

第27回センシングフォーラム 投稿原稿

テーマ：マイクロピペットの管理方法に関する提案

(英題：The proposal for a control method
of micropipette)

発表者：(株) エー・アンド・ディ 第1設計開発本部

出雲直人、香川貴昭、深見雄二

主催：SICE (社) 計測自動制御学会計測部門

協賛：応用物理学会、次世代センサ協議会、

センシング技術応用研究会、電子情報通信学会、

電気学会、日本機械学会、精密工学会、他

期日：2010年9月27日(月)、28日(火)

会場：群馬大学・桐生キャンパス

(群馬県桐生市)

マイクロピペットの管理方法に関する提案 リーク量と吐出量の相関について

(株)エー・アンド・デイ 第一設計開発本部 出雲直人 ○香川貴昭 深見雄二

The proposal for a control method of micropipette The relationship between a leakage of micropipette and its discharge rate

Naoto Izumo, Takaaki Kagawa, Yuuji Fukami A&D Company Limited

Higashi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170-0013 Japan

Abstract

Micropipettes (hereinafter called pipettes) are heavily used in various analytic research fields including medical practices fields. Meanwhile, methods of management for pipettes are yet to be established despite their importance as sampling devices. In this report the methods of regular management for pipettes are studied, and one adequate means for measuring and managing pipettes on site is proposed.

Keyword

Leak tester, Volume accuracy tester, Onsite measurement

1) はじめに

マイクロピペットは微小な定容量液体を分注する機器となります。特に臨床試験、製薬・バイオ関連や食品の研究開発、環境分析、化学実験など広範な分野で、手動によるサンプリング機器として使われています。マイクロピペット(以降ピペットと表記)は約50年前に欧州で開発され、医業の進歩に大きく貢献し現在では上記研究開発分野において、なくてはならない機器として認識されるに至っています。

ピペットはピストンとシリンダーにより構成された空間の圧力変動により、液体を吸引&排出する機能を持ちますが、使用環境や操作条件により、特に長時間を経ると内部のピストンシール、Oリング、ピストン軸などに摩耗、破損、腐食などが発生し、空気漏れが発生したり、分注量が不正確になる事があります。この為、ピペットの使用現場では、ピペットの基本性能として容量が正確に吐出できているのかが、品質管理上の大きな問題となっています。つまり、使用現場での日常点検が必要な機器と位置付けられています。特に海外規格 CAP : College of American Pathologists^[1] の認定を取得した臨床研究分野などでは、使用現場でのピペット管理手法を定める事 (SOP^[2] の確立) が規格の具体的要求事項になっており、臨床試験現場で発生するトラブルを未然に防ぎ、医療ミスなどの潜在的脅威をいかに低減し管理していくかが、今後の業界の重要課題と位置付けられています。

一方、ピペットの使用現場では、現在主に天びんを使用したピペット分注量の質量管理がなされています。しかし、ピペットは本来容量を決める機器となりますので、質量

ではなく容量で管理すべきとの指摘があります。そこで今回、重量法を利用した容量測定とピストン部からの空気のリーク量についての実験を行い、リーク量と容量の相関について検討しました。また、本実験結果から、より良いピペット管理のあるべき手法について考察し提案しました。

2) リーク量の測定原理

Fig.1にリークテスターの外観図を示します。リークテスターからの配管(チューブ)の先端にピペット用チップを装着し、最小 $2\mu\text{L}$ からのピペットをワンタッチで接続して約6秒でピストン部からの空気漏れのあり/なしを判定します。この機器ではポンプで発生した負圧を逆止弁を介してフィルターと継手を経由してピペットのチップ部に導入します。ピペットのピストン部構成要素に何らかの異常があれば、負圧が維持できず圧力容器に接続された圧力センサーに圧力変動が検出されます。

Fig.2にリークテスターの内部構造モデルを示します。空圧ポンプで発生した負圧は、逆止弁を介して圧力容器、圧力検出部とフィルターを経由してピペット側に印加されます。ピペットのピストン構成部に何らかの異常があれば、負圧が維持できず、圧力容器に接続された圧力センサーにおいて圧力変動が検出されます。



