

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26286032

研究課題名(和文)大量処理を実現する複合型マイクロ細胞ソーティングシステムの開発と応用

研究課題名(英文)Development and Application of Integrated Micro Cell-Sorting System Enabling High-Throughput Treatment

研究代表者

関 実 (Seki, Minoru)

千葉大学・工学(系)研究科(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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：非対称格子状流路構造，高密度2段格子状流路システム，改良型水力学的濾過法等の種々の新規細胞分離システムを提案し，希釈血液からの白血球の直接分離回収，血液中の単球のワンステップ・非標識濃縮，白血球除去・血小板除去・赤血球濃縮の同時実現等により，それらの有用性を示した。また，流路の高密度並列化，新規分離メカニズムの採用等により，希釈血液について最大で毎分15ミリリットルを越える高速分離を実現することもできた。さらに，細胞変形能を利用した細胞分離装置による循環がん細胞の効率的捕捉，多段階キャリア液交換用マイクロ流体デバイスによる「細胞プロセッサ」の開発等も行い，製品化のための共同研究も開始した

研究成果の概要(英文)：We proposed various novel cell-separation systems such as the asymmetric lattice-shaped microchannel structure, the high-density dual-depth lattice-shaped microchannel system, and the improved hydrodynamic filtration system etc., and demonstrated their usefulness as biomedical applications by realizing direct separation and recovery of leukocytes from diluted blood, one-step non-labeled concentration of blood monocyte, simultaneous realization of leukocyte/platelet-removal and erythrocyte-concentration, etc. In addition, the high throughput cell separation exceeding 15 mL/min could be realized for diluted blood samples by adopting high-density parallel microchannel, novel separation mechanism and so on. Furthermore, we also carried out efficient trapping of circulating tumor cells by cell separation device based on cell deformability, development of "Cell Processor" by microfluidic device for multi-step carrier-medium exchange. Collaborative research with companies also started.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオセパレーション 細胞分離 分離工学 生物工学 マイクロ流路 ナノマイクロシステム 水力的濾過 マイクロ流体工学

1. 研究開始当初の背景

不均一細胞集団からの特定細胞の選択的分離・回収は、再生医療、診断医療、幹細胞研究等の分野で必須の技術である。既存の細胞選抜手法のうち、遠心分離、濾過、磁気標識分離等では、特殊な装置を必要としない反面、正確な選抜は難しい。一方、フローサイトメトリー (FCM) によるセルソーターは、正確かつ高速の細胞分離が可能であるが、複雑な操作や高価な装置等が必要なため、一般的な装置としては普及し難い。

一方、近年、マイクロ流体デバイスを利用した細胞の分離・選抜に関する研究が盛んで、大きさ・比重・表面特性などを利用して細胞を選抜するための様々なマイクロ流路システムが開発されてきた。本申請者らの研究グループでも、世界に先駆けて、狭隘部を有する流路を用いた連続的分級技術であるピンチド・フロー・フラクショネーション (PFF) 法 (Anal Chem 2004 など) や、水力学的濾過法 (Lab Chip 2005 など) といった、主にサイズによって連続的に細胞を分離・選抜する手法を提案し、種々の細胞系への応用を実証してきた。また、最近では、サイズと表面マーカーを利用した 2 次元分離 (Anal Chem 2013) や、比重差を利用した細胞分離 (Microfluid Nanofluid 2010, 2013)、形状を利用した細胞分画 (Biomicrofluidics, 2011)、細胞内オルガネラの単離・精製システム (BMMD 2012) など、これまでにない細胞の分級、選抜、あるいは処理システムの開発に成功している。しかし、複数のパラメーターを利用した細胞選抜を可能とするマイクロ流路システムは、希少細胞の選抜において必須であるものの、我々の上記研究例を除いてこれまでにほとんど報告されていない。さらに、通常のマイクロ流路で達成される細胞の分離処理量は、一般的に、最大でもわずか毎分 10 マイクロリットル程度 (細胞約 10 万個/分) であり、実用化・商業化を阻む大きな要因となっており、

処理量の増大はマイクロ流路による細胞分離における大きな課題の一つとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロ流体デバイスを用いた細胞分離システムについて、実用化を目指した応用展開を行う上での解決すべき課題として、高速な細胞分離・選抜を可能とする新規マイクロ流体工学手法の提案と評価、個々の流路システムの並列化による大量細胞分離装置の提案、変形能などの他のパラメーターを利用した細胞分離手法の提案とそのメカニズムの解析、細胞機能との関連性評価を行い、さらに医療現場・組織工学・幹細胞生物学などにおける有用性を実証することを目的とした。加えて、細胞の分離や解析の際に必要な多段階の化学的処理をより効率的に行うために、水力学的濾過法を利用した連続的キャリア液交換システムの開発を目指した。

