

マイクロ流体デバイスの医療検査への応用

—血小板凝集機能検査システムの開発— (第1報)

山田 博之・阿部 治・西村 通喜・尾形 正岐・高尾 清利

The Application of Micro-Fluidic Device to Medical Test

- Development of Platelet Aggregation Testing System - (1st Report)

Hiroyuki YAMADA, Osamu ABE, Michiyoshi NISHIMURA, Masaki OGATA and Kiyotoshi TAKAO

要 約

近年、医療分野や化学分野では、分析機器の小型化とともに分析の高速化・人体負荷軽減などを考え微量試料による分析への要求が高まっており、現在、流体分析に必要な要素を小型・集積化したマイクロ流体デバイスに関する研究が行われている。本研究ではマイクロ流体デバイスを血小板凝集機能検査システムに応用するための基礎的な検討を行った。本報では、樹脂材料にマイクロ流路を形成するための微細溝を加工する技術と、作製したマイクロ流路へ液体を送液する方法について検討した。アクリル板に約 0.3mm の矩形断面形状の微細溝を切削加工でき、また、約 0.2mm の矩形断面形状のリブを有する微細転写加工用マイクロ金型を作製できた。一方、送液方法を検討した結果、流路寸法と流入状態との関係を明確に把握できなかつたため、流路終端部まで液体を充填することはできなかったが、毛細管現象と重力を利用して、流路へ液体を流入させることができた。

1. 緒 言

近年、医療分野や化学分野では、分析機器の小型化とともに分析の高速化・環境問題・人体負荷軽減などを考え微量試料による分析への要求が高まってきている。現在、流体試料の注入・混合・攪拌・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・集積化したマイクロ流体デバイスに関する研究が行われている。しかし、加工技術・マイクロ流体の特性・流体駆動方法・検出方法など実用化するには技術的に高度な問題も多く、現在までに実用化されている例は少ない。

一方、血小板凝集機能検査は血小板どうしが凝集する過程を評価する検査であり、血栓症リスクの評価や出血異常の原因評価や治療効果の評価などにおいて重要な検査である。また、抗凝固薬・抗凝集薬や凝固促進薬などが血小板凝集や血小板粘着にどのような作用や効果があるかを調べる研究がなされている。

そこで、本研究ではマイクロ流体デバイスを血小板凝集機能検査システムに応用するための基礎的な検討を行い、マイクロ流体デバイスを用いた検査システムを開発するための各種要素技術を提案することを目的とした。本報では、上記検査を目的としたマイクロ流路を形成するための微細溝を加工する技術を検討し、作製したマイクロ流路へ液体を送液する方法について検討したので報告する。

2. 実験方法

2-1 マイクロ流体デバイスの構成

本研究では、蛍光染色などの前処理された多血小板血漿を送液し、マイクロ流路壁面への血小板凝集や血小板粘着などを、デバイス内または外表面に配置した小型光源および小型受光機器によって検出する構成を考えた。マイクロ流路は、流路断面形状が矩形で寸法がおおよそ 0.1~2mm の範囲内で選択・設計し、一直線状の流路とした。材質は光学特性に優れた透明樹脂を用いることとした。送液方法は実用化への諸課題を考慮し、できるだけ単純な液体駆動方法と流量管理方法を目指した。そこで、本研究を遂行する上での初期構想として、図 1 に示すようなマイクロ流体デバイスの構成とした。

2-2 マイクロ流路の作製方法

樹脂材料にマイクロ流路を形成するための微細溝を加工する技術について検討した。マイクロ流体デバイスの研究開発における流路形状の検討や多品種少量デバイスの製造において、切削加工は流路設計の自由度が高く小ロット加工に適しているため、はじめに、切削加工による微細溝加工技術を検討した。次に、量産性やさらなる微細化をめざし熱転写加工による微細溝加工技術を検討した。