Fig. 1 リークテスター 外観図

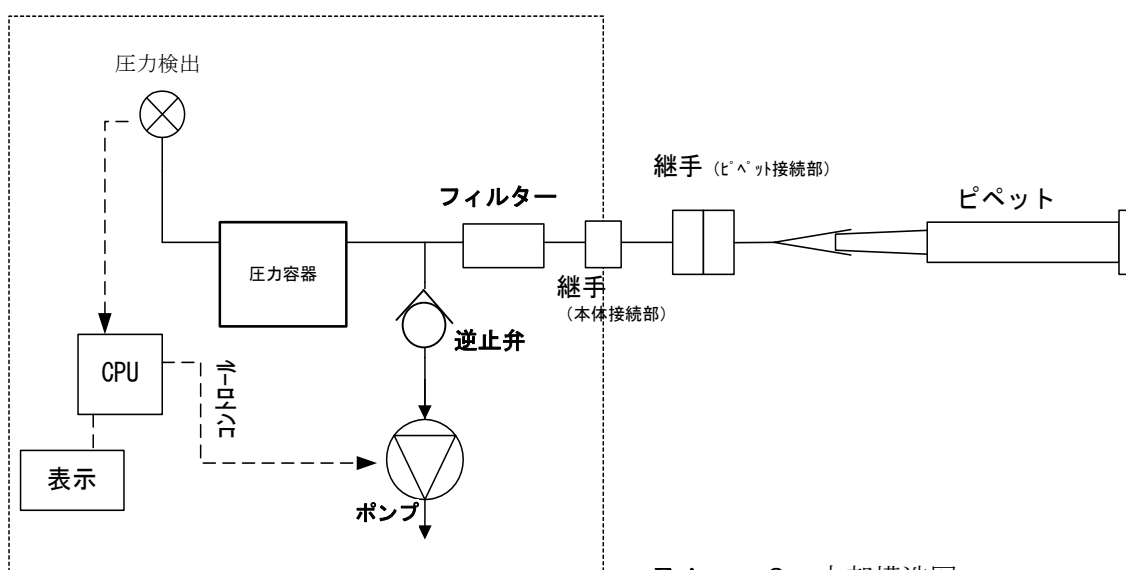


Fig. 2 内部構造図

このリークテスターの動作特性を **Fig.3** に表しました。一定時間ポンプが駆動し、その後ポンプが停止して逆止弁が作動するまで圧力は下がります。逆止弁作動後は配管内の温度変化に伴う圧力変動が2秒前後あり、その後圧力値が安定します。この時、接続されたピペットのピストン部からチップ先端までで構成されるピペット内部の圧力容器に、何らかの異常があれば、空気の漏れが発生して圧力変化として検出されます。

リークテスターの圧力変動グラフから、例えば圧力設定を負圧として -20 kPa 設定し、逆止弁作動後2～5秒の3秒間の圧力変動値を $+0.3\text{ kPa}$ 以下と規定する事で、ピペットのリーク量の規定値に対する合否判定を行う事ができます。

