

平成 2 3 年度第 3 次補正予算戦略的基盤技術高度化支援事業

「新規ナノガラス量子ドットによる多層マイクロ流路基板を
用いた POC 免疫学的診断法の開発」

研究開発成果等報告書

平成 2 5 年 3 月

委託者 近畿経済産業局

委託先 株式会社二一ト

目次

第1章 研究開発の概要

- 1 - 1 研究開発の背景および経緯・目的・目標 3
- 1 - 2 研究体制 5
- 1 - 3 成果概要 6
- 1 - 4 当該プロジェクト連絡窓口 6

第2章 蛍光粒子の最適化

- 2 - 1 従来の作製法 7
- 2 - 2 反応条件の最適化による高輝度化 7
- 2 - 3 ガラスビーズ表面への官能基の組み込み 8
- 2 - 4 さらに高機能化を目指した合成と評価 9

第3章 流路蛍光イムノクロマトの開発

- 3 - 1 マイクロ流路流動検討 10
- 3 - 2 アクリル透明流路による検討 11
- 3 - 5 実検体による測定 12
- 3 - 6 キット化準備 13

第4章 蛍光検出装置の開発

- 4 - 1 装置の構成 14
- 4 - 2 システム構成 14
- 4 - 3 試作機による5流路の蛍光測定 15

第5章 動的ヒート&クール成形法の開発

- 5 - 1 動的ヒート&クール成形法概念 18
- 5 - 2 ヒート&クール制御装置製作 18
- 5 - 3 ヒート&クール成形テスト(第2試作金型) 19

第1章 研究開発の概要

1 - 1 研究開発の背景および経緯・目的・目標

1 - 1 - 1 特定研究開発等概要

(計画名)

新規ナノガラス量子ドットによる多層マイクロ流路基板を用いた POC 免疫学的診断法の開発

(特定研究開発等の要約)

臨床分野では免疫学的検査を行う迅速・小型・高感度かつ多項目の POC 診断機器が求められている。これに使用する多層マイクロ流路基板の成形の為に、金型部材の伝熱差を利用し P C 制御にて高速加熱冷却する『動的ヒート&クール成形法』を開発する。

作製した流路内で新規ナノガラス量子ドットによる高感度蛍光 EIA 検査を行い、市場で要求されるアレルギー5項目の診断キットを開発し、蛍光読取装置と合わせてシステム構築する。

1 - 1 - 2 研究開発の背景

(川下産業のニーズ)

川下産業の臨床診断分野には、個別化医療の実現を目指して次のようなニーズがある。

(ア)検査センター検査から POC 診断(その場での診断)へ。

(イ)単項目検査から、同時多項目検査へ。

(ウ)従来検査できなかったものの高感度検出。

アレルギー患者は複数の抗原に反応する事が多いため、診断上は3～5項目の抗体の同時測定が必要である。更に各抗原との反応の強さを陰性から強陽性までの7クラスに分けて管理するが、従来法のイムノクロマトでは陰性とクラス1を確実に判断できないことが問題となっている。このように(イ)の多項目診断と(ウ)の高感度検出ニーズについて、アレルギー診断には同様の課題がある。

(イムノクロマト高感度化のニーズと手法)

代表的な POC 診断法として注目されている手法にイムノクロマトがある。

しかし上のアレルギーの場合もそうであったようにイムノクロマトは感度が低いのが重大な欠点である。平成21年の新型インフルエンザ騒ぎの時には、対策として日本に到着した飛行機に乗り込んでイムノクロマトで全員を検査していた。しかし迅速ではあるが感度が低いイムノクロマトでは事実上新型インフルの国内侵入は防げなかった。このためイムノクロマトのように簡便性を持ち、かつ高感度な検査法が確立すると、非常に大きな市場が開けると共に、個別化医療が急速に進むことになる。

(アレルギーには多項目同時診断が求められている)

アレルギー患者は、アレルギー体質とでもいえる性質を持ち、年月の経過により複数のアレルギーに対してアレルギーを持つようになる。そのため複数のアレルギーの同時多項目診断が非

常に重要となる。すでに市場には同時に3項目を検査できるものが販売開始されている。しかしこの3項目では市場にマッチせず、中途半端な組み合わせとなっている。

同時に5項目が検査できれば次のような目的別主要アレルゲンを検査する診断具ができることから、是非ともこのような安価な POC 診断具を開発したいというニーズが強い。

3用途の5項目診断の組み合わせを例示する。

花粉診断用：スギ・ヒノキ・ブタクサ・カモガヤ・ヨモギ

室内診断用：ヤケヒョウダニ・ネコ上皮・イヌのフケ・アルテリア・カンジダ

食品診断用：卵白・ミルク・大豆・小麦・そば

この同時多項目診断のために5本のマイクロ流路を用いた診断具を開発する。

1 - 1 - 3 研究開発の目的と目標

〔研究開発の目的〕

川下産業のニーズは、血液と試薬を混ぜて滴下するだけで、アレルギー5項目を、15分以内に、擬陽性レベル(アレルギークラス1)を確実に判定できる診断キットと判定装置ということである。このニーズを実現するために本研究の目的を次の3点とした。

(ア) 臨床診断分野が求める POC 診断システムを開発する。

(イ) プラスチック成形業高度化のための金型面を急速に昇温冷却する新技術を開発する。

(ウ) 量子ドットのバイオ分野への応用を可能とする技術を開発する。

〔本開発の高度化目標と技術的目標値〕

サブテーマ[1]：多層マイクロ流路基板内でサンドイッチ法イムノアッセイによる診断キットと CCD デテクターの製作

(達成目標)

・アレルギークラス1と陰性が判別できるように流路寸法を確定する。

サブテーマ[2]：動的ヒート&クール成形の技術開発を行う。

(達成目標)

・流路公差 $\pm 20 \mu\text{m}$ を達成する。

サブテーマ[3]：ナノガラス量子ドットのマイクロ流路反応用最適化の開発

(達成目標)

蛍光粒子のコア・シェル双方の製造法を見直し2倍以上の高輝度化する。

各種抗体との汎用的に結合の為、官能基(COOH、NH₂等)を安定的に組み込む。

粒径 $50 \pm 20\text{nm}$ が安定してできるようにする。

1 - 2 研究体制

研究実施機関

機関名	所在地
株式会社ニート	〒541-0057 大阪市中央区北久宝寺町 4-3-5 本町サミットビル4F 〒675-1322 兵庫県小野市匠台23番地 (研究場所)
トラストメディカル株式会社	〒679-0105 兵庫県加西市朝妻町 1044
独立行政法人 産業技術総合研究所	〒100-8921 東京都千代田区霞が関 1-3-1 〒563-8577 大阪府池田市緑丘 1-8-31(研究場所)

総括事業代表者(PM)

所属部署	株式会社ニート
役職	システム開発部 部長
氏名	柿本 正広

管理法人

法人名	株式会社ニート
住所	〒541-0057 大阪府大阪市中央区北久宝寺町 4 丁目 3 番 5 号
電話、FAX	06-6120-6607、06-6120-6608

