

論文の内容の要旨

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 研究背景

微細加工技術の発展に伴い MEMS と呼ばれる領域の研究が起こり、マイクロポンプやマイクロバルブの作成が取り込まれるようになってきた。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成手法が提唱されて以来、生物学にもその手法を持ち込まれるようになってきた。細胞生物学においては、マイクロ流路を用いて細胞周りの環境を制御し、細胞を操作しようと試みられてきた。

本研究では、シンプルな細胞培養用マイクロ流体デバイスを作成し、本研究における細胞操作の基本デバイスとした。次に、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。そして、開発した凍結保存技術を用いた Ready-to-Use な細胞試験マイクロ流体デバイスへの展開を行った。

2 外部動力を必要としない細胞培養用マイクロ流体デバイスの開発

1. 序論

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、マイクロ流体デバイスを利用したマイクロ流体チップの細胞培養・細胞試験への利用が多く報告されている。しかし、マイクロ流体チップは細胞生物学の研究者に向けて広がりを見せていない。理由として、マイクロ流体デバイスを用いた細胞培養には、液体培地をかん流させるための外部動力が必要であり、デバイスが大型になってしまい一般の研究者が使いづらいものになっていることがあげられる。この問題に対して、35 mm 細胞培養皿に収まる重力を利用することによって外部動力を必要としない細胞培養マイクロ流体デバイスを開発した。

2. 実験

Fig.1-1 に示すようなマイクロ流体細胞培養システムを設計した。100 μ L の液体培地リザーバと PDMS によるチップは 35 mm 培養皿のなかに収まっており、液体培地は重力によってリザーバよりチップ内に流れこむようにした。深さ 25 μ m 幅 500 μ m の培養エリアには、均一に細胞を播くために凹型のポケットを並べた。ポケットは、1 つの細胞がはまるサイズになっており、細胞培養エリアに均等に配置されている。細胞懸濁液を液体培地リザーバに満たし、遠心することによって細胞を細胞培養エリアへ導入した。液体培地リザーバに液体培地を満たした後、細胞培養用のインキュベーターの中に静置し、1 日 1 回液体培地の交換、充填を行なった。

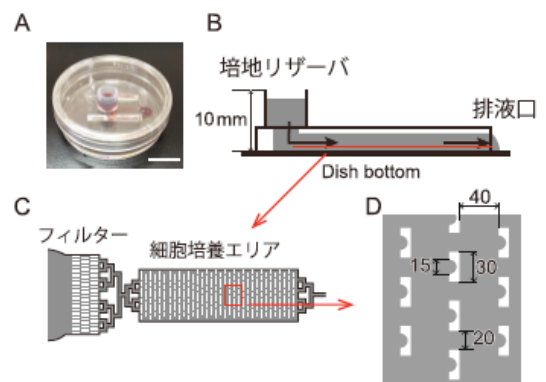


Fig.1-1 本デバイスのデザイン。(A)システム全体図 (B)PDMS チップ概略図 (C)PDMS チップ断面図 (D)細胞培養エリア拡大図。単位は μ m

3. 結果・考察

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(Fig.1-2)。コンフルエントに達した細胞は良好な生存率を保持しており、このシステムにおける重力によるかん流が細胞の良好な環境に適していることが分かった。外部の送液系がなく、35mm 培養皿に収まっているため、このシステムはマイクロ流体デバイスを使ったことのない研究者にも扱いやすいマイクロ流体細胞培養といえる。

