

博士論文

論文題目

細胞操作のためのマイクロ流体デバイスに関する研究

氏 名

近藤 栄太郎

1. 序説	4
1.1. はじめに	4
1.2. マイクロフルイディクスの特徴と利点	4
1.3. 歴史的背景	5
1.4. 細胞生物学での利用例	6
1.4.1. 細胞の分離選別	6
1.4.2. 1対1の細胞融合	8
1.5. マイクロ流体デバイスと細胞培養・アッセイ	9
1.6. 本研究の目的と構成	11
2. 簡易なマイクロ流体デバイスによる細胞培養	17
2.1. 緒言	17
2.1.1. マイクロ流体デバイスによる培養	17
2.1.2. 細胞培養におけるかん流	17
2.1.3. 本章の目的	18
2.2. 実験手法	20
2.2.1. コンセプトとデザイン	20
2.2.2. PDMS 鋳型の作製	21
2.2.3. ソフトリソグラフィ法による PDMS マイクロ流路の作製	23
2.2.4. 流速測定	24
2.2.5. 細胞培養	24
2.2.6. 細胞導入, 増殖曲線	24
2.3. 結果と考察	26
2.3.1. 流速	26
2.3.2. 細胞増殖	27
2.3.3. 細胞生存率	28
2.4. 結論	29
3. マイクロ流路による細胞凍結保存技術の開発	33
3.1. 緒言	33
3.1.1. はじめに	33
3.1.2. 細胞凍結保存技術	33
3.1.3. 細胞凍結保存とマイクロ流体デバイス	34
3.1.4. 本章の内容	35
3.2. 実験手法	37
3.2.1. 細胞培養	37
3.2.2. 細胞凍結保存	37
3.2.3. 免疫染色	37
3.2.4. 氷晶観察	38
3.3. 結果と考察	39
3.3.1. 凍結保存効率	39
3.3.2. PC12 分化能	42
3.3.3. 氷のドメイン観察	44
3.4. 結論	46
4. Ready-to-use な細胞試験用マイクロ流体デバイスの実証	50
4.1. 緒言	50
4.1.1. はじめに	50

4.1.2. Ready-to-Use な細胞試験用マイクロ流体デバイス	50
4.1.3. 細胞試験とマイクロ流体デバイス	51
4.1.3.1 細胞毒性試験とマイクロ流体デバイス	51
4.1.3.2 サイトメトリーとマイクロ流体デバイス	51
4.2. 実験	54
4.2.1 細胞毒性試験	54
4.2.2 イメージサイトメトリーによる細胞周期の推定	54
4.3. 結果と考察	55
4.3.1 細胞毒性試験	55
4.3.2 イメージサイトメトリー	57
4.4. 結論	59
5. 結章	62
付録 1. マイクロポケットの構造に関する考察	64
付録. 2 細胞凍結保存用マイクロ流体デバイスによる長期間保管	68

1. 序説

1.1. はじめに

マイクロフルイディクス・ナノフルイディクスと呼ばれる、基板上で微小流体を操ることによって様々な化学・生物学のプロセスを集積する技術が注目を集めている。この技術のはじまりは、1980 年ごろからの微細加工技術の発展に伴った MEMS と呼ばれる領域における研究に端を発する。当初は、様々なマイクロポンプやマイクロバルブの作製が主であった。これらの研究は、マイクロリアクターや、液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動の微小化・集積化など、分析化学を中心に展開されていた。その中で、1990 年代後半に、生体親和性の高い PDMS(ポリジメチルシロキサン)を用いたマイクロ流路作製手法が提唱されて以来、生化学・細胞生物学にもその手法が盛んに持ち込まれるようになってきた。本章では、これらの研究のキーとなるマイクロフルイディクスの特徴と利点、歴史的背景から、生物学への応用例にふれつつ本研究分野について述べる。

1.2. マイクロフルイディクスの特徴と利点

マイクロフルイディクスにおける特徴、及びそれに起因する利点は大きく分けて 2 つある。

一つ目は、マイクロフルイディクスの反応・プロセス場であるマイクロ系の空間サイズに起因する特徴である。通常の生化学・細胞生物学では、チューブを用いた mm から cm 程度のマクロな空間スケールにおける実験を行っている。これに対して、マイクロ系においては μm スケールである。これによって反応において様々な点での違いが生まれてくる。まず、マクロ系に比べ拡散距離が大幅に短縮され、拡散律速の系では非常に短い時間で混合・反応が実現できる。また、単位体積当たりの界面積の割合(比界面積)が大きい。これによって、親水性などの界面の性質がマクロな系に比べ大きく作用し、反応を積極的に制御することも可能になる。更に、体積が小さいために熱容量が小さい。このため、化学反応、酵素反応においては温度の迅速・精密・容易な制御が可能となる。当然の事ながら、絶対体積の小ささは用いる試料や試薬量の低減につながる。操作に必要なスペースも縮小できるため、操作の簡便化も期待できる。

2点目は、マイクロ空間内の溶液流れに由来する特徴である。マイクロ空間では空間サイズが小さいために低 Reynolds 数の環境を実現でき、溶液流れは層流となる。このため、物質混合は拡散によって起こり、2液混合による反応は界面で起こるようになる。層流を用いたアプリケーションとしては、本研究室で開発された層流樹状増幅法(LFDA: laminar flow-assisted dendritic amplification)がある。本技術は、基板上に固定されたターゲットに対して、層流界面で抗原抗体反応の連続的に起こすことによって、基板上での樹状増幅を行う手法である。この手法で、蛍光増幅を行うことによって、短時間に高感度なマーカートンパク質や miRNA の検出に成功している[1-3]。

1.3. 歴史的背景

1970年代後半頃より μm サイズの構造物の作製が可能になり、1979年に Terry らはガスクロマトグラフィーシステムのシリコン基板上への集積化によるマイクロシステムを報告した[4]。また、工学分野において MEMS(Micro Electro Mechanical System)と呼ばれる微細加工技術の発展に伴って、マイクロシステムの要素となるマイクロポンプやマイクロバルブなどの作製が取り込まれるようになった[5]。これらの発展に伴って、1990年に Manz らによって液体クロマトグラフィーシステムのシリコン基板上への集積化が報告された[6]。この中で、分析化学における全プロセスの集積化、すなわちサンプルの前処理から分離、検出までを集積化し制御する $\mu\text{-TAS}$ (Micro-Total Analysis Systems)の概念が提唱された。これより後に、マイクロシステムを用いた分析化学が急激に発達していった。マイクロ流体デバイスによるサンプルの前処理[7]、高速分離[8]、後処理[9]の手法が提案され、集積されていった結果、様々な生体分子の分析装置として市販されるに至っている。

分析化学以外の利用としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)システムへの応用があげられる。基板上に複数のヒーターを設置し、反応液が繰り返しヒーター上を流れるようにマイクロ流路をデザインすることによって、単に溶液を送液するだけでサーマルサイクル作り上げ、PCR 反応を実現した[10]。

ここまでは、シリコンやガラス基板上での構造によるマイクロシステムであったが、1999年に Whitesides らによってソフトリソグラフィ法を用いた PDMS によるマイクロシステムの作製方法が提唱された[11]。PDMS は以下にあげるような多くの利

点を持っている.

- 精度の高い複製の容易さ
- 生体親和性の高さ
- 透明性が高く, 顕微鏡での観察ができる
- シリコンやガラス基板への接着処理の簡易さ
- ガス透過性の高さ

これらの利点があることより, 細胞生物学分野への応用例が爆発的に増えている. その例については, 次の項で述べていく.

1.4. 細胞生物学での利用例

マイクロ流体デバイスで扱われる細胞は主に動物細胞であるが, 酵母[12], 植物細胞[13], 昆虫細胞[14]の扱いも報告されている. 本論文では, 動物細胞について述べていく.

マイクロフレイディクスで細胞を取り扱う目的は大きく分けて2つある. 1つ目は細胞の空間的な位置をマイクロ流体デバイスの構造や流れや電気といった力で物理的に位置を操作し, 細胞の分離選別, 配置, 脱離を行う. もう一つは, 細胞の周辺環境を精密に制御することによって, 細胞の機能を操作し, 生体模倣につなげようとする試みが挙げられる. 本節では, 物理的な操作について述べる.

1.4.1. 細胞の分離選別

細胞の分離選別の技術は, 細胞生物学の実験だけではなく, 診断医療や再生医療といった臨床医学やバイオプロセスの利用を目指す生物工学において重要だといえる. 多くの場合, 必要な特定の細胞は多種多様な細胞群の中にあることが多い. 診断医療を例にとれば, 血液循環がん細胞が挙げられる. 血液循環がん細胞を, 血液中から分離選別し, 特性評価を行うことで, がんの診断から転移性や治療効果の予測までが可能になると期待されている[15]. しかし, 血液循環がん細胞は 1 mL 中に数万個存在する血液細胞の中に数個しかない. 細胞を分離選別する手法に, 遠心分離や蛍光標識フローサイトメトリー(FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorter)などが挙げられる. 遠心分離は特殊な装置を必要としない反面, 分離能や回収率が高いとはいえず, 希

少な細胞をロスなく回収することは難しい。一方、FACS は分離能や回収率は高い一方で、複雑な光学系やシグナル検出・処理系が必要されるため非常にコストの高い装置になっている。そのため、研究室や医療機関に広く用いられている手法とはいえない。このような背景から、正確かつ簡便に細胞を分離選別する手法が強く求められており、マイクロ流体デバイスが注目を浴びている。

分離選別の指標として、遠心分離では比重、FACS では表面マーカーが用いられている。これらの指標を用いた分離選別マイクロ流体デバイスは数多く報告されている[16-18]。例えば、表面マーカーを指標として利用したデバイスでは、基板を抗体などで修飾することにより基板上に細胞を回収する[16]。これらでは、溶液体積に対する界面積の割合の大きさを利用することによって、高効率化を達成している。また微細なピラー構造物を持たせることにより、さらに界面積を増やしているものも見られる。また、図 1-1.に示すように水性 2 相流を利用した分離法も報告されている[19]。

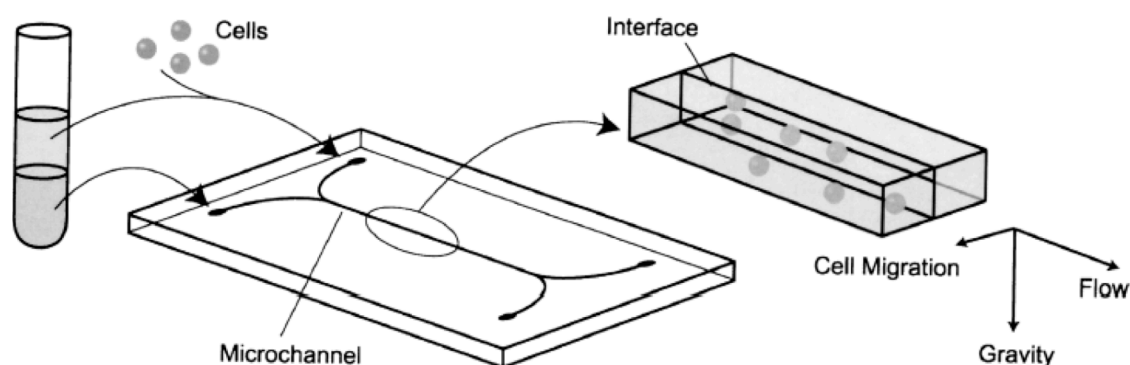


図 1-1. 水性 2 相流を細胞分離のデバイス(出典:Yamada et al., 2004)

比重をマーカーとするデバイスも報告されている[20]。細胞が流れているマイクロ流路に連続的に超音波で刺激することによって、比重やサイズで分離選別することができる。また Lab-on-a-CD と呼ばれる送液に遠心力を用いるマイクロ流体デバイスにおいても比重やサイズによって細胞を分離選別する手法が報告されている[21]。

マイクロ流体デバイスの特性を活かした分離選別指標としては、サイズによる分離手法が挙げられる。ピラー構造を用いた方法[22,23]、螺旋形の流路における慣性力と Dean Force を利用した方法[24,25]や、狭窄部を利用したピンチ・フロー・フラクネーション法流路[26-28]などが挙げられる(図 1-2)。これらのデバイスでは、流すだ

けで簡便に細胞をサイズによって分画することができる。

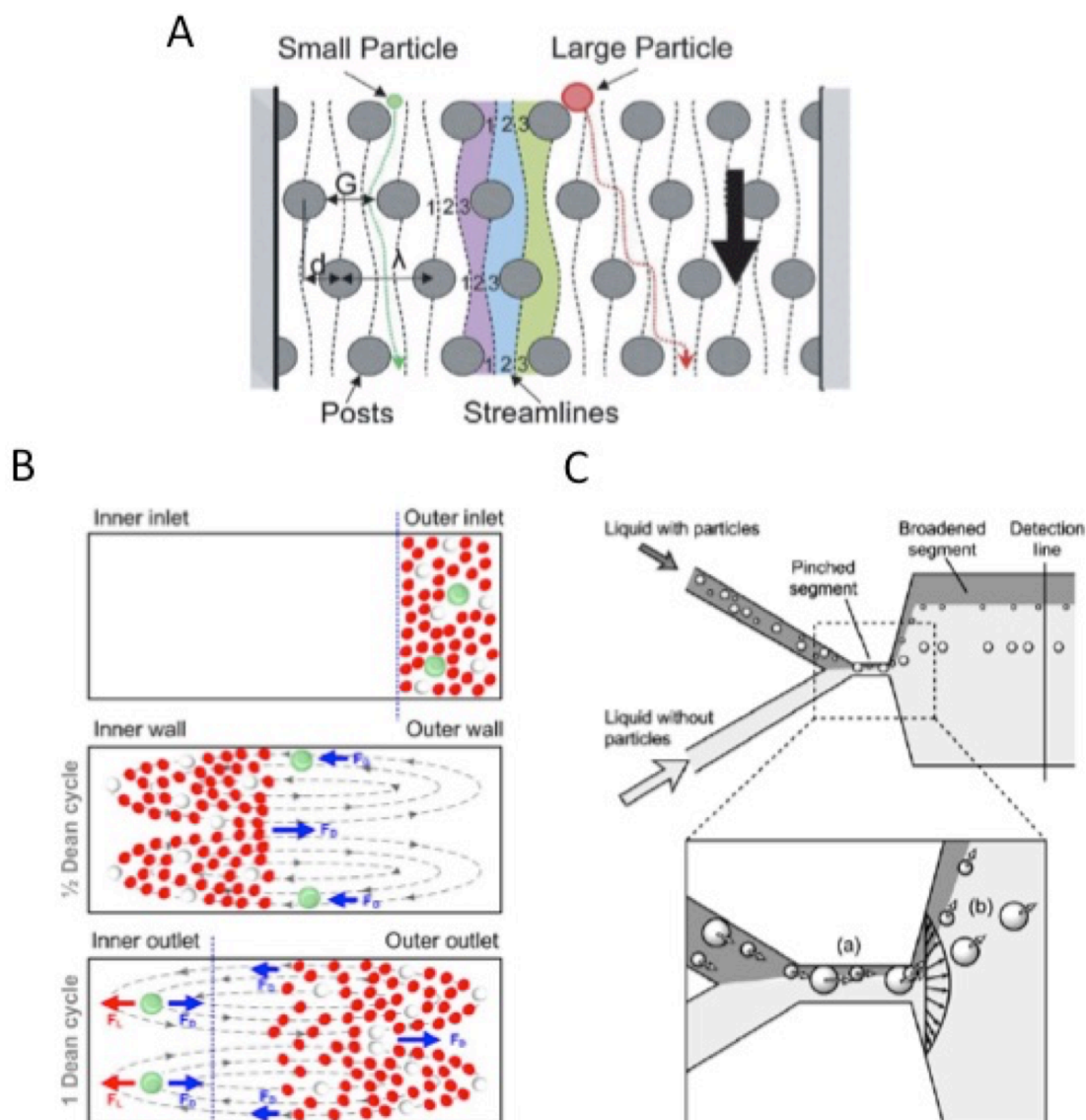


図 1-2. 細胞分離のデバイス. A.ピラー構造を用いた細胞分離(出典: Davis et al., 2006). B. 慣性力と Dean Force を利用した細胞分離(出典:Warkiani et al., 2014) C. ピンチ・フロー・フラクネーション法(出典:Jain and Posner, 2008)

1.4.2. 1対1の細胞融合

細胞融合のテクニックは歴史的にも古く、融合細胞による遺伝子解析や抗体産生細胞の作製などのアプリケーションが多く存在している。胚性生殖細胞や胚性幹細胞との融合によっても体細胞の初期化が起こることが報告されている[29]。これらの手法において、細胞融合の段階が重要なステップではあるが、試験管を用いたマクロな系では2個以上のランダムな細胞融合がおこり正確な融合のコントロールができ

ないという問題がある[30]. 一方で, 一細胞操作による細胞融合では, 高精度に融合がコントロールできるが, 熟練作業による手作業で複雑かつ高度な操作が要求されるため, 生産性が低い.

そこで, マイクロ流体デバイスを用いることによって, 流れや電気力を用いて細胞対を作り, 1 対 1 の正確な細胞融合を行うデバイスが報告されている[31-34]. 特に Voldman らによるデバイスは高い効率を保っており, また融合による細胞の初期化マーカーの発現が確認されている[31]. また, 本研究室では細胞融合による細胞質移植を報告している. 細胞融合による細胞の初期化においては, 複数の核をもつ異常核型細胞が形成されるため, 研究や再生医療への展開が難しい. そのため, 細胞質のみの移植によって初期化ができないかが検討されている. 本研究室では, 細胞核よりも小さな狭窄部を介して細胞を融合させることによって, 核の混合を伴わない細胞質や細胞小器官の移植に成功している[34].

1.5. マイクロ流体デバイスと細胞培養・アッセイ

PDMS は, 生体毒性が低くオートクレーブ可能であり, 細胞培養用のマイクロ流体デバイスの材料として有望である[35]. また, 光透過性が高いため, 従来の顕微鏡を用いた位相差, 蛍光観察が可能である. そのため, PDMS を用いたマイクロ流体デバイス内を用いた細胞培養が生物学への応用が始まった当初から進められてきていた[36]

細胞培養用マイクロ流体デバイスの多くはシリコン[37]やガラス基板[38,39]の上に PDMS 製のマイクロ流体チップを載せ, プラズマ処理で表面を酸化・活性化し, 接合させることによって作製されている. シリコンやガラス基板上に細胞は接着しないので, 細胞を導入する前に, コラーゲン[40]や poly-D-Lysine[41]などによる前処理が必要となってくる. その後, 細胞をマイクロ流体デバイス内に導入し, 細胞を培養する.