研究者氏名

研究員氏名	所属	研究分担
(総括事業代表者) 柿本 正広(カキモト マサヒロ)	(株)ニート	研究総括、管理
山口 明(ヤマグチ アキラ)	(株)ニート	機器
水谷 浩章(ミズタニ ヒロアキ)	(株)ニート	機器
平田 英樹(ヒラタ ヒデキ)	(株)ニート	金型技術
廣瀬 史明(ヒロセ フミアキ)	(株)ニート	金型技術
藤原 孝敏(フジワラ タカトシ)	(株)ニート	ソフト
岩城 常仁(イワキ ツネヒト)	トラストメディカル(株)	機器
橋本 和宏(ハシモト カズヒロ)	トラストメディカル(株)	反応
多喜 博(タキ ヒロシ)	トラストメディカル(株)	反応
杉山 益清(スギヤマ マスキヨ)	トラストメディカル(株)	機器
中川 朋子(ナカガワ トモコ)	トラストメディカル(株)	反応
川畑 吉弘(カワバタ ヨシヒロ)	トラストメディカル(株)	反応
井上 真紀(イノウエ マキ)	トラストメディカル(株)	反応
村瀬 至生(ムラセ リオ)	(独)産業技術総合研究所	研究総括
安藤 昌儀(アンドウ マサリ)	(独)産業技術総合研究所	量子ドット作製

1 - 3 成果概要

サブ テーマ	事業期間目標	達成内容
多層マイクロ流路基板を用いた診断キットとプロトタイプ CCD ディテクターの開発	アレルギークラス1と陰性が判別できるように流路寸法を確定する。	<p>開発初期に抗体と反応させた後の凝集に苦しんだ時期もあったが、その解決の後は一気に全ての目的が達成できた。アレルギーという高感度でなくては検出できない診断が5種同時にできるメリットは大きい。</p> <p>5流路を安定に流せる流路幅が当初見込んだ内容でよいことを示した。</p> <p>アレルギークラス1と陰性が判別できることを示した。</p> <p>5流路でアレルギー5項目が診断できる診断チップを試作し、実検体のネガ血清・ポジ血清の診断を5流路同時に5種診断できることを示した。</p> <p>診断分野の蛍光リーダーに必要な画像処理技術や光学技術を獲得し、感度・定量性の両面で所期の目的を達成した。</p> <p>5流路10点の蛍光を測定できるように、励起光照射系・画像取り込み光学系の技術を確認し、機器のバラック製作、試作機の製作と進め、アレルギー診断チップの測定を可能とした。</p> <p>画像処理アルゴリズムを開発しマイコン用制御ソフトとして実装した。</p> <p>この装置を用いて5流路チップの濃度を変えて検量線を完成させ、十分な感度と定量性を持つことを示した。</p>
動的ヒート&クール成形法の確立	流路公差 $\pm 20 \mu\text{m}$ を達成する。	<p>目標とする高外観・高転写性成形技術を完成させた。流路精度の $\pm 20 \mu\text{m}$ も達成した。生産性も市販の方式より格段に安価かつ省エネに効果がある成形業にとって有用な技術が習得できた。</p> <p>動的ヒート&クール成形を可能とするよう、数次に渡り金型や制御装置の改造を行い所期の目的を全て達成した。</p> <p>目的とした高転写性については、マイクロ流路の観察から十分な成果を得て、目標流路公差 $\pm 20 \mu\text{m}$ についても目標の半分以下のレンジで $17 \mu\text{m}$ を達成した。</p> <p>目標サイクルについては、金型構造と制御装置の改造により、既存市販のヒート&クール方式(5~15分)を凌駕する最終目標のハイサイクル(90秒)を達成した。</p> <p>制御法についても、シーケンサー制御から、Windowsによるパソコンでの安価で容易な制御法を確立した。</p>
ナノガラス量子ドットのマイクロ流路反应用最適化の開発	<p>蛍光粒子のコア・シェル双方の製造法を見直し2倍以上の高輝度化する。</p> <p>各種抗体との汎用的に結合の為、官能基(COOH、NH₂等)を安定的に組み込む。</p> <p>粒径 $50 \pm 20\text{nm}$ が安定してできるようにする。</p>	<p>ナノガラス量子ドットの高輝度化を達成し、バイオ分野向けに官能基COOHタイプの安定生産が可能となった。また関連する多くの技術が習得できたことも今後に向かって大きな成果であった。</p> <p>発光効率7~9%から、COOH基を組込んだ上で20%以上という2倍以上の高輝度化を達成。</p> <p>発光と収率の関係を明らかにした。</p> <p>COOH基をもち、凝集が少なく、粒径も安定した蛍光粒子を次工程に渡せた。</p> <p>トラストメディカルにてマイクロ流路チップによりアレルギークラス1の測定を可能とした。</p>

1 - 4 当該プロジェクト連絡窓口

氏名 : 柿本 正広 (カキモト マサヒロ)
 所属組織名 : 株式会社ニート
 所属役職 : システム開発部 部長
 Tel: 0790-47-9001、Fax: 0790-47-9007、E-mail: kakimoto@neatnet.jp

第2章 蛍光粒子の最適化

蛍光粒子（ナノガラス量子ドット）の最適化は、サブテーマ3に該当するが、本章以降ではサブテーマ順によらず、開発の流れに沿って、第2章：蛍光粒子の最適化・第3章：蛍光イムノクロマトの開発・第4章：蛍光検出装置の開発・第5章：動的ヒート&クール成形法の開発の順で記述する。

実施計画に従い、量子ドットの最適化、官能基として COOH 等の組み込みのテーマに取り組み、作製の簡便化、発光波長の長波長化、耐光性の向上も行った。現状で最適のガラスビーズの表面に COOH 基を接着し、蛍光イムノクロマト用の評価試料とした。

従来は、市販の有機溶液分散の ZnS コート CdSe 量子ドット(CdSe がコア、ZnS がシェル、CdSe/ZnS と略記)を用いてナノガラス量子ドット(量子ドット分散ガラスビーズ)を作製してきた。まず、この従来法について説明する。本プロジェクトでは、コアとシェルの構造などを最適化したものを安定に供給するために、量子ドットを自作することとした。その作製方法およびそれを用いたガラスビーズの作製方法について記述する。

2 - 1 従来の作製法

従来法は、以下のステップ1からステップ3の3段階からなる。

[ステップ 1] 市販の CdSe/ZnS 量子ドット(Evident社製)を分散したトルエン溶液にテトラエトキシシラン(TEOS)を添加する。テトラエトキシシラン(Si-(OEt)₄, TEOS と略記)を部分的に加水分解させ(Si-(OEt)₃OH)、量子ドットの表面をこの加水分解物で被覆する(有機溶液 A)。これを、量子ドットの表面シラン化と呼ぶ。

[ステップ 2] 部分的に加水分解した別のアルコキシド(メルカプトプロピルトリメトキシシラン、MPS)を含む水溶液を調製する。これをステップ1で調製した有機溶液 A と混合し、TEOS で覆われた量子ドットの表面に MPS の層を形成する。量子ドット表面の TEOS が水に触れて加水分解が進み、親水性となって水相に移動し、同時に集合体(シード)を作る。MPS の加水分解速度は TEOS よりも遅いので、量子ドットが凝集して大きな塊となることを防ぐ。

