

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：57301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04183

研究課題名(和文) オンチップ微小液滴電気穿孔プロセスの数値解析と現象メカニズムの解明

研究課題名(英文) Numerical analysis of on-chip microdroplet electroporation process and clarification of the mechanism

研究代表者

中島 賢治 (Nakashima, Kenji)

佐世保工業高等専門学校・機械工学科・教授

研究者番号：40311112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、iPS細胞の高効率生産を可能にする「オンチップ微小液滴電気穿孔プロセス」を開発するため、数値解析を用いて現象を可視化する。そのため、ディーン流れによる細胞整列、細胞を一つずつ分離するための液滴形成、電気穿孔における膜電子透過化、電気泳動による遺伝子導入の4つのステージに分けて数値解析を実施した。ディーン流れによって細胞整列の効果を得るには、電極上を通過する液滴の速度では足りないことが確認された。液滴形成を安定的に実現できる、界面張力と粘度の特性値分布を得た。細胞の液滴内位置の変化に伴う細孔生成の特性を整理できた。移動度による簡便な手法で計算することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で扱う「オンチップ微小液滴電気穿孔法」とは、細胞への遺伝子導入操作(電気穿孔)を連続的に施す技術である。この工程は、幅 $50\mu\text{m}$ ×高さ $30\mu\text{m}$ の矩形流路で構成される、全長 2cm 以内に収まるマイクロ流体デバイスによって実現される。この技術によって、安定的にiPS細胞の樹立が可能になれば、現在主流のウイルスベクター法による技術に置き換えることが可能になる。そして、本研究で開発する手法は、大規模並列処理と相性が良い。それゆえ、産業的にiPS細胞を大量生産することが可能になるため、iPS細胞を用いた臨床応用や製薬開発の推進に貢献することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：To develop an "on-chip microdroplet electroporation process" that can efficiently establish iPS cells, this study visualizes the phenomenon using numerical analysis. Therefore, the numerical analysis was divided into four stages: (1) cell alignment by Dean flow, (2) droplet formation to separate cells one by one, (3) membrane electron permeabilization in electroporation, and (4) gene transfer by electrophoresis. (1) It was confirmed that the velocity of droplets passing over the electrode was not sufficient to achieve the effect of cell alignment by Dean flow. (2) Characteristic distributions of interfacial tension and viscosity were obtained to enable stable droplet formation. (3) The characteristics of pore formation with changes in the position of cells in the droplet were organized. (4) The calculation could be performed using a simple method based on the calculation by mobility.

研究分野：流体

キーワード：数値解析 液滴エレクトロポレーション マイクロ流体デバイス 細胞膜穿孔 遺伝子導入 液滴形成
ディーン流れ 電気穿孔

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の学術的背景は、2015年に栗田らが発表した、細胞への遺伝子導入の革新的新法である「液滴エレクトロポレーション法」(Kurita et al., PLoS One, 2015)にある。その理論的基盤は、従来技術の「電気穿孔」を液滴化することで遺伝子の拡散律速を改善したところにある。栗田らは、従来の電気穿孔を進化させ、細胞と遺伝子、培養液からなる懸濁液で直径 1.8 mm の液滴を絶縁油中に作成、電圧印加することで遺伝子を細胞内に導入する、液滴電気穿孔を実現した。それにより、反応場を微小化することで遺伝子導入効率が飛躍的に改善できることを示した。申請者らは、それをさらに高効率化するため、液滴径 50 μm 以下を目指し、液滴電気穿孔のマイクロデバイス化を提案した。これにより、液滴の微小化による遺伝子拡散効率のさらなる改善と、連続高速処理の実現を企図し、「オンチップ微小液滴電気穿孔プロセス」の開発(服部他、精密工学会春季大会, 2021)に挑む。

