

Development of Magnetic Separator for Biomaterials Labeled by Magnetic Beads

W. Maeda, S. Yamada*, and M. Iwahara

Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa Univ., Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan

*Division of Biological Measurement and Applications, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa Univ., Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan

Magnetic separation is an important method of purifying of cells or DNA. A properly designed magnetic separator causes less physical and chemical damage to a target and has a high separation rate. This paper presents a new high-throughput continuous magnetic separator for biomaterials labeled by magnetic beads. The separator consists of three rectangular coils, two circular coils, and a separation chamber. These instruments were designed by a numerically analyzing of the magnetic field and the movement of magnetic beads. A separation rate over 90% was obtained with this system in a separation test using magnetic beads.

Key words: magnetic separation, magnetic beads, gradient magnetic field, biomaterial

磁気ビーズによる生体物質分離用磁気分離装置の開発に関する検討

前田 航, 山田外史*, 岩原正吉

金沢大学大学院 自然科学研究科, 石川県金沢市角間町 (〒920-1192)

*金沢大学 自然計測応用研究センター 人間計測制御研究部門, 石川県金沢市角間町 (〒920-1192)

1 はじめに

細胞や生体関連物質の分離技術は、細胞分析等の分野において必須の技術であり、近年注目されている再生医療の分野においても種々の臓器に分化可能な間葉系幹細胞を骨髄中から取り出す必要があるなど、分離技術は重要性を増している。従来からこれらの分野での分離技術としては、密度差を用いた遠心分離や光学的特性を用いた FACSs (Fluorescence Activated Cell Sorters) が用いられて来たが、近年では磁気ラベリング技術の急速な進展に伴い、簡易な装置で物理的・化学的に低ダメージの分離を行うことができる磁気分離技術も広く用いられるに至っている^{1,2)}。

磁気分離では、直径 1~5 μm の鉄酸化物を含んだポリスチレン製のビーズに分離対象物を抗原抗体反応により選択的に結合させ、それらを磁力で回収することで分離を行う。磁力による回収過程では、従来から分離容器を用いたバッチ処理的な方法が用いられて来たが、分離工程の自動化の要求に応えるため、流量 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 程度で連続的に分離を行える装置が開発されてきた³⁻⁵⁾。本稿では現状で開発されている装置と比較して高スループットを実現する磁気分離装置を設計・試作し、磁気ビーズによる予備分離実験を行ったので報告する。

2 磁気分離装置の動作原理

本稿で提案する磁気分離装置の概要図を Fig. 1 に示す。この装置は、3 個の長方形コイルと 2 個の円形コイルと円形コイルの間に配置された分離容器から成る。磁気ビーズと結合された分離対象物は、分離容器 (Fig. 2) の Inlet から容器内に注入され、容器内を移動する間、コイルによる傾斜磁界に曝される。磁気ビーズには傾斜磁界による磁力が働くため、磁気ビーズと分離対象物は x 軸正方向に移動する。同時にこれらは水に押し

流されながら y 軸正方向に移動、及び z 軸負方向に沈殿していき、最終的に Positive selection に到達し、分離が達成される。

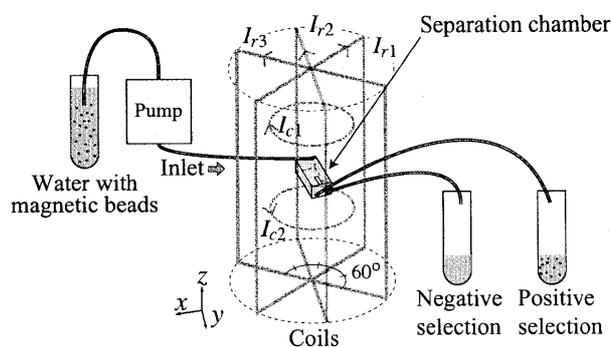


Fig. 1 Schematic of our magnetic separator.

