流体集積回路を用いる粒子制御*

Particle Handling Using Fluid Integrated Circuit-FIC

山 本 英 夫**
YAMAMOTO Hideo

松 山 達**
MATSUYAMA Tatsushi

Abstract A concept of Fluid Integrated Circuit (FIC) was introduced which was developed as a particle handling device especially suitable for handling of bio-materials. This device handles particulate materials in a two dimensional micro channel constructed on a substrate using fluid and electrophoretic interactions. As concrete examples, cell fusion device and particle detecting device were shown. A pearl chain of one to one cell pair was easily formed in the cell fusion device. In the particle detecting device, particle detecting and size measurement were performed using the principle of coulter counter. Also a basic study on the integration of these unit components into a single device was described.

Keywords : Fluid Integrated Circuit, Cell Fusion Device, Particle Detecting, Coulter Counter, Particle Handling

1. はじめに

酵母などの菌体や各種の培養細胞は、微小かつディスクリットな存在であって、それぞれが極めて複雑・高度な機能を発揮していると言う点で高機能性微粒子と位置付けることができ、当然のことながら、これら機能性微粒子を制御性良くハンドリングする技術が要請される。例えば、AとBという二種類の細胞を細胞融合させようとするとき、通常は、二種類の細胞を混合したサスペンションを作成して、これに物理的あるいは化学的作用を加えて融合操作を行う。このため、得られる融合細胞の中には、ABの組み合わせ以外に、AAやBB、あるいはAABなど様々な構成のものが含まれてしまうことになる。粒子を制御性良くハ

ンドリングすることによって、きちんとAとBの細胞を一对一で融合させることができるような技術が確立されればこのような問題が解決する。

鷺津[1,2]によって提案された「流体集積回路 (Fluid Integrated Circuit-FIC)」と呼ばれる装置概念は、一枚の基盤の上に微細流路を構築し、更にこの上に、電極やマイクロポンプなど粒子操作に必要な部品を集積することで、液中に分散した微粒子を微細流路中で操作可能とするものである。個別粒子の操作は、流路を流れる液の流れによって、あるいは、流路中に挿入した電極に電圧を印加して液中に電界を構成し、これによる誘電泳動力を利用して行なわれる。流路の形状、液の流速、電極配置、電極形状、印加電圧の強弱など

* 1997.10.22 受付

** 創価大学工学部 〒192 東京都八王子市丹木町1-236

TEL(0426)91-9454 FAX(0426)91-9454 E-mail: yhideo@t.soka.ac.jp

を工夫することで、細胞や菌体などの粒子に様々な操作を行なうことができる。

本稿では、筆者らが作製した、流体集積回路の個別機能ユニットとしての、細胞融合装置と粒子検出装置について紹介する。また、これらの異なる機能ユニットを一枚の基盤上に集積・複合化する為に必要となる条件に関して行った基礎的な検討の結果についても併せて述べたい。

2. 流体集積回路の作製法

流体集積回路の二次元微細流路はフォトリソグラフィを用いて作製する。図1に作製法の概念図を示した。まず、作製する流路の拡大図を描き、この縮小写真を写真乾板を用いて撮影する。この写真乾板を以下の作業でフォトマスクとして用いるので、この写真に写し撮られた流路の形が作製する微細流路の原寸となる。したがって例えば、 $10\mu\text{m}$ の幅の流路を作製しようとする時に拡大図の流路を5mm幅で描いたとすると、写真の縮小率は1/500に設定する。あらかじめこれとは別に、ガラス板にフォトレジスト(紫外線硬化樹脂)を貼り付けたものを用意しておく。フォトレジストの上に、作製した写真乾板をフォトマスクとして置いて、その上から紫外線の平行光線を照射すると、マスクされた箇所は紫外光があたらないため、フォトレジストは流路の形の部分(光があたった部分)だけ感光して硬化する。その後、溶剤でフォトレジストを洗い流すと、紫外線に感光・硬化した部分は溶剤に溶けずに残る。これを流路の<型>として利用する。つまり、次に、このフォトレジストによる流路の<型>に、液状シリコン樹脂を流し込んで硬化させる。これを引き剥がすと流路パ

