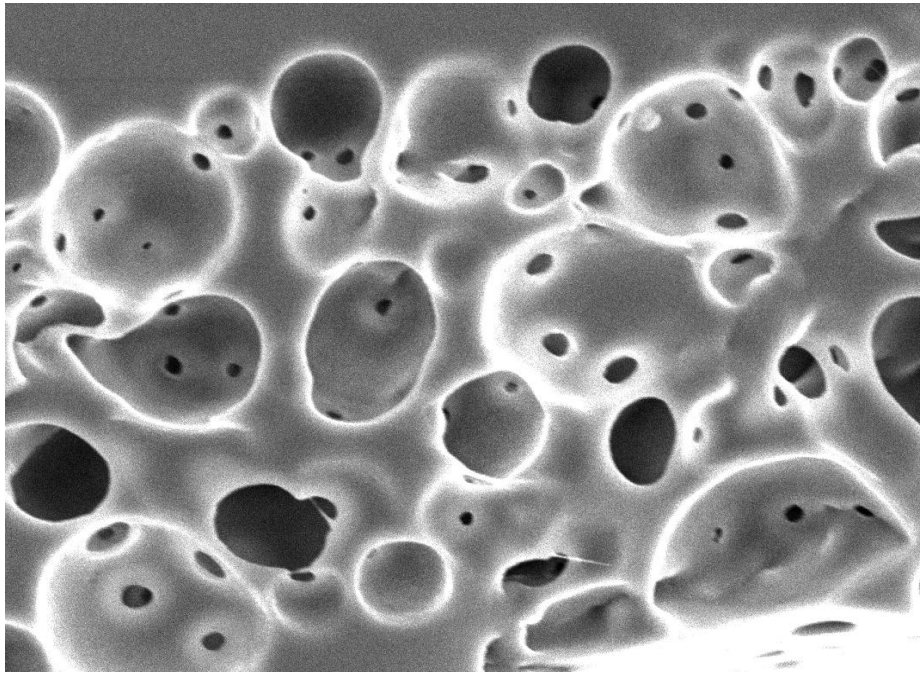
微粒子・細胞の連続分離を可能とする多孔性基材一体型マイクロ流路デバイス

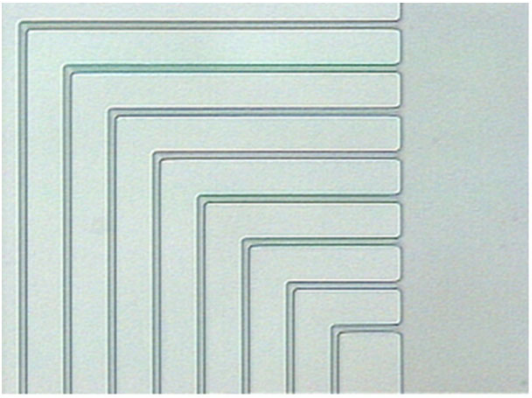


多孔性基材

千葉大学　大学院工学研究院
共生応用化学コース
准教授　山田　真澄

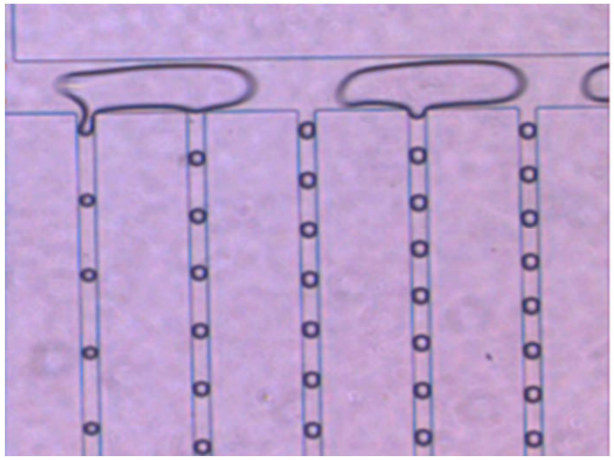
2022年10月20日

グループの基盤技術：マイクロ流体デバイス

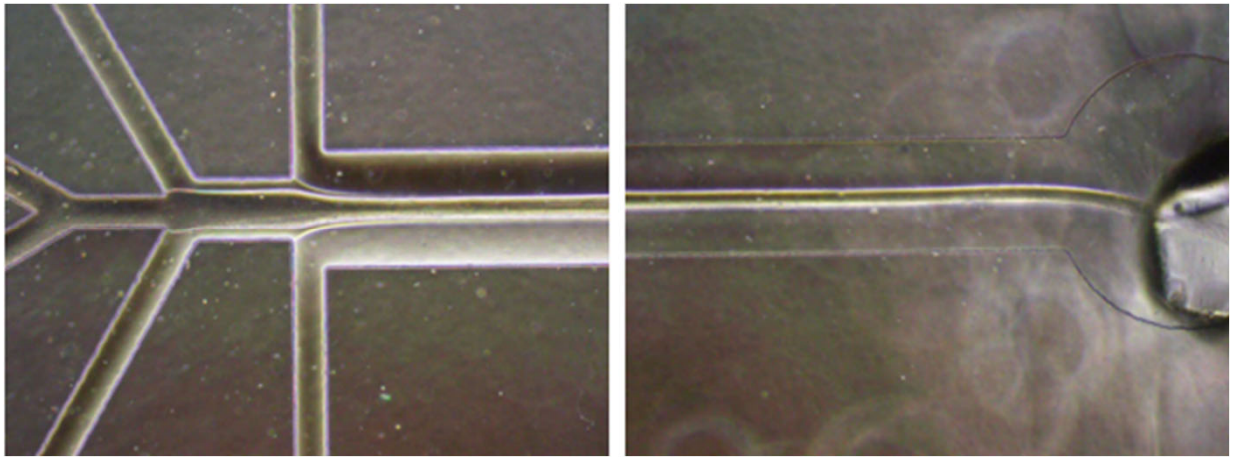


・微細加工技術を用いて作製した，幅・深さがサブミクロン～数100 μm程度の流路構造
・物理、化学、バイオ研究分野における様々な応用
・サイズの制御性、デザインの可変性

大きさのそろった液滴の形成・操作



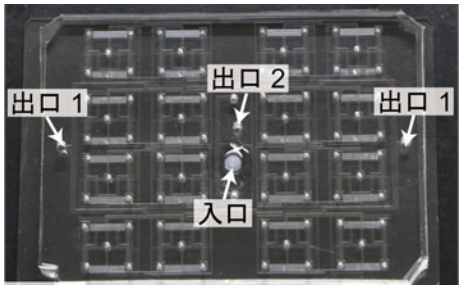
層流の形成

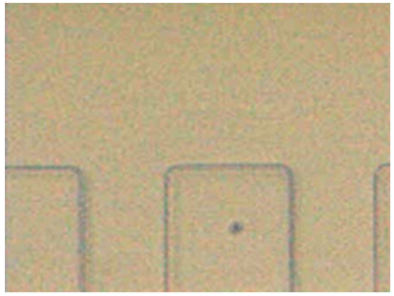


・微粒子やファイバーの作製・加工
・細胞培養用バイオマテリアルの作製と応用
・微粒子や細胞の分離・選抜システムの開発

マイクロ流体デバイス：研究例

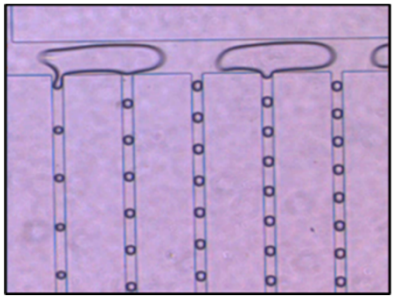
微粒子/細胞のソーティング

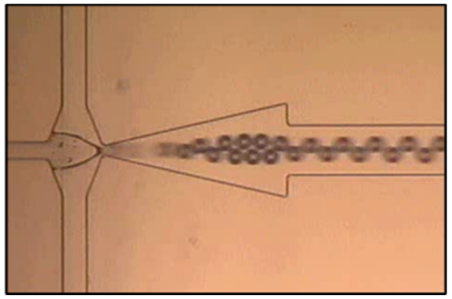




Anal Chem 2013, 2020, Lab Chip 2017, 2019, BMMD 2012, Biomicrofluidics 2011, Microfluid Nanofluid 2011, 2013, Micromachines 2019, Anal Chem 2020, Analyst 2022, etc.

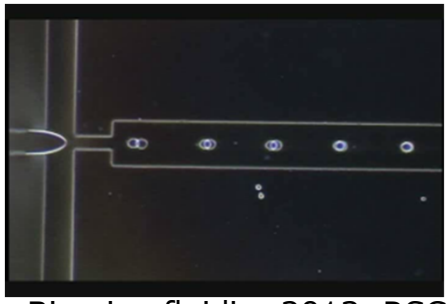
液滴や気泡の形成と応用

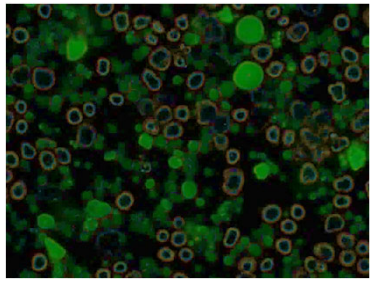




Anal Chem 2016, Lab Chip 2015, Chem Commun 2011, Sens Actuators B 2010, Langmuir 2015, 2017, etc.

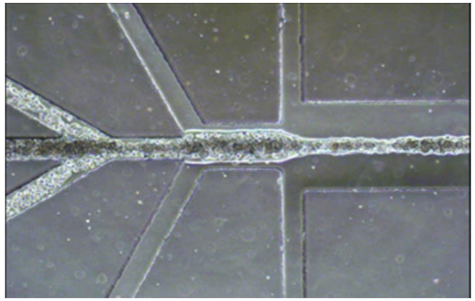
非平衡状態の液滴を用いる微粒子の調製と応用

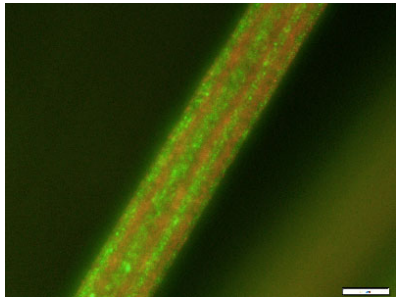




Biomicrofluidics 2013, RSC Adv 2013, 2014, 2017, Langmuir 2015, Lab Chip 2015, JBB 2022, ACS Biomater Sci Eng 2017, ACS Appl Bio Mater 2019, JBB 2022 etc.

