

現場 ATP 定量用マイクロ流体デバイスの小型化 -試作と評価-

○佐野優貴 (横浜市立大学), 福場辰洋・三輪哲也(海洋研究開発機構)

海底資源開発により環境が変動すると予想される深海底において、探査・採掘活動が環境に及ぼす影響を評価する基準の一つとして微生物バイオマスを用いることができると考えられる。微生物バイオマスの測定には、ルシフェリン・ルシフェラーゼ (L-L) 法による ATP (アデノシン 3 リン酸) の定量が一般に用いられる。生物発光反応である L-L 反応の発光強度は ATP 濃度と相関関係があるため、発光強度を測定することで ATP 濃度を算出することができる。ATP 濃度を計測するには、採水されたサンプルを用いた船上などのラボにおける分析に加えて、現場型装置による連続分析を行うことで高い時空間解像度を有するデータを取得することができるが、現場に装置を持ち込むためには装置の小型化が必須である。そこで、これまでにマイクロ流体デバイスおよび関連技術を応用した装置が開発されてきている [1]。マイクロ流体デバイスとは微細加工技術などを用いて、プラスチックなどの基板に微小流路や反応容器を形成することで実現される小型分析装置の総称である。マイクロ流体デバイスを用いることで、実験室で行っていた実験を小型のデバイス上で行うことができるため広い場所を必要とせず、同時に実験に使用する試薬や廃液の量を削減することができる [2]。

現在の現場型 ATP 定量分析装置 (IISA (Integrated *In situ* Analyzer)-ATP) は ROV に搭載して表層から深海底までの海中の ATP 濃度を計測できるが、大型調査船を用いた調査航海には多額の経費や多くの人員が必要である。そのため現在、大型の作業用 ROV の代わりに小型船から人力による投入と回収が可能な ROV や漂流ブイなどの小型の海中観測プラットフォームに搭載して計測を行うことを目指して、さらなる装置の小型化にむけた研究開発が進められている。現状の IISA-ATP では、L-L 反応に伴う微弱光の計測を行うために、光電面の直径が 22 mm の PMT (Photomultiplier tube : 光電子増倍管) を耐圧容器に収納して用いているが、それが装置全体の小型化の障害となっている。また、マイクロ流体デバイスの光計測用の流路は、その PMT の光電面の大きさに合わせるため流路長が長く (482 mm)、また容量も大きくなっており (361.5 μ L) [1]、それが分析の時間分解能向上の制限要因となっている。そこで本研究では、現場型 ATP 定量分析装置のさらなる小型化と時間分解能の向上を目的として、従来使用されてきた PMT よりも大幅に小型で光電面が小さな MPMT (Micro PMT) の使用を検討しており、それに合わせてマイクロ流体デバイスの再設計・評価を行っている。

本研究で評価に用いている MPMT (フォトンカウンティングヘッド H12406、浜松ホトニクス) と従来使用してきた PMT の光電面の形状及びサイズを図 1 に示す。まず、この MPMT を用いて最も効率よく発光強度を計測するための流路形状について以下の検討を行った。第一に、光電面上に配置されるマイクロ流体デバイスの発光検出部の最大幅と最大長さを決定するために以下の実験を行った。幅 1 mm、深さ 1.5 mm の透明アクリル製流路を有する評価用マイクロ流体デバイスを製作し、光電面の中心から縦方向と横方向に段階的にオフセットさせて配置した (図 2)。そこに人工海水 (ATP 濃度 : 5.0×10^{-8} pM)、ATP 抽出試薬、L-L 試薬を混合した状態で供給して発光強度測定を行った。結果より、光電面上のマイクロ流体デバイスの発光検出部の配置範囲を 5 mm \times 7 mm の矩形のエリア内と決定した。

