

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20760133  
研究課題名 (和文) マイクロ流路内での血球・細胞の熱・電気特性計測技術の開発  
研究課題名 (英文) Development of a Measurement Method for Heat and Electrical Characteristic of a Red Blood Cell  
研究代表者  
巽 和也 (TATSUMI KAZUYA)  
京都大学・大学院・工学研究科・助教  
研究者番号：90372854

## 研究成果の概要 (和文)：

本研究では、マイクロ流路とマイクロ薄膜電極を用いた単一赤血球のインピーダンス特性および変形能計測が可能なマイクロセンサの製作に成功した。センサの精度検証には、正常なヒト赤血球およびグルタルアルデヒド処理を行った硬化赤血球を用いた。測定では、センサ電極間への単一赤血球の高精度な誘導と細胞のインピーダンスおよび抵抗値測定に成功した。また、抵抗値の時系列分布を用いた簡便・低価格・高精度な新たな変形能測定技術を示した。

## 研究成果の概要 (英文)：

A microsensor that can measure the electrical impedance and deformability of a single red blood cell (RBC) using microchannels and membrane-type micro-electrodes was successfully developed in this study. Normal human RBC and glutaraldehyde treated rigidified RBC were used as samples to evaluate the validity and accuracy of the sensor. The RBCs were guided to the electrodes in high accuracy, and the impedance and resistance of the each cell could be measured continuously. Moreover, a novel method that can measure the deformability of the RBC by analyzing the time-series distribution of the resistance was proposed, and its validity was confirmed.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：マイクロ流体工学，伝熱工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：赤血球，マイクロ流れ，インピーダンス計測，弾性率計測，医療工学

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロテクノロジーは種々の工学分野で新規産業を生み出しており，特に医療機器

や試薬反応装置として応用される $\mu$ -TAS (Micro Total Analysis Systems)などの実現に向けて大きく貢献している。現在では MEMS

による製造技術は既に成熟過程にあり、マイクロデバイスの製品化には、デバイス内の流体・物質の諸量を定量的に測定する技術と現象解析手法の開発が要求されている。その中で、マイクロ流路内における血球等の単一細胞の諸特性評価および制御は重要な課題の一つである。例えば、マラリアに感染した（パラサイト）赤血球は、正常血球と比較して膜の形状（扁平、ユニ形など）、剛性、電気的特性が異なることが知られている。この他に、異常ヘモグロビンの発生による鎖状血球形成は、血栓やそれに伴う組織虚血症を惹起する。これら血球の温度や諸特性をシームレスかつ、安価、短時間、簡便に検査する技術が開発できれば、臨床的な検知技術に応用でき、医療の分野に大きく寄与すると考えられる。

血球や細胞に関する研究は、特に医学の分野で多くなされており、マイクロピペットで血球を吸引しその変形量を評価する手法など、膜特性の測定技術についても実用化されている。しかしながら、この方法では複数の血球をシームレスに測定できず、また顕微鏡による観察が必要である等の問題から、臨床系の測定に応用することは困難である。これに対し、マイクロデバイスは、微量な試薬を短時間で安価に検査可能であるため臨床面で優れている。しかしながら、その実現にはマイクロ流路内における血球特性の詳細で系統的な知見収集と、その高精度で安定した計測技術の開発が必要となっている。

## 2. 研究の目的

1節の背景を踏まえ、本研究は、マイクロPIV (Particle Image Velocimetry: 粒子画像流速計測) による速度場計測、高速度カメラによる血球挙動・変形能の可視化と解析、薄膜 Pt センサによる電気特性（インピーダンス）計測、レーザ蛍光偏光法によるマイクロ流路内の温度場計測、そして数値シミュレーションによる流体中の赤血球の導電率や比誘電率、および変形計算などを行い、マイクロ流路内における流体特性評価および単一血球や細胞の変形能、膜特性、電気特性を計測し、各特性に関する詳細な検討を行う一方、臨床試験を指向した新たな技術の提案と開発を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、実験および数値シミュレーションの両アプローチから、赤血球の電気特性、変形能、剛性などの評価とその特性検知が可能なセンサの開発を行う。

実験では、PIV 装置、高速度カメラ、レーザ蛍光偏光計測装置を用いて諸量の測定を行い、その上で金属スパッタリングとエッチングなどのマイクロファブリケーション技術によるマイクロ流路と薄膜電極から成る

