

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	接着性細胞を用いた細胞特異的結合分子探索のためのマイクロ流路デバイス開発
Title(English)	
著者(和文)	神永真帆
Author(English)	Maho Kaminaga
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11185号, 授与年月日:2019年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小俣 透,近藤 科江,初澤 毅,柳田 保子,八木 透,石田 忠
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11185号, Conferred date:2019/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

平成 30 年度 学位論文要約

接着性細胞を用いた
細胞特異的結合分子探索のための
マイクロ流路デバイス開発
要約版

東京工業大学 工学院 機械系

ライフエンジニアリングコース

氏名	神永 真帆
提出日	2019 年 02 月 27 日
指導教員	小俣 透 教授 石田 忠 准教授

目次

第1章	序論.....	1
1.1.	医薬品開発における細胞特異的結合分子の利用.....	1
1.2.	細胞特異的結合分子の探索.....	2
1.2.1.	<i>in vitro</i> 探索.....	2
1.2.2.	細胞を標的とした細胞特異的結合分子の探索.....	2
1.2.3.	細胞を用いた探索の課題.....	3
1.3.	マイクロ流路技術を用いた探索.....	4
1.3.1.	マイクロ流路デバイスにおける細胞の固定方法.....	5
1.3.2.	細胞を接着によって固定する探索用マイクロ流路デバイスの先行研究.....	5
1.3.3.	磁気ビーズを用いて細胞を固定する探索用マイクロ流路デバイスの先行研究.....	6
1.3.4.	細胞固定方法の異なる探索用マイクロ流路デバイスの先行研究の比較.....	7
1.4.	研究目的.....	8
1.5.	論文の構成.....	9
第2章	細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの概念設計.....	11
2.1.	細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイス.....	11
2.2.	本研究において開発するマイクロ流路デバイスの概要.....	11
2.2.1.	細胞チャンバ.....	11
2.2.2.	細胞の均一分散.....	12
2.2.3.	探索ステップ実現のための切り替えバルブ.....	13
2.3.	まとめ.....	17
第3章	細胞均一播種のためのMPAの開発.....	18
3.1.	細胞均一播種のためのMPA.....	18
3.1.1.	原理.....	18
3.1.2.	設計.....	20
3.2.	細胞均一播種デバイスの作製.....	21
3.2.1.	細胞均一播種デバイスの作製プロセス.....	21
3.2.2.	完成した細胞均一播種デバイス.....	23
3.3.	MPAの特性評価.....	23
3.3.1.	実験系.....	23
3.3.2.	MPAでの細胞の流れ.....	24
3.3.3.	MPAによる細胞の均一播種.....	24
3.4.	まとめ.....	25

第4章	流路切り替えのための空圧バルブの開発	26
4.1.	流路切り替えのための平行四辺形断面空圧バルブの開発	26
4.1.1.	バルブ形式の選択	26
4.1.2.	平行四辺形流路断面バルブの提案	27
4.1.3.	平行四辺形断面空圧バルブの設計	28
4.1.4.	傾斜露光における傾斜角と実際の角度	29
4.1.5.	平行四辺形断面空圧バルブの作製プロセス	29
4.1.6.	平行四辺形断面空圧バルブの実験系	32
4.1.7.	液の厚みの計算方法	32
4.1.8.	平行四辺形断面空圧バルブの膜厚と傾斜角の検討	33
4.1.9.	バルブの開閉が与える細胞への影響	34
4.2.	より高い流路を閉鎖可能なバルブの開発	35
4.3.	まとめ	35
第5章	細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの作製と評価	36
5.1.	細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの設計	36
5.2.	探索用マイクロ流路デバイスの作製	38
5.2.1.	探索用マイクロ流路デバイスの作製プロセス	38
5.2.2.	完成した探索用マイクロ流路デバイス	41
5.3.	実験系	43
5.3.1.	装置	44
5.3.2.	画像解析法	44
5.3.3.	細胞	45
5.3.4.	試薬	45
5.4.	探索用マイクロ流路デバイスの性能評価実験概要	46
5.4.1.	評価実験 (1) 直列したチャンバへの異種細胞導入	46
5.4.2.	評価実験 (2) 非標的細胞結合抗体除去実験	47
5.4.3.	評価実験 (3) 抗体回収実験	50
5.4.4.	省サンプル・省力化	52
5.5.	まとめ	53
第6章	結論	54
6.1.	本研究のまとめ	54
	参考文献	56

第1章 序論

1.1. 医薬品開発における細胞特異的結合分子の利用

医薬品の研究開発費は世界全体で約1兆7千億ドルに上り(2015年)、様々な薬が開発されている。しかし、安全性や有効性が不十分であるという理由で、そのほとんどが実用に至っていない[1]。安全性を高めるためには、薬の病変組織以外への影響を抑える必要がある。また、有効性を高めるためには、病変組織における薬濃度を上昇させる必要がある。そこで、薬と細胞特異的結合分子を組み合わせ、標的のみに付着することでそれらを実現する方法が着目されている[1]。

細胞特異的結合分子は、標的細胞に対して特異的に結合する分子であり、それを利用することで、特定の標的分子を発現している細胞のみに薬を集積することができる。標的細胞に特異的な表面タンパク質を標的とする抗体と薬を組み合わせることで、抗体を介して病変組織に薬を特異的に結合させるものが代表的である[2]。がん細胞では、正常細胞とは異なる細胞表面分子が発現したり、特定の分子のみが異常増殖したりするため、細胞表面分子は標的として利用しやすい。そのため、細胞特異的結合分子の多くはがん細胞を標的としている。また、細胞特異的結合分子と放射性同位体を組み合わせることによりがん細胞のマーカーに用いることも可能である[3]。

細胞特異的結合分子として利用される抗体の代表的なものとして、ヒト化抗 human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 抗体 (Trastuzumab)[4]、ヒト化抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 抗体 (Bevacizumab) [5]、マウスヒトキメラ型抗 epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体 (Cetuximab) [6]等が実用化されている。また、抗体以外の細胞特異的結合分子としては Integrin に特異的に結合する環状 Arg-Gly-Asp acid (RGD) ペプチド[7]、腫瘍細胞表面に高発現しているプロテインジスルフィドイソメラーゼに結合し、細胞に一酸化炭素 (NO) を供給することにより腫瘍増殖を抑制させるポリ S ニトロソ化ヒト血清アルブミン (Poly-SNO-HAS)[8]などが報告されている。

さらに、標的分子に特徴があれば、がん疾患に限らず、様々な臓器の疾患に適用することができる[9]。がん細胞以外を対象とした細胞特異的結合分子としては、以下のようなものがある。抗腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 抗体 (Infliximab) は、TNF- α に結合し、それを用いた薬は慢性関節リウマチや炎症性腸炎に優れた有効性を示す[10]。また、炎症性疾患部位の血管内皮細胞に発現する標的分子に特異的に結合する糖鎖が開発されている[11]。さらに、一本鎖核酸 emapticap pegol (NOX-E36) は CC Chemokine Ligand 2 (CCL2) に結合し慢性炎症性疾患、2型糖尿病に効果を発揮することが報告されている[12]。このように、様々な細胞特異的結合分子を用いた薬が開発されており、今後もさらに発展していくことが見込まれる。一方で、標的ごとに細胞特異的結合分子を用意する必要があるという課題がある。

1.2. 細胞特異的結合分子の探索

1.2.1. *in vitro* 探索

細胞特異的結合分子の候補となる分子は無数に存在し、その性質は以下の四つに分類できる。(1) 標的細胞だけに結合するもの、(2) 標的細胞と非標的細胞に結合するもの、(3) 非標的細胞だけに結合するもの、(4) どの細胞にも結合しないもの。その中から、(1)の性質を持つ細胞特異的結合分子を見つけるためには、探索が必要となる。*in vitro* で探索に使用する標的としては、標的分子のみをプレートなどに固定して使用方法と、細胞を使用する方法がある。なお、本論文では配置したものを動かなくすることを固定と呼び、細胞などの状態を薬品などで保持することを細胞固定と呼ぶことで区別する。

標的分子のみをプレートなどに固定して使用方法は、細胞を用いないために探索の下準備が容易である。しかし、標的分子のみを提示した探索では、本来細胞の表面に存在する分子が影響して起こる結合の阻害や促進を再現することができない。また、未知の標的分子に対しては使用できない[13]。一方、細胞を使用する方法は、細胞を用いるがゆえに培養などの下準備に時間と手間が必要である。しかし、細胞表面の分子と候補分子の相互作用を再現することができる。また、標的分子を特定せずに、標的細胞に結合する分子を候補から選ぶことができる。

以上から、細胞を標的とした探索は下準備に時間と手間がかかるものの、得られる細胞特異的結合分子が細胞表面に発現している状態の標的分子に結合できる可能性が高い。よって、細胞を標的として用いる探索をより容易なものに改良することは、探索の有効性向上につながる。

1.2.2. 細胞を標的とした細胞特異的結合分子の探索

従来の細胞を標的とした探索の流れを Figure 1.1 に示す[14, 15]。探索を行うためには、ライブラリを作製する必要がある。様々な分子のライブラリが存在するが、例えば、細菌に感染するウイルスの一種であるバクテリオファージ (以下、ファージ) の遺伝子の一部にランダム配列の遺伝子を組み込むことで、その情報をもとにファージ表面にランダムなペプチドやタンパク質を提示するライブラリを作製することができる。さらに、特定のペプチドやタンパク質を発現したファージを増幅させて遺伝子解析をすることで、発現分子の特定が容易になる。ここではファージを用いた場合について説明する。探索は、(1) 非標的細胞に結合する分子を発現したファージの除去、(2) 標的細胞に結合する分子を発現したファージの回収という操作を繰り返すことで行われる。以下にそれぞれについて説明する。

(1) 非標的細胞に結合する分子を発現したファージの除去：非標的細胞に結合する分子を発現したファージは、副作用の原因となるため、可能な限り除去する必要がある。ライブラリを非標的細胞が接着した培養ディッシュ (以下、ディッシュ) 等に導入し、十分な時間静置すると、一部の分子を発現したファージが非標的細胞表面に結合する。この状態で、

上澄みを集めることで非標的細胞に結合する分子を発現したファージが除去されたライブラリを得ることができる。

(2) 標的細胞に結合する分子を発現したファージの回収：非標的細胞に結合する分子を発現したファージが除去されたライブラリを、標的細胞が接着したディッシュ等に導入し、十分な時間静置すると、一部の分子を発現したファージが標的細胞に結合する。この状態からディッシュ内を洗浄し、標的細胞に結合しない不要な分子を発現したファージを洗い流す。最後に、標的細胞に結合した分子を発現したファージを回収する。

(1), (2) の工程をひとまとめにして 1 ラウンドと呼ぶ。ファージを使用する場合には、1 ラウンドの探索では細胞特異的結合分子の回収率が低いため、回収された分子を増幅し、それを用いて繰り返し探索を行う。多くの場合には、5 から 6 ラウンドの探索を経て、十分に増幅された細胞特異的結合分子発現ファージを回収することができる。

ファージライブラリを用いた場合、各ラウンドにおいて回収されたファージは標的細胞特異的結合分子の候補を表面に発現している。そのため、大腸菌とともにファージを振蕩培養することで、ファージが大腸菌に感染し、自己複製を行う[16]。これにより、ファージと共に分子が増幅される。また、溶液中のファージ密度はプラークアッセイ[16]によって、測定する。最終ラウンドで得られたファージの遺伝子解析をすることで、回収したファージが提示する分子を特定できる。

また、標的細胞に特異的に結合する抗体を作製する場合には、免疫動物に抗原を注射し、血液中に抗体を産生させたり、免疫動物から B 細胞を回収し不死化したがん細胞と融合させた細胞に抗体を産生させたりする。その中には、抗原以外に結合する抗体も含まれるため、標的細胞だけに結合するものを探索する必要がある。抗体を使用する場合にも、手順(1) および(2)は同様であるが、抗体回収後の増幅を行うことはできない。

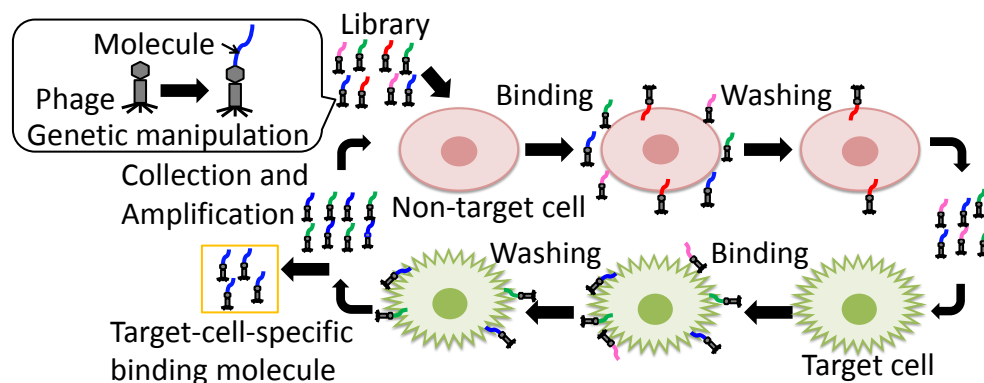


Figure 1.1 Flow diagram of the conventional screening method.

1.2.3. 細胞を用いた探索の課題

1.2.2 節で述べた細胞を用いた探索の課題として、作業能率や探索精度の向上が難しいこと、ヒューマンエラーが起きやすいこと、細胞や分子等の消費量が多いことが挙げられる。

従来の探索では手作業で複雑な操作を繰り返し行うため、作業能率が低く、ヒューマンエラーが起りやすい。また、手作業では完全に同じ条件で探索することが難しいために、再現性が低い。再現性が低いと、探索で回収される細胞特異的結合分子の一貫性がなくなり、探索精度を向上させることができない[17]。このため、細胞特異的結合分子を得るためには膨大な労力が必要である上に、ヒューマンエラーにより、細胞特異的結合分子を得ることができない可能性もある。さらに、探索に使用する標的細胞やライブラリの中には希少なものもあり、細胞や分子等の消費量が多い方法では探索そのものを行うことができない[18]。

1.3. マイクロ流路技術を用いた探索

マイクロ流路技術は、マイクロサイズの流路や構造の組み合わせによって精密な液体操作とさまざまな機能を実現できる。探索の各ステップをデバイス上で実現できれば、作業能率の向上や探索の精度向上が期待できる。さらに探索ステップのデバイス化により、探索ステップの各工程が人手ではなくポンプや圧力源を用いて制御が可能となり、探索の自動化が可能となる。これにより人手が必要な工程が減り、探索に必要な労力とヒューマンエラーを減らすことができる。また、マイクロ流路デバイスを用いることで細胞や分子等使用量の低減が容易に行われ、1.2.3 で述べた課題をすべて改善できる。

さらに1.2.3の課題の改善にとどまらず、マイクロ流路デバイスを用いることで、不要な分子の洗浄方法も改善される。従来の方法において、不要な分子の洗浄は、細胞を格納した容器への洗浄バッファの導入と除去を繰り返す定量繰返し洗浄法によって実現している(Figure 1.2 (a))。定量繰返し洗浄法では一定容量の洗浄バッファの出入を手作業で繰り返すため、ヒューマンエラーが発生したり、探索精度に影響を与えたりする。一方、マイクロ流路デバイスを用いた洗浄ステップにおいては、流路に洗浄バッファを連続導入する連続洗浄法が用いられる(Figure 1.2 (b))。連続洗浄法は、従来の定量繰返し洗浄法のように繰り返す手作業が少なく、洗浄バッファを外部ポンプから流すため、操作が容易な上に条件が一定となる。そのため、連続洗浄法を用いればヒューマンエラーが低減されるとともに探索精度が向上し、効率的に不要な分子を洗浄することができる[18, 19]。

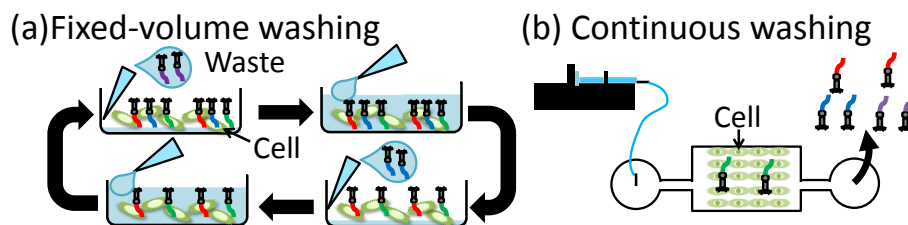


Figure 1.2 Schematic illustrations of the washing methods.

1.3.1. マイクロ流路デバイスにおける細胞の固定方法

連続洗浄法では洗浄バッファを流すため、細胞が流されないようにデバイス内に細胞を固定する必要がある。細胞のデバイス内での固定方法としては、(a)細胞自身がチャンバ底面に接着する性質を利用した方法、(b)磁気ビーズなどを細胞表面に付着させ、磁力などを用いてデバイス底面に固定する方法がある。これらの二つの方法において、細胞の形態が異なることが考えられ、探索結果に影響を与えうる。(a)では、細胞がチャンバ底面に扁平な状態で接着する (Figure 1.3(a)). 本接着は細胞の性質を利用したものであり、細胞培養用ディッシュに細胞が接着するのと同じ原理である。(b)では、接着分子でコーティングした磁気ビーズを細胞表面に結合し、外部磁場で固定する (Figure 1.3(b)). 細胞はディッシュから剥離された時と同じ球状であり、細胞自身は浮遊状態である。

Wada らの研究[20]から、細胞の接着状態が細胞の増殖能力をはじめとした細胞の性質に影響することが報告されており、細胞表面分子においても変化していると考えられる。そのため、マイクロ流路デバイスを用いて探索を実現する場合には、細胞の固定方法の選択が大きな検討事項となる。そこで、細胞の固定方法が異なる複数の先行研究を挙げ、比較検討を行う。

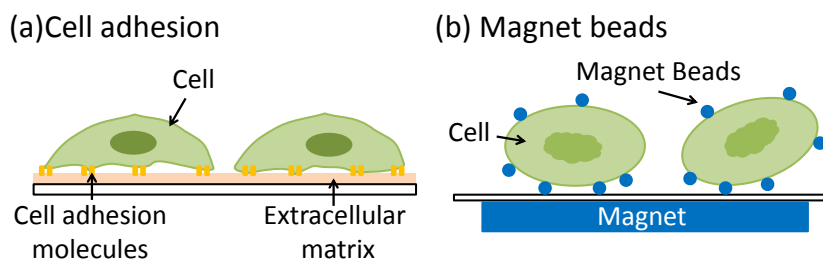


Figure 1.3 Schematic illustrations of the cell capture methods.

1.3.2. 細胞を接着によって固定する探索用マイクロ流路デバイスの先行研究

細胞の接着によりマイクロ流路デバイス内に細胞を固定した例として、Wang らが開発した microfluidic phage selection (MiPS) を挙げる[18]. MiPS では、細胞を接着させた基板に流路を配置し、ポンプを用いてライブラリの導入や洗浄を行う (Figure 1.4). デバイスは、細胞が接着するスライドガラスと、流路の側壁となる polydimethylsiloxane (PDMS) 層、流路の天井となるカバーガラスから構成され、両端をクリップで挟むことで各層を密着させて漏れを防ぐ。標的細胞には前立腺がんの細胞を用いる。前立腺がん細胞の表面分子である neuropilin-1 (NRP-1) に結合するペプチドを探索した結果、従来の探索で得られたペプチドよりも結合力の強いペプチドを得ている。ただし、チャンバが一つのみであるため正常細胞に結合するペプチドが混入している。それらを取り除くためには、デバイスをもう一つ用意し、正常細胞に結合するペプチドの除去を別に行う必要がある。

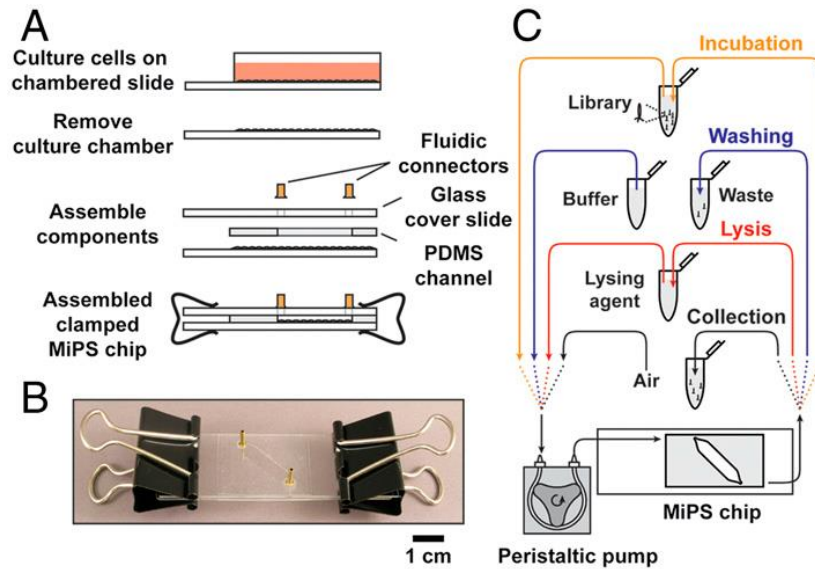


Figure 1.4 MiPS device for the selection of phage-displayed peptides targeting cell-surface markers [18].

