

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04640

研究課題名(和文) マイクロ流体デバイスを用いたナノ薬剤のホワイトボックステスト

研究課題名(英文) White box testing of nanomedicines on a microfluidic device

研究代表者

佐々木 直樹 (Sasaki, Naoki)

東洋大学・理工学部・准教授

研究者番号：30462691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナノメートルサイズの粒子に薬物を担持し、血管に投与して腫瘍への薬物送達に用いる研究が盛んに進められている。本研究では効率的な薬物送達が可能ナノ粒子の特性を明らかにするためのマイクロ流体デバイスを開発した。民生用のレーザー加工機を用いてマイクロ流体デバイスを作製した。多孔膜を組み込んだデバイス上で血管内皮細胞と腫瘍細胞を共培養した。腫瘍細胞は内皮細胞層に対するナノ粒子の透過性を亢進させた。

研究成果の概要(英文)：Nanoparticles have been widely utilized to deliver drugs from blood vessels to tumor tissues. In this study, we developed a microfluidic device to clarify nanoparticle characteristics required for efficient drug delivery. A consumer laser cutter was employed to fabricate the device. Tumor cells and vascular endothelial cells were co-cultured on a membrane-integrated microfluidic device. Permeation of nanoparticles through the endothelial monolayer increased in the presence of tumor cells.

研究分野：マイクロ・ナノ分析化学

キーワード：ナノ薬剤 血管透過性 共培養 レーザー加工

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ薬剤を用いた薬物送達が盛んに研究されている。ナノ薬剤とは、ナノメートルサイズの粒子に薬物を担持したものであり、これを血管に投与すると腫瘍に薬物を効率良く送達できる。この送達には、ナノ薬剤の血管からの漏出や、血管と腫瘍の間に位置する間質内輸送など、様々な過程が関与している。加えて、ナノ薬剤のサイズや形状などの影響も示唆されている。従って、効率的な薬物送達が可能なナノ薬剤の特性を明らかにすることは極めて重要である。

従来、ナノ薬剤の評価には動物実験が用いられてきた。しかし生体は「ブラックボックス」であり、薬剤が効く・効かないといった結果論的評価しかできない。加えて、実験に多くの時間と費用を要し倫理的問題も有する。培養細胞を用いた系ではナノ薬剤が内皮細胞の層を透過する過程しか評価できず、生体とサイズが大きく異なり、血流に相当する流れもない。すなわち、上述のナノ薬剤特性を明らかにするには、ナノ薬剤の送達に係る各過程を生体外で再現して組み合わせ、各過程におけるナノ薬剤の動態を観察可能な新規評価系の開発が必要である。

研究代表者は微細加工技術で作製したマイクロ流体デバイスを用い、生体と同等のサイズ・流れを有する血管のモデルを開発してきた。さらにこれをナノ薬剤評価に応用することを着想し、ナノ薬剤の血管外漏出を無細胞系で調べるモデルも報告してきた。そこで本研究ではこれらの成果を発展させ、細胞を組み込んでナノ薬剤の挙動を評価し、さらに1デバイス上に血管や腫瘍に相当する要素を配した「ホワイトボックス」を構築することで、ナノ薬剤の特性を疑似生体環境で精密評価できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、腫瘍への効率的な薬物送達を実現可能なナノ薬剤の特性を精密評価する実験系の構築を目的とした。具体的にはまず、血管と腫瘍に相当する要素を組み込むためのマイクロ流体デバイスを作製した。次に血管内皮細胞および腫瘍細胞をデバイス上で培養した。最後に、これらの細胞を共培養した状態で、ナノ薬剤に見立てた蛍光標識ナノ粒子の輸送過程を観察した。

### 3. 研究の方法

#### (1)マイクロ流体デバイスの作製

本研究ではまず、アクリル板をレーザーで彫刻してマイクロ流路の鋳型を作製することとした。アクリル板を民生用のCO<sub>2</sub>レーザー加工機で彫刻したのち、表面をエタノールで拭き、付着しているアクリル粉を除去して鋳型とした。これをポリジメチルシロキサン(PDMS)で型どりして、マイクロ流路のパターンを有するPDMS基板を作製した。この基板は、流路パターン以外の部分に彫刻跡が