2. 研究の目的

細胞機能デザインのためのオンチップ微小液滴電気穿孔システムが豊橋技科大の研究グループで開発されている。この技術は、液滴エレクトロポレーション法を理論的基盤とし、これをマイクロ流体デバイス上で実現することにより、遺伝子導入操作の大規模並列化を可能にする。服部らは、遺伝子導入効率の向上を目指してマイクロ流体デバイスの仕様改善を繰り返し、電気穿孔プロセスに及ぼすパルス電圧印加条件の影響を調べるなど、精力的に実験解析を行っている。しかし、50 μm 以下のマイクロスケール場で起こる現象を追跡すると、顕微鏡による実験観察の限界があり、さらに詳細な現象解析のためには数値解析による支援が必要である。

以上の理由から、本研究は、同システムに含まれる制御対象の物理現象について数値解析を行い、現象の可視化によりそのメカニズムを解明し、設計開発のための指針となる基盤データを整理し、設計の際に必要なリファレンシャルデータを蓄積することを主な目的とする。

3. 研究の方法

COMSOL Multiphysics 5.6 マイクロフルイディクスモジュールを用いて解析を行った。

3 - 1. 細胞整列の計算 COMSOL における“フィジクス選択 > 流体流れ > 短層流 > 層流”を用い、現象の支配方程式として連続の式とナビエ・ストークス方程式による解析を行った。

3 - 2. 液滴形成の計算 “フィジクス選択 > 流体流れ > 多層流 > 2 相流 (レベルセット) > 層流”を用い、現象の支配方程式として、連続の式とナビエ・ストークス方程式、レベルセット関数の式により解析を行った。

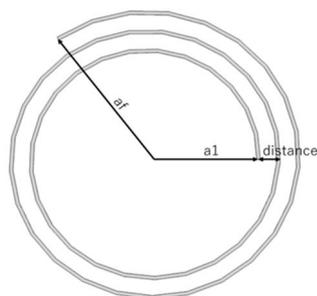


図1 細胞整列の計算空間

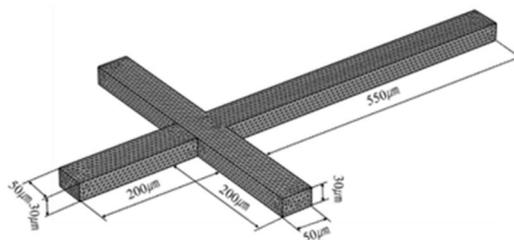


図2 液滴形成の計算空間

3 - 3. 膜電子透過化の計算 AC/DC モジュールの電流インターフェースと弱形式境界 PDE アプリケーションモードを使用して支配方程式を組み込んだ。電荷保存方程式および漸近スモルコフスキー方程式を連立することで膜穿孔現象を数値モデル化した(中島ら、機論 C, 2021)。

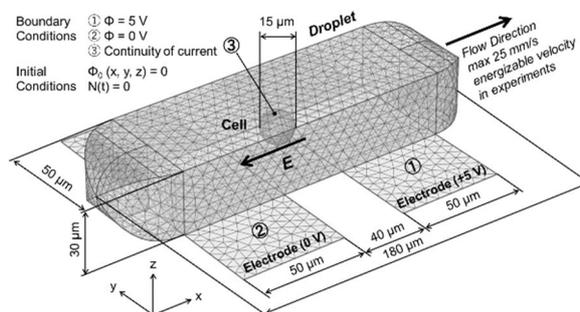


図3 膜電子透過化の計算空間

3 - 4. 電気泳動の計算 電場の空間分布データから一方向カップリングで計算できる移動度の式による方法を用いた。

4. 研究成果

4 - 1. 細胞整列 ディーン流れの計算結果を図4に示す。流れに対して垂直な断面について、流速分布をコンター図で可視化している。解析結果から、本デバイスの稼働条件では、細胞を整列させる効果がある。2次流れ対流が再現できないため、螺旋流路による細胞の整列が行われなことが分かった。また、実験においても計算結果と同様、螺旋流路で細胞整列が行われなことが確認された。