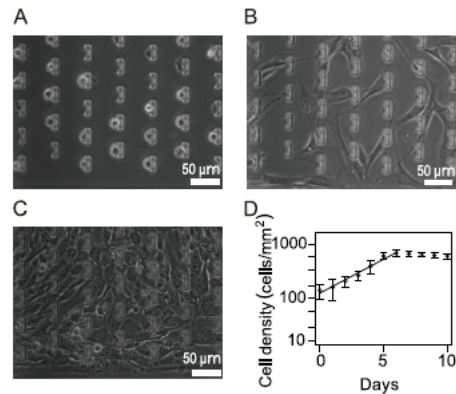


Fig.1-2 デバイス内培養中の細胞と増殖曲線。(A)0 日目、(B)1 日目、(C)5 日目、(D)細胞増殖曲線

3 マイクロ流体デバイスによる接着細胞の凍結保存

1. 序論

細胞凍結保存は、細胞培養と同様に生物学、医学研究において基本となる実験手法である。細胞培養を行う上で、細胞を凍結保存することは、細胞維持の負担を減らし、細胞の持ち運びを可能にしてきた。半世紀に渡る凍結保存の研究の中で、接着した状態にある細胞は懸濁状態にある細胞より凍結保存時にダメージを受けやすく保存には向いていないということが広く知られている。そのため、接着状態で使う細胞は、懸濁状態で凍結保存するのが一般的になっている。しかし、懸濁状態で保存した細胞を使うためには、一度培養皿で解凍し培養して細胞試験用のデバイスに播き直す必要があり、時間と労働力が要求される。このようなコストを省くために、接着状態で細胞を凍結保存することが試みられてきたが、十分な成果を上げてはいない。

今回、マイクロ流路内で接着状態にある細胞を凍結保存した。そして、マイクロ流路内で細胞を凍結することによって、凍結保存によるダメージから細胞を守り、接着状態での細胞凍結が可能であることを示した。

2. 実験

凍結保存

培養したのち、培地を凍結保存液(10% DMSO 入り細胞培養液)に遠心によって置換し、-80 °Cのディープフリーザーに静置した。36 時間後、室温で 10 分間静置し融解した。融解後、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 により染色を行った。死細胞数と生細胞数をカウントし、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。細胞培養皿で培養されている細胞を、深さ 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。

細胞分化試験

凍結保存した PC12 細胞を融解し回復培養をした後、Nerve Growth Factor(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。

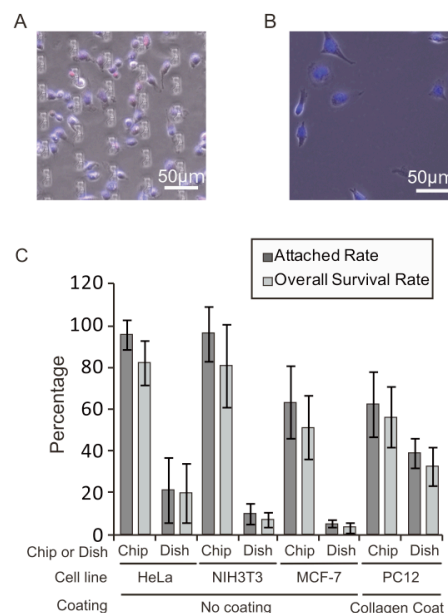


Fig. 3-1 (AB) 融解後のHeLa 細胞。(A)マイクロチップ内 (B)培養皿上 赤:ヨウ化プロピジウム 青:Hoechst (C) Attached rate (凍結後全細胞/凍結前全細胞:濃灰色)とOverall survival rate(凍結後生細胞/凍結前全細胞:薄灰色)

3. 結果・考察

凍結保存

Fig. 3-1 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 HeLa 細胞の凍結保存後の蛍光画像を示す。培養皿とくらべ、マイクロチップ中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。Fig. 3-1C 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。マイクロ流路を用いることにより、接着状態で細胞を凍結保存できることが見出された。この現象は、マイクロ空間によって、対流の減少と氷晶の移動度の低下がおり、凍結融解の際の細胞の剥離と損傷が抑えられた結果だと考えられる。

細胞分化試験

次に、細胞の表現形の確認するために、PC12 細胞を用いて、分化誘導を行った。PC12 細胞は NGF 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。

