

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01415

研究課題名(和文)生活習慣病予防を目的とした簡易血液粘度測定用マイクロ流体チップの研究

研究課題名(英文)Study of a micro fluid chip for blood viscosity measurement

研究代表者

坂本 憲児 (Sakamoto, Kenji)

九州工業大学・マイクロ化総合技術センター・准教授

研究者番号：10379290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：医療費増加の大きな原因となっている生活習慣病の予防を目的とし、そのリスク要因である食後高脂血症を簡便に判定できる簡易血液粘度測定装置を開発し、患者のセルフメディケーションを支援する。本研究期間では血液1滴で全血および血漿の粘度測定を可能にするため、毛細管現象による送液および血漿分離が可能なマイクロ流体チップの研究のに取り組んだ。本研究で試作したマイクロ流体チップにより、分離機構の研究を行い血漿分離可能な流路の作製に成功した。また、微量サンプルのポンプレスな送液を可能にし簡易測定が可能となった。ゆえに本研究期間において、微量のサンプルから血漿分離、簡易粘度測定が可能になり目的が達成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療費増加の大きな原因となっている生活習慣病の予防を目的とし、そのリスク要因である食後高脂血症や糖尿病を簡便に判定できる簡易測定装置の需要が高まっている。そのため本研究では、マイクロ流路を用いた簡易測定チップを試作し、生活習慣病の指標となる血液粘度を簡単に測定する研究を行った。マイクロ流路を用いている事で、一滴の血液で粘度状態を把握することが可能であり、患者の負担は極めて低くなる。本研究により生活習慣病予備患者のセルフメディケーションが推進されると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To prevent lifestyle-related diseases, which are a major cause of the increase in medical costs, we developed a simple blood viscosity measurement device that can easily detect Post-feeding hyperlipidemia, which will help patients to self-medicate. In this study, we studied a microfluidic chip that can deliver fluid by capillary action for measuring the viscosity of whole blood and plasma with a single drop of blood. Using the microfluidic chip developed in this study, we studied the separation mechanism and made a flow channel for plasma separation. In addition, the pumpless pumping of a small amount of sample was made possible for simple measurement. Therefore, in this study, plasma separation and simple viscosity measurement from a small amount of sample were possible, and the purpose of this study was achieved.

研究分野：マイクロ流路

キーワード：マイクロ流路 検査・診断システム 粘度測定装置 血球分離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 24 年度の国民医療費は 39 兆 2,117 億円で、高齢化率の上昇とともに増加しており、国民医療費の抑制が急務となっている。厚生労働省は『厚生労働白書』(平成 26 年版)において、健康長寿社会の実現や健康寿命の延伸に向けた提言を行っている。また「日本再興戦略」(平成 25 年 6 月閣議決定)

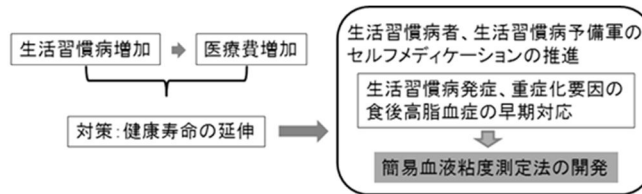


図1 健康政策とセルフメディケーション

においても、「国民の健康寿命の延伸」がテーマとなっており健康寿命延伸に向けてセルフメディケーションの推進が掲げられ、自己健康管理に必要な健康増進や生活支援を担う市場・産業の創出・育成の必要性が提起されている(図1)。セルフメディケーションとは、「自分自身の健康に責任を持ち、軽度な身体の不調は自分で手当てすること」と定義されている(世界保健機構)。現在、我が国では糖尿病や脂質異常症など生活習慣病は死因の上位を占めている。この背景に動脈硬化の発症進展を来しやすい食後高脂血症の関与が強く示唆されている。そのため食後高脂血症は動脈硬化進展による疾病発症のリスク評価のための代謝マーカーとして重要な指標となっている。しかし、食後高脂血症の診断には空腹時および食後一定時間経過後の2点で血中脂質量を測定することが望ましいが、一検査につき数 mL 以上の採血が必要であり、医療機関等を受診するなど患者への負担が大きい。