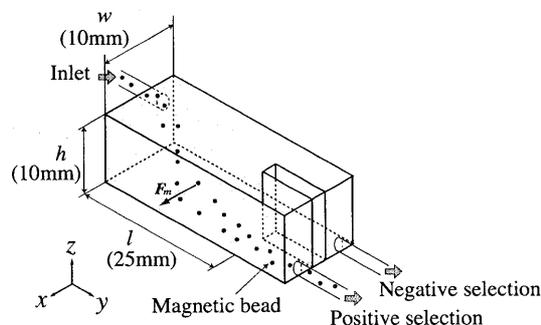


Fig. 2 More detailed schematic of the separation chamber.

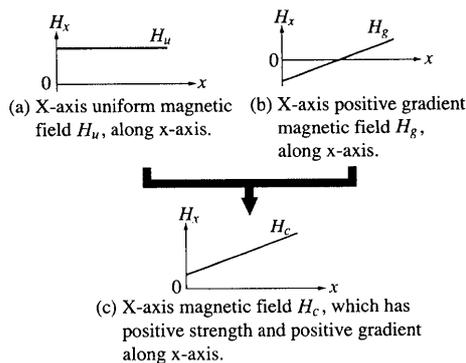


Fig. 3 Gradient magnetic fields for magnetic separation.

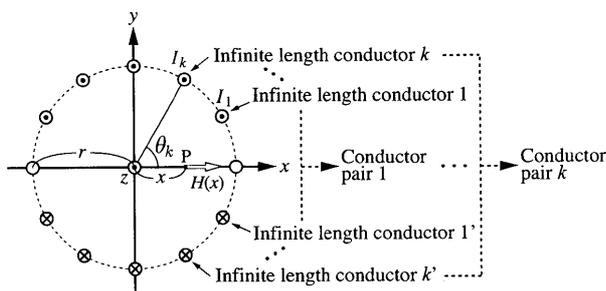


Fig. 4 Arrangement of infinite length conductors for generating uniform magnetic field.

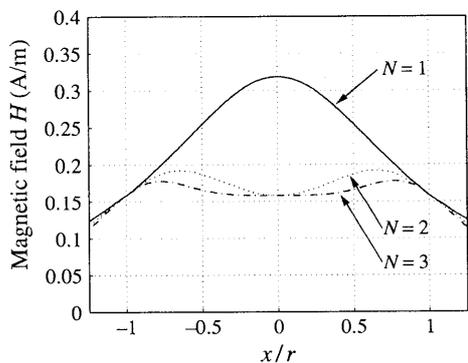


Fig. 5 Uniform magnetic field generated by infinite length conductors.

3 分離装置各部の設計

3.1 傾斜磁界を発生させるためのコイル寸法の検討

磁気ビーズに磁力を発生させるための傾斜磁界は、Fig. 3(a), (b)に示す均一磁界 H_u と傾斜磁界 H_g を合成することにより発生させる。このように磁界を合成する理由は、磁力は磁界強度と磁界傾斜の積に比例することを考慮し、強い磁力が得られる領域をできるだけ広くするためである。

これらの均一及び傾斜磁界を発生させるベクトル・ポテンシャル A_u, A_g は、以下のように与えられる⁶⁾。

$$A_u = (A_x, A_y, A_z) = (0, 0, \alpha y) \quad (1)$$

$$A_g = (A_x, A_y, A_z) = (\alpha y z, -\alpha x z, 0) \quad (2)$$

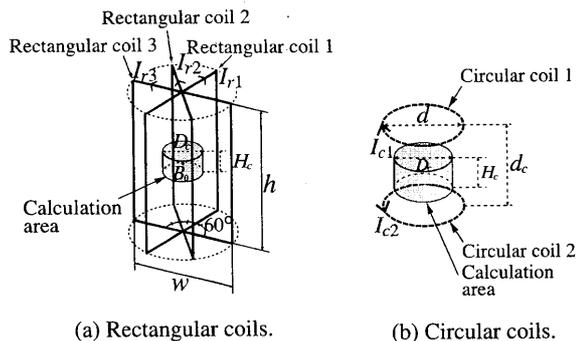


Fig. 6 Area of calculation for determining coil dimensions.

