

超並列自律制御型遠心マイクロ分注デバイスの開発

Development of Autonomously Driven Centrifugal Ultra Multiplex Micro Dispenser

研究代表者 豊橋技術科学大学大学院工学研究科機械工学系 助教 岡本俊哉

Shunya Okamoto

Microfluidic devices, also known as “lab-on-a-chip,” are capable of performing various processes within a fluidic chip that is only a few square centimeters in size. Centrifugal microfluidic devices, in which fluid is pumped by centrifugal force through the rotation of a disk-shaped fluidic chip, are considered advantageous for automating chemical analysis processes. In this study, we aimed to develop a highly accurate autonomously driven centrifugal micro dispenser. To achieve this, we conducted image analysis of the flow rate of the dispensing mechanism and analyzed the applied pressure to the valve using a capillary valve. Through these analyses, we were able to identify the parameters that determine the flow rate of the micro dispensing mechanism and estimate the pressure applied to each valve with high accuracy.

要旨

本研究では、定常回転で複数の注入先へ同時に定量分注可能な自律制御型遠心マイクロ分注機構の分注可能数を定量的に算出可能な設計指針の構築を目的に、分注機構の流量の画像解析と、キャピラリーバルブを用いたバルブにかかる印加圧力解析を行った。そして、分流機構の流量を決定するパラメータの同定を実現し、また、各バルブに印加される圧力を高精度に試算できるようになった。これにより、バルブに求められる耐圧性能 P_{valve} は、 n を分注数よする次式で定義できることがわかった。

$$P_{valve} > P_{(n-1)} \\ = Q \cdot \frac{12\eta l(n-1)}{H^3 W} \left(1 - 0.630 \frac{H}{W}\right)^{-1} + P'$$

1. まえがき

マイクロ流体デバイスは、Lab on a chip などとも呼ばれ、数百 nm から数百 μm の微細な流路がパターンニングされた数 cm 四方の大きさの流体チップ内で、様々なプロセスを実行することができる。その中で、ディスク形状の流体チップを回転させることで、遠心力によって送液を行う遠心送液型のマイクロ流体デバイスは、不安定な挙動になりやすい微小空間内の液体を高い遠心加速度によって支配的に制御可能であることや、並列化が容易であることから、化学分析プロセスの自動化を得意とする^[1]。

しかし、動作中は回転していることから、液体を流

したり止めたりといった流体操作を実行するためには複雑な制御装置が必要となっており、安価で簡便でかつ安定な流体操作技術が確立されていないことが課題といえる。その中で本研究では、自律型流体制御技術について研究を行った。この技術は、流体制御機能を持った流路やチャンバを予め流体チップに実装しておくことで、チップを定常回転で回転させるだけで、目的の流体操作を実現するものである^[2]。これまでの研究で、この技術によって、一般的な化学分析プロセスに必要となる、液体の注入時間制御や、反応容器内での液体の保持や排出が実行可能であることが実証されている^[3]。また、液体を複数の反応容器へ等量ずつ注入する分注機構の基本的な動作原理が提案されている^{[4], [5]}。しかしながら、この分注機構が、具体的に何か所へ分注可能かなどの仕様や動作条件、設計指針が確立されていなかったことから、本研究では、この分注機構の実装および実用化を指向し、これらを解明および確立する研究を行った。

2. 自律制御型マイクロ分注機構の動作原理と課題

図1に本研究で研究を行った分注機構の動作原理を示す。分注機構は、分配数に応じた計量チャンバが並列に並んでおり、そのチャンバで分注量を計量したあと、その下流のバルブが開放され、下流へと液体が注入される。

