

論文の内容の要旨

論文題目 Study on Continuous Particle Separation Utilizing Microfluidics
(マイクロフルイディクスを利用した微粒子の連続分離に関する研究)

氏名 山田 真澄

1990年代後半以降、半導体製造プロセスに代表される微細加工技術を応用し、マイクロメートルスケールの微小な空間・構造を作製し、その中に流体を導入して化学・生物プロセスを行う、という研究が活発になってきた。このような微小な空間では、流れの状態は層流が支配的となり、また体積に対する表面積の増加に起因する様々な特長があるため、化学合成、分析、生化学スクリーニング等の分野への応用が期待されている。

一方、細胞、ポリマー粒子、無機微粒子などの粒子を、大きさや表面状態によって分離、精製、あるいは選抜するといった技術は、様々な産業・研究分野において非常に重要である。そして近年、それらの粒子とほぼ同じスケールの微細な流路構造を用いた、新しい微粒子の分離・選抜システムの構築に関する試みも行われつつある。一例として、微小な流路の中で超音波、誘電泳動、磁場などを用いた粒子の分離手法が報告されている。これらの手法は、微小な空間において微小な粒子に特徴的・支配的に働く力を巧みに利用したものであり、科学的に見て非常に興味深い。しかしながら、操作の自動化、処理量の増加など、より実用的な手法が必要とされる場合には、連続的な処理が可能でシンプルなシステムが魅力的であり、望ましい。そこで本論文では、外部からの操作を必要としない、微小なスケールでの流れ（マイクロフルイディクス）の場を利用した新しい粒子の分離・分級法に関して報告する。具体的には、まず第1章において、微小なスケールでの化学・生物プロセスの発展と微粒子の分離に関する研究の動向について概観した後、第2章では、表面状態の違いを利用した細胞などの粒子の分離手法である、マイクロスケールでの水性2相流を用いた分離法について記述する。次に第3章、第4章では、大きさによる粒子の分離法として提案した Pinched Flow Fractionation (PFF) 法とその改良について説明する。さらに第5章、第6章では、大きさによる粒子の濃縮と分級を可能とする手法である水力学的フィルトレーション法とその改良について説明し、最後に第7章において総括と今後の展望について記述する。

最初に行った研究は、微小スケールでの層流系において、細胞等の粒子に対する親和性が異なり、互いに混ざり合わない複数の水溶液を並行に導入し、表面状態の違いにより粒子を分離する手法に関するものである。このような混ざり合わない水溶液は水性2相分配系と呼ばれ、通常は試験管などにおいて生体高分子や微小な顆粒等を親和性の違いによって分離するために用いられる。しかし、この分配系を用いて動植物細胞のような比較的大

きな粒子を分離する際には、重力が分離に影響を与えてしまうため、精度の高い分離を行うことは不可能であった。そこで、この分離法をマイクロチャンネル層流系で連続的に行い、界面を重力と平行な方向に形成することにより、純粋に表面状態のみによって細胞の選抜が可能となると期待された。

実際に、フォトリソグラフィとレプリカモールドイングと呼ばれる手法により、PDMSポリマーを用いて、入口と出口をそれぞれ2つずつ有し、流路幅が400ミクロンであるマイクロチャンネルを作製した。そして粒子として植物培養細胞塊を用い、水性2相系としてPEG-デキストランの混合水溶液系を用いたところ、細胞の表面状態・親和性を利用した分離が可能であることが確かめられた。さらに、流路幅が分離対象となる粒子径の2~3倍程度となる細い部分（ピンチ部分）をマイクロチャンネルの途中に設けることで、粒子の2相界面への接触確率を高めることができ、分離効率の向上に成功した。