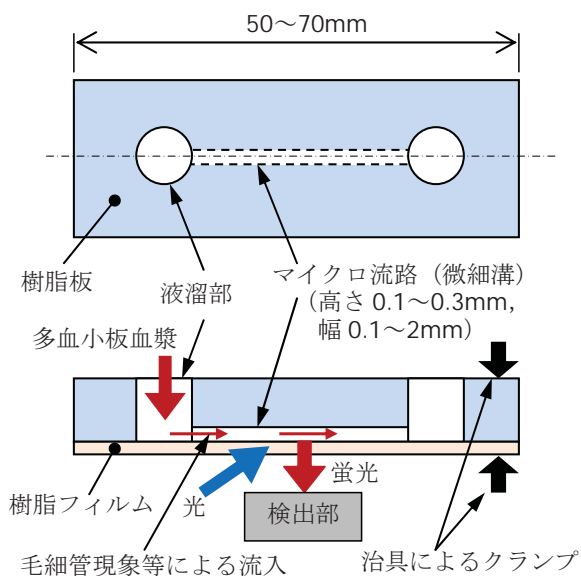


図1 マイクロ流体デバイスの構成の概略

切削加工の主な加工条件を表1に示す。マイクロ流体の流れにおいて流路の壁面状態、すなわち加工面の表面粗さが非常に重要であるため、仕上げ加工での切り込み量は小さく設定し、また、送り速度は表1に示す条件で変化させて加工実験を行った。

次に、熱転写加工を行うためのマイクロ金型の作製技術を検討した。本研究では図2に示すように、厚さ0.2mmのステンレス薄板を2つの金属ブロックで挟み込んで積層することによって微小リブを有するマイクロ金型を作製する方法とした。ワイヤー放電加工によって金属ブロックの切断およびステンレス薄板の切断を行った。さらに、金属ブロック表面、およびリブを形成するステンレス薄板の側面(幅0.2mmの面)をSiC研磨紙とダイヤモンド遊離砥粒を用いて研磨加工を行った。

表1 主な切削加工条件

切削加工機	(株) 牧野フライス製作所製 立型マシニングセンタ HYPER5
工具	樹脂用小径スクエアエンドミル (直径0.3mm)
被加工物	透明アクリル板
回転数	8000 rpm
切り込み(深さ)	仕上げ: 0.01 mm
切り込み(側面)	仕上げ: 0.02 mm
送り速度	50, 25, 10 mm/min

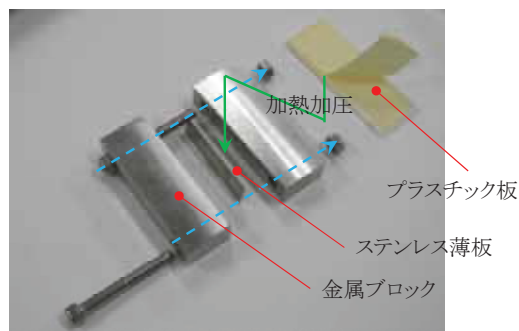


図2 転写用マイクロ金型の構成の概略

2-3 マイクロ流路への送液実験方法

本研究では、できるだけ単純な液体駆動方法で、かつ、できるだけ単純な構造で流量管理ができる方法を検討した。そこで、流路端部に液溜部分を設け、毛細管現象によってマイクロ流路内に液体を充填させる方法を試み、さらに、流入量はマイクロ流路内に液体が満たされる体積のみとすることによって流量を決定する方法が実現可能かを検討した。また、検査に使用する液体には、前処理された多血小板血漿を用いる予定であるが、本報では研究の初期段階であるため、利便性や送液実験を簡便に行えることからイオン交換水を使用し、観察しやすいように印刷用インクの赤色染料を用いて着色した液体(水)を使用した。

切削加工によってアクリル板に微細溝と液溜部分の貫通孔を加工し、その後、アクリル板と樹脂シートを2枚の板状の金属製治具で挟むことによって両者を密着させ、マイクロ流路を作製した。微細溝を覆う樹脂シートにはフッ素樹脂 PTFE とシリコーン材を用いた。流路断面形状は、高さを0.3mmとし、流路幅を0.3, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0mmとした5パターンのマイクロ流路を作製した。送液実験では、シリンジを用いて液溜部に液体を充填し、透明なアクリル板の外側からデジタルカメラで観察し撮影した。

