

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	抗がん剤評価に向けた患者由来がん組織の長時間培養流路デバイス
Title(English)	
著者(和文)	徳岡泰憲
Author(English)	Yasunori Tokuoka
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12902号, 授与年月日:2024年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:石田 忠,金 俊完,八木 透,柳田 保子,越川 直彦
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12902号, Conferred date:2024/9/20, 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

令和6年度 博士論文

抗がん剤評価に向けた患者由来がん組織の  
長時間培養流路デバイス

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 徳岡 泰憲

提出日 2024年08月21日

指導教員 石田 忠 准教授

# 目次

第1章 序論.....	3
1.1 悪性がん.....	3
1.2 抗がん剤.....	3
1.3 がん細胞を用いた抗がん剤開発.....	4
1.4 腫瘍微小環境.....	4
1.5 患者由来がん組織を用いたモデルの培養方法.....	5
1.6 がん組織の直接培養方法.....	6
1.6.1 サブミリメートルサイズのがん組織の直接培養方法.....	6
1.6.2 ミリメートルサイズのがん組織の培養.....	7
1.6.2.1 ミリメートルサイズのがん組織を培養するマイクロ流路デバイス.....	7
1.6.2.2 ミリメートルサイズのがん組織を拘束しながら培養したマイクロ流路デバイス.....	9
1.6.2.3 ミリメートルサイズのがん組織培養の課題.....	10
1.7 ミリメートルサイズのがん組織を培養するための要素.....	10
1.7.1 がん組織の拘束.....	10
1.7.2 灌流による物質供給.....	10
1.7.3 長時間培養を妨げるミリバブル除去.....	10
1.8 研究目的.....	11
1.9 論文の構成.....	11
第2章 拘束した組織に灌流で物質供給するH字流路デバイス開発.....	13
2.1 H字流路デバイスの概要.....	13
2.2 模擬組織.....	13
2.2.1 模擬組織サイズの検討.....	13
2.2.2 模擬組織の作製.....	13
2.3 H字流路デバイス.....	14
2.3.1 H字流路デバイスの設計.....	14
2.3.2 H字流路デバイスの作製.....	15
2.3.3ホルダー.....	16
2.3.4 H字流路デバイスの組立て.....	17
2.4 模擬組織の拘束と灌流の原理検証.....	18
2.4.1 実験セットアップ.....	18
2.4.2 H字流路デバイスの拘束条件.....	18
2.4.3 実験結果.....	19
2.5 物質供給実験.....	19
2.5.1 物質の拡散理論.....	20
2.5.2 物質の選定.....	20
2.5.3 実験セットアップ.....	20
2.5.4 実験後の評価方法.....	20
2.5.4.1 外観評価.....	21
2.5.4.2 内部評価.....	21
2.5.5 外観評価.....	22
2.5.5.1 時間経過に伴う模擬組織外部への色素供給.....	22

2.5.5.2	長時間供給実験後の模擬組織外部の色素供給評価	23
2.5.6	内部評価	24
2.5.6.1	模擬組織内部の色素供給評価	25
2.5.6.2	スライス内輝度分布	25
2.5.7	外観と内観の比較	26
2.6	議論	27
2.7	まとめ	27
第3章	局所ミリバブル除去流路デバイス開発	29
3.1	長時間灌流における流路内へのミリバブル混入	29
3.1.1	ミリバブルの混入	29
3.1.2	従来ミリバブル除去技術	29
3.2	陰圧を用いた局所ミリバブル除去技術	30
3.2.1	局所ミリバブル除去技術の原理	30
3.2.2	局所ミリバブル除去流路デバイスの概念図	31
3.2.3	局所ミリバブル除去流路デバイスの設計	32
3.2.3.1	電気回路理論を用いたミリバブルの局所除去計算	32
3.2.3.2	設計	32
3.2.4	局所ミリバブル除去流路デバイスの作製	33
3.2.5	実験環境	34
3.2.5.1	インキュベーションボックス	34
3.2.5.2	実験セットアップ	34
3.2.6	ミリバブル除去実験	35
3.2.6.1	ポケット内のミリバブル除去	35
3.2.6.2	局所ミリバブル除去におけるポケット内のゲージ圧	36
3.3	まとめ	37
第4章	腎がん組織の流路内培養と標本化技術	38
4.1	腎細胞がん組織	38
4.1.1	腎細胞がん組織の特徴	38
4.1.2	評価方法	38
4.1.2.1	HE染色図	38
4.1.2.2	Ki-67免疫染色	39
4.2	腎細胞がん組織の崩壊抑制	39
4.2.1	長時間培養流路デバイスの締め付け	39
4.2.1.1	締め付け条件	39
4.2.1.2	実験結果	40
4.3	がん組織包埋方法の検討	40
4.3.1	長時間培養流路デバイス内固定・包埋の検討	41
4.3.2	長時間培養流路デバイス内固定、長時間培養流路デバイス外包埋	42
4.4	まとめ	43

第 5 章 長時間培養流路デバイスの開発.....	45
5.1 長時間培養流路デバイスの概要.....	45
5.1.1 長時間培養流路デバイスの設計.....	45
5.1.2 作製結果.....	47
5.2 長時間培養に向けた性能評価.....	47
5.2.1 がん組織への物質供給.....	47
5.2.2 長時間培養に向けたミリバブル除去実験.....	48
5.3 まとめ.....	49
第 6 章 結論.....	49
6.1 本研究のまとめ.....	49
付録.....	51
参考文献.....	54

## 第 1 章 序論

### 1.1 悪性がん

世界中でがん罹患する患者数は 2022 年に年間 2000 万人に上り、970 万人ががんによって死亡すると推測されている[1]。2050 年にはがん患者数は 3500 万人に達すると予測されており[1]、効果的な治療法が研究されている。一般的にがんは治療が難しい疾患と思われているが、がんによる死亡率は進行度に応じて大きく変動する。進行度は 0 期から IV 期までの 5 つの段階に分類される。腎臓にできる腎がんでは、0 期～II 期ではがんが腎臓内に限定されているが、治療後の 5 年生存率は I 期で 90%、II 期で 75%になっている。III 期に進むと、がんは腎臓を越えて浸潤している状態であるが、III 期における治療後の 5 年生存率は 75%である[2]。一方、IV 期は、がんが腎臓から他臓器に転移している状態であり、治療後の 5 年生存率が 15%と他のステージに比べて極端に低い[2]。IV 期において 5 年生存率が低い理由は、他臓器に転移していることに加えて、他臓器への転移時にがん細胞が血管を通じて全身に広がっているためと考えられる。したがって、ステージ IV 期では、腫瘍などの特定の部位のみへの抗がん効果だけでは治療が困難であり、ステージ IV 期における治療では全身に対しての抗がん効果が必要となる。

### 1.2 抗がん剤

抗がん剤は、血液を通じて身体全体のがん細胞を殺傷したり、増殖を抑制するなどの作用機序は複数ある。例えば、DNA の複製を阻害することでがん細胞の増殖を抑制する作用機序、細胞分裂時に形成される紡錘体をがん治療標的として阻害する作用機序、がん細胞の増殖に関与する特定の分子に作用して細胞増殖を抑制する作用機序などがある[3]。現在、100 種類以上の抗がん剤が開発されており、年々増加している。ただし、従来の抗がん剤は正常細胞にも攻撃することで吐き気や倦怠感などの副作用を引き起こす。

近年では、分子標的薬と呼ばれる抗がん剤が開発されている[4-6]。分子標的薬はがん細胞に発現する特定の分子構造を標的にして作用するため、従来の抗がん剤に比べて正常な細胞へのダメージが低減され副作用が少ない。例えば、がんの成長に必要な仕組みにはたらきかけるシグナル伝達阻害剤や、がんが成長する際に生じる新生血管を阻害する血管新

生阻害剤が代表的である。様々な種類のがんやステージで使用できるため、抗がん剤の研究開発が盛んに行われている。

このように抗がん剤の開発は盛んに行われている。抗がん剤開発の初期において、多くの抗がん剤候補物質の中から高い薬効を示す物質を選別するスクリーニングが行われる。スクリーニングでは、*In vitro*(生体外)で複数の抗がん剤候補物質を様々な濃度で投与し、がんへの作用を調べる。スクリーニングに必要な時間は 48 時間程度とされており [7]、48 時間程度の長時間試験が必要と言われる。

### 1.3 がん細胞を用いた抗がん剤開発

*In vitro* での抗がん剤開発ではがん細胞株が用いられ、二次元培養されたがん細胞やがん細胞凝集体を対象とするのが一般的である[8]。二次元培養とは、ディッシュなどの培養器材表面に細胞を付着させ、単層で増殖させる手法である。二次元培養は簡便かつ迅速に行うことができ、薬剤に対する挙動を調べることができる。また、がん細胞株が凝集して作られるがん細胞凝集体(がん細胞スフェロイド、直径約 100~400  $\mu\text{m}$ )を対象とした抗がん剤開発が行われている[9-15]。非接着性の底面を持つディッシュやウェルプレートでがん細胞株を培養すると、培養液中で浮遊するがん細胞株が互いに接着し、がん細胞スフェロイドを形成する。がん細胞スフェロイドは *in vivo*(生体内)がんと同じように低酸素領域[10,12]を有する三次元構造を持っている。二次元培養されたがん細胞株より生体に近い反応を示す。

このように、抗がん剤の有効性を評価する手段として、ディッシュでがん細胞株を培養する手法が用いられてきた。ディッシュ内で培養したがん細胞株にさまざまな濃度の抗がん剤を投与し、濃度に対するがん細胞の増殖率を調べる試験が行われ、抗がん剤の効果が評価されている。しかし、こうしたがん細胞株を用いた抗がん剤のスクリーニングで有効と判断されても、実際のがん患者に対して有効性を示す抗がん剤の割合は低く、一般的に抗がん剤の開発成功率は約 5%と非常に低いことが報告されている[16]。

その理由として、二次元培養されたがん細胞やがん細胞スフェロイドのようながん細胞株モデルでは、がん細胞株から構成されているため、実際の患者の腫瘍の特性を一部しか反映できていないことが指摘されている[17]。がん細胞株モデルでは、臨床の 10~100 倍の抗がん剤濃度に対して応答しており[18]、*in vivo* がんとは異なる薬剤応答を示している可能性が指摘されている[19-20]。

### 1.4 腫瘍微小環境

がん細胞株モデルが *in vivo* のがんと異なる薬剤応答を示す理由として、腫瘍微小環境を持たないためと考えられている。腫瘍微小環境とは、がん細胞に加え、腫瘍関連マクロファージ、がん関連線維芽細胞、細胞外基質、腫瘍血管などから構成される *in vivo* のがん腫瘍内部に形成される複雑な三次元構造のことである(図 1.1) [21]。腫瘍関連マクロファージやがん関連線維芽細胞は間質細胞と呼ばれ、血管新生やがん細胞の増殖を促進する。細胞外基質は細胞間にある物質であり、腫瘍血管はがん細胞や間質細胞に栄養を供給する。これらの細胞や物質が不均一に組み合わせられて、数 mm~百数十 cm サイズのがん腫瘍が構成される[22-23]。*In vivo* のがんは、前述のがん細胞株モデルの有する低酸素領域に加えて、

様々な細胞や物質から構成されており、細胞間相互作用をしながら成長している。

また、血管から 200  $\mu\text{m}$  程度離れたがん細胞は低酸素状態になることが知られており[19-20、24-26]、低酸素状態でがん細胞の悪性化が促進される。さらに、2000  $\text{mm}^3$  程度のがん腫瘍には極端な低酸素状態[22]、更に大きくなった 1800  $\text{cm}^3$  のがん腫瘍には壊死領域が確認されている[23]。さらに、このような腫瘍微小環境が DNA 損傷時の修復力や細胞死(アポトーシス)回避といったがん細胞に対する防御機構を抑制し、抗がん剤の薬効に影響を及ぼす可能性が示唆されている[27]。

このように *in vivo* のがんが有する腫瘍微小環境はがんの悪性化や抗がん剤耐性に深く関与していると言われ、抗がん剤開発において腫瘍微小環境を有するモデルを対象とすることが重要である。しかし、腫瘍微小環境を持たないがん細胞株モデルを対象とした抗がん剤開発では、*in vivo* がんが発現する悪性化や抗がん剤耐性などの重要な特性を考慮することができず、抗がん剤の薬効や毒性、薬物代謝を予測することは難しい。抗がん剤の開発成功率を高めるためには、腫瘍微小環境を有するがん試料が不可欠である。

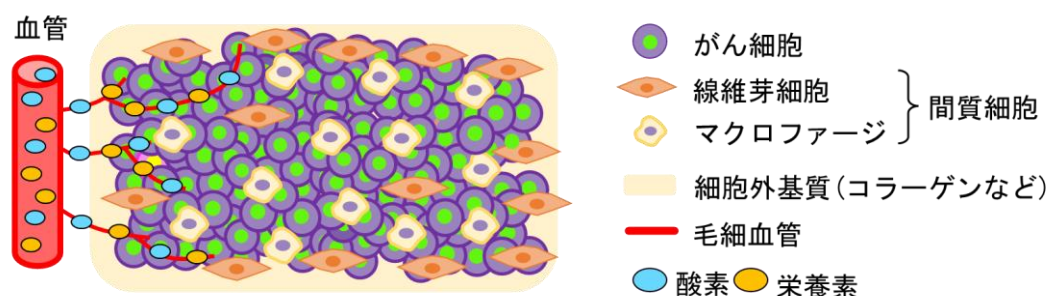


図 1.1 腫瘍微小環境

## 1.5 患者由来がん組織を用いたモデルの培養方法

腫瘍微小環境を人工的に再現することは困難であるため、腫瘍微小環境を有する患者由来がん組織(以下、がん組織)を基にした間接的なモデルを用いて研究が行われている。特に、がんオルガノイドや患者由来腫瘍異種移植(Patient-derived tumor xenograft、PDTX)モデルを用いた培養方法の研究が進んでいる。

がんオルガノイドは、患者由来のがん組織から取り出した様々な細胞の凝集体や、iPS細胞や幹細胞の凝集体を自己組織的に分化させたものであり、直径数百  $\mu\text{m}$  程度の大きさである[28]。がん組織や臓器の表現型や遺伝子型をより再現でき、がん細胞スフェロイドよりも生体に近い腫瘍微小環境を有している[29]。一部の臓器ではがんオルガノイドの作製に成功しており、がんオルガノイドと患者に同一の抗がん剤を投与し、がんオルガノイドの薬物応答が患者と近い結果を得ている。しかし、スクリーニング試験を行った結果、抗がん剤に応答を示さないがんオルガノイドが報告されている[29]。原因として、がんオルガノイドは血管系や免疫細胞の欠如が指摘されており、腫瘍微小環境の模倣が不十分であることが挙げられる[28-29]。

PDTX は患者から切り出した数ミリメートルサイズのがん組織を免疫不全マウスに移植し、がん組織をマウス体内で培養する手法である。生体内にがん組織を埋め込むため、*in vivo* に近い培養環境が得られ、がんの空間構造や腫瘍内の不均一性など、がんの特徴を再現するのに優れていることが示されている[30]。しかし、移植したヒト由来がん組織を構

成するヒト間質細胞が時間経過に伴いマウス間質細胞に置換されてしまう[31]。つまり、元々はヒトのがん組織であったものが、ヒトのがん細胞とマウスの間質細胞で構成されるがん組織となる。そのため、PDTXを対象とした抗がん剤開発は、腫瘍微小環境を有する組織を用いることができるが、ヒトの薬剤応答を正確に評価することは困難である。また、一般的に PDTX の樹立には一株あたり数十万円のコストや数か月の時間を要する[31]。

このように、がん組織を基にしたがん組織研究が行われており、抗がん剤の開発成功率は 6.2%に向上したが[32]、依然として開発成功率は低い水準に留まっている。この原因として、がん組織の腫瘍微小環境を十分に再現できなかつたり、培養中に腫瘍微小環境が変化し腫瘍微小環境を維持できないことが挙げられる。そのため、がん組織を直接培養して抗がん剤評価を行う手法が、抗がん剤の開発成功率の向上のために求められている。

## 1.6 がん組織の直接培養方法

抗がん剤の開発成功率を向上させるためには、手術で摘出したがん組織を生体外で直接培養する方法を用いることが一つの可能性となる。摘出したがん組織は腫瘍微小環境を有しており、*in vivo* がん組織に非常に近い抗がん剤応答を示すことが期待できる。例えば、*in vivo* がんに対する抗がん剤の効果を調べるためには、腫瘍関連マクロファージやがん関連線維芽細胞の組成、がん細胞の構造が重要であるが、がん組織自体は *in vivo* から取得したものであるためそれらを有している。そのため、摘出したがん組織を用いた抗がん剤スクリーニングにより抗がん剤の開発成功率を飛躍的に向上できると期待できる。

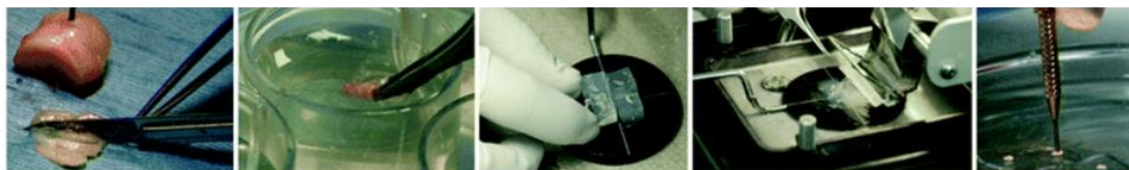
しかし、摘出したがん組織は腫瘍微小環境とそれを内含する大きさを有するため、腫瘍微小環境の維持や酸素・栄養供給の観点からその培養自体が困難である。現在、摘出したがん組織を培養可能とする技術開発がおこなわれている。酸素・栄養供給の観点で、組織サイズは培養条件に影響を与える要素であるため、以下にサブミリメートルサイズとミリメートルサイズに分けて紹介する。

### 1.6.1 サブミリメートルサイズのがん組織の直接培養方法

*In vivo* がん組織において、酸素や栄養は腫瘍に引き込まれた血管の表面から 200  $\mu\text{m}$  程度で枯渇することが報告されている[19-20、24-26]。そのため、酸素や栄養の供給という観点からは、サブミリメートル以下のがん組織が培養に望ましい。サブミリメートルサイズのがん組織を直接培養する方法として、ゲル包埋培養があげられる。生体内のがん組織は一般的に柔らかく崩壊しやすい。そこで、がん組織の崩壊を防止しながら培養するために、ゲルで包埋することによりがん組織の崩壊を防ぐ(図 1.2) [33]。

患者から採取された卵巣がん組織(Ovarian cancer, OvCa)、前立腺がん組織(Prostate cancer, PCa)、前立腺肥大症組織(Benign prostatic hyperplasia, BPH)を、ビブラトームで直径 420  $\mu\text{m}$  以下、厚さ 250~500  $\mu\text{m}$  のディスク状に切り出し、酸素や栄養が十分供給できるようにする。得られたディスク状のがん組織をアガロースゲルにより包埋した上で、マイクロ流路デバイスに導入する。2、3 日ごとの培地交換を行い、組織培養を行った。蛍光染色をした結果、8 日間に渡ってがん細胞を高い生存率で保つことができた。

(a) サブミリメートルサイズのがん組織の作製方法



(b) 蛍光染色による生存率評価

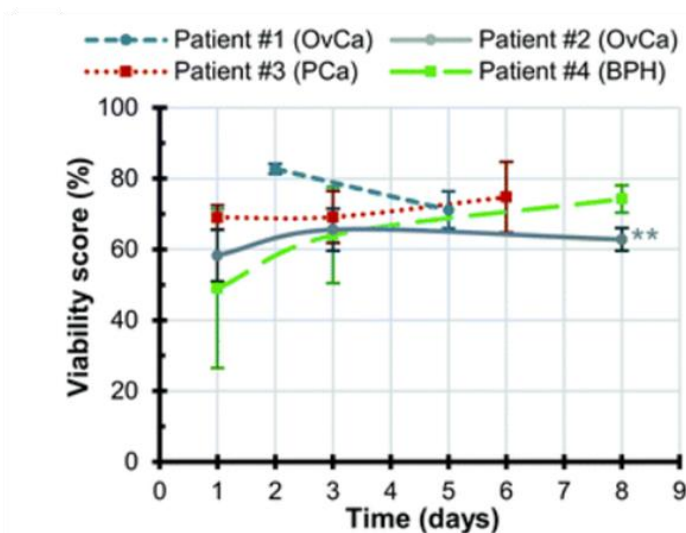


図 1.2 サブミリメートルサイズのがん組織を培養する方法(Astolfi, M. et al. (2016)[33]).

(a)サブミリメートルサイズの切り出し。(b)8日間培養後のがん細胞生存率。

サブミリメートルサイズのがん組織培養が実現しているが、サブミリメートルサイズのがん組織では腫瘍微小環境領域をカバーできていない可能性が高い。その理由として、サブミリメートルサイズではオルガノイドと同等のサイズであり、がん組織を構成する細胞数が数千〜数万個しかなく、サブミリメートルサイズのがん組織が腫瘍微小環境を含んでいるとしても評価に十分な領域を持たない可能性が高い。さらに、培養後に腫瘍微小環境を評価するためにはがん組織を薄切化して形態的に評価をする必要があるが、サブミリメートルサイズではその小ささから薄切化が難しく、評価が困難であるとも言われる。そのため、ミリメートルサイズのがん組織の直接培養技術が重要になる。

## 1.6.2 ミリメートルサイズのがん組織の培養

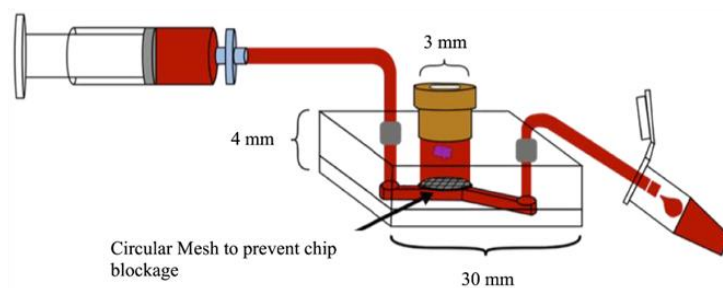
ミリメートルサイズのがん組織は、サブミリメートルサイズのがん組織の1000倍程度の細胞で構成されるため、腫瘍微小環境を評価できる可能性が高い。ミリメートルサイズのがん組織を培養することができれば、抗がん剤の反応させることができる。開発されたミリメートルサイズのがん組織の直接培養法を以下に2つ紹介する。

### 1.6.2.1 ミリメートルサイズのがん組織を培養するマイクロ流路デバイス

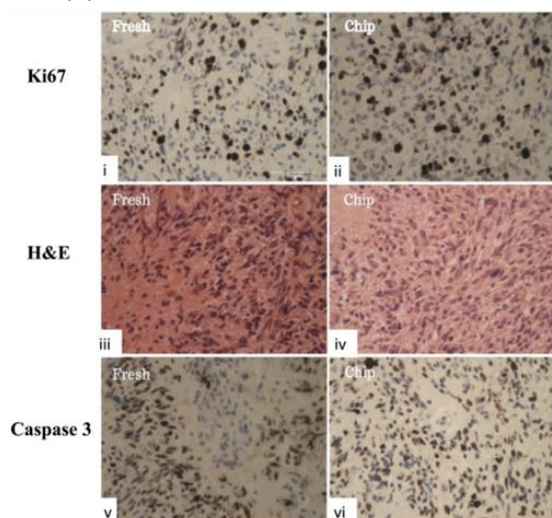
ミリメートルサイズのがん組織の培養は酸素・栄養供給などの点で困難であり、酸素・栄養供給を促進することが必要となる。そこで、培養液の灌流により酸素・栄養供給を促

進してミリメートルサイズのがん組織を培養するためのマイクロ流路デバイスが開発されている。がん組織をマイクロ流路デバイス内のチャンバーで浮遊させながら 48 時間以上灌流培養した報告がある[34]。患者から取り出した悪性脳腫瘍は 2 mm×2 mm×2 mm サイズに切り出され、ゲル包埋されていない状態でマイクロ流路デバイスに実装された(図 1.3)。実装されたがん組織はチャンバー内で浮遊しながら培養されている。培養液は流量 4  $\mu\text{L}/\text{min}$  で送液され、48 時間以上実験が行われた。培養後、がん組織はマイクロ流路デバイスから取り出され、HE (ヘマトキシリン、エオジン) 染色、Ki-67 免疫染色、Caspase3 によって染色され評価された。ここで、HE 染色によって形態評価、Ki-67 によって増殖細胞評価、Caspase3 によって細胞死を示す評価である。採取直後のがん組織と培養後のがん組織について形態、細胞増殖率、細胞死亡率を計測したところ、同等な結果が得られた。