なお、負圧をピペットに印加するのは、リークテスター側からのコンタミネーションの問題がピペット側に影響しないよう配慮した結果となります。

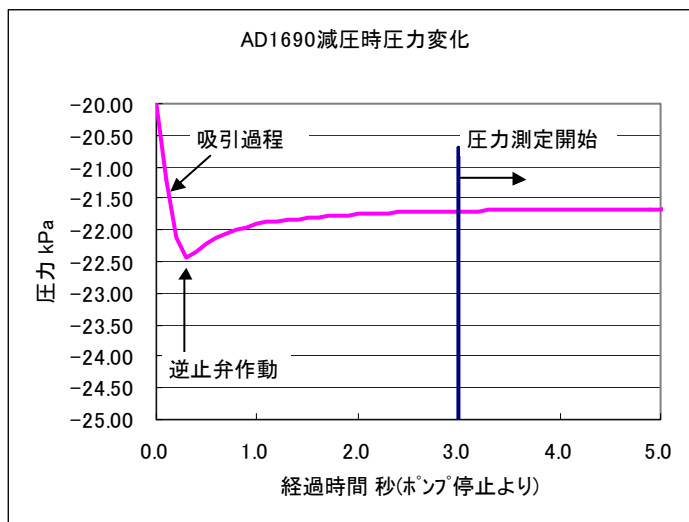


Fig. 3 動作特性

3) 測定方法と実験結果について

リーク量を定量化するのは簡単ではありません。そこで実験では、 $\phi 4\text{ mm}$ のナイロン製平ワッシャーに傷を付けたサンプルを作り、ピストンシール部に装着しました。実験ではギルソン社製 P-200 (容量 $50\sim 200\ \mu\text{L}$) の新品ピペットのピストン部に作った平ワッシャーを繰り返し装着しました。使用した平ワッシャーは **Fig.4** の写真にある3種類として傷(スリット)の本数を2、3、5本と変化させ、リーク量を圧力変化で規定しました。

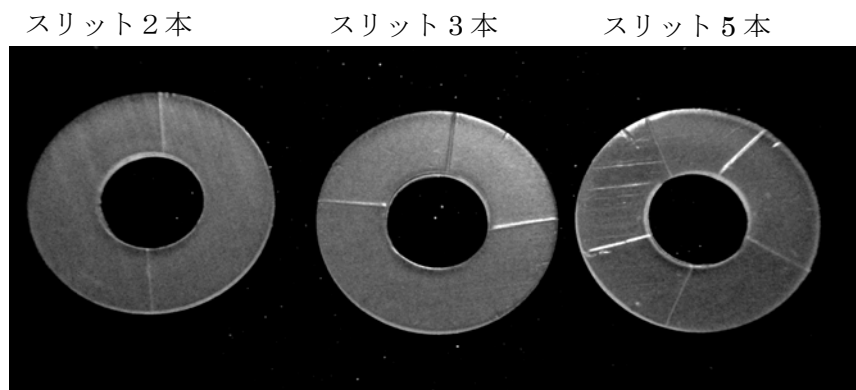


Fig. 4 平ワッシャーサンプル

その結果を Table.1 にまとめました。3種類の平ワッシャーを装着したピペットに負圧 20 k Pa を印加して、それぞれ 10 秒間で +0.4、+0.9、+1.4 k Pa のリーク量(圧力変化)が確認されました。また、3種類それぞれの条件下で 200、100、50 μ L の設定でリーク量と吐出容量を測定した結果を Fig. 5, 6, 7 に示します。

