

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350576

研究課題名(和文) マイクロ流体素子への超低温耐性・降温制御性付与と、オンチップ細胞調製への応用

研究課題名(英文) Cryopreservation-compatible microfluidic devices for on-chip cell processing

## 研究代表者

二井 信行 (Futai, Nobuyuki)

芝浦工業大学・工学部・准教授

研究者番号：10508378

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)：細胞を含んだまま凍結解凍でき、解凍後に細胞を高い確率で生存させるためのポリジメチルシロキサン(PDMS)製マイクロ流体デバイスを開発した。このマイクロ流体デバイスに細胞を播種したのち-80℃に冷却し、解凍後の生存率を評価したところ、典型的なマイクロ流路内で凍結・解凍し培養を再開した細胞はむしろ死滅する蛍光があった。この死滅の要因を把握すべくさらに鋭意検討をすすめた結果、PDMSを真空脱気処理し、マイクロ流路内に流線を剥離させずに流速を低下させて細胞の沈降を助ける凹構造を形成することで、高密度での細胞導入と迅速確実な凍結保護剤除去を両立し、流路内で凍結・解凍した細胞を生存させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a poly(dimethylsiloxane) (PDMS)-based microfluidic device stable in low temperature and successfully cryopreserves cells inside. We inoculated the device with cells, cooled off to -80 degrees Celsius, and was evaluated a survival rate after thawing. The cells frozen and thawed within microchannels tended to rather die even they were transferred to conventional culture conditions after thawing. In order to grasp a factor of this extinction, we then tried vacuum de-aeration of PDMS to reduce bubble formation in microchannels, and forming a dent structure at the middle of the microchannel to reduce flow velocity without letting a streamline exfoliate in the microchannel. It successfully increased the seeding density of the cells in the microchannels, and enabled quick removal of cryoprotective agent. By these improvements we have succeeded in cryopreservation of microfluidic devices in which cells were alive after freezing and thawing in the microchannels therein.

研究分野：生体医工学

キーワード：細胞凍結保存 マイクロ流体 線虫凍結保存

## 1. 研究開始当初の背景

原因未同定あるいは潜在的な健康問題・環境上の脅威を検出できる「細胞ベース」バイオセンサ、あるいは細胞を移植する医療（細胞医療）のニーズが近年拡大している。我々は、細胞を工学的に便利に活用することを目指し、高分子、とくにシリコン製のマイクロ流体デバイス内での長期細胞培養の可搬性の向上を、主にオンチップ CO<sub>2</sub> インキュベーションと点字デバイスによるマイクロ流体駆動によって達成している（図1）。しかし、以下の問題点が残されている：

- (1) 未使用チップの保存が困難：高分子のマイグレーション現象等により、気泡を噛み込む率が高くなる。現状では、チップ製造後即播種・培養開始を要する。
- (2) 細胞の過増殖：オンチップでの培養期間が長期化するにつれ、細胞等で流路が閉塞し、細胞による代謝で培地が劣化するなど、デバイスの機能不全の要因となるリスクが高まる。

上記問題の解決のために、それぞれ(1)細胞播種直後、(2)細胞処理完了時に、マイクロ流体チップを、その機能を維持したまま丸ごと凍結保存する必要性に思い至った。

## 2. 研究の目的

### ①超低温・急激な温度変化に対応した細胞培養マイクロ流体チップの実現

我々の開発した細胞長期培養用マイクロ流体チップ（図1）を基本に、材質・構造・加工法を再検討し、細胞の長期保存に対応できる超低温での凍結と、その後の常温までの解凍の際の急激な温度変化に耐えるものとする。チップの有する培地灌流・オンチップ雰囲気制御・光学的アクセスなどの機能は、解凍後も保持できるようにする。

### ②マイクロ流体チップの降温特性最適化による細胞の長期保存後生存率の向上

これまでに開発したマイクロ流体チップは、細胞近傍への熱伝導を調節するのに都合のよい構造をもつ（図1の細胞培養領域を囲むジャケット）。これら、熱伝導性を調節できるチップ内構造を応用し、流路内細胞の温度降下プロファイルを最適化し、一般に困難とされるチップ内の細胞の長期保存の実用性を検証する。

### ③マイクロ流体による凍結保護剤（Cryoprotective Agent: CPA）の影響の削減

マイクロ流体チップの降温特性に加えて、凍結前の流路内の細胞の物理的状態（沈降→付着→接着のどのステージにあるか）、冷却（凍結）中・加温（解凍）中のマイクロ流体操作の条件により、解凍後の細胞生存率を向

