遠心力を利用した微量液の定量分注と攪拌法の検討*

西 嶋 規 世^{*1}, 長 岡 嘉 浩^{*1}
佐 々 木 重 幸^{*1}, 斉 藤 充 弘^{*2}Metering and Mixing Methods on
Centrifuge-Based Microfluidic PlatformsNoriyo NISHIJIMA^{*3}, Yoshihiro NAGAOKA,
Shigeyuki SASAKI and Michihiro SAITO^{*3} Mechanical Engineering Research Laboratory, Hitachi, Ltd.,
832-2 Horiguchi, Hitachinaka-shi, Ibaraki, 312-0034 Japan

Centrifugation constitutes an attractive fluidic platform for biochemical analysis equipment due to its simple pumping mechanism and easy implementation with a small amount of liquid. In this paper, two unique features for liquid handling on centrifugal platforms are proposed. One is a liquid-metering structure and the other is for liquid mixing. In the metering structure, a sample liquid volume is defined in the first chamber and undergoes a determined treatment (e.g., centrifugal separation) in it. Then, the metered sample is decanted to the second chamber with the aid of an additional liquid flow, which generates negative pressure (lower than the ambient pressure) to pull the sample into the second chamber. The mixing structure consists of a mixing chamber and an adjacent air chamber connected to each other. Under centrifugal force, the liquid in the mixing chamber intrudes into the air chamber and compresses the air in the air chamber. By decreasing the rotational speed, this compressed air expands and pushes the liquid back to the mixing chamber. Changing the rotational speed repeatedly, the liquid moves between the mixing chamber and the air chamber and is convectively mixed. The design strategies are presented for these two structures, and their basic operations have been confirmed by visualization experiments using dyed liquids.

Key Words: Centrifugal Force, Metering, Mixing, Biochemical Analysis, Microfluidics, Flow Control

1. 緒 言

遠心力を利用した送液法は、ポンプ等の複雑な機構が不要であり、数百 nL～数 mL 程度の微量液を操作する手段として適していることから⁽¹⁾、医療・バイオ分野において分析装置への適用が進められている^{(2)～(6)}。これらの分析装置では、図1に示すように、回転体上に検査サンプル・分析試薬を分注・貯蔵するための容器、それらを送液するための流路等が形成された分析デバイスを備え、回転によって発生する遠心力を利用して分析に必要な所定の液操作を行う。

遠心力は、液体自身に体積力として作用するため、液量によらず確実に検査サンプルや試薬を送液できる利点がある。また、回転体上に配置された多数の液体を同時に操作できることから、多検体の並列分析処理が実現可能である。

上記利点の一方で、送液方向が常に遠心力方向（外周側）に限定される、回転体上にバルブ等を実装して送液を制御することが困難であるといった問題点がある。このため、分析に必要な複雑な液操作を遠心力あるいは回転だけで、いかに実現するかが課題となっている。分析手順は対象によって異なるが、必要な液操作を機能別に分類すると、（1）液体を容器に保持するためのバルブ機能、（2）容器から決められた液量を取り出すための定量分注機能、（3）複数の液体の攪拌・混合機能、の3点に整理される。これらの機能を組み合わせることで分析に必要な液操作が実現できる。

上記3つの機能を実現する手段として、液体の表面張力を利用した擬似的なバルブ構造^{(3),(4)}、サイホンと毛細管現象を利用した定量分注構造⁽²⁾、回転の加減速によって発生する角加速度を利用した混合法^{(2),(5),(6)}等が報告されており、分析装置へ適用されている。これらの方法は回転のみによって実現可能である点で優れているが、その動作が液体の表面張力や壁面の親水性に依存する、あるいは回転体の急激な

* 原稿受付 2007年4月3日。

^{*1} 正員、(株)日立製作所機械研究所(〒312-0034 ひたちなか市堀口832-2)。^{*2} (株)日立ハイテクノロジーズ(〒312-8504 ひたちなか市毛882)。

