

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360095

研究課題名（和文） 流体力による単細胞制御と電氣的センシングとの複合技術を用いた細胞変形能の計測

研究課題名（英文） Single Cell Deformability Measurement Based on the Combined Technology of Cell Flow Control and its Electric Detection

研究代表者

中部 主敬（NAKABE KAZUYOSHI）

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80164268

研究成果の概要（和文）： 単細胞の一種である赤血球に注目し、赤血球の変形能を効率良く測定できる新規な手法を提案した。また、その手法を具現化するためマイクロ流路壁面に対向型薄膜電極対を付設して赤血球変形能を測定した。赤血球はその健全性を損なうと硬化するので、剪断流中で赤血球を変形させ、その健全性に応じた変形指数 (DI) を電気抵抗の変化量 (ΔR) として検出する。 ΔR ピークの半値全幅 δ が DI と良好に対応することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： An innovative method to effectively detect a characteristic difference in the deformability of red blood cell (RBC) as a typical example of single cells has been proposed in this study and applied to micro-fluidic experiments using a pair of counter-type membrane electrodes carefully designed and mounted on the surface of a microchannel. The flows of high shear rate with which an RBC changes its shape depending on its health condition were introduced in the microchannel. The electrodes monitored the signal patterns of electric resistance ΔR which corresponds to the deformability index of RBC, DI . It was found that DI was closely correlated with the full width of half maximum δ of ΔR peak, rather than the peak value itself.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：物質輸送，細胞変形能，マイクロ流路，剪断応力，誘電分光，電場強度分布，速度分布，可視化技術

1. 研究開始当初の背景

流体の流れを制御して工学的、工業的に役立つ様々な流体機械を創製することはこれまで多数なされてきた。現在では MEMS (Micro ElectroMechanical Systems, マイクロ電気機械システム) デバイス製造技術の目覚ましい進展から、医学、薬学の科学、産業分野においても流体挙動の特徴を活かした

熱・物質の輸送、混合、反応が行えるマイクロ流体デバイスの考案が盛んになり、その高精度、高効率制御技術が強く求められるようになった。とくにマイクロメートルスケールの微細かつ複雑な流路を有する新規な試薬反応装置、医療検査機器として注目される μ -TAS (Micro Total Analysis Systems, マイクロ総合化学分析システム) や LOC

(Lab-on-a-Chip, ラボチップあるいはマイクロチップ実験室)と呼ばれるマイクロ流体デバイスではその具体的応用展開が期待されている。すなわち、従来からの試験管ベースの数 cc ($\sim 10^{-6}\text{m}^3$) 以上の体積と数 10s 以上の反応時間を要して嵩高い医療廃棄物も伴う検査処理に対して、 μ -TAS や LOC の活用は体積、時間、資源のいずれの面からも 10^3 分の 1 以上の大幅な削減を可能にする。

一方で超高齢化社会を迎えつつある社会において安心・安全と医療費削減を見込んだ高度診断技術確立の要望は強い。しかし、RBC を例にとると遠心分離したりマイクロピペットで一つずつ吸引したりすることでその変形量を顕微鏡観察して評価し、診断の実用に供されている。RBC は例えばマラリアに感染 (パラサイト) した場合、正常な柔らかい両凹円盤状から扁平状、ウニ状の細胞膜形状に変形、硬化する。また、RBC の細胞膜の剛性や電気的特性、温度特性が正常なものと異なり RBC が鎖状構造になると血栓やそれに伴う組織虚血症が惹起される。そのために RBC の変形の程度を評価しておくことは大切である。

このように単細胞を顕微鏡等によって個々に観察するバッチ処理では検査対象となる単細胞の個体数に限りがあり、臨床系への応用には時間的、人的労力の面から困難を伴う。これに対して μ -TAS はサンプル量、試薬量が微小で、短時間かつ簡便に検査できる特長がある上に、単細胞の特性を電気的に検出、評価できるならば多数の個体をシームレスに取り扱うことができる。それゆえ、臨床的検知の応用技術面で優れており、医療の分野に大きく貢献できると考えられる。しかし、その実現にはマイクロ流路内での単細胞挙動とその特性について、詳細かつ系統的な知見収集、ならびに、そのための高精度で安定した計測技術開発が必須となる。本研究ではこれらを達成するために、マイクロ流路を用いて剪断流を発生させて RBC を変形させ、その際の変形能特性を電気的に連続して簡便に精度良く計測できる手法を開発することとした。