糖尿病患者や脂質異常症患者と健常者において血液粘度を比較すると、前者の血液粘度が高い値を示すことが報告されており(参考(1))、家庭などで簡便に数  $\mu\text{L}$  量の血液を用いて血液粘度を評価できれば、糖尿病や脂質異常症の患者のセルフメディケーションに大きな貢献をされると考えられている。このような背景のもと、私の研究では血液粘度を測定する簡易測定装置の研究開発を進めている。

血液粘度の測定方法として、「電気伝導率」と「粘度」に相関があるという物理法則(Walden 則)に基づき測定する方法が提案されている(参考(2))。この原理確認を行うために、人為的に粘度を変えた食塩水、脂肪含量の異なる種々の牛乳および脱脂乳、および血液粘度が増大する処置を施したラット由来の血清および血漿などに電流を流し、電気伝導率を測定して、例外なく「粘度が大きければ電気抵抗が大きい」こと、つまり「電気伝導を測定して溶液粘度の大小を判別できる」ことを確認した。

この原理を応用し血液一滴程度で粘度測定を可能にするため、微細なマイクロ流路と電極を組み合わせたマイクロ流体チップの研究を進めている。平成 28 年度上半期までの研究で、電極付きマイクロ流路の作製プロセスを構築し、プロトタイプマイクロ流体チップと測定方法の基礎を確立した(参考(3))(図2、3)。プロトタイプマイクロ流体チップを用いて、食塩水等のサンプルの粘度測定に成功した。またプロトタイプチップを用いて全血の電気伝導率の測定も行った。しかし、全血の場合は、測定結果が安定しないという問題が生じている。これは血球成分由来の電気伝導率の変動が起こっている為と考えられている。

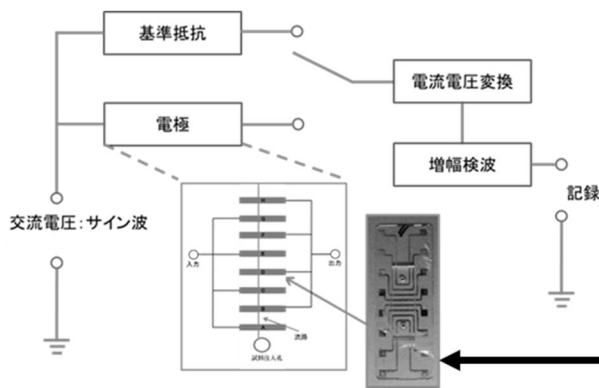


図2 マイクロ流体チップおよび測定法

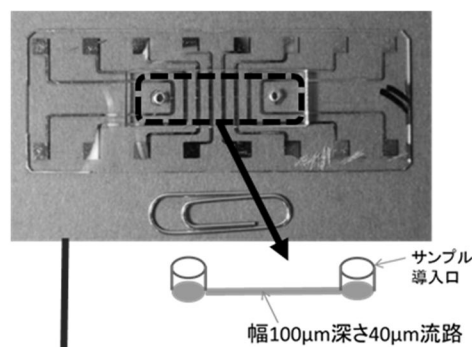


図3 マイクロ流体チップ拡大

2. 研究の目的

医療費増加の大きな原因となっている生活習慣病の予防を目的とし、そのリスク要因である食後高脂血症や糖尿病を簡便に判定できる簡易血液粘度測定装置を開発し、患者のセルフメディケーションを支援する。本研究期間では簡易血液粘度測定装置のために、血液 1 滴 (1  $\mu\text{L}$  程度) で全血および血漿の粘度測定を可能にするマイクロ流体チップの研究、マイクロ流体チップ上で全血成分から血漿成分を測定するための血球分離機構の研究、マイクロ流体チップの大量生産化研究の3つに関し取り組む。

### 3. 研究の方法

本研究では、血液 1 滴 (1  $\mu\text{L}$  程度) で簡易に血液粘度を測定する測定チップおよび測定方法を開発する。これまでの研究によりマイクロ流体チップを用いた粘度測定は、全血の場合は血球成分の影響で測定結果が安定しないという問題が生じている。この問題を解決し、簡易血液粘度測定チップを開発するため

