

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 11日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760618

研究課題名（和文） マイクロフルイディクスを利用した次世代型細胞アッセイチップの開発

研究課題名（英文） Development of novel cell-based assay chip using microfluidics

研究代表者

杉浦 慎治（SUGIURA SHINJI）

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

研究者番号：10399496

研究成果の概要（和文）：流体力学計算に基づいて設計されたマイクロ流路ネットワークを用いて段階希釈系列を自動的に調製し、労働集約的な濃度依存性試験を効率的に行うことのできる灌流培養マイクロチャンバーアレイチップを開発した。また、灌流培養時の酸素と栄養素の物質移動計算の結果と細胞増殖の実験結果とを比較することで、適切な酸素と栄養素の供給条件を見出し、灌流培養マイクロチャンバーアレイの設計指針を得た。

研究成果の概要（英文）：We developed a perfusion culture microchamber array chip with a serial dilution microfluidic network for analyzing drug dose response, which is required for practical drug discovery applications. We used a mathematical model of transport phenomena to investigate the concentration profile of oxygen and substances in a perfusion cell-culture microchamber array, and obtained optimal design strategy of a microfluidic perfusion culture chip.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：プロセス工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：医用化学工学

1. 研究開始当初の背景

マイクロプレートを用いた細胞アッセイ法は創薬研究の基盤技術として普及している。しかしながら、細胞アッセイにおける濃度依存性試験では、培養液中の薬剤濃度を段階希釈法によって調整するため、膨大な回数の分注・希釈といったルーチン作業を正確に繰り返す必要があり、手間と時間がかかる。

これらの作業を代行する分注ロボットも開発されているが、非常に高価な大型装置であり、小規模なラボでは人の手に頼らざるを得ない。一方、研究開発当初、マイクロ流体デバイスを用いた細胞試験ツールは、従来のハイスループットスクリーニング技術の次世代技術として将来的に創薬支援産業に普及していくと考えられていた。

このような背景のもと、申請者は細胞アッセイを効率化する「灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ」を開発した。このマイクロチップは灌流流路を通じて8種類の薬剤をマイクロチャンバー内で培養した細胞に投与でき、複数の薬剤の細胞増殖抑制能を同時並列的に解析できる。また、従来のマイクロプレートを用いた細胞アッセイに比べて1試験に使用する細胞および薬剤の量が少量で済むため、低コストで、薬剤溶液や細胞懸濁液を操作する手間が省け実験を効率化できるといった特徴を有している。

また、申請者は薬剤溶液を任意の単調減少関数に従って段階希釈し、所定の濃度系列の薬剤溶液を簡便に調製できる段階希釈マイクロ流路ネットワークを開発した。この段階希釈マイクロ流路ネットワークは、流路抵抗が数桁異なる流路によって構成される独自の設計により、(i)任意の単調減少関数に従う段階希釈系列を調製でき、(ii)段階希釈系列を広範な流量で正確に調製でき、(iii)数日間は段階希釈系列を安定に保つことができ、(iv)集積化に向けてコンパクトに収められる、といった細胞アッセイに必要な性能を満たしている。また、世界で初めて細胞アッセイに必要な6桁という広濃度範囲で段階希釈系列を生成することに成功した設計である。

2. 研究の目的

上述の背景をふまえて、本研究では「灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ」に「段階希釈マイクロ流路ネットワーク」を組み込み、薬剤毒性の濃度依存性試験を効率的に行うことのできる細胞アッセイツールを開発することを目的として研究を進めた。細胞アッセイに必要な6桁の濃度範囲で細胞毒性試験を行うことのできるチップを設計・加工し、モデル細胞と抗癌剤を用いて薬剤毒性の濃度依存性試験を実証した。また、ガス透過性のシリコン樹脂でチップを作製し、シリコン樹脂を介した拡散による酸素の供給や灌流による栄養素の供給量を推算し、細胞増殖の実験結果と比較することで、適切な酸素と栄養素の供給条件を見出し、マイクロチップの設計指針を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

マイクロチャンバーアレイチップで適切に細胞培養を行うためには、酸素や栄養素の供給が適切に行えるようにチップを設計する必要がある。マイクロチップを構成するシリコン樹脂の厚みや培養液の灌流速度を変化させることで、酸素及び栄養素の物質移動条件が細胞増殖に及ぼす影響について物質移動シミュレーションおよび実験的検討