[ステップ 3] 量子ドットの集合体にさらにシリカ(ガラス)層を堆積させて量子ドット分散ガラスカプセル蛍光体を作製する。これは、スーバー法により、アルカリ性の溶媒中で TEOS を加水分解させ、量子ドット集合体を核として堆積させることで行う。

この3ステップにより、量子ドット集合体は緻密なシリカ層に保護されてガラスカプセル蛍光体(ナノガラス量子ドット)となるので、高い輝度と耐光性を備える。

2 - 2 . 反応条件の最適化による高輝度化

(1) 量子ドット(CdSe/ZnCdS)の作製

文献をもとに、トリオクチルアミン(TOA)、リガンドのオクタデシルフォスホン酸に酸化カドミウムを不活性雰囲気中で加熱溶解し、トリオクチルホスフィンセレナイドを添加した。添加量や攪拌時間を制御することで、CdSeコアの大きさを作り分けた。

作製した CdSe コアには、傾斜組成の ZnCdS シェルをとりつける。この傾斜組成のシェルの方が、ZnS 単独よりも、格子定数のミスマッチが少ないために、高い発光効率が期待できる。トリオクチルアミン、オレイン酸、酢酸亜鉛、酢酸カドミウムを加えた後、加熱攪拌しながら CdSe コア溶液を添加した。次に、トリオクチルホスフィンサルファイドを添加、加熱、攪拌した。遠心分離、再沈殿により精製し、トルエン溶液とした。

(2) ガラスビーズ化

Evident 社量子ドットが販売中止になったため、上記のように自作した。より発光効率が高く、粒径分布が狭いガラスビーズを得るために、実験を繰り返した。量子ドットの大きさによる反応条件の違いについても調べた。

従来の作製法を参照しつつ、添加量や反応時間を変えて、結果を吸収・蛍光スペクトルや透過電顕像により評価した。特にステップ2では、シラン化量子ドットの加水分解、水相への移動、集合体(シード)

の形成、という過程を経て複雑なので、ひとつひとつ反応の条件出しを行うこととした。

ガラスビーズにした場合に高い発光効率と収量が得られる条件を探すと図2-1のようになった。オレイン酸コートの場合、波長 600nm 付近の量子ドットであれば、Evident 社の量子ドット(アルキルアミンコート)より3倍程度も高い濃度(0.6 μ M)で合成すると発光効率と回収率が最大になった。波長 550nm では、さらにその2倍程度の濃度が最適であった。粒径が小さくなるほど、単位濃度あたりの量子ドットの合計の表面積は減少するので、同じ平衡反応を得るためには、量子ドットの濃度を増やす必要があったと考えられる。

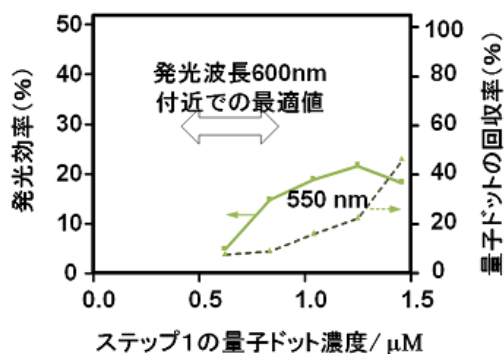


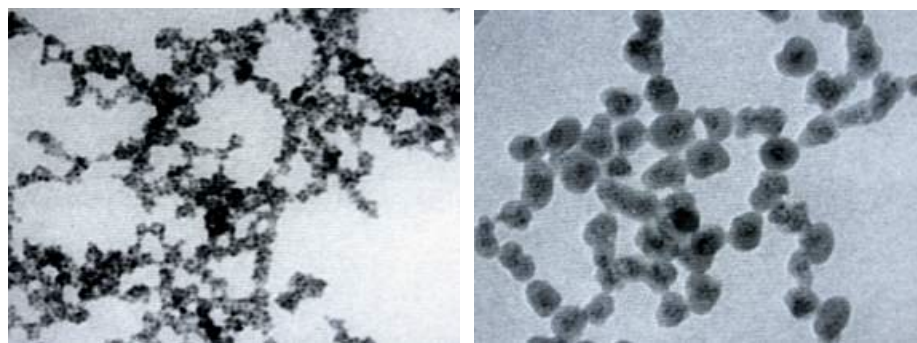
図2-1. ステップ1の量子ドット濃度とステップ2終了後の発光効率および回収率。

2-3. ガラスビーズ表面への官能基の組み込み

これらの条件出しを経て、最後に作製したガラスビーズの表面修飾を試みた。NH₂ 基をつける場合には、凝集を防ぐことが難しかった。これは、ガラス表面(OH 基)が中性領域ではマイナスに帯電しているのに対して、NH₂ 基はプラスに帯電しているためと考えられる。このため、以下の様にCOOH 基による表面修飾を行った。

COOH 基を含むアルコキシド(カルボキシエチルシラントリオールのナトリウム塩、CES)を用意した。CES は、脱水縮合し易く、アルコールに混ぜるだけで白濁する。このため、ステップ3において加水分解した TEOS と混ぜることで、TEOS のネットワークに CES を取り込む手法を開発した。これによって、CES 同士が直ぐに脱水反応によって結合し、大きな塊となるのを防ぐことが出来た。CES は TEOS に対して5モル%が適切であった。

ステップ2および3の段階での透過電子顕微鏡像を図2 - 2に示す。条件出しがうまく行っているために、量子ドットの凝集や空のガラスビーズは見られず、ほぼ単分散の量子ドット含有ガラスビーズが作製されていることがわかる。得られたガラスビーズの吸収・蛍光スペクトルは、始めの量子ドットのものと同様であった。



ステップ2終了直後 ステップ3でガラスビーズ化し、COOH基修飾後。

図2 - 2 透過電子顕微鏡像

これらの実験により、量子ドット作製、表面シラン化(ステップ1)、集合体形成(ステップ2)、ガラスコート(ステップ3)、表面修飾の過程を経て、目的の量子ドット分散ガラスビーズを作製し、(株)ニートおよびトラストメディカル(株)でのマイクロ流路を用いた評価実験に供した。その結果を、作製条件に反映させた。

2 - 4 さらに高機能化を目指した合成と評価

ガラスカプセルのさらに高機能化を目指して、長波長領域での発光、作製法の簡略化、耐光性試験を行った。

長波長域での発光を得るために、今までの合成の知識をもとに Te を含む量子ドットを作製した。CdTe_{0.5}S_{0.5}/CdZnS を目標組成としたところ、反応温度、時間などの条件を最適化することで、発光波長670nm程度で発光効率30%を得た。これは、赤色からオレンジ色領域で Te を含まないものの半分程度の値である。

また、作製法の簡略化では、ステップ2でステップ1の反応も同時に行わせる方法を試した。また、逆ミセル法による作製法も行った。いずれも透過電顕では同様の形態のガラスビーズができていたことが確かめられたが、発光効率が低く、条件出しが必要である。レーザー光を照射して蛍光強度の変化を調べる手法も開発した。ガラスシェルが厚くなるほど、耐光性は格段に上昇した。

第3章 流路蛍光イムノクロマトの開発

3-1 マイクロ流路流動検討

樹脂板のマイクロ流路を使う場合は、樹脂表面の濡れ性と溝幅と深さにより速度が変わるので、最適な樹脂と流路形状をえらぶことが重要なポイントとなる。「切削流路基板」「仮金型流路基板」などで流動性を検討し動的ヒート&クール金型で用いる流路幅を決定する検討を行った。

