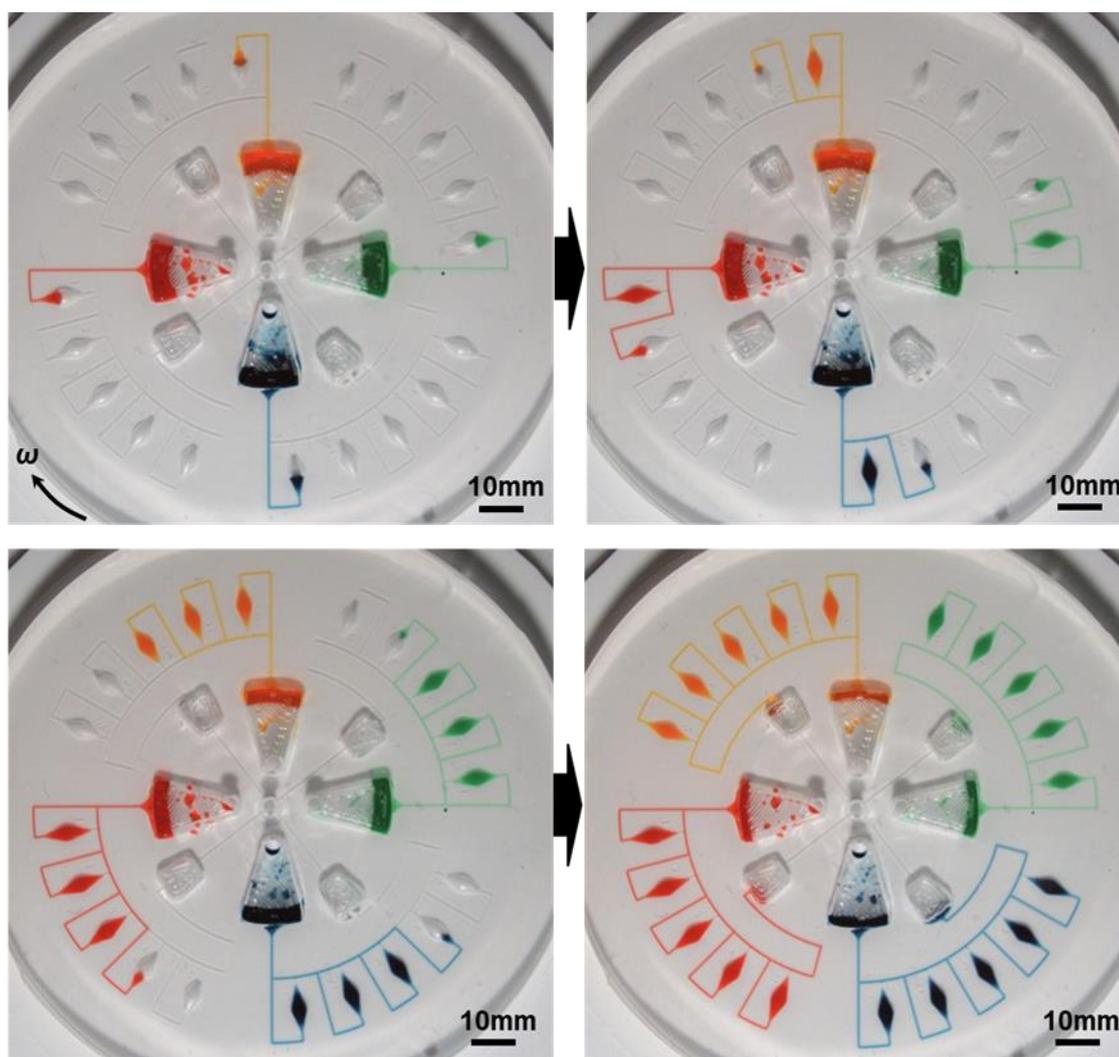
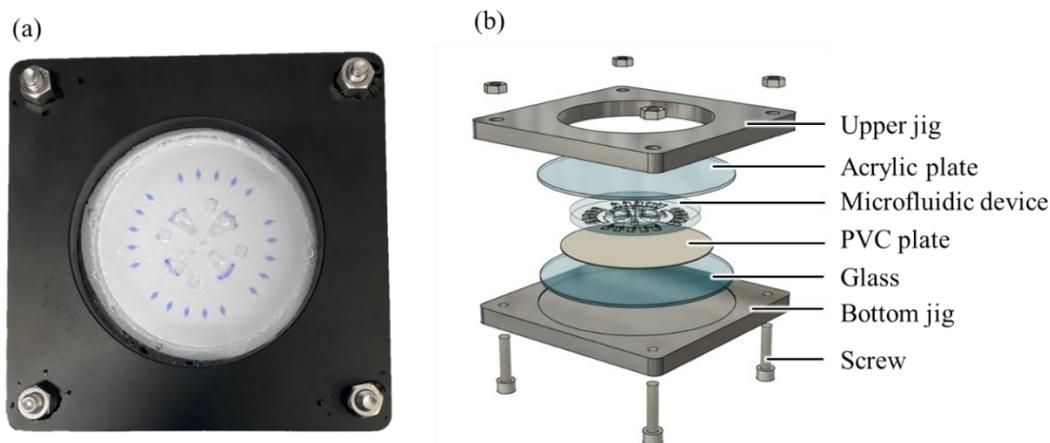


図 7.17 着色液 (40 μ L) を回転数 1500 min^{-1} で導入させたときの実験結果

食物アレルギー物質の検出実験には、小麦、落花生、ニワトリ（生肉）、ウシ（生肉）から精製した DNA サンプル（DNA 最終濃度、各 1.0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ）を用いた。使用した DNA は遺伝子抽出キット（タカラバイオ、TaKaRa NucleoSpin Plant II）を用いて精製した。遺伝子サンプルと試薬を合計 50 μL 調整し、各導入口より注入リザーバ内へマイクロピペットを用いて 40 μL 導入した。LAMP 試薬内の界面活性剤の影響により、表面張力が低減していることを考慮して、回転数を 1000 min^{-1} とし、150 s 回転させることで、混合液を反応容器へ導入した。

導入後は、図 7.18 に示すように新たに作製した縦 120 mm、横 120 mm 厚さ 9mm のアルミ治具で固定した。また、デバイス上部の天窓部には、外直径 105 mm 厚さ 2 mm のアクリル円板（さくら樹脂）、底部にはガラスウエハを挟み込んだ。