	傷本数	リーク量 kPa
Normal	0	0.00
LEAK1	2	0.39
LEAK2	3	0.86
LEAK3	5	1.40

Table.1 傷本数とリーク量

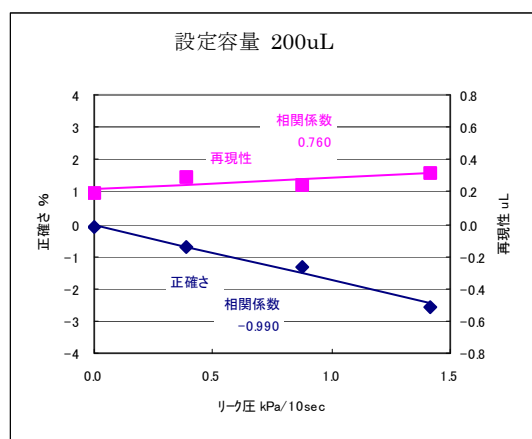


Fig. 5 リーク量と吐出結果

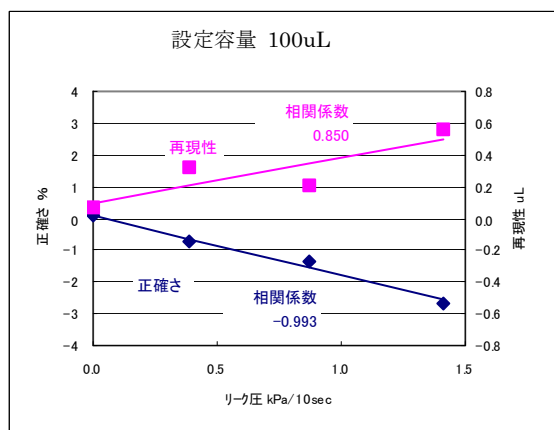


Fig. 6 リーク量と吐出結果(100uL)

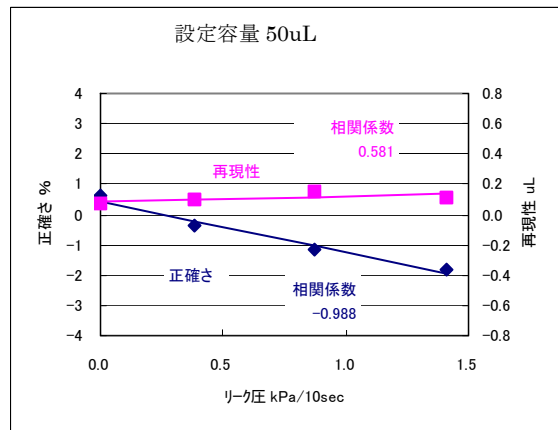


Fig. 7 リーク量と吐出結果(50uL)

このグラフでは横軸にピペットのピストン部で発生する漏れによる圧力変化(4点)と、縦軸左側には設定された容量に対すピペット分注量の正確さと、縦軸右側には同様に分注量の再現性を表しています。リーク量と正確さには、いずれも係数 0.9 以上となる強い相関のある事が確認されました。この事から、リーク量が多いと正確な分注ができない事が、数値レベルで始めて明らかになりました。

なお、正確さと再現性の測定方法については、重量法による容量測定を行っており、その手法については、ISO8655^[3] または、第 26 回センシングフォーラム 『容量計測に関する不確かさの推定』^[4] を参照願います。

4) 結論とまとめ

- ピペットピストン部からの空気漏れ(リーク)を容易に確認できる機器を製作しユーザーのピペット使用現場で利用できる商品化を行いました。
- 過去、ピペットピストン部からの空気漏れ確認は、吸引した液体の落下を時間をかけて待つ方法しかありませんでした。しかし、この機器を利用してピペットピストン部に印加した負圧を保持し、保持している間の圧力変化を測定する事でマイクロピペットの簡便なリークテストが可能になりました。
- このリークテスターを利用して新品となるピペットのピストン部に故意に漏れを設定すると、リーク量と分注量の正確さ、再現性には相関のある事が確認されました。
- 本報告による手法がピペットの使用可否判断を可能とする妥当な機器である事が実験レベルで証明されました。しかし、ピペットの使用現場では、人による操作の不安定を含め多くの確定し難い不良要因があります。
- この不良要因は、例えば長期の使用による容量調整ネジ部の磨耗、リターンスプリングのヘタリや汚染によるピストンへのOリングの貼りつきなどにより発生します。
- 上記原因では、漏れは発生しませんが調整した容量は不正確になる可能性があります。
- この為、ピペットはリークテスターによる簡易検査と重量法を利用した正確な吐出容量測定との2段階で管理される必要があると判断されます。

参考文献・資料

- [1] CAP : College of American Pathologists (米国臨床病理医協会の認定システム)
- [2] SOP : Standard Operation Procedures (医業における標準作業の手順を言います)
- [3] ISO8655 : ピペットに関する国際規格、ピペットから排出される容積を測定する手段として質量から容量を求める重量法とピペットから排出される試薬の量を色の濃淡から測定する色差法が提案されています
- [4] 『容量計側に関する不確かさの推定』第26回センシングフォーラム 2009.09.28
(株)エー・アンド・デイ 第1設計開発本部