細胞培養をマイクロ流体デバイスで行うことで, 培養皿やフラスコとは違った環境に細胞をさらし, 機能に変化がおこることが報告されている. さらに, 積極的に細胞周囲の環境を精密に制御することによって, より *in vivo* に近い細胞状態を発現させられないかということも考えられている[42-44]. 例えば, ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC 細胞)は通常の細胞培養皿で培養しても, 血管内皮細胞特異的機能が発現し

ない。しかし、マイクロ流体デバイスを用いてある一定以上の剪断応力をかけながら培養すると、細胞の形が紡錘形に変わり、また血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS: endothelial nitric oxide synthase)が高発現するなど血管内皮細胞特異的機能の発現が見られるようになる[44]。また、目的とする機能を発現する細胞と一緒に別の細胞を培養(共培養)すると、単一で培養した時には見られなかった機能が発現することも多く報告されている[45,46]。マイクロ流体デバイスを用いた培養皿やフラスコを用いた共培養系の再現はすでに知られている。マイクロ流体デバイスを用いて細胞配置を配置することによって、ディッシュを用いたランダムな共培養では発現しない機能が初めて発現するなど、マイクロ流体デバイスでしかできない共培養による細胞機能の発現も報告されている[47]。空間的に配置を制御することによってランダムな共培養系においては難しかった機能発現を誘導するメカニズムに関する解析にも有効であることが報告されている。マイクロ流体デバイスの特徴である層流も細胞培養・細胞試験に利用されている[48-50]。Gerardo らは、層流によってヒト胚性幹細胞の一部のみに刺激を与えることに成功している[49]。細胞シグナルの研究に利用できるのではないかと考えられている。細胞培養におけるこのように、細胞の周辺環境を精密に制御できるマイクロ流体デバイスは細胞生物学を深めていく上で重要なツールだといえる。

マイクロ流体デバイスの特徴である機能の集積化という点からみると、細胞培養と電気泳動を組み合わせたマイクロ流体デバイスがあげられる。キャピラリー電気泳動法はマイクロ流体デバイスを用いた代表的な手法と言え、シーケンシングやタンパクの検出など様々なアプリケーションへと展開されている。キャピラリー電気泳動と細胞培養と組み合わせることによって、細胞の培養と細胞内のホルモン量の定量を1チップで行えるデバイスが報告されている[51]。

機械的な流路抵抗の組み合わせによって2種類の溶液を任意の割合で混合させる機能と細胞培養を組み合わせることによって、細胞の半数致死濃度(IC₅₀)や増殖曲線の影響を評価するといった薬剤の毒性試験も多数報告されている[52-54]。このようなデバイスではマルチウェルプレートと同等の毒性試験ができることが報告されている[52]。

このようにマイクロ流体デバイスを用いた細胞培養は多種多様な手法を生み出し、マイクロ流体デバイスでなければ得られなかった結果が得られるようになってきて

いる。

しかし、このようなマイクロフルイディクスの発展にもかかわらず、細胞を培養し、操作するためのマイクロ流体デバイスはマイクロフルイディクスの研究者以外の一般的な細胞生物学者には広がっていない。

1.6. 本研究の目的と構成

これまでに述べてきたように、マイクロ流体デバイスを用いた細胞生物学は多くのことができるようになった反面、複雑になってきている。そのため、マイクロフルイディクスの研究者以外の一般的な細胞生物学者には広がっていない。その理由として、細胞を扱うためのポンプなどの附属に伴うマイクロ流体デバイスの大型化とポンプなどを含めたデバイスに技能が求められることがあげられる。

以上を踏まえて、本論文の目的を、シンプルなマイクロ流体デバイスによる細胞操作の実現を図ることとした。第2章では、細胞実験における基本的な操作である細胞培養を行うシンプルマイクロ流体デバイスを作製した。第3章では、作製した細胞培養用マイクロ流体デバイスを用いて、マイクロ空間を活かした細胞凍結保存法の開発を行った。第4章では、作製したマイクロ流体デバイスと凍結保存技術を用いて、Ready-to-Use な細胞試験マイクロ流体デバイスの実証実験に取り組んだ。そして、第6章では本研究の成果をまとめ、今後の展望を論じた。

付録1では、マイクロ流体デバイスでシングルセルを捕集するマイクロポケットの構造に関して考察した。付録2では、第3章で開発した細胞凍結保存技術を用いた長期間保存における問題点について考察した。

参考文献

- [1] K. Hosokawa, M. Omata, K. Sato, M. Maeda, Power-free sequential injection for microchip immunoassay toward point-of-care testing., *Lab Chip*. 6 (2006) 236–41.
- [2] K. Hosokawa, T. Sato, Y. Sato, M. Maeda, DNA detection on a power-free microchip with laminar flow-assisted dendritic amplification., *Anal. Sci.* 26 (2010) 1053–7.
- [3] H. Arata, H. Komatsu, K. Hosokawa, M. Maeda, Rapid and sensitive microRNA detection with laminar flow-assisted dendritic amplification on power-free microfluidic chip., *PLoS One*. 7 (2012) e48329.
- [4] Y. Goldstein, N.B. Grover, C. Chang, A. Jelli, J. Andre, P. Mark, et al., A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated, (1979) 1880–1886.
- [5] H. Van Lintel, F. Van de Pol, S. Bouwstra, A piezoelectric micropump based on micromachining of silicon, *Sensors and Actuators*. 15 (1988) 153–167.
- [6] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing, *Sensors Actuators B Chem.* 1 (1990) 244–248.
- [7] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, A.W.J. Moore, J.M. Ramsey, Precolumn Reactions with Electrophoretic Analysis Integrated on a Microchip, *Anal. Chem.* 66 (1994) 4127–4132.
- [8] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Koutny, J.M. Ramsey, High-Speed Separations on a Microchip, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1114–1118.
- [9] K. Fluri, G. Fitzpatrick, N. Chiem, D. Harrison, Integrated capillary electrophoresis devices with an efficient postcolumn reactor in planar quartz and glass chips, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4285–90.
- [10] M.U. Kopp, Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip, *Science* (80-.). 280 (1998) 1046–1048.
- [11] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J. Schueller, G.M. Whitesides, Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)., *Anal. Chem.* 70 (1998) 4974–84.
- [12] A. Groisman, C. Lobo, H. Cho, J.K. Campbell, Y.S. Dufour, A.M. Stevens, et al., A microfluidic chemostat for experiments with bacterial and yeast cells., *Nat. Methods*. 2 (2005) 685–9.

- [13] M. Horade, N. Yanagisawa, Y. Mizuta, T. Higashiyama, H. Arata, Growth assay of individual pollen tubes arrayed by microchannel device, *Microelectron. Eng.* 118 (2014) 25–28.
- [14] H. Yu, I. Meyvantsson, I. a Shkel, D.J. Beebe, Diffusion dependent cell behavior in microenvironments., *Lab Chip.* 5 (2005) 1089–95.
- [15] C. Alix-Panabières, H. Schwarzenbach, K. Pantel, Circulating tumor cells and circulating tumor DNA., *Annu. Rev. Med.* 63 (2012) 199–215.
- [16] W. Zhao, C.H. Cui, S. Bose, D. Guo, C. Shen, W.P. Wong, et al., Bioinspired multivalent DNA network for capture and release of cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 19626–31.
- [17] F.I. Thege, T.B. Lannin, T.N. Saha, S. Tsai, M.L. Kochman, M. a Hollingsworth, et al., Microfluidic immunocapture of circulating pancreatic cells using parallel EpCAM and MUC1 capture: characterization, optimization and downstream analysis., *Lab Chip.* 14 (2014) 1775–84.
- [18] W. Sheng, T. Chen, W. Tan, Z.H. Fan, Multivalent DNA nanospheres for enhanced capture of cancer cells in microfluidic devices., *ACS Nano.* 7 (2013) 7067–76.
- [19] M. Yamada, V. Kasim, M. Nakashima, J. Edahiro, M. Seki, Continuous cell partitioning using an aqueous two-phase flow system in microfluidic devices., *Biotechnol. Bioeng.* 88 (2004) 489–94.
- [20] T. Laurell, F. Petersson, A. Nilsson, Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles., *Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 492–506.
- [21] J. Zhang, Q. Guo, M. Liu, J. Yang, A lab-on-CD prototype for high-speed blood separation, *J. Micromechanics Microengineering.* 18 (2008) 125025.
- [22] L.R. Huang, E.C. Cox, R.H. Austin, J.C. Sturm, Lateral Displacement, (2004).
- [23] J. a Davis, D.W. Inglis, K.J. Morton, D. a Lawrence, L.R. Huang, S.Y. Chou, et al., Deterministic hydrodynamics: taking blood apart., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 14779–84.
- [24] H.W. Hou, M.E. Warkiani, B.L. Khoo, Z.R. Li, R. a Soo, D.S.-W. Tan, et al., Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces., *Sci. Rep.* 3 (2013) 1259.

- [25] M.E. Warkiani, G. Guan, K.B. Luan, W.C. Lee, A.A.S. Bhagat, P.K. Chaudhuri, et al., Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells., *Lab Chip*. 14 (2014) 128–37.
- [26] M. Yamada, M. Nakashima, M. Seki, Pinched flow fractionation: continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel., *Anal. Chem.* 76 (2004) 5465–71.
- [27] J. Takagi, M. Yamada, M. Yasuda, M. Seki, Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches., *Lab Chip*. 5 (2005) 778–84.
- [28] A. Jain, J.D. Posner, Particle dispersion and separation resolution of pinched flow fractionation., *Anal. Chem.* 80 (2008) 1641–8.
- [29] M. Tada, Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji, T. Tada, Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells., *Curr. Biol.* 11 (2001) 1553–8.
- [30] D.T. Chiu, A microfluidics platform for cell fusion, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 609–612.
- [31] A.M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch, J. Voldman, Microfluidic control of cell pairing and fusion., *Nat. Methods*. 6 (2009) 147–52.
- [32] B. Dura, Y. Liu, J. Voldman, Deformability-based microfluidic cell pairing and fusion., *Lab Chip*. 14 (2014) 2783–90.
- [33] M. Gel, Y. Kimura, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, M. Washizu, Dielectrophoretic cell trapping and parallel one-to-one fusion based on field constriction created by a micro-orifice array., *Biomicrofluidics*. 4 (2010) 1–8.
- [34] K.-I. Wada, K. Hosokawa, E. Kondo, Y. Ito, M. Maeda, Cell fusion through a microslit between adhered cells and observation of their nuclear behavior., *Biotechnol. Bioeng.* 111 (2014) 1464–8.
- [35] J.N. Lee, X. Jiang, D. Ryan, G.M. Whitesides, Compatibility of Mammalian Cells on Surfaces of Poly (dimethylsiloxane), (2004) 11684–11691.
- [36] A. Tilles, H. Baskaran, P. Roy, M.L. Yarmush, M. Toner, Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor., *Biotechnol. Bioeng.* 73 (2001) 379–89.

- [37] M. Brischwein, E.R. Motrescu, E. Cabala, a M. Otto, H. Grothe, B. Wolf, Functional cellular assays with multiparametric silicon sensor chips., *Lab Chip*. 3 (2003) 234–40.
- [38] K. Ziolkowska, E. Jedrych, R. Kwapiszewski, J. Lopacinska, M. Skolimowski, M. Chudy, PDMS/glass microfluidic cell culture system for cytotoxicity tests and cells passage, *Sensors Actuators B Chem.* 145 (2010) 533–542.
- [39] Y. Tanaka, Y. Kikukawa, K. Sato, Y. Sugii, T. Kitamori, Culture and leukocyte adhesion assay of human arterial endothelial cells in a glass microchip., *Anal. Sci.* 23 (2007) 261–6.
- [40] C.J. Bettinger, E.J. Weinberg, K.M. Kulig, J.P. Vacanti, Y. Wang, J.T. Borenstein, et al., Three-Dimensional Microfluidic Tissue-Engineering Scaffolds Using a Flexible Biodegradable Polymer., *Adv. Mater.* 18 (2005) 165–169.
- [41] B.G. Chung, L. a Flanagan, S.W. Rhee, P.H. Schwartz, A.P. Lee, E.S. Monuki, et al., Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device., *Lab Chip*. 5 (2005) 401–6.
- [42] J. Voldman, M.L. Gray, M. a Schmidt, *Microfabrication in biology and medicine.*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 1 (1999) 401–25.
- [43] G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics., *Nature*. 442 (2006) 368–73.
- [44] K. Hattori, Y. Munehira, H. Kobayashi, T. Satoh, S. Sugiura, T. Kanamori, Microfluidic perfusion culture chip providing different strengths of shear stress for analysis of vascular endothelial function., *J. Biosci. Bioeng.* 118 (2014) 327–32.
- [45] Y. Li, L. Liu, J. Kang, J.G. Sheng, S.W. Barger, R.E. Mrak, et al., Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression., *J. Neurosci.* 20 (2000) 149–55.
- [46] C. Spiess, M. Merchant, A. Huang, Z. Zheng, N.-Y. Yang, J. Peng, et al., Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies, *Nat. Biotechnol.* (2013).
- [47] K. Kikuchi, K. Sumaru, J.-I. Edahiro, Y. Ooshima, S. Sugiura, T. Takagi, et al., Stepwise assembly of micropatterned co-cultures using photoresponsive culture surfaces and its application to hepatic tissue arrays., *Biotechnol. Bioeng.* 103 (2009) 552–61.

- [48] F.-Q. Nie, M. Yamada, J. Kobayashi, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, On-chip cell migration assay using microfluidic channels., *Biomaterials*. 28 (2007) 4017–22.
- [49] L.G. Villa-diaz, Y. Torisawa, T. Uchida, J. Ding, N.C. Nogueira-de-souza, K. Sue, et al., Microfluidic culture of single human embryonic stem cell colonies, (2009) 1749–1755.
- [50] E. Berthier, J. Warrick, B. Casavant, D.J. Beebe, Pipette-friendly laminar flow patterning for cell-based assays., *Lab Chip*. 11 (2011) 2060–5.
- [51] M.G. Roper, J.G. Shackman, G.M. Dahlgren, R.T. Kennedy, Microfluidic Chip for Continuous Monitoring of Hormone Secretion from Live Cells Using an Electrophoresis-Based Immunoassay, *Anal. Chem*. 75 (2003) 4711–4717.
- [52] W. Gu, X. Zhu, N. Futai, B.S. Cho, S. Takayama, Computerized microfluidic cell culture using elastomeric channels and Braille displays., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 15861–6.
- [53] T. Glawdel, C. Elbuken, L.E.J. Lee, C.L. Ren, Microfluidic system with integrated electroosmotic pumps, concentration gradient generator and fish cell line (RTgill-W1)--towards water toxicity testing., *Lab Chip*. 9 (2009) 3243–50.
- [54] A. Tirella, M. Marano, F. Vozzi, A. Ahluwalia, A microfluidic gradient maker for toxicity testing of bupivacaine and lidocaine., *Toxicol. In Vitro*. 22 (2008) 1957–64.

2. 簡易なマイクロ流体デバイスによる細胞培養

2.1. 緒言

2.1.1. マイクロ流体デバイスによる培養

細胞培養は生物学、医学研究において基本となる実験手法であり、1912年のCarrelによるニワトリの心筋細胞による培養から、様々な細胞培養技術が報告されてきた[1-4]。PDMS製のマイクロ流体デバイスの作製手法が報告されて以降、マイクロ流体デバイスを利用した細胞培養・細胞試験への利用が報告されてきている[5,6]。マイクロ流体デバイスを用いることによって、細胞や試薬量が低減でき、実験を単一細胞レベルで行えるようになってきている[7]。しかし、マイクロ流体デバイスを用いた実験は一般の細胞生物学の研究者にとっては未だに難しいものだといえる。最も基本といえる *in vitro* な細胞培養においてでさえ、細胞培養液のかん流のための複雑な機器を必要とする[8,9]。マクロな環境に比べてマイクロ流体デバイスでは空間が少なく、細胞自身の代謝によって細胞周辺環境は容易に悪化していくため、かん流は必須である。しかし、かん流による剪断応力によって、細胞死を含めた細胞の機能に影響があるため、かん流は適度にコントロールされる必要がある。

2.1.2. 細胞培養におけるかん流

細胞培養用マイクロ流体デバイスにおける培養期間中におけるかん流は重要であり、これまでに多くのかん流の方法が報告されてきた。シリンジポンプ[10]、ペリスターポンプ[11]、点字ディスプレイ[12]、磁力駆動マイクロポンプ[13]、動物用マイクロインフュージョンポンプ[14]などが報告されている。これらのかん流のための機器は長期間安定的なかん流をおこなうことができる。しかし、生物学の研究者の視点から考えると、こういった機器ですら馴染みのないものであり、また大型化につながる。こういった機器の特徴を分類してみると、表 2-1. のように表せる。

		外部動力機器	
		あり	なし
外部との接続	あり	シリンジポンプ ペリスターポンプ	重力
	なし	点字ディスプレイ磁力駆動 マイクロポンプ	

表 2-1 .かん流方式のまとめ

外部機器とマイクロ流体チップをチューブでつなぐことによって、シリンジポンプやペリスターポンプなどが使えるようになるが、全体的にマイクロ流体デバイスが大きくなり、接続部を持つことによってコンタミネーションのリスクが増大する。容量が増加することによってチューブをなくす工夫としては、内部のマイクロポンプを、外部から磁力を用いて操作する方法がある。外部機器を必要としないマイクロ流体デバイスへの送液方法としては、毛細管現象が知られているが、液が流路を満たした時点で送液がとまり、長期間細胞を培養する、目的には使えない[15]。単純、小型化するということを考えると、動力源を必要としない受動的な方法によるかん流が望まれる。受動的な力の利用例として、重力の利用による精子の分析用のマイクロ流体デバイスが報告されている[16]。このマイクロ流体デバイスは、重力を用いることによって外部機器無しのかん流を実現し、小型化に成功している。細胞培養にも応用はされているが、これまでに報告されている重力によるかん流は外部へのチューブによる接続を必要としている[17-19]。Zhu らは細胞培養チャンバーの上部に大きなリザーバーをつけた細胞培養用マイクロ流体デバイスを報告している[17]。Marimuthu らは静脈注入キットを利用した細胞培養用マイクロ流体デバイスを報告している[19]。これらの外部の付属品は、十分な高低差を作り、長期間における安定的なかん流を産みだすのに必要である。しかしその一方で、流量の最適化は行われてはいないようである。正確な流量のコントロールの必要性について必ずしも高くないと考えられる。

2.1.3. 本章の目的

これまで述べてきたように、細胞培養用のマイクロ流体デバイスは多く報告されているが、使いにくさゆえに生物系の研究者に広がりを見せていない。より簡便で小

型な細胞培養用のマイクロ流体デバイスの作製は、マイクロ流体デバイスの利用者の広がりを考える上で重要である。そのため、簡便で小さな細胞培養用マイクロ流体デバイスを開発する必要があるといえる。そこで本章では、より使いやすい簡便で小さな細胞培養用のマイクロ流体デバイスのコンセプト及び作製について述べる。

2.2. 実験手法

2.2.1. コンセプトとデザイン

図 2-1 に細胞培養用マイクロ流体デバイスのデザインを示す. 簡便で小型な細胞培養用のマイクロ流体デバイスの作製において, かん流の動力源として重力を用いることにした. 自然の力である重力を用いることによって外部機器を用いることなくかん流をおこすことができる. 単純な操作性を実現するために, 細胞培養で普段から用いられている 35 mm 細胞培養皿(ファルコン)に PDMS 製のマイクロチップを接合しマイクロ流体デバイスとすることにした. 35 mm 細胞培養皿を用いることによって, 基板に対してコラーゲンや poly-D-Lysine などによる前処理をする必要がなく, 目的細胞に応じて細胞培養皿を選ぶことによりコーティングを簡単に選ぶことができる. PDMS 製マイクロチップは 35 mm 細胞培養皿のサイズに合わせて作られており, 大きさは 20 mm x 10mm x 3 mm(縦 x 横 x 高さ)とした. 高さは, PDMS のガス溶解性による自律駆動によるマイクロ流路への液の充填が可能な厚さになっている. PDMS 製のチップには, 培地タンクとなる内径 5 mm 外径 7 mm のシリコンチューブが取り付けられた. シリコンチューブとマイクロチップの接着には, 未重合の PDMS を用いた. 外部との接続をなくし, 高さ 11 mm の 35 mm 細胞培養皿の蓋を閉まるようにするために, 培地タンクの高さは, 7 mm とした. 従って, タンク内には 137 μL の液体を入れることができる. 培地タンクの底は, 導入口となる直径 3 mm の穴と繋がっている. 培地タンクと排液口の数 mm の高低差による重力によって, 培地タンク内の液体がかん流される.