E-mail: noriyo.nishijima.sj@hitachi.com

加減速が必要となるといった点で、適用が難しい場合もある。

本報では、定量分注、撹拌・混合の二つの液操作を、遠心力によって発生する圧力を利用して実現する方法を提案するとともに、その動作原理を実証した結果について報告する。

Fig. 1 Example centrifuge-based analysis device

2. 定量分注

2.1 定量分注の動作 医療分野における分析で定量分注が必要とされる例としては、血液からの血漿成分の分離が挙げられる。血液検査を行う際には血液試料を採血管に採取した後に遠心分離を行い、白血球等の血球成分を除去する。そして、遠心分離後の上澄みである血漿を定量分注 (metering/decanting) し検査に供する。

図2に示した分析デバイスの拡大図を用い、遠心力を利用して上記一連の操作を実現する構造を説明する。樹脂製の円板上に複数の容器 (chamber) とそれらを接続する流路 (channel) が形成される。さらに円板上面には同じく樹脂製のフィルムあるいは薄板が貼りつけられ、試料・試薬等の液体は外部に飛散することなく円板内部を流れるように構成されている。回転軸に近い最内周側には試料 (血液) を投入するための試料投入容器、そのすぐ外周側には血液の遠心分離を行うための分離容器、さらに外周側には、過剰量の試料を回収するためのオーバーフロー容器と、目的の定量分注した上澄み液 (血漿) を回収するための回収容器が設けられている。以上の構造は従来報告されているもの⁽²⁾と同様であり、これだけでも毛細管現象を利用することで一連の操作を行うことが出来る。本報の構造は、毛細管現象が生じない条件でも、遠心力による圧力を利用して定量分注を実現するために、追加液 (assisting fluid) 容器が新たに設けられ、それが分離容器の出口に設けられたサイホン流路の途中の合流部 (connection) に接続されている。

Fig. 2 Proposed structure for metering and decanting

Fig. 3 Sample metering and decanting process

(a) sample application, (b) metering and centrifugal separation of sample, (c) decanting supernatant by assisting fluid, (d) transferring metered supernatant to the outer chamber by siphon action.

図3を用いてその動作を説明する。まず図3(a)に示すように試料投入容器に試料を投入し、分析デバイスを回転させる。回転数を数千 min^{-1} 程度に設定すると、回転軸から数十 mm 程度の距離で遠心力は重力の100倍以上になり、液は試料投入容器から外周側の分離容器に移送され、図3(b)で示すように回転軸を中心とした円弧状の液面を形成する。この時、回転軸から r_1 の位置にオーバーフロー流路を設けておくことで、余剰分がオーバーフロー容器に移送され試料が

定量される。また、分離容器の右側に設けられた出口は内周側に折り返したサイホン流路となっており、その内周位置 r_2 は r_1 より内周側に設定されている。このため、試料は分離容器に保持される。この状態で回転を十分継続することで試料は上澄みと沈殿成分に遠心分離される。

次に回転を一旦停止し、追加液容器に追加液を投入し、再度回転を行う。図3(c)で示すように追加液は、サイホン流路の途中に合流し、回収容器に移送される。この際、後述するように流路、合流部および各容器を適切に配置することで、追加液が流れる際の流路抵抗によって合流部に負圧（大気圧以下の圧力）が発生し、サイホン流路上の上澄み液を吸引する。一旦吸引された上澄み液は図3(d)に示すようにサイホンによって自律的に流れ、追加液と混合しながら外周側容器に移送される。分離容器内の水位が r_4 の位置まで低下するとサイホン流動は停止しするので、 r_1 と r_4 で囲まれた所定量の上澄み液が分注され、追加液と共に回収容器に移送されることになる。本構成の場合は、必然的に上澄み液は追加液と混合されてしまうが、実際の分析では上澄み液は分析試薬あるいは試料の希釈液と混合されるので、追加液として分析試薬や希釈液を利用する事ができる。

