

論文の要旨

氏名 佐藤 友美

論文題目 Study on Integration Technology of Flow Cytometry Chip
(フローサイトメトリーチップ集積化技術に関する研究)

本論文は全 6 章から構成される。各章について概要を以下に記す。

第 1 章では本研究の背景と研究課題について述べた。

サンプル液中の微小粒子を高速に分析する技術としてフローサイトメトリーが知られている。これは液中に含まれる粒子を一行に配列して流し、短時間で大量の数の粒子を計測することができる技術であり、粒子濃度や数少ない粒子の存在を捉えることが可能となる。近年、血液像の検査のみならず、がん細胞の検出や培養細胞の評価まで、医療から基礎科学に至る幅広い分野で利用されており、基盤的なツールになりつつある。既に据え置き型サイズ（～幅数十 cm）の装置（フローサイトメータ）が商用化されているが、今後ベッドサイドでの迅速検査など、より身近な用途や場所での利用拡大を図っていくためには、粒子の染色反応などの前処理系も含めたシステム全体の大幅な集積・小型化、低コスト化を進める必要がある。フローサイトメータの心臓部であるシースフローセルは全体の長さが数 cm 程度、二重管構造となっており、円筒状のガラス管内の中央にサンプル液吐出用のノズルを配置し、その下流に細い毛細管を繋いだ構造となっている。サンプル液のまわりをシース液で包み込み、等方的に毛細管に縮流させることで、流路中央に直径 10 μm 程度、かつ流速数 m/s の安定したサンプル液の流れを作ることができ、粒子を一行に高頻度に流すことが可能となる。しかしながら、このようにガラス管を複雑に組み合わせた構造では、これ以上に小さくすることは相当に困難である。システム全体の小型化、低コスト化のためには前処理系とフローセルをリソグラフィなどの微細加工技術を用いて一体で形成・集積化することが理想的である。一般的に、微細加工には材料としてシリコンや樹脂が用いられ、出来上がった構造は平面的であるのに対し、フローセルは上記の通りガラス製で、構造が 3 次元であるため、現状では一括形成は見込めない。そこで、我々は手のひらに載るほどの超小型・低コストのフローサイトメータの実現を目標とし、以下の研究課題に取り組んだ。

- (1) シースフロー形成のためのマイクロ流路構造に関する既存技術の調査と課題の抽出
- (2) 3次元マイクロ流路網形成法に関する調査と PDMS (Polydimethylsiloxane)

の弾性変形を利用した 3 次元流路網簡易形成法の提案

- (3) 3 次元流路網簡易形成法で作製するフローセルの諸元決定法に関する研究
- (4) 前処理系とフローセルとの整合・集積化設計技術に関する研究
- (5) 前処理系を集積化したフローサイトメトリーチップの試作と性能評価
- (6) 3 次元流路網簡易形成法の汎用展開性に関する考察

第 2 章では、まずシースフロー形成のメカニズムについて整理した。また微細加工技術を用いたシースフローセルに関連する研究事例をレビューし、課題の抽出及び安定的なシースフロー形成のために流路構造に求められる要件を提示した。それを受けて立体的な流路構造や 3 次元マイクロ流路網を形成する方法について調査するとともに、簡易に立体的な流路を形成する手法（3 次元流路網簡易形成法）を新たに提案し、これを含めて各々の手法の得失を比較した。

新たに提案した手法は、近年マイクロ流路に汎用されている PDMS 材料の弾性変形性を利用したものである。具体的にはサンプル流路にシース液との合流箇所を 2 箇所設ける。シース液はサンプル流路の側面 2 方向から導入される。これらのマイクロ流路は、微細加工で形成したオス型を転写して平面的に作製される（ソフトリソグラフィ）。次に 2 箇所の合流箇所の間でサンプル流路を PDMS の弾性特性を利用して 90° 振り、マイクロ流路網を立体構造化する。その結果、シース液は、1 番目（上流側）の合流箇所では水平方向から、2 番目（下流側）の合流箇所では垂直方向から導入され、サンプル液を周囲から包み込む。その結果、サンプル液は流路断面の中央に集束され、シースフローが形成されると予想した。以上のアイデアの有効性を確認するために、提案した構造を単純化したモデルについて、有限要素法による粘性流れ解析を実施した。その結果、下流において粒子が流路中央付近に集まり、シースフローが形成されることが予測された。

第 3 章では、まず 3 次元流路網簡易形成法で構築するシースフローセルの諸元決定法について述べた。具体的にはシースフローセルを構成する各流路の寸法をパラメータとして、1 番目と 2 番目の合流部において等方性（マイクロ流路断面中央にサンプル液が集束）が確保されるように最適化した。

