

Title	マイクロ流路を用いた有核赤血球分離法の開発
Author(s)	雲, 健史
Citation	
Issue Date	2017-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/14263">http://hdl.handle.net/10119/14263</a>
Rights	
Description	Supervisor:高村 禪, マテリアルサイエンス研究科, 博士

# 博士論文

## マイクロ流路を用いた 有核赤血球分離法の開発

雲 健史

主指導教員

高村 禪

北陸先端科学技術大学院大学

マテリアルサイエンス研究科

平成 29 年 3 月



## Abstract

### Development of nucleated red blood cells separation method using micro flow channel

**1. Introduction** Conventional prenatal fetal DNA diagnosis methods are invasive when fetal cells are recovered, and it has a constant risk of miscarriage of the fetuses. For example, amniocentesis has a risk of miscarriage and infection with 0.2~0.3 % rate. Even though, prenatal fetal diagnosis is implemented 5 million times per year in the world. It should be non-invasive to fetus. Recently, the researches for non-invasive prenatal diagnosis using maternal peripheral blood were studied. In the maternal peripheral blood, nucleated red blood cells (NRBCs) that have migrated from the fetus exist and it is possible to analyze the retained DNA in them. However, the concentration of NRBCs in the maternal blood is very rare for example, 1~2 cells/mL, so that the separation of them is very difficult. Takabayashi et.al., reported that NRBCs were recovered successfully from the maternal blood by combination of density gradient centrifugation and image processing, and have also been successful in gender diagnosis. However, the method took too long time of 20 hours to recover the NRBCs and is inefficient for practical use. To overcome this problem, further concentration of NRBCs between the density gradient centrifugation and the image processing was effective because it reduces the number of blood cells to be searched over. To do this, we focused on the size and hardness of blood cell. Filters and chromatography also can separate blood cells, but it is difficult to recover trapped blood cells. Here, we developed micro-fluidic chip with separation/concentration and recovery mechanism by applying semiconductor micro-fabrication technology. In order to shorten the time for the separation and concentration of NRBCs by chip, we tried to develop multiple micro-gap chip. In addition, we develop fully automated processing equipment aiming at improvement of reproducibility and convenience. From those, the efficiency for the recovery of NRBCs was improved very much, which contributes to realize noninvasive prenatal genetic diagnosis.

**2. Experimental** The design of micro-gap chip was done using Adobe Photo Illustrator. Micro-gap chip is fabricated by photolithography. The height of the gap of the micro-gap chip was made at 1.2  $\mu\text{m}$ , 1.5  $\mu\text{m}$ , and 1.9  $\mu\text{m}$ . As preparation, maternal blood was centrifuged by density gradient. Maternal blood was delivered to the micro-gap chip, with the flow rate to the chip of 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , and the process time for separation and concentration of 30 minutes. Red blood cell, white blood cell count was measured using FACS. In order to speed up nucleated red blood cell separation by chip, multiple micro-gap chip was designed with Adobe Photo Illustrator and fabricated using photolithography. The number of micro-gap channels was increased 5 times from 90 to 448. Umbilical cord blood diluted 10 times was delivered to the chip. Here the flow rate to the chip was 11  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 22  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 33  $\mu\text{L}/\text{min}$ . PLC (programmable logic controller) was used for automation of multiple micro-gap chip, and flow operation and diaphragm operation were carried out by air pressure control using an actuator and an air cylinder.

**3. Results and discussion** The blood cell can be trapped at the interstitial spaces of the micro-gap chip, and the trapped blood cells can be recovered by opening the membrane gap. NRBCs were discovered from the recovered solution. When the height of the micro-gap channel was 1.0  $\mu\text{m}$ , the collection rate of NRBCs was 92%. When the micro-gap channel height was 1.5  $\mu\text{m}$  and 1.9  $\mu\text{m}$ , the collection rate of NRBCs was 75%, 25%. Removal rates of red blood cells and white blood cells were 93% and 98%. The processing time for one specimen was 90 minutes. The collection rate of NRBCs was 84% at the flow rate of 11  $\mu\text{L} / \text{min}$  in multiple micro-gap chip. The collection rate was 66% when the flow rate was 22  $\mu\text{L} / \text{min}$  and 60% when the flow rate was 33  $\mu\text{L} / \text{min}$ . Removal rates of white blood cells and red blood cells were 98% and 84% at the flow rate of 11  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Those were 93% and 99% when the flow rate was 22  $\mu\text{L}/\text{min}$ , and 92% and 94% when the flow rate was 33  $\mu\text{L}/\text{min}$ , respectively. From these results, the time for automatic image processing can be expected to be shortened from 20 hours to 1 hour. Moreover, the number of tests can be increased from 1 sample per day to 20 samples per day. By pressure control using PLC, flow operation and membrane control were automated. The automation of multiple micro-gap chip was achieved from sample introduction to recovery.

**4. Conclusion** The fabricated micro-gap chip was able to trapped NRBCs. When the height of the micro-gap channel was 1.0  $\mu\text{m}$  and the flow rate was 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ , the collection rate of NRBCs was 92%. Removal rates of red blood cells and white blood cells were 93% and 98%, respectively. In the multiple micro-gap chip, the collection rate of NRBCs was 84% at flow rate of 11  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Here, the removal rates of red blood cells and white blood cells were 84% and 98%. Using this chip, the total throughput of the recovery of NRBCs is expected to be improved by factor 20. The automation of micro gap chip operation is also achieved for convenience. From these, it is expected that the developed micro-gap chip will greatly contribute to non-invasive prenatal diagnosis.

Keyword: Noninvasive diagnosis, NRBCs, Cell hard and size, Micro- fluidic-chip, Micro gap.



## 目次

<b>第1章 緒論</b> .....	<b>7-22</b>
1-1 緒言.....	7
1-2 出生前診断.....	8
1-3 無侵襲出生前診断.....	12
1-4 NIFTY Study.....	13
1-4-1 FACS.....	14
1-4-2 MACS.....	16
1-5 FDD-MB.....	18
1-5-1 密度勾配遠心分離.....	19
1-6 目的と意義.....	22
<b>第2章 微小間隙チップによる有核赤血球の捕捉条件の調査</b> .....	<b>23-46</b>
2-1 緒言.....	23
2-2 目的.....	23
2-3 実験.....	24-29
2-3-1 試薬.....	24
2-3-2 装置.....	24
2-3-3 代替血液の検討.....	25
2-3-4 Adobe Photo Illustrator による流路の設計とマイクロ流路の構造の 検討.....	25
2-3-5 フトリソグラフィーによるマイクロ流路鋳型の作製.....	26

2-3-6	マイクロ流路への代替血液を送液.....	29
2-4	結果および考察.....	30-45
2-4-1	代替血液の探索および血球の大きさの調査.....	30
2-4-2	微小な間隙を含むマイクロ流体デバイスを設計・開発.....	37
2-4-3	代替血液を用いた有核赤血球の捕捉条件の確認と検討.....	43
2-5	結言.....	46
<b>第3章 微小間隙チップによるヒト有核赤血球の分離.....</b>		<b>47-77</b>
3-1	緒言.....	47
3-2	目的.....	47
3-3	実験.....	48-59
3-3-1	試薬.....	48
3-3-2	装置.....	49
3-3-3	血球付着の抑制を検討するマイクロ流体チップの設計と試薬の検証.....	50
3-3-4	ダイアフラム機構の設計と構造の検討.....	51
3-3-5	微小間隙チップの作製と構造の検証.....	52
3-3-6	密度勾配遠心分離処理によるヒト有核赤血球の分離.....	55
3-3-7	微小間隙チップによるヒト有核赤血球の分離.....	57
3-3-8	浸透圧変化による血球の変形とチップ処理.....	59
3-4	結果および考察.....	60-76
3-4-1	血球付着の効果と影響.....	60
3-4-2	ダイアフラム機構の動作時における血球回収の期待効果.....	61

3-4-3	ダイヤフラム機構の動作時における微小間隙チップへの影響...	64
3-4-4	密度勾配遠心分離による有核赤血球の分離と白血球および赤血球の除去率の予測検討.....	66
3-4-5	微小間隙チップによる有核赤血球の捕捉・回収率と白血球および赤血球除去率の検討.....	68
3-4-6	微小間隙チップがもたらす金沢医科大学 FDD-MB センターの出生前診断法への影響と期待効果の検討.....	72
3-4-7	浸透圧変化による血球の変形とチップ処理.....	74
3-5	結言.....	77

## 第4章 多連微小間隙チップによる有核赤血球分離の高速化.....78-91

4-1	緒言.....	78
4-2	目的.....	78
4-3	実験.....	79-80
4-3-1	試薬.....	79
4-3-2	装置.....	80
4-3-3	多連微小間隙チップの設計.....	80
4-3-4	多連微小間隙チップの作製.....	80
4-3-5	多連微小間隙チップによる臍帯血中のヒト有核赤血球の分離...	80
4-4	結果および考察.....	83-90
4-4-1	Percoll 密度勾配遠心分離.....	83
4-4-2	多連微小間隙チップによる有核赤血球の捕捉・回収.....	85
4-4-3	多連微小間隙チップによる白血球と赤血球の除去率への影響	88

4-4-4 多連微小間隙チップによる処理時間の短縮化に伴う、金沢医科大学FDD-MB法の全体の処理時間を占める割合と影響.....	90
4-5 結論.....	91
<b>第5章 多連微小間隙チップ操作の自動化.....</b>	<b>92-107</b>
5-1 緒言.....	92
5-2 目的.....	92
5-3 実験.....	93-95
5-3-1 試薬.....	93
5-3-2 装置.....	93
5-3-3 PLCと各種装置間の接続.....	94
5-3-4 多連微小間隙チップ操作の自動化を行う場所の選定.....	94
5-3-5 PLCプログラムの作製と各装置の制御.....	95
5-3-6 全自動化のためのチップ設計と動作確認.....	95
5-4 結果および考察.....	95-106
5-4-1 PLCと各種装置間の回路図.....	95
5-4-2 自動化する場所の選定.....	98
5-4-3 各種装置の制御プログラム.....	100
5-4-4 自動化の検証.....	103
5-4-5 全自動化のためのチップ設計.....	104
5-5 結論.....	107
<b>第6章 総括.....</b>	<b>108</b>

参考文献.....110

謝辞

業績など

## 第1章 序論

### 1-1 緒言

遺伝子診断は、身近なものとして定着している。例えば、アルコール診断、アレルギー診断、出生前遺伝子診断などがある。各診断は、軽度なものから命に係わる重大なものまでである。しかし、重要な診断を行うにも係わらず、手法そのものに大きな侵襲性を持つ診断がある。出生前遺伝子診断である。

従来 of 出生前遺伝子診断法には、妊婦に身体的な負担や精神的な負担を伴う。また、胎児には、命に係わる外傷や流産を併発する。しかし、超音波検査などの技術向上により、胎児に対する侵襲性は、減少傾向にある。一方で、出生前診断の需要が高まってきている。主な理由として、出産年齢の高齢化があり、高齢出産は、胎児遺伝子疾患の発症率が高いためである。診断希望の増加に伴う実施数の増加が見込まれ、侵襲性により失われる命が増加していくと予測される。無侵襲の遺伝子診断の開発は、必須である。

近年、無侵襲な遺伝子診断として、妊婦の末梢血中へ移行した有核赤血球を用いた診断が試みられている。また、有効な有核赤血球分離方法として、密度勾配遠心分離があり、染色塗抹標本から胎児の性別診断に成功したと報告されている。しかし、母体末梢血中の有核赤血球の濃度が低いために、染色塗抹標本上の血球探索に長時間を要し、無侵襲出生前診断の実現化を困難としている。診断の実現化のためには、染色塗抹標本上の血球数を減らし、血球探索の時間を短くすることが必要であ

る。

本論文では、密度勾配遠心分離に加え、さらに有核赤血球を分離する方法をマイクロ流路により実現させ、血球探索時間の短縮化を目的として、報告する。

第 1 章は、出生前診断と無侵襲出生前診断、マイクロ流路を用いた血球分離方法について述べる。

第 2 章は、有核赤血球を捕捉するためのマイクロ流路の設計とモデル血液を用いた検証実験について述べる。

第 3 章は、ヒト母体血を用いた有核赤血球の分離と探索時間の短縮化の効果について述べる。

第 4 章は、マイクロ流路による処理能力を向上させるための流路設計と臍帯血を用いた有核赤血球の分離と効果について述べる。

第 5 章は、マイクロ流路を備えた微小間隙チップの有核赤血球分離の全自動化について述べる。

第 6 章は、第 1 章から第 5 章までを総括する。

## 1-2 出生前診断

出生前診断は、胎児診断とも呼ばれ胎児の健康状態を見るために行われている。胎児の状態の検査は、安全な出産法の選定や遺伝子疾患の発見および治療に繋がる。日本において、出生前診断が始めて行われたのは、法的設備が整えられた 1948 年から 8 年後の 1956 年の羊水検査法<sup>1)</sup>である。他の検査方法として、臍帯検査法、絨毛検査法があるが、あまりにも高い侵襲性のため実施されることは無かった。1980 年以降に超音波

検査法が導入され、触診による胎児位置の選定から画像による位置選定に代わり、羊水検査法に及ばず全ての検査に対して安全性を向上させ、臍帯検査法、絨毛検査法も実施されるようになった。近年では、世界規模で年間約 500 万件実施され、日本では年間約 1 万件実施されている<sup>2)</sup>。

各出生前診断法と特徴を Fig.1 と Tabel.1 に示した。出生前診断は、母体血清マーカー検査、羊水検査(Fig.1a)、絨毛検査(Fig.1b)、臍帯血検査(Fig.1c)、超音波検査の 6 種類がある。それぞれ、検査目的により大別される。母体血清マーカー検査、羊水検査、絨毛検査、臍帯血検査は、胎児の遺伝子診断のために実施され、超音波検査は、胎児の発育状態を診断ために実施される<sup>12)</sup>。また、胎児遺伝子診断は、侵襲性の有無でさらに分けられる。母体血清マーカー検査は、無侵襲であり、羊水検査、絨毛検査、臍帯血検査は、流産などの侵襲性がある。羊水検査は、妊娠 15~18 週目から診断可能で、0.2~0.3%の確立で破水、感染、子宮収縮、出血、流産などを伴う<sup>5,7,8)</sup>。臍帯血検査は、妊娠 17~41 週目、出産直後と比較的長い範囲で診断ができ、3.1~41%の確率で出血、胎児徐脈、流産を伴う<sup>6,9)</sup>。絨毛検査は、妊娠 9~11 週目から最も早期に診断できるが、0.2~10%の確立で出血、感染、破水などを伴い<sup>5,10)</sup>、羊水検査よりも高い確率の侵襲性がある。母体血清マーカー検査は、妊娠 15~18 週目から検査でき、血漿中に浮遊する胎児遺伝子を用いて実施される。

現在、無侵襲な胎児遺伝子診断があるにも関わらず、侵襲性のある方法が診断に用いられるのは、検査結果の正審率が高いためである<sup>5,11)</sup>。加えて、羊水検査、絨毛検査で採取された検体には、母体の遺伝子が混入し 100%胎児細胞を採取できず<sup>16)</sup>、診断の正審率を 100%にすることができない。



正審率の高い無侵襲な診断方法の開発は、胎児遺伝子診断が開始された当時から望まれ、現在も研究が行われている。さらに、懸念されていた遺伝子疾患の治療に期待できる報告がされている<sup>3,4)</sup>。

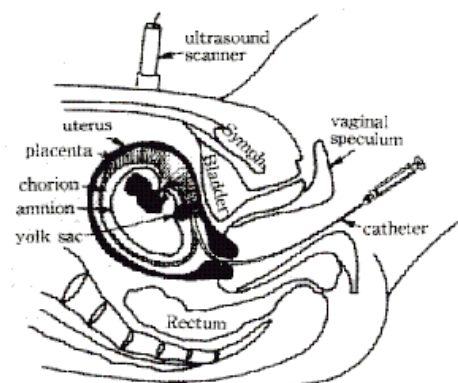
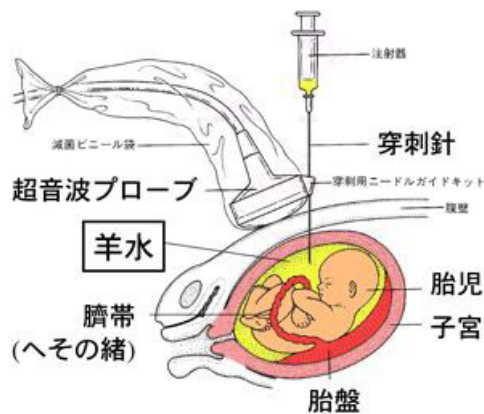


Fig.1.(a) 羊水検査(amniocentesis)<sup>13)</sup>

Fig.1.(b) 絨毛検査 (Chorionic villus sampling)<sup>14)</sup>

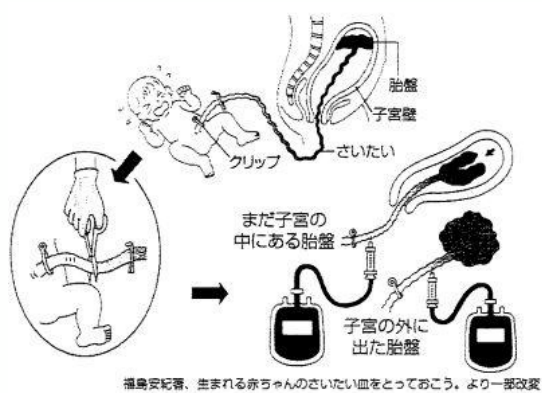


Fig.1.(c) 臍帯血検査(Cord blood sampling)<sup>15)</sup>

Table.1. Fetal diagnosis<sup>5,6,7)</sup>

	母体血清 マーカー検 査	羊水検査	絨毛検査	臍帯血検査	超音波検査
検査 時期	15~18 週	15~18 週	9~11 週	17~41 週	いつでも
採取 方法	母体血から 血液採取	母体腹部に 穿刺して 羊水採取	胎盤の絨毛 を採取	臍帯静脈か ら 胎児血を採 取	無
主な 検査 方法	マーカーの 血中濃度 を検査	胎児細胞を 遺伝子検査	胎児細胞を 遺伝子検査	胎児細胞を 遺伝子検査	画像から 胎児の 形態異常を 検査
検査に 要する 日数	7 日	7~21 日	2~14 日	2~7 日	即時
主な 検査 項目	ダウン 症候群、 神経管奇 形、 18トリソミー など	染色体異 常、 神経管奇 形、 遺伝子疾患 など	染色体異 常、 神経管奇 形、 遺伝子疾患 など	染色体異 常、 神経管奇 形、 遺伝子疾患 など	中枢神経系 異常、 形態異常な ど
胎児に 対する 侵襲性	無	有	有	有	無
診断 結果 の 信頼性	低	高	高	高	高

### 1-3 無侵襲出生前診断

出生前遺伝子診断に侵襲性を伴う理由は、胎児細胞の回収法にある。近年、妊娠中の母体末梢血に有核赤血球(NRBC:Nucleated Red Blood Cell)が存在していることが着目された。末梢血を採取する方法は、健康診断でも行われる採血であるため、侵襲性は極めて低く胎児に対しては無侵襲である。この有核赤血球は、胎児から臍帯を通じて母体へと移行しているため、胎児のものであり<sup>17)</sup>、含有する核には、遺伝子情報が保持されている。加えて、一般的な成人の血液中に有核赤血球が存在することは無いことから、母体血中で発見された有核赤血球は、胎児のものであるといえる。しかし、有核赤血球は母体血 1mL に約 1 個と非常に希少細胞であるため、高精度な分離方法で回収しなければならない。有核赤血球の他に、母体血中の血漿に胎児の遺伝子が浮遊している<sup>18)</sup>。この血漿中の遺伝子から診断することも可能であるが、羊水検査法などと同じく母体の細胞が含まれているため、親、子ともに遺伝子疾患があった場合などは、診断することができないと考えられる。

無侵襲遺伝子診断の実現には、特定の場合に限る母体末梢血中の血漿と有核赤血球中の遺伝子を解析することにより可能になるのではないかと期待され、アメリカでは NIFTY study、日本では FDD-MB で研究している<sup>19,20,21)</sup>。

#### 1-4 NIFTY study

1994 年からアメリカで無侵襲出生前診断法の開発に関する研究プロジェクト NIFTY study (National Institute of Health fetal cell study)が立ち上げられた<sup>19)</sup>。NIFTY study は、血球分離の基礎的な研究から応用まで発展させて進めている。代表的な血球分離法として、FACS (Fluorescence activated cell sorting)法や MACS (Magnetic-activated cell sorting)法、フィルター法、電気泳動法、誘電泳動法が挙げられる。特に FACS や MACS は高速かつ精密に細胞の分離・回収を行えるため、有核赤血球分離・回収法の中心を担っている。FACS は、抗原抗体反応を利用して蛍光染色し、それぞれの発光色と散乱光による細胞の形状に応じて分離・回収が行われる(Fig. 2)。MACS は、磁性微粒子に抗体を修飾し、目的細胞と抗原抗体反応を起こさせ磁力を用いて回収している(Fig. 3)。

2744 例の染色体異常のリスクが高い症例を対象に FACS と MACS を使った有核赤血球の回収を実施し、FISH 法による 13 番染色体、18 番染色体、21 番染色体、X 染色体、Y 染色体から胎児の性別および染色体数の異常の有無について検査を行った。男児を妊娠した母体から採血した検体を検査し、性別の同定に成功したが、正審率は、FACS 13%、MACS 48%だった。加えて、偽陽性率は 11%あり、臨床応用に結びつく満足な結果は得られなかった<sup>20)</sup>。FACS や MACS による有核赤血球の分離は難しく、さらなる改善が必要だと考えられる。

一方で、マイクロ流体チップを用いた有核赤血球の回収法を検討していた。このチップはマイクロピラーを設置し、白血球を捕捉しつつ、有核赤血球と無核赤血球が通過するよう設計されている。しかし、ピラーに捕捉

された有核赤血球が通過するまで長時間を要し、回収までの時間も長時間を必要とした<sup>21)</sup>。細胞の変形性を用いた分離のため、固定化などの処理をすることなく実施された。チップ処理の長時間化は、診断できる細胞数を減少させる可能性が考えられる。

#### 1-4-1 FACS<sup>24)</sup>

蛍光標識細胞分離システム(FACS)の誕生は、1969年にアメリカ合衆国国立予防衛生研究所 National institutes of Health (NIH)を中心に、カリフォルニア大学 Los Alamos 科学研究所の N.A. Van Dilla らのグループとスタンフォード大学の L.A. Herzenberg らが並行して細胞免疫系研究のための技術開発を行ったのがきっかけである。続いて、1965年に発表された Fulwyler の原理を利用した超音波振動子(ultra sonic nozzle vibrator)を応用することで、細胞を含む溶液を微細な液滴にし、細胞を一つずつ操作することが可能となり、細胞分離装置として 1972年に Becton-Dickinson 社から発売された。

FACSの細胞の判定方法は、蛍光染色した細胞懸濁液を微細管に通し、レーザー光線を細胞に照射させ、蛍光と散乱光を検出し、散乱光のうち直進方向の光から細胞の大きさを、直角方向の光から細胞内の構造を検出することで行われる。さらに、細胞分取機能として、細胞懸濁液に超音波振動を与え液滴に変換し、荷電させた後、電極板の間を通過させることで各液滴の軌道を変化させ、種類別に異なる収集管に分離・収集される。蛍光修飾した抗体と細胞を結合させるため、抗体の持つ高い分子認識能を利用でき、純度の高い分離精製を行うことが可能である。しかし、蛍光

物質は細胞に対し毒性を示すことが知られており、これが原因で生存率の低下を生じることもある。加えて、抗体を結合させることにより細胞内シグナル伝達などの生理的反応を生じさせる恐れがあるため、全ての細胞への適用が必ずしもできないという問題もある。装置が高価かつ大型であるため、汎用性に欠けるという問題もある。

当初は相対的DNA量測定に用いられていたが、細胞工学分野において細胞表面抗原の解析に利用されるようになり、さらには染色体の分取、ガン遺伝子の分析、幹細胞の分取など、広く応用されている。

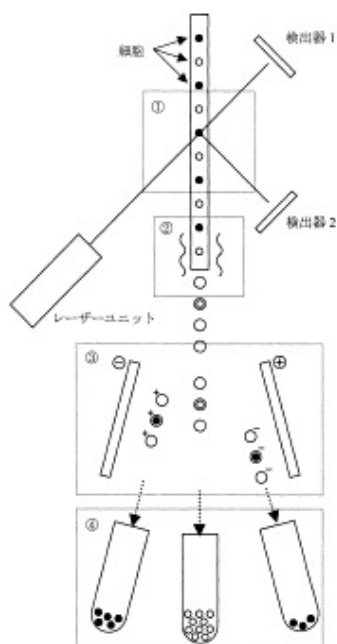


Fig.2. 蛍光標識細胞分離システム(Fluorescence Activated Cell Sorting : FACS)の原理図 <sup>24)</sup>

#### 1-4-2 MACS<sup>24)</sup>

磁気細胞分離システム(MACS)は、1984年に Owen C.S.らにより開発された分離法である。FACSの欠点である蛍光物質による細胞へのダメージ軽減を目的として開発された。MACSは、目的とする細胞表面分子を特異的に認識する抗体に磁性を示す微粒子を修飾し、細胞と抗原抗体反応を起こさせる。磁力を帯びた目的細胞は、磁場の発生しているカラムに通すことで誘導し分離する。抗体へ修飾させる物質は、細胞内ライゾソームにより分解が可能であるとされる直径 50 nm 程度の磁気微粒子が用いられる。強力な磁場を用いることで、より迅速な分離が可能であると期待されている。分離に用いられ細胞は、造血前駆細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、NK細胞、単球、顆粒球などの非接着性の浮遊細胞が多い。しかし、この方法は、磁気微粒子との結合が可能な抗体に限られ、対象とする細胞が磁気微粒子を非特異的に吸着しない細胞に対してのみ有効であることなど使用できる場に制約がある。より優れた細胞の分離技術の登場が期待されている。

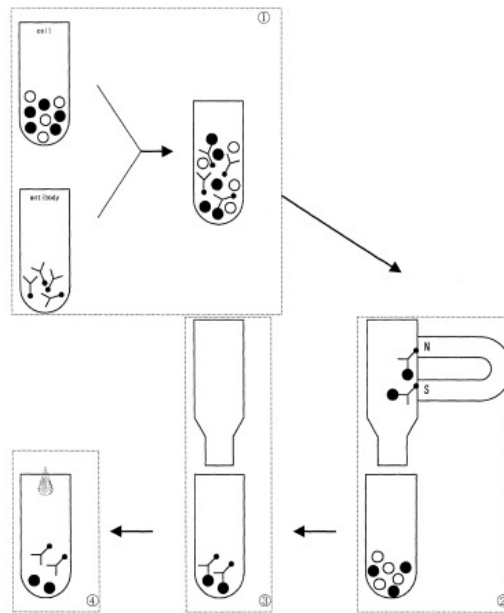


Fig.3. 磁気細胞分離システム(Magnetic Activated Cell Sorting : MACS)

原理図 24)



## 1-5 FDD-MB study

近年、アメリカに続いて日本でも有核赤血球による無侵襲出生前診断に関する研究(FDD-MB:Fetal DNA diagnosis from maternal blood)が行われている。アメリカで実施されたことを踏まえて有核赤血球の分離・回収をFACS や MACS 以外の方法で試みている。

赤血球膜の特性を活かし、レクチンを用いて有核赤血球と赤血球を凝集させ、有核赤血球を回収する方法を検討した。レクチン法による母体血 2mL 中に有核赤血球を 4 個回収することができたと報告している<sup>22)</sup>。また、Percoll 密度勾配遠心分離法による有核赤血球分離・回収が行われている。この方法は、母体血中の有核赤血球を Percoll 密度勾配遠心分離し、NRBC を最も多く含む分画を回収する。大部分の赤血球と白血球を分離することができる。次に回収した分画から染色塗抹標本を作製し、NRBC 自動探索装置を用いて NRBC 候補を探索する。最後に NRBC 候補を目視で判定し、マイクロマニピュレータで回収する。この方法により母体血中の有核赤血球を確実に回収することができ、2mL から 4.1 個回収することができたと報告している<sup>23)</sup>。加えて、男児の正審率が 98%であったことから無侵襲出生前遺伝子診断の実現化に期待されている。しかし、Percoll 法による有核赤血球回収法は、20 時間以上を要するため回収時間の短縮化が必須である。回収時間の問題を解決することによって、無侵襲出生前遺伝子診断の実現性が高まると考えられる。

### 1-5-1 密度勾配遠心分離<sup>24)</sup>

密度勾配遠心分離法は、遠沈管の底にいくにつれて溶液の密度が増すので、遠心中に生じる対流が最小限になる。勾配の上端に細胞を載せ、密度と大きさが同じ細胞を狭いバンドにして沈降させることができる。密度の勾配は、粘度勾配にもなっている場合が多く、バンドの前部に位置する細胞は、後部に位置するものよりも大きな抵抗を受け、バンドの幅が狭まってくる。密度勾配遠心分離法には速度ゾーン法と等密度遠心法の2種類がある。

速度ゾーン法は、液体の密度は管の下にいくにつれて増すが、分離される細胞の密度より大きくなることはない。遠心力がかかると、細胞の大きさによって沈降速度が変わってくる。密度勾配のために同じ大きさの細胞は、幅の狭いバンドとなって、すべて一緒に沈降する。大きさが違えば、その沈降速度に応じてはっきりとした Fig. 22 のようなバンドをつくる。従って、速度ゾーン遠心法は3つ以上の細胞集団を分離することができる。

