

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14547

研究課題名（和文）機能性細胞包埋ゲル粒子の精密調製に向けたオンチップ反応・処理プロセス

研究課題名（英文）On-chip reaction and processing process for precise preparation of functionalized cell-laden microgel particles

研究代表者

鳥取 直友（Naotomo, Tottori）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：00840646

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、レイノルズ数が低く環境制御が容易なマイクロ流路内に、各種反応・処理液からなる多相並行流を形成し、規則的な支柱配列を用いて細胞が内包された標的の液滴のみを斜行・横断させることで、細胞包埋数を均一化したゲル粒子の作製、および機能付与などのプロセスをシームレスに行う、新たな細胞包埋ゲル粒子の作製法を検討した。構築したマイクロ流体システムを用いて、液滴を生成した後、細胞内包液滴のみに多相並行流を斜行・横断させることで、細胞未封入の液滴が除去された細胞包埋ゲル粒子を連続生成可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞包埋ゲル粒子を用いた細胞の解析は、基礎研究や再生医療用途など様々な分野への応用が近年注目されているが、細胞周囲の微小空間が精密に制御され、さらには環境応答性等の機能が付与された、機能性細胞包埋ゲル粒子の作製プロセス技術は未確立である。対して、機能性細胞包埋ゲル粒子をシームレスに精密調製可能なプロセス技術の確立を目指す本研究は、医学・生化学などの基礎研究、再生医療への応用など、新しい分野の開拓・発展を支える基盤技術になり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we propose a novel microfluidic technique for the continuous production of functionalized microgel particles containing a uniform number of cells by guiding target cell-encapsulated droplets across multiple laminar streams (e.g., reaction and processing solutions) formed in micropillar arrays. Using the constructed microfluidic system, we demonstrated the continuous production of cell-laden microgels without empty droplets by guiding only the cell-encapsulated droplets across the multiple laminar streams.

研究分野：マイクロ・ナノ流体工学

キーワード：マイクロ流体デバイス ゲル粒子 反応・処理プロセス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の機能や応答は、細胞周囲の環境(細胞外基質や細胞間の相互作用等)に大きく影響されることが報告されている。細胞と周囲の環境との相互作用が細胞の機能や応答に与える影響を1細胞レベルで解析するために、近年、マイクロ流路を用いて微小空間(液滴やゲル粒子)へと細胞を包埋し、細胞応答や分泌物を解析する事例が報告されており、医学・生化学などの基礎研究、再生医療等、幅広い分野での応用が期待されている。

一方、従来のマイクロ流路を用いた手法では、例えば、(a)液滴やゲル粒子に封入される細胞数がポアソン分布により不均一となり、細胞の封入条件が精密に統制された状態での詳細な解析には至っていない。また、細胞の機能や応答は、(b)細胞周囲の微小培養環境(pH、温度、酸素濃度、等)からも影響を受けるため、細胞周囲の局所環境と細胞動態の同時計測が精密かつ定量的な解析には必要となるが、十分に検討されていない。そのため、細胞の機能や応答のさらなる理解には、細胞周囲の微小空間を精密に制御し、さらには細胞近傍の微小環境を計測可能な環境応答性が付与された、“機能性細胞包埋空間”が必要だが、このような空間(液滴やゲル粒子)の生成法は未確立である。

### 2. 研究の目的

本研究では、レイノルズ数が低く環境制御が容易なマイクロ流路内に、各種反応・処理液からなる多相並行流を形成し、規則的な支柱配列を用いて液滴や粒子を斜行・横断させることで、細胞包埋ゲル粒子の作製・ゲル粒子への機能性付与処理・所望の分離プロセスをシームレスに行う、新たな“機能性細胞包埋ゲル粒子”の作製法を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### マイクロ流体デバイスの設計・作製

