

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21100

研究課題名（和文）低侵襲出生前診断を革新する統合型細胞プロセッシングデバイスの実証

研究課題名（英文）Demonstration of an integrated cell processing device that revolutionizes minimally invasive prenatal diagnosis

研究代表者

関 実（SEKI, Minoru）

千葉大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：80206622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：母体血中にわずかに存在する「胎児由来有核赤血球（NRBC）」を利用した新型出生前診断を革新するための基盤技術の開発を目指し、「確度が高く」「低侵襲で」「操作が自動化され」「その場での迅速診断を可能とする」、システムの実現を目標とした検討を行った。そのために、極めて少数しか存在しない細胞を「濃縮・選抜」し、「多段階の化学処理による染色体の可視化」し、「光学的解析のために捕捉」するという一連の操作を、それぞれ高効率に実現するマイクロ流体システムを提案し、それらの性能を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児の染色体異常を、迅速かつ正確に検出するための「出生前診断技術」のニーズが飛躍的に高まっているが、母体血中にわずかに存在するNRBCを利用した診断手法は未だ発展の途上にある。NRBCのような極めて希少な細胞を診断に用いるためには、選抜から検出に至る一連の操作の効率を劇的に向上させる必要がある。そのような技術開発にチャレンジすることによって、最終的には出生前診断技術に革新をもたらす知見が得られるものと期待された。

研究成果の概要（英文）：We have developed microfluidic technologies that can potentially innovate the prenatal diagnosis using fetal-derived nucleated red blood cells (NRBCs). We attempted to realize new systems that are highly accurate, minimally invasive, automated, and rapid processing of cells. For this purpose, we proposed several types of microfluidic systems that can efficiently perform a series of operations such as "enrichment and selection," "visualization of intracellular molecules by multi-step chemical treatment," and "capture for optical analysis" of cells that exist only in extremely small numbers, and evaluated their performances.

研究分野：生物化学工学

キーワード：マイクロ流体デバイス 医療診断 細胞分離 染色 出生前診断

1. 研究開始当初の背景

女性の社会進出拡大による晩婚化・出産年齢の高齢化によって、近年、ダウン症候群に代表される胎児の染色体異常を、迅速かつ正確に検出するための「出生前診断技術」のニーズが高まりつつある。通常の羊水検査による出生前診断に代わる技術が求められており、最近では次世代 DNA シーケンサー (NGS) を用いた母体血中の胎児由来 DNA の解析による低侵襲診断も実用化されつつあるが、コストと時間がかかること、また、確定診断に至らない場合があること、などの課題もある。

一方で、侵襲性の低い確定型の出生前診断において長らく注目されてきた細胞として、母体血中にわずかに存在する「胎児由来有核赤血球 (NRBC)」が挙げられる。NRBC は胎児由来の遺伝情報を有しているため、母体血から効率的 NRBC を回収し、NRBC を濃縮あるいは選抜した上で、さらにその内部に存在する染色体を標識することによって、確定診断が可能になるものと期待されてきた。しかしながら、NRBC を効率的に選抜し回収する技術は未だ開発の途上にある。その理由としてまず、NRBC の存在割合が非常に低いことが挙げられる。NRBC を選抜するためには、周囲に大量に存在する赤血球を除去した上で、有核細胞中の NRBC を濃縮する必要があるが、そのための手法は限定的であった。また、NRBC を選抜した後に、非接着性の NRBC の内部に存在する染色体を効率的に標識するプロセスが必要となるが、通常の遠心分離による溶液交換プロセスは非常に煩雑であり、また操作中に NRBC をロスしてしまう確率が高い。

そのような背景のもと、近年、マイクロ流体デバイスを用いた細胞の分離・選抜装置が多数報告されてきた。本研究代表者のグループにおいても、純粋な流れの効果に基づいてマイクロ流路の内部において細胞を分離するための「水力学的濾過」手法に基づく分離システム (Lab Chip 2019 など) や、非対称に配置された格子状流路構造を用いた血球の分離装置 (Lab Chip 2017 など) の開発を行ってきた。これらのシステムを用いることで、NRBC のような希少細胞であっても、比較的簡便な操作で、かつ効率的に濃縮できるのではないかと考えた。さらに、マイクロ流体デバイスの内部において、複数回の溶液交換システムを組み込むことで、細胞内分子を染色するシステムの開発も行った (Anal Chem 2020)。このシステムにおいては、細胞を染色するための染色液が比較的少量に必要となるという欠点はあるものの、自動的な操作によって細胞内分子の可視化を行えることを示した。これらのデバイス・システムに代表されるような新規技術を駆使し応用することで、NRBC の濃縮・処理・標識における基盤技術となるのではないかと期待されたことが、本研究の実施における最も重要な動機となった。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究では、母体血中にわずかに存在する「胎児由来有核赤血球 (NRBC)」を利用し、「確度が高く」「低侵襲で」「操作が自動化され」「その場での迅速診断を可能とする」、革新的な新規出生前診断システムの実現を最終的な目標とし、そのための基盤技術の開発を目的とした。NRBC は、母体血中の白血球 100 万個に対してわずか数個と、極めて少数しか存在しないため、通常その検出は非常に困難であり、これまで出生前診断のためのマーカーとしての利用は限定的であった。本研究では、NRBC のような希少細胞を高効率に分離・選抜し、さらにその細胞内分子 (染色体) を効率的に可視化する、「統合型細胞プロセッシングデバイス」を開発することを目的とした。そのための技術として、これまでに開発したマイクロ流体工学に基づく細胞分離装置のコンセプトを導入しつつ、細胞内分子の染色・可視化・定量評価をより効率的に実施できる新規システムを開発することとした。そして最終的にはこれらの装置を統合した自動化システムの構築を目指した。