従来報告されている構造⁽²⁾では、図3(b)の段階で回転を停止すると、毛細管現象によりサイホン流路が自動的に満たされる事を前提としている。これに対し本報告の構成は、液物性、デバイス材質あるいは流路形状により毛細管現象が生じない場合でも、サイホン流動を引き起こすことが出来る点が特長となっている。

2.2 上澄み液の引き込み条件の検討 追加液の流れによって上澄み液を引き込むためには合流部に負圧を発生させなければならない。そのための条件を計算により検討した。図4に示すような追加液の送液が開始された直後の状態を考え、追加液容器の液面 r_5 から回収容器入口 r_8 に至る経路の圧力を遠心力と流路抵抗の釣り合いから求める。なお、本計算においては流路の曲がり部、入口・出口における損失は無視し、また微量液を扱う前提で層流を仮定した。

まず、遠心力によって発生する圧力は以下の式で表される。

$$\frac{dp(r)}{dr} = \rho r \omega^2 \quad (1)$$

ここで ρ : 液体の密度, r : 回転軸からの距離, ω : 回転角速度である。気体の密度が液体に比較して十分小さいとすると、 r_5 の液面位置の圧力は大気圧 p_0 であり、

r_6 における圧力 p_{r6} は、式(1)を r_5 から r_6 まで積分し以下のように求められる。

$$p_{r6} = \frac{1}{2} \rho (r_6^2 - r_5^2) \omega^2 + p_0 \quad (2)$$

合流部 r_7 における圧力 p_{r7} は、図4中の経路 L_1 において遠心力と流路抵抗の関係から以下ようになる。

$$p_{r7} = p_{r6} - C_d u L_1 + \frac{1}{2} \rho (r_7^2 - r_6^2) \omega^2 \quad (3)$$

ここで、 u : 流路内の流速である。右辺第2項は流路抵抗を表し、層流の一種断面流路では流速と流路長に比例することから、その比例定数を便宜上 C_d とした。同様に回収容器入口 r_8 における圧力は以下ようになる。

$$p_{r8} = p_{r7} - C_d u L_2 + \frac{1}{2} \rho (r_8^2 - r_7^2) \omega^2 \quad (4)$$

また、 r_8 において追加液の流れは開放されるため p_{r8} は大気圧 p_0 に等しくなる。

$$p_{r8} = p_0 \quad (5)$$

式(2)~(5)、および $L_2 = r_8 - r_7$ の関係より合流部の負圧（大気圧からの差圧） $p_{r7} - p_0$ は以下のように求められる。

$$p_{r7} - p_0 = -\frac{1}{2} \rho \omega^2 \frac{L_1 (L_2 + 2r_7) - (r_7^2 - r_5^2)}{1 + L_1 / L_2} \quad (6)$$

一方、分離容器からサイホン流路の最内周部の山を越えて上澄み液を引き込むためには、サイホン流路内の上澄み液の液面を r_1 から r_2 まで上昇させなければならない。そのために必要な圧力は式(2)と同様に以下の式で求められる。

$$\Delta p_{r1,r2} = \frac{1}{2} \rho (r_1^2 - r_2^2) \omega^2 \quad (7)$$

式(6)で示される合流部の負圧が式(7)より大きければ、上澄み液を引き込むことができると考えられ、最終的に上澄み液引き込み条件は以下のように与えられる。

$$\Delta p_{r1,r2} + (p_{r7} - p_0) < 0 \quad (8)$$

Fig. 4 Symbols used in pressure calculation

なお、式(6)からわかるように合流部の負圧は流路抵抗の比例定数 C_d に依存しない。すなわち扱う液体の粘性や流路断面形状が変わっても引き込み条件は変化しない。

2.3 負圧発生量の検討 負圧発生に必要な条件をより分かりやすく把握するために、式(2)～(5)を微分形で解き、追加液容器の液面 r_5 から回収容器入口 r_8 に至る経路の圧力分布を求めた。その結果を図5に示す。また、このとき計算に用いた条件を表1に示す。

