微細加工流路-毛細血管モデルによる 血液レオロジーの計測*

菊池 佑二**

Measurement of Blood Rheology using Micromachined Channel Arrays /

Yuji KIKUCHI

Key words: micromachine, microchannel array, blood rheology, microcirculation, capillary, erythrocyte deformability

1. はじめに

生体計測技術は、様々な分野の先端技術を飽くことなく取り入れて進歩してきた。精密機械工学の近年のトレンドであるマイクロマシン技術も例外ではない。また、マイクロマシン自体の開発への夢も、衆知のように、血管内走行微小システムによる診断と治療の可能性と結びつけて語られてきた。

このマイクロマシニングの現実的な応用の代表例は微小センサの開発であろうが、本稿では、それとは切り口の異なる応用になったと思われるシリコン単結晶基板表面内の微細流路のアレイと、それをを用いた血液レオロジー因子の計測^{1)~3)}について紹介したい。

この試みは、微細加工技術によって作られた微細な溝を流路として用いるという一見単純なものである。しかし、微細な溝を実際に流路として用いることはそれほど単純でも容易なことでもない。さらに、具体的な問題への応用や実用化には基本デザインの良否が決定的に重要になる。また流路網、特に細胞の流路網が構成されることには、電子回路網と同様に、さらに発展性を期待することもできよう。これらの諸点には本誌の読者にも関心を持って頂けるものと思う。

まず、生体計測の中で血液レオロジー計測の持つ意義から説明したい。

2. 血液レオロジー計測の意義

血液循環の役割はいうまでもなく酸素と栄養物の供給と炭酸ガスと他の代謝老廃物の除去であり、組織細胞の活動と生存には一時も欠かせない。また、生体防御・免疫系の働きもこの血液循環に依存している。したがって生体計測の最も重要な対象となる。

血液循環を可能にしている心・血管系の役割は明らかであり、その動作に関して種々の指標が求められている。それに対して、循環の受動的因子である血液の流動性（レオロジー）の重要性はこれまで看過されがちであった。これは、血液が「液体」として「高い流動性」を持つことが当然視されてきたことと、血液レオロジーの計測が予想外に困難で、その評価が難しかったことによるとと思われる。

まず血液中の「液体」成分（血漿）が体積的に約半分を過ぎないことに注意しなければならない。残りの半分は細胞成分（赤血球、白血球、血小板；赤血球が大部分）である。このような有形成分の濃さはコンデンスミルク中の脂肪球の濃さと同程度であり、食品研究者の目から見れば、血液が高い流動性を示すこと自体極めて不思議なことである。この血液流動性の秘密は赤血球に存在している。脂肪球が実質的に剛体球であるのに対し、赤血球は外力を受けるとその力に応じた形に極めて容易に変形する特性（変形能⁴⁾と呼ばれる）を持っている。形を保ちえないことが液体の特徴であるが、赤血球はこの変形能によってあたかも「液体のように」振る舞うことができる。したがって、その赤血球が体積的に約半分を占める条件でも、血液は「液体」として「高い流動性」を保つことができる。

なお、血液中に占める赤血球の割合の高さは、それだけ酸素輸送の要請の大きさを如実に物語るものである。

さらに、上記のガス交換・物質交換が行われる毛細血管

* 原稿受付 平成8年8月2日

** 農林水産省食品総合研究所（つくば市観音台2-1-2）

1972年大阪大学大学院理学研究科修士課程修了。同年北海道大学応用電気研究所（現電子科学研究所）助手。1984年筑波大学基礎医学系講師。1990年農林水産省食品総合研究所計測工学研究室長。理学博士。主にヘモレオロジーと食品の品質計測法の研究に従事

図1 毛細血管における赤血球の流れ

では、赤血球変形能がより直接的に重要になる。毛細血管の管径は組織によっても異なるが、平均5 μm 程度であるのに対して、赤血球（両凹円盤状）の径はヒトで約8 μm あり、変形しないと毛細血管を通過しえない関係にある（図1）。なぜこのような逆転関係にあるのか理由は明確になっていないが、赤血球変形能が毛細血管での血流速度ないし血流量を左右する最も重要な因子であることは明らかであろう。

このように血液流動性の基本メカニズムである赤血球変形能がどのような機構で維持され、また食事を含む環境因子によりどのような影響を受けるかを解明することは極めて重要な課題である。

