

【公開版】

平成28年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「希少細胞の選抜を実現する革新的な誘電泳動細胞分離システムの開発」

研究開発成果等報告書

平成29年5月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 国立大学法人京都大学大学院医学研究科

目次

第1章 研究開発の概要	3
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標.....	3
(1) 研究開発の背景.....	3
(2) 研究目標.....	3
1-2 研究体制	4
1-3 成果概要	5
1-4 当該研究開発の連絡窓口.....	6
第2章 本論	6
【1】分離システムの要素技術開発	6
【1-1】誘電泳動電極の3D化に向けた電極配置の検討	6
【1-2】処理量向上を目指した3D誘電泳動電極の開発	8
【1-3】流体力学的手法を利用した前処理機構の開発.....	10
【2】誘電泳動細胞分離システムの開発.....	11
【3】抗体産生細胞の高度選抜への応用.....	12
【3-1】抗体産生量と誘電特性の相関関係の実証.....	12
【3-2】抗体産生細胞の選抜実証試験.....	13
【4】血中循環腫瘍細胞（CTC）の検出への応用.....	14
【4-1】細胞種と誘電特性の相関関係の実証.....	14
【4-2】血中循環腫瘍細胞（CTC）の検出実証試験.....	15
最終章 全体総括	16

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

(1) 研究開発の背景

近年のバイオテクノロジーの発展に伴い、細胞の分離、選抜へのニーズが高まっている。例えば、抗体などの医薬品タンパク質生産のための遺伝子組換え細胞構築が活発に行われており、組換え細胞のほとんどは産生能力の低い細胞であるため、遺伝子組換え操作の後工程で有用物質を効率よく産生する細胞の選抜が重要となる。

また、がん患者の血中に僅かに存在する血中循環腫瘍細胞（CTC）の検出技術の開発が注目されている。CTC 検査法は画像診断や血清腫瘍マーカー検査よりも正確かつ迅速に転移性悪性腫瘍の診断が行えるため、予後や治療効果の検証に有用である。

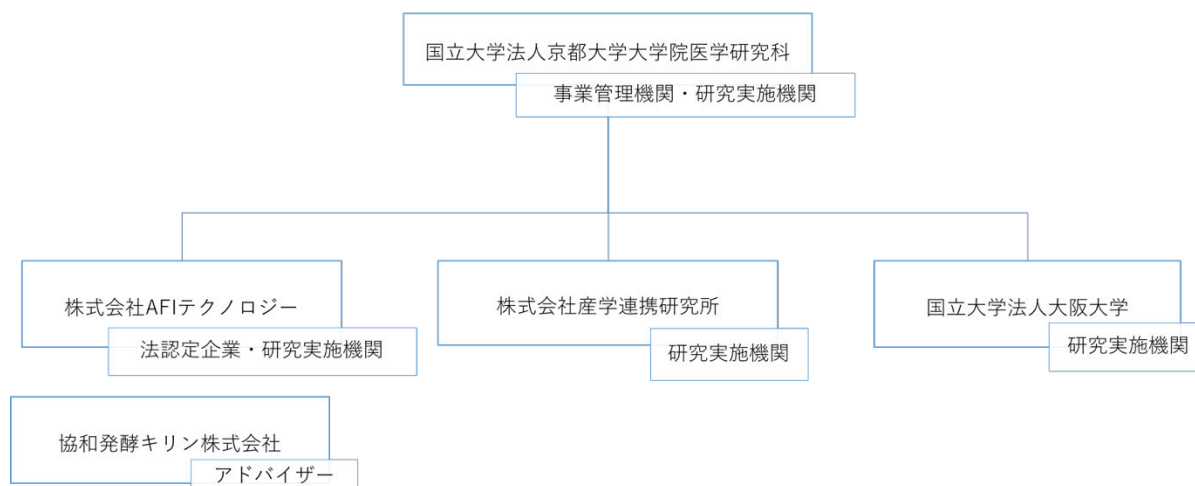
組換え細胞構築、CTC 検出に共通するニーズは、極めて希少な細胞（ 10^8 個に1個程度の存在）を分離分析するという点である。希少な細胞を確実に選抜するためには対象サンプル内の細胞全数を検査し、希少細胞を選抜（検出）する技術が望まれている。また、用途によっては細胞を非標識で選別することが求められている。

(2) 研究目標

近年、希少細胞の選抜に有望な手法として誘電泳動が研究されているが、前処理が必要である点や処理量が低いという問題がある。本事業の最終目標は誘電泳動に流体力学的手法を組み合わせることで誘電泳動の弱点を克服し、非標識で希少細胞を選抜可能とする革新的な誘電泳動細胞分離システムの開発を目的とするものである。

