

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2報)

山田 博之・阿部 治・西村 通喜・尾形 正岐・長田 和真・高尾 清利

The Application of Micro-Fluidic Device to Medical Test - Development of Platelet Aggregation Testing System - (2nd Report)

Hiroyuki YAMADA, Osamu ABE, Michiyoshi NISHIMURA, Masaki OGATA, Kazuma OSADA 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、光電子増倍管を用いて微弱な蛍光のフォトンを計測し、血小板凝集の度合いを数値的に比較評価するための小型の検出システムを検討し、また、上記検査を目的とした小型でシンプルな構造のマイクロ流路の作製および流体駆動方法を検討した。その結果、試作した検査システムにより、微弱な蛍光の変化が検出でき、共焦点レーザ顕微鏡による観察と同様の傾向が得られ、数値化できることがわかった。また、液体に加わる重力等を利用した流体駆動方法、および、流路側壁を空間にすることによって壁面抵抗を低減させ、毛細管現象を利用した流体駆動方法を考案し、両者ともマイクロ流路に液体を充填できた。

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、光電子増倍管を用いて微弱な蛍光のフォトンを計測し、血小板凝集の度合いを数値的に比較評価するための小型の検

出システムを検討した。さらに、マイクロポンプ等を使用する送液方法では複雑なデバイスが必要であり、シリンジポンプ等の外部機器を使用する方法では装置全体のサイズが大きくなってしまったため、小型でシンプルな構造のマイクロ流路および流体駆動方法について検討したので報告する。

2. 血小板凝集の検出

2-1 マイクロ流路への送液

血小板凝集の検出には、全血をキナクリン二塩酸塩 (Sigma-Aldrich 製 Q3251) により蛍光染色して用いた。また実験に使用したマイクロ流路 (ibidi 製コラーゲンIV型塗布 ICH マイクロスライドチャンバー) は流路長 50mm、流路幅 5mm であり、流路の高さは 0.1mm および 0.2mm の 2 種類を用いた。

加熱ステージ上で 37°C に保持したマイクロ流路に、生理食塩水 (PBS) を、シリンジポンプを用いて 0.1ml/min の吸引速度で流路内に 10 分間送液し、流路内のコラーゲンを湿潤した。その後、あらかじめ蛍光染色しておいた全血を、シリンジポンプを用いて 0.1ml/min の吸引速度で流路内に 5 分間送液することにより、流路内のコラーゲンに血小板が付着する (図 1)。最後に PBS を手動で 3ml 送液

し、コラーゲンに付着した成分以外を洗浄し、測定サンプルとした。

なお上記の全血の準備、および全血のマイクロ流路への送液については東洋大学寺田研究室の協力により実施した。

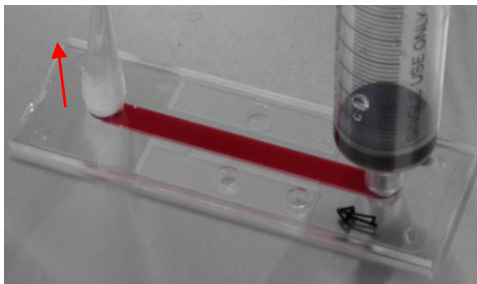


図1 全血をマイクロ流路へ流入する様子

2-2 検出方法

東洋大学寺田研究室では、2-1節で述べた方法で作製した測定サンプルを共焦点レーザー顕微鏡（オリンパス製 FV-10i）を用いて、励起波長 473nm の測定条件で観察することにより、血小板凝集を評価している。この場合、画像による評価だけで、定量的な評価を行っていない。そこで、我々は、微弱な蛍光の光子を計測することにより、血小板凝集の度合を数値的に評価することを試みた。

2-1節で述べた方法により作製した測定サンプルに励起光を入射し、その際に発生する蛍光を光電子増倍管（PMT）により計測する検査システムを提案・試作した。図2に示すように、励起光には 405nm 青色レーザー（オーディオテクニカ製 SU-61C-405-5）を用い、中心波長 390nm 半値全幅 45nm のバンドパスフィルタ（Edmund Optics 製#86-337）を透過させてから、測定サンプルに入射した。図3に示すように、励起光はデフォーカスして、流路幅全体を照射するようにした。血小板や流路自体で発生した蛍光は、中心波長 526nm 半値全幅 53nm の色ガラスフィルタ（Edmund Optics 製#46-053）を透過させた後に、マイクロ PMT フォトンカウンティングヘッド（浜松ホトニクス製 H12406）により検出する校正を提案し、試みた。受光部を測定サンプルに近接させることにより、コンパクトな設計とした。検出した光子は、カウンティングユニット（浜松ホトニクス製 C8855-01）を用いて 1 秒間当たりの光子数として計測した。図4に試作した検査システムの外観を示す。