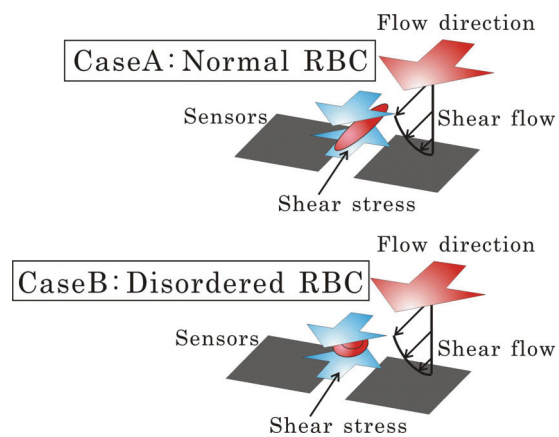
2. 研究の目的

本研究では μ -TAS の具体的応用分野として RBC を含む流れに注目し、その特性、とりわけ細胞変形能の異同について、短時間でシームレスに分析・評価する方策を検討することを目的とする。単細胞の特性分析、評価のためにはマイクロ流路内での精密な流動制御と電気的センシングを複合的に行う必要がある。さらに、それらを μ -TAS としての具体的な流体デバイスとして設計、製作する技術を開発しなければならない。

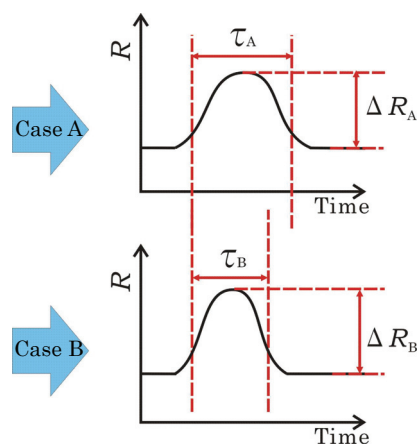
そこで、本手法確立とそれに基づく十分な

性能を発揮するマイクロ流体デバイスのプロトタイプ作製を行うことを目的に、以下の事項を実施して知見の収集を行い、詳細な検討を行う：

- (1) RBC を変形させながら薄膜センサー電極間へと誘導する流れ場の制御を行って、 μ -PIV (Micro-Particle Image Velocimetry, マイクロ粒子画像流速計) システムによる RBC およびその周りの速度場測定を行う。
- (2) 高速度デジタルビデオカメラによるマイクロ流路内での RBC 挙動とその変形能についての可視化観察と画像処理解析を行う。
- (3) 薄膜センサー電極の設計、製作とそれを用いた電気特性 (インピーダンス) 計測を行う。
- (4) 数値シミュレーションによる流体中の RBC に作用する剪断応力と細胞変形量、電場強度分布などの予測を行う。



(a) RBC 変形能センサー電極



(b) 出力信号

図 1 RBC 変形能センサー電極および出力信号の概念図。

図 1 (a) の Case A に示すように、正常な

RBC は流体中で剪断力が作用すると大きく変形し、異常なものは Case B のようにほとんど変形しない。そのためマイクロ流路内に付設する薄膜電極が検出する電気抵抗（インピーダンス、図 1 (b) の縦軸 R ）は同図に示すように RBC の健康状態に応じて Case A と Case B のように異なった形状となることが予想される。そこで、RBC の変形の程度とセンサーからの出力信号との対応関係を明らかにするために、RBC の流路中への供給量と電極間を流れる流体の剪断応力を制御して、電極間中央に RBC を誘導する。電極間を RBC が通過する時の様子を撮影して画像解析から RBC の変形の程度を示す変形指数 DI を算出する。それと同時にセンサー電極の検出した電気抵抗波形を解析して、 DI と関係づける。この対応関係から電気信号波形だけを検出することでセンサー電極間を通過する RBC の変形量を推定するというのが本研究の主要目的である。

3. 研究の方法

本研究遂行のための具体的方法は次のとおりである。

(1) マイクロ流路および薄膜センサー電極の設計、製作

① せん断流れが実現可能な数 $10\mu\text{m}$ スケールの断面寸法を有するマイクロ流路を設計、製作する。

② マイクロ流路は PDMS (Poly-Di-Methyl-Siloxane) を材料としてソフトリソグラフィによって製作し、チャンネル上面はガラス製とする。

③ リソグラフィで製作する型は SU-8 を材料とし、電子ビームによって製作したマスクまたはエマルジョンマスクを用いて、UV 露光することによって自作する。ただし、計測のための光学系や電気配線系をマイクロ流路中に施すような自作困難な加工については外注する。