まず、液体が上流からこの分注機構へ導入される

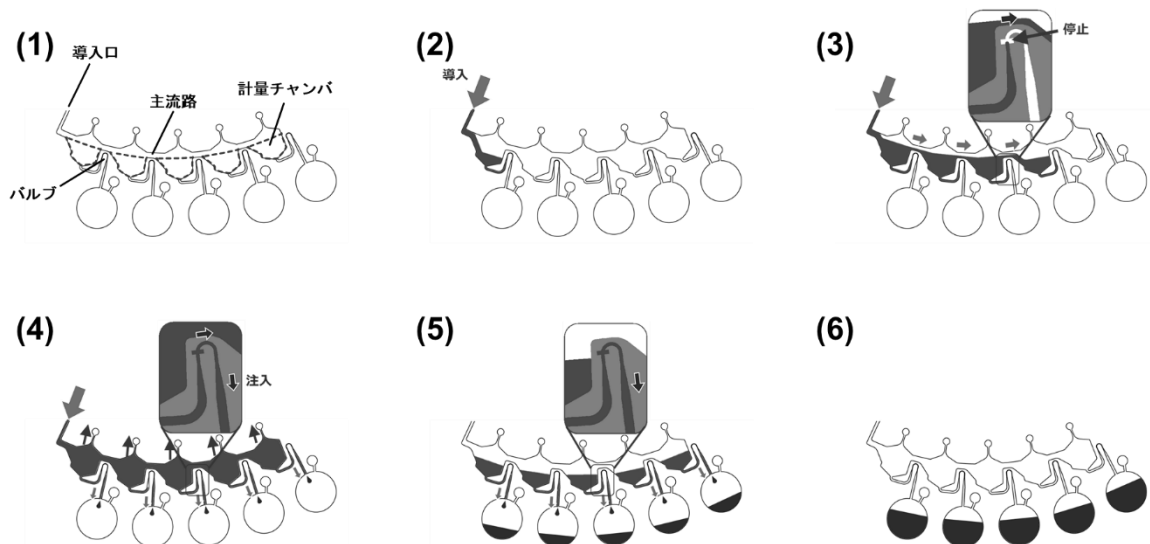


図1 自律制御型遠心マイクロ分注機構の概要

(図 (2)). 導入された液体は、導入口に近い計量チャンバへ流れ込み、計量チャンバを満たしていく。計量チャンバが満たされると、液体が隣の計量チャンバへと流れ込み、計量が行われる。これが計量チャンバの数だけ繰り返し実行される。そしてすべての計量チャンバが満たされると、計量が完了となり、注入の動作に移行する。計量チャンバが満たされているため、このあとに分注機構内に導入された液体は、分注機構内の水位を上昇させる。これにより、計量チャンバ下流のバルブには、その耐圧以上の水圧がかかるようになり、バルブが開放され、下流への注入が実行される。これが注入の動作原理である。以上が、分注機構へ液体を導入し続けるだけで、計量および注入の一連の動作が定常回転で実行される本分注機構の動作原理であり、これまでにこの原理通りに分注が実行されることが本申請者らに実証されている。

この分注機構の主な設計要素は、計量チャンバの形状とバルブの耐圧値である。計量チャンバの形状は、その容積が分注量に影響し、また、その上部の形状は、急激な水位上昇、つまり、トリガーの鋭さに影響するものの、比較的自由度が大きい。一方バルブは、計量を完了するまで液体保持可能であり、かつ、その後の追加の圧力印加で解放されるという制約条件があり、これを満たす適切な圧力設定が必須となる。しかしながら、これまで、このバルブにかかる詳細な圧力の分析はなされておらず、計量時

にバルブが開放してしまうといった不具合があった。具体的には、これまでは主に水位（水頭）に働く遠心加速度による圧力、つまり、静水圧しか考慮されていなかった。そこで本研究では、このほかにバルブに印加されている圧力を分析した。そしてこの分注機構の設計に必要な諸条件の確立を行った。

3. 計量時の流量測定と試算方法の確立

3.1 理論と目的

マイクロ流体に液体を流すとき、その上流には流量に比例した圧力がかかる。これは一般に圧力損失と同義であり、流路幅 W 、流路高さ H の流路 ($W > H$) では、圧力損失 P は (1) 式のようになる^[6]。