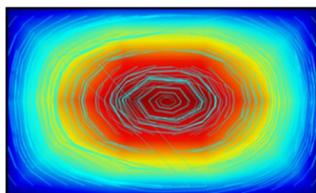


図4 ディーン流れの数値解析結果 断面平均流速 0.012 m/s , $De=1.54 \times 10^{-4}$ の場合

4 - 2. 液滴形成 液滴形成の計算結果を図5に示す。右側から水相(培養液+細胞+遺伝子)を、上下から油相(シリコンオイル)を流して液滴を形成する。粘度が低い場合(Oil 1)には長い、高い場合(Oil 11)には短い液滴が形成される。

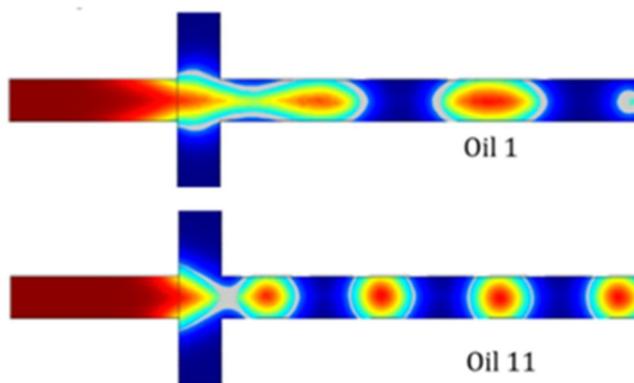


図5 液滴形成の数値解析結果

図6は液滴長と界面張力の相関を示す。0~18 mN/s以下で液滴形成は確認できなかった。70 mN/s以上は水の表面張力なので、解析対象とする系ではあり得ない条件である。

図7は液滴長と油相粘度の相関を示す。油相の粘度が50 mm²/s以下の領域で、油相粘度による液滴長の制御が可能である。なお、本節の成果は、日本機械学会2021年度年次大会において公表された。

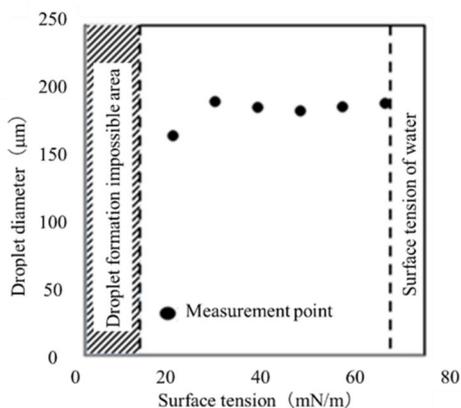


図6 液滴長と界面張力の相関

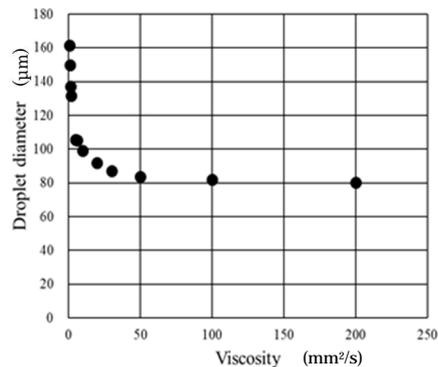
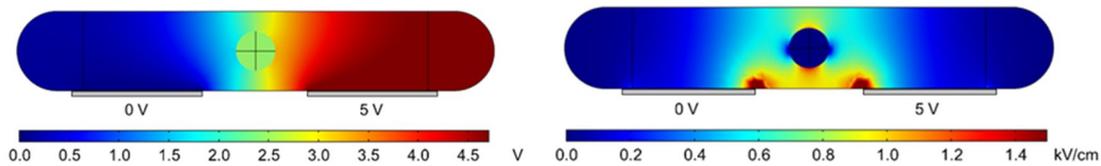