等密度遠心法は、密度の違いに基づいて細胞を分離する。勾配の下部は、目的の細胞よりも密度が高くなっている。このため、どんなに長く密度分離を続けても、決して細胞は遠沈管の底まで落ちない。細胞は、勾配の中の同じ密度の場所である平衡位置に達するまで沈降した後、下部の溶液はもっと重いため、細胞はそれ以上沈降できないためである。細胞は Fig. 23 のようなバンド状に集まる。また、細胞の大きさの違いは、平衡位置へ向かうときの速度に影響するにすぎない。勾配が安定で、遠心に悪い影響を与えない限り、必要な時間以上に遠心分離をしたからといって、分離が悪くなることはない。注意を要する点は、どんな細胞でも、勾配

内にできるバンドの位置は、密度勾配が違えば変化する可能性があることである。これは使う勾配液の違いによって、細胞が水を取り込んだり、あるいは放出したりするため、バンドを形成するときの密度が大きく変化する。等密度遠心法では、あらかじめつくっておいた勾配に細胞を重層して速度ゾーン法のようにして行うこともできる。

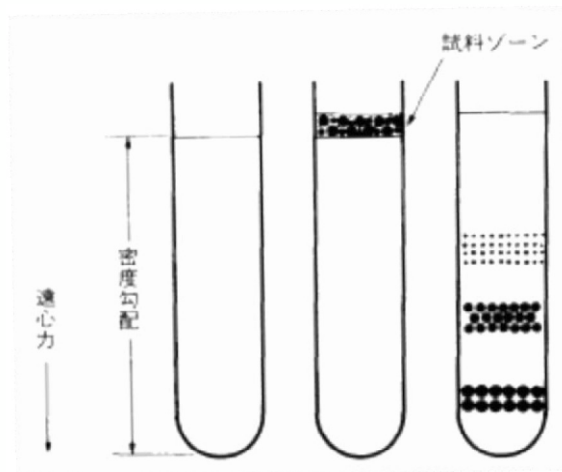


Fig.22. 速度ゾーン法(rate zonal density gradient centrifugation method)<sup>24)</sup>

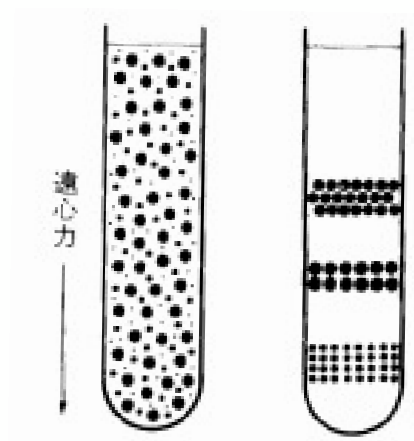


Fig. 23. 等密度遠心法  
(isopycnic centrifugation method)<sup>24)</sup>

## 1-6 目的と意義

従来から行われている出生前の胎児遺伝子診断は、胎児細胞を回収する際に侵襲性を伴っている。侵襲性の対象となるのは母体と胎児であるが、胎児に対しては流産となる。また、胎児遺伝子診断は世界規模で年間 500 万件実施されているため、胎児に対しての無侵襲化は必須である。現在、無侵襲出生前診断法の研究を日本でも行われており、母体の採血のみで胎児の診断を行う。母体血には、胎児から移行してきた有核赤血球が存在し、保持された遺伝子を分析することが可能である。この有核赤血球の回収法として Percoll 密度勾配遠心分離による方法があるが、血球探索に 20 時間以上要してしまい、回収までの効率が悪い。この解決案として Percoll 密度勾配遠心分離の後にさらに有核赤血球を濃縮することで、探索する血球数を少なくすることがある。そのためには、血球の比重以外の方法で分離する必要があり、血球回収の効率化のため簡易な操作かつ高速で行う方が望ましい。これらすべてを行うため、血球の大きさや硬さに着目した。フィルターやクロマトグラフィーなどは、血球を容易に分離することが可能であるが、回収することが困難である。そのため、濃縮と回収機構を備えた濃縮チップを作製する。まず、容易に濃縮を行うために微小間隙構造を作製し、容易に回収するためにダイアフラムを作製する。これらを組み合わせることで濃縮回収機構を実現することが目的である。これにより、有核赤血球回収までの工程の効率化を行うことが期待でき、無侵襲出生前遺伝子診断の実現に近づくといえる。

## 第2章 微小間隙チップによる有核赤血球の捕捉条件の調査

### 2-1 緒言

先行研究において、微小流路内の間隙部で、ヒト有核赤血球の捕捉を成功させている<sup>21)</sup>。しかし、記述されていた間隙の幅で、血球の捕捉ができるのか分からない。そこで、微小な間隙を含むマイクロ流路を設計・開発し、捕捉条件の確認と検討を行う。また、捕捉された時の血球がどのように変化するのも同時に観察する。

しかし、ヒト有核赤血球を含む、定量・定性的な母体血や臍帯血の入手は、難しい。代替血液として、鳥類の血球が用いられている<sup>21)</sup>が、ヒトの血球との差異が分からない。そこで、代替血液の探索を行うと共に、定性的な性質の調査も行う。

### 2-2 目的

本章の目的を以下に示した。

1. ヒト有核赤血球を含む血液の代替血液の探索および定性的な調査を行う。
2. 微小な間隙を含むマイクロ流体デバイスを設計・開発する。
3. 代替血液を用いた有核赤血球の捕捉条件の確認と検討を行う。

## 2-3 実験

### 2-3-1 試薬

実験に用いた試薬は、以下の通りである。

微小間隙鋳型作製

- (1) SILICON WAFERS;株式会社フェローテックシリコン
  - (2) SU-8 2002;化薬マイクロケム
  - (3) SU-8 3010;化薬マイクロケム
  - (4) SU-8 3035;化薬マイクロケム
  - (5) SU-8 Developer;化薬マイクロケム
  - (6) IPA (2-Propanol);関東化学
  - (7) SILPOT 184 W/C;東レ・ダウコーニング
  - (8) CATALYST SILPOT 184;東レ・ダウコーニング
- 代替血液をチップへ送液
- (9) ニワトリ血液;株式会社日本バイオテスト研究所

### 2-3-2 装置

実験に用いた装置は、以下の通りである。

微小間隙流路作製

- (1) スピンコーター 1H-DX2;ミカサ株式会社
- (2) ホットプレート DATAPLATE 722A-1;イウチ
- (3) マスクアライナー Double-view Mask Aligner PEM-800;ユニオン光学株式会社
- (4) 真空ポンプ MD 4C;株式会社アルバック
- (5) 真空脱包装置 AJ-0133-010;AS ONE

- (6) オープン DKN 301;ヤマト科学
  - (7) 酸素プラズマエッチング装置 RIE-10NR;SAMCO
  - (8) CCD レーザ LK-3100;KEYENCE
  - (9) デジタル顕微鏡 VH-6300C;KEYENCE
  - (10) 貼り合わせ装置 SMA-20GWUU;NB
- 代替血を送液
- (11) マイクロシリンジポンプ II ;株式会社エイコム
  - (12) 倒立顕微鏡 IX70;OLYMPUS
  - (13) 高速 CCD カメラ ADT-33C;FLOVEL

### 2-3-3 代替血液の検討

有核赤血球を含有する生物を探し、ヒトの有核赤血球の大きさと内包する核の大きさを比較し、近似する細胞を選択した。

### 2-3-4 Adobe Photo Illustrator による流路の設計とマイクロ流路構造の検討

流路のパターニングは、フォトマスクを通して、SU-8 に紫外光をあてるフォトリソグラフィ法を用いた。また、フォトマスクは、高精密な印刷機を用いる。フォトマスクのパターンは、間隙幅の調整と作製が容易になるように検討した。



### 2-3-5 フォトリソグラフィによるマイクロ流路鋳型の作製

マイクロ流体の形成は、以下の手順で行った(Table.2, Fig.24)。

- (1) シリコンウェハーに SU-8 をスピコートした。
- (2) 露光と現像を行った。
- (3) (2)のシリコンウェハーに SU-8 をスピコートした。
- (4) 露光と現像を行った。
- (5) PDMS による鋳造を行った。
- (6) (5)の鋳造した PDMS の流路部分とガラス板にプラズマ表面処理を施し、接着させた。

Table.2 Su-8 spin coat.

(1) Spin coat

Program	slope	rpm
0	5	-
10	5	500
20	10	-
30	30	1000,1750, 3000
40	10	-
50	end	

(7) 2nd Spin coat

Program	slope	rpm
0	5	-
10	5	500
20	10	-
30	30	3000
40	10	-
50	end	

(2) Soft bake

	Time	Tem.
1	1 min	65°C
2	2 min	95°C

(8) Soft bake

	Time	Tem.
1	5 min	65°C
2	20 min	95°C

(3) Exposure

25 sec.

(9) 2nd Exposure

40 sec.

(4) Post bake

	Time	Tem.
1	1 min	65°C
2	2 min	95°C

(10) Post bake

	Time	Tem.
1	1 min	65°C
2	5 min	95°C

(5) Develop and Rince

	Developer	2-propanol
1	1 min.	
2	1~5 sec.	
3		1~5 sec.
4		10 sec.

(11) Develop and Rince

	Developer	2-propanol
1	12 min.	
2	1 min.	
3		10 sec.
4		10 sec.

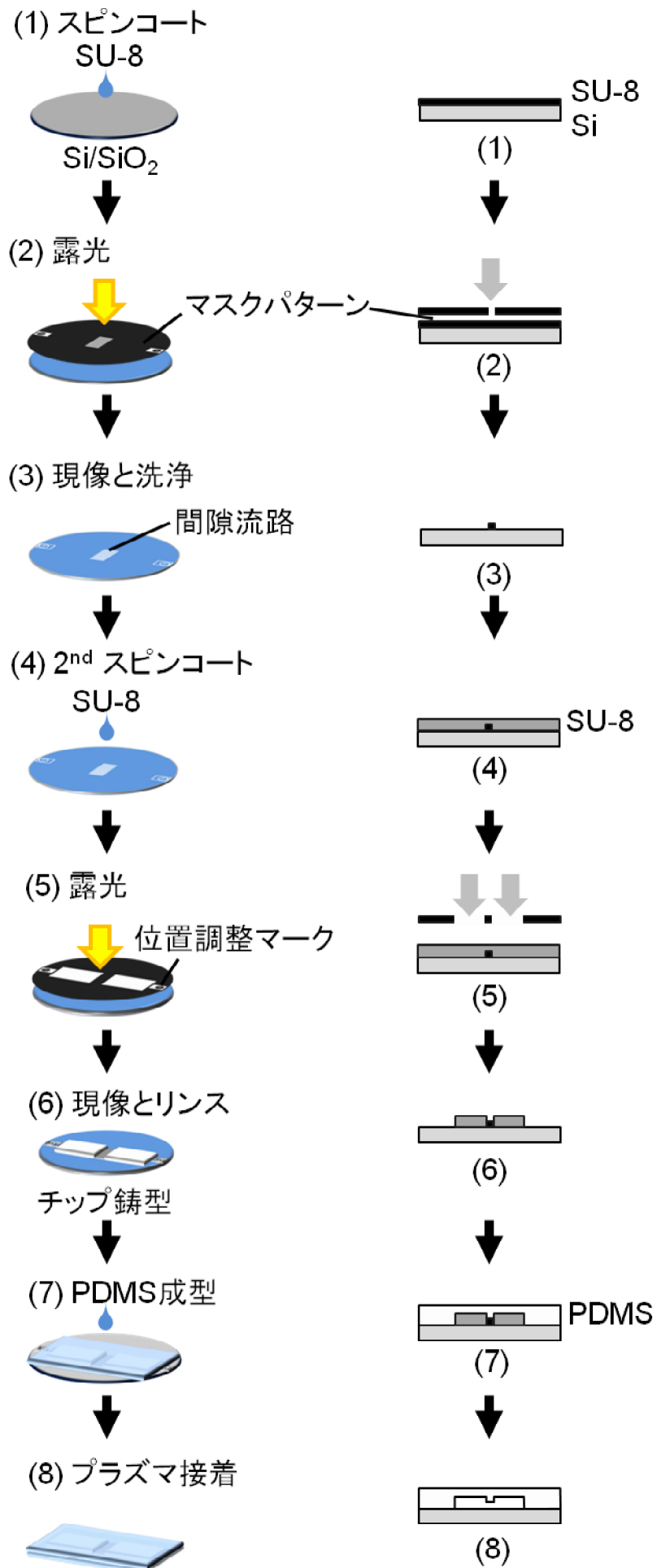


Fig.24. Fabrication of micro gap chip.

### 2-3-6 マイクロ流路へ代替血液を送液

マイクロ流路への、代替血の送液は、以下の手順で行った(Table.3, Fig.25)。

Table.3 Solution sending protocol of chicken blood.

手順	内容
1	ニワトリ全血をエッペンチューブに $10\ \mu\text{L}$ 分注する。
2	エッペンチューブのニワトリ血液を 100 倍希釈する。
3	シリンジとチューブを接続する。
4	チューブにニワトリ希釈血液を吸い入れる。
5	シリンジをシリンジポンプに設置する。
6	チューブと微小間隙チップを接続する
7	シリンジポンプを動作させ、希釈血液を送液する。
8	ニワトリ赤血球が捕捉される様子を倒立顕微鏡下で観察する。

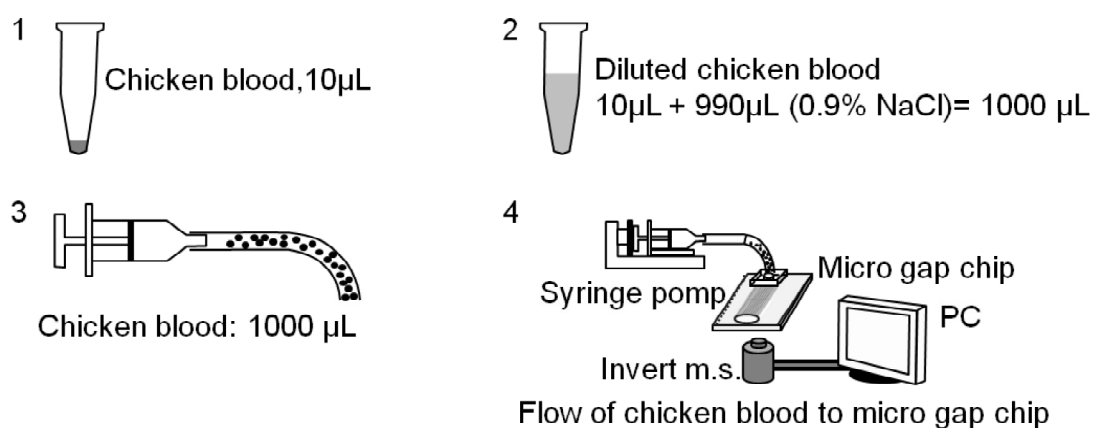


Fig.25 Solution sending protocol of chicken blood.

## 2-4 結果および考察

### 2-4-1 代替血液の探索および血球の大きさを調査

母体血中のヒト有核赤血球の代替細胞を探索するため、ヒト有核赤血球の大きさを調べた(Table.4, Fig.27, 28)。標本上のヒト有核赤血球は、9.3  $\mu\text{m}$  ~ 13.2  $\mu\text{m}$  であることが分かった<sup>29,30</sup>。

代替血液は、有核赤血球を保有する生物を調べた。一般的に哺乳類の赤血球は、無核であることが知られているため、各生物の有核赤血球の大きさを標本画像<sup>25,26,27,28</sup>から調べた(Fig.26, 28, Table.4)。

Fig.26, 27 で得られた各血球の大きさとヒト有核赤血球の大きさを比較した。ヒト有核赤血球の大きさと近似していた有核赤血球を持つ生物は、コイ、ニワトリ、スズメ、ツバメの 4 種を示し、各有核赤血球の大きさは、8.5  $\mu\text{m}$  ~ 12.3  $\mu\text{m}$ 、9.8  $\mu\text{m}$  ~ 11.6  $\mu\text{m}$ 、10.5  $\mu\text{m}$  ~ 12.6  $\mu\text{m}$ 、12.8  $\mu\text{m}$  ~ 13.5  $\mu\text{m}$  だった。ヒト有核赤血球の最小値よりも小さい有核赤血球を持つ生物は、コイだった。また、ヒト有核赤血球の最大値と同等の大きさを持つ生物は、ツバメだった。

有核赤血球の大きさを用いて微小間隙で捕捉する条件を検討する場合、最も小さな有核赤血球を持つコイが適当であると考えられる。加えて、最大値を示すヒト有核赤血球は、最小な有核赤血球を捕捉することが可能となれば、必然的に、捕捉できると考えられる。

さらに、比較する対象をヒト有核赤血球の核の大きさも加えて検討してみた(Table.5, Fig.29)。ヒト有核赤血球の核の大きさは、3.3  $\mu\text{m}$  ~ 10.2  $\mu\text{m}$  と最小と最大の値の幅が非常に大きい。代替血の候補として挙げたコイ、

ニワトリ、スズメ、ツバメの 4 種の有核赤血球の核のそれぞれの大きさは、それぞれ  $4.6\ \mu\text{m} \sim 5.6\ \mu\text{m}$ 、 $3.6\ \mu\text{m} \sim 3.9\ \mu\text{m}$ 、 $4.6\ \mu\text{m} \sim 5.5\ \mu\text{m}$ 、 $5.3\ \mu\text{m} \sim 6.1\ \mu\text{m}$  だった。有核赤血球の核が最も小さな生物は、ニワトリだった。逆に、有核赤血球の核が最も大きな生物は、コイだった。

ヒトの有核赤血球の最小の大きさに近似していたコイが代替血液に適していると考えられたが、核の大きさを比較すると、最小値に最も近似する生物は、ニワトリだった。

マイクロ流路内の微小間隙を血球が通過すると仮定した時、血球は、間隙流路を通過する為に変形する。では、候補血液の有核赤血球の中で最も変形する血球は、保有する核が小さいニワトリの有核赤血球だと考えられる。また、ヒト有核赤血球の核の大きさの最小値は  $3.3\ \mu\text{m}$  とニワトリの物と近いため、間隙流路を通過する際、似たように変形をされると考えられる。

以上のことから、ヒト有核赤血球が含まれる母体血や臍帯血の代替血液として、有核赤血球の大きさと変形性が近似すると推測される、ニワトリの血液を用いることが望ましいと考えられる。

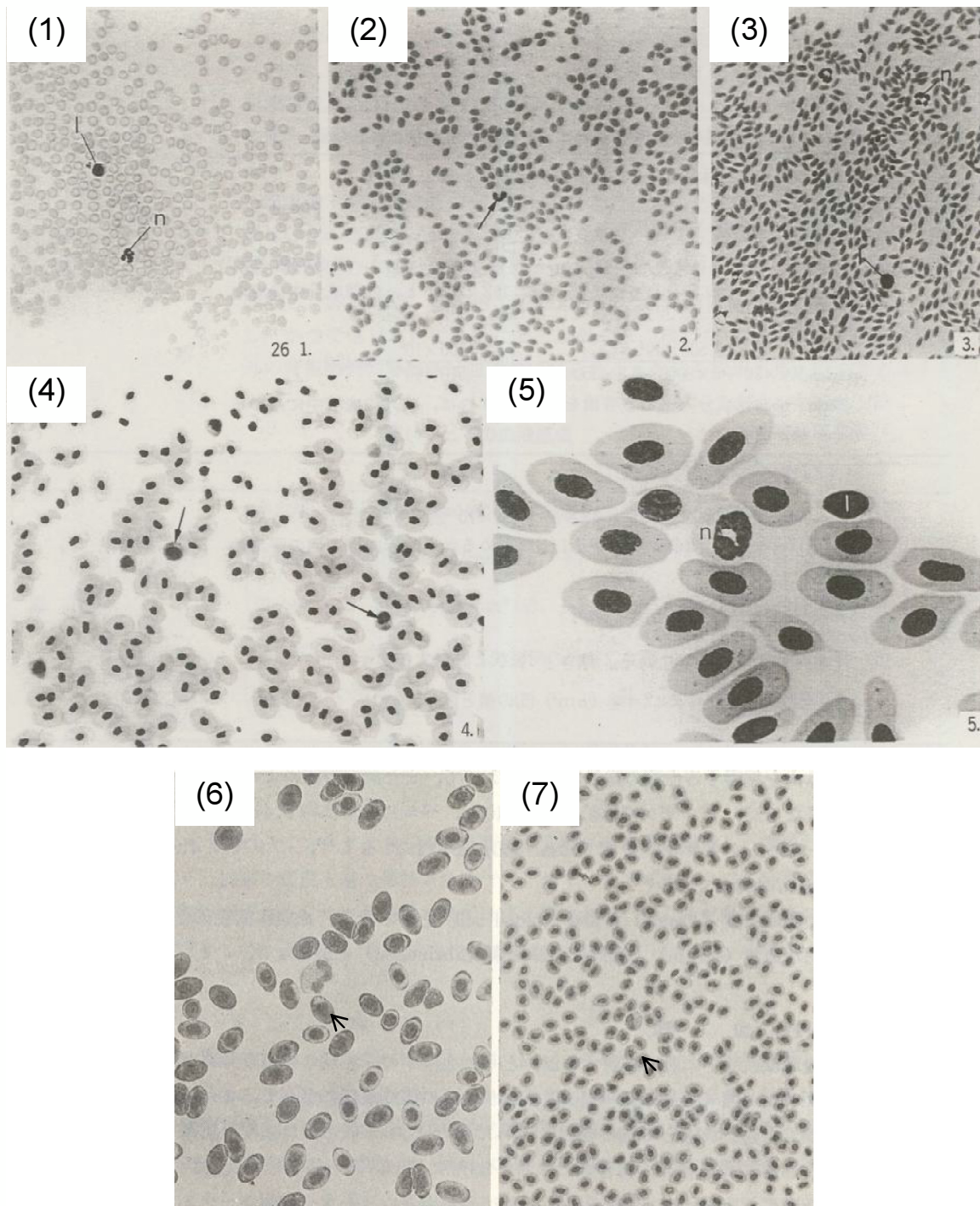


Fig.26 Staining animal blood cells x230 magnifications. (1) Rat<sup>25</sup>, (2) Camel<sup>25</sup>, (3) Lama<sup>25</sup>, (4) Trionychidae<sup>25</sup>, (5) Amphiuma<sup>25</sup>, (6) Ray<sup>26</sup>, (7) Carp<sup>26</sup>. Arrow and marking cells are white blood cells.

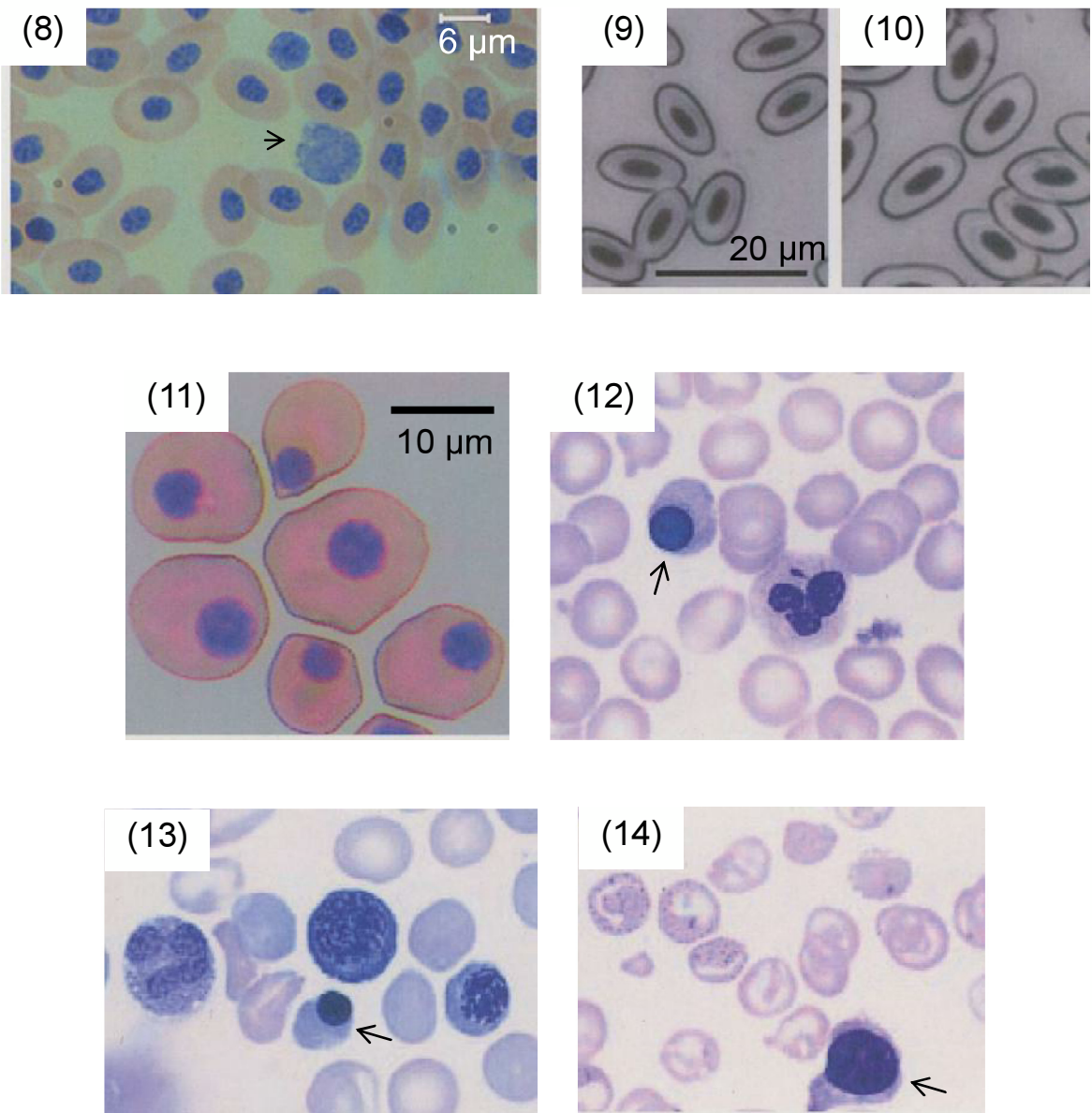


Fig.27 Staining Bird and Human blood cells. (8) Chicken<sup>28)</sup>. White blood cell is indicated by an arrow. (9) Sparrow<sup>27)</sup>, (10) Barn swallow<sup>27)</sup>, (11) Human<sup>29)</sup>, (12) Human, x230 magnifications<sup>30)</sup>, Arrow marking cell is nucleated red blood cell. (13) Human, x230 magnifications<sup>30)</sup>, Arrow marking cell is nucleated red blood cell. (14) Human. x230 magnifications<sup>30)</sup>. Arrow marking cell is nucleated red blood cell.



Table.4 Comparison of nucleated red blood cell size.

	生物名	長径 $\mu\text{m}$	短径 $\mu\text{m}$
1	ラット(無核)	7.1	6.6
2	ラクダ(無核)	6.9	4.6
3	ラマ(無核)	7.2	3.8
4	スッポン	17.7	13.2
5	アンヒューマ	56.9	26.3
6	エイ	16.5	12.0
7	コイ	10.6	8.3
8	ニワトリ	10.4	6.9
9	スズメ	11.7	6.4
10	ツバメ	13.1	7.6
11	ヒト	11.0	9.8

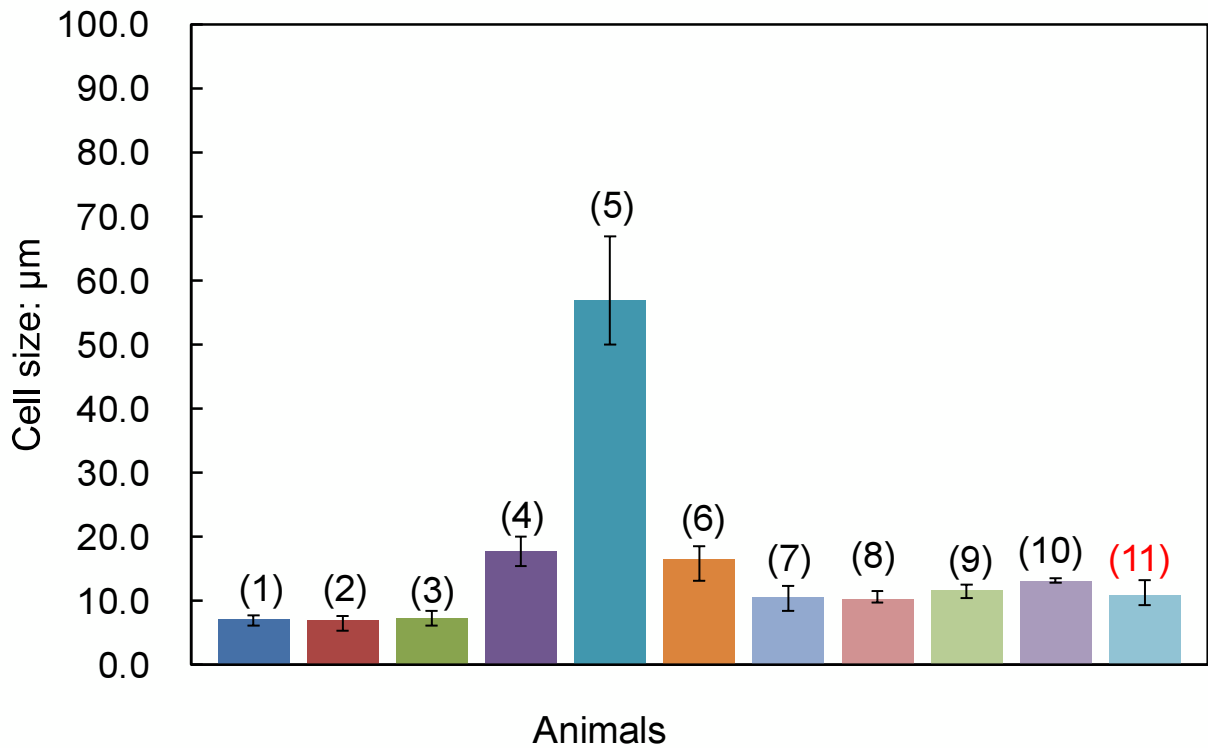


Fig.28 Comparison of nucleated red blood cell size. (1) Rat, (2) Camel, (3) Lama, (4) Trionychidae, (5) Amphiuma, (6) Ray,(7) Carp, (8) Chicken, (9) Sparrow,(10) Barn swallow,(11) Human.

