

マイクロ振動誘起流れを用いたナノ粒子検出システムの開発研究

Development of nanoparticle detection system using the micro vibration-induced flow

精密工学専攻 金子完治
Kanji Kaneko

1. 緒言

診断用途の様々なイムノアッセイにおいて、細胞外小胞 (EV) やウイルス、細菌などの生体由来のナノ粒子 (NP) は、しばしば重要なターゲットとなる[1]。従来の NP 検出法は、標的の蛍光標識に依存することが多く、サンプル事前処理や高価な検出装置を必要とする[2]。一方、免疫凝集法[3, 4]は、特定の NP に結合する捕捉微粒子 (CP) の凝集を利用するもので、蛍光標識を必要としない。この方法では標的分子を簡便・迅速に検出できるが、感度と再現性が比較的低く、定量的な評価には適していない。さらに、凝集体形成は分子・粒子のブラウン運動のみに依存しており、液体の攪拌によって凝集効率を高め、検出感度を向上させる試みはほとんど行われていない。

マイクロ空間内でアクティブな流体制御を行う手法として、振動誘起流れ (VIF) [5, 6]がある。これは、マイクロ構造を持つ基板に周期的な振動を加えることで、マイクロ構造の周囲の流体に正味の流れを誘起するもので、微量試薬のミキシングや流体・粒子の搬送などに利用されている[5, 7]。

本論文では、細胞外小胞やウイルス粒子などの NP 検出の高感度化を目指し、VIF を免疫凝集法に適用した NP 検出システムを開発した(Fig. 1)。また、システム設計の指針として、VIF の数値計算ツールを構築した。その中で、実験的および数値的アプローチにより、凝集に対する流れ場の依存性を調べた。最後に、開発システムの生体サンプルへの適用のため、EV の検出を行った。

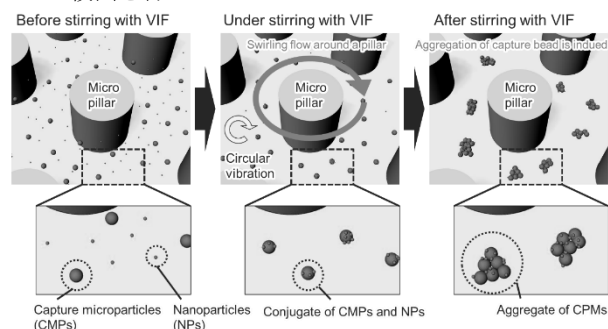


Fig. 1 Schematic of nanoparticle (NP) detection based on the aggregation of affinity capture particles (CPs) induced by vibration-induced flow (VIF).

2. モデル NP を用いた検出性能の評価

はじめに、VIF による免疫凝集法 NP 検出の促進について、実験的検証を行った。ここで、特異的親和性を持つアビジン-ビオチン相互作用をモデル捕捉系として用いた。

2.1. 実験手順

2.1.1. マイクロピラー基板の作製

まず、DRIE プロセスでの深堀エッチングにより円筒穴構造を有するシリコンウェハ鋳型を作製した。次に、PDMS 樹

脂と硬化剤を混合したものを鋳型に流し込み、硬化させた後、鋳型から剥離させてマイクロピラー基板を得た(Fig. 2)。ピラーは円柱状であり、直径 $D = 100 \mu\text{m}$ 、高さ $h = 50 \mu\text{m}$ 、中心間距離 $S = 200 \mu\text{m}$ で正方配列した。

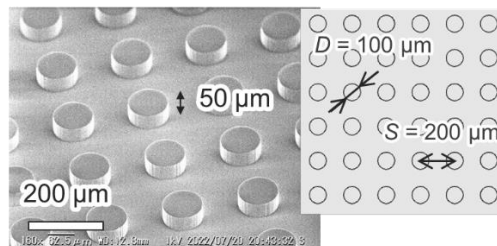


Fig. 2 SEM image of micropillar substrate with the height of $50 \mu\text{m}$. Pillar separation was set to $S = 200 \mu\text{m}$.