残ったため、未硬化のPDMSをスライドガラスにスピンコートし、そこにPDMS基板をスタンプしてそのままベイクすることで表面を平滑化した。

次に、アクリルの薄板を流路の形にレーザーで切断したのち、別のアクリル板に張り付けて鋳型を作製する手法も検討した。切り出されたアクリル片の歪みを解消するために、スライドガラスで挟んで重りに乗せてベイクした。その後、アクリル用接着剤を用いて別のアクリル板に接着し、これをマイクロ流路の鋳型とした。鋳型の型どりは上記と同様に行った。

I字型マイクロ流路を有するマイクロ流体デバイスは以下の手順で作製した。流路パターンを有するPDMS基板を作製し、パターンの両端に穴を開けてチューブを差し込んで固定した。オートクレーブ滅菌ののち、培養皿に貼りつけてデバイスとした。

2種の細胞を共培養するための、ウェルとI字型マイクロ流路を有するマイクロ流体デバイス(図1)は以下の手順で作製した。ウェルとなる穴を有するPDMS基板、および上記と同様にI字型マイクロ流路を有する基板を作製した。この間に、セルカルチャーインサートから切り出したポリエチレンテレフタレート製の多孔膜(孔径1μm)を挟み込んでデバイスとした。この際、未硬化のPDMSをヘキササンで希釈したものを接着剤として用いた。

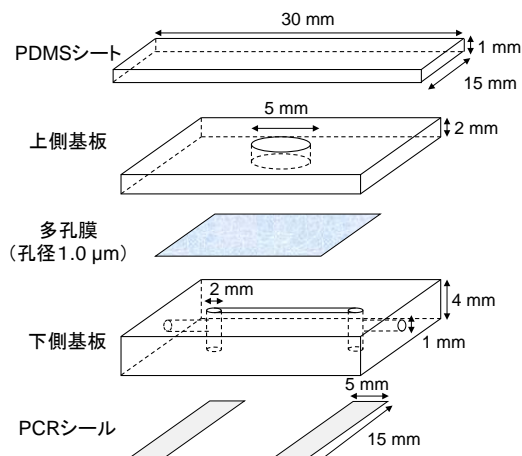


図1 共培養デバイスの模式図。

#### (2)マイクロ流路内での細胞培養

はじめにモデル実験として、ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞の培養に取り組んだ。I字型マイクロ流路にHeLa細胞の懸濁液を導入し、細胞を流路底部に接着させた。4時間後、シリッジポンプを用いて培地を送液し、灌流培養を開始した。懸濁液導入から1日毎に5日後まで細胞を顕微鏡観察し、各時刻における細胞密度を求めた。

次に、血管の細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の培養に取り組んだ。上記と同様にHUVECの懸濁液を流路に導入して灌流培養し、懸濁液導入から1日毎に3日後ま

で流路内の細胞の位相差像を撮影して、各時刻における流路内の細胞の配向角を求めた。配向角は細胞の長軸が流路と平行な時を  $0^\circ$ 、流路と直交している時を  $90^\circ$  とした。

### (3) ナノ粒子透過試験

本研究では市販の蛍光標識ポリスチレンナノ粒子 (粒径  $100\text{ nm}$ ) をナノ薬剤に見立てて実験した。共培養用のデバイスをクリーンベンチで UV 滅菌したのち、流路内部をフィブロネクチンでコートして細胞接着性とした。次に、ウェルと流路に HUVEC 用の培地を加え 30 分以上放置した。その後、HUVEC の懸濁液を流路内に加え、上記と同様に灌流培養した。懸濁液導入から 1 日後に HeLa 細胞と蛍光標識ナノ粒子の懸濁液をウェルに加え、経時蛍光観察した。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロ流体デバイスの作製

実験室レベルでマイクロ流体デバイスを作製する際には、まずフォトリソグラフィでマイクロ流体デバイスの鋳型を作製し、この鋳型を PDMS でかたどりしてデバイスを作製することがよく行われる。しかし、この手法では高価で大掛かりな微細加工装置やクリーンルームを要し、細胞実験を主に行う生化学・生物学分野の研究者が取り組みにくい。そこで本研究では、安価で操作も容易な民生用のレーザー加工機を用いてマイクロ流体デバイスの鋳型を作製し、これを PDMS でかたどってデバイスを作製することとした。