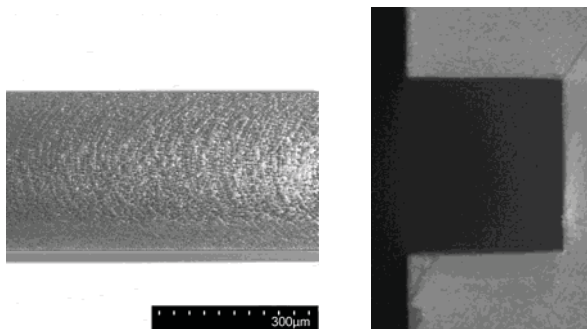
3. 結果および考察

3-1 マイクロ流路の作製技術

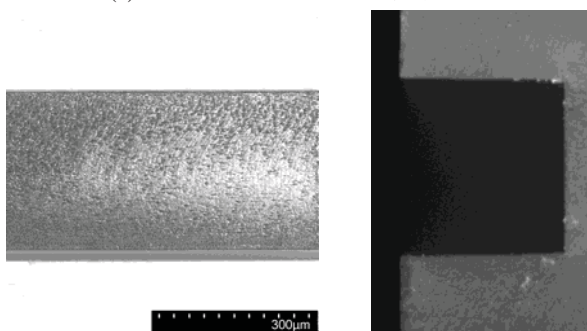
樹脂材料にマイクロ流路を形成するための微細溝を加工する技術について検討した。

はじめに、流路設計の自由度が高く小ロット加工に適しているため、切削加工によって微細溝を加工する条件を検討した。直径0.3mmの樹脂用小径スクエアエンドミルを用いて、アクリル板に幅0.32mmの微細溝を、送り速度を変えて加工した結果を図3に示す。溝上方(アクリル板の表面)へのバリが発生はほとんどなく、断面が矩形形状で角部分も比較的シャープな形状に加工できた。また、溝底面をはじめとする切削加工面は、送り速度が遅い方が表面状態が改善されることがわかった。さらに、加工面の表面

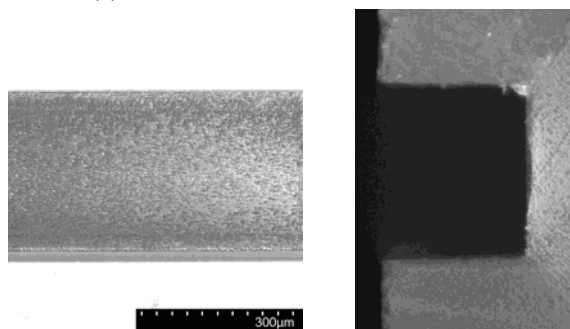
粗さの改善を目的に、アセトンや溶剤型接着剤（ジクロロメタン）の揮発によるアクリル製加工サンプルの表面処理を試みた。しかし、小さい傷などは鏡面化したが粗さが大きい部分の鏡面化は難しく、エッジ部のダレが発生してしまった。今後は流体への影響の検討および生産性やコスト等を考慮して送り速度などの各条件を決定・最適化していく必要があると考えられる。



(a) 送り速度 50mm/min の場合の加工例



(b) 送り速度 25mm/min の場合の加工例



(c) 送り速度 10mm/min の場合の加工例

図3 切削による微細溝加工部の顕微鏡観察結果
(左図：溝上方からの観察，右図：側方からの観察)

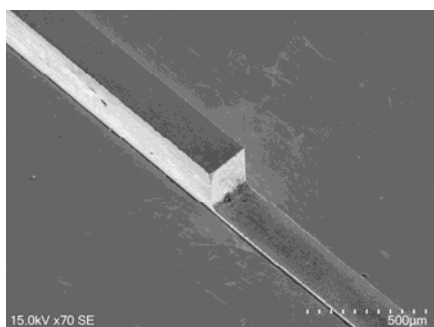


図4 微細転写加工用マイクロ金型の微小リブ部分

次に、量産加工に適しており比較的微細な加工も可能であるため、熱転写加工によって微細溝を加工する方法を検討した。図2に示すように、ステンレス薄板と金属ブロックを積層することによって幅 0.2mm、高さ約 0.2mm のリブを有するマイクロ金型を作製した。作製した微細転写加工用マイクロ金型のリブ部分を拡大観察した結果を図4に示す。転写加工によって流路底面を形成する金型リブ上面は鏡面に加工でき、角部分も比較的シャープな形状に加工することができた。今後は、作製したマイクロ金型を用い、樹脂板や樹脂フィルムへの微細転写加工条件を検討する予定である。

3-2 マイクロ流路への送液方法の検討

マイクロ流路に多血小板血漿を送液する方法として、外部ポンプ機器や送液用チューブを使用する場合ではシステム全体が大型化してしまう、またマイクロポンプ等を利用した流体駆動部分をマイクロ流体デバイス内に設ける送液方法では非常に複雑なデバイスが必要になる。そこで本研究では送液方法として流量も決定しやすいことから毛細管現象によるマイクロ流路への液体の充填について検討した。

