

## 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 3日現在

機関番号：13302

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23760150

研究課題名（和文） マイクロ流体デバイスによる連続的密度勾配遠心分離の研究

研究課題名（英文） Study on continuous density-gradient centrifugation using microfluidics

研究代表者

浮田 芳昭 (UKITA YOSHIKI)

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・助教

研究者番号：40578100

研究成果の概要（和文）：本課題では、密度勾配遠心法を連続的かつ自動的に実行する流体デバイスを開発した。遠心ディスク上に流路を形成し、この中で多層の流れを形成することに成功した。これを用いて、密度勾配遠心法を実施した結果、血液と密度媒体の界面に蛍光ビーズを選択的に濃縮しつつ、血球をこれらから分離して回収することができることが判った。この実験に於ける蛍光ビーズ除去率は100%であり、希少細胞抽出技術として有望な技術であると言える。

研究成果の概要（英文）：The new device for automated and continuous density gradient centrifugation was developed. Stable multilaminar flow was successfully patterned on a microfluidics. The device was applied to continuous mode density-gradient centrifugation to demonstrate separation of micro resin particle and blood cells. As the result, the resin beads were removed from the mixture with performance of 100 % of removal.

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	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：マイクロ流体工学

科研費の分科・細目：機械工学、流体工学

キーワード：細胞分離、マイクロフルイディクス

### 1. 研究開始当初の背景

今後実用化が期待される先進医療には、一細胞診断や再生医療等の細胞を活用するものが多く存在し、安価な装置で簡便に細胞の選別が出来る方法の開発が急務である。

### 2. 研究の目的

密度勾配遠心法は血液等からの細胞抽出に広く活用されている方法である。その方法は、遠心チューブ内にPercoll等の密度媒体とサンプルを積層し遠心する。遠心するとサンプルに懸濁した細胞が密度に応じて沈降、または上昇する。このとき、目的細胞の密度を挟み込む密度に媒体の密度を調整しておく、目的細胞がこれらの界面に濃縮出来る。

一方、液体同士をチューブ内に積み重ねる作業や密度媒体界面に濃縮したサンプルを回収する工程が極めて煩雑である点が問題である。本稿では、これらの煩雑な工程を自動化する事を目的とした、遠心型のマイクロ流体デバイスの開発について報告する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 連続密度勾配遠心法の原理

原理を示す。回転するディスク上に Fig. 1 に示すような流路を作製する。流路はディスクの円周に沿うような形をしており、入り口と出口を分岐させておく。ディスクを回転すると入り口からサンプルと密度媒体が流入し、これらが合流する事で階段状密度

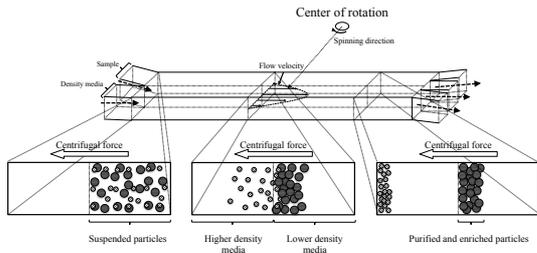


Fig. 1 Schematic illustration of continuous density gradient centrifugation.

勾配が連続的に形成される。遠心する事で細胞を分離するための重力を得る事が出来、密度勾配に応じて細胞が密度媒体界面に濃縮されると言うものである。

(2) 可視化装置の開発

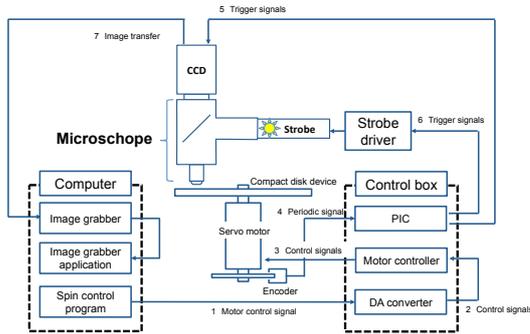


Fig. 2 Schematic illustration of micro strobe scope.

本研究を実施する上で問題となるのが、回転するディスク上での現象を如何に観察するかということである。本研究の実施にあたり、まず観察装置を独自に開発した。Fig. 2はこの装置の概略図を示している。ディスク型デバイスを取り付ける軸の角度をエンコーダーにより読み取り、ディスクが特定の角度に成った時にトリガー信号を出力する。この信号をPICマイコンにより2つのトリガー信号に分岐させ一方を数10 μs程度遅延させる。先に出したトリガーはCCDカメラの撮影開始トリガーとなり、CCDの撮影を開始する。このとき露光時間は1/15000 sであり、通常の室内では明瞭な像が得られない。後から、発信されたトリガー信号はストロボ発光信号となり CCD撮影開始後数10 μs後に発光する。今回使用したストロボの発光時間は0.8 μs程度(半値幅)である。このため、ストロボの発光中にディスクの撮影対象部位が移動する距離は数10 μm以下と成るため、撮影した瞬間の静止画像のようなスナップショットが撮影出来る。この撮影を一回転毎に行う事で、回転するCD上の同一位置の変化を一回転毎に捉える事が出来、あたかも静止している対象を観察しているかのように観察することが可能と成る。本研究では、特に観察対象がマイクロ流路内を流れる

