

令和元年5月10日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18033

研究課題名(和文) 輸血適合試験の自動化に向けた誘電泳動と気液二相流による粒子操作手法の開発

研究課題名(英文) Development of a particle-manipulation method for automating the cross-match test using two-phase flow and dielectrophoresis

研究代表者

山本 憲 (Yamamoto, Ken)

東京理科大学・工学部機械工学科・助教

研究者番号：70749100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：輸血適合試験や血液型判定試験は非常に頻繁に行われる基本的な試験であり、長い歴史があるにもかかわらず、未だに技師によるアナログな操作が主流であり続けている。本研究では、マイクロチップと気泡を利用することで、血液をセットしてボタンを1つ押したら約5分後に自動で検査結果を得ることができるデバイスを開発した。なお、このデバイスは検査結果を目視で確認できるほか、試薬との反応が弱いケースであっても検出が可能であるため、判定精度・速度ともに高い水準を達成している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療従事者の過酷な労働環境が問題となっている昨今において、可能な限り労働者の負担を軽減することが重要となってきている。本研究では、基本的な血液検査を対象として、これまで技師が手動で30分程度を要して行ってきた検査を自動化することで労働者の負担軽減に貢献することができる。また、デバイスの操作は試薬のロードとボタン操作を行うのみというユーザーフレンドリーな設計とし、さらに検査結果も目視で容易に確認できる。さらに、検査に要する時間を5分程度に短縮し、検出可能な反応強度も大幅に改善した。

研究成果の概要(英文)：Although the cross-match test and the blood-typing test are basic, frequently-performed, and long-history tests, they are, mainly, still performed manually by technicians. In this study, we developed a device that automatically returns the test result 5 minutes after loading the sample and pushing a button, by exploiting microchip technologies and bubbles. The device also has features that the reaction result can be observed by naked eyes and that the device can detect the reaction even if the reaction is weak. Therefore, we concluded that the device performance is high in terms of both accuracy and detection speed.

研究分野：流体工学

キーワード：血液 混合 希釈 混相流 マイクロチャネル 界面

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

手のひらサイズのマイクロ化学分析チップは様々な生化学分析に用いられ、分析精度の向上、分析時間の短縮、分析試料の削減を実現している。近年は血液検査にマイクロ化学分析チップを利用する例も多く見られ、種々の検査の高効率化が見込まれている。ところで、多くの血液検査においては、血液中の血漿 (液体) 成分と血球 (固体) 成分 (赤血球や白血球など) をそれぞれ試薬と混合させて抗体反応を観察する。そのため、試験前に予めこれら二成分の分離、および各成分を含む供試液体の濃度調整を行う必要があるが、血液は血球成分が全体積の 50% 近くを占める高濃度コロイド粒子分散系液体であり、血球成分を希釈するためには大量のバッファ溶液が必要になる。この要求は、少量の試料を扱うことを得意としているマイクロ化学分析チップの特性と反するものであるため、これまでは試料をマイクロチップに導入する以前にマニュアル操作によって全血を希釈する、という工程を挟んでいた。

血液検査そのものに目を向けると、操作の多くに技師によるマニュアル捜査が含まれ、また検査結果についても技師による目視判定に依存しているため、検査全般に熟練した技術が必要とされている。さらに、クロスマッチ試験や血液型判定試験といった基礎的かつ頻繁に行われる検査には 30 分から 1 時間程度の時間を要するため、緊急搬送された患者の輸血開始時間の遅れや医療従事者への過度の負担が懸念される。

2. 研究の目的

本研究では、血球を用いた血液検査の全自動化・高速度化を達成するために、界面力を利用した高効率なマイクロ混合・希釈システムの開発および、医療従事者 (研究者ではない人) にも容易に操作することができるユーザーフレンドリーなマイクロ血液分析チップを開発する。ユーザーフレンドリーなシステムにするためには、操作回数を可能な限り削減することや技術が要求される装置の使用を避けることが必要となるため、開発するチップは、試薬 (血液、バッファ液) のチップへのロード後はボタンを一回押すだけで検査が完了することと、検査結果の確認にカメラや光学系を必要とせず、目視で明確に結果の判別が可能になることを目指した。

3. 研究の方法

今回開発するチップには希釈していない血液 (全血) をロードするため、チップ内で血液を希釈し、さらに試薬と反応させる必要がある。そこで、チップ内のマイクロ流路 (マイクロチャンネル) において全血と PBS (リン酸緩衝生理食塩水) を効率よく混合する手法を開発した。混合 (希釈) 手法には、電気的な力で赤血球を操作する誘電泳動と、液滴や気泡の流動を利用した混合手法、およびこれら二つを併用した手法を考案し、比較検討した。

試薬と希釈後の血液の混合・反応および反応物 (凝集赤血球) の検出についても、マイクロスケールの流路を用いて検討した。赤血球は赤色を呈しているため、凝集した赤血球を集積させ、反応を示さなかった血液と分離することで目視による判定の可能性を模索した。