ファイバー状材料の調製と生体組織工学

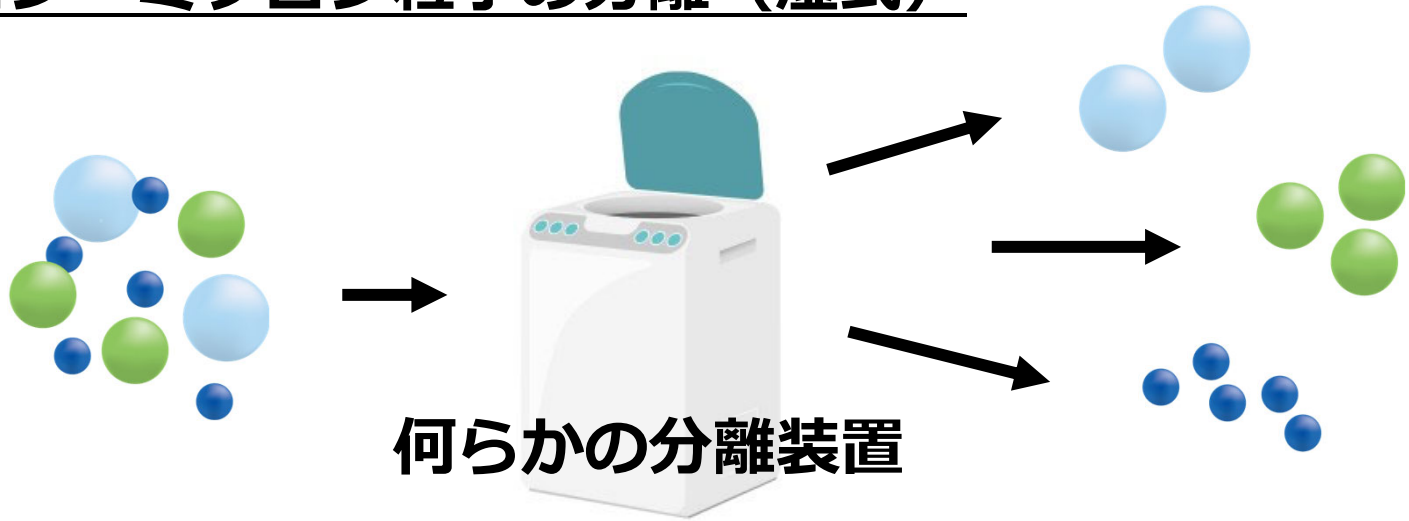




Soft Matter 2012, Biomaterials 2012, JBB 2013, 2018, Biofabrication 2014, Lab Chip 2018, Sens Actuators B 2019, Langmuir 2012, RSC Adv 2019, Biomicrofluidics 2014, ACS Omega 2020, Biotechnol J 2016 Mater Eng C 2021, etc.

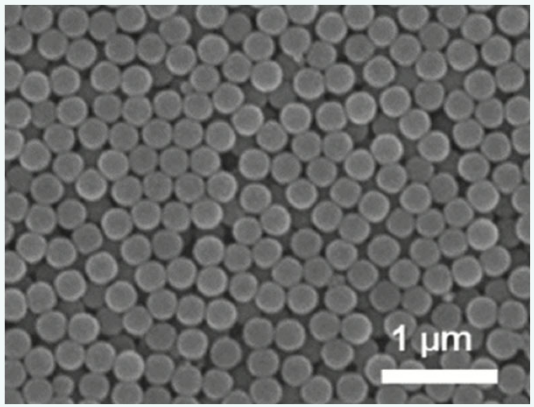
微粒子の分離：背景

サブミクロン～ミクロン粒子の分離（湿式）



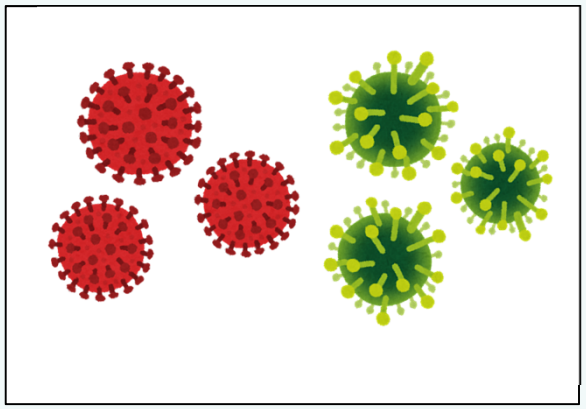
応用例

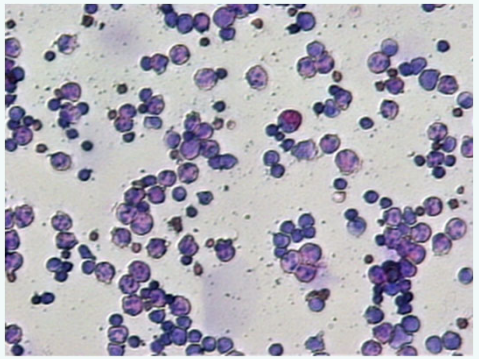
機能性材料開発



単分散粒子の調製

医療診断・生化学分析





ウイルス・細胞・生体分子の選抜

従来技術とその問題点

・遠心分離やろ過による分離

→　分離精度向上に課題，マニュアル操作による手間

・クロスフロー分離システム

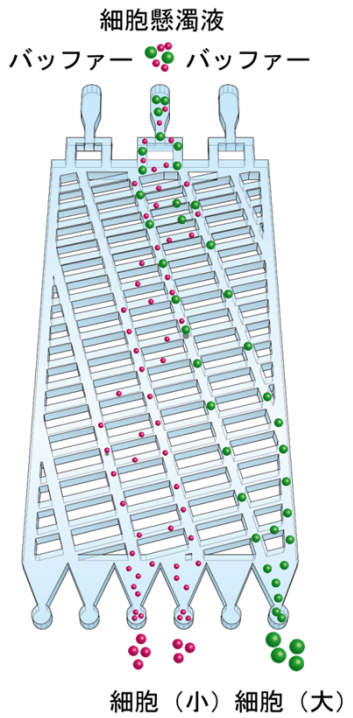
→　分離膜の流路系への統合に手間がかかる

分離膜の孔径制御，流体制御が困難

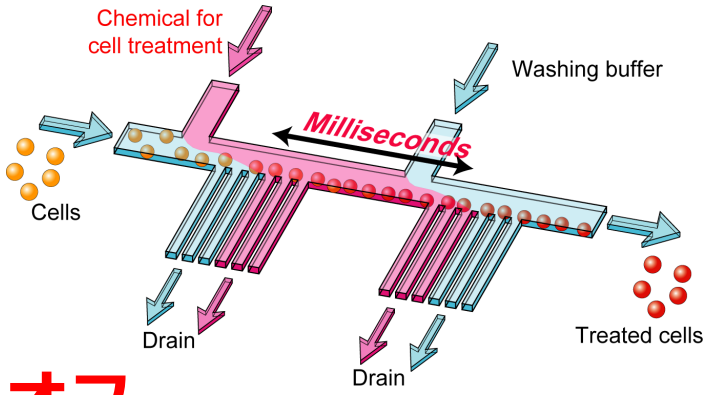
そもそも細胞や粒子分離への応用は極めて限定的

⇒ マイクロ流路を用いた分離技術の開発

マイクロ流体デバイス：微粒子分離

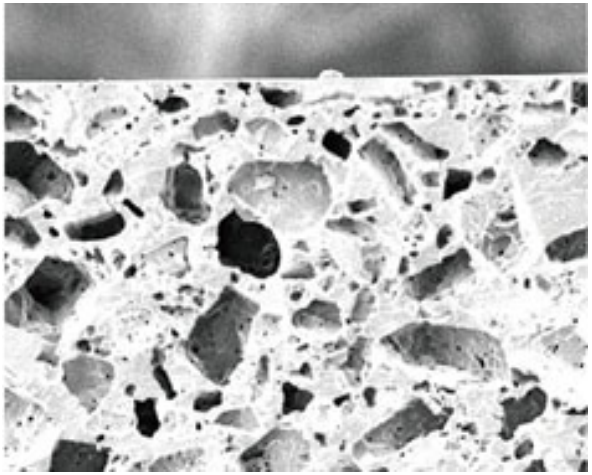


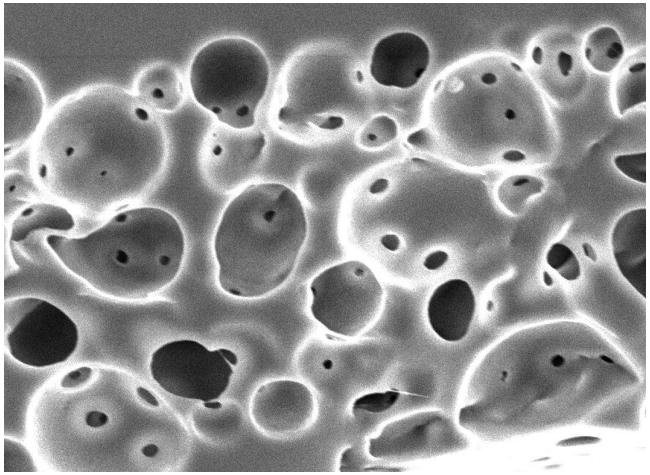
- 特定の流路構造に懸濁液を導入するだけ
- 連続かつ精密な分離
- 主にサイズを用いた精密分離
- 粒子の表面マーカー，変形能なども利用可能
- 閉塞しにくい格子状流路構造も提案
- 様々な細胞分離の実績あり
- 並列化することで，最大毎分20 mL程度まで処理可能
- 数ミクロン～数百ミクロンの対象も分離可能
- 粒子や細胞のキャリア液交換も可能
- 使い捨ての流路構造（PDMS製）
- 流路の集積度が低い：処理量と精度がトレードオフ