ターンの溝がついたシリコン樹脂が得られるので、別に用意したシリコンの平らな基盤を貼り合わせると、最終的に流路が完成する。更に必要となる電極や、送液・廃液のためのチューブなどの部品を挿入、接続すると流体集積回路の完成となる。

以下では、具体例として筆者らが作製した、流体集積回路の個別機能ユニットとしての、細胞融合装置と粒子検出装置について紹介する。

3. 流体集積回路による細胞融合装置

流体集積回路を用いる細胞融合装置の融合部には電極間に小孔をもつ絶縁壁を構築する。この電極間に高周波交流電圧を印加すると、絶縁壁にある小孔の部分に電気力線が集中し、不平等電界が構成される。この電界中に細胞が入ると電界の強い小孔の部分に誘電泳動されるので、この領域に二つの細胞を送り込めば、これらはお互いの誘電電荷によって引き合い、いわゆるパールチェーンを形成する。二つの細胞によるパールチェーンが形成されたところに高電圧パルス印加する方法で、この細胞対を融合させることができる。また、この装置では細胞を一つずつ融合部に送り込むことが可能となるため、目的の細胞同士が一对一で融合した細胞を得ることができる。

本装置の融合部で二つの細胞によるパールチェーンを形成することが可能であるかどうかを確認するために、モデルサンプルとしてウニの卵を用いて細胞の誘電泳動実験を行った。実験の結果、二つの細胞がパールチェーンを形成する様子が観察された。電極間に15V、550kHzの高周波交流電圧を印加したときの様子を図2に示す。図は泳動の様子を経時的に追ったもので1~4は約2秒間

図1 流体集積回路作製法の概念図

図2 作製した細胞融合装置内で二つの細胞がパールチェーンを形成する様子

の過程である。装置の融合部の小孔に細胞がトラップされ、一対一のパールチェーンを形成する様子が解る。

4. 流体集積回路による粒子検出装置

検出装置の原理には、いわゆるコールターカウンターの原理を利用した[3]。二つの電極は細孔を介して電解質溶液で結ばれており、液の抵抗率とは異なる抵抗率をもつ粒子が細孔に入ると、粒子の体積の分だけ細孔内から液が追い出されるので、電極間の電気抵抗が変化する。細孔に粒子が入ったときの電気抵抗の変化を検出することで、懸濁液中の粒子の大きさを測定し、また、個数をカウントすることができる。本装置では、流体集積回路の流路の一部に細孔を設け、細孔をはさんで電極を設置し、これと同様の機能を持つような構造を作製した。作製した流路と電極配置の概念図を図3に示す

ここでは電解質溶液として、コールターカウンター用の電解質溶液であるアイソトンを用いた。ポリスチレンラテックスの標準粒子(粒子径3.3, 7.1, 10.2, 15.3 μm)を用いてパルス波高のキャリブレーションを行った。その結果を図4に示す。

粒子検出装置の流路

細孔部分の拡大図

図3 粒子検出装置の概念図

図4 キャリブレーションの結果

縦軸は電圧パルス波高、横軸は細孔の断面積相当径Dで粒子径dを規格化した値である。パルス波高は電気抵抗変化に比例すると考えてよい。また、図中には抵抗変化についての厳密解に基づくフィッティングカーブと体積近似によるフィッティングカーブを示した。コールターカウンター法では、粒子体積が小さい範囲では計測される抵抗値の変化が粒子体積に比例することは良く知られたところであるが、この図から粒子径が細孔径に近づくにつれて体積近似が成立しなくなる様子も観測することができる。何れにせよこの結果から、検出装置からの出力電圧はコールターカウンター法の原理に従って、粒子径に対応して得られることが確認され、本装置を用いて粒子を検出し、粒子の大き