赤血球と比べて少数の白血球と血小板は、赤血球と共に循環しながら、それぞれ生体防御と血管系の保守の役割を担っている。両者は刺激を感知することにより非粘着性・非凝集性から粘着性・凝集性へと変化し、血管壁に粘着しまた凝集する。臨床的に特に問題になるのは、それぞれの機能の亢進や刺激の持続により、血管壁への白血球の過度の粘着あるいは血小板の過度の凝集が起これ、それによって血流障害、さらには血管閉塞が起きる事態である。微小循環レベルでの障害・閉塞はまれではないと考えられ、それらが繰り返されることでより太い血管の攣縮や閉塞に至ると推測される。

これらのことから、血液レオロジーの主要な因子である赤血球変形能、白血球粘着能および血小板凝集能の計測の重要性が理解されよう。しかしながら、これらの血液細胞の機能特性に対する信頼性・定量性の高い有用な計測法はいまだ確立されていない。

一方、血漿成分を含めて血液の構成を測定する自動血液分析装置の進歩は著しい。血液計測におけるこのような状況は、形態計測技術が著しい進歩を示す一方、機能計測技術の開発が遅れている今日の生体計測技術全般の状況の一つの現れである。血液の構成の測定はいうまでもなく組織の形態の計測に相当している。

3. シリコン単結晶基板表面に形成した毛細血管モデル

これまで、血液細胞のレオロジー特性は、ガラス管を極めて細く引き伸ばして作ったキャピラリーやマイクロピペット、ニュークリポアフィルタ中の細孔などを用いて計測されてきた。しかし、通常それらの径に1 μm 程度のば

図2 微細流路の構成。中段；土手の拡大図。下段；血液試料の流れ（実際は天地逆）。シリコン基板とガラス基板（両者光学研磨）は圧着される

らつきがあり、測定結果に大きな差が生じる原因になってきた。さらに、これまでの方法の信頼性や定量性の問題から、血液レオロジー因子の理解や評価にも混乱が生じるようになった⁵⁾。

このような問題を解決するため、小倉らは、マイクロピペット法に代わるものとして、電子線描画とプラズマエッチング法により加工した Si_3N_4 膜の小孔を用いる方法を提案している⁶⁾。それに対して、われわれは、はじめに述べたように、シリコン基板表面に加工した溝をそのまま流路とする方法を検討した。具体的には、溝を加工した基板表面に対して光学研磨したガラス基板を圧着させる方法で漏れの無い流路を実現した。この構造では流路が基板表面に展開されるので種々のデザインのものをリソグラフィにより作製できる。また流路を通過する細胞の全挙動をガラス基板を通して直接顕微鏡観察することができる。

何回かの試作の後に採用した流路の構成・デザインを図2に示す。微小な流路を長く作ると流路抵抗が高くなり過ぎ、実際に試料を流すことが困難になる。微小流路の長さを最小限に抑え、それ以外の部分の流路抵抗をできるだけ小さくすることが必要であり、そのため流路以外の部分を深く掘り下げている。結果的には、図に示すように、正方形を囲む4辺に土手を巡らして、その上面に微細な溝を横断方向に多数切った形になっている。同一サイズの流路を多数並列配置したのは、全流量を大きくして計測を容易に

するためである。流路の断面形状がV字状あるいは逆台形状であることや土手の側面が斜面になっているのは異方性エッチングを用いた結果である。プラズマエッチングによって矩形の溝の加工も可能であるが、溝の面平滑度はウェットエッチングの方が高い。血液ないし血液細胞の浮遊液は基板中央に開けられた貫通孔を通して土手で囲まれた内側の部屋に入り、土手の外側にかけられた一定の引圧により土手上面の流路を通過していく。全流路に対する通過流量を計測すると共に、個々の流路での血液細胞の通過挙動を顕微鏡-ビデオカメラのシステムで観察録画する。