1-2 研究体制

【研究組織図】（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）



統括研究代表者（PL）

株式会社 AFI テクノロジー 代表取締役 円城寺 隆治

副統括研究代表者（SL）

国立大学法人大阪大学工学研究科 教授 大政 健史

【管理体制】

	事業者名	管理担当部署	
補助事業者	国立大学法人京都大学大学院医学研究科	「医学領域」産学連携推進機構	事業管理機関
間接補助事業者	株式会社 AFI テクノロジー	企画グループ	
間接補助事業者	株式会社産学連携研究所	総務部	
間接補助事業者	国立大学法人大阪大学	大学院工学研究科	

【研究者氏名】

研究実施機関	部署・役職	氏名	備考
国立大学法人京都大学大学院医学研究科	乳腺外科教授	戸井 雅和	デバイス評価・検証実験
株式会社 AFI テクノロジー	代表取締役	円城寺 隆治	統括研究代表者
株式会社 AFI テクノロジー	研究開発部 第1グループ・グ	脇坂 嘉一	要素技術改良・デバイス開発

【公開版】

	ループ長		
株式会社 AFI テクノロジー	研究開発部 第 1 グループ	高野 雅代	要素技術改良・検証 実験
株式会社 AFI テクノロジー	研究開発部 第 1 グループ	糸井 隆行	要素技術改良・検証 実験
株式会社産学連携研究所		和田 眞昌	デバイス設計
国立大学法人大阪大学	大学院工学研究科	大政 健史	副統括研究代表者

【アドバイザー】

協和発酵キリン株式会社 塚原正義

協力内容：抗体産出細胞作成に関する技術および成果の市場適合性向上に対する助言

1-3 成果概要

平成26年度から28年度に渡って研究開発を実施してきたが、本事業の目標である「非標識で希少細胞を選抜可能とする革新的な誘電泳動細胞分離システムの開発」については、おおむね達成できたと考えている。

三次元形状の誘電泳動電極の開発に先立ち、平面電極とマイクロ流路を持つ分離実験デバイスを試作し、細胞分離実験を行った。分離実験では生死細胞の分離に成功し、分離性能は最大90%を実現した。

実験により得られた指針を元に3D 誘電泳動電極の設計、シミュレーション、試作を行った。このデバイスによる分離実験ではシミュレーションに近い挙動が確認できたが、更なる検証が必要である。

誘電泳動を利用した細胞分離では高導電率液体中では分離が阻害されるため、サンプル液の導電率が問題となる。それを解決する流体力学的フィルターの設計、試作を行い、前処理性能を検証したところ、誘電泳動を十分に阻害しない導電率に液の置換が可能となった。

以上の要素技術の成果により、前処理機構を統合した誘電泳動細胞分離システムの設計製作を実施し、問題なく動作することを確認した。しかし、3D 電極の製作は容易ではなく、平面電極を採用することとなった。しかしながら、平面電極でも性能が得られた。

用途開発として、抗体産生細胞の選抜への適用を試みた。遺伝子組換えにより抗体産生能力を持つ CHO-HcD6 株とその組み換え前の細胞株である CHO-K1 株について電気的特性地である (COF 値；詳細は後述) を計測したところ、両者に差異を見出した。次に、分

【公開版】

離条件を詳細検討するため、両株に加わる誘電泳動速度の周波数依存性を計測した結果、差異のある傾向は見られたものの分離条件を決定するに至らなかった。

二つ目の用途開発として、血中循環腫瘍細胞（CTC）の分離について検討した。がんパネル細胞株のうち7種類の細胞株と正常血液細胞の COF 計測を実施し、分離に最適な周波数を見出した。さらに、開発した細胞分離システムを用い、健常者血液中にスパイクしたがん細胞の分離を試み、90%以上の捕捉率でがん細胞を分離することが可能であった。

以上のように、各要素技術開発を実施、従来の誘電泳動電極の欠点を克服した細胞分離システム試作できたことは大きな成果である。さらに、CTC 分離用途としてスパイク細胞による模擬実験を実施、本事業の細胞分離システムによって希少細胞選抜が可能であることが確かめられた。補完研究は必要であるが、今後の事業化に向けて大きな期待がもたれる。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

所属：国立大学法人京都大学大学院医学研究科

「医学領域」産学連携推進機構

役職・氏名：副機構長 寺西 豊

電話：075-751-0909

E-mail：mi@kumbl.med.kyoto-u.ac.jp

第2章 本論

【1】分離システムの要素技術開発

【1-1】誘電泳動電極の3D化に向けた電極配置の検討

三次元形状を持つ3D誘電泳動電極の開発にあたり、マイクロ流路内での誘電泳動による細胞の分離特性を把握するため、平面電極に高精度な分岐流路を持つ分離実験デバイス（電極、流路、電極と流路を保持するホルダー）の設計および製作を実施し、細胞分離実験を実施した。

実験用細胞分離デバイスの試作

試作した細胞分離デバイス（図1）は、傾斜した櫛歯構造のマイクロ電極を持つ誘電泳動電極、分岐流路を備えた PDMS 製マイクロ流路、電極とマイクロ流路を保持しシリンジポンプから送液した細胞懸濁液を流入・流出させるためのコネクタを備えたセルホルダーからなる実験用誘電泳動デバイスである。

