

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02739

研究課題名（和文）粒子の液液分配を用いた高速細胞分離法の開発

研究課題名（英文）High-throughput cell sorting system using particle liquid-liquid partition

研究代表者

福山 真央（Fukuyama, Mao）

東北大学・多元物質科学研究所・講師

研究者番号：40754429

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自然乳化を利用したマイクロ水滴内イムノアッセイを確立した。1つ目の手法として、自然乳化による無機塩濃縮を利用し、ナノ粒子の界面へ集積化することで、サンドイッチイムノアッセイを確立した。また、2つ目の手法として、自然乳化による小分子の選択的分離を利用し、競合イムノアッセイを確立した。この手法では、1液滴中で細胞複数個からの分泌物について半定量的な検出が可能になった。

また、本研究を通じ、Span 80により自然乳化が起こる要因が分かった。Span 80の逆ミセルでは、小さいほど水の化学ポテンシャルが低くなり、その化学ポテンシャル差が自然乳化を駆動することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、自然乳化を利用したマイクロ水滴内イムノアッセイを確立した。特に、粒子を用いた手法では自然乳化による定量的濃縮操作を利用することで、マイクロ流体デバイスを用いることなくBF分離を実現できる可能性がある。本手法により、今後、細胞分泌物のハイスループットな検出とそれに基づく細胞分離が可能になると期待する。

また、Span 80を用いた自然乳化メカニズムを明らかにした。自然乳化は外力不要乳化法であり、エマルションのみならずナノ粒子やドラッグキャリアなどの材料合成にも応用されている。本成果を通じ、自然乳化を起こしうる新たな界面活性剤のデザインが可能になり、産業応用の拡大につながると期待する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established immunoassay methods in aqueous microdroplets using spontaneous emulsification. The first method is a sandwich immunoassay utilizing inorganic salt enrichment by spontaneous emulsification and accumulation at the interface of the nanoparticles. The second method, competitive immunoassay, was established using selective separation of small molecules by spontaneous emulsification. This technique enabled the semiquantitative detection of secretions from multiple cells in a single droplet.

In addition, through this study, we found the factors that cause spontaneous emulsification by Span 80: the smaller the Span 80 reverse micelle, the lower the chemical potential of water, and the difference in chemical potential drives spontaneous emulsification.

研究分野：分析化学

キーワード：自然乳化 逆ミセル マイクロ流体 ナノ粒子 イムノアッセイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、臨床検査や再生医療の観点より、様々な細胞分離法が報告されている。高選択性・高速な細胞分離法として FACS (fluorescence-activated cell sorting) と MACS (magnetic cell sorting) が広く普及している。造血幹細胞や血中循環腫瘍細胞(CTC)など 10^6 個の細胞中に 1 細胞しかないような希少細胞の検出に威力を発揮している。しかし、従来の FACS、MACS は細胞表面を蛍光/磁性粒子付抗体で標識しなければならず、細胞へダメージを与えてしまう(A. Kumar *et al. Biomed. Mater.* 2008)。

細胞へのダメージ低減する方法として、近年、細胞を 10-100 μm サイズの油中水滴(マイクロ水滴)に包接し、細胞分泌物をマーカーとする FACS が報告された (Griffith *et al. Nature Protocols*, 2013)。しかし、FACS ではマイクロ流体中での高シアストレスや水滴の崩壊を避けるため 10^3 - 10^4 個/s 程度の分離速度が限界だった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞分泌物検出・細胞分離の高速化を両立するため、マイクロ流体中でマイクロ水滴に細胞を包摂し、バルクスケールの溶液操作のみで細胞分泌物検出と細胞分離をおこなう技術の開発を目的とした。