血液 1  $\mu\text{L}$  程度で全血および血漿の粘度測定を可能にするマイクロ流体チップの研究

マイクロ流体チップ上で全血成分から血漿成分を測定するための血球分離機構の研究

マイクロ流体チップの大量生産化研究

の課題に分け研究をすすめる。

マイクロ流体チップ上で全血成分から血漿成分を測定するための血球分離機構の研究

本研究のマイクロ流体チップを用いたサンプル溶液 (例えばショ糖入り食塩水) の測定は、図 4 のように、流動時間に伴い階段状に電流値の変化が見られる。これは流動に沿って櫛歯状に配置した電極が、サンプル溶液を通して並列に接続される様子を表したデータである。このデータの 1 ステップの上昇量は、サンプル流動の先端部分の電流測定に対応しており、これによりサンプルの  $N$  回の電気伝導率測定 (図 4 では 7 回測定) を行っている事になり、精度の良い測定を実現している (参考 4)。しかし、全血の粘度測定を行うと、測定結果は図 5 のようになり、電流値の測定結果が安定しないという問題が生じている。これは全血中に含まれる血球成分が、電流伝達の役目をしている為と考えられる。このため、より正確な血液の粘性評価には血漿での測定が必要になり、マイクロ流体チップ上で全血から血漿成分を分離しなければならない。

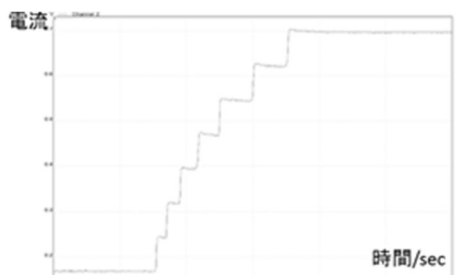


図4 ショ糖入り食塩水の測定結果

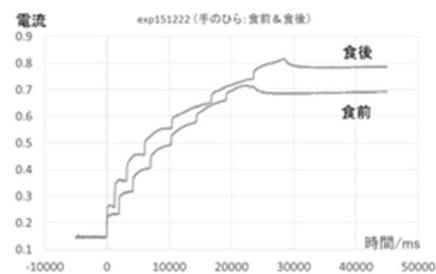


図5 血液の測定結果例

(食後の前後での血液粘度の変化を測定)

チップ上の血球分離のためには、次の課題を解決しなければならない。

a. マイクロ流路内の毛細管送液中で血球分離を行う

b. 血球成分は破壊しない

a. に関しては、マイクロ流路中に図 6 に示すような血球トラップ構造を検討している。これは半導体微細加工技術を用いて作製する事が可能である。b. については、a. のトラップ構造で血球に圧力の負荷がかかり、トラップされた血球が破壊されない様にしなければならない。このためトラップ構造に血球が通らない隙間を作り流動による圧力を逃がす形にする。血球細胞のサイズは 10  $\mu\text{m}$  前後であるが、血球の変形があるためこの隙間は数  $\mu\text{m}$  で作製する。この構造は深堀エッチング技術を用いれば作製可能である。これらの技術を用いて図 6 のトラップ構造を作製し、全血からの血漿分離を実施する。