彫刻加工で作製した鋳型を型取った PDMS 基板には、加工時に鋳型表面にできた彫刻跡がそのまま転写され、PDMS 基板の特徴である平滑基板への自己接着性を示さなかった。しかし、未硬化の PDMS で平滑化した後は自己接着性を示し、彫刻加工に基づく鋳型加工と基板作製を実証できた。流路パターンは断面は台形であった。これは、本研究で用いたレーザー加工機ではレーザー光をレンズで集光しており、その焦点をアクリル板の表面に合わせて加工しているためと考えられる。すなわち、基板表面ではレーザー光の強度が最も高いため、アクリル板が削られる量が多くなるが、表面から離れるにつれて削られる量が減少していると考えられる。切断加工でも同様の断面形状を有する流路パターンを得ることができた。彫刻加工、切断加工のいずれにおいても、流路パターン幅の設計値と実測値の間には直線関係が認められ、検量線を基に、目的とする幅の流路パターンを作製できることが示された。どちらの加工法でもデバイスの作製は可能であるが、彫刻加工では PDMS 基板を作製するたびに表面の平滑化が必要となるため、本研究では切断加工を用いることとした。

ウェルと I 字型マイクロ流路を有するマイクロ流体デバイスは、直径  $5\text{ mm}$  のウェルを

有する上側基板と、マイクロ流路 (幅  $0.7\text{ mm}$ 、深さ  $0.2\text{ mm}$ 、長さ  $12.0\text{ mm}$ ) を有する下側基板の間に、多孔膜 (孔径  $1\text{ }\mu\text{m}$ ) を挟み込むことで作製できた (図 2)。これにより、膜を挟んで異なる種類の細胞を共培養することが可能となった。加えて、生体内で血流にさらされる血管内皮細胞はマイクロ流路内で溶液流れ下で培養するのに対し、腫瘍細胞はウェル内で流れにさらされずに培養でき、生体内でそれぞれの細胞が置かれる環境を考慮した評価が可能な系の構築に成功した。さらに、マイクロ流路に溶液を導入・排出するための配管を、通常は基板に対して垂直に行うのに対し、本研究では基板と平行になるように行った。これにより、ウェルおよび流路への細胞懸濁液導入に伴うデバイスの上下反転を容易に行えるようにした。

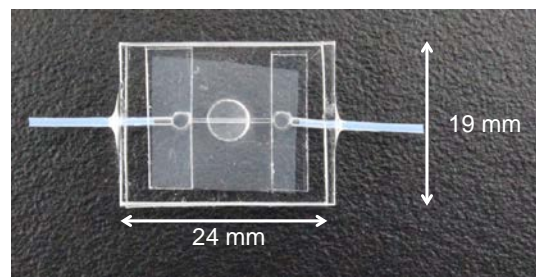


図 2 共培養デバイス。

### (2) マイクロ流路内での細胞培養

HeLa 細胞の培養では、培養開始から 5 日で細胞はコンフルエントに達した (図 3)。細胞増殖速度はマイクロ流路、培養フラスコのどちらでも  $2.9\text{ cells mm}^{-2}\text{ h}^{-1}$  であった。この結果から、本研究で作製したマイクロ流体デバイス上で、マクロ系と同様に HeLa 細胞を培養できることがわかった。

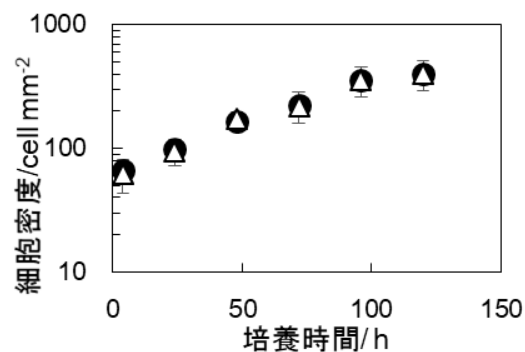


図 3 細胞密度の経時変化。

● : フラスコ. △ : デバイス. N=3.

