

補助事業番号 2022M-273

補助事業名 2022年度 自宅での簡易疾病検査を目的とした

赤血球特性評価が可能なポータブル検査キットの開発 補助事業

補助事業者名 防衛大学校 システム工学群 機械システム工学科 マイクロマシン講座 洞出 光洋

1 研究の概要

疾病の早期確認方法の1つとして、疾病との相関が強い細胞の特性計測を実施する。既存の技術として細胞の集団を計測する手法が挙げられるが、本事業では細胞個々の特性を計測することに挑戦する。細胞ごとに個性が存在するため、個々の細胞がどのような特徴を持っているか計測したい。様々なパラメータのなかで、本事業では細胞の大きさや変形のしやすさに着目した。例えばcovid-19感染者の白血球はサイズや変形能がばらつくという報告が行われている。したがって、細胞のサイズや大きさを容易に計測可能なシステム構築を実施したいと考えた。ただし、ミクロンスケールの細胞個々の大きさを計測するためには、精密な微細操作が必要不可欠である。また将来的にその場で安価に検査できるような技術を構築することも重要であると考えた。そこで本事業では、赤血球等の細胞の大きさや硬さ(変形能)を容易に確認することを目的とし、ポータブルタイプの細胞特性計測装置の開発を目指していく。具体的には申請者が得意とするマイクロ流体デバイス開発技術を活用し、微小な流路を人工毛細血管として利用し、細胞の大きさによる選別が可能なデバイス設計論と、硬さ計測手法の確立を行う。

2 研究の目的と背景

半導体プロセスの採用により、ナノマイクロスケールの微小構造体の形成が技術的に可能である。この技術を活用し、細胞1個のみ通過できるマイクロ流路や、ヒトの毛細血管より狭い線幅の人工毛細血管の開発をこれまで実施してきた。さらに精密操作や画像解析等のロボティクス技術を融合することで、メカトロニクスならではのユニークな細胞解析手法をこれまでに提示してきた。本事業では、これまで培った細胞操作用ナノマイクロデバイス開発を発展させ、将来的に診断への応用に繋がる細胞特性計測に挑戦する。本研究では最小線幅1-3 μm の狭窄部内細胞への負荷試験を試みる。さらに、負荷試験から細胞の硬さや変形能を解析し、自宅等その場で細胞特性を検査できる携帯型検査キットの開発を目指し、開発に必要な知見を提示することが本研究の目的である。

具体的には、段差や側壁傾斜を有する立体的な3次元マイクロ流路の設計開発をベースとし、負荷印加と解析の両方をデバイス内で完結できるような検査方法を提示する。PCR検査キットのように最終的に医療機関に送り返すことなく、その場で試験と検査まで完了できるような、これまでの検査キットでは実施困難な課題に挑戦する。マイクロ流路関連の研究では流路形状はシンプルなものを採用する傾向があるが、本事業の特色の1つとしてデバイスの設計を工夫する点が挙げられる。特色のある形状を考案し、さらにそれを実現できる開発技術の確立に焦点充てて、解析のパフォーマンスを向上させる。

3 研究内容

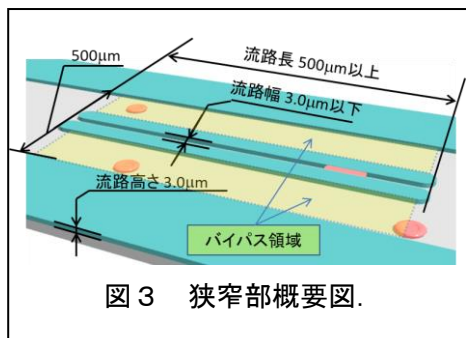
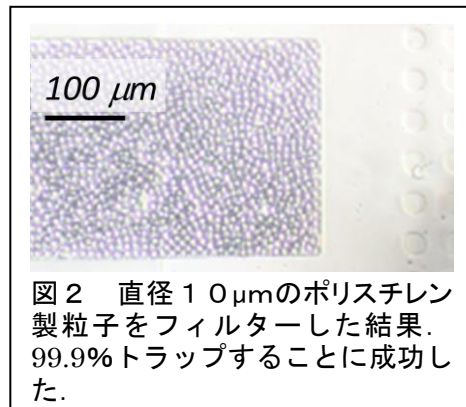
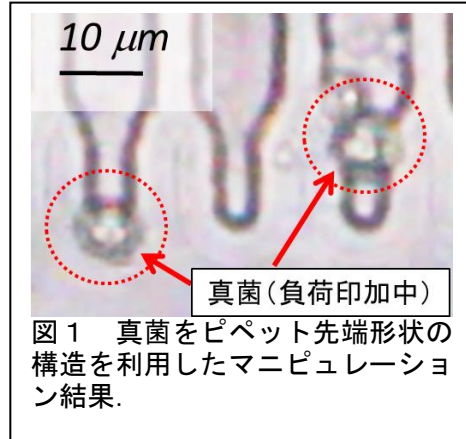
(1) 負荷印可可能なマイクロ流路開発

