

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 A

研究期間：2008～2011

課題番号：20241031

研究課題名（和文）水力学的手法によるマイクロ・ナノ構造体の高速連続分離原理の確立

研究課題名（英文） Investigation of Rapid and Continuous Separation Principle for Micro/Nano Structures Using Hydrodynamic Methods

研究代表者

関 実 (SEKI MINORU)

千葉大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80206622

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイクロ・ナノ流体デバイスと呼ばれる微小な流路構造を利用して、大きさや形状などが揃ったサブミクロンから数十ミクロン程度の微粒子・細胞・液滴・気泡・高分子等を、水力学的に混合物から連続かつ高速に分離・分級するための新しい原理（PFF法およびHDF法）を提案し、そのメカニズムと適用範囲を明確すると同時に、これらの手法を適用した種々の分離システムを実証した。これらの成果は、医学・生物学・化学などの基礎研究のみならず、医療・化学産業・電子工業などの産業分野での応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：Novel hydrodynamic separation/classification principles using micro/nano-fluidic devices (PFF and HDF) were proposed for collecting uniform micro/nano structures such as particles, biological cells, droplets, bubbles, or supra-molecules with the diameter from sub-micron to several tens of microns. In this study, the mechanisms of the proposed separation schemes and the limit of application were investigated and clarified. And also, various separation systems using PFF or HDF methods were examined. Future applications in various basic studies and industrial fields are expected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1800000	540000	2340000
2009年度	810000	243000	1053000
2010年度	890000	267000	1157000
2011年度	370000	111000	481000
年度			
総計	3870000	1161000	5031000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：ナノマイクロ科学・マイクロナノデバイス

キーワード：分離工学，微粒子分級，流体素子，セルソーター，マイクロ流体工学，血液分析

1. 研究開始当初の背景

(1) PFF法

研究代表者らは、マイクロ・ナノ流体デバイスを利用した新規な微粒子分級手法として、ピンチド・フロー・フラクショネーション法

（Pinched Flow Fractionation：PFF法と略す）を提案した（Anal. Chem., 76, 5465 (2004)）。PFF法では、マイクロ流路に粒子を含む流体 A と組成は同じで粒子を含まない流体 B を導入する。流体 B の流量が流体 A

に比べて十分に大きいと、層流条件では、粒子は合流部において、マイクロ流路の側壁に整列し、粒子の大きさに依存して、その中心位置にわずかな差が生じる。この差は下流の流路拡大部で増幅し、粒子をその大きさに従って分離・分取するのが PFF 法の原理である。この方法では、粒子を懸濁した流体をマイクロスケールの単純な構造の流路に導入するという簡便な操作だけで、その大きさに従って、連続的に分離することが可能で、原理的に分離性能が流速の影響を受け難いことがその特徴である。

(2) HDF 法

その後、研究代表者らは、同様にマイクロ・ナノ流体デバイスを利用した新規な微粒子分級手法として、水力学的ろ過法 (Hydrodynamic Filtration: HDF 法と略す) を提案し (Lab Chip, 5, 1233 (2005)), さらに、改良を加えた HDF 法 (Anal. Chem., 78, 1357 (2006)) も発表した。HDF 法では、壁近傍には粒子 (の中心) が存在しないことを利用して、最初の分岐点で、粒子懸濁液から溶媒のみ抜き出し、バイパス流路を経て、下流で合流させる。その後、第二の分岐点で溶媒のみ抜き出すと、粒子は流路側壁に整列する。その後、さらに下流の分岐点で、少しずつ液を抜き出す流量を増やして行き、大きさに従って粒子を濃縮・分取するのが HDF 法の原理である。HDF 法の特徴は、簡単な操作で微粒子・液滴などを高速かつ連続的に分離・濃縮可能なことであり、入口が一つで流速に依存しないため、精密な流量制御が必要ないことである。

