

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300157

研究課題名(和文)ハイスループット細胞培養実験のためのマイクロウェル基盤MEMSデバイスの開発

研究課題名(英文)Development of MEMS Devices with Microwell Slide for High Throughput Analysis of Cell Culture Experiment

研究代表者

大橋 俊朗(Ohashi, Toshiro)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30270812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、細胞物理環境計測・制御がマイクロメートルスケールの空間で実現できるMEMSデバイスを開発した。具体的には、細胞力学応答実験、細胞薬剤感度試験、細胞遊走性実験が可能なMEMSデバイスである。細胞流れ負荷実験デバイスにおいては、異なる流れせん断応力を血管内皮細胞に負荷することにより細胞流れ負荷実験が可能であること、細胞薬剤感度実験デバイスにおいては異なる濃度のサポニンを用いて内皮細胞に投与することにより薬剤濃度に対する感度実験が可能であること、細胞遊走実験デバイスにおいては繊維芽細胞の遊走時の牽引力ダイナミクスを計測することにより細胞遊走のメカニズムを力学的に検討できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this project, MEMS devices that allow to realize measurements and control of physical environment of cells were developed. The developed MEMS devices are for experiments of cell responses to mechanical environment, cell responses to chemical environment and cell migration. For the experiment of cell mechanical responses, it was confirmed to apply different level of fluid shear stress to endothelial cells cultured in a microwell to perform flow experiments. For the experiment of cell chemical responses, it was confirmed to apply different concentration of Saponin solution to endothelial cells to perform live/dead cell assay. For cell migration assay, mechanical characterization of fibroblast migration could be performed by using a micropillar array.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：細胞培養実験 マイクロウェルスライド 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

従来行われてきた細胞に関する実験技術は、細胞生化学実験から細胞バイオメカニクス実験に至るまで幅広く含んでいる。その多くはミリメートルスケールの培養空間で行われており細胞スケールに対して大きな培養空間のため、高価な細胞試料や試薬等を多量に必要とし実験費用は高価になる。また、ミリメートル空間では細胞集団に対して平均的な評価を行うものであるが、近年、同一種の細胞内でも構造、増殖能、遊走性、タンパク質の発現などに高い不均質性があることが知られており (Aird, *Critical Care Medicine*, 2003), よりハイスループット (高精度・高効率) な細胞計測・制御のためには、単一細胞レベルにより近い空間スケールにおける実験技術の開発すなわちマイクロメートル空間における実験技術の確立が望ましい。

例えば、ガン患者において細胞の不均質性は腫瘍細胞の活動性の過小評価や治療方法の失敗を招く主な原因として長い間認知されてきた。また、腫瘍細胞診断において薬剤感度実験を行う場合、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方法が行われているが、試験は高価であることや成功率が低い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実験技術の開発が求められている。そこで研究代表者らは、少数の細胞数、少量の試薬量で細胞実験が可能な新しいデバイスを研究協力者 (海外共同研究者) の Prof. Helene Andersson-Svahn (Royal Institute of Technology, Sweden) らと開発してきた。これまでにマイクロウェル (細胞培養面 650  $\mu\text{m}$  x 650  $\mu\text{m}$ ) を有するマイクロウェルスライド (Lindström, Andersson-Svahn, et al., *Electrophoresis*, 2008) を基盤要素とし (図 1(a)), MEMS 技術によるマイクロチャネル (微小流路) を実装することによりマイクロウェル内の細胞へ培養液や試薬を送液する基盤技術の確立することができた (Lindström, Ohashi, Andersson-Svahn, et al., *Electrophoresis*, 2009) (図 1(b))。これ

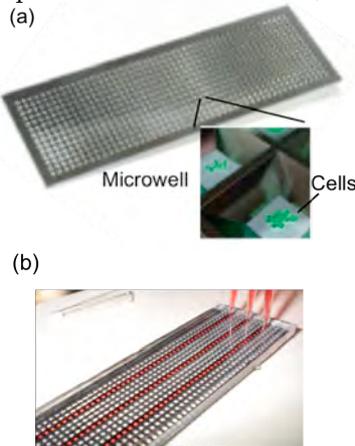


図 1 (a)マイクロウェルスライドと細胞培養。(b)培養液送液の様子。

により、細胞培養空間は従来の細胞培養ディッシュで必要であった数 ml から 500 nl へと 1/10,000 に減少した。国内外において、微小空間における細胞培養実験を目指したデバイス開発は近年盛んになってきているが、それらの多くはアレイ型デバイス (例えば Fukuda, et al., *Nano Biotech*, 2005) あるいはマイクロ流体型デバイス (例えば Heo, et al., *Anal Biochem*, 2007) のどちらかの開発に重心が置かれており、研究代表者らが開発してきたようにアレイ型デバイスをマイクロ流体型デバイスに実装して高機能化を図ったものではない。