マイクロセンサ製作を行う。

高速度カメラによる可視化撮影と PIV 測定では、血球近傍（ $10\mu\text{m}$  四方の領域）を含めた流れ場計測とせん断場の解析を行うことにより、Tank Treading Motion など血球膜特有の現象解明や血球の変形能との相関を求める。血管内のバルク的な速度場の計測は行われているが、各血球周りの速度場の測定を行った研究はほとんど無く、高速度カメラによる血球の変形能と連携することにより、流れ場における血球の膜特性の解明に大きく資すると考えられる。

次に、薄膜マイクロ電極をパターンニングしたガラス基盤を PDMS (Polydimethylsiloxane) 製のマイクロ流路に密着させたマイクロセンサを製作する。センサは、その電極間に高周波 AC 電圧を印加してインピーダンスを求め、電極間を通過する赤血球の電気特性を測定する。測定したインピーダンスから細胞の抵抗値を求め、その時系列データから細胞の変形能を求める手法を確立する。

数値シミュレーションでは、市販の電場解析ソフト COMSOL を用い、そこに細胞膜と細胞脂質を連成した新たな数値解析モデルを適用して、生理食塩水に懸濁した単一赤血球の導電率と比誘電率を計算する。さらに赤血球の変形度合によるこれらの値への影響を検討する。ここで得られたデータを、センサ電極および流路設計支援として活用し、効果的な形状の流路を製作すると共に、実験で得られたデータを計算のモデルにフィードバックして活用する。

## 4. 研究成果

### (1) 赤血球の電気特性に関する数値シミュレーション

電極対により赤血球を含む懸濁液に電圧を印加する場合、電極間の等価回路は、細胞質、細胞膜、溶媒、電極表面の電気二重層、それぞれ代表する抵抗性および容量性の回路要素で構成される。また、この回路は、赤血球の移動に伴って変化する可変抵抗の値  $R(t)$  と可変キャパシタの容量  $C(t)$  とで構成される並列要素と赤血球位置に無関係の電気二重層の要素との直列接続回路として簡略化した等価回路と見なせる。

ここで、マイクロセンサでは赤血球の浸透圧を保つためにイオン強度が高い生理条件溶媒を用いるため、電気二重層の容量は他の要素と比較して非常に大きく、直流～低周波交流では、電圧を印加しても  $R$  の正確な測定が不可能である。一方、周波数が高すぎると絶縁性の高い赤血球膜においても細胞膜インピーダンスが低下してしまう。従って、測定周波数の適切な選択が必要である。

そこで、はじめに懸濁した赤血球と生理食塩水を含む系の比誘電率  $\epsilon_{\text{sus}}$  と導電率  $\kappa_{\text{sus}}$  の周

波数特性を数値解析的に求めた。解析では、赤血球の細胞膜と細胞質を考慮した新たなモデルを適用し、それに生理食塩水のモデルを加えて解いている。解析手法の詳細は、発表論文を参照されたい。

図1に代表的な評価例として、 $\epsilon_{\text{sus}}$ と $\kappa_{\text{sus}}$ のAC電圧の周波数 $f$ に対する関係を示す。

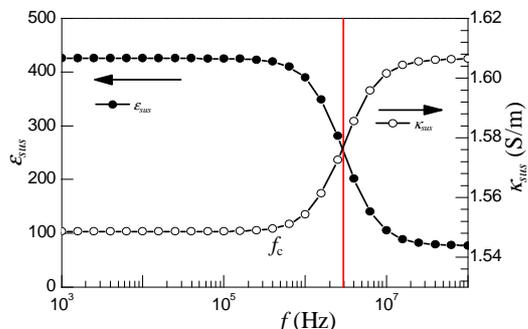


図1 赤血球懸濁液の導電率と比誘電率

図中の点線で表した $\kappa_{\text{sus}}$ の値から、溶液は誘電緩和現象を示し、2MHz付近に存在する緩和周波数 $f$ の前後で $\kappa_{\text{sus}}$ は変化することが分かる。これは、 $f$ を境にして、低周波数域では細胞膜は絶縁体として作用し、細胞形状が $R$ に強く反映される一方、高周波域では膜インピーダンスが低下し細胞質の抵抗値が直接測定され、低周波域の場合のように $R$ に形状が反映されないことを意味している。この知見を基に、本研究では10kHzを測定周波数として選択した。

さらに数値シミュレーションを用いて、電極や流路寸法、および赤血球の通過高さが測定抵抗に与える影響について系統的な検討を行った。図2にその代表的な結果を示す。図では、赤血球が電極間中央に位置する場合の測定抵抗 $R$ から生理食塩水のみを差し引いた赤血球による抵抗変化量 $\Delta R$ に与える、赤血球の通過高さ $z_{\text{RBC}}$ 、流路高さ $H_2$ 、センサ電極間隔 $w_s$ 、センサ電極幅 $l_s$ の影響を示す。

