

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		KASAGI NOBUHIDE					
①研究代表者氏名		笠木 伸英		②所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院工学系研究科・教授	
③研究課題名	和文	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					
	英文	Creation of highly functional thermal and fluids mechanism for micro cell processing					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		32,100	23,500	18,500	13,600	11,200	98,900
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
笠木 伸英	東京大学・大学院工学系研究科・教授	熱流体工学	研究計画実施の指揮，総括；マイクロ熱流動における数値解析コードの開発 マイクロ多相流の多次元画像計測，高機能マイクロ熱流体デバイスの試作 気-固-液混相流モデルの構築，マイクロ熱流動制御機構の開発 生体適合機能を有するマイクロ流路の開発 微小流れを有するデバイスの作製および材料界面（生体適合材料）と細胞との相互作用の物理化学的解析				
鈴木 雄二	東京大学・大学院工学系研究科・助教授	熱流体工学					
鹿園 直毅	東京大学・大学院工学系研究科・助教授	熱流体工学					
牛田 多加志	東京大学・大学院医学系研究科・教授	医用工学					
古川 克子	東京大学・大学院工学系研究科・講師	医用工学					
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>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、生体の失われた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大きく期待されている。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り、その解析時間の短縮、高精度化、小型化、そして清浄性の確保は、特に重要な課題である。本研究では、マイクロ流路内で細胞を高速分離可能なセルソーティングシステムに用いるための熱流体高機能プロセスの開発を目的とする。マイクロスケールの生化学・熱流体システムでは、混合不良、表面張力や壁面性状による特異な熱流動現象、壁面剪断による細胞膜の破壊、細胞や生体高分子の壁面凝着など、克服すべき現象が生じる可能性がある。そこで、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構築し、生体適合性の高いマイクロマシン技術による試作、評価を行って、将来実用に供するセルソーティングシステムの具体的設計指針を得ることを目指す。</p>							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

白血病、臓器不全などの治療手段として注目されている体性幹細胞による再生医療では、血液あるいは骨髄液から幹細胞を採取することが必須であるが、幹細胞は遠心分離後の細胞分画中に1~10個/cc（10%に1個程度）の数密度と、極めて僅かしか存在しない。細胞選別の方法としては、細胞表面マーカーを指標として抗原抗体反応を利用する方法が、選別精度および（抗体の入れ替えにより種々の細胞に対応可能という）汎用性において優れている。この原理を用いて、FACS（Fluorescence Activated Cell Sorting System）、MACS（Magnetic Cell Sorting System）の2つのシステムが実用化されているが、高額な設備、熟練技術者の不足、体外循環による幹細胞連続採取の困難など多くの問題を抱えており、広く普及する治療手法としては未だ確立されていない。

本研究では、細胞分離の第3の方法を構築するために、具体的な研究課題として、**A)マイクロ熱流動の解明と機能界面の創成**、**B)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**、**C)マイクロ・セルソーティングシステムの創成**を挙げている。研究は当初計画に沿ってほぼ良好に進捗していると言えるが、以下に各課題毎の現在までの経過を記す。

A) マイクロ熱流動の解明と機能界面の創成

A-1) 高速スキャニングマイクロPIVシステムの開発

従来のマイクロPIVシステムによる速度分布測定は、二次元平面内に限られるため、マイクロ流路内での3次元細胞挙動の計測には十分ではなかった。本研究では、焦点深度方向に高速スキャニングを行うことによって、疑似3次元の時系列速度場を得ることのできるシステムの開発を進め、現在までに測定精度の評価を行って有用性を確認した。

A-2) 高精度界面追跡法による細胞流れの数値解析コードの開発

マイクロ流路内での細胞挙動の数値解析には、有限体積や変形の考慮が必須である。本研究では、高精度界面追跡法であるフロント・トラッキング法を用い、変形界面を有するマイクロ熱流動のための数値解析コードを開発した。細胞の物性モデルとしては均質な核および細胞質の二流体、および弾性膜を模した二つの界面からなるモデルを用いた。幅200 μm のマイクロ混合器における細胞および磁性粒子混合過程の解析を行い、外部磁場による混合促進およびせん断力による細胞の変形量に関する知見を得た。

A-3) 機能化ポリパラキシリレンによる抗体固定手法の開発

表面効果を用いたセルソーター（後述）では、壁面に抗体を固定する必要があるが、本研究ではマイクロマシン技術と整合が高く、共有結合により強固に抗体を固定可能な、機能化ポリパラキシリレンを用いる手法を開発した。