まず追加液液面 r_5 は大気圧であり、追加液容器の出口部 r_6 にかけては圧力は増大する。これは遠心力による水圧増加によるものである。次に、流路 L_1 を流れると、流路抵抗による圧力損失で水圧は大きく低下する。合流部から回収容器入口 r_8 にいたる経路 L_2 では、経路 L_1 と同様に流路抵抗による圧力損失はあるものの、遠心力による水圧増加が勝り、圧力は大気圧まで回復する。

図5から分かるように負圧発生に直接寄与しているのは流路 L_1 である。 L_1 の経路は L_2 と異なり遠心力に対し垂直方向（周方向）に向かっている。このため、 L_1 の経路では遠心力による水圧増加が生じず、流路抵抗によって圧力を低下させることが可能となる。

また、図5から合流部の負圧は $p_{r7}-p_0 = -9.6 \text{ kPa}$ である。式(7)から求まる引き込みに必要な圧力 $\Delta p_{r1,r2}$ は 2.0 kPa であり、表1の条件は上澄み液の引き込みに必要な条件式(8)を満たしていることがわかる。

Table 1 Parameter values used in calculation.

parameter	value	parameter	value
r_1 (mm)	41	r_8 (mm)	65
r_2 (mm)	39	L_1 (mm)	23
r_3 (mm)	43	L_2 (mm)	15
r_6 (mm)	50	ρ (kg/m ³)	1000
r_7 (mm)	50	ω (rad/s)	157

Fig. 5 Pressure distribution along path of assisting fluid

L_1 , L_2 の長さが合流部の負圧量にどのように影響するかを計算した結果を図6に示す。本計算において r_8 は L_2 の増加に伴って外周側に移動するものとし、その他の条件は表1のまま固定した。図6より、負圧が発生するためには L_1 が 5 mm ないしそれ以上必要であり、また L_1 が長いほど合流部での負圧量は増加することがわかる。これは L_1 が長くなることで、 L_1 における流路抵抗が増加するためである。また、 L_1 が一定の場合、 L_2 が長いほど負圧量は増加する。 L_2 が長くなると、遠心力による水圧が増加し、流路を流れる流速が全体的に増加する。その結果 L_1 の流路における圧力損失が増加し合流部における負圧量が増加する。

以上より、効果的に負圧量を増加させるためには、 L_1 , L_2 の両方を長くする必要があることが分かる。

Fig. 6 Pressure at connection on different L_1 and L_2

2.4 流動実験 図3で示した動作を実証するために、デバイスを試作して送液の可視化実験を行った。図7に実験装置の概要を示す。デバイスは円板形状ではなく、複数個の取り付け可能な台形状のカートリッジとなっている。個々のカートリッジは遠心機（日立機製、CF-16RX）の回転軸に固定された回転保持ディスクに装着される。また、可視化のために遠心機の蓋は透明アクリル板に交換した。

Fig. 7 Centrifuge used in experiment (left); schematic illustration of holder disk (right)

図8に試作したデバイスの構成を示す。最終的に他の処理と組み合わせることを想定し、容器と流路がデバイスの一部に偏って配置されているが、基本構成は図3に示したものと同一である。また、容器・流路の配置条件は表1と一致させた。前述の検討結果からは、流路の断面形状は特に限定されないが、実験において所定の液量が数秒から数十秒程度で流れるように幅 0.3mm ×深さ 0.5mm とした。デバイスは樹脂製（ポリプラスチック社製，TOPAS）で、切削加工により流路・容器等の凹形状を製作し、上面の蓋としてはPET樹脂製の透明粘着シール（カジックス社製，タイタースティック HC）を用いた。

回転時の送液状態を可視化するために、回転に同期させたストロボ光源（日新電子製，HD-100-2）を用い、アクリル蓋の上面側から撮影を行った。

試料としては、実際の分析において試料の粘性が大きく変化することを想定し、着色した純水と高粘度のグリセリン溶液（体積濃度 67%，比重 1.17）の2種類を用い、追加液は純水を用いた。本濃度におけるグリセリン溶液の粘性は室温において水の約 10～12 倍である。また、液量は試料 $580\mu\text{L}$ ，追加液 $700\mu\text{L}$ である。