より具体的には、以下の項目(1)~(4)を順次実施することとした。まず基盤技術として、(1) 正確なサイズ分離を行う細胞セレクター、および精密な溶液交換を可能とする溶液エクステンジャーを開発し、単位モジュールの直列接続による統合型 4 段階溶液交換システムを実証す

ることとした。層流系の抵抗回路計算に基づく流路設計によって各分岐に導入される流量を制御することで、サイズ分離とキャリア液交換を同時に実施することを目指した。さらに、連通孔を形成した多孔性の基材を統合した流体デバイスを作製し、より高速な溶液交換技術の開発を目指した。これらの検討において、液体の粘性や圧力損失を考慮し、多段階直列化システムの設計指針を確立したいと考えた。

次に、(2) 細胞内分子の可視化デバイスを開発し、株化細胞（ヒト培養血球細胞など）をモデルとして用い、細胞の濃縮・標識・細胞内分子の可視化を実証することを目指した。各モジュール間の流路体積と流速を制御することによって、各ステップにおける細胞の滞留時間（＝処理時間）を制御し、それぞれの標識操作において最適な処理条件を見出すこととした。

そして次の段階として、(3) 細胞の効率的な捕捉を可能とする細胞ディテクターを開発することとした。主として平板型流路によって構成されたデバイスを用い、変形能の差異によって希少細胞のみを選択的に捕捉し検出するマイクロ流路構造を開発することとした。さらに場合によってはトラックエッチ膜などの細孔を有する薄膜を組み込んだ細胞捕捉デバイスを開発し利用することとした。

そして以上の検証を踏まえた上で、(4) これらのデバイスを統合した連続的細胞プロセッシングシステムへの開発を行い、実際に染色体の可視化を行うことを本研究の最終目的とした。特に、*in situ* ハイブリダイゼーション技術を組み込むことで、細胞内の特定の染色体の可視化を目指すこととした。実験の進捗に応じて、モデルとして血液細胞を用いた評価を行い、実際の NRBC への適用を検討することとした。以上を総括すると、マイクロ流体デバイスの有する「流れの制御性」を巧みに利用した統合型細胞プロセッサの開発によって、「低侵襲・確定型出生前診断における革新的技術開発」という社会的課題に資する技術開発を目指した。

3. 研究の方法

上記システムを実証するために、具体的には、以下の項目(1)～(4)を順次実施した。

(1) 細胞セクターおよび溶液エクステンジャーの開発

細胞の効率的な捕捉および溶液交換のための新規デバイスを設計・作製し、また同時にその開発において必要な新規多孔性材料の開発を行った。まず細胞の捕捉を行うセクターとしては、多数の分岐流路を有する流路構造をさらに複数並列化したマイクロ流体デバイスを設計・作製し、水力学的濾過の原理に基づく細胞分離効率を評価した。また他のシステムとして、スポンジ状シリコン基材を組み込んだマイクロ流体デバイスを作製し、連続的な溶液交換を実施するためのシステムを提案した。そのために、犠牲微粒子を溶解するプロセスと PDMS 製の流路構造を作製するモールドイング手法を組み合わせることで、側面にのみ溶液排出孔が高密度に形成された溶液交換流路（溶液エクステンジャー）を開発した。さらに、これまでに開発した格子状流路構造を用いた血球細胞のサイズ分離装置について、細胞懸濁液から溶液のみを抽出し、シース液として利用するシステムの開発も行った。