一方、細胞バイオメカニクス基盤技術として細胞の力学環境の計測・制御を行うデバイスの開発は国内外で盛んに行われている。例えば、細胞力学応答実験 (例えば Mott and Helmke, *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007) や細胞遊走実験 (例えば Ghibaudo et al., *Biophys J*, 2009) は欧米、日本の研究者が成果を競っているが、従来の多くはミリメートル空間において細胞培養実験を行っており、MEMS 技術を用いたデバイスの小型化に近年注目が集まってきている。この潮流は、毎年開催されている BMES (Biomedical Engineering Society) Annual Meeting や International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (通称  $\mu\text{TAS}$ ) の活況を見ると明らかである。

研究代表者は、これまでに血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、軟骨細胞などを対象とした細胞バイオメカニクス実験を精力的に行い、欧米誌を中心に研究成果を報告してきた (例えば Ohashi, et al., *J Biomech*, 2007; Ohashi et al., *JBSE*, 2010)。特に内皮細胞の力学応答計測デバイスの現状については近年レビュー誌を刊行した (Ohashi and Sato, *Bentham Science Publishers Ltd.*, 2011)。また、研究代表者は研究協力者 (海外共同研究者) の Prof. Justin Cooper-White (The University of Melbourne, Australia) らが開発した細胞遊走デバイス (Doran, Cooper-White, et al., *Lab Chip*, 2009) に研究代表者の有する細胞牽引力計測技術を融合させることで細胞遊走解析の革新的デバイスが創出できるとの認識に達し共同研究に着手している。

以上の背景から、上記 2 名の海外共同研究者の参画の下、研究代表者らが開発してきたマイクロウェルスライドを基盤とし、マイクロメートル空間における細胞力学応答実験、細胞薬剤感度試験、細胞遊走性実験が実現できる多種多様な MEMS デバイスの開発が可能であると着想し本研究課題の申請に至った。

### 2. 研究の目的

従来の細胞の力学応答解析あるいは薬剤感度試験はミリメートルスケールの培養空間の中で行われてきたものが大勢であり、高

価な細胞試料や試薬類などの多量使用の問題はもちろんのこと細胞の不均質性の評価など個々の細胞を詳細に解析するには細胞培養空間スケールと細胞寸法スケールに大きな隔りがあり最適な実験環境とは言えない。そこで本研究の目的は、研究代表者らが開発してきた MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) デバイス技術をさらに深化させ、細胞物理環境計測・制御がマイクロメートルスケールの空間で実現できる多種多様な MEMS デバイスを開発することである。具体的には、細胞力学応答実験、細胞薬剤感度試験、細胞遊走性実験が可能な MEMS デバイスファミリーを開発する。以上の技術開発がマイクロメートル空間における次世代の細胞培養実験技術の標準化に資することを旨とするものである。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、研究代表者らが開発してきたマイクロメートル空間で細胞培養実験が可能なマイクロウェルスライドを基盤要素として、細胞流れ負荷実験、細胞薬剤感度実験、細胞遊走実験が実現できる新しい MEMS デバイスを開発することである。細胞流れ負荷実験デバイスでは、任意の流れ負荷が可能なマイクロチャンネルをマイクロウェルスライドに実装する。細胞薬剤感度実験デバイスでは、任意の濃度の薬剤刺激負荷が可能なマイクロチャンネルをマイクロウェルスライドに実装する。細胞遊走実験デバイスでは、遊走時に細胞底面に働く力を計測するためにマイクロピラー技術をマイクロウェルスライドに実装する。本研究課題で開発する MEMS デバイスの一覧を図 2 に示す。以下に平成 24 年度および 25 年度以降の研究計画を示す。