2.1.2. 実験セットアップおよび振動駆動システム

アビジン修飾した捕捉粒子 CP (直径 $3 \mu\text{m}$) とビオチン修飾したナノ粒子 NP (直径 $0.15 \mu\text{m}$) を含む混合液を作製し、ピラー基板の中央に $5 \mu\text{L}$ を滴下した。カバーガラスで覆うことで、流体層の厚さはスペーサーの高さである $50 \mu\text{m}$ に規定される。このアセンブリを XY ピエゾドライブステージに固定した(Fig. 3)。波形発生器により 90° 位相オフセットした正弦波信号を発生させ、これをアンプを介してピエゾステージに印加することで、水平面内の円振動を発生させた。

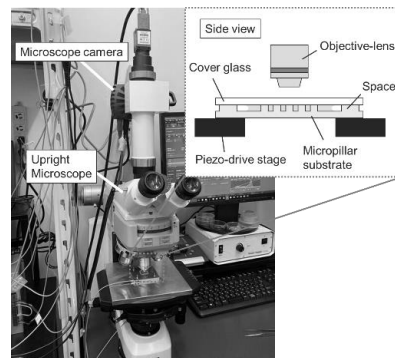


Fig. 3 Overview of the experimental setup of VIF system.

2.1.3. 画像解析を用いた凝集度の定量評価

凝集度は、顕微鏡で撮影した CP 凝集体の平均面積を求めることにより評価した。検出の簡略化のため、簡易光学顕微鏡で明視野画像のみを取得した。ImageJ ソフトウェアにより、凝集体を含む画像を 2 値化した後、ピラーが存在する領域は画像解析から除外し、凝集体の数と面積を求めた。ここで、1, 2 個の CP は凝集体としてカウントしない。最終的に、凝集体の総面積を凝集体の数で割って平均面積を算出した。

2.2. 実験結果

2.2.1. 振動が凝集形成に与える影響

はじめに、VIFシステムでのNP検出の実証実験を行った。 5.7×10^9 /mlのNPと 5.7×10^7 /mlのCPを含む液滴をピラー基板上に置き、周波数 $f = 500$ Hz、振幅 $A = 3.3$ μm の振動を与えた。円振動の開始から0および15分後に撮影した明視野画像をFig. 4に示す。振動を加える前(Fig. 4; top)は、CPが観察野に分散したが、振動15分後(Fig. 4 (a); bottom)には、CPの凝集体が多数出現した。対照実験として、振動を与えない場合には、凝集が発生しなかった(Fig. 4 (b)). NPを含まない場合には、凝集体のサイズは小さかった(Fig. 4 (c)). これは、CP同士の分子間力により小さい凝集体が形成されたと考えられる。これらの結果は、NPが存在する場合に、NPがCP同士のバインダーとして作用し、比較的大きなCP凝集が促進されたことを示している。そのため、VIF攪拌が凝集形成サイズに応じたNP検出に有効であることが示唆された。

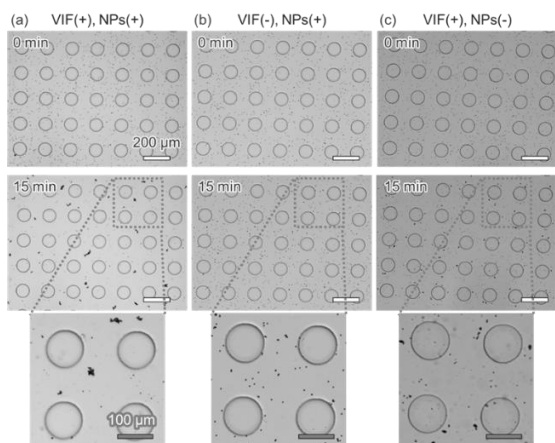


Fig. 4 Microscopic images of CPs on the substrate with micropillars captured at 0 min and 15 min after application of the VIF. (a) VIF(+), NP(+), (b) VIF(-), NP(+), (c) VIF(+), NP(-).

2.2.2. ピラー周囲の流れ場と凝集形成の関係

次に、振動によりピラー周りに誘起される流れ場と凝集形成の関係を調べた。Fig. 5は、粒子画像流速測定法(PIV)で測定した、ピラーの高さ中央面における平均流れ場の2次元ベクトルプロットである。ピラーの周囲で左回りの旋回流が発生している。ピラーの上下左右に低速領域が存在するのは、中信間距離 $S = 200$ μm 離れた隣接ピラー周囲の流れとの干渉によるものであると考えられる。また、隣接する4本のピラー間では、右回りの渦が形成された。

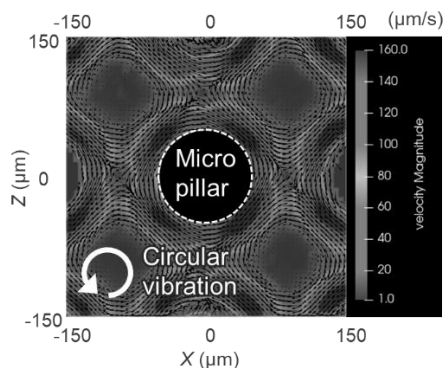


Fig. 5 2D vector plots of the average velocity around a pillar obtained via PIV measurements. The vibration conditions were $f = 500$ Hz and $A = 3.3$ μm .