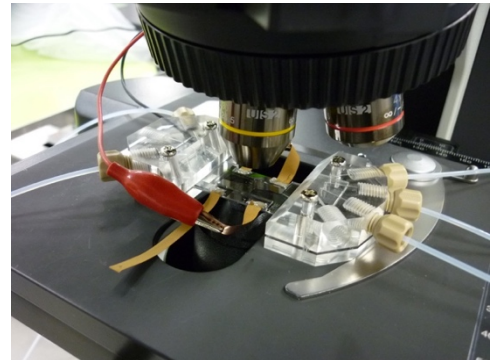


図1 細胞分離デバイス

細胞分離実験

試作した細胞分離デバイスを用い、生細胞と死細胞のフローによる連続分離を実施した。その結果、生死細胞の連続分離に成功した（図2参照）。

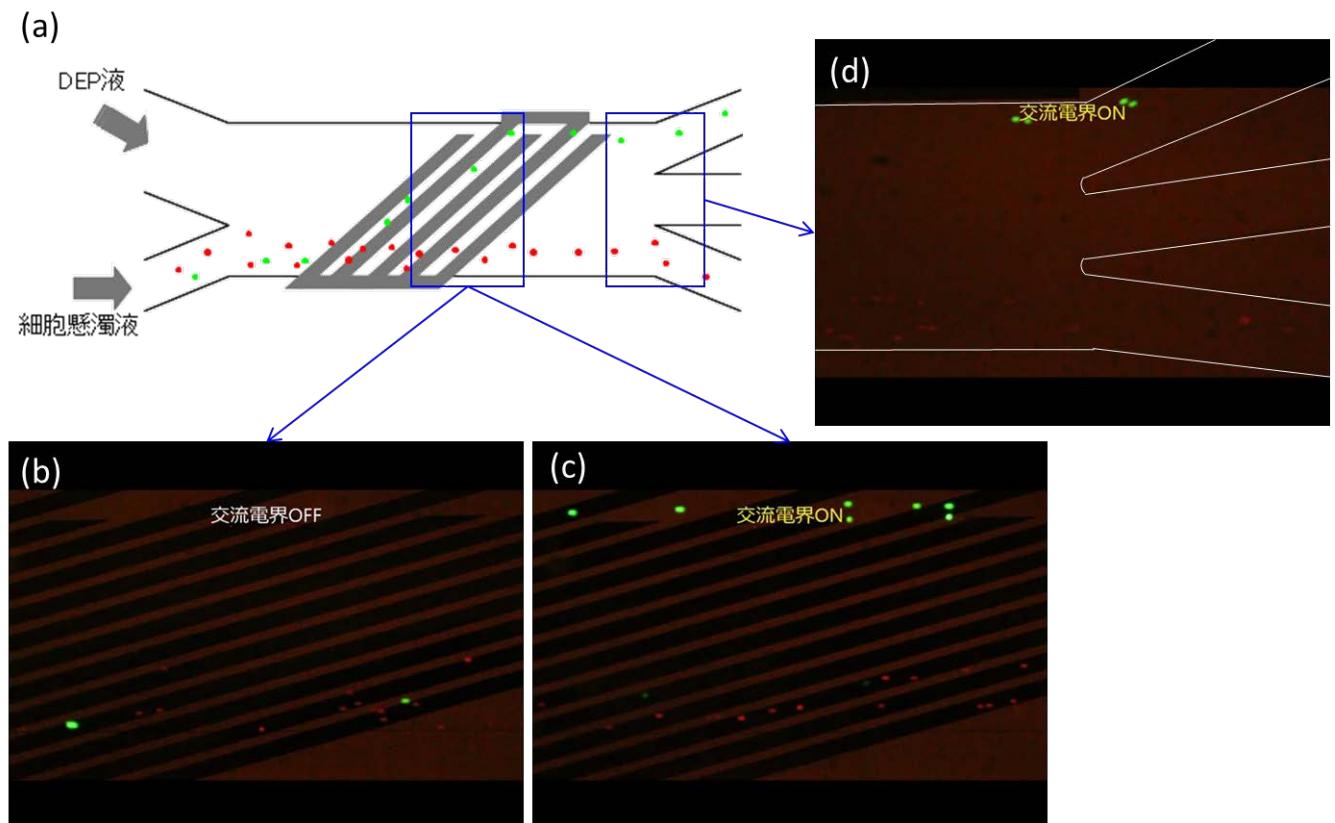


図2 誘電泳動とフローによる生・死細胞分離（生細胞を緑色、死細胞を赤色蛍光染色）

(a)分離の概念図、(b)電極部分における電界 OFF 時の様子、(c)電極部分における電界 ON 時の様子、(d)流路分岐部にて分画される様子

誘電泳動により生細胞のみが電極にトラップされ、フローによって電極に沿って上方へ移動する。流路分岐部分により生細胞と死細胞は別々に分画され、回収された。

細胞分離挙動の検討

製作したデバイスを使用して細胞分離条件を検討するため、電圧や流量、電極間距離を変化させて分離性能を計測した。その結果、条件に依存するが図3のように最大回収率 90%が得られた。