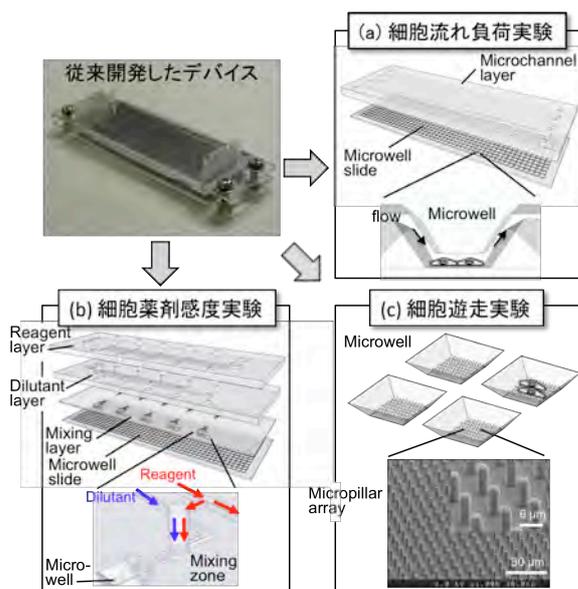


図 2 左上図：従来開発したデバイス。(a) 細胞流れ負荷実験、(b) 細胞薬剤感度実験、(c) 細胞遊走実験の各種デバイス。

### 【平成 24 年度】

#### (1) 細胞流れ負荷実験デバイスの開発

前述したマイクロウェルスライド(図 1(a))は、25 mm x 75 mm (厚さ 500 μm) のシリコンウエハ内に 14 x 48 = 672 個のマイクロウェルを有する。各マイクロウェルの上面開口部と底面開口部の寸法はそれぞれ 1,350 μm x 1,350 μm, 650 μm x 650 μm であり容積は 500 nl である。シリコンウエハ底面にはスライドガラスが貼り付けてあり、底面開口部において細胞培養と顕微鏡観察が可能である。これまでに開発したデバイスの写真を示す(図 2 左上図)。本デバイスは主としてマイクロウェルスライドおよび試薬送液のための PDMS (Polydimethylsiloxane) 製のマイクロチャンネル層の 2 層から構成される。この 2 層はプラズマ接合により接合させ、inlet と outlet を設けて流路の入口と出口を確保している。本研究項目ではマイクロウェル内底面に培養した細胞に任意の流れを負荷できるようにマイクロチャンネル層を加工するものである(図 2(a))。実験で扱う対象細胞は血管内皮細胞である。内皮細胞の流れ負荷応答は動脈硬化症との関連で盛んに研究が行われている。

##### ① マイクロチャンネル層の作製

マイクロウェル内底面に培養した細胞に層流を負荷するために、CFD (Computer Fluid Dynamics) による流体解析を行い細胞周囲の流れ場を詳細に把握した後、PDMS マイクロチャンネル層の流路形状を決定する。計算で得られた形状のシリコン鋳型を MEMS 技術により作製した後、PDMS で型取りすることによりマイクロチャンネル層を作製する。

##### ② 細胞流れ負荷実験

マイクロウェルスライドとマイクロチャンネル層をプラズマ処理により接合させ、inlet をダイヤフラム式のマイクロポンプ(mp6, Bartels, Germany)に接続する。培養液および試薬の送液にはマイクロポンプを用いる。マイクロポンプは A/D 変換器を介してコンピュータ上に搭載したプログラムソフト LabVIEW により自動制御を行う。内皮細胞をマイクロウェル内に予め培養しておき、任意の流れ(せん断応力 0~20 Pa)を負荷し構造変化など細胞応答を観察する。

#### (2) 細胞薬剤感度実験デバイスの開発

本研究項目では、マイクロウェル内底面に培養した細胞に任意の濃度の試薬を負荷できるようにマイクロチャンネル層を積層化するものである(図 2(b))。実験で扱う対象細胞は腫瘍細胞である。腫瘍細胞診断において腫瘍マーカーを用いた薬剤感度実験の効率化が求められている。

##### ① マイクロチャンネル層の作製

異なる濃度の試薬を自動的に生成するため、試薬層(Reagent layer)、希釈液層(Dilutant layer)および混合層(Mixing layer)より構成される 3 層のマイクロチャンネル層を作製する。この 3 層は立体的に流路を