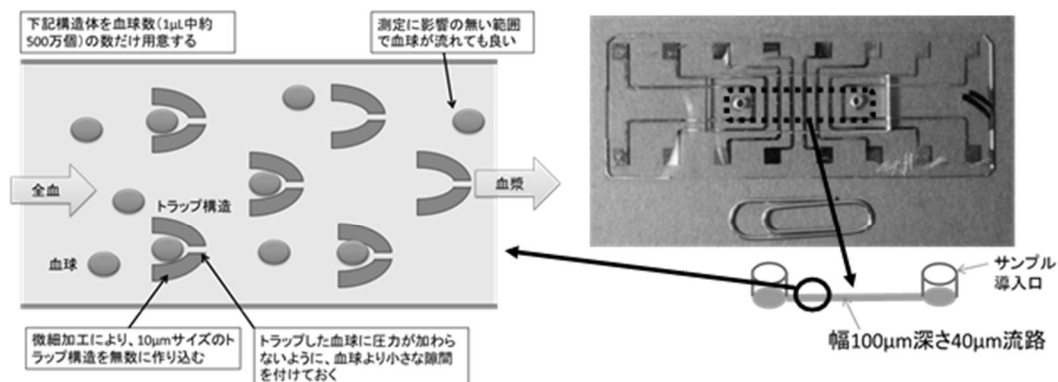


図6 血球分離のための血球トラップ構造

血液 1  $\mu\text{L}$  程度で全血および血漿の粘度測定を可能にするマイクロ流体チップの研究

マイクロ流体チップの大量生産化研究

課題 で研究した血漿分離機構を用いて実デバイスを作製し、ワンチップで全血と血漿成分の電気伝導率測定を実現する。毛細管力送液中で血漿分離と電気伝導度測定を行うため、また時間

が経つと血液が凝固するため、マイクロ流路チップは毛細管送液で10秒以内に流れて測定しなければならない。そのため、マイクロ流路に接する電極は微細加工により短く作り込む必要がある。ただし測定では時間に沿った電流測定をしているため、測定器の時間分解能の範囲内とする。この課題を解決し、測定チップを構築した後に、チップの大量生産性を考慮したプロセスに変更する。研究段階ではPDMS（ポリジメチルシロキサン）とガラス基板での作製を行うが、この材料は大量生産向けではないため、材料の変更を検討し、その材質にあったプロセスに修正する。

大量生産性の向上したチップを考案した後、基礎実験としてラットの血液サンプルにより基礎実験を行ない、血漿の粘度測定がワンチップで可能かどうかを評価する。その後、全血と血漿の測定結果を比較しヘマトクリット値のバラつき評価に本測定方法が使用可能かを検討する。

#### 4. 研究成果

**研究課題** マイクロ流体チップ上で全血成分から血漿成分を測定するための血球分離機構の研究については、計画段階から予定していた「1. 血球トラップ構造による血球分離機構」と、別手法である「2. サイドチャネル構造による血漿分離機構」の2種類の構造の検討を行った。

「1. 血球トラップ構造による血球分離機構」ではシリコンへの半導体微細加工およびMEMS加工を行い深さ約27 $\mu\text{m}$ 、長さ約1mmのトラップ構造流路を作製した（図7）。親水処理を行ったPDMS樹脂をカバーに用いて、マイクロ流路チップ形状に加工を行い、直径6 $\mu\text{m}$ の疑似細胞（ラテックスビーズ）を用いた疑似細胞混濁液（濃度：770 [cell/ $\mu\text{l}$ ]）を流動させ、光学顕微鏡によりトラップ性能の評価を行った。

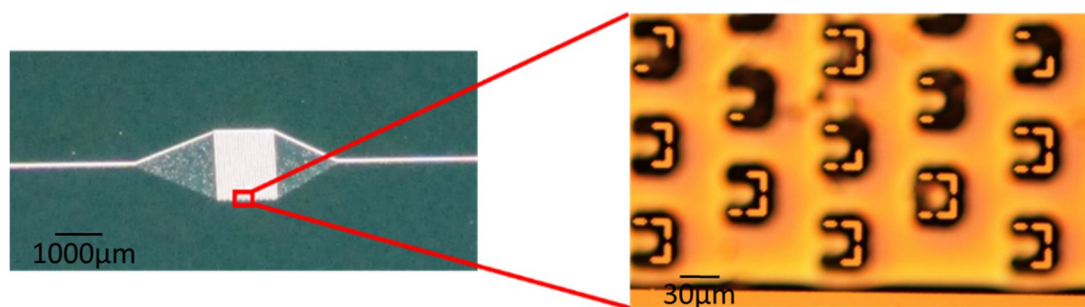


図7 血球トラップ構造流路の試作

この実験で、トラップ構造体に疑似細胞の補足は確認できたが、トラップ率は低く多数の疑似細胞が流れ出ている事が確認され、本課題の達成は困難であることが分かった。

そこで「2. サイドチャネル構造による血漿分離機構」による血球分離機構の手法を行った。サイドチャネル構造では、主流路、サイドチャネル部、分岐流路から構成され、主流路を流動している液体の上澄み（血漿成分）がサイドチャネル部を通過し分岐流路に到達する。粘度測定は、この分岐流路の先で行う構造にした。（図8）

