

SH-SAWバイオセンサでの音響ストリーミング効果

Acoustic streaming effects for SH-SAW immunosensors

小 貝 崇 谷津田 博 美
Takashi Kogai Hiromi Yatsuda

要 旨

Point of care testing (POCT) は、患者またはその近くでの診断検査であり、迅速な診断や高感度検出が必要とされている。本論文は、レイリー弾性表面波 (R-SAW) による溶液の攪拌を付加した横波型弾性表面波 (SH-SAW) バイオセンサの迅速検出について述べる。バイオセンサはSH-SAWで検出され、デバイスはSH-SAWとR-SAWの2つの弾性表面波を1つのすだれ状電極で同時に励振可能なX 148-Y LiTaO₃基板を用いた。SAW遅延線は、SH-SAWにおいて100 MHzで設計され、遅延線の表面上の抗原と滴下抗体の結合による免疫反応は、R-SAWの有無にかかわらずSH-SAWの速度変化によって検出される。結果、抗原と抗体の結合によるSH-SAWの速度変化は、R-SAWによる攪拌によって劇的に増幅されることが確認された。

Abstract

POCT (Point of Care Test), which is a diagnostic test at or near the patient, requires rapidly testing and higher sensitivity detection. This paper describes rapidly detection of a shear horizontal surface acoustic wave (SH-SAW) immunosensor which utilizes a liquid agitation using Rayleigh surface acoustic wave (R-SAW) for POCT. SH-SAWs and R-SAWs can be effectively generated at an interdigital transducer (IDT) with different frequencies on the X-cut 148-Y LiTaO₃ substrate. The SH-SAW is used for sensing. The SAW delay-line, which is designed at 100 MHz in SH-SAW, has a propagation area covered with antigens of human serum albumin (HSA) between transmitting and receiving IDTs. The immunoreactions caused by antigen-antibody binding events on the surface of the delay-line are investigated by the velocity changes of the SH-SAWs for sensing with and without an R-SAW assist. As a result, it is confirmed that the SH-SAW velocity changes due to antigen-antibody reactions can be dramatically improved by the R-SAW agitation assist.

1. まえがき

日本は、団塊世代が高齢化を迎え、人口の20%が「後期高齢者」となる2025年問題などの医療に関連する深刻な社会問題を抱えている⁽¹⁾。医療需要の課題解決に向けて、疾病治療を主とする医療から、人々が自立して健康を維持可能な予防や未病に繋げるものとして臨床現場即時検査 (point-of-care testing, POCT) への関心が高まっている。POCTは、訪問診療やベッドサイド診療などにおける医療従事者が被検者の傍で行う検査を指し、将来的には患者自らが検査を行うことを目指すものである。POCTにより場所を選ばないスクリーニングや即時診断が実現すれば、疾病リスクが低減し、医療従事者の負担軽減や、医療費の削減などに繋がるとして期待されている。

当社では、POCT向けのメディカルデバイスとして水晶上を伝搬する横波型弾性表面波 (shear horizontal- surface acoustic wave, SH-SAW) を用いたSAWバイオセンサの開発に取り組み、免疫反応を示すバイオマーカーに着目して研究開発を進めてきた⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾。SAWは、携帯電話用デュプレクサに多用される電子デバイスであり、その製造は半導体製造技術を利用できるため大量生産可能である。更に、検出は電気信号として直接バイオ反応を測定できるため、光学的な部分が不要で、低価格化や小型化が容易でありPOCTの需要に適していると考えられる。SAWバイオセンサは、ある物理量を変換するトランスデューサーにSAWを、被検体

に親和性を持つ結合子に免疫反応を示す抗体を用いる。免疫反応は、生物の本来持つ自己防衛の機能を利用する点で、HIVやインフルエンザなどの感染症や、腫瘍や炎症などの疾病に起因して増加するバイオマーカーなど、それら抗原を対象に抗体の置き換えによって異なるバイオセンサを構成できる特長を有している。