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

ここで、 Q が流量である。また、 η は液体の粘度、 L は流路の長さを示している。液体の粘度は計測することで把握可能であり、流路の長さ、幅、高さも計測可能である。つまり、圧力損失を試算するには流量を試算する必要がある。

(2) 式に、遠心場における流量の計算式を示す。マイクロ流体デバイスは、レイノルズ数が二桁以下であることが一般的で、その流れは層流となることから、流量は、印加（駆動）圧力と抵抗の比となり、遠心送液型デバイスにおいても同様であり、液体に印加される遠心力を流路抵抗で除したものが流量となる^[7]。

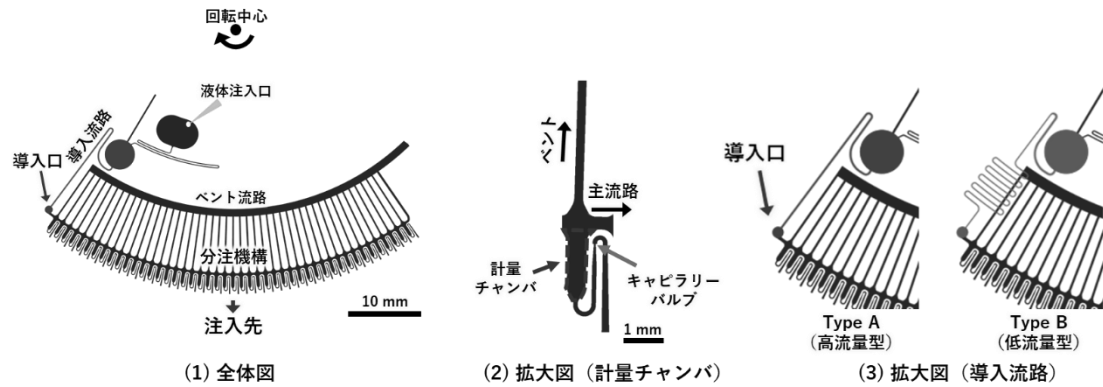


図3 テストデバイスの概要

$$Q = d_H^2 \rho \omega^2 (R_2 - R_1)(R_2 + R_1) / 64 \eta L \quad (2)$$

ここで、 d_H 、 A は流路の水力直径および断面積、 ρ は液体の密度、 ω は角速度を示している。 R_1 および R_2 はそれぞれ、回転中心から流路入口または出口の水面（メニスカス）までの距離である（図2）。この式においても、（1）式と同様に、流路の長さ、幅、高さ形状や液体の物性値は実物を計測可能である。しかし、本分注機構は2章で説明した通り、複数の計量チャンバが連結した形状となっており、計量時には、液体が計量チャンバへ蓄積する縦方向の流れと、隣の計量チャンバへ主流路を横方向に進む流れがあり、 R_1 および R_2 をどの位置と設定するかが未知である。

そこで図3に示すテストデバイスを作製した。基本的な構造は上記で説明した分注機構と同様に、45個の計量チャンバとその下流にバルブが配置されている。しかし分注を目的とするのではなく、各バルブに印加される圧力を調べるのが目的である。バルブには液体の表面張力を利用したキャピラリーバルブを採用した（図（2））。キャピラリーバルブは、決壊圧力を閾値とし、液体を堰き止めることができるバルブで、受動的なバルブとして用いられることが多いが、本検討では、その閾値を基準に、そこに印加されている圧力を可視化するために用いた。なお、決壊圧力は流路幅などの流路構造と表面物性および液体の物性などで導出され、これらは、計測することですべて把握することができる。

