

＊課題番号 : F-12-KT-0102
 ＊支援課題名 (日本語) : 赤血球変形能計測用マイクロデバイスの開発
 ＊Program Title (in English) : Development of a micro-device for red blood cell deformability measurement
 ＊利用者名 (日本語) : 巽 和也
 ＊Username (in English) : Kazuya Tatsumi
 ＊所属名 (日本語) : 京都大学
 ＊Affiliation (in English) : Kyoto University

※概要 (Summary) :

単一赤血球の変形能に関する測定技術の開発は、流体粘性等の流体力学的特性の解明だけでなく、病理学の臨床応用にも重要な課題である。著者らは図1に示すように、マイクロ流路内において、流路下壁に設けた電極対により、せん断流れや伸長流れにより変形した単一赤血球の交流電場における抵抗値を測定し、その時系列波形を解析することで変形能を求める手法について研究を行っている。この手法は、高いせん断流れを効果的に得られるマイクロ流路を利用した電気的計測であるため、光学的な画像計測と比較してコンパクトかつ安価に高応答な検査が可能である。本報では、赤血球を含む流路内の三次元電場に関する数値解析とマイクロ流路を用いた実験により、本手法の有効性の検証を行っている。

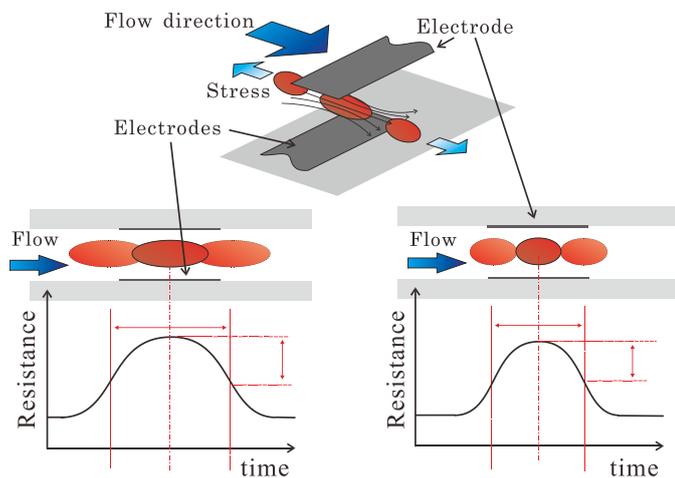


図1 : 測定原理

本申請においては、ナノテクノロジープラットフォームの装置を用いて実験で使用するマイクロ流路の製作を行った。

※実験 (Experimental) :

ナノテクノロジープラットフォームの使用機器と目

的

・A3 : レーザー描画装置 DWL2000

マイクロ流路製作において必要であるエッチングに用いる光学マスクの製作に使用した。

・C15 : 触針式段差計

製作したSU-8 (マイクロケム) 製およびPDMS製の流路の高さと平滑度を測定するために使用した。

実験に際し、マイクロ流路は2種類製作した。1つは、マスクおよびソフトエッチングによりパターンニングしたSU-8を鋳型にして作製したPDMSに、流路下壁としてあらかじめスパッタリングによりPt薄膜電極がパターンニングされたスライドガラスを永久接着することにより作製した。もう1つはSU-8製をPT電極が成膜されたガラス基板で上下を閉じたものである。

電気抵抗 R の測定のために用いたセンサ電極には、電流検出用のシャント抵抗 $R_s=20k\Omega$ が直列に接続され、信号発生装置(NF回路設計製, WF-1973)を用いて、振幅1V、周波数10kHzの交流電圧を印加した。シャント抵抗上端電位 V_1^* 及びセンサ電極電位 V_2^* は、それぞれオペアンプ(Analog Devices製, AD621)によりインピーダンス変換される。さらに、それらはA/D変換ボード(National Instruments製, PCIe-6251)により600kHzのサンプリング周波数でデジタル信号化され、バッファメモリを介してコンピュータに記録された。また、ガード電極は、ボルテージフォロア構成としたFET入力オペアンプ(National Semiconductor製, LF411)を介してセンサ電極と接続されることにより、測定電流に影響を与えずにセンサ電極と常に同電位を保つようにした。

一方、センサ部を通過する際の赤血球の変形量及び通過位置を測定するため、上述の電気的測定と併せて光学撮影を行った。画像撮影には倒立型光学顕微鏡を用い、透過像を長動作距離型(倍率100倍)の対物レンズ(オリ

ンパス製, LMPLFLN100X)を介して高速度カメラにより電氣的測定と同時に撮影を行った. 撮影画像の水平分解能は $0.21\mu\text{m}$ であり, 焦点深度は $1.7\mu\text{m}$ である. 焦点内で得られた赤血球画像から DI の算出を行った.

流量条件として, 中央流路からの赤血球懸濁液流体, 及び両側流路からの流体は, それぞれ個別にシリンジポンプを用いて流路へ供給され, シース流が形成される.

Korin ら⁽⁴⁾によれば, 正常赤血球が $DI=0.5$ 程度変形するために要するせん断応力は約 15Pa である. 作動流体が水の場合, センサ部の流れを平行平板間流れと仮定し, 流路寸法と上述の流量の場合について通過高さにおける流れのせん断応力を見積もると, およそ 1Pa である. この場合, 十分なせん断力が得られないため赤血球は変形せず, 回転等不安定な動作を示しながら流れる. せん断応力を増加するには, 流量の増大に伴う速度勾配の増加, もしくは流体粘性の増加が考えられる. しかし, 赤血球速度を増加させると, 抵抗値測定及び高速度カメラ撮影の時系列サンプル数の不足を招くため, 好ましくない. そこで, 作動流体に分子量 3.6×10^5 の PVP(Polyvinylpyrrolidone)を $10\text{wt}\%$ 添加し流体の粘性を増加させることで, 赤血球の変形に十分なせん断応力を得た.