Fig. 6には、流れ場における最大速度と15分振動後の平均凝集体面積の依存性を示した。最大速度が300 $\mu\text{m/s}$ 以下では、速度増加に応じて凝集体面積が増加した。一方で、速度が600 $\mu\text{m/s}$ を超えると凝集体面積は減少した。これらの結果は、速度が大きいくほど凝集体サイズが大きくなるが、一定の速度以上になると、粒子に作用するせん断力の影響が大きくなるため、凝集体が壊れて小さくなったことを示唆している。このことから、ピラーの配置によっては、大きなビーズ凝集体の実現に適切な速度領域が存在することがわかった。

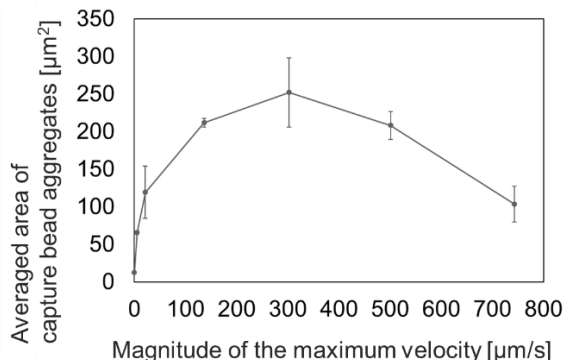


Fig. 6 Relationship between the magnitude of the maximum velocity and the average area of CP aggregates after 15 min.

2.2.3. NP濃度の定量

次に、NP濃度の定量性能を検証するために、CP凝集体面積のNP濃度依存性を調べた。Fig. 7(a)は、CP凝集体の平均面積の時間変化を示す。NPが存在する場合、CP凝集体の平均面積は、すべてのケースで時間とともにほぼ直線的に増加した(NP濃度 = 5.7×10^9 /mL, 1.1×10^9 /mL, 5.7×10^8 /mL, 5.7×10^7 /mL)。Fig. 7(b)に、NP濃度と凝集体面積の時間依存性増加の初期傾きとの関係を示す。傾きを選んだのは、比較的最長い時間(〜40分)の攪拌で、凝集体面積増加の明確なプラトーが得られなかったからである。NP濃度が 5.7×10^7 /mLの場合、NPを含まない場合と比較して有意に大きな傾きを示し、この濃度以上の範囲で、NP濃度を定量化できることが示唆された。

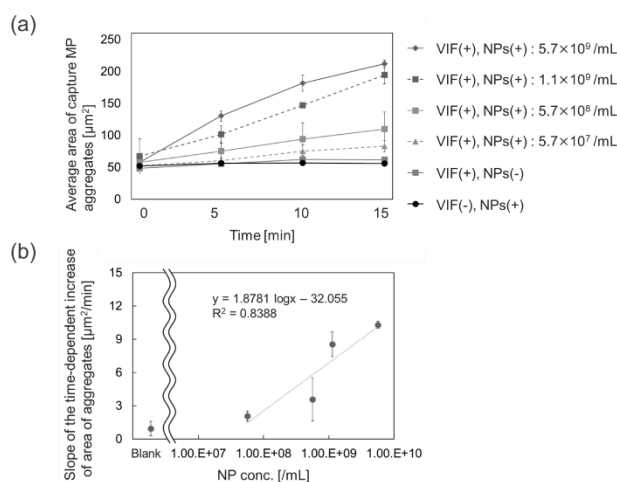


Fig. 7 (a) Time evolution of the average area of CP aggregates at various concentrations of NP. (b) Relationship between the NP concentration and the slope of the time-dependent increase of the aggregate size.

