

サイズソートチップを用いた血漿交換、血球分離の効率化

Improving efficiencies of plasma exchange and blood cell separation using microfluidic chip devices

| | | | |
|-------|---|-------------------------|--|
| 助成年度 | 令和3年度研究助成 | | |
| 助成番号 | MZR2022005 | | |
| 研究期間 | 2022/04/01 ~ 2023/03/31 | | |
| 代表研究者 | 松浦 宏治 (Koji Matsuura) | 岡山理科大学 生命科学部 生物科学科 | |
| 共同研究者 | 高田 耕児 (Koji Takata) | 富山県産業技術研究開発センター 生活科学研究所 | |
| キーワード | チップデバイス, 血球分離, 血漿交換, Deterministic lateral displacement | | |

1. 研究の背景と目的

血漿交換療法において、細胞や血球を患者に戻す際に培養液や体液から病原性因子・不要物を除去する必要がある。血漿交換療法で用いられる中空糸の細孔は200–500 nmであり、直径数百 nm の病原性エクソソームの除去には適しておらず、それらの除去は吸着材による吸着療法にも対応していない。吸着材やセルソーターと比較すると、マイクロデバイスを用いた分離方法では効率良く、細胞のダメージが少ない状態で不要物の除去が可能であり、我々が開発している直径数十 μm 以下のピラーを周期的に多数配置したサイズソートチップ（以下、「本チップ」と省略）を用いて課題解決を図る。このチップでは、図 1A に示す Deterministic lateral displacement (DLD) に基づく原理によって、ピラー間隔や角度の違いで粒子のサイズ分離を行う[1]。本チップを血液中の循環腫瘍細胞、Circulating Tumor Cells (CTC) の分離に用いた結果、平均して 97% の分離効率が

達成されている[2]。また、この微細構造をポリプロピレン (PP) エラストマーの射出成形で作製できるため、低コストの量産化が可能であるとともに、生体適合性の問題もクリアしている。本研究では、目的に対応したチップ構造・材料の最適化を行い、本デバイスの血漿交換療法への適用可能性の検討を行う。

2. 研究の内容・方法

直径が 6–8 μm のヒト赤血球が右側の出口に来る場合と左側の出口に来る場合を切り分ける方法として、経験的計算上の分離閾値 (D_c) が異なるチップを用いる。用途に応じて D_c の異なるチップを作製・使用した。

図 1B に本チップの基本システムの図を示す。チップデバイスとシリンジ Z を繰り返し押し込んだ際にシリンジ X と Y の気相に負荷される陽圧による流体駆動デバイスにより、チップ内に流れを作る。初めにシリンジ X と Y に PBS を入れて、プライミ

ングを行い、シリンジ X 側に血液を入れて分離を行った。本研究ではヒト血液は市販品を使用した。本報告書では、以下 (1) (2) (3) の結果について記載する。

(1) 赤血球と白血球の分離を目的とした場合、 $D_c = 10, 9, 8 \mu\text{m}$ のチップを用いる。本研究では、血球分離の評価をディフ・クイック染色法で行うとともに、ハイスピードカメラを用いて 200 fps での流路内観察を行った。

(2) 血漿交換療法においては赤血球と白血球両方を回収する必要があるため、 D_c は赤血球の直径よりも小さくする必要がある。今回、 $D_c = 2 \mu\text{m}$ のチップの場合の分離特性評価を行った。この実験においては、血液をシリンジ X と Y に入れた場合両方評価した。また、当療法においては、回収した血球を再度チップに通す方法も考えられる。

