

報告番号	甲 第 11908 号
------	-------------

## 主 論 文 の 要 旨

**論文題目** Microfluidic System for Mechanical Property Measurement of Biological Objects(生物体の機械的特性計測のためのマイクロ流体システム)

**氏 名** 伊藤 啓太郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

細胞の硬さなどに代表される機械特性は細胞の特性や状態を示す指標として近年注目されている。例えば、マラリアに感染した患者の赤血球は硬いことが知られていたり、適切な透明体の硬さを持つ卵子のみ分化が進むことなどが知られている。一方近年、複数の細胞を 3 次元的に共培養した細胞凝集体（スフェロイド）にも注目が集まっている。スフェロイドは 3 次元的な細胞間接着を持つため 2 次元平面に培養した細胞と比較して、生体組織に近い代謝機能や特性を持つことが知られており、がん細胞の薬剤スクリーニングや、組織構築、再生医療における移植などの分野で盛んに研究が行われている。より生体組織に近い特性を持つという観点からスフェロイドの機械特性も重要な指標になりうると考えられる。しかし、スフェロイドは接着細胞ではなく浮遊した状態であること、大きさが 100  $\mu\text{m}$ ~数 100  $\mu\text{m}$  と単一細胞と比較し非常に大きいこと、培養日数におけるサイズの変遷やばらつきが単細胞と比較して大きいこと、などの理由から従来の機械特性計測に関する技術ではスフェロイドの機械特性をハイスループットに計測することは困難であった。そこで、本研究では機械特性をハイスループットに計測するために、マイクロ流体チップを用いた機械特性計測システムの構築を行った。

第 2 章においてはマイクロ流体チップの閉空間内でワイドレンジに駆動可能なオンチッププローブの駆動方式として Whole chip deformation mechanism を提案した。Whole chip deformation mechanism はマイクロ流体チップ全体を外部のアクチュエータを用いて圧縮することでチップ内部に配置した V 字型のプローブが変位拡大機構となりワイドレンジに駆動する駆動方式のことである。この方式は外部に配置するアクチュエータの駆動特性を効率よくオンチッププローブに伝える事が出来る。外部のアクチュエータにピエゾアクチュエータを用いる事でスフェロイドに対し十分な分解能を持った駆動ができ、変位拡大機

構を用いる事で piezo アクチュエータを用いた駆動においてもオンチッププローブのワイドレンジな駆動が可能となる。折り返しバネ方式の力センサを V 字型のプローブの先端に配置する事で、スフェロイドを変形させると共に力センサの変位量を倒立顕微鏡に取り付けた CCD カメラを介して計測する事でスフェロイドを変形させた時の反力が計算できる。マイクロ流体チップはガラス、単結晶 Si、ガラスの三層構造となっている。本章では、V 型ビームと力センサを設計し V 字型のプローブ及び力センサは単結晶 Si の層に存在する単結晶 Si の層はフォトリソグラフィ及びディープリアクティブイオンエッチングを用いて加工を行った。また、プローブやセンサのスムーズな駆動を実現するためにガラスの層をリアクティブイオンエッチングを用いて 10  $\mu\text{m}$  加工した。インレット及びアウトレットの作製にはサンドブラストを用いてガラス層に貫通穴を形成した。マイクロ流体チップを作製後、V 字型プローブと力センサの駆動特性評価を行った。V 字型プローブのゲインは 100 Hz まで低下しないことを確認した。一方、2 Hz から、V 字型プローブと力センサとの間に位相遅れが生じた。V 字型プローブと力センサの間に位相遅れが生じると反力計測に余加重がかかった状態となるため今回スフェロイドの計測には 0.5 Hz 相当である 50  $\mu\text{m/s}$  の速さでスフェロイドを計測する事とした。

次に、V 型プローブと力センサの変位量の計測精度の評価を行った。変位計測にはサンプリングモアレ法を用いることで測定精度は 27.9 nm であり、力センサを用いた反力の測定精度は 79.8 nN であることが確認できた。作製したマイクロ流体チップは 30 $\mu\text{m}$ ~200 $\mu\text{m}$  の範囲内の大きさを持つスフェロイド及び細胞を計測する事ができる。また、設計したバネ定数が 0.42 N/m の場合、測定可能な反力の範囲は 79.8 nN~168  $\mu\text{N}$  となる。対象物の計測可能な大きさは流路の幅と単結晶 Si の厚みを変える事で変更が可能となり、力の測定範囲は、バネ定数を変更することで変える事が出来る。

第 3 章では第 2 章で作製したマイクロ流体チップを用いてヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)と間葉系幹細胞(MSC)を混合したスフェロイド(HUVEC/MSC スフェロイド)の反力計測を行った。3 次元構造を持つスフェロイドの反力と変位量の関係は非線形であるため、力学特性を評価するために硬さ指標 (Stiffness-index: SI) を導入した。SI は反力を変形量で割った値に、スフェロイドの初期直径でさらに割ったものと定義した。SI の単位は  $\text{N/m}^2$  となる。スフェロイドに対し標準弾性モデルを適用し、力センサをバネ要素としたモデルの伝達関数を計算し、入力にランプ入力を適応すると SI はランプ入力速度には依存せず、計測の時間と時間幅に依存した式となる。そのため、本研究では SI の計算に用いる時刻を押し始めから 0.5 秒とし、時間幅を 0.2 秒として SI の計算を行った。