Fig. 8 Layout of cartridge device for demonstrating metering and decanting process

図9にグリセリン溶液を試料として用いた場合の可視化結果を示す。試料投入容器に試料を分注し、回転（回転数 1500min^{-1} ，以下全て同じ）を行うと、図9(a)に示すように遠心力で分離容器に移送される。図9(b)に示すように過剰量の試料はオーバーフロー容器に移送され、図9(c)のように液面はオーバーフロー水位 r_1 になり所定量の試料が分離容器に保持される。本実験で用いた樹脂材料 TOPAS は試料に対し非常に弱い親水性ないし撥水性しか示さないため、この状態から回転を停止しても図9(d)で示すように毛细管現

象は生じずサイホン流路は液で満たされない。次に追加液を投入して回転を開始すると、 $700\sim 1000\text{min}^{-1}$ 程度の回転数に達した時点で、上澄み液がサイホン流路を超えて引きこまれ、図9(e)で示すようにサイホン流動が生じる。一旦サイホンが形成されると図9(f)のように全てのの上澄み液（ $200\mu\text{L}$ ）と追加液が回収容器に移送される。

Fig. 9 Visualized flows in metering and decanting process; all photos except (d) were taken during rotation

上記動作の確実性を検証するために、2 個のデバイスを 1 組とし 5 回（合計 10 ケース）の繰り返し実験を純水とグリセリン溶液に対してそれぞれ行った。繰り返し実験の際には、実験毎にデバイスを純水で超音波洗浄し充分乾燥させた。その結果純水を試料として用いた場合は 10 ケースすべて図9に示した動作が再現できたが、グリセリン溶液の場合には、10 ケース中 3 ケースで図9(e)～(f)の過程でサイホン流動が停止

し、上澄み液の一部が分離容器に残った。これに対し可視化画像を検討した結果、水とグリセリン溶液では、粘性の違いにより試料の流れきる時間が異なり、そのため試料と追加液の流れ終わる順序が逆転し、これがサイホン流動を停止させる要因であることが分かった。試料が純水の場合は、一旦サイホン流動が生じると、上澄み液は速やかに流れきり、追加液が後から単独で流れきる。これに対しグリセリン溶液の場合はこの順序が逆転し、追加液が流れきった後も、上澄み液がサイホン流動で流れ続ける。この時、図 10 に模式図で示すように、空になった追加液容器から合流部に空気が流入しサイホンを阻害することが分かった。

Fig. 10 Schematic illustration of flow along path of supernatant fluid in case of glycerin sample

グリセリン溶液を用いた場合に合流部から空気が混入する要因を検討するために、前節と同様の計算法を用い、図 10 の状態における圧力分布を求めた。その結果を図 11 に示す。図中の3つの線は、上澄み液が流れることにより分離容器内の液面位置 r が r_1 から r_9 に低下していった場合の変化を示したものである。圧力は液面 r から分離容器の出口 r_9 まで増加した後、サイホン流路の最内周 r_2 にかけて大きく減少する。そして、回収容器入口 r_8 まで緩やかに回復し出口で大気圧となる。

図 11 から分かるように合流部の圧力は負圧となっている。また、分離容器内の液面位置 r が低下するに従い負圧量は増加する。

このことから、グリセリン溶液では、図 10 で示した状態で合流部で負圧が発生し追加液容器側から空気が混入したと考えられる。混入が微量の場合は、空気は上澄み液の流れに乗って回収容器側に流れ、サイホンは維持されると思われるが、液面位置 r が低下するに従い負圧量が増大し、その結果、混入する空気量が増大しその一部が浮力によってサイホン流路を逆流し、サイホン流動を停止させると考えられる。