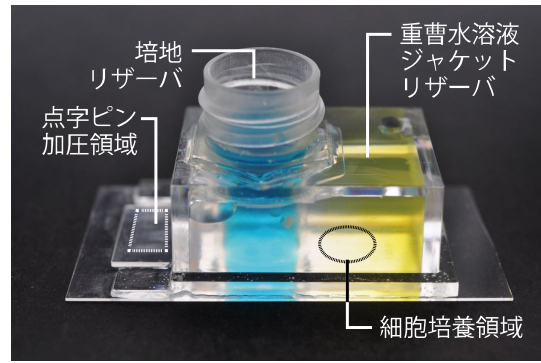


図1 オンチップ CO<sub>2</sub> インキュベーションと点字デバイスによるマイクロ流体駆動によるポータブルな長期灌流培養デバイス。

上させられるかどうかを、加えて、細胞凍結時に培地に添加する CPA の使用量と曝露時間を減少できる可能性とを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### ①ポータブル細胞維持システムの超低温凍結保存耐性の検証と問題点の解決

図1に示すマイクロ流体デバイスは、PMP 製ねじりと PMMA 製ジャケットリザーバを接着剤で接合して、凍結時または凍結後に強度が低下して離断すること、ジャケットリザーバに開口があるために液体が漏れるなどの問題があった。そこで、図2に示すように、新たにねじりを設計し、PMMA リザーバとそのねじり2個を一体化することにより、上記の問題を解決することを試みた。次いで、図2に示すデバイスのPDMS製流路部分に薄型熱電対を取付け、プログラムフリーザ内での冷却時における降温・昇温特性を評価した。

また、マイクロ流路内に培地を導入して凍結・解凍すると、流路内に気泡が生じることがあることが見いだされた。気泡が発生すると、大量の場合は細胞を死滅させ、大量でなくても、流路を詰まらせることでデバイスの機能を損なう。そこで、凍結前後において気泡を生じさせないための流路ならびに培地の満たすべき条件を探索した。

### ②PDMS 製マイクロ流体システム内の細胞の凍結保存

前項と並行して、図2に示すマイクロ流体デバイス内に、凍結保存液に懸濁した COS-7 細胞を播種し、プログラムフリーザにて-80℃まで冷却し、解凍後、凍結保存液を培地に置換して、継続して培養が可能であるかどうかを検証した。これに加えて、以上の操作をなるべく迅速かつ簡便に行えるような流路構成を検討した。具体的には、(1)マイクロ流路内の1区画に細胞を高密度に導入し、(2)凍結→

解凍後に細胞周囲の凍結保護剤を迅速に除去し、さらに、(3)マイクロ流体システム内の細胞を実際に用いる箇所に細胞を分配導入する一の3つの操作を確実に行うことが、マイクロ流体デバイス内の汎用的な細胞凍結保存プロセスに重要であると考えた。

行った実験の概略を以下に述べる。まず、図4Aに示すマイクロ流体デバイスを作製した。このデバイスは、流路中央部に、細胞凍結領域として、なめらかな断面をもつ凹構造(図4B;  $\phi 1.2\text{mm}$ , 深さ  $100\mu\text{m}$ )をもつ。これは、凍結時に細胞を内部にとどめつつ、その周囲の凍結保存液は確実に除去できることを狙ったものである。マイクロ流路内を凍結保存液(バンバンカー™)で満たし、同凍結保存液に懸濁したCOS-7細胞をラプラス圧を利用して細胞導入口より流路に導入、細胞凍結領域(凹構造)底面に沈降させた。直後にマイクロ流体デバイスをプログラムフリーザ(CS-80CP, SCINICS)にて  $20^\circ\text{C}$  から  $1\text{K}/\text{min}$  で  $-80^\circ\text{C}$  に降温し、6h 保持後取り出し、 $37^\circ\text{C}$  のサーモプレート(FTP-28190, AS ONE)上に90 s 静置して解凍した。解凍後、ラプラス圧を用いて流路内の凍結保存液を除去すると同時に細胞をマイクロ流路の末端にある細胞培養領域に移動させた。最後に、デバイス全体に培地を加え、 $\text{CO}_2$  インキュベータにて培養を開始した。

#### -③線虫を含むマイクロ流体チップの開発と凍結保存

培養細胞に加えて、嗅覚をもつ多細胞モデル生物であり、バイオセンサとしての活用も期待されている線虫(*C. elegans*)をマイクロ流体デバイス内で凍結保存可能かも検証した。