(a) マイクロ流路デバイスと実験セットアップ



(b) 脳腫瘍の染色図



(c) 脳腫瘍の染色図

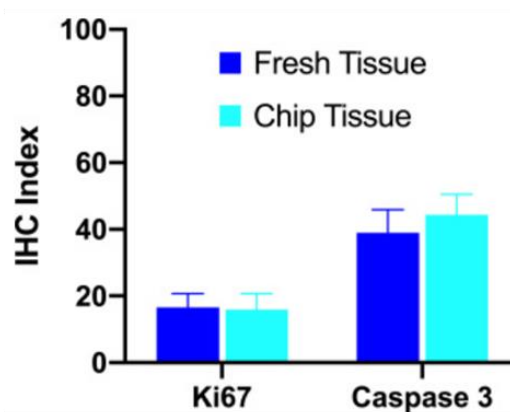
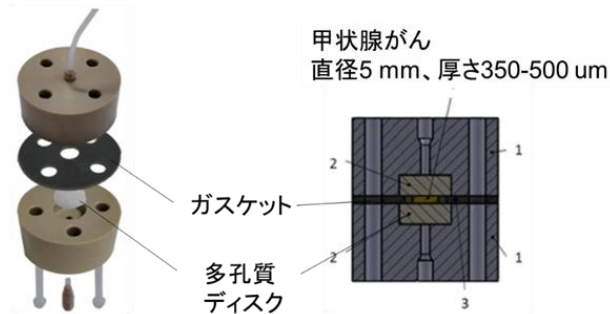


図 1.3 ミリメートルサイズのがん組織を浮遊させながら培養するマイクロ流路デバイス (Olubajo, F. et al. (2020) [34])。 (a) マイクロ流路デバイスと実験セットアップ、 (b) 脳腫瘍の染色図 (i) 採取直後の Ki-67、 (ii) マイクロ流路デバイスの Ki-67、 (iii) 採取直後の HE、 (iv) マイクロ流路デバイスの HE、 (v) 採取直後の Caspase3、 (vi) マイクロ流路デバイスの Caspase3。

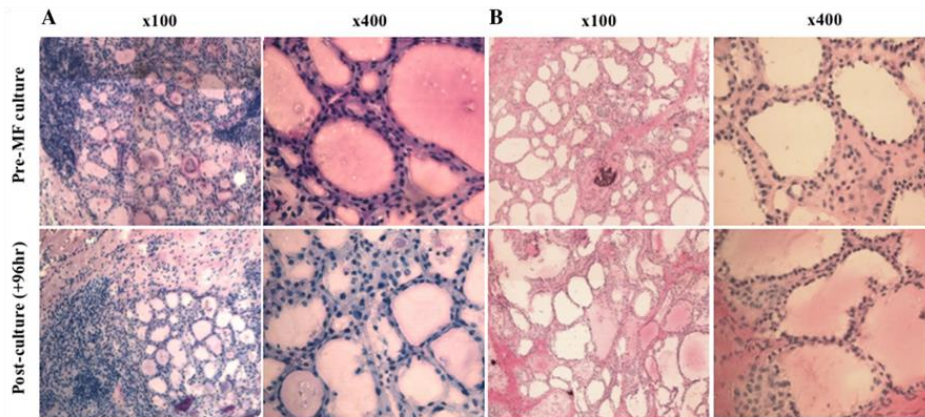
### 1.6.2.2 ミリメートルサイズのがん組織を拘束しながら培養したマイクロ流路デバイス

がん組織を機械的に拘束した状態で培養している報告もある[35]。摘出された甲状腺がん組織は、ビブラトームによって直径 5 mm、厚さ 350-500  $\mu\text{m}$  に切り出された。甲状腺がん組織はガスケットや多孔質ディスクに挟まれて、ねじ締めによって拘束されており、培養液を 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  で灌流させており、48 時間以上の培養が実施された (図 1.4)。このマイクロ流路デバイスにより継続的な灌流培養したところ、*in vivo* の血管系やリンパ管を維持することができている。採取直後とマイクロ流路デバイス内培養後のがん組織を HE 染色により、採取直後とマイクロ流路デバイスで培養した甲状腺がん組織は、濾胞構造が保たれていた (図 1.4(b))。また、Ki-67 による細胞増殖評価が行われ (図 1.4(c))、採取直後とマイクロ流路デバイスで培養した甲状腺がん組織に有意差がないことが明らかになった (図 1.4(d))。

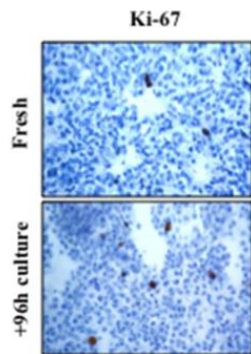
(a) マイクロ流路デバイス



(b) HE 染色図



(c) Ki-67 染色図



(d) Ki-67 評価の比較

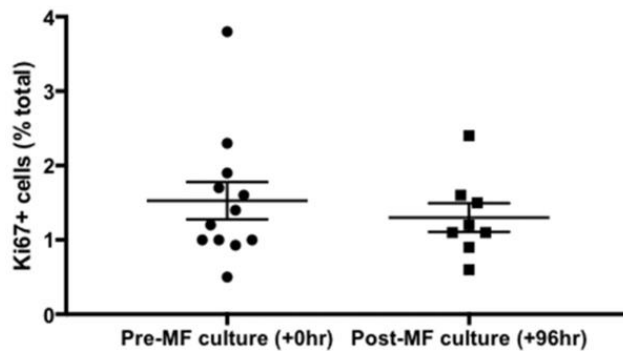


図 1.4 ミリメートルサイズのがん組織を拘束した状態で灌流培養可能なマイクロ流路デバイス(Riley, A. et al. (2019)[35])。 (a) マイクロ流路デバイス概要、 (b) HE 染色図、 (c) Ki-67 染色図、 (d) Ki-67 の比較。

### 1.6.2.3 ミリメートルサイズのがん組織培養の課題

1.6.2.1 節、1.6.2.2 節で紹介した培養法は、がん組織が血管の中心で常に血流から抗力やせん断応力を受けているモデルになっており、*In vivo* がん組織と乖離している。生体内では、がん組織が血流による力を受けることはないため、がん組織を血流の中に配置しないモデルが求められる。さらに、1.6.2.1 節で紹介した培養法は、灌流環境下でがん組織が浮遊しているため流路壁との接触が繰り返され、がん組織の変形やそれに伴う崩壊が避けられない。このように培養されたがん組織は標本化の際にがん組織内の一部の切片しか得られず、病理的な評価が困難である可能性があることが医師とのディスカッションで浮上した。

## 1.7 ミリメートルサイズのがん組織を培養するための要素

1.6 節で述べたように、ミリメートルサイズのがん組織の培養を実現するための要素を以下に述べる。

### 1.7.1 がん組織の拘束

*In vitro* のがん組織は周囲からの拘束がなければ崩壊してしまう。マイクロ流路デバイス内のポケットやチャンバーでがん組織を捕捉し、浮遊した状態で培養している報告もあるが、自項目の培養液の灌流があるとがん組織が崩壊し、構造を保つことができない可能性が高まる[34]。そのため、がん組織の崩壊を防ぐための拘束が必要である。

### 1.7.2 灌流による物質供給

ミリメートルサイズのがん組織の長時間培養は、栄養供給のために困難である。そこで、マイクロ流路デバイスを用いたがん組織や生体組織の灌流培養が開発され[36-38]、実際の挙動の発現や長時間の細胞培養が可能となっている。1.6.2 節で述べたミリメートルサイズのがん組織培養は、流路内で培養液の灌流により、がん組織への栄養素、酸素などの物質供給が促進し、その効果が確認されている。そのため、灌流による培養が必要である。1.6.2 節で紹介したようながん組織全体が流れに曝されている状態ではなく、がん組織両端のみが流れに曝されているモデルである必要がある。

### 1.7.3 長時間培養を妨げるミリバブル除去

抗がん剤の効果を見るためには48時間程度の長時間培養が必要である。しかし、24時間を超える灌流培養では、マイクロ流路デバイス内にバブル(ナノバブル：直径 1  $\mu\text{m}$  以内、マイクロバブル直径 1~100  $\mu\text{m}$  程度、ミリバブル：直径~5 mm、マイクロバブルが成長して形成される [39])が生じることが報告されている[40]。マイクロバブルやミリバブルは流路内の培養液の流れを変化/停止させ、細胞が接触すると細胞に表面張力を与える。これらの影響は、長時間の灌流培養を妨げてしまう[40-46]。バブルの形成の原因は明らかになっ

ていないが、微細構造にたまった微細なマイクロバブルが時間経過に伴って成長したり、溶存していたガスが圧力差によって成長するためであると考えられている。そのため、長時間の灌流培養の実現のためには流路内でのバブルの除去技術が必要である。

## 1.8 研究目的

本研究では、抗がん剤評価に向けたがん組織を長時間培養する流路デバイスの開発を目的とする。ミリメートルサイズのがん組織を機械的に拘束し、培養液を灌流して両端から栄養素を供給し、灌流中に発生するバブルを除去することで長時間培養可能な流路デバイスを開発する。そこで、2本の並行流路とそれらを接続する拘束流路を有する流路デバイスから構成されるH字流路デバイスを開発する。拘束流路でがん組織を拘束した状態で、並行流路に培養液を灌流し、がん組織両端から栄養素を供給可能とする。この流路デバイスに、ガス透過性の高い材料でできた流路壁を薄くすることで、陰圧を加えたチャンバーの近傍のみのミリバブルを局所的に除去できる技術を開発・実装する。この流路デバイスを用いてがん組織の長時間灌流培養を行い、病理診断により培養能について評価する。さらに抗がん剤供給を行い、抗がん剤開発への応用の可能性について評価する。

## 1.9 論文の構成

本論文は、本章と5つの章を合わせた全6章で構成される。論文の構成図を図1.5に示す。第1章では、本研究の研究背景および目的を述べた。第2章では、模擬組織を拘束しながら両端からの灌流による物質供給を調べるための流路デバイスを開発し、色素の供給評価を行う。第3章では、実験中に流路内に生じるミリバブルを除去するための技術開発を行う。薄壁を有する流路デバイスを作製し、陰圧を用いたミリバブル除去を実現する。第4章では、腎細胞がん組織について述べ、腎細胞がん組織の長時間実験に向けた流路内培養評価と実験後のがん組織評価プロセス検討を行う。第5章では、2章～4章の技術を統合した長時間培養流路デバイスを開発する。第6章では、本研究の結論と今後の展望・課題について議論する。

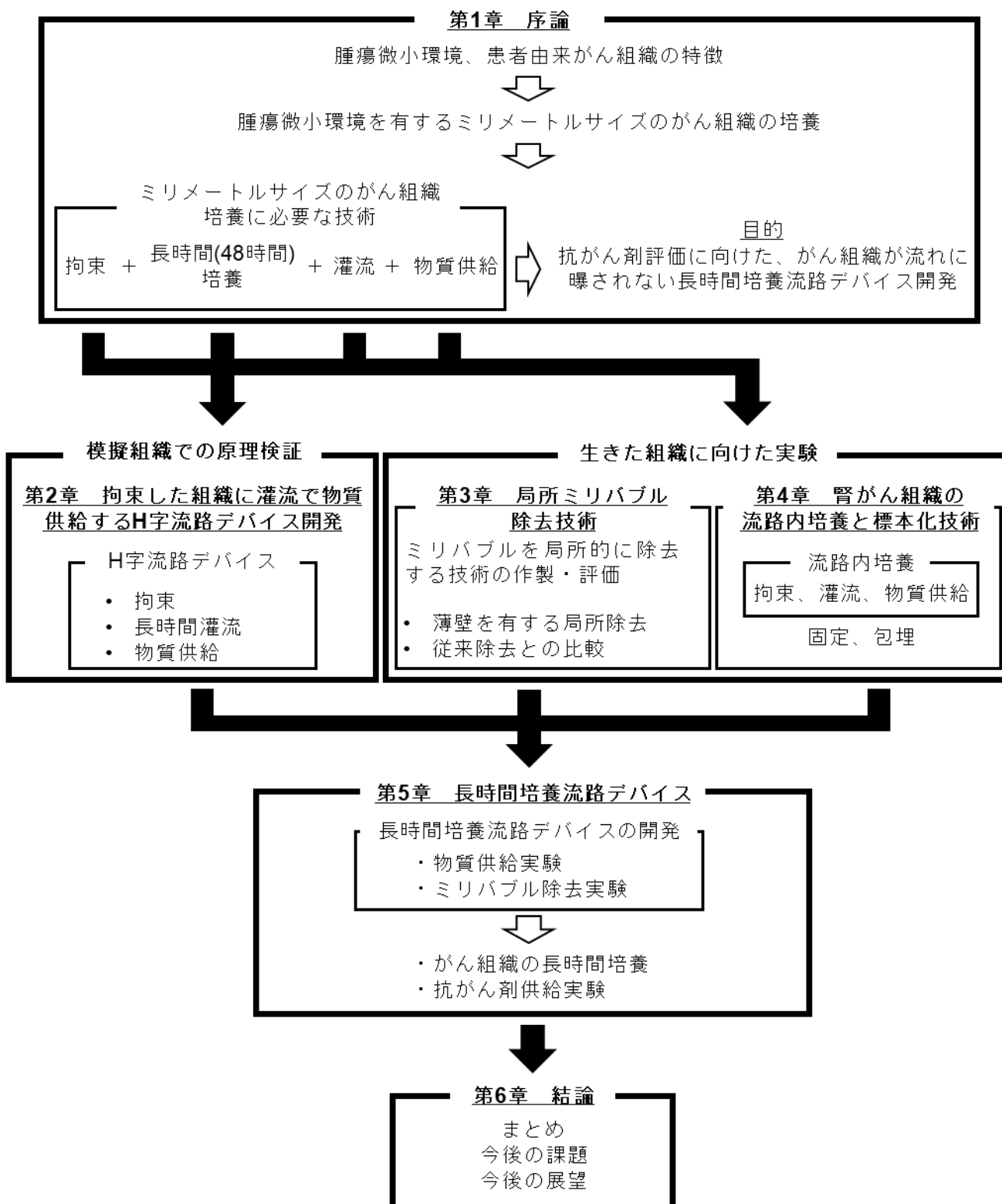


図 1.5 本論文の構成図

## 第 2 章 拘束した組織に灌流で物質供給する H 字流路デバイス開発

本章では、非生存の模擬組織を対象とする原理検証を実施するための H 字流路デバイス開発について述べる。2.1 節で組織を拘束し、組織両端から物質を供給するための H 字流路デバイスについて述べる。2.2 節で今回用いる模擬組織について述べ、2.3 節では H 字流路デバイスの設計・作製・組み立てについて述べる。2.4 節で模擬組織の拘束、灌流実験の原理検証を行う。2.5 節では模擬組織への物質供給実験を行い、模擬組織の外部と内部への物質供給を評価する。2.6 節で今回の結果に対する議論を行い、2.7 節で本章のまとめを述べる。

### 2.1 H 字流路デバイスの概要

組織を拘束し、両端から物質を供給するための H 字流路デバイスを提案する(図 2.1)。H 字流路デバイスには、組織を機械的に拘束し、組織の両端から灌流によって組織内部に物質を供給する機能を有する。組織の機械的拘束は、2 本の流路を結ぶ流路の断面サイズを組織の断面サイズにすることで実現している。また、組織の両端は 2 本の流路に接続しているため、2 本の流路に培養液を流すことで組織への栄養素などの物質供給が可能である。組織とミリバブルの接触を回避するために、ミリバブルにはたらく浮力を利用する。そのため、並行流路は高さを設ける。

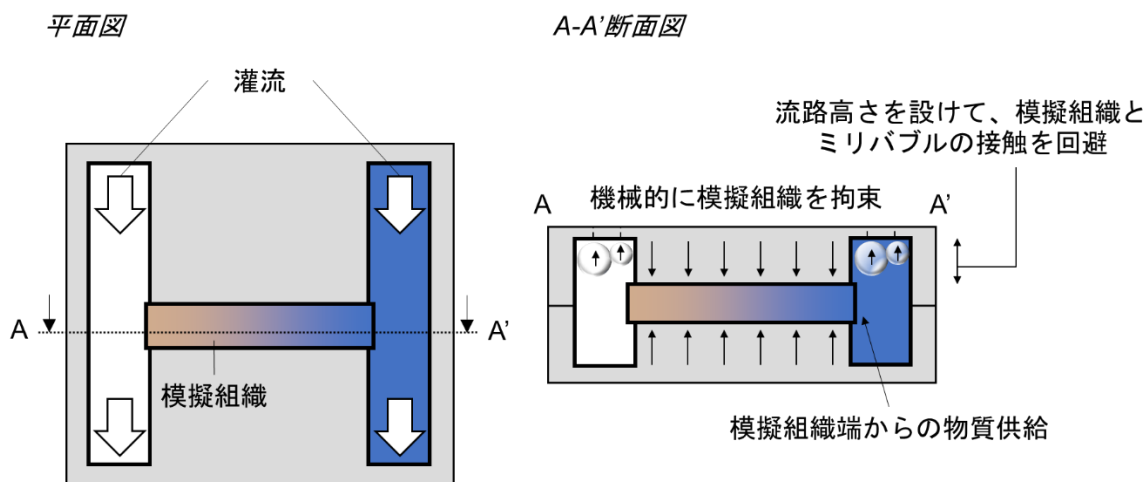


図 2.1 H 字流路デバイス概略図

### 2.2 模擬組織

#### 2.2.1 模擬組織サイズの検討

物質供給実験は模擬組織を対象に行う。H 字流路デバイスの設計のために、模擬組織のサイズを決定する。共同研究先の複数の医師との議論の結果、成形の容易さとハンドリング性の観点から、今回用いる模擬組織のサイズは直径 0.5 mm、長さ 3 mm に決定した。

#### 2.2.2 模擬組織の作製

模擬組織の選定にあたり、入手と整形のし易さから、市販の厚さ 4 mm 程度の豚の心臓を用いた。模擬組織を切り出しやすくするため、豚の心臓を冷凍後に内径 0.5 mm 生検針を刺し、直径 0.5 mm×長さ 3 mm 程度の円柱状の模擬組織をくり抜く。得られた模擬組織を図

2.2に示す。今回得られた模擬組織は、中腹部直径 0.48 mm、長さ 3.8 mm であった。

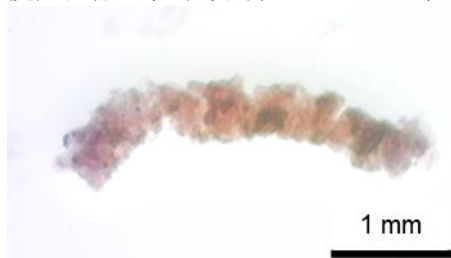
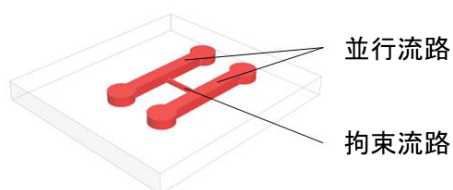


図 2.2 模擬組織

## 2.3 H 字流路デバイス

H 字流路デバイス概念図を図 2.3 に示す。2 本の並行流路には液体を流すことができる(図 2.3(a))。並行流路を橋渡しする拘束流路には模擬組織を配置し、H 字流路デバイス上層と下層を密着して、ホルダーで押さえることで模擬組織を機械的に拘束する(図 2.3(b))。模擬組織を実装した状態で並行流路に溶液を流すと、溶液と模擬組織の両端が接触し、物質を模擬組織内に供給することができる。

(a) H 字流路デバイス



(b) 組み立て

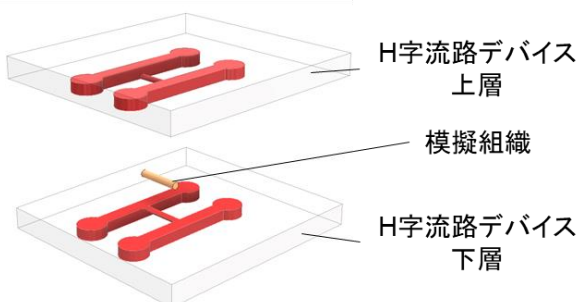


図 2.3 H 字流路デバイス概念図。(a) H 字流路デバイスの機能、(b) H 字流路デバイスの組み立て。

### 2.3.1 H 字流路デバイスの設計

H 字流路デバイスの寸法を図 2.4 に示す。対象とする模擬組織サイズは 2.2 節より直径 0.5 mm、長さ 3 mm である。このサイズを基に各部の設計を行う。模擬組織を実装するための拘束流路は、模擬組織のサイズに合わせて直径 0.5 mm、長さ 3 mm とした。また、患者からの模擬組織の切り出しと拘束流路への模擬組織の配置は手作業で行うため、サブ mm サイズのばらつきやずれが生じることが想定される。そのため、配置を容易に行えるよう並行流路幅は 1 mm として、個体ごとの長さのばらつきや配置におけるずれを許容するための余裕を持たせる。また、模擬組織が拘束流路から並行流路に飛び出た際に並行流路をふさがないようにするため、流路高さは余裕を持たせて 1.5 mm とした。

デバイス材料について以下の要素を満たす必要がある。(1)微細に加工された流路を作製するための成形性が求められる。(2)模擬組織が直接 H 字流路デバイスに接触することから、生体適合性が必要である。(3)ホルダーを用いて機械的に密着させて拘束流路や並行流路を形成するため、高い弾性が求められる。(4)実験中に流路や模擬組織を観察できるように、光透過性が求められる。(5)がん組織を培養する際に適切なガス濃度の環境にする必要があるため、高いガス透過性が求められる。以上の条件を満たす材料として、マイクロ流路デバイスとして広く用いられる PDMS(Polydimethylsiloxane)を選定する。

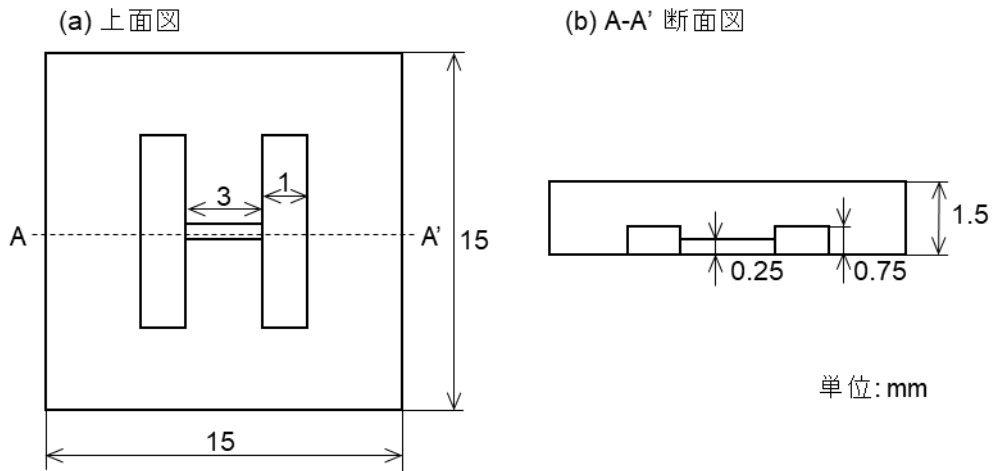


図 2.4 H 字流路デバイスの設計。(a)上面図。(b) A-A'断面図。

### 2.3.2 H 字流路デバイスの作製

H 字流路デバイスの作製方法を図 2.5 に示す。H 字流路デバイスは、ソフトリソグラフィを用いて作製した。H 字流路デバイスの高さがミリスケールであることから、鋳型の作製は切削で行った。ポリアセタールを切削加工機(MDX-540、ローランド ディージー)で加工し(図 2.5(a))、粗さ  $9\ \mu\text{m}$  のサンドペーパー(三共理化学株式会社)、粒子径  $3\ \mu\text{m}$  程度の研磨剤(PiKAL、日本磨料工業株式会社)、粗さ  $0.3\ \mu\text{m}$  のサンドペーパー(三共理化学株式会社)の順番で研磨し、超音波洗浄機およびエタノールで洗浄する(図 2.5(b))。PDMS(SILPOT 184 W/C、Dow Corning Toray)を主剤と硬化剤を質量比 10 : 1 の割合で混合し、 $-0.08\ \text{MPaG}$  で 15 分脱泡した後に鋳型に注いだ(図 2.5(c))。注いだ PDMS を硬化させるため、 $85^\circ\text{C}$  で 60 分間ベークして硬化した(図 2.5(d))。鋳型をエタノールに浸した状態で、流路が転写された PDMS を離型し(図 2.5(e))、二つの H 字流路デバイスを貼り合わせることで H 字流路デバイスになる(図 2.5(f))。なお、鋳型には、耐熱性に優れるポリアセタールを用いた。作製した H 字流路デバイスを図 2.6 に示す。また、拘束流路の断面図を図 2.7 に示す。設計値  $0.5\ \text{mm}$  に対して、得られた拘束流路の直径は  $0.46 \pm 0.02\ \text{mm}$  であった。