多孔性基材の利用

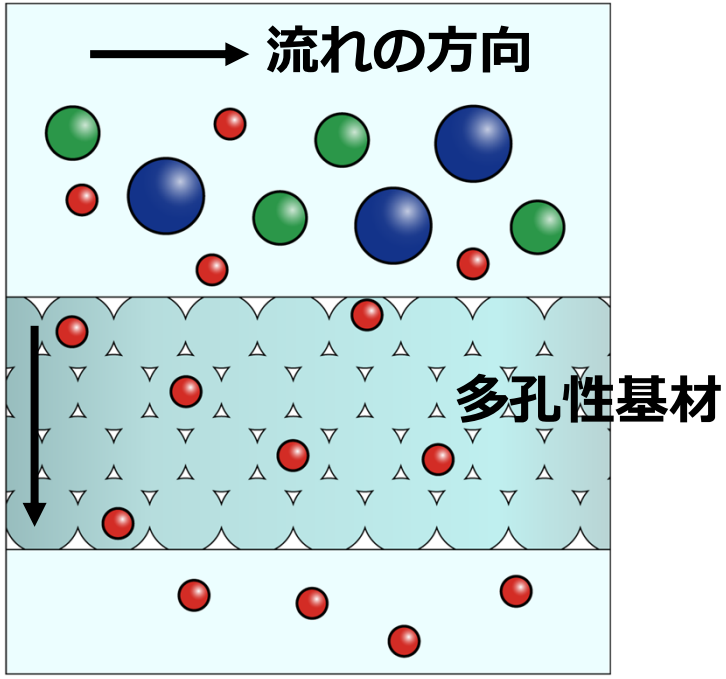
多孔性基材





サブミクロン～数10マイクロメートルの連通孔を形成
一つ一つの微細孔が粒子分離において機能？
新しい分離基材として利用できる！？

多孔性基材を組み込んだ
クロスフロー式分離機構

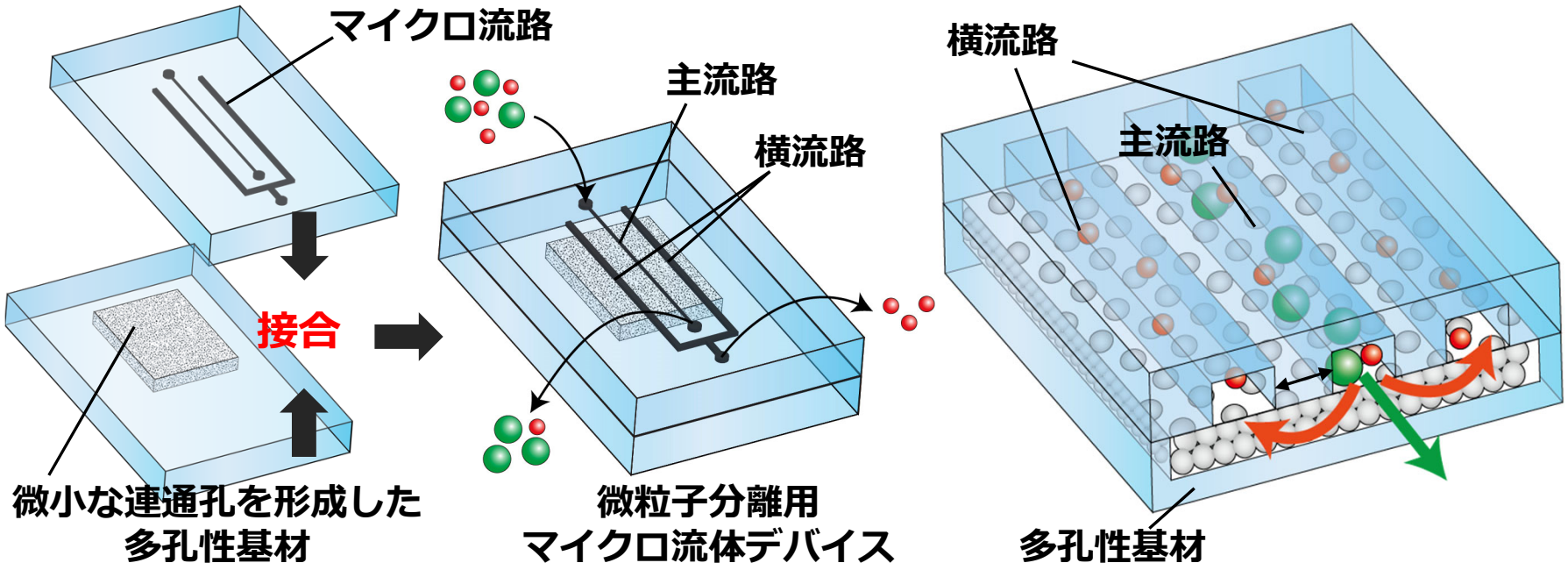


簡便な操作・システム
処理量の向上？
分離精度の向上？

分離の精度と処理量を向上するために，多孔性基材の構造だけでなく，
ハウジングの形態や操作条件の最適化が必要

多孔性基材を統合した分離デバイス

本研究のコンセプト



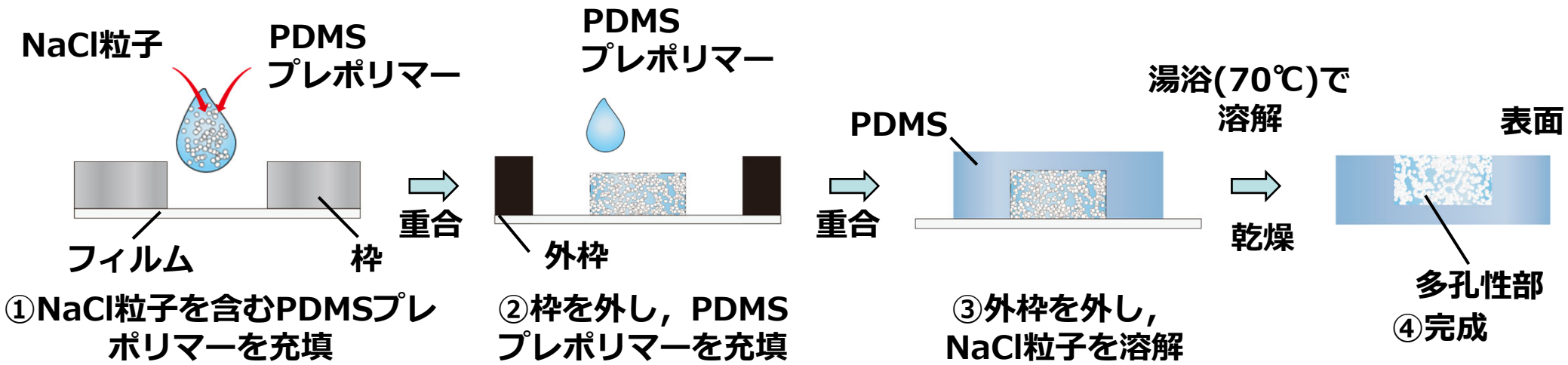
分離の模式図

２枚の基板を接合するだけ→**デバイス作製が簡便, 流路構造の変更が簡便**
連通孔が高密度→流路構造が数10 μmスケールでも，**サブミクロン粒子を分離**可能？
流路間距離を制御→流量分配比や微粒子の分離挙動を制御可能
　→**分離効率や精度の最適化が可能**！？