一般的な半導体プロセスでは、平面方向に対しては加工自由度が高いが、高さ方向の加工自由度は低い。そのため限定された形状しか製作できない。この課題解決のために、マイクロニードルや段差形状等を有するマイクロオーダーの三次元加工法の研究を実施してきた。この成果により、アクチュエータやバルブの機能を有する機構をデバイス内に集積することが可能となった。これは生化学・バイオ研究者が開発するマイクロ流路と異なり、微細加工に精通した研究者でなければ実施できないアプローチである。機能を集積化できるデバイスという点が最も大きな特徴であり、複数細胞への同時負荷試験やその場解析がデバイス内で完結できる。

赤血球は非常に変形能が高く、自身の形状よりもはるかに小さな断面でも通過することが可能である。細胞に負荷を与える流路として高さ $3\mu\text{m}$ 幅 $3\mu\text{m}$ のピペット形状を有する狭窄部アレイの開発に成功した(図1参照)。また、高さ $10\mu\text{m}$ と $1\mu\text{m}$ の段差を有するマイクロ流体デバイスを製作した。段差構造をフィルターとして利用することでサイズに応じた選別が可能である(図2参照)。

あるいは、高さ $1\mu\text{m}$ の狭所空間を利用して細胞に対して負荷を与えることも可能である。その他には高さ $3\mu\text{m}$ 幅 $3\mu\text{m}$ の断面形状を有する長さ $500\mu\text{m}$ の狭窄部を製作することにも成功した。設計概要図を図3に示す。人間の毛細血管が直径 $8\sim 20\mu\text{m}$ 位であるので、今回製作した狭窄部の方がはるかに小さな断面を有していることがわかる。したがってこのような流路に赤血球を流すと、変形能の高い赤血球のみ通過し、通過のしやす

さ等をしらべることで細胞の変形能を推測でき可能性が考えられる。微細加工技術を駆使し、なおかつ加工条件を最適化することで、細胞の中でも変形能が高い赤血球に対しても負荷印加可能な流路を開発可能にすることができた。さらに図1～3で紹介したように、複数の流路形状を提案することができた。



(2)細胞への負荷印加試験

前項図2で紹介した高さ $10\mu\text{m}$ と高さ $1\mu\text{m}$ の段差を有するマイクロ流体デバイスを用いて、細胞への負荷印加試験を実施した。実験概要図を図4に示す。段差の高い方から低い方に対して、細胞が含まれる懸濁液を流し、段差前後の挙動を確認することで細胞の特性を計測することができる(図5参照)。例えば変形能の高い(柔らかい)細胞は、高さ $1\mu\text{m}$ の領域で負荷を印可した場合、その接触面積が大きくなると考えられる。一方で変形能の低い(硬い)細胞は、高さ $1\mu\text{m}$ の領域で負荷を印可した場合、その接触面積が小さくなると考えられる。あるいは $1\mu\text{m}$ の領域での通過速度に着目した場合、硬い場合は通過速度が遅くなり、柔らかいほど通過速度が速くなる。細胞に負荷を印可することで細胞の特性を計測することができる。

さらに前項図3で紹介した長い狭窄部を有するマイクロ流路内で赤血球を通過させる実験を行った。図3にも示すようにバイパスを設けており、バイパスに比べて狭窄部では赤血球がギリギリ通過していくような挙動を示し、非常に通過速度が遅くなっていた。さらに興味深いのは通過時間の経過とともに赤血球の長さが減少していることが確認できた。これは変形能によって減少傾向が変わる可能性があるかと予測している。通過速度との因果関係にも興味をもたれるが、低速で流すことができるシステム構築が今後要求される。