また、上述したように、流路には流量に比例した圧力が印加されていることが示唆される。このため、導入部の抵抗を変えた2種類のデバイスを作製した（図（3））。

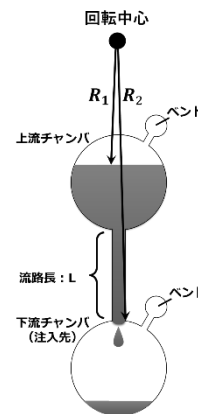


図2 遠心場の流量計算に必要な諸元の説明図

3.2 実験方法

デバイスの作製方法を図4に示す。デバイスはフォトリソグラフィで作製した型（モールド）からシリコンゴム（PDMS : Polydimethylsiloxane）へ、その形状を転写することで作製した。まず、シリコンウェハを基材にフォトレジストを塗布した（図（1））。続いて、流路形状がパターンニングされたフォトマスクをレジスト上に配置し、その上から紫外線を照射した（図（2））。そして現像液に浸してリンスすることで現像し（図（3））、余分な箇所のフォトレジストを流して、モールドを得た（図（4））。このモールドに、主剤と硬化剤を10:1の割合で混合させたPDMSを流し入れ、さらに75度で加熱することでシリコンゴムを硬化させた（図（5））。モールドからPDMSを離型したあと、シリコンウェハと接していた面にフラットなPDMSシートを、プラズマによる表面活性化接合にて封をして流路を得た。なお、容積が数十 μL 以上の比較的大きなチャンバなどは、パンチにて打ち抜き加工を行い、粘着テープで封をすることで作製した（図（6） - （8））。また、液体をデバイスへ入れるた

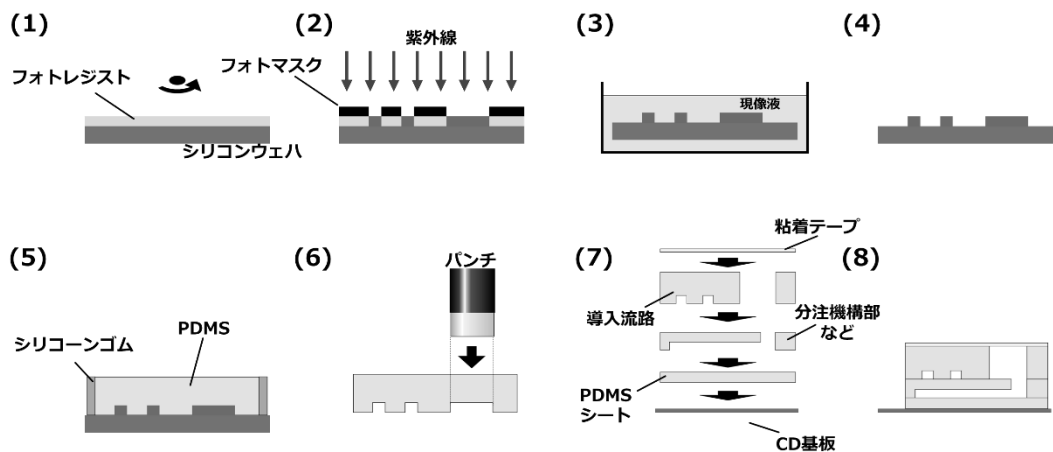


図4 テストデバイスの作製方法

め、ピペットが入る穴を最上流のチャンバに加工した。また、分注機構の導入流量のみが異なるデバイスを作製するため、導入流路と分注機構は、それぞれ別のモールドから作製し積層させた2層構造とし、分注機構部は、同一のモールドから成形されたものとなるようにした。

実験装置を図5に示す。デバイスはサーボモータで回転させ、その回転と同期したストロボスコープにて、デバイスとその流体挙動をリアルタイム観察した。なお作動流体には、着色した超純水を用いた。

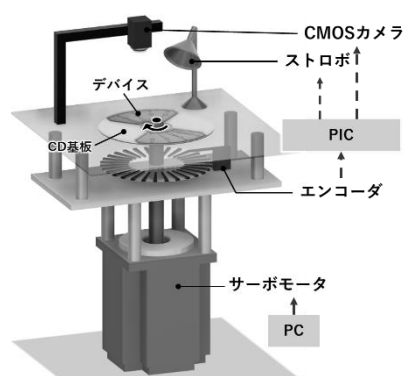
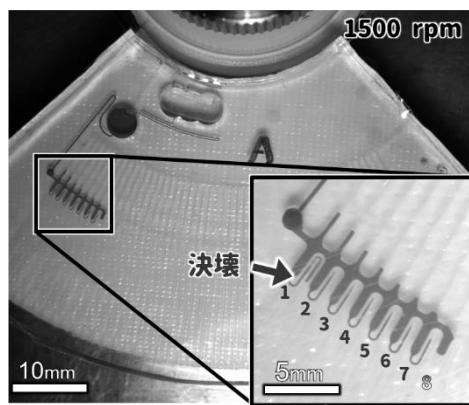


