

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20300149  
 研究課題名（和文） 高機能単一細胞診断を目指したマイクロウェル実装バイオアッセイシステムの開発  
 研究課題名（英文） Development of Bioassay System with Microwell Slide Towards High throughput Single Cell Analysis  
 研究代表者  
 大橋 俊朗（OHASHI TOSHIRO）  
 北海道大学・大学院工学研究院・教授  
 研究者番号：30270812

研究成果の概要（和文）：従来、がん細胞の細胞診断において薬剤感度試験を行う場合、細胞の表面抗原を蛍光標識抗体によりイメージングするなど多くの細胞診断法が開発され臨床に応用されてきた。しかしながら装置が高価であることや成功率が低いこと、操作が煩雑であること等の理由から、低価格・高精度かつ簡便に評価が可能な新しい細胞診断デバイスの開発が求められている。本研究課題では、単一細胞に対して高精度・高効率な細胞診断が可能な新しいバイオアッセイシステムを開発した。

研究成果の概要（英文）：Since most laboratory bioassays used for cell analysis are designed to measure average effects on cell population, it is difficult to study characteristics of individual cells such as patient's tumor cell samples in a high throughput manner. Recently, a novel microwell slide that allows several thousands of single cells to be addressed to an exact position, cultured for weeks, and treated separately in high throughput has been developed. In this project we have proposed a bioassay system consisting of an active microfluidic device integrated on the microwell plate for improved control of, and new applications for the single cells.

#### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：バイオメカニクス

科研費の分科・細目：人間医工学，医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス，単一細胞診断，マイクロウェル，マイクロフルイディクス，バイオチップ，バイオMEMS

#### 1. 研究開始当初の背景

従来、がん細胞の細胞診断において薬剤感度試験を行う場合、細胞の表面抗原を蛍光標識抗体によりイメージングするなど多くの細胞診断法が開発され臨床に応用されてきた。しかしながら、装置が高価であることや成功率が低いこと、操作が煩雑であること等の理由から、低価格・高精度かつ簡便に評価が可能な新しい細胞診断デバイスの開発が

求められている。さらに、細胞は個々によって特性が異なることからより高度な診断のためには単一細胞に対する細胞診断が求められている。単一細胞診断における大きな利点の一つは患者の細胞サンプルが極めて少量で済むことである。近年、遺伝子診断チップやタンパク質解析チップなどいわゆるラボオンチップ（Lab-on-a-Chip）の開発が盛んに行われつつある中、細胞診断チップの開発

に対する期待も大きい。細胞診断チップは細胞の分離、検出、解析、回収といった一連の工程の中で、その目的によりアレイ型チップとマイクロ流体型チップに大別される。この両者を融合させることでより高機能な細胞診断チップが実現できると考えられるが申請者らの知る限りそのような汎用チップは見られない。すなわち、細胞をソーティングしたアレイ型チップをマイクロ流体型チップに実装することにより薬剤などの送液機能をも具備した単一細胞診断チップの開発が可能であると考えた。これを実現させるためには、微細加工技術、ソフトリソグラフィ技術に加えて細胞ソーティング技術や送液技術など複数の高度な工学的基盤技術を必要とするため、パッケージ化に必要とされる微小な流路、ポンプ、バルブ等の構成要素そのものが研究試作段階にあるのが現状である。

申請者らはこれまでに、細胞の力学応答現象を解明するため細胞力学特性計測、力学刺激負荷時の細胞骨格のライブイメージング等のバイオメカニクス実験および数値計算バイオメカニクスを中心に研究を展開してきた (T. Ohashi and M. Sato, *Fluid Dynamics Research*, 37(1-2), 40-59, 2005 など)。また力学環境操作として、微細加工・ソフトリソグラフィ技術によりマイクロピラーアレイを有する基質や微小流路を用いて細胞応答を計測・制御してきた (T. Ohashi, *et al.*, *Proceedings of the 2006 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*, 2006 など)。そこで、申請者らのバイオメカニクス技術、バイオ MEMS 技術と研究協力者の Prof. Helene Andersson-Svahn (Royal Institute of Technology, Sweden) のバイオチップ技術、バイオテクノロジー技術を組み合わせれば、新しいバイオアッセイシステムの開発が可能であるとの認識で一致し、本研究課題の申請に至った。

## 2. 研究の目的

本研究課題では単一細胞に対して高精度・高効率な細胞診断が可能で新しいバイオアッセイシステムの開発を目的とする。アレイ型チップ (マイクロウェルスライド) をマイクロフルイデックスシステムに実装するものである。開発するバイオアッセイシステムは、マイクロウェルスライド、マイクロフルイデックス層、ガラス層、リザーバ層の 4 層より構成される。すなわち、マイクロウェルにソーティングされた個々の細胞に対してマイクロポンプにより任意の試薬を選択的に送液し、細胞イメージング等により高度な細胞診断を行うシステムである。具体的に