Table.5 Comparison of nuclear average size.

	生物	長径 $\mu\text{m}$	短径 $\mu\text{m}$
1	コイ	5.1	3.1
2	ニワトリ	3.7	3.0
3	スズメ	5.0	2.1
4	ツバメ	5.6	2.4
5	ヒト	5.8	5.5

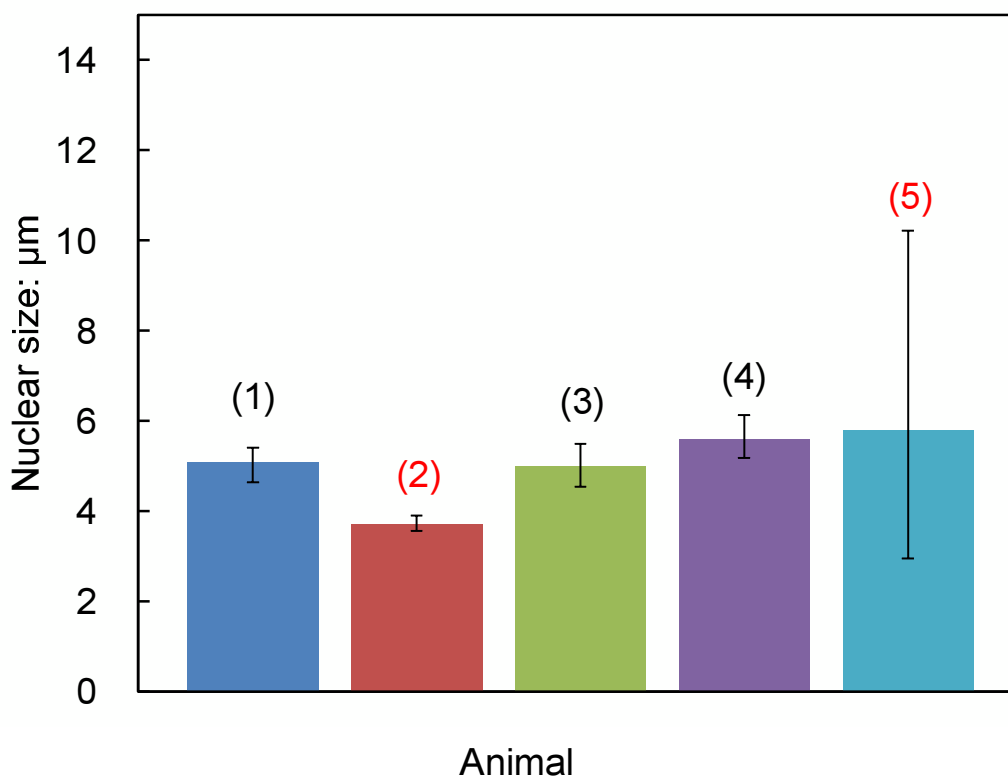


Fig.29 Comparison of nuclear size.. (1) Carp, (2) Chicken, (3) Sparrow, (4) Barn swallow, (5) Human.

## 2-4-2 微小な間隙を含むマイクロ流体デバイスを設計・開発

作製したフォトマスクパターンを示した(Fig.32, 34)。間隙の幅での捕捉を、高さで捕捉にできるよう調整し、設計を行った。パターン上の流路は、間隙流路部分と間隙まで送液する流路部分の2種で構成した。間隙流路部と送液流路部分を接続する為に、2段階露光を行う必要があるため、位置調整用のマークを描き込んだ(Fig.34)。また、間隙部の高さを保持するためにサポーターを設置した(Fig.33)。

マイクロ流路の作製段階において、各種スピコートで作製できた流路高さを示した(Table.6, 7 Fig.30, 31)。流路高さの形成は、SU-8の粘性、揮発性に依存しているため、同一回転数で塗布しても、同じ高さにならず、目的とする間隙の高さを作製するのが難しいことが分かった。

2段階露光を行うために、フォトマスクのマークと最初の露光で形成したマークと位置合わせを行う。しかし、光学顕微鏡を用いた際、2つに積層させたSU-8同士の反射光に差異が無いためか、位置調整にズレが生じた。もちろん、ズレが生じても良いようにフォトマスクを作製したが、より複雑な流路パターンを形成するには、ズレが致命的になる可能性がある。対処として最初の現像後にDeepR.I.E.を用いて基板を掘削する方法を考えられる。シリコンウェハ基板とSU-8の反射光に明確な差が現れると考えられるため、2段階露光時の位置調整を各段に容易化できると期待できる。

Table.6 SU-8 2002 thickness.

rpm	1	2
1000	1.7	1.8
1500	1.5	-
1750	1.2	1.3
3000	0.9	1.1

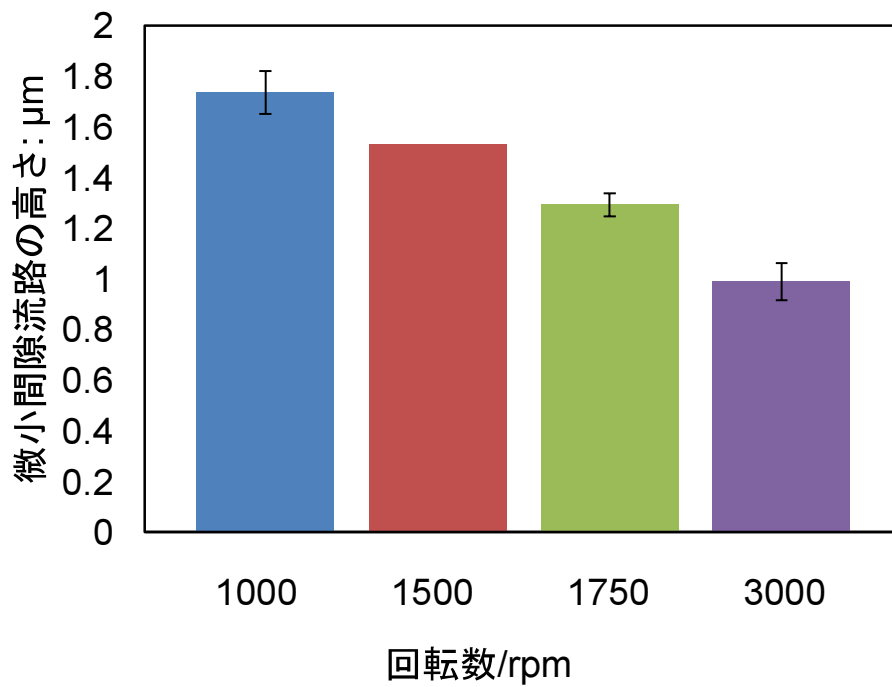


Fig.30 Fabricated micro gap height.

Table.7 SU-8 3035 thickness.

3000 rpm	$\mu\text{m}$
1	36.4
2	41.8
3	41.5
4	38.9
5	50.9
6	39.8
7	31.2
8	32.6
9	31.5
10	33.1

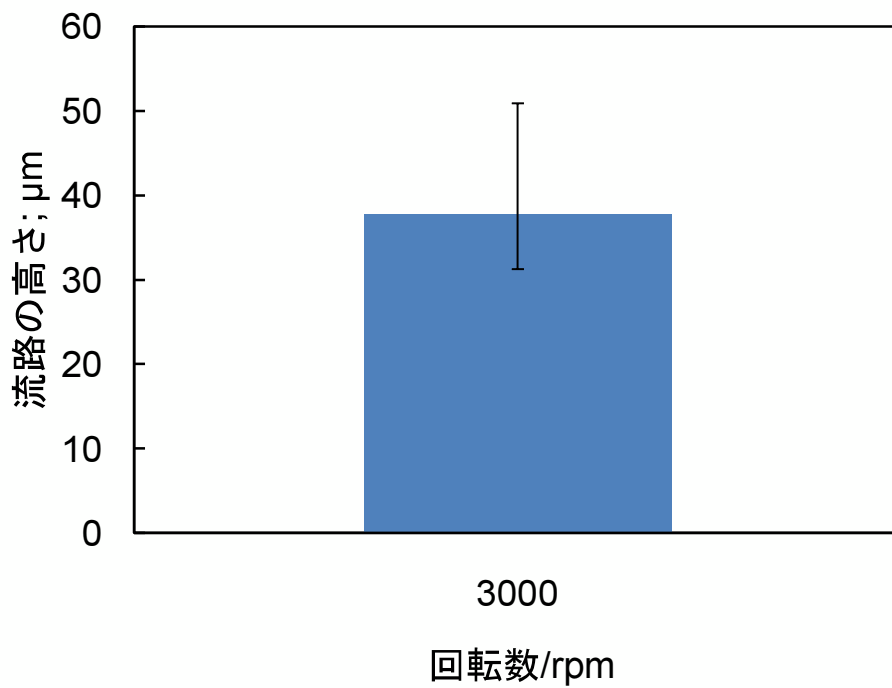
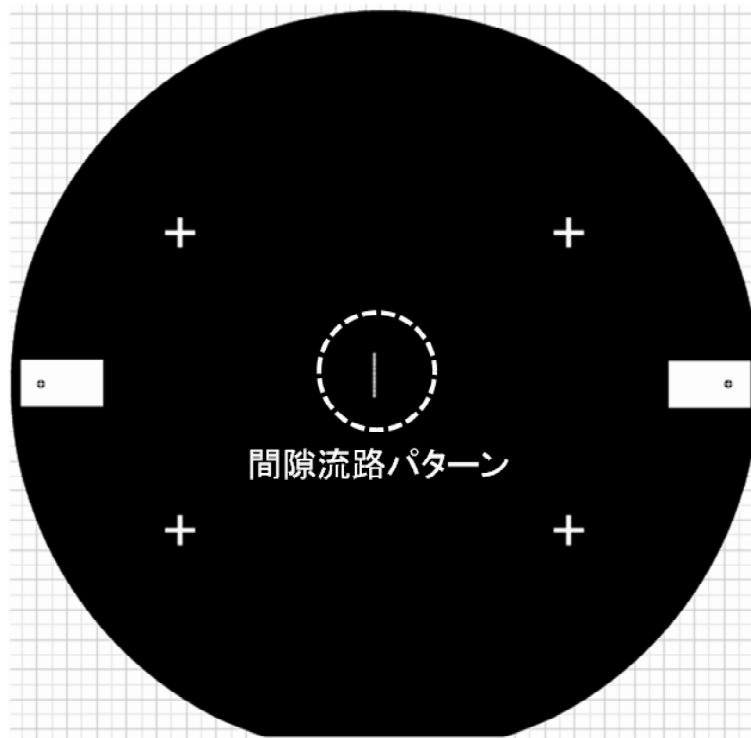
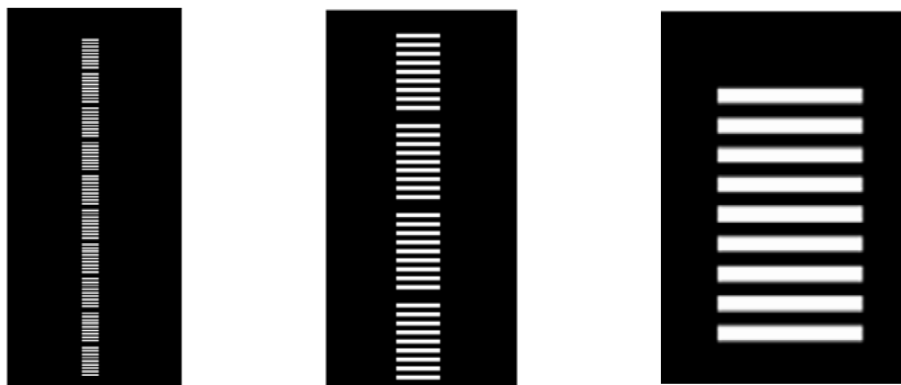


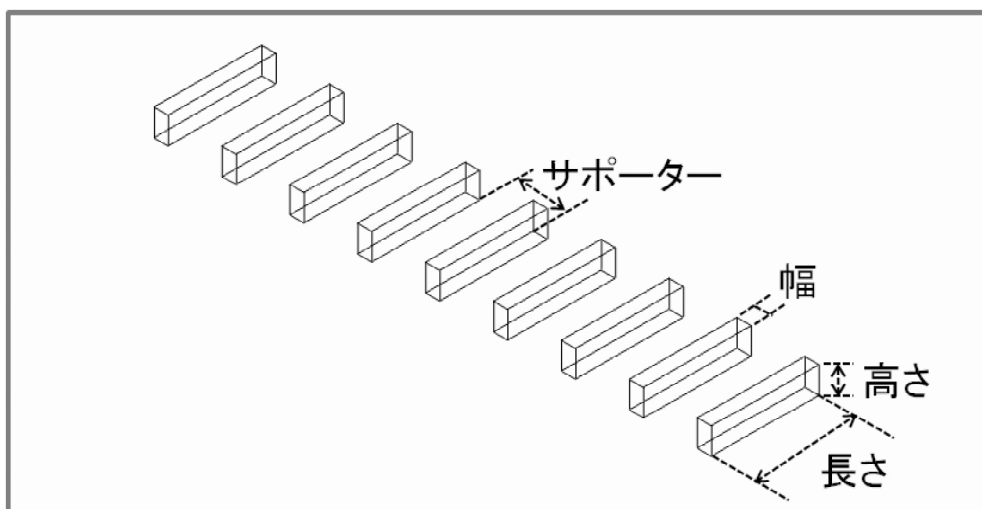
Fig.31 Fabricated flow channel height of 2<sup>nd</sup> exposure.



間隙流路パターンのフォトマスク

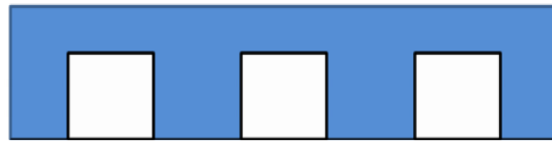
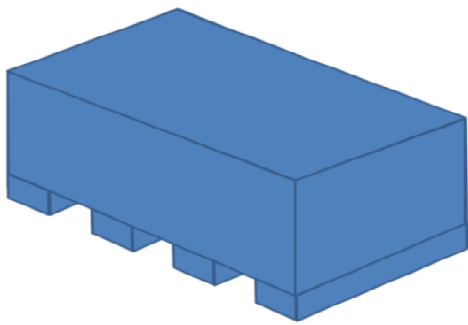


間隙流路パターンの拡大図

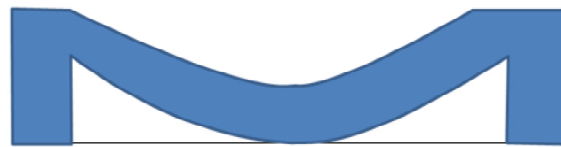
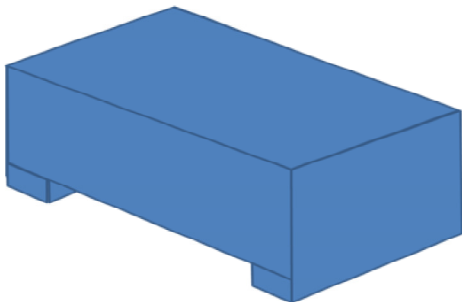


パターンニングされた間隙流路の3Dイメージ

Fig.32 Micro gap channel image in photo mask and 3D structure after patterning.



間隙流路の断面イメージ

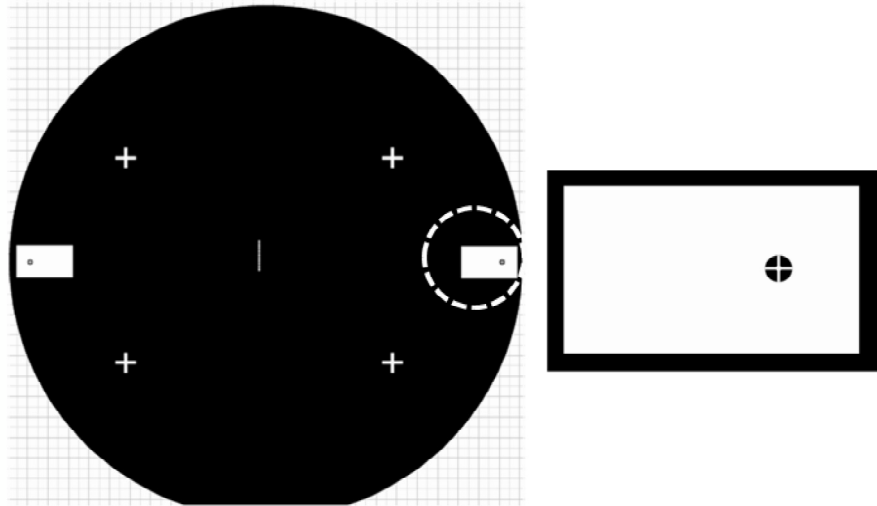


サポーターのない間隙流路の断面イメージ

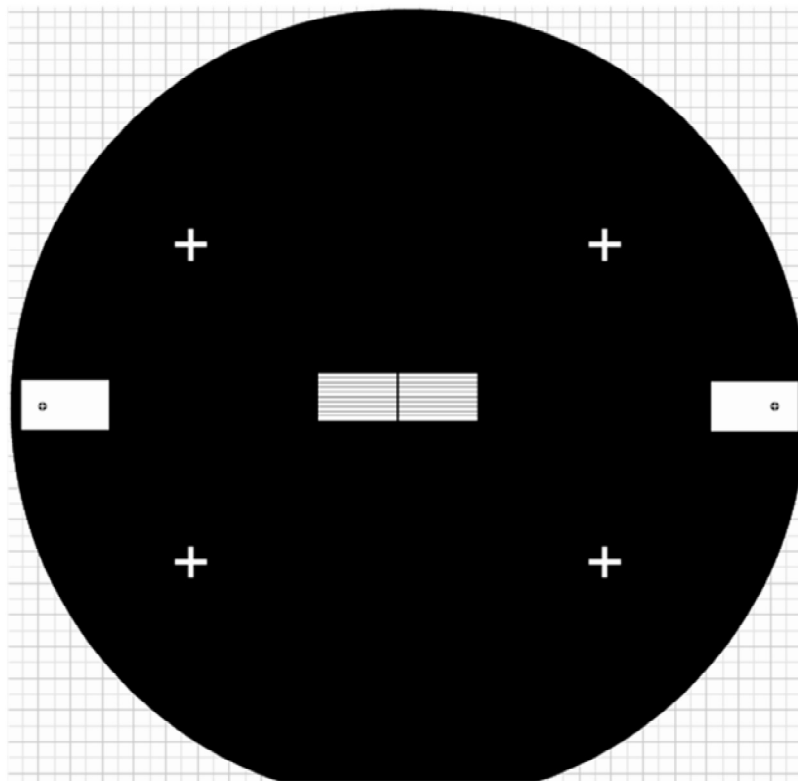
間隙流路の3Dイメージ

Fig.33 Micro gap channel supporter.





位置合わせ用アライメントマーク



2段階目の露光のマスクパターン

Fig. 34 Alignment mark and 2<sup>nd</sup> step exposures photo mask.

### 2-4-3 代替血液を用いた有核赤血球の捕捉条件の確認と検討

ニワトリ血液は、ヒト血液と同様に白血球を含んでいる。白血球を含まれないように 1000 倍以上希釈することが好ましいが、微小間隙チップ内へ送液される血球数が少なくなり、捕捉された様子を確認することが難しくなる。そのため、100 倍希釈液を用いた。ニワトリの有核赤血球を捕捉するために 4 つの高さのマイクロ流路を形成した。微小間隙流路の高さが、9 $\mu\text{m}$  の時、ニワトリの有核赤血球を捕捉することが出来なかった(Fig. 35)。2 $\mu\text{m}$  の時は、微小間隙流路の内部で捕捉していた(Fig. 35)。1.4 $\mu\text{m}$  においては、微小間隙流路の入口と内部で捕捉していた(Fig. 36)。1.2 $\mu\text{m}$  では、微小間隙流路の入口で全てを捕捉していた(Fig. 36)。ニワトリの有核赤血球の大きさ 10 $\mu\text{m}$  は、ヒト有核赤血球の大きさ 11 $\mu\text{m}$  と近いとため、捕捉される微小間隙の高さも近くなると考えられる。

また、流路壁面にニワトリの血球が付着していた(Fig. 35)。ヒト有核赤血球は、非常に希少な細胞のため、他の血球に巻き込まれる形で流路壁面に付着した場合、回収することができなくなる。流路内壁部の表面に血球付着抑制剤を展開することで解決できると考えられる。

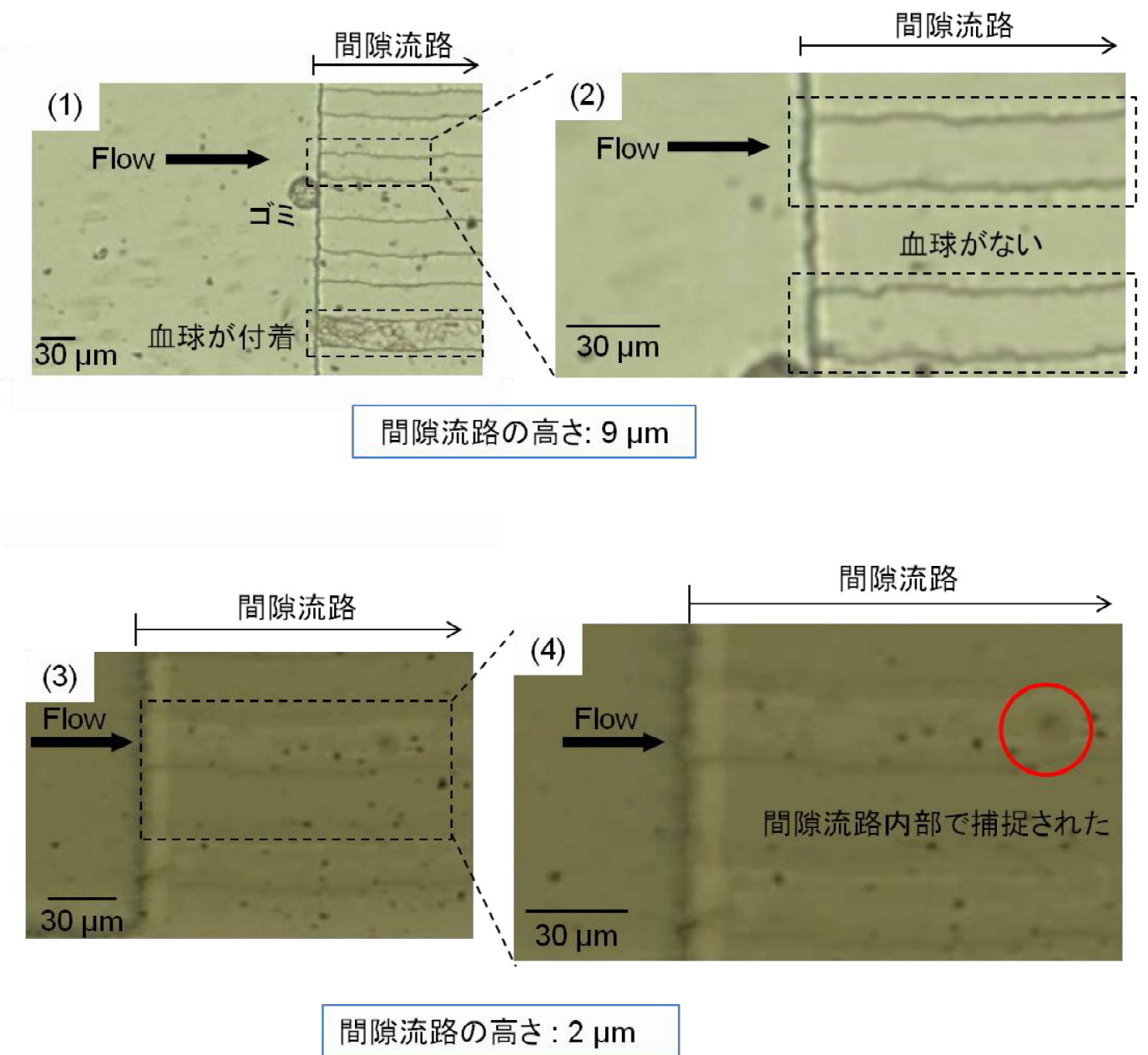


Fig.35 Chicken red blood cells trapped at micro gap channel. (1), (2) Gap height 9 μm. (3), (4) Gap height 2 μm.

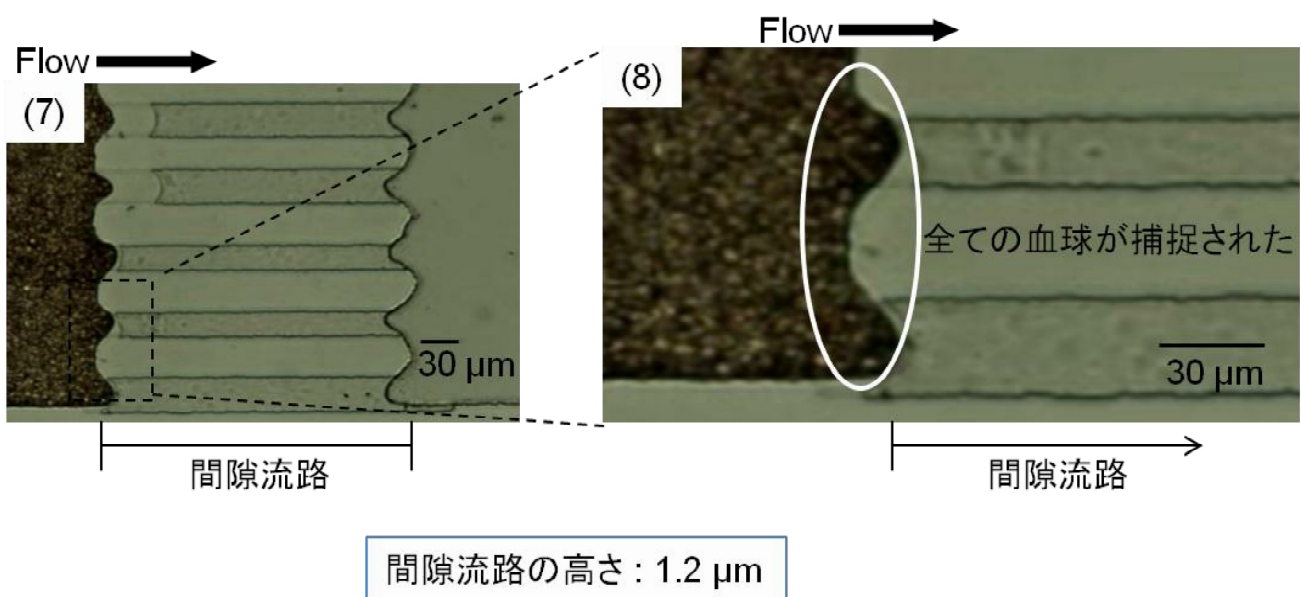
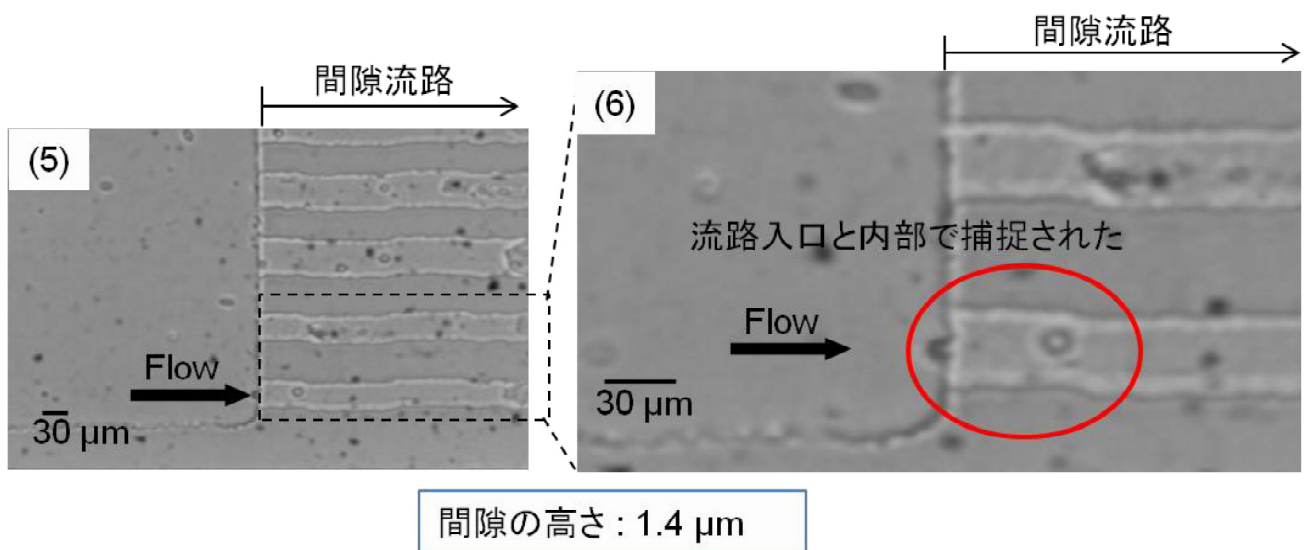


Fig.36 Chicken red blood cells trapped at micro gap channel. (5), (6) Gap height 1.4μm. (7), (8) Gap height 1.2 μm.