3. 3次元数値計算を用いた粒子捕捉の予測

VIF システムの設計指針を得るために、数値解析を用いたアプローチが有用である[4]。一方、流れ場は非定常であり、3次元的な流れ場を解くことは容易ではない。我々はこれまでに、3次元的にVIFを予測する解析ツールを開発してきた[5]。本研究ではこの解析を拡張し、多様な振動条件下での流れおよび粒子のラグランジュ的挙動を予測するツールを構築した。これを用い、凝集初期段階である粒子捕捉の計算を行った。

3.1. 数値計算の手順

3.1.1. 流れ場の計算

流れの支配方程式である3次元ナビエ・ストークス方程式と連続の式を解き、円振動するピラー周囲の流れ場を求めた。はじめに、ピラーとともに運動する移動座標系からみた流れを求め、それを外部観測者からみた静止座標系に変換することにより振動するピラー周りの周期的な流れ場を求めた。次に、周期的な瞬間速度場に追従する流体粒子について、振動10周期分の移動距離と時間から、時間平均速度場（ラグランジュ平均速度場、正味の流れ場に相当）を求めた。本研究では、多様な条件下での流れ場を予測するために、円柱および非軸対称（手裏剣）形状のピラー周囲の流れを計算した(Fig. 8)。円柱ピラーの直径と高さは、計算領域の高さと同じ100 μm とした。手裏剣形状ピラーは、 $l = 70 \mu\text{m}$ のアーム長さを有する。計算領域の下部と上部には滑りなし条件を適用した。水平方向は周期境界となっており、ピラーが400 μm ごとのマトリックス状に存在することに相当する。

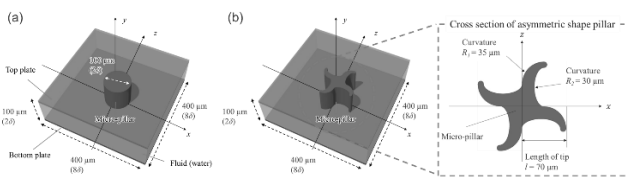


Fig. 8 Schematic of the coordinate system and computational domain. (a) Cylindrical and (b) Ninja-star-shape pillars.

3.1.2. 粒子捕捉の計算

計算領域中に、2種類の仮想粒子として捕捉粒子 ($D_{CP} = 3 \mu\text{m}$)と標的ナノ粒子 ($D_{NP} = 0.15 \mu\text{m}$)を3次元空間にランダムに配置した。それぞれの初期粒子数は228個である。4次のルンゲクッタ法による粒子トラッキングを行い、瞬間流れ場に追従する粒子挙動を求めた。2種類の粒子の中心間の距離 P がそれらの半径の和よりも小さくなったとき ($P \leq (D_{CP} + D_{NP})/2$) に捕捉（吸着）が生じたと判定した。

3.2. 数値計算における流れ場の検証

数値計算とPIV測定での平均流れ場を比較することで、計算の妥当性を検証した(Fig. 9)。Fig. 9 (a, b)は、円柱ピラー周囲のラグランジュ平均速度のベクトルプロットを示している。計算およびPIV測定で、ピラー周囲を旋回する流れが発生しており、速度の大きさはおよそ一致した。また、半径方向の速度分布では、ピーク位置（ピラー側壁から約25 μm 離れた $r = 75 \mu\text{m}$ 付近）や、ピラーからの遠ざかるにつれて速度が減衰する点で同様の傾向となった(Fig. 9 (c))。手裏剣形状ピラー周囲の流れ場では、ピーク速度は手裏剣4本のアー

ム先端付近で発生しており、この速度は計算およびPIV測定に一致した（ $\sim 800 \mu\text{m/s}$ ）。上記の結果から、数値計算が実験から得られる流れ場を正しく再現できることが確認された。

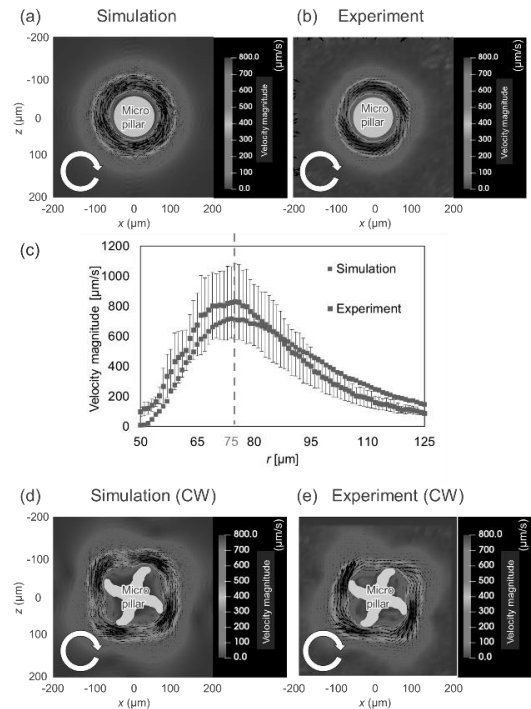


Fig. 9 2D vector plots of the Lagrangian mean velocity flow field around a (a, b) cylindrical pillar and (d, e) ninja-star shape pillar obtained with (a, d) the numerical simulation and (b, e) PIV measurement. (c) Lagrangian mean azimuthal velocity profiles as a function of the distance from the pillar center obtained in both simulation and experiment.