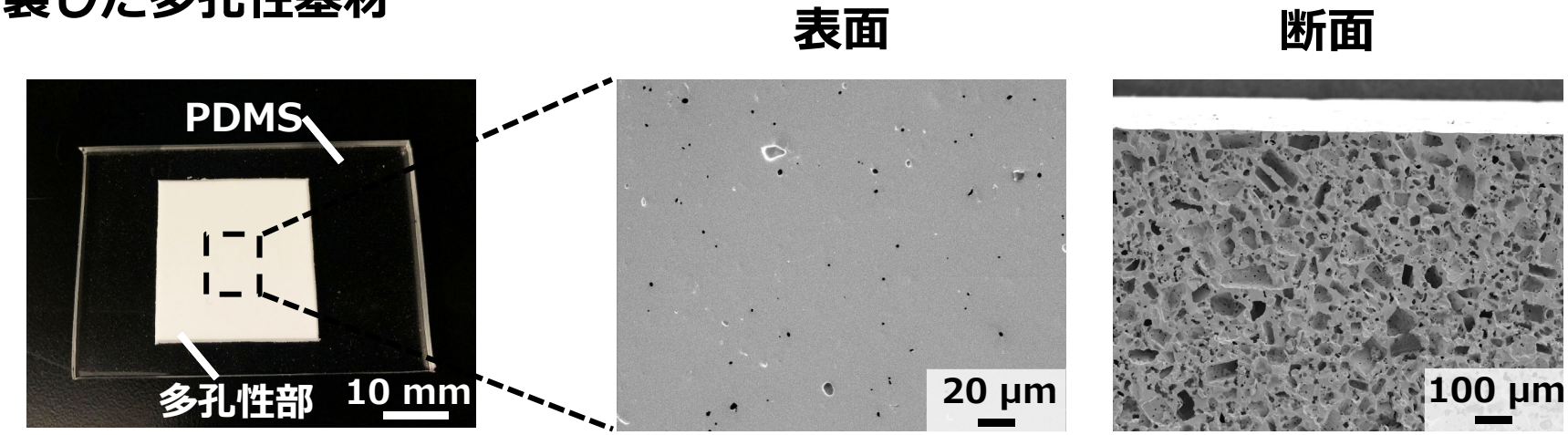
多孔性基材の作製方法①

- ソルトリーチング法

NaCl粒子：直径 30～60 μm，体積比：45%



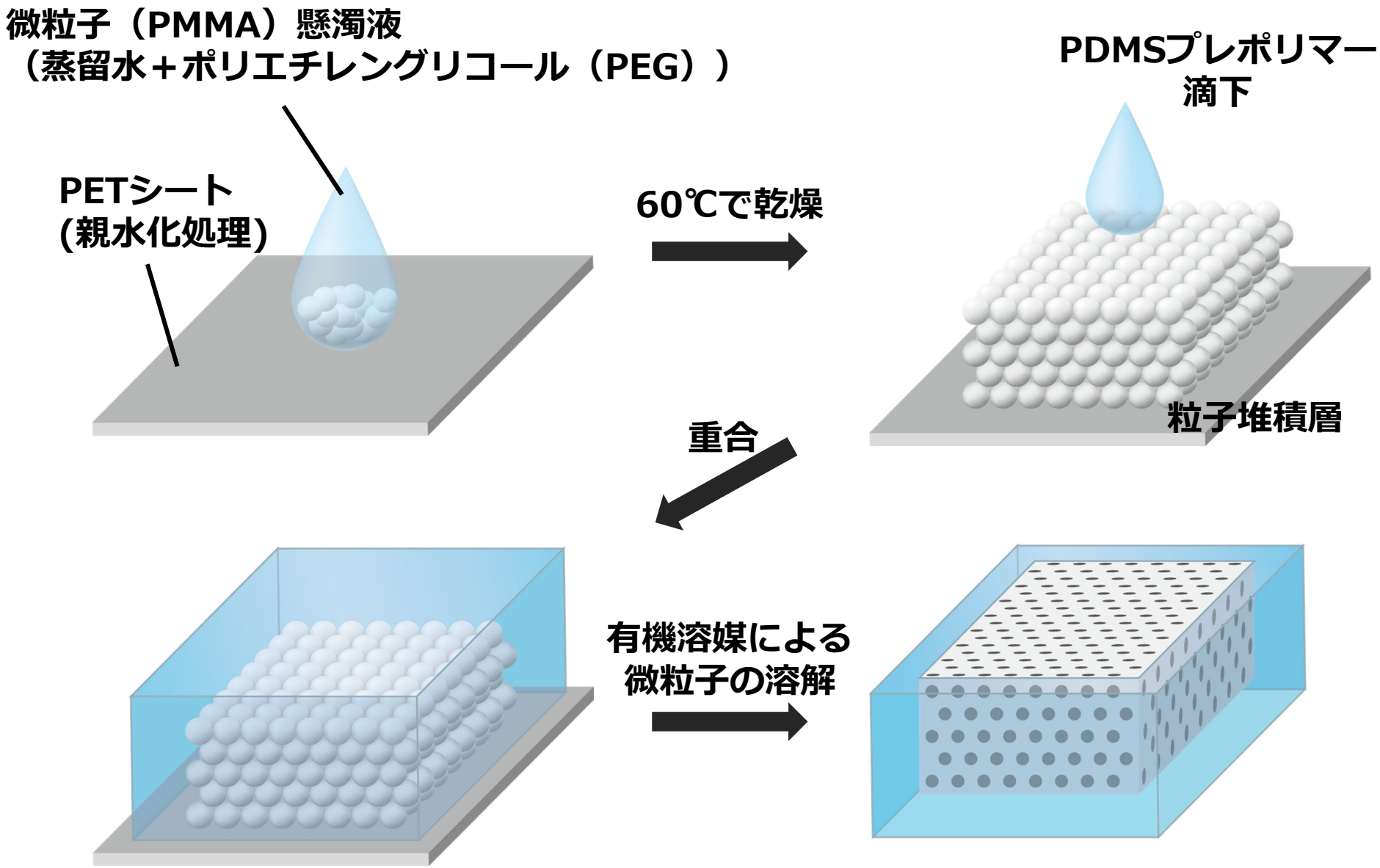
- 作製した多孔性基材



表面細孔径：直径1.7 ± 1.0 μm

多孔性基材の作製方法②

- 逆コロイド結晶

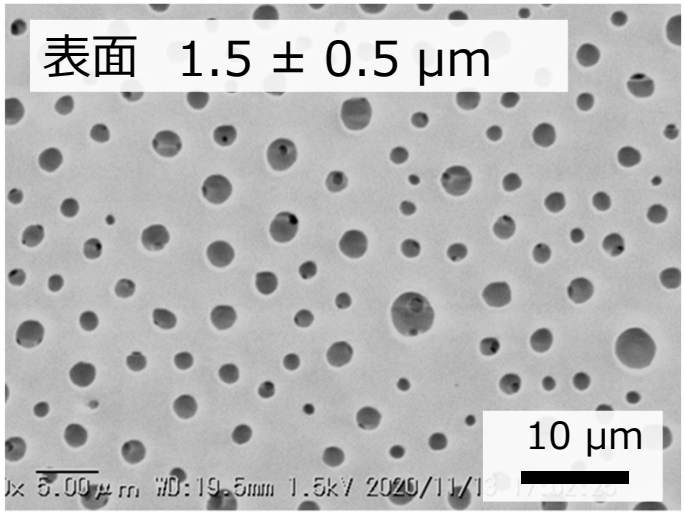


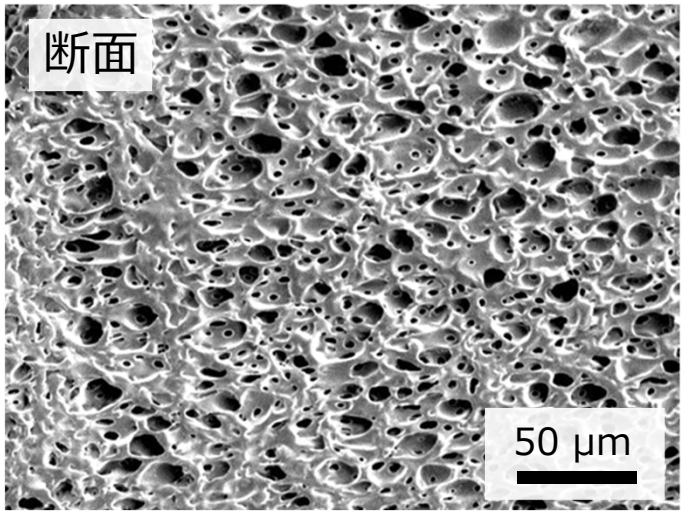
微細孔の観察

表面と断面のSEM像

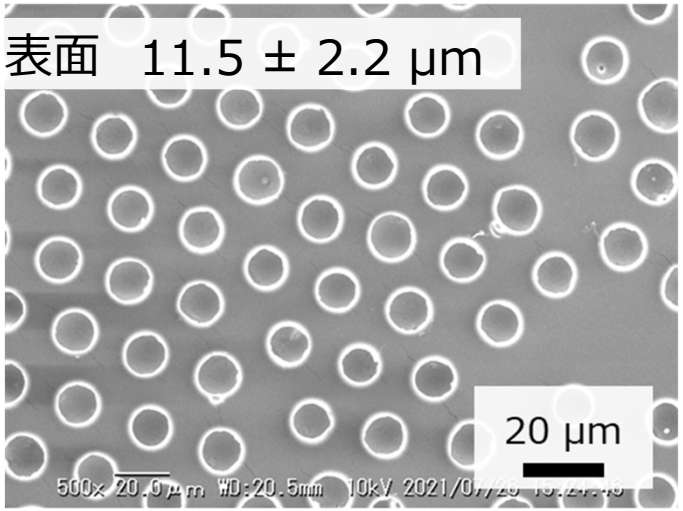
PMMA微粒子 (Φ = 4.9, 30 μm)