1.3.3. 磁気ビーズを用いて細胞を固定する探索用マイクロ流路デバイスの先行研究

磁気ビーズを用いてマイクロ流路デバイス内に細胞を固定した例として、Hung らが開発した一本鎖 deoxyribonucleic acid (ssDNA) の探索を行う cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Cell-SLEX) (Figure 1.5) を挙げる[21]. Cell-SLEX の特徴は、標的細胞と非標的細胞のチャンバが直列することで、正常細胞に結合する ssDNA の除去と標的細胞に結合する ssDNA の探索が 1 チップで実現したところである。また、細胞チャンバが開放型であり、ピペット等で細胞を直接導入できる。

探索の流れを Figure 1.6 に示す。探索前に、使用する細胞に磁気ビーズを結合させておく。磁気ビーズと細胞の結合は、磁気ビーズを細胞に結合する分子でコーティングする方法を用いる。初めに、標的細胞と ssDNA ライブラリを混合する。つぎに、磁石を用いて細胞を固定し、その状態で細胞を連続流により洗浄する。洗浄後、細胞に結合した ssDNA を細胞から取り外し、取り外した ssDNA と非標的細胞を混合する。標的細胞の時と同様の方法で、ssDNA を連続流で洗浄し、洗浄液を回収する。回収した ssDNA を増幅し、次のラウンドに回す。ssDNA の増幅に polymerase chain reaction (PCR) を用いる。Cell-SLEX では、従来 22 ラウンド必要であった探索を 5 ラウンドで実現することができた。また、13 種類の卵巣がん細胞特異的結合ペプチドを発見し、そのうち 3 種類は強い結合力を示した。また、大腸がん細胞に特異的に結合するペプチド [22], がん幹細胞に特異的に結合する ssDNA [23], 卵巣がん細胞に特異的に結合するオリゴペプチド [24] を探索するマイクロ流路デバイスにおいても、磁気ビーズを用いてマイクロ流路デバイス内に細胞を固定している。

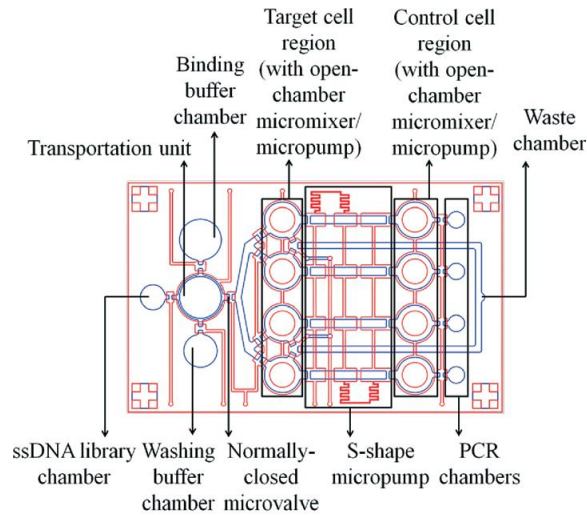


Figure 1.5 Integrated microfluidic chip equipped with multiple Microdevices [22].

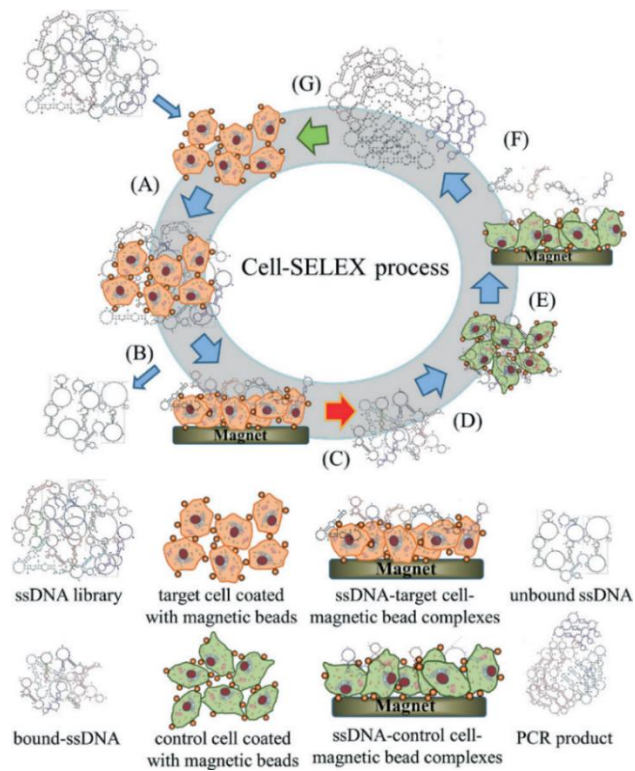


Figure 1.6 Cell-SELEX process for detection of OvCa [22].

1.3.4. 細胞固定方法の異なる探索用マイクロ流路デバイスの先行研究の比較

従来方法およびマイクロ流路デバイスによる探索の先行研究の特徴を、Table 1.1 にまとめて比較する。作業能率については、従来方法に比べ、デバイスを用いた MiPS や Cell-SELEX の方が優れている。洗浄方法については、デバイスを用いることにより連続洗浄を行うこ

とができる。細胞の固定方法については、従来方法と MiPS では接着培養を用いるが、Cell-SELEX 等では磁気ビーズを用いる。標的細胞として接着性細胞を用いる場合には、磁気ビーズを用いると、培養状態と探索時の状態が異なる。これにより、培養から探索への移行時に細胞の性質が変化する可能性がある。非標的細胞に結合する分子の除去(非標的細胞結合分子除去)については、従来方法と MiPS 以外では、同一のデバイス内を用いて行われている。標的細胞のみに結合する分子の探索を行うためには、非標的細胞結合分子の除去は不可欠である。さらに、細胞や分子等の損失およびコンタミネーションを防ぐためには、すべての探索ステップを一つにチップに実装することが望ましい。しかし、先行研究においては接着培養細胞を用いた非標的細胞結合分子の除去を一つのデバイス内で実現しているものが存在しない。

Table 1.1 Characteristics of the screening methods.

	Efficiency	Washing method	Cells capturing	Filtering of non-target cell binding molecules
Conventional method	Low	Fixed volume washing	Adhesion	Requires another culture dish.
MiPS	High	Continuous washing	Adhesion	Requires another device.
Cell-SELEX etc.	High	Continuous washing	Magnetic beads	Performs in one device.

1.4. 研究目的

以上の議論より、本研究では細胞特異的結合分子を少ない労力・サンプル消費量で効率的に探索するために、接着細胞を接着した状態で用いて非標的細胞に結合する分子を除去した上で、標的細胞に特異的に結合する分子の探索を行うマイクロ流路デバイスを開発することを目的とする。この目的を達成するためには、要素技術の開発が必要である。チャンバ内で細胞と分子が効率よく反応するためには、チャンバ内に細胞が均一に接着している必要がある。しかし、従来の細胞均一播種技術は細胞の増殖に影響を与えるために、探索に適さない。そこで、細胞の増殖に影響を与えず、かつ細胞を均一に播種する技術を開発する。また、探索ステップをひとつのマイクロ流路デバイス内で実現するためには、ステップにあわせて流路を切り替える必要がある。従来のマイクロ流路デバイス用のバルブは、細胞の通過に必要な流路高さを得られない、構造が複雑である、細胞均一播種技術と同一デバイスに組み込むことができないという問題があった。そのため、新たに流路切り替えバルブ技術を開発する。さらに、それらを実装したマイクロ流路デバイスを開発し、その性能評価を行う。

1.5. 論文の構成

本論文は、本章と五つの章を合わせた全 6 章で構成される。論文の構成図を Figure 1.7 に示す。第 1 章では、本研究の研究背景を述べ、本研究の目的を定めた。第 2 章では、提案する細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの概念を説明する。マイクロ流路デバイスによる探索操作に必要な要素技術として、細胞均一播種のためのマイクロピラーアレイおよび流路切り替えのための平行四辺形や台形断面の空圧バルブについて述べる。第 3 章では、探索用マイクロ流路デバイスに必要な要素技術である細胞均一播種構造を提案し、原理を説明する。さらに、作製プロセスと性能について述べる。マイクロピラーアレイを用いて、細胞の増殖に影響を与えず、マイクロチャンバ内に細胞を均一に播種することができるかを評価する。第 4 章では、探索用マイクロ流路デバイスに必要な要素技術である流路切り替えバルブを提案し、原理を説明する。さらに、作製プロセスと性能について述べる。通過する細胞にダメージを与えない高さの流路において、バルブを完全に閉鎖でき、繰り返し開閉が可能であるかを評価する。第 5 章では、第 3 章および第 4 章で開発した要素技術を組み込んだ、探索用マイクロ流路デバイスを提案し、その設計と作製プロセスを説明する。さらに、作製した、探索用マイクロ流路デバイスの性能を 2 種類の抗体と細胞を用いて評価した結果について述べる。第 6 章では、本研究の結論と今後の課題について述べる。

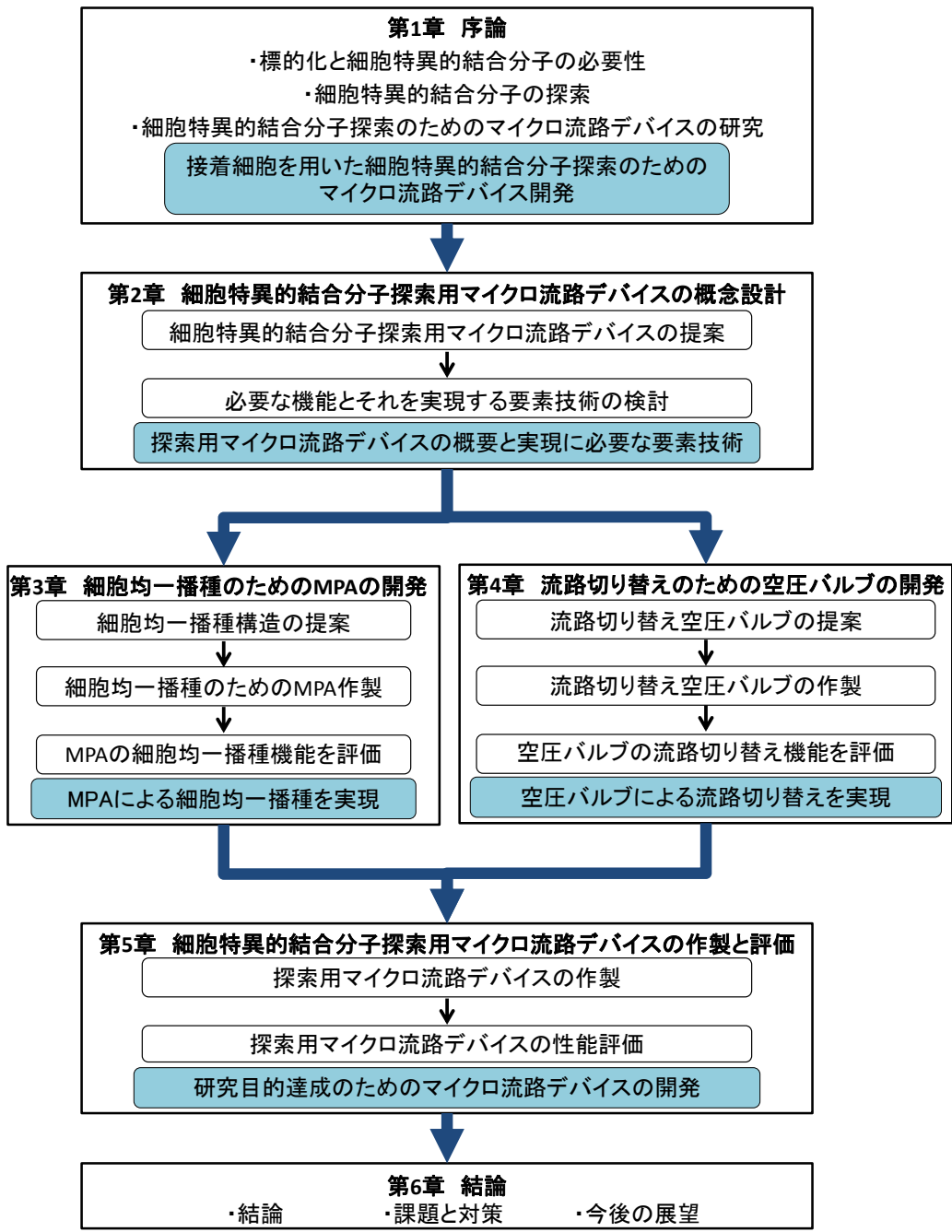


Figure 1.7 Outline of the thesis.

第2章 細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの概念設計

本章では、細胞特異的結合分子の探索をチップ上で実現するためのマイクロ流路デバイスの提案を行う。2.1節では提案したマイクロ流路デバイスに求められる機能について説明する。2.2節では、マイクロ流路デバイスのチャンバや細胞均一播種技術、および流路切り替えのための空圧バルブ技術について述べる。

2.1. 細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイス

本研究では、非標的細胞に結合する分子を除去した上で、標的細胞に特異的に結合する分子を捕獲・回収する細胞接着型のマイクロ流路デバイスを開発する。その実現に当たり、非標的細胞と標的細胞をそれぞれ均一に培養したチャンバを直列に配置し、流路を切り替えることで、探索に必要な各ステップを実現可能なマイクロ流路デバイスを考案する。つまり、このマイクロ流路デバイスに分子のサンプルを導入すれば、以下の機能を順次実行し、標的細胞特異的結合分子の探索を実現するマイクロ流路デバイスの開発を目指す。

- ・非標的細胞に結合する分子をサンプルから十分に除去
- ・標的細胞を培養したチャンバにおいてサンプルと標的細胞を反応
- ・チャンバ内で標的細胞に付着していない分子を洗浄
- ・標的細胞に付着した分子だけを回収

2.2. 本研究において開発するマイクロ流路デバイスの概要

2.1で説明したマイクロ流路デバイスを実現するためのマイクロ流路デバイスを提案する。マイクロ流路デバイスは、非標的細胞と標的細胞の2種類の細胞をそれぞれ導入するためのチャンバと、それらを接続する流路から構成される。各チャンバは、サンプルの分子と細胞が効果的に反応するため、細胞が均一かつ十分数存在することが求められる。そのためチャンバ内に細胞の均一播種を実現するためにマイクロピラーアレイ (MPA) 構造を実装する。また、探索ステップを順次行うため、流路の開閉を切り替えるためのバルブも実装する。

2.2.1. 細胞チャンバ

非標的細胞チャンバを標的細胞チャンバの上流側に配置することで、非標的細胞結合分子の標的細胞チャンバへの混入を低減できる。非標的細胞結合分子は非標的細胞表面の結合サイトなどに結合することで、非標的細胞チャンバ内にとどまる。細胞がもつ結合サイ

トの数は限られているため、チャンバ内の非標的細胞数を増やすことで、非標的細胞結合分子の除去量を向上させることができる。一定面積で培養可能な細胞数は限られているため、細胞数を増やすためにチャンバ数を一定にして底面積を増加させるか、一定面積のチャンバの数を増加させる二つの方法を考える。

底面積を増加させるとチャンバの容積が増える。サンプル導入量を一定とするとき、サンプル導入量よりチャンバ体積が大きくなり、サンプルがチャンバ内に残った培養液で希釈される。サンプルが希釈されると標的細胞特異的結合分子の濃度が薄まり、これを繰り返すと、標的細胞による捕獲や検出が困難となる。そのため、各チャンバの体積とサンプル容量を一致させる必要がある。サンプル量をチャンバ容積に合わせて増加させると、サンプル内の分子数も増加するため、十分な非標的細胞結合分子の除去が行えない。よって、非標的細胞結合分子の除去性能を向上させるためには、チャンバ数を増加させることが有効と考えられる。本研究では非標的細胞チャンバを 3 個連結し、十分な除去能の検討を行う。チャンバ数の選択については、5 章で述べる。

2.2.2. 細胞の均一分散

探索効率および再現性向上のため、マイクロ流路に細胞を播種する際には、細胞同士の凝集や偏りが発生しないように均一に導入する必要がある。しかし、マイクロ流路デバイス内の流れは、レイノルズ数が 1 以下と非常に低いために層流が支配的となる[25]。その結果、マイクロ流路からマイクロチャンバに細胞を導入する際、細胞の分布に偏りが生じる。これにより、マイクロ流路デバイス内においては細胞の均一分散が困難となる (Figure 2.1 (a))。さらに、接着性の細胞は凝集性が高いため、細胞の塊ができやすい。細胞播種時にそのような状態になると、チャンバ内で培養した際に細胞の有効面積が小さくなってしまう (Figure 2.1 (b))。また、細胞密度が局所的に高くなると細胞にストレスが加わり、細胞表面分子が変化してしまうことが懸念される[26, 27]。そこで、マイクロ流路デバイス内で接着性細胞を扱う場合には細胞を均一に播種するための技術が必要となる。

従来のマイクロ流路デバイスのチャンバ内に細胞を均一に播種する技術は、次の 2 タイプに分けられる。(1) チャンバの底面に均一に細胞接着物質をパターンニングする[28-30]、(2) 細胞を保持するためのマイクロ構造をチャンバ内に均一に配置する[31, 32]。これらの技術により、チャンバ内に細胞を均一に配置することができる。しかし、細胞接着物質やマイクロ構造は細胞の増殖方向や増殖範囲を制限する障害物となるため、細胞の性質に影響を与えることが報告されている[33, 34]。そのため、従来の方法を使用すると細胞の状態が通常の培養状態と異なってしまう可能性がある。そこで、本研究においては、Figure 2.1 (c)に示すように細胞培養領域の手前にランダム流を生成する構造を取り入れ、ランダム流を利用してチャンバ内に細胞を均一分散させ、Figure 2.1 (d)のように有効面積を向上させることを目指す。

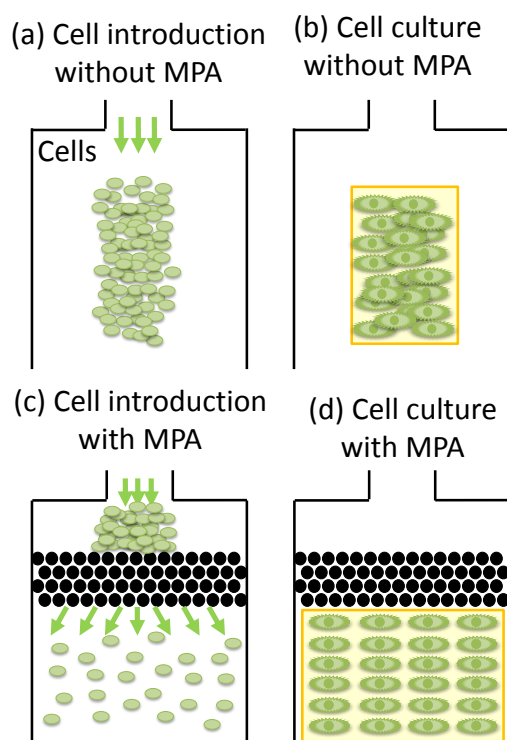


Figure 2.1 Concept of uniform cell dispersal by a micropillar array.

2.2.3. 探索ステップ実現のための切り替えバルブ

[探索ステップ]

従来の探索ステップ(Figure 2.2 A)とマイクロ流路デバイスの流路切り替えによる探索ステップ(Figure 2.2 B)を対比しながら説明する.

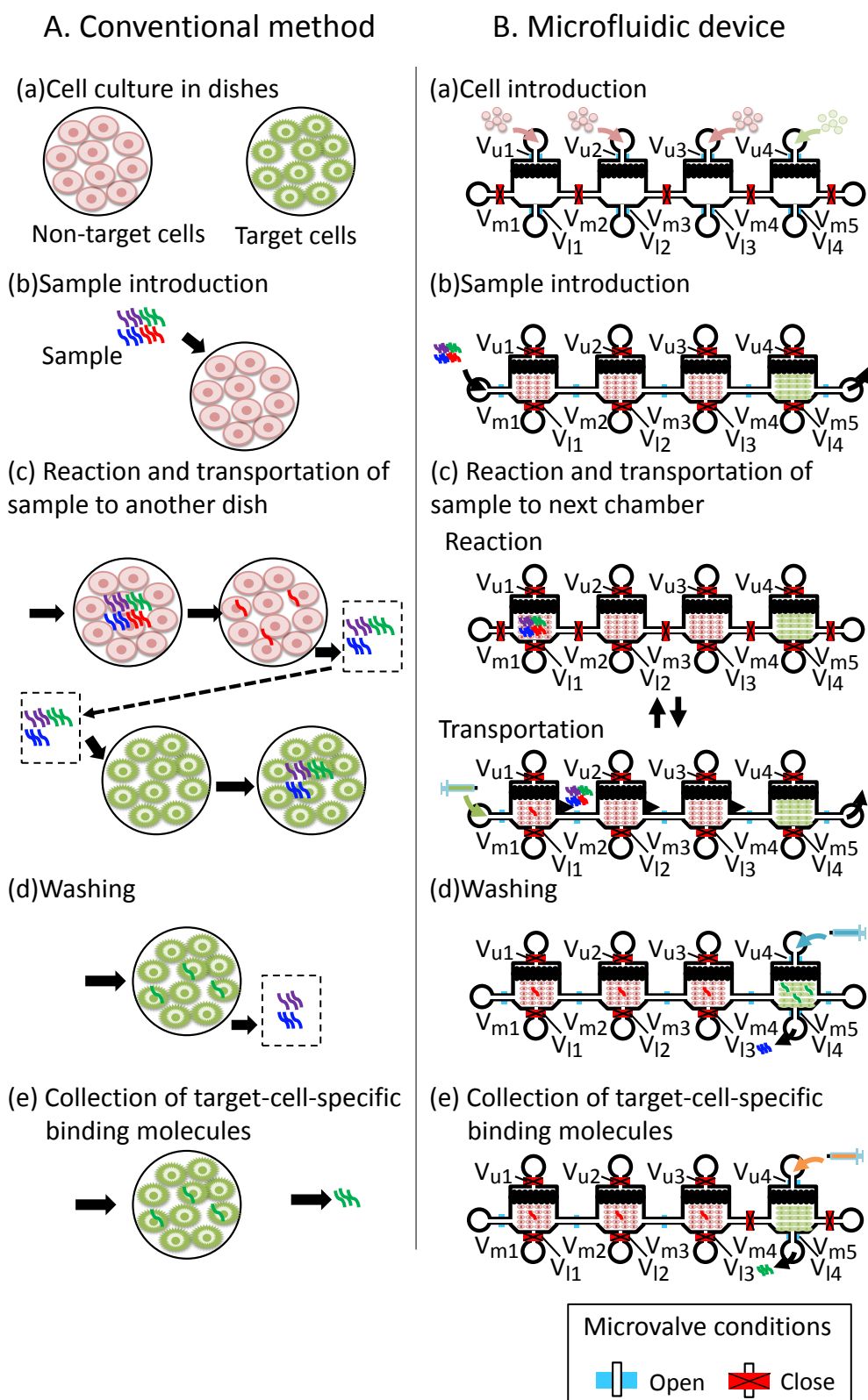


Figure 2.2 Valve switching method of the screening device.