2-3 検出結果

図5に試作した検査システムによる蛍光検出の結果を示す。マイクロ流路の流路高さが 0.1mm および 0.2mm の場合について、流路内の各位置で検出した光子数をプロットした。また励起光のみを入射した場合の光子数、および未使用のマイクロ流路に励起光を入射した場合（すなわち励起光と流路の自家蛍光の合計）の光子数につ

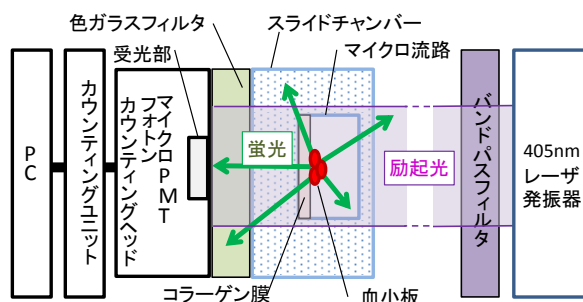


図2 血小板凝集の蛍光検出の概要

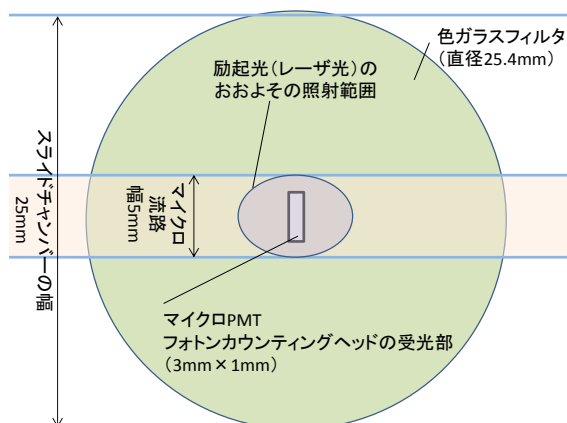


図3 蛍光検出時の励起光、流路幅、受光部の概要

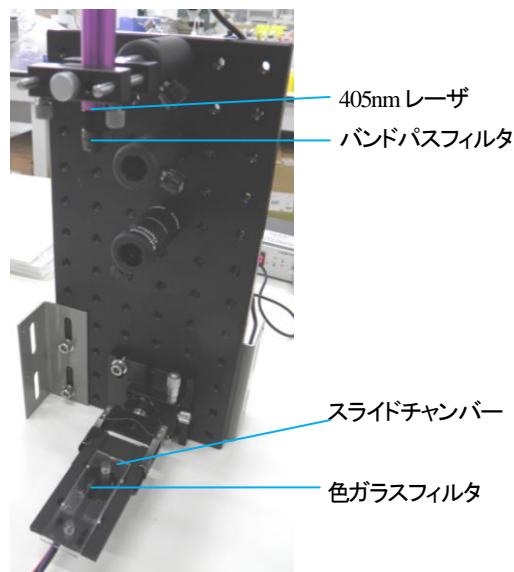


図4 試作した蛍光検出検査システム

いても合わせて示す。また同じ測定サンプルについて、東洋大学寺田研究室での共焦点レーザー顕微鏡による観察画像を図6および図7に示す。

流路高さが 0.1mm の場合、検出した光子数が流路の上流側から下流側に向かって線形に減少する傾向が得られた。流路高さが 0.2mm の場合には、0.1mm の場合とは異なり顕著な線形減少の傾向は見られなかったが、最上流

側で検出した光子数が最も多いことは共通していた。共焦点レーザー顕微鏡による観察でも、同様の傾向が得られており、試作した検査システムにより、微弱な蛍光の変化を検出し、数値化できることがわかった。上流側と下流側での血小板の付着量の変化を調べることによって、個人ごとの血小板凝集の違いの検査等への応用も考えられる。