3. 研究の方法

平面的に形成された流路ネットワークを使用した細胞分離システムの提案と開発を行った。まず、角の分離場に流路ネットワークを非対称に配置した格子状流路構造を作製し、サイズによる高速細胞選抜の実現可能性をテストした。流路の傾斜角度、左右の流路密度比、流路長さ比、流路幅および深さ、境界部流路幅などのパラメーターを分離対象となる細胞に合わせて最適化することによって、5~20 μm 程度の細胞を任意の分離サイズで選抜するシステムの構築を目指した。また、分離場の形状が段階的に異なる流路を利用することで、多数のフラクションへの分離を可能とするシステムの開発を目指した。特に、深さの異なる 2 段格子流路という、これまでに例のない流路構造を提案し、その評価を行った。さらに、細胞変形能を利用した分離場として、平板状流路構造を用いた細胞

選抜手法の開発を行い、非標識細胞を対象とした選抜・分離システムの有用性を評価した。さらに、流路構造を並列に配置するための基盤技術開発を試みた。水力学的濾過に基づくサイズ依存的細胞分離用流路について、それを名刺大の基板に多数（例えば 128 個）集積化した流路システムの開発を行った。加えて、多段階の連続的溶液交換を行うシステムを新規に設計・作製し、化学的細胞処理プロセスへの適用を行った。溶液交換部を複数（最大 4 ユニット）直列に接続し、その間を体積可変のチューブによって接続することによって、各ステップを 30 秒～10 分程度の任意の時間に調節できるシステムを開発した。

これらの系において分離対象とする細胞としては、モデルとしてまず PS 標準粒子を用いて分離挙動の評価を行った後、各種ヒト血球（白血球・赤血球・血小板のほかに、白血球のサブタイプ成分）を分離の対象とした。また、MCF-7 等の培養細胞、数種の株化細胞を用いた検討および評価も行った。分離した細胞の特性評価としては、サイズ・形態の直接観察、免疫染色、フローサイトメトリーによる評価を行った。

なお、これらの検討における流路の作製手法として、主として既存のソフトリソグラフィによって作製した PDMS 流路を使用した。そのほかに、NC 微細加工機による切削と熱圧着による、熱可塑性樹脂製（PMMA 等）の流路を作製し利用した。

4. 研究成果

(1) 格子状流路構造による新規高効率細胞分離システムと単球の高効率分離

非対称に配置した格子状の流路構造を用いた新規細胞分離・選抜装置を開発した。まず、標準粒子を用いて、格子状流路の形状（傾斜角度・本数密度比など）が分離に及ぼす影響の評価を行った。その結果、傾斜角度が 45° 以上の流路構造では分離が達成されず、

30° 以下の流路構造ではほぼ予測通りの分離が達成された。また、本数密度比を制御することで、粒子の分離サイズをある程度自由に設定できることを明らかにした。さらに、共焦点 MicroPIV による流れ場観察から、壁面近傍の流れ制御が重要であることも明らかになった。

応用として、希釈血液から白血球を直接分離回収可能であること、血液中の単球をワンステップ・非標識で濃縮できること等も示すことができた。これらは、ガン免疫療法や末梢移植療法における応用が期待される。また、格子状流路の並列化（最大 24 並列流路）の試作と評価を行い、毎分 3 ミリリットル程度の処理も実現している。

(2) 段差を有する 2 段格子状流路システム

上記の格子状流路は、高い細胞分離精度を有しているが、単一の格子状流路ではその処理量はそれほど高くない（毎分 100 マイクロリットル程度）。そこで、より高い処理量を実現するため、深さの異なる流路構造が直交した、高密度 2 段格子状マイクロ流路構造を作製し、サイズに依存した微粒子や細胞の連続的分離の実現可能性を検討した。

数種の格子状構造を作製し実験を行ったところ、複数の入口からの導入流速比が分離精度に大きく影響を与えることが確認された。次に、流路深さ方向の粒子挙動を観察したところ、これまでの平板状流路とは全くことなる原理に従って粒子が分離されている可能性が示唆された。具体的には、位置的な関係から、小さい粒子は主流路の上部まで到達できるが、大きい粒子は上部へと到達できないことが分離の主因であることが明らかとなった。