図5 実験装置の概要

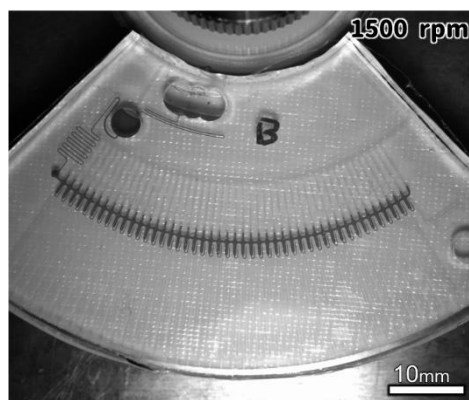
3.3 実験結果および考察

まずデバイスを 1500 rpm で動作させた結果を図6に示す。導入流路の抵抗が小さく、流量が大きい Type A では、8 個目の計量中に最上流のキャピラリーバルブが決壊した。一方流量が小さい Type B では、配置した 45 個すべての計量チャンバが満たされるまで、キャピラリーバルブは一切決壊しなかった。導入部以降はほぼ同一形状のため、バルブにかかる圧力は流量の大きさに依存することが示唆された結果といえる。

続いて、流量の試算方法を確立するため、画像解析による流量の実験値の計測を試みた。まず撮影された画像を二値化処理し、画像から液体部分を抽出する。この時、二値化の閾値によって抽出後の面積が変わることから、フォトマスクの2次元データおよび作製したチップの寸法と比較することで、閾値の最適化と、撮影画像の画素と実際の大きさの変換係数の導出を行った。これをすべての画像に対して行い、次に分注機構内のみ範囲を絞り、各画像間



(1) Type A (流量大)



(2) Type B (流量小)

図6 分注可能数の観察結果

の液体の増分つまり、投影面積の増分を算出した。そしてこれにチップの寸法の実測値である流路高さをかけることで、増分を容積の次元とし、また、各画像が撮影された時間をもとに、各画像間の時間差を求め、それで容積の増分を除することで、流量を算出した。

図7に流量の解析結果を示す。Type Aではキャピラリーバルブが決壊するまでの時間が短く、十分な画像数が得られなかったことから、回転数を1000 rpmとしたときの結果を示している。また、同時に(1)式および(2)式を利用して試算した理論値も示す。なお、ここで示す流量は、分注機構の導入部のすぐ下流で、1つ目の計量チャンバ手前の主流路部の流量である。また、実験値ではノイズによる影響を低減するため、15移動平均としてプロットしている。

まず、Type A, Type Bともに、実験値の流量が大きく波打っているのは、各計量チャンバを満たす際に一時的に流量が大きくなっているためである。計算ではこの脈動を考慮していないが、分注機構上流のチャンバの液体の減り具合と、流量の画像解析の結果を比べても、大きな差異はないことから、妥当な画像解析結果が得られていると考えられる。また、チャンバを満たす際の流れは、遠心力と同じ方向に流れることから、主流路の上流から押される圧力があまり作用しておらず、この間はバルブに大きな圧力は働いていない

