

マイクロ・セルプロセッシングのための熱流体高機能プロセス 発現機構の創成

Creation of highly functional thermal and fluids mechanism
for micro cell processing

笠木 伸英 (Nobuhide Kasagi)

東京大学・大学院工学系研究科・教授



研究の概要

再生医工学の臨床応用は、未来の社会システムを支える基盤の一つであるライフサイエンス分野において大きく期待されている。本研究では、混合、搬送、分離、温度制御など、熱流動の素過程に対して高度に制御された場を用いて、目的とする希少細胞を短時間で高精度に検知・選別・分取する手法を提案し、マイクロ細胞分離システムの試作・評価を行った。

研 究 分 野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キ ー ワ ー ド：バイオ関連機器，再生医学，熱流体工学，マイクロマシン

1. 研究開始当初の背景・動機

未来の社会システムを支える基盤の一つであるライフサイエンス分野では、失われた生体組織や臓器の機能再生を目的とする再生医工学の臨床応用が強く期待されている。再生医工学において、幹細胞等の細胞ソースを検知・選別・分取するためのセルソーティングシステムは必要不可欠の医用機器であるが、既存の高精度細胞分離システムはいずれも高コスト、複雑な動作原理と装置構成、連続処理の困難さなどの問題を抱えている。上記のことから、解析時間の短縮、高精度化、小型化、そして正常性の確保などを実現する幹細胞分離システムの開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロスケールでの熱流動の特性を活かし、マイクロ流路内で細胞の混合、ラベリング、分離、輸送等を極めて効率的に行うためのマイクロ・セルプロセッシングの創成を目標とした。具体的な応用分野として幹細胞を用いた再生医療技術を想定し、細胞群から稀少細胞を抽出するマイクロ・セルソーティングシステムの開発を試みた。

3. 研究の方法

セルソーティングシステム設計・評価の際に重要なマイクロスケールにおける熱流動現象、マイクロ流路内の細胞や粒子の運動などに対する知見を蓄積するため、高精度数値解析法や新しい画像計測法の開発、細胞のハンドリングに適する新規材料を用いたマイクロマシン技術の開発とデバイス

の製作、デバイス性能の実験的評価などを通して、細胞分離のための実用マイクロシステムの具体的設計指針を構築した。

[購入物品と使用用途]

冷却 3CCD カメラ，405nm 固体レーザー，エバネッセント光学系，共焦点スキャナ用固体レーザーなどを導入し、顕微鏡下での FRET，全反射，共焦点観察に用いて、マイクロ流路内の細胞流れの計測，細胞内部の観察を行った。

4. 研究の主な成果

4.1 マイクロ熱流動の解明と機能界面の創成

マイクロ・セルソーティングシステムの構築にあたり、マイクロスケール特有の熱流動現象および細胞・粒子運動に関する知見の蓄積，およびこれらを反映した設計ツール，計測ツールの開発を行った。

まず、マイクロ流路内における速度分布計測法として有用なマイクロ粒子画像計測法(microPIV)に着目し、計測平面の焦点深度方向高速スキャニングによる多断面計測を可能とするシステムを開発した。このシステムを用い、従来 10 Hz 程度に留まっていた断面走査周波数を 100 Hz 以上にまで高めることに成功し、三次元的流動構造を有する流れ場の非定常計測を初めて可能とした。

また、マイクロ流路コンポーネント設計ツールとして用いる数値解析コードを開発した。高精度界面追跡法のひとつである Front Tracking 法を用いて変形界面を有する流動現象の数値解析を行い、マイクロ混合器内の流動，細胞の運動・変形，外部磁

場の影響を受ける磁性粒子の運動などを同時に再現することを可能とした。

さらに、マイクロ流路コンポーネント開発に用いる基礎技術として、機能化ポリパラキシリレン上での生体分子の共有結合を用いたマイクロ加工技術と整合性の高い抗体固定法、抗体を混合した温度感受性ゲル接着後の細胞を容易に回収可能な細胞捕獲法などの開発を行った。

4.2 セルプロセッシングに用いる高機能マイクロ流路のコンポーネント開発

抗体を塗布した磁性粒子を目標細胞のみに結合させ、磁場を用いて細胞分離を行う免疫磁気細胞分離システムの構築にあたり、磁性粒子と細胞サンプルとの混合を促進するためのマイクロ混合器の開発を行った。マイクロスケールでは流れが層流であるため粒子の混合が困難である。本研究では流路構造の分岐・合流を繰り返すことにより粒子層の数をべき乗で増加させるラミネーション法を用いた混合器を数値解析およびカオス解析を用いて設計し、マイクロマシン技術により製作した。さらに、標識操作後のサンプルを連続的に分離するために、オンチップ電磁石を配置したマイクロ磁気分離器を設計・製作し、良好な分離性能が得られることを明らかにした。