流路断面形状の高さを 0.3mm とし、流路幅を 0.3, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0mm とした5パターンのマイクロ流路を切削加工によって作製した。切削加工の送り速度は、3-1 節で述べた検討結果をもとに 10mm/min とした。赤色染料で着色した水を液溜部に充填し、マイクロ流路への流入状態を調べた。微細溝を覆う樹脂シートにフッ素樹脂 PTFE を用いた場合、液溜部の液体はマイクロ流路内に全く流入しなかった。流路を形成する1面が撥水性であることが原因であると考えられる。次に、微細溝を覆う樹脂シートにシリコーン材を用い、送液実験を行った結果の例を図5に示す。流路の幅寸法が異なると流入状態が異なる結果となり、今回の実験結果のみでは幅寸法と流入状態との関係を明確に把握することはできなかった。また、流路終端部まで液体を充填することができなかった。一方、マイクロ流体デバイスにおける流路の下流側が上方になるように、マイクロ流体デバイス（チップ）を水平状態から 45° 傾斜させ、送液実験を行った結果の例を図6(a)に示す。デバイスが水平状態である図5の結果よりも流入長さが短いため、毛細管現象に加えて、液溜部や流路内の液体に加わる重力も影響していると推測される。この推測を確認するために、デバイスを水平状態に戻した場合、図6(b)に示すように、流路への流入が再度起こり流入長さが増加した。

今後は流路断面の幅寸法と高さ寸法の最適化を検討するとともに、液体に加わる重力の影響や壁面のぬれ性や液体の粘度なども考慮して毛細管現象を利用した送液方法を検討する予定である。

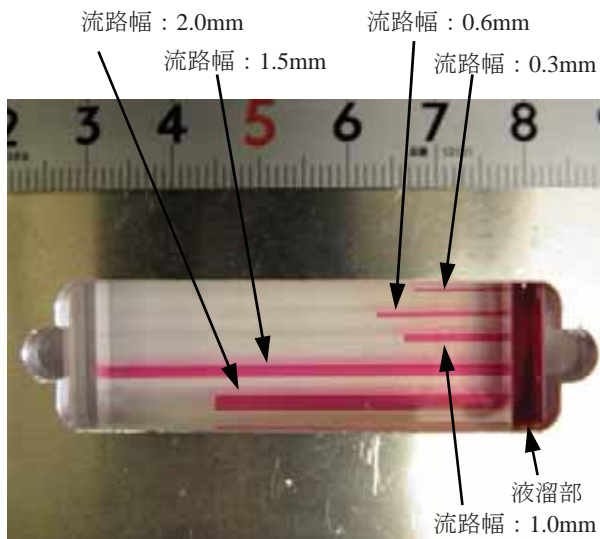
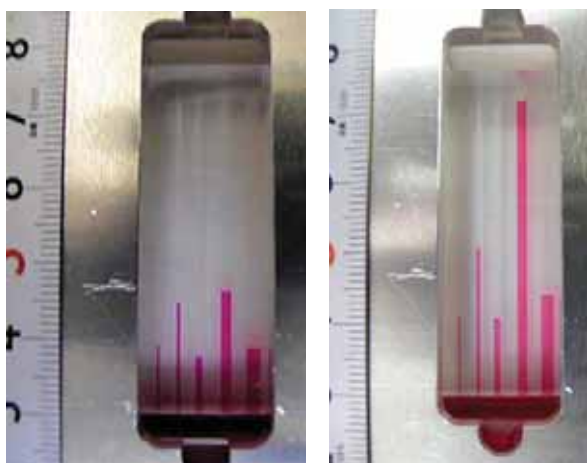


図5 送液実験結果の例

たが、流路終端部まで液体を充填することができず、また流路寸法と流入状態との関係を明確に把握することはできなかった。

今後は、微細溝加工技術、マイクロ流体デバイスの作製技術、液体の送液方法を引き続き検討し、さらに検出方法を検討するとともに、血小板凝集機能検査への応用の可能性に関する評価を行う予定である。



(a) 下流側を上方へ45°傾斜 (b) 水平状態に戻した場合

図6 流路を傾斜させることによる影響の例

4. 結言

マイクロ流体デバイスを血小板凝集機能検査システムに応用するための基礎的な検討を行った。本報では、樹脂材料にマイクロ流路を形成するための微細溝を加工する技術と、作製したマイクロ流路へ液体を送液する方法について検討した。得られた結果は以下のとおりである。

- 1) アクリル板に幅 0.32mm、深さ 0.3mm の矩形形状の微細溝を切削加工し、バリの発生を抑え、角部分も比較的シャープな形状に加工できた。ただし、さらに加工面粗さが改善する加工条件の検討が必要である。
- 2) 幅 0.2mm、高さ約 0.2mm のリブを有する微細転写加工用マイクロ金型を作製した。リブ上面が鏡面で、角部分も比較的シャープな形状の金型リブが得られた。
- 3) 毛細管現象と重力を利用して、流路へ液体を送液でき