さを識別することが可能であることが示された。

5. 細胞融合・粒子検出機能複合化装置の作製

上で観てきたような流体集積回路による各種個別基本操作ユニットを、一枚の基盤上に組み込んで相互に関係を持たせることにより、機能の集積化した高次の操作ユニットとすることができる。フォトリソグラフィーを用いる作製工程によって二次元微細流路を自在に構成できるという流体集積回路の特徴を活かし、複数の機能を集積化することは、装置の高度化・多機能化を考える場合に重要になるであろう。ここでは、上で試作した細胞融合装置と粒子検出装置を複合化した流体集積回路を作製し、機能発現のために行った基礎的な検討の例について紹介したい。

作製した細胞融合・粒子検出機能複合化装置の流路形状と電極配置を図5に示す。流体集積回路の機能集積化として、異なる機能をもつ流体集積回路を近接して配置し相互に関連をもたせ、二次元的に装置を構築するためには、流路形状や電極の配置等に若干の工夫が必要になる。本装置では、細胞融合装置と粒子検出装置を近接して配置し複合化装置としている。二次元的に装置を構築するための工夫として、粒子検出部に、先に作製した粒子検出装置の構造をそのまま用いず、流路形状、電極配置に変更を加えたものを採用した。電極は細孔の入口と出口に対称的に配置してある。これは粒子検出部の占めるスペースを小さく抑えるための工夫でもある。一方、細胞融合部の形状は先に作製した細胞融合装置と同様とした。

細胞融合部で細胞に誘電泳動力を有効に発生させるためには、細胞懸濁液の媒質としてはできるだけ抵抗率の大きな液を用いる必要がある。しかし、一方この細胞融合部の下流に位置する粒子検出部

では、抵抗率の大きな液を用いるとノイズの影響が大きくなる。細胞融合と粒子検出の機能を同時に発揮させるためには、従って、細胞懸濁液の媒質の抵抗率を適切に設定することが重要になる。本装置では、上で述べたように、誘電泳動により細胞を操作できる範囲で可能な限り小さな抵抗率の液を用いることが望ましい。そこで、媒質の抵抗率を変化させて細胞の誘電泳動実験を行い、本装置で誘電泳動により細胞を融合部の小孔にトラップするために必要な媒質の抵抗率の最小値を調べた。この結果、抵抗率約 $1\text{ k}\Omega\text{ cm}$ の液を用いたときに、融合部の小孔で二つの細胞によるパールチェーンが観察された。また、この媒液を用いることで検出部に於いて十分なS/N比でパルスが観察されることが確認できた。このことから、複数の基礎ユニットを組み合わせた場合でも(今回のようにそれぞれの基礎ユニットが要請する媒液条件が相反する場合にでも)最適な媒液条件を設定することによって、それぞれの機能を発揮させ得ることを確認することができた。

6. おわりに

本稿では、流体集積回路と呼んでいる粒子ハンドリング装置の概念について紹介し、具体的な装置の例として、筆者らが作製した細胞融合装置と粒子検出装置について紹介した。また、これらの基礎ユニットを複合化した場合の集積化・機能発現条件等について行った基礎的な検討の結果について述べた。

今後、粒子ハンドリング技術への要請の高まり、とりわけバイオテクノロジー分野の発展に伴うこうした要請にあって、その各種操作の自動化、効率化が大きな課題となるにつれ、ここで紹介した流体集積回路の概念を用いた装置の研究は必要性を増し、さらに発展していくものと期待される。また、流体集積回路の応用範囲が拡大するにつれ、その機能集積化に関する研究は重要性を増すことになるであろうと考えている。

参考文献

- [1] 鷲津,「生命機械工学」裳華房,46,(1992).
- [2] 鷲津,静電気学会誌,10,3,150,(1986).
- [3] 粉体工学会「粒子径計測技術」(1995).

図5 作製した複合化流体集積回路