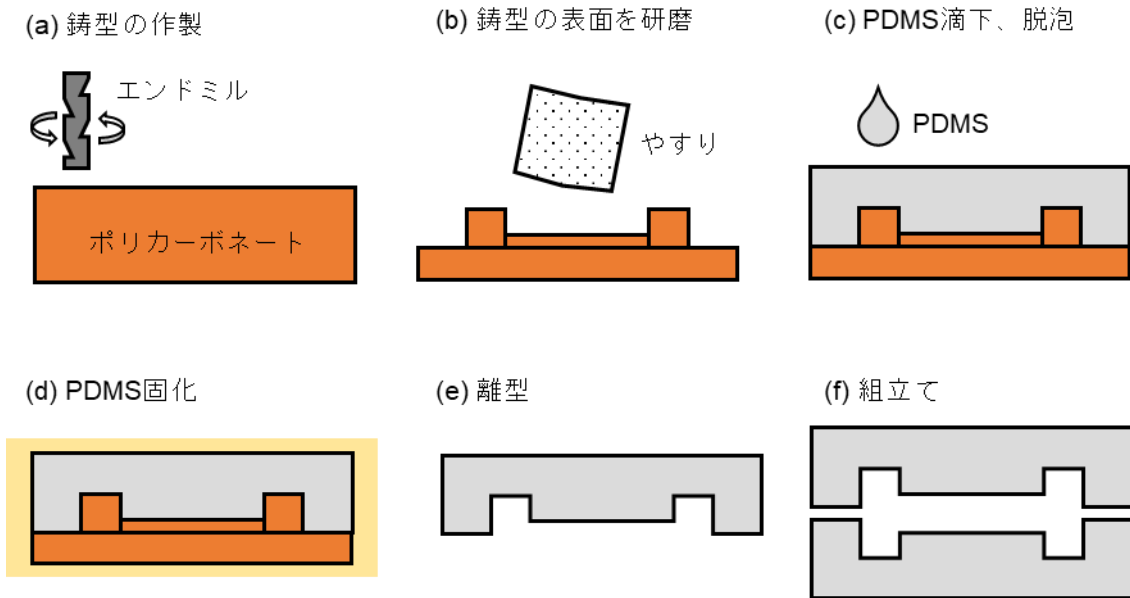


図 2.5 H 字流路デバイスの作製プロセス。(a) 鋳型の作製、(b) 鋳型の表面を研磨、(c) PDMS 滴下、脱泡、(d) PDMS 固化、(e) 離型、(f) 組立て。

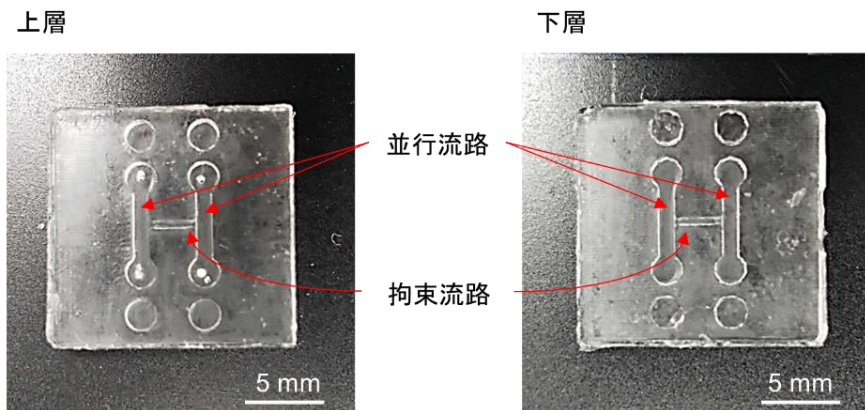


図 2.6 作製した H 字流路デバイス

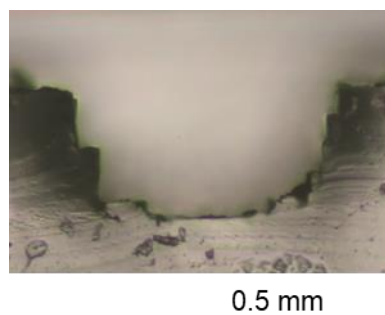


図 2.7 拘束流路の断面

### 2.3.3 ホルダー

拘束流路上の模擬組織を拘束しながら実験を行ったり、実験後評価のために模擬組織を取り出す必要がある。そのために、永久接着法でなく機械的に密着させる方法が求められ

る。

一般的なマイクロ流路デバイスは透明であるため流路内の組織を観察することが可能である。しかし、流路と基板を加熱プロセスを経て永久接着するため、デバイス内部の組織への大きなダメージになったり、取り出しが困難である。そこで、組織の容易な取り出しを実現するために、ホルダーを用いた密着法を採用する。ホルダーをねじ締めすることでPDMS製のマイクロ流路デバイスを貼り合わせている報告があり[47]、その手法を用いた。

ホルダーに求められる条件としては、実験中に組織を観察できること、拘束流路等を介した培養液の干渉および流路外への液漏れ(図 2.8)を阻止すること、実験後に模擬組織を容易に取り出せることが挙げられる。過去の研究結果から、ホルダー材料には透明なアクリルを採用した[48]。ホルダーはレーザー加工(L807PC、IIDA)で作製した。作製したホルダーを図 2.9 に示す。赤枠内は送液・排液用の穴になっており、その周囲はねじ締め用の穴である。

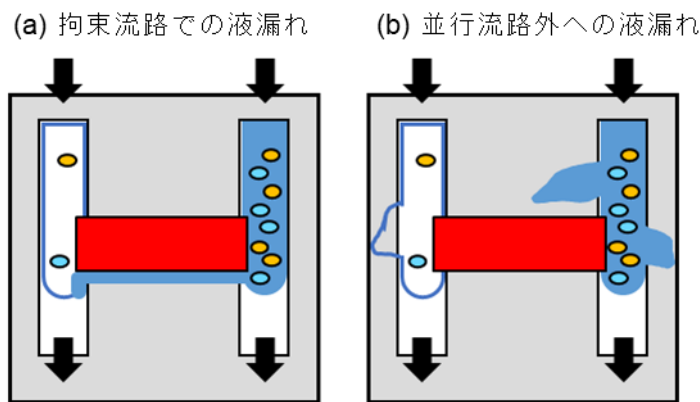


図 2.8 液漏れ例 (a) 拘束流路での液漏れ (b) 並行流路外への液漏れ

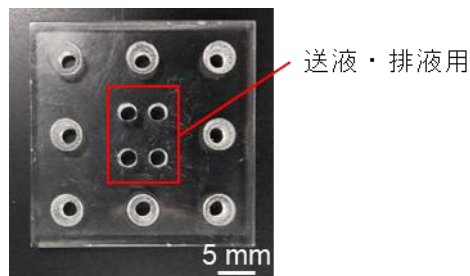


図 2.9 アクリル製ホルダー

### 2.3.4 H字流路デバイスの組立て

模擬組織を H 字流路デバイスの拘束流路に設置し、ホルダーで押さえ、流路周り 4 箇所をねじ締めする。ホルダーを押さえる条件は 2.4.2 で説明する。H 字流路デバイスを図 2.10 に示す。

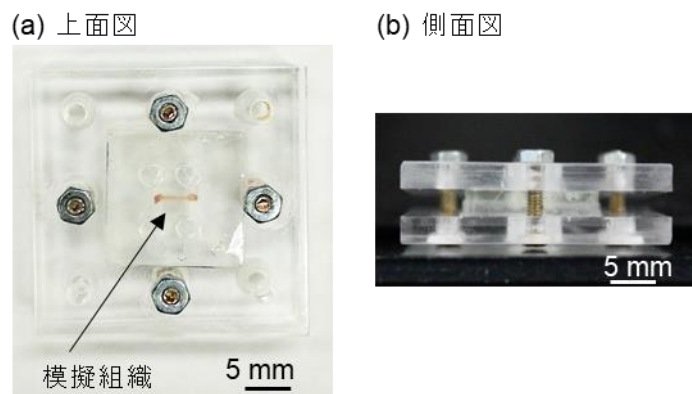


図 2.10 模擬組織を実装した H 字流路デバイス。(a)上面図、(b)側面図。

## 2.4 模擬組織の拘束と灌流の原理検証

模擬組織を対象に拘束と灌流の原理検証実験を行う。

### 2.4.1 実験セットアップ

実験セットアップを図 2.11 に示す。H 字流路デバイスを倒立顕微鏡(CKX、オリンパス)のステージ上に設置する。青色水を、デシケータ内で $-0.06$  MPaG で 24 時間脱泡した後に、10 mL シリンジ内にそれぞれ充填する。2本の並行流路の流入側のカットパイプとシリンジを接続し、シリンジを送液機であるシリンジポンプ(KDS210、KD Scientific Inc.)にセットする。並行流路の片側に純水、もう片側に青色水を流量  $1 \mu\text{L}/\text{min}$  で 20 時間送液する。実験中、H 字流路デバイス内部を透過照明倒立顕微鏡(CKX41、オリンパス)で 1 時間おきに観察し、模擬組織内に物質が供給されているかを調べる。なお、青色水にはブリリアントブルーFCF(共立食品)を用いる(詳細は 2.5 節)。ブリリアントブルーFCF を純水に  $0.002 \text{ g}/\text{mL}$  で調整し、青色水とする。

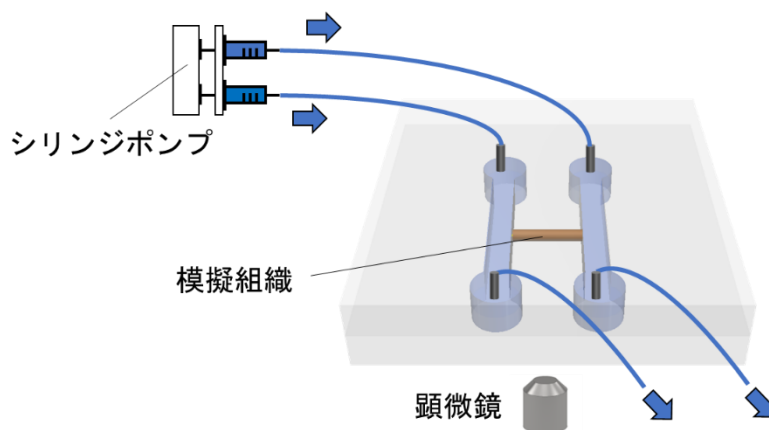


図 2.11 実験セットアップ

### 2.4.2 H 字流路デバイスの拘束条件

ホルダーによる H 字流路デバイスの密着具合により、液漏れが生じることがあった。H 字流路デバイスの密着は、 $M2 \times 10P0.4$  のボルトと、M2 六角ナットを用いて手動で締結す

ることで調整した(図 2.12)。シリコン製模擬組織を対象に行った拘束実験で得られた結果を表 2.1 に示す[48]。

締結が弱いとき(ピッチ数<4 (1.6 mm 押しつけ))は H 字流路デバイス同士の密着が十分にされておらず、流路外への液漏れが見られた。しかし、強く締結したとき(ピッチ数 4)に流路外への液漏れは見られなかった。また、シリコン製模擬組織の直径が 0.29 mm~0.46 mm の場合において、拘束流路での液体の混合は見られていない(表 2.1)。これはアクリルホルダーによって流路全体に垂直応力を加えられるため、拘束流路がたわみ、拘束流路とシリコン製模擬組織が密着しやすくなるためである。また、過剰に締め付けると模擬組織が潰れてしまう。以上の条件から、ピッチ数を 4 にして模擬組織を拘束する。

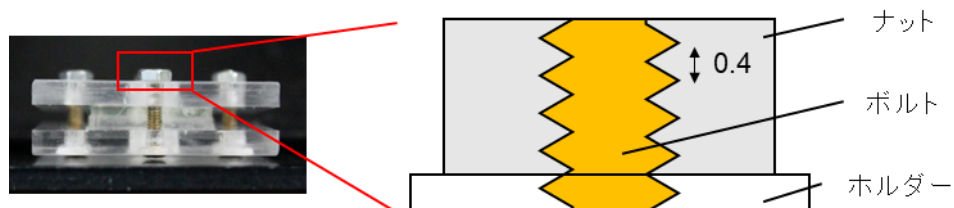


図 2.12 ボルトとナットによる締結

表 2.1 ピッチ数と液漏れ、はめ合いの関係

ピッチ数	実験条件	
	4 以上	4 未満
液漏れ	無し	有り
拘束流路間での液体混合	直径 0.29 mm ~0.46 mm で液体の混合無し	-

### 2.4.3 実験結果

実験結果を図 2.13 に示す。初期状態で、青色水が漏れることなく灌流しており、模擬組織も拘束されている(図 2.13(a))。この状態は 20 時間後まで維持された(図 2.13(b, c))。しかし、10 時間後に並行流路左側に、20 時間後に並行流路右側にミリバブルが生じ、模擬組織と接触してしまった。

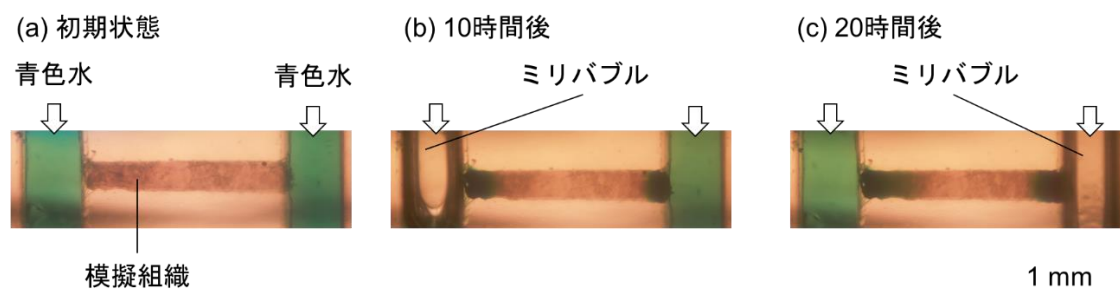


図 2.13 送液時の様子。(a) 初期状態。(b) 10 時間後。(c) 20 時間後。

## 2.5 物質供給実験

模擬組織を対象に物質の供給実験を行う。生体組織はハイドロゲルの一種と考えることができ、生体組織内部での栄養や薬剤などの物質の供給は拡散によって行われると言われている[49]。

### 2.5.1 物質の拡散理論

物質供給時に生じる現象の理論式について述べる。溶液中の物質の拡散はフィックの拡散方程式で定義されている。拡散流速は濃度勾配に比例するというものであり、微分方程式を解くことで、時刻  $t$  における拡散長さは式(2.1)で表すことができる。

$$L = \sqrt{Dt} \quad (2.1)$$

拡散長さ  $L$ 、拡散係数  $D$  とする。これにより拡散長さを計算するには、拡散係数  $D$  が必要となる。拡散係数  $D$  はアインシュタイン・ストークスの式より、式(2.2)で表すことができる。

$$D = \frac{kT}{6\pi\mu r} \quad (2.2)$$

ボルツマン定数  $k$ 、絶対温度  $T$ 、溶媒の粘性率  $\mu$ 、球状粒子の半径  $r$  とする。このことから、粒子半径がわかれば、拡散係数  $D$  は計算することが可能となる。

栄養や色素、薬剤は分子で構成されており、拡散係数  $D$  を計算するには 1 分子当たりの大きさを求める必要がある。1 分子が球体と仮定したときの半径のことを平均有効分子半径  $r$  と呼ぶ。1 分子あたりの体積  $V$  は  $M/\rho N_A$  と表される。密度  $\rho$ 、モル質量  $M$ 、アボガドロ数  $N_A$  とする。一方、1 分子を球体と仮定しているため、 $V = 4\pi r^3/3$  と書ける。これらの関係から、 $r$  は式(2.3)で表すことができる。

$$r = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi} \frac{M}{\rho N_A}} \quad (2.3)$$

以上より、対象の溶液の粘度とモル質量がわかれば、拡散係数を計算することが可能であり、物質供給について理論的に議論することが可能である。

### 2.5.2 物質の選定

模擬組織へ供給する物質を選定する。がん組織培養に必要な栄養素の代表格としてグルコースがある。グルコースは  $\rho = 1540 \text{ kg/m}^3$ 、 $M = 0.18 \text{ kg/mol}$  であるため、グルコースの平均有効分子半径  $r_G$  は式(2.3)より  $0.36 \text{ nm}$  である。この大きさに近く、観察が容易である物質として、今回は青色色素であるブリリアントブルーFCF ( $\rho = 1480 \text{ kg/m}^3$ 、 $M = 0.79 \text{ kg/mol}$ 、 $r_B = 0.60 \text{ nm}$ )を用いる。

### 2.5.3 実験セットアップ

2.4.2 で用いた実験セットアップを基本として、並行流路左側に純水、右側に青色水を 100 時間送液する。実験中、H 字流路デバイス内部を透過照明倒立顕微鏡で 1 時間おきに観察し、模擬組織内に物質が供給されているかを調べる。ブリリアントブルーFCF(共立食品)を純水に  $0.002 \text{ g/mL}$  で調整し、青色水とする。

### 2.5.4 実験後の評価方法

実験後の模擬組織の外観と内観から、物質が模擬組織内をどのように供給されているか評価する。今回は背景が白色に対し、青色の変化で物質の供給を評価する。背景色である白色を光の三原色に分解し、8 bit で表すと R255、G255、B255 となる。それに対して、青

色は R0、G0、B255 となる。つまり、青色物質の供給は青色の変化で計測できず、G 成分か R 成分で観察すればよいことが分かる。ここで、ブリリアントブルーFCF の吸収スペクトルは 629 nm であるため、R 成分を見ることで青色物質の供給を計測することができる。ブリリアントブルーFCF の供給長さを測定するために、画像の R 成分を抽出して評価する。画像解析ソフトには Image J を用いた。

#### 2.5.4.1 外観評価

実験後の模擬組織の外観評価のために、青色染色された模擬組織の反射像を撮影する。実験後に H 字流路デバイスを上下に分離して青色染色された模擬組織をむき出しにした状態で、一眼レフカメラ(Canon、EOS Kiss X6i)で撮影した青色染色された模擬組織画像を RGB に分割する。R 成分を白黒反転させた模擬組織画像の長軸方向に直線を引き、その直線上の輝度値を測定することで模擬組織外観のブリリアントブルーFCF の供給を調べた。青色物質の供給において、先端位置を決定するために大津の 2 値化を用いた。

#### 2.5.4.2 内部評価

模擬組織内部の輝度値を測定するために、実験後の模擬組織をスライス化した。スライス作製方法を図 2.14 に示す。クライオスタット(HM550、Thermo Fischer)内を $-20^{\circ}\text{C}$ まで冷却しておき、包埋剤であるクライオコンパウンドを H 字流路デバイス上の模擬組織と試料台上に薄く延ばして $-20^{\circ}\text{C}$ で固化させる。これにより模擬組織の形状変化を抑制し、試料台の土台を形成する(図 2.14(a))。模擬組織をピンセットで取り出し、試料台上に垂直に設置し、包埋剤を滴下し、再び $-20^{\circ}\text{C}$ で固化する(図 2.14(b))。この状態で試料台をクライオスタット本体に取り付け、模擬組織を短手方向へ切断しスライスにする(図 2.14(c))。

スライスの観察は顕微鏡用デジタルカメラ(DP74、オリンパス)を用いて、透過像を撮像した。今回は色を見るために、作製しやすい厚さ  $50\ \mu\text{m}$  に切断した。スライス内の輝度値の測定は 2.5.4 節と同様に行い、平均輝度値を測定する。また、模擬組織内を均一に物質が供給しているかを評価するために、模擬組織内に供給されたブリリアントブルーFCF の分布を調べた。図 2.15 に示すように、R 成分を抽出したスライスの横方向、縦方向に直線を引き、直線上の輝度分布を測定する。

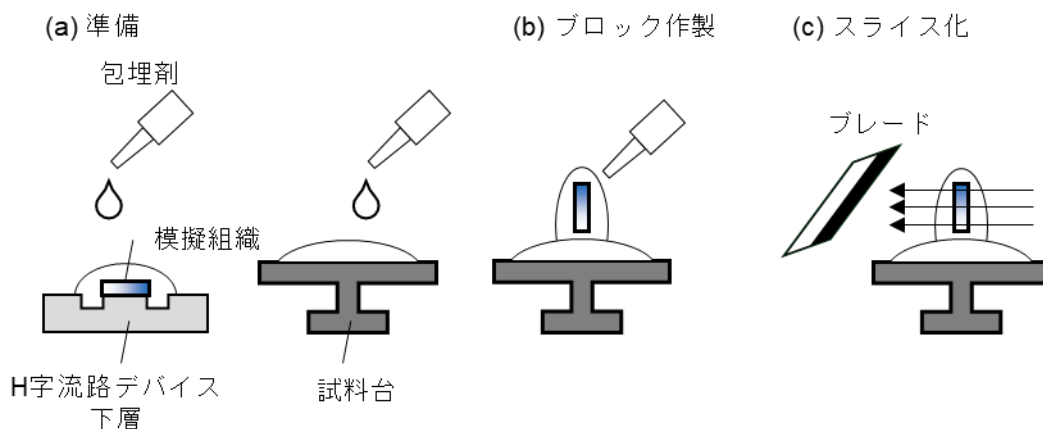


図 2.14 実験方法。(a) 準備、(b) ブロック作製、(c) スライス化。

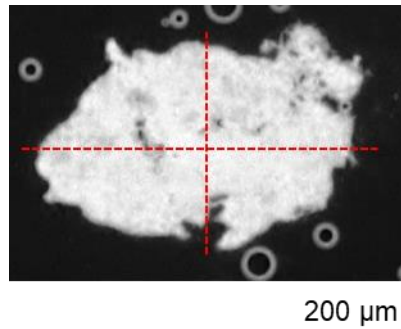


図 2.15 色素輝度分布の測定方法

## 2.5.5 外観評価

### 2.5.5.1 時間経過に伴う模擬組織外部への色素供給

長時間供給実験における模擬組織の様子を顕微鏡観察したものを図 2.16(a-f)に示す。模擬組織の様子を観察すると、青色水接触側から内側に向かって時間経過とともに青色に染色された。ブリリアントブルーFCF の供給長さは、初期状態から 20 時間後に 0.36 mm(図 2.16(b))、40 時間後に 0.56 mm(図 2.16(c))、60 時間後に 0.63 mm(図 2.16(d))、80 時間後に 0.67 mm(図 2.16(e))、100 時間後に 0.82 mm(図 2.16(f))であった。このように、時間経過に伴い、模擬組織内部の影の濃淡および青色水接触部付近の色素が濃くなり、青色水接触側から内側に向かって色素による染色される様子を観察した。以上より、100 時間連続で流路形成を維持しながら、模擬組織内をブリリアントブルーFCF が供給される様子を経過観察できた。