SAWバイオセンサは抗原と抗体の結合による抗原抗体反応を検出するものであるが、その反応は抗原の濃度に依存した緩やかな変化を示し、一定の反応時間が必要である。そこで反応時間短縮のため、レイリー弾性表面波 (Rayleigh surface acoustic wave, R-SAW) による溶液の攪拌⁽⁵⁾に着目し、SH-SAWでのバイオセンサにR-SAWを組み合わせ攪拌により免疫反応を促進できるのではないかと考えた。この反応促進が、POCTに要求される迅速な診断や高感度検出に好適であると考えた。そこで本論文では、SH-SAWとR-SAWが同時に励振可能なX 148-Y LiTaO₃基板を用いて、R-SAWによる溶液攪拌中でのSAWバイオセンサの免疫反応促進効果について報告する。

2. X 148-Y LiTaO₃基板上での弾性表面波

X 148-Y LiTaO₃基板は、一つのすだれ状電極 (interdigital transducer: IDT) でSH-SAWとR-SAWを独立した周波数として励振可能である⁽⁶⁾。二つのSAWは溶液負荷での性質が異

なり、図1はそれぞれのSAWにおける基板面内の変位分布の断面図である。図1(a)のSH-SAWは、変位が伝搬方向に対して垂直かつ表面に対して平行のため、溶液へのエネルギー放射が少なく、液相系センサを構成可能である。一方、図1(b)のR-SAWは、伝搬方向に平行な縦波成分と面内で表面に垂直な垂直方向のせん断成分の2つからなり、その変位の合成により表面で後方楕円回転し、伝搬により溶液へエネルギーを放射しながら減衰する。このためR-SAWは液相系センサに用いられないが、溶液へのエネルギー放射を利用して溶液を攪拌するものが音響ストリーミングの一種でありSAWストリーミングと呼ばれ研究されている⁽⁵⁾。

X 148-Y LiTaO₃基板上の二つのSAWについてデバイスを作製しその周波数特性を測定した。作製したデバイスは、それぞれパワーフロー角 (power flow angle, PFA) が異なるため二つの遅延線とした。PFAとは、表面波の等位相の波面が進む速度である位相速度の方向と、表面波のエネルギー伝搬方向である群速度の方向の差を示す角度である。X 148-Y LiTaO₃基板上でのPFAは、SH-SAWが+9.7°、R-SAWが-2°と報告されており⁽⁶⁾⁽⁷⁾、その角度だけ電極を傾けなければ伝搬する表面波を正しく受信することができない。図2はデバイスの模式図であり、作製した遅延線は、入出力IDTに4.545 μm幅ピッチのダブル電極を有し、IDTは対数40対の開口長1454.5 μm、入出力IDT間を距離7999.2 μmとする表面短絡の伝搬路を有する。IDTと伝搬路は、金(Au)を膜厚150 nmで蒸着し形成した。図2(a)は電極傾斜角 $\alpha_{\text{tilt}} = 0^\circ$ の遅延線(I)であり、図2(b)は $\alpha_{\text{tilt}} = +9^\circ$ の遅延線(II)である。Xカットの表面伝搬方位はY軸であるため、図2中では、実線(青)で示す方位がY軸148°の位相速度の方向であり、破線(赤)が+9°のSH-SAWの群速度の方向である。図3にデバイスの周波数特性を示した。各遅延線の中心周波数と最小挿入損失は、遅延線(I)が88.8 MHzの8.3 dB、遅延線(II)が100 MHzの8.5 dBであった。また、図3中の緑色鎖線は、純水負荷での遅延線(II)の特性で、100 MHzの特性は溶液の粘性により僅かに減衰するのみでSH-SAWの特性であると確認された。