マイクロ流路の高さは 25 μm で一様にできている. これは, 懸濁状態での NIH3T3 細胞(直径 14.9 μm)が高さ方向に 2 つは重ならないようになっている. マイクロ流路の構造は, 大きく分けてフィルターと細胞培養エリアの 2 つの部分から成り立っている. 導入口はフィルターに開けられている. フィルターは幅 3000 μm の流路に間隔 20 μm のスリットがアレイ化されており, 細胞導入時に細胞塊を排除するようにした. フィルターと細胞培養エリアは均一な流体力学的抵抗をつくるための幅 100 μm の二分岐構造の流路によって結ばれている. 細胞培養エリアは幅 500 μm で, 均一に細胞を播種するために細胞を捕集するマイクロポケットが並べられている. マイクロポケット間の間隔は, 懸濁状態での NIH 3 T3 の直径よりも大きく細胞が途中で詰

まることがないようにできている. マイクロポケットの密度は 240 個/mm^2 である. マイクロポケットは, $40\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ の長方形が直径 $15 \mu\text{m}$ の半円で削られた形になっており, 懸濁状態での NIH3T3 の大きさとほぼ同じになっている. そのため, 1 つのポケットに対して, 細胞は複数個入ることはできず, 均一に細胞を播くことができる. 細胞培養エリアから幅 $100 \mu\text{m}$ の直線が繋がっており, 溶液は排液口まで流れていく. このチップデザインをもとに, AutoCAD(Autodesk)でフォトリソマスクデザインを作製し, 株式会社システムアドバンスにフォトリソマスクの作製を依頼した.

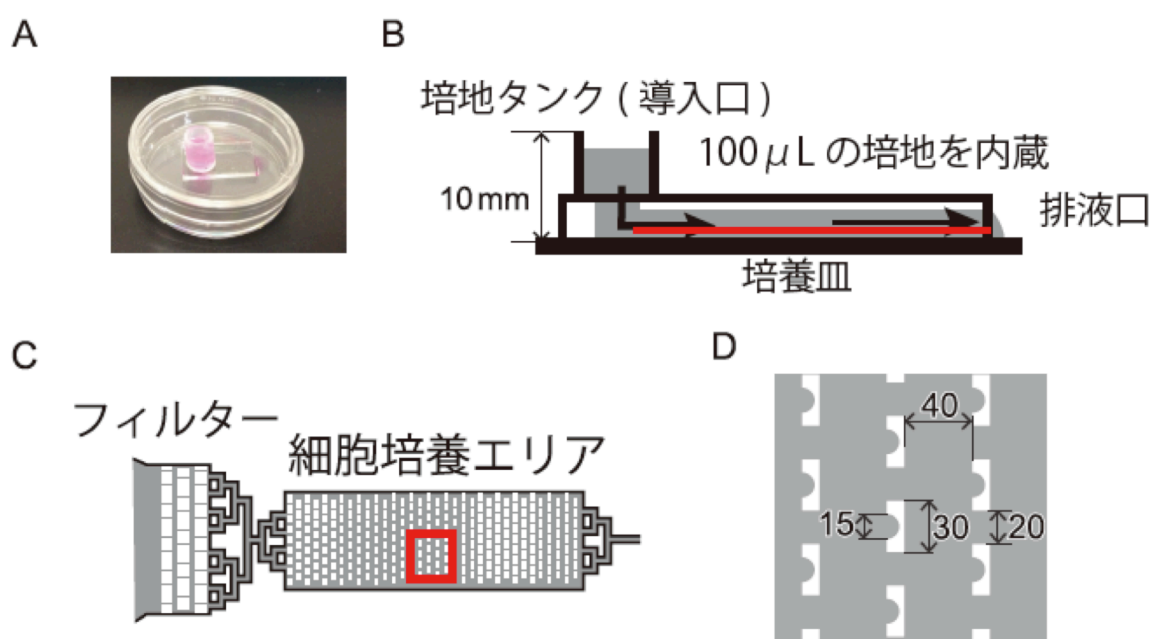


図 2-1. 細胞培養用マイクロ流体デバイスのコンセプトとデザイン. (A)デバイス外観図 (B) 縦方向の断面図. 流路の高さは $25\mu\text{m}$ (ノンスケール) (C) 赤線(図 B)における俯瞰図(ノンスケール) (D) 赤枠(図 C)拡大図. 直径 $15\mu\text{m}$ の半円状の細胞捕集ポケットがなっている.

2.2.2. PDMS 鋳型の作製

作製はフォトリソグラフィ法により行った[20]. 作製手順を図 2-2 に示す. はじめに, 6 インチシリコンウェハ (長野電子工業) をダイヤモンドペンで $32 \text{ mm} \times 32 \text{ mm}$ に切り分けた. Si ウェハー片を, 2-プロパノール(和光純薬)→純水の順で 1 分ずつ超音波洗浄を行った. 洗浄後, 遠心機で水滴を飛ばした後に, オープンにて 100°C で 10 分 加熱して完全に乾燥させた. 乾燥させた Si ウェハー片をプラズマエッチン

グ装置(Samco International, RIE-10NR)で O₂ プラズマ処理(プロセスガス O₂ 20 SCCM, 制御圧力 20 Pa, 出力 150 W, 放電時間 10 min)でクリーニングをおこなった。クリーニング後, Si ウェハ片にスピコート(MIKASA, 11-1-DX2)を用いてフォトレジスト剤(SU-8 シリーズ, MicroChem)を均一に塗布した。回転数は, 目的とするフォトレジスト層の厚さに応じて, 表.2 のように設定した。

厚さ	フォトレジスト剤	回転数
5 μm	SU-8 5	2500 rpm
18 μm	SU-8 25	3750 rpm
20 μm		3500 rpm
25 μm		3000 rpm
50 μm		1000 rpm

表.2 フォトレジスト層の厚さと回転数

フォトレジスト剤を塗布した Si ウェハ片をオープンにて, 90° C で 30 分のプリベイクした。マスクアライナ(ユニオン工学, PEM-800)を用いて, 15 秒の UV 照射によってマスクパターンを転写した。(図 2-2.A)パターン転写後, Si ウェハ片をオープンにて, 90° C で 30 分のポストベイクを行った。SU-8 現像液(MicroChem)を用いて, 室温で 5 分間現像を行った後, 2-プロパノールで 2 分間洗浄した。洗浄後, Si ウェハ片を遠心し, 2-プロパノールを飛ばした。多層構造を持つ鋳型を作製する際は, ここで次層のフォトレジスト剤を塗布した(図 2-2B)。塗布した後は, 1 層目と同じプロセスで転写, 現像を行った。

最終層の現像が終わった Si ウェハ片は 140° C で 10 分間のハードベイクを行い, 室温までオープン内でゆっくりと冷ました。

ハードベイクを行った Si ウェハ片はプラズマエッチング装置にてアッシング/エッチング(表 2-2.)を行って, 鋳型とした。

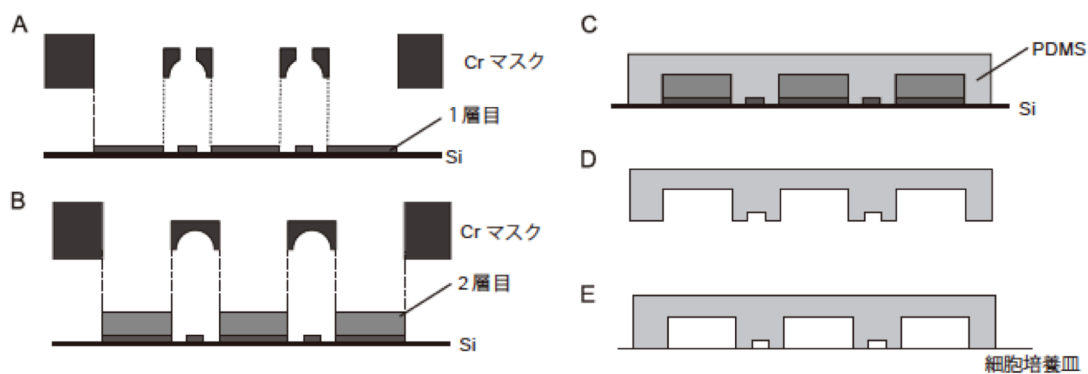


図 2-2. PDMS 製 マイクロチップの作製フローチャート. A.1 層目の作製 B.2 層目の作製 C.PDMS

	プロセス 1	プロセス 2
プロセスガス	CHF ₃ 45 SCCM O ₂ 5 SCCM	CHF ₃ 50 SCCM
制御圧力	20 Pa	20 Pa
出力	200 W	200 W
放電時間	5 min	2 min

表 2-2. アッシング/エッチングの動作設定

2.2.3. ソフトリソグラフィ法による PDMS マイクロ流路の作製

PDMS プレポリマーと重合開始剤を 10:1 の割合で混ぜ合わせ、作製した鋳型に流し込んだ(図 2-2C). 流し込んだ後、真空チャンバー内で脱泡し、65 ° C のオーブンで 1 時間加熱し固化させた. PDMS を鋳型から剥がし取り(図 2-2D), ナイフで成形したのちに液の導入部にハトメ(3 φ)で穴を開け、インレットリザーバーとなる外径 7 mm 内径 5mm 長さ 7 mm のシリコンチューブを PDMS の混合液で接着させた. 100° C のオーブンで一晩加熱し固化させたのちに、35 mm の細胞培養皿に接着させた. (図 2-2E)

2.2.4. 流速測定

マイクロデバイスへの液の導入は、本研究室で開発された自律駆動マイクロチップの技術を用いて行った[20]. PDMSは大気圧下で体積比10%程度のガスを溶存しており、その量はヘンリーの法則にしたがって気圧に応じて変化する. 従ってPDMSを真空下にしばらく置いておくと脱気することができ、大気圧下に戻せば空気を吸収する. この現象を細胞培養液の充填に用いた. マイクロデバイスを20 kPaで1時間脱気した. 脱気後、導入口及び排液口に10 μ Lの細胞培養液を滴下し、無動力でチャンネル内に細胞培養液を満たした. 導入口の培地を、PDMSの高さまで取り除いた. 蛍光ビーズ懸濁液体培地（直径1 μ m:数密度 1.0×10^6 個/ mL）100 μ Lを導入口に入れた. 入れてから、1,12,24,36,48時間後に、蛍光顕微鏡で、排液口の手前の直線部分を露光時間100 ms、撮影間隔150 msで連続撮影した.

撮影した画像の解析はImage Jを用いた[21]. 1つの粒子につき、1度だけ、連続2フレームの軌跡の端点の座標をとり、座標間の距離を算出し、フレーム間での移動距離とし、粒子の平均移動距離を流速とした. 算出した移動平均量はExcelを用いて処理をした.

2.2.5. 細胞培養

核標的化EGFP遺伝子[22]を安定にトランスフェクションすることによってNIH3T3細胞から得たNg3T3細胞を、4500mg/Lのグルコース(和光)を含有する、10%ウシ胎児血清(Gibco)を補充したダルベッコ改変イーグル培地で培養した.

2.2.6. 細胞導入, 増殖曲線

70%~80%コンフルエントに達したNg3T3を0.05%トリプシン-EDTAで3分間処理をした. 3~5倍量の液体培地で、トリプシンを失活させた後に、1000rpmで3分間遠心した. 遠心後上澄みを捨て、500 μ l PBS(和光純薬)でゆっくり懸濁し、細胞の洗浄を行った. 懸濁後、2.5mL PBSを加えて1000rpmで3分間遠心した. 遠心後、細胞の洗浄をもう一度行い、遠心した. 遠心後、上澄みをすて、細胞密度 1.0×10^6 個/mLに細胞培養液に細胞を懸濁した.

細胞懸濁液 100 μ L を培地タンクに入れて、流れを加速するために 60G で遠心をした。遠心後、100 μ L PBS で 3 回導入口を洗浄した。洗浄後、100 μ L 細胞培養液に置換し、CO₂ インキュベータに静置した。培地の置換は、毎日行った。

蛍光顕微鏡 (ZEISS, Axio Observer) を用いて、画像撮影をした。EGFP によって標識された核を利用して細胞数をカウントし、細胞密度を算出した。

2-2-7. PI-Hoechst 二重染色

PI(ヨウ化プロピジウム)-Hoechst の二重染色を行った。PBS で洗浄後、1 μ g/mL の PI で 20 分間染色した。4%パラホルムアルデヒドで 10 分固定した後、0.2%Triton X-100(和光純薬), 1 μ g/mL の Hoechst33258(PBS 中)で染色した。P B S で洗浄後、蛍光顕微鏡で撮影した。

2.3. 結果と考察

2.3.1. 流速

直径 $1\mu\text{m}$ の蛍光マイクロビーズを用いて流速の測定を行った. 導入口を $100\mu\text{L}$ の細胞培養液に満たして, 静置した. 1,12,24,36,48 時間後に, 排液口の手前の直線部分を連続撮影した(図 2-3A). 連続フレーム間での粒子の移動量の平均を流速として計算をした. すべてのデバイス($n=6$)で, 単調的に減少していた. 48 時間経過後には 6 つ中 2 つデバイスにおいて粒子の動きは流路方向だけではなくランダムに移動しているのが観察された(図 2-3B). このランダムな移動は十分な流れが無いために, 粒子がランダムに動いていると考えられる. そのため, この時点での流速は 0 とした. このマイクロ流体デバイスにおいては少なくとも 36 時間はかん流が保たれており, 1 日 1 度の培地交換を行えばよいということが確認できた. また, 求められた流速を分散の逆数を重みとした最小 2 乗法を用いて指数関数でフィッティングを行った. 指数関数によるフィッティングの結果, $R^2=0.96$ と高い回帰係数となった. このことは, かん流は主に重力によって引き起こされていることを示唆している. またフィッティング結果から予想される 48 時間の流量は $92\mu\text{L}$ となった.

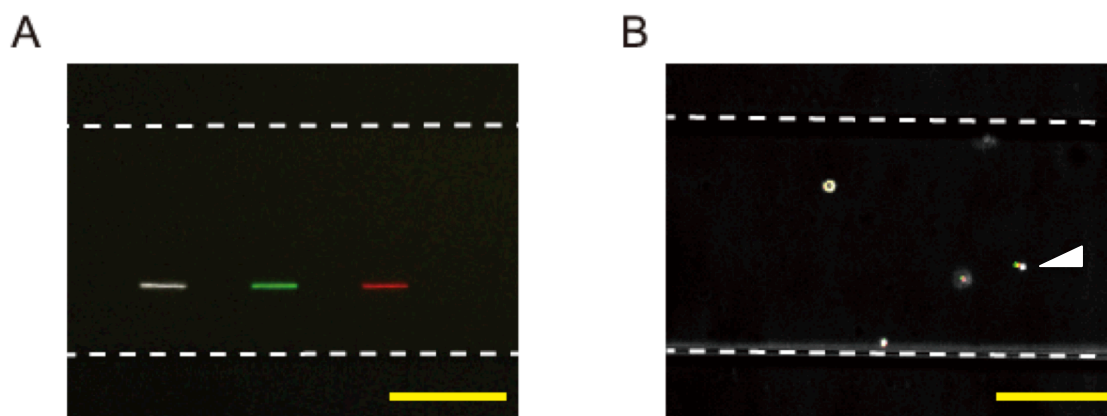


図 2-3. 流速測定における蛍光粒子の動き. 流れの向きは左から右. 白: 0 msec, 緑:250 msec 赤:500msec, 白点線:流路壁面, 黄: スケールバー($50\mu\text{m}$) A:12 時間後. B:48 時間後. 白矢印:ランダムに動いている蛍光粒子.

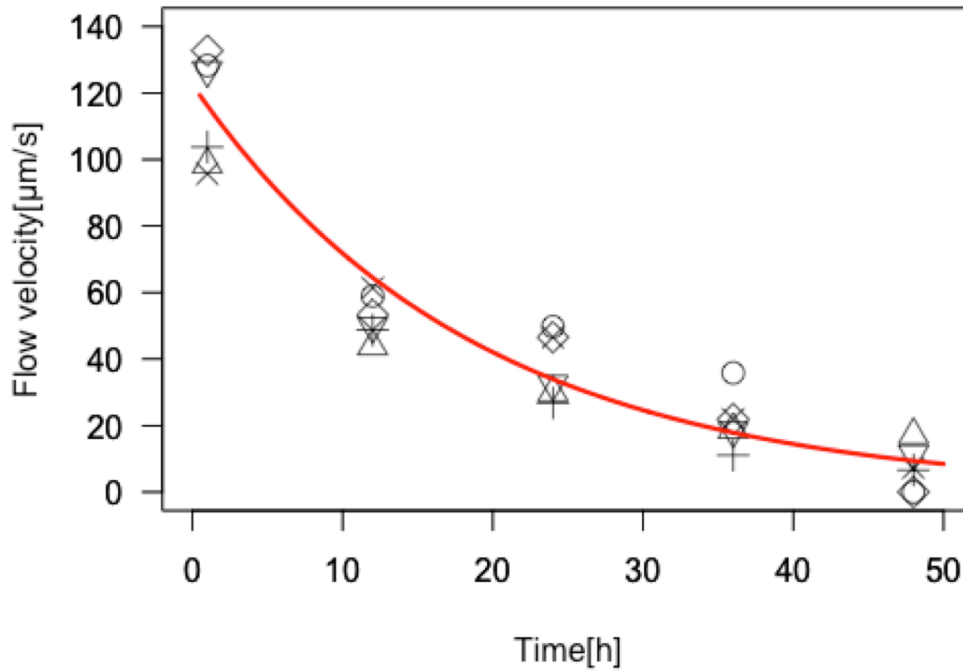


図 2-4 細胞培養エリアにおける実効流速。
100 μ L の液体培地導入後の経時変化(n=6) 赤線は最小二乗法による指数関数への回帰曲線
($y=122 \exp(-x/18.2)$, $R^2=0.96$).