(a) 作製した治具に固定したデバイスの外観写真 (b) 固定治具の構成図

図 7.18 デバイス固定用治具

治具での固定後，ウォーターバス内（60 °C）でタイムラプス撮影装置を用いて 60 min 間 30 s 毎に 1 枚撮影した。なお，本実験では視野を拡大させるため，単焦点レンズ（TAMRON 社製 M112FM12）をタイムラプス撮影に用いた。図 7.19 にタイムラプス撮影装置で取得した食物アレルギー物質 4 種類（小麦，落花生，ウシ，ニワトリ）の検出実験結果を示す。図 7.19 中，反応容器の *W* は小麦，*P* は落花生，*C* はニワトリ，*B* はウシの遺伝子に特異的なプライマーを 0.5 μ L 滴下し，加熱乾燥させ，固定していることを示す。なお，図 7.19 中 *N* はネガティブコントロールを意味し，プライマーの固定は行わなかった。また，図 7.20 に取得したタイムラプス画像から第 6 章で開発した色相解析プログラムを用いて解析した，各反応容器の遺伝子増幅曲線を示す。実験結果から，反応容器間のクロスコンタミネーションは見られず，対象となるプライマーを固定した反応容器のみが紫色から水色へと変化していることが分かる。さらに，解析結果より，加温 20 min 後にはニワトリプライマーが最も早く増幅を開始していることがわかった。続いてウシプライマー，小麦プライマーが加温 25 min 後に反応し，最後に加温 35 min 後に落花生プライマーが反応し，色相角度 12~17° 程度変化することがわかった。

