

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20710103
 研究課題名（和文）PDMS単一キャスト構造による三次元シースフロー型ゲルソーターの開発
 研究課題名（英文）Development of a micro cell sorter with thermal gelation polymer solution on a 3D focusing PDMS chip which fabricated using one step 3D casting technique
 研究代表者
 白崎 善隆 (Shirasaki Yoshitaka)
 独立行政法人理化学研究所・免疫ゲノミクス研究グループ・基礎科学特別研究員
 研究者番号：70469948

研究成果の概要（和文）：本研究においては、PDMSの3次元一括キャスト法を開発し、マイクロ流路および試薬をチップに直接充填するためのリザーバー構造を簡便に構築することに成功した。また、試料溶液をシースフローによって3次元的に絞り込むことが可能な多段鋳型構造を開発した。開発したマイクロチップを哺乳類細胞の分離で評価した。結果、検出された細胞を100%分離率、99%の純度で分離することが可能となった。

研究成果の概要（英文）：In this research, 3D casting method to fabricate the 3D focusing microchannel and reservoirs in one time has been developed. The 3D focusing microchannel with the multi deck structure which enables to cast in one time has also been developed. The newly developed cell sorting microchip was evaluated with mammalian cells, and the recovery ratio and purity was improved to 100% and over 99% respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

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：PDMS、3次元シースフロー、マイクロセルソーター

1. 研究開始当初の背景

再生医工学や免疫学、生化学の研究において、フローサイトメーターやセルソーターの果たす役割は非常に大きい。特に蛍光を指標としたフローサイトメーター/セルソーター（FACS：Fluorescence-activated cell sorter, Bonner et.al., Review of Scientific Instruments, 1972）は汎用性・感度、分析速度、また分離精度において他の技法より優れている。しかしながら、既存のFACSシステムには、溶液系統の洗浄再生を行わなければならないという欠点が挙げられる。近年、細胞を扱う研究において、クロスコンタミネーションは重要な課題として取り上げられるようになり（Rhitu et.al., Science 2007）、これは幹細胞や臨床検体を取り扱う上でも同様である。特にFACSは価格・大きさの兼ね合いで他の動物細胞の実験と共通で使われることが多く、現行ではキャピラリーなどの溶液系周辺を細心の注意を払い、重点的に洗浄を行うことでクロスコンタミネーションの問題に対応している。また、扱う試料が感染性などの場合、大型の陰圧ブースをFACSシステムの周りに設置しなければならない。

このような課題を解決する手段として、マイクロチップを用いたセルソーターシステム（ μ FACS）の開発が近年盛んになっている。 μ FACSでは測定・分離部などの溶液系が一枚のディスプレイチップに組み込まれており、前述したクロスコンタミネーションの問題を根本的に解決することが可能である。 μ FACSは半導体微細加工技術を応用したマイクロ流体システムを基軸に発展しており、多数の研究グループから様々な細胞分離の手法が報告されている（Dittrich et. al., Anal. Chem., 2006）。

申請者はこれまで温度感受性ハイドロゲルを用いた μ FACS（ゲルソーター）の開発を行ってきた（Shirasaki et. al., IEEE JSTQE, 2007, Shirasaki et. al., Anal. Chem., 2006）。ゲルソーターは特別な機構をチップに組み込むのではなく、温めると溶液自体がゲル化し、冷やすと元の液体に戻るハイドロゲル（昇温型温度感受性ハイドロゲル）を細胞培養液に添加し、マイクロチップに細胞分散液を流しながら、赤外レーザーによる局所加熱でゾルゲル制御することでバルブとして機能させることが特徴である。温度感受性ハイドロゲルとしては、3次元培養担体として利用されているMebiol Gel（ポリnイソプロピルアクリルアミド-ポリエチレングリコール共重合体、メビオール株式会社）を用いており、細胞毒性等のないハイドロゲルを用いている。すでにこのゲルソーターによって、蛍光ビーズや大腸菌などの $1\mu\text{m}$ 程度の大きさの細胞を分離することに成功しており、