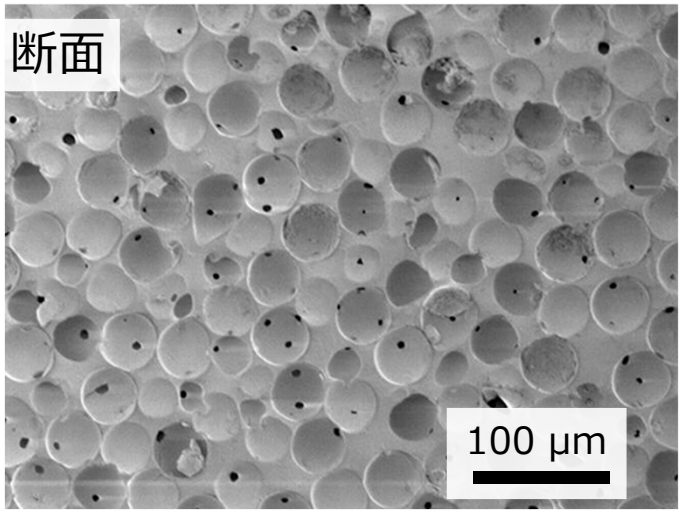
Φ = 4.9 μm　CV: 31%





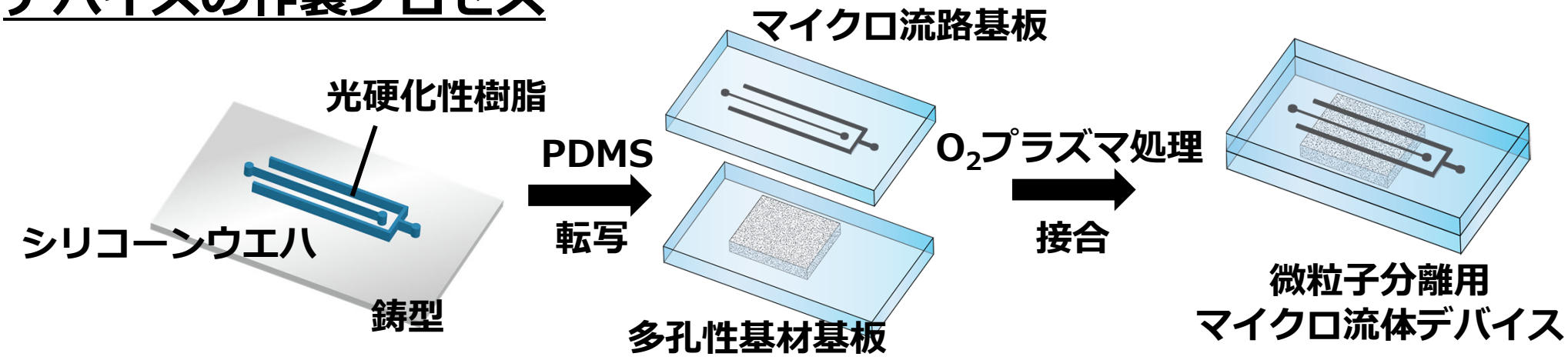
Φ = 30 μm　CV: 7.1%





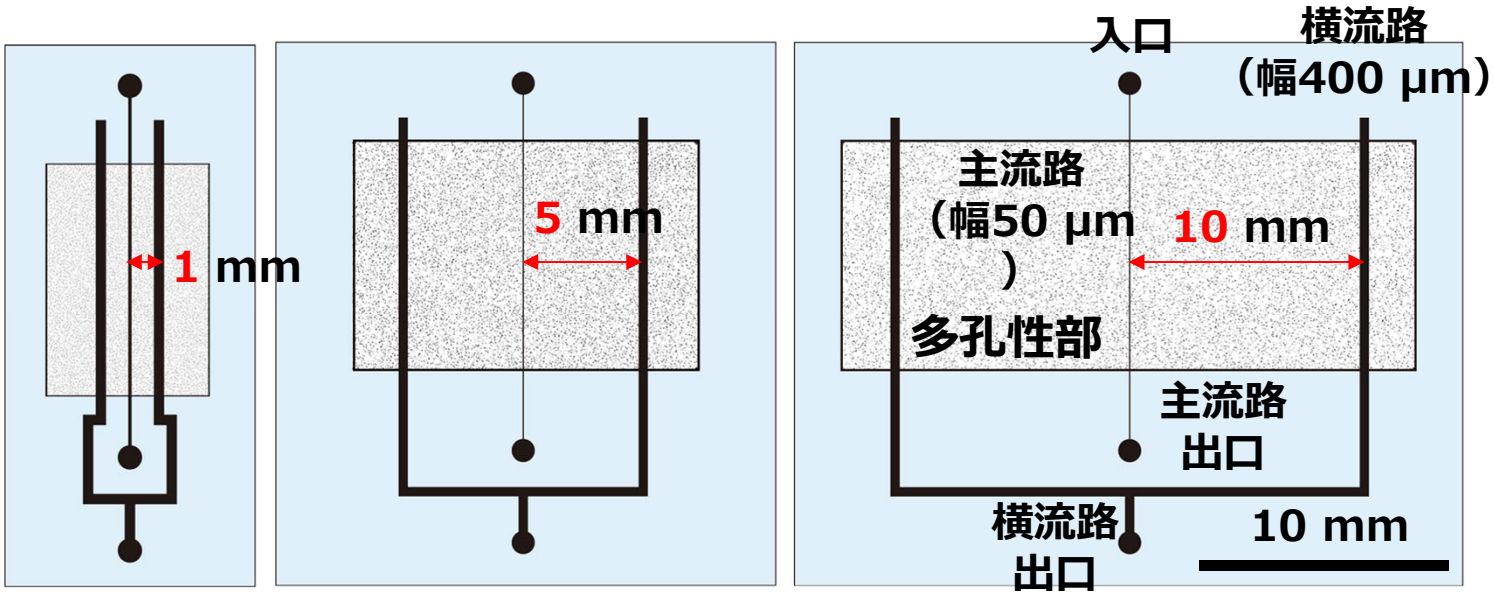
マイクロ流路の作製と設計

デバイスの作製プロセス

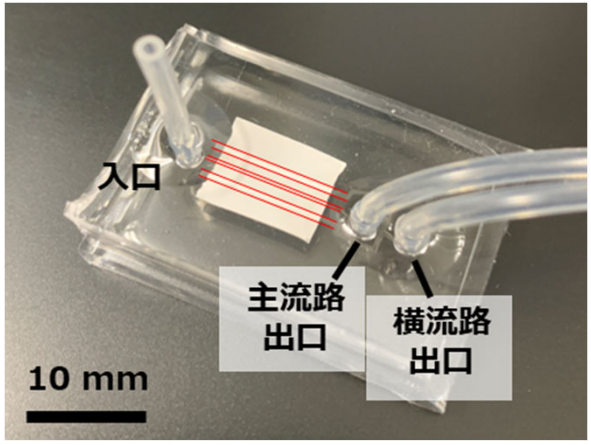


マイクロ流路の設計例

深さ：20 μm

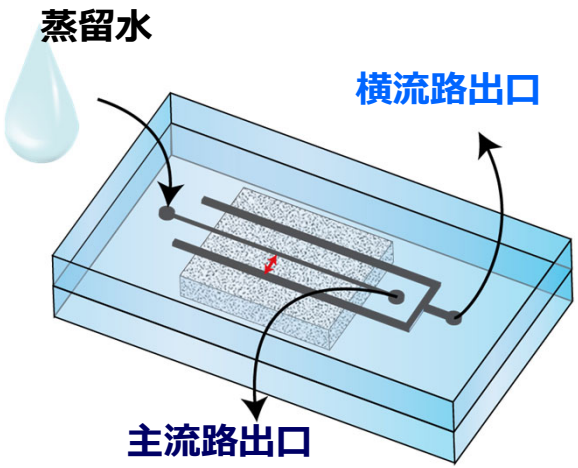


実際のデバイス
（1 mm）



流路間の距離を調節：距離が大きいと，横流路に導入される
流量が減少し，分離サイズも小さくなると予想

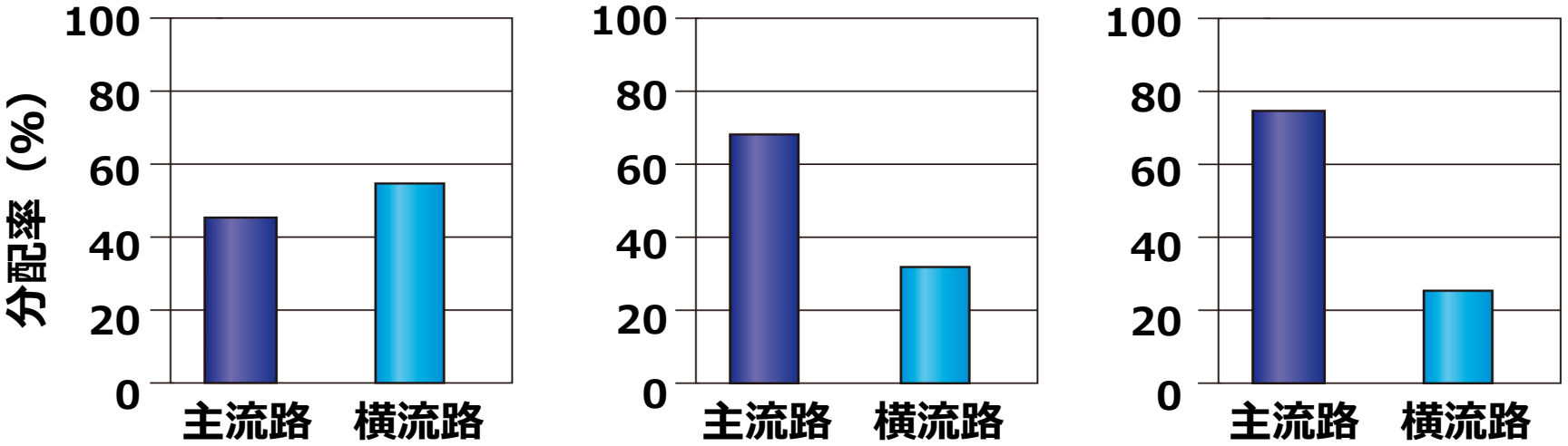
連通性の確認および流量制御



入口から蒸留水を導入し，
各出口から回収した蒸留水の分配率を測定

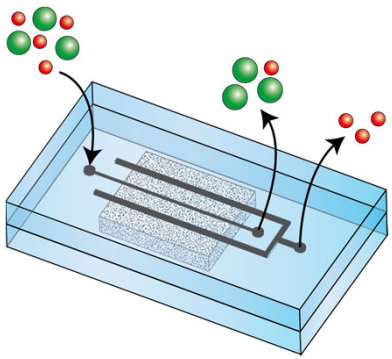
多孔性基材：PMMA粒子　Φ = 4.9 μm

流路間距離：1 mm　　流路間距離：5 mm　　流路間距離：10 mm



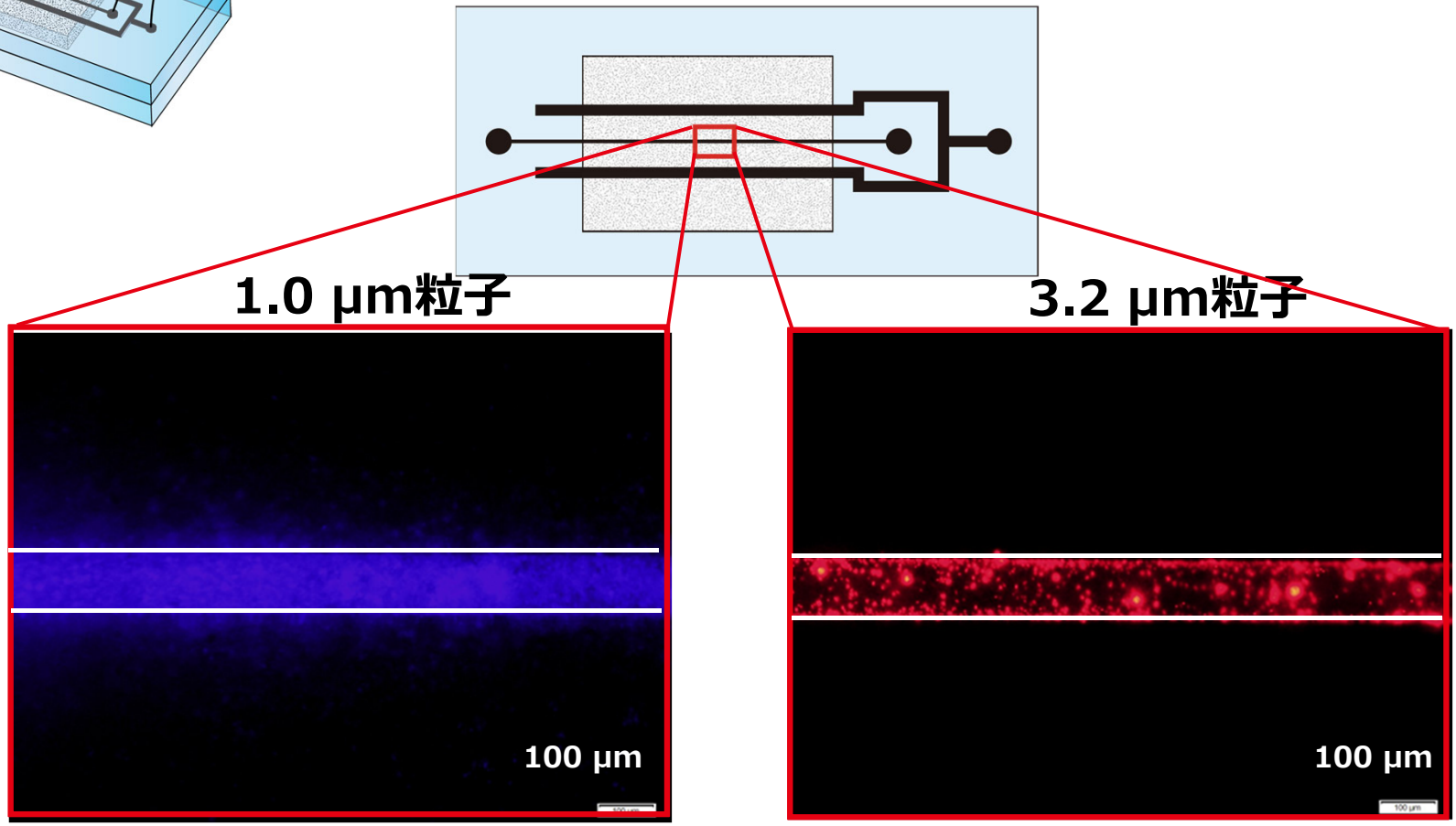
多孔性基材の孔は連通していた
流路間距離の制御によって，流量分配比が変化
→流量分配率を調節可能
30 μm 粒子の場合には横流路への分配量が増加