は、平成 20 年度においてシステムを構成する要素部品の設計・製作を行い、平成 21 年度以降においてマイクロウェルスライドをマイクロフルイデックスシステムに実装して送液実験を行いシステムの有効性を確認する物である。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、単一細胞に対して高精度・高効率な細胞診断が可能で新しいバイオアッセイシステムの開発を行う。図 1 に示すように提案するバイオアッセイシステムは、マイクロウェルプレート、マイクロフルイデックス層、ガラス層、リザーバ層の 4 層より構成される。具体的には、平成 20 年度において、主としてシステムを構成するマイクロウェルプレートおよびマイクロフルイデックスシステムに用いられるマイクロポンプ、マイクロリザーバ等構成要素部品の設計・製作に取りかかる。平成 21 年度以降において、マイクロウェルプレートをマイクロフルイデックスシステムに実装し送液実験を行う。

平成 20 年度：

- (1) マイクロウェルスライドの設計・開発  
マイクロウェルスライドの例を図 1 に示す。

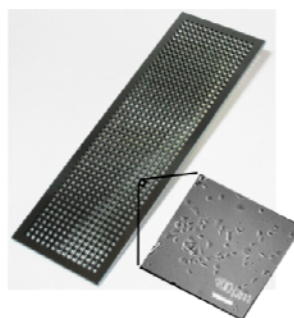


図 1 マイクロウェルスライドと細胞培養

等方性エッチングの微細加工技術により複数のマイクロウェルがシリコン基板を貫通するように形成されており、底面にはガラスプレートが接着されている。マイクロウェルの寸法は上面部で一辺 1,360  $\mu\text{m}$ 、下面部で一辺 560  $\mu\text{m}$ 、深さ 500  $\mu\text{m}$  である。マイクロウェルプレートは研究協力者の Prof. Helene Andersson-Svahn の研究室およびその連携企業と共同で設計・開発を行う。細胞ソーティングにおいて、予備的には細胞はマイクロウェルに直接播種できる。実際の腫瘍細胞診断の際には FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) システムを利用して細胞 1 個あるいは複数個ソーティングするものである。

- (2) マイクロフルイデックスシステムの設計・開発

マイクロウェル内の特定の細胞に特定の試薬を選択的に送液するマイクロフルイデ

イクスシステムの開発を行う。作製においては、シリコンの微細加工技術により原版を作製し、ソフトリソグラフィ技術によりPDMS膜を型取りすることで微小流路を実現する。流路は高機能化のためマルチチャンネル型とし、複数の試薬を同時に任意のマイクロウェルに送液できるようにする。流路内には、送液の駆動源であるマイクロポンプを組み込み、送液量、送液 on/off 等の機能を自動的に効率よく行えるようにする。

### (3)CFD によるマイクロウェル内の流体場解析および流路形状の最適化

マイクロウェルプレートとマイクロフレイディスクシステムを実装した場合、マイクロウェル内に発生する流体力学場、すなわち細胞周囲に発生する流体力学場を CFD (Computational Fluid Dynamics) 解析により求める。これより、最適な流路形状および流量等流体力学条件を決定し、得られた結果を上記項目(1)および(2)におけるマイクロウェルプレートとマイクロフレイディスクシステム的设计・開発にフィードバックする。

平成21年度以降：

初年度に着手したマイクロウェルプレート、マイクロフレイディスクシステムの開発を引き続き行うとともに、開発終了後直ちにマイクロフレイディスクシステムへの実装および送液実験へと移行する。

### (1)マイクロフレイディスクシステムへの実装

マイクロポンプをマイクロフレイディスクシステムとして集積化し、これにマイクロウェルスライドを実装する。

### (2) マイクロウェル内細胞培養と送液実験

開発したバイオアッセイシステムを用いて実際に培養細胞を用いた送液実験を行う。接着細胞をマイクロウェルに播種した後、Calcein AMによる生細胞染色アッセイを行う。さらに、接着細胞に対して流れ負荷実験を応用として行う。

## 4. 研究成果

本研究の中心的アイデアである新規バイオアッセイシステムの開発として、デバイスの開発および細胞培養実験により本デバイスの有効性の確認を行うことができた。具体的には、スウェーデン側と共同で開発してきた細胞培養用マイクロウェルスライドに主として日本側で開発したマイクロフレイディスクシステムを実装し、培養液や試薬を簡便にマイクロウェル内に培養した細胞に送液できるシステムの基礎を築くことができた。開発してきたマイクロ流体チップはより簡便により精度良くアレイ型チップに実装することが可能となった。流路を3本設け、LabViewにてマイクロポンプを制御する