次に、発光検出部として一本型と屈曲型の流路のパターン (図 3) を作成し、それぞれのパターンを用

いた際に得られる発光強度を比較するために以下の実験を行った。光電面の中心に光検出部の中心が重なるように配置し、人工海水(ATP濃度： 5.0×10^{-8} pM)、ATP抽出試薬、L-L試薬を混合した状態で供給することで発光強度測定を行った。結果より一本型の方が屈曲型よりも明らかに発光強度が高かった(図4)。これは、屈曲型の流路パターンの場合には光電面上に配置される流路の総面積(45.87 mm²)が一本型(60.00 mm²)よりも小さくなっているため、発光強度が低くなったと考えられた。一方で、発光検出部内の溶液の入れ替わりは一本型よりも屈曲型の方が早いため、分析の時間分解能の観点では屈曲型の方が優れていると考えられる。そこで今後は、高速な溶液の切り替えを可能とするためにマイクロバルブをマイクロ流体デバイス上に集積化した装置を作成することで、サンプルATP濃度を定期的に切り替えて発光強度を計測することで時間分解能の比較を行い、MPMTを用いた現場ATP定量分析に最適なマイクロ流路形状を提案することを目指す。

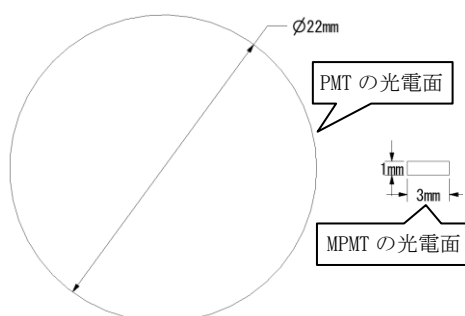


図1 PMTとMPMTの光電面のイメージ図

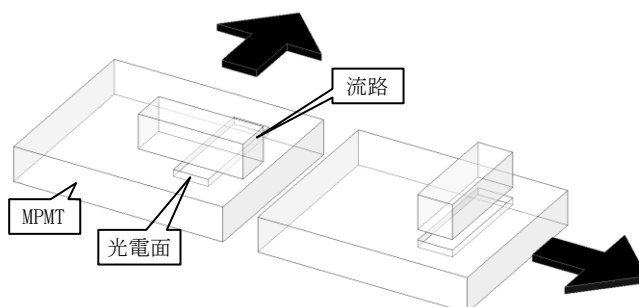


図2 実験の概要図。マイクロ流路を矢印の方向に段階的に移動させながら発光強度を測定した

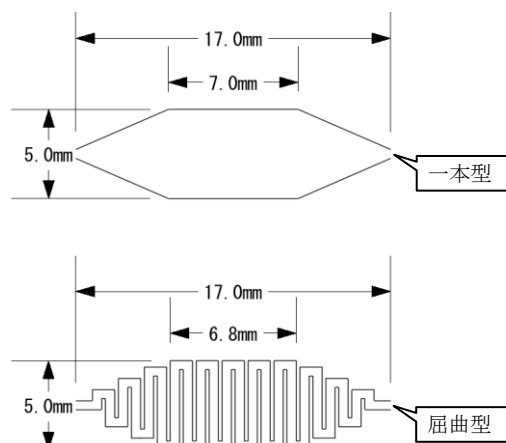


図3 光電面上の流路形状

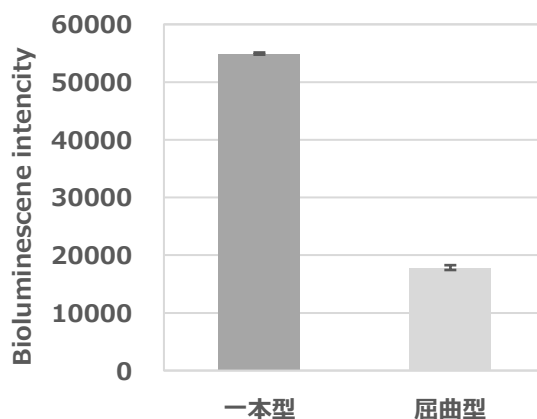


図4 各流路形状における既知濃度(5.0×10^{-8} pM)のATPを含む人工海水をサンプルとして用いて計測した発光強度の測定結果。エラーバーは発光強度が安定した後、10秒間の測定値の 3σ を示す

参考文献

- [1] T. Fukuba, T. Noguchi, K. Okamura, and T. Fujii, "Adenosine Triphosphate Measurement in Deep Sea Using a Microfluidic Device" *Micromachines*, vol. 9, 370, 2018, DOI 10.3390/mi9080370
- [2] 北森武彦, 庄子習一, 馬場嘉信編, *マイクロ化学チップの技術と応用*, 丸善出版, 2014, 374p.