(2) 細胞内分子の可視化デバイスの開発

上記溶液交換装置と同様のプロセスを用いて、スポンジ状材料を組み込んだ細胞の捕捉および多段階化学処理システムを開発した。連通する微細孔を形成した平面状のスポンジ状基材を作製し、その基材に対して垂直方向に流れを導入するデバイスを開発した。さらに、トラックエッチ膜を組み込んだ細胞の捕捉による細胞内分子の可視化デバイスも同時に開発し、染色の効率の比較、および細胞形態の変化を観察した。スポンジ状構造においては平均径約 2 μm 、トラックエッチ膜においては平均径約 0.8 μm の細孔を有する構造を用い実験に使用した。実際にモデル実験系として、培養ヒト白血球細胞株の捕捉と細胞内分子の染色（ファロイジンによる F-アクチン染色、抗体によるサイトケラチン染色、およびヘキストによる核染色など）を行った。

(3) 平板型流路によって構成された細胞ディテクターの開発

希少細胞を選択的に捕捉し検出するための「ディテクター」を開発した。PDMS によって形成された薄層平板型の深さ 2~3 μm の並列型流路構造を新規に設計・作製し利用することで、主に変形能の違いに基づいて希少血液細胞の捕捉を試みた。モデル実験系として培養がん細胞株（MCF-7）を用い、流速や流路形状が捕捉に与える影響を評価した。

(4) 統合型細胞プロセッサの開発と評価のための検討

上記の細胞セレクター、溶液エクステンジャー、ディテクターを統合したデバイスの開発を目指し、各デバイスにおける圧力損失の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞セレクターおよび溶液エクステンジャーを用いた希少細胞の分離・選抜・濃縮

水力学的濾過に基づく細胞分離システムとして、分離閾値の異なる数種類の並列型流路構造を作製し、実際の細胞分離・濃縮を実証することができた。また格子状流路構造については、細胞分離に必要なシース液を細胞懸濁液から生成させるような「シース生成装置」を開発し、それを格子状流路構造に統合させる新規アプローチを開発した。流路の形状や溶液排出孔のサイズを制御したところ、溶液排出孔の流体抵抗が小さい流路構造（流路間距離が 100 μm 以下）の場合に効率的にシース液を生成することができた。ヒト血球細胞を対象とした分離実験を行ったところ、有核細胞の選択的濃縮と赤血球の除去を実証することができ、操作性および処理量の向上が確認された。また溶液交換デバイスとして、細胞の溶液交換デバイス（溶液エクステンジャー）の設計と実証を行った。これまでに開発を行った水力学的濾過法に基づく溶液交換システムに加えて、より高効率・高処理量かつ連続的な溶液交換を実証するために、上記と同様のスポンジ状材料を組み込んだ流路構造を開発した。標準微粒子を用いた実験を行ったところ、直径数マイクロメートルの閾値以上の粒径をもつ粒子に対して、連続的な溶液交換を実現することができた。また、特に血液細胞を対象とした応用として、血液中の白血球の濃縮と赤血球の効率的な除去を行うことができ、白血球と同程度のサイズを有する有核赤血球の分離精製および溶液交換・化学処理への適用可能性を示すことができた。

(2) 細胞内分子の可視化デバイスの開発

スポンジ状シリコン基材を組み込んだマイクロ流体デバイスを作製した。上下層の平板状流路構造によって連通孔を有する多孔性基材を挟み込んだ構造を設計・作製した。その基材に対して垂直方向に細胞懸濁液を導入することによって、細胞をスポンジ表面に捕捉する、というコンセプトを実証した。培養白血球細胞を用いた評価を行ったところ、細胞を基材の表面に捕捉できた。さらに、化学固定・膜透過処理・染色のための各種溶液を逐次導入したところ、簡便な操作でこれら一連の操作を実行できることが確認された。さらに、希少細胞のモデルとして、ヒト末梢血液サンプルを希釈し、がん細胞（MCF-7）を少量スパイクして導入したところ、細胞内部の特定の分子（例として F-アクチンやサイトケラチン 19）を染色できることが確認され、希少細胞の可視化および定量化を実現できた。また、トラックエッチ膜を組み込んだシステムについては、細胞サイズよりも小さい 0.8 μm 程度の微細孔を有する膜を組み込んだデバイスを用いたところ、細胞内部の分子および器官の染色評価において、これまでと同程度の効率を達成し、さらにスポンジ構造と比較しても、染色時の細胞の変形を抑制できることを見出した。

(3) 平板型流路によって構成された細胞ディテクターの開発

まず細胞の捕捉を行うセレクターとしては、細胞のサイズと比較して厚みの薄い平板状流路を並列化したマイクロ流体デバイスを設計・作製し、その効率を評価した。血液サンプルにスパイクした特定の細胞を高効率に捕捉できることを示した。さらに細胞が捕捉された状態において免疫化学染色を行うことで細胞の同定を行うことが可能であり、細胞の検出装置（ディテクター）としての有用性も確認できた。