## 2-5 結論

ヒト有核赤血球を含む血液として、母体血と臍帯血が挙げられるが、双方ともに希少血液であり、定量・定性的な入手が難しい。代替血液として、他生物の血液を検討した。血中に有核赤血球を含む生物として、鳥類、魚類、爬虫類を選択し、各有核赤血球の大きさを比較した。ヒト有核赤血球の大きさと近似した血球を持つ生物は、ニワトリであることが分かった。ニワトリの血液の組成を基に、希釈倍率を 1000 倍とした。

間隙流路の高さを調整できるフォトマスクの作製を行った。間隙を支えるためにサポーターを設置し、捕捉される様子を観察するために 2 段階露光による間隙までの流路部分を形成した。2 段階露光時において、フォトマスクのマークと基板上のマークの位置合わせが難しいことが分かった。

ニワトリ血液をチップへ送液し、捕捉された間隙の高さは、 $1.2\sim 2\mu\text{m}$  だった。うち、間隙の高さが  $1.2\mu\text{m}$  において間隙入口部で全ての血球捕捉に成功した。今後、ヒト有核赤血球を捕捉する条件として、間隙の高さ  $1.2\mu\text{m}$  を基準として検討する。

また、流路壁面に血球が付着していたため、有核赤血球が他の血球に巻き込まれる形で流路壁面に付着する可能性が考えられたため、血球付着抑制のための流路壁面コートを検討する必要があると考えられた。

## 第3章 微小間隙チップによるヒト有核赤血球の分離

### 3-1 緒言

第2章において、代替血液であるニワトリ血液を用いた微小間隙による血球の捕捉条件の検討を行った。ニワトリ赤血球は、微小間隙の高さ $1.9\mu\text{m}$ 以下の時、捕捉することに成功した。また、捕捉した血球は、ヒト有核赤血球の大きさと近似していたため、血球の捕捉できる間隙高さも近似すると考えられた。しかし、流路壁面に血球が付着している事が確認されたため、付着抑制剤の検討を行う必要があることが分かった。

本章では、第2章で発見された問題点の解決とともに、捕捉された血球を回収する機構として、ダイアフラム機構を導入し、血球回収の容易さを実現できる条件の検討を行う。また、第2章の結果に基づき、母体血中のヒト有核赤血球の捕捉を、微小間隙チップを用いて実施し、ダイアフラム機構による血球回収が実現できるのか、確認する。さらに、本論文の目的である、有核赤血球以外の細胞を取り除き、候補細胞を減らすことで、塗沫標本の数を減らし、有核赤血球の回収を容易にすることができたのか、検討する。

### 3-2 目的

本章の目的は、以下に示した。

- (1) 流路内壁部の表面処理による血球付着の抑制
- (2) ダイアフラム機構による血球回収動作の条件検討

- (3) 微小間隙チップによるヒト母体血中の有核赤血球の捕捉条件の検討
- (4) 微小間隙チップによるヒト母体血中の白血球と赤血球の除去
- (5) 微小間隙チップがもたらす金沢医科大学FDD-MBセンターの出生前診断法への期待効果

### 3-3 実験

#### 3-3-1 試薬

使用した試薬は、以下に示した。

- (1) SILICON WAFERS;株式会社フェローテックシリコン
- (2) SU-8 2002;化薬マイクロケム
- (3) SU-8 3035;化薬マイクロケム
- (4) SU-8 Developer;化薬マイクロケム
- (5) IPA (2-Propanol);関東化学
- (6) SILPOT 184 W/C;東レ・ダウコーニング
- (7) CATALYST SILPOT 184;東レ・ダウコーニング
- (8) ヒト母体血液;金沢医科大学 FDD-MB センター
- (9) ヒト血液;金沢医科大学 FDD-MB センター
- (10) Percoll<sup>TM</sup>;GE Heal Health
- (11) May-Grunwald Stain Solution;MERCK
- (12) Gimsa's solution;MERCK
- (13) BlockMaster<sup>TM</sup>CE-210、510;JSR corporation
- (14) Lipidure-PMB;NOF corporation

(15) サイトップ;AGC 旭硝子

### 3-3-2 装置

使用した装置は、以下に示した。

- (1) スピンコーター 1H-DX2;ミカサ株式会社
- (2) ホットプレート DATAPLATE 722A-1;イウチ
- (3) マスクアライナー Double-view Mask Aligner PEM-800;ユニオン光学株式会社
- (4) 真空ポンプ MD 4C;株式会社アルバック
- (5) 真空脱包装置 AJ-0133-010;AS ONE
- (6) オープン DKN 301;ヤマト科学
- (7) 酸素プラズマエッチング装置 RIE-10NR;SAMCO
- (8) CCD レーザ LK-3100;KEYENCE
- (9) デジタル顕微鏡 VH-6300C;KEYENCE
- (10) 貼り合わせ装置 SMA-20GWUU;NB  
母体血およびヒト血液を送液
- (11) マイクロシリンジポンプ II ;株式会社エイコム
- (12) 倒立顕微鏡;IX70;OLYMPUS
- (13) 高速 CCD カメラ ADT-33C;FLOVEL
- (14) TOMI Multipurpose refrigerated centrifuge EX-135;TOMI



### 3-3-3 血球付着の抑制を検討するマイクロ流体チップの設計と試薬の検証

チップの作製手順は、第2章と同様にフォトリソグラフィ法を用いて行った(Table.8)。血球付着抑制剤として、非特異的吸着を阻害するBlockMaster<sup>TM</sup>CE-210、510、Lipidure-PMBの3種類を用いた。送液条件は、Table.9に示した。

Table.8 Chip fabrication protocol.

1	Si Wafer に SU8-3035 をスピンコート
2	露光と現像
3	PDMS 鋳造
4	PDMS 剥離
5	PDMS シートを作製
6	プラズマ接着

Table.9 Surface treatment protocol.

1	BMCE-250、510、Lipidure-PMB をチップへ送液
2	12 時間静置
3	生理食塩水を送液(洗浄)
4	血液を送液
5	30 分静置
6	送液速度 100 $\mu$ L/min で 5 分間送液

#### 3-3-4 ダイアフラム機構の設計と構造の検証

Adobe photo illustrator を用いて設計し、マスクパターンを作製した。動作と機構は、以下に示した(Table.10 , Fig.37)。

Table.10 Mechanics of diaphragm pump manipulation.

1	空気流路内を陽圧にする
2	空気流路内を陰圧にする

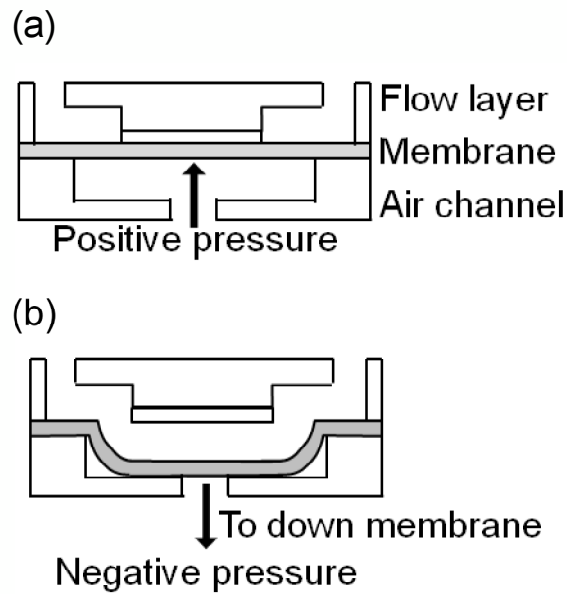


Fig.37 Mechanics of diaphragm pump manipulation. (a) Positive pressure in air channel. (b) Negative pressure in air channel.

### 3-3-5 微小間隙チップの作製と構造の検証

微小間隙流路部の作製は、第 2 章と同様に作製した。加えて、空気流路部と中間膜の作製を行った。

作製手順は、Table.11 および Fig.38 に示した

Table.11 Micro-gap-chip fabrication protocol.

(a) 微小間隙流路チップの作製

1	Si wafer に SU8-2002 をスピコート
2	露光と現像
3	Si wafer に SU8-3035 をスピコート
4	露光と現像
5	PDMS で鋳造

(b) PDMS 中間膜の作製

6	Si wafer に SYTOP をスピコート
7	PDMS をスピコート

(c) 空気流路チップの作製

8	Si wafer に SU8-3035 をスピコート
9	露光と現像
10	PDMS で鋳造

(d) 微小間隙チップの作製

11	プラズマ接着
----	--------

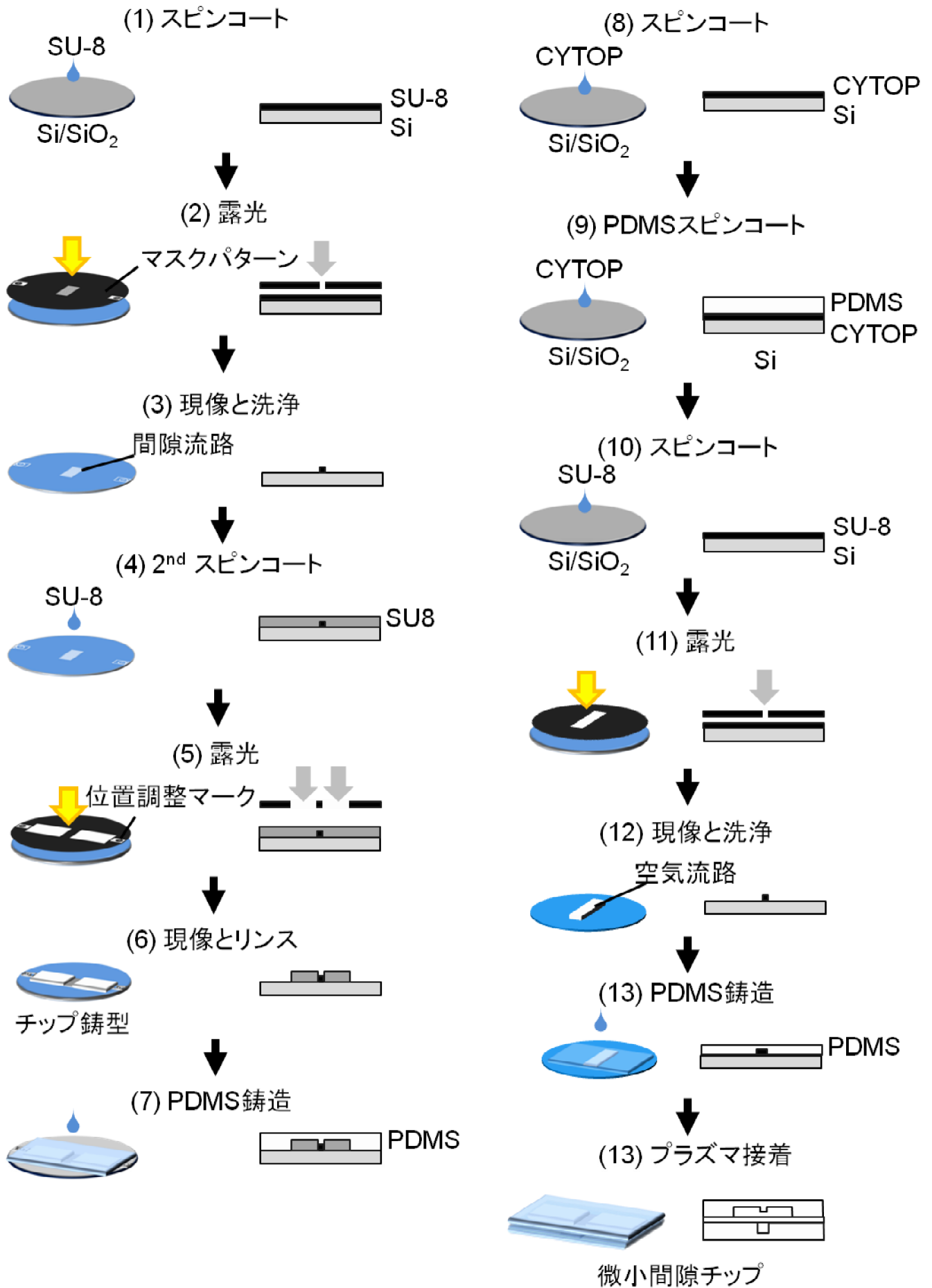


Fig.38 Micro-gap-chip fabrication protocol.

### 3-3-6 密度勾配遠心分離処理によるヒト有核赤血球の分離

密度勾配遠心分離は、金沢医科大学 FDD-MB センター法に準じて行った(Table.12, Fig.39)。

Table.12 Percoll density gradient centrifugation protocol.

1	Percoll 密度 1.085 g/mL と 1.095 g/mL 溶液を調整した。
2	母体血を 2 倍希釈した。
3	1.085 g/mL と 1.095 g/mL の Percoll 密度溶液を 1mL ずつ積層した。
4	2 倍希釈した母体血をさらに積層した。
5	20°C、30 分間、3000 rpm (1750 ×g)の条件で遠心分離した。
6	密度層 1.085 g/mL と 1.095 g/mL の間の層を回収した。
7	Percoll 除去として 20°C、5 分間、1500 rpm (450 ×g)の条件で遠心分離した。
8	Percoll 除去をあと 2 回行った。
9	沈降した血球を回収し、溶液量の計測

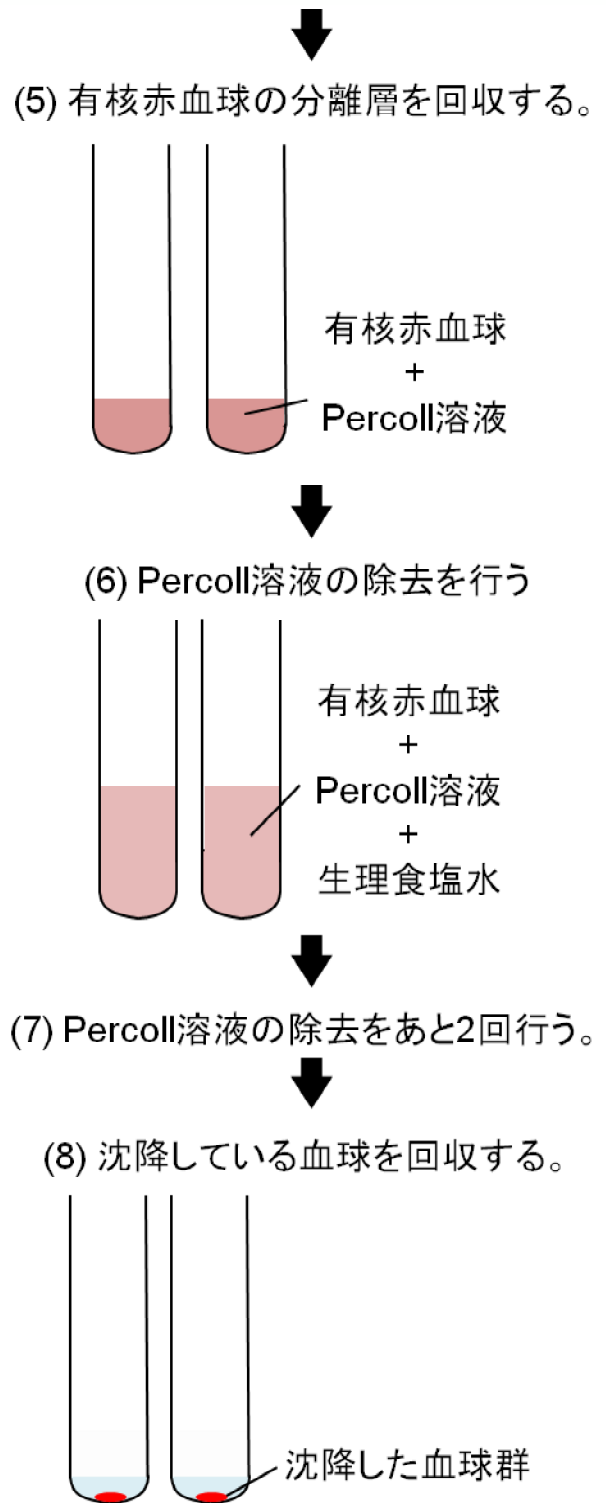
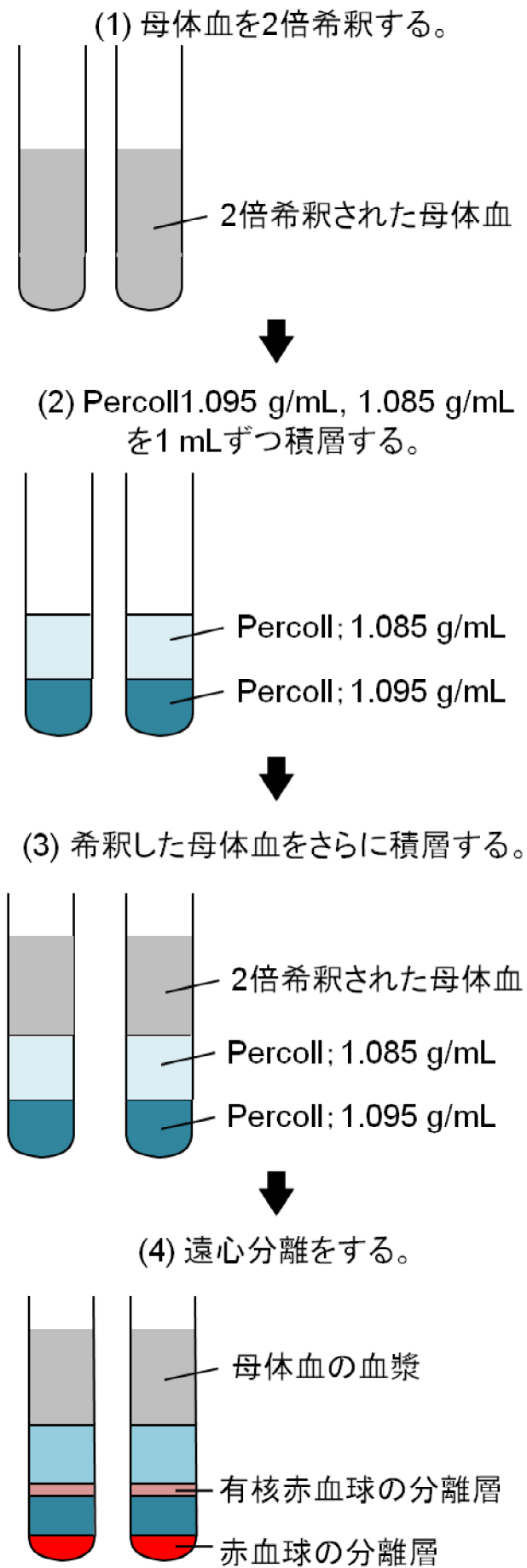


Fig.39 Percoll density gradient centrifugation protocol.

### 3-3-7 微小間隙チップによるヒト有核赤血球の分離

微小間隙チップへの導入手順を以下に示した(Table.13 , Fig.40)

Table.13 NRBC separation protocol by micro-gap-chip.

1	沈降した血球溶液 12 $\mu$ L をエッペンチューブに全て移した。
2	生理食塩水で 5 倍希釈し、全量を 60 $\mu$ L にし、20 $\mu$ L ずつ分注した。
3	シリンジに生理食塩水を吸い上げ、シリンジとチューブを接続した。
4	チューブ内へ生理食塩水を送液した。
5	シリンジを引き、チューブ内に空気を入れ、希釈した血液を 20 $\mu$ L 吸い入れた。
6	チップ内壁表面処理済みの微小間隙チップの空気流路内を陽圧(6.0 kPa)にした。
7	チューブと微小間隙チップを接続し、シリンジをシリンジポンプに設置した。
8	送液速度 1.0 $\mu$ L/min の条件で 20 分間、送液した。
9	20 分後、リザーバー部の溶液を回収した。この溶液を、通過液とする。
10	微小間隙流路の空気流路内を陰圧(-6.0kPa)にした。
11	生理食塩水を 100 $\mu$ L/min の条件で 10 分間、送液した。
12	リザーバー部の溶液を回収した。この溶液を、回収液とする。
13	通過液と回収液から、スメアを作製し、メイギュルンワルド染色液に 5 分間浸けた。
14	余剰染色液を生理食塩水で洗い流し、ギムザ染色液に 20 分間浸けた。
15	余剰染色液を生理食塩水で洗い流し、MillQ 水で洗浄後、自然乾燥させた。
16	標本上の有核赤血球の数を顕微鏡下で観察した。



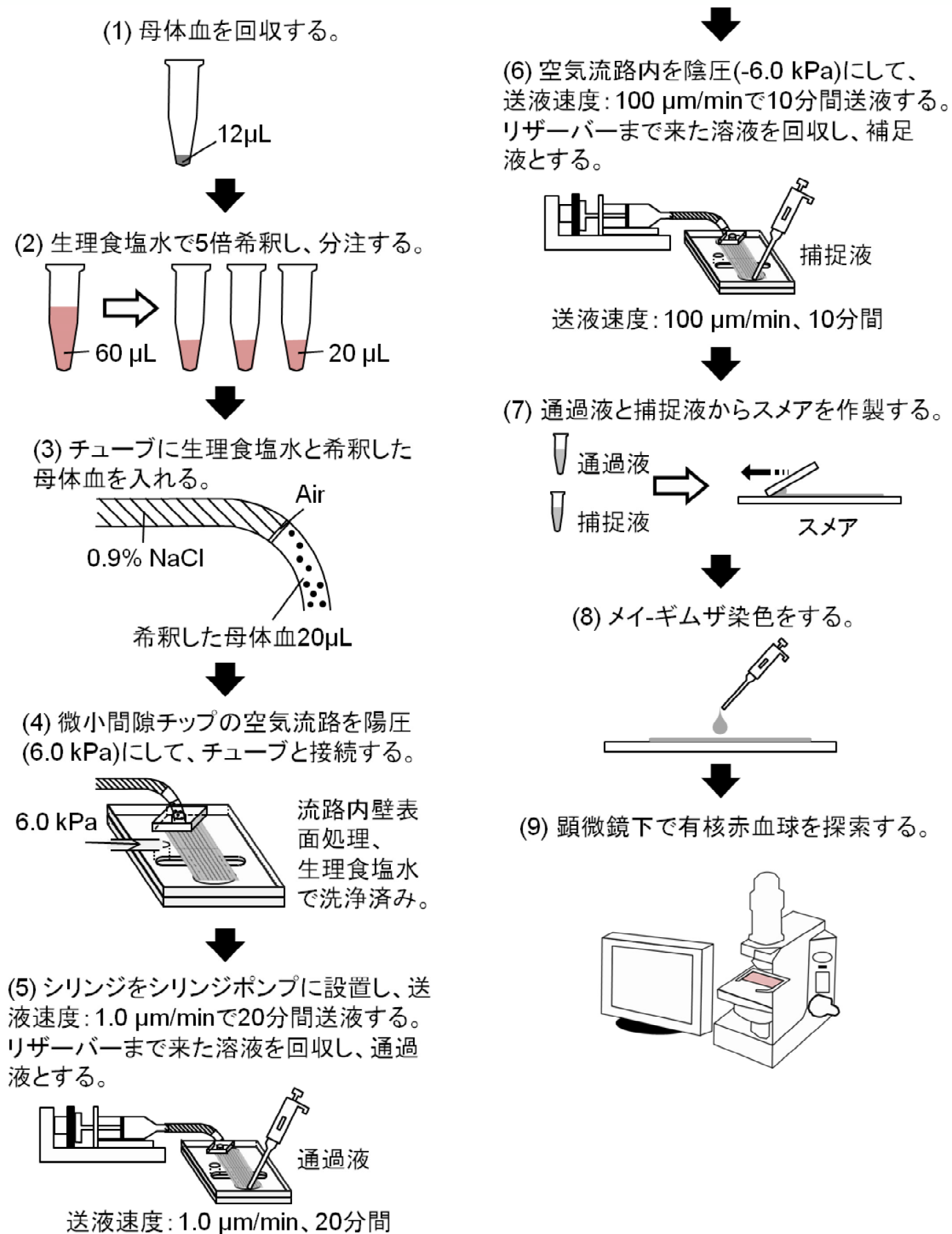


Fig. 40 NRBC separation protocol by micro-gap-chip.

### 2-3-8 浸透圧変化による血球の変形とチップ処理

微小間隙チップによる有核赤血球の捕捉率をより向上させるために、食塩水の濃度による各血球の変形を見る。また、変形させた血球をチップへ送液し、有核赤血球の捕捉率を調べる。

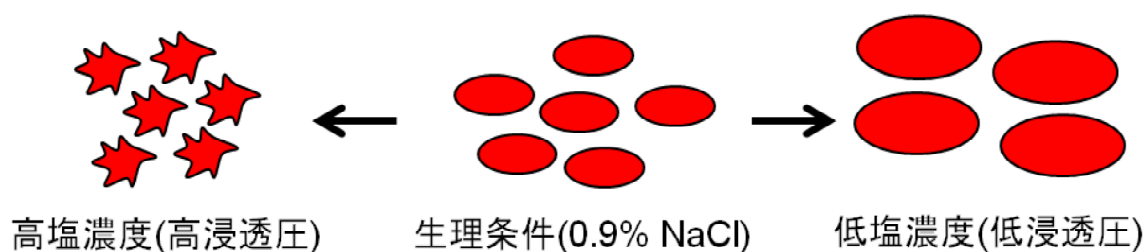


Fig.41 Cell deformation by the NaCl concentration.

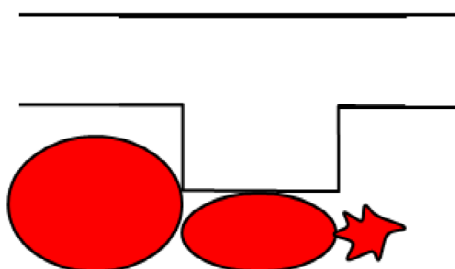


Fig.42 Cells passing through at micro-gap by cell deformation.

### 3-4 結果および考察

#### 3-4-1 血球付着の効果と影響

表面処理なしの場合、流路の角と角近くの流路部分に血球が付着していた(Fig.43 上)。付着していた細胞は、顕微鏡下の映像から赤色が見られたため赤血球だと考えられる。BMCE-250 を用いて表面処理を行い、送液した時、流路の角の部分に赤血球が付着していた(Fig.43 下)。しかし、顕微鏡観察より、表面処理なし時と比較すると、付着した細胞は少なかった。表面処理による血球の付着抑制は、効果があると考えられる。BMCE-510 を用いて表面処理を行い、送液した場合、赤血球が付着していなかった(Fig. 44 上)。BM シリーズは、ポリエチレングリコール鎖を流路内壁にコートしている。BMCE-250 と比較した時、BMCE-510 は、BMCE-250 よりもポリマー鎖が長い。壁面に来た血球をより流れやすくしたと考えられる。また、血球の付着から、付着抑制の効果は、ポリマー鎖の長さに比例していると考えられる。Lipidure-PMB を用いて表面処理を行い、送液した時、赤血球が付着していなかった(Fig.44 下)。Lipidure-PMB は、細胞の脂質二重膜の特性を模して作製された溶液であるため、流路内壁部を血球の外側の様にしてしていると考えられ、血球が付着しなかったと考えられる。血球付着抑制剤による流路壁面の表面処理を行うことで、赤血球の付着を抑えることが判明した。有核赤血球の吸着を抑えることができると期待できる。また、Lipidure-PMB は、溶液の粘性が高いため微小間隙流路へ送液することができなかった。このため、微小間隙チップの表面処理は、BMCE-510 が適当であることが分かった。

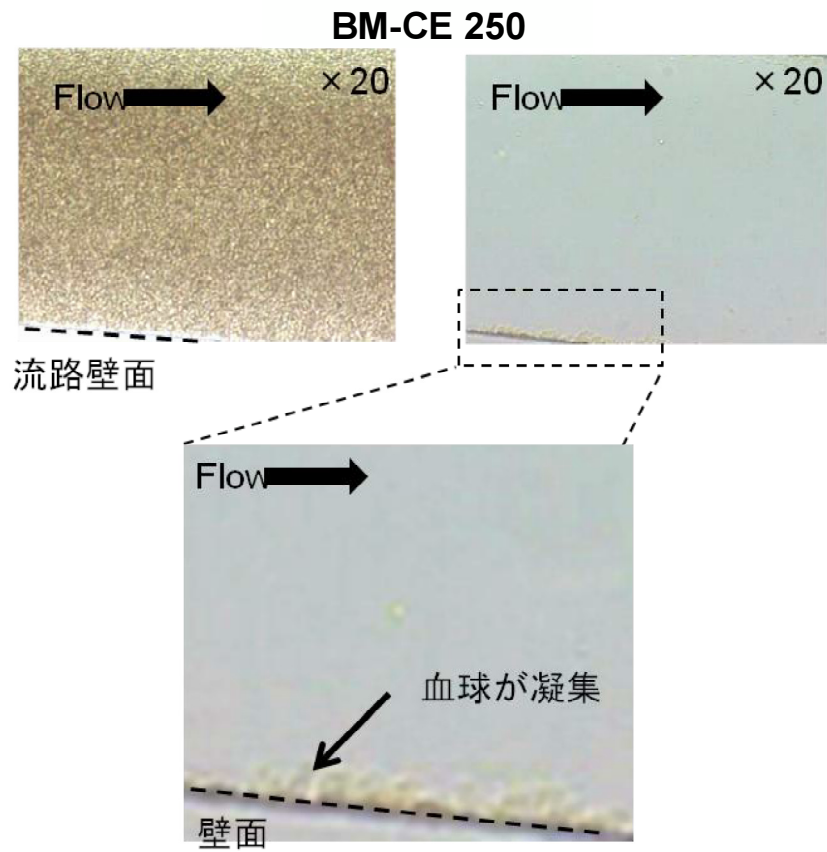
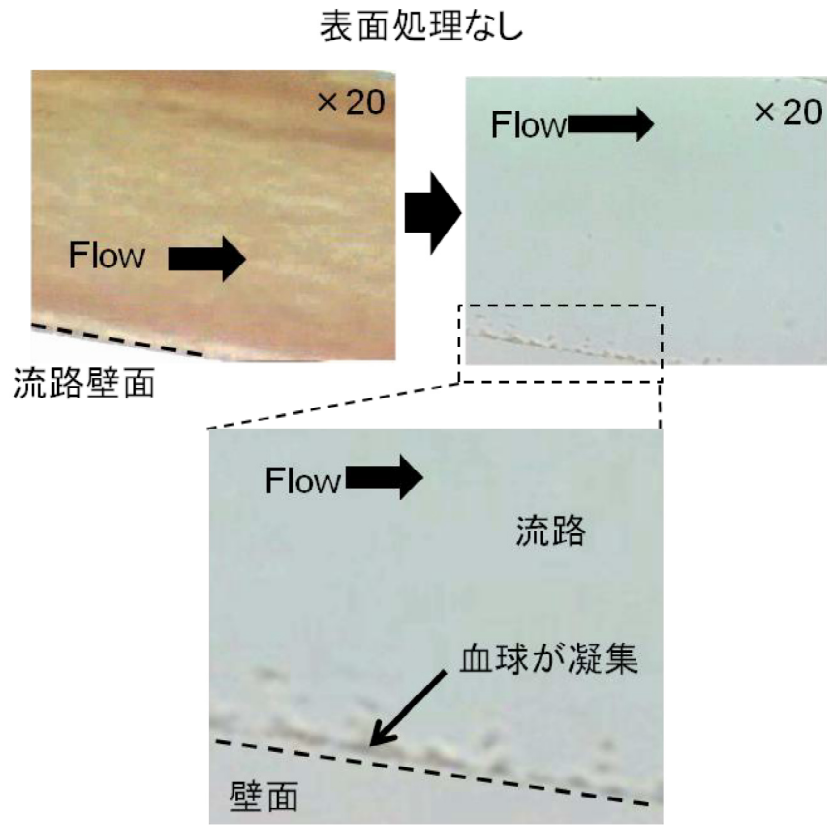


Fig.43 Non specific adsorption of red blood cells. non treatment (upside) and BM-CE250 treatment (under side).

