

血液検査用マイクロ流体デバイスの作製

寺田 信幸*・山田 博之**・吉田 善一*

Development of a Micro-fluid Device for Blood Tests

Nobuyuki TERADA,* Hiroyuki YAMADA** and Yoshikazu YOSHIDA*

Abstract Many studies have been carried out in order to understand the real effects of space environment on the human body. Our aim is to create a very small, energy-saving vital signs monitoring device capable of facilitating simple and precise blood tests in an orbiting vehicle where harsh technical conditions experienced. The device also has the potential to be used portable and ubiquitous diagnostics systems for medical care at home or bedside. In this study, we developed a micro-fluid device using laser-processing and resin-lamination methods. A number of heat-hardening resin films are layered on a soda glass. A laser is used to fabricate part of the channel on each film for every lamination. The channels are 45 μm in depth and 50-150 μm in width. The components we have currently produced were: 1) a trident channel structure; 2) a solid-body flow channel with a micro-pipe, both of which were designed to make blood cells flow in a single line in the channel for cell counting; and 3) a micro-flow channel simulating a capillary vessel for measuring blood coagulation, platelet aggregation, and transformation of red blood cells. We have successfully observed blood cells flowing in these micro-fluid devices.

Keywords: μTAS , UV laser, lamination, resin-films, blood cells.

1. はじめに

微小重力下において血液の主要成分である赤血球は変形する。一般に赤血球の90%は両凹平円盤形であるが、微小重力下では一部が金平糖状、ボール状に変形することが知られている[1]。また、宇宙滞在4日以内に赤血球の数が減少する[2]。さらに長期宇宙滞在においては、免疫能が低下すると言われている[3]。しかしながら、その機序や定量的な評価については、宇宙環境下での分析には限界がありデータが乏しく、実体を把握しているとは言い難い。

一方、流体試料の注入、混合、攪拌、反応、分離、抽出を行う機構部品や、流路、溜池などの流体分析に必要な要素を小型・集積化した micro total analysis system (μTAS) というマイクロ流体素子が近頃注目されている。 μTAS の実用化は宇宙環境下の厳しい制約条件の中で簡単かつ正確な血液検査を可能とする。さらに、超小型、省電力な生体情報モニターとして、ベッドサイドや在宅などで使える携

帯型ユビキタス医療診断システムとしての展開も可能である。

μTAS の流路は、幅数~数百 μm 、深さ数~数十 μm である。その作製には、半導体プロセスを応用しシリコンまたは石英基板に形成する方法、樹脂成形でプラスチック基板に形成する方法[4]、レーザによる樹脂の直接加工法[5]などが報告されている。今回、UV レーザ加工と樹脂ラミネート法を用いてマイクロ流体デバイスの作製を試みた。今回作製したマイクロ流体デバイスは、血球を一列に並べて流し血球をカウントするための三叉構造の流路、小径パイプを挿入した立体構造の流路、赤血球変形能、血小板凝集機能、血液凝固機能を測定することを目的とした擬似血管流路などである。それぞれに血液を流し、血球の状態を観察することに成功したので報告する。

2. 方 法

三叉構造及び小径パイプを挿入した立体構造の流路のレーザ加工には Exitech 社製のエキシマレーザ加工機 PS2000 (発振機: Lambda Physik 社製 LPX200i) を用いた。加工条件は波長 248 nm, 発振周波数 100 Hz, パルス幅 20 ns, 発振エネルギー 150 mJ とした。擬似血管流路のレーザ加工には、パルス Nd:YAG レーザ (Quantel 社製 Brilliant) を用い、加工条件は波長 266 nm, パルスエネルギー 3.1 mJ, パルス幅 4.3 ns, 繰り返し数毎秒 10 回とした。基

生体医工学シンポジウム 2005 発表 (2005 年 9 月, 大阪)

2005 年 8 月 9 日受付, 2005 年 11 月 1 日改訂

Received August 9, 2005; revised November 1, 2005.