A-4) 温度感受性ゲルを用いた細胞捕獲手法の開発

末梢血からのスクリーニングでは、連続フローで目標細胞を捕獲する必要がある。本研究では、温度感受性ゲルに抗体を混ぜることにより、回収の容易な新しい捕獲方法を開発した。

B) 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

B-1) マイクロマシン技術を用いたマイクロ混合器、マイクロ磁気分離器の試作

細胞分離の第二段階として、マイクロ流路内で抗体を塗布した磁性粒子と細胞サンプルを混合し、磁場により目標細胞のみを分離するシステムを設計し、マイクロマシン技術による試作を行い、実際に細胞を用いた予備実験によりその有効性を明らかにした。

B-2) 表面効果を用いたマイクロセルソーターの試作

マイクロ流路を用いたセルソーターとして、ガスクロマトグラフィと同様の表面効果を用いたシステムを新たに考案し、試作した。予備実験により、目標細胞の流下速度が他の細胞に比べ顕著に減少することを確認し、ソーターとしての機能が期待できることを明らかにした。

C) マイクロ・セルソーティングシステムの創成

C-1) モデル細胞の表面マーカーの定量化

細胞の表面マーカーの発現について、信頼性の高いデータが必ずしも十分ではない。そこで、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)、内皮前駆細胞(EPC)、ヒト前骨髄性白血病細胞(HL-60)をモデル細胞として選択し、CD31、CD34の発現をMACSにより定量化した。

C-2) 幹細胞の巡回培養による細胞凝集塊形成

末梢血からの幹細胞の分離のためのプレ選別法を探るために、細胞同士の相互作用を利用し、巡回流れの場において細胞凝集塊を作製する技術を開発した。この技術を基に骨髄性幹細胞を用いて細胞凝集塊の作製を試みたところ、骨髄性幹細胞は細胞凝集塊を形成することを確認した。

C-3) 温度感受性ゲルを用いた末梢血からの連続細胞採取法の開発

臨床での使用に十分な量の幹細胞を採取可能な実用的プロセスについて検討を行った。第一段階として末梢血からの体外循環システムによる目標細胞の連続分離採取を行い、その後マイクロ流路を用いたセルソーティングシステムを用いることによって、連続、高速かつ高精度の採取が可能であることを示した。さらに、上述の温度感受性ゲルを用いた末梢血からの細胞分離の予備実験を行い、分離精度が高く、回収も容易な細胞採取法が実現できることを明らかにした。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

以下に、本研究のこれまでの成果で特に独創性・新奇性の高い事項を示す。

1) 温度感受性ゲルを用いた連続細胞採取法の開発

温度感受性ゲルにアビジンを含ませたゲルを基板にパターン化し、さらにビオチン標識ターゲット抗体を結合させることによって、ゲル上に任意の抗原を持つ抗体パターン化基板を製作した。そして、モデル細胞を用いて、この基板によりターゲット細胞のみを効率的に捕獲できることを明らかにした。また、捕獲後、温度感受性ゲルの温度を相転移点よりも上げることにより、基板から容易に細胞を回収できることを実験的に示した。この新奇性の高い方法は、バッチ式でなく連続フロー処理、小型化を可能とし、細胞接触部分をディスポーザブルにすることが可能である点などで、FACS, MACS などの従来の手法に比較して優れ、臨床応用を行う上で重要なマイルストーンと考えられる。

本手法により回収された細胞群では、幹細胞の密度は 10^3 に 1 個程度に濃縮されると見積もられ、マイクロ流路を用いたセルソーターと組み合わせることによって、高速かつ高精度のシステムを構成可能である。従って、細胞選別技術を臨床ベットサイドに繋ぐことも可能と考えられる。

2) MEMS 技術を用いたマイクロ混合器の開発

細胞分離の第二段階として、マイクロ流路内で抗体を塗布した磁性粒子と細胞サンプルを混合し、磁場により目標細胞のみを分離するシステムを設計した。そして、ラミネーション原理により高速に混合するマイクロ混合器を流れの解析を行って設計した。ラミネーション型の混合器は複数提案されているが、入口と出口で流れの上下が反転するため、重力による磁性粒子・細胞の沈降を抑えることができるのが大きな特徴である。PDMS を用いたマイクロマシン技術により試作し、図 2 のように断面 $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ の流路を 3 次元的に組み合わせたユニットを直列に 9 つ繋げることで、出口で完全な混合が得られる。実際に HUVEC, hMSC, および、CD31 標識の磁性粒子を用いた実験により、異なる種類の細胞が磁性粒子を用いて分離できることを明らかにした。