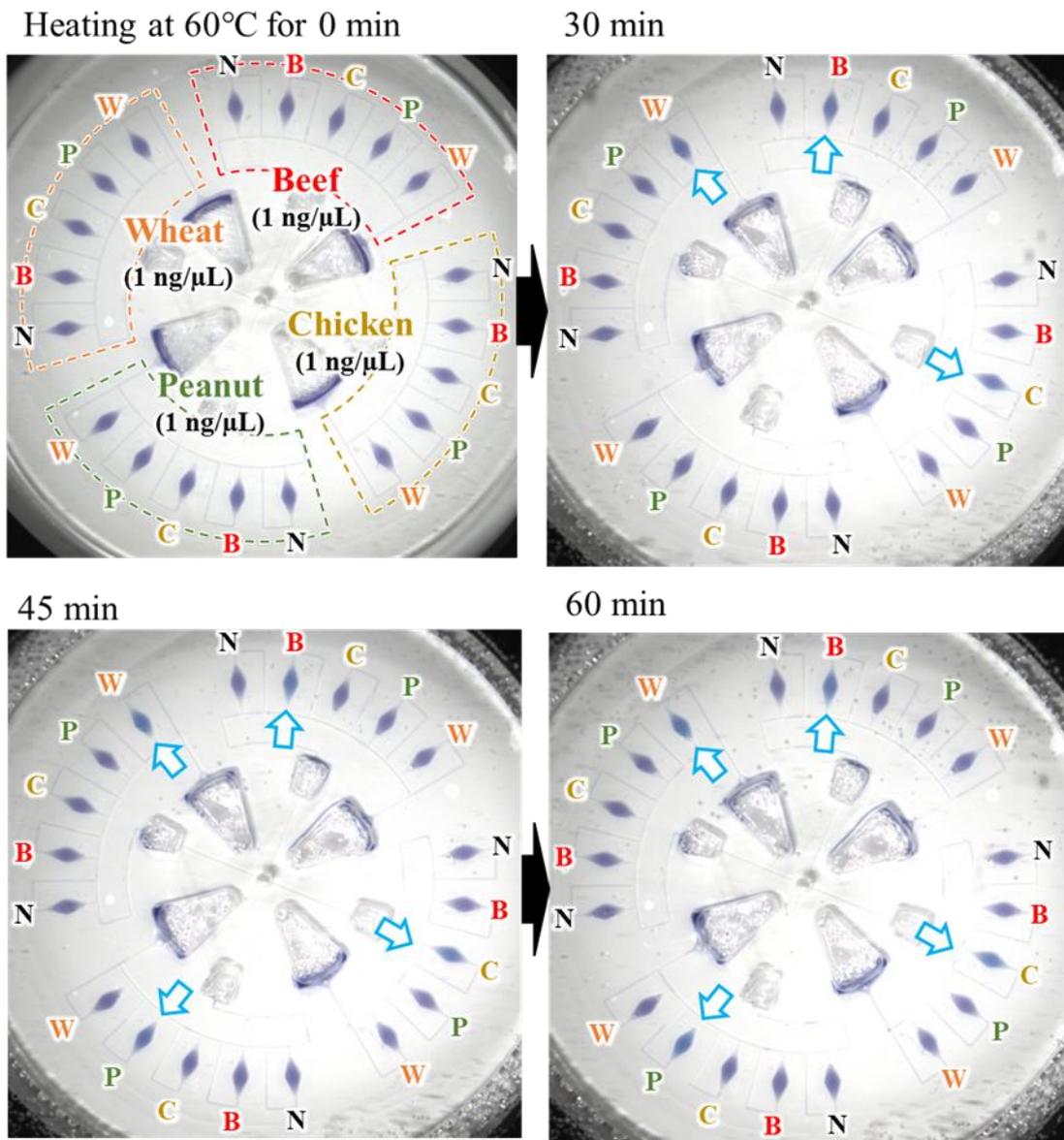


図 7.19 食物アレルギー物質 4 種 (W:小麦, P:落花生, C:ニワトリ, Bウシ) の多検体・多項目同時診断実験結果

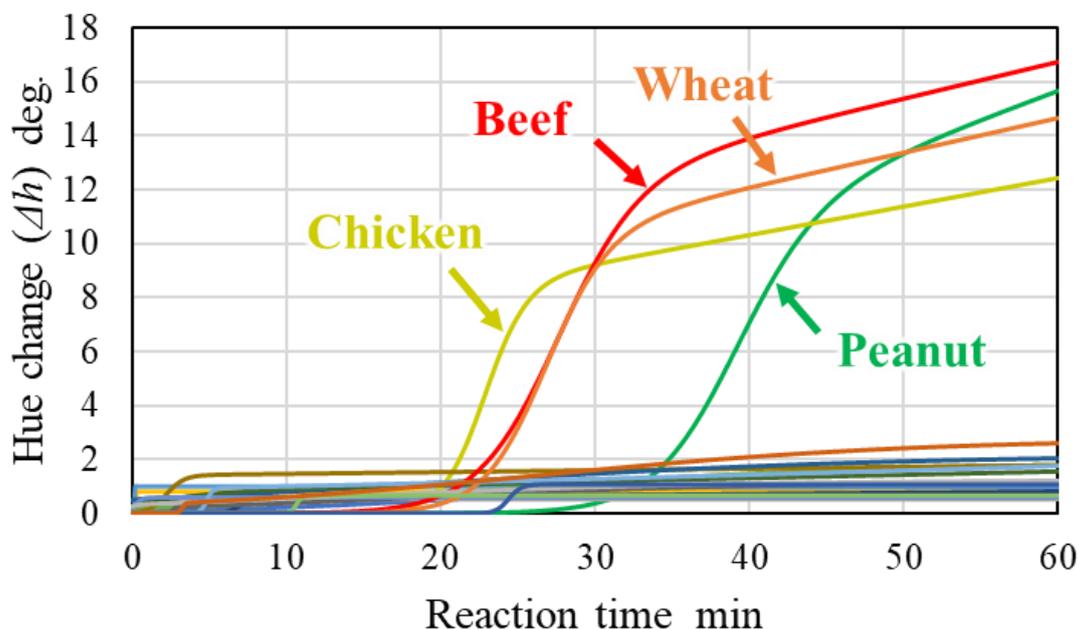


図 7.20 遺伝子増幅曲線解析結果

7.7 結言

本章では、多検体・多項目同時診断を行う遠心送液型デバイスの開発を目指し、定常回転において複数の反応容器への自律的な分注を可能にする流路デザインを検討した。さらに、開発したデバイスを用いて、食物アレルギー物質 4 種類の多検体・多項目同時診断を実証した。得られた結果をまとめると次のとおりである。

- (1) 遠心力と逆らう方向に分注することで反応容器内の空気を排出し、溶液を充填できることを示した。
- (2) 一時阻害バルブ S_1 の位置を逆転したことで作用する圧力を排除することができ、分注時間 164 s から 35 s に短縮することができ、導入流量を 5 倍にすることができた。
- (3) 反応容器に組み込んだ 2 個 1 組の受動バルブ（一時阻害バルブ S_1 ならびに永久阻害バルブ S_2 ）にかかる設計制約を明らかにした。
- (4) 第 6 章までの成果と本章の成果を組み合わせることで、食物アレルギー物質 4 種類（小麦、落花生、ニワトリ、ウシ）を 60 min 以内に検出できることを示し、4 検体・4 項目の同時診断が可能となった。

参考文献

- [1] R. Gorkin, J. Park, J. Siegrist, M. Amasia, B. S. Lee, J.-M. Park, J. Kim, H. Kim, M. Madou, and Y.-K. Cho, “Centrifugal microfluidics for biomedical applications”, *Lab Chip*, 10(14), 1758-73, (2010)
- [2] O. Strohmeier, M. Keller, F. Schwemmer, S. Zehnle, D. Mark, F. von Stetten, R. Zengerle, and N. Paust, “Centrifugal microfluidic platforms: advanced unit operations and applications”, *Chem. Soc. Rev.*, 44(17), 6187-229, (2015)
- [3] J. Ducreé, S. Haeberle, S. Lutz, S. Pausch, F. von Stetten, and R. Zengerle, “The centrifugal microfluidic Bio-Disk platform”, *J. Micromech. Microeng.*, 17, S103-S115, (2007)
- [4] M. Tang, G. Wang, S.-K. Kong, and H.-P. Ho, “A review of biomedical centrifugal microfluidic platforms”, *Micromachines*, 7(2), 26, (2016)
- [5] R. Burger, D. Kirby, M. Glynn, C. Nwankire, M. O’Sullivan, J. Siegrist, D. Kinahan, G. Aguirre, G. Kijanka, R. A. G. III, and J. Ducreé, “Centrifugal microfluidic for cell analysis”, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 16(3-4), 409-14, (2012)
- [6] A. Lee, J. Park, M. Lim, V. Sunkara, S. Y. Kim, G. H. Kim, M.-H. Kim, and Y.-K. Cho, “Correction to all-in-one centrifugal microfluidic device for size-selective circulating tumor cell isolation with high purity”, *Anal. Chem.*, 86(22), 11349-56, (2014)
- [7] W. A.-Faqheri, T. H. G. Thio, M. A. Qasaimer, A. Dietzel, M. Madou, and A. A.-Halhouli, “Particle/cell separation on microfluidic platforms based on centrifugation effect: a review”, *Microfluid Nanofluidics*, 21, 102, (2017)
- [8] S. Okamoto, and Y. Ukita, “Automatic microfluidic enzyme-linked immunosorbent assay based on CLOCK-controlled autonomous centrifugal microfluidics”, *Sens. Actuators B Chem.*, 261, 264-70, (2018)
- [9] T. Abe, S. Okamoto, A. Taniguchi, M. Fukui, A. Yamaguchi, Y. Utsumi, and Y. Ukita, “A lab in a bento box: an autonomous centrifugal microfluidic system for an enzyme-linked immunosorbent assay”, *Anal. Methods*, 12(40), (2020)
- [10] J. Park, V. Sunkara, T.-H. Kim, H. Hwang, and Y.-K. Cho, “Lab-on-a-Disc for fully integrated multiplex immunoassay”, *Anal. Chem.*, 84(5), 2133-40, (2012)
- [11] H. Xiong, X. Ye, Y. Li, L. Wang, J. Zhang, X. Fang, and J. Kong, “Rapid diagnosis of seven human respiratory coronaviruses based on centrifugal microfluidic nucleic acid assay”, *Anal. Chem.*, 92(21), 14297-14302, (2020)
- [12] L. Zhang, F. Tian, C. Liu, Q. Feng, T. Ma, Z. Zhao, T. Li, X. Jiang, and J. Sun, “Hand-powered centrifugal microfluidic platform inspired by a spinning top for sample-to-answer diagnosis of nucleic acids”, *Lab Chip*, 18(4), 610-9, (2018)
- [13] W. Yu, Y. Chen, Z. Wang, L. Qiao, R. Xie, J. Zhang, S. Bian, H. Li, Y. Zhang, and A. Chen,