ただし、線虫は凍結保存する前に流路内に捕捉すること自体が容易でない。そこで、我々は、図3に示す、微小機械要素を用いた動的再構成可能流路を用いることで、線虫を流路内に捕捉した状態で培地を凍結保存用培地に交換し、凍結解凍後に培地に再度入れ替える操作を行った。

#### 4. 研究成果

##### -①ポータブル細胞維持システムの超低温凍結保存耐性の検証

まず、長期細胞培養用マイクロ流体チップをプログラムフリーザ内で  $-80^\circ\text{C}$  まで降温し、室温まで昇温したところ、チップの耐久性に問題がないことが確かめられた。さらに、チップ内の温度を測定し、プログラム温度と比較したところ、チップ内の実測温度は、プログラム上の温度プロファイルを常にわずかに下回っており、プログラムフリーザにおける温度表示が  $-80^\circ\text{C}$  時のデバイス内の温度は、最低  $-81.4^\circ\text{C}$  であった。これは、図2のマイクロ流体デバイスの底面のガラス基板が、プログラムフリーザの冷却面と熱的によく結合してい

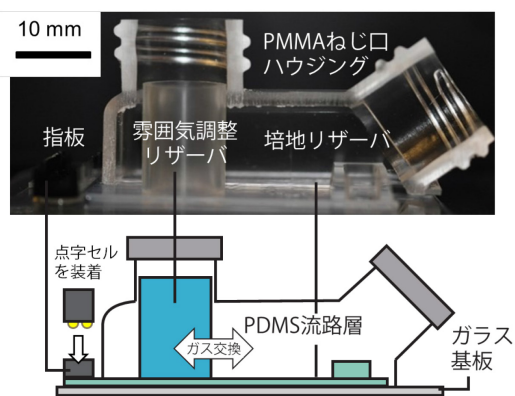


図2 凍結保存への耐性を付与したオンチップ  $\text{CO}_2$  インキュベーション対応長期灌流培養デバイス。

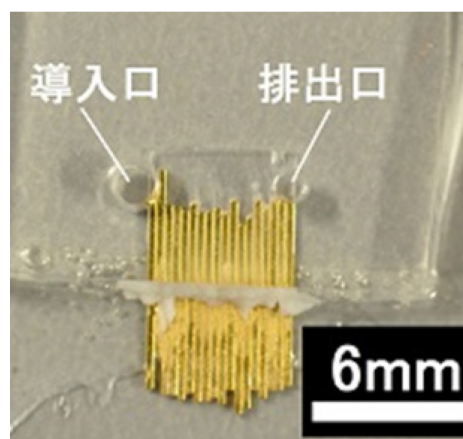


図3 線虫の流路への捕捉と凍結保存のための動的再構成可能マイクロ流体デバイス

たことによるものと考えられる。この程度の温度差は細胞の凍結保存の成否には影響ないと考えられる。

また、凍結解凍後に流路に気泡が残らないためには、系内の総培地量を数  $100\mu\text{l}$  以上にする、流路層どうしのプラズマ接合の強度を増す工夫をする、流路を短く(目安として長さ  $5\text{cm}$  以内)にする、凍結以前に培養を継続する、細胞導入前にデバイス全体を真空脱気する、ということが有効であることが確かめられた。なお、これらの方法がなぜ気泡の生成や成長を抑制するかについては、凍結中の気泡の発生や成長を妨げる作用があると思われるものの、明らかにはしなかった。このことを検証するためには、凍結中の流路内における気泡の成長をモニタするなどのセットアップが必要になると思われる。

以上2点により、マイクロ流体細胞培養デバイスに凍結耐性を与えるための条件は確立したといえる。

##### -②PDMS 製マイクロ流体システム内の細胞の凍結保存



図4 A,B に示した PDMS 製マイクロ流体デバイスの細胞培養領域にて凍結保存した COS-7 細胞を. 流路末端の細胞培養領域に移動させて培養した結果を図4 C,D に示す. 少なくとも1日間の生存と倍加時間 約36hの増殖を確認した.

本実験により, マイクロ流路内に, 流線を剥離させずに流速を低下させて細胞の沈降を助ける凹構造を形成し, そこで細胞を凍結した後に, 別に設けた細胞培養領域に移動するという方式をとることにより, 高密度での細胞導入と迅速確実な凍結保護剤除去を両立できる可能性が見いだされた. さらに生存率の向上と, 当初の目的であったオンチップ長期培養との両立は今後の課題である.