2.3.2. 細胞増殖

細胞は NIH3T3 に GFP 融合核内局在タンパク質を安定トランスフェクションした細胞株 Ng3T3 を用いた。自律駆動によって、マイクロ流路内に細胞培養液が満たされた。細胞導入は、540G, 1 分間遠心することによって流れを加速して行った。静置では、マイクロチャンネル内への細胞導入数が少なく、導入口の底部に細胞が沈殿する。遠心の結果、細胞捕集ポケットの $66 \pm 25\%$ ($158 \pm 60 \text{ cells/mm}^2$) に細胞が捕集された。培地タンク内の液体を 100 μ L 細胞培養液に置換し、細胞培養用のインキュベータ (100% humidity, 5% CO₂, and 37 ° C) に静置した。細胞導入を行った日を Day 0 とした。毎日, Ng3T3 の観察を行い, 核数のカウントより細胞数を算出し, 細胞培養液の交換を行った。Day1 には細胞は底面に接着し, 進展していることが確認できた。細胞は増殖を繰り返していき, Day 5 から Day 6 にかけて 100%コンフルエントに達した。このときの成長曲線を図 2-6.にしめす。細胞増殖曲線は指数関数的にフィッティングされ, 対数増殖期を経て細胞増加が起こっていることが確認された。細胞の倍加時間は 39.8 ± 9.6 時間であった。また, かん流の変化は細胞増殖に大きな影響を与えておらず, このマイクロ流体デバイスは良好な細胞培養環境を持っているこ

とが明らかになった。

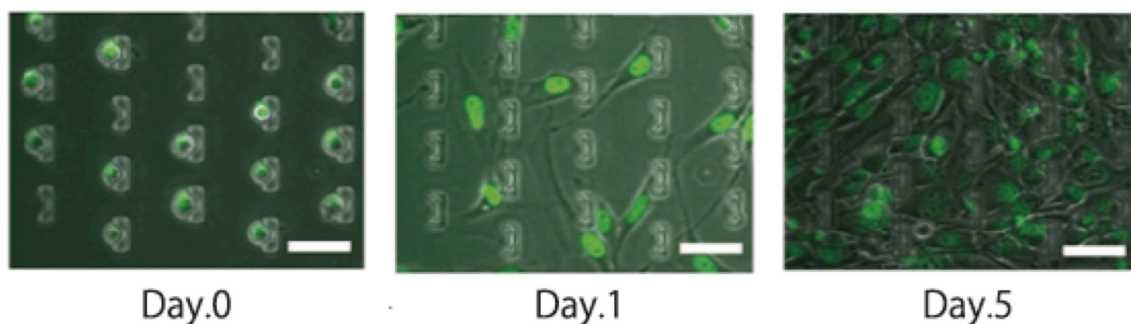


図 2-5. マイクロ流体デバイス内での Ng3T3 の蛍光画像. Day.0 は細胞導入直後. スケールバーは 50 μ m

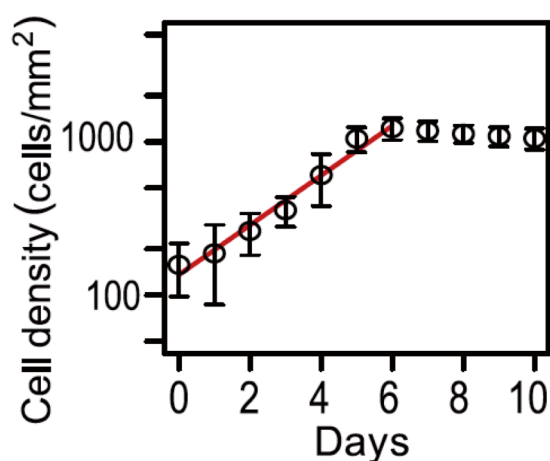


図 2-6. マイクロ流体デバイス内での増殖曲線. 赤線:対数増殖期での回帰曲線

2.3.3. 細胞生存率

最後に, Day9 と Day10 において細胞の生存率を PI-Hoechst 2 重染色によって算出した. PI は死細胞を染色し, Hoechst は全細胞の細胞核を染色する. そのため, 細胞生存率は (Hoechst 陽性 - PI 陽性)/Hoechst 陽性で算出することができる. また, 比較としてかん流を止めた. すなわち, マイクロチップ全体を液体培地に沈めることにより, 導入口と排液口の高低差を解消し, 流れを止めた. その結果, Day9 と Day10 において, 死んだ細胞を示す赤い PI の蛍光は非常に少なく生存率は高かった. このことから, 重力によるかん流が維持されている限り, 細胞生存率は良い状態をたもっているこ

と分かる. かん流を止めて24時間後(Day10)においてPI-Hoechst2重染色を行った時 PI の蛍光は著しく増加しており, 死細胞が増えていることが確認できた. 細胞生存率は 26%まで低下した. かん流を止めることによって細胞栄養素の供給が止まり, 細胞が壊死していると考えられる.

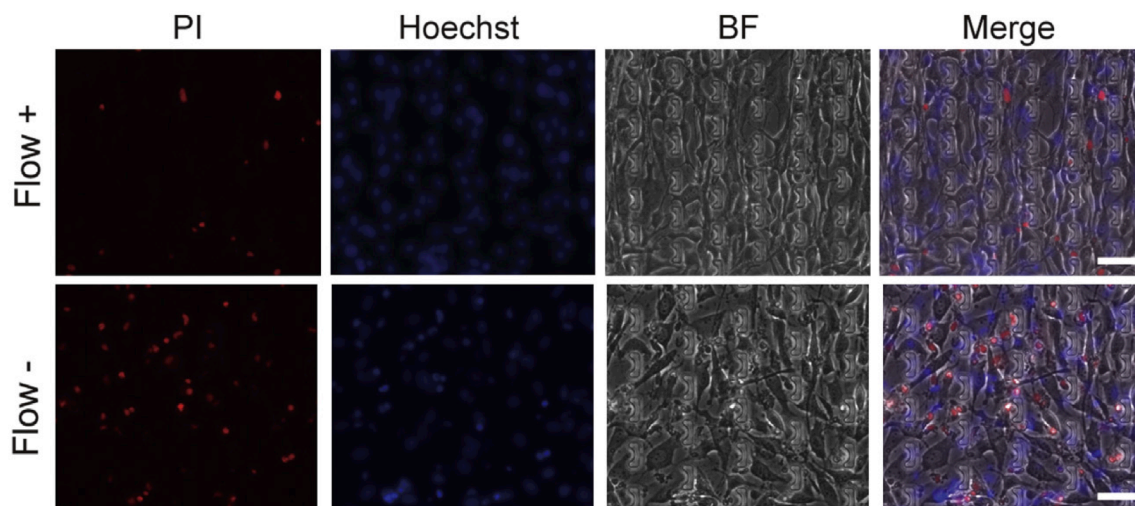


図 2-7. Day10 での PI-Hoechst2 重染色蛍光写真. かん流を維持した時(Flow +) と かん流を止めた時(Flow -)スケールバーは 50 μ m

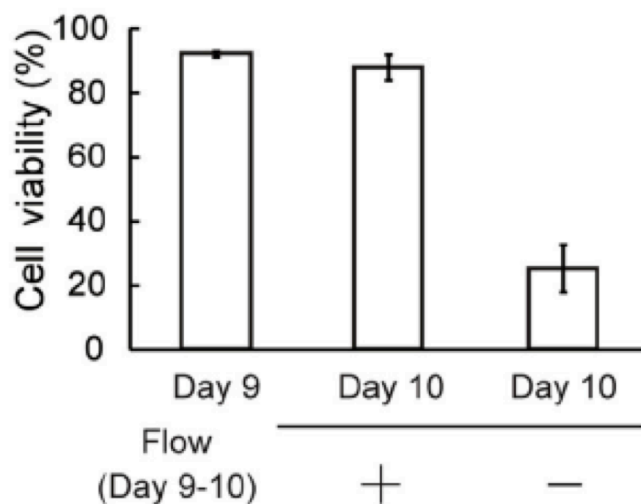


図 2-8. Day 9 と Day10 における細胞生存率. Flow + は 10 日間かん流を維持し続けた. Flow - は Day 9 においてかん流を止めた.

2.4. 結論

細胞は遠心によって均一に培養エリアのポケットに捕集された. 捕集された細胞は, 培養皿に接着・伸展し, 対数増殖期を経て, 5 日で 100%コンフルエントに達した.

コンフルエントに達した細胞は良好な生存率を保っており、この重力によるかん流が細胞への良好な環境に適していることが分かった。また、かん流を止めると細胞生存率が低下することより、本システムにおいて、かん流は細胞培養環境にとって必須であることも確認できた。

また、このデバイスは必要があれば細胞を回収すること可能である。PDMS 製のマイクロチップは PDMS の接着性のみを利用して細胞培養皿に接合されているため、マイクロチップを簡単に剥がしたのちにトリプシンなどで細胞を回収することができる。

この細胞培養用マイクロ流体デバイスは、これまでに報告されているものくらべて、小型で簡便な細胞培養用のマイクロ流体デバイスである。そのため、この細胞培養用のマイクロ流体デバイスは、これまでマイクロ流体デバイスを扱ったことのない生物系の研究者にも扱いやすいものであり、より広い生物系の研究者への新しい細胞生物学のプラットフォームとして期待される。

参考文献

- [1] A. Carrel, Pure Cultures of Cells., J. Exp. Med. 16 (1912) 165–8.
- [2] H. Eagle, Amino acid metabolism in mammalian cell cultures., Science (80-.). 168 (1959) 939–949.
- [3] P. Mazur, Cryobiology: The Freezing of Biological Systems, Science (80-.). 168 (1970) 939–949.
- [4] R.A. Knazek, P.M. Gullino, P.O. Kohler, R.L. Dedrick, Cell Culture on Artificial Capillaries: An Approach to Tissue Growth in vitro, Science (80-.). 178 (1972) 65–67.
- [5] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J. Schueller, G.M. Whitesides, Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)., Anal. Chem. 70 (1998) 4974–84.
- [6] A. Tilles, H. Baskaran, P. Roy, M.L. Yarmush, M. Toner, Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor., Biotechnol. Bioeng. 73 (2001) 379–89.
- [7] S. Takayama, E. Ostuni, P. LeDuc, K. Naruse, D.E. Ingber, G.M. Whitesides, Subcellular positioning of small molecules., Nature. 411 (2001) 1016.
- [8] K. Sato, K. Mawatari, T. Kitamori, Microchip-based cell analysis and clinical diagnosis system., Lab Chip. 8 (2008) 1992–8.
- [9] L. Kim, Y.-C. Toh, J. Voldman, H. Yu, A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells., Lab Chip. 7 (2007) 681–94.
- [10] Y. Tanaka, Y. Kikukawa, K. Sato, Y. Sugii, T. Kitamori, Culture and leukocyte adhesion assay of human arterial endothelial cells in a glass microchip., Anal. Sci. 23 (2007) 261–6.
- [11] Z. Wang, M.-C. Kim, M. Marquez, T. Thorsen, High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis., Lab Chip. 7 (2007) 740–5.
- [12] W. Gu, X. Zhu, N. Futai, B.S. Cho, S. Takayama, Computerized microfluidic cell culture using elastomeric channels and Braille displays., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 15861–6.
- [13] H. Kimura, T. Yamamoto, H. Sakai, Y. Sakai, T. Fujii, An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models., Lab Chip. 8 (2008) 741–6.

- [14] N. Sasaki, M. Shinjo, S. Hirakawa, M. Nishinaka, Y. Tanaka, K. Mawatari, et al., A palmtop-sized microfluidic cell culture system driven by a miniaturized infusion pump., *Electrophoresis*. 33 (2012) 1729–35.
- [15] D. Juncker, H. Schmid, U. Drechsler, H. Wolf, M. Wolf, B. Michel, et al., Autonomous Microfluidic Capillary System, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6139–6144.
- [16] B.S. Cho, T.G. Schuster, X. Zhu, D. Chang, G.D. Smith, S. Takayama, Passively Driven Integrated Microfluidic System for Separation of Motile Sperm, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1671–1675.
- [17] X. Zhu, L. Yi Chu, B. Chueh, M. Shen, B. Hazarika, N. Phadke, et al., Arrays of horizontally-oriented mini-reservoirs generate steady microfluidic flows for continuous perfusion cell culture and gradient generation., *Analyst*. 129 (2004) 1026–31.
- [18] A. Tourovskaia, X. Figueroa-Masot, A. Folch, Differentiation-on-a-chip: a microfluidic platform for long-term cell culture studies., *Lab Chip*. 5 (2005) 14–9.
- [19] M. Marimuthu, S. Kim, Pumpless steady-flow microfluidic chip for cell culture., *Anal. Biochem.* 437 (2013) 161–3.
- [20] K. Hosokawa, K. Sato, N. Ichikawa, M. Maeda, Power-free poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for gold nanoparticle-based DNA analysis., *Lab Chip*. 4 (2004) 181–5.
- [21] C. a Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*. 9 (2012) 671–675.
- [22] T. Abe, H. Kiyonari, G. Shioi, K.-I. Inoue, K. Nakao, S. Aizawa, et al., Establishment of conditional reporter mouse lines at ROSA26 locus for live cell imaging., *Genesis*. 49 (2011) 579–90.

3. マイクロ流路による細胞凍結保存技術の開発

3.1. 緒言

3.1.1. はじめに

序論で述べてきたように、マイクロ流体デバイス内で培養されている細胞を用いるアプリケーションは数多く報告されている。しかし、マイクロ流体デバイス内で細胞を保存する方法が少ないことが普及への障害になっている[1]。これらのマイクロ流体デバイスを用いたアプリケーションにおいて、細胞をマイクロ流体デバイス内に導入し、培養を行うというステップが必ず存在している。このステップは、労力と時間が要求される。細胞をマイクロ流体デバイス内で細胞凍結保存できれば、導入までの労力と時間を省くことができる。そのため、マイクロ流体デバイス内で細胞保存する技術の価値は高いと考えられる。

3.1.2. 細胞凍結保存技術

細胞凍結保存技術は、細胞実験における基盤技術のひとつである。凍結保存することによって、メンテナンスフリーで長期間の保管と細胞の持ち運びが可能になるからである。細胞を凍結保存するためには、細胞懸濁液を -80°C 、もしくは -196°C まで冷却し、細胞の活動を低下させる。使う際には解凍し、細胞機能を回復させる。この細胞凍結及び融解のプロセス中において、細胞死につながる要因として 1)浸透圧ショック 2)細胞内外に出来る氷晶の形成 3)凍結過程における脱水が考えられている[2,3]。細胞内外における氷晶の成長によるダメージを小さくするために、浮遊、接着細胞問わずに、細胞は懸濁液として保管されてきた。また、凍結保存液に凍結保存剤としてDMSO(Dimethyl sulfoxide)やグリセロールを入れることにより、氷晶の成長を抑えることが工夫されてきた[4,5]。今日では、多くのメーカーが改良を加えた細胞凍結保存液を販売している。加えて緩慢に冷却に保存することにより、細胞へのダメージを抑えるようになってきた[6]。多くの細胞株において、5%~20%のDMSOを含む凍結保存液で毎分 1°C ~ 2°C で冷却していくことによって十分な凍結保存効率で保存できるように

なった。この方法は、多くの研究室で多くの細胞株に対して用いられている。しかし、一部の細胞株においては、このような方法を用いても凍結過程での細胞質内での氷晶によるダメージが十分に押さえられていない。そこで、より氷晶の形成を抑えるために、急速冷却によるガラス化法が用いられている[7-9]。ガラス化法では、100 μ L 程度の懸濁液を液体窒素に直接浸すことにより、非晶質氷をつくり、細胞へのダメージを抑えることに成功している。

一方で、多くの細胞は接着状態でその細胞としての機能を発現し、細胞試験は接着状態で行われる。懸濁状態で凍結保存してある細胞を、接着状態で使えるようにするには、細胞を解凍したのちに播種し接着、増殖を待つ必要があるため時間とコストがかかる。そのため、細胞を接着状態で機能を保ったまま保存するという試みがなされてきた[10-12]。小西らは、メッシュ状の担体に細胞を伸展させずに接着させ、接着したまま凍結保存する方法を報告している[10]。また、宮本らはコラーゲンビトリゲルを用いた接着状態での細胞凍結保存技術が報告している[11]。このように、適切なプラットフォームを用意することによって、懸濁状態ではなく接着状態でも細胞を保存することができる。

3.1.3. 細胞凍結保存とマイクロ流体デバイス

マイクロ流体デバイスを細胞凍結保存に利用する試みには、マイクロ流体デバイスを凍結保存の為に容器と考えその内部で細胞保存する他にも、マイクロ流体デバイスを用いて凍結保存における前処理、後処理を行うといった手法が報告されている。

• 凍結細胞処理用マイクロ流体デバイス

前項で述べたように凍結保存における方法は緩慢冷却法が一般であり、細胞株によってはガラス化法が用いられている。どちらの方法においても、細胞培養液とは別に凍結保存液を用いている。したがって、凍結時に細胞を細胞培養液から、凍結保存液に置換する。解凍時に凍結保存液から細胞培養液に置換するという作業が必要である。しかし、液の置換の際に浸透圧の差によって細胞が損傷すると考えられている。この浸透圧差による損傷が細胞凍結中の生存性

や復帰に影響を与えている[13]. そのため、浸透圧ショックを受けないような液交換が望ましいと考えられている. しかし、特にガラス化法においては、凍結保存液は、高い生体毒性を持つ DMSO, アセトアミド, プロピレングリコールを含んでいるため、短時間の操作を要求され、段階的に置換するのは難しい[9,14]. そこで、マイクロ流体デバイスを用いることによって細胞培養液から凍結保存液になめらかな液交換を高速で実現している[2]. また、ガラス化法においてより急速に冷却するために液滴を使う例も報告されている[15]. マイクロ流体デバイスで、細胞を内包した数 pL の液滴を作製することによって液量を最小限にしている. その液滴を液体窒素へ滴下することによってより高速な冷却を実現している.

- **デバイス内凍結保存用マイクロ流体デバイス**

凍結保存用のマイクロ流体デバイスは、近年になって報告され始めているが数は少ない[16-19]. 前章でも述べたように細胞培養を行うマイクロ流体デバイスは大型でありデバイスごと凍結保存に保管することは難しいと考えられる. そこで、Li らは、細胞培養のマイクロチップをかん流のためのシリンジポンプから取り外せるようにして、マイクロ流体デバイス内で懸濁状態の細胞を凍結保存した[17]. また、Zou らはマイクロ流体デバイスを用いることによって毒性の高い DMSO などを用いた凍結保存液ではなく、凍結保護剤が入っていない緩衝液での精子の凍結保存できることを報告している[16]. 毒性のある凍結保護剤を用いないことによって、凍結保存による機能損失を抑えることに成功している.

このように、マイクロ流体デバイス内で細胞を凍結保存するということは報告例が少ないが、有用なアプリケーションが報告されている. しかし、すでに実現されている接着状態にある細胞の保存に、マイクロ流体デバイスを用いて成功した例は報告されていない.

3.1.4. 本章の内容

前項で述べたようにマイクロ流体デバイスを用いた細胞凍結保存は報告例が

少ない。また、接着状態においては、報告されていないようである。そこで、マイクロ流体デバイスを用いた細胞凍結保存技術を模索する中で、接着状態にある HeLa 細胞を凍結させると保存できることを発見した。そこで本章では、この発見に基づいて、マイクロ流体デバイス内での接着状態の細胞凍結保存技術の基本的な特性とメカニズムについて述べる。

3.2. 実験手法

3.2.1. 細胞培養

ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞及びヒト乳腺癌由来の MCF-7 細胞は, 10% ウシ胎児血清, 非必須アミノ酸, 100 mg/mL ペニシリン及び 0.1 mg/mL ストレプトマイシン (和光純薬) を補充したイーグル最小必須培地 (和光純薬) で培養した. ラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫 PC12 細胞は, 10% ウマ血清, 5% ウシ胎児血清, 100 mg/mL ペニシリン及び 0.1 mg/mL ストレプトマイシンを補充した RPMI-1640 (Sigma Aldrich) で培養した.

3.2.2. 細胞凍結保存

マイクロ流体デバイスは, 第 2 章で開発したものをを用いた. ただし, マイクロポケットの構造を, 付録での実験結果を参考に Tunnel -型より Tunnel +型に変更した.

細胞を導入後, 細胞密度が 50%コンフルエントまで細胞を培養した. 50 μ L の凍結保存液(10% DMSO/細胞培養液) に培地タンクを置換した. 60 G でデバイスを遠心し, マイクロチャンネル内の液を置換した. -80°C の極低温冷蔵庫に静置した. 36 時間後, 細胞培養液を 50 μ L ずつ培地タンクと排液口に滴下し, 室温で 10 分間静置し融解した. 融解後, 培地タンクを 100 μ L の液体培地に置換後, 細胞培養用のインキュベータで 1 時間の回復培養を行った. 回復培養後, ヨウ化プロピジウム-Hoechst による二重染色を行った(2-2-5.参照). 死細胞と全細胞を数え上げ, Attached rate(凍結後全細胞数/凍結前全細胞数)と Overall survival rate(凍結後生細胞数/凍結前全細胞数) を算出した.