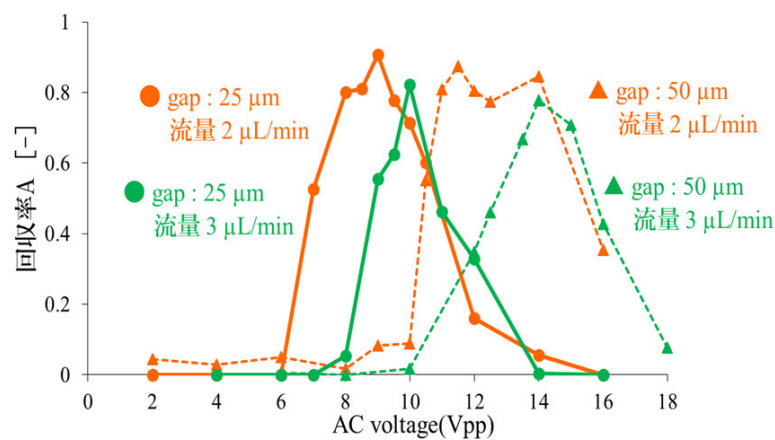


図3 各条件下における細胞回収率（分離性能）

電極設計指針

デバイス内での細胞分離挙動を検討すると共に電界解析と比較検討した。その結果、誘電泳動速度が分離時の液流速に打ち勝つことで分離されること、誘電泳動速度は電界強度に依存することから、電極設計指針となる式を得た。電極設計はこの関係が成立する電界強度が得られる電極形状、配置を検討すればよいと考えられる。

【1-2】処理量向上を目指した3D誘電泳動電極の開発

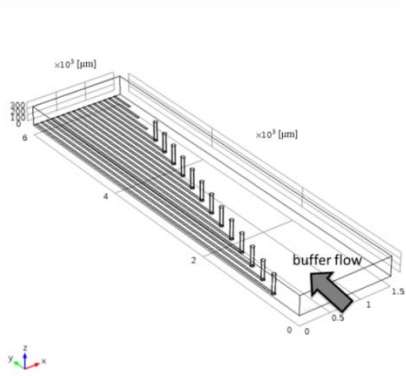
設計と電界シミュレーション

サブテーマ【1-1】で得られた電極の設計指針を元に 3D 誘電泳動電極の設計、分離シミュレーションを行った。また、3D 電極の試作を実施し、分離挙動の確認を行った。図4に設計した3D 誘電泳動電極を基にした解析モデルとその解析結果（流速分布、電位分布、

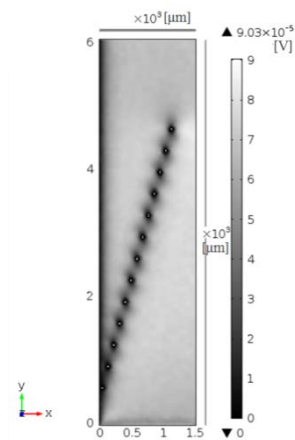
【公開版】

電界強度、細胞の分離軌跡を示す。解析の実施は 2 種の細胞を粒径 $10\ \mu\text{m}$ の粒子と $5\ \mu\text{m}$ の粒子を分離すると仮定して実施した。図 4 (e) に示すように、適切な条件を設定することで $10\ \mu\text{m}$ の粒子はピラー近傍で負の誘電泳動力を受けて、デバイスの中央へ移動した。一方、粒径 $5\ \mu\text{m}$ の粒子（青丸）は誘電泳動力の影響を受けながらもピラー間を通過した。誘電泳動力を用いた粒径による粒子分離が可能であることを示しており、3D 誘電泳動電極で 2 種の細胞を分離することが可能であることが示唆された。

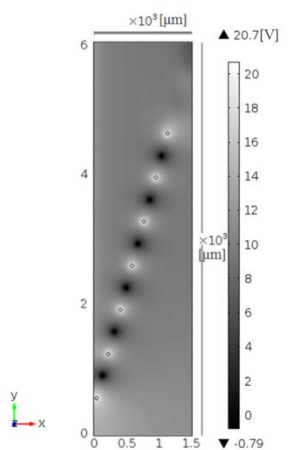
(a)



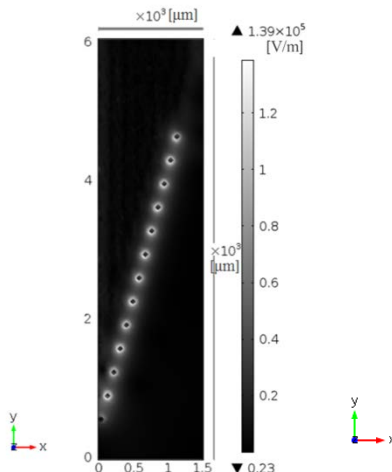
(b)