微粒子や細胞であるため、CCDに顕微鏡を取り付けて使用出来るようにもした。

4. 研究成果

(1) 可視化装置の評価

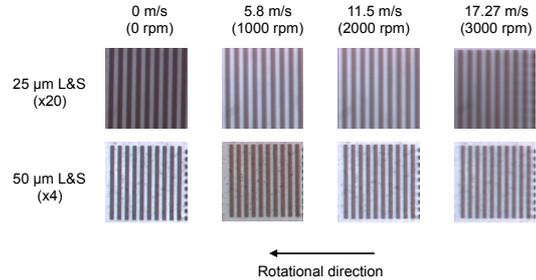


Fig. 3 Observed test patterns using microstrobe scope.

顕微ストロボスコープの評価結果について述べる。Fig. 3は顕微ストロボスコープにより撮影したテストパターンの写真である。ディスクの中心軸から55 mm離れた位置を顕微鏡を取り付けたCCDで撮影した。ディスクを静止した状態と回転させた状態を比較し、回転数は1000 ~ 3000 rpmの間で変化させた。3000 rpmに於ける観察対象の線速度は17.27 m/sであり、このスピードに於いても25 μmのラインアンドスペースの像が捉えられており、細胞の挙動を観察するのに十分な分解能を有していることが判った。さらに、ストロボの発光スペクトルが、蛍光色素の励起波長を多く含んでいる事に着目し、蛍光観察の検討を行った。

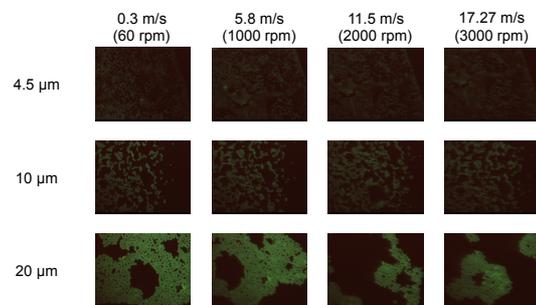


Fig. 4 Observed fluorescence microparticle using fluorescence micro stroboscope.

Fig. 4はディスク上に固定した蛍光ビーズを観察したものである。使用したビーズのサイズは4.5 μm ~ 20 μmであり、回転数は1000 rpm ~ 3000 rpmである。ビーズのサイズが小さいと蛍光強度も弱まるが、2000 rpmまでは一つ一つのビーズの形状が確認出来、細胞程度のサイズの粒子の挙動を可視化できることが判った。本技術開発に関しては現在原著論文執筆中である。

(2) 遠心フルイディクス上での多層流形成

① コリオリの力に由来する2次流れの発生と

制御

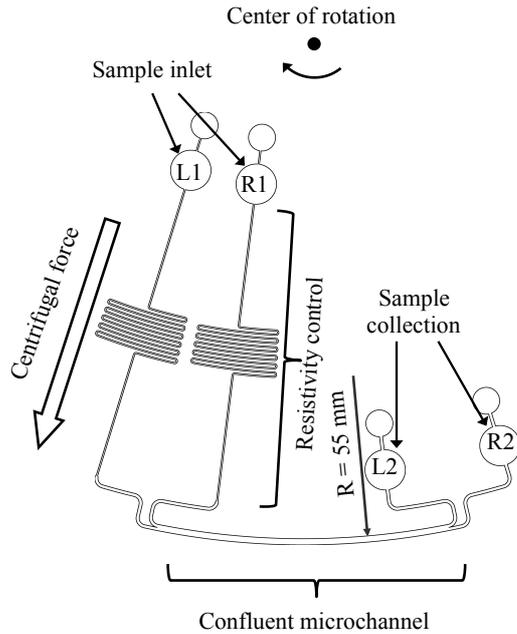


Fig. 5 Schematic illustration of microfluidic channels.

本検討では連続密度勾配遠心法の要と成る多層流の形成を検討した。検討には fig. 5 に示すような流路構造を使用した。入り口側に色の異なるインクを注入し、これを回転する事で、流路内に多層流が形成されるかをストロボスコープにより確認した。

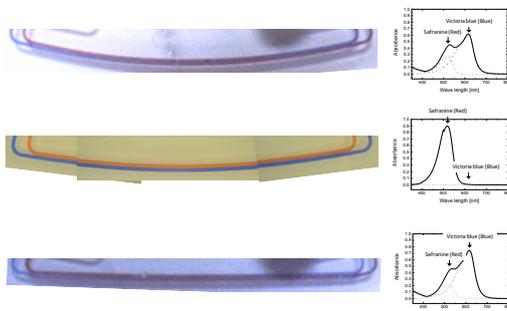


Fig. 6 Observed multilaminar flow patterns.