(2) 高速度カメラ撮影による RBC の変形能計測

① 流れ場中での RBC 観察は動的計測となるため、撮影には既存の高感度 CCD カメラおよび高速度デジタルビデオカメラを用いる。撮影された画像を解析することで、血球の形状や移動軌跡、変形能について検討を行う。

(3) μ -PIV による RBC 近傍の速度場計測

① RBC の直径は $7\sim 10\mu\text{m}$ であることからトレーサー粒子として直径 $0.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒径を用い、高倍率・高開口数対物レンズを用いて計測する。

② 励起光の光源には μ -PIV 用の Nd:YAG レーザやハロゲンランプを利用して顕微鏡へ供給できるようにするとともに、可能な限り現存の光学系の高性能化、高解像度

化を図り、血球近傍 ($10\mu\text{m}$ 四方の領域) を含めた流れ場の計測とせん断場の解析を行う。これにより、RBC の変形挙動^(*)や Tank Treading Motion^(*)など、RBC 膜特有の現象を捕捉し、RBC の変形能との相関を求める。

③ マイクロ流路を密着させるガラス基板上に付設するための白金製薄膜センサー電極を設計、製作する。その電極間に交流電圧を印加してインピーダンスを測定し、得られた信号の解析を行って RBC の変形能特性と関連づける。

(4) 速度場と電場の数値シミュレーション

① 流体内の RBC 挙動を予測するために、FVM (Finite Volume Method, 有限体積法) を用いた流体解析と FEM (Finite Element Method, 有限要素法) を用いた RBC の応力・変形解析をカップリングし、様々な流れ場における血球の挙動と変形能を 3 次元解析する。流体と RBC の界面は IB (Immersed Boundary, 境界埋込) 法を適用して取り扱う。また、RBC とセンサー電極との相対位置関係に依存したセンサー電極周りの電場強度分布についての解析も行い、電気的特性を検討する。

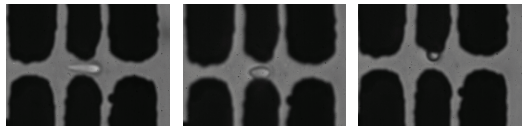
② 得られたデータを流路設計支援として活用し、効果的な形状の流路、電極設計に反映させつつ実験の効率を高め、最適なマイクロ流体デバイスのプロトタイプを完成させる。

* 参考文献: (1) Effleton, C. D. and Popel, A. S., Large Deformation of Red Blood Cell Ghosts in a Simple Shear Flow, *Physics of Fluids*, Vol. 10 (1998), pp. 1834 – 1845. (2) Korin, N., Bransky, A. and Dinnar, U., Theoretical Model and Experimental Study of Red Blood Cell (RBC) Deformation in Microchannels, *Journal of Biomechanics*, Vol. 40 (2007), pp. 2088 – 2095. (3) Olla, P., The Lift on a Tank-Treading Ellipsoidal Cell in a Shear Flow, *J. Physique. II*, (1997), pp. 1533 – 1540.

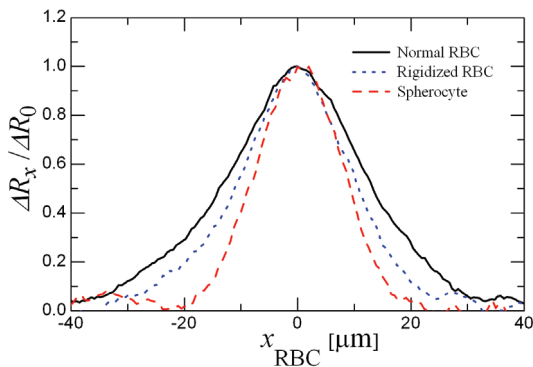
4. 研究成果

図 2 (a), (b), (c) に電極間のほぼ中央、数 μm 上空を通過中の RBC の画像を示す。それぞれの画像は両凹円盤形状の正常なもの、 Ca^{2+} を含む薬品で処理してほぼ両凹円盤形状を保ったまま硬化させたもの、類似の薬品処理を施した球状のもの 3 種類の RBC が通過する様子を捉えている。なお、図のパラメータとして記した DI は変形指数であり、RBC の長軸の長さ a および短軸のそれ b を用いて $DI = (a - b) / (a + b)$ で定義した。それゆえ、 a と b の等しくなる真球の場合には $DI = 0$ となる。流れは図中の左から右に向かっており、中央の黒い上下対はセンサー電極—グラウンド電極である。また、その左右に位置する