(a) 細胞導入 (Figure 2.2 (a))

細胞をマイクロチャンバに均一に導入する際は、バルブ V_{m1} から V_{m5} を閉じ、残りのバルブを開ける。このバルブの状態はチャンバ間の流路を閉じることで、2種類の細胞が混ざり合うことを防ぐ。従来の探索では Dish に細胞を播種する手順であり、探索の下準備に当たる。

(b) 非標的細胞チャンバへのサンプルの導入 (Figure 2.2 (b))

従来方法ではまずサンプルから不要な分子を十分に取り除くことから始まる。マイクロ流路デバイスでは、非標的細胞結合分子をサンプルから除去するために、非標的細胞チャンバにサンプルを導入する。この際、(a) で閉鎖していた V_{m1} から V_{m5} を開き、それ以外のバルブ V_{u1} から V_{u4} および V_{l1} から V_{l4} を閉じる。これにより、サンプルが細胞注入口および排出口から漏れることを防ぐ。また、サンプルの導入容量を非標的細胞チャンバの容量と一致させ、静かに導入することで、下流の標的細胞チャンバへサンプルが流れ込むことを防ぐ。

(c) 反応および隣接するチャンバへのサンプルの輸送 (Figure 2.2 (c))

チャンバに導入したサンプルと細胞を一定の反応時間静置する際には、 V_{m1} から V_{m5} も閉じる。隣接するチャンバへのサンプル輸送の際には、再び V_{m1} から V_{m5} を開いた上でサンプル導入口に輸送バッファを導入する。サンプルが標的細胞チャンバに到達するまでこの操作を繰り返す。

サンプルが標的細胞チャンバに到達後、サンプルと標的細胞を反応させ、サンプルの中の標的細胞結合分子を標的細胞に付着させる。従来方法では不要な分子を取り除いたサンプルを、標的細胞に結合させる。

(d) 洗浄 (Figure 2.2 (d))

従来方法では標的細胞に付着しなかった分子を洗浄する。マイクロ流路デバイスでは、標的細胞チャンバ内で標的細胞に付着しなかったサンプル内の分子を洗浄により取り除く。その際には、 V_{m1} から V_{m5} および V_{u4} , V_{l4} を開き他のバルブは閉じる。これにより、チャンバと V_{m4} およびチャンバと V_{m5} の間に未結合の分子が残留することを防ぐ。

(e) 標的細胞結合分子の回収 (Figure 2.2 (e))

従来方法では洗浄後の標的細胞に付着した分子を回収する。マイクロ流路デバイスでは、標的細胞に結合した分子を回収する際には、(d) の状態からさらに V_{m4} および V_{m5} も閉じる。これにより、サンプル回収に用いる回収バッファと細胞を反応させる間、他チャンバからの分子の混入を防ぐことができる。

[切り替えバルブ]

Figure 2.2 に示すような探索ステップをデバイス上に実現するためには、チャンバに接続する流路を切り替えるバルブが必要である。本研究においては Figure 2.3 に示すような平行

四辺形断面や台形断面の空圧バルブを提案する。

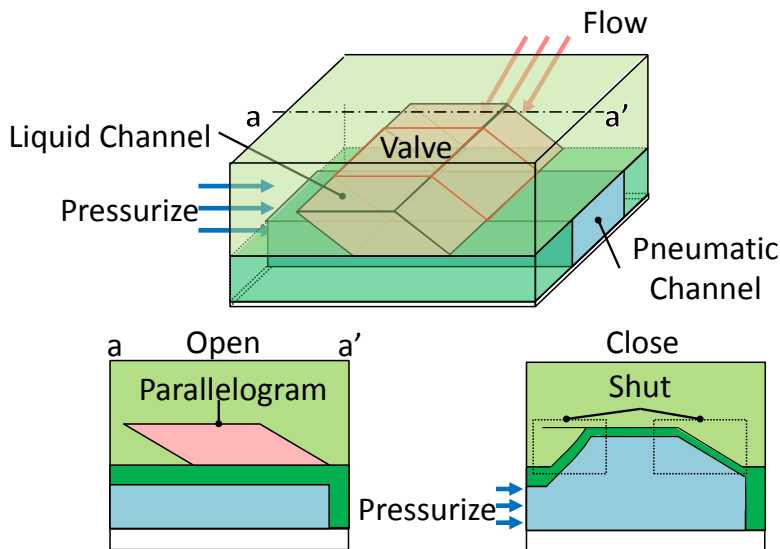


Figure 2.3 Schematic illustration of the parallelogram cross section pneumatic valve.

一般的なフォトレジストの鋳型で型取りした PDMS 製の流路は、多くの場合矩形断面を持つ。しかし、矩形断面流路を積層して作製したバルブは、空圧流路に加圧したとしても、液流路の角の部分完全に閉鎖することができない。これは、液流路と空圧流路の間の膜の変形が、矩形流路の角の直角に対し十分ではなく、隙間が生じていることが原因である。本研究で用いる細胞は、数 μm 程度の隙間であっても容易に変形して通過する。このため、矩形断面流路を今回のバルブに用いることはできない。

従来技術では、液流路断面を半円形にすることで角を無くし、液流路に膜が沿いやすくすることで、この問題を解消してきた。半円形断面流路では、膨張した膜が完全に液流路に沿うために、流れを完全に遮断できる。この半円形断面の流路の鋳型は、フォトレジストのリフローにより作製する[35]。リフローとは、パターンニングしたフォトレジストを熱によって融解し、その表面張力により曲面を得る方法である。これにより、半円形の断面を持つ鋳型が実現できる。しかし、リフローではパターンニングしたフォトレジスト全体を加熱するため、バルブの部分以外の構造も曲面になる。本研究ではバルブ構造と同一パターン内にピラー間隔が数 μm の MPA を含むが、リフローを行うとピラー構造の鋳型が変形することで、ピラーの作製が困難となる。さらにピラーを作製できたとしても、ピラー上部の間隔が広がり、細胞が素通りすることが予想される。このため、リフローを用いない新たなバルブを考案する必要がある。

液流路の断面を平行四辺形にすることで矩形断面では流路の角が閉じ切らない問題を解決し、さらに細胞通過時にストレスを与えないための高い流路において開閉を実現することを目指す。

2.3. まとめ

本章では，細胞特異的結合分子探索をチップ上で実現するための，本研究で開発するマイクロ流路デバイスの概念を提案し，その実現に必要な各要素技術を説明した．マイクロチャンバやマイクロピラーアレイ，空圧バルブの概念設計を行った，これらの要素技術を開発し，細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの開発につなげる．

第3章 細胞均一播種のためのMPAの開発

本章では、細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスに組み込む、細胞を均一に播種するためのマイクロピラーアレイ (MPA) の開発について述べる。3.1 節では、MPA の概念および動作原理を説明し、3.2 節では、MPA を利用した細胞均一播種デバイスの作製方法を説明する。3.3 節では、作製した MPA の細胞均一播種特性評価を行い、細胞の増殖に影響を与えず、マイクロチャンバ内に細胞を均一に導入できることを示す。

3.1. 細胞均一播種のためのMPA

細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスのチャンバ内に細胞を均一に播種するためのMPA構造を開発した。MPAを用いた細胞均一播種をFigure 3.1に示す。MPAは、隣接するピラー同士の距離が等しくなるように配置されたマイクロピラーから構成される。細胞が緩やかに保持され、細胞にかかる圧力が上昇すると保持された細胞が通過するようにピラー間隔を調節する。チャンバ内にMPAを配置し細胞を流すと、ランダム流が生成されそこに細胞が乗ることで、MPA下流のチャンバ内で細胞を均一に分散した状態で播種することができる。播種した細胞は、チャンバ内で培養し、探索に使用できる。

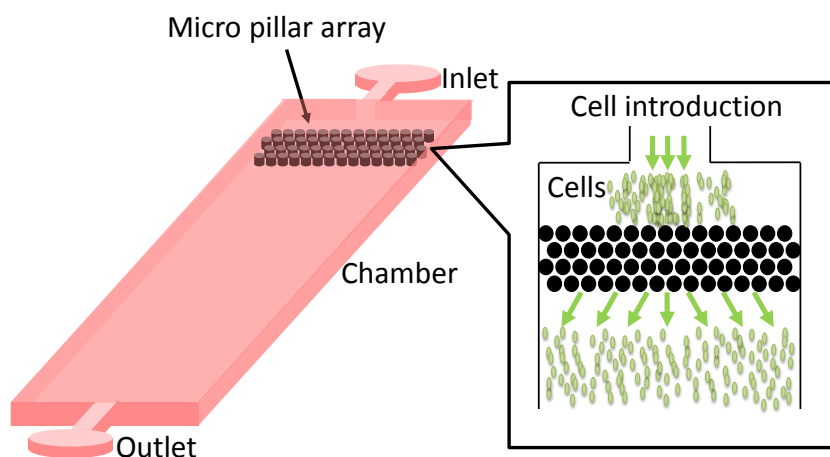


Figure 3.1 Concept of uniform cell dispersal by a micropillar array.

3.1.1. 原理

MPAによる細胞均一播種の原理は、ピラー間への細胞の詰まり(Figure 3.2)、ピラー間での細胞の詰まりおよび放出の繰り返し(Figure 3.3)、ならびに細胞のランダムな放出(Figure 3.4)からなる。細胞がMPA(Figure 3.2(a))に流入すると、ピラー間に細胞が詰まり(Figure 3.2(b))、流れの方向が変化するためその後の細胞は新しい流線に沿って移動する[36]。こ

これらの細胞は、マイクロピラーアレイに向かって流れ、他のギャップで詰まる (Figure 3.2 (c)). これらを繰り返すことで、細胞の流れは徐々に流路幅方向に広がっていき、MPA の 1 列目は完全に詰まる (Figure 3.2 (d)).

MPA が目詰まりすることにより、チャンバに流入する液体の圧力は上昇する。これにより、詰まった細胞に力がかかり、変形してピラー間を通過する。個々の細胞の弾性およびサイズの違いにより、細胞が通過するタイミングが異なるため、ランダムな流れを生じる。詰まった細胞がピラー間から放出されると、ランダムな流れに沿って移動し、2 列目のピラー間に詰まる (Figure 3.3 (a)). 放出された細胞が 2 列目のすべてのピラー間を充填した後、細胞は再び徐々にピラー間から押し出され、隙間から放出されて 3 列目に向かって流れる (Figure 3.3 (b)). ピラー間での細胞の詰まりと放出 (Figure 3.3 (c))は、細胞が最終列のピラー間から放出されるまで繰り返される (Figure 3.3(d)).

MPA から細胞が放出される向きは、詰まった細胞が通過する位置および方向によってランダムに変化する (Figure 3.4). 流れの種類としては、幅方向に広がる流れ (Figure 3.4 (a)), 中央に向かう流れ (Figure 3.4 (b)), 左または右に向かう流れ (Figure 3.4 (c)), 平行した流れ (Figure 3.4 (d))等が考えられる。

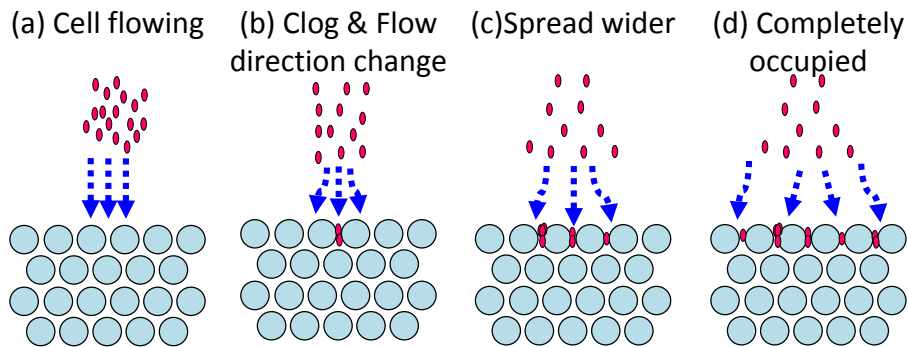


Figure 3.2 Schematic illustration of the clogging process.

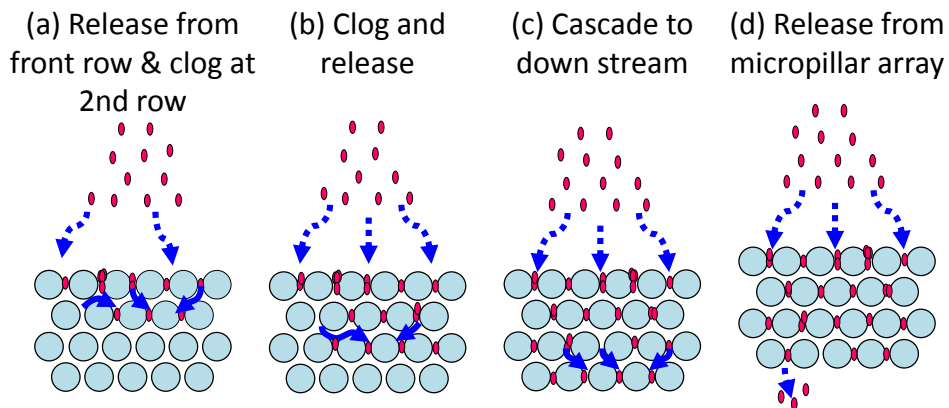


Figure 3.3 Schematic illustration of the repetitive clog-and-release process.

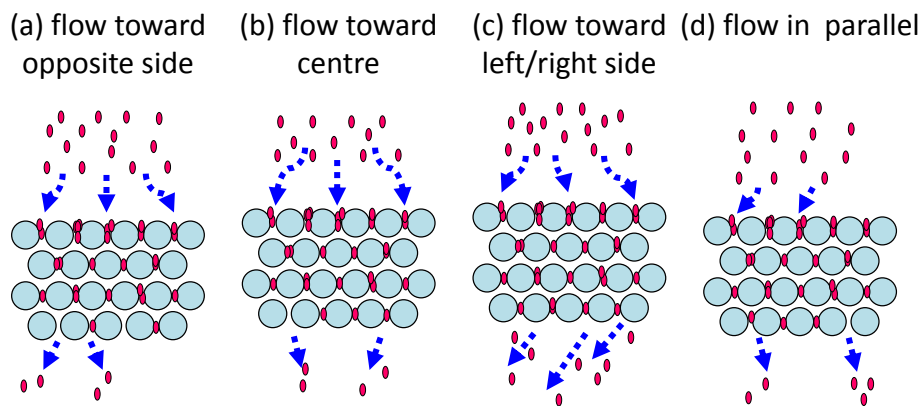


Figure 3.4 Schematic illustrations of the random release process.

3.1.2. 設計

Figure 3.5 に細胞均一播種デバイスの概念図を示す。デバイスは、細胞を保持するためのチャンバ、導入口、排出口を持つ。チャンバ内にはMPA構造をもつ。マイクロチャンバは、幅2 mm、長さ14 mm、高さ50 μm であり、マイクロピラーの直径は100 μm である。ピラー間隔は、緩やかに細胞を保持し、少しの圧力上昇で保持された細胞が通過することを可能にする必要がある。本研究では、ピラー間隔を5 μm ステップで5~20 μm に設定したMPAを作製し、同等のサイズ(10~20 μm)の細胞を流す予備実験を行った。その結果、間隔が5 μm より大きいと、細胞が簡単にピラー間を通過してしまい、間隔が5 μm 未満になると、本研究で用いるフォトリソグラフィでの作製が困難であった。そこで、今回の研究で用いる細胞に対しては、ピラー径100 μm 、ピラー間隔5 μm 、ピラー列数4を用いる。

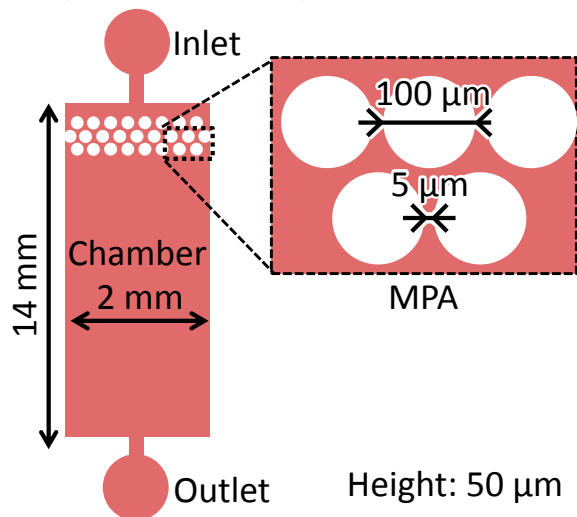


Figure 3.5 Schematic illustration of microfluidic device with the MPA.

3.2. 細胞均一播種デバイスの作製

3.2.1. 細胞均一播種デバイスの作製プロセス

本研究における細胞均一播種デバイスは、フォトリソグラフィを用いて作製した鋳型をPDMSに転写し、それをガラス基板と接合することにより作製する。詳細な作製プロセスをFigure 3.6に示す。

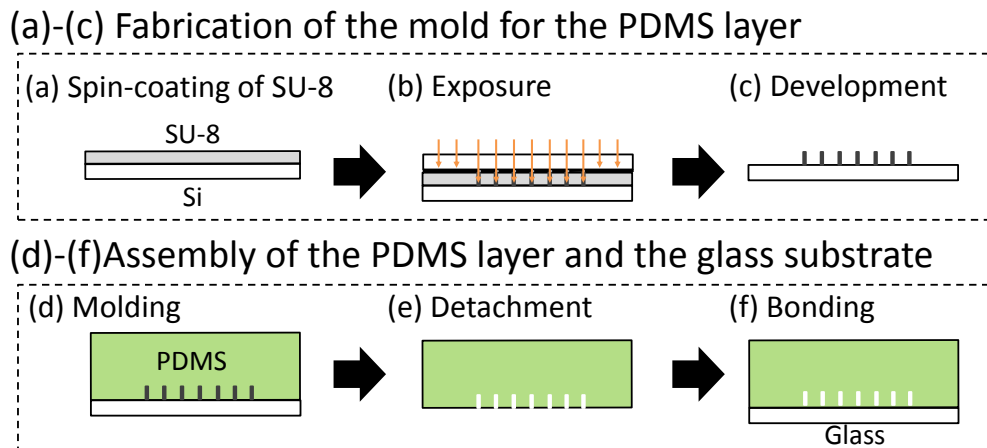


Figure 3.6 Schematic illustration of the fabrication process of uniform cell dispersion device.

[鋳型の作製 (Figure 3.6 (a)-(c))]

鋳型の作成には、超音波洗浄機(1510, BRANSON), SU-8(SU-8 3025, MicroChem), スピンコータ(1H-07, ミカサ), ホットプレート(HP-2S, AS ONE), マスクアライナ(MA-10, ミカサ), 現像液(SU-8 Developer, MicroChem), 攪拌機(WEV-03, AS ONE)反応性イオンエッチング (RIE; RIE-101L, SAMCO) を用いる。

1. 適当な大きさに劈開したシリコン基板をアセトンに浸し、超音波洗浄機で 10 min 洗浄する。その後、エタノールでリンスし、さらに純水でリンスする。
2. シリコン基板にSU-8をスピンコータで塗布する。回転数を 5 sec で 500 rpm まで上げ、500 rpm で 5 sec 回転する。回転数を 10 sec で 1000 rpm まで上げ 1000 rpm で 55 sec 回転する。時間と回転数の関係を Figure 3.7 に示す。
3. スピンコートした基板を 65 °C のホットプレートで 2 min 加熱したのち 95 °C まで温度を上げ、45 min 加熱する。
4. Figure 3.8 のようなマスクを基板上方に配置し、マスクの透明部のみ紫外線で露光する。露光にはマスクアライナを使用し、露光時のエネルギーは 350 mJ とする。
5. 65 °C のホットプレートで 2 min 加熱したのち 95 °C まで温度を上げ、4 h 加熱する。
6. シリコン基板を現像液に浸し、攪拌機で攪拌しながら 15 min 現像する。
7. 出来上がった鋳型には、PDMS の剥離性を向上するために炭化フッ素膜で表面処理する。

炭化フッ素膜での表面処理には RIE を用いる. 処理の際には条件をエネルギー 50 W, 圧力 100 mTorr, 流量 30 sccm, 処理時間 1 min とし, ガスはトリフルオロメタン(CHF₃) に設定する.