観察結果を Fig. 6 に示す。最上段の写真が回転中に於ける多層流パターンであり、中段は静止座標系において同じ流量のサンプルを流した結果を示している。回転数は 1500 rpm で流量は  $14 \mu\text{L/s}$  と見積もられた。回転していない座標系では色素が全く混じらずに明瞭な多層パターンを形成して流れている。典型的なマイクロ流体の挙動と言える。一方、最上段に示した写真では、入り口側では赤色の色素が内周を流れているが、流路を進むにつれてやがて界面は不明瞭になり、出口側では青色の色素が内周を流れている様子が明らかである。単なるミキシングにより色素が混じりあっている場合には色素の色

調は中間色である紫色に成るはずであるが、本実験ではそうはなっていないことに興味を持ち更に詳細に調べた。

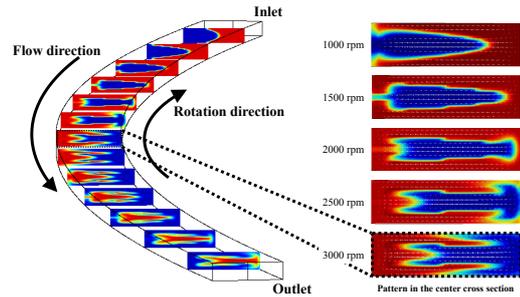


Fig. 7 Simulated secondary flow behavior.

Fig. 7 は有限要素解析により本系を再現したものである。通常ナビエーストックス式による解析に外力としてコリオリの力を適用して解析した。実験結果と同様に、入り口側と出口側とでは、色が反転する挙動が得られており、さらにこの挙動はコリオリの力に由来する2次流れが引き起こすものである事が判った。コリオリの力は回転ベクトルと物体の運動ベクトルとのベクトル積に比例する物理量であり、数値解析により回転数と2次流れパターンが相関する結果が得られていることは、これと整合する。流速条件を変更してもパターンの変化は得られなかったが、流速が速くなる事で、サンプルの滞在時間が短くなりその分2次流れがパターンを攪拌する影響が小さくなり、パターンの釣り合いが保たれるためと考えられる。一方、流速と回転数と色素の攪拌挙動との相関を実験的に確認した。

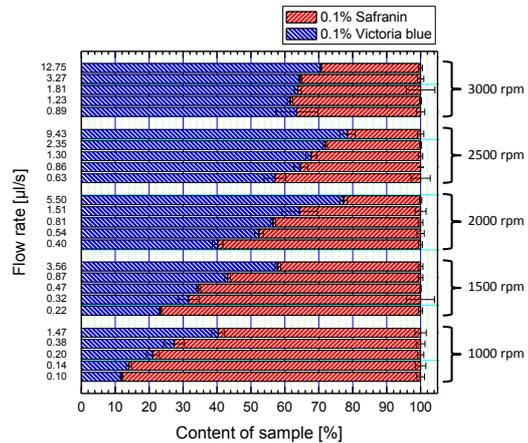


Fig. 8 Effect of spinning speed and flow rate on the magnitude of mixing.

Fig. 8 に結果を示す。回転数、及び流速共に攪拌に対して影響するファクターであることが判った。回転数の影響に関しては数値解析の結果と整合するものであると言えるが、流速依存性が生じる原因に関しては現在のところ不明である。流速を  $0.1 \mu\text{L/s}$  以下、回

転数を 1000 rpm 以下という条件では明瞭な界面が維持出来る条件である事が判った。以上の結果をまとめた原著論文は *Microfluidics and Nanofluidics* に受理されている。

### (3) 連続的密度勾配遠心法の検討

密度勾配遠心の基礎検討としてポリスチレンラテックスビーズの収束実験を実施した。事前の実験により、ポリスチレンラテックスの密度はおよそ 1.065 g/cc 程度である事がわかった。よって Percoll を 1.075 g/cc に調製し、PBS (1.01 g/cc) にポリスチレンラテックスビーズを懸濁して実験を行った。使用した流路は上記実験と同じ形状のものである。

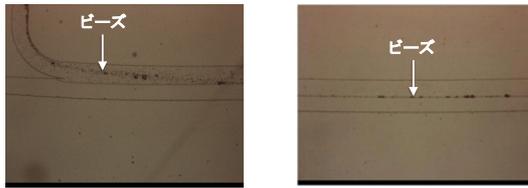


Fig. 9 Focused microparticles on the boundary of non-continuous density gradient.