チップモデル図を図 3-1 に示す。表 3-1 に示す様に、等しい断面形状を有する 5 本の流路を有している。各々の流路は、各流路によって経路形状は少しずつ差異はあるが、経路軸線長さは同一長さになる様に設計されている。

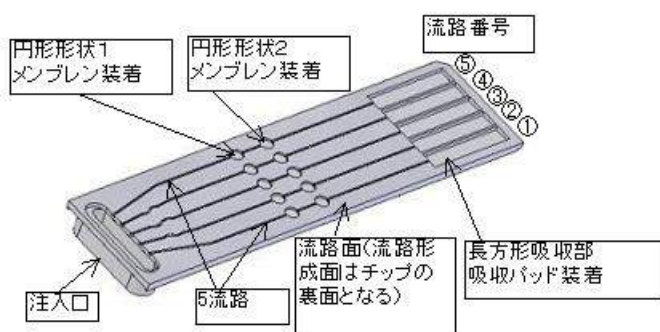
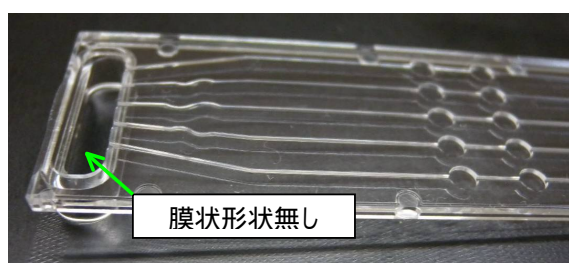


表 3-1 流路形状

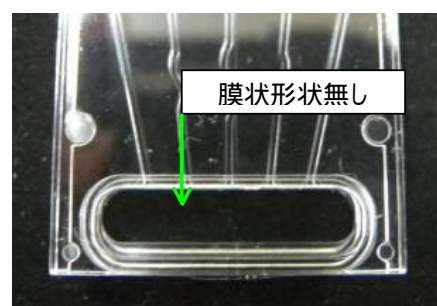
流路番号	流路幅 (mm)	流路深さ (mm)
	0.4	0.4
	0.4	0.4
	0.4	0.4
	0.4	0.4
	0.4	0.4

図 3-1 成型流路チップモデル図

最終年度に第2次試作金型(平板)として改修を実施し、図3-2(写真)に示す様な、注入部への膜状の不要形状の出現が無い流路チップ成型品を確保した。



斜め上方写



注入口上面写真

図 3-2 第2次試作金型成型品

採取した成型品に関して、流路面を透明感圧接着フィルムにて封止し、注入口から試験液滴下後の静置、大気圧下での流路流れの状況を調べた。試験液として青色着色 loading buffer (X10) を 11 倍希釈して使用した。

チップ成型材は、アクリル(標準グレード) (アクリペット VH001)を用いた。さらに微細な流路

開口部への液の侵入が不安定になる事から表面処理剤を塗布して流動状況を調べた。各部位への到達時間の平均を表 3-2 に示す。

表 3-2 第 2 次試作金型(平板)成型品での到達時間

流路番号	流路寸法	流路侵入	円形部1到達平均時間(sec)	円形部2到達平均時間(sec)	吸収パッド到達平均時間(sec)	吸収パッドによる吸出し(流路内)
1	0.4X0.4		4.0	9.0	35.3	空
2	0.4X0.4		4.0	7.3	29.3	空
3	0.4X0.4		5.7	9.7	31.0	空
4	0.4X0.4		5.3	14.0	31.7	空
5	0.4X0.4		3.0	7.7	36.0	空

:30sec程度遅れ
:即侵入

空: 全て吸収パッドへ

5 流路全てにおいて3 サンプルとも吸収パッド部に到達し、各部位への到達はばらつきが抑制され、非常に短時間になった。注入口での流路へのスムーズな侵入は、金型の改修により、膜除去の際の注入口壁面の表面粗さの劣化が無くなった事と表面処理剤の塗布による流路入り口付近の濡れ性の向上による 2 つの相乗効果によるものと考えられる。流路 円形反応部 流路間の液の良好な伝達に関しては、表面処理剤の塗布による流路内の濡れ性の向上によるものと考えられる。成型品チップと表面処理により、5 流路の反応並びにその結果の測定に供しうる流路としての基本的流動性能を確認した。

3 - 2 アクリル透明流路による検討

黒色流路を用いた検討を行ったところ、黒色の着色用顔料自体が発するオレンジ色の蛍光が障害となり、感度が上がらない可能性が示唆された。そこで蛍光の弱い透明流路を用いて検討を行った。

〔 アレルギー定量性の検討 〕

透明5流路基板を用いてイムノクロマトアレルギーの各段階が定量可能かどうかの検討を行った。定量性評価用サンプルとして、日本ケミファ アレルギー抗体診断機 ダイアパック 2000 のキャリブレーション用血清を用いた。アレルギー判定基準と各標準液の抗体濃度を表 3-3 に示す。

アレルギー判定基準		標準液濃度	
クラス	抗体濃度UA/mL		
0	0.34 以下	0.00 UA/ml	
1	0.35 以上	3.50 UA/ml	
2	0.7 以上	17.50 UA/ml	
3	3.5 以上	50.00 UA/ml	
4	17.5 以上	100.00 UA/ml	
5	50 以上		
6	100 以上		

表 3 - 3 アレルギー判定濃度とキャリブレーション試薬

これを5流路に個々に流した写真を図3-3に示す。
 (結果) 検量線を引くために、キャリブレーション液濃度とC-MOSGain(輝度)をプロットし、近似式を求めた。その結果、全濃度域については濃度 = 0.0235 輝度² - 4.96 輝度 + 263にて R² = 0.9994 の良好な結果を得た。また低濃度域についても、濃度 = 0.6594 輝度 - 69.529にて R² = 0.9998となり、この式を近似式として用いることとした。また、下のグラフで濃度 17.5と3.5を結んだ線が見事にネガコンの値を正確

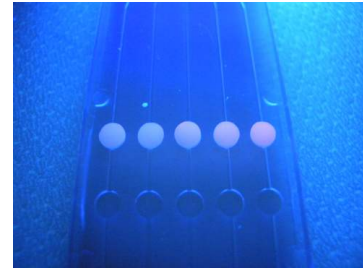


図3-3 キャリブレーション液の展開結果

(R² = 0.9998 と)に通過することから、アレルギークラス 0 と 1 との区分には十分な分解能をもっていることが示唆された。この二つのグラフを図3-4に示す。