上下対はガード電極であり，電場分布を整えてエッジ効果を抑制する役割を担っている．電極寸法として幅，間隔ともに $10\mu\text{m}$ にとった．電極表面には電気二重層の影響を抑制するための白金黒メッキ処理を施した．



(a) 正常 RBC ($DI=0.58$) (b) 硬化 RBC ($DI=0.31$) (c) 球状 RBC ($DI=0.02$)



(d) 電気抵抗信号の変化パターン

図 2 RBC の電極通過時における電気抵抗信号の変化パターンと対応する画像．

これらの画像から(a)の正常 RBC は主流方向に引き伸ばされた形状で移動しており，硬化させた(b)および(c)の RBC はそのままの形状を保持して移動していることが分かる．また，いずれの RBC もスパン方向にはその位置を変えずに電極間のほぼ中央を通過していることから，RBC を含む流れの制御は十分に機能していることが確認できる．

次に，上述の画像が得られた際にセンサー電極で検出された電気抵抗信号波形を同図(d)に示す．ただし，個々の RBC の速度を別途，画像解析から算定することで電気信号の時系列データ $\Delta R(t)$ を位置に関するデータ $\Delta R(x)$ に変換している．図中の黒い実線は(a)の正常 RBC，青い点線は(b)の元の形状を保ったまま硬化した RBC，赤い破線は球状 RBC の場合に対応する．また，縦軸はピーク値 ΔR_0 で規格化した．このグラフから画像でも大きな変形を示すことが確かめられた正常 RBC の場合の波形が最も幅の広いことが分かる．

そこで，この結果に基づいて，信号波形のピーク値に対する半値全幅 δ と画像解析から算定した変形指数 DI との相関を調べることにした．図 3 にその結果を示す．図中の黒い■印は(a)の正常 RBC，青い△印は(b)の元の形状を保ったまま硬化した RBC，赤い●印は

球状 RBC の場合である．

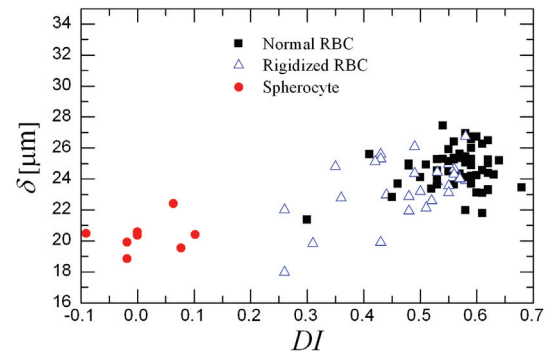


図 3 変形指数 DI に対する電気抵抗信号ピークの半値全幅 δ の相関図．

この図から $DI = 0 \sim 0.1$ に対応する球状 RBC の δ は $\delta = 19 \sim 23$ の範囲内にあり，その他の DI 値の RBC の場合と明瞭に異なっている．従って，画像解析による RBC 形状を反映した DI 値と電気的測定から得られる δ 値との間に強い相関が認められ，センサー電極の電気抵抗検出に関する有効性と，検出された信号波形の半値全幅 δ の値を得ることで RBC 変形能が評価できる手法の実現性を併せて示すことができた．

数値シミュレーションにより，出力信号に及ぼす RBC とセンサー電極の相対的な距離，流路高さ，電極寸法の影響を詳細に検討し，その結果を実験に反映させて電気信号の S/N 比向上を図った．具体的検討事項は次節に掲げた専門誌に論文として逐次報告を行った．今後の更なる δ 値検出の改善や変形能特性検出の信頼性の向上に向けて，研究を発展させる必要があると考えている．

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 6 件)

- ① K. Tatsumi, R. Kuroki, M. Nakamura and K. Nakabe, Numerical Investigation on Fluid Flow and Heat Transfer Characteristics in a Peristaltic Micro Pump, Progress in Computational Fluid Dynamics, 査読有, Vol. 11 (2011), pp. 160 – 168.
- ② K. Tatsumi, Y. Nishitani, K. Fukuda, K. Katsumoto and K. Nakabe, Measurements of Electroosmotic Flow Velocity and Electric Field in Micro-channels using PIV, Measurements Science and Technology, 査読有, Vol. 21, No. 10 (2010), pp. 105402-1 – 11.
- ③ Y. Katsumoto, K. Tatsumi, T. Doi and K. Nakabe, Electrical Classification of Single