HUVEC の培養では、灌流開始前は HUVEC がランダムに配向しているが、灌流培養することで HUVEC が流路長手方向に配向する様子が観察された。各時刻における HUVEC の配向角を求めたところ、灌流培養の時間と共に、流路長手方向に配向する細胞の割合が増加していることがわかった (図 4)。各時刻における配向角の平均値は、播種後 1 日で  $33.1\pm 24.1^\circ$ 、2 日で  $21.7\pm 16.7^\circ$ 、3 日で  $16.5\pm 12.9^\circ$

であり、研究代表者の既報(N. Sasaki et al., *Electrophoresis*, 33(12), 1729-1735 (2012))とおおよそ同等の結果であった。これらの結果から、本研究で作製したマイクロ流路内で、血管内皮細胞を流れ下で配向させて培養できることが示された。

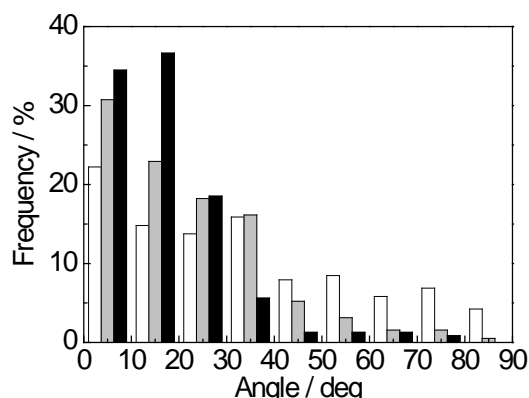


図 4 各時刻における配向角のヒストグラム。培養時間：24 h (白), 48 h (灰), 72 h (黒)。

### (3) ナノ粒子透過試験

本研究では、ナノ薬剤に見立てた市販の蛍光標識ナノ粒子を用い、マイクロ流路内の内皮細胞層に対する透過性を調べることにした。流路に HUVEC の懸濁液を導入してから 24 時間後、ウェルにナノ粒子のみの懸濁液を導入して経時蛍光観察したところ、この 24 時間後も粒子の透過は認められなかった。位相差像には大きな変化は認められなかった。よって、正常血管壁のように HUVEC がコンフルエントに培養された状態を維持している場合には、ナノ粒子は透過しないことが示された。次に、ウェルに導入するナノ粒子の懸濁液に、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を加えて同様の実験を行ったところ、24 時間後にはナノ粒子が明らかに透過しており、また位相差像からは HUVEC の密度が減少している様子が観察された。すなわち、生体内で腫瘍血管からナノ薬剤が漏出するのと符合するように、デバイス上でも血管内皮細胞の近傍に腫瘍細胞が存在する場合にナノ粒子が透過することを示唆する結果を得た。しかし、透過速度は実験ごとの差が大きく、定量的な議論のためには更なる検討が必要であると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①佐々木直樹, 林知美, 井上奈菜子, 大西真寛, 民生用レーザー加工機を用いる細胞培養マイクロ流体デバイスの作製, 分析化学, 査読有, 印刷中, 2018 年.

[学会発表] (計 6 件)

①Tomomi HAYASHI, Nanako INOUE, Naoki

SASAKI, A membrane-integrated microfluidic device for co-culture analysis, RSC Tokyo International Conference 2017, 2017.

②佐々木直樹, 生体に「まねぶ」バイオ分析, 東洋大学工業技術研究所講演会, 2017 年.

③佐々木直樹, 生体にまねぶバイオ分析, ナノ茶論, 2017 年.

④土屋公彰, 佐々木直樹, 多孔膜集積マイクロ流体デバイスによるナノ粒子の透過性分析, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年.

⑤臼井裕也, 渡邊学志, 佐々木直樹, 腫瘍血管-間質複合型無細胞マイクロ流体デバイスの開発, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年.

⑥佐々木直樹, 演繹的及び構成的アプローチに基づくマイクロバイオ分析デバイスの開発, 日本分析化学会第 64 年会, 2015 年.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 直樹 (SASAKI, Naoki)

東洋大学・理工学部・准教授

研究者番号：30462691