- “Multiple authentications of high-value milk by centrifugal microfluidic chip-based real-time fluorescent LAMP”, *Food Chem.*, 351, 129348, (2021)
- [14] K. G. de Oliveira, P. F. N. Estrela, G. de M. Mendes, C. A. D. Santos, E. de P. S.-L., and G. R. M. Duarte, “Rapid molecular diagnosis of COVID-19 by RT-LAMP in a centrifugal polystyrene-toner based microdevice with end-point visual detection”, *Analyst*, 146(4), 1178-87, (2021)
- [15] B. Xiao, R. Zhao, N. Wang, J. Zhang, X. Sun, and A. Chen, “Recent advances in centrifugal microfluidic chip-based loop-mediated isothermal amplification”, *Trends Analyt. Chem.*, 158, 116836, (2023)
- [16] O. Strohmeier, N. Marquart, D. Mark, G. Roth, R. Zengerle, and F. von Stetten, “Real-time PCR based detection of a panel of food-borne pathogens on a centrifugal microfluidic “LabDisK” with on-disk quality controls and standards for quantification”, *Anal. Methods*, 6(7), 2038-46, (2014)
- [17] M. Focke, F. Stumpf, G. Roth, R. Zengerle, and F. von Stetten, “Centrifugal microfluidic system for primary amplification and secondary real-time PCR”, *Lab Chip*, 10(23), 3210-2, (2010)
- [18] L. Zhou, Y. Chen, X. Fang, Y. Liu, M. Du, X. Lu, Q. Li, Y. Sun, J. Ma, and T. Lan, “Microfluidic-RT-LAMP chip for the point-of-care detection of emerging and re-emerging enteric coronaviruses in swine”, *Anal. Chim. Acta*, 1125(15), 57-65, (2020)
- [19] F. Tian, C. Liu, J. Deng, Z. Han, L. Zhang, Q. Chen, and J. Sun, “A fully automated centrifugal microfluidic system for sample-to-answer viral nucleic acid testing”, *Sci. China Chem.*, 63, 1498-506, (2020)
- [20] R. R. G. Soares, A. S. Akhtar, I. F. Pinto, N. Lapins, D. Barrett, G. Sandh, X. Yin, V. Pelechano, and A. Russom, “Sample-to-answer COVID-19 nucleic acid testing using a low-cost centrifugal microfluidic platform with bead-based signal enhancement and smartphone read-out”, *Lab Chip*, 21(15), 2932-44, (2021)
- [21] L. M. Dignan, M. S. Woolf, C. J. Tomley, A. Q. Nauman, and J. P. Landers, “Multiplexed centrifugal microfluidic system for dynamic solid-phase purification of polynucleic acids direct from buccal swabs”, *Anal. Chem.*, 93(19), 7300-9, (2021)
- [22] S. J. Oh, and T. S. Seo, “Combination of a centrifugal microfluidic device with a solution-loading cartridge for fully automatic molecular diagnostics”, *Analyst*, 144(19), 5766-74, (2019)
- [23] A. A. Sayad, F. Ibrahim, S. M. Uddin, K. X. Pei, M. S. Mohktar, M. Madou, and K. L. Thong, “A microfluidic lab-on-a-disc integrated loop mediated isothermal amplification for foodborne pathogen detection”, *Sens. Actuators B Chem.*, 227, 600-9, (2016)
- [24] L. Malic, D. Brassard, D. D. Fonte, C. Nassif, M. Mounier, A. Ponton, M. Geissler, M. Shiu, K. J. Morton, and T. Veres, “Automated sample-to-answer centrifugal microfluidic system for rapid molecular diagnostics of SARS-CoV-2”, *Lab Chip*, 22(17), 3157, (2022)
- [25] S. J. Oh, B. H. Park, G. Choi, J. H. Seo, J. H. Jung, J. S. Choi, D. H. Kim, and T. S. Seo, “Fully automated and colorimetric food borne pathogen detection on an integrated centrifugal

- microfluidic device”, *Lab Chip*, 16(10), 1917-26, (2016)
- [26] Y. Dan, K. Jilie, L. Xinxin, F. Xueen, and C. Qin, “Colorimetric LAMP microfluidic chip for detecting three allergens: peanut, sesame and soybean”, *Sci. Rep.*, 8, 8682, (2018)
- [27] J. Jin, L. Duan, J. Fu, F. Chai, Q. Zhou, Y. Wang, X. Shao, L. Wang, M. Yan, X. Su, Y. Zhang, J. Pan, and J. Chen, “A real-time LAMP-based dual-sample microfluidic chip for rapid and simultaneous detection of multiple waterborne pathogenic bacteria from coastal waters”, *Anal. Methods*, 13(24), 2710-2721, (2021)

第8章 結論

1980年代に始まった μ TASの開発は、ここ20~30年の間に急速に発展し、現在では多くの計測機器に基礎技術が応用され、キーテクノロジーとして大きな役割を担っている。その中で、2019年からの新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の蔓延に伴い、迅速・簡便・低コストに多項目・多検体の同時検査が行える検査機器へのニーズが高まったことで、 μ TASの遺伝子診断技術への応用研究が活発に進められている。

しかしながら、現在でもすべてのニーズを満たせる製品はなく、次なる新興・再興感染症への対策が喫緊の課題とされている。このような背景のもと、本研究では、マイクロ流体チップテクノロジーと等温遺伝子増幅法(LAMP法)を融合することで、標的遺伝子の多検体・多項目同時定量診断システムを開発することを目的として実施したものである。

第2章では、マルチプレックス遺伝子診断デバイスの基本原理として、分注部、混合部、遺伝子診断性能を示し、実用化に向けた技術的課題を挙げた。分注部には、各反応容器に角度の異なる3種類の横型相ガイドを設けることで複数の反応容器への自律的な溶液の分注を可能とした。混合部では、流路中に段差構造を設けた横型ミキサを実装することで、溶液の高効率な混合を実現した。さらに、開発したデバイス上で蛍光試薬を用いたLAMP法によって、農作物に感染するDNAウイルスおよびRNAウイルスの多項目同時遺伝子診断を実証した。しかし、分注部、混合部には段差構造を設けるための2段階の作製プロセスが必要であること、蛍光観察のためには大掛かりな装置が必要であることが実用化に向けての技術的課題となった。

第3章では、分注部の受動バルブの耐圧性能を向上ならびに作製プロセスの簡略化を目的とし、1回のプロセスで作製可能であり、かつ流路幅方向のギャップ長によって耐圧性能が制御できる縦型相ガイドを提案した。さらに、縦型相ガイドの配置を最適化したエアブラグインバルブ構造を考案し、横型相ガイド構造と比較し、導入流量を14倍(最大導入流量70 μ L/min)に向上させるとともに、分注可能な反応容器数の制約条件を解除(理論上、無限個数)することに成功した。さらに、反応容器への逐次分注挙動を記述する理論モデルを構築し、デバイスへ導入可能な最大流量の予測を可能とし、設計指針を明らかとした。

第4章では、1回のプロセスで作製可能で高効率な縦型ミキサ(P-ACEミキサ)を提案した。流路長手方向に対して左右非対称な障害物構造を流路壁面に設けることで、広いレイノルズ数の範囲($Re=0.13\sim 13$)において高い混合性能(送液距離20mmで90%以上)を実現した。さらに、混合メカニズムを考察し、流路長手方向の中心線に対して左右の領域で空間の体積が異なるため、2液が流路幅方向に対して交互に入れ替りながら混合が促進されることを明らかにした。