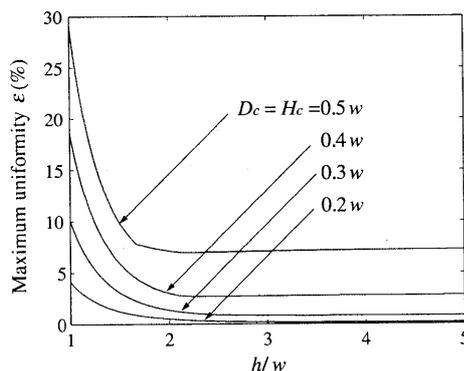


Fig. 7 Maximum magnetic field uniformity ϵ at each ratio of height and width of rectangular coils (h/w).

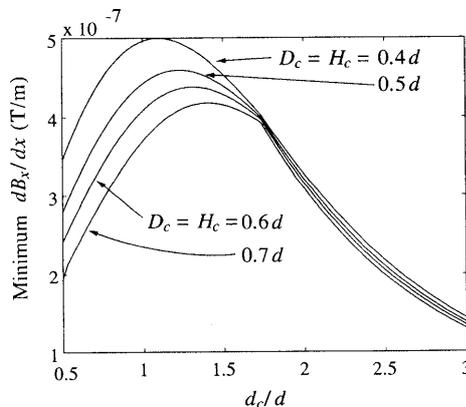


Fig. 8 Minimum magnetic field gradient dB_x/dx at each ratio of interval d_c and diameter d circular coils (d_c/d).

ここで、 α は任意の定数である。一般にベクトル・ポテンシャル A と電流 i の間には以下のような関係がある。

$$A = \frac{\mu_0}{4\pi} \int_v \frac{i}{r} dv \quad (3)$$

ここで、 r は dv と A の間の距離である。上式からベクトル・ポテンシャルと電流の方向は等しいので、各ベクトル・ポテンシャルに対応する電流分布 i_u, i_g は円筒座標系で表すと次式のようなになる。

Table 1 Coil dimensions and number of turns.

Width of rectangular coils	8 cm	Height of rectangular coils	16 cm
Diameter of circular coils	4 cm	Interval between circular coils	4.4 cm
Number of turns	140		

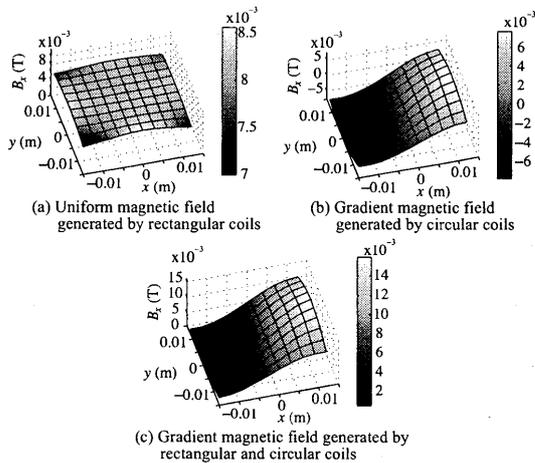


Fig. 9 Calculated magnetic field for all coils.

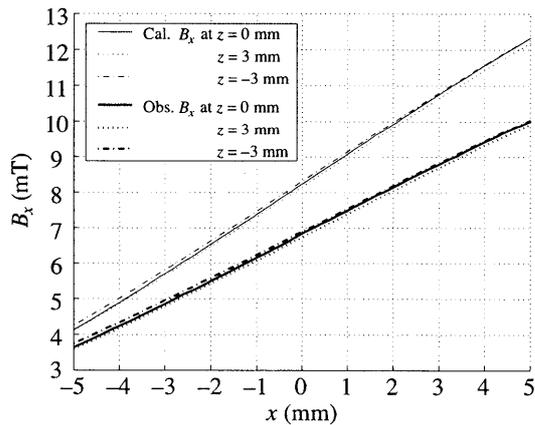


Fig. 10 Calculated and observed magnetic field of coils at $y = 0$.