微粒子の分離挙動①



粒子径 1.0, 3.2 μmの蛍光粒子を導入

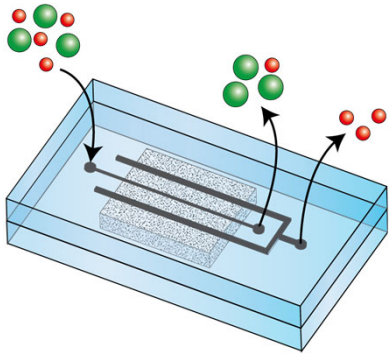
流路間距離： 1 mm　　多孔性基材：Φ = 4.9 μm



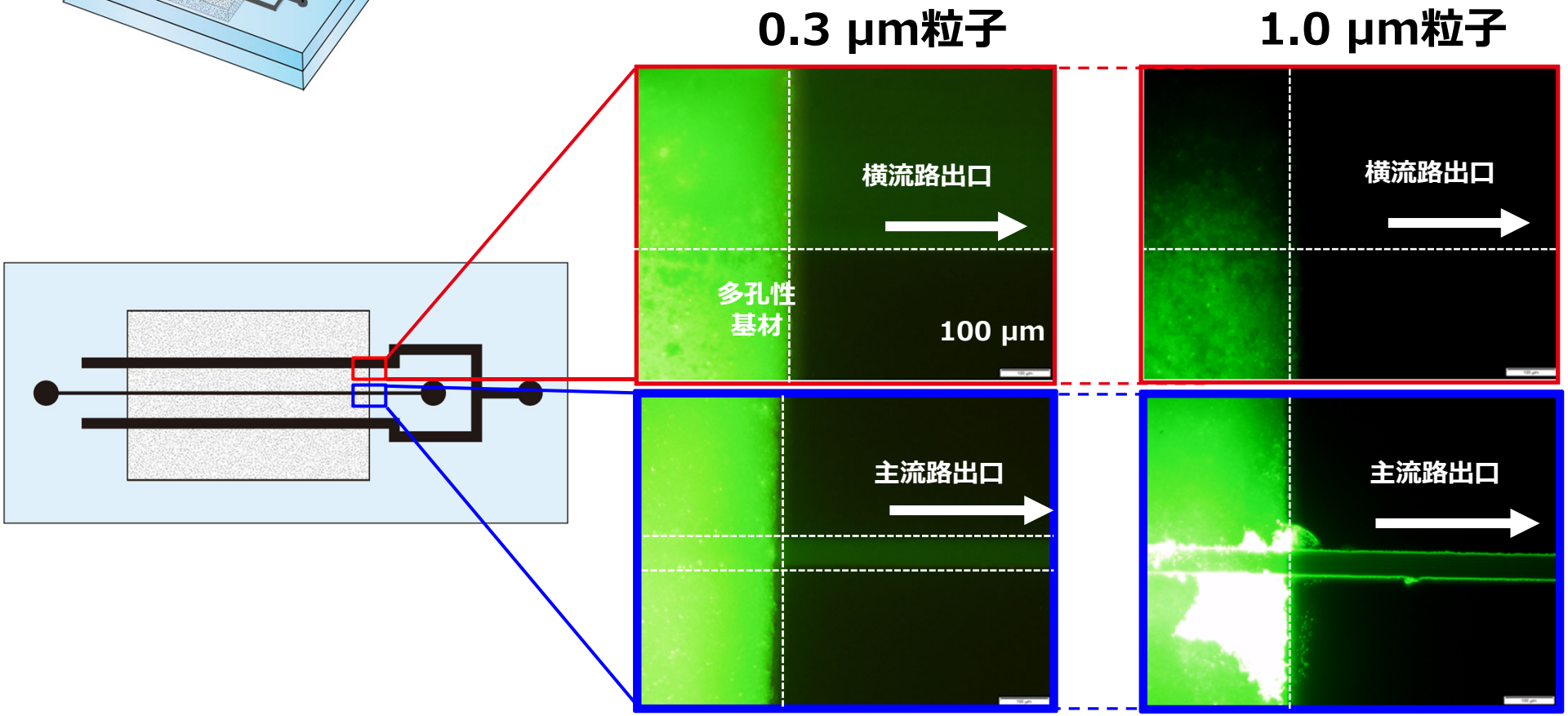
1.0 μmと3.2 μmの粒子は多孔性部に流入せず

→サブミクロン粒子への適用

微粒子の分離挙動②



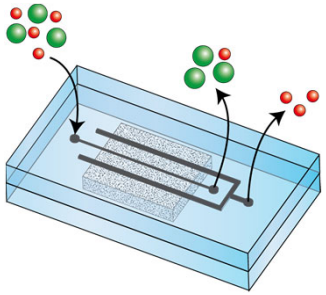
粒子径 0.3 ，0.5，0.7，1.0 μmの緑色蛍光粒子を導入
流量：10 μL/min
流路間距離： 1 mm　　多孔性基材：Φ = 4.9 μm



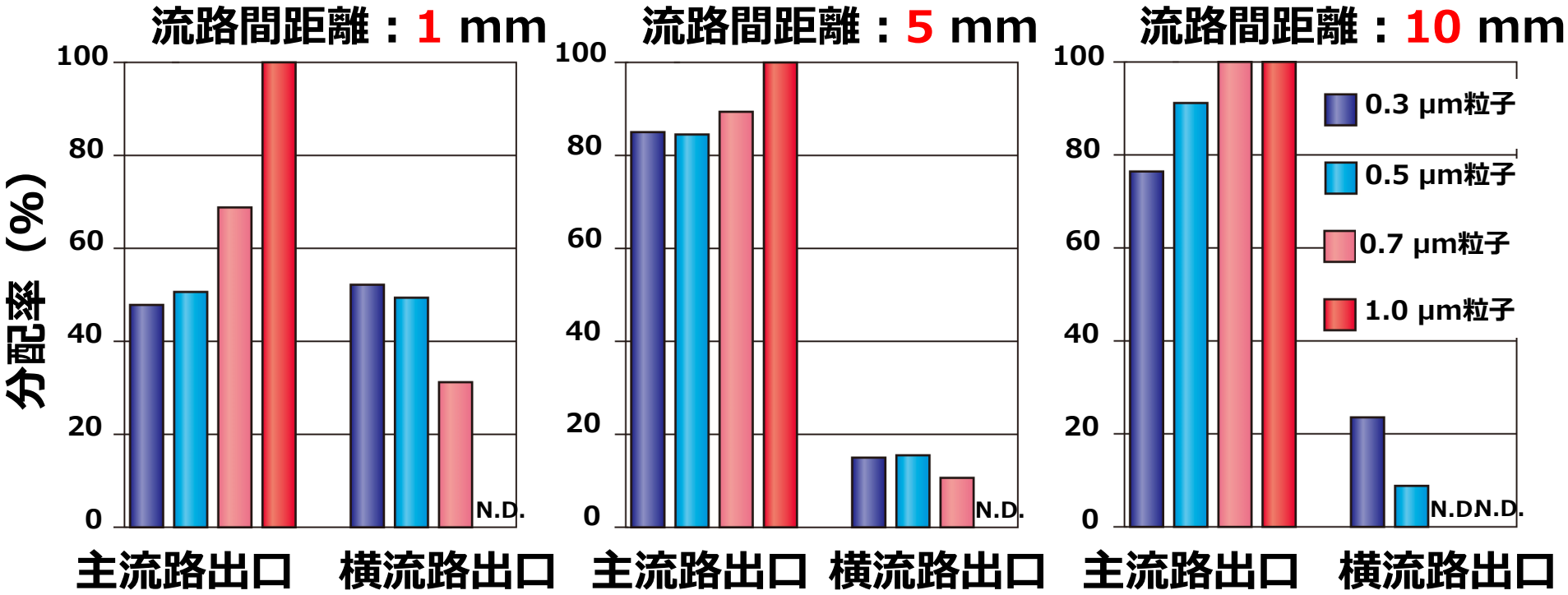
0.3 μmと1.0 μmの粒子は異なる分離挙動

サブミクロン粒子を連続的に分離可能

微粒子の分離挙動③

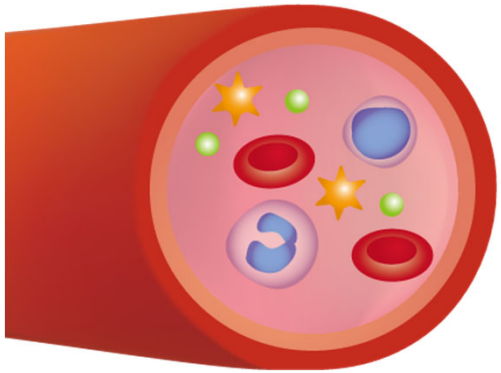


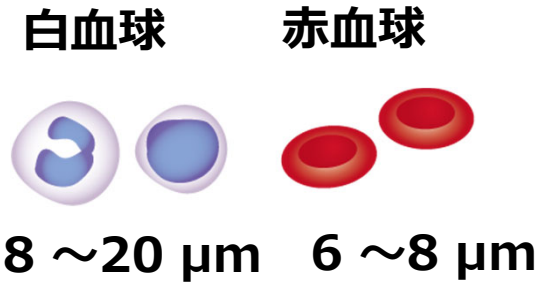
粒子径 0.3 ，0.5，0.7，1.0 μmの粒子を導入
流量：10 μL/min
各出口溶液中の粒子濃度を計測し，分配比を計算



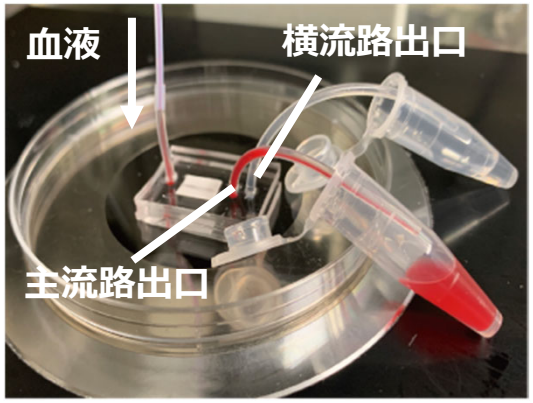
分離の閾値は流路間距離1，5 mm：0.7～1.0 μmの間
流路間距離10 mm：0.5～0.7 μmの間
流路間距離の変更によって分離の閾値を調節可能