3.2.3. 免疫染色

次に, 細胞の表現型の確認するために, PC12 細胞を用いて, 分化誘導を行った. 凍結保存した PC12 細胞を融解し, 1 時間の回復培養をした後, NGF (Nerve growth factor:神経成長因子)100 μ g/mL (NGF 2.5 S, Sigma-Aldrich.)を含む液体培地に切り替えた. 毎日 NGF 入り液体培地を補充し, 培養を 4 日間行った. まず, 細胞を 4%のパラホルムアルデヒド(和光純薬)で固定した. 固定後, 0.2% Triton

X-100(和光純薬)で 30 分間脱膜処理をした. TBST(0.05% Tween 20)で洗浄後, 2% ヤギ血清 in TBST でブロッキングを行った. ブロッキング後培養後, ブロッキングバッファに 500 倍希釈した primary rabbit anti-betaIII tubulin antibody (abcam) で, 4°Cで1晩一次抗体反応を行った. 抗体反応後, TBSTで洗浄, ブロッキングバッファに 500 倍希釈した secondary Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (Life technologies), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 で, 室温で 1 時間インキュベーションをした. 抗体反応後, TBST で洗浄し, 蛍光顕微鏡で蛍光画像を撮影した.

3.2.4. 氷晶観察

共焦点レーザ走査型顕微鏡(FV1200, Olympus, JAPAN)を用いて, 凍結時の氷晶の蛍光画像の撮影をおこなった. 実験装置を図.3-1 に示す. 顕微鏡のステージにはペルチェ素子(7 cm x 7 cm)が取り付けられており, 温度調節ができる. 細胞培養皿での凍結保存での状態を再現する系(マクロ系)での観察は, 銅製の皿(20 mm x 20 mm x 5 mm)に細胞凍結保存液を 2 mL 入れた. 皿をペルチェ素子とエチレングリコールで密着させたあと, ペルチェ素子の温度を-20°Cまで下げた. マイクロ流体デバイスでの状況を再現する系では, 細胞培養用マイクロ流体デバイスを銅製の皿の代わりにエチレングリコールを用いてペルチェ素子に密着させた. また, PDMS 上に結露防止剤として 3 M 塩化リチウム液を数滴塗布した.

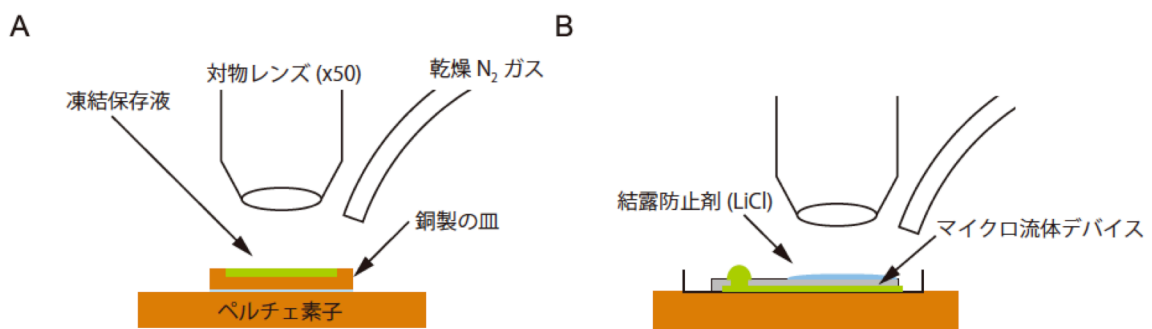


図.3-1 氷晶観察時の観察ステージ. A.マクロ系 B.マイクロ系.

3.3. 結果と考察

3.3.1. 凍結保存効率

図.3-2AB にマイクロチップ中とコントロールとしての培養皿での蛍光顕微鏡画像を示す. コントロールは, 細胞培養皿で培養されている HeLa 細胞を, 厚み 1 mm の凍結保存液で凍結保存したものをコントロールとした. 培養皿とくらべ, マイクロチャンネルではより多くの細胞が接着して残っており, 生存細胞数も多く観察された. 図 2-C に, HeLa, MCF-7, NIH3T3, PC12 細胞の凍結保存効率を示す. 凍結保存効率は, 全 4 つの細胞で, 培養皿と比べて attached rate, overall survival rate で有意に改善された. マイクロチャンネルを用いることにより, 接着状態で細胞ができた.

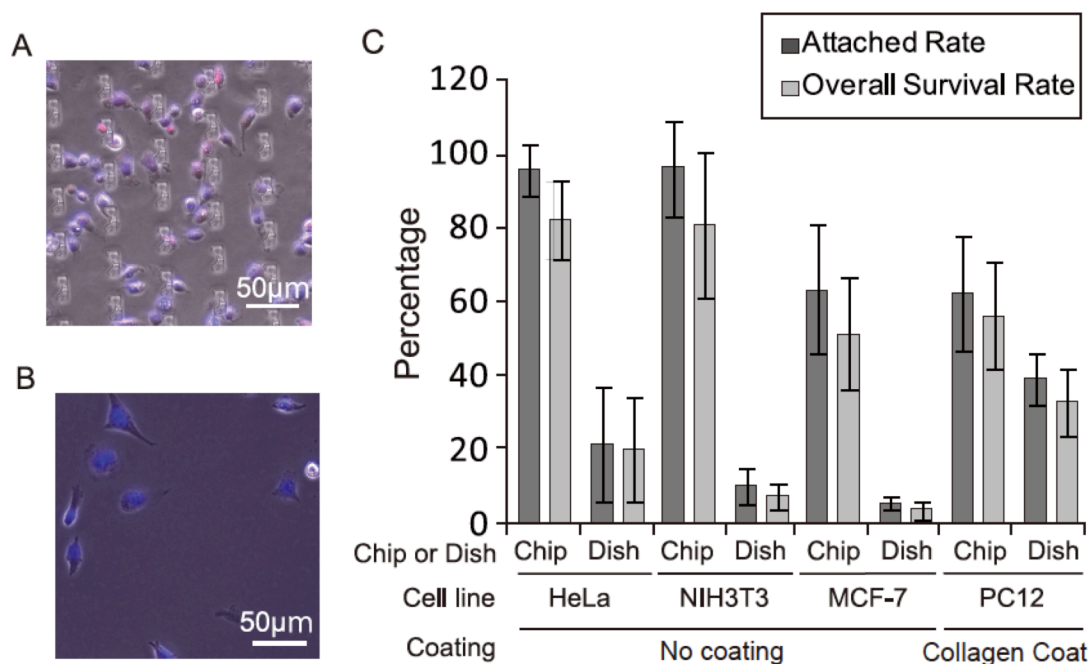


図.3-2 A. マイクロ流体デバイスでの接着細胞凍結保存 B. 培養皿での接着細胞凍結保存 C. Attached Rate と Overall Survival Rate の比較.

次に, HeLa 細胞を用いてマイクロチャンネルの構造(平面デザインと深さ)が与える影響について検討した. マイクロチャンネルのデザインを比較するために, ポケットのないマイクロチャンネル(図.3-3 深さ 25 μm , 60 μm)を作製し, 凍結保存及び生存率の評価を行った. このデザインはポケットがないため, 細胞懸濁

液を培地タンクに入れて、30秒後に2章で用いたマイクロチップを沈める方法を用いてかん流を止めて細胞を導入した。凍結保存の結果を、図.3-4に示す。ポケットのない構造でも、接着状態で凍結保存できることが分かった。また、深さ方向の比較として、ポケットのある構造のある構造で、深さ18 μm マイクロチップを作製し、凍結保存及び生存率の評価を行った。より浅いマイクロチャンネルでも、細胞を接着状態で保存できることが分かった。しかし、凍結保存効率はマイクロチャンネルの構造に依存しているかはわからなかった。マイクロチャンネルの構造については、検討を重ねる必要があると考えられる。

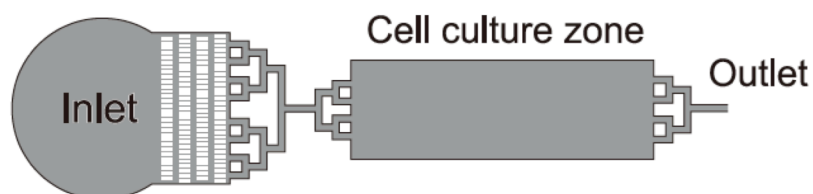


図.3-3 ポケット無し細胞培養用マイクロ流体デバイスデザイン

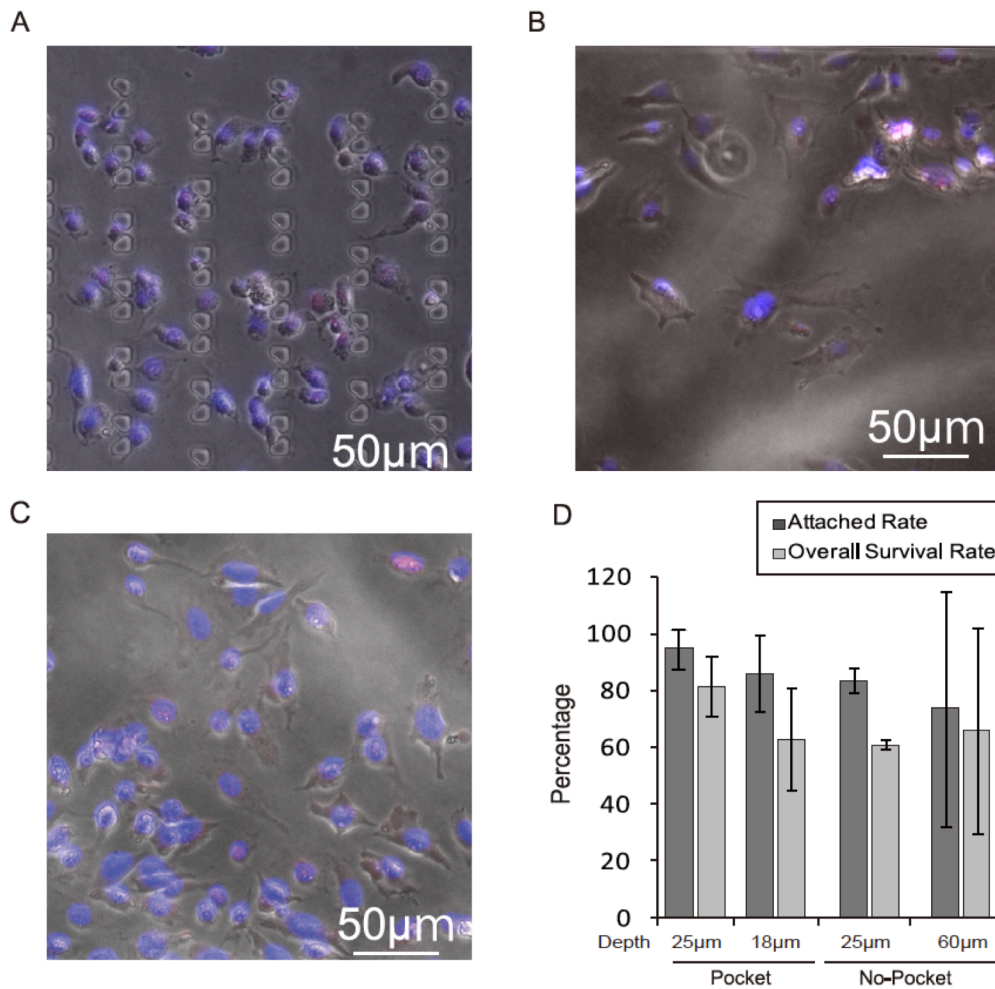


図.3-4 マイクロ流路デザインによる凍結保存への影響

A. 深さ 18µm B. ポケット無し 25 µm C. ポケット無し 60 µm. D.

Attached Rate と Overall Survival Rate の比較

最後に HeLa, MCF-7, NIH3T3 細胞を用いて, 細胞接着表面の与える影響を評価した. マイクロチップを接着させる培養皿を Collagen コートの培養皿に変えた. Collagen は接着性の弱い細胞を接着保存する際によく使われるコーティングであり, 一般的には HeLa, MCF-7, NIH3T3 細胞に使われることは多くない. HeLa, MCF-7, NIH3T3 細胞は, 細胞培養表面のコーティングによらず, 高い保存効率を保っていた(図.3-5).

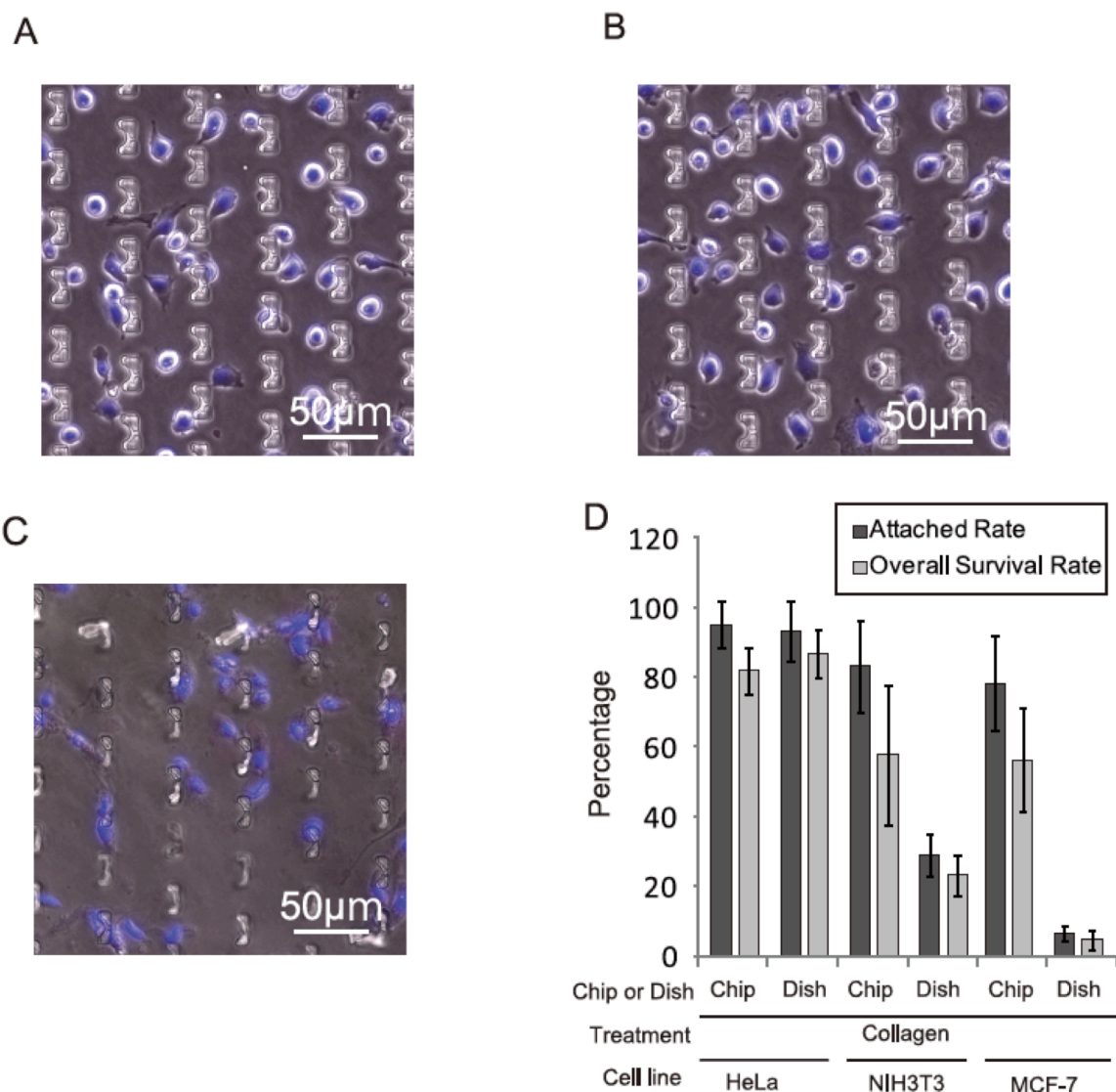


図.3-5 細胞接着面の変更A. HeLa細胞 B. MCF-7 C. NIH3T3 D. Attached Rateと Overall Survival Rateの比較

3.3.2. PC12 分化能

凍結保存による細胞への機能損傷を確認するために、PC12 細胞を用いて、分化誘導実験を行った。PC12 細胞は NGF(NGF 2.5S,Sigma-Aldrich.)に暴露させると、分化誘導がかかり、神経細胞様の突起を伸ばすことが知られている。凍結保存した PC12 細胞を融解し回復培養をした後、NGF 入りの液体培地に切り替え、4 日間培養を行った。培養後、抗 betaIII チューブリン抗体による免疫染色を行

い、蛍光顕微鏡で撮影した。

マイクロデバイス内で NGF に暴露した細胞では神経細胞様の突起状の構造がみられ、突起状を持つ細胞では神経細胞特異的なチューブリンの強い発現が見られた(図.3-6)。コントロールの通常の培養環境下で NGF に暴露された PC12 細胞と同じような構造をもち、発現をしていた。一方で、マイクロデバイス内で NGF に暴露していない細胞では突起状の構造は見られなく、またチューブリンの発現も弱かった。このように、NGF による PC12 の神経細胞様分化細胞への誘導が確認できた。以上から、凍結保存の間も PC12 細胞の代表的な表現型が維持されており、マイクロチャンネル内での凍結保存では細胞機能が損なうことなく維持することができる。

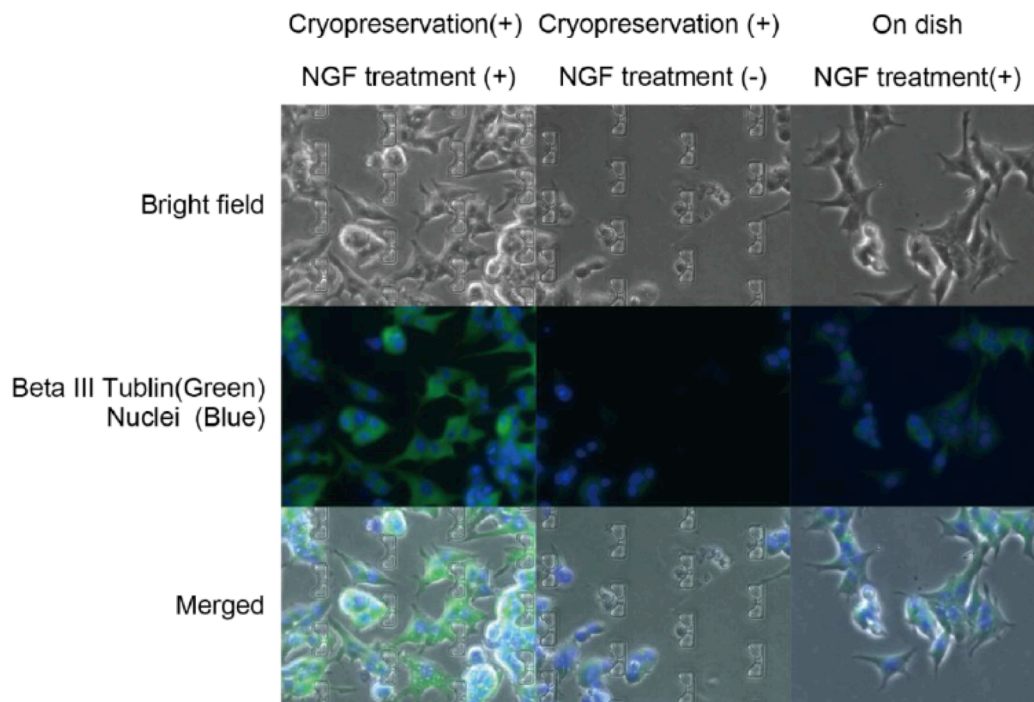


図.3-6 PC12の免疫染色. (左)マイクロ流体デバイス内で凍結保存したのちに NGF暴露 したPC12細胞(中央) NGF暴露なし(右)培養皿でNGF暴露したPC12細胞