(c)



(d)



(e)

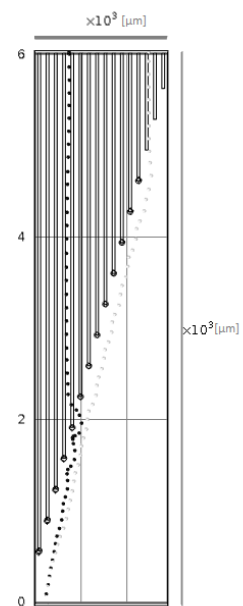


図4 解析モデルと解析結果

(a)解析モデル、(b)流速分布解析結果、(c)電位分布解析結果、(d)電界強度解析結果、(e)分離挙動のシミュレーション

3D 電極の試作と分離挙動

設計した 3D 誘電泳動電極の試作を行った。製作した 3D 誘電泳動電極を下図に示す。ピラー高にバラつきがあると高さ方向で分離挙動が変わるため心配されたが、想定以上の精度で仕上がった。本デバイスを使用し、細胞の分離挙動を確認したところ、細胞の移動軌跡はシミュレーションに近い挙動を示し、ピラー間を通過する細胞とそうでない細胞が発生した。何らかの特性に基づいた分離が行われていると考えられるが、さらなる検証が必要である。

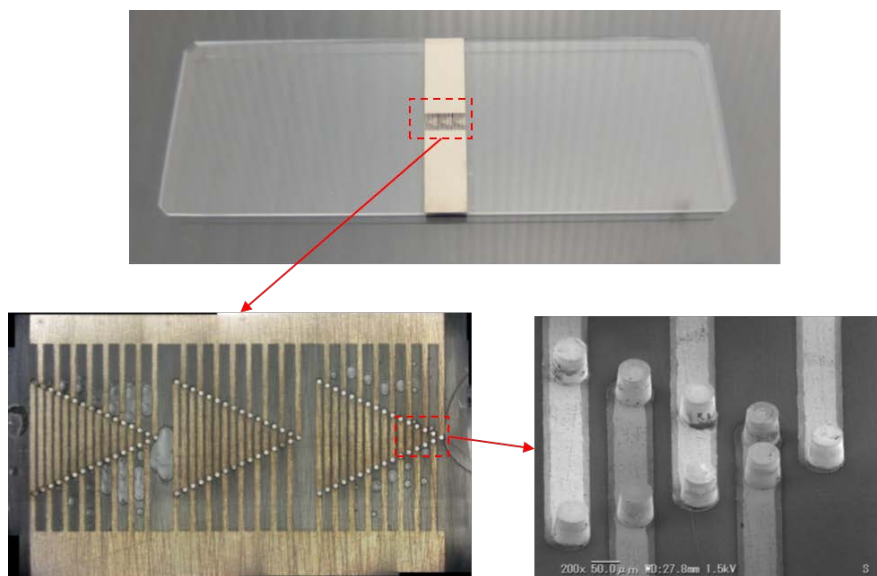


図5 製作した3D 誘電泳動電極

【1-3】流体力学的手法を利用した前処理機構の開発

流路構造の設計方法について学術論文を参考に理論的検証を実施し、細胞懸濁液や

【公開版】

血液サンプルの前処理を行うための流路構造の理論的設計方法、流路構造の製造方法について検討、試作し、基礎的実験を実施した。

HDF 流路によるサンプルの液置換によって導電率を誘電泳動可能な範囲に下げる必要がある。実際に液置換試験（図6）を実施した結果、サンプルの導電率を 1,410 mS/m から 7.6 mS/m に下げることができ、本サブテーマの最終目標の一つである、処理後導電率 10 mS/m 以下を達成した。

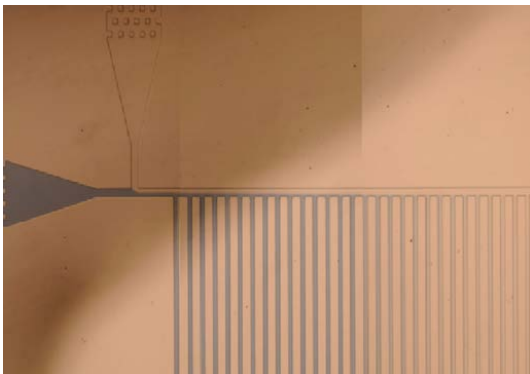


図6 HDF による前処理の模擬試験
可視化のため細胞懸濁液流入口からの液に
青色色素を使用している

次に、血液サンプル希釈液からの赤血球の除去試験を実施した。HDF 流路により粒径の小さい赤血球が除去されるため、廃液として排出されるサンプルは除去回収された赤血球により赤色となる。それに対し赤血球を除去された側は無色となった（図7）。