解析では、この他に赤血球電極通過時の抵抗値の時系列変化などを求めた。これらの値を用いて、事項(3)に示すマイクロセンサの設計寸法を決定することができた。

また、本解析モデルの妥当性が示されたことから、今後は、このモデルを用いてさらに赤血球形状センサや強磁場下における赤血球特性、さらに赤血球と流体の連成解析モデルへの展開を予定している。

## (2) レーザ蛍光偏光法によるマイクロ流路内の温度場計測

マイクロ流路内において高精度な温度場の測定が可能で、新たな非接触型の計測手法を提案し、その妥当性の検証を実験的に行っ

た。

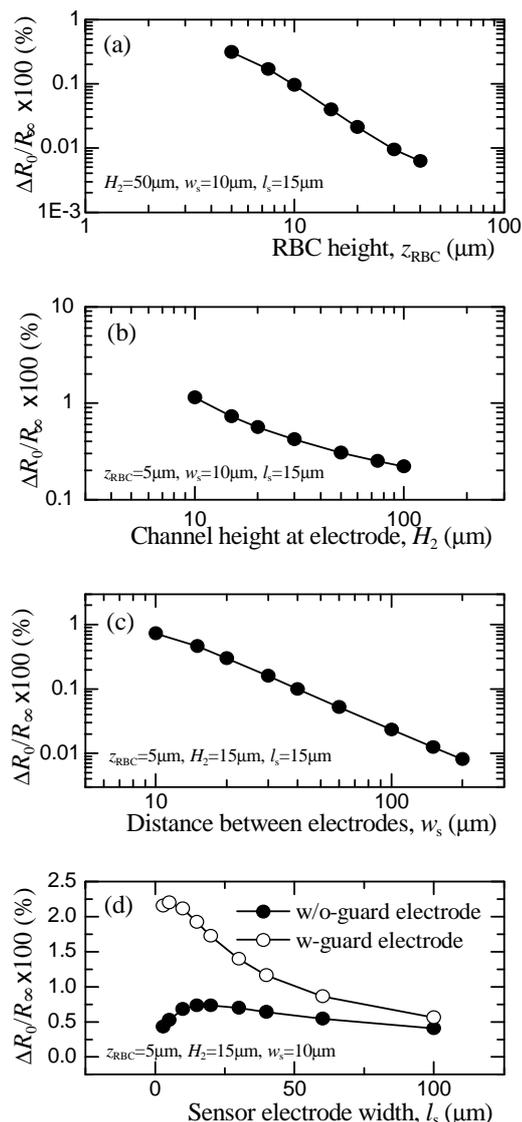


図2 流路と電極寸法が抵抗値測定の精度に与える影響

溶液中の蛍光分子に直線偏光した励起光を照射した場合、その偏光方向と平行な吸収モーメントをもつ蛍光分子が選択的に励起される。さらに、発光モーメントと吸収モーメントが平行な場合、蛍光分子は吸収モーメントと同偏光方向を持つ蛍光を発する。この時、蛍光物質の励起吸収から蛍光発光までの間に蛍光分子が回転ブラウン運動することで蛍光偏光方向が変化する。この場合、分子量が小さい蛍光分子では、緩和時間は蛍光寿命と比較して十分小さいため蛍光偏光方向はほぼランダムとなる。一方、蛍光分子が他粒子へ付着して分子量と共に回転緩和時間が増大すると、蛍光の偏光特性が観測される。この時、蛍光分子の体積と蛍光寿命が一定であれば、蛍光偏光度 $P$ の逆数 $1/P$ は、温度 $T$ と流体粘性 $\mu$ について、 $T/\mu$ と線形関係にある