(3) 国内外の研究状況と研究の意義

マイクロ・ナノ流体デバイスを用いて、微粒子・液滴等の微小物体を精密に分離・分級するための方法として、FFF, HDC, Optical manipulation, Acoustic manipulation, Dielectrophoresis, Deterministic lateral displacement, Gravity-driven separation など、国内外で多くの提案がなされていたが、外力を加えることなく精密な連続分離が可能で、簡単な構造で高速 (高処理量) 操作の可能性がある方法としては、研究代表者らの提案した密接に関連した 2 手法 (PFF 法と HDF 法) は類例のない優れたものであり、その分離原理と適用限界を評価がすることが、学問的な意義も高く、本手法ならびに類似の分離手法の開発に必須で、波及効果も大きいものと考えられた。

2. 研究の目的

そこで、本研究の具体的な目的は、以下の 4 点とした。

(1) PFF 法と HDF 法の分離精度、分離速度を支配する要因を解析し、そのメカニズムを明らかにすること (例えば、ドリフト効果や

ブラウン運動の影響の評価など)。

(2) 両分離手法において適用可能な粒子や液滴等の種類や大きさ・形状、分離効率に影響を与える因子などを明らかにすること (例えば、ナノ粒子、非球形粒子、非水溶媒中、高分子物質の分離など)。

(3) 両分離手法を応用した種々の操作によってその有効性を実証すること (例えば、存在頻度の低い細胞の分離濃縮など)。

(4) 両分離手法と他の分離手法を組み合わせ、簡便でありながら高度な分離が可能となる手法を開発すること。

3. 研究の方法

(1) マイクロ PIV 法により流れを可視化し、粒子運動を 3 次元的に計測することにより、PFF 法と HDF 法の分離精度、分離速度を支配する要因を解析し、それらの分離のメカニズムを明らかにする。

(2) 適用可能な構造体の種類や大きさ・形状、分離効率に影響を与える因子などを明らかにする。特に、ナノ粒子、高分子物質などナノ構造体の分離可能性を検討する。

(3) 存在頻度の低い細胞の分離濃縮などに適用して有効性を実証する。

(4) アフィニティー分離等の他の分離手法と組み合わせ、簡便でありながら高度な分離が可能となる手法を開発する。

4. 研究成果

(1) PFF 法と HDF 法の両手法とも、層流系の流れに乗った対流移動とブラウン運動による流れの直角方向への遷移のバランスが分離精度を決める重要な因子であり、PFF では分離に有効な時間という概念が提起できることを明らかにした。このことは、粒子の分離精度は、ペクレ数 (Pe) によって整理され、一定の Pe の下では、小さい粒子ほど飛躍的に高速な分離を必要とすることを意味しており、このことが小さい方の分離限界を規定することを明らかにした (学会発表⑧)。一方、HDF 法では、多段化によって PFF 法より精度の高い分離を実現しているが、これには、流れによる押しつけ (ブラウン運動やドリフト効果のリセット) が重要となり、粒子の位置を一定に保つことの有効性も示されている (学会②)。

(2) 数百 nm~数十 μm 程度の大きさ (学会⑧)、球形および長円形 (論文⑥, 学会③⑨) などの種々の形状、変形しないポリマー粒子から細胞 (論文④)・液滴 (論文⑥)・ベシクル (論文③)・気泡 (学会⑧) のような柔らかい粒子、DNA のような高分子 (学会④) など、広範な微小構造物に対して、本手法が適用可能であることを明らかにしてきた。特に、非球形の物体の分離には、壁面近傍での物体の回転が重要な役割を果たすことを

MicroPIV 法によって明らかにし、回転を促進あるいは抑制する構造によって、構造物（粒子）の短径あるいは長径による分離を制御することが可能であることが明確になってきた（学会②③）。

(3) HDF を応用した全血からの血漿分離、白血球と赤血球の分離（論文④）、白血球のサイズ分離、肝組織からの実質細胞の分離、酵母のセルサイクルに依存した分離（論文⑥）が可能であることを明らかにしたほか、存在確率の低い種々の細胞の分離濃縮が可能であることを明らかにしてきた。また、細胞に対する短時間化学処理による細胞毒性評価（論文⑨）や細胞核の単離（論文①）、粒子のフォーカシング（論文⑦）、気泡（学会⑥）や液滴（論文②）の濃縮による分離操作などが可能であることも明らかにしてきた。