*結果と考察 (Results and Discussion) :

赤血球が電極部を通過する際の抵抗変化と, そこから得られる変形能評価指標としての半値幅 δ を各赤血球に対して算出した結果について考察する. そのためにまず, 実験により得られた $R(t)$ に対し, 15 点隣接平均操作を行った上で, 各赤血球通過事象に対応する $R(t)$ の部分集合を抜き出すとともに, 赤血球の電極間通過時の主流方向速度 u_{RBC} を画像処理により算出して時刻 t の x_{RBC} への変数変換を行い, R_x を求めた. さらに R_x の極大値 R_0 を得た位置から前後に十分離れた位置における R_{infy} を求め, $\Delta R_x / \Delta R_0$ と δ を決定した.

図 2 に, 正常赤血球と硬化赤血球の通過時の抵抗変化の代表例をそれぞれ示す. 図では, 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事が分かる.

次に, 電氣的測定により得られる変形能評価指標と

しての半値幅 δ を各赤血球に対して算出し, 撮影画像から求めた DI との関係性を考察する. δ は, 以下のようにして求めた.

まず, 実験により得られた $R(t)$ に対し, 15 点隣接平均操作を行った上で, 各赤血球通過事象に対応する $R(t)$ の部分集合を抜き出し, R の上昇開始前後の時刻における溶媒の抵抗値 R_0 を得た. 次に, $R(t)$ から R_0 を差し引き, $\Delta R(t) = R(t) - R_0$ を求めた. 最後に, u_{RBC} を $\Delta R(t)$ の時刻 t に乗算することで, $\Delta R(x_{\text{RBC}})$ を求め, ピーク高さ半値幅 δ を決定した. 本手法では, 先に述べた流路構造と両側流れの流量調節によりスパン方向赤血球通過位置を精密に制御するものの, 流路作製プロセスの制約上, 上流入口流路の幅は $50\mu\text{m}$ となり, 電極間隔 L_s に比して大きい. そのため, スパン方向の赤血球通過位置には数 μm のばらつきは避けられない.

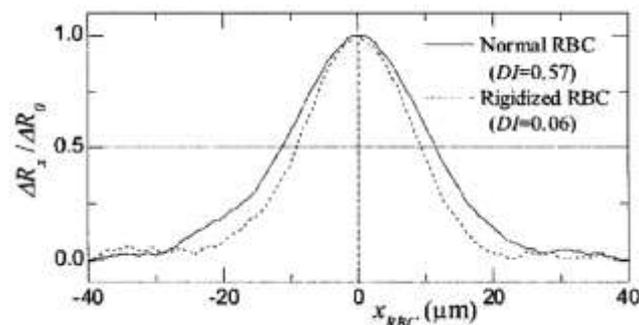


図 2 : 抵抗値分布

そこでスパン方向の電場分布の影響を考慮して補正を行った場合の, 画像処理により求めた各赤血球の変形指標 DI と, 上述の y 方向位置の影響を補正した抵抗極大値の半値幅 δ の関係を, 図 3 に示す.

$DI=0.5$ 及び $DI=0$ 付近における赤血球の半値幅は互いに異なり, 画像解析による赤血球変形形状を反映した DI と, 電氣的測定によって得られた δ との間に相関が見られる. また, この結果は, センサ電極幅 w_s が数値計算と実験とで $5\mu\text{m}$ 程度異なるために δ にオフセットが載り, かつ, 赤血球モデルには実験との乖離が存在するものの, 数値計算の結果と定性的に一致している. これは, 先行研究である画像解析による変形能測定法⁽⁴⁾の代替法たり得ることを示唆している.

なお, 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, δ はさらに定量的に評価できると考えられる.

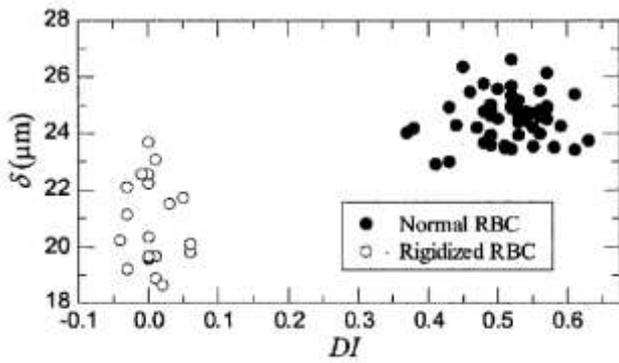


図3：赤血球変形度 DI と半値幅 δ の関係

Kagawa.

関連特許 (Patent) :

なし

※その他・特記事項 (Others) :

・今後の課題

SU-8 流路とガラス基板から構成される上下壁電極付設のマイクロチップでは、電極の位置あわせが困難であるため測定が行われていない。今後、レーザー描画の精度を高めることによりチップ作成を完了する必要がある。

・参考文献

(1) 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.

共同研究者等 (Coauthor) :

一ノ瀬雄平, 藤原良治, 勝本洋一, 中部主敬

論文・学会発表

(Publication/Presentation) :

K. Tatsumi, Y. Katsumoto, R. Fujiwara, K. Nakabe, Numerical and Experimental Study on Measurements of Red Blood Cell Deformability in Micro-channel Using Electric Sensors, *Sensors*, Vol. 12, No. 8 (2012) 10566-10583 .

K. Tatsumi, Measurements of the Deformability of the Red Blood Cells in Microchannel using Electric Sensors, *Novel devices applicable to bio/clinical/medical fields*, (2012), November 2,