以上の検討によって提案・開発した各装置は、希少細胞の「濃縮・選抜」「多段階の化学処理による染色体の可視化」「光学的解析のための NRBC の捕捉」という一連の操作を、シームレスかつ自動的に実現するための個別技術として有用であると考えられる。ただし、(4) 統合型流路の開発および流路内における *in situ* ハイブリダイゼーションについては、条件の検討を行ったものの、実際に希少細胞の検出を実現するまでには至っていない。また、連結型デバイスについては、圧力損失の増加および送液システムの複雑化の観点から、3 年間の研究期間においても実現することができなかった。これらの点については今後の研究の進展に期待したい。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ayumi Hayashi, Runa Hemmi, Masumi Yamada, and Minoru Seki	4. 巻 1
2. 論文標題 Sheath Flow Generator Implementing PDMS Sponges for Microfluidic Particle Sorting Systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2022)	6. 最初と最後の頁 203-204
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 -
1. 著者名 Natsumi Shimmyo, Mayu Furuhashi, Masumi Yamada, Rie Utoh, and Minoru Seki	4. 巻 147
2. 論文標題 Process Simplification and Structure Design of Parallelized Microslit Isolator for Physical Property-based Capture of Tumor Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 1622-1630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2AN00052K	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 Natsumi Miura, Masumi Yamada, Rie Utoh, and Minoru Seki	4. 巻 1
2. 論文標題 Gentle Trap-and-release Mechanism for Multistep Cell Processing Using PDMS Sponge-integrating Microfluidic Devices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2020)	6. 最初と最後の頁 732-732
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 -
1. 著者名 Natsumi Shimmyo, Makoto Furuhashi, Masumi Yamada, Rie Utoh, and Minoru Seki	4. 巻 1
2. 論文標題 Parallelized Microfluidic Thin Cell Trappers for Effectively Selecting Blood Circulating Tumor Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2020)	6. 最初と最後の頁 1155-1156
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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 高木真惟, 山田真澄, 鶴頭理恵, 関 実
2. 発表標題 スフェロイドの形成・灌流培養・観察・回収を効率化する多孔性チャンバーの開発
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayumi Hayashi, Runa Hemmi, Masumi Yamada, and Minoru Seki
2. 発表標題 Sheath Flow Generator Implementing PDMS Sponges for Microfluidic Particle Sorting Systems
3. 学会等名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦菜摘, 山田真澄, 鶴頭理恵, 関 実
2. 発表標題 シリコーンスポンジ統合型マイクロ流路を用いた動物細胞の効率的捕捉
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第43回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新名菜摘, 古畑 誠, 山田真澄, 鶴頭理恵, 関 実
2. 発表標題 マルチレーン薄層マイクロ流路における血中がん細胞の捕捉挙動の評価
3. 学会等名 分離技術会年会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新名菜摘, 古畑 誠, 山田真澄, 鶴頭理恵, 関 実
2. 発表標題 並列平板型マイクロ流体デバイスの深さ制御による循環がん細胞の高効率捕捉
3. 学会等名 化学工学会第86年会 (オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦菜摘, 山田真澄, 鶴頭理恵, 関 実
2. 発表標題 シリコーンスポンジを用いる細胞の効率的捕捉・染色プロセス
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会 (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤丈流, 山田真澄, 関 実
2. 発表標題 多孔性基材を統合したマイクロ流体デバイスを用いる溶液交換システム
3. 学会等名 令和2年度E部門総合研究会(バイオ・マイクロシステム研究会) (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新名菜摘, 古畑 誠, 山田真澄, 鶴頭理恵, 関 実
2. 発表標題 薄層並列型マイクロ流路を用いた血中循環がん細胞の捕捉
3. 学会等名 令和2年度E部門総合研究会(バイオ・マイクロシステム研究会) (オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Natsumi Shimmyo, Makoto Furuhata, Masumi Yamada, Rie Utoh, and Minoru Seki
2. 発表標題	Parallelized Microfluidic Thin Cell Trappers for Effectively Selecting Blood Circulating Tumor Cells
3. 学会等名	The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2020), online (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Natsumi Miura, Masumi Yamada, Rie Utoh, and Minoru Seki
2. 発表標題	Gentle Trap-and-release Mechanism for Multistep Cell Processing Using PDMS Sponge-integrating Microfluidic Devices
3. 学会等名	The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2020), online (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Takeru Sato, Yurika Sakurai, Masumi Yamada, and Minoru Seki
2. 発表標題	Microfluidic Medium Exchanger with Micropored Fluid Drainage for Cell Culture Applications
3. 学会等名	The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2020), online (国際学会)
4. 発表年	2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>千葉大学 工学部共生応用化学コース バイオプロセス化学研究室 http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb01/</p>
--

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	山田 真澄 (Yamada Masumi) (30546784)	千葉大学・大学院工学研究院・准教授 (12501)	

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