(4) PFF 法と遠心力の組み合わせにより、粒子の大きさに依存した分離が可能であることを示した。この場合、デバイスの回転による遠心力だけでなく（学会⑩）、カーブした流路による密度差分離（論文⑤、特許①）も可能であることを明らかにしてきた。また、PFF 法と磁気分離法（MACS）の組み合わせにより、細胞の大きさ、表面抗原の有無に基づく 2 次元分離（特許②）が可能であることも明らかにしてきた。

(5) 今後の課題

100nm 程度あるいはそれ以下の粒子や構造物（ソフトマター）の対象とするには、高速分離が必要であり、安定で比較的高速な層流を実現する必要がある。一方、処理量を上げるには、流路の数を増やすことも必要である。結果として、ナノスケールの丈夫で精密な構造を簡便に大量安価に作製することは、今後の課題の一つとなる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、連携研究者に下線）

〔雑誌論文〕（計 19 件）

- ① K. Toyama, M. Yamada, M. Seki, Isolation of Cell Nuclei in Microchannels by Short-term Chemical Treatment via Two-Step Carrier Medium Exchange, *Biomedical Microdevices*, 査読有, 14, in press (2012). DOI: 10.1007/s10544-012-9653-8
- ② T. Moritani, M. Yamada, M. Seki, Generation of Uniform-Size Droplets by Multistep Hydrodynamic Droplet Division in Microfluidic Circuits, *Microfluidics and Nanofluidics*, 査読有, 11, 601-610 (2012). DOI: 10.1007/s10404-011-0826-1
- ③ M. Masubuchi, T. Toyota, M. Yamada, M. Seki, Fluidic Shear-Assisted Formation of Actuating Multilamellar Lipid Tubes Using

Microfabricated Nozzle Array Device *Chemical Communications*, 査読有, 47, 8433-8455 (2012).

DOI: 10.1039/c1cc11510c

- ④ M. Matsuda, M. Yamada, M. Seki, Blood Cell Classification Utilizing Hydrodynamic Filtration, *Electronics and Communications in Japan.*, 査読有, 94, 1-6 (2011).

DOI: 10.1002/ecj.10281

- ⑤ T. Morijiri, S. Sunahiro, M. Senaha, M. Yamada, M. Seki, Sedimentation Pinched-flow Fractionation for Size- and Density-based Particle Sorting in Microchannels, *Microfluidics and Nanofluidics*, 査読有, 11, 105-110 (2011).

DOI: 10.1007/s10404-011-0785-6

- ⑥ S. Sugaya, M. Yamada and M. Seki, Observation of Non-spherical Particle Behaviors for Continuous Shape-based Separation Using Hydrodynamic Filtration, *Biomicrofluidics*, 査読有, 5, 024103 (13 pages) (2011).

DOI: 10.1063/1.3580757

- ⑦ R. Aoki, M. Yamada, M. Yasuda and M. Seki, In-channel Focusing of Flowing Microparticles Utilizing Hydrodynamic Filtration, *Microfluidics and Nanofluidics*, 査読有, 6, 571-576 (2009).

DOI: 10.1007/s10404-008-0334-0

- ⑧ H. Maenaka, M. Yamada, M. Yasuda, M. Seki, Continuous and Size-Dependent Sorting of Emulsion Droplets Using Hydrodynamics in Pinched Microchannel, *Langmuir*, 査読有, 24, 4405-4410 (2008).

DOI: 10.1021/la703581j

- ⑨ M. Yamada, J. Kobayashi, M. Yamato, M. Seki, T. Okano, Millisecond Treatment of Cells Using Microfluidic Devices via Two-Step Carrier-Medium Exchange, *Lab Chip*, 査読有, 8, 772-778 (2008).

DOI: 10.1039/b718281c

- ⑩ T. Kawamata, M. Yamada, M. Yasuda, M. Seki, Continuous and Precise Particle Separation by Electroosmotic Flow Control in Microfluidic Devices, *Electrophoresis*, 査読有, 29, 1423-1430 (2008).