を進め、マイクロチャンバーアレイチップの設計や操作条件に関する指針を得た。物質移動シミュレーションに基づくマイクロチャンバーの設計には有限要素法を用いた数値計算を利用した。ガス透過性のシリコン樹脂を介した拡散による酸素の供給量と、灌流による栄養素の供給量を数値計算によって推定し、細胞培養に適したシリコン樹脂の厚み、培地液深、培養液の供給流量を決定した。

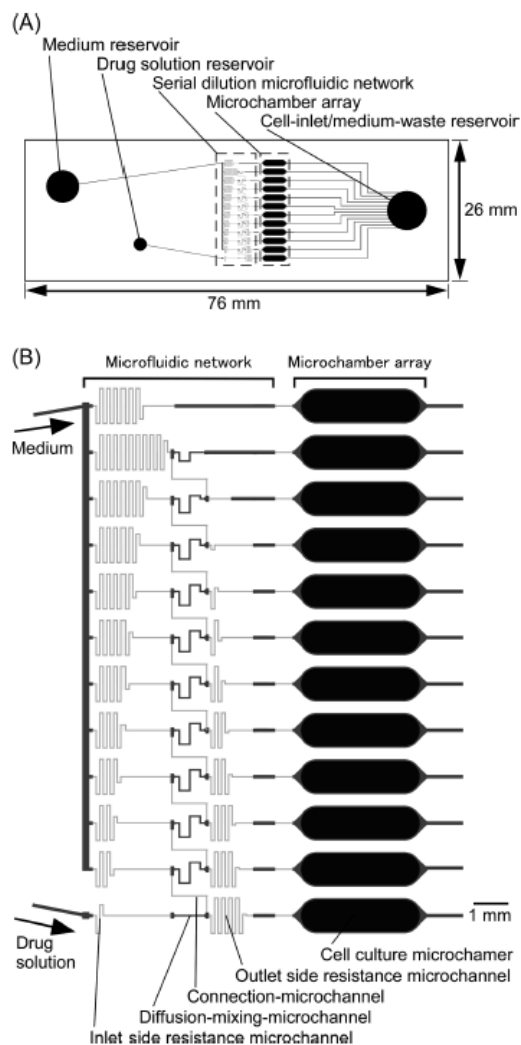


図1. 段階希釈マイクロ流路ネットワークを備えた灌流培養マイクロチャンバーアレイチップの模式図. (A)チップの全体図(B)マイクロ流路ネットワークの拡大図

段階希釈マイクロ流路ネットワークの下流に細胞を培養することのできるマイクロチャンバーアレイを加工したチップを設計した。ここでは、8段階の濃度系列で細胞毒性試験を行うチップを加工した(図1)。モデル薬剤としてPaclitaxelを用い、モデル細胞として子宮頸癌由来のHeLa細胞を用い、細胞毒性の濃度依存性試験を行った。図1に

示すマイクロチャンバーアレイチップを用いて、6桁濃度範囲のPaclitaxelの存在下で灌流培養を行い、蛍光染色して細胞増殖を評価することで、細胞増殖阻害活性 (IC_{50}) を求めた。

4. 研究成果

酸素と栄養素の供給条件の最適化という観点からマイクロチップの設計指針を得るために、灌流培養時の酸素と栄養素の物質移動計算を行った。物質移動計算に使用した灌流培養マイクロチャンバーアレイチップのモデルを図2に示す。