次に理論値を見る。この理論値は、(2)式において、 R_1 を「回転中心から分注機構上流のチャンバ内の液面までの距離」、 R_2 を「回転中心から、分注機構の主流路と最上流の計量チャンバの合流点までの距離」とし、さらに(1)式の圧力損失を駆動圧力の負の圧力として働くと仮定して算出したものである(図8)。実験値と比較すると、多少の大小の違いがあるものの、ほぼ一致しており、このことからこの分注機構における主流路の流量(および導入流量)の試算方法を確立できたといえる。なお、式にすると次式の通りとなる。

$$Q_n = P_{Applied,n} / R \quad (3)$$

$$P_{Applied,n} = P_{Centrifugal} - P_{Loss,n} \quad (4)$$

ここで(3)式は前提となるマイクロ流路における流量の定義式で、(4)式は本分注機構における駆

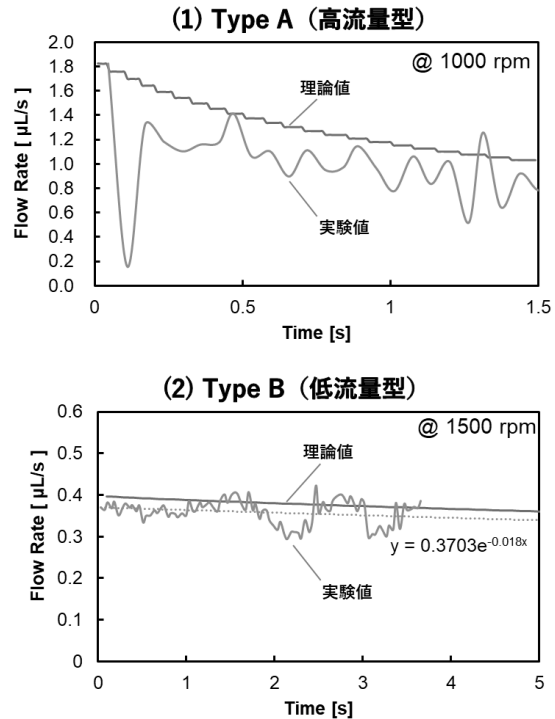


図7 主流路の流量解析結果

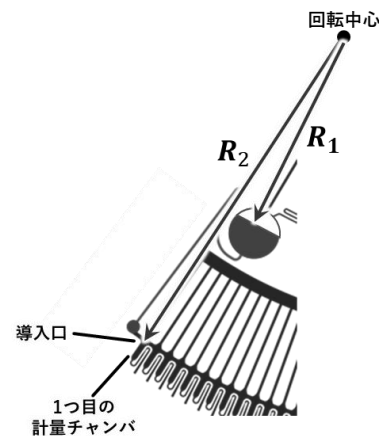


図8 同定された流量試算に必要な半径距離

動圧力を示す式である。添え字のnは、現在何個目の計量チャンバを分注しているかを示しており、段階的に流量を求める必要がある。そして(4)式に示す2つの圧力は、遠心力由来の圧力と、液体を先へ流すための圧力、つまり圧力損失で次式のように表すことができる。

$$P_{Centrifugal} = \frac{1}{2} \rho \omega^2 (R_2 - R_1)(R_2 + R_1) \quad (5)$$

$$P_{Loss,n} = Q \cdot \frac{12\eta l_{n-1}}{H^3 W} \left(1 - 0.630 \frac{H}{W}\right)^{-1} \quad (6)$$

いずれも(1)式、(2)式として紹介したものと同様である。ただし、(6)式には計量チャンバ数

に応じた流路長 L_{n-1} がかかっている。n-1 となっているのは、例えば5つ目のチャンバで計量を実行中は、その前の4つの主流路分の流路抵抗がかかっていることを示している。つまり、手順としては、1つ前までの抵抗を計算し、その情報をもとに、次のチャンバで計量する際の流量を計算していくという流れになる。なお、(3)式のRは次式で表現される。

$$R = \frac{d_H^2 A}{32\eta L_{in}} \quad (7)$$

これも抵抗を表す一般的な式であるが、ここで代入する流路長 L_{in} は、導入流路部の流路長であり、これは計量チャンバの数によらない値となる。

なお、実験値と理論値の差は、計算に採用した流路径の差や液体の粘度の差が考えられる。(2)式に示すように、流路の太さは、その4乗で流量に影響を及ぼす。また、粘度は温度によって容易に変化するためである。そしてこれらの誤差は、最も単純な直線流路での比較においても生じるものであることから、今回の複雑な分注機構の流量比較で生じた誤差は非常に小さく、高精度に同定できているといえる。