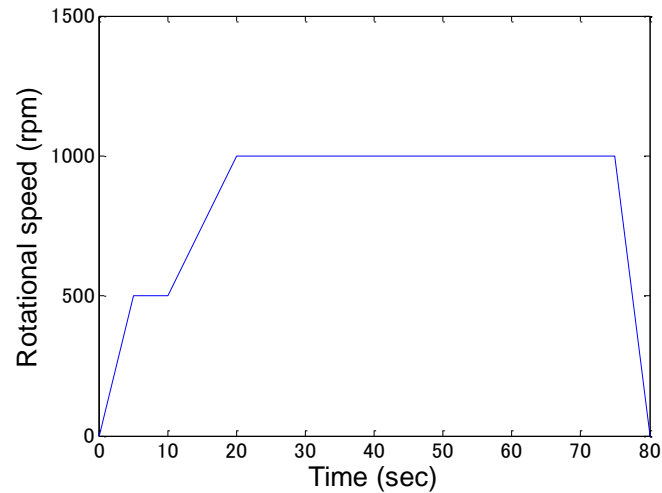


Figure 3.7 Diagram of a spincoating procedure of the rotational speed as a function of time.

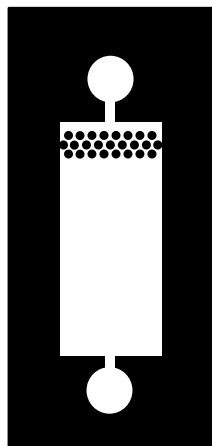


Figure 3.8 Photomask of the uniform cell dispersion device.

[PDMS への転写およびガラス基板との接着 (Figure 3.6 (d)-(f))]

この工程では, PDMS 主剤 (SILPOT184, DOWCORNING TORAY), PDMS 硬化剤 (SILPOT184 CAT, DOW-CORNING TORAY), ガラス基板 (Micro cover glass 5070, MATSUNAMI) を用いる.

1. PDMS の主剤と硬化剤を重量比 10:1 で混合する.
2. 厚さ 2 mm のシリコーンゴム製の土手で鋳型を囲む. 土手で囲まれた領域に PDMS を流し込み, -0.06 MPa(ゲージ圧)まで減圧して 10 分間脱泡して, 気泡を完全に除去する.

3. PDMS を流し込んだ鋳型を 100 °C に熱したホットプレートで 1 h 加熱することで PDMS を硬化させる (Figure 3.6 (d)).
4. 鋳型を用いて型取りした PDMS (Figure 3.6 (e)) とガラス基板の接着によりマイクロ流路とする (Figure 3.6 (f)). 接着前には酸素プラズマで親水化処理を行うことで接着力を上げる. 酸素プラズマ処理は RIE を用いる. 処理の際には条件をエネルギー 75 W, 圧力 50 mTorr, 流量 50 sccm, 処理時間 10 sec に設定する. 接着後に 100 °C のホットプレートで重りを乗せた状態で 10 min 加熱する.

3.2.2. 完成した細胞均一播種デバイス

完成した完成した細胞均一播種デバイスを Figure 3.9 に示す. 流路を赤色水で着色した (Figure 3.9 (a)). チャンバ内には MPA が作製されていた (Figure 3.9 (b)). ピラー直径は 100 μm , ピラー間隔は 5 μm であった.

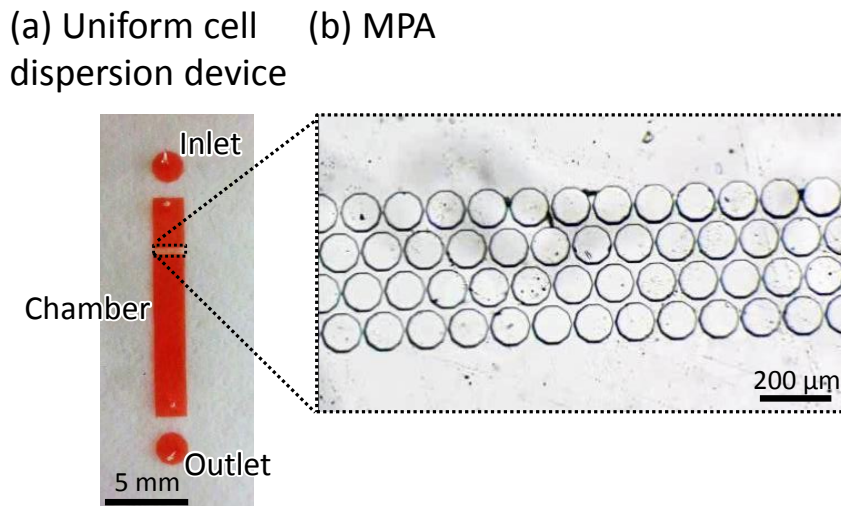


Figure 3.9 Fabricated uniform cell dispersion device.

3.3. MPA の特性評価

3.3.1. 実験系

[装置]

均一播種性能を評価するために用いる実験系の概要を Figure 3.10 に示す. 実験には, 顕微鏡 (IX-73, Olympus) とシリンジポンプ (KDS200, KD Scientific) を使用した. 細胞均一播種デバイスを顕微鏡に設置し, 動作の様子を観察した. シリンジポンプを用いて, デバイスの導入口 (Figure 3.9 の inlet) から細胞密度 1.0×10^7 cell/mL の N87 細胞懸濁液を, 一定流速で導入した. 導入の際には, ステンレスカットパイプとシリコンチューブを介してシリンジを導入口に接続した.

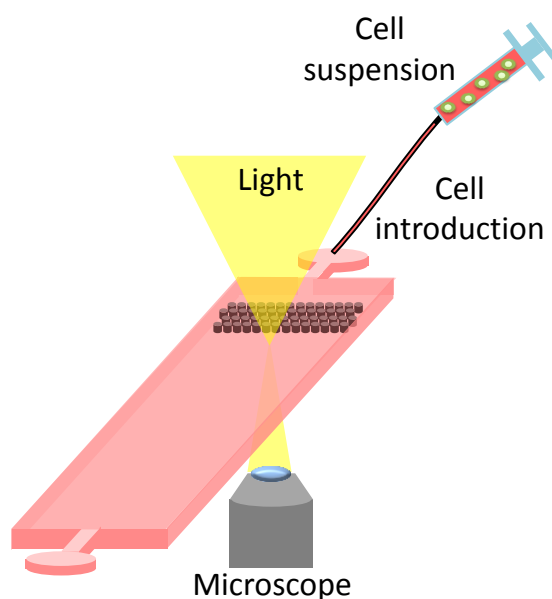


Figure 3.10 Schematic illustration of experimental setup.

[細胞]

細胞均一播種デバイスの評価実験では、胃癌細胞である N87 細胞 (NCI-N87, American Type Culture Collection) を使用した。培養には、高グルコースの Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地(D-MEM(高グルコース) (L-グルタミン, フェノールレッド, ビルビン酸ナトリウム含有), Wako), ウシ胎児血清 (FBS; Fetal Bovine Serum, Regular, Corning), ペニシリン-ストレプトマイシン(PS; ペニシリン-ストレプトマイシン溶液($\times 100$), Wako) を用いた。DMEM に 10% (体積) の FBS と 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の PS を混合したものを培養液とした。

3.3.2. MPA での細胞の流れ

細胞懸濁を 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ でチャンバ内に導入し、MPA を通過する細胞の動きを調査した。細胞の動きを撮影し、ピラー間への細胞の詰まり (Figure 3.2), ピラー間での細胞の詰まりおよび放出の繰り返し (Figure 3.3), ならびに細胞のランダムな放出 (Figure 3.4) に分類し、分析した。ランダムな流れの蓄積によって細胞の分布が均一になり、十分な時間細胞を導入し続けると、細胞が均一に広がった。

3.3.3. MPA による細胞の均一播種

MPA をチャンバに配置することにより細胞の均一播種が可能であるかを検証するため、MPA なし、ありのチャンバにそれぞれ細胞懸濁液を導入し、結果を比較した。MPA なしの場合には、細胞がチャンバの中央に凝集していた。一方で、MPA ありの場合には細胞が幅方向に広がっていた。細胞懸濁液導入後においては、MPA なしの場合には細胞がチャンバの中央に凝集して播種されていた。一方で、MPA ありの場合には細胞が均一に播種され

ていた.

MPA を通過した細胞を 50 時間培養したところ, 細胞数が培養開始時の 2.6 倍に増殖した. これは, MPA を通過していない一般的な N87 細胞の同等の増殖率である[37]. つまり, MPA の通過は N87 の増殖率に影響しないと言える. また, HeLa 細胞を用いた場合にも N87 細胞と同様の均一播種を実現できた[38].

3.4. まとめ

本章では, 本研究で開発する細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスに組み込む, 細胞を均一に播種するための MPA を開発した. はじめに MPA の動作原理を説明し, 設計・作製を行った. 次に, 作製した MPA の性能評価を行った. 細胞の増殖に影響を与えず, マイクロチャンバ内に細胞を均一に導入できることを確認した.

第4章 流路切り替えのための空圧バルブの開発

本章では、細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスに組み込むバルブの開発について述べる。バルブを使用することで、探索の全ステップ、つまりチャンバへの細胞導入、非標的細胞に結合する分子の除去、標的細胞に結合しない分子の洗浄、標的細胞に結合する分子の回収を切り替えることができる。4.1 節では、他の流路構造に影響を与えず、かつ完全に閉鎖することができる平行四辺形断面を持つ空圧バルブ提案し、静的な特性と細胞のせき止め能力の評価を行う。

4.1. 流路切り替えのための平行四辺形断面空圧バルブの開発

探索用マイクロ流路デバイスに適応するバルブの条件として、(1) バルブ閉鎖時に細胞が通過しないこと、(2) 細胞培養にダメージがないこと、(3) 構成がシンプルであることの三つの要件を満たす必要がある。

- (1) バルブ閉鎖時に細胞が通過しないこと：今回開発するバルブの最も重要な役割は、マイクロ流路デバイスのチャンバへの細胞導入時に、目的のチャンバ以外に細胞が流入することを防ぐことである。そのため、バルブ閉鎖時には細胞が流路を通過できないようにすることが重要となる。
- (2) 細胞培養にダメージがないこと：接着培養細胞を用いて分子探索を行うためには、マイクロ流路デバイス内で細胞培養が可能である必要がある。そのため、細胞がバルブを通過する際にダメージを受けないような設計とする必要がある。
- (3) 構成がシンプルであること：コンタミネーションを防ぐため、マイクロ流路デバイスは1回ごとの使い捨てを想定して設計する。そのため、安価かつ作製が容易なマイクロ流路デバイスであることが望ましい。よって、バルブ部分もシンプルな構成であることが望ましい。

4.1.1. バルブ形式の選択

マイクロ流路デバイスに利用するバルブは、駆動方法やせき止め方法で分類できる。本節では、本研究の用途に適した駆動方法と閉鎖方法の選定を行う。

駆動方法としては、静電アクチュエータ[39]、機能性流体[40]、空圧[41]などが挙げられる。それぞれの駆動方法の利点、欠点を以下に述べる。静電アクチュエータによる駆動は、電磁力や静電力によって流路内の仕切りを並進・回転させて流路を切り替える方法である。利点としては、デバイスの外から非接触で駆動が可能なのが挙げられる。一方で、構造が複雑になるという欠点がある。機能性流体による駆動は、電界に応じて粘度が変化する流体を用いて流路抵抗を変化させる方法である。利点としては、省エネルギーであること、

機械要素を含まないため故障が少ないことが挙げられる。一方で、特殊な流体(電気粘性流体)を使用する場合にしか適用できない欠点がある。空圧による駆動は、加圧による流路の変形や仕切りの並進を用いて流路を切り替える方法である。利点としては、小型化やマイクロ流路デバイスへの組み込みが容易であることが挙げられる。一方で、駆動するために必要な外部装置が大きくなりがちなことが欠点である。今回はバルブをシンプルな構造で実現する必要があり、使用流体として細胞を含む培養液を使うため、空圧による駆動を用いる。

空圧駆動バルブにおける閉鎖方法としては、流路の変形によるもの[42, 43]と仕切りで流路を遮断するもの[44]に大別される。流路の変形による閉鎖は、流路を構成する材料を柔軟な材料にすることで実現が容易になる。一方で、材料の伸びの範囲でしか流路の変形ができないため、流路が高いと閉鎖できない欠点がある。仕切りによる閉鎖は、流路高さを高くしやすいが、マイクロ流路に適したサイズの仕切りに十分な強度を持たせることは難しい。今回の閉鎖方法としては作製が容易な流路の変形が適している。

以上より、本研究に用いるバルブとして、空圧により流路を変形させて閉鎖し、流れをせき止める形式を採用する。

4.1.2. 平行四辺形流路断面バルブの提案

空圧による流路変形を利用したバルブは、変形能を有する薄膜を介して 2 本の流路を立体的に交差させ、積層することで得られる[45]。動作原理としては、片方の流路に空圧を印加し膜を変形させ、その変形により他方の流路を閉鎖する[46]。

レジストのリフローを使用しないことでピラー構造の作製に影響を与えず、かつ完全に閉鎖することができる空圧バルブを提案する。完全に流路を閉鎖することのできる流路断面形状として、Figure 4.1 のような平行四辺形断面を考案する。平行四辺形断面では、鈍角の部分においては、矩形断面の角よりも角度が緩いため膜が角に沿いやすくなる。また、鋭角の部分は、はり出している膜が薄いため変形しやすく、下から押されて曲がるため、流路を閉鎖しやすい。鈍角と鋭角において上述のような変形をすることで、矩形断面で生じていた膜と角の隙間を解消する。また、平行四辺形断面を持つ鋳型は傾斜露光[47]により実現することができるため、レジストのリフローが必要なく、完全に閉鎖するバルブを実現することができる。

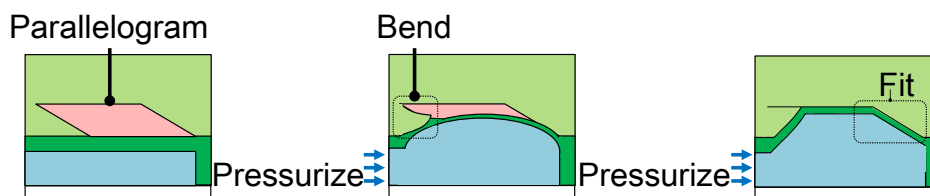


Figure 4.1 Working principle of the parallelogram cross-section pneumatic valve.

4.1.3. 平行四辺形断面空圧バルブの設計

本バルブは、細胞懸濁液の導入を行う層である (1) 液流路層, バルブへの空圧印加に用いる層である (2) 空圧流路層, (3) 底面となる層からなる. 型取り成形によって作製した二つの流路層及び底面となる支持層を接着することによって作製する (Figure 4.2). 本バルブには, 空圧流路層上部の薄膜の変形が容易であり, 細胞毒性がなく, 倒立顕微鏡を用いた観察のために透明度が高いことが求められる. そこで材質としてPDMSとガラスを用いる. 以下に, 各層の形状・寸法・および材質を示す.

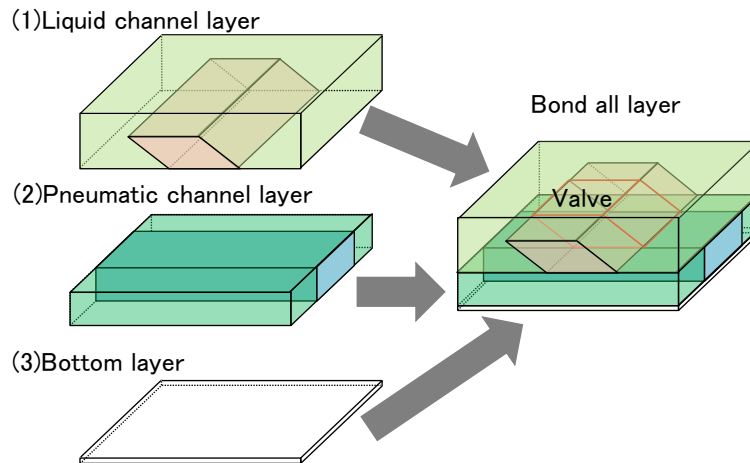


Figure 4.2 Schematic illustration of the constitution of the parallelogram cross-section pneumatic valve.

(1) 液流路層

できる限りシンプルな流路形状とする. 各部位の形状および寸法を Figure 4.3 (a)に示す. 液流路は, 液導入口 (inlet), 液輸送流路 (channel), バルブ部分 (valve), 液排出口 (outlet) からなる. 3.2 節の要件を実現するために細胞にダメージを与えず, かつ比較的容易に作製できる必要がある. そこで, すべての流路の高さを均一とし, $50\ \mu\text{m}$ に設定した[48]. 半円形断面のバルブはアスペクト比 0.1 の時に容易に閉鎖するため[49], 本研究においてもバルブ部分の流路幅は $500\ \mu\text{m}$ とし, 同等のアスペクト比にした. 液輸送流路の幅は $200\ \mu\text{m}$ とした. 液排出口は, バルブ部分の末尾に直接穴をあけることで実現する. 液流路と空圧流路を仕切る膜の膜厚については $30\ \mu\text{m}$, $40\ \mu\text{m}$, $80\ \mu\text{m}$ の膜を, また傾斜露光の角度については 0° , 30° , 60° の液流路を作製し, 実験により最適な膜厚と角度を選択する. 材質は PDMS とする.

(2) 空圧流路層

作製を容易にするため, 導入口, バルブ部, 流路幅は空圧流路も液流路と同一の寸法とする. ただし, 空圧流路の目的は空圧印加により流路を膨張させ, 流路上部の薄膜部を湾曲させることであるため, 排出口は設けない. 液流路と空圧流路の相対的配置を, Figure 4.3

(b)に示す．バルブの実現には，お互いのバルブ部が交差している必要があるため，Figure 4.3 (b)の青い流路に示すように直角に曲がった形状にする．材質はPDMS とする．

(3) 底面となる層

取り扱いを容易にするため，流路底面にはある程度の剛性を持たせる必要がある．倒立顕微鏡を用いた観察を想定するため，細胞観察によく用いられるスライドガラス (厚さ 1 mm) を用いる．

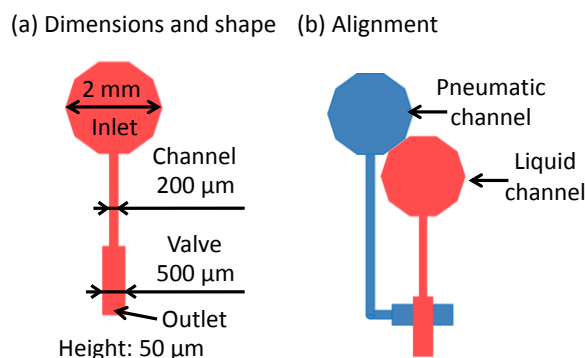


Figure 4.3 Design of the liquid channel and the parallelogram cross-section pneumatic valve. (a) Dimensions and shape of the liquid channel. (b) Alignment of the pneumatic and liquid channels.

4.1.4. 傾斜露光における傾斜角と実際の角度

本研究で開発するバルブの鋳型には SU-8 を用いるが，空気と SU-8 の屈折率が異なるため，露光時の傾斜角 θ と鋳型断面の傾斜角 θ' に違いが生じる (Figure 4.4)．これはスネルの法則により計算可能である．実際の角度は傾斜角を用いて， $\theta' = 90^\circ - \arcsin(\sin\theta/1.67)$ と記述できる[50]．紫外光 (365 nm) における SU-8 の屈折率は 1.67 である[50]． θ を $0^\circ, 30^\circ, 60^\circ$ とした際， θ' はそれぞれ $90^\circ, 72.5^\circ, 58.8^\circ$ となる．なお，実際の角度の最小値は $53.2^\circ (= 90^\circ - \arcsin(1/1.67))$ となる．

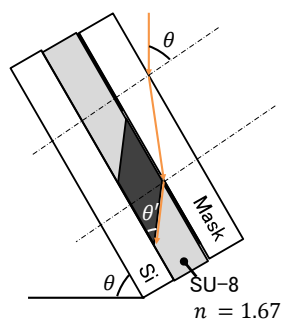


Figure 4.4 Schematic illustration of the inclined lithography.