第5章では、現場即時検査を目的として、デバイス上での比色指示薬を用いたLAMP法による目視での定性遺伝子診断法を確立した。また、反応容器の色を画像解析することによって、エンドポイントでの陽性・陰性判定が可能であることを示した。開発した定性遺伝子

診断法によって、アフリカ諸国における熱帯病のオンサイト検査を目的とし、節足動物媒介性ウイルス2種類（デング2型ウイルスおよびジカ熱ウイルス）を標的とした多項目同時遺伝子診断を実現した。救急医療におけるスクリーニング検査を目的とし、有毒植物（イヌサフラン）の迅速診断に適用できることを示した。ヒト感染性ウイルスの多項目診断を目的とし、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)、A型インフルエンザウイルス、新型インフルエンザ A(H1N1)pdm09 ウイルスの4種類の同時迅速診断を実証した。食料の安定供給の観点から、農作物病害虫の多項目診断に適用し、農業害虫の種類の識別と同時に保毒した植物ウイルスの診断も可能であることを実証した。食の安全・安心の観点から、植物性食物アレルギー物質3品目（小麦、そば、落花生）を標的とし多項目同時診断を実現し、本提案技術の有用性を示した。

第6章では、遺伝子増幅反応中のデバイスの画像を30s毎に取得するタイムラプス撮影装置と、得られた画像から反応容器の色の時間変化を解析する画像色解析プログラムを開発し、比色指示薬を用いた遺伝子定量診断法を確立した。ヒトヘルペスウイルスの遺伝子定量診断に適用し、従来のマイクロチューブを用いた濁度検出手法と同等の感度を有することを実証した。

第7章では、多検体の同時遺伝子診断を実現するために、遠心力によって送液が可能な遠心送液型デバイスを開発した。複数の反応容器へ逐次的に分注が行える流路デザインを提案し、遠心分注理論を構築し、デバイスの設計指針を明らかにした。さらに、第6章までの成果と組み合わせることで、食物アレルギー物質（動物性2種、植物性2種）の4検体・4項目同時定量診断を実現した。

以上の各章にて得られた結果を総括すると次の通りである。

- (1) 耐圧性能の設計自由度が高い縦型相ガイド（受動バルブ）を提案し、個々の反応容器の入口側に一時障害バルブとして、出口側に永久障害バルブとして配置することで、逐次的な分注操作を可能とする流体制御技術を開発した。また、受動バルブを空気排出流路内に配置したエアープラグインバルブ構造を提案し、分注可能な反応容器数の制約条件を解除した。さらに、分注理論モデルを構築し、デバイスに送液可能な最大流量の予測を可能とし、受動バルブに必要な耐圧性能の設計指針を明らかにした。
- (2) 簡便なプロセスで作製が可能であり、かつ流路デザインを損なうことなく実装が可能な汎用性の高い非対称構造を有する縦型ミキサを開発した。広いレイノルズ数の範囲（ $0.13 \leq Re \leq 13$ ）において、高効率な混合性能（送液距離20mmで90%）を実現した。また、開発した縦型ミキサの混合メカニズムを考察し、流路長手方向に対し、左右非対称な障害物構造を流路壁面に設けることで、2液が流路幅方向に対して交互に入れ替りながら混合が促進されることを明らかにした。

- (3) マイクロ流体デバイス上に比色指示薬を用いた LAMP 法を実装し、遺伝子増幅反応過程の反応容器の色相の時間変化を自動解析することで、検体中の遺伝子濃度を定量診断するシステムを開発した。本システムは、濁度検出法に基づく従来の LAMP 法と同等の検出感度を有し、さらに、多項目の遺伝子同時定量診断を可能とした。
- (4) 遠心力による送液に適した流路デザインを提案し、多検体の逐次的な分注操作を実現した。また、遠心分注理論モデルを構築し、受動バルブに必要な耐圧性能の設計指針を明らかにした。開発した遠心送液型デバイスによって、多検体・多項目の同時定量診断が可能であることを実証した。
- (5) 本論文で開発した診断システムは、新興感染症ならびに再興感染症の感染拡大防止へ寄与する技術である。また、加工食品の安全確保や農作物の安定供給に資する技術でもある。さらに、開発した流体制御技術は汎用性の高いものであり、化学、生命科学、工学など広範な分野への応用が可能な基盤技術である。

今後の展望

本研究で得られた各要素を統合することで、図 8.1 に示すように検体サンプルから抽出した遺伝子サンプルを導入するだけで、LAMP 試薬と高効率に混合し、各反応容器へ自律的分注、および同時に遺伝子診断が行える簡便な多検体・多項目検査システムへと展開することができる。さらに、カメラ、ヒーター、回転用モーターを小型化、集積化することにより、卓上サイズの可搬型の診断システムを開発することができることが期待できる。これは、オンサイトで安価かつ簡便に多検体・多項目を遺伝子診断することを実現する。