上記問題に対しては、サイホン流路の上流側部分の流路断面を幅 0.3mm×深さ 0.5mm から 0.4mm×1.0mm に拡大する対策を実施した。これによって、試料が流れるサイホン流路の流路抵抗が減少し、グリセリン溶液であっても、純水の場合と同様に追加液が後から流れきるようになり、純水・グリセリン溶液のいずれの場合でも流動が再現できるようになった。

Fig. 11 Pressure distribution along path of supernatant fluid

3. 混合

3.1 混合の動作 次に、遠心力を利用して2液を混合する構造を説明する。図 12 にその基本構成を示す。

内周側に混合したい試料を投入するための試料投入容器、そのすぐ外周側には混合操作を行うための混合容器が配置される。更に、その外周側には後述するように圧縮空気を保持するための空気容器が設けられ、混合容器と空気容器は流路によって外周側で接続されている。ここで、空気容器には他の容器と異なり空気抜きが設けられておらず、この容器内の空気はデバイスの外部に抜けることが出来ないように構成されている。

Fig. 12 Proposed structure for mixing process

図 13 を用いて一連の動作を説明する。2 種の液体 (液体 A, B とする) を試料投入容器に順次 (あるいは同時に) 投入し回転を行うと、液は遠心力によって外周側の混合容器に移送される。説明を分かりやすくするために、2 種の液体には比重差があり、遠心力によって分離している状態を仮定する。回転を継続すると、図 13(a)で示すように液は更に接続流路を通り空気容器に流入する。空気容器は前述の通り密閉されているため、液が流入することで内部の空気が圧縮され内圧が上昇する。そして、空気容器の内圧と遠心力による水圧がバランスするように混合容器と空気容器の液面 r_1, r_2 が形成される。

Fig. 13 Process of mixing two liquids with different densities

(a) sample flows into the air chamber and air in the air chamber is compressed, (b)(c) by increasing rotational speed, all of the sample is transferred to the air chamber, (d) by decreasing rotational speed, air in the air chamber expands and pushes the sample back to the mixing chamber. This cycle may be repeated until two liquids are mixed.

図 13(a)の状態から更に回転数を上げると、遠心力による水圧が増加し、図 13(b)で示すように液体は更に空気容器に流入する。この時、液体 A が空気容器中の液体 B の中に吐出されると、比重差によって図中に示すように空気容器内を上昇流として流れ、この過程で液体 A と B が混合される。十分に回転数を上げると図 13(c)で示すように、混合容器内の全ての液体が空気容器に移送される。

この状態から回転数を低下させていくと、遠心力が減少するために圧縮されていた空気が膨張し、図 13(d)に示すように、液は逆に混合容器に押し戻される。この際にも、比重の軽い液体 A が液体 B の中に吐出されるため、両者は混合される。この回転数の増減を繰り返す、混合容器と空気容器の間で液を往來させることで 2 液の混合が行われる。

従来報告されている構造^{(2), (5), (6)}では、基本的に液を揺らして攪拌するため回転体の急激な加減速が必要であるのに対し、本方法は緩やかな加減速でも混合が可能である点に特長がある。また上記のように、比重差がある 2 液であっても液の往來の過程で混合することが可能である。

3.2 混合動作条件の検討 図 13(a)から(c)の過程では、前述のように空気容器の内圧と遠心力による水圧が釣り合うように混合容器と空気容器の液面 r_1, r_2 が形成されている。

図 13(a)の場合の液と空気の界面 r_2 における圧力の釣り合いを考える。まず空気容器内の空気の圧力は圧縮されることによって上昇し、等温過程を仮定すると以下ようになる。

$$p_{air} = p_0 \left(\frac{V_0}{V_0 - \Delta V} \right) \quad (9)$$

ここで、 V_0 :空気容器の体積、 ΔV :空気容器に流入する液体の体積である。また、遠心力によって発生する水圧は以下ようになる。

$$p_{liquid} = \frac{\omega^2}{2} \{ \rho_A (r_3^2 - r_1^2) + \rho_B (r_2^2 - r_3^2) \} + p_0 \quad (10)$$