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(Fig.3-2)。これらは、コントロールの通常の培養環境下で NGF に暴露された PC12 細胞でも見られた。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ず、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形が維持されていた。マイクロ流路内での接着状態での凍結保存では細胞機能が損なうことなく凍結保存を行うことができた。

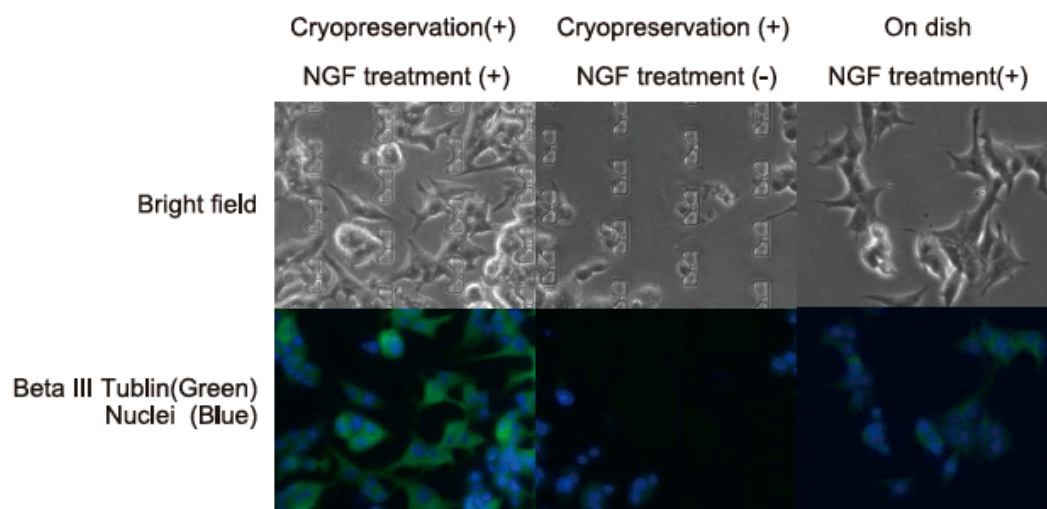


Fig.3-2 PC12 細胞の免疫染色図。(左)マイクロチップ内で凍結保存したPC12 細胞をNGFに暴露して分化誘導をかけた。(中央) マイクロチップ内で凍結保存した細胞をNGFに暴露せずに培養した。(右) 培養皿上で、NGFに暴露し分化誘導をかけた。

4 Ready-to-use な細胞試験向けマイクロ流体デバイスの実証

1. 序論

細胞を用いた試験は生物学、医学研究において重要な実験手法である。しかし、前項で述べたように凍結細胞から細胞試験を行うには、解凍した細胞を一度培養皿に播き、細胞が培養皿に接着するのを待つ必要がある(Fig4-1 左)。今回、マイクロ流路内で細胞を接着状態で凍結保存できることが分かった。そこで、マイクロ流体デバイスを用いることによって解凍から細胞をそのまま細胞試験が行えるのではないかと考えられる(Fig4-1 右)。