拘束流路と並行流路の接触部からの青色領域の境界線の長さを、時間の関数としてプロットした(図 2.17)。実験開始から 20 時間経過後には、色素の供給長さの増加は 0.36 mm であった。色素供給の長さの増加は、時間の経過とともに減速した。80~100 時間では、青色領域の境界線の長さの増加は 0.09 mm であった。色素供給長さの時間変化に対し最小二乗法を用いて近似曲線を求めると  $L=1.35 \times 10^{-6} \cdot t^{\frac{1}{2}}$  となった。この式から、ブリリアントブルーFCF の模擬組織への供給は式(2.1)に従っていることが分かった。つまり、色素供給は拡散によって生じていると言える。また、ブリリアントブルーFCF の模擬組織への拡散係数  $D_{B(st)}$  は  $1.80 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$  と求めた。

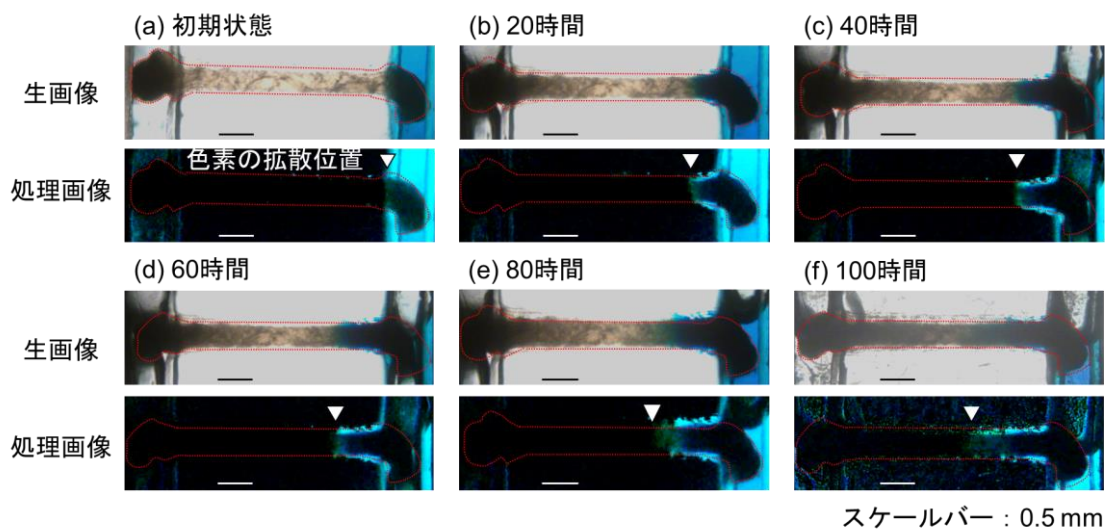


図 2.16 模擬組織外部への色素拡散の様子(a)初期状態、(b)20 時間、(c)40 時間、(d)60 時間、(e)80 時間、(f)100 時間。

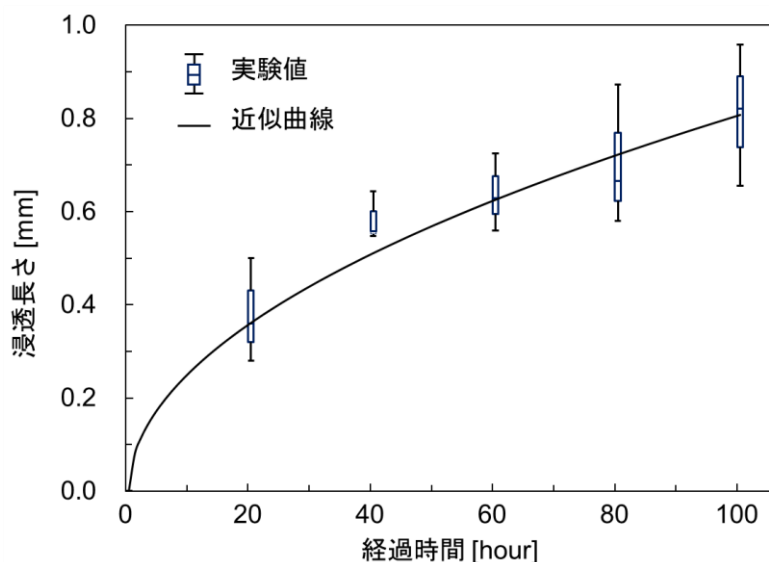


図 2.17 経過時間と模擬組織への供給長さの関係

### 2.5.5.2 長時間供給実験後の模擬組織外部の色素供給評価

長時間供給実験前後の模擬組織を図 2.18 に示す。100 時間後の模擬組織の長手方向の青色輝度分布を測定した(図 2.19)。点 A は、純水(0.0 mm)用の拘束流路と並行流路の接続部の位置とし、点 B は、青色水(3.0 mm)用の拘束流路と並行流路の接続部の位置とした。ボックスプロットの中央値を見ると、青色強度は 0.0 mm から 1.5 mm までは 133~148 で一定である。1.5 mm から 2.0 mm までは輝度値が 25 上昇し、ここまでブリリアントブルー-FCF が供給されていることが分かる。2.0 mm から 2.5 mm までに輝度値は更に 71 上昇し、244 であった。3.0 mm の輝度値は 247 で、全体の中で最も高い輝度値であった。以上の結果から、ブリリアントブルー-FCF は B 点から A 点に向かって供給されており、その輝度値が A 点に近いほど低いことが分かった。また、ブリリアントブルー-FCF は B 点から 1 mm 以上供給されていることが分かった。

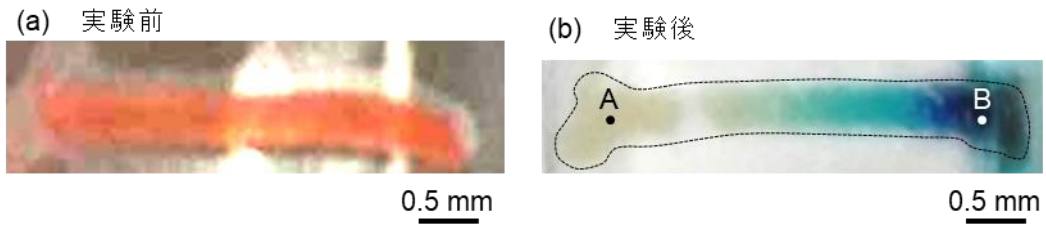


図 2.18 実験前後の模擬組織の様子。(a) 実験前、(b) 実験後。

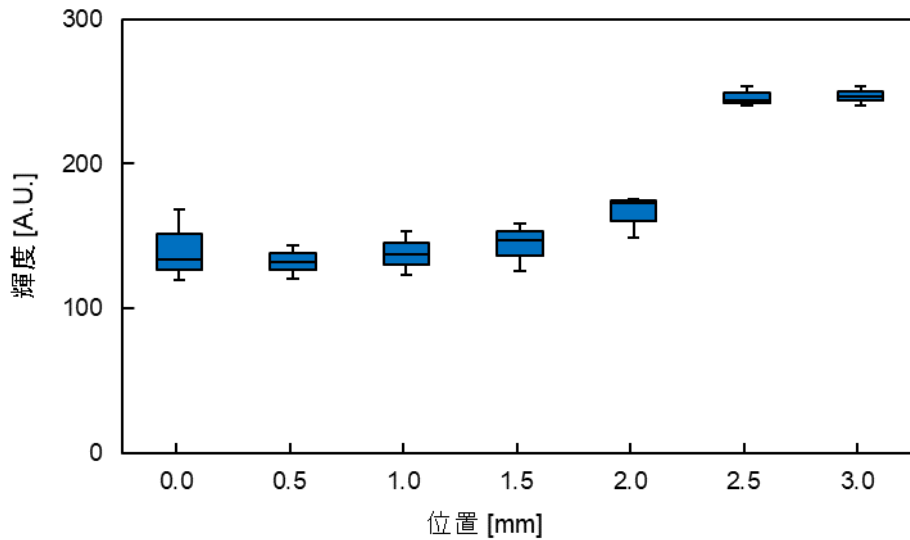


図 2.19 100時間後の模擬組織外観の色素輝度分布

### 2.5.6 内部評価

2.5.5 では模擬組織表面におけるブリリアントブルーFCF の供給を評価した。本節では模擬組織内部までブリリアントブルーFCF が入り込み、模擬組織全体にブリリアントブルーFCF が供給されていることを評価するため、実験後の模擬組織を切断して内部の様子を観察する。

模擬組織の一連の切片を図 2.20 に示す。得られた標本の枚数は 86 枚であった。

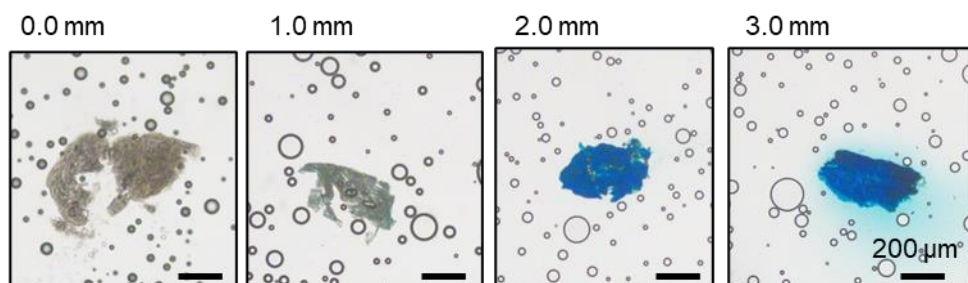


図 2.20 長時間実験後の模擬組織から切り出した一連のスライス画像。

### 2.5.6.1 模擬組織内部の色素供給評価

模擬組織スライス内の色素輝度分布を図 2.21 に示す。縦軸に模擬組織内部の平均輝度、横軸に純水からの距離を示す。0.0 mm と 3.0 mm の位置がそれぞれ A 点と B 点に対応する。ボックスプロットの中央値に注目したところ、0.0 mm から 1.0 mm のスライスから得られた輝度はそれぞれ 103、96、104 とほぼ一定であった。1.5 mm で輝度値は 128 まで上昇し、2.0 mm では 217 まで急激に上昇した。2.5 mm では 223、3.0 mm では 226 となり、純水側では輝度値が低く、青色水側では高い傾向が見られた。

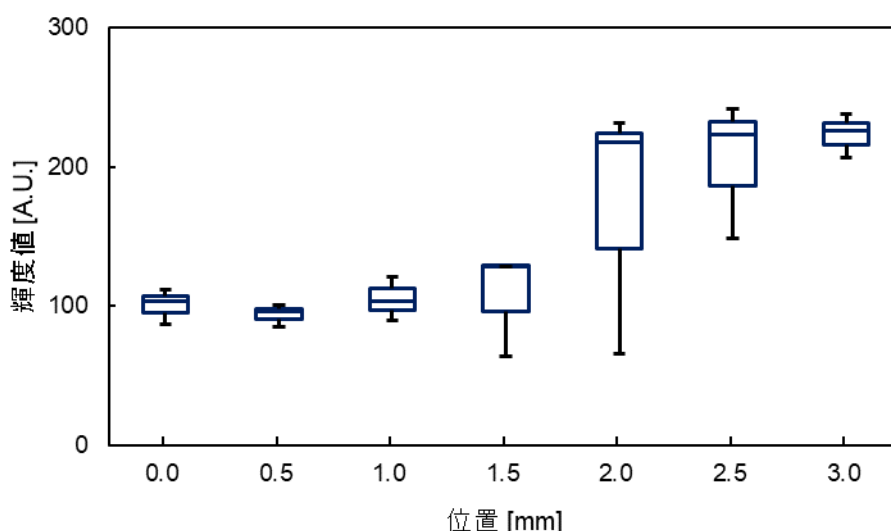


図 2.21 模擬組織スライス内の輝度分布

### 2.5.6.2 スライス内輝度分布

色素輝度の変化が大きな領域が最も組織内部の物質供給に不均一性が生まれやすいと考え、2.0 mm におけるスライス上の輝度分布を調べた。その輝度のライン輝度分布と輝度分布の傾きを図 2.22 に示す。横方向輝度分布と縦方向輝度分布ともに、スライス部分で輝度値が上昇している(図 2.22(a, b))。組織内部の横方向、縦方向の平均輝度値はそれぞれ  $225.1 \pm 16.7$ 、 $224.3 \pm 15.9$  であった。背景の輝度値が  $23.3 \pm 5.3$  であるのに対し、組織内部の標準偏差が 15 程度と大きくなっていた。この組織内部の青色の不均一性はスライスの厚みの不均一性や組織成分の不均一性に由来するものと考えられる。スライス内部は均一にブリリアントブルーFCF が供給されていることが分かる。

上述のようにスライス内の輝度分布を評価するために、図 2.22(c, d) に示す輝度分布の傾きを用いて周囲と組織の境界領域を決定した。今回は、輝度分布の傾きのピークにおける半値幅(最大ピーク値の 1/2 になる値の幅)が背景と組織の境界領域と定義した。横方向では  $6.7 \mu\text{m}$ (正方向ピーク) と  $5.0 \mu\text{m}$ (負方向ピーク) が境界領域となる。縦方向では  $6.7 \mu\text{m}$ (正方向ピーク)、 $8.3 \mu\text{m}$ (負方向ピーク) が境界領域となる。この境界領域は 4-7 ピクセル程度であり、この区間は境界として、均一性の評価から除外する。なお、ピーク間で値が急激に下がっている区間は半値幅の領域をスライス内での脱落として除外した。

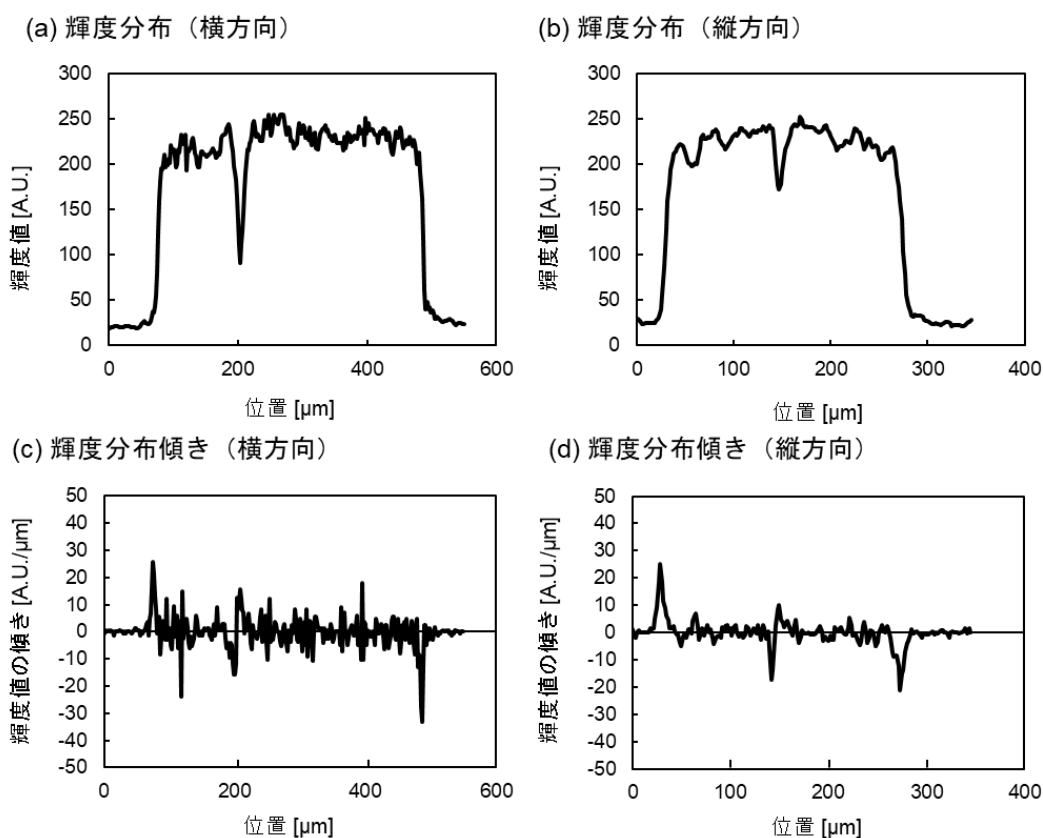


図 2.22 (a) 横方向輝度分布、(b) 縦方向輝度分布、(c) 横方向輝度傾き、(d) 縦方向輝度傾き。

### 2.5.7 外観と内観の比較

模擬組織外観と内観の中央値を比較したグラフを図 2.23 に示す。外観・内観ともに、青色水側に近いほど輝度値が高くなる傾向が見られた。個体差にもよるが、外観・内観ともにブリリアントブルーFCFが1 mm 以上供給されていることが分かった。

外観と内観に有意差があるかを評価した。ブリリアントブルーFCFが供給されている1.5 mm から3.0 mm を対象に有意水準を0.05としてt検定を行った。結果、1.5 mm から3.0 mm の間で両者に有意差は見られなかった。外観は反射像で評価しているため、模擬組織表面近傍の情報を取得している。内観は透過像で評価しているため、模擬組織の内部から表面までの積算情報を取得している。異なる観察法で得られた結果、有意差が見られていない。このことから、外部と内部の輝度値に差異はないことが分かった。

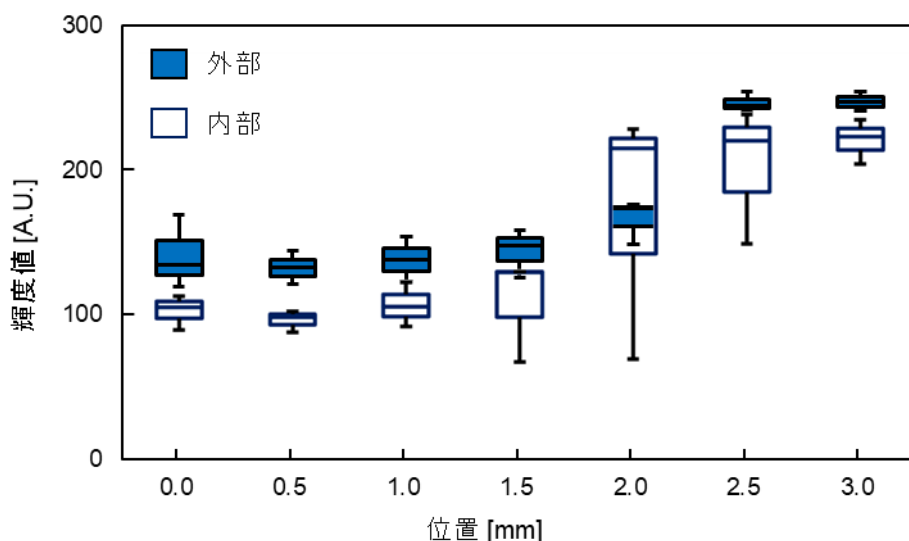


図 2.23 模擬組織外観と内観の比較

## 2.6 議論

2.5.6.2 節の輝度分布から、スライス内部には均一に物質が供給されていることが分かった。また、2.5.7 節での外部と内部の輝度値の比較から、外観と内観には有意差がないことが分かった。以上の結果から、物質の供給は組織全体に有意な差なしに行われていると言える。2本の並行流路に流す液の流量が完全に一致することはないため、組織には圧力差が生じていてもおかしくない。しかし、圧力差によって生じる流れはハーゲンポアズイユ流れの様に中央の流速が速く壁面の流速が遅くなるが、そのような色素分布は見られておらず、組織内での分子レベルの物質供給においては無視できると言える。そのため、がん組織への物質供給は拡散によって行われると考えることとする。また、模擬組織は豚心臓由来であるため筋細胞が多く密度が高いが、*in vivo* のがん組織は密度が低い。そのためがん組織内での物質供給は模擬組織より長距離で行われると考えられる。

グルコースを用いた場合の模擬組織に供給される長さについて検討する。式(2.2)と式(2.3)より、平均有効分子半径から拡散長さの差を算出することができる。グルコースとブリリアントブルーFCFの拡散長さをそれぞれ $L_G$ 、 $L_B$ とすると、 $L_G/L_B = \sqrt{r_B/r_G} = \sqrt{0.60/0.36} = 1.29$ となる。すなわち、ブリリアントブルーFCFが1 mm供給される場合、グルコースは1.29 mm供給される。

## 2.7 まとめ

本章では、組織両端から物質を供給させるためのH字流路デバイスの開発と、それを用いた模擬組織への灌流によるブリリアントブルーFCFの供給実験について述べた。PDMS製のH字流路デバイスとアクリル製のホルダーを作製し、模擬組織を対象にH字流路デバイスを作製した。H字流路デバイスは、ピッチ0.4 mm、ピッチ数4でねじ締めした場合に液漏れが生じなかった。並行流路に、純水とブリリアントブルーFCFを溶解した青色水を送液し、供給長さと経過時間の関係を出した結果、供給がフィックの法則に則っていることが分かった。模擬組織の外部だけでなく内部にもブリリアントブルーFCFが供給されていることを確認するために、供給実験後の模擬組織を接線方向に切断しスライス内部の平均輝度を調べた。結果、青色水との接触点に近いほどスライス内の平均輝度値は高い傾向が見られ、1 mm以上内側のスライスまでブリリアントブルーFCFが供給されていることが

分かった。スライス内部における輝度分布を調べると、均一にブリリアントブルーFCFが供給されていることが分かった。ブリリアントブルーFCFが供給されている1.5 mmから3.0 mmを対象に、内部と外部でt検定を行ったところ、1.5 mmから3.0 mmの間で両者に有意差は見られなかった。模擬組織表面と内部で有意差のない拡散によってブリリアントブルーFCFが供給されていることが分かった。

## 第3章 局所ミリバブル除去流路デバイス開発

本章では、がん組織の長時間培養のためのミリバブルの局所除去技術について述べる。3.1 ではミリバブル混入防止技術の概要について述べる。3.2 では陰圧を用いた局所的なミリバブルの除去技術を開発し、性能評価を行う。3.3 では本節のまとめについて述べる。

### 3.1 長時間灌流における流路内へのミリバブル混入

#### 3.1.1 ミリバブルの混入

第2章で開発したH字流路デバイスのインレットでミリバブルが生じ、時間経過に伴って成長し、最終的に下流へ流れて模擬組織と接触した(図3.1)。ミリバブルが流路内で成長して培養液の流れをせき止めると、組織への酸素・栄養供給を阻害される。組織とミリバブルが接触すると、組織に大きなせん断応力が加わり、組織が崩壊したり、組織を構成する細胞が死亡する可能性がある。そのため、ミリバブルと組織が接触しないように、インレット近傍でミリバブルを除去する技術が必要である。

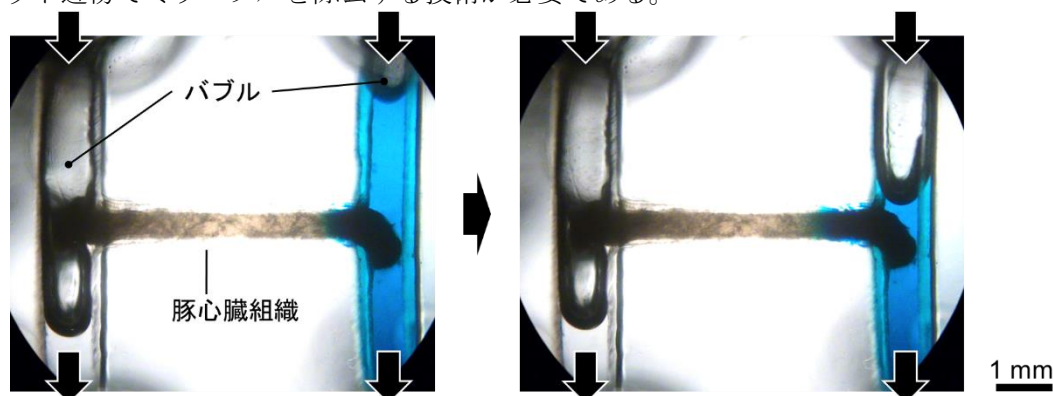


図3.1 流路内に生じるミリバブルが模擬組織と接触する様子。

#### 3.1.2 従来ミリバブル除去技術

PDMSの膜透過性の高さは、微視的に考えると内部が微小なメッシュ構造になっており、そのメッシュ構造を介して大気を構成する気体分子が移動できると説明できる。しかし、メッシュ構造が微小であるために応答性は悪い。PDMSに陰圧を加えると内部の大気が時間をかけて除去され、PDMS内圧が陰圧に等しくなる。この状態でPDMSを大気に暴露すると、PDMS内圧と大気圧の差圧によって、外部から大気が流れ込み、時間をかけてPDMS内部が大気圧になる。