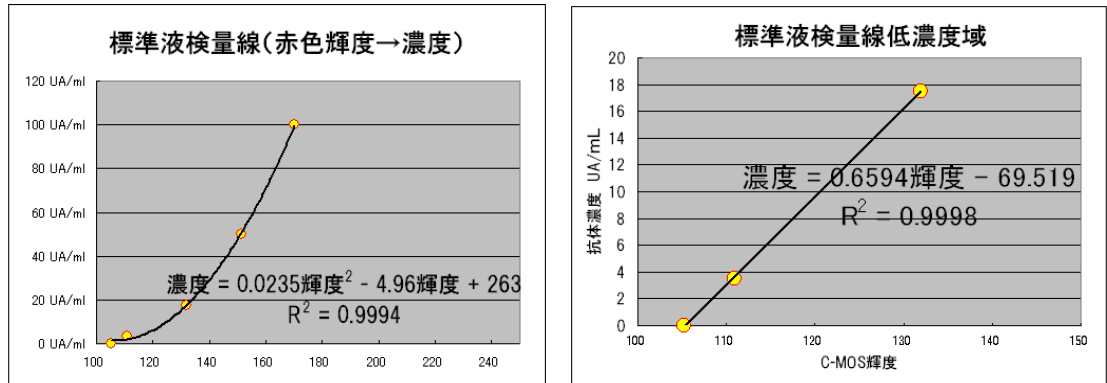


図3-4 アレルギー抗体濃度検量線

3-3 実検体による測定

最終的に実際の患者血清にて所期の結果が得られるかどうか検証した。

ネガコンとして血清(BRH302286)、ポジコンとして血清(11751)について実際に測定した。

アクリル透明流路テストウエルには抗ヒトIgG抗体・コントロールラインには抗マウス抗体を固相化した Whatman GF/D を3 に打ち抜いたものを圧入した。

血清 150 μl にナノガラス量子ドットで標識した抗人IgE抗体とブレンドし、所期の方法でアクリル透明流路に流した。その5分後に DiaPac2000 用洗浄液300 μlを流し、10分後に測定した。

結果を表3-4、写真を図3-5に示した。

種別	ポジコン血清		ネガコン血清	
	濃度UI/mL	クラス	濃度UI/mL	クラス
カモガヤ	31.37	4	-	0
スギ	4.94	3	-	0
ブタクサ	3.21	2	-	0
ヨモギ	2.57	2	-	0
ヒノキ	3.64	3	-	0

表3-4 実検体検査結果



図3-5 実検体の検査結果

5種の抗体を同時に検出することに成功し、写真、表からも明らかなように、ほぼ期待通りの結果が得られた。今回入手した血清にたまたまクラス1が無かったが、アレルギークラス0と1の識別という本開発の目的は、図3-4に示した検量線から十分にそれが期待できる内容であり、達成したと考えている。

3 - 4 キット化準備

メンブレンを実装した5流路試作チップにフィルムの貼付を行い、試験液を滴下し、加圧して圧送、バキューム吸引して負圧引きを行い、流路封止部の流体漏れなき事を確認した。

次に、診断キットの試薬類以外の構成となる上記のメンブレン実装サンプルを用いて、0.8mmと0.05mmの流路について、静置、大気圧下での流れ状況を観察し、末端である吸収パッド迄到達する事を確認した。図3-6に、試作し、送液を行ったサンプルの写真を示す。



図3-6 診断チップ組み上げ試験

他項の実験は、この結果を活用して実施している。

第4章 蛍光検出装置の開発

4 - 1 装置の構成

本蛍光リーダーは、検体を滴下した流路チップをセットすると、所定の観測部位(抗体トラップ部とコントロール部を含む)を CMOS カメラで捉え、その画像中で抗体に感作させた蛍光量子ドットの蛍光発光状況を計測する装置である。

装置の代表的なスペックは、

- ・サイズ: 幅 232mm
奥行き 145mm
高さ 205mm(蓋閉時)
300mm(蓋開時)
- ・重量: 1.7Kg
- ・供給電力 制御用 5V
励起光用 20V

図4 - 1 に試作装置正面写真,
図4 - 2 に試作装置側面写真,
図4 - 3 にチップ搭載状態の
写真、
図4 - 4に全体図を示す。



図4 - 1 装置正面写真



図4 - 2 装置右側面写真



図4 - 3 チップ搭載状態写真

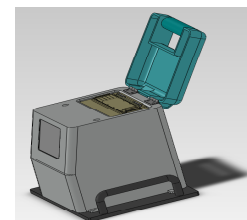


図4 - 4 全体図

4 - 2 システム構成

(全体構成)

図4 - 5に CCD デテクターの
全体構成を示す。

CCD デテクターの装置全体の
制御およびユーザーインター
フェースを担う CPU モジュールと
検出部の CMOS カメラモジュール
を制御する RX マイコン基板、
各基板間の通信接続と外部接続
を担うインターフェース基板から
構成される。

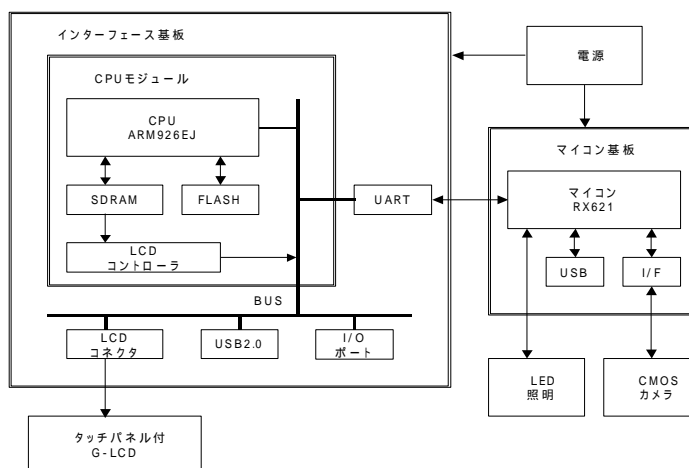


図 4 - 5 CCD デテクター全体構成

4 - 3 試作機による5流路の蛍光測定

〔事前調整〕

血清とアレルギー抗原を感作させたナノ量子ドットの混合液からなる実サンプルをトラップ抗体を測定領域に固定したチップに流して所定の反応時間経過後にディテクター試作装置にて測定を行い、先に求めた関係式から量子ドット濃度換算値を求めた。

希釈濃度を、ナノ量子ドット原液、その2倍積、5倍積、10倍積、20倍積の5段階希釈系列でのチップ上の測定領域の発光状態と測定結果の表示を写真で図4-6に示す。

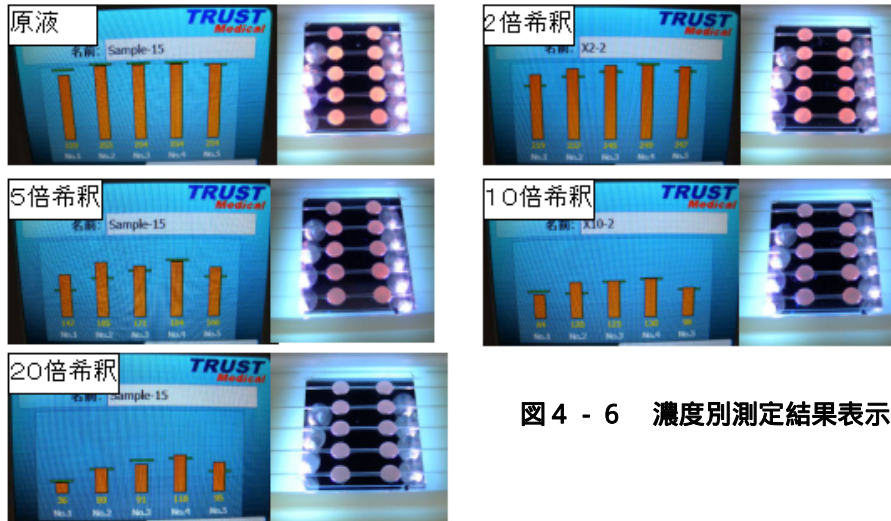


図4-6 濃度別測定結果表示

励起光のエリア的なばらつきと撮像素子の周辺部に行くほど感度が低下する傾向が若干あることから1番流路は他に比べると差が認められるが、絶対値の差異を吸収できる範囲となっていると考えられる。そこで、基本検量線の作成を行った。