形成して接続しており、試薬層および希釈液層から混合層に任意の割合の液が流入し混合層内で攪拌されマイクロウェル内に流入するものである。試薬層、希釈液層において inlet から混合するまでのマイクロチャネルの幅と距離は異なるため、予め計算により所望の混合比の下でマイクロチャネルの形状を決定することができる。その後、前述と同様に計算で得られた形状のシリコン鋳型を MEMS 技術により作製した後、PDMS で型取りすることによりマイクロチャネル層を作製する。第一段階として混合層には 8 つの混合チャンバを設ける。試薬と希釈液の混合の様子は CFD 流体・拡散解析により最適な混合チャンバ形状を求める。

#### ② 細胞薬剤感度実験

マイクロウェルスライドとマイクロチャネル層をプラズマ処理により接合させ、前述と同様に inlet をダイヤフラム式のマイクロポンプに接続した後、試薬（腫瘍マーカー）および希釈液をマイクロポンプにより送液する。腫瘍細胞をマイクロウェル内に予め培養しておき、任意の濃度の試薬（濃度比 1～10,000 倍）を負荷し細胞病理状態をタンパク質発現観察など生化学的に診断する。

#### (3) 細胞遊走実験デバイスの開発

細胞遊走は組織の修復や再生などの恒常性の維持に関わる細胞の基本的な機能であり、がんの発生や転移など様々な疾患の発達や治療においても重要な役割を果たす。本研究項目では、マイクロウェル内底面に培養した細胞の遊走を観察し、遊走時の底面の力学場を推定することにより細胞遊走メカニズムの理解を深めるものである。マイクロウェルプレートの底面に細胞牽引力計測用のマイクロピラー（微小な弾性列柱）アレイを組み込む（図 2(c)）(Tan et al., PNAS, 2003; Ohashi et al., JBSE, 2010)。マイクロピラーは直径 3  $\mu\text{m}$ 、高さ 10  $\mu\text{m}$ 、中心間距離 8  $\mu\text{m}$  の PDMS 製である。細胞をマイクロピラー上に培養すると細胞は牽引力（接着時に基質に対して発生する力）を発生し基質に接着する。このときマイクロピラーをたわませるため、マイクロピラーのたわみを計測することで牽引力を推定することができる。細胞遊走は細胞と細胞外基質間における力の相互作用であるので、細胞底面に発生する力学場計測により細胞遊走の力学的メカニズムを考察する。実験で扱う対象細胞は繊維芽細胞である。

#### ① マイクロピラー基質の作製

MEMS 技術によりシリコン鋳型を作製した後、PDMS で型取りすることによりマイクロピラーアレイを作製する。マイクロピラーアレイは、マイクロウェルスライドの底面に貼り付けるスライドガラス表面に予め実装しておく。

#### ② 細胞遊走実験

繊維芽細胞をマイクロウェル内に予め培養しておき、細胞遊走時における牽引力ダイ

ナミクスを計測する。上記 1 や 2 で提案する、細胞流れ負荷実験や細胞薬剤感度実験と組み合わせることで流れ存在下あるいは薬剤投与下といった高機能な細胞遊走実験が可能である。

【平成 25 年度以降】初年度の継続項目以外の項目について以下に示す。

#### (1) 細胞流れ負荷実験デバイスの開発

##### ① 画像自動取得システムの構築

初年度に引き続き細胞培養実験を継続する。特に、異なる流れせん断応力に対する細胞応答観察を自動的に効率よく行うため、電動顕微鏡ステージをソフトウェアにより駆動させ実験後に自動的に各マイクロウェルに位置合わせを行いながら画像を取得するシステムを構築する。

##### ② 細胞外基質の影響実験

細胞外基質が内皮細胞の流れ負荷応答に与える影響として、フィブロネクチン、ヴィトロネクチン、コラーゲン等の細胞外基質をマイクロウェル底面に塗布した後、細胞流れ負荷実験を行う。

#### (2) 細胞薬剤感度実験デバイスの開発

##### ① 混合チャンバ数の拡張

初年度のデバイスをさらに拡張し、混合チャンバ数を 20 として細胞培養実験を行う。マイクロチャネルを 2 系統設けることで 2 種類の試薬に対して 10 種類の濃度の薬剤感度実験を行う。