3.3.3. 氷のドメイン観察

細胞凍結保存において、凍結保存効率の改善についての考察を行った。細胞凍結保存において、細胞死につながる要因は 1)浸透圧ショック 2)凍結過程における脱水 3)細胞内外に出来る氷晶の形成が考えられている[2,3]。浸透圧ショックと凍結過程における脱水は凍結保存液の組成に強く影響されるものであり、細胞培養皿とマイクロ流体デバイスで大きな違いはないと考えられる。また、マイクロチャネルの構造や細胞接着表面は細胞の生存に影響を与えないため、細胞外の氷晶に注目した。細胞は培養表面に接着しているため、浮遊状態とは違った氷晶の影響を受けると考えられる。また、氷晶の氷晶の形成過程と接着している細胞の損傷には関連があることが知られている[20]。そこで、凍結過程での氷晶の大きさの差を検出する系を構築した。細胞培養皿での凍結保存での状態を再現するマクロ系とマイクロ流体デバイス内での凍結での状態を再現するマイクロ系において氷晶の大きさを観察した。凍結保存液に、5 μ M Fluorescein を加えたものを凍結した。凍結過程において、Fluorescein は液相に取り残されるため、液相を緑色で染めることができる[21]。そのため、固相と液相を区別することができる。

マクロ系での凍結結果を図.3-7A に示す。H₂O-DMSO の状態図[22](図.3-8)より、-20℃では共晶点には至っておらず、固相と液相の2相状態である。氷晶の大きさは、100 μ m 程度の大きさをもっている。マイクロ系での凍結結果を図.7-B に示す。冷却時の氷晶のサイズは 20 μ m 程度であった。このとき形成された氷晶のサイズは、マクロ系と比べると小さい。マイクロ流体デバイス内では、液量が小さく、系全体の熱分布がサンプルチューブと比較して均一である。過冷却状態になっていると思われる。過冷却状態から結晶状態への遷移のなかで、空間的な制限によって氷晶サイズの縮小化が起こったと考えられる。氷晶の成長が押さえられ、より小さな氷晶の集合になることによって、細胞は、細胞死からまぬがれたと考えられる。

マイクロチャネル内での、凍結時の氷晶パターンの形成についてはあまり知られておらず、この結果は、細胞凍結保存用のマイクロチャネル構造の検討に

において重要であると考えられる。

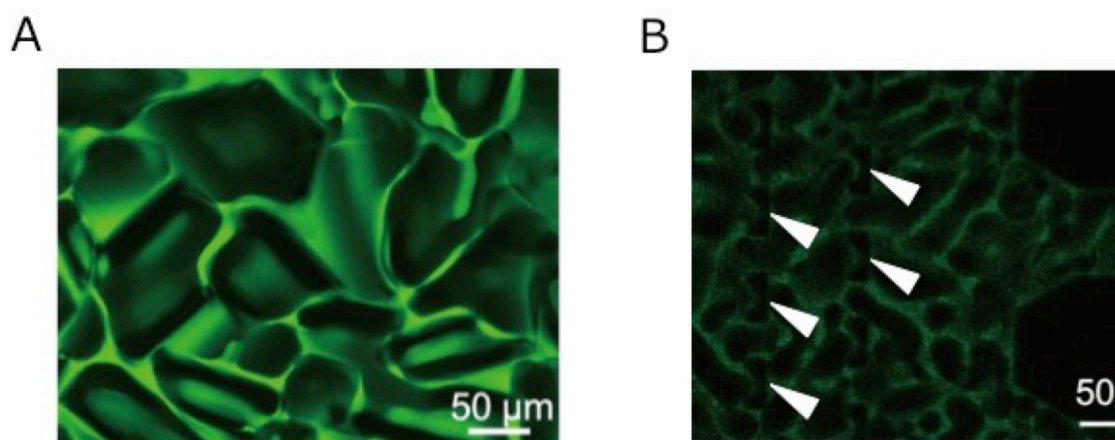


図.3-7 凍結時の凍結保存液の蛍光写真. (A)バルク系 (B)マイクロ系. 白矢印はマイクロチップのマイクロポケット

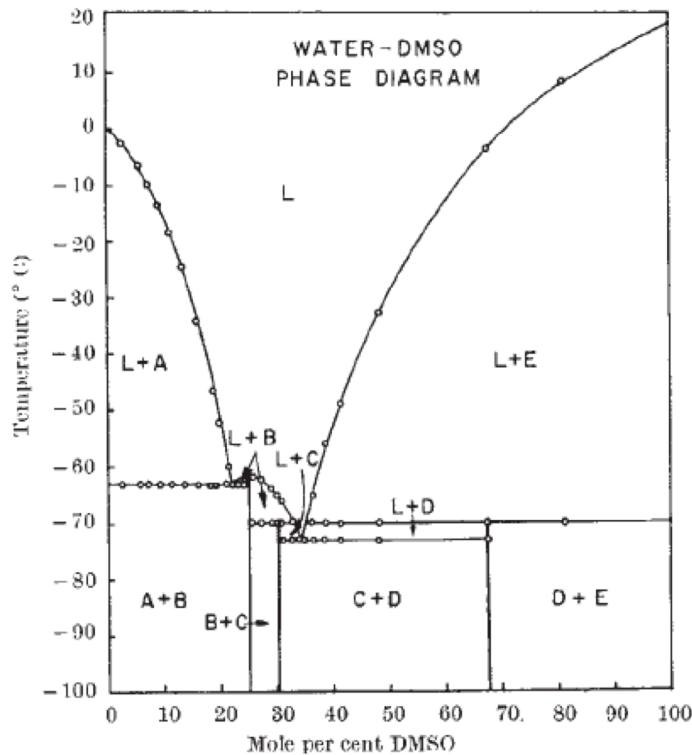


図.3-8 水-DMSO 系における状態図.

A. $\text{H}_2\text{O}(\text{s})$ B. $\text{DMSO}-3 \text{H}_2\text{O}(\text{s})$ C. $\text{DMSO}-2 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}(\text{s})$ D. $\text{DMSO} \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}(\text{s})$

(出典: D.H. Rasmussen et. al., 1964)

3.4. 結論

本章では、マイクロ流体デバイス内では接着状態にある HeLa 細胞を保存できるという発見を元に、マイクロ流体デバイスによる細胞凍結保存技術の基本的な評価とメカニズムの検討を行った。

基本的な評価として、HeLa 細胞を含めた 4 種類の細胞株を用いて凍結保存効率の評価を行った。すべての種において、凍結保存効率の改善が見られた。このことより、幅広い細胞株についてこの技術が有効であることを示した。続いて、マイクロチャネルの構造と細胞培養表面についての影響を評価した。構造や培養表面による影響は観察されなかった。マイクロチャネルで保存することが重要であるが、構造や培養表面の最適化が必要であることが示唆された。細胞凍結保存の必要要素である細胞の表現型が維持されているかの確認として、PC12 細

胞を用いた分化能試験を行った。PC12 細胞の分化能は維持されており，細胞の表現型が維持されていることを確認した。

最後に，メカニズムの考察として細胞死の一因である氷晶の成長について観察を行った。マイクロチャネル内では熱分布の小ささと空間的な制限より氷晶の成長が抑制され，細胞損傷が抑えられたと考えられる。メカニズムの検討によって，マイクロチャネル構造の最適化ができる可能性がある。

本技術は，マイクロチャネル内で細胞を凍結保存するための基本的な技術といえる。そのため様々なマイクロ流体デバイスに応用可能であり，適用していくことによって新たなアプリケーションにつながっていくと期待できる。

参考文献

- [1] Y. Xu, K. Sato, K. Mawatari, T. Konno, K. Jang, K. Ishihara, et al., A microfluidic hydrogel capable of cell preservation without perfusion culture under cell-based assay conditions., *Adv. Mater.* 22 (2010) 3017–21.
- [2] Y.S. Song, S. Moon, L. Hulli, S.K. Hasan, E. Kayaalp, U. Demirci, Microfluidics for cryopreservation., *Lab Chip.* 9 (2009) 1874–81.
- [3] B.-L. LIU, J. McGRATH, Response of Cytoskeleton of Murine Osteoblast Cultures to Two-step Freezing, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 37 (2005) 814–818.
- [4] C. POLGE, A.U. SMITH, A.S. PARKES, Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures, *Nature.* 164 (1949) 666–666.
- [5] J.E. LOVELOCK, M.W.H. BISHOP, Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide, *Nature.* 183 (1959) 1394–1395.
- [6] P. Mazur, Cryobiology: The Freezing of Biological Systems, *Science (80-.)*. 168 (1970) 939–949.
- [7] W. Rall, G. Fahy, Ice-free cryopreservation of mouse embryos at— 196 C by vitrification, *Nature.* 313 (1985) 573–575.
- [8] J.R. Dobrinsky, Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos, *Theriogenology.* 57 (2002) 285–302.
- [9] T. Fujioka, K. Yasuchika, Y. Nakamura, N. Nakatsuji, H. Suemori, A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells., *Int. J. Dev. Biol.* 48 (2004) 1149–54.
- [10] 小西聡史, 動物細胞の凍結保存用担体, それを用いた凍結保存用バイオデバイス及び凍結保存方法, 2010.
- [11] Y. Miyamoto, S. Enosawa, T. Takeuchi, T. Takezawa, Cryopreservation in situ of cell monolayers on collagen vitrigel membrane culture substrata: ready-to-use preparation of primary hepatocytes and ES cells., *Cell Transplant.* 18 (2009) 619–626.

- [12] R. Malpique, F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, H. Zimmermann, P.M. Alves, Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing., *Tissue Eng. Part C. Methods.* 15 (2009) 373–86.
- [13] S.J. Paynter, A. Cooper, L. Gregory, B.J. Fuller, R.W. Shaw, Permeability characteristics of human oocytes in the presence of the cryoprotectant dimethylsulphoxide., *Hum. Reprod.* 14 (1999) 2338–42.
- [14] M. Lane, B.D. Bavister, E.A. Lyons, K.T. Forest, Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos., *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 1234–6.
- [15] U. Demirci, G. Montesano, Cell encapsulating droplet vitrification., *Lab Chip.* 7 (2007) 1428–33.
- [16] Y. Zou, T. Yin, S. Chen, J. Yang, W. Huang, On-chip cryopreservation: a novel method for ultra-rapid cryoprotectant-free cryopreservation of small amounts of human spermatozoa., *PLoS One.* 8 (2013) e61593.
- [17] L. Li, X. Lv, H. Guo, X. Shi, J. Liu, On-chip direct freezing and thawing of mammalian cells, *RSC Adv.* 4 (2014) 34443.
- [18] E. Berthier, D.J. Guckenberger, P. Cavnar, A. Huttenlocher, N.P. Keller, D.J. Beebe, Kit-On-A-Lid-Assays for accessible self-contained cell assays., *Lab Chip.* 13 (2013) 424–31.
- [19] S. Li, W. Liu, L. Lin, On-Chip Cryopreservation of Living Cells, *J. Assoc. Lab. Autom.* 15 (2010) 99–106.
- [20] Y. Li, F. Wang, H. Wang, Cell death along single microfluidic channel after freeze-thaw treatments., *Biomicrofluidics.* 4 (2010) 14111.
- [21] T. Hashimoto, Y. Tasaki, M. Harada, T. Okada, Electrolyte-Doped Ice as a Platform for Atto- to Femtoliter, (2011) 3950–3956.
- [22] D.H. Rasmussen, A.P. Mackenzie, Phase Diagram for the System Water–Dimethylsulphoxide, *Nature.* 220 (1968) 1315–1317.

4. Ready-to-use な細胞試験用マイクロ流体デバイスの実証

4.1. 緒言

4.1.1. はじめに

生細胞をもちいた試験は生物学、医学研究においても重要な実験手法である。これまで、薬剤探索、毒性試験、細胞診断といった細胞試験は細胞培養皿やマイクロプレートで行われてきた。しかし、細胞試験には、凍結保存している細胞を解凍し、一度培養皿に播き、細胞が培養皿に接着し適切な細胞密度になるまで待つか、継続的に細胞を培養し維持し続ける必要がある[1]。このように従来 of 細胞試験というのは時間と労働力を必要とする。そのため、Ready-to-Use な細胞は高い価値があるといえる。

更に、これまでに述べてきたようにマイクロ流体デバイスを用いることによってより In vivo に近い環境での細胞培養ができること考えられており、より望ましい細胞試験ができる可能性がある[2]。また、マイクロ流体デバイスには試薬量の削減や高並列化によるハイスループットな分析や高速な検出ができると考えられており、マイクロ流体デバイスは有用な新しい細胞試験プラットフォームであるといえる。しかし、マイクロ流体デバイスで細胞試験を行うには、細胞培養皿で細胞を培養した後に、マイクロ流体デバイスに細胞を導入し、再び培養する必要があり、従来 of 細胞試験と比べても時間と労力のかかる手法となってしまう。

4.1.2. Ready-to-Use な細胞試験用マイクロ流体デバイス

細胞をマイクロ流体デバイス内で凍結しておく方法が報告されていることは前章において述べた。しかし、その手法を用いた細胞試験はまだ報告されていないようである。一方で、全く違った方法で Ready-to-Use な細胞試験用マイクロ流体デバイスが報告されている[3]。3 種類のモノマーからなるコポリマー(PMBV)のハイドロゲルで細胞をマイクロ流体デバイスで包むことによって、長期間 37°C・5% CO₂ の細胞様培養用インキュベータの中で保管している。また、簡単な毒性試験を行っている。細胞はハイドロゲルの中において懸濁状態で保管されており、毒性試験も懸濁状態で行われている。

しかし、接着状態にある細胞を Ready-to-Use 細胞試験用マイクロ流体デバイスは報告されていないようである。

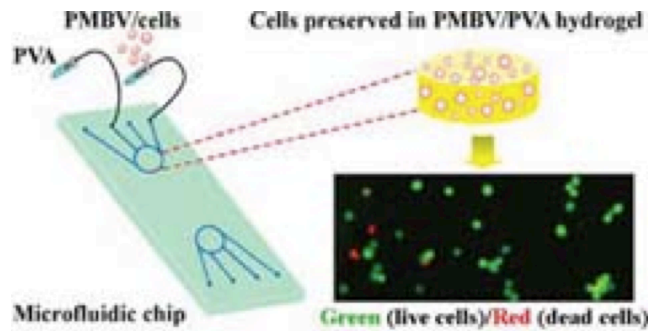


図.1 Ready-to-Use 細胞試験用マイクロ流体デバイス
(出典: Xu et al., 2010)

4.1.3. 細胞試験とマイクロ流体デバイス

マイクロ流体デバイスを用いた Ready-to-Use な細胞試験として2つの実験を行った。1つ目はPI-Hoechst染色を用いて細胞の生死による測定解析を用いた細胞毒性試験である。2つめはHoechst染色によるイメージサイトメトリーの手法を用いた細胞周期の推定である。

4.1.3.1 細胞毒性試験とマイクロ流体デバイス

細胞毒性試験は、培養細胞を用いて、対象となる物質の毒性の評価を行う。培養細胞を用いることによって、実験動物を用いずに対象となる物質の評価を行うことができるため、毒性の初期のスクリーニングや医療機器の安全性試験など幅広く用いられている。そのため、目的に応じて、培養細胞の選択を行う必要がある。また目的に応じて、細胞の生存率、死亡率を測る様々な方法が報告され[5-8]、多くの商品が市販されている。細胞を染色し直接計数する方法[5]と、MTTアッセイのような細胞内に存在している特定の酵素や物質を光学的方法または放射標識化合物により定量して間接的に生存・死亡率を見積もる方法がある[6-8]。マイクロ流体デバイスで細胞毒性試験を行う上では、細胞内に存在している特定の酵素や物質を測定するは簡単ではない。かん流が行われているマイクロ流体デバイスで細胞抽出物をすべて回収し測定することは簡単ではない。一方で、細胞数を直接計数する方法は、PDMSは光透過性があり顕微鏡での観察が可能のため、親和性が高い方法と言える。細胞数を直接カウントする方法での、細胞毒性試験はこれまでに報告されている。

4.1.3.2 サイトメトリーとマイクロ流体デバイス

サイトメトリーとは、多量の細胞を1個ずつ測定する細胞測定法である。細胞ごとに大きさ、DNAやRNA量、タンパクの発現量などの複数の情報を蛍光強度などで習得

し、その結果に基づいて統計解析を行う。分子生物学、再生医学、病理学などにおいて、非常に広く用いられている手法である

サイトメトリーは測定する方法によって、フローサイトメトリーとイメージサイトメトリーの2つに分けることができる。この2つの違いは、データを取得する対象である。フローサイトメトリーは、懸濁した細胞をマイクロ流路に流し、流れの中で細胞の情報を習得する。一方、イメージサイトメトリーはスライドガラスなどに接着した細胞を撮影し、そのイメージからデータを取得する。フローサイトメトリーは、流れの中で散乱光や蛍光強度といった数値データの取得を行うため、処理能力が高い。またソーティング系を取り付けることにより、データ取得を行うのと同時に、特定の細胞のみを回収することができるため、基礎、応用研究問わずに活用範囲が広い。しかし、細胞を懸濁する前処理が必要であり、細胞の空間的情報は失われてしまう。一方で、イメージサイトメトリーは画像取得するため、空間的情報を得ることができる。また、観察パラメーターによって経時観察も可能である。しかし、画像データを取得するため処理能力はフローサイトメトリーと比べると低く、統計解析には画像処理による数値データへの前処理が必要である。

このようにサイトメトリーは有用な方法ではあり、マイクロ流体デバイスにおける細胞試験の解析にも用いた例も報告されている。細胞培養用のマイクロ流体デバイスとフローサイトメトリーの相性は、細胞を懸濁化して回収する前処理が必要なため、あまり良いとは言えない。しかし、イメージサイトメトリーは画像を取得できればよく、マイクロ流体デバイスとの相性は良いと言える。

4-1-4. 本章の目的

これまでの細胞試験は凍結している細胞を解凍して、培養する必要があり時間と労力のかかるプロセスに依存していた(図.4-1 左)。マイクロ流体デバイスで細胞試験を行おうとすると、マイクロ流体デバイスに細胞を導入する作業が必要で、便利なものとは言い難いものであった。そこで、前章で開発した細胞凍結保存技術を用いて、Ready-to-Useな細胞試験用マイクロ流体デバイスのコンセプトを提唱する(図.4-1 右)。優れた実験プラットフォームであるマイクロ流体デバイス内で細胞が接着状態で凍結保存されているので、解凍するだけですぐに細胞試験を行うことができるのかんがえられる。

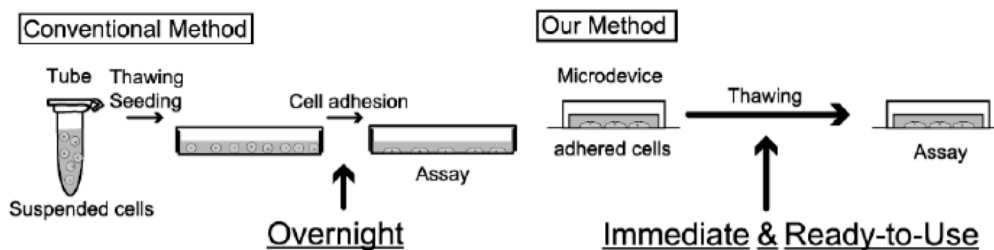


図.4-1 (左) 従来の凍結状態から細胞試験までの流れ. (右) 本章で提唱するマイクロ流体デバイス内で凍結保存した細胞を用いた細胞試験までの流れ

このコンセプトの実証として、2つの実験を行った。1つ目はマイクロ流体デバイス内で凍結保存した細胞を用いた細胞毒性試験である。シスプラチンの HeLa 細胞に対する IC_{50} (半数成長阻害濃度)を算出し従来法と比較した。2つ目はイメージサイトメトリーを用いた HeLa 細胞の細胞周期の推定である。HeLa 細胞をパクリタキセルに暴露することによって、暴露の有無による細胞周期に変化を観察した。パクリタキセルの効果及び作用機序は既に明らかされており、Hoechst による単染色によってパクリタキセルの効果の検出を目的とした。これら2つの実証実験を通じて、細胞凍結保存技術を用いた Ready-to-Use な細胞試験の可能性を述べる。

4.2. 実験

4.2.1 細胞毒性試験

HeLa 細胞を 50%コンフルエントにまで培養したマイクロ流体デバイスを第 3 章と同様に凍結保存を行った。36 時間の凍結保存後に、HeLa 細胞を解凍して、1 時間の回復培養を行った。回復培養を行った後に、培地タンクにシスプラチン含有細胞培養液を 100 μL 入れて、24 時間シスプラチンに暴露した。インキュベーション後に PI-Hoechst の二重染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて画像撮影をした。生細胞数を数え、シスプラチン 0 μM の平均生細胞数を 100%として、相対細胞生存率を算出した。その後、統計処理言語 R 及び drc パッケージを用いて、対数化したシスプラチン濃度と算出した相対生存率を 4 パラメータロジスティック関数(式 1)でフィッティングを行い、 IC_{50} (半数阻害濃度)を算出した[9,10].

$$f(x, (a, b, c, d)) = b + \frac{c - b}{1 + \exp(a(x - d))}$$

式.4-1 4パラメーターロジスティクス関数.