本目的を達成するために、自然乳化を利用することを着想した。自然乳化は外力を必要としない乳化現象であり、例えば水-Span 80-有機相の系では 10-1000 μm サイズの水滴(ナノ水滴)が自発的に生成する。これまで、我々は自然乳化を利用しマイクロ水滴内包物の選択的濃縮・分離法を報告してきた (Fukuyama *et al. Anal. Chem.* 2015, *Anal. Chem.* 2017)。また、これらの手法を利用して、マイクロ水滴内で結合抗体/未結合抗体の分離 (BF 分離) が可能になり、イムノアッセイ法を報告した (特許第 6842168 号)。本研究では、これらの知見を踏まえ、自然乳化利用したマイクロ水滴内イムノアッセイにより、バルクスケールの溶液操作のみでの細胞分泌物検出・細胞分離が可能になる手法の確立を目指した。特に、高スループットな細胞分離が可能な MACS と組み合わせることを想定し、ターゲット物質の有無によってマイクロ水滴内の「ナノ粒子の量・形」などが変化するようなイムノアッセイ法の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではマイクロ流体デバイス中に 100-200 μm サイズのマイクロ水滴のアレイを作製し、画像解析より水滴界面での物質輸送を定量的に評価した。マイクロ流路内は、レイノルズ数が低く、安定な層流を形成する。そのため、マイクロ水滴界面への界面活性剤の供給フラックスやせん断力を再現性良く一定に保つことができる。また、マイクロ水滴は高い比表面積を持ち、ナノ粒子の微量の相間移動も感度よく測定することができる。以上の利点より、自然乳化における溶質・水の輸送を定量的な解析が可能となる。この特性を生かし、マイクロ水滴内でイムノアッセイを実現するために必要な流体力学的条件や、試薬の選択指標について検討した。

4. 研究成果

(1) Span 80 による自然乳化のメカニズム解明

自然乳化とは、外力を加えることなく自発的に進行する乳化現象であり、19 世紀より報告がある。これまでに様々な定性的メカニズムが報告されているが、未だ謎の多い現象であり今日でも界面化学分野では研究が続けられている。我々はマイクロ水滴-Span 80-アルカン系で自然乳化では、Span 80 逆ミセルとマイクロ水滴中の水の活量差が自然乳化を駆動することを明らかにしていた。本研究では、この知見を基に定量的濃縮操作が可能であること、更に BF 分離が可能であることを示した。また、マイクロ水滴止めのあるマイクロ流体デバイスを作製することで、濃縮の高速化を実証した。

更に、Span 80 で自然乳化が起こる要因を明らかにした。他の脂溶性界面活性剤 (例えば Brij O2 など) と異なり、Span 80 では逆ミセルが水で膨潤し大きくなるほど内部の水の化学ポテンシャルが高くなることが実験的に示唆された。これにより逆ミセルとマイクロ水滴中の水の活量差が生まれ、自然乳化が起こることが分かった。さらにシミュレーション結果より、逆ミセル中の Span 80 の水素結合の安定性が寄与していることが示唆された。

(2) 自然乳化が誘起するナノ粒子の界面吸着を用いたマイクロ水滴内イムノアッセイ実証

最初に、MACS による水滴分離を可能にするために、ナノ粒子の分配を利用したサンドイッチイムノアッセイ法を着想した。本手法では、抗体付ナノ粒子を利用し、分析対象分子とナノ粒子のイムノコンプレックスを形成する。その後自然乳化により、フリーのナノ粒子とイムノコンプレックスを組んだナノ粒子を分離することを考えた。実際、自然乳化中におけるポリスチレンナノ粒子の分配を確認したところ、25-100 nm サイズのナノ粒子がナノ水滴に分配し、500 nm のナノ粒子はマイクロ水滴にとどまることが分かった。しかし、ナノ粒子の分配挙動は、界面活性剤導入の最初期に起こるマランゴニ流などの界面擾乱に大きく依存し、流体条件がよく再現するマイクロ流路内においても制御が困難であることが分かった。

以上を踏まえ、ナノ粒子の吸着を利用したイムノアッセイ法を着想した(図1)。本手法では、自然乳化による無機塩の定量的な濃縮を利用する。マイクロ水滴内に試薬として、蛍光標識抗体と粒子結合抗体を封入する。自然乳化による無機塩の濃縮により、粒子-粒子間および粒子-界面間の斥力が低下するため、粒子はマイクロ水滴界面に吸着する。その際、ターゲット分子が存在する場合は界面に蛍光が局在化する一方で、ターゲット分子が不在の場合はマイクロ水滴全体に蛍光が分布すると考えた。