さらに、流路構造を相似的に拡大あるいは縮小させることにより、分離粒子のサイズ制御が可能であることを実証した。最後に、培養細胞の導入実験を行い、細胞の分離あるいは濃縮への適用可能性を示すことができた。マイクロ流路を用いた細胞分離手法は多数

提案されてきたが、本手法は、これまでに知られていないメカニズムに基づくもので、学術的な価値も大きいものと考えている。

(3) 高密度並列化による大量処理用マイクロシステム・水中手術への応用展開

水力学的濾過法に基づく細胞分離用流路構造について、臨床応用を視野に入れ、希釈血液からの白血球の除去・血小板の除去・赤血球の濃縮、という3つの課題を同時に可能とする流路システムの設計・作製を行い、効率的に血小板のみを除去する流路構造や、白血球のみを選抜する流路構造の設計指針を立てることができた。得られた基本構造を組み合わせ、さらにその流路構造を並列化したところ、128流路を名刺大の基板に集積した際には、希釈血液について最大で毎分15~20ミリリットルの高速分離を実現することができた。この値は、本プロジェクトにおいて達成した最大値であり、マイクロ流路システムを用いた細胞分離・選抜システムとして報告されているシステムの中でも最大のレベルである。さらに、分離精度および効率も極めて高い水準を維持することができたため、今後の幅広い応用が期待される。特に、このようなシステムは、手術時の血液成分の濃縮システムとして、あるいはアフエレーシスのための細胞分離装置として有用であることが示唆された。また、企業との共同研究を通じて、本技術の製品化および実応用への展開を図った。2017年現在でも、引き続き製品化を目指した検討を行っている段階である。

(4) 細胞の変形能を利用した細胞分離装置の開発と循環ガン細胞の効率的捕捉

細胞の変形能に基づく分離・選抜システムを開発し、循環ガン細胞(CTC)の選抜を試みた。本研究で注目したことは、CTCが転移の際に、自身よりも径の細い毛細血管に詰まるという現象である。通常の血球はCTCよりも変形しやすく、自身よりも径の細い毛細血管でも詰まりにくい。この変形能の差を利用

したCTC捕捉システムの開発を行った。

循環ガン細胞モデル細胞としてMCF-7細胞(ヒト乳癌由来細胞株)を10倍希釈血液に混合し、深さの異なるPDMS製の平板状流路にそれぞれ導入したところ、特定の流路において導入したMCF-7が捕捉されることが確認された。白血球に対し数万分の1以下しか存在しない循環ガン細胞を、最大捕捉率は約71%で効率的かつ選択的に捕捉でき、白血球の存在比を1回の操作において1000分の1程度に減少させることが可能であることを実証した。本システムは、希少細胞の簡便な分離および選抜できるため、今後のさらなる展開も期待できる。

(5) 細胞の多段階キャリア液交換用マイクロ流体デバイス

細胞機能の詳細な解析においては、溶液中に懸濁細胞に対し、化学物質による刺激付与、化学的固定、透過処理、色素や抗体の結合、洗浄、という多段階の操作が必要な場合が多い。しかし、遠心分離を伴う複数回の溶液交換では細胞のロスが多く、操作に手間がかかる、という欠点があった。そこで本研究では、細胞の分離という操作に加えて、連続的な流れの中で多段階の溶液交換を行い、細胞をロスすることなく処理する「細胞プロセッサ」の開発を行った

そのために、水力学的濾過の原理を利用し、直径が6 μm より大きな対象物は分岐流路に引き抜かれずに流路構造全体を適切に設計し、各溶液交換部分の間を体積可変のチューブで接続した流体システムを開発した。このシステムでは、処理時間を30秒~10分程度の間で任意に調整可能であり、実際に、多段階の溶液交換による細胞染色が一度の操作で実現できることが確認できた。本研究で開発した細胞プロセッサは、生化学的研究や疾患の診断などにおいて有用であると考えられる。

以上の検討に加え、特に血液中の小胞等の

サブミクロン粒子の分離を目的に、マイクロ流路エルトリエーターシステムを用いた比重差分分離技術、PFF ベースの分離システムの基礎検討も行った。

これらの結果を総括すると、特に医療や生物学的研究において有用な種々の新規細胞分離操作のためのマイクロ流路システムの開発を行う、その応用可能性について実証することができたと言える。現在はそれらの実用化に向けて複数の企業との共同研究開発も行っており、近い将来これらの技術が汎用的なものとなることを期待して引き続き検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者に下線)