4. 血液レオロジー因子の計測

血液の流れの観察例を図3に示す。流路は長さ30 μm 、深さ4.5 μm 、深さ中間点での幅7 μm である。上段は血液試料が流路に到達した時点、中段は圧力差20 cm水柱をかけて流量を測定している時点、下段は圧力差の付加を中止して流れが止まるまでの時点での様子である。流れはいずれも右から左である。血液試料は健康者からヘパリン採血（血液量9.5に対しヘパリン溶液（1000単位/ m^3 ）量0.5）した全血そのままである。上段は試料注入時に生じた微小な圧力差の下での赤血球の流路通過を示している。20 cm水柱の下では赤血球の通過は速すぎて目で見えることは全くできない（中段）。数mm水柱以下の圧力差になってもなお赤血球の通過は速く、個々の赤血球の通過の識別は困難である（下段）。中段で2つの流路の間の突起部にまたがる形で引っ掛かっている細胞および下段で静止して見える細胞は白血球であり、その通過速度は赤血球に比べて著しく遅い。

一定圧力差の下での赤血球の通過速度ないし通過時間が赤血球変形能の良い指標になることは明らかである。しかし、個々の赤血球について計測することは、その通過があまりに速いため技術的困難が大きい。また通過速度を計測に適した大きさにするには、極めて微小な圧力差の正確な制御が求められる。これらの技術的困難を避けるため、ここでは、一定濃度の赤血球-血漿浮遊液試料を調製し、その100 μl が20 cm水柱の圧力差下で全流路を通過する時間を求めている。より正確を期する場合は、血漿のみの通過時間も求め、赤血球だけの寄与分を求めている。

通常、白血球、血小板が流路障害を起こすことはなく、全血試料も一定速度で円滑に通過する。しかし、白血球、血小板が活性化されると、図4に見られるように著しい流路障害を起こす。上段は大腸菌（*Escherichia coli* K-12）に暴露された白血球による流路閉塞である。下段は血小板凝集能が亢進している場合で、血小板凝集塊が流路をふさいでいる。

図4に見られるような流れの状況を画像的に定量化するのは容易ではない。ここでも全流量の計測が有用であり、その値から流路の平均開存率、あるいは、その時間的变化

図3 長さ30 μm の流路を通過する血液試料の流れ（右から左）。上段；微小圧力差下で試料が流路に到達した時点、中段；20 cm水柱の圧力差下で流量を測定している時点、下段；圧力差の付加を中止して流れが止まるまでの時点

図4 活性化した白血球と血小板凝集塊による流路障害。上段；大腸菌K-12に暴露された白血球（流れ；上から下）、下段；血小板凝集能の亢進が見られた例（流れ；右から左）

から流路の閉塞率と再開通率が求められ、それらを白血球粘着能および血小板凝集能の指標にすることができる。

血小板凝集能に関しては、これまで血小板-血漿浮遊液の濁度を計測する方法が広く用いられてきたが、その結果の *in vivo* との対応性は常に議論となってきた。それに対して、全血を用いて流れの場で測定できるわれわれの方法の利点は明らかであろう。

ここでの流路の表面は SiO_2 膜であり、その生体親和性は高い。また、流量から求めた流路内の流速（流量÷流路本数÷流路断面積）と流路内の圧力勾配との比は、毛細血管での流速/圧力勾配の計測値あるいは推定値と良く一致することが示され^{1)~3)}、この流路が実際に毛細血管のモデルになりえることが示唆された。

5. 微細加工流路設計の要点

われわれの報告以来、同様の研究がいくつか報告されてきている⁷⁾⁸⁾。それらではシリコン基板とガラス基板の密着に陽極接合法が用いられている。しかし、この方法はわれわれが試作段階で放棄したものである。

微細流路を用いる研究で失敗する第一の原因は気泡の問題である。流路が清浄で乾いている場合の初回の使用では気泡による障害を防ぐことも比較的容易であるが、2回目以降の使用ではその除去が極めて困難になる。

この気泡の問題を防ぐために、我々は水の中でシリコン基板とガラス基板を圧着する方法を考案した。光学研磨した基板同士の密着度は圧着のみでも十分高く漏れを防ぐことができる。この方法はさらに流路の洗浄を可能にし、繰り返し使用を可能にしている。分解できない微細流路では、特に血液試料を流した後の洗浄は実際上不可能である。

また、我々が採用した流路構造と全流量を測定する方式は最も単純なものであるが、上述のように、大きな利点を持つことを注意したい。活性化した白血球や血小板の粘着・凝集反応は個々の流路における流れを極めて複雑・不均一なものとし、そこでの計測を困難あるいは実質的に不可能にする（図4）。一方、ここで用いた全流量には揺らぎは見られず、規則的な指数関数的変化を示す。これは多数の並列流路に見られた統計力学の例と思われ、興味深い⁹⁾。