##### (3) 細胞遊走実験デバイスの開発

##### ① マイクロピラー形状の変更

マイクロピラーの寸法（面積）や形状（円形から楕円形へ）を変更することにより細胞遊走性に与える影響を検討する。

##### ② 細胞外基質の影響実験

細胞外基質が繊維芽細胞の遊走性に与える影響として、フィブロネクチン、ヴィトロネクチン、コラーゲン等の細胞外基質をマイクロピラー上に塗布した後、細胞遊走実験を行う。

#### 4. 研究成果

初年度は、細胞力学応答実験としてマイクロウェル内底面に培養した内皮細胞に任意の流れを負荷できるようマイクロチャネル層を加工し、マイクロウェルスライドと接合させて流路を形成した。流れ負荷を与えることにより内皮細胞の形態変化が観察できることを確認した。また細胞薬剤感度試験として、マイクロウェル内底面に培養した細胞に任意の濃度の試薬を負荷できるよう試薬層、希釈液層および混合層より構成される 3 層のマイクロチャネル層を積層化し、本デバイスの有効性を薬剤投与細胞実験により確認した。さらに細胞遊走性実験として、細胞牽引力計測用のマイクロピラーをマイクロチャネル底面に組み込み、細胞遊走時における細胞牽引力の経時応答を観察できるデバイスを開発した。

次年度以降は、開発を進めてきた細胞流れ

負荷実験デバイスの開発, 細胞薬剤感度実験デバイスの開発, 細胞遊走実験デバイスの開発において, デバイスの改良を継続するとともに, 前年度に引き続き細胞培養実験を継続し本デバイスの有効性を確認した. その結果, 細胞流れ負荷実験デバイスにおいては, 異なる流れせん断応力を血管内皮細胞に負荷することにより細胞流れ負荷実験が可能であること (図 3), 細胞薬剤感度実験デバイスにおいては異なる濃度のサポニンを用いて内皮細胞に投与することにより薬剤濃度に対する感度実験が可能であること (図 4), 細胞遊走実験デバイスにおいては繊維芽細胞の遊走時の牽引力ダイナミクスを計測することにより細胞遊走のメカニズムを力学的に検討できることを確認した (図 5).

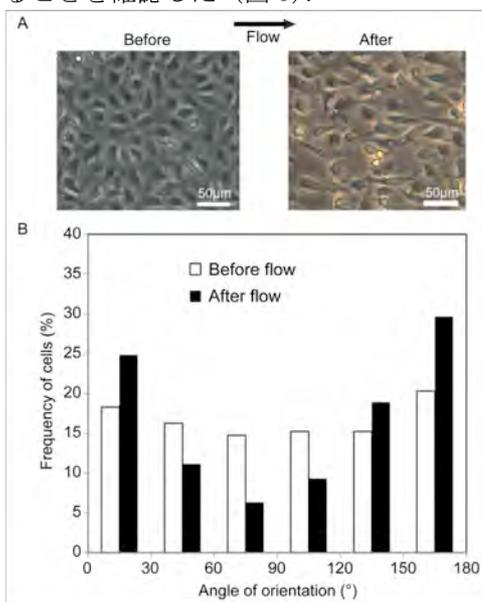


図 3 (A)流れによる内皮細胞の形態変化. (B)流れによる内皮細胞の配向角変化.

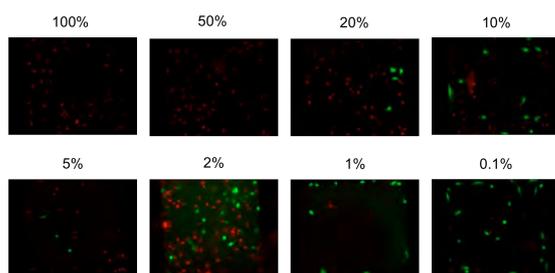


図 4 異なる濃度のサポニンに対する内皮細胞の生死アッセイ.

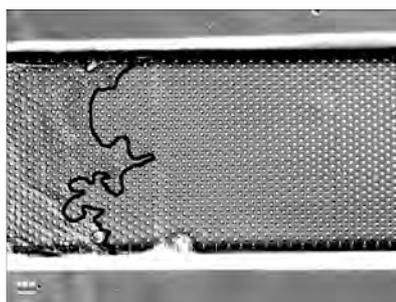


図 5 マイクロピラー上の繊維芽細胞の遊走.