[雑誌論文](計 8 件)

- (1) **Slanted, Asymmetric Microfluidic Lattices as Size-selective Sieves for Continuous Particle/Cell Sorting**, Masumi Yamada, Wataru Seko, Takuma Yanai, Kasumi Ninomiya, and Minoru Seki, *Lab on a Chip*, 17 (2), 304–314 (2017).
- (2) **Microfluidic System Enabling Multistep Tuning of Extraction Time Periods for Kinetic Analysis of Droplet-Based Liquid-Liquid Extraction**, Natsuki Nakajima, Masumi Yamada, Shunta Kakegawa, and Minoru Seki, *Analytical Chemistry*, 88 (11), 5637–5643 (2016).
- (3) **Continuous, Time-controllable, and Multistep Microfluidic Cell Processor Based on Hydrodynamic Carrier-Medium Exchange**, Hajime Toyoda, Masumi Yamada, and Minoru Seki, *Proceedings of the 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016)*, 405-314 (2016).
- (4) **Microfluidic Device Enabling Multistep Tuning of Time Period for Droplet-Based Liquid-Liquid Extraction**, Natsuki Nakajima, Masumi Yamada, and Minoru Seki, *Proceedings of the 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2015)*, 1371-1373 (2015).
- (5) **Lattice-shaped Dual-depth Microchannel Systems for Continuous Separation of Microparticles**, Takuma Yanai, Masumi Yamada, Wataru Seko, and Minoru Seki, *Proceedings of the 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2015)*, 2065-2067 (2015).
- (6) **マイクロ流体デバイスによる微粒子の選**

式分級, 山田真澄, 関 実, 「化学装置」2017年3月号 P33~38 (株)工業通信

(7) **二段格子マイクロ流路を用いた微粒子の連続的湿式分級**, 矢内 巧馬, 山田真澄, 関 実, 分離技術 2016年9月号 P37(293)~38(294)

(8) **細胞の分離・選抜のためのマイクロ流体デバイス**, 山田真澄, 関 実, 日本生物工学会誌 92巻4号 P153~156 2014年4月

[学会発表](計 24 件)

(1) **二段格子マイクロ流路を用いたサイズ依存の微粒子分離プロセスの開発**, 矢内巧馬, 山田真澄, 瀬古 航, 関 実, 第22回流動化・粒子プロセッシングシンポジウム 東京大学 生産技術研究所 2016年12月8日~9日

(2) **微粒子の連続的多段階化学処理のための溶液交換マイクロ流体デバイス**, 豊田一, 山田真澄, 関 実, 第22回流動化・粒子プロセッシングシンポジウム 東京大学 生産技術研究所 2016年12月8日~9日

(3) **「高さ位置が横方向位置を決定する」微粒子分離デバイスの開発**, 矢内巧馬, 山田真澄, 瀬古 航, 関 実, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第34回研究会 幕張メッセ国際会議場 コンベンションホール 2016年9月6日~7日

(4) **処理時間の制御を可能とする多段階溶液交換細胞プロセッサの開発**, 豊田一, 山田真澄, 関 実, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第34回研究会 幕張メッセ国際会議場 コンベンションホール 2016年9月6日~7日

(5) **高密度格子状マイクロ流体デバイスを用いた微粒子・細胞の連続的分離手法の開発**, 矢内巧馬, 山田真澄, 瀬古 航, 関 実, 日本混相流学会 混相流シンポジウム 2016 同志社大学 今出川キャンパス 2016年8月8日~10日

(6) **多段階溶液交換を利用する細胞プロセッサの開発**, 豊田一, 山田真澄, 関 実, 生物学若手研究者の集い 夏のセミナー2016 ホテルコンチネンタル府中 2016年7月16~17日

(7) **マイクロフルイデクスを利用する微粒子合成・分級操作の新展開(招待講演)**, 山田真澄, 関 実, エビスビルAAホール本館3階会議室 大阪 2016年3月16日

(8) **多段階溶液交換による細胞染色処理マイクロ流体デバイスの開発と評価**, 豊田一, 小澤良兼, 山田真澄, 関 実, 化学工学会 第81年会 関西大学千里山キャンパス 2016年3月13~15日

(9) **水力学的作用を利用する細胞選抜マイクロ流路システムの開発と応用**, 山田真澄, 小澤良兼, 矢内巧馬, 瀬古航, 関 実, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第32回研究会 福岡県北九州国際会議場 2015年11月26日~27日