4.1.5. 平行四辺形断面空圧バルブの作製プロセス

平行四辺形断面空圧バルブの作製の全体の流れを示す．初めに，液流路層の鋳型を作製

する。次に、空圧流路層の鋳型を作製。最後に、それぞれの鋳型を用いて PDMS を成形し、2 層の流路を積層したうえでスライドガラスと接合する。詳細を以下に述べる。

[鋳型の作製]

A. 液流路鋳型

- 1-4. レジストの塗布から加熱までは、3.1.3 [鋳型の作製] の手順 1 から 4 と同様である。
5. Figure 4.5 (a)のようなマスクを基板に重ねて配置し、マスクと基板を水平から θ° 傾斜した状態で、マスクの透明部のみ露光する (Figure 4.6)。傾斜角 θ はそれぞれ 0° , 30° , 60° に設定した。露光エネルギーは 420 mJ とする。傾斜露光では、同じ厚さの SU-8 に対して行う水平露光と比較して光が通過する距離が長くなる。そのため、必要なエネルギーが大きくなる。
6. 65°C のホットプレートで 2 min 加熱したのち 95°C まで温度を上げ、45 min 加熱する。
7. シリコン基板を現像液に浸し、攪拌機で攪拌しながら 15 min 現像する。現像後、エタノールおよび純水を用いてリンスする。
8. 出来上がった鋳型には、PDMS の剥離性を向上するために表面処理をする。表面処理には反応性イオンエッチングを用いる。処理の際には条件をエネルギー 50 W, 圧力 100mTorr, 流量 30 sccm, 処理時間 1 min とし、ガスは CHF_3 に設定する。

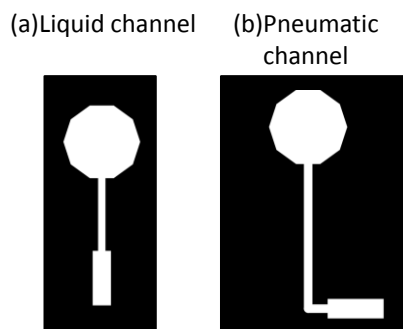


Figure 4.5 Masks for the parallelogram cross-section pneumatic valve.

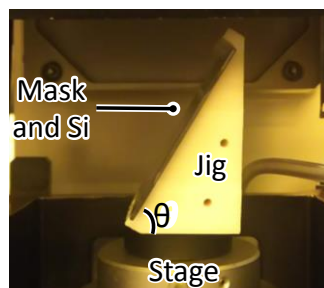


Figure 4.6 Photograph of the inclined mask and Si substrate for inclined lithography.

B. 空圧流路鋳型

空圧流路の鋳型の作製手順は、液流路の鋳型とほぼ同じである。手順 4.の露光のみ、傾斜露光ではなく通常の水平露光を行う。マスクと Si 基板を重ねて透明部のみ露光する。露光エネルギーは 350 mJ とする。

[PDMS への転写および流路の積層]

- 1-3. 手順 1 から 3 は 3.1.3 [PDMS への転写およびガラス基板との接着] と同様である。
4. 空圧流路鋳型に、1 と同様に硬化剤と混合した PDMS を、スピンのコータを用いて薄く塗布す。最大回転数 N を変えることで、膜厚を $30\ \mu\text{m}$ ($N = 3000\ \text{rpm}$), $40\ \mu\text{m}$ ($N = 2000\ \text{rpm}$), $80\ \mu\text{m}$ ($N = 1000\ \text{rpm}$) に設定する。回転数を 500 rpm まで 5 sec で上げ、500 rpm で 5 sec 回転する。回転数を $N\ \text{rpm}$ まで 10 sec で上げ、 $N\ \text{rpm}$ で 30 sec 回転する。 $N = 2000\ \text{rpm}$ のときの時間と回転数の関係を Figure 4.7 に示す。
5. PDMS を塗布した鋳型を $100\ ^\circ\text{C}$ のホットプレートで 3 min 加熱することで、PDMS が完全に硬化せず、粘着性を持った状態 (半硬化状態) にする。
6. 半硬化状態の PDMS 上に、液流路鋳型を用いて型取りした PDMS を積層し、加圧しながら $100\ ^\circ\text{C}$ のホットプレートで 1 h 加熱する。これにより、二つの流路層を接合する。

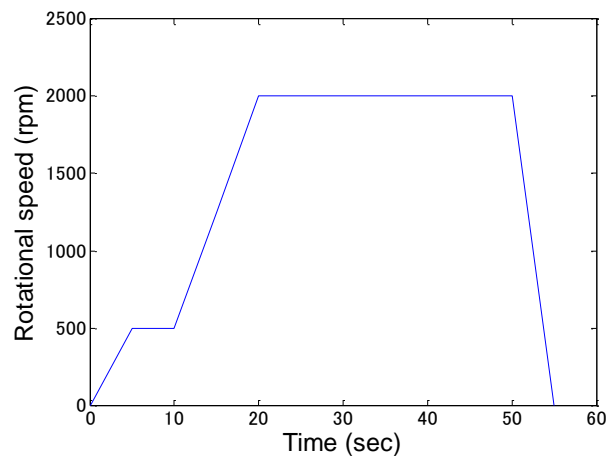


Figure 4.7 Diagram of spincoating procedure of the rotational speed as a function of time.

[PDMS とガラスの接着]

1. ガラス基板の接着面に、エキシマランプ (Min-Excimer SUS713, ウシオ電機株式会社) を用いて紫外線を 1 min 照射し、親水化する。
2. 2層を接合した PDMS の接着面に、エキシマランプを用いて紫外線を 2 sec 照射し、親水化する。
3. 双方の処理が完了した後、接着面同士を重ね合わせ、加圧しながら $100\ ^\circ\text{C}$ のホットプ

レート 1 h 加熱する。

[完成した平行四辺形断面空圧バルブ]

完成したバルブの断面は、平行四辺形になっていた。露光時の傾斜角 θ が 0° , 30° , 60° のときの平行四辺形断面の鋭角 θ' はそれぞれ 88.4° , 64.7° , 53.6° であり、計算値に近い値となっていた。流路高さは $50\ \mu\text{m}$ 、流路幅は $590\ \mu\text{m}$ であった。流路幅が設計よりも大きくなった原因としては、過露光が考えられる。

4.1.6. 平行四辺形断面空圧バルブの実験系

[装置]

駆動特性を測定するために用いる実験系の概要を示す。バルブを顕微鏡 (IX-73) に設置し、動作の様子を観察した。バルブの駆動には電磁弁 (SY114-5LZ, SMC)、レギュレータ (IR1020-01BG-A, SMC)、エアコンプレッサ (OFP-07005, 岩田) を使用した。バルブの動作実験には着色水を、細胞せき止めの実験には HeLa 細胞懸濁液をそれぞれ液流路に導入した。液流路の導入口はステンレスカットパイプとシリコンチューブを介してシリンジに接続した。シリンジはシリンジポンプにセットし、一定流量で着色水や細胞懸濁液を導入した。空圧流路の導入口はステンレスカットパイプとシリコンチューブを介して電磁弁に接続した。電磁弁にはレギュレータを通してエアコンプレッサを接続した。バルブ動作の観察結果の解析には、画像処理ソフト ImageJ を用いた。

[細胞]

細胞せき止めの評価実験では、子宮頸がん細胞である HeLa 細胞 (HeLa, American Type Culture Collection) を使用した。細胞培養液としては、高グルコースの DMEM 培地に 10 % (体積) の FBS と $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ の PS を混合したものをを用いた。

4.1.7. 液の厚みの計算方法

本研究に用いた顕微鏡では流路断面方向からの動作の観察が不可能であるため、液流路の画像中の輝度から液流路の高さを概算した。着色水を液流路に導入後、空圧流路を加圧することで薄膜がたわみ、液流路の高さを低くなる。これに伴い液流路の着色水の厚みが薄くなり、液流路の輝度が上昇する (Figure 4.8)。この関係から、液の厚み、つまり液流路の高さを計算することが可能である。

作製したバルブにおいて、空圧無印加時の流路高さ ($50\ \mu\text{m}$)、バルブと同じ方法で作製した別の流路の高さ ($25\ \mu\text{m}$)、空圧を最大まで印加してバルブを閉鎖し、確実に膜と流路高さが接触しているバルブ中央部分の高さ ($0\ \mu\text{m}$) の輝度を測定した。各高さにおける輝度の測定結果 (Figure 4.9) から、輝度 I と流路高さ H の間に式 (1) の関係が成り立つことがわか

った。この結果から、本実験においてはマイクロ流路の高さと画像輝度の関係が線形であると考えられる。

$$H = -0.35I + 76 \quad (1)$$

それぞれのバルブにおいて液流路のバルブ部が同一高さであっても画像中の輝度が異なっていた。そこで、各バルブにおいて流路高さ 50 μm 、流路高さ 0 μm (バルブを閉鎖した時) のバルブ部分の輝度をそれぞれ最大値、最小値として、間の輝度と流路高さの関係を線形補間した。それをもとに、マイクロ流路の高さを算出した。

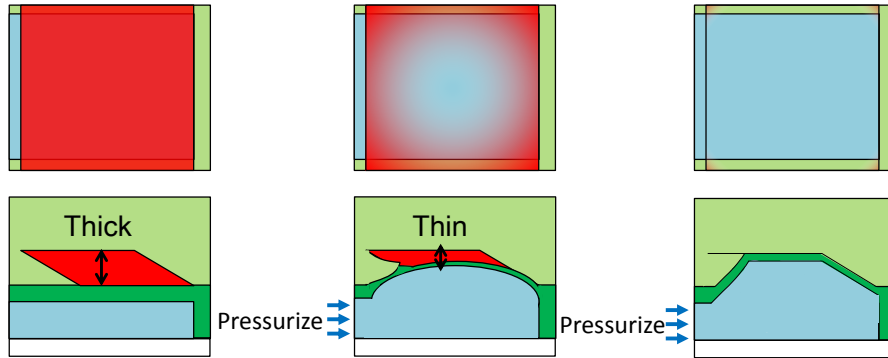


Figure 4.8 Schematic illustration of the pressure response of the parallelogram cross-section pneumatic valve.

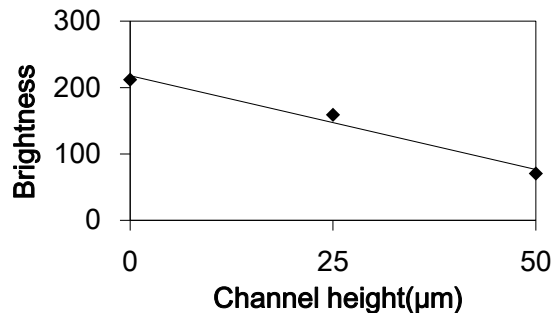


Figure 4.9 Relationship between channel height and brightness of the micro channel filled with dyed water.

4.1.8. 平行四辺形断面空圧バルブの膜厚と傾斜角の検討

平行四辺形断面空圧バルブの静的圧力印加における駆動特性を測定した。空圧バルブの重要な特性として、低い圧力の印加でバルブが閉鎖することと、圧力解放時に流路が再び開くこと、バルブ閉鎖時に細胞がすり抜けられないことが挙げられる。膜厚と傾斜角の検討においてはこれらに着目して行った。

[PDMS 薄膜の膜厚の検討]

印加圧力に対するバルブの応答と繰り返し駆動時の応答を通して、膜厚を検討した。そ

の際、流路高さ 50 μm 、流路幅 500 μm 、傾斜角度 60°の液流路に対し、膜厚 30 μm 、40 μm 、80 μm の薄膜を用いた。

A. 印加圧力とバルブ開口率との関係

バルブに印可する空圧を、ゲージ圧で 0 kPa から 200 kPa まで 20 kPa 刻みで増加させ、PDMS 薄膜の中央部付近の変形を観察した。観察結果から、4.1.7 に示す方法を用いて、バルブの動作を定量的に評価した。バルブの動作の指標として、開口率を用いた。開口率は、それぞれの圧力印加時においてバルブ中央部の流路高さを、空圧無印加時のバルブ中央部の流路高さで正規化したものと定義した。流路高さの計算にはそれぞれの膜厚、空圧において、バルブ中央部の輝度を用いた。膜厚 30 μm および 40 μm において圧力印加時に低圧で液流路の開口率を下げるができることがわかった。

B. 圧力解放後のバルブ応答

膜厚 30 μm 、40 μm 、80 μm のバルブに対して、空圧を 200 kPa 印加状態から 0 kPa まで解放したときの、バルブの様子を観察した。それにより、高さ 50 μm 、幅 500 μm 、傾斜角度 60°の液流路での開口効率膜厚 30 μm 、40 μm が良い特性を示し、解放に対しては膜厚 40 μm のバルブが良い特性を示すことが分かった。閉鎖性能と解放性能を同時に満たす空圧バルブとして、流路高さ 50 μm 、流路幅 500 μm の液流路に対し膜厚 40 μm の薄膜を用いることにした。

[バルブ傾斜角度の検討]

液流路を流れる HeLa 細胞 (直径約 10 μm) のせき止め実験を通して、傾斜角を検討した。その際、流路高さ 50 μm 、流路幅 500 μm の液流路と膜厚 40 μm の薄膜で構成されるバルブにおいて、液流路の傾斜角 (露光時) 0°, 30°, 60°を用いた。細胞懸濁液は流量 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ で導入し、バルブ閉鎖は印加圧力に 200 kPa を用いた。

実験の結果、高さ 50 μm 、幅 500 μm の液流路と膜厚 40 μm の薄膜で構成されるバルブのせき止め性能は傾斜角 60°が良い特性を示した。そこで膜厚と傾斜角の検討結果から、本研究では空圧バルブとして、流路高さ 50 μm 、流路幅 500 μm 、傾斜角 60°の液流路に対し膜厚 40 μm の薄膜で構成されるバルブを用いることにした。

4.1.9. バルブの開閉が与える細胞への影響

平行四辺形断面空圧バルブを用いた細胞のせき止めが、細胞に影響を与えることはないか確認する実験を行った。バルブ部分を通じた細胞を培養し、代表的な細胞の特性である細胞増殖率および細胞形態の評価を行った。

細胞増殖率と細胞形態の比較から、通常の継代とバルブ通過後の HeLa 細胞において、定

性的な違いは見られなかった。これにより、平行四辺形断面空圧バルブは HeLa 細胞に大きな影響を与えていないことが示唆された。

4.2. より高い流路を閉鎖可能なバルブの開発

4.1 節で開発した平行四辺形断面空圧バルブで閉鎖可能な最大流路高さは 100 μm であった[51]。これは、浮遊状態の標的細胞が通過するには十分である。しかし、細胞培養のためにはチャンバの高さは 200 μm 以上必要である。よって、チャンバと流路の高さが異なる。これにより、チャンバと流路の接続部位において段差が生じ、細胞やサンプルが滞留する問題があった。そこで、チャンバと段差なしに接続できる高さ 200 μm 以上の流路を閉鎖可能なバルブが必要となる。そこで、最大高さ 350 μm の液流路の完全な閉鎖と繰り返し開閉が可能であるバルブを提案し試作した。

4.3. まとめ

本章では、本研究で開発する細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスに組み込む、流路切り替えのためのバルブを開発した。平行四辺形流路断面をもつ空圧バルブの原理を提案し、設計・作製した。流路高さ 50 μm 、流路幅 500 μm 、傾斜角度 60°の液流路に膜厚 40 μm の薄膜で構成される平行四辺形断面空圧バルブが、完全な閉鎖と繰り返し開閉動作において良い特性を示した。平行四辺形断面空圧バルブでは高さ 100 μm までの液流路の開閉が可能であった。さらに、最大高さ 350 μm の液流路の完全な閉鎖と繰り返し開閉が可能であるバルブを提案し試作した。

第5章 細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの作製と評価

本章では、細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの作製と評価を行う。5.1節では、3章および4章で開発したマイクロピラーアレイ (MPA) と平行四辺形断面空圧バルブを実装したマイクロ流路デバイスの設計について述べる。5.2節では設計したマイクロ流路デバイスの作製方法について述べる。5.3節では、作製したデバイスの性能評価実験の実験系を説明し、5.4節では、実験方法および結果について説明する。性能評価実験には2種の細胞と蛍光標識抗体を用いて、(1) 直列したチャンバへの異種細胞導入、(2) 非標的細胞結合抗体の除去、(3) 標的細胞特異的結合抗体の回収を行う。これにより、本デバイスが細胞特異的結合分子の探索用マイクロ流路デバイスに必要な機能と性能を兼ね備えることを示す。

5.1. 細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの設計

細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスを Figure 5.1 に示す。探索用マイクロ流路デバイスは、型取り成形によって作製した二つの流路層と薄膜を接合することによって作製する (Figure 5.2)。本デバイスは、細胞やサンプルの導入を行う (1) 液流路層、流路層を仕切る (2) 薄膜層、空圧バルブに空圧印加を行う (3) 空圧流路層からなる。今回開発する流路には、空圧による変形が容易であり、細胞毒性もなく、倒立顕微鏡での観察のために透明度が高いことが求められる。そこで全層の材質として PDMS を用いる。以下に、各層の形状・寸法を示す。

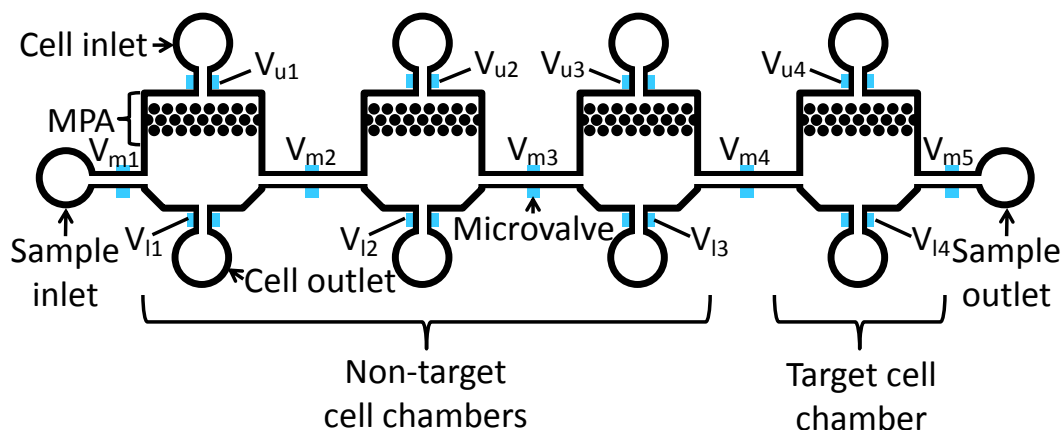


Figure 5.1 Schematic illustration of the microfluidic device for screening for cell-specific binding molecules.

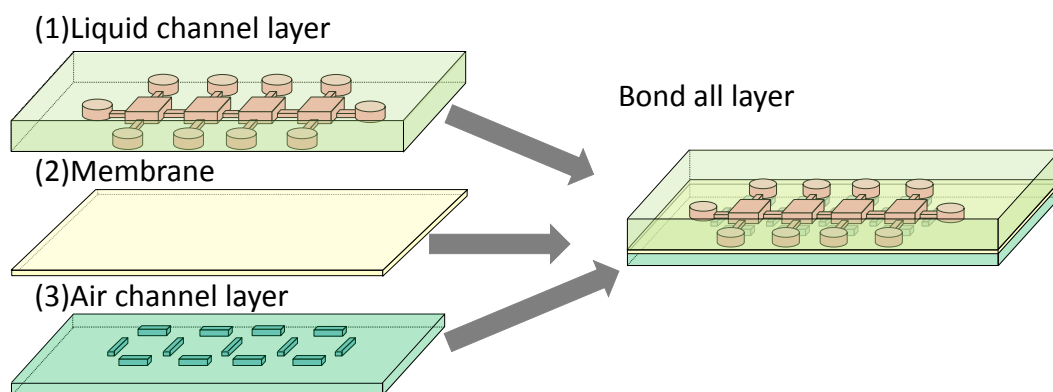


Figure 5.2 Schematic illustration of the device constitution.

(1) 液流路層

液流路の形状および代表的な寸法を説明する．マイクロ流路デバイス内に細胞を接着させて細胞特異的結合分子探索を行った先行研究[18]においては， 10^4 オーダーの細胞数で細胞特異的結合分子探索を行っている．接着細胞は，一般的に底面積 100 mm^2 あたり 10^5 個オーダーの細胞が接着できる[52]．よって， 10^4 個オーダーの細胞を導入するためには 10 mm^2 程度の底面積が必要である．そこで，MPA を除いたチャンバ部の長さを 5 mm ，幅を 2 mm とし， 10 mm^2 の底面積を確保する．また，洗浄時にチャンバの隅に結合分子等が残留することを防ぐため，角を落としておく．細胞分散のための MPA 部分は 3 章の結果より，直径 $100 \mu\text{m}$ ，高さ $50 \mu\text{m}$ のピラーを $5 \mu\text{m}$ 間隔で 4 列配置した．ひとつの探索用マイクロ流路デバイスに組み込むバルブ数が多いため，バルブの作製成功率が重要になる．そこで，流路切り替えバルブには最も成功率の高い， $50 \mu\text{m}$ の平行四辺形空圧バルブを使用した．導入口・排出口やバルブ部となる流路の寸法は，4.2.5 (1) の液流路に準ずる．

液流路は部位によって高さが異なる．これまでの経験から，チャンバ部分の流路高さを $200 \mu\text{m}$ に設定することで，安定した細胞の接着や培養が可能になることが分かっている．また，液体の導入・排出口の高さをそれに続く流路に対して高く設定しておくことで，流路に気泡が入ることを防ぐことができる．細胞を導入するチャンバの部分と，液体の導入・排出口のみ，高さを他の部分より高い $200 \mu\text{m}$ に設定している (Figure 5.3 の黒色で塗りつぶされた箇所)．それ以外の部位では，バルブ部に合わせて高さ $50 \mu\text{m}$ とした．

バルブ箇所の液流路断面形状は傾斜露光により平行四辺形にする必要がある．MPA 部分は傾斜せず水平であるほうが都合がよい．その他の部分も，平行四辺形にする必要はないため，水平にする．そこで，液流路のうち Figure 5.3 に示す斜線の流路のみ断面を平行四辺形にする．液流路層は，PDMS 製とする．

(2) 薄膜層

液流路と空圧流路を仕切る膜の厚みは、4章の検証結果から 40 μm とした。

(3) 空圧流路層

空圧流路は、細胞導入用の一つの空圧導入口から分岐させたバルブとチャンバ間に独立したバルブを、バルブの位置に合わせて配置する。バルブ部分の流路幅は 500 μm とする。空圧流路の流路高さは作製が容易な 50 μm とした。空圧流路と液流路の相対的配置を Figure 5.4 に示す。

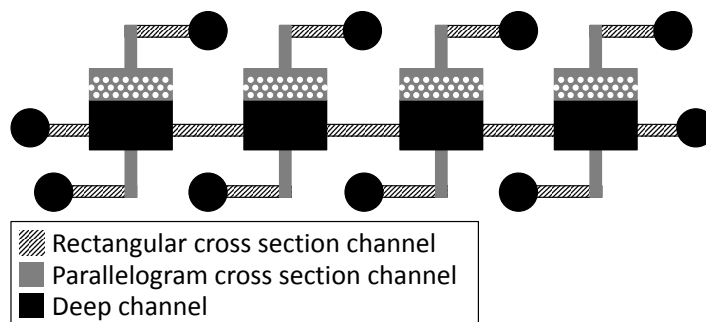


Figure 5.3 Schematic illustration of the liquid channel.