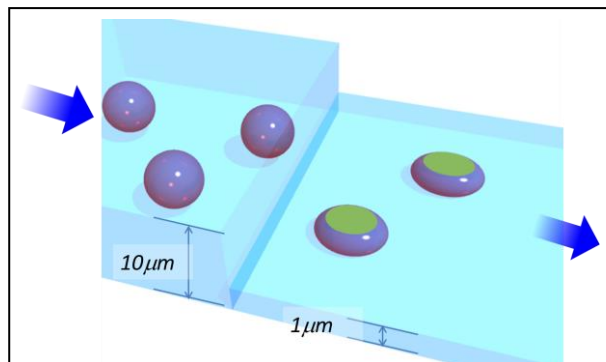


図4 段差構造を有するマイクロ流路を用いた細胞計測実験概要図。高さ $1\mu\text{m}$ の狭窄部を利用して細胞に負荷印可を実施する。

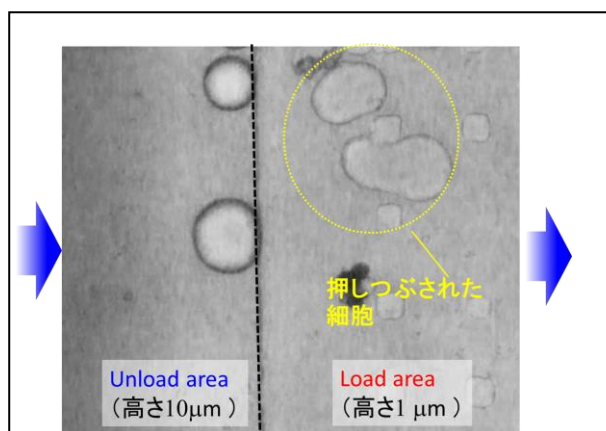


図5 高さ $1\mu\text{m}$ の狭窄部領域では細胞に負荷が印可され、輪郭が大きくなることが確認できる。

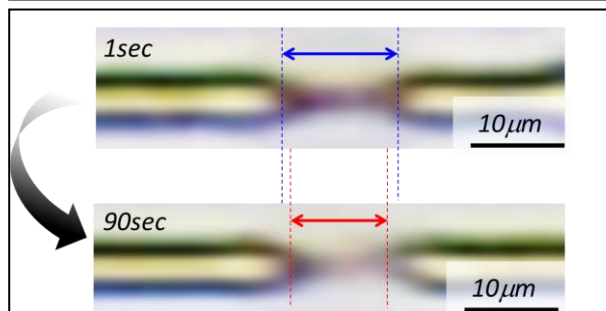


図6 赤血球長さ減少結果。通過していく過程で赤血球の長さが短くなっていることが確認できた。

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

マイクロ流体デバイスで直径10 μ m以下の細胞に対して負荷を与えることが確認できた。また負荷を与えることで、細胞の流れにくい状況を作作的に作り出す、あるいは負荷印可中の形状を計測することで、定性的ではあるがセンサ等を用いなくても画像から細胞の状態が推定できることが確認できた。したがって小型のポータブルタイプの装置と、画像情報から細胞個々の状態を把握することが技術的に可能であることが示唆された。今後診断等への応用や、疾病のリスク提示等に繋げるためには、多くの検体を調査し特異点を見つけるデータ解析、あるいは臨床等のハードルはもちろんクリアしていく必要はあるが、検査にもちいる評価方法の選択肢の1つとして活用されることを期待したい。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

マイクロ流体デバイスを用いた細胞解析においては、流路をシンプル形状にする、あるいは回路を形成して成分分析を行う方法も行われている。そのなかでメカトロニクスに携わる研究分野ならではのアプローチとして、デバイスの形状を工夫する、特に微小な構造物を容易に製作する要素技術の確立に焦点を充てた。また解析においても、画像情報から特徴を見出すアプローチを採用した。このようなアプローチを採用することで、大掛かりな周辺機器や高価な試薬等を不要にし、最低限の設備としてマイクロ流路が形成されたマイクロ流体デバイスのみで細胞操作と解析が行える。このマイクロ流体デバイスのみで解析できることの優位性を示すために、研究遂行時にはある程度方向性に制限を設けて実施した。これまでの研究歴からも、最大の武器はデバイス設計技術であると考えたからである。そのなかで複数流路形状を提示でき、学術講演会12件、雑誌論文3件の報告に繋がったことは期待以上の成果であったと考えられる。今後も生化学分野への応用を視野に入れた研究を実施していくが、設計等の要素技術を基盤として実施していきたい。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