図7 液滴長と油相粘度の相関

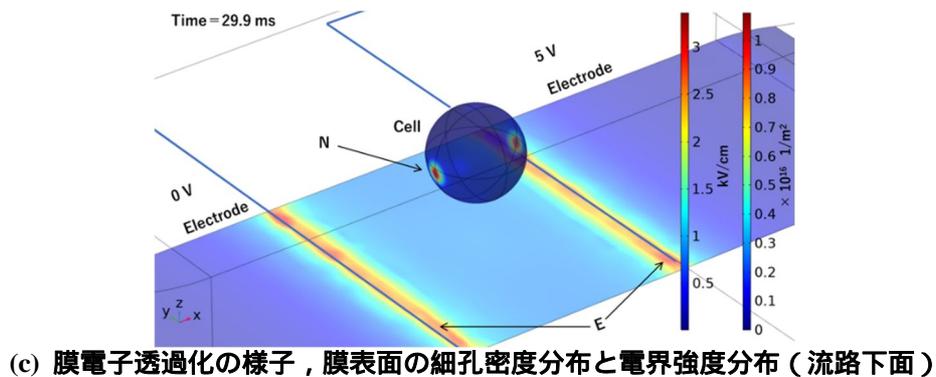
4 - 3. 膜電子透過化 膜電子透過化の工程について、その数値シミュレーション結果の可視化図を図8に示す。電荷保存則により液滴内電場(a)と(b)が計算され、その結果を基にスモルコフスキー方程式で細孔分布(c)が連成計算される。この数値解析環境を用いて、細胞が液滴内で取る位置を変化させ、何度も計算することにより、この系における膜電子透過化の普遍的特性を整

理した。



(a) 液滴内電位分布

(b) 液滴内電界強度分布



(c) 膜電子透過の様子，膜表面の細孔密度分布と電界強度分布（流路下面）

図 8 数値シミュレーションの可視化図

液滴の流下に伴い，液滴の中で対流が起こることが実験で確認されている．そうすると，細胞は液滴の中で位置が変化する．そのため，液滴内の細胞位置を図 9 のように変化させた場合について， $9 \times 9 = 81$ 通りの計算を行った．

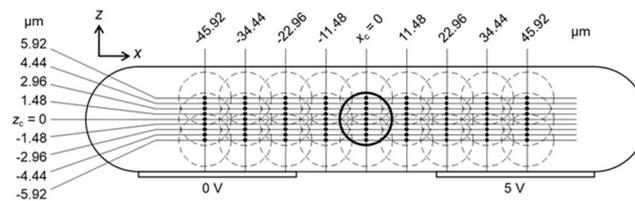


図 9 液滴内細胞位置の設定

図 10 は，液滴内細胞位置の変化に応じた細孔数密度の最大値分布である．図 10 の下面は細胞位置を表しており，奥面の斜掛け部分に電極が配置される．Moen らの試算によれば，電気穿孔が達成される細孔数密度は 1×10^{17} 個/ m^2 であり (Moen et al., 2016)，図 10 においてこれより大きな値をとる細胞中心位置は，電極間の $|x| < 20 \mu\text{m}$ の範囲に 9 か所あることがわかった．

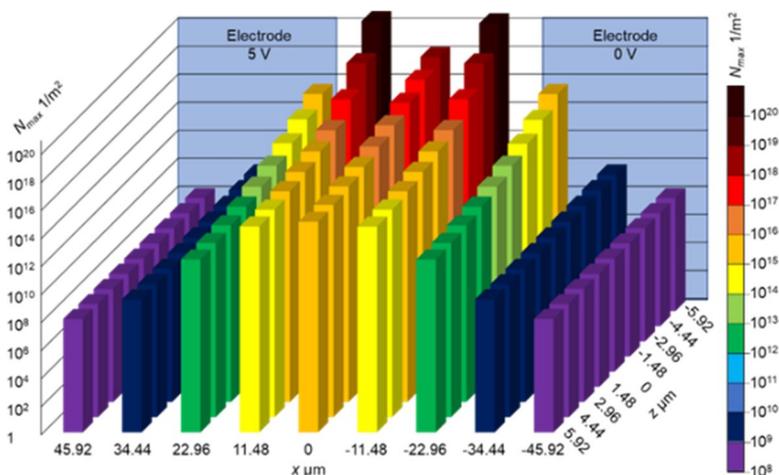


図 10 液滴内細胞位置に応じた細孔密度の最大値の分布

図 11 は，液滴内細胞位置の変化に応じた穿孔の様子を可視化している．電極間中央部(最右)に位置している場合は y - z 平面对称に穿孔部が現れている．なお，実際には，静止膜電位の影

響で正極側に多く細孔が分布することがわかっている (Moen et al., 2016). 細胞位置が電極中央 (最右) から正極のほぼ真上 (最左) へ移動するにつれ細孔分布の対称性はなくなり, 電極の少し内側へ細胞中心が入る位置 (電極から約 $3\mu\text{m}$) で細孔数密度が最も大きくなる位置がある.