* 東洋大学工学部機能ロボティクス学科

Department of Engineering, Toyo University

** 山梨県工業技術センター高度技術開発部

Yamanashi Industrial Technology Center

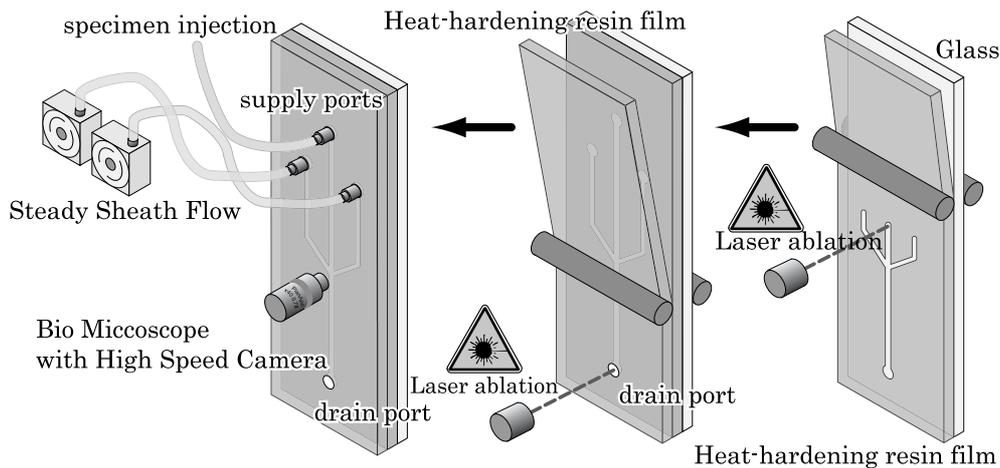


図 1 マイクロ流体デバイス作製プロセス
 Fig. 1 Micro fluidic device production process.

板の置いてある XY ステージを動かすことによって加工を行った。また、レンズの焦点距離は 45 mm で、ビームの直径は焦点位置で $\phi 30 \mu\text{m}$ 以下である。

図 1 にマイクロ流体デバイスの作製プロセスを示した。はじめにガラス基板に熱硬化性樹脂フィルムをラミネート接着し、レーザ加工により樹脂部分に微細溝や微小穴を形成する。基板には Matsunami 製カバーガラス (硼珪酸ガラス, $24 \times 60 \times 0.23 \text{ mm}$) またはスライドガラス (ソーダガラス, $76 \times 26 \times 1 \text{ mm}$) を用いた。熱硬化性樹脂フィルムには厚さ $25 \mu\text{m}$ のポリイミドを用い、厚さ $20 \mu\text{m}$ のエポキシ系接着層も含めたラミネートフィルム (Nikanflex, ニッカン工業) の総厚さは $45 \mu\text{m}$ である。多層化させる場合は、さらに樹脂フィルムをラミネート接着しレーザ加工により微細溝を形成する。最後に樹脂フィルムをラミネート接着することによりそれらを覆い送液用のチューブを接着する。

送液実験にはシリンジポンプを用い、流れの観察は光学顕微鏡 (Olympus BX50) と高速度ビデオカメラ (PHOTRON FASTCAM-MAX) を用いた。

3. 結 果

3・1 三又流路の作製と血液送液実験

上記の条件をもとに加工した溝幅 $50 \sim 150 \mu\text{m}$ の三又構造微細溝の電子顕微鏡観察写真を図 2 に示した。比較的良好な加工形状と面粗さの微細溝が得られた。この細溝面にもう一層樹脂フィルムをラミネートし、流路の出入り口に外径 1 mm, 内径 0.5 mm のシリコンチューブを接着してマイクロ流体デバイスを作製した。

三又構造の中央の流路に血液を流し、両側の流路に生理食塩水を流した。試料がシース液に包まれた状態で流れるシースフローの現象を利用して血液の流れ幅を変化させる実験を試みた。光学顕微鏡と高速度ビデオカメラを用いて