DOI: 10.1002/elps.200700658

〔学会発表〕（計 101 件）

- ① 関 実（研究賞受賞記念講演），マイクロ流体システムにおける微量操作と分離法に関する研究，化学工学会第 77 年会，Mar. 14-17, 2012, 東京。
- ② M. Yamada, M. Seki (Invited)

- Microfluidics and Microfabrication Technology for Highly Precise Cell Manipulation and Cultivation, 2011 Intl. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (IEEE-MHS2011), Nov. 6-9, 2011, Nagoya, Japan.
- ③ A. Tamura, S. Sugaya, M. Yamada, M. Seki, Tilted-Branch Hydrodynamic Filtration for Length-dependent Sorting of Rod-like Particles, 15th Intl. Conf. on Miniaturized Systems for Chem. and Life Sci. (MicroTAS2011), Oct. 2-6, 2011, Seattle, USA..
- ④ M. Yamada, M. Seki (Invited), Continuous Microfluidic Processes for Cell Manipulation, Separation, and Cultivation Systems, The 11th Intl. Symp. on Microchem. and Microsys. (ISMM2011), Jun. 2-4, 2011, Seoul, Korea.
- ⑤ M. Seki (Invited), M. Yamada, Continuous and Rapid Separation of Soft Matters Using Microfluidic Systems, Pacificchem 2010, Dec. 15-20, 2010, Honolulu, Hawaii, USA.
- ⑥ A. Kobayashi, M. Yamada, M. Seki, Bubble-based Continuous Separation System in Microfluidic Device, MicroTAS2010, Oct. 3-7, 2010, Groningen, The Netherlands.
- ⑦ M. Senaha, R. Mitamura, M. Yamada, M. Seki, Two-dimensional Cell Sorting Device Employing Pinched-flow Fractionation and Magnetophoresis, MicroTAS2010, Oct. 3-7, 2010, Groningen, The Netherlands.
- ⑧ M. Seki (Invited), Continuous and Rapid Separation of Micro/Nano-Structures Using Microfluidic Systems, 13th Annual European Conf. on Micro & Nanoscale Technol. for the Biosci. (NanoBioTech-Montreux 2009), Nov. 16-18, 2009, Montreux, Switzerland.
- ⑨ S. Sugaya, M. Yamada, M. Seki, Visualizing Non-spherical Particle Behaviors for Continuous Shape-based Separation Using Hydrodynamic Filtration, MicroTAS2009, Nov. 1-5, 2009, Jeju Island, Korea.
- ⑩ S. Sunahiro, M. Senaha, M. Yamada, M. Seki, Pinched Flow Fractionation Device for Size- and Density-Dependent Separation of Particles Utilizing Centrifugal Pumping, MicroTAS2008, Oct.12-16,2008, San Diego, USA.

[図書] (計 3 件)

- ① 関 実 (分担)「イムノアッセイチップ」, in 「バイオチップ実用化ハンドブック」 (監修 金子周一, 堀池靖浩), NTS, 2010 年, pp.537-543 (610 頁)
- ② 関 実 (分担)「粒子ハンドリング」, in 「マイクロ・ナノ化学チップと医療・環境・バイオ分析」 (監修 北森武彦), 技術教育出版 (NTS), 2009 年, pp.62-78 (459 頁)
- ③ 関 実 (分担), 「マイクロ・ナノ流体デバイスを用いた細胞分離」, in 「細胞分離・操作技術の最前線」 (監修 福田敏男・新井史人), シーエムシー, 2008 年, pp.66-76 (387 頁)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

- ①名称: エルトリエータ用マイクロ流路システムおよび粒子分離方法
 発明者: 関 実, 山田真澄, 森尻智樹, 疋田敏勝
 権利者: 千葉大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-223564
 出願年月日: 2010 年 10 月 1 日
 国内外の別: 国内
- ②名称: 連続的 2 次元粒子分離装置および粒子分離方法
 発明者: 関 実, 山田真澄, 瀬名波 匡, 三田村龍典
 権利者: 千葉大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2010-223550
 出願年月日: 2010 年 10 月 1 日
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb01/Research/content-separation.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 実 (SEKI MINORU)
 千葉大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号: 8 0 2 0 6 6 2 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

串田正人 (KUSHIDA MASATO)
 千葉大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号: 7 0 1 7 7 9 8 9
 山田真澄 (YAMADA MASUMI)
 千葉大学・大学院工学研究科・特任准教授
 研究者番号: 3 0 5 4 6 7 8 4