

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月25日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656136

研究課題名（和文） せん断流れ場と歪曲電場を援用した特定単細胞連続選別法の開発

研究課題名（英文） Seamless Single Cell Sorting Method Appropriately Applying Shear Flows and Distorted Electric Fields

研究代表者

中部 主敬（NAKABE KAZUYOSHI）

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80164268

研究成果の概要（和文）：

生体単細胞の赤血球（RBC）に注目し、マイクロ流路内せん断流れ中での RBC に誘電泳動力（DEP）を作用させて高速かつ連続的に選別する方法を開発する研究を行った。RBC に DEP を適切に作用させるため流路内に設置した直線型あるいは半円型形状の薄膜電極によって発生する歪曲電場を数値予測し、球状ポリスチレン粒子を用いた可視化実験結果と良好な一致を示したことから RBC の分離・選別に応用できることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Numerical simulation and flow visualization on the motions of a fine spherical polystyrene particle in a microchannel installing thin membrane-type electrodes were made in order to develop an innovative method for fast and seamless sorting of single cell, in particular, red blood cell (RBC). Distorted electric fields around straight- or semi-circle- type electrodes that dielectrophoretic (DEP) forces suitably act on the particle flowing in the channel were numerically predicted. The numerically obtained trajectories of the particles show the good agreement with the visualization results, which can be expected to advance an effective manipulation and sorting of RBCs using DEP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：単細胞選別，流体計測，せん断流れ，電場強度分布，誘電泳動力

1. 研究開始当初の背景

高齢化の加速する社会において、各人の健康状態を診断して発病を事前に察知することは、健康志向の高まりとも相俟って医療費の増大を抑制するためにも好ましい。また、地球温暖化の傾向から熱帯地方の伝染病の南北極方向への蔓延が懸念される昨今、感染の有無を手軽に診断することは重要である。このような初期診断を行うためには血液・体液を測定する必要があるが、その測定には迅速、簡便、正確、低コスト、省スペースであることが要求される。

近年、血糖値測定等はチップ上で簡便に行われるようになってきたが、赤血球（RBC）そのものの検査は試験管規模の血液サンプルを採取してメッシュフィルタ等に通すバッチ処理測定と個々の RBC をピペット等で吸引する標本測定に限定される。しかし、前者の方法には異常 RBC を相当量含まないと識別できないという測定感度上の欠点があり、後者には異常 RBC を統計的に有意なサンプル数だけ発見するための手間が掛かり過ぎるという測定時間・コスト上の欠点がある。そこで、これらの欠点を克服するために、

これまでとは全く異なる斬新な検出・選別法を開発、確立する必要がある。

RBC の特性に関する研究は古くから数多く行われているが、RBC の流れ場中における流体力学的、電気的挙動は学術的に未だ不明な点が多い。RBC 以外の単細胞への応用展開も視野に新規手法を開発するためには RBC の諸特性に関する基礎的研究も併せて行う必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は生体単細胞とくに RBC に注目して、正常な RBC の特徴を有しない RBC だけを連続的に検出・選別する方法を開発することにある。今後の更なる高齢化に伴う病気治療頻度の増大や地球温暖化に伴う伝染病の蔓延等に備えた初期診断は必須であり、その診断には迅速、簡便、正確、低コスト、省スペースであることが要求される。現状ではこれらの要求にそぐわない試験管規模の血液を要するバッチ処理測定あるいは個々の RBC の多数標本測定が行われている。そこで、速度場を整えた流路に微量サンプルを流して特定の RBC を電気的に連続検出し、その RBC を非対称に歪曲させた電場でシームレスに分離・選別する。この斬新な RBC 検出～選別には困難を伴うが、その方法は独創的であり学術的にも極めて興味深く挑戦的な内容を有する。また、RBC 以外の単細胞に対する分離・選別を可能とする手法への応用展開できる。