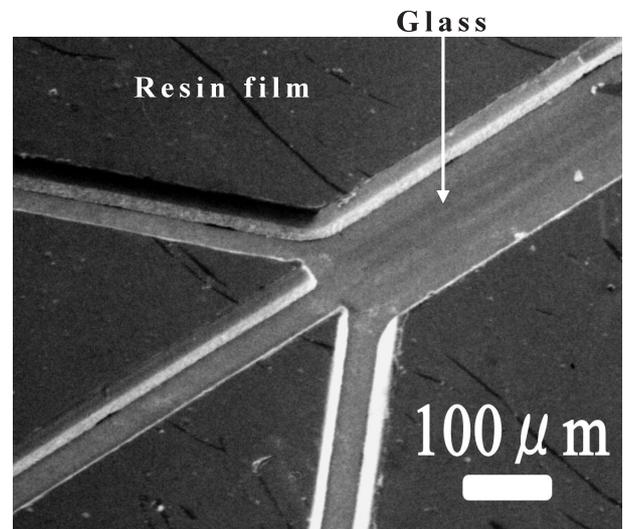


図 2 三又構造の溝加工の走査電顕像
 Fig. 2 SEM side view of three-pronged grooves without a cover film.

観察した結果を図 3 及び図 4 に示した。両側の流路の圧力を高くすることにより図 3 に示すように血液の流れ幅が絞られ、三又流路の合流位置から数 mm 離れた下流位置では図 4 に示すように赤血球が一列に並んだ状態で流れることが確認できた。ただし、血液は上下の流れ幅もあり、流路底面を転がるように流れる血球も観察された。

3・2 小径パイプ流路の作製と血液送液実験

血液と生理食塩水の合流部において血液の流れの全周を生理食塩水のシースフローで覆うことを目的として、小径パイプを挿入した立体流路を作製した。パイプは外径 $\phi 100 \mu\text{m}$, 内径 $\phi 30 \mu\text{m}$, 長さ 5 mm の銅パイプを用い、ラミネートフィルムを積層してレーザ加工した流路の中央に銅パイプを取り付けた構造とした。図 5 は 4 層と 5 層のラミネートを行う前の 3 層目までの構造を走査電子顕微鏡で

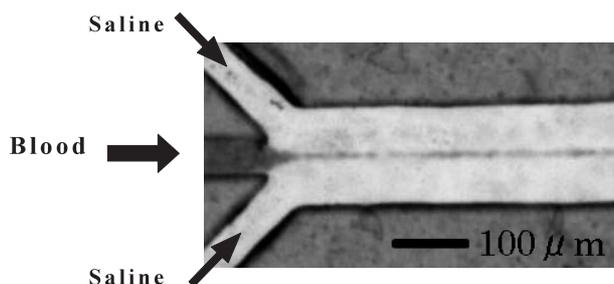


図3 三又流路における血液の流れ
矢印は流れの方向を示している。血液は中央を流れ、両側を生理食塩水が流れる。

Fig. 3 Blood stream in a three-pronged channel.
Each arrow shows a direction of flow. Blood is flowing from the center, and saline is flowing from both sides.

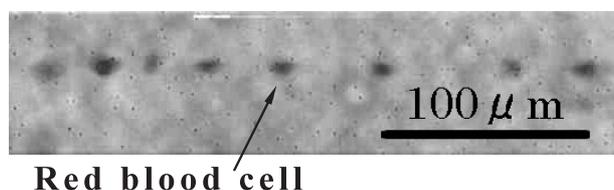


図4 下流における血球の流れ
Fig. 4 The flow of blood downstream.