3. 実験方法

実験構成を図4に示す。使用するデバイスは、2章と同様の電極設計でX 148-Y LiTaO₃基板上の $\alpha_{\text{tilt}} = +9^\circ$ を2チャンネル構成とした。2チャンネルのセンサは、将来的に血液粘性等の外乱を打ち消す目的に用いる差動構造で、本実験では片側1チャンネルのみを使用した。センサに用いるSH-SAWは、ネットワークアナライザを用いて通過特性により周波数100 MHzの位相と振幅を測定し、送受信IDT間の伝搬路を検出領域として速度変化と減衰変化に変換した。一方、音響ストリーミングを発生させるR-SAWは、ファンクションジェネレータにより、中心周波数89 MHzを入力した。各信号の入力は、合成器を用いて接続し送信IDTへ印加した。

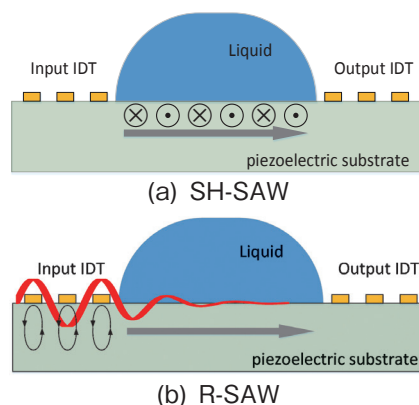


図1 圧電基板面内の変位分布の断面図

Fig.1 Schematic diagram of displacement in the piezoelectric substrate surface

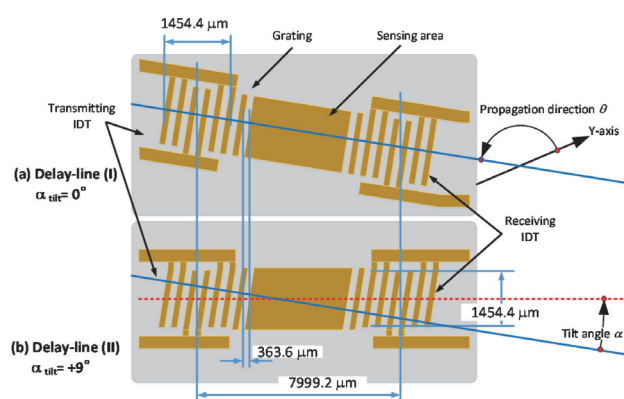


図2 X 148-Y LiTaO₃上の異なるPFAでの遅延線：(a)遅延線I、(b)遅延線II

Fig.2 Delay-lines of different PFA on X-cut 148-Y LiTaO₃ : (a) delay-line (I) and (b) delay-line (II).

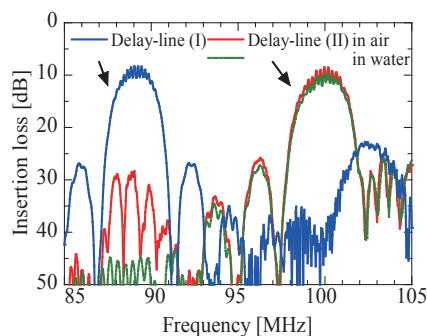


図3 X 148-Y LiTaO₃上での遅延線の周波数特性
Fig.3 Frequency response of delay-line on X 148-Y LiTaO₃

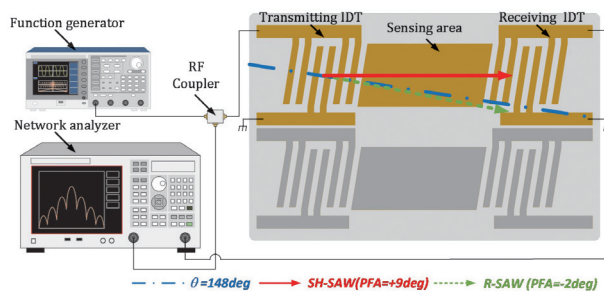


図4 実験構成

Fig.4 Block diagram of measurement setup

4. X 148-Y LiTaO₃の性能

4.1 粘性変化に対するSH-SAWセンサの応答

SAWバイオセンサでの抗原抗体反応の検出は粘性として主に検出される⁽⁴⁾。そこで、グリセリン水溶液5-30 wt%をセンシングエリアに滴下して、SH-SAWの速度変化から粘性によるセンサの感度を評価した。図5は、丸点にX 148-Y LiTaO₃基板上でのグリセリン水溶液の濃度に対するSH-SAWの速度変化の実測値を、実線に水晶基板の250 MHzのSH-SAWでの数値解析結果⁽⁴⁾を比較として示した。結果、速度変化はグリセリンの粘性に依存して増加し、粘性に対する感度が示された。しかしながら、X 148-Y LiTaO₃は水晶と比べて約1/8倍の粘性感度と低いことがわかり、高感度検出に課題があるとわかった。