哺乳類細胞などの $10\sim 20\mu\text{m}$ の粒子も分離可能であることを確認している。

2. 研究の目的

本研究では、これまで申請者が開発してきたゲルソーターを細胞分離に特化させ、試料溶液の導入や送液の調整を極限に簡素化したシステムの構築を目指す。さらに既存のFACSに近い精度の検出を可能とする。従来までの申請者の研究では既存のFACSで用いられているような試料溶液を中央に配した3次元シースフローの形成は出来ていない。また、試料溶液の他にシース液を用意し、独立に制御する必要があるという点で、既存のFACSと同様に操作の煩雑性を有している。そこで、本研究ではPDMS（polydimethylsiloxane）単一キャスト加工及び3次元シースフロー形成を可能とする流路構造の開発を目指す。さらに、試料溶液である細胞分散液から溶液のみを抽出・再合流させることによってシースフロー形成を可能とする流路構造の開発を目指す。最終目標は、既存のFACSと同等の検出精度を有し、且つ、マイクロチップに試料溶液を注入してセットするだけで検出及び分離が可能な簡易高精度 μ FACSシステムを構築し、単一細胞解析などの最先端技術と組み合わせることで、免疫学における先端解析研究へと発展させることである。

3. 研究の方法

① PDMS単一キャスト加工法の開発

従来、PDMSを用いたマイクロ流路チップは転写したマイクロ流路に貫通穴を追加加工することで接続ポートを作製しているものが多い。この場合、マイクロ流路に目視によって位置を合わせて穴を開ける必要があり、加工が煩雑であった。これを改善するために、図1にあるようにリザーバー形状のPEEK製鋳型を用意し、マイクロ流路鋳型に対して独立にバネにより押し付けた状態でPDMSを重合させた。鋳型同士の相対位置は位置決めピンにより高精度に一致させている。この方法によってマイクロ流路、リザーバー、貫通穴を一括して形成することに成功した。図2に実際に作製した μ FACSチップの写真を示す。チップの厚さは 11mm 程度であり、上面4箇所それぞれのリザーバーには $150\mu\text{L}$ 程度の溶液を充填することが出来る。

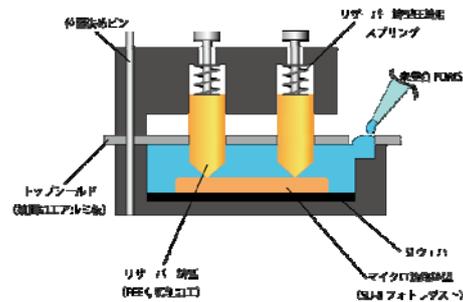


図1. PDMS単一キャスト加工の模式図

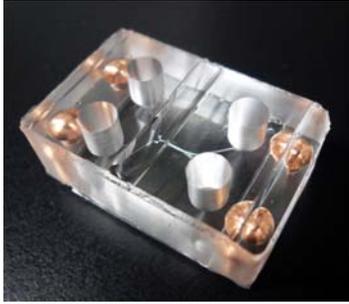


図 2. 単一キャスト加工で作製したマイクロチップ

② 単一キャスト可能な 3 次元シースフロー形成を可能とする流路構造の開発
 サンプル流を流路断面中央に収束させるためにはサンプル流を上下左右方向からキャリア流で挟む必要がある。本研究ではこのサンプル流の絞り込みを単一キャスト可能な片面多段構造によって実現することを目指した。そのため、絞り込みを 2 回に分け、1 回目で上左右方向から絞り込みを行い、2 回目で下左右方向から絞り込みを行う。その後、所望の高さまで流路を変形させることで 3 次元シースフローが形成される (図 3)。上記を達成するために実際の流路の形状を設計した (図 4)。赤部分の高さは 100 μm 、青部分の高さは 50 μm 、緑部分の高さは 5 μm である。特に第 1 フォーカスおよび第 2 フォーカスにおける青、緑部分の流路の幅、長さは流路抵抗を計算し、第 1 フォーカス : 第 2 フォーカス = 1 : 1.5 の流量比になるようにした。また、回収 : 廃棄の流路抵抗は流量比 1 : 2 になるように調整した。これらの設計に基づき、SU-8 3005、3050 (化薬マイクロケム株式会社) を用いて 3 段階のフォトリソグラフィを行い、図 5 中央に示す鋳型構造を作製した。この鋳型から PDMS に転写し、カバーガラスにより蓋をすることでマイクロ流路とした。作製したマイクロ流路にサンプルとして蛍光色素溶液を、キャリアとして純水を流し、共焦点顕微鏡 (Leica) によって観察した。各地点における流路断面図を図 5 左右に示したが、上左右方向の絞り込みの後、下左右方向の絞り込みが良好に行われることを確認した。次に試料溶液として直径 2 μm の蛍光ビーズを用いて絞り込みの有無による流速分布の変化を検討した。測定は絞り込み後の流路 2 カ所の蛍光強度を光電子増倍管で測定し、2 地点間を通過した時間差分から線速度を計算した。図 6 には最大速度からの線速度差 Δv に対するビーズの頻度をヒストグラムで示した。結果、シースフローによる絞り込みを行うことで流速分布が狭くなり、これまで問題であった流速差による回収率および純度の低下が改善することが期待された。