3.3. 粒子捕捉と凝集面積の比較

粒子トラッキングの計算を行い粒子捕捉率の時間経過をプロットしたところ(Fig. 10 (a))、捕捉率は単調増加し、200 s時点で15%程度となった。200 s時点の捕捉率と、同条件の実験における凝集面積との相関を調べた。Fig. 10 (b)は、捕捉率と実験におけるCP凝集体の平均面積の関係を周波数/振幅依存性として示している。捕捉率と凝集面積は正の相関を示しており、速度の増加に応じて粒子捕捉や凝集体の形成が促進されることが示唆された。

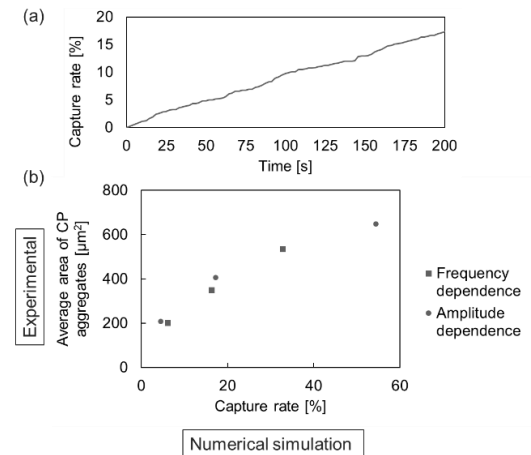


Fig. 10 (a) Time course of the capture rate of target NP. (b)

Correlation between the averaged area of CP aggregates and the capture rate obtained in the experiment and numerical simulation, respectively.

4. 細胞外小胞 (EV) の検出

最後に、VIF システムの診断用途での応用可能性を検証するため、生体由来 NP である EV 検出の性能を実証した。

4.1. 実験手順

牛乳由来の EV (直径 150 μm) を標的 NP とし、CP には Tim-4 を修飾した磁気粒子 (直径 3 μm) を用いた。EV と磁気 CP を含む混合液 5 μL をピラー基板の中央に滴下し、カバーガラスで覆った。2 章で用いたポリスチレン CP よりも質量が大きい磁気 CP を移流するために、周波数 $f=500$ Hz、振幅 $A=5.2$ μm の振動を与えた。

4.2. 実験結果

はじめに、VIF による EV 検出の検証を行った。Fig. 11 に、攪拌前後でのピラー周囲の明視野画像を示す。振動を加える前 (0 分, Fig. 11; top) は、磁気 CP が観察視野内に分散していたが、振動を加えた 15 分後には、多くの凝集体が観察された (Fig. 11 (a) bottom)。対照実験として、VIF 印可なしの条件を行ったところ、磁気 CP の凝集体は形成されなかった (Fig. 11 (b))。また、EV なしの条件下では、磁気 CP の凝集体サイズは小さかった (Fig. 11 (c))。これらの結果は、アビジン-ビオチン捕捉モデル系と同様に、標的 EV と磁気 CP の間に親和性がある場合、VIF による局所的な流れが磁気 CP の凝集を効果的に誘発したことを示唆している。

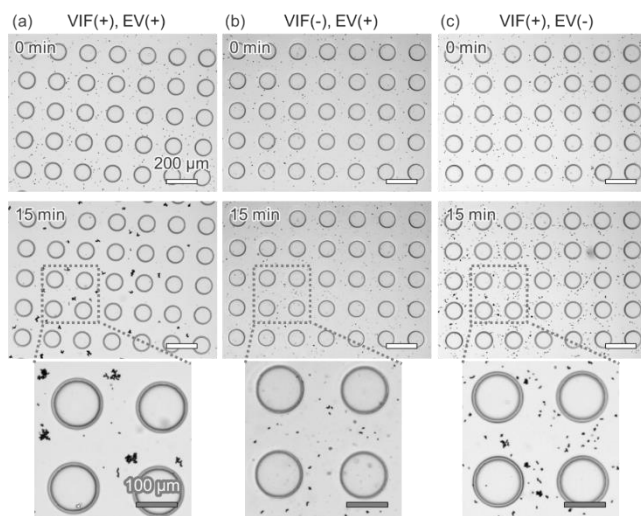


Fig. 11 Microscopic images of Tim-4 conjugated CPs captured at 0 min and 15 min of VIF: (a) VIF(+), EV(+), (b) VIF(-), EV(+), and (c) VIF(+), EV(-).