雑誌紹介での報告 3件

1. Particle Size-Dependent Component Separation Using Serially Arrayed Micro-Chambers
Mitsuhiro Horade, Ryuusei Okumura, Tasuku Yamawaki, Masahito Yashima, Shuichi Murakami, Tsunemasa Saiki
Micromachines (2023年4月公開)
DOI <https://doi.org/10.3390/mi145091910.3390/mi1450919>
2. Analysis of separation efficiency focusing on particle concentration and size using a spiral microfluidic device
Mitsuhiro Horade, Syunsuke Mukae, Tasuku Yamawaki, Masahito Yashima, Shuichi Murakami, Tsunemasa Saiki
Journal of Robotics and Mechatronics (2023年10月公開)
DOI <https://doi.org/10.20965/jrm.2023.p1203>

3. Separation of fine particles and liquid using a physical trapping method via a stepped structure

Mitsuhiro Horade, Keisuke Misu, Takachika Usagawa, Tasuku Yamawaki, Masahito Yashima, Shuichi Murakami, Tsunemasa Saiki

Microsystem Technologies (2024年3月公開)

DOI <https://doi.org/10.1007/s00542-024-05624-2>

学術講演会での報告 12件

1. 高効率成分分離のための多段マイクロ流路デバイスの開発

洞出光洋, 三須慶佑, 宇佐川天力, 村上修一, 山脇輔, 八島真人, 才木常正
ロボティクス・メカトロニクス講演会2022, 2P2-N06 (2022年6月)

2. マイクロチャンバレイの直列配置を利用した粒子サイズに依存した成分分離法の検討

洞出光洋, 奥村龍成, 村上修一, 才木常正
2022年度精密工学会秋季大会学術講演会 (2022年9月)

3. ESTABLISHMENT OF COMPONENT SEPARATION METHOD DEPENDING ON PARTICLE SIZE USING MICRO-CHAMBER ARRAY

Mitsuhiro Horade, Ryuusei Okumura, Shuichi Murakami, Tsunemasa Saiki

The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2022) (2022年10月)

4. オンサイトバッテリーレス成分分離実現のためのマイクロ流路設計に関する研究

洞出光洋, 迎隼輔, 村上修一, 才木常正
第39回「センサ・マイクロマシンと応用シンポジウム」 (2022年11月)

5. マイクロスケール狭窄部を利用した微小対象物への負荷試験方法の検討

洞出光洋, 本山幾久治, 村上修一, 才木常正
2023年度精密工学会春季大会学術講演会 (2023年3月)

6. 細胞サイズおよび変形能の簡易評価システム

洞出光洋, 森賀正詔, 村上修一, 才木常正
ロボティクス・メカトロニクス講演会2023, 2P1-E20 (2023年6月)

7. 微粒子のサイズと濃度に着目した螺旋型マイクロ流路デバイスの分離性能向上に関する研究

洞出光洋, 迎隼輔, 村上修一, 才木常正
2023年度精密工学会秋季大会学術講演会 (2023年9月)

8. 細胞への負荷印可可能なマイクロ流体デバイスを用いた細胞評価試験

洞出光洋, 森賀正詔, 村上修一, 才木常正
2023年度精密工学会秋季大会学術講演会 (2023年9月)

9. CONSTRUCTION OF A CELL SIZE AND HARDNESS MEASUREMENT METHOD USING A MICROFLUIDIC DEVICE WITH A MULTI-LAYERED STRUCTURE

Mitsuhiro Horade, Masatsugu Moriga, Shuichi Murakami, Tsunemasa Saiki
The 27th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2022) (2023年10月)

10. チャンバアレイを集積したマイクロ流体デバイスによる成分分離の性能評価
洞出光洋, 奥村龍成, 村上修一, 才木常正
第40回「センサ・マイクロマシンと応用シンポジウム」 (2023年11月)

11. マイクロ流路内での細胞低速マニピュレーションに関する研究
坂本公大, 洞出光洋
2024年度精密工学会春季大会学術講演会 (2024年3月)

12. 細胞負荷試験のためのPDMSマイクロ流路デバイスの製作に関する研究
野々村奎吾, 洞出光洋
2024年度精密工学会春季大会学術講演会 (2024年3月)

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当なし

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 摂南大学(セツナンダイガク)
工学部 (リコウガクブ)
機械工学科(キカイコウガクカ)
マイクロマシン研究室(マイクロマシンケンキュウシツ)

住 所: 〒572-8508
大阪府寝屋川市池田中町17-8

担 当 者: 准教授 洞出光洋(ホラデミツヒロ)

担 当 部 署: マイクロマシン研究室(マイクロマシンケンキュウシツ)

E - m a i l: mitsuhiro.horade@setsunan.ac.jp

U R L: <https://www.setsunan.ac.jp/~horade/>