

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23585

研究課題名（和文）マイクロピラーアレイを用いた単一細胞包埋ゲル微粒子の連続生成

研究課題名（英文）Continuous generation of single-cell-laden microgels using micro pillar arrays

研究代表者

鳥取 直友（Tottori, Naotomo）

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） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、支柱配列マイクロ流路を用いた、単一細胞内包液滴の生成と分離、および細胞包埋ゲル微粒子の連続生成試験を行った。マイクロ流路で生成した液滴を支柱配列流路へと導入し細胞内包液滴と未内包液滴が分離される様子を確認した。また、支柱配列流路に形成した各種反応・処理溶液の並行流に対して、細胞内包液滴を斜行・横断させることにより、連続的にゲル化および溶液置換を行い、サテライト滴が除去されたサイズの均一な球状の細胞包埋ゲル微粒子を水溶液に分散した状態で得られることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のマイクロ流路を用いた単一細胞包埋ゲル微粒子の作製手法では、単一細胞の包埋効率は低く、また、ゲル微粒子の作製工程において、煩雑なバッチ式作業による、粒子洗浄・溶液置換が必要であるといった課題がある。対して本研究は、単一細胞包埋ゲル微粒子を迅速、簡便かつ高効率に作製可能な手法の確立を目指す、前例のない研究であり、提案するプロセス技術は、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 demonstrated separation of single-cell-encapsulated droplets, and continuous generation of cell-laden microgels using micropillar arrays. Water-in-oil droplets containing cells were produced in a microchannel and subsequently introduced into the micropillar arrays to separate cell-encapsulated droplets from empty droplets. In addition, spherical cell-laden microgel particles dispersed in aqueous phase without satellite droplets were obtained by transporting precursor main droplets across the streams of the reaction solution and washing aqueous solution using micropillar arrays.

研究分野：マイクロ流体デバイス

キーワード：マイクロナノデバイス ゲル微粒子 粒子分離

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内において細胞は、3次元的に周囲の環境と相互作用しながら存在するため、2次元平板上で培養された細胞特性と異なることが知られている。そのため、細胞を3次元培養し、生体内の環境を生体外にて適切に再現する技術が必要とされる。例えば、細胞凝集体(スフェロイド)の形成や、バルクハイドロゲル材料への細胞包埋による、3次元培養手法があるが、内部構造・配列の制御は難しく、各細胞の環境が不均質になるといった課題がある。

一方、マイクロ流路を用いて、細胞を直径100 μm 程度のゲル微粒子やファイバーに包埋し、3次元培養する手法が近年多く報告されている。本手法を用い、微小空間に細胞を包埋することで、各細胞間での環境を均質化できるほか、3次元的な微細環境の物理・化学的性質も精密に制御できる。特に、単一細胞のゲル微粒子への包埋により、従来困難であった単一細胞レベルでの培養、細胞解析、および組織構築が可能になり、医学・生物学などの基礎研究、創薬、再生医療用途等、幅広い分野において有用な基盤技術になると期待されている。

その一方で、マイクロ流路による単一細胞のゲル微粒子への包埋効率は、ポアソン分布により確率的に定まるため低く、各種分析効率や、組織構築における空間分解能の低下が生じている。また、ゲル微粒子を作製後、煩雑なバッチ式作業にて粒子の洗浄、溶液置換が行われるため、処理工程での粒子損失・細胞への負荷といった課題もある。細胞包埋粒子の純度を高める方法には、フローサイトメーターを用いて細胞包埋粒子を分離する手法や、細胞表面への架橋剤修飾による選択的ゲル化誘導法があるが、複雑な操作や細胞への前処理が必要といった短所がある。

2. 研究の目的

本研究では、支柱配列を用いた粒子軌道制御法を応用し、単一細胞包埋ゲル微粒子を迅速、簡便かつ高効率に作製可能な新規プロセス技術を確立する。また、得られた細胞包埋ゲル微粒子の状態を観察し、作製プロセスが細胞に与える影響を評価する。

近年、単一細胞包埋ゲル微粒子の様々な分野への応用が期待されているが、確固たる作製プロセスは未確立である。対して、本研究は、申請者がこれまで報告してきた粒子軌道制御法を応用、発展させ、単一細胞包埋ゲル微粒子を迅速、簡便かつ高効率に作製可能な手法の確立を目指す研究である。

3. 研究の方法

マイクロ流路デバイスの設計・作製

マイクロ流路デバイスは、十字型マイクロ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内に各種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した(図1)。十字型マイクロ流路は、連続相供給流路(幅100 μm)、分散相供給流路(幅100 μm)、およびドレイン流路(幅200 μm)から構成され、流路高さは100 μm 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)100 μm 、支柱間距離(d)80 μm 、支柱のずれ率($\Delta d/d$)0.1とし、分離直径(D_c)を37 μm 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レジストを用いて作製した微小凸型をシリコン樹脂(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1.2mm)を開けた後、PDMS片とPDMSを塗布した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。