6. おわりに

微細加工流路が血液レオロジーの研究に標準法として用いられる意義は極めて大きい。シリコン単結晶基板を用いる最大の利点はいうまでもなく大量生産の可能性である。しかしながら、その最先端の技術を用いても、流路に要求されるサブミクロンの加工精度を安定に達成するにはなおいくつかの課題が残されている。その解決に向けての努力と技術の蓄積を現在民間（日立原町電子工業（株）；福島県原町市）との共同で進めている。

現在、同一チップの洗浄・繰り返し使用の不便が残るものの、試験に供しえる測定装置（MC-FAN）を完成し、同

社およびサンツリー機工（札幌）により特注の形で製作が可能になっている。これまでに同装置が国内外の何か所かの施設に導入され、その評価が進められている。

また、微細加工流路には血液レオロジーの計測以外に種々の応用が考えられる。例えば状態・機能の差に基づく細胞の選別は、バイオテクノロジーにおいて極めて重要であるが、現在そのような分離を短時間に行える有用な方法は開発されておらず、非効率の原因の一つになっている。血液細胞に限らず、一般に細胞の粘弾性などの力学的特性はその状態・機能と密接に関係し、したがって微細流路の通過特性の差による選別・分離は有望であると思われる¹⁰⁾。

食品・医薬品の分野では微生物の選別、微生物とその生産物の厳密な分離などが重要な課題となる。

最先端の電子線直接描画法では $0.1\ \mu\text{m}$ の線幅が報告されている。この幅の流路の加工には関連技術のさらなる開発が必要であろうが、近い将来確実なものとなろう。ここでは大腸菌レベルの微生物とその生産物の厳密な分離が可能になると思われる。またバクテリアの選別や同定が可能となればその波及効果は極めて大きい。

これらの可能性を開拓していくことが筆者の夢である。諸先輩・諸兄のご指導・ご支援を切に望んでいる。

引用文献

- 1) Y. Kikuchi, K. Sato, H. Ohki and T. Kaneko: Optically Accessible Microchannels Formed in a Single-crystal Silicon Substrate for Studies of Blood Rheology, *Microvasc. Res.*, **44**, 2, (1992) 226.
- 2) Y. Kikuchi, K. Sato and Y. Mizuguchi: Modified Cell-flow Microchannels in a Single-crystal Silicon Substrate and Flow Behavior of Blood Cells, *Microvasc. Res.*, **47**, 1, (1994) 126.
- 3) Y. Kikuchi, Q-W. Da and T. Fujino: Variation in Red Blood Cell Deformability and Possible Consequences for Oxygen Transport to Tissue, *Microvasc. Res.*, **47**, 2, (1994) 222.
- 4) R. I. Weed: The Importance of Erythrocyte Deformability, *Am. J. Med.*, **49**, 2, (1970) 147.
- 5) 菊池佑二：赤血球変形能——未だに良く理解できていない赤血球の力学的特性と流れ、*循環制御*, **14**, 4 (1993) 545.
- 6) E. Ogura, P. J. Abatti and T. Moriizumi: Measurement of Human Red Blood Cell Deformability using a Single Micropore on a Thin Si_3N_4 Film, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **38**, 8, (1991) 721.
- 7) J. P. Brody, Y. Han, R. H. Austin and M. Bitensky: Deformation and Flow of Red Blood Cells in a Synthetic Lattice: Evidence for an Active Cytoskeleton, *Biophys. J.*, **68**, (1995) 2224.
- 8) M. Tracey, R. Greenaway, A. Das, P. Kaye and A. Barnes: A Silicon Micromachined Device for Use in Blood Cell Deformability Studies, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **42**, 8, (1995) 751.
- 9) Y. Kikuchi: Effect of Leukocytes and Platelets on Blood Flow through a Parallel Array of Microchannels: Micro- and Macroflow Relation and Rheological Measures of Leukocyte and Platelet Activities, *Microvasc. Res.*, **50**, 2, (1995) 288.
- 10) 菊池佑二、菊池裕子、日野明寛：血液細胞およびパン酵母のマイクロチャンネル通過能——マイクロチャンネルアレイを用いた細胞選別の可能性, *Trans. IEE of Japan*, **116-E**, 5 (1996) 190.