## 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 2 件)

1. E. Weibull, S. Matsui, H. Andersson-Svahn, T. Ohashi: A microfluidic device towards shear stress analysis of clonal expanded endothelial cells, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol. 9, No. 1, pp. JBSE0006, 2014 DOI: 10.1299/jbse.2014jbse000X (査読有)
2. E. Weibull, S. Matsui, M. Sakai, H. Andersson-Svahn, T. Ohashi, Microfluidic device for generating a stepwise concentration gradient on a microwell slide for cell analysis, *Biomicrofluidics*, Vol.7, Issue 6, 064115-1-064115-12, 2013 (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

1. T. Ohashi, Bio-MEMS Devices for Mechanical Characterization of Cells, International BioMedical Engineering Conference, 2014 年 11 月 20 日~2014 年 11 月 22 日, Gwangju (Korea)
2. 大橋 俊朗, 細胞物理環境の制御および計測実験のためのバイオ MEMS デバイスの開発, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 30 回研究会, 2014 年 10 月 02 日, 北海道大学(札幌市)
3. T. Ohashi, Development of Bio-MEMS Devices for Cell Culture Study, The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanic, 2014 年 09 月 01 日~2014 年 09 月 04 日, 志摩観光ホテル (志摩市)
4. T. Ohashi, C. Shaoyi, J. Cooper-White, Traction Force Microscopy-Based Mechanical Characterization of Cell Migration Using Microchannel Device, 7th World Congress of Biomechanics, 7th World Congress of Biomechanics, 2014 年 07 月 06 日~2014 年 07 月 11 日, Boston (USA)
5. 大橋 俊朗, マイクロデバイスを用いた細胞バイオメカニクス解析, 数学・数理科学と諸科学・産業との協働によるイノベーション創出のための研究推進プログラム, 2014 年 02 月 26 日~2014 年 02 月 28 日, 明治大学(東京)
6. T. Ohashi, E. Weibull, A. Matsui, M. Sakai, H. Andersson-Svahn, A Microfluidic Device for Stepwise Concentration Generation on a Microwell Slide for Cytotoxic Assay, The 15th International Conference on Biomedical Engineering, 2013 年 12 月 04 日~2013 年 12 月 07 日, National University of Singapore (Singapore)
7. 大橋 俊朗, 菅原 章人, J. Cooper-White, マルチチャネルデバイスを用いた細胞遊走観察と牽引力計測, 日本機械学会 M&M2013 材料力学カンファレンス, 2013 年 10 月 11 日~2013 年 10 月 14 日, 岐阜大学 (岐阜市)

8. T. Ohashi, Microdevices for Mechanical Characterization and Mechanical Responses of Cells, International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, 2013年09月28日～2013年09月30日, 東北大学(仙台市)
9. 大橋 俊朗, 菅原 章人, Justin Cooper-White, マイクロチャネルデバイスを用いた細胞遊走観察と牽引力計測, 日本機械学会2013年度年次大会, 2013年09月09日～2013年09月11日, 岡山大学(岡山市)
10. T. Ohashi, E. Weibull, A. Matsui, M. Sakai, H. Andersson-Svahn, A Microfluidic Device Generating Stepwise Concentrations Using a Microwell Slide for High-Throughput Cell Analysis, 7th Asian Pacific Conference on Biomechanics, 2013年08月29日～2013年08月31日, KIST (Korea)
11. T. Ohashi, A. Sugawara, Traction Force Measurement During Collective Cell Migration Measured by Multichannel Micropillar Device, ASME 2013 11th International Conference on Nanochannels, Microchannels, and Minichannels, 2013年06月16日～2013年06月19日, 北海道大学(札幌市)
12. 大橋 俊朗, 菅原 章人, J. Cooper-White, マイクロチャネルデバイスを用いた細胞遊走時の牽引力計測, 第36回日本バイオロロジー学会年会, 2013年06月06日～2013年06月08日, 九州大学西新プラザ(福岡市)

## 6. 研究組織

### (1)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

### (2)研究分担者

前田 英次郎 (MAEDA, Eijiro)  
北海道大学・大学院工学研究院・助教  
研究者番号：20581614

### (3)研究協力者

Prof. Helene Andersson-Svahn (Royal Institute of Technology, Sweden)  
Prof. Justin Cooper-White (The University of Melbourne, Australia)