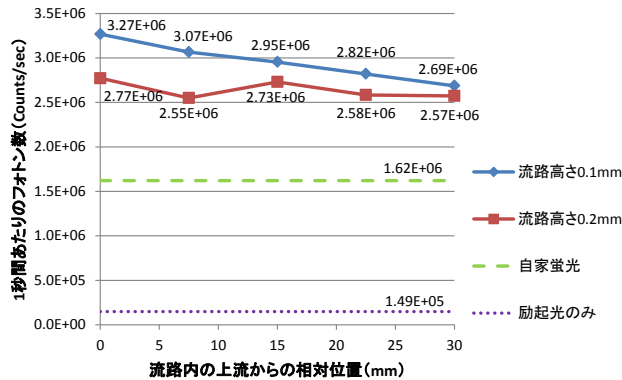


図5 試作した検査システムによる蛍光検出の結果

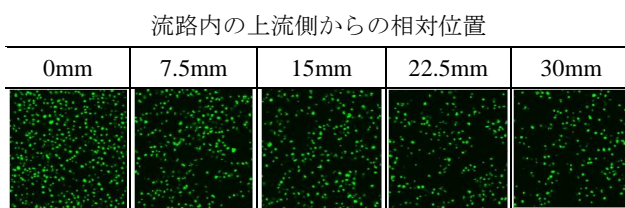


図6 流路高さ 0.1mm の場合の共焦点レーザー顕微鏡による蛍光染色した血小板の観察画像

(N.Terada et al., 2016, unpublished data)

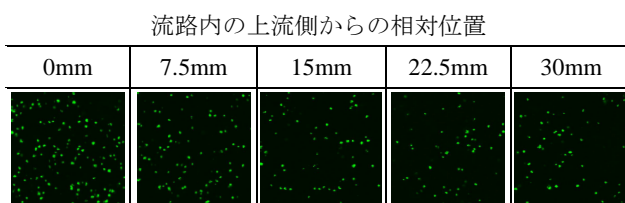


図7 流路高さ 0.2mm の場合の共焦点レーザー顕微鏡による蛍光染色した血小板の観察画像

(N.Terada et al., 2016, unpublished data)

試作した検査システムは入射と受光を同軸で行っており、受光部および測定サンプルに近接した色ガラスフィルタにより、発生した蛍光のみを選択的に受光するようにしている。そのため、蛍光顕微鏡等のダイクロイックミラーを使用した光学系に比べて、装置全体をコンパクトに設計できた。また色ガラスフィルタの代わりに光学薄膜のバンドパスフィルタの使用も検討したが、フィルタに対して垂直に入射しないとバンドパス性能が発揮できない点が問題であった。励起光が流路内や流路壁面で散乱や反射し、フィ

ルタに対して垂直入射しないために、励起光が色ガラスフィルタに比べて受光部に達してしまうことがわかった。蛍光試薬が変わった場合、受光部のフィルタの選定に関しては注意が必要である。

またマイクロ流路自体が発する自家蛍光があることがわかった。測定サンプルから発生する蛍光は、この自家蛍光に加算されるため、マイクロ流路の作製にあたっては、過大な自家蛍光や、測定箇所による自家蛍光のばらつき等の問題がない材料を選定する必要がある。

3. マイクロ流路作製と流体駆動方法

3-1 マイクロ流体デバイスの構成

前章に記述した検出方法の検討では、液体の送液手段としてシリンジポンプ、シリンジ、配管用（送液用）チューブ等を使用した。しかし、シリンジポンプ等の外部機器を使用する方法では装置全体のサイズが大きくなってしまい、また、マイクロポンプ等を使用する送液方法では微細で複雑なデバイスが必要になる。そこで、我々はシンプルな流体駆動構造や流路構成によって一定流量・安定流速で送液することを目標として、小型でシンプルな構造のマイクロ流路と流体駆動方法について検討した。

また本研究では、マイクロ流路壁面への血小板凝集や血小板粘着などを向上させるため、人の血管を模擬し、マイクロ流路底面をコラーゲンIV型の表面にすることを試みた。

3-2 実験方法

マイクロ流路を形成する微小溝の加工方法として、切削加工が流路設計の自由度が高く小ロット加工に有効であるため、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適していると考えられる。そこで、本報では切削加工によってアクリル板に微小溝を加工した。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重要になるため、切削加工条件は加工速度（加工効率）等よりも表面粗さが良好となる条件を選択した。主な切削加工条件を表1に示す。切削加工によってアクリル板に微小溝と液溜部分の貫通孔を加工し、その後、このアクリル板とコラーゲンIV型がコートされたポリスチレン板を重ねて密着させ、2枚の金属製治具で挟むことによって、マイクロ流路を作製した。なお、両者の合わせ面に液が漏れないようにシリコン材の薄い層を設けた。また、合わせ面の液漏れに対する比較検討のため、アクリル板とシリコンゴムシートとを密着させた場合の送液実験も行った。

送液実験では、マイクロ流体デバイスの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を用いて流路内の状態を観察および撮影した。検査に使用する液体には、イオン交換水を使用し、観察しやすいように印刷