3. 研究の方法

数値解析では始めに有限要素法解析ソフトウェア (COMOSOL Multiphysics) を用いて、式(1)により粒子 (または単細胞) に働く誘電泳動力を計算する。

$$F_{\text{DEP}} = 2pe_0e_f^*R^3 \text{Re} \frac{\chi_{\text{CM}}^*}{\chi_{\text{CM}}^*} \Delta E_{\text{rms}}^2 \quad (1)$$

ただし、

$$K_{\text{CM}}^* = \frac{e_p^* - e_f^*}{e_p^* + 2e_f^*} \quad \text{および} \quad e^* = e \left[1 + \frac{k}{i2pf} \right]$$

である。ここで、 E_{rms} 、 ϵ_0 、 ϵ^* 、 κ および f はそれぞれ電場強度の 2 乗平均平方根、真空の誘電率、複素誘電率、比誘電率、導電率および周波数である。下付添字の p および f はそれぞれ、粒子および流体の値であることを示す。流体ならびに粒子の物性値は実験に対応する値を適用した。ここでの解析では $K_{\text{CM}} = -0.5$ となる。

粒子運動の解析では式(1)で求まる F_{DEP} と有限体積法を用いて計算した 3 次元流れから受ける流体力を考慮して計算を行う。この時、

離散化手法として対流項には 1 次精度風上差分を、拡散項には 2 次精度中心差分を用い、圧力解法には SIMPLE を用いた。また、粒子と流体との連成解析では、Immersed-Boundary Method (境界埋め込み法) を適用した。

本実験で用いるマイクロデバイスは Polydimethylsiloxane (PDMS) 製のマイクロ流路とスパッタで製膜された Pt 薄膜電極付設ガラス基板とを密着させて製作した。このマイクロ流路の入口部では圧力駆動の送液装置を用いて、粒子を含む流体とその両側からの流体を供給することでシース流れを形成させて電極領域における粒子のスパン方向通過位置を制御した。この時の流路内の流量は 1.20mL/min であり、断面平均流速は 6.7mm/s である。送液する流体はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にラウリル硫酸ナトリウム (SLS) 0.1% を添加した溶液である。粒子運動の測定には倒立型光学顕微鏡と高速度デジタルビデオカメラを用いた。空間分解能と撮影速度はそれぞれ 1.09 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ と 250frame/s である。

実験では当初、直径 12 μm (Thermo fisher scientific, 4212A) のポリスチレン粒子を用いて検討を行った。電極に対してはファンクションジェネレータを用いて $V_{\text{pp}} = 20\text{V}$, 10MHz の交流電圧を印加した。

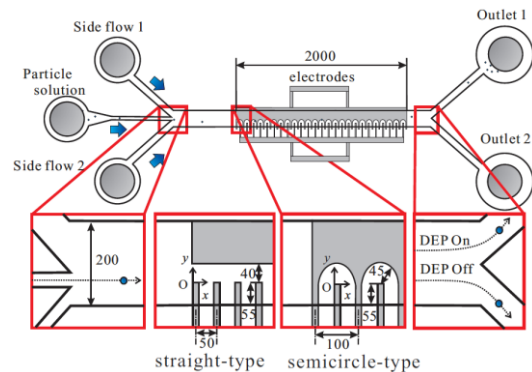


図 1: マイクロ流路と電極の概略図。

電極形状は図 1 に示す直線型電極と半円型電極を検討する。直線型電極は 40 本の楕型電極とそれに対向する直線型接地電極で構成され、楕型電極には 3 本おきに通電し、その間にある 2 本は接地する。一方、半円型電極は楕型電極とそれを取り囲む半円型接地電極で構成され、すべての楕型電極に通電する。なお、数値計算では計算負荷低減のために主流方向に周期境界条件を適用し、1 周期当たりの電極配置について検討を行う。

4. 研究成果

図 2 に流路高さ中央 ($z = 7.5\text{mm}$) における電場強度分布 E_{rms} および y 方向誘電泳動力分布 $F_{\text{DEP}, y}$ の計算結果を 2 種類の電極形状について示す。図 2(a) の直線型電極では電位を与