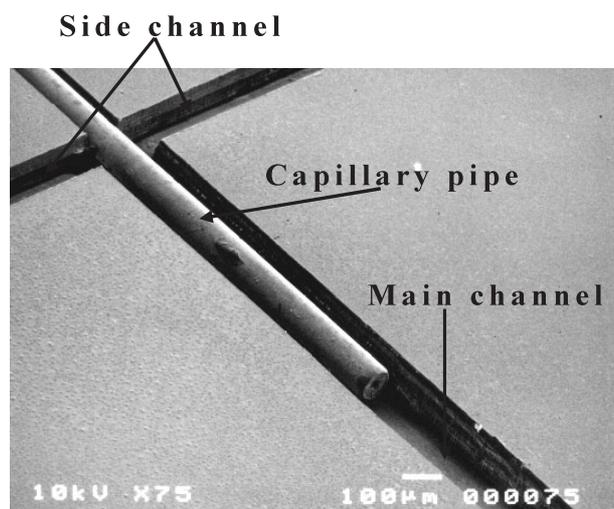


図5 小径パイプを挿入した流路
Fig. 5 Side view micrograph of grooves inserted into a capillary pipe

観察した写真である。比較的良好な加工形状と加工面粗さが得られている。

次に、マイクロ流体デバイスを作製し、パイプに血液を流し、サイドチャネルの両側からメインチャネルに生理食塩水を流した。内径 $\phi 30 \mu\text{m}$ のパイプの中に血液を流すことができ、生理食塩水と合流する流路に吐出することができた。さらに、生理食塩水の圧力を高くすることにより図6に示すように血液の流れ幅が絞られ、赤血球が一列に並んだ状態で流れることが確認できた。下流では全ての血球

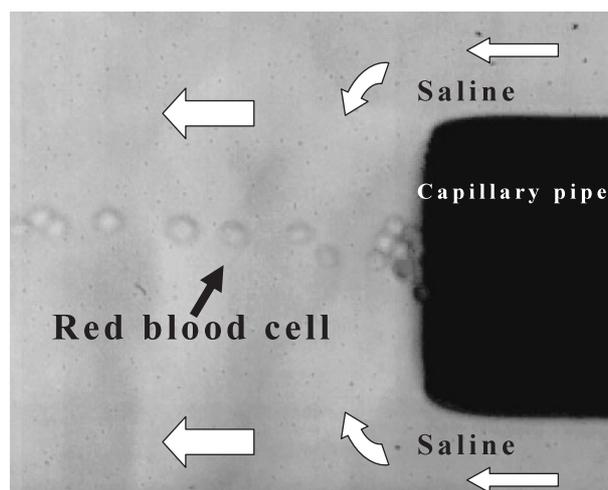


図6 小径パイプ流路における血液の流れ
矢印は流れの方向を示している。血液は小径パイプの内側から流れ出て、生理食塩水は小径パイプの周囲から流れ出る。

Fig. 6 Blood stream from a micro-pipe in a flow channel.
Each arrow shows a direction of flow. Blood is flowing from inside the capillary pipe, and saline is flowing from the periphery of the capillary pipe.

が同一速度で流れており、血液の上下の流れ幅や流路底面を転がるように流れる血球もないことがわかった。また、血液と生理食塩水の合流部分において、血球の流れが生理食塩水によって全周から絞られ、血球が一列に並んでいく状態が確認できた。

3・3 擬似血管流路の作製と血液送液実験

図7に擬似血管流路の概略図を示した。基板にはソーダガラスを用い、1層目は長方形流路、2・3層目は擬似血管流路と出口、4層目は台形流路と出口、5層目は入り口・出口となっている。血液は5層目の入り口から流入し、4層目を経由して3層目・2層目の擬似血管としての小孔に流入する。小孔を通り抜けた血液は1層目から2層目3層目4層目の出口流路を通り5層目の出口に向かう。各層ごとにレーザーで加工し、ラミネートフィルムを多層化していくことにより擬似血管流路を作製した。レーザー入射側の穴の直径は $18 \mu\text{m}$ で、ラミネートフィルムの厚さは $90 \mu\text{m}$ 、1パルス当たりのレーザー出力は 1 mJ である。レーザー出射側の穴の直径は $12 \mu\text{m}$ である。レーザー加工の際に、穴の周りにデブリやヒビ等の影響が少しあったが、送液や観察には問題がなく、比較的きれいな円形の穴を作製することができた。この条件では、穴のサイズに対する熱影響が少ないと考えられる。