流路内に生じるミリバブルを除去する技術として、これまでにガス透過性が高いPDMS構造越しに陰圧を印加する技術が報告されている[50-51]。ミリバブル除去技術の原理を図3.2(a)に示す。デバイスの流路内にミリバブルがあり、壁を介してチャンバーがある。チャンバーは陰圧を印加するためのものである。チャンバーに陰圧を印加すると、PDMS内部が陰圧になる(図3.2(b))。デバイスの表面からは大気が流入するため、デバイス表面は大気圧になっている。流路内のミリバブルは陰圧になったPDMSに流入し、PDMS壁越しにミリバブルが除去される(図3.2(c))。PDMSで繋がる部分は同様に陰圧になるため、流路全体が陰圧になる。そのため、チャンバーに近いミリバブルだけでなく、チャンバーから離れたミリバブルも陰圧になったPDMSによって除去される(図3.2(c))。PDMSを通過するミリバブル除去速度の理論式は式(3.1)のように表される[50]。

$$-\frac{dV}{dt} = \frac{PA(p_2 - p_1)}{b} \frac{T}{273 P_{\text{atm}}} \frac{76}{1000} \quad (3.1)$$

ここで、 $P$  は PDMS のガス透過率( $1.92 \times 10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ )、 $A$  はミリバブルが除去される薄壁面積、 $p_2 - p_1$  はゲージ圧力差、 $b$  はチャンバーからミリバブルまでの距離、 $T$  は温度、 $P_{\text{atm}}$  は大気圧を表す。

流路全体が陰圧になると、流路内部で培養される細胞や組織も陰圧になり、細胞活動（例えば、増殖や分化）に影響を及ぼす[52-55]。更に、細胞や組織の周囲の酸素分圧や二酸化炭素濃度が変化してしまい、培養に悪影響を及ぼす[56-57]。以上の理由から、がん組織を培養する領域は大気圧になっている必要がある。そのため、インレットでは陰圧によってミリバブルを除去し、組織培養領域では大気圧になるような局所的なミリバブル除去技術が必要である。

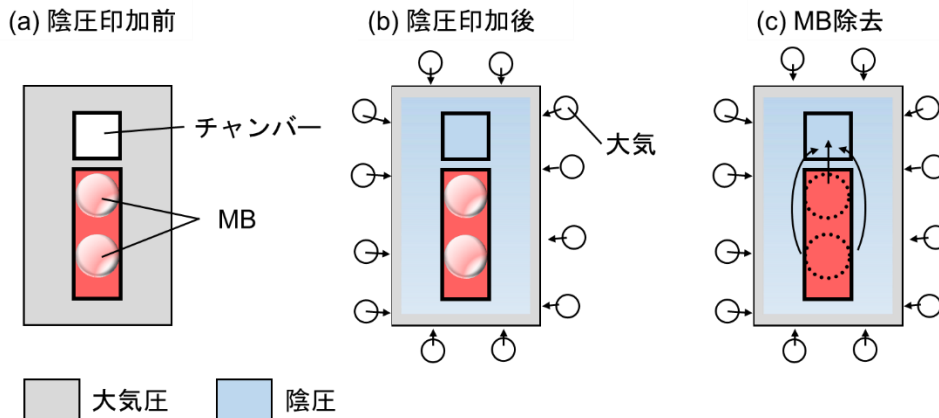


図 3.2 従来ミリバブル除去技術。(a) 陰圧印加前。(b) 陰圧印加後。(c) ミリバブル除去。

## 3.2 陰圧を用いた局所ミリバブル除去技術

### 3.2.1 局所ミリバブル除去技術の原理

ミリバブルの局所除去技術の原理を図 3.3 に示す。局所ミリバブル除去技術では、流路壁を薄くしている(図 3.3(a))。チャンバーに陰圧を印加すると PDMS 内部の大気が除去されるためチャンバー付近は陰圧になる(図 3.3(b))。一方、一定距離離れた領域では、陰圧になった PDMS 薄壁に大気が流入するため、大気圧になる。そのため、チャンバーに近い領域のミリバブルのみを除去できる(図 3.3(c))。これにより、チャンバー付近でのみ陰圧となりミリバブル除去され、チャンバーから離れたところでは大気圧となり組織培養できる。つまり、ミリバブル除去と組織培養を両立するための、局所ミリバブル除去が可能となる。

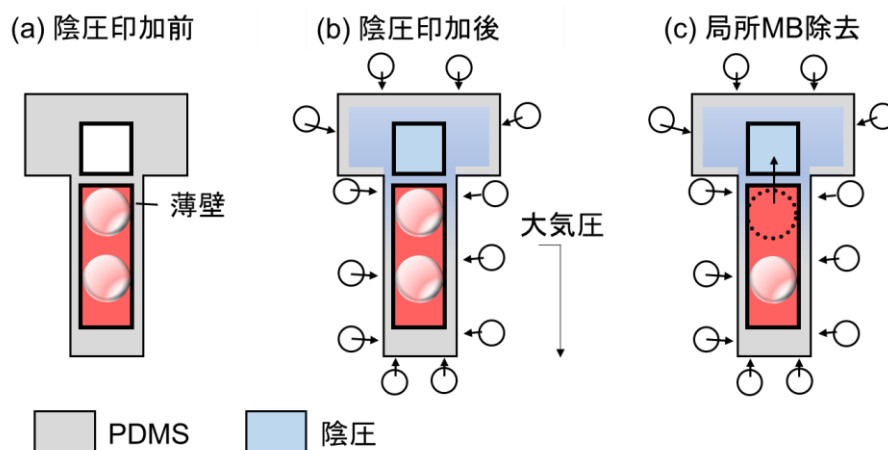


図 3.3 陰圧による局所ミリバブル除去原理。(a)陰圧印加前。(b)陰圧印加後。(c)局所ミリバブル除去。

### 3.2.2 局所ミリバブル除去流路デバイスの概念図

局所ミリバブル除去流路デバイスの概念図を図 3.4 に示す。局所ミリバブル除去流路デバイスは、H 字流路デバイスにおける並行流路の一本部分を模擬しており、トラップ、チャンバー、液体流路、ポケットから構成される(図 3.4(a))。トラップは、インレットで生成するミリバブルを捕捉するためのものである。チャンバーには陰圧を印加する。液体流路には液体が灌流し、ポケットは組織を配置する拘束流路に対応するが、本流路ではミリバブルを保持する役割を担う。ポケットは液体流路に沿って配置されており、チャンバーからどの程度離れた領域で大気圧になっているかを調べることができる。これにより、組織培養に適した位置を決定することができる。

チャンバーとトラップは上層、液体流路上部とポケットは中層、液体流路下部は下層にある(図 3.4(b))。三層を組み合わせてホルダーで密着させることで局所ミリバブル除去流路デバイスになる。

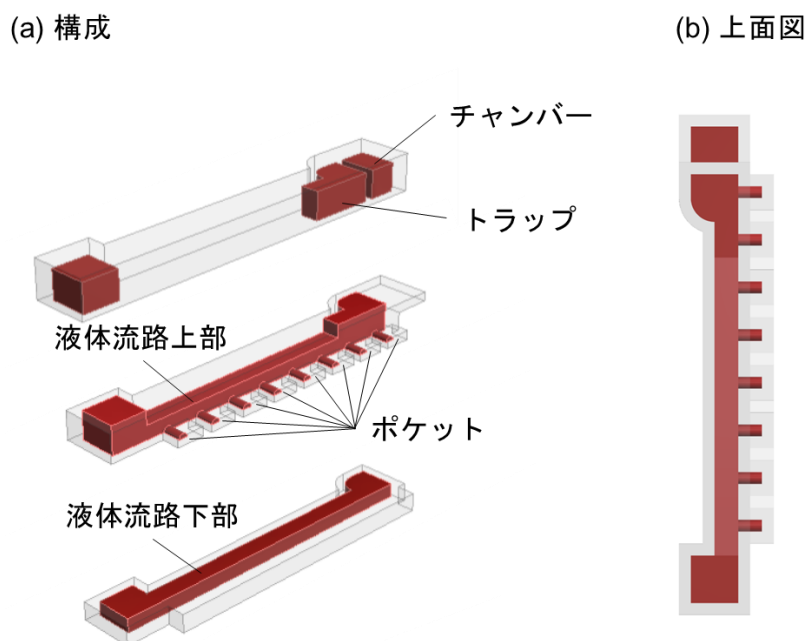


図 3.4 局所ミリバブル除去流路デバイス概念図。(a) 構成、(b) 上面図。

### 3.2.3 局所ミリバブル除去流路デバイスの設計

#### 3.2.3.1 電気回路理論を用いたミリバブルの局所除去計算

陰圧によって駆動される PDMS を通るガスの流れと、電圧によって駆動される抵抗を通る電流の類似性から、電気回路理論で議論できる。図 3.5 (a)に示すように電気回路理論を用いて局所的なミリバブル除去を簡易モデル化する。ここでは、ガス流量*i*、チャンバーから最初のポケットまでの抵抗  $r_0$ 、ポケット間の抵抗  $r_p$ 、側壁を通る抵抗  $r_t$ 、チャンバーと大気間の圧力差  $V (=p_2-p_{atm})$  とする。局所ミリバブル除去流路デバイスを電気回路モデルで記述すると、図 3.5(b)に示すように並列抵抗で表される。チャンバーから最初のポケットまでの距離を 1 mm、ポケット間の距離を 2 mm、側壁の厚さを 0.5 mm とすると、 $r_0=2r_t$ 、 $r_p=4r_t$  となる。全抵抗は  $2.64r_t$  と計算され、ガス流量は  $0.38V/rt$  となった。2*k*-1 mm(*k* 番目のポケット)におけるチャンバーと大気間の圧力差  $V_k$ は、

$$V_k = \frac{0.24V}{4(k-1) + 1}$$

となる。これにより、ガス流量は

$$i = \frac{0.24V}{(4 - 3/k)r_t k}$$

と計算される。図 3.5(c)に示すように、7 mm に該当する第 4 ポケットのガス流量は  $0.02 V/r_t$  未満であったのに対し、1 mm に該当する第 1 ポケットのガス流量は  $0.24V/r_t$  であった。

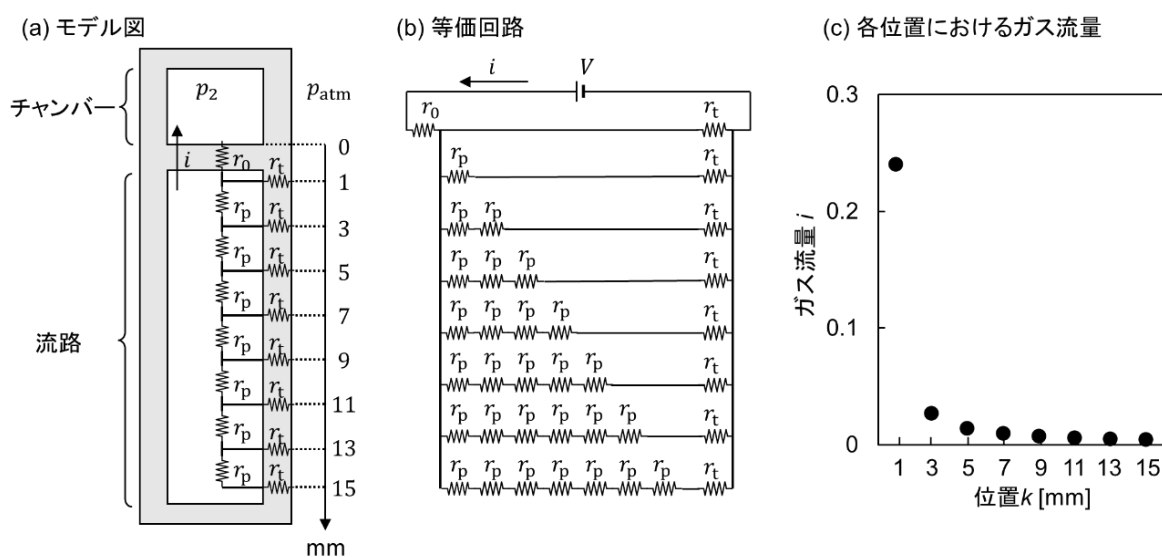


図3.5 局所ミリバブル除去の電気回路モデル。(a)局所ミリバブル除去デバイスの電気回路モデル。(b)局所ミリバブル除去デバイスの等価回路。(c) PDMS 側壁を通過するポケットの位置におけるガス流量。

#### 3.2.3.2 設計

局所ミリバブル除去流路デバイスの設計を図 3.6 に示す。液体流路の高さと幅は、2章で述べた H 字流路デバイスの並行流路の寸法に合わせてそれぞれ 1.5 mm と 1.0 mm である。ポケットも同様に模擬組織と同じ直径 0.5 mm、長さは 1.0 mm の半円筒形である。液体流路とチャンバー間およびポケット周辺の薄壁の厚さは 0.5 mm である。ポケットの位置は、チャンバーの端から 1 mm から 15 mm まで 2 mm 間隔である。

トラップの設計について述べる。2章の100時間の送液中に流路内に生じたミリバブルの総量は、片流路あたり約24  $\mu\text{L}$ であることが分かった。そのため、余裕を持ってH字流路デバイスのインレットに30  $\mu\text{L}$ のトラップを設ける。

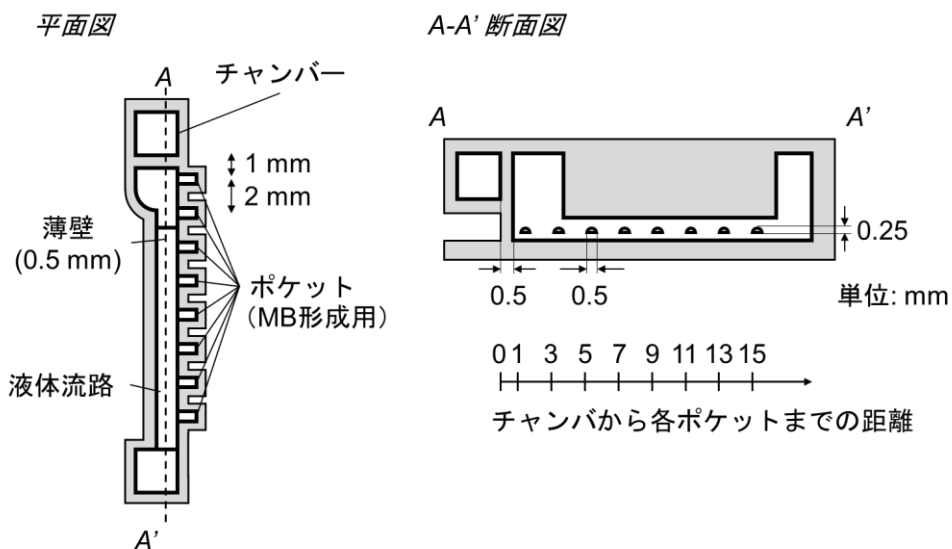


図 3.6 局所ミリバブル除去流路デバイスの設計図。

### 3.2.4 局所ミリバブル除去流路デバイスの作製

局所ミリバブル除去流路デバイスは、2.1.2.2 節と同様に作製した。切削後、鋳型表面には粗さが生じるため、粗さ  $9 \mu\text{m}$  のサンドペーパー(三共理化学株式会社)、粒子径  $3 \mu\text{m}$  程度の研磨剤(PiKAL、日本磨料工業株式会社)、粗さ  $0.3 \mu\text{m}$  のサンドペーパー(三共理化学株式会社)の順番で研磨し、超音波洗浄機およびエタノールで洗浄する。作製した局所ミリバブル除去流路デバイスを図 3.7 に示す。

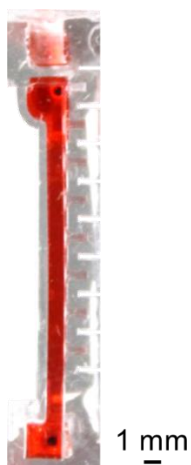


図 3.7 作製した局所ミリバブル除去流路デバイス

## 3.2.5 実験環境

### 3.2.5.1 インキュベーションボックス

培養時の温度である 37°Cでは気体の溶解度が室温に比較して低下するためミリバブルが生じやすい。そのため、インキュベーションボックス内で実験を行う。インキュベーションボックスの全体図を図 3.8 に示す。インキュベーションボックス上部の開閉蓋はゴムでシールしており、インキュベーションボックス内の環境を定常状態に保つことができる。インキュベーションボックスはアクリル製のボックス、コントローラー、熱電対、ヒーター、ガスポートから構成される。コントローラーと熱電対、ヒーターが接続されている。コントローラーで 37°Cに設定し、熱電対で検知した温度に合わせてヒーターで加温するシステムである。

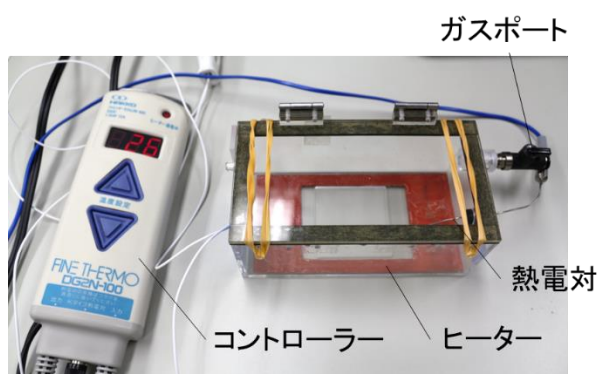


図 3.8 インキュベーションボックス

### 3.2.5.2 実験セットアップ

実験セットアップを図 3.9 に示す。光学顕微鏡(CKX41、オリンパス)のステージ上にインキュベーションボックスを設置し、内部環境を 37°Cに設定する。インキュベーションボックス内に、シリンジポンプと接続した局所ミリバブル除去流路デバイスを配置する。37°Cに温めておいた赤色水をシリンジポンプで液体流路に 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  で 48 時間以上送液した。送液中、真空ポンプでチャンバー内をゲージ圧力差-50 kPa にする。対照実験として、流路壁が 1.5 mm の従来ミリバブル除去デバイスでも同様の実験を行った。ポケット内のミリバブルの除去の有無を観察して、陰圧が及ばない領域を調べる。なお、赤色水には食用赤色 102 号(共立食品)を用いる。食用赤色 102 号を純水に 0.002 g/mL で調整し、赤色水とする。

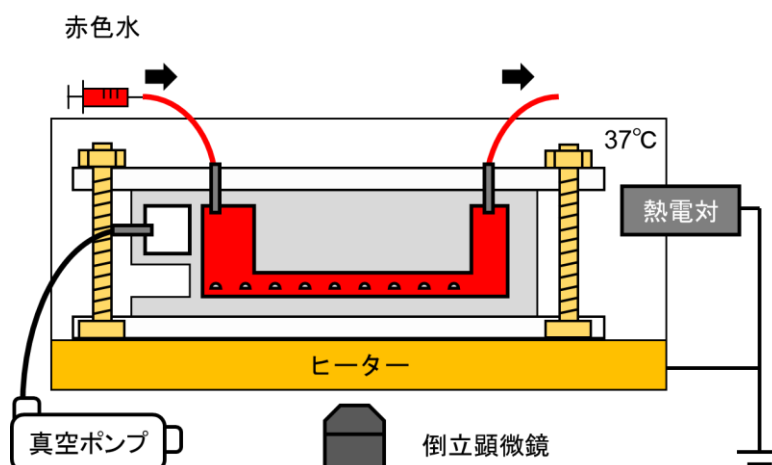


図 3.9 実験セットアップ

### 3.2.6 ミリバブル除去実験

#### 3.2.6.1 ポケット内のミリバブル除去

ミリバブル除去実験は、従来ミリバブル除去と局所ミリバブル除去で実験を行った(図 3.10)。従来ミリバブル除去において、初期状態ではポケット内がミリバブルで満たされていた(図 3.10(a-i))。すべてのポケット内のミリバブルが徐々に除去され、24 時間後にはポケット内に赤色水が入り始めた(図 3.10(a-ii))。48 時間後、すべてのポケット内のミリバブルが完全に除去され、72 時間後まで赤色水で置換された(図 3.10(a-iii)、a-iv))。一方、局所ミリバブル除去において、初期状態にポケット内がミリバブルで満たされた(図 3.10(b-i))。24 時間後、チャンバーから 1 mm の位置にあるミリバブルが除去されたが、他のポケット内のミリバブルに体積変化は測定されなかった(図 3.10(b-ii))。48 時間後、1 mm のポケットは赤色水で満たされたが、他のポケットでは依然としてミリバブルの体積変化は測定されなかった(図 3.10(b-iii))。この状態は 72 時間後まで維持された(図 3.10(b-iv))。

チャンバーからのポケットの位置とミリバブル除去速度の関係を図 3.11 に示す。ミリバブル除去速度を、赤色水がポケット内に流入する速度と定義する。従来ミリバブル除去および局所ミリバブル除去の実験値がプロットされている。従来ミリバブル除去と局所ミリバブル除去の実験値は、図 3.5(c)に示すグラフの形状に近い結果が得られた。ミリバブル除去速度の実験値より、すべてのポケット内のミリバブルが除去された。一方、局所ミリバブル除去の実験値より、1 mm での除去速度は 41.0 nL/h、3 mm での除去速度は 11.5 nL/h、5 mm では 1.2 nL/h となり、7 mm 以上のポケットのミリバブルは除去されていない。薄壁の厚さを 0.5 mm にすることで、チャンバーから 5 mm までの位置には陰圧が及んでいるが、7 mm 以上離れている領域では陰圧が大気圧によって相殺されていることが分かる。

局所的ミリバブル除去では、従来ミリバブル除去と比較すると、チャンバーから 1、3、5、7 mm のポケットでミリバブル除去速度がそれぞれ 24、70、96、100%減少した。しかし、チャンバーから 3 mm 以上離れたポケットでは、陰圧になった薄壁内に大気圧の流入したため、従来除去と局所除去の差は大きくなったと考えられる。

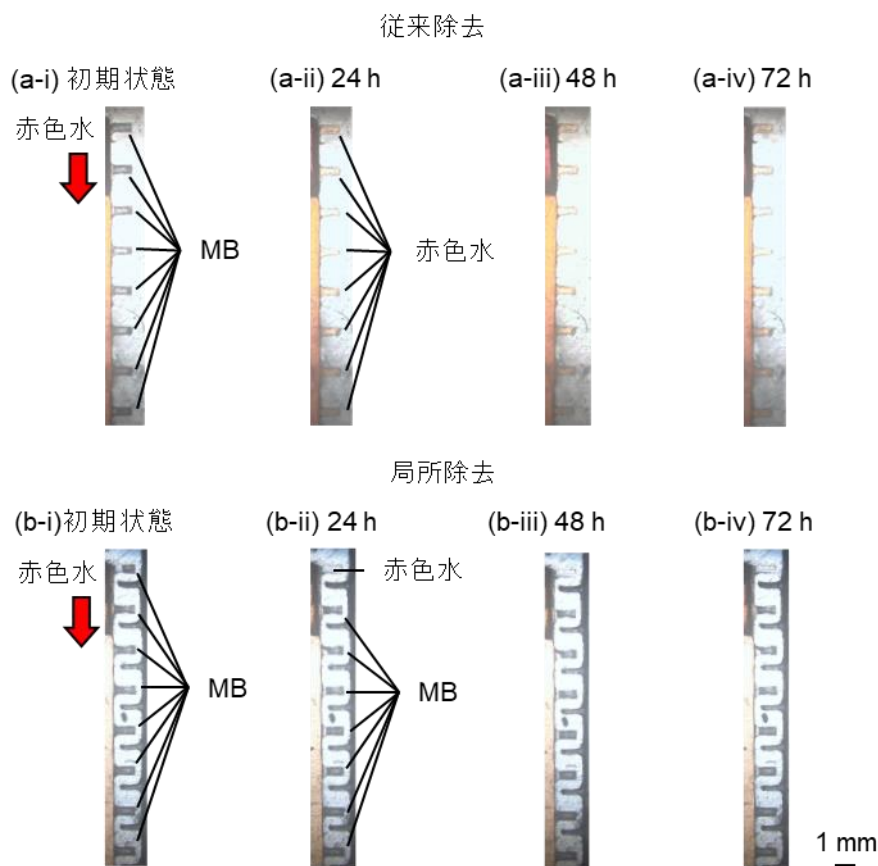


図 3.10 従来除去と局所除去のミリバブル除去の比較。(a)従来ミリバブル除去実験。(b)局所ミリバブル除去実験。

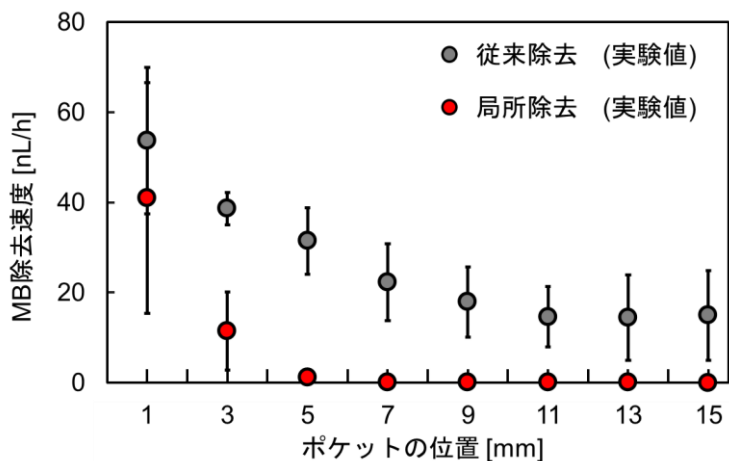


図 3.11 ポケットの位置とミリバブルの除去速度の関係。(N=3)。

### 3.2.6.2 局所ミリバブル除去におけるポケット内のゲージ圧

局所ミリバブル除去における各位置でのゲージ圧を求める。局所ミリバブル除去において、式(3.1)における各パラメータはそれぞれ、 $A=0.39 \text{ mm}^2$ 、 $p_2 - p_1 = -50 \text{ kPa}$ 、 $b = 1 \sim 15 \text{ mm}$ 、 $T = 310 \text{ K}$ 、 $P_{\text{atm}} = 76 \text{ cmHg}$  である。図 3.12 にポケットの位置とゲージ圧の関係を示す。1

mm、3 mm、5 mm、7 mm 以上において、ゲージ圧はそれぞれ-13、-11、-2、0 kPaG であった。これらの結果から、チャンバーから 7 mm 以上の距離は大気圧状態であることが示唆された。すなわち、チャンバーから 7 mm 以上離れた領域にがん組織を設置すれば、陰圧の影響を受けることなくがん組織の培養が可能となる。