図7 血液サンプル希釈液からの赤血球
の除去

【2】誘電泳動細胞分離システムの開発

サブテーマ【1】の各要素技術の成果を利用して、要素技術の統合、システム化について検討を実施。細胞分離システムを設計製作した。誘電泳動による細胞分離は高導電率液体中では困難である。そのため、血液や培養液中の細胞をそのまま分離することは困難である。導電率低減と小細胞（赤血球など）除去のため HDF を統合

【公開版】

した DEP デバイスの試作を行った。さらに前処理性能確認試験を行ったところ、HDF により赤血球が確実に除去されること、導電率が誘電泳動に影響を与えない 6.7mS/m 以下となり、デバイスが問題なく動作することを確認した (図8)。

なお、3D 電極の製作は容易ではないこと、平面電極の分離性能が目標達成が可能な範囲に改良されたことから、現時点では平面電極を採用した。

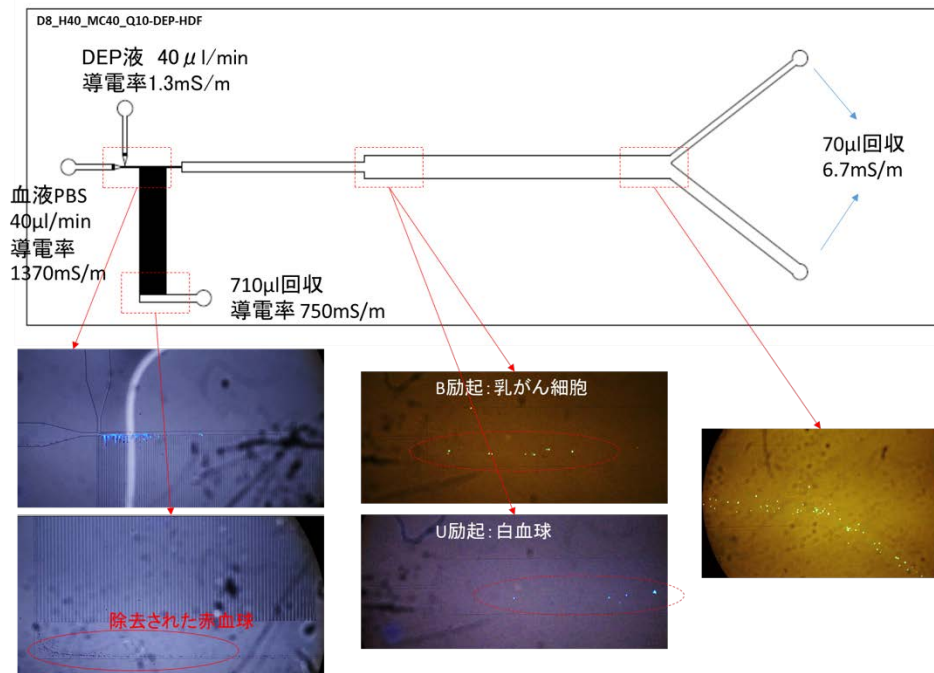


図8 HDF と DEP を統合した誘電泳動細胞分離システムによる前処理試験

【3】抗体産生細胞の高度選抜への応用

【3-1】抗体産生量と誘電特性の相関関係の実証

組換え前後の細胞の誘電泳動挙動が異なることを実証するため、CHO細胞（抗体非生産株）と組換えCHO細胞（抗体生産株）について誘電泳動特性の指標であるCOF計測を実施した。実験材料としては、CHO-K1株(ATCC® CCL-61™)および、CHO-K1株を親株とする抗体産生株であるCHO-HcD6株を使用し、誘電特性値であるクロスオーバー周波数（誘電泳動力が加わらない細胞固有の特性値）を計測、COFのヒストグラムと周波数平均値等を示す。(図9・表1)

表1に示す様に、抗体非生産株である CHO-K1 株と抗体産生株である CHO-HcD6 株の

【公開版】

COF の平均値を比較すると CHO-HcD6 株の方が高い COF を有することが示された。また、COF 分布を表したヒストグラムにおいても CHO-HcD6 株の COF は高い値へとシフトしていることが示された。CHO-K1 株と CHO-HcD6 株の COF に差異が現れた原因としては、CHO-HcD6 株の細胞内では抗体タンパク質が大量に生産されており、細胞内部の電気的特性の変化が起きていることが考えられる。