送液が可能かを確認するために、まず生理食塩水を用いて送液実験を行った。ラミネートフィルムの穴あけ加工にレーザーを用いることで、径、長さ、形状を自由に変えることができ、擬似血管流路の1つ1つの穴を検査に適した擬似血管として形成することが可能である。送液実験による

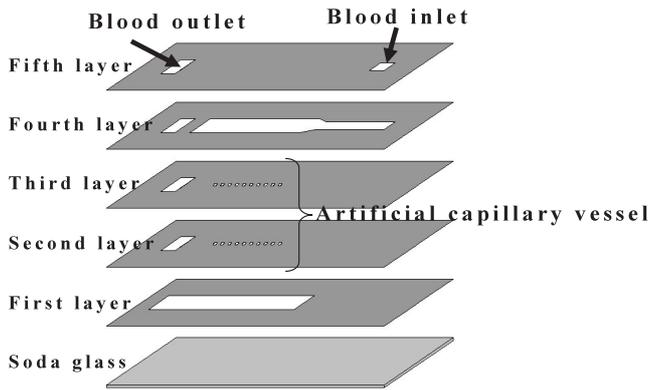


図 7 擬似血管流路の概略図

Fig. 7 Schematic diagram of a micro-flow channel simulating a capillary vessel.

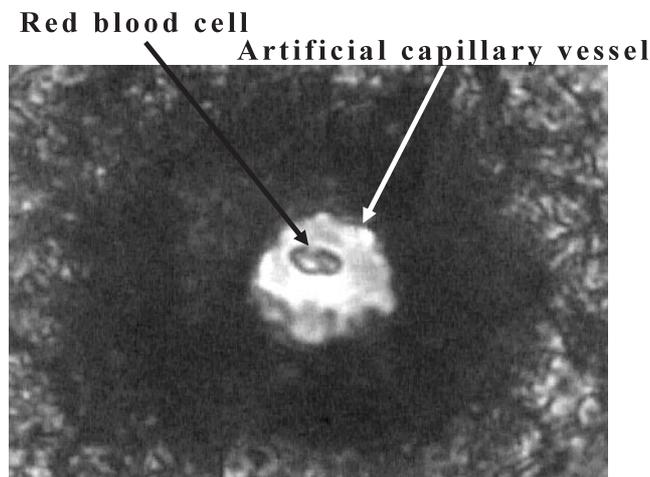


図 8 擬似血管内を通る赤血球

Fig. 8 Red cells passing through an artificial capillary vessel.

チャンネルへのダメージは発生しなかった。また、チャンネル内に発生する気泡は気泡溜めの作製により、送液が止まらないようにしたため、スムーズに送液することができた。

赤血球は直径 $8\ \mu\text{m}$ の両凹円盤形状で厚さが $1\sim 2\ \mu\text{m}$ であることから観察を考慮し、約 $\phi 20\ \mu\text{m}$ ・長さ $45\ \mu\text{m}$ の擬似血管を使用して、通過する赤血球の状態を観察した。図 8 は擬似血管内を流れる赤血球を観察した結果で、顕微鏡を通してビデオで撮影した。流量 $10\ \mu\text{L}/\text{min}$ の場合、血球は約 5 個/s で流れており、2 個ずつや重なって流れている様子が観察された。流量残留圧では、血球は約 2 個/s で流れており、血球が穴の中心を 1 個ずつ流れている様子及び変形する様子を観察することができた。