### -③線虫を含むマイクロ流体チップの開発と凍結保存

まず, 線虫用の凍結保存液を導入し凍結中の動的再構成可能マイクロ流体デバイス内部の温度を測定し, クライオバイアルにおけるそれと比較したところ, マイクロ流路においても内部の液体は過冷却を生じ, クライオバイアルに近い冷却特性であることを見出した.

また, この流路に線虫を導入し, 解凍直後に流路内で運動を観察した結果, 50 体中 13 体(約 25%)が運動を示した. なお, クライオバイアルにて凍結解凍し, ディッシュに移した後に運動を観察できた個体は, 全体の約 50%であった.

運動を観察できた個体の率が減少した理由として, マイクロ流路とクライオバイアルの凍結特性の差があるという結論は得られなかった. その理由として, そもそも線虫は液体培地等の高い流動性のあるところでは走化性による運動を観察しにくいという点が挙げられる. また, オンチップで走化性を観察できることが, 実は線虫をバイオセンサとして活用するために重要なことであるという認識も得られた.

まとめると, マイクロ流体デバイス内で凍結解凍した線虫の走化性を確実に検証するには至らなかったものの, 線虫を流路内部に捕捉し, 凍結し, 線虫の生存を確認できた. 走化性をオンチップで評価するためには, 寒天培地に匹敵する足場を有するマイクロ流路が必要となると考えられる.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計5件)

- ① 高野温, 中嶋宏樹, Arthur Diniz Flor Torquato Fernandes, 田中真人, 二井信行, 細胞培養用マイクロ流体デバイスの凍結保存, 第 61 回低温生物工学会大会, 2016/6/25, 東京電機大学 (埼玉県比企郡鳩山町).
- ② 芦野祐樹, 中嶋宏樹, 高野温, 二井信行. 細胞培養用マイクロ流体デバイスの凍結保存, 生体医工学シンポジウム 2015,

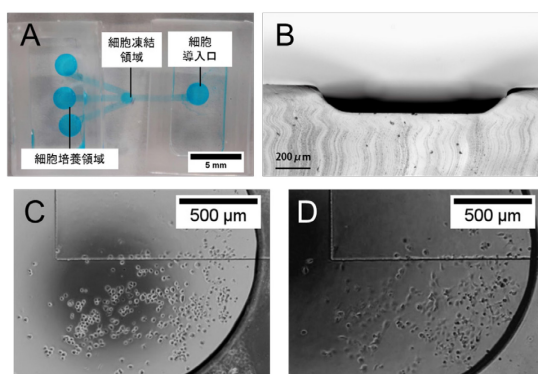


図4 細胞の凍結保存に適したマイクロ流路. A)上面写真と各部の名称. B)細胞凍結領域の底面の断面写真. C)細胞凍結領域にて-80℃にて6h凍結後, 解凍し, 流体操作にて細胞培養領域に移動させた COS-7細胞, D)C)で示した細胞の6h培養後

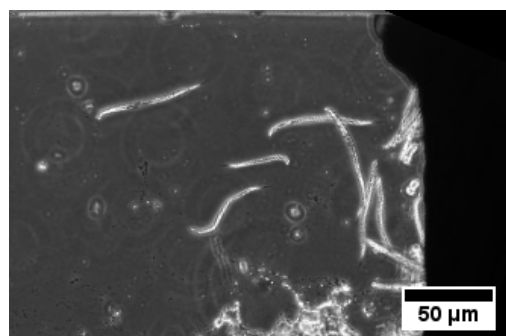


図5 動的再構成可能マイクロ流体デバイス (図3) 内でピンにより捕捉, 凍結, 解凍された線虫 *C. elegans*.

2015/9/25, 岡山国際交流センター (岡山県岡山市).

- ③ 栗津雄介, 秋永悠登, 二井信行, マイクロ流体デバイス内の線虫の長期凍結保存, 生体医工学シンポジウム 2014, 2015/9/26, 東京農工大学 (東京都小金井市).
- ④ 町田浩志, 松永仁来, 林正和, 村勢則郎, 二井信行, 濃度勾配生成用マイクロ流体チップへの線虫の導入と凍結保存, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, 2013/12/5, イーグレ姫路 (兵庫県姫路市).
- ⑤ 後藤雅和, 三浦陽紀, 高野温, 田中真人, 二井信行, 長期細胞培養用マイクロ流体チップの培養中凍結保存, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, 2013/12/5, イーグレ姫路 (兵庫県姫路市).

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

二井 信行 (FUTAI, Nobuyuki)  
 芝浦工業大学・工学部・准教授  
 研究者番号: 10508378