$$\mathbf{i}_u = (i_r, i_\theta, i_z) = (0, 0, \beta r \sin \theta) \quad (4)$$

$$\mathbf{i}_g = (i_r, i_\theta, i_z) = (0, -\beta r z, 0) \quad (5)$$

ここで、 β は定数である。

式(4)の電流分布が満たされるとき、半径 r の円筒内において x 方向均一磁界が発生する。この電流分布は、複数の長方形コイルを用いて近似的に発生させる。

磁界の均一性が確保される長方形コイル数を決定するために、まず、長方形コイルの短辺部分の導体を無視した Fig. 4 のような z 方向無限長導体による磁界を検討する。ここでは、 y 軸対称の位置にある 2 導体は、それぞれ導体ペアとして取り扱うこととし、 k 番目の導体ペアの電流強度は式(4)に基づき、

以下のように定める。

$$I_k = \frac{I}{N} \sin \theta_k = \frac{I}{N} \sin \frac{\pi}{N} \left(k - \frac{1}{2} \right) \quad (6)$$

ただし、計算の便宜上、 βr は I/N と置換した (I, N はそれぞれ電流強度を表す任意定数と導体ペア数である)。

このとき、 x 軸上の点 P において、全導体による総合磁界 $H(x)$ は次式ようになる。

$$H(x) = \frac{Ir}{\pi N} \sum_{k=1}^N \frac{\sin^2 \theta_k}{r^2 + x^2 - 2rx \cos \theta_k} \quad (7)$$

上式に基づき、磁界の計算を行った結果を Fig. 5 に示す。ここでは $I = r = 1$ とした。この図より、導体ペア数 N が 3 のとき、導体に囲まれた部分における磁界均一性が大きく改善しているため、長方形コイル数は 3 を採用する。また、式(6)より、長方形コイル 1, 2, 3 の電流強度の比はそれぞれ 1:2:1 とする。

次に、長方形コイルの短辺部分を考慮した場合、磁界の均一性が確保される長方形コイルの寸法比を得るために、Fig. 6(a) に示した計算領域を定義し、ビオ・サバールの法則により磁界の計算を行った。評価指標としては、次式で表される磁界均一性 ε を用いた。

$$\varepsilon = \frac{\sqrt{(B_x - B_{0x})^2 + B_y^2 + B_z^2}}{B_0} \times 100 (\%) \quad (8)$$

ここで、 B_0 は計算領域中央における磁界強度である。Fig. 7 は長方形コイルの高さ h と幅 w の比 (h/w) を変化させた場合の磁界均一性 ε の計算領域内での最大値を示す。この図より、 h/w が 2 より大きいとき、磁界均一性 ε の最大値はほぼ一定値となっているため、長方形コイル寸法比 h/w は 2 を採用する。

式(5)を近似的に満たす電流分布は、Fig. 6(b) に示す 2 個の円形コイルにより発生させる。円形コイル 1, 2 の電流強度の比は同じで、電流の方向はそれぞれ反対とする。

磁界傾斜が最も大きくなる円形コイルの寸法比を得るために、Fig. 6(b) に示した計算領域を定義し、磁界の計算を行った。Fig. 8 は円形コイルの間隔 d_c と直径 d の比 (d_c/d) を変化させた場合の磁界傾斜 (dB_x/dx) の計算領域内での最小値を示す。この図より、 d_c/d が 1.1 から 1.4 程度するとき、磁界傾斜の最小値は最も大きくなるため、円形コイル寸法比 d_c/d は 1.1 を採用する。