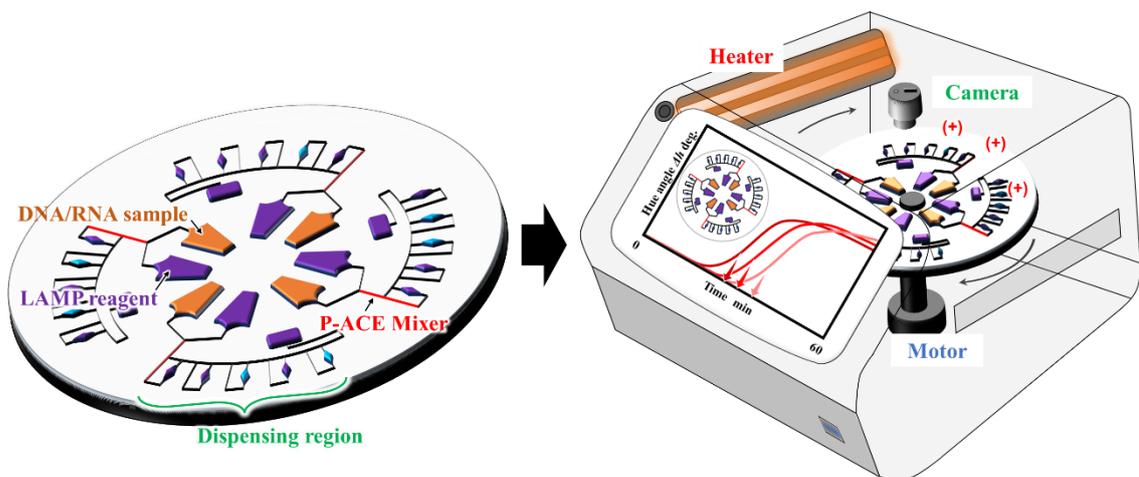


図 8.1 開発した各要素を統合した多検体・多項目検査デバイスと可搬型診断システム

しかし、真の意味での完全自動診断システムの実現には、前工程である遺伝子抽出プロセスにおいてもヒトの介入から解放する技術の提供が不可欠となる。現状の遺伝子抽出工程は、①細胞膜（タンパク質）を溶解して細胞核内の遺伝子を溶出し、②不要なタンパク質を洗浄・除去し、③遺伝子のみを選択的に抽出している。これらの操作はマイクロピペットを用いた複数回の試薬のハンドリングと遠心分離操作が求められることから、作業者の負担になるだけでなく、診断結果の信頼性が作業者の熟練度に大きく依存するという問題がある。そこで、図 8.2 に示すように、サンプルから遺伝子を抽出する工程をデバイス上に実装することにより、サンプルを導入するだけで遺伝子抽出、試薬との混合、多検体・多項目の同時診断が可能な Sample-to-Answer システムへと展開することが期待できる。

このデバイスのコンセプトは、3箇所への注入りザーバに検体サンプル、洗浄バッファ、溶出バッファをそれぞれ導入し、遠心力によって送液する。3種類の溶液は、流路長さとタイミングチャンバの容積を調整することにより、順番にシリカメンブレン（DNA を特異的に吸着するシリカゲル）を通液する。マイクロ流路内に実装した縦型相ガイドにより、流れの方向を制御することによって、検体サンプルと洗浄バッファは廃液チャンバ側に、シリカ

謝辞

本研究は、豊橋技術科学大学において2018年4月より2023年7月にわたり行ったものであります。豊橋技術科学大学教授 柴田隆行 博士には、本研究課題を与えられ、ご指導いただきました。熱血なご指導を受ける中で、研究者としての素養を高めることができたことはもちろんのこと、教育者としてのあるべき姿を感じ、筆者の目指す教育者・研究者像が確立されました。充実した研究環境の中、著者の自由な発想を尊重し、研究させていただいたことで大変多くのことを学ぶことができました。本論文を通じて、著者は研究者としても、一人の人間としても大きく成長することができました。ここに謹んで感謝の意を表します。

豊橋技術科学大学教授 永井萌土 博士、助教 岡本俊哉 博士には、本論文に対して有益なご助言とご指導を賜り、公私にわたる励ましをいただきました。深く感謝申し上げます。

東京慈恵会医科大学教授 嘉糠洋陸 博士、講師 櫻井達也 博士、講師 青沼宏佳 博士には、本研究を遂行する上でヒト感染症ウイルス検出に関するご指導、ご助言をいただきました。また、論文投稿の折には多くの激励の言葉をくださいました。また、本論文で使用したサンプルを提供していただきました。ここに深く感謝申し上げます。

藤田医科大学教授 井平 勝 博士には、本研究を遂行するにあたり、小児感染症ウイルス検出に関するご指導、ご助言をいただきました。また、本論文で使用したサンプルを提供していただきました。ここに心から御礼申し上げます。

城西大学准教授 北村 雅史 博士には、本研究を遂行する上で、食物アレルギー物質、有毒植物に関するご指導、ご助言をいただきました。本論文で使用したサンプルを提供していただきました。また、当時在籍していた、見沢沙瑛さんならびに、騎馬由佳さんには、サンプルの度重なる準備をしていただきました。ここに心から深く感謝申し上げます。

愛知県農業総合試験場 水上優子 氏、恒川健太 氏には、本研究を遂行する上で、植物病害に関するご指導、ご助言をいただきました。この場をかりて、深く謝意を表します。

当時、豊橋技術科学大学大学院工学研究科機械工学専攻博士前期課程に在籍していた、瀧下啓介さん、田中輝介さん、齋藤亮吾さん、佛生智哉さんには、献身的なご助力をいただいたおかげで、本論文の多くの成果を生み出してくれました。心より感謝申し上げます。

そして、有益な議論を交わした豊橋技術科学大学マイクロ・ナノ機械システム研究室の皆様にも心より感謝申し上げます。

また、本論文は、日本学術振興会 特別研究員奨励費および、科学技術振興機構 大学発新産業創出プログラム START、東海広域5大学ベンチャーファンド:スタートアップ準備資金の支援を受けて行いました。この場をかりて、深く御礼申し上げます。

最後に、自分の進路の選択を尊重し、惜しみない援助をしていただいた両親に対して深い感謝の意を表して謝辞と致します。

夏原 大悟

本論文を構成する論文

査読付き論文

- [1] Daigo Natsuhara, Keisuke Takishita, Kisuke Tanaka, Azusa Kage, Ryoji Suzuki, Yuko Mizukami, Norikuni Saka, Moeto Nagai, and Takayuki Shibata, "A Microfluidic Diagnostic Device Capable of Autonomous Sample Mixing and Dispensing for the Simultaneous Genetic Detection of Multiple Plant Viruses", *Micromachines*, 11(6) 540-540, (2020)
- [2] Daigo Natsuhara, Ryogo Saito, Hiroka Aonuma, Tatsuya Sakurai, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, Hirota Kanuka, and Takayuki Shibata, "A method of sequential liquid dispensing for the multiplexed genetic diagnosis of viral infections in a microfluidic device", *Lab Chip*, 21(24), 4779-4790, (2021)
- [3] Daigo Natsuhara, Sae Misawa, Ryogo Saito, Koki Shirai, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, Masashi Kitamura, and Takayuki Shibata, "A microfluidic diagnostic device with air plug-in valves for the simultaneous genetic detection of various food allergens", *Sci. Rep.*, 12, 12852, (2022)
- [4] Daigo Natsuhara, Ryogo Saito, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, and Takayuki Shibata, "Mixing Performance of a Planar Asymmetric Contraction-and- Expansion Micromixer", *Micromachines*, 13(9), 1386-1410, (2022)