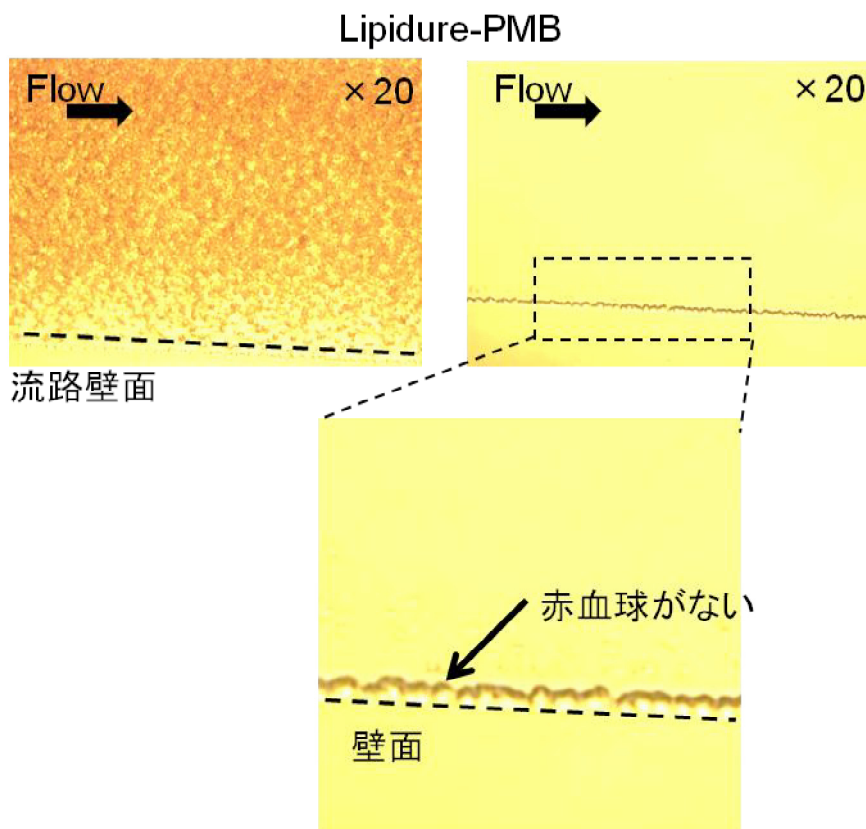
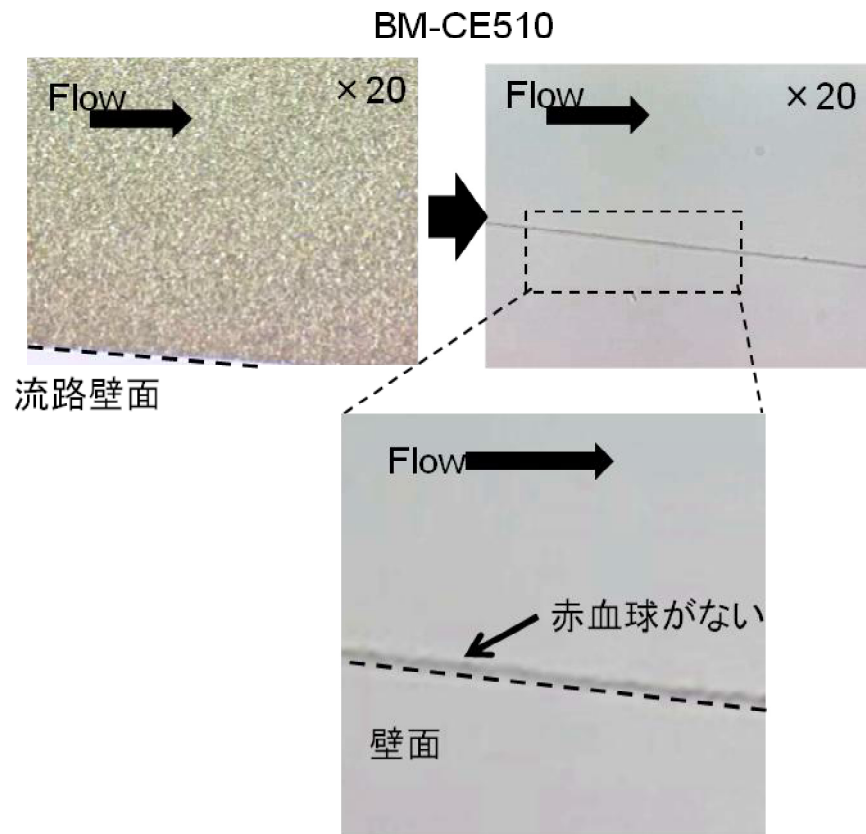


Fig.44 Non specific adsorption of red blood cells. BM-CE510 treatment (upside) and Lipidure-PMB treatment (under side).

### 3-4-2 ダイアフラム機構の動作時における血球回収の期待効果

作製したダイアフラム機構の断面を SEM にて確認した(Fig.45)。中間膜が動作することで、間隙流路部分が十二分に拡張されていた。微小間隙流路部で捕捉された全ての細胞の回収に期待できる。

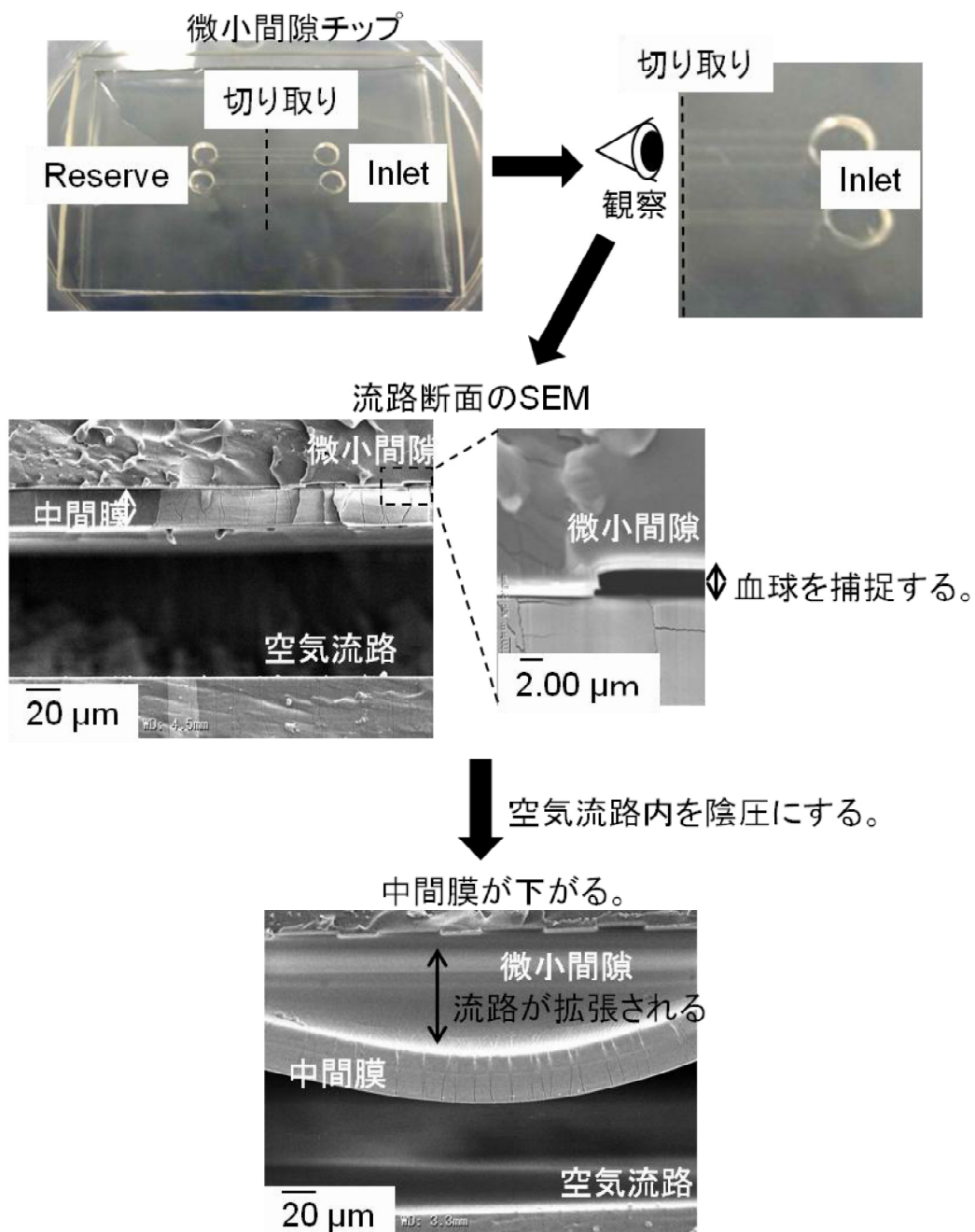


Fig.45 SEM image of diagram structure and performance.

### 3-4-3 ダイアフラム機構動作時における微小間隙チップへの影響

微小間隙流路部が拡張されないように中間膜を維持するため、空気流路を加圧した(Fig.46 上)。流路内の圧力が 7 kPa の時、空気が中間膜を透過し、流路内部に気泡が発生した(Fig.46 左)。PDMS 素材は、空気透過性があるため、空気流路の加圧時に空気が中間膜を透過し、流路内部の溶液中に混入したと考えられる。流路内の圧力が 6 kPa の時は、流路内部で気泡が発生しなかった(Fig. 46 右)。

作製したダイアフラム機構部分の空気流路に加圧し、中間膜を動作させた(Fig. 47)。空気流路の高さを 40  $\mu\text{m}$  とし、中間膜の厚さ 20  $\mu\text{m}$ 、40  $\mu\text{m}$ 、60  $\mu\text{m}$ 、80  $\mu\text{m}$  をそれぞれ作製した。中間膜の厚さが 20  $\mu\text{m}$  の時、膜の厚さが薄かったため、微小間隙流路に接着し、陰圧し中間膜を下げた時に膜が破れてしまった(Fig. 47 左)。中間膜の厚さ 40  $\mu\text{m}$  の時は、接着や破れもなく正常に膜が動作した(Fig. 47 右)。中間膜の厚さ 60  $\mu\text{m}$  と 80  $\mu\text{m}$  の時は、陰圧時に膜が下がらず、微小間隙流路を拡張できなかった。

微小間隙部での血球の捕捉と回収のためのダイアフラム機構の操作条件は、中間膜の厚さが 40  $\mu\text{m}$  の時が適当であり、中間膜を維持するための空気流路の内圧は 6 kPa 以下が適当であることが分かった。



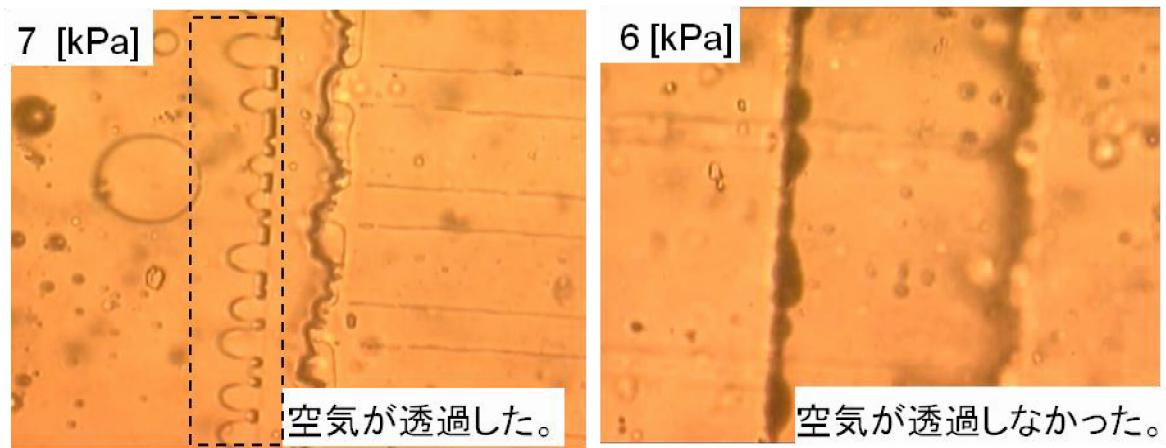
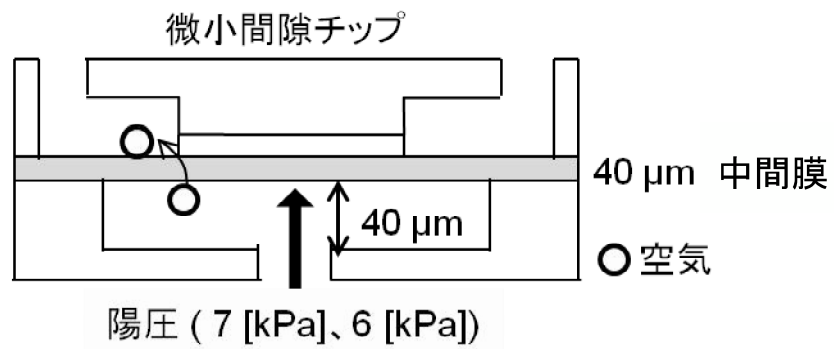
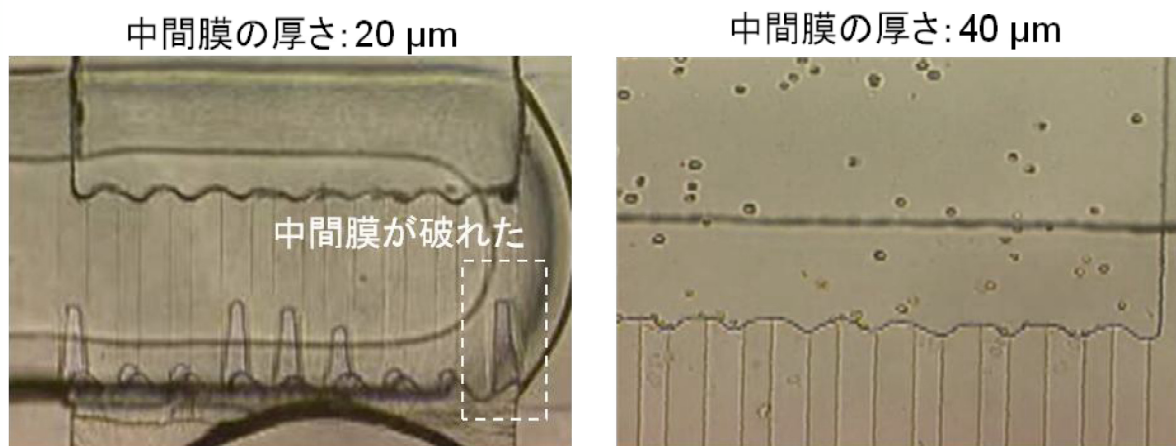


Fig.46 Air pass through of membrane



.Fig.47 Membrane breaking at the processing of diaphragm.



#### 3-4-4 密度勾配遠心分離による有核赤血球の分離と白血球および赤血球の除去率の予測検討

エッペンチューブ内での密度勾配の作製はシリンジを用いて行った。密度勾配の作製を、マイクロピペットを用いて実施したが、シリンジを使った方が Percoll 密度溶液の送液速度の調整を容易に行えたため、密度勾配の作製には、シリンジが適していると分かった。密度勾配遠心分離において、1.085 g/mL、1.095g/mL の間で有核赤血球のバンドが形成されていた (Fig.48)。このバンド内は、赤血球と白血球が多分に含まれている。また、白血球の分離帯にも関わらず、赤血球が集まっていたのは、血球内部に水が入り込み、密度が上昇したためと考えられる。回収した溶液の量は、12 $\mu$ L だった。また、有核赤血球以外の赤血球と白血球の余剰細胞の分離として、赤血球の大部分を取り除くことに成功した。回収したバンド層内の血球数の比率として、染色塗抹標本の観察から赤血球と白血球がおおよそ 1:1 の割合で含まれていると考えられる。

このことから、赤血球数を  $10^9$  個から  $10^6$  個まで取り除いたことから、1000 倍濃縮することに成功したと考えられる。また、総液量を 12 $\mu$ L まで濃縮することができたため、マイクロ流体チップを用いた血球の分離を行い易くなったと考えられる。

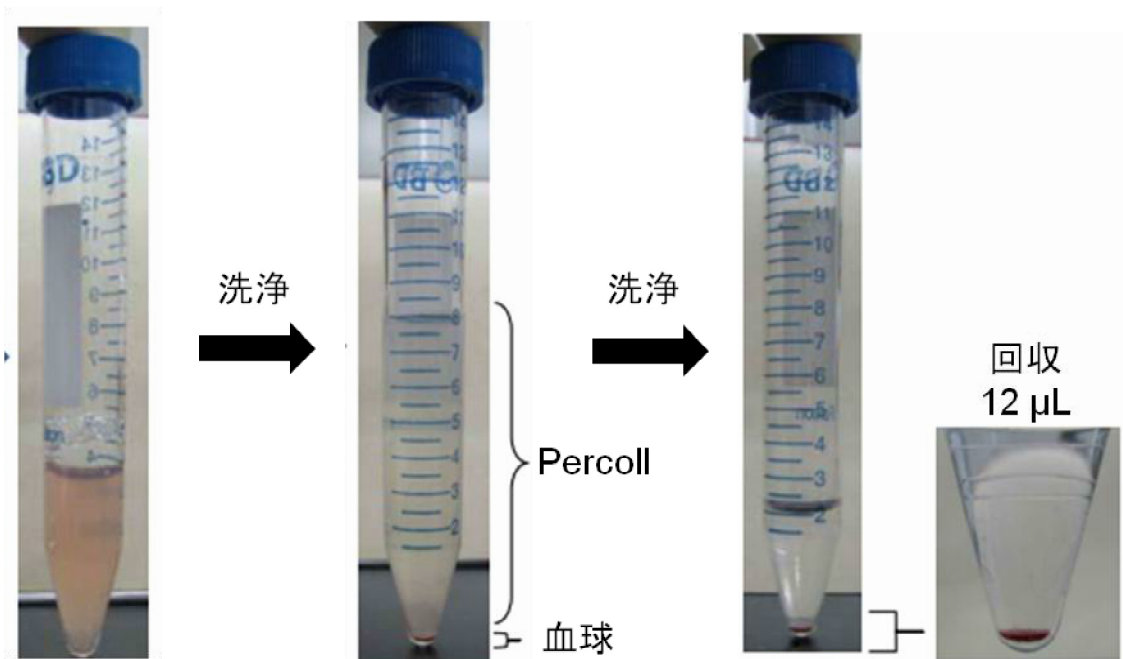
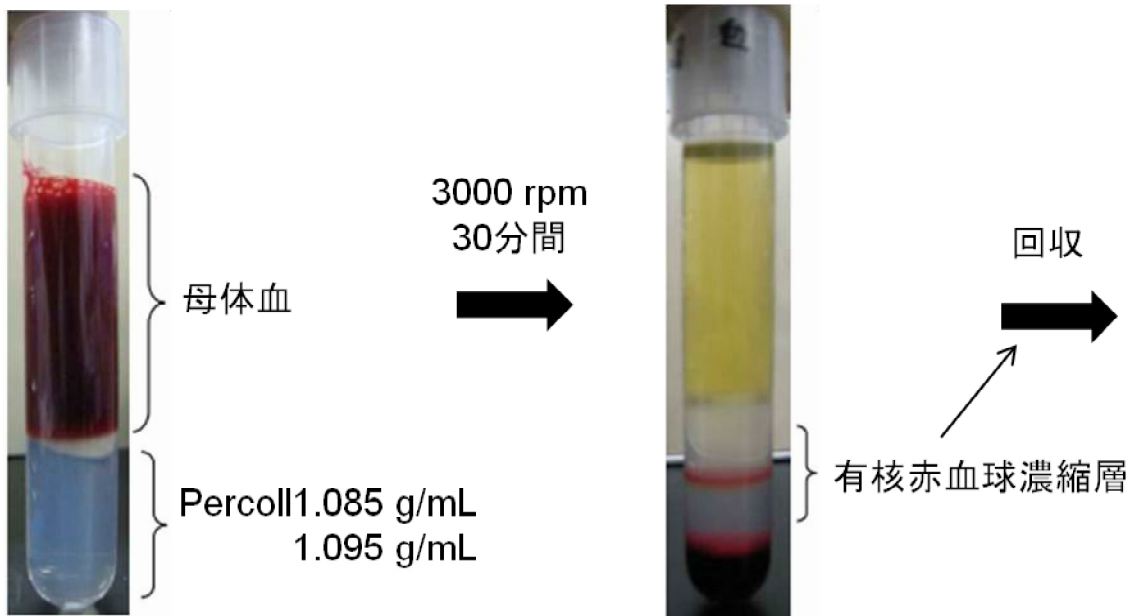


Fig.48 NRBC pre-serapration with density gradient centrifugations.

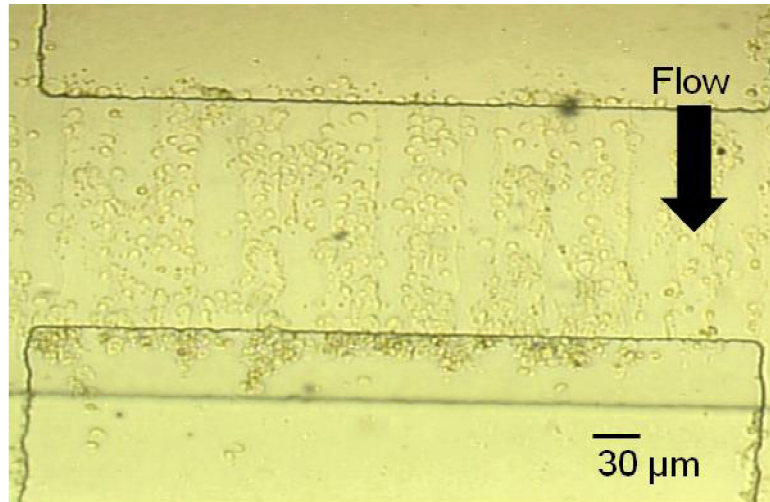
### 3-4-5 微小間隙チップによる有核赤血球の捕捉・回収率と白血球および赤血球の除去率の検討

密度勾配遠心分離処理後のサンプルを各微小間隙チップに送液した。空気流路内部は、常に 6 kPa で維持されるようにして行った。微小間隙流路で、血球を捕捉することに成功した(Fig.49 上)。加えて、ダイヤフラム機構を動作させることで、捕捉された細胞をすべて回収することができた(Fig.49 下)。捕捉された血球は、微小間隙流路の入口と内部の 2 か所で見られた。第 2 章で微小間隙の高さが 1.4 $\mu\text{m}$  の時に見られた結果と似ている。Fig.49 の微小間隙部で捕捉された血球の写真から種類の判別は難しいが、血球の色が赤かったため、赤血球が捕捉されたと考えられる。また、流路内部に有核赤血球や白血球が赤血球に巻き込まれて捕捉されていることも考えられる。密度勾配遠心分離後の溶液と微小間隙チップで捕捉・回収した溶液から作製した染色標本を Fig.50 a,b に示した。微小間隙チップ処理を行ったことで、血球数を減らすことに成功した。有核赤血球の捕捉率は、微小間隙流路で捕捉した有核赤血球(Fig.50 b)の数と微小間隙流路を通過した有核赤血球の数から算出した(Fig.51 上)。母体血中の白血球数と赤血球数、微小間隙流路を通過した白血球数と赤血球数の計測は FACS を用いて行い(Fig.51)、除去率を算出した。白血球と赤血球の除去率は、98%、93%だった。白血球は、赤血球よりも大きいため有核赤血球と共に微小間隙部分で捕捉されると考えていたが、1.0 $\mu\text{m}$  の間隙を通過していた。染色された白血球(Fig.50 a)を観察すると核は、球状ではなく、直線状の物が折りたたまれていることが分かる。微小間隙を通過する時、核の形が変形して通過したと考えられる。

微小間隙流路の高さが、1.0  $\mu\text{m}$  の時、有核赤血球の回収率は、92%だった。また、微小間隙流路の高さが、1.5  $\mu\text{m}$  および 1.9  $\mu\text{m}$  の時、有核赤血球のそれぞれの回収率は、75%、25%だった。

第2章において、間隙流路の高さが 1.4 $\mu\text{m}$  以下の時、ヒト有核赤血球の捕捉・回収率が高くなると予測できる結果が得られた。本章の実験において、ヒト有核赤血球の捕捉・回収率が高い結果を得られたのは、間隙流路の高さが、1.0  $\mu\text{m}$  の時と 1.5  $\mu\text{m}$  の時であった。ニワトリ赤血球から予測した通り有核赤血球の回収率は高い値を得られた。また、本章での母体血の量は 7mL で実施した。診断には、最大量で 14mL を用いる。この量の判断は、妊婦の妊娠週数にて決定するが、ヒト有核赤血球の母体側への移行数の正確な値は、明らかにされていない。しかし、FDD-MB では、密度勾配遠心分離により 1mL 当たり 1~2 細胞回収することができたと報告しているため、母体血量の範囲として 7~14mL を用いる。回収できる有核赤血球の数は、おおよそ 7~14 個と推定できる。出生前診断に必要な有核赤血球の数は、10 個以上必要とされる。微小間隙チップによる最も良いヒト有核赤血球の回収率は、92%だったため、最低限必要な母体血の量は 11mL 以上であることが考えられる。健康診断時の採血量は 10mL 前後が多いため、母体血 11mL を用いた診断は可能だと考えられる。このため、出生前診断に微小間隙チップは適応できると考えられる。

血球の補足

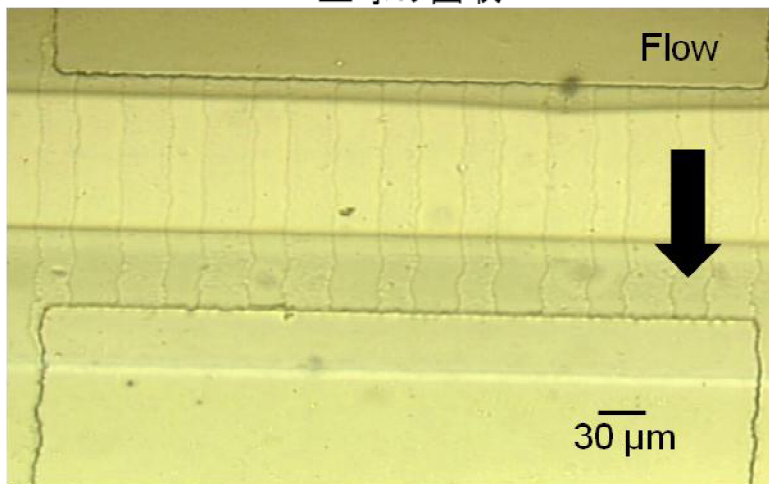


間隙の高さ : 1.0 μm 、送液速度 : 1.0 μm/min



ダイアフラムを動作させた。

血球の回収



間隙高さ : 1.0 μm 、送液速度 : 100 μm/min

Fig.49 Trapped cells at micro-gap (upside) and correcting (under side).