十字流路による液滴生成部とその下流に接続された支柱配列流路、および支柱配列流路に異なる溶液の並行流を形成するための溶液導入用流路から構成される、マイクロ流体デバイスを設計・作製した(図1)。十字型マイクロ流路は、連続相供給流路(幅 $50\mu\text{m}$ )、分散相供給流路(幅 $50\mu\text{m}$ )、および狭窄部(幅 $30\mu\text{m}$ )を有するドレイン流路(幅 $75\mu\text{m}$ )から構成され、流路高さは $25\mu\text{m}$ とした。また、支柱配列流路は、生成した液滴の内、標的の液滴のみが支柱配列の傾きに沿って斜行するように、支柱直径( $D_p$ ) $45\mu\text{m}$ 、支柱間距離( $d$ ) $45\mu\text{m}$ 、支柱のずれ率( $\Delta d/d$ ) $0.1$ とし、分離直径( $D_c$ )を $21\mu\text{m}$ に設定した。デバイスの微細構造部は、Si基板上にネガ型フォトリソを用いて作製した微小凸型をシリコーン樹脂(polydimethylsiloxane, PDMS)に転写することで作製した。微細溝が形成されたPDMS片に溶液導入および回収用の貫通孔(直径 $1.0\text{mm}$ )を開けた後、PDMS片とスライドガラスを酸素プラズマ処理により接合することでマイクロ流路デバイスを形成した。その後、water-in-oil(W/O)液滴を生成するために、疎水化剤を流路に導入することで表面を疎水性に改質した。

#### 実験システムの構築

マイクロ流路への各種溶液の送液は、試料が入ったマイクロチューブ(または遠心管)とデバイスをチューブを介して接続した後、圧力ポンプを用いて試料に圧力を印加することで行った。流路内の流れを観察するために倒立顕微鏡に高速度カメラを組み合わせて用いた。

#### 細胞内包液滴の生成と分離

上記の十字型マイクロ流路とその下流に接続した支柱配列流路を用いて、細胞内包液滴の生成と分離を行った。液滴生成用の連続相には、コーン油に界面活性剤を添加したものを用い、分散相には、アルギン酸ナトリウム(Na-alginate)水溶液にモデル細胞としてマウス線維芽細胞(NIH3T3-3-4)を添加したものをを用いた。分散相と連続相の流量、細胞濃度など各種条件を変化させ、液滴の生成状態、細胞内包数と液滴サイズの関係、および内包効率の評価を行った。次に、生成液滴を支柱配列流路へと導入し、細胞内包数の違いに基づいた液滴分離を試み、分離性能の評価を行った。

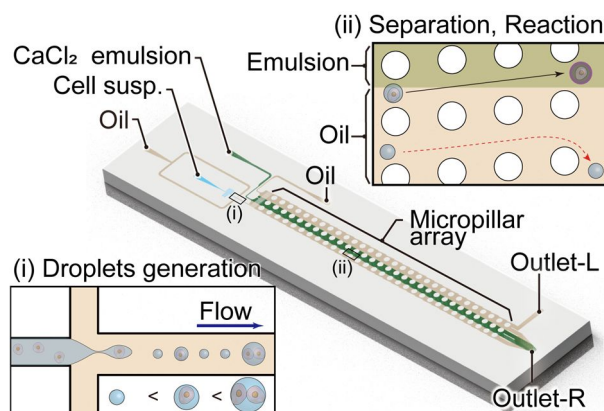


図1 細胞包埋ゲル粒子生成用マイクロ流路デバイスの概念図。(i)液滴生成部、(ii)支柱配列流路内での分離、反応部を表す。

#### 支柱配列流路内の多相並行流を介した細胞包埋ゲル粒子の連続生成

上記の十字型マイクロ流路とその下流に接続した支柱配列流路を用いて、細胞包埋ゲル粒子の作製を行った。具体的には、支柱配列流路にゲル化反応液（カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )を含む W/O エマルション）、シース液（界面活性剤を添加したコーン油）を導入し、支柱配列流路内に多相並行流を形成した後、細胞内包液滴に多相並行流内を斜行・横断させ、連続的に液滴のゲル化、および溶液置換を行った。その後、回収した生成ゲル粒子の状態を観察し、評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### 細胞内包液滴の生成と分離