結果を Fig. 9 に示す。流路の合流部ではポリスチレンラテックスビーズが溶媒中に分散している様子が確認出来るが、流路を進むにつれてビーズが界面に収束しており、密度勾配遠心法の原理が確認出来た。次に、ビーズ懸濁液と血球細胞を混合したサンプルを用いて実験を行った。血液サンプルにはニワトリ保存血を使用した。また、本実験で使用した流路では、上記実験で使用した流路の出口分岐部を 3 本に分岐する事で界面に収束した成分を選択して分離できる設計にしてある。

分離の様子を可視化したものを Fig. 10 に示す。流路合流部 (左上) に於いて、血球細胞は溶媒全体に分散している様子であるが、流路を流れて行くにつれて (左中) 遠心力により沈降し、界面を通り抜けて Percoll に侵入して行く。

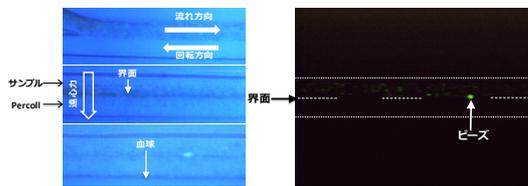


Fig. 10 Observed density gradient centrifugation.

一方、本実験を蛍光視野により観察した場合には、蛍光ビーズが Percoll 内に侵入せずに密度勾配が障壁になり血球細胞のみが Percoll に侵入していることがわかる。出口

側に回収されたサンプルをカウントして評価した結果を Fig. 11 に示す。右と示すものは分岐部最下部の流路であり、この流路へのポリスチレンビーズの流入は無いことがわかる。即ち、完全にビーズを除去出来ている。現在、以上の成果をもとに更に研究を進め、希少細胞抽出技術の開発に取り組んでいる。

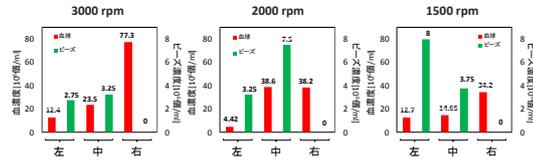


Fig. 11 Result of density-gradient centrifugation.

### 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 1 件)

1. Yoshiaki Ukita, Yuzuru Takamura, Control of secondary flow in concentrically traveling flow on centrifugal microfluidics, *Microfluidics and Nanofluidics*, 査読あり, 2013, DOI 10.1007/s10404-013-1194-9

[学会発表] (計 7 件)

1. Yoshiaki Ukita, Yuzuru Takamura, Formation of stable multilaminar flow on centrifugal microfluidic device and application to density gradient separation, International Joint Symposium on Single-Cell Analysis (The 6th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis & The 8th International Forum on Post-Genome Technologies), 2012.11.27-28, Kyoto Research Park
2. Takayuki Oguro, Yoshiaki Ukita, Yuzuru Takamura, Continuous density gradient centrifugation using a centrifugal microfluidic device, 25th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2012), 2012.10.30-11.02, Kobe Meriken Park Oriental Hotel
3. Yoshiaki Ukita, Yuzuru Takamura, Switching of secondary flow behavior on centrifugal microfluidics, The 16th International Conference on

Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012), 2012. 10. 28-11. 1 , OKINAWA,

4. Yoshiaki Ukita, Takayuki Oguro, Masaki Ishizawa, Hiroki Nose, Yuichi Utsumi, Yuzuru Takamura, Visualization of Biological Fluid Behaviour on Spinning Centrifugal Microfluidics using Coaxial Micro-Stroboscope, 38th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE2012), 2012. 9. 16-20, Toulouse France
5. 小黒 崇之, 浮田 芳昭, 高村 禪、遠心送液型マイクロ流体デバイスを用いた血球分離挙動の可視化、2012 年秋季第 73 回 応用物理学会学術講演会、2012. 9. 11-14、愛媛大学・松山大学
6. Yoshiaki Ukita, Takayuki Oguro, Yuzuru Takamura, Study on secondary flow behavior in centrifugal microfluidics, JAIST ISEN(International Seminar on Emerging Nanotechnology) 2012, 2012. 3. 28, Ishikawa
7. 浮田 芳昭, 小黒 崇之, 高村 禪、遠心送液型マイクロフルイディスク内の 2 次流れ挙動、2012 年春季第 59 回応用物理学関係連合講演会、2012. 03. 15-18、早稲田大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：送液方法

発明者：浮田芳昭, 小黒崇之, 高村禪

権利者：国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学

種類：出願

番号：特願 2012-119476

出願年月日：2012 年 9 月 11 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浮田 芳昭 (UKITA YOSHIAKI)

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・助教  
研究者番号：40578100