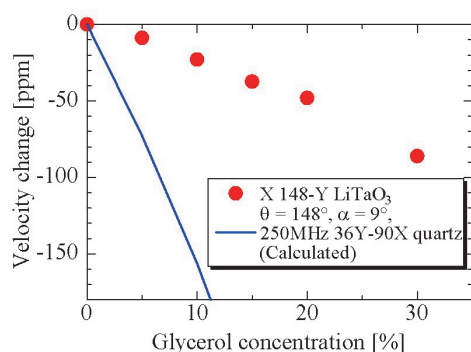


図5 グリセロール濃度の粘度変化に伴うSH-SAWの速度変化

Fig.5 Velocity change of SH-SAW due to viscosity change of glycerol-water mixture concentrations

4.2 SAWストリーミングによる液滴の攪拌

R-SAWによる攪拌効果を伝搬面に純水を30 μL滴下してカメラで観察した。実験は、純水に粒子径38 μmの赤色鉍石粒子を付加し、R-SAWへの入力信号は周波数スイープ信号とした。スイープ信号は、音響ストリーミングによる溶液加熱の効果を抑える目的であり、中心周波数89 MHz、スイープ幅5 MHz、スイープ時間を往復で6 sとして、振幅+23 dBmを入力した。図6は2章図3の遅延線(I)の特性から予測されるスイープ信号入力による送信IDTからの出力レベルである。遅延線(I)のR-SAWは-3 dBの通過帯域で1.96 MHzであり、スイープの往復でONとOFFを繰り返す。図7は(a)から(d)の順に0.5 s間隔の撮像結果であり、図7(a)はR-SAWの帯域外入力で励振が停止し攪拌されていないことが、図7(c)(d)はフィルタ帯域内のため攪拌されていることが確かめられた。図7(c)(d)の攪拌時には送信IDTの近傍において粒子が疎になっており、それに沿って渦流の発生が見られる。これは、R-SAWの伝搬方位と一致し、渦流によって溶液の攪拌が繰り返されていることが確認された。本手法は、3×8 mm²の伝搬路面内に配置された数十マイクロリットルの微量液滴が攪拌され、簡便で高い効果を持つものと考えられる。