ことが理論的に示されている．これは， $1/P$ を測定することで流体温度が求まる可能性を示しており，本測定手法はこの原理に立脚する．

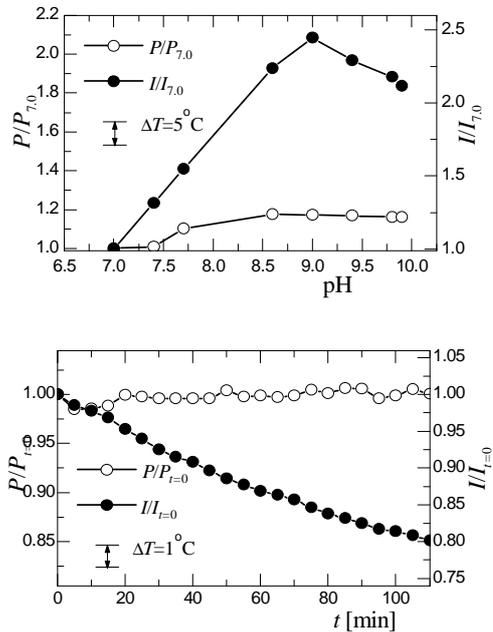


図3 流体の pH と測定時間が蛍光強度  $I$  (従来手法) と蛍光偏光度  $P$  (本手法) に与える影響

測定では，マイクロ流路内の温度測定の妥当性の他，溶液の pH や測定時間が測定精度に与える影響について検討を行った．図3にその結果を示す．図に示す通り，LIF (Laser Induced Florescent) 法などで用いられる蛍光強度は pH や測定時間に対して減衰するのに対して，蛍光偏光度を用いた本手法では，これらの影響を受けないことが分かる．また，図4に示すように，マイクロ流路内の温度場測定についても相関性を示す．これらの結果に基づき，マイクロ流路内の温度場測定に本手法を適用し，流路内の温度環境の設定に活用した．

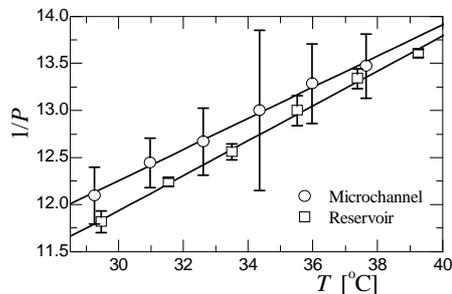


図4 マイクロ流路内の流体温度  $T$  と偏光度の逆数  $1/P$  の関係

(3) マイクロセンサによる赤血球の抵抗値および変形能の計測

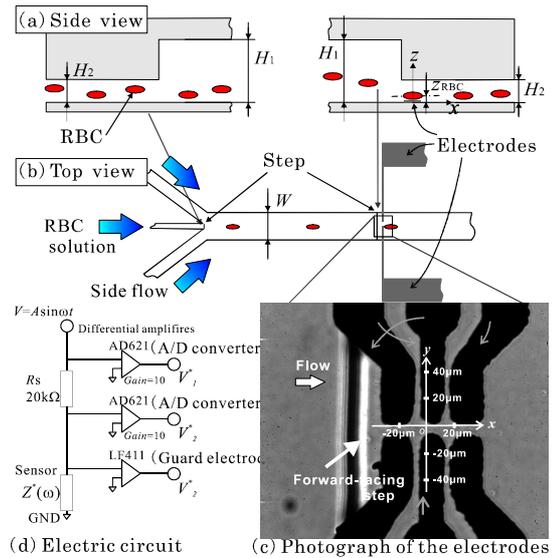


図5 マイクロセンサの概略図

(1)および(2)の数値シミュレーションと計測により，マイクロ流路と電極の寸法を定め，マイクロファブ리케이션技術を活用して，図5に示すマイクロセンサを製作した．電極は，電圧印加・電流検出用のセンサ電極，センサ電極と同電位のガード電極，そしてグラウンド電極，の三種類から成る．ガード電極は，センサ電極から発生する電気力線のフリッジ成分を低減させ，赤血球通過時の抵抗値変化を増大させることで，S/N比を向上させた．流路は三つの流入口が設けられ，中央流路から赤血球を含む溶液が，両側の流路から溶媒のみが供給される．このようにシース流れを生成することで，赤血球を電極間中央に安定して導くことが可能とした．さらに，赤血球のFähraeus効果による流路壁面から離れてしまう効果に対して，入口と出口において，それぞれ後ろ向きステップと前向きステップを付設することで赤血球を電極部において流路下壁近傍に一定高さで通過することに成功し，S/N比を向上させた．

このセンサを用いて，正常なヒト赤血球とグルタルアルデヒド処理により硬化させた赤血球を用いて実験を行い，赤血球通過時の抵抗値  $R$  測定と，その時系列分布の解析による赤血球の変形能測定を行った．

図6に実験で得られた赤血球の電極中心位置に対する主流方向位置と  $R$  の関係を示す．図に示すように，高い時間分解能で赤血球による  $R$  の変化が測定出来ていることが分かる．また，正常赤血球と硬化赤血球との違いが見られ，変形の相対的に大きい正常赤血球で半値幅が大きくなることが分かる．このことは数値計算による予測と定性的によく一致し，実験および数値解析の妥当性の裏付けともなった．