4. 計量時にバルブにかかる圧力の試算

4.1 理論と目的

3章で本分注機構における導入流量の試算方法を確立した。これにより、(1)式より、バルブに印加される圧力を試算することができる。本章では、この条件式の妥当性を検証するため、いくつかのチャンバで計量が可能であるかを実験値と比較する。

4.2 実験方法

3章で使用したデバイスを利用し、検証を行った。また、作動流体についても同様の液体を使用した。回転数は常用的に用いている1500, 1750 rpmと計量可能数が増える1000 rpmとした。

デバイスのキャピラリーバルブの寸法を測定した結果をもとに、決壊圧力を試算すると、3.2 kPaとなった。バルブにかかる圧力は、(1)式のLに相当する主流路の長さ、つまり、満たされた計量チャンバの数に比例する。また、最も高い圧力がかかるのは、最上流のバルブであることから、計量可能数

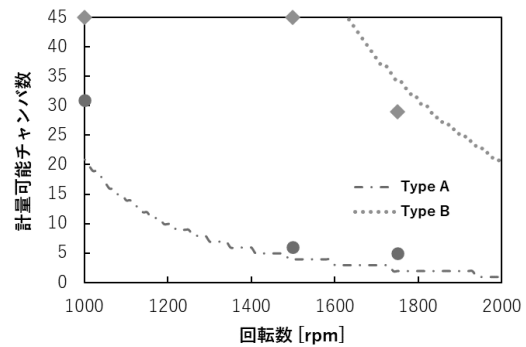


図9 計量が完了したチャンバ数の比較

の理論値は、この決壊圧力を参考にし、最上流のバルブにかかる圧力が、この決壊圧力を超えるまでのチャンバの数として、算出した。

4.3 実験結果および考察

図9に計量可能数の実験結果と理論値の試算結果を示す。なお、低流量のType Bの1000, 1500 rpmはすべての計量が完了するまで、決壊がなかったため、45個にプロットしており、実際はより多くの分注が可能であると示唆される。

まず、定性的に比較すると、Type A, Type B共に傾向が一致しており、理論値の近くに実験値がプロットされていることがわかる。次に、2つのデバイスで比較すると、流量の大きなType Aは実験値が理論値よりも計量可能チャンバ数が多く、逆に流量の小さなType Bでは、実験値のほうが少なくなった。これは、計量に要する時間の違いにより、キャピラリーバルブ付近の濡れ性が変化したためだと考えられる。具体的には、Type Bでは流量が小さいため、計量に時間がかかる。長時間液体に触れることにより、流路表面の接触角が小さくなり、キャピラリーバルブの決壊圧力が小さくなったことで、相対的にバルブにかかる圧力が大きくなり、理論値よりも早く決壊することになったと考えられる。一方、Type Aでは流量が大きいため、バルブの決壊と次の計量チャンバへ流れるタイミングとでタイムラグが生じ、決壊中であるもののその間に次の計量チャンバでの計量も完了しているという状態となっている可能性がある。また、観察画像は1回転につき1枚のため、フレームレートは、1500 rpmのとき25 fps, 1750 rpm 29 fpsとなり、十分な時間分解能が得られておらず、見かけ上、計量可能チャンバ数が

多くなっていることも示唆される。ただし、1000 rpm の実験結果は、理論値と大きく乖離していると考えられる。1000 rpm でのみ大きな乖離が見られていることから、この要因は、低遠心加速度になることで、相対的に表面力が支配的になったと考えられる。具体的には、実験時の気温などの環境の違いによって、液体や流量表面の物性、特に液体の表面張力が大きくなっていったことや、接触角が大きくなり、キャピラリーバルブの決壊圧力が大きくなっていったことが考えられる。また、構造的にキャピラリーバルブを突破した下流においても、狭小流路が続くことから、決壊したと判定できるほど液体が進行する間に、計量が実行されていたことも示唆される。しかしながら、実用的な 1500 rpm, 1750 rpm では誤差数個程度と高い精度で計量可能数を試算できており、実用に十分な試算方法を確立できたといえる。