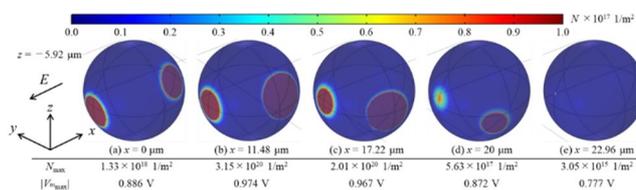


図 11 液滴内細胞位置に応じた穿孔の様子

4 - 4 . 遺伝子導入 細胞膜が導電性を持つようになると, 細胞の中へ電気力線が通るようになり, 電気力線を通して負に帯電した遺伝子が細胞の表面へ吸着される. 図 12 は, 赤丸で示した遺伝子が電気泳動によって細胞の中へ取り込まれる様子を可視化したものである. 計算においては, 細胞膜上に切り欠きを作成して移動度の方法により再現したが, 実際の遺伝子導入は, もっと複雑な経緯を経て行われる.

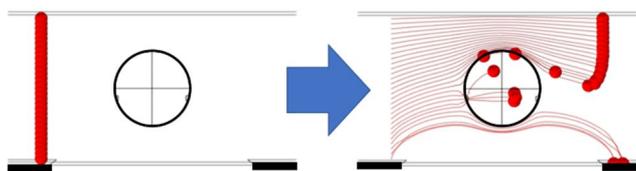


図 12 電気泳動による遺伝子導入の可視化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 NAKASHIMA Kenji, MATSUYAMA Fuminori, JOHNNO Yuuki, ISHII-TESHIMA Miho, SHIBATA Takayuki	4. 巻 Vol.87, No.896
2. 論文標題 Numerical analysis of cell membrane perforation in on-chip microdroplet-based electroporation (Membrane perforation characteristics when electrodes are placed on the same plane)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transactions of the JSME (in Japanese)	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/transjsme.20-00446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuyama, F., Nakashima, K., Johnno, Y.	4. 巻 33
2. 論文標題 EXPERIMENTAL DEVELOPMENT OF AN ADVANCED OXIDATION PROCESS BY USING FLUID MIXING EQUIPMENT AND PLASMA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Multiphase Science and Technology	6. 最初と最後の頁 33-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1615/MultScienTechn.2021040278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島賢治, 山中慎太郎, 小佐々拓巳, 松山史憲, 城野祐生, 手島（石井）美帆, 柴田隆行
2. 発表標題 マイクロ矩形流路を用いた液滴電気穿孔の数値解析（細胞膜穿孔と遺伝子導入）
3. 学会等名 日本機械学会2020年度年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島賢治, 小佐々拓巳, 山中慎太郎, 松山史憲, 城野祐生, 柴田隆行, 手島美帆
2. 発表標題 オンチップ液滴電気穿孔の数値解析と実験による検証
3. 学会等名 2019年度精密工学会佐世保地方講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小佐々拓巳, 中島賢治, 手島(石井)美帆, 柴田隆行
2. 発表標題 オンチップ単一細胞操作プロセスを可視化するマイクロスケール場の数値シミュレーション
3. 学会等名 2021年度先進的技術シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島賢治, 松山史憲, 城野祐生, 小佐々拓巳, 手島(石井)美帆, 柴田隆行
2. 発表標題 オンチップ微小液滴電気穿孔の数値解析
3. 学会等名 KESCOカンファレンス2021 COMSOL Simulations WEEK
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小佐々拓巳, 中島賢治, 松山史憲, 城野祐生, 柴田隆行, 手島(石井)美帆
2. 発表標題 オンチップ微小液滴電気穿孔の数値解析と実験による検証
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------