- Red Blood Cell Deformability in High Shear Rate Micro-Channel Flows, International Journal of Heat and Fluid Flow, 査読有, Vol. 31, No. 6, (2010), pp. 985 – 995.
- ④ 勝本洋一, 巽和也, 土井立樹, 中部主敬, 高剪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), 査読有, Vol. 75, No. 759 (2009), pp. 2215 – 2224.
- ⑤ 巽和也, 福田啓介, 勝本洋一, 中部主敬, PIV を用いたマイクロ流路内の電気浸透流速度と電場強度計測, 日本機械学会論文集 (B 編), 査読有, Vol. 75, No. 750 (2009), pp. 251 – 258.
- ⑥ K. Tatsumi, Y. Matsunaga, Y. Miwa and K. Nakabe, Numerical Study on Fluid Flow Characteristics of Peristaltic Pump, International Journal of Heat and Fluid Flow, Progress of Computational Fluid Dynamics, 査読有, Vol. 9 (2009), pp. 176 – 182.
[学会発表] (計 11 件)
- ① K. Nakabe, Detecting and Sorting of Difference in Deformability of Single Cell Flowing in a Microchannel, Single Cell Analysis Congress 2012, (2012), March 28, Edinburgh, UK (招待講演).
- ② K. Tatsumi, K. Imajou, H. Shintani, Y. Katsumoto and K. Nakabe, Numerical Model for Microparticle and Lymphocyte Motions in Dielectrophoretic Manipulation Device, Proc. 15th Int. Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS-2011), (2011), October 2-6, Seattle, USA.
- ③ R. Fujiwara, K. Tatsumi, Y. Katsumoto and K. Nakabe, Numerical and Experimental Study on Measurement of a Single Red Blood Cell Deformability using a Microchannel and Electric Sensors, Proc. 3rd Int. Symposium on Computational Heat Transfer and Fluid Flow (ASCHT-2011), (2011), September 22-26, Kyoto.
- ④ Y. Komori, T. Arakawa, K. Nishitani, K. Tatsumi and K. Nakabe, Motion of Red Blood Cell in Stationary Fluid under Uniform Magnetic Field, Proc. 3rd Int. Symposium on Computational Heat Transfer and Fluid Flow (ASCHT-2011), (2011), September 22-26, Kyoto.
- ⑤ K. Tatsumi, R. Kuroki, K. Nishitani, T. Arakawa and K. Nakabe, Numerical Modeling of Red Blood Cell Suspended in a Channel with Uniform Magnetic Field, Proc. ASME-JSME-KSME Joint Fluids Engineering Conference (AJK2011), July 24-29, Hamamatsu.
- ⑥ K. Tatsumi, A. Tozaki and K. Nakabe, Microscopic Fluid Temperature Measurements using Fluorescence Polarization Method, Proc. ASME/JSME 8th Thermal Engineering Joint Conference (AJTEC2011), (2011), pp. AJTEC2011 - 44461, March 13-17, Honolulu, USA.
- ⑦ K. Tatsumi, A. Tozaki and K. Nakabe, Microscopic Fluid Temperature Measurements in Channels using Fluorescence Polarization Method, Proc. 10th Kyoto - Seoul National - Tsinghua University Thermal Engineering Conference, (2010), pp. 173-176, October 27-29, Beijing, China.
- ⑧ R. Kuroki, K. Tatsumi, M. Nakamura and K. Nakabe, Numerical Study on Flow and Heat Transfer Characteristics of Peristaltic Pump, Proc. 2nd Asian Symposium on Computational Heat Transfer and Fluid Flow, (2009), pp., October 20-23, Jeju, Korea.
- ⑨ 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 (Micro-TAS 2009), (2009) pp. 424-426, November 1 - 5, Jeju, Korea.
- ⑩ K. Tatsumi, Y. Katsumoto, T. Doi, K. Nishitani and K. Nakabe, Red Blood Cell Deformability Sensing System using Electric Sensors and Micro-channels, Proc. 9th Kyoto - Seoul National - Tsinghua University Thermal Engineering Conference, (2009), pp. 173-176, October 27-29, Kyoto.
- ⑪ 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), pp. 201-208, June 28 - July 03, Krakow, Poland.
- [その他]
ホームページ等
<http://mtfm.me.kyoto-u.ac.jp/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
中部 主敬 (NAKABE KAZUYOSHI)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：80164268
- (2) 研究分担者
巽 和也 (TATSUMI KAZUYA)
京都大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：90372854
- (3) 連携研究者
()
研究者番号：