国際学会発表

- [1] Pim de Haan, Daigo Natsuhara, Genn A.A. van Lieshout, Vassilis Triants, Takayuki Shibata, and Elisabeth Verpoorte, "The Infantile Digestive System Recreated in Flow-Through Microfluidic Reactors", *The SLAS Europe 2019 International Conference and Exhibition (SLAS Europe 2019)*, 1pp, 2019年6月26日
- [2] Daigo Natsuhara, Keisuke Takishita, Kisuke Tanaka, Azusa Kage, Moeto Nagai, Yuko Mizukami, Norikuni Saka, and Takayuki Shibata, "Controlled Dispensing and Mixing in Microfluidic Devices for Multiplex Genetic Diagnosis", *45th International Conference on Micro & Nano Engineering (MNE2019)*, PD56 (1pp), Rhodes island, 2019年9月23日
- [3] Daigo Natsuhara, Keisuke Takishita, Kisuke Tanaka, Azusa Kage, Moeto Nagai, Yuko Mizukami, Norikuni Saka, and Takayuki Shibata, "Fabrication and Characterization of Parallelized Microfluidic Devices for Multiplex Genetic Diagnosis", *The 8th International Conference of Asian Society for Precision Engineering and Nanotechnology (ASPEN2019)*, D31 (3pp), Matsue, 2019年11月12日
- [4] Keisuke Takishita, Daigo Natsuhara, Kisuke Tanaka, Azusa Kage, Moeto Nagai, Takeshi Hatsuzawa, and Takayuki Shibata, "Development of Microfluidic Devices for Multiplex Genetic Diagnosis Based on Isothermal DNA Amplification", *The 4th International Symposium on*

Biomedical Engineering (ISBE 2019), pp.108-109, 2019 年 11 月 14 日

- [5] Daigo Natsuhara, Kiskey Tanaka, Moeto Nagai, Yuko Mizukami, Norikuni Saka, and Takayuki Shibata, "Development of Microfluidic Device for Simultaneous Detection of Multiple Plant Viruses", *The 18th International Conference on Precision Engineering* (ICPE2020), G-1-1 (2pp), 2020 年 11 月 23 日
- [6] Daigo Natsuhara, Kiskey Tanaka, Hiroka Aonuma, Tatsuya Sakurai, Moeto Nagai, Hirotaka Kanuka, and Takayuki Shibata, "A Multiplex Genetic Diagnostic Device Integrated with Vertical Phaseguide Capable Autonomous Dispensing for the Detection of Arbovirus Infections", *The 24th International Conference of Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences* (MicroTAS 2020), pp.1189-1190, 2020 年 10 月 4 日
- [7] Daigo Natsuhara, Sae Misawa, Ryogo Saito, Kiskey Tanaka, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, Masashi Kitamura, and Takayuki Shibata, "A Microfluidic Device for Food Allergy Diagnostics Fabricated Through a Wax Reflow Process to Improve the Reliability of Autonomous Sample Dispensing," *The 47th International Conference on Micro and Nano Engineering 2021* (MNE 2021), PB-5 (2pp), 2021 年 9 月 21 日
- [8] Ryogo Saito, Daigo Natsuhara, Kiskey Tanaka, Hiroka Aonuma, Tatsuya Sakurai, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, Hirotaka Kanuka, and Takayuki Shibata, "A Highly Efficient Passive Micromixer Integrated with Asymmetric Vertical Obstacle Structures for a Microfluidic Diagnostic Device", *The 47th International Conference on Micro and Nano Engineering 2021* (MNE 2021), PB-9 (2pp), 2021 年 9 月 21 日
- [9] Daigo Natsuhara, Ryogo Saito, Kiskey Tanaka, Hiroka Aonuma, Tatsuya Sakurai, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, Hirotaka Kanuka, and Takayuki Shibata "Design Optimization of Microfluidic Diagnostic Devices for the Rapid Genetic Detection of Multiple Infectious Viruses", *The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences* (μ TAS 2021), pp.847-848, 2021 年 10 月 12 日
- [10] Daigo Natsuhara, Koki Shirai, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, and Takayuki Shibata, "A Microfluidic-based Quantitative Analysis System for the Detection of Multiple Nucleic Acid Targets", *International Symposium on Flexible Automation 2022* (ISFA2022), (pp.423-425), 2022 年 7 月 3 日
- [11] Masaru Ihira, Daigo Natsuhara, Yasuko Enya, Yuji Higashimoto, Kei Kozawa, Yoshiki Kawamura, Kazumitsu Sugiura, Takayuki Shibata, and Tetsushi Yoshikawa, "Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based on a microfluidic chip for detection of HSV-1 and 2 and VZV", *ID Week 2022*, 373 (1pp), 2022 年 10 月 20 日
- [12] Daigo Natsuhara, Yuka Kiba, Koki Shirai, Tomoya Bussho, Ryogo Saito, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, Masashi Kitamura, and Takayuki Shibata, "A Microfluidic-based Quantitative LAMP Detection system for Multiple Food Allergens", *The 26th International Conference on*

Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2022), pp.592-593, 2022 年 10 月 26 日

- [13] Daigo Natsuhara, Koki Shirai, Tomoya Bussho, Ryogo Saito, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, Masaru Ihira, Takeshi Hatsuzawa, and Takayuki Shibata, "A Microfluidic-Based Quantitative Analysis System for the Genetic Diagnosis of Multiple Viral Infectious Diseases", *The 7th International Symposium on Biomedical Engineering* (ISBE2022), P018 (1pp), 2022 年 11 月 25 日
- [14] Daigo Natsuhara, Sae Misawa, Koki Shirai, Ryogo Saito, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, Masashi Kitamura, and Takayuki Shiabta, "Design Optimization of a Microfluidic Diagnostic Device with Air Plug-in Valves for the On-site Multiplexed Genetic Detection of Food Allergens", *The 19th International Conference on Precision Engineering* (ICPE2022), C134 (2pp), 2022 年 12 月 1 日.
- [15] Ryogo Saito, Daigo Natsuhara, Koki Shirai, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, and Takayuki Shibata, "A Centrifugal Microfluidic Device with a Pair of Capillary Stop Valves for Multiplexed Genetic Diagnosis", *The 19th International Conference on Precision Engineering* (ICPE2022), C102 (2pp), 2022 年 12 月 1 日.
- [16] Daigo Natsuhara, Yu Jia Xin, Koki Shirai, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, and Takayuki Shibata, "A Microfluidic-Based Real-Time Quantitative Analysis System for the Genetic Diagnosis of Multiple Viral Infectious Diseases", *IEEJ workshop International Meeting on Sensors and Microsystems for SDGs*, MSS-23-016, CHS-23,012, BMS-23-004 (4pp), 2023 年 3 月 28 日