最後に、VIF による EV 濃度の定量性能を検証した。Fig. 12 (a)に磁気 CP 凝集体の平均面積の時間変化を示す。EV と磁気 CP を含む試料を置いた基板に振動を加えると、すべての濃度条件 (EV 濃度 = 6.4×10^9 /mL, 1.28×10^9 /mL, 6.4×10^8 /mL, 6.4×10^7 /mL) で、凝集体の平均面積が時間とともに増加した。EV 濃度 6.4×10^7 /mL では、EV を含まない対照実験よりも有意に高い凝集面積の増加が得られており、この濃度領域での EV の存在が検出できることが示された。

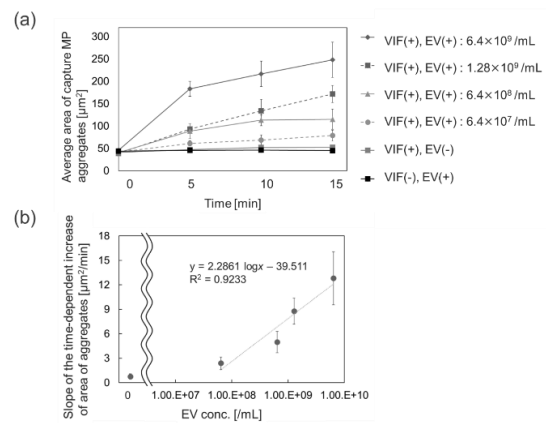


Fig. 12 Time evolution of the average area of CP aggregates with various EV concentrations. (b) Relationship between the slopes of the time-dependent increase of the aggregate size (0–10 min) and EV concentrations.

5. 結言

本論文では、VIF を免疫凝集法に適用し、微量サンプル中の NP を検出するシステムを開発した。アビジン-ビオチン相互作用のモデル捕捉系を用いた検証実験では、NP が含まれるサンプルに VIF での攪拌をした場合に凝集面積が増加しており、NP が検出されたことを実証した。また、システムの設計指針として、VIF の 3D 数値計算ツールの構築を行った。境界条件が変動する非定常な流れにおいて、PIV を用いた測定結果と数値計算結果が複数の条件下で一致しており、計算の妥当性が証明された。加えて、このツールを拡張し、凝集の初期段階である粒子捕捉の計算を行った。最後に、システムの実応用に向けて生体 NP である EV の検出を行った。アビジン-ビオチン捕捉と同様に、検出限界は 10^7 /mL のオーダーであり、顕微鏡観察を用いた従来の免疫凝集法での粒子検出法と比較して、高感度かつ短時間に検出が可能であった。今後、更なるシステム簡易化に加え、多様な生体物質の検出が期待される。

6. 参考文献

- (1) Boriachek, K., and Shiddiky, M. J. A., et al., Biological functions and current advances in isolation and detection strategies for exosome nanovesicles, *Small*, **14-6** (2018) pp. 1–21.
- (2) Xu, H., and Ye, B. C., et al., Magnetic-based microfluidic device for on-chip isolation and detection of tumor-derived exosomes, *Anal. Chem.*, **90-22** (2018) pp. 13451–13458.
- (3) Thomas, N and Coakley, W., Measurement of antigen concentration by an ultrasound-enhanced latex immunoagglutination assay, *Ultrasound in Med. & Biol.*, **22** (1996) pp. 1277–1284.
- (4) Wiklund, M., and Hawkes, J. J., et al., Acoustofluidics 21: Ultrasound-enhanced immunoassays and particle sensors. *Lab Chip*, **13** (2013) pp. 25–39.
- (5) Hayakawa, T., Arai, F., et al., A single cell extraction chip using vibration-induced whirling flow and a thermo-responsive gel pattern., *Micromachines*, **5-3** (2014) pp. 681–696.
- (6) Kaneko, K., and Suzuki, H., et al., Numerical and experimental analyses of three-dimensional unsteady flow around a micropillar subjected to rotational vibration, *Micromachines*, **9-12** (2018) pp. 668.
- (7) Huang, H. P., Huang, J. T., An acoustofluidic micromixer based on oscillating sidewall sharp-edges, *Lab on a Chip*, **13** (2013) pp. 3847–3852.