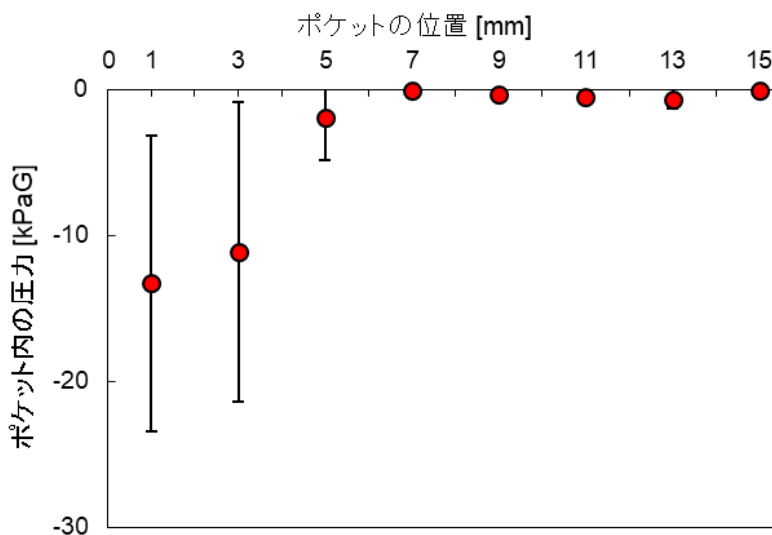


図 3.12 ポケット位置とゲージ圧の関係(N=3)。

### 3.3 まとめ

本章では、ミリバブルの流路内への混入を防止するための技術を開発した。ガス透過性の高い PDMS 製の薄壁を有する局所ミリバブル除去流路デバイスを開発した。局所ミリバブル除去流路デバイスにはミリバブルを形成するための複数のポケットと、陰圧を印加するためのチャンバーがある。陰圧になった PDMS に大気が入る原理を利用して、チャンバーからのポケットの位置とミリバブル除去速度の関係を調べた。チャンバーから 1 mm、3 mm、5 mm の位置にあるポケット内のミリバブルは除去され赤色水が流入し、7 mm 以上離れたポケット内のミリバブルは除去されず赤色水の流入はなかった。各ポケットにおけるゲージ圧を計算したところ、7 mm 以上離れたポケット内は大気圧になっていることが分かった。以上の結果から、チャンバーから 7 mm 以上離れた領域にがん組織を設置すれば、陰圧の影響を受けることなくがん組織の培養ができると言える。

## 第4章 腎がん組織の流路内培養と標本化技術

本章では、4.1 節で腎細胞がん組織の特徴とその評価方法について述べる。4.2 節では流路デバイスの密着性について述べる。4.3 節では実験後のがん組織を包埋する方法について述べる。4.4 節ではまとめについて述べる。

### 4.1 腎細胞がん組織

#### 4.1.1 腎細胞がん組織の特徴

本研究で対象とするがん組織は腎臓にできる腎がんである。腎がんの中で最も多いタイプが淡明型腎細胞がんである[58]。主に、がん細胞、間質細胞、類洞状血管網と呼ばれる不規則な形状の血管から構成される。細胞内には、脂質やグリコーゲンを多く含む細胞質を有している。淡明型腎細胞がんは脆く非常に柔らかい。

腎細胞がんは、共同研究先の医師によって切除してもらい使用した。実験前の腎細胞がん組織を図 4.1 に示す。

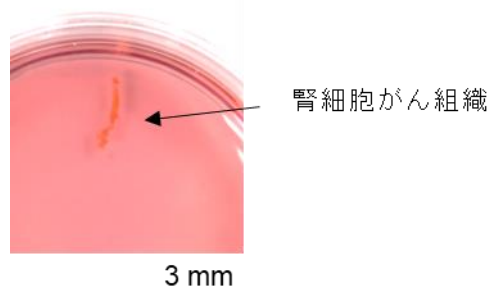


図 4.1 採取直後のがん組織

#### 4.1.2 評価方法

腎細胞がん組織の状態を長時間維持し、観察に適した標本を作製するためには、腎細胞がん組織全体にパラフィン浸透させるパラフィン包埋が行われる。パラフィン包埋したがん組織は、評価のために様々な染色を行うことができる。ミリメートルサイズのがん組織の評価に用いられる代表的な染色方法である HE 染色と Ki-67 免疫染色をした腎細胞がん組織について説明する。

##### 4.1.2.1 HE 染色図

HE 染色は一般的に病理検査に用いられる手法である。細胞やがん組織構造の形態を把握するための染色で、病理標本において重要な染色法である。

淡明型腎細胞がん組織の一般的な HE 染色図を図 4.2 に示す。生存している淡明型腎細胞がんは、細胞核と細胞膜を保持している。円形～楕円形の細胞膜の中に細胞質と細胞核があり、巣状になっている[59]。一方で、細胞核は散見されるが細胞膜は見られない領域は、細胞の構造を保つことができていることを示すため、壊死していると判断される。また、毛羽立ったように見える箇所や脱落箇所も同様に壊死していると判断される。

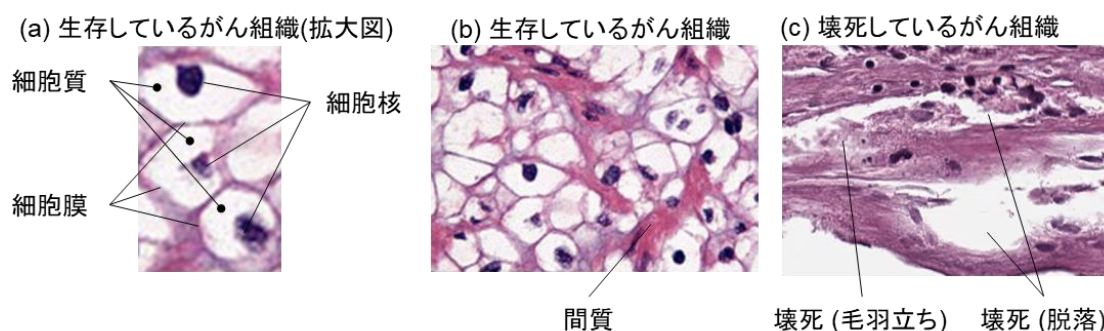


図 4.2 淡明型腎細胞がん組織の HE 染色図[59]。(a) 生存しているがん組織の拡大図。(b) 生存しているがん組織。(c) 壊死している状態。

#### 4.1.2.2 Ki-67 免疫染色

がん組織の培養の評価に用いられる項目として、HE 染色に加えて細胞増殖マーカーである Ki-67 の免疫染色がある。Ki-67 は細胞が増殖する際に生じるタンパク質である。淡明型腎細胞がん組織の一般的な Ki-67 染色図を図 4.3 に示す。Ki-67 が染色されると、がん細胞の核が黒褐色になる。がん組織の切片中に生じる Ki-67 の割合を調べることで、がん組織を構成するがん細胞がどの程度増殖しているかが分かる。

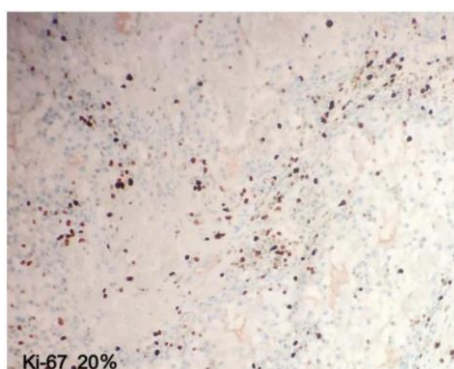


図 4.3 淡明型腎細胞がん組織の Ki-67 免疫染色図(Song, J. et al. (2021)[60])。

## 4.2 腎細胞がん組織の崩壊抑制

### 4.2.1 長時間培養流路デバイスの締め付け

長時間培養流路デバイスはホルダーをボルトとナットで締結することで密着する。そのため、締結が緩すぎると長時間培養流路デバイスを構成する各層の密着が不足してしまい液漏れが生じてしまう。また、締結が強すぎるとがん組織に加わる応力が高くなり、がん組織が育たない可能性がある。そのため、液漏れせず、かつ細胞培養できる範囲でボルトとナットを締結する適正なトルクを調べる。

#### 4.2.1.1 締め付け条件

トルクの測定はトルクゲージ(CN24SGK、株式会社中村製作所)を用いた。トルクは 8.0

cN・m、9.2 cN・m とする。

#### 4.2.1.2 実験結果

実験結果を図 4.4 に示す。トルクが 8.0 cN・m のとき、初期状態で流路外への液漏れは見られなかった(図 4.4(a))。しかし、45 分後には並行流路外への液漏れが見られた(図 4.4(b))。8.0 cN・m では液漏れが生じたため、トルクを少しずつ高めて液漏れが生じないトルクを特定した。結果、9.2 cN・m で安定して液漏れが生じないことが分かった(図 4.5(a、b))

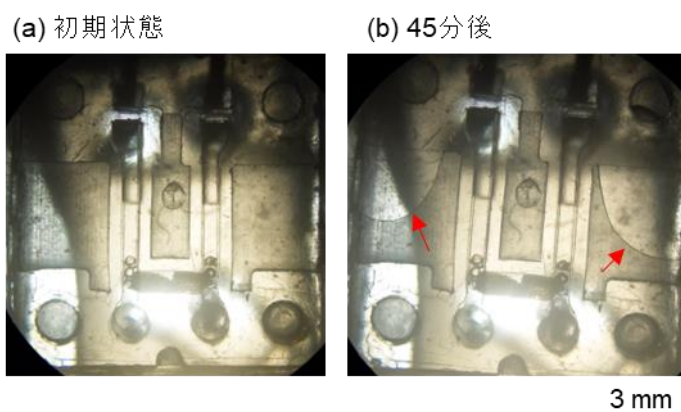


図 4.4 トルクが 8.0 cN・m 時の長時間培養流路デバイス。(a)初期状態、(b)45 分後。

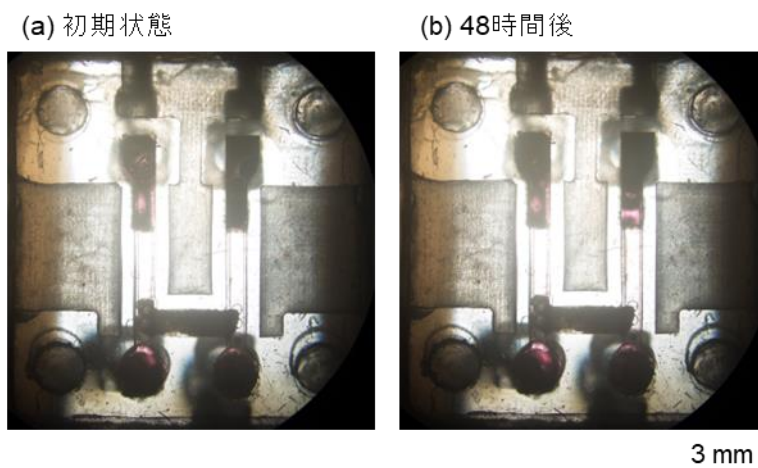


図 4.5 トルクが 9.2 cN・m 時の長時間培養流路デバイス。(a)初期状態、(b)48 時間後。

### 4.3 がん組織包埋方法の検討

一般的に、がん組織の HE 染色や免疫染色のためには、培養したがん組織をホルマリンで固定して、パラフィンなどの包埋剤でがん組織に固さを持たせて薄切化・分析を行う。そのため、長時間培養流路デバイス内で培養、抗がん剤供給実験後に、がん組織を取り出してホルマリンに浸す必要がある。この際、がん組織のどちらの端から抗がん剤を供給したか、向きが不明になったり、がん組織の形状が崩壊してしまい、実験後の解析が困難になることがある。そのため、実験時のがん組織の向き情報を失わずにがん組織を解析する

ための手法を検討する。包埋処理後、HE染色を行う。

### 4.3.1 長時間培養流路デバイス内固定・包埋の検討

長時間培養流路デバイス内包埋の実験方法を図 4.6 に示す。長時間培養流路デバイス内にがん組織を設置し、室温下で 10%ホルマリン中性緩衝液(ユーマイ化成株式会社)を 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  で送液してがん組織を固定する(図 4.6(a))。一晩以上送液した後、脱水のため 70%エタノールを 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  で送液した。90 分後、99.5%エタノールを 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  で送液した。90 分後、キシレンを 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  で送液した。30 分後、長時間培養流路デバイスを分解し H 字流路デバイスのみにし(図 4.6(b))、70°Cに温めたパラフィンの中に入れて 1 分間手で振とうさせた(図 4.6(c))。振とう後、H 字流路デバイスを室温で一晩徐冷してパラフィンを固化させた(図 4.6(d))。より大きなパラフィンブロックにするために、再度 70°Cで融解し(図 4.6(e))、H 字流路デバイスを取り除く(図 4.6(f))。がん組織の上から更に 70°Cのパラフィンを滴下し(図 4.6(g))、パラフィンを冷却し、ブロック化する(図 4.6(h))。パラフィンブロックにしたがん組織を図 4.7 に示す。がん組織が全体的にパラフィン包埋されていることが分かった。

以上のプロセス後に HE 染色されたがん組織を図 4.8 に示す。細胞や細胞核のひび割れが生じてしまった。これは、ホルマリンががん組織内へ供給されていなかったり、有機溶媒の影響でシリンジの樹脂が溶けてしまい、以降のプロセスに悪影響を及ぼしてしまったためと考えられる。

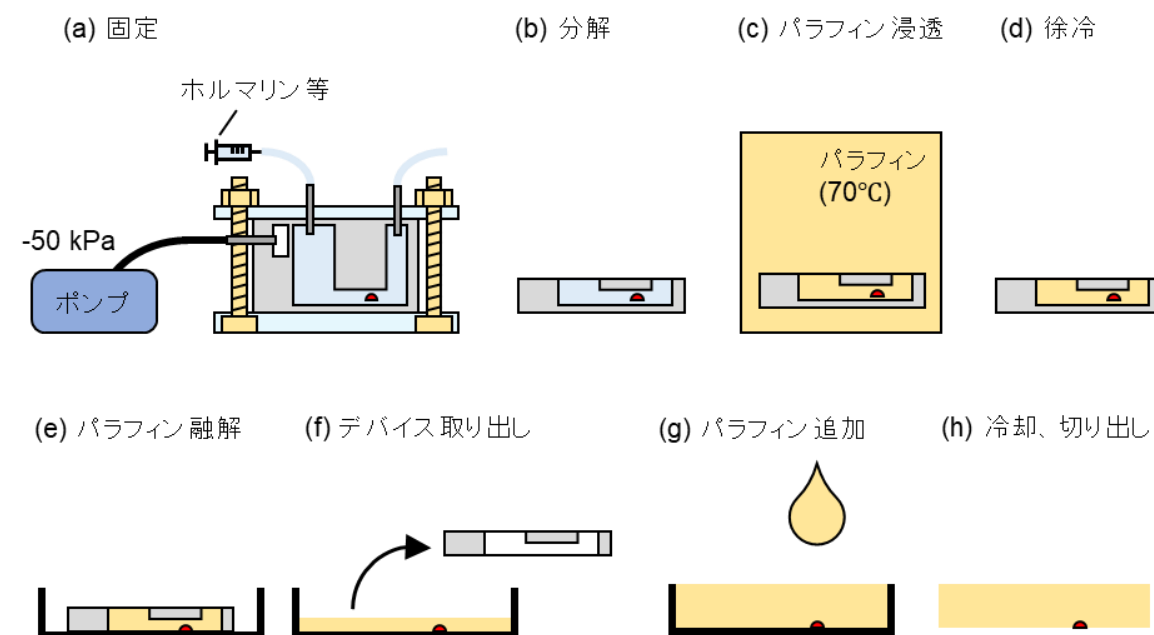


図 4.6 流路内でのパラフィン包埋。(a)固定、(b)分解、(c)パラフィン浸透、(d)徐冷、(e)パラフィン融解、(f)デバイス取り出し、(g)パラフィン追加、(h)冷却、切り出し。

パラフィン包埋後のがん組織

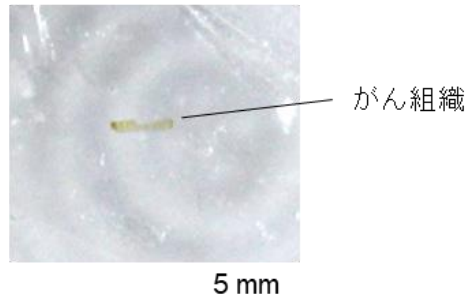


図 4.7 包埋後のがん組織

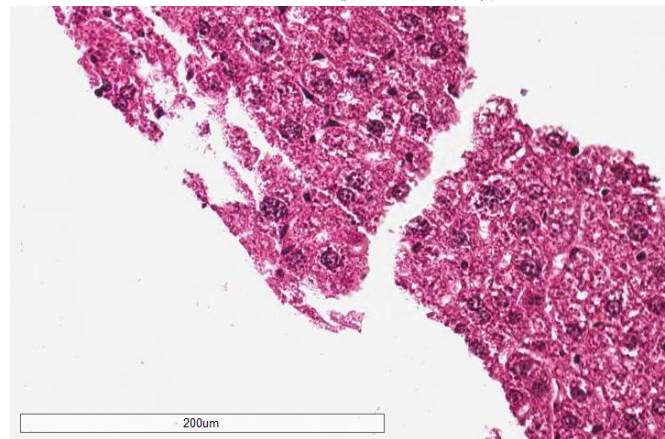


図 4.8 HE 染色されたがん組織

#### 4.3.2 長時間培養流路デバイス内固定、長時間培養流路デバイス外包埋

有機溶媒やホルマリンによる固定不足の影響で、長時間培養流路デバイス内部で組織包埋を完結させることが困難であることが分かったため、長時間培養流路デバイス外で組織包埋する手法について検討する(図 4.9)に示す。実験後の長時間培養流路デバイスを分解し、H 字流路デバイス部分を取り出す。カセットにろ紙、H 字流路デバイス、スポンジの順番で入れ、カセット蓋を閉じる(図 4.9(a))。カセットを 10%ホルマリン中性緩衝液に入れ、一晚以上常温で放置する(図 4.9(b))。次に、10%ホルマリン中性緩衝液からカセットを取り出し、H 字流路デバイスを慎重にピンセットで開封する。がん組織に含まれる 10%ホルマリン中性緩衝液を綿棒で軽く吸収する。がん組織の片端にマーカーをつけることで、標本のどちらに抗がん剤が付着していたか理解できるため、爪楊枝の先端に組織学用染色試薬(株式会社ファルマ)をつけ、がん組織の片端に 3~4 回付着させる(図 4.9(c))。黒くなるまでがん組織の片端を染色したら 1 分以上乾燥させ、組織学用染色試薬をがん組織にしみこませる。85°Cの 0.5%アガロース(アガロース S、(株)ニッポンジーン)をスポイトで数滴がん組織の上に滴下し、冷却してアガロース包埋する(図 4.9(d))。アガロース包埋したがん組織は病理医による処理を経てパラフィンブロックになる。

この手法を経て HE 染色されたがん組織を図 4.10 に示す。一般的な HE 染色図で見られるような標本を取得することができた。以降のがん組織実験後の処理は、このプロセスに則って行う。

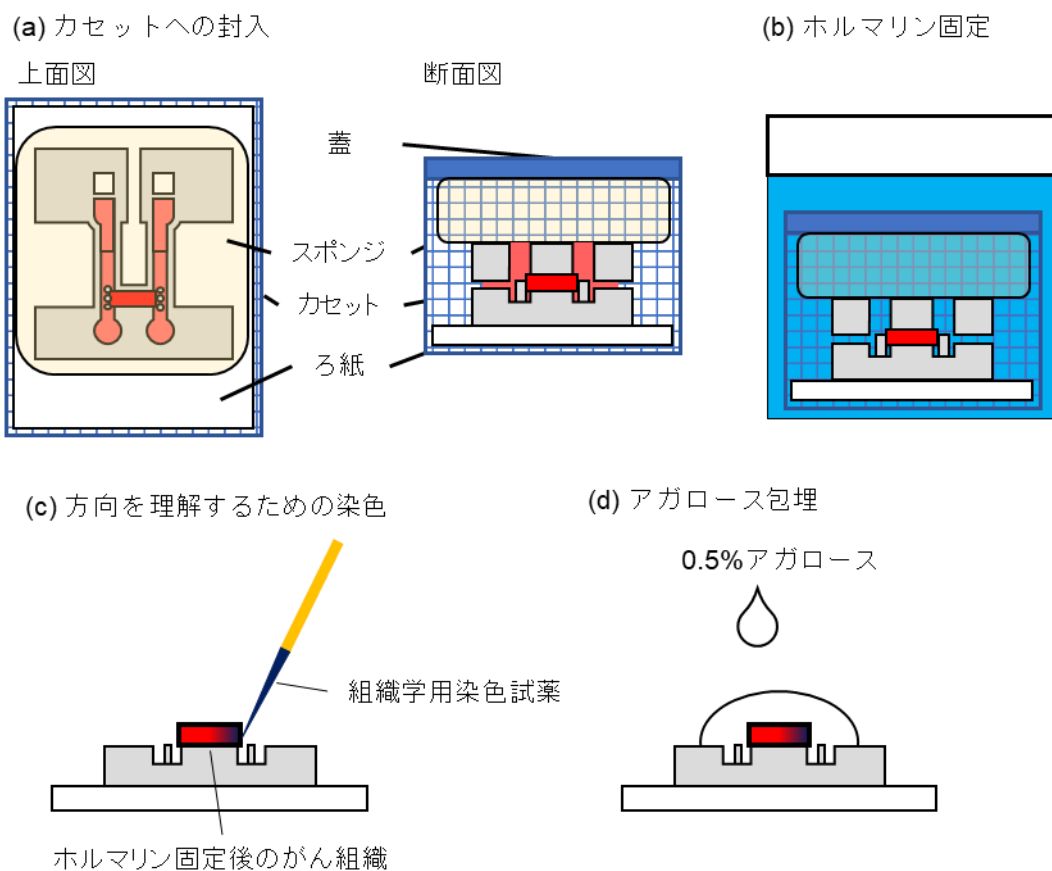


図 4.9 長時間培養流路デバイス外でのがん組織固定方法

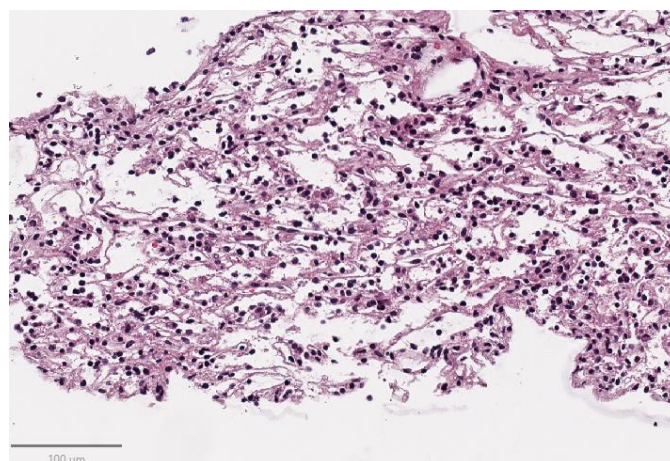


図 4.10 HE 染色されたがん組織

#### 4.4 まとめ

本章では、がん組織の長時間培養に向けた検討と短時間培養を行い、長時間培養流路デバイスの性能を検証した。

培養後のがん組織を染色するための包埋プロセスについて検証を行った。ホルマリンによる固定まで長時間培養流路デバイス内で行い、以降のプロセスを長時間培養流路デバイ

ス外で実施した場合には、形態を保ったまま標本を取得できた。

## 第5章 長時間培養流路デバイスの開発

第2～4章で述べた要素技術を統合した長時間培養流路デバイスを開発する。

### 5.1 長時間培養流路デバイスの概要

長時間培養流路デバイス概念図を図5.1に示す。長時間培養流路デバイスは、培養液が流入するインレット、排出されるアウトレット、長時間培養を妨げるマイクロバブル・ミリバブル除去を実現するためのトラップとチャンバー(第3章)、灌流による物質供給のための並行流路、がん組織を拘束するための拘束流路、臨床現場での標本評価に適したサイズの腎細胞がん組織から構成される(第2章)。バブル除去層にはインレット、アウトレット、トラップ、チャンバーがある。H字流路デバイス上層には拘束流路と並行流路、H字流路デバイス下層には並行流路とがん組織の流出を防止するためのピラーがある(詳細は付録)。