次に、上記のピンチ部分の効果を粒子の分級に利用することに着目した手法が Pinched Flow Fractionation (PFF) 法である。この手法では、ある特定の形状を有する微細な流路に細胞等の粒子を導入するだけで連続的な分級が可能である。原理としては、まず粒子懸濁液と粒子を含まない溶液（シース液）を、図1に示すように入口を2つ有し、かつ局所的に細い部分を有するマイクロチャンネルにそれぞれ導入する。この時、シース液の流量が粒子懸濁液の流量より相対的に大きくなるように調節することで、粒子はその大きさに関わらず、ピンチ部分において流路壁に整列されながら流れる。この時、粒子の大きさの違いによって、流路壁から粒子の中心位置への距離に、わずかながら差が生じる。このわずかな距離の差を効率的にピンチ部の下流において増幅することにより、粒子を流れと垂直な方向に、大きさによって正確に分離することが可能となる。実際に大きさの異なるポリマー粒子混合物の分離を行ったところ、正確な分級が可能であることが確かめられた。また、下流において複数の分岐を設けることにより、分離した粒子をそれぞれ個別に回収することも可能であることが確認された。

一方、複数の分岐流路を非対称に配置することで、PFF法の分級精度の向上を目指した手法が、Asymmetric PFF (AsPFF) 法である。この手法においては、複数の分岐流路のうちの一つを短く設計することで、ピンチ部における流れのうちのをその短い流路（ドレインチャンネル）に導入することができ、粒子の分級精度を飛躍的に向上させることが可能となる。実際に13の出口流路を有するマイクロ流路を作製して粒子の分離を行ったところ、直径0.7~3.0ミクロン程度の微小な粒子でも正確に分離できることが確かめられた。さらに、赤血球細胞などの非球形な粒子についても分級を行ったところ、これらの粒子はその短径に従って分級されることが確認された。

上記のPFF法は微小な流路内の流れを利用するだけで、粒子を大きさによって正確に分離できる優れた手法であると言えるが、粒子を含まない溶液を大量に導入しなければならないため、結果的に粒子が希釈されてしまうという欠点があり、さらに流量を正確にコントロールする必要もあった。そこで、単純に粒子懸濁液を導入するだけで粒子の分級と濃

縮を同時に可能とする手法を提案した。この手法の基本的な原理を図2に示す。まず、図2(a)に示すように、ある一つの分岐点において、左右の分岐流路へと導入される流量が十分に少ない場合、ある一定以上の大きさの粒子は、たとえ流路壁近傍を流れていたとしても、また、大きさが分岐流路の断面形状よりも小さい場合であっても、分岐流路へと導入されることがない。これは、粒子の中心位置は、少なくとも流路壁から粒子の半径に等しい距離の間には存在しない、という事実により説明できる。一方で、図2(b)に示すように、分岐流路へと導入される流量が大きい場合には、分岐流路へと導入される最小の粒子の大きさが増加する。つまり、左右の分岐流路へと導入される流量が、分岐流路へと導入される粒子の大きさを決定すると言える。

そして、これらの流れの状態を組み合わせることによって、粒子の濃縮と分級が可能となる。つまり、図2(c)に示すように、まず濃縮・分級対象となる粒子が左右の分岐流路へと導入されないような流れの状態を繰り返す。これにより、一段ごとの濃縮率はわずかであるが、数10回程度の繰り返しにより、粒子が大幅に濃縮される。さらに、流路内の流れは安定な層流系であるため、粒子の大部分はメイン流路の左右の壁面に整列しながら流れることになる。そしてさらに下流にある分岐点において、分岐流路に導入される流量を図2(a)、(b)のように段階的に増加させることにより、壁面に整列した粒子を段階的に、大きさによって分離・選抜することが可能となる。この手法では、流路内の仮想的な流れの幅が分離または濃縮される粒子の大きさを決めるため、水力学的フィルトレーション (Hydrodynamic Filtration) と名づけた。なお、それぞれの分岐流路に導入される流量は、流路の設計段階で流路を電気回路のアナログとみなすことで調節した。

実際に、入口が1つ、出口が7つあり、メイン流路の幅は20ミクロン、分岐流路の幅は5~20ミクロンであるマイクロ流路をデザインし、作製した。実際に2.1ミクロンと3.0ミクロンの粒子を導入したところ、粒子の濃度は結果的に30~40倍程度に濃縮され、さらに正確に分級されることが確認できた。また、細胞への応用として、血液中からの白血球の選択的濃縮を行ったところ、白血球の選択的な濃縮が可能であった。