用インクの染料を用いて着色した水を使用した。次に、東洋大学寺田研究室の協力によって、全血または前処理された多血小板血漿を用いて同様な送液実験を行った。

表 1 主な切削加工条件

切削加工機	牧野フライス精機 (株) 製 マシニングセンタ MSA40-20 (株) 牧野フライス製作所製 フライス盤 KSJP-55
工具	樹脂用小径スクエアエンドミル (直径 0.3~5mm)
被加工物	透明アクリル板
回転数	●00~●,000 rpm
切り込み (深さ)	仕上げ: 0.01~0.1 mm

3-3 結果および考察

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、流路端部に液溜め部分を設け、液体に加わる重力や大気圧、あるいは、液体の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を試みた。本研究では以下の2つの流体駆動方法を考案し送液実験を行った。

第1報で報告した例のように、マイクロ流路が非常に微細である場合や、壁の濡れ性や液体の粘性によっては、マイクロ流路に液体が充填されないことがある1)。そこで、微細な流路をエアベントとして応用し、さらに液体に加わる重力や大気圧による流体駆動を利用した送液方法をはじめに考案した。図8に示すように、高さ0.05mm以下の流路をエアベントとし、液体に加わる重力等を利用して高さ0.5mm、幅2mmの流路に液体を送液させた。その結果、図9に示すようにエアベントがある流路終端部まで液体を充填でき、図10に示すように一定速度で流路内を送液できた。なお、流路底面の材質がシリコーンゴムの場合とコラーゲンIV型の場合では、流れの到達時間すなわち流速が異なることがわかった。液体に加わる重力や大気圧を利用して流体駆動力が小さいため、流路底面の濡れ性の影響を大きく受けることが原因であると予想される。

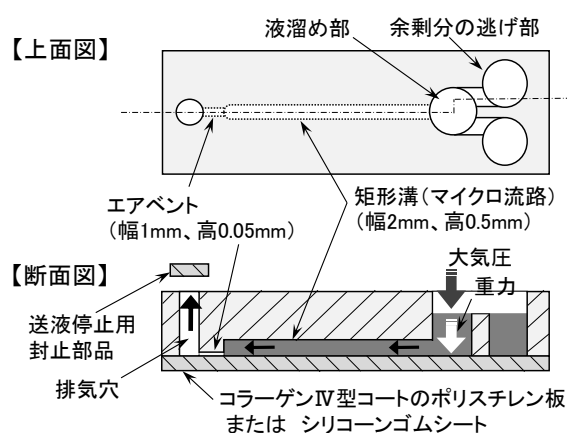


図 8 マイクロ流体デバイスの概略図

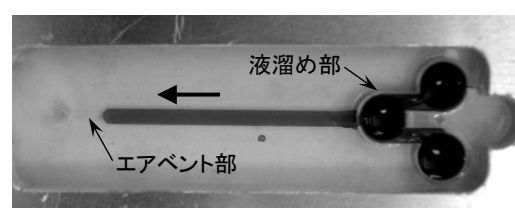


図 9 液体に加わる重力等を利用した送液実験の結果

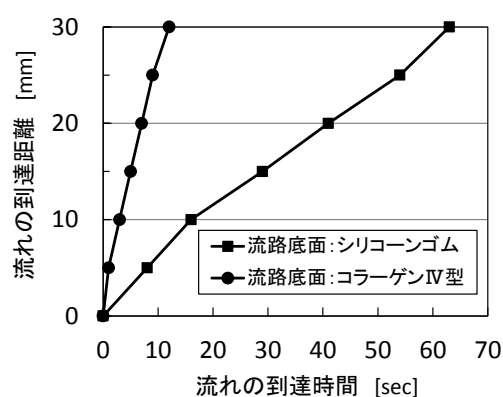


図 10 液体に加わる重力等を利用した送液状態

次に、もう1つの流体駆動方法として毛細管現象を利用し、さらに、流路側壁を空間にすることによって、壁面抵抗を低減させ、かつ、重ね合わせた2枚の板の接合面への液体の流出を防止するマイクロ流路を考案した。本研究では、マイクロ流路の高さ寸法と毛細管現象による送液状態との関係を調べるために、図11に示すように、2枚のアクリル板の間にシムテープを配置することによって流路高さが決まる構成とし、シムテープの厚さを変更することによって流路高さ寸法を変更できるようにした。また、流路を形成する部分の両側に微小溝を加工することによって、流路側壁となる部分を空間とした。シムテープの厚さ、すなわち流路の高さ寸法は0.01mm~0.1mmとし、毛細管現象を利用して液体を送液させた。その結果、図12に示すように、流路終端部まで液体を充填でき、一定速度で流路