国内学会発表

- [1] 夏原大悟, 瀧下啓介, 鹿毛あずさ, 永井萌土, 嘉糠洋陸, 柴田隆行, 「節足動物媒介性ウイルスのオンチップ感染症診断デバイスの開発 (第 2 報)」, 2018 年度精密工学会秋季大会学術講演会, pp.772-773, 2018 年 9 月 5 日
- [2] 瀧下啓介, 夏原大悟, 鹿毛あずさ, 永井萌土, 水上優子, 坂 紀邦, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発—等温遺伝子増幅法による植物ウイルス検査への適用」, 2019 年度精密工学会春季大会学術講演会, pp.304-305, 2019 年 3 月 13 日
- [3] 瀧下啓介, 夏原大悟, 田中輝介, 鹿毛あずさ, 永井萌土, 水上優子, 坂 紀邦, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発 (第 2 報) —等温遺伝子増幅のためのデバイスデザインの最適化—」, 2019 年度精密工学会秋季大会学術講演会, pp.274-275, 2019 年 9 月 4 日
- [4] 夏原大悟, 瀧下啓介, 田中輝介, 鹿毛あずさ, 永井萌土, 水上優子, 坂 紀邦, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスのためのマイクロ流体制御技術の開発」, 第 10 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 20pm3PN310 (2pp), 2019 年 11 月 19 日
- [5] 瀧下啓介, 夏原大悟, 田中輝介, 鹿毛あずさ, 永井萌土, 青沼宏佳, 櫻井達也, 嘉糠洋

- 陸, 柴田隆行, 「ウイルス感染症の多項目同時迅速検査のための遺伝子診断デバイスの開発」, 第 29 回ライフサポート学会フロンティア講演会, p.59, 2020 年 3 月 12 日
- [6] 夏原大悟, 瀧下啓介, 田中輝介, 鹿毛あずさ, 永井萌土, 水上優子, 坂紀邦, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発 (第 3 報) —植物ウイルス病の多項目同時検出—」, 2020 年度精密工学会春季大会学術講演会, pp.168-169, 2020 年 3 月 17 日
- [7] 田中輝介, 夏原大悟, ゲレルサイハン テムーレン, 永井萌土, 位高光俊, 鈴木良地, 水上優子, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発 (第 4 報) —射出成形マイクロ流体デバイスの基本性能評価—」, 2021 年度精密工学会秋季大会学術講演会, pp.445-446, 2020 年 9 月 1 日
- [8] 見沢沙瑛, 夏原大悟, 騎馬由佳, 山室匡史, 鈴木龍一郎, 柴田隆行, 北村雅史, 「有毒植物イヌサフランのオンサイト鑑別法の開発」, DNA 多型学会 第 29 回学術集会, 2020 年 10 月 20 日
- [9] 夏原大悟, 田中輝介, 永井萌土, 青沼宏佳, 櫻井達也, 嘉糠洋陸, 柴田隆行, 「微小流体制御理論に基づくマルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発」, 第 30 回ライフサポート学会フロンティア講演会, pp.44, 2021 年 3 月 5 日
- [10] 齋藤亮吾, 夏原大悟, 田中輝介, 永井萌土, 青沼宏佳, 櫻井達也, 嘉糠洋陸, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発—分注理論の構築と新型コロナウイルス感染症への適用—」, 2021 年度精密工学会春季大会学術講演会, pp.765-766, 2021 年 3 月 16 日
- [11] 田中輝介, ゲレルサイハン テムーレン, 夏原大悟, 永井萌土, 恒川健太, 鈴木良地, 水上優子, 柴田隆行, 「射出成形マイクロ流路チップを用いた全自動マルチプレックス遺伝子検査システムの開発」, 2021 年度精密工学会春季大会学術講演会, pp.767-768, 2021 年 3 月 16 日
- [12] 見沢沙瑛, 夏原大悟, 齋藤百香, 騎馬由佳, 泉川梓, 鈴木龍一郎, 柴田隆行, 北村雅史, 「食物アレルギー多項目同時検出に資する「小麦」の DNA 鑑別法の開発」, 日本植物学会 第 85 回大会, 56, pp.143, 2021 年 9 月 16 日
- [13] 佛生智哉, 田中輝介, リュウ グレス フィ リン, 夏原大悟, 岡本俊哉, 永井萌土, 恒川健太, 鈴木良地, 水上優子, 柴田隆行, 「射出成形マイクロ流路チップを用いた全自動マルチプレックス遺伝子検査システムの開発 (第 2 報) —等温遺伝子増幅条件の最適化—」, 2021 年度精密工学会秋季大会学術講演会, pp.275-276, 2021 年 9 月 21 日
- [14] 齋藤亮吾, 夏原大悟, 白井孝興, 永井萌土, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発 (第 6 報) —非対称構造を有する高効率マイクロミキサの提案—」, 2021 年度精密工学会秋季大会学術講演会, pp.273-274, 2021 年 9 月 21 日
- [15] 白井孝興, 夏原大悟, 井平 勝, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発 (第 7 報) —遺伝子定量検査のための自動画像色解析システム

- の構築—], 2022 年度精密工学会春季大会学術講演会、pp. 509-510, 2022 年 3 月 15 日
- [16] 夏原大悟, 見沢沙瑛, 白井孝興, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発 (第 8 報) —耐圧無限大バルブの提案と食物アレルギーの多項目同時診断—」, 2022 年度精密工学会春季大会学術講演会、pp. 511-512, 2022 年 3 月 15 日
- [17] 清水一希, 齋藤亮吾, 飯田玲史, 夏原大悟, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行, 「遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発」, 2022 年度精密工学会秋季大会学術講演会、pp. 288-289, 2022 年 9 月 7 日
- [18] 佛生智哉, 宮島輝, 騎馬由佳, 夏原大悟, 岡本俊哉, 永井萌土, 北村雅史, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発 (第 9 報) —遺伝子増幅試薬の固相化技術の検討—」, 2022 年度精密工学会秋季大会学術講演会、pp. 290-291, 2022 年 9 月 7 日
- [19] 騎馬由佳, 夏原大悟, 君山柚月, 後藤優奈, 横川貴美, 柴田隆行, 北村雅史, 「食物アレルギー多項目同時検出に資する、小麦・そば・落花生 DNA 鑑別法の開発」, 第 31 回 DNA 多型学会, 2022 年 11 月 17 日
- [20] 夏原大悟, 齋藤亮吾, 佛生智哉, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行, 「マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発」, 令和 4 年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会, pp.157, 2023 年 3 月 3 日
- [21] 夏原大悟, 齋藤亮吾, 飯田玲史, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行, 「遠心送液型マルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発 (第 2 報) —逐次分注理論の構築—」, 2023 年度精密工学会春季大会学術講演会、pp. 815-816, 2023 年 3 月 14 日
- [22] 宮島輝, 夏原大悟, 齋藤亮吾, 岡本俊哉, 永井萌土, 柴田隆行, 「オンサイト遺伝子検査のための多段階希釈マイクロ流体デバイスの開発」, 2023 年度精密工学会春季大会学術講演会、pp. 807-808, 2023 年 3 月 14 日