パラメーター d が IC_{50} (半数阻害濃度)

4.2.2 イメージサイトメトリーによる細胞周期の推定

HeLa 細胞を 50%コンフルエントにまで培養したマイクロ流体デバイスを第 3 章と同様に凍結保存を行った。36 時間の凍結保存後に、HeLa 細胞を解凍して、1 時間の回復培養を行った。回復培養を行った後に、培地タンクにパクリタキセル含有細胞培養液を 100 μL 入れて、24 時間パクリタキセルに暴露した。

24 時間の暴露後に、4%パラホルムアルデヒドで 10 分固定した。固定した細胞を、0.2%Triton X-100(和光純薬)、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Hoechst33258(PBS 中)で染色した。PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡で撮影した。習得した画像を用いて、Image J を用いて画像処理を行った。1 細胞ごとに細胞核の蛍光の積分値を習得し、ヒストグラムを作製した。

4.3. 結果と考察

4.3.1 細胞毒性試験

細胞を解凍後, HeLa 細胞を用いたシスプラチンの細胞毒性試験を行った. 比較対象として, 従来のマルチウェルプレート(96-ウェルプレート)と凍結保存をしていないマイクロ流体デバイスを用いて, 同様の細胞毒性試験を行った. 96-ウェルプレートと凍結保存をしていないマイクロ流体デバイスにおいて, 50%コンフルエントになるように細胞を播種し培養した後に, 24時間シスプラチンに暴露した. 暴露後は同様に PI - Hoechst 染色を行い, 生細胞数を計数した.

図.4-2 に, 各シスプラチン濃度におけるシスプラチンに暴露していないコントロールとの相対生存率をプロットしたものを示す. デバイスによらず, シスプラチンの濃度に応じて, 細胞生存率が落ちていた. この結果を用いて, データの処理を行った. データの処理は, 統計処理言語 R 及び drc パッケージを用いた[9,10]. 細胞毒性試験の代表的なパラメーターである IC_{50} は対数正規分布を持つことが知られている. そこで, 濃度の対数化を行った後に, ロジスティクス曲線へと回帰を行った. パラメーターを算出した結果を表 4.1 に示す. IC_{50} は それぞれ, 2.6 μM (凍結保存ありマイクロ流体デバイス), 5.7 μM (マイクロ流体デバイス), and 5.1 μM (96 ウェル)であった. これらの結果は既報とほぼ変わらない値であった[11-13]. 得られたパラメーターを用いて, 95 %信頼区間を求めた(図.4-2). それぞれの信頼区間が十分に一致しており, それぞれの結果に有意な差は見られなかった. この結果より, 開発した細胞凍結保存技術を利用した Ready-to-Use 細胞試験は従来の 96 ウェルでの細胞試験と同等の性能を持っていることが示唆された.

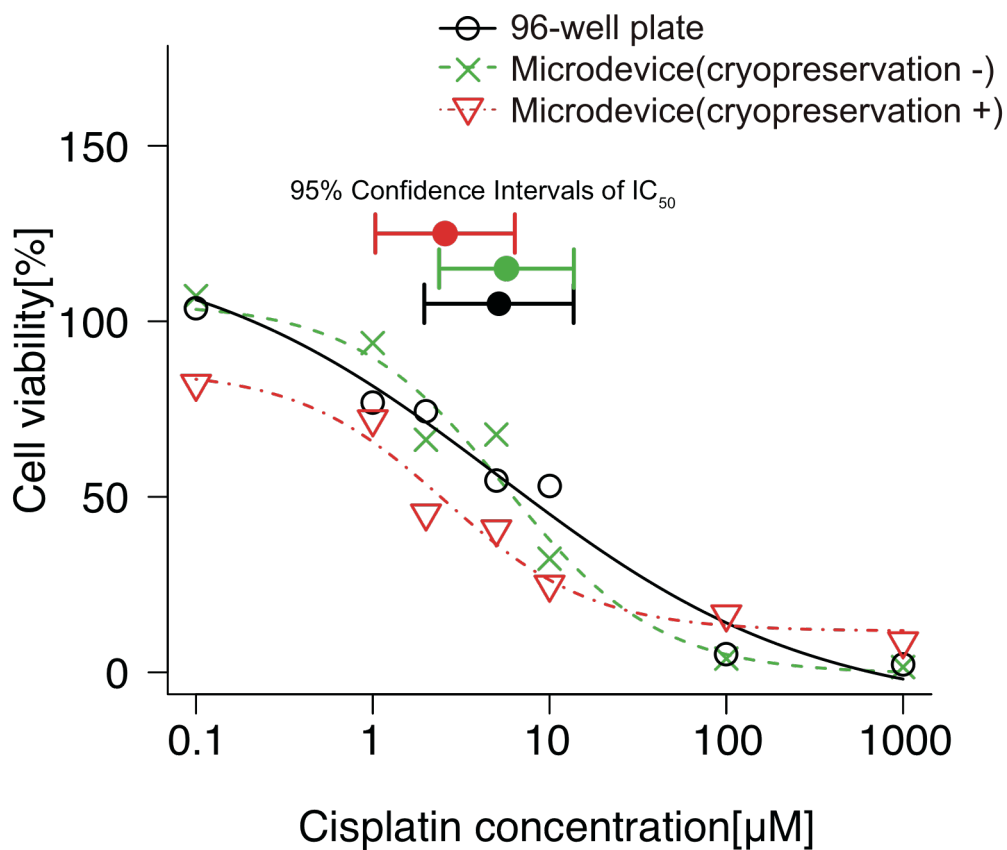


図.4-2 HeLa 細胞- シスプラチン 用量反応曲線. 実線: 96-well plate 破線: 凍結保存なしマイクロ流体デバイス 一点鎖線: 凍結保存ありマイクロ流体デバイス

96 ウェル	推定値	標準誤差
Hill's slope	1.13	0.35
min	-11.4	13.4
Max	123	11.8
Log (IC ₅₀)	0.71	0.21
凍結保存なし	推定値	標準誤差
Hill's slope	2.33	0.95
min	-0.43	10.5
Max	105	9.5
Log (IC ₅₀)	0.77	0.18
凍結保存あり	推定値	標準誤差
Hill's slope	2.39	1.06
min	11.7	6.68
Max	86	10.4
Log (IC ₅₀)	0.41	0.19

表.4-1 ロジスティクス曲線へのフィッティングパラメーターと標準誤差.

4.3.2 イメージサイトメトリー

細胞を解凍後、HeLa 細胞を用いたパクリタキセルの細胞試験を行った。比較対象として、従来法(細胞培養皿)でも同様の細胞試験を行った。細胞培養皿と凍結保存をしていないマイクロ流体デバイスにおいて、50%コンフルエントになるように細胞を播種し培養した後に、24 時間パクリタキセルに暴露した。暴露後は同様に Hoechst 染色を行い、生細胞の核の蛍光強度を計測した。

パクリタキセルの効果及び作用機序は既に報告されている[14,15]。パクリタキセルは細胞骨格の一部である微小管に結合し、微小管を安定化させ脱離重合を阻害する。特に細胞分裂の際に、染色体分配を阻害する。そのため、細胞をパクリタキセルに暴露することによって、細胞周期を G2/M 期で止めることができる。

図.4-3 に、マイクロ流体デバイスを用いて凍結保存した細胞を用いた結果を示す。ヒストグラムより、細胞周期の推定を行った。パクリタキセルに暴露していない細胞においては、G1 期の細胞は 45.4%, G2 期 27.0%と推定された。パクリタキセルに暴露した細胞においては、G1 期の細胞は 14.0%, G2 期 52.7%と推定された。この結果は、既に知られているパクリタキセルの効果と一致している。比較として培養皿でも同様の実験を行った。パクリタキセルに暴露していない細胞においては、G1 期の細胞は 57.3%, G2 期 13.9%と推定された。パクリタキセルに暴露した細胞においては、G1 期の細胞は 29.5%, G2 期 54.3%と推定された(図. 4-4)。凍結保存したマイクロ流体デバイスと細胞培養皿では、同様の変化が観察された。一方で、マイクロ流体デバイスと細胞培養皿の結果を比較すると変化量は小さいように考えられる。凍結保存による影響かマイクロ流体デバイスによる影響だと考えられる。

今回、簡単ではあるがイメージサイトメトリーを用いた細胞試験を通じて、開発した細胞凍結保存技術を利用した Ready-to-Use 細胞試験の実証実験を行った。効果及び作用機序が十分に知られている化合物を用いた実証実験ではあったが、化合物の影響が確認された。開発した細胞凍結保存技術を利用した Ready-to-Use 細胞試験は十分な性能を持っていることが示唆された。

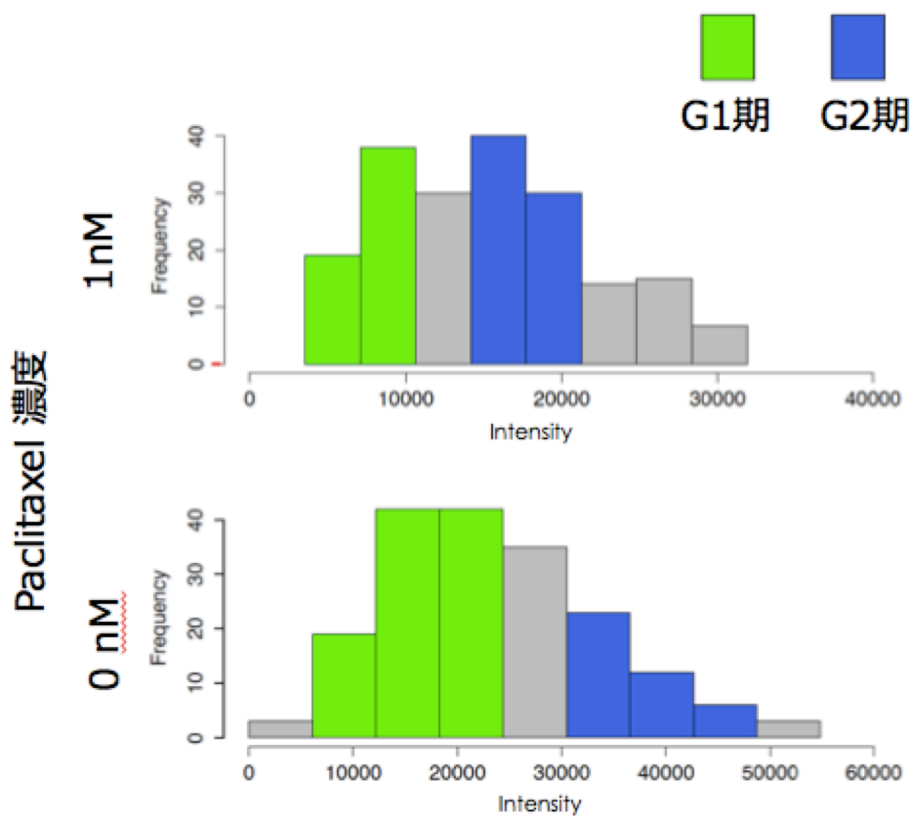


図. 4-3 マイクロ流体デバイスにおける核の蛍光強度のヒストグラム

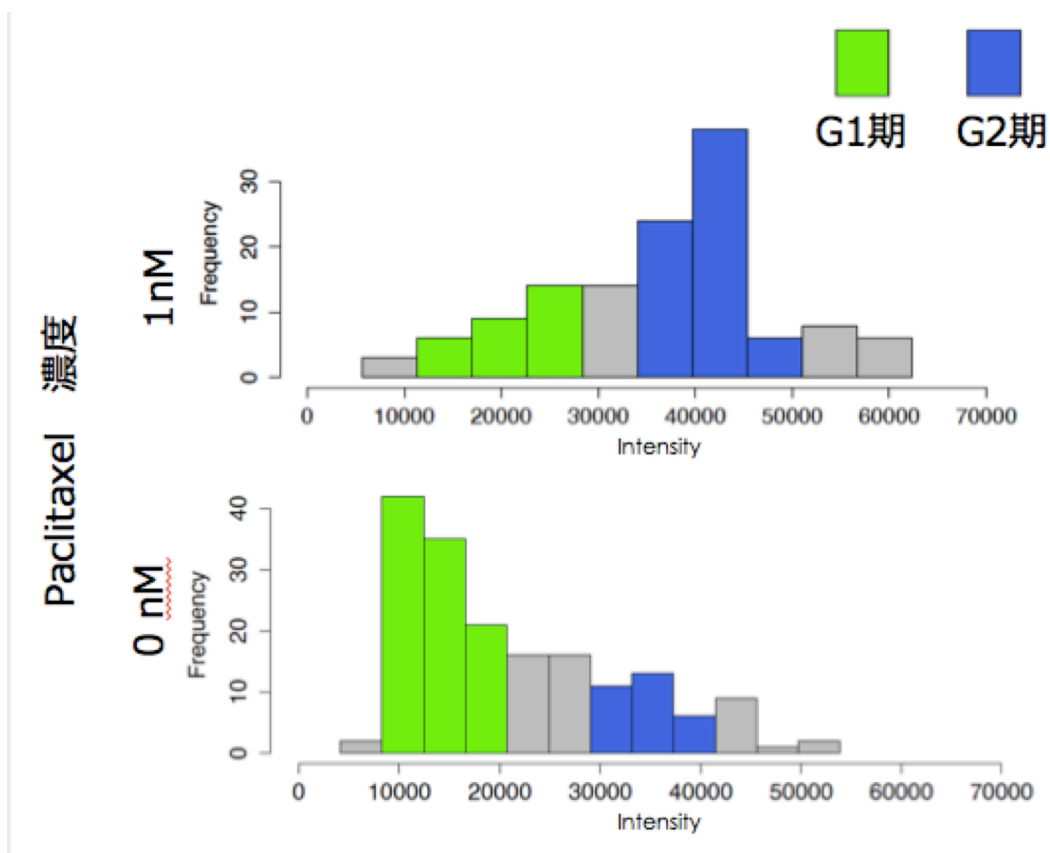


図. 4-4 マイクロ流体デバイスにおける核の蛍光強度のヒストグラム

4.4. 結論

第三章で開発したマイクロ流体デバイス内で細胞を凍結することによって、Ready-to-use な細胞試験用のデバイスの開発に繋がることを 2 つの実証実験を通じて示した。1 つ目の実証実験は、マイクロ流体デバイス内で凍結保存した細胞を用いた細胞毒性試験である。シスプラチンの HeLa 細胞に対する半数成長阻害濃度を算出し従来法との比較を行った。その結果、凍結保存したマイクロ流体デバイスと従来法との有意な差は観察することができず、従来法と変わらないと考えられる結果を得た。2 つ目の実証実験は 1 細胞ごとに画像を解析することによる HeLa 細胞の細胞周期の推定である。HeLa 細胞をパクリタキセルに暴露することによって、細胞周期に変化が見られた。この変化は従来法との結果とも一致しているが、変化量が小さかった。その理由として、凍結保存による影響とマイクロ流体デバイスによる影響が考えられる。

これら 2 つの実証実験を通じて、第三章で開発したマイクロ流体デバイスを用いた細胞凍結保存技術が Ready-to-use な細胞試験用のデバイスの開発に繋がることを示した。今回は、細胞毒性試験を通した IC_{50} を算出と単染色によるイメージサイトメトリーであったが、この結果は他の細胞試験にも応用できると考えられる。例えば、抗体などを用いた多重染色によるイメージサイトメトリーや 1 細胞レベルでのシグナル解析を行うことも可能であると考えられる。また、解凍するだけで使えることを活かして、研究室だけではなく、オンサイトでの環境汚染物質にも適用できるかもしれない。

参考文献

- [1] R. Malpique, F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, H. Zimmermann, P.M. Alves, Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing., *Tissue Eng. Part C. Methods.* 15 (2009) 373–86.
- [2] I. Meyvantsson, D.J. Beebe, Cell culture models in microfluidic systems., *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1 (2008) 423–49.
- [3] Y. Xu, K. Sato, K. Mawatari, T. Konno, K. Jang, K. Ishihara, et al., A microfluidic hydrogel capable of cell preservation without perfusion culture under cell-based assay conditions., *Adv. Mater.* 22 (2010) 3017–21.
- [4] M. Halter, Modernizing the MTT assay with microfluidic technology and image cytometry., *Cytometry. A.* 81 (2012) 643–5.
- [5] J.R. TENNANT, EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY., *Transplantation.* 2 (1964) 685–94.
- [6] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, et al., New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 1107–1112.
- [7] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63.
- [8] M.M. Roden, K.-H. Lee, M.C. Panelli, F.M. Marincola, A novel cytolysis assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology, *J. Immunol. Methods.* 226 (1999) 29–41.
- [9] R. Ihaka, R. Gentleman, R: A Language for Data Analysis and Graphics, *J. Comput. Graph. Stat.* 5 (1996) 299–314.
- [10] C. Ritz, J.C. Streibig, Bioassay Analysis using R, *J. Stat. Softw.* 12 (2007) 1–18.
- [11] S. Mohanty, J. Huang, A. Basu, Enhancement of cisplatin sensitivity of cisplatin-resistant human cervical carcinoma cells by bryostatin 1., *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 6730–7.
- [12] Y. Minagawa, J. Kigawa, H. Itamochi, Y. Kanamori, M. Shimada, M. Takahashi, et al., Cisplatin-resistant HeLa cells are resistant to apoptosis via p53-dependent and -independent pathways., *Jpn. J. Cancer Res.* 90 (1999) 1373–9.

- [13] S.I. Abdel Wahab, A.B. Abdul, A.S. Alzubairi, M. Mohamed Elhassan, S. Mohan, In vitro ultramorphological assessment of apoptosis induced by zerumbone on (HeLa)., *J. Biomed. Biotechnol.* 2009 (2009) 769568.
- [14] D. a Brito, Z. Yang, C.L. Rieder, Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied., *J. Cell Biol.* 182 (2008) 623–9.
- [15] R. Bharadwaj, H. Yu, The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer., *Oncogene.* 23 (2004) 2016–27.