ここで、 ρ_A, ρ_B :液体 A, B の密度である。両者が等しいことから、以下の式が導かれる。

$$\frac{p_0}{V_0 / \Delta V - 1} = \frac{\omega^2}{2} \{ \rho_A (r_3^2 - r_1^2) + \rho_B (r_2^2 - r_3^2) \} \quad (11)$$

さらに 2 液の比重がほぼ等しいと近似すると、式 (11)は以下のように簡略化される。

$$\frac{p_0}{V_0 / \Delta V - 1} = \frac{\rho \omega^2}{2} (r_2^2 - r_1^2) \quad (12)$$

混合効果を高めるためには、所定の回転数まで上げた時に図 13(c)のように混合したい液がすべて空気容器側に移動する必要がある。式(12)を用いて、そのために必要な空気容器体積と水位および回転数の関係を求めた結果を図 14 に示す。また、その際に用いた条件を表 2 に示す。

Table 2 Parameter values used in calculation.

parameter	value	parameter	value
r_1 (mm)	100	p_0 (kPa)	101
r_2 (mm)	101~103	ρ (kg/m ³)	1000

Fig. 14 Relationship between required air chamber volume and rotational speed on different water levels

図 14 から、例えば想定回転数を 3000min^{-1} 、その時の水位差を 2mm に設計したい場合には、 $V_0/\Delta V$ は約 6 となる。従って、混合したい液量 ΔV が $100\mu\text{L}$ の場合には、必要な空気容積 V_0 は $600\mu\text{L}$ となる。

混合機構を小型化する観点からは水位差 $r_2 - r_1$ 、および空気容器体積は V_0 は出来るだけ小さいことが望ましい。しかしながら、図 14 から分かるように、両者を小さくしたい場合、必要な回転数は高くなる。

3.3 流動実験 図 13 で示した動作を実証するために、送液の可視化実験を行った。実験装置および方法は前章の実験と同様である。図 15 に実験に用いたデバイスの構成を示す。デバイス上には、本報告の混合機構（図 15 中の拡大図左側）に加えて、送液のみを行う容器（同右側、以下比較用容器と呼ぶ）が隣り合わせに配置されている。比較用容器は混合機構における空気容器と同一の形状となっている。両者に対し、同時に送液操作と撮影を行い、着色液の混ざり具合を同一形状の容器内で比較することで混合効果の有無を確認することとした。

混合する 2 液の合計液量を $20\mu\text{L}$ とし、純水 $15\mu\text{L}$ とグリセリン溶液 $5\mu\text{L}$ （体積濃度 50%、比重 1.13）を用いた。デバイス設計においては、表 3 の条件と r_1 が一致するように容器を配置し、想定最高回転数を 4500min^{-1} 、その時の水位差を 2mm 以下とすることとした。図 14 からこれらの条件を満たすために必要な空気容器体積は $65\mu\text{L}$ 以上となることから、 $80\mu\text{L}$ に設定した。また混合容器体積は $25\mu\text{L}$ である。なお、空気容器には部分的に深さ 0.3mm の浅い領域

（Shallower part）が設けられ、外周側の円形部分（体積約 $20\mu\text{L}$ ）と内周側部分に分けられている。これは、最終的に混合した液を空気容器外周側の円形部分に集め、デバイス上面から光学的手段によって反応検出を行うことを想定したためである。浅い領域を設けることによって回転を停止しても液は外周側の円形部分に安定して保持され、気液界面の影響を受けずに光学検出を行うことが可能となる。

Fig. 15 Layout of cartridge device for demonstrating mixing process (chamber with no mixing structure is patterned on same device for comparison; device is symmetrical with respect to centerline)