5. まとめ

本研究では、自律制御型遠心マイクロ分注機構の分注可能数を定量的に算出可能な設計指針の構築を目的に、分注機構の流量の画像解析と、キャピラリーバルブを用いたバルブにかかる印加圧力解析を行った。その結果、分注機構の流量を決定するパラメータの同定を実現し、また、各バルブに印加される圧力を高精度に試算できるようになった。これにより、バルブに求められる耐圧性能 P_{valve} は次式で定義できることがわかった。

$$P_{valve} > P_{(n-1)}$$

$$= Q \cdot \frac{12\eta l(n-1)}{H^3 W} \left(1 - 0.630 \frac{H}{W}\right)^{-1} + P' \quad (8)$$

ここで、 n が分注数で、 Q は分注機構への導入流量で (3) 式によって試算できる。また、 P' は、バルブと主流路の高低差による水頭圧など、構造的な圧力を考慮する項である。

以上により、自律制御型遠心マイクロ分注機構のバルブの耐圧性能の設計指針の確立を実現したといえる。

口頭発表、受賞等

- [1] 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, 2022年9月
- [2] Ryogo SAITO, Daigo NATSUHARA, Koki SHIRAI, Shunya OKAMOTO, Moeto NAGAI, Takayuki SHIBATA, A Centrifugal Microfluidic Device with a Pair of Capillary Stop Valves for Multiplexed Genetic Diagnosis, 19th International Conference on Precision Engineering (ICPE) 2022年12月
- [3] 中村勝太, 永井萌土, 柴田隆行, 岡本俊哉, デジタル ELISA のための自律制御型遠心マイクロ流体デバイスの開発 -微小液滴の生成に向けた微量試薬操作手法の基礎検討-, 2023年度精密工学会春季大会学術講演会, 2023年3月

参考文献

- (1) Ling X. Kong, Alexandra Perebikovskiy, Jacob Moebius, Lawrence Kulinsky, and Marc Madou, Lab-on-a-CD: A Fully Integrated Molecular Diagnostic System, J Lab Autom., 21(3) (2016), 323-55
- (2) Shunya Okamoto and Yoshiaki Ukita, Autonomous and complex flow control involving multistep injection and liquid replacement in a reaction chamber on steadily rotating centrifugal microfluidic devices, RSC Adv., 7 (2017), 35869-35874
- (3) Shunya Okamoto and Yoshiaki Ukita, Automatic microfluidic enzyme-linked immunosorbent assay based on CLOCK-controlled autonomous centrifugal microfluidics, Sens. B: Chemical, 261 (15) (2018), 264-270
- (4) 岡本俊哉, 浮田芳昭, POCTを指向した自律型遠心マイクロ分注機構の開発, 電気学会論文誌 E, 138 (8) (2018), 370-375
- (5) 岡本俊哉, 浮田芳昭, 両面成形型自律遠心マイクロ分注機構の開発と動作安定性の評価, 電気学会論文誌 C, 140 (4) (2020), 457-464
- (6) Daigo Natsuhara, Ryogo Saito, Hiroka Aonuma, Tatsuya Sakurai, Shunya Okamoto, Moeto Nagai, Hirota Kanuka, Takayuki Shibata, A method of sequential liquid dispensing for the multiplexed genetic diagnosis of viral infections in a microfluidic device, Lab Chip, 21 (2021), 4779-4790
- (7) David C. Duffy, Heather L. Gillis, Joe Lin, Norman F. Sheppard, and Gregory J. Kellogg, Microfabricated Centrifugal Microfluidic Systems: Characterization and Multiple Enzymatic Assays, Anal. Chem., 71 (20) (1999), 4669-4678