3) 機能化ポリパラキシリレンによる抗体固定手法の開発と表面効果を用いたマイクロセルソーターの試作

マイクロ流路を用いたセルソーターとして、ガスクロマトグラフィと同様の表面効果を用いたシステムを新たに考案し、試作した。壁面に抗体を固定する手法としては、生体適合性が高く、マイクロマシン技術との整合性も良いポリパラキシリレンを使用し、なかでもアミノ基を持つ機能化ポリパラキシリレンを壁面にコーティングし、共有結合により抗体を結合した。本手法は新奇性が高く、また、生体分子の汎用的な壁面パターンング法としても応用することができる。図 3 のように、壁面に CD31 抗体を固定したカラム型のマイクロ流路を形成し、HUVEC, hMSC を流して細胞の速度を計測した。その結果、CD31 を持つ HUVEC は、hMSC に比べ流下速度が顕著に減少することを明らかにした。

4) 高速スキャンングマイクロ PIV システムの開発

図 4 に、本研究で開発を進めている高速スキャンングマイクロ PIV システムで得られた速度ベクトルを示す。従来のスキャンング PIV システムでは、焦点深度方向に 10Hz 程度のスキャンが限界であったが、本システムでは、100Hz 以上の高速スキャンングにより、疑似三次元の時系列速度場が得られることを明らかにした。