本イムノアッセイ法を実証するために、ポリスチレンナノ粒子を用いて粒子サイズの影響を検討した。粒子サイズが100 nm 以上の場合粒子は凝集体を形成し、界面に均一に吸着しないことが分かった。一方、50 nm 以下の場合、コンセプト通りナノ粒子がマイクロ水滴界面に均一に吸着することが分かった。この知見を踏まえ、25 nm のポリスチレンナノ粒子を用いて本イムノアッセイ法を実証した(図2)。水滴外周の蛍光強と水滴中心の蛍光強度の比を計測することで、アトモレベルのタンパク質の検出が可能となった。

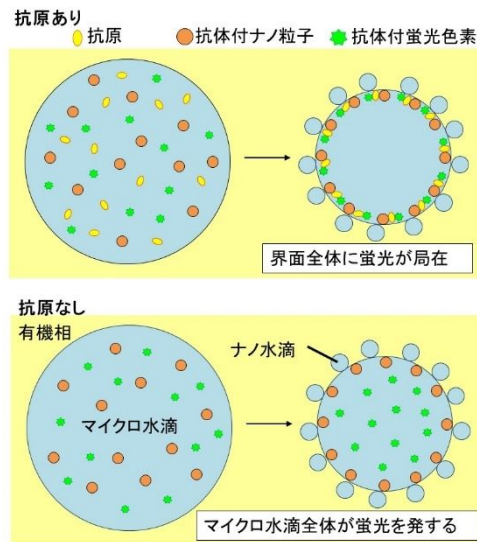


図1 自然乳化による粒子吸着を利用したマイクロ水滴内イムノアッセイ

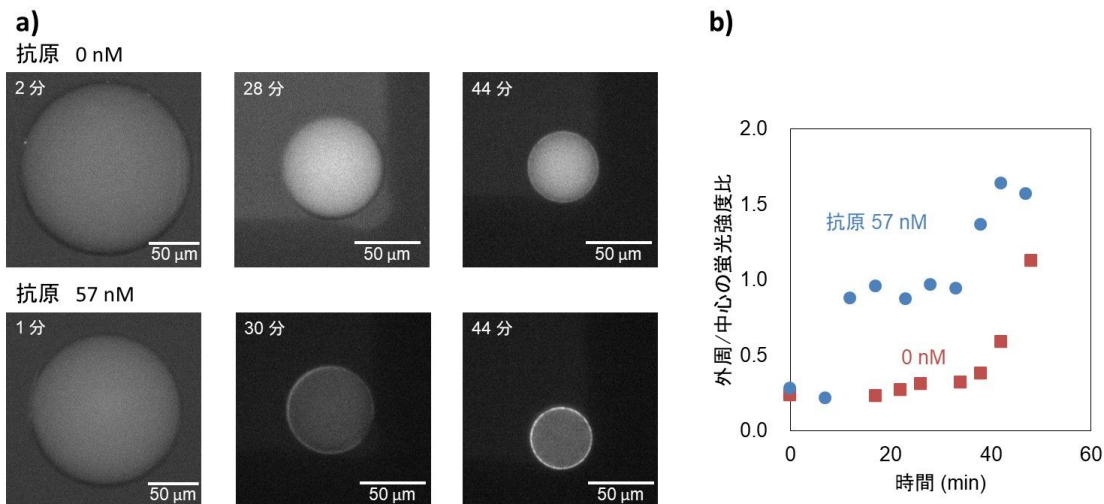


図2 自然乳化中のマイクロ水滴の蛍光の時間変化。

(a) マイクロ水滴の蛍光顕微画像。(b)水滴外周の蛍光強と水滴中心の蛍光強度の比の時間変化

本手法のBF分離は粒子の界面吸着によって達成される。その制御因子となる塩強度は、自然乳化を起こす際の逆ミセルの活量で決まるため、マイクロ流体操作は不要である。本イムノアッセイ法では、BF分離をバルクの溶液操作のみで行うことができる。そのため、本手法は高スループットな水滴イムノアッセイに向けた基盤技術になると期待する。今後、本手法のMACSへの応用の検討が望まれる。

(3)競合イムノアッセイを用いたマイクロ水滴内での細胞分泌物のイムノアッセイの実証

上記イムノアッセイ法では、塩強度を2M程度まで上昇させる必要があるため、細胞を生かしたまま分析することは困難だった。自然乳化を用いたマイクロ水滴内イムノアッセイによる細胞分泌物の実証として、本研究では競合イムノアッセイを試みた。