連続相と分散相の流量を適切な領域に設定した際、均一サイズの液滴が規則的に生成され（図 2a）、細胞内包液滴のサイズが未内包液滴のサイズよりも大きくなる様子が確認された（図 2b）。例えば、分散相流量を  $0.3 \mu\text{L}/\text{min}$ 、連続相流量を  $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$  に設定した際、均一サイズの液滴 ( $21.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ) が  $1050 \text{ droplets}/\text{s}$  の生成速度で生成され、細胞が内包された際に液滴のサイズが未内包の液滴よりも大きくなる（1 細胞内包液滴の直径： $25.8 \pm 1.8 \mu\text{m}$ ）ことが確認された。生成された液滴が下流に接続した支柱配列流路へと流入すると、サイズの大きい細胞内包液滴は、支柱配列流路の支柱配列の傾きに沿って斜行し、サイズの小さい未内包液滴は支柱配列流路を流れ方向へと進むことで、細胞内包液滴と未内包液滴が分離される様子が確認された。

#### 支柱配列流路内の多相並行流を介した細胞包埋ゲル粒子の連続生成

次に、支柱配列流路内に多相並行流を形成し、生成した細胞内包液滴に支柱配列流路内に形成したゲル化反応液内を斜行横断させることにより、細胞包埋ゲル粒子の作製を試みた。十字型マイクロ流路で生成した液滴は、ドレイン流路の中央から下流に連結した支柱配列流路へと流入後、 $D_c$  よりも大きな液滴（細胞内包液滴）は、支柱配列の傾きに沿って斜行することで、流路内に形成した W/O エマルション流に突入する様子が観察された（図 3ab）。細胞内包液滴は、W/O エマルション流を横断した後、W/O エマルション流から分離されることでコーン油の流れに置換され（図 3c）、流れ方向に対して左側の出口（Outlet-L）から順次回収される様子が確認された。一方で、細胞を内包していない小さな液滴（ $< D_c$ ）は、支柱配列流路内を流れ方向へと進み（図 2）、細胞内包液滴から分離された後、流れ方向に対して右側の出口（Outlet-R）から排出される様子が観察された。

流れ方向に対して左側の出口からの回収物を培地に置換し観察したところ、細胞を内包した粒子が観察されたことから、支柱配列流路内の W/O エマルション流を斜行・横断する過程で、エマルションと合一し、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) による架橋反応によってゲル化されていることが確認され、本手法により細胞包埋ゲル粒子を連続生成することに成功した。