ただしこの手法では回収率が十分でなく、また、大きな粒子の中には必然的に小さな粒子が混入してしまう、という問題点があった。そこで、まずメインの流路の片側から流体のみを分離し、下流において合流させ、さらにその下流において、反対側の流路壁から流体を分離し、粒子の濃縮と分級を可能とする方法を提案した。この手法では、上記の水力学的フィルトレーションと同様に、ある流路構造に粒子懸濁液を導入するだけで、完全な回収と濃縮・分級が可能となる。実際に数種類のマイクロ流路をデザインし、ポリマー粒子を導入して実験を行ったところ、非常に正確な粒子の分離が可能であることが確かめられた。さらに血球細胞を導入したところ、白血球と赤血球をほぼ完全に分離できることが確認された。

以上に示した手法は、純粋なフルイディクス的手段により、表面状態または大きさによって微粒子を正確に分離することのできる優れた方法であると言える。また、操作が非常

に簡便であるため、医学・生化学、環境計測、粒子製造などの幅広い分野において、実用的な手段になると期待される。

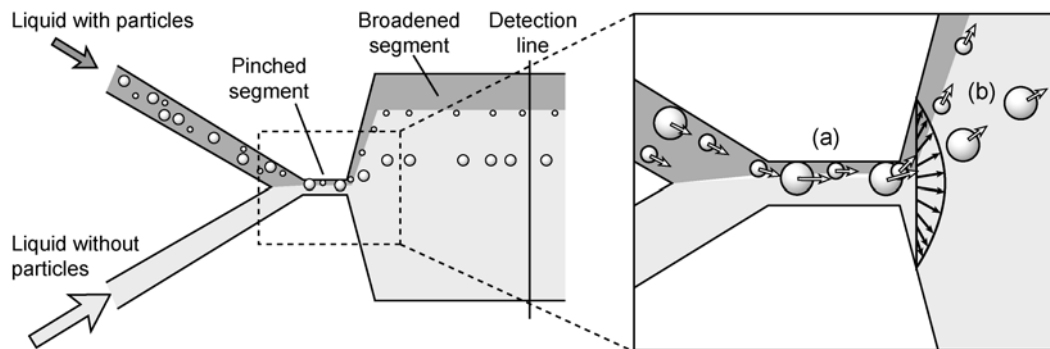


図 1 Pinched Flow Fractionation 法の原理図。

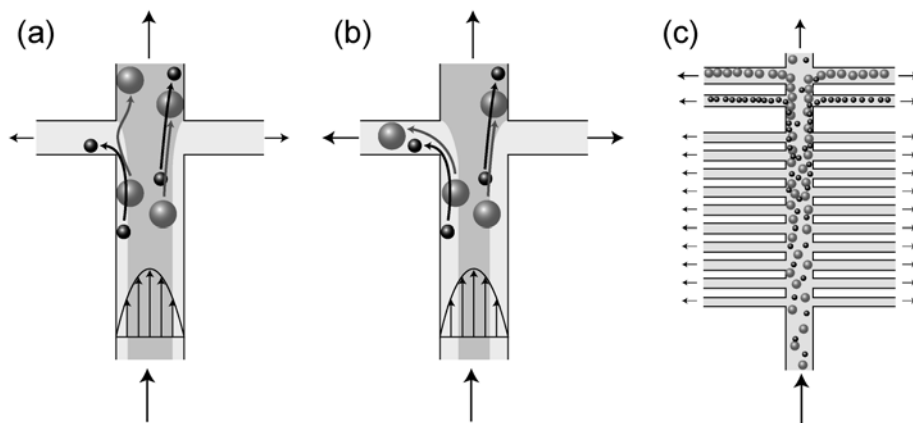


図 2 水力学的フィルトレーションの原理図。