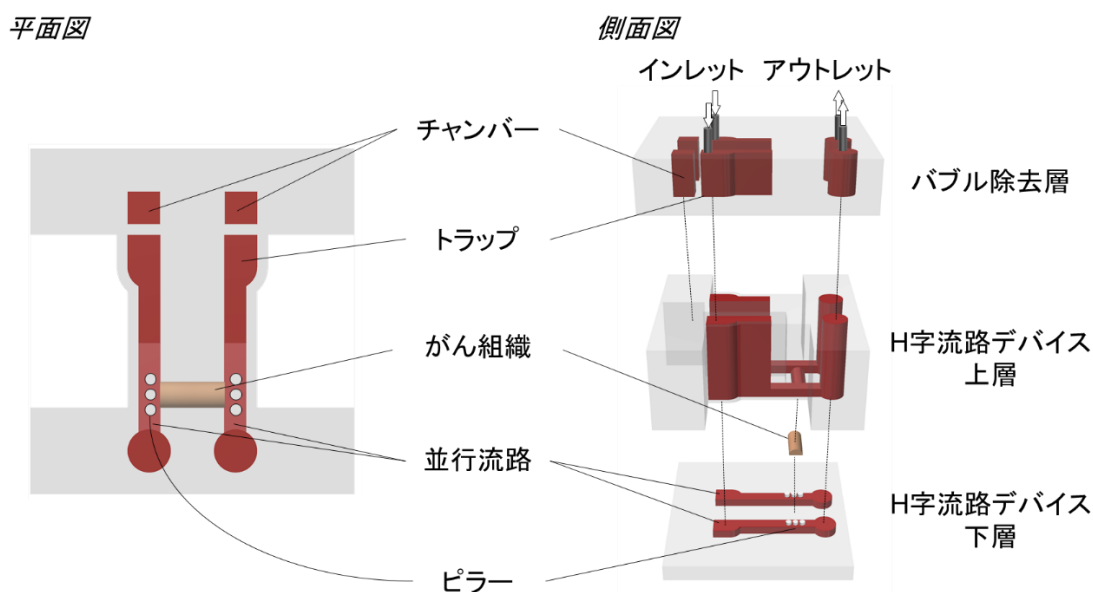


図5.1 長時間培養流路デバイス概念図

#### 5.1.1 長時間培養流路デバイスの設計

長時間培養流路デバイスを設計する。材料は、2章と3章と同様にPDMSである。

##### (1) バブル除去層

バブル除去層の設計を図5.2に示す。トラップは並行流路に合わせた形状になっている。3章を踏まえて、チャンバー側の幅は1.5 mm、下流側は1.0 mmである(図5.2(a))。厚さ0.5 mmの薄壁を介して、陰圧を印加するためのチャンバーがあり、幅1.5 mmである。チャンバー、トラップ、アウトレットは、いずれも高さ3 mmである(図5.2(b))。

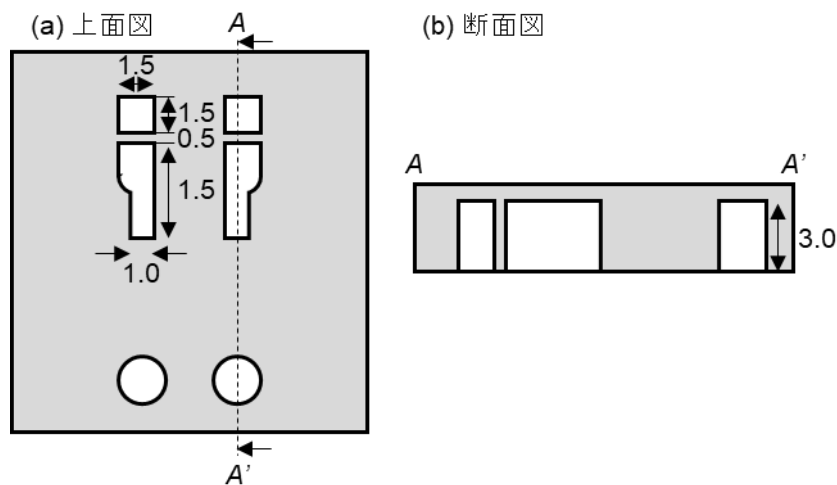


図 5.2 バブル除去層設計図。(a)上面図、(b)断面図。単位 ; mm。

### (2) H 字流路デバイス上層

H 字流路デバイス上層の設計を図 5.3 に示す。並行流路と拘束流路の側壁は 3 章の結果を踏まえて 0.5 mm である(図 5.3(a))。がん組織を設置するための拘束流路はチャンバーから 8.0 mm の位置にある(図 5.3(b))。これは、3 章でチャンバーから 7 mm 以上離れた場所では大気圧になっているためである。並行流路の高さは 1.1 mm、並行流路の上流側はトラップの役割を持ち、高さ 3.0 mm である。

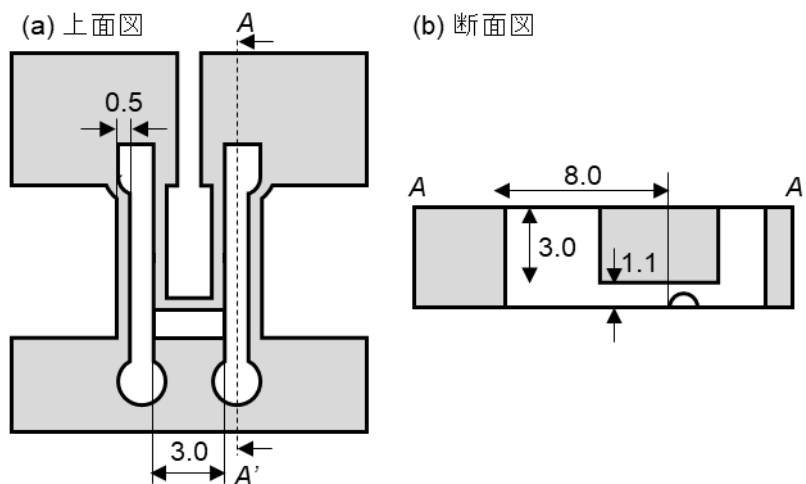


図 5.3 H 字流路デバイス上層設計図。(a)上面図、(b)断面図。単位 ; mm。

### (3) H 字流路デバイス下層

H 字流路デバイス下層の設計を図 5.4 に示す。並行流路は H 字流路デバイス上層と同じ設計で、高さが 0.4 mm になっている(図 5.4(a)、(b))。並行流路の下流側には直径 0.5 mm、高さ 1.0 mm のピラーが 0.5 mm 間隔で 3 本ある。

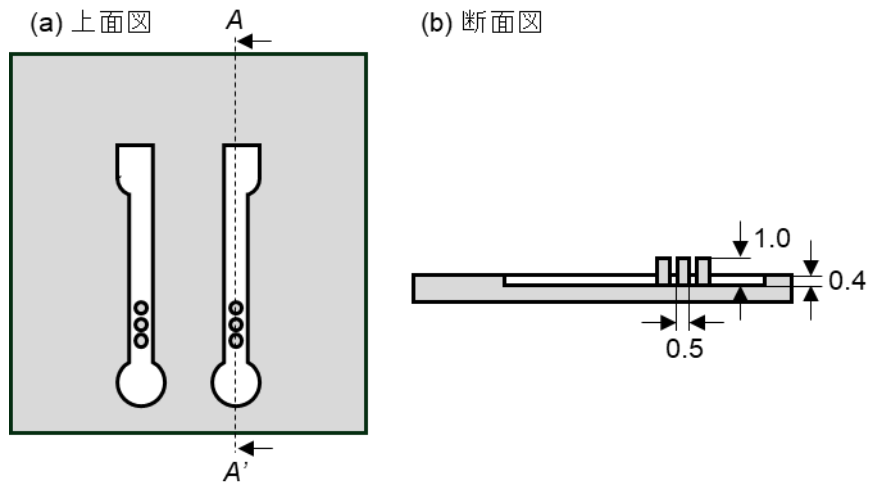


図 5.4 H字流路デバイス下層の設計図。(a)上面図、(b)断面図。単位；mm。

### 5.1.2 作製結果

5.1.1 で述べた三層は 3.2.4 節と同様に作製した。作製した長時間培養流路デバイスを図 5.5 に示す。

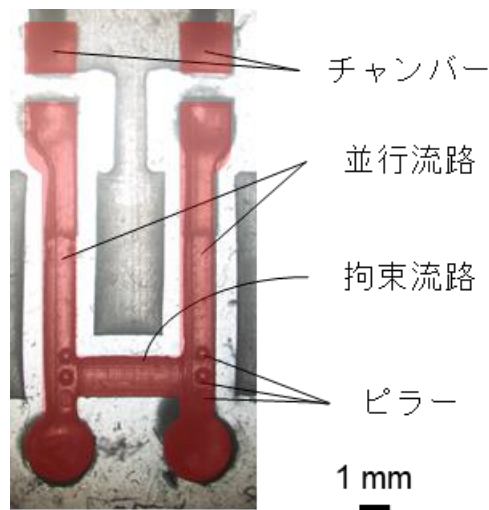


図 5.5 作製した長時間培養流路デバイス

## 5.2 長時間培養に向けた性能評価

腎細胞がん組織を長時間培養流路デバイス内で取り扱うにあたっての検討を行う。本節では、腎細胞がん組織の物質供給と長時間灌流実験に関する評価を行う。

### 5.2.1 がん組織への物質供給

がん組織は柔らかく密度が小さいため、模擬組織と異なる物質供給が生じる可能性がある。がん組織を対象に 2 章で用いたブリリアントブルー-FCF の供給実験を行う。3.2.5 節と

同様の実験セットアップと条件を元に、片方に 0.002 g/mL のブリリアントブルー-FGF 溶解 DMEM を送液し、24 時間後と 48 時間後のがん組織内の供給長さを 2 章と同様の手法で計測する。

実験後のがん組織を図 5.6 に示す。24 時間後、ブリリアントブルー-FCF はがん組織の端から 1.77 mm 供給された (図 5.6(a))。48 時間後には、2.65 mm まで供給された (図 5.6(b))。拘束流路と並行流路の接触色部からの青領域の境界線の長さを、時間の関数としてプロットした (図 5.7)。2.4.4.1 節と同様に、近似曲線を作成した。近似曲線は最小二乗法を用いて  $L=7.34 \times 10^{-6} * t^{\frac{1}{2}}$  となり、腎細胞がん組織への物質供給は拡散によるものであることが分かる。ブリリアントブルー-FCF の腎細胞がん組織への拡散係数は、 $5.39 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  であった。

2.4 節で述べたように、ブリリアントブルー-FCF、腎細胞がん組織の抗がん剤であるエベロリムスの有効分子半径はそれぞれ 0.60 nm、0.69 nm であるため、式(2.2)より、エベロリムスの拡散係数/ブリリアントブルー-FCF の拡散係数は、 $0.69/0.60=1.15$  である。すなわち、エベロリムスでもブリリアントブルー-FCF と同等の供給がされることが推察される。

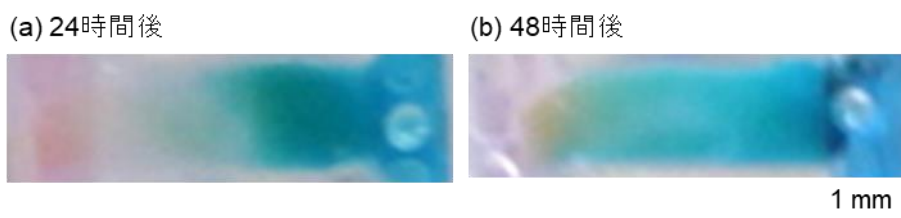


図 5.6 がん組織への供給実験。(a)24 時間後、(b)48 時間後。

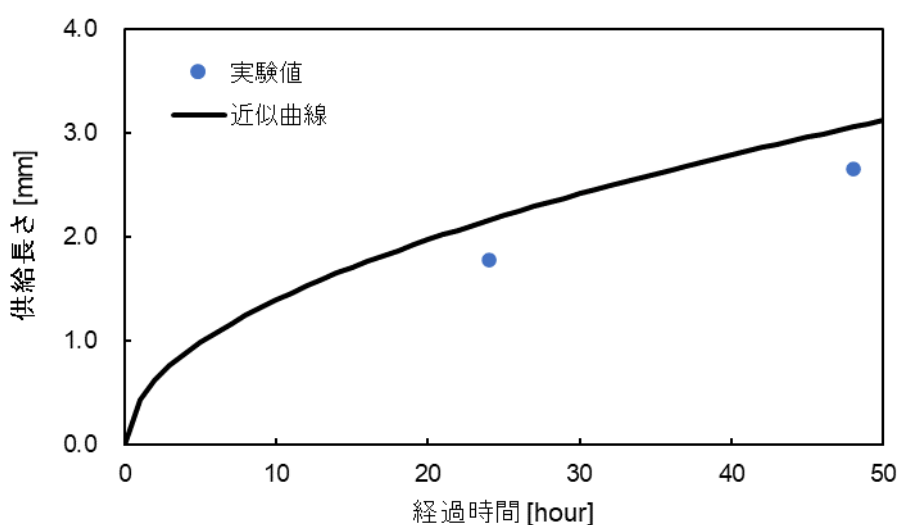


図 5.7 経過時間と腎細胞がん組織への供給長さの関係

## 5.2.2 長時間培養に向けたミリバブル除去実験

長時間培養流路デバイスを用いて、長時間培養に向けたミリバブル除去実験を行う。局所ミリバブル除去技術が長時間培養流路デバイスにおいても動作していることを調べる。実験は 4.2.1 節と同様に行った。

実験結果を図 5.8 に示す。初期状態で、左側並行流路のインレットの黒い影がミリバブルを示している (図 5.8(a))。24 時間後、左側並行流路のミリバブルは徐々に除去された (図 5.8(b))。48 時間後には、ミリバブルが完全に除去され、ミリバブルはインレットに見られ

なくなった。(図 5.8(c))。この状態は 72 時間以上維持された(図 5.8(d))。72 時間に渡って、ミリバブルとがん組織の接触は見られなかったことから、長時間培養流路デバイスが長時間連続でミリバブルを除去しながら灌流し続けることができる性能を有していることが分かった。

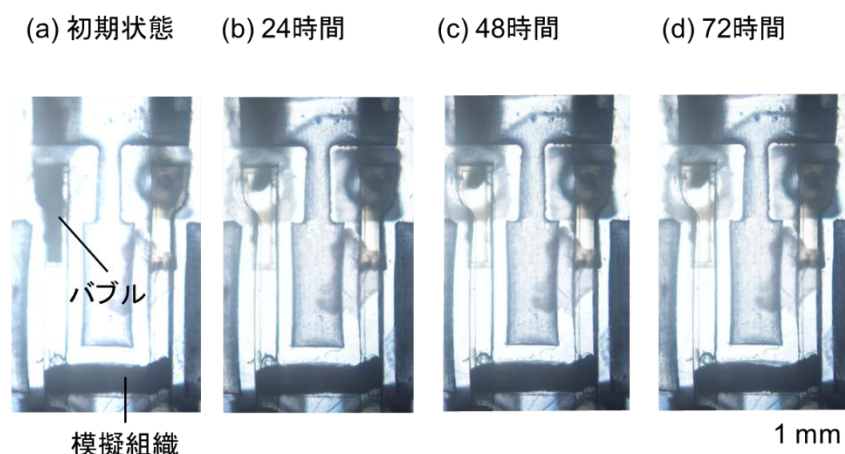


図 5.8 模擬組織の灌流試験。(a)初期状態、(b) 24 時間、(c) 48 時間、(d)72 時間。

### 5.3 まとめ

本章では、第 2 章で検証した色素供給技術、第 3 章で開発した局所ミリバブル除去技術、第 4 章で述べた拘束を融合した長時間培養流路デバイスを開発した。腎細胞がん組織へのブリリアントブルーFCF の供給実験を行った。2 章で述べた模擬組織と同様に拡散に沿ってブリリアントブルーFCF が供給されていることが分かった。最後に、長時間培養流路デバイスを用いて灌流試験を行い、72 時間に渡ってマイクロバブル・ミリバブルとがん組織の接触は見られなかった。

## 第 6 章 結論

### 6.1 本研究のまとめ

本研究では、抗がん剤評価に向けた患者由来がん組織の長時間培養流路デバイスの開発を行った。患者由来がん組織の長時間培養流路デバイスの概念設計を行い、必要な技術として、組織の両端から物質を供給させる技術と、マイクロ流路デバイス内に生じるミリバブルを除去する技術を開発した。二つの技術を融合させ、長時間培養流路デバイスを作製し、がん組織の長時間培養を実施した。

第 1 章では、研究背景とがん組織を長時間培養する必要性について述べた。従来のがん細胞を用いた研究は *in vivo* がんの理解を深めたが、腫瘍微小環境や抗がん剤に対する応答を理解するためには患者由来のがん組織を対象とした研究が必要である。マイクロ流路デバイス内で、がん組織を長時間培養することが実現し始めているが、抗がん剤の開発成功率は低いままである。そこで本研究では、抗がん剤評価に向けたがん組織を長時間培養するための流路デバイスの開発を目的とした。研究目的達成のために、「がん組織を機械的に拘束し、その両端から物質を供給する技術」、「長時間培養中に生じるマイクロバブル・ミリバブルを局所的に除去する技術」を開発することが必要であると述べた。

第2章「拘束した組織に灌流で物質供給するH字流路デバイス開発」では、がん組織両端から物質を供給するためのH字流路デバイスの開発し、非生存の模擬組織を対象に拘束、長時間の灌流、物質供給について述べた。PDMS製のH字流路デバイスとアクリル製のホルダーを作製し、模擬組織を対象に色素供給実験を行った。並行流路に、純水とエベロリムスに近い平均有効分子半径であるブリリアントブルーFCFを混ぜた青色水を送液し、供給長さと経過時間の関係を出した結果、フィックの法則に則っていることが分かった。模擬組織を切断しスライス内部の平均輝度を調べた結果、スライス内では均一にブリリアントブルーFCFが供給されており、表面と内部でブリリアントブルーFCFの供給長さに違いはないことが分かった。

第3章「長時間培養のための局所ミリバブル除去技術」では、流路デバイス内での陰圧領域と大気圧領域を明らかにする局所ミリバブル除去技術を開発した。ガス透過性の高いPDMS製の薄壁を有する局所ミリバブル除去流路デバイスを開発した。陰圧になったPDMSに大気が入る原理を利用して、チャンバーからのポケットの位置とミリバブル除去速度の関係を調べた。チャンバーから5mm以内のポケット内のミリバブルは除去され赤色水が流入し、7mm以上離れたポケット内のミリバブルは除去されず赤色水の流入はなかった。各ポケットにおけるゲージ圧を計算したところ、7mm以上離れたポケット内は大気圧になっていることが分かった。以上の結果から、チャンバーから7mm以上離れた領域にがん組織を設置すれば、陰圧の影響を受けることなくがん組織の培養ができることが分かった。

第4章「がん組織の流路内培養と標本化技術」では、今回研究に用いる腎細胞がん組織を対象とした長時間実験に向けた検討を行った。培養に適した直径、長時間培養流路デバイスに求められる機械拘束に適したトルクを検討し、短時間の培養を実現した。次に、ホルマリンによる固定まで長時間培養流路デバイス内で行い、以降のプロセスを長時間培養流路デバイス外で実施することで、形態を保つことができた。

第5章「長時間培養流路デバイスの開発」では、2章で検証した色素供給技術、3章で開発した局所ミリバブル除去技術を融合した流路デバイスを開発した。がん組織へのブリリアントブルーFCFの供給実験を行い、腎細胞がんにおいてもフィックの法則に則って物質が供給されることを確認した。また、72時間培養液を灌流させた結果、ミリバブルとがん組織の接触は見られなかった。

## 付録

### A 流量と物質供給

流量と物質供給の関係を調べる。2.4.1 節の実験セットアップで、48 時間で流量  $10 \mu\text{L}/\text{min}$  で模擬組織に色素を供給する。実験結果を図 7.1 に示す。ブリリアントブルー-FCF は、12 時間後に  $0.55 \text{ mm}$ 、24 時間後に  $0.84 \text{ mm}$ 、36 時間後に  $1.20 \text{ mm}$ 、48 時間後に  $1.36 \text{ mm}$  拡散していた。近似曲線は、最小二乗法を用いて  $L=3.69 \times 10^{-6} * t^{\frac{1}{2}}$  となった。この式から、ブリリアントブルー-FCF の模擬組織への供給は式(2.1)に従っていることが分かった。また、ブリリアントブルー-FCF の模擬組織への拡散係数は  $1.36 \times 10^{-11} [\text{m}^2/\text{s}]$  であることが分かった。2.4.6.1 で得られた拡散係数は  $1.80 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$  であったため、流量を 10 倍にすることで拡散長さが  $\sqrt{1.36 \times 10^{-11}/1.80 \times 10^{-12}}=2.7$  倍になることが分かる。