〔検量線の設定〕

測定は、3流路チップ(各チップ測定10箇所内数値表示5箇所)に対して1回実施し、その平均値を輝度相当値として採用した。測定結果を表4-1に示す。

濃度	流路No.	1回目	2回目	3回目	輝度
1倍	1	227	229	225	227.0
	2	254	253	251	252.7
	3	254	254	255	254.3
	4	255	254	255	254.7
	5	253	254	252	253.0
2倍	1	216	219	220	218.3
	2	236	237	240	237.7
	3	247	245	245	245.7
	4	247	249	246	247.3
	5	245	247	248	246.7
5倍	1	148	147	146	147.0
	2	183	185	182	183.3
	3	170	171	173	171.3
	4	183	184	187	184.7
	5	168	166	165	166.3
10倍	1	85	84	84	84.3
	2	122	120	119	120.3
	3	124	123	125	124.0
	4	133	130	130	131.0
	5	95	98	100	97.7
20倍	1	35	36	36	35.7
	2	81	80	83	81.3
	3	92	91	93	92.0
	4	116	118	115	116.3
	5	93	95	92	93.3

表4-1 測定結果

測定結果に基づき、輝度測定値と濃度との関係をグラフにプロットし、対数式で近似させたグラフを図 4 - 7 に示す。

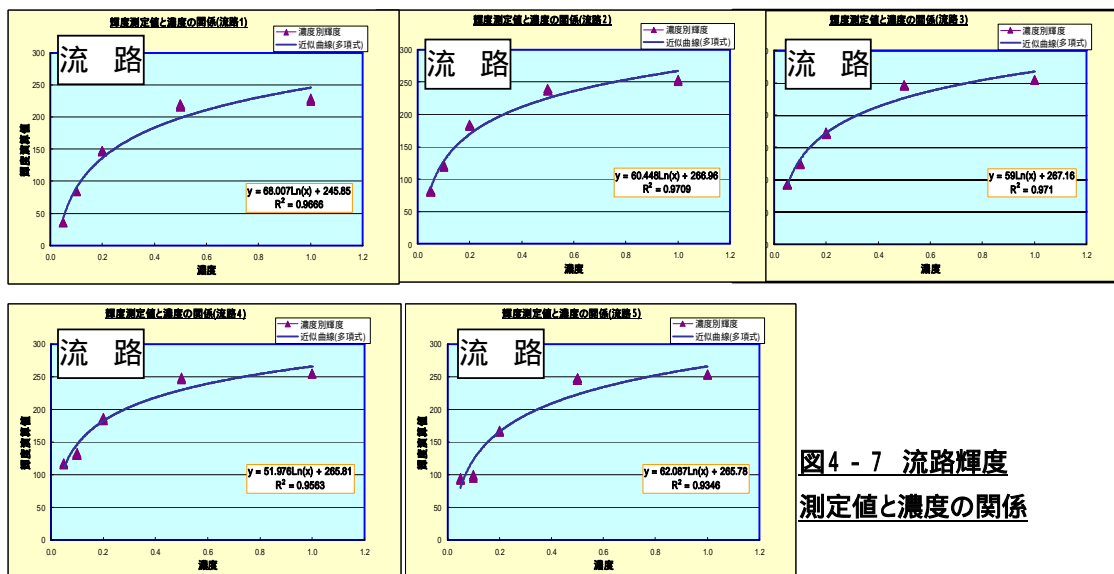


図4 - 7 流路輝度測定値と濃度の関係

各流路毎に得られた対数近似式は、グラフ中にも示されているが、以下の様に計算される。測定輝度の絶対値レベルが異なる為、対数式の係数もそれぞれ分布が生じている。特に1番流路は、2~4番流路との差が大きい為、係数値の差も大きい。2,3番流路と5番流路の係数が近く、予想に反して4番流路の係数の乖離が大きくなっている。これは、4,5番流路の低濃度域での測定値が他の濃度に比較して高い値で測定されている事による。その為、この2本の流路は、一致度も低い値となっている。

流路 1 :	$y = 68.007\text{Ln}(x) + 246.85$	決定係数 (R^2): 0.9666
流路 2 :	$y = 60.448\text{Ln}(x) + 266.96$	決定係数 (R^2): 0.9709
流路 3 :	$y = 59.000\text{Ln}(x) + 267.16$	決定係数 (R^2): 0.971
流路 4 :	$y = 51.976\text{Ln}(x) + 265.81$	決定係数 (R^2): 0.9563
流路 5 :	$y = 62.087\text{Ln}(x) + 265.78$	決定係数 (R^2): 0.9346

低濃度の部分をオミットすれば、充分一致度の高い数式で定義できていると言える。

(検量線の検定)

最後に、測定領域であるテスト領域にピオチン化抗人抗体を固定し、コントロール領域に抗マウス抗体を固定したチップに下記 5 種類のアレルギ抗原を別個に感作させたナノ量子ドットと血清を混和した実サンプルを流路に流して一定時間経過後の紫外線照射蛍光像とディテクター試作装置で測定した画面を図 4 - 8, 図 4 - 9 に示す。各流路に流したサンプルに投入した抗原は、

1 番流路 : カモガヤ, 2 番流路 : ブタクサ, 3 番流路 : ヒノキ,
4 番流路 : スギ, 5 番流路 : ヨモギ となっている。



図 4 - 8 実サンプルアプライチップ

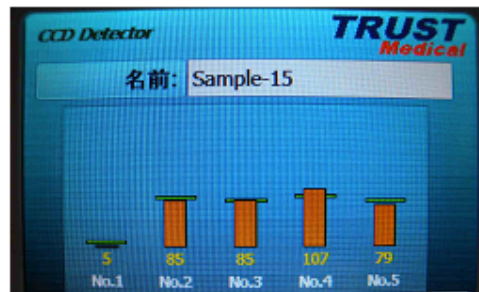


図 4 - 9 実サンプル測定時間

図 4 - 8, 9 より, 1 番流路ブタクサ以外はテスト, コントロール両領域でよくトラップされている事が示されている。これをディテクターで測定した結果を示す画面で見ると, 蛍光像によく一致した測定数値が得られている。この得られた数値を基に, 先に決定された検量線の逆関数(1 番流路の場合: $x = \text{EXP}((y - 245.85) / 68.007)$)でナノ量子ドット濃度相当値を計算すると,

1 番 : 34.5 倍希釈相当, 2 番 : 20.3 倍希釈相当, 3 番 : 21.9 倍希釈相当,
4 番 : 21.3 倍希釈相当, 5 番 : 20.3 倍希釈相当