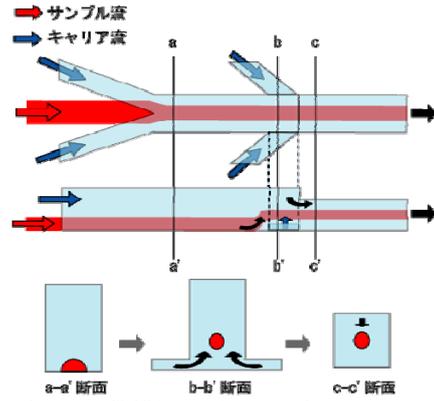


図 3. 片面多段構造による 3 次元シースフロー形成の模式図

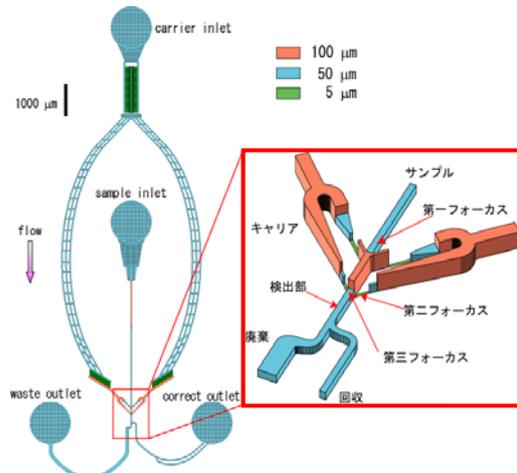


図 4. 3 次元シースフロー形成構造を組み込んだ μ FACS チップの概図

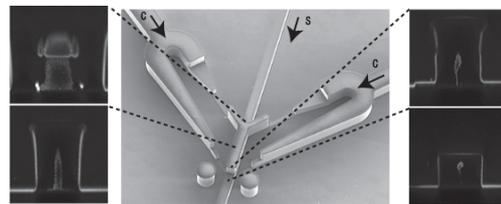


図 5. 流路鋳型の 3 次元シースフロー形成部の SEM と転写した PDMS チップに蛍光溶液をサンプルとして流した時の共焦点顕微鏡画像 (流路断面)

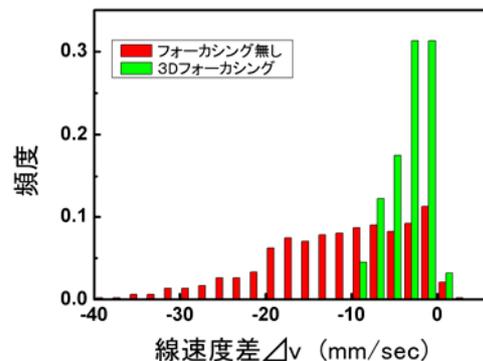


図 6. 3 次元シースフローの有無による $\Phi 2 \mu\text{m}$ 蛍光ビーズの線速度差の頻度ヒストグラム

③ 3次元シースフロー形成流路を用いた μ FACS (ゲルソーター) の性能評価

上記に示すように開発された3次元シースフロー形成流路を用いてセルソーティングの性能を評価した。評価には免疫細胞への応用を見越し、Tリンパ球様株化細胞であるJarkat細胞を用いた。Tリンパ球様細胞をCalceinAM試薬にて染色し、 $10^6/\text{mL}$ 程度の濃度になるようにMebiol Gel (32°C転移、7.5wt、RPMI1640培地に溶解)に懸濁した。キャリア溶液には同様にMebiol Gel (32°C転移、7.5wt、RPMI1640培地中)を用いた。図7にセルソーティングの概図を示す。個々の細胞から発せられる蛍光は分岐上流で光電子増倍管により測定されている。試料溶液は分岐後の流路の抵抗差により廃棄側へと導入されている。予め設定されている閾値を越える細胞が検出されると廃棄側分岐流路入口に1,480 nmの赤外レーザーを照射し、局所的に溶液を加熱する。この加熱に応じて溶液に含まれるMebiol Gelが相転移を起こしてゲル化する。すると試料溶液の流れは回収側へ導入されるようになり、検出された細胞は回収側へと流れ込む。赤外レーザーの照射を停止すると速やかに温度は低下し、ゲル化していたMebiol Gelも速やかに液化して定常の流れに復帰する。図7の下の写真はNormal state、sorting stateにおける蛍光標識された細胞の流れる輝線を捉えた顕微鏡写真である。分離性能の評価をするに当たり、分岐上流に設置した光電子増倍管とは別に回収側分岐入口にもう一台光電子増倍管を設置した。これにより、回収された細胞の個数をリアルタイムに検出することが可能となる。分岐上流および回収側分岐の光電子増倍管からのシグナルを解析し、表1にそれぞれの分離条件における分離率および分離後の純度を測定した。結果、赤外レーザーの出力(レーザーのファイバ出力端での値)が1.3 mWのときに2.4 ms以上の時間赤外レーザーの照射を行うことで検出した細胞を100%の割合で分離することが可能となった。参考までに試料溶液を2次元方向に挟みこんだ層流で分離を行った際の分離率は85~90%であり、3次元シースフローにより大幅に改善したことがわかる。また、廃棄する細胞と回収する細胞の流れる速度差が最小化されたため、分離時に間違っって混入する細胞の数も大幅に改善し、分離後の純度は99%以上とすることができた。