4. 考 察

生体を構成する全ての細胞は、血液が循環することにより生かされている。血液循環は様々な要因により調節され、生体はその恒常性を維持している。赤血球は血液全体の 40% から 45% を占め、その性状変化は生体の恒常性維持

に大きく影響する。近年、赤血球膜の水チャンネルの発見、酸素分子解離能の高い赤血球の発見、赤血球を用いた薬物運搬とがん治療など、赤血球に関する新たな研究が開発されている。赤血球の物理的・化学的性状変化を網羅的に把握することは、糖尿病、心筋梗塞、脳血管障害など生活習慣病の予防、治療に不可欠である。しかしながら、その測定には、大掛かりな装置や高度な手技が必要とされ、日常的な計測は困難である。血液に関して日常的に行われる主な検査としては、赤血球数、白血球数、血小板数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度などを測定する血球計測が行われる。

今回我々は、超小型、省電力な生体情報モニターを開発する基礎的検討として、UV レーザ加工と樹脂ラミネート法を用いて、三叉構造の流路、小径パイプを挿入した立体構造の流路、擬似血管流路の 3 種類のマイクロ流体デバイスの作製を試みた。それぞれに血液を流し、血球の状態を観察することに成功した。その結果、三叉構造の流路から発展させた小径パイプを挿入した立体構造の流路は、血球を一列に並べて流すことが可能で、血球をカウントする装置に最適であることが明らかとなった。この立体流路と微小パイプを組み合わせたデバイスは、血液流の全周を生理食塩水などの還流液が包み込み、層流を形成する。シーズ流は血液を流路壁面から浮かせ、細いビーム状に絞り込むため、流路壁面の影響や重力の方向・大きさの影響を受けにくい。これは宇宙微小重力下における血液検査システムを構築する上で重要な意味を持つ。また、在宅医療やベッドサイドで使用するポータブルタイプの血液検査システムにおいても、設置方向を一定に保つことが難しく、重力の方向の影響を受けにくいという特徴は大きなメリットとなる。

さらに、個々の血球に対する特定光の透過、吸収、散乱の度合いを可能な限り高分解能・高感度で検出できれば、数のカウントは無論のこと、個々の血球内の物質分析や形状解析までが可能となる。そのためには、極近傍まで光源を持っていき、散乱や吸収などの微弱光変化をその近傍で捕らえる必要がある。光ファイバや埋め込み型の光導波路にレーザで微細な穴もしくは溝加工を施し流路形成することは可能で、血液をファイバ内部に流し込みそのときの血球形状、計数、内物質の観測を一本または複数本のレーザビームで計測することができる。今回得られた成果は新たな検査・診断方法開発に繋がることが予想される。

赤血球変形機能の測定は糖尿病、循環器疾患の予防・診断・治療に有用な情報をもたらすと考えられているが、未だ測定法が確立されていない。血液凝固機能測定、血小板凝集機能測定も、脳梗塞、心筋梗塞などの血栓症の治療・予防に不可欠である。これら検査の多くは病院の臨床検査部や臨床検査センターに送られ測定されている。近年の生活習慣病の急増に伴い、これら検査がベッドサイドや在宅

などで行える小型、軽量で、取り扱いが簡単で、経費が安価な装置の開発が望まれている。

今回作製した擬似血管流路は、観察を考慮し約 $\phi 20 \sim 12 \mu\text{m}$ ・長さ $45 \mu\text{m}$ の流路としたが、さらに細い流路とすることが可能であり、 $\phi 10 \mu\text{m}$ 以下の擬似毛細血管として赤血球変形能の計測装置に発展させたいと考えている。1つのデバイス内に径の異なる多数の流路を作成することによって、赤血球変形能の観察と血管内血栓形成の観察など複数の検査を同時に行うことも可能である。また、ATカット水晶振動子との組み合わせや流路内のずり応力荷重による血小板凝集機能測定装置としても展開できる。