と計算され, 紫外線蛍光像の提示結果とよく似た傾向を示している事が確認できた。

以上より, 本ディテクターは, 目標である 5 流路での基本検量線の決定を行い, 実サンプル 5 項目の測定値からそれぞれの濃度を求める事が可能であることを確認し, 実サンプルでの検量線をひく検討のための流路チップ上のナノ量子ドットからの発光量測定に供しうる事が確認できた。

第5章 動的ヒート&クール成形法の開発

5 - 1 動的ヒート&クール成形法

動的ヒート&クール成形法

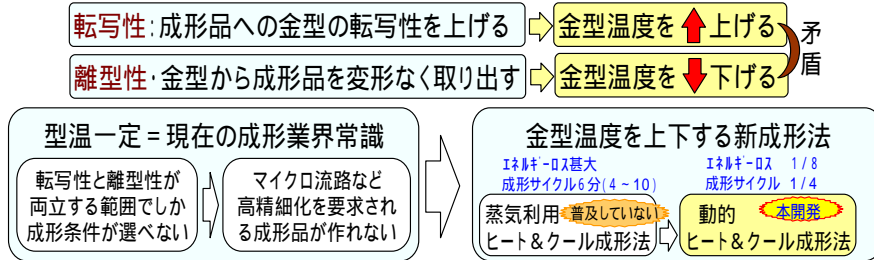


図 5 - 1 金型温度の矛盾解決のためのヒート&クール成形法

綺麗なマイクロ流路を得るために、現在のヒート&クール法のように金型全体を昇温・冷却せず、金型全体は加熱する一方で製品部だけを昇温・冷却する方法を開発した。

具体的には、極力小さな製品部に水冷配管を行い、冷却が終わったら成形品を離型し、直ちに水冷配管の水をパージし、加熱する一方の外側金型の熱で製品部を昇温する方式である。

本開発の概念図を図 5-2 に示す。製品部の表面温度を、高温: 140 低温: 50 を想定した場合の金型内 A,B,C 部の温度例を下に示す。外側の金型は、高温の設定 140 より高く 180 に保持されている。

A 部の冷却と、圧空パージで伝熱加熱する間に B 部は若干の温度変化をする。右図中の温度は金型の大きさによるので、あくまでもモデル的概念図である。

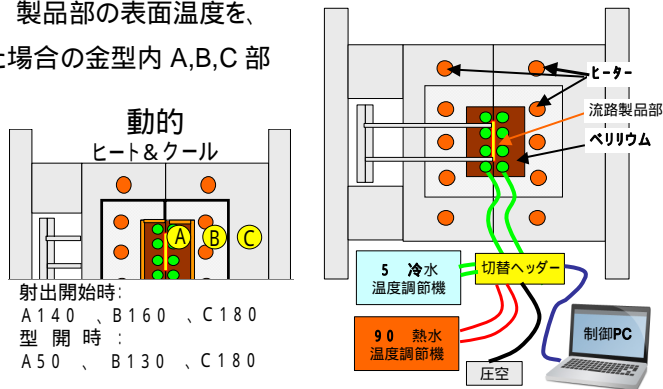


図 5 - 2 動的ヒート&クール法の実施イメージ

5 - 2 ヒート&クール制御装置製作

(ヒート&クール制御装置製作)

製作したヒート&クール制御装置を図 5 - 3 に示す。ヒート&クール成形システムの全体は図 5 - 4 に示した。このシステムの実験ではバルブの切替や圧空パージ等はうまく行った。やや問題といえば冷却能力が不足している。今後は、この装置を使用して各種試作金型で、動的ヒート&クール成形の試験を行い、ブラッシュアップを図る予定である。

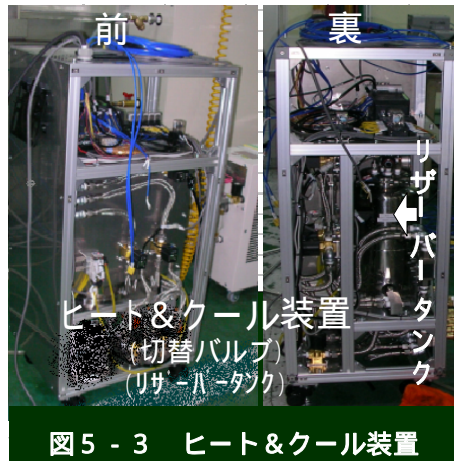
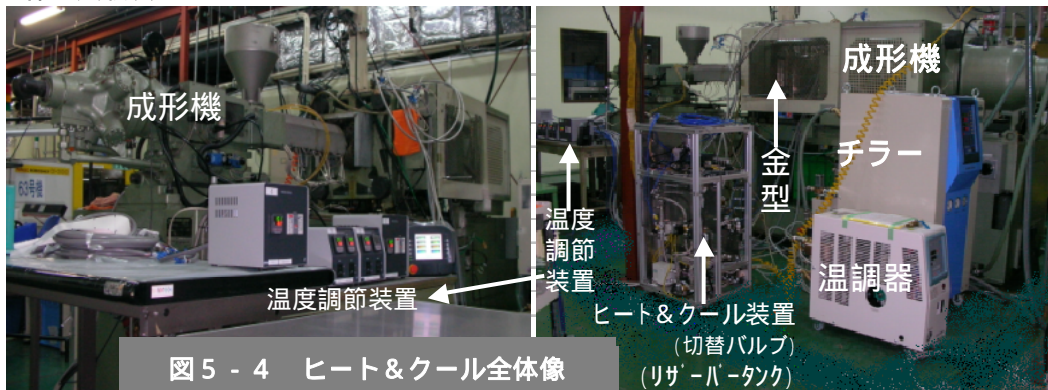


図 5 - 3 ヒート&クール装置

(全体の実験装置)



5 - 3 ヒート&クール成形テスト(第2 試作金型)

[金型]

アレルギー診断用として使用する基板(幅0.4mm×深さ0.4mmの5流路)のヒート&クール用第2 試作金型を図5-5の左に示し、成形機に取り付けて射出後に金型が開いた状態を右に示した。

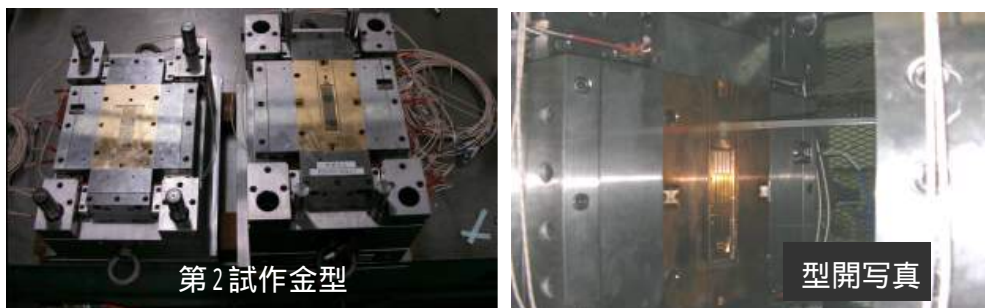
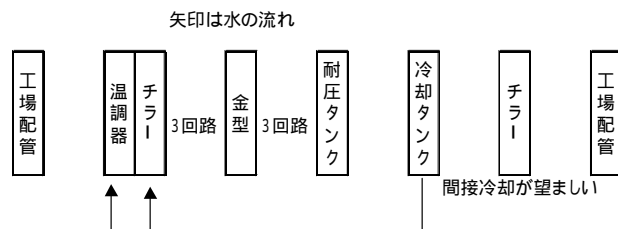