(10) **連続的粒子分離のための高密度格子状マイクロ流体デバイスの開発(学生賞・銀賞)**

矢内巧馬, 山田真澄, 瀬古航, 関実, 化学工学会 群馬大会 2015 群馬県桐生市民会館 2015年11月27~28日

(11) **マイクロ流路層流系を利用する微粒子の精密湿式分級プロセス(展望講演)**, 山田真澄, 関実, 化学工学会第47回秋季大会北海道大学札幌キャンパス 2015年9月9日~11日

(12) **細胞の選抜とセンシングのための格子状微細流路デバイスの開発**, 山田真澄, 瀬古航, 矢内巧馬, 関実, フィジカルセンサバイオ・マイクロシステム 合同研究会 機械振興会館 東京 2015年8月3~4日

(13) **格子状マイクロ流路を用いたサイズに基づく微粒子分級法の開発**, 山田真澄, 瀬古航, 矢内巧馬, 関実, 分離技術会年会 2015 技術・研究発表会, 明治大学生田キャンパス, 2015年5月29~30日

(14) **格子状マイクロ流路からなる細胞選抜装置の開発と血球分画への応用**, 山田真澄, 瀬古航, 関実, 化学工学会 第80年会 芝浦工業大学 豊洲キャンパス 2015年3月19日~21日

(15) **格子状マイクロ流路構造を利用した新規連続的細胞分画手法の提案(学生賞 特別賞)**, 瀬古航, 山田真澄, 関実, 化学工学会 新潟大会 2014 新潟大学 五十嵐キャンパス 2014年11月22~23日

(16) **マイクロフルイデックスを用いた赤血球の選択的濃縮システムの開発**, 小澤良兼, 山田真澄, 関実, 化学工学会第46回秋季大会 九州大学伊都キャンパス 2014年9月17-19日

(17) **Continuous, Time-controllable, and Multistep Microfluidic Cell Processor Based on Hydrodynamic Carrier-medium Exchange**, Hajime Toyoda, Masumi Yamada, Minoru Seki, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016), Dublin, Ireland, Oct. 9-13, 2016.

(18) **Development of Microfluidic Lattices for High-Performance Cell/Particle Separations (Invited lecture)**, Masumi Yamada and Minoru Seki, PITTCO Conference and Expo, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA, Mar. 6-10, 2016.

(19) **A New Method for Continuous Sorting of Cells/Particles Using Lattice-shaped Dual-depth Microchannels**, Takuma Yanai, Masumi Yamada, Wataru Seko, and Minoru Seki, 26th 2015 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS 2015), Nagoya University, Nov. 23-25, 2015.

(20) **Lattice-shaped Dual-depth Microchannel Systems for Continuous Separation of Microparticles**, Takuma Yanai, Masumi Yamada, Wataru Seko, and Minoru Seki, The 19th International Conference on Miniaturized

Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2015), Gyeongju, Korea, Oct. 25-29, 2015.

(21) **Continuous Sorting of Microparticles Using High-Density Lattice-Shaped Microchannels**, Takuma Yanai, Masumi Yamada, Wataru Seko, and Minoru Seki, The 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2015), Kyoto, Japan, June 8-10, 2015.

(22) **Asymmetric Lattice-shaped Microchannel Structures for Continuous Size-dependent Cell Sorting (Best Paper Award)**, Wataru Seko, Masumi Yamada, and Minoru Seki, 2014 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS 2014), Nagoya University, Nov. 10-12, 2014.

(23) **Evaluation of Liquid-liquid Extraction Kinetics Utilizing Microfluidic Droplets and Hydrodynamic Filtration**, Natsuki Nakajima, Shunta Kakegawa, Masumi Yamada, and Minoru Seki, RSC Tokyo International Conference 2014 - Analytical Technology Towards Future Society - (JASIS 2013), Makuhari Messe, Chiba, Japan, Sep. 4-5, 2014.

(24) **Platelet Separation Using Hydrodynamic Filtration**, Ryoken Ozawa, Masumi Yamada, and Minoru Seki, The 6th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2014), Singapore, Jul. 30-Aug. 1, 2014.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: マイクロ流路構造体及び粒子の分離方法

発明者: 二宮郁純, 山田真澄, 関実, 瀬古航

権利者: 旭化成株式会社, 千葉大学

種類: 特許

番号: 特開 2015-051430

出願年月日: 2014年09月10日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

<http://chem.tf.chiba-u.jp/gacb01/>

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: 80206622

(2) 研究分担者

山田真澄 (YAMADA MASUMI)

千葉大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 30546784