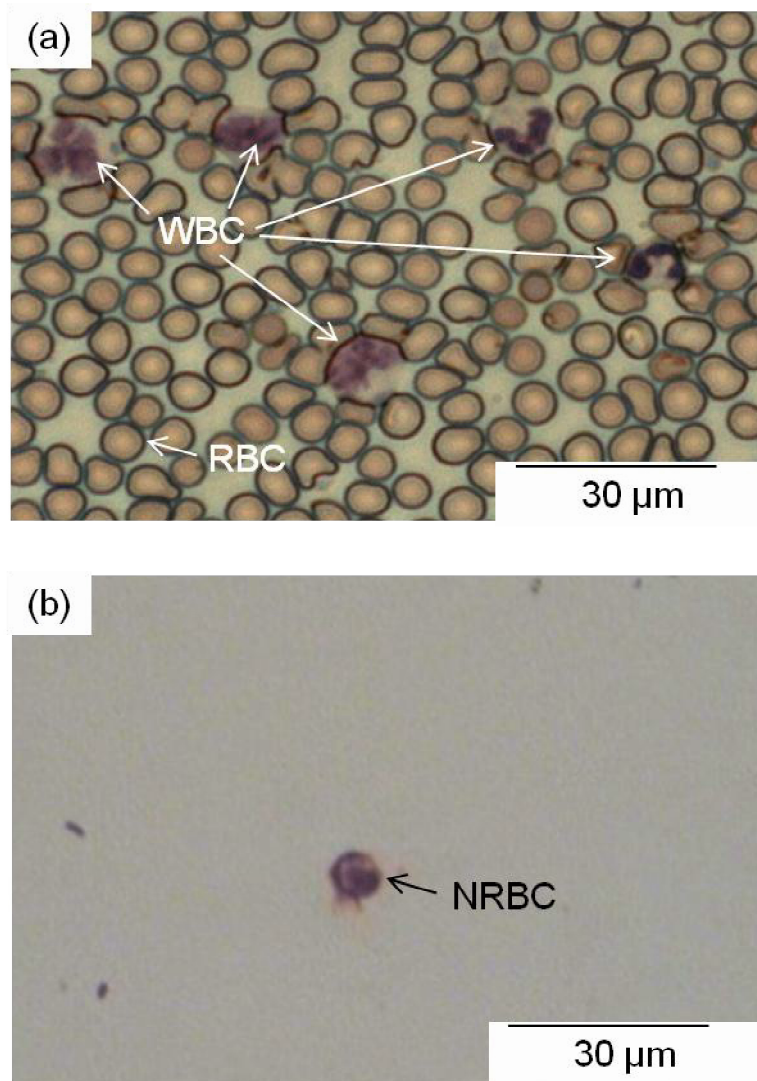


Fig.50 May-gimsa stained cells image. (a) After density-gradient centrifugation, (b) after chip collection.

$$\text{NRBC回収率(\%)} = \frac{N_{\text{Rc}}}{N_{\text{Rc}} + N_{\text{Tr}}} \times 100$$

$N_{\text{Rc}}$ :回収したNRBC数、 $N_{\text{Tr}}$ :通過したNRBC数

微小間隙高さ $\mu\text{m}$	NRBC		NRBC回収率 %	評価
	$N_{\text{Rc}} / (N_{\text{Rc}} + N_{\text{Tr}})$			
1.0	13 / 14		93	◎
1.5	6 / 8		75	○
1.9	2 / 8		25	×

$W_{\text{Th}} / M$ の白血球数	$R_{\text{Th}} / M$ 赤血球数	白血球除去率/%	赤血球除去率/%
$1.64 \times 10^7$ / $1.66 \times 10^7$	$3.40 \times 10^9$ / $3.63 \times 10^9$	98.7	93.6

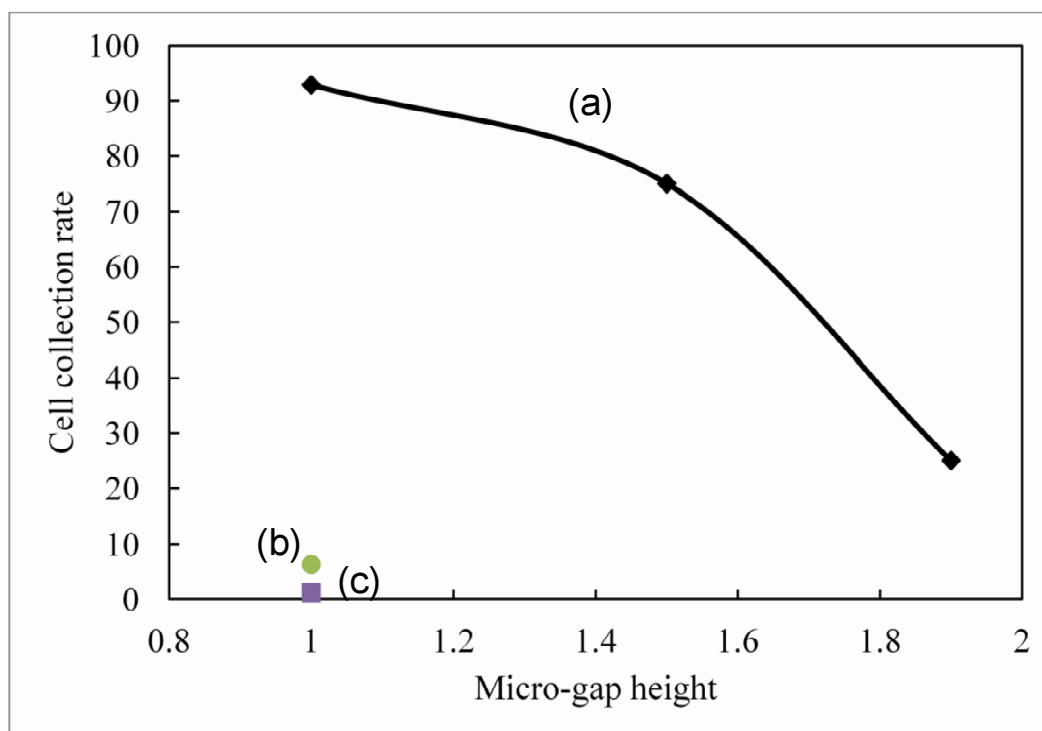


Fig.51 Cell collection rate(a) and RBC(b), WBC(c).

### 3-4-6 微小間隙チップがもたらす金沢医科大学 FDD-MB センターの出生前診断法への影響と期待効果の検討

本論文の目的は、NRBC 標本画像の自動処理装置に要する時間の短縮化を行うため、ヒト有核赤血球の高い捕捉・回収率を実現しつつ、他の血球を分離する方法の開発である。作製した微小間隙チップを用いる事で 93%の有核赤血球の捕捉・回収と、他の血球数を減少させ、塗沫標本の枚数を4枚から0.2枚に減らすことに成功した。NRBCの自動画像処理に要する時間を20時間から1時間の短縮に期待できる(Table.14)。検査が出来る実施数が1日あたり1検体から1日あたり20検体まで増えることが示唆された。

Table.14 Micro-gap-chip efficiency in non-invasiveness diagnosis.

	チップ不使用			チップ使用		
	WBC 個	RBC 個	NRBC 個	WBC 個	RBC 個	NRBC 個
母体血:7mL	$5.3 \times 10^7$	$3.3 \times 10^{10}$	7~14	$5.3 \times 10^7$	$3.3 \times 10^{10}$	7~14
Perdoll: 12~30 $\mu$ L	$5.3 \times 10^7$	$5.3 \times 10^7$	7~14	$5.3 \times 10^7$	$5.3 \times 10^7$	7~14
チップ処理後	-	-	-	$1.1 \times 10^5$	$3.9 \times 10^6$	6~12
標本作製枚数	4			0.2		
画像処理時間 / h	20			1		
スループット	1 検査 / 1 日			20 検査 / 1 日		



### 3-4-7 浸透圧変化による血球の変形とチップ処理

生理食塩水と同じ食塩濃度 9mg/mL(Fig.52 a)の時の血球の形と大きさを基準として検討する。また、生理的条件下で大きく変形している血球が見られた。白血球であると考えられる。生理食塩水より 2 倍の食塩濃度 18mg/mL(Fig.52 b)の時は、赤血球の膜に棘が見られた。血球の大きさは、生理的条件下時と大きく変化していないことが分かった。生理食塩水と4倍の食塩濃度 36mg/mL(Fig.52 c)の時は、赤血球の大きさが基準よりも小さくなった。また、形状は棘がより現れた。生理食塩水より 5 倍の食塩濃度 45mg/mL(Fig.52 d, Fig.53)。形状は、球状や円筒形状など大きな変化が見られた。

ヒト有核赤血球は食塩濃度 45mg/mL の時でも大きな変形が見られなかった。また、赤血球や白血球の大きさや形は大きく変形していた。これらの特徴を利用して、微小間隙チップでの有核赤血球の捕捉率を向上させるため、血液を食塩濃度 45mg/mL の条件下に置き、微小間隙高さ 1.0 $\mu$ m のチップに送液した。微小間隙の入り口で多くの血球が捕捉され、血球塊が形成された(Fig.54)。血球の形状をあらかじめ変化させ、微小間隙チップへ送液し、ヒト有核赤血球の分離・回収には適応できないことが分かった。しかし、食塩水の濃度によって、ヒト有核赤血球と無核赤血球、白血球の判別が容易になることが分かった。

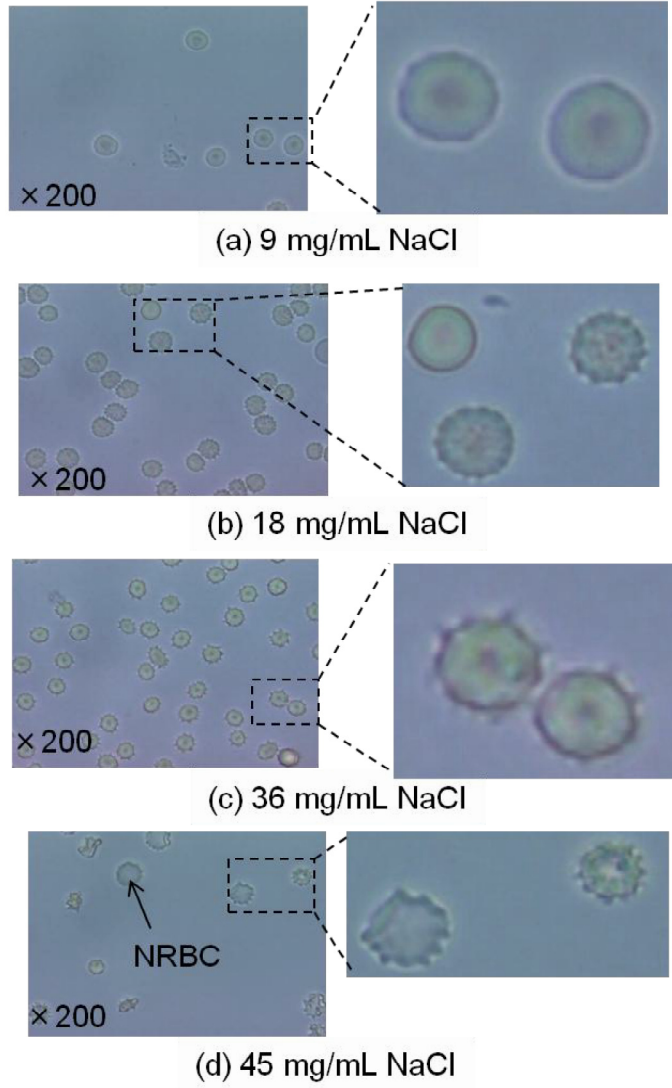


Fig.52 Cell deformation with NaCl concentration.

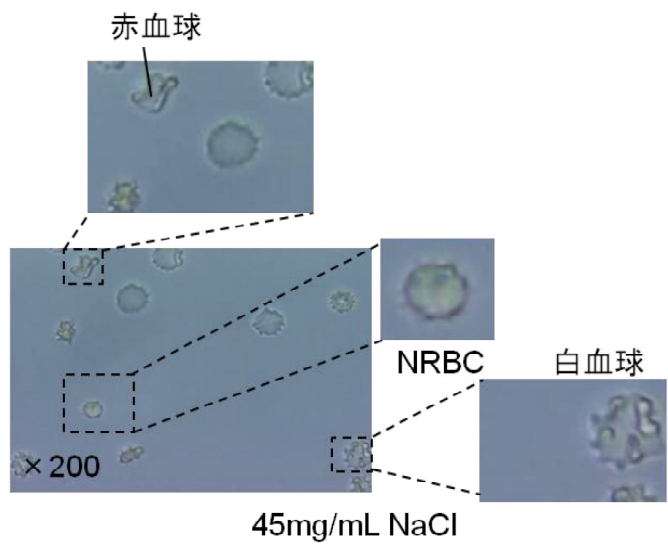


Fig.53 Cell deformation with NaCl 45 mg/mL.

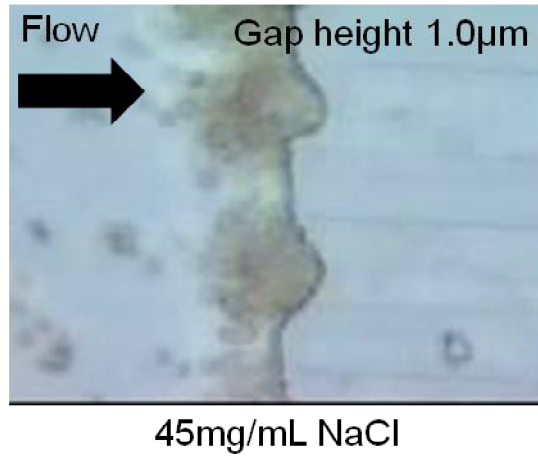


Fig.54 Cell solution sending with micro-gap chip.

### 3-5 結論

マイクロ流体チップの流路内壁部分に付着する血球の抑制として、表面処理を実施した。最も効果を期待できるものとして、BMCE-510 を上げられた。

ダイヤフラム機構を動作させることで、微小間隙流路が十分に拡張され、捕捉された血球の回収ができることが分かった。

ヒト有核赤血球の捕捉は、微小間隙チップの高さが  $1.9\ \mu\text{m}$  以下の時に捕捉することができた。この条件は、ニワトリ赤血球の条件と近似していたため、血球の大きさのみならず、変形性も似ている可能性を考えられた。

ヒト有核赤血球の捕捉・回収率が 90%と最も高い値を示した、微小間隙の高さは、 $1.0\ \mu\text{m}$  の時であることが分かった。また、微小間隙高さ  $1.0\ \mu\text{m}$  における白血球と赤血球の除去率は、98%、93%であることが分かった。

作製した微小間隙チップによって染色標本の枚数を 4 から 0.2 まで減らすことに成功したと同時に自動画像処理に要する時間も減少すると考えられた。期待される効果として、検査が出来る実施数が 1 日あたり 1 検体の検査から 1 日あたり 20 検体まで増加できることが分かった。

しかし、このチップ処理の課題として、自動画像処理に要する時間の減少に伴い、マイクロ流体チップ処理の時間が全体の処理に含まれる割合が多くなることが挙げられた。チップ処理時間の短縮化を行いたい。

一方、高濃度食塩水に置かれたヒト有核赤血球の形状は、他の血球と比較し、大きく変形性しないことが分かった。これにより、ヒト有核赤血球判別の別の方法として考えることができる。

## 第 4 章 多連微小間隙チップによる有核赤血球分離の高速化

### 4-1 緒言

第 3 章において、微小間隙チップが有核赤血球の自動探索時間の短縮を実現し、将来、実施できる検査数を 20 倍にまで上げる効果を期待できると分かった。しかし、自動画像処理時間の短縮化に伴い、微小間隙チップの処理時間が、金沢医科大学 FDD-MB 法の全体の処理時間の割合を多く占めることが分かった。

そこで、処理時間の短縮化を行うため、微小間隙流路の数、長さ、幅を増加させたマイクロ流体チップ設計・開発を行う。また、処理時間の短縮化に伴う、臍帯血を用いた有核赤血球の捕捉・回収率と白血球・赤血球の除去率への影響を調べる。さらに、処理時間の短縮化に伴う、マイクロ流体チップ処理時間が、金沢医科大学 FDD-MB 法の全体の処理時間の割合を占めることになったのか検討する。

### 4-2 目的

本章における目的を以下に示した。

- (1) 微小間隙チップの処理時間の短縮を目指し、多連微小間隙チップの設計・開発を行う。
- (2) 処理時間の短縮に伴う、ヒト有核赤血球の捕捉・回収率への影響を調べる。
- (3) 処理時間の短縮に伴う、白血球、赤血球の除去率への影響を調べ

る。

(4) 多連微小間隙チップの処理時間が金沢医科大学 FDD-MB 法の全体の処理時間の割合を占めることになったのか検討する。

### 4-3 実験

#### 4-3-1 試薬

使用した試薬は、以下に示した。

- (1) SILICON WAFERS; 株式会社フェローテックシリコン
- (2) SU-8 2002; 化薬マイクロケム
- (3) SU-8 3035; 化薬マイクロケム
- (4) SU-8 Developer; 化薬マイクロケム
- (5) IPA (2-Propanol); 関東化学
- (6) SILPOT 184 W/C; 東レ・ダウンコーニング
- (7) CATALYST SILPOT 184; 東レ・ダウンコーニング
- (8) ヒト臍帯血液; 金沢医科大学 FDD-MB センター
- (9) Percoll<sup>TM</sup>; GE Heal Health
- (10) May-Grunwald Stain Solution; MERCK
- (11) Gimsa's solution; MERCK
- (12) BlockMaster<sup>TM</sup>CE-510; JSR corporation

#### 4-3-2 装置

使用した装置は、以下に示した。

- (1) スピンコーター1H-DX2;ミカサ株式会社
- (2) ホットプレート DATAPLATE 722A-1;イウチ
- (3) マスクアライナーDouble-view Mask Aligner PEM-800;ユニオン光学株式会社
- (4) 真空ポンプ MD 4C;株式会社アルバック
- (5) 真空脱包装置 AJ-0133-010;AS ONE
- (6) オープン DKN 301;ヤマト科学
- (7) 酸素プラズマエッチング装置 RIE-10NR;SAMCO
- (8) CCD レーザ LK-3100;KEYENCE
- (9) デジタル顕微鏡 VH-6300C;KEYENCE
- (10) 貼り合わせ装置 SMA-20GWUU;NB  
母体血およびヒト血液を送液
- (11) マイクロシリンジポンプII;株式会社エイコム
- (12) 倒立顕微鏡;IX70;OLYMPUS
- (13) 高速 CCD カメラ ADT-33C;FLOVEL

#### 4-3-3 多連微小間隙チップの設計

設計はAdobe Illustrator を用いて行った。第3章の結果から、血球の捕捉は、微小間隙流路の入口と微小間隙流路の内部の 2 か所で行われて

いた。そこで、変更する点として、微小間隙流路の数、微小間隙流路の幅、長さを上げる。

#### 4-3-4 多連微小間隙チップの作製

フォトリソグラフィ法による流路の形成を行った。作製手順は、第 3 章を同様である。また、今回の変更により作成段階で問題が生じる可能性がある。これを解決する手法も検討する。

#### 4-3-5 多連微小間隙チップによる臍帯血中のヒト有核赤血球の分離

実験手順は、第 3 章と同様であるが、異なる点として、用いた血液と希釈倍率、送液速度が挙げられる。詳細を以下に示した(Table.15, Fig.55)



Table.15. NRBCs separation protocol with multiple micro-gap-chip using a cord blood.

1	臍帯血 10 $\mu$ L を分注し、生理食塩水で 5 倍希釈し、全量を 100 $\mu$ L にした。
2	シリンジに生理食塩水を吸い上げ、チューブを接続し、チューブに生理食塩水を送液した。
3	シリンジを引き、チューブ内に空気を入れ、希釈した血液を 100 $\mu$ L 吸い入れた。
4	チップ内壁表面処理済みの微小間隙チップの空気流路内を陽圧(6.0 kPa)にした。
5	チューブと微小間隙チップを接続し、シリンジをシリンジポンプに設置した。
6	三つのチップに送液速度 11 $\mu$ L/min、22 $\mu$ L/min、33 $\mu$ L/min の条件で 6 分間、送液した。
7	6 分後、リザーバー部の溶液を回収した。この溶液を、通過液とする。
8	微小間隙流路の空気流路内を陰圧(-6.0kPa)にした。
9	生理食塩水を 100 $\mu$ L/min の条件で 10 分間、送液した。
10	リザーバー部の溶液を回収した。この溶液を、回収液とする。
11	通過液と回収液から、スメアを作製し、メイギュルンワルド染色液に 5 分間浸けた。
12	余剰染色液を生理食塩水で洗い流し、ギムザ染色液に 20 分間浸けた。
13	余剰染色液を生理食塩水で洗い流し、MillQ 水で仕上げ洗浄後、自然乾燥させた。
14	標本上の有核赤血球の数を顕微鏡下で観察した。

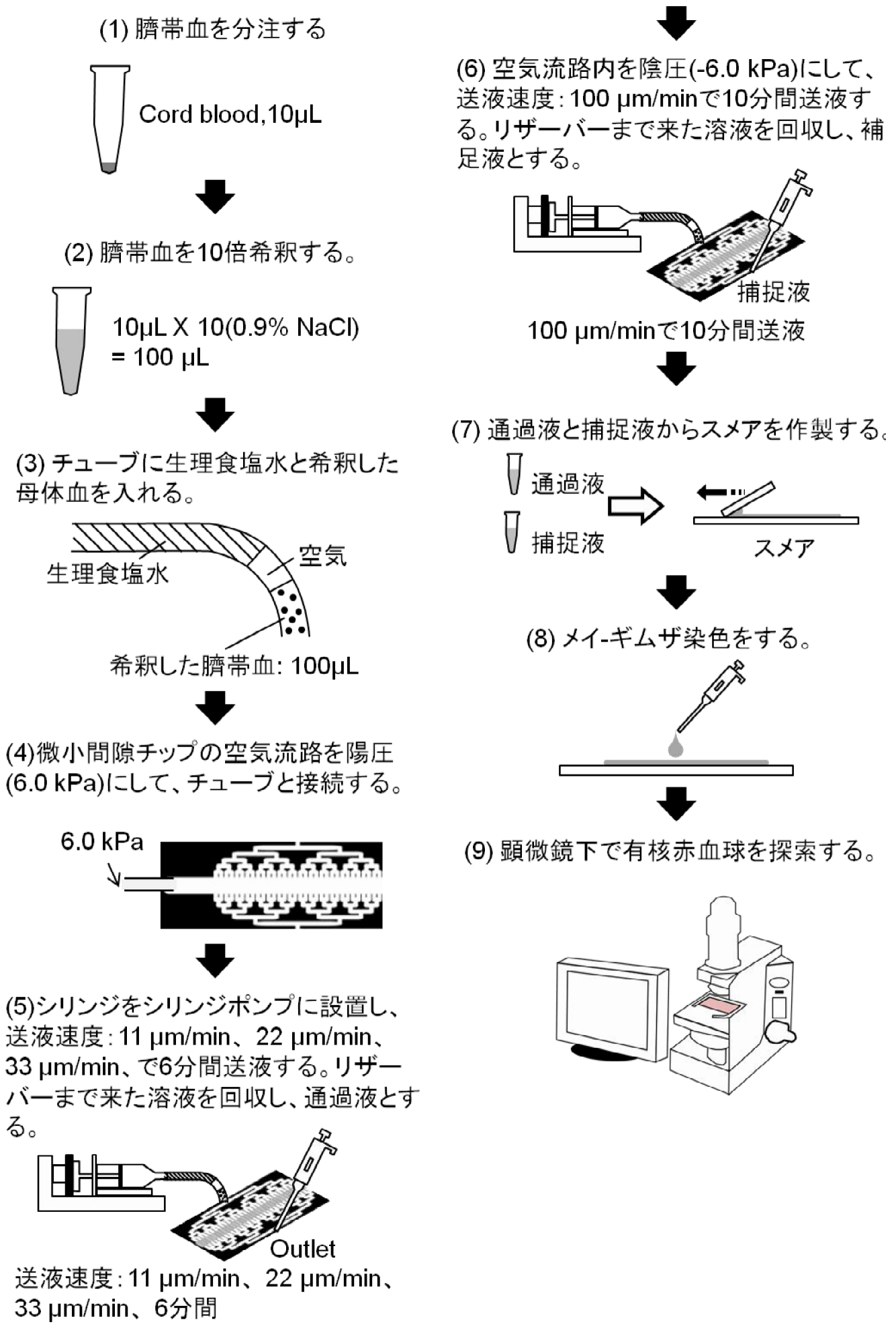


Fig.55 NRBCs separation protocol with multiple micro-gap-chip using a cord blood.

## 4-4 結果および考察

### 4-4-1 多連微小間隙チップの設計と開発

設計したマスクパターンを Fig.56 に示した。血球の捕捉を間隙流路の入口と内部で成功していたため、間隙流路の数と長さ、幅を変更した (Table.16)。また、分岐流路を新たに追加することで、送液速度の向上に伴う処理時間の短縮化を試みた。分岐数は、6 か所作製した。チップ作製中、PDMS を引きはがす際、鋳型に PDMS が残った。PDMS が十二分に硬化していなかったと考えられる。そこで、PDMS 鋳造時間を 1 時間から 2 時間に変更し、焼成温度も 75°C から 60°C に変更して検討した。また、引き剥がしの方向を流路入口から出口にした。これらにより引き剥がしを、容易にすることができた。より複雑になった流路の PDMS 鋳造は、硬化時間を長くし、引き剥がしの方向を調整することで、成功することが分かった。

Table.16 Structure of micro-gap channel

	初期	改良	倍率
数	90	448	5.0 倍
幅	30 $\mu\text{m}$	50 $\mu\text{m}$	1.7 倍
長さ	197 $\mu\text{m}$	1400 $\mu\text{m}$	7.1 倍

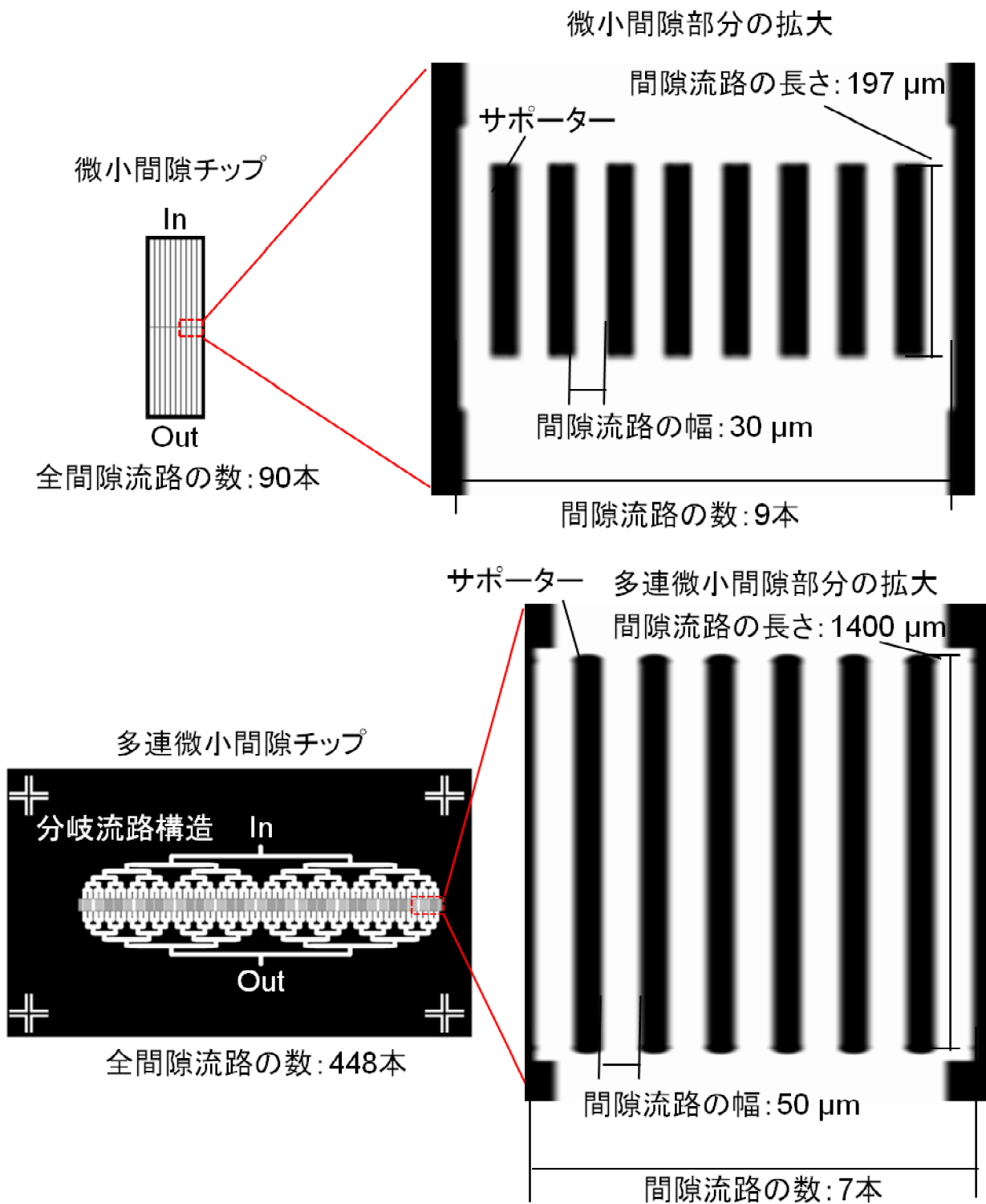


Fig.56 Structure of micro-gap chip and multiple micro-gap-chip

#### 4-4-2 多連微小間隙チップによる有核赤血球の捕捉・回収

各送液速度時における有核赤血球の回収率を Fig.57 に示した。臍帯血の染色標本画像と捕捉回収した有核赤血球の染色標本画像を Fig.58 に示した。第 3 章と同様に血球を減らすことに成功した。

送液速度が 11  $\mu\text{L}/\text{min}$  の時、有核赤血球の捕捉・回収率は、84%だった。送液速度が 22  $\mu\text{L}/\text{min}$  の時は、66%だった。送液速度が 33  $\mu\text{L}/\text{min}$  の時は、60%だった。送液速度が 11  $\mu\text{L}/\text{min}$  の時の回収率が最も高い値を示した。溶液量が有核赤血球の回収率できた血球数(Table.17)から算出した。

有核赤血球の数が 1mL 中 1~2 個であり、使用する母体血は、7~14mL である。胎児遺伝子診断に必要な血球数は、10 個以上なので、有核赤血球が 1mL に 1 個だったとすると必要になる血液量は、12mL である。第 3 章の結果と比較すると、血液量が 1mL 多くなり、回収率が 8%ほど低い値になった。しかし、処理時間を 90 分間から 16 分間と 10 倍近くまで短縮することができた。加えて、送液速度を上げる毎に回収率が減少した為、回収率の値は、処理速度を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$  より低速にすることで回収率を高めることができると考えられる。

チップの処理時間はより短ければ良いが、最低限 60 分間以下であれば課題を解決できる。第 3 章の密度勾配遠心分離後の溶液量が 12 $\mu\text{L}$  だった。溶液コントロールのために 60 $\mu\text{L}$  まで希釈したとして、多連微小間隙チップで処理したと想定する。送液速度は、1.2 $\mu\text{L}/\text{min}$  以上であれば処理時間は 60 分間以下となる。つまり、送液速度 1.2 $\mu\text{L}/\text{min}$  から 11 $\mu\text{L}/\text{min}$  の間であれば有核赤血球の回収率は 84%以上を見込め、第 3 章のチップよ

りも処理時間を 30 分間以上短縮化することができたと言える。

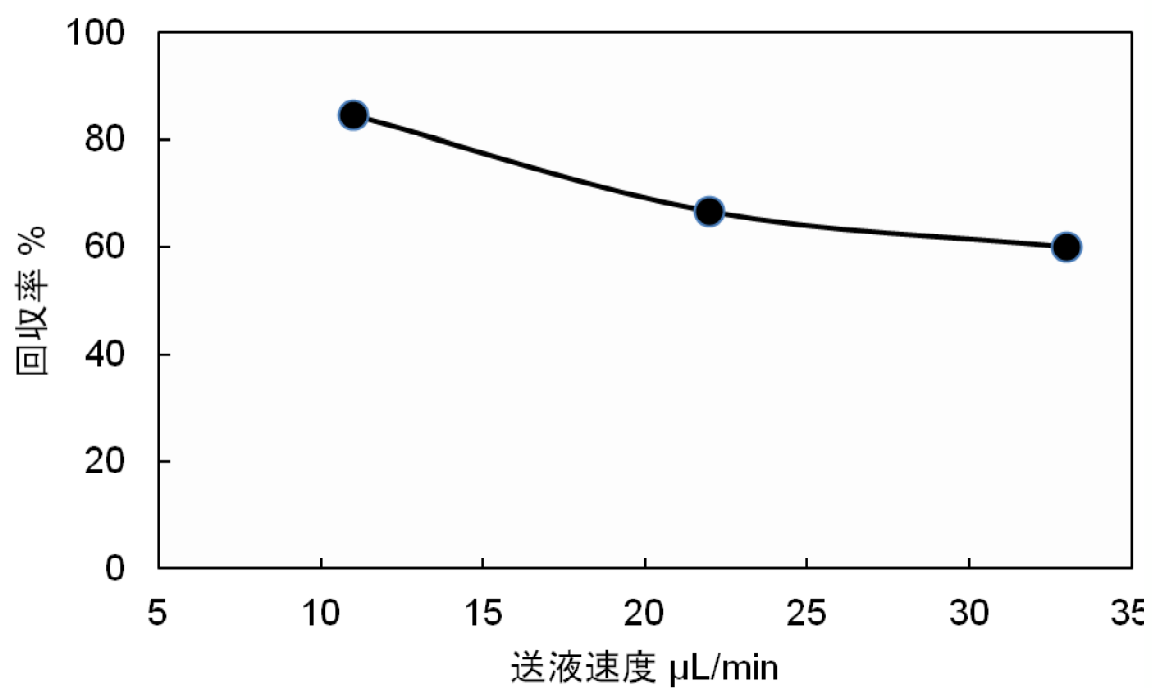


Fig.57 NRBCs collection rate with flow parameter.