えた電極 ($x = 0\text{mm}$) 先端で電場強度が最も強く、電極先端から周囲の接地電極へ電気力線が広がり、電場強度が空間的に滑らかに減衰している。従って、櫛型電極先端より y 方向正の領域 ($y \geq 0\text{mm}$) で y 方向に負の電場強度勾配が支配的となり、正の誘電泳動力 ($F_{\text{DEP},y} > 0$) が得られる。しかし、電位を与えた電極先端から x 方向に拡散する電気力線は最終的に櫛型または直線型接地電極へ向かうため、電気力線の向かう方向が変化し、電場強度の極小領域が生じる。そのため櫛型電極と直線型電極の間の領域 ($0 \leq y \leq 40\text{mm}$) における電場強度勾配が正負どちらか一様にならない。

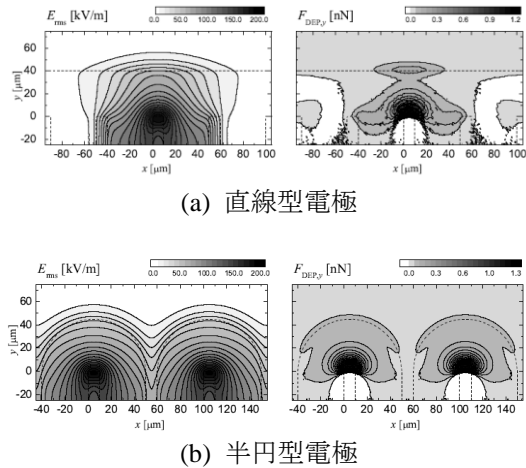


図 2：電場強度分布 E_{rms} および誘電泳動力分布 $F_{\text{DEP},y}$ ($z = 7.5\text{mm}$)。

一方、図 2(b)の半円型電極では電位を与えた電極を取り囲むように接地電極を配置したため、櫛型電極 ($x = 0, 100\text{mm}$) の先端から電場強度が半円型接地電極へ向かって等方的に減衰する。これにより、 $y > 0$ の全領域において $F_{\text{DEP},y} > 0$ となる。これに加えて半円型電極では主流方向に電極間隔も密であるため、 $F_{\text{DEP},y}$ の空間平均値も大きい。従って、直線型電極と比較して主流方向の電極領域（粒子誘導領域）長さを短くできる利点もある。

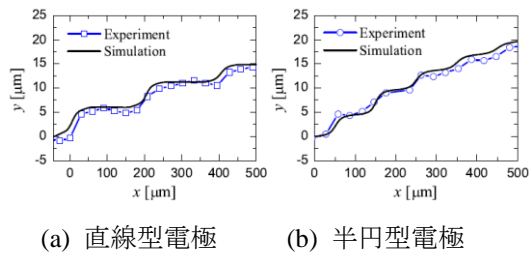


図 3：ポリスチレン粒子の運動軌跡。

図 3 に粒子運動解析の結果を太い実線で示す（同図中の口印のプロットに関しては後述する）。直線型電極および半円型電極ともに電位を与えた櫛型電極付近を粒子が通過する際、スパン方向に大きく移動する。一方、両者を比較すると半円型電極の場合の方が電位を与えた櫛型電極の間隔が密であるため、主流方向長さ当たりの粒子のスパン方向移動量は大きい。従って、粒子運動の解析結果から運動の安定性だけでなく、その性能でも半円型電極の優位性が確認できた。

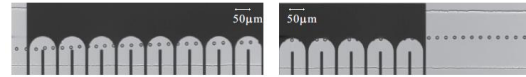


図 4：ポリスチレン粒子の連続静止画像。

実験では、電極領域入口・出口付近の粒子軌跡についても可視化した。図 4 は半円型電極の場合の粒子画像である。櫛型電極の先端付近に供給された粒子が誘電泳動力を受けてスパン方向に移動しながら下流へ流れることが確認できる。