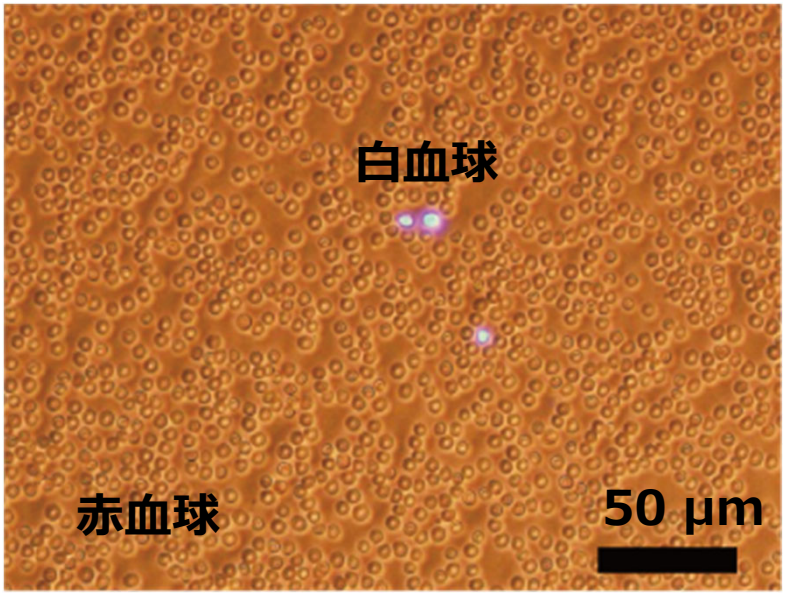
血液成分の分離



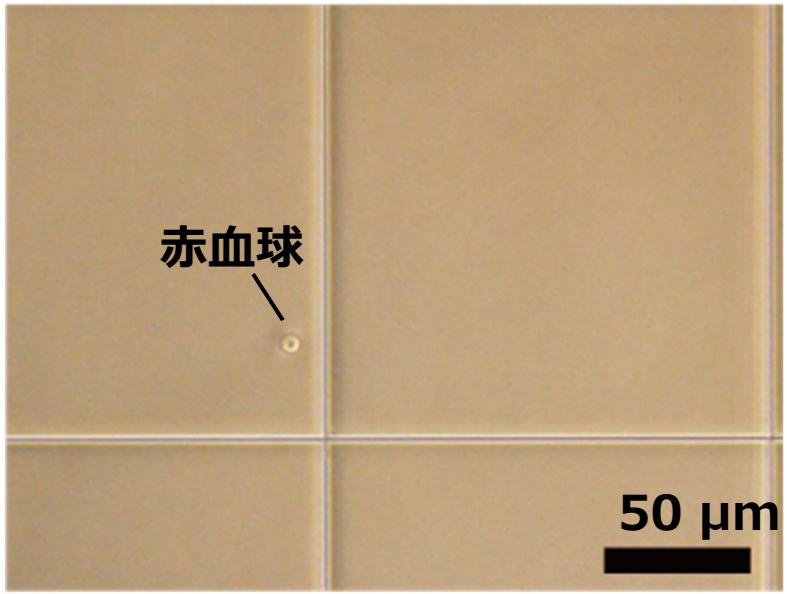


実験の様子





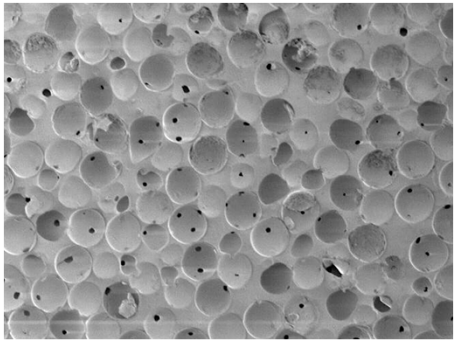
横流路出口から回収した結果



横流路出口から回収した結果

血液サンプルを導入するだけで，簡便に，血漿成分の分離が可能

新技術の特徴・従来技術との比較



・多孔性基材を分離マトリックスとして利用
→　孔径・孔形状の制御が可能

・流路と多孔性基材を簡便に統合可能
→　作製プロセスの操作性向上，安定性向上

・流路形状の制御による分離制御
→　任意の流路構造を自在に設計可能

想定される用途

・医療診断

→　特定の生体微粒子，生体高分子，細胞，血液成分の分離濃縮の自動化プロセス

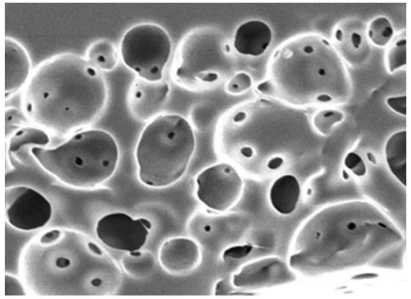
・材料開発

→　サブミクロン～ナノ材料の生成プロセス

・その他，微粒子調製，細胞培養，薬剤の評価，etc

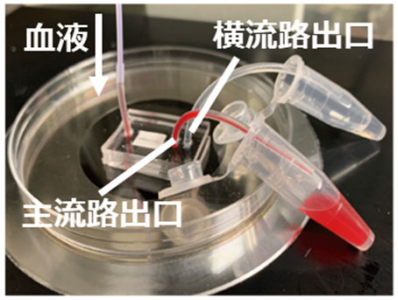
実用化に向けた課題

・よりサイズの小さい連通孔の形成
（現状5 μmのポアジェンが最小）



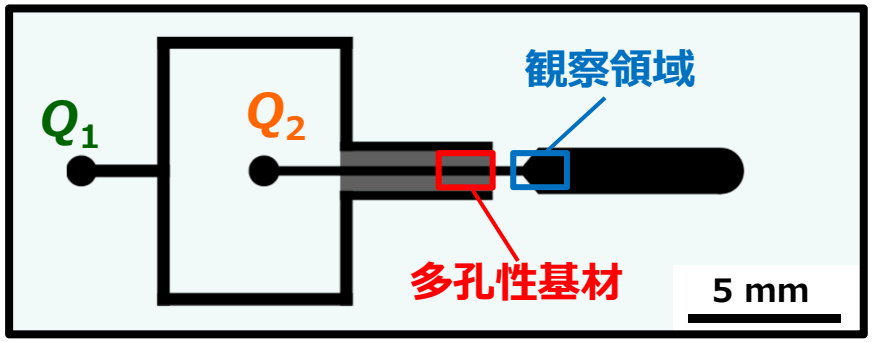
・最適な流路設計指針の開発

・ファウリングを抑制する材料の利用
（特に血液成分の場合）



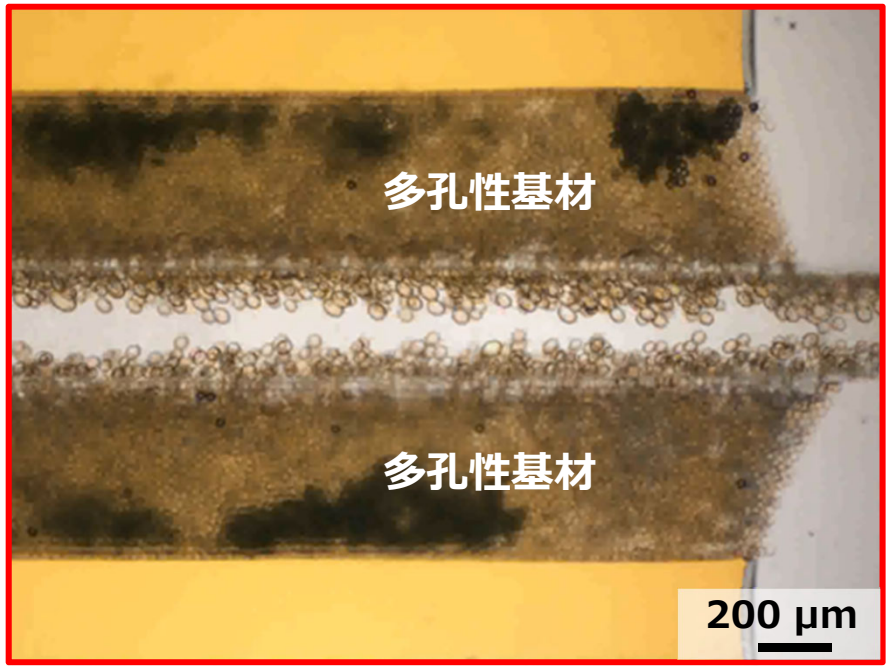
おまけ①：単分散液滴の効率的生成

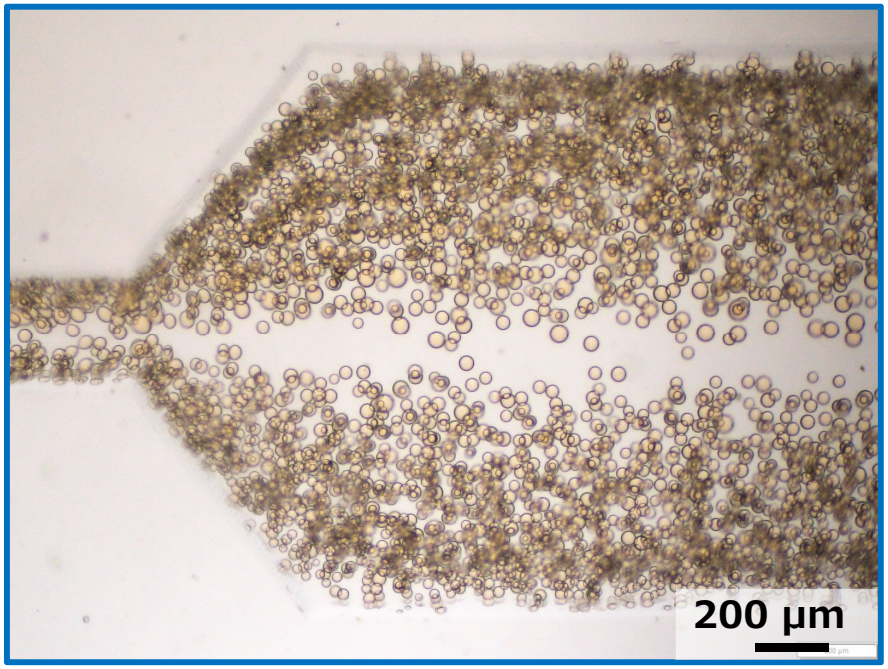
30 μL 粒子を用いて多孔性基材を作製



分散相:
蒸留水 + フルオレセインNa (1 mM)
Flow rate (Q_1): 20 μL/min

連続相:
オリーブ油 + 界面活性剤
Flow rate (Q_2): 100 μL/min