まず、イムノアッセイの検討に先立ち、マイクロ水滴からナノ水滴への水のフラックスがない

条件における、マイクロ水滴内溶質分子のナノ水滴への分配挙動を、オリゴペプチドを用いて検討した。その結果、分子によってはナノ水滴への水フラックスがないとナノ水滴へと分配しない場合があることが分かった。これまで、Span 80 の自然乳化におけるマイクロ水滴-ナノ水滴間の溶質の分配はナノ水滴内の水の活量で決まると考えられていたが (Fukuyama *et al. Anal. Chem.* 2017)、本研究より、水の輸送に伴う溶質輸送があることが初めて明らかになった。

以上の溶質輸送の特性を踏まえ、小分子を分析対象物質とした競合イムノアッセイを検討した。プロスタグランジン E2 (PGE2) を例として本手法の実証を行った。本手法では、試薬として蛍光標識 PGE2 と抗 PGE2 抗体をマイクロ水滴内に封入した。逆ミセル内の水の活量を、生理食塩水と同等に調整することで、塩強度を上昇させることなくフリーの蛍光標識 PGE2 をナノ水滴へと分配することができた。本手法を用いて、マウス肺がん由来の 3LL 細胞からの PGE2 の分泌を検出することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukuyama Mao, Zhou Lin, Okada Tetsuo, Simonova Kristina V., Proskurnin Mikhail, Hibara Akihide	4. 巻 1149
2. 論文標題 Controlling water transport between micelles and aqueous microdroplets during sample enrichment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 338212 ~ 338212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2021.338212	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 該当する
1. 著者名 Fukuyama Mao, Suto Makoto, Hibara Akihide	4. 巻 37
2. 論文標題 Transport of Oligopeptide from Aqueous Phase to Span 80 Reverse Micelles in Microdroplet Array	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 753 ~ 758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20SCP18	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 -
1. 著者名 Fukuyama Mao, Kubota Kotone, Hibara Akihide	4. 巻 -
2. 論文標題 Nanoparticle Assembly at the Water-Oil Interface Induced by Spontaneous Emulsification for Microdroplet Immunoassay	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.3c00723	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 -
1. 著者名 Piangrawee Santivongskul, Mao Fukuyama, Akihide Hibara	4. 巻 -
2. 論文標題 Fast Droplet Enrichment Using Spontaneous Emulsification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, microTAS 2020	6. 最初と最後の頁 72 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 福山真央
2. 発表標題 水・ミセル間分子輸送の理解と微量生化学分析への応用
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mao Fukuyama
2. 発表標題 Micelle manipulation for biochemical microanalyses using microdroplets
3. 学会等名 The 2020 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2020)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福山真央
2. 発表標題 界面物理化学を利用した微量試料前処理操作の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福山真央
2. 発表標題 ナノ・マイクロサイズの分析化学 ～微小現象の理解に向けて～
3. 学会等名 第8回 V-iClinix講座セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Piangrawee Santivongskul, Mao Fukuyama, Akihide Hibara
2. 発表標題 FAST DROPLET ENRICHMENT USING SPONTANEOUS EMULSIFICATION
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福山 真央, 火原 彰秀
2. 発表標題 水相-逆ミセル間の物質輸送の定量的評価とマイクロ濃縮・精製操作への応用
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福山 真央, 火原 彰秀
2. 発表標題 水相-ミセル間分子移動を利用したマイクロ水滴内イムノアッセイ法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第80回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福山真央、火原彰秀
2. 発表標題 DropIet microfluidicsを用いたLLPS高速アッセイ法の展望
3. 学会等名 第4回LLPS研究会・ASUKA若手交流会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 窪田 琴音, 福山 真央, 火原 彰秀
2. 発表標題 マイクロ水滴を用いた水相-逆ミセル間のナノ粒子分配挙動解析 マイクロ水滴を用いた水相-逆ミセル間のナノ粒子分配挙動解析
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 真季, 福山 真央, 須藤 誠, 火原 彰秀
2. 発表標題 マイクロ水滴内小分子イムノアッセイのための水相-逆ミセル間有機小分子輸送解析
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会 2021年3月19日
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
研究 分担 者	白木 賢太郎 (Shiraki Kentaro) (90334797)	筑波大学・数理物質系・教授 (12102)	

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
---------	---------