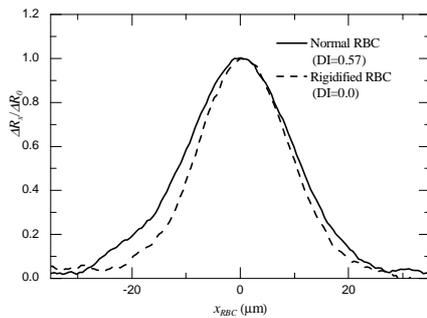


図6 赤血球の電極間通過時の測定抵抗の時系列分布 (正常・硬化赤血球の比較)

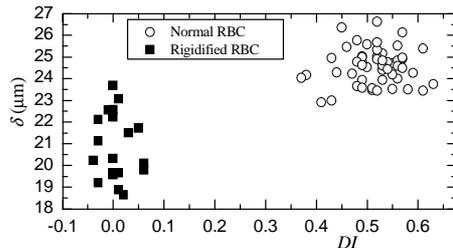


図7 抵抗値の時系列分布の半値幅 $\delta$ と変形度 $DI$ の関係

つぎに、高速度カメラ撮影により求めた赤血球の変形度 $DI$ と抵抗値 $R$ の時系列分布の半値幅 $\delta$ との関係を図7に示す。図に示すように、 $DI$ と $\delta$ の間では良好な相関が得られた。この結果から、本マイクロセンサによる単一赤血球の変形能測定の有効性と妥当性が示すことができた。

定量的には、正常赤血球の場合、実験で得られた $\delta$ の平均値は数値計算の値に比べて完全には一致しない。この差は、センサ電極幅 $l_s$ が数値計算での条件に対してやや広いことや、実際の赤血球にはモデルとの乖離が存在することに起因すると考えられる。赤血球の力学特性を考慮した流体解析と電場解析をカップリングさせることにより、 $\delta$ はさらに定量的に評価できると考えられる。

また、 $\delta$ にはまだ誤差が含まれていることが分かる。これは、主として電極間通過時の赤血球高さ $x_{RBC}$ とスパン方向位置のばらつきに起因すると考えられる。これらの問題を解決するために、H22年度現在も電極と流路形状を改良し、測定を引き続き行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- 1) Y. Katsumoto, K. Tatsumi, T. Doi and K. Nakabe, Electrical Classification of Single Red Blood Cell Deformability in High Shear Rate Micro-Channel Flows, *Int. J. Heat and Fluid Flow*, 有, 2010,

印刷中.

- 2) 勝本洋一, 巽和也, 土井立樹, 中部主敬, 高せん断マイクロ流れと電気的測定を用いた赤血球変形能の評価, *日本機械学会論文集, B編*, 有, 75-759, 2009, 2215-2224.

[学会発表] (計7件)

- 1) 遠崎晃久, 巽和也, 中部主敬, マイクロ蛍光偏光法を用いた流路内の流体温度計測, *熱工学コンファレンス 2009*, 2009/11/7, 山口.
- 2) Y. Katsumoto, K. Tatsumi, T. Doi and K. Nakabe, Measurements of Human Red Blood Cell Deformability in Micro-channel Using Electric Sensors, *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2009)*, 2009/11/1, Jeju.
- 3) K. Tatsumi, Y. Katsumoto, T. Doi, K. Nishitani and K. Nakabe, Red Blood Cell Deformability Sensing System using Electric Sensors and Micro-channels, *9th Kyoto - Seoul National - Tsinghua University Thermal Engineering Conference*, 2009/10/27, Kyoto.
- 4) 西谷幸祐, 土井立樹, 勝本洋一, 巽和也, 中部主敬, 高せん断マイクロ流路内流れにおける赤血球変形能の電気的計測 (第2報), *日本機械学会 2009年度年次大会*, 2009/9/13, 盛岡.
- 5) Y. Katsumoto, K. Tatsumi, T. Doi and K. Nakabe, Electrical Classification of Single Red Blood Cell Deformability in High Shear Micro-Channel Flows, *7th World Conference on Experimental Heat Transfer, Fluid Mechanics and Thermodynamics (ExHFT-7)*, 2009/6/28, Krakow.
- 6) Y. Katsumoto, T. Doi, K. Tatsumi and K. Nakabe, Measurement of Deformability of a Single Red Blood Cell in Micro Channels with High Shear Flows using an I-V method, *2nd International Forum on Heat Transfer*, 2008/9/17, Tokyo.
- 7) 勝本洋一, 土井立樹, 巽和也, 中部主敬, 高せん断マイクロ流路内流れにおける赤血球変形能の電気的計測, *第25回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム*, 2008/10/23, 沖縄.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巽 和也 (TATSUMI KAZUYA)  
京都大学・工学研究科・助教  
研究者番号：90372854

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し