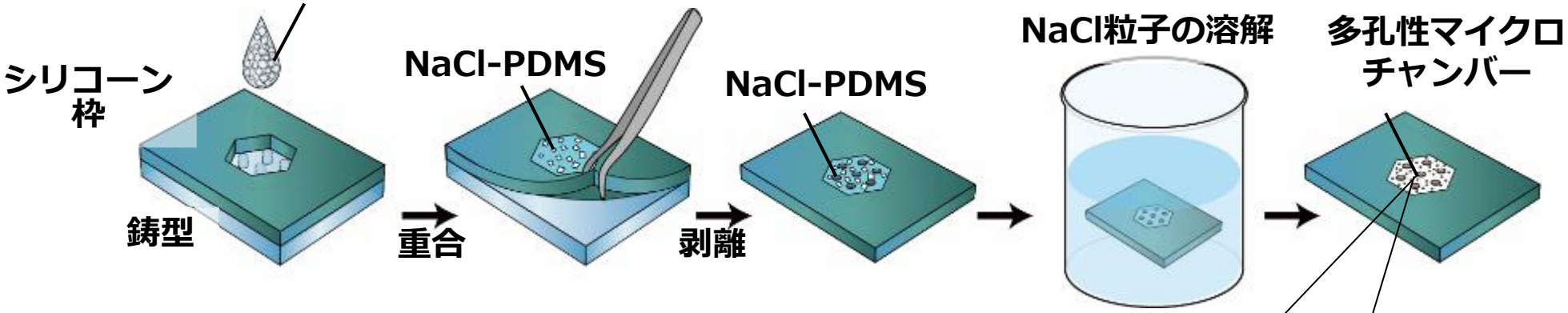


毎秒10,000~100,000個程度の液滴形成
（通常のマイクロ流路の100~1000倍程度）

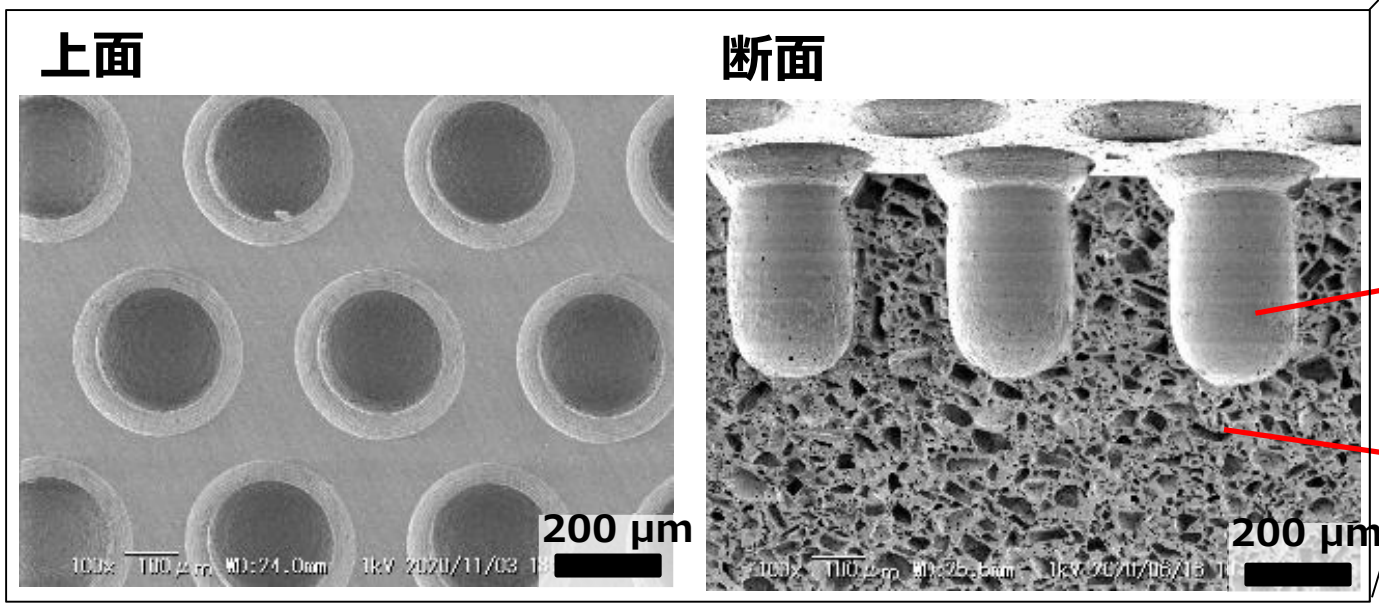
→　微粒子調製などに応用

おまけ②：細胞のかん流培養系

PDMSプレポリマー + NaCl粒子 (φ = 30-60 μm) 50% (v/v)



多孔性マイクロチャンバー (φ = 200 μm, d = 300 μm)



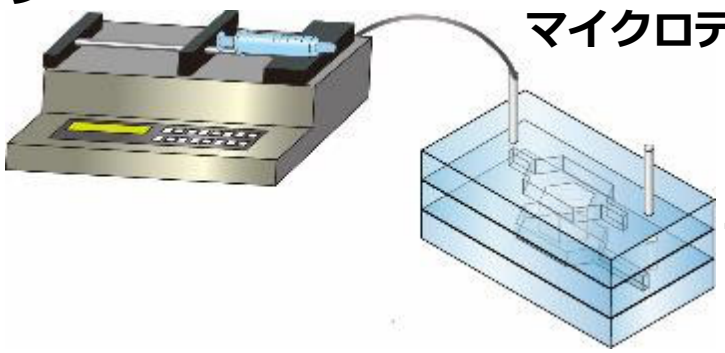
表面孔
(φ = 3-5 μm)

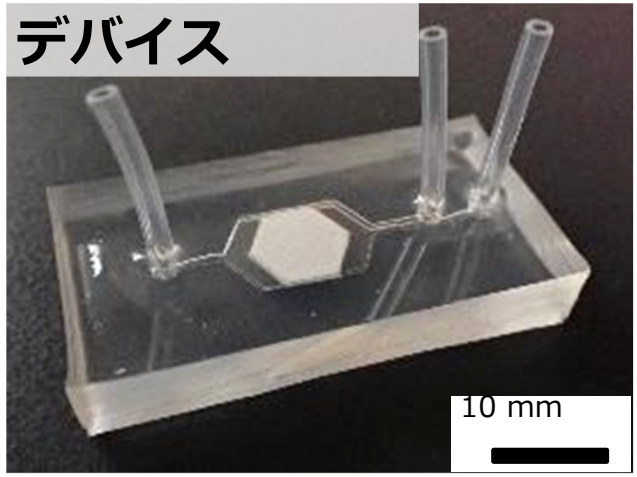
連通孔

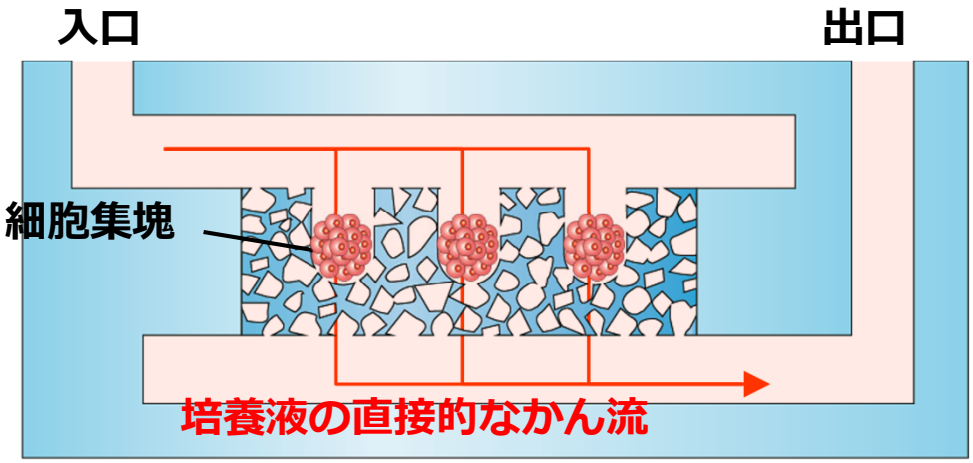
多孔性のマイクロチャンバーを作製 → 細胞培養に応用

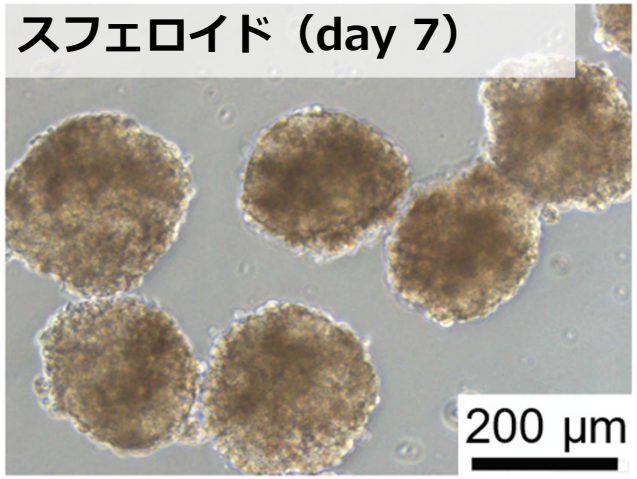
おまけ②：細胞のかん流培養系

かん流培養システム









HepG2細胞

直接的な培養液の供給　→　細胞の機能・増殖能の向上！

企業への期待

・マイクロ流路作製法：技術移転実績も多数あります

・多孔性基材の活用例を募集しています

・より良い作製方法や材料の活用事例があれば活用させていただきたいです

・マイクロ流路によるさまざまな分離・分析・評価系を提案できます

もしご一緒にできそうなことがありましたら,
お気軽にお声がけください。
研究室のHPもご確認ください。

本技術に関する知的財産権

発明の名称	クロスフローろ過装置の作製方法
出願人	国立大学法人千葉大学
出願番号	特願2019-071898
公開番号	特開2020-168611

連絡先

千葉大学　学術研究・イノベーション推進機構
プロジェクト推進部門
Tel　043-290-3048
Fax　043-290-3519
E-mail　ccrcu@faculty.chiba-u.jp