これらの成果に基づき、特許 3 件を出願済みであり、現在、別途 3 件の出願を準備中である。

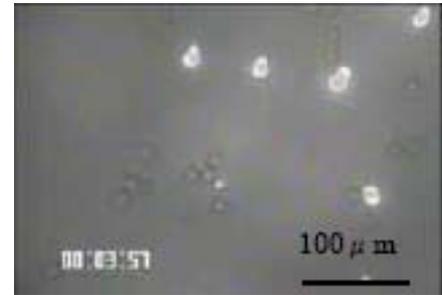


図 1 : 温度感受性ゲルによるターゲット細胞の捕獲

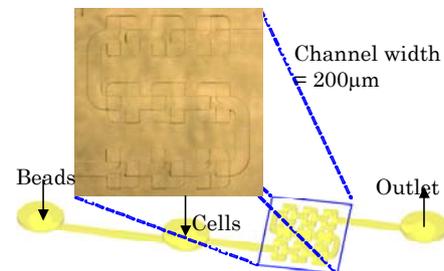


図 2 : ラミネーション型マイクロ混合器

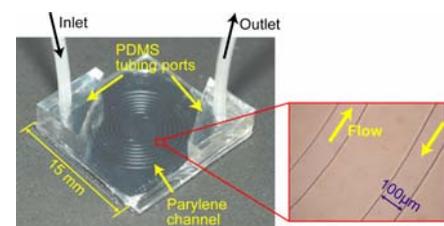


図 3 : 表面効果を用いたセルソータープロトタイプ

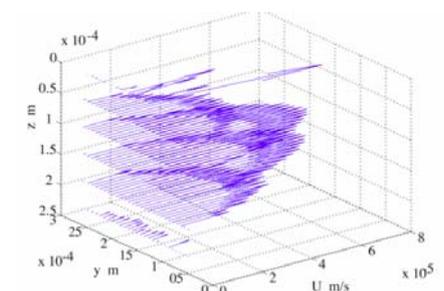


図 4 : スキャンング PIV により計測された速度ベクトル

- ⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)
- J. Miwa, W.-H. Tan, Y. Suzuki, N. Kasagi, N. Shikazono, K. Furukawa, and T. Ushida, "Development of micro immunoreaction-based cell sorter for regenerative medicine," Int. Conf. Bio-Nano-Informatics (BNI) Fusion, Marina del Rey, (2005), to be presented.
- Y. Suzuki, K. Angele, Y. Yamaguchi, J. Miwa, and N. Kasagi, "Development of high-speed micro scanning PIV," 6th Int. Symp. Particle Image Velocimetry, Pasadena, (2005), to be presented.
- J. Miwa, Y. Suzuki, and N. Kasagi, "Adhesion-based cell velocity regulation in an antibody-coated micro column for stem cell separation," μ TAS 2005, Boston, (2005), to be presented.
- H. Suzuki, C.-M. Ho., and N. Kasagi, "A chaotic mixer for magnetic beads-based micro cell sorter," J. Microelectromech. Sys., Vol. 13, No. 5, pp. 779-790 (2004).
- C. Chaktranond, K. Fukagata, and N. Kasagi, "Mixing enhancement in a micro serpentine conduit for cell sorting," Proc. 5th Int. Conf. on Multiphase Flow, Yokohama, (2004), Paper No. 405, 9 pp.
- K. Fukagata, N. Kasagi, and C. Chaktranond, "Lagrangian chaos in a micro serpentine mixer for immunomagnetic cell sorting," Proc. Transport Phenomena in Micro and Nanodevices, Kona Coast, (2004), (CD-ROM), Paper No. ii-5, 6 pp.
- W.-H. Tan, Y. Suzuki, N. Kasagi, N. Shikazono, K. Furukawa, and T. Ushida, "Development of novel micro mixer and its application to μ -immunomagnetic cell sorter," 8th Int. Conf. Miniaturised Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2004), Malmö, Sweden, (2004), Vol. 1, pp. 156-158.
- H. Suzuki, M. Nakano, N. Kasagi, and C.-M. Ho, "Particle tracking velocimetry measurement of chaotic mixing in a micro mixer," Int. Symp. Micro-Mechanical Engineering (ISMME2003), Tsuchiura, (2003), pp. 397-402.
- H. Suzuki, N. Kasagi, and C.-M. Ho, "Chaotic mixing of magnetic beads in micro cell separator," Proc. 3rd Int. Symp. on Turbulence and Shear Flow Phenomena, Sendai, (2003), pp. 817-822.
- C. Chaktranond, 深淵康二, 笠木伸英, "セルソータ用マイクロ混合器における磁性粒子運動の数値シミュレーション," 第18回数値流体力学シンポジウム講演論文集, 東京, (2004), (CD-ROM), Paper C6-2, 5 pp.
- Y. Sakai, M. Otsuka, J. Kozasa, F. Miyata, K. S. Furukawa, and A. Yamashita, "Ultra-violet-irradiation-based photofabrication that simultaneously produces a macroporous structure and flow channels using a photo-reactive biodegradable polymer and a gas-forming azoamide compound," Biochm. Eng. J., in press.
- E. Leclerc, K. S. Furukawa, F. Miyata, Y. Sakai, T. Ushida, and T. Fujii, "Fabrication of microstructures in photosensitive biodegradable polymers for tissue engineering applications," Biomaterials, in press.
- E. Leclerc, F. Miyata, K. S. Furukawa, T. Ushida, Y. Sakai, and T. Fujii, "Effect on liver cells of stepwise microstructures fabricated in a photosensitive biodegradable polymer by soft lithography," Materials Science & Engineering C, in press.
- H. Suenaga, K. S. Furukawa, T. Ushida, T. Takato, and T. Tateishi, "Aggregate formation of bone marrow stromal cells by rotation culture," Materials Science & Engineering C, 24(3), (2004), pp. 421-424.
- S. Miyata, K. S. Furukawa, T. Ushida, Y. Nitta, and T. Tateishi, "Static and dynamic mechanical property of extracellular matrix synthesized by cultured chondrocytes," Materials Science & Engineering C, 24(3), (2004), pp. 425-429.
- K. S. Furukawa, S. Miyauchi, D. Suzuki, Y. Umezu, T. Shinjo, T. Ushida, H. Suzuki, and T. Tateishi, "Bone tissue engineering based on bead-cell sheets composed of calcium phosphate beads and bone marrow cells," Materials Science and Engineering C, 24(3), (2004), pp. 437-440.