しかしながら、流路を形成するラミネート樹脂の材質については検討を要する。今回はレーザー加工が容易なポリイミドフィルムを用いたが、血液凝固機能、血小板凝集機能に対する影響や血液成分との相互作用が少ない材質を選択する必要がある。現在、血液成分との反応性が低いテフロン系樹脂シートを用い、接着剤を使用することなく熱圧着のみでの流路作製に取り組んでいる。

5. おわりに

UVレーザー加工と樹脂ラミネート法を用いて、血液検査装置の構成要素となる3種類のマイクロ流体デバイスを作製し、それぞれに血液を流し血球の観察を行った。得られた結果は、以下のとおりである。

- (1) 三又構造の流路を持つマイクロ流体デバイスを作製し、血液送液実験を行った結果、血液の流れ幅を絞ることができ血球を並べて流すことができた。
- (2) 外径 $\phi 100 \mu\text{m}$ 、内径 $\phi 30 \mu\text{m}$ の小径パイプを挿入した立体流路を持つマイクロ流体デバイスを作製し、血液送液実験を行った結果、血球を一直線に1個ずつ並べて流すことができた。
- (3) 擬似血管流路を持つマイクロ流体デバイスを作製し、血液送液実験を行った結果、直径 $12 \mu\text{m}$ の擬似血管に赤血球を流すことができ、赤血球の変形状態が観察できた。

以上の結果から、これらの流路は血液検査用 μTAS に適用可能であることが見出せた。今後、様々な検出システムとの組み合わせを検討し、携帯型ユビキタス医療診断システムの構築、さらには、新たな検査・診断方法開発に繋げたいと考えている。

文 献

1. 加藤恒生, 秋山真一郎: 血液・免疫, 宇宙医学・生理学. 社会保険出版, 東京, 1998, pp. 119-126.
2. Tavassoli M: Anemia of space. Blood. **60** (5): 1059-1067, 1982.
3. Taylor GR, Neale LS, Dardano BS: Immunological analyses of U. S. Space Shuttle crewmembers. Aviat Space Environ Med. **57**: 213-217, 1986.
4. 平尾一之: 基礎から学ぶナノテクノロジー. 東京化学同人, 東京, 2003, pp. 197-222.
5. Yoshida Y: 3-D Micro channels in laminated resins by UV laser ablation. Proc SPIE. 5063: 189-192, 2003.

寺田 信幸 (テラダ ノブユキ)

現職：東洋大学工学部機能ロボティクス学科教授。医学博士。専門分野：環境生理学・生体医工学・宇宙医学。1976年東邦大学理学部生物学科卒業，信州大学医学部附属病院，国立循環器病センター，山梨医科大学生理学講座，山梨大学総合分析実験センターを経て，2005年4月より現職。



所属学会：日本生理学会（評議委員），日本自律神経学会（評議委員），日本宇宙航空環境医学会（評議委員），日本宇宙生物科学会（評議委員），日本分析化学会，日本生体医工学会，日本医療情報学会。

山田 博之 (ヤマダ ヒロユキ)

平成6年3月山梨大学大学院工学研究科修了。平成11年4月山梨県工業技術センター技術第3部配属。現在，同センター高度技術開発部高微細加工科研究員。専門研究分野：マイクロ加工，CAE。



所属学会：精密工学会，レーザー加工学会。

吉田 善一 (ヨシダ ヨシカズ)

1982年に筑波大学物理工学科卒業。京都大学電子工学教室研究員。松下電器産業(株)生産技術研究所・中央研究所を経て，1995年より，山梨大学機械システム工学科助教授。2000年より，東洋大学機械工学科教授。工学博士。専門分野は，レーザー，プラズマ，マイクロマシン。研究テーマは，血液検査用マイクロ流体デバイス，医療用ナノカプセル，カーボンセラピー用イオン源。



所属学会は，精密工学会，応用物理学会，電気学会，レーザー協会。