単一細胞内包滴の生成と分離

上記マイクロ流路を用いて、単一細胞内包滴の生成と分離を行った。分散相には、アルギン酸ナトリウム(Na-alginate)水溶液に、モデル細胞としてヒトMCF-7細胞を添加したものを、連続相には、コーン油に界面活性剤を添加したものをを用いた。まず、分散相と連続相の流量を変化させ、十字型マイクロ流路で生成される細胞内包滴と未内包滴のサイズの変化を評価した。次に、液滴生成部の下流域に接続した支柱配列流路へと生成液滴を導入し、細胞内包滴と未内包滴の分離を試みた。

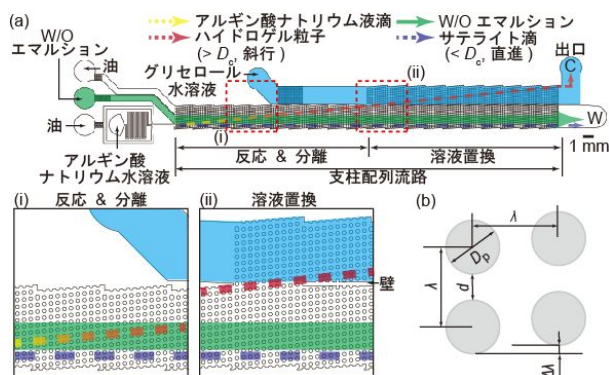


図1(a)細胞包埋ゲル微粒子生成用マイクロ流路デバイスの概念図。破線の四角は拡大部を表す。(b)支柱配列のパラメータ。

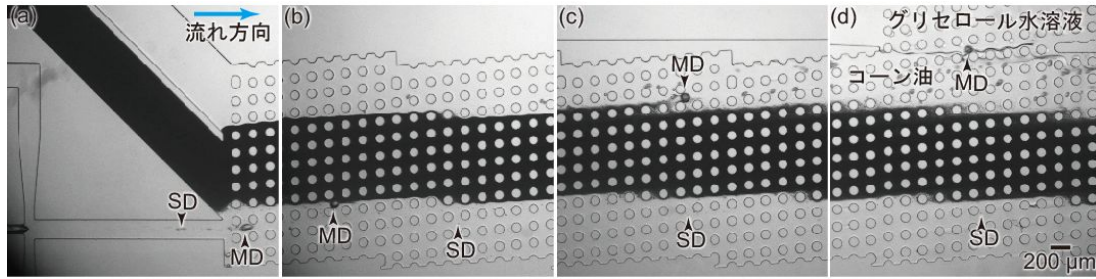


図 2 支柱配列流路を用いた細胞包埋ゲル微粒子の連続生成の様子。

支柱配列流路を用いた細胞包埋ゲル微粒子の作製

上記マイクロ流路を用いて、細胞内包ゲル微粒子の作製を行った。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ヒト MCF-7 細胞を添加したものを、連続相には、コーン油を用いた。ゲル化反応溶液には、界面活性剤を添加したコーン油と塩化カルシウム水溶液をホモジナイザーにより攪拌することで調製した油中水型 (W/O) エマルションを用いた。置換溶液にはグリセロール水溶液を用意した。各種溶液を支柱配列流路へと導入し、十字型流路で生成した細胞内包滴に各溶液流内を斜行・横断させ、細胞包埋ゲル微粒子の生成および溶液置換を試みた。また、細胞包埋ゲル微粒子を回収し、ゲル微粒子の状態を評価した。

4. 研究成果

単一細胞内包滴の生成と分離

連続相と分散相の流量を適切な領域に設定した際、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。生成した液滴が支柱配列流路へと流入すると、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、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。