表 1. COF 解析結果

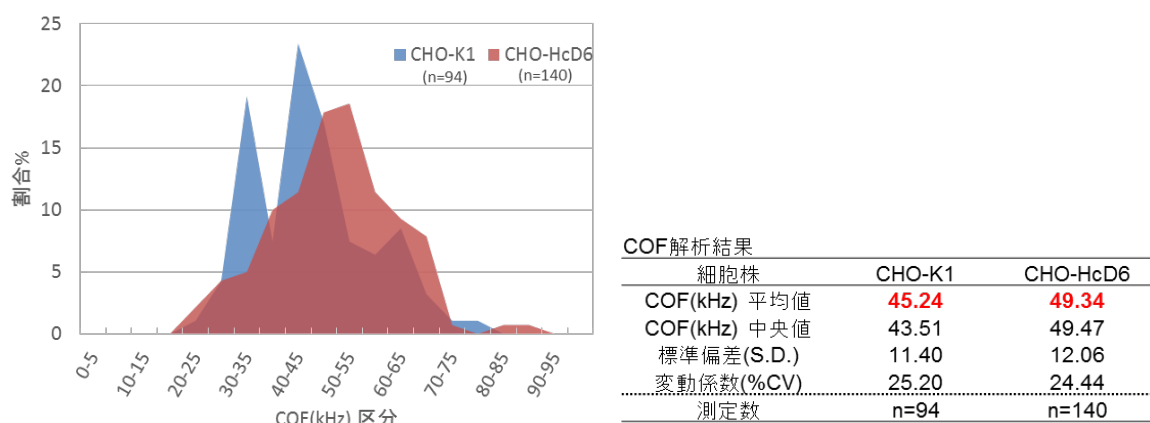


図9 CHO-K1 および CHO-HcD6 株の COF 分布

【3-2】抗体産生細胞の選抜実証試験

COF のみでは最適な分離条件を検討できなかったため、両株の誘電泳動速度の計測を行った。両株で泳動速度に差異が生じる周波数帯を見つけられれば泳動速度から目的細胞を回収するための周波数条件と分離流速を決定できるため計測を行った。

抗体産生株と非産生株の泳動速度を計測した結果（図10）、細胞の個体差が大きいこと、日ごとの細胞状態にも違いが生じているため、N数を増やした結果からp値を算出した。その結果、周波数700kHzの条件で両株を比較するとp値は0.051となり（ $p < 0.1$ ）、統計的な傾向を見出した。さらに、本試験では誘電泳動を生じさせるために、細胞を誘電泳動用のバッファーに置換しているが、置換してからの時間で誘電泳動速度に差が生じることがわかっている。そのため、バッファー組成を抗体産生細胞の選抜が優位になるように変更することで、分離を効率よく成し遂げられる可能性があるため、今後さらなる改良を行うことで