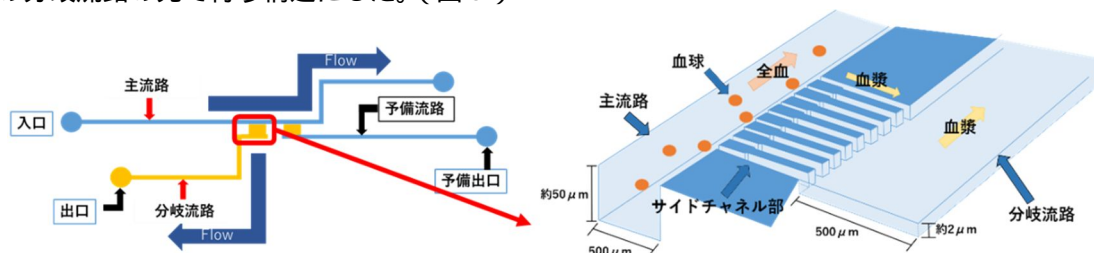


図8 サイドチャネル構造による血漿分離機構のイメージ

シリコンウエハ上への半導体微細加工および深堀エッチング技術を用いた二段階エッチングを用いて、この分離機構の作製プロセスを考案し試作を行った。主流路には全血を流すため深さは35 $\mu\text{m}$ 、サイドチャネル部および分岐流路の深さは血球の分離を行い、血漿成分のみを流すことが目的になるため4.5 $\mu\text{m}$ とした。図10が作製されたサイドチャネル構造流路である。

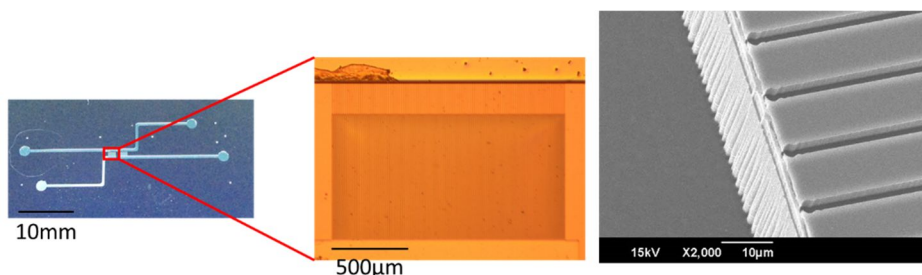


図9 試作したサイドチャネル構造による血漿分離流路



また、作製したマイクロ流路に親水化処理を行い毛細管現象による送液を実現し、ポンプレスな送液を可能にした。直径  $6\mu\text{m}$  の疑似細胞(ラテックスビーズ)を用いた疑似細胞混濁液(濃度:  $1050 [\text{cell}/\mu\text{l}]$ ) の流動実験を行い、溶液の流動の確認、分岐流路内に疑似細胞がないことの確認ができた。図 10 の白い丸は、疑似細胞を表しており、サイドチャンネル部の手前で疑似細胞がストップしている事が確認できた。