実際に作製したコイルの寸法と巻線ターン数を Table 1、円形コイル中間部 x 軸上における x 方向磁界の計算値を Fig. 9、計算値と測定値の比較を Fig. 10 に示す (長方形コイル 1, 3 の励磁電流 (I_{r1}, I_{r3}) は 1.5 A、長方形コイル 2 と円形コイル 1, 2 の励磁電流 (I_2, I_{c1}, I_{c2}) は 3.0 A とした)。Fig. 10 より、当初の目標である Fig. 3(c) に示された特性を持った傾斜磁界が発生できていることが確認される。コイル中心 ($x = y = z = 0$) において計算値では $B_x = 8.2$ mT、 $dB_x/dx = 0.85$ T/m、測定値では $B_x = 6.8$ mT、 $dB_x/dx = 0.65$ T/m であり、この差が生じた原因としてはコイル製作時の占積率の低下が考えられる。結果として磁性物に働く磁力も小さくなるが、分離容器の設計においてはその点を考慮した。

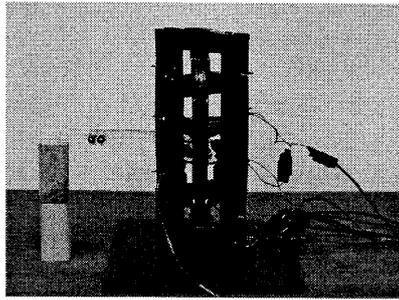


Fig. 11 Magnetic separator for preliminary experiment.

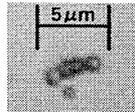


Fig. 12 Micrograph of Magnetic beads CM-10.

また、磁界中で磁気ビーズに働く磁力 F は次式のように与えられる⁷⁾。

$$F = (1 - N_d)\mu_0\mu_r V_m(\mathbf{H} \cdot \nabla)\mathbf{H} \quad (9)$$

ここで、 $N_d, \mu_0, \mu_r, V_m, \mathbf{H}$ はそれぞれ反磁界係数、真空中の透磁率、磁気ビーズの比透磁率、磁気ビーズの体積、磁気ビーズの周囲の磁界である。反磁界係数 N_d は、球状のビーズでは 0.33 である。この磁力による磁性物の移動速度 v_m は次式のようになる。

$$v_m = NF/3\pi\eta D_p \quad (10)$$

ここで、 N, η, D_p はそれぞれ 1 個の分離対象物に結合した磁気ビーズの個数、液体粘度、分離対象物の直径である。

磁気ビーズ 1 個 (直径 1.2 μm , 比透磁率 11.3, 密度 1580 kg/m^3) に同程度の直径の分離対象物 1 個を結合させ、水中 (粘度 0.89 $\text{mPs}\cdot\text{s}$) で試作したコイルの中心に置いた場合、磁気ビーズの周囲の x 方向磁界は 6.8 mT , x 方向磁界傾斜は 0.65 T/m となり、式 (9), (10) より磁気ビーズの x 方向磁力は $2.4 \cdot 10^{-14} \text{ N}$, x 方向速度は $2.4 \mu\text{m}/\text{s}$ であることが求められる。

3.2 分離容器の寸法の検討

分離容器の寸法 (長さ l , 高さ h , 幅 w) を定めるにあたり、高分離率を達成するため、磁気ビーズと分離対象物の分離容器内滞留時間 T_r に関して、以下の条件を満たすようにする。

$$T_m < T_r < T_s \quad (11)$$

ここで、 T_m は磁気ビーズと分離対象物の分離容器内での分離所要時間、 T_s は沈殿時間である。

Inlet から容器内に入った磁性物が Positive selection から出るようになるためには、少なくとも $w/2$ 以上の x 軸正方向への移動が必要であることから、 T_m は $w/2v_m$ となる (v_m は磁力による磁性物の x 方向移動速度)。また、 T_r は l/v_f , T_s は h/v_s となる (v_f は y 軸正方向の液体の流速, v_s は重力による磁性物の z 軸負方向の沈殿速度)。以上より、式 (11) は以下のようになる。