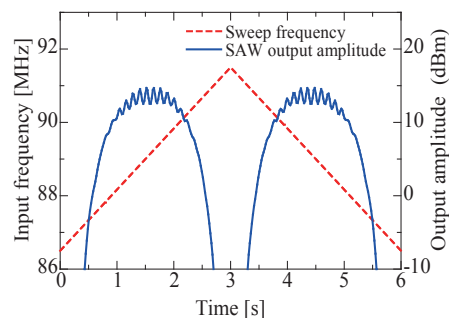


図6 周波数スイープ入力によるR-SAWの振幅
Fig.6 Amplitude of R-SAW by frequency sweep input

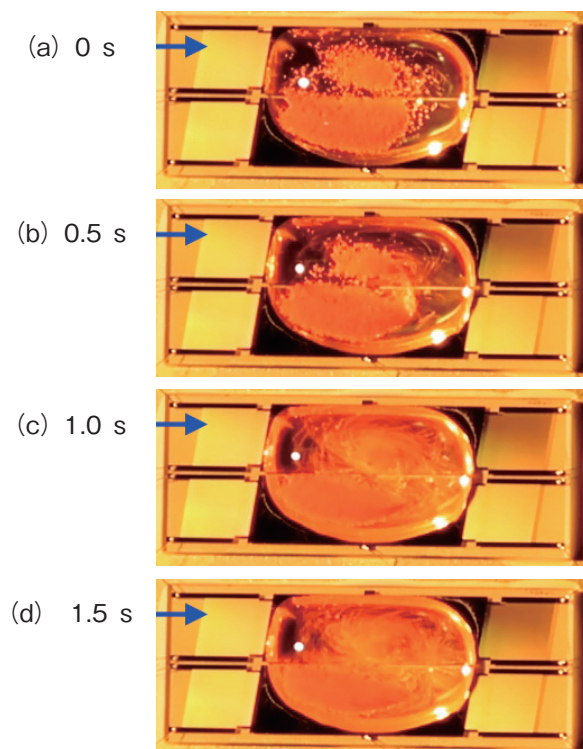


図7 周波数スイープ信号を用いたSAWストリーミングによる液滴の攪拌

Fig.7 Liquid agitating by SAW streaming using frequency sweep signal

5. 免疫反応へのSAWストリーミングの効果

R-SAWによる音響ストリーミングの攪拌が免疫反応の促進効果を有するか、人の血清アルブミン (human serum albumin, HSA) の抗原抗体反応を用いて評価した。測定は、センシングエリア表面へ濃度100 μg/mlのHSA抗原を滴下しあらかじめ固定した。測定は、リン酸緩衝液を滴下し基準値として、抗体溶液へ溶液置換し行った。

初めに、抗体を含まないリン酸緩衝液のみでの溶液置換による速度変化を測定した。R-SAWへの入力条件は4.2章の周波数スイープ信号とし、抗体置換の5分前よりR-SAWの信号を入力した。図8は速度変化と減衰変化であり、R-SAW励振により速度変化が減少した。この変化は、基板の温度特性が影響しており、表面の溶液と滴下する溶液のおよそ0.5 °Cの温度差が

速度変化に現れたためであった。また、線分に含まれるリップルは、周波数スイープによるON/OFFが温度変化として検出されたためであった。この二つの変化は外乱のため、将来的に2チャンネルのセンサにより差動し打ち消す考えである。

続いて、抗ヒト血清アルブミン抗体100 μg/mlを滴下し、表面の抗原との抗原抗体反応による速度変化と減衰変化を測定した。測定条件は抗体を含まない測定と同一とした。図9はR-SAW攪拌有無での抗原抗体反応による速度変化と減衰変化である。結果、速度変化と減衰変化が共に変化し、抗原抗体反応に伴う粘弾性変化を捉えることができた。図中の補正カーブは、図8での温度特性の影響を差動補正した速度変化であり、温度補正後もR-SAW攪拌により速度変化と減衰変化は増加し、その反応は抗体滴下直後から効果を示した。以上より、R-SAWによる音響ストリーミングの攪拌が免疫反応に高い効果を有することが確認でき、僅かな時間のR-SAWの入力が迅速な検出を可能にできると示された。

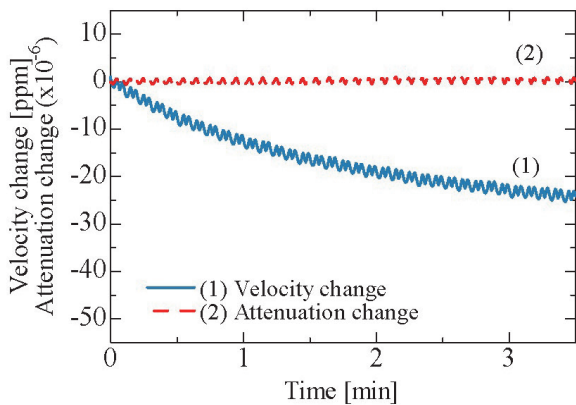


図8 反応を伴わないSH-SAWの速度変化及び減衰変化の測定

Fig.8 Measured velocity changes and attenuation changes of SH-SAW without reaction events