(3) 連続流体システムの開発結果についても簡単に説明する。

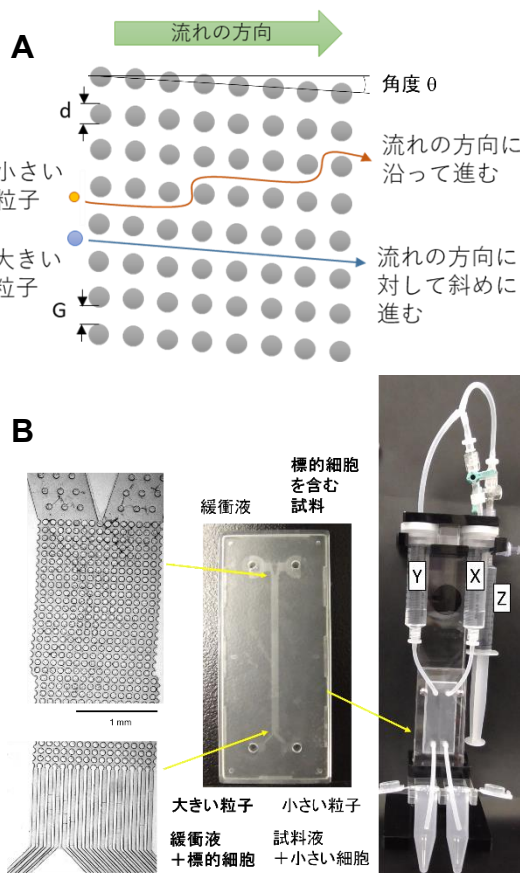


図1 (A)分離の原理と(B)本実験の基本システム

3. 研究の成果

(1) $D_c = 10, 9, 8 \mu\text{m}$ のチップの分離特性

これらのチップを用いてビーズを分離した場合、分離サイズの閾値がほぼ D_c 値であった。ヒト血液の分離において、 $D_c = 10 \mu\text{m}$ のチップを用いた場合、ヒトの赤血球と白血球のうち好中球は完全に分離されるが、 $D_c = 8 \mu\text{m}$ の場合は左側に赤血球が回収される場合が見られた。本シリンジデバイスを用いた流体駆動においてはレイノルズ数が 10 以下になり、実際の D_c 値が計算値とほぼ同じであった。従って、 $D_c = 10 \mu\text{m}$ 近傍においては、細胞直径に応じた細胞分離が成功したといえる。

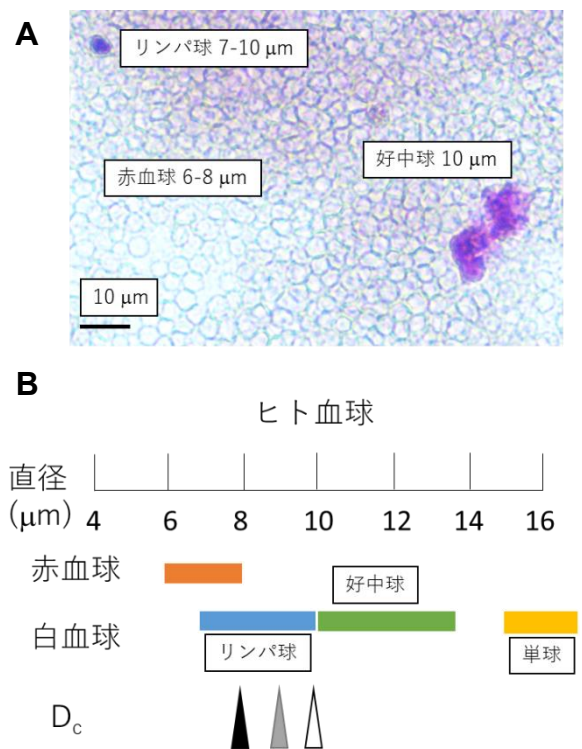


図2 (A) 今回用いたヒト血液のディフ・クイック染色像
白血球は紫色に染色された。(B) ヒト血球のサイズ分布
[3]と用いたチップの D_c 値との関係

ハイスピードカメラを用いた出口近傍の $D_c = 8 \mu\text{m}$ を有するチップの流路内観察結果を図 3 に示す。入口側における右側と左側の流路の割合は 1 : 1 であることから、赤血球は図 3 の出口番号 10-20 に見られた結果は妥当であった。また、サイズの大きい白血球が左側の出口に移動するこ

とが確認された。同様の現象が $D_c=10\ \mu\text{m}$ のチップでも観察されたため、この D_c 領域では血球が直径に応じて分離されたと言える。