$$v_s l/h < v_f < 2v_m l/w \quad (12)$$

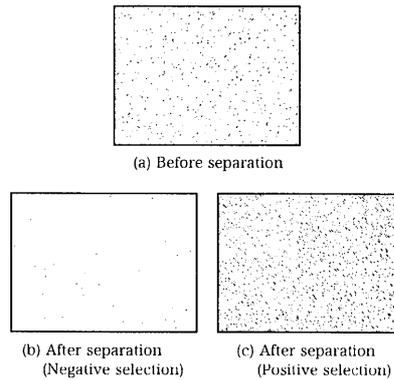
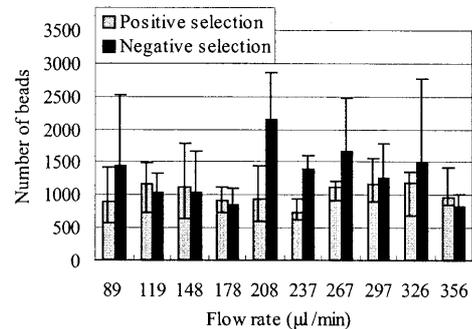
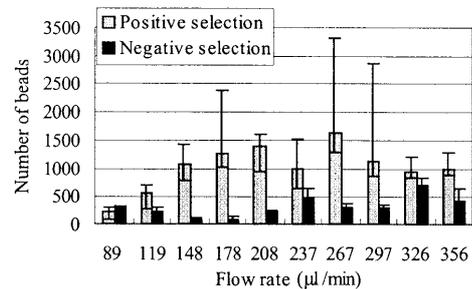


Fig. 13 Images of magnetic beads for three situations.



(a) Without magnetic field.



(b) With magnetic field.

Fig. 14 Number of magnetic beads counted from micrographs

上式で、磁気ビーズの沈殿速度 v_s は次式のように与えられる⁸⁾。

$$v_s = (\rho_b - \rho_f)gD_p^2/18\eta \quad (13)$$

ここで、 ρ_b, ρ_f, g は、それぞれ磁気ビーズの密度、液体の密度、重力加速度である。

分離容器の長さ l , 高さ h , 幅 w はそれぞれ 25 mm , 10 mm , 10 mm とし、前述の磁性物の速度 v_m と沈殿速度 v_s を式 (12) に代入すると、次式の流速 v_f の範囲で分離が行われることがわかる。

$$1.28 \times 10^{-6} < v_f(\text{m}/\text{s}) < 1.20 \times 10^{-5} \quad (14)$$

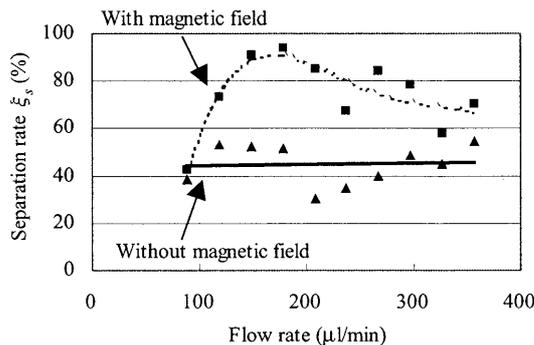


Fig. 15 Separation rate for all flow rates.

4 磁気ビーズによる予備分離実験

4.1 装置構成と手順

Fig. 11 に試作した分離装置の外観写真を示す。磁気ビーズによる予備分離実験は Fig. 1 の装置構成を用い、長方形コイル 1, 3 の励磁電流 (I_{r1}, I_{r3}) は 1.5 A, 長方形コイル 2 と円形コイル 1, 2 の励磁電流 (I_{r2}, I_{c1}, I_{c2}) は 3.0 A とした。予備実験用磁気ビーズとしては, SPHERO CM-10 (Fig. 12) を超純水で 20 倍希釈したものを使用した。分離実験後は, Positive 及び Negative selection から得られた磁気ビーズ含有液体を顕微鏡 (倍率: 200 倍) で 6 枚撮影し, 画像鮮明化処理を行い, 画像処理ソフトウェア WinROOF で画像中の磁気ビーズ個数を数えた。