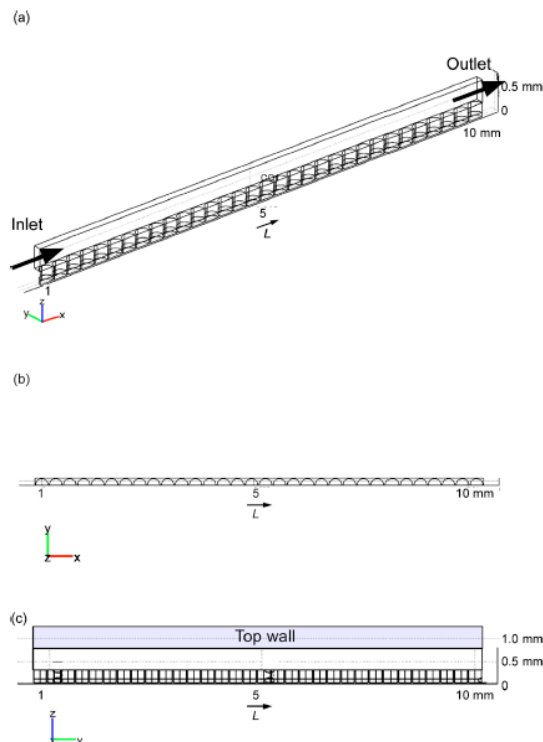


図2. 物質移動計算に使用した灌流培養マイクロチャンバーアレイチップの模式図。(A) 鳥瞰図。(B) 平面図。(C) 断面図。

図2に示した灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ内で灌流培養を行った際の酸素とグルコースの供給について計算したところ、グルコースに比べて酸素の供給がクリティカルなパラメーターとなることが確認された(図3)。また、酸素供給に関しては、培養液の灌流による酸素供給に比べて、チップ壁面の酸素透過性材料からの酸素供給が重要であることが示された。また、酸素供給に関わるパラメーターについて、灌流培養チップ壁の材質及び厚み、培養液の液深が重要であることが示された。一方、グルコース供給については培地流量と培養チャンバーの長さが重要なパラメーターであることが示された。

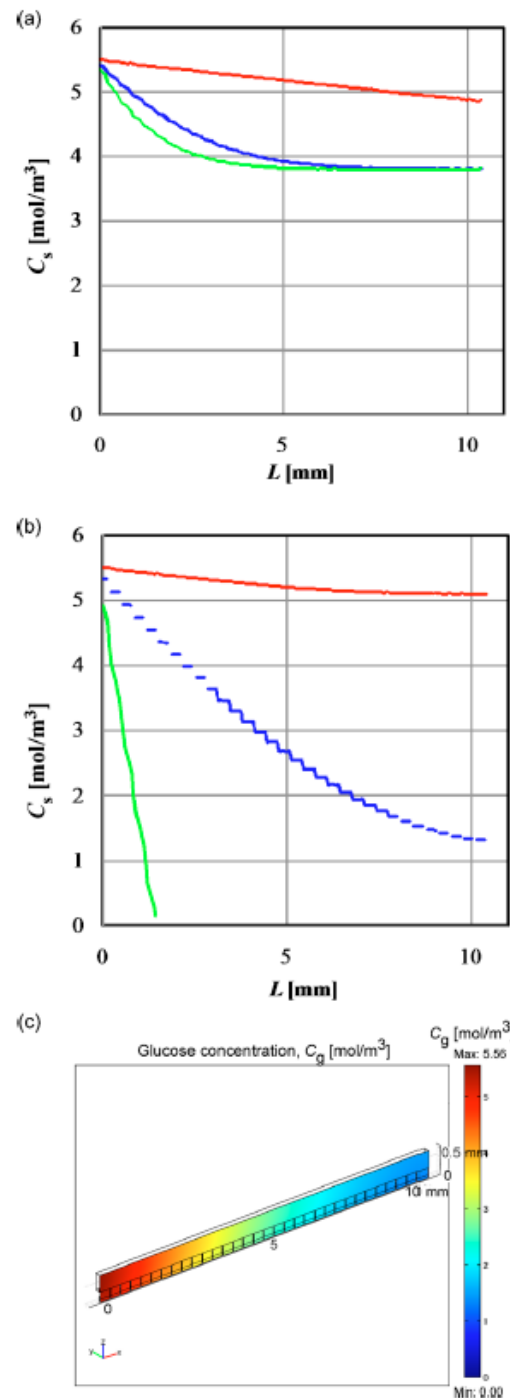


図3. 灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ内のグルコース濃度分布。(A) 灌流開始 4040 秒後の細胞表面でのグルコース濃度. 導入口の培地速度は 1×10^{-5} m/s (赤)、 1×10^{-6} m/s (青)、 1×10^{-7} m/s (緑). (B) 灌流開始後滞留時間が経過した時点での細胞表面でのグルコース濃度. 導入口の培地速度と滞留時間は 1×10^{-5} m/s および 1056 秒 (赤)、 1×10^{-6} m/s および 10560 秒 (青)、 1×10^{-7} m/s および 105600 秒 (緑). (C) 導入口の培地流速 1×10^{-6} m/s で 10560 秒経過後の x-z 平面におけるグルコース濃度プロファイル。

図1に示す段階希釈型マイクロ流路ネットワークを備えた灌流培養マイクロチャンバーアレイチップを設計・加工し、動作試験を行った。作成したマイクロチャンバーアレイチップを図2に示す。また、マイクロピペットで細胞懸濁液および薬剤溶液を導入し(図4A)、加圧により送液することで(図4B)、マイクロチップ上で細胞アッセイを簡便に行えることを確認した。段階希釈系列は6桁の濃度範囲に渡って正確に調製できることが確認され(図4C)、適切な操作条件で操作することで、各マイクロチャンバー内で良好な細胞増殖が確認された(図5)。