5. 結章

マイクロ流体デバイスは、優れた細胞生物学のツールであり、細胞培養においては、マイクロ空間で環境を制御することによって、細胞機能の発現などの操作が可能になりより *In vivo* に近い細胞培養ができるのではないかとされている。しかし、様々なことが実現できるようになっている一方で、マイクロフルイディクス研究者以外の一般的な細胞生物学者には広がっていない。その理由として、マイクロ流体デバイスの大型化と扱いに技能が求められることがあげられる。そこで本論文の目的を、シンプルなマイクロ流体デバイスによる細胞操作の実現を図ることにした。

第2章では、細胞実験における基本的な操作である細胞培養を行うシンプルマイクロ流体デバイスを作製した。マイクロ流体デバイスを複雑化していた要因である外部機器と外部との接続を無くし、35 mm 細胞培養皿に収まる細胞培養用マイクロ流体デバイスを作製した。また、操作も重力を利用することによってシンプルにすることができた。重力によるかん流は一定の流れではないが、細胞培養に大きな影響を与えていなく、細胞への良好な環境に適していることが分かった。これまでに報告されているマイクロ流体デバイスとくらべて、最も小型の細胞培養用のマイクロ流体デバイスである。

第3章では、作製した細胞培養用マイクロ流体デバイスを用いて、マイクロ空間を活かした細胞凍結保存法の開発を行った。これまで、マイクロ流体デバイス内での細胞凍結保存技術は懸濁状態であり接着状態にある細胞については報告されてきていなかった。今回、接着状態にある細胞を凍結保存できることを明らかにした。基本的な評価として、4種類の細胞株を用いて凍結保存効率の評価を行った。すべての細胞株において、マイクロ流体デバイスを用いることによって凍結保存効率の改善が見られた。また、PC12細胞を用いた分化能試験より、細胞凍結保存の必要要素である細胞の表現型が維持されている確認を行った。PC12細胞の分化能は維持されており、PC12細胞の表現型が維持されていることを確認した。更に、メカニズムの検討を進める上で、マイクロチャンネル内では氷晶のサイズが縮小する現象が見られた。氷晶のサイズ縮小が細胞ダメージの低減、保存効率の改善につながっていると考えられる。

第4章では、作製したマイクロ流体デバイスと凍結保存技術を用いて、Ready-to-Useな細胞試験マイクロ流体デバイスの2つの実証実験に取り組んだ。2つ

の実証実験は凍結保存によって細胞機能に損傷は起こっておらず, Ready-to-Use に細胞試験ができることが実証された.

以上, 本研究では, 多くの人が使えるシンプルなマイクロ流体デバイスによる細胞操作の実現を目指して, 細胞培養, 細胞凍結保存, 開発した凍結保存技術を用いた細胞試験の実証実験を行った. 新規に開発したマイクロ流体デバイスは小型で簡便であり, 生物系の研究者にも利用が見込めるものである. 本マイクロ流体デバイスを利用した接着状態の細胞の凍結保存技術は, これまでわずかにしか報告されていなかった Ready-to-Use な細胞試験へと繋がるものである. Ready-to-Use な細胞試験は, 細胞試験へのハードルを下げることに寄与すると考えられる. 本論文で開発したマイクロ流体デバイス及び凍結保存技術は, マイクロ流体デバイスを用いた細胞生物学への新たな可能性を切り拓き, 今後の発展に大きく寄与するものと期待できる.

付録1. マイクロポケットの構造に関する考察

マイクロ流体デバイスにおいて、細胞を導入するステップは、培養期間中のかん流と違う操作が要求される。細胞を導入する際に、細胞懸濁液をシリンジなどで流し込み、一度細胞が接着するまで数時間から一晩程度かん流を止め、細胞を接着させる。細胞が接着した後に、培養用のかん流に切り替え、接着していない細胞を洗い流す。しかし、こういった導入法では、細胞培養エリアだけでなく、エリアをつなぐ流路などにマイクロチャンネル全体に細胞が接着するという問題がある。マイクロスタンプと呼ばれる基板修飾技術で、細胞接着因子を細胞培養エリアだけに修飾させる手法は報告されているが、簡単ではない。細胞培養エリアに細胞を捕集するマイクロポケットを配置することによって、捕集されなかった細胞を洗い流し、培養エリアのみに細胞を接着させる方法が報告されている[1-4]。今回開発したデバイスは、かん流と一時的に止める操作が煩雑であるため、細胞培養エリアにマイクロポケットを配列する方法を採用した。

マイクロポケットを用いた細胞捕集技術は用いられているが、マイクロポケットの構造と細胞捕集効率の評価はなされていない。そこで、付録ではマイクロポケットの構造と細胞捕集効率の評価を行った。

今回、2章においてもちいたマイクロポケット(Tunnel -型マイクロポケット)の構造を図1Aに示す。Ng3T3 及びは効率よく捕集(68%±25%)されていた。しかし、報告されている細胞培養用のマイクロポケットは、図1.Bのようなマイクロポケット(Tunnel +型マイクロポケット)が主流となっている。このマイクロポケットは奥に貫通路が掘られており、細胞をポケットへ誘導する流れの流路となっている。しかし、細胞が1つ捕集されると、ポケット奥の貫通路は塞がれ、細胞は捕集されないようになる。このように、1つの細胞を捕集する構造である。

そこで、今回はこの2種類のマイクロポケットに加えて、比較のために図1(C)のようなスリット構造のマイクロポケットの3つのポケットの細胞の捕集能力の評価を行った。

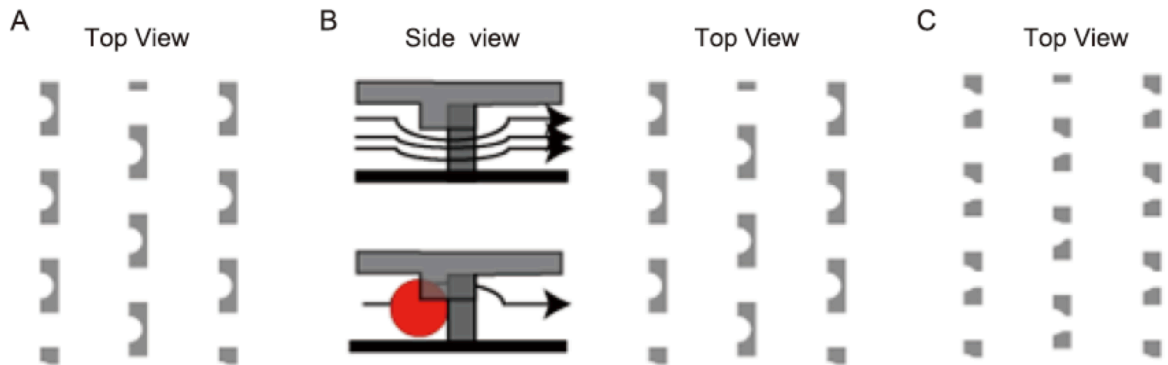


図1. マイクロポケット構造(A) Tunnel- マイクロポケット B.Tunnel+マイクロポケット C.スリット型

2-2-2の遠心による細胞導入を行った. HeLa 細胞を 1.0×10^6 個/ml に懸濁したものを導入した. そのときの導入結果を図2に示す. スリット型のマイクロポケットと貫通路ありマイクロポケットにはほとんどのポケットに細胞が入っているが, 貫通路なしでは 50%程度のポケットに細胞が入っている様子が観察できた. ポケットに入っている細胞の数を観察すると, スリット型では複数の細胞が入っているポケットがある. 貫通路ありマイクロポケット, 貫通路なしマイクロポケットにおいては複数個の細胞が入っているポケットはない.

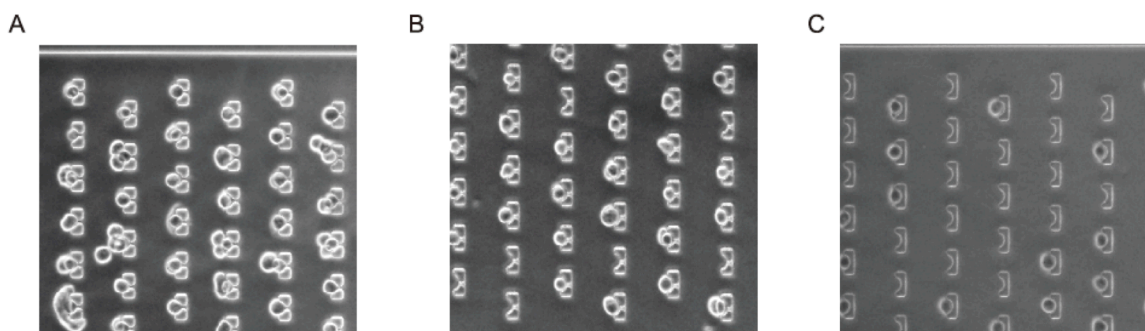


図2. 細胞導入後の細胞培養エリアの明視野画像

(A) Tunnel- マイクロポケット B. Tunnel+マイクロポケット C.スリット型

また, マイクロポケットに対する細胞占有率を用いて捕集効率を評価した(図3). 平

均捕集効率は、スリット型、貫通路ありマイクロポケットが高く、貫通路なしマイクロポケットは低い。個別試行の結果をみていくとスリット型、貫通路あり型は安定した高い捕集効率が得られているが、貫通路なし型では、ばらつきが大きい。そのため、平均で見ると低い捕集効率になっている。マイクロポケットあたりの細胞数をみていくと、スリット型では複数の細胞が入っているマイクロポケットが 10%あるが、貫通路ありマイクロポケット、貫通路なしマイクロポケットでは、ほぼ 1 マイクロポケットに 1 細胞が入っている。貫通路の有無に関わらず、マイクロポケット構造が 1 ポケットに 1 細胞の捕集に向いている。スリット型において、スリットに 1 つめの細胞が捕集されたとしても、流路の高さは細胞の直径よりも 1.5 から 2 倍程度大きいため、空間が空いている (図 4)。そのため、その空間に起こる流れによって複数の細胞が捕集されているとか考えられる。

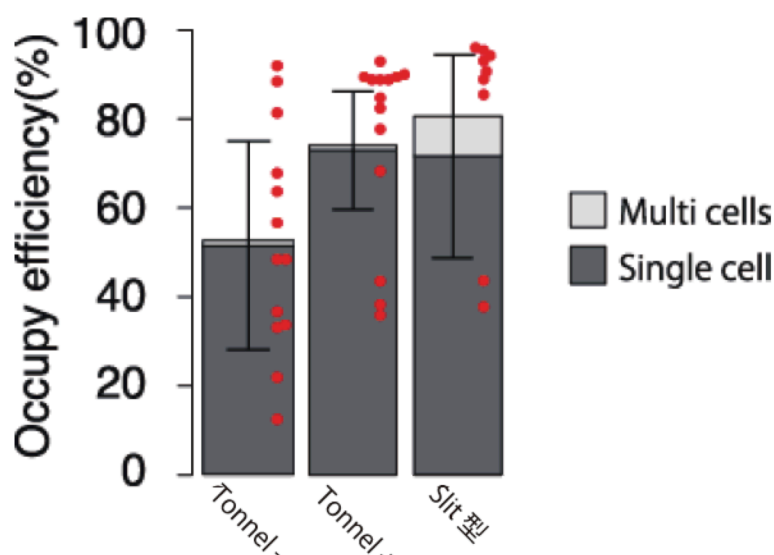


図 3.細胞捕集効率の評価.

棒グラフ濃灰:1 細胞/マイクロポケット, 薄灰:複数細胞/マイクロポケット
エラーバー:濃灰の標準偏差. 赤点:個別試行における結果.

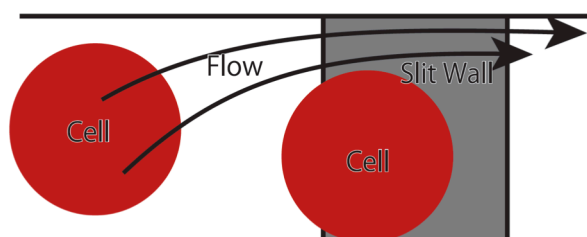


図 4. スリット型における複数細胞捕集のメカニズム

このようにすでに多く用いられている貫通路ありマイクロポケットが 1 ポケット 1 細胞捕集に向いている。このようなマイクロポケットの数（密度）を調節することによって、実験目的に応じた適度な細胞密度に細胞をまくことができる。

参考文献

- [1] A.M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch, J. Voldman, Microfluidic control of cell pairing and fusion., *Nat. Methods.* 6 (2009) 147–52.
- [2] K.-I. Wada, K. Hosokawa, E. Kondo, Y. Ito, M. Maeda, Cell fusion through a microslit between adhered cells and observation of their nuclear behavior., *Biotechnol. Bioeng.* 111 (2014) 1464–8.
- [3] A.Y. Lau, P.J. Hung, A.R. Wu, L.P. Lee, Open-access microfluidic patch-clamp array with raised lateral cell trapping sites., *Lab Chip.* 6 (2006) 1510–5.
- [4] D. Di Carlo, L.Y. Wu, L.P. Lee, Dynamic single cell culture array., *Lab Chip.* 6 (2006) 1445–9.

付録.2 細胞凍結保存用マイクロ流体デバイスによる長期間保管

第3章で細胞凍結保存技術では、細胞保管期間が36時間であった。しかし、細胞の凍結保管期間は長期に渡ることが多い。従って、長期間の保存による安定性を調べることは必要である。しかし、第3章マイクロ流体デバイスでは48時間以上PDMSを -80°C に保管することによって解凍時に流路内に気泡が発生する(図1)。この気泡は、流路の大部分を埋め尽くしていることより、凍結保存液に溶存していた気体ではなく、PDMSからでていることが示唆される。PDMSのガス透過性によって、PDMS内には体積比10%のガスを溶存しているが、 -80°C にすることによってPDMSがガラス化し始め、溶存していたガスが流路内に溶出したと推測される。この問題を解決する方法として、PDMSを凍結時に脱気する方法をとった。PDMS内に溶存しているガスは低圧条件で脱気することができることが知られている。そこで、凍結時にバキュームシーラーを用いることによってPDMSを脱気したまま凍結保存することを試みた。

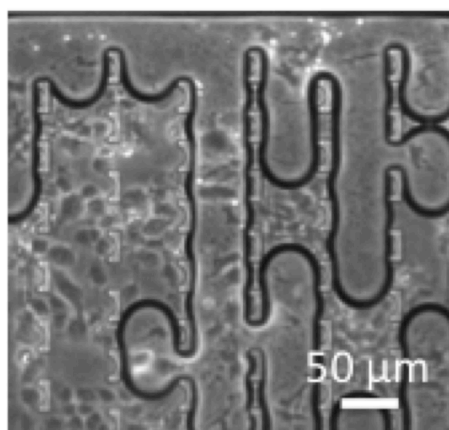


図1. 10日間凍結保存したマイクロ流体デバイスに発生する気泡。

HeLa細胞を導入、培養したマイクロ流体デバイスのマイクロチャネルを凍結保存液に置換した後に、バキュームシーラーを用いて低真空パックに細胞培養用マイクロ流体デバイスを入れた。その状態で、 -80°C の極低温冷蔵庫に保管をした。10日間の保管後、細胞培養用のマイクロ流体デバイスを取り出した。低真空状態が保たれている状態で室温において10分解凍を行った。その後、真空パックから細胞培養用マイクロ流体デバイスを取り出し、培地タンクと排液口に $50\ \mu\text{L}$ の液体培地を滴下した。滴下した後に5分静置したのちに、培地タンクを $100\ \mu\text{L}$ の液体培地と交換をした。

この時、流路内に気泡は見られなかった。その後、細胞培養用のインキュベータに入れて、1時間回復培養を行った。その後、Hoechst-PI染色を行った(図2)。細胞生存率は63%±16%であった。気泡が発生することなく、接着状態での細胞の10日間の凍結保存に成功した。

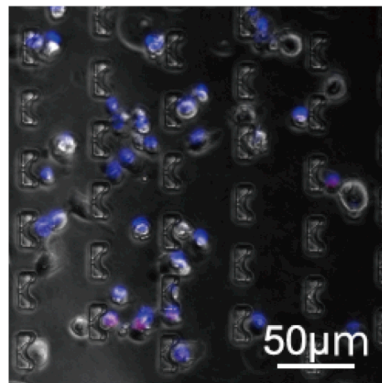


図2 10日間凍結保存後のHeLa細胞のHoechst-PI染色

PDMSを凍結保存用のマイクロチップの材料として使うには、真空処理などが必要である。短期間の低圧下に細胞を置くことによる影響はないとされているが、長期間に場合は知られておらず、こういった処理は細胞への負荷になる可能性がある。細胞への影響に関して調べていく必要がある。

発表状況

【原著論文】

E. Kondo, K.-I. Wada, K. Hosokawa, and M. Maeda, Microfluidic perfusion cell culture system confined in 35 mm culture dish for standard biological laboratories, J. Basic. Bioeng., 2014, **118**, 356–8.

K.-I. Wada, K. Hosokawa, E. Kondo, Y. Ito, and M. Maeda, Cell fusion through a microslit between adhered cells and observation of their nuclear behavior, Biotechnol. Bioeng., 2014, **111**, 1464–8.

E. Kondo, K.-I. Wada, K. Hosokawa, and M. Maeda, Cryopreservation of adhered cells on microfluidic device for Ready-to-Use cell based assay, In preparation.

【国際学会 査読付き Proceedings】

E. Kondo, K.-I. Wada, K. Hosokawa, and M. Maeda, “MICROFLUIDIC DEVICE IS EFFECTIVE FOR KEEPING ADHERED CELLS INTACT DURING CRYOPRESERVATION: TOWARD READY-TO-USE CELL ASSAY PLATFORMS”, International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences(microTAS), Proceedings of μ TAS 2014, Chemical and Biological Microsystems Society Publishing, 2014(Poster)

【特許】

特願 2014-202940

発明の名称 凍結細胞の製造方法

発明者 細川和生, 近藤栄太郎, 和田健一, 前田瑞夫

【国内学会】

○近藤 栄太郎, 和田健一, 細川和生, 前田瑞夫, “重力を用いた受動的なかん流によるマイクロ流体チップ上での細胞培養”, 第3回 CSJ 科学フェスタ, 東京都, 2013(ポスター)

○近藤 栄太郎, 和田健一, 細川和生, 前田瑞夫, “外部の送液系が不要で 35 mm 培養皿に収まるマイクロ流体細胞培養システム”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第28回研究会, 兵庫県姫路市, 2013(ポスター)

謝辞

博士後期課程の3年間にわたり御懇篤なる御指導、御鞭撻ならびに学位論文提出の機会を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科 前田 瑞夫 教授には謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たっては、研究開始当初から、数々の有益な御指導、御討論を頂きました理化学研究所 前田バイオ工学研究室 細川 和生 専任研究員ならびに和田 健一 協力研究員に心より感謝いたします。

また、ご多忙な御身ながら予備審査及び本論文の審査をしていただきました東京大学大学院新領域創成科学研究科 伊藤 耕三教授、佐々木 裕次教授、三尾 典克准教授、東京大学工学部 高井 まどか教授、東京大学生産技術研究所 藤井 輝夫教授、には多くのご意見およびご鞭撻を頂きました。深く感謝申し上げます。

第3章の水晶の観察実験に関して、ご助力を頂きました東京工業大学理学部 岡田 哲男教授、火原 彰秀准教授、稲川 有徳さんに深く感謝いたします。

また、研究活動を進めるにあたり多大な御指導・ご協力を頂きました理化学研究所 前田バイオ工学研究室の皆様にご深くお礼申し上げます。

最後に、長い大学生活を支え、また見守ってくれた家族に心からの感謝の意を表して、ここに謝辞とさせていただきます。

2015年2月
近藤栄太郎