4.2 予備実験結果

Fig. 13 にポンプの流量が 178 $\mu\text{l}/\text{min}$ のときの分離前後の磁気ビーズ画像 (鮮明化処理後) を示す。この図より, 分離処理後は Positive selection から多数の磁気ビーズが取り出されていることが容易にわかる。また, Fig. 14 に示す各流速ごとの画像中の磁気ビーズ個数からは, 磁界非印加時は両取出口から同様に磁気ビーズが得られ, 磁界印加時は Positive selection から多数の磁気ビーズが得られていることがわかる。

分離率 ξ_s として, 次式のように定義すると, 各流速における分離率は Fig. 15 のようになる。

$$\xi_s = \frac{N_p}{N_p + N_n} \times 100(\%) \quad (15)$$

ここで, N_p, N_n はそれぞれ Positive 及び Negative selection での磁気ビーズ個数である。Fig. 15 より, 流量が 178 $\mu\text{l}/\text{min}$ のとき分離率が最大である。

これより流量が小さい領域で分離率が低くなっているのは, 磁気ビーズが容器内の磁界に捕捉されてしまうこと, および沈殿によりビーズが容器底部に達してしまい液流に流されにくくなったことが原因であると考えられる。一方, 流量が大きい領域でも分離率の低下がみられるのは, 分離時間が短すぎるために十分に Positive selection 側に磁気ビーズが移動しないためであると考えられる。

また, 分離率最大のときの流量 (178 $\mu\text{l}/\text{min}$) は前節における最大設計流量 ($1.2 \times 10^{-9} \text{m}^3/\text{s} = 72 \mu\text{l}/\text{min}$) よりも大きい値である。その理由としては, 磁気ビーズがクラスター状の固まりになったことで, 当初の計算した沈殿速度よりも磁気ビーズが早く沈殿したことが一因として考えられる。

5 結論

本稿では, 他の従来の連続処理型分離装置に比べて高スループットの分離装置の構造を提案し, コイル及び分離容器の設計・試作を行った。また, 磁気ビーズを用いた分離実験の結果, 流量が 178 $\mu\text{l}/\text{min}$ のときに分離率 94.4% が得られた。しかし, より実際の使用に近い条件に近づけるために, 磁性物と非磁性物が混在した液体からの磁性物の分離実験を行う必要がある。ただし, 現状の装置では非磁性物は分離容器の出口から等しく得られることになるため, 磁性物の純度が高くなるよう分離容器の改良・装置の多段化等を行わねばならない。

以上を踏まえ, 今後はより高純度の分離を目指し装置を改良し, より実際の使用に近い対象物を使って実験を行う予定である。

References

- 1) I. Šafařík and M. Šafaříková: *J. Chromatography B*, **722**, 33 (1999).
- 2) NEDO: *FOCUS NEDO*, **17**, 9 (2004).
- 3) R. Hartig, M. Hausmann, G. Lüers, M. Kraus, G. Weber, and C. Cremer: *Rev. Sci. Instrum.*, **66**, 3289 (1995).
- 4) H. Inokuchi, Y. Suzuki, N. Kasagi, N. Shikazono, K. Furukawa, and T. Ushida: Proc. the 22nd sensor symp., Tokyo, 2005, *IEEJ Sensors and Micromachines Soc.*, 125 (2005).
- 5) R. Rong, J. Choi, and C. H. Ahn: Proc. the 16th IEEE MEMS Workshop, 530 (2003).
- 6) Glover P.: 6th Int. Conf. on Magn. Resonance Microscopy, <http://www.magres.nottingham.ac.uk/conferences/2001/icmrm/ICMRMglover.ppt> (As of March 19, 2007)
- 7) H. Suzuki: Doctoral Thesis, Dept. Mech. Eng., The University of Tokyo., http://www.hybrid.iis.u-tokyo.ac.jp/hsuzuki/docs/hsuzuki_dissertation.pdf (As of March 19, 2007).
- 8) J. Tsubaki, M. Suzuki, and Y. Kanda: Nyumon Ryushi Funtai Kogaku (in Japanese), p. 92 (Nikkan Kogyo Shimbunsha, Tokyo, 2002).

2006 年 10 月 5 日受理, 2007 年 3 月 19 日採録