- G. Chen, T. Sato, T. Ushida, R. Hirochika, N. Ochiai and T. Tateishi, "Regeneration of cartilage tissue by combination of canine chondrocyte and a hybrid mesh scaffold." *Material Science & Engineering C* 24(3), (2004), pp. 373-378.
- H. Akaogi, T. Akimoto, S. Miyaki, T. Ushida, N. Ochiai, T. Tateishi and J. Tanaka, "Basic fibroblast growth factor supports in vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with osteoarthritis," *Material Science & Engineering C* 24(3), (2004), pp. 403-406.
- K. Tsuchiya, G. Chen, T. Ushida, T. Matsuno and T. Tateishi, "The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype in vitro," *Material Science & Engineering C* 24(3), (2004), pp. 391-396.
- M. Kawanishi, T. Ushida, T. Kaneko, H. Niwa, T. Fukubayashi, K. Nakamura, H. Oda, S. Tanaka, and T. Tateishi, "New type of biodegradable porous scaffolds for tissue-engineered articular cartilage," *Material Science & Engineering C* 24(3), (2004), pp. 431-435.
- S. Miyaki, K. Tezuka, T. Ushida, T. Akimoto, H. Akaogi, T. Kitamura, Y. Miyanaga, J. Tanaka, N. Ochiai and T. Tateishi, "Identification of membrane and secreted proteins in anterior cruciate ligament derived cells using "signal-sequence-trap", a retrovirus-mediated expression screening method," *Material Science & Engineering C* 24(3), (2004), pp. 397-401.
- T. Ohno, K. Tanisaka, Y. Hiraoka, T. Ushida, T. Tamaki, and T. Tateishi, "Effect of type I and type II collagen sponges as 3D scaffolds for hyaline cartilage-like tissue regeneration on phenotypic control of seeded chondrocytes in vitro," *Material Science & Engineering C* 24(3), (2004), pp. 407-411.
- T. Sato, G. Chen, T. Ushida, T. Ishii, N. Ochiai, T. Tateishi, and J. Tanaka, "Evaluation of PLLA-collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering," *Material Science & Engineering C* 24(3), (2004), pp. 365-372.
- Y. Ishii, T. Ushida, T. Tateishi, H. Nishimagi, and Y. Miyanaga, "Efficacy of topical hyperbaric oxygen for refractory foot ulcer," *Material Science & Engineering C* 24(3), (2004), pp. 329-332.
- T. Akimoto, T. Ushida, S. Miyaki, H. Akaogi, T. Tateishi, and T. Fukubayashi, "Effect of mechanical stretch on TGF- β 1 expression of C2C12 myogenic cells," *Material Science & Engineering C* 24(3), (2004), pp. 387-389.
- 下森徹平, 吉田大祐, 鈴木雄二, 笠木伸英, 古川克子, 牛田多加志, "コーンプレート装置による細胞ソーティングモデルの構築," 日本機械学会第 17 回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋, (2004).
- 古川克子, 大島宣雄, 立石哲也, 牛田多加志, "抗血栓性材料の評価系の開発," *バイオレオロジー学会誌*, 18(4), (2004), pp. 135-142.
- 古川克子, 牛田多加志, "血液適合性材料の評価," *日本機械学会学会誌*, 107, (2004), pp. 130-132.
- 古川克子, "三次元培養," 図解再生医療工学第 3 章, 再生医療のキーテクノロジー技術編 6, 立石哲也編, 工業調査会出版, (2004), pp. 78-82.
- G. Chen, T. Sato, T. Ushida, R. Hirochika, T. Tateishi, "Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh," *FEBS Letters* 542, (2003), pp. 95-99.
- G. Chen, T. Sato, T. Ushida, R. Hirochika, Y. Shirasaki, N. Ochiai, and T. Tateishi. "The use of a novel PLGA fiber / collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness," *J. Biomed. Mater. Res.* 67A, (2003), pp. 1170-1180.
- K. S. Furukawa, H. Suenaga, K. Toita, A. Numata, J. Tanaka, T. Ushida, Y. Sakai, and T. Tateishi, "Rapid and Large-Scale Formation of Chondrocytes Aggregates by Rotational Culture," *Cell Transplantation*, 12, (2003), pp. 475-479.

- K. S. Furukawa, T. Ushida, T. Noguchi, T. Tamaki, and T. Tateishi. "Development of cone and plate-type rheometer for quantitative analysis of endothelial cell detachment by shear stress," *Int. J. Artif. Organs*, 26(5), (2003), pp. 436-441.
- Y. Ishii, T. Ushida, T. Tateishi, and Y. Miyanaga, "Effects of transcutaneous topical injection of oxygen on vascular endothelial growth factor gene into the healing ligaments in rats," *J. Orthop. Res.*, 21, (2003), pp. 1113-1117.
- Y. Nakanishi, G. Chen, H. Komuro, T. Ushida, S. Kaneko, T. Tateishi, and M. Kaneko, "Tissue-Engineered Urinary Bladder Wall Using PLGA Mesh-Collagen Hybrid Scaffolds: A Comparison Study of Collagen Sponge and Gel as a Scaffold," *J. Pediatr. Surg.*, 38, (2003), pp. 1781-1784.
- 宮田昌吾, 牛田多加志, 陳国平, 新田康雄, 立石哲也, "再生軟骨の力学的特性に関する研究," 日本機械学会論文集(A編), 69巻677号, (2003), pp.
- 古川克子, 牛田多加志, 末永英之, 酒井康行, 立石哲也, "軟骨再生のための旋回培養による3次元凝集塊の大量形成," 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 24, (2003), pp. 39-44.