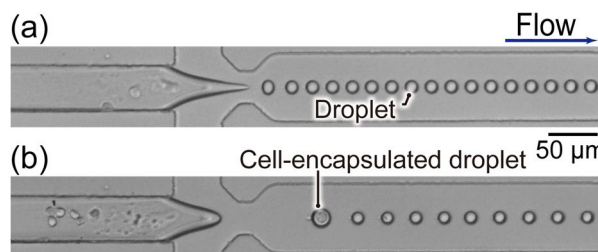


図 2 十字型マイクロ流路を用いた液滴生成の様子。(a) 細胞未内包液滴生成の様子。(b) 細胞内包時の液滴生成の様子。

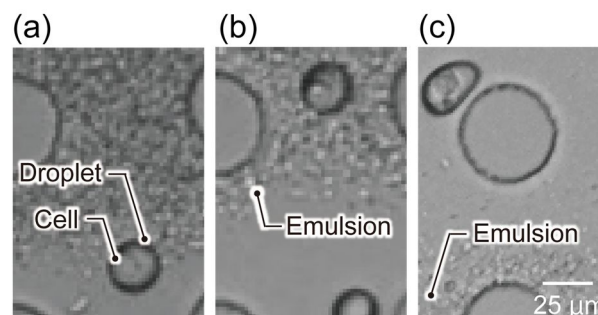


図 3 細胞内包液滴がマイクロピラーアレイ内のエマルション流内を横断する様子。(a) 横断前、(b) 横断中 (c) 横断後の液滴の様子。

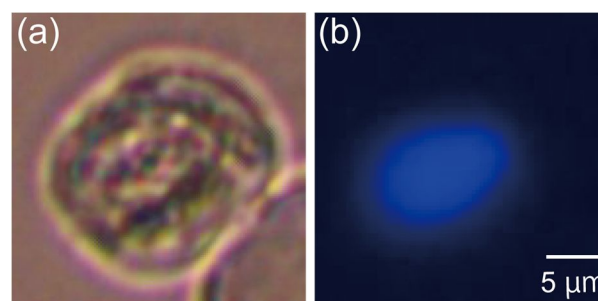


図 4 マイクロ流路から回収後に培地に置換した細胞包埋ゲル粒子（1 細胞包埋）の様子。(a) 明視野画像、(b) 蛍光（細胞核を染色）画像。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Naotomo Tottori, and Takasi Nisisako	4. 巻 13
2. 論文標題 Tunable deterministic lateral displacement of particles flowing through thermo-responsive hydrogel micropillar arrays	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32233-z	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hiroki Fukunaga, Naotomo Tottori, Shinya Sakuma, Takeshi Hayakawa, and Yoko Yamanishi
2. 発表標題 Tunable particle separation through acoustic deterministic lateral displacement micropillar arrays
3. 学会等名 The 37th IEEE Int. Conf. on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2024) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hiroki Fukunaga, Naotomo Tottori, Shinya Sakuma, Tomomi Tsubouchi, and Yoko Yamanishi
2. 発表標題 On-chip high-speed and continuous electro cell fusion utilizing droplet microfluidics
3. 学会等名 The 34th 2023 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuma Kadamura, Naotomo Tottori, Shinya Sakuma, and Yoko Yamanishi
2. 発表標題 Virtual particle valve toward generation of double-cells encapsulated microdroplet
3. 学会等名 The 22nd International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroki Fukunaga, Naotomo Tottori, Shinya Sakuma, Tomomi Tsubouchi, and Yoko Yamanishi
2. 発表標題 Continuous production of cell-encapsulated droplets for membrane fusion of cells utilizing a microfluidic device
3. 学会等名 The 22nd International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福永 裕輝, 鳥取 直友, 佐久間 臣耶, 山西 陽子
2. 発表標題 支柱配列流路を介した単一細胞封入ゲル粒子生成
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 角村 勇真, 鳥取 直友, 佐久間 臣耶, 山西 陽子
2. 発表標題 オンチップ仮想粒子バルブによる液滴への粒子封入挙動の評価
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第48回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 角村 勇真, 鳥取 直友, 佐久間 臣耶, 山西 陽子
2. 発表標題 2細胞封入液滴の生成に向けた仮想粒子バルブの提案
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福永 裕輝, 鳥取 直友, 佐久間 臣耶, 坪内 知美, 山西 陽子
2. 発表標題 融合細胞の作製に向けた2細胞封入液滴へのオンチップ電圧印可
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naotomo Tottori, Sora Sadamichi, Shinya Sakuma, Tomomi Tsubouchi, and Yoko Yamanishi
2. 発表標題 Continuous generation of fused cells in microdroplets utilizing a droplet microfluidic system
3. 学会等名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳥取 直友, 定道 空, 佐久間 臣耶, 坪内 知美, 山西 陽子
2. 発表標題 融合細胞の高効率回収を目指したマイクロピラーアレイによる細胞内包液滴の連続分離
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 定道 空, 鳥取 直友, 佐久間 臣耶, 坪内 知美, 山西 陽子
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた細胞内包液滴への電圧印加による細胞融合
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第45回研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------