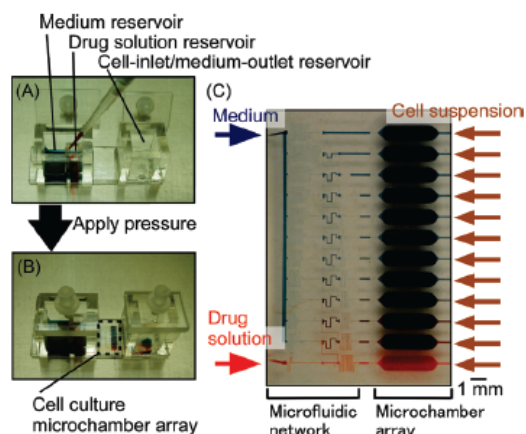


図4. 作製した灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ. (A) マイクロピペットで培養液を導入する様子. (B) 加圧により灌流培養する様子. (C) 作製された段階希釈系列.



図5. 灌流培養マイクロチャンバーアレイ内での細胞増殖

以上の予備検討の結果を踏まえて、モデル細胞 (HeLa 細胞) とモデル抗癌剤 (Paclitaxel) を用いて薬剤毒性の濃度依存性試験を実施した。細胞増殖を傾向画像解析によって評価したところ(図6A)、灌流培養マイクロチャンバーアレイチップを用いて測定された細胞増殖阻害活性 (IC_{50}) は、マイクロプレートを用いて測定された IC_{50} と同程度であり、従来の労働集約的な濃度依存性試験を1枚のマイクロチップを用いて実施可能であることを実証した(図6B)。以上の成果は灌流培養マイクロチャンバーアレイチップを次世代型細胞アッセイツールとして実現するためのマイルストーンとなるべき成果であり、分析化学の一流紙に掲載された。

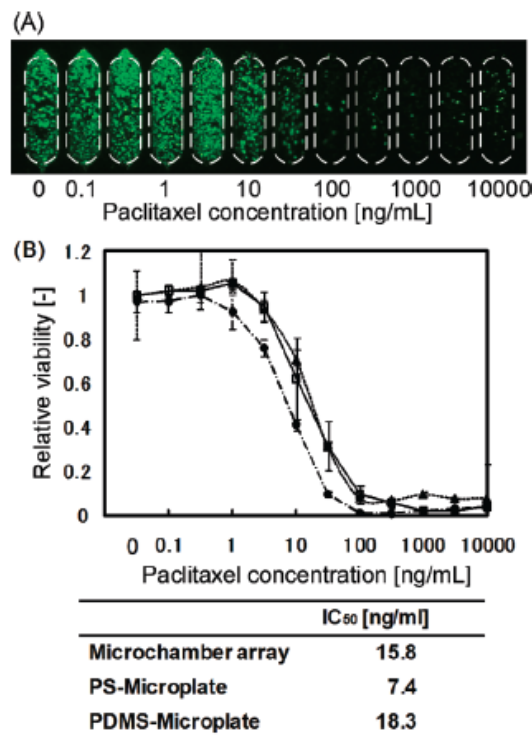


図6. 段階希釈型マイクロ流路ネットワークを備えた灌流培養マイクロチャンバーアレイチップによる細胞毒性試験. (A) 蛍光画像解析によるマイクロチャンバー内の細胞増殖評価. (B) マイクロチャンバーアレイチップとマイクロプレート(従来法)を用いた細胞毒性試験結果の比較.

以上で、当初の計画の研究を完了したが、本研究の成果をさらに発展させ、実用化に向けた方向性を見出すために、集積化細胞毒性試験チップのプロトタイプを試作・加工した。モデルチップとして、(12種類の薬剤) x (8段階の希釈系列) x (4連) = 384とおりの細胞アッセイを行うことのできるマイクロプレートサイズの灌流培養マイクロチャンバーアレイチップを設計・加工し、細胞毒性試験を集積化する際の技術的な課題の抽出を行った。このチップを用いて細胞毒性試験のモデル実験を行ったところ、微細な構造のマイクロ流路ネットワークの集積度を上げるにつれ、チップ加工の歩留まりが低下するという問題点が顕在化した。この問題点は集積化細胞毒性試験チップを実用化するために、今後解決すべき課題と考えられる。

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6件)

- ① Sugiura, S. & Kanamori, T. Comparison of substance supply in static an

perfusion cultures based on mass transport phenomena. Biochemical Engineering Journal 57, 69-74 (2011), 査読有.