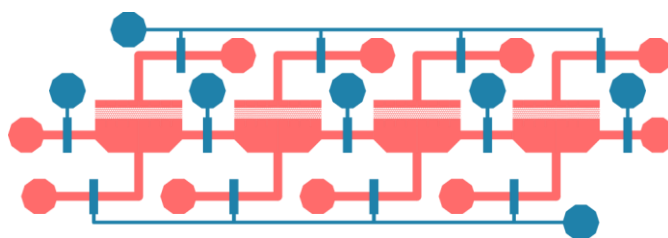


Figure 5.4 Overlay view of the liquid channel and pneumatic channel.

5.2. 探索用マイクロ流路デバイスの作製

5.2.1. 探索用マイクロ流路デバイスの作製プロセス

探索用マイクロ流路デバイス作製の全体の流れを示す。初めに、液流路層の鋳型を作製する。次に、空圧流路層の鋳型を作製する。最後に、それぞれの鋳型を用いて PDMS を成形し、2層の流路を PDMS の薄膜を介して接合する。

[鋳型の作製]

A. 液流路鋳型の作製方法

液流路鋳型には、高さ 50 μm の部分と高さ 200 μm の部分が存在する。そのため、はじめに高さ 50 μm の層を作製し、その上に高さ 200 μm の層を重ねて作製する。高さ 50 μm の層では、傾斜露光によって MPA まで傾斜することを防ぐため、流路(傾斜露光)と MPA(水平露光)の2回に分けて露光する。そのため、液流路のうち断面が平行四辺形となるのは Figure 5.3

に示す斜線の流路のみである。

- 1-4. 高さ 50 μm の層を作製するためのレジスト塗布および加熱方法は, 3.2.1 [鋳型の作製] A の 1-4 と同様である。
5. Figure 5.5 のマスクを基板に重ねて配置し, マスクと基板を水平から 60°傾斜した状態で透明部のみ露光する。露光エネルギーは 420 mJ とする。これにより, Figure 5.3 の斜線部の鋳型ができる。
6. Figure 5.6 のようなマスクを基板に重ねて配置し, 透明部のみ露光する。露光にはマスクアライナを使用し, 露光エネルギーは 350 mJ とする。これにより, Figure 5.3 の灰色部の鋳型ができる。
7. 65 °Cのホットプレートで 2 min 加熱したのち 95 °Cまで温度を上げ, 4 h 加熱する。基板を現像液に浸し, 攪拌機で攪拌しながら 15 min 現像する。現像後, エタノールおよび純水を用いてリンスする。)
8. リンス後, 十分に乾燥させた鋳型に高さ 200 μm の層を作るための厚膜 SU-8 を塗布する。Figure 4.8 に示す条件で回転する。スピンの回転数を 500 rpm まで 5 sec で上げ, 500 rpm で 5 sec 回転する。回転数を 2000 rpm まで 10 sec で上げ, 2000 rpm で 30 sec 回転する。
9. スピンコートした基板を 65 °Cのホットプレートで 10 min 加熱したのち 95 °Cまで温度を上げ, 2 h 加熱する。
10. Figure 5.7 のようなマスクを基板に重ねて配置し, 透明部のみ露光する。露光エネルギーは 350 mJ とした。これにより, Figure 5.3 の黒色部の鋳型ができる。
11. 65 °Cのホットプレートで 2 min 加熱したのち 95 °Cまで温度を上げ, 45 min 加熱する。
12. 基板を現像液に浸し, 攪拌機で攪拌しながら 1 h 現像する。現像後, エタノールおよび純水を用いてリンスする。
13. パターニングされた基板には, PDMS の剥離性を向上するために表面処理をする。表面処理には CVD を用いる。処理ガスは CHF_3 , 処理条件をエネルギー 50 W, 圧力 150mTorr, 流量 30 sccm, 処理時間 3 min に設定する。

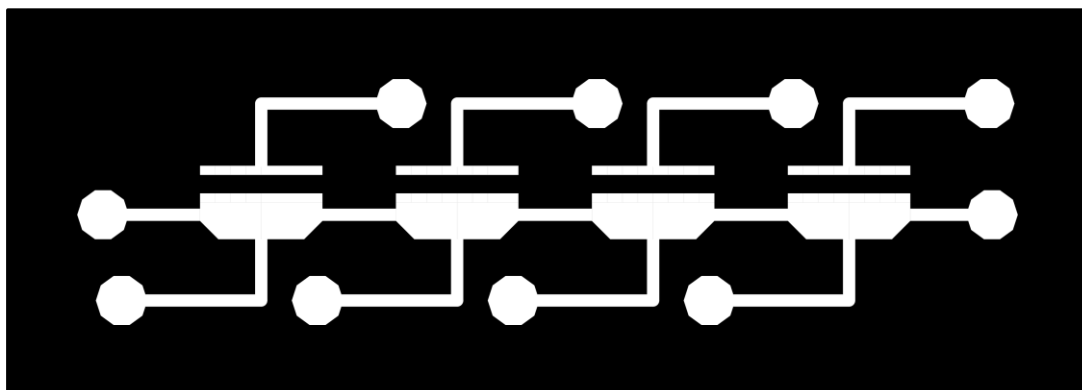


Figure 5.5 Mask for the 50 μm layer of the liquid channel (inclined lithography).

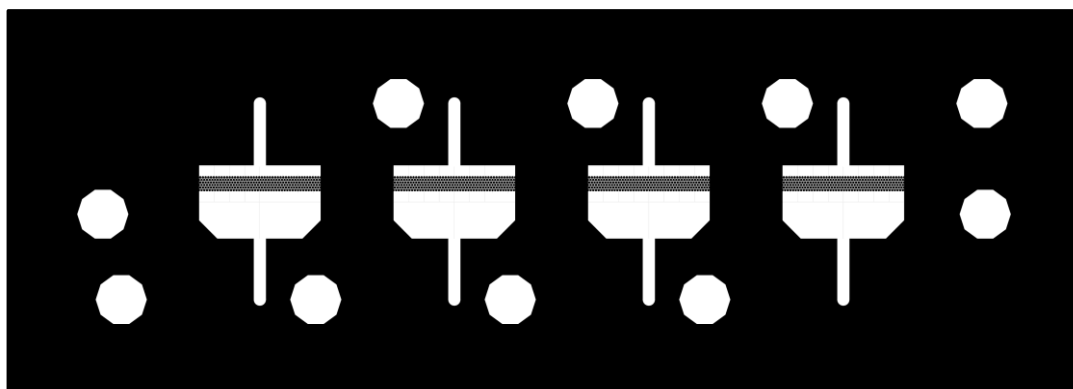


Figure 5.6 Mask for the 50 μm layer of the liquid channel.

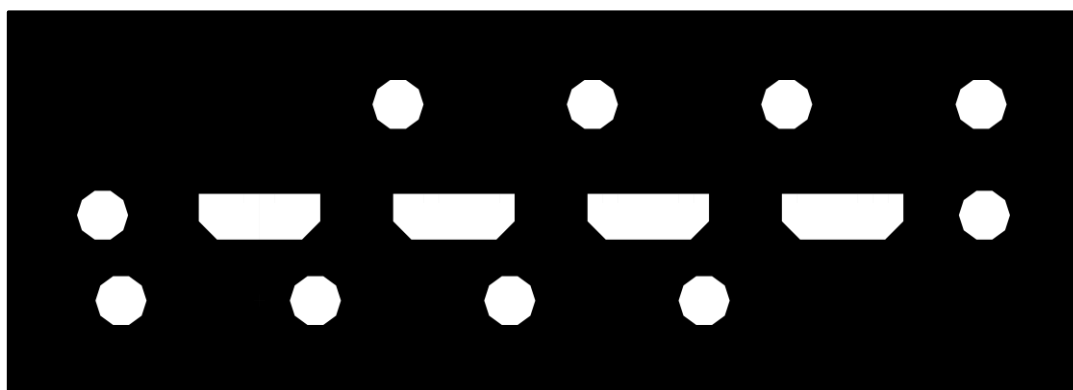


Figure 5.7 Mask for the 200 μm layer of the liquid channel.

B. 空圧流路鋳型

作製手順は、4.1.5 [鋳型の作製] B と同一となる。Figure 5.8 に示すマスクを用いる。

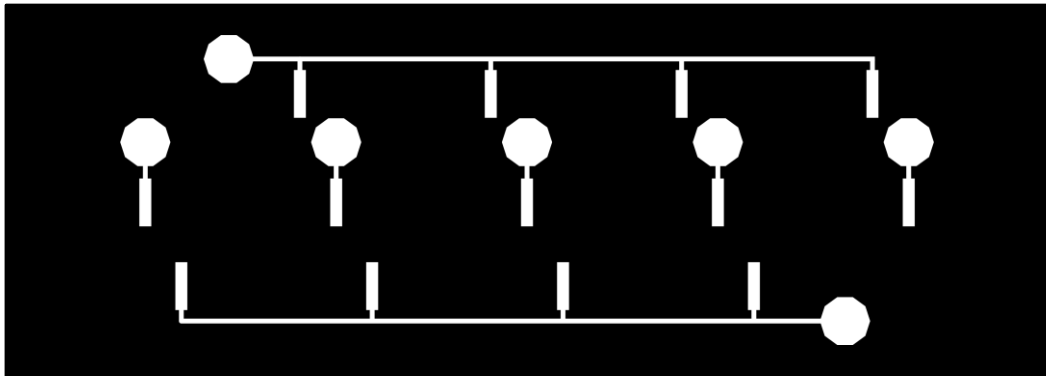


Figure 5.8 Mask for the pneumatic channel.

[PDMS への転写および流路の積層]

1. PDMS の主剤と硬化剤を重量比 10:1 で混合する。
2. 厚さ 2 mm のシリコンゴム製の土手で液流路鋳型，空圧流路鋳型をそれぞれ囲む．土手で囲まれた領域に PDMS を流し込み， -0.06 MPa (ゲージ圧) まで減圧して 10 min 脱泡して，気泡を完全に除去する。
3. PDMS を流し込んだ鋳型を 100°C に熱したホットプレートで 1 h 加熱することで PDMS を硬化させる。
4. 剥離性を向上する表面処理を施した平滑なシリコン基板に，1 と同様に硬化剤と混合した PDMS を，スピンドクターを用いて薄く塗布する．回転数は 4.1.5 [PDMS への転写及び流路の積層]4. と同様にする。
5. PDMS を塗布した鋳型を 100°C のホットプレートで 10 min 加熱することで，PDMS 薄膜とする。
6. 液流路鋳型を用いて型取りした PDMS を鋳型から剥離する．直径 1 mm の生検トレパンを用いて液の出入り口を作製する。
7. 穴を開けた液流路層と PDMS 薄膜を 120°C のホットプレートで 1 min プリバークする．それぞれの接合面に，エキシマランプを 40 sec 照射する．加圧しながら 120°C のホットプレートで 1 h 加熱する．これにより，二つの流路層を接合する。
8. 接合した薄膜つき液流路層を，シリコン基板から剥離する。
9. 直径 0.5 mm の生検トレパンを用いて空圧流路の流入口を作製する。
10. 穴を開けた空圧流路層を薄膜つき液流路層と 7. と同様の手順で接合する。

5.2.2. 完成した探索用マイクロ流路デバイス

作製した探索用マイクロ流路デバイスを Figure 5.9 に示す．赤色水で着色した部分が液体を流すための液流路で，青色水で着色した部分がバルブ制御用の空圧流路である．

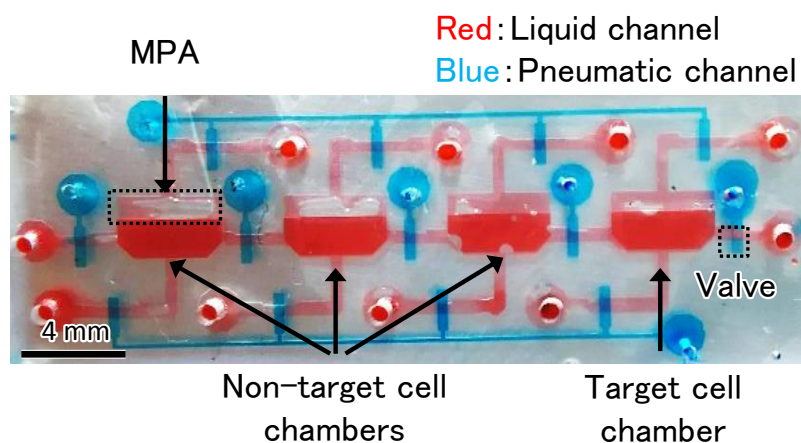
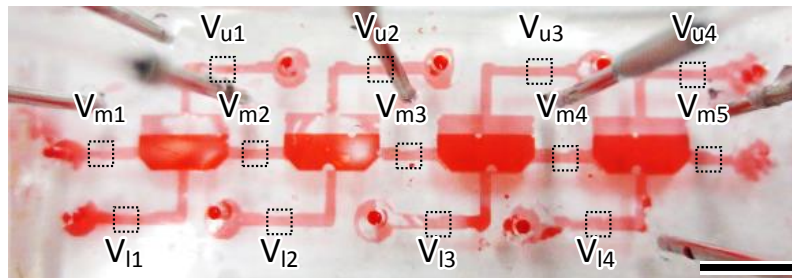


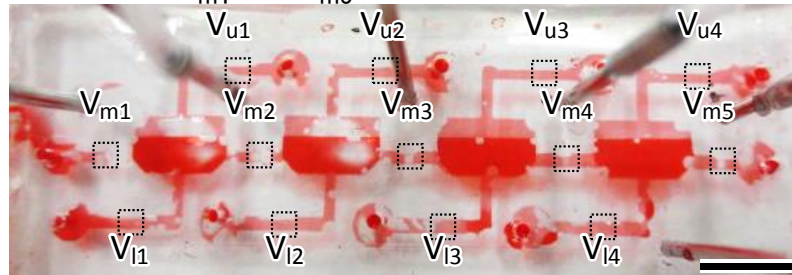
Figure 5.9 Photograph of the device, the micrograph of the valve.

作製した探索用マイクロ流路デバイスのバルブ切り替え動作を Figure 5.10 に示す. 液流路のみが赤色水で着色されており, 点線で囲った部分がバルブである. Figure 5.10 (a)はすべてのバルブを開いた状態である. Figure 5.10 (b)は V_{m1} , V_{m2} , V_{m3} , V_{m4} , V_{m5} のみを閉じた状態である. バルブ部分が透明になっていることから, バルブが閉じていることが分かる. この状態は 2.2.3 節の(a) 細胞導入, (d) 洗浄, (e) 標的細胞結合分子の回収のステップで使用する. (d)洗浄と(e)標的細胞結合分子の回収ステップでは, Figure 2.3 と異なるが, これは実際のデバイスではより操作を簡便にするために V_{11} から V_{14} , V_{u1} から V_{u4} の空圧流路がそれぞれ共通の inlet に接続されているためである. Figure 5.10 (c)は V_{11} , V_{12} , V_{13} , V_{14} , V_{u1} , V_{u2} , V_{u3} , V_{u4} のみを閉じた状態である. この状態は 2.2.3 節の(b) 非標的細胞チャンバへのサンプルの導入と, (c) 反応および隣接するチャンバへのサンプルの輸送の中の輸送のステップで使用する. Figure 5.10 (d)は全てのバルブを閉じた状態である. この状態は 2.2.3 節の(c) 反応および隣接するチャンバへのサンプルの輸送の中の反応のステップで使用する.

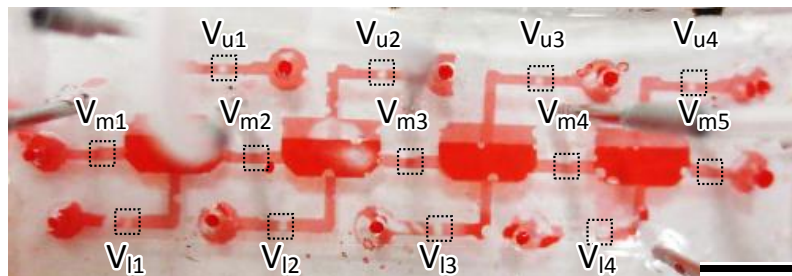
(a) All valves are open



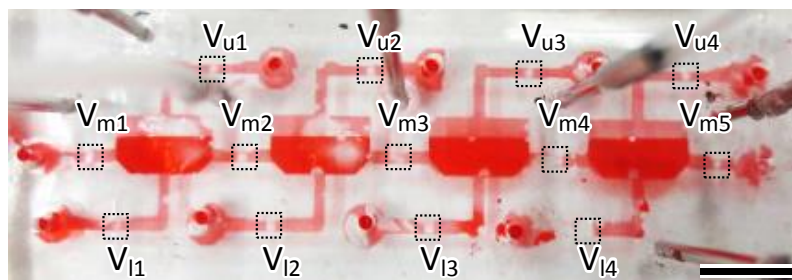
(b) From V_{m1} to V_{m5} are closed



(c) From V_{u1} to V_{u4} and V_{l1} to V_{l4} are closed



(d) All valves are closed



Scale bar: 5 mm

Figure 5.10 Valve operation of the fabricated microfluidic device.

5.3. 実験系

探索用マイクロ流路デバイスの評価実験系は、装置、画像解析法、細胞、試薬と様々な要素で構成される。

5.3.1. 装置

実験系を構成する装置の概要を Figure 5.11 に示す。探索用マイクロ流路デバイスを顕微鏡下に設置し、標的細胞チャンバを観察した。細胞および細胞結合分子としての蛍光標識抗体の導入にはシリンジポンプを用いた。細胞懸濁液または蛍光標識抗体を満たしたシリンジと細胞導入口または抗体導入口は、シリコンチューブとステンレスカットパイプを用いて接続した。流路切り替えバルブの制御に使う空圧流路は、空圧流路の導入口にステンレスカットパイプ、シリコンチューブ、電磁弁、レギュレータを介してエアコンプレッサを接続した。

細胞導入時には顕微鏡 CKX-41 (Olympus) を用いて標的細胞チャンバを明視野観察した。非標的細胞結合抗体除去実験と抗体回収実験における細胞の蛍光観察には、蛍光顕微鏡 IX-83 (Olympus) を用いた。探索用マイクロ流路デバイスの評価実験には、赤色と緑色の蛍光色素で標識した抗体を用いた。赤色の蛍光観察にはミラーユニット U-FGWA (Olympus) を、緑色の蛍光観察には U-FBNA (Olympus) を用いた。溶液の蛍光強度測定には蛍光光度計 Infinite F500 microplate reader (Tecan) を用いた。測定時に使用するフィルタの励起波長は 485 ± 20 nm, 蛍光波長は 535 ± 25 nm とした。

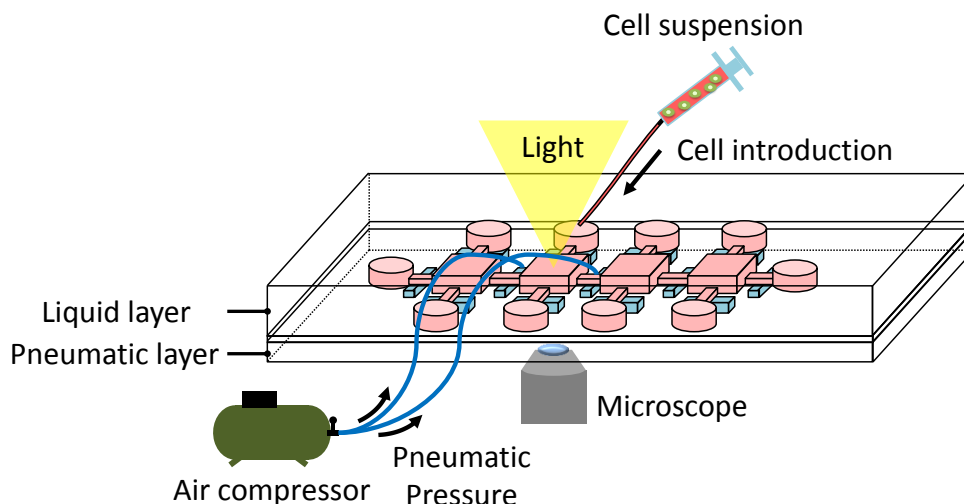


Figure 5.11 Schematic illustration of the experimental equipment for cell introduction.