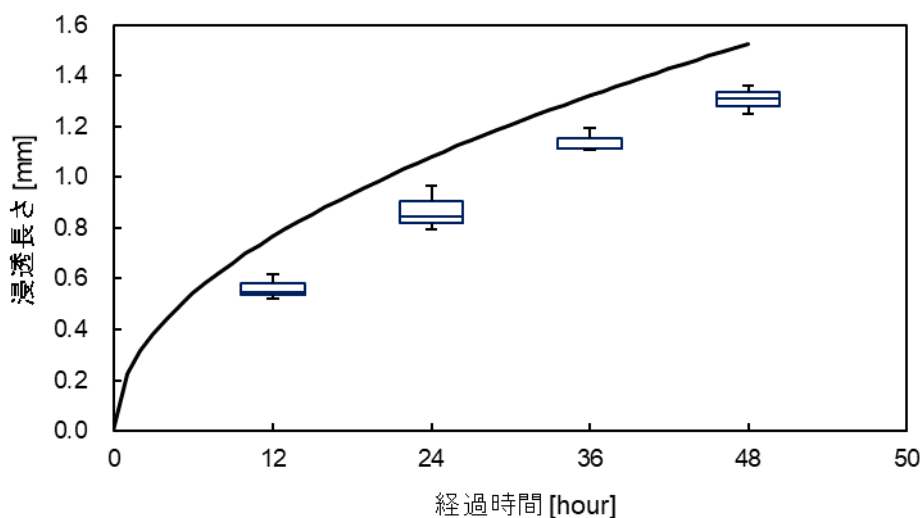


図 7.1 色素の浸透長さと経過時間の関係。

### B ミリバブル混入防止技術の検討

#### (a) 吸引による送液

送液で流路内にミリバブルが生じてしまったため、アウトレットから液体の吸引を試みる。図 7.2 に示すように、容器の中にそれぞれ青色水と純水を入れ、蓋に穴を開ける。開けた穴にチューブを差し込んで液中に浸し、H 字流路デバイスのインレットと接続する。アウトレット側のチューブとシリンジポンプを接続し、流量  $10 \mu\text{L}/\text{min}$  で吸引する。実験中、倒立顕微鏡で H 字流路デバイス内部を観察した。

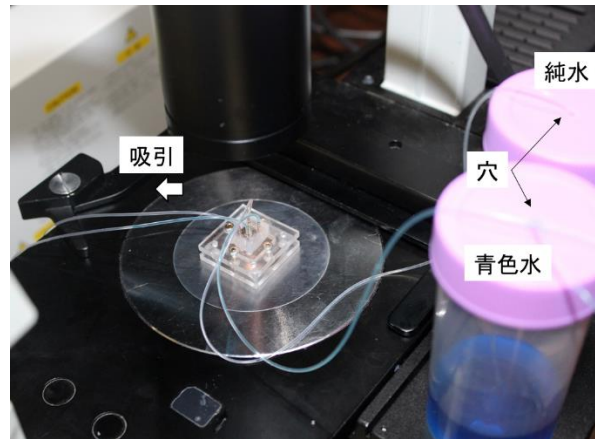


図 7.2 吸引による送液

吸引開始から 12 時間後のチューブ内部をそれぞれ図 7.3 に示す。インレット側ではチューブ内部にミリバブルは観察されなかった(図 7.3(a))。しかし、アウトレット側では定期的にバブルが観察された(図 7.3(b))。H 字流路デバイスを図 7.4 に示す。送液直後の青色水側のインレットにはバブルが観察されなかったが(図 7.4(a))、230 分後にミリバブルの成長が観察された(図 7.4(b))。チューブ内にミリバブルは観察されなかったため、ミリバブルは流路内で生じている可能性がある。カットパイプと PDMS の境界でバブルが成長していると考え、カットパイプレスで送液実験を行う。

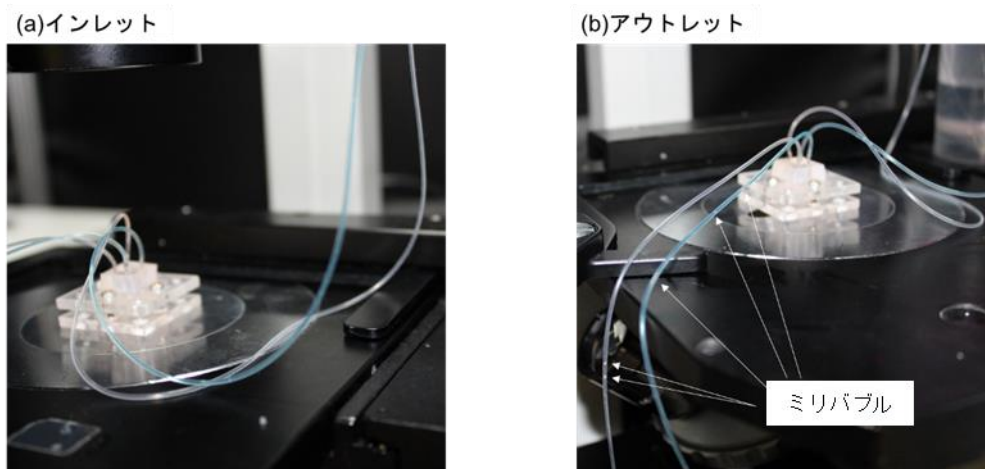


図 7.3 チューブ内部の様子。(a)インレット側。(b)アウトレット側。

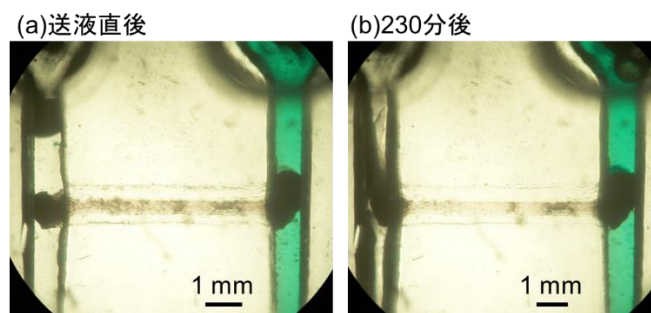


図 7.4 H 字流路デバイス内部の様子。(a)送液直後。(b)230 分後。

(b) カットパイプレスでの吸引による送液実験

カットパイプレスでの吸引による送液実験を行う。図 7.5 に示すように、H 字流路デバイスのインレットからカットパイプを無くして、代わりに液溜めを設ける。液溜めを青色水で満たし、シリンジポンプで流量  $10 \mu\text{L}/\text{min}$  で吸引する。結果を図 7.6 に示す。導入直後から 5 時間後まで、バブルが並行流路内に混入することはなかった図 7.6(a)。しかし、液溜めに青色水があるにも関わらず、9 時間後に並行流路内にバブルが入っていき、模擬組織と接触している様子が観察された(図 7.6(b))。得られた結果から、カットパイプの有無に関わらず、インレットからバブルが混入してしまうことが分かった。

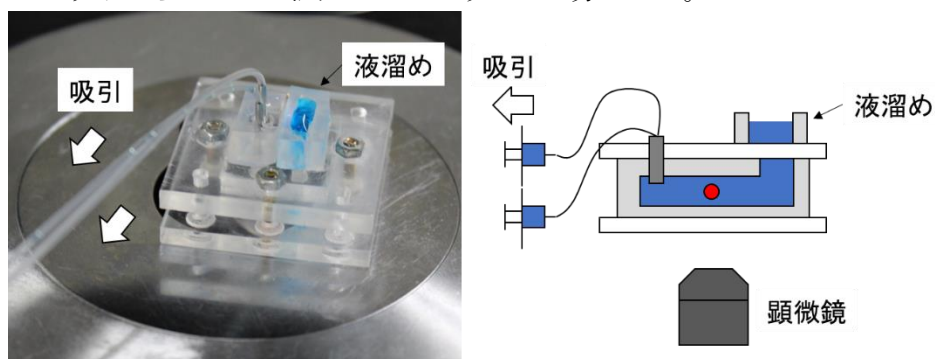
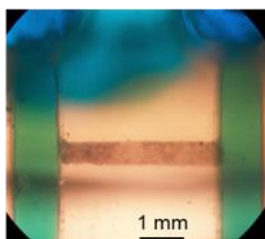


図 7.5 液溜め付き H 字流路デバイス

(a) 導入直後



(b) 9時間後

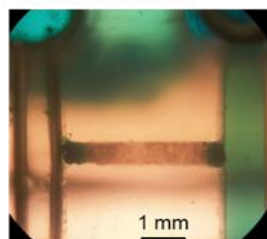


図 7.6 H 字流路デバイス内部の様子。(a)導入直後。(b)9時間後。

## 参考文献

- [1] Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., Jemal, A. “Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **74**, 229-263 (2024).
- [2] Padala, S.A., Barsouk, A., Thandra, K.C., Saginala, K., Mohammed, A., Vakiti, A., Rawla, P., Barsouk, A. “Epidemiology of Renal Cell Carcinoma,” *World Journal of Oncology*, **11(3)**, 79-87 (2020).
- [3] 坂井隆之、「化学療法薬からの癌細胞のサバイバルメカニズム」、*Folia Pharmacologica Japonica*, **127**, 342-347 (2006)。
- [4] Sawyers, C. “Targeted cancer therapy,” *Nature*, **432(7015)**, 294-297 (2004).
- [5] Druker, B. J. “Imatinib as a paradigm of targeted therapies,” *Advances in cancer research*, **91(1)**, 1-30 (2004).
- [6] Hou, J., He, Z., Liu, T., Chen, D., Wang, B., Wen, Q., Zheng, X. “Evolution of Molecular Targeted Cancer Therapy: Mechanisms of Drug Resistance and Novel Opportunities Identified by CRISPR-Cas9 Screening,” *Frontiers in Oncology*, **17(12)**, 755053 (2022).
- [7] Chen, Z., Zhang, S., Levchenko, I., Isak, I.B., Michael, K. “In vitro Demonstration of Cancer Inhibiting Properties from Stratified Self-Organized Plasma-Liquid Interface,” *Scientific Reports*, **7**, 12163 (2017).
- [8] Langhans, S. A. “Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning,” *Frontiers in Pharmacology*, **9**, 334617 (2018).
- [9] Hengoju, S., Shvydkiv, O., Tovar, M., Roth, M., Rosenbaum, M.A. “Advantages of optical fibers for facile and enhanced detection in droplet microfluidics,” *Biosensors and Bioelectronics*, **200**, 113910 (2022).
- [10] Kim, B.J., Forbes, N.S. “Flux analysis shows that hypoxiainducible-factor-1-alpha minimally affects intracellular metabolism in tumor spheroids,” *Biotechnology Bioengineering*, **96**, 1167- 1182 (2007).
- [11] Hsiao, A.Y., Torisawa, Y.S., Tung, Y.C., Sud, S., Taichman, R.S., Pienta, K.J., Takayama, S. “Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids,” *Biomaterials*, **30**, 3020–3027 (2009).
- [12] Wu, L.Y., Di Carlo, D., Lee, L.P. “Microfluidic Self-Assembly of Tumor Spheroids for Anticancer Drug Discovery,” *Biomedical Microdevices*, **10**, 197–202 (2008).
- [13] Ruen, J., Cortes-Dericks, L., Marconi, E., Karoubi, G., Schmid, R.A., Peng, R., Marti, T.M., Guenat, O.T. “A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids,” *Lab on a Chip*, **14**, 1198–1205 (2014).
- [14] B. Patra, Y. H. Chen, C. C. Peng, S. C. Lin et al. “A microfluidic device for uniform-sized cell spheroids formation, culture, harvesting and flow cytometry analysis,” *Biomicrofluidics*, **7**, 054114 (2013).
- [15] Sankar, S., Mehta, V., Ravi, S., Sharma, C.S., Rath, S.N. “A novel design of microfluidic platform for metronomic combinatorial chemotherapy drug screening based on 3D tumor spheroid model,” *Biomed. Microdevices*, **23**, 50 (2021).
- [16] Mullard, A. “Parsing clinical success rates,” *Nature Reviews Drug Discovery*, **15**, 447 (2016).
- [17] [https://www.ncc.go.jp/jp/ri/department/pharmacology\\_therapeutics/project/040/index.html](https://www.ncc.go.jp/jp/ri/department/pharmacology_therapeutics/project/040/index.html) (2024/06/16 閲覧)
- [18] Ayuso, J.M., Virumbrales-Muñoz, M., Lang, J.M., Beebe, D.J. “A role for microfluidic systems in precision medicine,” *Nature Communications*, **13**, 3086 (2022).
- [19] Breslin, S., & O’Driscoll, L. “Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery,” *Drug discovery today*, **18(5-6)**, 240-249 (2013).
- [20] Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., Correia, I. J. “3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis,” *Biotechnology advances*, **34(8)**, 1427-1441 (2016).
- [21] 日本がん免疫学会、<https://jaci.jatient/immune-cell/immune-cell-06/>
- [22] 上田順彦、大西敏雄、甲斐田大資、藤田秀人、木南伸一、小坂健夫、木下英理子、黒

- 瀬望、「中心壊死を伴った肝原発腺扁平上皮癌の1例」、*胆道*、**29巻5号**、905-912 (2015)。
- [23] 大沼勝、三浦雅人、藤坂泰之、洞口愛、阿曾沼祥、梅村賢、飯岡佳彦、大藤高志、高橋道長、内藤広郎、「中心壊死をとめない巨大腫瘍で発見された胆嚢原発乳頭腺癌の1例」、*日本消化器病学会雑誌*、**第110巻第1号**、95-103 (2013)。
- [24] Li, Y., Zhao, L., & Li, X. F. “Hypoxia and the tumor microenvironment,” *Technology in cancer research & treatment*, **20**, 15330338211036304 (2021).
- [25] Fukumura, D., Jain, R. K. “Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize,” *Journal of cellular biochemistry*, **101(4)**, 937-949 (2007).
- [26] Kizaka-Kondoh, S., Inoue, M., Harada, H., Hiraoka, M., “Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy,” *Cancer Science*, **94(12)**, 1021-1028 (2003).
- [27] Jiménez-Valerio, G., Martínez-Lozano, M., Bassani, N., Vidal, A., Ochoa-de-Olza, M., Suárez, C., García-Del-Muro, X., Carles, J., Viñals, F., Graupera, M., Indraccolo, S., Casanovas, O. “Resistance to antiangiogenic therapies by metabolic symbiosis in renal cell carcinoma PDX models and patients,” *Cell Reports*, **15**, 1134–1143 (2016).
- [28] Smith, R.C., Tabar, V. “Constructing and Deconstructing Cancers Using Human Pluripotent Stem Cells and Organoids,” *Cell Stem Cell*, **24**, 12–24 (2019).
- [29] Granat, L. M., Kambhampati, O., Klosek, S., Niedzwecki, B., Parsa, K., Zhang, D. “The promises and challenges of patient-derived tumor organoids in drug development and precision oncology,” *Animal models and experimental medicine*, **2(3)**, 150-161 (2019).
- [30] Jiahao, S., Yongyun, L., Renbing, J., Xianqun, F. “The fidelity of cancer cells in PDX models: Characteristics, mechanism and clinical significance,” *International Journal of Cancer*, **146**, 2078-2088 (2020).
- [31] Tsumura, R., Koga, Y., Hamada, A., Kuwata, T., Sasaki, H., Doi, T., Aikawa, K., Ohashi, A., Katano, I., Ikarashi, Y., Ito, M., Ochiai, A. “Report of the use of patient-derived xenograft models in the development of anticancer drugs in Japan,” *Cancer Science*, **111(9)**, 3386-3394 (2020).
- [32] Haslam, A., Olivier, T., Powell, K., Tuia, J., Prasad, V. “Eventual success rate and predictors of success for oncology drugs tested in phase I trials,” *International Journal of Cancers*, **152(2)**, 276-282 (2023).
- [33] Astolfi, M., Péant, B., Lateef, M. A., Rousset, N., Kendall-Dupont, J., Carmona, E., Monet, F., Saad, F., Provencher, D., Mes-masson, A.M., Gervais, T. “Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy,” *Lab on a chip*, **16**, 312-325 (2016).
- [34] Olubajo, F., Achawal, S., Greenman, J. “Development of a microfluidic culture paradigm for ex vivo maintenance of human glioblastoma tissue: a new glioblastoma model?,” *Translational oncology*, **13(1)**, 1-10 (2020).
- [35] Riley, A., Green, V., Cheah, R., McKenzie, G., Karsai, L., England, J., Greenman, J. “A novel microfluidic device capable of maintaining functional thyroid carcinoma specimens ex vivo provides a new drug screening platform,” *BMC cancer*, **19**, 1-13 (2019).
- [36] Ma, L.D., Wang, Y.T., Wang, J.R., Wu, J.L., Meng, X.S., Hu, P., Mu, X., Liang, Q.L., Luo, G.A. “Design and fabrication of a liver-on-a-chip platform for convenient, highly efficient, and safe in situ perfusion culture of 3D hepatic spheroids,” *Lab on a Chip*, **18**, 2547–2562 (2018).
- [37] Cheah, L.T., Dou, Y.H., Seymour, A.L., Dyer, C.E., Haswell, S.J., Wadhawan, J.D., Greenman, J. “Microfluidic perfusion system for maintaining viable heart tissue with real-time electrochemical monitoring of reactive oxygen species,” *Lab on a Chip*, **10**, 2720–2726 (2010).
- [38] Kostrzewski, T., Cornforth, T., Snow, S.A., Ouro-Gnao, L., Rowe, C., Large, E.M., Hughes, D.J. “Three-dimensional perfused human in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease,” *World Journal of Gastroenterology*, **23**, 204–215 (2017).
- [39] Khuntia, S., Majumder, S.K., Ghosh, P. “Microbubble-aided water and wastewater purification: a review,” *Reviews in Chemical Engineering*, **28**, 191-221 (2012).
- [40] Sung, J.H., Shuler, M.L. “Prevention of air bubble formation in a microfluidic perfusion cell culture system using a microscale bubble trap,” *Biomedical Microdevices*, **11**, 731–738 (2009).
- [41] Wang, Y., Lee, D., Zhang, L., Jeon, H., Mendoza-Elias, J.E., Harvat, T.A., Hassan, S.Z., Zhou, A., Eddington, D.T., Oberholzer, J. “Systematic prevention of bubble formation and accumulation for long-term culture of pancreatic islet cells in microfluidic device,” *Biomedical Microdevices*, **14**, 419–

426 (2012).

- [42] Kang, J.H., Kim, Y.C., Park, J.K. “Analysis of pressure-driven air bubble elimination in a microfluidic device,” *Lab on a Chip*, **8**, 176–178 (2008).
- [43] Lee, K.K.P., Matsu-Ura, T., Rosselot, A.E., Broda, T.R., Wells, J.M., Hong, C.I. “An integrated microfluidic bubble pocket for long-term perfused three-dimensional intestine-on-a-chip model,” *Biomicrofluidics*, **15**, 014110 (2021).
- [44] Pereiro, I., Fomitcheva Khartchenko, A.F., Petrini, L., Kaigala, G.V. “Nip the bubble in the bud: A guide to avoid gas nucleation in microfluidics,” *Lab on a Chip*, **19**, 2296–2314 (2019).
- [45] Battat, S., Weitz, D.A., Whitesides, G.M. “Nonlinear phenomena in microfluidics,” *Chemical Reviews*, **122**, 6921–6937 (2022).
- [46] He, X., Wang, B., Meng, J., Zhang, S., Wang, S. “How to prevent bubbles in microfluidic channels,” *Langmuir*, **37**, 2187–2194 (2021).
- [47] van Midwoud, P.M., Groothuis, G.M., Merema, M.T., Verpoorte, E. “Microfluidic Biochip for the Perfusion of Precision-Cut Rat Liver Slices for Metabolism and Toxicology Studies,” *Biotechnology and Bioengineering*, **105**, 184–194 (2010).
- [48] 徳岡泰憲、「濃度勾配下における組織計測のための機械式密着型流路デバイスの開発」、東京工業大学大学院修士論文、(2021)。
- [49] 附柴裕之、剣萍、長田義仁、「ゲルの機能からみた生体組織の役割」、日本バイオレオロジー学会誌(B&R)、16、51-60 (2002)。
- [50] Skelley, A.M., Voldman, J. “An active bubble trap and debubbler for microfluidic systems,” *Lab on a Chip*, **8**, 1733–1737 (2008).
- [51] Huang, C., Wippold, J.A., Stratis-Cullum, D., Han, A. “Eliminating air bubble in microfluidic systems utilizing integrated in-line sloped microstructures,” *Biomedical Microdevices*, **22**, 76 (2020).
- [52] Dong, J., Qing, C., Song, F., Wang, X., Lu, S., Tian, M. “Potential molecular mechanisms of negative pressure in promoting wound healing,” *International Wound Journal*, **17**, 1428–1438 (2020).
- [53] Liu, H., Zheng, X., Chen, L., Jian, C., Hu, X., Zhao, Y., Li, Z., Yu, A. “Negative pressure wound therapy promotes muscle-derived stem cell osteogenic differentiation through MAPK pathway,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **22**, 511–520 (2018).
- [54] Putri, I.L., Adzalika, L.B., Pramanasari, R., Wungu, C.D.K. “Negative pressure wound therapy versus conventional wound care in cancer surgical wounds: A meta-analysis of observational studies and randomised controlled trials,” *International Wound Journal*, **19**, 1578–1593 (2022).
- [55] Wang, Y.J., Yao, X.F., Lin, Y.S., Wang, J.Y., Chang, C.C. “Oncologic feasibility for negative pressure wound therapy application in surgical wounds: A meta-analysis,” *International Wound Journal*, **19**, 573–582 (2022).
- [56] Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B.E., Matejuk, A., Grillon, C., Kieda, C. “Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **15**, 1239–1253 (2011).
- [57] Höckel, M., Vaupel, P. “Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects,” *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **93**, 266–276 (2001).
- [58] Song, J., Yu, Z., Dong, B. et al. “Clinical significance of circulating tumour cells and Ki-67 in renal cell carcinoma,” *World Journal of Surgical Oncology*, **19**, 156 (2021).
- [59] Algaba, F., Akaza, H., López-Beltrán, A., Martignoni, G., Moch, H., Montironi, R., Reuter, V. “Current Pathology Keys of Renal Cell Carcinoma,” *European Urology*, **60**, 634–643 (2011).
- [60] Song, J., Yu, Z., Dong, B., Zhu, M., Guo, X., Ma, Y., Zhao, S., Yang, T. “Clinical significance of circulating tumour cells and Ki-67 in renal cell carcinoma,” *World Journal of Surgical Oncology*, **19**, 156 (2021).

## 謝辞

本研究の進行および本論文の執筆にあたり、多大なご指導ご鞭撻いただきました指導教員である科学技術創造研究院未来科学研究所石田忠准教授に心よりお礼申し上げます。優しく様々な知識や視点をくださったおかげで研究を進めることができました。研究の方針に迷ったときは次の筋道を立てて導いてくださいました。また、学生が主体的に研究に取り組める環境を設け、推進していただき、大変有意義な時間を過ごすことができました。重ねて深くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、様々な助言をいただきました元 東京工業大学 工学院機械系小俣透氏に心よりお礼申し上げます。日々の研究やゼミを通して鋭い指摘をしていただいたことで、自身の研究への理解を一層深めることができました。

本研究を進めるにあたり、医学的観点から助言をいただきました横浜市立大学近藤慶一准教授、神奈川県立がんセンター中井川昇准教授に心よりお礼申し上げます。

研究を進める上で試料を提供していただいた患者様方に深くお礼申し上げます。

本論文を審査していただいた東京工業大学 金俊完教授、越川直彦教授、八木透教授、柳田保子教授に感謝致します。

研究費や学生生活に関する書類の管理等、事務面において研究をサポートしていただきました小俣・石田研究室秘書である藤原亜希子氏、荒川桂子氏に感謝致します。

小俣・石田研究室をご卒業された、栗生識氏、飯野優佳氏、川田斐斗氏、鈴木聡氏、仁木彰太氏、近藤健太郎氏、横坂豪大氏、木内翠氏、佐藤綾音氏、関口大雅氏、菊本要氏、近藤充氏、角崎青周氏、村上明弘氏、青木志雲氏、稲垣慧氏、鈴木菜々子氏、梅澤陽希氏、宮路克弘氏、楠田悠賀氏、甲斐翔樹氏の在学中におかれましては、研究におけるアドバイス、研究室生活において大いに支えていただき、楽しく有意義に過ごすことに感謝致します。

博士課程 1 年の小松和樹氏、修士課程 2 年の梶並剛氏、久下雄大氏、阪上祐生氏、楊地博氏、修士課程 1 年の大槻渉氏、瀬木大輔氏、中村峻寛氏、山本浩太氏、学士過程 4 年の崔俊清氏、柴田悠希氏、技術支援員の筒井隆司氏、飯塚薫氏、椿本チェインの凌霄氏に大変感謝致します。皆様には研究だけでなく私生活も含めた生活全般において大いに支えていただき、充実した博士課程を過ごすことができました。心より感謝致します。

最後になりましたが、ここまで学業生活を支えてくれた両親と、お世話になった方々全員に感謝致します。

2024 年 8 月 徳岡 泰憲