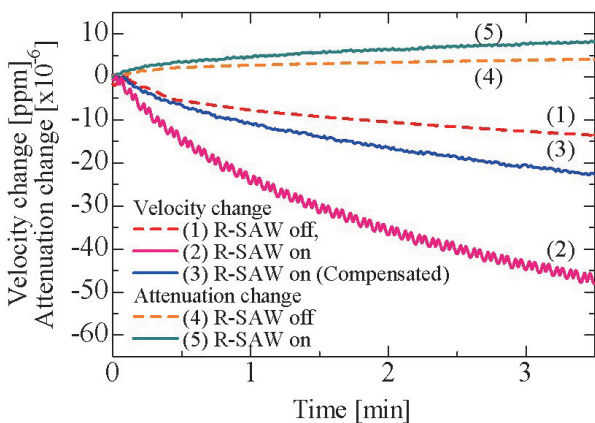


図9 R-SAW有無での抗原抗体反応によるSH-SAWの速度変化及び減衰変化

Fig.9 Velocity change and attenuation change of SH-SAW due to antibody-antigen binding event with and without R-SAW

6. あとがき

一つの入力IDTでR-SAWとSH-SAWを励振可能なX 148-Y LiTaO₃基板によるバイオセンサを構成し、免疫反応の反応促進を検討した。本基板上のSH-SAWは、水晶に比べて感度が劣り高感度化が必要と判明した。R-SAWによる音響ストリーミングは、温度変化による外乱は課題であるが、センシングエリア上で効率よく溶液を攪拌可能であることが確認された。R-SAWによる音響ストリーミング中での免疫反応は、抗原抗体反応に伴う速度変化と減衰変化を滴下直後から増加し、音響ストリーミングによる攪拌の免疫反応促進の効果を確認した。

今後、本成果を組み合わせたSAWバイオセンサによって、POCTに要求される高感度検出や迅速検出を目指し、開発を進めていく計画である。

謝辞

本研究は静岡大学博士論文の研究⁽⁸⁾での成果であり、静岡大学創造科学技術大学院、近藤淳教授に多大なるご協力を頂きました。深く感謝いたします。

参考文献

- (1) 今井博久, “2025年問題とは何か：公衆衛生が直面する問題の諸相.” 保健医療科学65 (2016) : 2-8.
- (2) T. Kogai, et al. “Liquid-phase shear horizontal surface acoustic wave immunosensor.” Japanese Journal of Applied Physics 49.7S (2010) : 07HD15.
- (3) 谷津田博美, et al. “POCT用 SH-SAWバイオセンサの開発.” 日本無線技報64 (2013) : 41-45.
- (4) 後藤幹博, and 谷津田博美. “SH-SAWバイオセンサの数値解析.” 日本無線技報68 (2017) : 36-39.
- (5) 塩川祥子, and 近藤淳. “SAWストリーミングの研究: SAWによる液体流動・飛翔・霧化・発熱.” 信学技報, IEICE Technical Report US2008-66 (2008) : 29-34.
- (6) K. Hashimoto, and M. Yamaguchi. “Non-leaky, piezoelectric, quasi-shear-horizontal type SAW on X-cut LiTaO₃.” Ultrasonics Symposium, 1988. Proceedings., IEEE 1988: 97.
- (7) T. Kogai, H. Yatsuda, and J. Kondoh. “Rayleigh SAW-Assisted SH-SAW Immunosensor on X-Cut 148-Y LiTaO₃.” IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control 64.9 (2017) : 1375-1381.
- (8) 小貝崇, “音響ストリーミングによる免疫反応促進効果を利用した弾性表面波バイオセンサの研究” 静岡大学博士論文, 2018.

用語一覧

POCT : Point-of-Care Testing (臨床現場即時検査)
 SH-SAW : Shear horizontal- Surface Acoustic Wave (横波型弾性表面波)
 R-SAW : Rayleigh Surface Acoustic Wave (レイリー弾性表面波)
 IDT : Interdigital transducer (すだれ状電極)
 PFA : Power flow angle (パワーフロー角)
 HSA : Human Serum Albumin (ヒト血清アルブミン)