一方、上記のような磁性標識を必要としない細胞分離手法として、マイクロ流路壁面に抗体を固定し、ガスクロマトグラフィと同様の表面効果を用いて流れ方向に細胞分離を行う手法を開発した。即ち、先述の抗体固定法を用いて製作した壁面を有する流路内で目標細胞を他の細胞群に対して大幅に減速可能であることを初めて実証した。さらに、連続流においても細胞を流れの横断方向に分離することができる全く新しい機能化表面を設計・製作し、モデル粒子を用いた実験により高い分離性能があることを明らかにした。

4.3 マイクロセルソーティングシステムの創成

上述のマイクロ混合器と永久磁石を用いた磁気分離コンポーネントとを組み合わせたマイクロ磁気細胞分離システムのプロトタイプを製作し、ヒト細胞を用いた細胞分離実験により従来の磁気分離システムと遜色のない分離性能を確認した。また、サンプル処理速度の面では、細胞分離に関する従来の研究例と比較し 3~4 倍程度の性能を得ている。

また、上述の表面効果を用いた細胞分離法を用い、プラグ状に導入した二種類の細胞を含む細胞サンプルを主流方向に分離するシステムを設計・製作し、細胞種ごとに分離することに成功した。

さらに、温度感受性ゲルを用いた機能化表面上に特定の細胞のみを捕獲できること

を示し、体外循環システムとの接続を想定したサンプル流入・流出部を設計・製作し、より実用に近い細胞分離システムのプロトタイプを製作した。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

本研究で開発した細胞分離手法はいずれも幹細胞を簡便な操作で短時間に分離することを可能とし、将来の幹細胞治療技術の普及に大きく貢献するものと期待される。

ラミネーションマイクロ混合器、およびそれを用いた免疫磁気細胞分離システムでは、これまでのマイクロ・セルソーターよりも高い分離速度が得られることを示し、臨床に必要な比較的大量のサンプルについても並列処理によって実現できる見通しが得られている。

また、細胞に全く標識粒子を結合させることなく抗原抗体反応により分離する方法として、接着力による減速効果を用いる分離システムを提案した。機能化ポリパラキシリレンを用いる高密度抗体固定法と、マイクロマシン技術により試作したマイクロ細胞分離器は、新規性が極めて高い手法として、国際会議でも特に高い評価を受けた。また、連続流で分離可能とする手法は、さらに臨床応用に向くものとして、注目されている。

従来の再生医療研究における体性幹細胞抽出・培養は数週間にわたり、臨床に適用するには膨大な時間や人的リソースを要していた。熱流動の特性を活かした本研究で提案する分離法により、抽出プロセスの短時間・低コスト化が可能であり、再生医療の発展に大きく貢献できるものと考えられる。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

- 1) J. Miwa, Y. Suzuki and **N. Kasagi**, "Adhesion-based cell sorter with antibody-immobilized amino-functionalized parylene surface," *J. Microelectromech. Syst.*, Vol. 17, (2008), in press.
- 2) **K. Furukawa**, T. Tateishi, T. Tamaki and T. Ushida, "Cell sorting system by modified cone plate type rheometer," *Jpn. J. Clinical Medicine*, (2008), in press.
- 3) K. P. Angele, Y. Suzuki, J. Miwa and **N. Kasagi**, "Development of high-speed micro scanning PIV using a rotating disk," *Meas. Sci. Tech.*, Vol. 17, (2006), pp. 1639-1646.
- 4) W.-H. Tan, Y. Suzuki, **N. Kasagi**, N. Shikazono, **K. Furukawa** and T. Ushida, "Lamination micro mixer for micro-immunomagnetic cell sorting," *JSME Int. J., Ser. C*, Vol. 48, (2005), p. 425-435.
- 5) H. Inokuchi, Y. Suzuki, **N. Kasagi**, N. Shikazono, **K. Furukawa** and T. Ushida, "Micro Magnetic Separator for Stem Cell Sorting System," *Proc. 22nd Sensor Symp.*, Tokyo, (2005), pp. 125-128.