支柱配列流路を用いた細胞包埋ゲル微粒子の作製

連続相と分散相の流量を適切な領域に設定すると、十字型マイクロ流路において均一サイズの液滴が規則正しい周期で生成される様子が確認された。また、主滴 (Main droplet: MD) が生成される際、副生成物としてサテライト滴 (Satellite droplet: SD) が生成される様子も確認された (図 2a)。連続相流量 (Q_c) と分散相流量 (Q_d) をそれぞれ 4.0 ml/h と 0.005 ml/h に設定した際、液滴生成流路で生成された主滴 ($\sim 100 \mu\text{m}$) とサテライト滴 (最大径、 $\sim 30 \mu\text{m}$) 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 (図 2a)、主滴 ($> D_c$) 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 2b)。主滴は、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 (図 2c)、コーン油とグリセロール水溶液の界面に突入する様子が確認された (図 2d)。主滴は、油水界面を通過後、支柱配列の傾きに沿って斜行し、連続相が油相から水相に置換され、流れ方向に対して左側の出口から回収された (図 3)。主滴は、油水界面を通過し、連続相が油相から水相に置換された後も形状を維持していたことから、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 (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できた。一方で、副生成物であるサテライト滴 ($< D_c$) は、支柱配列流路内を流れ方向へと進み (図 2)、主滴から分離された後、流れ方向に対して右側の出口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回収された細胞包埋ゲル微粒子の形状を観察したところ、概ね円形であることが確認された (図 4)。ゲル微粒子の真円度および粒度分布を測定したところ、真円度は 0.9、平均直径は $103 \mu\text{m}$ 、変動係数は 3.6% であり、十分に単分散な細胞包埋ゲル微粒子であることが確認された (図 4)。

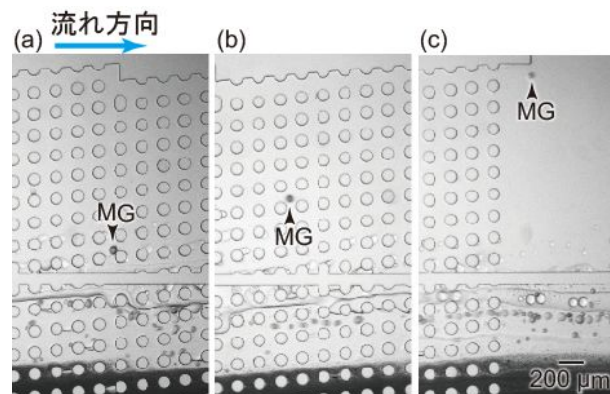


図 3 細胞包埋ゲル微粒子の溶液置換と回収の様子。

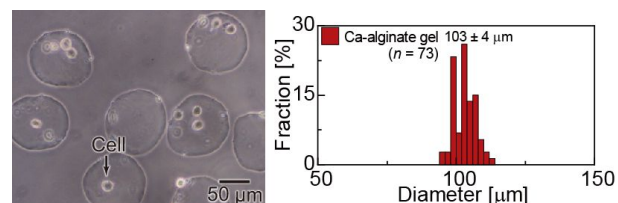


図 4 生成した細胞包埋ゲル微粒子とサイズ分布。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Naotomo Tottori, Yasuhiko Muramoto, Hiraku Sakai, and Takasi Nisisako	4. 巻 53
2. 論文標題 Nanoparticle Separation through Deterministic Lateral Displacement Arrays in Poly(dimethylsiloxane)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN	6. 最初と最後の頁 414 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1252/jcej.19we160	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 Naotomo Tottori, and Takasi Nisisako	4. 巻 20
2. 論文標題 Particle/cell separation using sheath-free deterministic lateral displacement arrays with inertially focused single straight input	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 1999 ~ 2008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0lc00354a	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 Naotomo Tottori, and Takasi Nisisako	4. 巻 11
2. 論文標題 Editorial for the Special Issue on Particles Separation in Microfluidic Devices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 602 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11060602	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Guangchong Ji, Naotomo Tottori, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 Lactic acid bacteria of different shapes flowing through deterministic lateral displacement microarrays
3. 学会等名 The 18th International Conference on Precision Engineering (ICPE2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naotomo Tottori, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 Continuous generation of cell-laden microgels through deterministic lateral displacement arrays
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Guangchong Ji, Naotomo Tottori, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 Deterministic lateral displacement separation of lactic acid bacteria from yogurt sample after vortexing
3. 学会等名 2020年度精密工学会春季大会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥取直友, 西迫貴志
2. 発表標題 マイクロピラーアレイを用いたアルギン酸カルシウムゲル粒子の連続生成
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Guangchong Ji, Naotomo Tottori, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 Isolation of lactic acid bacteria from yogurt using a deterministic lateral displacement array
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Guangchong Ji, Naotomo Tottori, and Takasi Nisisako
2. 発表標題 Separation of lactic acid bacteria from yogurt through deterministic lateral displacement micropillar arrays
3. 学会等名 2019年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥取直友, 西迫貴志
2. 発表標題 DLDマイクロピラーアレイを用いたハイドロゲル微粒子の生成と溶液置換
3. 学会等名 2019年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鳥取直友, 西迫貴志 (分担執筆)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 599
3. 書名 フロー合成、連続生産のプロセス設計、条件設定と応用事例	

〔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