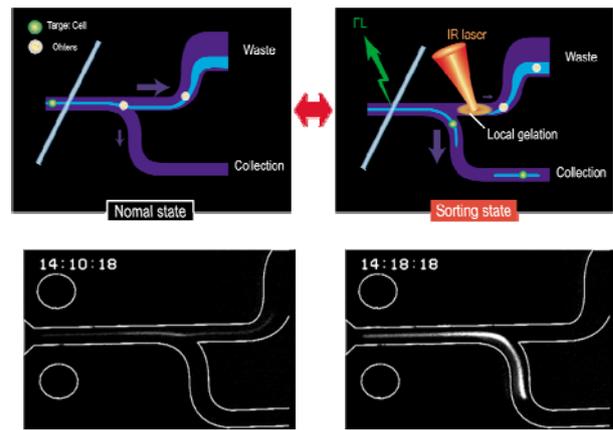


図7. 温度感受性ハイドロゲルを用いたセルソーティングの概図(上)と分離時の顕微鏡写真(下)

表1. 赤外レーザーの照射条件と分離性能評価

IR laser irradiation		Gated cells	Sorting speed (cells/s)	Recovery	Purity
Duration (ms)	Power (W)				
1.2	2.4	100 %	0.75	91 %	-
1.2	2.6	100 %	0.95	96 %	-
2.4	1.3	100 %	0.87	100 %	-
4.8	1.3	100 %	0.92	100 %	-
4.8	1.3	45 %	1.3	100 %	100 %
4.8	1.3	50 %	2.4	100 %	99 %

4. 研究成果

本研究によって、片面多段構造を用いた単一キャスティング工程により作製されたPDMSマイクロ流路を用いることで3次元シースフローの形成に成功し、100%の分離率と99%以上の純度での細胞分離を可能とすることができた。本研究では高感度蛍光顕微鏡上にシステムを構築しており、開口数0.75の対物レンズを用いて高感度に検出を行うことができた。本研究が達成したオンチップ細胞分離技術はマウスなどのモデル小動物を扱うことが多い免疫学等の研究において、非常に微量の試料溶液を余すことなく解析、分離出来る先端技術としての需要を満たすことが可能である。一方で研究目標として掲げていた細胞分散液から溶液のみを抽出・再合流させる機構を組み込むまでには至らなかった。本研究を完成させるためには、今後流体力学的手法による細胞の分離 (M. Yamada *et al.*, *Lab Chip*, 2008, 8, 772 – 778)などを参考にさらなる研究の推進が必要とされる。

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 2 件)

① Integration in a multilayer microfluidic chip of 8 parallel cell sorters with flow control by sol-gel transition of thermo-reversible gelation polymer, Sugino H, Arakawa T, Nara Y, Shirasaki Y, Ozaki K, Shoji S, Funatsu T, *Lab Chip*, in Press, 2010, 査読有り

② On-chip microfluidic sorting with fluorescence spectrum detection and multiway separation., Sugino H, Ozaki K, Shirasaki Y, Arakawa T, Shoji S, Funatsu T, *Lab Chip*, **9**(9): 1254-60, 2009, 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

① 白崎 善隆、オンチップ生体分子ソーターの開発、日本薬学会第 130 回年会、2010 年 3 月 30 日、岡山大学津島キャンパス

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 三次元シースフロー形成構造及び微粒子集束方法

発明者: 庄子習一、水野潤、後藤峰生、加藤友也、篠原秀敏、船津高志、荒川貴博、小原 収、白崎善隆

権利者: 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所、学校法人早稲田大学

種類: 特願

番号: 2009-135665

出願年月日: 平成 21 年 6 月 5 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白崎 善隆 (Shirasaki Yoshitaka)

独立行政法人理化学研究所・免疫ゲノミクス研究グループ・基礎科学特別研究員

研究者番号: 70469948