内を送液できた。また、流速と流路の高さ寸法との関係を調べた結果を図 13 に示す。流路の高さ寸法が 0.01～0.06mm では平均流速の変化は小さく、毛細管現象による流体駆動と考えられるが、それ以上の高さ寸法では平均流速が速くなり、毛細管現象に加え、液体に加わる重力等の影響もあると推測される。また、流速に対して温度の影響が大きいと考えられ、液体の粘性の影響が大きいと推測される。

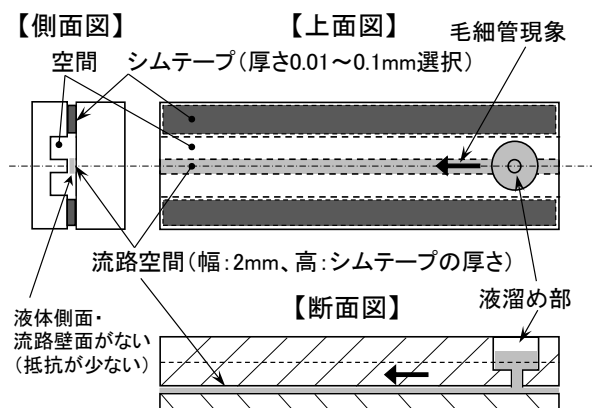


図 11 マイクロ流体デバイスの概略図



図 12 毛細管現象と空間壁面を利用した送液実験の結果

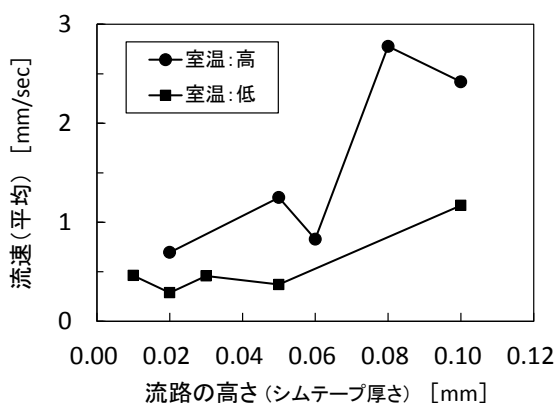


図 13 毛細管現象を利用した場合の流速と流路寸法

次に、東洋大学寺田研究室の協力によって、全血または前処理された多血小板血漿を用いて送液実験を行った。その結果、上記それぞれのマイクロ流体デバイスにおいて、マイクロ流路の末端部まで液体を充填できた。ただし、ポリスチレン板にコートされたコラーゲンIV型の表面に血小

板が付着・堆積する量が少ないという課題がわかった。今後は上記コラーゲンIV型への血小板の付着・堆積に関する諸条件について生物学的（細胞学的）な検討を加える必要があると考えられる。

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について提案した。その結果は以下のとおりである。

- 1) 微弱な蛍光の光子を計測することにより、血小板凝集の度合を数値的に評価するために、光電子増倍管により検出する蛍光検査システムを提案・試作した。このシステムを用いて、市販のコラーゲンIV型が塗布されたマイクロ流路内に蛍光染色した全血を送液し、血小板を付着させた測定サンプルについて、光子数の計測を行った。その結果、検出した光子数が流路の上流側から下流側に向かって減少する傾向が得られた。共焦点レーザー顕微鏡による観察でも、同様の傾向が得られており、試作した検査システムにより、微弱な蛍光の変化を検出し、数値化できることがわかった。
- 2) マイクロ流路の作製および流体駆動方法について検討した結果、液体に加わる重力や大気圧による流体駆動方法を利用して流路へ送液できた。また、流路側壁を空間にすることによって壁面抵抗を低減させ、毛細管現象による流体駆動方法を利用して流路へ送液できた。両者ともマイクロ流路に液体を安定した速度で充填できた。小型でシンプルな構造である新たな流体駆動方法を提案できた。ただし、今後はコラーゲンIV型への血小板の付着・堆積に関する諸条件について生物学的（細胞学的）な検討を加える必要があると考えられる。

研究の遂行にあたり、東洋大学 寺田信幸教授には多大なご指導と実験に関するご協力をいただき、厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1)山田博之, 阿部 治, 西村通喜, 尾形正岐, 高尾清利: 山梨県富士工業技術センター平成 26 年度業務・研究報告, P.68 (2014)