DOI:10.1016/j.bej.2011.08.010

- ② Sugiura, S., Sakai, Y., Nakazawa, K. & Kanamori, T. Superior oxygen and glucose supply in perfusion cell cultures compared to static cell cultures demonstrated by simulations using the finite element method. Biomicrofluidics 5, 022202 (2011), 査読有.
DOI:10.1063/1.3589910
- ③ 杉浦慎治, 服部浩二, 金森 敏幸, マイクロチップを用いた細胞アッセイ, 化学センサ, 26-4, pp.170-175, 2010/12/01, 査読無,
<http://chemsens.electrochem.jp/journal/2010/2010-4abt.htm>
- ④ 杉浦慎治, 服部浩二, 金森敏幸, 細胞アッセイマイクロチップ, 化学装置, 52-9, pp.2-6, 2010/09/01, 査読無,
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40017264755>
- ⑤ 杉浦慎治, 服部浩二, 金森敏幸, 細胞アッセイチップ開発における化学工学, 化学工学, 74-6, pp.-294, 2010/06/01, 査読無,
<http://www.scej.org/content/view/949/13/>
- ⑥ Sugiura, S., Hattori, K. & Kanamori, T., Microfluidic Serial Dilution Cell-Based Assay for Analyzing Drug Dose Response over a Wide Concentration Range. Anal. Chem. 82, 8278-8282 (2010), 査読有.
DOI: 10.1021/ac1017666

[学会発表] (計9件)

- ① 杉浦慎治, 須丸公雄, 金森敏幸, 医薬品アッセイへの応用を目指した細胞チップ開発, 第63回日本生物工学会大会, 2011/09/28, 東京
- ② Sugiura, S., Hattori, K. & Kanamori, T., Perfusion Culture Microchamber Array Chip for High-Throughput Cell-Based, SBS 17th Annual Conference & Exhibition, 2011/03/28, Orland
- ③ 金森敏幸, 杉浦慎治, 服部浩二, 須丸公雄, 医薬品アッセイへの応用を目指した細胞チップ開発, 動物実験代替法学会第23回大会, 2010/12/05, 東京
- ④ 服部 浩二, 杉浦慎治, 藤橋政人, 黒川正也, 中野優一, 柳澤真澄, 金森敏幸, 灌流培養マイクロチャンバーアレイと

段階希釈流路網を集積化した細胞アッセイチップの開発, 第21回 化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2010/11/28, 名古屋

- ⑤ Sugiura, S., Hattori, K. & Kanamori, T., Integrated Perfusion Culture Microchamber Array Chip for High-Throughput Drug Dose Response Assay, 218th Meeting of the Electrochemical Society, 2010/10/13, Las Vegas
- ⑥ 杉浦慎治, 服部浩二, 須丸公雄, 金森敏幸, マイクロプロセスを利用した細胞マニピュレーション/アッセイシステムの開発, 化学工学会 第42回秋季大会, 2010/09/06, 京都
- ⑦ Sugiura, S., Hattori, K., Fujihashi, M., Kurokawa, M., Nakano, Y., Yanagisawa, M., & Kanamori, T., Integrated Pressure Driven Perfusion Culture Microchamber Array Chip For High-Throughput Drug Dose Response Assay, The International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM) 2010, 2010/05/28, Hong Kong
- ⑧ 杉浦慎治, 服部 浩二, 金森 敏幸, 灌流培養マイクロチャンバーアレイチップによる薬物毒性評価, 第17回 HAB 研究機構学術年会, 2010/05/22, 東京
- ⑨ Sugiura, S., Hattori, K. & Kanamori, T., Perfusion Culture Microchamber Array Chip for High Throughput Drug Dose Response Assay, SBS 16th Annual Conference & Exhibition, 2010/04/12, Phoenix

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: マイクロチップ、マスターチップ
発明者: 杉浦慎治、服部浩二、金森敏幸
権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所
種類: 特許
番号: 特願 2007-279711
出願年月日: 2007/10/26
国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: 液体導入用デバイス
発明者: 杉浦慎治、金森敏幸
権利者: 独立行政法人産業技術総合研究所
種類: 特許
番号: 特 4836272
取得年月日: 2011/10/7
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/scrc/ci/teams/drugassay/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 慎治 (SUGIURA SHINJI)

産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

研究者番号：10399496