図 5 - 5 0.4均一流路基板金型

図5-5には初期の水の流れが示してある(圧空の流れは記していない)。この金型については、初期試作では熱容量の関係で十分な昇温冷却ができず数回の改造を行った。また製品部周囲の断熱にポリイミドフィルムを挟み込むなどの改良を行うことで成形が可能となった。

[使用原料]

いずれの樹脂も成形は可能であったので、アクリルを中心に検討を進めた。

TOPAS:環状オレフィン アクリル樹脂:アクリペット GL樹脂:ソアライト ABS

〔 成形品 〕

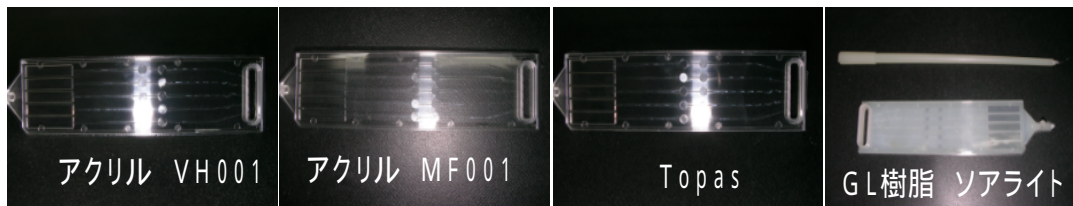


図 5 - 6 それぞれの成形品

残った課題1に対する金型改造

ヒート&クール性能向上のためにベリリウム銅製の製品部を更に小さくすると共に、ヒーターの容量アップと、金型内部の製品部背面の接触面積を減らす改造を行った。

以上の対策により次の結果が得られた。

設定温度120 60 のヒート&クール成形

クール側性能(キャビ側中央部実温) : 113 60 60秒

ヒート側性能(キャビ側中央部実温) : 60 113 30秒

結果として本開発が目標としたヒート&クール成形法のサイクル目標を達成した。

〔 転写性の確認 : 流路各部の写真 〕

ヒート&クール法のもう一つの狙いである転写性を評価する目的で、成形品の流路の顕微鏡観察を行った。

その結果、極めて高い転写性が認められ、極めて綺麗な成形品が出来た。

200倍で観察した写真を図5 - 7として添付する。左上から右に、滴下口出口、蛇行部1、蛇行部2、直線部、左下に下がって、検出ウエル部2枚、吸収パッド部左、吸収パッド部右である。

結果として本開発が目標としたヒート&クール成形法の高転写性も確認された。

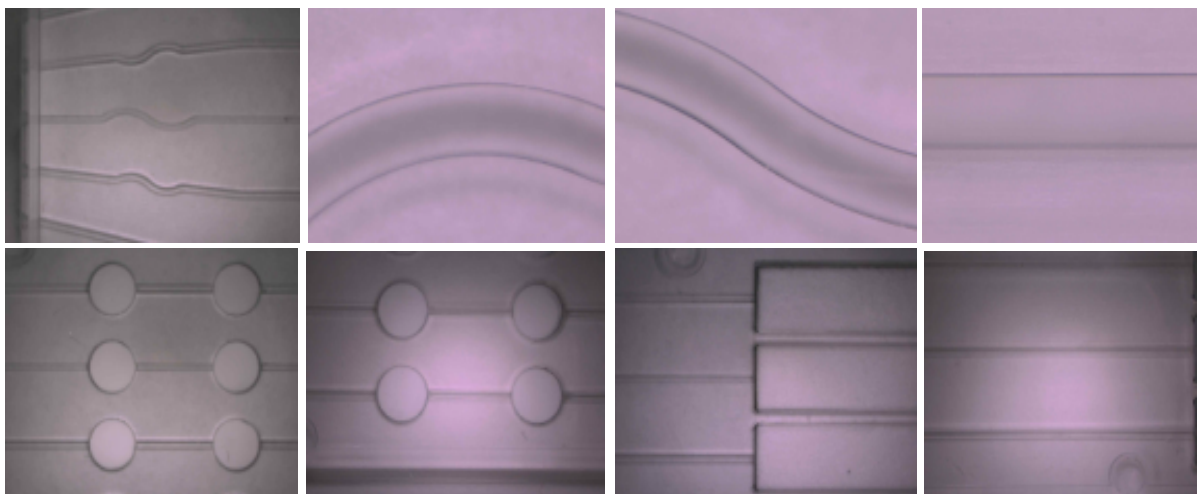


図5 - 7 流路転写性評価 200倍マイクロ流路写真

〔 マイクロ流路寸法ばらつき 〕

本開発で作成する流路基板は、毛細管現象だけで送液することから、第2試作金型による転写性を評価するため、アクリル成形基板の流路幅を工具顕微鏡で測定した。流路の特徴的な測定位置をA～Eまで選定した。その位置を図5 - 8に示した。

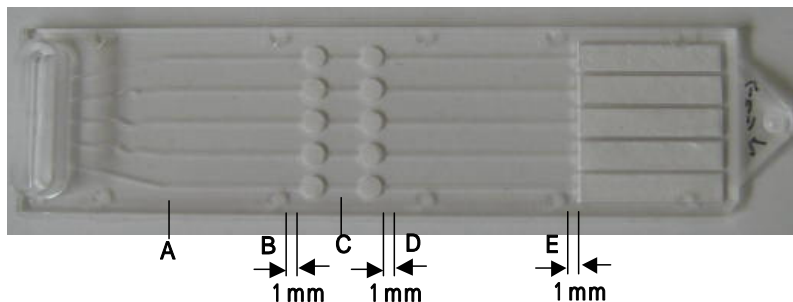


図 5 - 8 マイクロ流路幅測定位置

各位置の流路幅の測定結果を表5 - 1に示した。

表5 - 1 流路幅測定結果

流路	A	B	C	D	E	個別流路内ばらつき		
						最大	最小	レンジ
	0.397	0.410	0.397	0.405	0.412	0.412	0.397	0.015
	0.409	0.396	0.402	0.411	0.407	0.411	0.396	0.015
	0.397	0.402	0.408	0.413	0.399	0.413	0.397	0.016
	0.400	0.406	0.412	0.397	0.400	0.412	0.397	0.015
	0.398	0.404	0.409	0.405	0.411	0.411	0.398	0.013
～ 全体のバラツキ								
	最大	0.413	最小	0.396	平均	0.404	範囲	0.017

測定の結果、いずれの流路でも振れ幅は、15 μm 程度であり、全体でも17 μm のレンジに入っている。結果として本開発が目標とした流路幅のばらつき20 μm が達成された。

第6章 全体総括

本プロジェクトは産業技術総合研究所が高効率発光の蛍光粒子開発を担当し、トラストメディカルと共に多層マイクロ流路による診断キットを開発した。また、ニートとトラストメディカルは機器、制御回路、ソフト開発を担当し、蛍光検出装置の開発を行った。更にニートは動的ヒート&クール成型法を確立し、転写性に優れた流路チップを作成した。各研究機関の役割分担が明確であり、短期間ではあったが総合的にみて順調に進行し、大きな成果を得ることができた。