次に、上記設計諸元をもとに実際にデバイスを作製し、シースフローが形成されているかについて蛍光色素による観察を行った。サンプル液として蛍光色素（ウラニン）を、シース液として水を流し、2 番目の合流箇所の下流位置で顕微鏡観察した。ただし、この方法では、観察方向の 2 次元的な縮流は確認できたが、奥行方向の縮流は確認できなかった。そこで、一方向からの観察でも奥行方向の流れを知る方法として、サンプル液としてトレーサ粒子含む水を用い、

粒子の速度からシースフロー形成を予測する方法を提案した。高速度カメラ撮影によりフレーム数と移動した距離から粒子の速度を計算し、その頻度分布を求めた。さらに検証精度を高める目的でレーザーを光源とする蛍光粒子観測系を立ち上げた。観測対象の粒子としては $\phi 6 \mu\text{m}$ 蛍光粒子を用い、信号強度の頻度分布、信号の半値幅を求めた。粒子速度が速い場合、信号は鋭くなり半値幅が小さくなることから、半値幅は粒子速度に反比例する。この値の頻度分布から、フローセル内を流れる粒子の流路断面内の位置を推測した。実験の結果、頻度分布が狭い範囲内に集まっていることを確認し、振りフローセルにおいて、シースフローが形成されていることを確認した。

第 4 章では、まず前処理系の流路と、シースフローセルのサンプル流路を連続した一本の流路で繋いで一枚のチップに集積化する（フローサイトメトリーチップ）場合の整合の取り方や流量設定など運用条件に関する設計法について述べた。前処理系では、細胞等を十分に染色するために一定以上の滞留時間が必要となる。その時間は前処理系内の流路容積とサンプル液の流量に依存するが、一方、サンプル液の流量は、どの程度の量のサンプル液をどの程度の時間で計測するかというシステム全体の仕様によっても決定される。したがって双方を満足するように前処理系の構造や流量を決定する必要がある。以上の設計指針に従い、チップを試作した。試作においては1回のソフトリソグラフィと掘り変形処理のみで、前処理系を含めた複雑な 3 次元流路網が迅速・簡易に作製できることを確認した。世界最小レベル（長さ 60 mm）のフローサイトメトリーチップが極めて簡便に製作可能となった。

次に、試作したチップを用いて細胞計測を実施した。まず前処理系において設定条件の下で染色反応処理が可能であることを確認した。実験には、酵母細胞および PC-9 細胞（ヒト肺腺癌細胞株）の 2 種類のサイズの異なる細胞を使用した。夾雑物によるノイズが多いものの、染色細胞からの信号を光電子増倍管で検出できることを確認した。現状では直径 $1 \mu\text{m}$ 程度の細菌を捉えることは困難であったが、直径数 μm 程度の細胞は計測可能であった。また前処理系とフローセルが直結することによる① 無効体積の微小化、② 試薬の微量化、③ 前処理から検出までの時間短縮、の効果についても検証を行った。以上をまとめて、現段階におけるフローサイトメトリーチップの性能限界を仕様としてまとめた。

なお、各細胞からの信号強度に幅があった。その理由について、第 2 章で用いた有限要素法による粘性流れ解析を用いて考察した。その結果、フローセル流路の断面形状をより正方形に近づけることで、粒子の中央への集束が促進され、信号強度の幅が抑えられること、より微小な粒子の計測も可能となることが予測された。

第 5 章では、超小型フローサイトメータの実現に向けて、小型・簡易な光学系のフローサイトメトリーチップへの適用可能性について検討した。チップ以外の部分で、小型化を妨げる部位として光学系が挙げられる。そこで、小型・簡素化のために LED と PT (Photo Transistor) による光学系を試作、フローサイトメトリーチップと合体させ、性能評価を実施した。実験には $\phi 50 \mu\text{m}$ 蛍光粒子を使った。その結果、LED と PT の配置を工夫するなどして、粒子からの信号を捉えることが可能となった。以上より、超小型・低コストのフローサイトメータの実現可能性を示すことができた。

第 6 章では、まず本研究の要のプロセス技術であり、著者が新たに提案した 3 次元マイクロ流路網の簡易形成法の一般のマイクロ流体システムへの展開性について議論した。

また本研究全体を通して得られた知見、結論についてレビューし、以下のとおりまとめた。まず PDMS を基材とする 3 次元流路網簡易形成法を提案した。本法で作製するシースフローセルの諸元を決定、試作したデバイスによりシースフロー形成を確認した。前処理系とシースフローセルを集積化した世界最小レベルのフローサイトメトリーチップを提案し、その設計指針を示した。これを試作し、細胞染色から計測まで一貫して可能であることを示し、さらに試薬の微量化など集積化の有効性について検証した。最後に手のひらサイズの超小型フローサイトメータ実現に向けて、LED・PT による簡易光学系を用い、実際に粒子計測を行い、超小型化への実現可能性を示した。