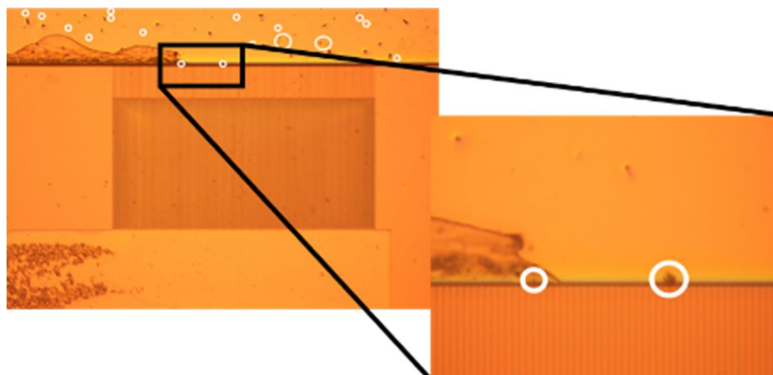


図 10 サイドチャンネル構造により捕捉された疑似細胞

以上より、課題 に関しては、「2. サイドチャンネル構造による血漿分離機構」の手法により、全血からの血球分離、分離した血漿の流動の確保が可能になったといえる。  
課題 血液  $1\mu\text{L}$  程度で全血および血漿の粘度測定を可能にするマイクロ流体チップの研究、に関しては、課題 の設計段階において、同時に課題に取り組んでいる。「2. サイドチャンネル構造による血漿分離機構」において、サイドチャンネル機構主要部は  $\mu\text{L}$  オーダーの液量になるように設計している。その前後に測定用マイクロ流路構造体を作製しても  $1\mu\text{L}$  をはるかに下回る(デッドスペースなどを含めて  $1\mu\text{L}$  程度)。また微量化を行うためには、ポンプを用いず毛細管現象による送液が必要である。マイクロ流路内の表面親水化処理手法の検討を行い、研究成果を学会で発表した(参考 5)。この成果をもとに本試作でも親水化処理を行っており、送液速度は入力部から出力部まで約 13 秒で達しており、血液凝固の対策も行うことができた。本試作流路の血漿分離後の流路に、過去の研究で行った電極の形成は容易であるため、本研究の目的の「血漿の測定」が実現可能になっている。以上より、課題 の試作チップにて目的は達成できている。  
課題 マイクロ流体チップの大量生産化研究に関しては、本研究の試作で用いたシリコンの半導体工程を用いる事で量産が実施可能である。チップサイズも主要部は  $5\text{mm}$  角程度であり、半導体工程に融合しやすい。ゆえに本研究期間において、微量のサンプルから血漿分離、簡易粘度測定が可能になり目的が達成できた。また半導体工程を用いた測定チップより、さらに安価な測定を実現するために、本手法を用いた測定手法をガラス製流路に転用する手法を検討している。ガラスへの微細加工は簡易なプロセスで実施可能であり、また親水化プロセスを簡略化することができるため低コスト化が望める。ガラスへの応用を検討し測定手法を改良した結果、粘度測定手法を含めた内容の特許出願を H30 年度、R 元年度に行った(参考 6,7)。この特許を元に企業との共同研究が R2 年度 3 月よりスタートした。

#### 【参考】

- (1) Leonardo J. Tamariz et al.: Am J Epidemiol. 2008; 168:1153 - 1160.
- (2)特願 2014-3378 産業医科大学 大野宏毅、門野敏彦、佐藤寛晃、鳥巢伊知郎、佐藤教昭、戸上英憲
- (3)特願 2016-13442 九州工業大学 坂本憲児、小林孝一郎、産業医科大学 大野宏毅、徳井教孝. 特願 2016-159498 九州工業大学 坂本憲児、小林孝一郎、産業医科大学 大野宏毅、徳井教孝
- (4) 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 34 回研究会講演要旨集 1P32
- (5) 簡易体液粘度測定チップ, 園山義貴、西園寺嶺、小林孝一郎、大野宏毅、坂本憲児, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 38 回研究会講演要旨集 4P03
- (6) 体液粘性測定装置, 大野宏毅、八谷百合子、坂本憲児, 特願 2018-127461, 出願日:平成 30 年 07 月 04 日
- (7) 液体採取装置、マイクロ流体チップ、粘度測定方法および表面張力測定法, 大野宏毅、坂本憲児, 特願 2019-114609 出願日:令和 1 年 6 月 20 日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 園山義貴、西園寺嶺、小林孝一郎、大野宏毅、坂本憲児
2. 発表標題 簡易体液粘度測定チップ
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第38回研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 体液粘性測定装置	発明者 大野宏毅、八谷百合子、坂本憲児	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-127461	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 液体採取装置、マイクロ流体チップ、粘度測定方法および表面張力測定法	発明者 大野宏毅、坂本憲児	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-114609	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----