上述の希釈、検出の要素の他にも、検査結果を安定的なものにするために必要である、希釈血液濃度の時空間的な均質化や、各要素を 1 枚のチップ上に集約した場合に起こる挙動の安定化、検査時間短縮のための最適化などを検討した。

4. 研究成果

混合手法について、上述の通り誘電泳動を用いた手法、液滴や気泡の流動を利用した手法、両者を利用した手法の 3 つを検討した。その結果、誘電泳動を用いた場合には、血球挙動の操作はより精密になるものの、チップのスループット性が低下する (検査時間が長くなる) ということが明らかになった。また、誘電泳動と液滴や気泡の流動を組み合わせる手法は、操作性および検査時間のいずれにおいても良好な結果を示したが、液滴や気泡のみを利用した手法と比較して圧倒的な優位性があるわけではなかった。そこで本研究では、チップのコンパクト性や操作性を考慮して、液滴や気泡の流動のみを利用して希釈を行う手法を採用することとした。

液滴や気泡を利用した希釈手法のメカニズムや特性を明らかにするために、マイクロチャンネル内でサンプル (染料もしくは微粒子) と水を混合する実験を行った (図 1)。液滴 (オレイン

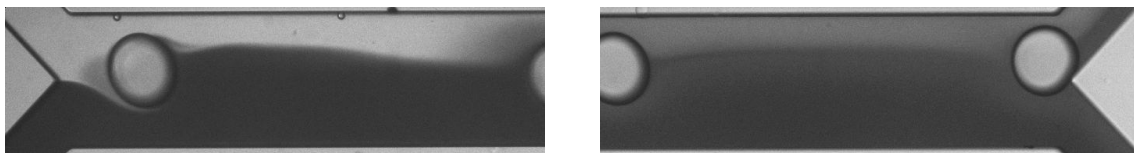


図 1. マイクロチャンネル内における、液滴を利用した染料溶液の希釈。左：染料 (左下から流入) と水 (左上から流入) が、液滴の流入により効率よく混ぜられている。右：流路出口では、希釈が行われていることが確認できる。流路幅は 200 マイクロメートル (0.2 mm)、流路高さ (紙面奥行き方向) は 50 マイクロメートル。

酸)を流入させない場合には、混合は拡散により少しずつ進行するため、図1右に見られるような、流路出口(入口から10 mmの距離)において画面上側の壁面に染料が到達することはない。このように、液滴の流入によって効率的な希釈が行えることが明らかになったため、希釈に最適な条件を検討するために、試料、バッファー液、液滴の流量、および流路幅をパラメータとして本手法の混合・希釈特性を明らかにした。得られた結果は、国際論文誌上で発表した (Sakurai, Yamamoto, Motosuke, *Analyst*, 2019)。

上述のように、染料および微粒子溶液を試料とした場合には、液滴を混合することで効率的に希釈が行えることが明らかになった。この結果を受け、全血を用いた同様の希釈実験を行ったが、赤血球とオレイン酸が好ましくない反応をすることが明らかになったため、液滴の代わりに気泡を用いて希釈を行うこととした。気泡を用いることによって希釈特性は変化した、液滴と同様に効率的な希釈が可能であることが明らかになった。また、血液が空気に触れることによる悪影響がないことを確かめるため、本手法によって希釈した血液を抗体と混合させて反応の様子を観察した。その結果、マニュアル操作で希釈した場合と比較して変化がない事が示されたため、気泡を用いた希釈手法を採用することとした。

希釈手法を確立した後、希釈後の血液と試薬の混合を行うチャンバーを設計し、検出感度や視認性について調査した。本チャンバーでは、赤血球と抗体試薬が反応すると赤血球の凝集が起こることに着目し、単体の赤血球のサイズより大きく、凝集した赤血球のサイズよりは小さいスリットをチャンバー内に設け、血球と試薬の混合後にPBSで血球を洗い流すことにより、凝集した赤血球のみをチャンバー内にトラップする構造とした。その結果、図2に示すように、強い凝集(図2b: 4+)から弱い凝集(図2c: 1+)まで、目視で確認でき、反応がない場合(図2d: 0)と明確に区別できることが明らかになった(チャンバーの幅は4 mm程度)。従来の凝集判定試験では弱い凝集の有無の判定は検査者の技術に依存しており、誤判定の余地が残されていたが、本チャンバーを用いることで判定の精度は向上すると考えられる。

気泡あるいは液滴を利用した希釈手法は、希釈の高効率化を実現したが、その一方で、図1右に見られるように希釈後の溶液は空間的に濃度が均一ではない。この状態のまま検査を行うと、試料濃度が異なる影響で検査結果が不安定になる恐れがある。そこで、希釈後の血液濃度を均一にするための機構をマイクロチップに導入した。ところで、濃度の均一化も混合の一種であると捉えれば、ここでも気泡の流動を利用することによって効率的に均一化が行えると考えられる。本チップでは、希釈流路の下流にマイクロスケールの小部屋を複数配置し、その中を気泡がランダムに流動する仕組みを導入した。これにより、非常に短時間のうちに希釈血液の濃度の均一化が実現された。また、ここまで有益な働きをしてきた気泡は、反応・検出の段階に混入することは望ましくないため、気泡を取り除いて希釈血液のみを検出チャンバーに導入する機構も取り入れた。