本事業のデバイスが抗体産生細胞の選抜を簡便にできる可能性があることは非常に大きな意義を持っていると考えている。

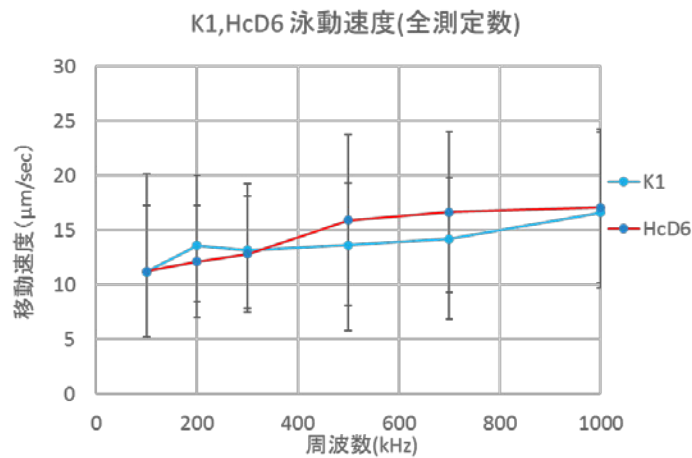


図 10 CHO-K1 および CHO-HcD6 株の泳動速度の周波数依存性

【4】血中循環腫瘍細胞（CTC）の検出への応用

【4-1】細胞種と誘電特性の相関関係の実証

多数の培養がん細胞種と健常者の血球細胞を用い、誘電特性測定データを取得し、がん細胞と健常者血球細胞との間に誘電特性差異の存在を確認した（図 11）。

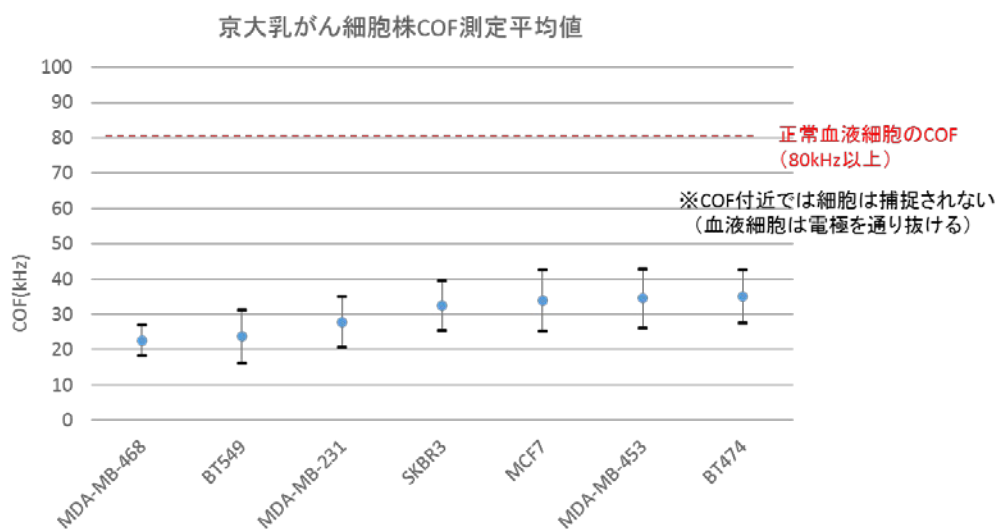


図 11 各がん細胞株の誘電特性値とその分布

【4-2】血中循環腫瘍細胞（CTC）の検出実証試験

サブテーマ【2】で試作した細胞分離システムを利用し、健常者の血液に培養がん細胞をスパイク（添加）して分離試験を実施した。その結果、実際のがん細胞と正常血液細胞が分離可能であることを示した。細胞分離システムの概略図を図12に示す。HDF部は $7\mu\text{m}$ 以下の細胞（主に赤血球）を除去すると共に血液をシース液（DEPに適した等張液で導電率 30 mS/m に調整）に置換、DEP部ではHDFで除去されずに残った細胞（白血球と癌細胞）から癌細胞を選択的に捕捉しシース液の流れに乗せて分離することを意図した。実験にはPBSによって2倍希釈した血液に乳癌細胞株（MDA-MB-231あるいはMCF7）をスパイクしたサンプルを用いた。血液サンプルとシース液をそれぞれ $30\ \mu\text{L}/\text{min}$ の流量でHDF部に送液し、69%の液をHDFで廃棄し31%をDEP部に送液（共に設計値）、DEP部では 160 kHz 、 9 Vpp の交流電圧を印加して分離を試みた。分離性能はDEP部の分岐流路部分を動画により観察し、癌細胞株の捕捉率により評価した。

HDF部でほぼすべての赤血球を廃液側に除去することができ、HDF部からDEP部へ移行した液の導電率は 36 mS/m 程度であり、DEPに適した状態に液が置換された。また、DEP部では癌細胞が選択的に捕捉され捕捉率は90%程度であった。HDFを統合したDEP細胞分離デバイスによりDEPの欠点を補うことが可能であることが示唆された。

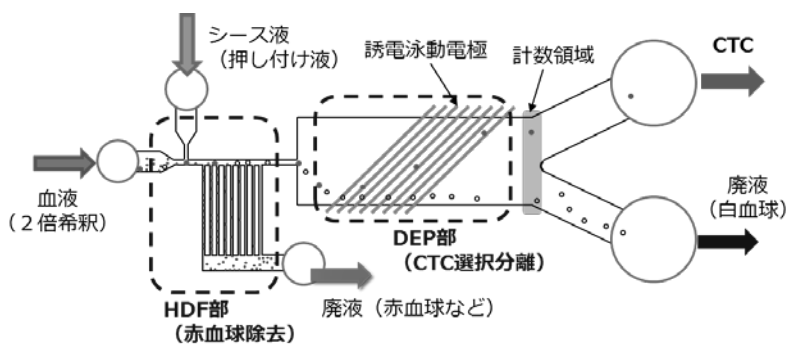


図12 HDFによる前処理機能統合型のDEP細胞分離デバイス

最終章 全体総括

細胞分離システムの特徴

3D 電極の製作は困難を極めたものの、平面電極でも改良により性能が得られたことから、細胞分離システムには平面電極を採用した。製作した細胞分離システムにより、健常者血液にスパイクしたがん細胞の分離実証試験を実施したところ、90%以上の捕捉回収性能で分離できる結果を得た。これは他の手法と比較しても遜色ないだけでなく、本手法は細胞の標識が不要であるだけでなく、前処理をほとんどせず（2倍希釈のみ）にそのまま分離装置にアプライするだけで分離を行うことが可能であることは特筆すべき点である。

今後の課題

細胞分離システムの流路内に気泡が入り込むと分離に影響を及ぼすため、分離開始前のセッティング時に気泡を除去するための特殊な操作を必要とする。この操作を不要とするための改良が今後の課題であり、事業終了後も引き続き補完研究として実施していく。また、量産方式の検討と量産による生産原価低減は合わせて検討の必要な事項である。

事業化展開

本事業における成果品である『希少細胞選抜用誘電泳動細胞分離システム』は、非標識・非侵襲性を有する画期的なシステムである。バイオ関連の研究機器はもとより、再生医療及び臨床（がん細胞検出）市場への導入を検討している。本事業グループ内での補完研究により、バイオ関連研究機器およびがん細胞検出への応用展開を図り、細胞分離システムとしての装置販売を行っていく見込みである。また、再生医療関連への応用展開も順次実施していく予定である。