図 16 に可視化画像を示す。図 16 は図 15 中の拡大図で示した領域であり、左側が本報告の混合機構、右側が比較用容器である。

試薬投入容器から水、グリセリン溶液を続けて投入し 1500min^{-1} で回転を行うと図 16(a)で示す状態となる。右側の比較用容器では、2 液が容器内にそのまま流入し容器内で比重差により分離した状態が確認できる。左側の混合機構では、比重の重いグリセリン溶液と水の一部が空気容器に流入し、図 13(a)で示した状態となっている。更に 4500min^{-1} まで回転数を上げると、図 16(b)のように殆ど全ての液が空気容器に流入する。高速回転時は画像が不鮮明であるため、図からは判別し難いが、この時の水位差は 2mm ないしそれ以下であり、前述の検討結果とほぼ一致していた。この状態から回転数を 1000min^{-1} まで低下させると図 16(c)で示すように、液は空気容器から押し出され混合容器に移動する。 4500min^{-1} への加速から 1000min^{-1} への減速までを 1 サイクルとして、回転を停止させることなくこのサイクルを 5 回繰り返し、空気容器と混

合容器の間で液を移動させた。1 サイクルに要する時間は遠心機の性能によって規定され、減速と加速のそれぞれについて約 10 秒、合計約 20 秒であった。

Fig. 16 Visualized flows during rotation in mixing process

この後回転を停止し、図 16(d)中に示す空気容器内周の空気抜きに穴を開けて空気容器内の空気をデバイス外部に開放し、再度回転を行った。これにより、空気容器内にすべての液が移動し、右側の比較用容器と同じ状態で液の混合状態を比較することが可能となる。回転中に比較を行ったのは、停止すると、仮に混合し

ていなくても、グリセリン溶液が比重差によって水の下側に回りこむため、上面から可視化すると混合しているように見えてしまうためである。図 16(d)から分かるように、右側の比較用容器では、容器内でグリセリン溶液と水は依然として分離しその界面が確認できるのに対し、混合機構を備えた左側の構成では一様となった。

4. まとめ

遠心力を利用して回転体上で微量液の定量分注および攪拌・混合を実現する手法を検討し、以下の結論を得た。

- (1) 追加液を用い、その流れによって発生する負圧を利用して、試料の定量分注を行う構造を提案した。また、遠心力と流路抵抗の関係から、必要な負圧を発生させる条件を示した。
- (2) 遠心力によって圧縮空気を生成しその圧縮・膨張作用を利用して 2 液を攪拌・混合する構造を提案した。
- (3) 定量分注と攪拌・混合を行う構造をそれぞれ試作し、回転場での可視化実験により所定の液操作が可能であることを実証した。また混合の基本的効果を確認した。

文 献

- (1) J.V.Zoval and M.J.Madou, Centrifuge-based fluidic platform, *Proceedings of the IEEE*, Vol.92, No.1(2004), pp.140-153.
- (2) G.T. Schembri, T.L.Burd, A.R.Kopf-sill, L.R.Shea, and B.Braynin, Centrifugation and capillarity integrated into a multiple analyte whole blood analyser, *J. of Automatic Chemistry*, Vol.17, No.3(1995), pp.99-104.
- (3) N.Honda, U.Lindberg, P.Andersson, S.Hoffmann, and H.Takei, Simultaneous multiple immunoassays in a compact disk-shaped microfluidic device based on centrifugal force, *Clinical Chemistry*, No51, Vol.10(2005), pp.1955-1961.
- (4) M. J. Madou and G. J. Kellogg, The Lab CD™: A centrifuge-based microfluidic platform for diagnosis, *Proc. of SPIE (Systems and Technologies for Clinical Diagnostics and Drug Discovery)*, Vol.3259(1998), pp. 80-93.
- (5) J.Steigert, et al, Integrated Sample Preparation, Reaction, and Detection on a High-Frequency Centrifugal Microfluidic Platform, *J. of the Association for Laboratory Automation*, Vol.10(2005), pp.331-341.
- (6) M.Grumann, A.Geipel, L.Riegger, R.Zengerle, and J.Ducree, Batch-mode mixing on centrifugal microfluidic platform, *Lab on a Chip*, Vol.5(2005), pp.560-565.