この粒子軌跡を測定して図 3 に示した計算結果に口印の散布図として重ねて示す。実験でも各櫛型電極付近で粒子が強い誘電泳動力の作用でスパン方向に大きく移動することが分かる。また、解析と実験の結果は非常に精度よく一致し、解析手法の妥当性と精度の高さが確認できた。

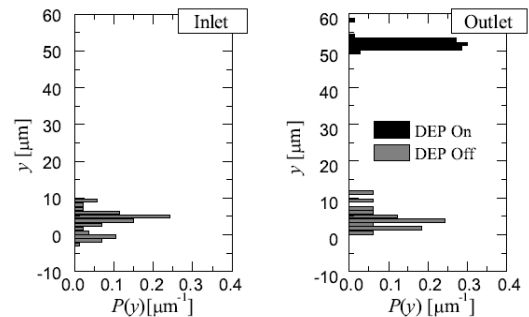


図 5：電極領域入口・出口におけるポリスチレン粒子の位置に関する確率密度関数。

図 5 に実験を行った全ての粒子について、半円型電極における電極領域入口・出口での粒子の y 方向通過位置の確率密度関数を求めた。この図から電極領域入口ではスパン方向に $10\mu\text{m}$ の分布幅を持って供給された粒子が電圧を印加しない場合にはほぼ同じ位置と幅を維持して流れるが、その一方で電圧を印加した場合には、出口でスパン方向に約 $50\mu\text{m}$ 移動して流れることが分かる。従って、本研究で開発した装置の性能として粒子を正確かつ安定的に誘導できることを示すことができた。今後、様々な単細胞に対してよ

り高精度に分離・選別できる手法を開発するための萌芽的なアプローチを達成することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- (1) Y. Rai, H. Kogame, K. Tatsumi and K. Nakabe, Reaction Characteristics of Methanol Non-Catalytic Partial Oxidation Stabilized by Ceramic Honeycomb, *Combustion Science and Technology*, Vol. 185, No. 1 (2013), pp. 1 - 16. (査読有)
- (2) 巽和也, 永坂亘, Heong Chee Leong, 中部主敬, 蛇行流路内における粘弾性流体流れの流れと伝熱特性, 日本機械学会論文集 (B編), Vol. 79, No. 797 (2013), pp. 93 - 103. (査読有)
- (3) K. Tatsumi, Y. Komori, T. Arakawa, K. Nishitani and K. Nakabe, Development of a Numerical Model for Single Red Blood Cell Motions in Stationary Fluid in the Presence of Uniform Magnetic Field, *Progress in Computational Fluid Dynamics*, Vol. 13, No. 3/4 (2013), pp. 228 - 241. (査読有)
- (4) K. Tatsumi, Y. Katsumoto, R. Fujiwara, K. Nakabe, Numerical and Experimental Study on Measurements of Red Blood Cell Deformability in Micro-Channel Using Electric Sensors, *Sensors*, Vol. 12, No. 8 (2012) 10566 - 10583. (査読有)
- (5) 頼 泰弘, 小亀秀行, 巽和也, 中部主敬, メタノール部分酸化改質反応の安定化に及ぼすセラミックハニカムの熱流動効果, 日本機械学会論文集 (B編), Vol. 78, No. 796 (2012), pp. 2142 - 2152. (査読有)
- (6) K. Tatsumi, R. Kuroki, M. Nakamura and K. Nakabe, Numerical Investigation on Fluid Flow and Heat Transfer Characteristics in a Peristaltic Micro Pump, *Progress in Computational Fluid Dynamics*, Vol. 11 (2011), pp. 160 - 168. (査読有)
- (7) K. Tatsumi, Y. Rai, Y. Niibayashi and K. Nakabe, Mixing and Combustion Performance of a Baffle-Plate-Type Miniature Confined Multi-Jet, *Journal of Fluid Science and Technology*, Vol. 6 (2011), pp. 465 - 476. (査読有)

[学会発表] (計9件)

- (1) K. Nakabe, Microchannel Flow Control, Electric Measurement, and Dielectrophoretic Manipulation to Analyze Single Cell Characteristics, *5th Conference and Exhibition of Molecular Medicine and Diagnostics*, December 2 - 4 (2012),

Guangzhou, China.