HUVEC/MSC スフェロイドの培養日数 1 日目から 7 日目まで 1 日毎に反力計測を行い、SI の評価を行った。計測に用いたスフェロイドは計測による培養状況の変化の影響を排除するため培養から排除した。計測した SI の平均値は 1 日目から 4 日目までは日に日に大きくなることを確認した。一方培養 4 日目以降 SI の値が小さくなっていく傾向が確認できた。次に、HUVEC/MSC スフェロイドの培地に ROCK inhibitor 10 nM と 100 nM を混ぜて培

養した HUVEC/MSC スフェロイド (ROCK10 スフェロイド, ROCK100 スフェロイド) の SI の評価を行った. ROCK inhibitor は細胞内のアクトミオシンの収縮力を抑制する事が知られている. 計測した SI は HUVEC/MSC スフェロイドと比較して ROCK10 スフェロイドの方がどの培養日数でも小さく, ROCK100 スフェロイドは更に小さくなる事を確認した. この結果から MSC 中のアクトミオシンは HUVEC/MSC スフェロイドの硬さの要因の 1 つであることが確認できた. さらに, yes-associated protein 1 (YAP1) 遺伝子発現量を q-PCR 法を用いて計測した結果, 硬さ指標と YAP1 の遺伝子発現量には相関があることが確認できた.

構築したシステムはマイクロ流体を用いることで, 測定スループットは 92 個/時間となった. 第 4 章ではマイクロ流体チップ内に構築可能な流体制御素子の構築を目指し, フォトリソグラフィによってパターンニング可能な温度応答性樹脂であるバイオレジストとマイクロ電極を用いてゲルアクチュエータの作製を行った. 初めに, バイオレジストのパターンニング精度の評価を行い, 次にバイオレジストの温度と膨張率の関係の評価を行った. バイオレジストは 32 度付近に相転移温度を持ち, 相転移温度以下では親水性となり周りの水分を吸収し 1.7 倍程度に膨張することが分かった. 一方, 32 度以上ではバイオレジストは疎水性となりバイオレジスト内の水分を放出し収縮した. 次に, ゲルアクチュエータをマイクロ流路内に作製し, ゲルバルブユニットとしてバルブ特性の評価を行った. 作製したゲルバルブユニットはリーク圧が 199.5 kPa となった. このリーク圧はマイクロ流体チップの通常の使用に十分な耐圧である. 次にゲルバルブの動特性評価を行った. マイクロ電極に輸入する電圧を 0.89 V 印加した際, 1 Hz 以降ゲルバルブは十分な加熱がされず変位が減少していった. 一方 1.17 V 印加した際には 5 Hz 以降は冷却が追い付かずゲルバルブは閉じたままとなった. 1.03 V 印加した際には 5 Hz まで開閉駆動の変位が減少する事はなかったが, 10 Hz では変位に減少が見られた. この結果から作製したゲルバルブユニットは 5 Hz まで駆動する事が確認できた. 次にゲルバルブユニットを二つ用いて植物細胞である *Synechocystis sp. PCC 6803* のソーティングを行った. 2 分岐の流路の下流にゲルバルブユニットをそれぞれ配置して 1 Hz で 180 度位相差を持つ電圧の入力を行いゲルバルブの開閉駆動を行ったところゲルバルブの開閉に合わせて *Synechocystis sp. PCC 6803* が 2 分岐に分かれて流れていくことが確認できた.

上記のソーティング方法は細胞が流れる流路上にゲルバルブが配置されているため, ゲルバルブへの細胞の接着やマイクロ電極の熱が細胞に影響を与える可能性がある.

マイクロ領域においては層流が支配的な流れである. そのため, 間接的にゲルバルブの開閉によって, 主流路の流線をシフトさせることができる.

この仕組みを利用する事で細胞や微粒子のソーティングを行う間接マルチソーティング方式の構築を行った. 本方式を用いて大きさ 15  $\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズを 5 分岐にソーティングする事に成功した. 本方式で用いたゲルアクチュエータの消費電力は 20 mW と非常に小さい電力で駆動する事ができる.

第 2 章で構築した機械特性計測の為のマイクロ流体チップ及び第 4 章で達成したゲルアクチュエータによるマルチソーティングシステムを組み合わせる事で機械特性を指標とした細胞のソーティングシステムが構築可能となる。機械特性計測の為のマイクロ流体チップの作製には陽極接合を用いている。これは、400 度に加熱しながら電流を流すことでガラスと単結晶 Si が接合できる方法である。しかし、バイオレジストは 400 度高温に耐える事が出来ない。そこで、原子拡散接合やプラズマ支援低温接合を行う事で上記 2 つの統合を今後行っていく。

機械特性を指標とした細胞選別技術は従来の細胞の評価指標であった蛍光染色をする必要がなく低侵襲な評価・選別手法になりうると考えられる。今後、機械特性をがん化マーカーや分化マーカーと突き合わせを行う事で機械特性が持つ情報の精査を行っていく。