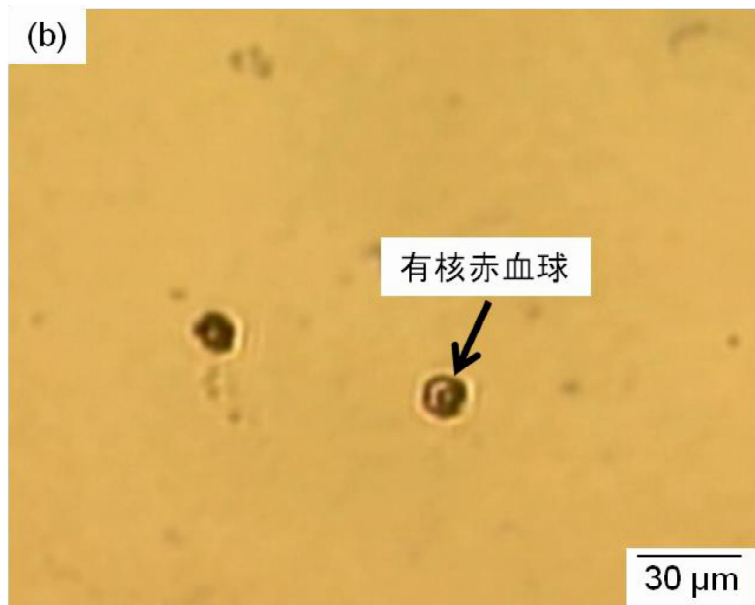
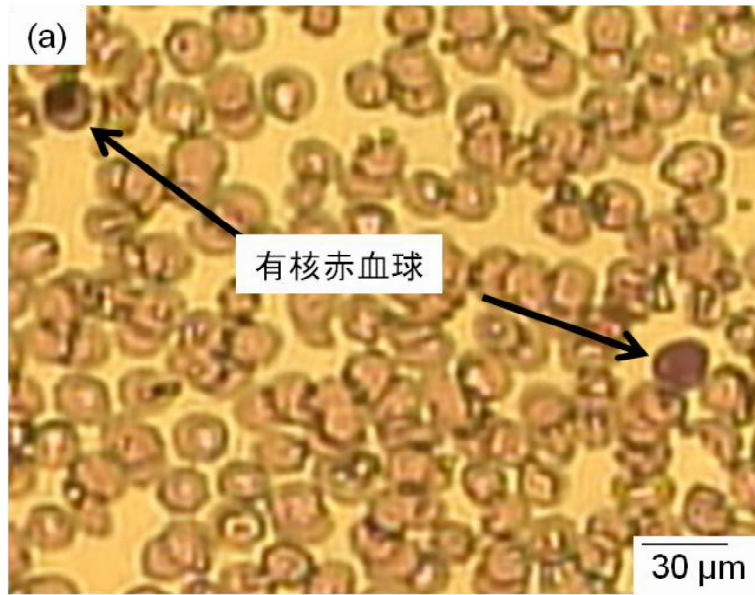


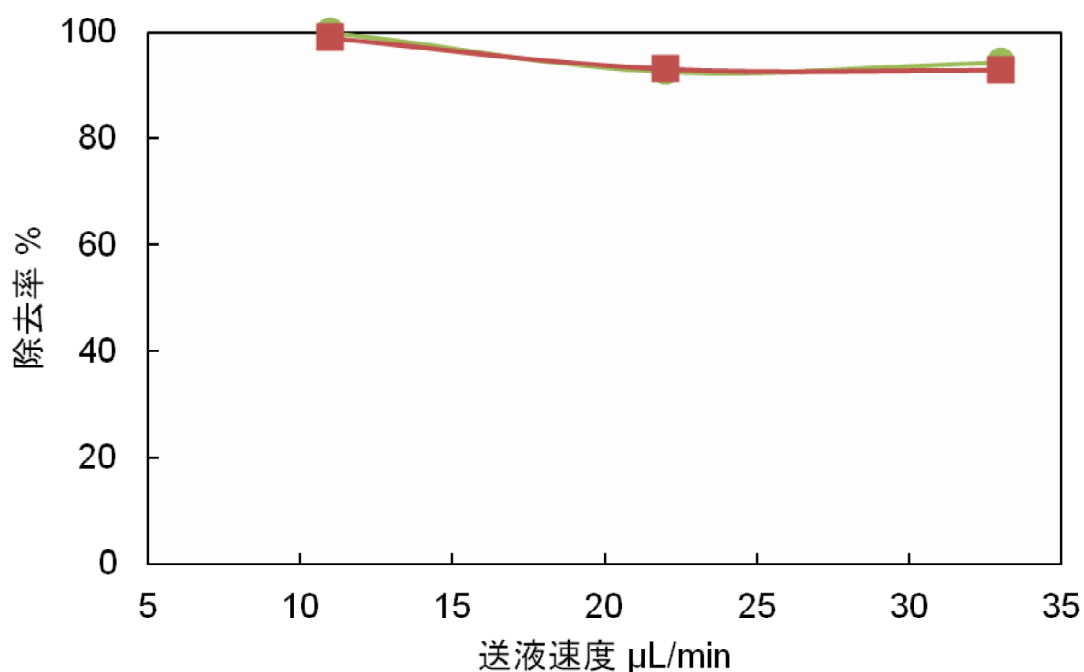
Fig.58 May-gimsa stained cells image. (a) Cord blood, (b) after chip collection.

#### 4-4-3 多連微小間隙チップによる白血球と赤血球の除去率への影響

各送速度時における赤血球および白血球の除去率を Fig.59 に示した。送液速度 11 $\mu$ L/min の時、白血球および赤血球の除去率は、98%、84% だった。送液速度 22 $\mu$ L/min の時、白血球および赤血球の除去率は、93%、99% だった。送液速度 33 $\mu$ L/min の時、白血球および赤血球の除去率は、92%、94% だった。赤血球及び白血球の除去率は、微小間隙を通過した血球数と捕捉した血球数から算出した。どの送液速度でも除去率は、80%以上と高い値を示した。第3章では、送液速度 1.0 $\mu$ L/min でも除去率は 90%以上だった。計測方法は、目視と FACS と異なるが近い値を示していたため、微小間隙を通過した時の条件が近いと考えられる。また、Table17 に示した各血球数から、壊れた血球数を見ると、赤血球と白血球は、多くが壊れていた。血球が壊れた原因は、微小間隙を通過する時と染色標本作製する時の二つを考えられる。第3章において微小間隙を通過した血球は FACS で計測することができた。つまり、微小間隙流路通過した血球の膜があり、壊れた細胞が少ないと考えることができる。しかし、多連微小間隙チップは、微小間隙流路の長さを第3章のチップよりも7倍長くしている。血球が変形しながら流れる距離が伸びたために、血球へのダメージが大きくなった可能性を考えられる。

以上の点から、大きく変形し続けた血球は、壊れやすくなり標本作製時に大部分が壊れた可能性を示唆したと考えられる。





●赤血球、■白血球

Fig.59 RBC and WBC removal rate with flow parameter.

Table 17. Number of cells in stained samples and missing cells rate.

	流速 $\mu\text{L}/\text{min}$		導入前	捕捉	通過	合計	失われた血球の割合 %
サンプル1	11	NRBC	40	33	6	39	3
		RBC	$3.9 \times 10^5$	13	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$	60
		WBC	$1.9 \times 10^3$	5	$4.3 \times 10^2$	$4.3 \times 10^2$	77
サンプル2	22	NRBC	52	6	3	9	83
		RBC	$2.7 \times 10^6$	$2.8 \times 10^4$	$3.5 \times 10^5$	$3.7 \times 10^5$	86
		WBC	$4.5 \times 10^3$	27	363	390	91
サンプル3	33	NRBC	12	6	4	10	17
		RBC	$9.7 \times 10^5$	$5.3 \times 10^4$	$8.7 \times 10^5$	$9.3 \times 10^5$	4
		WBC	$3.5 \times 10^3$	84	1090	1174	67

4-4-4 多連微小間隙チップによる処理時間の短縮化に伴う、金沢医科大学 FDD-MB 法の全体の処理時間全体を占める割合への影響。

多連微小間隙チップを用いて、分離処理の時間を 10 倍以上高速化しても、有核赤血球の捕捉率は、80%以上と高い傾向にあることが分かった。また、多連微小間隙チップによる、処理時間の短縮化に伴い、金沢医科大学 FDD-MB 法の全体の処理時間全体を占める割合は、大きく減少することが分かった(Table.18)。また、本章の目的であるチップ処理時間の短縮化を達成することができた。

Table.18 Throughput enhancement by the multiple micro-gap-chip .

	多連微小間隙チップ(4 章のチップ)			微小間隙チップ(3 章チップ)		
	WBC/cells	RBC/cells	NRBC/cells	WBC/cells	RBC/cells	NRBC/cells
臍帯血 10 $\mu$ L	4.00 $\times 10^3$	3.00 $\times 10^6$	12~52	-	-	-
Perdoll: 12~30 $\mu$ L	-	-	-	5.3 $\times 10^7$	5.3 $\times 10^7$	7~14
チップ処理後	426	1.50 $\times 10^5$	10~44	1.1 $\times 10^5$	3.9 $\times 10^6$	6~12
処理時間	16 分間			90 分間		
スループット	60 処理/1 日			12 処理/1 日		

#### 4-5 結論

微小間隙チップ内の微小間隙流路の数を7倍にすることで処理時間の短縮化を行った。送液速度を  $1\mu\text{L}/\text{min}$  から  $11\mu\text{L}/\text{min}$ 、 $22\mu\text{L}/\text{min}$ 、 $33\mu\text{L}/\text{min}$  と10倍以上にして、臍帯血中のヒト有核赤血球の捕捉・回収率を検証した。また、白血球と赤血球の除去率の検証も実施した。

送液速度  $11\mu\text{L}/\text{min}$  の時、有核赤血球の捕捉・回収率は、84%だった。また、白血球および赤血球の除去率は、98%、84%だった。送液速度  $22\mu\text{L}/\text{min}$  の時、有核赤血球の捕捉・回収率は、66%だった。また、白血球および赤血球の除去率は、93%、99%だった。送液速度  $33\mu\text{L}/\text{min}$  の時、有核赤血球の捕捉・回収率は、60%だった。また、白血球および赤血球の除去率は、92%、94%だった。多連微小間隙チップを用いて、分離処理の時間を10以上高速化しても、有核赤血球の捕捉率は、80%以上と高い傾向にあることが分かった。また、本章の目的であるチップ処理時間の短縮化は、流路を多連にすることで90分間から16分間にすることができた。この多連微小間隙チップによる、処理時間の短縮化に伴い、金沢医科大学FDD-MB法の全体の処理時間全体を占める割合は、大きく減少することが分かった。

## 第5章 多連微小間隙チップ操作の自動化

### 5-1 緒言

第2章から第4章において、微小間隙チップ処理におけるヒト有核赤血球の捕捉・回収と処理時間の短縮を試みた。チップ処理の問題点として、操作に多くの段階を有していることで、再現性の不安定さや、ユーザーの利便性の低下が挙げられる。

そこで、本章では、多連微小間隙チップ操作の自動化試み、問題点の解決を試みる。

### 5-2 目的

本章の目的は、以下に示した。

- (1) チップ処理の再現性の向上とユーザーの利便性の向上
- (2) PLC(programmable logic controller)を用いた装置の拡張性の向上
- (3) 圧力操作による送液とダイアフラム機構の制御
- (4) 多連微小間隙チップ操作の全自動化

## 5-3 実験

### 5-3-1 試薬

使用した試薬を以下に示した。

- (1) SILICON WAFERS;株式会社フェローテックシリコン
- (2) SU-8 2002;化薬マイクロケム
- (3) SU-8 3035;化薬マイクロケム
- (4) SU-8 Developer;化薬マイクロケム
- (5) IPA (2-Propanol);関東化学
- (6) SILPOT 184 W/C;東レ・ダウコーニング
- (7) CATALYST SILPOT 184;東レ・ダウコーニング
- (8) 粉末食用色素 青;不明

### 5-3-2 装置

使用した装置を以下に示した。

- (1) スピンコーター1H-DX2;ミカサ株式会社
- (2) ホットプレート DATAPLATE 722A-1;イウチ
- (3) マスクアライナーDouble-view Mask Aligner PEM-800;ユニオン光学株式会社
- (4) 真空ポンプ MD 4C;株式会社アルバック
- (5) 真空脱包装置 AJ-0133-010;AS ONE

- (6) オープン DKN 301;ヤマト科学
- (7) 酸素プラズマエッチング装置 RIE-10NR;SAMCO
- (8) CCD レーザ LK-3100;KEYENCE
- (9) デジタル顕微鏡 VH-6300C;KEYENCE
- (10) 貼り合わせ装置 SMA-20GWUU;NB
- (11) マイクロシリンジポンプ II ;株式会社エイコム
- (13) 高速 CCD カメラ ADT-33C;FLOVEL
- (14) ACON-PL/P0;IAI
- (15) ACON 制御用 24V 電源;IAI
- (16) プログラマブルコントローラーFP0 コントロールユニット;Panasonic
- (17) プログラマブルコントローラーFP0 増設ユニット E32T;Panasonic
- (18) プログラマブルコントローラーFP0 A/D 変換ユニット;Panasonic
- (19) 3ポートソレノイドバルブ V124;SMC
- (20) デジタル圧力センサ E8F2;オムロン
- (21) アクチュエーター RCP2;IAI
- (22) ジグシリンダー;KOGANEI
- (23) EPWIN GR;Panasonic

### 5-3-3 PLCと各種装置間の接続

各種装置間の接続は、回路図を作製して行った。

### 5-3-4 多連微小間隙チップ操作の自動化を行う場所の選定

チップへの送液手順からどの操作を自動化するか検討した。

#### 5-3-5 PLCプログラムの作製と各装置の制御

添付されていたソフトウェア EPWIN GR を用いて、圧力コントロールができるラダープログラムを作製した。

#### 5-3-6 全自動化のためのチップ設計と動作確認

Adobe Illustrator を用いてチップの設計を行った。

### 5-4 結果および考察

#### 5-4-1 PLCと各種装置間の回路図

作製した回路図を以下に示した(Fig.60, 61)。PLC との接続は、アクチュエーター、圧力計、ソレノイドバルブ間を行った。接続後、簡易な動作確認を行い、正常に駆動した。エラー発生時の対処として、アラームチェックも行ったが、安定的に動作した。チップ動作の検討には、制御プログラムが必要であるが、装置の安定した制御に成功した。

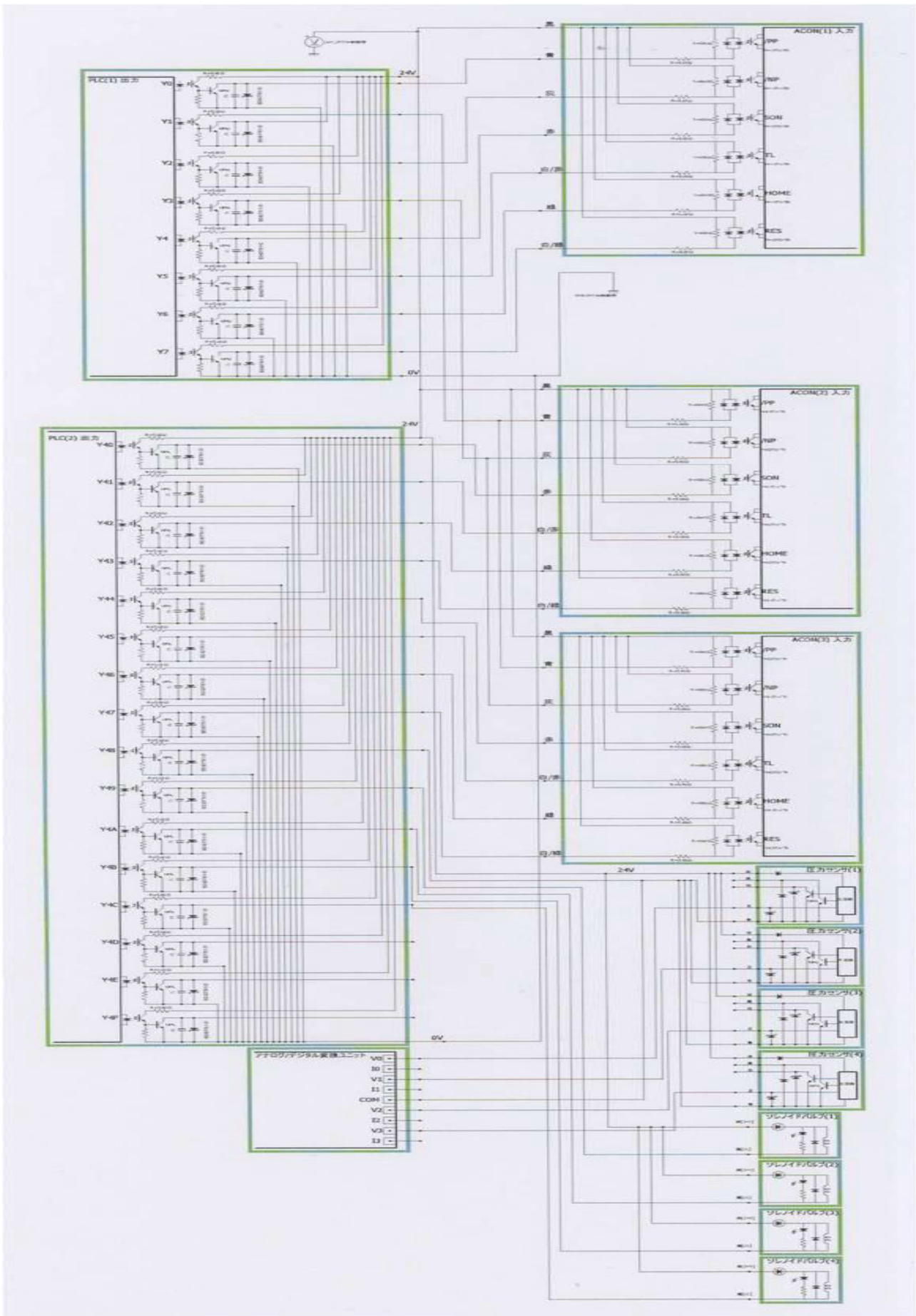


Fig.60 Electronic circuit of plc connection 1.



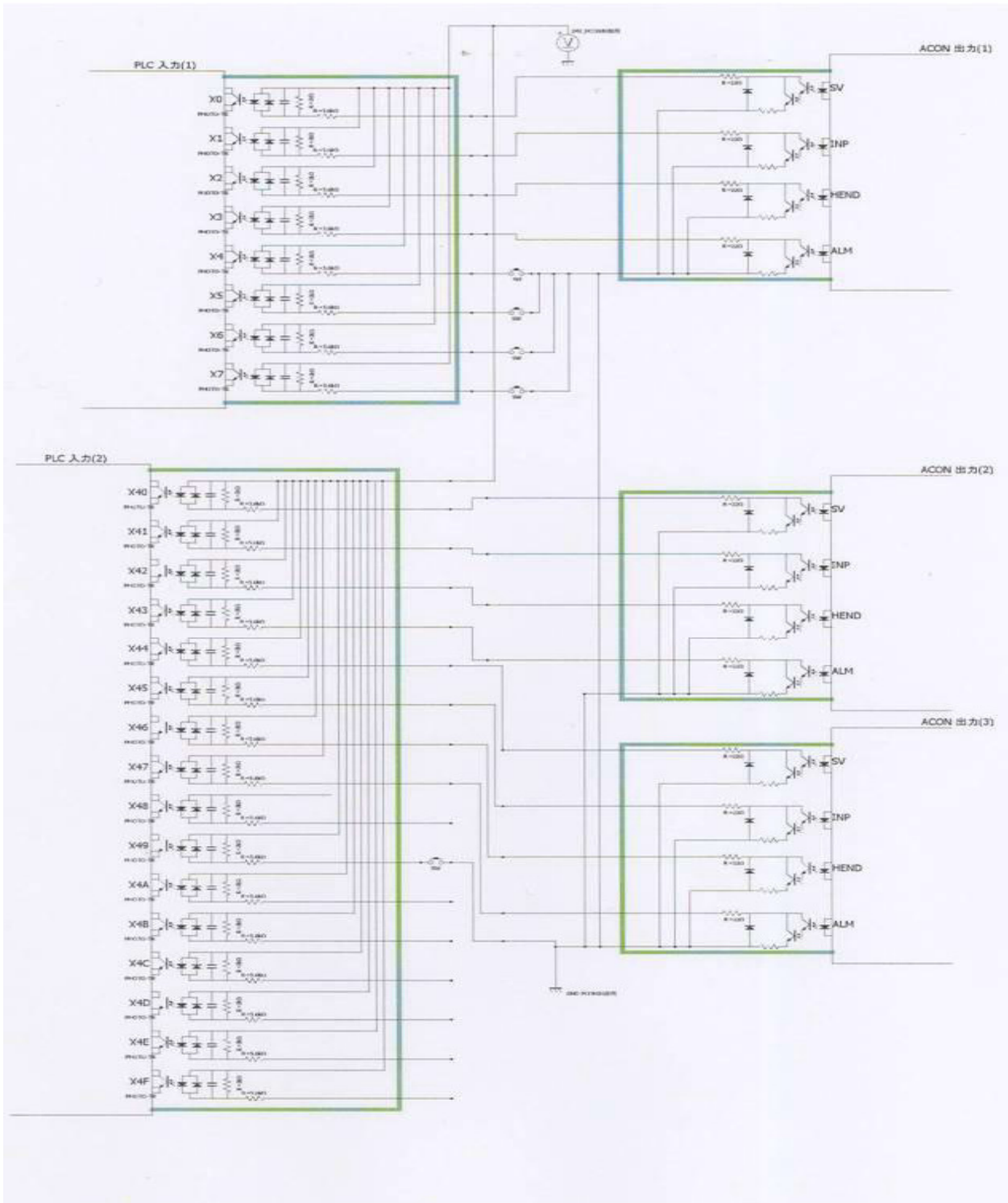


Fig.61 Electronic circuit of plc connection 2.

## 5-4-2 自動化する場所の選定

多連微小間隙チップの操作において、自動化できる項目として、圧力操作による送液、ダイヤフラムの動作が最適であると考えられた(Table.19, Fig.62)。また、有核赤血球の分離や回収操作は、溶液回収用のリザーバーが一か所のため有核赤血球の捕捉液と間隙通過液は3弁コックでの制御を考えた。これにより、チップ処理の再現性の向上を期待できる。

しかし、ユーザーの利便性をより高めるため、溶液回収を含めた全自動化実施を行いたい。自動化に適したチップ構造の検討が必要であることが分かった。

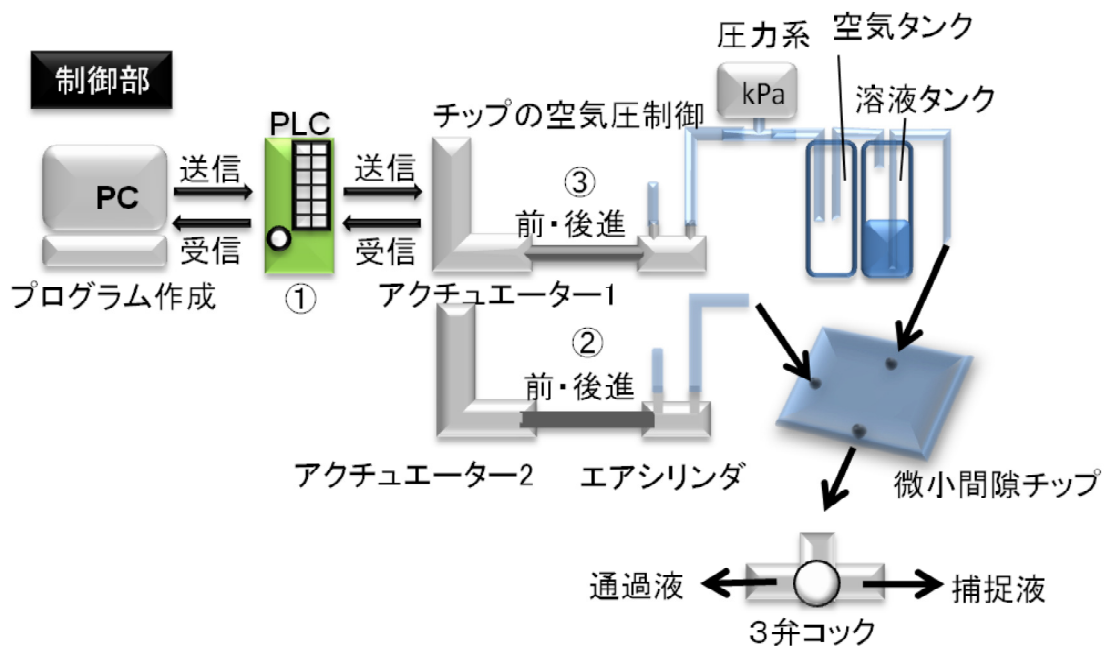


Fig.62 Selection of automatic manipulation points.

Table.19 Automatic manipulation of chip with plc devices.