5.3.2. 画像解析法

非標的細胞結合抗体除去実験と抗体回収実験において、撮影した蛍光画像の蛍光強度計測には、解析ソフト iQ3 (Andor) の Analyze 機能を用いた。測定の手順を以下に示す。

1. 明視野画像を元に、細胞が存在する領域および存在しない領域を手動で指定した。
2. それぞれの領域における赤色・緑色蛍光の平均輝度を取得した。
3. 赤色・緑色蛍光のそれぞれに対して、細胞の存在する領域の平均輝度から細胞が存在

しない領域の輝度を減算し、その値をそれぞれの色の蛍光強度とした。

5.3.3. 細胞

全ての探索用マイクロ流路デバイスの評価実験では、標的細胞として HER2 分子を発現している N87 細胞を使用し、非標的細胞として HER2 分子を発現していない HeLa 細胞を用いた。また、N87 細胞、HeLa 細胞ともに integrin 分子を発現している。

N87 細胞と HeLa 細胞の細胞培養液としては、高グルコースの DMEM 培地に 10% (体積) の FBS と 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の PS を混合したものをを用いた。細胞懸濁液を作製する際には、トリプシン (0.25w/v% Trypsin Solution with Phenol Red, wako) を使用して細胞を培養 dish から剥離した。N87 細胞の剥離時間は 10 min, HeLa 細胞の剥離時間は 2 min とし、常温で行った。探索用マイクロ流路デバイスのチャンバへの細胞の接着率を向上させるため、チャンバをコラーゲン (Cellmatrix Type I-C, wako) でコーティングした。評価実験においては、各細胞を 4% パラフォルムアルデヒド (PFA; 4%-Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution, Nacalai Tesque) 溶液で細胞固定した。これは、本実験で使用する抗体と細胞の反応にかかる時間が長く、実験中に生じる細胞表面に発現するタンパク質の変化を抑制するためである。また、細胞固定をすることでチャンバからの細胞の剥離を防ぐことができる。

5.3.4. 試薬

非標的細胞結合抗体除去実験と抗体回収実験においては、蛍光標識抗体を用いた。分子として抗体を選択した理由は、結合力が強いためである。結合対象が既知の抗体をそれぞれ異なった蛍光色素で標識することで、蛍光観察により抗体の種類を判別する。蛍光顕微鏡画像の輝度からそれぞれの結合量を概算できる。標的細胞結合抗体と、非標的細胞結合抗体の 2 種類を用意した。N87 細胞に結合し、HeLa 細胞には結合しない標的細胞特異的結合抗体として蛍光色素 AF 488 で標識した抗 HER2 抗体 (Alexa Fluor® 488 anti-human CD340 (erbB2/HER2) Antibodies, BioLegend) を用いた。AF 488 の励起波長は 490 nm, 蛍光波長は 525 nm である (緑色蛍光)。また、HeLa 細胞と N87 細胞の双方に結合する非標的細胞結合抗体として蛍光色素 AF 555 で標識した抗 integrin 抗体 (Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ Antibody, Alexa Fluor® 555 Conjugated, Bioss) を用いた。AF 555 の励起波長は 555 nm, 蛍光波長は 580 nm である (赤色蛍光)。これら 2 種類の蛍光標識抗体を混合した液を抗体液と呼ぶことにする。

抗体液中の蛍光標識抗体の混合比率は、観察時の蛍光強度が同程度となる抗 Integrin 抗体 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 抗 HER2 抗体 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に設定した。抗 Integrin 抗体の分子量は 150 kDa であり、1 μg 中の分子数は 4.01×10^{12} 個である。また、抗 HER2 抗体の分子量は 72.4 kDa であり、1 μg 中の分子数は 8.33×10^{12} 個である。そのため、抗 Integrin 抗体 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 抗 HER2 抗体 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の混合液中には、1 ml 辺り 4.01×10^{13} 個の抗 Integrin 抗体分子と 3.33×10^{13} 個の抗 HER2 抗体分子が含まれる。

チャンバ間の抗体溶液の輸送には、キャノーラ油 (cooking canola oil, Ajinomoto, Tokyo, Japan. オレイン酸 64.0 %, リノール酸 20.6 %, α リノレン酸 9.5 %, パルミチン酸 4.1 %, ステアリン酸 1.8 %) を用いた。キャノーラ油をチャンバに導入することで、チャンバに存在した抗体液を隣接するチャンバに移動できる。

標的細胞に結合した抗体を回収する際に用いる回収バッファには、T7 フェージを用いた探索プロトコルを参考に、1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS; wako), 0.1% Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween20, TCI), リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; PBS(-), wako) の混合液を用いた[53]。

5.4. 探索用マイクロ流路デバイスの性能評価実験概要

探索用マイクロ流路デバイスの性能として、2種のがん細胞と蛍光標識抗体を用いて、(1) 直列したチャンバへの異種細胞導入、(2) 非標的細胞結合抗体の除去実験、(3) 標的細胞特異的結合抗体の回収の評価実験を行った。

5.4.1. 評価実験 (1) 直列したチャンバへの異種細胞導入

前節で作製された探索用マイクロ流路デバイスの標的細胞チャンバおよびそれに隣接する非標的細胞チャンバに、標的細胞と非標的細胞をそれぞれ導入した(Figure 5.12)。これにより、細胞が均一かつ混合せずにチャンバ内に導入できることを確認した。細胞導入の詳細な手順を以下に示す。

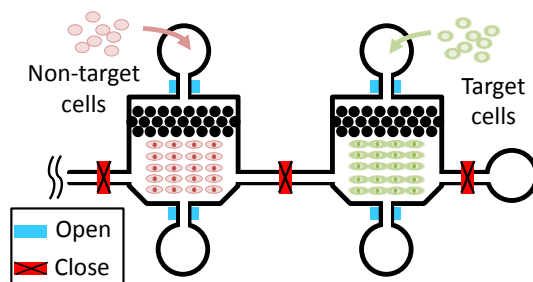


Figure 5.12 Schematic illustration of cell introduction

[探索用デバイスの下準備]

1. オートクレーブ (KTS-2322, 株式会社コクサン)を用いて、127°Cで 30 min 探索用デバイスを滅菌した。
2. 10% (体積) に希釈したコラーゲンを探索用デバイスの液流路全体に導入する。導入後、クリーンベンチ内で一晩乾燥させた。
3. 探索用デバイスを純水に沈めた状態で-0.06 MPa (ゲージ圧) まで減圧し、10 min の間静置した。これにより液流路を純水で満たした。
4. 探索用デバイスの液流路内を培養液で洗浄し、余分なコラーゲンを取り除いた。その後、探索用デバイス内を培養液で満たした。

[標的細胞の導入]

1. 標的細胞懸濁液(1.0×10^7 個/mL)をシリンジに満たし、シリンジポンプにセットした。
2. 探索用デバイスを顕微鏡にセットした。
3. 標的細胞チャンバの両側に位置するバルブ (Figure 5.1 の V_{m4}, V_{m5}) を空圧源に接続した。
4. V_{m4}, V_{m5} に 200 kPa の空気圧を印可し、流路を閉鎖した。
5. 5.3.3.で作製した標的細胞懸濁液を標的細胞チャンバの細胞導入口 (Figure 5.1 の cell inlet) に接続し、導入した。チャンバ全体に標的細胞が広がるまで $2 \mu\text{L}/\text{min}$ で 1 min 導入した。導入後、ゆっくりとカットパイプを細胞導入口から引き抜いた。
6. バルブに印可されていた空圧をゆっくりと解放した。0 kPa まで解放した後にカットパイプを引き抜いた。
7. 培養液を 15 mL 加えた 100 mm ディッシュに探索用デバイスを設置し、 CO_2 インキュベータで 6 h 培養した。

[非標的細胞の導入]

1. 非標的細胞懸濁液(1.0×10^7 個/mL)をシリンジに満たし、シリンジポンプにセットした。
2. インキュベータ内の探索用デバイスを取り出し、顕微鏡にセットした。
3. 非標的細胞を導入する非標的細胞チャンバの両側に位置するバルブ (Figure 5.1 の $V_{m1}-V_{m4}$) を空圧減に接続した。
4. $V_{m1}-V_{m4}$ に 200 kPa の空気圧を印可し、流路を閉鎖した。
5. 5.3.3.で作製した非標的細胞懸濁液で満たしたシリンジを非標的細胞チャンバの細胞導入口に接続し、導入した。チャンバ全体に非標的細胞が広がるまで $2 \mu\text{L}/\text{min}$ で 1 min 導入した。導入後、ゆっくりとカットパイプを細胞導入口から引き抜いた。
6. バルブに印可されていた空気圧をゆっくりと開放した。0 kPa まで解放した後にカットパイプを引き抜いた。
7. 培養液の入ったディッシュに探索用デバイスを設置し、 CO_2 インキュベータで 6 h 培養した。

それぞれのチャンバに細胞導入し、培養した後にチャンバ全体にわたりを観察したが、細胞形態という観点では細胞同士の混入は見られなかった。また、細胞導入中の観察においても、バルブで閉じた流路の方向へは細胞が流れなかった。これらのことから、細胞導入および培養時には細胞同士の混入が起こっていないと考えられる。

5.4.2. 評価実験 (2) 非標的細胞結合抗体除去実験

[輸送バッファの選択]

非標的細胞結合抗体除去実験を行うためには、抗体液を隣のチャンバに輸送するための

輸送バッファが必要になる。抗体液の希釈を防ぐため、輸送バッファは水と混合しない流体である必要がある。本実験では、水と混合しない流体として空気とキャノーラ油を比較した。Figure 5.13 にそれぞれを輸送バッファとしてチャンバに導入する前後に撮影した、非標的細胞の様子を示す。Figure 5.13 (a)でチャンバ内に接着していた細胞が、空気導入後にはFigure 5.13 (b)ではチャンバ内に確認できなくなっていた。これは、チャンバ内に満たされていた PBS と空気との界面に発生する界面張力により細胞が剥離し、チャンバから流出したためである。一方、キャノーラ油を使用した場合には導入前 (Figure 5.13 (c)), 導入後の (Figure 5.13 (d))の両方で、チャンバに細胞が接着していることが確認できた。そこで、本研究においては輸送バッファとしてキャノーラ油を選択した。なお、キャノーラ油を使用した場合には、抗体液輸送中においても非標的細胞が標的細胞チャンバに混入する様子は無かった。

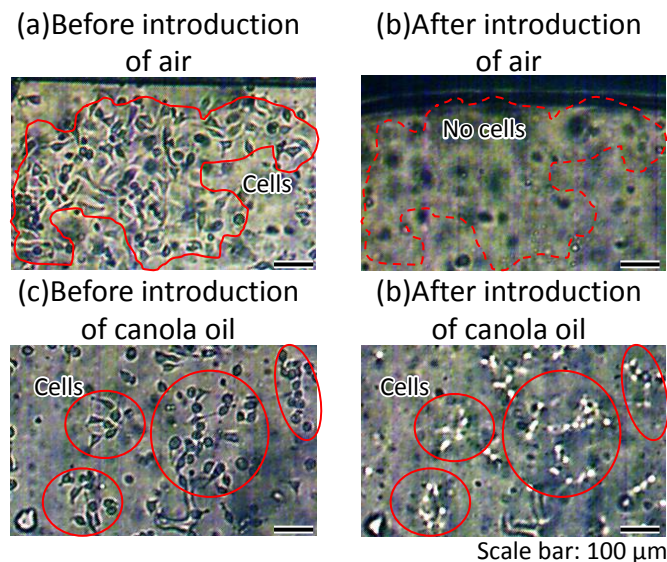


Figure 5.13 Micrograph of the non-target cells before and after the introduction of transportation buffer.

キャノーラ油との混合による抗体液への影響を調査するため、下記の手順で実験を行った。

1. 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標的細胞特異的結合抗体液とキャノーラ油を混合し、 37°C で 6 h 静置した。
2. 24 well dish に N87 細胞を播種し、 37°C の CO_2 インキュベータで 6 h 培養した。
3. N87 細胞を 500 μL の PBS で 1 回洗浄した。
4. 4% PFA を dish に添加し、 20°C で 15 min 静置し細胞固定した。
5. N87 細胞を 500 μL の PBS で 1 回洗浄した。
6. 1 の混合液からキャノーラ油を除去し、N87 細胞の dish に 500 μL 添加した。

7. 37°Cで2 h 静置した後に、500 μ L の PBS で3回洗浄した。
8. 蛍光顕微鏡を用いて dish の蛍光観察を行った。

キャノーラ油を使用せずに実験を行った場合と、キャノーラ油を使用した場合の細胞上の平均蛍光輝度を Figure 5.14 に示す。キャノーラ油を使用した場合には、わずかに蛍光輝度が低下していた。しかし、本実験においてはすべてのデバイスにおいて同じ条件で蛍光輝度の低下が起こるため実験結果への影響は無いと考えられる。

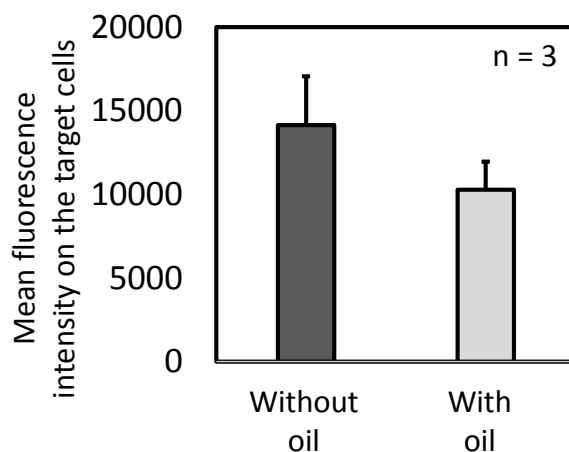


Figure 5.14 Graph of the mean fluorescence intensity on the target cells.

[非標的細胞結合抗体の除去]

上流チャンバに非標的細胞を導入したチャンバを配置することにより、標的細胞に結合する非標的細胞結合抗体の割合を低減することが可能であるかを調べた。四つのチャンバが接続した探索用マイクロ流路デバイスに細胞を次に示すタイプ A から C のパターンで導入した。なお、本実験で使用するマイクロ流路デバイスのチャンバは、上流側からチャンバ 1, チャンバ 2, チャンバ 3, チャンバ 4 と呼ぶ。

タイプ A: チャンバ 1 から 3 は細胞なし、チャンバ 4 は標的細胞あり。

タイプ B: チャンバ 1, 2 は細胞なし、チャンバ 3 は非標的細胞あり、チャンバ 4 は標的細胞あり。

タイプ C: チャンバ 1 から 3 は非標的細胞あり、チャンバ 4 は標的細胞あり。

タイプ A, タイプ B, タイプ C のデバイスにそれぞれ同じ手順で抗体液を導入した。またコントロールとして、タイプ A と同じパターンで細胞を導入したデバイスに標的細胞特異的結合抗体のみを導入した。蛍光強度は蛍光標識抗体濃度によって変化する。そのため、タイプ A, B, C のチャンバ 4 における標的細胞の赤色蛍光と緑色蛍光の蛍光強度比を計算することで、非標的細胞の導入されたチャンバ数の増加による非標的細胞結合抗体の低減具

合を測定できる。また、コントロールでは標的細胞の赤色の自家蛍光の強度と、緑色蛍光強度の比率を測定した。

[実験手順]

1. 5.4.1 に述べた方法で、それぞれの細胞を探索用デバイスのそれぞれのチャンバに導入し、培養した。
2. 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 10 min の間 PBS を導入し、チャンバ内を洗浄した。
3. 4% PFA 溶液をチャンバに導入したのちに、20 $^{\circ}\text{C}$ で 15 min 静置して細胞固定を行った。
4. 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 10 min の間 PBS を導入し、チャンバ内を洗浄した。
5. PBS と 5% FBS の混合液をチャンバに導入したのちに、20 $^{\circ}\text{C}$ で 60 min 静置してブロッキングを行った。
6. 非標的細胞結合抗体と標的細胞特異的結合抗体の混合物 (混合抗体液) をチャンバ1に導入した (非標的細胞結合抗体 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 標的細胞特異的結合抗体 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。導入後、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 h 静置した。
7. キャノーラ油をサンプル導入口 (Figure 5.1 の sample inlet) から導入し、混合抗体液を隣のチャンバに移動させた。移動完了後、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 h 静置した。この操作を混合抗体液が標的細胞チャンバに到達するまで繰り返した。
8. 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 10 min の間 PBS を導入し、チャンバ内を洗浄した。
9. 蛍光顕微鏡を用いてチャンバ4の蛍光観察を行った。

蛍光観察により得られた緑色蛍光画像の輝度に対する赤色蛍光画像の輝度の割合を計算した結果、チャンバの増加により、非標的細胞結合抗体の除去能力を向上することが示された。コントロールの自家蛍光の赤/緑比率とタイプ C の赤/緑比率が同等であることから、十分に非標的細胞結合抗体が除去されたと考える。ただし、これは蛍光観察によって検出可能な範囲での評価であり、実際にすべての抗体を除去できたとは言えない。蛍光観察における検出下限は細胞の自家蛍光の輝度であり、それ以下の輝度の蛍光は自家蛍光に埋もれてしまい観察することができない。なお、本実験における非標的細胞結合抗体の検出下限濃度は (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) である。

5.4.3. 評価実験 (3) 抗体回収実験

回収バッファを用いることで、細胞に結合した蛍光標識抗体を回収できることを確認した。探索用マイクロ流路デバイスのチャンバ4に標的細胞を導入した。標的細胞に標的細胞特異的結合抗体を結合させた後に洗浄した。洗浄後、回収バッファを導入し、静置時間をデバイス毎に 15 min, 30 min, 60 min と設定した。一定時間静置した後に PBS を導入することで、標的細胞表面から剥離した抗体を回収した (回収溶液)。標的細胞上の抗体が剥離

すると、回収操作後の標的細胞の蛍光画像の強度が回収前と比較して減少する。同時に、剥離した抗体は回収溶液に移行し、回収溶液の蛍光は上昇する。本実験では、回収バッファの代わりに PBS を導入し 60 min 静置した実験をコントロールとした。

【実験手順】

1-5. 5.4.2[実験手順] 1-5 と同様の方法でブロッキングまでを行った。

6. 標的細胞特異的結合抗体をチャンバに導入した (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 導入後, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 h 静置した。
7. 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 10 min の間 PBS を導入し, チャンバ内を洗浄した。
8. 蛍光顕微鏡を用いて標的細胞の蛍光画像を撮影した。
9. 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 1 min の間回収バッファまたは PBS を導入した。回収バッファを導入した三つのデバイスの反応条件は 20 $^{\circ}\text{C}$ でそれぞれ 15 min, 30 min, 60 min とした。PBS を導入したデバイスの反応条件は 20 $^{\circ}\text{C}$ で 60 min とした。
10. チャンバ内に 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 5 min の間 PBS を導入した。回収溶液はチャンバ 4 の細胞排出口 (Figure 5.1 の cell outlet) から回収しマイクロチューブに保存した。
11. 蛍光光度計を用いて回収溶液の蛍光強度を測定した。
12. 再度標的細胞の蛍光画像を撮影した。

抗体回収操作前後の標的細胞の蛍光画像および各反応時間における抗体回収操作前の緑色蛍光画像の平均強度に対する、回収後の平均強度の割合を比較すると、回収バッファにより細胞表面から蛍光標識抗体が脱離し、回収バッファに回収されたことが分かる。

抗体回収操作前後の標的細胞の蛍光画像および抗体を結合させていない標的細胞の蛍光画像(自家蛍光)から、下記の手順で回収率を算出した。A: 回収操作前の細胞上における平均蛍光輝度, B: 回収バッファを使用して回収操作を行った後の細胞上における平均蛍光輝度, C: 蛍光標識抗体を結合させていない細胞上における平均蛍光輝度 (自家蛍光)の 3 種類の輝度を測定する (Figure 5.15a). このとき, A から B を引いた値が回収操作によって剥離した蛍光標識抗体の量であると考え, A から C を引いた値が回収操作前に細胞に結合していた蛍光標識抗体の結合量であると考え (Figure 5.15b). すると, $(A - B) / (A - C)$ が回収率であると考えることができる。この方法を用いて計算した回収率を Figure 5.16 に示す。反応時間 60 min の時の回収率は%であり、標的細胞に結合した抗体のすべてを回収しきることはできなかった。回収率を向上させるためには、反応時間の延長や洗浄条件の改善が効果的であると考えられる。ただし、この方法には自家蛍光を下回る蛍光標識抗体の結合量を検出することができないという課題がある。

(a) Measurement of the fluorescence intensity (b) Estimation of the amount of the antibodies

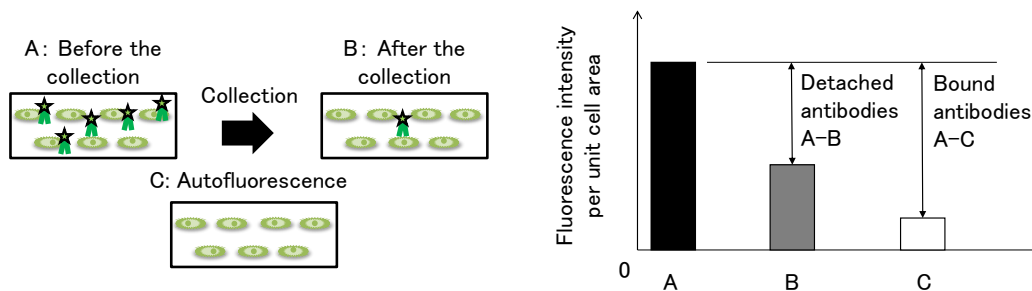


Figure 5.15 Calculation method of the collection ratio of the target-specific Abs attached on the target cells.