以上で検討した各要素を1枚のチップに集約して完成させた血液検査チップを図3に示す。本チップを用いて血液型判定を行ったところ、血液およびPBSをロードしてポンプを動作させてから約5分後に、図3に示すような目視でも明確な赤血球の凝集を確認することができた。

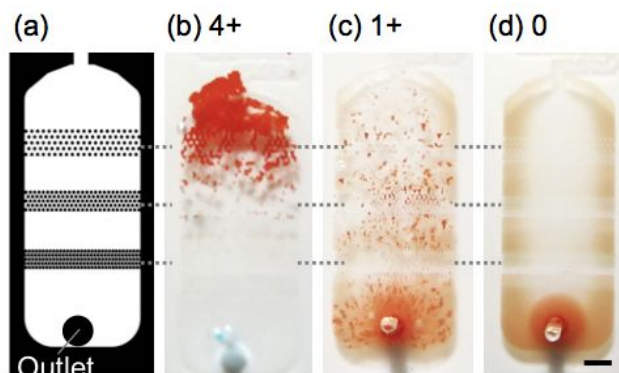


図2. チャンバー内での赤血球の凝集の様子。スケールバーは1 mmを表す。

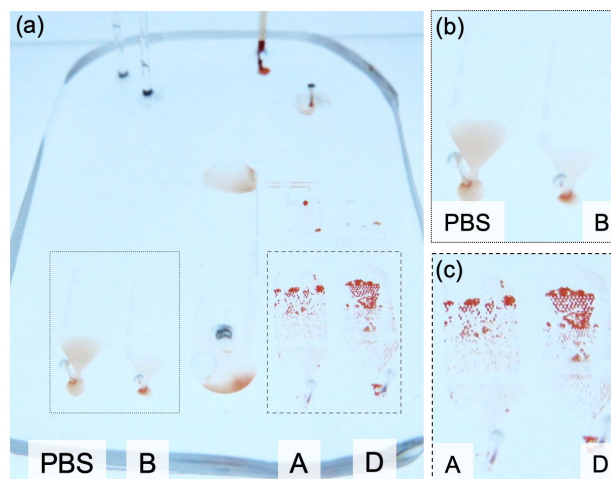


図3. 開発したチップを用いた血液型判定結果。“A抗体”および“D抗体”がロードされたチャンバーで赤血球の凝集反応が見られるため、検査した血液型はA (Rh+)であることがわかる。チップのサイズは縦5 cm、横3 cm程度。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ryosuke Sakurai, Ken Yamamoto, Masahiro Motosuke, Concentration-adjustable micromixer using droplet injection into a microchannel, *Analyst*, 査読有, Vol. 144, 2019, pp. 2780-2787.

〔学会発表〕(計 8 件)

Ken Yamamoto, Ryosuke Sakurai, Masahiro Motosuke, Concentration-adjustable superdilutor chip, *22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (MicroTAS 2018)*, paper ID: 3233, Kaohsiung, Taiwan (2018)

Ryosuke Sakurai, Ken Yamamoto, Masahiro Motosuke, Whole-blood-based microfluidic blood typing chip with precise dilution and sensitive agglutination level detection, *22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (MicroTAS 2018)*, paper ID: 3121, Kaohsiung, Taiwan (2018)

Ryosuke Sakurai, Ken Yamamoto, Masahiro Motosuke, Bubble-based dilutor and slit-type RBC agglutination detector for an integrated microfluidic blood typing device using whole blood, *Water on Materials Surface 2018 (WMS 2018)*, Tokyo, Japan (2018)

櫻井 亮介, 山本 憲, 元祐 昌廣, マイクロチャネルにおける液滴の流入を利用した懸濁液濃度の能動制御, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会, 群馬, 2017年10月

Ken Yamamoto, Ryosuke Sakurai, Masahiro Motosuke, Particle motions in microscale multiphase flow, *International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2017 (ICMaSS)*, Nagoya, Japan (2017)

櫻井 亮介, 山本 憲, 元祐 昌廣, マイクロ流体デバイスにおける液滴の流動を利用した分散微粒子の輸送, 日本混相流学会混相流シンポジウム2017, 東京, 2017年8月

Ryosuke Sakurai, Ken Yamamoto, Masahiro Motosuke, Micromixer using droplet injection, *4th I² plus International Symposium on Interfacial Thermofluid Dynamics*, Tokyo, Japan (2017)

櫻井 亮介, 山本 憲, 元祐 昌廣, マイクロ流体デバイスにおける液滴の流動を利用した分散微粒子の混合・希釈の促進, 関東学生会 第56回学生員卒業研究発表講演会, 東京, 2017年3月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：元祐 昌廣

ローマ字氏名：(MOTOSUKE, Masahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。