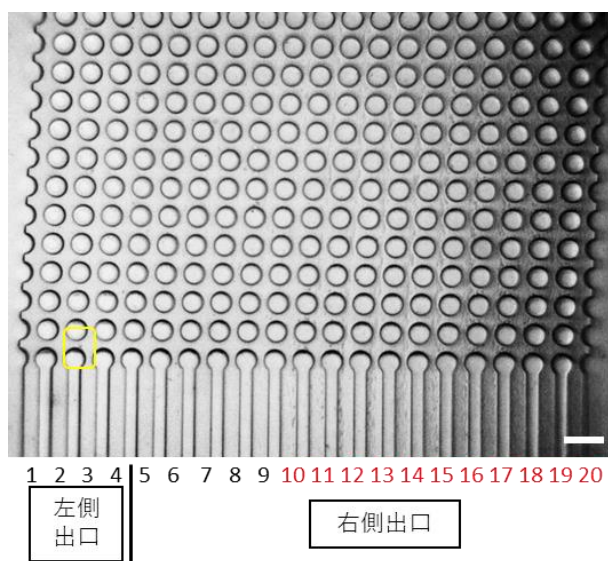


図3 $D_c=8\ \mu\text{m}$ のチップを用いた際の出口近傍の高速カメラ像 (200 fps) 黄色四角内は白血球である。赤文字は赤血球が到着した流路を示す。スケールバーは0.1 mmである。

(2) $D_c=2\ \mu\text{m}$ のチップの場合の分離特性

市販のヒト血液をシリンジ X に入れて血球分離実験を行った際、右側の出口と左側の出口から見られた血球の割合を比較したところ、右:左=最大50:50であった。図4Aの $D_c=2\ \mu\text{m}$ を有するチップの流路内観察像からは血球はまっすぐ進んでおり、大きな粒子として流体を移動していた。図4Bに示す当チップの入口と出口近傍の像からは、出口側は左側の割合が大きいため、右側に入れた血球の一部がまっすぐ流体を移動したことにより左側の出口に到達したものと考えている。流路内の観察による血球移動の評価を今後も継続する。

一方、ヒト血液をシリンジ Y に入れてチップ内に血液を流した際、ほぼ全ての血球は左側の回収液内に見られた。血漿交換療法への適用可能性については、回収された血球分散液が再度繰り返し分離できることが必要と考えている。

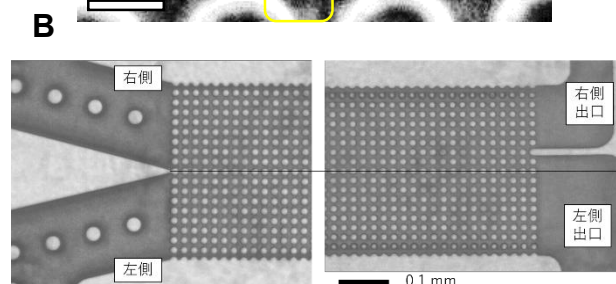
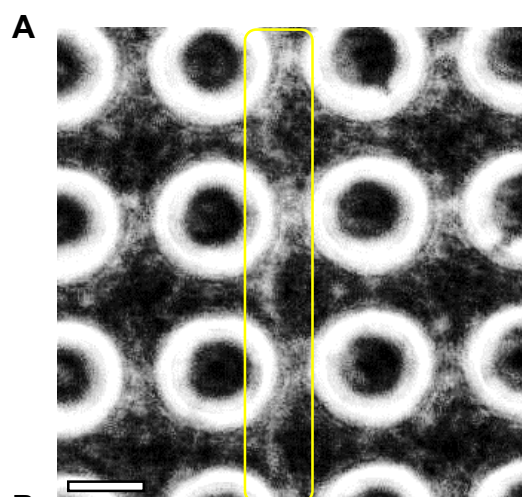


図4 (A) $D_c=2\ \mu\text{m}$ のチップ内の高速カメラ像(1000 fps) 黄色四角部分は分離血球の軌跡である。スケールバーは0.05 mmである。(B) $D_c=2\ \mu\text{m}$ のチップのマイクロスコープ像 左側は入口、右側は出口を示す。