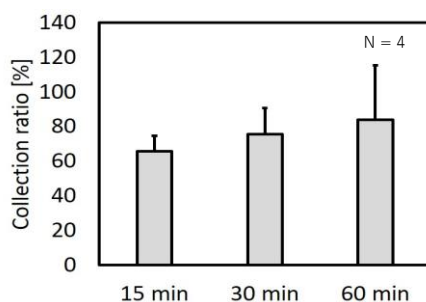


Figure 5.16 Collection ratio of the target-specific Abs attached on the target cells.

5.4.4. 省サンプル・省力化

本研究で開発したマイクロ流路デバイスのチャンバ容積は 2 μl である。一方、手作業で行う場合のサンプル容量は、ピペットで扱いやすい 100 から 1000 μl の範囲に設定することが多い。そのため、サンプル濃度が同一の場合にはマイクロ流路デバイスを使用することでサンプル使用量を 1/100 に削減することができる。

本研究におけるマイクロ流路デバイスへの液体導入は、シリンジポンプを用いて行った。シリンジポンプをコンピュータに接続しプログラムによって駆動することで、自動制御が可能となる。しかし、今回開発したデバイスはサンプル溶液、輸送バッファの導入口が共通であり、細胞、洗浄バッファ、回収バッファの導入口が共通であったため、手動でのシリンジ交換が必要であった。そこで、今後は導入口を並列に設け、使用する液体に合わせて流路をバルブで切り替える必要がある。また、デバイス内での細胞培養はデバイスから外部装置を取り外しインキュベータに静置することで実現していたが、完全な自動化のためには、デバイス周辺のみ温度と湿度を制御する装置を用意する必要がある。バルブへの空圧印加は電磁弁を介しており、電磁弁もコンピュータによる自動制御が可能である。シリンジポンプと電磁弁の制御を同期させ、培養装置と組み合わせることで、細胞導入か

ら標的細胞特異的結合分子の回収までの約 24 h かかる全ステップを自動化することができる。これにより、大幅な省力化が見込める。

5.5. まとめ

3章および4章で開発した要素技術を実装した細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスを設計し、作製した。さらに、作製したデバイスの性能評価実験として、直列したチャンバへの異種細胞導入、非標的細胞結合抗体の除去、標的細胞特異的結合抗体の回収を行った。隣接するチャンバ間において異種細胞を混入させずに導入できた。非標的細胞結合抗体の除去実験においては、3個の非標的細胞チャンバを配置することで、標的細胞チャンバにおける非標的細胞結合抗体由来の蛍光強度を自家蛍光レベルまで低減できた。標的細胞に結合した標的細胞特異的結合抗体は、回収バッファにより回収することができた。これらの性能評価により、細胞特異的結合分子の探索に必要な機能と性能を実現できていることを示すことができた。

第6章 結論

6.1. 本研究のまとめ

本論文では、接着細胞を用いた細胞特異的結合分子の探索を目指したマイクロ流路デバイスの開発を行った。細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの概念設計を行い、必要な要素技術として、細胞均一播種構造と空圧バルブを開発した。それらを組み込んだ探索用マイクロ流路デバイスを開発し、2種類のがん細胞と蛍光標識抗体を用い、細胞特異的結合分子の探索に必要な性能評価を行った。以下に、各章毎のまとめを述べる。

第1章「序論」では、細胞特異的結合分子と薬を組み合わせることで、特定の標的分子を発現している細胞のみに薬を集積する方法について述べた。この方法は、標的分子に特徴があれば、様々な臓器の疾患に適用することができる。しかし、標的ごとに特異的に結合する分子を用意する必要があるという問題点がある。そのため、細胞特異的結合分子の探索が重要になる。従来の手作業による細胞特異的結合分子の探索の問題点として、低作業能率、低探索精度、高サンプル消費量があり、マイクロ流路技術を用いることでそれらが改善できることを述べた。マイクロ流路デバイスを用いた細胞特異的結合分子の探索に関する先行研究を紹介し、接着細胞を接着させた状態で用いて、非標的細胞に結合する分子を除去することが達成されていないことを明らかにした。そのうえで標的細胞に特異的に結合する分子の探索を行うマイクロ流路デバイスを開発することを本研究における研究目的と定めた。

第2章「細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの概念設計」では、細胞特異的結合分子の探索をチップ上で実現するための、探索用マイクロ流路デバイスの提案を行った。この機能を実現するための探索用マイクロ流路デバイスの概要を示し、その特徴と探索操作について説明した。探索用マイクロ流路デバイスは三つの非標的細胞チャンバと一つの標的細胞チャンバが直列に連結したものである。上流側に配置する非標的細胞チャンバにより非標的結合分子を分子のライブラリから除去し、その残りを標的細胞チャンバで探索する。このために必要となる要素技術として、細胞均一播種のためのマイクロピラーアレイおよび流路切り替えのための平行四辺形断面の空圧バルブの概要について述べた。

第3章「細胞均一播種のためのMPAの開発」では、要素技術である細胞均一播種のためのマイクロピラーアレイの詳細について説明した。マイクロピラーアレイは、等間隔に配置されたマイクロピラーから構成され、間隔を適切に設定することでピラー間に細胞が一時的に保持され、やがて解放される。この動作を繰り返すことで、ランダム流を生成する。マイクロピラーアレイを配置したチャンバに細胞を流すと、ランダム流により細胞が均一に播種されることを実験的に確認した。また、細胞の増殖や形態に影響は見られなかった。

第4章「流路切り替えのための空圧バルブの開発」では、流路切り替えのための平行四

辺形断面と台形断面の空圧バルブの詳細について説明した。空圧バルブは液流路と空圧流路を柔軟な膜を介して積層することで形成される。バルーン状の空圧流路に空圧を印可することで、膜が変形し液流路を閉鎖する。一般的なプロセスで作製される矩形断面液流路バルブでは、膜と角に隙間生じるために液流路を完全に閉鎖することができなかった。その解決のため、従来はレジストのリフローを用いた半円形断面液流路が使用されていた。しかし、リフローを使用すると液流路鋳型全体の形状が変化するために、MPA 構造が変形する問題があった。そこで、目的部位の断面形状のみを変更できる傾斜露光を用いて平行四辺形断面空圧バルブを開発した。平行四辺形断面空圧バルブは、断面を平行四辺形とすることで膜と角の隙間を解消し、流路を完全に閉鎖することができる。平行四辺形断面の空圧バルブが、作製プロセスにおいて周囲の流路構造に影響を与えないこと、および、高さ 50 μm 、幅 500 μm 、傾斜角 60°の液流路と膜厚 40 μm の薄膜の組合せにおいて、液流路を完全に閉鎖でき、繰り返し開閉ができることを確認した。さらに、最大高さ 350 μm の液流路の完全な閉鎖と繰り返し開閉が可能であるバルブを提案し試作した。

第 5 章「細胞特異的結合分子探索用マイクロ流路デバイスの作製と評価」では、第 2 章で概念を説明したマイクロピラーアレイと平行四辺形断面空圧バルブの実装とこれを用いた実験について説明した。第 3 章で説明した MPA および第 4 章で説明した平行四辺形断面空圧バルブを組み込んだ実装方法を説明しデバイスを作製した。デバイスの性能評価として、2 種のがん細胞と蛍光標識抗体を用いた。導入時に異種細胞が隣接チャンバに混入しないこと、3 連結した非標的細胞を培養したチャンバを用いて非標的細胞結合抗体を蛍光測定の検出限界まで除去できること、回収バッファを用いて標的細胞特異的結合抗体を回収できることを確認した。また、マイクロ流路デバイスを使用することでサンプルの消費量が約 1/100 になった。さらに、制御を行うことにより細胞導入から標的細胞特異的結合分子の回収までの全ステップを自動化できる可能性を示した。

参考文献

- [1] 永井恒司. “総論:薬物送達システム(DDS)展望”. ドラッグデリバリーシステムの新展開. 株式会社シーエムシー出版, 2004, pp. 1-11.
- [2] 谷口博昭, 今井浩三. “DDS を利用した抗体医薬の展望”. ドラッグデリバリーシステムの新展開 II. 株式会社シーエムシー出版, 2012, pp.113-119.
- [3] 長谷川功紀. “放射性標識ペプチドの分子病理診断への応用”. 遺伝子医学 MOOK 別冊 次世代ペプチド医薬創製. 2014, 株式会社メディカルドゥ, pp. 114-121.
- [4] Boekhout, A. H.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. Trastuzumab. *The Oncologist*. 2011, 16, pp. 800-810.
- [5] 布施望, 大津敦. ”抗 VEGF 療法(消化器)”, 別冊・医学の歩み がん分子標的治療の最先端. 医歯薬出版株式会社, 2008, pp. 16-21.
- [6] 高張大亮, 島田安博. “Cetuximab を用いた大腸癌に対する抗体療法”, 別冊・医学の歩み 癌抗体療法. 医歯薬出版株式会社, 2007, pp. 29-33.
- [7] Danhier, F.; Le Breton, A.; Pr at, V. RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol. Pharmaceut.* 2012, 9, pp. 2916-2973.
- [8] Ishima, Y.; Chen, D.; Fang, J.; Maeda, H.; Minomo, A.; Kragh-Hansen, U.; Kai, T.; Maruyama, T.; Otagiri, M. S-Nitrosated Human Serum Albumin Dimer is not only a Novel Anti-Tumor Drug but also a Potentiator for Anti-Tumor Drugs with Augmented EPR Effects. *Bioconjugate Chem.* 2012, 23, pp. 264-271.
- [9] 西山 伸宏. ペプチドリガンドを搭載したドラッグデリバリーシステム (DDS) の創製. *Journal of Japanese Biochemical Society*. 2017, 89(1), pp. 39-43.
- [10] Ebert, E. C. Infliximab and the TNF- α System. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009, 296(3), G612-20.
- [11] Noboru Yamazaki, Hideo Tsurushima, Nobuyuki Ooguro. REMEDY OR DIAGNOSTIC FOR INFLAMMATORY DISEASE CONTAINING TARGET-DIRECTING LIPOSOME. WO/2005/011633. 10.02.2005.
- [12] Menne, J.; Eulberg, D.; Beyer, D.; Baumann, D.; Saudek, F.; Valkusz, Z.; WieRcek, A.; Haller, H. for the Emapticap Study Group. C-C motif-ligand 2 inhibition with emapticap pegol (NOX-E36) in type 2 diabetic patients with albuminuria. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32, pp. 307-315.
- [13] McGuire, M. J.; Gray, B. P.; Li, S.; Cupka, D.; Byers, L. A.; Wu, L.; Rezaie, S.; Liu, Y.-H.; Pattisapu, N.; Issac, J.; Oyama, T.; Diao, L.; Heymach, J. V.; Xie, X.-J.; Minna, J. D.; Brown, K.C. Identification and Characterization of a Suite of Tumor Targeting Peptides for Non-Small

Cell Lung Cancer. *Scientific Reports*. 2014, 4, Article number 4480.

- [14] McGuire, M.J.; Li, S.; Brown, K. C. Biopanning of Phage Displayed Peptide Libraries for the Isolation of Cell-Specific Ligands. *Methods Mol Biol.*, 2009, 504, pp. 291-321
- [15] Lin, H.; Talwar, H. S.; Tarca, A. L.; Ionan, A.; Chatterjee, M.; Ye, B.; Wojciechowski, J.; Mohapatra, S.; Basson, M. D.; Yoo, G.H.; Peshek, B.; Lonardo, F.; Pan, C.G.; Folbe, A. J.; Draghici, S.; Abrams, J.; Tainsky, M. A. Autoantibody Approach for Serum-Based Detection of Head and Neck Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2007, 16, 11, pp. 2396-2405.
- [16] Pande, J.; Szewczyk, M.M.; Grover, A.K. Phage display: Concept, innovations, applications and future, *Biotechnology Advances*. 2010, 26, 6, pp. 849-858.
- [17] Hoffman, J. A.; Laakkonen, P.; Porkka, K.; Bernasconi, M.; Ruoslahti, E. *Phage Display: A Practical Approach*. Oxford University Press, 2004, pp. 171-192.
- [18] Wangs, J.; Liu, Y.; Teesalu, T.; Sugahara, K. N.; Kotamrajua, V. R.; Adams, J. D.; Ferguson, B. S.; Gong, Q.; Oh, S. S.; Csordas, A.T.; Cho, M.; Ruoslahti, E.; Xiao, Y.; Soh, H.T. Selection of phage-displayed peptides on live adherent cells in microfluidic channels. *PNAS*, 2011, 108, 17, pp.6909-6914.
- [19] Yuan, B.; Schulz, P.; Liu, R.; Sierks, M. R. Improved affinity selection using phage display technology and off-rate based selection. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006, 9(2), pp. 171–175.
- [20] Wada, K.; Itoga, K.; Okano, T.; Yonemura, S.; Sasaki, H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*. 2011,138, 18, pp.3907-3914.
- [21] Hung, L.-Y.; Wang, C.-H.; Hsu, K.-F.; Chou C.-Y.; Lee, G.-B. An on-chip Cell-SELEX process for automatic selection of high-affinity aptamers specific to different histologically classified ovarian cancer cells. *Lab. Chip*. 2014, 14, pp.4017-4028.
- [22] Che, Y.-J.; Wu, H.-W.; Hung, L.-Y.; Liu, C.-A.; Chang, H.-Y.; Wang, K.; Lee, G.-B. An integrated microfluidic system for screening of phage-displayed peptides specific to colon cancer cells and colon cancer stem cells. *Biomicrofluidics*. 2015, 9, 054121:1-054121:15.
- [23] Weng, C.-H.; Hsieh, I.-S.; Hung, L.-Y.; Lin, H.-I.; Shiesh, S.-C.; Chen, Y.-L.; Lee, G.-B. An automatic microfluidic system for rapid screening of cancer stem-like cell-specific aptamers. *Microfluid. Nanofluidics*. 2013, 14, pp. 753-765.
- [24] Wang, C.-H.; Weng, C.-H.; Che, Y.-J.; Wang, K.; Lee, G.-B. Cancer Cell-Specific Oligopeptides Selected by an Integrated Microfluidic System from a Phage Display Library for Ovarian Cancer Diagnosis. *Theranostics*. 2015, 5, pp. 431-442.
- [25] Squires, T.; Quake, S. Microfluidics Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.* 2005, 77, pp. 977–1026.

- [26] Basu, S.; Gerchman, Y.; Collins, C.H.; Arnold, F.H.; Weiss, R. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature* 2005, 434, pp. 1130–1134.
- [27] Ben-Ze'ev, A.; Robinson, G.S.; Bucher, N.L.; Farmer, S.R. Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *PNAS*. 1988, 85, pp. 2161–2165.
- [28] Gonzalez-Macia, L.; Morrin, A.; Smyth, M.R.; Killard, A.J. Advanced printing and deposition methodologies for the fabrication of biosensors and biodevices. *Analyst*. 2010, 135, pp. 845–867.
- [29] Khademhosseini, A.; Suh, K.Y.; Jon, S.; Eng, G.; Yeh, J.; Chen, G.J.; Langer, R. A soft lithographic approach to fabricate patterned microfluidic channels. *Anal. Chem.* 2004, 76, pp. 3675–3681.
- [30] Rozkiewicz, D.I.; Kraan, Y.; Werten, M.W.T.; de Wolf, F.A.; Subramaniam, V.; Ravoo, B.J.; Reinhoudt, D.N. Covalent microcontact printing of proteins for cell patterning. *Chemistry*. 2006, 12, pp. 6290–6297.
- [31] Nilsson, J.; Evander, M.; Hammarström, B.; Laurell, T. Review of cell and particle trapping in microfluidic systems. *Anal. Chim. Acta*. 2009, 649, pp. 141–157.
- [32] Ges, I.A.; Brindley, R.L.; Currie, K.P.M.; Baudenbacher, F.J. A microfluidic platform for chemical stimulation and real time analysis of catecholamine secretion from neuroendocrine cells. *Lab Chip*. 2013, 13, pp. 4663–4673.
- [33] Brammer, K.S.; Choi, C.; Frandsen, C.J.; Oh, S.; Jin, S. Hydrophobic nanopillars initiate mesenchymal stem cell aggregation and osteo-differentiation. *Acta Biomater*. 2011, 7, pp. 683–690.
- [34] Ross, A.M.; Jiang, Z.; Bastmeyer, M.; Lahann, J. Physical aspects of cell culture substrates: Topography, roughness, and elasticity. *Small*. 2012, 8, pp. 336–355.
- [35] Daly, D, Stevens, R.F.; Hutley, M.C.; Davles, N. The manufacture of microlenses by melting photoresist. *Measurement Science and technology*. 1990, 1, pp.759-766.
- [36] Tan, W.-H.; Takeuchi, S. A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications. *PNAS*. 2007, 104, pp. 1146–1151.
- [37] Park, J.G.; Frucht, H.; LaRocca, R.V.; Bliss, D.P.; Kurita, Y.; Chen, T.R.; Henslee, J.G.; Trepel, J.B.; Jensen, R.T.; Johnson, B.E. Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res*. 1990, 50, pp. 2773–2780.
- [38] Kaminaga, M.; Ishida, T.; Kadonosono, T.; Kizaka-Kondoh, S.; Omata, T. Uniform Cell Distribution Achieved by Using Cell Deformation in a Micropillar Array. *Micromachines*. 2015, 6, pp. 409-422.
- [39] Potkay, J.A.; Wise, K.D. A Hybrid Thermopneumatic and Electrostatic Microvalve with

- Integrated Position Sensing. *Micromachines*. 2012, 3, pp. 379-395.
- [40] Yoshida, K.; Kikuchi, M.; Park, J.-H.; Yokota, S. A MICRO ER VALVE FABRICATED BY MICROMACHINING. *Micro Electro Mechanical Systems 2001*. 2001, pp. 467-470.
- [41] Vieider, C.; Ohman, O.; Elderstig, H. A PNEUMATICALLY ACTUATED MICRO VALVE WITH A SILICONE RUBBER MEMBRANE FOR INTEGRATION WITH FLUID-HANDLING SYSTEMS. *TRANSDUCERS '95 /EUROSENSORS IX*. 1995, 303-B 7, pp.284-286.
- [42] Yang, L.-J.; Wang, H.-H.; Wang, J.-M.; Liu, K.-C.; Ko, K.-C.; BUCKELD-TYPE VALVES INTEGRATED BY PARYLENE MICRO-TUBES. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2006, 130-131, pp. 241-246.
- [43] Yoon, D.H.; Ito, J.; Sekiguchi, T.; Shoji, S. Active and Precise Control of Microdroplet Division Using Horizontal Pneumatic Valves in Bifurcating Microchannel. *Micromachines*. 2013, 4, pp.197-205.
- [44] Nath, T.; Raut, G.; Kumar, A.; Khatri, R.; Palani, I. A. Investigation on Laser Assisted Actuation of Shape memory alloy based Micro-valve. *2015 International Conference on Robotics, Automation, Control and Embedded Systems (RACE)*. Chennai, 2015, pp. 1-6.
- [45] Shin, J.; Park, H.; Dang, V. B.; Kim, C.-W.; Kim, S.-J. Elastomeric microfluidic valve with low, constant opening threshold pressure. *RSC Advanced*. 2015, 5, pp. 23239-23245.
- [46] Unger, M.A.; Chou, H.-P.; Thorsen, T.; Scherer, A.; Quake, S.R. Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography. *Science*. 2001, 288, pp. 113-116.
- [47] Han, M.; Lee, W.; Lee, S.-K.; Lee, S. S. 3D microfabrication with inclined/rotated UV lithography. *Sensors and Actuators A*. 2004, 111, pp. 14-20.
- [48] Morel, M.; Bartolo, D.; Galas, J.-C.; Dahan, M.; Studer, V. Microfluidic stickers for cell- and tissue-based assays in microchannels. *Lab. Chip*. 2009, 9, pp. 1011-1013.
- [49] Lau, A. T. H.; Yip, H. M.; Ng, K. C. C.; Cui, X.; Lam, R. H. W. Dynamics of Microvalve Operations in Integrated Microfluidics. *Micromachines*. 2014, 5, pp. 50-65.;
- [50] Lee, J.B.; Choi, K.H.; Yoo, C.K. Innovative SU-8 Lithography Techniques and Their Applications. *Micromachines*. 2015, 6, pp. 1–18.
- [51] Kaminaga, M.; Ishida, T.; Omata, T. Fabrication of Pneumatic Microvalve for Tall Microchannel Using Inclined Lithography. *Micromachines*. 2016, 7, pp. 224:1-224:13.
- [52] Freshney, R.I. “Cell Yield”. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. John Wiley & Sons, 2015, pp117.
- [53] Nowak, J. E.; Chatterjee, M.; Mohapatra, S.; Dryde, S. C.; Tainsky, M. A. Direct production and purification of T7 phage display cloned proteins selected and analyzed on microarrays. *BioTechniques*. 2006, 40, pp. 220-227.