		パソコンとPLCを接続 制御プログラムの送受信	空気流路へ加圧 ダイヤフラム制御	チップへ送液 空気圧制御	溶液回収 3弁コック
①	プログラムをPLCへ保存				
②	アクチュエーター1を動かす				
③	アクチュエーター2を動かす				

### 5-4-3 各種装置の制御プログラム

ラダープログラムを Fig.63, 64 に示した。X4 は各装置の電源を ON にする。X5 は、アクチュエーターの原点復帰、X6 は、圧力計のリセットである。X7 は、アクチュエーターを動作させ加圧させる。R11 は、圧力計の数値がある一定値を下回った時、ON になる理論スイッチである R20 も R11 と同様である。

プログラムシミュレーションにおいて、圧力のコントロールができることが分かった。多連微小間隙チップ操作の自動化に期待できた。

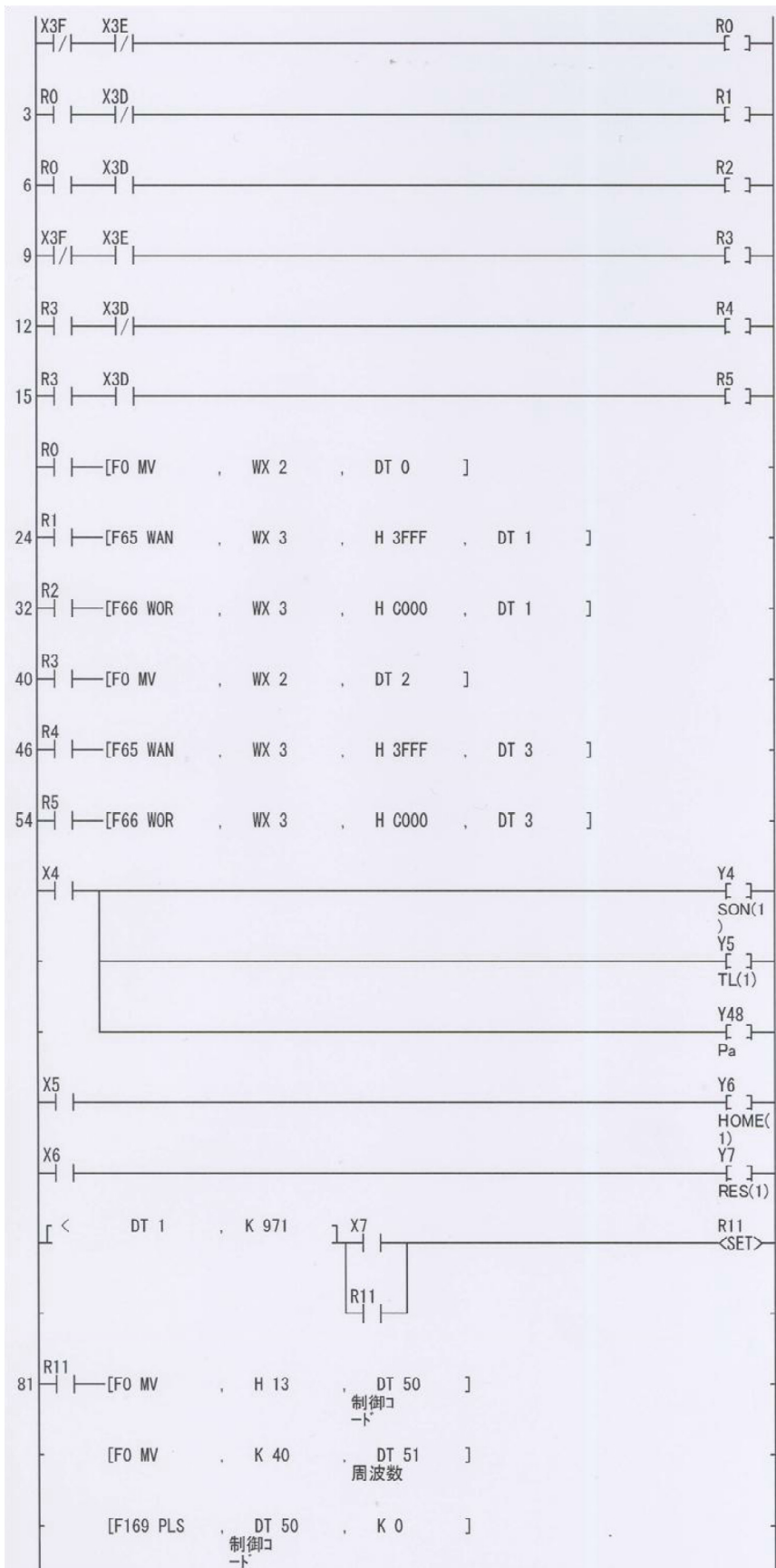


Fig.63 Ladder diagram program for automation of chip 1.

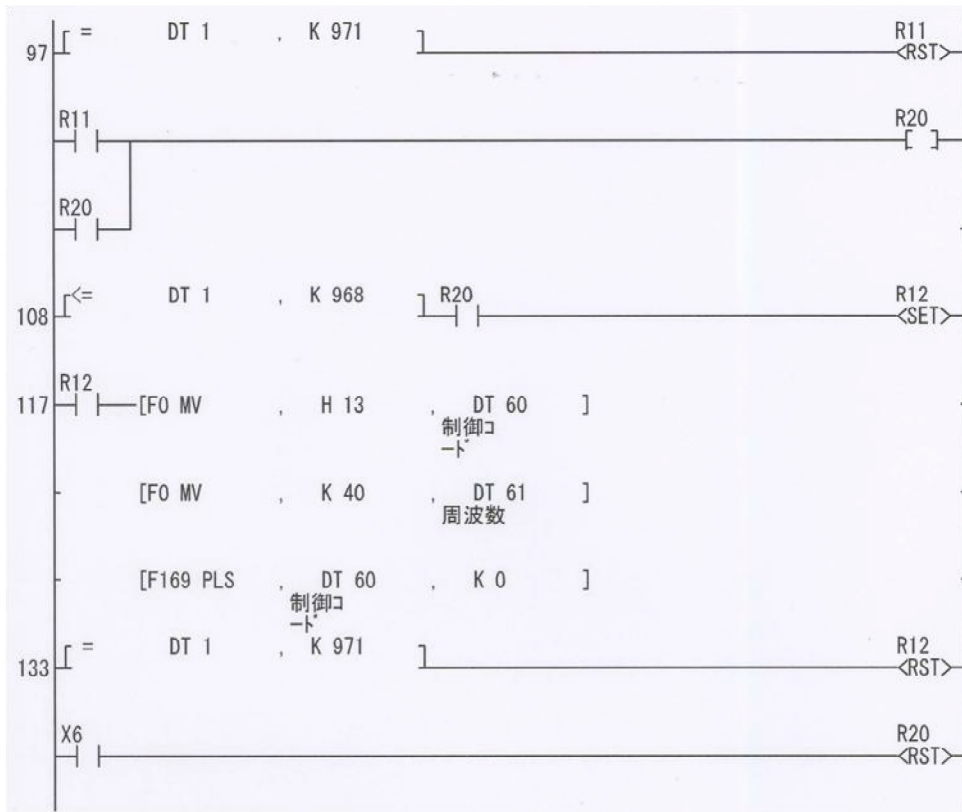


Fig.64 Ladder diagram program for automation of chip 2.

#### 5-4-4 自動化の検証

多連微小間隙チップ PLC の各装置を接続し、可動させた(Fig.65)。送液操作の自動化を検証し、圧力コントロールに成功した。また、中間膜や送液時の圧力維持にも成功した。常に一定量の送液と中間膜のコントロールができることが分かった。今回の自動制御プログラムの値を変更することで、チップ操作の内、圧力コントロールで処理できる操作すべてに対応できることが分かった。

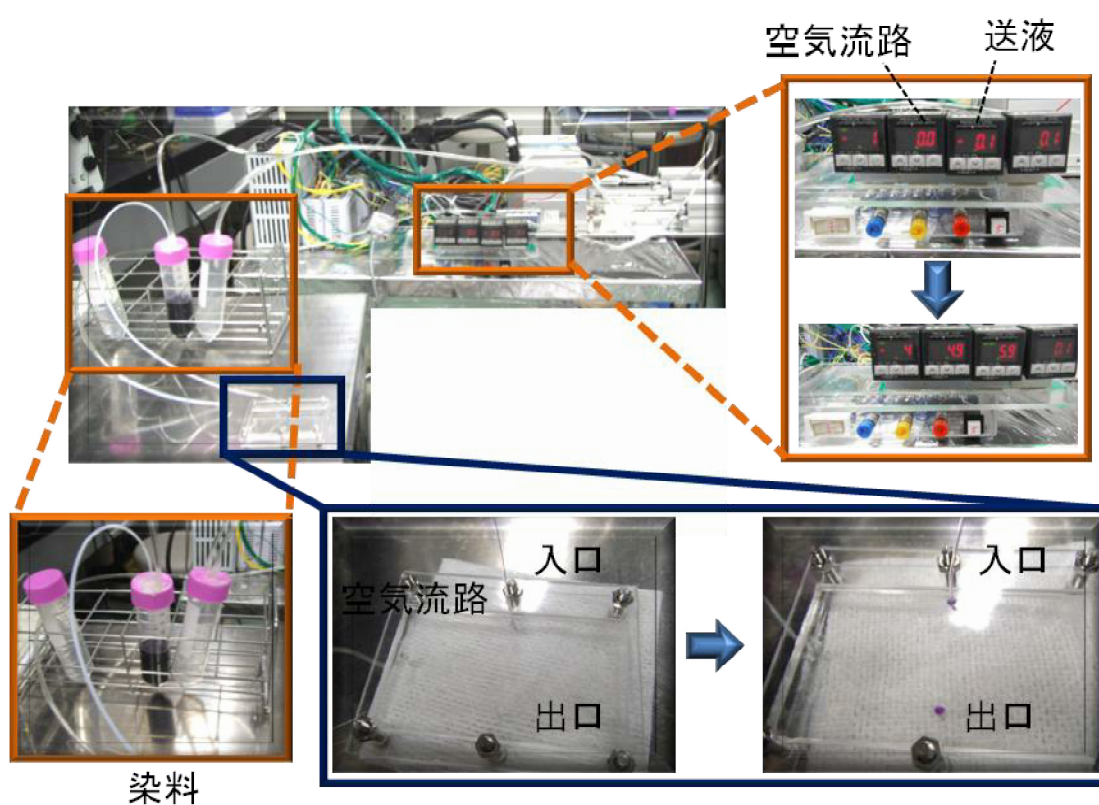


Fig.65 Automatic chip control by air pressure.

#### 5-4-5 全自動化のためのチップ設計

作製したマスクパターンを Fig. 66 に示した。多連微小間隙チップの自動制御において重要となるのは、送液の自動化と溶液の選択である。微小間隙と通過した血球と微小間隙で捕捉した血球をそれぞれ回収するのは勿論のこと、血液を送液した後、生理食塩水を流すことで、血球の捕捉を十分に行う必要がある。そのため、血液の入口、生理食塩水の入口、微小間隙と通過した血球回収の出口、微小間隙で捕捉できた血球を回収する出口の 4 つ設け、それぞれを個別で制御できるダイヤフラムを設置した。

この自動制御用チップの各制御パターンを Fig.67 に示した。空気圧制御 1 より生理食塩水と血液を加圧し、送液する。この時、空気圧制御 2 とソレノイドバルブの開閉をすることで、それぞれの溶液を選択的に送液する。血液送液後は、生理食塩水を送液させる。空気圧制御 3 より、微小間隙の中間膜を維持する。また、空気圧制御 2 とソレノイドバルブの開閉をすることで、微小間隙を通過した血球を回収や、微小間隙で捕捉した血球の回収を選択的に回収できる。多連微小間隙チップの全自動化血球分離システムの構築の実現に期待できる。



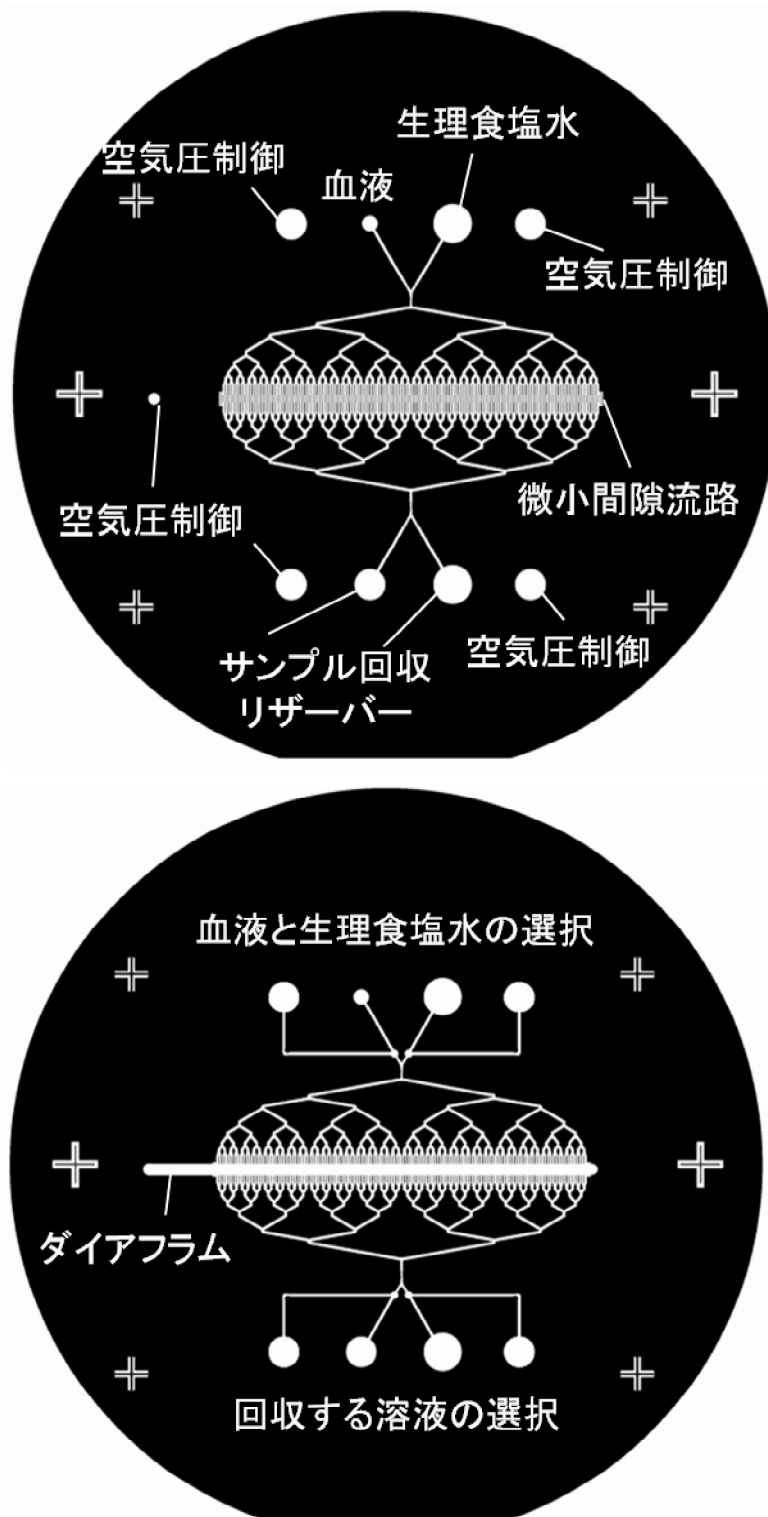


Fig.66 Mask patern.

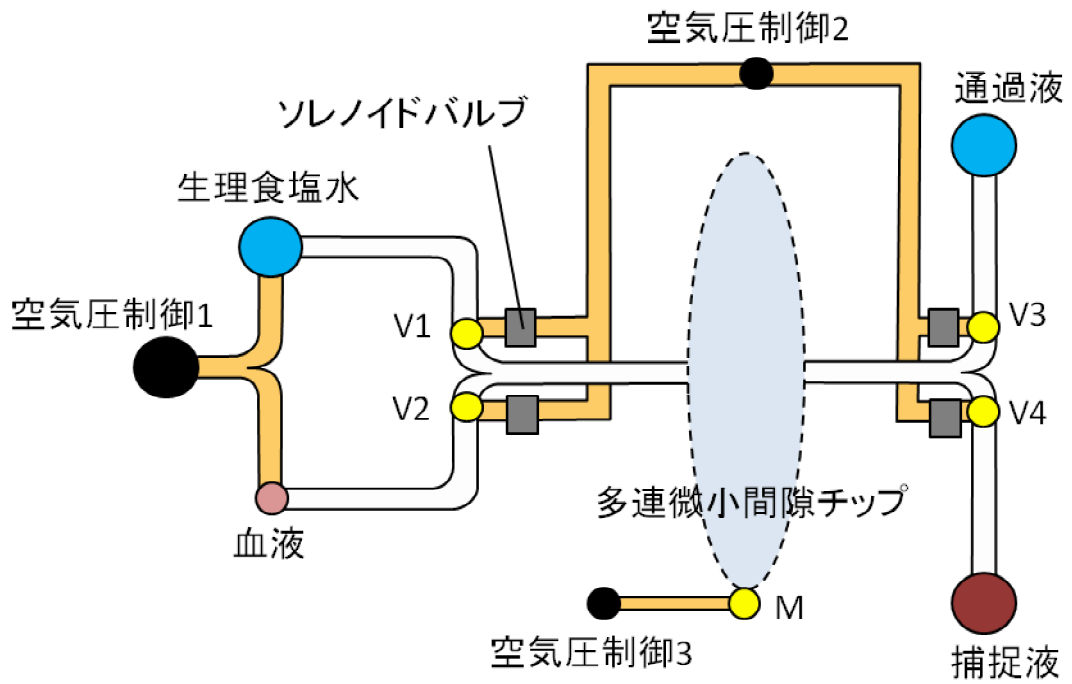


Fig.67 Automatic chip control system.

## 5-5 結論

多連微小間隙チップ処理の再現性とユーザーの利便性の向上を目的として、チップ処理の全自動化を試みた。微小間隙チップへのサンプルの導入、中間膜の制御、微小間隙処理、リザーバーへの溶液移動、溶液の回収の全てを自動実行できる装置を完成させた。多連微小間隙チップ処理の再現性を高められると期待できる。また、溶液を選択的に送液できるチップの設計を行った。2 つ以内のサンプルを同時かつ自動的に送液できるようになる。加えて、回収する溶液も選択的に行えるようになる。溶液の選択と回収液の選択も自動で行うことでユーザーの利便性をさらに向上できると期待できる。

## 第6章 総括

出生前の遺伝子診断には侵襲性を伴う。この侵襲性は、母体・胎児ともに避けられないものであるため、無侵襲化は必須である。アメリカやヨーロッパなど世界各地で無侵襲出生前診断について研究されているが、実用化には至っていない。日本の無侵襲出生前診断研究グループであるFDD-MBでは、Percoll密度勾配遠心分離により有核赤血球を濃縮し、濃縮液を染色標本にして標本上の有核赤血球を自動画像処理装置により探索している。しかし、有核赤血球の探索には、20時間以上要するため、作業の効率化が必須である。これを解決するために、密度勾配遠心分離を前処理とし、血球の密度以外でさらに濃縮することができる微小間隙チップを作製した。このチップにより探索上の候補血球を減らすことで、自動画像処理装置による探索時間の短縮化を期待できる。

本論文では、容易かつ簡単に有核赤血球を濃縮回収することができるチップを設計・開発し、探索時間の短縮化を目指した。

微小間隙による血球の捕捉においては、間隙部入り口に多数の血球塊が形成されるため、入り口部の角を無くし、血球塊の形成を抑えることができた。また、ニワトリ有核赤血球で捕捉することが出来た間隙の高さが1.2~2.0 $\mu\text{m}$ の時だったのに対して、ヒトの有核赤血球は、間隙の高さが1.0~1.85 $\mu\text{m}$ の時に捕捉することができ、ニワトリ有核赤血球とヒト有核赤血球の形状は異なるが、通過できる間隙の高さに近似が見られることが分かった。さらに、微小間隙の高さが1.0 $\mu\text{m}$ の時に有核赤血球の回収率は90%を超え、赤血球、白血球の除去率も90%を超えた。この微小間隙チップによる金沢医科大学FDD-MB法の血球探索時間の短縮化に効果を期

待できるか検討した。チップを使った時と使わなかった時を比較し、スループットを 20 倍に向上できることが分かった。しかし、自動 NRBC 探索の時間の短縮に伴い、チップ処理の時間の方が長くなった。そこで微小間隙流路の数を増やし、チップ処理時間の短縮化を試みた。

微小間隙チップの流路数 90 から 448 の約 5 倍まで増やした多連微小間隙チップを作製した。送液速度 11  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、22  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、33  $\mu\text{L}/\text{min}$  と微小間隙チップよりも 10 倍以上の流速で有核赤血球の捕捉回収を試みた。有核赤血球の回収率は、送液速度 11 $\mu\text{L}/\text{min}$  の 83%が最も高い値を示した。また、赤血球、白血球の除去率は、80%を超えた。微小間隙チップの処理時間を流路の数を増やした多連微小間隙チップにすることで、短時間でチップ処理を行えるようになった。金沢医科大学 FDD-MB の血球探索時間の短縮化に有効な分離法の開発に成功した。

多連微小間隙チップの再現性とユーザーの利便性の向上させるためにチップ処理の全自動化を試みた。溶液サンプルの導入からチップ処理動作、溶液の回収の全てを自動実行できる装置を完成させた。多連微小間隙チップ処理の再現性とユーザーの利便性の向上を期待できる。さらにユーザーの利便性向上のため、溶液の選択から回収液の選択も自動で行えるチップの設計を行った。ボタン一つですべての操作ができるチップと装置の開発に貢献することができた。

本論文の目的である有核赤血球の分離法の開発を微小間隙チップにより実現させ、金沢医科大学 FDD-MB 法の探索時間の短縮化に大きく期待できることを明確にした。

## 参考文献

1. Bevis, D.C.A. : The antenatal prediction of hemolytic disease of the newborn. *Lancet*, **1**:395-398, 1952
2. 平成 13 年度 厚生科学研究 遺伝子医療の基盤整備に関する研究  
産科診療における遺伝カウンセリング体制の構築に関する研究  
2001.
3. Kay, M.A., Manno, C.S., Ragni, M.V., et al. : Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet.*, **24**, 257-261, 2000
4. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bay, S., de Saint Basile, G., et al. : Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID) -X1 disease. *Science* **288**, 669-672, 2000
5. 日産婦誌 59 巻 7 号「19. 羊水検査・絨毛検査」: N-224-228, 2007
6. 日産婦誌 53 巻 6 号「10. 穿刺診」: N-108-112, 2001
7. 日産婦誌 53 巻 11 号「18. 羊水検査」: N-395-405, 2001
8. Hanson, F.W., Tennant, F.R., Zorn, E.M., Samuels, S. : Analysis of 2136 genetics amniocenteses: experience of a single physician. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **152** : 345-352, 1988
9. Daffos, F., Capella-Pavlovsky, M., Forestier, F. : Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound : a study of 606 consecutive cases, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **153** : 655-660, 1988
10. G. Mari, M. D., For the collaborative group for Doppler assessment : Noninvasive Diagnosis by Doppler Ultrasonography of Fetal Anemia Due to Maternal Red-Cell Alloimmunization, *N.E.J.M.*, **342** : 9-14, 2000

11. 日本人類遺伝学会論理審査委員会・理事会 : 「母体血清マーカー検査に関する見解」, 1998
12. 馬場一憲. : 「超音波検査」, 母子保健情報, 58 : 22-26, 2008
13. 松本雅彦: 羊水穿刺・臍帯穿刺, 「羊水穿刺の模式図」: 図説産婦人科, **33**, 130, メジカルビュー社, 1998
14. 細胞学的診断法 : [http://mikore.net/prenataldiag/taiji\\_shindan2.htm](http://mikore.net/prenataldiag/taiji_shindan2.htm), 2009.12.22
15. 兵庫県さい帯血バンク. 「さい帯血バンク採取従事者・ボランティア合同研修会」: <http://www.saitaiketu.org/1302.html>, 2009.12.22
16. 日本ダウン症ネットワーク(JDSN)委員会, 「母体血清マーカー検査に関するQ & A」. <http://rg4.rg.med.kyoto-u.ac.jp/JDSN/data/Q-A.html>, 2009.12.22
17. Schroder. J. *J. Med. Gent.* **12**, 230-242, 1975
18. Y. M. Dennis Lo, Mark S.C. Tein, Tze K. Lau, Christopher J. Haines, Tse N. Leung, Priscilla M.K. Poon, James S. Wainscoat, Philip J. Johnson, Allan M.Z. Chang and N. Magnus Hjelm, “Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis” : *Am. J. Hum. Genet.* **62**:768–775, 1998
19. Diana W. Bianchi, Joe Leigh Simpson, Laird G. Jackson, Mark I. Evans, Sherman Elias, Wolfgang Holzgreve, Lisa M. Sullivan, Felix de la Cruz and DM-STAT on behalf of the NICHD Fetal Cell Study (NIFTY) Group, “Fetal Cells in Maternal Blood: NIFTY Clinical Trial Interim Analysis”, *Prenat. Diagn.* **19**: 993-997, 1999
20. D. W. Bianchi, J. L. Simpson, L. G. Jackson, S. Elias, W. Holzgreve, M. I. Evans, K. A. Dukes L. M. Sullivan, K. W. Klinger, F. Z. Bischoff,

- S. Hahn, K. L. Johnson, D. Lewis, R. J. Wapner and F. de la Cruz  
*Prenat Diagn.* **22**, 609-615 2002
21. Hisham Mohamed, James N. Turner, Michele Caggana, “Biochip for separating fetal cells from maternal circulation”, *Journal of Chromatography A*, **1162**, 187–192, 2007
22. Michihiro Kitagawa, Kentaro Sugiura, Hiroko Omi, Yoshiaki Akiyama, Kiyoko Kanayama, Masaru Shinya, Tadao Tanaka, Hirobumi Yura, Haruhiko Sago, “New technique using galactose-specific lectin for isolation of fetal cells from maternal blood”, *Prenat Diagn*, **22**, 17–21, 2002
23. Haruo Takabayashi, Soryu Kuwabara, Toshihiko Ukita, Kazumi Ikawa, Kaoru Yamafuji, Tatsuhiko Igaras, “Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood”, *Prenat Diagn*, **15**, 74–77, 1995
24. R.H.BURDON, P.H.van KNIPPENBERG, :細胞分離法:, 東京化学同人
25. 越田 豊, 常木 和日子, 光学顕微鏡で見る比較動物学, 株式会社培風館, 57-59, 1994
26. 岩井保, 水産脊椎動物Ⅱ 魚類, 株式会社恒星社恒星閣, 137-138, 1985
27. Chandler B. Andrews, Stuart A. Mackenzie and T. Ryan Gregory., *Proc. R. Soc. B*, **276**: 55-61, 2009
28. G.N. Isitor, Z. Asgarali, K. Pouching., *Research in Veterinary Science* **85**; 418-432, 2008
29. Sukumar Ponnusamy, Huoming Zhang, Priya Kadam, Qingsong Lin, Teck Kwang Lim, et.al., *JOURNAL OF PROTEOMICS*, **75**; 5762-5773, 2012



30. Benie T. Constantino, et. al., LABORATORY MEDICINE NUMBER 4,  
31; 223-229, 2000

## 謝辞

本研究の遂行、本論文の作製にあたり、北陸先端化学技術大学院大学 マテリアルサイエンス科の高村禪教授をはじめ、共同研究させていただきました金沢医科大学 FDD-MB グループの高林晴夫教授、北 美紀子先生、およびグループメンバーの皆様に深く感謝し、心からお礼を申し上げます。また、サブテーマ論文の作製にあたり、丁寧にご指導して下さいました金沢医科大学の高林教授、北先生、北陸先端化学技術大学院大学の平塚祐一准教授に深くお礼申し上げます。

最後に、高村研究室、ならびに共同研究員、企業の皆様に感謝致します。

## 原著論文

(1) Takeshi Kumo, Yuichi Tomizawa, Mikiko Kita, Haruo takabayashi, Yuzuru Takamura, "Concentration and extraction chip of fetal nucleated red blood cells (NRBCs) by micro gap with diaphragm for fetal diagnosis from maternal blood", *Microsystem Technologies*, Accepted, 2017, online published, 2017, doi:10.1007/s00542-017-3309-9.

## 国際学会プロシーディング

(1) Takeshi Kumo, Yuichi Tomizawa, Mikiko Kita, Haruo takabayashi, Eichi Tamiya, Yuzuru Takamura, *Proc. of Micro Total Analysis System 2010*, pp.1583-1585, 2010.

## 国際学会

(1) Takeshi Kumo, Yuichi Tomizawa, Mikiko Kita, Haruo takabayashi, Eichi Tamiya, Yuzuru Takamura, *The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ -TAS2010)*, 2010, 10, 03.

(2) Yuichi Tomizawa, Takeshi Kumo, Mikiko Kita, Haruo takabayashi, Eichi Tamiya, Yuzuru Takamura, *The Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST) and the California NanoSystems Institute (CNSI)*, 2010, 01, 18.

(3) Takeshi Kumo, Yuichi Tomizawa, Mikiko Kita, Haruo takabayashi, Eichi Tamiya, Yuzuru Takamura, *International Symposium on Mathematical Morphology 2009 (ISMM2009) & Nano Technology 2009 (NT2009)*, 2009, 11, 07.

## 国内学会

- (1) 雲 健史, 富澤 祐一, 北 美紀子, 高林 晴夫, 民谷 栄一, 高村 禪, 平成 23 年度 応用物理学会 北陸・信越支部 学術講演会, 2011, 11,18
- (2) 雲 健史, 富澤 祐一, 北 美紀子, 高林 晴夫, 民谷 栄一, 高村 禪, 2010 年秋季 第 71 回応用物理学会学術講演会(応用物理学会), 2010, 09,14-17
- (3) 雲 健史, 富澤 祐一, 北 美紀子, 高林 晴夫, 民谷 栄一, 高村 禪, 2010 年春季 第 57 回応用物理学会学術講演会(応用物理学会), 2010, 03,17-19
- (4) 高村 禪, 雲 健史, 富澤 祐一, 北 美紀子, 高林 晴夫, 民谷 栄一, 第 13 回胎児遺伝子診断研究会, 2010, 02,20
- (5) 雲 健史, 富澤 祐一, 北 美紀子, 高林 晴夫, 民谷 栄一, 高村 禪, 第 20 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2010, 06,10-11

## 国内および国際特許

- (1)特許 5311356 号(2013), US2012-030-1867-a-1, WO2011-027832-a-1,  
発明者:雲 健史, 高村 禪, 高林 晴夫  
"有核赤血球濃縮回収用チップ及び有核赤血球濃縮回収方法".