今回、マイクロデバイス内で接着状態での凍結保存をした細胞に対して、抗がん剤を暴露

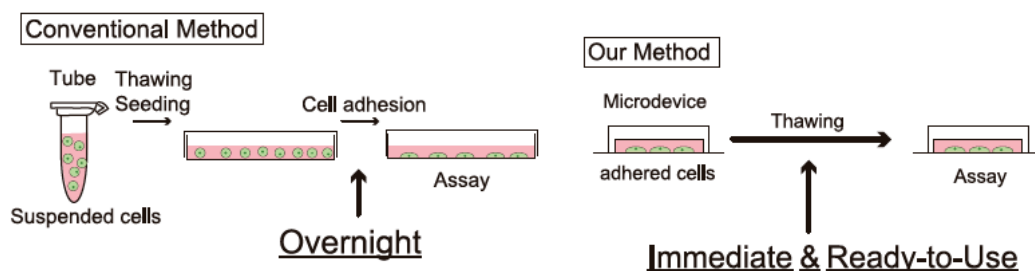


Fig.4-1 (左) 従来の凍結状態から細胞試験までの流れ。(右) マイクロ流体デバイス内で凍結保存した細胞を用いた細胞試験までの流れ

する細胞毒性試験を行い、従来の96ウェルを用いた細胞毒性試験の結果との比較を行った。

2. 実験

50%コンフルエントで凍結保存した HeLa 細胞を解凍して、回復培養を行った後に、シスプラチン 0 ~1000 μM の液体培地をリザーバに入れ、24 時間インキュベーションした。インキュベーション後にヨウ化プロピジウム-Hoechst の二重染色を行い、生細胞数を算出した。シスプラチン 0 μM の平均生細胞数を 100%として、各シスプラチン濃度での相対細胞生存率を算出した。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で回帰を行った。比較対象として、凍結保存なしのマイクロ流体デバイス、一般的な 96 ウェル プレートでの細胞毒性試験を行った。

3. 結果・考察

回帰の結果を Fig.4-2 に示す。IC₅₀ の算出はフィティングパラメーターを元に行った。IC₅₀ は、それぞれ 2.6 μM (凍結保存ありマイクロデバイス)、5.7 μM (凍結保存なしマイクロデバイス)、5.2 μM (96 ウェルプレート)となった。算出された IC₅₀ でそれぞれ2群間比較を行ったところ、有意差があるとは言えなかった(各々の群間で $p > 0.1$)。そのため、これらの3種類の毒性試験の結果は同一とみなせると考えられる。マイクロデバイス内で凍結保存された細胞を用いた細胞試験は従来の方法と同等の性能を持っていると考えられる。

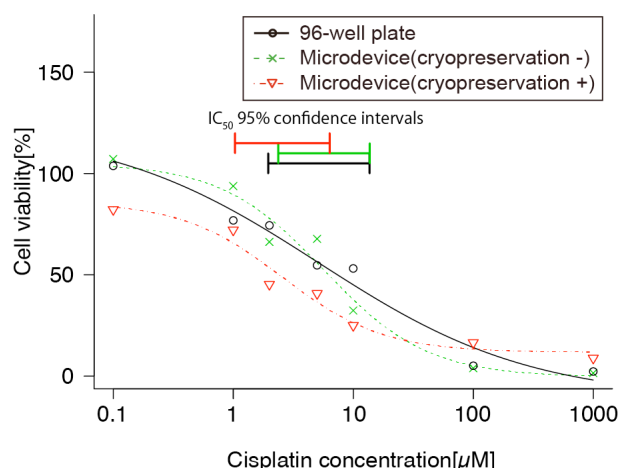


Fig.4-2 HeLa 細胞- シスプラチン 用量反応曲線。実線: 96-well plate 破線:凍結保存なしマイクロ流体デバイス 一点鎖線: 凍結保存ありマイクロ流体デバイス

5 結論

本研究では、細胞用マイクロ流体デバイスの開発及びマイクロ流体デバイス内での細胞凍結保存を行った。そして、凍結保存技術を用いた Ready-to-Use な細胞試験への展開を行った。

まず初めに細胞培養用のマイクロ流体デバイスを開発した。開発したマイクロ流体デバイスは、これまでに報告されているどの細胞培養用のマイクロ流体デバイスより小さく、簡便なものである。次に、開発したマイクロ流体デバイスを用いて接着状態にある細胞の凍結保存を試みた。マイクロ流路内で細胞を接着状態で生存したまま凍結保存できることをしめし、PC12 細胞を用いることによって分化能が維持されていることを確認した。従来の概念を覆す接着状態での細胞の凍結保存に成功することができた。さらに、凍結保存した細胞を用いた細胞試験を行った。この結果より、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つながることを示すことができた。