ことにより異なる流量の試薬をそれぞれの流路に流すことに成功した。バイオアッセイシステムの概略図を図2に示す。

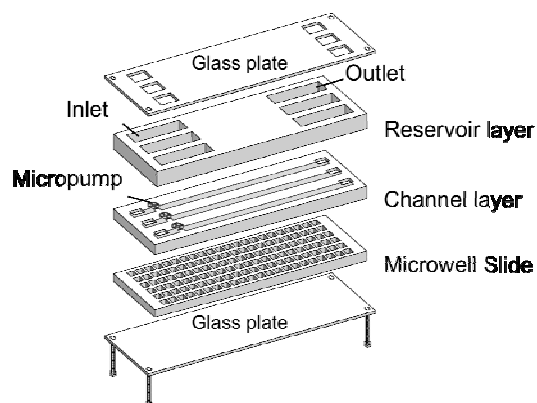


図2 開発したバイオアッセイシステムの概略図

CFDを用いてマイクロウェル内に発生する流れ場を解析した。図3に有限要素解析モデル

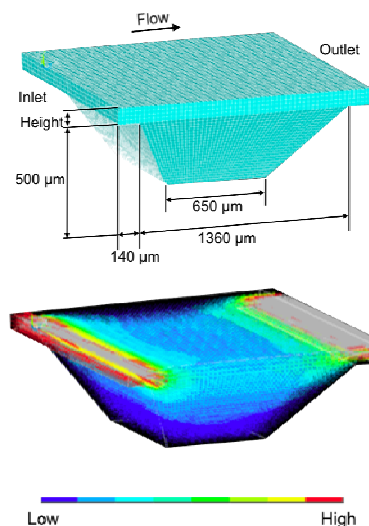


図3 マイクロウェル内の流れ場解析

ル(上図)および計算結果の一例(下図)を示す。マイクロウェル内において流れ場はマイクロポンプによる送液量により任意に制御できることがわかった。本システムの応用として、接着細胞に対する流れ負荷実験といったバイオメカニクス実験が可能である。

本システムを用いて、Calcein AMによる生細胞の染色実験を行った。用いた細胞はウシ大動脈由来血管内皮細胞である。図4にマイクロウェル内で培養された内皮細胞の明視野像(左図)および蛍光像(右図)をそれぞれ示す。生細胞は効率よく染色されている様子がわかる。

さらに、本デバイスを用いて内皮細胞の流れ負荷実験が可能であることを示した。具体的にはアレイ型チップに内皮細胞を予めコ

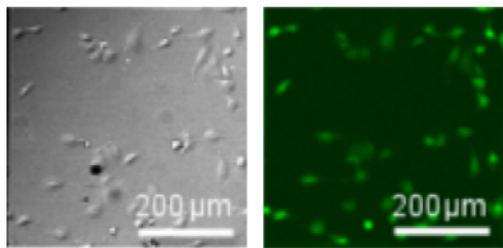


図4 内皮細胞の染色実験

シングルセル状態になるまで培養し、マイクロポンプの送液により内皮細胞に流れによるせん断応力を負荷するものである。マイクロウェル内の中央領域において内皮細胞はマクロな系で行われてきた実験結果と同様に流れの方向に伸長・配向した(図5)。

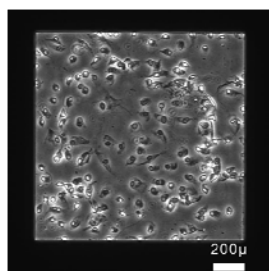


図5 流れに対する内皮細胞の配向(流れは右から左)

単一細胞診断デバイスの開発に関する研究は遺伝子診断チップやタンパク質解析チップの開発とともに国内外で盛んになりつつある。細胞診断チップは細胞の分離、検出、解析、回収といった目的の工程に応じてアレイ型チップとマイクロ流体型チップに総じて大別されており、これらの工程を一つのチップで行う一体型チップの開発は十分に進んでいないのが現状である。本研究課題では、アレイ型チップとマイクロ流体型チップを融合させ高機能なバイオアッセイシステムを開発したものであり、この点に学術的なインパクトがある。特に、従来の研究において、一つのチップ上でソーティングされた特定の細胞に特定の試薬を選択的に送液し、高度な細胞診断を行おうとするものは見られず、細胞の力学環境操作と併せて本システムのさらなる高機能化を目指している。

#### 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. Sara Lindström, Kiichiro Mori, Toshiro Ohashi, Helene Andersson-Svahn, A microwell array device with integrated microfluidic components

for enhanced single-cell analysis, Electrophoresis, 査読有 Vol. 30, pp. 4166-4171, 2009.

[学会発表] (計3件)

1. Toshiro Ohashi, Novel bioassay systems for single cells, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS2009), 2009年11月3日, Jeju, Korea

[図書] (計1件)

1. Toshiro Ohashi and Masaaki Sato: Chapter 23 Endothelial cell responses to fluid shear stress: From Methodology to Applications, in Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering, Bentham e Books, 2011 (in press).

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大橋 俊朗 (OHASHI TOSHIRO)

東北大学・大学院工学研究科・准教授 (〜2009年3月)

北海道大学・大学院工学研究院・教授 (2009年4月〜)

研究者番号: 30270812

##### (2) 研究分担者

佐藤 正明 (SATO MASAOKI) (〜2009年3月)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号: 30111371

坂元 尚哉 (SAKAMOTO NAOYA) (〜2009年3月)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 20361115

前田 英次郎 (MAEDA EIJIRO) (2010年4月〜)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 20581614