(3) 連続流体システム開発

一度回収した血球をもう一度サイズソートチップで分離可能な連測流体システムの構成案を図5に示す。図5Aのように血液リザーバーを用いた際には、出口側と入口側の圧力をポンプの駆動力で制御できるが、解放流路系であり血液が空気に接触するという問題がある。そこで、図5Bに示す連続流体システムを作製し、流路内を緩衝液でプライミングした後、回収した血液分散液を再度分離できるか検証した。しかし、右側の入口のある緩衝液側と、左側の入口の手前のポンプによる圧力の調整が不十分であり、このシステムでは血球分離能を発揮できなかった。用いるポンプの流量バランスを検討する必要がある。

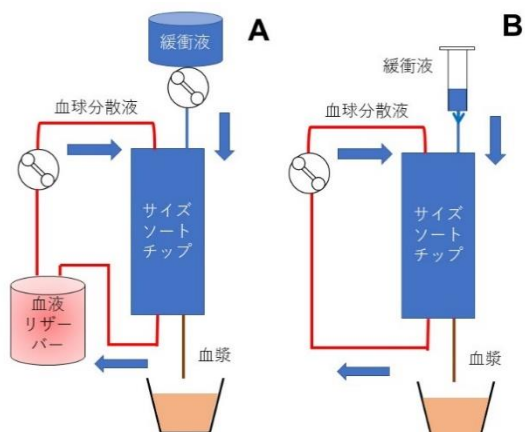


図5 (A)血液リザーバーを用いた連続流体システムと(B)血球分散液側の閉鎖回路における連続流体システムの模式図

4. 結び

血球分離については、 $D_c=10\ \mu\text{m}$ のチップを用いた場合には原理通り達成できた。しかし $D_c=2\ \mu\text{m}$ のチップを用いた場合には、血球は原理通りの振る舞いはするものの、流路内の血球数が多いなどの理由で血球分離がうまくいかなかった場合が見られた。また、2層流のポンプ圧・流量の調整にも課題があることが分かり、サイズソートチップの血漿交換療法への適用については技術的な課題が現存する。また、 D_c 値が低下した場合には流路の抵抗が上昇するために、流量が低下する点も課題である。

5. 今後の研究方向性・課題

数年で終了する予定の短期的課題と長期的課題に分けて記載する。

短期的課題： D_c が小さい場合に血球分離効率がさらに上昇する方法を、チップ成型プロセスと流体操作の両面から検討する。赤血球や血小板を大きい粒子として効率的に回収するために必要な流路・流体特性の発見につながると考えている。

長期的課題：診断・治療への展開として、採血後の臨床サンプルを用いて、回収した白血球の遺伝子、蛋白質発現を評価することにより、本技術で有用な診断対象を発見する。血球分離においては

白血球増加症の分析に本チップの活用は有益と考えている。血漿交換療法については全血球を小スケールかつ低ダメージで回収することに価値のある症例を発見し、その適用を目指す。また、実際の診断・治療に適した溶液系を用いて想定した血球・血漿分離機能発揮を確認する。

6. 参考文献

- [1] 1. Huang, L. R.; Cox, E. C.; Austin, R. H.; Sturm, J. C. *Science* 2004, 304, 987-990.
- [2] Bao, H.; Bai, T.; Takata, K.; Yokobori, T.; Ohnaga, T.; Hisada, T. *Oncology Lett.* 2018, 15, 3061-3067.
- [3] Bergman, R. A.; Afifi, A. K.; Heidger, Jr, P. M. *Atlas of Microscopic Anatomy Section 4: Blood.* 1995.

6. 論文・発表

・原著論文 Koji Matsuura and Koji Takata, Blood Cell Separation Using Polypropylene-Based Microfluidic Devices Based on Deterministic Lateral Displacement, *Micromachines*, 2023, 14, 238. 図2および3はこの論文Figure 6, 8からの転載である。(CC BY 4.0)

・ポスター発表 OUS フォーラム「サイズソートチップによる血球分離」2022年11月28日岡山市