- (2) W. Nagasaka, K. Tatsumi, O. Nakajima and K. Nakabe, Flow and Heat Transfer Characteristics of Viscoelastic Fluid Flow in a Serpentine Channel - Influences of the Fluid Properties on the Performance -, *Proc. 3rd Int. Forum on Heat Transfer*, November 13 - 15 (2012), Nagasaki, Japan.
- (3) H. Kogame, Y. Rai, K. Tatsumi and K. Nakabe, Heat Transfer and Reaction Characteristics of Honeycomb-Type Methanol-Fueled Reformer, *Proc. 12th Kyoto - Seoul National - Tsinghua University Thermal Engineering Conference*, November 10 - 11 (2012), Kyoto, Japan.
- (4) K. Tatsumi, O. Nakajima, W. Nagasaka and K. Nakabe, Flow Observation and Heat Transfer Performance of Viscoelastic Fluid Flow in a Serpentine Channel, *Proc. 7th Int. Symposium on Turbulence, Heat and Mass Transfer*, September 24 - 27 (2012), Sicily, Italy.
- (5) Y. Rai, H. Kogame, K. Tatsumi and K. Nakabe, Experimental Study on a Compact Methanol-Fueled Reformer with Heat Regeneration Using Ceramic Honeycomb (3rd Report: Observation of Reaction Structure and Its Effect on Reforming Characteristics), *Heat Transfer*, June 27 - 29 (2012), Split, Croatia.
- (6) K. Nakabe, Detecting and Sorting of Difference in Deformability of Single Cell Flowing in a Microchannel, *Single Cell Analysis Congress 2012*, March 28 - 29 (2012), Edinburgh, United Kingdom.
- (7) Y. Rai, H. Kogame, K. Tatsumi and K. Nakabe, Experimental Study on a Compact Methanol-Fueled Reformer Using Ceramic Honeycomb, *Proc. 11th Kyoto - Seoul National - Tsinghua University Thermal Engineering Conference*, November 3 - 4 (2011), Jeju, Korea.
- (8) K. Tatsumi, K. Imajou, H. Shintani, Y. Katsumoto and K. Nakabe, Numerical Model for Microparticle and Lymphocyte Motions in Dielectrophoretic Manipulation Device, *Proc. 15th Int. Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS - 2011)*, October 2 - 6 (2011), Seattle, U.S.A.
- (9) K. Tatsumi, R. Kuroki, K. Nishitani, T. Arakawa and K. Nakabe, Numerical Modeling of Red Blood Cell Suspended in a Channel with Uniform Magnetic Field, *Proc. ASME - JSME - KSME Joint Fluids Engineering Conference (AJK2011)*, July 24 - 29 (2011), Hamamatsu, Japan.

〔図書〕(計3件)

- (1) 中部主敬, 伝導・対流伝熱解析のための基礎(3), 機械の研究, 4月号 (Vol. 64, No. 4) (2012), pp. 307-313, 養賢堂.
- (2) 中部主敬, 伝導・対流伝熱解析のための基礎(2), 機械の研究, 3月号 (Vol. 64, No. 3) (2012), pp. 207-212, 養賢堂.
- (3) 中部主敬, 伝導・対流伝熱解析のための基礎(1), 機械の研究, 2月号 (Vol. 64, No. 2) (2012), pp. 91-100, 養賢堂.

〔その他〕

ホームページ等

京都大学大学院工学研究科機械理工学専攻
熱材料力学研究室

<http://mtfm.me.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中部主敬 (NAKABE KAZUYOSHI)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 80164268

(2) 研究分担者

巽和也 (TATSUMI KAZUYA)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 90372854

(3) 連携研究者 なし